

研究报告

贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 发酵培养基优化及其泡腾颗粒的研制

武天上, 薛雅蓉, 刘常宏*

南京大学生命科学学院 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210023

武天上, 薛雅蓉, 刘常宏. 贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 发酵培养基优化及其泡腾颗粒的研制[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2599-2611

Wu Tianshang, Xue Yarong, Liu Changhong. Optimization of fermentation medium and preparation of effervescent granules of *Bacillus velezensis* CC0955[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2599-2611

摘要:【背景】植物病害的生物防治及生防产品的开发一直是植物保护研究的重点方向,但现有的生防产品多为可湿性粉剂和水剂,存在剂型单一、货架期短及运输和使用不便等问题。【目的】优化贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 菌株发酵培养基,并利用其开发出一种容易使用和保存的新生防产品——泡腾颗粒。【方法】采用 Plackett-Burman 设计、中心组合设计和响应面分析等方法,优化了贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 的发酵培养基成分;采用 $L_9(3^3)$ 正交设计,以溶液 pH 和活菌数为指标,优化了贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 泡腾颗粒配比,并评价了其物理性质和抑菌效果。【结果】贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 最优发酵培养基成分为(g/L): 蛋白胨 12.00, 酵母粉 1.00, 葡萄糖 15.00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.40, K_2HPO_4 0.05。用此培养基发酵 48 h, 发酵液对立枯丝核菌的抑制率达到 89.78%。泡腾颗粒最佳配比为: 碱酸摩尔比为 2.00, 白炭黑 1.50 g, 黄腐酸钾 0.03 g。泡腾颗粒的平均崩解时间为 61.00 s, 溶解后溶液 pH 值为 5.44, 对立枯丝核菌的 EC_{50} 为 27.65 mg/mL, 活菌数为 6.05×10^8 CFU/g。室温下放置 6 个月, 细菌存活率为 58.68%。盆栽实验表明, CC0955 泡腾颗粒溶液对水稻纹枯病的防效为 42.35%, 对番茄灰霉病的防效为 57.62%。【结论】贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 泡腾颗粒是一种新型的抗植物病原真菌制剂, 可用于农田病害的生物防治。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌 CC0955; 立枯丝核菌; 发酵优化; 泡腾颗粒; 防治效果

基金项目: 国家自然科学基金(31471810)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31471810)

*Corresponding author: E-mail: chliu@nju.edu.cn

Received: 2021-11-05; Accepted: 2021-12-31; Published online: 2022-01-28

Optimization of fermentation medium and preparation of effervescent granules of *Bacillus velezensis* CC0955

WU Tianshang, XUE Yarong, LIU Changhong*

State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Biocontrol of plant diseases and development of biocontrol products have been the research focuses in plant protection. However, most of the existing biocontrol agents feature a few available dosage forms (wetable powder or aqueous solution), short shelf life, and inconvenient transport and use. [Objective] To optimize the fermentation medium of *Bacillus velezensis* CC0955 and develop a novel biocontrol agent “effervescent granules”, which is easy to use and preserve. [Methods] Plackett-Burman design, central composite design, and response surface methodology were used to optimize the composition of CC0955 fermentation medium. With the evaluation indicators of pH and bacterial viable count, the composition of CC0955 effervescent granules was optimized by $L_9(3^3)$ orthogonal design, and the physical properties and antifungal effect of the effervescent granules were assessed. [Results] The optimal fermentation medium for CC0955 was composed of peptone 12.00 g, yeast powder 1.00 g, glucose 15.00 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.40 g, K_2HPO_4 0.05 g, and distilled water 1 L. After 48 h fermentation with this medium, the inhibition of the culture broth on *Rhizoctonia solani* reached 89.78%. The optimal composition of effervescent granules is as follows: alkali-to-acid molar ratio of 2.00, silica of 1.50 g, and potassium fulvic acid of 0.03 g. The effervescent granules showed the average disintegration time of 61 s and the pH of the disintegrated solution was 5.44. In addition, the half maximal effective concentration (EC_{50}) against *R. solani* was 27.65 mg/mL, and the number of viable bacteria was 6.05×10^8 CFU/g. The survival rate of bacteria was 58.68% after six months of storage at room temperature. Pot experiment showed that the control rate of CC0955 effervescent granule solution on rice sheath blight was 42.35%, and that on tomato gray mold was 57.62%. [Conclusion] The CC0955 effervescent granule is a novel formulation against phytopathogens, which can be used for the control of farmland diseases.

Keywords: *Bacillus velezensis* CC0955; *Rhizoctonia solani*; fermentation optimization; effervescent granules; control effect

微生物农药属于生物农药，其中以芽孢杆菌为核心的微生物农药已广泛应用于农业生产。国内已成功开发并上市的芽孢杆菌制剂有“百抗”水剂和“纹曲宁”“根腐消”可湿性粉剂等，它们对水稻纹枯病等病害有较好的防治效果。据统计，在我国已登记的微生物农药产品中，可湿性粉剂占比超过 50.0%，悬浮剂占比为 28.6%，二者总和占比近 80.0%^[1]。不难看出，我国农用微生物农药存在剂型单一的问题。另外，

虽然以含有活菌的发酵液制备的水剂产品防效显著，但由于运输和储存难度大，生防菌存活期短^[2]，不适合大规模推广使用^[3]。因此，开发出长效、易用的生防产品新剂型就显得很有必要。

泡腾剂是一种相对新颖的剂型，在食品和中药行业比较常见^[4-5]，然而在农药领域报道较少且多为除草剂^[6-7]。相对液体制剂如水剂和乳油等，泡腾剂有易于储存和运输的特性；而相对于固体制剂如粉剂和可湿性粉剂，泡腾剂制

备过程中产生的粉尘污染较少^[8]。此外, 泡腾剂遇水迅速崩解, 具有速释功能。农业上应用泡腾剂能够省时省力, 基于目前农村青壮年劳动力短缺的现状和植保专业化的需要^[9], 细菌泡腾剂在植物生物防治上有较好的应用前景, 符合农药发展的安全性和方便性等要求。

贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 是分离自樟树叶片内生细菌 CC09 的抗利福平突变株, 与野生菌株相比, 该突变菌株具有更强的生防潜力, 其发酵液及提纯产物对禾谷镰刀菌、立枯丝核菌和白地霉等常见植物病原菌均表现出较强的体外生长抑制活性^[10]。本文通过发酵培养基的响应面优化, 采用非水制粒法^[11]制备该突变株的泡腾颗粒制剂, 并评价了其物理性质和抑菌效果, 以期防治植物真菌病害提供新的选择。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株和样品

Bacillus velezensis CC0955 为本实验室获得的抗利福平突变菌株^[10], 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* ATCC 13289)、姜茎腐霉菌(*Pythium myriotylum* ACCC 36294)和番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* ATCC 12481)由南京农业大学植物保护学院惠赠。创两优 276 水稻种子, 江苏神农大丰种业科技有限公司; 合作 903 大红番茄, 上海长种番茄种业有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、无水乙醇, 国药集团化学试剂有限公司; 白炭黑、高岭土、滑石粉、膨润土、硅藻土、PVP-K30, 上海源叶生物科技有限公司; 一水柠檬酸、碳酸氢钠, 麦克林生化试剂有限公司; 黄腐酸钾, 江苏渔水灵生物科技有限公司; PDA 培养基, 青岛海博生物; LB 培养基, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

灭菌锅, 智微科技有限公司; 摇床, 上海知楚仪器有限公司; 烘箱, 上海博迅实业有限公司; 恒温培养箱, 精宏仪器有限公司; pH 计, 上海雷磁仪器厂。

1.3 CC0955 发酵培养基的响应面优化

1.3.1 Plackett-Burman 实验设计

前期实验结果显示, CC0955 菌株在由蛋白胨 9.0, 酵母粉 3.0, 葡萄糖 10.0, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 组成的培养基(g/L)中发酵 48 h, 其发酵液对立枯丝核菌的抑制率相对较高, 为 51.11%。基于此培养基, 采用 Design-Expert 软件进行了 $n=12$ 的 Plackett-Burman 摇瓶发酵优化^[12], 以发酵液对立枯丝核菌的抑制率(菌丝生长速率法)为响应值, 考察了培养基中葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、 K_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 这 5 个因素对 CC0955 发酵液抑菌率的影响。计算每个因素的 T 效应值, 并通过 Plackett-Burman 试验的 F 值检验及显著性分析, 从 5 个因素中选出对发酵液抑菌率有明显影响的因素。

1.3.2 中心组合试验检测显著影响因子之间的交互作用

根据 Plackett-Burman 试验结果, 选出 2 个对抑菌率有显著性影响的因素——蛋白胨和 K_2HPO_4 , 分别用 A 和 B 表示, 并确定中心点数值, 在固定其他因素的条件下, 对 A 和 B 进行 2 因素 5 水平的中心组合设计, 共 13 组试验, 最后基于中心组合设计试验结果及响应面分析, 获得抑菌率最高的 CC0955 菌株发酵培养基。

1.4 泡腾颗粒的制备

1.4.1 吸附载体的筛选

参考蔡勋超等^[13]的方法, 评估了白炭黑、高岭土、滑石粉、膨润土和硅藻土载体对 CC0955 菌株的吸附性和生物相容性, 以筛选最佳吸附载体。

载体吸附能力测定: 分别将 2 g 载体置于

不同的锥形瓶中,然后用移液枪吸取含菌发酵液,缓慢加入锥形瓶中,直至载体呈液体流动状为止,记录添加的发酵液体积。

生物相容性测定:在 LB 琼脂培养基中添加 5% 的载体,采用涂布平板法接种菌株 CC0955,于 37 °C 培养 24 h,计数含各载体平板上的菌落形成单位(CFU),不含载体的平板为对照(CK),重复 3 次,计算各载体对菌株 CC0955 的生物相容性。生物相容性(%)=(处理组的 CFU/CK 的 CFU)×100。

1.4.2 正交设计优化泡腾颗粒配方

参考文献[14-15]确定泡腾颗粒的崩解剂为柠檬酸和碳酸氢钠。根据 1.4.1 的结果,吸附载体选择白炭黑。配料为黄腐酸钾,其既可作为 pH 调节剂中和柠檬酸,又可为植物补充钾元素。

以泡腾颗粒的活菌数和 pH 为指标^[16],优化碳酸氢钠与柠檬酸的摩尔比(A)、白炭黑(B)和黄腐酸钾(C)这 3 个因子的组成水平,其中 A 的 3 个水平分别为 1.0、2.0 和 3.0 (C₆H₇O₇·H₂O 为 1.05 g;当 A=1.0 时,NaHCO₃ 为 0.42 g;当 A=2.0 时,NaHCO₃ 为 0.84 g;当 A=3.0 时,NaHCO₃ 为 1.26 g);B 的 3 个水平分别为 0.5、1.0、1.5 g;C 的 3 个水平分别为 10.0、20.0、30.0 mg。通过极差分析,获得影响泡腾颗粒质量的关键因素。

1.4.3 泡腾颗粒的制备

基于 1.4.2 的优化结果,采用非水制粒法^[11]制备泡腾颗粒。制备步骤:称取 1.50 g 白炭黑,按 1:3 (质量体积比)的比例吸附 CC0955 菌株发酵液,于 50 °C 烘箱中干燥除去水分;然后再与 1.05 g C₆H₇O₇·H₂O、0.84 g NaHCO₃、0.03 g 黄腐酸钾混合均匀,加入黏合剂 PVP-K30 乙醇溶液 4 mL 使其湿润黏合,移至模具中(规格为直径 0.8 cm,高 1 cm 的空心圆柱)压实成型后取出,40 °C 烘干制得成品。

1.5 泡腾颗粒物理性质评价

1.5.1 密度

用分析天平测得泡腾颗粒的质量 m ,卡尺测量颗粒的直径 d 和高 h ,则泡腾颗粒的密度可通过公式 $\rho=4m/\pi d^2 h$ 。重复测量 3 次。

1.5.2 崩解时间和溶液 pH

在室温下(25 °C)将 1 g 泡腾颗粒放到含有 99 mL 水的 250 mL 烧杯中(pH 7.0)^[17],完全崩解后记录其崩解时间,然后用 pH 计测定溶液的 pH 值,重复 3 次。

1.5.3 泡腾颗粒活菌计数

称取 0.1 g 泡腾颗粒,置于 9.9 mL 无菌水中充分涡旋崩解,再将溶液稀释 10² 倍,吸取 100 μ L 均匀涂布于 LB 平板(3 个重复),37 °C 恒温箱培养 24 h 后计数。泡腾颗粒室温下放置 6 个月后再重复上述实验,计算菌存活率。

1.6 对常见植物病原菌的毒力回归方程和 EC₅₀

通过前期预试验获得正式实验的浓度范围,分别称取一定量的泡腾颗粒溶于 10 mL 无菌水中,获得终浓度为 5、10、20、40、80 和 100 mg/mL 的悬液;分别取 1 mL,制备含不同浓度悬液的 PDA 培养基;以含等量无菌水的 PDA 平板作为对照。然后接种立枯丝核菌、姜茎基腐霉菌和番茄灰霉病菌菌饼(直径 5 mm),28 °C 培养 36 h,测量菌丝生长直径,计算抑制率,每个处理重复 4 次。

抑制率(%)=[(对照病菌直径-5)-(处理病菌直径-5)]/(对照病菌直径-5)×100^[18]。

按照程根武等^[19]的方法,计算菌株 CC0955 泡腾颗粒抑制供试病原真菌的毒力回归方程和 EC₅₀。

1.7 泡腾颗粒与原始发酵液效果比较

采用与 1.6 相同的皿内抑菌实验方法,比较 CC0955 菌株发酵液与含等量发酵液的泡腾

颗粒抑制 3 种病原真菌活性的差异, 考察泡腾颗粒制备过程对 CC0955 菌株发酵液抑菌活性的影响。

1.8 泡腾颗粒对水稻纹枯病和番茄灰霉病的防治效果

1.8.1 泡腾颗粒对立枯丝核菌侵染水稻幼苗的防治效果

将营养土、蛭石、珍珠岩以 50:25:25 (质量比)的比例混合, 在 0.12 MPa 下蒸汽灭菌 20 min 后装入组培瓶(高 10.5 cm, 直径 6.5 cm), 表面平整后播种经过表面消毒的饱满水稻种子 10 颗/瓶, 于 25 °C 培养 20 d。参考易润华等的方法^[20], 制备立枯丝核菌菌核接种体并接种于水稻根部土壤。然后将等量的 30 倍稀释 CC0955 发酵液、粉剂、泡腾颗粒溶液(1 g 样品溶于 30 mL 无菌水中)分别施入水稻根部, 施入等量的无菌水作为阳性对照。既不接种立枯丝核菌也不使用 CC0955 菌株产品的健康植株为阴性对照。其中粉剂为实验室早期制备^[13]。各处理重复 3 次。于 14 h 光照、10 h 黑暗、温度 25 °C 和湿度 85% 条件下培养 12 d, 调查水稻幼苗的发病情况, 计算病情指数与防治效果^[21]。
病情指数= $[\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查}$

总叶数 \times 最高级代表值)] $\times 100$;

防治效果(%)= $[(\text{空白对照病指} - \text{处理组病指}) / (\text{空白对照病指})] \times 100$ 。

1.8.2 泡腾颗粒对灰霉菌侵染番茄的防治效果

采用与 1.8.1 相同的种植方法在加仑盆中(高 10 cm, 直径 11 cm)培育番茄至六叶期, 高 15 cm 左右。参考周小江等的方法^[22]制备 10^6 CFU/mL 的孢子悬浮液并接种于番茄叶面上。然后将等量 30 倍稀释 CC0955 发酵液、粉剂、泡腾颗粒溶液分别喷洒于番茄叶面, 喷洒等量的无菌水为阳性对照。既不接种番茄灰霉菌也不使用 CC0955 菌株产品的健康植株为阴性对照。各处理重复 3 次。将番茄置于 23 °C、湿度 90% 的黑暗环境中培养 24 h, 之后保持同样温度和湿度, 14 h 光照/10 h 黑暗条件下培养 4 d, 调查番茄叶面发病情况, 计算病情指数与防治效果^[22]。

2 结果与分析

2.1 CC0955 发酵培养基的响应面优化

2.1.1 Plackett-Burman 筛选关键因素的结果

Plackett-Burman 的试验结果见表 1, 处理 8 组抑菌率最高, 为 77.05%, 处理 6 组抑菌率最低, 为 60.66%。试验结果的统计分析(表 2)显

表 1 Plackett-Burman 实验设计及结果

Table 1 Design and results of Plackett-Burman experiment

Group	Glucose (g/L)	Peptone (g/L)	Yeast powder (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	Inhibition rate (%)
1	15	12	1	0.4	0.4	67.21
2	5	12	5	0.1	0.4	73.77
3	15	6	5	0.4	0.1	60.66
4	5	12	1	0.4	0.4	67.21
5	5	6	5	0.1	0.4	70.49
6	5	6	1	0.4	0.1	60.66
7	15	6	1	0.1	0.4	73.77
8	15	12	1	0.1	0.1	77.05
9	15	12	5	0.1	0.1	70.49
10	5	12	5	0.4	0.1	70.49
11	15	6	5	0.4	0.4	63.93
12	5	6	1	0.1	0.1	65.57

表 2 Plackett-Burman 实验统计分析

Table 2 Statistical analysis of Plackett-Burman experiment

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value Prob>F
Model	233.94	5	46.79	4.510	0.047 2
Glucose	2.02	1	2.02	0.190	0.674 8
Peptone	80.81	1	80.81	7.790	0.031 6
Yeast powder	0.22	1	0.22	0.022	0.888 0
K ₂ HPO ₄	139.95	1	139.95	13.480	0.010 4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.94	1	10.94	1.050	0.344 1
Residual	62.28	6	10.38		
Cor total	296.22	11			

示模型显著($P=0.047\ 2$);此外,蛋白胨($P=0.031\ 6$)和 K₂HPO₄ ($P=0.010\ 4$)两因素的影响达到显著水平。试验结果的 t -效应值分析表明(图 1),葡萄糖、蛋白胨、MgSO₄·7H₂O 对 CC0955 菌株发酵液抑制立枯丝核菌有正效应(灰色),而酵母粉和 K₂HPO₄ 对 CC0955 菌株发酵液抑制立枯丝核

菌有负效应(黑色)。

2.1.2 中心组合设计试验结果及响应面分析

根据 2.1.1 的结果,在固定其他因素的条件下(葡萄糖 15.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/L),采用 2 因素 5 水平的中心组合设计方法,研究了蛋白胨和 K₂HPO₄ 两因素对 CC0955 菌株发酵液抑菌活性的影响,结果见表 3。统计分析显示(表 4), $P=0.006\ 9<0.05$, Lack of fit=0.822>0.1, 表明模型可靠。两因素对 CC0955 菌株发酵液抑菌率影响见图 2。当蛋白胨为 12.00 g、K₂HPO₄ 为 0.05 g 时抑菌率最大,为 90.60%。据此获得 CC0955 菌株的最佳发酵培养基组成为:蛋白胨 12.00 g/L, 酵母粉 1.00 g/L, 葡萄糖 15.00 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.40 g/L, K₂HPO₄ 0.05 g/L。利用此培养基发酵 48 h, CC0955 菌株发酵液对立枯丝核菌的抑制率达到 89.78%, 显著高于优化前的抑制率 51.11%, 并与模型预测值 90.60% 无显著性差异($P>0.05$)。

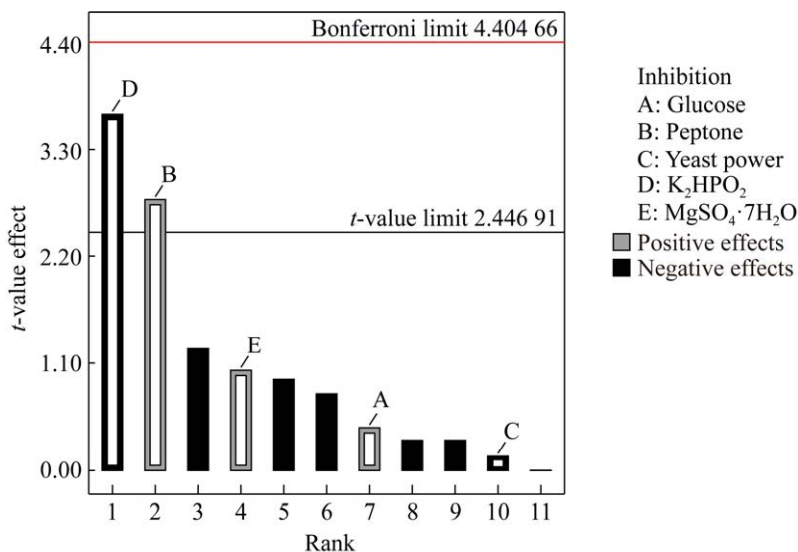


图 1 Plackett-Burman 试验各因素对 CC0955 菌株发酵液抑菌率的影响 ■: 正效应; ■: 负效应

Figure 1 Effects of various factors on inhibition rate of strain CC0955 fermentation broth in Plackett-Burman test. ■: Positive effect; ■: Negative effect.

表 3 中心组合设计试验及结果

Table 3 Central composite design and results

Group	Peptone (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	Inhibition rate (%)
1	15.00	0.04	91.13
2	18.00	0.05	88.98
3	18.00	0.10	89.25
4	19.24	0.08	90.32
5	12.00	0.05	89.78
6	15.00	0.08	88.98
7	10.76	0.08	88.44
8	15.00	0.08	86.83
9	15.00	0.11	87.63
10	15.00	0.08	90.05
11	15.00	0.08	89.25
12	15.00	0.08	89.52
13	12.00	0.10	84.68

2.2 泡腾颗粒的制备

2.2.1 吸附载体的筛选结果

根据载体吸附的菌液体积和细胞数, 比较了不同载体的吸附能力。实验结果显示(表 5), 膨润土和白炭黑吸附能力最强, 硅藻土次之, 滑石粉和高岭土的吸附能力较差。

表 4 中心组合设计试验统计分析

Table 4 Statistical analysis of central composite design

Item	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value Prob>F
Model	24.33	3	8.11	7.88	0.006 9
Peptone	5.17	1	5.17	5.02	0.051 8
K ₂ HPO ₄	11.96	1	11.96	11.62	0.007 8
Peptone-K ₂ HPO ₄	7.21	1	7.21	7.01	0.026 6
Residual	9.26	9	1.03		
Lack of fit	3.14	5	0.63	0.41	0.822 2
Pure error	6.12	4	1.53		
Cor total	33.59	12			

生物相容性实验结果显示(表 5), 白炭黑的生物相容性最高, 达到 94.16%; 滑石粉和硅藻土次之, 分别为 88.31%和 79.22%; 高岭土生物相容性较差, 为 57.14%; 膨润土的生物相容性最差。

综合吸附能力和生物相容性指标, 选取白炭黑为 CC0955 菌株发酵液泡腾颗粒制剂的吸附载体。

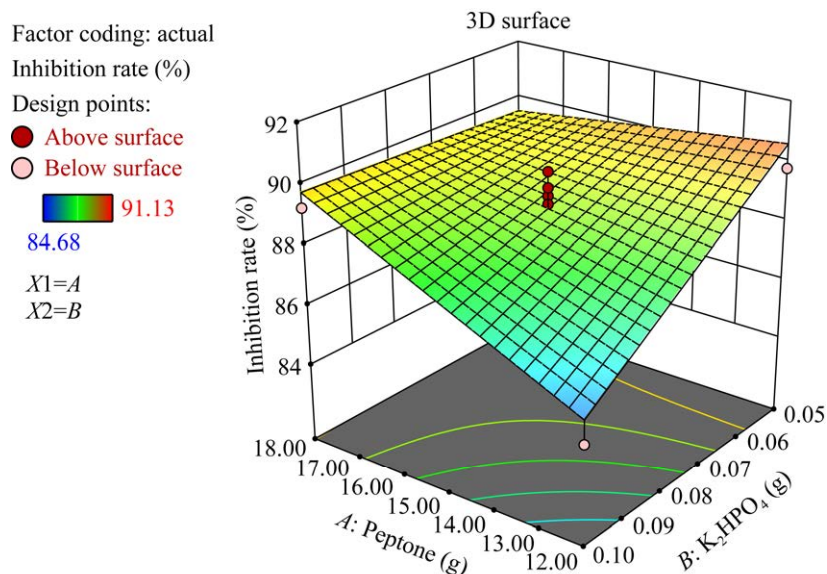
图 2 蛋白胨和 K₂HPO₄ 影响菌株 CC0955 发酵液抑菌率的响应面图

Figure 2 Response surface diagram of the effect of peptone and K₂HPO₄ on the inhibition rate of strain CC0955 fermentation broth.

表5 载体吸附能力和生物相容性

Table 5 Adsorption capacity and biocompatibility of carriers

Carriers	Adsorption capacity		Biocompatibility	
	Volume (L/kg)	Number of bacteria (10^9 cell/g)	Alive bacteria (CFU)	Biocompatibility (%)
Talc	1.10±0.20c	5.50	136	88.31
Diatomite	2.50±0.05b	12.50	122	79.22
Bentonite	3.75±0.15a	18.75	0	0.00
Silica	3.70±0.15a	18.50	145	94.16
Kaolin	0.95±0.05c	4.75	88	57.14
CK			154	

注：不同小写字母表示方差分析结果的邓肯氏新复极差检验在 0.05 水平上达到显著差异。下同

Note: Different lowercase letters mean that Duncan's new complex difference test of analysis of variance has significant difference at the level of 0.05. The same below.

2.2.2 泡腾颗粒组成的优化及制备

采用正交设计试验，优化了碱酸摩尔比(A)、白炭黑含量(B)和黄腐酸钾含量(C)三因素对泡腾颗粒崩解 pH 和活菌数的影响。以 pH 为指标条件下，因素 A 的极差最大($R=1.633$)，表明碱酸摩尔比对 pH 的影响最大；但以活菌数为指标条件下，因素 B 的极差最大($R=2.877$)，表明白炭黑对活菌数影响最大(表 6)。因素 B 和 C 在 K_3 水平上取得平均活菌数最大值，即选择 B3 (白炭黑)和 C3 (黄腐酸钾)可实现最大活菌数。虽然因素 A 在 K_1 水平下活菌数最多，但 pH 值最低，溶液过酸。综合考虑活菌数和 pH，选择 K_2 水平，即 $A_2=2$ ，最终获得各因素的最佳配比为 $A_2B_3C_3$ ，此配比下 1 kg 泡腾颗粒含： $C_6H_7O_7 \cdot H_2O$ 307.02 g、 $NaHCO_3$ 245.61 g、白炭黑 438.60 g 和黄腐酸钾 8.77 g。根据此配比，采用非水制粒法，成功制备含贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 菌株发酵液的泡腾颗粒。

2.3 泡腾颗粒的物理性质

泡腾颗粒外观为白色圆柱状颗粒(图 3)；泡腾颗粒的平均直径为 0.70 cm，平均高度为 0.77 cm，平均质量为 0.21 g，平均密度为 0.71 g/cm^3 ；室温下 1 g 泡腾颗粒在 99 mL 水中平均崩解时间为 61.00 s、溶液的 pH 值为 5.44；泡腾颗粒所含活

菌数为 6.05×10^8 CFU/g。室温下保存 6 个月，细菌数仍维持在同一数量级，为 3.55×10^8 CFU/g，存活率达 58.68%。

2.4 泡腾颗粒对 3 种植物病原菌的毒力回归曲线

采用检测菌丝生长速率的方法，获得了泡腾颗粒对 3 种植物病原菌的毒力回归曲线(图 4)，并据此求出泡腾颗粒对立枯丝核菌、姜茎腐霉菌和番茄灰霉病菌的 EC_{50} 分别为 27.65、34.49 和 41.50 mg/mL。

2.5 泡腾颗粒与发酵液的抗菌活性比较

采用检测菌丝生长速率的方法，比较了 CC0955 菌株发酵液与含等量发酵液的泡腾颗粒对病原真菌生长的抑制率差异，结果显示(图 5)，泡腾颗粒对立枯丝核菌和番茄灰霉菌的抑制作用与发酵液无显著差异，但对姜茎基腐霉的抑制作用显著低于发酵液。

2.6 泡腾颗粒对水稻纹枯病和番茄灰霉病的防治效果

用 30 倍稀释的 CC0955 泡腾颗粒溶液、发酵液和粉剂溶液分别处理感染了立枯丝核菌的水稻幼苗根部以及感染了灰葡萄孢的番茄叶面，分别调查水稻和番茄各植株的发病严重程度。结果显示(表 7)，泡腾颗粒对由立枯丝核菌

表 6 L₉(3³)正交设计方案与结果

Table 6 Scheme and results of L₉(3³) orthogonal design

Group	A Molar ratio of alkali to acid	B Silica (g)	C Potassium fulvic acid (g)	pH	Number of alive bacteria (×10 ⁸ CFU/g)
1	1	0.5	0.01	5.04	1.00
2	1	1.0	0.02	4.98	3.50
3	1	1.5	0.03	4.94	7.25
4	2	0.5	0.02	5.66	1.88
5	2	1.0	0.03	5.72	1.75
6	2	1.5	0.01	5.74	2.88
7	3	0.5	0.03	6.88	0.75
8	3	1.0	0.01	6.53	2.25
9	3	1.5	0.02	6.45	2.13
K ₁	4.987 (3.917)	5.860 (1.210)	5.770 (2.043)		
K ₂	5.707 (2.170)	5.743 (2.500)	5.697 (2.503)		
K ₃	6.620 (1.710)	5.710 (4.087)	5.847 (3.250)		
R ₁	1.633 (2.207)	0.150 (2.877)	0.150 (1.207)		

注: 括号外数据是以 pH 值为指标做的分析, 括号内数据是以活菌数为指标做的分析

Note: The data outside the bracket is the analysis with pH value as the index, and the data inside the bracket is the analysis with the number of alive bacteria as the index.

引起的水稻纹枯病的防效与发酵液和粉剂的防效无显著差异, 分别为 42.35%、45.63%和 39.08%, 但发酵液的防效则显著高于粉剂; 泡腾颗粒对由灰葡萄孢引起的番茄灰霉病的防效与发酵液和粉剂无显著差异, 分别为 57.62%、58.93%和 69.13%。

菌防效的重要手段, 常见的优化方式包括单因素试验、正交试验和响应面试验等^[23]。例如, 杨从军^[24]采用单因素试验与正交试验设计相结合的方法, 对 *Bacillus brevis* W4 菌株发酵培养基及培养条件进行了优化, 优化后的发酵液对

3 讨论与结论

优化发酵培养基及培养条件, 是提高生防

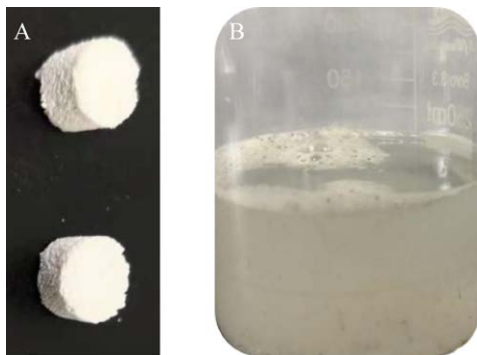


图 3 泡腾颗粒(A)和泡腾颗粒在水中的崩解(B)
Figure 3 Effervescent granules (A) and disintegration of effervescent granules in water (B).

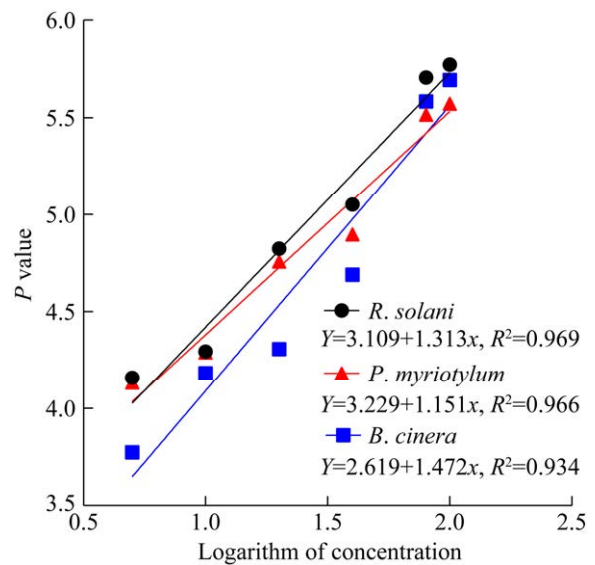


图 4 泡腾颗粒溶液对 3 种病原菌的毒力回归曲线
Figure 4 Toxicity regression curve of effervescent granule solution to three pathogens.

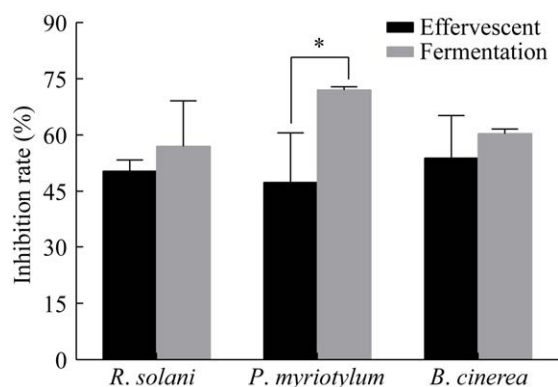


图5 泡腾颗粒与发酵液对植物病原菌的抑制率
Figure 5 Inhibition rate of effervescent granule and fermentation broth to phytopathogens. *: $P < 0.05$.

番茄灰霉病菌的抑制率较优化前提高了26.9%。刘京兰等^[12]利用响应面优化的方法,使 *Bacillus velezensis* CC09 菌株发酵产 iturin A 的能力较优化前提高了4.2倍,高达501.0 mg/L。本研究采用响应面优化方法,对CC09的抗利福平突变株CC0955进行了发酵培养基组成的优化,优化后的发酵液对立枯丝核菌的抑制率为89.78%,较优化前提高了38.67%,显著提升了该菌作为生防菌的应用潜力。

目前市面上的微生物农药多为悬浮剂^[25],而且大多直接利用微生物代谢产物或单独的微生物菌体为原料制备产品^[26],存在防效较差或较难保存运输等问题。泡腾剂是一种相对新颖

的剂型,在食品和中草药领域应用较多。郭慧玲等^[27]利用正交设计法优化了三黄泡腾片的处方,获得的泡腾片崩解迅速、口感良好。在农业领域,杀虫剂、除草剂和杀菌剂均有泡腾剂型^[8],但以除草剂为主^[28-29],目前尚缺乏生防菌泡腾剂型。鉴于泡腾剂具有环保、简便、易保存运输和使用等特点,市场应用前景广阔。本文研究制备的泡腾颗粒,完全利用了CC0955菌株的菌体及其发酵液中的活性成分,具有快速崩解、抗菌活性高和保存期长的特点,室温下保存6个月活菌存活率高达58.68%,高于Wiwattanapatapee等^[17]的结果,显示出一定的贮存优势。

CC0955菌株泡腾颗粒具有与发酵液相当的抗菌活性,但对姜茎基腐霉的抑制率显著低于发酵液(图5),这可能与姜茎基腐霉的生长对pH敏感有关^[30],泡腾颗粒偏酸,发酵液偏碱,碱性条件更不利于姜茎基腐霉的生长。然而,在实际应用中,无论泡腾颗粒还是发酵液都需要进行大量稀释,稀释后的pH接近中性,因此推测,在大田应用时,泡腾颗粒和发酵液对姜茎基腐霉所致病害的防治效果无显著差异。此外,泡腾颗粒对立枯丝核菌和番茄灰霉菌的抑制作用则与发酵液无显著差异,说明泡腾颗粒制备过程中基本保留了CC0955菌株发酵液的抗菌成分。

表7 CC0955剂型对水稻纹枯病和番茄灰霉病的防治效果

Table 7 Control effect of CC0955 formulation on rice sheath blight and tomato gray mold

Treatment group	Rice		Tomato	
	Disease index	Control effect (%)	Disease index	Control effect (%)
Negative control	0	0	0	0
Positive control	27.52±1.76a	0c	13.97±4.53a	0b
Fermentation	14.96±0.87b	45.63±3.89a	5.74±1.10b	58.93±7.85a
Powder	16.76±1.03b	39.08±4.60b	4.31±1.54b	69.13±11.00a
Effervescent	15.86±0.78b	42.35±3.45ab	5.92±2.45b	57.62±17.55a

近年来,随着国家对生态农业的高度重视,生防菌产品及其应用越来越受到关注^[31-32]。本研究以贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 菌株发酵液为有效成分研制的泡腾颗粒制剂,30 倍稀释液对由立枯丝核菌引起的水稻纹枯病以及由灰葡萄孢引起的番茄灰霉病有较好的防治效果,防效与 CC0955 发酵液无显著差异。作为一种新的生防菌剂型,该泡腾颗粒制剂具有重要的应用和推广价值。

由于白炭黑载体的吸附能力有限,限制了泡腾颗粒对发酵液的承载量,进而影响其防病效果。因此,今后可通过筛选吸附能力更强的载体或通过冷冻干燥^[16]等发酵液浓缩技术或添加麸皮和糖蜜等辅料^[33],提高泡腾颗粒对发酵液的吸附量,进一步提升泡腾颗粒的防病效果及贮存时间。此外,有必要开展大田试验,进一步验证 CC0955 菌株泡腾颗粒的防病效果及其优越性。

REFERENCES

- [1] 王以燕,袁善奎,农向群,李梅. 我国微生物农药常见剂型种类及管理[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 640-645
Wang YY, Yuan SK, Nong XQ, Li M. Main types and management of common formulations of microbial pesticides in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 640-645 (in Chinese)
- [2] Melin P, Håkansson S, Schnürer J. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73(5): 1008-1016
- [3] Pengnoo A, Kusonwiriawong C, Nilratana L, Kanjanamaneesathian M. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*[J]. BioControl, 2000, 45(2): 245-256
- [4] 曲中原,朱室儒,姜雪,邹翔,王欣晨,吴双,李文兰. 五味子泡腾片的制备工艺及质量评价[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(6): 99-105
Qu ZY, Zhu SR, Jiang X, Zou X, Wang XC, Wu S, Li WL. Preparation technology and quality evaluation of *Schisandra chinensis* effervescent tablets[J]. Food Research and Development, 2020, 41(6): 99-105 (in Chinese)
- [5] 王文宝,杨俊涛,杜利月,金少举,段少峰. 香菇多糖泡腾片制备工艺[J]. 食品工业, 2020, 41(12): 20-23
Wang WB, Yang JT, Du LY, Jin SJ, Duan SF. The preparation of lentinan effervescent tablets[J]. The Food Industry, 2020, 41(12): 20-23 (in Chinese)
- [6] 冯翔,王文凯,徐志红. 1%精噁唑禾草灵泡腾片剂的研制及其除草活性[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(4): 44-47
Feng X, Wang WK, Xu ZH. Preparation and herbicidal activity of 1% fenoxaprop-p-ethyl EB[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(4): 44-47 (in Chinese)
- [7] 化全县,胡斌,汤建伟,刘咏,王立锁. 泡腾颗粒药肥中除草剂的释放特性[J]. 科技导报, 2011, 29(26): 30-33
Hua QX, Hu B, Tang JW, Liu Y, Wang LS. Release kinetics of herbicide in fertilizer-herbicide granules with effervescent characteristics[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(26): 30-33 (in Chinese)
- [8] 华乃震. 农药泡腾剂的加工和应用[J]. 世界农药, 2015, 37(2): 37-42
Hua NZ. Processing and application of pesticides effervescent formulations[J]. World Pesticides, 2015, 37(2): 37-42 (in Chinese)
- [9] 刘旺,袁树忠,张省委,王荣,冯建国. 国内农药泡腾剂的应用研究概况[J]. 农药, 2019, 58(1): 16-20
Liu W, Yuan SZ, Zhang SW, Wang R, Feng JG. Application research of pesticides effervescent formulations[J]. Agrochemicals, 2019, 58(1): 16-20 (in Chinese)
- [10] Cai XC, Xi H, Liang L, Liu JD, Liu CH, Xue YR, Yu XY. Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 178
- [11] 杨新玲. 农药制剂加工技术[J]. 农药学报, 2015, 17(5): 615
Yang XL. Pesticide preparation processing technology[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2015, 17(5): 615 (in Chinese)
- [12] 刘京兰,蔡勋超,薛雅蓉,刘常宏,余向阳. 生防解淀粉芽孢杆菌 CC09 合成 iturin A 条件的响应面优化[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 235-243
Liu JL, Cai XC, Xue YR, Liu CH, Yu XY. Optimization of iturin A synthesis by *Bacillus*

- amyloliquefaciens* CC09 using response surface technique[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 235-243 (in Chinese)
- [13] 蔡勋超, 刘佳栋, 高旭, 王保通, 刘常宏. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 可湿性粉剂的研制[J]. 现代农药, 2015, 14(6): 8-12, 20
Cai XC, Liu JD, Gao X, Wang BT, Liu CH. Preparation of endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 WP[J]. Modern Agrochemicals, 2015, 14(6): 8-12, 20 (in Chinese)
- [14] Liu ZB, Sun XM, Liang TT, Luo Y, Chen XY, Li T, Chen L, Wang JJ, Lin Y, Ye Y, et al. Preparation and characterization of the biological compound effervescent granule of calcium acetate[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 20(11): 934-944
- [15] Aslani A, Sharifian T. Formulation, characterization and physicochemical evaluation of amoxicillin effervescent tablets[J]. Advanced Biomedical Research, 2014, 3: 209
- [16] 乔宏兴, 何金环, 史洪涛, 赵圣振, 姜亚乐, 边传周. 黄芪-枯草芽孢杆菌泡腾颗粒的制备及在保育猪上的应用[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(11): 1809-1813
Qiao HX, He JH, Shi HT, Zhao SZ, Jiang YL, Bian CZ. Preparation and application of astragalus-*Bacillus subtilis* effervescent granules in nursery pigs[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(11): 1809-1813 (in Chinese)
- [17] Wiwattanapatapee R, Chumthong A, Pengnoo A, Kanjanamaneesathian M. Effervescent fast-disintegrating bacterial formulation for biological control of rice sheath blight[J]. Journal of Controlled Release, 2007, 119(2): 229-235
- [18] 赵志祥, 陈圆, 肖敏, 肖彤斌, 陈绵才. 几种杀菌剂对薯蓣茎腐病菌的室内毒力测定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(S1): 67-69, 73
Zhao ZX, Chen Y, Xiao M, Xiao TB, Chen MC. Ndoor toxicity of several fungicides against stem rot of *Dioscorea Zingiberensis*[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2013, 39(S1): 67-69, 73 (in Chinese)
- [19] 程根武, 刘赢, 祁之秋, 纪明山. 噬菌酯对几种植物病原真菌的室内活性测定[J]. 农药, 2005, 44(4): 190-191
Cheng GW, Liu Y, Qi ZQ, Ji MS. Activity of azoxystrobin on several plant pathogenic fungi[J]. Pesticides, 2005, 44(4): 190-191 (in Chinese)
- [20] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 水稻纹枯病菌人工接种方法的研究[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2003, 2(3): 224-227
Yi RH, Zhu XR, Zhou EX. On the evaluation of different methods by artificially inoculating with rice sheath blight fungus (*Rhizoctonia solani*)[J]. Journal of Guangzhou University: Natural Science Edition, 2003, 2(3): 224-227 (in Chinese)
- [21] 郑少兵, 孙正祥, 徐梦亚. 解淀粉芽孢杆菌 YU-1 对水稻纹枯病的防治作用[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 275-281
Zheng SB, Sun ZX, Xu MY. Control effect of *Bacillus amyloliquefaciens* YU-1 on rice sheath blight[J]. Plant Protection, 2020, 46(4): 275-281 (in Chinese)
- [22] 周小江, 马湘君, 张久明, 李闯, 田黎. 两株海洋极端生境微生物防治番茄灰霉及促进抗盐抗寒作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 244-250
Zhou XJ, Ma XJ, Zhang JM, Li C, Tian L. Effects of two marine microorganisms on tomato leaf mold and their resistance to salt and cold[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 244-250 (in Chinese)
- [23] 李书颖, 朱天辉. 响应面法优化杜仲黑斑病菌生防芽孢杆菌的发酵参数[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 133-141
Li SY, Zhu TH. Optimization of fermentation parameters of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Pestalotiopsis trachicarpicola* by using response surface methodology[J]. Plant Protection, 2020, 46(5): 133-141 (in Chinese)
- [24] 杨从军. 抗番茄灰霉病菌的内生短芽孢杆菌 W4 菌株发酵条件优化[J]. 中国蔬菜, 2019(6): 64-69
Yang CJ. Optimizing fermentation condition for endophytic *Brevibacillus brevis* W4 strain against tomato *Botrytis cinerea*[J]. China Vegetables, 2019(6): 64-69 (in Chinese)
- [25] 明亮, 陈志谊, 储西平, 刘永锋. 生物农药剂型研究进展[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 125-128
Ming L, Chen ZY, Chu XP, Liu YF. Research progress of bio-pesticides dosage forms[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(9): 125-128 (in Chinese)
- [26] 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
Qiu DW. Research progress and prospect of bio-pesticides[J]. Plant Protection, 2013, 39(5): 81-89 (in Chinese)
- [27] 郭慧玲, 向竹枝, 胡律江, 金鑫, 赵晓娟, 谢颖. 正交设计法优选三黄泡腾片处方[J]. 江西中医药, 2011, 42(11): 44-45
Guo HL, Xiang ZZ, Hu LJ, Jin X, Zhao XJ, Xie Y. Optimization of prescription of Sanhuang effervescent

- tablets by orthogonal design[J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2011, 42(11): 44-45 (in Chinese)
- [28] 邓秀成. 27%苯噻酰草胺·吡嘧磺隆泡腾片防除水稻移栽田杂草试验[J]. 现代化农业, 2017(12): 14-15
Deng XC. Control of weeds in rice transplanting field with 27% phenoxychlor-pyrazosulfuron effervescent tablets[J]. Modernizing Agriculture, 2017(12): 14-15 (in Chinese)
- [29] 蒋希峰. 新型泡腾片剂除草剂对水稻移栽田杂草的防效[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(24): 130-131, 135
Jiang XF. Control effect of new effervescent tablet herbicide on weeds in rice transplanting field[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(24): 130-131, 135 (in Chinese)
- [30] 曾婷英. 福建省4种新的烟草病害诊断及其病原学研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2014
Zeng TY. Etiology and diagnosis of four new tobacco diseases in Fujian, China[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2014 (in Chinese)
- [31] Jamali H, Sharma A, Roohi, Srivastava AK. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(3): 268-280
- [32] Chaudhary S, Sagar S, Lal M, Tomar A, Kumar V, Kumar M. Biocontrol and growth enhancement potential of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease in rice[J]. Journal of Environmental Biology, 2020, 41(5): 1034-1045
- [33] 蒋建东, 李荣, 陈凯, 倪斌, 李顺鹏. 多功能农药降解基因工程菌剂保藏条件研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(4): 1686-1691
Jiang JD, Li R, Chen K, Ni B, Li SP. Study on the conservation of multifunctional pesticides-degrading genetically engineered microorganisms[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(4): 1686-1691 (in Chinese)