

# 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 悬浮剂配方的筛选

谢兰芬<sup>1</sup> 吴毅歆<sup>2</sup> 何鹏飞<sup>1</sup> 邱昂<sup>1</sup> 肖春<sup>1</sup> 何月秋<sup>1,2</sup>

1. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心, 昆明 650201;

2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201

**摘要** 通过对润湿分散剂、黏度调节剂、UV 保护剂、防腐剂、抗冻剂和消泡剂的筛选, 确定  $5.0 \times 10^9$  cfu/mL 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 悬浮剂的最佳配方: Y2 菌粉 5.00%, 农乳 34 2.50%, D-425 2.00%, OP-10 1.50%, 黄原胶 0.15%, 尿素 0.15%, 对羟基苯甲酸甲酯 0.06%, 甘油 5.00%, 正辛醇 0.20%, 水 83.44%。经过湿法研磨后测定, 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 悬浮剂的悬浮率达 92.00% 以上, 且冷热贮藏稳定。

**关键词** 芽孢杆菌; 悬浮剂; 配方; 筛选

**中图分类号** S 482.2<sup>+</sup>92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0045-05

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)能够形成耐热、耐旱、抗紫外线的芽孢,是研制生防菌剂的良好材料。多种解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)菌株因其具有控制植物病害、促进植物生长、提高作物产量等优势,在生物防治制剂中显示出广阔的应用前景<sup>[1-3]</sup>。解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2(简称 Y2,专利号:ZL200310104195.6)是笔者所在实验室从小麦根系土壤分离的一株具有广谱抑菌促生长作用的生防菌株<sup>[4-6]</sup>,能有效防治玉米大斑病、小斑病、圆斑病等真菌性病害,促进多种植物插条生根,是一种很好的生物防治制剂,但其制剂较单一,目前仅有可湿性粉剂产品。为克服 Y2 可湿性粉剂颗粒较大、易于沉降和分散性较差等缺点,笔者筛选并确定了 Y2 悬浮剂的最佳配方,旨在为其产品的商业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试菌株:解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 菌粉,芽孢含量  $\geq 1.0 \times 10^{11}$  cfu/g,芽孢率  $\geq 95\%$ ; 润湿分散剂:烷基萘磺酸缩聚物钠盐(Morwet D-425)、亚甲基双萘磺酸钠(NNO)、聚乙烯醇(PVA)、苯乙基酚聚氧乙烯醚(农乳 602)、烷基芳基聚氧乙烯聚氧丙稀醚(农乳 34)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯(吐温-

80)、烷基酚聚氧乙烯醚(OP-10); 增稠剂:黄原胶、硅酸镁铝、羧甲基纤维素(CMC); 防冻剂:甘油; 防腐剂:苯甲酸钠、山梨酸钾、对羟基苯甲酸甲酯; 紫外(UV)保护剂:黄原胶、羧甲基纤维素(CMC)、刚果红、淀粉、糊精、尿素、抗坏血酸(VC)、纯牛奶; 消泡剂:正辛醇; 主要仪器:粉碎机、小型立式砂磨机、旋转粘度计、激光粒度分析仪、台式离心机、恒温摇床等。

### 1.2 制剂加工与初始比例

将 Y2 菌粉与一定比例助剂补足水混合均匀后经砂磨机砂磨 4 h 后制成各种不同的悬浮剂。初始制剂成分配比(质量百分数,下同):原粉 5.00%、润湿分散剂总计  $\leq 10.00\%$ 、紫外保护剂 0.30%、防腐剂 0.30%、防冻剂 5.00%、消泡剂 0.20%。

### 1.3 配方的筛选

1)润湿分散剂。采用流点法筛选润湿分散剂品种<sup>[7]</sup>,试验重复 4 次。选用对供试原粉流点值较低的润湿分散剂进行下一步试验,按悬浮剂配制方法,配制几个样品,测定样品悬浮剂的各项指标,确定润湿分散剂组合及用量。

2)增稠剂。按照配方要求,将粘度调节剂按不同的含量制成样品。将样品经  $(54 \pm 2)^\circ\text{C}$  贮存 14 d 后,测定各样品的倾倒性、流动性及分层情况。

3)紫外保护剂。将保护剂按 0.30% 比例添加

收稿日期:2014-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(30660007)、科技部国际合作项目(2009DFA32360)和昆明市校企合作项目(09H130301)

谢兰芬,博士研究生。研究方向:生物农药。E-mail: xlf19711@163.com

通信作者:何月秋,博士,教授。研究方向:植物病害生物防治。E-mail: ynhf2007@163.com

到发酵液中,混合均匀并分别稀释后涂布在 LB 平板上,置于距离紫外灯 40 cm 处,分别照射 30、60、90 s 后统计存活率。以不加保护剂作对照,每个处理重复 4 次。保护效能指数=(处理芽孢存活率-对照芽孢存活率)/(100-对照芽孢存活率)。

4) 防腐剂。以上述配方为基础,加入不同种类和含量的防腐剂,配制不同的样品。将样品经室温贮存 14 d 后,测定产品的悬浮率和霉变程度。

5) 防冻剂。将筛选出的润湿分散剂、增稠剂、保护剂、防腐剂配制成悬浮剂样品后,添加不同浓度的防冻剂。将样品经(0±2)℃贮存 24 h 后,测定产品的悬浮率、析水率和分散性。

#### 1.4 悬浮剂稳定性的测试

将试验结果得到的最佳配方制作成悬浮剂样品,分 2 组装入安瓿瓶中,每组 5 瓶,分别进行冷贮[(0±2)℃贮存 7 d]和热贮[(54±2)℃贮存 14 d]处理,测定悬浮剂的芽孢含量、悬浮率、流动性、粘度等各项指标。

#### 1.5 制剂质量指标的测定

按照《中华人民共和国国家标准》对解淀粉芽孢杆菌 Y2 悬浮剂的各项质量指标进行测定。悬浮率测定参照 GB/T14825-2006 的方法<sup>[8]</sup>; pH 值测定参照 GB/T1601-1993 的方法<sup>[9]</sup>; 冷贮稳定性测定参照 GB/T 19137-2003 的方法<sup>[10]</sup>; 热贮稳定性测定参照 GB/T19136-2003 的方法<sup>[11]</sup>; 分散性、倾倒性、持久泡沫量测定参照易敏等的方法<sup>[12]</sup>; 有效成分采用平板菌落计数法测定; 粘度采用旋转粘度计测定; 颗粒直径采用激光粒度仪测定。

#### 1.6 数据处理与统计方法

应用 SPSS 19.0 对所得试验数据进行统计分析,采用 Excel 2007 进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 润湿分散剂的筛选

1) 润湿分散剂的流点。在预试验助剂与 Y2 生物相容的基础上,选择 7 种生物相容性较好的润湿分散剂,用流点法测定各自流点,比较其润湿分散能力(表 1)。润湿分散剂流点越小,表明润湿分散能力越强。

表 1 润湿分散剂的流点<sup>1)</sup>

Table 1 Flow point of surfactants

润湿分散剂 Surfactant	流点/(mL/g) Flow point
D-425	2.15±0.02 b B
NNO	2.13±0.08 bc B
PVA	2.40±0.05 a A
农乳 602 Nongru 602	2.08±0.01 c BC
农乳 34 Nongru 34	2.02±0.01 d C
吐温-80 Tween-80	2.14±0.01 bc B
OP-10	2.08±0.00 c BC

1) 表中小写字母表示在 5% 水平上差异显著,大写字母表示在 1% 水平上差异显著(下表同)。Data with the different lowercase and capital letters in column are significant difference at 5% and 1% level, respectively (the same as the following tables).

由表 1 可知,7 种润湿分散剂的流点由小到大依次为农乳 34 < OP-10 < 农乳 602 < NNO < D425 < 吐温 80 < PVA, PVA 与其他 6 种润湿分散剂间存在极显著差异,在润湿分散剂配方优化筛选中将被剔除。

2) 润湿分散剂配方的优化。根据预试验,样品中的增稠剂、防腐剂和防冻剂分别为黄原胶、对羟基甲酸甲酯和甘油,添加量分别为 0.20%、0.10% 和 5.00%,配制成不同的样品后,测定悬浮剂的悬浮率和分散性(表 2)。

表 2 润湿分散剂配方优化体系

Table 2 Formula optimization system of surfactant

样品 Samples	农乳 34 Nongru 34	D-425	NNO	农乳 602 Nongru 602	吐温-80 Tween-80	OP-10	悬浮率 Suspensibility	分散性 Dispersity
1	2.50	2.00		2.00			75.35	良 Good
2	2.50		2.00	2.00			82.23	良 Good
3	2.50	2.00			2.00		85.98	良 Good (+)
4	2.50		2.00		2.00		86.11	良 Good (+)
5	2.50	2.00				1.50	96.20	优 Excellent (-)
6	2.50		2.00			1.50	90.68	优 Excellent
7	2.50	2.00	1.50			1.50	81.26	良 Good
8	2.50	1.50	2.00			1.50	72.79	良 Good (-)
9	2.50	1.50	2.00				80.69	良 Good
10	2.50	2.00	1.50				90.01	良 Good
11		1.50	2.00			2.50	81.27	优 Excellent (-)
12		2.00	1.50			2.50	85.68	良 Good (+)

由表 2 可知,5 号样品中润湿分散剂选用农乳 34、D-425 以及 OP-10 组合,其用量分别为 2.50%、2.00% 和 1.50%,样品的悬浮率最高达 96.20%,分散性能优越。

### 2.2 增稠剂的确定

以黄原胶、硅酸铝镁及羧甲基纤维素 3 种增稠

剂为筛选对象,按照已筛选出的润湿分散剂,加入不同含量和比例的增稠剂,配制成不同的样品后,测定悬浮剂的倾倒性和流动性(表 3)。

由表 3 可知,当样品中黄原胶的添加量为 0.15% 时,悬浮剂的倾倒性和流动性均良好,且没有分层状况。

表 3 增稠剂的筛选

Table 3 Selection of thickeners

增稠剂 Thickener	用量/% Percent	倾倒性 Pourability	流动性 Flowability	分层状况 Hierarchical situation
黄原胶 Xanthan gum	0.10	良 Good (+)	优 Excellent	严重 Worse
黄原胶 Xanthan gum	0.15	良 Good	良 Good	稳定 Steady
黄原胶 Xanthan gum	0.20	良 Good (-)	差 Bad	稳定 Steady
硅酸镁铝 Veegum	0.10	良 Good	优 Excellent	严重 Worse
硅酸镁铝 Veegum	0.15	良 Good	良 Good	严重 Worse
硅酸镁铝 Veegum	0.20	良 Good (-)	差 Bad	严重 Worse
羧甲基纤维素 CMC	0.10	良 Good (+)	优 Excellent	稍有分层 Bad
羧甲基纤维素 CMC	0.15	良 Good	良 Good	稍有分层 Bad
羧甲基纤维素 CMC	0.20	良 Good (-)	差 Bad	稳定 Steady

### 2.3 紫外保护剂的选择

测定结果表明,8 种紫外保护剂不同照射时间的保护效能表现出差异性(表 4)。照射 30 s 后,各保护剂均有不同程度的保护作用,除糊精和纯牛奶保护效能指数低于 0.50 外,其余均高于 0.60,VC 保护效率最高 0.93;照射 60 s 后,淀粉和 VC 保护效能急剧下降到 0.19 和 0.11;照射 90 s 后,黄原胶、CMC 和尿素 3 种紫外保护剂仍然保持 0.40 以

上的较高保护效能。CMC 生物相容性较差(预试验),黄原胶已选作为增稠剂,若再加入会影响体系的平衡,因此,在黄原胶添加量的基础上选择尿素作为保护剂。

进一步筛选结果显示,在 0.15% 黄原胶的基础上添加 0.15% 和 0.20% 尿素具有较好的保护效果,且无显著差异(表 5)。综合分析并考虑成本因素,确定以尿素为悬浮剂的保护剂。

表 4 UV 保护剂不同照射时间的保护效能指数

Table 4 Protective efficacy index after different irradiation time of UV protectants

保护剂 Protectants	30 s	60 s	90 s
黄原胶 Xanthan gum	0.86±0.06 b AB	0.76±0.02 a A	0.44±0.01 a A
CMC	0.83±0.02 b B	0.76±0.02 a A	0.44±0.01 a A
刚果红 Congo	0.65±0.05 d C	0.58±0.01 b B	0.26±0.01 b B
淀粉 Amylon	0.71±0.01 c C	0.19±0.03 d D	0.12±0.00 c C
糊精 Dextrin	0.37±0.03 f E	0.13±0.02 e E	0.06±0.01 d D
尿素 Urea	0.89±0.02 ab AB	0.73±0.03 a A	0.43±0.02 a A
VC	0.93±0.02 a A	0.11±0.04 e E	0.02±0.02 e E
纯牛奶 Pure milk	0.43±0.05 e D	0.25±0.03 c C	0.07±0.01 d D

表 5 尿素不同照射时间的保护效能指数

Table 5 Protective efficacy index after different irradiation time of urea

尿素/% Urea	30 s	60 s	90 s
0.10	0.65±0.05 b B	0.39±0.02 b B	0.26±0.01 b B
0.15	0.84±0.03 a A	0.76±0.02 a A	0.44±0.01 a A
0.20	0.84±0.02 a A	0.77±0.00 a A	0.45±0.01 a A

### 2.4 防腐剂的筛选

选择与 Y2 生物相容性较好的山梨酸钾、苯甲酸钠和对羟基苯甲酸甲酯,按照试验筛选出的助剂,加入不同的防腐剂,配制成不同的样品,再将样品经室温贮存 14 d 后测定其悬浮率和霉变度(表 6)。测定结果表明,加入 0.06% 对羟基苯甲酸甲酯防腐效果较好,制剂前后悬浮率未发生显著变化且无霉变现象;而 0.10%~0.30% 山梨酸钾和苯甲酸钠处理后,制剂的悬浮率下降明显且仍有霉变。

表 6 防腐剂的防腐效果

Table 6 The effect of preservatives

%

样品 Samples	山梨酸钾 Potassium sorbate	苯甲酸钠 Sodium benzoate	对羟基苯甲酸甲酯 Methylparaben	贮存前悬浮率 B-suspensibility	贮存后悬浮率 A-suspensibility	霉变度 Mould
1	0.10			95.40	50.80	+++
2	0.20			95.20	55.30	+++
3	0.30			95.50	56.10	+++
4		0.10		95.60	47.50	+++
5		0.20		94.80	48.50	+++
6		0.30		95.10	50.20	+++
7			0.01	95.30	85.10	++
8			0.04	94.90	90.40	+
9			0.06	95.30	95.20	-

## 2.5 防冻剂的确定

制作悬浮剂的一些助剂在温度较低时可从液态凝固成固态。为防止产品在贮存过程中出现结晶现象而影响使用效果,选用相容性好的甘油进行浓度配方。按照试验筛选得到助剂配方,加入不同含量的甘油,配制成不同的样品,然后将样品经过 $(0\pm 2)^\circ\text{C}$ 贮存24 h后,测定产品的悬浮率、析水率和分散性(表 7)。测定结果表明,5.00%甘油的防冻效果好于3.00%和 4.00%的甘油,且样品中无析水现象。

表 7 甘油添加量的筛选

Table 7 Glycerol content screening

%

甘油 Glycerol	悬浮率 Suspensibility	析水率 Water filtration	分散性 Dispersity
3.00	85.60	5.00	良 Good
4.00	90.70	2.00	良 Good
5.00	94.60	0.00	良 Good

## 2.6 消泡剂的选择

在悬浮剂砂磨过程中,会产生大量的泡沫,需要加入小量消泡剂。试验结果表明,正辛醇添加到 0.20%时,便有良好的消泡效果。

## 2.7 悬浮剂的稳定性

将试验结果得到的最佳配方:Y2 菌粉 5.00%, 农乳 34 2.50%, D-425 2.00%, OP-10 1.50%, 黄原胶 0.15%, 尿素 0.15%, 对羟基苯甲酸甲酯 0.06%, 甘油 5.00%, 正辛醇 0.20%, 水 83.44%, 采用湿磨法研磨 4 h 后制得样品后,测定悬浮剂的各项质量指标(表 8)。

悬浮剂稳定性的测定结果表明:Y2 悬浮剂的芽孢含量达 50 亿/mL,悬浮率达 92.00% 以上, $\leq 5\ \mu\text{m}$  的粒径高于 96%,pH 值稳定在 7.5~7.6,粘度 610~620 Pa·s;制剂的倾倒性好,热贮和冷贮前后差异不大。

表 8 优化的生防制剂的冷热贮稳定性

Table 8 Stabilization of hot and cool storages of the optimized biocontrol agent

贮藏 Storage	状态 Condition	活菌数/ ( $10^9$ cfu/mL) Viable count	悬浮率/% Suspensibility	粒径 $\leq 5\ \mu\text{m}$ Diameter	析水率/% Water filtration	泡沫体积/mL Foam volume	pH	粘度/(Pa·s) Viscosity	倾倒性 Pourability
热贮 Hot	前 Before	50.30	95.40	96.50	0.00	11	7.6	620	良 Good
	后 After	50.10	92.30	96.20	0.02	13	7.5	610	良 Good
冷贮 Cool	前 Before	50.30	95.40	96.50	0.00	11	7.6	620	良 Good
	后 After	50.20	93.20	96.30	0.01	12	7.6	620	良 Good

## 3 讨论

紫外光对活体的杀伤作用是影响生防制剂在田间稳定性的重要因素,在生防制剂中加入一定量的紫外保护剂来保障生防活体在环境中的存活率是一种常用手段。本试验结果表明,黄原胶和尿素在生物相容性良好的条件下对 Y2 芽孢表现出良好的保护作用。黄原胶防护效果与程立君等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。然而,在紫外保护剂筛选时,紫外灯照射时间存在较大差异,从照射 30 s 到 24 h 不等,其中以

短时间照射为多<sup>[13-17]</sup>。本试验中以紫外灯照射 5 min 后,全部 Y2 芽孢几乎死亡。尿素对作物叶片损伤较小,适宜作叶片追肥。袁立海等<sup>[18]</sup>的研究结果表明,尿素的叶面追肥量不超过 5.00% 时有良好增产效果且不会导致烧苗。本试验添加 0.15% 尿素,具有芽孢紫外保护剂作用,同时还具有叶片追肥的功效,但增产效果有待进一步验证。

悬浮剂实际上仍是水分散体系,其中添加的某些助剂是有机营养成分,在室温下容易被外界杂菌所利用,导致制剂系统平衡的破坏。同时,生防活体

微生物也有自身利用的条件。为了防止出现这些现象,农药剂型中常加入山梨酸钾、苯甲酸钠和甲醛<sup>[12-19]</sup>。本研究结果显示,制剂中添加 0.10%~0.30%的山梨酸钾、苯甲酸钠无防腐效果,其原因是该 2 种物质为酸性防腐剂,而解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 悬浮剂是弱碱性制剂(pH 7.6)。因此,将酸碱适应范围大的对羟基苯甲酸甲酯作为 Y2 悬浮剂的防腐剂,能明显抑制霉变和芽孢萌发,尽管其价格是苯甲酸钠的 10 倍、山梨酸钾的 3 倍,但添加量只需二者的 1/10~1/5,制剂的成本相差无几。

### 参 考 文 献

- [1] 王英国,王军华,权春善,等.解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J].中国生物工程杂志,2007,27(6):41-45.
- [2] ROSTAMI S,MALEKI M,SHAHRIARI D. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* to control of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of cucumber [J]. International Journal of Farming and Allied Sciences,2013,2(22):965-970.
- [3] ROMANO A,VITULLO D,SENATORE M,et al. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A [J]. Journal of Natural Products,2013,76(11):2019-2025.
- [4] 和凤美,何月秋,朱永平.生防菌 B9601 的防治效果研究[J].西南农业大学学报,2002,24(4):312-314.
- [5] 汪澈,何月秋,张永庆.枯草芽孢杆菌 B9601-Y2 抑菌蛋白活性及产生条件的研究[J].植物病理学报,2005,35(1):30-36.
- [6] 刘拴成,杨进成,马丽华,等.解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 提高玉米生长和产量的效应[J].玉米科学,2010,18(6):78-82,85.
- [7] 郭武棣.液体制剂[M].北京:化学工业出版社,2004:196-236.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T 14825-2006.农药悬浮率测定方法[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T 1601-1993.农药 pH 值的测定方法[S].北京:中国标准出版社,1993.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T 19137-2003.农药低温稳定性测定方法[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局.GB/T 19136-2003.农药热贮稳定性测定方法[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [12] 易敏,徐树兰,汤历,等.10 亿 PIB/mL 斜纹夜蛾核型多角体病毒悬浮剂的研制[J].广东农业科学,2011,38(20):81-83.
- [13] 程立君,陈玉惠,彭述敏,等.1 株生防木霉菌可湿性粉剂中助剂的筛选[J].西南林学院学报,2010,30(5):48-52.
- [14] 张拥华,李磊,彭志刚,等.粘帚霉可湿性粉剂助剂的初步研究[J].农药,2007,46(2):94-96.
- [15] 王剑,王楠,高观朋,等.200 亿芽孢/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂的研制[J].农药,2010,49(7):486-489.
- [16] 田大伟,杨顺义,张新虎,等.顶孢霉 Ahy1 菌株孢子乳悬剂的配方筛选[J].植物保护,2009,35(4):78-82.
- [17] NICKLE W R,SHAPIRO M. Use of a stilbene brightener, Tinopal LPW as a radiation protectant for *Steinernema carpocapsae* [J]. Journal of Nematology,1992,24(3):371.
- [18] 袁立海,李艳杰,刘显辉,等.尿素叶面施肥的效果[J].黑龙江八一农垦大学学报,1985(1):53-60.
- [19] 张国生,李琳光.农药悬浮剂的配方技术[J].世界农药,2010,32(4):40-47.

## Screening of *Bacillus amyloliquefaciens* 9601-Y2 suspension concentrate formula

XIE Lan-fen<sup>1</sup> WU Yi-xin<sup>2</sup> HE Peng-fei<sup>1</sup> QIU Ang<sup>1</sup> XIAO Chun<sup>1</sup> HE Yue-qiu<sup>1,2</sup>

1. National Engineering Center of Applied Technologies for Agricultural Diversity, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Faculty of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

**Abstract** An environment friendly biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens* 9601-Y2  $5.0 \times 10^9$  cfu/mL SC was formulated though screening surfactants, thickeners, UV protectants, preservatives, antifreezes, and defoamers. It included 5.00% B9601-Y2 powder, 2.50% Nongyu 34, 2.00% D-425, 1.50% emulsifier OP-10, 0.15% xanthan gum, 0.15% urea, 0.06% methylparaben, 5.00% glycerol, 0.20% n-octanol and 83.44% water. By wet grinding the product suspension rate was over 92.00% and stable after cold and hot storage.

**Key words** *Bacillus* spp.; suspension concentrate; formula; screening

(责任编辑:陈红叶)