

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.05.008

邬伊萍, 王静文, 张亚轩, 等. 短梗木霉与芽孢杆菌固体共培养物 WP 剂型研制 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(5): 90-102.

短梗木霉与芽孢杆菌固体共培养物 WP 剂型研制

邬伊萍¹, 王静文¹, 张亚轩¹, 刘铜^{1,2}

1. 海南大学 热带农林学院/热带有害生物防控教育部重点实验室, 海南 儋州 571737;

2. 海南大学 南繁学院, 海南 三亚 572020

摘要: 以对植物具有促生作用兼具防病作用的短梗木霉 *Trichoderma breve* LN006 和亲和贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* ZJ 为功能菌株, 经过固体共培养发酵、粉碎, 并与助剂混匀制备成一种灰色粉状制剂, 通过对载体、润湿剂、分散剂、保护剂的筛选, 确定了木霉与芽孢杆菌共培养物可湿性粉剂(WP)的最佳配方, 并测定其施用对水稻纹枯病的影响。结果表明: 共发酵产物中木霉活孢子数为 7.51×10^9 CFU/g, 芽孢活菌量为 9.22×10^9 CFU/g。可湿性粉剂最佳配方为: 菌粉 20%、吐温-20 5%、羧甲基纤维素钠 8%、卵磷脂 0.4%、白炭黑 66.6%。该配方湿润时间为 41.72 s, 悬浮率为 87.79%, pH 值为 7.11, 200 目筛的通过率为 95.77%, 木霉活孢子数为 1.45×10^9 CFU/g, 芽孢活菌量为 1.78×10^9 CFU/g。起泡性为 14 mL, 符合国标要求。WP 在盆栽试验中对于水稻纹枯病的防效为 65.12%, 对照药剂井冈霉素为 72.09%, 两者间差异无统计学意义。萌发试验表明: WP 处理水稻株高及根长与对照相比分别提高了 18.67% 和 10.47%。综合表明: *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 可防控水稻纹枯病。

关键词: 木霉; 芽孢杆菌; 亲和菌株; 共培养; 剂型

中图分类号: TQ450.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2025)05-0090-13

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Preparation of Wettable Powder for Solid Co-Culture of *Trichoderma breve* LN006 and *Bacillus velezensis* ZJ

WU Yiping¹, WANG Jingwen¹, ZHANG Yaxuan¹, LIU Tong^{1,2}

1. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Diseases and Pests of Ministry of Education / School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou Hainan 571737, China;

2. School of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya Hainan 572020, China

Abstract: *Trichoderma breve* LN006, which has a growth-promoting effect and disease prevention effect on

收稿日期: 2024-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060609, 32472639); 海南大学协同创新中心科研项目(XTCX2022NYB12)。

作者简介: 邬伊萍, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

通信作者: 刘铜, 博士, 教授。

plants, and *Bacillus velezensis* ZJ were used as functional strains to prepare a wettable powder (WP) by solid co-culture, grinding, and mixing with carriers and dispersants. The effect of its application on rice sheath blight was measured. The results showed that the number of spores of *Trichoderma* in the co-culture products was 7.51×10^9 CFU/g, and the number of bacterium was 9.22×10^9 CFU/g, and the optimal formula of wettable powder was as follows: 20% product of co-culture, 66.6% hydrated silica, 5% Tween-20, 8% sodium carboxymethylcellulose and 0.4% lecithin. The wetting time of the formula was 41.72 s, the suspension rate was 87.79%, the pH value was 7.11, the pass rate of 200 mesh sieve was 95.77%, the number of live spores of *Trichoderma* was 1.45×10^9 CFU/g, and the number of live bacterium was 1.78×10^9 CFU/g. The foaming property is 14 mL, which meets the requirements of the national standard. There was no significant difference in control effect on rice sheath blight between WP (65.12%) and control agent Jinggangmycin (72.09%). The germination test showed that the plant height and root length of WP treated rice were increased by 18.67% and 10.47% compared with the control, respectively. *T. breve* LN006-*B. velezensis* ZJ WP provides a new way for green and sustainable prevention and control of rice sheath blight.

Key words: *Trichoderma breve*; *Bacillus velezensis*; compatible strains; co-culture; wettable powder

水稻纹枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的土传真菌病害,在秧苗期至穗期均可发生,可造成严重减产。目前海南在生产上对于水稻纹枯病主要采用化学农药、微生物源农药井冈霉素及活体微生物农药蜡质芽孢杆菌等进行防治。木霉^[1-2]、芽孢杆菌^[3]等生防菌株对水稻纹枯病有较好的防效,两者组合作为生防菌剂的应用潜力大^[4],将其共培养成复合微生物菌剂防治水稻纹枯病值得探索。

芽孢杆菌类生防菌能拮抗大部分真菌,但有些木霉菌与芽孢杆菌菌株能亲和共培养成复合菌群,且防效提高^[5]。一些木霉复合菌剂比单一微生物对植物的促生和控制病害的效果更好^[6]。木霉与芽孢杆菌共培养后可诱导木霉菌产生拮抗和促生物质、免疫性物质、生长调控物等,对小麦赤霉病的防效高于两种菌分别培养再组合的发酵产物,且有增产作用^[7]。棘孢木霉 HG1 与枯草芽孢杆菌 tpb55 通过固态共培养发酵得到新代谢产物 harziandione,对烟草病害防效提高^[8]。木霉 PT-29 与枯草芽孢杆菌 S-16 液体共发酵,对马铃薯枯萎病的防效达到 73.44%,高于单一菌株发酵产物的防效^[9]。

可湿性粉剂(WP)是商品微生物农药中的主要剂型。从实验室保存的菌种中,筛选出 1 株对稻瘟病菌及纹枯病菌抑菌强、生长快且产孢多的 LN006 菌株,从分子水平鉴定其为短梗木霉 *Trichoderma breve*; 1 株对稻瘟病菌抑菌强、中等抑制纹枯病菌、白叶枯病菌且对水稻有促生效果的细菌 ZJ 菌株,鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis*。本研究采用固体共培养技术发酵生产 *T. breve* LN006 孢子和 *B. velezensis* ZJ 菌体及代谢产物组成的复合菌粉,辅以载体和润湿剂等辅剂,粉碎并混合成 WP。通过测定不同种类及配比助剂的性能指标及与二菌之间的生物相容性,进行单因素优化试验,确定可湿性粉剂的组成,并验证其对水稻纹枯病的防病效果,为生产开发及田间应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌株: *T. breve* LN006、*B. velezensis* ZJ、水稻纹枯病原菌 Hn-rs1 由海南大学热带农林学院海南省绿色农用生物制剂创制工程研究中心分离保存。水稻种子: 华浙优 210, 浙江勿忘农种业股份有限公司。固体 PDA 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL); 液体 PDB 培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL); 液体 LB 培养基(10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g 氯化钠, 蒸馏水 1 000 mL); 固体 LB 培养基(10 g 蛋白胨, 5 g 酵母粉, 10 g 氯化钠, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL)。木

霉—芽孢固体共发酵基质: 稻壳 40 g, 玉米粉 40 g, 麦麸 20 g, 水 40 mL, 121 ℃ 高温灭菌 20 min。载体: 硅藻土、膨润土, 天津市众联化学试剂有限公司; 高岭土, 河南恒源新材料有限公司; 滑石粉, 福晨(天津)化学试剂有限公司; 白炭黑, 山东优索化工科技有限公司。润湿剂: 十二烷基苯磺酸钠、十二烷基硫酸钠、拉开粉、吐温-20, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 吐温-80, 西陇科学股份有限公司。分散剂: 羧甲基纤维素钠, 广东新如荣生物科技有限公司; 木质素磺酸钙、聚乙烯醇, 上海麦克林生化科技股份有限公司; BB4, 禾大化学品(上海)有限公司; 皂角粉, 市售散装。紫外保护剂: 维生素 C, 石药集团维生药业有限公司; 氧化锌, 凯邦生物科技有限公司; 卵磷脂, 河南嘉派生物科技有限公司; 荧光素钠, 天津登峰化学试剂厂; 黄原胶, 广东新如荣生物科技有限公司。药剂: 4% 井冈霉素水剂, 桐庐汇丰生物科技有限公司。

1.2 木霉孢子、芽孢杆菌悬浮液以及水稻纹枯病菌悬液的制备

将 *T. breve* LN006 转接于 PDA 培养基上活化, 28 ℃ 培养, 4 d 大量产孢, 无菌水冲洗孢子, 并稀释为 1×10^7 CFU/mL 的种子液备用。在 LB 固体培养基上用枪头划取 *B. velezensis* ZJ 菌体并打入液体 LB 培养基中, 37 ℃, 180 r/min 培养 2 d 后备用。在 PDA 固体培养基上用直径 6 mm 的打孔器取水稻纹枯病菌菌丝块并打入液体 PDB 培养基中, 28 ℃, 180 r/min 培养 7 d 后备用。

1.3 木霉—芽孢共培养验证及菌粉的制备

T. breve LN006 和 *B. velezensis* ZJ 在 PDA 平板上同时接种并进行对峙培养, 观察两菌株共培养时的相容性。将 *T. breve* LN006 孢子悬浮液按照 4% 的接种量加入含木霉—芽孢固体共发酵基质的组培瓶中, 于 28 ℃ 恒温培养箱中静置培养 2 d 后, 加入 2% 接种量的 *B. velezensis* ZJ 种子液, 混匀, 28 ℃ 共培养 5 d。

发酵后的产物晾干后, 用粉碎机粉碎 5 s, 共粉碎 2 次, 2 次粉碎间隔为 5 min; 之后将其过 200 目筛, 得到菌粉备用。称取 50 mg 菌粉, 用 0.1% 的吐温-80 将其均匀分散, 用血球计数板测量^[10]孢子与菌体浓度, 重复 3 次。

1.4 载体的筛选

1.4.1 载体对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

将 5 种载体分别与融化后的 PDA、LB 培养基混合, 载体在培养基中的浓度为 1 000 μg/mL, 灭菌后制成平板。直径 6 mm 的打孔器取 *T. breve* LN006 菌丝块, 接种到含不同载体的 PDA 平板上, 3 个重复, 采用十字交叉法, 以 PDA 培养基为对照, 分别在第 1、2、3 d 后测量各个菌落的直径, 计算菌丝生长速率、抑菌率^[11]。将芽孢稀释到 10^{-5} 涂布接种到上述含不同载体的 LB 平板中, 在 37 ℃ 培养箱中倒置培养, 每种平板 3 个重复, 计算菌落数, 以 LB 固体培养基为对照, 计算抑菌率^[12]。选择出对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 影响较小的载体。

木霉菌菌丝生长速率($R_{\text{生长}}$)、抑菌率($R_{\text{抑菌}}$)的计算公式:

$$R_{\text{生长}} = \frac{D_{\text{最后}} - D_{\text{最初}}}{T_{\text{菌落}}} \quad (1)$$

$$R_{\text{抑菌}} = \frac{D_{\text{对照}} - D_{\text{处理}}}{D_{\text{对照}} - 0.6} \times 100\% \quad (2)$$

$$R_{\text{芽孢}} = \frac{N_{\text{对照}} - N_{\text{处理}}}{N_{\text{对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $D_{\text{最后}}$ 为最后菌落直径; $D_{\text{最初}}$ 为最初菌落直径; $T_{\text{菌落}}$ 为菌落生长天数; $D_{\text{对照}}$ 为对照菌落直径; $D_{\text{处理}}$ 为处理菌落直径; $R_{\text{芽孢}}$ 为芽孢杆菌抑菌率; $N_{\text{对照}}$ 为对照菌落数; $N_{\text{处理}}$ 为处理菌落数。

1.4.2 载体润湿时间与悬浮率测定

载体润湿时间的测定: 采用《农药可湿性粉剂润湿性测定方法》(GB/T 5451—2001)^[13]的方法进行测定, 记录每处理的润湿时间, 设置 3 次重复。

载体悬浮率的测定: 参照《农药悬浮率测定方法》(GB/T 14825—2023)^[14] 的方法进行测定, 记录每处理的悬浮率, 设置 3 次重复。

1.4.3 载体对孢子—菌体悬浮液的吸附作用

称取硅藻土、高岭土、白炭黑、滑石粉、膨润土各 2 g, 放入洁净的烧杯中, 使用胶头滴管将浓度为 1.0×10^6 CFU/mL 的木霉—芽孢孢子—菌体悬浮液逐滴加入不同的载体中, 用玻璃棒搅拌至载体聚成一团, 再称量吸附分生孢子浆后的总体质量, 并计算载体对孢子—菌体悬浮液的吸附率, 每个处理 3 次重复, 选择出吸附率较高的载体, 按公式计算载体吸附率(q)^[15]:

$$q = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \quad (4)$$

式中: m_1 为吸附分生孢子浆后载体的质量(g); m_0 为吸附前吸附材料的质量(g)。

1.5 润湿剂的筛选

1.5.1 润湿剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

试验方法参照 1.4.1。

1.5.2 润湿剂的湿润性能测定

将十二烷基硫酸钠、甲基纤维素、十二烷基苯磺酸钠、拉开粉、吐温-80、吐温-20 分别按照 3% 的比例、木霉—芽孢菌粉 20% 的比例加入白炭黑中, 混合均匀。参考 GB/T 5451-2001^[13] 的方法进行不同润湿剂润湿时间的测定, 每个处理 3 次重复, 记录润湿时间, 选出湿润性能较好的润湿剂。

1.6 分散剂的筛选

1.6.1 分散剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

试验方法参照 1.4.1。

1.6.2 分散剂的分散指数测定

取不同分散剂 250 μ g/mL, 配成含药 PDB 培养基, 用移液枪移取 10 mL 浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的木霉孢子—芽孢菌体悬浮液, 加入含有不同分散剂的 150 mL 母液中, 空白对照为不加任何分散剂的 PDB 培养基, 同样加入 10 mL 相同浓度的孢子悬浮液, 摇匀后静置, 经过 0、4、8 h 分别用移液枪从悬浮液上、中、下层取样, 采用血球计数法测量孢子浓度, 计算不同分散剂的分散指数^[8], 选择出分散效果较好的分散剂。按公式计算分散剂的分散指数($I_{\text{分散}}$):

$$I_{\text{分散}} = 2\sigma/\bar{A} \quad (5)$$

式中: σ 为标准差; $\bar{A}$ 为样本平均数。

1.7 紫外保护剂的筛选

1.7.1 紫外保护剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

试验方法参照 1.4.1。

1.7.2 紫外保护剂的保护效能指数测定

取不同紫外保护剂 1 000 μ g/mL, 分别配置含紫外保护剂的木霉孢子悬浮液和芽孢菌液, 木霉孢子悬浮液浓度稀释至 1.0×10^3 CFU/mL, 芽孢菌液稀释到 10^{-5} 。分别均匀涂布于 PDA 培养基平板上, 参照文献^[16]中设定的紫外处理方法, 36 h 后分别观察萌发形成的木霉孢子以及芽孢菌落数, 以不加紫外保护剂、不经紫外灯照射的为对照 1, 计算理论活菌率; 以不加紫外保护剂、经紫外灯照射的为对照 2, 计算残存活菌率)。选择出保护效能较高的紫外保护剂, 保护效能指数($I_{\text{保护}}$)计算公式:

$$I_{\text{保护}} = (R_{\text{照射后}} - R_{\text{残存}})/(R_{\text{理论}} - R_{\text{残存}}) \quad (6)$$

式中: $R_{\text{照射后}}$ 为照射后活菌率; $R_{\text{残存}}$ 为残存活菌率; $R_{\text{理论}}$ 为理论活菌率。

1.8 可湿性粉剂(WP)助剂成分比例的优化

完成单因素筛选后, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案(表 1, 表 2), 以 5 g 为基数, 木霉—芽孢菌粉、吐

温-20、羧甲基纤维素钠、卵磷脂作为试验因素，其余用最佳载体白炭黑补足至 100%。不同试验因素按常用质量分数设计 3 个水平，进行 4 因素 3 水平的正交试验。通过正交试验设计出各因素水平的组合方案，以润湿时间和悬浮率作为测定指标，每个处理 3 次重复，选择出 WP 的最佳助剂成分比例。

表 1 助剂成分比例筛选的因素水平表 %

水平	A 菌粉	B 吐温-20	C 羧甲基纤维素钠	D 卵磷脂
1	10	1	5	0.2
2	15	3	8	0.3
3	20	5	11	0.4

表 2 助剂成分比例筛选的 4 因素 3 水平正交表

处理	A 菌粉/%	B 吐温-20/%	C 羧甲基纤维素钠/%	D 卵磷脂/%	处理组合
1	10	1	5	0.2	A1B1C1D1
2	10	3	8	0.3	A1B2C2D2
3	10	5	11	0.4	A1B3C3D3
4	15	1	8	0.4	A2B1C2D3
5	15	3	11	0.2	A2B2C3D1
6	15	5	5	0.3	A2B2C3D1
7	20	1	11	0.3	A3B1C3D2
8	20	3	5	0.4	A3B2C1D3
9	20	5	8	0.2	A3B3C2D1

1.9 可湿性粉剂的质量检测

根据 GB/T 5451—2001^[13]、GB/T 14825—2023^[14]、《农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法》(GB/T 16150—1995)^[17]、《农药 pH 值的测定方法》(GB/T 1601—2023)^[18]、《农药持久起泡性测定方法》(GB/T 28137—2011)^[19]的要求对木霉—芽孢 WP 的悬浮率、润湿时间、样品细度、pH 值、起泡性等进行检测；并将可湿性粉剂溶于无菌水中，取 100 μL 合适稀释倍数的溶液涂平板检测活孢子数。

1.10 可湿性粉剂对水稻幼芽的促生及防病效果

测试方法参考文献[20]，略作改动。取 1 g WP，无菌水稀释至 50 mL；选取刚发芽的种子，保持 5 mm 左右间距放入铺有湿润滤纸的培养皿中，共分为 1 个对照组和 3 个试验组，9 颗种子为 1 组。对照组接种无菌水，试验组分别接种 1 mL 可湿性粉剂 WP 稀释液、0.5 mL 的纹枯菌悬液和 0.5 mL 无菌水、0.5 mL 的纹枯菌悬液和 0.5 mL 可湿性粉剂稀释液。室温培养 14 d 后观察并测量株高及根长，重复 3 次。

1.11 室内盆栽防效测定

称取 1 g WP 加入 100 mL 无菌水中，配制成浓度为 0.01 g/mL 的溶液，备用。将出芽一致的水稻种子播种至装有无菌泥土、高 25 cm、长 16 cm、宽 16 cm 的塑料盆中，置于温度 30 ℃、相对湿度 90% 的温室中培养，待秧苗长至分蘖期时，在 PDA 平板上培养 2 d 的水稻纹枯病菌边缘取直径为 6 mm 的菌饼，将其用昆虫针固定接种到水稻基部以及叶部^[21]，2 d 后分别用 0.01 g/mL 木霉—芽孢可湿性粉剂、4%井冈霉素 300 倍液、清水喷施水稻苗，直到叶片向下滴水为止。共设 3 个处理，每个处理 3 株，重复 3 次。药后 14 d 按照《农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治水稻纹枯病》(GB/T 17980.20—2000)^[22]中的方法记录病害严重度，计算病指与防效。

1.12 统计学分析

数据使用 Excel 2019 和 SPSS 27.0 软件进行相关分析，采用沃勒—邓肯法比较不同处理间的差异显著

性($p<0.05$), 对正交试验进行极差分析和方差分析。

2 结果与分析

2.1 木霉—芽孢共培养验证及菌粉的制备

T. breve LN006 和 *B. velezensis* ZJ 在 PDA 平板上对峙培养显示, 木霉与芽孢杆菌可以亲和共培养(图 1)。在固体培养基上共培养结果显示, 木霉产孢速度快, 3 d 时产生大量孢子; 7 d 后烘干、粉碎并过 200 目筛后, 其木霉孢子数为 7.51×10^9 CFU/g, 芽孢活菌量为 9.22×10^9 CFU/g(图 2)。

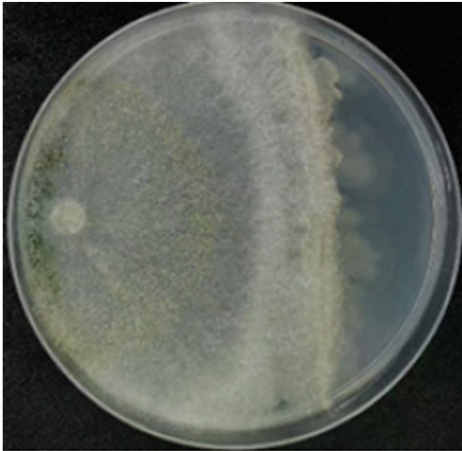


图 1 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ
平板对峙



图 2 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ
固体培养基共培养效果

2.2 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 共培养载体的筛选

2.2.1 载体对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

载体对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 菌丝生长的影响如表 3。*T. breve* LN006 在不同的载体培养基上生长 2 d 后, 除滑石粉外其余 4 种载体均不抑制菌丝生长。*B. velezensis* ZJ 在不同的载体培养基上生长 2 d 后, 高岭土、滑石粉抑制生长, 膨润土、白炭黑、硅藻土对菌落生长有促进作用。

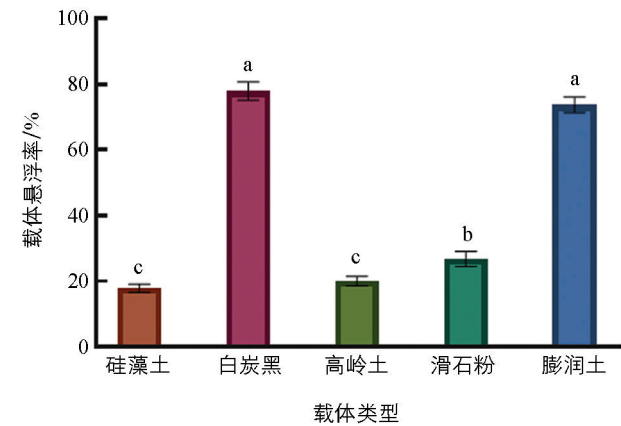
表 3 载体对 *T. breve* LN006 菌丝生长速率及 *B. velezensis* ZJ 菌落数的影响(2 d)

载体种类	菌落直径/ cm	菌丝生长速率/ ($\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$)	<i>T. breve</i> LN006 抑菌率/%	菌落数/ 个	<i>B. velezensis</i> ZJ 抑菌率/%
硅藻土	$5.24\pm0.15\text{a}$	3.13	—3.49	$2\,581.33\pm51.36\text{a}$	—9.94
白炭黑	$5.15\pm0.07\text{a}$	3.07	—1.64	$2\,672.33\pm98.18\text{a}$	—13.81
高岭土	$5.32\pm0.09\text{a}$	3.16	—4.93	$2\,245.67\pm33.42\text{ab}$	4.36
滑石粉	$3.98\pm0.15\text{b}$	2.20	21.38	$1\,974.00\pm306.56\text{b}$	15.93
膨润土	$5.07\pm0.14\text{a}$	2.93	0	$2\,572.33\pm59.04\text{a}$	—9.55
CK	$5.07\pm0.07\text{a}$	2.92	—	$2\,348.00\pm86.75\text{ab}$	—

注: 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

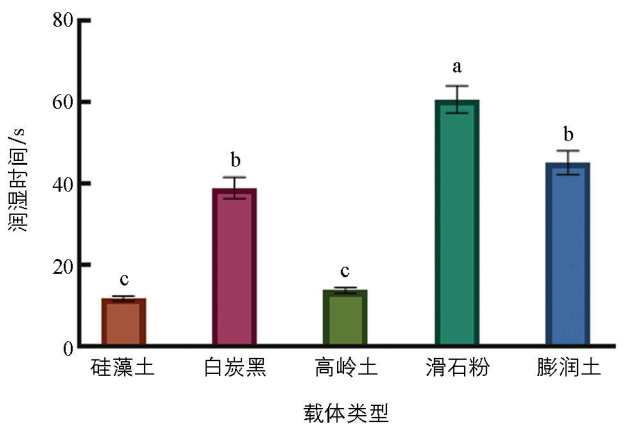
2.2.2 载体润湿时间与悬浮率测定

载体的悬浮率越高, 润湿时间越短, 载体的性能越好。5 种供试载体中, 白炭黑的悬浮率最高, 为 77.86%, 高于其他筛选载体(图 3)。润湿时间最短的是硅藻土, 为 11.76 s(图 4), 其他载体润湿时间由短到长依次为: 高岭土(13.78 s)、白炭黑(38.94 s)、膨润土(45.09 s)、滑石粉(60.71 s)。综合分析得出, 白炭黑和膨润土的性能较好。



小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

图 3 不同载体悬浮率



小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

图 4 不同载体润湿时间

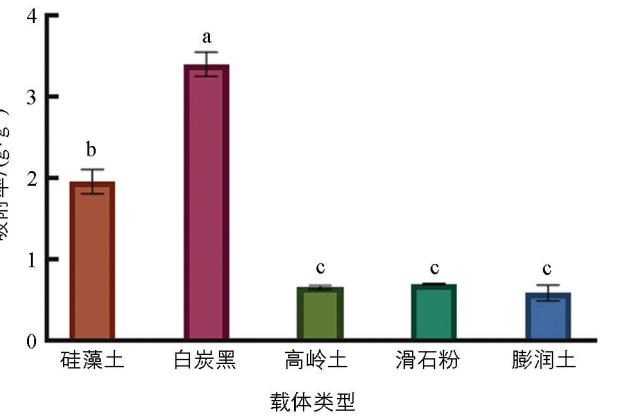
2.2.3 载体对木霉—芽孢菌体悬浮液的吸附作用

5 种载体对木霉—芽孢菌体悬浮液都具有一定的吸附力。白炭黑吸附率最高, 为 3.40, 且与其余 4 种载体相比差异有统计学意义, 证明白炭黑的吸附力最强; 其次是硅藻土, 为 1.95; 吸附率最低的是膨润土, 为 0.59(图 5)。综合分析得出, 硅藻土和白炭黑的吸附率较高、吸附力较强。结合前期的试验结果, 选择白炭黑作为 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 的最佳载体。

2.3 润湿剂的筛选

2.3.1 润湿剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

结果如表 4, *T. breve* LN006 在不同的含药培养基上生长 2 d 后, 十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、拉开粉对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 抑制率为 100%, 吐温-80 可促进 *T. breve* LN006 菌丝的生长但强烈抑制 *B. velezensis* ZJ 菌落的形成。甲基纤维素、吐温-20 对 *B. velezensis* ZJ 生长影响小, 与对照差异无统计学意义; 对 *T. breve* LN006 的生长有中等程度的抑制作用, 但木霉菌丝仍可在 5 d 内长满平板。



小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

图 5 载体吸附率

表 4 润湿剂对 *T. breve* LN006 菌丝生长速率及 *B. velezensis* ZJ 菌落数的影响(2 d)

润湿剂种类	菌落直径/ cm	菌丝生长速率/ (cm · d ⁻¹)	<i>T. breve</i> LN006 抑菌率/%	菌落数/ 个	<i>B. velezensis</i> ZJ 抑菌率/%
十二烷基硫酸钠	0	0	100	0	100
十二烷基苯磺酸钠	0	0	100	0	100
拉开粉	0	0	100	0	100
甲基纤维素	3.46±0.15c	1.73	23.82	1 620.33±136.32a	3.13
吐温-20	2.99±0.09c	1.50	35.90	1 598.33±81.25a	4.44
吐温-80	6.36±0.23a	3.18	—50.64	446.67±43.33b	73.30
CK	4.39±0.40b	2.19	0	1 672.67±585.10a	—

注: 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

2.3.2 润湿剂的湿润性能测定结果

润湿剂的润湿时间越短，湿润性能越好。吐温-20 的润湿时间最短，为 36 s；十二烷基苯磺酸钠的润湿时间最长，为 52.23 s(图 6)。结果显示，吐温-20 和吐温-80 的湿润性能相对较好，结合前期的试验结果，选择吐温-20 作为 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 的最佳润湿剂。

2.4 分散剂的筛选

2.4.1 分散剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

T. breve LN006 在不同的含药培养基上生长 2 d 后，木质素磺酸钙、羧甲基纤维素钠对菌丝生长的影响较小，与对照差异无统计学意义(表 5)。*B. velezensis* ZJ 在不同的含药培养基上生长 2 d 后，对生长量影响最小的载体为聚乙烯醇，其次为羧甲基纤维素钠，与对照差异有统计学意义。BB4 完全抑制了 *B. velezensis* ZJ 的生长。羧甲基纤维素钠对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长的影响均较小，可作为本制剂中的分散剂。

表 5 分散剂对 *T. breve* LN006 菌丝生长速率及 *B. velezensis* ZJ 菌落数的影响(2 d)

分散剂种类	菌落直径/	菌丝生长速率/	<i>T. breve</i> LN006	菌落数/	<i>B. velezensis</i> ZJ
	cm	(cm · d ⁻¹)	抑菌率/%	个	抑菌率/%
羧甲基纤维素钠	7.52±0.28a	3.76	1.96	980.00±180.83b	34.38
聚乙烯醇	6.40±0.08b	3.20	17.56	990.00±61.10b	33.71
皂角粉	3.13±0.18d	1.56	63.30	430.67±29.24c	71.16
木质素磺酸钙	7.78±0.07a	3.89	—1.77	519.00±142.01c	65.25
BB4	5.20±0.13c	2.60	34.33	0	100
CK	7.60±0.02a	3.83	—	1 493.33±257.70a	—

注：小写字母不同表示 $p<0.05$ ，差异有统计学意义。

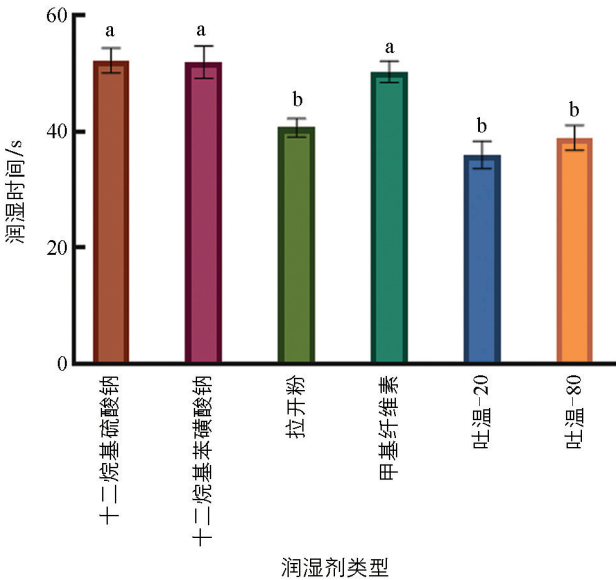
2.4.2 分散剂的分散指数测定结果

不同分散剂对孢悬液孢子的分散效力不同，但总体上能促进孢子分散。在 0~8 h，与对照相比，分散指数随着静置时间的增加，孢子分布由均匀分布向随机分布发展；在含有 5 种不同分散剂的母液中，BB4 的分散性能最佳，在 8 h 时的分散指数为 0.53，随着时间的增加呈均匀分布；其次是羧甲基纤维素钠，8 h 的分散指数为 0.72(表 6)。综合分析得出，BB4 和羧甲基纤维素钠的分散性能较好，结合前期试验结果，选择羧甲基纤维素钠为 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 的最佳分散剂。

表 6 分散剂的分散指数($I_{分散}$)

分散剂种类	0 h	4 h	8 h
羧甲基纤维素钠	0.75	0.98	0.72
聚乙烯醇	0.71	0.71	1.36
皂角粉	0.65	1.04	1.02
木质素磺酸钙	0.53	0.95	1.29
BB4	0.73	0.51	0.53
CK	1.02	0.96	1.38

注：当 $I_{分散}>1$ 时，孢子呈聚集分布；当 $I_{分散}=1$ 时，孢子呈随机分布；当 $I_{分散}<1$ 时，孢子呈均匀分布。



小写字母不同表示 $p<0.05$ ，差异有统计学意义。

图 6 润湿剂润湿时间

2.5 紫外保护剂的筛选

2.5.1 紫外保护剂对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 生长量的影响

T. breve LN006 在不同的含药培养基上生长 2 d 后, 卵磷脂和荧光素钠与对照相比差异无统计学意义, 说明其不抑制菌丝的生长。*B. velezensis* ZJ 在不同的含药培养基生长 2 d 后, 维生素 C 完全抑制了 *B. velezensis* ZJ 的生长, 黄原胶和卵磷脂对 *B. velezensis* ZJ 生长的影响较小(表 7)。

表 7 紫外保护剂对 *T. breve* LN006 菌丝生长速率及 *B. velezensis* ZJ 菌落数的影响(2 d)

紫外保护剂种类	菌落直径/	菌丝生长速率/	<i>T. breve</i> LN006	菌落数/	<i>B. velezensis</i> ZJ
	cm	(cm · d ⁻¹)	抑菌率/%	个	抑菌率/%
荧光素钠	7.68±0.03a	3.84	—0.19	706.33±33.72c	29.79
维生素 C	6.40±0.08c	3.20	17.67	0	100
卵磷脂	7.84±0.07a	3.92	—2.42	879.33±90.21abc	12.59
氧化锌	3.32±0.07d	1.66	60.65	813.00±101.05bc	19.18
黄原胶	7.15±0.10b	3.58	7.21	1 085.00±106.11a	—7.85
CK	7.67±0.02a	3.83	0	1 006.00±65.85ab	—

注: 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

2.5.2 紫外保护剂的保护效能

不同紫外保护剂的保护效能指数存在显著差异, 维生素 C 对于 *T. breve* LN006 的保护效能指数最高, 达到 0.27, 与其他 4 种紫外保护剂相比差异明显, 说明维生素 C 可明显抑制紫外光对孢子的杀伤作用; 其次是卵磷脂, 保护效能指数为 0.12; 其余 3 种紫外保护剂的保护效能较低(表 8)。卵磷脂对于 *B. velezensis* ZJ 的保护效能指数最高, 达到 0.21。综合分析得出, 卵磷脂的保护能力较好, 结合前期的试验结果, 可选择卵磷脂作为 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 的最佳紫外保护剂。

表 8 紫外保护剂的保护效能

紫外保护剂种类	保护效能指数	
	<i>T. breve</i> LN006	<i>B. velezensis</i> ZJ
荧光素钠	—0.09±0.05b	0.18±0.01a
维生素 C	0.27±0.13a	—
卵磷脂	0.12±0.02ab	0.21±0.03a
氧化锌	—0.03±0.07b	0.12±0.01b
黄原胶	0.07±0.03ab	0.15±0.01ab
CK	—	—

注: 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

2.6 WP 助剂成分比例的优化

在确定 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 最佳助剂种类的基础上, 进行正交优化试验, 研究不同助剂成分比例对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 悬浮率和润湿时间的影响, 结果见表 9。4 个因素的极差 R 值存在差异, 各因素对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 润湿时间的影响大小通过 R 值反应, R 值越大, 则表明该因素对润湿时间的影响程度越大, 反之则越小。结果显示, 对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 润湿时间的影响为 $A>C>B>D$, 即菌粉对 WP 的润湿时间影响最大, 其次为羧甲基纤维素钠、吐温-20、卵磷脂。

对悬浮率试验结果进行数据统计分析, 结果显示, 4 个因素的极差 R 值存在差异, 各因素对 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 悬浮率的影响程度为 $A>B>C>D$, 即菌粉对 WP 悬浮率的影响最大, 其次为吐温-20、羧甲基纤维素钠、卵磷脂(表 10)。

表 9 助剂成分比例优化正交试验润湿时间结果极差分析

试验号	A 菌粉	B 吐温-20	C 羧甲基纤维素钠	D 卵磷脂	润湿时间/s
1	1	1	1	1	71.340 0
2	1	2	2	2	58.683 3
3	1	3	3	3	76.876 7
4	2	1	2	3	40.086 7
5	2	2	3	1	57.833 3
6	2	3	1	2	40.280 0
7	3	1	3	2	56.566 7
8	3	2	1	3	33.546 7
9	3	3	2	1	29.653 3
K_1	206.903 3	167.996 7	145.170 0	158.829 9	
K_2	138.200 0	150.063 3	128.423 3	155.530 0	
K_3	119.766 7	146.810 0	191.276 7	150.510 1	
k_1	68.967 7	55.998 9	48.390 0	52.943 3	
k_2	46.066 6	50.021 1	42.807 7	51.843 3	
k_3	39.922 2	48.936 6	63.758 9	50.170 0	
R	29.045 5	7.062 2	20.951 1	2.773 2	
主次顺序			$A>C>B>D$		
最优水平	A3	B3	C2	D3	
最优组合			$A3B3C2D3$		

表 10 助剂成分比例优化正交试验悬浮率结果极差分析

试验号	A 菌粉	B 吐温-20	C 羧甲基纤维素钠	D 卵磷脂	悬浮率/%
1	1	1	1	1	87.26
2	1	2	2	2	83.60
3	1	3	3	3	80.07
4	2	1	2	3	78.99
5	2	2	3	1	74.61
6	2	3	1	2	78.45
7	3	1	3	2	84.24
8	3	2	1	3	80.71
9	3	3	2	1	84.74
K_1	2.509 3	2.504 9	2.464 2	2.466 1	
K_2	2.320 5	2.389 2	2.473 3	2.462 9	
K_3	2.496 9	2.432 6	2.389 2	2.397 7	
k_1	0.836 4	0.834 9	0.821 4	0.822 0	
k_2	0.773 5	0.796 4	0.824 4	0.820 9	
k_3	0.832 3	0.810 8	0.796 4	0.799 2	
R	0.062 9	0.038 5	0.028 0	0.022 8	
主次顺序			$A>B>C>D$		
最优水平	A1	B1	C2	D1	
最优组合			$A1B1C2D1$		

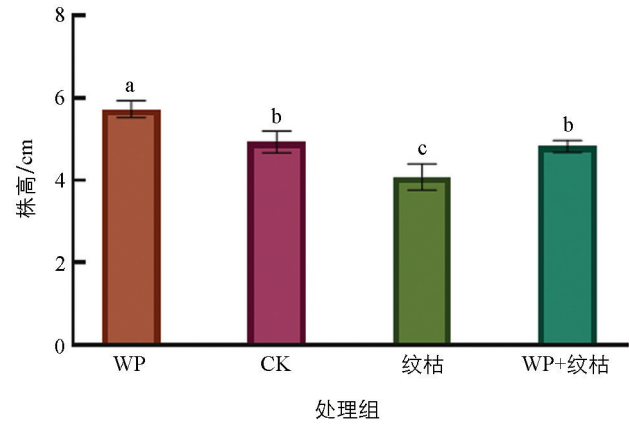
助剂成分比例筛选结果表明, *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 各个助剂最佳组合为 A3B3C2D3, 即菌粉 20%, 吐温-20 5%, 羧甲基纤维素钠 8%, 卵磷脂 0.4%, 其余 66.6% 用载体白炭黑补足, 制成 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP。

2.7 可湿性粉剂的质量检测

经测定, *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 湿润时间为 41.72 ± 2.69 s, 悬浮率为 $87.79\% \pm 3.15\%$, pH 值为 7.11 ± 0.03 , 200 目筛的通过率为 $95.77\% \pm 1.32\%$, 木霉活孢子数为 1.45×10^9 CFU/g, 芽孢活菌量为 1.78×10^9 CFU/g, 起泡性为 14 ± 3.06 mL。

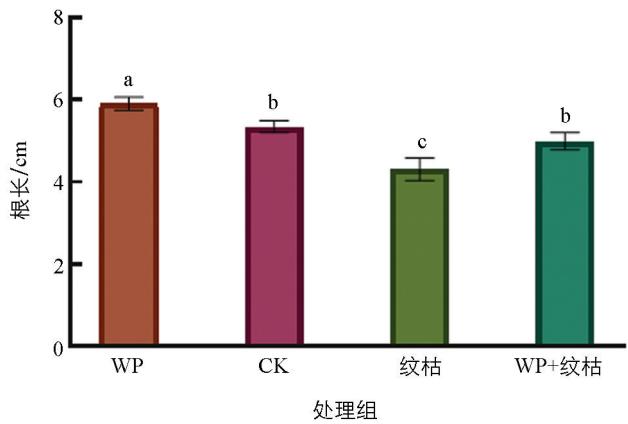
2.8 可湿性粉剂对水稻幼芽的促生效果

T. breve LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 对水稻幼芽有促生作用, 其根长与株高均高于清水对照组。由图 7、图 8 可知, WP 株高为 5.73 cm, 根长为 5.91 cm, 与对照相比分别增长了 18.67% 和 10.47%。与水稻纹枯病菌摇菌液单独处理相比, WP 与水稻纹枯病菌摇菌液共同处理的水稻根长与株高也明显增加。



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 7 WP 对幼芽株高的影响



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 8 WP 对幼芽根长的影响

2.9 可湿性粉剂室内盆栽防效测定

T. breve LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 与井冈霉素对水稻纹枯病均有较好的盆栽防效, 分别为 65.12% 和 72.09% (表 11), 两处理间差异无统计学意义。

表 11 WP 对水稻分蘖期水稻纹枯病的防效

处理	病情指数	防效/%
清水	$53.09 \pm 2.47a$	—
WP	$18.52 \pm 5.66b$	65.12
井冈霉素	$14.81 \pm 6.42b$	72.09

注: 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

3 讨论与结论

水稻纹枯病是水稻的重要病害, 化学防效受雨量、湿度等天气因素影响较大, 且需配合排水晒田等措施才能达到较好防效, 因此, 利用生物防治探索纹枯病的防治新途径非常必要。本文研究不同载体、润湿剂、分散剂、紫外保护剂与 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ 的生物相容性, 并结合载体的吸附力、润湿剂的湿润性能、分散剂的分散指数、紫外保护剂的保护效能等试验因素, 成功制备了含有木霉菌和芽孢杆菌固体共培养物的可湿性粉剂。制剂悬浮率符合可湿性粉剂的要求, 初步测定菌剂的盆栽试验防效为

65.12%，且对水稻有促生作用。

可湿性粉剂是微生物农药的重要剂型，不同生防菌株与可湿性粉剂不同助剂之间生物相容性差异也很大。在 *T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 中，吐温-20 5%，羧甲基纤维素钠 8%，卵磷脂 0.4%，白炭黑 66.6%，与两种生防菌相容性较好。白炭黑是农药水悬浮剂等制剂的重要载体，枯草芽孢杆菌 JN005 可湿性粉剂^[23]、甲基营养型芽孢杆菌 NKG-1 可湿性粉剂^[24]的载体均为白炭黑。吐温-20 在木霉菌剂制备中可用作润湿剂^[25]，加入一定含量的润湿剂可使其快速润湿。分散剂羧甲基纤维素钠具有增稠、成膜、乳化和悬浮等特性，可以提高可湿性粉剂的悬浮率^[26]。对 *T. breve* LN006 紫外保护效果最好的是维生素 C，但在使用浓度下完全抑制了 *B. velezensis* ZJ 的生长。康氏木霉 KS WP 的研制中^[11]，维生素 C 的紫外保护效能最高，卵磷脂次之，其结论与本研究相似。不同紫外保护剂对不同波长紫外线吸收度不尽相同，可进一步试验筛选不同保护剂进行组合应用。参照化学农药制作方法制备微生物农药时，存在菌种活力下降较快等问题，木霉与亲和芽孢杆菌 WP 由于含有一定数量的谷物培养基，其中稻壳生产过程中含有残留的淀粉、纤维素和半纤维素，以及其本身含有丰富的微量元素^[27]，有利于菌种在制剂中存活。另外，制剂喷洒到作物叶面后，其自身能提供菌体初始萌发生长所需的营养，有利于活体微生物在叶面的迅速定殖及菌剂防效的发挥。

木霉与芽孢杆菌是应用比较广泛的生防微生物，且可通过促根作用来促进水稻幼苗的生长^[28]。共培养时可通过微生物间互作产生新型代谢物，木霉与细菌之间的协同作用带来的好处大于它们各自的作用之和，其组合作为植物生长促进剂和生防菌剂的作用机制更加多样化，应用潜力更大^[4]。本研究通过筛选亲和菌株、时序接种等方式平衡木霉与芽孢杆菌共培养过程中的生长难题，并做出了有益的尝试。*T. breve* LN006 和 *B. velezensis* ZJ WP 对水稻安全，全生长期都可使用。海南每年第二造水稻在 11—12 月留茬收割，此时段再生稻株上容易感染纹枯等病害，在稻茬上喷洒菌剂，一方面菌剂中的木霉可加速稻茬纤维素的降解，加快有机质还田，提高土壤肥力、抗氧化以及土壤污染修复^[29]等；另一方面，菌剂在水稻田中的扩繁可抑制纹枯病菌的越冬菌量，为水稻纹枯病可持续防控提供了一条新的途径。制剂中加入亲和绿僵菌等微生物，可达到水稻害虫协同绿色防控的目的，减少了施药次数，有较好的应用前景，值得进一步试验并加以推广。

参考文献：

- [1] 刘路宁, 屠艳拉, 张敬泽. 绿木霉菌株 TY009 防治纹枯病等水稻主要真菌病害的潜力 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(10): 2031-2038.
- [2] 李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 等. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 98-107.
- [3] 陈刘军, 俞仪阳, 王超, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 防治水稻纹枯病机理初探 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 107-112.
- [4] POVEDAJ, EUGUI D. Combined Use of *Trichoderma* and Beneficial Bacteria (Mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of Microbial Synergistic Bio-Inoculants in Sustainable Agriculture [J]. Biological Control, 2022, 176: 105100.
- [5] 郑旭蕊. 复合微生物菌剂的研制及其对尖孢镰刀菌防治效果研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2021.
- [6] ALIZADEH H, BEHBOUDI K, AHMADZADEH M, et al. Induced Systemic Resistance in Cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the Combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14 [J]. Biological Control, 2013, 65(1): 14-23.
- [7] LIU H Y, LI T T, LI Y Q, et al. Effects of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus Subtilis* 22 on the Biocontrol of Wheat Head Blight [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(12): 1250.
- [8] 彭治鑫, 赵栋霖, 林伟, 等. 固态共培养木霉和芽孢杆菌抗烟草黑胫病及其活性成分研究 [J]. 中国烟草科学, 2023,

44(6): 36-43.

[9] 张尹强, 郝建秀, 赵远征, 等. 棘孢木霉 PT-29 与枯草芽孢杆菌 S-16 共培养对马铃薯枯萎病的防控作用 [J]. 河南农业科学, 2024, 53(3): 95-102.

[10] 张成, 李欣雨, 邹艺琴, 等. 木霉菌 *Trichoderma brev* 可湿性粉剂的研制 [J]. 农药, 2022, 61(5): 329-335.

[11] 赵诗杰. 康氏木霉 KS 的生物活性及其可湿性粉剂的制备和应用研究 [D]. 太原: 山西农业大学, 2022.

[12] 赵春燕, 安良聪, 赵秋玲, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 JK-1 可湿性粉剂研制及对辣椒褐腐病的防治效果 [J]. 天津农业科学, 2023, 29(2): 52-56, 63.

[13] 国家质量监督检验检疫总局. 农药可湿性粉剂润湿性测定方法: GB/T 5451—2001 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[14] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 农药悬浮率测定方法: GB/T 14825—2023 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.

[15] 路红. 棘孢木霉菌剂的研制及其对番茄促生抗病作用研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2024.

[16] 张晓云, 丛蓉, 赵卫松, 等. 30 亿 CFU/g 芽孢杆菌可湿性粉剂的研制及其对马铃薯黄萎病和疮痂病的防治效果 [J]. 农药学学报, 2023, 25(1): 140-149.

[17] 国家技术监督局. 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法: GB/T 16150—1995 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[18] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 农药 pH 值的测定方法: GB/T 1601—2023 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.

[19] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 农药持久起泡性测定方法: GB/T 28137—2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[20] 唐筱茸. 哈茨木霉 ACCC30371 与贝莱斯芽孢杆菌 S3-1 共培养体系对小麦的抗病促生作用 [D]. 上海: 上海师范大学, 2023.

[21] 龙欣钰, 孟祥佳, 曹帅, 等. 水稻纹枯病生防菌株的筛选、鉴定及其防治效果 [J]. 植物保护学报, 2022, 49(6): 1620-1630.

[22] 国家标准化管理委员会. 农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治水稻纹枯病: GB/T 17980. 20—2000 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.

[23] 丁宇倩, 任佐华, 黎圆花, 等. 枯草芽孢杆菌 JN005 可湿性粉剂研制及其对稻瘟病防治效果 [J]. 农药, 2019, 58(6): 415-419.

[24] 张维, 吕朝阳, 李博雅, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 NKG-1 可湿性粉剂的制备及药效研究 [J]. 中国农学通报, 2022, 38(15): 130-138.

[25] 陈捷. 木霉菌剂制备与应用技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.

[26] 李小伟, 李兴昱, 薛应钰. 公牛链霉菌 JPD-1 可湿性粉剂的研制及对苹果斑点落叶病的防效 [J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(2): 355-365.

[27] 魏周玲, 朱洪江, 陆宁, 等. 生防菌哈茨木霉 TMN-1 最佳固体发酵条件探究 [J]. 植物医学, 2024, 3(4): 50-57.

[28] 刘玲, 冯乃杰, 郑殿峰, 等. 不同微生物菌剂对水稻幼苗形态建成和生理特性的影响 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(1): 88-95.

[29] 王兴娥, 赵永田, 刘荣, 等. 木霉菌防治植物真菌病害的研究进展 [J]. 植物医学, 2024, 3(4): 11-19.

责任编辑 周仁惠

