



网络出版日期:2019-12-18

doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2019.12.017

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20191217.2340.010.html>

Bacillus amyloliquefaciens Y-3 保鲜剂的制备及对番茄货架期的影响

张晓宇¹, 张立新¹, 高振峰¹, 张新宪¹, 秦一帆¹, 刘 枫²

(1. 山西省农业科学院 农产品贮藏保鲜研究所, 太原 030031; 2. 山西省农业科学院 农业科技信息研究所, 太原 030006)

摘要 为获得对番茄货架期腐烂率控制具有良好效果的解淀粉芽孢杆菌 Y-3 可湿性粉生物保鲜剂, 采用单因素和平板活性检测相结合的方法, 筛选出对解淀粉芽孢杆菌 Y-3 活性影响最小的最佳载体和助剂及其配方, 并在此基础上采用活体试验和货架试验对制剂的最佳稀释倍数和货架期腐烂控制效果进行测定。结果表明: 解淀粉芽孢杆菌 Y-3 生物可湿性粉保鲜剂最佳配方为: 发酵液 70%、膨润土 10%、PEG8000 2.4%、净洗剂 LS 3.6%、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)2%、膨润土补足 100%; 药剂稀释倍数为≤300 倍; 红熟番茄经解淀粉芽孢杆菌 Y-3 可湿性粉生物保鲜剂浸泡 15 min 后, 可 20 °C 货架 11 d, 且使病果率和腐烂率分别控制在 7.35% 和 10.75%, 明显低于对照。说明该生物保鲜剂不仅对番茄采后早疫病和灰霉病病原具有良好防治效果, 而且可有效减少红熟番茄货架期腐烂率和病果率, 在延长番茄货架供应时间方面具有重要意义。

关键词 解淀粉芽孢杆菌 Y-3; 可湿性粉保鲜剂; 番茄货架; 腐烂率; 生物防治

中图分类号 S476

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)12-2043-10

番茄营养价值高、产量高、需求量大, 种植面积不断扩大, 但皮薄、肉嫩, 不耐贮运, 使其在采后到餐桌的“最后一公里”易发生腐烂, 其病因主要包括生理软化和病原物侵染, 其中以病原物致病引起的果实腐烂较为常见^[1-2]。研究发现番茄采后病原主要包括葡萄孢菌(*Botrytis* spp.)、链格孢菌属(*Alternaria* Nees)、根霉属(*Rhizopus* spp.)、青霉菌属(*Penicillium* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)和镰刀菌属(*Fusarium* spp.)等, 其中以番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和番茄早疫病菌(*Allternana solani*)引起的腐烂较为常见^[3]。番茄贮藏期间由灰霉病菌引起的腐烂率可达 1%~20%, 有时甚至高达 50%^[4]; 童志丹^[5]研究发现在番茄早疫病菌感染下, 番茄贮藏 15 d 腐烂率便可达 40% 左右; 周防震^[6]研究发现在番茄灰霉病菌感染下, 贮藏 20 d 腐烂率便可达 60%。另外, 还有研究发现番茄采后受到病原(*B. cinerea*)侵染时, 会导致体内乙烯释放量显著增加, 从而加速果实衰老和腐烂速率, 缩短其采后贮藏或货架时间^[7]。试验期间课程组(山西省农业科学

院农产品贮藏保鲜研究所果蔬采后病害生物防治课题组)发现番茄早疫病菌不仅同番茄采后腐烂有关, 而且在货架期间发病较快, 常在果蒂部位出现褐色病斑, 使番茄在发生腐烂之前便失去商品价值。因此, 有关番茄采后灰霉和早疫病害控制对降低番茄采后货架或贮藏期间腐烂率具有重要意义。

目前为有效减少由于灰霉病和早疫病病害发生而导致的番茄货架和贮藏期间腐烂现象, 研究者已对植物提取物(丁香精油、月桂精油和阿魏酸等)^[3,8-9]、杀菌剂(NaClO、ClO₂ 和水杨酸甲酯等)^[10-12]、水处理(热水、富氢水)^[10,13-14]、拮抗微生物^[13,15-16]以及包装材料处理^[1]等方法对灰霉病和早疫病病害防治效果进行了探究, 并取得一定成果, 但由于见效速率、成本、易操作性, 生物保鲜研究仍停留在平板抑菌效果测定和活体接种病原抑菌效果测定以及生物保鲜产品研发和应用效果研究等方面。目前对灰霉病和早疫病种采后病害仍以化学防治为主, 然而化学药剂不合理使用带来的环境污染、食品药剂残留和病原物抗药性增强

收稿日期:2019-04-29 修回日期:2019-06-26

基金项目: 山西省重点研发计划(201703D211006, 201703D221026-1, 201803D221016-1); 山西省农科院特色农业攻关项目(YGG17002)。

第一作者: 张晓宇, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为果蔬采后病理及采后病害生物防治。E-mail: xiaoyuzhang2005@163.com

通信作者: 高振峰, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物病害生物防治及生物菌剂开发。E-mail: sxndgjf@163.com

等问题亦不容忽视^[6]。另外,人们为延长番茄采后贮藏和货架时间,通常在成熟前(绿果期)便进行采收,然后低温贮藏,待其转红后进行上市,导致市面番茄失去原有味道和出现烹饪时不易软化现象,影响食用口感,因此,后期不仅有关生物保鲜剂的开发和货架效果验证研究还需进一步加强,有关红熟番茄的采后贮藏及货架保鲜技术研究显得尤为重要。

本研究从绿色、安全和生物防治角度出发,一方面对番茄采后灰霉病和早疫病具有良好防治效果的解淀粉芽孢杆菌 Y-3 进行可湿性粉生物保鲜剂制备配方探究,以期获得同菌株 Y-3 具有良好生物相容性的制剂配方;另一方面对该生物保鲜剂对番茄采后早疫病和灰霉病病原的活体抑菌效果和稀释倍数进行研究来验证制剂活体防效。最后在获得制剂成品后,模拟番茄货架环境对制剂在红熟番茄货架期间腐烂的控制效果进行试验,旨在为番茄采后早疫病和灰霉病安全防治以及延长红熟番茄货架供应时间提供新型绿色产品。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 解淀粉芽孢杆菌 Y-3(CGM-CC NO. 14113)从抱茎苦荬菜叶片表面分离,番茄采后病原真菌灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和早疫病菌(*Allternana solani*)由山西省农业科学院农产品贮藏保鲜研究所提供;供试番茄 2017-07-03 采收于山西省太谷县任村乡郝村,品种为‘欧宝三号’,初始果实硬度 386 g/mm²,挑选果面无机械伤的番茄用于试验。

1.1.2 供试培养基 营养琼脂(NA)培养基、营养肉汤(NB)培养液和马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基的配方及制备参照高振峰^[17]文献中的描述。

1.2 菌株活化

1.2.1 Y-3 菌株活化 取-80 °C 保存的菌株 Y-3 20 μL 采用涂布法涂布于新鲜 NA 平板,置于 26 °C 恒温活化培养 24 h,用于后续试验。

1.2.2 番茄采后病原真菌活化 用打孔器从病原真菌平板上取直径为 5 mm 的菌块,接种至新鲜的 PDA 平板,置于 26 °C 电热恒温培养箱活化培养 7 d,用于后续试验。

1.3 Y-3 菌株发酵培养和抗逆性芽孢制备

用接种环取活化后的 Y-3 菌株 1 环至新鲜

NB 无菌液中,于 160 r/min、28 °C 发酵培养 5 d 后,使用血球计数板在显微镜下镜检,并记录菌株总数和无芽孢菌株总数,当其抗逆性芽孢产生率达 90% 以上时终止发酵,用于可湿性粉剂制备。

1.4 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂的制备

1.4.1 载体前处理 在高岭土、硅藻土、膨润土、玉米粉、食用麦麸、木屑、滑石粉和白炭黑中筛选,将各载体分别经粉碎机粉碎,使细度小于或等于 44 μm,分装于 250 mL 磨口瓶,高温高压灭菌锅灭菌 30 min,置于 50 °C 烘箱烘干备用。

1.4.2 载体吸附特性测定及最佳载体筛选 载体吸附特性测定:取灭菌载体 10 g 置于 90 mm 培养皿中,缓慢加入 Y-3 发酵液(每次 1 mL),使载体湿润并保持疏松不结块,直至加到呈现稀糊状为止,此时已加入的发酵液体积即为载体的最大吸附量,比较吸附量确定载体的吸附特性。各处理和各试验均重复 3 次。

最佳载体筛选:依据各载体吸附性能,参照中华人民共和国行业标准 NY/T2293. 1-2012《细菌微生物农药枯草芽孢杆菌第 1 部分:枯草芽孢杆菌母药》进行 Y-3 菌株母粉制备:将 Y-3 发酵液和各类载体按相应比例混合制成母液;置于 45 °C 鼓风干燥箱烘干;经粉碎后过 200 目筛,制成初始制剂(母药)。随后对使用不同载体制备成的母粉的润湿时间、悬浮特性和活菌数量进行检测分析。活菌数量测定采用平板稀释涂布法^[18]。润湿时间测定参照文献^[19],悬浮率测定参照文献^[20]。各处理和各试验均重复 3 次。

1.4.3 助剂(润湿剂、分散剂)种类、配比和用量筛选 助剂种类筛选及生物相容性测定:将 11 种助剂[木质素磺酸钙、木质素磺酸钠、拉开粉 BX、净洗剂 LS、PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、聚乙二醇 8000、羧甲基纤维素钠、分散剂 MF、十二烷基硫酸钠、朗钛 CF-200 和朗钛 LT-WP60]分别按照 10% 添加量加入到以最佳载体制备好的母药中,鼓风干燥箱 45 °C 烘干后粉碎。室温贮藏 30 d 后对其润湿时间、悬浮特性以及同菌株 Y-3 的生物相容性进行测定,旨在筛选出悬浮性、润湿时间和生物相容性均较好的助剂。各处理和各试验均重复 3 次。

助剂用量最佳配比及生物相容性测定:将分散剂和润湿剂以最佳配比按照质量比 2%、4%、6%、8%、10% 的用量添加到母药中并粉碎^[21]。

室温贮藏 30 d 后对制剂的润湿时间、悬浮特性和芽孢含量进行测定,以悬浮性高、润湿时间短和芽孢含量高为较优配比评价指标。

1.4.4 稳定剂筛选 在上述最佳配方中分别加入 2% (质量比) 稳定剂(CMC-Na、碳酸钙、磷酸钾和磷酸氢二钾), 经粉碎过筛后, 测定润湿时间、悬浮特性、初始活菌数及室温贮藏 30 d 后的活菌数, 以室温贮藏 30 d 后活菌数下降最少的为最佳稳定剂。

1.4.5 Y-3 可湿性粉生物保鲜剂的制备 将筛选出的最佳载体、润湿剂、分散剂与 Y-3 发酵液按照筛选出的最佳比例混合, 45 ℃ 烘干后, 粉碎至细度小于或等于 44 μm, 制得生物保鲜可湿性粉剂。将制剂分装为每袋净质量 10 g 的小包装, 阴凉干燥处保存, 用于后续试验。

1.5 Y-3 可湿性粉生物保鲜剂不同稀释倍数对番茄采后病害的防治效果

1.5.1 不同稀释倍数可湿性粉生物保鲜液制备

用无菌水将 Y-3 可湿性粉保鲜剂分别稀释 0 倍、100 倍、300 倍、500 倍和 800 倍, 以等量不含 Y-3 的空白制剂为对照。

1.5.2 病害防治效果活体测定 选取大小及成熟度相近的番茄, 依次经 $w=3\%$ NaClO 和 $\varphi=75\%$ 乙醇溶液浸泡 5 min, 无菌水清洗 3 次, 无菌滤纸擦干后, 用打孔器在番茄表面打直径 5 mm、深 2 mm 的伤口。随后将“1.5.1”中制备的 6 种不同浓度处理液分别取 20 μL 接种于番茄伤口, 瞄干后, 用接种针将直径 5 mm、高 2 mm 的番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌菌饼分别接种至不同番茄伤口中, 套袋保湿, 25 ℃ 恒温培养 7 d, 参照 Zheng 等^[22]的方法计算不同稀释倍数保鲜剂的生防效果。每处理 10 个番茄, 试验重复 3 次。

表 1 不同载体对制剂特性的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of different carriers on formulation characteristics

载体 Carrier	吸附量/(mL/hg) Adsorption capacity	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	芽孢量($\times 10^8$)/(cfu/mL) Number of strain
高岭土 Kaolin	50.0±0.41 f	22.86±1.21 b	59.61±0.45 c	1.58±0.21 b
硅藻土 Diatomite	230.0±0.29 c	13.73±0.61 d	26.67±0.68 e	1.54±0.16 b
膨润土 Bentonite	89.9±0.15 e	13.16±0.54 d	81.27±0.16 a	1.68±0.04 a
玉米粉 Corn flour	170.0±0.56 d	17.98±0.68 c	26.58±1.26 e	1.56±0.14 b
麦麸 Wheat bran	260.0±0.68 b	13.11±0.12 e	28.68±0.54 e	1.52±0.11 b
木屑 Sawdust	310.1±0.79 a	14.87±0.78 d	15.31±0.49 f	1.62±0.08 a
滑石粉 Talc	50.0±0.54 f	44.68±2.31 a	78.23±0.89 b	1.40±0.21 c
白炭黑 Silica	22.0±0.16 g	14.63±0.78 d	35.14±0.91 d	1.28±0.07 d

注:同列不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。下同。

Note: Different lower case letters in the same column indicate significant differences at $P<0.05$. The same below.

1.6 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂对番茄货架腐烂率和病果率的影响

选取大小和成熟度相近番茄, 使用“1.5”中筛选出的 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂最大稀释倍数对红熟期番茄果实进行 15 min 浸泡处理, 以清水浸泡为对照, 以不做任何处理为空白对照。浸泡晾干后, 置于 20 ℃ 进行番茄货架试验, 每隔 1 d 统计番茄腐烂率和病果率。每处理 10 kg 番茄, 重复 3 次。

$$\text{腐烂率} = \frac{\text{腐烂果实数}}{\text{果实总数}} \times 100\%$$

$$\text{病果率} = \frac{\text{病果数}}{\text{果实总数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂制备

2.1.1 载体筛选 不同载体由于其自身的特性差异, 对制剂特性会产生一定影响。由表 1 看出, 木屑吸附效果最好、麦麸次之, 白炭黑最差。除载体为滑石粉和高岭土润湿时间超过 20 s 外, 其余载体的润湿时间均低于 20 s, 说明各类载体都具有较好的润湿特性。同润湿时间相比, 各载体在悬浮率方面则差异较大, 载体为膨润土和滑石粉的悬浮率在 75% 以上, 而其他载体的悬浮率均低于 60%, 也低于农业部行业标准(NY/T 2293.2-2012)中规定的 75%^[23]。载体为膨润土和木屑的制剂, Y-3 菌株存活率较高, 均在 1.6×10^8 cfu/g 以上; 其次为高岭土、硅藻土、玉米粉和麦麸, 均在 1.50×10^8 cfu/g 以上; 白炭黑存活率最低, 仅为 1.28×10^8 cfu/g。综合各载体参数特征, 膨润土作为载体时, 可有效保证生物制剂的悬浮率、润湿时间和菌株存活率, 是 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂的最佳载体。

2.1.2 助剂(润湿剂、分散剂)筛选 不同助剂对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂的特性影响进行研究后发现,不同助剂类型之间差异显著。由表2看出,添加助剂后对制剂的润湿时间、悬浮率和活菌数都有显著影响,其中润湿时间普遍出现增加现象,净洗剂LS润湿时间较长,为186.44 s;聚乙二醇8000(PEG 8000)最短,为20.13 s。虽然净洗剂LS延长了制剂的润湿时间,但可有效提

高制剂悬浮率,悬浮率可达77.44%,在各试验助剂中效果最好。在菌株存活率方面,净洗剂LS和PEG 8000存活率最高,分别为 1.60×10^8 cfu/g和 1.58×10^8 cfu/g,说明净洗剂LS可有效提高制剂悬浮率和保持菌株存活率。综合润湿时间、悬浮率和菌株存活率后,选择PEG 8000和净洗剂LS相配合来提高制剂的悬浮率和降低润湿时间。

表2 不同助剂对制剂特性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of different additives on characteristic of formulation

助剂 Additive	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	芽孢含量($\times 10^8$)/(cfu/mL) Number of strain
木质素磺酸钙 Calcium lignosulphonate	50.64±2.41 g	45.38±1.45 c	1.32±0.02 abcd
木质素磺酸钠 Sodium ligninsulfonate	48.81±0.86 j	46.28±1.77 c	1.28±0.03 abcd
拉开粉 BX Open powder	86.29±3.43 e	37.61±0.38 e	1.13±0.05 cd
净洗剂 LS Detergent LS	186.44±4.65 b	77.44±0.83 a	1.60±0.02 a
聚乙烯吡咯烷酮-K30 Polyvinylpyrrolidone K30	86.35±2.17 f	30.56±0.86 g	1.24±0.03 bcd
聚乙二醇 8000 Polyethylene glycol 8000	20.13±1.59 k	23.48±1.88 i	1.58±0.03 a
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	162.27±6.29 c	53.52±2.14 b	1.46±0.67 ab
分散剂 MF Naphthalenesulfonic acid	145.18±2.59 d	32.67±0.65 f	1.07±0.05 cd
十二烷基硫酸钠 Sodium dodecyl sulfate	321.72±3.27 a	40.57±0.37 d	0.99±0.03 d
朗钛 CF-200 Onvitec CF-200	40.74±1.21 i	24.77±0.40 h	1.38±0.03 abc
朗钛 LT-WP60 Onvitec LT-WP60	46.84±0.88 h	30.67±0.68 g	1.50±0.02 ab

2.1.3 助剂配比对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂特性的影响 由表3看到,PEG8000和净洗剂LS之间不同配比对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂菌株存活率影响较小,但对润湿时间和悬浮率则具有较大影响。当配比为1:9时悬浮率和润湿时间最高、最长,分别为80.63%和163.48 s,其中润湿时间高于国标规定的120 s;当配比为9:1时,润湿时间最短,为18.18 s,但悬浮率较低,仅为24.89%,低于农业部行业标准(NY/T

2293.2-2012)中规定的75%^[23];当配比为4:6时,悬浮率可达75%,且润湿时间均低于120 s,符合农业部有关微生物制剂的质量要求。综合考虑润湿时间和悬浮率后,选择4:6为助剂PEG8000和净洗剂LS的最佳比例。

2.1.4 助剂添加量对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂特性的影响 由表4看到,助剂添加量对制剂润湿时间和悬浮率影响较大,但对菌株存活量影响较小。随着助剂添加量的增加,润湿时间呈

表3 不同助剂比例对制剂特性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of different ratios of additives on characteristic of formulation

助剂比例 Additive ratio	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	芽孢含量($\times 10^8$)/(cfu/mL) Number of strain
1:9	163.48±3.46 a	80.63±0.06 a	1.61±0.03 a
2:8	128.35±5.05 b	80.21±0.10 a	1.48±0.02 c
3:7	96.54±1.33 c	71.35±0.06 c	1.54±0.04 b
4:6	92.02±1.20 d	75.89±0.10 b	1.53±0.01 b
5:5	66.84±0.67 e	70.20±0.12 d	1.60±0.02 a
6:4	98.32±1.08 f	61.06±0.06 e	1.58±0.03 ab
7:3	79.66±0.74 g	34.70±0.82 f	1.54±0.04 b
8:2	68.17±0.13 h	24.22±0.63 g	1.50±0.02 bc
9:1	18.18±1.11 i	24.89±0.58 h	1.57±0.03 ab

递增趋势,悬浮率也呈上升趋势,且不同添加量下润湿时间和悬浮率均满足国标要求。综合考虑润湿时间、悬浮率以及经济因素后选择4%作为助剂的最佳添加量。

2.1.5 稳定剂对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂特性的影响 由表5看到,羧甲基纤维素钠

(CMC-Na)可有效保持Y-3菌株存活率,下降率仅为1.86%,且对制剂润湿时间和悬浮率影响不大,效果优于其他种类稳定剂(表5)。因此选择2% CMC-Na为Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂的最佳稳定剂。

表4 不同助剂添加量对制剂特性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of different dosages of compounding additive on characteristic of formulation

助剂用量 Additive dosage	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	芽孢含量($\times 10^8$)/(cfu/mL) Number of strain
2%	44.08±0.82 e	76.49±0.16 d	1.56±0.04 ab
4%	60.60±0.89 d	80.87±0.19 c	1.60±0.02 a
6%	65.51±0.31 c	80.97±0.44 c	1.58±0.02 ab
8%	75.41±0.19 b	83.41±0.40 b	1.56±0.02 ab
10%	96.87±0.98 a	86.44±0.44 a	1.54±0.03 b

表5 不同稳定剂对制剂特性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of different stabilizers on characteristic of formulation

处理 Treatment	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	芽孢含量($\times 10^8$)/(cfu/mL) Number of strain		
			贮藏0d Storage 0 d	贮藏30d Storage 30 d	下降率/% Decrease rate
对照 Control	60.60±0.89 b	80.87±0.19 a	1.60±0.02 a	1.54±0.02 b	3.73±2.17 d
羧甲基纤维素钠 Carboxymethylcellulose sodium	66.80±1.23 a	79.70±0.69 b	1.61±0.01 a	1.58±0.04 a	1.86±1.76 e
磷酸钾 Tripotassium phosphate	59.96±0.19 b	71.28±0.13 c	1.60±0.01 a	1.26±0.04 d	21.42±3.12 b
碳酸钙 Calcium carbonate	60.64±0.03 b	70.10±0.23 d	1.58±0.02 a	1.35±0.04 c	15.01±1.57 c
磷酸氢二钾 Potassium phosphate dibasic	60.74±0.56 b	70.84±0.11 c	1.61±0.02 a	1.00±0.03 e	37.35±2.80 a

2.2 Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂稀释倍数及番茄采后病害活体抑菌效果

由表6和图1看到,当Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂稀释倍数高于300倍时,对番茄采后*B. cinerea*和*A. solani*活体抑菌效果明显下降,均低于70%;当稀释倍数为300时,虽然防治效果低于0和100倍,但防效仍在70%以上。综合防治效果和经济因素,确定该生物保鲜剂的最大

稀释倍数为300倍。另外,从图1还可看出,采后番茄在灰霉病病原侵染点周围出现明显腐烂的水渍状症状,进一步说明该病原是造成番茄采后腐烂的重要病原之一。

2.3 Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂对番茄货架期病果率和腐烂率的影响

模拟货架环境对Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂对红熟番茄货架期病果率和腐烂率控制效果

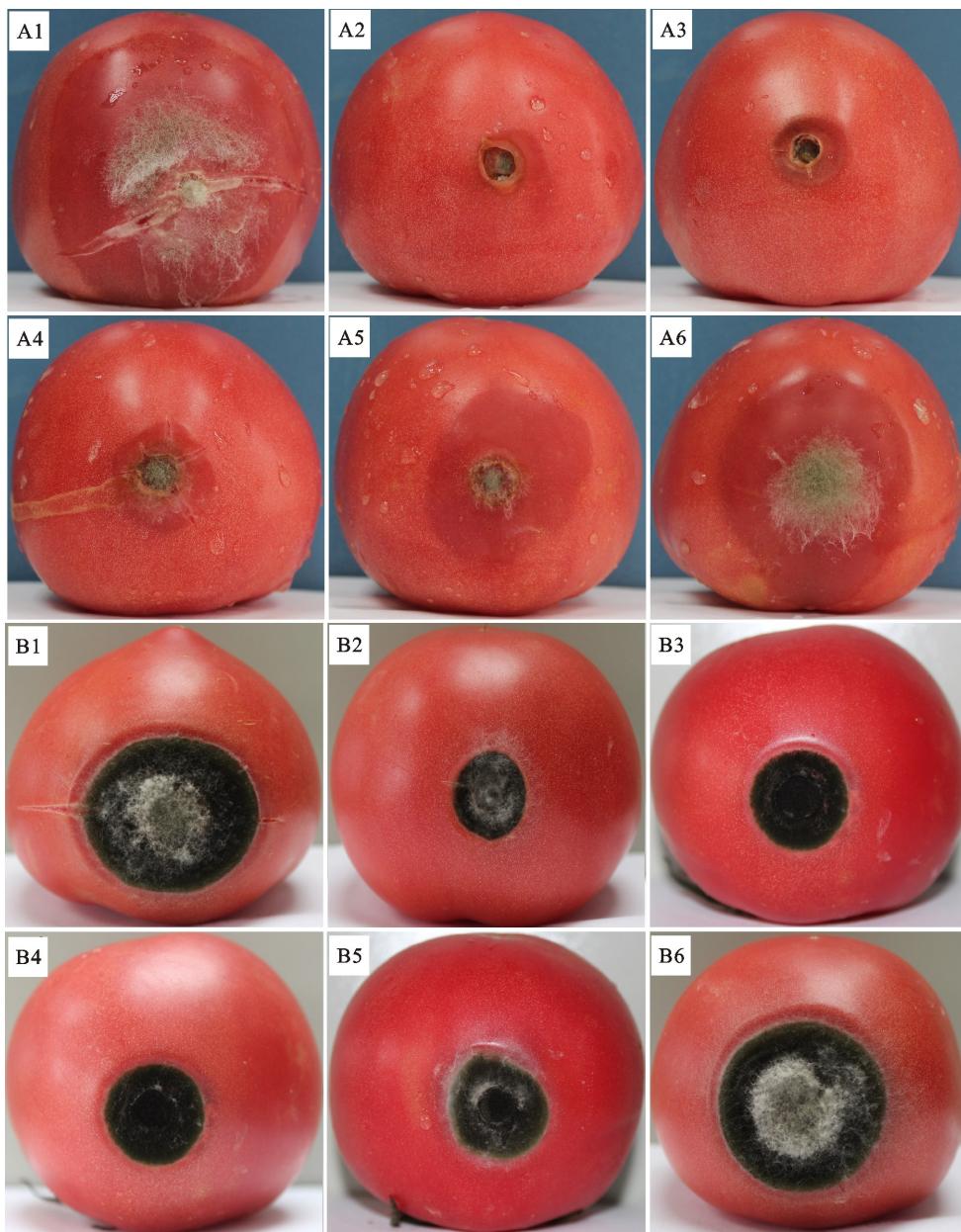
表6 不同浓度菌株Y-3可湿性粉生物保鲜剂对番茄采后灰霉和早疫病害的活体抑菌效果($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Antifungal activity of wettable powder biological preservative of stain Y-3 against postharvest disease of *B. cinerea* and *A. solani* of tomato in vivo at different dilution times

稀释倍数 Dilution times	病斑面积/ cm^2 Lesion area		抑菌效果/% Inhibition rate	
	<i>B. cinerea</i>	<i>A. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. solani</i>
CK	34.21±2.08 a	21.25±1.63 a	—	—
0	2.27±0.27 e	2.84±0.30 d	93.32±1.00 a	86.63±1.26 a
100	2.51±0.29 e	4.40±0.57 d	92.64±1.03 a	79.14±3.73 a
300	4.75±0.83 d	6.95±0.75 c	86.00±3.06 b	76.96±2.03 a
500	10.38±0.88 c	8.49±0.62 c	69.63±2.60 c	59.99±2.70 b
800	20.22±1.23 b	13.46±1.96 b	40.79±4.48 d	35.92±13.98 c

进行测定后发现:红熟番茄在不经任何处理时,于20℃货架3 d和5 d便开始出现腐烂和病果现象;当货架至7 d时,腐烂率和病果率便分别已达20%和10%以上,对番茄商品价值造成较大影响;货架至11 d时,腐烂率和病果率总和已达50%以上(表7)。番茄经清水清洗后,同不经处理相比腐烂时间可后延2 d;病果出现时间虽同空白对照相同,但病果率(2.71%)低于空白对照(3.36%),且相同货架时间下病果率和腐烂率均

低于空白对照,说明番茄采后清洗可在一定程度上降低番茄采后腐烂率和病果率。然而,同空白对照和清水浸泡对照相比,红熟番茄经Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂浸泡15 min处理后,不仅可显著推迟其货架期间腐烂和病果现象出现时间,分别在货架6 d和7 d时开始出现腐烂和病果,而且相同货架时间下,Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂处理组病果率和腐烂率均显著低于清水对照和空白对照;红熟番茄经该制剂浸泡处



A1~A6和B1~B6均依次为对照、稀释0倍、稀释100倍、稀释300倍、稀释500倍和稀释800倍 A1—A6 and B1—B6 all represent control, diluted 0 time, diluted 100 times, diluted 300 times, diluted 500 times and diluted 800 times

图1 菌株Y-3可湿性粉生物保鲜剂对番茄采后灰霉病菌(A)和番茄早疫病菌(B)的活体抑菌效果

Fig. 1 Antifungal activity of wettable powder biological preservative of stain Y-3 against postharvest disease of *B. cinerea* (A) and *A. solani* (B) of tomato in vivo at different dilution times

理 15 min 后可使货架时间延长至 11 d,且将腐烂率和病果率总和控制在 10% 左右(表 7),明显低于清水浸泡对照和空白对照,说明 Y-3 菌株可湿

性粉生物保鲜剂在延长红熟番茄 20 ℃ 货架时间和降低腐烂率与病果率方面具有较好应用潜力。

表 7 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂浸泡处理对番茄采后货架腐烂和病害控制效果($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Control effect of soaking treatment of strain Y-3 wettable powder biological preservative on decay and disease of tomato during postharvest shelf

货架时间/d Shelf life time	空白对照 Blank control		清水浸泡处理 Soaking treatment of water		300 倍稀释液浸泡处理 Soaking treatment of 300 times dilution	
	病果率/% Disease rate	腐烂率/% Decay rate	病果率/% Disease rate	腐烂率/% Decay rate	病果率/% Disease rate	腐烂率/% Decay rate
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	1.28±0.13	0	0	0	0
4	0	4.37±0.67	0	0	0	0
5	3.36±0.33	6.31±0.11	2.71±0.47	7.05±1.28	0	0
6	6.96±0.51	10.41±1.03	5.73±1.13	9.18±1.47	0	2.88±0.60
7	12.17±0.71	21.38±2.11	11.57±0.66	16.71±2.47	2.79±0.43	4.05±0.21
8	19.36±1.33	27.33±2.17	18.63±1.70	26.05±1.11	4.37±0.76	5.67±0.90
9	24.41±2.43	36.19±3.41	21.41±0.76	35.57±3.16	5.79±1.65	7.71±0.92
10	30.51±1.83	46.27±1.39	25.48±1.31	47.17±1.84	6.63±1.60	8.72±0.65
11	47.61±4.17	57.86±3.51	29.64±1.63	61.07±1.17	7.35±1.22	10.75±0.57

3 结论与讨论

采用单因素试验和平板活菌数量检测方法对 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂配方和配方中各成分同菌株 Y-3 之间的生物相容性进行测定后发现:Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂的最佳载体为膨润土,最佳助剂组合为净洗剂 LS、羧甲基纤维素钠和聚乙二醇 8000;最佳生物保鲜剂配方为:发酵液 70%、膨润土 10%、PEG8000 2.4%、净洗剂 LS 3.6%、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)2%,膨润土补足 100%。该配方中稳定剂种类同李舒雯等^[21]、蔡勋超等^[24]和王剑等^[25]相同,且生防菌株均为芽孢杆菌,进一步说明 CMC-Na 在保护芽孢杆菌存活方面具有较好作用。除稳定剂外,其他试剂用量及种类均存在一定差异,如:枯草芽孢杆菌 B99-2 的最佳配方为硅藻土 10%,分散剂 PVA 7.2%,润湿剂 D425 4.8%,稳定剂 CMC-Na 2.0%,保护剂 FWA 0.1%^[25];内生短芽孢杆菌 011 可湿性粉剂最佳配方:滑石粉 10%,木质素磺酸钙 7%,DBS 3%,CMC-Na 2%,糊精 0.1%^[21];枯草芽孢杆菌 B1514 最佳配方为摇瓶发酵液 70%、硅藻土 18%、CMC-Na 4.8%、PEG8000 7.2%^[26]。造成制剂配方中的差异可能与菌株自身特性差异关系较为密切。

在明确 Y-3 菌株可湿性粉生物保鲜剂配方后,还通过活体试验对制剂的稀释倍数和番茄采后早疫和灰霉病病原抑菌效果进行了测定,结果发现:稀释 300 倍为该制剂的最大稀释倍数,在该稀释倍数以下对 2 种病原的抑菌效果可保持在 75%以上;当稀释 500 时,抑菌效果出现较大下降,对番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌的防治效果仅为 69.63% 和 59.99%,说明该制剂的最大稀释倍数为 300 倍。稀释倍数同化学药剂田间用药倍数相比较低,可能与制剂中的活菌数量、生物菌剂活性以及作用效果缓慢等存在一定关系。另外,该菌株制剂稀释倍数同贝莱斯芽孢杆菌菌株 S6 可湿性粉剂^[27]和枯草芽孢杆菌 B36 菌株可湿性粉剂^[28]相比稀释倍数较低,但同每克枯草芽孢杆菌含 10 亿芽孢可湿性粉剂^[29]和枯草芽孢杆菌 D-29 可湿性粉剂^[30]相比稀释倍数较大,进一步说明不同菌株制备成的可湿性粉剂在同种病害防治和不同种病害防治中存在一定活性差异,造成这种差异的原因可能与菌株自身差异、植物品种、用药时间、用药方式以及用药环境存在一定差异有关。

随后,为进一步明确制剂的实际应用效果,本研究还模拟超市货架环境,在单位保鲜库 20 ℃ 条件下,采用浸泡 15 min 处理对制剂应用效果进行验证。结果显示:红熟番茄经该制剂浸泡 15 min

可有效降低番茄货架期间的病果率和腐烂率;同对照相比可使货架时间延长至11 d。防治效果同王金玉等^[10]的处理方式NaClO(可使成熟番茄在20℃货架7 d)相比,效果较优;同Asgar等^[31]的阿拉伯树胶处理(可使绿果番茄在20℃下货架20 d)和王文辉等^[32]的1-MCP处理(可使番茄室温货架期后延7 d)相比效果略差,造成这些差异的原因可能同番茄成熟度和品种存在差异有关。另外,试验过程中还发现在无外源灰霉和早疫病病原接种的情况下,番茄在货架期间的主要病害表现为番茄早疫病,而无番茄灰霉病害发生,同已报道的研究结果(*B. cinerea*是引起番茄采后腐烂的主要病原)^[11-12]存在差别,造成这种差异原因可能同本研究没有采用外源接种病原或番茄采收前的病害发生情况有关。

本研究发现Y-3菌株可湿性粉生物保鲜剂制备配方、稀释倍数、活体抑菌效果以及对红熟番茄采后货架期间的腐烂率控制有一定效果,但在后期研究中还尚需对制剂在不同品种番茄中的应用效果、采前应用效果、不同成熟度番茄应用效果、番茄贮藏中试试验、推广应用以及制剂剂型改良等方面进行大量研究,以期为该菌株和制剂的市场化应用奠定坚实基础。

参考文献 Reference:

- [1] 王金玉.采后因子对番茄货架期腐烂及品质的影响[D].北京:中国农业科学院,2008.
- WANG J Y. Effect of postharvest factors on tomato rot and quality during shelf life [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008.
- [2] 田虎,张继红,孙和龙,等.番茄采后寄生菌的分离鉴定及(E)-2-己烯醛抑菌活性研究[J].激光生物学报,2015,24(6):545-550.
- TIAN H,ZHANG J H,SUN H L,*et al*. Isolation & identification of bacteria from postharvest tomato and a study on the antibacterial activity of (E)-2-Hexenal [J]. *Acta Laser Biology Sinica*,2015,24(6):545-550.
- [3] 潘洁.阿魏酸处理对采后番茄果实品质影响及青霉病控制的研究[D].杭州:浙江工商大学,2017.
- PAN J. Effects of ferulicacid treatment on fruit quality of postharvest tomatoes and control of penicillium[D]. Hangzhou:Zhejiang Gongshang University,2017.
- [4] SHARMA R R,SINGH D,SINGH R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists:A review[J]. *Biological Control*,2009,50(3):205-221.
- [5] 童志丹.番茄采后早疫病菌拮抗微生物的筛选、鉴定及发酵条件优化[D].长沙:湖南农业大学,2011.
- TONG ZH D. Screening, identification and optimization of fermentation conditions for antagonistic microorganisms of postharvest early blight pathogens in tomato[D]. Changsha:Hunan Agricultural University,2011.
- [6] 周防震.番茄采后病害拮抗酵母菌的筛选和应用[D].武汉:华中农业大学,2004.
- ZHOU F ZH. The screening and application of antagonism yeast on tomato postharvest disease [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University,2004.
- [7] SHI T,YUN L,QIN G,*et al*. Effect of fungal infection on ethylene production, ACC synthase and lipoxygenase activity in tomato fruits [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002,32(2):159-164.
- [8] 陈梅.丁香精油对番茄采后腐烂抑制作用及成分分析[J].山西农业大学学报(自然科学版),2016,36(9):678-684.
- CHEN M. Inhibitory effects of clove oil on postharvest decay of tomato and its essential components [J]. *Journal of Shanxi Agriculture University (National Science Edition)*,2016,36(9):678-684.
- [9] 徐仕翔.月桂精油及其复合保鲜方法对樱桃番茄采后病害抑制效果的研究[D].杭州:浙江大学,2016.
- XU SH X. Study on the inhibitory effect of laurel essential oil and its composite preservation method on postharvest diseases of cherry tomato [D]. Hangzhou:Zhejiang University,2016.
- [10] 王金玉,张学杰,郭科,等.不同消毒剂及清洗温度对番茄货架期腐烂率的影响[J].中国蔬菜,2009(12):7-10.
- WANG J Y,ZHANG X J,GUO K,*et al*. Effect of postharvest washing with different disinfection and temperature on controlling rotten rates of tomatoes during shelf life[J]. *China Vegetables*,2009(12):7-10.
- [11] ZHANG X,MIN D,LI F,*et al*. Synergistic effects of arginine and methyl salicylate on alleviating postharvest disease caused by *Botryoscinerea* in tomato fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*2017, 21; 65 (24): 4890-4896.
- [12] MIN D,LI F,ZHANG X,*et al*. Effect of methyl salicylate in combination with 1-methylcyclopropene on postharvest quality and decay caused by *Botrytis cinerea* in tomato fruit[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,2018,98(10):3815-3822.
- [13] ZONG Y,LIU J,LI B,*et al*. Effects of yeast antagonists in combination with hot water treatment on postharvest diseases of tomato fruit[J]. *Biological Control*,2010,54(3):316-321.
- [14] 卢慧,伍冰倩,王伊帆,等.富氢水处理对采后番茄果实灰霉病抗性的影响[J].河南农业科学,2017,46(2):64-68.
- LU H,WU B Q,WANG Y F,*et al*. Effects of hydrogen-rich water treatment on defense responses of postharvest tomato fruit to *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of Henan*

- Agricultural Sciences*, 2017, 46(2):64-68.
- [15] KILANI-FEKIO, KHEDHER S B, DAMMAK M, et al. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease[J]. *Biological Control*, 2016, 95(5):73-82.
- [16] SHI J F, SUN C Q. Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, 48(4):706-714.
- [17] 高振峰. 桦树内生细菌 ZSYB-1 分离、鉴定及抗菌活性研究[D]. 山西太谷:山西农业大学, 2015.
GAO ZH F. Isolation and identification of endophytic bacteria ZSYB-1 from catalpaovata G. Don and the study of antibacterial activity [D]. Taigu Shanxi: Shanxi Agriculture University, 2015.
- [18] CHEN C C, WANG C, GUO Q Q, et al. Identification and culture condition study of marine actinomycete HT-8 with nematicidal activity against pine wood nematode [J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(6):54-60.
- [19] 中华人民共和国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/T5451-2001 [S]. 北京:中国标准出版社, 2004.
General Administratio of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Testing Method for the Wettability of Dispersible Powders of Pesticides; GB/T5451-2001 [S]. Beijing: China Standard Press, 2004.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中国标准化管理委员会. 农药悬浮率测定方法:GB/T14825-2006 [S]. 北京:中国标准出版社, 2007.
General Administratio of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination Method of Suspensibility for Pesticides; GB/T14825-2006[S]. Beijing: China Standard Press, 2007.
- [21] 李舒雯, 周金伟, 易有金, 等. 内生短芽孢杆菌 011 可湿性粉剂的研制[J]. 植物保护, 2014, 40(4):96-100.
LI SH W, ZHOU J W, YI Y J, et al. Development of the wettable powder of endophytic *Brevibacillus brevis* strain 011 [J]. *Plant Protection*, 2014, 40(4):96-100.
- [22] ZHENG M, SHI J, SHI J, et al. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos[J]. *Biological Control*, 2013, 65(2):200-206.
- [23] 中华人民共和国农业部. 细菌微生物农药. 枯草芽孢杆菌第2部分:枯草芽孢杆菌可湿性粉剂:NY/T 2293. 2-2012 [S]. 北京:中国农业出版社, 2013.
Ministry of Agriculutre of the PRC. Bacterial pesticide-*Bacillus subtilis*-Part2: *Bacillus subtilis* wettable powders (wp); NY/T 2293. 2-2012 [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2013.
- [24] 蔡勋超, 刘佳栋, 高 旭, 等. 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.
CAI X CH, LIU J D, GAO X, et al. Preparation of endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 WP [J]. *Modern Agrochemicals*, 2015, 14(6):8-12.
- [25] 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.
WANG J, WANG N, GAO G M, et al. Research on wetting powder of *Bacillus subtilis* with each gram 20 billion spores [J]. *Agrochemicals*, 2010, 49(7):486-489.
- [26] 贺振宁, 李海燕, 苏 媛, 等. 枯草芽孢杆菌 B1514 可湿性粉剂的研制及其对小麦纹枯病的防效[J]. 河南农业科学, 2015, 44(11):67-72.
HE ZH N, LI H Y, SU Y, et al. Development of wettable powder of *Bacillus subtilis* B1514 and its control effect on wheat sheath blight [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2015, 44(11):67-72.
- [27] 张 帆. 贝莱斯芽孢杆菌菌株 S6 可湿性粉剂研制及其对番茄主要病害防治效果[D]. 长春:吉林农业大学, 2018.
ZHANG F. *Bacillus Brevis* strain S6 WP development and control effect of main tomato diseases [D]. Changchun:Jilin Agriculture University, 2018.
- [28] 纪明山, 王建坤, 王 芳, 等. 吡虫啉等 11 种农药对枯草芽孢杆菌 B36 菌株可湿性粉剂防治番茄灰霉病效果的影响 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(11):295-297.
JI M SH, WANG J K, WANG F, et al. Effects of imidacloprid and other 10 kinds of pesticides on B36(*Bacillus subtilis*) WP to control tomato gray mould[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(11):295-297.
- [29] 王 震, 谢晓霞, 施晓艳, 等. 有机番茄生产中“10 亿芽孢/克枯草芽孢杆菌可湿性粉剂”的应用效果[J]. 食品安全导刊, 2017(33):144-145.
WANG ZH, XIE X X, SHI X Y, et al. Application effect of 1 billion spores/gram *Bacillus subtilis* wettable powder on organic tomato production [J]. *China Food Safety*, 2017 (33):144-145.
- [30] 姚晓东. 枯草芽孢杆菌 D-29 可湿性粉剂的研制及其防效果的研究[D]. 山西太谷:山西农业大学, 2016.
YAO X D. Preparation for wettable powder of *Bacillus subtilis* D-29 and its application as biocontrol agent [D]. Taigu Shanxi: Shanxi Agriculture University, 2016.
- [31] Asgar Ali, Mehdi Maqbool, Senthil Ramachandran, 等. 应用新型可食性阿拉伯树胶涂膜延长番茄果实货架期及提高果实质品的研究[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(1):56.
ASGAR A, MEHDI M, SENTHIL R, et al. A new type of edible gum arabic coating was used to prolong the shelf life of tomato fruit and improve fruit quality [J]. *Storage and Process*, 2011, 11(1):56.
- [32] 王文辉, 孙希生, 王志华, 等. 1-MCP 对延长番茄货架寿命的作用[J]. 保鲜与加工, 2002, 2(2):12-13.
WANG W H, SUN X SH, WANG ZH H, et al. Action of 1-MCP on extending shelf life of tomato [J]. *Storage and Process*, 2002, 2(2):12-13.

Preparation of *Bacillus amyloliquefaciens* Y-3 Preservative and Its Effect on Shelf Life of Tomato

ZHANG Xiaoyu¹, ZHANG Lixin¹, GAO Zhenfeng¹,
ZHANG Xinxian¹, QIN Yifan¹ and LIU Feng²

(1. Institute of Agricultural Product Storage and Fresh Keeping, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

2. Information Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China)

Abstract In order to obtain the *Bacillus amyloliquefaciens* Y-3 wettable powder biological preservative for effectively controlling the decay rate of tomato during shelf life, the single factor and plate activity detection methods were combinedly used to screen the best carrier and composite additive, which it had the least effect on activity of strain Y-3. In addition, the best dilution ratio and the control effect of formulation on decay rate of tomato during shelf were determined in vivo and by shelf experiment, respectively. The results showed that the best formula of *B. amyloliquefaciens* Y-3 bio-wettable powder preservative was fermentation broth 70%, bentonite 10%, PEG 8000 2.4%, detergent LS 3.6%, sodium carboxymethyl cellulose(CMC-Na) 2% and bentonite was used to add 100%. The dilution times of formulation was ≤ 300 times and the red ripe tomato could be shelved at 20 °C for 11 days when tomato was soaked in the solution of *B. amyloliquefaciens* Y-3 wettable powder biological preservative for 15 min. In addition, the disease rate and decay rate of tomato were 7.35% and 10.75%, respectively, which were significantly lower than that of the control. In conclusion, the biological preservative of strain Y-3 could not only have good effect on post-harvest disease of *A. solani* and *B. cinerea* of tomato, but also effectively reduce the decay and disease rate of red ripe tomato during shelf life, it was of great significance in extending the shelf supply time of tomato.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens* Y-3; Wettable powder bio-preservative; Tomato shelf; Decay rate; Biological control

Received 2019-04-29

Returned 2019-06-26

Foundation item Key Program of Shanxi Provincial Key R&D Plan (No. 201703D211006, No. 201703D221026-1, No. 201803D221016-1); Key Project for Special Agriculture of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (No. YGG17002).

First author ZHANG Xiaoyu, Ph. D, associate research fellow. Research area: fruit and vegetable post-harvest pathology and biological control of fruit and vegetable postharvest diseases. E-mail: xiayuzhang2005@163.com

Corresponding author GAO Zhenfeng, Ph. D, research assistant. Research area: biological control of plant diseases and development of biopreparate. E-mail: sxndgjf@163.com

(责任编辑:史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)