

# 番茄灰霉病拮抗菌 TB-12 菌株发酵条件优化及其生防效果

王 伟, 李 佳, 姜军坡, 王世英

(河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071001)

**摘 要:**以灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)为指示菌,采用单因素试验与正交实验相结合的方式,对 TB-12 菌株发酵培养基组成及培养条件进行优化,以提高番茄灰霉病拮抗菌 *Bacillus velezensis* TB-12 菌株的抑菌效果,并通过盆栽试验考察了 TB-12 菌株对番茄灰霉病的防治效果,为今后该菌剂生产工艺条件的进一步确定及其防治应用的开展奠定相应的基础。结果表明:TB-12 菌株的最佳发酵培养基组合为乳糖 2%,酪蛋白胨 4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%,KCl 0.05%;最佳培养条件为接种量 10%,装瓶量 50 mL,初始 pH 8,发酵时间 60 h,培养温度 30 °C,摇床转速 180 r·min<sup>-1</sup>。与采用基础发酵培养基相比,优化后 TB-12 菌株对灰葡萄孢菌的抑制效果增加了 69.4%。盆栽试验表明,优化后 TB-12 菌株发酵上清液对番茄灰霉病的预防效果达到 69.2%,治疗效果达到 58.2%,分别提高了 32.6%和 19.5%。TB-12 菌株对番茄灰霉病有良好的防治效果。

**关键词:**番茄灰霉病;发酵;抗菌活性;正交实验;防治效果

**中图分类号:**Q 939.95 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)15-0036-06

番茄灰霉病是大棚栽培番茄的重要病害之一,其主要由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)侵染引发。利用细菌、真菌、放线菌等对其进行生物防治正日益成为灰霉病控制中一条重要而有效的途径<sup>[1-3]</sup>。牛贞福等<sup>[4]</sup>采用菌丝生长速度法研究了 6 种生防菌株对番茄灰霉病的拮抗活性,结果表明木霉、拟康氏木霉、黑根霉、匍枝根霉等菌株均能有效抑制番茄灰霉病,田间试验表明,木霉发酵液防效最高,为 61.09%。王美琴等<sup>[5]</sup>从番茄植株根茎接合部分离到 1 株链霉菌属酒红链霉菌菌株 St24,其具有明显的抑菌活性,经盆栽试

验发现,St24 发酵液对番茄灰霉病有保护和治疗的作用,100 mg·L<sup>-1</sup>粗提物叶面喷雾的保护作用效果最好,24 h 后防效达到 94.3%,120 h 后为 85.4%。赵新贝等<sup>[6]</sup>从土壤中分离筛选了一株对番茄灰霉病菌具有拮抗作用的唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)菌株 18BS-12,其离体和温室防治效果分别为 82.37%和 75.61%。目前生防菌株多集中于非芽孢杆菌和真菌。相比而言,芽孢杆菌耐热性强,能抵抗不良环境,有利于菌剂的生产、剂型加工及在环境中生存、定殖与繁殖<sup>[8]</sup>。且经田间应用试验证实,芽孢杆菌生防菌剂稳定性好,与化学农药相容,广泛适用于不同种类和不同年份的植物病害防治<sup>[9]</sup>。王伟等<sup>[7]</sup>所筛选得到 *Bacillus velezensis* X-75 菌株对番茄灰霉病具有较强拮抗作用,利用番茄离体叶片法进行初步研究发现 X-75 菌株对番茄灰霉病菌具有明显的拮抗作用。由于番茄灰霉病的防治主要依赖于发酵产生的活性物质<sup>[6]</sup>。为了进一步提高菌株

**第一作者简介:**王伟(1983-),女,硕士,讲师,研究方向为应用微生物学。E-mail:hebyj2007@126.com.

**责任作者:**王世英(1963-),男,本科,教授,硕士生导师,现主要从事应用微生物学等研究工作。E-mail:wsy99999@126.com.

**收稿日期:**2017-02-14

的抑菌能力,增强菌株对番茄灰霉病的防治效果,该研究选取具有较高抑菌活性的 TB-12 菌株,以灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)为病原指示菌,采用正交优化的方法,确定 TB-12 菌株的最佳发酵培养条件,并通过盆栽试验对优化前后发酵上清液对番茄灰霉病的防治效果进行考察,以期为今后该菌剂生产工艺条件的进一步确定及其防治应用的开展奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

分离自罹患灰霉病番茄植株的灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.),番茄灰霉病拮抗细菌 *Bacillus velezensis* TB-12 菌株均由河北农业大学生命科学院制药工程系分离并保存。

营养琼脂(NA)培养基、营养肉汤(NB)培养基、马铃薯(PDA)培养基的配制详见《微生物学实验技术》<sup>[10]</sup>。

种子培养基为蛋白胨 1%,葡萄糖 1%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,pH 7.0~7.2,分装于 250 mL 三角瓶中,每瓶装液量 50 mL,121 ℃灭菌 15~20 min。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 TB-12 菌株生长曲线的测定及种子培养

将 TB-12 菌株活化后,在其斜面上倒入 5 mL 无菌水制备菌悬液,接种于 50 mL(250 mL 三角瓶)NB 培养基中,于 30 ℃,180 r·min<sup>-1</sup>振荡培养,每隔 2 h 取出一瓶测其吸光度( $\text{OD}_{600}$ ),重复 3 次。以  $\text{OD}_{600}$  为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制 TB-12 菌株的生长曲线。将 TB-12 菌株接种于种子培养基中,30 ℃,180 r·min<sup>-1</sup>振荡培养,根据生长曲线培养直到菌种生长到对数期后接种于发酵培养基进行后续试验。

#### 1.2.2 发酵培养基的筛选

发酵培养基单因素试验按照下列试验方案进行,并采用以下培养条件:种子液的接种量为 2%,装瓶量为 50 mL(250 mL 三角瓶),发酵温度为 30 ℃,转速为 180 r·min<sup>-1</sup>,发酵培养时间为 48 h。发酵结束,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,对获得的发酵上清液检测其抗菌活性<sup>[7]</sup>。最适碳源的筛选:

以碳源 2.0%、蛋白胨 2.0%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2$  0.02%、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4% 配制发酵培养基,其中选择蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇、D-果糖、可溶性淀粉等 6 种不同的供试碳源分别进行抗菌比较试验,以筛选最适碳源。最适氮源的筛选:以最适碳源 2.0%、氮源 2.0%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2$  0.02%、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2%、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4% 配制发酵培养基,其中选择蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、酪蛋白胨、黄豆饼粉等 7 种不同的供试氮源进行抗菌比较试验,以筛选最适氮源。最适无机盐的筛选:以最适碳源 2.0%、最适氮源 2.0%、无机盐 0.05% 配制发酵培养基,其中选择  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$  等 7 种供试无机盐进行抗菌比较试验,以筛选最适无机盐。

#### 1.2.3 正交实验

在初步确定培养基各组分的基础上,采用  $\text{L}_{16}(4^4)$  正交实验法(表 1),研究培养基组分不同配比对抗菌性能的影响。在优化培养基组成的基础上,研究发酵工艺参数对 TB-12 菌株拮抗灰葡萄孢菌的影响<sup>[7]</sup>,试验方案如表 2 所示。

表 1 TB-12 菌株发酵培养基组成  
正交优化实验因素及水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design for medium composition of strain TB-12 %

因素 Factor	水平 Level			
	1	2	3	4
碳源 Carbon source	1.0	2.0	3.0	4.0
氮源 Nitrogen source	1.0	2.0	3.0	4.0
无机盐 I Inorganic salt I	0.01	0.05	0.1	0.2
无机盐 II Inorganic salt II	0.01	0.05	0.1	0.2

表 2 TB-12 菌株培养条件正交优化  
试验因素及水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal design for fermentation conditions of strain TB-12

因素 Factor	水平 Level			
	1	2	3	4
发酵时间 Fermentation time/h	24	48	60	72
装瓶量 Media volume/mL	30	50	75	100
接种量 Inoculation volume/%	2.0	4.0	8.0	10.0
pH	6.0	7.0	8.0	9.0

### 1.2.4 拮抗细菌 TB-12 菌株对番茄灰霉病的盆栽试验

刮取 PDA 平板上的灰霉菌孢子和菌丝, 稀释成  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  cfu  $\cdot$  mL $^{-1}$  灰霉菌孢子悬液; 以 TB-12 菌株基础发酵条件下得到的发酵上清液为发酵液 A; TB-12 菌株发酵条件优化后得到的发酵上清液为发酵液 B。当番茄苗生长到 4~6 叶期, 用发酵液 A 和发酵液 B 以喷洒方式处理叶面, 以叶面刚好滴水为宜, 待叶面自然晾干后, 分别接种番茄灰霉菌。同时以无菌水为对照。5 d 后观察 TB-12 菌株发酵产物对灰霉病的防病效果, 每处理 5 盆, 每盆 5 株。同期, 在叶面上接种灰霉菌孢子悬液, 24 h 后分别用发酵液 A、发酵液 B 喷施叶面, 同时以无菌水为对照。5 d 后观察 TB-12 菌株对灰霉病的治疗防效, 每处理 5 盆, 每盆 5 株。根据番茄灰霉病的分级标准<sup>[11]</sup> 分别记录植株病级, 计算病情指数和防病效果。病情指数 =  $\sum(\text{各级病叶} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查总叶} \times \text{最高级数值}) \times 100$ 。防病效果 (%) =  $(\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数} \times 100$ 。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 软件的单因素方差分析, 结果采用平均值  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 TB-12 菌株的生长曲线

由图 1 可知, TB-12 菌株生长曲线分布为 0~6 h 为延迟期, 7~12 h 为对数生长期, 13~24 h 为稳定期, 25 h 后细菌生长进入衰亡期。在菌株的对数生长期, 菌体生长迅速, 代谢旺盛, 适合做种子液。因此最终确定 TB-12 发酵用种子液培养时间为 12 h。

### 2.2 最适碳源、氮源和无机盐的筛选

通过比较不同培养基发酵所得到的发酵上清液的抑菌效果发现(图 2~4), 发酵培养基的碳源为乳糖时, 抑菌效果最佳, 抑菌直径达到 8.5 mm; 发酵培养基氮源为酪蛋白胨时, 抑菌效果最佳, 抑菌直径达到 11.0 mm; 发酵培养基无机盐分别为 KCl 和  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  较好, 抑菌直径分别达到 13.4、12.0 mm, 因此最终确定发酵培养基的最佳

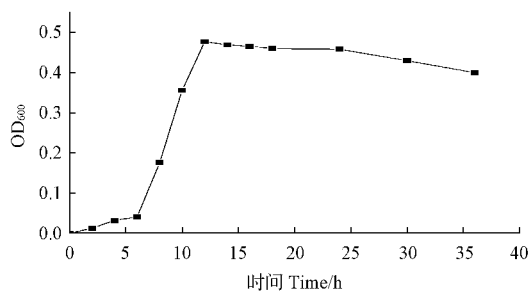


图 1 TB-12 菌株的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of strain TB-12

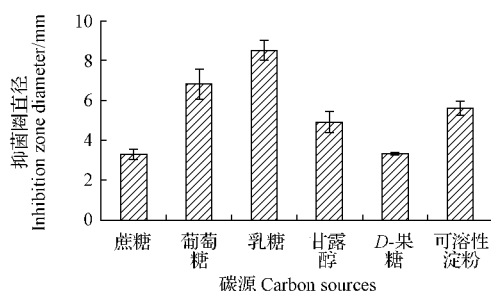


图 2 不同碳源对灰葡萄孢菌的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effects of different carbon source on *Botrytis cinerea* Pers.

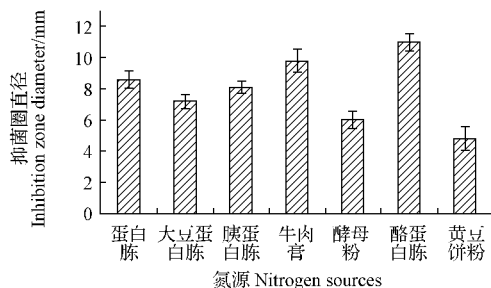


图 3 不同氮源对灰葡萄孢菌抑制效果

Fig. 3 Inhibitory effects of different nitrogen source on *Botrytis cinerea* Pers.

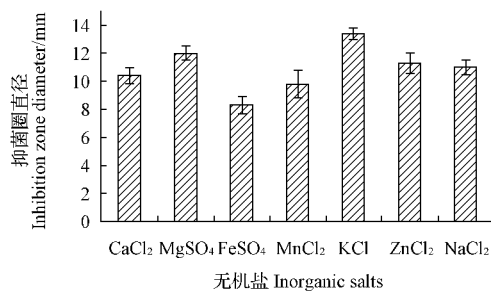


图 4 不同无机盐对灰葡萄孢菌抑制效果

Fig. 4 Inhibitory effects of different inorganic salts on *Botrytis cinerea* Pers.

碳源、氮源和无机盐分别为乳糖、酪蛋白胨、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{KCl}$ 。

2.3 发酵培养基组分正交实验的结果

在确定最优发酵培养基组分种类的基础上进行各组分浓度的优化正交实验。由表 3 可知,碳源对菌株的拮抗活性影响最大,且  $R_A > R_B > R_D > R_C$ ,  $A_3B_4C_4D_4$  为最佳浓度组合,即乳糖 3%,酪蛋白胨 4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2%, $\text{KCl}$  0.2%。由于该试验中并未涉及此组合设计,因此

将其与抑菌活性最强的 8 号组合  $A_2B_4C_3D_2$  进行比较试验,结果发现,8 号组合发酵液抑菌活性较强,抑菌圈最大,为 14.0 mm。因此,确定最佳培养基组合为乳糖 2%,酪蛋白胨 4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, $\text{KCl}$  0.05%。与采用基础发酵培养基培养所产生的抑菌圈直径 11.2 mm 相比,优化后抑菌圈直径增加了 25% ( $P < 0.01$ ),差异极显著。

表 3 TB-12 菌株发酵培养基组成正交优化实验结果  
Table 3 Results of orthogonal design for medium composition of strain TB-12

项目 Item	碳源 Carbon source/%	氮源 Nitrogen source/%	无机盐 I Inorganic salt I/%	无机盐 II Inorganic salt II/%	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone/mm
1	1.0	1.0	0.01	0.01	8.0±0.40
2	1.0	2.0	0.05	0.05	8.5±0.25
3	1.0	3.0	0.10	0.10	8.5±0.36
4	1.0	4.0	0.20	0.20	9.0±0.70
5	2.0	1.0	0.05	0.10	8.4±0.17
6	2.0	2.0	0.01	0.20	12.5±0.61
7	2.0	3.0	0.20	0.01	13.0±0.45
8	2.0	4.0	0.10	0.05	14.0±0.23
9	3.0	1.0	0.10	0.20	13.4±0.21
10	3.0	2.0	0.20	0.10	12.8±0.59
11	3.0	3.0	0.01	0.05	11.5±0.35
12	3.0	4.0	0.05	0.01	13.5±0.35
13	4.0	1.0	0.20	0.05	10.5±0.47
14	4.0	2.0	0.10	0.01	9.0±0.60
15	4.0	3.0	0.05	0.20	11.3±0.56
16	4.0	4.0	0.01	0.10	11.0±0.20
K <sub>1</sub>	34.0	40.3	43.0	43.5	
K <sub>2</sub>	47.9	42.8	41.7	44.5	
K <sub>3</sub>	51.2	44.3	44.9	40.7	
K <sub>4</sub>	41.8	47.5	45.3	46.2	
极差 R	17.2	7.20	3.60	5.50	

2.4 培养条件优化正交实验结果

由表 4 可知,理论培养条件最佳组合为  $A_3B_2C_3D_2$ 。即发酵时间 60 h,装瓶量 50 mL,接种量 8%,pH 7。实际的试验设计组合中并无该组合。因此将其与抑菌活性最强的 10 号组合  $A_3B_2C_4D_3$  进行比较试验。结果发现,10 号培养基组合的发酵液抑菌活性最强,抑菌圈最大,为 18.8 mm。因此最终确定最佳的发酵工艺参数的组合为发酵时间 60 h,装瓶量 50 mL,接种量 10%,pH 8。综上所述,与基础发酵培养基培养所产生的抑菌圈直径 11.2 mm 相比,经发酵培养基和发酵条件优化后,抑菌圈直径增加了 67.9%

( $P < 0.01$ ),差异极显著。

2.5 拮抗细菌 TB-12 菌株对番茄灰霉病的防治效果

采用盆栽试验考察拮抗细菌 TB-12 菌株发酵上清液对番茄灰霉病的防治效果,结果如表 5 和表 6 所示。可知 TB-12 发酵条件的优化对番茄灰霉病的预防和治疗防治效果均有增强作用,优化后的预防防效达到了 69.2%,防效达到了 58.2%,比优化前的发酵液 A 相比分别提高了 32.6%和 19.5%。同时发现,发酵液对番茄灰霉病的预防防效强于治疗防效。

表 4 TB-12 菌株培养条件正交实验优化的结果  
Table 4 Results of orthogonal design for fermentation conditions of strain TB-12

项目 Item	发酵时间 Fermentation time/h	装瓶量 Media volume/mL	接种量 Inoculation volume/%	pH	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone/mm
1	24	25	2	6	13.5±0.50
2	24	50	4	7	15.8±0.55
3	24	75	8	8	16.2±0.76
4	24	100	10	9	15.6±0.55
5	48	25	4	8	14.5±0.38
6	48	50	2	9	15.0±0.67
7	48	75	10	6	12.5±0.10
8	48	100	8	7	15.5±0.47
9	60	25	8	9	15.0±0.84
10	60	50	10	8	18.8±0.55
11	60	75	2	7	17.0±0.32
12	60	100	4	6	15.5±0.44
13	72	25	10	7	12.0±0.76
14	72	50	8	6	12.5±0.51
15	72	75	4	9	11.5±0.51
16	72	100	2	8	11.4±0.47
K <sub>1</sub>	61.1	55.0	56.9	54.0	
K <sub>2</sub>	57.5	62.1	57.3	61.1	
K <sub>3</sub>	66.3	57.2	60.0	60.1	
K <sub>4</sub>	47.4	58.0	58.1	57.1	
极差 R	18.9	7.1	3.1	7.1	

表 5 TB-12 发酵上清液叶面喷施对植株对抗番茄灰霉病的保护作用  
Table 5 Protective effects of leaf spraying TB-12 fermented liquor on plants against *Botrytis cinerea*

组别 Group	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%
发酵液 A Fermented liquor A	31.2	52.2
发酵液 B Fermented liquor B	20.1	69.2
对照 Control group	65.2	—

表 6 TB-12 发酵上清液叶面喷施对植株对抗番茄灰霉病的治疗作用  
Table 6 Therapeutic effects of leaf spraying TB-12 fermented liquor on plants against *Botrytis cinerea*

组别 Group	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%
发酵液 A Fermented liquor A	36.1	48.7
发酵液 B Fermented liquor B	29.4	58.2
对照 Control group	70.4	—

3 讨论

番茄灰霉病是一种重要的番茄病害,由于其室内栽培面积的扩大而蔓延加剧,危害越来越大,引起研究者越来越多的关注。生物防治在控制番茄灰霉病方面,应用前景广阔,也将是未来防治番茄灰霉病手段的发展趋势。朱红霞等<sup>[12]</sup>采用对峙培养法和生长速率法研究 ZXK 菌体及其发酵上清液的抑菌效果,发现均具有较好的抑制效果,ZXK 发酵液效果更佳。但是生物防治虽引起诸

多关注,但是大部分尚处于实验室研究阶段,只有芽孢杆菌在国内外被商业化<sup>[13-14]</sup>。在生物防治过程中,利用芽孢杆菌等等微生物间的拮抗作用所制备的细菌杀菌剂,以及采用发酵代谢产物活性成分制备生物农药,进行番茄灰霉病的预防和治疗,将是未来发展的方向。

该试验主要是对已经分离得到的 TB-12 菌株进行发酵条件优化,提高其发酵液中抗菌物质的含量和抑菌活性。发现经过发酵培养条件的正交实验后,TB-12 菌株对番茄灰霉病的防治效果分别提高了 32.6%和 19.5%,对于番茄灰霉病的

防治均有良好的作用。该研究进一步证明, TB-12菌株的抑菌活性主要来源于发酵产物, 其相关性质和结构特征有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 韩斯琴, 徐梅, 白震, 等. 番茄灰霉病菌拮抗菌 D2-4 发酵条件的研究[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(1): 93-98.
- [2] 庄敬华, 孙国良, 高增贵, 等. 番茄灰霉病生物防治菌株的筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(1): 33-36.
- [3] 高伟, 田黎, 张久明, 等. 海洋芽胞杆菌 B-9987 菌株对番茄灰霉病和早疫病的作用机制初探[J]. 植物保护, 2010, 36(1): 55-59.
- [4] 牛贞福, 国淑梅, 张鹤, 等. 控番茄灰霉病的化学药剂和生防菌株筛选研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(3): 41-45.
- [5] 王美琴, 马林, 韩巨才, 等. 番茄内生菌 St24 的鉴定及其对灰霉病的生防作用[J]. 应用生态学报, 2012, 23(9): 2529-2535.
- [6] 赵新贝, 上官妮妮, 李月飞, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌 18BS-12 发酵条件的优化及防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 116-124.
- [7] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选与 X-75 菌株鉴定[J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 307-312.
- [8] EMMERT E. Biocontrol of plant disease positive perspective[J]. FFM Microbiol Lett, 1999, 171(1): 1-9.
- [9] ELIZABETH A D, WILLIAM E B. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds[J]. Pest Management Science, 2001, 57(8): 695-706.
- [10] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
- [11] 孙军德, 刘灵芝, 王辉, 等. 番茄灰霉病菌生物防治菌的筛选试验[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 550-553.
- [12] 朱红霞, 李良娟, 胡林峰. 一株活性细菌的抑菌活性研究[J]. 河南科技学院学报, 2013, 41(6): 21-24.
- [13] 葛绍荣, 牛莉娜, 李铭. 番茄灰霉病害及其微生物防治的研究进展[J]. 生物加工过程, 2007, 5(3): 15-19.
- [14] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003, 35: 323-331.

## Optimization of Fermentation Conditions and Disease Control Effectiveness Research of Antagonistic Bacteria TB-12

WANG Wei, LI Jia, JIANG Junpo, WANG Shiyang

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

**Abstract:** *Botrytis cinerea* was used as indicator bacteria. The fermentation medium and process parameters of strain TB-12 was optimized by single factor experiment and orthogonal test to improve antibacterial effect of strain TB-12. Pot experiments were also carried out to investigate the control efficiency of *Botrytis cinerea* with fundamental and optimized fermented liquors comparatively. The results showed that optimal medium lactose 2%, casein peptone 4% and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1%, KCl 0.05%. The optimal fermentation conditions were: inoculation amount 10%, volume ratio of seed liquid fermentation medium 50 mL, fermentation time 60 hours, initial pH 8, fermentation temperature 30 °C, rotation speed 180 r · min<sup>-1</sup>. Compared with the fermentation of culture medium, the inhibition effect of TB-12 strain on *Botrytis cinerea* Pers. increased to 69.4%. Pot experiments showed that after optimization the preventive effect of TB-12 strain on the prevention of tomato gray mold was 69.2%, and the treatment effect was 58.2%, which increased by 32.6% and 19.5% respectively. TB-12 strain had good control effect on tomato gray mold.

**Keywords:** *Botrytis cinerea* Pers.; fermentation; antagonistic activity; orthogonal test; control effect