

# 生防菌株 YM3-3 的鉴定和抑菌能力测定 及发酵条件优化

王春明<sup>1</sup>, 郭成<sup>1</sup>, 周天旺<sup>1</sup>, 洪流<sup>1</sup>, 徐生海<sup>2</sup>, 许永锋<sup>3</sup>

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 武威市农业技术推广中心, 甘肃 武威 733000; 3. 张掖市植保植检站, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:** 为开发安全、高效的微生物农药提供生防菌株资源, 对玉米叶片内分离得到 1 株具有优良生防潜能的内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)拮抗菌株 YM3-3 进行鉴定及发酵条件优化, 为生防菌剂防治玉米病害提供技术参数和理论依据。试验采用平板对峙法, 测定了其对玉米穗腐病原菌(拟轮枝镰孢*Fusarium verticillioides*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、西瓜蔓枯病菌(*Mycosphaerella melonis*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola*)、茄子菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、番茄绵腐病菌(*Pythium aphanidermatum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)和棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. vesinfectum) 等 10 种病原真菌的抑制效果。结果显示, 菌株 YM3-3 对这些病原真菌均具有良好的抑制效果, 抑制率为(53.19±3.78)%~(81.94±1.54)%, 表明其具有显著的生防潜能。通过形态学及 16SrDNA 和 *gyrB* 序列分析相结合的方法, 将其鉴定为枯草芽孢杆菌。为进一步优化其发酵条件, 进行了培养条件优化试验, 确定最佳培养时间为 3 d, 最佳培养温度为 27 °C, 最佳转速为 150 r/min, 最佳 pH 为 7, 最佳装液量为 90 mL; 发酵培养基的最优组合为 15.0 g/L 甘露醇、2.5 g/L 蛋白胨、7.5 g/L 硝酸钾、5.0 g/L 碳酸钙。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; YM3-3; 抑菌能力; 发酵条件; 正交试验; 培养条件; 优化组合

**中图分类号:** Q939.9; S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-2172(2025)04-0365-08

[doi:10.3969/j.issn.2097-2172.2025.04.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.2097-2172.2025.04.014)

## Identification, Antagonistic Ability Evaluation, and Fermentation Optimization of Biocontrol Strain YM3-3

WANG Chunming<sup>1</sup>, GUO Cheng<sup>1</sup>, ZHOU Tianwang<sup>1</sup>, HONG Liu<sup>1</sup>, XU Shenghai<sup>2</sup>, XU Yongfeng<sup>3</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China;

2. Wuwei Agricultural Technology Extension Centre, Wuwei Gansu 733000, China;

3. Zhangye Plant Protection Station, Zhangye Gansu 734000, China)

**Abstract:** To provide biocontrol strain resources for high-efficiency and safe microbial pesticides, the endophytic *Bacillus subtilis* YM3-3, a strain with ideal biocontrol potential, isolated from maize leaves was identified, and the fermentation conditions were optimized. This study provided technical parameters and a theoretical basis on control maize diseases as biocontrol agents. The inhibition effect of strain YM3-3 against 10 pathogenic fungi(including *Fusarium verticillioides*, *Exserohilum turcicum*, *Mycosphaerella melonis*, *Valsa mali*, *Physalospora piricola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum* f. sp. vesinfectum.) was measured by the dural culture method. The results showed that it had good antagonistic effect, and the inhibition rate against 10 pathogenic fungi was (53.19±3.78)% to (81.94±1.54)%, showing good biocontrol potential. According to morphological, 16SrDNA, and *gyrB* sequence analysis, it was identified as *Bacillus subtilis*. In order to further optimize the fermentation conditions, the optimization experiment of culture conditions was carried out. The results showed that the optimal culture time, temperature, rotational speed, pH, and liquid volume were 3 d, 27 °C, 150 r/min, 7 and 90 mL, respectively. The optimal combination of fermentation medium was 15 g/L mannitol, 2.5 g/L peptone, 7.5 g/L potassium nitrate, and 5.0 g/L calcium carbonate.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; YM3-3; Antagonistic ability; Fermentation condition; Orthogonal test; Culture condition; Optimization

收稿日期: 2024-11-20; 修订日期: 2024-12-07

基金项目: 甘肃省科技计划-自然科学基金项目(24JRRA729); 甘肃省科技计划-科技特派员(团)专项(24CXNA048)。

作者简介: 王春明(1979—), 女, 甘肃武威人, 副研究员, 主要从事农作物病害、抗病性鉴定及有益微生物利用工作。

Email: wchm179@126.com。

通信作者: 郭成(1985—), 男, 甘肃会宁人, 研究员, 主要从事玉米病害及抗病性鉴定工作。Email: gsguoch@126.com。

目前,我国农作物病虫害防治主要以化学农药为主<sup>[1-2]</sup>。但是,长期大量的应用化学农药,对土壤、大气和水体等环境造成严重污染,对人、畜健康造成危害<sup>[2]</sup>。同时,大量使用化学农药还导致病虫抗药性上升,化学农药防治效果逐步降低,防治难度不断增加。利用微生物或者微生物制剂防治病虫害和清除农药残留是现今微生物学研究的一个热点<sup>[3-4]</sup>。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)作为目前生物防治中研究较多的一类细菌<sup>[5]</sup>,由于其生长快、营养简单、极易分离培养、能产生抗逆性强的芽孢这一典型特征,更有利于作为生防菌剂进行剂型加工、生产和在环境中存活与定殖<sup>[6-10]</sup>。有研究发现,芽孢杆菌生防菌剂在稳定性和与化学农药相容性等方面明显优于其他生防菌<sup>[11]</sup>。尤其枯草芽孢杆菌在防病、促生、提高产量等方面展现了优越的应用前景,是理想的生防菌筛选对象,已引起了植保工作者的极大关注<sup>[12]</sup>。杨兴有等<sup>[13]</sup>发现,1株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株TBWR1,对烟草青枯病的防效可达71.10%,与对照相比,TBWR1能显著提高烟草株高、叶长、根长和茎粗。胡金雪等<sup>[14]</sup>研究发现,枯草芽孢杆菌对马铃薯疮痂病的防效可达49.35%,与空白对照相比可增产14.51%。对于生防菌的开发和应用,不管是利用菌株的代谢产物还是菌株本身,都必须对其发酵工艺进行优化,这将为进一步应用提供基础数据<sup>[15]</sup>。有效活菌数是枯草芽孢杆菌在工业发酵中的重要指标<sup>[16-17]</sup>,通过优化发酵培养基及其发酵条件能有效提高活菌数<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究从玉米叶片内分离得到1株对多种病原真菌具有良好抑制效果的拮抗菌株YM3-3,通过形态学及16SrDNA和gyrB序列分析明确其分类地

位,以有效活菌数为指标,采用单因素试验和正交设计对其发酵条件进行优化,以期开发安全、环保的微生物农药提供菌种资源,为玉米病害的防治和生防菌剂的开发和利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试培养基 NA培养基、PDA培养基的具体成分参考方中达<sup>[19]</sup>的方法并制作。

1.1.2 发酵基础培养基 试验共涉及以下8种基础培养基,具体成分见表1。

1.1.3 供试菌株 供试菌株分别为YM3-3(分离自玉米叶片)、玉米穗腐病病原菌(拟轮枝镰孢菌*Fusarium verticillioides*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、西瓜蔓枯病菌(*Mycosphaerella melonis*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola*)、茄子菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、番瓜绵腐病菌(*Pythium aphanidermatum*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)和棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.vesinfectum),以上供试菌株均由甘肃省农业科学院植物保护研究所提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株YM3-3鉴定 参考东秀珠等<sup>[20]</sup>的方法,进行形态学观察,结合16SrDNA和gyrB序列分析对其进行鉴定,具体参考王春明等<sup>[21]</sup>的方法。

1.2.2 生防菌株YM3-3抑菌能力测定 参考蒋晶晶等<sup>[8]</sup>的方法,采用平板对峙法进行抑菌能力测定。

1.2.3 菌株YM3-3发酵条件优化 种子液制备参考蒋晶晶等<sup>[8]</sup>和臧超群等<sup>[22]</sup>的方法进行,将保存

表1 不同基础培养基具体成分

编号	成分
A	牛肉膏 3.50 g、蛋白胨 5.00 g、酵母膏 1.50 g、葡萄糖 10.00 g、NaCl 5.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
B	可溶性淀粉 20.00 g、KNO <sub>3</sub> 1.00 g、NaCl 0.50 g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.50 g、MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.50 g、FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
C	大豆胰蛋白 10.00 g、酵母提取物 5.00 g、NaCl 10.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
D	马铃薯 200.00 g、葡萄糖 20.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
E	玉米粉 20.00 g、葡萄糖 20.00 g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.40 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
F	KNO <sub>3</sub> 2.00 g、K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.00 g、NaCl 0.50 g、MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.50 g、FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01 g、蔗糖 30.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
G	燕麦片 30.00 g、葡萄糖 10.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2
H	胡萝卜 200.00 g、葡萄糖 10.00 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2

的菌株 YM3-3 接入 NA 平板活化, 27 °C 下培养 24 h。后将活化好的菌株接入 NA 培养液中, 150 r/min、27 °C 条件下振荡培养 48 h, 备用。发酵液浓度计算采用稀释涂布平板法进行<sup>[8]</sup>, 每个稀释浓度均重复 3 次, 于 27 °C 恒温倒置培养 3 d, 统计菌落数(即活菌数)。不同培养基对 YM3-3 菌株生长量影响分别向装有 100 mL 的 A、B、C、D、E、F、G、H 培养液的三角瓶中加入 1 mL 种子液, 每处理重复 3 次。27 °C、150 r/min 条件下振荡培养 3 d, 测定各处理活菌数。不同培养条件对菌株 YM3-3 生长量的影响参考蒋晶晶等<sup>[8]</sup>的方法略做修改, 分别进行不同培养时间(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d)、温度(20、25、27、30、35、40 °C)、转速(90、120、150、180、210 r/min)、起始 pH(3、4、5、6、7、8、9、10)、装液量(30、50、70、90、110、130 mL)、碳源(蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、可溶性淀粉、甘油、甘露醇)、氮源(尿素、硝酸铵、硝酸钾、磷酸二氢铵、氯化铵)和无机盐(碳酸钙、硫酸钙、氯化钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化镁)对菌株 YM3-3 生长量的影响筛选试验。培养时间、温度、转速、起始 pH、碳源、氮源和无机盐等各试验中的每处理装液量均为 100 mL, 接种量均为 1 mL 种子液; 装液量试验则按装液量 1% 接入种子液; 以上各试验的每处理重复 3 次。在 27 °C(温度试验除外)、150 r/min(转速试验除外)条件下振荡培养 3 d(培养时间除外), 测定各处理的活菌数。

1.2.4 发酵培养基最佳组合正交试验 依据上述单因素试验结果, 在单因素筛选出的最佳发酵条件下, 选取了碳源(甘露醇)、有机氮(蛋白胨)、无机氮(硝酸钾)和无机盐(碳酸钙)4 个因素的 3 个水平(表 2), 设计  $L_9(3^4)$  正交试验, 对发酵培养基成分进行优化。

表 2 发酵培养基正交试验因子水平<sup>①</sup>

因子	A (甘露醇)	B (蛋白胨)	C (硝酸钾)	D (碳酸钙)
水平1	0.50%	0.25%	0.25%	0.25%
水平2	1.00%	0.50%	0.50%	0.50%
水平3	1.50%	0.75%	0.75%	0.75%

①表中 A 因子的 0.50%、1.00% 和 1.50% 分别指每 100 mL 培养液中含甘露醇的量, 单位为 g; B、C、D 因子的 0.25%、0.50%、0.75% 分别指每 100 mL 培养液中含蛋白胨、硝酸钾、碳酸钙的量, 单位均为 g。

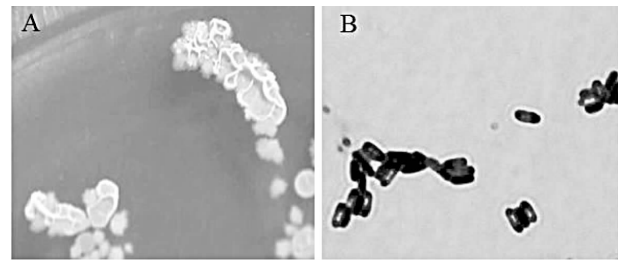
### 1.3 数据统计分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 软件对试验数据进行整理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 YM3-3 鉴定结果

菌株 YM3-3 菌落在 NA 培养基上显示乳白色、表面有褶皱, 边缘不规则(图 1A), 菌体杆状、中生芽孢, G+ (图 1B)。用 Mega 7.0 软件构建基于 16S rDNA 和 *gyr B* 的系统发育树(图 2), YM3-3 与枯草芽孢杆菌(QH-668、QH-664、NN11、DY3)聚在一个分支, 故将其鉴定为枯草芽孢杆菌。



(A 为 NA 培养基上的菌落形态, B 为革兰氏染色后的菌落形态)

图 1 菌株 YM3-3 培养特性

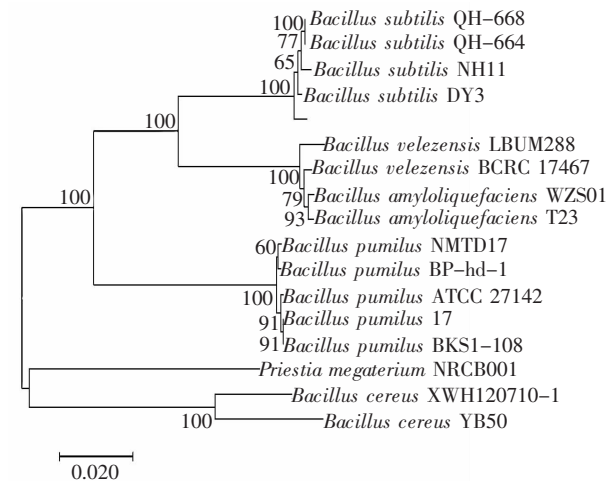


图 2 基于 16S rDNA 和 *gyr B* 建立的菌株 YM3-3 系统发育树

### 2.2 YM3-3 抑菌能力测定结果

由试验结果可知, 菌株 YM3-3 对玉米大斑病菌、玉米穗腐病病原菌(拟轮枝镰孢菌)等 10 种植物病原真菌均有一定的抑制效果(表 3、图 3), 抑制率为  $(53.19 \pm 3.78)\%$ ~ $(81.94 \pm 1.54)\%$ , 抑菌带宽度为  $(4.0 \pm 0.5)$ ~ $(8.8 \pm 0.7)$  mm。尤其对玉米大斑病菌的抑制效果最好, 平均抑制率达 81.94%; 其次对玉米穗腐病病原菌(拟轮枝镰孢菌)、西瓜



蔓枯病菌、苹果轮纹病菌、苹果腐烂病菌和茄子菌核病菌也具有较强的抑制效果，平均抑制率均在 60.00% 之上，平均抑菌带宽度也均在 6.0 mm 之上。综合抑制率和抑菌带宽度可知，菌株 YM3-3 对玉米大斑病菌、玉米穗腐病原菌（拟轮枝镰孢菌）、茄子菌核病菌和西瓜蔓枯病菌的抑制效果较好。

### 2.3 发酵基础培养基筛选结果

如图 4 所示，菌株 YM3-3 在 8 种培养液中均可生长，在相同培养条件下培养液 A 中活菌数最多，其常用对数值为 8.94，显著高于其他各处理 ( $P < 0.05$ )；其次是培养液 C、H，活菌数常用对数值分别为 8.22、7.94；G 培养液中活菌数最少，活菌数常用对数值仅为 7.03。因此，培养液 A 可作

为后续发酵基础培养基。

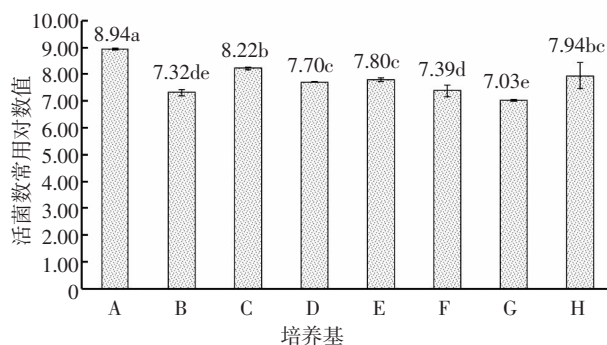


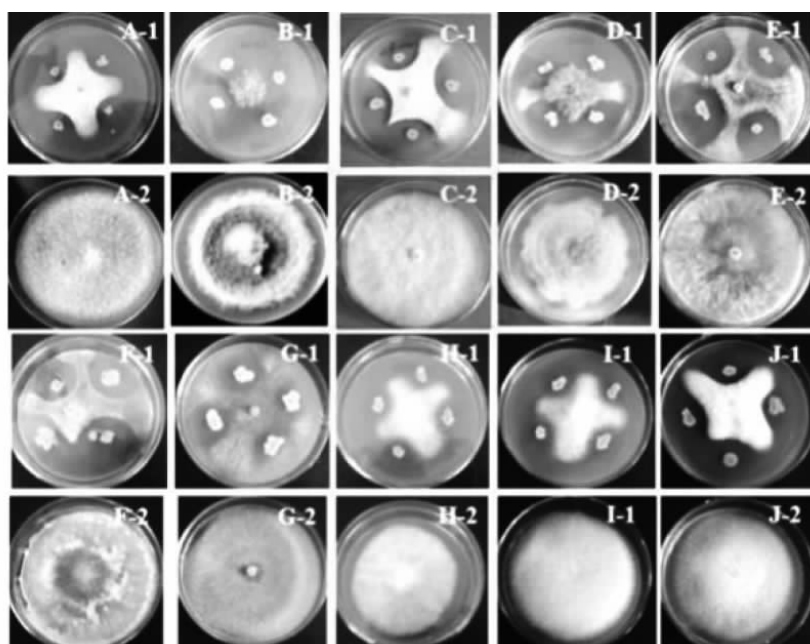
图 4 不同培养基对菌株 YM3-3 生长量的影响

### 2.4 不同培养条件对菌株 YM3-3 生长量的影响

2.4.1 培养时间对菌株 YM3-3 生长量的影响 菌株 YM3-3 在培养 1~10 d 内均能生长 (图 5A)，最

表 3 菌株 YM3-3 对 10 种植物病原真菌的抑菌作用

病害名称	病原菌拉丁学名	抑菌带宽度 /mm	抑制率 /%
玉米穗腐病原菌(拟轮枝镰孢菌)	<i>Fusarium verticillioides</i>	6.4±0.8 c	68.75±2.01 b
玉米大斑病	<i>Exserohilum turcicum</i>	8.6±0.6 a	81.94±1.54 a
西瓜蔓枯病	<i>Mycosphaerella melonis</i>	7.1±0.7 bc	66.94±3.45 b
苹果轮纹病	<i>Physalospora piricola</i>	7.6±0.4 b	62.64±2.14 c
苹果腐烂病	<i>Valsa mali</i>	8.8±0.7 a	62.92±2.84 c
茄子菌核病	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8.5±0.6 a	68.33±7.10 b
马铃薯立枯丝核病	<i>Rhizoctonia solani</i>	5.6±1.0 d	57.36±2.30 d
番茄绵腐病	<i>Pythium aphanidermatum</i>	4.0±0.5 e	54.44±3.51 de
辣椒疫霉病	<i>Phytophthora capsici</i>	5.2±0.7 d	53.19±3.78 e
棉花枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. vesinfectum	6.8±0.5 c	56.67±1.68 de



[-1 为处理, -2 为对照; A 为玉米穗腐病原菌 (拟轮枝镰孢菌), B 为玉米大斑病菌, C 为西瓜蔓枯病菌, D 为苹果轮纹病, E 为苹果腐烂病菌, F 为茄子菌核病菌, G 为马铃薯立枯丝核病菌, H 为番茄绵腐病, I 为辣椒疫霉病菌, J 为棉花枯萎病菌]。

图 3 菌株 YM3-3 对 10 种植物病原真菌的拮抗谱

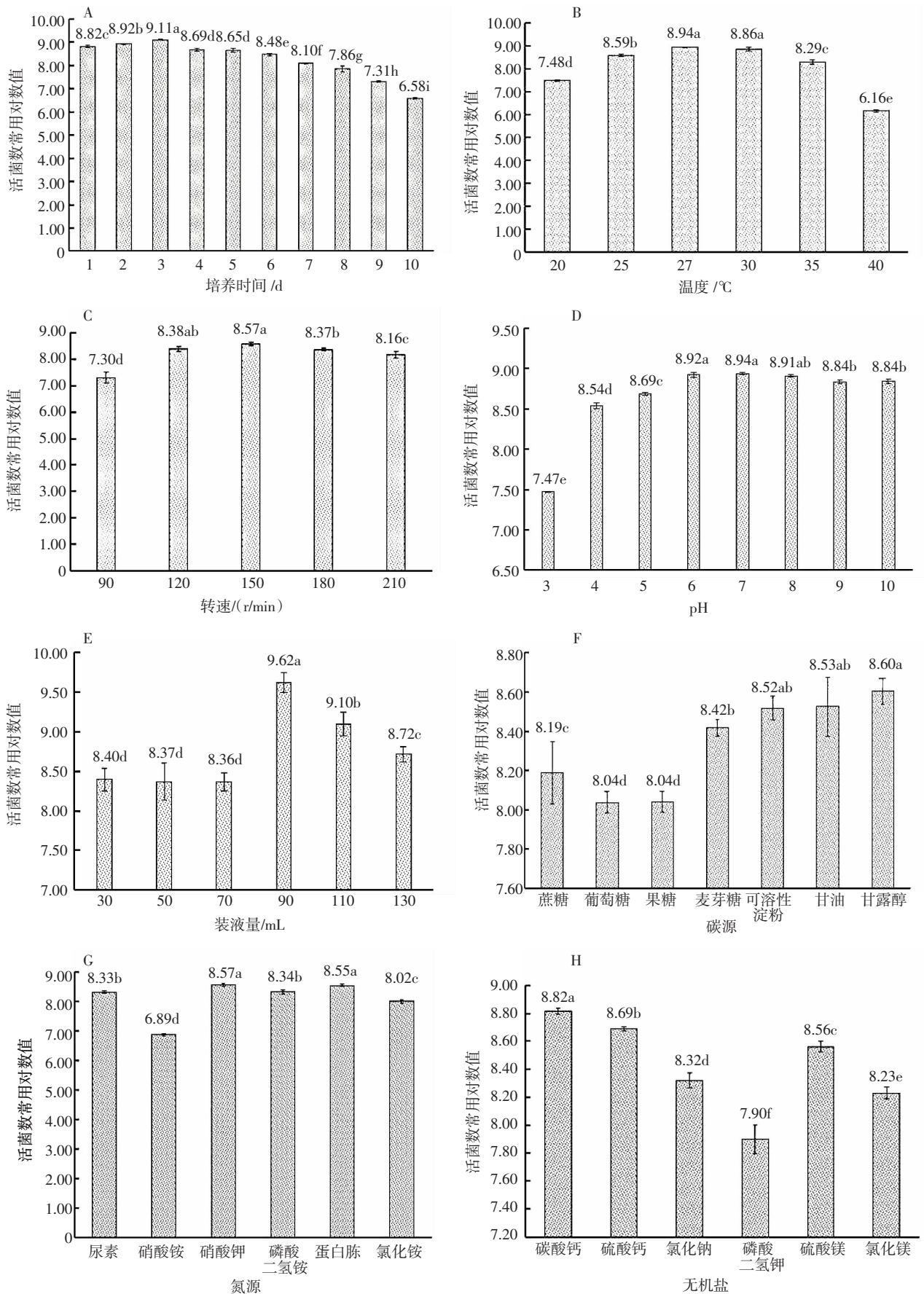


图 5 不同培养条件对菌株 YM3-3 生长量的影响

佳培养时间为 3 d, 活菌数常用对数值为 9.11, 显著高于其他各处理( $P<0.05$ )。

2.4.2 培养温度对菌株 YM3-3 生长量的影响 菌株 YM3-3 在供试的不同温度下均能正常生长(图 5B), 最佳培养温度为 27 °C, 活菌数常用对数值为 8.94, 其与 30 °C 条件下活菌数(常用对数值为 8.86) 差异不显著 ( $P>0.05$ ), 但与其他各处理差异显著( $P<0.05$ )。

2.4.3 转速对菌株 YM3-3 生长量的影响 菌株 YM3-3 在供试的不同转速下均能生长(图 5C), 最佳转速为 150 r/min, 活菌数常用对数值达为 8.57, 与 120 r/min 条件下活菌数(常用对数值为 8.38) 差异不显著 ( $P>0.05$ ), 但与 90、180、210 r/min 条件下各处理均差异显著( $P<0.05$ )。

2.4.4 起始 pH 对菌株 YM3-3 生长量的影响 pH 为 3~10 时, 菌株 YM3-3 均能生长(图 5D), 最佳 pH 为 7, 活菌数常用对数值达 8.94; pH 为 3 时, 活菌数最低(常用对数值为 7.47), 与其他处理差异显著 ( $P<0.05$ ); 但 pH 为 6、7、8 时, 活菌数差异不显著 ( $P>0.05$ )。进一步分析可知, pH 为 8、9、10 时活菌数显著高于 pH 为 3、4、5 时活菌数( $P<0.05$ ), 说明该菌株能适应偏碱环境。

2.4.5 装液量对菌株 YM3-3 生长量的影响 装液量的多少在发酵过程中起着很大的作用, 此次试验中装液量为 30、50、70、90、110、130 mL 时, 菌株均能很好的生长(图 5E); 装液量为 90 mL 时活菌数常用对数值最高, 为 9.62, 显著高于其他各处理( $P<0.05$ )。

2.4.6 碳源对菌株 YM3-3 生长量的影响 菌株 YM3-3 在供试的 7 种碳源中均能生长(图 5F), 最佳碳源为甘露醇, 活菌数常用对数值为 8.60; 其次为甘油, 活菌数常用对数值为 8.53; 可溶性淀粉居第 3, 活菌数常用对数值为 8.52, 三者活菌数差异均不显著( $P>0.05$ )。

2.4.7 氮源对菌株 YM3-3 生长量的影响 菌株 YM3-3 在供试的 6 种氮源中均能生长(图 5G), 最佳氮源为硝酸钾, 活菌数常用对数值为 8.57, 与蛋白胨作为氮源时活菌数差异不显著( $P>0.05$ )。硝酸铵作为氮源时, 活菌数最少(常用对数值为 6.89), 与其他处理均差异显著( $P<0.05$ )。

2.4.8 无机盐对菌株 YM3-3 生长量的影响 无机盐对菌株生长具有一定的影响, 当培养液中含有一定浓度时, 有利于其繁殖, 本次试验中加入无机盐碳酸钙 0.50% 时, 菌液中的活菌数最多(常用对数值为 8.82), 与其他各处理差异显著( $P<0.05$ ) (图 5H)。

综合考虑各试验条件下活菌数及成本等因素, 菌株 YM3-3 的最佳培养时间为 3 d, 最佳培养温度为 27 °C, 最佳转速为 150 r/min, 最佳 pH 为 7, 最佳装液量为 90 mL; 最佳碳源、氮源和无机盐分别为甘露醇、硝酸钾 / 蛋白胨、碳酸钙。由于有机氮和无机氮在菌株发酵过程中对菌株的生长和代谢作用不同, 故后续发酵培养基成分优化中对有机氮(蛋白胨)和无机氮(硝酸钾)进行一定配比优化。

2.5 培养基成分最佳组合正交试验结果

由试验结果(表 4)可知, 9 个组合中第 7 个组

表 4 培养基成分最佳组合正交试验结果 $L_9(3^4)$

编号	因素及水平				活菌数 常用对数值
	A(甘露醇)	B(蛋白胨)	C(硝酸钾)	D(碳酸钙)	
1	1(0.50%)	1(0.25%)	1(0.25%)	1(0.25%)	10.628 053 66
2	1(0.50%)	2(0.50%)	2(0.50%)	2(0.50%)	10.660 935 79
3	1(0.50%)	3(0.75%)	3(0.75%)	3(0.75%)	10.581 042 31
4	2(1.00%)	1(0.25%)	2(0.50%)	3(0.75%)	10.637 769 75
5	2(1.00%)	2(0.50%)	3(0.75%)	1(0.25%)	10.670 811 30
6	2(1.00%)	3(0.75%)	1(0.25%)	2(0.50%)	10.618 596 32
7	3(1.50%)	1(0.25%)	3(0.75%)	2(0.50%)	10.911 761 96
8	3(1.50%)	2(0.50%)	1(0.25%)	3(0.75%)	10.691 663 62
9	3(1.50%)	3(0.75%)	2(0.50%)	1(0.25%)	10.610 656 94
$K_1$	31.870 032	32.177 585	31.938 314	31.909 522	
$K_2$	31.927 177	32.023 411	31.909 362	32.191 294	
$K_3$	32.214 083	31.810 296	32.163 616	31.910 476	
$k_1$	10.623 344	10.725 862	10.646 105	10.636 507	
$k_2$	10.642 392	10.674 470	10.636 454	10.730 431	
$k_3$	10.738 028	10.603 432	10.721 205	10.636 825	
R	0.095 635	0.122 430	0.084 751	0.093 606	



合中活菌数量最高, 菌落数量常用对数值达 10.91 以上。利用 SPSS 软件对正交试验数据进行分析发现, 培养基最佳组合中极差 R 依次排列为  $R_B > R_A > R_D > R_C$ , 说明各因素在该菌株发酵过程中产生活菌数量影响大小顺序依次为蛋白胨、甘露醇、碳酸钙、硝酸钾。从表 5 方差分析可知, 甘露醇、蛋白胨及碳酸钙对该菌株发酵过程中活菌数量的影响极显著 ( $P < 0.01$ ), 硝酸钾对其影响较为显著 ( $P < 0.05$ )。且根据表 4 中, A 列  $K_3$  值最大, B 列  $K_1$  值最大, C 列  $K_3$  值最大, D 列  $K_2$  值最大, 故得出最佳发酵组合为  $A_3B_1C_3D_2$ , 与正交试验中组合 7 对应。综合分析可看出, 发酵培养基的最优组合为 1.50% 甘露醇、0.25% 蛋白胨、0.75% 硝酸钾和 0.50% 碳酸钙, 即 15.0 g/L 甘露醇、2.5 g/L 蛋白胨、7.5 g/L 硝酸钾、5.0 g/L 碳酸钙。

表 5 培养基成分正交试验方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性 <sup>①</sup>
甘露醇	0.091	2	0.045	7.772	0.002	**
蛋白胨	0.091	2	0.045	7.778	0.002	**
硝酸钾	0.052	2	0.026	4.430	0.022	*
碳酸钙	0.070	2	0.035	6.031	0.007	**
误差	0.157	27	0.006			

①“\*”表示差异显著( $P < 0.05$ ), “\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论与结论

生防细菌抗菌谱的宽窄决定着生防菌的应用前景, 许多分离得到的生防菌由于其抗菌谱太窄在实际生产应用中受到很大的限制, 因此筛选广谱性的生防菌已成为植物病害生物防治的关键所在<sup>[23]</sup>。本研究筛选出的菌株 YM3-3 抑菌谱较广, 对供试的涉及 9 个属 10 个种的植物病原真菌均有不同程度的抑制作用, 是一株具有良好生防潜能的内生细菌, 根据形态学观察及 16S rDNA 和 *gyrB* 序列分析将其鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

对于不同的微生物, 其生长代谢都有自己所适宜的条件, 营养物质的种类及其浓度, 培养时间、温度、通气量等因素均影响微生物的生长代谢<sup>[15]</sup>。这些因素不仅相互促进, 也相互制约。如宋卡魏等<sup>[24]</sup>研究表明, 枯草芽孢杆菌(菌株 B68)发酵最佳碳源为葡萄糖, 添加一定量的氯化钠和

碳酸钙能促进芽孢的产生; 蒋晶晶等<sup>[8]</sup>研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)(菌株 X1-6-1)发酵最佳碳源为可溶性淀粉, 最佳氮源为牛肉膏, 最佳无机盐为氯化镁; 刘晓霞等<sup>[25]</sup>研究表明, 枯草芽孢杆菌(菌株 ATCC6051)发酵最佳碳源为蛋白胨(2.5%), 最佳碳源为柠檬酸(2.0%), 最佳无机盐为硫酸钾(2.4%); 郭世杰等<sup>[18]</sup>研究表明, 枯草芽孢杆菌(菌株 EBS03)发酵最佳碳源为甘露醇(1.8%), 最佳氮源为蛋白胨(2.1%), 最佳无机盐为硫酸镁(1.9%)。由此可知, 不仅不同种类的生防细菌发酵最适培养基与培养条件等差异较大, 而且同种生防细菌的发酵最适培养基和培养条件也存在差异<sup>[8]</sup>。因此, 本研究对枯草芽孢杆菌 YM3-3 菌株进行了发酵基础培养基、培养条件筛选和培养基组分优化试验, 结果表明, 最佳培养条件为培养时间 3 d、培养温度为 27 ℃、转速为 150 r/min、pH 为 7、装液量为 90 mL; 发酵培养基的最优组合为: 1.50% 甘露醇、0.25% 蛋白胨、0.75% 硝酸钾和 0.50% 碳酸钙, 即 15.0 g/L 甘露醇、2.5 g/L 蛋白胨、7.5 g/L 硝酸钾、5.0 g/L 碳酸钙, 这与郭世杰等<sup>[18]</sup>对最佳碳源和最佳氮源的研究研究结果一致, 但与其含量和最佳培养条件有差异。

综上所述, 菌株 YM3-3 具有广谱的抗菌活性, 是 1 株具有优良生防潜能的枯草芽孢杆菌。通过优化发酵条件, 可以显著提高其活菌数和生防效果, 为开发安全、高效的微生物农药提供了有力支持。未来的研究将进一步探讨其生防机制, 为其在实际生产中的广泛应用提供更多的科学依据。生防细菌主要通过竞争、产生抗菌物质、促生、诱导等方式直接或间接对作物起到防病或促生作用<sup>[26-31]</sup>。在本次研究中并未对其产生的抑菌物质种类及发酵过程中活菌数与抑菌物质积累量、抑菌活性的相关性等进行研究, 因此在后续试验中还需对其进一步进行研究。

### 参考文献:

- [1] 黄忠诚. 防治水稻立枯病的复合微生物制剂及其生产方法和用途与流程[P]. 中国: CN201710310252.8, 2017.
- [2] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732.
- [3] 杨森. 一株用于生物防治的 *Burkholderia* 菌的基因

- 改造和生长条件研究[D]. 西安: 西北大学, 2006.
- [4] 杨森, 孙高利, 董兆麟, 等. 一株 *Burkholderia* 细菌的抗植物病原真菌及生物学特性的研究[J]. 西北大学学报(自然版), 2008, 38(5): 779-782.
- [5] 陈丽丽, 何玲玲, 赵雅, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对烟草的促生作用及机制[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 152-154.
- [6] 孙正祥, 纪春艳, 李云锋, 等. 香蕉枯萎病拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 143-147.
- [7] OOSTENDORP M, IKORA R A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet[J]. *Revue Nematol*, 1989, 12(1): 77-83.
- [8] 蒋晶晶, 王春明, 陈明, 等. 内生拮抗细菌 X1-6-1 的鉴定、发酵条件优化及抑菌作用研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(3): 113-120.
- [9] KIM S Y, LEE S Y, WEON H Y, et al. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 241: 112-115.
- [10] 马龙, 马兴, 贾蕊鸿, 等. 一株马铃薯黑痣病拮抗菌的筛选鉴定及其生长条件研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2017, 52(4): 90-95.
- [11] OOSTENDORP M, SIKORA R A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet [J]. *Revue Nematol*, 1989, 12(1): 77-83.
- [12] 杨佐忠. 枯草杆菌拮抗体在植物病害生物防治中的应用[J]. 四川林业科技, 2001(9): 41-43.
- [13] 杨兴有, 丁安明, 余祥文, 等. 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.
- [14] 胡金雪, 樊建英, 相丛超, 等. 枯草芽孢杆菌对马铃薯的促生防病效应[J]. 中国瓜果, 2023, 36(10): 121-128.
- [15] 臧超群. 葡萄霜霉病生防细菌 SY286 及控病机理研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014.
- [16] 王晴, 朱成诚, 王欣悦, 等. 具有生防潜力的枯草芽孢杆菌 KC-1 培养基及培养条件的优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2021, 33(4): 67-76.
- [17] 韩云哲, 黄哲禹, 李钟民, 等. 光合细菌分离鉴定及其培养基配方研究[J]. 延边大学农学学报, 2010, 32(4): 265-268.
- [18] 郭世杰, 白红燕, 张东风, 等. 防治棉花黄萎病的枯草芽孢杆菌 EBS03 发酵条件优化[J]. 中国棉花, 2024, 51(4): 35-40.
- [19] 方中达. 植物病理研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] 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.
- [21] 王春明, 郭成, 周天旺, 等. 一种新发生的玉米细菌性叶腐病原菌分离鉴定[J]. 植物保护, 2023, 49(4): 256-262.
- [22] 臧超群, 安福涛, 刘长远, 等. 生防细菌 SY286 发酵条件优化[J]. 中国农学通报, 2015, 31(25): 157-163.
- [23] 乔宏萍. 小麦内生细菌对小麦全蚀病的生物防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [24] 宋卡魏, 王星云, 张荣意. 培养条件对枯草芽孢杆菌 B68 芽孢产量的影响[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 255-259.
- [25] 刘晓霞, 伏漪, 王宗成, 等. 立枯丝核菌拮抗菌枯草芽孢杆菌 ATCC6051 发酵条件优化及抑菌物质分析[J]. 核农学报, 2024, 38(7): 1326-1334.
- [26] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
- [27] KEEL C, DEFAGO G. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and Ecological impact[M]. London, United Kingdom: Blackwell Scientific Publishers, 1997.
- [28] 陈秀蓉, 南志标. 细菌多样性及其在农业生态系统中的作用[J]. 草业科学, 2002, 19(9): 34-38.
- [29] 李娟, 汤莹, 赵旭. 酸碱度和含水量对枯草芽孢杆菌生物有机肥活性和效应研究[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(10): 955-959.
- [30] 柳利龙, 张爱琴, 张环, 等. 当归根际土壤中木霉菌的分离鉴定及拮抗作用[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(8): 774-778.
- [31] 王馨芳, 张婉霞, 史美玲, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 BQ 对党参根腐病原菌抑制效应初探[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(2): 167-173; 197.