



贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 发酵条件优化及其番茄枯萎病的防治效果

申云鑫^{1,2#}, 施竹凤^{2#}, 李铭刚³, 赵江源³, 王楠^{1,2}, 冯路遥^{2,3}, 莫艳芳^{1,2}, 陈齐斌^{1*}, 杨佩文^{2*}

- 1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650000
- 2 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 云南 昆明 650205
- 3 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091

申云鑫, 施竹凤, 李铭刚, 赵江源, 王楠, 冯路遥, 莫艳芳, 陈齐斌, 杨佩文. 贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 发酵条件优化及其番茄枯萎病的防治效果[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 220-237.

SHEN Yunxin, SHI Zhufeng, LI Minggang, ZHAO Jiangyuan, WANG Nan, FENG Luyao, MO Yanfang, CHEN Qibin, YANG Peiwen. *Bacillus velezensis* SH-1471: optimization of fermentation conditions and evaluation of the biocontrol effect on tomato *Fusarium* wilt[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 220-237.

摘要:【目的】贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) SH-1471 是一株兼具防控作物土传病害、促进土壤养分转化以及促进作物生长等功能的菌株(保藏编号: CCTCC No. M 2022923, 专利号: ZL 2022 1 1479280.X)。挖掘其潜在的生物活性并探究其最适发酵条件, 是推进该菌株产业化和商业开发的有效手段之一。【方法】结合形态学、分子生物学、16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因对菌株 SH-1471 进行分类地位鉴定; 利用 PCR 技术, 对菌株抗生素合成基因检测; 使用平板对峙试验和发酵液抑菌试验测定菌株抑菌广谱性; 并测定其体外产酶、解磷、解钾、固氮及产铁载体能力; 以菌株发酵液 OD_{600} 值和抑菌率为指标, 通过设计单因素试验和响应面优化试验, 探究菌株的最佳发酵配方和最佳发酵条件; 采用室内盆栽试验测定优化前后菌株发酵液对番茄植株的促生效果及其对番茄枯萎病的防治效果。【结果】经鉴定, SH-1471 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 具有 *srfA*、*fenB*、*ituA*、*ituD* 和 *bymA* 等抗生素合成基因, 对番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、烟

资助项目: 云南省科技计划重大科技专项(202202AE090010, 202202AE090015); 国家自然科学基金(32060624); 云南省专家基层科研工作站——杨佩文专家工作站(嵩明县, 陆良县)(云人社通[2022] 17号)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Yunnan Province (202202AE090010, 202202AE090015), the National Natural Science Foundation of China (32060624), and the Yunnan Provincial Expert Grassroots Research Workstation——Yang Peiwen Expert Workstation (Songming, Luliang) (Yunrenshetong [2022] No. 17).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: YANG Peiwen, pwyang2000@126.com; CHEN Qibin, tclass99@163.com

Received: 2023-06-04; Accepted: 2023-06-28; Published online: 2023-07-04

草赤星病菌(*Alternaria alternata*)和玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)等 8 种病原微生物具有良好的拮抗效果; 且具有产蛋白酶、纤维素酶、解磷、固氮和分泌铁载体的能力。菌株 SH-1471 最适培养配方为: 蔗糖 17.92 g/L、豆粉 16.95 g/L、硫酸镁 2.88 g/L、酵母膏 5.0 g/L; 最适发酵条件为 pH 7.5、温度 33 °C、转速 220 r/min、发酵时间 20–24 h; 优化后, 抑菌率提升至 94.08%, 提高 15.6%, 发酵液 OD_{600} 提升至 3.28, 提高 36.7%, 盆栽防效提升至 93.8%; 此外, 菌株 SH-1471 可显著提高番茄幼苗的株高、茎围、根长、根重、地上部位鲜重和地上部位干重等农艺性状。【结论】贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 具有丰富的抗生素合成基因, 同时具有产蛋白酶、纤维素酶、解磷、固氮和分泌铁载体等生物活性, 对多种病原物具有良好的抑制效果, 可显著降低番茄枯萎病的发病率, 并对番茄幼苗农艺性状具有显著促进作用, 在植物病害生物防治方面以及促进植物生长方面具有广阔的应用前景。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 单因素试验设计; 响应面优化; 生物活性

***Bacillus velezensis* SH-1471: optimization of fermentation conditions and evaluation of the biocontrol effect on tomato *Fusarium* wilt**

SHEN Yunxin^{1,2#}, SHI Zhufeng^{2#}, LI Minggang³, ZHAO Jiangyuan³, WANG Nan^{1,2}, FENG Luyao^{2,3}, MO Yanfang^{1,2}, CHEN Qibin^{1*}, YANG Peiwen^{2*}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, Yunnan, China

2 Agricultural Environment and Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

3 School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

Abstract: [Objective] *Bacillus velezensis* SH-1471 (CCTCC No. M 2022923, Patent No. ZL 2022 1 1479280.X) is a strain that can control soil-borne diseases of crops and promote soil nutrient conversion and crop growth. This study aims to explore its potential biological activity and the optimum fermentation conditions, so as to promote the industrialization and commercial development of this strain. [Methods] A strain SH-1471 was identified based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and the 16S rRNA gene and *gyrB*-based phylogenetic trees. PCR was carried out to detect antibiotic synthesis genes in the strain. The inhibitory spectrum of the strain was measured by the plate confrontation assay and the fermentation liquid inhibition test. The abilities of the strain to produce enzymes, solubilize phosphorus and potassium, fix nitrogen, and secrete siderophores *in vitro* were measured. The fermentation conditions were optimized by single factor tests and response surface methodology with OD_{600} value and inhibition rate as indicators. The growth-promoting effect of the fermentation liquid on tomato plants and the control effect of the fermentation liquid on tomato *Fusarium* wilt before and after optimization were determined by indoor pot experiments. [Results] Strain SH-1471 was identified as *B. velezensis*, carrying the antibiotic

synthesis genes *srfA*, *fenB*, *ituA*, *ituD*, and *bymA*. It had strong antagonistic effects on 8 pathogenic microorganisms such as *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, and *Exserohilum turcicum*. Moreover, the strain was capable of producing protease and cellulase, solubilizing phosphorus, fixing nitrogen, and secreting siderophores. The optimal medium formula for the fermentation of SH-1471 was composed of 17.92 g/L sucrose, 16.95 g/L soybean powder, 2.88 g/L magnesium sulfate, and 5.0 g/L yeast extract. The optimum fermentation conditions were pH 7.5, 33 °C, 220 r/min, and 20–24 h. After optimization, the inhibition rate, OD_{600} , and potted control efficiency of the fermentation liquid reached 94.08% (increasing by 15.6%), 3.28 (increasing by 36.7%), and 93.8%, respectively. Moreover, strain SH-1471 significantly improved plant height, stem circumference, root length, root weight, and fresh weight and dry weight of the aboveground part of tomato seedlings. **[Conclusion]** *B. velezensis* SH-1471 carries rich genes for antibiotic synthesis, has the abilities of producing protease and cellulase, solubilizing phosphorus, fixing nitrogen, and secreting siderophores, and demonstrates strong inhibitory effects on a variety of pathogens. It can significantly reduce the incidence of tomato *Fusarium* wilt and improve the agronomic traits of tomato seedlings. Therefore, the strain has broad application prospects in the biocontrol of plant diseases and the promotion of plant growth.

Keywords: *Bacillus velezensis*; single factor experimental design; response surface optimization; bioactivity

近年来贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 在农业病虫害防控方面受到广大学者的关注, 但部分研究主要以不同菌株资源的分离鉴定以及抑菌活性分析为目的, 缺乏对菌株系统的研究, 总体呈现优良的菌株资源匮乏, 且菌株的发展前景受功能单一、活性较低以及定殖能力偏弱等条件的限制^[1]。此外, 微生物制剂对病害的防治效果受活菌数和抑菌活性物质含量的影响, 而各异的生理特性和生境条件偏好性往往决定菌株的最适生长条件不同^[2-3]。因此, 靶向已有高活性菌株, 多方位挖掘其生物活性, 并探究其最适生长条件, 不仅可为植物病害的生物防控提供优良的菌株资源, 而且可促进菌株的规模化和商业化应用。

贝莱斯芽孢杆菌是革兰氏阳性好氧细菌, 菌体呈杆状, 能形成芽孢, 广泛分布于自然界的水体、土壤、空气、植物根系、植株表面和动物肠道等^[4]。近年来, 国内外有关贝莱斯芽

孢杆菌的报道越来越多, 研究主要集中在促进植物生长、拮抗病原菌、诱导植物强化细胞壁、积累防御酶和产生抗菌物质等防御反应等方面^[5]。研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌对番茄早疫病病原菌(*Alternaria solani*)和马铃薯疮痂病原菌(*Streptomyces galilaeus*)具有良好的拮抗活性^[6]。菌株 JS25R 可产生挥发性物质(如禾烷酮、2-壬酮和 2-壬醇等)抑制谷镰刀菌的菌体生长和孢子萌发, 从而降低小麦赤霉病的发病率^[7]。菌株 YB15 可通过分泌 β -葡聚糖酶等抑菌活性物质, 从而对病原真菌起到拮抗作用^[8]。综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌在防治植物病害方面具有极大的潜力, 但部分菌株功能单一, 同时也缺乏对菌株多样化的功能的进行开发利用。此外, 菌株的抑菌活性通常与菌株生物量、活性物质产量以及菌株定殖能力的强弱相关^[9]。发酵条件优化旨在营造一个菌株生长的适宜环境, 促进菌株生长, 提高菌株发酵液抑菌活性物质

的含量,从而提高菌株的防治效果^[10]。不同菌株具有不同的生理特性和生境条件偏好性,最适发酵温度、发酵时间、转速以及碳源、氮源和无机盐均有差异,如解淀粉芽孢杆菌 L009 在温度 28 °C 时,发酵 72 h 发酵液含菌量最大^[11]。解淀粉芽孢杆菌 GM-1-2 的最适发酵温度为 28 °C,且发酵时间仅为 30 h^[12]。暹罗芽孢杆菌的最适碳源为乳糖,最适氮源为酵母提取物^[13],而贝莱斯芽孢杆菌 HC-01 的最适碳源为麦芽糖,最适氮源为蛋白胨^[14]。因此,针对不同菌株探索其适宜发酵条件,是将功能菌株应用到生产、充分发挥其生防功能的关键步骤。

优良的菌种资源匮乏是制约植物病害生物防控的发展限制性因素之一,加强优良菌株的筛选和改良及以现有菌株为靶标,深入挖掘和评价菌株多样化的生物活性,优化其生产工艺是打破该壁垒的有效措施^[4]。本研究以现有高活性贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 为研究对象,该菌分离自健康烟草根际土壤,本身具有极强的定殖能力,基于 PCR 技术检测菌株抗生素合成基因类别,并利用平板对峙法以及底物降解法等活性筛选模型,挖掘菌株对病原微生物的生防活性,溶磷、解钾和固氮等促生长活性以及产铁载体、蛋白酶和纤维素酶等活性,并进一步对其最适发酵条件进行优化,旨在为农用微生物制剂的发展提供高效且功能多样化的菌株资源,且为该菌株的开发以及推广利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

功能菌株 SH-1471 由云南省农业科学院农业环境资源研究所于健康烟草根际土壤分离与保存,并于 2022 年 6 月 20 日保藏于中国典型培养物保藏中心(保藏编号: CCTCC No. M 2022923)。

1.1.2 指示病原物

文中涉及的指示病原物番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、草果茎点霉属叶斑病菌(*Phoma matteucicola*)、草果枝枯病菌(*Diaporthe eres*)、烟草炭疽病菌(*Colletotrichum nicotianae*)、烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*)和油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)由云南省农业科学院农业环境资源研究所分离、鉴定与保存。

1.1.3 培养基

功能筛选培养基:解无机磷选择培养基,解钾选择培养基,固氮选择培养基,营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基,营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基,马铃薯葡萄糖水培养基(potato dextrose broth, PDB),马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基,脱脂牛奶培养基,纤维素培养基,果胶培养基,铬天青(chrome azurol sulphate, CAS)琼脂双层培养基^[15]。

优化初始培养基:培养基 A (g/L):葡萄糖 5.00,鱼粉 10.00,氯化钠 5.00、酵母膏 5.00。酵母蛋白胨蔗糖培养基(yeast sucrose peptone medium, YSP) (g/L):蛋白胨 10.00,酵母浸粉 5.00,蔗糖 20.00。培养基 D (g/L):玉米淀粉 3.00,硫酸铵 10.00,磷酸二氢钾 15.00,蔗糖 10.00。牛肉膏酵母葡萄糖培养基(nutrient yeast beef paste dextrose medium, NYBD) (g/L):牛肉膏 8.00,酵母浸粉 5.00,葡萄糖 10.00。营养琼脂培养基(NA) (g/L):牛肉膏 3.00,蛋白胨 10.00,氯化钠 5.00。细菌基础培养基(LB) (g/L):蛋白胨 10.00,酵母浸粉 5.00,氯化钠 10.00。121 °C 灭菌 30 min。

1.2 菌株 SH-1471 抗生素合成基因检测及功能检测

抗生素合成基因 PCR 检测,参照濮永瑜等^[16]的试验方法进行。抑菌广谱性测定:(1) 平板对

峙试验：以上述 10 种病原真菌为指示病原物，在 PDA 培养基中心接种 5 mm 的病原菌菌饼，十字交叉在距离其 25 mm 处接种菌株，3 个重复。

(2) 发酵液抑菌试验：将菌株 SH-1471 接种于 NB 培养基，30 °C、180 r/min 培养 24 h，4 °C、8 000 r/min 冷冻离心 5 min，使用 0.22 μL 无菌滤膜滤除菌体，得无菌发酵液，将其与 PDA 以 1:4 的比例混合均匀，制成带毒平板后取 5 mm 的病原菌菌饼接种于平板中央，3 个重复。以未接菌株 SH-1471 为对照，置于 25–28 °C 的恒温培养箱黑暗条件培养 5–7 d，记录并计算抑制率。

抑制率(%)=[对照组菌落直径(cm)–处理组菌落直径(cm)/对照组菌落直径(cm)–0.5]×100。

功能测定：将菌株分别点接到脱脂牛奶培养基、纤维素培养基、果胶培养基、解钾选择培养基和固氮选择培养基上，37 °C 培养 48 h，若有透明圈生成则具有相应活性，使用 CAS 双层平板检测菌株产铁载体能力^[17]。

1.3 不同培养基种类对细菌生长的影响

种子液制备：挑取斜面保存的菌株 SH-1471 菌落接种于 100 mL NB 液体培养基中，于 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后备用。

分别制备培养基 A、培养基 D、YSP、NYBD、NB 和 LB 液体培养基各 100 mL，以 1% 的接种量接种 SH-1471 种子液，于 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h，3 个重复，测量菌株发酵液的 OD_{600} 值。将菌株发酵液 8 000 r/min 离心 2 min，并使用 0.22 μm 的无菌滤膜滤除菌体，采用发酵液抑菌试验，验证菌株发酵液对番茄枯萎病菌的抑制效果，结合菌株发酵液 OD_{600} 值与发酵液对病原菌的抑制率筛选出最适培养基种类。

1.4 不同碳源、氮源和无机盐对细菌生长的影响

以 1.2.2 筛选出的最佳发酵培养基靶标，设

置单因素试验，分别加入碳源：麦芽糖(maltose)、乳糖(lactose)、葡萄糖(glucose)、蔗糖(saccharose)和淀粉(starch)；氮源：氯化铵(NH_4Cl)、酵母浸粉(yeast extract)、硝酸铵(NH_4NO_3)、甘氨酸(glycine)、蛋白胨(peptone)、硝酸钠($NaNO_3$)和豆粉(bean flour)；无机盐：碳酸钾(K_2CO_3)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、碳酸钙($CaCO_3$)、氯化钠($NaCl$)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)和硫酸镁($MgSO_4$)。于 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后，测量菌株发酵液 OD_{600} 值和发酵液抑制率(同 1.2.2)，以确定最佳碳源。

1.5 不同 pH、温度和转速对细菌生长的影响

分别配制上述优化的培养基 100 mL，以 pH：4.5、5.5、6.5、7.5 和 8.5，温度：21、24、27、30、33、36 和 39 °C，转速：140、160、180、200 和 220 r/min 为指标，设置单因素试验，以 1% 的接种量接种 SH-1471 种子液，振荡培养 24 h 后，测定不同培养条件下细菌生长情况 (OD_{600})，以及发酵液对番茄枯萎病菌的抑制率(同 1.2.2)，以确定最佳初始 pH、温度和转速。

1.6 响应面优化实验设计

基于上述试验所得的最适配方条件，以菌株发酵液 OD_{600} 为指标，选取蔗糖浓度(5、10、15、20 和 25 g/L)、豆粉浓度(5、10、15、20 和 25 g/L)和 $MgSO_4$ 浓度(0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 g/L)进行优化，使用 Design-Expert 13 软件进行试验设计与分析，以进一步得到适合菌株 SH-1471 的最适发酵条件。

1.7 拮抗菌株最适发酵时间优化

基于单因素试验和响应面优化结果，以菌株发酵液的 OD_{600} 值为指标，测定不同发酵时间对菌株发酵液生物量的影响，在 0–24 h 内每隔 2 h 测量一次，24 h 后每隔 12 h 测量一次，直至 120 h，并根据测定结果绘制菌株生长曲线。

1.8 拮抗菌株发酵液对番茄枯萎病的防控效果以及对番茄幼苗的促生效果测定

病原菌经 PDB 培养基 28 °C、180 r/min 培养 5–7 d 后, 稀释成 1.5×10^7 CFU/mL 孢子悬浮液; 将菌株 SH-1471 用优化后的培养条件和优化前的培养条件, 分别培养 20–24 h, 稀释成 2×10^8 CFU/mL 菌悬液。采用灌根法接种菌液, 用玻璃棒在番茄苗根茎约 3 cm 处扎孔, 深约 5 cm, 每株 100 mL 病原菌悬液, 待病原菌定殖 3 d 后接入等量的功能菌株菌悬液, 每个处理 10 株, 3 个重复。以 CK1 (灭菌培养基) 与 CK2 (病原菌+灭菌培养基) 为对照, 30 d 后观察并记录发病情况, 同时测量番茄植株株高、茎围、根长、根重和地上部鲜重和地上部干重。

将盆栽在恒温条件下培养 30 d, 观察并记录植株生长和发病情况。各处理发病情况按照番茄枯萎病病情分级标准^[18], 0: 无症状; 1: 1 片或 2 片叶子变黄; 2: 3 片或者 4 片真叶变黄叶片萎蔫下垂; 3: 5 片或 6 片真叶变黄或真叶萎蔫下垂; 4: 全株严重萎蔫以致枯死。

病情指数=(各级病株数×该病级值)/(总株数×最高级值)×100

防效=(对照组病情指数–处理组病情指数)/对照组病情指数×100

1.9 菌株 SH-1471 形态学、生理生化测定及分子生物学鉴定

参照《伯杰氏系统分类手册》^[19]和《常见细菌系统鉴定手册》^[20]中的方法对菌株 SH-1471 进行形态学鉴定和生理生化特性检测。

将菌株 SH-1471 接种至 NB 培养基中, 33 °C、220 r/min 振荡培养, 当菌株处于对数生长期时结束培养。采用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 试剂盒提取菌株 SH-1471 的基因组 DNA, 采用

16S rRNA 基因序列 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')、1492R (5'-TACGGYTACCTT GTTACGACTT-3')和 *gyrB* 基因序列 *gyrB*BF2 (5'-GGGGTCTACTGCTTCACCAA-3')、*gyrB*BR2 (5'-TTGTCCGGGTTGTACTCGTC-3')对菌株 SH-1471 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 细菌 DNA 模板 2 μL, 2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 60 s, 53 °C 60 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 委托北京擎科生物科技有限公司测序。测序结果经 BLAST 搜索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)后与 GenBank 数据库中相关种属的基因序列进行比较分析, 选用同源性较高的模式菌株序列作为参比对象, 用 ClustalX 1.8 软件进行多序列比对, 计算供试菌株与参比菌株序列的相似性。系统发育分析时排除碱基缺失位点, 采用邻接法(neighbor-joining analysis)用 MEGA 7.0 构建供试菌株与参比菌株之间的系统发育树。其中, bootstrap 值设定为 1 000, 其余均为默认值。

1.10 数据处理

数据采用单因素方差分析, 应用 Duncan's 新复极差法检验处理间差异显著性。选择 Excel 和 SPSS Statistics 20.0 软件进行数据统计分析以及正交试验设计, 并采用软件 Origin 2021 和软件 GraphPad Prism 8 制图。

2 结果与分析

2.1 菌株 SH-1471 抗生素合成基因检测及其功能检测结果

对菌株进行 PCR 检测结果表明(图 1), 菌株 SH-1471 具有产 *srfA* (1 300 bp)、*fenB* (1 600 bp)、*ituA* (1 047 bp)、*ituD* (647 bp)和 *bymA* 等抗生素

合成基因，平板对峙试验以及发酵液抑菌试验结果表明，菌株 SH-1471 对番茄枯萎病菌、烟草赤星病菌和玉米大斑病菌等 8 种病原微生物具有良好的抑制效果(图 2)，且对番茄枯萎病菌的抑制率最高，为 96.59%。功能筛选结果可知，

菌株 SH-1471 还具有产蛋白酶、纤维素酶、解磷、固氮和分泌铁载体的能力(图 3)。综上所述，该菌株不仅在作物病害生物防治方面具有极大的应用前景，在促进作物生长提供土壤肥力等方面均具有广阔的应用前景。

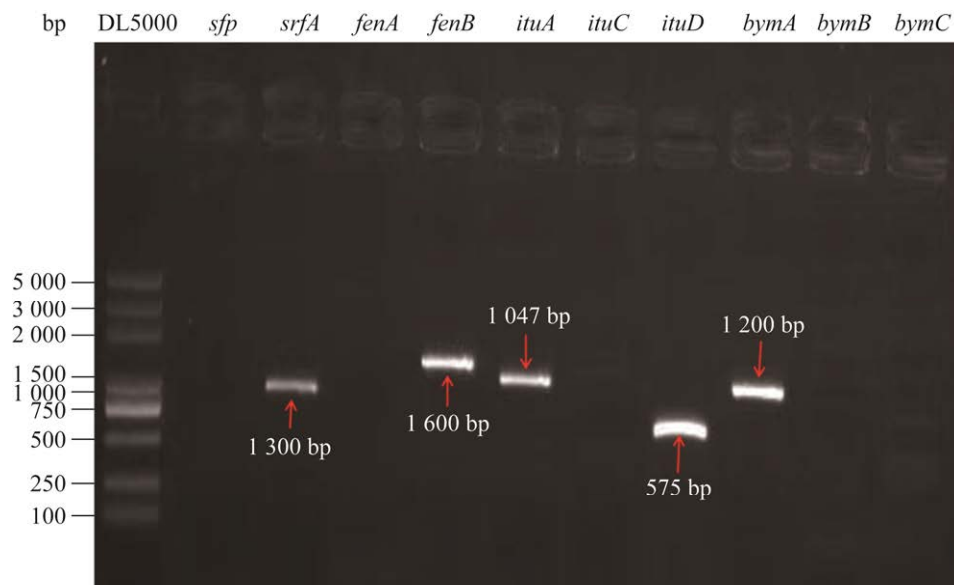


图 1 菌株 SH-1471 抗生素合成基因 PCR 电泳产物

Figure 1 PCR electrophoresis products of antibiotic synthesis gene of strain SH-1471.

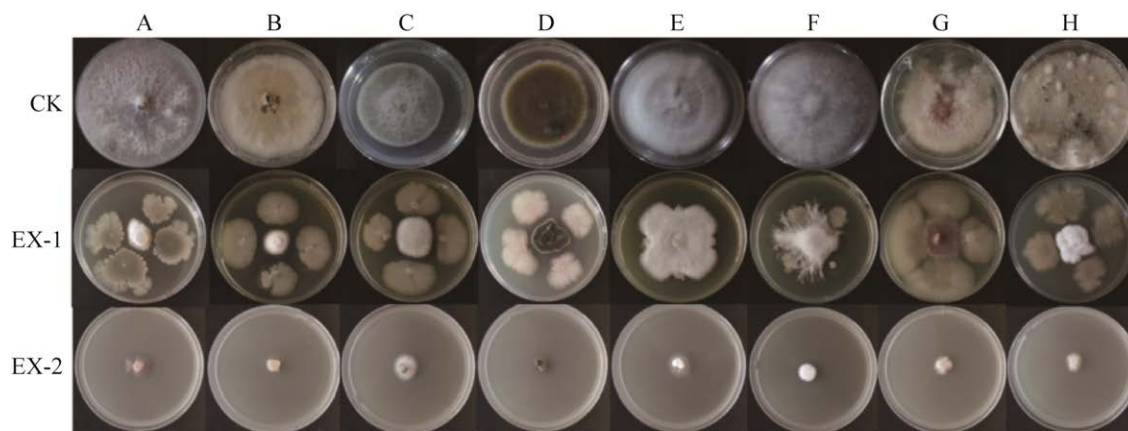


图 2 菌株 SH-1471 抑菌广谱性测定

Figure 2 Broad-spectrum determination of antimicrobial activity of strain SH-1471. A: *Fusarium oxysporum*. B: *Phoma mattheuicicola*. C: *Exserohilum turcicum*. D: *Alternaria alternate*. E: *Colletotrichum micotianae*. F: *Diaporthe eres*. G: *Phytophthora parasitica*. H: *Sclerotinia sclerotiorum*. EX-1: Flat plate confrontation test; EX-2: Bacteriostatic test of fermentation solution.

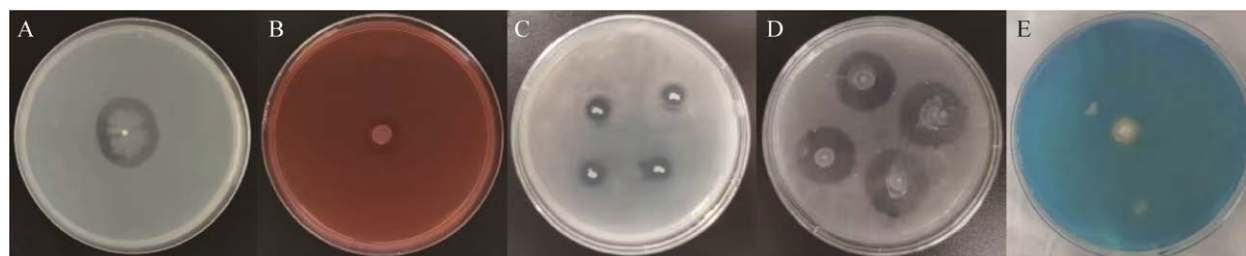


图3 菌株 SH-1471 功能测定结果

Figure 3 Results of functional determination of strain SH-1471. A: Protease. B: Cellulase. C: Dissolved inorganic phosphorus. D: Nitrogen fixation. E: Excreting siderophore.

2.2 菌株 SH-1471 生长及抑制活性发酵条件优化

2.2.1 不同种类培养基对菌株 SH-1471 生长及抑菌活性的影响

七种培养基对菌株 SH-1471 的生长的影响具有显著差异(图 4A), 培养 24 h 后, SH-1471 在培养基 A、LB、NYBD、YSP 和 NA 中的 OD_{600} 值分别为 2.56、2.45、2.43、2.41 和 2.31, 其中培养基 A 的 OD_{600} 值显著高于其他配方; 而培养基 D 和培养基 YPG 对菌株的生长促进作用最差, OD_{600} 分别为 1.46 和 1.98。且培养基 A 条件下, 对病原物的抑制率最高, 达 82.4%, 故选择培养基 A 作为菌株 SH-1471 的基础培养基。

2.2.2 不同碳源、氮源和无机盐对菌株 SH-1471 生长及抑制活性的影响

由图 4B 可知, 当添加蔗糖和葡萄糖为碳源时, 菌株发酵液的 OD_{600} 值最高, 分别为 2.62 和 2.44, 以麦芽糖为碳源时, OD_{600} 仅为 1.32; 此外, 以蔗糖为碳源时, 菌株发酵液对番茄枯萎病菌的抑制率最高, 达 84.6%, 综合发酵液 OD_{600} 值与发酵液抑菌活性, 以蔗糖作为菌株 SH-1471 的最佳碳源。对不同氮源筛选结果如图 4C 所示, 当以豆粉为氮源时, 菌株 OD_{600} 最高, 达 2.65, 其次为酵母浸粉, 为 2.49, 而氯化铵最低, 仅为 0.76, 而以豆粉作为氮源时, 菌株发酵液对病原物的抑制率为 84.9%。综合

考虑, 以豆粉作为菌株 SH-1471 的最佳氮源。如图 4D 所示, 当以硫酸镁和磷酸氢二钾作为无机盐源时, 菌株发酵液 OD_{600} 值和抑制率均强于其他无机盐源; 当以硫酸镁作为无机盐时, 菌株发酵液 OD_{600} 值为 2.61, 抑制率为 85.2%; 以磷酸氢二钾为无机盐时, 菌株发酵液 OD_{600} 值为 2.45, 抑制率为 81.2%; 而以碳酸钾为无机盐时, 菌株发酵液 OD_{600} 值最低为 1.54, 抑菌率为 73.6%。综上所述, 以硫酸镁作为菌株 SH-1471 的发酵培养基的最佳无机盐。

2.3 不同 pH、温度和转速对菌株 SH-1471 生长及抑菌活性的影响

由图 5A 所示, 当 pH 为 4.5 和 8.5 时, 发酵液浓度显著低于其他浓度梯度, OD_{600} 值仅为 2.11 和 2.22, 表明 pH 值过高与过低均会抑制菌株的生长。pH 值为 7.5 时, 发酵液 OD_{600} 值最高为 2.65、发酵液对病原物的抑菌率最高为 88.6%。综上所述, 菌株 SH-1471 的最适 pH 值 7.5。由图 5B 可知, 当温度为 33 °C 时, 菌株发酵液 OD_{600} 值最高为 2.67, 抑菌率为 86.5%。因此, 确定菌株的最适发酵温度为 33 °C。由图 5C 可知, 不同转速对菌株发酵液 OD_{600} 值和抑菌率具有不同的影响, 当转速为 220 r/min 和 200 r/min 时发酵液 OD_{600} 值相似, 但转速为 220 r/min 时, 抑菌率较大, 故以此为菌株发酵的最适转速。

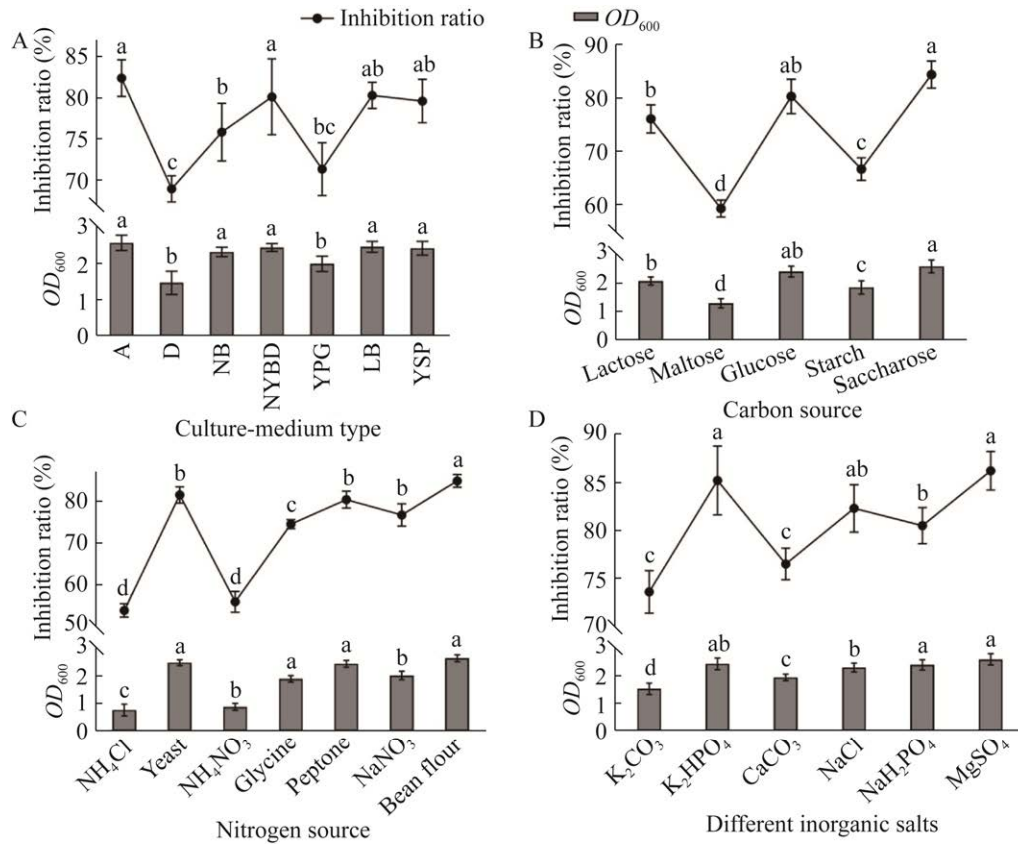


图 4 不同培养基(A)、碳源(B)、氮源(C)和无机盐(D)种类对菌株 SH-1471 生长及抑菌活性的影响
 Figure 4 Effects of different medium (A), carbon source (B), nitrogen source (C), and inorganic salt (D) types on the growth and antibacterial activity of SH-1471 strain. The data in the figure are mean±standard error. Univariate analysis of variance was used and Duncan's new complex range method was used to test the differences. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the 0.05 level.

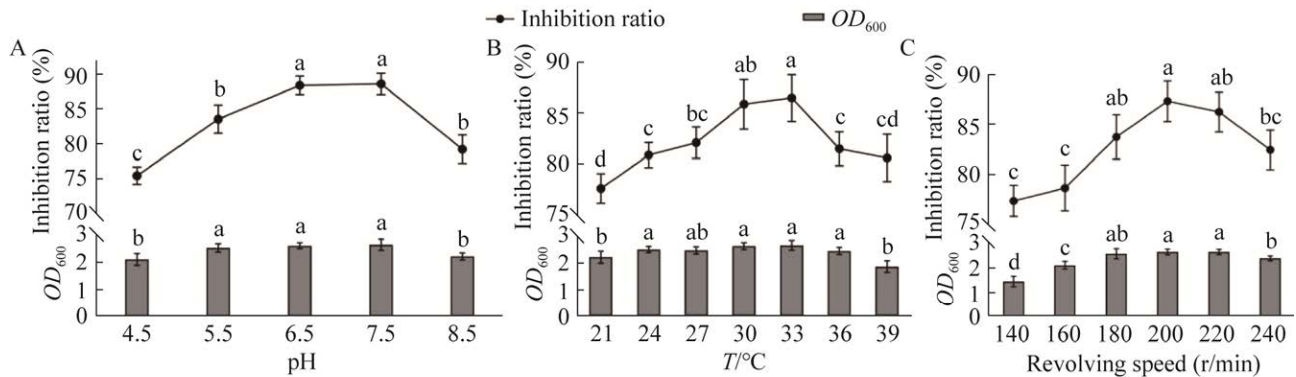


图 5 不同 pH (A)、温度(B)和转速(C)对菌株 SH-1471 生长及发酵液抑菌活性的影响
 Figure 5 Effects of different pH (A), temperature (B), and rotation speeds (C) on the growth of strain SH-1471 and the antibacterial activity of fermentation broth. Univariate analysis of variance was used and Duncan's new complex range method was used to test the differences. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments at the 0.05 level.

2.4 菌株 SH-1471 发酵条件响应面实验结果

基于上述配方优化结果, 选取蔗糖浓度 5–25 g/L、豆粉浓度 5–25 g/L 和 MgSO_4 浓度 0.5–2.5 g/L 3 个影响因素, 采用 Design-Expert 13 进行响应面优化试验设计, 进行方差分析导出结果(表 1), 得到菌株发酵液 $OD_{600}=3.02+0.10A+0.097B+0.05C-0.051AB-0.054AC+6.500E-003BC-0.13A^2-0.14B^2-0.093C^2$ 的回归方程。从表可以看出, F 值为 0.026 4, $P<0.05$, 达到极显著水平, 失拟项差异不显著, 相关系数为 0.965 4, 说明实测值与预测值具有较好的拟合度, 试验误差较小。 CV 值为 3.47%, 该模型 R^2 Adj 相关系数为 0.921 0, 响应面变化可由该模型解释, 且与实际情况拟合较好, 可用于试验分析预测。 A 、 B 、 AC 、 BC 、 A^2 和 B^2 均为差异极显著($P<0.05$), 其余项差异不显著。根据 F 值大小, 可以得出试验各因素对菌株 OD_{600} 值影响的顺序为: 蔗糖>豆粉> MgSO_4 。运用 Design-Expert 13 软件分析得知菌株的最适条件为: 蔗糖浓度为 17.92 g/L、豆粉浓度为 16.95 g/L、 MgSO_4 浓度

为 2.88 g/L, 预测值为 3.06, 在该条件下进行 3 次平行试验, 试验结果分别为 3.17、3.12 和 3.21, 平均值为 3.17, 与预测值相近, 表明优化结果可靠(图 6)。

2.5 菌株 SH-1471 最适发酵时间优化

基于单因素试验结果和响应面优化结果, 利用所得的最佳发酵配方及发酵条件进行菌株最适发酵时间优化, 结果如图 7 所示, 菌株 SH-1471 发酵液 OD_{600} 值总体呈“S”型变化, 0–8 h 时, 发酵液 OD_{600} 值无显著变化, 为菌株生长迟缓期, 22 h 时菌株发酵液 OD_{600} 值最大, 为 3.37。因此, 8–22 h 为菌株的对数生长期, 此时菌株生长最快。22–120 h 菌株生长缓慢, 趋于平稳期。120 h 之后, 呈下降趋势, 为生长的衰亡期。

2.6 菌株 SH-1471 发酵条件优化前后对比试验结果

基于单因素试验结果和响应面优化结果, 利用所得的最佳发酵配方及发酵条件进行连续 3 批发酵实验对比, 结果如图 8 所示, 优化后

表 1 回归模型的方差分析

Table 1 Analysis of variance for regression model

Source of variation	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	0.41	9	0.046	4.73	0.026 4
A: Saccharose	0.082	1	0.082	8.43	0.022 9
B: Bean flour	0.075	1	0.075	7.65	0.027 8
C: MgSO_4	0.020	1	0.020	2.03	0.197 3
AB	0.010	1	0.010	1.06	0.033 9
AC	0.012	1	0.012	1.20	0.031 0
BC	1.690E–004	1	1.690E–004	0.017	0.899 0
A^2	0.072	1	0.072	7.36	0.030 0
B^2	0.086	1	0.086	8.78	0.021 0
C^2	0.037	1	0.037	3.76	0.093 6
Residual	0.068	7	9.758E–003		
Lack of fit	0.021	3	7.138E–003	0.61	0.643 7
Pure error	0.047	4	0.012		
Cor total	0.48	16			

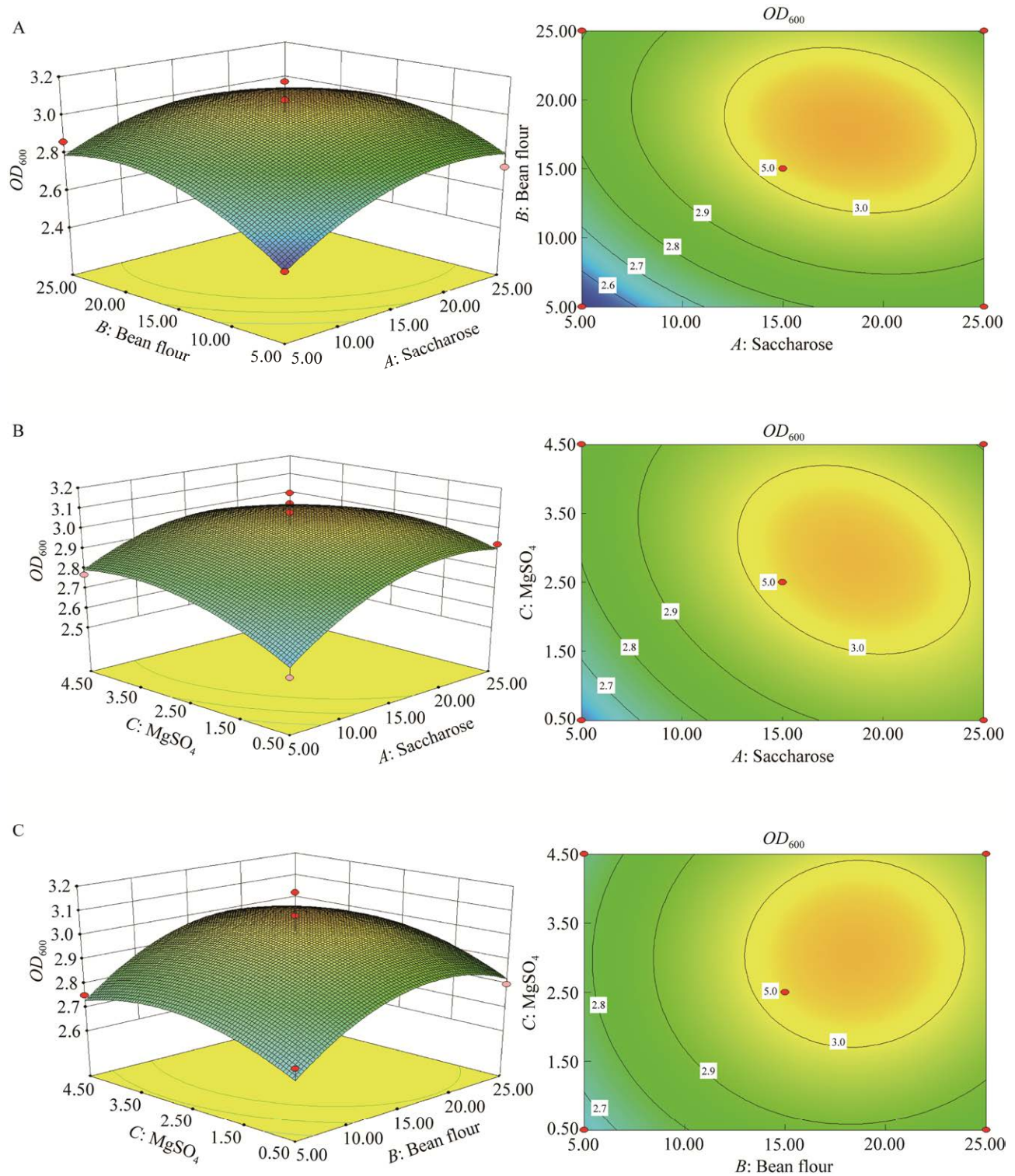


图 6 AB、AC、BC 因素之间对溶磷量影响的响应图和等高线图

Figure 6 Response diagram and contour diagram of the influence of AB, AC, BC factors on phosphorus solubility. A: Sucrose concentration. B: Concentration of bean flour. C: $MgSO_4$ concentration.

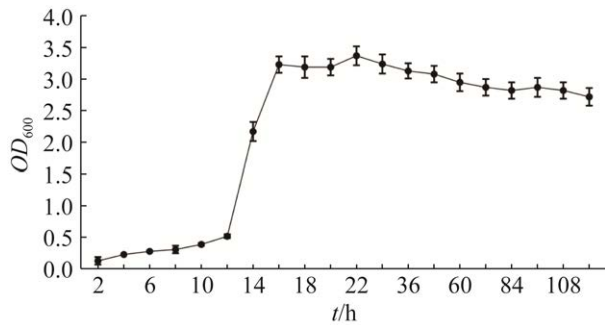


图 7 菌株 SH-1471 生长曲线

Figure 7 Growth curve of SH-1471 strain. The data in the figure are mean±standard error.

菌株发酵液的 OD_{600} 达到 3.28, 相比于优化前提升 36.7%; 优化后对病原物的抑菌率达到 94.08%, 相比于优化前提升 15.6%。综上所述, 发酵优化试验结果可靠, 对菌株的生长量及其对病原物的抑制率均具有较强的提高效果。

2.7 优化前后菌株 SH-1471 发酵液对番茄枯萎病菌的抑制效果及防控效果测定

基于上述优化结果进行室内盆栽试验, 30 d 后测定各处理下的病情指数、发病率以及番茄幼苗的农艺性状。结果如表 2 和图 9 所示, 番茄幼苗经过接种处理 30 d, 无论优化前或优化后, 菌株均能有效抑制番茄枯萎病的发生, 只接病原菌(CK1)的对照处理发病较为严重, 病

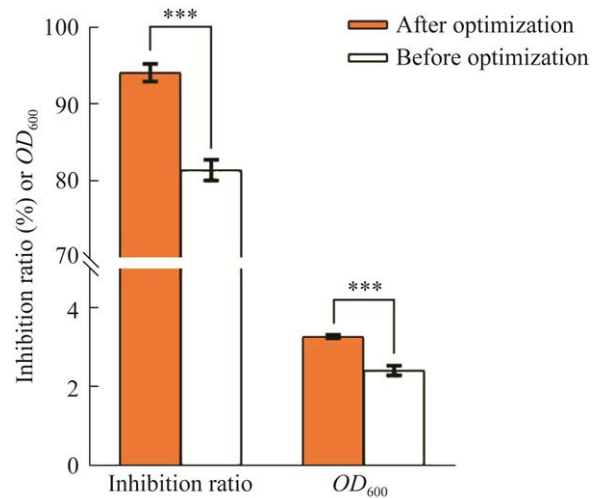


图 8 基于单因素优化和响应面优化前后菌株抑菌率及发酵液 OD_{600} 变化

Figure 8 Changes in inhibition ratio and OD_{600} of strains before and after optimization based on single factor and response surface optimization. The data in the figure are mean±standard error. Univariate analysis of variance was used and Duncan's new complex range method was used to test the differences. ***: $P < 0.001$.

情指数高达 79.8。菌株 SH-1471 优化前的发酵液处理的番茄幼苗病情指数为 4.6, 防治效果为 85.9%; 优化后的发酵液处理的番茄幼苗病情指数为 2.2, 防治效果为 93.8%; 此外, 菌株

表 2 菌株 SH-1471 发酵稀释液对番茄幼苗生长的影响和番茄枯萎病的防治效果

Table 2 Effect of fermentation diluent of strain SH-1471 on tomato growth and control effect of tomato *Fusarium* wilt

Treatment	Height (cm)	Stem thick (cm)	Root length (cm)	Root weight (g)	Fresh weight of above-ground part (g)	Dry weight of above-ground part (g)	Disease index	Control effect (%)
After optimization	62.90±1.82a	2.50±0.10a	19.70±1.15a	0.84±0.19a	15.10±1.15a	3.15±0.52a	2.2±0.05a	93.8±0.18b
Before optimization	58.61±2.05a	1.83±0.22b	17.65±1.22a	0.69±0.16a	11.10±1.34b	2.75±0.83ab	4.6±0.06b	85.9±0.03a
CK1	38.77±1.99b	1.77±0.16b	12.85±0.53b	0.53±0.04b	8.49±2.11b	2.14±0.28b	10.6±1.65c	—
CK2	28.35±2.21b	1.39±0.11c	8.99±0.26b	0.25±0.05c	6.21±0.29c	1.31±0.26c	38.3±1.58d	—

CK1: Sterilized culture-medium; CK2: Pathogen+Sterilized culture-medium. —: There is no control effect. The data in the table are mean±standard deviation. Different letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's new complex range test before and after fermentation condition optimization.



图9 菌株 SH-1471 对番茄枯萎病盆栽防治效果(30 d)

Figure 9 Effect of functional bacteria SH-1471 on pot control of tomato *Fusarium* wilt (30 d). A: Control effect of optimized strain fermentation broth on tomato *Fusarium* wilt. B: Control effect of pre-strain fermentation broth on tomato *Fusarium* wilt was optimized. C: Sterilized culture-medium. D: Pathogen+Sterilized culture-medium.

SH-1471 对番茄幼苗的生长还具有一定的促生长作用，与对照相比，经菌株发酵液处理后，番茄幼苗的株高、茎围、根长、根重、地上部位鲜重和干重等农艺性状均得以显著提高。

2.8 菌株 SH-1471 形态学、生理生化测定及分子生物学鉴定结果

菌株 SH-1471 孢子呈杆状，菌落中心呈乳白色，不产色素，菌落形状不规则，边缘呈放射状，菌落表面粘稠，略微凸起(图 10)。生理生化鉴定结果表明，菌株革兰氏染色均为阳性，好氧生长，能产生芽孢，接触酶、硝酸还原反应、精氨酸双水解、V-P 试验均为阳性，可分解淀粉、使明胶水化、可利用葡萄糖和甘露醇，不可利用柠檬酸盐，最低生长温度为 3 °C，生长含盐量范围 0%–9%，不具有产 H₂S 和分泌吡啶的活性。

基于 16S rRNA 基因扩增，将菌株序列在

NCBI 上注册，菌株序列登录号为 ON417363，经 NCBI BLAST 比对分析发现 SH-1471 分别与 *Bacillus velesiensis* CR-502 (GenBank 登录号: AY603658)和 *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (GenBank 登录号: AJVF01000043)的同源性分别为 99.8%和 99.3%，利用邻接法(neighbour-joining)构建系统发育树,结果表明,SH-1471 与 *Bacillus velesiensis* CR-502 在同一分支上(图 11A)。基于 *gyrB* 基因扩增结果，经 NCBI BLAST 比对分析发现 SH-1471 分别与 *Bacillus velezensis* KACC 13105 (GenBank 登录号: JTKJ020000141)和 *Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7 (GenBank 登录号: ATCC 23350)同源性最高，分别为 100%和 99.2%，且与菌株 *Bacillus velezensis* KACC 13105 位于系统发育树的同一分支(图 11B)，结合形态学鉴定结果以及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因检测结果，最后将菌株 SH-1471 鉴定为贝莱斯

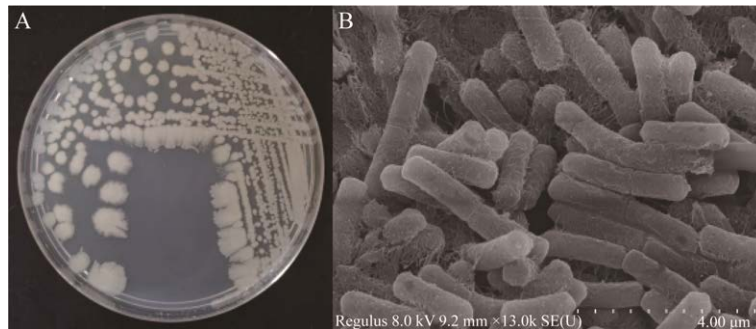


图 10 菌株 SH-1471 菌落形态(A)和扫描电镜图(B)

Figure 10 Colony morphology (A) and scanning electron microscopy (B).

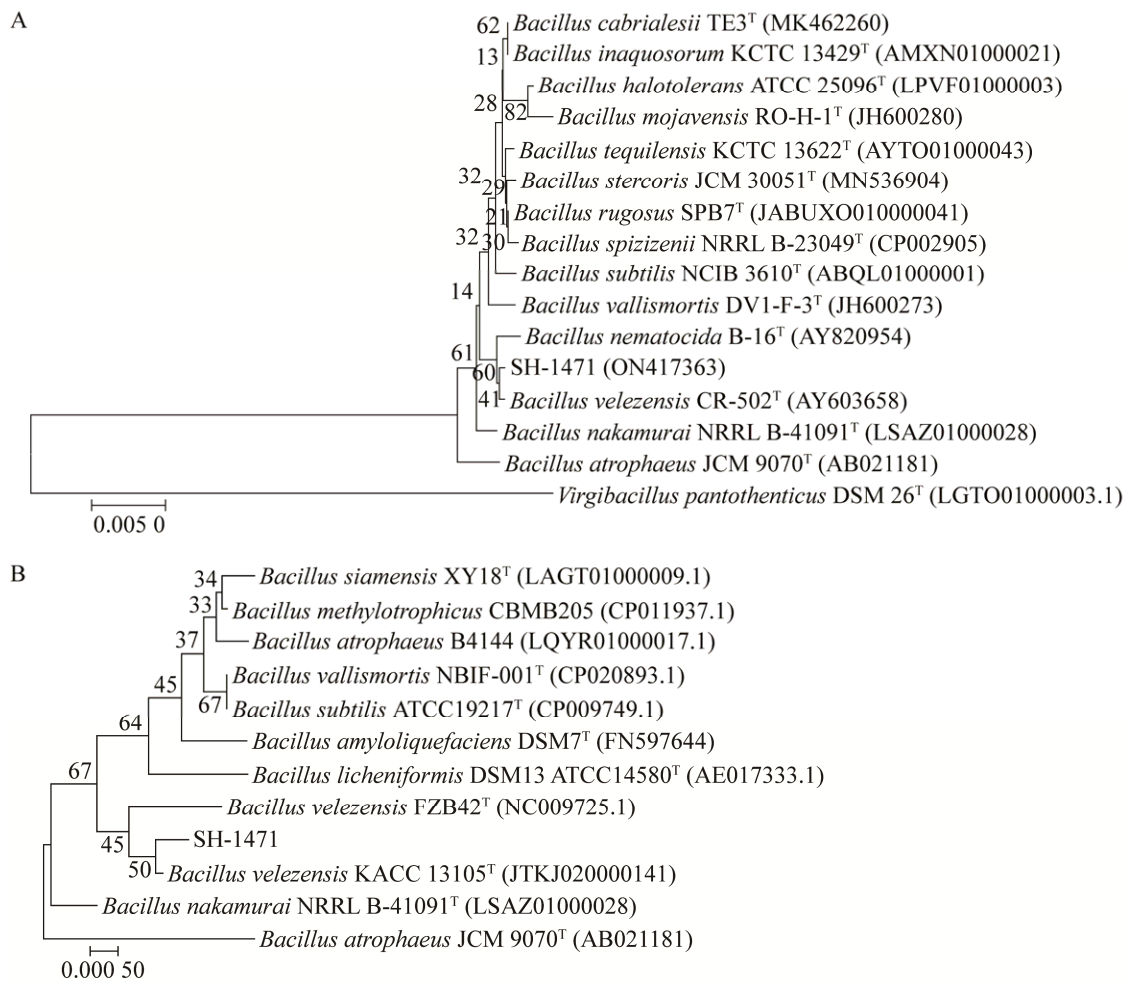


图 11 菌株 SH-1471 基于 16S rRNA 基因(A)和 *gyrB* 基因(B)的系统发育树

Figure 11 Phylogenetic tree of strain SH-1471 based on gene 16S rRNA gene (A) and *gyrB* gene (B). The serial number in parentheses is the GenBank entry number of the strain; The superscript "T" indicates the type strain; The branch number indicates the bootstrap support rate; The length indicated by the scale is 0.005 0 nucleotide substitution rate.

芽孢杆菌(并保藏于中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏编号: CCTCC No. M 2022923)。

3 讨论与结论

近年来, 贝莱斯芽孢杆菌在农业上的应用越发广泛。在已有的研究中, 具有拮抗作用的贝莱斯芽孢杆菌常从水体、土壤、空气、植物根系、植株表面和动物肠道中分离得到^[1]。本文的研究对象贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471, 分离自健康烟草根际土壤, 本身对自然环境具有良好的适应性, 前人研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌可通过聚酮合酶合成途径、核糖体途径和非核糖体途径合成脂肽类化合物、聚酮类化合物、细菌素和抑菌蛋白等活性物质抑制病原物生长^[21-23]。冯江鹏等^[24]研究的贝莱斯芽孢杆菌 JK3 菌株基因组中含有 *srfAA*、*bymB*、*fenD*、*bacA* 和 *ituC* 等脂肽类抗菌物质生物合成相关基因。与之类似, 本研究 PCR 结果表明, 菌株 SH-1471 具有 *srfA*、*fenB*、*ituA*、*ituD* 和 *bymA* 等基因, 可通过合成多种脂肽类抗生素抑制真菌、细菌的生长, 并诱导生物膜的形成。且贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 菌体以及无菌发酵液对番茄枯萎病菌均可起到良好的抑制效果, 并可显著提高番茄幼苗的株高、根长以及根重等农艺性状。与陈万权等^[25]分离自土壤的贝莱斯芽孢杆菌 Jnb16 的结果类似, 该菌对水稻稻瘟病菌具有良好的抑制效果, 且可有效促进水稻植株的生长。贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 除对番茄枯萎病菌具有良好的抑制效果, 还对烟草赤星病菌、烟草炭疽病菌、玉米大斑病菌等病原微生物具有抑制效果。余水等^[26]分离的贝莱斯芽孢杆菌 MT310 亦具有广谱抑菌性, 对烟草赤星病菌、黄连根腐病菌和高粱炭疽病菌等植物病原真菌有明显抑制效果。

除生防作用外, 贝莱斯芽孢杆菌被广泛应

用在工业以及生物医学方面。贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 还具有产蛋白酶和纤维素酶活性, 对难溶性蛋白、植物纤维等具有良好的分解作用, 在饲料添加剂、洗涤剂 and 造纸领域具有良好的应用前景^[27]。此外, 菌株 SH-1471 具有解磷和固氮功能, 可促进土壤中难溶性化合物的降解, 增加土壤中有效磷和可溶性氮的含量, 对作物发芽率和作物根系生长具有促进作用, 且对提高土壤肥力以及磷肥的利用率具有重要的作用^[28]。而菌株 SH-1471 的铁载体合成能力也是诱导植物系统抗性从而抵御病原菌的侵染的重要途径, 可通过分泌铁载体来促进植物根部系统发育和营养物质的摄取来促进植物生长, 诱导系统抗病性等。

此外, 在菌株生长过程中, 往往伴随着多种活性物质和芽孢的产生, 二者决定着菌株的生防活性以及菌株的抗逆性, 但其通常与发酵条件息息相关, 因此对菌株的发酵条件进行优化决定着菌株的生物量大小以及抑菌活性强度^[29]。前人研究表明, 细菌在营养物质和外界条件都适宜的情况下, 产生的抑菌物质往往较为丰富^[30], 枯草芽孢杆菌 MC4-2 的最适 pH 为 6.0、转速 210 r/min、温度 32 °C^[31]。本研究在该条件下, 菌株生物量及抑菌活性均得以显著提高。解淀粉芽孢杆菌 HF-01 的最适无机盐为硫酸镁, 最适 pH 为微酸性至中性, 培养温度 28 °C^[32], 与本研究结果类似。桑树内生甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) XP-27 最适无机盐为硫酸镁, 培养温度为 30 °C^[33], 这与本研究类似, 但其最适初始 pH 值为 8.0, 而本研究最适 pH 为 7.5, 可能是由于菌株长期生长环境的不同而导致的^[34]。本研究通过室内摇瓶对菌株培养基配方、发酵条件进行优化, 优化结果对菌株的生物量、拮抗活性及盆栽防效等均具有显著的促进作用。此外, 平板对峙试

验和室内盆栽试验表明, 发酵条件优化后菌株 SH-1471 对番茄枯萎病菌的抑制作用和盆栽防效显著提高至 94.08%, 盆栽防效提高至 93.8%。但缺乏大型的发酵设备以及田间实际防效进行验证, 今后还需进行小试和中试, 以验证并完善优化结果, 进一步获得菌株的最适发酵罐发酵工艺, 同时验证其是否还具有促生长和诱导植物抗性等作用, 为贝莱斯芽孢杆菌 SH-1471 的产业化应用提供理论基础。

参考文献

- [1] LIM SBY, JUNQUEIRA ACM, UCHIDA A, PURBOJATI RW, HOUGHTON JN, CHÉNARD C, WONG A, KOLUNDŽIJA S, CLARE ME, KUSHWAHA KK, PANICKER D, PUTRA A, GAULTIER NE, PREMKRISHNAN BNV, HEINLE CE, VETTATH VK, DRAUTZ-MOSES DI, SCHUSTER SC. Genome sequence of *Bacillus velezensis* SGAir0473, isolated from tropical air collected in Singapore[J]. *Genome Announcements*, 2018, 6(27): e00642-18.
- [2] 王以燕, 袁善奎, 农向群, 李梅. 我国微生物农药常见剂型种类及管理[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 640-645.
WANG YY, YUAN SK, NONG XQ, LI M. Main types and management of common formulations of microbial pesticides in China[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(4): 640-645 (in Chinese).
- [3] 吴志美, 兰明先, 高熹, 李梦月, 袁远, 郭子俊, 殷兴华, 吴国星. 除草活性成团泛菌 ZLSY20 菌株发酵条件的优化[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(9): 1990-1997.
WU ZM, LAN MX, GAO X, LI MY, YUAN Y, GUO ZJ, YIN XH, WU GX. Screening of fermentation conditions for herbicidal activity of *Pantoea agglomerans* strain ZLSY20[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50(9): 1990-1997 (in Chinese).
- [4] 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).
- [5] 蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展[J]. *北方园艺*, 2018(12): 162-167.
CAI GL, ZHANG F, OUYANG YX, ZHAO CS, PENG XH, JIANG AM. Research progress on *Bacillus velezensis*[J]. *Northern Horticulture*, 2018(12): 162-167 (in Chinese).
- [6] 邓丽, 孙冉, 姚蒋庞, 谢毓丹. 贝莱斯芽孢杆菌粗提物对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(3): 1-9.
DENG L, SUN R, YAO JP, XIE YD. Antibacterial mechanism of crude extract of *Bacillus velezensis* against *Staphylococcus aureus*[J]. *Food and Fermentation Science and Technology*, 2021, 57(3): 1-9 (in Chinese).
- [7] 宗英, 赵月菊, 刘阳, 杨庆利. 一株贝莱斯芽孢杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. *核农学报*, 2018, 32(2): 310-317.
ZONG Y, ZHAO YJ, LIU Y, YANG QL. Study on the inhibitory effect of *Bacillus velezensis* on *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(2): 310-317 (in Chinese).
- [8] 徐婷, 朱天辉, 李姝江, 谯天敏. 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* YB15 β -葡聚糖酶的抑菌作用与基因克隆[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(2): 276-281.
XU T, ZHU TH, LI SJ, QIAO TM. Fungus-inhibitory activity and gene cloning of β -glucanase from *Bacillus velezensis* YB15[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30(2): 276-281 (in Chinese).
- [9] 姚锦爱, 黄鹏, 侯翔宇, 余德亿. 海洋细菌解淀粉芽孢杆菌 BA-3 在兰花的定殖及对根际微生态的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(6): 915-921.
YAO JA, HUANG P, HOU XY, YU DY. Colonization dynamics marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* BA-3 and its impact on the microbial community of *Cymbidium rhizosphere*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019, 35(6): 915-921 (in Chinese).
- [10] 毛继龙, 张建辉, 王璨, 赵芑, 陈文静, 邱忠平. 一株高产洛伐他汀红曲霉的筛选与液态发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(6): 2221-2232.
MAO JL, ZHANG JH, WANG C, ZHAO P, CHEN WJ, QIU ZP. Screening and liquid fermentation condition optimization of a high lovastatin producing *Monascus*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(6): 2221-2232 (in Chinese).
- [11] 王玲, 刘二明, 周鑫钰, 任佐华, 陈娟芳. 一株辣椒青枯病菌拮抗内生细菌的筛选鉴定与发酵条件优化[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(10): 1781-1787.

- WANG L, LIU EM, ZHOU XY, REN ZH, CHEN JF. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacteria strain against *Ralstonia solanacearum* in pepper and its optimal fermentation conditions[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(10): 1781-1787 (in Chinese).
- [12] 汪晶晶, 曹雪梅, 李欢, 暴增海, 马桂珍, 贾杰, 王淑芳, 罗志会. 抗菌海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1-2 菌株摇瓶发酵培养基和发酵条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(8): 291-295.
- WANG JJ, CAO XM, LI H, BAO ZH, MA GZ, JIA J, WANG SF, LUO ZH. Optimization of fermentation medium and fermentation conditions of antibacterial marine *Bacillus amyloliquefaciens* GM-1-2 strain in shake flask[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(8): 291-295 (in Chinese).
- [13] 林格儿, 刘宏, 刘海杰, 闫巧娟, 江正强. 暹罗芽孢杆菌高产 γ -聚谷氨酸的发酵条件优化[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(8): 3335-3345.
- LIN GE, LIU H, LIU HJ, YAN QJ, JIANG ZQ. Optimization of fermentation conditions for poly- γ -glutamic acid production by *Bacillus siamensis*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3335-3345 (in Chinese).
- [14] 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).
- [15] 申云鑫, 施竹凤, 周旭东, 李铭刚, 张庆, 冯路遥, 陈齐斌, 杨佩文. 三株具生防功能芽孢杆菌的分离鉴定及其生物活性研究[J]. *生物技术通报*, 2023(3): 267-277.
- SHEN YX, SHI ZF, ZHOU XD, LI MG, ZHANG Q, FENG LY, CHEN QB, YANG PW. Isolation, identification and bio-activity of three *Bacillus* strains with biocontrol function[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023(3): 267-277 (in Chinese).
- [16] 濮永瑜, 包玲凤, 何翔, 刘芮, 张庆, 施竹凤, 何永宏, 杨佩文. 烟草青枯病和黑胫病拮抗细菌的筛选、鉴定及防效研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(7): 116-123.
- PU YY, BAO LF, HE X, LIU R, ZHANG Q, SHI ZF, HE YH, YANG PW. Screening, identification and control efficacy of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and *Phytophthora parasitica*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(7): 116-123 (in Chinese).
- [17] 何翔, 张庆, 李楚, 番华彩, 李铭刚, 徐胜涛, 陈齐斌, 杨明英, 杨佩文. 具铁载体活性病原细菌的筛选及铁摄取干预对其生长影响[J]. *植物保护*, 2020, 46(3): 85-93.
- HE X, ZHANG Q, LI C, FAN HC, LI MG, XU ST, CHEN QB, YANG MY, YANG PW. Screening of the pathogenic bacteria with siderophore-producing activity and the effect of intervention in iron uptake on its growth[J]. *Plant Protection*, 2020, 46(3): 85-93 (in Chinese).
- [18] LI JY, ZHAO QQ, WURIYANGHAN H, YANG C. Biocontrol bacteria strains Y4 and Y8 alleviate tobacco bacterial wilt disease by altering their rhizosphere soil bacteria community[J]. *Rhizosphere*, 2021, 19: 100390.
- [19] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [20] 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).
- [21] PEYPOUX F, GUINAND M, MICHEL G, DELCAMBE L, DAS BC, LEDERER E. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*[J]. *Biochemistry*, 1978, 17(19): 3992-3996.
- [22] PEYPOUX F, BONMATIN JM, WALLACH J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. *Applied microbiology and Biotechnology*, 1999, 51(5): 553-563.
- [23] VANITTANAKOM N, LOEFFLER W, KOCH U, JUNG G. Fengycin: a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3[J]. *The Journal of antibiotics*, 1986, 39(7): 888-901.
- [24] 冯江鹏, 邱莉萍, 梁秀燕, 陈碧秀, 夏海洋, 彭春龙, 钟永军. 草莓胶孢炭疽菌拮抗细菌贝莱斯芽孢杆菌 JK3 的鉴定及其抗菌活性[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(5): 831-839.
- FENG JP, QIU LP, LIANG XY, CHEN BX, XIA HY, PENG CL, ZHONG YJ. Identification of antagonistic bacteria *Bacillus velezensis* JK3 against anthracnose of strawberry and its antipathogenic activity[J]. *Acta*

- Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(5): 831-839 (in Chinese).
- [25] 陈万权. 植物健康与病虫害防控[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2020: 104.
CHEN WQ. Plant Health and Pest Control[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2020: 104 (in Chinese).
- [26] 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).
- [27] LU J, ZHAO Y, HU R, CHENG Y, QIN JH, YANG J, FANG YW, LYU MS, WANG SJ. Screening and characteristics of marine *Bacillus velezensis* Z-1 protease and its application of enzymatic hydrolysis of mussels to prepare antioxidant active substances[J]. Molecules, 2022, 27(19): 6570.
- [28] 池景良, 郝敏, 王志学, 李杨. 解磷微生物研究及应用进展[J]. 微生物学杂志, 2021, 41(1): 1-7.
CHI JL, HAO M, WANG ZX, LI Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. Journal of Microbiology, 2021, 41(1): 1-7 (in Chinese).
- [29] XIE J, STROBEL GA, FENG T, REN HS, MENDS MT, ZHOU ZY, GEARY B. An endophytic *Coniochaeta velutina* producing broad spectrum antimycotics[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(6): 390-397.
- [30] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 付岗, 缪剑华, 林纬. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346.
YE YF, LI QQ, YUAN GQ, FU G, MIAO JH, LIN W. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese).
- [31] 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).
- [32] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 耿鹏, 桑松. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569-578.
HONG P, AN GD, HU MY, GENG P, SANG S. Optimizing fermentation condition for *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(4): 569-578 (in Chinese).
- [33] 方翔, 徐伟芳, 牛娜, 欧婷, 王飞, 左伟东, 谢洁. 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2147-2160.
FANG X, XU WF, NIU N, OU T, WANG F, ZUO WD, XIE J. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2147-2160 (in Chinese).
- [34] LIU GQ, KONG YY, FAN YJ, GENG C, PENG DH, SUN M. Data on genome analysis of *Bacillus velezensis* LS69[J]. Data in Brief, 2017, 13: 1-5.