

研究报告

一株花椒根腐病拮抗菌的筛选、发酵条件及其抑菌物质的初步分析

田凤鸣^{*1,2}, 陈强^{1,2}, 何九军^{1,2}, 张晓娜^{1,2}, 王国斌³

1 陇南师范高等专科学校农林技术学院, 甘肃 陇南 742500

2 陇南特色农业生物资源研究开发中心, 甘肃 陇南 742500

3 陇南市武都区花椒服务中心, 甘肃 陇南 742500

田凤鸣, 陈强, 何九军, 张晓娜, 王国斌. 一株花椒根腐病拮抗菌的筛选、发酵条件及其抑菌物质的初步分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2950-2969.

TIAN Fengming, CHEN Qiang, HE Jiujun, ZHANG Xiaona, WANG Guobin. A biocontrol bacterial strain against *Zanthoxylum bungeanum* root rot: screening, fermentation condition optimization, and preliminary identification of antimicrobial ingredients[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2950-2969.

摘要: 【背景】腐皮镰孢(*Fusarium solani*)是陇南花椒根腐病的主要病原物, 是危害花椒生产的重要原因之一。【目的】筛选拮抗腐皮镰孢的生防菌株, 为开发防治花椒根腐病的微生物农药提供新的生物资源。【方法】采用平板对峙法结合 16S rRNA 基因序列分析等方法从花椒根围中分离具有较强抑菌效果的细菌并进行筛选鉴定; 通过 Box-Behnken 中心组合设计试验探究该菌最佳发酵条件; 采用液质联用(LC-MS)方法对该菌发酵液的有机溶剂提取相进行非靶向代谢组学分析及 KEGG、Lipidmaps 数据库注释。【结果】分离筛选出一株拮抗菌株贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) W-1, 该菌株对腐皮镰孢的抑菌率为 89%, 对藤仓赤霉(*Gibberella fujikuroi*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、梅毒镰孢(*Fusarium syphilis*)、层生镰孢(*Fusarium proliferatum*)和松针刺盘孢(*Colletotrichum fiorinae*)的抑制率为 57%–90%。优化后 W-1 的最佳发酵条件为 pH 值 6.5、温度 30 °C、接种量 5%、转速 180 r/min; 发酵菌液浓度 OD_{600} 值达到 1.93, 与 LB 基础培养基菌浓度相比提高了 2.6 倍; 无菌发酵液在 pH 2.0–9.0 范围内抑菌活性稳定, 紫外线(UVC 200–280 nm, 100 μ W/cm²)照射 10 min 后抑菌活性逐渐下降, 温度超过 80 °C 后抑菌活性显著降低。最佳抑菌活性成分提取的有机溶剂是乙酸乙酯, 有机提取相代谢物中含有脂肽类化合物表面活性素、磷酸寡肽抗生素、丁酰苷菌素、聚酮类化合物、溶菌杆菌素、环二肽、短杆菌肽等多种拮抗物质。【结论】贝莱斯芽胞杆菌 W-1 能分泌多种抑菌活性物质, 对多种植物病原真菌抑制效果较强; 其发酵液耐酸

资助项目: 甘肃省青年科技基金(21JR7RK913); 2021 年度陇南市科技计划(2021-13); 2021 年甘肃省高等学校创新基金(2021B-376)

This work was supported by the Science and Technology Fund for Youths of Gansu Province (21JR7RK913), the Longnan Science and Technology Project in 2021 (2021-13), and the Higher Education Innovation Foundation of Gansu Province in 2021 (2021B-376).

*Corresponding author. E-mail: tianfengming2010@163.com

Received: 2023-01-22; Accepted: 2023-04-12; Published online: 2023-05-17

碱、耐高温，在花椒根腐病的生物防治中具有较大应用潜力。

关键词：花椒根腐病；腐皮镰孢；拮抗菌；发酵优化

A biocontrol bacterial strain against *Zanthoxylum bungeanum* root rot: screening, fermentation condition optimization, and preliminary identification of antimicrobial ingredients

TIAN Fengming^{*1,2}, CHEN Qiang^{1,2}, HE JiuJun^{1,2}, ZHANG Xiaona^{1,2}, WANG Guobin³

1 Technique College of Agriculture and Forestry, Longnan Teachers College, Longnan 742500, Gansu, China

2 Center for Research and Development of Longnan Characteristic Agro-Bioresources, Longnan 742500, Gansu, China

3 Prickly Ash Peel Service Center of Wudu District, Longnan 742500, Gansu, China

Abstract: [Background] *Fusarium solani* is the main pathogen of *Zanthoxylum bungeanum* root rot in Longnan, affecting the production of *Z. bungeanum*. [Objective] To screen out a strain for the biocontrol of *F. solani* and provide new bioresources for the development of microbial agents for the control of *Z. bungeanum* root rot. [Methods] In this study, we employed the plate confrontation method and 16S rRNA gene sequencing to screen and identify the bacterial strain with strong antimicrobial activity from the rhizosphere soil of *Z. bungeanum*. Box-Behnken design was employed to optimize the fermentation conditions of the strain. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to study the changes of metabolites in the organic solvent phase of the bacterial fermentation broth. [Results] The antagonistic strain screened out was identified as *Bacillus velezensis* W-1, which showed the inhibition rates of 89% against *F. solani* and 57%–90% against *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium syphilis*, *Fusarium proliferatum*, and *Colletotrichum fioriniae*. The fermentation conditions of W-1 were optimized as pH 6.5, 30 °C, inoculum amount of 5%, and 180 r/min. The OD_{600} value of the fermentation broth obtained under the optimal conditions reached 1.93, which was 2.6 times higher than that of the LB basal medium. The antimicrobial activity of the sterile fermentation broth remained stable in the range of pH 2.0–9.0 and gradually decreased after the broth was irradiated with ultraviolet light (UVC 200–280 nm, 100 μ W/cm²) for 10 min. The antimicrobial activity significantly decreased when the temperature exceeded 80 °C. Ethyl acetate was the best organic solvent for the extraction of antimicrobial ingredients. The organic phase of the extract contained rich antagonistic substances, such as lipopeptides (surfactants), phosphate oligopeptides (antibiotics), butirosin, polyketone compounds, lysobactin, cyclic dipeptides, and gramicidin. [Conclusion] *B. velezensis* W-1 can secrete a variety of antimicrobial substances and has strong inhibitory effects on multiple common pathogenic fungi of plants. Moreover, its fermentation broth can tolerate acid, alkali, and high temperature, demonstrating great potential for application in the biocontrol of *Z. bungeanum* root rot.

Keywords: *Zanthoxylum bungeanum* root rot; *Fusarium solani*; antagonistic bacteria; optimization of fermentation conditions

花椒根腐病是甘肃陇南花椒种植园最典型的病害之一,已给花椒栽培与种植带来了严重的影响。近年来,许多学者对不同区域的花椒根腐病病原菌进行分离鉴定,确定腐皮镰孢(*Fusarium solani*)是引起花椒根腐病的优势种群^[1-5]。目前农药依然是花椒根腐病防治的重要手段,但过度使用化学农药会造成生态环境污染并影响食品安全,而选择环保安全的生物农药进行替代和补充就显得尤为重要^[6]。因此,利用微生物农药防治花椒根腐病是未来花椒农业发展的最有效途径,而生防菌的筛选成为防控花椒根腐病的研究热点。

芽胞杆菌对细菌、真菌和病毒所引起的植物病害均具有很好的抑制作用,是生防菌中应用最广泛的菌种资源^[7]。贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)作为芽胞杆菌的新种,在其培养中能够产生多种具有广谱抑菌活性的次级代谢产物,在农作物病虫害防治中应用广泛^[8]。国内外已报道许多有关贝莱斯芽胞杆菌的研究及成果,研究最多的是商业化的贝莱斯芽胞杆菌 FZB42,与其相关的文章有 140 多篇^[9]。肖倩等^[10]报道的贝莱斯芽胞杆菌 HMQUAU19044 和 Zheng 等^[11]研究的贝莱斯芽胞杆菌 D61-A 分别对黄瓜霜霉病和水稻纹枯病表现出良好的防控效果。2016 年贝莱斯芽胞杆菌 9912D 被批准为新型生物杀菌剂,特别是在高效防治黄瓜灰霉病、苹果腐烂病、棉花枯萎病、番茄灰霉病等病害方面具有重要抑菌作用^[12]。2019 年贝莱斯芽胞杆菌专利产品进行了登记^[13]。2021 年农业农村部正式颁发了针对烟草白粉病和黄瓜白粉病的贝莱斯芽胞杆菌 CGMCC 14384 微生物农药原药和制剂登记证书^[14]。此外,贝莱斯芽胞杆菌 AH2 也已在农业中广泛应用并投入到生产中^[15]。由此可见贝莱斯芽胞杆菌具有广阔的应用前景。贝莱斯芽胞杆菌作为生物菌剂或生物

农药在防治花椒根腐病中的相关报道较少。因此,筛选针对花椒根腐病的生防菌尤为必要,同时也可防控花椒根腐病的生物菌剂或生物农药的研发提供新的生物资源。

本研究筛选的贝莱斯芽胞杆菌 W-1 分离自健康花椒根围土壤中,不仅对花椒根腐病具有良好的拮抗作用,更适宜陇南土壤环境,易在陇南土壤中定殖。为提高该菌的发酵产量,本研究优化发酵条件并对其无菌发酵液的稳定性和抑菌活性物质开展具体研究,以期挖掘出菌株 W-1 在花椒根腐病防治中的重要应用价值,为该菌的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品来自陇南市武都区马街镇花椒示范基地,距离表层 10 cm 处的土层。腐皮镰孢(*Fusarium solani*)分离自陇南花椒根腐病株^[4]。植物病原真菌藤仓赤霉菌、禾谷镰孢、梅毒镰孢和层生镰孢由江西师范大学杨慧林惠赠;松针刺盘孢由本实验室保存于 4 °C 冰箱备用。

1.1.1 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,NaCl 10.0,调 pH 值至 7.0;PDA 培养基(g/L):葡萄糖 20.0,马铃薯 200.0,琼脂 18.0;NYBD 培养基(g/L):牛肉浸粉 8.0,葡萄糖 10.0,酵母浸粉 5.0,调 pH 值至 7.0;经过 121 °C 灭菌 20 min 后备用。

CAS (铬天青)检测平板(g/L):基础培养基,葡萄糖 100.0,蛋白胨 20.0,七水硫酸镁 0.5,氯化钙 0.5,琼脂粉 20.0,10×缓冲液(已灭菌) 100.0 mL;CAS 检测液:铬天青 0.06,FeCl₃·6H₂O 0.002 7,溴化十六烷基三甲铵 0.073,调 pH 值至 7.0。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技有限公司;PCR产物磁珠法纯化试剂盒,硕美公司;琼脂糖,太阳马;其余试剂均为国产分析纯。体视显微镜,南京鼎诚精密仪器有限公司;不锈钢正压过滤器,上海信步科技有限公司;紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;气浴式摇床,常州高德仪器制造有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株 W-1 的分离纯化和筛选

称取 1.0 g 土壤样品加入 90 mL 的无菌水,在气浴式摇床 180 r/min、30 °C 培养 30 min,梯度稀释至 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} ,取 100 μ L 分别涂布于 LB 固体培养基中,32 °C 恒温培养 24 h 后挑取单菌落进行液体培养。

在培养 7 d 后的腐皮镰孢 PDA 培养基中打成直径 6 mm 的菌饼,放置于新的 PDA 平板中央,在距菌饼 2.0 cm 处按照品字形放置无菌滤片,滤片上加入 10 μ L W-1 培养液。以不加培养液的真菌平板作为对照,在 30 °C 恒温培养 5–7 d,每个处理 3 次重复,测定抑菌率。抑菌率(%)=[对照组菌落直径(mm)–测试组菌落直径(mm)]/[对照组菌落直径(mm)–6 (mm)] $\times 100$ ^[16]。通过抑菌率的测定筛选出菌株 W-1。

1.2.2 菌株 W-1 对病原真菌菌丝的抑制作用

将培养 7 d 的抑菌平板置于放大倍数为 150 的体视显微镜下,观察腐皮镰孢的菌丝形态,分析菌株 W-1 对腐皮镰孢菌丝前端生长形态的影响程度。

1.2.3 菌株 W-1 抑菌谱的测定

将供试真菌用打孔器打成 6 mm 直径的菌饼,放置于 PDA 平板中央,将 W-1 培养液接种于以品字形放置在 PDA 培养基上的无菌滤纸片上,30 °C 恒温培养 5–7 d,测定抑菌率,

每个处理 3 次重复。

1.2.4 菌株 W-1 产嗜铁素和产胞外酶的检测

菌株 W-1 产嗜铁素能力的检测参照梁建根^[17]的方法,取 5 μ L W-1 菌液接种于 CAS 检测平板中,32 °C 恒温培养 3 d 后测量菌落周围的黄色晕圈直径(mm)。菌株 W-1 产纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶能力的检测均参照郝金辉等^[18]的方法,取 5 μ L W-1 菌液分别接种于纤维素酶、几丁质酶和蛋白酶平板中,32 °C 恒温培养 3 d 后,在纤维素酶平板上加入刚果红染色 15 min,NaCl 脱色 10 min 后测量其透明圈的直径。几丁质酶和蛋白酶直接测定其透明圈的直径。

1.2.5 菌株 W-1 的分子生物学鉴定

扩增菌株 W-1 的 16S rRNA 基因片段使用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1429R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μ L):上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板(20 ng/ μ L) 2 μ L,PCR Mix 21 μ L。PCR 反应条件:96 °C 5 min;96 °C 20 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 10 min;4 °C 保存。PCR 扩增产物送北京六合华大基因科技有限公司进行测序。通过 NCBI 中 BLAST 进行同源序列的比对,筛选相似度高的菌株序列分析其亲缘关系并构建系统发育树^[19]。

1.3 响应面法优化菌株 W-1 的最佳发酵条件

1.3.1 筛选最佳发酵条件单因素试验

前期试验证实 NYBD 培养基为菌株 W-1 最适生长培养基。比较 4 项因素对菌株 W-1 生长量的影响:pH 值以 1.0 为间隔设置 2.5–10.5 共 9 个不同的梯度;温度以 2 °C 为间隔设置 26–34 °C 5 个不同的梯度;转速以 20 r/min 为间隔设置 140–220 r/min 5 个不同的梯度;接种量以 2% 为间隔设置 1%–11% 共 6 个不同的梯度,每个处理重复 3 次,采用紫外可见分光光度计测定 22 h 的菌液 OD_{600} 值,确定液体发酵的最佳单因素条件。

1.3.2 响应面法优化菌株 W-1 液态发酵的最佳条件

根据 Box-Behnken 中心组合的试验设计原理,同时结合单因素结果,选取 4 项因素(pH、温度、转速、接种量)设计响应面的分析试验,响应值是以 22 h 的 OD_{600} 值为测定数据,每组试验 3 次重复。二次回归拟合方程利用 Design-Expert 11 软件进行分析,获得 W-1 最佳液态发酵条件。拟合出的最佳条件通过单因素试验筛选结果进行验证^[20]。试验因素与水平设计见表 1。

1.4 菌株 W-1 无菌发酵液的制备及其稳定性测定

将 W-1 单菌落接种于 NYBD 液体培养基中 30 °C、180 r/min 培养 22 h 后,以 5% (体积分数)接种于 500 mL 液体培养基中扩大培养。恒温培养 7 d 后得到菌株 W-1 的发酵液。将发酵液用不锈钢正压过滤器过滤(0.22 μ m 细菌过滤膜)后得到无菌发酵液。

1) pH 对发酵液稳定性的测定

将发酵液分别用盐酸溶液(2.0 mol/L)和氢氧化钠溶液(2.0 mol/L)调节 pH 值至 2.0–12.0,以 1.0 为间隔,调成 12 个不同的梯度,以未调节 pH 的发酵液为对照,将不同 pH 的发酵液放于 4 °C 冰箱,24 h 后取出发酵液将其 pH 值调回至 6.5,测定对腐皮镰孢的抑菌率。

2) 温度对发酵液稳定性的测定

将 10 mL 拮抗菌 W-1 的发酵液分别在 40、60、80 和 100 °C 的水浴锅中加热,分别处理 10、

30 和 60 min 后,取出样品置于冰上冷却,以未加热处理的发酵液作为对照,测定对腐皮镰孢的抑菌率。

3) 紫外线对发酵液稳定性的测定

取 11 个无菌培养皿各加入 10 mL 发酵液,放置于距离紫外灯管(UVC 200–280 nm, 100 μ W/cm²) 10–15 cm 处的正下方,照射时间为 0、1、5、10、15、20、25、30、45、60 和 75 min,取出不同时间点的发酵液测定对腐皮镰孢的抑菌率。

1.5 菌株 W-1 抗真菌物质提取

选取 4 种不同的有机溶剂(环己烷、正丁醇、石油醚和乙酸乙酯)作为提取溶剂,将 500 mL 无菌发酵液与等体积的提取溶剂混合,静置提取 48 h,混合液分层后用分液漏斗收取有机相和水相。将提取后的水相和有机相置于旋转蒸发仪中 40 °C 减压蒸馏,水相除去其中的有机溶剂,有机相旋转至干燥后用 5–10 mL 甲醇溶解,将其作为抗菌物质提取物,测定对腐皮镰孢的抑制率,筛选最佳的有机溶剂^[21]。

1.6 乙酸乙酯提取有机相中抑菌活性成分分析

对乙酸乙酯提取的有机相中抗真菌活性成分进行 LC-MS 非靶向代谢组分析,以上代谢组分析由北京百迈客生物科技有限公司完成。代谢产物进行 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)数据库和 lipid metabolites and pathways strategy (LIPID MAPS)数据库注释^[22]。

1.7 数据分析

试验数据的统计和分析采用 SPSS 17.0 和 Excel 2007 软件。

2 结果与分析

2.1 菌株 W-1 的分离及形态观察

菌株 W-1 在 LB 固体培养基上培养 36 h 后,菌落形态呈圆形,乳白色,不透明(图 1A),在

表 1 响应面因素与水平设计

Table 1 Response surface factors and horizontal design

Factor	-1	0	1
A: pH	5.5	6.5	7.5
B: Temperature (°C)	28	30	32
C: Inoculation amount (%)	3	5	7
D: Rotational speed (r/min)	160	180	200

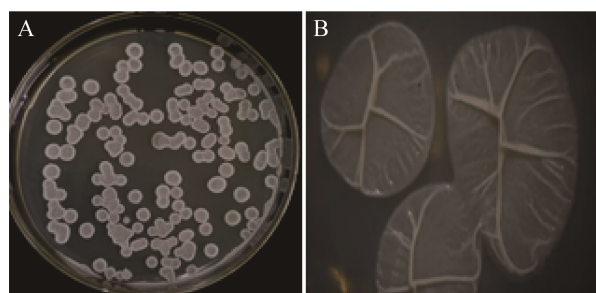


图1 菌株 W-1 的菌落及形态特征 A: 36 h 后的菌落形态. B: 在体视显微镜下的菌落形态 (150×)

Figure 1 Colony and morphological characteristics of strain W-1. A: Colony morphology after 36 hours. B: Morphology under stereomicroscope (150×).

体视显微镜下观察到单菌落表面干燥且呈褶皱状(图 1B), 在 LB 固体培养基中易被挑起成黏稠状态, 在 LB 液体培养基中, 液体表面会形成一层薄膜, 液体内混浊均匀。

2.2 菌株 W-1 的筛选及对腐皮镰孢菌丝生长的影响

以培养 7 d 的病原菌为对照(图 2A), 菌株 W-1 对腐皮镰孢有明显的拮抗作用, 抑菌率为

89%(图 2B), 体视显微镜观察到对照腐皮镰孢的菌丝前端呈放射状, 菌丝粗细均匀, 前端浓密且蓬松、颜色亮白(图 2C); 而被菌株 W-1 抑制的腐皮镰孢菌丝前端出现扭曲、稀薄、无延伸等畸形现象(图 2D)。这表明菌株 W-1 对腐皮镰孢菌丝的生长存在明显的抑制作用。

2.3 菌株 W-1 对植物病原真菌的抑制作用

菌株 W-1 对 5 种植物病原真菌菌丝的生长均表现出较强的抑制作用, 对禾谷镰孢的抑菌率为 57%, 对梅毒镰孢的抑菌率为 77%, 对层生镰孢的抑菌率为 73%, 对松针刺盘孢菌的抑菌率为 90%, 对藤仓赤霉的抑菌率为 83%, 其中对松针刺盘孢的抑制作用最强, 对禾谷镰孢的抑制作用最弱(图 3)。

2.4 菌株 W-1 产嗜铁素及胞外酶能力的检测结果

透明圈的大小表明, 菌株 W-1 能够产生大量的蛋白酶(图 4A)和少量的纤维素酶(图 4B), 但未检测到几丁质酶。同时 W-1 菌落周围产生较大的橘黄色晕圈, 且黄色晕圈直径可达 82 mm (图 4C), 表明产嗜铁素能力极强。

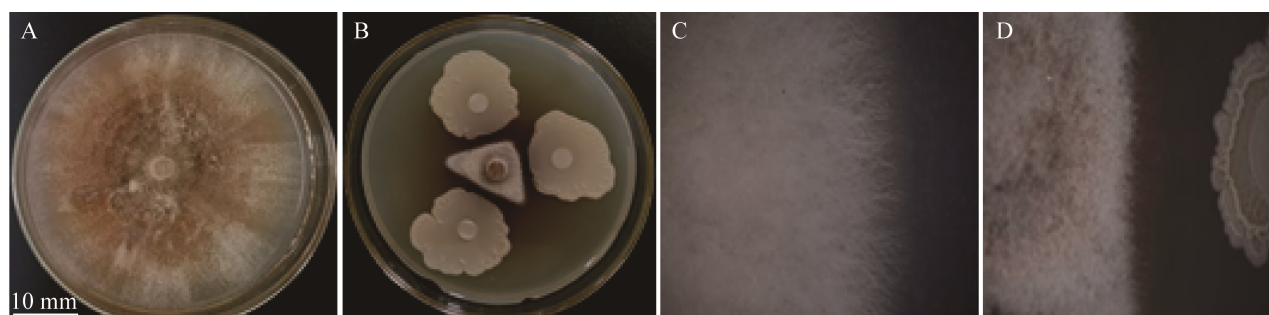


图2 菌株 W-1 的抑菌效果及对腐皮镰孢菌丝生长的影响 A: 培养 7 d 的腐皮镰孢. B: 菌株 W-1 对腐皮镰孢的抑菌效果. C: 正常的腐皮镰孢菌丝前端. D: 菌株 W-1 存在时的腐皮镰孢菌丝前端

Figure 2 The bacteriostatic effect of strain W-1 and its influence on the mycelial growth of *Fusarium solani*. A: *Fusarium solani* after cultured for 7 days. B: The bacteriostatic effect of strain W-1 on *Fusarium solani*. C: Normal hyphal front end of *Fusarium solani*. D: The hyphal front end of *Fusarium solani* with strain W-1.

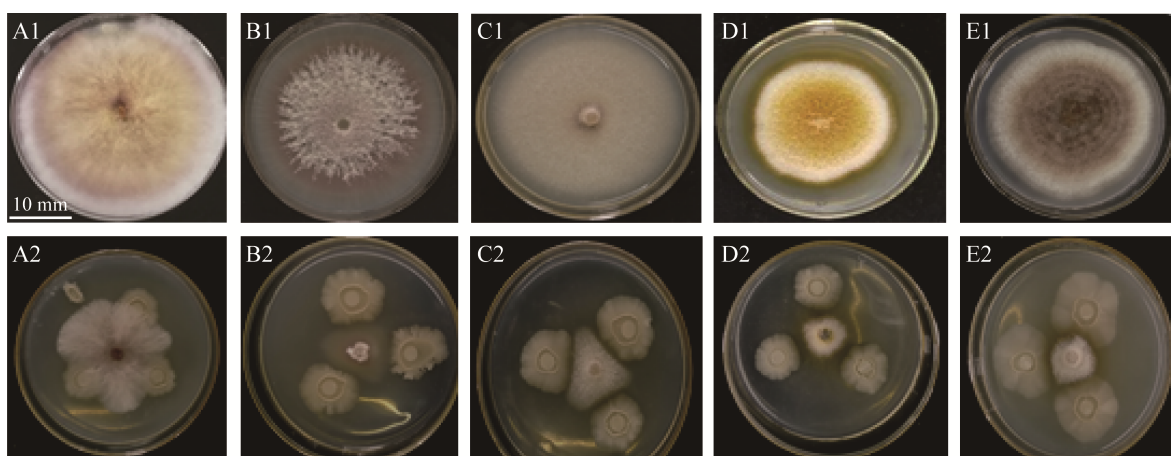


图3 菌株 W-1 对 5 种植物病原真菌的抑菌作用 A1: 禾谷镰孢. A2: 菌株 W-1 对禾谷镰孢的抑菌作用. B1: 梅毒镰孢; B2: 菌株 W-1 对梅毒镰孢的抑菌作用. C1: 层生镰孢; C2: 菌株 W-1 对层生镰孢的抑菌作用. D1: 松针刺盘孢; D2: 菌株 W-1 对松针刺盘孢的抑菌作用. E1: 藤仓赤霉菌; E2: 菌株 W-1 对藤仓赤霉的抑菌作用

Figure 3 Antimicrobial effect of strain W-1 on five plant pathogenic fungi. A1: *Fusarium graminearum*; A2: Antimicrobial effect of W-1 against *Fusarium graminearum*. B1: *Fusarium syphilis*; B2: Antimicrobial effect of strain W-1 against *Fusarium syphilis*. C1: *Fusarium proliferatum*; C2: Antimicrobial effect of strain W-1 against *Fusarium proliferatum*. D1: *Colletotrichum fioriniae*; D2: Antimicrobial effect of strain W-1 on *Colletotrichum fioriniae*. E1: *Gibberella fujikura*; E2: Antimicrobial effect of strain W-1 on *Gibberella fujikura*.

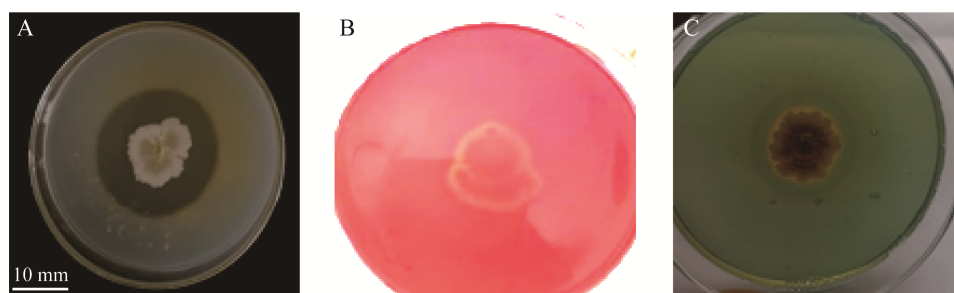


图4 菌株 W-1 胞外酶检测及产嗜铁素能力检测 A: 产蛋白酶检测. B: 产纤维素酶检测. C: 产嗜铁素能力检测

Figure 4 Detection of extracellular enzyme and siderophore production ability of strain W-1. A: Detection of protease production. B: Detection of cellulase production. C: Siderophore production capacity test.

2.5 菌株 W-1 基因序列分析及系统发育树构建

利用 PCR 扩增菌株 W-1 的 16S rRNA 基因片段, 经测序其长度为 1 423 bp, 将序列提交至 GenBank 数据库, 通过 BLAST 筛选出高度

相似的序列, 采用 MEGA 7.0 软件构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树, 图 5 结果显示: 菌株 W-1 与贝莱斯芽胞杆菌聚为一支, 结合形态学特征及序列分析结果, 将菌株 W-1 鉴定为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。

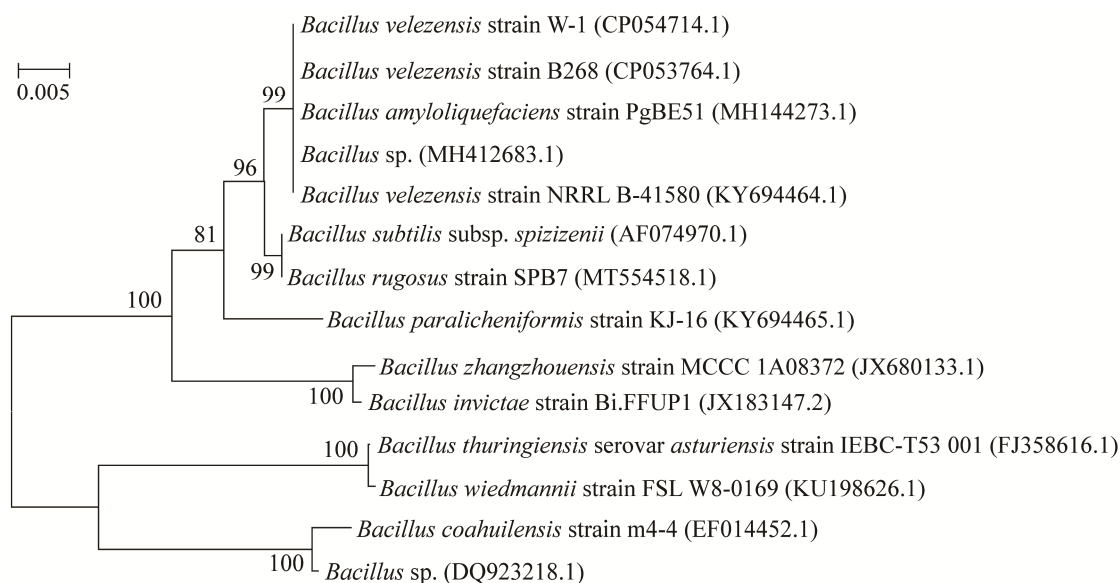


图5 菌株 W-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内表示 GenBank 登录号;Bootstrap 设置为 1 000;分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率;标尺表示 0.005%的序列差异

Figure 5 Phylogenetic tree construction based on 16S rRNA gene sequence of strain W-1. The parentheses represent the GenBank login number; Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; Ruler represents 0.005 of sequence.

2.6 菌株 W-1 培养条件的单因素试验结果

菌株 W-1 在 pH 5.5–9.5 之间均能较好地生长,在 pH 6.5 时 OD_{600} 值最大为 1.79,而且酸碱度接近中性有利于菌株 W-1 的发酵,最佳 pH 值为 6.5 (图 6A);当接种量为 5%时, OD_{600} 值最大为 1.77,为最优接种量(图 6B);不同发酵温度对菌株发酵影响较大,随着发酵温度的升高,在 26–30 °C 范围内, OD_{600} 值也逐渐升高,30 °C 时 OD_{600} 值最大为 1.84,超过 30 °C 发酵液的 OD_{600} 值随着温度升高而呈下降趋势,不利于其发酵,最佳发酵温度为 30 °C (图 6C);不同摇床转速条件下的 OD_{600} 值存在一定差异,在 140–180 r/min 范围内, OD_{600} 值随着转速的升高不断增加,转速为 180 r/min 时 OD_{600} 值最大为 1.85,确定 180 r/min 为菌株 W-1 发酵培养的最适转速(图 6D)。

2.7 响应面法优化菌株 W-1 最佳发酵条件的结果

响应面水平试验设计方案和结果见表 2,利用 Design-Expert 11 软件对试验数据进行二次多元回归拟合,得到 OD_{600} 值(Y)对 pH (A)、发酵温度(B)、接种量(C)和摇床转速(D)这 4 个变量的二次多项回归拟合方程为: $Y=1.93-0.0021A-0.0048B+0.0027C+0.0101D+0.0216AB+0.0075AC+0.0017AD-0.0057BC+0.0144BD-0.0137CD-0.2502A^2-0.2363B^2-0.2432C^2-0.2528D^2$ ($R^2=0.9994$),由表 3 结果可知,模型极显著($P<0.01$),且失拟项不显著($P>0.5$),表明此模型不但可信度好且拟合程度较高,预测 $R^2=0.9972$ 与调整决定系数 $R^2(\text{adj})=0.9989$ 的差值 <0.2 ,表明该回归模型的拟合度良好,且模型得到的预测值与试验值相一致,信噪比 Adeq precision >4 ,表明该回归模型不但响应信号强且可信度高,可用于后续设计菌株 W-1 液

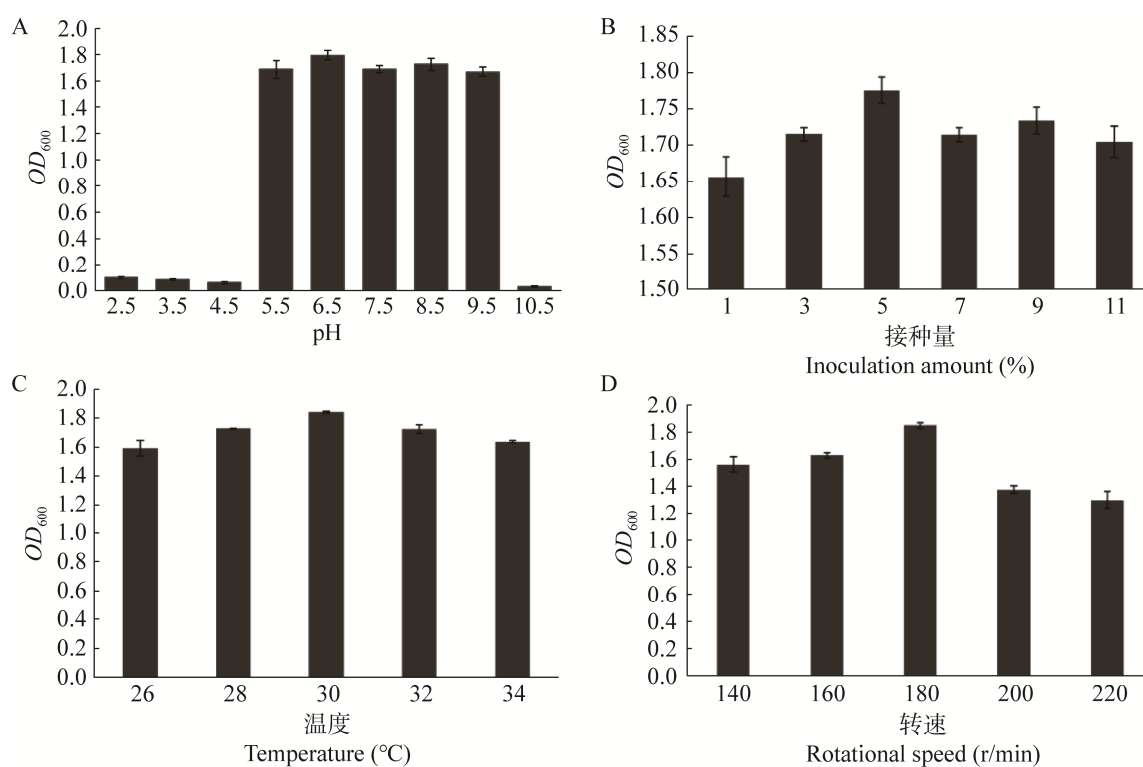


图 6 四种不同因素对菌株 W-1 生长量的影响 A: pH. B: 接种量. C: 温度. D: 转速

Figure 6 Effects of four different factors on the growth of strain W-1. A: pH. B: Inoculation amount. C: Temperature. D: Speed.

表 2 响应面法设计方案和结果

Table 2 Response surface method design scheme and results

No.	A: pH	B: Temperature (°C)	C: Inoculation amount (%)	D: Rotational speed (r/min)	OD ₆₀₀	No.	A: pH	B: Temperature (°C)	C: Inoculation amount (%)	D: Rotational speed (r/min)	OD ₆₀₀
1	5.5	28	5	180	1.475 00	16	6.5	32	7	180	1.438 33
2	7.5	28	5	180	1.423 00	17	5.5	30	3	180	1.438 67
3	5.5	32	5	180	1.425 67	18	7.5	30	3	180	1.430 67
4	7.5	32	5	180	1.460 00	19	5.5	30	7	180	1.431 67
5	6.5	30	3	160	1.434 67	20	7.5	30	7	180	1.453 67
6	6.5	30	7	160	1.465 83	21	6.5	28	5	160	1.465 53
7	6.5	30	3	200	1.434 33	22	6.5	32	5	160	1.432 00
8	6.5	30	7	200	1.410 67	23	6.5	28	5	200	1.425 00
9	5.5	30	5	160	1.445 00	24	6.5	32	5	200	1.449 00
10	7.5	30	5	160	1.431 00	25	6.5	30	5	180	1.924 67
11	5.5	30	5	200	1.420 33	26	6.5	30	5	180	1.936 60
12	7.5	30	5	200	1.413 00	27	6.5	30	5	180	1.936 67
13	6.5	28	3	180	1.451 67	28	6.5	30	5	180	1.928 33
14	6.5	32	3	180	1.445 33	29	6.5	30	5	180	1.931 67
15	6.5	28	7	180	1.467 67						

表 3 响应面试验回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation of response surface test

Source of variance	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	P-value	Significance
Model	1.01	14	0.071 8	1 791.79	<0.000 1	**
A: pH	0.000 1	1	0.000 1	1.30	0.273 4	
B: Temperature	0.000 3	1	0.000 3	6.88	0.020 0	*
C: Inoculation amount	0.000 1	1	0.000 1	2.20	0.160 5	
D: Rotational	0.001 2	1	0.00 12	30.79	<0.000 1	**
AB	0.001 9	1	0.001 9	46.49	<0.000 1	**
AC	0.000 2	1	0.000 2	5.61	0.032 7	*
AD	0.000 0	1	0.000 0	0.277 5	0.606 6	
BC	0.000 1	1	0.000 1	3.30	0.090 8	
BD	0.000 8	1	0.000 8	20.64	0.000 5	**
CD	0.000 8	1	0.000 8	18.74	0.000 7	**
A ²	0.405 9	1	0.405 9	10 127.18	<0.000 1	**
B ²	0.362 3	1	0.362 3	9 039.51	<0.000 1	**
C ²	0.383 7	1	0.383 7	9 573.26	<0.000 1	**
D ²	0.414 6	1	0.414 6	10 344.11	<0.000 1	**
Residual	0.000 6	14	0.000 0			
Lack of fit	0.000 5	10	0.000 0	1.65	0.332 4	Not significant
Pure error	0.000 1	4	0.000 0			
Cor total	1.01	28				
R ² =0.997 2 R ² (adj)=0.998 9 Adeq precision=113.585 3						

0.01<P<0.05, 表示显著(*); P<0.01, 表示极显著(**)

0.01<P<0.05, indicating significant (*); P<0.01, indicating extremely significant (**).

态发酵培养条件。一次项转速(D)、二次项 pH(A²)、交互项(AB)、培养温度(B²)、摇床转速(D²)和接种量(C²)对菌株 W-1 生长量的 OD₆₀₀ 影响极显著(P<0.01), 一次项发酵温度(B)、交互项(AC)对菌株 W-1 生长量(OD₆₀₀)影响显著(P<0.05), 表明这 4 个单因素对菌株 W-1 生长量(OD₆₀₀)的影响不是简单的线性关系, 而是存在交互作用。

由图 7 的 6 个响应面可知, 其均为光滑且开口向下的曲面, 表明在试验设计的 4 因素 3 水平范围内能够获得菌株 W-1 的最大发酵产量。等高线图趋于椭圆形, 表明所对应的两因素交互作用对菌株 W-1 的生长量在所确定因素范围之内。综上所述, 各因素对菌株 W-1

发酵量的影响顺序为: 转速>温度>接种量>pH, 该结果与回归模型方差分析结果相一致。

2.8 菌株 W-1 无菌发酵液稳定性测定结果

如图 8A 所示, 菌株 W-1 的发酵液经紫外照射 15 min 后, 抑菌率由 65.3%下降至 46.2%。在 15–75 min 范围内抑菌活性下降缓慢, 照射 75 min 后, 抑菌率仍有 36.9%。如图 8B 所示, 发酵液在 pH 2.0–7.0 的酸性环境中抑菌活性稳定, 抑菌率在 60%以上。在 pH 8.0 时抑菌活性逐渐下降, 在 pH 12.0 时抑菌率下降至 12.3%。如图 8C 所示, 菌株 W-1 发酵液的抑菌活性在 40–60 °C范围内稳定性较好, 80 °C处理 60 min, 其抑菌率由原有的 66.1%下降至 44.6%; 而 100 °C处理 60 min 后抑菌活性下降显著, 由原

有的 65.7%下降至 24.3%，这表明抗菌物质对 80 °C以上的高温比较敏感。综上所述，菌株 W-1 的发酵液对紫外线照射、碱性环境和 80 °C 以上的高温比较敏感。

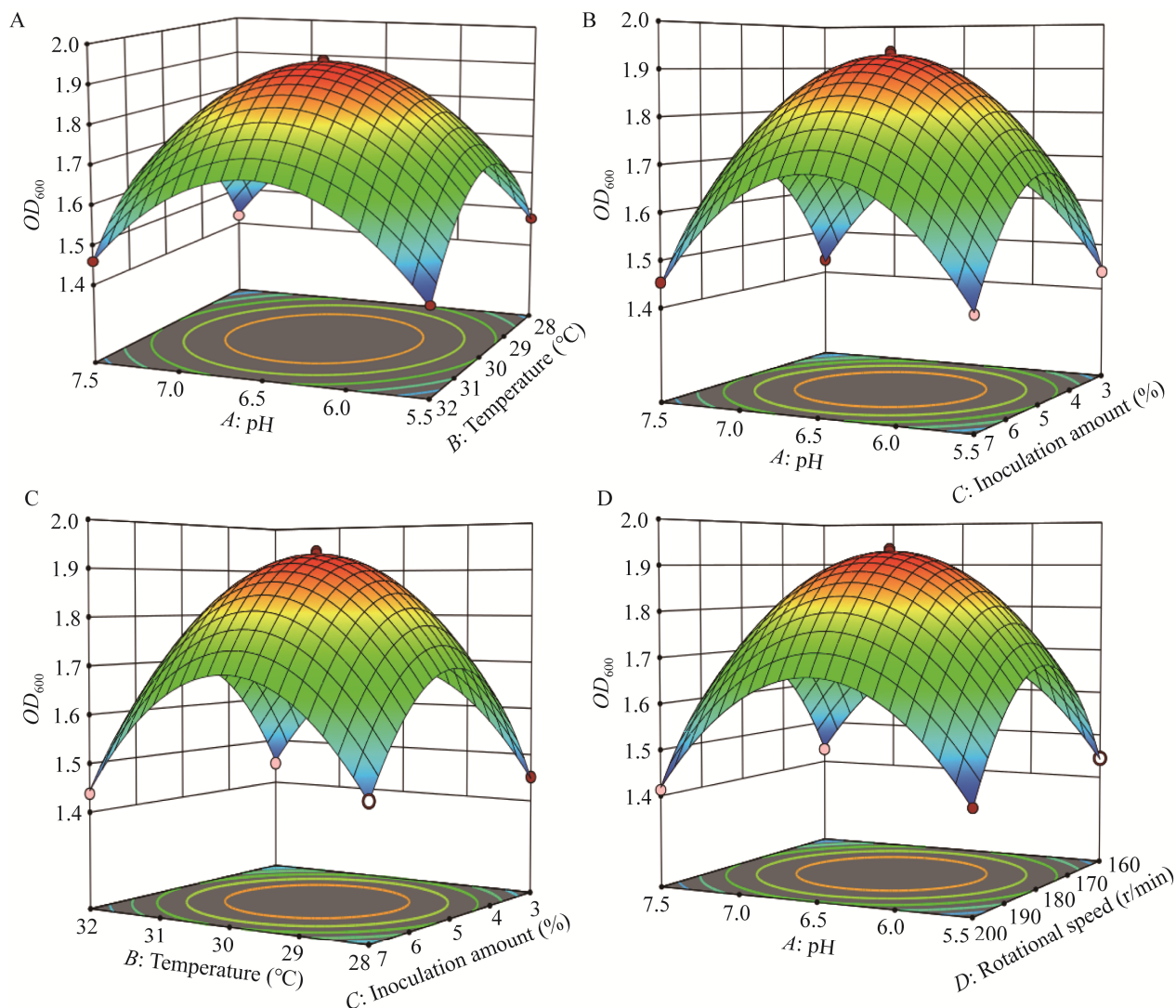
2.9 不同有机溶剂对菌株 W-1 抗真菌物质提取效果分析

如图 9 所示，菌株 W-1 发酵液的有机溶剂提取物对腐皮镰孢菌菌丝的抑制效果依次为：乙酸乙酯>石油醚>正丁醇>环己烷，因此确定乙酸乙酯为最佳提取溶剂。如图 10 所示，乙酸乙酯提取的有机相对腐皮镰孢的抑菌率最高，为

97.3%，而乙酸乙酯提取后的余液的抑制率仅为 61.2%。结果表明，乙酸乙酯能够将菌株 W-1 发酵液中的抑菌活性物质提取出来。

2.10 菌株 W-1 发酵液乙酸乙酯提取物抑菌活性成分分析

LC-MS 检测结果如图 11 和图 12 所示，菌株 W-1 发酵液的乙酸乙酯提取物样本中共检测到 11.015 个峰，其中注释到 5.177 个代谢物。KEGG 数据库注释结果如图 13 所示，获取到主要的代谢途径，主要集中在色氨酸代谢，葡萄糖苷酸生物合成，吲哚生物碱的生物合成，异



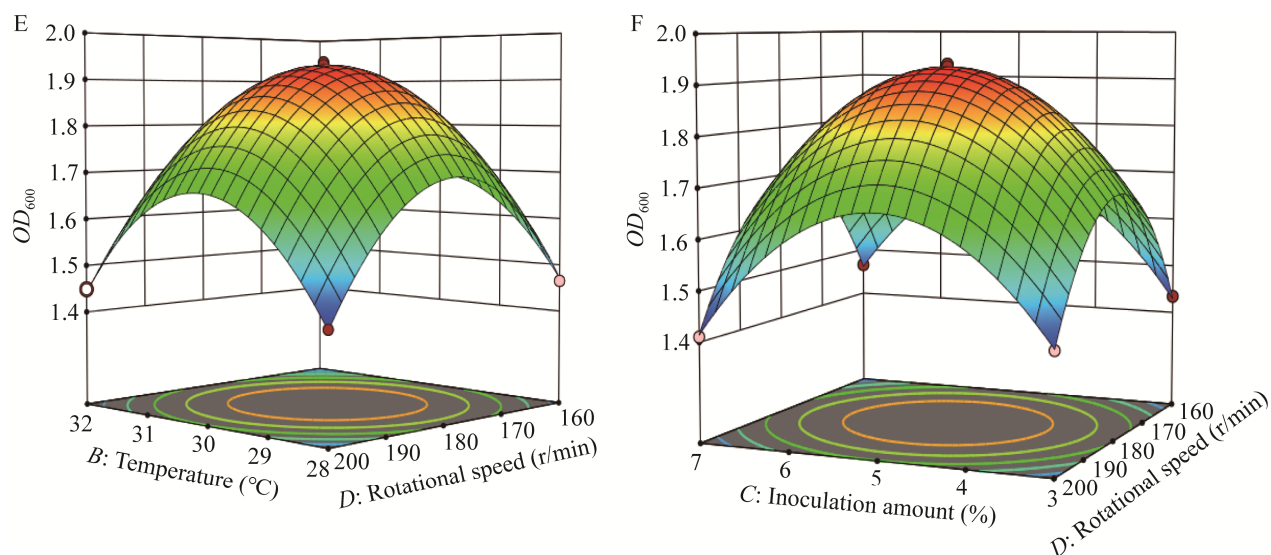


图7 各因素交互影响的响应面图 A: pH与温度交互对响应面图的影响. B: pH与接种量交互对响应面图的影响. C: 温度与接种量交互对响应面图的影响. D: pH与转速交互对响应面图的影响. E: 温度与转速交互对响应面图的影响. F: 接种量与转速交互对响应面图的影响

Figure 7 Response surface diagram of the interaction of various factors. A: Effect of pH and temperature interaction on response surface diagram. B: Effect of interaction between pH and inoculum on response surface diagram. C: The influence of temperature and inoculation quantity interaction on response surface diagram. D: Effect of interaction between pH and rotating speed on response surface diagram. E: The influence of temperature and speed interaction on response surface diagram. F: The effect of the interaction between inoculation amount and rotation speed on response surface diagram.

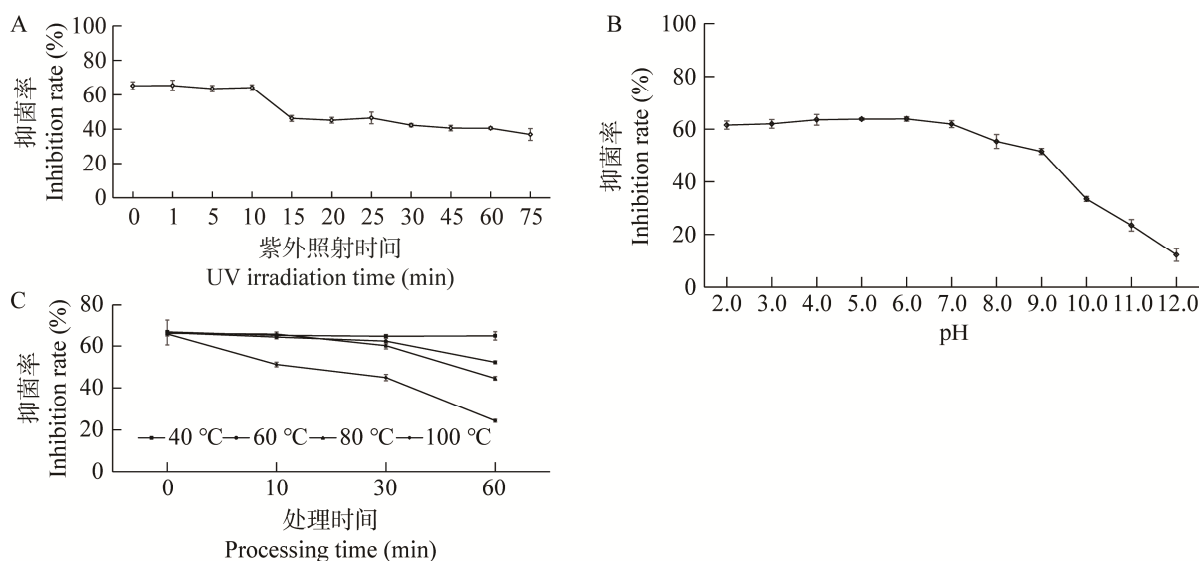


图8 菌株 W-1 的发酵液稳定性测定结果 A: 不同紫外照射时间对发酵液抑菌活性的影响. B: 不同 pH 对发酵液抑菌活性的影响. C: 不同处理温度对发酵液抑菌活性的影响

Figure 8 Determining of fermentation broth stability of strain W-1. A: The effect of different ultraviolet irradiation time on the antibacterial activity of fermentation broth. B: The effect of different pH on the antibacterial activity of fermentation broth. C: Effect of different treatment temperature on antibacterial activity of fermentation broth.

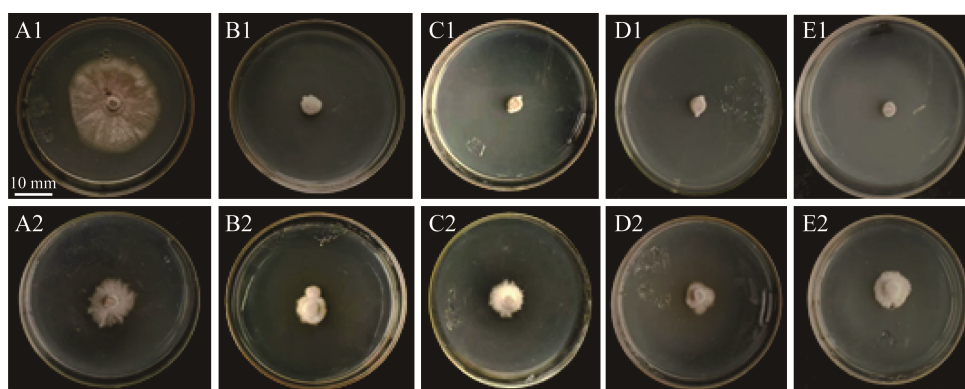


图 9 不同有机溶剂提取相对腐皮镰孢菌丝的抑菌效果 A1: 腐皮镰孢的对照; A2: 菌株 W-1 发酵液对腐皮镰孢的抑菌效果. B1: 环己烷提取有机相对腐皮镰孢的抑菌效果; B2: 环己烷提取水相对腐皮镰孢的抑菌效果. C1: 正丁醇提取有机相对腐皮镰孢的抑菌效果; C2: 正丁醇发酵水相对腐皮镰孢的抑菌效果. D1: 石油醚提取有机相对腐皮镰孢的抑菌效果; D2: 石油醚提取水相对腐皮镰孢的抑菌效果. E1: 乙酸乙酯提取有机相对腐皮镰孢的抑菌效果; E2: 乙酸乙酯提取水相对腐皮镰孢的抑菌效果

Figure 9 The antimicrobial effect of different organic solvent extract phase on *Fusarium solani*. A1: Control of *Fusarium solani*; A2: Antibacterial effect of strain W-1 fermentation broth on *Fusarium solani*. B1: Antimicrobial effect of cyclohexane extraction on *Fusarium solani*; B2: The antibacterial effect of cyclohexane extract aqueous phase on *Fusarium solani*. C1: The antibacterial effect of organic extracts of n-butanol on *Fusarium solani*; C2: Antibacterial effect of n-butanol extract aqueous phase on *Fusarium solani*. D1: Inhibition of petroleum ether extract on *Fusarium solani*; D2: Antibacterial effect of petroleum extract aqueous phase on *Fusarium solani*. E1: The organic phase extracted with ethyl acetate has antibacterial effect on *Fusarium solani*; E2: Antimicrobial effect of ethyl acetate extract aqueous phase on *Fusarium solani*.

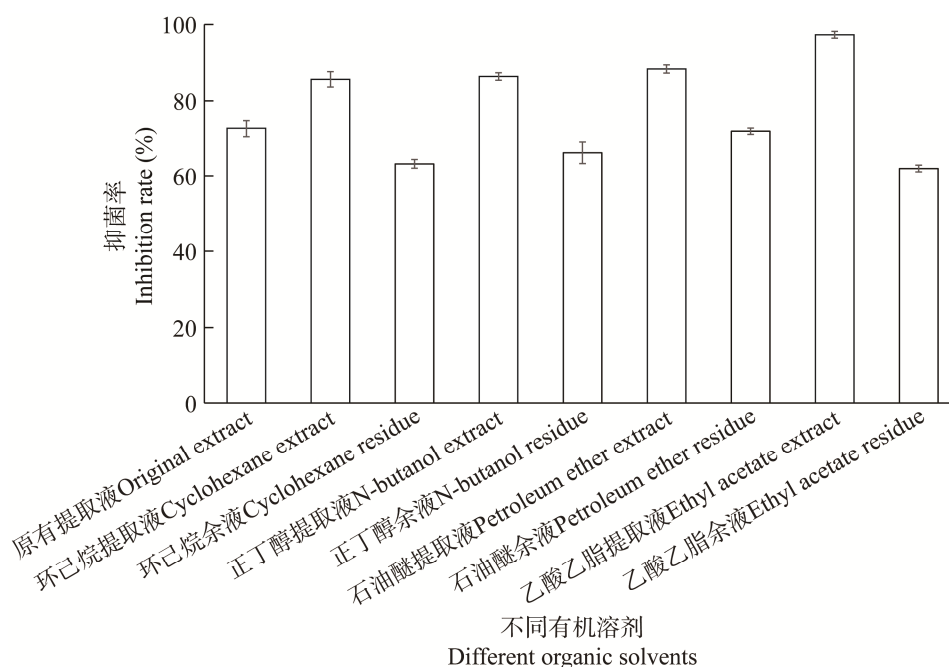


图 10 不同有机溶剂提取相对腐皮镰孢抑制率的测定

Figure 10 Determination of relative inhibition rate extracted with different organic solvents on *Fusarium solani*.

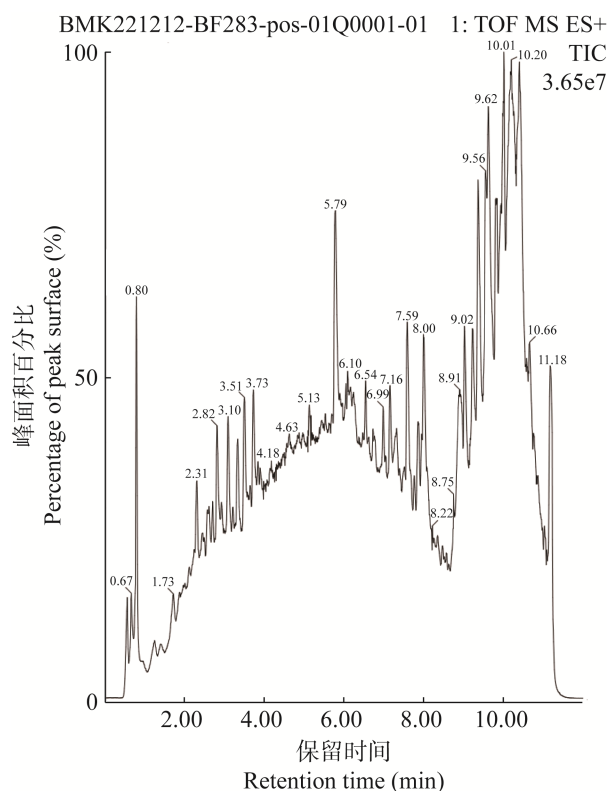


图 11 正离子模式

Figure 11 Positive ion mode.

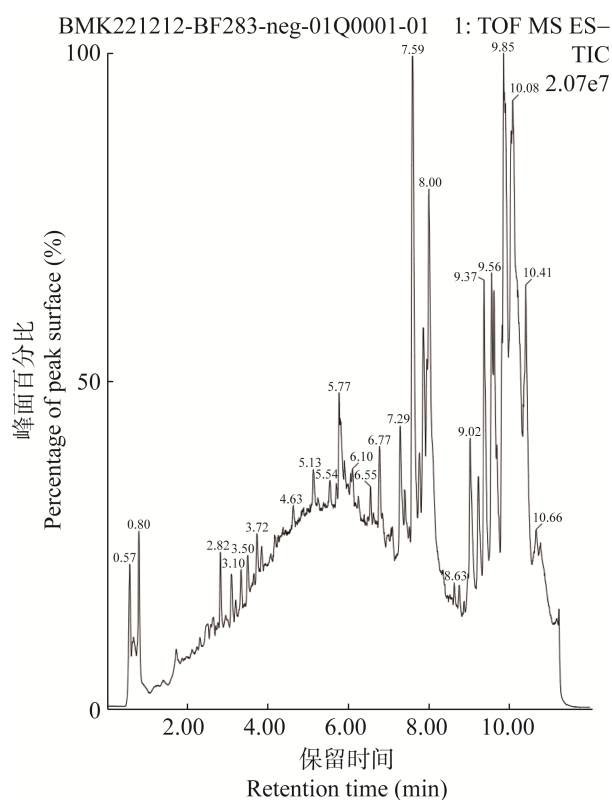


图 12 负离子模式

Figure 12 Negative ion mode.

喹啉生物碱生物合成, 托烷-哌啶和吡啶生物碱的生物合成, 鸟氨酸赖氨酸和烟酸的生物碱, 莽草酸途径生物碱的生物合成, 花生四烯酸代谢, 苯基丙酸的生物合成, 12、14 和 16 元大环内酯的生物合成, 类固醇激素生物合成, ABC 转运系统, 蛋白质消化和吸收, 以及类胡萝卜素生物合成, 以上代谢物和代谢途径为后期研究菌株 W-1 的抑菌机制提供了重要的信息。LIPID MAPS 数据库注释结果如图 14 所示, 富集到的代谢物包括脂质的 6 大类, 分别为孕烯醇酮脂类(prenol lipids, PR)、脂肪酸类(fatty acids, FA)、聚酮类(polyketides, PK)、鞘脂类(sphingolipids, SP)、固醇脂类(sterol lipids, ST)和甘油磷脂类(glycerophospholipids, GP), 其中

脂肪酸类(fatty acids, FA)的脂肪酸和共轭物(fatty acids and conjugates)次代谢产物所包含的代谢物数目最大。代谢产物中与抑菌相关的活性物质如表 4 所示, 负离子模式下检测出 4 种抑菌活性物质, 分别为 rhizocticin D、butirosin A、macrobiotic-A 和 surfactin, 其中丰度最高的为 macrobiotic-A, 高达 2 032.659 005。在正离子模式下检测到 5 种抑菌活性物质, 分别为 bacilysin、cyclo (Tyr-Ala)、7-o-succinyl macrolactin A、surfactin A 和 gramicidin S, 其中丰度最高的为 surfactin A, 高达 775 637.811 7。以上结果推测菌株 W-1 是通过产生多种拮抗物质来抑制腐皮镰孢的生长, 是一种十分具有生物防治潜力的优势菌种。

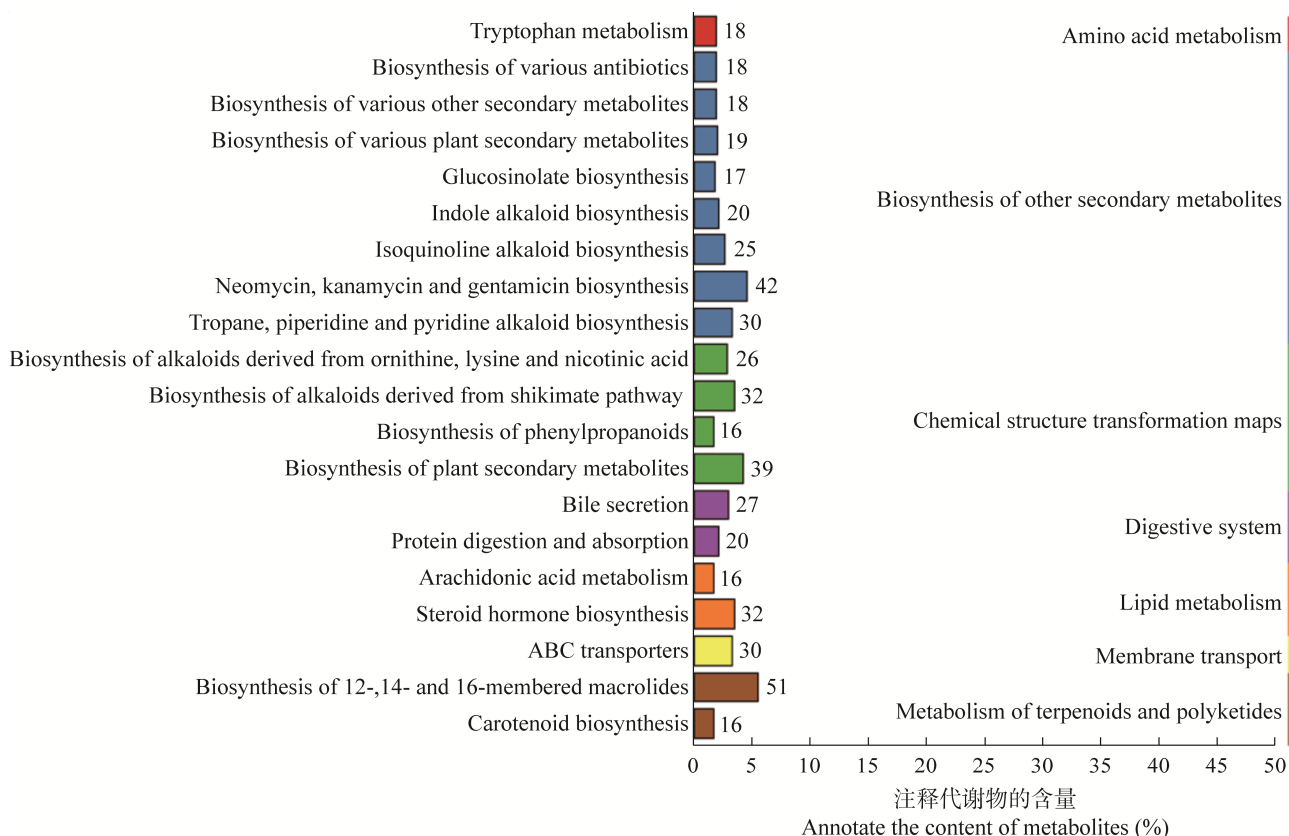


图 13 KEGG 数据库分类汇总 横坐标表示对应通路注释到的代谢物数量与所有注释到 KEGG 的代谢物数量的比值

Figure 13 Summary of KEGG database classification. The abscissa represents the ratio of the number of metabolites annotated to the corresponding pathway to the number of metabolites annotated to KEGG.

3 讨论与结论

贝莱斯芽胞杆菌作为拮抗菌株的功能逐渐被研究者认识并分离鉴定,但国内对其研究起步较晚,用于防治花椒根腐病的生防菌种类和数量较少,已有的菌株满足不了人们对生防制剂的需求。目前有李姝江等^[31]筛选出的蜡样芽胞杆菌与本团队前期试验中筛选出的绿色木霉和哈茨木霉^[32]及贝莱斯芽胞杆菌 T-1^[30]表现出对花椒根腐病良好的拮抗作用。贝莱斯芽胞杆菌易受环境因素的影响,筛选适宜陇南土壤环境下的优良菌株仍需深入研究。

本研究分离的拮抗菌株 W-1 鉴定为贝莱斯芽胞杆菌,防效达到 89%,其效果优于陈志垚等^[33]分离的贝莱斯芽胞杆菌 BKS104。另外检测到菌株 W-1 可产生大量的蛋白酶,蛋白酶是贝莱斯芽胞杆菌产生的主要抑菌蛋白之一。而且菌株 W-1 产嗜铁素能力极强,嗜铁素作为铁载体,通过和土壤中的病原菌竞争铁而抑制病原体的生长,从而起到降低植物病害的效果。嗜铁素被认为是一种新型生物活性物质,具有开发和利用价值,已在植物病原菌的防治中逐渐应用^[34]。

微生物发酵是获得大量次级代谢产物的基础,菌株代谢产物的产率受到不同发酵条件的

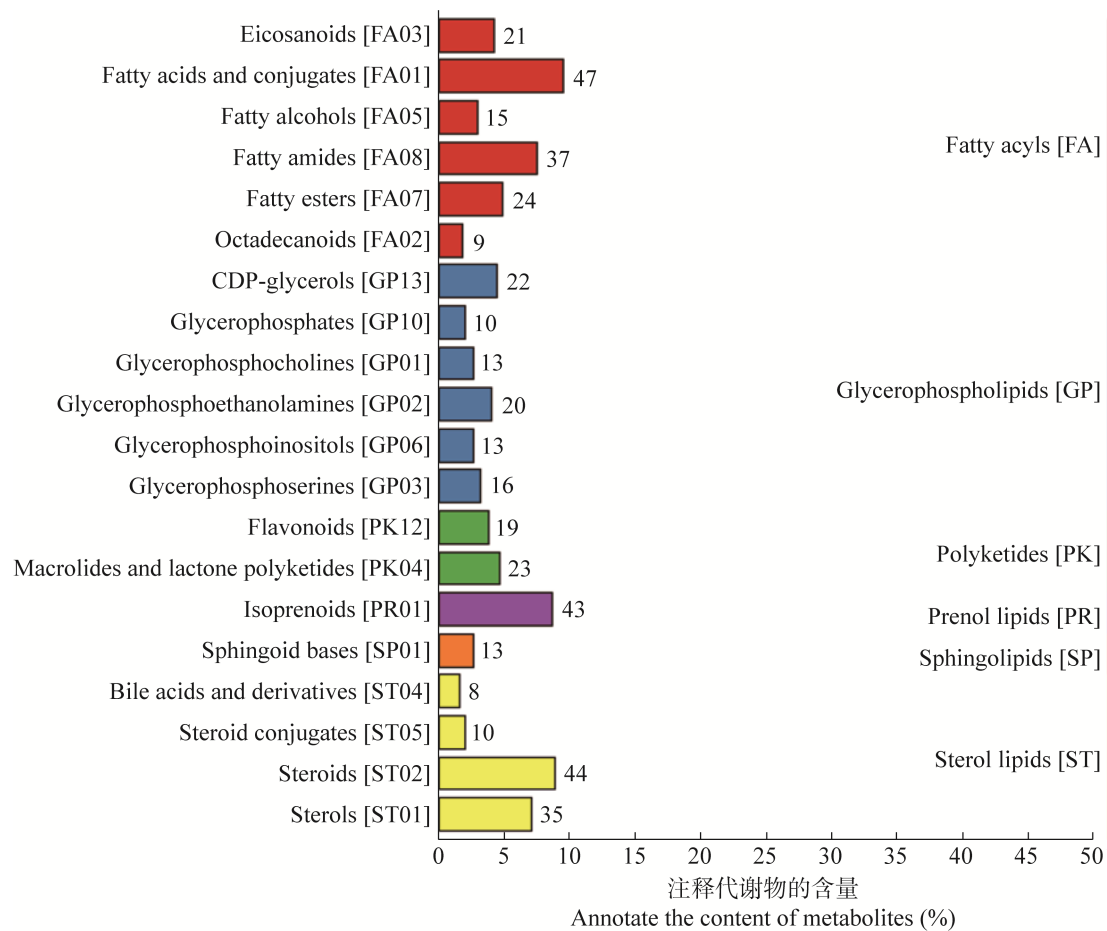


图 14 LIPID MAPS 数据库分类汇总 横坐标表示对应分类注释到的代谢物数量与所有注释到 LIPID MAPS 的代谢物数量的比值

Figure 14 Summary of LIPID MAPS database classification. The abscissa represents the ratio of the number of metabolites annotated in the corresponding classification to the number of metabolites annotated in all LIPID MAPS.

表 4 菌株 W-1 发酵产物中检测到的抑菌活性物质

Table 4 Bacteriostatic substances detected in the strain W-1 fermentation products

代谢物	代谢物	代谢物丰度
Metabolite (ID) PP	Metabolites	Metabolite abundance
neg_3182	聚酮类化合物 Macrolactin-A ^[23]	2 032.659 005
pos_5060	聚酮类化合物 7-o-succinyl macrolactin A ^[24]	5 510.821 967
pos_3418	环二肽 Cyclo (Tyr-Ala) ^[25]	132.503 287 8
pos_6944	短杆菌肽 S Gramicidin S ^[26]	522.431 152 8
pos_3098	溶菌杆菌素 Bacilysin ^[27]	309.497 846 6
neg_1137	磷酸寡肽抗生素 Rhizocticin D ^[28]	51.485 015 75
pos_6886	表面活性素 A Surfactin A ^[29]	775 637.811 7
neg_1648	丁酰甘菌素 Butirosin ^[30]	55.956 298 83
neg_3751	表面活性素 Surfactin ^[11]	1 088.490 227

影响^[35]。响应面法优化拮抗菌的发酵条件不仅能够提高菌的发酵浓度,且发酵液中还能产生更多的抑菌活性物质。优化后菌株 W-1 的发酵浓度 OD_{600} 值比优化前提高了 2.6 倍,这为深入挖掘该菌的拮抗作用提供了参考,同时提升了该菌的防控效果。不同菌株其最佳发酵条件存在较大差异。菌株 W-1 培养的最适 pH 和温度与多数芽胞杆菌相近,这表明该菌在常规酸碱环境和温度条件下具备良好的生长能力。然而过高的转速不利于菌株 W-1 的发酵培养,这可能与发酵液中自溶酶的释放速度有关,转速越高释放速度越快,造成菌体自溶^[36]。接种量也是影响发酵效率的重要因素之一,菌株 W-1 优化后发酵的最佳接种量为 5%。这与兰成忠等^[37]研究的贝莱斯芽胞杆菌 FJ17-4 的接种量 12.5%和黎燕珊等^[38]研究的贝莱斯芽胞杆菌 HC-8 的接种量 0.1%的结果差异较大,但与杨可等^[39]研究的贝莱斯芽胞杆菌 TCS001 的接种量是 3%结果接近。贝莱斯芽胞杆菌对病原菌具有抑制作用的主要原因是能够合成次级代谢产物,包括脂肽类物质、抑菌蛋白、细菌素和聚酮化合物等^[40]。为更好地利用拮抗菌 W-1 发酵液中产生的次级代谢产物,本研究确定乙酸乙酯为菌株 W-1 发酵液中抑菌活性物质提取的最佳溶剂,并在乙酸乙酯的提取有机相中检测到多种抑菌活性物质,其中丰度最高的是聚酮类化合物和表面活性素。贝莱斯芽胞杆菌主要是通过分泌聚酮类化合物、脂肽类抗生素和抗菌蛋白等物质发挥抑菌作用^[41]。短杆菌肽 S、溶菌杆菌素和环二肽均具有明确的生物活性且对多种农作物病原真菌有抑菌作用^[42]。以上研究成果与欧婷等^[22]通过 LC-MS 方法分析获得的贝莱斯芽胞杆菌 SWUJ1 发酵液中的抑菌活性物质相似,进一步证实了菌株 W-1 的抑菌能力。

菌株 W-1 对花椒根腐病病原菌和其他多种

植物病原真菌均具有良好的抑制作用,表现出较好的广谱抑菌活性。该菌发酵液的抑菌活性受到 pH、温度、紫外照射的影响,在常规条件下稳定性良好,在极端环境下抑菌活性会发生变化,能够适应大田可变的环境条件,具备防治花椒根腐病等土传病害的潜力,也具有潜在开发为生物农药的价值,为花椒根腐病的生物防治提供了新的生物防治资源。在后续研究中仍需深入探讨菌株 W-1 防治花椒根腐病的抑菌物质及其稳定性,这对研制出功能型、绿色高效微生物农药具有重要指导价值。

REFERENCES

- [1] 朱天辉, 陈第文. 花椒根腐病的症状和病原初探[J]. 四川农业大学学报, 1994(4): 451-454.
ZHU TH, CHEN DW. A primary study of the symptom and pathogen of root rot on Chinese prickly ash[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 1994(4): 451-454 (in Chinese).
- [2] 李智敏, 陈建斌, 周惠萍, 李丽娟, 范静华. 花椒根腐病病原鉴定和生物学特性研究[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(5): 591-595.
LI ZM, CHEN JB, ZHOU HP, LI LJ, FAN JH. Pathogen identification and biological characteristics of *Zanthoxylum bungeanum* root rot[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2006, 21(5): 591-595 (in Chinese).
- [3] 李志克, 唐蓉, 黄小琴, 张蕾, 张重梅, 鲜赟曦, 何天伟, 周西全, 刘勇, 杨潇湘. 四川茂县花椒根腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 中国农学通报, 2021, 37(27): 100-104.
LI ZK, TANG R, HUANG XQ, ZHANG L, ZHANG ZM, XIAN YX, HE TW, ZHOU XQ, LIU Y, YANG XX. The pathogen causing root rot in *Zanthoxylum bungeanum* in Mao County of Sichuan Province: isolation and identification[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(27): 100-104 (in Chinese).
- [4] 田凤鸣, 陈强, 王瀚, 卓平清, 孙杰. 陇南花椒根腐病病原菌的分离鉴定及生物学特性的研究[J]. 东北农业科学, 2022, 47(1): 95-99, 107.
TIAN FM, CHEN Q, WANG H, ZHUO PQ, SUN J. Isolation, identification and biological characteristics of the pathogen bacteria of *Zanthoxylum bungeanum* root

- rot in Longnan[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2022, 47(1): 95-99, 107 (in Chinese).
- [5] 阮钊, 丁俊园, 唐光辉, 李培琴. 花椒根腐病的病原鉴定与防治药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2022, 52(4): 630-637.
- RUAN Z, DING JY, TANG GH, LI PQ. Pathogen identification of root rot of *Zanthoxylum bungeanum* and screening of fungicides[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(4): 630-637 (in Chinese).
- [6] 孙正祥, 龙欣钰, 孟祥佳, 曹帅, 毛国庆, 周燚. 枯草芽孢杆菌 YZU-S149 的分离鉴定及对西瓜枯萎病的生防作用[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2021, 18(4): 114-120.
- SUN ZX, LONG XY, MENG XJ, CAO S, MAO GQ, ZHOU Y. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* YZU-S149 and its biocontrol effect on watermelon *Fusarium* wilt[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2021, 18(4): 114-120 (in Chinese).
- [7] 余小霞, 田健, 伍宁丰. 枯草芽孢杆菌芽胞表面展示外源蛋白的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 31-38.
- YU XX, TIAN J, WU NF. Research progress on *Bacillus subtilis* spore display of recombinant proteins[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(5): 31-38 (in Chinese).
- [8] 刘雪娇, 李红亚, 李术娜, 朱宝成, 高同国. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生防和促生机制[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(3): 302-310.
- LIU XJ, LI HY, LI SN, ZHU BC, GAO TG. Biocontrol and growth promotion mechanisms of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2019, 39(3): 302-310 (in Chinese).
- [9] 余水, 丁海霞, 罗玉英, 程欢欢, 姚伟伟, 彭丽娟. 贝莱斯芽孢杆菌 MT310 生防机制初探[J]. 山地农业生物学报, 2020, 39(5): 23-28.
- YU S, DING HX, LUO YY, CHENG HH, YAO WW, PENG LJ. Primary research on bio-control mechanism of *Bacillus velezensis* MT310[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2020, 39(5): 23-28 (in Chinese).
- [10] 肖倩, 李守望, 梁晨, 李文宇, 毛怡文. 贝莱斯芽孢杆菌对黄瓜霜霉病的作用方式和持效期[J]. 农药, 2021, 60(11): 829-831.
- XIAO Q, LI SW, LIANG C, LI WY, MAO YW. Action mode and duration of *Bacillus velezensis* against cucumber downy mildew[J]. Agrochemicals, 2021, 60(11): 829-831 (in Chinese).
- [11] ZHENG TW, LIU L, NIE QW, HSIANG T, SUN ZX, ZHOU Y. Isolation, identification and biocontrol mechanisms of endophytic bacterium D61-A from *Fraxinus hupehensis* against *Rhizoctonia solani*[J]. Biological Control, 2021, 158: 104621.
- [12] 陈龙, 吴兴利, 闫晓刚, 魏炳栋, 张芳毓. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、次级代谢产物及应用[J]. 家畜生态学报, 2020, 41(1): 1-8.
- CHEN L, WU XL, YAN XG, WEI BD, ZHANG FY. The classification, secondary metabolites and application of *Bacillus velezensis*[J]. Acta Ecologica Animalis Domastici, 2020, 41(1): 1-8 (in Chinese).
- [13] 卢志军, 石旺鹏, 李鹏, 张小利, 潘慧英, 陶永梅, 付琼. 一种贝莱斯芽孢杆菌及其在植物上的应用: CN107964514A[P]. 2019-10-01.
- LU ZJ, SHI WP, LI P, ZHANG XL, PAN HY, TAO YM, FU Q. *Bacillus velezensis* and its application in plants: CN107964514A[P]. 2019-10-01 (in Chinese).
- [14] 李洋. 2021 年国内新登记的生物农药品种[J]. 世界农药, 2022, 44(2): 1-8.
- LI Y. New biopesticides registered in China in 2021[J]. World Pesticides, 2022, 44(2): 1-8 (in Chinese).
- [15] NAM MH. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(5): 520-524.
- [16] 许乐, 王子强, 张爽, 邢倩, 刘丽娜, 洒荣波. 丹参根腐病拮抗细菌筛选、鉴定及生防机理研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 847-855.
- XU L, WANG ZQ, ZHANG S, XING Q, LIU LN, SA RB. Screening, identification and biocontrol mechanism of antagonistic bacteria against root rot of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 847-855 (in Chinese).
- [17] 梁建根. 产嗜铁素菌株 HZ-2 的鉴定及其产嗜铁素能力的检测[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(9): 1849-1852, 1881.
- LIANG JG. Identification of siderophore-producing strain HZ-2 and detection of its siderophore-producing ability[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(9): 1849-1852, 1881 (in Chinese).
- [18] 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).
- [19] 廖海浪, 钟芙蓉, 柯汶佳, 李娜, 马云桐. 黄连根腐病原菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(9): 900-912.
- LIAO HL, ZHONG FR, KE WJ, LI N, MA YT. Isolation and identification of the pathogen of root rot of *Coptis chinensis* and screening of antagonistic microorganism[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(9): 900-912 (in Chinese).
- [20] 安卫娟, 钟敏, 张庆华, 邹金琦, 柯淑芬, 罗咏琪, 钟春燕, 安雪姣. 响应面分析法优化沙雷氏菌 (*Serratia* sp.) AXJ-M 对己烯雌酚的降解[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4006-4018.
- AN WJ, ZHONG M, ZHANG QH, ZOU JQ, KE SF, LUO YQ, ZHONG CY, AN XJ. Degradation of diethylstilbestrol by *Serratia* sp. AXJ-M was optimized by response surface methodology[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4006-4018 (in Chinese).
- [21] 吕昂, 吴明德, 张静, 杨龙, 李国庆. 链霉菌 3-10 发酵液及提取物的稳定性研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 250-257.
- LÜ A, WU MD, ZHANG J, YANG L, LI GQ. Stability of cultural filtrate and crude extract produced by *Streptomyces* sp. 3-10[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 250-257 (in Chinese).
- [22] 欧婷, 金必堃, 高海英, 王若琳, 张雨阳, 左伟东, 谢洁. *Bacillus velezensis* SWUJ1 拮抗物质分离纯化及抑菌机理研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(1): 75-87.
- OU T, JIN BK, GAO HY, WANG RL, ZHANG YY, ZUO WD, XIE J. Purification and research of inhibitory mechanism of antagonist substances from *Bacillus velezensis* SWUJ1 strain[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2022, 44(1): 75-87 (in Chinese).
- [23] CHEN JM, LIU TL, WEI M, ZHU ZQ, LIU WX, ZHANG ZL. Macrolactin a is the key antibacterial substance of *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM against the pathogen *Dickeya chrysanthemi*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155(2): 393-404.
- [24] SCHNEIDER K, CHEN XH, VATER J, FRANKE P, NICHOLSON G, BORRISS R, SÜSSMUTH RD. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the *pks2* cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(9): 1417-1423.
- [25] 黄伟, 张丽娟, 秦新政, 王宁, 王玮. 贝莱斯芽胞杆菌 JK19 发酵液稳定性及抑菌物质初步分析[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 73-80.
- HUANG W, ZHANG LJ, QIN XZ, WANG N, WANG W. Preliminary analysis of stability and antimicrobial substances in fermentation broth of *Bacillus velezensis* JK19[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 73-80 (in Chinese).
- [26] 陈芳芳, 余小妹, 韩晶晶, 吴春, 庞海月, 张书迪, 陈煜沛. 贝莱斯芽胞杆菌抗真菌能力及基因组分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2292-2307.
- CHEN FF, YU XM, HAN JJ, WU C, PANG HY, ZHANG SD, CHEN YP. Antifungal activity and genomic analysis of *Bacillus velezensis* X49[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2292-2307 (in Chinese).
- [27] 杨冰, 杜春梅. 贝莱斯芽胞杆菌次生抗生物质的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 502-512.
- YANG B, DU CM. Review on secondary antibiotic metabolites of *Bacillus velezensis*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(2): 502-512 (in Chinese).
- [28] Borisova SA, Circello BT, Zhang JK, van der Donk WA, Metcalf WW. Biosynthesis of rhizoctinins, antifungal phosphonate oligopeptides produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633[J]. Chemistry & Biology, 2010, 17(1): 28-37.
- [29] RABBEE MF, ALI MS, CHOI J, HWANG BS, JEONG SC, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1046.
- [30] 田凤鸣, 陈强, 何九军, 卓平清, 王让军, 王国斌, 张晓娜. 一株花椒根腐病拮抗菌的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3205-3219.
- TIAN FM, CHEN Q, HE JJ, ZHUO PQ, WANG RJ, WANG GB, ZHANG XN. Isolation, identification, and whole genome analysis of a strain against *Zanthoxylum bungeanum* root rot[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3205-3219 (in Chinese).
- [31] 李姝江, 朱天辉, 譙天敏, 韩珊. 花椒根腐病生防芽胞杆菌的筛选鉴定及定殖和防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 114-122.
- LI SJ, ZHU TH, QIAO TM, HAN S. Screening, identification, colonization and control effect of biocontrol *Bacillus* sp. against root rot of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim.[J]. Journal of Northwest A&F

- University (Natural Science Edition), 2016, 44(4): 114-122 (in Chinese).
- [32] 田凤鸣, 陈强, 何九军, 卓平清. 两种木霉对陇南花椒根腐病原菌的拮抗作用研究[J]. 宁夏师范学院学报, 2021, 42(4): 44-50.
- TIAN FM, CHEN Q, HE JJ, ZHUO PQ. Study on the antagonistic effects of two kinds of *Trichoderma* on the pathogen of *Zanthoxylum bungeanum* root rot in Longnan[J]. Journal of Ningxia Normal University, 2021, 42(4): 44-50 (in Chinese).
- [33] 陈志垚, 王鹏, 王微, 金光辉, 台莲梅, 郭永霞, 孙冬梅, 靳学慧. 马铃薯疮痂病菌 *Streptomyces scabies* 拮抗细菌的筛选及 BKS104 鉴定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4145-4155.
- CHEN ZY, WANG P, WANG W, JIN GH, TAI LM, GUO YX, SUN DM, JIN XH. Screening of antagonistic bacteria against *Streptomyces scabies* and identification of BKS104[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4145-4155 (in Chinese).
- [34] 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.
- 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).
- [35] 王朝恩, 刘婉慧, 陆蓝翔, 付欢欢, 石慧敏, 史纪武, 叶建仁. 短小芽孢杆菌 HR10 产孢培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(2): 37-45.
- WANG CE, LIU WH, LU LX, FU HH, SHI HM, SHI JW, YE JR. Optimization of sporulation medium and fermentation conditions for *Bacillus pumilus* HR10[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(2): 37-45 (in Chinese).
- [36] 徐世荣, 陈襄, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-126.
- XU SR, CHEN X, WU YP. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4): 121-126 (in Chinese).
- [37] 兰成忠, 林雄, 甘林, 代玉立, 刘晓菲, 杨秀娟, 蒋军喜. 贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2022, 37(10): 1335-1343.
- LAN CHZ, LIN X, GAN L, DAI YL, LIU XF, YANG XJ, JIANG JX. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions of *Bacillus velezensis* FJ17-4[J]. Journal of Fujian Agriculture, 2022, 37(10): 1335-1343 (in Chinese).
- [38] 黎燕珊, 崔文艳, 张陈芳, 黄小欣, 何朋杰. 抗金银花白粉病菌贝莱斯芽孢杆菌 HC-8 菌株培养基及发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2021, 52(8): 2148-2157.
- LI YS, CUI WY, ZHANG CF, HUANG XX, HE PJ. Optimization of culture medium and fermentation parameters of *Bacillus velezensis* HC-8 antagonistic to *Erysiphe lonicerae*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(8): 2148-2157 (in Chinese).
- [39] 杨可, 司文, 林海, 林方锐, 袁静, 陈杰. 利用响应面分析法优化贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的发酵条件[J]. 农药学学报, 2019, 21(4): 444-452.
- YANG K, SI W, LIN H, LIN FR, YUAN J, CHEN J. Fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* TCS001 using response surface methodology[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(4): 444-452 (in Chinese).
- [40] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [41] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33.
- TAO YM, PAN HJ, HUANG J, XI X, LI P, LU ZJ. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33 (in Chinese).
- [42] BEREZHNYAYA AV, EVDOKIMOVA OV, VALENTOVICH LN, SVERCHKOVA NV, TITOK MA, KOLOMIYETS EI. Molecular genetic and functional analysis of the genome of bacteria *Bacillus velezensis* BIM B-439D[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2019, 55(4): 386-396.