

拮抗放线菌 S24 的鉴定及其对黄曲霉的抑制作用

周启升¹ 孙长坡² 张楠³ 仇念全¹ 曹宁宁¹ 张本峰¹ 刘训理^{1*}

(1. 山东农业大学林学院 山东 泰安 271018)

(2. 国家粮食局科学研究院 北京 100037)

(3. 山东农业大学生命科学学院 山东 泰安 271018)

摘要: 以黄曲霉(*Aspergillus flavus*)为靶标, 从泰山土壤中分离获得一株对黄曲霉、赭曲霉、黑曲霉等粮食和饲料中常见的曲霉菌有高效拮抗活性的放线菌 S24。根据其形态特征、培养特征、理化性质、细胞壁组份及 16S rRNA 序列分析, 初步判定该菌株为链霉菌属中的白网链霉菌(*Streptomyces albireticuli*)的近似种; 该菌株抗菌谱广, 胞外抗菌物质对热稳定, 100°C 加热 100 min 抗菌活性无明显变化; 96 孔板法测得其胞外抗菌物质粗提物对黄曲霉的最小抑/杀菌浓度(MIC/MFC)分别为 19.53 µg/mL 和 39.06 µg/mL。

关键词: 黄曲霉, 白网链霉菌, 鉴定, 最小抑/杀菌浓度

Identification of Actinomycete Strain S24 and Its Antagonistic Effects on *Aspergillus flavus*

ZHOU Qi-Sheng¹ SUN Chang-Po² ZHANG Nan³ QIU Nian-Quan¹
CAO Ning-Ning¹ ZHANG Ben-Feng¹ LIU Xun-Li^{1*}

(1. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

(2. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

(3. College of Life Science, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

Abstract: Taking *Aspergillus flavus* as the target, Actinomycetes S24 isolated from Mountain Tai soil showed strong antagonistic activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus alutacells* and the other common *Aspergillus* in food and feed. Based on its morphologic, culture, physiological and biochemical characteristics, chemotaxonomy as well as 16S rRNA sequence analysis, strain S24 was placed within the genus *Streptomyces* and identified as a similar species with *Streptomyces albireticuli*, which had a broad inhibition spectrum and its fermentation characteristics were outstanding. The antibacterial substance was stable. Deposited for 100 min at 100°C, there was no obvious influence on its antibacterial activity. Assay using 96-well plate illustrated that the minimum inhibitor concentration (MIC) and minimum antifungal concentration (MFC) of extracellular crude antibacterial extracts against *A. flavus* were 19.53 µg/mL and 39.06 µg/mL, respectively.

Keywords: *Aspergillus flavus*, *Streptomyces albireticuli*, Identification, MIC/MFC

* 通讯作者: Tel: 86-538-8249131; ✉: xlliu@sdau.edu.cn

收稿日期: 2009-05-19; 接受日期: 2009-08-21

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)属曲霉属真菌,是引起粮食霉变的主要真菌之一,在自然界中广泛存在,粮食和饲料在储藏过程中易受其污染^[1]。近年来,由于黄曲霉污染粮食和饲料所导致的人畜曲霉病病例越来越多^[2-4],而黄曲霉最大的危害是其产生的次级代谢物黄曲霉毒素(Aflatoxins),黄曲霉毒素具有诱导突变、抑制免疫和致癌作用,1993年国际癌症组织(IARC)将其确定为一级致癌物质^[5]。

对黄曲霉及其毒素的危害,国内外研究者较多集中在毒素脱毒技术的改进及检测方法的优化等方面^[6],近几年关于植物源与微生物源活性物质对黄曲霉及其毒素的防治正不断引起人们的重视,相关的报道也逐渐增多。Vargas等^[7]从药用植物三齿拉瑞阿(*Larrea tridentata*)中分离到对黄曲霉产生明显抑制作用的活性物质,研究发现该活性物质的主要成分为木质素类;Sanchez等^[8]利用不同溶剂提取舌兰属植物 *Agave asperrima* 和 *Agave striata* 的活性物质发现,乙醇、甲醇和水萃取物均能抑制黄曲霉在玉米上的生长及毒素的产生;Klich^[9]从低海拔沙漠棉花地分离到多种能抑制黄曲霉的真菌;Yadav等^[10]报道,一株大肠杆菌(*Escherichia coli*)的发酵液能抑制黄曲霉孢子萌发;章挺^[11]等从油菜地分离到一株枯草芽孢杆菌,对黄曲霉表现出强烈的拮抗作用,其抗菌物质粗提物对黄曲霉的最低抑菌浓度为 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$;Roy等^[12]在干酪和未加工的牛奶上筛选到 6 个乳酸菌表现出对黄曲霉的抑制活性,其中活性最强的一株菌的发酵液对黄曲霉的抑菌圈为 15 mm~19 mm,拮抗成分表现出蛋白质性质。从粮食及饲料安全角度考虑利用微生物之间的拮抗作用及探索生物控制方法来预防黄曲霉的生长与产毒具有重要意义。本研究以黄曲霉为靶标,从泰山土壤中分离获得一株对黄曲霉有高拮抗活性的放线菌 S24,通过形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁组分及 16S rRNA 序列的分析对该菌进行了鉴定,并对其抗菌谱及抗菌物质粗提物的抑菌效果进行了测定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株:放线菌 S24 由本实验室从泰山林地土壤中分离获得;供试病原菌:黄曲霉(*Aspergillus flavus* CGMCC3.2890),黑曲霉

(*Aspergillus niger* CGMCC3.6478),赭曲霉(*Aspergillus alutaceus* CGMCC3.1409),烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* CGMCC3.3552),由国家粮食局科学研究院提供。

1.1.2 培养基:高氏一号培养基:可溶性淀粉 10.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, KNO_3 1.0 g,琼脂 15.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, pH 7.2~7.4,蒸馏水 1000 mL。改良 PDA 培养基:马铃薯 200 g,牛肉膏 5.0 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, MgSO_4 1.0 g, KH_2PO_4 0.6 g, CaCO_3 3.0 g, pH 6.8~7.2,蒸馏水 1000 mL。抗菌物质生物活性检测培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g, MgSO_4 1.0 g, KH_2PO_4 0.6 g, pH 6.8~7.2,蒸馏水 1000 mL。S24 菌株发酵培养基:葡萄糖 16.0 g,可溶性淀粉 2.5 g,蛋白胨 10 g,黄豆饼粉 26 g,玉米浆 1.0 g, NaCl 7.5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.0 g,自然 pH,蒸馏水 1000 mL。

1.1.3 主要试剂和仪器:菌株 DNA 提取、PCR 扩增试剂及药敏培养液制备试剂购自上海生物工程有限公司;凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物工程有限公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。SPX 型智能生化培养箱;Olympus 光学显微镜;美国 Bio-Rad 公司 PTC-200 型 PCR 仪和 Lab Assistant Gel 3000 Series 凝胶成像分析系统;HZQ-F160 全温振荡培养箱;Heraeus 台式高速冷冻离心机。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的鉴定:形态学观察:将 S24 菌株划线接种于高氏一号培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 插片培养 7 d~14 d,取片,显微镜下观察菌体的形态特征。

培养特征和生理生化特征分析:参照《链霉菌鉴定手册》,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d~14 d 后观察记录特征^[13]。

细胞壁化学成分分析:采用快速薄板层析法(TCL)^[14]分析细胞壁氨基酸和糖型。

16S rRNA 序列测定和系统发育分析:基因组总 DNA 的提取及 16S rRNA 片段的扩增均参照文献[15,16]的方法。16S rRNA 全序列扩增采用扩增细菌 16S rRNA 的一对保守引物,正向引物 16Sf: AGA GTTTGATCCTGGCTCAG;反向引物 16Sr: ACG GCTACCTTGTTACGACT,这对引物可扩增约 1.6 kb,PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,选取 DL2000 为 Marker。扩增产物经 U-GENE 胶回收试剂盒纯化后,电泳检测送上海生工测序,将所得序

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

列与 GenBank 数据库中序列进行 Blast 分析对比, 并选取相似性较高的菌株, 用 Mega4.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树和同源性比较。

1.2.2 抗菌谱的测定: 将指示真菌菌盘接种在平板中央, 距中央 2 cm 处接种 S24 菌株, 28°C 培养 96 h 后, 观察抑菌情况, 测量抑菌带宽度, 拍照记录。

1.2.3 抗菌物质粗提物的制备: 发酵培养基 1×10^5 Pa 湿热灭菌 20 min, 取一个 S24 菌株圆形菌块(直径 8 mm)接种到 50 mL/250 mL 三角瓶中, 200 r/min, 30°C 振荡培养 48 h。发酵液 1×10^4 Pa 灭菌 10 min, 低速大容量多管离心机 4200 r/min, 离心 30 min, 上清液经吸附树脂吸附后解吸, 洗脱液经旋转蒸发、冷冻干燥得到抗菌物质粗提物。

1.2.4 抗菌物质效价的生物测定: 生物活性检测平板的制备: 生测培养基融化后, 温度降至 50°C~55°C 时, 加入黄曲霉孢子悬液, 使黄曲霉孢子终浓度为 2×10^4 CFU/mL~ 4×10^4 CFU/mL, 将培养基孢子悬液倒入直径为 90 mm 的无菌培养皿中, 20 mL/培养皿, 制成混菌平板, 冷凝后备用。在每个平板上等距离均匀放置牛津杯(内径 $6 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$, 高 $10 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$, 外径 $8 \text{ mm} \pm 0.1 \text{ mm}$)6 个。向每个杯中准确加入 250 μL 不同浓度的标准液, 每个浓度设 3 个重复。25°C 培养 18 h 后用游标卡尺测量抑菌圈直径。

抗菌物质效价生物测定工作曲线的制作: 准确称取抗菌物质粗提物配制成浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、150 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、300 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 进行生物测定。以抗菌物质粗提物浓度的对数值为横坐标, 以抑菌圈直径为纵坐标制作的标准曲线如图 1 所示。可见, 浓度的对数值与抑菌圈直径呈线性关系, 其决定系数 $R^2 = 0.9968$, 可以满足效价测定的要求。由此, 得到

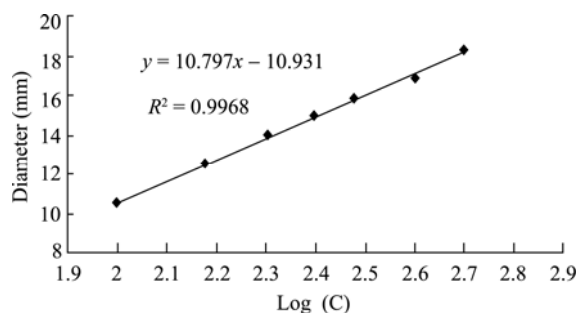


图 1 杯碟法测定效价工作曲线

Fig. 1 The curve for working of portency mensuration by means of cylinde-plate method

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

抗菌物质效价计算方程: $Y = 10^{(x+10.931)/10.797} \times n$ [Y : 抗菌物质效价($\mu\text{g/mL}$); x : 抑菌圈直径($10.5 \text{ mm} < x < 18.0 \text{ mm}$); n : 稀释倍数]。

1.2.5 抗菌物质对温度的敏感性试验: 配制浓度为 5000 $\mu\text{g/mL}$ 的抗菌物质水溶液, 分别经 100°C 水浴处理 10 min、20 min、40 min、60 min、80 min、100 min 及 1×10^5 Pa 处理 15 min。用无菌水稀释至合适浓度, 利用杯碟法测定其效价。比较活性物质效价的变化。

1.2.6 抗菌物质对黄曲霉最小抑/杀菌浓度(MIC 和 MFC)的测定: 药敏平板的制备: 取无菌 96 微孔板, 第 1 孔加入 150 μL 的 RPMI-1640 培养液作为阴性对照, 第 2~11 孔分别加入 75 μL RPMI-1640 培养液 2 倍稀释的抗菌物质溶液, 使各孔的最终药物浓度为: 2500 $\mu\text{g/mL}$ 、1250 $\mu\text{g/mL}$ 、625 $\mu\text{g/mL}$ 、312.5 $\mu\text{g/mL}$ 、156.25 $\mu\text{g/mL}$ 、78.13 $\mu\text{g/mL}$ 、39.06 $\mu\text{g/mL}$ 、19.53 $\mu\text{g/mL}$ 、9.77 $\mu\text{g/mL}$ 、4.88 $\mu\text{g/mL}$ 。2~12 孔分别加入 1×10^4 CFU/mL~ 2×10^4 CFU/mL 病原菌菌悬液 75 μL , 12 孔再加入 75 μL RPMI-1640 培养液作为阳性对照。

MIC 和 MFC 的测定: 参照美国临床试验标准委员会(NCCLS)的《产孢丝状真菌的液基稀释抗真菌药敏试验参考方案》进行。

2 结果与分析

2.1 S24 菌株的形态学观察结果

显微镜观察 S24 菌株的菌丝及孢子丝形态, 该菌株具有丝状菌丝, 基生菌丝较平直, 气生菌丝稍有弯曲且有较多分支; 菌丝体横隔明显、能断裂成段; 孢子丝直, 二级轮生, 孢子丝成串排列, 孢子为椭圆形。

2.2 S24 菌株的培养特征和生理生化特征

S24 菌株在 8 种不同的培养基上生长及产色素情况差异较大(表 1), 其基生菌丝为以黄色为基调的多种颜色; 气生菌丝是以白色为基调的多种颜色。

生理生化试验结果(表 2)表明, 该菌株可在 15°C~37°C 环境下生长, 最适生长温度为 28°C; 存活 pH 值为 4~12, 耐盐性差, 在生长过程中可利用多种碳源, 可产生凝乳酶、淀粉水解酶、硝酸盐还原酶, 不能产生蛋白酶及纤维素酶。

2.3 S24 菌株的细胞壁化学成分分析结果

S24 菌株的细胞壁化学成分分析结果显示, 无特征性糖, 糖型 C; 含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)

表 1 菌株 S24 的培养特征
Table 1 Cultural characteristics of strain S24

培养基 Medium	气生菌丝 Color of aerial mycelium	基内菌丝 Color of substrate mycelium	可溶性色素 Color of soluble pigments	菌丝生长量 Mycelial growth
Gauze No. 1 sagers	Hoariness	Mustard	Black	+++
Inorganic salt agars	Hoariness	Bamboo palm	None	++++
Salt-starch agar	Breast white	Chorion yellow	None	+
PDA agars	Bamboo palm	Sepia ash	Coffee	++
Glucose/Asparagine agars	Lichee white	Ivoryyellow	None	+
Glycerol/Asparagine agar	Dull green	Fleet pine mist	None	++
Czapek sucrose agars	Hoariness	Clam flesh white	None	-
Oat agars	Frog flesh white	Fleet mustard	None	++

注: -: 生长缓慢; +: 稀疏; ++: 较多; +++: 较茂盛; ++++: 茂盛.

Note: -: Growth slowness; +: Sparseness; ++: More; +++: Clear flourish; ++++: Flourish.

表 2 S24 菌株的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical properties of strain S24

试验项目 Test items	结果 Results	试验项目 Test items	结果 Results
Coagulation of milk	+	Glucose	+
Starch hydrolysis	+	Fructose	+
Production of melanoid pigmen	+	Xylose	-
Growth on cellulose	-	Sucrose	+
Gelatin liquefaction	-	Rhamnose	+
Nitrate deoxidization	+	Arabinose	+
Production of H ₂ S	+	Glycerol	+
3% NaCl	+	Mannitol	+
5% NaCl	-	Inositol	-
Optimal temperature	28°C	Sorbitol	+

注: +: 该反应为阳性或能利用该糖; -: 该反应为阴性或不能利用该糖.

Note: +: Positive; -: Negative.

和甘氨酸。因此其细胞壁化学组分属于 I 型, 符合链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.4 S24 菌株的 16S rRNA 序列分析

利用 16Sf/16Sr 一对引物扩增得到的 S24 菌株 16S rRNA 序列长度大约为 1600 bp(图 2), 符合常规的 16S rRNA 序列长度。

经测序, 该菌株的 16S rRNA 核酸序列全长为 1426 bp, 将此序列注册 GenBank(登录号: FJ596182)并与数据库中的相关种进行比较, 与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属, 选取 11 株与 S24 序列相似性高的菌株进行系统发育分析, 用 Mega4.0 软件程序包中的 Neighbor-Joining 法构建以 16S rRNA 全序列为基础的系统进化树(图 3), 可以看出, S24 菌株

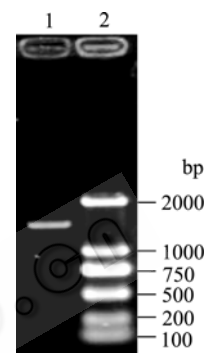


图 2 S24 菌株 16S rRNA 片段 1%琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 2 Electrophoresis result with 1% agarose gel of 16S rRNA

Note: 1: PCR Production; 2: DL2000 DNA marker.

与链霉菌属中的轮生类群处于同一大的分支, 与其中的白网链霉菌(*Streptomyces albireticuli*)进化距离最近, 相似性为 98.61%。

2.5 S24 菌株的抗菌谱测定结果

由图 4 可以看出, S24 菌株对引起粮食和饲料霉变的主要真菌(A: 黄曲霉; B: 黑曲霉; C: 烟曲霉; D: 赭曲霉)均具有较强的抑制作用, 抑菌带宽度均达 8 mm 以上。其中图 4 E 为 S24 菌株发酵液对黄曲霉的抑制效果, 其抑菌圈直径达 32 mm~33 mm。

2.6 S24 菌株抗菌物质对温度的敏感性

由图 5 可以看出, S24 菌株抗菌物质经 100°C 水浴 20 min 其效价无显著变化, 加热 40 min 后效价开始略有降低, 加热到 100 min 效价降低 18.18%, 抗菌物质经 1×10^5 Pa 高温灭菌 15 min 效价仅降低 13.97%, 说明活性物质对热比较稳定。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

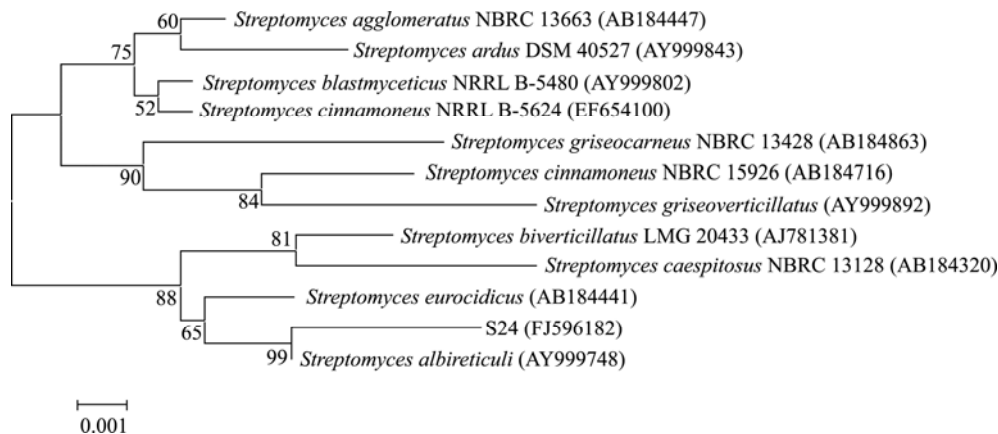


图 3 利用 16S rRNA 同源序列和邻接法(Neighbor-Joining)构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on homologous sequences of 16S rRNA and Neighbor-Joining analysis

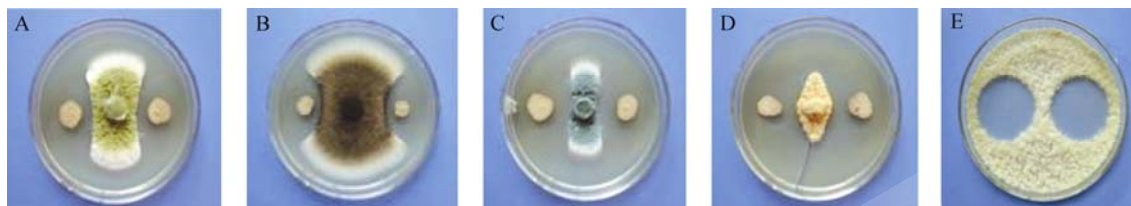


图 4 S24 菌株及其发酵液对粮食和饲料中主要真菌的抑制效果

Fig. 4 Inhibition effect of strain fermentation filtrate of S24 on major epiphyte in food and feed

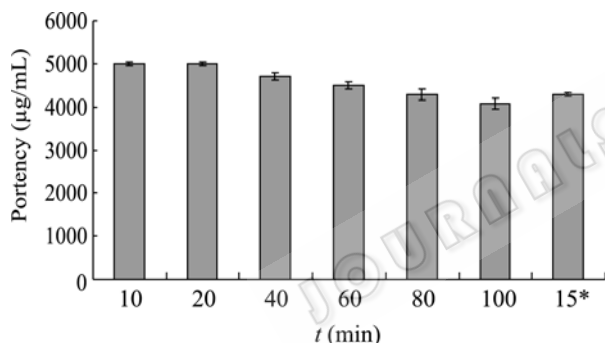


图 5 抗菌物质对热的稳定性

Fig. 5 Heat stability of antifungal active substances

注: * : 1×10^5 Pa 处理 15 min.

Note: *: 1×10^5 Pa treatment 15 min.

2.7 S24 菌株抗菌物质粗提物对黄曲霉的 MIC 和 MFC

RPMI-1640 微量液稀释法测定结果显示, S24 菌株抗菌物质粗提物在较低的浓度下就能够抑制和杀死供试病原菌, 对黄曲霉的 MIC 为 $19.53 \mu\text{g/mL}$, 取肉眼清晰的培养基液体, 即抑/杀菌级别为 0~1 的微孔培养基, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 平板涂布 PDA 培养基, 28°C 培养 48 h 后, 未发现黄曲霉菌落的生长。因此确定 S24 粗提物对黄曲霉的 MFC 为 $39.06 \mu\text{g/mL}$ 。

3 结论与讨论

有关黄曲霉拮抗菌的筛选已有较多报道, 包括有乳酸菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等, 产生的活性物质多表现出蛋白质性质, 但有些仅对黄曲霉孢子的萌发有较好的抑制作用。本研究从泰山林地土壤中筛选到多株对黄曲霉有拮抗活性的放线菌, 其中 S24 菌株对黄曲霉的抑菌活性最强。通过鉴定, S24 菌株属链霉菌属, 其形态特征和理化特性同白网链霉菌(*Streptomyces albireticuli*)基本一致, 16S rRNA 序列分析发现该菌株与白网链霉菌进化距离最近, 因此将该菌初步鉴定为白网链霉菌的近似种。但该菌在树状图上呈现为一个独立的分支, 与白网链霉菌的序列相似性为 98.61%, 因此, S24 菌株也可能为链霉菌属的一个新种, 要最终确定其分类地位, 还要进一步结合该菌株与其它典型菌株之间的 DNA-DNA 杂交实验来确定。

该菌株对黄曲霉等多种粮食和饲料霉变病原菌有强烈的拮抗活性, 抗菌谱广, 发酵液对黄曲霉的拮抗活性强烈, 抑菌圈直径达 $32 \text{ mm} \sim 33 \text{ mm}$, 抗菌物质对热稳定; 本试验用 96 孔板法测得菌株 S24 抗菌物质粗提物对黄曲霉的 MIC 和 MFC 分别

为 19.53 $\mu\text{g/mL}$ 和 39.06 $\mu\text{g/mL}$, 说明该菌株产生的抗菌物质在极低的浓度下即可达到杀菌效果, 显示了良好的应用潜力。

利用微生物活体防治黄曲霉不仅有对其释放风险的担忧, 也受释放技术及环境温度、湿度等因素的限制, 所以研究者更期望从拮抗菌中提取活性物质用于生物防治^[17]。本实验室已经完成了 S24 菌株发酵的研究, 运用筛选获得的发酵配方和条件摇瓶发酵, 发酵液效价达 9500 $\mu\text{g/mL}$, 表明该菌株发酵性状优异。对 S24 菌株产生的抗菌物质的分离纯化和结构鉴别工作正在进行中, 期望该菌株及其抗菌物质在控制粮食及饲料黄曲霉毒素污染方面能有所作为。

参 考 文 献

- [1] Bluma RV, Etcheverry MG. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section *Flavi*. *Pest Management Science*, 2006, **62**: 242–251.
- [2] Ricci RM, Evans JS, Merrert JJ, et al. Primary cutaneous *Aspergillus ustus* infection second report case. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1998, **38**: 797–798.
- [3] Van Burik JA, Colven R, Spaeh DH. Cutaneous aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, **36**: 3115–3121.
- [4] Zhang Q, Li L, Zhu M, et al. Primary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus flavus*: a case report. *Chinese Medical Journal*, 2005, **18**(3): 255–257.
- [5] Oakley EJ, Schmitt F, Jost JP, et al. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC Scientific Publication*, 1993, **56**(6): 489–521.
- [6] 熊 丽, 陆 琳, 罗 超, 等. 黄曲霉毒素的危害及检测方法的研究进展. *畜牧兽医杂志*, 2008, **27**(3): 39–41.
- [7] Vargas-Arispuro I, Reyes-Baez R, Rivera-Castaieda G, et al. Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products*, 2005, **22**: 101–107.
- [8] Sanchez E, Heredia N, Garcia IS. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, **98**: 271–279.
- [9] Klich MA. Soil fungi of some low-altitude desert cotton fields and ability of their extracts to inhibit *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 2003, **142**: 97–100.
- [10] Yadav V, Gupta J, Mandhan R, et al. Investigations on anti-*Aspergillus* properties of bacterial products. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, **41**(4): 309–314.
- [11] 章 挺, 胡梁斌, 王 飞, 等. 拮抗菌 B-FS06 的鉴定及其发酵产物对黄曲霉的抑制作用. *中国生物防治*, 2007, **23**(2): 160–165.
- [12] Roy U, Batish VK, Grover S. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, **32**: 27–34.
- [13] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975.
- [14] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004, pp.102–321.
- [15] Carl W, Gabriela S. PCR Primer: A Laboratory Manual. Beijing: *Chemical Industry Press*, 2000.
- [16] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 697–703.
- [17] Klich MA, Lax AR, Bland JM, et al. Influence of iturin A on mycelial weight and aflatoxin production by *aspergillus parasiticus* in shake culture. *Mycopathologia*, 1993, **123**: 35–38.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>