



柞蚕空胴病病原拮抗菌的分离、鉴定及防治效果研究

贾姝, 张俊涛, 李喜升, 赫英姿, 于庭洪, 赵翀, 宋策*

辽宁省蚕业科学研究所, 辽宁 凤城 118100

贾姝, 张俊涛, 李喜升, 赫英姿, 于庭洪, 赵翀, 宋策. 柞蚕空胴病病原拮抗菌的分离、鉴定及防治效果研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 670-682.

JIA Shu, ZHANG Juntao, LI Xisheng, HE Yingzi, YU Tinghong, ZHAO Chong, SONG Ce. Screening, identification, and biocontrol effect of bacteria against empty-gut disease of *Antheraea pernyi*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 670-682.

摘要:【目的】本研究从辽宁省蚕业科学研究所柞园土壤中分离筛选对柞蚕空胴病病原菌有显著拮抗作用的细菌, 为该病的生物防治奠定研究基础。【方法】采用稀释涂布平板法分离柞园土壤中细菌, 利用抑菌圈法筛选拮抗效果显著的菌株; 根据形态学、生理生化及分子生物学对拮抗菌进行鉴定; 利用自然转化法对拮抗菌进行荧光蛋白标记, 测定其在柞树叶片和柞蚕肠道内的定殖规律, 并对其室内和野外防效进行测定。【结果】从柞园土壤中分离获得 87 株细菌, 其中 BF-49 对柞蚕肠球菌的拮抗效果显著($P < 0.001$); 鉴定结果显示该 BF-49 与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的亲缘关系最近, 故将该菌株鉴定为 *Bacillus velezensis*, 命名为 *B. velezensis* BF-49。荧光蛋白标记菌株 BF-49-GFP 在柞蚕肠道中能定殖 5 d, 在柞树叶片上接种 20 d 后浓度仍达 1.25×10^4 CFU/g。BF-49 发酵液的 10 倍稀释液对柞蚕空胴病的室内防效为 78.25%, 野外防效为 74.42%, 均显著高于对照药剂。【结论】筛选获得的 *B. velezensis* BF-49 对柞蚕空胴病防效显著, 可作为开发柞蚕空胴病生防制剂的候选菌株。

关键词: 柞蚕肠球菌; 拮抗菌; 鉴定; 生防效果

资助项目: 辽宁省自然科学基金(2020-MS-344)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (2020-MS-344).

*Corresponding author. E-mail: songce2006@163.com

Received: 2022-06-05; Accepted: 2022-07-26; Published online: 2022-08-04

Screening, identification, and biocontrol effect of bacteria against empty-gut disease of *Antheraea pernyi*

JIA Shu, ZHANG Juntao, LI Xisheng, HE Yingzi, YU Tinghong, ZHAO Chong, SONG Ce*

Sericultural Research Institute of Liaoning Province, Fengcheng 118100, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To isolate and screen bacteria against *Enterococcus pernyi* (the pathogen of *Antheraea pernyi* empty-gut disease) from the oak garden soil of Sericultural Research Institute of Liaoning Province and thus to lay a foundation for the biocontrol of the disease. [Methods] Bacteria were isolated from soil by spread plate technique and the antagonistic strain was screened out with the inhibition zone method. The strain was identified according to morphological features, physiological and biochemical characteristics, and molecular biology. The antagonistic strain was labeled with green fluorescent protein with natural transformation method, and the colonization of the antagonistic strain in oak leaves and gut of *A. pernyi* was determined. The control of empty-gut disease of *A. pernyi* was identified by indoor and field experiments. [Results] A total of 87 bacterial strains were isolated from soil. Among them, BF-49 was found to have significant antagonistic activity against *E. pernyi*. The identification results revealed that BF-49 had the closest genetic relationship with *Bacillus velezensis*. Therefore, it was identified as *B. velezensis* and named *B. velezensis* BF-49. The fluorescence-labeled strain BF-49-GFP could colonize in the gut of *A. pernyi* for 5 days, and the count of BF-49-GFP reached 1.25×10^4 CFU/g 20 days after inoculation on the oak leaves. The indoor and field control of empty-gut disease by the 10-fold diluted BF-49 fermentation broth was 78.25% and 74.42%, respectively, which were significantly higher than those of the control agents. [Conclusion] The *B. velezensis* BF-49 has significant control effect on empty-gut disease of *A. pernyi*, being a candidate strain for developing the biological control agent against empty-gut disease.

Keywords: *Enterococcus pernyi*; antagonistic bacterium; identification; control effect

柞蚕(*Antheraea pernyi*)是一种重要的经济昆虫,我国柞蚕茧产量达 8.5 万 t/年,占全球总产量的 90%^[1]。柞蚕茧及其副产品可有效带动服装、纺织、医药及食品等产业的发展,另一方面也为人们提供了更为丰富的蛋白摄入食用资源^[2]。柞蚕肠球菌(*Enterococcus pernyi*)引起的空胴病^[3]是柞蚕生产上的主要病害之一,分布范围广,为害时间长。一般年份造成减产 20%–30%,严重年份可达 80%以上,给柞蚕生产造成巨大损失^[4]。柞蚕 1–5 龄幼虫都能受到

肠球菌感染^[5],柞园内病蚕粪便或尸体中的柞蚕肠球菌可存活 17.5–35 个月^[6],并且该菌可在柞蚕与其他昆虫间交叉感染^[7],最终造成柞蚕空胴病扩大传染。柞蚕肠球菌对不同环境条件和化学药剂(如乙醇、1%氢氧化钠、1%高锰酸钾等)有一定的耐受性,需要高温干热、高温蒸汽和高压蒸汽等才能达到灭菌的目的^[8]。目前,生产上主要采用放养前消毒的方法,对该病起到消灭垂直传播的作用,在种源上控制病害的发生。虽然相继研发出一些防治药剂如蚕得乐、

保蚕宁、蚕康宁等^[9],但受到发病原因不明确、侵染方式复杂、寄主易产生抗药性等因素制约,化学药剂始终无法发挥有力作用^[10]。同时,由于柞蚕自身对于药剂的耐受性较差^[11],化学农药的不正确使用常会引起柞蚕中毒^[12]。因此,柞蚕生产上亟需一种安全、环保、高效的生物农药的研发与应用。

柞蚕病害生物防治相关报道较少,1982年,曾繁启等从病蚕中分离出了8株柞蚕软化病链球菌噬菌体,用其对病卵进行卵面消毒,取得明显效果^[13-14],但并未见其后续研究。赫英姿等^[15]分离出8种植物提取液对柞蚕肠球菌具有抑菌活性,但并未对其防治效果进行研究。Qu等^[16]利用木霉菌株培养滤液合成银纳米颗粒,能有效控制柞蚕空胴病,提高柞蚕存活率,但仅限于感染14 d内的室内防效。在动物生物防治方面,一些芽孢杆菌能够产生对胃酸和胆盐具有抗性的孢子,在肠道环境的生存能力比其他益生菌具有优势,因此芽孢杆菌被认为是动物益生菌补充剂的候选菌株,并在包括家禽、猪、反刍动物和水产养殖的益生菌研究中展现出良好的抗菌活性、促生作用和生物安全性^[17]。在柞蚕病害防治中尚未见芽孢杆菌属用于防治柞蚕相关病害的研究,本研究从柞园土壤中分离、筛选对柞蚕肠球菌有拮抗作用的细菌,对其进行鉴定和定殖规律测定,并确定其对柞蚕空胴病的防效,为该病生防菌剂的开发提供候选菌株。

1 材料与方 法

1.1 供试材料和培养基

菌株和质粒:柞蚕肠球菌为模式菌株78501,保存于中国科学院微生物研究所(菌号:AS1.1010);pHT0-P43GFPmut3a为携带氯霉素和绿色荧光蛋白基因的质粒,由辽宁省农业科学院植物保护研究所水稻病害研究室提供。

培养基:柞蚕肠球菌培养基(酵母膏3 g,蛋白胨20 g,葡萄糖20 g,NaCl 5 g,琼脂20 g,pH 9-10,水1 000 mL)用于柞蚕肠球菌培养, LB用于细菌培养。

供试柞蚕品种为抗大,孵化后的柞蚕幼虫在室内饲养(24 °C、RH 75%)至4龄第2天用于室内防效测定,饲料为麻栎(*Quercus acutissima* Carruth.);孵化后的柞蚕幼虫在麻栎柞园饲养至4龄第2天用于野外防效测定。

1.2 柞蚕肠球菌拮抗菌的分离和筛选

土样细菌的分离:采用5点取样法^[18]从辽宁省蚕业科学研究所柞园(N123°99',E40°48')土壤表层5-10 cm柞树根际周围取土壤样品5份,各200-300 g。混合均匀,称取各份土样20 g放入装有50 mL灭菌水的三角瓶中,28 °C、180 r/min振荡培养1 h后,静置沉淀,吸取上清液,采用稀释涂布平板法,取10 μL稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍的土壤悬浮液均匀涂布于LB平板上,28 °C培养24 h,挑取单菌落进行纯化。

拮抗细菌的筛选:采用抑菌圈法^[19]。将柞蚕肠球菌配制成浓度为 1×10^7 CFU/mL的菌悬液,以5%的接种量接种到温度为45 °C左右的肠球菌培养基中,混匀后倒入培养皿。冷却后在培养基中央接种细菌发酵液,28 °C培养2 d后调查抑菌效果。

1.3 拮抗菌株的分类鉴定

1.3.1 生理生化鉴定

参照文献[20]的方法对拮抗菌株进行生理生化测定,包括革兰氏染色、甲基红、淀粉水解、蛋白胨水解、明胶液化试验、VP试验、过氧化氢酶试验以及耐盐试验。

1.3.2 分子鉴定

使用细菌快速提取试剂盒提取细菌基因组DNA。采用表1中^[21]引物对拮抗菌株16S rRNA和gyr B基因进行扩增,所得PCR产物

表 1 16S rRNA 及 *gyr B* 基因序列扩增所需引物Table 1 Primers for amplification of 16S rRNA and *gyr B* gene sequence

Gene	Sequence of primer (5'→3')	References
16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	[21]
	1492R: GGTACCTTGTACGACTT	
<i>gyr B</i>	UP-1S: GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	[21]
	UP-2rS: AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC	

送至生物工程技术有限公司测序。测序结果与 GenBank 中核酸数据进行 Blast 比对, 下载同源性较高的序列, 使用邻接法(neighbour-joining) 构建系统发育树^[22]。

1.4 拮抗菌株对柞蚕幼虫安全性测定

柞蚕幼虫室内饲养参照方法 1.1, 饥饿胁迫 1 d 后用于安全性测定。设置 4 个处理, 每个处理 10 头幼虫, 设置 3 次重复, 分别添食浓度为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 和 1.0×10^5 CFU/mL 的拮抗菌株发酵液, 剂量为 10 μ L/头。连续添食 7 d, 每隔 24 h 观察幼虫粪便、活动力和死亡情况。

1.5 拮抗菌的荧光蛋白标记

1.5.1 拮抗菌株自然转化

拮抗菌株的自然转化参照唐萍等^[23]的方法, 拮抗菌种培养于 GMI 和 GMII 培养基中, 制备感受态细胞, 将 pHT01-P43GFPmut3a 质粒导入到感受态细胞中, 摇瓶培养 2–4 h 后涂布于 LB 平板上(氯霉素浓度 10 μ g/mL), 过夜培养, 选取荧光较强的转化子进行后续试验。

1.5.2 标记菌株的稳定性、生长速率和生物膜测定

将荧光标记菌株连续转接于不含抗生素的液体 LB 培养基中 10 次, 每次转接前进行计数, 测得荧光菌占比, 检测荧光菌在无胁迫压力下继代培养稳定性。将标记菌株与原始菌株配置成浓度为 10^8 CFU/mL 菌悬液, 按 1% 接种量接种到 100 mL 培养液中, 每 4 h 用细菌计数板计算浓度, 试验处理设置 3 次重复。分别以测定时间、细菌浓度为横、纵坐标轴, 绘制标记菌株与原始菌株的生长曲线^[23]。分别挑取标记菌

株与原始菌株单菌落^[23], 接种于 LB 培养液中, 35 $^{\circ}$ C、180 r/min 摇瓶培养 1 d, 使用无菌液体 LB 培养基稀释菌液并调整 $OD_{600}=0.1$, 将菌液以 1% (体积分数) 的比例加入装有无菌液体 LB 培养基的玻璃管中, 混匀后于 25 $^{\circ}$ C 静置培养 1 d, 记录生物膜的形成情况, 测定生物膜 OD_{590} 的光吸收值, 每个处理设置 3 次重复。

1.6 标记菌株定殖测定

1.6.1 标记菌株在柞树叶片上的定殖

将标记菌株发酵液(浓度为 1×10^7 CFU/mL) 以雾状均匀喷施在长势基本一致的盆栽麻栎叶片表面, 设置 3 次重复。分别收集未接种叶片和接种第 1、3、5、10、15、20 d 叶片 1 片, 用无菌水洗涤, 并在无菌滤纸上干燥。称取 3 g 置于装有 20 mL 无菌水的 50 mL 离心管中, 150 r/min 振荡 1.5 h, 10 倍系列稀释涂布抗性平板(氯霉素浓度 10 μ g/mL)^[24], 培养 48 h 后计菌落数, 根据每皿菌落数计算每克鲜重组织中的细菌数(CFU/g)。

1.6.2 标记菌株在柞蚕肠道内的定殖

柞蚕幼虫室内饲养参照方法 1.1, 用无菌微量进样器取 10 μ L 标记菌株(浓度为 1×10^7 CFU/mL)经口添食, 设置 3 次重复, 分别取未添食和添食第 1、3、5、10、15 天柞蚕幼虫 1 头, 解剖取中肠组织 2 g 置于灭菌研磨内, 加入 4 mL 水研磨, 取上清做 10 倍系列稀释涂布抗性平板(氯霉素浓度 10 μ g/mL)^[24], 培养 48 h 后计菌落数, 根据每皿菌落数计算每克中肠组织中的细菌数(CFU/g)。

1.6.3 荧光菌落观察

取标记菌株处理 3 d 的柞树叶片和柞蚕幼虫, 用无菌刀片将叶片和柞蚕肠道切成 0.5 cm 左右的切片, 铺展在预先滴有无菌水的载玻片上, 盖上盖玻片后用共聚焦荧光显微镜(Nikon Eclipsev 80i)观察, 激发波长为 488 nm。

1.7 拮抗菌株对柞蚕空胴病的防治效果

1.7.1 拮抗菌发酵液制备

取 1 mL 浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的 BF-49 菌悬液添加到装有 100 mL LB 培养基的三角瓶中, 置于 35 °C、180 r/min 摇床中培养 24 h, 得到 BF-49 发酵液, BF-49 发酵液经 0.22 μ m 滤膜过滤, 即得无菌发酵液。

1.7.2 室内防治效果

柞蚕幼虫室内饲养参照方法 1.1, 设 5 个处理, 每个处理 10 头蚕, 设置 3 次重复: (1) 空白对照; (2) 发病对照; (3) 蚕得乐 30 倍稀释液对照; (4) BF-49 无菌发酵液 10 倍稀释液处理; (5) BF-49 发酵液 10 倍稀释液处理, 处理方法为经口添食, 剂量为 10 μ L/头, 每隔 5 d 处理 1 次, 第 2 次添食 1 d 后接种肠球菌(浓度为 1×10^7 CFU/mL)。发病后调查, 发病率=发病幼虫数量/调查幼虫数量 $\times 100\%$; 校正防治效率(以下简称防效)=(对照组发病率-处理组发病率)/对照组发病率 $\times 100\%$; 结茧率=调查茧数量/10 $\times 100\%$ ^[25]。

1.7.3 野外防治效果

柞蚕幼虫野外饲养参照方法 1.1, 设 5 个处理, 每个处理 100 头蚕, 设置 3 次重复: (1) 空白对照; (2) 发病对照; (3) 蚕得乐 30 倍稀释液处理; (4) BF-49 发酵液 10 倍稀释液处理; (5) BF-49 发酵液 100 倍稀释液处理, 处理方法为叶面喷施, 以雾状均匀喷施在麻栎叶片表面至叶面湿润而不滴水, 每隔 5 d 喷施 1 次, 第 2 次喷施 1 d 后接种肠球菌(叶面喷施, 浓度为 1×10^7 CFU/mL)。发病后调查, 发病率和防效计算方法同 1.7.1; 结茧率=调查茧数量/100 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 生防细菌的分离与筛选

将采集的土壤样品进行涂布分离, 共获得 87 株细菌。其中, 13 株对柞蚕肠球菌具有拮抗作用(表 2), 选择拮抗效果显著($P < 0.001$)且稳定的 BF-49 菌株(抑菌圈直径为 41.04 mm)开展后续研究(图 1)。

2.2 生防菌株的分类鉴定

2.2.1 形态学与生理生化鉴定

菌株 BF-49 菌落在 LB 培养基上呈近圆形, 表面干燥褶皱, 乳白色不透明, 边缘不整齐(图 2A); 光学显微镜观察显示 BF-49 菌株呈

表 2 不同细菌对柞蚕肠球菌的拮抗作用

Table 2 Antagonistic effect of different bacteria on *Enterococcus pernyi*

Strain No.	Inhibition zone Diameters (mm)	Strain No.	Inhibition zone Diameters (mm)
BF-03	21.15 \pm 0.25f	BF-53	8.03 \pm 0.11a
BF-12	34.06 \pm 0.38i	BF-56	14.20 \pm 0.29d
BF-13	12.64 \pm 0.33c	BF-58	17.82 \pm 0.15e
BF-21	31.42 \pm 0.38h	BF-69	37.54 \pm 0.46j
BF-27	17.99 \pm 0.222e	BF-78	38.04 \pm 0.25j
BF-38	10.92 \pm 0.22b	BF-86	23.95 \pm 0.19g
BF-49	41.10 \pm 0.07k		

Data are presented as $x \pm s$ ($n=3$). Values by different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$), and with the same letter mean no significant difference ($P > 0.05$). A one-way ANOVA was conducted to evaluate differences.

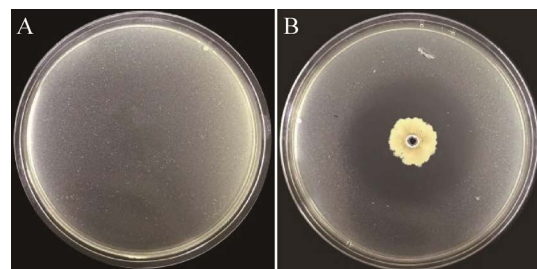


图 1 BF-49 菌株带菌发酵液的抑菌效果

Figure 1 Inhibitory effect of fermentation broth from strain BF-49 against growth of *Enterococcus pernyi*. A: CK. B: Fermentation broth.

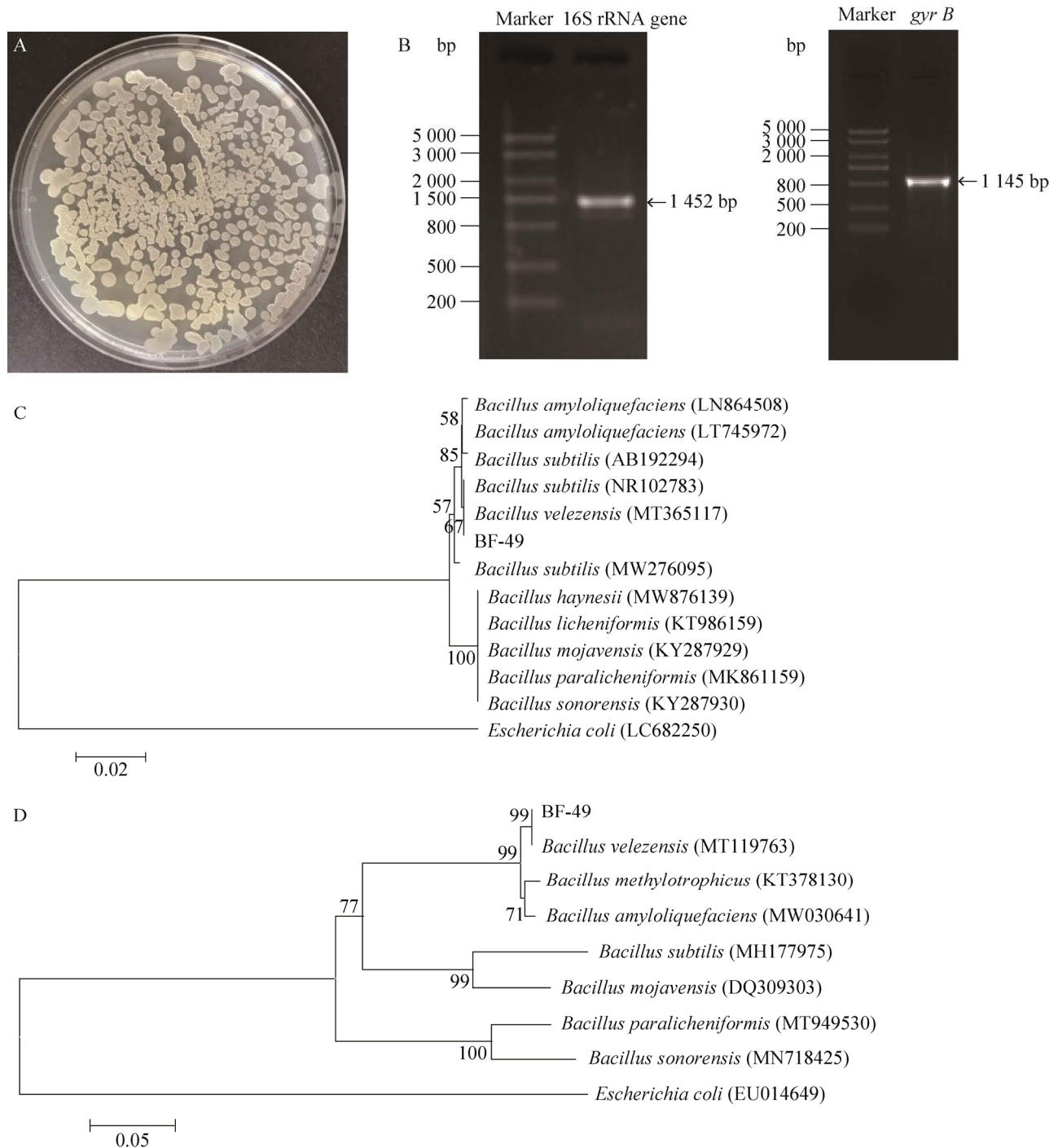


图 2 BF-49 菌株形态学特征和系统发育分析

Figure 2 The morphological features and phylogenetic analysis of strain BF-49. A: The colonial morphology of BF-49 strain. B: PCR products of 16S rRNA and *gyr B* gene amplified from strain BF-49. C: The phylogenetic tree of strain BF-49 based on 16S rRNA gene sequence. D: The phylogenetic tree of strain BF-49 based on *gyr B* gene sequence. Numbers at the nodes represented the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1 000 resampled datasets; Numbers in parentheses represented the sequences' accession number in GenBank; The scale bar indicates 0.5% sequence divergence; Target strain was labeled in bold.

杆状, 大小为 $0.5 \mu\text{m} \times (1.5-3.5) \mu\text{m}$ 。菌株 BF-49 生理生化鉴定结果如表 3 所示。结合形态学及生理生化检测结果, 初步将菌株 BF-49 归类为芽胞杆菌属(*Bacillus*)。

2.2.2 分子生物学鉴定

对 BF-49 菌株进行 16S rRNA 和 *gyr B* 基因序列测定, 分别得到 1 452 bp 和 1 145 bp 的序列(图 2B), 基因序列提交至 NCBI, 登录号分别为 OK442649 和 ON929823。经 Blast 比对, BF-49 菌株 16S rRNA 和 *gyr B* 基因序列与贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)的相似率分别为 99.45%和 99.91%, 系统发育分析结果显示 BF-49 与贝莱斯芽胞杆菌(MT119763.1)聚合为一支(图 2C、2D)。确定菌株 BF-49 为 *B. velezensis*, 命名为 *B. velezensis* BF-49。

2.3 BF-49 菌株对柞蚕幼虫安全性测定

以浓度为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 和 1.0×10^5 CFU/mL 的 BF-49 发酵液给柞蚕连续添食 7 d, 添食过程中柞蚕排便正常, 活动力良好, 无中毒和死亡现象。说明 BF-49 发酵液对柞蚕安全。

表 3 BF-49 菌株生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of BF-49 strain

Test item	Results
Gram staining	+
Starch hydrolysis	+
Gelatine liquefaction test	+
Oxidase	+
VP test	+
Catalase	+
Nitrate reduction	+
Methyl red	-
Peptone hydrolysis	-
3% NaCl	+
5% NaCl	+
7% NaCl	+
9% NaCl	+
11% NaCl	+

+: Positive (growth or reaction); -: Negative (no growth or no reaction).

2.4 BF-49 菌株的荧光标记

2.4.1 BF-49 菌株的自然转化

获得的标记菌株在共聚焦荧光显微镜下可呈现绿色荧光(图 3), 将该菌株命名为 BF-49-GFP。

2.4.2 BF-49-GFP 菌株的稳定性、生长曲线和生物膜形成能力测定

在无选择压力条件下连续转接培养 50 h 后, BF-49-GFP 菌落占比仍可达 91.04%(图 4), 稳定性较好; BF-49-GFP 的生长趋势与 BF-49 基本一致(图 5), 表明质粒的转入未对 BF-49 的生长造成不良影响; 图 6 可见, BF-49 和 BF-49-GFP 的生物膜形成能力无显著差异($P > 0.05$), 故可推断 BF-49-GFP 的定殖能力未发生明显改变, BF-49-GFP 可以用于 BF-49 的定殖研究。

2.5 BF-49-GFP 在柞树叶片和柞蚕肠道内的定殖及观察

定殖试验结果显示(表 4), 未喷施 BF-49-GFP 菌悬液时, 标记菌株浓度为 0, 说明柞树叶片和柞蚕肠道内原没有 BF-49-GFP, 现有的 BF-49-GFP 均来源于添食。喷施 1 d 后, 叶片上 BF-49-GFP 菌株的浓度为 5.99×10^5 CFU/g, 随后逐渐减少, 3 d 后, BF-49-GFP 菌株的浓度为 3.25×10^5 CFU/g, 20 d 后仍在柞树叶片上检测到 BF-49-GFP 菌株, 浓度为 1.25×10^4 CFU/g。添食 1 d 后, 柞蚕肠道内 BF-49-GFP 菌株浓度为 3.6×10^4 CFU/g, 3 d 后急剧下降, 5 d 后浓度为 1.33×10^3 CFU/g, 10 d 后未检测到 BF-49-GFP。BF-49-GFP 菌株处理 3 d 的定殖情况见图 7。

2.6 室内防效

室内防效试验结果(表 5)表明, BF-49 发酵液 10 倍稀释液对柞蚕空胴病的防效显著, 达到 78.25%, 显著高于蚕得乐 30 倍液(防效 65.21%)和 BF-49 无菌发酵液 10 倍稀释液(防效 39.13%) ($P < 0.05$)。其结茧率与空白对照无明显差异($P > 0.05$)。

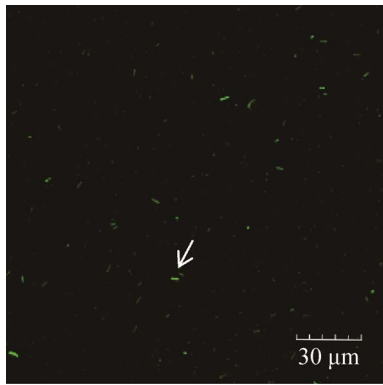


图 3 共聚焦荧光显微镜中 BF-49-GFP 的菌落形态及颜色

Figure 3 Colony morphology and color of strain BF-49-GFP under the Confocal fluorescence microscope.

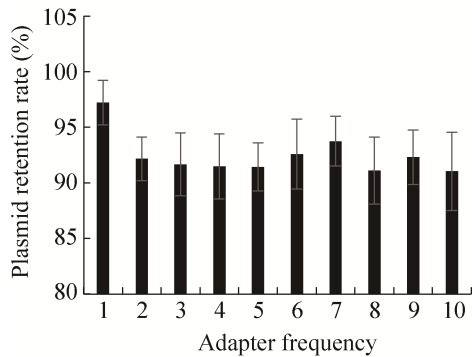


图 4 BF-49-GFP 菌株的稳定性

Figure 4 Stability of BF-49-GFP strain. Means represent the value of three replicates; Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.

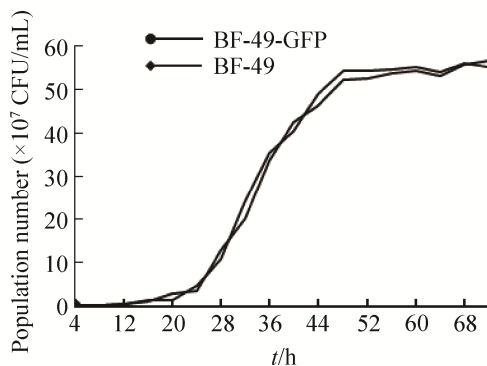


图 5 BF-49 与 BF-49-GFP 菌株的生长曲线

Figure 5 Growth curves of BF-49 and BF-49-GFP strains.

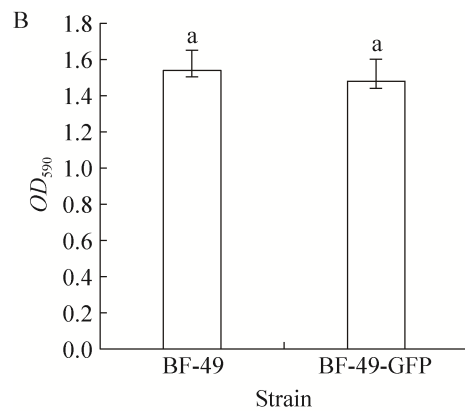
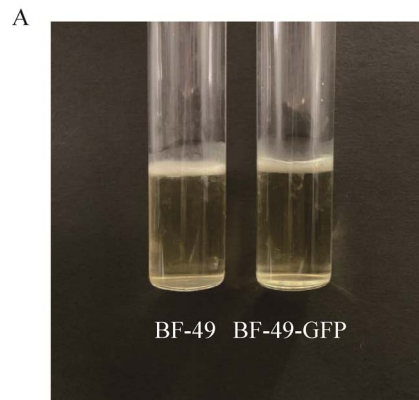


图 6 BF-49 与 BF-49-GFP 菌株的生物膜形成

Figure 6 Biofilm formation of BF-49 and BF-49-GFP strain. A: Biofilm formation. B: OD_{590} of biological film. Means represent the value of three replicates; Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments; The different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$), and the same lowercase letter mean no significant difference ($P > 0.05$).

2.7 野外防效

野外防效试验结果(表 6、图 8)表明, BF-49 发酵液 10 倍稀释液的防效为 74.42%, 显著高于蚕得乐 30 倍液(防效 31.00%)和 BF-49 带菌发酵液 100 倍稀释液(防效 39.53%) ($P < 0.05$), 其结茧率与空白对照无明显差异($P > 0.05$)。

3 讨论与结论

在动物生产上, 拮抗益生菌能够在动物肠

道内定殖并形成种群优势，将有效减少益生菌的使用剂量和使用频率。目前益生菌研究是通过添加到饲料中使其在动物肠道中保持足够菌量，使其稳定地发挥益生和控制病害的作用^[26]。

已有研究显示鳞翅目昆虫肠道呈碱性^[27]，对于非本土肠道菌而言，在高碱性肠道条件下无法长期定殖。绿色荧光蛋白标记的大肠杆菌(*Escherichia coli*)引入斜纹夜蛾(*Spodoptera littoralis*)肠道中

表 4 BF-49-GFP 在柞树叶片和柞蚕肠道内的定殖情况

Table 4 Colonization of BF-49-GFP strain in oak leaf and *Antheraea pernyi* intestinal tract

Group	Time after inoculation (d)							
	0	1	3	5	10	15	20	
Oak leaves ($\times 10^4$ CFU/g)	0	57.67 \pm 3.26a	32.13 \pm 2.01b	29.26 \pm 1.73bc	22.93 \pm 3.17c	3.55 \pm 0.33d	1.25 \pm 0.17d	
Larvae guts ($\times 10^3$ CFU/g)	0	36 \pm 3.33a	2.13 \pm 0.53b	1.33 \pm 0.31b	0c	0c	Undetected	

Data are presented as $x\pm s$ ($n=3$). Data in the same line with the different letters mean significant difference ($P<0.05$), and with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$). A one-way ANOVA was conducted to evaluate differences.

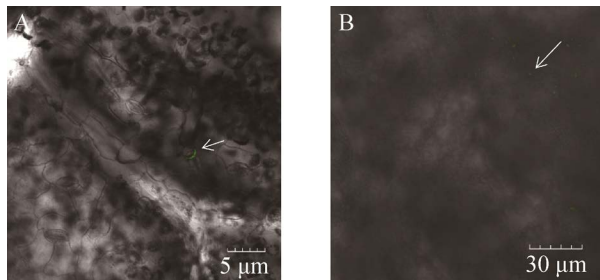


图 7 BF-49-GFP 的定殖观察

Figure 7 Colonization of BF-49-GFP strain. A: In oak leaf. B: *A. pernyi* intestinal tract.

表 5 BF-49 菌株室内防治效果

Table 5 The control effect of BF-49 strain in indoor experiment

Treatment	Incidence rate	Control effect	Cocoon rate
1	23.33 \pm 8.82ab	69.57 \pm 10.35c	60.00 \pm 5.77bc
2	76.67 \pm 3.33c	0a	0a
3	26.67 \pm 8.82ab	65.21 \pm 11.50c	53.33 \pm 13.33bc
4	46.67 \pm 8.82b	39.13 \pm 11.50b	36.67 \pm 6.67b
5	16.67 \pm 3.33a	78.25 \pm 7.53d	63.33 \pm 6.67c

Data are presented as $x\pm s$ ($n=3$). Data in the same column with the different letters mean significant difference ($P<0.05$), and with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$); A one-way ANOVA was conducted to evaluate differences. 1: Blank control; 2: Disease control; 3: Pathogen inoculation after treatment with 30-fold dilution of Silkworm Dele; 4: Pathogen inoculation after treatment of 10-fold dilution of BF-49 aseptic fermentation broth; 5: Pathogen inoculation after treatment of 100 \times dilution treatment of BF-49 carrier fermentation broth.

表 6 BF-49 菌株野外防治效果

Table 6 The control effect of BF-49 strain in field assay

Treatment	Incidence rate	Control effect	Cocoon rate
1	17.67 \pm 1.45ab	58.91 \pm 5.45d	52.33 \pm 2.60c
2	43.00 \pm 4.58d	0a	30.33 \pm 2.96a
3	29.67 \pm 4.67c	31.00 \pm 3.85b	38.00 \pm 1.53ab
4	11.00 \pm 1.52a	74.42 \pm 3.55e	45.00 \pm 5.03bc
5	26.00 \pm 4.04bc	39.53 \pm 6.40c	35.33 \pm 5.04ab

Data are presented as $x\pm s$ ($n=3$). Data in the same column with the different letters mean significant difference ($P<0.05$), and with the same letter mean no significant difference ($P>0.05$). A one-way ANOVA was conducted to evaluate differences. 1: Blank control; 2: Disease control; 3: Pathogen inoculation after treatment with 30-fold dilution of Silkworm Dele; 4: Pathogen inoculation after treatment of 10-fold dilution of BF-49 aseptic fermentation broth; 5: Pathogen inoculation after 100 \times dilution treatment of BF-49 carrier fermentation broth.

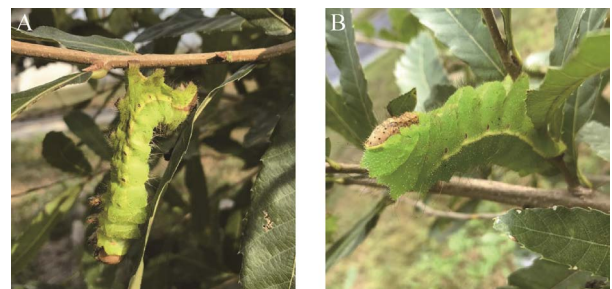


图 8 柞蚕幼虫野外发病情况

Figure 8 Field incidence of larvae. A: Diseased larvae. B: Healthy larvae.

4 d 就消失了, 引入弹尾目动物的肠道后 1 d 就消失了^[28]。在本研究中, BF-49 标记菌株在柞蚕肠道内能保持 5 d, 但野外放养中常使用喷雾法施用生防制剂, BF-49-GFP 在柞树叶片上定殖时间较长, 且在接种 20 d 后仍能达到 4 个数量级, 若能在第 5d 强化处理一次, 使其在叶片上保持种群优势, 将对柞蚕空胴病发挥更明显的防治效果。

益生菌是家畜常用的饲料添加剂, 它们能够作为抗生素的替代品, 提高生长性能, 降低发病率^[29-31]。在我国, 可以直接应用于动物饲养的常见菌种包含双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)等^[32]。它们大多可以产生抗菌物质, 如抗菌肽、乳酸和细菌素等^[33], 改善肠道微生物群的生态条件, 降低病原菌定殖的风险, 或通过竞争性排斥抑制病原菌生长^[34]。虽然 *B. velezensis* 属内分类地位的确定比其他已报道的生防芽孢杆菌相对较晚^[35], 相关研究较少, 但已经展现出良好的应用潜力。Bampidis 等^[36]报道了 *B. velezensis* 符合添加剂授权条件, 是动物生产上极具潜力的益生菌物种。*B. velezensis* 具有广谱抑菌活性, 能够分泌抗菌蛋白、脂肽类抗生素、多肽类物质和聚酮类等抗菌物质^[37], 喂食 *B. velezensis* 能够提高宿主的抗病能力。例如 Li 等^[38]的研究表明, *B. velezensis* K2 对多种水生物致病菌具有良出的拮抗作用, 明确了该菌可增强石斑鱼对哈维氏弧菌的抗病力; 在实验室条件下, 饲喂 *B. velezensis* LF01 能够显著增强罗非鱼对无乳链球菌的抗病力^[39]; *B. velezensis* DY-6 菌株对多种病原菌均有良好的抑制作用, 通过浸浴和投喂均可降低刺参的发病率^[40]。在本研究中, *B. velezensis* BF-49 对柞蚕肠球菌具有显著抑制作用, 对柞蚕空胴病的室内防效为 78.25%, 野

外防效为 74.42%, 室内防效显著高于陈卓等^[9]报道的蚕康宁(74.44%)、保蚕宁 3 号(41.11%)和蚕得乐的室内防效(33.33%) ($P < 0.05$), 但陈卓的研究中未设置清水对照和发病对照, 也并未对野外防效进行测定。另外毒性测试显示蚕康宁浓度为 2.0 mg/mL 时会使得个别柞蚕行动略迟缓, 对蚕有一定影响, 而 *B. velezensis* BF-49 在安全性测试中柞蚕幼虫未表现出不良影响, 对柞蚕幼虫具有良好的安全性。这与王金燕等^[40]和高艳侠等^[41]的研究结果一致, *B. velezensis* DY-6 与 *B. velezensis* LF01 也表现出良好的生物安全性。

以往的研究证实了 *B. velezensis* 具有产生纤维素酶、半纤维素酶、淀粉酶、过氧化氢酶和氧化酶的能力^[42], 可有效促进宿主消化食物、帮助宿主吸收营养物质。这提示 *B. velezensis* BF-49 可能还具有帮助柞蚕幼虫消化吸收营养物质、促进生长发育的作用, 后续研究将继续探讨该生防细菌对柞蚕幼虫的促进生长发育的作用。高艳侠等^[41]从罗非鱼肠道中分离的 *B. velezensis* LF01 具有耐热、耐酸碱、耐蛋白酶消化以及耐低温储藏等特性。从 *B. velezensis* DH82 发酵液提取的抗菌蛋白具有较好的热稳定性且对常见蛋白酶不敏感^[43], 说明 *B. velezensis* 可能也具有一定抗逆性, 这确保 *B. velezensis* BF-49 在柞蚕肠道内对肠球菌具有稳定的拮抗作用。

芽孢杆菌的抗菌活性通常与产生的抗菌物质有关, 后续研究将在本研究基础上探讨该拮抗菌的抑菌机制和发酵条件等, 为在生产中利用该菌株进行柞蚕空胴病的生物防治奠定研究基础。

参考文献

- [1] WANG LL, QIN F, SONG C. Reclassification of the pathogen for empty-gut disease of Chinese oak

- silkworm, *Antheraea pernyi*[J]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2010, 8(2): 156-158.
- [2] LI Q, LI YP, AMBÜHL D, LIU YQ, LI MW, QIN L. Nutrient composition of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*, a traditional edible insect in China: a review[J]. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2020, 6(4): 355-369.
- [3] 商翠芳, 秦利, 赵振军, 宋策, 李树英, 姜德富, 范琦. 应用16SrRNA基因序列鉴定柞蚕空胴病原菌[J]. *蚕业科学*, 2011, 37(5): 931-936.
- SHANG CF, QIN L, ZHAO ZJ, SONG C, LI SY, JIANG DF, FAN Q. Identification of the pathogen for *Antheraea pernyi* empty-gut disease by using 16S rRNA gene sequence[J]. *Science of Sericulture*, 2011, 37(5): 931-936 (in Chinese).
- [4] 王庆忠, 罗朝斌, 冯世华. 柞蚕空胴病的发生规律及防治[J]. *蚕桑茶叶通讯*, 2016(2): 5-6.
- WANG QZ, LUO CB, FENG SH. Occurrence regularity and control of tussah hollow trunk disease[J]. *Newsletter of Sericulture and Tea*, 2016(2): 5-6 (in Chinese).
- [5] 李树英, 秦利. 柞蚕病理学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2015.
- LI SY, QIN L. Tussah pathology[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Publishing House, 2015 (in Chinese).
- [6] 宋策. 我国柞蚕软化病研究现状与存在问题[J]. *辽宁农业科学*, 2005(4): 39-41.
- SONG C. Research status and existing problems of tussah softening disease in China[J]. *Liaoning Agricultural Science*, 2005(4): 39-41 (in Chinese).
- [7] 赫英姿, 宋策, 宿桂梅, 刘孝良. 柞蚕链球菌在柞蚕与蚕场昆虫之间的交叉感染研究[J]. *辽宁农业科学*, 2007(1): 21-22.
- HE YZ, SONG C, SU GM, LIU XL. Cross-infection of *Streptococcus* tussah between tussah and insects in silkworm farm[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2007(1): 21-22 (in Chinese).
- [8] 宿桂梅, 赫英姿, 刘孝良, 李喜升, 陈悦, 赵春山, 仝振祥, 宋策. 几种常见物理灭菌方法对柞蚕链球菌的灭活作用[J]. *蚕业科学*, 2015, 41(2): 387-390.
- SU GM, HE YZ, LIU XL, LI XS, CHEN Y, ZHAO CS, TONG ZX, SONG C. The deactivation effects of several common physical sterilization methods on *Streptococcus pernyi*[J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41(2): 387-390 (in Chinese).
- [9] 陈卓, 刘佳蔚, 李文睿, 刘限, 秦利, 夏润玺. 蚕康宁防治柞蚕空胴病的室内试验效果初报[J]. *中国蚕业*, 2019, 40(2): 23-25.
- CHEN Z, LIU J(W/Y), LI WR, LIU X, QIN L, XIA RX. Preliminary report on laboratory test effect of silkworm kangning on controlling tussah hollow trunk disease[J]. *China Sericulture*, 2019, 40(2): 23-25 (in Chinese).
- [10] 孙影. 柞蚕空胴病原菌基因组、侵染后柞蚕蛋白质组及柞蚕免疫 Toll 通路研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2016.
- SUN Y. Empty-gut disease in *Antheraea pernyi*: genome of pathogen, proteome of infected a.pernyi and innate immune toll pathway in a.pernyi[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [11] 付蓉, 焦阳. 农药在柞蚕生产中的应用现状及前景[J]. *园艺与种苗*, 2016, 36(3): 43-45.
- FU R, JIAO Y. Application status and development prospect of pesticides in tussah production[J]. *Horticulture & Seed*, 2016, 36(3): 43-45 (in Chinese).
- [12] 杨海青. 浅谈秋蚕农药中毒发生的原因及预防措施[J]. *蚕桑通报*, 2013, 44(2): 53, 55.
- YANG HQ. Causes and preventive measures of pesticide poisoning in autumn silkworm[J]. *Bulletin of Sericulture*, 2013, 44(2): 53, 55 (in Chinese).
- [13] 曾繁启, 阎红燕, 金宝铨, 金义福, 崔海玉, 杨建民. 柞蚕软化病链球菌噬菌体的分离及其特性的研究[J]. *蚕业科学*, 1982, 8(3): 151-154.
- ZENG FQ, YAN HY, JIN BX, JIN YF, CUI HY, YANG JM. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* phage from *Antheraea pernyi*[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 1982, 8(3): 151-154 (in Chinese).
- [14] 金宝铨, 杨建民, 曾繁启, 阎红燕. 噬菌体用于柞蚕空胴病生物防治的研究[J]. *生物防治通报*, 1986, 2(1): 17-19.
- JIN BX, YANG JM, ZENG FQ, YAN HY. Application of phage in biocontrol of tussah empty-gut disease[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1986, 2(1): 17-19 (in Chinese).
- [15] 赫英姿, 宋策, 宿桂梅, 刘孝良. 几种植物提取液对柞蚕链球菌活性的初步筛选[J]. *北方蚕业*, 2007, 28(4): 18-19.
- HE YZ, SONG C, SU GM, LIU XL. Preliminary screening of several plant extracts against *Streptococcus* tussah[J]. *North Sericulture*, 2007, 28(4): 18-19 (in Chinese).
- [16] QU MX, YAO W, CUI XH, XIA RX, QIN L, LIU X. Biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs)

- employing *Trichoderma* strains to control empty-gut disease of oak silkworm (*Antheraea pernyi*)[J]. *Materials Today Communications*, 2021, 28: 102619.
- [17] MINGMONGKOLCHAI S, PANBANGRED W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(6): 1334-1346.
- [18] 卡特MR, 格雷戈里奇EG. 土壤采样与分析方法. 李保国, 李永涛, 任图生, 王朝辉, 徐建明, 译. 北京: 电子工业出版社, 2022.
- [19] 谭才邓, 朱美娟, 杜淑霞, 姚勇芳. 抑菌试验中抑菌圈法的比较研究[J]. *食品工业*, 2016, 37(11): 122-125.
- TAN CD, ZHU MJ, DU SX, YAO YF. Study on the inhibition zone method in antimicrobial test[J]. *The Food Industry*, 2016, 37(11): 122-125 (in Chinese).
- [20] 朱旭芬. 现代微生物学实验技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011.
- ZHU XF. *Modern experimental technique of microbiology*[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2011 (in Chinese).
- [21] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(5): 968-974.
- CAO FM, YANG XH, MA MC, CHEN HJ, SHEN DL, LI J. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(5): 968-974 (in Chinese).
- [22] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [23] 唐萍, 何鹏飞, 袁远, 吴毅歆, 叶敏, 何月秋. 黄曲霉生防菌 DJB5 在玉米种子中的定殖研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2020, 35(3): 409-414.
- TANG P, HE PF, YUAN Y, WU YX, YE M, HE YQ. Colonization of the biocontrol bacterial strain DJB5 against *Aspergillus flavus* in maize grains[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2020, 35(3): 409-414 (in Chinese).
- [24] 李健, 何鹏飞, 李咏梅, 吴毅歆, 何鹏搏, 孔宝华, 李兴玉, MUNIR Shahzad, 何月秋. 枯草芽孢杆菌 L1-21 在柑橘上的定殖能力及其防治绿霉病效果[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(5): 31-36.
- LI J, HE PF, LI YM, WU YX, HE PB, KONG BH, LI XY, SHAHZAD M, HE YQ. Colonization ability of *Bacillus subtilis* L1-21 in *Citrus* and its control effect on green mold[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(5): 31-36 (in Chinese).
- [25] 刘铁成, 黄裕峰, 牛雄雷, 张惠淳, 刘洪丽, 黄均伟, 陈连清. 氟虫腈希夫碱化合物的合成及对柞蚕饰腹寄蝇防治效果的研究[J]. *蚕业科学*, 2018, 44(1): 105-112.
- LIU TC, HUANG YF, NIU XL, ZHANG HC, LIU HL, HUANG JW, CHEN LQ. Synthesis of fipronil schiff base compounds and their control effect against *Blepharipa tibialis* Chao[J]. *Science of Sericulture*, 2018, 44(1): 105-112 (in Chinese).
- [26] 徐淑琴, 马祥兆, 陈晓慧, 贺曦, 贺晓龙, 冶贵生. 藏羊源贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. *饲料研究*, 2021, 44(13): 114-118.
- XU SQ, MA XZ, CHEN XH, HE X, HE XL, YE GS. Study on the isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* isolated from Tibetan Sheep[J]. *Feed Research*, 2021, 44(13): 114-118 (in Chinese).
- [27] MASON CJ, CLAIR AS, PEIFFER M, GOMEZ E, JONES AG, FELTON GW, HOOVER K. Diet influences proliferation and stability of gut bacterial populations in herbivorous lepidopteran larvae[J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0229848.
- [28] TEH BS, APEL J, SHAO YQ, BOLAND W. Colonization of the intestinal tract of the polyphagous pest *Spodoptera littoralis* with the GFP-tagged indigenous gut bacterium *Enterococcus mundtii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 928.
- [29] HU SL, WANG L, JIANG ZY. Dietary additive probiotics modulation of the intestinal microbiota[J]. *Protein and Peptide Letters*, 2017, 24(5): 382-387.
- [30] 王永, 杨维仁, 张桂国. 饲料中添加屎肠球菌对断奶仔猪生长性能、肠道菌群和免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(5): 1069-1076.
- WANG Y, YANG WR, ZHANG GG. Effects of *Enterococcus faecium* on growth performance, intestinal flora and immune function of weaner piglets[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(5): 1069-1076 (in Chinese).
- [31] ZHAO PY, KIM IH. Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weanling pigs[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, 200: 86-92.
- [32] 辛海云. 藏猪肠道中拮抗致病菌微生物的筛选及其抗菌肽研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2017.
- XIN HY. Isolation of anti-pathogen microorganism

- from intestinal tract of Tibetan swine and investigation of the antibacterial peptides[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2017 (in Chinese).
- [33] LIU GR, REN L, SONG ZQ, WANG CT, SUN BG. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animals* BB04 from centenarians' intestine[J]. *Food Control*, 2015, 50: 889-895.
- [34] VARALAKSHMI S, BALASUBRAMANYAM BV, SURENDRANATH B, BAGATH M, RAJENDRAN D. Use of novel lactic acid bacterial strains with antagonistic activity for the preparation of safe indigenous fermented dairy foods (*Dahi* and *Raita*)[J]. *Journal of Food Safety*, 2014, 34(1): 26-33.
- [35] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191-195.
- [36] BAMPIDIS V, AZIMONTI G, de LOURDES BASTOS M, CHRISTENSEN H, DUSEMUND B, KOUBA M, FAŠMON DURJAVA M, LÓPEZ-ALONSO M, LÓPEZ PUENTE S, MARCON F, MAYO B, PECHOVÁ A, PETKOVA M, RAMOS F, SANZ Y, VILLA RE, WOUTERSEN R, COCCONCELLI PS, GLANDORF B, HERMAN L, PRIETO MARADONA M, SAARELA M, et al. Safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus velezensis* ATCC PTA-6737) as a feed additive for chickens for fattening, chickens reared for laying, minor poultry species (except for laying purposes), ornamental, sporting and game birds[J]. *EFSA Journal*, 2020, 18(11): e6280.
- [37] 陈龙, 吴兴利, 闫晓刚, 魏炳栋, 张芳毓. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、次级代谢产物及应用[J]. *家畜生态学报*, 2020, 41(1): 1-8.
CHEN L, WU XL, YAN XG, WEI BD, ZHANG FY. The classification, secondary metabolites and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Journal of Domestic Animal Ecology*, 2020, 41(1): 1-8 (in Chinese).
- [38] LI J, WU ZB, ZHANG Z, ZHA JW, QU SY, QI XZ, WANG GX, LING F. Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 1047-1055.
- [39] ZHANG DF, GAO YX, KE XL, YI MM, LIU ZG, HAN XQ, SHI CB, LU MX. *Bacillus velezensis* LF01: *in vitro* antimicrobial activity against fish pathogens, growth performance enhancement, and disease resistance against streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(21): 9023-9035.
- [40] 王金燕, 李彬, 王印庚, 廖梅杰, 荣小军, 张正, 牛盈盈, 宁鲁光. 刺参养殖池塘一株贝莱斯芽孢杆菌的分离及其生理特性[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(3): 567-575.
WANG JY, LI B, WANG YG, LIAO MJ, RONG XJ, ZHANG Z, NIU YY, NING LG. Screening and characteristic analysis of *Bacillus velezensis* from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ponds[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 567-575 (in Chinese).
- [41] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 刘志刚, 衣萌萌, 王森, 韩雪晴, 卢迈新. 罗非鱼源无乳链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J]. *微生物学报*, 2019, 59(5): 926-938.
GAO YX, ZHANG DF, KE XL, LIU ZG, YI MM, WANG M, HAN XQ, LU MX. Selection and characterization of intestinal *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Streptococcus agalactiae* of tilapia[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(5): 926-938 (in Chinese).
- [42] 刘韶娜, 张斌, 相德才, 赵智勇, 常雅洁, 沙茜, 赵彦光. 贝莱斯芽孢杆菌对猪生长性能、微生物群落和代谢产物的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(12): 5622-5635.
LIU SN, ZHANG B, XIANG DC, ZHAO ZY, CHANG YJ, SHA Q, ZHAO YG. Effects of *Bacillus velezensis* on growth performance, fecal microbiota and metabolites in pigs[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12): 5622-5635 (in Chinese).
- [43] 王青华, 孙晓晖, 唐旭, 万婧惊, 徐长安. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的筛选、鉴定及其抗菌粗蛋白性质分析[J]. *海洋通报*, 2019, 38(1): 63-69.
WANG QH, SUN XH, TANG X, WAN JL, XU CG. Screening and identification of *Bacillus velezensis* strain DH82 and the characterization of the crude antimicrobial protein[J]. *Marine Science Bulletin*, 2019, 38(1): 63-69 (in Chinese).