

一株具广谱抗真菌活性细菌菌株的分离鉴定 及拮抗物的理化特性

成丽霞¹ 彭 兵¹ 李天金² 王立安^{1*}

(1. 河北师范大学生命科学学院 河北 石家庄 050016)

(2. 张家口教育学院 河北 张家口 075000)

摘 要: 从玉米小斑病叶片上分离到一株细菌(CGMCC No. 1982)。拮抗谱测定结果表明, 该菌株对常见致病真菌均具有不同程度的拮抗作用, 表现广谱抗真菌活性。对该菌株的菌落、菌体形态观察, 生理生化特性分析及 16S rDNA 序列测定结果表明, 该菌株为一株枯草芽孢杆菌。以玉米小斑病菌做为指示真菌, 对拮抗物的理化特性进行了研究, 结果表明, 在硫酸铵饱和度为 60% 时获得的拮抗物沉淀具较好的抗真菌活性, 并且该拮抗物对热、酸和碱较稳定; 对蛋白酶、氯仿敏感; 对紫外线部分敏感。该菌株表现出较好的微生物杀菌剂开发前景。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 拮抗作用, 16S rDNA, 杀菌剂

Isolation, Identification and Characteristics of a Bacterium with Extensive Antifungal Activity from a Corn Leaf Spot

CHENG Li-Xia¹ PENG Bing¹ LI Tian-Jin² WANG Li-An^{1*}

(1. The Life Science College, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050016, China)

(2. Zhangjiakou Institute of Education, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: A strain of bacterium (CGMCC No. 1982) was isolated from a corn leaf spot infected by *Bipolaris maydis*. The strain exhibited extensive antagonistic effect on quite a number of plant pathogenic fungi such as *Bipolaris maydis*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum* and so on. The strain was identified as *Bacillus subtilis* based on the 16S rDNA sequence homology, and the physiological and biochemical characteristics and morphological observation. The antagonistic substances prepared by adding 60% saturation of ammonium sulfate to cultivating medium of the strain exhibited higher antifungal activity. The physical and chemical character of the antagonists was tested using *Bipolaris maydis* as indicator. The results suggested that the antagonists were of thermal stability and acidic-basic stability. However, the antagonists were sensitive to protease and chloroform, partially sensitive to Ultraviolet. Therefore, the strain has a bright developmental prospect as a novel biocontrol bacterium.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Inhibition, 16S rDNA sequence, Fungicide

基金项目: 河北省科技攻关计划(No. 05547002D-5); 石家庄市科技攻关计划(No. 07149113A); 河北师范大学应用开发基金(No. L2004K02)资助项目

* 通讯作者: Tel: 86-311-86268425; E-mail: wlan1965@126.com

收稿日期: 2008-09-23; 接受日期: 2008-12-02

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

目前,化学杀菌剂在农业生产上仍是控制真菌病害的主要农药。但化学杀菌剂的毒性大、污染环境、易产生抗药性等缺点已逐渐被人们所认识。随着人们环保意识和健康理念的增强,开发代替化学杀菌剂的新型生物杀菌剂已成为必然。在众多的生物杀菌剂中,枯草芽孢杆菌类杀菌剂是最具开发潜力的生物杀菌剂。枯草芽孢杆菌种类很多,功能也各不相同,是一类广泛存在于自然界的腐生细菌,具有生长快、营养简单、极易分离培养等优点^[1]。该属细菌能产生抗逆能力较强的芽孢,有利于生物杀菌剂的生产、剂型的加工及在所处环境中存活、定殖与繁殖。美国已有4株枯草芽孢杆菌生防菌株获得环保局(EPA)商品化或有限商品化生产应用许可,它们分别是GBO3、MBI600、QST713和FZB24,已广泛用于蔬菜、瓜果及粮食作物的病害防治^[2]。澳大利亚开发的*Bacillus subtilis* A-13对麦类和胡萝卜立枯病以及其他土传病害具有很好的防治和增产作用^[3]。我国利用生防细菌防治植物病害的应用研究也达到了世界先进水平,现已开发成功并投入试生产的商品制剂有亚宝、百抗、麦丰宁^[4]、纹曲宁^[5]等。

本研究从玉米小斑叶片上分离到一株具广谱抗真菌活性的细菌菌株。已完成了对该菌的鉴定及拮抗物的理化特性等分析,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

玉米小斑病叶片,采自河北农林科学院玉米试验田。玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp.vasinfestum)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、大蒜菌核病菌(*Sclerotinia allii*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)均为本实验室保存的菌种。pUCm-T vector、T4 DNA连接酶购自上海生工生物技术有限公司;Taq DNA聚合酶、PCR产物纯化试剂盒、IPTG、X-Gal、琼脂糖等购自TaKaRa公司。

TSA培养基:胰蛋白胨15 g,大豆蛋白胨5 g, NaCl 5 g, pH 7.3, 水1000 mL。

测定需氧性的培养基:酪素水解物20 g, NaCl

5 g, 巯基醋酸钠2 g, 甲醛次硫酸钠1 g, 琼脂15 g, 蒸馏水1000 mL。

V-P测定培养基:蛋白胨5 g, 葡萄糖5 g, NaCl 5 g, 水1000 mL, pH 7.0~7.2。

卵磷脂酶测定培养基:10 mL卵黄的生理盐水悬浊液加入到融化的、约50℃~55℃的200 mL肉汁琼脂中,混合均匀后倒入培养皿内。制成的卵黄平板过夜后即可使用。

利用丙二酸盐实验所需的培养基:丙二酸钠3 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.6 g, 溴百里酚蓝(溶于蒸馏水)0.025 g, 酵母膏1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KH₂PO₄ 0.4 g, 蒸馏水1000 mL, pH 7.4。

淀粉水解所需培养基:牛肉浸膏2.0 g, 蛋白胨17.5 g, 淀粉1.5 g, 琼脂17.0 g, 蒸馏水1000 mL, pH 7.0。

1.2 实验方法

1.2.1 拮抗菌株的分离:将玉米病叶片用75%酒精擦拭,表面灭菌,剪取病斑部位的组织块,在70%酒精中浸泡15 s,然后在0.1%升汞溶液中消毒1 min,立即用无菌水清洗3次。加10 mL无菌水研碎,上清液用无菌水分别稀释至10⁻²、10⁻³、10⁻⁴。分别取各个浓度稀释液100 μL,在LB培养基涂布,每浓度3个重复,30℃培养2 d。挑取单菌落细菌在LB平板上划线进一步纯化,筛选其中拮抗活性最高的菌株,做成甘油菌,置于-20℃冰箱中保存。

1.2.2 分离菌株拮抗真菌活性测定:采用对峙培养法^[6]。菌株A在LB平板上活化,病原真菌在PDA平板上活化。把病原真菌的菌丝块接到PDA平板中央,同时在距菌落边缘1 cm处点接分离菌株,观察生长情况,记录拮抗菌落半径(R₁)、抑菌带宽度(R₂),并用R₂/R₁表示抑菌活性强弱^[7]。

1.2.3 分离菌株的鉴定:1) 分离菌株的菌落菌体形态特征观察及革兰氏染色。将活化的分离菌株在TSA培养基上划线,于30℃培养箱中培养2 d~3 d后观察菌落形态,显微镜下观察菌体形态特征。采用革兰氏染液观察分离菌株革兰氏染色结果。

2) 分离菌株的生理生化测试^[8]。需氧性的测定:将拮抗菌穿刺接种到测定需氧性的培养基底部,于30℃培养3 d后观察结果。接触酶:将培养24 h后的斜面菌种用接种环涂布于已滴有3%过氧化氢的玻片上,观察有无气泡产生。耐盐性和需盐性:向TSA液体培养基中分别加入2%、7%氯化钠,取

对数生长期菌种液接种培养,分别培养 3 d 和 7 d,与未接种的对照管比较,目测生长情况。V-P 测定:取对数生长期菌液和 40% NaOH 等量混合,加少许 0.3% 肌酸,10 min 后观察是否呈现红色。卵磷脂酶测定:取斜面中培养 24 h 的菌种接种到卵黄平板上,每个平板分点 4 株菌,30℃ 培养 24 h 后,观察是否出现不透明区域。丙二酸盐的利用:取对数生长期菌液接种到利用丙二酸盐实验所需的培养基中,30℃ 培养 1 d~2 d,观察培养基的颜色变化。

淀粉水解:取斜面中培养 24 h 的菌种接种到淀粉水解所需培养基平板,30℃ 培养 2 d。形成明显菌落后,在平板上滴加卢戈氏碘液,观察颜色变化。

3) 16S rDNA 序列同源性测定^[9]

提取分离菌株的总 DNA,根据原核微生物 16S rDNA 保守序列,设计合成上游引物为 5'-AGAG TTTGATCATGGCTCAG-3',下游引物为 5'-TACGGT TACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系(25 μ L)为:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.25 μ L, 上、下游引物各(10 μ mol/L) 0.25 μ L, Taq 酶(5 U/mL) 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 超纯水 18.5 μ L。PCR 扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

PCR 产物的回收、克隆^[10]。克隆载体为 pUCm-T 载体。DNA 序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。DNA 序列分析采用 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中 Blast 工具进行。

1.3 分离菌株拮抗物的提取及理化性质研究

1.3.1 提取拮抗蛋白硫酸铵饱和度的确定:分离菌株在 LB 液体培养基中摇瓶培养,转速为 200 r/min,温度 30℃。培养 48 h 后离心去菌体,上清液分别加入不同量的硫酸铵,使其饱和度分别为 30%、45%、60%、75%、90%,4℃ 冰箱静置过夜,12000 r/min 离心 25 min,得到不同饱和度的拮抗蛋白^[11]。采用透析方法脱盐后,于冷冻真空干燥器中干燥。以玉米小斑病菌为指示菌,用对峙打孔法测不同硫酸铵饱和度的拮抗蛋白的抑菌活性,确立最适盐析度和度。

1.3.2 拮抗蛋白稳定性实验:1) 热稳定性。取浓度为 1 mg/mL 的拮抗蛋白溶液 100 μ L,至于 30℃~100℃ (10℃ 间隔)条件下处理 10 min。采用平

板对峙法,测定经不同温度处理的拮抗蛋白对玉米小斑病菌的抑菌活性。

2) pH 的稳定性。用 pH 值为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液溶解拮抗蛋白,浓度为 1 mg/mL。pH 2.2~8.0 采用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液;pH 9.0~10.0 采用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。采用平板对峙法,测定不同 pH 值处理的拮抗蛋白对玉米小斑病菌的抑菌活性。

3) 对蛋白酶的稳定性。取 3 mg/mL 拮抗蛋白溶液 0.5 mL 两份,分别加入 10 mg/mL 胰蛋白酶溶液和 10 mg/mL 蛋白酶 K 溶液 50 μ L,在 37℃ 水浴下处理 90 min。采用平板对峙法,测定对玉米小斑病菌的抑菌活性。

4) 对氯仿的稳定性。取浓度为 1 mg/mL 的拮抗蛋白溶液 100 μ L 与等体积氯仿混合,振荡抽提 60 min 后离心,分层后取上层水相,残留氯仿挥发后,采用平板对峙法,测定其对玉米小斑病菌的抑菌活性。

5) 对紫外线的稳定性。将浓度为 1 mg/mL 的拮抗蛋白溶液 100 μ L 置于 30 W 紫外灯下照射 8 h,距离为 10 cm。采用平板对峙法,测定处理后溶液对玉米小斑病菌的抑菌活性。

以上稳定性实验均设有空白对照,3 次重复。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离及拮抗谱

通过平板对峙法对分离到的细菌进行筛选,得到一株对玉米小斑病菌具有强拮抗能力的细菌,命名为菌株 A(菌种保藏编号为 CGMCC No. 1982)。

测定了菌株 A 对 10 种病原真菌的拮抗活性(表 1),结果表明,菌株 A 对所有测试的病原真菌均具有不同程度的拮抗作用,菌株 A 表现出广谱抗病原真菌特性。其中以对黄瓜炭疽病菌、大蒜菌核病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、水稻稻瘟病菌、玉米小斑病菌、辣椒炭疽病菌较强。后面的研究利用玉米小斑病菌作为指示真菌,对拮抗物进行活性鉴定。

2.2 菌株 A 的鉴定

2.2.1 菌株 A 的菌落及菌体特征:在 TSA 培养基上菌落呈浅黄色,近圆形,表面干燥,有褶皱,不透明。显微镜下观察,菌株 A 菌体杆状,产生芽孢。革兰氏反应为阳性。

表 1 菌株 A 的拮抗谱
Table 1 The antagonistic spectrum of strain A to pathogens

病原菌 Pathogens	R_2/R_1	拮抗活性 Antagonistic activity
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum lagenarium</i>	1.826	++
辣椒疫霉病菌 <i>Phytophthora capsici</i>	0.343	+
大蒜菌核病菌 <i>Sclerotinia allii</i>	4.934	++
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	2.319	++
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	1.616	++
水稻稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	1.878	++
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum</i>	1.350	+
玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	1.776	++
辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum capsici</i>	1.957	++
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	1.379	+

注：++： $R_2/R_1>1.5$ ；+： $1.5>R_2/R_1>0$ ； R_2 ：抑菌带宽度； R_1 ：拮抗菌落半径。
Note： R_1 ：Diameter of strain A colony； R_2 ：Distance between the rim of strain A and mycelial colony；++： $R_2/R_1>1.5$ ；+： $1.5>R_2/R_1>0$ 。

表 2 供试细菌的鉴定特征
Table 2 Characteristic comparison of Strain A in different physiological or biochemical reaction

鉴定特征 Characteristic	菌株 A Strain A	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
需氧性 Aerobism	+	+
接触酶 Catalase test	+	+
耐盐性和需盐性 Salt resistance and requisite	+	+
V-P 测定 V-P test	+	+
卵磷脂酶试验 Lecithovitellin reaction	-	-
丙二酸盐利用试验 Malonate utilization test	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis test	+	+

注：+：反应呈阳性或者可以生长、利用；-：反应呈阴性或者不可以生长、利用。
Note：+：Positive reaction；-：Negative reaction.

2.2.2 菌株 A 的生理生化特征：生理生化实验鉴定结果如表 2 所示。由表中可看出，菌株 A 为好氧菌，接触酶阳性，V-P 实验阳性，能产生淀粉酶，对盐有一定的耐受性；不能利用丙二酸盐；不产生卵磷脂酶。

2.2.3 16S rDNA 序列的测定：以菌株 A 总 DNA 为模板，PCR 扩增出一条约 1.5 kb DNA 片段。回收该片段，用 PCR 产物克隆试剂盒进行克隆，以重组质粒为模板进行 PCR 检测也得到大小为 1.5 kb 的片段，表明菌株 A 的 16S rDNA 片段已经成功克隆到 pUCm-T 载体中。

菌株 A 16S rDNA 片段测序结果表明，该片段全长为 1514 bp。将测定的序列用 Blast 软件与 GenBank 中的已知的 16S rDNA 进行同源性比较，通过比对发现与 *Bacillus subtilis*(登录号：AY887082、EF417872、EF221612 和 AY971527)的同源性都为 100%。

通过菌落、菌体形态特征的观察，革兰氏染色、生理生化测试及 16S rDNA 序列分析结果，菌株 A 和枯草芽孢杆菌相吻合，因此鉴定菌株 A 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 适合提取拮抗蛋白的硫酸铵饱和度

结果如图 1 所示：不同饱和度的拮抗蛋白均有抑菌活性，30%饱和度拮抗蛋白抑菌活性最低，60%饱和度拮抗蛋白抑菌活性最高，以后活性逐渐下降。由此确定提取拮抗蛋白最佳硫酸铵饱和度为 60%。以下实验采用的拮抗蛋白均为在硫酸铵饱和度为 60%时获得的。

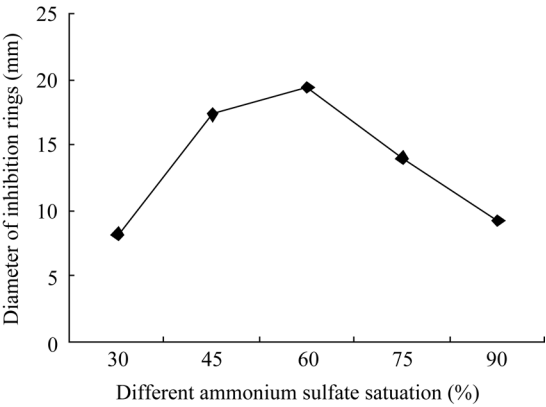


图 1 不同硫酸铵饱和度粗蛋白的拮抗活性
Fig. 1 Antagonistic activity to *Bipolaris maydis* of antimicrobial substance deposited by different $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturations

2.4 菌株 A 拮抗蛋白的稳定性

2.4.1 热稳定性：拮抗蛋白溶液分别在不同温度下处理 10 min 后，拮抗活性如图 2 所示。随着处理温度的升高，拮抗蛋白对玉米小斑病菌的拮抗能力呈下降趋势。在 30℃~70℃ 之间，拮抗蛋白的抑菌活性受温度影响较小，且不同温度之间的抑菌活性没有显著差异。当温度上升到 80℃ 以上时，拮抗蛋白的活性显著下降，但仍有部分活性，说明菌株 A 产生的拮抗物质对热较稳定。

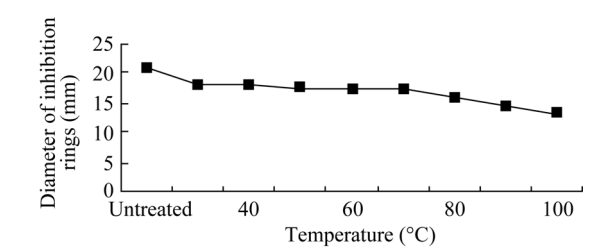


图 2 抗菌肽经不同温度处理后对玉米小斑病菌的抗菌效果
Fig. 2 Effects of temperature on the antagonistic activity to *Bipolaris maydis* of antimicrobial substance deposited by 60% (NH₄)₂SO₄ saturations

2.4.2 对酸碱的稳定性：拮抗蛋白经以不同 pH 值的缓冲溶液溶解后，测定抑菌活性的结果如图 3。由表可以看出，pH 值为 8.0 时，拮抗蛋白对玉米小斑病菌的抑菌活性最强，在 pH 5.0~9.0 之间，抑菌活性没有显著差别，说明在这个 pH 范围内，拮抗蛋白的活性受 pH 值的影响较小。当 pH 值为 2.2~4.0 或 9.0~10.0 时，拮抗蛋白的活性显著下降，但仍具有拮抗活性，说明菌株 A 粗提拮抗物质对酸碱具有比较高的耐性。

2.4.3 对蛋白酶的稳定性：用蛋白酶 K、胰蛋白酶处理后的拮抗蛋白的抑菌活性检测结果如图 4。从

图中可以看出，经蛋白酶 K 处理的拮抗蛋白的拮抗活性仅为对照的 28.5%；用胰蛋白酶处理的拮抗蛋白的抑菌活性为对照的 64.3%。说明拮抗蛋白对蛋白酶 K 敏感，对胰蛋白酶部分敏感。

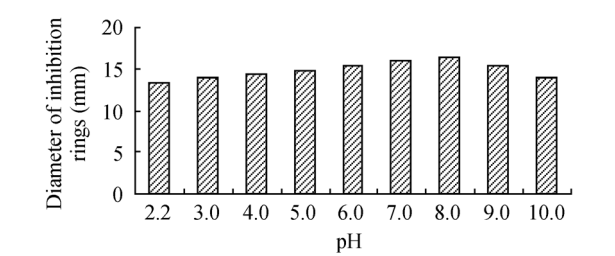


图 3 抗菌肽在不同 pH 下对玉米小斑病菌的抗菌效果
Fig. 3 Effects of different pH on the antagonistic activity to *Bipolaris maydis* of antimicrobial substance deposited by 60% (NH₄)₂SO₄ saturations

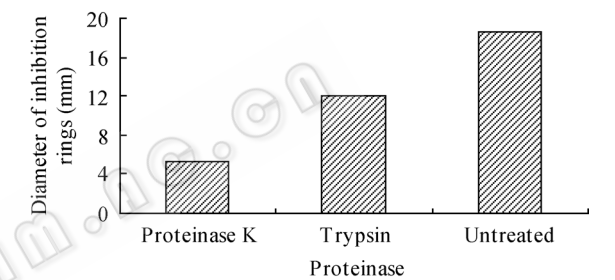


图 4 抗菌肽经不同蛋白酶处理后对玉米小斑病菌的抗菌效果
Fig. 4 Effects of different proteinase treatment on the antagonistic activity to *Bipolaris maydis* of antimicrobial substance deposited by 60% (NH₄)₂SO₄ saturations

2.4.4 对氯仿的稳定性：表 3 表明，拮抗蛋白经氯仿处理后，对玉米小斑病菌的抑菌圈直径为 4.67 mm，而未经氯仿处理的拮抗蛋白抑菌圈直径为 21 mm，拮抗活性下降了约 78%，说明菌株 A 产生的拮抗蛋白对氯仿敏感。

表 3 菌株 A 拮抗物质经氯仿处理后对玉米小斑病菌的抗菌活性 Table 3 Effect of chloroform treatment for 60 min on the antagonistic activity to <i>Bipolaris maydis</i> of antimicrobial substance deposited by 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ saturations		
处理 Treatment	等量氯仿处理 60 min Treated by isometric chloroform for 60 min	未处理 Untreated
抑菌直径 Diameter of inhibition rings ^A	4.67±0.58 ^b	21.00±0.58 ^a

Note: ^A Means followed by the same letter do not indicate a significant difference at $P > 0.05$.

2.4.5 对紫外线的稳定性：拮抗蛋白经紫外线处理后，对玉米小斑病菌的抑菌圈直径为 14.5 mm，而未经紫外线处理的拮抗物的抑菌圈直径为 19 mm，

拮抗活性下降了约 24%，但仍表现部分活性(图 5)。说明菌株 A 产生的拮抗物质对紫外线部分敏感。

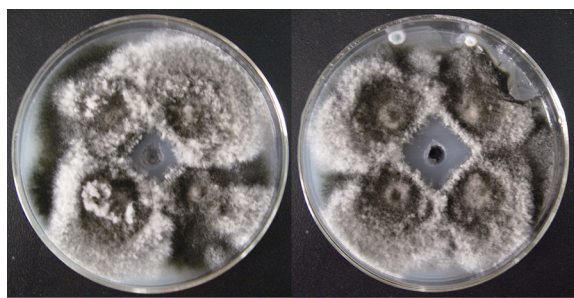


图 5 拮抗物质经紫外线处理后对玉米小斑病菌的拮抗作用(右图为对照)

Fig. 5 Effects of UV treatment on the antagonistic activity to *Bipolaris maydis* of antimicrobial substance deposited by 60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturations

3 讨论

自然界中,大多数细菌可以产生对其它微生物有抑制作用的拮抗物质,这有利于提高其自身在自然界中的竞争能力,具有重要的生态学意义。同时,由于细菌具有繁殖快、便于培养等优点,日益成为人们研究和开发拮抗物质的一种重要资源。至今,人们已从不同细菌类型和细菌菌株中分离得到拮抗物质,其中一部分是低分子量的抗生素,也有一些分子量较大的蛋白抗菌物质。

本实验从玉米病叶片上分离到了一株菌株,该菌株对玉米小斑病菌等多种致病真菌都有拮抗作用。研究表明,该菌株为一株枯草芽孢杆菌,并可产生蛋白性质的拮抗物质,且这种拮抗物质对温度、酸碱度较稳定,对紫外线、胰蛋白酶部分敏感,对蛋白酶 K、氯仿敏感,说明该拮抗蛋白有稳定的性能及很好的环境适应性,这些性质有利于拮抗蛋白应用于植物病害生物防治。尽管需要深入探讨的问题还很多,但通过现阶段的研究,已经显示了一定的开发前景。一方面可以将拮抗蛋白制成制剂,在农业生产中应用;或者可以分析抗菌蛋白氨基酸序列,反推 DNA 核苷酸顺序,设计引物,克隆编码该蛋白

的基因,然后构建载体将此基因转入植物体内,获得抗病植株。另一方面可以直接利用菌株 A,进一步研究高效价发酵工艺及剂型等,制成活菌制剂,直接在农业生产中应用。

参考文献

- [1] Hortencia G M-V, Victor O-P. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 2007, **113**: 103–106.
- [2] Office of Pesticide Program: biopesticide. 2001, in gov/pesticides/biopesticides.
- [3] Baker KF. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann Rev Phytopathol*, 1987, **25**: 67–85.
- [4] 张学君, 凌宏通, 李洪连, 等. 生物农药麦丰宁 B-3 对小麦纹枯病菌的抑制作用. *植物病理学报*, 1994, **24**(4): 361–366.
- [5] 陈志谊, 高太东, 严大富, 等. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验. *中国生物防治*, 1997, **13**(2): 75–78.
- [6] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 1998, p.182.
- [7] 刘焕利, 王金生, 张学君, 等. 枯草杆菌 B3 抗植物病原真菌蛋白的纯化及其性质的研究. *农业生物技术学报*, 1995, **3**(3): 33–38.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英, 王宝玲, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.66–127.
- [9] 刘小宇, 许强芝, 杨 好, 等. 菌株 F12-11-1-2 的 16S rDNA 序列分析及其生理生化性质研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(1): 36–38.
- [10] Fry NK, Warwick S, Saunders NA, *et al*. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *Journal of General Microbiology*, 1991, **137**: 215–222.
- [11] 胡 剑, 林心怡, 张九一, 等. 拮抗菌 BS—98 分泌抗菌蛋白的条件及其发酵液特性. *微生物学通报*, 1996, **23**(6): 323–326.