

木霉菌厚垣孢子水分散粒剂的研制及田间应用效果

裴文亮, 王伟*

(华东理工大学/生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 木霉菌是广泛应用并具有良好防治效果的植物病害生防真菌。市场上木霉菌制剂多是分生孢子为主要成分的可湿性粉剂, 存在着货架期短, 生产和使用时有粉尘污染等问题。为了解决木霉菌应用上的这一瓶颈问题, 提高木霉菌的应用价值, 本研究针对木霉菌 T4 在高产厚垣孢子发酵培养基及工艺优化的基础上, 对其水分散粒剂的工业化生产工艺进行了研究。确定以硅藻土为载体, 3%稳定剂羧甲基纤维素钠, 0.4% UV 保护剂抗坏血酸, 4%崩解剂可溶性淀粉, 3.2%粘结剂淀粉, 利用摇摆湿法进行造粒, 得到 1×10^8 cfu/g 的木霉菌 T4 水分散粒剂。在田间防治番茄灰霉病, 花期或者发病初期首次用药, 施药浓度为 300~500 倍稀释液, 施药间隔期为 7 d, 总共用药 3 次。结果显示, 最佳使用浓度为 300 倍稀释, 对番茄灰霉病的防治效果达到 71.85%, 与 50%啮酰菌胺水分散粒剂 1000 倍稀释液防治效果相当, 具有较好的应用前景。

关键词: 木霉菌; 水分散粒剂; 灰霉病防治

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2020)02-0241-08

Preparation and Field Efficacy of Chlamyospore Water Dispersible Granule of *Trichoderma harzianum*

PEI Wenliang, WANG Wei*

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering/East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: *Trichoderma* is a biocontrol fungus that has been proved to have good control effect in the field on grape gray mold, tomato *Fusarium* wilt and melon anthrax. Most *Trichoderma* preparations on the market are wettable powders with conidia as the main component, which has the problem of short shelf life and dust pollution when used. In order to solve this bottleneck problem in the application of *Trichoderma* and improve its application value, this study focused on the industrial production of *Trichoderma* T4 as a water dispersible granule agent on the basis of the optimization of the laboratory flask high-yielding chlamyospore fermentation medium. With kieselguhr as carrier, 3% stabilizer CMC, 0.4% UV protectant ascorbic acid, 4% disintegrating agent soluble starch and 3.2% binder starch were selected for granulation by wet swaying granulation method, and 1×10^8 cfu/g *Trichoderma* T4 WDG was obtained to prevent and control gray mold in the field for the first time in the flowering period or the early stage of the disease. The application concentration was 300—500 times diluted, the application interval was 7 days, and a total of three times. The results showed that the best concentration was 300 times dilution, the control efficacy of tomato gray mold reached 71.85%, which was the same as that of 50% boscalid WDG 1000 times dilution.

Key words: *Trichoderma*; water dispersible granule; gray mold control

收稿日期: 2019-07-05

基金项目: 上海市科委“科技创新行动计划”重点攻关项目(18391902500)

作者简介: 裴文亮, 硕士研究生, 助理工程师, E-mail: liangflyto2008@163.com; *通信作者, 博士, 教授, E-mail: weiwang@ecust.edu.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.02.009

木霉菌是土壤中普遍存在且得到广泛应用的生防真菌。20世纪30年代,首次发现木霉菌有抑制土传病原真菌的作用^[1]。自70年代以来,木霉菌的生物防治机制被广泛地进行研究。木霉菌的生防机理主要包括竞争作用^[2,3]、重寄生作用^[4]、抗生作用^[5,6]、诱导植物抗性^[7]。Silva等^[8]发现木霉菌不仅具有显著的生防作用,且具有促生长作用^[9]。这些研究都表明木霉菌是一种具有较高生防能力和巨大应用潜力的生防菌。

本实验室从田间分离得到一株具有广谱抗性的哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum* T4,室内及田间试验表明该菌株对由葡萄灰霉菌、大豆尖孢镰刀菌、番茄尖孢镰刀菌等引起的病害可以进行有效的防治^[10,11]。夏斯琴和王伟^[12]曾对本实验室的绿色木霉 T4 固体发酵产分生孢子和液体发酵产厚垣孢子的培养基进行了筛选,分别得到了产分生孢子较优的固体发酵培养基和产厚垣孢子较优的糖蜜-玉米粉和麦麸发酵培养基。通过抗性试验和田间试验发现,厚垣孢子对化学药物的抗性要高于分生孢子,并且防效要远高于分生孢子。可见,分生孢子虽然数量多,但是其难于保藏。而厚垣孢子货架期长、防效高,具有更好的发展潜力^[13]。因此,研制木霉菌厚垣孢子制剂是解决其货架期和应用效果的关键技术。市场上木霉菌制剂多为以分生孢子为主要成分的可湿性粉剂,存在着货架期短,生产和使用时有粉尘污染等问题^[14,15]。水分散粒剂是新型的环保农药剂型,使用时不会产生粉尘飞扬,并且溶于水中能快速崩解^[16]。木霉菌水分散粒剂主要的有效成分是有活性的木霉厚垣孢子,较高的温度(大于40℃)以及剪切力都会对其造成损伤,因此在选择造粒设备应特别考虑这些因素。摇摆湿法造粒是先将发酵液与加有助剂的底料进行混合,调整到合适的湿度,放入摆粒机料斗中,通过间歇转动的摆轮将物料从下面的筛网中挤出,再进行干燥,得到制剂成品。由于没有大的剪切力以及热量产生,所以适合木霉菌水分散粒剂的制备。本研究在前期研究木霉菌厚垣孢子发酵优化以及水分散粒剂助剂筛选的基础上^[17],在摇摆湿法造粒机上进行造粒,综合考量选择合适的造粒设备和工艺,对形成的木霉菌厚垣孢子水分散粒剂特性进行了分析,并开展了田间防治番茄灰霉病试验。为木霉菌厚垣孢子水分散粒剂的应用和相关标准的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

木霉菌发酵液: 1.0×10^8 cfu/mL 木霉菌 T4 发酵液由本实验室在 10 L 发酵罐上 30℃、100 r/min, 罐压 0.05 MPa, 发酵培养 5 d 获得。

供试原料和试剂: 高岭土, 硅藻土, 凹凸棒土, 白炭黑, 膨润土, 均为市售农用级别。烷基萘磺酸盐, L-抗坏血酸, 可溶性淀粉, 淀粉, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司(AR级)。

孟加拉红培养基: 蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g、琼脂 20 g, 上述各成分加入少量蒸馏水中溶解, 再将 100 mL 1/3000 孟加拉红溶液加入培养基中, 加蒸馏水定容至 1000 mL, 混合均匀后分装, 121℃灭菌 20 min。倾注平板前, 另用少量乙醇溶解氯霉素 0.1 g 加入培养基中。

仪器和设备: 湿法混合造粒机、摇摆整粒机、沸腾干燥机、pH 计、超净工作台。

1.2 造粒配方的优化

确定合适的离心时间, 满足湿法造粒。并对助剂配方进行调整, 为工业化选择设备做准备。

1.2.1 离心时间的确定 发酵液按照工业离心机的转速 1900 r/min 进行离心, 设置 6 个不同的离心时间, 通过显微镜检测不同的离心时间下一个视野中上清液的孢子数量, 来确定最佳的离心时间。

1.2.2 不同载体造粒效果 选择 5 种不同的载体, 湿法造粒后检测分析崩解性和菌含量。

1.2.3 不同助剂配方对制剂崩解性以及菌含量的影响 发酵液 1900 r/min 离心 15 min, 弃上清(37 mL/31 mL), 收集菌泥, 参考李秀明等^[17]助剂配方并进行调整, 共设 6 个配方进行湿法造粒, 分别为 13 g 硅藻土、13 g 硅藻土+助剂(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%)、13 g 硅藻土+助剂(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+崩解剂可溶性淀粉 4%)、13 g 硅藻土+助剂(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%)、14 g 硅藻土+助剂(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%)、15 g 硅藻土+助剂(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%

+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%),制成样品后烘干,检测崩解性和含菌量。

1.2.4 粘结剂与底料比例的优化 为改善湿法造粒的成粒效果,分别添加 0、3.0%、3.2%、3.4%、3.6%的淀粉水溶液,进行湿法制粒,制成样品后烘干,测定崩解时间,确定添加不同量的粘结剂对成粒效果的影响。

1.3 造粒工艺集成

1.3.1 湿法造粒工艺 首先将底料和助剂放入湿法混合机中,进行混匀加入离心后的发酵液制粒,然后在流化床中进行干燥,最后进行质量检测。

1.3.2 摇摆湿法造粒工艺 在湿法造粒工艺基础上,加入适当的粘结剂水溶液。混匀后,在摇摆整粒机中进行摇摆造粒,制成的颗粒在流化床中进行干燥,最后进行质量检测。

1.4 制剂分析、测定方法

1.4.1 菌含量测定 采用梯度稀释平板计数法测定。

1.4.2 水分的测定 参考国家标准 GB/T 1600—2001 农药水分测定方法。

1.4.3 pH 的测定 采用行业标准 HG/T 2467.1—2003 农药 pH 值的测定。

1.4.4 润湿时间的测定 采用国家标准 GB/T 5451—2001 农药可湿性粉剂润湿性的测定。

1.4.5 悬浮率的测定 采用国家标准 GB/T 14825 农药悬浮率的测定。

1.4.6 湿筛试验 参考国家标准 GB/T 16150 中的“湿筛法”进行测定。

1.4.7 分散性 采用行业标准 HGT 2467.13—2003 农药水分散粒剂产品标准编写规范。

1.4.8 持久起泡性的测定 参考采用行业标准 HGT 2467.13—2003 中测定方法。

1.4.9 崩解性的测定 将 0.5 g 样品颗粒倒入含有 90 mL 蒸馏水的 100 mL 具塞量筒中,塞住筒口,夹住量筒的中部,以 8 r/min 的速度绕中心旋转,记下样品在水中完全崩解的时间。崩解时间小于 3 min 为合格。

1.4.10 热贮稳定性的测定 参考行业标准 HG/T 2467.12—2003 进行。

1.5 木霉菌 T4 厚垣孢子水分散粒剂防治番茄灰霉病田间药效试验

试验地点在上海市奉贤区庄行镇上海市农业科学院庄行试验站塑料大棚种植的番茄上进行。番茄品种为申粉 8 号,6 个药剂处理,4 次重复,共 24 个小区,每小区面积 12 m²。小区按区组随机排列,试验区四周留保护行。其中 1.00×10⁸ cfu/g 木霉菌 T4 厚垣孢子水分散粒剂分别采用 300、500、800 倍稀释液,以自来水为对照,每组处理 30 株。30 d 后,按下列方法进行病害调查统计,并计算发病率、病情指数和防治效果。病害分级标准:0 级,无病斑;1 级,残留花瓣发病或者柱头发病;3 级,萼片腐烂或者柱头腐烂蔓延到果脐部;5 级,果脐部有浸润斑无霉层;7 级,果脐部有霉层但未扩散到其他部位;9 级,霉层扩展到果实其他部位。

1.6 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件分析处理,LSD 法做多重比较分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 造粒配方优化

2.1.1 离心时间的确定 随着离心时间的增长,上清液显微镜一个视野中的厚垣孢子数逐渐减少。离心 18、20 min 上清液中孢子含量最少,显微镜一个视野中仅有 3 个,与离心 15 min 上清液中孢子含量无显著差异(表 1)。鉴于工业生产能耗的考虑,本文选离心 15 min 用于湿法造粒试验。

2.1.2 不同载体造粒效果 不同载体的理化特性以及生物相容性不同,选择合适的载体有助于活菌存活以及制剂的崩解性。由表 2 可知,硅藻土、凹凸棒和膨润土生物相容性较好,菌含量都在 1.00×10⁸ cfu/g 以上,崩解时间都小于 65 s,结果差异不明显,符合行业标准小于 180 s 的要求。综合考虑原材料成本,确定选用成本较低的硅藻土进行湿法造粒。

2.1.3 不同保护剂对制剂崩解性以及菌含量的影响 发酵液 1900 r/min 离心 15 min,弃上清(37 mL/31 mL),加不同助剂配方混合均匀,进行湿法造粒流化床干燥。检测产品崩解性和菌含量。其中 13 g 硅藻土+助剂

表 1 上清液显微镜一个视野中厚垣孢子数量与离心时间的关系

Table 1 Relationship of centrifugation time and the content of the chlamydospore in the supernatant at a microscope field of view

序号 No.	离心时间 Time of centrifugation (min)	上清液孢子数量 The spore number of liquid supernatant
1	10	60±2.89 d
2	12	20±1.53 c
3	13	8±0.58 b
4	15	5±0.58 ab
5	18	3±1.15 a
6	20	3±0.58 a

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

表 2 不同载体对木霉水分散粒剂的影响

Table 2 Effects of carrier on the WDG formulation of *Trichoderma*

序号 No.	处理 Treatment	崩解性 Disintegrative (s)	菌含量 Microbial content (10 ⁸ cfu/g)
1	高岭土	45±2.65 a	0.95±0.02 a
2	硅藻土	55±1.53 b	1.10±0.06 b
3	凹凸棒土	65±4.51 c	1.00±0.03 ab
4	白炭黑	50±1.00 ab	0.50±0.03 ab
5	膨润土	65±2.08 c	1.00±0.04 ab

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

(UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定羧甲基纤维素钠 3%+崩解剂可溶性淀粉 4%) 的配方菌含量可达 1.05×10^8 cfu/g，崩解时间为 90 s，满足造粒指标要求（表 3）。其他配方菌含量未达到要求，分析原因可能是润湿分散剂烷基萘磺酸盐对制剂菌含量有一定的影响，后续造粒选择不添加润湿分散剂烷基萘磺酸盐。同时确定湿法造粒的水分应控制在 30%，崩解性符合国标规定。

表 3 助剂配方对木霉水分散粒剂的影响

Table 3 Effects of additives on the WDG formulation of *Trichoderma*

序号 No.	处理 Treatment	崩解性 Disintegrative (s)	菌含量 Microbial content (10 ⁸ cfu/g)
1	13 g 硅藻土	45±1.53 a	1.10±0.01 a
2	13 g 硅藻土+助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%)	90±2.89 b	0.38±0.06 b
3	13 g 硅藻土+助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定羧甲基纤维素钠 3%+崩解剂可溶性淀粉 4%)	90±2.31 b	1.05±0.05 c
4	13 g 硅藻土+助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%)	120±2.52 c	0.10±0.01 a
5	14 g 硅藻土+助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%)	198±4.04 e	0.02±0.01 a
6	15 g 硅藻土+助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+润湿分散剂烷基萘磺酸盐 4%+崩解剂可溶性淀粉 4%)	175±1.73 d	0.30±0.03 b

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean±SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

湿法造粒工艺先将 13 g 载体与助剂 (UV 保护剂抗坏血酸 0.4%+稳定剂羧甲基纤维素钠 3%+崩解剂可溶性淀粉 4%) 混合加入湿法造粒机，开启搅拌，3 min 后喷入发酵浓缩液，制粒 2 min 后，下料流化床干燥，然后进行质量检测。各项指标达到行业要求，但湿法造粒制成的木霉菌水分散粒剂颗粒大小不够均匀（图 1），还有未成粒的细粉，后续需要添加粘结剂来优化造粒工艺。



图1 湿法造粒木霉水分散粒剂外观图片

Fig. 1 The apparent picture of WDG of *Trichoderma* made by wet granulation

2.1.4 粘结剂与底料比例的优化 将湿法造粒最优配方 13 g 硅藻土添加 0.4% UV 保护剂抗坏血酸、3% 稳定剂羧甲基纤维素钠、4% 崩解剂可溶性淀粉加入湿法造粒机混匀后，喷入加有不同比例粘结剂的发酵浓缩液，混合制粒后，加入摇摆整粒机整粒，流化床进行干燥。成品进行崩解时间检测。随着粘结剂淀粉含量的增多，崩解时间也随之延长。添加 3.0%、3.2%、3.4% 崩解性都可以满足指标要求（崩解时间小于 180 s）。综合考虑产品颗粒硬度以及田间用药崩解时间，最终确定粘结剂淀粉的添加量为 3.2%（表 4）。

表4 不同含量粘结剂淀粉对木霉水分散粒剂的影响

Table 4 Effects of different binder content on the WDG formulation of *Trichoderma*

序号 No.	粘结剂淀粉 Agglomerant (%)	崩解时间 Disintegration time (s)
1	0	91 ± 3.61 a
2	3.0	138 ± 1.15 b
3	3.2	144 ± 4.36 b
4	3.4	176 ± 2.65 c
5	3.6	330 ± 1.00 d

注：数据为平均值 ± 标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean ± SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

2.2 摇摆湿法造粒工艺

摇摆湿法造粒首先将底料放入湿法混合机中，将离心后浓缩的发酵固形物、粘结剂淀粉加入底料中进行混合制粒，然后再通过筛网为 40 目的摇摆整粒机进行二次造粒，成粒后放入流化床中进行干燥，干燥之后筛分一下，将粒径达不到要求的细粉进行二次造粒，符合标准的颗粒便可对产品进行质检，合格后包装。工艺流程如图 2 所示。

2.3 木霉菌水分散粒剂特性的检测与分析

两种造粒方式都达到 HG/T 2467.13—2003 农药水分散粒剂产品标准，菌含量、水分、pH、湿筛试验、分散性、悬浮率、持久起泡性都无显著差异，只有润湿时间和崩解时间差异明显，摇摆湿法造粒的产品润

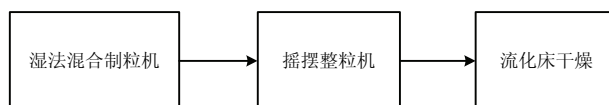


图2 摇摆湿法造粒工艺流程

Fig. 2 Process of wet granulation



图 3 摇摆湿法造粒木霉水分散粒剂的外观

Fig. 3 The appearance picture of WDG of *Trichoderma* by wet swing granulation

湿时间为 10 s 长于湿法造粒的 2 s，摇摆湿法造粒的崩解时间为 144 s 长于湿法造粒的 90 s（表 5），这是由于摇摆湿法造粒添加了粘结剂，产品颗粒更加均一，硬度增大导致润湿时间加长。由外观可以看出（图 1, 3），湿法造粒造出的水分散粒剂，粒径大小不一，而摇摆湿法造粒制成的木霉菌水分散粒剂整齐均一，为短圆柱状颗粒，流动性较好。综合考虑产品的商品性，更有利于产品销售，最终选用摇摆湿法造粒的工艺进行木霉菌水分散粒剂的制备。

表 5 湿法造粒制成木霉水分散粒剂质量检测

Table 5 Quality inspection of water dispersible granules of *Trichoderma* by wet granulation

指标 Index	湿法造粒产品测定值 Estimated value	摇摆湿法造粒产品测定值 Estimated value	行业标准 Industry standard
菌含量 Microbial content (10^8 cfu/g)	1.05 ± 0.06	1.10 ± 0.01	-
水分 Moisture content (%)	4.50 ± 0.12	4.00 ± 0.58	≤ 5
pH	7.40 ± 0.15	7.38 ± 0.01	6.0~7.5
润湿时间 Wetting time (s)	2.00 ± 1.00	10.00 ± 0.15	< 180
湿筛试验（通过 75 μm 试验筛） Wet sieve test (Pass 75 micron test sieve) (%)	98.67 ± 0.33	98.33 ± 0.33	≥ 98
分散性 Dispersiveness (%)	76.00 ± 1.15	76.00 ± 0.58	≥ 60
悬浮率 Suspension percentage (%)	63.00 ± 1.15	59.00 ± 2.08	≥ 50
崩解时间 Disintegration time (s)	90.00 ± 1.53	144.00 ± 2.08	≤ 180
持久起泡性（1 min 后起泡量）(mL)	6.00 ± 0.58	7.00 ± 0.58	≤ 60

将两种造粒方式的木霉菌水分散粒剂做热储稳定试验，可湿性粉剂木霉菌作为对照，由表 6 的结果可以看出，经过热贮处理后（54 $^{\circ}\text{C}$ 、14 d），可湿性粉剂的损失率高达 50%，而通过摇摆湿法造粒以及湿法造粒的木霉菌水分散粒剂的损失率仅为 10%。由此可见，摇摆湿法造粒以及湿法造粒制成的木霉菌水分散粒剂对木霉菌厚垣孢子有很好的保护作用。

2.4 木霉菌 T4 厚垣孢子水分散粒剂的番茄灰霉病田间药效试验结果

通过摇摆湿法造粒制成含量为 1.00×10^8 cfu/g 的木霉菌水分散粒剂在上海市奉贤区庄行镇上海市农业科学院庄行试验站塑料大棚种植的番茄上进行田间防治番茄灰霉病试验。不同浓度的 1×10^8 cfu/g 木霉菌水分散粒剂对番茄灰霉病都可以起到一定的防治作用，500 倍稀释液防效达到 62.75%，300 倍稀释液的防效达到 71.85%，与化学农药 50% 啶酰菌胺水分散粒剂的防效差异不显著（表 7）。

表 6 热贮稳定性
Table 6 The hot storage stability

处理 Treatment	热贮前菌量 The amount of microbial before hot storage ($\times 10^8$ cfu/g)	热贮后菌量 The amount of bacteria after hot storage ($\times 10^8$ cfu/g)	存活率 Survival rate (%)
木霉菌可湿性粉剂 <i>Trichoderma</i> WP	1.20 \pm 0.01	0.60 \pm 0.02	49.99 \pm 0.86 a
木霉菌水分散粒剂 <i>Trichoderma</i> WDG (湿法造粒)	1.05 \pm 0.01	0.95 \pm 0.02	90.47 \pm 0.63 b
木霉菌水分散粒剂 <i>Trichoderma</i> WDG (摇摆湿法造粒)	1.10 \pm 0.01	1.00 \pm 0.02	90.63 \pm 0.85 b

注: 数据为平均值 \pm 标准误, 不同小写字母表示 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean \pm SE, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

表 7 木霉菌 (1×10^8 cfu/g) 水分散粒剂防治番茄灰霉病田间药效结果
Table 7 Control efficiency of *Trichoderma* (1×10^8 cfu/g) to *Botrytis cinere*

处理 Treatment	稀释倍数 Dilution ratio	平均病指 Disease index	平均防效 Control efficiency (%)	差异显著性 Significance of difference	
				0.05	0.01
1×10^8 cfu/g 木霉菌水分散粒剂 <i>Trichoderma</i> WDG	300	3.40	71.85	a	A
1×10^8 cfu/g 木霉菌水分散粒剂 <i>Trichoderma</i> WDG	500	5.29	62.75	a	B
1×10^8 cfu/g 木霉菌水分散粒剂 <i>Trichoderma</i> WDG	800	8.99	37.40	b	C
50%啞酰菌胺水分散粒剂 Boscalid WDG	1000	3.74	73.48	a	A
空白对照 CK		14.35	0		

注: 数据为平均值 \pm 标准误, 不同小写字母表示 0.01 和 0.05 水平上的显著差异。

Note: Data were presented as mean \pm SD, data with different uppercase and lowercase letters indicated significant difference at 0.01 and 0.05 level respectively.

3 讨论

水分散粒剂具有良好的流动性且能够在水中快速崩解悬浮成悬浊液, 克服了可湿性粉剂的粉尘飞扬的缺点。田间施药表明水分散粒剂是更加环保、安全的农药剂型。随着田间施药对田间工作人员的健康、安全的威胁日益受到关注, 新型、安全的水分散粒剂将会得到长足的发展与推广。

本研究在对不同载体、助剂、UV 保护剂抗坏血酸、稳定剂羧甲基纤维素钠、崩解剂可溶性淀粉、粘结剂淀粉进行筛选的基础上, 对配方进行优化, 发现润湿剂烷基萘磺酸盐对木霉活性有影响, 所以后续研究不再添加润湿分散剂。对湿法造粒离心速度进行确定, 发酵液在 1900 r/min 转速下, 离心 15 min, 弃上清, 加载体, 调节水含量在 30%, 进行造粒, 得到木霉菌水分散粒剂各项指标符合要求。但是湿法造粒获得的木霉菌水分散粒剂, 粒径大小不一, 商品性较差, 曹艳等^[21]比较了湿法高效混合制粒法与摇摆式制粒法制备菇茶降脂胶囊工艺, 同样发现湿法造粒, 颗粒粒径大小不均一, 摇摆制粒的粒径较均一。所以考虑通过摇摆整理机来改进工艺。

摇摆湿法造粒首先将底料放入湿法混合机中, 将离心后弃上清液的发酵液沉淀物加入底料中进行混合, 然后添加 3.2% 粘结剂淀粉, 混匀, 再通过筛网为 40 目的摇摆整粒机进行造粒, 成粒后放入流化床中进行干燥、筛分, 将粒径达不到要求的细粉进行二次造粒, 符合标准的颗粒便可对产品进行质检, 合格便可包装。Watano 等^[18]、咎艳坤^[19]、谢毅等^[20]研究表明粘结剂淀粉含量以及筛网的大小都会影响制剂的崩解性, 说明针对不同的产品要选择合适的粘结剂和筛网大小。摇摆湿法造粒产能高, 操作工序简便, 但离心过程会产生工业废水, 离心上清液还有可能含有发酵的代谢产物, 如纤维素酶、几丁质酶等有生防效果的产物。郭培磊等^[22]研究表明木霉菌发酵液中几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶对番茄灰霉病菌有较高的抑菌活性, 后续大规模生产应该考虑如何利用离心后的上清液, 避免浪费上清液中的活性物质。

本研究表明 1×10^8 cfu/g 的木霉菌水分散粒剂 300 和 500 倍的稀释液对番茄灰霉病有较好的防治作用, 与 50%啞酰菌胺水分散粒剂效果相当。马辉刚和李瑞明^[23]的研究也发现木霉对番茄灰霉病具有较好的防治效果。赵蕾^[24]研究表明木霉菌不但可以寄生在植物病原菌的菌丝上, 还可以寄生在菌核上。木霉菌不仅对灰霉

病有很好的防治作用,还可以防治甘蓝黑腐病^[25]、西瓜枯萎病^[26]、棉花枯萎病^[27]、茄子白绢病^[28]、小麦纹枯病^[29]等种植物病害。可见木霉菌 T4 水分散剂具有较好的防治植物病害功能和巨大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi[J]. *Phytopathology*, 1932, 22(8): 837-845.
- [2] Harman G. *Trichoderma*—not just for biocontrol anymore[J]. *Phytoparasitica*, 2011, 39(2): 103-108.
- [3] 徐同, 钟静萍, 李德葆. 木霉对土传病原真菌的拮抗作用[C]//全国生物防治学术讨论会论文集, 1991.
- [4] 胡琼, 邵菲菲. 木霉对植物促生作用的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(10): 5077-5079.
- [5] 于新, 田淑慧, 徐文兴, 等. 木霉菌生防作用的生化机制研究进展[J]. *中山大学学报*, 2005, 44(2): 86-90.
- [6] 陈婕, 朱洁伟, 张婷, 等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2011, 27(2): 145-151.
- [7] Matarese F S, Sabrina G. Biocontrol of fusarium head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*[J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 98-106.
- [8] da Silva L, Honorato T, Cavalcante R, et al. Effect of pH and temperature on enzyme activity of chitosanase produced under solid stated fermentation by *Trichoderma* spp.[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(1): 60-65.
- [9] Ryder L S, Harris B D, Soanes D M, et al. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12[J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 84-97.
- [10] 赵永田, 顾巧英, 王伟. 哈茨木霉菌与几丁聚糖混用对不同栽培模式葡萄灰霉病的防效[J]. *中国植保导刊*, 2015, 35(11): 52-54.
- [11] 尹丹韩, 高观朋, 夏飞, 等. 生防菌哈茨木霉 T4 对黄瓜根围土壤细菌群落的影响[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(2): 246-254.
- [12] 夏斯琴, 王伟. 绿色木霉 T4 的固体发酵工艺及其制剂稳定性的研究[J]. *化学与生物工程*, 2008, 25(12): 52-56
- [13] 栗静, 罗志威, 吕黎, 等. 哈茨木霉液体发酵产厚垣孢子条件的优化[J]. *山西农业科学*, 2014, 42(2): 169-173.
- [14] 田连生, 陈菲. 木霉菌可湿性粉剂药效的提高技术[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(10): 97-99.
- [15] 张晶晶, 徐文, 黄亚丽, 等. 木霉 Tr-92 厚垣孢子可湿性粉剂的储存性能及应用效果[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(3): 495-500.
- [16] 华乃震. 浅议农药水分散粒剂的发展及趋势[J]. *农药市场信息*, 2017, 26: 6-10.
- [17] 李秀明, 李卿, 韦灵林, 等. 哈茨木霉 T4 厚垣孢子水分散粒剂的研制[J]. *农药*, 2013, 52(1): 24-27, 40.
- [18] Watano S, Ohtsubo T, Muroi T, et al. Effect of binder composition on physicochemical properties of water dispersible granules obtained through direct granulation of agrochemical suspension using fluidized bed[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2017, 42(3/4): 112-115..
- [19] 管艳坤. 水分散剂悬浮率的影响因素[J]. *农药*, 2007, 46(7): 462-464.
- [20] 谢毅, 郭凡, 康占海, 等. 农药水分散粒剂的研究进展[J]. *农药科学与管理*, 2005, 26(12): 26-29.
- [21] 曹艳, 范彦博, 曾庆峰, 等. 湿法高效混合制粒法与摇摆式制粒法制备茶降脂胶囊的比较[J]. *医药导报*, 2010, 29(3): 353-355.
- [22] 郭培磊, 刘限, 高增贵, 等. 木霉菌胞外酶及对番茄灰霉病菌作用的研究[J]. *北方园艺*, 2009(8): 126-128.
- [23] 马辉刚, 李瑞明. 木霉菌防治番茄灰霉病田间药效试验[J]. *植物保护*, 1998, 24(2): 32-35.
- [24] 赵蕾. 绿色木霉对灰霉病菌拮抗机制的初步研究[J]. *植物保护*, 1998, 24(2): 36-37.
- [25] 赵玳琳, 卯婷婷, 王廿, 等. 微生物菌剂和生防木霉菌对甘蓝黑腐病的田间防效及其对甘蓝的促生作用[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(4): 761-767.
- [26] 王依纯, 廉华, 马光恕, 等. 木霉不同施用方式对黄瓜幼苗质量特性及枯萎病防效的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(3): 416-425.
- [27] 孙艳, 张学坤, 王振辉, 等. 滴灌条件下木霉菌厚垣孢子制剂防治棉花黄萎病试验[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(10): 89-92.
- [28] 姚艳平, 李友莲, 王建国, 等. 木霉菌对植物病原真菌拮抗作用的研究[J]. *山西农业科学*, 2013, 41(4): 369-371.
- [29] 卢德鹏, 吴远征, 扈进冬, 等. 木霉菌水分散剂防治小麦纹枯病的田间药效研究[J]. *山东科学*, 2018, 31(2): 32-35.