

响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 F-37 抑制青枯劳尔氏菌活性

张佳佳¹, 崔文艳¹, 舒慧琳¹, 罗喜燕¹, 张恺琦¹, 何朋杰^{*1,2}

1 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学 绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

张佳佳, 崔文艳, 舒慧琳, 罗喜燕, 张恺琦, 何朋杰. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 F-37 抑制青枯劳尔氏菌活性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3271-3284.

ZHANG Jiajia, CUI Wenyan, SHU Huilin, LUO Xiyang, ZHANG Kaiqi, HE Pengjie. Optimization of fermentation medium formula and fermentation conditions for enhancing the inhibitory activity of *Bacillus velezensis* F-37 against *Ralstonia solanacearum* by response surface methodology[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3271-3284.

摘要:【背景】生防细菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) F-37 能有效抑制生姜青枯病病原菌青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)的活性, 而响应面法和二次通用旋转试验可在较少的试验次数下优化生防菌发酵培养基配方和发酵条件。【目的】优化贝莱斯芽孢杆菌菌株 F-37 的发酵培养基配方及发酵条件, 提高其对青枯劳尔氏菌的抑菌活性。【方法】以平板拮抗效果为指标, 采用单因素试验、响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 F-37 发酵培养基配方, 通过二次通用旋转组合试验优化其发酵条件, 采用牛津杯法比较并分析优化前后菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的拮抗活性。【结果】发酵条件及成分优化结果表明, 小麦淀粉、酵母浸粉、氯化钾分别是对菌株 F-37 抑菌活性影响最显著的碳源、氮源和无机盐。培养基最优配方(g/L): 小麦淀粉 14.9、酵母浸粉 8.6 和氯化钾 7.8; 最佳发酵条件为: 接种量 1.0%、温度 27 °C、装液量 78 mL/300 mL、pH 7.8、转速 180 r/min、培养时间 3 d。在优化方案下, 菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率为 70.10%, 显著高于优化前的 46.9%, 抑菌率增长率为 49.5%。【结论】优化后的培养基和发酵条件提高了贝莱斯芽孢杆菌 F-37 抑制青枯劳尔氏菌的抑菌活性, 为生姜青枯病病原菌生防制剂的研制和应用提供了技术基础。
关键词: 响应面法; 二次通用旋转组合; 贝莱斯芽孢杆菌; 发酵培养基配方; 发酵条件

资助项目: 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划(贵中医大创合字[2023]116); 贵州省基础研究计划(黔科合基础-ZK[2021]一般 147); 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2020]4Y109)

This work was supported by the College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine ([2023]116), the Basic Research Program of Guizhou Province (ZK[2021]147), and the Science and Technology Support Program of Guizhou Province ([2020]4Y109).

*Corresponding author. E-mail: 2497032366@qq.com

Received: 2024-10-23; Accepted: 2025-02-04; Published online: 2025-03-14

Optimization of fermentation medium formula and fermentation conditions for enhancing the inhibitory activity of *Bacillus velezensis* F-37 against *Ralstonia solanacearum* by response surface methodology

ZHANG Jiajia¹, CUI Wenyan¹, SHU Huilin¹, LUO Xiyan¹, ZHANG Kaiqi¹, HE Pengjie^{*1,2}

1 Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Background] The biocontrol bacterium *Bacillus velezensis* F-37 can effectively inhibit the viability of the pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*, which causes ginger bacterial wilt. The response surface methodology (RSM) and quadratic general rotary design can optimize the fermentation medium formula and fermentation conditions of the biocontrol bacterium with a few tests. [Objective] To optimize the fermentation medium formula and fermentation conditions of *B. velezensis* F-37, enhancing its inhibitory activity against *R. solanacearum*. [Methods] With the antagonism effect as the indicator, single-factor experiments and RSM were employed to optimize the fermentation medium formula for *B. velezensis* F-37. A quadratic general rotary design was employed to optimize the fermentation conditions. The Oxford cup method was employed to compare the antagonistic activity of sterile filtrates of strain F-37 against *R. solanacearum* before and after optimization. [Results] Wheat starch, yeast powder, and potassium chloride were the most significant carbon source, nitrogen source, and inorganic salt, respectively, for the antibacterial activity of F-37. The optimal medium formula was composed of 14.9 g/L wheat starch, 8.6 g/L yeast powder, and 7.8 g/L potassium chloride. The best fermentation conditions were inoculum size of 1.0%, 27 °C, liquid volume of 78 mL/300 mL, pH 7.8, rotation at 180 r/min, and fermentation for 3 days. Under these optimized conditions, the inhibition rate of the sterile filtrate of F-37 against *R. solanacearum* was 70.10%, significantly higher than that (46.9%) before optimization, representing a 49.5% increase. [Conclusion] The optimized medium and fermentation conditions significantly improved the inhibitory activity of *B. velezensis* F-37 against *R. solanacearum*, providing a technical basis for the development and application of biocontrol preparations for ginger bacterial wilt.

Keywords: response surface methodology; quadratic general rotary composite design; *Bacillus velezensis*; fermentation medium formula; fermentation conditions

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是姜科姜属多年生宿根药食同源的作物^[1]。然而,由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的青枯病^[2],在生姜种植领域又被称作姜瘟病是最为严重的病害之一,严重制约了生姜产业的可持续发展^[3]。当前,化学防治是治理生姜青枯病的主要方式。但是,长期使用化学药剂不仅会

污染环境,还会导致病原菌产生抗药性,这使得寻找环境友好且高效的防治方法成为必要^[4]。

生物防治作为一种绿色防控技术,具有环境安全、靶向性强、持久性强等优势,受到广泛关注^[5]。其中,芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是一类常用的生防细菌,广泛分布于土壤、水体及动、植物体内等生境中,具有抗环境胁迫能力强^[6]、

繁殖速度快、代谢产物复杂多样、易于人工培养等特点^[7-9]。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为一种新型菌种,因其广谱抗菌及促植物生长作用,日益受到研究人员的重点关注^[10]。研究表明,贝莱斯芽孢杆菌对多种植物病害有良好的防控效果,能有效抑制多种植物病原菌^[11]。

相比于传统的单因素方法,响应面法(response surface methodology, RSM)通过数学和统计技术来分析自变量之间的相关性,利用二次多项式模型来确定最佳响应^[12-13]。这种方法简单、快速、准确,已在多个学科领域得到成功应用^[14]。通过 RSM 优化发酵条件,可以提高菌株产抑菌活性物质的性能,快速有效地确定多因子系统的最佳条件^[15]。

微生物的生长与代谢过程极易受到发酵条件的调控如温度、时间、pH 及培养基配方等。通过合理设计发酵条件,可以显著提升微生物的性能^[16]。贝莱斯芽孢杆菌 F-37 是本课题组前期从生姜根围中分离得到的 1 株对青枯劳尔氏菌具有良好活性的生防菌株,在盆栽和大田试验中均表现出良好的防控效果^[17]。本研究在前期研究基础上,通过单因素试验、响应面法优化试验及二次通用旋转组合试验,优化菌株 F-37 的发酵培养基配方及发酵条件,以平板拮抗效果为指标,分析优化方案下菌株 F-37 对青枯劳尔氏菌的拮抗活性,提升其发酵效价,以期为青枯劳尔氏菌生防制剂的研制工作提供有力的研究支撑。

1 材料与方法

1.1 样品

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) F-37 和青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*) FH-2, 均保存于贵州中医药大学中药材病害防控实验室。

1.2 培养基

LB 液体培养基及固体培养基参考文献^[18]配制。初始发酵培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 5.0, 氯化钠 10.0, pH 7.0, 121 °C 灭菌 30 min。发酵条件优化后所用培养基(g/L): 小麦淀粉

14.9, 酵母浸粉 8.6, 氯化钾 7.8; pH 7.8, 121 °C 灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和仪器

酵母浸粉, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 氯化钾, 天津市大茂化学试剂厂; 氯化钠, 天津市华盛化学试剂有限公司; 氢氧化钠, 成都金山化学试剂有限公司。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 立式智能精密摇床, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 医用离心机, 长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司; pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.4 菌株 F-37 种子液的制备

将活化好的菌株 F-37 接种于 LB 培养基平板上, 于 30 °C 静置培养 24 h。挑取单菌落接种至预先装有 25 mL LB 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h, 调整其 OD_{600} 值至 1.0, 即制成种子液。

1.5 菌株 F-37 对青枯劳尔氏菌拮抗活性的测定

采用点接法检测拮抗菌株 F-37 对青枯劳尔氏菌的拮抗效果。吸取 2 μ L 菌株 F-37 的种子液点接在预先涂有青枯劳尔氏菌(10^6 CFU/mL)的 LB 平板上, 于 30 °C 静置培养 24 h, 观察并测量抑菌圈的形成情况和直径。

1.6 菌株 F-37 发酵液及无菌滤液的制备

将菌株 F-37 的种子液以 1% 的接种量分别接入含有不同碳源、氮源、无机盐成分或不同发酵参数(接种量、培养温度、装液量、培养时间、转速和 pH)的初始发酵培养基中。在 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 48 h 得到发酵液。将发酵液在 4 °C、10 000 r/min 的条件下离心 5 min, 收集上清液, 并通过 0.22 μ m 的细菌滤膜进行过滤, 最终制得菌株 F-37 的无菌滤液。

1.7 发酵液无菌滤液抑菌活性的测定

抑菌活性的测定采用牛津杯法。以平板中心为参照点, 在预先涂有青枯劳尔氏菌(10^6 CFU/mL)的 LB 平板上等距离放置 4 个牛津杯, 杯与杯之

间的间隔为 2 cm。向每个牛津杯中加入 200 μ L 菌株 F-37 的无菌发酵滤液,将平板置于 30 $^{\circ}$ C 静置培养 48 h。培养结束后,利用十字交叉法测定抑菌圈的直径,并进一步计算抑菌率及其增长率,如公式(1)、(2)所示。

抑菌率(%)=(抑菌圈直径-牛津杯直径)/抑菌圈直径 $\times$ 100 (1)

抑菌率增长率(%)=(优化后抑菌率-优化前抑菌率)/优化前抑菌率 $\times$ 100 (2)

1.8 最佳碳源、氮源、无机盐的筛选

以初始培养基为对照,分别以甘油、麦芽糖、可溶性淀粉、蔗糖、糯米粉、玉米淀粉和小麦淀粉取代初始培养基中的葡萄糖作为碳源;以牛肉浸膏、蛋白胨、氯化铵、尿素、甘氨酸、胰蛋白胨和硫酸铵取代原有酵母浸粉作为氮源;以氯化镁、碳酸钙、碳酸氢钠、氯化钾、硫酸镁和磷酸二氢钠取代原有氯化钠作为无机盐,其他成分及含量不变,参照 1.6 和 1.7 的方法制备无菌发酵液并计算抑菌率。

1.9 碳源、氮源、无机盐最佳浓度单因素试验

以 1.8 中筛选出的最优碳源、氮源和无机盐组合为基础培养基,分别加入 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0、15.0 和 17.0 g/L 的 1.8 中筛选出的最优碳源(小麦淀粉)的浓度取代原有碳源浓度;分别加入 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0 和 15.0 g/L 的最优氮源(酵母浸粉)的浓度取代原有氮源浓度;分别加入 5.0、7.0、9.0、11.0、13.0 和 15.0 g/L 的最优无机盐(氯化钾)的浓度取代原有无机盐浓度,按照 1.6 和 1.7 的方法制备无菌发酵液并计算抑菌率,确定最优碳源、氮源和无机盐的最佳浓度。

1.10 发酵条件的优化

以发酵液无菌滤液的平板拮抗效果作为指标,系统优化菌株 F-37 的初始 pH、接种量、培养温度、装液量、培养时间及摇床转速等发酵参数。各发酵条件的具体设置如下:初始 pH,分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0;接种量:0.5%、

1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%;培养温度:分别为 25、28、31、34 和 37 $^{\circ}$ C;装液量分别为 60、80、100、120、140 和 160 mL 于 300 mL 的三角瓶中;培养时间:24、36、48、60、72 和 84 h;摇床转速分别为 140、160、180、200 和 220 r/min。按照 1.6 和 1.7 的方法制备无菌发酵液并计算抑菌率。

1.11 培养基配方 Box-Behnken 响应面优化

根据单因素试验结果筛选出 3 个主要影响因素(小麦淀粉浓度、酵母浸粉浓度和氯化钾浓度),采用 Design-Expert 12.0 软件设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面试验并进行数据分析。

1.12 二次通用旋转组合试验优化发酵条件

根据单因素试验结果选取装液量、培养温度和初始 pH 值作为 3 个关键影响因素,并利用 DPS 7.05 软件建立三元二次通用旋转组合设计模型。其他参数均设置为单因素试验确定的最佳水平,通过频率分析法对试验数据进行解析,最终确定最优发酵条件组合,并对模型预测结果进行验证。

1.13 数据统计与分析

采用 DPS 7.05 软件中的 Duncan's 多重比较法进行组间差异检验,数据可视化部分则使用 Origin 软件完成图表制作。

2 结果与分析

2.1 菌株 F-37 的拮抗活性

通过点接法测定菌株 F-37 对青枯劳尔氏菌的拮抗效果。结果表明,菌株 F-37 对青枯劳尔氏菌具有良好的抑菌效果,其抑菌带宽度达 (0.67 $\pm$ 0.01) cm (图 1)。

2.2 发酵配方优化及分析

2.2.1 碳源、氮源和无机盐种类的筛选

在不同碳源、氮源和无机盐培养基中,菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑制效果存

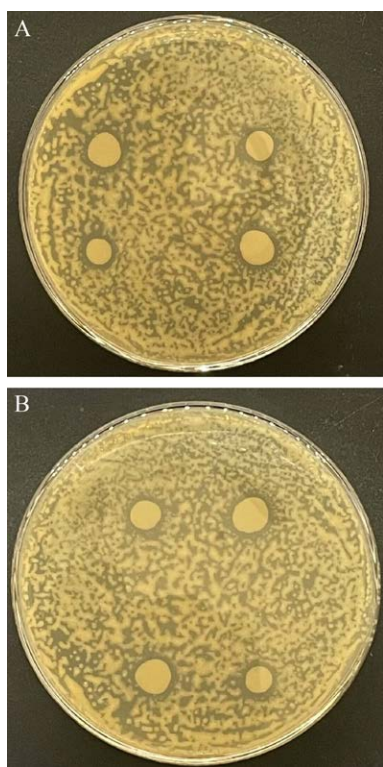


图1 贝莱斯芽孢杆菌 F-37 对青枯劳尔氏菌的抑制效果 A: 正面效果图; B: 反面效果图。

Figure 1 Inhibition effect of strain *Bacillus velezensis* F-37 against *Ralstonia solanacarum*. A: Front view; B: Back view.

在显著差异。其中, 以小麦淀粉、酵母浸粉及氯化钾分别作为唯一碳源、氮源和无机盐时, 菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率分别为 68.1%、50.4%及 59.6%, 显著高于其他供试的碳源、氮源或无机盐成分(图 2-4)。因此, 分别选择小麦淀粉、酵母浸粉和氯化钾为最佳碳源、最佳氮源及最佳无机盐。

2.2.2 碳源、氮源和无机盐最佳浓度试验

单因素试验结果显示, 培养基中小麦淀粉、酵母浸粉和氯化钾的添加量对菌株 F-37 无菌滤液的拮抗活性具有显著影响。如图 5 所示, 随着这 3 种组分浓度的增加, 其对青枯劳尔氏菌的抑制效果均呈现先上升后下降的变化。当小麦淀粉添加量为 15.0 g/L、酵母浸粉和氯化钾均为 7.0 g/L 时, 对应的抑菌率分别达到 61.3%、62.7% 和 62.7%, 显著高于其他处理组。基于此, 综合

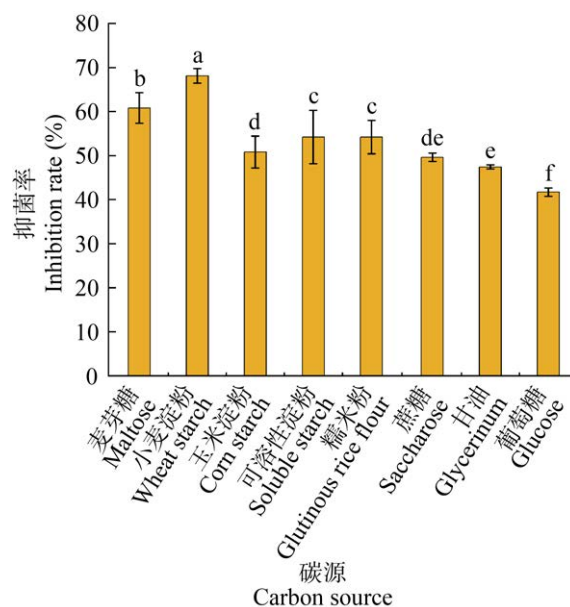


图2 不同碳源对贝莱斯芽孢杆菌 F-37 拮抗活性的影响 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Figure 2 Effect of different carbon sources on the antagonistic activity of *Bacillus velezensis* F-37. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

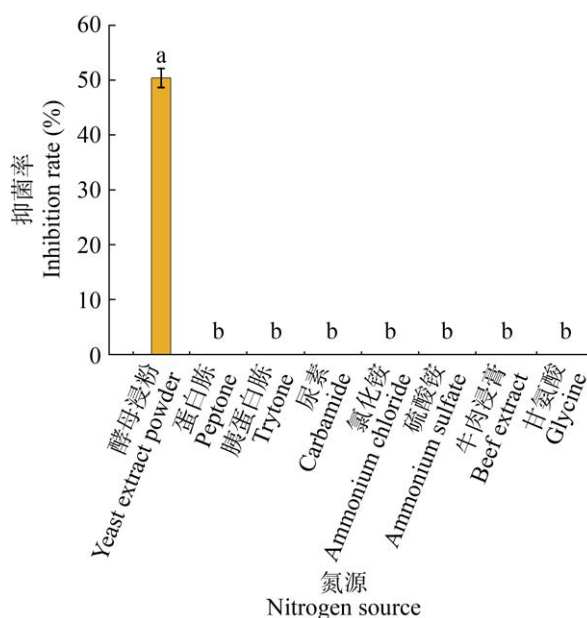


图3 不同氮源对贝莱斯芽孢杆菌 F-37 拮抗活性的影响

Figure 3 Effect of different nitrogen sources on the antagonistic activity of *Bacillus velezensis* F-37.

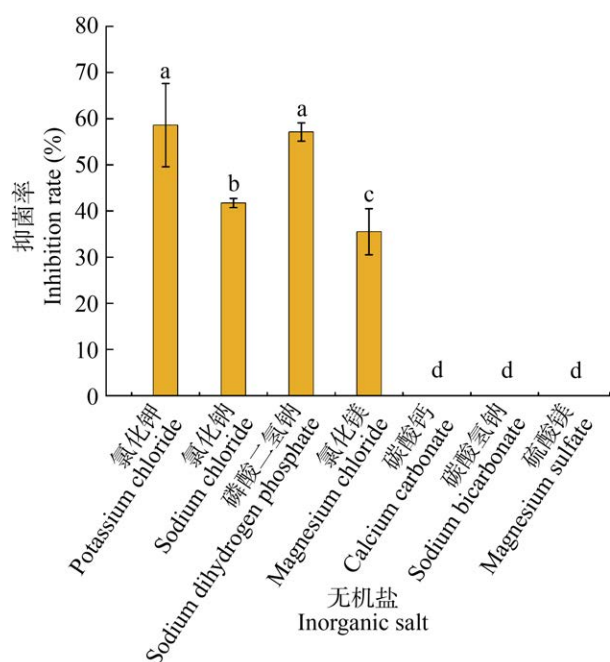


图4 不同无机盐对贝莱斯芽孢杆菌 F-37 拮抗活性的影响

Figure 4 Effect of different inorganic salts on the antagonistic activity of *Bacillus velezensis* F-37.

分析确定小麦淀粉、酵母浸粉和氯化钾的最佳添加浓度分别为 15.0、7.0 和 7.0 g/L。

2.3 培养基组分 Box-Behnken 试验结果

2.3.1 响应面回归模型建立分析

Box-Behnken 试验设计与结果见表 1。通过 Design expert 12.0 软件对表 1 中的数据进行分折, 抑菌率(Y)对小麦淀粉(A)、酵母浸粉(B)和氯化钾(C)的二次多项回归方程模型为: $Y = -388.97 + 35.02A + 35.33B + 11.36C - 0.98AB + 0.4AC + 0.36BC - 0.97A^2 - 1.29B^2 - 1.47C^2$ 。各因素的显著性如表 2 所示, 其中, 回归模型的 $P = 0.001 < 0.01$, 表明该模型在 $\alpha = 0.01$ 水平上极显著, 实验数据与模型相符, 模型选择合适; 失拟项 $P = 0.185 > 0.05$, 失拟项不显著, 该回归方程展现出良好的拟合效果, 充分证实实验具备可行性。决定系数 $R^2 = 0.9569$, 这意味着响应值变动的 95.69% 可归因于实验因素, 由此表明实测值与预测值之间存在极高的相关性, 模拟实验结果与真实值的误差极小。同时, 变异系数(coefficient of

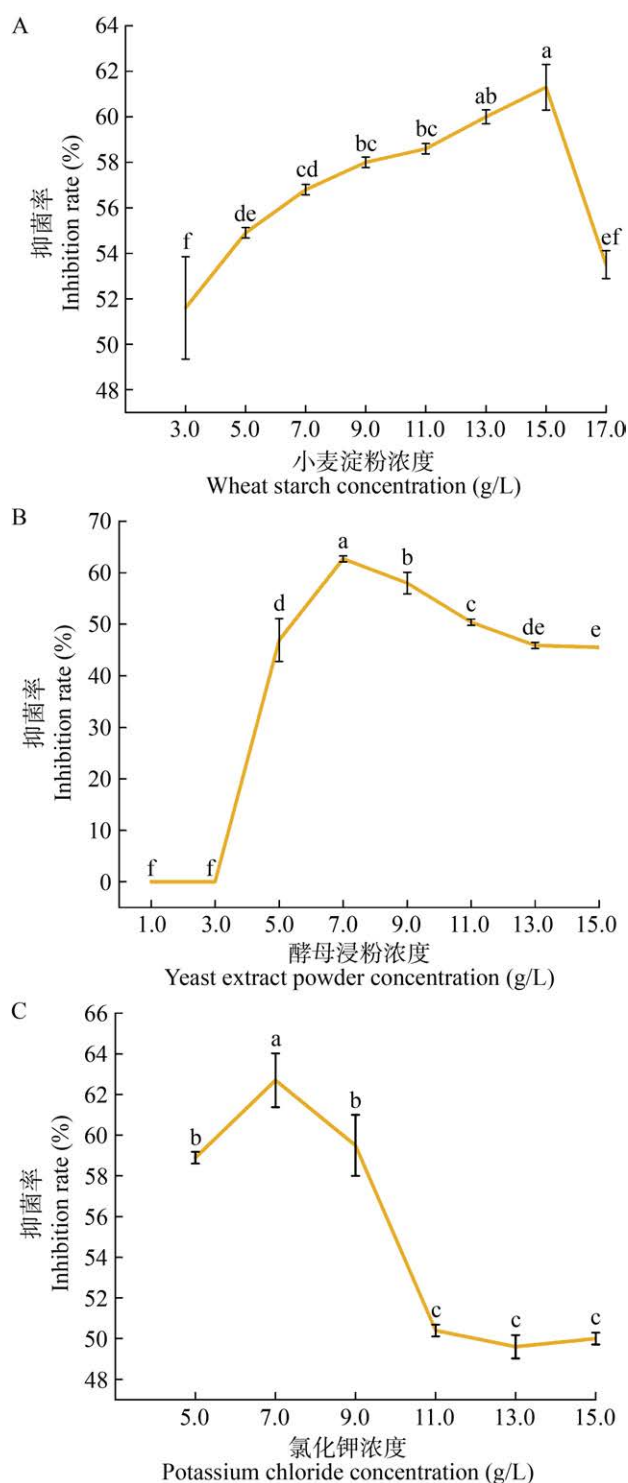


图5 碳源(A)、氮源(B)及无机盐(C)浓度变化对贝莱斯芽孢杆菌 F-37 拮抗活性的影响效应

Figure 5 Effects of carbon source (A), nitrogen source (B), and inorganic salt (C) concentrations on the antagonistic activity of *Bacillus velezensis* F-37.

表 1 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 1 Box-Behnken design and corresponding results

处理 Treatment	A 小麦淀粉 Wheat starch (g/L)	B 酵母浸粉 Yeast powder (g/L)	C 氯化钾 Potassium chloride (g/L)	抑菌率 Inhibition rate (%)
1	15.0 (0)	7.0 (0)	7.0 (0)	69.5
2	15.0 (0)	7.0 (0)	7.0 (0)	65.1
3	15.0 (0)	7.0 (0)	7.0 (0)	64.9
4	15.0 (0)	7.0 (0)	7.0 (0)	66.2
5	15.0 (0)	7.0 (0)	7.0 (0)	69.5
6	15.0 (0)	9.0 (1)	9.0 (1)	64.1
7	15.0 (0)	5.0 (-1)	9.0 (1)	40.6
8	15.0 (0)	9.0 (1)	5.0 (-1)	68.6
9	15.0 (0)	5.0 (-1)	5.0 (-1)	50.8
10	17.0 (1)	7.0 (0)	9.0 (1)	63.6
11	13.0 (-1)	7.0 (0)	9.0 (1)	52.8
12	17.0 (1)	7.0 (0)	5.0 (-1)	58.6
13	13.0 (-1)	7.0 (0)	5.0 (-1)	54.2
14	17.0 (1)	9.0 (1)	7.0 (0)	68.1
15	13.0 (-1)	9.0 (1)	7.0 (0)	68.1
16	17.0 (1)	5.0 (-1)	7.0 (0)	55.8
17	13.0 (-1)	5.0 (-1)	7.0 (0)	40.1

括号内数值表示各因素水平的编码设定。

Values in parentheses denote the coded levels of experimental factors.

表 2 Box-Behnken 试验方差分析

Table 2 Analysis of variance for Box-Behnken experiment

来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	1 402.809	9	155.868	17.272	0.001	**
A Wheat starch	119.351	1	119.351	13.226	0.008	**
B Yeast powder	832.320	1	832.320	92.232	0.000	**
C Potassium chloride	15.401	1	15.401	1.707	0.233	
AB	61.623	1	61.623	6.829	0.035	*
AC	10.240	1	10.240	1.135	0.322	
BC	8.122	1	8.122	0.900	0.374	
A ²	63.061	1	63.061	6.988	0.033	*
B ²	111.457	1	111.457	12.351	0.010	*
C ²	145.082	1	145.082	16.077	0.005	**
残差 Residual	63.170	7	9.024			
失拟 Lack of fit	42.018	3	14.006	2.649	0.185	
误差 Error	21.152	4	5.288			
总和 Cor. total	1 465.979	16				

$R^2=0.956\ 9$, C.V.%=5。*: 差异显著($P<0.05$); **: 差异极显著($P<0.01$)。

$R^2=0.956\ 9$, C.V.%=5。*: Significant difference ($P<0.05$); **: Extremely significant ($P<0.01$).

variation, C.V.)=5%, 反映出实验具有较高的精确度。综合以上各项指标, 可以用该模型来预测小麦淀粉、酵母浸粉和氯化钾对抑菌率的影响。根据结果显示, 一次项 A 和 B 以及二次项 C² 的显著性水平均低于 0.01, 暗示在影响响应值时具有显著性; 同时, 交互项 AB 及二次项 A² 和 B² 的显著性水平低于 0.05, 对响应值也具有显著性的影响; 而其他项的显著性水平大于 0.05, 则意味着并未对响应值产生显著影响。此外, F 值的大小反映了相应因素对响应值的重要性程度。从回归分析表可知, 3 个因素的 F 值大小为 B>A>C, 即表明影响因素主次为酵母浸粉>小麦淀粉>氯化钾。

采用 Design-Expert 12.0 软件对主要因素之间的交互作用进行分析, 以研究其对抑菌率的影响。结合 3D 响应曲面图对回归方程进行图解, 以展示响应值与各因素之间的关系, 各因素的交互 3D 响应曲面图如图 6 所示。总体上, 抑菌率随着小麦淀粉、酵母浸粉和氯化钾的增加呈先上升后下降的趋势, 小麦淀粉、酵母浸粉两因素的交互作用下, 其 3D 响应曲面图的坡度相对于小麦淀粉、氯化钾的交互作用和酵

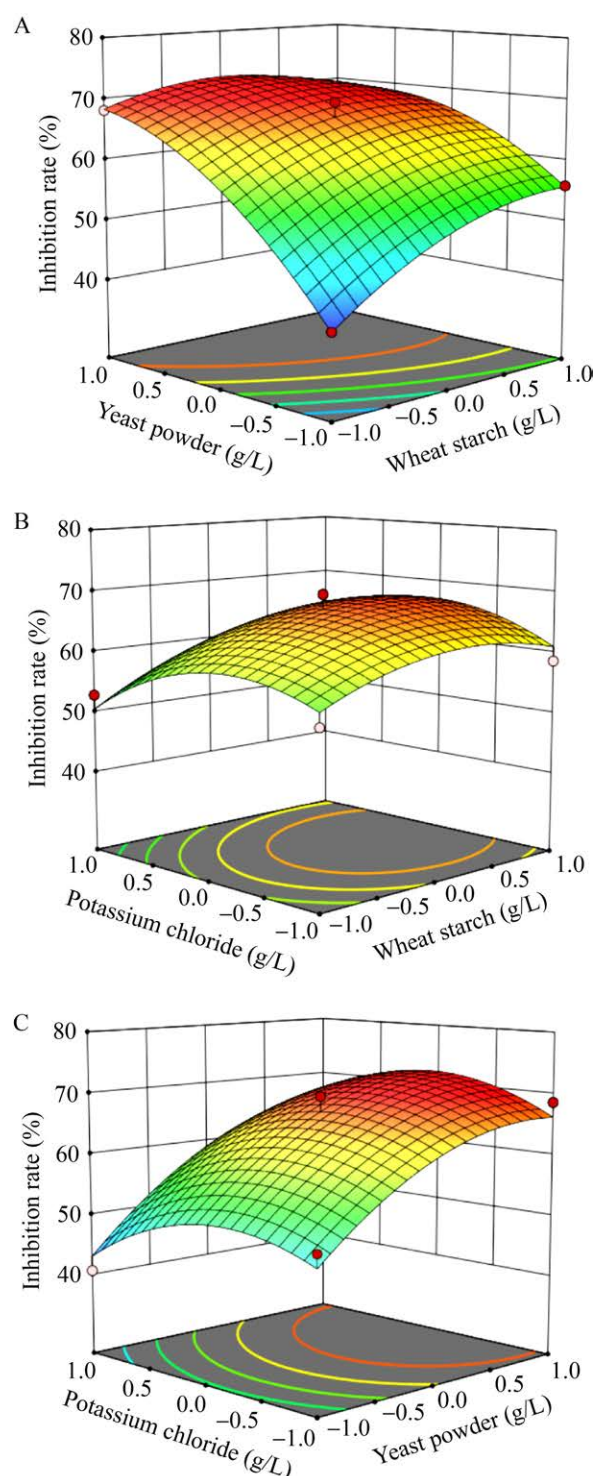


图 6 三个因素交互作用对青枯劳尔氏菌抑菌活性影响的响应曲面图

Figure 6 Response surface plots of the interaction effects of three factors on the antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*.

母浸粉、氯化钾的交互作用最陡,并且相应等高线图的椭圆度较大,表明小麦淀粉和酵母浸粉这2个因素的交互作用对抑菌率的影响最为显著,这与回归分析的结果一致。

2.3.2 培养基配方优化与验证

通过响应面分析法得到最佳工艺条件为小麦淀粉 14.9 g/L、酵母浸粉 8.6 g/L 和氯化钾 7.8 g/L,在此条件下,抑菌率为 70.6%。为了验证模型准确性,在该条件下进行 3 次平行试验,测得菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率为 $(69.70 \pm 0.14)\%$,与理论值相近,表明可以用该模型来预测其最佳工艺条件。

2.4 菌株 F-37 发酵条件优化结果

2.4.1 培养温度、装液量和转速单因素试验结果

培养温度(图 7A)、装液量(图 7B)及转速(图 7C)的梯度变化对菌株 F-37 的抑菌效果呈现单峰调控特征,其拮抗活性随参数提升均呈现先增后减的非线性响应规律。尤其是在培养温度达到 28 °C、装液量为 80 mL/300 mL 及转速为 180 r/min 时,菌株 F-37 的无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率达到最大(分别为 59.2%、68.2% 和 62.5%),因此最佳培养温度为 28 °C、最佳装液量为 80 mL/300 mL,最佳转速为 180 r/min。

2.4.2 接种量、初始 pH 和培养时间单因素试验结果

在不同接种量(图 7D)、初始 pH (图 7E)和培养时间(图 7F)下,菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的拮抗活性存在显著差异。随着接种量和初始 pH 的增加,菌株 F-37 的拮抗活性呈先增加后降低再增加的趋势,而随着培养时间的增加其拮抗先增加后降低。在接种量为 1.0%、初始 pH 值为 8.0 及培养时间为 3 d 时,菌株 F-37 的无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率达到最大(分别为 64.7%、68.3% 及 62.7%)。因此,最佳接种量为 1.0%、最佳初始 pH 值为 8.0、最佳培养时间为 3 d。

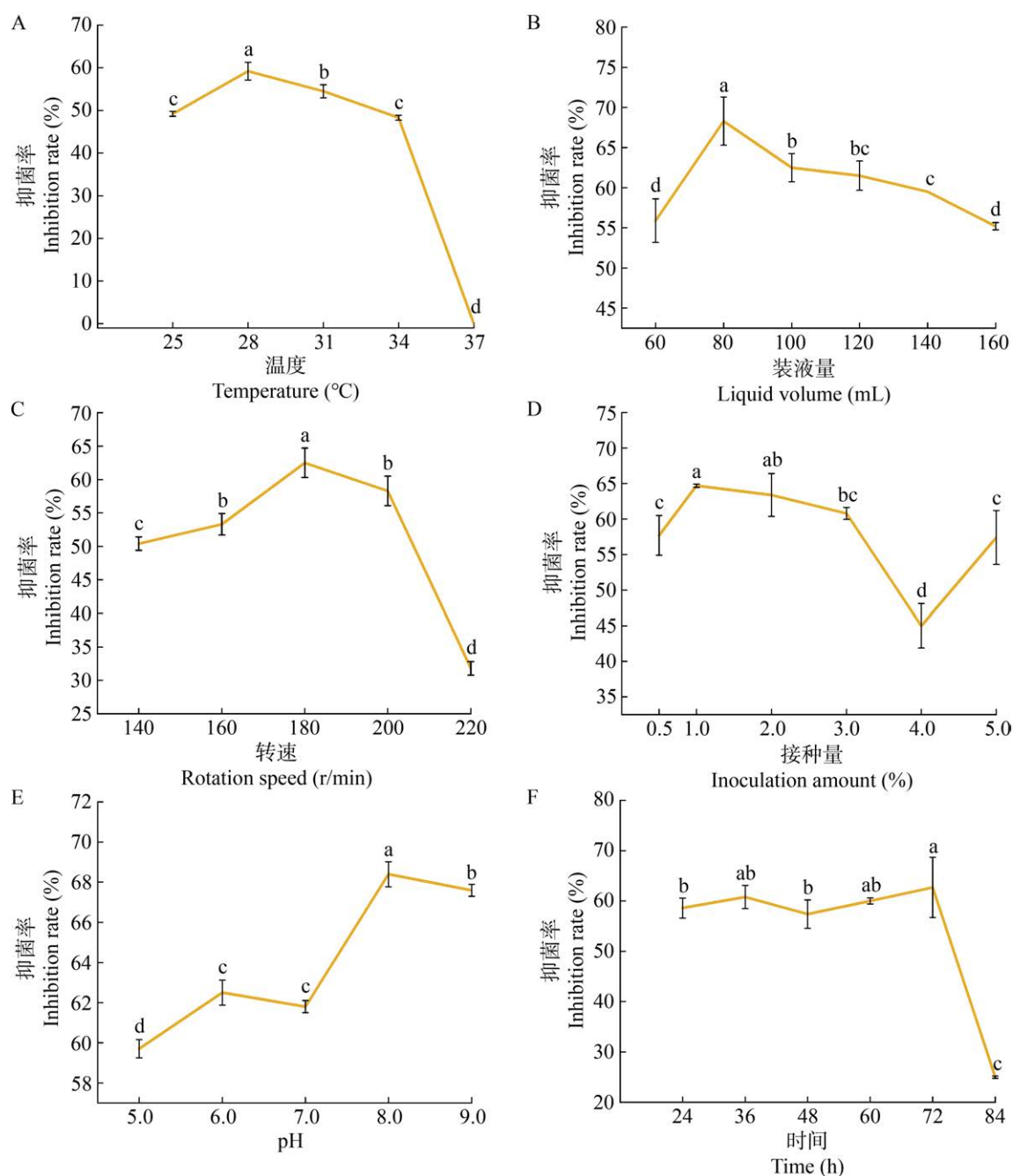


图 7 不同培养条件对贝莱斯芽孢杆菌 F-37 拮抗活性的影响

Figure 7 Effects of different culture conditions on the antagonistic activity of *Bacillus velezensis* F-37.

2.5 二次通用旋转组合试验优化发酵条件

2.5.1 模型的建立与显著性试验

在单因素发酵条件优化基础上, 选定温度、初始 pH 值和装液量作为考察因子, 通过构建

三元二次通用旋转组合模型, 解析多因素交互作用对菌株拮抗效能的影响(表 3)。基于 DPS 7.05 统计软件对表 3 实验数据执行方差分析, 通过逐步回归算法构建了发酵液抑菌率(Y)与 3 个关键发酵参数的二次多项式回归模型:

表 3 三元二次通用旋转组合实验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of ternary quadratic universal rotation combination

处理 Treatment	温度 Temperature (°C)	装液量 Liquid volume (mL)	pH	抑菌率 Inhibition rate (%)
1	31 (1)	100 (1)	9.00 (1)	60.1
2	31 (1)	100 (1)	7.00 (-1)	48.4
3	31 (1)	60 (-1)	9.00 (1)	60.5
4	31 (1)	60 (-1)	7.00 (-1)	51.7
5	25 (-1)	100 (1)	9.00 (1)	61.3
6	25 (-1)	100 (1)	7.00 (-1)	61.1
7	25 (-1)	60 (-1)	9.00 (1)	64.8
8	25 (-1)	60 (-1)	7.00 (-1)	63.7
9	23 (-1.681 8)	80 (0)	8.00 (0)	56.8
10	33 (1.681 8)	80 (0)	8.00 (0)	63.3
11	28 (0)	46 (-1.681 8)	8.00 (0)	50.8
12	28 (0)	114 (1.681 8)	8.00 (0)	48.5
13	28 (0)	80 (0)	6.32 (-1.681 8)	52.8
14	28 (0)	80 (0)	9.68 (1.681 8)	0.0
15	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	64.9
16	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	64.7
17	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	63.6
18	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	63.4
19	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	60.3
20	28 (0)	80 (0)	8.00 (0)	61.3

括号内数值表示各因素水平的编码设定。

Values in parentheses denote the coded levels of experimental factors.

$Y=62.560\ 14-1.410\ 89X_1-1.000\ 83X_2-4.905\ 86X_3+2.037\ 79X_1^2-1.639\ 17X_2^2-9.859\ 28X_3^2+0.300\ 00X_1X_2+2.400\ 00X_1X_3+0.250\ 00X_2X_3$ 。方差分析显示(表 4), 各参数对抑菌率的主效应排序为: 初始 pH (X_3)>温度(X_1)>装液量(X_2), 其中仅 pH (X_3)对发酵液抑菌活性具有极显著影响($P<0.001$), 而装液量 X_2 未达显著性阈值($P>0.05$)。

2.5.2 发酵条件优化与验证

pH 是菌株 F-37 发酵中关键影响因素之一, 基于频率分析法对回归模型进行优化, 优化结果详见表 5。在 95%置信水平下, 当发酵液抑菌率超过 56.1%的阈值时, 各变量的编码取值区间分别为-0.711-0.056、-0.432-0.286 和 -0.591--0.256, 即参数优化范围为: 发酵温度 25.9-28.2 °C、装液量 71.4-85.7 mL/300 mL、pH

7.4-8.3。为考虑操作便捷, 将最佳优化条件方案调整为: 发酵温度 27 °C、装液量 78 mL/300 mL、pH 7.8。经 3 次平行试验验证, 测得菌株 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌率为(70.10±0.07)% (图 8), 接近理论值 70.7%, 与优化前的培养基(46.9%)及 LB 培养基抑菌率(25.9%)相比, 抑菌率显著提高, 表明此模型可预测最佳工艺条件。

3 讨论

近年来, 随着生姜种植面积的不断扩大, 青枯病逐渐成为其生产中的主要土传病害。尽管传统的化学防治方法在一定程度上有效, 但由于环境污染、病原菌抗药性等问题, 其应用受到了诸多限制。贝莱斯芽孢杆菌已被广泛研

表 4 二次通用旋转组合试验结果方差分析

Table 4 Analysis of variance for quadratic general rotary composite design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
X_1 temperature	1 532.521 1	1	1 532.521 1	7.905 8	0.018 4
X_2 liquid volume	771.143 8	1	771.143 8	3.978 1	0.074 1
X_3 pH	18 528.908 2	1	18 528.908 2	95.585 4	0.000 1
X_1^2	3 373.571 9	1	3 373.571 9	17.403 3	0.001 9
X_2^2	2 182.813 6	1	2 182.813 6	11.260 5	0.007 3
X_3^2	18 969.918 2	1	18 969.918 2	407.383 5	0.000 1
X_1X_2	40.588 3	1	40.588 3	0.209 4	0.657 0
X_1X_3	2 597.650 4	1	2 597.650 4	13.400 5	0.004 4
X_2X_3	28.186 3	1	28.186 3	0.145 4	0.710 9
回归 Model	1 962.933 5	9	218.103 7	$F_2=1.125$	0.434 5
剩余 Residual	1 938.466 5	10	193.846 7		
残差 Lack of fit	1 921.273 2	5	384.254 6	$F_1=111.745$	0.000 1
误差 Pure error	17.193 3	5	3.438 7		
总和 Cor. total	3 901.400 0	19			

表 5 各变量取值的频率分布

Table 5 Frequency distribution of variable value in the optimization scheme

Item	X_1 Temperature		X_2 Liquid volume		X_3 pH	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
	Times	Frequency	Times	Frequency	Times	Frequency
-1.681 8	12	0.292 7	7	0.170 7	2	0.048 8
-1.000 0	10	0.243 9	10	0.243 9	14	0.341 5
0.000 0	7	0.170 7	10	0.243 9	25	0.609 8
1.000 0	5	0.122 0	7	0.170 7	0	0.000 0
1.681 8	7	0.170 7	7	0.170 7	0	0.000 0
加权均数 Weighted average	-0.327 0		-0.196 0		-0.424 0	
标准误 Standard error	0.196 0		0.183 0		0.086 0	
95%置信区间	-0.711-0.056		-0.432-0.286		-0.591--0.256	
95% Confidence interval						
发酵条件范围 Factor range	25.9-28.2		71.4-85.7		7.4-8.3	

究, 证明其对多种作物青枯病原菌具有显著的抑制作用。例如, 冯印印等^[19]发现贝莱斯芽孢杆菌 FY-C 对烟草青枯病菌具有较好的抑菌效果; 王晓楠等^[20]则指出, 贝莱斯芽孢杆菌 ZN-S10 不仅能够显著减缓番茄青枯病的病情发展, 还对番茄细菌性髓部坏死病菌、甘薯茎腐病菌、花椰菜细菌性软腐病菌等病原菌具有不同程度的抑菌活性。相比之下, 针对生姜青枯病的生防菌研究相对较少。本研究以分离自

生姜根围的贝莱斯芽孢杆菌 F-37 为对象, 检测结果表明其对生姜青枯劳尔氏菌的抑菌带宽度达 (0.67 ± 0.01) cm, 表现出良好的抑菌活性。

贝莱斯芽孢杆菌作为一种常见的生防菌株, 能够通过合成多种次级代谢产物及抑菌蛋白发挥对病原菌的抑制作用。其中, 次级代谢产物主要包括聚酮类抗生素、细菌素及挥发性有机化合物^[21]等。王春玲等^[22]研究发现, 贝莱斯芽孢杆菌 MB1019 能够产生具有抑菌活性的

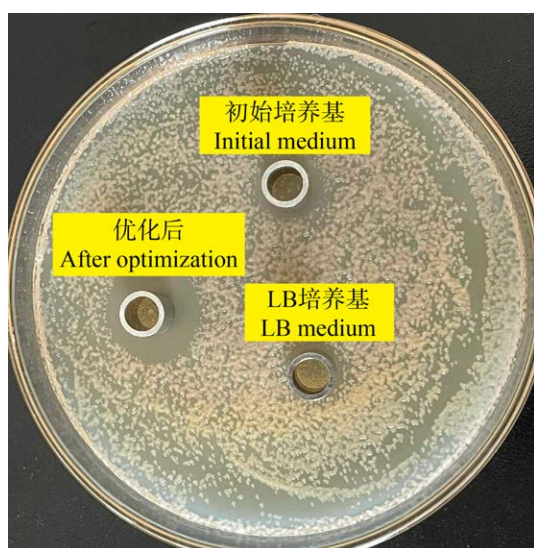


图8 优化前后贝莱斯芽孢杆菌 F-37 无菌滤液对青枯劳尔氏菌的抑菌效果比较

Figure 8 Comparison of the inhibition effect of the sterile supernatant of *Bacillus velezensis* F-37 on *Ralstonia solanacearum* under the conditions of before optimization and post-optimality.

多种次级代谢产物, 以及蛋白酶和纤维素酶, 这些物质对番茄青枯病菌具有显著的抑菌作用。黄伟等^[23]研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌 K19 可能通过产生杆菌霉素 D、环二肽等拮抗物质抑制青枯病菌的生长。细菌素作为一种核糖体合成的肽类物质, 通常具有广谱的抗菌活性, 能够通过破坏靶细胞的细胞膜或抑制其细胞壁合成来抑制细菌生长^[24]。研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌 CM7-4 产生的细菌素粗提物对多种革兰氏阴性和阳性菌展现了显著的抑菌活性, 其中对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等病原菌表现出强烈的抑制作用^[25]。此外, 贝莱斯芽孢杆菌通过产生挥发性有机化合物如醇类、酮类化合物等, 进一步抑制病原菌生长, 尤其在土壤和植物根际环境中表现出独特的抗病优势^[26]。

研究还表明, 贝莱斯芽孢杆菌在不同环境条件下, 抑菌成分的产量和活性表现出显著差异。例如, 温度、pH 值及碳、氮源的不同对脂肽类物质和其他抗菌物质的合成具有重要影响^[27]。因

此, 优化发酵参数成为提升其抗菌活性的关键手段之一。RSM 能够精确分析多个变量之间的交互作用, 提高实验效率, 显著提升抑菌物质的生产。本研究基于单因素筛选获得碳源、氮源及无机盐的最适配比, 结合 Box-Behnken 响应面优化模型, 系统解析并验证贝莱斯芽孢杆菌 F-37 发酵培养基的最优组分组合, 该培养基原料简单易得、成本低廉, 采用优化后的培养基进行发酵后, 贝莱斯芽孢杆菌 F-37 的抑菌圈直径较未优化前显著增加, 表明该配方能显著提高菌株 F-37 对生姜青枯劳尔氏菌的抗菌活性。

菌株 F-37 在 25–34 °C 范围内均能生长, 但在 28 °C 时抑菌活性最高, 温度升至 34 °C 时抑菌能力有迅速下降的趋势, 而当温度升至 37 °C 时抑菌能力基本丧失, 说明高温条件下不利于菌株 F-37 产生抑菌物质, 与刘丙花等^[28]对高产胞外多糖巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的研究结果相似。不同转速对菌株 F-37 无菌滤液的拮抗活性差异显著, 在 180 r/min 时达到峰值, 与李铮等^[29]对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) DST27 的研究结果相近。

菌株在发酵条件下的表现具有特异性, 不同菌株对培养基成分和发酵参数的需求可能存在差异。因此, 尽管本研究成功优化了菌株 F-37 的发酵条件, 但不同贝莱斯芽孢杆菌在相同条件下的抑菌活性和代谢产物产量可能各异。在后续研究中, 需在更接近工业化生产的条件下(如发酵罐)进一步验证菌株 F-37 的发酵工艺。此外, 还应深入探讨菌株 F-37 所产生抑菌活性物质的种类、稳定性和作用机制, 以期为青枯劳尔氏菌的生物防治提供理论支持, 并为该菌株的大规模生产和田间应用奠定基础。

4 结论

本研究确定了贝莱斯芽孢杆菌 F-37 的最佳发酵培养基配方(g/L): 小麦淀粉 14.9、酵母浸粉 8.6、氯化钾 7.8; 确定其最优发酵参数为: 装液量 78 mL/300 mL、接种量 1.0%、初始 pH 7.8、

温度 27 °C、转速 180 r/min、培养时间 3 d, 在此条件下, 菌株 F-37 的无菌滤液对生姜青枯劳尔氏菌的抑菌率达到 70.10%, 较优化前的 46.9%显著提升。

作者贡献声明

张佳佳: 实验方法设计, 实验数据分析及论文初稿撰写; 崔文艳: 方法指导, 协助研究资金获取; 舒慧琳: 参与实验设计, 协助完成实验操作; 罗喜燕: 实验数据初步分析, 协助整理参考文献; 张恺琦: 部分数据收集与辅助分析; 何朋杰: 提供资源, 获取科研基金。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] SHAHRAJABIAN MH, SUN WL, CHENG Q. Clinical aspects and health benefits of ginger (*Zingiber officinale*) in both traditional Chinese medicine and modern industry[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 2019, 69(6): 546-556.
- [2] 汪茜, 覃晓娟, 陈廷速, 周生茂, 宋娟. 丛枝菌根真菌与深色有隔内生真菌对姜瘟病的防效及抗病机理初探[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(2): 788-801.
WANG Q, QIN XJ, CHEN TS, ZHOU SM, SONG J. Preventive effects of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes on ginger and the anti-disease mechanism[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(2): 788-801 (in Chinese).
- [3] 汪茜, 宋娟, 李冬萍, 覃晓娟, 陈廷速, 周生茂. 巨大芽孢杆菌 YB-3 的筛选、鉴定及其对生姜青枯病的生防效果研究[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(1): 204-211.
WANG Q, SONG J, LI DP, QIN XJ, CHEN TS, ZHOU SM. Screening, identification and control efficacy of *Bacillus megaterium* with antagonist activity against ginger wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(1): 204-211 (in Chinese).
- [4] 赵志祥, 严婉荣, 陈圆, 肖彤斌, 肖敏. 一株生姜青枯病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. *南方农业学报*, 2015, 46(3): 421-427.
ZHAO ZX, YAN WR, CHEN Y, XIAO TB, XIAO M. Screening, identification and fermentation condition optimization of biocontrol bacteria YA-1 against ginger bacterial wilt[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(3): 421-427 (in Chinese).
- [5] 党柯柯, 彭俊伟, 孙阳, 谢子煜, 董元华, 李建刚. 拮抗姜瘟病内生细菌的筛选及其生防效果研究[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(3): 585-593.
DANG KK, PENG JW, SUN Y, XIE ZY, DONG YH, LI JG. Screening and biocontrol characteristics of endophytic strains against ginger bacterial wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(3): 585-593 (in Chinese).
- [6] 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(12): 277-280.
QI AY, ZHAO XS, LIU DQ. Research of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(12): 277-280 (in Chinese).
- [7] PARSAAE M, KIANI DEH KIANI M, KARIMI K. A review of biogas production from sugarcane vinasse[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2019, 122: 117-125.
- [8] BAIS HP, WEIR TL, PERRY LG, GILROY S, VIVANCO JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 233-266.
- [9] 刘帅康, 黎昕, 丰慧, 张翼飞, 黄宁, 周栗禾, 刘忠伟, 蔡璘. 青枯病生物防治研究进展[J]. *植物医学*, 2023, 2(4): 39-46.
LIU SK, LI T, FENG H, ZHANG YF, HUANG N, ZHOU LH, LIU ZW, CAI L. Advances in biological control of bacterial wilt[J]. *Plant Health and Medicine*, 2023, 2(4): 39-46 (in Chinese).
- [10] 张彩文, 程坤, 张欣, 刘波, 都海渤, 姚粟. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)分类学及功能研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(17): 258-265.
ZHANG CW, CHENG K, ZHANG X, LIU B, DU HB, YAO S. Taxonomy and functions of *Bacillus velezensis*: a review[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(17): 258-265 (in Chinese).
- [11] 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).
- [12] YAZID H, BOUZID T, EL MOUCHTARI EM, BAHIS L, EL HIMRI M, RAFQAH S, EL HADDAD M. Insights into the adsorption of Cr(VI) on activated carbon prepared from walnut shells: combining response surface methodology with computational calculation[J]. *Clean Technologies*, 2024, 6(1): 199-220.
- [13] LI RF, WANG B, LIU S, CHEN SH, YU GH, YANG SY, HUANG L, YIN YL, LU ZF. Optimization of the expression conditions of CGA-N46 in *Bacillus subtilis* DB1342(p-3N46) by response surface methodology[J]. *Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences*, 2016, 8(3): 277-283.
- [14] HE YH, XU JP, WANG SJ, ZHOU GY, LIU JN. Optimization of medium components for production of chitin deacetylase by *Bacillus amyloliquefaciens* Z7, using response surface methodology[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014, 28(2): 242-247.
- [15] TRELOAR NJ, BRANIFF N, INGALLS B, BARNES CP. Deep reinforcement learning for optimal experimental design in biology[J]. *PLoS Computational Biology*, 2022, 18(11): e1010695.
- [16] SREEKUMAR G, SOUNDARAJAN K. Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis*

- SK09 by medium optimization using response surface methodology[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(47): 8078-8084.
- [17] CUI WY, ZHANG JJ, WANG WJ, WU XY, LUO XY, ZOU Y, CHEN KX, HE PJ. Screening native *Bacillus* strains as potential biological control agents against ginger bacterial wilt and for promoting plant growth[J]. Biological Control, 2024, 192: 105510.
- [18] 何朋杰, 崔文艳, 何鹏飞, 李兴玉, 吴毅歆, SHAHZAD Munir, 何月秋. 表面活性素促进枯草芽孢杆菌 XF-1 在大白菜叶际定殖能力研究[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 28-34.
- HE PJ, CUI WY, HE PF, LI XY, WU YX, MUNIR S, HE YQ. Surfactin promotes the colonization of *Bacillus subtilis* XF-1 in the phyllosphere of Chinese cabbage[J]. Plant Protection, 2021, 47(5): 28-34 (in Chinese).
- [19] 冯印印, 李斌, 杨洋, 何佑弦, 安航, 闫芳芳, 安德荣. 烟草青枯病菌拮抗细菌的筛选、鉴定和抑菌机制研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 331-339.
- FENG YY, LI B, YANG Y, HE JX, AN H, YAN FF, AN DR. Screening, identification and inhibition activity of the antagonistic bacteria of *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 331-339 (in Chinese).
- [20] 王晓楠, 冯晓晓, 施斌, 陈恩磊, 陈梦丽, 郑永利, 吴慧明. 内生细菌 ZN-S10 的鉴定及其对番茄青枯病菌的抑菌作用[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(11): 2636-2644.
- WANG XN, FENG XX, SHI B, CHEN EL, CHEN ML, ZHENG YL, WU HM. Identification of *Bacillus velezensis* ZN-S10 and its antifungal effect on tomato bacterial wilt[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2023, 35(11): 2636-2644 (in Chinese).
- [21] 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).
- [22] 王春玲, 黄钰婷, 刘星, 徐良雄, 王艳君, 肖海霞, 朱柏诗, 毛露甜. 一株贝莱斯芽孢杆菌鉴定、全基因组学分析及其抗病促生特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 745-757.
- WANG CL, HUANG YT, LIU X, XU LX, WANG YJ, XIAO HX, ZHU BS, MAO LT. Identification, genomic analysis, and disease-resistant and plant growth-promoting characterization of a *Bacillus velezensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 745-757 (in Chinese).
- [23] 黄伟, 张丽娟, 秦新政, 王宁, 王玮. 贝莱斯芽孢杆菌 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).
- [24] TWOMEY E, HILL C, FIELD D, BEGLEY M. Recipe for success: suggestions and recommendations for the isolation and characterisation of bacteriocins[J]. International Journal of Microbiology, 2021, 2021(1): 9990635.
- [25] 马浩天, 李杨, 余梦博, 潘瑞雪, 龙赞而, 赵一宁, 彭金菊, 马驿. 产细菌素贝莱斯芽孢杆菌 CM7-4 全基因组测序及抑菌活性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(12): 5117-5127.
- MA HT, LI Y, YU MB, PAN RX, LONG YE, ZHAO YN, PENG JJ, MA Y. Whole genome sequencing of bacteriocin-producing *Bacillus velezensis* CM7-4 and its bacteriostatic activity[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(12): 5117-5127 (in Chinese).
- [26] GAO HY, LI PZ, XU XX, ZENG Q, GUAN WQ. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 456.
- [27] 杨然迪, 杨怡妍, 曹灏, 金京, 陈杰. 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 产脂肽类物质抑菌活性及发酵条件优化[J]. 农药学报, 2024, 26(3): 504-516.
- YANG RD, YANG YY, CAO H, JIN J, CHEN J. Antifungal activity and fermentation optimization of lipopeptides produced by *Bacillus velezensis* TCS001[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(3): 504-516 (in Chinese).
- [28] 刘丙花, 丁延芹, 刘方春, 刘幸红, 马胜国, 彭琳, 孙铭婕, 于连家, 马海林. 一株高产胞外多糖巨大芽孢杆菌的筛选鉴定、发酵条件优化及其对土壤团聚体的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3968-3979.
- LIU BH, DING YQ, LIU FC, LIU XH, MA SG, PENG L, SUN MJ, YU LJ, MA HL. Screening, identification, fermentation condition optimization of an exopolysaccharide-producing strain and the influence on soil macro-aggregate formation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3968-3979 (in Chinese).
- [29] 李铮, 王艳, 晋玲, 王伟, 付瑶, 栾涵钰, 吕娇娇. 短小芽孢杆菌 DST27 发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 农药, 2024, 63(7): 500-506, 514.
- LI Z, WANG Y, JIN L, WANG W, FU Y, LUAN HY, LYU JJ. Optimization of fermentation medium and conditions for *Bacillus pumilus* DST27[J]. Agrochemicals, 2024, 63(7): 500-506, 514 (in Chinese).