

枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC25 发酵条件优化及防效测定

危潇^{1#}, 黎妍妍^{2#}, 袁勤峰³, 姚经武³, 黄大野^{3*}, 曹春霞^{3*}

1 湖北工业大学 生命科学与健康工程学院, 湖北 武汉

2 湖北省烟草科学研究院, 湖北 武汉

3 湖北省生物农药工程研究中心, 国家生物农药工程技术研究中心, 湖北 武汉

危潇, 黎妍妍, 袁勤峰, 姚经武, 黄大野, 曹春霞. 枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC25 发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3208-3220.

WEI Xiao, LI Yanyan, YUAN Qinfeng, YAO Jingwu, HUANG Daye, CAO Chunxia. Fermentation condition optimization and biocontrol effect determination of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* YC25[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3208-3220.

摘要:【目的】通过优化枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC25 的发酵培养基及培养条件, 提高其发酵水平, 为后续该菌株的工业开发及应用提供理论基础。【方法】以芽孢产量为指标, 通过单因素试验筛选出最适的培养条件, 在此基础上进行响应面分析, 优化出最佳发酵培养基配方。采用盆栽防效试验测定优化后发酵液对烟草黑胫病和烟草镰孢菌根腐病的防治效果。【结果】最佳发酵培养条件: 30 °C、180 r/min、接种量 2%、装液量 20%、发酵时间 36 h。最佳发酵培养基组分: 玉米淀粉 15.53 g/L, 豆粕粉 8.70 g/L, KH₂PO₄ 0.50 g/L, MgSO₄ 0.92 g/L, CaCO₃ 0.50 g/L。在此条件下, 芽孢产量为 1.423×10^{10} CFU/mL。盆栽试验结果表明: 稀释 20 倍的发酵液对烟草黑胫病的防效为 77.88%, 对烟草根腐病的防效为 62.09%。【结论】优化后的培养基能显著增加菌株 YC25 的芽孢量, 并且施用 YC25 发酵液后, 烟草黑胫病菌及根腐病菌病情指数显著降低, 该研究为今后生防菌株 YC25 的菌剂开发生产及田间病害防治提供理论依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 发酵优化; 响应面法; 防治效果

资助项目: 中国烟草总公司湖北省公司科技项目(2025KY3CGJSYN2A010); 中国烟草总公司重大科技项目[110202201019 (LS-03)]; 农业农村部重点实验室建设项目(2018ZTSJJ4); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2021-620-000-001-027) This work was supported by the Scientific and Technological Project of Hubei Branch of China Tobacco Corporation (2025KY3CGJSYN2A010), the Major Scientific and Technological Project of China Tobacco Corporation (110202201019(LS-03)), the Key Laboratory Construction Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2018ZTSJJ4), and the Hubei Agricultural Science and Technology Innovation Center Innovation Team Project (2021-620-000-001-027).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CAO chunxia, CAOChunxia@163.com; HUANG Daye, xiaohuangdaye@126.com

Received: 2025-01-17; Accepted: 2025-03-11; Published online: 2025-05-09

Fermentation condition optimization and biocontrol effect determination of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* YC25

WEI Xiao^{1#}, LI Yanyan^{2#}, YUAN Qinfeng³, YAO Jingwu³, HUANG Daye^{3*}, CAO Chunxia^{3*}

1 School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei, China

2 Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan, Hubei, China

3 National Biopesticide Engineering Research Center, Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Wuhan, Hubei, China

Abstract: [Objective] To improve the fermentation performance by optimizing the fermentation medium and conditions of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* YC25, thereby providing a theoretical basis for the subsequent industrial development and application of the strain. [Methods] With the spore yield as the indicator, the optimal fermentation conditions were screened by single factor tests. On this basis, the response surface methodology was employed to optimize the fermentation medium. Pot experiments were conducted to evaluate the control effects of the optimized fermentation broth on tobacco black shank and tobacco *Fusarium* root rot. [Results] The optimum fermentation conditions were as follows: 30 °C, 180 r/min, an inoculation amount of 2%, a liquid-loading volume of 20%, and fermentation time 36 h. The optimum fermentation medium was as follows: corn starch 15.53 g/L, soybean meal 8.70 g/L, KH₂PO₄ 0.50 g/L, MgSO₄ 0.92 g/L, and CaCO₃ 0.50 g/L. Under these conditions, the spore yield reached 1.423×10^{10} CFU/mL. The results of pot experiments showed that the control effects of the fermentation broth diluted by 20 times on tobacco black shank and tobacco *Fusarium* root rot were 77.88% and 62.09%, respectively. [Conclusion] The optimized medium could significantly increase the spore yield of strain YC25, and the disease indexes of tobacco black shank and tobacco *Fusarium* root rot were significantly reduced after the application of YC25 fermentation broth. This study provides a theoretical basis for the development and application of the biocontrol strain YC25 and the prevention and control of field diseases in the future.

Keywords: *Bacillus subtilis*; fermentation condition optimization; response surface methodology; control effect

芽孢杆菌(*Bacillus*)是一类广泛存在于自然界中的细菌,具有繁殖速度快、营养要求简单、抗菌谱广等特点,因而在植物病害防治中被广泛应用^[1-3]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是芽孢杆菌属的一种,是一种普遍存在于土壤和植物根际的革兰氏阳性细菌,因其能产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的内生孢子而受到人们广泛关注,并被认为是理想的生防菌株^[4]。

枯草芽孢杆菌主要包括枯草亚种(*B. subtilis* subsp. *subtilis*)、斯氏亚种(*B. subtilis* subsp. *spizizenii*)、沙漠亚种(*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*)和粪便亚种(*B. subtilis* subsp. *stercoris*)等^[5],其中前3个亚种在植物保护领域均有相关研究报道^[6-8]。枯草芽孢杆菌主要通过竞争作用、分泌抗菌物质以及诱导植物抗病性等途径发挥生物防治功能。目前,已有大量研

究报道枯草芽孢杆菌在多种植物病害防治中的应用。侯凯丽等^[9]发现枯草芽孢杆菌 WR 发酵菌液及其 50 倍稀释液对采后番茄果实灰霉病的发生均具有 100% 的保护作用。邱一埔等^[10]研究发现枯草芽孢杆菌 H6-1 对香蕉枯萎病、炭疽病和桉树枯萎病病原菌具有良好的抑制效果,抑制率分别为 87.13%、70.37% 和 81.34%。Yang 等^[11]发现枯草芽孢杆菌 JNF2 能促进黄瓜生长,且盆栽试验表明其对镰孢菌枯萎病的防治效果达(81.33±0.21)%。这些研究进一步强调了枯草芽孢杆菌作为生物防治剂的应用潜力。

本实验室前期从烟草根际土壤中分离到 1 株枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*B. subtilis* subsp. *spizizenii*),本研究以 YC25 为研究对象,采用单因素试验和响应面分析相结合的方法对菌株 YC25 的发酵培养条件和发酵培养基进行优化,并对发酵产物进行烟草黑胫病和根腐病的盆栽防效检验,旨在为其后续的扩大生产和产业化应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC25 由本研究自主分离获得,烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)由湖北省生物农药工程研究中心提供。

1.1.2 培养基

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母提取物 5.0, 琼脂粉 18.0。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 酵母提取物 5.0。

PDA 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 18.0。

PDB 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0。

V8 培养基(g/L): V8 汁 220.0, 碳酸钙 2.0,

琼脂 18.0。

发酵初始培养基(g/L): 玉米淀粉 20.0, 豆粕粉 15.0, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, CaCO₃ 0.5。

1.2 菌株活化

将斜面保存的菌种 YC25 在 LB 固体培养基上进行划线培养,待长出单菌落后,用接种针挑取单菌落接种至 LB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 18 h 即为种子液,后续用于发酵条件研究。

1.3 生长曲线测定

将活化好的种子液按 1% 接种量在 LB 液体培养基中(40% 装液量)28 °C、180 r/min 振荡培养,每隔 6 h 进行取样,测定其吸光度 OD₆₀₀ 和芽孢产量。以培养时间为横坐标,OD₆₀₀ 和芽孢产量为纵坐标,绘制其生长曲线。

1.4 芽孢数的测定

将发酵稀释液于 80 °C 水浴 20 min 杀死其中的营养体^[12],再利用稀释涂布平板计数法^[13]测定。

1.5 单因素试验

1.5.1 温度对芽孢产量的影响

将活化好的种子液按照 1.3 节的培养条件培养,将温度分别设置为 20、25、30、35、40 °C,发酵 30 h 后测定芽孢数。

1.5.2 转速对芽孢产量的影响

将活化好的种子液按照 1.3 节的培养条件培养,将转速分别设置为 120、150、180、210、240 r/min,发酵 30 h 后测定芽孢数。

1.5.3 接种量对芽孢产量的影响

将活化好的种子液按照 1.3 节的培养条件培养,将接种量分别设置为 1%、2%、3%、4%、5%,发酵 30 h 后测定芽孢数。

1.5.4 装液量对芽孢产量的影响

将活化好的种子液按照 1.3 节的培养条件培养,将装液量分别设置为 20%、30%、40%、50%、60%,发酵 30 h 后测定芽孢数。

1.6 响应面分析

1.6.1 Plackett-Burman (PB)设计

以玉米淀粉(A)、豆粕粉(B)、磷酸二氢钾(C)、硫酸镁(D)、碳酸钙(E)共 5 种因素进行 Plackett-Burman 试验设计, 5 因子 2 水平的 PB 试验因素水平表如表 1 所示, 筛选影响芽孢发酵产量的显著影响因子。

1.6.2 最陡爬坡试验设计

根据 Plackett-Burman 试验得出的拟合方程对确定的 3 个显著因素进行最陡爬坡试验设计, 利用拟合方程中各变量系数确定爬坡方向和变化步长。

1.6.3 Box-Behnken 试验设计

选取玉米淀粉(A)、豆粕粉(B)、硫酸镁(D)作为关键因素, 运用 Box-Behnken 试验设计方法, 构建 3 因素 3 水平的响应面模型, 进一步优化菌株 YC25 的发酵培养基配方, 试验因素与水平见表 2。

1.7 菌株 YC25 优化后发酵产物对烟草黑胫病和根腐病的防治

1.7.1 病原菌孢子悬浮液制备

将尖孢镰孢菌菌饼接种于 PDB 培养基中, 28 °C、180 r/min 避光培养 7 d, 使用纱布过滤掉发酵液中的菌丝, 用无菌水调节孢子液浓度为 1×10^7 CFU/mL 备用。

将烟草疫霉菌饼接种于 V8 培养基平板中, 光照培养 14 d, 用无菌水将病原菌菌丝及孢子从平板上洗脱下来, 过滤掉发酵液中的菌丝后, 放入 4 °C 冰箱中处理 30 min, 再在常温下放置

表1 PB试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman experiment

Levels	Factors (g/L)				
	A	B	C	D	E
-1	15.00	10.00	0.25	0.30	0.30
1	25.00	20.00	0.75	0.70	0.70

表2 Box-Behnken试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of Box-Behnken experiment

Levels	Factors (g/L)		
	A	B	D
-1	12.50	7.50	0.64
0	15.00	10.00	0.78
1	17.50	12.50	0.92

20 min, 促进菌丝释放游动孢子, 调节成 1×10^6 CFU/mL 孢子悬浮液备用。

1.7.2 盆栽试验设计

选取长势较为一致的 6 叶期烟苗进行试验, 采用刺伤灌根的方式进行接种, 每株烟苗接种 20 mL 菌液, 共分为 4 个处理, 分别为 CK: 无菌水对照; T1: 稀释 20 倍发酵液; T2: 稀释 50 倍发酵液; T3: 商品菌剂太抗-枯芽春(芽孢杆菌微胶囊剂, 稀释 100 倍)。每个处理 3 个重复, 每个重复 15 株烟苗。施药 48 h 后, 接种病原菌的孢子悬浮液, 每株接种 5 mL。在接种后 15 d 统计烟草黑胫病的结果, 20 d 后统计烟草根腐病的结果。烟草黑胫病分级标准参照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)^[14], 烟草根腐病发病分级则参考《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)和刘利佳^[15]的方法。计算发病率, 病情指数和防治效果, 如公式(1)–(3)所示。

$$\text{发病率} = \frac{\text{发病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病级数} \times \text{该级病株数})}{\text{病级最高数} \times \text{调查总株数}} \times 100\% \quad (2)$$

防治效果=

$$\frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100\% \quad (3)$$

1.8 数据统计与分析

采用 Origin 2021 软件进行作图绘制, 利用 Design-Expert 12.0 软件进行响应面设计和数据分析, 并使用 IBM SPSS Statistics 26 软件对试验结果进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 生长曲线的测定

根据绘制的生长曲线(图 1), 菌株 YC25 在前 6 h 处于迟滞期, 6 h 后进入对数生长期, 18 h 后进入稳定期, 36 h 后进入衰亡期。因此,

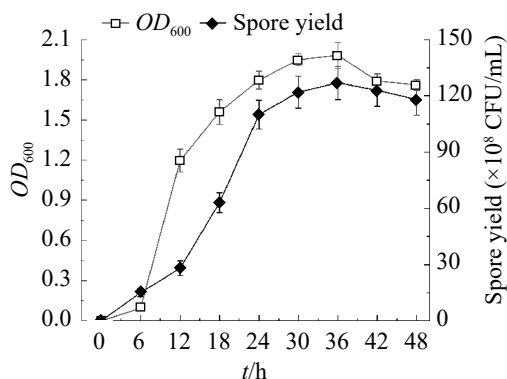


图1 菌株YC25生长曲线

Figure 1 Growth curves of strain YC25.

选择 18 h 作为菌株种子液的培养时间, 此时菌株处于对数期, 代谢旺盛且生理特性稳定。芽孢产量在前 12 h 缓慢增长, 在 12–24 h 快速增长, 36 h 时达到峰值。因此, 选择 36 h 作为后续发酵的最佳时间。

2.2 单因素试验结果

由图 2A 可知, 随着温度的升高, 芽孢的产量呈现先上升后下降的趋势。过低或过高的温度均会影响芽孢的形成。温度过高, 与菌体细胞生长相关的蛋白质和酶的活性可能会下降; 温度过低, 又会导致菌体生长代谢变缓, 从而影响芽孢的产量。在 30 °C 时的芽孢产量最大, 能达到 127×10^8 CFU/mL。因此, 选择 30 °C 作为后续的发酵培养条件。

由图 2B 可知, 当转速在 120–180 r/min 时, 芽孢的产量随着转速的提高增加。在 180 r/min 时, 芽孢的产量最大; 超过 180 r/min 后, 芽孢

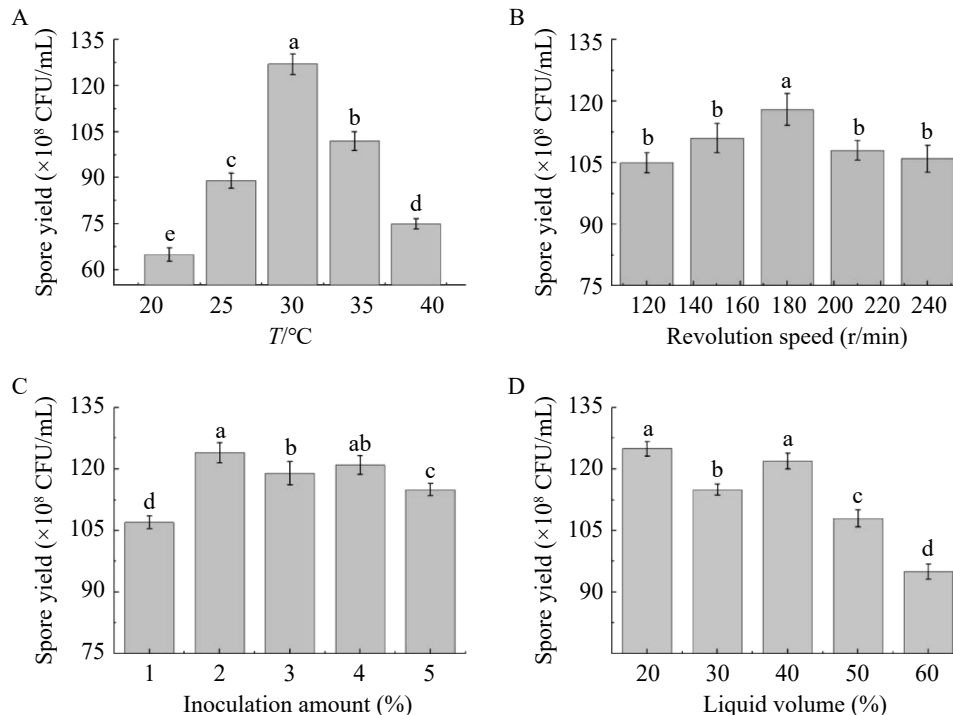


图2 不同温度(A)、转速(B)、接种量(C)、装液量(D)对芽孢产量的影响

Figure 2 Effects of different temperature (A), rotation speed (B), inoculation amount (C) and liquid volume (D) on spore yield. Different lowercase letters on the figure indicate significant differences ($P < 0.05$).

产量随着转速的提高逐渐降低。分析认为, 转速较低时, 随着转速的增加, 溶氧和营养物质传递效率提高, 从而提高了芽孢的产量; 而超过最适转速后, 由于溶氧过饱和或代谢产物抑制等因素, 可能会导致菌体自溶, 芽孢产量又逐渐下降。因此, 选择转速为 180 r/min 作为后续的发酵培养条件。

由图 2C 可知, 接种量为 1% 时, 芽孢产量较低; 接种量为 2%–5% 时, 芽孢产量无显著差异。推测菌株 YC25 的产孢效率在较宽接种量范围内具有稳定性。在接种量为 2% 时, 其芽孢数量最多。因此, 选择 2% 的接种量作为后续的发酵培养条件。

由图 2D 可知, 随着装液量的增加, 芽孢产量整体呈下降趋势。在装液量为 20% 时的芽孢产量最大, 但在装液量为 40% 时, 芽孢产量较 30% 有所增加, 推测可能是 40% 装液量时振荡作用改善了氧气传递效率, 抵消了装液量增加带来的溶氧下降。此外, 在 40% 装液量下可能稀释了抑制性代谢产物, 缓解了对菌体的生长抑制, 从而促进芽孢形成。最终选择 20% 的装液量作为后续的发酵培养条件。

2.3 响应面分析结果

2.3.1 Plackett-Burman (PB)结果

在单因素筛选的发酵条件基础上, 根据 Plackett-Burman (PB)试验设计, 在发酵 36 h 时取样测定芽孢产量作为响应值, 其试验结果和

方差分析见表 3 和表 4。通过 Design Expert 12 软件对结果进行拟合, 得到拟合方程为: $Y = 115.350\ 59 - 8.793\ 92A - 18.263\ 55B + 0.127\ 258C + 13.182\ 26D + 8.627\ 26E$ 。玉米淀粉(A)、豆粕粉(B)系数为负数, 说明其与响应值呈负相关; 磷酸二氢钾(C)、硫酸镁(D)、碳酸钙(E)系数为正数, 说明其与响应值呈正相关。方差分析结果表明模型的 P 值为 0.001 3 ($P < 0.01$) (表 4), 说明该模型影响非常显著。 A 、 B 、 D 、 E 项均为差异非常显著 ($P < 0.01$), C 项为差异不显著。其中玉米淀粉(A)、豆粕粉(B)和硫酸镁(D) 3 个因素的 P 值最小, 说明这 3 个因素对菌株 YC25 的芽孢产

表3 PB试验设计及结果

Table 3 The design and result of Plackett-Burman experiment

Run	Factors (g/L)					Spore yield ($\times 10^{10}$ CFU/mL)
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	
1	-1	1	-1	-1	-1	0.816 7
2	1	-1	1	-1	-1	1.136 7
3	-1	-1	-1	-1	-1	1.193 3
4	1	1	1	-1	1	0.840 0
5	1	1	-1	1	-1	0.956 7
6	-1	1	1	-1	1	0.946 7
7	-1	-1	-1	1	1	1.666 7
8	-1	1	1	1	-1	1.120 0
9	1	1	-1	1	1	1.083 3
10	1	-1	1	1	-1	1.180 0
11	1	-1	-1	-1	1	1.196 7
12	-1	1	1	1	1	1.340 0

表4 PB试验方差分析结果

Table 4 Analysis of variance of the results of PB experiment design

Source	SS	Freedom	MS	<i>F</i> value	<i>P</i> value
Model	5 553.10	5	1 110.62	18.81	0.001 3
<i>A</i>	899.00	1	899.00	15.22	0.008 0
<i>B</i>	3 446.76	1	3 446.76	58.37	0.000 3
<i>C</i>	0.188 30	1	0.188 30	0.003 2	0.956 8
<i>D</i>	2 020.10	1	2 020.10	34.21	0.001 1
<i>E</i>	865.24	1	865.24	14.65	0.008 7
Residual	354.30	6	59.05		
Total	5 907.40	11			

$R^2=0.940\ 0$ Adj $R^2=0.890\ 0$

量的影响最显著。因此选取这 3 个因素作为显著影响因素。根据 F 值大小, 三者显著影响的大小顺序为: 豆粕粉(B)>硫酸镁(D)>玉米淀粉(A)。

2.3.2 最陡爬坡试验结果

在 PB 试验基础上进行最陡爬坡试验, 以 PB 试验设计的中心点作为步移的起点, 最陡爬坡试验设计及结果如表 5 所示。由表 5 可知, 产孢量最高值出现在第 3 组实验, 因此采用玉米淀粉为 15.00 g/L, 豆粕粉 10.00 g/L, 硫酸镁 0.78 g/L 作为后续 Box-Behnken 试验的中心点。

2.3.3 Box-Behnken 试验结果

Box-Behnken 试验设计及结果和方差分析如表 6 和表 7 所示。应用 Design Expert 12 软件拟合得到非线性回归方程为: $Y = -21.185\ 18 + 10.518\ 24A + 11.273\ 33B + 50.803\ 07D - 0.333\ 2\ AB + 5.707\ 14AD - 1.428\ 57BD - 0.404\ 027A^2 - 0.297\ 227B^2 - 64.932\ 14D^2$ 。回归模型 P 值=0.000 7<0.001, 表明模型极显著, 且足以研究变量与响应之间的相关性, 失拟项 P 值=0.488 7>0.05, 表明失拟项不显著, 拟合情况可靠, 说明模型不存在失拟现象。 $R^2=0.954\ 6$, Adj $R^2=0.896\ 2$, 两者差值小于 0.2, 表明此模型可以应用于理论预测, 且各因素的影响非简单线性关系。回归方程显著性差异分析显示, BD 和 D^2 项 P 值>0.05, 为不显著; A 、 AD 和 B^2 项 P 值小于 0.05, 为显著; B 、 AB 、 A^2 项 P 值小于 0.01, 为非常显著; D 项 P 值小于 0.001, 为极显著。

表5 最陡爬坡试验设计及结果

Table 5 Design and results of the steepest climb experiments

Run	A (g/L)	B (g/L)	D (g/L)	Spore yield ($\times 10^{10}$ CFU/mL)
1	20.00	15.0	0.50	1.116 7
2	17.50	12.5	0.64	1.150 0
3	15.00	10.0	0.78	1.290 0
4	12.50	7.50	0.92	1.143 3
5	10.00	5.00	1.06	1.134 0

表6 Box-Behnken试验设计及结果

Table 6 The design and results of Box-Behnken experiment

Run	Factors (g/L)			Spore yield ($\times 10^{10}$ CFU/mL)
	A	B	D	
1	0	1	1	1.310 0
2	0	-1	-1	1.306 7
3	0	0	0	1.343 3
4	0	0	0	1.356 7
5	-1	0	1	1.326 7
6	1	1	0	1.250 0
7	-1	1	0	1.323 3
8	0	0	0	1.353 3
9	0	0	0	1.326 7
10	0	0	0	1.343 3
11	1	0	-1	1.246 7
12	-1	0	-1	1.303 3
13	1	0	1	1.350 0
14	1	-1	0	1.320 0
15	-1	-1	0	1.310 0
16	0	1	-1	1.266 7
17	0	-1	1	1.370 0

表7 Box-Behnken试验方差分析结果

Table 7 Analysis of variance of the results of Box-Behnken experiment

Source	SS	Freedom	MS	F value	P value
Model	5 553.10	5	1 110.62	18.81	0.000 7
A	11.66	1	11.66	8.66	0.021 6
B	30.69	1	30.69	22.80	0.002 0
D	68.04	1	68.04	50.53	0.000 2
AB	17.35	1	17.35	12.88	0.008 9
AD	15.96	1	15.96	11.85	0.010 8
BD	1.00	1	1.00	0.74	0.417 3
A^2	26.85	1	26.85	19.94	0.002 9
B^2	14.53	1	14.53	10.79	0.013 4
D^2	6.82	1	6.82	5.07	0.059 1
Residual	9.42	7	1.35		
Lack of fit	3.97	3	1.32	0.972 0	0.488 7
Pure error	5.45	4	1.36		
Total	207.44	16			
$R^2=0.954\ 6$ Adj $R^2=0.896\ 2$					

用 Design-Expert 12 软件绘制拟合三因素之间交互作用的三维曲面图和等高线图, 各因素交互对芽孢产量的影响如图 3-5 所示。通过响应曲面与等高线图的展示, 可直观呈现交互效应对响应值的量化影响。当曲面陡峭且等高线分布密集时, 表明影响因素的作用强度显著提升。若等高线呈现出近似椭圆的几何特征, 则反映 2 个变量间存在较强的交互作用关系。由曲面图和等高线图可知, 3 个因素间两两交互的影响效果均显著, 均有明显的坡度和最高点, 代表响应值存在最大值。由 F 值可知, 交互作

用强弱为 $AB > AD > BD$ 。

2.3.4 验证试验

通过 Design-Expert 12 软件分析预测, 得到菌株 YC25 最优发酵培养基组分为: 玉米淀粉(A) 15.53 g/L、豆粕粉(B) 8.70 g/L、硫酸镁(D) 0.92 g/L。此时的芽孢产量达到最大, 预测值为 1.3717×10^{10} CFU/mL。针对最佳培养基配方进行了 3 次重复性验证试验, 在此条件下的芽孢数量为 1.4233×10^{10} CFU/mL, 基本符合模型预测值, 验证了模型的稳定性和准确性。

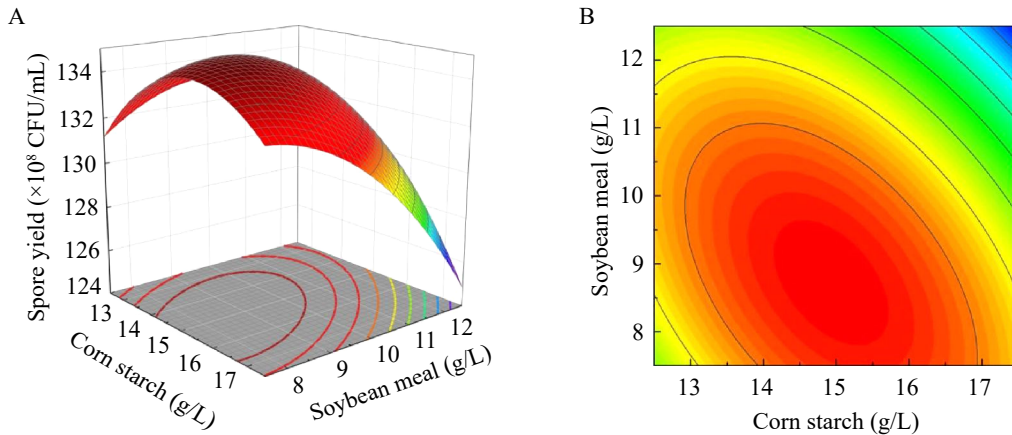


图3 玉米淀粉与豆粕粉对芽孢产量的响应曲面(A)和等高线(B)分析

Figure 3 Response surface (A) and contour (B) analysis of corn starch and soybean meal on spore yield.

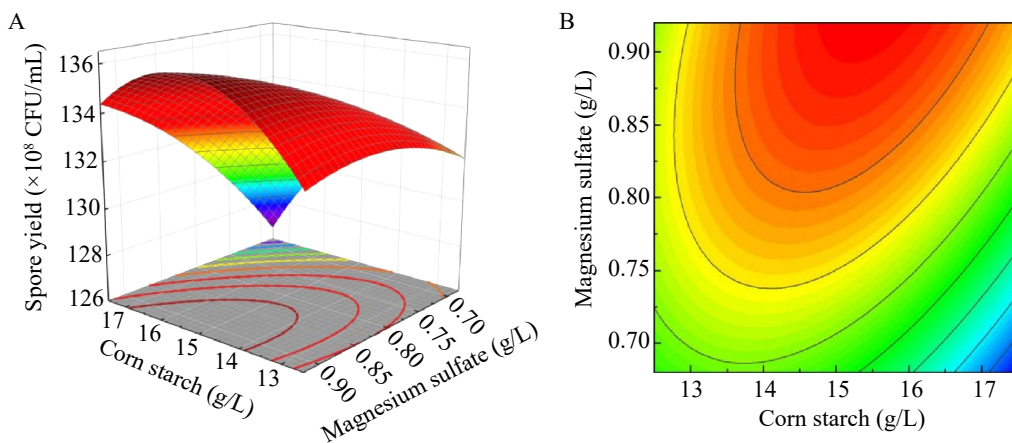


图4 玉米淀粉与硫酸镁对芽孢产量的响应曲面(A)和等高线(B)分析

Figure 4 Response surface (A) and contour (B) analysis of corn starch and magnesium sulfate on spore yield.

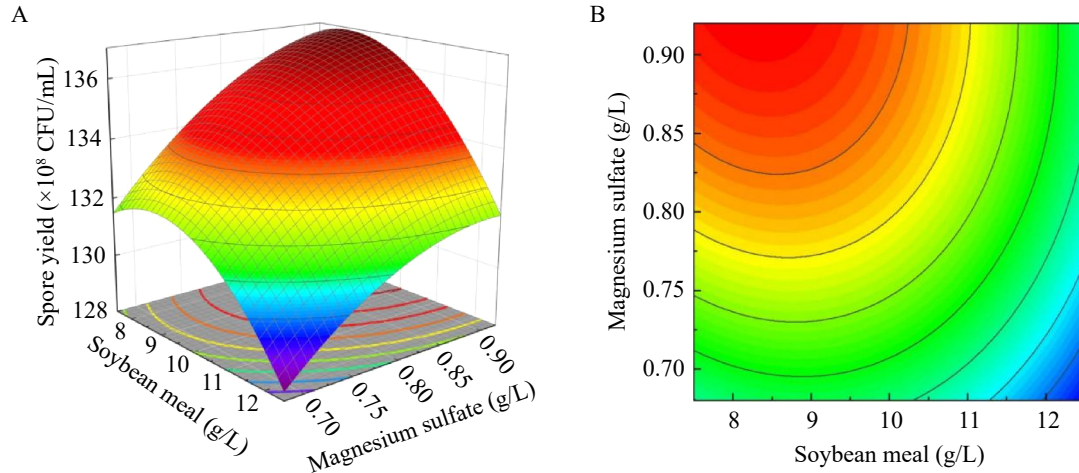


图5 豆粕粉与硫酸镁对芽孢产量的响应曲面(A)和等高线(B)分析

Figure 5 Response surface (A) and contour (B) analysis of soybean meal and magnesium sulfate on spore yield.

2.4 菌株 YC25 优化后发酵物对烟草黑胫病和根腐病防效

盆栽试验表明, 菌株 YC25 发酵液能降低烟草黑胫病及烟草根腐病的病情指数。20 倍稀释液对烟草黑胫病的防治效果为(77.88±5.14)% (表 8), 对烟草根腐病的防治效果为(62.09±2.75)% (表 9)。50 倍稀释液对烟草黑胫病和烟草根腐病的防治效果分别为(55.23±3.74)%和(55.79±3.64)%。与商品菌剂太抗-枯芽春相比, 20 倍发酵稀释液在烟草黑胫病和烟草根腐病的防治效果上更优。

表8 菌株YC25发酵物对烟草疫霉的盆栽防治效果
Table 8 Control effect of fermentation products of strain YC25 on *Phytophthora nicotianae* in pot experiment

Treatment	Disease index (%)	Control effect (%)
CK	51.36±4.08a	–
T1	11.36±2.26d	77.88±5.14a
T2	20.00±9.95b	55.23±3.74c
T3	17.78±5.34c	65.38±12.14b

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); –代表无此项。

After the same column of data, different lowercase letters showed significant differences ($P<0.05$); – in the table indicated no such item.

表9 菌株YC25发酵物对尖孢镰刀菌的盆栽防治效果

Table 9 Control effect of fermentation products of strain YC25 on *Fusarium oxysporum* in pot experiment

Treatment	Disease index (%)	Control effect (%)
CK	95.36±1.97a	–
T1	35.27±3.28d	62.09±2.75a
T2	42.18±3.87c	55.79±3.64b
T3	45.31±4.20b	52.48±5.73c

同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); –代表无此项。

After the same column of data, different lowercase letters showed significant differences ($P<0.05$); – in the table indicated no such item.

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌作为一种重要的微生物资源, 在多个应用领域得到广泛应用。由于其对繁殖营养条件需求简单, 分裂生长速度较快, 因此易于培养^[16]。同时, 其能够利用多种碳源和氮源进行代谢活动, 相对降低了生产成本^[17]。目前, 对于枯草芽孢杆菌的应用主要作为工程菌株进行发酵扩大生产^[18]。近年来关于枯草芽孢杆菌在农业方向的研究不断扩大, 在生物防治、

果蔬保鲜^[19-20]、促生^[21-23]等方面都出现了报道, 具有广阔的应用前景。

芽孢杆菌产生的芽孢具有极强的抗逆作用, 这对于芽孢杆菌的工业化生产具有推动作用^[24]。现阶段, 针对枯草芽孢杆菌的微生物发酵研究, 国内外学者主要致力于优化培养条件以提升目标产物的合成效率。例如, 金桩等^[25]采用单因素结合正交试验优化枯草芽孢杆菌-MBS 的生产工艺参数, 使得其芽孢产量提高至 2.83×10^{10} 个/mL。刘晓霞等^[26]采用单因素结合响应面分析优化枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 发酵条件, 最终使其对立枯丝核菌的抑菌率从 27.32% 提高至 52.57%。陈莉等^[27]通过单因素试验及正交试验对枯草芽孢杆菌 K-6-9 进行发酵条件优化, 优化后芽孢产量为 1.40×10^9 CFU/mL, 相对于初始发酵培养基的芽孢量提高了 2.55×10^3 倍。

优化发酵工艺的主要手段包括优化发酵培养基配方和改进发酵条件等。通过优化实验可以确定最适宜微生物生长繁殖的营养组分比例及培养条件, 从而有效提高产物的产量并降低发酵原辅料成本^[28]。在对培养条件的改进上, 本研究选择了温度、接种量、装液量及转速 4 个条件。其中, 温度影响其生长繁殖过程中的蛋白质和酶的合成与活性, 接种量会改变枯草芽孢杆菌的生长代谢途径, 装液量和转速会影响培养基体积内的溶氧系数。由于枯草芽孢杆菌为好氧菌, 因此氧气会在生长中扮演重要角色。本研究通过单因素试验发现, 菌株 YC25 在温度 30 °C、180 r/min、接种量 2%、装液量 20% 的条件下, 其芽孢产量值最高, 其结果与陈莉等^[27]和兰成忠等^[29]优化后的培养条件相似。在对发酵培养基的优化上, 选择使用响应面分析方法来进行优化, 该法可通过构建模型对不同因子水平及交互作用进行优化, 快速有效地确定其最佳培养基^[30]。枯草芽孢杆菌对碳源和氮源的利用范围较广, 可以利用多种有机物和无机物作为碳源和氮源进行生长繁殖。同时为了后续的产业化开发, 本研究的碳源和氮源选

择了易获取的农副产品, 以玉米淀粉和豆粕粉作为碳源和氮源, 这与前人研究对枯草芽孢杆菌发酵培养基中碳源、氮源的研究结果一致, 只是由于不同亚种对营养的利用率不同, 在玉米淀粉和豆粕粉的用量上有所不同^[31-32]。同时, 在无机盐的选择上, 本研究以磷酸二氢钾^[33]、硫酸镁^[34]和碳酸钙^[35]为无机盐的组成。通过响应面分析优化后发现玉米淀粉、豆粕粉和硫酸镁对芽孢的形成影响最大, 其中硫酸镁与芽孢产量呈正相关, 说明更高的 Mg^{2+} 浓度会提高发酵液中的芽孢产量, 这与 Posada-Urbe 等^[36]和郑双凤等^[37]研究枯草芽孢杆菌发酵时得出的结论一致。最终确定最佳发酵培养基组分: 玉米淀粉 15.53 g/L, 豆粕粉 8.70 g/L, KH_2PO_4 0.50 g/L, $MgSO_4$ 0.92 g/L, $CaCO_3$ 0.50 g/L。利用优化所得到的培养基配方和培养条件进行菌株 YC25 发酵, 最终芽孢数量为 $1.423 3 \times 10^{10}$ CFU/mL, 其芽孢的产量与模型预测值非常接近, 这也证明了响应面方法优化发酵培养基的可靠性。Yáñez-Mendizábal 等^[38]利用大豆粉与糖蜜发酵枯草芽孢杆菌 CPA-8, 最大生物量达 3×10^9 CFU/mL。Rao 等^[39]利用乳糖、木薯淀粉、 $(NH_4)_2SO_4$ 、蛋白胨作为培养基碳、氮源, 发酵后芽孢产量达 5.93×10^9 CFU/mL。Zhang 等^[40]以玉米粉和黄豆粉作为生防芽孢杆菌 Z-14 的碳、氮源, 芽孢产量达 1.85×10^9 CFU/mL。曲远航等^[41]以玉米淀粉和糖蜜作为碳源、花生饼粉和蛋白胨作为氮源, 最终芽孢产量达 6.92×10^9 CFU/mL。与上述研究相比, 本研究所用发酵培养基配制简单, 并且发酵的芽孢产量更高, 更适于在生产中应用。何明川等^[42]发现贝莱斯芽孢杆菌 MC2-1 的 1×10^8 CFU/mL 发酵液对烟草黑胫病的盆栽试验平均防效为 63.92%。刘芳等^[43]优化贝莱斯芽孢杆菌 YC11 发酵培养基后, 其 5 倍发酵稀释液对烟草黑胫病的平均防效为 84.06%。张蒙蒙等^[44]使用贝莱斯芽孢杆菌 YCYM-09 对烟草黑胫病防治效果为 61.50%。沈会芳等^[45]使用贝莱斯芽孢杆菌 GDND-2 发酵液处理 15 d, 对烟草根腐病

的防效为 70.00%。本研究利用优化培养基制备的发酵液,其 20 倍稀释液对烟草黑胫病和烟草根腐病的防治效果分别达到了 77.88% 和 62.09%,与上述研究结果相比,表明菌株 YC25 具有较好的防效,可为烟草病害的防治提供安全高效的生物防控产品,但其发酵液中具体的抑菌成分未知,需要进一步的研究和探索。

本研究通过对枯草芽孢杆菌斯氏亚种 YC25 的发酵工艺和培养基进行优化,显著提高了其芽孢产量,并验证了其在烟草病害防治中具有良好应用效果,生防性能优于对照商品菌剂。与现有研究相比,本研究的优化培养基配方成分简单且价格低廉,适应工业生产,并且在芽孢产量和生物防治效果方面表现出较高的效率和应用潜力。然而,本研究仅针对摇床条件下的培养基成分及培养参数开展了优化工作,该菌株的孢子生成能力仍需在发酵罐体系中进行深入验证与评估。

作者贡献声明

危潇:实验操作及初稿撰写;黎妍妍:数据分析及论文修改;袁勤峰:协助培养基配制及无菌实验材料准备;姚经武:协助盆栽试验的植株培育及材料准备;黄大野:论文选题构思设计;曹春霞:协助论文修改及润色。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在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。

参考文献

- [1] 蒲欣, 吴茂华, 刘锋, 陈松, 任尧, 何兵. 芽孢杆菌对玉米真菌病害生物防治效果的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(4): 23-30.
- [2] 黄慧婧, 罗坤. 芽孢杆菌与杀菌剂复配防治植物病害的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 938-947.
- [3] 崔荣强, 田黎. 芽孢杆菌的生物防治研究进展[J]. 山东化工, 2015, 44(12): 55-57.
- [4] 张万强, 任立瑞, 折红军, 杨中华, 韩平. 枯草芽孢杆菌生防机制与剂型加工及联用研究进展[J]. 农药, 2024, 63(8): 547-553.
- [5] DUNLAP CA, BOWMAN MJ, ZEIGLER DR. Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 1-12.
- [6] MORALES-SANDOVAL PH, VALENZUELA-RUIZ V, SANTOYO G, HYDER S, MITRA D, ZELAYA-MOLINA LX, ÁVILA-ALISTAC N, PARRA-COTA FI, de LOS SANTOS-VILLALOBOS S. Draft genome of a biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal phytopathogen of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*): *Bacillus inaquosorum* TSO22[J]. *Open Agriculture*, 2024, 9(1): 20220309.
- [7] GUILLÉN-NAVARRO K, LÓPEZ-GUTIÉRREZ T, GARCÍA-FAJARDO V, GÓMEZ-CORNELIO S, ZARZA E, deLa ROSA-GARCÍA S, CHAN-BACAB M. Broad-spectrum antifungal, biosurfactants and bioemulsifier activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*-a potential biocontrol and bioremediation agent in agriculture[J]. *Plants*, 2023, 12(6): 1374.
- [8] ELSHARKAWY MM, ELSAWY MM, ISMAIL IA. Mechanism of resistance to *Cucumber mosaic virus* elicited by inoculation with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*[J]. *Pest Management Science*, 2021, 78(1): 86-94.
- [9] 侯凯丽, 冯宇航, 杨从军. 枯草芽孢杆菌 WR 菌株对番茄灰霉病的生防潜力[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2023, 40(1): 30-34.
- [10] 邱一埔, 吴诗唯, 侯期任, 黄文善. 枯草芽孢杆菌 H6-1 的生防及促生效果研究[J]. 现代农业研究, 2024, 30(8): 56-62.
- [11] YANG F, WANG X, JIANG HY, YAO QJ, LIANG S, CHEN WW, SHI GY, TIAN BM, HEGAZY A, DING SL. Mechanism of a novel *Bacillus subtilis* JNF2 in suppressing *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* and enhancing cucumber growth[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 64807516.

- 2024, 15: 1459906.
- [12] 刘芳, 廖先清, 周荣华, 陈伟, 饶彝, 黄大野. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌CY30发酵培养基的研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(23): 91-94.
LIU F, LIAO XQ, ZHOU RH, CHEN W, RAO B, HUANG DY. Study on optimization of fermentation medium of *Bacillus velezensis* CY30 by using response-surface method[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2019, 58(23): 91-94 (in Chinese).
- [13] 何岚, 王柳懿, 朱琪, 乔家运, 王文杰. 两种绘制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌生长曲线方法的比较[J]. 天津农业科学, 2017, 23(5): 14-18.
HE L, WANG LY, ZHU Q, QIAO JY, WANG WJ. Comparison of two methods for drawing the growth curve of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2017, 23(5): 14-18 (in Chinese).
- [14] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 烟草病虫害分级及调查方法: GB/T 23222—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Grade and investigation method of tobacco diseases and insect pests: GB/T 23222—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [15] 刘利佳. 烟草抗感镰刀菌根腐病鉴定方法及其防治研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2021.
LIU LJ. Identification method and control of tobacco resistance to *Fusarium mycorrhizal* rot[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [16] 满丽莉, 向殿军. 枯草芽孢杆菌MX-6的特性研究[J]. 中国调味品, 2019, 44(9): 24-28.
MAN LL, XIANG DJ. Study on the Characteristics of *Bacillus subtilis* MX-6[J]. China Condiment, 2019, 44(9): 24-28 (in Chinese).
- [17] 班博, 戴维, 田科雄. 枯草芽孢杆菌的生理功能及其在动物生产中的应用[J]. 湖南饲料, 2020(2): 42-45.
BAN B, DAI W, TIAN KX. Physiological function of *Bacillus subtilis* and its application in animal production[J]. Hunan Feed, 2020(2): 42-45 (in Chinese).
- [18] DONG HN, ZHANG DW. Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 63.
- [19] 周淼, 常希光, 冯晓光, 赵富士, 孙美玲, 陈湘宁. 枯草芽孢杆菌抗菌肽对鲜切山药的保鲜及货架期预测[J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(4): 76-81.
ZHOU M, CHANG XG, FENG XG, ZHAO FS, SUN ML, CHEN XN. Effect of *Bacillus subtilis* antimicrobial peptides on fresh-cut yam and the predicted shelf life[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2021, 44(4): 76-81 (in Chinese).
- [20] 刘奎, 赵焕兰, 宗宁, 李欢欢, 刘永胜, 苗敏. 枯草芽孢杆菌BS-1菌株对猕猴桃采后软腐病的抑制和保鲜效果评价[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(10): 40-49.
LIU K, ZHAO HL, ZONG N, LI HH, LIU YS, MIAO M. Inhibition and fresh-keeping effects evaluation of *Bacillus subtilis* BS-1 strain on soft rot of postharvest kiwifruit[J]. Storage and Process, 2021, 21(10): 40-49 (in Chinese).
- [21] 杨兴有, 丁安明, 余祥文, 谢强, 夏春, 张永辉, 徐传涛, 王卫锋, 陈志华. 烟草青枯病拮抗菌TBWR1的筛选鉴定及防病促生能力[J]. 贵州农业科学, 2023, 51(10): 58-65.
YANG XY, DING AM, YU XW, XIE Q, XIA C, ZHANG YH, XU CT, WANG WF, CHEN ZH. Screening, identification, growth promotion and disease control of antagonistic bacteria TBWR1 against tobacco bacterial wilt[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2023, 51(10): 58-65 (in Chinese).
- [22] 胡金雪, 樊建英, 相丛超, 贾明飞, 封志明, 李东玉, 张淑青. 枯草芽孢杆菌对马铃薯的促生防病效应[J]. 中国瓜菜, 2023, 36(10): 121-128.
HU JX, FAN JY, XIANG CC, JIA MF, FENG ZM, LI DY, ZHANG SQ. Effects of *Bacillus subtilis* on growth promotion and disease control of potato[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2023, 36(10): 121-128 (in Chinese).
- [23] 秦楠, 周建波, 吕红, 任璐, 陈亚蕾, 田森, 殷辉, 赵晓军. 枯草芽孢杆菌对藜麦霜霉病的防治效果及其促生和改善土壤真菌群落作用[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(14): 159-164.
QIN N, ZHOU JB, LYU H, REN L, CHEN YL, TIAN M, YIN H, ZHAO XJ. Effects of *Bacillus subtilis* strain LF17 on biocontrol of quinoa downy mildew, growth promotion of quinoa and improvement of soil fungal community[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(14): 159-164 (in Chinese).
- [24] EMMERT EAB, HANDELSMAN J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 171(1): 1-9.
- [25] 金桩, 彭健, 胡新文, 林声汉, 关玮. 枯草芽孢杆菌-MBS的培养条件优化研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(5): 111-114.
JIN Z, PENG J, HU XW, LIN SH, GUAN W. Optimization of culture conditions of *Bacillus subtilis*-MBS[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2010(5): 111-114 (in Chinese).
- [26] 刘晓霞, 伏漪, 王宗成, 杜湘恒, 覃佐东. 立枯丝核菌拮抗菌枯草芽孢杆菌ATCC 6051发酵条件优化及抑菌物质分析[J]. 核农学报, 2024, 38(7): 1326-1334.
LIU XX, FU Y, WANG ZC, DU XH, QIN ZD. Optimizing fermentation conditions and inhibitory substance analysis of *Bacillus subtilis* ATCC 6051 antagonistic to *Thanatephorus*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2024, 38(7): 1326-1334 (in Chinese).
- [27] 陈莉, 汪立平, 赵勇, 陈乐, 邓添. 枯草芽孢杆菌K-6-9发酵条件优化及放大[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 172-176.
CHEN L, WANG LP, ZHAO Y, CHEN L, DENG T. Optimization of cultural conditions and amplification of *Bacillus subtilis* K-6-9[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(3): 172-176 (in Chinese).
- [28] 储炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2016.
CHU J, LI YR. Modern Concepts of Industrial Fermentation[M]. 3rd edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2016 (in Chinese).

- [29] 兰成忠, 林雄, 甘林, 代玉立, 刘晓菲, 杨秀娟, 蒋军喜. 贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件优化[J]. 福建农业学报, 2022, 37(10): 1335-1343.
LAN CZ, LIN X, GAN L, DAI YL, LIU XF, YANG XJ, JIANG JX. Optimization of *Bacillus velezensis* FJ17-4 Fermentation[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37(10): 1335-1343 (in Chinese).
- [30] 武天上, 薛雅蓉, 刘常宏. 贝莱斯芽孢杆菌 CC0955 发酵培养基优化及其泡腾颗粒的研制[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2599-2611.
WU TS, XUE YR, LIU CH. Optimization of fermentation medium and preparation of effervescent granules of *Bacillus velezensis* CC0955[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2599-2611 (in Chinese).
- [31] 章四平, 刘圣明, 王建新, 周明国. 枯草芽孢杆菌生防菌株 NJ-18 的发酵条件优化[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(2): 58-62.
ZHANG SP, LIU SM, WANG JX, ZHOU MG. Optimizing fermentation condition for the antagonistic *Bacillus subtilis* NJ-18 strain[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2010, 33(2): 58-62 (in Chinese).
- [32] 饶彝, 周荣华, 闵勇, 廖先清, 刘芳, 陈伟, 张光阳. 枯草芽孢杆菌的发酵培养基优化研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(21): 127-129.
RAO B, ZHOU RH, MIN Y, LIAO XQ, LIU F, CHEN W, ZHANG GY. Optimizing on fermentation conditions of *Bacillus subtilis* by response surface analysis methodology[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(21): 127-129 (in Chinese).
- [33] MACHUIS M, DECLERCK N, HUBER R, WIEGAND G. Kinetic stabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(13): 11546-11553.
- [34] 黄福佳, 姜宁, 张爱忠, 全佳慧, 张晨雪, 孙海森, 杨萧华, 申林用. 枯草芽孢杆菌工程菌发酵技术的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(5): 63-67.
HUANG FJ, JIANG N, ZHANG AZ, QUAN JH, ZHANG CX, SUN HS, YANG XH, SHEN LY. Research progress of the fermentation technology of genetic engineering bacteria of *Bacillus subtilis*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(5): 63-67 (in Chinese).
- [35] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 梅汝鸿. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S1): 82-88.
ZHANG LX, LI RX, WANG Q, MEI RH. Optimization of *Bacillus subtilis* B908 fermentation medium[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(S1): 82-88 (in Chinese).
- [36] POSADA-URIBE LF, ROMERO-TABAREZ M, VILLEGAS-ESCOBAR V. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(10): 1879-1888.
- [37] 郑双凤, 谭武贵, 丰来, 罗志威, 徐滔明, 张冬雪, 谭石勇. 枯草芽孢杆菌 NTGB-178 高产芽孢发酵工艺优化[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(6): 1031-1040.
ZHENG SF, TAN WG, FENG L, LUO ZW, XU TM, ZHANG DX, TAN SY. Optimization of sporulation fermentation process of *Bacillus subtilis* NTGB-178[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(6): 1031-1040 (in Chinese).
- [38] YÁÑEZ-MENDIZÁBAL V, VIÑAS I, USALL J, TORRES R, SOLSONA C, TEIXIDÓ N. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products[J]. Biological Control, 2012, 60(3): 280-289.
- [39] RAO YK, TSAY KJ, WU WS, TZENG YM. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 535-541.
- [40] ZHANG D, GAO T, ZHU B. Optimization of spores production culture medium of biocontrol *Bacillus* bacteria against wheat take-all diseases using response surface method[J]. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(3): 418-424.
- [41] 曲远航, 郭庆港, 李社增, 宣立锋, 张晓云, 马平. 生防枯草芽孢杆菌 HMB19198 发酵培养基的筛选及优化[J]. 农药学报, 2022, 24(3): 509-519.
QU YH, GUO QG, LI SZ, XUAN LF, ZHANG XY, MA P. Screening and Optimization of *Bacillus subtilis* HMB19198 fermentation medium[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2022, 24(3): 509-519 (in Chinese).
- [42] 何明川, 施春兰, 魏聪聪, 曾舒泉, 兰明先, 唐萍, 王志江, 伍显录, 陆光钰, 谢永辉. 烟草黑胫病拮抗细菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2022, 53(6): 1604-1615.
HE MC, SHI CL, WEI CC, ZENG SQ, LAN MX, TANG P, WANG ZJ, WU XL, LU GY, XIE YH. Isolation, identification and optimization of fermentation conditions of antagonistic bacteria against tobacco black shank[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(6): 1604-1615 (in Chinese).
- [43] 刘芳, 黎妍妍, 陈伟, 曹春霞, 温少华, 饶彝, 黄大野. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 YC11 的液体发酵培养基[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(4): 915-923.
LIU F, LI YY, CHEN W, CAO CX, WEN SH, RAO B, HUANG DY. Optimization of fermentation medium for spore production by *Bacillus velezensis* YC11 through response-surface methodology[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(4): 915-923 (in Chinese).
- [44] 张蒙蒙, 梁俊阳, 王清福, 都亚飞, 张洁, 刘前进, 彭建斐, 付博. 烟草黑胫病生防细菌的鉴定和防效测定[J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(2): 219-227.
ZHANG MM, LIANG JY, WANG QF, DU YF, ZHANG J, LIU QJ, PENG JF, FU B. Identification and control efficiency of biocontrol bacteria against tobacco black shank[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2022, 56(2): 219-227 (in Chinese).
- [45] 沈会芳, 杨祁云, 张景欣, 蒲小明, 孙大元, 刘平平, 林壁润. 烟草镰刀菌根腐病生防菌 GDND-2 的鉴定及防病效果[J]. 中国农学通报, 2024, 40(23): 126-134.
SHEN HF, YANG QY, ZHANG JX, PU XM, SUN DY, LIU PP, LIN BR. The biocontrol strain GDND-2 of tobacco *Fusarium* root rot: identification and control effect[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(23): 126-134 (in Chinese).