

一株表面活性剂产生菌的分离及抑菌活性

王彦杰^{1,2} 毕思宁³ 左豫虎^{2*} 胡小平¹ 康振生¹ 王艳杰² 黄晓东⁴

(1. 西北农林科技大学 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室 陕西 杨凌 712100)

(2. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江 大庆 163319)

(3. 黑龙江生态工程职业学院 黑龙江 哈尔滨 150080)

(4. Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, N2L 3GL, Canada)

摘要: 【目的】研究分离得到的表面活性剂产生菌的产表面活性剂能力、分类地位和抑菌活性。【方法】采用血平板、油平板进行表面活性剂产生菌的分离,以排油圈法进行表面活性的测定;通过生理生化特性和 16S rDNA 序列相似性分析对 BS1 菌株进行初步鉴定;利用对峙培养法和菌丝生长、孢子囊形成、孢子萌发的抑制率测定研究其抑菌活性。【结果】从石油污染土壤中分离到的 BS1 菌株可产生表面活性剂,在分类学地位上属于假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.)。BS1 菌体、发酵上清液、挥发性物质对 12 种供试病原真菌均表现出一定的抑制作用。BS1 菌体、发酵上清液对大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)的抑制率最大,分别达到 65.31%和 95.93%。发酵上清液通过影响大豆疫霉菌菌丝生长、孢子囊形成、孢子萌发等方式抑制病原菌的正常生长,稀释 20 倍的发酵上清液依然具有明显的抑制作用。BS1 菌株产生的挥发性物质对大豆菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抑菌效果最好,抑制率达到 84.25%。【结论】BS1 菌株在产生表面活性剂的同时,还具有生物防治作用潜力。

关键词: 生物表面活性剂, 抑菌活性, 大豆疫霉菌, 大豆菌核菌

Isolation and antifungal activity of a biosurfactant-producing bacterium

WANG Yan-Jie^{1,2} BI Si-Ning³ ZUO Yu-Hu^{2*} HU Xiao-Ping¹

基金项目: 教育部 2008 年高等学校博士点科研基金资助项目(No. 200802230001); 黑龙江省教育厅海外学人资助项目(No. 1054HZ026); 黑龙江省教育厅资助项目(No. 5040299310242); 黑龙江省科技攻关指导项目(No. GZ11B108)。

*通讯作者: Tel: 86-459-6819182; 信箱: zuoyuhu@163.com

收稿日期: 2011-09-19; 接受日期: 2011-12-19

KANG Zhen-Sheng¹ WANG Yan-Jie² HUANG Xiao-Dong⁴

(1. Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management of Ministry of Education, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

(3. Heilongjiang Vocational Institute of Ecological Engineering, Haerbin, Heilongjiang 150080, China)

(4. Department of Biology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, N2L 3G1, Canada)

Abstract: [Objective] The objective of this study was to examine the production of biosurfactant, taxonomic position and antifungal activity of the strain BS1. **[Methods]** Biosurfactant-producing bacterium was isolated by hemolytic activity assay on blood agar plates and hydrolyzing oil activity estimation on oil agar plates. Oil spreading method was used to assay surface activity. The strain BS1 was indentified according to morphological features, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences of the strain. Antifungal activity was tested by dual-culture method and the inhibiting effect on the the mycelium growth, sporangium formation and spore germination. **[Results]** The strain BS1 of producing biosurfactant, isolated from the petroleum-polluted soil, was indentified as *Pseudomonas* sp.. The strain BS1, fermentation supernatant and the volatile compounds (VCs) exhibited inhibition activity on 12 kinds of plant pathogenic fungus. The strain BS1 and fermentation supernatant displayed significant inhibition to the *Phytophthora sojae*, the inhibitory rate was 65.31% and 95.93%, respectively. The fermentation supernatant of BS1 inhibited the growth of *Phytophthora sojae* by inhibiting mycelium growth, sporangium formation and spore germination, which had also remarkable inhibition even if it was diluted 20 times with pure water. VCs produced by strain BS1 had notable inhibiting effect against *Sclerotinia sclerotiorum*, and its inhibitory rate was 84.25%. **[Conclusion]** The strain BS1 can produce surfactant and has the potential biocontrol.

Keywords: Biosurfactant, Antifungal activity, *Phytophthora sojae*, *Sclerotinia sclerotiorum*

生物表面活性剂是微生物合成的具有双亲性(分子结构中同时具有亲水性和亲油性基团)的一类化合物^[1]。目前市场上大部分表面活性剂都是化学合成的,化学合成表面活性剂的应用易产生二次污染。与化学表面活性剂相比,生物表面活性剂除具有降低表面张力、稳定乳化液等特性以外,还具有一般化学合成表面活性剂所不具备的可生物降解、低毒和适应极端的温度、酸碱性等优点^[2-3],可应用于环境保护、医药、化妆品、洗涤剂、食品、微生物采油等领域^[4-6]。前人的一些研究发现,一些生物表面活性剂还表现出对细菌^[7-8]、真菌^[9-10]、病毒^[11]有抗菌活性,使其在新

药开发、食品防腐和农业生物防治领域也具有广阔的应用前景,是很有希望开发的环保型生物源农药。

本研究从大庆受石油污染的土壤中筛选出一株生物表面活性剂产生菌BS1,初步研究发现产生的表面活性剂主要成分为糖脂类表面活性剂^[12],在研究其在原油降解等方面应用(研究结果另文发表)的同时,在室内离体条件下检测了菌株及代谢产物对12种植物病原真菌的抑菌作用,以期初步明确菌体和代谢产物的抑菌作用,为扩大该菌株的应用范围进行了初步的探索和尝试。

1 材料与amp;方法

1.1 供试土样

土壤样品采自大庆市石油污染土壤。取样方法:以多点采样法采取油井附近长期被石油污染的表层土(3 cm-10 cm)。

1.2 供试病原真菌

供试病原真菌(表1)均由黑龙江八一农垦大学植物病理与应用微生物研究所提供。

1.3 培养基

富集培养基参照文献[13];血液凝胶培养基和油平板培养基参照文献[14]。

发酵培养基:用等量的液体石蜡替代富集培养基中的原油。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、马铃薯蔗糖培养基(PSA)和牛肉膏蛋白胨培养基的配制参照文献[15],胡萝卜琼脂培养基(CA)的配制参照文献[16]。

1.4 产表面活性剂菌株筛选

1.4.1 富集培养:称取5 g土样,置于盛有100 mL富集培养基的250 mL的三角瓶中振荡培养(37 °C、180 r/min),5-7 d后将变浑浊的培养物按5%的接种量接种到富集培养基中继续富集培养3次。

1.4.2 血平板筛选:由于表面活性剂可使红细胞破裂并释放血红素出现溶血圈,因此采用血平板法进行表面活性剂产生菌的初筛^[13-14,17]。取0.1 mL的富集培养液涂布于血液凝胶培养基上,37 °C恒温培养箱中培养1-2 d后取出,观察是否有溶血现象,若有则为产生物表面活性剂的菌株。

1.4.3 油平板筛选:采用油平板法进行表面活性剂产生菌的复筛^[14,18]。将溶血圈大且透明的单菌落转接于油平板培养基上,37 °C培养3-4 d,将在油平板上形成噬油斑的菌落进行单菌的分离,保存做进一步研究。

1.5 菌株产表面活性剂能力测定

血平板和油平板筛选只能定性地筛选得到表

面活性剂产生菌,而排油活性试验可以初步研究菌株产表面活性剂的浓度和活性^[19]。将1.4筛选获得的产表面活性剂菌株活化培养后接种于发酵培养基中,37 °C、180 r/min培养4 d,参照文献[12]的方法,采用排油圈法测定发酵液的表面活性,以排油圈直径大小比较菌株的产表面活性剂能力,筛选高产菌株。

1.6 BS1菌株的生理生化实验和16S rDNA的PCR扩增及其序列分析

生理生化实验方法参见文献[20]。利用氯苯法^[21]提取菌株总DNA。16S rDNA序列的扩增采用细菌通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3';1492R:5'-GGCTACCTTGTTACGACT T-3'。PCR反应程序为:94 °C 5 min;92 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 2 min,30个循环;72 °C 5 min。

PCR产物使用TIANGEN琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化回收。纯化后的PCR产物由上海生物工程技术有限公司完成测序。根据测序结果,在NCBI网站中进行比对,使用ClustaW和MEGA 4.0软件进行系统发育分析,用Neighbor-Joining的方法构建系统进化树。

1.7 BS1菌株抑菌活性测定

1.7.1 BS1菌株抑菌活性:采用对峙培养法测定BS1菌株的抑菌活性。在PDA、PSA、CA平板中心接种植物病原菌菌饼(直径5 mm),四周2 cm处接BS1菌株菌饼(直径5 mm),空白对照不接BS1菌株菌饼,置25 °C培养箱中培养。空白对照长满平皿时测定各处理病原真菌菌落直径,计算抑制率。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌丝块直径}} \times 100\%$$

1.7.2 BS1菌株发酵上清液制备及其抑菌活性测定:将表面活性剂产生菌BS1活化培养后接种于装有130 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中,置于30 °C、180 r/min的振荡培养箱中培养4 d后,将发酵液于4 °C、10 000 r/min离心20 min,上清液

再经0.2 μm 滤膜过滤后, 获得发酵上清液。

用对菌丝生长的抑制率^[22]测定 BS1 菌株发酵上清液的抑菌作用。将 25 mL 发酵上清液分别加入到冷却至 45 °C 左右的 100 mL PDA、PSA、CA 培养基中迅速混匀后倒入培养皿中, 每皿 15 mL, 以加入等量发酵培养基的处理为对照。培养基凝固后, 将供试病原菌菌饼(直径 5 mm)接种到平板中央, 25 °C 培养, 重复 3 次。当对照菌落长满培养皿时, 用十字交叉法测量菌落直径, 按 1.7.1 中的公式计算抑制率。

1.7.3 BS1 菌株挥发性物质抑菌活性测定: BS1 菌株挥发性物质抑菌活性测定采用平板检测方法^[23]。将菌株 BS1 涂布接种于牛肉膏蛋白胨平板上。将接种病原真菌菌饼(直径为 5 mm)的 PDA、PSA、CA 平板反扣在已涂布菌株 BS1 的培养皿上, 用封口膜密封两培养皿接口处, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养。以不涂布 BS1 菌株为对照, 重复 3 次。在对照菌丝长满培养皿后, 十字交叉法测量各处理菌落直径, 按 1.7.1 中的公式计算抑制率。

1.8 BS1 菌株发酵上清液对大豆疫霉菌的抑制作用

1.8.1 BS1 菌株发酵上清液对大豆疫霉菌丝生长的影响: 将不同量的 BS1 菌株发酵上清液加入到冷却至 45 °C 左右定量的 CA 培养基中, 使培养基中去菌体发酵滤液分别稀释至 10、20、30、40、50、100 倍, 迅速混匀倒平板。待培养基冷却后, 将直径为 5 mm 的大豆疫霉菌菌饼接种于平板中央, 以大豆疫霉菌菌饼接种到发酵上清液作为原液处理。分别以等量的空白发酵培养基代替发酵上清液为对照, 每处理重复 3 次。以对菌丝生长的抑制率测定去菌体发酵滤液的抑菌作用^[22]。

1.8.2 BS1 菌株发酵上清液对大豆疫霉孢子囊形成和孢子萌发的影响: 参照文献[24]的方法制备游动孢子悬浮液。BS1 菌株发酵上清液原液及稀释 10、20、30、40、50、100 倍的稀释液对大豆

疫霉孢子囊形成和孢子萌发的影响测定分别参照左豫虎等^[22]和易龙等^[25]方法测定。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂产生菌的分离筛选

通过富集培养、血平板和油平板筛选从大庆石油污染土样中分离到 10 株具有产表面活性剂的菌株。利用排油圈实验进行排油活性测定, 获得一株排油圈直径达到 6.4 cm 的菌株 BS1。BS1 菌株溶血现象明显(图 1), 可以在油平板上生长(图 2), 具有排油活性(图 3), 表明 BS1 菌株可以产生表面活性剂。



图1 菌株BS1在血平板上形成的溶血斑
Fig. 1 Hemolytic zone formed by strain BS1 on blood agar plate

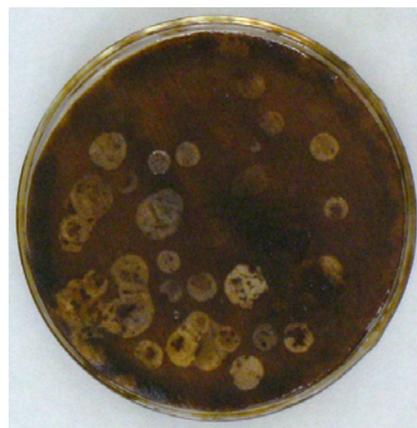


图2 菌株BS1在油平板上形成的噬油斑
Fig. 2 Hydrolyzing oil spot formed by strain BS1 on oil agar plate

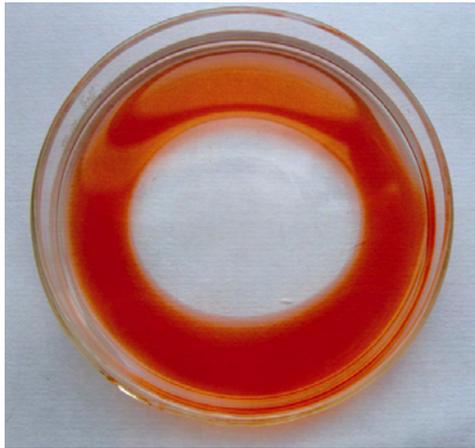


图3 菌株BS1发酵液的排油效果

Fig. 3 Degreasing activity of fermentation broth

2.2 菌株BS1的形态及生理生化鉴定

BS1菌株平板培养的菌落呈不规则圆形, 不透明, 乳白色, 边缘整齐, 菌株为两端椭圆, 杆状, 大小 $0.6 \mu\text{m} \times 2.2 \mu\text{m}$ 。革兰氏染色、V.P.反应、吡啶试验为阴性, 甲基红试验(M.R.)、接触酶、明胶液化反应、硝酸盐还原反应阳性, 不产 H_2S , 葡萄

糖发酵产酸, 能利用蔗糖并产气, 不能水解淀粉。

2.3 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

将菌株BS1 16S rDNA 序列提交GenBank 数据库(登录号GQ281048), 经BLAST序列对比, 选出数据库中具有代表性的几株细菌的序列构建系统发育树(图4)。图4表明菌株BS1与 *Pseudomonas* sp.亲缘关系最近。结合生理生化特征、菌体和菌落形态学特征进一步确定该菌株在分类学地位上属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

2.4 BS1菌株、发酵上清液和挥发性物质对供试病原真菌菌丝生长的抑制作用

对峙培养法测定的BS1菌株抑菌活性及其发酵上清液和挥发性物质对12种植物病原真菌的抑菌作用结果见表1。BS1菌株对大豆疫霉病菌、大豆菌核病菌、番茄灰霉病菌的抑制作用较好, 抑制率均在60%左右。BS1菌株发酵上清液对大豆疫霉菌的抑菌率可达95.93%, 对马铃薯早疫病菌、番茄早疫病菌的抑菌效果次之, 抑制率分别

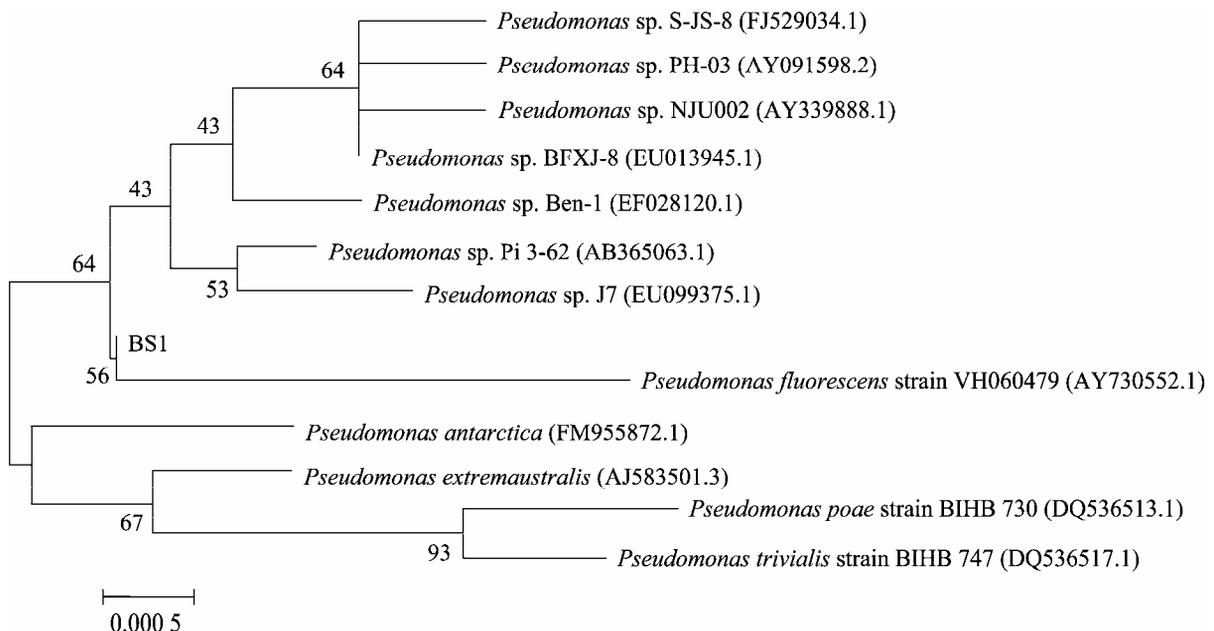


图4 菌株BS1的16S rDNA系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of derived from 16S rDNA sequence of strain BS1

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar: 0.005 represent sequence divergence.

为89.34%和71.85%。BS1菌株产生的挥发性物质对大豆菌核菌的抑菌效果最好,抑制率为84.25%;对番茄灰霉病菌和小麦赤霉病菌的抑菌效果次之,抑制率分别为68.82%和56.53%。

2.5 BS1菌株发酵上清液对大豆疫霉菌丝生长、孢子囊形成和孢子萌发的影响

BS1菌株发酵上清液对大豆疫霉菌丝生长、

孢子囊形成和孢子萌发均有一定的抑制作用,随着浓度的增大,抑制作用逐渐增强(表2)。稀释20倍的发酵上清液对菌丝生长、孢子囊形成和孢子萌发的抑制作用分别达到69.42%、69.04%和59.17%。表明BS1菌株发酵上清液是通过影响大豆疫霉菌菌丝的生长、孢子囊的形成、孢子的萌发等方式阻碍大豆疫霉菌的正常生长发育。

表1 BS1菌株、发酵上清液和挥发性物质对病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition activity of strain BS1, supernatant and VCs on experimental pathogen fungal mycelium

病原真菌 Pathogenic fungi	对峙培养抑菌率 Inhibitory rate of confronting incubation (%)	发酵上清液抑菌率 Inhibitory rate of supernatant (%)	挥发性物质抑菌率 Inhibitory rate of VCs (%)
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	53.38	71.85	33.37
马铃薯早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	41.41	89.34	37.07
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	46.49	29.90	10.69
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	59.96	22.20	68.82
杨树烂皮病菌 <i>Cytospora chrysosperm</i>	34.62	44.08	49.58
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	30.74	47.54	56.53
甜瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	14.88	54.16	20.09
大豆疫霉菌 <i>Phytophthora sojae</i>	65.31	95.93	33.76
水稻稻瘟病菌 <i>Pyricularia grisea</i> Cav	38.39	5.51	19.64
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	47.34	48.71	27.13
大豆根腐病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	40.70	48.90	43.88
大豆菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	60.56	50.35	84.25

表2 BS1菌株发酵上清液对大豆疫霉菌丝生长、孢子囊形成和孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibition of supernatant from strain BS1 on the mycelium growth, sporangium formation and spore germination of *Phytophthora sojae*

稀释 倍数 Dilution multiple	菌丝生长 Mycelium growth			孢子囊形成 Sporangium formation			孢子萌发 Spore germination		
	菌落直径 Colony diameter (cm)		抑制率 Inhibition rate (%)	孢子囊数 Sporangium number (ind)		抑制率 Inhibition rate (%)	孢子萌发率 Spore germination rate (%)		抑制率 Inhibition rate (%)
	对照 CK	处理 Treatment		对照 CK	处理 Treatment		对照 CK	处理 Treatment	
	对照 CK	处理 Treatment	抑制率 rate (%)	对照 CK	处理 Treatment	抑制率 rate (%)	对照 CK	处理 Treatment	抑制率 rate (%)
原液 Stock solution	4.25	0.58	95.93	317.00	0.00	100.00	92.50	0.00	100.00
10	4.09	1.33	81.12	319.33	60.67	81.00	92.00	31.33	68.50
20	4.13	1.76	69.42	319.77	99.00	69.04	92.33	40.67	59.17
30	4.21	2.35	51.33	319.77	155.67	51.32	92.50	68.17	31.83
40	4.24	2.81	35.57	320.00	206.33	35.52	92.83	77.00	23.00
50	4.29	3.43	22.05	319.77	249.33	22.03	92.83	85.33	13.67
100	4.34	3.89	10.95	319.33	285.00	10.75	93.33	90.17	9.83

3 结论与讨论

产表面活性剂的微生物大致可分为3类:一类是严格以烷烃作为碳源的微生物,如 *Corynebacterium* sp.;一类是以水溶性底物为碳源的微生物,如 *Bacillus* sp.;另一类可以烷烃和水溶性底物两者作为碳源,如 *Pseudomonas* sp.^[26]。其中 *Pseudomonas* sp.在自然界分布比较广,但能产表面活性剂的种类却很少^[27]。本研究从大庆石油污染土样中筛选出一株排油圈直径达6.4 cm的表面活性剂产生菌BS1。经形态观察、生理生化特性测定及16S rDNA序列测定分析,初步鉴定BS1属于 *Pseudomonas* sp.。研究发现BS1菌株代谢物在具有表面活性剂的同时,其菌体、发酵上清液、挥发性物质对12种供试病原真菌均表现出不同程度的抑制作用,其中BS1菌株的菌体、代谢产物对 *Phytophthora sojae* 及其挥发性物质对 *Botrytis cinerea*抑制作用较高。但起抑菌作用的物质是BS1代谢产生的表面活性剂,还是产生了其它抑菌物质,抑菌物质的性质及抑菌机制还需进一步研究明确。

Joshi 等^[10]研究发现了 *Bacillus subtilis* 具有同时产生表面活性剂和抑制真菌物质的特性,认为此类微生物的应用可以大大减少化学表面活性剂和杀菌剂的用量。Nielsen等^[28]研究表明产生表面活性剂的 *Pseudomonas fluorescens* 的菌体及发酵提取物对 *Pythium ultimum*和 *Rhizoctonia solani*有较好的抑制作用。李宝庆等^[23]研究表明枯草芽孢杆菌菌株BAB-1能够产生脂肽类物质和挥发性物质,并且这两类物质都具有较强的抑菌活性。以上报道对抗菌作用仅做了定性研究或对菌体、代谢产物和挥发性物质中的两者生防作用进行了研究。本研究的BS1菌株的菌体、发酵上清液、挥发性物质对供试的8个属病原真菌均有不同程度的抑制作用,说明BS1菌株具有生物防治

应用潜力。

BS1菌株的菌体、挥发性物质和发酵上清液对不同供试病原真菌的作用效果不同,可能是由不同病原真菌的特异性造成的。

参考文献

- [1] Banat IM. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art[J]. *Acta Biotechnologica*, 1995, 15(3): 251-267.
- [2] Cameotra SS, Makkar RS. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(5): 520-529.
- [3] Banat IM. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 51(1): 1-12.
- [4] Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 427-444.
- [5] Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(4): 229-236.
- [6] Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences[J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(3): 142-146.
- [7] Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA, et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(5): 1527-1534.
- [8] 杨胜远, 韦锦, 李云, 等. 一株产抗菌活性物质解淀粉芽孢杆菌的筛选及鉴定[J]. *食品科学*, 2010, 31(21): 208-212.
- [9] Chung YR, Kim CH, Hwang I, et al. *Paenibacillus korensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(4): 1495-1500.
- [10] Joshi S, Bharucha C, Desai AJ. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B[J].

- Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4603–4608.
- [11] Vollenbroich D, Özel M, Vater J, et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*[J]. *Biologicals*, 1997, 25(3): 289–297.
- [12] 毕思宁, 王彦杰, 左豫虎. 生物表面活性剂排油圈检测方法的改进和应用[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2009, 21(6): 58–60.
- [13] 李宝明, 阮志勇, 姜瑞波. 石油降解菌的筛选、鉴定及菌群构建[J]. *中国土壤与肥料*, 2007(3): 68–72.
- [14] 叶和松, 盛下放, 江春玉, 等. 生物表面活性剂产生菌的筛选及其对土壤重金属铅的活化作用[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(10): 1631–1636.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [16] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 86–87.
- [17] 孙燕, 洪青, 李顺鹏. 一株生物表面活性剂产生菌的分离及其特性研究[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(8): 1110–1116.
- [18] 丁立孝, 何国庆, 刘晔, 等. 脂肽生物表面活性剂产生菌的筛选[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 330–333.
- [19] Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56(3): 339–347.
- [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: 370–390.
- [21] Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(22): 5279–5280.
- [22] 左豫虎, 薛春生, 刘惕若. 杀菌剂对大豆疫霉菌生长的抑制作用[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2002, 19(1): 106–108.
- [23] 李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3547–3554.
- [24] 左豫虎, 臧忠婧, 刘惕若. 影响大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 游动孢子产生的条件[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(3): 241–245.
- [25] 易龙, 肖崇刚, 马冠华, 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. *微生物学报*, 2004, 44(1): 19–22.
- [26] 马歌丽, 彭新榜, 马翠卿, 等. 生物表面活性剂及其应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(5): 42–45.
- [27] 郝瑞霞, 潘永强, 王关玉. 假单胞菌S-7产生的表面活性剂特性研究[J]. *北京大学学报: 自然科学版*, 2003, 39(6): 844–849.
- [28] Nielsen TH, Christophersen C, Anthoni U, et al. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(1): 80–90.