



生物实验室

抗病促生复合芽孢杆菌水分散粒剂的研制与应用

王小兵^{*1,2} 钱娜¹ 汪晓丽¹ 成立³ 张正杨⁴ 钱海明⁵ 王海潮¹

Saima Parveen Memon¹

1 扬州大学环境科学与工程学院 江苏 扬州 225127

2 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心 江苏 南京 210095

3 镇江贝斯特有机活性肥料有限公司 江苏 镇江 212400

4 江西省烟草公司 江西 南昌 330025

5 苏州傲龙环保科技有限公司 江苏 苏州 215159

摘要:【背景】乳油、可湿性粉剂和粉剂等生物制剂含有苯类有机溶剂及粉尘,会对环境造成污染,而水分散粒剂具有环境友好性、附加值高、市场潜力大等优点,被认为是最具发展前景的剂型之一,然而关于复合芽孢杆菌水分散颗粒的研究却很少。【目的】利用解淀粉芽孢杆菌 BZ6-1 和短小芽孢杆菌 SC-12 研制成一种复合芽孢杆菌水分散粒剂。【方法】通过生物相容性实验,研究不同载体和助剂对两种芽孢杆菌孢子的影响,以筛选出最佳载体和添加剂。通过质量检测实验,研究不同筛孔直径、干燥温度、干燥时间对水分散性颗粒质量的影响,以优化制粒条件。在辣椒定植后,使用不同剂量的水分散粒剂进行田间辣椒试验。【结果】复合芽孢杆菌水分散粒剂最佳配方:润湿剂 4%十二烷基硫酸钠,分散剂 6%羧甲基纤维素钠,崩解剂 4%硫酸铵,粘结剂 4%聚乙二醇,载体 82%硅藻土;最佳造粒条件为:筛孔粒径 0.8 mm,烘干温度 40 °C,烘干时间 45 min。研制出的复合芽孢杆菌水分散粒剂含菌量为 2.52×10^8 CFU/g,悬浮率为 79.3%,pH 6.8,水分含量为 4.5%,湿润时间为 19.6 s,崩解时间为 86.4 s,颗粒强度适中,符合水分散粒剂国家标准。【结论】研制出的复合芽孢杆菌水分散粒剂能够有效防治辣椒青枯病,并提高辣椒的产量和品质,推荐复合芽孢杆菌水分散粒剂最适用量为 3.0 kg/hm²。

关键词: 抗病, 促生, 复合芽孢杆菌, 水分散粒剂

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41471236); Agricultural Science and Technology Innovation Fund of Jiangsu Province (CX(17)3043, CX(20)3082); Open Project of State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Y20160017); Taicang Construction Project of Demonstration County of Greenhouse Vegetable Safety Land and Farmland Productivity Improvement in 2019; Taicang Pilot Project of Safe Utilization and Remediation of Soil in 2018

***Corresponding author:** Tel: 86-514-87979528; E-mail: xbwang@yzu.edu.cn

Received: 25-02-2020; **Accepted:** 06-06-2020; **Published online:** 29-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41471236); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(17)3043, CX(20)3082); 土壤与农业可持续发展国家重点实验室开放课题(Y20160017); 2019 年太仓市设施蔬菜净土工程与耕地地力提升示范县建设项目; 2018 年太仓市土壤安全利用与修复试点项目

***通信作者:** Tel: 0514-87979528; E-mail: xbwang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-25; **接受日期:** 2020-06-06; **网络首发日期:** 2020-06-29

Preparation and application of compound *Bacillus* sp. water dispersible granules with disease resistance and growth promoting activity

WANG Xiao-Bing^{*1,2} QIAN Na¹ WANG Xiao-Li¹ CHENG Li³ ZHANG Zheng-Yang⁴
QIAN Hai-Ming⁵ WANG Hai-Chao¹ Saima Parveen Memon¹

1 College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China

2 Jiangsu Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing, Jiangsu 210095, China

3 Zhenjiang Beisite Organic Active Fertilizer Company Limited, Zhenjiang, Jiangsu 212400, China

4 Jiangxi Tobacco Company, Nanchang, Jiangxi 330025, China

5 Suzhou Aolong Environmental Protection Science and Technology Company Limited, Suzhou, Jiangsu 215159, China

Abstract: **[Background]** Common biological agents such as emulsifiable concentrate (EC), wettable powders (WP), dust powder (DP) and other biological agents contain benzene and derivatives as organic solvents and dust, which could cause pollution to the environment. Water dispersible granule is considered as one of the most promising dosage forms owing to its environmental friendliness, high added value, and large market potential. However, there are few studies on the compound *Bacillus* sp. water dispersible granules. **[Objective]** To prepare a compound water dispersible granule using *Bacillus amyloliquefaciens* BZ6-1 and *Bacillus pumilus* SC-12, and evaluate its antimicrobial effects on suppression against bacterial wilt in pepper. **[Methods]** The effects of different carriers and auxiliaries on the spores of two kinds of *Bacillus* were investigated in a biocompatibility experiment to select optimal carriers and additives. The effects of different sieve diameter, drying temperature, drying time on the quality of water dispersible granules investigated in a quality inspection experiment to optimize the granulation conditions. Field pepper experiment was conducted by spraying different dosage after planting to field. **[Results]** The best formula included 4% sodium dodecyl sulfate (wetting agent), 6% sodium carboxymethyl cellulose (dispersant), 4% ammonium sulfate (disintegrating agent), 4% polyethylene glycol (binder), and 82% diatomite (carrier). The optimum conditions for granulation were mesh size 0.8 mm, drying temperature of 40 °C, drying time of 45 min. The optimal water dispersible granule, which meets the national standards for wetting powder, was developed with bacteria content of 2.52×10^8 CFU/g, suspension rate of 79.3%, pH 6.8, water content of 4.5%, wetting time of 19.6 s, disintegration time of 86.4 s, and moderate particle strength. **[Conclusion]** Compound *Bacillus* sp. water dispersible granules effectively controlled pepper bacterial wilt and improved the yield and quality of pepper. The most suitable application rates of as-prepared dispersible granules were recommended to be 3.0 kg/hm².

Keywords: Anti-disease, Growth-promotion, Compound *Bacillus* sp., Water dispersible granule

我国是设施农业大国,农户为追求较高的经济收益,普遍依赖大肥大水提高作物产量,导致设施土壤次生盐渍化及土传病害发生严重^[1]。近年来,对根际微生物的研究范围越来越广泛,对根际微生物与植物的相互作用机制研究越来越深入,根际微生物不仅能够促进植物养分的吸收,而且可以提高作物的产量^[2-3]。李秀明^[4]用生防木霉菌 T4 和枯草芽孢杆菌 B99-2 研制出一种生物药剂,可以有效防治葡萄灰霉病;孙中华^[5]利用木霉菌 Tr8 和枯草芽

孢杆菌 B67 研制出一种复配水分散粒剂,可以有效防治黄瓜枯萎病。王小兵等从江苏省沿海滩涂植物根际土壤中筛选到一株短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SC-12 菌株,其 16S rRNA 基因序列在 NCBI 的登录号为 KF012032,其 ACC 脱氨酶比活力达 0.087 U/mg,并具有较强的产铁载体能力,菌株 SC-12 在 100 mmol/L 和 200 mmol/L 硝酸盐胁迫条件下,能显著提高辣椒、番茄发芽率^[6];另外,王小兵等从花生青枯发病区健康花生植株体内获

得一株抗病效果较好的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BZ6-1 菌株, 其 16S rRNA 基因序列在 NCBI 的登录号为 JF693628, 该菌对花生青枯病原菌等细菌性病害和水稻纹枯病菌、稻瘟病菌等真菌性病害均有较强的抑制作用, 具有较广的抗菌谱^[7]。

传统生物菌剂剂型主要是乳油、可湿性粉剂和粉剂, 含有苯类有机溶剂及粉尘, 会对环境造成污染, 而且田间试验性状表现极不稳定^[8]; 随着现代社会对环保越来越重视, 传统生物菌剂剂型对环境都存在不容忽视的缺陷^[9]。水分散粒剂(water dispersible granule)是一种环保新剂型, 由药剂原药、分散剂、润湿剂、粘结剂、崩解剂以及载体加工造粒而成, 外观为颗粒状, 使用时投入水中迅速崩解分散, 形成高悬浮体系^[10], 以其高分散性、高有效性、高稳定性、环境友好性、附加值高、市场潜力大等优点, 被认为是 21 世纪最具发展前景的剂型之一^[11]。

基于水分散粒剂生产成本较低、使用方便、储存时间长和稳定性高等优点^[12], 本研究以短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SC-12 和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BZ6-1 为研究对象, 筛选复合芽孢杆菌水分散粒剂最佳载体和助剂, 优化造粒条件, 以期研制成耐盐促生和生防抗病双重效果的复合水分散粒剂, 为复合水分散粒剂的产业化生产提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) SC-12 和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BZ6-1 混合发酵液(含量 1.2×10^8 CFU/mL, 短小芽孢杆菌 SC-12 和解淀粉芽孢杆菌 BZ6-1 菌落数比值约为 0.95); 载体: 滑石粉(talcum powder, TP), 碳酸钙(calcarea carbonic, CC), 硅藻土(diatomite, DT), 生物炭(biochar, BC); 湿润剂: 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、十二烷基苯磺酸钠(sodium

dodecyl benzene sulfonate, SDBS)、皂角粉(fructusgleditsiasinensis, FD); 分散剂: 木质素磺酸钠(converted ligninsulfonates, CLF)、羟甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose, CMC)和三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP); 崩解剂: 氯化钙(calcium chloride, CaCl₂)、硫酸铵[ammonia sulfate, (NH₄)₂SO₄]和氯化钠(sodium chloride, NaCl); 粘结剂: 聚乙烯醇(polyvinyl, PV)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PG)和可溶性淀粉(starch, ST); 所有载体和助剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 氯化钠 10.0, 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, pH 7.2。

气流粉碎机, 山东埃尔派粉体科技股份有限公司; 旋转式挤压造粒机, 江苏张家港市开创机械制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 复合芽孢杆菌水分散粒剂工艺流程

在转速为 132 r/min, 发酵温度为 30 °C 的混合培养条件下, 将混合培养的 *Bacillus amyloliquefaciens* BZ6-1 和 *Bacillus pumilus* SC-12 菌液 10 000 r/min 离心 10 min, 40 °C 干燥后制成菌粉, 在载体和湿润剂、分散剂、崩解剂、粘结剂等助剂充分混合粉碎后, 利用气流粉碎机进行超微粉碎, 并与 1% 的菌粉混合均匀后加水捏合、挤压造粒, 40 °C 烘干后筛分获得产品^[13]。

1.2.2 复合芽孢杆菌水分散粒剂载体、助剂生物相容性的测定

按 5% (质量体积比)载体和助剂与牛肉膏蛋白胨培养基混合均匀制成液体培养基, 将复合芽孢杆菌接种到液体培养基内, 30 °C 培养 1 d 后, 将培养的菌液稀释后均匀地涂在牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 记录不同处理下的菌落数, 其中以不含载体和助剂成分的培养基为对照。

1.2.3 复合芽孢杆菌水分散粒剂助剂用量的优化

按 2%、4%、6%、8% (质量体积比)湿润剂与菌粉混合, 载体补足 100%, 加水造粒后 40 °C 干燥

1 h 制成样品, 根据润湿时间国家标准 (GB/T5451-2001) 筛选适合的润湿剂用量^[14]。

按 4%、5%、6%、7% (质量体积比) 分散剂与湿润剂、菌粉混合, 载体补足 100%, 加水造粒后 40 °C 干燥 1 h 制成样品, 根据悬浮率国家标准 (GB/T14825-2006)^[15] 筛选适合的分散剂。

采用刻度量筒试验法^[16], 按 2%、3%、4%、5% (质量体积比) 崩解剂与湿润剂、分散剂、菌粉混合, 载体补足 100%, 加水造粒后 40 °C 干燥 1 h 制成样品, 根据样品颗粒的崩解时间确定最适崩解剂。

按 3%、4%、5%、6% (质量体积比) 粘结剂与湿润剂、分散剂、崩解剂、菌粉混合, 载体补足 100%, 加水造粒后 40 °C 干燥 1 h 制成样品, 根据测得样品颗粒的崩解时间、颗粒强度确定最适粘结剂。

1.2.4 复合芽孢杆菌水分散粒剂挤压造粒条件的优化

按 0.8、1.0、1.2 mm 筛孔粒径和 30、40、50 °C 烘干温度以及 15、30、45、60 min 烘干时间进行优化, 每处理 3 次重复。采用平板计数法计算芽孢杆菌菌落数。

1.2.5 复合芽孢杆菌水分散粒剂质量检测

复合芽孢杆菌水分散粒剂悬浮率测定按照 GB/T14825-2006^[15] 进行, pH 值测定按照 GB/T1601-1993^[17] 进行检测, 水分测定按照 GB/T1600-2001^[10] 进行检测, 润湿时间按照 GB/T5451-2001^[14] 进行检测。

1.2.6 复合芽孢杆菌水分散粒剂贮藏稳定性测定

分别取制成的复合水分散粒剂在 4 °C 和 25 °C 条件下贮存, 每隔一个月测定样品中的含菌量, 测定时长为 12 个月, 评估复合芽孢杆菌水分散粒剂的贮藏稳定性。

1.2.7 复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒抗病促生的田间试验

试验于 2019 年 3–8 月在江苏省扬州高邮丰盛果蔬土地股份专业合作社设施大棚内进行。供试土壤 pH 7.1, 全氮 1.9 g/kg, 有机质 32.0 g/kg。采

用随机区组设计, 钙镁磷肥 900 kg/hm²、硫酸钾 360 kg/hm² 做基肥, 实验分以下 4 个处理: 处理 1 为 CK; 处理 2 为复合水分散粒剂 1.5 kg/hm² (CB15); 处理 3 为复合水分散粒剂 3.0 kg/hm² (CB30); 处理 4 为复合水分散粒剂 6.0 kg/hm² (CB60)。每处理 3 个重复, 一共 12 个小区, 小区间设保护行, 每个小区面积为 15 m²。复合芽孢杆菌水分散粒剂施用方式为 100 倍液稀释后在定植后和盛果期各灌溉一次, 收获期记录每个小区辣椒产量, 并测定辣椒维生素 C、蛋白质和可溶性糖含量等品质相关指标。维生素 C 含量采用 2,6-二氯酚酞酚滴定法, 蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法, 可溶性糖含量测定采用分光光度法^[18]。辣椒青枯病发病率和防病效果参照邱敬萍等^[19] 测定方法。

1.2.8 数据处理

采用 Excel 2010 进行数据整理, 采用 Origin 8.5 进行数据作图, 采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并结合邓肯法 (Duncan) 进行不同处理的差异显著性检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 复合芽孢杆菌水分散粒剂载体的筛选

复合芽孢杆菌水分散粒剂载体的筛选见图 1, 含有载体的复合芽孢杆菌菌落数均略低于对照, 表明载体对芽孢杆菌生长均产生一定的影响。不同载体之间的比较发现, 硅藻土与两种芽孢杆菌相容性较好, 总菌落数为 0.86×10^7 CFU/mL, 其次是生物碳、滑石粉, 相容性最小的载体是碳酸钙; 当硅藻土为载体时, 两种芽孢杆菌菌落数比值为 0.87, 其次是生物碳、碳酸钙, 最小的是滑石粉。综合考虑, 最适载体为硅藻土。

2.2 复合芽孢杆菌水分散粒剂助剂的筛选

复合芽孢杆菌水分散粒剂助剂的筛选结果如图 2 所示, 助剂对芽孢杆菌的生长均有一定影响, 均降低了芽孢杆菌的数量。不同助剂之间的比较发现, 如图 2A 所示, 当湿润剂是十二烷基硫酸钠时,

两种芽孢杆菌的总量最大为 2.83×10^7 CFU/mL, 此时两种菌落数之间的比值为 0.82; 如图 2B 所示, 当分散剂为羧甲基纤维素钠时, 两种芽孢杆菌的总量最大为 2.25×10^7 CFU/mL, 此时两种芽孢杆菌菌落数比值为 0.84; 如图 2C 所示, 当崩解剂是硫酸铵时, 两种芽孢杆菌的总量最大为 2.51×10^7 CFU/mL, 此时两种芽孢杆菌的比值为 0.82; 如图 2D 所示, 当粘结剂是聚乙二醇时, 两种芽孢杆菌的总量最大为 0.93×10^7 CFU/mL, 此时两种芽孢杆菌的比值为 0.79。

2.3 复合芽孢杆菌水分散粒剂助剂用量的筛选

复合芽孢杆菌水分散粒剂助剂用量筛选见表 1, 湿润时间随着十二烷基硫酸钠含量的增加而减少, 4%、6%和 8%十二烷基硫酸钠的湿润时间差异

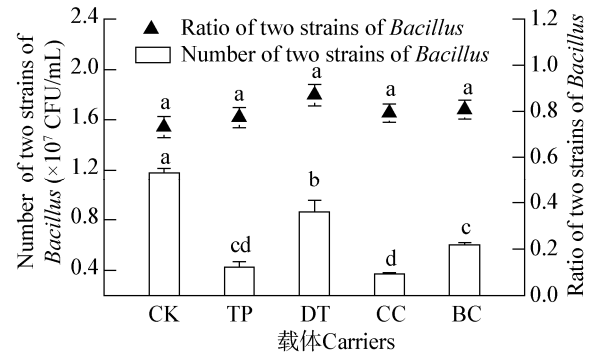


图 1 不同载体对两种芽孢杆菌菌落数和比例的影响

Figure 1 Effect of carriers on the number and ratio of two strains of *Bacillus*

注: CK: 对照; TP: 滑石粉; DT: 硅藻土; CC: 碳酸钙; BC: 生物炭. 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: CK: Control; TP: Talcum powder; DT: Diatomite; CC: Calcarea carbonic; BC: Biochar. Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

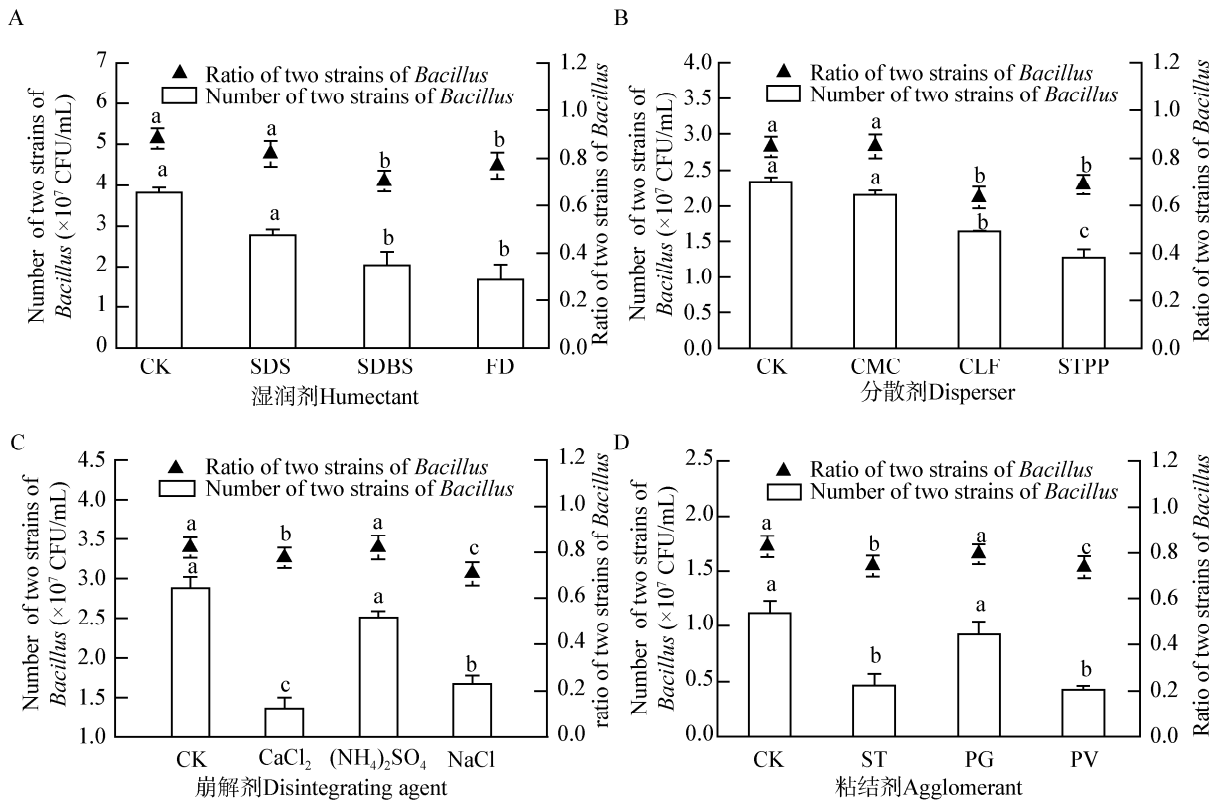


图 2 不同助剂对两种芽孢杆菌菌落数和比例的影响

Figure 2 Effect of additives on the number and ratio of two strains of *Bacillus*

注: SDS: 十二烷基硫酸钠; SDBS: 十二烷基苯磺酸钠; FD: 皂角粉; CMC: 羧甲基纤维素钠; CLF: 木质素磺酸钠; STPP: 三聚磷酸钠; ST: 可溶性淀粉; PG: 聚乙二醇; PV: 聚乙烯醇. 不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: SDS: Sodium dodecyl sulfate; SDBS: Sodium dodecyl benzene sulfonate; FD: Fructusgle ditsiaesinensis; CMC: carboxymethylcellulose; CLF: Converted ligninsulfonates; STPP: Sodium tripolyphosphate; ST: Starch; PG: Polyethylene glycol; PV: Polyvinyl. Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

表 1 助剂用量的筛选

Table 1 The amount selection of additives

湿润剂 Wetting agent (%)	湿润时间 Wetting time (s)	分散剂 Dispersants (%)	湿润时间 Wetting time (s)	悬浮率 Suspensibility (%)	崩解剂 Disintegration agent (%)	崩解时间 Disintegration time (s)	粘结剂 Binder (%)	崩解时间 Disintegration time (s)	颗粒硬度 Hardness of particles
2	37.7±0.7a	4	18.9±0.1a	64.3±0.7d	2	155.3±1.7a	3	89.3±0.8b	偏软 Soft
4	21.5±1.0b	5	19.2±0.2a	72.1±0.8c	3	101.8±1.1b	4	86.8±0.8c	适中 Moderate
6	19.7±0.3bc	6	19.1±0.2a	86.2±1.0a	4	89.7±0.8c	5	94.7±1.3a	偏硬 A little hard
8	18.6±0.5bc	7	18.3±0.1a	75.5±0.5b	5	87.2±0.3c	6	93.2±1.3a	硬 Hard

注：湿润剂为十二烷基硫酸钠；分散剂为羧甲基纤维素钠；崩解剂为硫酸铵；粘结剂为聚乙二醇。不同字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Wetting agent: Sodium dodecyl benzene sulfonate; Dispersants: Carboxymethylcellulose; Disintegration agent: Ammonia sulfate; Binder: Polyethylene glycol. Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

不显著。从生产成本考虑，湿润剂选用 4% 十二烷基硫酸钠；分散剂羧甲基纤维素钠当含量为 6% 时，悬浮率显著高于其他含量，而且不同含量羧甲基纤维素钠湿润时间差异不显著，因此分散剂选用 6% 羧甲基纤维素钠；崩解剂硫酸铵崩解时间随着用量增加而减少，4% 和 5% 硫酸铵崩解时间差异不显著，因此崩解剂选用 4% 硫酸铵；粘结剂聚乙二醇当含量为 4% 时，崩解时间最短而且差异显著，颗粒硬度适中，因此粘结剂选用 4% 聚乙二醇。

2.4 复合芽孢杆菌水分散粒剂的造粒工艺优化

复合芽孢杆菌水分散粒剂造粒工艺优化见表 2，进行单因子优化可知当筛孔粒径为 0.8 mm 时，芽孢杆菌菌落数最多，达到 2.36×10^8 CFU/g；烘干温度为 40 °C 时，芽孢杆菌菌落数最多，达到 2.31×10^8 CFU/g，与其他处理差异显著；烘干时间为 45 min 时，芽孢杆菌菌落数最多，达到 2.46×10^8 CFU/g，与其他处理差异显著。验证试验表明在筛孔粒径 0.8 mm、烘干温度 40 °C、烘干时间 45 min 条件下，芽孢杆菌菌落数含量达到 2.52×10^8 CFU/g。

2.5 复合芽孢杆菌水分散粒剂的性能指标分析测定和贮藏稳定性测定

2.5.1 复合芽孢杆菌水分散粒剂的性能指标分析测定

研制出的复合芽孢杆菌水分散粒剂含菌量为

2.52×10^8 CFU/g，其中，解淀粉芽孢杆菌 BZ6-1 含菌量为 1.37×10^8 CFU/g，短小芽孢杆菌 SC-12 含菌量为 1.15×10^8 CFU/g，pH 6.8，水分含量为 4.5%，悬浮率为 79.3%，湿润时间为 19.6 s，崩解时间为 86.4 s，颗粒强度高，各项指标均符合生物农药国家标准^[14]。

2.5.2 水分散粒剂的贮藏稳定性测定

芽孢杆菌水分散粒剂的贮藏稳定性如图 3 所示，在室温下水分散粒剂储藏 12 个月，芽孢杆菌

表 2 不同造粒条件对两种芽孢杆菌菌落数的影响

Table 2 Effect of different granulating conditions on the number of two strains of *Bacillus*

条件因子 Factors	处理 Treatments	芽孢杆菌落数 ($\times 10^8$ CFU/g)
筛孔粒径 Sieve diameter (mm)	0.8	2.36±0.15a
	1.0	2.01±0.12a
	1.2	1.97±0.16a
烘干温度 Drying temperature (°C)	30	1.26±0.04b
	40	2.31±0.07a
	50	1.04±0.08b
烘干时间 Drying time (min)	15	1.76±0.13c
	30	2.18±0.11b
	45	2.46±0.13a
	60	1.64±0.16c

注：不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

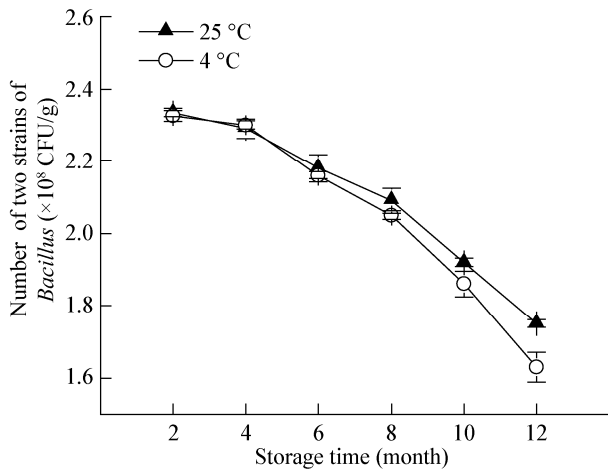


图 3 不同储藏方式对复合芽孢杆菌水分散粒剂菌落数的影响

Figure 3 Effect of different storage on the number of two strains of *Bacillus* in compound *Bacillus* sp. water dispersible granules

注: 不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$).

Note: Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

存活率为 66.67%; 而在 4 °C 条件下, 芽孢杆菌存活率为 69.44%, 两种储藏方式对芽孢杆菌存活率的影响差异不显著。表明复合芽孢杆菌水分散粒剂在常温下长时间储存也可以保持较高的存活率和稳定性。

2.6 复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒品质和产量的影响

复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒品质和产量的影响见表 3。复合芽孢杆菌水分散粒剂处理的辣椒产量均显著高于对照。施用复合芽孢杆菌水分散粒剂均显著提高了辣椒果实维生素 C、可溶性糖和

蛋白质含量。各处理间比较发现, 维生素 C 含量差异显著, 而蛋白质和可溶性糖各处理间差异不明显。

2.7 复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒青枯病的田间防治效果

由表 4 可知, 试验结果表明施用复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒青枯病的防治均有较好的效果, CB15、CB30 和 CB60 的防治效果分别是 42.0%、63.0%和 63.1%, CB30 和 CB60 防治效果相当。

3 讨论

由于生物制剂多为活菌制剂, 本实验通过生物相容性研制的水分散粒剂能够有效克服传统水剂和可湿性粉剂存在的储存时间短和粉尘飞散等缺点, 同时具有高分散性、高稳定性、环境友好性等优势, 在生产上有广泛的应用前景^[20]; 载体是水分散粒剂必不可少的成分, 载体可以将菌株、助剂均匀地分布在载体的粒子表面, 使其稀释成为均匀的混合物。本实验结果表明复合芽孢杆菌水分散粒剂的最佳载体为硅藻土, 其应用效果优于滑石粉、碳酸钙等常用载体, 这与蹇天佑等^[21]的报道一致。硅藻土的主要成分为 SiO_2 , 其结构呈微孔状, 孔隙度较宽、孔洞排列整齐、吸收性好、比表面积大、耐磨、热稳定好, 附着力强, 对微生物有保护作用, 是生产微生物菌剂常用的载体之一^[22-23]。

水分散粒剂的贮存稳定性直接影响其产品质量与应用效果。选择合适助剂可以提高微生物菌剂的贮存稳定性^[24]。王建方^[17]在草甘膦铵盐水分散性粒剂研制过程中筛选出最佳湿润剂是 3%十二烷基硫酸钠; 孙中华^[5]在研制复配生物农药水分散粒剂

表 3 复合芽孢杆菌水分散粒剂对辣椒品质和产量的影响

Table 3 Effect of compound *Bacillus* sp. water dispersible granules on yields and quality of peppers

处理	产量	维生素 C	蛋白质	可溶性糖
Treatments	Yield (kg/hm^2)	Vitamin C (mg/kg)	Protein (g/kg)	Soluble sugar (%)
CK	3 137.29±29.52c	71.25±0.88d	1.22±0.01c	2.82±0.02c
CB15	3 368.28±10.67b	82.52±0.13c	2.29±0.06ab	3.74±0.03a
CB30	3 576.64±57.56a	90.38±0.64b	2.45±0.08ab	3.91±0.06a
CB60	3 647.37±73.51a	106.25±0.78a	2.81±0.05a	4.25±0.05a

注: 不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$).

Note: Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

表 4 复合芽孢杆菌水分散剂对辣椒青枯病的田间防治效果

Table 4 Control efficiency of the compound *Bacillus* sp. water dispersible granules on pepper bacterial wilt

处理	发病率	防治效果
Treatments	Incidence rate (%)	Control effect (%)
CK	63.3±2.64a	—
CB15	36.7±5.00b	42.0
CB30	16.7±1.88c	73.6
CB60	13.3±3.50c	78.9

注: —: 没有抑菌效果; 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$).

Note: —: No inhibitory effect; Different lowercase letters meant significantly difference between treatments at 0.05 level.

时筛选的最佳分散剂是 5%的羧甲基纤维素钠; 杨波^[25]在天维菌素生物活性研究及水分散剂研制过程中筛选出最佳的崩解剂是 4.5%硫酸铵; 潘森林^[26]在 75%烟嘧磺隆水分散剂的研制过程中筛选出最佳粘结剂为 2%聚乙二醇。本研究表明复合芽孢杆菌水分散剂在润湿剂为 4%十二烷基硫酸钠、分散剂为 6%羧甲基纤维素钠、崩解剂为 4%硫酸铵、粘结剂为 4%聚乙烯醇条件下含菌量为 2.52×10^8 CFU/g。

本试验研制的复合芽孢杆菌水分散剂由两种芽孢杆菌复配而成, 克服了单一生物防治菌株依赖环境性强、适应性差、需菌量大和防治效果偏低等问题。同时, 复合芽孢杆菌水分散剂结合各菌株作用机理的协同作用能更好地防治辣椒土传病害^[27-28], 提高辣椒产量和品质, 效果均优于单一型水分散剂^[29-31]。本试验研究发现施用复合芽孢杆菌水分散剂显著提高了辣椒含量, 可能是由于微生物菌剂中大量功能菌的迅速繁殖提高了土壤酶的活性, 加快了土壤有机物质的分解, 促进土壤中固定养分向有效养分的转化, 从而提高了辣椒 V_C 含量, 这与左焱^[32]研究结果一致。复合芽孢杆菌水分散剂施用对辣椒青枯病的防治效果发现, 其剂量 3.0 kg/hm^2 和 6.0 kg/hm^2 的防治效果显著优于 1.5 kg/hm^2 , 而 3.0 kg/hm^2 和 6.0 kg/hm^2 效果相当, 推荐复合芽孢杆菌水分散剂最适用量为 3.0 kg/hm^2 。

4 结论

复合芽孢杆菌水分散剂的最佳配方是: 润湿剂为十二烷基硫酸钠, 分散剂为羧甲基纤维素钠, 崩解剂为硫酸铵, 粘结剂为聚乙二醇, 含量分别为 4%、6%、4%、4%, 载体为硅藻土 82%。最佳造粒条件为筛孔粒径 0.8 mm, 烘干温度为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 烘干时间为 45 min, 制备的复合芽孢杆菌水分散剂菌落数为 2.52×10^8 CFU/g, 悬浮率 79.3%, pH 6.8, 水分含量为 4.5%, 湿润时间为 19.6 s, 崩解时间为 86.4 s, 颗粒强度适中。分散剂的各项指标均达到了生物农药国家标准, 田间实验表明施用复合水分散剂能显著提高辣椒产量和品质, 推荐复合芽孢杆菌水分散剂的最适用量为 3.0 kg/hm^2 。

REFERENCES

- [1] Wang CY. Study on nitrogen and nitrate leaching of greenhouse vegetable in outskirts of Jinan city[J]. China Fruit Vegetable, 2017, 37(2): 22-25 (in Chinese)
王春燕. 济南市郊设施蔬菜氮肥施用及硝态氮淋失状况研究[J]. 中国果菜, 2017, 37(2): 22-25
- [2] Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms[J]. Plant and Soil, 2009, 321(1/2): 305-339
- [3] Sindhu SS, Phour M, Choudhary SR, et al. Phosphorus cycling: prospects of using rhizosphere microorganisms for improving phosphorus nutrition of plants[A]//Parmar N, Singh A. Geomicrobiology and Biogeochemistry[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014
- [4] Li XM. Studies on the formulation of biocontrol agents *Trichoderma harzianum* T4 and *Bacillus subtilis* B99-2 and biocontrol in the green house[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese)
李秀明. 生防木霉菌 T4 和枯草芽孢杆菌 B99-2 制剂的研制及田间试验[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2013
- [5] Sun ZH. Compound biological pesticides (Tr8 and B67) WG development[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese)
孙中华. 复配生物农药(Tr8 和 B67)水分散剂研制[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2017
- [6] Wang XB, Ye SK, Wang XL, et al. Screening and identification of plant-growth-promoting rhizobacteria from

- coastal tidal flats in Jiangsu province and its characterization of growth-promoting under salt stress[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2016, 37(2): 81-86 (in Chinese)
- 王小兵, 叶赛克, 汪晓丽, 等. 江苏沿海滩涂植物根际促生菌的筛选鉴定及其耐盐促生特性[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2016, 37(2): 81-86
- [7] Wang XB, Luo YM, Liu WX, et al. Identification, antimicrobial activity and field control efficacy of an endophytic bacteria strain against peanut bacterial wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27(1): 88-92 (in Chinese)
- 王小兵, 骆永明, 刘五星, 等. 花生青枯病内生拮抗细菌的鉴定、抗菌活性及其田间防效[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(1): 88-92
- [8] Hua NZ. Problems and solutions of unsafe additive in pesticide formulation[J]. *Modern Agrochemicals*, 2009, 8(4): 3-7,10 (in Chinese)
- 华乃震. 农药剂型中非安全添加物的问题和对策[J]. *现代农药*, 2009, 8(4): 3-7,10
- [9] Feng JG, Zhang XJ, Yu C, et al. General situation of applied studies on pesticide formulations processing in China[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2013, 18(2): 220-226 (in Chinese)
- 冯建国, 张小军, 于迟, 等. 我国农药剂型加工的应用研究概况[J]. *中国农业大学学报*, 2013, 18(2): 220-226
- [10] Ming L, Liu CC, Yang XY, et al. Screening on formula and auxiliaries for biological germicide *Bacillus amyloliquefaciens* B1619[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(4): 529-535 (in Chinese)
- 明亮, 刘程程, 杨晓云, 等. 生物杀菌剂解淀粉芽孢杆菌 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
- [11] Ma C, Liu F, Mu W, et al. Study on the formulation of water dispersible granule with triangle-coordinate figure[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2006, 8(4): 379-382 (in Chinese)
- 马超, 刘峰, 慕卫, 等. 三角坐标图法在农药水分散粒剂配方研制中的应用[J]. *农药学报*, 2006, 8(4): 379-382
- [12] Jing F. The optimization of fermentation conditions and development of water dispersible granules and growth-promoting and biological control effect of *Trichoderma longibrachiatum* T6[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 景芳. 生防菌长枝木霉 T6 发酵条件优化、剂型研制及促生防病作用研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016
- [13] Wu RH. Effects of pesticide adjuvants on water dispersible granules of different granulation process[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2016 (in Chinese)
- 吴日辉. 农药水分散粒剂造粒工艺中助剂的作用研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2016
- [14] Liu G, Su DM. Pesticide related national standards issued in 2009 in China[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2010, 31(5): 53-55 (in Chinese)
- 刘刚, 苏冬梅. 2009 年我国发布的农药相关国家标准[J]. *农药科学与管理*, 2010, 31(5): 53-55
- [15] Li WF. Research on formulation and biological activity of 70% imidacloprid water dispersing granule[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian agricultural and Forestry University, 2010 (in Chinese)
- 李文凤. 70%吡虫啉水分散粒剂配方及生物活性研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2010
- [16] Wei YM, Wang ZY. Study on the recipe of orthosulfamuron WDG[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(18): 131-134 (in Chinese)
- 魏玉梅, 王峥业. 噻苯胺磺隆水分散粒剂配方筛选研究[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(18): 131-134
- [17] Wang JF. Development and application of 88.8% glyphosate ammonium salt WDG[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- 王建方. 88.8%草甘膦铵盐水分散性粒剂研制与应用[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2008
- [18] Li M, Zhang ZL, Liu DP, et al. Effects of biochar fertilizer on pepper growth and micro-ecological environment in rhizosphere soil[J]. *China Vegetables*, 2019(2): 53-58 (in Chinese)
- 李嫚, 张忠良, 刘东平, 等. 生物炭肥对辣椒生长及根际土壤微生态环境的影响[J]. *中国蔬菜*, 2019(2): 53-58
- [19] Qiu JP, Huang YX, Wang C, et al. Effects of bacterial consortium EG03 on control of pepper bacterial wilt and rhizosphere microbial community characteristics in fields[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(5): 1468-1474 (in Chinese)
- 邱敬萍, 黄艳霞, 王超, 等. EG03 菌剂对辣椒青枯病的防治效果及对根围土壤微生物群落的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(5): 1468-1474
- [20] Hua NZ. Dry flowable: top product of water dispersible Granules[J]. *World Pesticides*, 2018, 40(2): 1-8 (in Chinese)
- 华乃震. 干悬浮剂-水分散粒剂的顶级产品[J]. *世界农药*, 2018, 40(2): 1-8
- [21] Qian TY, Tang CL, Tian XL, et al. Formulation of biocontrol actinomyces strain 153 and its control effect on verticillium wilt[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(4): 169-172 (in Chinese)
- 蹇天佑, 唐彩乐, 田晓丽, 等. 生防放线菌 153 活菌剂填

- 料的选择及其防病促生作用研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(4): 169-172
- [22] Anderson WA, Bay P, Legge RL, et al. Adsorption of *Streptococcus faecalis* on diatomite carriers for use in biotransformations[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1990, 47(2): 93-100
- [23] Ding CY, Shen QR, Zhang RF, et al. Evaluation of rhizosphere bacteria and derived bio-organic fertilizers as potential biocontrol agents against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato[J]. Plant and Soil, 2013, 366(1/2): 453-466
- [24] He W, Liu JL, Kou JN, et al. Development of microbial inoculum of *Streptomyces silaceus* and its effect on wheat seedling growth[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(12): 119-124 (in Chinese)
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
- [25] Yang B. Research on formulation and biological activity tenvermectin water dispersing granule[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2016 (in Chinese)
杨波. 天维菌素生物活性研究及水分散粒剂研制[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2016
- [26] Pan SL. Preparation and application of 75% nicosulfuron water dispersible granule in corn[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2013 (in Chinese)
潘森林. 75%烟嘧磺隆水分散粒剂研制及其在玉米上的应用研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2013
- [27] Liu SM, Zhou DM, Yang JH, et al. Control effect of composite biological agent on verticillium wilt in strawberry in fields[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 501-503 (in Chinese)
- 刘苏闽, 周冬梅, 杨敬辉, 等. 复合菌剂对草莓黄萎病的田间防治效果[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 501-503
- [28] de Boer M, Bom P, Kindt F, et al. Control of fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms[J]. Phytopathology, 2003, 93(5): 626-632
- [29] Zhang GH, Zhao ZT, Fan TA. Influences of 988 bacterial manure on growth, yield and quality of summer maize[J]. Shandong Agricultural Science, 2010(7): 68-69 (in Chinese)
张桂花, 赵中亭, 樊廷安. 988 生物菌肥对夏玉米生长、产量及品质的影响[J]. 山东农业科学, 2010(7): 68-69
- [30] Ha XJ, Zuo JM, Si CC, et al. The influence of applying bio-organic fertilizer and biological bacterium agentia on the yield, quality of watermelon and the soil property[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2018, 31(10): 45-48 (in Chinese)
哈雪皎, 左继民, 司长城, 等. 施用生物有机肥及生物菌剂对西瓜产量、品质及土壤养分含量的影响[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(10): 45-48
- [31] Huang DY, Yao JW, Zhu ZG, et al. Controlling effect of *Bacillus subtilis* water dispersible granule *Phytophthora* blight and its growth-promoting effect on pepper[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(19): 4737-4739 (in Chinese)
黄大野, 姚经武, 朱志刚, 等. 枯草芽孢杆菌水分散粒剂防治辣椒疫病的效果及其对辣椒的促生作用[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(19): 4737-4739
- [32] Zuo Y. Effect of different biological bacterial fertilizers on yield and quality of pepper in greenhouse[J]. Agricultural Science-Technology and Information, 2016(7): 84-86 (in Chinese)
左焯. 不同生物菌肥对大棚辣椒产量及品质的影响[J]. 农业科技与信息, 2016(7): 84-86