

侧孢短芽孢杆菌 AMCC 100017 的分离鉴定及其生防潜力

陈潺¹ 陈升富¹ 王建宇¹ 毛志泉² 周波^{1,3} 王冰^{1*}

(1. 山东农业大学 生命科学学院 山东 泰安 271018)

(2. 山东农业大学 园艺科学与工程学院 山东 泰安 271018)

(3. 土壤肥料资源高效利用国家工程实验室 山东 泰安 271018)

摘要:【目的】从土壤中分离、筛选和鉴定具有抑制病原真菌活性等生防效果的菌株,为进一步开发利用具有良好定殖能力的生防菌株奠定基础。【方法】利用对峙试验筛选拮抗菌并评价其拮抗性能,根据其形态特征、生理生化特性、16S rRNA 基因序列测定及 GenBank 序列相似性分析进行分离菌株的分类鉴定,并通过福林酚法测定该菌株的蛋白酶活力。【结果】从山东泰安各种类型土壤中分离得到侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*),保藏编号为 AMCC 100017。平板对峙试验结果表明该菌株对多种植物病原真菌均有较强的拮抗作用,尤其是对镰刀菌属致病菌拮抗效果明显。另外,本试验还初步验证该菌能产生较高活性的胞外蛋白酶。【结论】侧孢短芽孢杆菌 AMCC 100017 在作物真菌病害生物防治方面,有较好的开发和利用潜力,并可望应用于线虫生物防治。

关键词:侧孢短芽孢杆菌, 果树病害, 生物防治, 拮抗作用, 蛋白酶活性

Isolation, identification and the biocontrol potential of a strain of *Brevibacillus laterosporus*

CHEN Chan¹ CHEN Sheng-Fu¹ WANG Jian-Yu¹ MAO Zhi-Quan²
ZHOU Bo^{1,3} WANG Bing^{1*}

(1. College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(3. National Engineering Laboratory of Soil Fertilizer Resources Utilization, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: [Objective] In order to lay the foundation for the further development and utilization of biocontrol strains with good colonization ability, bacterial strains with antifungal activity were isolated, screened and identified from soil. [Methods] Antagonistic experiment was used to screen the specific bacteria against pathogenic fungi and evaluate its inhibitory ability. The strain was classified and identified by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, sequencing of 16S rRNA gene and analysis of sequences similarity in GenBank. Protease activity of the test strain was measured by Folin-Ciocalteu method. [Results] *Brevibacillus*

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. CARS-28); 山东省农业重大应用技术创新课题

*通讯作者: ✉: bwan@sdau.edu.cn

收稿日期: 2014-03-02; 接受日期: 2014-04-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-21

laterosporus, preservation number AMCC 100017, was isolated from various kinds of soil in Tai'an, Shandong province. Plate confrontation experiment indicated that the strain has strong antagonistic effect against various plant pathogenic fungi, especially *Fusarium*. In addition, it was also verified that the strain could produce highly reactive extracellular protease. [Conclusion] *Brevibacillus laterosporus* AMCC 100017 is a biocontrol strain with the development and utilization potential against fungal diseases of crops and fruit trees, as well as the biological control of nematodes.

Keywords: *Brevibacillus laterosporus*, Fruit diseases, Biocontrol, Antagonism, Protease activity

植物病原真菌是植物重要病原物之一,其大面积发作会给农作物和经济作物的生产带来严重危害^[1]。随着人们对环境问题的日益重视,探索可持续发展的、有效的生物防治措施已成为植物病害综合治理中的重要课题^[2]。土壤是微生物的天然培养基,生存着许多具有复杂相互作用的微生物,它们共同构成了无比丰富的菌种资源库。微生物的拮抗通常指微生物通过产生特定代谢产物,尤其是抗生素类物质而抑制其他微生物的生长甚至杀死它们的一种相互关系。充分考虑到植物与微生物之间的相互作用关系,通过对根际土壤中的微生物进行筛选,有望获得具有良好定殖能力的微生物菌株,接种后能在植物根系周围长期发挥特定的生防作用^[3-4]。

作物长期连作后,土壤微生物种群会发生明显变化。关于连作障碍的调查研究表明,土传病害是引起连作障碍的主要因子之一^[5]。经验证,微生物自身所产生的酶具有一定的生防效果,尤其是胞外蛋白酶对土壤病害和线虫都具有显著的抑制和杀灭效果^[6-8]。

本研究从山东泰安各种类型土壤中,分离筛选出一株生防效果较好的细菌,对其进行形态学、生理生化特征和分子鉴定,并进一步探究其生物学特性和抗菌谱,为开发利用微生物资源,筛选与环境相容性好的微生物生防菌剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

生防细菌 AMCC 100017 由山东农业大学资源与环境微生物研究室分离、鉴定并保藏。

植物病原真菌:串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、芦笋茎枯病菌(*Phomopsis asparagi*)、小麦根腐病菌(*Helminthosporium sativum*)、小麦曲根霉(*Rhizopus tritici* sp.)、小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola*)和桃根霉菌(*Rhizopus* sp.)均由山东农业大学资源与环境微生物研究室保藏。

1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(NA)、LB 培养基和 PDA 培养基配方见《微生物学实验》^[9]。

1.3 分离方法

从山东泰安林地、果园和农田采集地表下 5-10 cm 处土样,采用平板稀释分离法^[10]涂布,28 °C 培养 1-2 d。根据单菌落大小、表面结构、质地、光泽和颜色等特征,挑取菌落形态差异明显的单菌落,纯化后斜面保存。

1.4 拮抗菌的筛选

以串珠镰刀菌和尖孢镰刀菌作为靶标筛选拮抗菌,采用平板对峙法^[11],每处理 3 次重复。30 °C 培养 3-5 d 后,根据抑菌带的大小,选择拮抗效果好的菌株进入下一轮复筛,进一步确定抑菌效果最佳的分离菌株。

1.5 分离拮抗菌的分类鉴定

1.5.1 形态学鉴定:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[12]中的形态学指标,记录菌落形态、光学显微形态并拍摄透射电镜照片(37 °C 平板培养 24 h,透射式电子显微镜型号:JEM-1200EX),以确定其形态特征。

1.5.2 生理生化鉴定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]中的生理生化鉴定指标, 对待测菌株进行 V-P 试验、M.R 试验、耐盐性试验、接触酶试验、糖醇发酵试验、淀粉水解和明胶液化等生理生化指标测定。

1.5.3 16S rRNA 基因序列测定和比对分析: 将待测菌株接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 摇床过夜培养, 12 000 r/min 离心收集菌体, 用试剂盒(北京天根生物科技有限公司)提取细菌基因组 DNA。使用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAGAACGAACGCT-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCCACCC-3')对提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[14]。所得 PCR 产物委托北京六合华大基因科技股份有限公司测序。在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)上进行序列相似性比对分析, 再利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育进化树。

1.6 分离拮抗菌生长曲线的测定

37 °C 摇床培养不同时间后, 通过比色法, 在 600 nm 波长下测定 OD 值, 以时间为横坐标, OD 值为纵坐标作图, 绘出待测菌株的生长曲线。

1.7 分离拮抗菌抗菌谱的测定

采用平板对峙法, 分别用菌块和菌悬液, 在新鲜的 PDA 固体培养基上距中心 3 cm 的两个对称点处接种病原菌和分离到的拮抗菌, 用只接病原菌的平板做对照。30 °C 培养, 待对照组长满整个培养基平板后, 测量实验组病原菌生长半径 r , 对照组半径为培养皿内半径 r_0 , 利用公式: 抑菌率 = $(r_0 - r) / r_0$, 通过比较抑菌率的大小来评价抗病菌的拮抗性能。

1.8 分离拮抗菌蛋白酶活力的测定

37 °C 摇床培养待测菌株, 取不同时间发酵液, 采用福林酚法, 按照国标 GB/T 23527-2009 测定蛋白酶活力。酶活力定义: 1 mL 发酵液在 40 °C 和 pH 10.5 条件下, 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸, 即为 1 个酶活力单位。L-酪氨酸溶液的标准曲线见图 1。

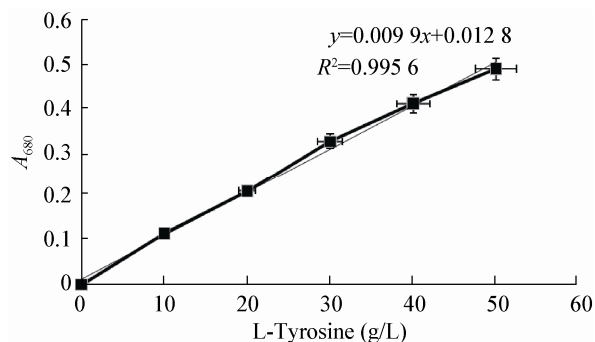


图 1 L-酪氨酸溶液的标准曲线

Figure 1 Standard curve of L-tyrosine solution

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

从山东泰安林地、果园和农田土壤中共分离、筛选得到 48 株细菌, 其中具有拮抗效果的 12 株, 效果较明显的 5 株, 编号为 B1-B5, 其中菌株 B2 产生的抑菌圈最大。将 B2 按菌种保藏编号定为 AMCC 100017, 进一步进行系列鉴定工作。

2.2 菌株 AMCC 100017 鉴定结果

2.2.1 菌株 AMCC 100017 形态学鉴定: 菌株 AMCC 100017 在不同培养基上的菌落形态不同, 在牛肉膏蛋白胨培养基和 LB 上菌落都为黄褐色, 扁平, 边缘光滑, 中央突起, LB 上形成的菌落略大; 而在 PDA 上菌落为乳白色, 边缘锯齿状, 中央突起, 表面不光滑, 菌落直径明显比在前两个培养基上大, 呈花状。

光学显微镜染色观察, 菌株 AMCC 100017 细胞杆状, 大小 $(0.5-1.0) \mu\text{m} \times (2.0-5.0) \mu\text{m}$, 芽孢侧生。革兰氏染色结果可变, 对数期时染色结果为阳性, 稳定期时变为阴性。透射电镜结果如图 2 所示, 图 2A、B 为菌体形态, 图 2C 为形成中的芽孢。

2.2.2 菌株 AMCC 100017 的生理生化鉴定: 菌株 AMCC 100017 的部分生理生化特征见表 1。通过生理生化试验结果, 结合形态学特征, 依据《伯杰氏细菌系统鉴定手册》, 可初步将菌株鉴定为短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)。

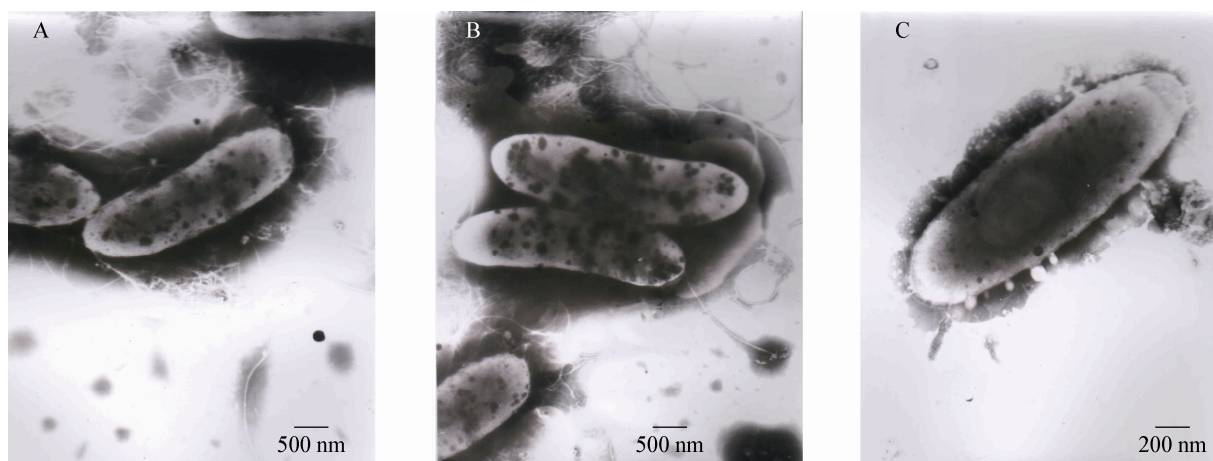


图 2 菌株 AMCC 100017 的透射电镜照片

Figure 2 Transmission electron microscope photographs of strain AMCC 100017

注：A, B：菌株 AMCC 100017 的菌体形态；C：形成中的芽孢。

Note: A, B: Cell morphology of strain AMCC 100017; C: Spore in formation.

表 1 菌株 AMCC 100017 的生理生化实验结果

Table 1 Result of physiological and biochemistry tests of strain AMCC 100017

生理生化指标 Physiological and biochemical indexes	AMCC 100017	生理生化指标 Physiological and biochemical indexes	AMCC 100017
V-P	-	Salt tolerance 2% NaCl	+
M.R	+	Salt tolerance 5% NaCl	-
Catalase reaction	+	Nitrate reduction	+
Citrate utilization	-	Nitrite reduction	+
Tartrate utilization	+	Denitrification	-
Glucose	+	Fibrinolysis	-
Lactose	-	Fluorochrome-producing	-
Xylose	-	Pyovendin-producing	-
Arabinose	-	Citric acid	-
Rhamnose	-	Sodium oxalate	-
Galactose	+	Cystine	-
Fructose	+	Tryptophan	-
Maltose	+	Tyrosine	-
Mannose	+	Phenylalanine	-
Mannital	+	Cysteine	-
Ethanol	-	Glycine	-
Sorbitol	-	Potassium nitrate	+
Gelatin hydrolysis	+	(NH ₄) ₂ HPO ₄	+
Amylohydrolysis	-	Hydrogen sulfide	-
Urease	+		

注：+：阳性；-：阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

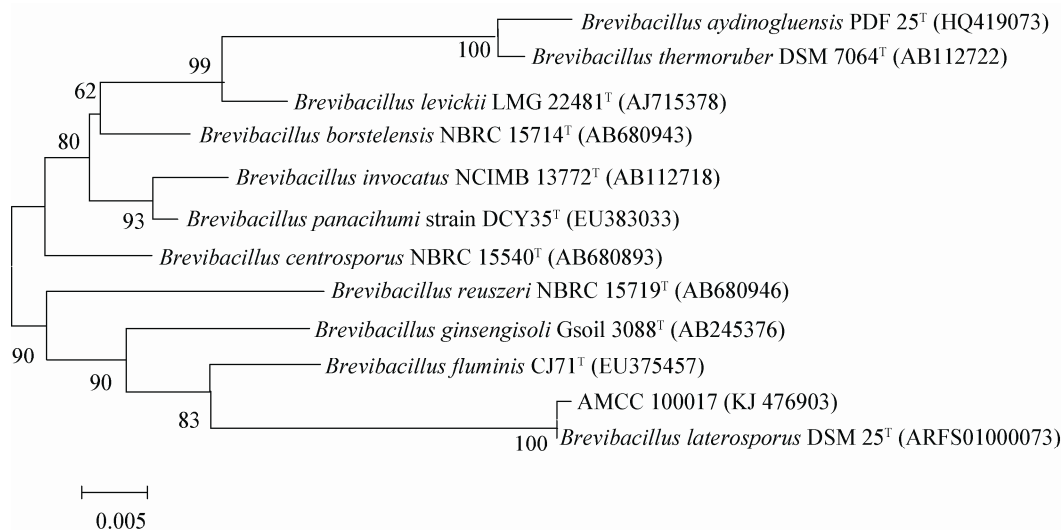


图 3 基于 16S rRNA 基因序列相似性构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain AMCC 100017 and its related bacteria based on 16S rRNA gene sequences

2.2.3 菌株 AMCC 100017 的 16S rRNA 基因分子鉴定: 经 DNA 提取, PCR 扩增和测序获得的 16S rRNA 基因的片段长度为 1 447 bp, 在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 得出该菌株与侧孢短芽孢杆菌序列相似性达到 99%。从 GenBank 中调取侧孢属不同种的 11 株标准菌株的 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育进化树, 结果显示(图 3)菌株 AMCC 100017 与侧孢短芽孢杆菌的同源关系最近, 提交序列后获得的登录号为 KJ476903。结合形态学和生理生化鉴定结果, 确定菌株 AMCC 100017 为 *Brevibacillus laterosporus*, 中文名称侧孢短芽孢杆菌。

2.3 菌株 AMCC 100017 的生长曲线

测定细菌生长曲线, 可为该菌株的进一步培养和发酵利用提供依据。由图 4 可知, 菌株 AMCC 100017 在 0-6 h 为延滞期, 6-16 h 为指数期, 18 h 以后进入稳定期。指数期的生长速率常数最大, 代时最短, 组成均一, 酶系活跃; 稳定期菌体生长速率常数为 0, 菌体产量达到最大, 镜检开始出现芽孢。

2.4 菌株 AMCC 100017 的抗菌谱

从表 2 中可以看出, AMCC 100017 对提供的几种供试病原真菌均显示出一定的抑制作用, 其中

对镰刀菌属、丝核菌等有明显的抑菌圈, 部分抑菌效果如图 5-7 所示。说明该菌是一种广谱的拮抗菌, 具有潜在应用价值。

2.5 菌株 AMCC 100017 蛋白酶活力测定

采用福林酚法测定蛋白酶活力, 发酵液酶活力结果如表 3 所示。由表 3 可以看出, 在营养充足的条件下, 菌株 AMCC 100017 的发酵液中蛋白酶活力随发酵时间增加而升高, 数据显示其产蛋白酶能力较强。

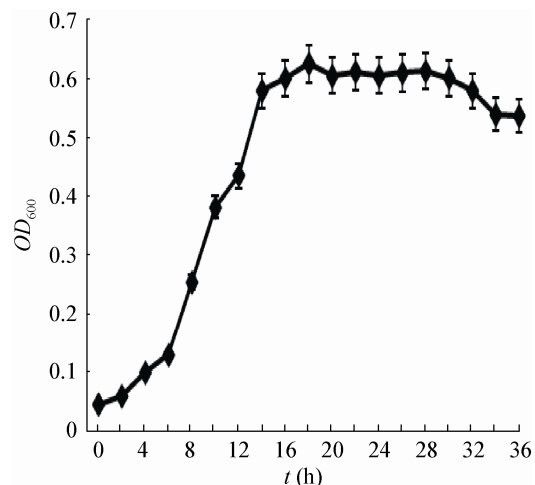


图 4 菌株 AMCC 100017 生长曲线

Figure 4 Growth curve of strain AMCC 100017

表 2 AMCC 100017 对植物病原真菌的拮抗效果		
Table 2 Antagonism effect of strain AMCC 100017 against plant pathogenic fungi		
供试病原菌 Pathogenic fungi	病原菌生长半径 r (cm)	抑菌率 Bacteriostasis rate (%)
<i>Fusarium moniliforme</i>	3.77±0.06	12.46
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.83±0.02	34.32
<i>Fusarium solani</i>	3.21±0.01	25.56
<i>Fusarium proliferatum</i>	3.79±0.03	14.87
<i>Rhizoctonia solani</i>	3.76±0.01	12.87
<i>Phomopsis asparagi</i>	3.90±0.02	9.57
<i>Helminthosporium sativum</i>	4.15±0.01	3.68
<i>Rhizopustitici</i> sp.	3.97±0.03	7.90
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	2.85±0.03	33.91
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	2.93±0.04	32.08
<i>Physalospora piricola</i>	3.42±0.01	20.45
<i>Rhizopus</i> sp.	3.65±0.03	15.33

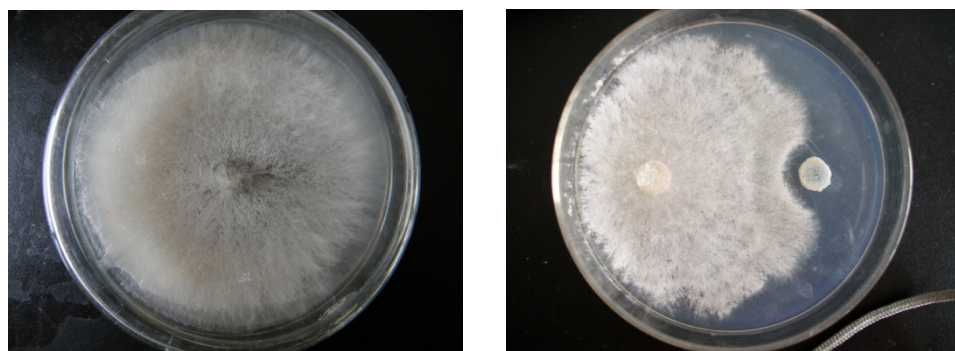


图5 AMCC 100017对丝核属病原菌的平板对峙实验结果
Figure 5 Confrontation test of strain AMCC 100017 against *Rhizoctonia solani*

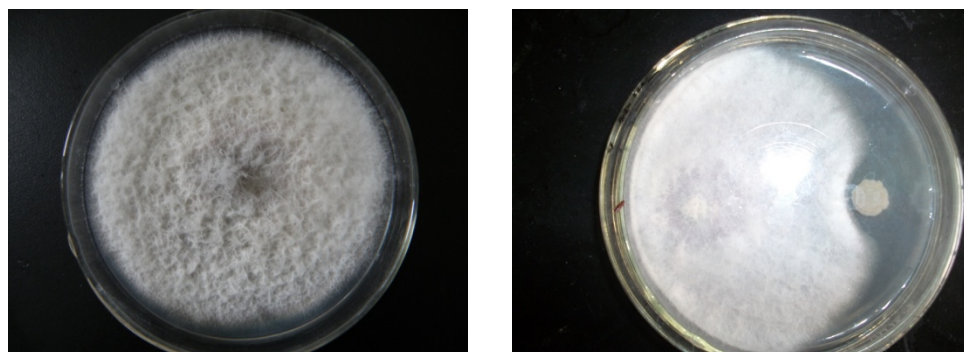


图6 AMCC 100017对串珠镰刀菌的平板对峙实验结果
Figure 6 Confrontation test of strain AMCC 100017 against *Fusarium moniliforme*

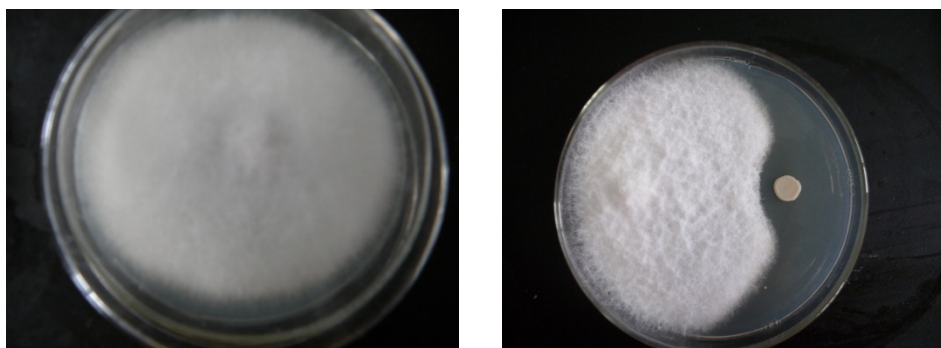


图7 AMCC 100017对尖孢镰刀菌的平板对峙实验结果

Figure 7 Confrontation test of strain AMCC 100017 against *Fusarium oxysporum*表3 菌株 AMCC 100017 蛋白酶活力测定结果
Table 3 Protease activity of strain AMCC 100017

发酵时间 Fermentation time (d)	蛋白酶活力 Protease activity (U/mL)
3	494.6
4	558.4
5	965.3
6	1 687.2

3 讨论

1996年 Shida 等^[15]通过 *Bacillus laterosporus* 的 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建研究, 将其归类为短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*), 并命名为侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*)。本实验筛选出的细菌 AMCC 100017 经形态学、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定为侧孢短芽孢杆菌, 经抗菌谱和酶活测定, 初步验证了该菌株是一种具有应用潜力的生防菌。

目前国内外关于侧孢短芽孢杆菌抑菌及杀线虫作用的研究越来越活跃。如赵秀香等^[16]从烟草根际土壤中, 分离到一株生防菌侧孢短芽孢杆菌 B8, 其发酵液对烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 显示了较强的抑制作用; SONG Z. 等^[17]从苹果根际中分离到侧孢短芽孢杆菌 ZQ2, 能产生广谱抗性的抑真菌活性物质, 并对其发酵条件进行了优化; Saikia 等^[18]从热泉水中分离到侧孢短芽孢杆菌 BPM3, 可强烈抑制植物致

病真菌和革兰氏阳性细菌的生长; Prasanna 等^[19]在红树林沼泽土壤中分离出的侧孢短芽孢杆菌所产生的胞外几丁质酶, 具有杀真菌活性和杀线虫活性。本实验室分离的菌株 AMCC 100017 对参试的几种病原真菌都显示了不同程度的拮抗效果, 尤其对尖孢镰刀菌、小麦纹枯病菌、黄瓜炭疽病菌以及腐皮镰刀菌等效果明显, 经进一步的优化和开发, 有望对有效消除相应作物、蔬菜等的真菌病害做出贡献。

苹果是中国北方广泛种植的果树品种, 再植障碍是目前苹果减产的主要原因之一。对苹果再植造成危害的真菌主要有丝核属 (*Rhizoctonia*)、镰刀霉属 (*Fusarium*)、腐霉属 (*Pythium*)、疫霉属 (*Phytophthora*)、柱盘孢属 (*Cylindrocarpon*) 等^[20-24]。本实验室分离的菌株 AMCC 100017 所产抑菌物质具有广谱拮抗性, 尤其是对镰刀菌属和丝核病属致病菌拮抗效果明显。因此, 侧孢短芽孢杆菌 AMCC 100017 可能对有效解除苹果再植障碍具有潜在应用价值。

Singer 等^[25-26]的研究发现侧孢短芽孢杆菌对于某些甲虫类昆虫、线虫和软体动物都具有毒性作用; Huang 等^[27]分离到一株不产伴孢晶体的侧孢短芽孢杆菌 G4, 有很高的抗线虫活性, 病理学观察结果说明, G4 菌株纯化的胞外蛋白酶直接导致了线虫表皮的破坏。本研究对菌株 AMCC 100017 蛋白酶活的测定结果, 显示其蛋白酶活性高, 预测其

可望对作物线虫的生物防治发挥特定的作用。另外,是否是蛋白酶在拮抗作用中发挥了作用有待进一步研究确认。

综上所述,本研究室分离鉴定的侧孢短芽孢杆菌 AMCC 100017,因其广谱的抗病原真菌潜力,可作为优良的微生物资源,为开发利用与环境相容性好的微生物生防菌剂奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 易自力,周朴华,朱雅安. 植物抗真菌病害基因工程研究进展[J]. 作物研究, 2001, 15(3): 81-84.
- [2] 余凤玉,李振化,曾会才. 抗真菌农用抗生素的研究进展[J]. 热带农业科学, 2005, 25(1): 60-65.
- [3] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310.
- [4] 汪茜,胡春锦,黄思良,等. 真菌病害拮抗菌的筛选及其对多种植物病原真菌的拮抗活性测定[J]. 广西农业科学, 2010, 41(7): 675-678.
- [5] 韩雪,吴凤芝,潘凯. 根系分泌物与土传病害关系之研究综述[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 316-318.
- [6] 黎波,魏学军,李亚宁,等. 解淀粉芽孢杆菌 X-278菌株抗菌蛋白初步分析[J]. 河南农业科学, 2013, 42(7): 68-71.
- [7] 肖同建. *Bacillus cereus* X5的杀线活性及其生物有机肥对南方根结线虫的防治作用研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011.
- [8] 李娟,彭德良,廖金铃,等. 农作物重要病原线虫生物防控的研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(1): 8-15.
- [9] 沈萍,陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-249.
- [10] 陈雪,万科,张传萍,等. 烟草赤星病拮抗细菌的筛选、鉴定及机制初步研究[J]. 生物学通报, 2013, 48(7): 51-54.
- [11] 江木兰,赵瑞,胡小加,等. 油菜内生防菌 BY-2在油菜体内的定殖与对油菜菌核病防治作用[J]. 植物病理学报, 2007, 37(2): 192-196.
- [12] 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: 58-64.
- [13] 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: 364-398.
- [14] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 795-799.
- [15] Shida O, Takagi H, Kadowaki K, et al. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 939-946.
- [16] 赵秀香,张春波,赵柏霞,等. 侧孢短芽孢杆菌 B8发酵液中抑菌物质理化性质研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 90-93.
- [17] Song Z, Guo H, Fu WD, et al. Medium optimization for production of antifungal active substances from antagonistic *Brevibacillus laterosporus* and its antifungal activity analysis[J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(19): 1933-1939.
- [18] Saikia R, Gogoi DK, Mazumder S, et al. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India[J]. Microbiological Research, 2011, 166(3): 216-225.
- [19] Prasanna L, Eijsink VGH, Meadow R, et al. A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(4): 1601-1611.
- [20] Manicia LM, Keldererb M, Franke-Whittlec IH, et al. Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe[J]. Applied Soil Ecology, 2013, 72: 207-214.
- [21] Sewell GWF. Effects of *Pythium* species on the growth of apple and their possible causal role in apple replant disease[J]. Annals of Applied Biology, 1981, 97(1): 31-42.
- [22] Braun PG. Effects of cylindrocarpon and pythium species on apple seedlings and potential role in apple replant disease[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1995, 17(4): 336-341.
- [23] Manici LM, Ciavatta C, Kelderer M, et al. Replant problems in South Tyrol: role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic apple orchards[J]. Plant and Soil, 2003, 256(2): 315-324.
- [24] Tewoldemedhin YT, Mazzola M, Labuschagne I, et al. A multi-phasic approach reveals that apple replant disease is caused by multiple biological agents, with some agents acting synergistically[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(9): 1917-1927.
- [25] Singer S. The utility of strains of morphological group II *Bacillus*[J]. Advance in Applied Microbiology, 1996, 42: 219-261.
- [26] Singer S, Van Fleet AL, Viel JJ, et al. Biological control of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the snail *Biomphalaria glabrata*, using Gramicidin S and D and molluscicidal strains of *Bacillus*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1997, 18(4): 226-231.
- [27] Huang X, Tian B, Niu Q, et al. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5): 719-727.