

# 解淀粉芽胞杆菌 DS-1 菌剂的研制及田间应用效果

王莉<sup>1</sup>, 米佳雯<sup>1</sup>, 池明<sup>1</sup>, 田小卫<sup>1</sup>, 单慧勇<sup>3</sup>,  
王彦譞<sup>1,4</sup>, 刘慧芹<sup>1,2\*</sup>

(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; 2. 和田职业技术学院, 和田 848000;  
3. 天津农学院工程技术学院, 天津 300384; 4. 天津绿之本生物科技有限公司, 天津 301804)

**摘要** 本文以一株解淀粉芽胞杆菌 DS-1 生防菌为研究对象, 采用单因素法和正交试验法优化该菌株的发酵条件和生产工艺, 通过菌剂的研制测定了其温室防效。结果表明: 该菌株最佳固态发酵为以玉米粉为基质, 培养条件为可溶性淀粉 200 mg/g、小米粉 50 mg/g、接种量 0.8 mL/g、培养时间 96 h、pH 8.0; 最适的菌株助剂为壳聚糖 20 mg/g (载体)、聚四氟乙烯浓缩分散液 100 mg/g (分散剂) 和糊精 50 mg/g (保护剂)。粉剂与颗粒剂均能提高番茄和黄瓜的株高和鲜重, 且颗粒剂效果更突出; 并对辣椒枯萎病的防治效果可达 60.75% 和 62.86%, 对黄瓜枯萎病的防效达 63.58% 和 66.12%, 两种制剂的防效均显著高于发酵液的防效。

**关键词** 解淀粉芽胞杆菌; 固态发酵; 剂型; 田间应用

中图分类号: S 476 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019258

## Development and field application of microbial inoculum from *Bacillus amyloliquefaciens* DS-1

WANG Li<sup>1</sup>, MI Jiawen<sup>1</sup>, CHI Ming<sup>1</sup>, TIAN Xiaowei<sup>1</sup>, SHAN Huiyong<sup>3</sup>,  
WANG Yanxuan<sup>1,4</sup>, LIU Huiqin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. Hotan Vocational and Technical College, Hotan 848000, China; 3. College of Engineering and Technology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 4. Tianjin Lüzhiben Biotechnology Co., LTD., Tianjin 301804, China)

**Abstract** Fermentation condition and production process of *Bacillus amyloliquefaciens* strain DS-1 were optimized by single factor method and orthogonal experiment method and control effect was determined in greenhouse. The results showed that the optimal solid-state fermentation of the strain was based on corn flour, soluble starch 200 mg/g, small rice flour 50 mg/g, inoculation content 0.8 mL/g, incubation time 96 h, and pH 8.0. The optimum auxiliaries of the strain were chitosan 20 mg/g (carrier), polytetrafluoroethylene concentrated dispersion 100 mg/g (dispersant) and dextrin 50 mg/g (protectant). Both powder and granules could improve the plant height and fresh weight of peppers and cucumbers, but granules are more effective than powder. The greenhouse control efficacy of powders and granules on pepper Fusarium wilt could reach to 60.75% and 62.86%, respectively, and that on cucumber Fusarium wilt could reach to 63.58% and 66.12%, respectively. Two agents had more significant effects on two diseases than fermentation broth.

**Key words** *Bacillus amyloliquefaciens*; solid-state fermentation; microbial inoculum; field application

近年来, 由于人类对化学药剂的使用频率过高而且使用方法不当, 导致了环境污染农药残留等一系列问题, 因此, 选择高效无毒的生物防治技术进行

植物有害生物的防治已成为时代发展的必然趋势。生防菌是一类资源丰富、对生物安全、环境友好、防治机理复杂多样的微生物类群, 在植物病害生物防

收稿日期: 2019-05-24

修订日期: 2019-07-22

基金项目: 天津市高校中青年骨干创新人才培养计划(J01009030709); 天津市大学生创新创业训练计划(201910061111); 天津市企业科技特派员项目(19JCTPJ056700); 宝坻区农业科技计划(201918); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201703080)

\* 通信作者 E-mail: wjxlhq@126.com

治中具有十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。随着对生防菌的筛选、鉴定、特性及防治机理的深入研究<sup>[3-4]</sup>,研究人员积极开展了生防菌剂的研制。目前国内已有大量研究表明生防制剂在植物病害防治中具有突出的防效<sup>[5-6]</sup>。国外早在 20 世纪末就开始了菌剂的商品化生产。美国已有多株枯草芽胞杆菌获得商品化或生产应用许可<sup>[7]</sup>。德国、美国等国家对枯草芽胞杆菌 FZB 24 进行了注册,并由德国 Bayer 公司投入生产,用于防治番茄晚疫病、灰霉病等<sup>[8]</sup>。目前,我国已开发成功并投入生产的商品制剂有亚宝、百抗、麦丰宁、纹曲宁等<sup>[9]</sup>,利用枯草芽胞杆菌防治植物病害的应用研究也达到了世界先进水平。解淀粉芽胞杆菌 DS-1 筛选自丹参组织,是一株对多种植物病害具有防治作用的优良内生菌株。本文对该菌株的固体发酵和生产工艺进行了初步探索,用于两种常见蔬菜土传病害的防治,以期为蔬菜病害的田间防治提供参考,并为生防菌的产业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

DS-1 菌株由丹参 *Salvia miltiorrhiza* 叶中分离得到,经鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*<sup>[10]</sup>;靶标真菌辣椒枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、黄瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumebrium* Owen 均由天津农学院植病实验室提供。

LB 液体培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA 和 PDB 在 121℃ 下灭菌 20 min。

### 1.2 菌株 DS-1 的固态发酵基质筛选

选取大米粉、玉米粉和小米粉 3 种基质,以活菌数作为测定指标。分别称取 12 g 不同基质分别放入 50 mL 烧杯中后进行高温灭菌。吸取 4 mL DS-1 菌液( $1 \times 10^7$  cfu/mL)与固料充分混合,混合后将其置于 37℃ 恒温培养箱中,48 h 后取出,60℃ 烘干。取 1 g 基质用无菌水梯度稀释成  $1 \times 10^{-7}$  g/mL,吸取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 固体培养基,用稀释平板涂布法测定不同处理的活菌数(方法同下)<sup>[11]</sup>。每个处理设 6 次重复。

### 1.3 碳源和氮源的筛选

从 1.2 筛选出的最佳基质(玉米粉,下同)进行碳、氮源筛选,添加不同的碳源:葡萄糖、可溶性淀

粉、麦芽糖、蔗糖、红糖、乳糖、玉米秸秆、红薯粉、麦麸共 9 种;氮源:胰蛋白胨、酵母粉、花生粉、黄豆粉、尿素、硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、绿豆粉、小米粉共 10 种。以不加碳氮源的玉米粉为对照。依照 10:1 的质量比把最适的基质和各种碳或氮源共 12 g 放置于烧杯中进行混合,灭菌后与 4 mL DS-1 发酵液( $1 \times 10^7$  cfu/mL)混匀,置于 37℃ 恒温培养 48 h,60℃ 烘干。测定各处理活菌数。设 3 次重复。

### 1.4 固态发酵条件的优化

通过  $L_{16}(4^5)$  正交表,测定初始 pH(6、7、8、9)、接种量(1.0、0.8、0.6、0.4 mg/g)、培养时间(24、48、72、96 h)、碳源(可溶性淀粉 200、150、100、50 mg/g)、氮源(小米粉 100、75、50、25 mg/g)5 因素对 DS-1 菌株活菌数的影响,每种因素各取 4 个水平。根据设计方案配制不同固态发酵培养基,灭菌后依次加入 DS-1 发酵液( $1 \times 10^7$  cfu/mL),搅拌均匀,置于 37℃ 恒温培养。测定各处理活菌数。设 3 次重复。

### 1.5 助剂的筛选

将 1.4 中最佳发酵配方所得的 DS-1 菌株的固体发酵物在 40℃ 鼓风机中干燥成原粉,研碎备用。将原粉与 3 类助剂包括:载体(硅藻土、壳聚糖、高岭土、碳酸钙)、分散剂(海藻酸钠、腐植酸钠、糊精、可溶性淀粉)、保护剂(十二烷基硫酸钠、吐温-80、羧甲基纤维素钠、聚四氟乙烯浓缩分散液)分别按质量比 20:1 进行混合处理,不加助剂为对照。载体和分散剂的处理在室温下静置 3 d,保护剂处理在紫外灯下照射 6 h。测定不同处理的活菌数。

### 1.6 DS-1 菌株粉剂及颗粒剂的制备

采用  $L_9(3^3)$  正交表测定 3 种助剂(壳聚糖、糊精、聚四氟乙烯浓缩分散液)不同含量(100、50、20 mg/g)对 DS-1 原粉活菌数的影响,各因素取 3 水平。室温下静置 3 d,测定各种处理的活菌数。设 3 次重复。

将正交试验中选出的最优组合与原粉进行混合搅拌之后制成粉剂。将 10 mg/g 的海藻酸钠以及粉剂按质量比 4:3 进行混合,再滴入 0.028 g/mL 的氯化钙,充分混匀,在室温中风干成粒状,制成颗粒剂。

### 1.7 DS-1 菌株粉剂的田间应用效果

以 1.6 中最佳配方中制成的粉剂和颗粒剂分别按质量与体积比为 1:100 比例拌营养土,发酵液以  $1 \times 10^7$  cfu/g 浓度 1:50 拌营养土,以不加菌剂为对

照,在边长为 5 cm 育苗钵中播种种子。辣椒长出 3~4 片真叶,黄瓜 1~2 片真叶时,挑选每个处理中长势较为一致的幼苗带土移至直径为 15 cm 的花盆中,放入温室。设 3 次重复,每重复 30 盆。30 d 后取 6 株测定其株高、鲜重。30 d 时在幼苗的根茎基部用一次性注射器针头轻微刺伤 3 处,采用灌根法,分别接种  $1 \times 10^7$  cfu/mL 的辣椒枯萎病菌和黄瓜枯萎病菌。30 d 后开始记录植株发病情况。按方中达方法划分病情级数,计算病情指数和防病效果<sup>[12]</sup>。

### 1.8 数据分析

运用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 DS-1 的固态发酵基质的筛选

采用 3 种不同的发酵基质对 DS-1 菌株进行培养,活菌数分别为大米粉  $6.60 \times 10^8$  cfu/g,小米粉  $9.68 \times 10^8$  cfu/g,玉米粉  $11.90 \times 10^8$  cfu/g,采用大米粉、小米粉、玉米粉 3 种基质培养的 DS-1 菌株数量间有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),玉米粉 > 小米粉 >

大米粉(表 1),玉米粉处理的活菌数优于小米粉和 大米粉,故后续试验将菌株 DS-1 的固态发酵基质选定为玉米粉。

表 1 不同基质对 DS-1 菌株活菌数的影响<sup>1)</sup>

Table 1 Effect of different substrates on viable count of strain DS-1

基质 Substrate	活菌数/ $1 \times 10^8$ cfu · g <sup>-1</sup> Viable count of the strain
玉米粉 Corn flour	11.90 aA
小米粉 Millet flour	9.68 bB
大米粉 Rice flour	6.60 cC

1) 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。下表同。

Different small letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), different capital letters in the same column indicate extremely significant difference ( $P < 0.01$ ). The same below.

### 2.2 碳源和氮源的筛选

不同种类碳、氮源对 DS-1 菌株活菌数的影响如表 2 所示。可溶性淀粉为碳源时,活菌数最高,达  $15.60 \times 10^8$  cfu/g,显著高于其他碳源,所有碳源的活菌数均高于对照的。后期选取可溶性淀粉为碳源进一步研究。氮源中,除绿豆粉和小米粉外均很少形成孢子,其中小米粉为氮源的活菌数极显著高于绿豆粉,故选取小米粉作为氮源。

表 2 不同碳源和氮源对 DS-1 菌株活菌数的影响

Table 2 Effect of different carbon and nitrogen sources on viable count of strain DS-1

碳源 Carbon source		活菌数/ $1 \times 10^8$ cfu · g <sup>-1</sup> Viable count of the strain	氮源 Nitrogen source		活菌数/ $1 \times 10^8$ cfu · g <sup>-1</sup> Viable count of the strain
葡萄糖 Glucose		7.23 deBC	蛋白胨 Tryptone		2.67 dCD
可溶性淀粉 Soluble starch		15.60 aA	酵母粉 Yeast powder		1.00 dD
麦芽糖 Maltose		8.23 cdeBC	花生粉 Peanut powder		7.33 cC
蔗糖 Sucrose		11.27 bB	黄豆粉 Soybean powder		6.67 cC
红糖 Brown sugar		7.60 deBC	尿素 Urea		1.00 dD
乳糖 Lactose		9.93 bcdB	硫酸铵 Ammonium sulfate		0.67 dD
玉米秸秆 Corn straw		8.33 bcdBC	硝酸钾 Potassium nitrate		0.33 dD
红薯粉 Sweet potato flour		10.63 bcB	氯化铵 Ammonium chloride		3.33 cdCD
麦麸 Wheat bran		11.30 bB	绿豆粉 Mung bean flour		28.00 bB
对照 Control		5.60 cC	小米粉 Millet flour		36.66 aA
			对照 Control		7.00 cC

### 2.3 DS-1 菌株的固态发酵条件优化

DS-1 菌株固态发酵的正交统计结果如表 3 所示:试验的 5 种不同因素根据极差 R 值和 F 测验结果可知各因素影响菌株 DS-1 固态发酵的程度不同,大小依次为培养时间(60.83) > 接种量(41.87) > pH 值(36.50) > 氮源(小米粉)(32.25) > 碳源(可溶性淀粉)(19.95)。培养时间对活菌数的影响最

大,而碳源影响最小。5 个因素主效应均表现为差异显著。处理组合间的显著性分析表明,处理组合 10(可溶性淀粉 100 mg/g,小米粉 100 mg/g,培养时间 96 h,接种量 0.8 mL/g,初始 pH 为 8)的活菌数最高达到了  $1.35 \times 10^9$  cfu · g<sup>-1</sup>,除了与组合 7 和组合 14 差异不显著外,均极显著高于其他组合。因此本试验采用组合 10 作为固体发酵条件。

对菌落数影响:培养时间>接种量>初始 pH>氮源>碳源。DS-1 菌株固态发酵最优条件筛选为以玉米粉为基质,其他因素最佳水平为:可溶性淀粉 200 mg/g,小米粉 50 mg/g,培养时间 96 h,接种量

0.8 mL/g,初始 pH 为 8。处理组合的显著性分析表明,处理组合 10(可溶性淀粉 100 mg/g,小米粉 100 mg/g,培养时间 96 h,接种量 0.8 mL/g,初始 pH 为 8)的活菌数极显著高于其他处理组合。

表 3 菌株 DS-1 固态发酵工艺优化的正交统计结果

Table 3 Orthogonal statistical results of solid-state fermentation process optimization of strain DS-1

处理 Treatment	pH	接种量/mL·g <sup>-1</sup> Inoculum concentration	培养时间/h Incubation time	可溶性淀粉/mg·g <sup>-1</sup> Soluble starch	小米粉/mg·g <sup>-1</sup> Millet flour	活菌数/1×10 <sup>8</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Viable count of the strain
1	6	1.0	24	200	100	1.50 kI
2	6	0.8	48	150	75	6.33 ghFG
3	6	0.6	72	100	50	6.87 fgEFG
4	6	0.4	96	50	25	9.70 bcdCDE
5	7	1.0	48	100	25	3.37 ijkHI
6	7	0.8	24	50	50	9.17 cdeCDEF
7	7	0.6	96	200	75	11.67 abAB
8	7	0.4	72	150	100	7.33 efgDEFG
9	8	1.0	72	50	75	8.53 defCDEF
10	8	0.8	96	100	100	13.50 aA
11	8	0.6	24	150	25	5.17 ghiGH
12	8	0.4	48	200	50	11.80 abAB
13	9	1.0	96	150	50	10.13 bcdCD
14	9	0.8	72	200	25	11.30 abcABC
15	9	0.6	48	50	100	2.80 kHI
16	9	0.4	24	100	75	4.63 hijGH
$\bar{x}_1$	61.00 cC	58.80 cC	51.17 cC	90.75 aA	62.75 cB	
$\bar{x}_2$	78.80 bB	100.67 aA	60.83 cC	72.40 bB	77.92 bB	
$\bar{x}_3$	97.50 aA	66.25 cC	85.08 bB	70.80 bB	95.00 aA	
$\bar{x}_4$	72.16 bcBC	83.75 bB	112.00 aA	75.50 bB	73.83 bcB	
R	36.50	41.87	60.83	19.95	32.25	
F	19.67*	29.43*	62.96*	7.00*	15.05*	

## 2.4 助剂及助剂组合配比

不同助剂对 DS-1 原粉活菌数的影响如表 4 所示。载体和保护剂中有些会降低 DS-1 原粉的活菌数,但壳聚糖、糊精和聚四氟乙烯浓缩分散液均能显

著提高原粉的活菌数,分别达到  $1.21 \times 10^{10}$ 、 $1.72 \times 10^{10}$ 、 $1.51 \times 10^{10}$  cfu/g。助剂则分别选择这 3 种物质开展优化配比的正交试验。

表 4 不同助剂对 DS-1 原粉活菌数的影响

Table 4 Effects of different additives on viable count of DS-1 raw powder

载体 Carrier	活菌数/ 1×10 <sup>10</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Viable count of the strain	保护剂 Protective agent	活菌数/ 1×10 <sup>10</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Viable count of the strain	分散剂 Dispersant	活菌数/ 1×10 <sup>10</sup> cfu·g <sup>-1</sup> Viable count of the strain
硅藻土 Diatomite	1.11 abAB	腐殖酸钠 Sodium humate	0.70 dC	十二烷基硫酸钠 Sodium dodecyl sulfate	1.13 bB
壳聚糖 Chitosan	1.21 aA	糊精 Dextrin	1.72 aA	吐温-80 Tween-80	1.15 bB
高岭土 Kaolin	0.95 bcAB	海藻酸钠 Sodium alginate	0.90 cBC	羧甲基纤维素钠 Sodium carboxymethyl cellulose	1.25 bAB
碳酸钙 Calcium carbonate	0.87 cB	可溶性淀粉 Soluble starch	0.71 dC	聚四氟乙烯浓缩分散液 Polytetrafluoroethylene concentrated dispersion	1.51 aA
对照 Control	1.08 bcAB	对照 Control	1.08 bB	对照 Control	1.08 bB

在助剂筛选的基础上,DS-1 菌株助剂组合配比的正交统计结果分析结果如下(表 5):根据直观分析极差 R 值和 F 测验,不同助剂时菌株 DS-1 活菌数影响程度不同,依次为载体(57.33)>保护剂

(40.23)>分散剂(12.43)。通过各因素各水平间活菌数的多重比较分析,结果表明使用载体壳聚糖 20 mg/g 时活菌数极显著高于其他处理( $P < 0.01$ )。使用保护剂糊精 50 mg/g 时活菌数极显著高于其他

处理( $P < 0.01$ )。分散剂聚四氟乙烯浓缩分散液 50 mg/g 与 100 mg/g 时,在活菌数量上没有显著差异,但极显著高于其他处理( $P < 0.01$ )。处理组合

的显著性分析表明,载体壳聚糖 20 mg/g,保护剂糊精 50 mg/g,分散剂聚四氟乙烯 100 mg/g 的组合活菌数达到最大,为  $1.74 \times 10^{10}$  cfu/g。

表 5 助剂组合优化的正交统计结果

Table 5 Orthogonal statistical results of the optimum combination of auxiliaries

处理 Treatment	壳聚糖/mg · g <sup>-1</sup> Chitosan	糊精/50 mg · g <sup>-1</sup> Dextrin	聚四氟乙烯浓缩分散液/100 mg · g <sup>-1</sup> Dispersant polytetrafluoroethylene concentrated dispersion	活菌数 /1 × 10 <sup>10</sup> cfu · g <sup>-1</sup> Viable count of the strain
1	100	100	100	0.97 eEF
2	100	50	50	1.27 cdCD
3	100	20	20	0.67 fG
4	50	100	50	0.90 eF
5	50	50	20	1.15 dDE
6	50	20	100	0.92 eF
7	20	100	20	1.47 bB
8	20	50	100	1.74 aA
9	20	20	50	1.39 bcBC
$\bar{x}_1$	95.89 bB	111.33 bB	121.11 aA	
$\bar{x}_2$	99.11 bB	138.56 aA	118.44 aA	
$\bar{x}_3$	153.22 aA	98.33 bB	108.67 bB	
R	57.33	40.23	12.43	
F	102.79*	41.74*	4.25*	

2.5 DS-1 菌株不同制剂对辣椒及黄瓜的田间应用效果

制剂在田间应用如表 6 所示。可以看出 3 种处理均能促进辣椒和黄瓜幼苗的生长,尤其是颗粒剂的效果最突出,均显著高于对照。在对辣椒株高和鲜重的增长上,颗粒剂的作用显著高于发酵液,相于

对发酵液增长了 17.7% 和 12.5%;但在黄瓜上只对株高的增长表现显著,相对于发酵液增长了 31.0%。两种制剂对两种枯萎病的防效均超过 60%,显著高于发酵液,但其二者之间差异不显著,颗粒剂效果略好于粉剂。

表 6 DS-1 不同制剂的田间应用效果

Table 6 Field application effect of different agents of DS-1

处理 Treatment	辣椒 Pepper				黄瓜 Cucumber			
	株高/cm Plant height	鲜重/g Fresh weight	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy	株高/cm Plant height	鲜重/g Fresh weight	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy
发酵液 Fermentation broth	18.1 b	7.92 b	17.13	55.80 b	11.3 b	8.36 ab	31.34	57.52 b
粉剂 Power	19.6 ab	8.50 ab	15.21	60.75 a	13.4 a	8.67 a	26.87	63.58 a
颗粒剂 Granule	21.3 a	8.91 a	14.39	62.86 a	14.8 a	9.13 a	24.99	66.12 a
对照 Control	17.3 b	7.02 b	38.75	—	10.6 b	7.34 bc	73.77	—

3 讨论

芽胞杆菌由于抗逆性强,易于在植物体内定殖,抗菌谱广,对人畜安全,并具有复杂的抗性机理而成为菌剂研制及商品化生产中广泛选用的对象<sup>[13-14]</sup>。固态发酵是芽胞杆菌常用的培养工艺,它操作简单、便于储运、田间应用广泛<sup>[5]</sup>。合适的固态培养基是菌株高效发酵的基础,影响着生防菌的开发与利用。不同的生防菌对基质的选择多不一致,本试验中以玉米粉为基质添加可溶性淀粉和小米粉分别作为碳

源和氮源,通过固态发酵的正交统计,最终优化了固态培养基,明显地提高了 DS-1 菌株的活菌数,由最初的  $10^7$  cfu/g 提升到  $10^9$  cfu/g。

微生物菌剂对湿度、温度和紫外等环境因素比较敏感,在实际使用中极易导致菌剂稳定性和效能的降低,因此往往添加一些助剂来提高菌剂的性能<sup>[15]</sup>。如在假单胞菌<sup>[6]</sup>、链霉菌<sup>[16]</sup>、木霉<sup>[17]</sup>等生防菌中添加不同的助剂均提升了菌剂的性能。本试验在固态发酵的基础上,筛选出了壳聚糖(载体)、糊精(保护剂)、聚四氟乙烯浓缩分散液(分散剂)3 种不同

助剂配方,进一步提高了 DS-1 菌株的活菌数,达到  $1.74 \times 10^{10}$  cfu/g。芽胞杆菌不同剂型均会促进芽胞量或活菌数显著增加,如李西会等研制的解淀粉芽胞杆菌可湿性粉剂的芽胞数可达  $2.82 \times 10^{10}$  cfu/g<sup>[17]</sup>,王剑等研制的枯草芽胞杆菌可湿性粉剂芽胞含量为  $2.0 \times 10^{10}$  cfu/g<sup>[19]</sup>;明亮等研制的解淀粉芽胞杆菌水分散粒剂的活菌数为  $1.2 \times 10^9$  cfu/g<sup>[20]</sup>。本试验所得粉剂的活菌数介于各研究结果之间,但数量级一致,这也表明 DS-1 芽胞杆菌菌剂达到了目前菌剂的研制水平。

DS-1 制剂在田间应用中,可以看出两种菌剂均能促进两种蔬菜幼苗的长势,尤其是颗粒剂的效果显著高于对照,并且提高了对两种枯萎病的防治效果,均达到 60% 以上。其中,颗粒剂防效更突出,显著高于发酵液的防效,这一方面是由于制剂本身活菌数量大大高于发酵液,另一方面固态发酵基质及助剂也有利于菌株的繁殖和储存<sup>[21]</sup>,进而提高了防治效果。颗粒剂的防效略好于粉剂的防效,推测可能是颗粒剂在土壤中释放较为缓慢,细菌可以持续定殖寄主,有利于调节土壤微生态环境,提高土壤微生物多样性,从而改善土壤性质,使植物整体处于良好生长状态<sup>[22-23]</sup>。

菌剂的耐热性、耐酸碱性、抗紫外、贮藏期等特性对其性能的发挥是至关重要的,其含水量、悬浮率、细度等指标是微生物菌型工业化生产的重要评价内容,因此本试验还需要进一步深入研究,为田间病害的科学防治做到精确调控。

## 参考文献

- [1] 方珍娟,张晓霞,马立安. 植物内生菌研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2018, 15(10): 47-51.
- [2] GAO Zhengfeng, ZHANG Baojun, LIU Huiping, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* [J]. Biological Control, 2017, 105, 27-39.
- [3] 裴淑兰,刘东,刘慧芹,等. 野生酸枣内生细菌筛选、鉴定及其抑菌活性测定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 871-877.
- [4] ZHNAG Xiaofang, LI Jingjing, QI Gaofu, et al. Insecticidal effect of recombinant endophytic bacterium containing *Pinellia ternata agglutinin* against white backed planthopper, *Sogatella furcifera* [J]. Crop Protection, 2011, 30(11): 1478-1484.
- [5] YANG Lirong, HAN Xiaoyun, ZHANG, Fan, et al. Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat [J]. Biological Control, 2017, 118: 1-9.
- [6] SINGH P C, SHUKLA A D, FAMTIMA T, et al. Biological control of *Fusarium* sp. NBRI-PMSF12 pathogenic to cultivated betelvine by *Bacillus* sp. NBRI-W9, a potential biological control agent [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2016, 36(1): 106-117.
- [7] ISLAM M T, RAHMAN M, PANDEY P, et al. *Bacillus* spp. : A promising biocontrol agent of root, foliar, and postharvest diseases of plants [M]// RAHMAN M. Bacilli and agrobiotechnology. Cham:Springer, 2017: 113-141.
- [8] PAULITZ T C, BELANGER R R. Biological control in greenhouse systems [J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 39(1): 103-133.
- [9] 郭荣君,李卫东. 载体和助剂对芽孢杆菌 B006 和 BH(1)菌株存活的影响[C]//中国植物保护学会 2009 年学术年会. 北京:中国农业出版社, 2013:1090.
- [10] 代跃厅. 丹参内生细菌 DS-1 分离鉴定及抗菌活性研究[D]. 晋中:山西农业大学, 2015.
- [11] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社, 2007: 29-31.
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1998: 63-64.
- [13] ZHANG Baoguo, BAI Zhihui, HIEFELL D, et al. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 284(1): 102-108.
- [14] 陈向东. 枯草芽胞杆菌作为生防制剂在农业上的应用[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1323-1324.
- [15] 刘振华,邢雪琨. 微生物农药助剂研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(8): 2109-2113.
- [16] 何文,刘金龙,寇娟妮,等. 黄赭色链霉菌固体菌剂的研制及其对小麦幼苗生长的影响[J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 119-124.
- [17] BAI Zhihui, JIN Bo, LI Yuejie, et al. Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation [J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(3): 353-358.
- [18] 李西会,权春善,许永斌,等. 解淀粉芽胞杆菌 Q426 可湿性粉剂的研制[J]. 大连民族学院学报, 2013, 15(5): 485-488.
- [19] 王剑,王楠,高观朋,等. 200 亿芽胞/g 枯草芽胞杆菌可湿性粉剂的研制[J]. 农药, 2010, 49(7): 486-489.
- [20] 明亮,刘程程,杨晓云,等. 生物杀菌剂解淀粉芽胞杆菌 B1619 水分散粒剂配方及助剂筛选[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(4): 529-535.
- [21] 邱德文. 生物农药研究进展与未来展望[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 81-89.
- [22] 许艳丽,张红骥,张匀华,等. 施用根腐病生防颗粒剂对大豆田土壤微生物区系的影响[J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 198-203.
- [23] 高芬,郝锐,秦雪梅,等. 防治药用植物土传病害的芽胞杆菌剂开发的制约因素分析[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 23-28.