

## 臭氧水对土传病原真菌的杀灭作用

李红梅, 魏艳丽, 扈进冬, 杨凯, 刘宝军, 杨合同, 李纪顺\*

(齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省科学院生态研究所 山东省应用微生物重点实验室, 山东 济南 250103)

**摘要:**为探寻土壤绿色消毒方法,研究不同质量浓度的臭氧水对3种土传病原真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)及灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的杀灭效果。结果表明:质量浓度1.0~5.0 mg/L的臭氧水对3种病原真菌的孢子都有一定的杀灭作用,臭氧水质量浓度是影响杀灭率的主要因素,作用时间对杀灭率无显著影响;提高臭氧水质量浓度及增加浇灌次数能显著增强对土壤中3种病原真菌的杀灭率;臭氧水浇灌土壤能显著降低植株的发病率,但植株的生长受到抑制,添加木霉能消除这种抑制作用。

**关键词:**臭氧水;土传病原真菌;杀灭率;发病率;木霉

中图分类号:S477 文献标志码:A 文章编号:1002-4026(2021)04-0067-06

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



## The disinfection effect of ozone water on soil-borne pathogenic fungi

LI Hong-mei, WEI Yan-li, HU Jin-dong, YANG Kai, LIU Bao-jun, YANG He-tong, LI Ji-shun\*

(Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Ecology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China)

**Abstract :** For exploring the green methods of soil disinfection, the disinfection effects of ozone water at different mass concentrations on three soil-borne pathogenic fungi, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*, were studied. The results showed that ozone water in the mass concentration range of 1.0~5.0 mg/L has certain sterilizing effect on the spores of the three pathogenic fungi. The mass concentration of ozone water is the main factor affecting the sterilization rate, whereas the treatment time has no significant effect on it. Increasing the mass concentration of ozone water and the frequency of irrigation can significantly enhance the sterilization rate of the three pathogenic fungi in the soil. Irrigation of the soil with ozone water can significantly reduce disease incidence in plants. However, it leads to growth inhibition, and the introduction of *Trichoderma* can eliminate this inhibition.

**Key words :** ozone water; soil-borne pathogenic fungi; sterilization rate; disease incidence; *Trichoderma*

收稿日期:2020-12-04

基金项目:山东省2018年度农业重大应用技术创新项目;山东省科学院国际合作专项(2019GHZD11);山东省重点研发计划(2019GSF107066)

作者简介:李红梅(1977—),女,硕士,高级工程师,研究方向为环境微生物。E-mail: hmlhm@163.com

\* 通信作者,李纪顺(1971—),男,应用研究员。研究方向为环境微生物。E-mail: yewu2@sdas.org

病原真菌引起的土传病害能够造成农作物及设施瓜果蔬菜大面积减产,甚至绝产,且难以防治。由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)等致病菌引起的土传病害危害极大<sup>[1-3]</sup>,这些病原菌都能够在土壤中以菌核、分生孢子或菌丝体越冬,如果上茬作物发病严重,需要对土壤进行消毒后才能种植下茬,否则土传病害会大面积发生,造成绝产。目前土壤消毒方法主要有物理消毒法和化学消毒法<sup>[4]</sup>,化学消毒法不但使病原菌产生抗药性,且容易造成土壤污染,而生产上常用的高温焖棚等物理消毒方法易受季节影响。因此,亟需寻找一种绿色、高效的土壤处理方法。

臭氧是一种强氧化消毒剂,可杀灭各种微生物<sup>[5-6]</sup>,溶于水后具有更强的杀菌作用<sup>[7]</sup>,且臭氧水易于分解、无污染、廉价高效,是理想的新型杀菌剂。臭氧水对病原真菌的抑制和杀灭效果的研究多见于只针对一种病原真菌<sup>[8-10]</sup>,少数研究针对两种病原真菌<sup>[11]</sup>,而针对3种及以上多种土传病原真菌的研究较少。本研究利用臭氧水对3种土传病原真菌进行杀灭试验,筛选适宜的臭氧水质量浓度及最佳作用时间,以期对土壤的绿色消毒技术提供数据支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器

臭氧水发生器(山东泽恩农业科技股份有限公司);启立 DOZ-30 臭氧浓度检测仪(广州启立环保设备有限公司)。

#### 1.1.2 菌株及培养基

病原真菌(尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、灰霉菌)及深绿木霉 20111(*Trichoderma atroviride*)均为本实验室分离保存。

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 15 g/L,蒸馏水 1 L, pH 自然。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 真菌孢子悬浮液制备

将本实验室保藏的病原真菌尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、灰霉菌转接至 PDA 固体培养基上,28 ℃ 培养 3~5 d,待有大量孢子产生时,刮取孢子至无菌生理盐水中震荡混匀,无菌擦镜纸过滤,滤液即为孢子悬浮液。

#### 1.2.2 臭氧水对真菌孢子的杀灭试验

孢子悬浮液血球计数板计数后,浓度调整成  $10^5$  数量级备用,设置以下处理:(1)臭氧水质量浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L;(2)处理时间分别为 0.5、1.0、2.0、5.0 min。每处理 3 个重复,臭氧水与孢子悬浮液体积比为 9:1,处理完成后加入中和试剂混匀<sup>[8]</sup>。每个处理取适当的稀释度涂布于 PDA 平板上,每个稀释度 3 个重复,28 ℃ 培养 3 d 后计数。以对照组 CK(未加臭氧处理)和处理组平板的菌落数计算杀灭率:

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{对照菌数} - \text{处理菌数}}{\text{对照菌数}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.2.3 臭氧水对土壤中病原真菌的杀灭试验

将培养好的病原菌制备孢子悬浮液,并稀释到一定质量浓度,在显微镜下用血球计数板进行计数,将孢子悬浮液与土壤混匀,调整土壤中孢子数为  $10^5$  cfu/g 干土,作为病土装入花盆(19 cm×16 cm),1000 g/盆,浇灌臭氧水质量浓度设为 5、10 mg/L,浇灌量 500 mL/盆(以盆底有水流为宜),进行以下处理:(1)对照 CK,浇灌自来水;(2)处理 T1,臭氧水浇灌 1 次;(3)处理 T2,臭氧水浇灌 2 次,间隔 5 d;(4)处理 T3,臭氧水浇灌 3 次,各间隔 5 d。每处理 3 个重复,处理结束后,取各处理土壤,采用选择性培养基对土壤进行病原菌计数<sup>[12-14]</sup>,杀灭率按公式(1)计算。

### 1.2.4 臭氧水处理对接种尖孢镰刀菌白菜幼苗的影响

将制备好的尖孢镰刀菌孢子悬浮液与土壤混匀至  $10^5$  cfu/g 干土,装入花盆(19 cm×16 cm),1000 g/盆,浇灌臭氧水质量浓度设为 5 mg/L,浇灌量 500 mL/盆,共浇灌 3 次,间隔 5 d,处理如下:(1)对照 CK,浇灌自来水;(2)臭氧处理:土壤浇灌臭氧水;(3)木霉处理:土壤浇灌自来水,白菜种子浸种木霉 20111 孢子悬浮液(浓度为  $4.3 \times 10^5$  cfu/mL);(4)臭氧处理+木霉处理:土壤浇灌臭氧水,白菜种子用木霉 20111 孢子液浸种(浓度同处理(3))。以上各处理 3 个重复,土壤湿度合适时进行播种,常规管理。4 周后调查白菜发病情况及株高、干重、叶绿素含量等生长指标,计算各处理的病株率和防治效果。

$$\text{病株率} = \frac{\text{病株数}}{\text{总株数}} \times 100\% , \quad (2)$$

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病株数} - \text{处理病株数}}{\text{对照病株数}} \times 100\% 。 \quad (3)$$

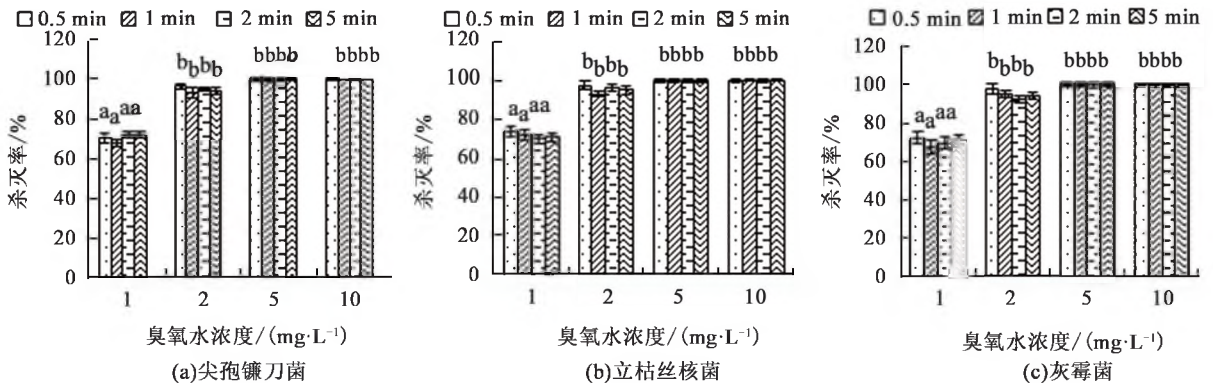
### 1.3 数据统计与分析

采用 SPSS 21.0 统计软件中的 Duncan's 方法进行分析,结果为 3 次重复的平均值±标准差。

## 2 结果

### 2.1 臭氧水对病原真菌孢子的杀灭作用

由图 1 可知,各质量浓度的臭氧水对 3 种病原真菌都有杀灭作用,在 1.0~5.0 mg/L 范围内,杀灭率随臭氧水质量浓度增加而增大。当质量浓度为 1.0 mg/L 时,0.5 min 内对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌及灰霉菌的杀灭率分别为 70.4%、74.2%、72.7%,随着时间的延长,杀灭率没有明显升高;当质量浓度上升到 2.0 mg/L 时,0.5 min 内对 3 种病原真菌的杀灭率分别为 96.2%、97.5%、97.4%;当质量浓度达到 5.0 mg/L 时,0.5 min 对 3 种病原真菌的杀灭率都达到 100%。可见臭氧水质量浓度显著影响病原菌的杀灭率,而处理时间对杀灭率没有显著影响。



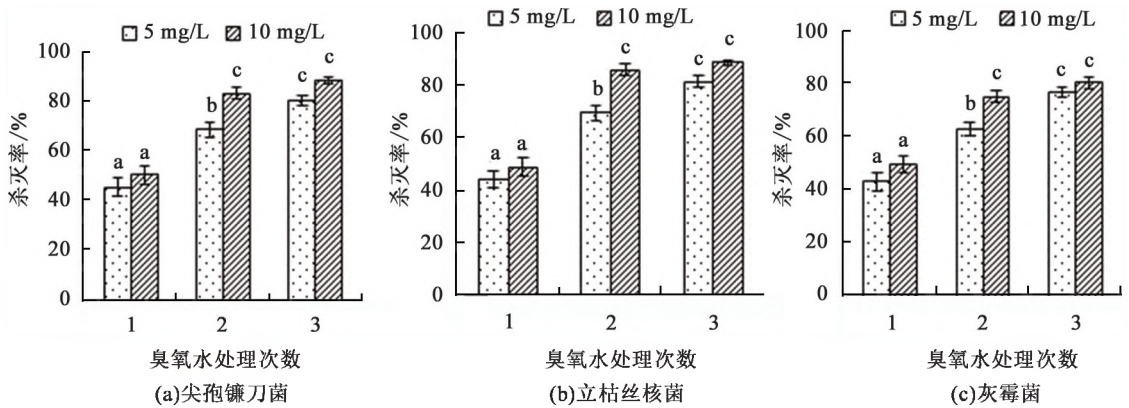
注:图中不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著。

图 1 臭氧水对 3 种病原真菌孢子的杀灭效果

Fig.1 The sterilizing effect of ozone water on the spores of the pathogenic fungi

### 2.2 臭氧水对土壤中病原真菌的杀灭作用

利用两种质量浓度的臭氧水对土壤中的 3 种病原真菌进行灭菌处理,由图 2 可以看出,当臭氧水质量浓度为 5 mg/L 时,对 3 种病原菌的杀灭率随处理次数的增加而显著增加;质量浓度为 10 mg/L 时,处理 2 次、3 次对 3 种病原真菌的杀灭率与处理 1 次差异显著,而处理 2 次与 3 次之间差异不显著。



注:图中不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著。

图2 臭氧水对土壤中病原真菌的杀灭效果

Fig.2 The sterilizing effect of ozone water on the pathogenic fungi in soil

### 2.3 臭氧水处理对接种尖孢镰刀菌白菜幼苗的影响

臭氧水处理接种病原菌的土壤后种植大白菜,结果如表1所示。臭氧水消毒土壤后,能显著降低白菜枯萎病的发病率,臭氧处理和臭氧+木霉处理发病率降低至2.5%和6.25%,与对照以及木霉处理间存在显著差异。臭氧水处理土壤后直接播种,对白菜幼苗的生长有一定影响,植株明显矮小,株高和单株干重与其他处理间差异显著。木霉浸种处理能有效缓解臭氧水消毒土壤后对植株的影响,其株高和干重都与对照无显著差异。臭氧水处理土壤后白菜幼苗叶片的叶绿素含量不受影响,各处理间无显著差异。

表1 臭氧水处理对白菜幼苗的影响

Table 1 The effect of ozone water on the cabbage seedlings

处理	发病率/%	防效/%	平均株高/cm	单株干重/g	叶绿素含量/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
CK	58.17±2.21 a	—	13.51±1.38 a	0.57±0.07 b	0.518±0.028 a
臭氧处理	2.50±1.98 c	95.70	10.67±0.78 b	0.45±0.08 c	0.492±0.025 a
木霉处理	13.84±0.89 b	76.21	12.53±0.74 a	0.70±0.10 a	0.544±0.023 a
臭氧+木霉处理	6.25±3.42 c	89.26	12.60±0.36 a	0.65±0.06 a	0.528±0.02 a

注:结果为3次重复的平均值±标准差,不同小写字母表示  $P < 0.05$  水平差异显著。

## 3 讨论

臭氧水杀菌作用强,可杀灭各种微生物。本文用臭氧水处理  $10^5$  数量级的真菌孢子悬浮液,当臭氧水质量浓度为1 mg/L时,0.5 min内对3种病原菌孢子的杀灭率在70.4%~74.2%;当臭氧水质量浓度上升为2 mg/L时,0.5 min的杀灭率迅速升高到96.2%~97.4%。而作用时间对杀灭率无显著影响,可见质量浓度是影响臭氧水杀菌效果的关键因素,这与已报道的试验结果<sup>[15]</sup>一致。

臭氧水对土壤中3种病原真菌的杀灭试验表明,5 mg/L的臭氧水处理3次与10 mg/L的臭氧水处理2次都能达到很好的杀菌效果。实际生产中高浓度臭氧水不易获得,所以采用多次浇灌的方法能有效防治土壤病虫害。

臭氧对微生物的杀灭作用无选择性,所以对土壤处理后有益微生物菌群会受到破坏。本试验中臭氧处理的白菜幼苗生长受到影响,植株明显矮小,株高和单株干重都与其他处理差异显著,而添加木霉处理的植株不受影响,株高和单株干重都与对照无显著差异,这可能是木霉的施入明显改善了土壤消毒后的有益菌群,使植株健康生长。有报道称植株在生长期进行臭氧水浇灌,能显著提高叶片的叶绿素含量、SPAD值<sup>[16-17]</sup>,本试验中,种植前土壤浇灌臭氧水,各处理间的叶绿素含量无显著差异,这可能与臭氧水浇灌时间以及臭氧水质量浓度有关。



试验结果表明,臭氧水浇灌可作为土壤绿色消毒技术,但消毒后需要添加有益微生物来重建土壤中的微生物生态系统,以达到植株健康生长的目的。

## 参考文献:

- [1]王宇鹏,杨帆,赵华.致病性尖孢镰刀拮抗菌的筛选与鉴定[J].中国酿造,2018,37(9):94-99. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.09.019.  
WANG Y P, YANG F, ZHAO H. Screening and identification of antagonistic bacteria against pathogenic *Fusarium oxysporum*[J]. China Brewing, 2018, 37(9): 94-99. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2018.09.019.
- [2]宁晓雪,苏跃,马玥,等.立枯丝核菌研究进展[J].黑龙江农业科学,2019(2):140-143. DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2019.02.0140.  
NING X X, SU Y, MA Y, et al. Research progress on *Rhizoctonia solani*[J]. Heilongjiang Agricultural Science, 2019(2):140-143. DOI:10.11942/j.issn1002-2767. 2019.02. 0140.
- [3]郑媛萍,周连柱,孔繁芳,等.山东蓬莱葡萄灰霉菌对7种杀菌剂的抗药性检测[J].植物保护,2019,45(1):164-169. DOI: 10.16688/j. zwbh. 2018140.  
ZHENG Y P, ZHOU L Z, KONG F F, et al. Detection of the resistance of *Botrytis cinerea* on grape plants in Penglai of Shandong to seven fungicides[J]. Plant Protection, 2019, 45(1): 164-169. DOI: 10.16688/j. zwbh. 2018140.
- [4]张庭发,杨进波,易小光,等.土壤消毒方法综述[J].云南农业,2017(12):43-45.  
ZHANG T F, YANG J B, YI X G, et al. Summary of soil disinfection methods[J]. Yunnan Agriculture, 2017(12): 43-45.
- [5]鲁建云,李苗苗,高丽华,等.臭氧水浓度衰减及其杀菌作用[J].中南大学学报(医学版),2018,43(2):143-146. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.006.  
LU J Y, LI M M, GAO L H, et al. Attenuation rules and germicidal efficacy of ozonated water[J]. Journal of Central South University (Medical Sciences), 2018, 43(2):143-146. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2018.02.006.
- [6]惠觅宙,魏晨,郭清.臭氧和臭氧水消炎杀菌在治疗人体伤口疾病中的应用[J].健康研究,2013,33(6):412-414. DOI: 10.3969 /j.issn.1674-6449. 2013.06.005.  
HUI M Z, WEI C, GUO Q. Clinical applications of ozonated water for treatment of skin wound and diseases[J]. Health Research, 2013, 33(6): 412-414. DOI: 10.3969 /j.issn.1674-6449. 2013.06.005.
- [7]王雅琦,宋璿楠,陆启环,等.臭氧水浇灌和喷施对马铃薯幼苗生理特性的影响[J].山东农业科学,2018,50(5):43-45. DOI: 10.14083/j.issn.1001-4942.2018.05.009.  
WANG Y Q, SONG J N, LU Q H, et al. Effects of irrigation and spraying with ozone water on physiological characteristics of potato seedlings[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(5): 43-45. DOI: 10.14083/j.issn.1001-4942.2018.05.009.
- [8]乔彩云,梁俊,李建科,等.不同浓度臭氧水对苹果轮纹菌的杀灭效果[J].食品与发酵工业,2012,38(3):185-189. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.03.006.  
QIAO C Y, LIANG J, LI J K, et al. Sterilizing effect on *Botryosphaeria berengiana* in apple fruit by the treatment with ozone water[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(3): 185-189. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.03.006.
- [9]安星辰,宋卫堂,何华名,等.微/纳米气泡臭氧水对尖孢镰刀菌的杀灭效果研究[J].沈阳农业大学学报,2014,45(6):679-684. DOI:10.3969/j.issn.1000-1700.2014.06.007.  
AN X C, SONG W T, HE H M, et al. Disinfection efficacy of micro/nano bubbles ozone water on *F. oxysporum* f.sp. lycopersici[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2014, 45(6): 679-684. DOI:10.3969/j.issn.1000-1700.2014.06.007.
- [10]王恒振,李蕊蕊,王霄倩,等.利用臭氧水溶液防治葡萄果实灰霉病试验[J].黑龙江农业科学,2016(4):50-52. DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.04.0050.  
WANG Z H, LI R R, WANG X Q, et al. Grape fruit grey mould control test using ozone water solution [J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2016 (4): 50-52. DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.04.0050.
- [11]袁也,顾红蕊,张潇丹,等.臭氧对三七自毒皂苷的降解和根腐病菌的抑制效应研究[J].云南农业大学学报(自然科学

版), 2019(1): 124-131. DOI:10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709003.

YUAN Y, GU H R, ZHANG X D, et al. Effect of ozone on the degradation of *Panax notoginseng* autotoxic saponins and the inhibition of root rot pathogens[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2019(1): 124-131. DOI:10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709003.

- [12] 韩宝坤, 杜艳华. 非无菌操作下分离尖孢镰刀菌的培养基[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 373. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2001.04.017.

HAN B K, DU Y H. A medium without sterile operation isolating for *Fusarium oxysporum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(4): 373. DOI: 10.3321/j.issn:0412-0914.2001.04.017.

- [13] 周而勋, 杨媚. 从植物病组织中分离立枯丝核菌的快速、简便技术[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(1): 125-126.

ZHOU E X, YANG M. A rapid and simple technique for the isolation of *Rhizoctonia solani* from diseased plant tissues[J]. Journal of South China Agricultural University, 1998, 19(1): 125-126.

- [14] 姚技强, 朱国仁. 介绍一种灰霉病菌的选择培养基[J]. 植物保护, 1997, 23(5): 41-42.

YAO J Q, ZHU G R. Introduction of a selective medium for *Botrytis cinerea*[J]. Plant Protection, 1997, 23(5): 41-42.

- [15] 吴春笃, 王晨希, 许小红. 臭氧水杀灭弓形杆菌效果及影响因素的研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(7): 631-633. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2011.07.022.

WU C D, WANG C X, XU X H. Efficacy of ozone water in killing *Arcobacter*[J]. Journal of Environment and Health, 2011, 28(7): 631-633. DOI:10.16241/j.cnki.1001-5914.2011.07.022.

- [16] 宋璉楠, 王雅琦, 孙唯航, 等. 臭氧水处理对生姜幼苗生理特性的影响[J]. 山东农业科学, 2018, 50(3): 50-52. DOI: 10.14083 /j. issn.1001- 4942. 2018. 03. 011.

SONG J N, WANG Y Q, SUN W H, et al. Effects of ozone water treatment on physiological characteristics of ginger seedlings[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(3): 50-52. DOI: 10.14083 /j. issn.1001- 4942. 2018. 03. 011.

- [17] 武月, 刘双, 宋丽芬. 臭氧水浇灌对菠菜产量及生理特性的影响[J]. 海峡科技与产业, 2019(2): 133-135.

WU Y, LIU S, SONG L F. Effects of ozone water irrigation on spinach yield and physiological characteristics[J]. Technology and Industry Across the Straits, 2019(2): 133-135.