

研究报告

附子白绢病菌拮抗菌的鉴定、发酵条件优化及抑菌效果

汤永玉, 吴国星, 朱国渊, 李冉, 施春兰, 王思洁, 杨燕通, 高熹*

云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201

汤永玉, 吴国星, 朱国渊, 李冉, 施春兰, 王思洁, 杨燕通, 高熹. 附子白绢病菌拮抗菌的鉴定、发酵条件优化及抑菌效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2892-2906.

TANG Yongyu, WU Guoxing, ZHU Guoyuan, LI Ran, SHI Chunlan, WANG Sijie, YANG Yantong, GAO Xi. Identification, fermentation condition optimization, and effect of a strain against *Sclerotium rolfsii* in *Aconitum carmichaeli*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2892-2906.

摘要:【背景】附子白绢病是由齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)引起的一种土传细菌性病害, 该病原菌严重影响附子的生产。【目的】筛选出对附子白绢病具有生防效果的菌株, 并将其用于病害防治。【方法】利用平板涂布法和划线法从黄粉虫蛹体分离菌株, 平板对峙法筛选对齐整小核菌具有较强拮抗能力的菌株, 通过形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因测序分析确定其分类地位; 以单因素试验对发酵条件进行优化, 并初步测定拮抗菌的菌悬液、挥发性气体和发酵液对齐整小核菌菌丝的抑制效果。【结果】筛选出的拮抗菌株将其编号为 N2, 初步鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*); 菌株 N2 最佳培养基配方(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 蔗糖 20.0; 最佳培养条件: 初始 pH 6.0, 温度 36 °C, 转速 240 r/min, 装液量 30 mL, 接菌量 0.05%; 其菌悬液、挥发性气体和发酵液均能有效抑制白绢病菌菌丝的生长; 胞外酶测定结果显示该菌株可产生蛋白酶和纤维素酶, 不产嗜铁素。【结论】菌株 N2 对附子白绢病具有较好的抑制效果, 在生物防治中具有较好的应用潜力和较高的研究价值。

关键词: 附子白绢病; 暹罗芽孢杆菌; 发酵条件优化; 抑制效果; 生物防治

资助项目: 四川省区域创新合作项目(2021YFQ0022); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(202205AC160077)
This work was supported by the Regional Innovation Cooperation Project of Sichuan Province (2021YFQ0022) and the Reserve Talents Program for Young and Middle-aged Academic and Technical Leaders of Yunnan Province (202205AC160077).

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

Received: 2022-10-10; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-26

Identification, fermentation condition optimization, and effect of a strain against *Sclerotium rolfii* in *Aconitum carmichaeli*

TANG Yongyu, WU Guoxing, ZHU Guoyuan, LI Ran, SHI Chunlan, WANG Sijie, YANG Yantong, GAO Xi*

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

Abstract: [Background] Southern blight of *Aconitum carmichaeli* is a soil-borne bacterial disease caused by *Sclerotium rolfii*, which seriously affects the production of the medicinal plant. [Objective] To screen a strain against the *S. rolfii* in *A. carmichaeli* and use it for disease control. [Methods] The strains were isolated from *Tenebrio molitor* pupae by plate coating method and streak plate method. The strain with strong ability against *S. rolfii* was identified by plate confrontation assay, and the taxonomic status was determined based on morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA sequencing. Fermentation conditions were optimized by single factor test. The inhibitory effect of suspension, volatile gas, and fermentation broth of the antagonistic strain on the mycelia of *S. rolfii* was determined. [Results] An efficient antagonistic strain N2 was screened out and identified as *Bacillus siamensis*. The best medium formula (g/L) of strain N2 is tryptone 10.0, yeast extract 5.0 and sucrose 20.0. The optimum culture conditions were as follows: initial pH 6.0, temperature 36 °C, rotating speed 240 r/min, liquid volume 30 mL, and inoculum 0.05%. The suspension, volatile gas, and fermentation broth of the strain all can effectively inhibit the growth of *S. rolfii* mycelia. The results of extracellular enzyme assay showed that the strain could produce protease and cellulase but failed to synthesize siderophore. [Conclusion] Strain N2 has ideal inhibitory effect on *S. rolfii* of *A. carmichaeli*, which has a good application potential and high research value in biological control.

Keywords: southern blight of *Aconitum carmichaeli*; *Bacillus siamensis*; optimization of fermentation conditions; inhibitory effect; biological control

附子(*Aconitum carmichaeli*)又叫乌头或附片,最初记载于《神农本草经》^[1],具有镇痛、强心、抗炎、提高免疫力的作用^[2]。附子白绢病是对附子危害最严重的病害之一,病原为半知菌亚门无孢目的齐整小核菌(*Sclerotium rolfii*),由其引起的病害发生在附子根部,因而很难进行防治,直接导致附子的产量和品质下降^[3]。近年来,由于附子被列入药食同源名录,市场多元化导致附子需求量逐年增加,附子种植规模也逐年攀升,这为附子致病菌繁衍和传播创

造了有利条件,病害问题愈发突显,对附子产量及品质威胁较大^[4]。通过选择合适的低毒高效农药防治白绢病效果并不理想,同时长期大量使用农药会造成土壤污染,农产品质量和安全性下降^[5]。国家《中药材生产质量管理规范》标准中有具体条例规定,应使用高效、低毒、低残留的农药对药用植物病害进行防治,并且鼓励使用生防菌剂^[6],因此筛选具有高效生防效果的拮抗菌株并将其运用到药用植物生产上显得尤为重要。

芽孢杆菌在植物病害防控方面具有显著的效果,具有促进植物生长发育和抑制植物病害等生防作用^[7]。已报道用于花生、白术和茉莉等植物白绢病的生防菌有蜡样芽孢杆菌^[8]、解淀粉芽孢杆菌^[9]、枯草芽孢杆菌、荧光性假单胞菌、类芽孢杆菌、黄杆菌^[10]和木霉属^[11]等不同菌种,且大部分都来源于植物根际土壤^[12]和植物内生细菌^[13]。相较而言,有关附子白绢病的生物防治报道较少。然而在应用生防芽孢杆菌进行植物病害防治时,生防菌株能否成功定殖往往决定着最终防效^[14]。发酵条件优化可为生防菌找到一个较为适宜的培养条件,有利于其定殖并大大提升发酵液浓度,提高防效。

本研究利用稀释涂布法和平板划线法分离拮抗菌、平板对峙法测定菌株的抑菌效果,结合形态学、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列测定确定菌株的分类学地位;通过单因素试验对菌株的最适发酵培养基和最佳发酵条件(温度、初始 pH、接种量、发酵时间、装液量、转速)进行优化,筛选其最佳发酵条件并探究其发酵产物抑菌效果,同时进行抑菌机理研究,以期利用该菌对附子白绢病进行生物防控提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

病原菌:附子白绢病病原菌齐整小核菌由本课题组前期分离自患病附子,保存于云南农业大学昆虫毒理学实验室。

拮抗菌:供试附子白绢病菌拮抗菌从室内自然饲养的黄粉虫蛹体中分离得到,经分离纯化后待用,将其编号为 N2,现保存于云南农业大学农药药理学实验室。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, pH 自然;蛋白胨酵母蔗糖培养基(YSP, g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0,蔗糖 20.0, pH 自然;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, pH 自然;营养琼脂培养基(NA, g/L):牛肉膏 3.0,胰蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0, pH 自然;完全培养基(CM, g/L):葡萄糖 5.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 柠檬酸钠 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 6.0, pH 自然;马铃薯葡萄糖培养基(PDA, g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 15.0–20.0, pH 自然。

胞外酶活性测定培养基参考文献[15]配制。

蛋白酶鉴定培养基(g/L):脱脂牛奶:15.0,琼脂 20.0, 121 °C 灭菌 20 min。

纤维素酶鉴定培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄ 0.5, KH₂PO₄ 1.0, NaCl 0.5, 纤维素粉 20.0, 刚果红 0.2, 琼脂 20.0, pH 自然, 121 °C 灭菌 20 min。

嗜铁素检测培养基(CAS, mg/L): 铬天青 60.5, 十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA) 72.9, 六水氯化铁 2.645, 二水磷酸二氢钠, 295.25, 十二水磷酸氢二钠 1 213.5, 氯化铵 125, 磷酸二氢钾 37.5, 氯化钠 62.5, 琼脂 9 000, pH 6.8±0.1。

称取 CAS 培养基 10.87 g 加入 1 L 蒸馏水中,加热煮沸 1 min 以上使溶解,115 °C 灭菌 20 min,冷至 50–55 °C,备用。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母浸粉、胰蛋白胨等生化试剂,北京生物科技有限公司;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;牛肉膏,广东环凯微生物科技有限公司;蔗糖、葡萄糖、氯化钠等,天津市大茂化学试剂厂。

智能型人工气候箱, 宁波东南仪器有限公司; 恒温摇床, 易晨仪器制造有限公司; 分光光度计, 岛津仪器(苏州)有限公司, 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 立式蒸汽灭菌锅, 江苏登冠医疗器械有限公司; 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学有限公司。

1.2 拮抗菌的分离

将黄粉虫蛹用 75% 酒精冲洗 3 次后再用无菌水冲洗 3 次, 放入无菌离心管中, 加入 1 mL 无菌水, 充分研磨进行梯度稀释(10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9}), 分别涂布于 LB 平板上, 28 °C 培养 2–4 d, 将所得单菌落划线培养^[16]。

1.3 拮抗菌的抑菌效果测定

采用平板对峙的方法, 使用 5 mm 的灭菌打孔器在已培养 3 d 的附子白绢病菌平板上打孔, 用无菌镊子取菌饼接种于新的 PDA 平板中央。用接种环蘸取菌株 N2 单菌落接种于该 PDA 平板的四周距离菌饼相同距离处, 然后放入 28 °C 培养箱中培养 2–4 d, 待对照长满整个平板后取出计算抑菌率。空白对照只接种病原菌, 重复 3 次^[16]。

抑菌率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times 100$ (1)

1.4 拮抗菌的鉴定

1.4.1 形态结构及生理生化特性

将分离纯化的 N2 菌株接种于固体 LB 培养基上, 28 °C 培养 2–3 d 后观察长出的单菌落形态。刮取单菌落进行革兰氏染色, 在油镜下观察染色成功的载玻片, 记录染色结果。生理生化特性测定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[17]方法进行。

1.4.2 分子鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 N2 的基因组 DNA 作为模板, 选择细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTGACCTGGCTCA-3') 对菌株的 16S

rRNA 基因和 *gyrB* 基因和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Mix 25 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 2 μ L, DNA 模板(200 ng/ μ L) 3 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应条件: 94.8 °C 2.5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 20 s, 30 个循环; 72 °C 2 min。采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 然后将产物送昆明擎科生物有限公司进行测序, 将测序结果提交 NCBI 基因库, 进行 BLAST 比对, 确定亲缘关系, 下载相似度最高的序列。使用 MEGA 7 软件采用邻接法构建菌株的系统发育树, 确定菌株的系统分类学地位^[16]。

1.5 探究拮抗菌的培养条件

1.5.1 种子液的制备

在装有 100 mL LB 液体培养基的锥形瓶中接种菌株 N2 的单菌落, 28 °C、180 r/min 培养 1 d 后备用。

1.5.2 不同培养基对菌体量的影响

配制 LB、NA、YSP、CM、NYBD 这 5 种液体培养基各 100 mL 于锥形瓶中, 每个培养基各接入种子液 50 μ L, 28 °C、180 r/min 振荡培养 1 d 后用分光光度计测定菌液的 OD_{600} 值, 每个处理设置 3 个重复, 下同。

1.5.3 不同碳源对菌体量的影响

以 1.5.2 筛选出的最适培养基为基础, 用麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖和淀粉作为该培养基的碳源, 保持其他组分及培养条件不变, 1 d 后测量菌液的 OD_{600} , 以此确定最佳碳源。

1.5.4 不同氮源对菌体量的影响

以筛选出的最适培养基为基础, 保持除氮源外的其他组分和培养条件不变, 在培养基中加入 NH₄Cl、酵母浸粉、NH₄NO₃、甘氨酸和胰蛋白胨作为该培养基的氮源, 培养 1 d 后测量菌液的 OD_{600} , 确定最佳氮源。

1.5.5 初始 pH 对菌体量的影响

配制 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的 100 mL 筛选出的培养基, 分别接种 50 μ L 种子液于各培养基中, 培养 1 d 后测量不同初始 pH 菌液的 OD_{600} 值, 以此确定最适初始 pH。

1.5.6 温度对菌体量的影响

以上述条件为基础, 分别设置恒温摇床的温度为 20、24、28、32、36 和 40 $^{\circ}$ C 进行 1 d 的发酵, 振荡培养后于分光光度计中测量各不同温度下的菌液的 OD_{600} 值, 以此确定最佳发酵温度。

1.5.7 转速对菌体量的影响

以上述筛选结果为基础, 保持优化后培养条件不变, 分别调整恒温摇床转速为 120、150、180、210 和 240 r/min, 培养 1 d 后测量各不同转速下菌液的 OD_{600} 值, 以此确定摇床培养的最适转速。

1.5.8 不同装液量对菌体量的影响

以上述研究结果为基础, 在 250 mL 锥形瓶中分别配制 30、60、90、120 和 150 mL 的优化液体培养基, 于各培养基中接种种子液, 培养 1 d 后于分光光度计中测量各不同装液量菌液的 OD_{600} 值, 以此确定菌株培养的最适装液量。

1.5.9 不同初始接菌量对菌体量的影响

以上述探究结果为基础培养基, 分别接种 0.05%、0.1%、0.5%、1%、2% 的种子液。培养 1 d 后测定不同初始接菌量菌液的 OD_{600} , 以确定最适的初始接菌量。

1.5.10 发酵时间对菌体量的影响

以上述探究结果为基础培养基, 在 0–1 d 内每间隔 2 h 测量一次, 1 d 后每间隔 12 h 测量一次, 直至测到 120 h, 于分光光度计中测量各发酵时间下菌液的 OD_{600} 值。根据所得数据绘制细菌的生长曲线。

1.6 菌悬液对附子白绢病菌丝生长的影响

将细菌接入优化后的液体 YSP 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 2 d, 吸取 50 μ L 菌液在 PDA 平板上进行涂布, 将附子白绢病菌 5 mm 的菌饼接种到涂布好的 PDA 平板中央, 对照培养基只接入附子白绢病病原菌, 设置 3 个重复。采用十字交叉法测量病原菌生长直径, 运用公式(1)计算抑菌率。

1.7 无菌发酵液对附子白绢病菌丝生长的影响

将经 YSP 液体培养基 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 2 d 后的菌株发酵液于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min, 使用 0.22 μ m 滤菌膜将菌体过滤, 得到无菌发酵滤液。将无菌发酵滤液原液分别稀释 2 倍和 4 倍待用, 将无菌发酵液与 PDA 培养基按照 1:4 的比例混合均匀, 配制成带毒 PDA 平板, 然后将活化好的 5 mm 附子白绢病菌菌饼接种在平板中央。以不接菌的 YSP 液体培养基代替无菌发酵滤液为对照。28 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 转速采用优化后的最适转速, 每个处理设置 3 个重复。待 CK 布满整个平板时, 十字交叉法测量菌落直径, 运用公式(1)计算菌株无菌发酵滤液原液、稀释 2 倍液和 4 倍液对附子白绢病菌的抑菌率。

1.8 挥发性气体对附子白绢病菌丝生长的影响

参考彭启超等^[18]方法进行改进, 选取 2 个培养皿底, 一侧倒入 YSP 固体培养基, 另一侧倒入马铃薯培养基(PDA), 在 YSP 培养基一侧用 N2 菌株划线, 马铃薯培养基(PDA)侧接种附子白绢病菌菌饼, 然后将 2 个培养基底用封口膜密封培养。以未划线的培养基作为对照, 3 次重复, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养, 待对照长满平板时测量菌落直径, 运用公式(1)计算抑菌率。

1.9 菌株产胞外酶活性测定

将拮抗菌株分别接种于蛋白酶、纤维素酶、嗜铁素检测培养基平板, 于 28 °C 恒温培养箱中培养 3 d, 观察是否产生透明圈。纤维素酶检测培养基采用刚果红染色 20–30 min 后, 再用 1 mol/L 氯化钠浸泡 15 min, 然后观察是否产生透明圈。

1.10 数据处理

采用 Excel 2016 对试验数据进行整理, Excel 2016、GraphPad 8.02 制作图表; 运用 SPSS 20.0 对试验数据进行统计及差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离与抑菌效果

自黄粉虫蛹体共分离得到 4 株形态不同的菌株, 其中菌株 N2 对附子白绢病病原齐整小核菌具有较好拮抗作用, 平板对峙试验对齐整小核菌的抑制率为 68.39% (图 1)。

2.2 拮抗菌的鉴定结果

2.2.1 拮抗菌的形态特征及生理生化特性

将菌株在 LB 培养基上划线培养 2–3 d 后, 形成的单菌落表面凹凸不平, 边缘有褶皱且中

心褶皱呈波浪状凸出, 不透明, 颜色为乳白色 (图 2A)。革兰氏染色结果表明, 菌体呈杆状, 能产芽孢, 为阳性菌 (图 2B)。生理生化试验显示, N2 菌株淀粉水解、石蕊牛奶、明胶液化、尿素试验、H₂S 试验、伏普试验、柠檬酸盐试验结果为阳性, 油脂水解、葡萄糖发酵、乳糖发酵、吲哚、甲基红试验结果为阴性, 不能利用葡萄糖和乳糖 (表 1)。

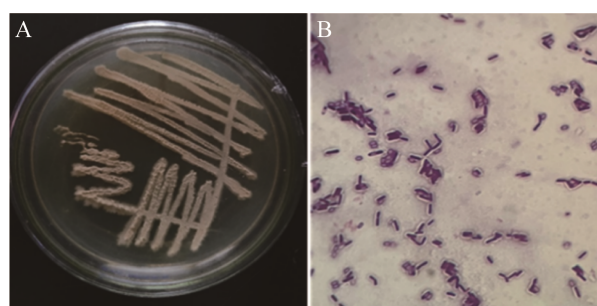


图 2 菌株 N2 的形态特征及革兰氏染色 (100×)
A: 平板上的菌落形态. B: 革兰氏染色

Figure 2 Morphological characteristics and Gram staining of strain N2 (100×). A: Colony morphology on the plate. B: Gram stain.

表 1 菌株 N2 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain N2

Items	Results
Starch hydrolysis	+
Oil hydrolysis	–
Litmus milk	+
Gelatin liquefaction	+
Urea solution	+
Glucose fermentation	–
Lactose fermentation	–
Hydrogen sulfide	+
Indole	–
Methyl red test	–
Voges-proskauer test	+
Citric acid decomposition	+

+: 阳性; –: 阴性

+: Positive; –: Negative.

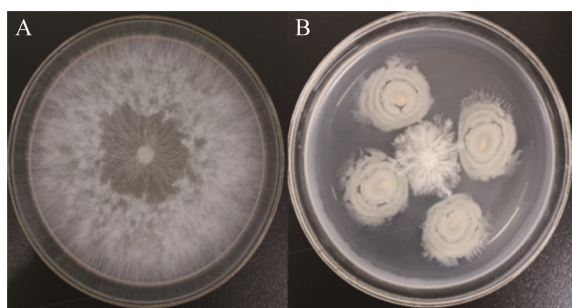


图 1 拮抗菌株 N2 对附子白绢病菌的抑菌作用
A: 对照组. B: 拮抗菌 N2 平板对峙对附子白绢病的抑制效果

Figure 1 Antifungal effect of antagonistic strain N2 on *Sclerotium rolfsii*. A: Control group. B: Inhibitory effect of antagonistic N2 plate confrontation on *Sclerotium rolfsii*.

2.2.2 拮抗菌分子鉴定结果

将菌株 N2 的 16S rRNA 基因测序结果与 GenBank 数据库中已有序列进行 BLAST 比对, 发现该菌与 *Bacillus siamensis* strain (NR 117274.1) 具有高度相似性, 相似度达 99.39%。构建菌株 N2 的系统发育树, 结果显示 N2 菌株与 *B. siamensis* 聚在同一系统分支上(图 3)。结合形态特征和生理生化结果, 初步鉴定该菌为暹罗芽孢杆菌 (*B. siamensis*)。

2.3 拮抗菌最适培养条件优化结果

2.3.1 最佳培养基

如图 4A 所示, 菌株 N2 在 5 种培养基上都能生长, 并且菌株菌体量具有显著差异性。在摇床上振荡培养 1 d 后, 菌株 N2 在 YSP 培养基中菌体量最大, OD_{600} 值达到 2.008; 其次为 LB、NYBD、NA, 在 CM 培养基上生长最慢, OD_{600} 值最小。因此, 菌株 N2 的最佳培养基为 YSP。

2.3.2 最佳碳源

以筛选出的最佳培养基 YSP 为基础培养基筛选碳源, 如图 4B 所示, 菌株 N2 在 5 种碳源中均可以生长, 但菌株 N2 在以蔗糖为碳源时

菌体量最大, OD_{600} 值可以达到 2.049; 麦芽糖为碳源时菌液浓度仅次于蔗糖, 差异不显著; 淀粉作为碳源时, 细菌浓度最低, 生长最慢。

2.3.3 最佳氮源

如图 4C 所示, 菌株在 5 种氮源中均能生长, 但当以蛋白胨为氮源时细菌的菌体量最大, 菌液浓度最高, 以酵母粉、氯化铵、硝酸铵为氮源时细菌生长也较好, 但与蛋白胨相比有显著差异; 当以甘氨酸为氮源时, 菌株基本不能生长, 说明甘氨酸无法作为氮源。因此选择蛋白胨作为最佳培养基的氮源。

2.3.4 最适 pH 的优化

如图 4D 所示, 不同的 pH 对菌株 N2 生长具有很大的影响。当初始 pH 值为 6.0 时, 菌株 N2 菌体量最大, 经摇培 1 d 后, 测得菌液 OD_{600} 为 2.226; 菌株 N2 在初始 pH 值为 5.0、7.0 和 8.0 时菌体量也较大, OD_{600} 分别为 2.066、2.105、2.066; 当 pH 值为 4.0、9.0 和 10.0 时菌株菌体量较小, OD_{600} 仅为 0.042、0.019 和 0.190。这说明菌株在偏酸或偏碱的环境都不利于生长, 因此菌株 N2 的最适 pH 值为 5.0–8.0。

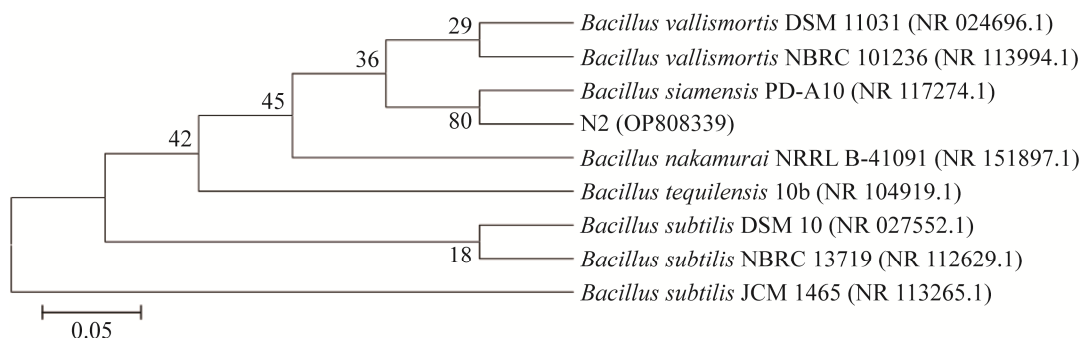


图 3 菌株 N2 基于 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树 括号内为基因的 GenBank 序列号; 分支点上的数据代表 bootstrap 的支持率, 代表分类单位被聚在一起的概率, bootstrap 次数设置为 1 000; 标尺刻度 0.05 是序列进化的分支差异

Figure 3 Phylogenetic tree of strain N2 based on *gyrB* gene sequence. The GenBank sequence number of the gene is in brackets; The data on the branch point represents the support rate of bootstrap, representing the probability that classification units are gathered together, and the number of bootstrap times is set to 1 000; Scale 0.05 is the branch difference of sequence evolution.

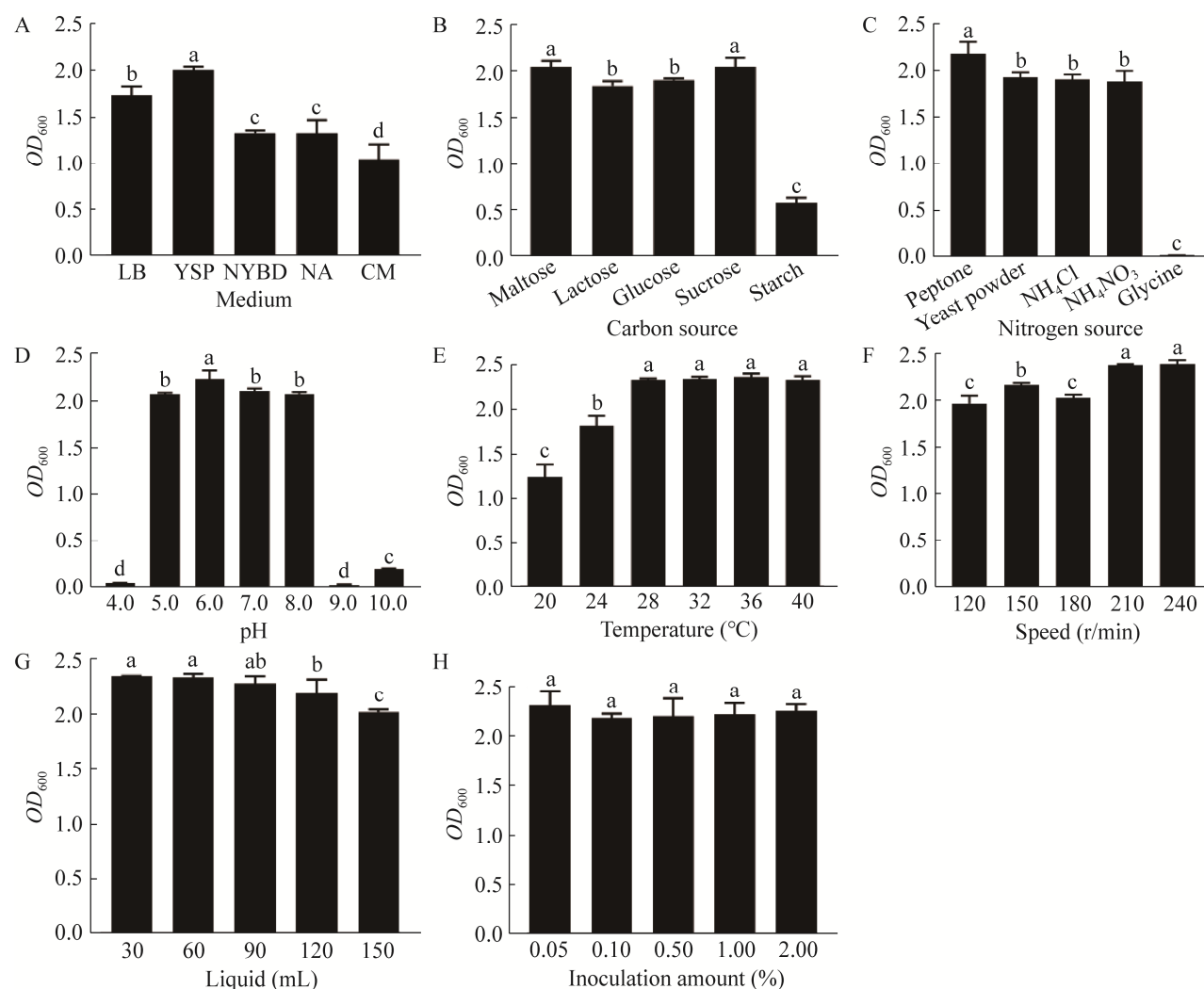


图 4 不同培养条件对菌株 N2 生长速度的影响 A: 不同培养基. B: 不同碳源. C: 不同氮源. D: 不同 pH. E: 不同温度. F: 不同转速. G: 不同装液量. H: 不同接菌量. 不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著

Figure 4 Effects of different culture conditions on the growth rate of strain N2. A: Culture medium. B: Carbon source. C: Nitrogen source. D: pH. E: Temperature. F: Rotating speed. G: Liquid loading. H: Inoculation amount. Different lowercase letters show significant differences at $P<0.05$ level by Duncan's new repolarization method.

2.3.5 最适温度优化

如图 4E 所示, 在不同环境温度下, 菌株 N2 均能生长, 在温度为 36 °C 时, 菌株 N2 生长速度相对较快; 从 20–36 °C, 菌株菌体量逐渐增大, 当温度升高到 40 °C 时, 菌体量又开始减小。细菌体内相关酶的活性随着温度的变化而

变化, 从而影响菌株的生长发育和代谢。较高或较低的温度都能影响 N2 菌株的生长, 因此, 菌株 N2 的最适生长温度为 36 °C。

2.3.6 最适转速的优化

如图 4F 所示, 摇床的不同转速对菌株 N2 的生长具有一定影响。当摇床转速为 240 r/min 时,

培养 1 d 后菌株菌体量最大, OD_{600} 为 2.382; 其次是转速为 210 r/min; 当转速为 120 r/min 时菌液浓度最低, OD_{600} 为 1.965。经恒温摇床培养, 培养基溶解氧气的含量增大, 从而提供更多的氧气供菌株生长繁殖。

2.3.7 最适装液量的优化

如图 4G 所示, 不同装液量对菌株 N2 的生长具有一定影响。当用 250 mL 三角瓶装液 30 mL 时, 经恒温摇床振荡培养 1 d 后菌株菌体量最大, OD_{600} 达 2.344; 随着装液量的不断增大, 菌体量逐渐减少, 当装液量为 150 mL 时, OD_{600} 达 2.018。

2.3.8 最适接菌量的优化

如图 4H 所示, 当初始接菌量为 0.05% 时, 经振荡培养 1 d 后菌株 N2 菌体量最大, OD_{600} 达 2.307; 其次为接菌量 2%。不同接菌量之间差异不显著, 说明不同的接菌量对菌株生长影响不大。

2.3.9 最适发酵时间的优化

如图 5 所示, 随着培养时间的延长, N2 菌株的菌体量变化呈现“S”型曲线。0–6 h, 菌体量较小, 细菌 OD_{600} 值无显著变化, 表明该段时间为菌株的生长迟缓期; 6 h 以后, 菌体量随

时间的延长而逐渐增大, 16 h 时菌液浓度最大, OD_{600} 值最高为 2.379, 因此 6–16 h 为细菌的对数生长期, 细菌在该段时间菌体量最大, 生长速度最快, 16–120 h 为细菌的平稳期, 该段时间菌体量缓慢增大, 菌液浓度趋于平稳; 120 h 后, 细菌浓度逐渐开始下降, 该时间段为细菌的生长衰亡期。

2.4 拮抗菌菌悬液、无菌发酵液和挥发性气体对附子白绢病菌丝生长的影响

由图 6A 可见, 菌株 N2 菌悬液对附子白绢病菌菌丝生长具有显著的抑制效果。培养 3 d 时 N2 菌悬液处理的白绢病菌仅有菌饼周围有菌丝生长, 菌饼整体直径为 5.40 mm, 而 CK 则长满整个培养皿, 菌落直径为 84.38 mm (图 B)。由表 2 可知, N2 菌悬液对白绢病菌菌丝生长的抑制率达到 99.53%。

由图 6C 可以看出, N2 菌株无菌发酵液对附子白绢病菌丝生长有一定的抑制效果。培养 3 d 时稀释 4 倍的 N2 无菌发酵液处理附子白绢病菌菌落增长直径为 39.68 mm, 稀释 2 倍液处理后附子白绢病菌落直径为 12.91 mm, 原液处理过的菌落不生长, CK 菌落增长直径为 77.26 mm (图 6D)。N2 无菌发酵液原液对附子白绢病菌菌

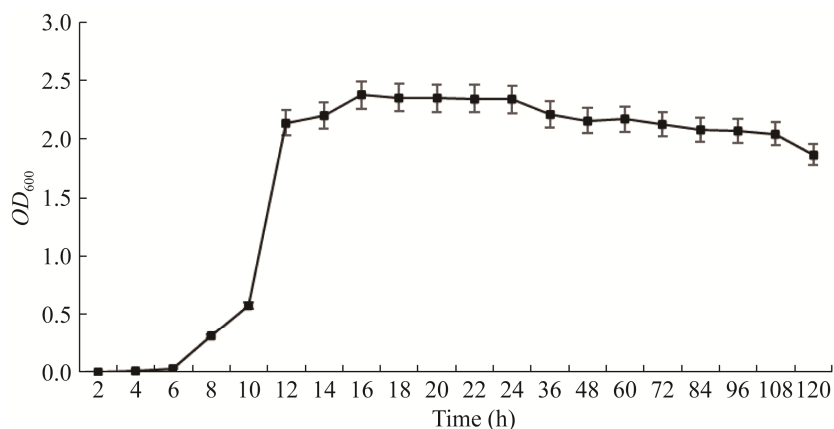


图 5 菌株 N2 生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain N2.

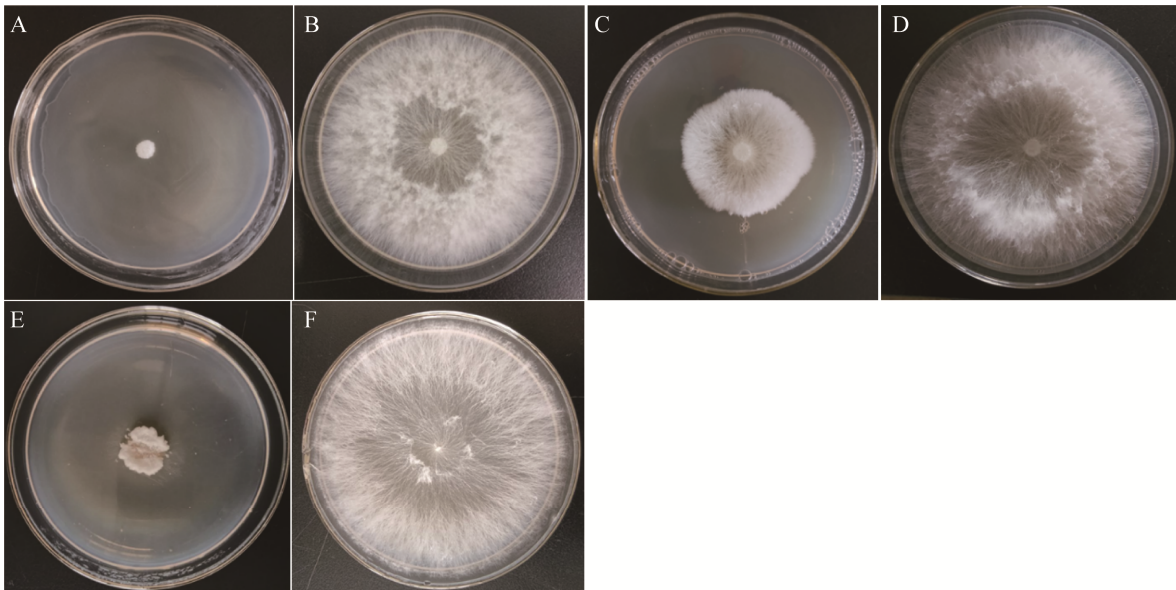


图 6 菌株 N2 不同组分对附子白绢病菌菌丝生长的抑制效果 A、C、E：分别为经菌悬液、无菌发酵液(稀释 4 倍)和挥发性气体处理后的菌落. B、D、F：分别为菌悬液、无菌发酵液(稀释 4 倍)和挥发性气体的 CK

Figure 6 Inhibitory effect of different components of strain N2 on mycelial growth of *Sclerotium rolfsii*. A, C and E: The colonies treated by bacterial suspension, sterile fermentation broth (diluted 4 times) and volatile gas, respectively. B, D and F: The control of bacterial suspension, aseptic fermentation broth (dilution 4 times) and volatile gas, respectively.

丝生长的抑制率为 100%，稀释 2 倍液对菌丝生长抑制率为 83.29%，稀释 4 倍液对菌丝生长的抑制率为 48.64% (表 2)。

由图 6E 可见，菌株 N2 挥发性气体对附子白绢病菌菌落生长具有较好的抑制效果。培养 3 d 时，N2 处理附子白绢病菌菌落增长直径为 24.84 mm，CK 增长直径为 83.84 mm (图 6F)，N2 挥发性气体对附子白绢病菌菌丝生长抑制率为 70.38%；从整体效果看，N2 无菌发酵液原液抑制效果>N2 菌悬液涂布抑制效果>稀释 2 倍的无菌发酵液抑制效果>挥发性气体抑制效果>平板对峙抑制效果>稀释 4 倍无菌发酵液抑制效果(表 2)。

2.5 拮抗细菌产胞外酶活性测定结果

三种胞外酶结果显示(图 7)，菌株 N2 能产

表 2 菌株 N2 不同组分对附子白绢病菌菌丝生长的抑制率对比

Table 2 Comparison of inhibition rates of different components of strain N2 on hypha growth of *Sclerotium rolfsii*

Mode of action	Inhibition rate (%)
Flat confrontation	68.39±1.59c
Suspension coating	99.53±0.05a
Sterile fermentation broth (original)	100.00±0.00a
Sterile fermentation broth (dilution 2 times)	83.29±0.42b
Sterile fermentation broth (dilution 4 times)	48.64±1.91d
Volatile gas	70.38±1.78c

同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著
Different lowercase letters in the same column indicated significant difference by Duncan’s new multiple range test ($P<0.05$).

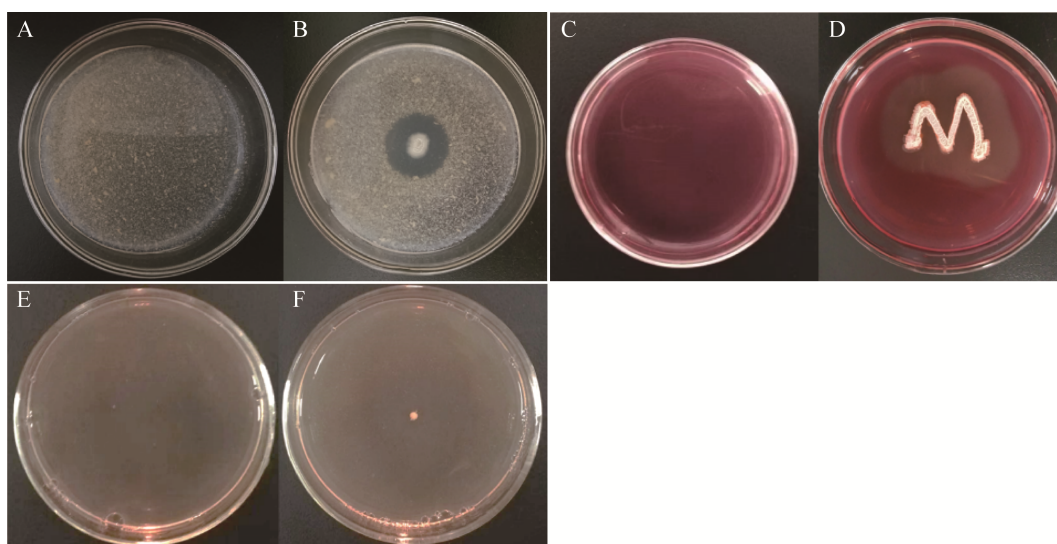


图 7 拮抗菌株产胞外酶检测 A、C、E: 分别为蛋白酶、纤维素酶和嗜铁素检测平板 CK. B、D、F: 分别为蛋白酶、纤维素酶和嗜铁素检测平板处理

Figure 7 Detection of extracellular enzymes produced by antagonistic strains. A, C and E: Protease, cellulase and siderophore detection plates CK. B, D and F: Treated by protease, cellulase and siderophore detection plates, respectively.

生蛋白酶和纤维素酶,有透明圈出现,其降解圈的直径均大于 10 mm,但不能分泌嗜铁素(表 3)。

3 讨论与结论

芽孢杆菌是一类好氧的革兰氏阳性菌,广泛存在于自然界中。研究表明,芽孢杆菌具有促进植物生长、固定氮元素及防治植物病害等

多方面的生物学作用^[19]。由于芽孢杆菌生长速度快、营养要求较简单,同时自身具有较强的抗逆性,因此是目前具有开发应用前景的一类生防菌^[20]。本文通过平板对峙法和菌丝生长速率法筛选到一株对附子白绢病菌具有拮抗活性的细菌菌株 N2,该菌的平板对峙试验对附子白绢病菌丝生长抑制率达到 68.39%。利用细菌形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析,将该菌株鉴定为暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*)。这不仅增加了生防菌的来源,还为利用昆虫来源生防菌进行生物防治提供了参考依据。

已有研究表明暹罗芽孢杆菌是一种重要的生防细菌,具有较广的抑菌谱,能够防治禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)^[21]、马铃薯干腐病菌(*Fusarium spp.*)^[22]、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、棉花立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)^[23]等多种

表 3 菌株 N2 产胞外酶活性

Table 3 Extracellular enzyme activity of strain N2

Extracellular enzyme	Diameter of degradation ring
Protease	++
Cellulase	+++
Siderophore	-

-: 降解圈直径=0 mm, +: 0 mm<降解圈直径≤10 mm; ++: 10 mm<降解圈直径≤20 mm; +++: 降解圈直径>20 mm
 -: Diameter of degradation ring=0 mm, +: 0 mm<diameter of degradation ring≤10 mm; ++: 10 mm<diameter of degradation ring≤20 mm; +++: The diameter of degradation ring is >20 mm.

植物真菌病害和青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)等细菌病害^[24]。张霞等^[25]从土传病害发生严重的花生田中分离细菌,经平板对峙获得了一株拮抗细菌暹罗芽孢杆菌 ZHX-10,其菌悬液、挥发性气体和发酵液均能有效抑制花生白绢病菌菌丝的生长。徐晓裕等^[26]对暹罗芽孢杆菌分离纯化得到具有拮抗作用的抗菌肽,该抗菌蛋白可用于果蔬采后病害防治。

对生防细菌发酵条件优化有利于菌株的培养和规模化生产。本研究采用单因素试验对菌株 N2 的最适培养基和发酵条件进行了优化,结果表明, YSP 为菌株 N2 的最适培养基,优化后的培养基配方为胰蛋白胨 10.0 g/L、酵母粉 5.0 g/L、蔗糖 20.0 g/L、蒸馏水 1 L;最适培养条件为初始 pH 6.0、发酵温度 36 °C、最适转速 240 r/min、250 mL 的三角瓶装液 30 mL、初始接菌量 2%、发酵时间 16 h。这与徐晓裕等^[27]报道的暹罗芽孢杆菌 G2 优化后的发酵条件为初始接种量 3%、初始 pH 7.0、发酵温度 33 °C、转速为 160 r/min、培养时间为 33 h 相比,初始接菌量、初始 pH 和发酵时间比其低,发酵温度和转速比其高;与曹云娥等^[28]报道的暹罗芽孢杆菌 WQ-6 优化后的 pH 6.0、转速 236.2 r/min 等结论接近,初始接菌量比其 4%少,培养时间比其 1 d 少;比王寒影等^[29]报道的暹罗芽孢杆菌 D1 最佳发酵培养时间 48 h 和李晨霞等^[30]报道的暹罗芽孢杆菌 B-6578 最佳发酵时间 36 h 短,且在 16 h 后进入稳定生长期,表明 N2 菌株能在较低的培养要求下得到较多发酵产物,此差异出现的原因也可能是菌株来源于昆虫尸体。经过培养条件的优化,菌株 N2 的菌液浓度显著增大,该试验结果为菌株 N2 工厂化应用提供了良好的试验基础。但菌株的抑菌物质具体来源于菌株代谢产物或是菌体尚不明确,还需进行深入挖掘。

本研究中,暹罗芽孢杆菌 N2 的菌体、菌悬液、无菌发酵液和挥发性气体对附子白绢病菌菌丝生长具有明显的拮抗作用,这与张霞等^[25]、彭启超等^[18]研究发现暹罗芽孢杆菌菌悬液、无菌发酵液、挥发性气体能有效抑制白绢病菌菌丝和菌核生长,以及潘梦诗等^[31]研究的贝莱斯芽孢杆菌对花生白绢病菌菌丝具有显著抑制作用的结果类似。相较于 N2 挥发性气体,无菌发酵液更能抑制白绢病菌菌丝的生长,无菌发酵液浓度越高,抑制率效果越好;同样地,相较于菌体,无菌发酵液和菌悬液抑制效果更好。推测 N2 对附子白绢病菌菌丝的抑菌活性物质主要来源于发酵液中的代谢产物。据相关文献报道,生防芽孢杆菌能产生细菌素^[32]、酶类、肽类^[33]、大环内酯类、抗菌蛋白类、聚酮类和脂肽类化合物等^[34]多种抗菌抑菌活性物质。许本宏^[35]对暹罗芽孢杆菌 JFL15 抑菌代谢物进行分离鉴定,共检测出 25 种不同的化合物,对其归类分析发现,主要为酮类化合物,碳氢化合物和醇类化合物次之,含少量的酯类和其他代谢物。本研究通过对暹罗芽孢杆菌生防机理的初步研究发现,其可产生蛋白酶、纤维素酶等细胞壁水解酶,与 You 等^[36]报道的暹罗芽孢杆菌能产生纤维素酶和蛋白酶结果一致。这些次级代谢产物均可抑制植物病原菌的生长,这与其无菌发酵滤液具有抑菌活性的试验结果相吻合。

上述研究结果为利用暹罗芽孢杆菌进行生物防治提供了更多参考依据,同时也为附子白绢病病害的防治提供菌种资源,丰富了对昆虫来源生防细菌的利用和研究,表明菌株 N2 是一株具有较大潜力的生防菌株。在后续的研究中,应对其代谢产物进行分离,并探究该菌活性物质的主要种类、特性及其稳定性,进一步验证其生防效果,为其商业化生产提供理论支持。

REFERENCES

- [1] 张存艳, 魏蒿玲, 刘红梅, 袁明昊, 叶强, 郭力. 附子药对化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5421-5425.
ZHANG CY, WEI AL, LIU HM, YUAN MH, YE Q, GUO L. Research progress on the couplet medicines of prepared common monkshood branched root on chemical constituents and pharmacological effects[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 36(9): 5421-5425 (in Chinese).
- [2] 熊秋韵, 李梦婷, 缪璐琳, 易进海, 谢晓芳, 彭成. 附子不同炮制品抗炎、镇痛和提高免疫功能作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 123-127.
XIONG QY, LI MT, MIAO LL, YI JH, XIE XF, PENG C. Comparative study of different processed products of Aconiti Lateralis Radix Praeparata on effects of anti-inflammation, analgesia and enhancing immune function[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2017, 33(1): 123-127 (in Chinese).
- [3] 唐莉, 梁丽娟, 叶华智, 曾拥军. 附子常见病害的调查[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(6): 29-32.
TANG L, LIANG LJ, YE HZ, ZENG YJ. Study on pests plaguing Aconitum carmichaeli debx[J]. Research and Practice of Chinese Medicines, 2004, 18(6): 29-32 (in Chinese).
- [4] YANG MQ, CHEN C, MAO YF, LI Y, ZHONG X, YU YD, XUE YT, SONG YM. Application of network pharmacology and molecular docking approach to explore active compounds and potential pharmacological mechanisms of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Lepidii Semen Descurainiae Semen for treatment of heart failure[J]. Medicine, 2022, 101(33): e30102.
- [5] 曾桂萍, 赵致, 李忠. 贵州太子参白绢病发生及防治[J]. 耕作与栽培, 2020, 40(6): 37-38, 41.
ZENG GP, ZHAO Z, LI Z. The occurrence and prevention of Pseudostellaria heterophylla southern blight in Guizhou[J]. Tillage and Cultivation, 2020, 40(6): 37-38, 41 (in Chinese).
- [6] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 33-37, 25.
HAN CZ. Research status and development trend of microbial antagonists against plant diseases[J]. Forest Pest and Disease, 2015, 34(1): 33-37, 25 (in Chinese).
- [7] 胡党振, 徐媛媛, 于梦怡, 姜玲. 芽孢杆菌处理对柑桔苗木黄龙病抑制效果[J]. 中国农业大学学报, 2021, 26(8): 72-83.
HU DZ, XU AY, YU MY, JIANG L. Inhibitory effect of Bacillus treatment on citrus Huanglongbing disease in nursery growth plants[J]. Journal of China Agricultural University, 2021, 26(8): 72-83 (in Chinese).
- [8] 张金凤, 成波, 曹延丽, 迟玉成, 鄢洪海. 花生白绢病生防菌筛选及防控作用研究[J]. 花生学报, 2019, 48(3): 65-70.
ZHANG JF, CHENG B, CAO YL, CHI YC, YAN HH. Screening and controlling effect of biocontrol bacteria against peanut white blight[J]. Journal of Peanut Science, 2019, 48(3): 65-70 (in Chinese).
- [9] 李亮亮, 雷高, 李磊, 岳丹丹, 甄静, 王继雯. 一株花生白绢病菌拮抗细菌的筛选、鉴定及发酵液中活性物质稳定性研究[J]. 花生学报, 2021, 50(1): 12-18.
LI LL, LEI G, LI L, YUE DD, ZHEN J, WANG JW. Screening and identification of an antagonistic bacterium against Sclerotium rolfsii, and studies on the stability of bioactive substances in fermentation broth[J]. Journal of Peanut Science, 2021, 50(1): 12-18 (in Chinese).
- [10] 胡朝晖, 陈秋强, 王博林, 倪方方, 徐红梅, 宋腾蛟, 袁小凤. 枯草芽孢杆菌等益生菌对白术白绢病的防治研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(10): 2621-2624.
HU ZH, CHEN QQ, WANG BL, NI FF, XU HM, SONG TJ, YUAN XF. Prevent and control southern blight of atractylides macrocephala by adding probiotic such as Bacillus subtilis[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2017, 35(10): 2621-2624 (in Chinese).
- [11] 杜婵娟, 晏卫红, 潘连富, 付岗, 韦永存. 木霉制剂对茉莉白绢病和土壤微生物数量的影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(1): 169-173.
DU CJ, YAN WH, PAN LF, FU G, WEI YC. Effect of Trichoderma preparation on jasmine southern blight and amount of soil microorganism[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(1): 169-173 (in Chinese).
- [12] 罗云艳, 安航, 何佶弦, 杨洋, 江连强, 闫芳芳, 徐传涛, 安德荣, 李斌. 烟草根黑腐病根际拮抗菌的筛选、鉴定及其促生防病效果[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(3): 57-64.
LUO YY, AN H, HE JX, YANG Y, JIANG LQ, YAN FF, XU CT, AN DR, LI B. Screening and identification of antagonistic bacteria against Thielaviopsis basicola and their effects on growth and disease prevention[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(3): 57-64 (in Chinese).
- [13] 卢占慧, 周如军, 袁月, 李自博, 傅俊范. 人参内生拮

- 抗细菌分离、鉴定及其对人参菌核病抑菌作用研究[J]. 中国植保导刊, 2016, 36(3): 5-10.
- LU ZH, ZHOU RJ, YUAN Y, LI ZB, FU JF. Isolation and identification of endophytic bacteria from ginseng and its inhibition activity against *Sclerotinia ginseng*[J]. China Plant Protection, 2016, 36(3): 5-10 (in Chinese).
- [14] 李颖, 龙长梅, 蒋标, 韩丽珍. 两株 PGPR 菌株的花生定殖及对根际细菌群落结构的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(9): 237-247.
- LI Y, LONG CM, JIANG B, HAN LZ. Colonization on the peanuts of two plant-growth promoting rhizobacteria strains and effects on the bacterial community structure of rhizosphere[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(9): 237-247 (in Chinese).
- [15] 郝金辉, 包慧芳, 王宁, 詹发强, 侯新强, 郑素慧, 何亚芳, 史应武, 杨蓉, 龙宣杞. 库尔勒香梨黑斑病菌拮抗菌筛选及其抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3709-3721.
- HAO JH, BAO HF, WANG N, ZHAN FQ, HOU XQ, ZHENG SH, HE YF, SHI YW, YANG R, LONG XQ. Screening and possible mechanism of strains against black spot of Korla pear[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3709-3721 (in Chinese).
- [16] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星, 谢永辉. 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[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4636-4648.
- HE MC, ZENG SQ, WANG ZJ, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX, XIE YH. Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4636-4648 (in Chinese).
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [18] 彭启超, 黄德龙, 张志鹏, 魏浩, 吴书凤, 吴妍, 李俊, 邓祖科, 王宗抗. 贝莱斯芽孢杆菌 DPT-03 对花生白绢病菌的防控效果[J]. 河南农业科学, 2022, 51(2): 97-103.
- PENG QC, HUANG DL, ZHANG ZP, WEI H, WU SF, WU Y, LI J, DENG ZK, WANG ZK. The biocontrol effect of *Bacillus velezensis* DPT-03 on *Sclerotium rolfsii* in peanut[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(2): 97-103 (in Chinese).
- [19] 赵月盈. 解淀粉芽孢杆菌抗病机制研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2021, 17(3): 205-210.
- ZHAO YY. Research progress on the disease inhibition mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Subtropical Agriculture Research, 2021, 17(3): 205-210 (in Chinese).
- [20] 陈羽娇, 余朝阁. 芽孢杆菌在植物病害防治中的应用及研究进展[J]. 农机使用与维修, 2020(11): 39-40.
- CHEN YJ, YU CG. Application and research progress of *Bacillus* in plant disease control[J]. Agricultural Mechanization Using & Maintenance, 2020(11): 39-40 (in Chinese).
- [21] 王瑶, 赵月菊, 邢福国, 王龔, 刘阳. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 核农学报, 2017, 31(6): 1128-1136.
- WANG Y, ZHAO YJ, XING FG, WANG Y, LIU Y. Screening and identification of *Bacillus* spp. strains with biocontrol activity against *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(6): 1128-1136 (in Chinese).
- [22] 贾鹏莉, 沈硕. 拮抗马铃薯干腐病原菌活性菌株的筛选及鉴定[J]. 青海大学学报, 2021, 39(2): 34-41.
- JIA PL, SHEN S. Screening and identification of active strains against the pathogen of potato dry rot[J]. Journal of Qinghai University, 2021, 39(2): 34-41 (in Chinese).
- [23] 王春伟, 王燕, 张曦倩, 董田, 温智浩, 刘倩茹, 李田丽, 王怡惠, 王赛凤, 张作刚, 王建明, 王美琴. 拮抗细菌菌株 YJ15 的分离鉴定、发酵条件优化及对越橘灰霉病的防效[J]. 园艺学报, 2018, 45(10): 1905-1916.
- WANG CW, WANG Y, ZHANG XQ, DONG T, WEN ZH, LIU QR, LI TL, WANG YH, WANG SF, ZHANG ZG, WANG JM, WANG MQ. Isolation, identification, optimization of fermentation conditions and biocontrol effects of antagonistic bacterium strain YJ15[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(10): 1905-1916 (in Chinese).
- [24] 林志楷, 林文珍. 暹罗芽孢杆菌研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2019, 48(4): 391-396.
- LIN ZK, LIN WZ. Research progress on *Bacillus siamensis*[J]. Subtropical Plant Science, 2019, 48(4): 391-396 (in Chinese).
- [25] 张霞, 许曼琳, 郭志青, 于静, 吴菊香, 于建垒, 刘同金, 李新国, 迟玉成, 万书波. 暹罗芽孢杆菌 ZHX-10 的分离鉴定及其对花生白绢病的生防效果[J]. 中国油料作物学报, 2020, 42(4): 674-680.
- ZHANG X, XU ML, GUO ZQ, YU J, WU JX, YU JL, LIU TJ, LI XG, CHI YC, WAN SB. Isolation and identification of *Bacillus sinensis* ZHX-10 and

- analysis on its biological control activities against *Sclerotium rolfsii*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(4): 674-680 (in Chinese).
- [26] 徐晓裕, 李甜, 王欢, 王斌, 史学伟. 暹罗芽孢杆菌 X7 抗菌肽的分离纯化及抑菌特性分析[J]. 山东农业科学, 2022, 54(5): 139-145.
- XU XY, LI T, WANG H, WANG B, SHI XW. Separation and purification of antibacterial peptides from *Bacillus siamensis* X7 and analysis of its antibacterial properties[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(5): 139-145 (in Chinese).
- [27] 徐晓裕, 李甜, 史学伟, 王斌. 黑曲霉拮抗细菌的筛选、鉴定和生防条件优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 132-138.
- XU XY, LI T, SHI XW, WANG B. Screening, identification and optimization of biocontrol conditions for antagonistic bacteria of *Aspergillus niger*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 132-138 (in Chinese).
- [28] 曹云娥, 吴庆, 张美君, 尹翠, 高艳明, 朱红艳, 张文文, 李建设. 瓜类枯萎病生防菌 WQ-6 的筛选鉴定、发酵工艺优化及防效研究[J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1072-1086.
- CAO YE, WU Q, ZHANG MJ, YIN C, GAO YM, ZHU HY, ZHANG WW, LI JS. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of biocontrol strain WQ-6 to melon *Fusarium* wilt disease[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(6): 1072-1086 (in Chinese).
- [29] 王寒影, 孙悦龙, 樊誉倩, 郭晓军, 朱宝成. 多西环素降解菌的筛选、鉴定及发酵培养基优化[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(15): 135-139.
- WANG HY, SUN YL, FAN YQ, GUO XJ, ZHU BC. Screening and identification of polycycline-degrading bacteria and optimization of fermentation medium[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(15): 135-139 (in Chinese).
- [30] 李晨霞, 梁晶, 孙丽慧. 一株产 γ -PGA 的芽孢杆菌的分离鉴定及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 101-108.
- LI CX, LIANG J, SUN LH. Isolation and identification of a strain of *Bacillus* producing γ -PGA and its fermentation conditions optimization[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(19): 101-108 (in Chinese).
- [31] 潘梦诗, 郭文阳, 张宗源, 岳丹丹, 亓兰达, 王雪妍, 张英涛. 贝莱斯芽孢杆菌对花生白绢病的防治效果[J]. 生物学杂志, 2022, 39(1): 37-41.
- PAN MS, GUO WY, ZHANG ZY, YUE DD, QI LD, WANG XY, ZHANG YT. Biocontrol effects of *Bacillus velezensis* on peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*[J]. Journal of Biology, 2022, 39(1): 37-41 (in Chinese).
- [32] SHAHID I, HAN J, HANOOQ S, MALIK KA, BORCHERS CH, MEHNAZ S. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2021, 5: 605195.
- [33] VOLKOV MI, TKACHENKO EI, VOROBEĖCHIKOV EV, SINITS A. *Bacillus subtilis* metabolites as a novel promising probiotic preparations[J]. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii, 2007(2): 75-80.
- [34] 许本宏, 林俊芳, 叶志伟, 郭丽琼, 陆雅琴, 林金德. 带鱼肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵液抗菌性质研究[J]. 水产科学, 2018, 37(2): 193-200.
- XU BH, LIN JF, YE ZW, GUO LQ, LU YQ, LIN JD. Isolation and identification of *Bacillus* from gastrointestinal tract of hairtail (*Trichiurus haumela*) and antibacterial characteristics of their fermented liquids[J]. Fisheries Science, 2018, 37(2): 193-200 (in Chinese).
- [35] 许本宏. 暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) JFL15 抗菌物质的纯化鉴定及其生物合成途径解析[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2018.
- XU BH. Purification, identification and biosynthesis pathway analysis of antimicrobial compounds produced by *Bacillus siamensis* JFL15[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [36] YOU WJ. Screening of a broad-spectrum antagonist *Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits[J]. Biological Control, 2021, 157: 104584.