

李全胜,武冬梅,陈云,等.生防芽孢杆菌 S12 产芽孢摇瓶发酵条件优化[J].江苏农业科学,2020,48(19):119-124.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.026

# 生防芽孢杆菌 S12 产芽孢摇瓶发酵条件优化

李全胜<sup>1</sup>,武冬梅<sup>2</sup>,陈云<sup>1</sup>,王国栋<sup>1</sup>,梁飞<sup>1</sup>

(1.新疆农垦科学院农田水利与土壤肥料研究所,新疆石河子 832000;

2.新疆农垦科学院生物技术研究所/作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室,新疆石河子 832000)

**摘要:**通过优化生防芽孢杆菌 S12 产芽孢发酵条件,以提高其摇瓶水平上发酵液中芽孢产量,为其进一步产业化开发提供技术支撑。在摇瓶水平上,首先采用单因素试验研究不同的发酵时间、初始 pH 值、温度、转速、接种量和装液量等发酵条件对生防芽孢杆菌 S12 芽孢数量、菌体数量和产率的影响,随后采用正交试验优化确定各发酵条件的最佳组合。生防芽孢杆菌 S12 产芽孢的最适发酵条件为:装液量 80 mL/250 mL、接种量 3%、初始 pH 值 7.0、温度 35 ℃、转速 160 r/min、时间 84 h。发酵条件优化后,摇瓶水平上 S12 菌株的芽孢数量、菌体数量分别达到  $5.721 \times 10^9$ 、 $5.822 \times 10^9$  CFU/mL,芽孢产率为 98.28%。正交试验优化后的发酵条件提高了 S12 菌株的芽孢产量,降低了生产成本,为其进一步生防菌剂的生产和应用奠定了基础。

**关键词:**生防芽孢杆菌;芽孢产量;发酵条件;正交试验

**中图分类号:**S435.621;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)19-0119-06

我国棉花黄萎病主要是由大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 引起的一种毁灭性种传和土传性病害,俗称“棉花癌症”<sup>[1-2]</sup>。大丽轮枝菌寄主广泛,达 600 多种,主要是锦葵科、豆科、十字花科和茄科等双子叶植物,且易受环境和寄主变化的影响而产生新的生理型,并且形成的微菌核在土壤中存活时间达十几年,给防治工作造成了巨大的困难<sup>[3-4]</sup>。目前,国内外对棉花黄萎病的防治主要采用轮作倒茬、选育抗病品种、化学防治和生物防治等手段,其中生物防治具有环境友好、绿色环保、不易产生抗性、发展潜力大等优势而备受大家关注和青睐<sup>[5]</sup>。

芽孢杆菌不仅能产生抗菌物质,且可形成抗逆性的芽孢,便于运输和储藏,是一种理想的生防微生物<sup>[6-7]</sup>。目前应用的农业生防制剂多采用芽孢杆菌作为菌种资源,制剂中芽孢的含量是影响制剂应

用效果的关键因素<sup>[8-9]</sup>,因此在芽孢杆菌菌株进行工业化生产前,须要通过发酵工艺优化提高发酵液中芽孢的产量。从不同生境中筛选分离的芽孢杆菌菌株对营养及生长条件要求不同,优化适合特定生境菌株的发酵条件是菌剂工业化生产的基础。不同学者利用单因素、正交设计和响应面分析方法优化芽孢杆菌的发酵工艺,提高芽孢产量。侯敏等采用单因素和正交试验对芽孢杆菌 S13 产芽孢培养条件进行优化,芽孢数量达到  $4.9 \times 10^9$  CFU/mL,芽孢产率达到 90%<sup>[10]</sup>;卢彩鸽等利用响应面分析方法对芽孢杆菌 MH71 的产芽孢培养条件进行优化,优化后芽孢数量达到  $1.2 \times 10^9$  CFU/mL<sup>[11]</sup>。发酵条件优化不仅能够提高芽孢产率,而且能降低生产能耗,提高经济效益。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S12 是从新疆绿洲棉田中分离获得的 1 株广谱抗真菌生防菌株,尤其对大丽轮枝菌具有较强的拮抗作用<sup>[12]</sup>,具备微生物菌剂商业化开发的潜力。芽孢含量是影响微生物杀菌剂贮藏运输和防治效果的关键因素<sup>[13-14]</sup>。本研究团队前期采用响应面分析法优化确定了菌株 S12 产芽孢培养基的优化配比组合<sup>[15]</sup>,为了进一步提高发酵液中菌株 S12 的芽孢产量,本试验在优化培养基的基础上采用单因素和正交设计试验对芽孢杆菌 S12 产芽孢发酵条件进行优化,以期为该菌株的工业化生产提供依据。

收稿日期:2019-11-21

基金项目:新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化计划(编号:2016AD029、2016AC008);新疆生产建设兵团中青年领军人才计划(编号:2018CB026);国家重点研发计划(编号:2016YFD02004005-4、2017YFD0201506)。

作者简介:李全胜(1986—),男,山东齐河人,硕士,助理研究员,主要从事土壤微生物发掘及利用研究。E-mail: moucheng2005@126.com。

通信作者:梁飞,博士,副研究员,主要从事土壤肥料与滴灌技术研究。E-mail: liangfei3326@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 生防芽孢杆菌 S12 分离自新疆连作棉田根际土壤,4 ℃ 试管斜面保存。

1.1.2 培养基 NA 培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 3 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂粉 15 g/L,pH 值 7.0 ~ 7.2;NB 培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉浸膏 3 g/L,NaCl 5 g/L,pH 值 7.0 ~ 7.2;发酵培养基:玉米粉 13 g/L,大豆蛋白胨 15.1 g/L,CaCO<sub>3</sub> 0.7 g/L,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2 g/L,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 4 g/L,pH 值 7.0 ~ 7.2<sup>[14]</sup>。

### 1.2 种子液的制备

1.2.1 菌株活化及培养 将保存的菌株 S12 接种于 NA 培养基平板上,30 ℃ 培养 16 h。

1.2.2 种子发酵 将活化的菌株 S12 接种到装有 40 mL NB 培养基的 100 mL 三角瓶中,于摇床 30 ℃、180 r/min 振荡培养 14 h 作为种子液。

### 1.3 单因素试验

将培养 14 h 的种子液接入配制的发酵培养基中,接种量为 1%,250 mL 的三角瓶装液量为 60 mL,pH 值 7.0,150 r/min,30 ℃ 振荡培养 84 h 进行发酵,为了进行单因素试验筛选,依次对以上发酵条件中的发酵时间、初始 pH 值、温度、转速接种量、装液量进行改变,其中分别设定发酵时间为 36、48、60、72、84、96 h,初始 pH 值为 5、6、7、8、9、10,温度为 20、25、30、35、40 ℃;转速为 120、140、160、180、200 r/min,接种量为 1%、3%、5%、7%、9%,250 mL 三角瓶装液量为 40、60、80、100、120 mL,考察各因素对芽孢数量、菌体数量和芽孢产率的影响,从而确定正交试验的因素及水平。

### 1.4 正交设计试验

根据单因素试验结果,确定对菌株 S12 芽孢产量影响因素的考察水平,按照正交试验表 L<sub>18</sub>(3<sup>6</sup>) 设计 6 因素 3 水平的正交试验,比较装液量、温度、转速、发酵时间、接种量不同水平组合对 S12 菌株芽孢数量、菌体数量和芽孢产率的影响。

### 1.5 测定项目及方法

采用系列稀释平板涂布法进行菌体和芽孢计数,其中芽孢计数前将发酵菌液经过 80 ℃ 水浴 15 min 后进行。芽孢产率 = 芽孢数量/菌体数量 × 100%。试验于 2018 年在新疆农垦科学院作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室进行。

### 1.6 数据处理分析

采用 Excel2007 软件进行数据统计,运用 GraphPad Prism 5.0 软件作图,采用 SPSS 17.0 软件进行正交试验设计和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵条件单因素试验

2.1.1 发酵时间 随着发酵时间的延长,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现逐渐增多的趋势(图 1 - A),分别由 36 h 的  $0.028 \times 10^9$ 、 $0.155 \times 10^9$  CFU/mL 增加到 96 h 的  $2.230 \times 10^9$ 、 $2.330 \times 10^9$  CFU/mL;当发酵时间延长到 84 h 时,芽孢数量和菌体数量均达到最大值,分别为  $2.240 \times 10^9$ 、 $2.350 \times 10^9$  CFU/mL;此时芽孢产率也达到最大值 95.32%,因此选择 72、84、96 h 作为正交试验的发酵时间的 3 个水平。

2.1.2 初始 pH 值 随着发酵液初始 pH 值的升高,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现先增加后降低的趋势(图 1 - B),pH 值为 7 时均达到最大值,分别为  $2.212 \times 10^9$ 、 $2.292 \times 10^9$  CFU/mL,此时芽孢产率也达到最大值 96.42%。从图 1 - B 可以看出,发酵滤液呈酸性或碱性,对芽孢的形成和菌体生长均影响较大,因此选择 pH 值为 7 作为正交试验发酵培养基的初始 pH 值。

2.1.3 温度 随着发酵温度的升高,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现先增加后降低的趋势(图 1 - C),发酵温度为 35 ℃ 时均达到最大值,分别为  $3.675 \times 10^9$ 、 $3.766 \times 10^9$  CFU/mL,此时芽孢产率也达到最大值 97.60%。当温度低于或高于 35 ℃ 时,发酵液中的芽孢数量和菌体数量均有所下降,因此,选择 30、35、40 ℃ 作为正交试验的发酵温度的 3 个水平。

2.1.4 转速 随着转速的增加,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现先增加后降低的趋势(图 1 - D),转速为 180 r/min 时均达到最大值,分别为  $3.590 \times 10^9$ 、 $3.930 \times 10^9$  CFU/mL,此时芽孢产率也达到最大值 91.38%。当转速高于或是低于 180 r/min 时,发酵液中的芽孢数量和菌体数量均有所下降,因此选择 160、180、200 r/min 作为正交试验的转速的 3 个水平。

2.1.5 接种量 随着接种量的增加,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现先增加后降低的趋势(图 1 - E),但趋势变化不大,接种量为 5% 时均达到最

大值,分别为  $3.255 \times 10^9$ 、 $3.375 \times 10^9$  CFU/mL,此时芽孢产率也达到最大值 96.46%。当接种量高于或是低于 5% 时,发酵液中的芽孢数量和菌体数量均有所下降,因此选择 3%、5%、7% 作为正交试验的转速的 3 个水平。

2.1.6 装液量 随着装液量的增加,发酵液中芽孢数量和菌体数量均呈现先增加后降低的趋势(图

1-F),装液量为 80 mL/250 mL 时均达到最大值,分别为  $3.675 \times 10^9$  CFU/mL、 $3.766 \times 10^9$  CFU/mL,此时芽孢产率也达到最大值 97.53%。当接种量高于或是低于 80 mL/250 mL 时,发酵液中的芽孢数量和菌体数量均有所下降,因此选择 60、80、100 mL/250 mL 作为正交试验的转速的 3 个水平。

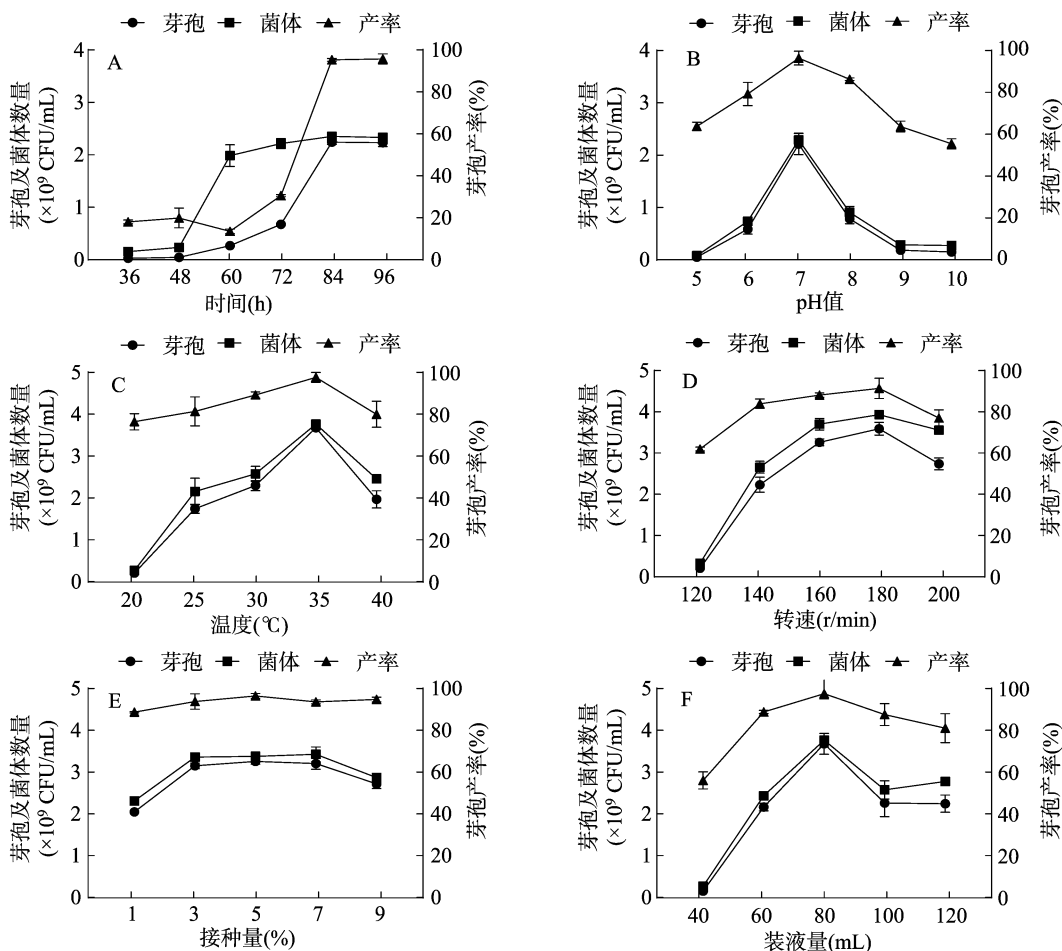


图1 不同条件对菌株 S12 发酵液中菌体数量和芽孢产量的影响

## 2.2 发酵条件正交试验优化

单因素的试验结果表明,发酵条件不同因素对菌株 S12 芽孢数量和菌体数量都有影响,为综合评价各发酵因子对 S12 菌株芽孢数量和菌体数量,采用  $L_{18}(3^6)$  正交表,设计 6 因素 3 水平正交试验,以进一步确定影响 S12 菌株发酵产芽孢各发酵因子的最佳组合。

从表 1 可以看出,产芽孢发酵各条件最佳组合为  $A_2B_2C_2E_3F_3$ ,即产芽孢最佳发酵条件为装液量 80 mL/250 mL、温度 35 °C、转速 180 r/min、时间 96 h、接种量 7%,5 个因素的主次顺序依次为 A(装液量) > B(温度) > E(时间) > C(转速) > F(接种

量)。产菌体各发酵条件最佳组合为  $A_2B_2C_2E_3F_3$ ,即产芽孢最佳发酵条件为装液量 80 mL/250 mL、温度 35 °C、转速 180 r/min、时间 96 h、接种量 7%,5 个因素的主次顺序依次为 A(装液量) > E(时间) > B(温度) > C(转速)  $\approx$  F(接种量)。芽孢产率各发酵条件最佳组合为  $A_2B_2C_2E_2F_3$ ,即产芽孢最佳发酵条件为装液量 80 mL/250 mL、温度 35 °C、转速 180 r/min、时间 84 h、接种量 7%,5 个因素的主次顺序依次为 A(装液量) > B(温度) > E(时间) > C(转速) > F(接种量)。极差评价分析结果显示,装液量是影响发酵条件的主要因素,其次是温度和时间,最后是转速和接种量。

表 1 正交试验优化菌株 S12 发酵条件的极差评价结果

试验号	因素						芽孢数量 ( ×10 <sup>9</sup> CFU/mL)	菌体数量 ( ×10 <sup>9</sup> CFU/mL)	芽孢产率 ( % )
	A:装液量 (mL)	B:温度 (℃)	C:转速 (r/min)	D:误差项	E:时间 (h)	F:接种量 (%)			
1	1(60)	1(30)	1(160)	1	1(72)	1(3)	1.287	2.085	61.73
2	1(60)	1(30)	1(160)	3	2(84)	2(5)	1.877	2.515	74.61
3	1(60)	2(35)	3(200)	2	2(84)	2(5)	2.738	3.558	76.95
4	1(60)	2(35)	3(200)	1	3(96)	3(7)	3.413	4.336	78.71
5	1(60)	3(40)	2(180)	2	1(72)	1(3)	2.678	3.739	71.62
6	1(60)	3(40)	2(180)	3	3(96)	3(7)	2.435	3.816	63.80
7	2(80)	1(30)	3(200)	2	1(72)	3(7)	4.240	5.325	79.63
8	2(80)	1(30)	3(200)	3	3(96)	1(3)	4.589	5.364	85.54
9	2(80)	2(35)	2(180)	1	1(72)	2(5)	5.196	5.276	98.48
10	2(80)	2(35)	2(180)	3	2(84)	1(3)	5.675	5.766	98.42
11	2(80)	3(40)	1(160)	2	2(84)	3(7)	4.370	5.407	80.81
12	2(80)	3(40)	1(160)	1	3(96)	2(5)	4.667	5.457	85.52
13	3(100)	1(30)	2(180)	1	2(84)	3(7)	2.296	2.576	89.13
14	3(100)	1(30)	2(180)	2	3(96)	2(5)	2.188	3.892	56.21
15	3(100)	2(35)	1(160)	3	1(72)	3(7)	2.923	3.508	83.34
16	3(100)	2(35)	1(160)	2	3(96)	1(3)	3.094	3.856	80.23
17	3(100)	3(40)	3(200)	3	1(72)	2(5)	1.136	2.031	55.95
18	3(100)	3(40)	3(200)	1	2(84)	1(3)	1.525	2.214	68.88
芽孢数量	<i>k</i> <sub>1</sub>	2.404	2.746	3.036	3.064	2.910	3.141		
	<i>k</i> <sub>2</sub>	4.789	3.840	3.411	3.218	3.080	2.967		
	<i>k</i> <sub>3</sub>	2.194	2.802	2.940	3.106	3.397	3.280		
	<i>R</i>	2.596	1.094	0.471	0.154	0.487	0.313		
菌体数量	<i>k</i> <sub>1</sub>	3.341	3.626	3.805	3.657	3.660	3.837		
	<i>k</i> <sub>2</sub>	5.432	4.383	4.177	4.296	3.673	3.788		
	<i>k</i> <sub>3</sub>	3.013	3.777	3.805	3.833	4.454	4.161		
	<i>R</i>	2.420	0.757	0.373	0.639	0.793	0.373		
芽孢产率	<i>k</i> <sub>1</sub>	71.24	74.48	77.71	80.41	75.13	77.74		
	<i>k</i> <sub>2</sub>	88.07	86.02	79.61	74.24	81.47	74.62		
	<i>k</i> <sub>3</sub>	72.29	71.10	74.28	76.94	75.00	79.24		
	<i>R</i>	16.83	14.93	5.33	6.17	6.47	4.62		

发酵条件优化的方差评价结果见表 2、表 3、表 4。其中,产芽孢发酵条件中,因素 A 和 B 的 *P* 值均小于 0.05,即这 2 种因素对产芽孢数量试验结果影响显著;因素 C、E 和 F 的 *P* 值均大于 0.10,即因素 C、E 和 F 对试验结果影响不显著;各因素主次顺序为 A(装液量) > B(温度) > C(转速) > E(时间) > F(接种量)(表 2)。产菌体发酵条件中,因素 A 的 *P* 值小于 0.05,即该因素对产菌体数量试验结果影响显著;因素 B 和 E 的 *P* 值均小于 0.10,即因素 B、E 对试验结果有一定的影响;而 C 和 F 的 *P* 值均大于 0.10,即因素 C 和 F 对试验结果影响不显著;各

因素的主次顺序为 A(装液量) > E(时间) > B(温度) > C(转速) > F(接种量)(表 3)。芽孢产率发酵条件中,因素 A 的 *P* 值小于 0.05,即该因素对产菌体数量试验结果影响显著;因素 B 的 *P* 值小于 0.10,即因素 B 对试验结果有一定影响;而 C、E 和 F 的 *P* 值均大于 0.10,即因素 C、E 和 F 对试验结果影响不显著;各因素影响试验结果的主次顺序为 A(装液量) > B(温度) > E(时间) > C(转速) > F(接种量)(表 4)。方差评价结果显示,装液量是对试验结果显著影响的因素,温度和时间是有一定影响的因素,而转速和接种量是影响不显著的因素,与极差

表 2 正交试验优化菌株 S12 发酵条件的方差评价结果(芽孢数量)

变异来源	离差平方	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
校正模型	3 126.708	10	312.671	27.158	0.000
截距	17 626.283	1	17 626.283	1 531.003	0.000
装液量	2 494.060	2	1 247.030	108.316	0.000
温度	455.330	2	227.665	19.775	0.001
转速	74.374	2	37.187	3.230	0.101
时间	73.516	2	36.758	3.193	0.103
接种量	29.428	2	14.714	1.278	0.336
误差	80.590	7	11.513		
总计	20 833.582	18			
校正的总计	3 207.299	17			

表 3 正交试验优化菌株 S12 发酵条件的方差评价结果(菌体数量)

变异来源	离差平方	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
校正模型	2 612.313 <sup>a</sup>	10	261.231	9.608	0.003
截距	27 785.888	1	27 785.888	1 021.955	0.000
装液量	2 067.018	2	1 033.509	38.012	0.000
温度	192.678	2	96.339	3.543	0.087
转速	55.602	2	27.801	1.023	0.408
时间	247.686	2	123.843	4.555	0.054
接种量	49.329	2	24.665	0.907	0.446
误差	190.323	7	27.189		
总计	30 588.524	18			
校正的总计	2 802.635	17			

表 4 正交试验优化菌株 S12 发酵条件的方差评价结果(芽孢产率)

变异来源	离差平方	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
校正模型	2 119.787 <sup>a</sup>	10	211.979	2.695	0.101
截距	107 270.940	1	107 270.940	1 363.547	0.000
装液量	1 066.523	2	533.262	6.778	0.023
温度	734.989	2	367.494	4.671	0.051
转速	87.664	2	43.832	0.557	0.596
时间	164.056	2	82.028	1.043	0.401
接种量	66.554	2	33.277	0.423	0.671
误差	550.693	7	78.670		
总计	109 941.420	18			
校正的总计	2 670.480	17			

评价结果基本一致。

根据方差分析的结果,只须对试验结果有显著影响的因素选取最佳水平,而影响较小的因素则可按实际需要和投入产出效益选择适当的水平<sup>[16]</sup>。本试验发酵条件各因素的较佳组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>E<sub>2</sub>F<sub>1</sub>,即菌株 S12 产芽孢摇瓶培养较佳发酵条件为装液量 80 mL/250 mL、温度 35 ℃、转速 160 r/min、时间

84 h、接种量 3%。

## 2.3 验证试验

发酵条件优化后的组合为:装液量 80 mL/250 mL、接种量 3%、初始 pH 值 7.0、温度 35 ℃、转速 160 r/min、时间 84 h,此条件下芽孢产量为  $5.721 \times 10^9$  CFU/mL,活菌数为  $5.822 \times 10^9$  CFU/mL,比优化前(芽孢为  $2.240 \times 10^9$  CFU/mL,

菌体为  $2.350 \times 10^9$  CFU/mL) 分别增加 2.55、2.48 倍,此时发酵液中芽孢产率为 98.28%。

### 3 讨论与结论

随着我国经济的快速发展、居民生活水平的不断提高,消费者对农产品质量安全要求也越来越高。绿色有机生态农业备受人们重视。在生态农业病虫害防治方面,环保无毒害作用的生防菌剂逐渐发挥作用并且替代了部分化学农药,其生产量和需求量日益增高<sup>[17-18]</sup>。作为生防菌剂菌种资源的芽孢杆菌,由于具有来源广泛、繁殖力强、对人畜无害、不污染环境等特点,成为近年来研究和应用的热点<sup>[6]</sup>。芽孢杆菌不仅能产生多种脂肽类抑菌物质,抑制真菌病原菌的生长,还具有诱导作物产生抗病性的作用,并且可形成抗逆性的芽孢,便于运输和储藏,是一种理想的商业化生防微生物。

正交试验设计是研究多因素、多水平一种设计方法,具有高效、快速、经济的优势<sup>[16]</sup>。蒋盼盼等采用正交试验设计对解淀粉芽孢杆菌 B1619 发酵工艺进行了优化,优化后发酵菌液含菌量同初始发酵工艺相比提高 87.83%<sup>[16]</sup>。成莉凤等采用正交试验设计研究枯草芽孢杆菌 BE-91 生长及其胞外表达  $\beta$ -甘露聚糖酶的发酵条件的优化组合,优化条件下发酵 10 h,  $\beta$ -甘露聚糖酶活性最高达 432.4 IU/mL,即缩短了发酵时间也提高了酶活性<sup>[19]</sup>。发酵工艺参数的优化是微生物发酵产品成功实现产业化的重要环节。枯草芽孢杆菌 S12 产芽孢发酵工艺涉及的因素较多,无法逐一地进行研究,因此根据细菌发酵工艺参数,首先进行单因素试验筛选,然后再根据筛选结果设计正交试验对枯草芽孢杆菌 S12 产芽孢摇瓶发酵条件进行优化,以期获得菌株 S12 产芽孢的最佳发酵条件参数,提高其发酵液中的芽孢含量,降低投入成本,为微生物菌剂的工业化生产提供理论依据。

试验结果表明,单因素试验筛选和正交试验设计结合是一种较好的设计组合,能在较短的时间内确定发酵工艺的关键参数<sup>[16]</sup>。验证试验结果表明,优化后获得的枯草芽孢杆菌 S12 产芽孢的发酵条件为:装液量 80 mL/250 mL、接种量 3%、初始 pH 值 7.0、温度 35 ℃、转速 160 r/min、时间 84 h。该研究结果不仅提高了发酵液中芽孢的数量和产率,并为枯草芽孢杆菌 S12 进一步产业化的开发节约了生产成本。但本试验对枯草芽孢杆菌 S12 发酵条件优化

仅进行了摇瓶发酵的初步研究,以上参数有待于在后续工厂化生产中进一步验证,从而为该菌株用于生防菌剂的研制提供理论依据

### 参考文献:

- [1] Huang J L, Li H L, Yuan H X. Effect of organic amendments on *Verticillium wilt* of cotton [J]. *Crop Protection*, 2006, 25 (11): 1167 - 1173.
- [2] 李成伟, 丁锦平, 刘冬梅, 等. 棉花黄萎病及抗病育种研究进展 [J]. *棉花学报*, 2008, 20(5): 385 - 390.
- [3] 石磊, 吕宁, 李全胜, 等. 生物农药随水滴施防治棉花黄萎病用量筛选研究 [J]. *西南农业学报*, 2019, 32(4): 829 - 836.
- [4] 马宗斌, 严根土, 刘桂珍, 等. 棉花黄萎病防治技术研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2012, 41(2): 12 - 17.
- [5] 梁宏, 黄静, 赵佳, 等. 生物防治棉花黄萎病的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(5): 1 - 6.
- [6] 沙月霞. 芽孢杆菌在防治水稻稻瘟病中的应用及生防机制 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(11): 2734 - 2740.
- [7] 杨敬辉, 陈宏州, 肖婷, 等. 杜鹃内生细菌 DJ-6 的鉴定及生防活性研究 [J]. *西南农业学报*, 2016, 29(1): 89 - 94.
- [8] 陈向东. 枯草芽孢杆菌作为生防制剂在农业上的应用 [J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1323 - 1324.
- [9] 孙冰冰, 李伟, 魏军, 等. 生防芽孢杆菌的研究进展 [J]. *天津农业科学*, 2015, 21(12): 102 - 107.
- [10] 侯敏, 詹发强, 张慧涛, 等. 番茄枯萎病拮抗菌 S13 产芽孢发酵培养基及发酵条件优化 [J]. *新疆农业科学*, 2014, 51(7): 1269 - 1276.
- [11] 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.
- [12] 李全胜, 谢宗铭, 刘政, 等. 棉花黄萎病拮抗菌 H14 的筛选鉴定及其拮抗机理分析 [J]. *植物保护学报*, 2018, 45(6): 1204 - 1211.
- [13] Elliott M L, des Jardin E A, Batson W E, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds [J]. *Pest Management Science*, 2001, 57(8): 695 - 706.
- [14] 徐世荣, 陈襄, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用 [J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(4): 121 - 126.
- [15] 李全胜, 张国丽, 吕宁, 等. 棉花黄萎病生防芽孢杆菌 S12 产芽孢培养基的响应面优化 [J]. *西北农业学报*, 2018, 27(10): 1526 - 1536.
- [16] 蒋盼盼, 陈志谊, 仲毅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 生物摇瓶发酵工艺的正交优化 [J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(2): 221 - 228.
- [17] 邱德文. 生物农药——未来农药发展的新趋势 [J]. *中国农村科技*, 2017(11): 36 - 39.
- [18] 闫杨, 刘月静, 王帅珂, 等. 生防芽孢杆菌对黄瓜根际土壤酶活性的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(7): 108 - 111.
- [19] 成莉凤, 戴小阳, 冯湘沅, 等. *Bacillus subtilis* BE-91 生长及其胞外表达  $\beta$ -甘露聚糖酶的发酵条件优化 [J]. *微生物学通报*, 2015, 42(12): 2300 - 2307.