

百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究

武志江^{1,2} 李业燕³ 王亚军¹ 杨柳^{1,2} 潘华奇⁴ 谢忠奎^{1*} 胡江春⁴

(1. 中国科学院寒区旱区环境与工程研究所 甘肃 兰州 730000)

(2. 中国科学院大学 北京 100049)

(3. 广西海洋环境监测中心站 广西 北海 536000)

(4. 中国科学院沈阳应用生态研究所 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:【目的】筛选对百合枯萎病具有抑菌活性的拮抗细菌,对其抑菌活性物质进行初步分离纯化分析。【方法】以强致病力的百合尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)为靶菌,采用系列稀释法和平板对峙法初筛拮抗细菌,并通过产铁载体能力、水解酶活性、土壤定殖力等多种生防特性指标进行复筛,结合形态学特征、生理生化指标和 16S rRNA 基因序列比对鉴定其分类地位;利用百合尖孢镰刀菌作为靶菌进行活性追踪,结合酸沉淀、快速柱色谱、HPLC 等分离纯化手段,对菌发酵液中的抑菌活性物质进行纯化分析。【结果】在 64 株百合根际细菌和 386 株海洋细菌中进行初筛,得到 9 株对百合镰刀菌具有较强拮抗活性的菌株,最后筛选了 1 株拮抗活性较强且产铁载体能力和水解酶活性、土壤定殖能力较高的菌株 11B91,鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其抑菌活性物质初步推测可能为 Iturin 和 Fengycin 脂肽类化合物。【结论】菌株 11B91 在百合枯萎病的生物防治中具有潜在的应用价值,证实海洋来源的微生物也具有防治陆地植物病原菌的潜力,为植物病害的防治拓宽了思路。

关键词: 尖孢镰刀菌, 平板对峙法, 铁载体, 土壤定殖力, 脂肽

Isolation and identification of an antagonistic bacterium against *Fusarium* on lily and its antifungal substances

WU Zhi-Jiang^{1,2} LI Ye-Yan³ WANG Ya-Jun¹ YANG Liu^{1,2} PAN Hua-Qi⁴
XIE Zhong-Kui^{1*} HU Jiang-Chun⁴

(1. Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3. Marine Environmental Monitoring Center of Guangxi, Beihai, Guangxi 536000, China)

(4. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study was to isolate and characterize an antagonistic bacterium against *Fusarium* on lily and to separate and identify its antifungal compounds. [Methods]

基金项目: 宁夏农业综合开发办公室项目(No. NTKJ2014-09-01); 国家自然科学基金项目(No. 41171027)

*通讯作者: Tel: 86-931-4967197; 信箱: wxhcas@lzb.ac.cn

收稿日期: 2014-10-06; 接受日期: 2014-11-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-24

Serial dilution method and dual-culture inhibition on agar plate were adopted for screening bacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum*. The bacterial antagonists were rescreened by measuring siderophores-producing potential, hydrolytic enzymes activity and soil colonization. The previously isolated bacterial strain was identified using morphological, physiological and biochemical analyses as well as 16S rRNA gene sequencing. Antifungal substances produced by the antagonists were isolated, purified and analyzed based on bioactivity-guided method together with acid precipitation, flash chromatography and HPLC. **[Results]** A total of 64 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere of filed-grown lily and 386 bacterial isolates were from marine organisms and silt. In a dual-culture inhibition test, 9 isolates displayed the antagonistic activity towards *Fusarium oxysporum*. Strain 11B91 was obtained by rescreening and identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Antifungal substances produced by strain 11B91 were speculated to be lipopeptides iturin and fengycin. **[Conclusion]** Strain 11B91 deserved to be developed a kind of biocontrol agent. This is to certify that bacteria from ocean could have potential for the biological control of pathogens which reside in soil so as to broaden our horizon for the prevention and control of plant diseases.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, Dual-culture inhibition, Siderophores, Soil colonization, Lipopeptides

百合(*Lilium*)属多年生球根类花卉,尤其以东方百合“索邦”(*Lilium orential* ‘Sorbonne’)花大而艳丽,呈深粉色,作为鲜切花深受消费者喜爱。然而,镰刀菌引起的枯萎病严重影响了百合切花的质量和产量,制约了百合产业化发展。该病原菌主要从百合基生根或鳞茎盘基部的伤口入侵,造成肉质根和基盘褐化腐烂,鳞片开始出现褐色凹陷病斑,后期鳞片散开而剥落^[1]。地上植株明显矮化,叶片由上而下黄化后枯萎而死。由于长期使用化学农药带来的生态环境问题,利用微生物及其代谢产物为主的生物防治手段已成为世界范围内植物病害防治的发展方向^[2]。生防菌的筛选是生物防治中极为重要的一步,也是生防能否成功的关键所在。目前,国内对百合致病菌的防治主要集中在化学药剂^[3-4]、诱抗剂^[5-6]以及抗病百合品种^[7]的筛选上,生物防治研究较少,仅韩玲等^[8]研究发现枯草芽孢杆菌对百合枯萎病有抑菌和防病作用,而关于百合根际微生物和海洋微生物拮抗百合镰刀菌的生物防治尚未见报道。

生防菌剂发挥作用的一个重要机理是生防菌能够产生抗病菌活性物质。对于活性物质的研究是开发新型农药的有效途径,也是阐明其作用机理的重要环节。目前,很多研究者致力于芽孢杆菌产

生抗菌活性的机制研究,其目的是为芽孢杆菌最终作为植物病害控制因子及促生因子提供理论依据。芽孢杆菌可产生多种抗菌物质,然而芽孢杆菌作为活体微生物制剂对植物病原菌进行生物防治时,其抗菌作用主要源于其产生的脂肽类抗生素^[9-11],主要包括 Iturin、Fengycin 和 Surfactin 三大类脂肽,它们在植物病害防治中各自发挥着不同的作用。Iturins 和 Fengycins 具有很强的抑真菌活性,并对植物病害菌的生长具有广谱抑制性。Surfactins 单独并没有抑菌作用,但与 Iturin A 在一起具有协同抑菌效应。这些脂肽类物质包括脂肪酸和肽环两部分结构,是由 7 个(Surfactins 和 Iturins)或 10 个(Fengycins) α -氨基酸链接到一个独特的 β -氨基(Iturins)或 β -羟基(Surfactins, Fengycins)脂肪酸。这种脂肪酸链的长度不一,从 C₁₃ 到 C₁₆ 为 Surfactins,从 C₁₄ 到 C₁₇ 为 Iturins,从 C₁₄ 到 C₁₈ 为 Fengycins^[9]。

本研究对源自百合根际土壤和海洋生物、深海淤泥中的菌株进行初步筛选,通过测定初筛菌株的产铁载体活性(定性和定量)、产蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶等水解酶活性以及土壤定殖力等生防相关特性进行复筛,以期筛选出对百合镰刀菌拮抗活性强的生防菌株,并进一步研究其代谢产物的抑菌活性及其成分分析,为百合镰刀菌病害的生物防治

应用以及开发利用海洋微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株: 细菌分离自中国南海约 2 400 m 深海的海泥和大连浅海海洋生物; 供试病原真菌分离自百合病株, 包括尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄类镰刀菌 (*Fusarium solani*) 和三线镰刀菌 (*Fusarium tricinctum*)。所有病原菌均回接至健康百合根部进行致病性测定以确定其致病力。

1.1.2 培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基^[12]; 佐贝尔 (ZoBell) 2216E 培养基^[12]; PDA (Potato dextrose agar) 培养基^[12]; 酪蛋白培养基^[13]; 淀粉酶活性测定培养基^[12]; 羧甲基纤维素钠培养基^[14]; CAS (铬天青) 蓝色平板^[15-16]; MKB 液体培养基^[17]; 发酵培养基^[18]。

1.2 试验方法

1.2.1 百合根际细菌和海洋微生物的分离、纯化及保存: 百合根际细菌来源于宁夏回族自治区隆德县大塆坡种植的东方百合 (*Lilium orential* 'Sorbonne') 根际土壤。获取根际土壤的方法如下: 在百合植株发病严重的地块, 选择健康植株将其挖出, 用力抖落附着的土壤, 最后以无菌刮刀刮下的土壤作为百合根际土。取 1 g 根际土加入到 100 mL 无菌水中 (装有少量玻璃珠), 150 r/min 振荡摇匀 20–30 min, 系列稀释到 10^{-4} 、 10^{-5} 后分别取 100 μ L 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上, 待菌落长出后挑取不同菌落纯化培养, 最后将纯化的根际细菌保存于斜面培养基。深海海泥中微生物的分离过程与百合根际细菌分离方法相同, 浅海海洋生物中微生物的分离按照内生细菌分离方法^[19], 最后均涂布于佐贝尔 2216E 培养基, 待菌落长出后挑取不同菌落进行纯化培养、保存于斜面培养基。

1.2.2 拮抗细菌的筛选: 以百合主要致病菌尖孢镰刀菌为靶菌, 采用平板对峙法筛选拮抗菌株。具体步骤如下: 将 PDA 平板上培养 7 d 的尖孢镰刀菌用无菌打孔器打取直径为 6 mm 的菌饼接种于新的

PDA 平板中央, 在距离中心 30 mm 处用无菌牙签同时接种已在牛肉膏蛋白胨上培养 2 d 的根际细菌和海洋细菌, 每个平板接种 6 株细菌, 3–5 d 后观察结果, 对于有拮抗作用的细菌, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。将筛选出的拮抗细菌用相同的方法分别测定其对茄类镰刀菌和三线镰刀菌的抑菌活性。

1.2.3 产铁载体能力的定性和定量测定: 采用点接种法, 用灭菌的牙签将拮抗细菌接在改进的 CAS 蓝色平板上, 每个平板 6 个点, 一个菌 3 个重复, 28 °C 培养 48 h, 然后用游标卡尺测量橙色晕圈及菌落直径, 最后计算可溶性指数^[20], 用于衡量菌株的产铁载体能力。可溶性指数=晕圈直径/菌落直径。

参考王平等^[17]的方法, 选择用于定性测定的 CAS 蓝色检测平板上产晕圈的菌株, 用接种环取一环新鲜菌苔接种于 MKB 液体培养基, 180 r/min、28 °C 摇床培养 48 h 后, 培养液 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 3 mL 与 3 mL CAS 染液充分混匀, 静置 1 h 后, 用紫外分光光度计测定 680 nm^[15] 的吸光度 (A_s), 以双蒸水为对照调零。同样方法以未接种的 MKB 培养液与 CAS 检测液混匀测定吸光值作为参比值 (A_r)。 A_s 与 A_r 的比值表示上清液中铁载体的相对含量。铁载体的浓度用铁载体活性单位 (Siderophore unit, S_u)^[21] 表示: $S_u=1-A_s/A_r$ 。

1.2.4 蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性的测定: 用灭菌牙签将在牛肉膏蛋白胨上活化的拮抗细菌分别接种在酪蛋白培养基、淀粉培养基和羧甲基纤维素钠平板上, 每个平板 4 个点, 一个菌 3 个重复, 28 °C 培养 72 h, 分别往酪蛋白培养基、淀粉培养基和羧甲基纤维素钠培养基加入三氯乙酸、卢戈氏碘液和刚果红氯化钠溶液作为显色剂, 观察菌落周围有无透明圈并用游标卡尺测量透明圈的直径, 依次计算蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性。酶活性=透明圈直径/菌落直径。

1.2.5 土壤定殖力测定: 于兰州坚家山百合种植农田, 选取健康植株的根际土壤, 取土方法同 1.2.1。将拮抗细菌菌悬液以 10^6 – 10^7 CFU/g 接种于根际

土,混合均匀后于 25 °C 恒温培养箱中培养。分别于接种 0、2、4、6、9、12、16、20、25、32、37、40 d 后取土样,在无菌条件下,用无菌药匙于土样中心位置挖取 0–5 cm 表层土壤,取 1 g 土壤进行梯度稀释。应用平板稀释法将土样稀释后,涂布于已加入各菌株抗性抗生素的平板进行计数,最后计算平均每克根际土壤中的含菌量^[22],即定殖密度来表示菌株在百合根际土壤的定殖力。

1.2.6 形态学和生理生化指标:取新鲜的菌株在牛肉膏蛋白胨平板上划线,于 28 °C 恒温培养箱中培养 48 h,观察单菌落的颜色、形状、光滑度。挑取培养 24 h 的幼龄菌落于无菌蒸馏水中制成显微涂片,进行革兰氏染色,以枯草芽孢杆菌标准菌株作为对照。在菌落培养 28 h 后每隔 4 h 取样一次,用结晶紫染色,在 1 000×油镜(100 倍目镜×10 倍物镜)下观察菌体形态特征和产芽孢情况。

采用《常见细菌系统鉴定手册》^[23]中的方法进行生理生化特性鉴定,主要指标包括对麦芽糖、鼠李糖、蜜二糖、甘露醇等各种糖醇利用,水杨素、七叶苷等分解能力,耐盐性、苯丙氨酸脱氨酶、硝酸盐还原等。

1.2.7 分子生物学鉴定:细菌基因组 DNA 提取使用细菌 DNA 提取试剂盒(大连 TaKaRa 公司),按照说明书进行。16S rRNA 基因的 PCR 扩增引物采用通用引物 27F/1495R (正向引物:5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3';反向引物:5'-ACGGCTACC TTGTTACGACT-3'),以菌株总 DNA 为模板进行扩增。PCR 反应采用 50 µL 体系: *Taq* buffer mix 混合物 25 µL, 10 µmol/L 正反引物各 1 µL, 10 mg/L DNA 模板 1 µL, ddH₂O 22 µL。扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 54 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳验证后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,所得序列在 GenBank 中进行序列同源性比对,利用 MEGA 5.05 采用 Neighbor-Joining 分析方法构建系统发育进化树。

1.2.8 拮抗菌发酵液的制备:将拮抗菌株 11B91 接

种到种子培养基(同发酵培养基成分)中,置于 HZQ-QX 全温振荡器中 28 °C、180 r/min 培养 24 h,作为种子液。将种子液以 5%接种量接种于发酵培养基中,然后置于振荡器中 28 °C、180 r/min 培养 48 h。

1.2.9 脂肽粗提物的制备:用 2% NaOH 溶液将拮抗菌株 11B91 发酵液的 pH 调至 8.0 (让脂肽尽可能溶于发酵液中), 4 000 r/min 常温下离心 30 min; 取上清液,用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 2.0,于 4 °C 静置过夜;次日上清液于 4 000 r/min 常温下离心 30 min,弃上清液,沉淀用 pH 2.0 的盐酸洗涤 2 次,用甲醇少量多次萃取(萃取 3 次以上),萃取液在 RE52-99 旋转蒸发仪中 30 °C 减压蒸干溶剂,得到脂肽粗提物。

1.2.10 脂肽粗提物的抑菌活性跟踪测定:采用滤纸片法测定拮抗菌脂肽粗提物的抑菌活性。将百合尖孢镰刀菌的菌块(直径约为 8 mm)接种于 PDA 平板中央,28 °C 培养 48 h。待菌落长至直径约 2 cm 大小时,在直径为 6 mm 的无菌滤纸片上加入待测脂肽粗提物(溶于甲醇中,浓度约为 5 g/L) 20 µL,以等量纯甲醇作为对照。放置于距菌块中心 2 cm 处,平板置于 28 °C 培养 48 h,观察并记录抑菌情况。

1.2.11 活性脂肽的纯化及分析:参考 Schelhaas 等^[24]和 Romero 等^[25]的方法,并结合前期研究基础采用快速硅胶柱色谱法对活性粗提取进行分段。首先使用 500–600 g 的硅胶制作硅胶柱,然后按照粗提物和硅胶质量比 1:2 混合拌样。依次用二氯甲烷:甲醇体积比 100:0、98:2、95:5、90:10、80:20、70:30、50:50、0:100 各 500 mL 减压快速洗脱,收集各洗脱液于 35 °C 减压旋蒸去除溶剂后称重。采用滤纸片法对各组分(浓度为 1 g/L)进行抑菌活性跟踪,方法同 1.2.10。采用分析型高效液相色谱检测活性较高的组分的化学组成。液相色谱条件:Acclaim 120 C₁₈ 分析柱(4.6 mm×250 mm),溶液浓度:1 g/L,进样量:20 µL,检测波长:220 nm,梯度洗脱:流动相 A: 甲醇, B: 0.05% TFA 水溶液, 30 min 内 A 由

80%升至 100%，流速：1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离与筛选

从百合根际土壤中分离纯化得到 64 株细菌，从海洋淤泥和生物中共分离出 386 株细菌。采用平板对峙法以尖孢镰刀菌为靶菌进行初筛，得到 BHB20、11B65、11B91、11B574、11B593、11B618、

11B650、11B664 和 11B669 等 9 株拮抗细菌(图 1)。

这些菌株对尖孢镰刀菌表现出不同程度的抑制活性，其中抑菌活性最强为 11B91，抑菌圈直径达 27.0 mm (表 1)，其次为 11B593、11B574，但三者之间抑制圈直径大小并无显著差异。来源于根际土壤的唯一一株菌株 BHB20 的抑菌圈直径仅为 15.0 mm (表 1)。

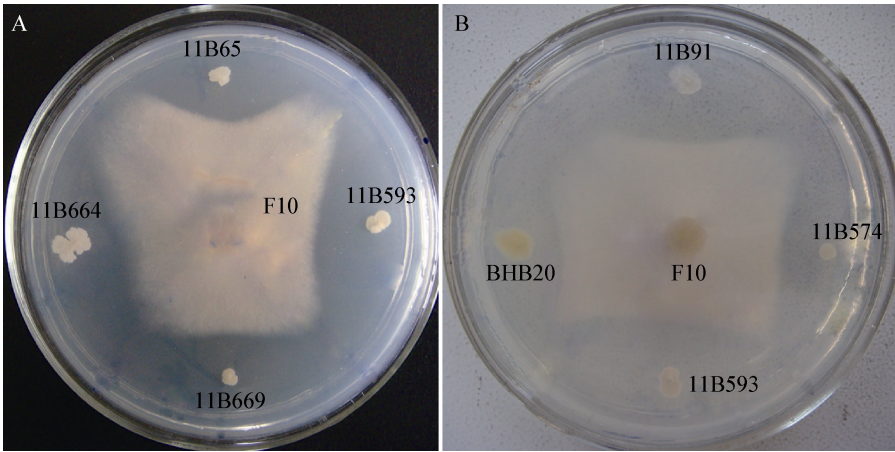


图 1 拮抗细菌对百合尖孢镰刀菌的拮抗作用
Figure 1 Antifungal effects of antagonistic bacteria on *Fusarium oxysporum*

表 1 不同拮抗细菌对致病菌的抑菌活性				
Table 1 Antifungal effects of antagonistic bacteria on pathogens				
菌株 Strains	来源 Microenvironment of strains	尖孢镰刀菌抑菌圈直径 <i>Fusarium oxysporum</i> diameter of inhibition zone (mm)	抑菌强度	
			Intensity of antifungal activity	
			茄类镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	三线镰刀菌 <i>Fusarium tricinctum</i>
BHB20	Rhizosphere soil	15.0 c	++	+
11B65	Marine organisms	20.0 b	++	+
11B91	Marine organisms	27.0 a	++	+
11B574	Marine silt	22.7 ab	++	+
11B593	Marine silt	26.7 a	++	+
11B618	Marine silt	11.0 c	+	+
11B650	Marine silt	10.7 c	+	+
11B664	Marine silt	14.7 c	+	+
11B669	Marine silt	14.0 c	+	+

注：++：抑菌明显；+：抑菌微弱。 同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)，表中数据为 3 次重复的平均值，下同。
Note: ++: Intensive antifungal activity; +: Moderate antifungal activity. Different letters within a column indicate significant differences at the 0.05 level by the Duncan's test; Data are the means of three replicates. The same as below.

除了对尖孢镰刀菌具有拮抗性, 9 株菌对百合致病菌茄类镰刀菌和三线镰刀菌均具有拮抗活性(表 1)。BHB20、11B65、11B91、11B574 和 11B593 对茄类镰刀菌的抑菌活性均较强, 而所有菌株对三线镰刀菌的抑菌活性均较弱。

2.2 拮抗细菌产铁载体能力

对 9 菌株进行铁载体定性分析与定量分析结果不尽相同(表 2)。定性分析试验中, 经 48 h 培养, 7 株菌可在 CAS 蓝色平板上产铁载体, 其中在菌株 11B664 菌落周围出现较大橙色晕圈, 可溶性指数最大, 达 3.52, 其次是 11B91, 但两者之间差异不显著(表 2)。而在定量分析试验中, 11B91 的 S_u 值最大, 即产铁载体能力最强, 显著大于 11B664。这进一步证实了定性分析虽然简便, 但存在一定的局限性。菌株 11B618 和 11B650 均无晕圈产生, 表明这两株细菌不产铁载体, 与定量分析的结果一致(表 2)。根据 Persmark 等^[21]对细菌产铁载体能力的划分, 一般产铁载体能力较高的细菌其 A_s/A_r 低于 0.5, 因此菌株 11B91 和 11B664 是高产铁载体细菌。

2.3 拮抗细菌的水解酶活性

不同的拮抗细菌产生不同的水解酶, 且水解酶的活性大小也存在显著差异。所有菌株中, 仅 BHB20、11B65、11B91、11B574 和 11B593 等 5 株拮抗细菌可产生纤维素酶, 且菌株的纤维素酶活性

大小差异不显著。全部菌株均可产生蛋白酶, 而 BHB20、11B65、11B91、11B574 和 11B593 菌株产蛋白酶活性明显高于其他菌株。除菌株 BHB20 外, 其他 8 株菌均可产生淀粉酶, 其中 11B65、11B91、11B574、11B593 和 11B669 产淀粉酶活性均显著高于其他菌株(表 3)。

2.4 拮抗细菌在根际土壤的定殖力

综合考虑所有菌株的性能指标, 选取抑菌活性较高, 产铁载体能力较强和水解酶活性较高的菌株 BHB20、11B65、11B91、11B574 和 11B593 作为待选菌, 进一步测定其在根际土壤中的定殖力。从总体来看, 5 株菌株在土壤中的菌群数量均随时间而减少(图 2), 其中 11B65 和 11B593 的数量的消长动态基本一致, 均在土壤培养 2 d 内急速下降, 之后又开始升高, 第 4 天后随时间逐渐减少; 11B574 的数量在 40 d 内一直比其他菌株低, 前期下降速度较快, 后期较慢。与其他菌株相比, BHB20 和 11B91 的土壤中的数量在前期较高, 且随时间下降的也较慢, 最后稳定在 2.5×10^6 CFU/g 左右, 32 d 后数量均高于其他菌株, 且 BHB20 在 25 d 后菌群数量有上升的趋势(图 2)。总之, BHB20 和 11B91 的菌群数量较为稳定, 定殖效果较好。综合考虑各种指标, 11B91 菌株可作为潜在的生防菌株进行菌种鉴定。

表 2 不同拮抗细菌产铁载体的能力

Table 2 Siderophore-producing activity of antagonistic bacteria

菌株 Strains	可溶性指数 Solubility indexes	S_u	A_s/A_r	产铁载体能力等级 Siderophore activity level
BHB20	2.50 b	0.40 c	0.60 a	+++
11B65	2.56 b	0.44 c	0.56 a	+++
11B91	3.33 a	0.69 a	0.31 c	++++
11B574	2.50 b	0.39 c	0.61 a	++
11B593	2.50 b	0.39 c	0.61 a	++
11B618	—	—	—	—
11B650	—	—	—	—
11B664	3.52 a	0.58 b	0.42 b	+++
11B669	2.80 b	0.39 c	0.61 a	++

注: —: 表示不产铁载体; S_u : 铁载体活性单位; A_s/A_r : 上清液中铁载体的相对含量; +越多表示产铁载体能力越强。

Note: —: No siderophores; S_u : Siderophore unit; A_s/A_r : Relative content of siderophores in the supernatant; More '+' indicates higher siderophore activity.

表 3 不同拮抗细菌的水解酶活性
Table 3 Hydrolase activity of antagonistic bacteria

菌株 Strains	纤维素酶活性 Cellulase activity	蛋白酶活性 Protease activity	淀粉酶活性 Amylase activity
BHB20	2.46 a	4.63 a	—
11B65	2.71 a	3.08 b	3.17 b
11B91	2.68 a	3.17 b	3.33 ab
11B574	2.29 a	5.02 a	4.14 a
11B593	2.67 a	4.68 a	3.36 ab
11B618	—	1.79 c	1.63 c
11B650	—	2.64 b	1.83 c
11B664	—	1.35 c	1.88 c
11B669	—	2.76 b	3.22 b

注：—：无酶活性。
Note：—：No hydrolase activity.

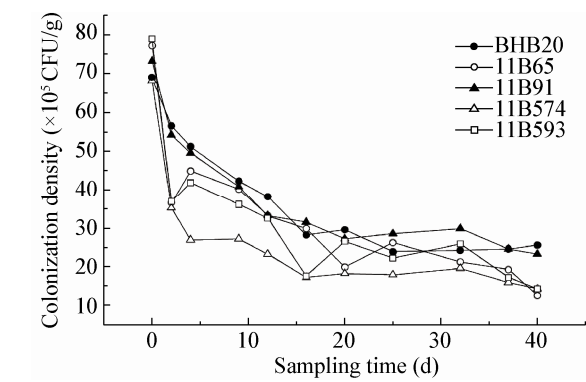


图 2 不同拮抗细菌在根际土壤的定殖力
Figure 2 Colonization density of antagonistic bacteria in rhizosphere soil

2.5 11B91 菌株的鉴定

2.5.1 菌落及菌体形态：菌株 11B91 在牛肉膏蛋白胨培养基上培养 48 h 后菌落呈圆形，边缘整齐，乳白色，表面平整且光滑(图 3)，培养 7 d 后菌落表面褶皱。1 000×油镜下观察到菌体均呈短杆状，中生芽孢(图 4)，培养 36 h 时已经有芽孢产生，培养 48 h 后，绝大部分(90%以上)菌体产生芽孢。

2.5.2 生理生化特征：菌株 11B91 为革兰氏阳性，能利用麦芽糖、阿拉伯糖、山梨醇、甘露糖、七叶苷、柠檬酸盐、水杨苷等，能液化明胶，能还原硝酸盐，过氧化氢酶为阳性，V-P 反应为阳性，不产

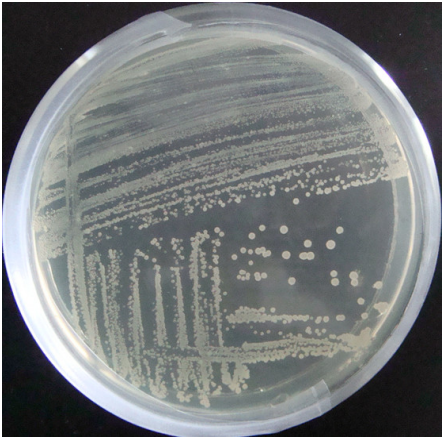


图 3 菌株 11B91 菌落形态
Figure 3 Colony of strain 11B91

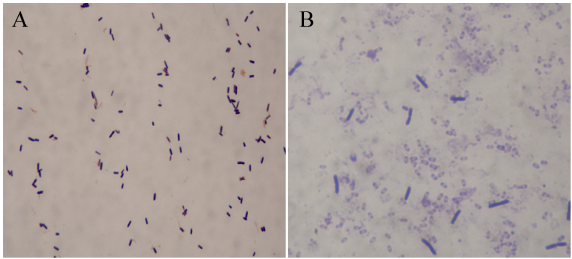


图 4 菌株 11B91 显微形态(1 000×)
Figure 4 Micromorphology of strain 11B91 (1 000×)
注：A：菌体；B：芽孢。
Note: A: Thalli; B: Spores.

硫化氢等；在含 1%–7%氯化钠的培养基中均可正常生长(表 4)。

2.5.3 16S rRNA 基因序列测定及分析:菌株 11B91 的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库，登录号为 KM873228，使用 BLASTn 程序进行相似性比对分析，调取 GenBank 数据库中与之同源性较高

的菌株 16S rRNA 基因序列，利用 MEGA 5.05 采用 Neighbor-Joining 分析方法构建系统发育进化树。来源于海洋生物的细菌 11B91 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 一致性为 100% (图 5)，生理生化指标也与之相符，所以将 11B91 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

表 4 菌株 11B91 生理生化特性			
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of 11B91			
测定指标	11B91	测定指标	11B91
Characteristics		Characteristics	
Maltose	+	Melibiose	+
Arabinose	+	Rhamnose	+
Sorbitol	+	Phenylalanine	—
Mannose	—	Acetate	—
Inositol	—	Gelatin liquefaction	+
Esculotide	+	Nitrate reduction	+
β-Galactoside	—	V-P reaction	+
Hydrogen sulfide	—	Hippurate	+
Gluconate	—	Amylolysis	+
Citrate	+	Anaerobic growth	—
Arginine double hydrolysis	—	Colony color	乳白色
Catalase	+	Sodium chloride tolerance	7%
Sucrose	+	Colony surface	光滑
Salicin	+		

注：+：阳性反应；—：阴性反应；%：菌株的最高耐盐浓度。
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction; %: The highest concentration of sodium chloride the strain could endure.

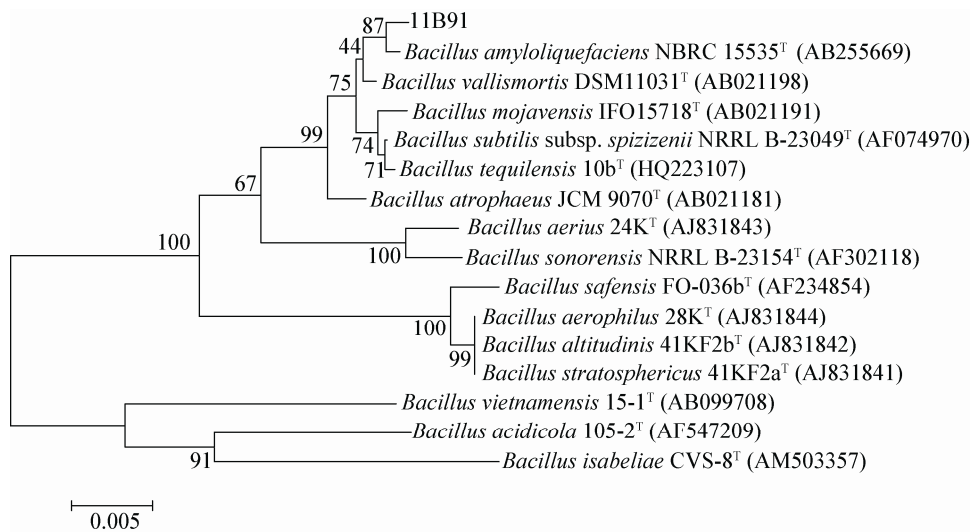


图 5 拮抗细菌 11B91 16S rRNA 基因系统发育进化树
Figure 5 Phylogenetic tree constructed from comparative analysis of 16S rRNA gene sequences

2.6 菌株 11B91 的脂肽粗提物的抑菌活性

经过酸沉淀、甲醇提取、旋转蒸发得到脂肽粗提物 6.69 g, 经活性跟踪测定结果表明, 脂肽粗提物对百合尖孢镰刀菌有明显的抑菌活性(图 6)。

2.7 不同组分的抑菌活性及液相色谱分析

11B91 脂肽粗提物经快速硅胶柱色谱得到 8 个组分(nf1–nf8), 经活性跟踪测定, 其中组分 nf5、nf6、nf7 和 nf8 对百合尖孢镰刀菌具有明显抑菌活

性(图 6)。为了检测这 4 个组分所含化合物类型, 经 HPLC 检测得到液相色谱图如图 7 所示。根据脂肽的特点及前期的相关研究^[26-27], 在反相高效液相色谱中, Iturin 类脂肽会最先出峰(保留时间在 5–11 min 左右), 接着是 Fengycin 类脂肽(保留时间在 13–20 min 左右), 最后是 Surfactin 类的脂肽(保留时间在 30–35 min 左右, 图 7)。从保留时间来看, 4 个组分均主要是 Iturin 和 Fengycin 两类脂肽。

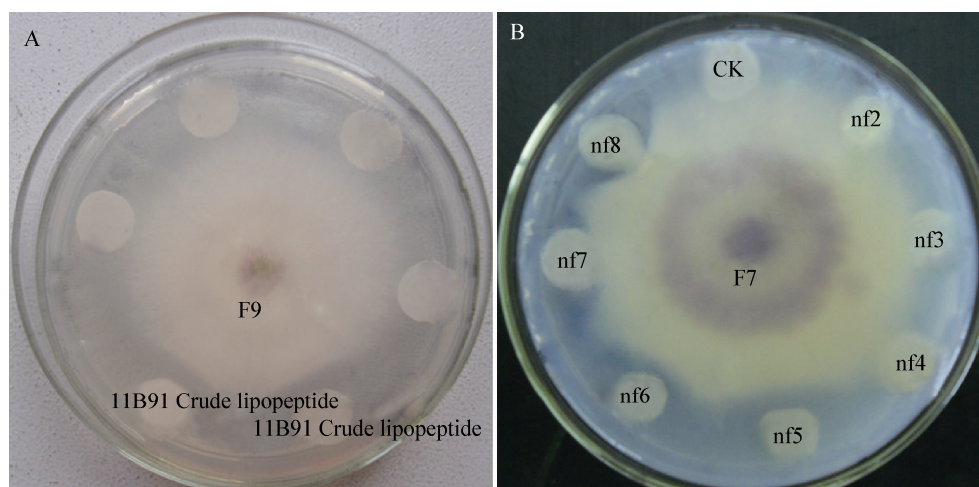
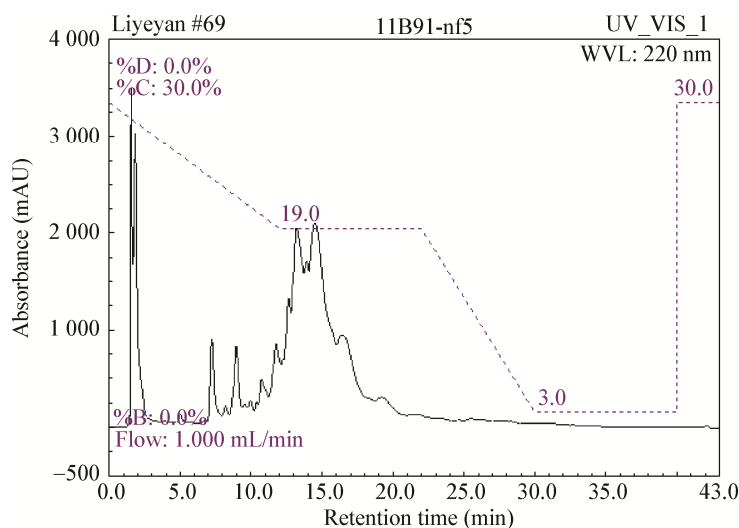


图 6 11B91 脂肽粗提物(A)和不同组分(B)对百合尖孢镰刀菌的抑菌活性

Figure 6 The antifungal activity of crude lipopeptides (A) produced by 11B91 and varied fractions (B) to *Fusarium oxysporum*



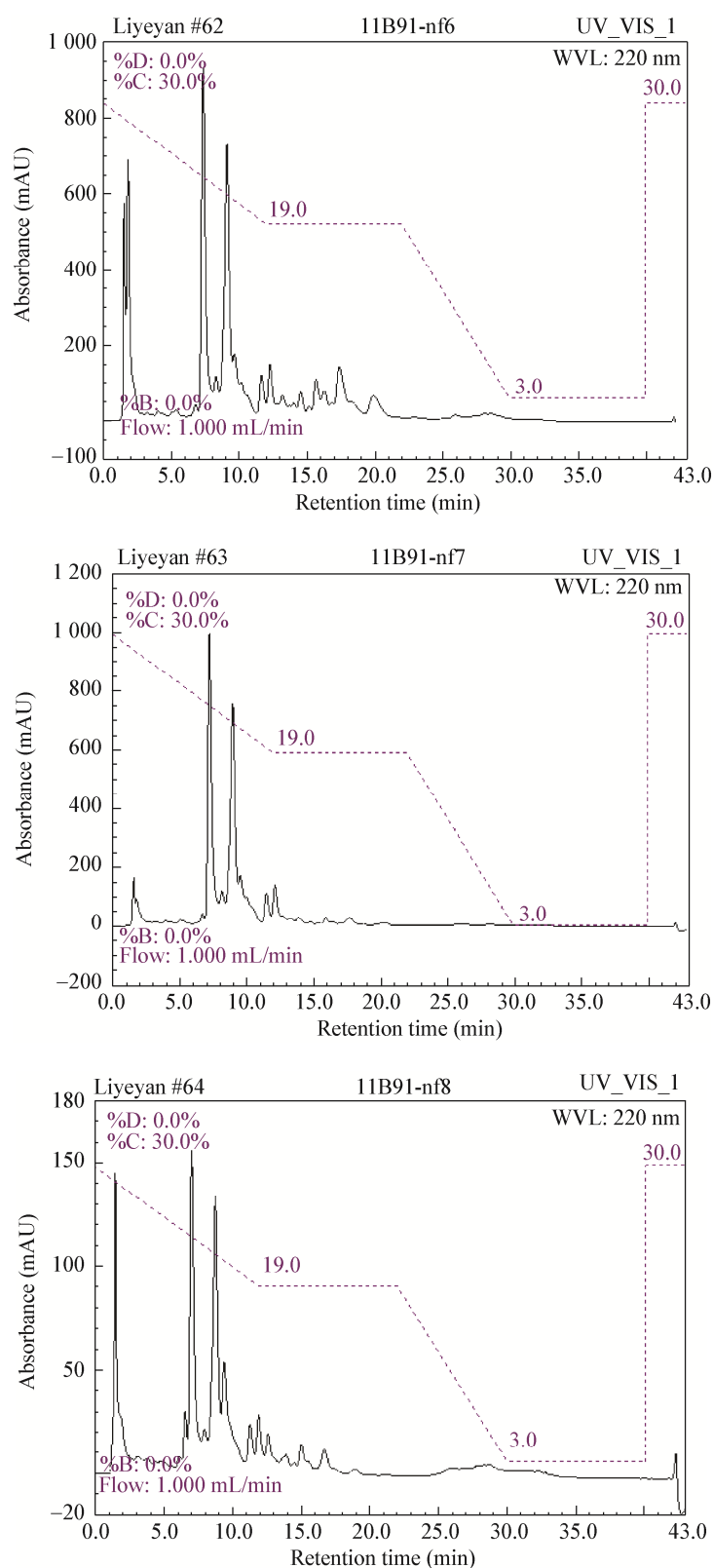


图 7 4 个活性组分(nf5-nf8)的液相色谱图

Figure 7 The chromatogram of antifungal fractions (nf5-nf8) in RP-HPLC system

3 结论与讨论

解淀粉芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的重要菌种, 越来越受到研究人员的关注, 它在植物病害生防中发挥着重要作用。随着解淀粉芽孢杆菌 FZB42 的全基因组测序^[28], 关于解淀粉芽孢杆菌在生防中的分子机制也得到了广泛而深入的研究^[29-31], 进一步阐明了其在生防中的作用机理, 推动了其在生产实践中的应用。本文中的 11B91 是一株来源于海洋生物的解淀粉芽孢杆菌, 该菌株对百合镰刀菌具有较强的拮抗作用, 且能产生铁载体、蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶, 能够在土壤中较好地定殖, 是一株极具生防潜力的海洋菌株。后续将对该菌株的发酵工艺、菌剂研制、生防机制等进行深入研究, 并制成可湿性芽孢菌剂进行田间防效试验, 以明确其田间生防效果及应用前景。

在生防菌的筛选过程中结合生防作用机制, 能够增加菌株在田间生防中成功的几率。近年来, 研究人员对微生物铁载体越来越关注, 对原来的检测方法进行了改进, 变得更加简便和准确。本研究采用改进的铁载体检测方法^[15,17]从定性、定量两方面研究了拮抗细菌的产铁载体特性。铁载体是拮抗菌产生的拮抗物质之一, 与微生物的拮抗作用密切相关。已有大量研究^[32-35]发现, 高产铁载体菌株产生的超强螯合能力的铁载体螯合了环境中痕量的铁, 有效地与病原菌竞争铁离子从而抑制病原菌。本研究筛选的 9 株拮抗菌中有 7 株能产生铁载体, 这也证实了前人研究的铁载体在微生物拮抗病原菌中具有重要作用。另外, 水解酶作为菌株的生防机制之一, 越来越多地被用作评估生防菌的生防潜能指标^[36-38]。纤维素酶在生防菌竞争营养基质方面可作為筛选生防菌的首选参考指标^[39-40], 纤维素酶活力越高, 生防潜能越大^[41]。本研究筛选的拮抗菌中有 5 株可产纤维素酶, 这也与抑菌活性较高的菌株一致。

由于生防菌在田间会受到各种因素的影响, 平板对峙法所筛选出的抑菌效果好的菌株不一定是

最好的生防菌^[42]。生防菌能否发挥其防治病害的功效首要条件就是其能否在根际有效定殖, 生防菌在根际的定殖力决定其生防力^[43]。本研究筛选得到的 5 株拮抗细菌在百合根际土壤中的定殖数量均随时间延长而减少, 其中菌株 11B65 和 11B593 在土壤培养 2 d 内急速下降后又开始升高, 第 4 天后随时间逐渐减少, 这可能是菌株本身短时间内难以适应土壤而大量死亡, 之后又有一定的繁殖, 而这一时期可能是菌株逐渐适应土壤的阶段。定殖 25 d 后, 仅 BHB20 和 11B91 基本趋于稳定, 定殖效果较好, 证实了 BHB20 与其他海洋菌株相比, 定殖力更强。Kim 等^[44]也发现辣椒生防菌株 KJ9C8 在根际土壤的定殖数量前期逐渐下降, 21 d 后开始趋于稳定。而在定殖前期所有菌株的密度均有不同程度的降低, 这可能与海洋细菌难以在短时间适应大田土壤环境有关, 或与土壤中微生物种群复杂、微生物相互制约有关。对于菌株 BHB20 和 11B91 在根际土壤中的定殖及其定殖后的生防能力应需要进一步深入研究, 结合盆栽和大田防效试验, 明确其在田间的生防效果。

解淀粉芽孢杆菌可产生 Iturin、Fengycin 和 Surfactin 的脂肽类抗生素^[45], 它们均具有抵抗植物病原真菌的能力, 但抗菌效果较好的属于 Iturin 和 Fengycin 两类^[46-47]。牛力轩等^[27]从海洋淤泥中首次筛选到产 Bacillopeptin 类脂肽抗生素的解淀粉芽孢杆菌, 对于解淀粉芽孢杆菌脂肽类抗生素的种类又有了新的扩展。本研究来源海洋的解淀粉芽孢杆菌 11B91, 其代谢物中的脂肽粗提物对百合尖孢镰刀菌有明显的抑菌活性。这表明 11B91 能够产生抑真菌物质, 对病原菌有拮抗作用。11B91 脂肽粗提物经过快速硅胶色谱柱分段后, 对各组分进行抗真菌活性测试, 4 个活性组分经高效液相色谱检测, 根据保留时间可初步确定活性物质为 Iturins 和 Fengycins 两类脂肽。为了进一步确定其化学结构, 还需结合半制备反相高效液相色谱、高分辨质谱和核磁共振的手段对活性脂肽进行再纯化及结构鉴定。

参考文献

- [1] Pan QY, Zhu MD, Deng JL, et al. Study on occurrence and control of *Fusarium* wilt of lily[J]. Shanghai Agricultural Science and Technology, 2004(3): 103-104 (in Chinese)
潘其云, 朱明德, 邓建玲, 等. 百合镰刀菌枯萎病的发生与防治研究[J]. 上海农业科技, 2004(3): 103-104
- [2] Hao XJ, Liu B, Xie GL. Research progress in biological control of *Fusarium* wilt disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(7): 319-322,337 (in Chinese)
郝晓娟, 刘波, 谢关林. 植物枯萎病生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(7): 319-322,337
- [3] Tian LL, Liang QL, Xu BL, et al. Fungicides screening against to *Fusarium oxysporum* in lilium and application in fields[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2008, 43(5): 113-116 (in Chinese)
田丽丽, 梁巧兰, 徐秉良, 等. 切花百合枯萎病菌室内药剂筛选及田间防治效果[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 43(5): 113-116
- [4] Wang T. Studies on physiological and biochemical characteristics of *Colletotrichum lilli* and screening of effectual fungicides[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2007 (in Chinese)
汪涛. 百合炭疽菌生理生化及有效药剂筛选研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2007
- [5] Guo F, Wang YJ, Xie ZK, et al. The effects of inducers on growth, disease resistance and related enzymes activities of lily cut flower[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(5): 763-768 (in Chinese)
郭芳, 王亚军, 谢忠奎, 等. 诱抗剂对切花百合生长、抗病性及相关酶活性的影响[J]. 园艺学报, 2010, 37(5): 763-768
- [6] Zhang LL. Study on wilt-resistance of lily[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2013 (in Chinese)
张丽丽. 百合抗枯萎病研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2013
- [7] Zhang LL, Liu DY, Zhao CP. Lily wilt disease resistance identification and study of pathogenic factors[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2012, 35(6): 27-32 (in Chinese)
张丽丽, 刘冬云, 赵婵璞. 百合枯萎病抗性鉴定及发病因素的研究[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(6): 27-32
- [8] Han L, Cheng ZH, Sun JL, et al. Inhibitive effects of *Bacillus subtilis* on liliaceous *Fusarium oxysporum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2010, 19(10): 133-136,151 (in Chinese)
韩玲, 程智慧, 孙金利, 等. 枯草芽孢杆菌对百合枯萎病的防治效果[J]. 西北农业学报, 2010, 19(10): 133-136,151
- [9] Ongena M, Jacques P, Toure Y, et al. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 29-38
- [10] Jourdan E, Henry G, Duby F, et al. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009, 22(4): 456-468
- [11] Romero D, de Vicente A, Olmos JL, et al. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(4): 969-976
- [12] Wang SJ. Land-Marine Microbial Research: Theories, Applications, New Methods[M]. Shenyang: Liaoning Science & Technology Publishing House, 2004: 400-420 (in Chinese)
王书锦. 陆地-海洋微生物研究理论·应用·新方法[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2004: 400-420
- [13] Wang XM, Hu JC, Wang SJ. Identification of the protease-producing strain B1394 and characterization of the protease[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2009, 31(2): 143-147 (in Chinese)
王雪梅, 胡江春, 王书锦. 深海芽孢杆菌 B1394 的鉴定及其蛋白酶酶学性质[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(2): 143-147
- [14] Shi YY, Shen QR, Lou WJ, et al. Isolation and screening of cellulose-decomposing mixing strains[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1996, 19(3): 62-65 (in Chinese)
史玉英, 沈其荣, 娄无忌, 等. 纤维素分解菌群的分离和筛选[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 62-65
- [15] Zhao X, Xie ZX, Chen SX, et al. Improvement and analysis in over-siderophores production bacteria filtrating and detecting[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 95-98 (in Chinese)
赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 等. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 95-98
- [16] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical-assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [17] Wang P, Dong B, Li FD, et al. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese)
王平, 董飏, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326
- [18] Xu Y, Wang N, Li W, et al. Purification and structural identifications of the antifungal lipopeptides produced by marine bacterium *Bacillus subtilis* 3512A[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009, 25(4): 328-333 (in Chinese)
徐杨, 王楠, 李伟, 等. 海洋枯草芽孢杆菌 3512A 抗真菌脂肽的分离纯化及结构特性鉴定[J]. 中国生物防治, 2009, 25(4): 328-333
- [19] Fu YF, Zhang YF, Zhang XP. Isolation and identification of one anti-*Rhizoctonia solani* endophytic bacteria strain from corn and its antagonism and promoting research[J]. Microbiology China, 2008, 35(8): 1240-1245 (in Chinese)
辜运富, 张云飞, 张小平. 一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定及其抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1240-1245
- [20] Zhao X, Chen SX, Xie ZX, et al. Isolation, identification and over-siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp-f[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 691-695 (in Chinese)
赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 691-695

- [21] Persmark M, Expert D, Neilands JB. Isolation, characterization, and synthesis of chrysobactin, a compound with siderophore activity from *Erwinia chrysanthemi*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(6): 3187-3193
- [22] Qi YX, Chen FX. Colonization of *Beauveria bassiana* in corn rhizosphere and its effect on rhizosphere microorganisms[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(5): 962-966 (in Chinese)
齐永霞, 陈方新. 球孢白僵菌在玉米根际的定殖及对根际微生物的影响[J]. 热带作物学报, 2013, 34(5): 962-966
- [23] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-388 (in Chinese)
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: 349-388
- [24] Schelhaas M, Glomsda S, Hansler M, et al. Enzymatic synthesis of peptides and Ras lipopeptides employing choline ester as a solubilizing, protecting, and activating group[J]. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1996, 35(1): 106-109
- [25] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(4): 430-440
- [26] Ma ZW, Wang N, Hu JC, et al. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A[J]. Journal of Antibiotics, 2012, 65(6): 317-322
- [27] Niu LX, Wang N, Wang XM, et al. Screening and identification of a deep-sea derived *Bacillus* sp. producing lipopeptide bacillopeptin A[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(10): 738-744, 750 (in Chinese)
牛力轩, 王楠, 王雪梅, 等. 一株产脂肽类抗生素 Bacillopeptin A 深海芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(10): 738-744, 750
- [28] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9): 1007-1014
- [29] Qiao JQ, Wu HJ, Huo R, et al. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action[J]. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2014, 1(1): 1-14
- [30] Cai XH, Ma J, Wei DZ, et al. Functional expression of a novel alkaline-adapted lipase of *Bacillus amyloliquefaciens* from stinky tofu brine and development of immobilized enzyme for biodiesel production[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 106(5): 1049-1060
- [31] Niazi A, Manzoor S, Asari S, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104651
- [32] de Boer M, Born P, Kindt F, et al. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms[J]. Phytopathology, 2003, 93(5): 626-632
- [33] Tian F, Ding YQ, Zhu H, et al. Screening, identification and antagonistic activity of a siderophore-producing bacteria G-229-21T from rhizosphere of tobacco[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 631-637 (in Chinese)
田方, 丁延芹, 朱辉, 等. 烟草根际铁载体产生菌 G-229-21T 的筛选、鉴定及拮抗机理[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 631-637
- [34] Lin TX, Tang M, Huang MY, et al. Screening and identification of a high yield siderophores-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 668-676 (in Chinese)
林天兴, 唐梅, 黄明远, 等. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 668-676
- [35] Rong LY, Yao T, Zhao GQ, et al. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens[J]. Plant Protection, 2011, 37(1): 59-64 (in Chinese)
荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 等. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 59-64
- [36] Yang JH, Wen PL, Zhuang YQ. Screening of antagonistic bacteria and potential biocontrol evaluation[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(2): 565-571 (in Chinese)
杨敬辉, 文平兰, 庄义庆. 颞颥细菌的筛选及生防潜能评估[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 565-571
- [37] Wu HL, Liu WC, Dong D, et al. Isolation and identification of an *Bacillus* strain and analysis of its antibacterial substances[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(33): 107-111 (in Chinese)
吴慧玲, 刘伟成, 董丹, 等. 一株生防细菌的分离鉴定及其抑菌活性物质的分析[J]. 中国农学通报, 2012, 28(33): 107-111
- [38] Zhang N, Han LR, Sun PP, et al. Screening and identification of actinomycetes on *Verticillium dahliae* from soil[J]. Acta Phytologica Sinica, 2012, 39(2): 109-114 (in Chinese)
张宁, 韩立荣, 孙平平, 等. 拮抗茄子黄萎病菌土壤放线菌的分离筛选和鉴定[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 109-114
- [39] Liang XJ, Zhang TT, Qiao JQ, et al. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against soil-borne diseases of tomato[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(3): 1096-1103 (in Chinese)
梁雪杰, 张婷婷, 乔俊卿, 等. 番茄土传病害拮抗菌的筛选、评价及鉴定[J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1096-1103
- [40] Xu LP. Screening of antagonists from pepper-associated bacteria for biological control of phytophthora blight of pepper[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese)
徐刘平. 辣椒疫霉生防细菌筛选、生防潜能评估及生物防治研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2007
- [41] Ma XF, Liu CY, Zhao KH, et al. Study on identification and control mechanism of biocontrol *Phytophthora capsici*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(10): 136-141 (in Chinese)
马晓飞, 刘长远, 赵奎华, 等. 辣椒疫病生防菌株鉴定及控病机理研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(10): 136-141
- [42] Weller DM. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of

- Phytopathology, 1988, 26: 379-407
- [43] Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219-1232
- [44] Kim HS, Sang MK, Jung HW, et al. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuae* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of Phytophthora blight of pepper[J]. Crop Protection, 2012, 32: 129-137
- [45] Chen XH, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 4024-4036
- [46] Deng JL, Liu HY, Liu YX, et al. Identification of the antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens* strain YN-1[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(2): 202-209 (in Chinese)
- 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209
- [47] Zhang RS, Wang XY, Luo CP, et al. Identification of the lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 and biocontrol efficacy of surfactin against bacterial leaf streak[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(10): 2014-2021 (in Chinese)
- 张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用[J]. 中国农业科学, 2013, 46(10): 2014-2021

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
- 王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
- 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
- 刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2015-00-00; 接受日期: 2015-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-00-00

(下转 p.1337)