

金玮璁,张凤杰,张晓蒙,等.解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂的抑菌和防腐效果[J].江苏农业科学,2021,49(6):169-172.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.06.030

解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂的抑菌和防腐效果

金玮璁¹,张凤杰¹,张晓蒙¹,于佳俊¹,邹理²,孙宝胜²,闫寅卓¹,薛洁¹

(1.中国食品发酵工业研究院有限公司,北京 100015;2.北京利农富民葡萄种植专业合作社,北京 101501)

摘要:酿酒葡萄种植、果实贮存保鲜和葡萄酒贮存时期均会发生不同程度的真菌性病害,影响葡萄酒酿造品质,造成一定的生产损失。利用解淀粉芽孢杆菌 B15 对真菌的抑制作用,在一定条件下制备得到生物农药——解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂,并对其在葡萄种植病害防治、葡萄酒窖抑菌及葡萄防腐等方面分别进行初步应用。药剂施用结果表明,解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂施用效果良好,对葡萄种植病害的平均防效在 70% 以上;在酒窖封闭空间的平均抑菌率为 77.32%;在果蔬防腐应用试验中,100 mg/L 处理组好果率达到 83.3%,在果蔬保鲜剂应用领域具有一定的开发价值。B15 可湿性粉剂的初步应用为我国酿酒葡萄在葡萄种植、果实保鲜和葡萄酒贮存整个流程中真菌病害的防治提供了有价值的应用参考。

关键词:解淀粉芽孢杆菌;B15 可湿性粉剂;真菌病害防治;葡萄种植;酒窖抑菌;葡萄防腐

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)06-0169-04

葡萄酒品质的好坏极大程度上取决于所挑选的酿酒葡萄的品质,而葡萄种植阶段的病害侵扰会极大影响葡萄品质,进而影响葡萄酒酿造品质及口感,严重制约着行业发展。葡萄病害一般以真菌为主,常见病害主要有葡萄霜霉病、葡萄灰霉病等。早期防控葡萄病害一般以种植抗病品种、温室栽培和化学防治为主^[1]。与化学防治手段相比,生物农药(biological pesticide)具有很好的生物安全性和环境友好性,是目前全球农药产业发展的新趋势^[2]。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillm amyloliquefaciens*)对外界有害因子抵抗力强且易培养繁殖,近几年被优选为研发稳定生物农药的菌种,是一种效果理想的生防菌株,市场上以可湿性粉剂和水剂最为常见^[3-7]。相关文献已证实,解淀粉芽孢杆菌对西瓜生长枯萎病、番茄枯萎病等田间果蔬真菌性病害具有一定的抑菌防治效果^[8-11],但鲜有提到对田间葡萄种植病害及葡萄酒贮存污染有抑制效果的相关研究。

基于实验团队前期的理论研究成果^[12-14],将筛选得到的具有有效抑制灰葡萄孢的解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液在一定条件下制备成可湿性粉剂,并在葡萄种植期间的病害防治、葡萄酒贮存期酒窖内的抑菌情况和葡萄果实贮存期间的防腐保鲜等 3 个方面进行施药应用,并对施用效果进行评价,以期为我国酿酒葡萄的真菌性病害防治提供有价值的应用参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验主要材料有解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) B15,保藏于国家酒类品质与安全国际联合研究中心(ICAB)国家级重点实验室。表面活性剂(分散剂 2425,润湿剂 200),由北京格林泰姆科技有限公司提供。

1.2 试验仪器

试验仪器主要有 LGJ-30FD 真空冷冻干燥机(德国 FRITSCH 公司)、微型行星式球磨机 PULVERISETTE6(北京松源华兴科技发展有限公司)、SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、LRH-250 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、LDZX-50KBS 立式电热压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂)、DHZ-B 高温全温振荡器(太仓市豪诚实验仪器制造有限公司)。

收稿日期:2020-06-05

基金项目:北京市科技计划(编号:Z191100004019018);北京市科技新星计划(编号:z181100006218004)。

作者简介:金玮璁(1991—),女,北京人,硕士,工程师,从事食品生物技术研究。Tel:(010)53218288;E-mail:weiyun_jin@163.com。

通信作者:薛洁,博士,教授,高级工程师,从事食品生物技术研究。Tel:(010)53218262;E-mail:lxuejie@126.com。

1.3 试验方法

1.3.1 生物抑菌剂的剂型合成 解淀粉芽孢杆菌 B15 发酵液经真空冷冻干燥成固体粉末,按 4% 添加量与 20% 表面活性剂和 76% 膨润土混合,用行星式球磨机充分粉碎混匀,制备得到解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂(图 1)。



图1 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂

1.3.2 生物抑菌剂的指标测定方法 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂经一定比例无菌水稀释后,制备得到 B15 生物抑菌剂。

抑菌剂的孢子计数方法为稀释一定倍数后,在 1 000 倍光学显微镜下用血球计数板计数。

可湿性粉剂 pH 值的测定参考 GB/T 1601—93《农药 pH 值的测定方法》,细度的测定参考 GB/T 16150—1995《农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法》,悬浮率测定方法参考 GB/T 14825—2006《农药悬浮率测定方法》,热稳定性测定参考 GB/T 19136—2003《农药热贮稳定性测定方法》。

1.3.3 葡萄田间抑菌应用试验方法 试验于 2019 年 7—8 月,在北京市密云区某葡萄园区实施,试验药剂为 B15 生物抑菌剂,对照药剂为常见防治葡萄霜霉病的生物农药啞菌酯悬浮剂,推荐浓度为 250 g/L。试验药剂用水稀释,采用 DFH-16A 型背负式手动喷雾器对葡萄植株双面均匀喷雾。

选择 5 个面积在 1 hm² 左右的相邻葡萄地块,抑菌剂施药浓度按 75、150、300 g/hm² 等分别喷洒在 3 个地块上,施药液量均为 90 L/hm²,另外 2 个地块分别为对照和空白对照(清水)。喷洒时间为葡萄霜霉病发病初期,每隔 7 d 施药 1 次,连续 4 次。当对照组明显发病时开始调查,1 周后调查防治效果。

调查方法为每个地块随机调查 10 个当年抽生新蔓,自上而下调查全部叶片,采用邓肯氏新复极差(DMRT)法记录各级病叶数及总叶数,具体各级标准及药效计算方法参考钱一鑫等的调查方法^[15]。

1.3.4 葡萄酒窖抑菌应用试验方法 试验于 2019 年 11—12 月于北京市密云区某酒庄窖内进行,试验药剂为 B15 生物抑菌剂,对照组为无菌水。选取合适的大空间酒窖,将酒窖空间均分为前部相对通风、有空气扰动的流动空间和后部氧气浓度较低、气流相对封闭的空间等 2 个部分进行。在 2 个空间分别挑选 3 处互不干扰的不同位置,每个位置放置均匀高度的平台桌,在桌上均匀放置 3 个干净的孟加拉红平板用于收集空气中的菌体。

施药前,打开平板 2 h 收集菌体,设为空白对照组。然后,向 2 个空间的空气中均匀喷洒抑菌剂,施药浓度为 1.2 g/L,药液量为 1 L,喷洒体积为 8 m³,然后换一组新平板在相同条件下重复取样。平板倒置于 28 ℃ 培养箱中,2 d 后计数,观察并记录酒窖空气中霉菌的数量。之后每天固定时间重复取样和培养操作。1 周后重复喷洒、取样和培养操作,试验共进行 4 周。

1.3.5 果蔬防腐应用试验方法 试验于 2019 年 12 月在实验室完成,试验药剂为 B15 生物抑菌剂,对照组为无菌水。

在市场购买当日现摘同一品种鲜食葡萄,将葡萄果实单粒完整剪下,每组 30 粒。将葡萄分别在无菌水和浓度为 1.25、2.50 g/L 的抑菌剂中各浸泡 2 min,然后取出自然晾干,置于干燥、洁净的塑封袋中,每个袋子上中下位置分别扎一些小孔。1 周后重复施药处理,共重复施药 4 周,每周观察并记录霉烂果粒数。

2 结果与分析

2.1 生物抑菌剂的指标测定

2.1.1 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂孢子计数 选取 10⁵ 作为稀释倍数,经血球计数板计数,结果得到解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂中活性孢子数为 5.02 × 10⁷ 个/g。

2.1.2 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂 pH 值的测定 测定 3 组后,得到该可湿性粉剂 pH 值的平均值为 7.58。对照文献[7—10]可知,可湿性粉剂的 pH 值在 6~8 为宜,中性最佳。该可湿性粉剂的 pH 值处于适宜范围。

2.1.3 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂细度的测定 3 组可湿性粉剂试样取样量均为 20.00 g,经 3 组平行试验得到的数据带入 GB/T 16150—1995《农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法》中的公式计算,

得到的结果如表 1 所示。由表 1 可知,可湿性粉剂的细度为(97.97 ± 0.13)%,符合推荐可湿性粉剂细度范围。

表 1 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂细度的测定结果

可湿性粉剂试样质量 (g)	玻璃皿中残留物质量 (g)	细度 (%)
20.00	0.43	97.85
20.00	0.38	98.10
20.00	0.41	97.95
$\bar{x} \pm s$		97.97 ± 0.13

2.1.4 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂悬浮率的测定 经 3 组平行试验得到的数据带入 GB/T 14825—2006《农药悬浮率测定方法》中的公式计算,得到结果如表 2 所示。由表 2 可知,可湿性粉剂的悬浮率为(85.60 ± 0.63)%,符合推荐可湿性粉剂悬浮率范围。

表 2 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂悬浮率的测定结果

悬浮液中有效成分 质量(g)	量筒底部 25 mL 悬浮液中 有效成分质量(g)	悬浮率 (%)
0.500 8	0.071 2	85.78
0.499 6	0.069 4	86.11
0.500 6	0.075 6	84.90
$\bar{x} \pm s$		85.60 ± 0.63

2.1.5 解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂热稳定性的测定 将可湿性粉剂在 54 ℃ 的恒温箱中放置 14 d 后取出,分别按“1.3.2”节中所述方法测定 pH 值、细度和悬浮率,每个试验设 3 组平行。测定结果显示,孢子数为 4.55×10^7 个/g,pH 值为 7.55,细度为 98.92%,悬浮率为 85.58%,与初始测定结果相比变化不大。可以看出,该可湿性粉剂热稳定性良好。

2.2 生物抑菌剂的初步应用

2.2.1 果蔬田间抑菌试验 试验结果表明, 5.02×10^7 个/g B15 可湿性粉剂防治葡萄霜霉病试验在 75、150、300 g/hm² 处理浓度均呈现出一定的抑菌效果,其平均防效分别为 69.8%、72.3%、76.7%,在 5% 和 1% 水平上均具有显著性影响。其中,处理浓度为 300 g/hm² 时对葡萄霜霉病的防治效果优于 75、150 g/hm²,且与对照药剂 22 400 g/hm² 噁菌酯悬浮剂的防治效果相当,平均防效在 70% 以上(表 3、表 4),达到农药防效的水平(70% ~ 80%)。同时,B15 可湿性粉剂对葡萄安全无药害,药剂在水中分散性能良好。

表 3 5.02×10^7 个/g B15 可湿性粉剂防治葡萄霜霉病试验结果

药剂	处理浓度 (g/hm ²)	平均病情 指数	平均防治 效果(%)
B15 可湿性粉剂	75	12.5	69.8cB
B15 可湿性粉剂	150	11.4	72.3bB
B15 可湿性粉剂	300	9.6	76.7aA
清水	0	41.3	
噁菌酯悬浮剂(对照)	22 400	9.7	76.5

注:数据后不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

表 4 5.02×10^7 个/g B15 可湿性粉剂防治葡萄霜霉病方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值
处理间	98.406	2	49.2	26.175	0.000
处理内	16.918	9	1.88		
总变异	115.32	11			

据此建议,B15 可湿性粉剂在葡萄田间的施药浓度控制在 150 ~ 300 g/hm²,施药时间为葡萄发病前喷施,会对夏季露地葡萄霜霉病有较好的防治效果。

2.2.2 葡萄酒窖抑菌试验 酒窖阴暗潮湿的环境利于霉菌生长,会对葡萄酒品质造成影响,一些霉菌代谢产生的霉菌毒素还会危害消费者的身体健康。对酒窖前后 2 个空间分别进行施药试验,结果如图 2 所示。试验结果表明,封闭空间施药效果较好,平均抑菌率为 77.32%,持续时间为 3 d;流动空间受空气扰动的影响,结果稳定性较差,平均抑菌率为 64.72%,持续时间为 1.8 d。

2.2.3 果蔬防腐实验 由表 5 可知,试验第 1 周所有试验组和对照组均无霉烂果粒,第 2 周开始出现霉烂果粒,随着周数的增加,对照组霉烂果粒数逐渐增多,好果率逐渐降低,最后 1 周好果率仅为 26.7%。相比对照组,经过抑菌剂处理的 2 个试验组的葡萄果粒大部分仍保持完整,最后 1 周 50、100 mg/L 试验组好果率分别为 76.7%、83.3%。试验结果表明,B15 抑菌剂在果蔬保鲜方面确实存在一定的防腐效果,因其为天然生物抑菌剂,易降解冲洗,对果蔬危害较小,在果蔬保鲜剂方面具有一定的应用前景。

3 讨论与结论

本研究根据解淀粉芽孢杆菌对葡萄霜霉病、葡萄炭疽病等真菌病原的抑制作用,制备了解淀粉芽

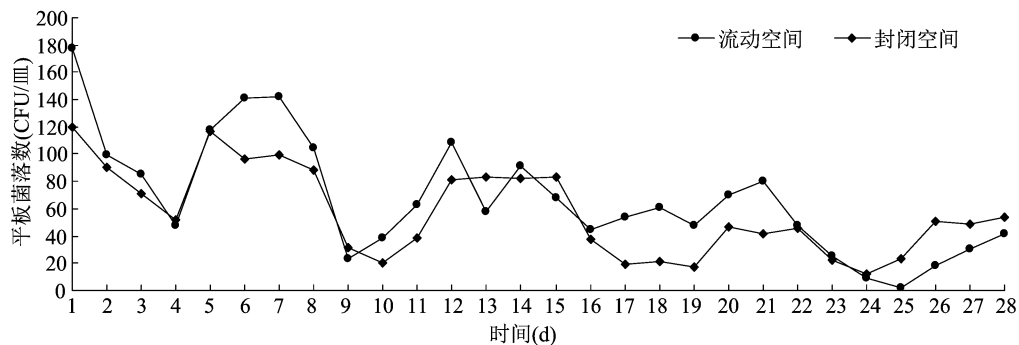


图2 流动空间和封闭空间试验期间平板菌落数变化对比

表 5 果蔬防腐试验结果

试验天数 (d)	空白组 好果数(粒)	50 mg/L 试验组 好果数(粒)	100 mg/L 试验组 好果数(粒)
0	30	30	30
7	30	30	30
14	19	26	28
21	14	25	28
28	11	24	26
35	8	23	25

孢杆菌 B15 可湿性粉剂,并对其在葡萄种植病害防治、葡萄酒窖抑菌及葡萄防腐等方面分别进行了初步应用。3 种施药应用试验结果表明,B15 可湿性粉剂在葡萄酒厂中的葡萄园种植、酒窖贮存和葡萄防腐方面均具有一定的效果,尤其在果蔬保鲜剂的应用领域,具有一定的应用前景和潜力。

总体来说,解淀粉芽孢杆菌 B15 可湿性粉剂在具体试验中显示出良好的应用效果,具有很好的应用潜力和开发价值,为我国酿酒葡萄在葡萄种植、果实保鲜和葡萄酒贮存整个流程中的真菌病害防治提供了有价值的参考。

参考文献:

[1] 史娟,杨之为. 葡萄霜霉病的研究现状[J]. 宁夏农学院学报, 2004,25(2):92-94.

[2] 纪明山,谷祖敏,张杨. 生物农药研究与应用现状及发展前景[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(4):545-550.

[3] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology,2008,16(3):

115-125.

[4] Lucy M,Reed E,Glick B R. Applications of free living plant growth - promoting rhizobacteria [J]. Antonie Van Leeuwenhoek,2004,86(1):1-25.

[5] Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling:a love parade beneath our feet[J]. Critical Reviews in Microbiology,2004,30(4):205-240.

[6] Lugtenberg B,Kamilova F. Plant - growth - promoting rhizobacteria [J]. Annual Review of Microbiology,2009,63(1):541-556.

[7] 黄海. 解淀粉芽孢杆菌 Ba168 对番茄灰霉病的防治作用[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.

[8] 王夏雯,孟佳丽,刘永锋,等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对连作西瓜生长及枯萎病发生的影响[J]. 福建农业学报,2019,34(11):1302-1308.

[9] 荆卓琼,郭致杰,徐生军,等. 解淀粉芽孢杆菌 HZ-6-3 的筛选鉴定及其防治番茄灰霉病效果的评价[J]. 草业学报,2020,29(2):31-41.

[10] 王世伟,王卿惠. 解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究进展[J]. 生物技术通报,2020,36(1):150-159.

[11] 史一然,徐伟慧,吕智航,等. 解淀粉芽孢杆菌 LZN01 对西瓜专化型尖孢镰刀菌的抑制效应[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):141-145.

[12] 龚谷迪. 抑菌微生物在葡萄酒厂中应用技术的研[D]. 济南:齐鲁工业大学,2013.

[13] 朱弘元,康健,范昕,等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 产脂肽的分离鉴定及抑菌机理[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):186-189.

[14] 潘虹余,金玮璠,张晓蒙,等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 抑菌物质对葡萄灰霉病灰葡萄孢的抑菌机理[J]. 微生物学报,2018,58(7):1245-1254.

[15] 钱一鑫,康冀川,罗乙凯,等. 猕猴桃灰霉病拮抗解淀粉芽孢杆菌 X17 可湿性粉剂的研制[J]. 中国生物防治学报,2016,32(3):342-348.