



研究报告

致病疫霉拮抗菌株 B25-I-3 的鉴定及其次级代谢产物

武志华 赵璞钰 丁一秀 马强 王雪寒 刘惠荣*

内蒙古农业大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要:【背景】粘细菌是一类具有社会性行为的高等原核生物,能产生丰富、多样、新颖的具有生物活性的次级代谢产物,具有很大的研究开发价值。【目的】从土壤样品中筛选出对致病疫霉(*Phytophthora infestans*)具有拮抗作用的粘细菌,并对其次级代谢产物进行研究。【方法】对分离到的一株拮抗 *P. infestans* 菌株,结合形态观察和 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位,并通过单因素分析与正交优化相结合的方法对菌株的发酵参数进行研究。采用滤纸片法对其浓缩发酵液中活性物质的稳定性及抗菌活性进行检测,并通过薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)与高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等初步分离后,将具有抗 *P. infestans* 活性的组分利用液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)进行检测,最后通过离体叶片法测定活性物质对马铃薯晚疫病的防病作用。【结果】从土壤样品中分离得到的菌株 B25-I-3 对 *P. infestans* 表现出较强的拮抗活性,经鉴定为橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*)。其拮抗 *P. infestans* 的活性物质主要存在于胞外,产活性物质的最优发酵条件为:摇床转速 180 r/min,接种量 10%,培养温度 30 °C,发酵周期 7 d。该菌株产生的活性物质耐受蛋白酶 K 以及紫外线与自然光照射,对温度耐受性极强,而且易于在低温下保存,对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、向日葵核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)均有不同程度的抑制作用。其对 *P. infestans* 的拮抗组分中含有 N-(3-氨基-2-羟丙基)-N-甲基硫酸二酰胺[N-(3-amino-2-hydroxypropyl)-N-methylsulfuric diamide]与甲基(2R)-2-叠氮基-3-羟基-2-甲基丙酸酯[methyl(2R)-2-azido-3-hydroxyl-2-methylpropanoate],该活性物质能明显抑制 *P. infestans* 侵染马铃薯叶片且对不同品种的叶片均无损伤作用。【结论】研究为 *M. fulvus* B25-I-3 活性物质的分离鉴定及抗马铃薯晚疫病生物农药的研发提供了基础数据。

关键词: 粘细菌, 分离鉴定, 马铃薯晚疫病, 橙色粘球菌, 正交优化

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31370058)

*Corresponding author: E-mail: huirong_liu@imau.edu.cn

Received: 08-12-2019; **Accepted:** 27-02-2020; **Published online:** 01-06-2020
基金项目: 国家自然科学基金(31370058)

*通信作者: E-mail: huirong_liu@imau.edu.cn

收稿日期: 2019-12-08; 接受日期: 2020-02-27; 网络首发日期: 2020-06-01

Identification and secondary metabolites of strain B25-I-3 against *Phytophthora infestans*

WU Zhi-Hua ZHAO Pu-Yu DING Yi-Xiu MA Qiang WANG Xue-Han
LIU Hui-Rong*

College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China

Abstract: [Background] Myxobacteria are a group of higher prokaryotes with social behaviors. They can produce rich, diverse, and novel secondary metabolites with biological activity, and have great research and development value. [Objective] To screen and identify culturable myxobacteria resistant to the pathogen of potato late blight from soil samples and study secondary metabolites of the isolates. [Methods] Myxobacteria were isolated from soil samples by rabbit feces inducing method. The strain resistant to the pathogen of potato late blight was identified by morphological observation and the 16S rRNA gene sequence analysis. Then, the fermentation parameters were studied by the combination of univariate analysis and orthogonal optimization. The stability and antibacterial activity of the active substances in the concentrated fermentation broth were detected by the filter paper method. The active substances were separated by TLC and HPLC, and the components with antibiotic activity were detected by HPLC-MS. The anti-disease effect of the active substances on potato late blight was determined by the *in vitro* leaf method. [Results] Strain B25-I-3 isolated from the soil sample showed strong antagonistic activity against *P. infestans* and was identified as *Myxococcus fulvus*. The antibiotic substances against *P. infestans* were mainly present in the extracellular matrix. Its optimal fermentation conditions were: shaking speed 180 r/min, inoculum size 10%, incubation temperature 30 °C, incubation time 7 d. The active substances produced by strain B25-I-3 were highly tolerant to the treatment of protease K, ultraviolet and natural light, temperature, and were easily preserved at low temperatures. The antibacterial and antifungal activity analysis showed the active substances exhibited different degrees of antagonism against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*. The antagonistic components of strain B25-I-3 contained N-(3-amino-2-hydroxypropyl)-N-methylsulfuric diamide and methyl(2R)-2-azido-3-hydroxyl-2-methylpropanoate. The results of disease control on potato leaves showed that the active substances could significantly inhibit the infection of *P. infestans* on the detached potato leaves of different varieties without harming. [Conclusion] This study provides basic data for the isolation and identification of active substances and the development of biopesticide against potato late blight.

Keywords: Myxobacteria, Isolation and identification, Potato late blight, *Myxococcus fulvus*, Orthogonal optimization

马铃薯是我国的第四主粮, 其最严重的病害之一为晚疫病(potato late blight), 病原菌为致病疫霉(*Phytophthora infestans*)^[1], 能够导致马铃薯茎叶死亡和块茎腐烂^[2], 在多雨、冷凉的气候条件下能引起大田大面积发病。目前该病仍以化学防治为主, 通常采用的药物试剂有甲霜灵锰锌、安泰生、薯瘟消、代森锰锌等。农药的长期使用不但导致 *P. infestans* 的抗药性逐渐增强, 还破坏了

生态环境。因此, 研发能够防治马铃薯晚疫病的高效低毒的生物农药迫在眉睫。

粘细菌是一类具有形态发生、复杂多细胞行为和社会性行为的革兰氏阴性细菌^[3], 属高等原核生物^[4], 因捕食性生活方式而闻名^[5]。粘细菌生物合成潜力巨大, 50%以上的菌株能产生具有生物活性的次级代谢产物^[6], 是很好的天然药物筛选资源^[7], 其次级代谢产物中已有 100 多种基

础结构和 500 多种衍生物被阐明^[8], 具有应用研究开发潜力^[9]。由于粘细菌具有产生的活性物质种类多、结构新、作用水平层次多、作用机制多样等特点, 其研究工作日益受到重视^[10]。研究报告发现粘细菌对多种真菌表现出拮抗活性, Liu 等^[11]发现 *Myxococcus fulvus* ZJ2 有抗白色念珠菌 (*Canidia albicans*) 的活性; 王海英^[12]分离纯化出的 *Cystobacter* sp. 93009 能够抑制毛霉 (*Mucor hiemalis*) 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 的生长; *Myxococcus xanthus* YR-7^[13]、*Myxococcus stipitatus* X6-II-1^[14]、*Myxococcus virescens* YR-35^[15] 等不同的粘细菌被发现对 *P. infestans* 表现出较强的抑制作用。

本研究从采集自内蒙古自治区包头地区的一份土壤样品中筛选出一株对 *P. infestans* 具有显著抑制作用的粘细菌菌株(实验室编号为 B25-I-3), 通过形态特征与 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行分类鉴定, 还进行了抗菌活性分析并通过正交试验优化发酵条件, 然后对浓缩发酵液中活性物质的稳定性及抗菌活性进行检测, 通过 TLC 与 HPLC 等初步分离后, 将具有抗 *P. infestans* 活性的组分进行 HPLC-MS 检测, 最后通过离体叶片法测定了活性物质对马铃薯晚疫病的防病作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品

内蒙古自治区包头地区的一片草地 (N40.310 57°, E110.842 4°), 属草甸盐土, 利用五点采样法采集表层 1–10 cm 处土壤。将土样风干后室温干燥保存。

1.1.2 培养基

菌株的诱导与纯化所需培养基有 ST21CX 固体培养基、VY/2 固体培养基、CAS 液体培养基, 抗菌活性分析所用培养基有 PDA 培养基、YPD 液体培养基、土豆培养基、牛肉膏蛋白胨固体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基、黑麦固体培养

基等^[16]。

1.1.3 抗菌活性指示菌

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、致病疫霉 (*Phytophthora infestans*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和向日葵核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 均由本实验室提供。

1.1.4 主要试剂和仪器

FeCl₃、K₂HPO₄、NaNO₃、MgSO₄、CaCl₂ 等, 天津风船化学试剂科技有限公司; Taq DNA 聚合酶, 上海信裕生物科技有限公司。生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 体视显微镜, 厦门叁诺西努科技有限公司; 电泳仪, 北京百晶生物技术有限公司; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司; 液质联用仪, 沃特世公司。

1.2 菌株的分离、纯化及保存

将土壤样品预处理后, 利用兔粪诱导法对其中的粘细菌进行分离^[17]。识别兔粪球上或其周围土样上的粘细菌, 利用直接转接法对其进行纯化^[18]。挑取经观察没有杂菌的菌孢子实体, 接种于 CAS 液体培养基 30 °C、180 r/min 振荡培养 36 h, 若 CAS 液体培养基澄清即认为该菌株已为纯菌^[19]。将已纯化的菌株用 20% 无菌甘油置于 -80 °C 保存。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态观察

参照《伯杰细菌鉴定手册》^[20]分类标准, 对分离纯化出的于 VY/2 培养基上已生长 8 d 的菌落形态以及子实体的结构进行观察并拍照。

1.3.2 分子鉴定

采用石英砂与溶菌酶法共同破壁对染色体 DNA 进行提取^[21], 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1495R 进行 PCR 扩增^[22]。将 PCR 产物送

北京六合华大基因科技股份有限公司测序, 利用 BLAST 对其 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行相似性比对。

1.4 菌株 B25-I-3 抗菌谱检测

将菌株 B25-I-3 接于 VY/2 固体培养基上, 30 °C 培养 7 d。将 -80 °C 保存的 *S. aureus*、*E. coli* 与 *B. subtilis* 各 20 μ L 分别接入牛肉膏蛋白胨液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 次日将培养液 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min 后取菌体沉淀, 并加入 3 mL 无菌水重新混悬, 各取 1 mL 分别均匀涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上。将 20 μ L 保存于 -80 °C 的 *S. cerevisiae* 接入 YPD 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养 18 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 加入 3 mL 无菌水混悬菌体沉淀并吸取 1 mL 均匀涂布在土豆培养基上。用直径为 0.8 cm 的无菌蓝色枪头扎取 VY/2 培养基上已生长 7 d 的菌株 B25-I-3 制成菌饼, 将菌饼分别倒扣在涂有不同指示菌的平板上, 以同样大小的 VY/2 培养基作空白对照, 37 °C 培养 2 d 后观察抑菌情况。

采用平板对峙法^[23], 将 *R. solani*、*V. dahliae*、*F. oxysporum*、*S. sclerotiorum* 分别接种于 PDA 培养基上, 将 *P. infestans* 接入黑麦培养基, 再用直径为 0.8 cm 的无菌蓝色枪头扎取 VY/2 培养基上已生长 7 d 的菌株 B25-I-3 制成菌饼, 将菌饼倒扣于距各指示菌约 2.5 cm 处, 以同样大小的 VY/2 培养基作空白对照, 18 °C 培养 7 d, 观察是否出现抑菌圈, 重复 3 次。

1.5 菌株 B25-I-3 发酵条件优化

1.5.1 生长曲线测定

将 VY/2 培养基上培养 7 d 的菌株 B25-I-3 转到有 100 mL VY/2 液体培养基的锥形瓶中, 30 °C、180 r/min 培养 3 d, 以 10% 的接种量转到 100 mL VY/2 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养。每隔 24 h 于 8 000 r/min 离心 10 min 收集一次菌体, 菌体经去离子水洗涤后再次离心, 沉淀于 50 °C 恒温烘干至恒重。测量菌体干重并绘制生长

曲线^[24]。

1.5.2 活性物质分布

将 VY/2 培养基上培养 7 d 的菌株 B25-I-3 转接到 100 mL 的 VY/2 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d 后打碎菌块, 以 10% 的接种量转到 100 mL VY/2 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 7 d。将发酵液 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液(细胞外)。同时沉淀用无菌水洗涤 3 次后超声破碎(功率为 220 W, 超声 5 min, 暂停 10 min, 共超声 30 min)后 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液(细胞内)。将 2 次收集的上清液分别冻干并称重, 按比例用无菌水溶解至浓度一致, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 用滤纸片法^[25]检测其抗致病疫霉的活性。

1.5.3 发酵条件优化

对拮抗 *P. infestans* 的粘细菌菌株 B25-I-3 进行摇瓶发酵, 利用单因素筛选与正交试验结合的方案对接种量、周期、温度与转速进行优化, 以期为工业生产提供基础数据。表 1 为发酵条件的单因子筛选方案。

根据单因素实验结果确定影响菌株 B25-I-3 对 *P. infestans* 拮抗活性较大的因素及水平范围, 然后将菌株 B25-I-3 接入 VY/2 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇瓶振荡培养 3 d 后按表 2 进行正交试验

表 1 发酵条件单因素筛选方案

Table 1 Screening program of single factor for fermentation conditions

Factors	Levels				
Incubation temperature (°C)	25	28	30	32	35
Incubation time (d)	5	6	7	8	9
Inoculum size (%)	5	8	10	12	15
Rotating speed (r/min)	150	160	170	180	190

表 2 正交试验 $L_9(3^3)$ 因素和水平

Table 2 Factors and levels in orthogonal experiment $L_9(3^3)$

Levels	Factors		
	Inoculum size (%)	Incubation temperature (°C)	Incubation time (d)
1	8	28	7
2	10	30	8
3	12	32	9

继续摇瓶振荡培养, 然后利用滤纸片法^[25]对发酵上清液的抗 *P. infestans* 活性进行检测。

1.6 菌株 B25-I-3 活性物质的稳定性检测

将菌株 B25-I-3 在最适发酵条件下进行培养后 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液于 -40 °C 低温冻干。用无菌水溶解冻干物, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 使发酵液最终浓缩 50 倍。滤纸片法检测浓缩发酵上清液对温度、蛋白酶 K 以及紫外光和自然光的稳定性, 并对其耐贮性进行检测。

1.7 菌株 B25-I-3 活性物质抗细菌与抗真菌活性检测

在菌株 B25-I-3 的 VY/2 液体发酵培养基中添加 4% 的 XAD-16 大孔吸附树脂, 于最适条件下发酵培养后收集树脂, 在自然条件下风干后加入 10 倍体积的甲醇洗脱 3 次, 合并洗脱液并于旋转蒸发器上减压浓缩, 蒸干称重后用少量甲醇溶解, 经 0.22 μm 微孔滤膜(有机相)过滤除菌后, 置于 4 °C 冰箱保存备用, 采用滤纸片法检测其对 *S. aureus*、*E. coli*、*B. subtilis*、*S. cerevisiae*、*R. solani*、*F. oxysporum* 和 *S. scotiorum* 的拮抗活性。

1.8 菌株 B25-I-3 活性物质的初步分离与鉴定

以甲醇与水为展开剂将浓缩后的菌株 B25-I-3 具有抗菌活性的次级代谢产物进行薄层层析实验, 以确定高效液相色谱实验时最佳的流动相。根据表 3 的洗脱方法对样品进行 HPLC 初步分离。收集单峰样品, 分别将其再次浓缩, 用甲醇溶解

表 3 HPLC 梯度洗脱法

Table 3 HPLC gradient elution method

Time (min)	Water (%)	Methanol (%)
0	95	5
5	80	20
10	80	20
40	0	100
60	0	100
66	95	5
67	95	5

后使所有液体浓度相同, 采用滤纸片法检测各峰样品对 *P. infestans* 的拮抗活性。

对具有抗 *P. infestans* 活性的组分使用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪(Acquity UPLC Xevo Q-TOF)进行鉴定。利用色谱柱为 BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 μm)的 C18-UPLC 系统对样品首先进行色谱分离, 上样量为 10 μL, 流速为 0.3 mL/min。流动相 A 为有机相(乙腈溶液+0.2%甲酸溶液), 流动相 B 为水相(水+0.2%甲酸溶液), 在正离子扫描模式下按表 4 梯度洗脱后使用质谱仪扫描检测。

1.9 菌株 B25-I-3 活性物质对马铃薯晚疫病的防治作用

克新 1 号、青薯 9 号、费乌瑞它和冀张薯于光照下生长 5-8 周, 剪取植株中部健康且大小相近的叶片, 冲净后置于 150 mm 的平板中, 底部用脱脂棉保湿。处理组于叶片背面分别均匀涂布浓度为 200、100、10、5、3 和 0 μg/mL 菌株 B25-I-3 活性物质浓缩液, 自然风干后, 将 100 μL *P. infestans* 游动孢子悬液滴加于各个叶片的中脉, 于 20 °C、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 7-10 d, 观察 *P. infestans* 侵染情况并对叶片的相对病斑面积通过 Adobe Photoshop CS5 进行测量^[26]。以无菌水分别替代 *P. infestans* 游动孢子悬液与菌株 B25-I-3 活性物质浓缩液为对照组 1 和 2, 每种处理都重复 6 个叶片, 重复 3 次。

表 4 活性物质的梯度洗脱条件

Table 4 The gradient elution condition for active substances

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)	Curve
0	5	95	Initial
2	5	95	6
5	50	50	6
8	60	40	6
16	70	30	6
23	80	20	6
26	80	20	6
28	5	95	6

2 结果与分析

2.1 菌株 B25-I-3 的鉴定

2.1.1 形态鉴定

通过兔粪诱导与子实体多次转接的方法从土样中共分离纯化出 3 株粘细菌, 其均对致病疫霉表现出拮抗活性, 其中拮抗活性相对较强的菌株编号为 B25-I-3。该菌株能够在 VY/2 培养基上形成特征性的菌落, 有圆形扩展的薄而半透明的膜。单个生长的柔软子实体为橙色, 球形或椭球形, 没有柄状结构, 但有折光性, 呈不规则点状分布, 在其外围可产生透明粘液(图 1), 与《伯杰细菌鉴定手册》上橙色粘球菌的形态特征相似。

2.1.2 分子鉴定

将菌株 B25-I-3 的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库中, 获得登录号为 MH730555, 与其中的已知序列进行相似性比对, 发现与 *Myxococcus fulvus* strain 1mx (登录号为 KC862597) 的相似性最高, 可达 100%。结合形态特征, 确定菌株 B25-I-3 为橙色粘球菌(*M. fulvus*)。

2.2 菌株 B25-I-3 的抗菌谱

菌株 B25-I-3 可以杀死并溶解 *E. coli*, 而且可以抑制 *B. subtilis*、*F. oxysporum*、*R. solani*、*S. sclerotiorum*、*V. dahliae* 以及 *P. infestans* 的生长(表 5), 其中对 *P. infestans* 的抑制活性最强, 但是对 *S. aureus* 和 *S. cerevisiae* 没有抑制活性。

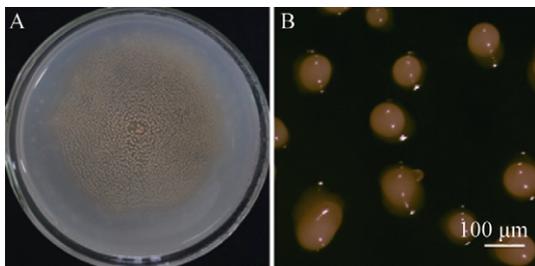


图 1 菌株 B25-I-3 的形态特征

Figure 1 The morphological characteristics of strain B25-I-3

注: A: 菌落; B: 子实体。

Note: A: Colony; B: Fruiting bodies.

表 5 菌株 B25-I-3 的抗菌谱

Table 5 The antibiotic spectrum of the strain B25-I-3

The indicator microorganism	The antibiotic activity
<i>Escherichia coli</i>	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i>	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+
<i>Phytophthora infestans</i>	+++
<i>Verticillium dahliae</i>	+

Note: +++: Strong inhibition; ++: Medium inhibition; +: Weak inhibition; -: Indicated no inhibition.

2.3 菌株 B25-I-3 产抗菌物质发酵条件的优化

2.3.1 生长曲线的测定及抗致病疫霉活性物质的分布

如图 2A 所示, 菌株 B25-I-3 接种后经 2 d 的迟缓期, 在第 2-3 天进入快速增长期, 第 3-5 天进入第 2 个迟缓期, 第 5-7 天再次进入快速增长期, 第 7 天时菌体重量达到最大值, 之后急速减少, 进入

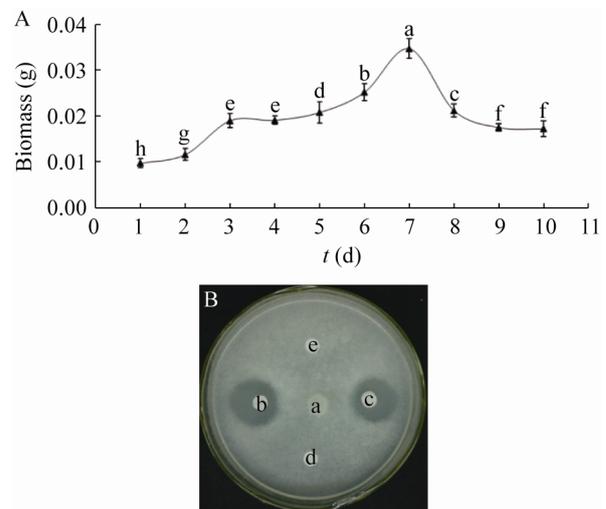


图 2 菌株 B25-I-3 的生长曲线(A)及其活性物质的分布(B)

Figure 2 The growth curve (A) and distribution of active substances (B)

注: 图 A 中小写字母代表 0.01 差异显著性水平。图 B 中: a: 致病疫霉; b/c: 胞外物质; d: 胞内物质; e: 空白对照。

Note: A: The lowercase letters in Figure 2A indicate significant difference level of 0.01. B: a: *P. infestans*; b/c: Extracellular substances; d: Intracellular substances; e: Blank control.

衰亡期, 9 d后趋于稳定。将菌株发酵培养后, 滤纸片法分别检测其胞内物及胞外物对致病疫霉的抗性。结果如图 2B 所示, 菌株 B25-I-3 的胞外物对致病疫霉的生长表现出一定的抑制作用, 但并未检测到胞内物的抑菌活性, 可初步说明菌株 B25-I-3 的抗致病疫霉活性物质主要存在于细胞外。

2.3.2 菌株 B25-I-3 发酵条件优化结果

(1) 转速的影响

不同转速对菌株 B25-I-3 发酵上清液抑菌活性的影响并不明显。转速为 150–170 r/min 时, 抑菌活性呈上升趋势; 当转速为 170 r/min 和 180 r/min 时, 其对 *P. infestans* 的抑制活性相同且达到最强; 在 180–190 r/min 时, 抑菌活性呈下降的趋势(图 3A), 因此, 确定最佳转速为 180 r/min。

(2) 接种量的影响

菌株 B25-I-3 发酵上清液对 *P. infestans* 的抑制

活性随接种量的增加先升后降, 当接种量为 10% 时其活性最强, 滤纸片与菌丝生长边缘的最短距离达到 6.5 mm (图 3B), 因此选择 10% 为最适接种量。

(3) 发酵周期的影响

菌株 B25-I-3 发酵 5 d 的抑菌活性还较低, 但随着发酵周期的延长抑菌活性逐渐增强, 第 7 天活性达到最高, 第 8 天时开始出现下降的趋势(图 3C), 最终确定最佳发酵周期为 7 d。

(4) 温度的影响

温度为 25–30 °C 时, 菌株 B25-I-3 发酵上清液对 *P. infestans* 的抑制活性随温度的升高而增强, 30 °C 时达到最高, 菌丝生长边缘距滤纸片为 6.5 mm, 之后抑菌活性随温度的增高而降低(图 3D), 说明温度过高或过低都不利于 *M. fulvus* B25-I-3 活性物质的产生, 因其最佳发酵温度为 30 °C。

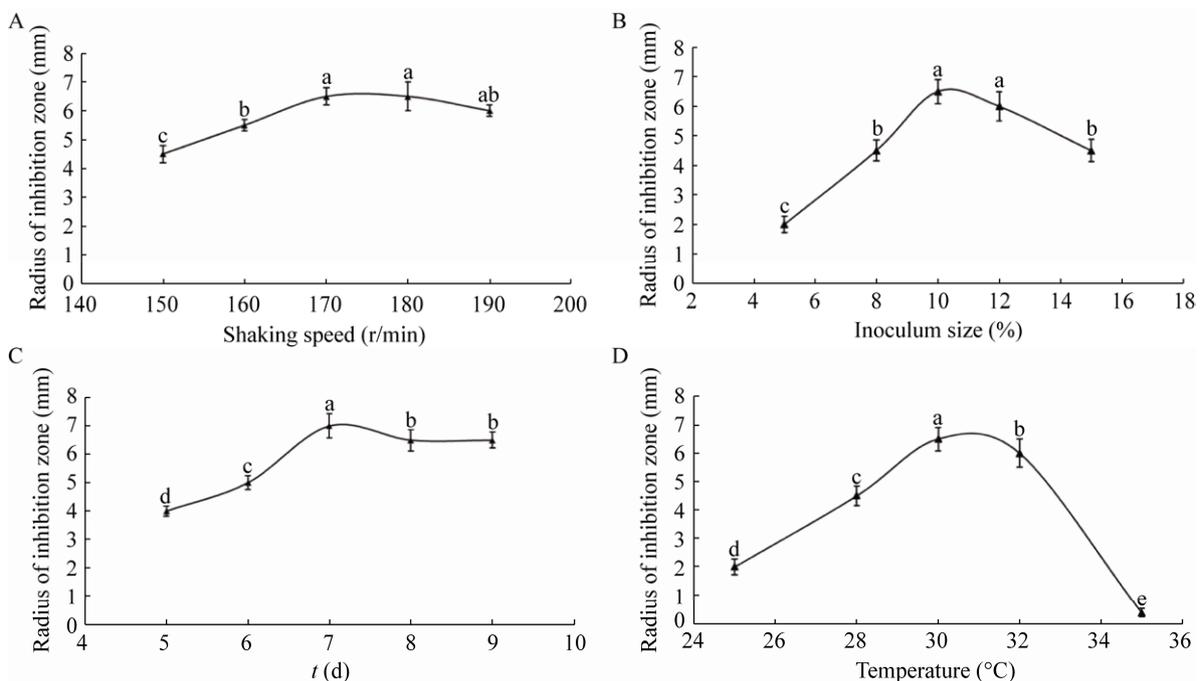


图 3 不同转速(A)、接种量(B)、周期(C)和温度(D)对菌株 B25-I-3 发酵上清液活性的影响

Figure 3 Effect of shaking speed (A), inoculum size (B), time (C) and temperature (D) on the antibiotic activity of fermentation supernatant

注: 图中小写字母代表 0.01 差异显著性水平。

Note: The lowercase letters indicate significant difference level of 0.01.

选取对抑菌活性影响较大的接种量、温度与周期这 3 个因素进行正交试验, 方案及结果如表 6 所示。菌株 B25-I-3 经不同接种量、温度、周期产生的发酵上清液对 *P. infestans* 的抑制活性不同。其最优发酵条件为: 接种量 10%, 温度 30 °C, 周期 7 d。极差分析可知影响发酵上清液抑制 *P. infestans* 活性的顺序为: 温度>接种量>周期。

对试验结果进行方差分析, 如表 7 所示。温度的 *P* 值最接近 0.01, 对试验结果影响较显著, 是影响菌株 B25-I-3 发酵上清液抑菌活性的主要因素, 接种量和周期为次要因素。通过比较 *F* 值大小, 进一步确定温度为主要影响因素, 接种量的影响则

略高于周期。所以对发酵产物抑制 *P. infestans* 生长活性的影响大小顺序为: 温度>接种量>发酵周期, 与极差分析结果相符。

2.4 菌株 B25-I-3 抗菌活性物质的稳定性检测

2.4.1 热稳定性检测

菌株 B25-I-3 发酵产生的活性物质在 30–100 °C 恒温水浴中各处理 30 min 仍可对 *P. infestans* 保持较高的抑制活性(图 4)。与在 4 °C 保存的活性物质的抗 *P. infestans* 活性相比, 在 30–50 °C 恒温水浴中处理后的活性物质对 *P. infestans* 的抑制活性下降并不明显, 但在 60 °C 及以上的恒温水浴中处理后的活性却有不同程度的升高, 推测是较高的外界

表 6 正交试验设计及结果

Table 6 Design and results of orthogonal experiment

Test No.	Factors			Radius of inhibition zone (mm)			
	Temperature (°C)	Incubation time (d)	Inoculum size (%)	Repeat 1	Repeat 2	Repeat 3	Average value
1	28	8	12	5.0	4.0	5.0	4.7f
2	30	7	10	8.5	8.5	8.5	8.5a
3	32	9	12	7.0	6.0	6.5	6.5bcd
4	28	9	8	4.5	5.0	5.5	5.0ef
5	30	9	12	7.5	7.0	7.5	7.3b
6	32	7	8	6.0	6.0	6.0	6.0cde
7	28	7	10	5.5	6.0	5.0	5.5def
8	30	8	8	7.5	6.5	6.5	6.8bc
9	32	8	10	7.0	6.5	7.0	6.8bc
K_1	5.1	6.7	5.9	$K=6.3$			
K_2	7.5	6.1	6.9				
K_3	6.4	6.3	6.2				
k_1	1.7	2.2	2.0	$k=2.1$			
k_2	2.5	2.0	2.3				
k_3	2.1	2.1	2.1				
<i>R</i>	2.4	0.6	1.0				

Note: K_1 , K_2 , K_3 : The means of the corresponding list, respectively; *R*: Range; The lowercase letters indicate significant difference level of 0.01.

表 7 方差分析

Table 7 Variance analysis

Source of variance	The square sum of the mean squared	Mean square	Degrees of freedom	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperature	9.162	4.581	2	38.896	0.025
Inoculum size	1.436	0.718	2	6.094	0.141
Incubation time	0.302	0.151	2	1.283	0.438
Deviation	0.236	0.118	2		

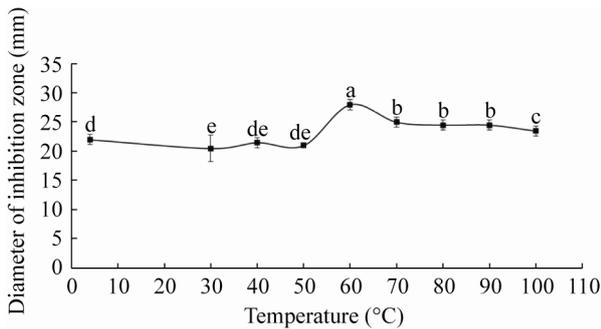


图4 温度对发酵产物抑菌活性的影响

Figure 4 Effects of the temperature on the antibiotic activity of fermentation products

Note: The lowercase letters indicate significant difference level of 0.01.

温度蒸发掉部分溶剂而使活性物质浓度升高所致。初步推断温度对菌株 B25-I-3 产生活性物质抑制 *P. infestans* 的影响较小。

2.4.2 自然光、紫外线、蛋白酶 K 与贮存温度对菌株 B25-I-3 发酵产物稳定性的影响

菌株 B25-I-3 浓缩发酵液在分别经紫外线和自然光照射以及蛋白酶 K 处理后,与未经处理的浓缩液相比,均对 *P. infestans* 的抑菌圈大小无显著变化(图 5A)。说明菌株 B25-I-3 的次级代谢产物对紫外线和自然光以及蛋白酶 K 稳定,该菌株抑制 *P. infestans* 的活性物质可能不是蛋白质。菌株

B25-I-3 的活性物质在不同低温条件下各保存 15 d 后对 *P. infestans* 的抑制作用均略有下降,其中于 -80 °C 保存后的活性下降较为明显(图 5B),说明菌株 B25-I-3 的次级代谢产物便于在 -20 °C 与 4 °C 条件下长期保存。

2.5 菌株 B25-I-3 抗菌活性物质的抗菌谱

菌株 B25-I-3 发酵产生的具有拮抗 *P. infestans* 生长活性的次级代谢产物对 *S. aureus*、*E. coli*、*B. subtilis*、*S. cerevisiae*、*R. solani*、*F. oxysporum* 与 *S. sclerotiorum* 均表现出了抑制作用。但菌株对 *S. aureus* 及 *S. cerevisiae* 并未表现出抑制活性,推测菌株分泌的活性物质有限,而其发酵液经浓缩后活性物质浓度增加,表现出了比菌株更广的抗菌谱。

2.6 菌株 B25-I-3 抗菌活性物质的初步分离与鉴定

以甲醇与水(4:1, 体积比)为洗脱相对菌株 B25-I-3 的甲醇浓缩液进行 HPLC 检测,结果如图 6 所示。浓缩液中的化合物大部分在 25 min 后吸收,洗脱时间在 25-50 min,有较多物质被冲洗出来,其中 1-6 号峰对称且宽度较窄,分离度较好,而其余峰交叉在一起,未能达到极限分离。

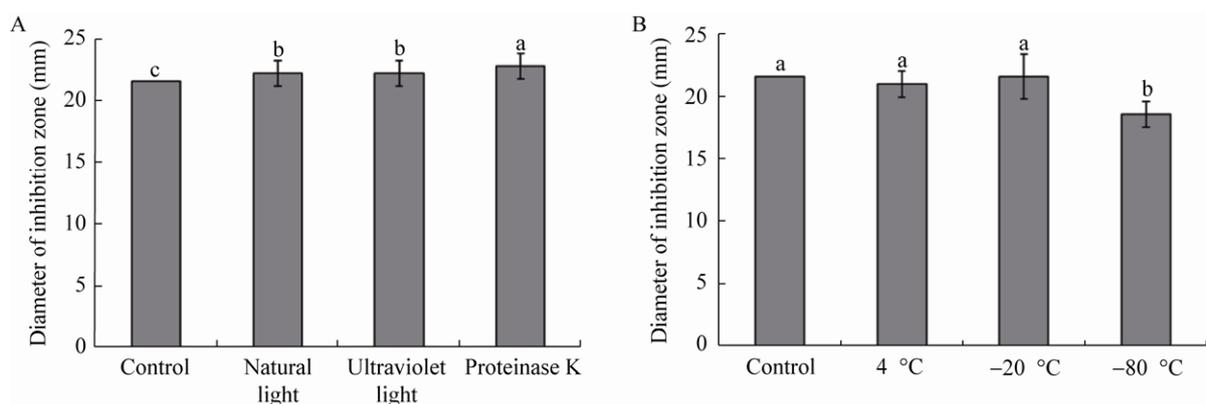


图5 自然光、紫外线、蛋白酶 K (A)与贮存温度(B)对菌株 B25-I-3 发酵产物抗致病疫霉活性的影响

Figure 5 Effects of natural light, ultraviolet, proteinase K (A) and storage temperature (B) on the antibiotic activity of fermentation products

Note: The lowercase letters indicate significant difference level of 0.01.

利用滤纸片法检测各个峰的馏分对致病疫霉的拮抗活性。图 6 中峰 5 处收集的洗脱液对 *P. infestans* 具有较强的抑制作用, 而其他峰处收集的馏分与交叉在一起的峰的混合馏分对

P. infestans 都未表现出抑制活性。初步判定峰 5 处的馏分中含有对 *P. infestans* 具有抑制作用的活性物质。对具有拮抗活性的组分进行 HPLC-MS 检测, 结果如图 7 所示。

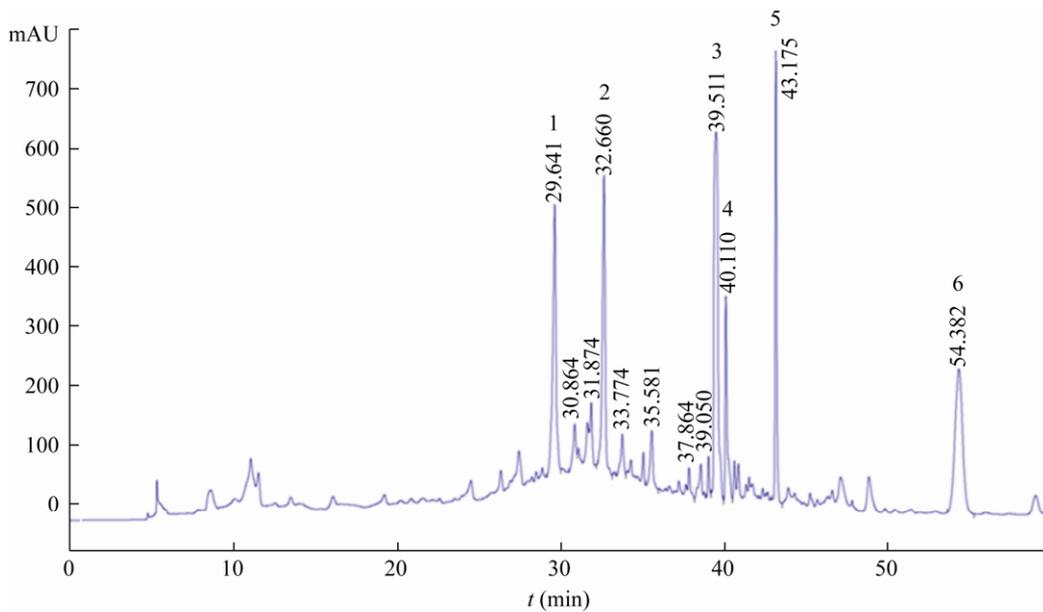


图 6 菌株 B25-I-3 活性物质的 HPLC 色谱图

Figure 6 HPLC chromatogram of the active substances

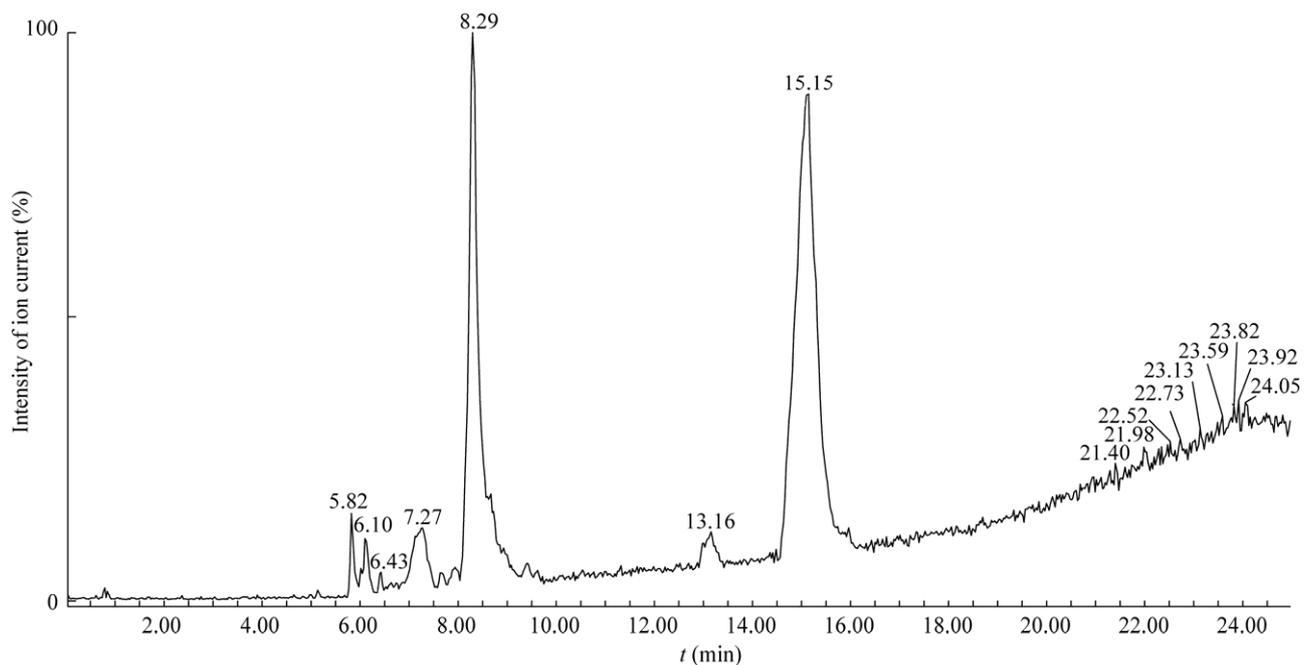


图 7 HPLC-MS 图

Figure 7 HPLC-MS

经数据分析后,图6中峰5处收集的馏分中主要含有2种物质,一种为N-(3-氨基-2-羟丙基)-N-甲基硫酸二酰胺[N-(3-amino-2-hydroxypropyl)-N-methylsulfuric diamide],分子式为 $C_4H_{13}N_3O_3S$,分子量为183.07,结构式见图8A;另一种为甲基(2R)-2-叠氮基-3-羟基-2-甲基丙酸酯[methyl(2R)-2-azido-3-hydroxy-2-methylpropanoate],分子式为 $C_5H_9N_3O_3$,分子量为159.06,结构式见图8B。

2.7 菌株 B25-I-3 活性物质对马铃薯晚疫病的防治作用

在只涂无菌水的空白对照组与只涂甲醇的对照组中,经 *P. infestans* 侵染后,4个品种叶片的相对病斑面积均在90%以上;试验组中,叶片的相

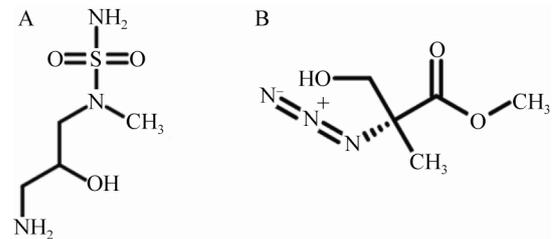


图8 液质联用仪检测到的物质结构

Figure 8 Structure of the substances detected by HPLS-MS analysis

Note: A: N-(3-amino-2-hydroxypropyl)-N-methylsulfuric diamide; B: Methyl(2R)-2-azido-3-hydroxy-2-methylpropanoate.

对病斑面积随着活性物质浓度的升高而逐渐下降(图9),说明菌株 B25-I-3 抗致病疫霉活性物质对马铃薯晚疫病具有明显的防治作用,而且对不同品种的马铃薯无特异性。

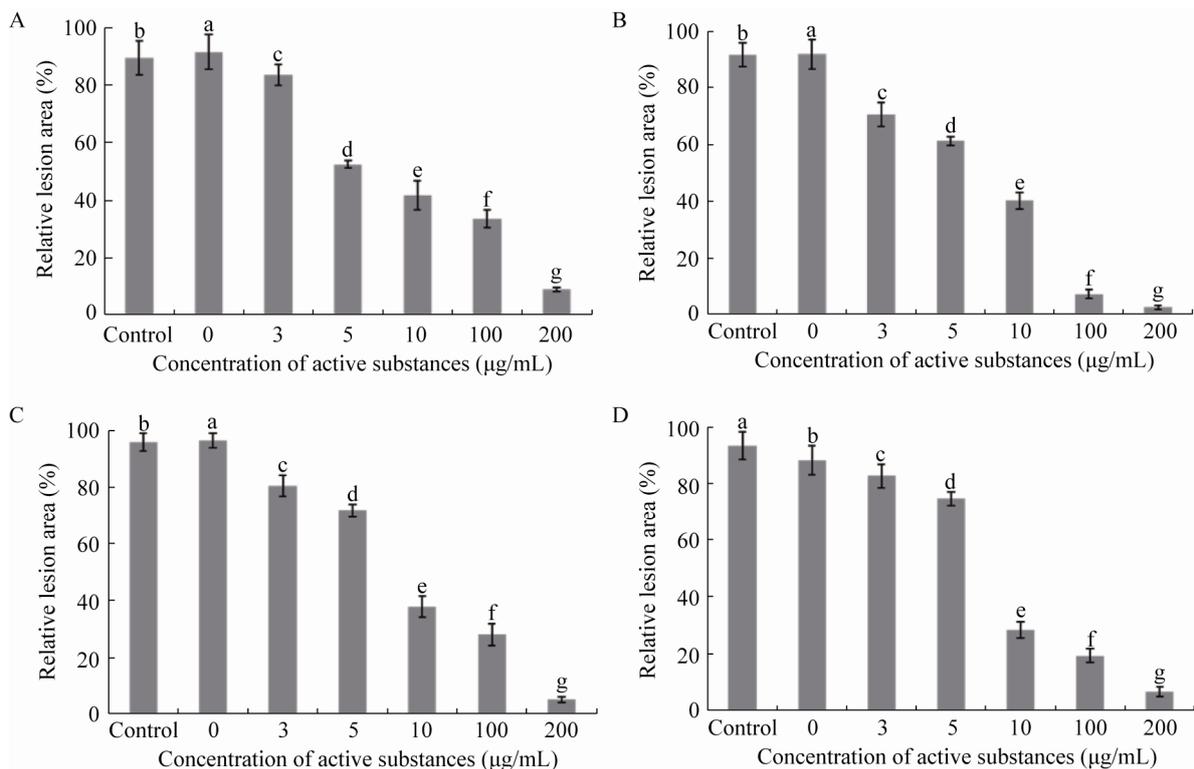


图9 菌株 B25-I-3 活性物质对致病疫霉侵染马铃薯离体叶片的影响

Figure 9 Effect of active substances on the detached potato leaves infected by *P. infestans*

注: A: 费乌瑞它; B: 冀张薯; C: 青薯9号; D: 克新1号。小写字母: 0.01 差异显著性水平。

Note: A: Feurita; B: Jizhangshu; C: Qingshu No.9; D: Kexin No.1. The lowercase letters indicate significant difference level of 0.01.

3 讨论与结论

利用有益微生物抑制有害微生物是防治植物病害的有效途径之一^[27]。El-Hasan 等^[28]从木霉菌 (*Trichoderma*) 中分离出的多种次级代谢产物均可以抑制植物病原体; Caulier 等^[29]发现枯草芽孢杆菌 30B-B6 对 *P. infestans* 具有抑制作用, 能明显降低病害的发生; 蒋继志等^[30]将 3 株抗 *P. infestans* 的放线菌复合发酵后, 发现发酵液能明显地抑制菌丝生长, 且使菌丝变形或孢子囊发生异常破裂。因此, 从微生物产生的活性物质中研发生物农药用以防治马铃薯晚疫病具有极大的可能性。

本研究对象是具有生物活性次级代谢产物“微工厂”之称的粘细菌。目前已从粘细菌中发现了约 600 多种生物活性物质, 有抗菌、抗病毒、溶栓及抗癌等活性。如 Chivosazol 能破坏真菌的细胞壁及其稳定性^[31]; Disorazol 作用于微管蛋白, 抑制细胞骨架形成^[32]; Myxopyronin 通过抑制 RNA 多聚酶活性而抑制细菌核酸的合成^[33]。这些结果说明了利用粘细菌抑制 *P. infestans* 生长的可能性。*M. fulvus* 的次级代谢产物越来越受到人们的关注, 但是有关其次级代谢产物对植物病害, 尤其是马铃薯晚疫病的防治作用鲜见报道。本研究中分离到的菌株 B25-I-3 对 *P. infestans* 表现出了较强的拮抗活性, 其产生的次级代谢产物具有明显抑制 *P. infestans* 侵染马铃薯叶片的活性, 且对不同品种叶片无损伤作用。该结果补充了抑制致病疫霉生长的微生物资源, 并为未来抗马铃薯晚疫病生物农药的研发提供基础数据。

粘细菌能分泌大量的粘液及导致自溶的胞外酶, 这使其在次级代谢产物的发酵生产方面有较大的局限性。温度、转速、周期、通风及补料等是优化微生物发酵的主要因素, 这些因素并非单一地影响菌株发酵, 而是通过各因素之间的交互作用共同影响^[34]。植物乳杆菌 AB-1 (*Lactobacillus plantarum* AB-1) 的发酵条件经正交设计优化后, 其产苯乳酸的量较优化前提高了 1.17 倍^[35]; 甲基

营养型芽孢杆菌 SD48 (*Bacillus methylotrophicus* SD48) 的培养基组成和发酵条件经正交试验被系统优化后, 其产生的大豆肽产量及其抗氧化活性有了较大的提高^[36]。这些研究结果说明, 微生物的生物活性是可以优化发酵条件来提高的。本研究对菌株 B25-I-3 抗 *P. infestans* 活性的发酵条件进行了正交优化, 发现该菌株最优发酵条件为: 摇床转速 180 r/min, 接种量 10%, 发酵周期为 7 d, 温度为 30 °C。这部分工作为未来开发基于菌株 B25-I-3 的抗马铃薯晚疫病生物农药奠定了基础。

此外, 本研究对菌株 B25-I-3 发酵产生的活性物质的稳定性进行了分析, 发现其耐受紫外线和自然光照射以及蛋白酶 K 的处理, 且易于在低温条件下保存, 该结果与任兴波等^[15]分离得到的变绿粘球菌 YR-35 (*M. virescens* YR-35) 发酵浓缩液的稳定性结果一致。但变绿粘球菌 YR-35 产生的活性物质在温度为 90 °C 时对 *P. infestans* 菌丝的抑制率仅能达到 15.38%, 而高温对菌株 B25-I-3 的活性物质影响较小。刘沛生等^[37]分离得到的具有抗 *P. infestans* 活性的 *M. fulvus* Xt-2 的次级代谢产物对高温环境也较敏感。相比之下, 本研究筛选的菌株 B25-I-3 其活性产物更具有应用于大田防治马铃薯晚疫病的潜力。

本研究表明菌株 B25-I-3 的次级代谢产物具有实用价值, 能够作为防治马铃薯晚疫病的有效药剂加以开发与利用, 但其发酵产生的活性物质究竟为何种物质以及其拮抗 *P. infestans* 的作用机理、大田应用等多个问题还需要今后的进一步研究。

REFERENCES

- [1] Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 385-402
- [2] Haas BJ, Kamoun S, Zody MC. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*[J]. *Nature*, 2009, 461(7262): 393-398
- [3] Kim YJ, Kim HJ, Kim GW, et al. Isolation of coralmycins A and B, potent anti-gram negative compounds from the

- myxobacteria *Coralloccoccus coralloides* M23[J]. Journal of Natural Products, 2016, 79(9): 2223-2228
- [4] Sun YW, Tomura T, Sato J, et al. Isolation and biosynthetic analysis of haliamide, a new PKS-NRPS hybrid metabolite from the marine myxobacterium *Haliangium ochraceum*[J]. Molecules, 2016, 21(1): 59
- [5] Livingstone PG, Morpew RM, Whitworth DE. Genome sequencing and Pan-Genome analysis of 23 *Coralloccoccus* spp. strains reveal unexpected diversity, with particular plasticity of predatory gene sets[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3187
- [6] Wenzel SC, Müller R. Myxobacteria-‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites[J]. Molecular BioSystems, 2009, 5(6): 567-574
- [7] Wang DT, Mang ZL. The molecular biology of myxobacterium[J]. Chemistry of Life, 2010, 30(5): 779-782 (in Chinese)
王德韬, 马中良. 黏细菌的分子生物学[J]. 生命的化学, 2010, 30(5): 779-782
- [8] Herrmann J, Fayad AA, Müller R. Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities[J]. Natural Product Reports, 2017, 34(2): 135-160
- [9] Diez J, Martinez JP, Mestres J, et al. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 52
- [10] Weissman KJ, Müller R. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(6): 2121-2136
- [11] Liu JL, Li HD, Wang J, et al. Screening and identification of myxobacterias with antifungal activity[J]. Plant Diseases and Pests, 2011, 2(3): 39-41,48
- [12] Wang HY. Biological characteristics of myxobacteria and screening of active substances[D]. Baoding: Master’s Thesis of Hebei University, 2003 (in Chinese)
王海英. 粘细菌的生物学特性及活性物质筛选[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2003
- [13] Ren XB, Wu ZH, Cui HC, et al. Isolation and identification of the strain YR-7 against *Phytophthora infestans* and study on its antibiotic substances[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1513-1523 (in Chinese)
任兴波, 武志华, 崔海辰, 等. 致病疫霉拮抗菌株 YR-7 的分离鉴定及其活性物质[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1513-1523
- [14] Wu ZH, Guo WW, Dong Y, et al. Isolation and identification of myxobacterial strain X6-II-1 resistant to *Phytophthora infestans* and its antibiotic activity and optimal fermentation condition[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(9): 1467-1479 (in Chinese)
武志华, 郭维维, 董晔, 等. 抗马铃薯晚疫病菌的粘细菌菌株 X6-II-1 的分离鉴定、拮抗活性及发酵条件的优化[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(9): 1467-1479
- [15] Ren XB, Zhang ZL, Zhao PY, et al. Isolation and identification of the strain YR-35 resistant to *Phytophthora infestans* and its metabolites[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(3): 379-387 (in Chinese)
任兴波, 张子良, 赵璞钰, 等. 马铃薯晚疫病菌拮抗粘细菌 YR-35 的分离鉴定及其代谢产物稳定性[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(3): 379-387
- [16] Wu ZH. Isolation of myxobacteria from the central region of Inner Mongolia and their activity and components against potato late blight pathogen[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese)
武志华. 内蒙古中部地区粘细菌分离及其抑制马铃薯晚疫病菌的活性和成分研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2018
- [17] Liu BH, Yang L, Feng LF, et al. Isolation and purification of myxobacteria in Chengdu[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2011, 3(1): 25-27
- [18] Guo WJ, Tao GJ, Tao WY, et al. A myxobacterium strain *Sorangium cellulosum* AHB125 producing epothilone B and other anticancer substances[J]. Natural Product Research, 2007, 21(14): 1256-1265
- [19] Wu ZH, Li N, Ma XZ, et al. Diversity and bioactivities of myxobacteria in Daxing’an Mountains[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 266-283 (in Chinese)
武志华, 李娜, 马秀枝, 等. 大兴安岭地区粘细菌资源的多样性及其生物活性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 266-283
- [20] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology[M]. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2004: 134-137
- [21] Zhou XL, Shen W, Rao ZM, et al. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology China, 2004, 31(4): 89-92 (in Chinese)
周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89-92
- [22] Zhang ZD, Xie YQ, Chu M, et al. Study on isolation and identification of endophytes in yam rhizome[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(1): 126-129 (in Chinese)
张志东, 谢玉清, 楚敏, 等. 山药内生菌的分离及菌种鉴定研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(1): 126-129
- [23] Li LY, Jiang JZ, Guo W. Screening of antagonistic bacteria against *Phytophthora infestans* and its inhibition effect[J]. Plant Diseases and Pests, 2011, 2(3): 49-51,55
- [24] Tang SJ, Xiao R, Wen Y, et al. Isolation and identification of Myxobacteria strain STXZ54 with antitumor activities[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 532-542 (in Chinese)
唐少军, 肖蓉, 文也, 等. 粘细菌 STXZ54 的分离鉴定及其抗肿瘤活性[J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 532-542

- [25] Li X, Xia Q, Li Y, et al. The study of vitro antibacterial effect of several traditional Chinese medicine extracts on common pathogens and antioxidant activity[J]. Journal of Changchun University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2019, 42(1): 139-142 (in Chinese)
厉雪, 夏青, 李艳, 等. 几种中药提取液对常见的致病菌体外抑菌及抗氧化活性的初步研究[J]. 长春理工大学学报: 自然科学版, 2019, 42(1): 139-142
- [26] Cui HW, Yang YL, Li JT, et al. A faster method for measuring relative lesion area on leaves based on software Photoshop[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(22): 10760-10762, 10805 (in Chinese)
崔华威, 杨艳丽, 黎敬涛, 等. 一种基于 Photoshop 的叶片相对病斑面积快速测定方法[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10760-10762, 10805
- [27] Jiang JZ, Zhao LK, Shi J, et al. Inhibition of fungal fermented filtrates on *Phytophthora infestans*[J]. Microbiology China, 2001, 28(2): 55-59 (in Chinese)
蒋继志, 赵丽坤, 史娟, 等. 几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 55-59
- [28] El-Hasan A, Walker F, Schöne J, et al. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 124(3): 457-470
- [29] Caulier S, Gillis A, Colau G, et al. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 143
- [30] Jiang JZ, Li S, Wang HX. Culture condition optimization of three actinomycetes mixed fermentation against *Phytophthora infestans* and mechanism[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2010, 30(1): 78-82 (in Chinese)
蒋继志, 李莎, 王会仙. 3 株致病疫霉拮抗放线菌复合发酵及其抑制机理[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2010, 30(1): 78-82
- [31] Irschik H, Jansen R, Gerth K, et al. Chivosazol A, a new inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria[J]. Journal of Antibiotics, 1995, 48(9): 962-966
- [32] Khalil MW, Sasse F, Lünsdorf H, et al. Mechanism of action of tubulysin, an antimetabolic peptide from myxobacteria[J]. ChemBioChem, 2006, 7(4): 678-683
- [33] Tupin A, Gualtieri M, Brodolin K, et al. Myxopyronin: a punch in the jaws of bacterial RNA polymerase[J]. Future Microbiology, 2009, 4(2): 145-149
- [34] Zhang YT. The studies on isolation, identification and antibacterial activity of *Myxococcus fulvus*[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan University of Technology, 2011 (in Chinese)
张宜涛. 橙色黏球菌的分离鉴定及其抑菌活性研究[D]. 郑州: 河南工业大学硕士学位论文, 2011
- [35] Yang XY, Li JP, Shi GC, et al. Optimization of *Lactobacillus plantarum* fermentation conditions in producing phenyllactic acid[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(9): 19-23 (in Chinese)
杨小院, 李渐鹏, 史国萃, 等. 植物乳杆菌发酵生产苯乳酸的条件优化研究[J]. 食品科技, 2018, 43(9): 19-23
- [36] Zhou XH, Dong WJ, Jiang JP, et al. Optimization of liquid fermentation condition of producing soybean peptide by acid-resisting and protease-producing *Bacillus* strain SD48 with soybean meal[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(8): 140-146 (in Chinese)
周星华, 董伟洁, 姜军坡, 等. 耐酸产蛋白酶芽孢杆菌 SD48 菌株液体发酵豆粕产大豆肽条件的优化[J]. 河南农业科学, 2019, 48(8): 140-146
- [37] Liu PS, Li N, Feng FY, et al. Identification of a mycobacterium strain against *Phytophthora infestans* and its activity analysis[J]. Science Technology and Engineering, 2014, 14(21): 40-45 (in Chinese)
刘沛生, 李娜, 冯福应, 等. 一株抗马铃薯晚疫病菌的黏细菌鉴定及其活性分析[J]. 科学技术与工程, 2014, 14(21): 40-45