

大丽轮枝菌拮抗细菌 *B. subtilis* LZ2-70 产芽孢条件优化

李术娜¹, 王树香¹, 王占利², 李红亚¹, 王全¹, 朱宝成^{1*}

(1. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001; 2. 保定学院资源与环境系, 河北保定 071000)

摘要: 为了提高大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) 拮抗细菌枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* LZ2-70 菌株的芽孢形成率及芽孢数量, 在摇瓶发酵基础上对影响该菌芽孢形成的主要因素进行了考察。通过单因素试验确定了最佳的碳源、氮源和无机盐等, 通过正交试验研究了培养基最佳浓度和组合, 以及种龄、接种量、培养液初始 pH 和培养时间等发酵条件。摇瓶发酵生产芽孢的最佳条件为: 0.5% 麦芽糖、2% 黄豆饼粉、0.05% KH_2PO_4 和 0.1% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、培养液初始 pH 值 8.0、种龄 24 h、装瓶量 30 mL/250 mL、接种量 10%、发酵时间 48 h、培养温度为 30 °C、摇床转速为 200 r·min⁻¹。在此优化条件下, 发酵液中 LZ2-70 菌株的芽孢数量达到 6.6×10^9 个·mL⁻¹, 芽孢形成率为 98.94%。

关键词: 大丽轮枝菌; 拮抗细菌; 枯草芽孢杆菌; 发酵; 芽孢

中图分类号: S435.621 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2009)04-0307-06

Optimization of Spore Production Conditions of Antagonistic Bacteria *Bacillus subtilis* LZ2-70 Against *Verticillium dahliae*

LI Shu-na¹, WANG Shu-xiang¹, WANG Zhan-li², LI Hong-ya¹, WANG Quan¹, ZHU Bao-cheng^{1*}

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Department of Resources and Environment, Baoding University, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: In order to improve the spore production rate and spore quantity of antagonistic strain *Bacillus subtilis* LZ2-70 against *Verticillium dahliae*, the main factors influencing spore production were investigated using shake-flask fermentation method. Through single factor experiment and orthogonal experiment, the optimal shaking flask fermentation condition of strain *Bacillus subtilis* LZ2-70 was determined as follows: media composed of 0.5% Maltose, 2% soybean meal, 0.05% KH_2PO_4 and 0.1% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, initial pH 8.0, culture time 24 h and bottle filling capacity 30 mL/250 mL, 10% inoculums volume, fermentation time 36 h, fermentation temperature 30 °C, rotating speed 200 r·min⁻¹. Under this optimum condition, the spore quantity of strain *Bacillus subtilis* LZ2-70 achieves 6.6×10^9 · mL⁻¹ and the spore production rate achieves 98.94%.

Key words: *Verticillium dahliae*; antagonistic bacteria; *Bacillus subtilis*; fermentation; spore

由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) 引起的棉花黄萎病是世界性的重要病害^[1-2]。当前国内外预防和治理棉花黄萎病主要是利用抗病品种、化学防治和生物防治^[3]。其中生物防治被认为是最具有发展潜力的防治棉花黄萎病的方法^[4]。枯草芽孢杆菌作为植物病原菌的拮抗菌, 已有很多报道, 并已作为生物农药广泛应用^[5-6]。

芽孢是产芽孢在其生长发育后期细胞内形成的圆形或椭圆形的抗逆性休眠体, 具有极强的抗热、抗辐射、抗化学药物和抗静水压等一些特殊的性质^[7]。这一特征使芽孢杆菌具有非常良好的应用前景, 特别是在活菌制剂中表现出强大的生命力, 对于提高菌剂的仓储期、维持菌剂生物活性非常重要, 是制备生防菌制剂的理想存在形式^[8-9],

收稿日期: 2008-03-31

作者简介: 李术娜(1972-), 女, 讲师, bdlshuna@126.com; * 通讯作者, zhu2222@126.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目

但是芽孢的形成并不是细菌生活史中的一个必要过程,其形成不但与菌种本身有关,而且芽孢的形成受到营养物质及环境因素的影响^[10-11]。芽孢的形成影响着拮抗细菌能否进一步用于生产实际,因此对芽孢形成条件的研究具有重要的实际意义。

本实验室近几年已经在棉花黄萎病拮抗细菌研究方面作了一些工作,已证明拮抗细菌 *B. subtilis* LZ2-70 菌株对大丽轮枝菌有较高的抑菌活性。因此,对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株产芽孢条件进行研究,可以提高拮抗细菌对不良环境的抗性,延长制剂保存期,稳定活性。从而为防治棉花黄萎病的拮抗细菌进入工业化生产提供理论依据。本文考察了工业生产中常用的价廉、易得的碳、氮源及无机盐对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株芽孢形成的影响,并研究了供试菌株产芽孢的最适发酵条件,旨在为其工业化生产提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。拮抗细菌:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)LZ2-70 菌株,本实验室分离保存。

1.1.2 试剂。草酸铵结晶紫染液,0.5%的番红染色液,加路哥氏碘液。

1.1.3 培养基。牛肉膏蛋白胨培养基参见文献[12]。

种子培养基:1%蛋白胨、1%葡萄糖、0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH7.2~7.4。发酵培养基:2%蛋白胨、2%葡萄糖、0.4% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% CaCl_2 , 蒸馏水 1000 mL, pH7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 拮抗细菌 LZ2-70 菌株种子培养。将斜面培养的拮抗细菌 LZ2-70 菌株接种于装有种子培养基的三角瓶中。于 30 °C, 200 r·min⁻¹, 摇床培养 16 h 后使用, 摇瓶容量为 250 mL, 装瓶量为 50 mL。

1.2.2 拮抗细菌 LZ2-70 菌株发酵培养。根据试验需要配制发酵培养基, 置于 250 mL 三角瓶中, 装液量为 50 mL, 单因素改变碳源、氮源、无机盐等条件及培养基配方和发酵条件的正交试验。将培养好的液体菌种按 10% 的接种量接种于发酵培养基。于 30 °C, 200 r·min⁻¹, 摇床培养。

1.2.3 测定方法。芽孢染色参照文献[13], 血球计数板计数。

1.2.4 正交试验。培养基成分和培养条件对芽孢形成率的影响分别按正交试验表 $L^{16}(4^4)$ 和 $L_{16}(3^4)$ 设计进行。培养基成分试验中碳源和氮源均设计 0.5%、0.5%、0.5%、0.5% 四个水平, 无机盐设计 0.01%、0.05%、0.10%、0.30% 四个水平。培养条件正交试验中 pH 值设计 6.5、7.0、7.5、8.0 四个水平; 培养时间设 14、18、20、24 小时四个水平; 装量设 30、50、100、125 mL 四个水平。

2 结果与分析

2.1 碳源对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株发酵产芽孢的影响

分别以 2% 的葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇、可溶性淀粉、麦芽糖、D-果糖、麦芽糊精代替基础发酵培养基的葡萄糖。基础培养基中其它成分不变, 摇床培养, 在不同时间(48、60、72、84、96 h) 取样观察并统计芽孢形成情况。从图 1 可看出, 当以可溶性淀粉作碳源时, 96 h 的取样中菌体和芽孢的数量很少, 几乎为零, 说明淀粉作碳源不利菌体生长。培养 96 h 时, 以乳糖为碳源的培养基中芽孢的形成率达到 86.18%, 以麦芽糖为碳源的培养基中芽孢的形成率达到 80.99%, 虽然以乳糖为碳源的培养基中芽孢的形成率较高, 但是根据计数结果, 以麦芽糖为碳源的培养基中芽孢的总数量却远远高于以乳糖为碳源的培养基, 考虑到生产中不仅要求芽孢形成率, 还要求芽孢总数量应达到一定要求, 综合两个方面, 最佳碳源定为麦芽糖。

2.2 氮源对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株发酵产芽孢的影响

分别以 2% 的蛋白胨、胰蛋白胨、酵母浸粉、牛肉浸膏、大豆蛋白胨、酪蛋白、玉米粉、黄豆饼粉代替基础培养基中 2% 的蛋白胨, 其它成分不变。在 30 °C, 200 r·min⁻¹, 摇床上培养, 24 h 开始取样观察。从图 2 可看出, 氮源种类对芽孢形成的影响较大。培养 36 h 时, 以黄豆饼粉为氮源的培养基中芽孢的形成率达到 98.27%, 培养 48 h 时, 芽孢的形成率达到 96.44%, 远高于其它氮源。因此对 LZ2-70 菌株而言, 黄豆饼粉为芽孢产生的最佳氮源。

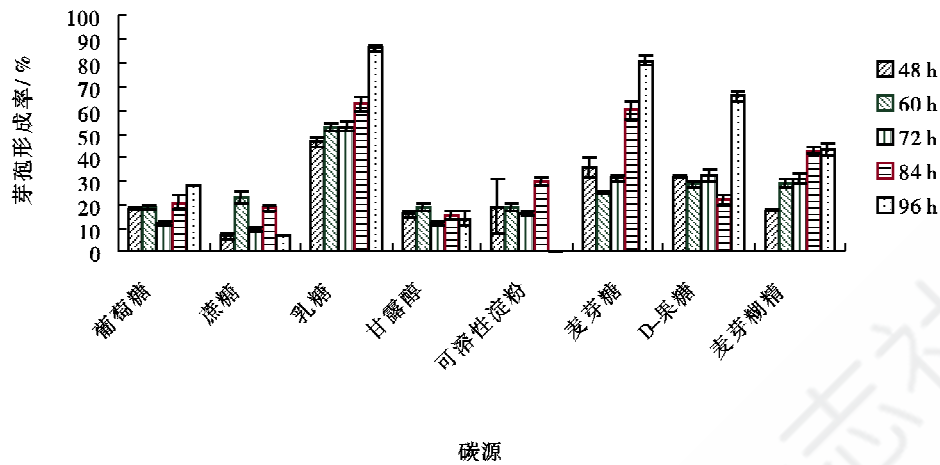


图 1 碳源对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株芽孢形成的影响

Fig. 1 Effect of carbon sources on spore production rate of *B. subtilis* LZ2-70

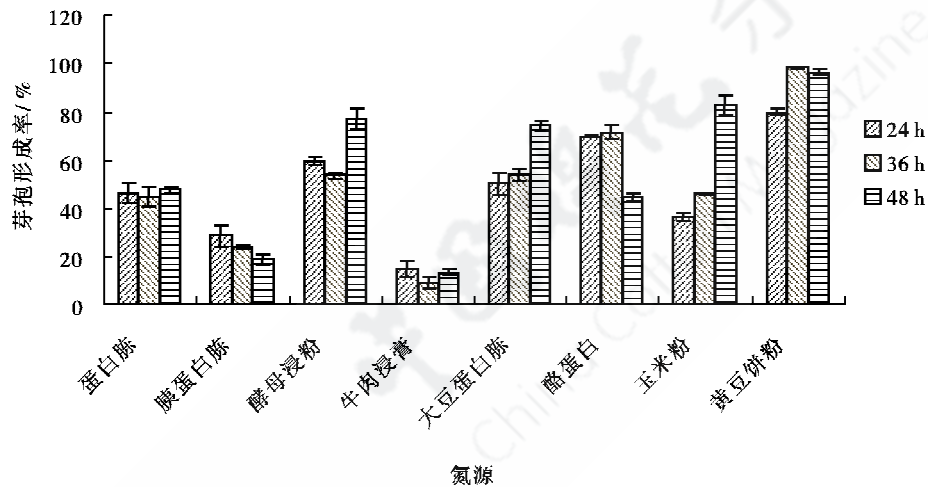


图 2 氮源对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株芽孢形成的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen sources on spore production rate of *B. subtilis* LZ2-70

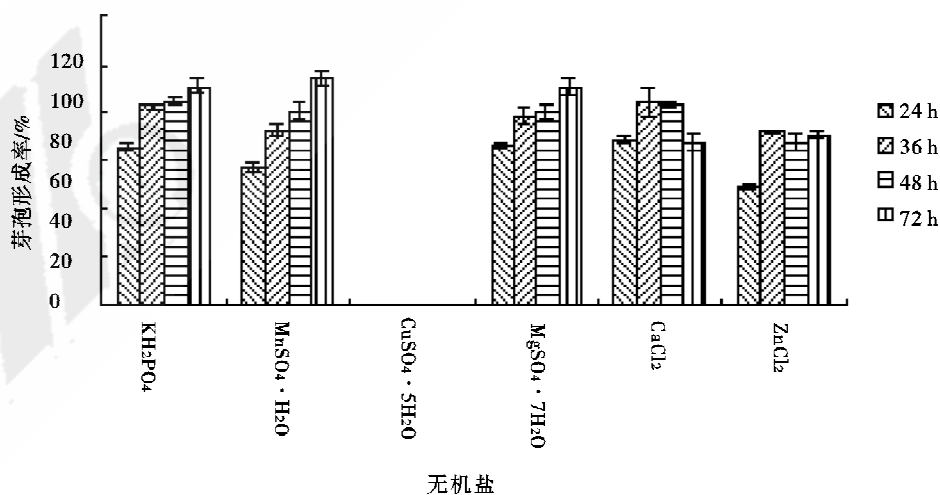


图 3 无机盐对 LZ2-70 菌株芽孢形成的影响

Fig. 3 Effect of inorganic salts on spore production rate of *Bacillus* LZ2-70

2.3 无机盐对 *B. subtilis* LZ2-70 菌株发酵产芽孢的影响

分别以 0.05% 的 KH_2PO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 ZnCl_2 作

为发酵培养基的无机盐,摇床培养。分别在不同时间取样观察芽孢的生成情况,计算芽孢形成率。从图 3 中可以看出,无机盐种类对芽孢形成的影响差异较大。拮抗细菌 LZ2-70 菌株在培养 72 h

时, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 试验组中芽孢形成率可达 94.05%, 铜盐组中则既没有菌体存在也无芽孢形成。试验结果表明, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 作为拮抗细菌 LZ2-70 菌株产芽孢的最佳无机盐。由于用锰盐做无机盐时, 芽孢形成率较高但菌体的生长状况欠佳, 菌体量较少, 故培养基中的无机盐采用复合盐 KH_2PO_4 和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 作为拮抗菌 LZ2-70 的最佳无机盐。

2.4 培养基成分正交试验

通过正交试验对发酵培养基进行优化, 分别

以不同浓度的最适 C 源、N 源、无机盐配制培养基, 分装于 250 mL 三角瓶, 装瓶量 50 mL, 30 °C, 200 r · min⁻¹ 摇床培养。考察 C 源、N 源、无机盐的浓度和不同组合对 LZ2-70 菌株芽孢形成的影响。图 4 表明, 营养成分浓度对芽孢形成有着重要影响。

对 24、36、48、60 h 进行芽孢计数。发现培养 48 h 时有些试验组 *B. subtilis* LZ2-70 菌株的芽孢形成率即可达到 90%, 因此以 48 h 的结果为代表进行正交分析(表 1)。

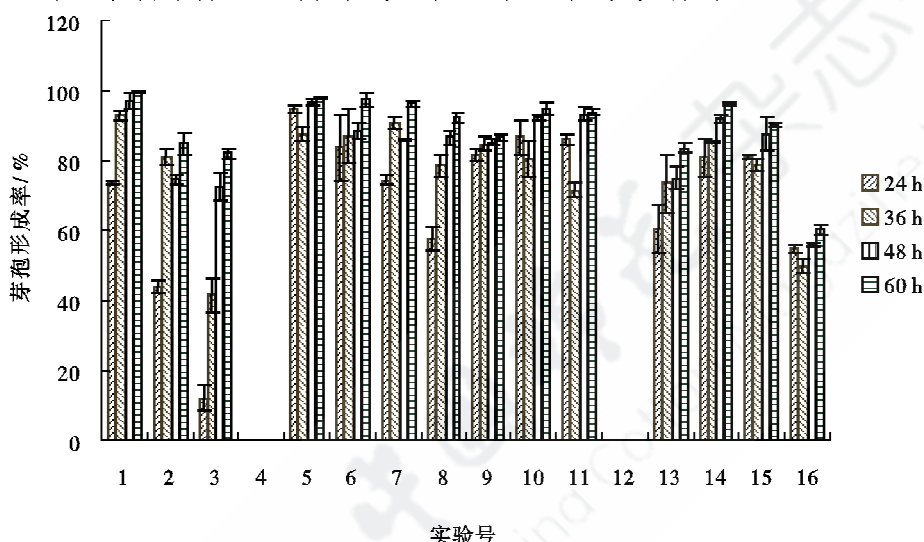


图 4 培养基成分正交试验结果

Fig. 4 Medium composition orthogonal experiment result

表 1 培养基成分正交试验分析

Table 1 Medium composition orthogonal experiment analysis

试验组标号	A 碳源/%	B 氮源/%	C 无机盐 I /% KH_2PO_4	D 无机盐 II /% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	芽孢形成率/%
1	0.5	1.0	0.10	0.10	97.23±2.09
2	1.0	5.0	0.01	0.05	74.79±1.44
3	2.0	5.0	0.10	0.30	72.61±4.02
4	5.0	1.0	0.01	0.01	0
5	0.5	2.0	0.01	0.30	96.81±0.63
6	1.0	0.5	0.10	0.01	88.74±2.35
7	2.0	0.5	0.01	0.10	85.84±0.26
8	5.0	2.0	0.10	0.05	86.58±2.04
9	0.5	0.5	0.30	0.05	85.28±0.99
10	1.0	2.0	0.05	0.10	92.46±0.86
11	2.0	2.0	0.30	0.01	93.23±2.06
12	5.0	0.5	0.05	0.30	0
13	0.5	5.0	0.05	0.01	75.00±3.07
14	1.0	1.0	0.30	0.30	91.76±1.14
15	2.0	1.0	0.05	0.05	87.56±4.92
16	5.0	5.0	0.30	0.10	56.10±0.63
K_1	88.58	64.97	64.36	64.24	
K_2	86.94	69.14	63.76	83.55	
K_3	84.81	92.27	86.29	82.91	
K_4	35.67	69.63	81.59	65.30	
R	52.91	27.30	22.53	19.31	
顺序	0.5>1>2>5	2>5>1>0.5	0.1>0.3>0.01>0.05	0.05>0.1>0.3>0.1	
最优水平	0.5	2.0	0.1	0.05	
最佳组合	$\Lambda_1 B_3 C_3 D_2$: 0.5% 麦芽糖, 2.0% 黄豆饼粉, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1%, KH_2PO_4 0.05%				

注: K 代表平均值, R 代表极差。

对表 1 中数据直观分析得知,各因素极差的大小为 $R_A > R_B > R_C > R_D$,即培养基中影响芽孢形成率的各因素主次为:碳源、氮源、 KH_2PO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,其中以碳源最为显著,无机盐影响较小。正交试验分析最佳组合是 $A_1B_3C_3D_2$,但是在正交试验表中没有此组合,需进行验证试验。

选最佳组合与正交设计表中的相近组合即试验 1(在正交试验中该组合芽孢形成率也最高)、试验 5、试验 8 进行验证试验。结果显示,最佳组合芽孢形成率达 97.86%,而试验 1 芽孢形成率为 96.98%,试验 5 芽孢形成率为 95.98%,试验 8 芽孢形成率为 87.52%。因此,优化后的培养基为:0.5% 麦芽糖、2.0% 黄豆饼粉、0.05% KH_2PO_4 和 0.1% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。

2.5 培养条件正交试验

以 0.5% 麦芽糖、2% 黄豆饼粉、0.05% KH_2PO_4 和 0.1% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 配置培养基,考察 pH、种龄、装瓶量对 LZ2-70 菌株芽孢形成的影响。对发酵培养条件进行优化,通过不同时间进行接种,得到不同种龄的种子液,经过一段时间的摇床培养,再将其分别接到不同 pH 值和装瓶量的发酵培养基中进行摇床培养,结果见表 2。表 2 表明,不同培养条件对芽孢形成有着重要影响。通过对 3 个不同时间取样结果的分析,种龄定为 20 h。

表 2 培养条件正交试验结果

试验组 标号	不同培养条件下芽孢的形成率/%		
	24 h	36 h	48 h
1	76.74±2.10	84.33±1.10	91.93±0.11
2	68.12±0.69	78.02±4.91	83.27±2.47
3	51.04±2.70	59.04±3.45	73.11±1.10
4	24.37±2.11	47.12±3.74	77.46±3.83
5	80.93±0.91	85.77±0.08	88.44±1.37
6	79.36±1.94	92.71±0.88	94.94±3.25
7	34.94±2.94	53.50±2.96	71.47±3.00
8	17.82±5.59	57.05±0.80	79.33±4.74
9	44.70±4.75	59.93±0.43	77.53±2.95
10	6.24±0.30	17.74±4.47	28.61±4.89
11	85.99±4.04	79.01±0.34	95.17±1.07
12	81.00±0.25	80.85±3.34	95.71±0.50
13	31.19±3.50	53.83±3.17	76.85±3.12
14	3.71±0.20	42.21±1.10	73.60±1.82
15	70.46±0.64	84.27±1.48	94.30±1.89
16	91.44±1.29	92.11±1.14	98.94±1.50

拮抗菌 LZ2-70 菌株的培养基条件经优化后培养 48 h 芽孢形成率到 90% 以上。因此,以 48 h 的结果为代表进行培养条件正交试验分析。

表 3 的结果表明,培养基装瓶量对芽孢的形成影响最大,装瓶量过多造成发酵液溶氧小,不利于菌体生长和芽孢生成。从表 3 中可以看出, $A_4B_4C_1$ 为最佳组合(试验 16),芽孢形成率可达

98.94%,最终芽孢产量可达 6.6×10^9 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此,培养基的最佳培养条件是培养基初始 pH 8.0、种龄 24 h、装瓶量 30 mL/250 mL。

通过培养条件的优化,使芽孢形成率进一步提高,同时也使得芽孢形成的最佳时间有很大程度的缩短。这为工业生产节省了大量时间。

表 3 培养条件正交试验分析

Table 3 Culture condition orthogonal experiment analysis at 48 h

试验组 标号	pH 值	培养 时间/h	培养基装 量/250 mL	芽孢形 成率/%
1	6.5	14	30	91.93±0.11
2	6.5	18	50	83.27±2.47
3	6.5	20	100	73.11±1.10
4	6.5	24	125	77.46±3.83
5	7.0	14	50	88.44±1.37
6	7.0	18	30	94.94±3.25
7	7.0	20	125	71.47±3.00
8	7.0	24	100	79.33±4.74
9	7.5	14	100	77.53±2.95
10	7.5	18	125	28.61±4.89
11	7.5	20	30	95.17±1.07
12	7.5	24	50	95.71±0.50
13	8.0	14	125	76.85±3.12
14	8.0	18	100	73.60±1.82
15	8.0	20	50	94.30±1.89
16	8.0	24	30	98.94±1.50
K_1	81.44	83.69	95.25	
K_2	83.55	70.11	90.43	
K_3	74.26	83.51	82.23	
K_4	85.92	87.86	63.60	
R	11.66	17.75	31.65	
顺序	8.0>7.0>6.5>7.5	24>14>20>18	30>50>100>125	
最优水平	8.0	24	30	
最佳条件	初始 pH 8.0, 培养时间 24 h, 装瓶量 30 mL/250 mL			

注:K 代表平均值,R 代表极差。

3 讨论

本试验通过比较拮抗菌 LZ2-70 菌株在不同条件下的芽孢形成率,从而确定了棉花黄萎病拮抗菌 LZ2-70 菌株产芽孢的最佳培养条件。最佳条件的确定不但要考虑拮抗细菌的芽孢形成率,而且还要考虑总的生物量的多少及生产成本问题^[14]。因此,根据本试验的结果,在相同的条件下,发酵 60 h 的芽孢形成率虽然略高于培养 48 h 的芽孢形成率,但是结合工业生产中经济效益,采用的最优发酵时间为 48 h。另外,虽然在有些培养条件下芽孢产率较高,但细菌具有黏附性,取样时拮抗菌易粘在一起成块^[15-16],这给血球计数板直接计数造成很大的困难。本试验将细胞简单染色与血球计数板计数法结合使用。在培养细菌时在摇瓶中加入玻璃珠,利用玻璃珠之间的摩擦打散菌块;在取样和稀释时用漩涡震荡器对试管中的菌液进行打散,使菌体更加分散;在用水冲洗结晶紫染液时,由于芽孢和菌体对载玻片的吸附能

力不同,也有可能造成对结果的影响。另外在镜检计数时应采取高峰值比较,尽量使视野之内的芽孢比例最高,从而减小结果误差。

营养物质影响菌体的生长代谢情况和形态,在碳源、无机盐检验时,出现了很多疑似芽孢的微小菌体,但通过进一步的染色和镜检排除了其是芽孢的可能。

某些条件的刺激也有可能导致芽孢快速生成,比如突然降温、静置、添加固体介质等等,都有可能大大提高芽孢形成率^[17]。我们将在以后继续进行研究,进一步完善试验结果,以期缩短生产周期。

本文对大丽轮枝菌的拮抗细菌 LZ2-70 菌株发酵产芽孢所需的基本营养物质进行了室内摇瓶发酵的研究,通过正交试验确定了拮抗菌产芽孢所需营养物质的合理配比,确定了培养基起始 pH、发酵时间及装瓶量等培养条件,旨在为工业发酵提供参考。我们还将通过小罐发酵确定相应的发酵参数,为生防菌株 LZ2-70 的大规模生产奠定基础。

参考文献:

- [1] 马平. 棉花黄萎病生物防治研究进展[J]. 河北农业科学, 2003, 7(3):382-385.
MA Ping. Biological control of cotton *Verticillium* Wilt[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2003, 7(3):382-385.
- [2] 李术娜, 杜红方, 袁洪水, 等. 棉花黄萎病拮抗细菌 LC-04 菌株的抗菌蛋白产生条件研究[J]. 棉花学报, 2006, 18(4):233-237.
LI Shu-na, Du Hong-fang, Yuan Hong-shui, et al. Fermentation conditions of antagonistic strain LC-04 against *Verticillium dahliae* [J]. Cotton Science, 2006, 18(4):233-237.
- [3] 梁启美, 齐东梅, 贾洁, 等. 棉花黄、枯萎病拮抗菌的筛选及抗菌蛋白 B1102a 的初步测定[J]. 植物保护学报, 2005, 8(5):31-35.
LIANG Qi-mei, Qi Dong-mei, Jia Jie, et al. Isolation of antagonistic of antifungal *Bacillus* and purification protein B110-a [J]. Journal of Plant Protection, 2005, 8(5):31-35.
- [4] 张子俊, 张元亮. 棉花黄萎病拮抗菌发酵条件的初步研究[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(11):68-69.
ZHANG Zi-jun, ZHANG Yuan-liang. Studies on fermentation condition of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2006, 12(11):68-69.
- [5] MOORE K G, Price M S, Boston P S, et al. A chitinase from Tex6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*[J]. Phytopathology, 2004, 94(1): 82-87.
- [6] VARGAS A I, Reyes B R, Riverv C G, et al. Antifungal lignans from the creosotebush(*Larrea tridentata*) [J] industrial crops and products, 2005, 22(2):101-107.
- [7] MONICA L E, Elizabeth A D J, William E B J, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds [J]. Pest Management Science, 2001, 57(8):695-706.
- [8] SPINOSA M R, Braccini T, Ricca E, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores[J]. Research in Microbiology, 2000(151):361-368.
- [9] 徐世荣, 陈 骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在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.
XU Shi-rong, Chen xiang, Wu Yun-peng. Application of the mechanism of sporulation in production pharmaceutical probiotics[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2007, 26(4):121-126.
- [10] 郭荣君, 王步云, 李世东. 营养对生防菌株 BH₁ 芽孢产量的影响研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35 (3):283-285.
GUO Rong-jun, Wang Bu-yun, Li Shi-dong. Nutrition requirements for spore formation by *Bacillus licheniformis* isolate BH₁ [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(3):283-285.
- [11] LU Xiu-yun, Li She-zeng, Ma Ping, et al. Isolation and partial purification of an extracellular metabolite from a *Bacillus subtilis* strain NCD-2 active against *Verticillium dahliae* [J]. Shandong Science, 2005, 18(3):22-25.
- [12] 程丽娟, 薛泉宏, 来航线. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000.
CHENG Li-juan, Xue Quan-hong, Lai Hang-xian. Microbiology experiment technology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000.
- [13] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京:高等教育出版社, 1999.
SHEN Ping, Fan Xiu-rong, Li Guang-wu. Microbiology experiment[M]. 3rd Edition. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [14] 任 雁, 叶 舸, 张惟广. 浅谈发酵经济学[J]. 四川食品与发酵, 2005, 41(3):1-7.
REN Yan, Ye Ke, Zhang Wei-guang. Discussion on the economics of the fermentation[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2005, 41(3):1-7.
- [15] STURZ A V, Christle B R, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. Critical Review in Plant Science, 2000, 19(1):1-30.
- [16] BERG G, Ballin G. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. [J]. Journal of Phytopathology, 1994, 141:99-110.
- [17] CHANWAY C P. Bacterial endophytes[M]//David P. The encyclopedia of pest management. New York: Marcel Dekker, 2002:43-46. ●