

土壤芽孢杆菌分离方法的比较——以成都郊区土壤为例

龚国淑¹, 张世熔², 唐志燕³, 杨成伟¹, 徐 严¹, 张 洪¹

(¹四川农业大学农学院, 四川雅安 625014; ²四川农业大学资源环境学院, 四川雅安 625014; ³安徽合肥丰乐种业股份有限公司, 合肥 230031)

摘要:【目的】筛选一种简便、实用的从土壤中分离芽孢杆菌的方法, 初步调查成都郊区土壤芽孢杆菌资源。【方法】以稀释平板计数法为基础, 用成都郊区 20 个土样作材料, 设土壤悬液经加热和不加热分别用牛肉膏蛋白胨琼脂和麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂分离芽孢杆菌 4 种处理方法, 用“直接法-牛肉膏”、“直接法-麦芽汁”、“间接法-牛肉膏”和“间接法-麦芽汁”分别表示这 4 种处理。【结果】4 种处理测定的芽孢杆菌总数为 $(5.18 \pm 0.38) \sim (6.30 \pm 0.56) \log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$, 加热处理测定的数量显著低于不加热处理的; 用“直接法-麦芽汁”分离的芽孢杆菌种类极显著多于其它处理, 用该方法可从成都郊区分离 21 个种, 最常见种有环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、泛酸芽孢杆菌 (*B. pantothenicus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alcalophilus*) 等。用“间接法-牛肉膏”仅分离到 13 个种, 最常见种有巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、异常芽孢杆菌 (*B. insolitus*) 等。【结论】直接法-麦芽汁是分离土壤芽孢杆菌的理想方法。*B. circulans*、*B. megaterium*、*B. pantothenicus*、*B. alcalophilus*、*B. cereus*、*B. licheniformis*、*B. insolitus*、*B. subtilis*、*B. spaericus*、*B. pumilus* 等为成都市郊区土壤芽孢杆菌的主要类群, 广泛存在于区域内。

关键词: 土壤芽孢杆菌; 分离方法; 麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂; 直接法-麦芽汁; 成都郊区

A Comparative Study on Isolation Methods of *Bacillus* spp. —Taking Chengdu Suburbs Soil as an Example

GONG Guo-shu¹, ZHANG Shi-rong², TANG Zhi-yan³, YANG Cheng-wei¹, XU Yan¹, ZHANG Hong¹

(¹Agricultural College of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan; ²College of Resources and Environment of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan; ³Hefei Fengle Seed Co. Ltd., Hefei 230031)

Abstract: 【Objective】In this paper, four treatments were set up to isolate soil *Bacillus* species so that a simple, convenient and practical method can be selected. In addition, the quantity and species of *Bacillus* in Chengdu suburbs soil were also estimated. 【Method】20 soil samples were collected at 0-20 cm depth in Chengdu suburbs and the dilution plate method was used. The soil suspensions with heat treatment at 80°C for 10 min and without heat treatment were spread onto beef extract peptone agar and beef extract peptone malt extract agar to enumerate *Bacillus* spp., which were represented by four treatments of Direct Isolation Method-Beef Extract, Direct Isolation Method-Malt Extract, Indirect Isolation Method-Beef Extract and Indirect Isolation Method-Malt Extract in this study, respectively. 【Result】The quantity of total culturable *Bacillus* species ranged from $5.18 \pm 0.38 \sim 6.30 \pm 0.56 \log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$ in Chengdu suburbs soil, and those of *Bacillus* species were significantly lower in heated suspensions than in unheated ones. The differences of *Bacillus* groups were highly significant among the four treatments and the most dominant groups were estimated by Direct Isolation Method-Malt Extract. With this method, 21 species were identified in Chengdu suburbs soil, and *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pantothenicus*, *B. alcalophilus* belonged to the predominant species. However, only 13 species were got with Indirect Isolation Method-Beef Extract, and the main species were *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. insolitus*. The predominant species were significantly different between Direct Isolation Method-Malt Extract and Indirect Isolation Method-Beef Extract. 【Conclusion】Direct Isolation Method-Malt Extract is the best

收稿日期: 2007-11-22; 接受日期: 2008-04-01

基金项目: 四川省教育厅项目 (01LA02, 2004A2002), 四川农业大学校科技基金 (1301)

作者简介: 龚国淑 (1964-), 女, 四川泸县人, 教授, 博士, 研究方向为植物病理学和微生物生态学。E-mail: guoshugong@126.com

one of the four treatments, and suitable to isolate soil *Bacillus* species. The result shows that *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. pantothenicus*, *B. alcalophilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. insolitus*, *B. subtilis*, *B. spaericus*, *B. pumilus* are the main *Bacillus* species that distributed frequently in Chengdu suburbs soil.

Key words: Soil *Bacillus* spp.; Isolation methods; Beef extract peptone malt extract agar; Direct isolation method-malt extract; Chengdu suburbs

0 引言

【研究意义】芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 是土壤中常见的细菌类群, 在土壤生态系统中占有重要地位, 在农业^[1-6]、工业^[6]、医药^[6]、卫生^[6]、环保^[7]等领域具有广泛的用途。【前人研究进展】目前, 土壤芽孢杆菌分离方法主要有两种, 一种是根据在平板上所生长的菌落, 鉴定出芽孢杆菌^[5,7-9], 该方法主要问题是由于微生物种群繁多, 会影响分离结果; 另一种是先加热以杀死非芽孢细菌, 再根据菌落特征, 分离出芽孢杆菌, 该方法简单易行, 是目前常用的方法^[10-14], 筛选一些特殊芽孢杆菌时多用此方法^[15-18]。用于分离芽孢杆菌的培养基有多种, 主要包括牛肉膏蛋白胨琼脂^[8,12-14]、麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂^[11,19,20]、胰蛋白血清琼脂培养基 (tryptose blood agar base)^[10]等, 由于前两种成分简单, 制作方便, 故应用最普遍。从用牛肉膏蛋白胨琼脂分离的情况看, 唐志燕等^[8]研究表明成都郊区土壤芽孢杆菌为 $7.87 \log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$, 主要有巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、球形芽孢杆菌 (*B. spaericus*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 和环状芽孢杆菌 (*B. circulans*) 等; 刘秀花等^[12]分离河南土壤的结果表明覃状芽孢杆菌 (*B. mycoides*)、蜡状芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、坚强芽孢杆菌 (*B. firmus*)、巨大芽孢杆菌等检出率较高; Nishijima 等^[13]发现日本耕作土壤中芽孢杆菌数量约 $6.4 \sim 7.4 \log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$, *B. megaterium*、*B. cereus*、*B. niacini* 为主要种。用麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂分离芽孢杆菌的报道较少, 如张华勇等^[11]分析了不同生态下红壤中的芽孢杆菌, 发现巨大芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌在林地、旱地、水田中比较常见, 没有报道其数量状况。单娜娜等^[19]研究表明, 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤中芽孢杆菌数量较低, 最高只达 10^5 ($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry soil}$) 个数量级。【本研究切入点】综上所述, 有关土壤芽孢杆菌的分离培养方法不少, 如杨自文等^[21]报道加入抗生素, 能显著地提高醋酸钠方法分离苏云金杆菌效率。由于研究区域生态条件差异

较大, 即使采用同样的方法获得的结果也大不相同, 不同的方法所得结果可能存在更大的差异。另外, 由于芽孢杆菌的分离鉴定工作繁琐, 目前还没有任何一种培养方法能探明所有种类, 因而需要寻找一种简便、实用的分离培养方法, 用以研究土壤中芽孢杆菌资源和多样性。【拟解决的关键问题】成都市郊区属成都平原的中心区域, 是四川省重要的农业生产基地, 土地肥沃, 土壤芽孢杆菌资源丰富, 约占细菌总数的 25.3%^[8]。本文以成都郊区土壤为材料, 比较了加热和不加热处理土壤悬液两种处理方式, 以及牛肉膏蛋白胨琼脂和麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂培养基两种培养基分离芽孢杆菌的效果, 以期寻找简易的分离土壤芽孢杆菌方法, 并初步调查了成都郊区土壤的芽孢杆菌资源, 为进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样点的设计与样品的采集

于 2002 年 9 月在成都市郊区, 根据土壤类型、土地利用方式和耕作制度等差异, 随机采集 0~20 cm 耕层土样 20 个 (表 1), 每个样品由 5 点混合而成, 土样装入洁净塑料袋带回室内进行分离。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂、麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂, 参照文献^[20]配制。

1.3 芽孢杆菌的分离、计数

称取 10 g 土壤于 90 ml 无菌水中, 按照 10 倍稀释法配制成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 系列土壤悬液, 其中 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 悬液 80℃ 水浴中保持 10 min 以杀死非芽孢杆菌, 而 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 悬液不进行加热处理。吸取系列悬液 0.1 ml 3 份, 分别涂抹于牛肉膏蛋白胨和麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上 28℃ 下培养 3~4 d。根据菌落形状、大小、颜色等特征进行初步归类, 每一类随机挑取 3~5 个单菌落划线纯化, 并制成菌悬液置于 80℃ 水浴中处理 10 min, 仍能成活的菌株经芽孢染色验证后保存于 5℃ 冰箱中备用。

1.4 芽孢杆菌的分类与鉴定

各菌株在牛肉膏蛋白胨琼脂上 28℃ 培养 3~4 d,

表 1 土壤样品来源

Table 1 The origins of soil samples

样点号 Plot no.	采样点 Distribution of samples	样点号 Plot no.	采样点 Distribution of samples
1	新都大丰乡蒲家 1 组 Dafeng in Xindu Count	11	金牛区洞子口友联 7 组 Dongzikou in Jinniu District
2	双流县永福乡 13 大队 2 组 Yongfu in Shuanliu Count	12	金牛区赖家店朱家坡 2 组 Laijiadian in Jinniu District
3	金牛区天回乡土门 1 组 Tianhui in Jinniu District	13	成华区新山 2 组 Xinshan in Chenghua District
4	金牛区石羊乡清河 8 组 Shiyang in Jinniu District	14	成华区保合胜利 Baohe in Chenghua District
5	金牛区簇桥乡凉水井 9 组 Cuqiao in Jinniu District	15	金牛区龙潭同乐 1 组 Longtan in Jinniu District
6	锦江区万象寺 Wanxiangsi in JinJiang District	16	金牛区苏坡中坝村 4 组 Supo in Jinniu District
7	郫县犀浦 17 大队 1 队 Xipu in Pixian Count	17	龙泉驿区洪河公社百合 2 组 Honghe in Longquanyi District
8	金牛青龙西林村五队 Qinglong in Jinniu District	18	双流县中和朝阳 4 组 Zhonghe in Shuanliu Count
9	武侯区玻璃场 8 大队 2 队 Bolichang in Wuhou District	19	双流金桥镇昆山村 Jinqiao in Shuanliu Count
10	锦江区三圣乡 Sansheng in JinJiang District	20	郫县唐昌镇战旗村 Tangchang in Pixian Count

根据形态特征进行初步分类，获得各处理每样品的类群数量。需要鉴定到种的菌株，通过形态学观测和生理生化试验后，与文献[22]、[23]所列种类的特征逐一比较鉴定到种，暂时不能确定的视为未知种。

1.5 数据的处理与统计分析

参考文献[24]所得结果用烘干土壤质量表示 ($\log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{dry soil}$)。采用 SPSS12.0 软件包中的单因素方差分析 (ANOVA) 进行显著性检验，如必要再进行

多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同分离方法对测定土壤芽孢杆菌数量的影响

采用单一样本 K-S 检验的结果 (表 2) 表明，20 个土样的芽孢杆菌总数量和类群数呈正态分布。其总数约为 $10^5 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{dry soil}$ ，土壤悬液加热处理显著地降低了测定的芽孢杆菌数量，但培养基成分对测定结

表 2 不同分离方法下土壤芽孢杆菌总数和类群的统计特征

Table 2 Statistical characters of quantity and groups of *Bacillus* in Chengdu suburbs under different isolation methods

项目 Items	分离方法 Isolation methods	样点数 Sampling No.	分布类型 Distribution type	总数 Quantity ($\log \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1} \text{dry soil}$)			标准差 SD	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	
				最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Mean				
总数 Quantity	直接法-牛肉膏 Direct isolation method-beef extract	20	正态 Normal	4.23	6.40	5.30Aa	0.57	0.248	0.155	
	直接法-麦芽汁 Direct isolation method-malt extract	20	正态 Normal	4.41	5.93	5.18Aa	0.38	0.052	-0.146	
	间接法-牛肉膏 Indirect isolation method-beef extract	20	正态 Normal	4.92	7.11	6.12Bb	0.58	-0.344	-0.049	
	间接法-麦芽汁 Direct isolation method-malt extract	20	正态 Normal	5.23	7.45	6.30Bb	0.56	-0.352	0.505	
	类群 Groups No.	直接法-牛肉膏 Direct isolation method-beef extract	20	正态 Normal	4	8	6.60Aa	1.23	-0.444	-0.735
		直接法-麦芽汁 Direct isolation method-malt extract	20	正态 Normal	5	10	7.55Bb	1.40	0.145	-0.648
间接法-牛肉膏 Indirect isolation method-beef extract		20	正态 Normal	1	5	2.45Cc	0.95	0.992	1.712	
间接法-麦芽汁 Direct isolation method-malt extract		20	正态 Normal	3	6	4.65Dd	0.88	-0.250	-0.337	

多重比较采用最小显著差数法 (LSD)，小写字母代表 0.05 显著水平，大写字母代表 0.01 显著水平，处理之间有相同字母者差异不显著 Lowercase represent $\alpha=0.05$, capital letter represent $\alpha=0.01$; Average values followed by the same letter in the table are not different at $\alpha=0.05$ or $\alpha=0.01$ using LSD test; SD Standard deviation

果没有显著的影响。

不同方法所检测到的芽孢杆菌类群差异很大, 最少的平均只有 (2.45±0.95) 个类群, 最多的有 (7.55±0.00) 个类群。土壤悬浮液加热处理显著减少了芽孢杆菌类群, 麦芽汁培养基可获得更多的类群 (表 2)。

2.2 不同分离方法对分离土壤芽孢杆菌类群的影响

从表 3 可知, 不加热处理的土壤悬浮液 (间接法-牛肉膏) 分离鉴定出 13 个种 (其中 1 个未知种), 而加热处理 (直接法-麦芽汁) 则获得 21 个种 (其中 5 个未知种)。“间接法-牛肉膏”分离的最常见种有巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)、异常芽孢杆菌 (*B. insolitus*) 等; 常见种有环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢

杆菌 (*B. licheniformis*)、球形芽孢杆菌 (*B. spaericus*) 等; 而缓病芽孢杆菌 (*B. lentimorbus*)、泛酸芽孢杆菌 (*B. pantothenicus*)、巴氏芽孢杆菌 (*B. pasterurii*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alcalophilus*) 等属少见种, 偶有分离。唐志燕等^[8]也分离到这些种, 但与其优势种组成不同。

“直接法-麦芽汁”分离的最常见种有环状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、泛酸芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌等; 常见种有覃状芽孢杆菌 (*B. mycooides*)、短小芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、圆孢芽孢杆菌 (*B. globisporus*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、异常芽孢杆菌、海洋芽孢杆菌 (*B. marinus*) 等; 而假覃状芽孢杆菌 (*B. pseudomycooides*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) 和一些未知种属少见种, 分离频度很低。

表 3 两种方法从成都郊区土壤中分离的芽孢杆菌

Table 3 The main species of soil *Bacillus* in Chengdu suburbs under two isolation methods

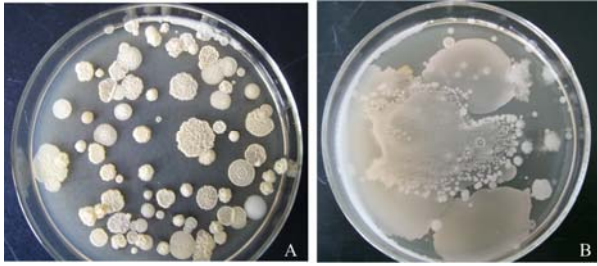
类群 <i>Bacillus</i> species	直接法-麦芽汁 Direct isolation method-malt extract		间接法-牛肉膏 Indirect isolation method-beef extract	
	百分率 Percentage (%)	分离频度 Frequency	百分率 Percentage (%)	分离频度 Frequency
环状芽孢杆菌 <i>B. circulans</i>	25.44	0.94	3.41	0.30
巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	13.03	0.94	35.40	0.45
泛酸芽孢杆菌 <i>B. pantothenicus</i>	11.82	0.17	0.33	0.05
嗜碱芽孢杆菌 <i>B. alcalophilus</i>	10.33	0.39	0.07	0.05
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	8.36	0.44	1.39	0.20
球形芽孢杆菌 <i>B. spaericus</i>	5.90	0.44	2.50	0.30
短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	3.53	0.44	13.38	0.30
蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	3.20	0.78	22.66	0.35
地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i>	1.97	0.61	0.97	0.10
覃状芽孢杆菌 <i>B. mycooides</i>	0.42	0.33	/	/
圆孢芽孢杆菌 <i>B. globisporus</i>	0.11	0.06	/	/
凝结芽孢杆菌 <i>B. coagulans</i>	1.12	0.17	/	/
假覃状芽孢杆菌 <i>B. pseudomycooides</i>	0.20	0.22	/	/
苏云金芽孢杆菌 <i>B. thuringiensis</i>	0.02	0.06	/	/
异常芽孢杆菌 <i>B. insolitus</i>	2.37	0.17	18.85	0.05
海洋芽孢杆菌 <i>B. marinus</i>	0.93	0.11	/	/
缓病芽孢杆菌 <i>B. lentimorbus</i>	/	/	1.98	0.05
巴氏芽孢杆菌 <i>B. pasterurii</i>	/	/	0.88	0.05

“/”表示由于未分离到相应的种而缺乏数据 “/” represent no data because the related species was not isolated

2.3 培养基对分离计数的影响

图是土壤悬液热处理后在 2 种培养基上的菌落生长情况。在麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂 (图-A) 上, 芽孢杆菌的菌落不扩散, 且菌落特征比较典型和稳定; 而在牛肉膏蛋白胨琼脂 (图-B) 上则相反, 菌落易扩散连成一片, 对计数和初步鉴定均不利。分离计数工

作中为了克服菌落扩散现象, 制作平板时要求去除表面微量的冷凝水, 不仅烦琐, 且易污染, 使用牛肉膏蛋白胨琼脂分离时即使除去表面凝固水, 也不能完全解决菌落扩散的问题, 而用麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂则无需去除表面凝固水。可见, 麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂更适合用于芽孢杆菌的分离计数。



A: 麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂培养基; B: 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基
A: Beef extract peptone-malt extract(BPMA) agar medium; B: Beef extract peptone agar (BPA) medium

图 芽孢杆菌在不同培养基上的菌落特征

Fig. Colony characteristics of *Bacillus* spp. in different media

3 讨论

土壤芽孢杆菌数量差异很大, 农田土壤一般为 $3\sim 6 \log \text{ cells}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh soil^[25,26], 笔者的测定结果也在此范围之内。测定方法是影响测定结果的主要因素, 许光辉等^[20]认为, 在加热过程中会杀死营养型芽孢杆菌, 降低测定结果, 笔者也得到类似的结果。但由于热处理杀死了非芽孢杆菌, 可适当降低稀释度, 从而简化了分离和鉴定工作, 所以该程序仍被广泛采用^[11~18]。培养基成分对测定结果也有一定的影响, 特别是显著地影响到种群数量, 用麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂极显著高于牛肉膏蛋白胨琼脂分离的种群数量。

至今没有一种方法能真正测定土壤中芽孢杆菌的实际数量和类群。分子生物学方法已用于检测芽孢杆菌, 不仅可以分析易培养类群, 还能揭示许多难培养物种, 而且揭示的优势类群有时可能与常规分离法不同^[25,26]。但由于分子检测法未得到纯培养物, 故不利于芽孢杆菌的进一步开发应用, 本文的“直接法-麦芽汁”在分离计数中显示了较强的优势, 简便实用, 可广泛用于土壤芽孢杆菌的资源研究。

4 结论

芽孢杆菌的总数量与土壤悬液是否加热有关, 热处理后测定的数量显著低于非热处理的; 培养基种类对计数和鉴定有影响, 用麦芽汁培养基分离得到的菌落直观、分散, 易于计数, 而且鉴定的类群明显比其它方法多。从分离鉴定的整个过程看, 土壤悬液热处理后采用麦芽汁牛肉膏蛋白胨琼脂培养基分离最适宜, 程序简单, 计数方便, 鉴定的类群多。

成都市郊区土壤芽孢杆菌数量约为 $5 \log \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ dry

soil, 不同方法分离和鉴定的类群数和优势种有显著差异, “直接法-麦芽汁”可分离 21 个种, 反映出成都平原土壤蕴藏着极丰富的芽孢杆菌种群资源, 尚待进一步研究。

References

- [1] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
Chen Z Y, Zhang J, Huang D F. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(2):97-103. (in Chinese)
- [2] 范青, 田世平, 李永兴, 汪沂, 徐勇, 李久蒂. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)B-912 对采后柑桔果实青、绿霉病的抑制效果. 植物病理学报, 2000, 30(1): 343-348.
Fan Q, Tian S P, Li Y X, Wang X, Xu Y, Li J D. Postharvest biological control of green mold and blue mold of citrus fruit by *Bacillus subtilis*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30(1): 343-348. (in Chinese)
- [3] 黎起秦, 林纬, 陈永宁, 彭好文, 蒙姣荣, 韦绍兴. 芽孢杆菌对水稻纹枯病的防治效果. 中国生物防治, 2000, 16(4): 160-167.
Li Q Q, Li W, Chen Y N, Peng H W, Meng J R, Wei S X. Biological control of sheath blight of rice by *Bacillus* sp. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16(4): 160-162. (in Chinese)
- [4] 林启美, 饶正华, 孙焱鑫, 张有山, 姚军, 刑礼军. 一株胶质芽孢杆菌 RBC13 的解磷解钾作用. 华北农学报, 2000, 15(4): 116-119.
Lin Q M, Rao Z H, Sun Y X, Zhang Y M, Yao J, Xing L J. Dissolving P and K by a Strain of *Bacillus mucilaginosus* RBC13. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*, 2000, 15(4): 116-119. (in Chinese)
- [5] 于翠, 吕德国, 秦嗣军, 杜国栋. 本溪山樱根际与非根际解磷细菌群落结构及动态变化. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2381-2384.
Yu C, Lü D G, Qin S J, Du G D. Community structure and its dynamics of phosphobacteria in *Cerasus sachalinensis* rhizosphere and nonrhizosphere. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(12): 2381-2384. (in Chinese)
- [6] 张华勇, 李振高. 土壤芽孢杆菌及其资源的持续利用. 土壤, 2001, (2): 92-96.
Zhang H Y, Li Z G. Resources and the sustainable utilization of *Bacillus* species in soil. *Soil*, 2001, (2): 92-96. (in Chinese)
- [7] 杨妹倩, 李素玉, 李法云, 谯兴国, 罗岩, 张志琼. 沈抚污灌区结冻土壤中微生物群落及石油烃优势降解菌的筛选. 气象与环境学报, 2006, 22(3): 54-56.
Yang S Q, Li S Y, Li F Y, Qiao X G, Luo Y, Zhang Z Q. Microbial population and screening of predominant strains for petroleum biodegradation in freezing soils of Shenfu wastewater irrigation area. *Journal of Meteorology and Environment*, 2006, 22(3): 54-56. (in Chinese)

- [8] 唐志燕, 龚国淑, 刘 萍, 邵宝林, 张世熔. 成都市郊区土壤芽孢杆菌的初步研究. 西南农业大学学报, 2005, 27(2): 188-192.
Tang Z Y, Gong G S, Liu P, Shao B L, Zhang S R. A preliminary study of soil *Bacillus* in the suburbs of Chengdu. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2005, 27(2): 188-192. (in Chinese)
- [9] 朱万泽, 王金锡, 张秀艳, 李登煜, 蔡小虎. 华西雨屏区不同恢复阶段湿性常绿阔叶林的土壤微生物多样性. 生态学报, 2007, 27(4): 1387-1396.
Zhu W Z, Wang J X, Zhang X Y, Li D Y, Cai X H. The diversity of soil microorganism during different recovery phases of moist evergreen broad-leaved forest in the rainy zone of west China. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(4): 1386-1396. (in Chinese)
- [10] Pantastico-Caldas M, Duncan K E, Istock C A. Population dynamics of Bacteriophage and *Bacillus subtilis* in soil. *Ecology*, 1992, 73(5): 1888-1902.
- [11] 张华勇, 李振高, 王俊华, 潘映华. 红壤生态系统下芽孢杆菌的物种多样性. 土壤, 2003, (1): 45-47.
Zhang H Y, Li Z G, Wang J H, Pan Y H. Diversity of *Bacillus* species in different red soil eco-system. *Soil*, 2003, (1):45-47. (in Chinese)
- [12] 刘秀花, 梁 峰, 刘 茵, 翟兴礼. 河南省土壤中芽孢杆菌属资源调查. 河南农业科学, 2006, (8): 67-71.
Liu X H, Liang F, Liu Y, Zhai X L. Genus *Bacillus* resource of soil in Henan Province. *Henan Agricultural Science*, 2006, (8): 76-71. (in Chinese)
- [13] Nishijima T, Toyota K, Mochizuki M. Predominant culturable *Bacillus* species in Japanese arable soils and their potential as biocontrol agents. *Microbes Environment*, 2005, 20(1): 61-68.
- [14] 韩玉竹, 陈秀蓉, 王国荣, 杨成德, 徐长林. 东祁连山高寒草地土壤微生物分布特征初探. 草业科学, 2007, 24(4): 14-18.
Han Y Z, Cheng X R, Wang G R, Yang C D, Xu C L. Distribution characteristics of soil micro-organism in alpine grassland of Eastern Qilian Mountains. *Pratacultural Science*, 2007, 24(4): 14-18. (in Chinese)
- [15] 戴莲韵, 王学聘, 杨光滢, 张万儒. 我国森林土壤中苏云金芽孢杆菌生态分布的研究. 微生物学报, 1994, 34(6): 449-456.
Dai L Y, Wang X P, Yang G Y, Zhang W R. Ecology distribution of *Bacillus thuringiensis* in forest soil in China. *Acta Microbiologica Sinica*, 1994, 34(6): 449-456. (in Chinese)
- [16] 罗 兰, 谢丙炎, 袁忠林, 杨芝为. 我国土壤中苏云金芽孢杆菌的分离与基因型鉴定. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 756-759.
Luo L, Xie B Y, Yun Z L, Yang Z W. Identification of cry-type gene and isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil in China. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(6): 756-759. (in Chinese)
- [17] Vilas-Bôas G T, Franco Lemos M V. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(8): 605-613.
- [18] Quesada-Moraga E, Garcia-Tovar E, Valverde-Garcia P, Santiago-Alvarez. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soil in Spain. *Microbiological Research*, 2004, 159(1): 59-71.
- [19] 单娜娜, 潘伯荣, 文启凯, 罗 明, 赖 波. 塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤微生物生态学特性研究. 干旱区研究, 2001, 18(4): 52-56.
Shan N N, Pan B R, Wen Q K, Luo M, Lai B. Study on the ecological characteristics of soil-inhabiting microorganisms of the artificial vegetation in the hinterland of Taklamakan Desert. *Arid Zone Research*, 2001, 18(4): 52-56. (in Chinese)
- [20] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986: 103-105.
Xu G H, Zheng H Y. Analysis handbook of soil microorganism. Beijing: China Agriculture Press, 1986: 103-105. (in Chinese)
- [21] 杨自文, 吴宏文, 王开梅, 谢天健, 钟连胜, 岳书奎. 从土壤中高效分离苏云金杆菌的方法. 生物防治, 2000, 16(1): 26-30.
Yang Z W, Wu H W, Wang K M, Xie T J, Zhong L S, Yue S K. Method for highly efficient isolation of *Bacillus thuringiensis* from soil. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16(1): 26-30. (in Chinese)
- [22] 戈登 R E, 海恩斯 W C, 帕格 C H N. 芽孢杆菌属. 北京: 中国农业出版社, 1983.
Gordon R E, Haynes W C, Pang C H N. *The Genus Bacillus*. Beijing Agricultural Press, 1983. (in Chinese)
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 43-65.
Dong X Z, Cai M Y. Handbook of the main bacteria identified systems. Beijing: Science Press, 2001: 43-65. (in Chinese)
- [24] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002: 69-72, 233-235.
Zhao B, He S J. *Experiment of Microbiology*. Beijing: Science Press, 2002: 69-72, 233-235. (in Chinese)
- [25] Garbeva, P, van Veen J A, van Elsas J D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 2003, 45(3): 302-316.
- [26] McSpadden Gardener B B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 2004, 94: 1252-1258.

(责任编辑 毕京翠)