



研究报告

多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 对林木病原菌物的拮抗作用及代谢产物的稳定性

解星丽^{1,2} 吴小芹^{*1,2}

1 南京林业大学林学院 南方现代林业协同创新中心 江苏 南京 210037

2 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室 江苏 南京 210007

摘要:【背景】伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia*)是一类重要的植物根际促生细菌,许多菌株具有抑制植物病原菌生长和促进植物生长等功能。【目的】探究高效解磷促生细菌多噬伯克霍尔德氏菌(*B. multivorans*) WS-FJ9 对不同林木病原菌物的抑菌作用。【方法】采用平板对峙法检测菌株 WS-FJ9 对 5 株林木病原真菌和卵菌的抑制效果;基于比色法检测经菌株 WS-FJ9 处理后病原菌菌丝细胞内含物的变化;使用 antiSMASH 5.0 在线预测网站对其次生代谢物质进行预测;通过菌丝生长抑制速率法对其无菌发酵滤液的抑菌活性和稳定性进行研究。【结果】菌株 WS-FJ9 对 5 种林木病原菌均具有不同程度的抑制作用,其中菌悬液对樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)的抑制作用最好,抑菌带宽度为 14.82±0.20 mm,无菌发酵滤液对真菌拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)和松杉球壳孢(*Sphaeropsis sapinea*)的抑制效果显著,抑菌率分别为 62.22%和 62.78%;经无菌发酵滤液处理后的病原菌菌丝内的丙二醛含量增高,还原糖和可溶性蛋白含量显著降低。WS-FJ9 菌株的基因组中含 27 个不同的次级代谢产物编码基因簇,其中包含编码嗜铁素、细菌素和抗生素等抑菌基因簇;该菌株发酵液在高温、紫外照射和强酸强碱环境条件下及经蛋白酶处理后,其抑菌活性均未受到影响。【结论】多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 对林木病原菌物具有很好的生防潜力。

关键词: 多噬伯克霍尔德氏菌,病原真菌和卵菌,发酵液,稳定性

Antagonism against forest pathogens and stability of fermentation broth of *Burkholderia multivorans* WS-FJ9XIE Xingli^{1,2} WU Xiaoqin^{*1,2}

1 Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China

2 Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing, Jiangsu 210007, China

Abstract: [Background] Some *Burkholderia* are important plant rhizosphere growth-promoting bacteria, which can inhibit plant pathogens and promote plant growth. [Objective] This study is to investigate the

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0600104); Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions

***Corresponding author:** Tel: 86-25-85427427; E-mail: xqwu_njfu@163.com

Received: 24-11-2020; **Accepted:** 28-12-2020; **Published online:** 12-04-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0600104); 江苏高校优势学科建设工程项目

***通信作者:** Tel: 025-85427427; E-mail: xqwu_njfu@163.com

收稿日期: 2020-11-24; **接受日期:** 2020-12-28; **网络首发日期:** 2021-04-12

antagonistic ability of phosphate solubilizing and growth-promoting bacteria *B. multivorans* WS-FJ9 against different forest pathogens. **[Methods]** The antagonistic effect of WS-FJ9 strain against five forest pathogenics, the changes of mycelial contents of pathogenic fungi and oomycetes treated by strain WS-FJ9, the prediction of secondary metabolites and the antagonistic activity and stability of the fermentation broth were studied by using dual culture, colorimetric method, antiSMASH 5.0 online prediction site and mycelium growth inhibition rate method, respectively. **[Results]** The strain WS-FJ9 had different inhibitory effects against the five forest pathogens, in which the suspension had the best inhibitory effect against *Phytophthora cinnamomi* with the inhibitory zone width up to 14.82 ± 0.20 mm. The fermentation broth of WS-FJ9 had significant inhibitory effect against *Phomopsis macrospore* and *Sphaeropsis sapinea*, and the inhibition rates were 62.22% and 62.78%, respectively. The contents of malondialdehyde (MDA), reducing sugar and soluble protein in the mycelia of pathogenic bacteria were increased after the treatment of sterile fermentation filtrate. The genome of the WS-FJ9 strain contained 27 different gene clusters encoding secondary metabolites, including genes encoding siderophores, bacteriocins and antibiotics. The antifungal activity of the fermentation broth of the strain was not affected under high temperature, ultraviolet irradiation, protease treatment, extreme acid and alkali treatment. **[Conclusion]** *B. multivorans* WS-FJ9 could be potentially used as biocontrol agent against forest pathogens.

Keywords: *Burkholderia multivorans*, pathogenic fungi and oomycetes, fermentation broth, stability

植物病原菌是引起植物病害的主要病原,如疫霉属(*Phytophthora*)、镰刀菌属(*Fusarium*)和丝核菌属(*Rhizoctonia*)等是常见的植物病原菌^[1],给农林业生产造成严重损失。目前化学农药仍然是防治植物病害的主要方法,但化学农药的长期大规模滥用,不仅导致土壤中的有益微生物受到危害、生态环境遭到破坏,而且还严重影响人类健康^[2]。生物防治作为一种环境友好型的植物病害控制措施已成为国内外的研究热点^[3]。

植物根际促生细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)可通过产生氰化氢(HCN)、抗生素及真菌细胞壁水解酶等代谢物质来抑制植物病原真菌的生长和繁殖^[4]。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)菌株可产生多黏菌素(Polymyxin)、环杆菌素(Circulin)和黏菌素(Colistin)等抗生素,对革兰氏阳性和阴性细菌以及一些致病性真菌具有拮抗活性^[5]。Hill 等^[6]研究发现由荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) BL915 菌株产生的硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin, PRN)对引起棉花枯萎的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)具有抑制作用。Gao 等^[7]报道了由瓦雷兹芽孢杆菌(*B. velezensis*) ZSY-1 产生的挥

发性化合物对植物病原真菌具有拮抗活性。除此之外,PGPR 还可通过竞争和寄生作用及诱导抗性 etc 机制来抑制植物病原菌。

洋葱伯克霍尔德氏菌群(*Burkholderia cepacia* Complex, Bcc)是一组表型相近但基因型不同的复合物,许多 Bcc 种类为植物根际促生菌,可产生不同的抗菌化合物来抑制植物病原菌^[8],如产生抗生素和铁载体等代谢物质来抑制腐霉(*Pythium* spp.)、立枯丝核菌和镰刀菌(*Fusarium* spp.)的孢子萌发和菌丝生长^[9]。Deng 等^[10]报道了菌株 *B. contaminans* MS14 具有广谱的抗菌活性,并显示出其在生物农药开发方面的巨大潜力。

本实验室前期从松树根际筛选获得一株可促进林木生长的多噬伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia multivorans*) WS-FJ9^[11],研究表明,该菌株具有良好的溶磷特性,并可明显促进林木生长^[12-13]。然而关于该菌株对林木病原菌的拮抗活性未见报道。为进一步了解该菌株的抗菌特性,本研究针对多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 对几种林木病原菌的拮抗活性、抗菌特性以及代谢产物的稳定性进行探究,以期今后该菌株 WS-FJ9 在植物病害生物防治中

的开发和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

根际促生细菌多噬伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia multivorans*) WS-FJ9, 由本实验室前期从福建官庄林场 28 年生湿地松树根际土壤分离筛选获得^[11], 现保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC), 保藏编号为 M2011435。

植物病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)、金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*)、拟茎点霉(*Phomopsis macrospore*)、松杉球壳孢(*Sphaeropsis sapinea*)均保存于南京林业大学森林病理实验室。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

硫代巴比妥酸、考马斯亮蓝 G250、3,5-二硝基水杨酸, 国药集团化学试剂有限公司; 三氯乙酸、刚果红、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 等, 天津风船化学试剂科技有限公司。pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 紫外分光光度计, 珀金埃尔默股份有限公司; 恒温生化培养箱, 上海一恒实业有限公司。

LB 培养基和 PDA 培养基的配制方法见参考文献[14]; 嗜铁素检测培养基: 根据 Schwyn 等的方法制作铬天青(Chromeazurol S, CAS)定性检测培养基^[15]; 蛋白酶检测培养基和纤维素酶检测培养基的配制方法见参考文献[16]。

1.3 WS-FJ9 抑菌谱的测定

WS-FJ9 抑菌谱的测定采用平板对峙法^[17]: 用无菌打孔器(直径 5 mm)在已活化好的立枯丝核菌、樟疫霉、金黄壳囊孢、拟茎点霉和松杉球壳孢平板上打孔, 将菌碟接入 PDA 平板中央; 取一环细菌, 在距离平板中央圆心左右各 3 cm 处分别划线接种 WS-FJ9, 于 28 °C 恒温培养 3–4 d, 待空白对照长满整个培养皿时, 用游标卡尺测量抑菌圈宽度, 判断拮抗效果。每个处理 3 个重复。抑菌带宽度为病原菌菌落边缘到细菌菌苔边缘之间的距离(mm)。

1.4 菌株 WS-FJ9 无菌发酵滤液的抑菌谱测定

1.4.1 无菌发酵滤液的制备

于固体 LB 平板上活化菌株 WS-FJ9, 用接种环挑取菌株 WS-FJ9 单菌落于 20 mL 液体 LB 培养基中, 在 28 °C、200 r/min 的摇床中振荡培养 24 h 获得种子液。参考丁森等^[18]的方法制备无菌发酵滤液: 按照 1% 的接种量将种子液重新转接至 LB 液体培养基中, 在 28 °C、200 r/min 的摇床中振荡培养 72 h 后获得发酵液。将发酵液 10 000 r/min 离心 20 min 后获取上清液, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 即获得无菌发酵滤液。

1.4.2 无菌发酵滤液的抑菌活性检测

按照 10% 的比例将无菌发酵滤液加入 PDA 培养基中, 摇匀后倒入培养皿中制成带毒平板。将病原菌菌碟接种至带毒平板的中央, 以加入等量的液体 LB 培养基为对照, 每个处理重复 3 次, 置于 28 °C 条件下培养 3 d。用十字交叉法测量病原菌的直径大小。抑菌率的测定公式为: 抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径) $\times 100\%$ ^[19]。

1.5 无菌发酵滤液对 3 株林木病原菌代谢的影响

1.5.1 酶液的制备

挑取樟疫霉、拟茎点霉和松杉球壳孢 3 株植物病原菌菌块于 20 mL 液体 PDA 中, 25 °C、180 r/min 条件下培养 4 d 后加入菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液, 继续培养 48 h 后将病原菌菌丝取出, 用无菌水进行反复清洗后滤纸吸干滤液, 称重并记录。将菌丝移至研钵中, 加入 Tris-HCl 提取液(0.05 mol/L, pH 7.8), 冰浴下研磨至糊状。将研磨液于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。

1.5.2 丙二醛含量的测定

参考梁军等^[20]的方法对病原菌菌丝内的丙二醛含量进行测定。

1.5.3 还原糖含量的测定

参考梁军等^[20]的方法对病原菌菌丝内的还原糖含量进行测定。

1.5.4 可溶性蛋白含量的测定

参考 Chou^[21]的方法对病原菌菌丝内的可溶性蛋白含量进行测定。

1.6 菌株 WS-FJ9 产抑菌活性物质的测定

1.6.1 产嗜铁素能力的测定

使用 CAS 定性检测培养基检测菌株产嗜铁素能力,将菌株 WS-FJ9 点接到培养基上,28 °C 培养 4 d,若产生透明圈则表明有嗜铁素产生。

1.6.2 产蛋白酶能力的测定

使用蛋白酶检测培养基检测菌株产蛋白酶的能力,将菌株 WS-FJ9 点接到培养基上,28 °C 培养 4 d,若产生透明圈则表明有蛋白酶产生。

1.6.3 产纤维素酶能力的测定

使用纤维素酶检测培养基检测菌株产纤维素酶的能力,将菌株 WS-FJ9 点接到培养基上,28 °C 培养 4 d,若产生透明圈则表明有纤维素酶产生。

1.7 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 次生代谢物质的预测

根据菌株 WS-FJ9 的全基因组序列^[22],通过 antiSMASH 5.0 在线预测网站对其次生代谢物质进行预测^[23]。

1.8 无菌发酵滤液抑菌作用的稳定性检测

1.8.1 温度对无菌发酵滤液抑菌稳定性的影响

无菌发酵滤液置入 4、40、60、80、100 °C 不同温度的水浴锅中处理 1 h,处理完毕后将其冷却至室温,根据 1.4.2 的方法测定无菌发酵滤液对 3 株病原菌的抑菌作用,对照组为未经处理的 28 °C 无菌发酵滤液,每个处理 3 个重复。

1.8.2 紫外光对无菌发酵滤液抑菌稳定性的影响

取 0.5 mL 的无菌发酵滤液于直径为 9 cm 的无菌培养皿中,揭开皿盖放置于距 30 W 紫外灯 30 cm 处,分别照射 15、30、60、180、360 min 后,检测无菌发酵滤液对 3 株病原菌的抑菌作用,对照组为未经紫外线照射的无菌发酵滤液,每个处理 3 个重复。

1.8.3 pH 对无菌发酵滤液抑菌稳定性的影响

用 1 mol/L 的 HCl 溶液和 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节无菌发酵滤液的 pH 为 2.0、4.0、6.0、8.0、

10.0、12.0,静置 24 h 后调回至无菌滤液的原始值 (pH 8.67),分别测定无菌发酵滤液对 3 株病原菌的抑菌作用,对照组为未经酸碱溶液处理的无菌发酵滤液,每个处理 3 个重复。

1.8.4 蛋白酶对无菌发酵滤液抑菌稳定性的影响

在无菌发酵滤液中分别加入终浓度为 1 mg/mL 的蛋白酶 K 和胰蛋白酶,混匀后于 37 °C 条件下静置 1 h,检测无菌发酵滤液对 3 株病原菌的抑菌作用,对照组为未加入蛋白酶处理的无菌滤液,每个处理 3 个重复^[24]。

1.9 数据处理

试验数据利用 Microsoft Excel 进行处理,采用 SPSS 21.0 统计软件中的方差分析程序进行差异显著性分析,处理间差异多重比较采用 Duncan 新复极差法 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 对 5 种不同林木病原菌的拮抗作用

如图 1 所示,菌株 WS-FJ9 对金黄壳囊孢、樟疫霉、拟茎点霉、立枯丝核菌和松杉球壳孢 5 种林木病原菌均有不同程度的拮抗作用,其中菌株 WS-FJ9 对樟疫霉的抑制效果最好,与对照组相比,在接种 WS-FJ9 的平板上可以看出樟疫霉的菌丝生长受到抑制,靠近细菌一侧的菌丝逐渐萎缩,形成明显的抑菌带,抑菌带宽度达到了 14.82 ± 0.20 mm;菌株 WS-FJ9 对拟茎点霉的抑制效果次之,抑菌带宽度达到了 9.31 ± 0.20 mm。松杉球壳孢的抑菌带宽度虽然较小,但与对照组相比菌丝明显稀疏;菌株 WS-FJ9 对金黄壳囊孢和立枯丝核菌的抑制效果则较弱。

2.2 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液对 3 株林木病原菌的抑菌作用

菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液对樟疫霉、拟茎点霉和松杉球壳孢 3 株林木病原菌的抑菌效果如图 2 所示,菌株 WS-FJ9 对拟茎点霉和松杉球壳孢的菌丝生长抑制效果明显,与对照组相比,在含有

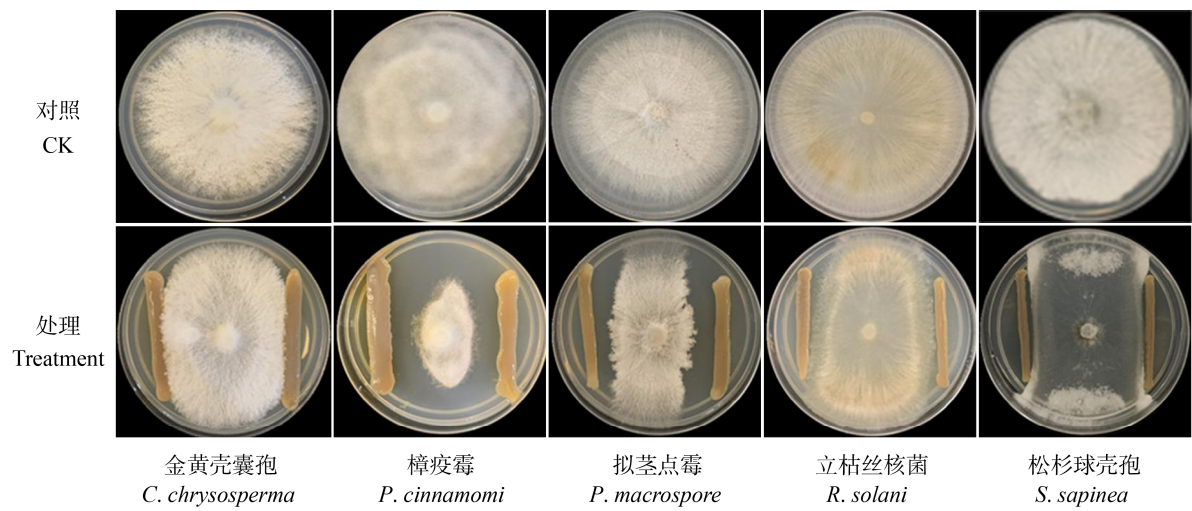


图 1 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 与 5 种不同植物病原菌的对峙培养结果
Figure 1 The results of confrontation culture between *B. multivorans* WS-FJ9 and five different plant pathogens

菌株 WS-FJ9 发酵液的培养基上 2 株病原菌生长缓慢, 抑菌率分别为 62.22% 和 62.78%; 菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液对樟疫霉的菌丝生长抑制作用较弱, 抑菌率为 22.78%。

2.3 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液对 3 株林木病原菌代谢的影响

樟疫霉、拟茎点霉和松杉球壳孢 3 种林木病原菌经菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液处理后, 它们菌丝内丙二醛含量均明显高于对照组(图 3A), 说明

这些病原菌的细胞膜均受到影响; 同时, 3 种病原菌菌丝内的还原糖和可溶性蛋白含量均要低于对照组(图 3B 和图 3C), 表明菌株 WS-FJ9 的无菌滤液可影响病原菌菌体的代谢合成, 从而导致菌丝细胞壁水解受损, 使得菌体生长受到影响。

2.4 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 产抑菌活性物质的测定

如图 4 所示, 将菌株 WS-FJ9 接种在嗜铁素、蛋白酶及纤维素酶检测培养基上均出现了明显的透明圈, 这表明该菌株具有产生嗜铁素、蛋白酶和纤维素酶的能力。

2.5 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 次生代谢物质预测

使用 antiSMASH 对 WS-FJ9 的基因组进行分析, 发现 27 个不同的次级代谢产物编码基因簇(表 1)。包括 12 个非核糖体肽合成酶基因簇(Non-Ribosomal Peptide Synthetase Cluster, NRPS), 其中包含编码抗生素如 Lysocin、Atratumycin、Malleilactone、Myxochelin 等基因簇, 以及编码嗜铁素 Ornibactin 和 Coelibactin 基因簇, 这与 2.4 节中 WS-FJ9 能够在嗜铁素检测培养基上产生透明圈结果一致。除此之外, WS-FJ9 基因组中还

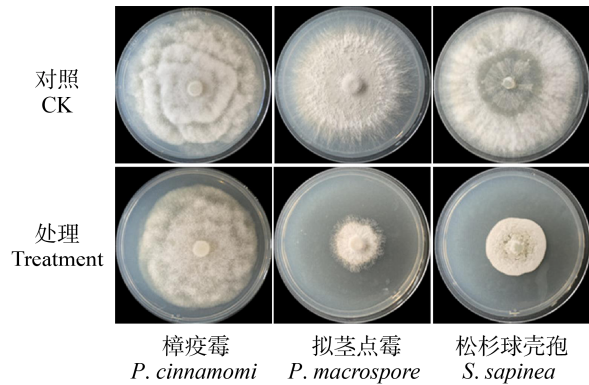


图 2 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液对林木病原菌的拮抗作用
Figure 2 The antagonistic effect of fermentation broth of *B. multivorans* WS-FJ9 on forest pathogens

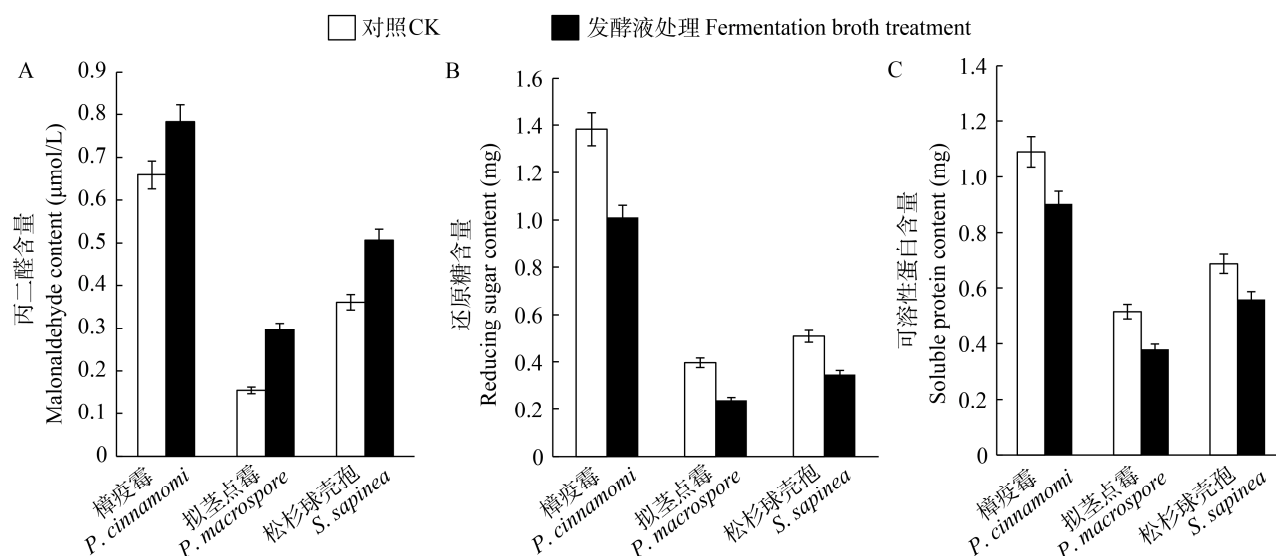


图3 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液对林木病原菌丝代谢的影响

Figure 3 Effect of fermentation broth of *B. multivorans* WS-FJ9 on hyphae metabolism of forest pathogens

注: A: 丙二醛; B: 还原糖; C: 可溶性蛋白

Note: A: MDA; B: Reducing sugar; C: Soluble protein

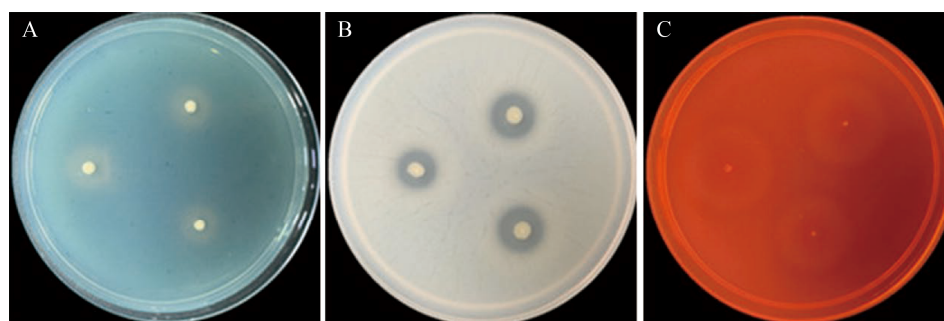


图4 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 产抑菌活性物质测定

Figure 4 Determination of antifungal active compounds of *B. multivorans* WS-FJ9

注: A: 嗜铁素检测培养基; B: 蛋白酶检测培养基; C: 纤维素酶检测培养基

Note: A: Siderophore detection medium; B: Protease detection medium; C: Cellulase detection medium

有编码硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin, PRN)、细菌素(Bacteriocin)、四氢嘧啶(Ectoine)、萜类(Terpene)基因簇, 以及编码高丝氨酸内酯(Hserlactone)类、 β -内酰胺类、环二肽合酶(CDPS)类、聚酮合酶(T1PKS)产物基因簇等。在发现的 27 个基因簇中, 最小的基因簇 3 008 bp, 为 CDPS 类基因簇; 最大的基因簇 43 376 bp, 为杂合聚酮/非核糖体聚肽类基因簇。其中有 10 个生物合成基因簇都是在其

他菌株中被证实有功能的次生代谢产物合成基因簇, 但大多数次级代谢产物基因簇与已发表的基因簇存在较大差异, 相似度最低只有 7%。该预测结果表明菌株 WS-FJ9 具有较强的次级代谢产物合成潜能, 可能产生有效的抑菌活性物质来拮抗植物病原物。

2.6 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 胞外代谢产物的稳定性

2.6.1 无菌发酵滤液的热稳定性

将菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液进行 4 °C 低

表 1 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 次生代谢物质预测
Table 1 Prediction of secondary metabolites of *B. multivorans* WS-FJ9

Cluster type	Most similar known cluster	Similarity (%)	Location	ORF name
NRPS	Lysocin	9	1-11 475	Contig2
NRPS	Atratumycin	7	1-6 821	Contig3
NRPS	Cyclic depsipeptide+Polyketide (Macrolide)	33	1-18 917	Contig12
NRPS	Cyclic depsipeptide+Polyketide (Macrolide)	9	1-11 614	Contig14
NRPS; T1PKS; transAT-PKS	Malleilactone	92	1-43 376	Contig16
NRPS	Ornibactin	33	1-22 736	Contig45
NRPS-like	Coelibactin	18	1-16 074	Contig159
NRPS	Myxochelin A/Myxochelin B	33	1-16 880	Contig585
NRPS			1-11 433	Contig4
NRPS			1-8 054	Contig700
NRPS-like			1-8 176	Contig701
NRPS			1-8 991	Contig1106
hglE-KS			1-13 000	Contig141
Terpene			1-6 489	Contig143
Terpene			1-11 912	Contig167
Terpene	12-epi-hapalindole J isonitrile ambiguine (A, B, C, D, E, K, L, I, J) isonitrile	6	1-9 273	Contig678
Terpene			1-6 910	Contig910
Hserlactone			1-5 324	Contig246
Bacteriocin			1-7 899	Contig714
Ectoine			1-3 912	Contig1364
Blactam	(2S,6R)-diamino-(5R,7)-dihydroxy-heptanoic acid	6	1-11 211	Contig456
CDPS			1-3 008	Contig465
T1PKS			1-5 252	Contig624
TransAT-PKS-like			1-4 662	Contig832
TransAT-PKS-like			1-13 883	Contig885
TransAT-PKS-like			1-14 183	Contig947
Other	Pyrrolnitrin	50	1-3 064	Contig390

温处理以及 40–100 °C 高温处理, 处理后其抑菌效果如图 5A 所示。与对照组(28 °C)相比, 经过 5 种不同温度处理的无菌滤液对樟疫霉抑菌活性无影响; 当对无菌滤液进行 60–100 °C 高温处理时, 随着温度的逐渐升高, 对拟茎点霉和松杉球壳孢的抑菌率逐渐降低, 但抗菌物质在 100 °C 时仍保持 40% 左右的抑菌率, 表明无菌滤液中的抗菌物质具有良好的热稳定性。

2.6.2 无菌发酵滤液的紫外线稳定性

菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液经紫外线照射后, 对 3 株植物病原菌的抑菌活性如图 5B 所示。可以看出无菌滤液经不同时间的紫外线照射后, 与对照组相比, 3 株病原菌的抑菌率没有发生明显的变化, 这表明菌株 WS-FJ9 具有良好的紫外线稳定性。

2.6.3 无菌发酵滤液的酸碱稳定性

菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液在不同 pH 条件下, 对 3 株植物病原菌的抑菌活性如图 5C 所示。与对照组(原始 pH 8.67)相比, 当无菌滤液在 pH 为 2.0–12.0 时, 对松杉球壳孢、樟疫霉和拟茎点霉的抑菌活性均较稳定, 当 pH=8.0 时其抑菌活性达到最佳。表明菌株 WS-FJ9 无菌滤液中的抑菌活性物质具有较强的酸碱稳定性, 最适 pH 为 8.0–9.0。

2.6.4 无菌发酵滤液的蛋白酶稳定性

如图 6 所示, 菌株 WS-FJ9 的无菌滤液经蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理后, 对 3 株病原菌的抑菌活性与对照组相比无明显变化, 说明无菌滤液中的抑菌物质对这 2 种蛋白酶均不敏感, 推测菌株 WS-FJ9 的抑菌物质活性部位不存在蛋白酶 K 和胰蛋白酶的敏感区域, 是一类非蛋白类物质。

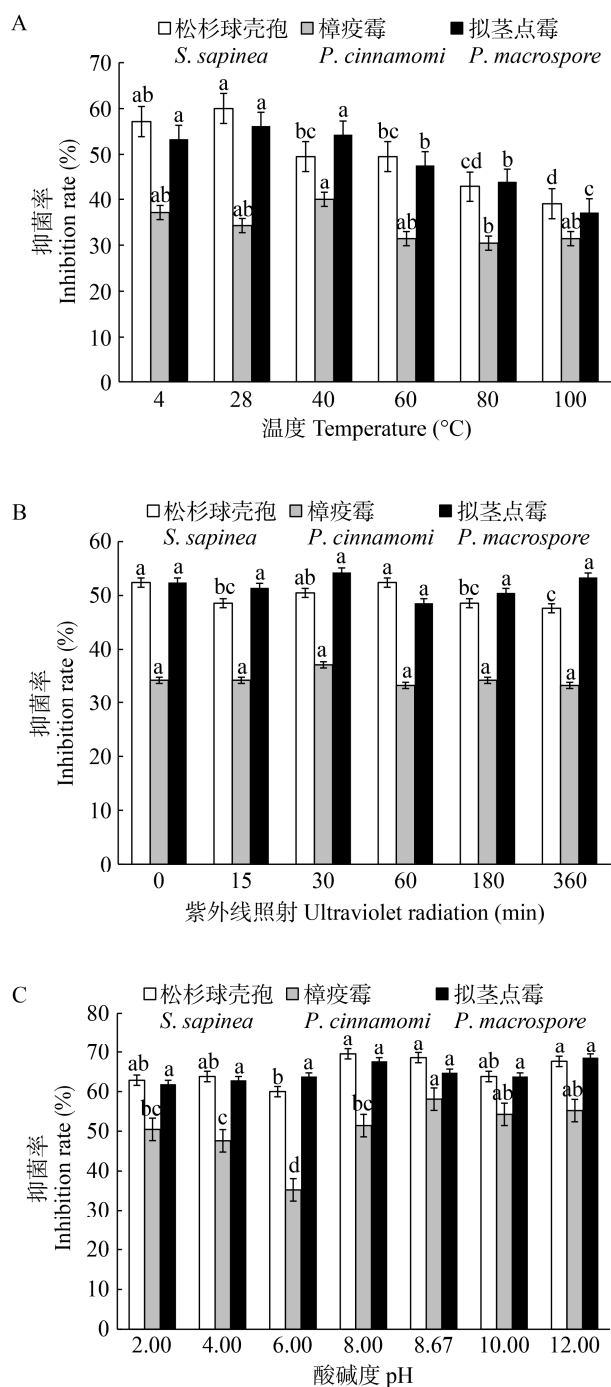


图 5 不同条件下多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液的稳定性

Figure 5 Stability of fermentation broth of *B. multivorans* WS-FJ9 under different conditions

注: A: 温度; B: 紫外线; C: 酸碱度。小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: A: Temperature; B: Ultraviolet light; C: pH. The difference of small letters is significant ($P < 0.05$)

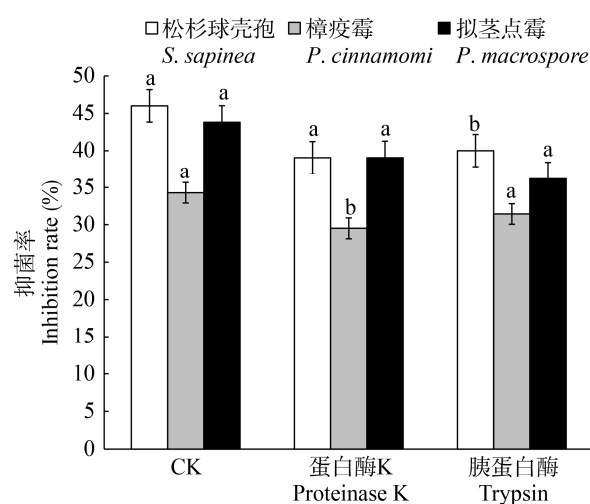


图 6 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 无菌发酵滤液的蛋白酶稳定性

Figure 6 Protease stability of fermentation broth of *B. multivorans* WS-FJ9

注: 小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The difference of small letters is significant ($P < 0.05$)

3 讨论与结论

对植物有益的伯克霍尔德氏菌是一类较为重要的根际促生菌, 它们普遍存在于土壤中, 能够在多种植物的土壤中大量定殖, 而且具有生物固氮、解磷和抗菌等促生功能^[25-28]。伯克霍尔德氏菌能够合成多种抗菌物质, 部分菌株在 20 世纪 90 年代已被批准用于如 Deny[®]、Blue Circle[®]及 Intercept[®]等多种植物病原真菌防治的菌剂当中^[29]。宫安东等^[30]研究发现溶磷吡咯伯克霍尔德氏菌 WY6-5 能高效抑制镰刀菌属、灰霉属、曲霉菌属、炭疽菌属等 8 种病原真菌的生长, 为潜在的高效抑菌生物制剂。本研究对实验室前期筛选的高效解磷菌——多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 的抑菌活性进行检测, 发现菌株 WS-FJ9 的菌体对植物病原真菌金壳孢、拟茎点霉、松杉球壳孢、立枯丝核菌和植物病原卵菌樟疫霉均具有拮抗活性, 其中对樟疫霉、拟茎点霉和松杉球壳孢的拮抗效果最为显著, 樟疫霉的抑菌带宽度达 14.82 mm, 表明多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 具有较广泛的抑菌谱。

进一步观察菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液对病原菌菌丝生长的影响,发现无菌滤液对拟茎点霉和松杉球壳孢的菌丝生长的抑制率为 62.22%和 62.78%,对樟疫霉的菌丝生长抑制率为 22.78%,结果与前面描述的 WS-FJ9 菌液的抑制结果有所不同,表明 WS-FJ9 菌株对卵菌和真菌的拮抗机制可能存在差异。从目前的研究结果来看,菌株 WS-FJ9 的无菌发酵滤液对 2 株林木病原真菌拟茎点霉和松杉球壳孢的拮抗效果较好,可能是其代谢产物中存在一些抑菌活性物质。对于樟疫霉而言,对峙培养的抑制效果要优于无菌滤液,说明 WS-FJ9 菌株除了分泌抑菌物质外,可能在与病原菌共培养时还存在空间位点和营养的竞争,这些拮抗机制可能综合提高了拮抗菌株的抑制效率。李亚男等^[31]发现萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)的无菌发酵液对稻瘟病菌丝生长抑制较强,在抑制孢子萌发试验中发现,菌悬液的抑制效果优于无菌发酵液。其次,一些生防细菌在与病原菌物相互接触后才能诱导其分泌抗菌物质,如唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*) NGJ 在与植物病原菌相互接触的条件下通过三型分泌系统分泌多种抑菌物质来拮抗植物病原真菌和卵菌^[32]。关于 WS-FJ9 菌株是否存在或可通过三型分泌系统分泌抑菌物质来拮抗樟疫霉有待进一步深入研究。

细胞膜的完整性是菌体正常生长代谢的一个主要影响因素,还原性糖、蛋白质等大分子物质贯穿于整个细胞膜和细胞质中,是维持生命活动最重要的物质。丙二醛是脂质过氧化作用产生的一种细胞毒素,不仅会导致脂质膜的损伤,还会引起核酸、蛋白质等生命大分子的交联聚合,可通过检测丙二醛含量间接反应脂质过氧化程度和膜系统受损程度^[33]。本研究使用 WS-FJ9 的无菌发酵滤液处理 3 株植物病原菌,发现检测到病原菌菌丝的丙二醛含量明显增加,表明其细胞膜受损。在正常条件下微生物能主动从环境中摄取所需营养物质,而当膜结构遭到破坏时,细胞内物质包括糖类则发生泄

漏,通过测定病原菌菌丝中可溶性总糖质量浓度变化可检测菌体膜结构的完整性^[34]。本研究发现经 WS-FJ9 菌株的胞外代谢产物处理 48 h 后病原菌菌丝内的还原糖和可溶性蛋白含量均有所降低,该结果与马利平等^[35]报道的枯草芽孢杆菌 B96-II 使细胞膜的通透性增加,造成糖类、蛋白质等细胞内容物的渗漏导致膜受损的结果一致。由此推测,菌株 WS-FJ9 的发酵液对供试几种病原菌的抑菌作用可能主要是对细胞膜结构造成破坏,细胞内容物流出,使菌体代谢紊乱,菌体的生长繁殖受到阻碍和抑制。

据报道,生防菌的胞外代谢产物可以抑制多种植物病原真菌的生长,是生防菌发挥抑菌作用的重要因子。基于上述多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 的抑菌特性,本研究进一步发现该菌株可分泌嗜铁素、蛋白酶和纤维素酶。有研究表明,在缺铁的情况下,拮抗细菌能产生一系列的铁螯合物或铁载体,这些铁螯合物螯合了根际中有限的可利用铁,使病原菌不能获得生长所需的铁,从而阻碍病原菌的生长^[36]。孔维亮等研究发现水拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1 可以产生羧酸盐和异羟肟酸型的复合型铁载体,其嗜铁素发酵液对樟疫霉和立枯丝核菌的抑制率均达到 100%^[37];枯草芽孢杆菌 ZL2-70 的抗菌蛋白具有较强的纤维素酶和几丁质酶活力,推测通过抑制病原菌的孢子萌发和菌丝溶解断裂来抑制大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)^[38]。对多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 的基因组进行挖掘,发现该菌株具有多种抑菌功能的代谢产物生物合成基因簇,如合成细菌素、环肽类抗生素 Atratumycin^[39]、PRN^[40]、大环类抗菌物质 Myxochelin^[41]和萜类和聚酮类^[42]等基因簇。PRN 广泛存在于假单胞菌属、伯克霍尔德氏菌属及沙雷氏菌属(*Serratia*)中,能抑制多种植物病原菌的生长^[43],其作用的主要靶位点位于细胞膜上,以阻止蛋白质、RNA 和 DNA 的合成^[44]。姜海博等^[45]从番茄根际筛选出对番茄青枯病有很强抑制作用

的荧光假单胞菌 SN15-2 能产生 PRN、藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin, Plt)和嗜铁素等物质。来源于 *B. gladioli* pv. *cocovenenans* 的聚酮化合物毒素为线粒体 ATP 酶抑制剂, 具有强烈的细胞毒性和抑菌作用^[46]。本实验中菌株 WS-FJ9 的无菌发酵液既能够抑制病原菌菌丝的生长, 又能够破坏菌体膜结构的完整性, 说明菌株 WS-FJ9 可能产生了嗜铁素、抗生素和水解酶类等物质单独或同时作用于植物病原菌。有关 WS-FJ9 菌株抑菌物质的成分确定和抑菌机理还有待进一步研究。

为了探究菌株 WS-FJ9 发酵滤液的稳定性, 本研究发现该菌株在 4–100 °C 温度范围内其抑菌活性几乎无变化, pH 2.0–12.0 酸碱处理和蛋白酶处理后也仍能保持较高的抑菌活性。崔文会等^[47]研究发现贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) CX-2 的无菌发酵液在经过高温和强酸强碱处理后, 其抑菌活性显著下降。贾淑颖等^[48]发现对苏云金芽孢杆菌 Bt185 和 HD-1 菌株发酵上清液在 50 °C 以上抑菌活性逐渐下降, 80 °C 以上抑菌活性丧失, 当发酵上清液 pH 值为 10.0 时几乎没有抑菌活性。林业上施用的生物防治剂和常规有机合成农药一样, 都要受到环境的影响^[49], 多噬伯克霍尔德氏菌 WS-FJ9 的无菌发酵滤液具有很好的热和酸碱等稳定性, 说明该菌株分泌的抗菌物质能更好地适应多种生境, 应用范围更广。

REFERENCES

- [1] Liu CH, Chen X, Liu TT, Lian B, Gu YC, Caer V, Xue YR, Wang BT. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(2): 459-466
- [2] Sanchez AD, Ousset MJ, Sosa MC. Biological control of *Phytophthora collar* rot of pear using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms[J]. *Biological Control*, 2019, 135: 124-134
- [3] Gálvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(2): 142-148
- [4] Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(4): 1044-1051
- [5] Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkova LI. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, 47(4): 333-345
- [6] Hill DS, Stein JI, Torkewitz NR, Morse AM, Howell CR, Pachlatko JP, Becker JO, Ligon JM. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1): 78-85
- [7] Gao ZF, Zhang BJ, Liu HP, Han JC, Zhang YJ. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. *Biological Control*, 2017, 105: 27-39
- [8] Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Déziel E. *Burkholderia* diversity and versatility: an inventory of the extracellular products[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(9): 1407-1429
- [9] Yang XA, Chen XJ, Song ZQ, Zhang XW, Zhang JF, Mei SY. Antifungal, plant growth-promoting, and mycotoxin detoxication activities of *Burkholderia* sp. strain XHY-12[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(4): 158
- [10] Deng P, Wang XQ, Baird SM, Showmaker KC, Smith L, Peterson DG, Lu SE. Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis[J]. *MicrobiologyOpen* (Weinheim), 2016, 5(3): 353-369
- [11] Hou L. Studies on screening of efficient phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere of pine trees and on their characteristics[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2012 (in Chinese)
侯亮. 松树根际高效解磷细菌的筛选及解磷特性的研究[D]. 南京林业大学硕士学位论文, 2012
- [12] Zeng QW, Wu XQ, Wang JC, Ding XL. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(4): 844-855
- [13] Li GX, Wu XQ, Ye JR, Yang HC. Characteristics of organic acid secretion associated with the interaction between *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 and poplar root system[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 9619724
- [14] Huang YQ, Yun JM, Zhang WW, Ai DY, Qi QY, Yao B. Effect of *Bacillus pumilus* HN-10 on antagonistic activity and cell structure of *Trichothecium roseum*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(6): 25-33 (in Chinese)
黄玉琴, 贡建民, 张紊玮, 艾对元, 漆倩涯, 姚博. *Bacillus pumilus* HN-10 对 *Trichothecium roseum* 的拮抗作用及菌体结构的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2019,

- 38(6): 25-33
- [15] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [16] Han JH, Shim H, Shin JH, Kim KS. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 165-175
- [17] Zhan YS, Li J, Chu XD, Cai ZY, Ji PW, Chen BZ, Jiang YJ. Screen, identification and fermentation optimization of an antifungal bacterium Z21[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1503-1514 (in Chinese)
詹艺舒, 李婕, 褚秀丹, 蔡志英, 纪鹏伟, 陈炳智, 江玉姬. 一株真菌拮抗细菌 Z21 的筛选与鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1503-1514
- [18] Ding S, Ye JR. Preliminary study on antibacterial properties of *Bacillus velezensis* YH-20 fermentation broth[J]. Journal of West China Forestry Science, 2019, 48(5): 81-88 (in Chinese)
丁森, 叶建仁. 瓦雷兹芽孢杆菌 YH-20 发酵液的抑菌特性初探[J]. 西部林业科学, 2019, 48(5): 81-88
- [19] Zhao Y, Zhang D, Yang ZH, Zhu JH, Zhao DM, Xue X. Determination of the stability of fermentation broth and analysis of active components of *Bacillus velezensis* HN-Q-8[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 490-499 (in Chinese)
赵雅, 张岱, 杨志辉, 朱杰华, 赵冬梅, 薛雪. 贝莱斯芽孢杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液稳定性测定及抑菌活性成分分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 490-499
- [20] Liang J, Wang Y, Jia XZ, Zhang XY. Effects of infection with *Botryosphaeria dothidea* on cell membrane permeability, soluble sugar and MDA content in poplar calli[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2008, 44(8): 72-77 (in Chinese)
梁军, 王媛, 贾秀贞, 张星耀. 溃疡病菌对杨树愈伤组织细胞膜透性、可溶性糖及 MDA 含量的影响[J]. 林业科学, 2008, 44(8): 72-77
- [21] Chou CM. Wavelet-based multi-scale entropy analysis of complex rainfall time series[J]. Entropy, 2011, 13(1): 241-253
- [22] Liu YQ, Wang YH, Kong WL, Liu WH, Xie XL, Wu XQ. Identification, cloning and expression patterns of the genes related to phosphate solubilization in *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different soluble phosphate levels[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 108
- [23] Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W81-W87
- [24] Ge PH, Ma GZ, Fu HR, Wang SF, Liu ZP. The inhibitory spectrum and stability determination of marine *Bacillus amyloliquefaciens* GM-1 strain[J]. Agrochemicals, 2012, 51(10): 730-732, 741 (in Chinese)
葛平华, 马桂珍, 付泓润, 王淑芳, 刘兆普. 海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定[J]. 农药, 2012, 51(10): 730-732, 741
- [25] Estrada-de Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2790-2798
- [26] Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Barka EA. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(4): 607-626
- [27] Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 719-729
- [28] Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, Reynolds SE, Samuels RI. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 239(2): 319-323
- [29] Eberl L, Vandamme P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys[J]. F1000Research, 2016, 5: 1007
- [30] Gong AD, Zhu ZY, Lu YN, Wan HY, Wu NN, Dimuna C, Gong SJ, Wen ST, Hou X. Functional analysis of *Burkholderia pyrrocinia* WY6-5 on phosphate solubilizing, antifungal and growth-promoting activity of maize[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(9): 1574-1586 (in Chinese)
宫安东, 朱梓钰, 路亚南, 万海燕, 吴楠楠, Dimuna C, 龚双军, 文淑婷, 侯晓. 吡咯伯克霍尔德菌 WY6-5 的溶磷、抑菌与促玉米生长作用研究[J]. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1574-1586
- [31] Li YN, Jiang F, Zhang J, Fan YY, Chen J, Peng YL, Hu YG. Inhibition effects and antibacterial mechanism against rice blast of antagonistic bacteria in plateau soil[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2017, 23(1): 33-40 (in Chinese)
李亚男, 蒋芬, 张杰, 范永义, 陈敬, 彭友林, 胡运高. 高原土壤中稻瘟病拮抗细菌的抑菌效果及抗菌机理[J]. 应用与环境生物学报, 2017, 23(1): 33-40
- [32] Swain DM, Yadav SK, Tyagi I, Kumar R, Kumar R, Ghosh S, Das J, Jha G. A prophage tail-like protein is deployed by *Burkholderia* bacteria to feed on fungi[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 404
- [33] Tian J, Ban XQ, Zeng H, He JS, Chen YX, Wang YW. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30147

- [34] Dong FB. Antibacterial mechanism and control effect to the silkworm disease of an antagonistic endophytic *Burkholderia cepacia* Lu10-1 isolated from mulberry[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2010 (in Chinese)
董法宝. 桑树内生拮抗细菌 *Burkholderia cepacia* Lu10-1 的抑菌机制及对家蚕病害的防治效果研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2010
- [35] Ma LP, Hao BQ, Wang J, Qin S, Qiao XW. Inhabitation of antagonistic bacterium B96-II to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(6): 861-865 (in Chinese)
马利平, 郝变青, 王静, 秦曙, 乔雄梧. 拮抗菌 B96-II 对芦笋枯萎菌的抑菌作用[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 861-865
- [36] Xu LP, Yin YN, Li SM, Guo JH. Mechanisms of antagonistic bacteria against soil-borne pathogen[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(1): 10-14 (in Chinese)
徐刘平, 尹燕妮, 李师默, 郭坚华. 拮抗细菌对土传病原菌的作用机理[J]. 中国生物防治, 2006, 22(1): 10-14
- [37] Kong WL, Zhou M, Wu XQ. Characteristics of siderophores production by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 and its antagonism against forest pathogens[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3278-3285 (in Chinese)
孔维亮, 周敏, 吴小芹. 水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素特性及其对林木病原菌的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3278-3285
- [38] Wang YD, Jiang TT, Wang Q. Physical and chemical properties and antifungal mechanism of antifungal protein produced by antagonistic strain *Bacillus subtilis* ZL2-70 against *Verticillium dahliae*[J]. Cotton Science, 2017, 29(6): 560-569 (in Chinese)
王奕丁, 姜婷婷, 王全. 棉花黄萎病拮抗细菌 *Bacillus subtilis* ZL2-70 抗菌蛋白的理化性质和抑菌机理[J]. 棉花学报, 2017, 29(6): 560-569
- [39] Rojas-Rojas FU, Salazar-Gómez A, Vargas-Díaz ME, Vásquez-Murrieta MS, Hirsch AM, De Mot R, Ghequire MGK, Ibarra JA, Estrada-de Los Santos P. Broad-spectrum antimicrobial activity by *Burkholderia cenocepacia* TAtl-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere[J]. Microbiology (Reading), 2018, 164(9): 1072-1086
- [40] El-Banna N, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes[J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(1): 69-78
- [41] Kunze B, Bedorf N, Kohl W, Höfle G, Reichenbach H. Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales): production, isolation, physico-chemical and biological properties[J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(1): 14-17
- [42] Feng S, Jian YF, Jin L, Tang SC, Li ZG. Complete genome sequence data of rare actinomycetes strain *Saccharothrix texasensis* 6-C, a biological control agent for potato late blight[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2021: MPMI-10-20-0300
- [43] Pawar S, Chaudhari A, Prabha R, Shukla R, Singh DP. Microbial pyrrolnitrin: natural metabolite with immense practical utility[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 443
- [44] Warden JT, Edwards DL. Electron spin resonance investigations of mitochondrial electron transport in *Neurospora crassa*. Characterization of paramagnetic intermediates in a standard strain[J]. European Journal of Biochemistry, 1976, 71(2): 411-418
- [45] Lou HB, Wang XB, Chen J, Wang W. Isolation and identification of bacterium strain SN15-2 against *Ralstonia solanacearum* and analysis on its bio-control ability[J]. China Plant Protection, 2019, 39(3): 12-18 (in Chinese)
娄海博, 王晓冰, 陈俊, 王伟. 拮抗青枯劳尔氏菌的荧光假单胞菌 SN15-2 分离鉴定及其生防能力分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(3): 12-18
- [46] Sun T. Mining of nonribosomal peptides from *Burkholderia gladioli* ATCC 10248[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2020 (in Chinese)
孙涛. 唐菖蒲伯克氏菌 ATCC10248 中非核糖体肽类天然产物的挖掘[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2020
- [47] Cui WH, Sun X, Liang CY, Yuan XM, Li BG, Liu L. Screening of antagonistic bacteria against soil-borne pathogenic fungi and evaluation of their biocontrol effects[J]. Industrial Microbiology, 2020, 50(2): 41-47 (in Chinese)
崔文会, 孙雪, 梁承宇, 袁晓明, 李保国, 刘莉. 土传真菌病害拮抗菌的筛选及其生防效果研究[J]. 工业微生物, 2020, 50(2): 41-47
- [48] Jia SY, Hao ZB, Chen SY, Han BB, Li X. Study on *Bacillus thuringiensis* fermentation supernatant antimicrobial spectrum and stability[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(6): 661-665 (in Chinese)
贾淑颖, 郝再彬, 陈圣怡, 韩兵兵, 李霞. 苏云金芽孢杆菌发酵上清液抑菌谱及稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(6): 661-665
- [49] Zhu CX, Bai XS, Zhang M. The status quo of development and perspective of bio-pesticides[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2002, 21(11): 654-657, 661 (in Chinese)
朱昌雄, 白新盛, 张木. 生物农药的发展现状及前景展望[J]. 上海环境科学, 2002, 21(11): 654-657, 661