



研究报告

一株烟草疫霉拮抗菌 MC4-2 的鉴定、发酵条件优化及防效测定

何明川^{Δ1} 曾舒泉^{Δ1} 王志江² 詹菽国² 柯昌磊² 李微杰² 张忠³ 吴国星¹ 谢永辉^{*2}

1 云南农业大学植物保护学院 云南 昆明 650201

2 云南省烟草公司昆明市公司 云南 昆明 650051

3 山东第一医科大学生命科学院 山东 泰安 271016

摘要:【背景】烟草黑胥病是由烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的真菌性病害, 给我国烟叶生产带来了巨大损失。【目的】在美洲大蠊肠道中分离并获得一株对烟草疫霉具有拮抗作用的菌株 MC4-2, 拟进一步明确该菌株的分类地位、优化发酵条件及对真菌性病害的防治效果。

【方法】通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列等方法对菌株 MC4-2 进行鉴定; 以细菌发酵液在波长为 600 nm 时的 OD 值为指标, 采用单因素和正交试验的方法对菌株 MC4-2 的发酵培养基和发酵条件进行优化; 通过在温室内进行盆栽防效试验, 明确了该菌株对烟草黑胥病的防治效果。【结果】通过平板对峙试验发现菌株 MC4-2 对烟草疫霉有较好的抑制效果, 抑制率可达到 64.04%; 16S rRNA 基因序列分析表明菌株 MC4-2 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)相似度达到 99%, 形态特征和生理生化特征与该菌也基本符合; 其优化培养基配方为: 蛋白胨 1.0 g、酵母浸粉 1.0 g、蔗糖 1.5 g、蒸馏水 100 mL; 最佳发酵条件为接种量 8%、装液量 30 mL、初始 pH 6.0、转速 210 r/min、温度 32 °C、培养时间 60 h、光照时间 12 h/d; 室内盆栽试验结果表明, 菌株 MC4-2 对烟草黑胥病的平均防效可达到 63.86%。【结论】为利用枯草芽孢杆菌 MC4-2 进行生物防治提供了重要参考依据。

关键词: 美洲大蠊肠道内生菌, 枯草芽孢杆菌, 烟草疫霉, 发酵条件, 防效

Foundation items: Science and Technology Planning Project of Yunnan Tobacco Company (2020530000242026); Construction Project of Scientific and Technological Innovation Team in Colleges of Yunnan Province

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: xiaohui3615@163.com

Received: 09-04-2021; Accepted: 20-05-2021; Published online: 24-06-2021

基金项目: 云南省烟草公司科技计划项目(2020530000242026); 云南省高校科技创新团队建设项目

Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: xiaohui3615@163.com

收稿日期: 2021-04-09; 接受日期: 2021-05-20; 网络首发日期: 2021-06-24

Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*

HE Mingchuan^{Δ1} ZENG Shuquan^{Δ1} WANG Zhijiang² ZHAN Youguo² KE Changlei²
LI Weijie² ZHANG Zhong³ WU Guoxing¹ XIE Yonghui^{*2}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

2 Kunming Tobacco Company of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650051, China

3 College of Life Sciences, Shandong First Medical University, Tai'an, Shandong 271016, China

Abstract: [Background] Tobacco black shank is a fungal disease caused by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, which has brought great losses to tobacco production in China. [Objective] In this study, a strain MC4-2 was isolated from *Periplaneta americana* intestinal tract, which had antagonistic effect on *P. parasitica* var. *nicotianae*. [Methods] The strain MC4-2 was identified by morphological characteristics, physiological and biochemical methods and 16S rRNA gene sequencing. The fermentation medium and fermentation conditions of strain MC4-2 were optimized by single factor and orthogonal experiment using the *OD* value of bacterial fermentation broth at the wavelength of 600 nm as the index. The control effect of this strain on tobacco black shank was confirmed by potted experiment in greenhouse. [Results] Through the plate confrontation test, it was found that strain MC4-2 had a good inhibitory effect on *P. parasitica* var. *nicotianae*, and the inhibition rate could reach 64.04%; 16S rRNA gene sequence analysis showed that the similarity between strain MC4-2 and *Bacillus subtilis* reached 99%, and the morphological and physiological and biochemical characteristics were basically consistent with that of strain MC4-2; The optimal medium formula was peptone 1.0 g, yeast extract 1.0 g, sucrose 1.5 g, distilled water 100 mL. The results showed that the optimal fermentation conditions were inoculation amount of 8%, liquid volume of 30 mL, initial pH of 6.0, rotation speed of 210 r/min, temperature of 32 °C, culture time of 60 h and light time of 12 h/d. The results of indoor pot experiment showed that the average control effect of strain MC4-2 on tobacco black shank could reach 63.86%. [Conclusion] This study provides an important reference for the biological control of *B. subtilis* MC4-2.

Keywords: intestinal bacteria of *Periplaneta americana*, *Bacillus subtilis*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, fermentation conditions, control effect

烟草黑胫病(Tobacco Black Shank)是由烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)引起的真菌性病害, 俗称“腰烂病”“穿大褂”。该病广泛分布于我国各大烟区, 是我国烟草上最具毁灭性的病害之一^[1]。在较长时间里, 防治烟草黑胫病主要靠农业措施和化学防治等手段。然而由于化学农药的滥用和不科学使用, 以及烟草品种的单一性种植等原因, 形成了环境污染、农残超标和烟草抗病品种退化等问题^[2], 所以生产方式亟需向绿色化生产的方向转变。生物防治相较于化学防治而言, 兼具无毒、低残留、选择性强等优点, 近年来越来越被关注^[3]。研究发现, 烟草黑胫病的生物防治方法

所利用的生防微生物主要包括细菌、真菌、放线菌等, 其中以细菌居多^[4]。例如已有报道的枯草芽孢杆菌^[5]、多粘芽孢杆菌^[6]、青霉菌、木霉菌^[7]及链霉菌^[8]等。

目前, 用于烟草黑胫病生物防治的细菌主要来源于植物根际土壤^[6,9], 其次是植物内生细菌^[10]。相比之下, 其他来源的细菌几乎空白, 特别是利用昆虫肠道分离的枯草芽孢杆菌进行病害防治也未见相关报道。常见的昆虫肠道微生物研究多集中在对昆虫本身的影响等方面, 对植物病害防治方面的相关研究较少^[11-12]。然而食腐昆虫例如家蝇、美洲大蠊、蜣螂等生存于真菌等病原体大量存在的环境

中,其肠道内进化出大量用于对病原真菌产生免疫作用的共生细菌^[13],例如在美洲大蠊成虫肠道中发现存在着丰富的细菌多样性^[14]。因此,这类昆虫是潜在的烟草疫霉拮抗细菌库,其定殖能力强且应用前景较广。

本课题组前期在食腐昆虫美洲大蠊肠道中分离并筛选出一株对烟草黑胫病有较好拮抗效果的细菌 MC4-2。通过平板对峙试验发现该菌对烟草疫霉抑制率可达到 64.04%,通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析的方法初步鉴定该菌为枯草芽孢杆菌,明确了其最佳发酵条件并测定了该菌对烟草黑胫病的室内防治效果。为后续枯草芽孢杆菌 MC4-2 的利用提供重要的依据,同时下一步也将开展更多关于菌株 MC4-2 进行植物病害防治的相关研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

该菌株由本课题组前期从美洲大蠊肠道内分离得到,编号为 MC4-2,现保存于云南农业大学昆虫毒理学实验室。

1.1.2 供试培养基

蛋白胨酵母蔗糖培养基(YSP) (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 蔗糖 20.0。牛肉膏酵母葡萄糖培养基(NYBD) (g/L): 牛肉膏 8.0, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 10.0。营养琼脂培养基(NA) (g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0。细菌基础培养基(LB) (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0。完全培养基(CM) (g/L): 葡萄糖 5.0, 硫酸铵 2.0, 柠檬酸钠 1.0, 七水合硫酸镁 0.2, 磷酸氢二钾 4.0, 磷酸二氢钾 6.0。燕麦培养基(OA) (g/L): 燕麦 30.0, 琼脂 18.0^[15]。以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、酵母浸粉、NaCl 等分析纯试剂,广东环凯微生物科技有限公司;杀

毒矾可湿性粉剂(64%噁霜·锰锌),先正达(苏州)作物保护有限公司; Biospin Bacteria Genomic DNA Extraction Kit, 杭州博日科技有限公司。PCR 仪, Biometra 公司; 微生物培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 恒温摇床, 上海知楚仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司。

1.2 拮抗菌的分离

美洲大蠊成虫体表用 75%乙醇漂洗 3-4 次,每次 2-3 min,用无菌水漂洗 3-4 次后进行解剖,获得完整的美洲大蠊消化道以备用。将美洲大蠊消化道放入无菌离心管中,加入 1 mL 无菌水,用研磨棒充分研磨后进行梯度稀释^[16]。取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释后的菌悬液 0.1 mL 分别涂布于 NA 平板上,然后倒置平板于 28 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d,每组设置 3 次重复^[17]。待单菌落形成后用接种环挑取各单菌落至新制备的 LB 平板上进行划线培养,多次重复划线培养后待无杂菌产生为止,最后将纯化好的菌株保存于 4 °C 冰箱备用^[16]。

1.3 拮抗菌抑菌效果测定

采用平板对峙的方法,使用灭菌后的打孔器(6 mm)在已活化的烟草疫霉平板上打孔,再用无菌镊子取一菌饼接种于另一新的 OA 平板的中央。挑取分离得到的菌株 MC4-2 单菌落接种于该 OA 平板的四周 2.5 cm 处,接种完毕后放入 28 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d,最后取出平板计算抑菌率。以不接拮抗菌作为空白对照,每个处理设置 3 个重复^[6]。

抑菌率(%)=

$$\frac{\text{对照平板菌落直径} - \text{处理平板菌落直径}}{\text{对照平板菌落直径}} \times 100。$$

1.4 拮抗菌的鉴定

1.4.1 形态结构及生理生化特征

挑取分离纯化后的菌株 MC4-2 单菌落接种于 LB 固体培养基上,在 28 °C 恒温培养箱中培养 2-3 d 以获得单菌落,待在平板中长出单菌落后观察其形态。然后在载玻片中央加一滴无菌水,用接种环挑取 MC4-2 单菌落于中央无菌水中并将其涂

成一均匀薄层, 再进行革兰氏染色。将已完成革兰氏染色的玻片放在油镜下观察, 最后测定菌体形态大小并记录革兰氏染色结果。生理生化特征相关检测参照沈萍等^[18]方法进行, 并以本实验室保存的 ZLSY2 菌株作为参考。

1.4.2 系统发育树构建

提取菌株 MC4-2 基因组 DNA 为模板, 选择细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTAGACTT-3') 进行 PCR 扩增。纯化后的产物送昆明擎科生物有限公司进行测序, 得到菌株的 16S rRNA 基因测序结果后, 将序列提交至 NCBI (GenBank) 中进行 BLAST 比对。最后, 使用 ClustalX 1.83 和 MEGA 7 软件分析其系统发育进化关系^[6]。

1.5 拮抗菌发酵条件筛选

1.5.1 种子液的制备

挑取菌株 MC4-2 单菌落于 100 mL LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后备用。

1.5.2 发酵培养基对细菌的影响

分别制备 100 mL 的 YSP、NYBD、NA、LB、CM 这 5 种液体培养基, 再分别接种 50 μ L MC4-2 种子液于不同液体培养基中。28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 测量菌液在波长为 600 nm 时的 OD 值。每组设置 3 个重复, 下同。

1.5.3 碳源对细菌的影响

以上述试验筛选出的最佳发酵培养基为基础, 固定除碳源外的其他组分, 分别加入麦芽糖、乳糖、葡萄糖、蔗糖和淀粉作为该培养基的碳源, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后测量细菌浓度, 确定最佳碳源。

1.5.4 氮源对细菌的影响

以上述试验筛选出的最佳发酵培养基为基础, 固定除氮源外的其他组分, 分别加入 NH_4Cl 、酵母浸粉、 NH_4NO_3 、甘氨酸和蛋白胨作为该培养基的氮源, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后测量细菌浓度, 确定最佳氮源。

1.5.5 培养基组分的正交试验

根据上述碳氮源单因素试验结果, 设置 3 因素 3 水平正交试验, 对蔗糖、酵母浸粉和蛋白胨的最佳用量进行优化, 以确定最佳培养基组分配方, 正交试验因素如表 1 所示。

1.5.6 初始接菌量对细菌的影响

在上述优化培养基中, 分别接种含量为 2%、4%、6%、8%、10% 的种子液。28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 测量在不同初始接菌量下的各培养基中细菌浓度, 以确定最佳的初始接菌量。

1.5.7 装液量对细菌的影响

在 250 mL 三角瓶中分别配置 30、60、90、120、150 mL 的优化培养基, 再在各培养基中接种种子液, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后测定菌液浓度, 确定最佳装液量。

1.5.8 初始 pH 对细菌的影响

分别配置 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的 100 mL 上述优化培养基, 并在各培养基中分别接种 50 μ L 种子液, 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 测定不同 pH 环境中细菌生长情况, 以确定最佳初始 pH。

1.5.9 转速对细菌的影响

按照上述优化结果配制培养基, 并采用上述优化培养条件, 分别调整转速为 120、150、180、210、240 r/min, 培养 24 h 后测量菌液浓度, 确定最佳摇床转速。

1.5.10 温度对细菌的影响

在上述优化培养基和发酵条件的基础上, 分别设置温度至 20、24、28、32、36、40 °C 进行发酵培养 24 h, 测定不同温度下的菌液浓度。

表 1 正交试验因素

Table 1 Orthogonal test factors

处理 Treatment	蔗糖 Sucrose (%)	酵母浸粉 Yeast powder (%)	蛋白胨 Peptone (%)
1	1.5	0.5	1.0
2	2.0	1.0	1.5
3	2.5	1.5	2.0

1.5.11 发酵时间对细菌的影响

采用上述优化培养基及发酵条件,分别在 12、24、36、48、60、72、96、108 h 测量细菌浓度,在 0–24 h 内每间隔 2 h 测量 1 次,24 h 后每间隔 12 h 测量 1 次。根据所得数据绘制细菌的生长曲线。

1.5.12 光照时间对细菌的影响

采用上述优化培养基及发酵条件,分别设定光照为 0、4、8、12、16、20、24 h/d,测定不同光照条件细菌浓度的大小。

1.6 烟草黑胫病室内盆栽防效测定

1.6.1 拮抗菌株悬浮液的制备

将菌株 MC4-2 接入 100 mL LB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后得到细菌菌悬液,再对菌悬液进行梯度稀释并进行平板计数将浓度调节至约为 1×10^8 CFU/mL。

1.6.2 烟草疫霉游动孢子悬浮液的制备

将烟草疫霉在 OA 培养基上培养 21 d,刮取菌丝置于 0.1% KNO_3 溶液中浸润 72 h,产孢后加无菌水捣碎,然后置于 4 °C 冰箱中处理 40 min,再置于 25 °C 恒温箱内放置 20 min,取出后将其配置成浓度为 1×10^4 个/mL 的游动孢子悬浮液,并加入 1% 葡萄糖溶液待用^[19]。

1.6.3 室内防效测定

以拮抗细菌处理土壤后,再移栽烟苗接种烟草黑胫病病原体。以土壤不做任何处理的盆栽苗为空白对照,以杀菌剂处理为阳性对照。按照烟草黑胫病分级标准调查病株数和发病级数,计算发病率、病情指数及防治效果。设置 3 个重复,每处理 15 盆烟苗。

病害分级标准:调查发病分级标准参考《中华人民共和国国家标准农药田间药效实验准则(二) GB/T23222–2008》。

0 级 全株无病;

1 级 茎部病斑不超过茎围的 1/3,或 1/3 以下叶片凋萎;

3 级 茎部病斑环绕茎围 1/3–1/2,或 1/3–1/2

叶片轻度凋萎,或下部少数叶片出现病斑;

5 级 茎部病斑超过茎围的 1/2,但未全部环绕茎围,或 1/2–2/3 叶片凋萎;

7 级 茎部病斑全部环绕茎围,或 2/3 以上叶片凋萎;

9 级 病株基本枯死。

相关计算公式如下:

$$\text{发病率(\%)} = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100;$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总株数} \times 9} \times 100;$$

$$\text{防效(\%)} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理区病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100。$$

1.7 数据处理

采用 Microsoft 2010 对试验数据进行处理以及图表制作;DPS 软件对数据进行显著性分析,根据 Duncan's 新复极差法进行检验。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的抑菌效果

拮抗菌 MC4-2 的平板对峙试验结果如图 1 所示,经测量和计算,处理组平板疫霉菌落平均半径为 10.00 ± 0.50 mm,抑制率可达到 $64.04\% \pm 3.30\%$ 。菌株 MC4-2 对烟草疫霉抑制性效果明显且稳定,因此值得将菌株 MC4-2 作为一株生防菌进行开发利用,并进行后续的研究。

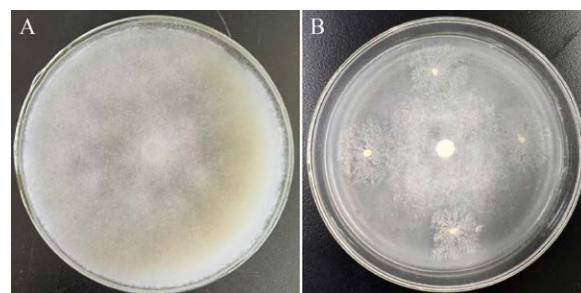


图 1 拮抗菌 MC4-2 的抑菌效果

Figure 1 Antibacterial effect of antagonistic MC4-2

注: A: 对照组; B: 处理组

Note: A: Control group; B: Treatment group

2.2 拮抗菌鉴定结果

2.2.1 拮抗菌形态特征及生理生化特征

菌株 MC4-2 在 LB 固体培养基上 28 °C 培养 2–3 d 后, 形成菌落的直径为 0.86–2.41 mm, 菌落为圆形, 呈乳白色, 表面干燥且边缘突起有皱纹, 边缘完整。菌体杆状, 大小为 0.57 μm×1.70 μm, 产生椭圆形芽孢, 革兰氏阳性菌, 染色结果如图 2 所示。与标准菌株进行对比后, 生理生化特征结果如表 2 所示。

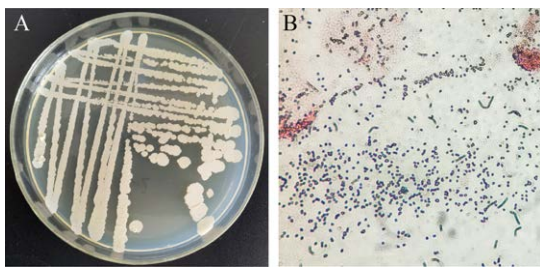


图 2 菌株 MC4-2 菌落形态及革兰氏染色结果
Figure 2 Colony morphology of strain MC4-2 and the result of Gram staining

注: A: 菌落形态; B: 革兰氏染色结果。B 图中蓝紫色部分为 MC4-2 菌株的菌体和芽孢(阳性), 红色部分为对照菌株(阴性)
Note: A: Colony morphology of MC4-2 strain; B: The result of Gram staining. The blue and purple part in the figure B is the bacteria and spore of MC4-2 strain (positive), and the red part is the control strain (negative)

表 2 菌株 MC4-2 生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain MC4-2

测试项目 Test items	结果 Results	
	标准菌株 ZLSY2 Standard strain ZLSY2	MC4-2
Starch hydrolysis	+	+
Grease decomposition	-	-
Litmus milk	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Urea decomposition	+	+
Glucose fermentation	-	+
Lactose fermentation	+	+
H ₂ S hydrolysis	-	-
Indole test	-	-
Methyl red test	-	+
V-P test	+	-
Citric acid decomposition	+	+

Note: +: Positive; -: Negative

2.2.2 拮抗菌分子鉴定结果

经测序所得菌株 MC4-2 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 451 bp, 将序列提交至 GenBank 中并上传该序列(GenBank 登录号: MW82274), 在数据库中进行 BLAST 比对, 分析表明菌株 MC4-2 和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) NJ1 (GenBank 登录号: KT588643.1) 相似度最高, 达到了 99%。再使用 MEGA 7 等软件分析其系统发育进化关系, 并结合细菌形态和生理生化特征, 初步鉴定菌株 MC4-2 为枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*。结果如图 3 所示。

2.3 发酵条件优化结果

2.3.1 培养基对细菌生长的影响

如图 4 所示, 菌株 MC4-2 在 5 种培养基中均能生长, 并且存在显著性差异。经 24 h 振荡培养后, 菌株 MC4-2 在 YSP 中生长最快, OD_{600} 值可达到 2.265; 其次为牛肉膏酵母葡萄糖培养基(NYBD)、细菌基础培养基(LB)、营养琼脂培养基(NA), 在完全培养基(CM)中生长最慢。因此, 菌株 MC4-2 的最佳基础培养基为 YSP。

2.3.2 不同碳源对细菌生长的影响

固定上述试验结果, YSP 培养基组分中蛋白胨 1.0 g、酵母浸粉 0.5 g、蒸馏水 100 mL 的配方, 筛选最佳碳源。如图 5 所示, 5 种碳源中皆可以生长, 但在以蔗糖为碳源时最适合菌株 MC4-2 生长, OD_{600} 值可以达到 2.231。菌株 MC4-2 对麦芽糖和葡萄糖的分解能力相似; 淀粉作为碳源时, 细菌浓度最低, 这说明该菌株分解淀粉的能力相较于其他 4 种碳源弱。

2.3.3 不同氮源对细菌生长的影响

如图 6 所示, 菌株 MC4-2 在 5 种不同氮源中均可以生长, 当以酵母膏为氮源时细菌生长最好, 菌液浓度最高, 其次是以蛋白胨作为氮源。从图 6 中可以看出, 当以甘氨酸为氮源时, 细菌浓度最低, 仅为 0.993, 这表示菌株 MC4-2 对部分氨基酸的分解能力有限或不能分解。因此, 选择酵母膏和蛋白胨作为 MC4-2 发酵培养基氮源。

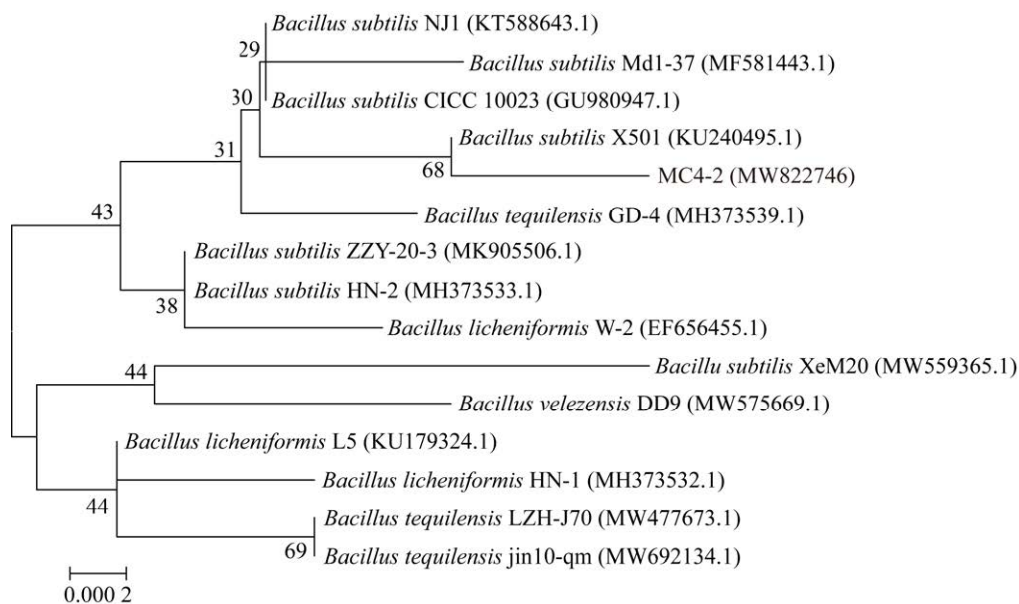


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株MC4-2及相关菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain MC4-2 and related strains constructed based on 16S rRNA gene sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000; 分支点上的数字表示 Bootstrap 的支持率; 括号内表示 GenBank 登录号; 左下角标尺表示 0.02% 的序列进化差异

Note: Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for Bootstrap; The parentheses represent the GenBank login number; Ruler represents 0.02% of sequence evolutionary differences

2.3.4 培养基组分正交试验结果

以蔗糖、酵母浸粉和蛋白胨为因素的正交试验结果如表 3 所示, 根据表中 R 值的大小排序得出 3 种因素对细菌生长的影响顺序为蛋白胨>蔗糖>酵母浸粉; 根据表中 K 值的大小, 得出最佳培养

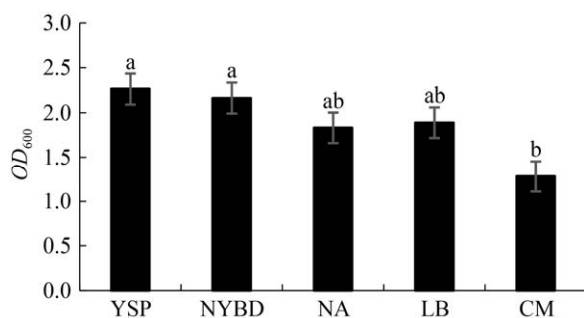


图4 培养基对菌株MC4-2生长的影响

Figure 4 Effect of medium on the growth of strain MC4-2

注: 图中不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著, 下同
Note: The different lowercase letters in the figure indicate that the $P<0.05$ level was significantly different, the same below

基水平组合为蔗糖(1.5%)、酵母浸粉(1.0%)、蛋白胨(1.0%), 即优化培养基配方为蔗糖 1.5 g、酵母浸粉 1.0 g、蛋白胨 1.0 g、蒸馏水 100 mL。

2.3.5 初始接种量对细菌生长的影响

如图 7 所示, 当初始接种量为 8% 时, 菌株 MC4-2 在经过 24 h 振荡培养后细菌浓度最高, OD_{600} 值为 2.613, 其次为接种量 10% 和 6% 等。

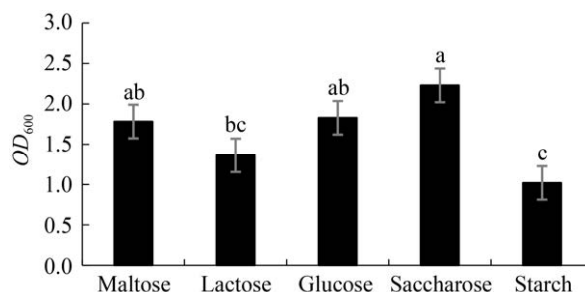


图5 碳源对菌株MC4-2生长的影响

Figure 5 Effect of carbon sources on the growth of strain MC4-2

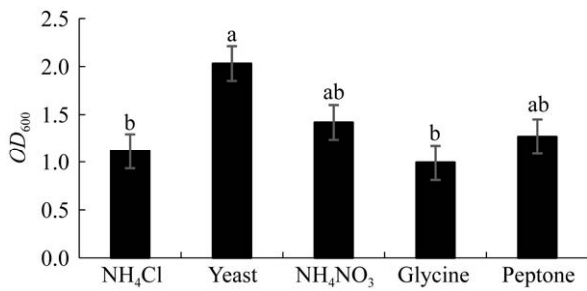


图6 氮源对菌株 MC4-2 生长的影响

Figure 6 Effect of nitrogen sources on the growth of strain MC4-2

表3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results

处理 Treatment	因素 Factors			OD ₆₀₀
	蔗糖 Sucrose (%)	酵母浸粉 Yeast powder (%)	蛋白胨 Peptone (%)	
1	1.5	0.5	1.0	2.792
2	1.5	1.0	1.5	2.753
3	1.5	1.5	2.0	2.706
4	2.0	0.5	1.5	2.738
5	2.0	1.0	2.0	2.605
6	2.0	1.5	1.0	2.739
7	2.5	0.5	2.0	2.644
8	2.5	1.0	1.0	2.828
9	2.5	1.5	1.5	2.665
K ₁	2.750	2.724	2.786	
K ₂	2.694	2.729	2.718	
K ₃	2.712	2.703	2.651	
R	0.056	0.025	0.135	

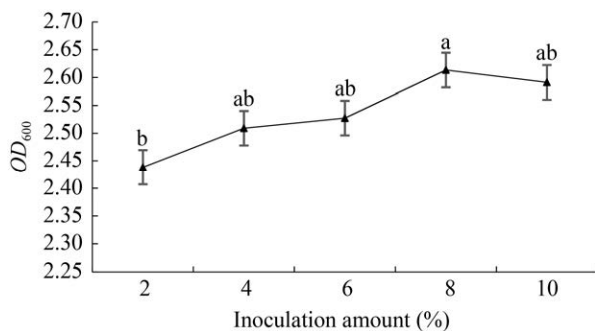


图7 接种量对菌株 MC4-2 生长的影响

Figure 7 Effect of inoculation amount on the growth of strain MC4-2

2.3.6 装液量对细菌生长的影响

如图8所示,不同装液量对细菌生长的影响存在显著差异。当在250 mL三角瓶中装液量为30 mL时,菌株MC4-2振荡培养24 h后细菌浓度最高,OD₆₀₀值为2.695。随着装液量的不断加大,细菌生长受到了影响,菌液浓度逐渐降低,当装液量为150 mL时,OD₆₀₀值为2.050。这说明菌株MC4-2为好氧型细菌,液体培养基中溶解氧气含量越高,该菌生长越好。

2.3.7 初始 pH 对细菌生长的影响

如图9所示,不同初始 pH 对菌株 MC4-2 的影响存在显著差异。当初始 pH 为 6.0 时,菌株 MC4-2 生长最快,24 h 振荡培养后 OD₆₀₀ 值为 2.885。菌株 MC4-2 在 pH 为 5.0 和 7.0 时生长也较好,OD₆₀₀ 值分别为 2.823 和 2.692。当 pH 为 8.0 和 9.0 时,菌液浓度相对较低;当 pH 为 4.0 和 10.0 时,菌株 MC4-2

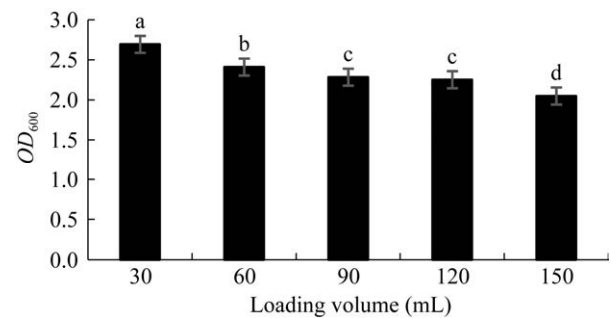


图8 装液量对菌株 MC4-2 生长的影响

Figure 8 Effect of loading volume on the growth of strain MC4-2

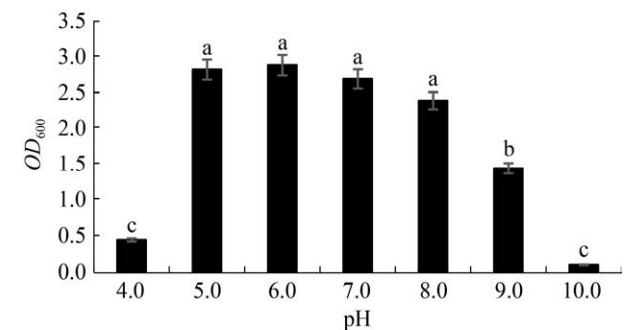


图9 初始 pH 对菌株 MC4-2 生长的影响

Figure 9 Effect of initial pH on the growth of strain MC4-2

基本不生长, OD_{600} 值仅为 0.443 和 0.104。这说明过酸或过碱的环境对菌株 MC4-2 的生长都有抑制作用, 菌株 MC4-2 的生长最适 pH 范围为 5.0–7.0。

2.3.8 转速对细菌生长的影响

如图 10 所示, 摇床设置不同的转速对菌株 MC4-2 生长的影响具有显著性差异。当摇床转速为 210 r/min 时, 培养 24 h 后细菌浓度最高, OD_{600} 值为 2.515, 其次是转速为 240 r/min 和 180 r/min。通过振荡培养, 增大了液体培养基的溶氧量, 从而促进细菌的生长。

2.3.9 温度对细菌生长的影响

如图 11 所示, 在不同的环境温度下, 菌株 MC4-2 均能生长, 在温度为 32 °C 时, 菌株 MC4-2 生长相对较快。温度自 20 °C 梯度升高至 32 °C, 细菌菌液浓度总体呈现逐渐上升趋势; 再逐渐升高环境温度至 40 °C, 菌液浓度又逐渐降低。温度的变化影响了细菌酶的活性, 从而影响其代谢和生长。温度过高或过低对菌株 MC4-2 的生长均有不良的影响, 因此菌株 MC4-2 的最佳发酵温度为 32 °C。

2.3.10 发酵时间对细菌生长的影响

如图 12 所示, 菌株 MC4-2 的菌液浓度随时间变化呈现“S”型曲线。0–6 h, 细菌浓度较低, 基本无变化, 该时段为细菌生长的迟缓期。从 6 h 开始, 细菌生长速度开始加快, 细菌浓度随时间的延长而逐渐增大。因此, 6–36 h 为细菌的对数生长期,

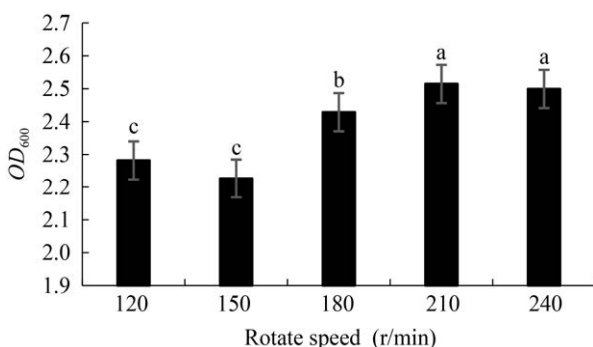


图 10 转速对菌株 MC4-2 生长的影响
Figure 10 Effect of rotate speed on the growth of strain MC4-2

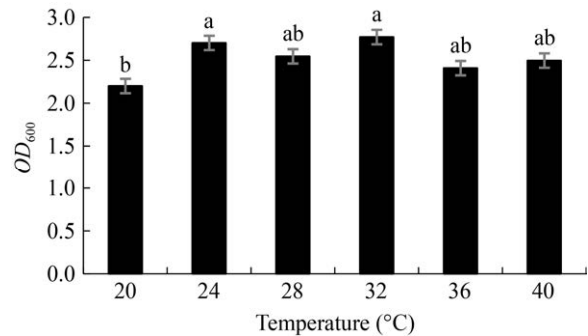


图 11 温度对菌株 MC4-2 生长的影响
Figure 11 Effect of temperature on the growth of strain MC4-2

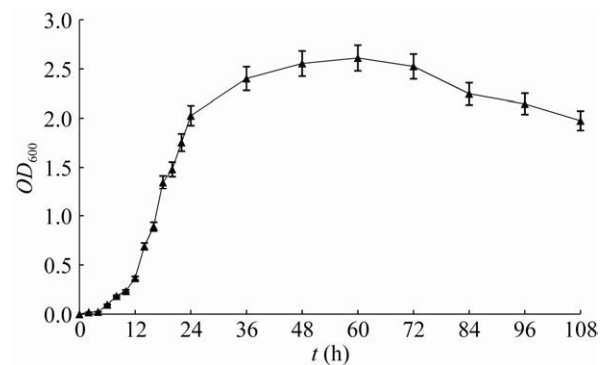


图 12 菌株 MC4-2 生长曲线
Figure 12 Growth curve of strain MC4-2

细菌在该时期生长速度最快。36–72 h 为细菌生长的稳定期, 在该时段细菌生长放缓, 菌液浓度趋于平稳。在 60 h 时, 菌株 MC4-2 菌液浓度最大, OD_{600} 值为 2.611。72 h 后, 细菌浓度开始逐渐下降, 该时段为细菌生长的衰亡期。

2.3.11 光照时间对细菌生长的影响

如图 13 所示, 不同光照时间对菌株 MC4-2 生长影响存在显著性差异。当光照时间为 12 h/d 时, 菌液浓度最高, OD_{600} 值为 1.569。与无光照的情况相对比, 可以发现在有一定光照的情况下, 细菌生长相对较好, 说明光照促进了菌株 MC4-2 的生长。

2.4 菌株 MC4-2 对烟草黑胥病的室内防效

室内盆栽试验结果如表 4 所示, 先接种拮抗菌 MC4-2 48 h 后再人为用烟草黑胥病致病菌感染烟

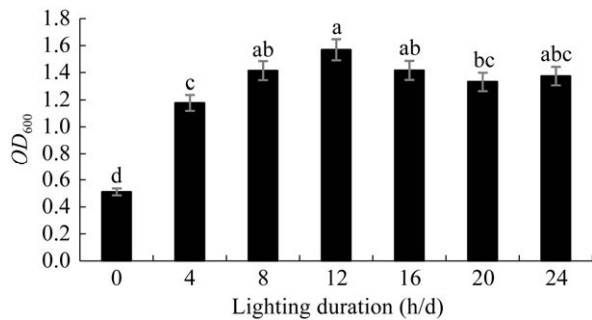


图 13 不同光照时间对菌株 MC4-2 生长的影响
Figure 13 Effect of different light duration on the growth of strain MC4-2

表 4 菌株 MC4-2 对烟草黑胫病室内防效结果
Table 4 Results of indoor control effect of strain MC4-2 on tobacco black shank

处理 Treatment	病情指数 Disease index	平均防效 Average control effect (%)
MC4-2 optimized fermentation broth	29.63±3.70b	63.86±4.64b
64% oxadixyl-mancozeb	18.51±3.71c	77.36±4.93a
CK	82.01±1.84a	—

Note: —: No data

苗, 这样处理对烟草黑胫病的平均防效可以达到 64%, 病情指数从空白对照的 82.01 降低至 29.63, 对烟草黑胫病能够起到较好的防治效果。通过先接种拮抗菌 MC4-2 再接种病原菌的试验方法, 可以发现 MC4-2 对烟草黑胫病有一定的预防效果。

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)作为芽孢杆菌中的模式菌株, 具有使用安全、生长速度快、营养要求简单及能够产生具有抗逆性和耐高温的芽孢等特点^[20]。枯草芽孢杆菌对病原菌的抑菌机制主要为拮抗、竞争和溶菌作用等^[20], 该菌能产生诸多对病原菌有抗生作用的物质^[21], 例如脂肽类物质、胞外蛋白、蛋白酶、葡聚糖酶等^[22-24]。除了对病害的防治, 枯草芽孢杆菌对植物的生长还表现出一定的促进作用^[25-26]。在已有的研究中, 具有拮抗作用的枯草芽孢杆菌常从土壤和植物中分离得到, 从昆

虫体内分离的报道较少。然而微生物与宿主昆虫之间有着密切的关系, 昆虫的生活和进化等各方面在某种程度上都依赖于各种有益微生物^[11], 两者是相互影响的, 所以丰富的昆虫肠道微生物在利用方面有着巨大的研究前景^[16,27]。本试验从食腐昆虫美洲大蠊的肠道中分离得到一株细菌 MC4-2, 通过平板对峙试验发现该菌对烟草疫霉抑制率可达到 64.04%, 通过对该菌的形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列等进行分析 and 对比, 初步鉴定该菌为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。这不仅丰富了昆虫肠道内生菌的研究, 还为利用昆虫内生枯草芽孢杆菌进行生物防治提供了参考依据。

由于枯草芽孢杆菌在生长过程中能产生多种活性物质和芽孢, 因此对于该菌发酵培养的条件进行筛选和优化就显得非常重要。在营养物质和外界条件都适宜的情况下, 细菌产生的抑菌物质往往较为丰富^[28]。本研究采用单因素和正交试验的方法对菌株 MC4-2 的基础培养基和发酵条件进行了优化, 结果表明菌株 MC4-2 在 YSP 培养基上生长最好, 并以蔗糖为最佳碳源, 以酵母膏和蛋白胨为最佳氮源, 优化培养基配方为: 蛋白胨 1.0 g、酵母浸粉 1.0 g、蔗糖 1.5 g、蒸馏水 100 mL, 最佳发酵条件为接种量 8%、装液量 30 mL、初始 pH 6.0、转速 210 r/min、温度 32 °C、培养时间 60 h、光照时间 12 h/d。将菌株 MC4-2 的最佳发酵条件与路妍等^[29]从土壤中分离得到的枯草芽孢杆菌 S-16 和叶云峰等^[28]从植物内分离得到的枯草芽孢杆菌 B47 的最佳发酵条件相比, 可以发现三者发酵温度的选择上相似, 都集中在 30–34 °C 之间; 最适 pH 集中在 6.0–7.0 之间, 为中性偏微酸性; MC4-2 与 B47 都表现出对蔗糖和酵母的选择, 而且培养基正交试验结果相似; MC4-2 与 S-16 都对蛋白胨有较好的选择性。将 MC4-2 与本实验室保存的枯草芽孢杆菌 ZLSY2 菌株的生理生化特征对比, 两者在葡萄糖分解、甲基红试验和 V-P 试验中结果不相同, 这可能是由于 2 株菌对葡萄糖的分解能力有

差异造成的。综上所述,可以发现即使是同为枯草芽孢杆菌,但是由于菌株的来源、生境等不相同,其生理生化和对发酵条件的选择也各不相同。

本试验对真菌性病害烟草黑胫病进行了室内盆栽防效测定,结果发现优化发酵后的菌株MC4-2菌悬液对烟草黑胫病的盆栽平均防效达到了63.86%。该试验结果与李苗苗^[30]在烟田土壤中分离得到拮抗菌和常栋等^[10]从植物茎组织中分离筛选得到的内生拮抗菌的室内盆栽的防效结果相比较,可以发现不同来源的枯草芽孢杆菌对于烟草黑胫病的盆栽防治效果也存在着差异。当然,除了对烟草疫霉进行防治外,不同来源的枯草芽孢杆菌对其他植物病害同样在盆栽防效试验中表现出较好的防治效果,而且存在着差异^[31-32]。

上述研究结果为枯草芽孢杆菌的生物防治提出更多的参考和依据,并丰富了昆虫肠道细菌的利用研究,同时也证明菌株MC4-2是一株具有较大潜力的生防菌株。在下一步的研究中,应加强对该菌的生防机制、代谢产物的分离及对防治其他植物病害的筛选等方面的探究。

REFERENCES

- [1] Dong JG. Agricultural Plant Pathology (3rd Edition)[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2015 (in Chinese)
董金皋. 农业植物病理学(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015
- [2] Xie YH, Zhang YG, Zhu LQ, You DG, Lu Y. Research advances in integrated management of tobacco black shank[J]. Current Biotechnology, 2015, 5(1): 41-46 (in Chinese)
谢永辉, 张永贵, 朱利全, 尤道贵, 鲁耀. 烟草黑胫病综合防治研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(1): 41-46
- [3] Qiu DW. Analysis of the development situation and trends of biological pesticides in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 679-684 (in Chinese)
邱德文. 生物农药的发展现状与趋势分析[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 679-684
- [4] Yi L, Qiu MW, Chen YM, Deng HB. Advances in biological control of tobacco black shank[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(25): 146-151 (in Chinese)
易龙, 邱妙文, 陈永明, 邓海滨. 烟草黑胫病的生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(25): 146-151
- [5] Han T, You C, Zhang L, Feng C, Zhang C, Wang J, Kong F. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank[J]. BioControl, 2016, 61(2): 195-205
- [6] Li XJ, Li CJ, Liu HY, Qiu R, Zhao H, Chen YG, Hu YJ, Liu C, Bai JK, Li SJ. Screening and fermentation condition optimization for antagonistic bacteria to *Phytophthora nicotianae*[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(1): 68-74 (in Chinese)
李小杰, 李成军, 刘红彦, 邱睿, 赵辉, 陈玉国, 胡亚静, 刘畅, 白静科, 李淑君. 烟草疫霉菌拮抗细菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(1): 68-74
- [7] Peng HY, Tian YH, Li XF, Zhang R, Wang DH, Liang YC, Gao KX. Control of tobacco black shank and black root rot by the combination of fungal biocontrol agents and amino oligosaccharides[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(1): 47-53 (in Chinese)
彭海莹, 田叶韩, 李晓芳, 张蕊, 王德浩, 梁元存, 高克祥. 生防真菌与氨基寡糖素组合对烟草黑胫病和根黑腐病的防治[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(1): 47-53
- [8] Yang Y, Zhang SW, Li KT. Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(9): 145
- [9] Xu TW, Zhou JY, Zu QX, Wen JT, Jian SY, Hu Y, Diao CQ, Zeng QB, Chen DX. Screening, identification, biocontrol and growth-promoting potential evaluation of two bacterial strains against tobacco black shank[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(3): 44-50 (in Chinese)
徐同伟, 周建云, 祖庆学, 文锦涛, 简胜义, 胡勇, 刁朝强, 曾庆宾, 陈德鑫. 两株烟草黑胫病拮抗细菌的筛选、鉴定和促生防病潜力评价[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(3): 44-50
- [10] Chang D, Gu JG, Jia FF, Ma WH, Xu YQ, Yan HT. Screening and control efficacy of different plant-derived biocontrol bacteria against tobacco black shank disease[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2020, 26(3): 84-90 (in Chinese)
常栋, 顾建国, 贾方方, 马文辉, 许跃奇, 闫海涛. 烟草黑胫病不同植物源生防菌的筛选及防效测定[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(3): 84-90
- [11] Guo J, Wu J, Deng XY, Lin LB, Liu S, Li JL. Advances in research on insect gut microbiota and their functions[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2015, 52(6): 1345-1352 (in Chinese)
郭军, 吴杰, 邓先余, 林连兵, 刘珊, 李继莲. 昆虫肠道菌群的功能研究进展[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(6): 1345-1352
- [12] Wei XY, Guo CL, Chu D. Research progress on the factors

- influencing microbiota diversity in insect[J]. Journal of Biosafety, 2019, 28(3): 170-176 (in Chinese)
魏晓莹, 郭晨亮, 褚栋. 昆虫体内微生物多样性的影响因素研究进展[J]. 生物安全学报, 2019, 28(3): 170-176
- [13] Xiang H, Huang YP. Symbiosis between gut microbiota and insects[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2008, 45(5): 687-693 (in Chinese)
相辉, 黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系[J]. 昆虫知识, 2008, 45(5): 687-693
- [14] Liu XF, Liu J, Tian L, Chen FM, Yang YL, Zhang XP. Diversity of culturable bacteria isolated from *Periplaneta americana* adult gut[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2207-2214 (in Chinese)
刘晓飞, 刘娟, 田蕾, 陈芳敏, 杨雅琳, 张小平. 美洲大蠊成虫肠道可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2207-2214
- [15] Wu ZM, Lan MX, Gao X, Li MY, Yuan Y, Guo ZJ, Yin XH, Wu GX. Screening of fermentation conditions for herbicidal activity of *Pantoea agglomerans* strain ZLSY20[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(9): 1990-1997 (in Chinese)
吴志美, 兰明先, 高熹, 李梦月, 袁远, 郭子俊, 殷兴华, 吴国星. 除草活性成团泛菌 ZLSY20 菌株发酵条件的优化[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9): 1990-1997
- [16] Lan MX, Zhang M, Li JY, Lu WF, Li ZB, Xia T, Li LF, Wu GX, Gao X. Isolation, identification and herbicidal activity of symbiotic bacteria in *Procecidochares utilis* larvae[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2018, 30(1): 59-64 (in Chinese)
兰明先, 张某某, 李建一, 鲁武锋, 李召波, 夏涛, 李丽芳, 吴国星, 高熹. 泽兰实蝇幼虫内生细菌的分离鉴定及除草活性研究[J]. 江西农业学报, 2018, 30(1): 59-64
- [17] Zhang H, Xue Y, Hou YF, Wang KM, Zhang ZG, Li MS, Yu ZN. Effects of gut bacteria to the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward *Helicoverpa armigera*[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(7): 176-180 (in Chinese)
张浩, 薛妍, 侯艳飞, 王开梅, 张志刚, 李明顺, 喻子牛. 肠道菌对苏云金芽孢杆菌杀虫活性的研究[J]. 生物技术通报, 2012(7): 176-180
- [18] Shen P, Chen XD. Experimental Microbiology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007
- [19] Wang WN, Quan XJ, Xiao CG. Research on the methods of producing zoospore and inoculation of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2005, 32(1): 18-22 (in Chinese)
王万能, 全学军, 肖崇刚. 烟草疫霉的产孢和接种方法研究[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 18-22
- [20] Huang X, Xu LL, Huang RS, Huang SS. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(1): 24-29 (in Chinese)
黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 黄庶识. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29
- [21] Liu X, Mu CQ, Jiang XL, Guo P, Tian YL, Zhu CX. Research progress of the metabolic substances produced by *Bacillus subtilis* and their application on biocontrol of plant disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(S1): 179-184 (in Chinese)
刘雪, 穆常青, 蒋细良, 郭萍, 田云龙, 朱昌雄. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S1): 179-184
- [22] Ji JY, Yang J, Gao XN, Huang LL, Kang ZS. Isolation and identification of lipopeptides produced by endophytic bacteria *Bacillus subtilis* E1R-j and its anti-fungal mechanism studies[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2015, 17(2): 172-178 (in Chinese)
姬婧媛, 杨洁, 高小宁, 黄丽丽, 康振生. 植物内生枯草芽孢杆菌 E1R-j 脂肽类化合物的分离鉴定及抑菌作用[J]. 农药学报, 2015, 17(2): 172-178
- [23] Li YG, Guo XH. Preliminary exploration for inhibitory mechanism of *Bacillus subtilis* strain BS2 to *Botrytis cinerea*[J]. Microbiology China, 2010, 37(5): 721-725 (in Chinese)
李永刚, 郭晓慧. 枯草芽孢杆菌 BS2 对葡萄灰霉病菌抑菌机制的初步探索[J]. 微生物学通报, 2010, 37(5): 721-725
- [24] Liu SF. Identification of *Bacillus subtilis* XZ18-3 and study on its antibacterial mechanism and preparation of fungicide[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan University of Technology, 2020 (in Chinese)
刘仕飞. 枯草芽孢杆菌 XZ18-3 的鉴定及其抗菌机制和菌剂制备研究[D]. 郑州: 河南工业大学硕士学位论文, 2020
- [25] Qiao JQ, Chen ZY, Liang XJ, Liu YF, Liu YZ. Biocontrol efficacy on tomato bacterial wilt by *Bacillus subtilis* Bs916[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 229-234 (in Chinese)
乔俊卿, 陈志谊, 梁雪杰, 刘永锋, 刘邰洲. 枯草芽孢杆菌 Bs916 防治番茄青枯病[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 229-234
- [26] Liu FC, Xing SJ, Ma HL, Du ZY, Ma BY. Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9155-9164
- [27] Wang HX, Jin L, Peng T, Zhang HY, Chen QL, Hua YJ. Identification of cultivable bacteria in the intestinal tract of

- Bactrocera dorsalis* from three different populations and determination of their attractive potential[J]. Pest Management Science, 2014, 70(1): 80-87
- [28] Ye YF, Li QQ, Yuan GQ, Fu G, Miao JH, Lin W. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese)
叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 付岗, 缪剑华, 林纬. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346
- [29] Lu Y, Yang X, Wu WQ, Lian ZQ, Hu JH, Zhou HY. Optimization of fermentation conditions and purification of antagonistic proteins produced by *Bacillus subtilis* strain S-16[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(2): 63-70 (in Chinese)
路妍, 杨鑫, 吴文庆, 连紫倩, 扈景晗, 周洪友. 枯草芽孢杆菌 S-16 产抗菌蛋白发酵条件优化及蛋白分离纯化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(2): 63-70
- [30] Li MM. Control effect of three *Bacillus* on tobacco black shank and its biocontrol characteristics[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese)
李苗苗. 三株芽孢杆菌复配对烟草黑胫病的防治效果及菌株生防特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2020
- [31] Huang DY, Cao CX, Zhang YN, Wang KM, Rao B, Wan ZY, Zhou RH, Yang ZW. Studies on controlling tomato *Corynespora* leaf spot by *Bacillus subtilis* NBF809[J]. China Vegetables, 2018(12): 40-44 (in Chinese)
黄大野, 曹春霞, 张亚妮, 王开梅, 饶犇, 万中义, 周荣华, 杨自文. 枯草芽孢杆菌 NBF809 防治番茄棒孢叶斑病研究[J]. 中国蔬菜, 2018(12): 40-44
- [32] Zhao XX, Niu SQ, Wen N, Su FF. Screening and identification of biocontrol *Bacillus* sp. against *Astragalus* root rot and its pot experiment[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(9): 107-111 (in Chinese)
赵晓霞, 牛世全, 文娜, 苏锋锋. 黄芪根腐病生防芽孢杆菌的筛选鉴定与盆栽防效试验[J]. 生物技术通报, 2019, 35(9): 107-111