

尹向田, 杨 阳. 甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 产抗菌活性物质发酵条件优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 89–93.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.023

# 甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 产抗菌活性物质发酵条件优化

尹向田, 杨 阳

(山东省葡萄研究院, 山东济南 250100)

**摘要:**为探讨甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 菌株液体发酵条件, 提高菌体及次级代谢物质产量, 以菌体生物量和发酵液对葡萄白腐病病菌的抑菌活性为指标, 采用单因子试验和正交设计方法对菌株的最适发酵培养基成分和发酵条件进行优化, 并研究抗菌活性物质的稳定性。结果表明, 菌株 GSBM05 最适发酵培养基配方为 2.0% 可溶性淀粉, 2.0% 豆粕, 3.0% 酵母粉, 0.3% NaCl, 0.3% CaCO<sub>3</sub>; 最佳发酵条件: 初始 pH 值为 7.0, 装液量为 90 mL/250 mL 三角瓶, 接种量为 6%, 摇床转速为 150 r/min, 培养温度为 30 ℃, 培养时间为 72 h。在最佳发酵培养基和培养条件下, 菌株 GSBM05 的抑菌能力提高 66.9%; GSBM05 菌株发酵液在 pH 值为 3.0~11.0 之间抑菌活性较稳定, 经 40~100 ℃ 处理后仍具有较高的活性, 当温度为 120 ℃ 时抑菌活性丧失。经不同时间的紫外线照射后, 发酵液抑菌活性趋于稳定。

**关键词:**甲基营养型芽孢杆菌; 发酵条件优化; 葡萄白腐病病菌; 抗菌活性物质; 正交试验; 稳定性; 生防菌剂

**中图分类号:** S188<sup>+</sup>.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0089-05

2010 年 Madhaiyan 等自水稻根系土壤中分离得到甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*), 首次明确为新种, 并研究发现该菌具有促进植物生长的作用<sup>[1]</sup>。吕倩等从深海特殊生境下分离筛选到具有较强抗病原真菌活性的甲基营养型芽孢杆菌, 并分离纯化得到 3 个主要抗真菌脂肽活性物质, 具有较强的抑制黄瓜炭疽病菌、立枯丝核菌、黄瓜枯萎病等植物病原真菌的活性, 具有防治作物真菌病害的研发价值<sup>[2]</sup>。

芽孢杆菌通过分泌一些次生代谢产物来抑制病原菌的生长是芽孢杆菌作用于病原菌的重要机制<sup>[3]</sup>。自 1952 年 Babard 等从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗真菌肽以来, 不断有新的拮抗物质被发现<sup>[4]</sup>。正是由于具有强大合成抗生物质的能力, 离体条件下芽孢杆菌能对多种不同类型的植物病原菌表现出很强的拮抗效果<sup>[5]</sup>。

甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 是由笔者所在实验室在葡萄园根际土壤中分离得到的菌株, 初步试验表明, 该菌株对葡萄炭疽病病菌、葡萄溃疡病病菌、葡萄白腐病病菌等多种葡萄种植中常见的病害均具有良好的生防活性。关于甲基营养型芽孢杆菌发酵条件优化的报道中, 有产氨基酸酶、产果聚糖蔗糖酶、产 3-羟基丁酮等的发酵条件优化<sup>[6-8]</sup>, 但对于甲基营养型芽孢杆菌产抗菌物质发酵条件优化的研究极少, 因此, 有必要对菌株 GSBM05 的发酵特性进行深入研究。本研究以葡萄白腐病病菌为靶标, 主要以提高抗菌活性物质产量为目的, 优化该菌株的最佳发酵条件, 以期为该菌株抗菌物质的进一步

分离及生防菌剂的开发应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 菌株、葡萄白腐病病菌, 均由山东省葡萄研究院良种与栽培研究所保存。  
1.1.2 供试培养基 NA 培养基: 3 g 牛肉浸膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 15 g 琼脂, 调节 pH 值至 7.0, 定容至 1 000 mL。121 ℃ 灭菌 20 min, 用于 GSBM05 菌株斜面培养与活化; NB 培养基: 在 NA 培养基的基础上去掉琼脂, 用于 GSBM05 菌株种子液培养; PDA 培养基: 200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, 20 g 琼脂, 1 000 mL 水, pH 值自然, 用于真菌的培养。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子液的制备 菌株 GSBM05 于 NA 培养基上活化后接于装有 100 mL NB 培养液的 250 mL 三角瓶中, 于 28 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.2 测定内容及方法 菌体生物量测定方法: 将菌株 GSBM05 发酵液原液用 0.85% 生理盐水稀释 5 倍, 用 721 型分光光度计在 600 nm 波长下测定其  $D_{600\text{ nm}}$ 。

抑菌活性检测方法: 将菌株 GSBM05 发酵液在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 15 min, 上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤得无菌发酵液。刮取在 PDA 培养基上培养 7 d 的葡萄白腐病病菌孢子, 配成浓度为 10<sup>7</sup> 个孢子/mL 的悬浮液, 将孢子悬浮液与 PDA 培养基以 1:50 的体积比混匀后倒平板, 凝固后在培养皿中间用直径为 7 mm 的打孔器 (已灭菌) 打孔, 加入 60 μL 菌株 GSBM05 发酵液, 3 d 后测量抑菌圈直径。

1.2.3 发酵培养基成分优化 碳源的筛选: 在 NB 培养基中分别添加 1% 乳糖、甘露醇、葡萄糖、可溶性淀粉、柠檬酸、麦芽糖、蔗糖、麦芽浸膏、甘油、玉米粉、燕麦粉等作为 NB 培养基中的碳源, 其他成分不变。以 5% 的接种量将种子液分别

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 山东省农业科学院青年基金 (编号: 2016YQN35); 山东省自然科学基金 (编号: ZR2016CP20); 山东省农业科学院创新工程 (编号: CXGC2016D01)。

作者简介: 尹向田 (1985—), 女, 山东济南人, 硕士, 农艺师, 主要从事葡萄病害的生物防治工作。E-mail: yxt1985@163.com。

接种到装有 100 mL 液体发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 条件下培养 48 h,测定其  $D_{600\text{ nm}}$  和抑菌活性,每个处理 3 次重复。

**氮源的筛选:**分别以 1% 蛋白胨、酵母粉、牛肉膏、酵母膏、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、胰蛋白胨、豆粕、大豆粉等代替 NB 培养基中的氮源,其他操作同碳源的筛选,每个处理 3 次重复。

**无机盐的筛选:**分别以 0.5%  $\text{NaCl}$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{CaNO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$  等代替 NB 培养基中的无机盐,其他操作同碳源的筛选,每个处理 3 次重复。

**多因素正交试验:**以单因子试验筛选出的最佳碳源、氮源、无机盐为变异因素,采用  $\text{L}_{16}(4^5)$  正交表进行培养基优化试验,确定培养基各组分的最优配比。

**1.2.4 菌株发酵条件的优化** 以优化后的培养基为发酵培养基,对 GSBM05 菌株装液量、接种量、初始 pH 值、发酵时间、温度、转速等发酵条件进行优化。装液量分别为 30、60、90、120、150 mL/250 mL 三角瓶;接种量分别为装液量的 2%、4%、6%、8%、10%、12%;初始 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;发酵时间分别为 24、36、48、60、72、84、96、120 h;温度分别为 20、24、28、30、32、36、40 ℃;转速分别为 90、120、150、180、220 r/min。每个处理 3 次重复。

**1.2.5 优化培养条件与原始条件防效对比** 用筛选出来的发酵优化培养基成分和培养条件对 GSBM05 菌株进行发酵培养,以原始发酵条件为对照,对比所产抗菌活性物质对葡萄白腐病菌的抑菌圈大小。

### 1.3 菌株 GSBM05 发酵液抑菌活性稳定性的测定

**温度稳定性:**将无菌发酵液分别置于 40、60、80、100、120 ℃ 温度下处理 30 min,测定其对葡萄白腐病菌的抑菌活性。

**pH 值稳定性:**室温下用 0.1 mol/L HCl 溶液或 0.1 mol/L NaOH 溶液将菌株 GSBM05 发酵液的 pH 值分别调至 3.0、5.0、7.0、9.0、11.0,静置 4 h,再依次将各 pH 值调回 7.0,测定其对葡萄白腐病菌的抑菌活性。

**紫外稳定性:**将无菌发酵液分别在紫外灯下照射 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 h 后,测定其对葡萄白腐病菌的抑菌活性。

### 1.4 数据统计与分析

试验数据用 DPS 软件进行差异显著性分析,用 Microsoft Excel 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵培养基成分优化

#### 2.1.1 不同碳源对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 1 可知,不同碳源对菌株 GSBM05 代谢抑菌活性物质有显著影响,以柠檬酸为碳源的发酵液抑菌圈直径及  $D_{600\text{ nm}}$  均为最小值,而以可溶性淀粉为碳源的发酵液抑菌圈直径为最大值,为 15.5 mm,且此时的  $D_{600\text{ nm}}$  也较大。因此,选用淀粉为培养基碳源。

#### 2.1.2 不同氮源对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 2 可知,以淀粉为固定碳源,不同氮源的发酵液均具有抑菌活性,以  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源时,菌株基本未生长,发

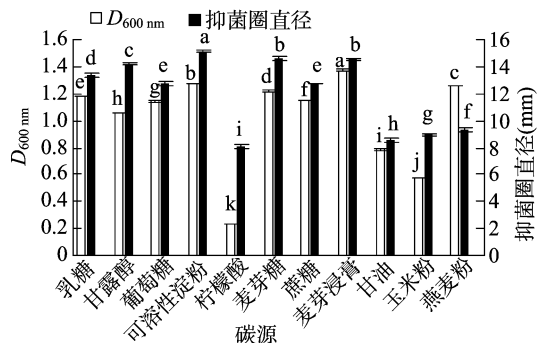


图1 不同碳源对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

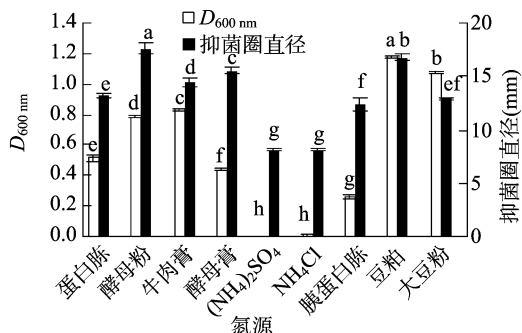


图2 不同氮源对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

酵液抑菌效果也不强;以酵母粉为氮源时,发酵液的抑菌活性最高,此时的抑菌圈直径为 17.6 mm,但活菌量并不大;以豆粕为氮源时,发酵液活菌量最高,发酵液抑菌活性也较强,此时的抑菌圈直径为 16.8 mm。因此,选用能提高抑菌活性物质的酵母粉和提高菌株数量的豆粕共同作为培养基的氮源。

#### 2.1.3 不同无机盐对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 3 可知,不同无机盐对菌株 GSBM05 发酵液活菌量和抑菌活性影响不同。以  $\text{NaCl}$  为无机盐时,菌株 GSBM05 的抑菌活性最强,但活菌量没达到最高, $\text{CaCO}_3$  能有效促进菌株的生长,且抑菌活性也较强。 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$  等作为无机盐时,发酵液活菌量和抑菌活性均较低。因此,选用  $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCO}_3$  作为培养基的无机盐。

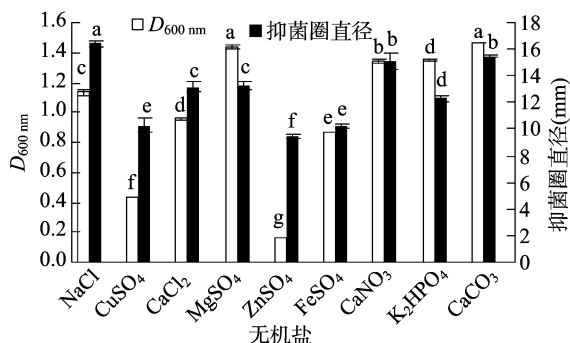


图3 不同无机盐对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

**2.1.4 正交试验优化培养基配比** 通过上述碳源和氮源单因子试验的研究,确定了液体发酵培养基最佳的碳源、氮源、无机盐等种类。为进一步优化培养基配方,采用  $\text{L}_{16}(4^5)$  正交表设计 5 因素 4 水平正交试验(表 1),以发酵液的抑菌圈直径为判断标准,确定培养基中各组分的最优配比。由表 2 可知,不同培养基配方组合对菌株 GSBM05 发酵液的抑菌活性

有明显影响。其中,处理 10 的培养基抑菌活性最强,抑菌圈直径为 22.9 mm。处理 1 的培养基抑菌活性最弱,抑菌圈直径仅为 13.5 mm。由极差的大小可以看出,培养基配方中的 5 种组分对发酵液的抑菌活性影响力表现为  $A > C > B > D > E$ ,由各列相应位级的抑菌圈直径平均值可以得出最佳水平组合为  $A_3B_3C_4D_2E_3$ 。因此,菌株 GSBM05 产抗菌物质的最佳培养基配方为 2.0% 可溶性淀粉,2.0% 豆粕,3.0% 酵母粉,0.3% NaCl,0.3%  $CaCO_3$ 。

表 1  $L_{16}(4^5)$  正交优化培养基配比试验设计

水平	各因素含量(%)				
	A:可溶性淀粉	B:豆粕	C:酵母粉	D:NaCl	E: $CaCO_3$
1	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1
2	1.0	1.0	1.0	0.3	0.2
3	2.0	2.0	2.0	0.5	0.3
4	3.0	3.0	3.0	0.7	0.5

表 2  $L_{16}(4^5)$  正交优化培养基配比试验结果

处理 编号	A:可溶性淀 粉含量	B:豆粕 含量	C:酵母粉 含量	D:NaCl 含量	E: $CaCO_3$ 含量	抑菌圈 直径(mm)
1	1	1	1	1	1	13.5
2	1	2	2	2	2	15.6
3	1	3	3	3	3	19.8
4	1	4	4	4	4	20.1
5	2	1	2	3	4	16.6
6	2	2	1	4	3	16.9
7	2	3	4	1	2	20.3
8	2	4	3	2	1	19.7
9	3	1	3	4	2	22.6
10	3	2	1	3	1	22.9
11	3	3	4	2	4	22.5
12	3	4	2	1	3	20.6
13	4	1	4	2	3	22.1
14	4	2	3	1	4	19.9
15	4	3	2	4	1	18.6
16	4	4	1	3	2	17.8
$k_1$	17.3	18.7	17.8	18.6	18.7	—
$k_2$	18.4	18.8	17.9	20.0	19.1	—
$k_3$	22.2	20.3	20.5	19.3	19.9	—
$k_4$	19.6	19.6	21.3	19.6	19.8	—
极差	4.9	1.6	3.5	1.4	1.2	—
主次顺序	$A > C > B > D > E$					—
最优水平	$A_3$	$B_3$	$C_4$	$D_2$	$E_3$	—

## 2.2 菌株 GSBM05 培养条件的优化

**2.2.1 装液量对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响** 由图 4 可知,当 250 mL 三角瓶中装液量为 90 mL 时活菌量和抑菌活性均最高,装液量过少或过多时,都不利于菌株发酵,说明菌株 GSBM05 生长对通气量有一定的要求。因此,最佳装液量为 90 mL/250 mL 三角瓶。

**2.2.2 接种量对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响** 由图 5 可知,当接种量为 2%~12% 时菌株均能较好地生长,发酵液均有一定的抑菌活性,在接种量为 6% 时活菌量达到最大值,抑菌活性也较强。随着接种量的增加,抑菌活性逐渐降低。这可能是由于接种量过大,导致菌株生长过快,造成溶氧量不足而影响抑菌物质的生成。因此,最适接种量为 6%。

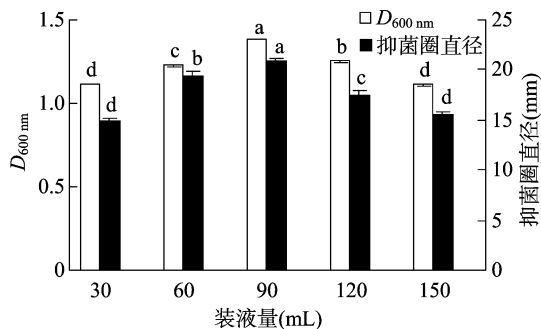


图 4 不同装液量对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

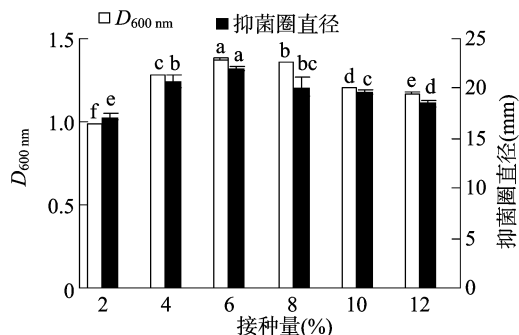


图 5 不同接种量对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

### 2.2.3 初始 pH 值对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 6 可知,菌株 GSBM05 在 pH 值为 6.0~9.0 时均可生长,其中在 pH 值为 6.5~7.5 时菌株生长量较高,在 pH 值为 8.0~9.0 时菌株生长受到一定抑制,说明碱性条件下不利于菌株 GSBM05 生长。在发酵液抑菌活性方面,初始 pH 值为 6.0~8.0 时发酵液的抑菌活性明显高于 pH 值为 8.0~9.0 时的抑菌活性。在 pH 值为 7.0 时,活菌量和发酵液的抑菌活性均达到最大值。因此,发酵液培养基的初始 pH 值以 7.0 为最适。

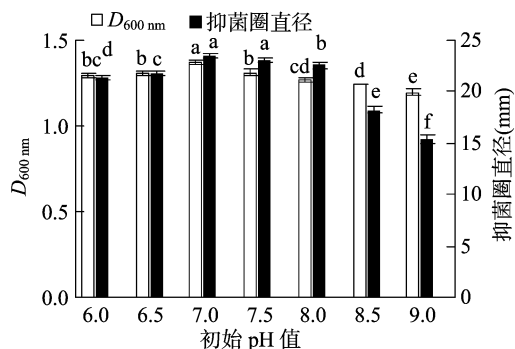


图 6 不同初始 pH 值对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

### 2.2.4 发酵时间对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 7 可知,培养 24~48 h 时,活菌量逐渐增加,在 48 h 时达到稳定。60~120 h 时随着培养时间的增加,活菌量明显下降。在发酵液抑菌活性方面,在培养 24~72 h 时,发酵液抑菌活性逐渐增加,并在 72 h 时达到最大值。在 84~120 h 时,发酵液抑菌活性基本保持稳定,仅有轻微的降低。综合以上结果,确定 72 h 为最佳发酵时间。

### 2.2.5 发酵温度对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响

由图 8 可知,不同发酵温度对菌株 GSBM05 的活菌量和发酵

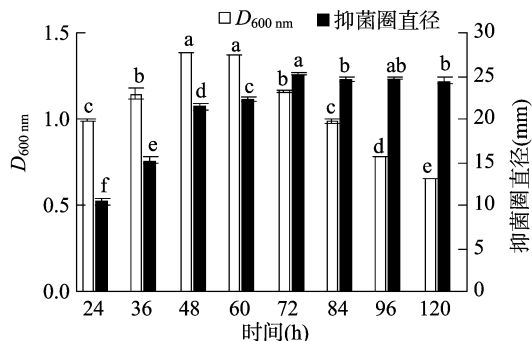


图7 不同发酵时间对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

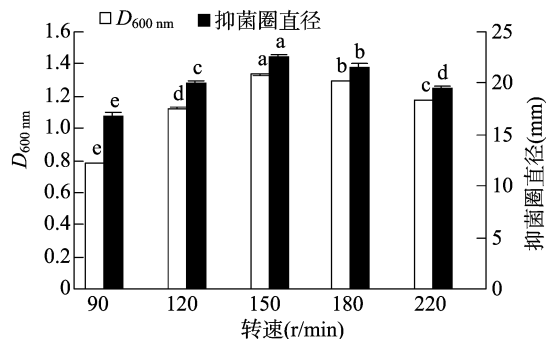
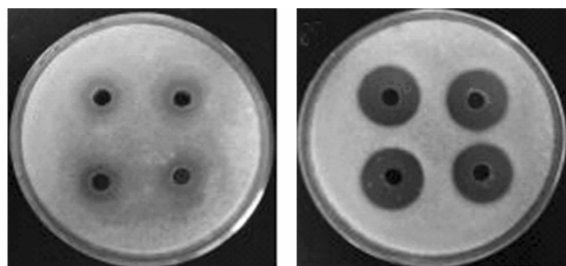


图9 不同转速对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

培养条件(培养基配方为 2.0% 可溶性淀粉、2.0% 豆粕、3.0% 酵母粉、0.3% NaCl、0.3%  $\text{CaCO}_3$ , 初始 pH 值为 7.0, 装液量为 90 mL/250 mL 三角瓶, 接种量为 6%, 在 150 r/min、30 ℃ 条件下振荡培养 72 h)培养菌株 GSBM05, 测得其发酵液对葡萄白腐病病菌的抑菌圈直径达 25.2 mm, 与原始条件相比提高 66.9%。



A. 优化前发酵液

B. 优化后发酵液

图10 甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵液抑菌活性对比

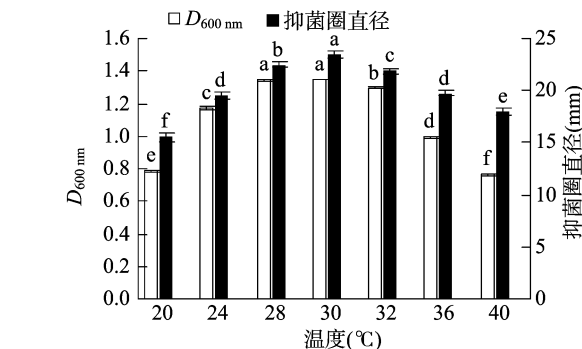


图8 不同发酵温度对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵的影响

液抑菌活性均有较大影响, 在 28 ~ 32 ℃ 时活菌量较高, 在 30 ℃ 时达到最大值, 随着温度的升高, 活菌量逐渐下降。在抑菌活性方面, 在 30 ℃ 时发酵液表现出较强的抑菌活性。在 20、40 ℃ 时, 抑菌活性较低。温度过高或过低均不利于菌株 GSBM05 的生长和抑菌物质的产生, 因此, 选择 30 ℃ 作为最适温度。

2.2.6 转速对菌株生长和抑菌活性物质产生的影响 由图 9 可知, 当转速为 90 ~ 150 r/min 时, 随着转速的增加, 菌体的活菌量和发酵液抑菌活性均逐渐增加, 并在 150 r/min 时达到最大值。当转速超过 150 r/min 时, 菌体的活菌量和发酵液的抑菌活性逐渐下降。因此, 选择 150 r/min 作为最佳转速。

### 2.3 优化培养条件与原始条件抑菌活性对比

由图 10 可知, 原始条件下测得菌株 GSBM05 发酵液对葡萄白腐病病菌的抑菌圈直径为 15.1 mm, 利用优化后的最佳

### 2.4 菌株 GSBM05 发酵液抑菌活性稳定性的测定

由图 11 可知, 在温度稳定性方面, 经 60 ℃ 处理后抑菌圈直径依旧高达 20 mm, 随着温度的升高, 菌株 GSBM05 发酵液抑菌活性逐渐降低, 在 120 ℃ 处理 30 min 后, 抑菌物质失去活性; 在酸碱稳定性方面, 菌株 GSBM05 发酵液经不同 pH 值处理后均具有抑菌活性, 在 pH 值为 7.0、9.0 时抑菌活性较高; 菌株 GSBM05 发酵液在紫外线下照射不同时间后, 抑菌活性均维持在较高水平, 说明菌株 GSBM05 发酵液具有较好的紫外稳定性。

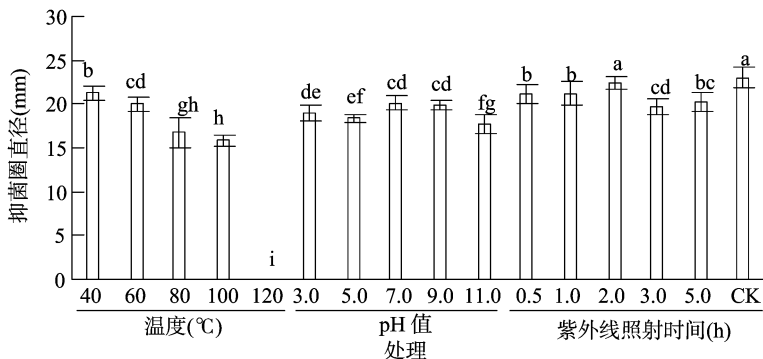


图11 不同处理对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 发酵液稳定性的影响

## 3 讨论与结论

芽孢杆菌在发酵中可以产生抗生素类物质如表面活性

素<sup>[9]</sup>、依枯草菌素<sup>[10-11]</sup>、泛草素<sup>[12]</sup>等物质, 另外, 还能产生细菌素、细胞壁降解酶等拮抗蛋白类物质<sup>[13]</sup>。芽孢杆菌次生物质的产生受到培养基成分及发酵条件的影响。不同培养基成

分和发酵条件可显著影响菌株生长和代谢物质的产生。卢彩鸽等的研究表明,在优化后的培养基和培养条件下,解淀粉芽孢杆菌 MH71 对番茄灰霉病的抑菌能力提高了 37.4%<sup>[14]</sup>。洪鹏等优化后的解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵液抑菌能力提高了 37.3%<sup>[15]</sup>。

本研究通过单因素试验对 GSBM05 菌株产抗菌物质的最佳碳源、氮源、无机盐等进行筛选,结果表明,在不同碳源、氮源、无机盐等条件下,菌株生长量与抑菌物质活性呈正相关。可溶性淀粉作为碳源有利于菌株 GSBM05 生长和抗菌物质产生,而该菌株对柠檬酸和甘油的利用效果较差。氮源中,有机氮利于菌株生长和活性物质产生,在铵态氮源中菌株生长受到抑制。通过正交试验得到 GSBM05 菌株高产抗菌物质的最优培养基配方为 2.0% 可溶性淀粉,2.0% 豆粕,3.0% 酵母粉,0.3% NaCl,0.3% CaCO<sub>3</sub>。优化培养基中所含的 5 种成分均是生产上容易获得的价格相对低廉的化工原料。这为今后大量生产抑菌物质提供了先决条件。利用优化的培养基在不同条件下培养得到的最适发酵条件:pH 值为 7.0,装液量为 90 mL/250 mL 三角瓶,接种量为 6%,摇床转速为 150 r/min,培养温度为 30 ℃,培养时间为 72 h,优化后抑菌活性提高了 66.9%。在优化培养条件方面,菌株生长量与抗菌物质产量的变化并不完全一致,在测试的各因素中,培养时间对 GSBM05 菌株产抗菌物质影响最大。培养到 48 h 时,菌体含量达到最大值,但抑菌圈直径在 72 h 时达到最大值,随着发酵时间的延长,菌体含量明显下降,而抗菌物质却下降不明显,说明其产抗菌物质的峰值时间出现在生长衰退期。

发酵液稳定性在甲基营养型芽孢杆菌中研究较少。本试验的结果表明,GSBM05 菌株在液体发酵培养中产生的抑菌物质具有较好的稳定性,紫外线照射对抑菌物质基本没有影响,当温度超过 100 ℃ 时,抑菌活性显著降低甚至失活,发酵液在 pH 值为 3.0 ~ 11.0 处理后依然保持较高的抑菌活性。说明温度对 GSBM05 菌株抑菌物质活性影响较大。这与李颖等研究的枯草芽孢杆菌 SH-1 发酵液稳定性<sup>[16]</sup>相符。但侯宝宏等研究发现,解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 产生的抗菌物质粗提物在 120 ℃ 仍具有活性<sup>[17]</sup>。说明不同芽孢杆菌发酵液的温度稳定性不尽相同。

发酵培养基优化是微生物发酵产品向产业化转入的重要环节。本研究仅对甲基营养型芽孢杆菌 GSBM05 的培养基组成和培养条件进行了摇瓶发酵的初步研究,接下来还要进一步通过发酵罐放大试验来验证发酵参数,为工业化生产提供依据。

## 参考文献:

[1] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon S W, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2490-2495.

[2] 吕倩, 胡江春, 王楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 113-120.

[3] Leclère V, Marti R, Béchet M, et al. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(6): 475-483.

[4] Babad J, Pinsky A, Turner-Graff R, et al. An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1952, 170(4328): 618-619.

[5] Ravu R R, Jacob M R, Chen X, et al. Bacillus A, an antibacterial macrodiolide from *Bacillus amyloliquefaciens* AP183 [J]. Journal of Natural Products, 2015, 78(4): 924-928.

[6] 向军, 张金虎, 柴海云, 等. 甲基营养型芽孢杆菌产氨肽酶的发酵优化[J]. 中国酿造, 2012, 31(5): 45-50.

[7] 章宁娟, 薛正莲, 王洲, 等. 甲基营养型芽孢杆菌产 3-羟基丁酮的微孔板发酵培养基优化[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 103-107.

[8] 李润静, 张涛, 江波, 等. 甲基营养芽孢杆菌 SK21.002 产果聚糖蔗糖酶的发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 157-161.

[9] Bais H P, Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-319.

[10] Tang W H. Advances in biological control of plant disease: proceeding of the international workshop on biological control of plant disease [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 1996.

[11] 朱震, 罗毅, 张鹏, 等. 产表面活性素和伊枯草菌素 A 菌株的筛选及其脂肽类产物的特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1488-1498.

[12] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090.

[13] 李晶, 杨谦, 赵丽华, 等. 生防枯草芽孢杆菌 B29 菌株抗菌物质的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(2): 59-65.

[14] 卢彩鸽, 董红平, 张殿朋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 MH71 摇瓶发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 369-377.

[15] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569-578.

[16] 李颖, 金鑫, 沙海天, 等. 枯草芽孢杆菌 SH-1 发酵条件优化及抑菌活性物质稳定性研究[J]. 食品科技, 2016, 41(9): 25-29.

[17] 侯宝宏, 徐秉良, 郇町, 等. 抗苹果树腐烂病解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 的抑菌活性物质稳定性及抑菌谱测定[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(1): 80-86.