

基于均匀设计法的枯草芽孢杆菌 me-1 的发酵培养基优化

苏荣荣¹, 杨武², 王威², 赵辉², 陈美杉³, 罗坤^{2*}

(1. 湖南农业大学食用菌研究所, 湖南长沙 410128; 2. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128; 3. 湖南农业大学东方科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要 为提高枯草芽孢杆菌 me-1 对食用菌绿霉病的防治效果, 以常见绿霉病原真菌长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 为指示菌, 采用单因素试验和均匀设计法对菌株 me-1 发酵培养基的碳源、氮源、无机盐进行了筛选及优化, 最终确定其最适发酵培养基: 可溶性淀粉 35 g, 蛋白胨 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.2, 培养条件: 30 ℃, 150 r/min, 接种量 7.0%。优化后对木霉的抑菌率达 94.55%, 比优化前提高了 38.03%。选用优化后的培养基, 绘制菌株生长曲线, 结果表明, 其发酵液培养 3.0 d 至 3.5 d 可使菌株 me-1 的菌量达到最大。该研究结果为枯草芽孢杆菌 me-1 的工业化生产奠定了基础。

关键词 枯草芽孢杆菌; 长枝木霉; 发酵培养基优化; 均匀设计

中图分类号 S476 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)23-0164-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.047



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Optimization of Fermentation Medium for *Bacillus subtilis* me-1 Based on Uniform Design

SU Rong-rong¹, YANG Wu², WANG Wei² et al (1. Institute of Edible Fungi, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128; 2. College of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract To improve the control effect of *Bacillus subtilis* against *Trichoderma*, the optional fermentation medium of me-1 for the production of antimicrobial substance were soluble starch 35 g, peptone 20 g, water 1 000 mL, pH 7.2 under the culture conditions; fermentation temperature 30 ℃, rotation speed 150 r/min, amount of inoculation 7% and two days cultivation through single-factor test and uniform design. Because of the optimization, the inhibitory rate reached 94.55%, which increased by 38.03% before the optimization. Furthermore, the growth curve of me-1 was drawn through six days cultivation by using the optimized medium, the results showed that the amount of me-1 could reach the maximum by the cultivation between 3.0 days and 3.5 days. The results of this experiment provided useful information for the industrial production of me-1.

Key words *Bacillus subtilis*; *Trichoderma longibrachiatum*; Optimization of fermentation medium; Uniform design

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类广泛存在于不同环境中需氧型革兰氏阳性菌, 可产生内生芽孢, 抗逆性强, 能产生 70 多种抗菌物质, 如肽类、脂肽类和氨基酸类等多种化合物^[1-3], 其防病机制包括竞争作用、诱导植物抗性和拮抗作用等方面, 在植物病害防治方面具有广泛的应用^[4-5]。研究发现, 枯草芽孢杆菌对香蕉枯萎病、小麦纹枯病、烟草赤星病等真菌性病害, 烟草青枯病等细菌性病害和烟草花叶病毒等病毒性病害均有较好的防治效果^[6]。木霉是国内外食用菌大规模人工栽培和菌种生产中为害严重的一种真菌性病害^[7-8], 其适应性强, 繁殖速度快, 可侵害香菇、杏鲍菇、黑木耳等食用菌, 造成严重减产甚至绝收^[9-10]。笔者所在实验室前期筛选获得一株木霉拮抗菌枯草芽孢杆菌 me-1, 能有效防治食用菌绿霉病。为提高拮抗菌 me-1 对绿霉病的防治效果, 笔者通过单因素试验法和均匀设计法相结合的方式对枯草芽孢杆菌的发酵培养基进行优化, 并以 OD₆₀₀ 为指标绘制其生长曲线, 旨在为菌株 me-1 的规模化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。供试病原真菌长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 和供试菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 为笔者前期研究分离。

基金项目 湖南省重点研发计划(2016NK2179)。

作者简介 苏荣荣(1995—), 女, 陕西宝鸡人, 硕士研究生, 研究方向: 食用菌栽培; 杨武(1999—), 男, 湖南邵阳人, 从事植物病理学研究。苏荣荣和杨武为共同第一作者。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事植物病理学研究。

收稿日期 2019-05-27; **修回日期** 2019-06-26

1.1.2 供试培养基。供试细菌与真菌的培养分别采用 LB 培养基、马铃薯琼脂葡萄糖(PDA)培养基。种子培养液为 LB 液体培养基, 发酵初始培养基: 葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L、pH 7.2。

1.2 拮抗菌 me-1 的发酵培养基优化

1.2.1 碳、氮源与无机盐的优化。采用单因素试验^[11], 优化发酵培养基的配方, 选取 20 g/L 的 4 种碳源(麦芽糖、玉米粉、甘油、可溶性淀粉), 10 g/L 的 6 种氮源(尿素、硝酸钾、硫酸铵、硝酸铵、鱼粉、氨水), 5 g/L 的 6 种无机盐(硫酸锰、硫酸镁、氯化钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、碳酸钙), 在基础培养基上, 单一改变碳源、氮源、无机盐, 其他成分保持不变, 配制不同发酵培养基。挑取 me-1 菌体于含 50 mL 种子培养基的 100 mL 锥形瓶中, 置于培养箱中 30 ℃、150 r/min 振荡培养 2 d。按接种量 7% 分别接种上述种子液于不同发酵培养基中, 30 ℃、150 r/min 培养 2 d。

采用含毒介质法^[12]测定各个处理及基础发酵培养基的抑菌效果, 用 0.22 μm 的细菌过滤器过滤 30 ℃ 培养 2 d 的 me-1 的发酵液, 取 1 mL 发酵液过滤液原液于培养皿中, 将 10 mL PDA 培养基(55 ℃ 左右)倒入皿中, 充分混匀, 制成平板, 待冷却后, 向平板中央接种新鲜真菌菌饼(8 mm), 并设等量无菌水作为对照, 每个处理各设 4 个重复, 重复以上操作直至所有发酵培养基发酵液处理完毕, 置于 30 ℃ 恒温箱中培养, 待对照菌落长满整个培养皿的 2/3 时, 用十字交叉法测定菌落直径, 并按照下述公式计算抑菌率。同时, 以不加菌的各个液体培养基作为对照, 测定各个培养基的 OD₆₀₀ 值, 将 OD₆₀₀

作为菌量多少的判断标准,OD 值越大,菌量越多^[13]。

抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%

1.2.2 发酵培养基配比的优化。选取“1.2.1”中抑菌率最高的发酵培养基(可溶性淀粉 20 g/L、蛋白胨 10 g/L、碳酸钙 5 g/L,pH 7.2),采用均匀设计法^[14]进行发酵培养基配比的优化,选取可溶性淀粉、蛋白胨、碳酸钙 3 个因素,每个因素设 6 个水平,用 DPS 数据处理系统 V7.05 设计 $U_{12}(3^6)$ 的均匀设计表。采用“1.2.1”中的方法,进行各个处理抑菌率的测定,试验结果用 SPSS 18.0 分析,选出最佳发酵培养基。

1.3 发酵时间对拮抗菌 me-1 的影响 选择“1.2.2”中最佳发酵培养基(可溶性淀粉 35 g/L,蛋白胨 20 g/L,pH 7.2)作为 me-1 的液体发酵培养基,在 30 ℃、150 r/min 条件下进行振荡培养,每隔 12 h 取发酵液测定其 OD_{600} ,并设 3 个重复,以 OD_{600} 为参考值,绘制 me-1 的生长曲线,并测得不同发酵时间对其抑菌效果的影响,进一步优化抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 me-1 的发酵培养基优化

2.1.1 碳、氮源与无机盐的优化。通过单因素试验,从供试 4 种碳源、6 种氮源和 6 种无机盐中,筛选出最优碳源、氮源和无机盐,其中最优碳源——可溶性淀粉对指示菌的抑制率为 63.39%(虽然甘油对指示菌的抑菌率最高,结合 OD_{600} 值分析,故选择可溶性淀粉),最优氮源为蛋白胨,其抑制率为 56.52%,最优无机盐为 $CaCO_3$,抑制率为 67.94%(表 1),其中对照培养基(20 g/L 葡萄糖,10 g/L 蛋白胨,5 g/L NaCl)对指示菌的抑制率为 56.52%。不同培养基值测得的 OD_{600} 值见表 2。

表 1 菌株 me-1 在不同碳、氮源与无机盐下对木霉的抑制效果

Table 1 Inhibition effect of strain me-1 against *Trichoderma* under different carbon,nitrogen sources and inorganic salts

种类 Types		抑制率 Inhibitory rate//%
碳源 Carbon source	甘油	67.48 aA
	可溶性淀粉	63.39 abAB
	麦芽糖	61.42 abAB
	葡萄糖	56.52 bB
	玉米粉	42.07 cC
氮源 Nitrogen source	蛋白胨	56.52 aA
	尿素	39.70 bB
	NH_4NO_3	24.35 cC
	KNO_3	23.58 cC
	NH_4SO_4	20.88 cC
	氨水	9.32 dD
无机盐 Inorganic salts	鱼粉	0 eD
	$CaCO_3$	67.94 aA
	NaCl	56.52 bAB
	KCl	53.50 bB
	K_2HPO_4	49.11 bcB
	$MgSO_4$	43.26 cB
	KH_2PO_4	43.12 cB
	$MnSO_4$	0 dC

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note:Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$); different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$)

表 2 不同碳、氮源与无机盐对菌株 me-1 生长的影响

Table 2 The influence of different carbon,nitrogen sources and inorganic salts on the growth of strain me-1

种类 Types		OD_{600} 值 Values of OD_{600}
碳源 Carbon source	玉米粉	3.010 aA
	可溶性淀粉	2.298 bB
	麦芽糖	2.255 bB
	甘油	1.458 cC
氮源 Nitrogen source	葡萄糖	1.172 dD
	鱼粉	2.659 aA
	蛋白胨	1.172 bB
	KNO_3	0.474 cC
	氨水	0.255 dD
	NH_4NO_3	0.248 dD
无机盐 Inorganic salt	NH_4SO_4	0.238 deD
	尿素	0.162 eD
	$CaCO_3$	2.345 aA
	KCl	1.705 bB
	$MgSO_4$	1.210 cC
	NaCl	1.172 cC
	KH_2PO_4	1.139 cC
	K_2HPO_4	0.840 dD
$MnSO_4$	0.069 eE	

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note:Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$); different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$)

2.1.2 发酵培养基配比的优化。选择可溶性淀粉(最优碳源)、蛋白胨(最佳氮源)、 $CaCO_3$ (最优无机盐)3 个因素,各设 6 个水平,进行 12 次处理,用 DPS 数据库处理系统 V7.05 设计均匀设计表 $U_{12}(3^6)$ (表 3),按表中的试验配比在 30 ℃、150 r/min、pH 7.2 和接种量 7% 的条件下进行试验,测定不同配比对木霉的抑制率,试验结果用 SPSS 18.0 进行分析,由表 3 可知,经过优化的拮抗菌 me-1 发酵液培养基(可溶性淀粉 35 g、蛋白胨 20 g、水 1 000 mL)对木霉的抑制率最高达 94.55%,比优化前的 56.52% 提高了 38.03%(图 1),因此经优化,菌株 me-1 的发酵培养基为可溶性淀粉 35 g、蛋白胨 20 g、水 1 000 mL,pH 7.2,发酵条件为 30 ℃、150 r/min,接种量为 7%,培养 2 d。

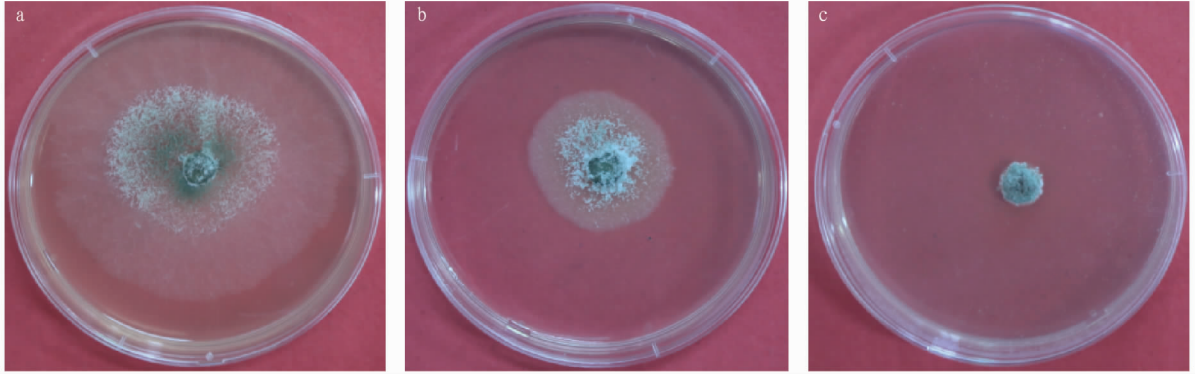
表 3 发酵培养基在不同配比对木霉的抑菌率

Table 3 Inhibition rate of *Trichoderma* under different ratio of fermentation medium

编号 Number	可溶性淀粉 Soluble starch g	蛋白胨 Peptone g	$CaCO_3$ g	抑制率 Inhibitory rate %
1	35	20	0	94.55 aA
2	45	25	7.5	92.88 aA
3	15	25	12.5	88.20 abA
4	20	30	10.0	87.32 abA
5	5	25	5.0	86.25 abA
6	25	30	2.5	83.75 bAB
7	35	15	12.5	74.66 cB
8	15	15	0	72.99 cB
9	20	5	2.5	52.94 dC
10	45	10	5.0	51.47 deCD
11	5	10	7.5	44.43 efCD
12	25	5	10.0	41.17 fD

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)

Note:Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$); different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$)



注:a:对照 b:优化前 c:优化后

Note:a,CK; b. Before optimization, c. After optimization

图1 菌株 me-1 对长枝木霉的抑制试验

Fig. 1 Inhibition of strain me-1 against *Trichoderma longibrachiatum*

由于均匀设计的结果不具有整齐可比性,现使用 SPSS 18.0 进行多元线性回归分析,结果:①相关系数 $R=0.904$, $R^2=0.817$,调整后 $R^2=0.748>0.6$,初步判断该模型的拟合效果良好。② F 测验方差分析: $F=11.909$,显著性值 $\text{sig}=0.003<0.01<0.05$,表明该试验构建的线性关系回归模型具有极显著的统计学意义。③线性回归方程 $Y=35.929+0.228X_1+1.929X_2-0.552X_3$,根据显著性值 sig 的大小,可知影响菌株 me-1 发酵液抑制木霉生长的变量中,影响程度从大到小为蛋白胨、可溶性淀粉、 CaCO_3 。其中蛋白胨对抑制率有极显著的影响。④为检验数据是否可以进行分析,进行残差分析,在标准残差直方图中,曲线左右两侧大致对称;标准化残差的 P-P 图中,大部分散点靠近斜线,只有少许偏离,因此,该次残差正态性结果可以接受。⑤模型残差独立性检验中, $DW=1.922$,该值接近 2,说明残差序列不存在自相关,残差独立,通过测验。

2.2 发酵时间对菌株 me-1 的影响 由图 2 可知,在菌株 me-1 培养的 1.5 d 内,吸光度迅速上升,表明此时细菌进入对数期,生长迅速,代谢旺盛。培养 1.5~3.0 d,吸光度平缓增加,表明细菌生长处于稳定期,细菌繁殖速度逐渐下降。培养第 3.5 天,吸光度达到最大,此时菌量最多。培养 3.5 d 后,吸光度逐渐下降,表明细菌进入衰亡期,部分细菌出现死亡。根据 me-1 的生长曲线可知,若需保证菌株具有较高的活力,代谢较快,应在培养 1.0~1.5 d 取样,若需发酵获得最大菌量进行大规模生产,可培养 3.0~3.5 d。由于菌株在不同培养基上生长速度不同,测得的生长曲线会存在差异,该试验选用的是优化后培养基。

3 讨论

目前,关于微生物培养基优化的方法有单因子设计、正交设计、均匀设计、Plackett-Burman 设计等^[15]。均匀设计(uniform design)是 1978 年由方开泰等^[16]中国专家提出来的,其出发点是将设计点均匀地分散在试验范围内,所用试验点不多却能使积分值得到较好的近似,与正交设计不同,当试验因素较多时可显著减少试验次数,其试验结果不具有整齐可比性,但可结合回归分析得到较为精准的结果^[17-18]。

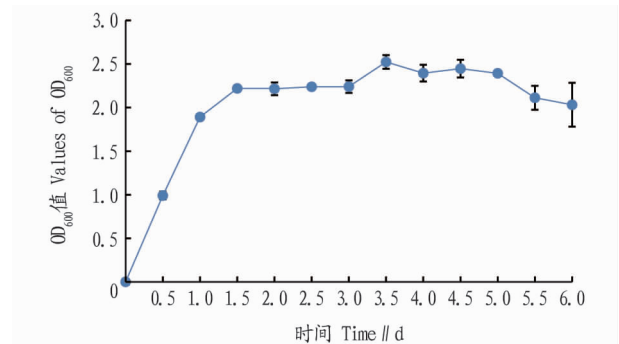


图2 菌株 me-1 的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of strain me-1

对拮抗菌的发酵条件进行优化可以提高其对相关病原菌的防治效果,而目前关于枯草芽孢杆菌对食用菌木霉的拮抗作用鲜有报道。高越等^[19]通过单因子试验和正交试验相结合的方法对枯草芽孢杆菌 GS8 菌株的发酵条件进行了优化,优化后 GS8 菌株发酵滤液对葡萄炭疽病菌的抑制率提高 13.1%。张璐等^[20]通过单因子碳源、氮源试验与正交试验对发酵培养基成分进行优化,优化后枯草芽孢杆菌对芒果炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)抑菌圈直径达 27.3 mm,较优化前提高了 13.3 mm。陈丹等^[21]通过单因子变量法和均匀设计法对菌株 CZB40 极暗黄链霉菌(*Streptomyces fulvissimus*)进行发酵条件研究,经优化后,菌株 CZB40 无菌滤液的 10 倍稀释液对水稻纹枯菌丝生长抑制率最高,达 94.85%,比优化前明显提高。

该研究通过单因素试验和均匀设计法对菌株 me-1 的发酵培养基进行了优化,最终选定可溶性淀粉为最优碳源,蛋白胨为最优氮源, CaCO_3 为最优无机盐,并确定了其最优发酵培养基为可溶性淀粉 35 g,蛋白胨 20 g,水 1 000 mL,pH 7.2,培养条件:30 ℃,150 r/min,接种量为 7%。以优化后的培养基为液体发酵培养基,发现枯草芽孢杆菌发酵液过滤液对木霉的抑菌率达 94.55%,比优化前提高了 38.03%。选用优化后的培养基,绘制菌株生长曲线,结果表明,其发酵液培养 3.0~3.5 d 可使菌株 me-1 的菌量达到最大。该研究为枯

(下转第 173 页)

磷酸二铵在培养 32 h 后氨挥发量最多的结果类似。氨挥发量影响土壤有效氮含量,培养试验发现随着培养时间的增加工业磷酸二铵的氨挥发量越多,而盆栽试验 40 d 后工业级磷酸二铵处理的氨挥发量增加,导致此处理的有效氮含量在各处理中最低。在石灰性土壤中 Ca^{2+} 含量高,磷酸钙的固定作用十分强烈,容易造成施入的磷肥形成难溶性的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,并逐渐向更稳定的 $\text{Ca}_8\text{-P}$ 、 $\text{Ca}_{10}\text{-P}$ 等无效磷转化,显著降低了磷的生物有效性^[14],该研究表明随着培养时间的增加各磷肥处理的有效磷含量呈降低趋势。研究表明,磷酸一铵饱和溶液施入石灰性土壤中的低 pH 可减少肥际 pH,从而增加磷的有效性,而磷酸二铵则相反^[15]。该研究中盆栽试验 40 d 后 MAP 工、MAP 农处理的土壤有效磷含量与 APP 处理无显著差异,同时对玉米的长势及磷吸收量均无显著差异,但显著高于 DAP 工、DAP 农处理。Sample 等^[16]研究发现焦磷酸盐占比较多的聚磷酸铵与磷酸一铵的施用无显著差异。陈小娟等^[17]研究发现低聚为主的聚磷酸铵与磷酸一铵在土壤中有有效磷含量及对玉米的生长均无显著差异,研究表明作为作物的氮源和磷源,聚磷酸铵与正磷酸盐无显著差异^[18]。与该研究结果相似。此外,Venugopalan 等^[19]通过对比磷酸二铵、硝酸磷肥、固体聚磷酸铵和液体聚磷酸铵在小麦上的肥效试验,结果发现聚磷酸铵有利于小麦的生长。

4 结论

工业级和农用磷酸一铵及聚磷酸铵在石灰性土壤上氨挥发量低,同时有效氮含量较高,工业级和农用磷酸二铵挥发量大,不适合在石灰性土壤上施用。

在石灰性土壤上,工业级和农用磷酸一铵及聚磷酸铵有利于玉米苗期的生长,同时也促进玉米对氮磷元素的吸收。

参考文献

[1] DU Z Y,ZHOU J M A. simple procedure to study the movement of fertilizer

(上接第 166 页)

草芽孢杆菌 me-1 的工业化生产以及食用菌绿霉病害的有效防治提供理论依据。

参考文献

- [1] 李睿,崔曦,汪新星,等. 枯草芽孢杆菌微生态制剂的研究与应用进展[J]. 预防医学论坛,2018,24(12):959-960,969-970.
- [2] 张彩凤. 生防菌枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 现代农村科技,2015(21):47.
- [3] ZHAO Q Y,RAN W,WANG H,et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IVI [J]. BioControl,2013,58(2):283-292.
- [4] 关小红. 枯草芽孢杆菌 Tpb55 抗菌物质纯化及特性的初步研究[D]. 北京:中国农业科学院,2008.
- [5] YÁÑEZ-MENDIZÁBAL V,VIÑAS I,USALL J,et al. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products[J]. Biological control,2012,60(3):280-289.
- [6] 胡亚杰,韦建玉,卢健,等. 枯草芽孢杆菌在农作物生产上的应用研究进展[J]. 作物研究,2019,33(2):167-172.
- [7] 马林,曲绍轩,王晓强,等. 食用菌木霉的生防细菌鉴定及相关基因功能预测[J]. 江苏农业学报,2016,32(3):528-533.
- [8] 张旭,刘灿,生吉萍,等. 食用菌致病木霉优良拮抗菌株的筛选及生理特性的初步研究[J]. 食品科学,2012,33(1):186-190.
- [9] 吴晓金. 食用菌栽培相关木霉的调查和分析[D]. 福州:福建农林大学,

- P in soil microsites[J]. Agrochimica (Italy),2005,49(3/4):112-117.
- [2] 尹金来,曹翠玉,史瑞和. 磷肥在石灰性土壤中的形态转化及其有效性[J]. 土壤通报,1989(1):14-16.
- [3] 张永志. 中国磷肥工业现状及发展思路[J]. 中国土壤与肥料,2007(1):1-4.
- [4] BELL L C,BLACK C A. Crystalline phosphates produced by interaction of orthophosphate fertilizers with slightly acid and alkaline soils[J]. Soil science society of America journal,1970,34(5):735-740.
- [5] 金亮,周健民,王火焰,等. 磷酸氢二铵在酸性土壤中的转化与垂直扩散[J]. 生态与农村环境学报,2008,24(3):45-50.
- [6] 金亮,周健民,王火焰,等. 石灰性土壤肥际磷酸一铵的转化及其机制探讨[J]. 中国土壤与肥料,2008(6):5-10.
- [7] STROECHLEIN J L,SABET S A,CLEMENTZ D M. Response of plants to polyphosphate on calcareous soils 1[J]. Agronomy journal,1968,60(5):576-577.
- [8] 史建硕,张彦才,王丽英,等. 聚磷酸铵水溶肥对设施番茄产量、品质、氮素吸收及利用的影响[J]. 华北农学报,2015,30(S1):465-470.
- [9] 纪玉刚,孙静文,周卫,等. 东北黑土玉米单作体系氨挥发特征研究[J]. 植物营养与肥料学报,2009,15(5):1044-1050.
- [10] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:638.
- [11] ZHANG F S,JU X T. Discussion on nitrogen management and environment in agro-ecosystems of sustained development of agriculture[J]. Atca Pedofil Sin,2002,39:41-55.
- [12] WHITEHEAD D,RAISTRICK N. Ammonia volatilization from five nitrogen compounds used as fertilizers following surface application to soils[J]. Journal of soil science,1990,41(3):387-394.
- [13] 李书田,黄德明. 磷酸一铵与磷酸二铵在石灰性土壤上的行为[J]. 土壤肥料,1994(4):33-35.
- [14] 张清,陈智文,刘吉平,等. 提高磷肥利用率的研究现状及发展趋势[J]. 世界农业,2007(2):50-52.
- [15] 鲁如坤. 土壤-植物营养学原理和施肥[M]. 北京:化学工业出版社,1998:443.
- [16] SAMPLE E C,AKIN G W,MIKKELSEN R. TVA fluid fertilizers chapter two-agronomic aspects[M]. International Plant Nutrition Institute,1984.
- [17] 陈小娟,杨依彬,龚林,等. 种肥同播聚磷酸铵施用距离对玉米苗期生长的影响[J]. 磷肥与复肥,2018,33(4):37-40.
- [18] YOUNG R D,WESTFALL D G,COLLIVER G W. Production,marketing, and use of phosphorus fertilizers[M]//ENGELSTAD O P. Fertilizer technology and use. Madison, WI:SSSA,1985:323-376.
- [19] VENUGOPALAN M V,PRASAD R. Relative efficiency of ammonium polyphosphate and orthophosphates for wheat and their residual effects on succeeding cowpea fodder[J]. Fertilizer research,1989,20(2):109-114.

2008.

- [10] 王晶. 食用菌病害的调查与新病害病原鉴定研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2010.
- [11] 刘春红,张丽霞,李燕,等. 枯草芽孢杆菌 B201 产芽孢培养基优化[J]. 中国生物防治学报,2016,32(5):650-656.
- [12] 胡亮亮,徐汉虹,廖美德. 胶冻样芽孢杆菌 PS04 产抗菌物质培养条件的优化[J]. 华中农业大学学报,2011,30(3):276-279.
- [13] 朱宏建,欧阳小燕,周倩,等. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化[J]. 植物病理学报,2012,42(4):418-424.
- [14] 方开泰. 均匀试验设计的理论、方法和应用——历史回顾[J]. 数理统计与管理,2004(3):69-80.
- [15] 代志凯,张翠,阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报,2010,37(6):894-903.
- [16] 李泽. 方开泰、王元首创“均匀设计”法[M]//《中国精神文明年鉴》编辑部. 中国精神文明年鉴:1993-1994. 北京:学习出版社,1995.
- [17] 左斌,胡超,谢达平. 均匀设计对大肠杆菌产谷氨酸脱羧酶培养基优化的应用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2008,34(5):531-533.
- [18] 石小丹,李啸,张松,等. 均匀设计法优化重组大肠杆菌产酮基还原酶培养基[J]. 天津农业科学,2015,21(6):1-6.
- [19] 高越,马贵龙,臧超群,等. 葡萄炭疽病生防菌株 GS8 发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 吉林农业大学学报,2015,37(4):411-416.
- [20] 张璐,齐希猛,刘婷婷,等. 一株拮抗芒果炭疽菌海洋细菌的鉴定和发酵培养基优化[J]. 广东海洋大学学报,2011,31(4):75-80.
- [21] 陈丹,叶波,刘燕娟,等. 水稻纹枯病菌拮抗菌 CZB40 的筛选、鉴定及其发酵条件优化[J]. 植物保护,2015,41(5):46-53.