

# 白星花金龟虫砂-GelMA水凝胶载菌体系优化及对棉花黄萎病菌抑制率的影响

王雨潇, 焦子蕴, 陈京京, 黄毅衡, 叶 晚, 康文杰, 孟 卓, 马德英, 陈爱松\*

新疆农业大学农学院, 农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 丝绸之路经济带棉花优质高效协同创新中心, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2026年7月31日; 录用日期: 2026年8月26日; 发布日期: 2026年9月2日

## 摘 要

目的: 制备白星花金龟虫砂与载菌水凝胶(B-GelMA)复合体系, 评价其对棉花黄萎病菌的抑制效果。方法: 以解淀粉芽孢杆菌为目标菌, 建立OD<sub>600</sub>与菌量标准曲线; 优化B-GelMA的载菌条件; 通过释放动力学实验考察温度、pH对解淀粉芽孢杆菌释放的影响; 采用平板对峙法测定虫砂、B-GelMA及复合体系对大丽轮枝菌的抑制率。结果: 菌液浓度与OD<sub>600</sub>在0~0.35范围内线性良好,  $R^2 = 0.9882$ 。最佳载菌条件: 浸泡时间8 h、温度31℃、pH 6~7、凝胶质量2.5 g、菌液体积30 mL、初始浓度 $8 \times 10^8$  cfu/mL, 载菌量达 $2.16 \times 10^9$  cfu/g。释放动力学显示: 温度  $\leq 31^\circ\text{C}$  时为不规则扩散,  $\geq 34^\circ\text{C}$  转为Fick扩散; pH 6~9时均为不规则扩散。平板对峙结果表明, B-GelMA及复合体系的抑菌率分别达61.72%和60.00%显著高于白星花金龟虫砂, 二者之间无显著差异。结论: 白星花金龟虫砂具有一定抑菌作用, 在体外抑菌测试中, B-GelMA展现了比虫砂更强的抑制活性, 其在复合体系中起主导作用; 虫砂的综合作用及协同潜力有待土壤环境中的进一步验证。该载菌水凝胶在适宜条件下负载效率高、释放可控, 具备防控棉花黄萎病的应用潜力。

## 关键词

白星花金龟虫砂, 甲基丙烯酰化明胶水凝胶, 解淀粉芽孢杆菌, 大丽轮枝菌, 抑制率

# Optimization of *Protaetia brevitarsis* Frass-GelMA Hydrogel Bacteria-Loading System and Its Effect on the Inhibition Rate of *Verticillium dahliae* in Cotton

Yuxiao Wang, Ziyun Jiao, Jingjing Chen, Yiheng Huang, Wan Ye, Wenjie Kang, Zhuo Meng, Deying Ma, Aisong Chen\*

\*通讯作者。

文章引用: 王雨潇, 焦子蕴, 陈京京, 黄毅衡, 叶晚, 康文杰, 孟卓, 马德英, 陈爱松. 白星花金龟虫砂-GelMA 水凝胶载菌体系优化及对棉花黄萎病菌抑制率的影响[J]. 农业科学, 2026, 16(9): 1391-1403. DOI: 10.12677/hjas.2026.169168

Silk Road Economic Belt Cotton High-Quality and Efficient Collaborative Innovation Center, College of Agronomy, Key Laboratory of the Pests Monitoring and Safety Control of Crops and Forests, Xinjiang Agricultural University, Urumqi Xinjiang

Received: July 31, 2026; accepted: August 26, 2026; published: September 2, 2026

## Abstract

**Objective:** To prepare a composite system of *Protaetia brevitarsis* frass and bacteria-loaded hydrogel (B-GelMA) and evaluate its inhibitory effect against *Verticillium dahliae* in cotton. **Method:** Using *Bacillus amyloliquefaciens* as the target biocontrol bacterium, a standard curve between OD<sub>600</sub> and bacterial count was established. The bacteria-loading conditions of B-GelMA were optimized; the effects of temperature and pH on bacterial release were investigated through release kinetics experiments. The inhibition rates of frass, B-GelMA, and the composite system (frass + B-GelMA) against *Verticillium dahliae* were determined using the plate confrontation method. **Result:** The bacterial concentration showed a good linear relationship with OD<sub>600</sub> in the range of 0~0.35, with  $R^2 = 0.9882$ . The optimal loading conditions were soaking time 8 h, temperature 31°C, pH 6~7, hydrogel mass 2.5 g, bacterial solution volume 30 mL, and initial concentration  $8 \times 10^8$  cfu/mL, achieving a bacterial loading capacity of  $2.16 \times 10^9$  cfu/g. Release kinetics indicated that bacterial release followed anomalous diffusion at temperatures  $\leq 31^\circ\text{C}$  and switched to Fickian diffusion at  $\geq 34^\circ\text{C}$ . At pH 6~9, the release mechanism was anomalous diffusion in all cases. Plate confrontation results showed that the inhibition rates of B-GelMA and the composite system reached 61.72% and 60.00%, respectively, which were significantly higher than that of *Protaetia brevitarsis* frass alone, with no significant difference between the two. **Conclusion:** *Protaetia brevitarsis* frass possesses certain antifungal activity. In *in vitro* antibacterial tests, B-GelMA exhibited stronger inhibitory activity than Chongsha, playing a dominant role in the composite system. The comprehensive effect and synergistic potential of Chongsha require further validation in the soil environment. This bacterial-loaded hydrogel demonstrates high loading efficiency and controllable release under suitable conditions, showing application potential for the prevention and control of cotton *Verticillium wilt*.

## Keywords

*Protaetia brevitarsis* Frass, Methacrylated Gelatin Hydrogel, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Verticillium dahliae*, Inhibition Rate

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

【研究意义】棉花产业在新疆区域经济发展中占据举足轻重的地位[1]。然而，棉花黄萎病持续蔓延，严重威胁产量与纤维品质。新疆超 50% 棉田受侵染，病情指数  $\geq 5.0$  的棉田占 28.1%，经济损失巨大[2]。机械化作业、常年连作和秸秆还田等栽培模式使病害逐年加重[3]。因此，开发高效、环保、可持续的防控技术对保障新疆棉花产业安全具有重要意义。【前人研究进展】该病由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起，病原菌以微菌核在土壤中长期存活，侵染根系致叶片焦枯、整株死亡[4] [5]。国内外在抗性育种、栽培管理、化学防治和生物防治等方面开展了大量研究。抗性育种因缺乏有效抗病源且菌株易变异，西

北内陆棉区多数品种对黄萎病仍处于低耐或感病水平,高抗黄萎病品种极为稀缺[6]。化学防治缺乏特效药剂,且易造成污染和抗药性[7]。农业措施受制于成本难以推广。生物防治因环境友好、安全、不易产生抗性而成为理想途径[8]。拮抗微生物中,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)固定殖力强、抑菌谱广且能促生而备受关注[9]-[11]。但传统生防菌剂田间存活率低、持效期短,限制了其稳定性与推广[12]。水凝胶具有三维网络结构,生物相容性好、吸水保水且可控释放,在药物递送和细胞固定化中应用广泛[13]。将其用于农业生防菌负载,可提高菌体存活率和释放稳定性[14]。虫砂,也称昆虫粪便,富含有机质和微量元素,具改良土壤潜力[15]。白星花金龟虫砂与微生物菌剂复合施用对棉花黄萎病有一定防控效果[16],但作用机制及虫砂与载体材料的协同关系尚不明确。【本研究切入点】现有研究证实水凝胶可作为生防菌载体,虫砂在抑菌和改良土壤等方面具有一定潜力,但三者有机结合的复合体系未见报道。水凝胶载菌条件缺乏系统优化,负载效率不稳定。载菌水凝胶中菌种释放动力学不明确,难以精准控释。虫砂与水凝胶载菌体系联合抑制黄萎病菌的效果尚未确定。因此,需要构建“虫砂-水凝胶-生防菌”三元复合体系,明确其最佳制备工艺、释放行为及抑菌效能。【拟解决的关键问题】本研究以甲基丙烯酰化明胶(GelMA)水凝胶为载体,解淀粉芽孢杆菌为目标生防菌,系统优化载菌条件,阐明环境因子对菌种释放动力学的影响;通过平板对峙法比较虫砂、载菌水凝胶及二者复合体系对大丽轮枝菌的抑制率,揭示各组分抑制效果,为棉花黄萎病绿色防控提供科学依据和技术支撑。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 供试材料

供试虫砂为白星花金龟(*Protaetia brevitarsis*) 3龄幼虫新鲜粪便,由新疆农业大学驻玛纳斯科研基地自产,于室温下干燥储存,使用前粉碎,过100目筛后备用。供试生防菌为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)菌株,由北京绿氮生物科技有限公司提供。供试病原菌为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)菌株,由新疆农业大学植物病理系实验室提供。甲基丙烯酰化明胶(GelMA)水凝胶购买于润原生物科技(苏州)有限公司, LB 液体培养基购买于北京索莱宝科技有限公司。

### 2.2. 解淀粉芽孢杆菌菌液 OD 值的测定与标准曲线建立

取活化后处于对数生长期的解淀粉芽孢杆菌菌液,用无菌生理盐水稀释成一系列浓度梯度。采用 UV-2600 型紫外可见分光光度计在波长 600 nm 处测定各稀释度菌液的吸光度( $OD_{600}$ )值,每个浓度设置 3 个平行样,取平均值。同时,采用稀释涂布平板法对相同梯度菌液进行活菌计数,计数培养基为 LB 固体培养基,37℃培养 48 h 后统计菌落数。以  $OD_{600}$  值为横坐标(x),对应的菌液浓度(cfu/mL)为纵坐标(y),绘制标准曲线,并建立回归方程。

### 2.3. 载菌水凝胶的制备与载菌条件优化

#### 2.3.1. 载菌水凝胶的制备

将 GelMA 水凝胶注入 96 孔板中,制成直径 6 mm、厚 2 mm 的圆片,经紫外灯照射灭菌 1 h 后,置于优化条件下的解淀粉芽孢杆菌菌液中,于恒温摇床中(120 r/min)避光震荡负载 12 h。负载完成后,用无菌 PBS 缓冲液轻轻冲洗凝胶表面 3 次以去除未吸附的菌体,得到负载解淀粉芽孢杆菌的载菌水凝胶,记作 B-GelMA。

#### 2.3.2. 载菌量与载菌率计算

参照朱孟臻[17]的方法,并结合 1.2 中拟合的方程,通过空白对照的方式,直接测定水凝胶颗粒上负载的解淀粉芽孢杆菌载菌量与载菌率。配制 LB 液体培养基,接种纯化后的解淀粉芽孢杆菌,在 37℃下

振荡培养至对数生长期。将对数生长期的菌液平均分为两组，分别分装于 250 mL 锥形瓶中。其中一组加入 20 颗经紫外灯照射灭菌 1 h 的水凝胶颗粒，作为负载组；另一组不加水凝胶，作为空白对照。负载结束后，测定负载组菌液的吸光度值  $A_1$ ，空白对照组菌液的吸光度值  $A_2$ 。载菌量( $Q$ )与载菌率( $R$ )分别按公式(1)和(2)计算。

$$Q(\text{cfu}) = a(A_2 - A_1) + b \quad (1)$$

$$R = \frac{a(A_2 - A_1) + b}{aA_2 + b} \quad (2)$$

2.3.3. 载菌条件优化

通过单因素试验，分别考察浸泡时间(2、4、6、8、10、12 h)、负载温度(25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃)、菌液 pH(3、4、5、6、7、8、9、10)、水凝胶质量(0.5、1、1.5、2、2.5、3 g)、菌液体积(10、20、30、40、50 mL)和初始浓度对水凝胶载菌量及载菌率的影响，确定最优负载条件。每组试验设置 5 个重复。

2.4. B-GelMA 释放动力学研究

选取负载条件一致的 B-GelMA 水凝胶，分别研究其在温度分别为 25℃、28℃、31℃、34℃、37℃、40℃和 pH 分别为 6、7、8、9 梯度下的菌种释放行为。将单个载菌水凝胶置于盛有 20 mL 无菌 PBS 缓冲液的离心管中，于恒温水浴振荡器中震荡(120 r/min)。分别在 1、2、3、5、10、15、20、25、30、40、50、60 min 时间点取样，测定释放介质中的菌液 OD<sub>600</sub> 值，计算累积释放率。采用 Peppas 经验方程(3)和(4)对释放过程进行动力学模拟。

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3)$$

对公式两边取对数得：

$$\ln(M_t/M_\infty) = n \ln t + \ln k \quad (4)$$

式中： $M_t$  为  $t$  时间内的累积释放量(cfu)， $M_\infty$  为平衡释放量(cfu)， $k$  为释放速率常数， $n$  为扩散指数。  
以  $\ln t$  为  $x$  轴， $\ln(M_t/M_\infty)$  为  $y$  轴， $\ln k$  为截距。根据表 1 中菌种释放扩散特征指数，以柱状模型经验模型作为参考。

Table 1. The relationship of Peppas empirical index  $n$  and mechanism of drug release  
表 1. Peppas 经验式指数  $n$  与药物释放的机制关系

| 释放机制    | 经验指数 $n$ |           |           |
|---------|----------|-----------|-----------|
|         | 片状模型     | 柱状模型      | 球状模型      |
| Fick 扩散 | <0.5     | <0.45     | <0.43     |
| 不规则扩散   | 0.5~1.0  | 0.45~0.89 | 0.43~0.85 |
| 溶蚀扩散    | >1.0     | >0.89     | >0.85     |

2.5. 复合体系对棉花黄萎病菌的抑制效果

采用平板对峙法。将大丽轮枝菌菌饼(直径 5 mm)接种于 PDA 平板中央，在距离菌饼 2 cm 处按表 2 设置的 4 种处理放置，每个处理设置 5 个重复，25℃恒温对峙培养 10 d，十字交叉法测量菌落直径，计

算抑菌率，公式如下：

菌落直径(mm)=量菌落直径-0.5 (5)

抑菌直径(mm)=照病原菌直径-与拮抗菌对峙的病原菌 (6)

抑制率(%)= (对照菌落直径-处理菌落直径) / (对照菌落直径-0.5) ×100% (7)

Table 2. Experimental design of frass composite biocontrol bacteria  
表 2. 虫砂复合生防菌试验设计

| 处理组          | 使用剂量        | 简称        | 备注                                |
|--------------|-------------|-----------|-----------------------------------|
| 空白对照组        | 1 片         | Vehicle   | GelMA 水凝胶                         |
| 白星花金龟虫砂组     | 10 mg       | Frass     | 白星花金龟虫砂(1500 kg/hm <sup>2</sup> ) |
| B-GelMA 水凝胶组 | 1 片         | Gel_JDF   | B-GelMA 水凝胶                       |
| 复合体系组        | 10 mg + 1 片 | F_Gel_JDF | 虫砂 + B-GelMA 水凝胶                  |

2.6. 数据处理与分析

所有数据采用 WPS 进行初步整理，利用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。处理间差异显著性采用单因素方差分析(ANOVA)及 Tukey HSD 多重比较(α = 0.05)，\*表示差异显著，p < 0.05，\*\*表示差异极显著 p < 0.01，ns 表示无显著差异，p > 0.05，图形使用 graphpad prism9.0 软件绘制。

3. 结果与分析

3.1. 解淀粉芽孢杆菌菌数与 OD<sub>600</sub> 值的关系

对不同稀释度的解淀粉芽孢杆菌菌液进行 OD<sub>600</sub> 测定及活菌计数，结果如表 3 和图 1 所示。以 OD<sub>600</sub> 值为横坐标(x)，菌液浓度(×10<sup>8</sup> cfu/mL)为纵坐标(y)，进行最小二乘法分析。结果表明，解淀粉芽孢杆菌在 OD<sub>600</sub> 值 0~0.35 范围内，菌液浓度与吸光度呈良好的线性关系，决定系数 R<sup>2</sup> = 0.9882，表明拟合优度较高，方程的可靠性强。该回归方程可用于后续实验中根据 OD<sub>600</sub> 值快速、准确地计算解淀粉芽孢杆菌的活菌数量。

Table 3. Relationship between bacterial count and OD<sub>600</sub> of *Bacillus amyloliquefaciens*  
表 3. 解淀粉芽孢杆菌菌数与 OD<sub>600</sub> 关系

| 稀释倍数                        | CK                   | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-3</sup>        | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-1</sup> |
|-----------------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------------|------------------|------------------|
| OD <sub>600</sub>           | 0                    | 0.023            | 0.041            | 0.078            | 0.094                   | 0.187            | 0.336            |
| 菌数(×10 <sup>8</sup> cfu/mL) | 0                    | 0.11             | 0.29             | 0.68             | 1.26                    | 2.42             | 3.95             |
| 拟合方程                        | y = 12.28x - 0.08055 |                  |                  |                  | R <sup>2</sup> = 0.9882 |                  |                  |

3.2. 不同环境条件对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响

如图 2 所示，通过单因素试验，分别考察浸泡时间、负载温度和菌液 pH 对水凝胶载菌量及载菌率的影响。结果表明，在 2~8 h 范围内，随着浸泡时间的延长，水凝胶的载菌量和载菌率呈快速上升趋势，10 h 时达到最大值，分别为 2.58 × 10<sup>9</sup> cfu 和 56.93%。但浸泡 8 h 之后载菌量和载菌率趋于平稳，分别为 2.39

$\times 10^9$  cfu 和 55.94%，与浸泡 10 h 和 12 h 组相比无显著增加( $p > 0.05$ )，表明浸泡时间 8 h 为最佳负载时间(图 2(a)，图 2(b))。

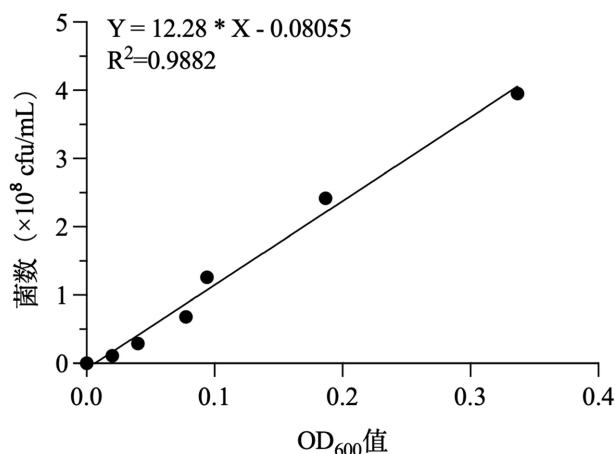


Figure 1. Standard curve of *Bacillus amyloliquefaciens*

图 1. 解淀粉芽孢杆菌标准曲线

在 25℃~40℃ 范围内，载菌量呈现先升高后降低的趋势。31℃ 时载菌量和载菌率达到最高，分别为  $1.69 \times 10^9$  cfu 和 57.54%，显著高于其他温度组( $p < 0.05$ )。当温度低于 31℃ 时，菌体活性较低，运动能力不足，导致吸附量偏低；当温度高于 34℃ 时，解淀粉芽孢杆菌进入发酵亡阶段，菌体分裂繁殖停止，同时部分菌体可能失活，因此载菌量明显下降，说明 B-GelMA 水凝胶负载解淀粉芽孢杆菌的最适温度为 31℃ (图 2(c)，图 2(d))。

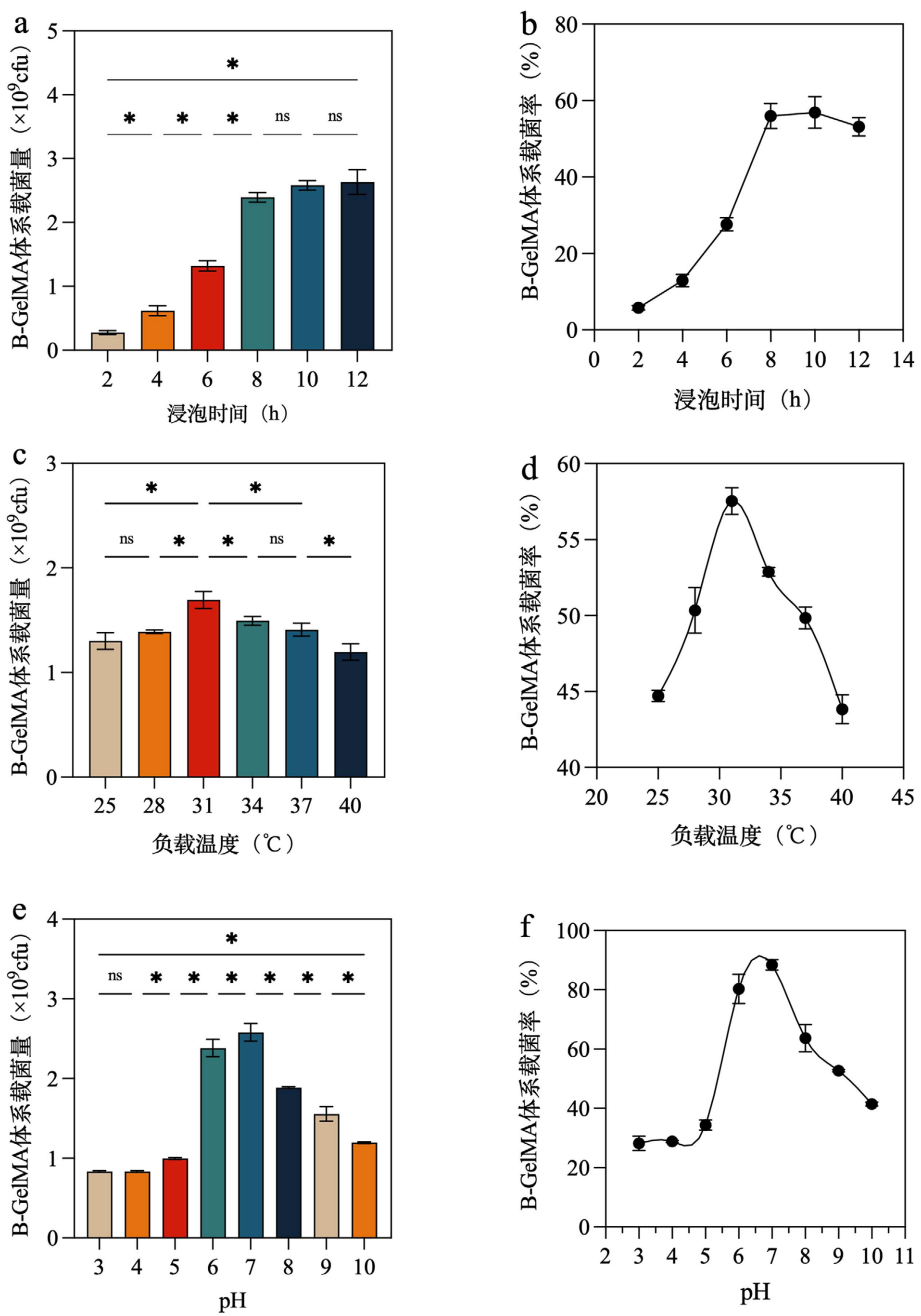
在 pH 3~5 范围内，载菌量较低，分别为  $0.83 \times 10^9$  cfu、 $0.83 \times 10^9$  cfu 和  $0.95 \times 10^9$  cfu，组间无显著差异( $p > 0.05$ )。当 pH 升至 6 时，载菌量显著增加至  $2.38 \times 10^9$  cfu，pH 7 时达到最大值  $2.58 \times 10^9$  cfu，组间差异显著( $p < 0.05$ )。随后 pH 升至 8~10 时，载菌量逐渐下降。载菌率的变化趋势与载菌量基本一致，pH 3~5 时载菌率较低，pH 6 时急剧上升至 80.27%，pH 7 时达到最高值 88.34%，随后 pH 8~10 逐步下降。这表明载 pH 6~7 的中性偏碱条件最有利于解淀粉芽孢杆菌在 B-GelMA 水凝胶上的负载，而过酸(pH 3~5)或过碱(pH  $\geq 8$ )环境均会抑制负载效率(图 2(e)，图 2(f))。

### 3.3. 不同操作参数对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响

随着水凝胶质量的增加，载菌量呈先上升后趋于平稳的趋势。如图 3 所示，0.5 g 时载菌量最低，为  $0.79 \times 10^9$  cfu，2.5 g 时载菌量达到最大值  $2.25 \times 10^9$  cfu，3 g 时载菌量为  $2.20 \times 10^9$  cfu，与 2.5 g 组相比无显著差异( $p > 0.05$ )。2.5 g 和 3 g 的载菌量均显著高于 0.5、1、1.5 g 组( $p < 0.05$ )。载菌率随水凝胶质量变化的趋势与载菌量一致。0.5 g 时载菌率最低，为 52.35%，2.5 g 时载菌率达到最大值 81.98%，综合考虑资源利用效率，确定最佳水凝胶质量为 2.5 g (图 3(a)，图 3(b))。

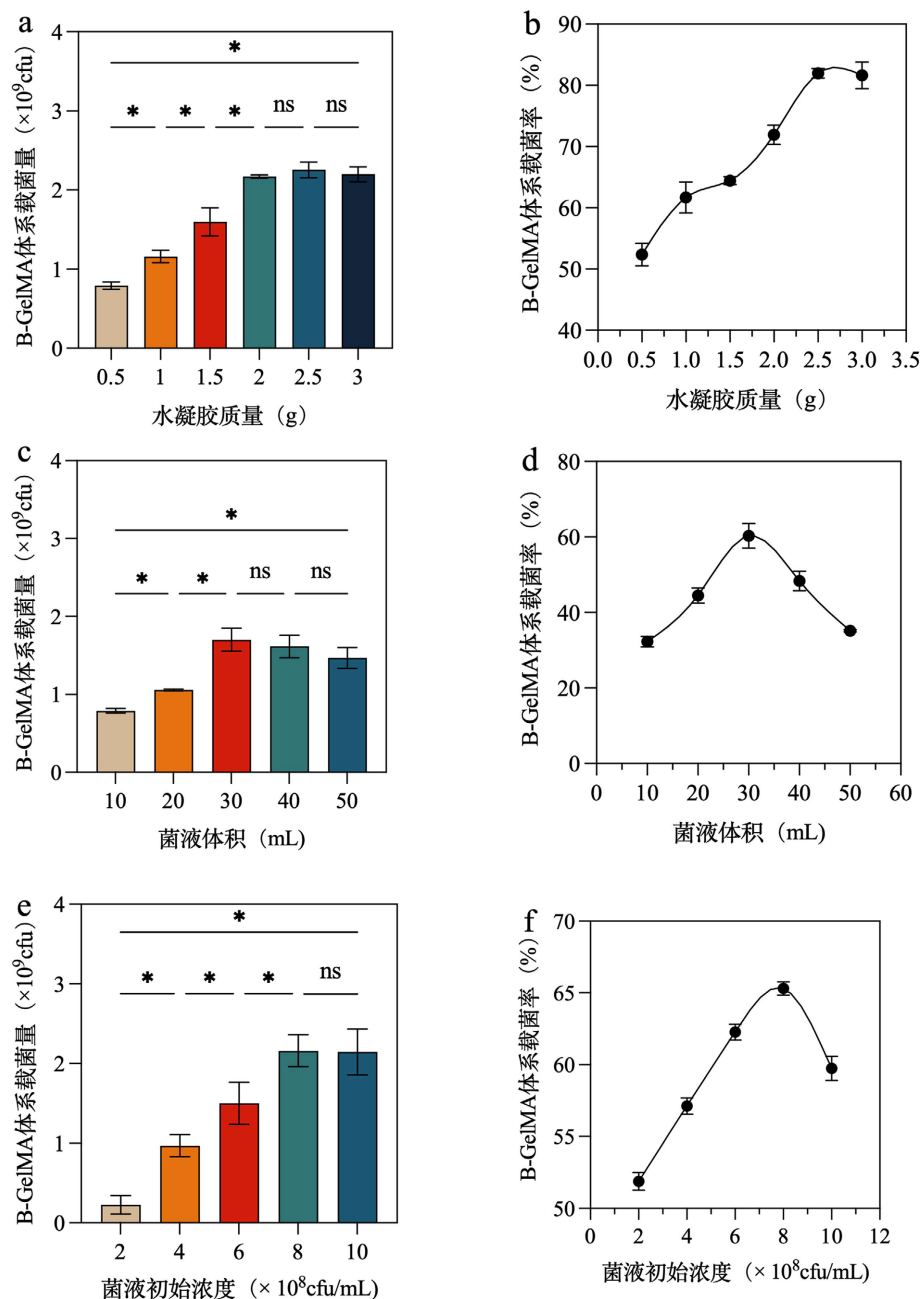
随着菌液体积从 10 mL 增加至 30 mL，载菌量呈上升趋势。体积继续增大至 40、50 mL 时，载菌量有所下降。10 mL 时载菌量最低，为  $0.79 \times 10^9$  cfu，20 mL 时升至  $1.06 \times 10^9$  cfu，较 10 mL 显著提高 34.2% ( $p < 0.05$ )。30 mL 时载菌量达到最大值  $1.70 \times 10^9$  cfu，显著高于 20 mL 组( $p < 0.05$ )，提高 60.4%。40 mL 组和 50 mL 组载菌量与 30 mL 组相比差异不显著( $p > 0.05$ )，但显著高于 20 mL 组( $p < 0.05$ )。载菌率随菌液体积的变化趋势与载菌量一致，10 mL 时载菌率最低，为 32.32%，30 mL 时载菌率达到最大值 60.27% (图 3(c)，图 3(d))。

如图 3(e)和图 3(f)所示, 在  $2 \times 10^8$  cfu/mL 时, 载菌量和载菌率最低, 平均值分别为  $0.23 \times 10^9$  cfu 和 51.87%。在  $8 \times 10^8$  cfu/mL 时, 载菌量和载菌率最高, 平均值分别为  $2.16 \times 10^9$  cfu 和 65.31%。 $8 \times 10^8$  cfu/mL 组的载菌量比  $2 \times 10^8$  cfu/mL 组显著提高 839.1% ( $p < 0.05$ )。各浓度组间差异显著( $p < 0.05$ ), 载菌量随初始浓度增加总体呈上升趋势。



注: (a)和(b), 浸泡时间对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响; (c)和(d), 负载温度对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响; (e)和(f), pH 值对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响。\*表示差异显著,  $p < 0.05$ , ns 表示无显著差异,  $p > 0.05$ , 处理间差异显著性采用单因素方差分析(ANOVA)及 Tukey HSD 多重比较( $\alpha = 0.05$ )。

**Figure 2.** Effect of different environmental conditions on bacterial load and bacterial load rate of B-GelMA system  
**图 2.** 不同环境条件对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响



注: (a)和(b), 水凝胶质量对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响; (c)和(d), 菌液体积对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响; (e)和(f), 菌液初始浓度对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响。\*表示差异显著,  $p < 0.05$ , ns 表示无显著差异,  $p > 0.05$ , 处理间差异显著性采用单因素方差分析(ANOVA)及 Tukey HSD 多重比较( $\alpha = 0.05$ )。

**Figure 3.** Effect of different operating parameters on the bacterial load and bacterial load rate of B-GelMA system

**图 3.** 不同操作参数对 B-GelMA 载菌体系的载菌量和载菌率影响

### 3.4. 环境温度对 B-GelMA 载菌体系的释放动力学影响

采用 Peppas 经验方程对 B-GelMA 水凝胶在不同温度下的菌种释放过程进行动力学模拟。以柱状模型为参考, 计算各温度下的扩散指数  $n$ 、释放速率常数  $k$  及线性相关系数  $R^2$ 。每个温度下取三个重复的平均累积释放量, 平衡释放量  $M_\infty$  取 30~40 min 的平均值, 25℃为  $0.70 \times 10^9$  cfu, 28℃为  $0.80 \times 10^9$  cfu,

31℃为  $1.09 \times 10^9$  cfu, 34℃为  $1.09 \times 10^9$  cfu, 37℃为  $1.11 \times 10^9$  cfu, 40℃为  $1.20 \times 10^9$  cfu。选取释放比例在 10%~90%之间的时间点, 即 0~25 min, 进行线性回归, 结果如图 4 和表 4 所示。

在 25℃~31℃范围内, 扩散指数  $n$  介于 0.45~0.89 之间, 表明菌种释放机制为不规则扩散。当温度升高至 34℃及以上时,  $n$  值均小于 0.45, 释放机制转变为 Fick 扩散。随着温度升高,  $\ln k$  从-1.825 增至 -0.308, 释放速率常数  $k$  增大, 说明温度越高, 菌种释放越快。

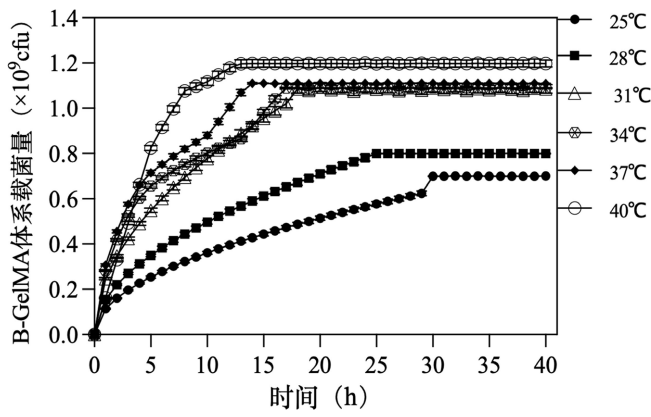


Figure 4. Effect of ambient temperature on release kinetics of B-GelMA carrier system

图 4. 环境温度对 B-GelMA 载菌体系的释放动力学影响

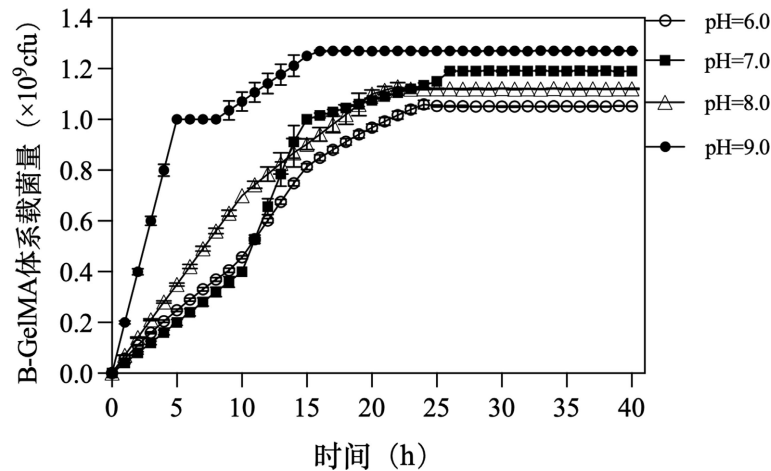
Table 4. Relationship between parameters of Peppas strain release equation and temperature  
表 4. Peppas 菌种释放方程式参数与温度的关系

| 温度(℃) | 回归方程                 | 斜率( $n$ ) | 截距( $\ln k$ ) | $R^2$ | 释放机制    |
|-------|----------------------|-----------|---------------|-------|---------|
| 25    | $y = 0.486x - 1.825$ | 0.486     | -1.825        | 0.992 | 不规则扩散   |
| 28    | $y = 0.524x - 1.565$ | 0.524     | -1.565        | 0.976 | 不规则扩散   |
| 31    | $y = 0.519x - 1.273$ | 0.519     | -1.273        | 0.975 | 不规则扩散   |
| 34    | $y = 0.401x - 0.975$ | 0.401     | -0.975        | 0.988 | Fick 扩散 |
| 37    | $y = 0.375x - 0.721$ | 0.375     | -0.721        | 0.987 | Fick 扩散 |
| 40    | $y = 0.138x - 0.308$ | 0.138     | -0.308        | 0.993 | Fick 扩散 |

3.5. 环境 pH 对 B-GelMA 载菌体系的释放动力学影响

根据提供的 pH 释放动力学数据, 采用 Peppas 经验方程对 B-GelMA 水凝胶在不同 pH 条件下的菌种释放过程进行动力学模拟。以柱状模型为参考, 计算各 pH 下的扩散指数  $n$ 、释放速率常数  $k$  及线性相关系数  $R^2$ 。每个 pH 取三个重复的平均累积释放量, 平衡释放量  $M_\infty$ 取 30~40 min 的平均值, pH 6.0 为  $1.05 \times 10^9$  cfu; pH 7.0 为  $1.192 \times 10^9$  cfu; pH 8.0 为  $1.12 \times 10^9$  cfu; pH 9.0 时  $1.27 \times 10^9$  cfu。选取释放比例在 10%~90%之间的时间点进行线性回归, 结果如图 5 和表 5 所示。

在 pH 6.0~9.0 范围内, 扩散指数  $n$  均介于 0.45~0.89 之间, 表明菌种释放机制均为不规则扩散。随着 pH 从 6.0 升高至 9.0,  $n$  值逐渐减小,  $\ln k$  从-2.101 增至 -0.946, 释放速率常数  $k$  先减小后增大, 说明 pH 7.0 下释放最慢, 而 pH 9.0 下释放最快。



**Figure 5.** Effect of ambient pH on release kinetics of B-GelMA carrier system  
**图 5.** 环境 pH 对 B-GelMA 载菌体系的释放动力学影响

**Table 5.** Relationship between parameters of Peppas strain release equation and pH  
**表 5.** Peppas 菌种释放方程式参数与 pH 的关系

| pH  | 回归方程                 | 斜率(n) | 截距(lnk) | R <sup>2</sup> | 释放机制  |
|-----|----------------------|-------|---------|----------------|-------|
| 6.0 | $y = 0.682x - 2.101$ | 0.682 | -2.101  | 0.974          | 不规则扩散 |
| 7.0 | $y = 0.714x - 2.254$ | 0.714 | -2.254  | 0.986          | 不规则扩散 |
| 8.0 | $y = 0.593x - 1.832$ | 0.593 | -1.832  | 0.967          | 不规则扩散 |
| 9.0 | $y = 0.475x - 0.946$ | 0.475 | -0.946  | 0.971          | 不规则扩散 |

3.6. 复合体系对棉花黄萎病菌的抑制效果评价

采用平板对峙法评价复合体系对棉花黄萎病菌的抑制效果，根据前期载菌条件优化结果，B-GelMA 水凝胶的载菌量约为  $2.16 \times 10^9$  cfu/g。一个直径 6 mm、厚度 2 mm 的凝胶圆片，体积约为 0.057 cm<sup>3</sup>，质量约为 0.057 g，其负载的解淀粉芽孢杆菌数量约为  $1.4 \times 10^8$  cfu，足以产生明显的抑菌圈。如表 6 所示，Vehicle 组菌落直径最大，平均值为  $5.15 \pm 0.38$  mm；Frass 组次之，平均值为  $3.03 \pm 0.15$  mm；Gel\_JDF 组平均值为  $2.28 \pm 0.31$  mm；F\_Gel\_JDF 组平均值为  $2.36 \pm 0.21$  mm。Vehicle 组菌落直径显著高于其他三组 ( $p < 0.05$ )。Frass 组抑菌率最低，平均值为  $45.52\% \pm 3.28\%$ ；Gel\_JDF 组平均值为  $61.72\% \pm 6.70\%$ ；F\_Gel\_JDF 组平均值为  $60.00\% \pm 4.46\%$ 。多重比较结果表明：Gel\_JDF 组和 F\_Gel\_JDF 组的抑菌率均显著高于 Frass 组 ( $p < 0.05$ )，分别提高 35.6% 和 31.8%；Gel\_JDF 组和 F\_Gel\_JDF 组之间差异不显著 ( $p > 0.05$ )。

**Table 6.** Inhibition rate of different treatments on *Verticillium dahliae* of cotton  
**表 6.** 不同处理对棉花黄萎病菌的抑菌率

| 处理组          | 使用剂量        | 简称        | 菌落直径(mm)         | 抑菌率(%)            |
|--------------|-------------|-----------|------------------|-------------------|
| 空白对照组        | 1 片         | Vehicle   | $5.15 \pm 0.38a$ | -                 |
| 白星花金龟虫砂组     | 10 mg       | Frass     | $3.03 \pm 0.15b$ | $45.52 \pm 3.28b$ |
| B-GelMA 水凝胶组 | 1 片         | Gel_JDF   | $2.28 \pm 0.31c$ | $61.72 \pm 6.70a$ |
| 复合体系组        | 10 mg + 1 片 | F_Gel_JDF | $2.36 \pm 0.21c$ | $60.00 \pm 4.46a$ |

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

## 4. 讨论

本研究优化了 GelMA 水凝胶负载解淀粉芽孢杆菌的制备条件,明确了温度与 pH 对菌种释放动力学的影响规律,并比较了虫砂、载菌水凝胶及二者复合体系对大丽轮枝菌的抑制效果。

在载菌条件优化方面,本研究发现浸泡时间 8 h 后载菌量趋于平衡,与朱孟臻[17]报道的 WPU/PVA 水凝胶负载嗜酸乳杆菌的最佳浸泡时间 10 h 相近,略短的平衡时间可能与 GelMA 水凝胶的孔隙率和比表面积有关[18]。最佳负载温度 31℃ 与解淀粉芽孢杆菌的最适生长温度一致[11],温度过低时菌体运动能力不足,过高时进入衰亡期,均导致负载效率下降。pH 对载菌量的影响呈现“低-高-低”趋势,pH 6~7 时载菌量最高,而 pH 3~5 的酸性环境或 pH ≥ 8 的碱性环境均抑制负载效率。这与生防菌定殖受环境 pH 显著影响的结论一致[19]。本研究了解淀粉芽孢杆菌在 GelMA 水凝胶上的最佳负载 pH 为中性偏碱,表明在制备载菌水凝胶时应将菌液 pH 调节至适宜范围,以保障菌体活性。

释放动力学结果表明,B-GelMA 水凝胶中菌种的释放受温度显著调控。温度 ≤ 31℃ 时为不规则扩散,即 Fick 扩散与溶蚀扩散共同作用,≥ 34℃ 时转为 Fick 扩散。这一温度转变阈值与微菌核萌发及病害发生的适宜温度范围存在重叠,说明,在 25℃~30℃ 温度条件下棉花黄萎病高发[20],载菌水凝胶以不规则扩散方式缓慢释放菌种,有利于延长拮抗作用时间。在 pH 6~9 范围内释放机制均为不规则扩散,未出现溶蚀扩散,说明 GelMA 水凝胶在弱酸至弱碱环境中结构稳定,菌种释放以扩散为主,材料骨架降解贡献较小[21]。这一特性有利于实现菌种的稳定、持续释放。

平板对峙结果显示,B-GelMA 水凝胶的抑菌率达 61.72%,显著高于白星花金龟虫砂的抑菌率,但二者复合体系的抑菌率为 60.00%,未表现出协同增效作用,抑菌率与 B-GelMA 单独处理无显著差异。其原因为虫砂的抑菌作用可能主要依赖于其含有的有机酸和微量元素[22][23],在 PDA 平板上这些可溶性物质易扩散稀释,抑菌效果被削弱;而 B-GelMA 负载的解淀粉芽孢杆菌在培养过程中持续代谢产生抑菌物质,抑菌作用更为持久[11]。其他研究也表明,解淀粉芽孢杆菌可通过激活大量防御相关酶活性来增强植物的系统抗性,诱导棉花植株产生较长时间的免疫反应来抵抗大丽轮枝菌的侵染[10]。孟卓等[16]的田间试验表明虫砂与生防菌复合施用对棉花黄萎病有防控效果,但田间条件下虫砂主要通过改良土壤微环境、促进生防菌定殖间接发挥作用[24]-[26],而平板对峙法无法反映这一间接机制。因此,复合体系在平板对峙中未表现协同增效,并不否定其在土壤环境中的潜在协同效应。此外,虫砂用量基于田间推荐剂量(1500 kg/hm<sup>2</sup>)按面积换算得出,但在平板尺度上可能存在“剂量不足”的问题,后续研究应设置虫砂梯度浓度以确定最佳配比。抑菌效果评价仅限于体外平板对峙试验,未能反映虫砂-水凝胶-生防菌复合体系在土壤-根系微环境中的真实互作过程。

需要着重指出的是,本研究中“无协同作用”的结论仅适用于当前体外平板对峙测试条件,不能外推至土壤环境或田间条件。平板对峙实验的局限性在于:它无法模拟土壤中复杂的物理化学环境、根系分泌物介导的微生物互作、以及虫砂对土壤微生态的长期改良效应。因此,后续研究应开展盆栽及田间试验,结合土壤微生物群落分析、根系生理指标测定及病害发生率调查,综合评价该复合体系对棉花黄萎病的田间防控效能。

## 5. 结论

GelMA 水凝胶负载解淀粉芽孢杆菌的最适条件为 31℃、pH 6~7,载菌量达  $2.16 \times 10^9$  cfu/g。菌种释放机制在温度 ≤ 31℃ 时为不规则扩散,≥ 34℃ 转为 Fick 扩散;pH 6~9 范围内均为不规则扩散。平板对峙试验中,B-GelMA 水凝胶对大丽轮枝菌的抑菌率为 61.72%,显著高于白星花金龟虫砂的抑菌率,虫砂 + B-GelMA 水凝胶复合体系的抑菌率为 60.00%,无协同增效,载菌水凝胶是抑菌的主要贡献因子。虫砂的

抑菌作用在平板上有限, 其与生防菌的协同可能依赖土壤微环境。虫砂用量按田间剂量换算, 平板尺度可能存在剂量不足, 需优化配比。平板对峙试验无法完全反映土壤-根系系统中的真实效应, 需通过盆栽及田间试验进一步验证。

## 基金项目

自治区高校基本科研业务费科研项目(XJEDU2025J046), 自治区级大学生创新训练计划项目(S202510758071)。

## 参考文献

- [1] 张志高, 李艳敏, 袁征, 等. 1988-2020 年新疆棉花生产格局与贡献因素[J]. 农业资源与环境学报, 2024, 41(5): 1192-1200.
- [2] 刘海洋, 王伟, 张仁福, 等. 北疆棉花黄萎病发病率调查及土壤中黄萎病菌微菌核数量与种群类型分析[J]. 植物保护, 2023, 49(4): 276-283+292.
- [3] Zhang, G., Meng, Z., Ge, H., Yuan, J., Qiang, S., Jiang, P., *et al.* (2023) Investigating Verticillium Wilt Occurrence in Cotton and Its Risk Management by the Direct Return of Cotton Plants Infected with *Verticillium dahliae* to the Field. *Frontiers in Plant Science*, **14**, Article 1220921. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1220921>
- [4] 高翔宇. 拮抗放线菌 KF-5-1 处理种子对棉花黄萎病的防效研究[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
- [5] 宋东博, 苏飞鸿, 郭旺珍, 等. 棉花黄萎病拮抗菌 KF-43-1 的鉴定与 3 种处理田间防治效果对比[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2463-2474.
- [6] 全国农业技术推广服务中心. 中国棉花新品种动态[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2013.
- [7] 张博然. 三种药剂对棉花黄萎病的田间防效及其农艺性状的影响[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [8] 刘延财, 唐叶, 吴家和, 等. 生防微生物在棉花黄萎病防治中的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 994-1006.
- [9] 赵卫松, 李社增, 赵明珠, 等. 基于西兰花尾菜为载体的解淀粉芽孢杆菌 PHODG36 颗粒剂研制及其对棉花黄萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(5): 1186-1193.
- [10] Sherzad, Z., 杨娜, 张静, 等. 棉花内生解淀粉芽孢杆菌 489-2-2 对棉花黄萎病的防效研究[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 41-48.
- [11] 张金凤, 韩琴, 王晓楠, 等. 解淀粉芽孢杆菌 41B-1R 对棉花黄萎病的防效研究[J]. 核农学报, 2016, 30(3): 468-475.
- [12] 刘海洋, 王伟, 张仁福, 等. 利用生防菌防治棉花黄萎病效果的制约因素[J]. 新疆农业科学, 2022, 59(1): 155-161.
- [13] Piao, Y., You, H., Xu, T., Bei, H., Piwko, I.Z., Kwan, Y.Y., *et al.* (2021) Biomedical Applications of Gelatin Methacryloyl Hydrogels. *Engineered Regeneration*, **2**, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2021.03.002>
- [14] Wang, X., Xiang, S., Wang, J., Luo, X., Du, C. and Sun, X. (2024) Long-Acting Sustained-Release Hydrogel for Soil-Borne Pathogen Control in Chinese Herbal Medicine. *Journal of Polymers and the Environment*, **32**, 6311-6319. <https://doi.org/10.1007/s10924-024-03275-9>
- [15] Praeg, N. and Klammersteiner, T. (2024) Primary Study on Frass Fertilizers from Mass-Reared Insects: Species Variation, Heat Treatment Effects, and Implications for Soil Application at Laboratory Scale. *Journal of Environmental Management*, **356**, Article 120622. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120622>
- [16] 孟卓, 唐小雯, 马德英, 等. 虫砂复合微生物菌剂 2 种施用方式对棉花生长发育及防控黄萎病的影响[J]. 新疆农业科学, 2024, 61(12): 2861-2871.
- [17] 朱孟臻. 微生物负载抗菌水凝胶的制备与性能研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 陕西科技大学, 2020.
- [18] 李媛媛, 温瑜, 李俊, 等. GelMA 复合水凝胶的制备与性能[J]. 太原理工大学学报, 2021, 52(5): 842-848.
- [19] 周厚英, 朱志炎, 何勇, 等. 水稻纹枯病菌拮抗内生菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2025, 40(12): 1304-1313.
- [20] 张亚林, 蒋艳, 赵丽红, 等. 温度对棉花黄萎病发生及寄主防御反应的影响[J]. 中国农业科学, 2023, 56(23): 4671-4683.
- [21] Vigata, M., Meinert, C., Bock, N., Dargaville, B.L. and Huttmacher, D.W. (2021) Deciphering the Molecular Mechanism

- of Water Interaction with Gelatin Methacryloyl Hydrogels: Role of Ionic Strength, pH, Drug Loading and Hydrogel Network Characteristics. *Biomedicines*, **9**, Article 574. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050574>
- [22] Pereira, D.M., Noites, A., Valentão, P., Ferreres, F., Pereira, J.A., Vale-Silva, L., *et al.* (2009) Targeted Metabolite Analysis and Biological Activity of *Pieris brassicae* Fed with *Brassica rapa* var. *rapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 483–489. <https://doi.org/10.1021/jf8031638>
- [23] 汪钰. 柞蚕蚕沙化学成分及其抑菌活性研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [24] 吴祖良. 黑水虻养殖产物协同牛粪堆肥联产有机肥的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广东工业大学, 2025.
- [25] Ashworth, A.J., Amorim, H.C.S., Drescher, G.L., Moore, P.A., Rojas, M.G., Morales-Ramos, J., *et al.* (2025) Insect Frass Fertilizer as Soil Amendment for Improved Forage and Soil Health in Circular Systems. *Scientific Reports*, **15**, Article No. 3024. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87075-8>
- [26] Hernández-Muñiz, P., Borrero, C., Avilés, M. and Fernández-Bayo, J.D. (2025) Perspectives on Microbial Community Changes Produced by *Hermitia illucens* Frass and Their Impact on Soil Suppression against *Fusarium oxysporum* F. *sp. lactucae*. *Pest Management Science*, **81**, 6832–6842. <https://doi.org/10.1002/ps.70036>