

陈佳蕙, 黄洁, 叶敏, 等. 番茄灰霉病拮抗菌 DB2203A 筛选鉴定及发酵条件优化 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(9): 213–221. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070102

CHEN Jiahui, HUANG Jie, YE Min, et al. Screening, Identification and Fermentation Condition Optimization of Antagonistic Bacterium DB2203A against Tomato Gray Mould (*Botrytis cinerea*)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(9): 213–221. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070102

· 生物工程 ·

番茄灰霉病拮抗菌 DB2203A 筛选 鉴定及发酵条件优化

陈佳蕙, 黄洁, 叶敏*, 范黎明*

(云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 引发的一种危害严重的世界性病害, 本研究从云南高黎贡山大树茶的健康枝叶中分离到一株对重要植物病原菌灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 有较强抑菌作用的拮抗菌, 形态学及分子生物学的鉴定结果表明, 该拮抗菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 并命名为 DB2203A。通过单因素和正交试验优化了菌株 DB2203A 的发酵条件, 并在此条件下进行发酵液的抑菌活性测定与抑菌物质初探。结果显示, 本研究从枝叶组织中分离筛选得到 7 株对病原菌具有较强拮抗作用的菌株, 其中对灰葡萄孢菌抑菌效果最显著的菌株为 DB2203A, 其无菌发酵液对灰葡萄孢菌的抑制率达 74.77%。菌株最佳培养基为 LB 培养基, 最佳发酵条件为接种量 6%、装液量 50%、初始 pH7.0、发酵时间 72 h。研究结果还表明, 稀释 40 倍的发酵液对灰葡萄孢菌的抑菌活性为 59.25%, 且发酵液中的脂肽类物质可抑制灰葡萄孢菌菌丝的生长。枯草芽孢杆菌 DB2203A 及其脂肽类代谢产物在番茄灰霉病绿色防控中具有良好应用潜力, 为微生物菌剂开发提供了理论基础与菌种资源。

关键词: 番茄灰霉病, 枯草芽孢杆菌, 正交试验优化, 抑菌活性, 高黎贡山大树茶

中图分类号: S432

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2026)09-0213-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025070102



本文网刊:

Screening, Identification and Fermentation Condition Optimization of Antagonistic Bacterium DB2203A against Tomato Gray Mould (*Botrytis cinerea*)

CHEN Jiahui, HUANG Jie, YE Min*, FAN Liming*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources in Yunnan, College of Plant Protection,
Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Tomato grey mould, caused by *Botrytis cinerea*, is a severely damaging global disease. This study isolated a strain of antagonistic bacteria with strong inhibitory effects against the important plant pathogen *Botrytis cinerea* from healthy branches and leaves of *Camellia sinensis* in Yunnan's Gaoligong Mountain. The morphological and molecular biological identification results indicated that the antagonistic strain was *Bacillus subtilis*, which was designated as DB2203A. The fermentation conditions of strain DB2203A were optimized through single-factor and orthogonal experiments, and the antibacterial activity of the fermentation broth was determined along with a preliminary exploration of the antibacterial substances under these conditions. This study isolated and screened seven strains with strong antagonistic effects against pathogenic fungi from leaf and branch tissues. Among them, strain DB2203A exhibited the most significant inhibitory effect against *B. cinerea*, with its sterile fermentation broth achieving an inhibition rate of 74.77% against the

收稿日期: 2025-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060631)。

作者简介: 陈佳蕙 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物农药, E-mail: c2648447216@163.com。

* 通信作者: 叶敏 (1960-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 天然产物农药, E-mail: yeminpc@163.com。

范黎明 (1976-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物化学, E-mail: fanliming1976@163.com。

pathogen. The optimal medium for the strain DB2203A was LB medium, with the best fermentation conditions being an inoculation volume of 6%, a filling volume of 50%, an initial pH of 7.0, and a fermentation time of 72 h. The research results also showed that the antifungal activity of the 40 times diluted fermentation broth against *B. cinerea* was 59.25%. Moreover, the lipopeptide substances in the fermentation broth could inhibit the growth of the mycelium of *B. cinerea*. The strain *B. subtilis* DB2203A and its lipopeptide metabolites exhibit promising potential for the green control of tomato gray mold, providing a theoretical foundation and microbial resources for the development of microbial products.

Key words: tomato grey mould; *Bacillus subtilis*; orthogonal experiment optimisation; antifungal activity; *Camellia sinensis* in Gaoligong Mountain

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)是全球重要的经济作物,但在种植过程中极易受灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)侵染,导致番茄灰霉病大规模爆发。灰葡萄孢菌主要侵染番茄的叶和果实,造成叶片干枯和果实腐烂,严重时可使番茄减产高达60%以上^[1-2],并且在果实采后贮藏、运输过程中低温高湿的环境下仍能发生病菌侵染,造成很大的经济损失。目前,灰霉病的防治仍依赖化学杀菌剂,但长期滥用化学农药引发了灰葡萄孢菌抗药性增加^[3]、农残超标等问题。因此,亟需一项绿色安全的生物防治技术,对保障番茄品质和防治番茄采后病害具有重要意义。

近年来,植物内生菌因其与宿主的长期共生关系及低环境风险,成为生物防治研究的热点。这类微生物定殖于健康植物组织内部,且不会对宿主植物产生危害的微生物,主要包括内生细菌、内生真菌和内生放线菌等^[4-5]。目前,植物内生菌的研究多集中于常见水生和陆生植物^[6-7]中,但对特殊生态环境中(如极端盐碱、干旱、高寒等)的植物内生菌仍较为匮乏,这往往是功能独特的内生菌资源及其活性物质的重要来源^[8-9]。Mutungi等^[10]研究团队从盐碱湖岸灌木中筛选出两株对菜豆根腐病菌(*Fusarium solani*)具有显著抑制活性的拮抗菌。Egas等^[11]研究发现,南极洲维管植物通过内生真菌共生调控氧化还原平衡等分子机制,显著增强对持久性有机污染物的胁迫耐受性。而随着对植物内生菌的深入研究,发现部分内生菌可通过定殖竞争、抗菌物质分泌或诱导植物抗性等方式抑制病原菌,从而成为具有开发潜力的拮抗菌株^[12-13]。

目前,防治番茄采后病害的拮抗菌主要有木霉^[14]、枯草芽孢杆菌^[15]、放线菌^[16]等。其中枯草芽孢杆菌因其广谱抑菌性,并且能产生抗菌物质,如脂肽类抗生素、抗菌蛋白等物质,成为食品保鲜的研究热点^[17]。马超等^[18]从植物内生细菌中筛选出解淀粉芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,其发酵液对番茄灰葡萄孢菌抑制率分别达86.6%和83.0%。赵焕兰^[19]从猕猴桃筛选出一株贝莱斯芽孢杆菌A4,其发酵液在体内及体外均可抑制灰霉孢子萌发和破坏菌丝。然而,现有研究多集中于常温环境菌株,对适应低温环境中的拮抗菌鲜有报道。本研究首次从云南省高黎贡山(海拔1800余米)大树茶中分离内生菌,通过平板对峙法和菌丝生长速率法筛选高效抑菌菌株,结合形态鉴定和基因鉴定明确菌株地位,进一步优化发酵条件,

并采用酸沉淀法提取脂肽类活性物质,通过HPLC比对表面活性素标准品,解析其抑菌活性成分。本研究不仅为高寒植物内生菌资源库填补空白,更为开发适用于番茄采后低温保鲜的微生物菌剂提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

高黎贡山大树茶(树径20 cm)健康枝条样品取自于海拔1800余米的有机生态茶园,采样区域由云南省腾冲市高黎贡山生态茶叶有限责任公司挂牌保护管理;灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)为云南省植物病理重点实验室保藏菌种;Surfactin标准品上海源叶生物科技有限公司;2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)高保真聚合酶南京诺唯赞生物科技股份有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、营养琼脂培养基(NA)、营养肉汤培养基(NB)、LB培养基(酵母浸粉5 g/L,蛋白胨10 g/L, NaCl 10 g/L)、牛肉膏酵母浸粉葡萄糖培养基(NYBD)(牛肉膏8 g/L,酵母浸粉5 g/L,葡萄糖10 g/L)、完全培养基(CM)(葡萄糖5 g/L,硫酸铵2 g/L,柠檬酸钠1 g/L,七水合硫酸镁0.2 g/L,磷酸氢二钾4 g/L,磷酸二氢钾6 g/L)^[20]。

YXO-LS-50S II型立式压力蒸汽灭菌锅上海博迅实业有限公司医疗设备厂;AL104型电子分析天平梅特勒-托利多仪器上海有限公司;HG303-3型恒温培养箱南京实验仪器厂制造;SW-CJ系列超净工作台苏州安泰空气技术有限公司;MSD701型显微镜宁波舜宇仪器有限公司;CHA-S型气浴恒温振荡器金坛市易晨仪器制造有限公司;ST3100型pH计奥豪斯仪器有限公司;Hei-vap Advantage(ML)型旋转蒸发仪德国海道尔夫(Heidolph)公司;Kinetex 2.6 μ C₁₈色谱柱广州菲罗门科学仪器有限公司;1260型高效液相色谱仪美国Agilent公司。

1.2 实验方法

1.2.1 拮抗菌的分离与纯化 将大树茶枝条剪切成0.5 mm大小的块状组织;经75%酒精溶液漂洗2~3次后,采用3%次氯酸钠浸泡处理7 min,无菌水漂洗4次,置于无菌滤纸上晾干,将消毒过的组织块接种于含0.05 mg/mL重铬酸钾的NA平板,每组处理3次重复;28℃黑暗培养5 d,每日观察菌落生长情况。根据菌落形态差异挑取单菌落,于NA平板

划线纯化, 甘油保存法在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选 以灰葡萄孢菌作为指示菌, 本研究采取以下方法分别进行初筛与复筛。

1.2.2.1 初筛 参考文献 [21] 采用平板对峙法对上述分离纯化得到的细菌进行筛选, 在其基础上进行一定改良, 来达到初期快速筛选的目的。将灰葡萄孢菌菌饼(直径 5 mm)接种于直径 9 cm 的 PDA 平板中央, 用无菌竹签在距菌饼 2.5 cm 处沿十字交叉线对称的两个方向分别接种两种待测细菌的平板为处理组, 以未接细菌只接种灰葡萄孢菌的平板为对照组, 每处理 3 个重复, 置于 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 5 d, 采用十字交叉法测量灰葡萄孢菌菌落直径, 计算拮抗菌的抑制率, 选择抑制效果较好的拮抗菌菌株进行后续实验。

参考文献 [22] 采用滤纸片法在其基础上进行改动。挑取从经平板对峙筛选得到的菌株在 NA 培养基上划线, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 24 h, 挑取单菌落接种至 50/250 mL NB 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 12 h, 获得对数期菌悬液($\text{OD}_{600}\approx 0.8$), 即为拮抗菌种子液。在 PDA 平板中心接种灰葡萄孢菌菌饼(5 mm), 在距菌饼中心 3 cm 处的水平两侧, 各放置一片无菌滤纸片, 在其上滴加 4 μL 拮抗菌种子液作为处理组, 而对照组则滴加等量无菌水, 于无菌超净台中静置风干 2 min, 每个处理设置 3 个重复。在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下倒置培养 5 d 后, 测量菌落直径计算抑制率, 选择抑制率较高的菌株进行后续实验。公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100$$

1.2.2.2 复筛 采用菌丝生长速率法^[23]。将上述经初筛得到的抑制率较高的拮抗菌种子液按 2% 接种量转移至 50 mL NB 培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 72 h。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10000 r/min 下离心 10 min, 弃沉淀, 收集上清液, 经 0.22 μm 过滤除菌, 即为拮抗菌的无菌发酵液, 将无菌发酵液与灭菌后冷却至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的 PDA 培养基按 1:4(v/v)混合, 振荡混匀后倒成平板作为处理组, 取直径 5 mm 的灰葡萄孢菌菌饼接种于平皿中央, 每组处理设 3 个重复, 以加入等体积无菌水的平板为对照组。置于 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 5 d, 测量菌落直径, 并根据 1.2.2.1 中公式计算抑制率。

菌株筛选标准: 选择抑制率 $\geq 70\%$ 且三次重复间标准差 $< 5\%$ 的菌株为有效候选菌。

1.2.3 拮抗菌的鉴定

1.2.3.1 菌株形态学及生理生化鉴定 对培养 24 h 的菌落进行革兰氏染色, 通过光学显微镜观察菌落形态, 并参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[24] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[25] 中的测试方法对拮抗菌进行初步鉴定。

1.2.3.2 菌株分子生物学鉴定 分子鉴定采用细菌通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'^[26-27]

和 *gyrB* 引物 *gyrB*-2F(5'-AGAAGDTTGGAAGCTG TTCG-3') 和 *gyrB*-2R(5'-CGCGTTCTACYTTGTC DCC-3') 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。细菌 16S rDNA 和 *gyrB* 基因测序工作分别委托昆明擎科生物有限公司和中科 e 测公司完成。将获得的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析及系统发育树的构建采用 MEGA 7.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining ethod)完成, 其中 Bootstrap 重复抽样次数设置为 1000 次, 其他参数均采用软件默认设置^[28]。

1.2.4 发酵条件优化

1.2.4.1 初始发酵培养基对拮抗菌无菌发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌种子液(同 1.2.2.1)以 2% 的接种量分别接种于含 50 mL LB、NYBD、NB、CM 培养基的 250 mL 锥形瓶中, pH 为 7.0, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 72 h, 离心后上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 采用生长速率法测定抑制率, 每个处理重复 3 次^[29]。

1.2.4.2 发酵时间对拮抗菌无菌发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌种子液以 2% 接种量接于 50 mL 的优化培养基中, pH 为 7.0, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中分别发酵培养 48、60、72、84、96 h, 离心后上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 采用生长速率法测定抑制率, 每个处理重复 3 次^[30]。

1.2.4.3 接种量对拮抗菌无菌发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌种子液分别以接种 2%、4%、6%、8%、10% 的接种量接于 50 mL 优化培养基中, pH 为 7.0, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 72 h, 离心后上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 采用生长速率法测定抑制率, 每个处理重复 3 次^[31]。

1.2.4.4 装液量对拮抗菌无菌发酵液抑菌活性的影响 分别以 10%、20%、30%、40%、50% 的装液量在 250 mL 锥形瓶中装入上述优化的发酵培养基, 以 2% 的接种量接种拮抗菌种子液, pH 为 7.0, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 72 h, 离心后上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 测定其无菌上清液对灰葡萄孢菌的抑制率, 每个处理重复 3 次^[31]。

1.2.4.5 初始 pH 对拮抗菌无菌发酵液抑菌活性的影响 用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 标准溶液将培养基初始 pH 分别调节至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 将拮抗菌种子液接种于 50 mL 优化培养基中, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床中培养 72 h, 离心后上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 测定其无菌上清液对灰葡萄孢菌的抑制率, 每个处理重复 3 次^[32]。

1.2.5 正交试验优化 根据单因素实验结果选取三个抑菌活性影响显著的因素进行设计 $L_9(3^4)$ 试验, 以优化培养基为基础, 采用菌丝生长速率法测定其无菌上清液对灰葡萄孢菌的抑制率并以此作为衡量指

标,每个处理重复3次,各因素的水平见表1。

表1 菌株DB2203A发酵条件正交优化试验因素及水平
Table 1 Orthogonal design factors and levels for strain DB2203A fermentation optimization

水平	A发酵时间(h)	B接种量(%)	C初始pH
1	60	4	6
2	72	6	7
3	84	8	8

1.2.6 不同浓度发酵液对灰葡萄孢菌的影响 结合单因素实验与正交试验的优化条件培养拮抗菌,采用菌丝生长速率法测定DB2203A无菌发酵液对灰葡萄孢菌菌丝生长的影响,用45℃的PDA培养基将发酵液稀释2.5、5、10、20、40倍,混合摇匀倒板,以只加无菌水的平板作对照组,平板中央接入5mm灰葡萄孢菌菌饼,28℃培养5d,测定菌落的生长直径,计算其无菌发酵液对灰葡萄孢菌的抑制率。

1.2.7 拮抗菌株DB2203A抑菌物质的初步分析

1.2.7.1 酸沉淀法提取有效物质 菌株DB2203A初步鉴定为芽孢杆菌,该属细菌产生脂肽类抑菌物质的研究可见于多份相关文献^[33-34]。推测菌株DB2203A抑菌活性的物质基础,有较大概率是脂肽类成分。为验证该推测,参考文献[35]所述,采用针对脂肽类物质的提取方法,对菌株DB2203A的发酵上清液进行酸沉淀提取。按照1.2.2.2中的方法获得DB2203A的无菌发酵液,用6.0 mol/L的盐酸调节无菌培养滤液的pH至2.0,于4℃冰箱静置过夜,在4℃、10000 r/min的条件下离心30 min后收集沉淀,用甲醇萃取3次,合并萃取液,在旋转蒸发器中减压蒸干得到脂肽类粗提物。用蒸馏水将粗提物溶解成浓度为40 mg/mL的待测样品,0.22 μm微孔滤膜过滤,吸取600 μL待测样品溶于45℃的60 mL PDA培养基中,振荡摇匀后制成平板,平板中央接种5 mm的灰葡萄孢菌菌饼,以接种无菌水的平板为对照,每个处理重复三次,参考1.2.2.1中公式计算其抑制率。

1.2.7.2 高效液相色谱检测 将上述得到的脂肽类粗提物用甲醇溶解,0.22 μm有机系滤膜过滤,进行HPLC分析,以表面活性素(surfactins)为参照。检测仪器为Agilent UPLC 1290 Infinity II,色谱条件如下:色谱柱为Kinetex 2.6 u C₁₈, 100×4.6 mm;流动相A: 0.1%磷酸水,流动相B: 乙腈;流速: 0.5 mL/min;柱后平衡: 3 min;柱温: 35℃;检测波长: 205 nm;步进值: 2.0 nm;采样频率: 20 Hz;进样量: 5 μL;梯度洗脱条件见表2。

表2 液相色谱梯度洗脱程序

Table 2 Program of HPLC gradient elution

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	40	60
5	30	70
20	15	85
20.5	40	60

1.3 数据处理

采用SPSS Statistics 27.0软件统计与分析实验数据和设计正交试验,通过单因素方差分析对实验数据进行统计学检验,并利用Duncan多重比较法进行组间差异分析。所有数据均以均值±标准差形式呈现,P<0.05表示差异显著,P<0.01表示差异极显著,并采用软件Origin Pro2024制图。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌筛选

2.1.1 拮抗菌初筛 从大树茶健康枝叶分离纯化得到细菌107株,通过平板对峙法初筛得到对灰葡萄孢菌抑制作用较好(抑制率≥50%)的细菌28株,进一步通过纸片法筛选出抑菌率在70%以上且稳定的细菌8株(表3)。

表3 大树茶拮抗菌筛选(初筛)

Table 3 Primary screening of antagonistic bacteria from *Camellia sinensis*

拮抗菌	抑制率(%)	拮抗菌	抑制率(%)
DB04	77.26±0.52 ^a	DB05	73.93±1.58 ^{cd}
GB02	76.25±1.74 ^{ab}	GBAZ	72.71±1.15 ^d
DB03	75.79±1.19 ^{abc}	DB2203A	70.04±0.77 ^e
TB2202	75.11±0.7 ^{bc}	TB3	68.78±0.25 ^{ef}
TB1	75.11±1.67 ^{bc}	TB2212A	67.19±0.34 ^f

注:不同小写字母表示差异显著(P<0.05),表4、表7同。

2.1.2 拮抗菌复筛 采用菌丝生长速率法对初筛所得的菌株发酵液的抑菌活性进行复筛,有7株拮抗菌抑菌效果较好,均在58.93%以上,其中DB2203A无菌发酵液抑菌率达到74.77%±2.35%,结合初筛结果,因此选择DB2203A作为后续实验研究菌株。结果见图1、表4。

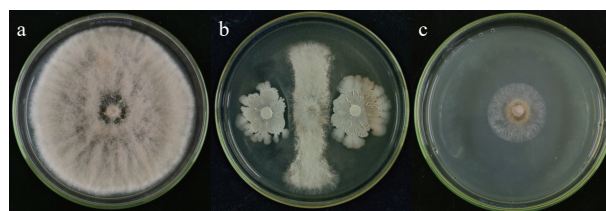


图1 拮抗菌DB2203A对灰葡萄孢菌的抑菌效果

Fig.1 Antibacterial effect of antagonistic bacteria DB2203A against *Botrytis cinerea*

注: a: 对照组; b: 菌株拮抗组; c: 无菌发酵液拮抗组。

表4 大树茶拮抗菌筛选(复筛)

Table 4 Secondary screening of antagonistic bacteria from *Camellia sinensis*

拮抗菌	抑制率(%)	拮抗菌	抑制率(%)
DB04	22.38±4.52 ^{cd}	DB05	28.38±0.49 ^c
GB02	60.97±9.07 ^b	GBAZ	65.71±5.66 ^{ab}
DB03	67.26±8.36 ^{ab}	DB2203A	74.77±2.35 ^a
TB2202	60.96±3.66 ^b	TB3	15.90±5.57 ^d
TB1	70.74±2.41 ^a	TB2212A	58.93±2.87 ^b

2.2 DB2203A 菌株鉴定

2.2.1 DB2203A 形态学和生理生化鉴定 菌株 DB2203A 在 NA 培养基上 28 °C 培养 24 h 后, 菌落近似圆形, 呈乳白色, 表面干燥且边缘突起有皱纹, 边缘完整, 光学显微镜下观察菌体呈杆状, 革兰氏结果显示阳性(图 2)。V-P 试验、接触酶试验、硝酸盐还原试验、氧化酶试验均为阳性, 甲基红试验弱阳性, 使明胶液化、可分解淀粉、葡萄糖, 可利用柠檬酸盐, 不能产生脲酶、吡啶(表 5)。结合形态特征和生理生化特征, 初步鉴定 DB2203A 为芽孢杆菌属。

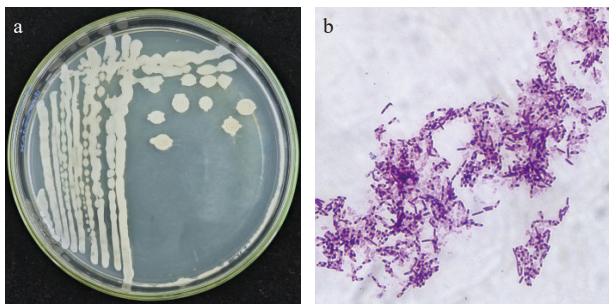


图 2 DB2203A 形态学特征

Fig.2 Morphological characteristics of strain DB2203A

注: a: DB2203A 的菌落形态; b: 革兰氏染色结果(1000×)。

表 5 菌株 DB2203A 的生理生化特性
Table 5 Physiological and biochemical properties of strain DB2203A

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	接触酶试验	+
V-P 试验	+	脲酶试验	-
甲基红试验	±	明胶液化	+
氧化酶试验	+	淀粉水解	+
吡啶试验	-	柠檬酸盐利用	+
硝酸盐还原试验	+	糖酵解试验	+

注: “+”表示阳性或有, “-”表示阴性或无, “±”表示弱阳性。

2.2.2 DB2203A 分子生物学鉴定 测序所得菌株 DB2203A 的 16S rDNA 基因序列长度为 1393 bp, 将测序结果与 GenBank 数据库中已知基因序列进行 Blast 比对分析, 选取数据库中与其相似度最高的菌株序列信息, 利用 NJ 法构建系统发育树。进一步对菌株进行 *gyrB* 多基因鉴定, 使用 2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)高保真聚合酶, 按设计的 4 对简并引物分别进行 PCR 扩增, *gyrB*-2F/*gyrB*-2R 可以扩增出目的条带大小约 1800 bp, 将测序结果拼接后与 GenBank 数据库中已知基因序列进行同源性比对分析, 并构建系统发育树。从图 3 及图 4 系统发育树中可明显看出菌株 DB2203A 与其他菌种的进化关系, 菌株 DB2203A 的 16S rRNA 基因序列均与芽孢杆菌属处于同一分支, 其 *gyrB* 基因序列与枯草芽孢杆菌 NCIB 3610 同源性均达到了 100%。结合形态学与生理生化试验结果, 将菌株 DB2203A 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

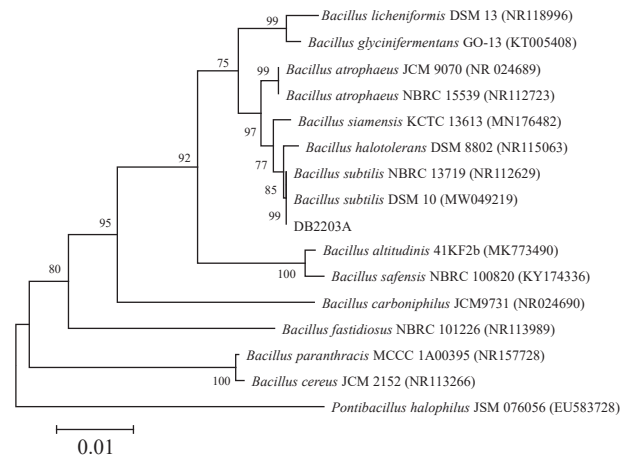


图 3 基于菌株 DB2203A 的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain DB2203A based on 16S rDNA gene sequence

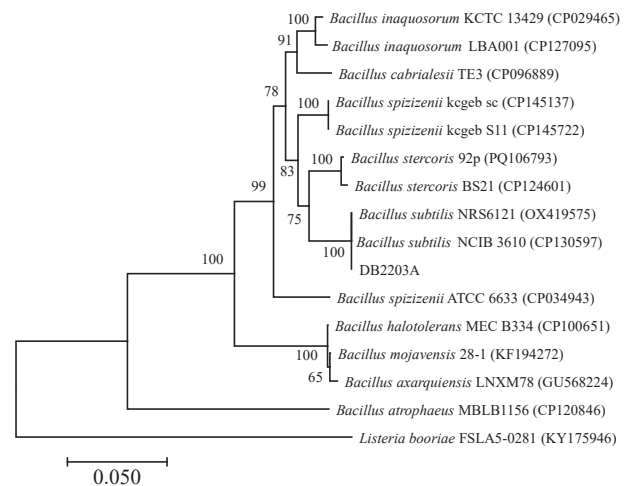


图 4 基于菌株 DB2203A 的 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain DB2203A based on *gyrB* gene sequence

2.3 发酵条件优化结果

2.3.1 初始发酵培养基筛选 如图 5 所示, 相较于其他三种培养基, 采用 LB 培养基发酵所得发酵液对灰葡萄孢菌的抑制率最高, 达到 94.28%, 其次为 CM、

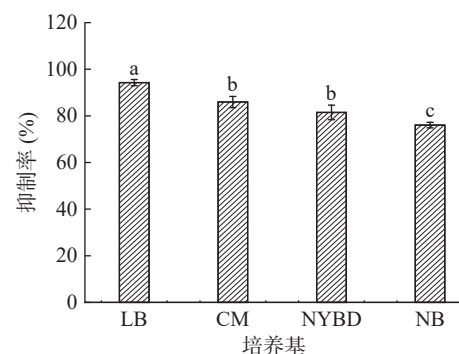


图 5 不同发酵培养基对抑制率的影响

Fig.5 Effect of different fermentation media on inhibition rate

注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); 图 6~图 9 同。

NYBD 和 NB 培养基,说明 LB 培养基更有利于抑菌活性物质的合成。因此,选定 LB 培养基作为后续发酵优化实验的基础培养基。

2.3.2 发酵时间的影响 如图 6 所示,当发酵时间为 48 h 时,菌株已产生抑菌物质,其发酵液的抑制率达到 93.64%,随着时间增长,抑菌率逐渐上升,是因为在生长前期,营养物质充足,菌体优先快速增殖,并逐渐积累次生代谢产物,在 72 h 时, DB2203A 发酵液的抑菌活性物质产生达到峰值,抑菌率达到 100%,超过 72 h,其抑菌活性轻微下降。可能是菌株在生长后期因自溶作用导致菌体减少,并释放蛋白酶、脂肪酶等,使部分抗菌活性物质被降解^[36]。方差分析结果显示发酵时间对菌株的抑菌物质产出有显著影响($P<0.05$),因此选择 72 h 作为最适发酵时间,并选择作为下一步正交试验的中心点。

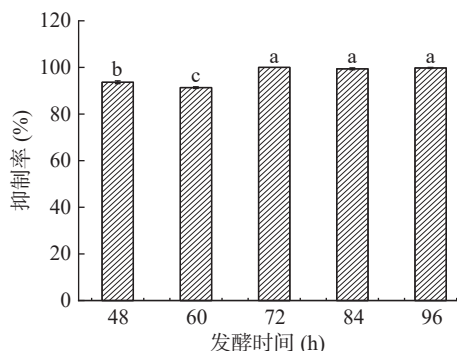


图 6 不同发酵时间对抑制率的影响

Fig.6 Effect of different fermentation times on inhibition rate

2.3.3 接种量的影响 由图 7 可知,随着接种量的提升,抑菌活性物质的产量呈现出先增后减的趋势,当初始接种量为 6% 时,菌株 DB2203A 发酵液的抑菌活性达到峰值,抑制率达到 99.79%,而在 8%~10% 的接种量之间,抑菌活性明显下降,推测这可能是培养基中菌体量过多导致菌种竞争增加,并产生更多的代谢废物^[37]。方差结果也显示接种量对菌株的抑菌物质产出较为显著($P<0.05$),因此,选择 6% 接种量为最适接种量,并选择作为下一步正交试验中心点。

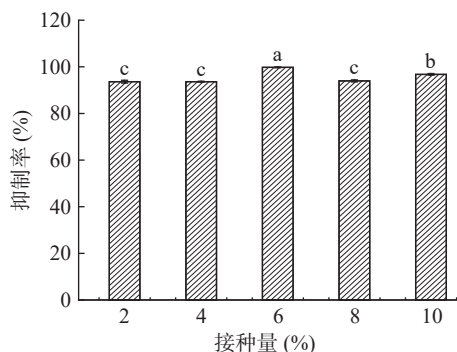


图 7 不同接种量对抑制率的影响

Fig.7 Effect of different inoculum size on inhibition rate

2.3.4 装液量的影响 如图 8 所示,装液量在 10%~30% 时,发酵液的抑菌效果先上升后下降,后续随着

装液量的增加持续稳定上升,这可能由于随着装液量的升高,营养物质增多所以先逐渐上升,后续可能是由于培养基溶氧量不足导致轻微下降。并且装液量在 40%~50% 之间抑菌活性差异不显著,在装液量为 50% 时,抑菌率达到最高。发酵工艺中,装液量少,在发酵过程中发酵液蒸发会增大^[37],因此选取 50% 装液量作为菌株 DB2203A 发酵培养的最适装液量,并后续不再进行优化。

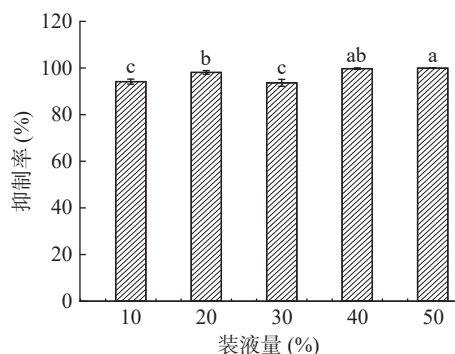


图 8 不同装液量对抑制率的影响

Fig.8 Effect of different liquid volume on inhibition rate

2.3.5 初始 pH 的影响 如图 9 所示,培养基的初始 pH 对菌株 DB2203A 产生的抑菌活性物质产生显著影响($P<0.05$)。在 pH6.0~8.0 范围内,菌株 DB2203A 的发酵液显示出最高的抑菌活性,且在 pH 为 8.0 时达到峰值,当 pH 为 5.0 或 9.0 时,发酵液则几乎丧失抑菌活性,这说明过酸或过碱的环境中不利于菌株生长进而影响抑菌活性物质的合成。因此, pH 在 6.0~8.0 之间,适合菌株的抑菌物质的产出,并选择 pH 为 7.0 作为正交试验中心点。

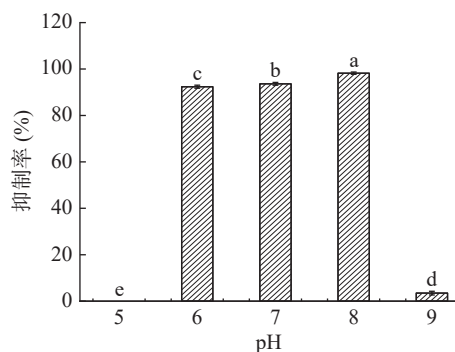


图 9 不同 pH 对抑制率的影响

Fig.9 Effect of different pH on inhibition rate

2.3.6 正交试验 本研究以灰葡萄孢菌作为指示菌,在 LB 培养基作为基础培养基的条件下,选择发酵时间、接种量和初始 pH 这三个关键因素,对枯草芽孢杆菌 DB2203A 的发酵条件进行了 $L_9(3^4)$ 正交试验。试验结果如表 6 所示,在 3 个因素中,初始 pH 对试验结果的影响最大,发酵时间次之,接种量影响最小。如表 6 所示,最佳发酵条件的组合为 $A_2B_2C_2$,即初始 pH7.0、发酵时间 72 h、接种量为 6%,在此发酵条件下 DB2203A 发酵液对灰葡萄孢菌的抑制率

最大, A₂B₁C₂ 组合同时达到了 100%, 但结合单因素实验和优化结果, 并且以抑制率稳定性和后续工业化可放大性为核心目标, 优先选择 A₂B₂C₂ 进行后续试验。经验证, 根据正交试验得出的最优组合, 在最适培养基(LB)和最适装液量(50%)条件下, 独立进行 3 次重复实验, 平均抑制率为 100%, 与正交试验结果趋于一致。

表 6 正交试验结果(L₉(3⁴))
Table 6 Results of orthogonal design L₉(3⁴)

试验号	A(发酵时间)	B(接种量)	C(初始pH)	抑制率(%)
1	1	1	1	94.75
2	1	2	2	98.44
3	1	3	3	96.46
4	2	1	2	100.00
5	2	2	3	99.98
6	2	3	1	98.17
7	3	1	3	94.89
8	3	2	1	95.50
9	3	3	2	99.25
K ₁	96.55	96.55	96.14	
K ₂	99.38	97.97	99.23	
K ₃	96.55	97.96	97.11	
R	2.84	1.43	3.09	

2.4 不同浓度发酵液对灰葡萄孢菌的影响

本研究通过 PDA 培养基梯度稀释法评估了菌株 DB2203A 发酵产物的抑菌活性(图 10)。如表 7 所示: 发酵液 2.5 倍稀释时完全抑制灰葡萄孢菌菌丝生长; 20 倍稀释时仍保持 89.25% 的抑制率; 40 倍稀释时抑制活性仍达 59.25%, 表明该发酵产物具有优异的抑菌稳定性。

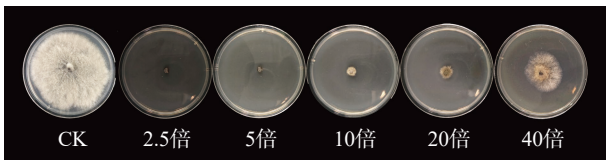


图 10 不同浓度发酵液对灰葡萄孢菌抑制效果
Fig.10 Inhibitory effects of fermentation broth at different concentrations on *Botrytis cinerea*

表 7 稀释发酵液对灰葡萄孢菌抑菌效果
Table 7 Inhibitory efficacy of diluted fermentation broth against *Botrytis cinerea*

稀释倍数	抑制率(%)
2.5	100.00±0.00 ^a
5	100.00±0.00 ^a
10	93.54±0.98 ^b
20	89.25±0.82 ^c
40	59.25±2.73 ^d

2.5 拮抗菌 DB2203A 抑菌物质初探

2.5.1 脂肽粗提物产量及抑菌活性分析 采用酸沉淀法, 得到疑似脂肽类产品 0.155 g。该提取物显示较强的抑菌活性, 在 0.4 mg/mL 浓度下, 能抑制灰葡萄孢菌丝生长, 且抑菌活性稳定, 抑菌率达到 62.18%

(图 11), 说明该抑菌物质很可能是脂肽类物质, 并通过后续的 HPLC 检测进行验证。与已报道的枯草芽孢杆菌脂肽类代谢产物相比, 如钱荣等^[34] 筛选得到的枯草芽孢杆菌 KC-WQ, 其胞外脂肽类产物对沙门氏菌具有显著抑菌特性, 而 DB2203A 脂肽类代谢产物对病原真菌更具特异性; 其抑菌效果与苗永美等^[33] 从石豆兰植物分离得到的枯草芽孢杆菌 BBs-27 相似, 其脂肽类提取物使黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*) 菌丝畸变并通过破坏可溶性蛋白和糖的合成途径抑制菌丝生长。现有研究表明, 抗菌脂肽通过改变细胞膜通透性、破坏质子动力势、诱导活性氧积累及引发氧化损伤等机制发挥广谱抑菌作用^[38]。因此, DB2203A 菌株的脂肽类代谢产物在生物防治方面具有应用潜力, 并在后续试验中会进一步挖掘抑菌物质的其他活性成分。

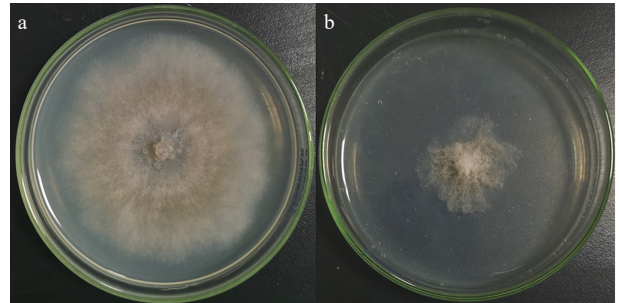


图 11 脂肽类粗提物对灰葡萄孢菌的抑菌活性
Fig.11 Antibacterial activity of lipopeptide crude extracts against *Botrytis cinerea*
注: a: 对照组; b: 处理组。

2.5.2 HPLC 分析 采用同样的 HPLC 方法分别对表面活性素(surfactins)混合标准品和菌株 DB2203A 的酸沉淀粗提物进行了色谱分析, 结果见图 12。通过对比几组色谱峰的保留时间、相对分布和相对峰面积, 发现两者具有较高的相似性。表面活性素(surfactins)是由芽孢杆菌发酵产生的一系列具有相似基本结构的环状脂肽, 本次色谱分析条件下, 呈现

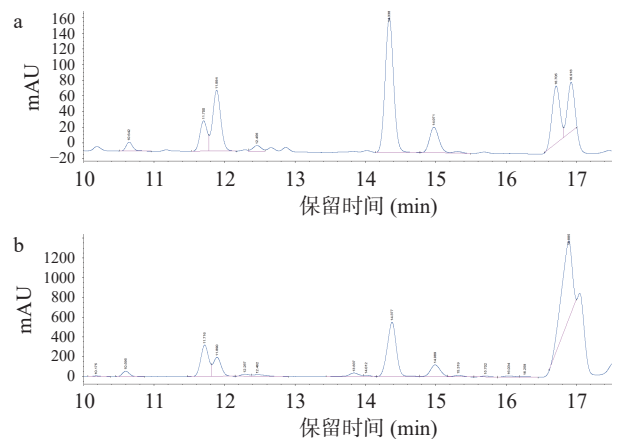


图 12 脂肽粗提物与标准品 HPLC 保留时间对比
Fig.12 Comparison of HPLC retention times between crude lipopeptide extract and standard product
注: a: 标准品; b: 粗提物。

出三组、六个主要色谱峰的特征,第一组保留时间在 11.7、11.9 min,第二组保留时间在 14.3、14.97 min,第三组保留时间在 16.7、16.9 min。菌株 DB2203A 的酸沉淀粗提取物在基本相同的保留时间出现色谱峰,只是第三组的相对峰面积更大。这些色谱特征可以作为初步证据,支持菌株 DB2203A 所产生的抑菌物质是表面活性素等脂肽类成分的结论。

3 结论

本研究从云南高黎贡山大树茶健康枝叶中分离筛选到一株拮抗细菌 DB2203A,经鉴定,该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。其无菌发酵液对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)的抑制率达 74.77%。通过单因素和正交试验优化确定了其产抑菌活性物质的最佳条件为:LB 培养基,接种量 6%,装液量 50%,初始 pH7.0,发酵时间 72 h。在此条件下,无菌发酵液 5 倍稀释时对灰葡萄孢菌完全抑制,40 倍稀释时抑制活性仍达 59.25%。此外,通过酸沉淀法获得的粗提物在浓度为 0.4 mg/mL 时对灰葡萄孢菌丝生长具有较强抑菌作用,抑制率达 62.18%,此为高黎贡山大树茶内生细菌资源的首次报道,结果显示菌株 DB2203A 具有作为开发为番茄灰霉病生防制剂的潜力,但是关于菌株 DB2203A 产生的抑菌物质分离纯化及鉴定、抑菌机制与田间防效都需要进一步深入研究。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 魏林,梁志怀,唐炎英. 番茄灰霉病的发生规律及其综合防治[J]. 长江蔬菜, 2020(7): 54-55. [WEI Lin, LIANG Zhihui, TANG Yanying. Occurrence laws and comprehensive control of *Botrytis cinerea* on tomato[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2020(7): 54-55.]

[2] 杨利敏,全赞华,郭立华,等. 番茄灰霉生防菌 CQ 的分子鉴定及其生防效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(6): 956-960. [YANG Limin, TONG Zanhua, GUO Lihua, et al. Screening, identification and biocontrol effects of antagonistic bacterial strain CQ against *Botrytis cinerea* from tomato[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(6): 956-960.]

[3] 于永学,王英姿. 灰霉病菌抗药性发生概况及机理研究进展[J]. 现代农业科技, 2009(11): 117-118. [YU Yongxue, WANG Yingzi. Research progress on the occurrence and mechanism of drug resistance of *Botrytis cinerea*[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2009(11): 117-118.]

[4] HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914.

[5] 马莲菊,王金缘,张韞璐,等. 植物内生菌次生代谢产物活性多样性及其应用前景[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(3): 344-348. [MA Lianju, WANG Jinyuan, ZHANG Yunlu, et al. The bioactive diversity of endophyte's secondary metabolites and application prospects[J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition), 2017, 35(3): 344-348.]

[6] 宋薇薇,朱辉,余凤玉,等. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(6): 12-16. [SONG Weiwei, ZHU Hui, YU Fengyu, et al. Plant endophytes and their control effects on plant diseases: A review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(6): 12-16.]

[7] 方珍娟,张晓霞,马立安. 植物内生菌研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2018, 15(10): 41-45. [FANG Zhenjuan, ZHANG Xiaoxia, MA Li'an. Research progress of endophytic bacteria in plants[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2018, 15(10): 41-45.]

[8] 张静怡,赵龙飞,刘梦洁. 植物内生菌多样性、功能及应用研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1446-1468. [ZHANG Jingyi, ZHAO Longfei, LIU Mengjie. Progress in research concerning the diversity, function, and application of plant endophytes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(4): 1446-1468.]

[9] 俞晓平,陈列忠,申屠旭萍. 植物内生菌及其代谢物在生物农药创制中的应用[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 289-293. [YU Xiaoping, CHEN Liezhong, SHENTU Xuping. Review on plant endophyte and its secondary metabolites in the application of producing bio-pesticides[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2006, 18(5): 289-293.]

[10] MUTUNGI P M, WEKESA V W, ONGUSO J, et al. Culturable bacterial endophytes associated with shrubs growing along the draw-down zone of lake *Bogoria, Kenya*: Assessment of antifungal potential against *Fusarium solani* and induction of bean root rot protection[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 796847.

[11] EGAS C, BALLESTEROS G, GALBÁN-MALAGÓN C, et al. Fungal endophytes modulate the negative effects induced by persistent organic pollutants in the Antarctic plant *Colobanthus quitensis*[J]. Physiologia Plantarum, 2025, 177(1): e70079.

[12] SUWANNARACH N, KUMLA J, BUSSABAN B, et al. Biofumigation with the endophytic fungus *Nodulisporium* spp. CMU-UPE34 to control postharvest decay of *Citrus* fruit[J]. Crop Protection, 2013, 45: 63-70.

[13] 郭洁心,马超,朱洪磊,等. 植物内生菌 G-1 菌株的鉴定及其拮抗物质的初步研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(1): 59-65. [GUO Jiexin, MA Chao, ZHU Honglei, et al. Preliminary study on identification of plant endophytic bacteria G-1 and its antagonistic function[J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 2020, 40(1): 59-65.]

[14] 尤佳琪,李国庆. 拟康宁木霉 T-51 菌株发酵液对灰葡萄孢的抑菌活性[J]. 植物保护, 2021, 47(1): 74-78,83. [YOU Jiaqi, LI Guoqing. Antifungal activity of *Trichoderma koningiopsis* T-51 cultural filtrate against *Botrytis cinerea*[J]. Plant Protection, 2021, 47(1): 74-78,83.]

[15] MAHAFFEE W F. Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03[J]. Phytopathology, 1993, 83(10): 1120.

[16] 徐大勇,李峰. 番茄灰霉病拮抗内生放线菌的筛选、鉴定及其活性评价[J]. 生态学杂志, 2012, 31(6): 1461-1467. [XU Dayong, LI Feng. Screening, identification, and activity assessment of endophytic actinomycetes from tomato plants against *Botrytis cinerea*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(6): 1461-1467.]

[17] 王蕊,王腾,李二峰. 生防芽孢杆菌在植物病害领域的研究进展[J]. 天津农学院学报, 2021, 28(4): 71-77. [WANG Rui, WANG Teng, LI Erfeng. Research advances of biocontrol *Bacillus* in the field of plant diseases[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2021, 28(4): 71-77.]

[18] 马超,朱洪磊,黄太伟,等. 番茄灰霉病菌内生拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 山西农业科学, 2018, 46(3): 437-440,452. [MA Chao, ZHU Honglei, HUANG Taiwei, et al. Screening and identifi-

- cation of endophytic antagonistic bacteria to *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2018, 46(3): 437-440,452.]
- [19] 赵焕兰. 贝莱斯芽孢杆菌对樱桃番茄采后灰霉病的抑制机理研究及保鲜效果评价[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022. [ZHAO Huanlan. Inhibitory mechanism of *Bacillus velezensis* on gray mold caused by *Botrytis cinerea* and evaluation of its fresh-keeping effect on cherry tomato[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2022.]
- [20] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 等. 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 M C, ZENG S Q, WANG Z J, et al. 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.]
- [21] 谢宗华. 水稻纹枯菌拮抗细菌的筛选及其活性代谢产物的分离与鉴定[D]. 湘潭: 湖南科技大学, 2012. [XIE Zonghua. Screening of antagonistic bacteria against rice sheath blight fungus and separation and identification of their active metabolites[D]. Xiangtan: Hunan University of Science and Technology, 2012.]
- [22] 朱咏珊, 罗晓欣, 梁浩然, 等. 一株茶树根际细菌的鉴定与生防效果研究[J]. 茶叶科学, 2022, 42(1): 87-100. [ZHU Yongshan, LUO Xiaoxin, LIANG Haoran, et al. Identification of a tea rhizosphere bacterium and its biocontrol of tea anthracnose disease[J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(1): 87-100.]
- [23] 濮永瑜, 包玲凤, 何翔, 等. 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 Yongyu, BAO Lingfeng, HE Xiang, et al. Screening, identification and control efficacy of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and *Phytophthora parasitica*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(7): 116-123.]
- [24] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册: 第八版[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 446. [BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's manual of determinative bacteriology[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 446.]
- [25] 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 Xiuzhu, CAI Miaoying. Handbook of identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001.]
- [26] 廖隽锐, 刘韶娜, 霍金龙, 等. 青贮巨菌草乳酸菌的分离鉴定及其对蚕豆秸秆青贮发酵的效果[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(6): 966-972. [LIAO Junrui, LIU Shaona, HUO Jinlong, et al. Isolation, identification of a lactic acid bacteria strain and its effect on fermentation of broad bean straw silage[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(6): 966-972.]
- [27] 卢宇, 马东晓, 周锦涛, 等. 一株产吲哚乙酸的日本野漆树内生枯草芽孢杆菌生长条件及其促生特性研究[J]. 云南农业大学学报, 2023, 38(5): 392-399. [LU Yu, MA Dongxiao, ZHOU Jintao, et al. Growth conditions and growth-promoting characteristics of an endophytic bacterium from *Toxicodendron succedaneum*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Social Science), 2023, 38(5): 392-399.]
- [28] 殷晓慧, 王庆国, 张畅, 等. 桃果实褐腐病拮抗细菌的筛选、鉴定及其拮抗活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(9): 128-132,138. [YIN Xiaohui, WANG Qingguo, ZHANG Chang, et al. Isolation and identification of antagonistic bacteria against peach brown rot and its antibacterial activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(9): 128-132,138.]
- [29] 高强, 王丽丽, 张渐隆, 等. 高地芽孢杆菌 CY1 的分离鉴定及其对烟草黑胫病的防治作用[J]. 浙江农业学报, 2025, 37(2): 405-416. [GAO Qiang, WANG Lili, ZHANG Jianlong, et al. Screening and identification of *Bacillus altitudinis* strain CY1 and its control effects against tobacco black shank[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2025, 37(2): 405-416.]
- [30] 张吉昌, 许云凤, 蒋凌雁. 柱花草内生细菌 ZW21 发酵条件优化及其抑菌物质稳定性测定[J]. 生物技术通报, 2025, 41(5): 280-289. [ZHANG Jichang, XU Yunfeng, JIANG Lingyan. Optimization of fermentation conditions of endophytic bacterium ZW21 isolated from *Stylosanthes* and stability analysis of antimicrobial substances[J]. Biotechnology Bulletin, 2025, 41(5): 280-289.]
- [31] 施春兰, 曾舒泉, 王志江, 等. 2 株烟草病害拮抗细菌的分离鉴定和发酵条件优化研究[J]. 江西农业学报, 2023, 35(7): 81-90. [SHI Chunlan, ZENG Shuquan, WANG Zhijiang, et al. Isolation and identification of two antagonistic bacterial strains against tobacco diseases and optimization of fermentation conditions[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2023, 35(7): 81-90.]
- [32] 施春兰, 朱国渊, 秦得强, 等. 附子白绢病拮抗细菌 CZ1 的分离鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4485-4498. [SHI Chunlan, ZHU Guoyuan, QIN Deqiang, et al. An antagonistic bacterial strain CZ1 against southern blight on *Aconitum carmichaelii*: Isolation, identification, optimization of fermentation conditions, and evaluation of control effect[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4485-4498.]
- [33] 苗永美, 苗翠苹, 于庆才. 枯草芽孢杆菌 BBs-27 发酵液性质及脂肽对黄色镰刀菌的抑菌作用[J]. 生物技术通报, 2023, 39(9): 255-267. [MIAO Yongmei, MIAO Cuiping, YU Qingcai. Properties of *Bacillus subtilis* strain BBs-27 fermentation broth and the inhibition of lipopeptides against *Fusarium culmorum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(9): 255-267.]
- [34] 钱荣, 续晓琪, 许宗奇, 等. 枯草芽孢杆菌 KC-WQ 发酵液中抗菌脂肽的分离鉴定及发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(15): 123-131. [QIAN Rong, XU Xiaoqi, XU Zongqi, et al. Isolation and identification of antibacterial lipopeptides from *Bacillus subtilis* KC-WQ fermentation broth and optimization of fermentation conditions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(15): 123-131.]
- [35] 田爱霞. 拮抗菌株 TJB-8 的鉴定及抑菌物质分析[J]. 浙江农林大学学报, 2017, 34(6): 1071-1078. [TIAN Aixia. Antagonistic strain of TJB-8 and its antifungal substances[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2017, 34(6): 1071-1078.]
- [36] REN Kexin, WANG Qiang, HU Mengkai, et al. Research progress on the effect of autolysis to *Bacillus subtilis* fermentation bioprocess[J]. Fermentation, 2022, 8(12): 685.]
- [37] 汤维涛, 唐堂, 沈雪梅, 等. 枯草芽孢杆菌发酵工艺研究进展[J]. 当代化工, 2024, 53(8): 1952-1958. [TANG Weitao, TANG Tang, SHEN Xuemei, et al. Research progress in fermentation technology of *Bacillus subtilis*[J]. Contemporary Chemical Industry, 2024, 53(8): 1952-1958.]
- [38] 闻诗歌, 李爽, 彭小锋, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌脂肽的重组表达及应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(14): 105-114. [WEN Shige, LI Shuang, PENG Xiaofeng, et al. Research progress on encapsulation systems to improve the bioavailability of plant polyphenols[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(14): 105-114.]