

# 一株产抗菌活性物质解淀粉芽孢杆菌的筛选及鉴定

杨胜远<sup>1</sup>, 韦锦<sup>2</sup>, 李云<sup>1</sup>, 姚虹<sup>1</sup>, 黄月丹<sup>1</sup>

(1.韩山师范学院生物系, 广东 潮州 521041; 2.韩山师范学院图书馆, 广东 潮州 521041)

**摘 要:** 从菜园土壤中分离筛选到1株产广谱抗菌活性物质的菌株K6, 其抗菌活性物质对藤黄微球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、酿酒酵母、匍枝根霉和白色念珠菌均有抑制作用, 其中对革兰氏阳性菌的抑菌作用最强, 对霉菌的抑制作用相对较弱。通过形态特征、16S rDNA序列分析和系统发育分析, 菌株K6与*B. amyloliquefaciens*位于同一簇群, 同源性达99%, 将其初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

**关键词:** 抗菌活性物质; 16S rDNA; 系统发育分析; 解淀粉芽孢杆菌

## Screening and Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* Strain Producing Antimicrobial Substances

YANG Sheng-yuan<sup>1</sup>, WEI Jin<sup>2</sup>, LI Yun<sup>1</sup>, YAO Hong<sup>1</sup>, HUANG Yue-dan<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China;

2. Library of Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China)

**Abstract:** A strain producing broad-spectrum antimicrobial substances, named K6, was isolated and screened from the soil of a local vegetable garden in Xiangqiao district, Chaozhou city, which presented an inhibition effect on the growth of *Mirococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus stolonifer* and *Candida albicans*. The strongest inhibition effect on gram-positive bacteria was observed. Base on the morphological, 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis, the strain K6 was classified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Key words:** antimicrobial substance; 16S rDNA; phylogenetic analysis; *Bacillus amyloliquefaciens*

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)21-0208-05

食品含有大量的水分和丰富的营养成分,是微生物天然的良好培养基,只要条件适宜,微生物就会大量繁殖,导致食品腐败变质。通过防腐剂抑制或杀灭微生物,可以起到阻止、延缓食品的变质。目前食品防腐剂主要为合成防腐剂,如苯甲酸、山梨酸及其盐类、对羟基苯甲酸酯类等。但经长期的研究,发现一些合成防腐剂有诱癌性、致畸性和易引起食物中毒等问题。随着人民生活水平的不断提高,对健康的日益关注以及对食品的卫生安全性的日趋重视,对食品防腐剂的要求也越来越高,因此研究开发高效、广谱、安全的新型防腐剂具有重要意义<sup>[1]</sup>。

食品防腐剂的天然化和营养化已成为防腐技术的发展趋势,植物源、动物源和微生物源天然防腐剂的研究开

发已成为食品领域的研究热点<sup>[2]</sup>,特别是微生物源天然防腐剂的研究备受人们的关注。乳酸链球菌素(nisin)<sup>[3]</sup>、纳他霉素(Natamycin)<sup>[4]</sup>、表面活性素(surfactin)<sup>[5]</sup>、芬芥素(fengycin)<sup>[6]</sup>、伊枯草菌素(iturin)<sup>[7]</sup>、杆菌霉素(bacillomycin)<sup>[8]</sup>、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)<sup>[9]</sup>、制磷脂菌素(plipstatin)<sup>[10]</sup>等微生物源抗菌活性物质的结构、抑菌机理和安全性均得到了深入研究,其中乳酸链球菌素和纳他霉素已获准应用于在食品或饲料行业。然而,目前微生物源防腐剂仍然存在产量低、价格昂贵等缺点,极大地限制了其广泛应用,因此高产广谱抗菌活性物质的菌种选育仍亟待研究人员不懈努力。

本课题组从菜园的土壤中分离筛选到了1株具有广谱抗菌活性的菌株K6,本实验主要对其筛选、鉴定及抗菌谱进行研究。

收稿日期: 2010-02-23

基金项目: 广东省自然科学基金项目(8452104101001546); 国家级星火计划项目(2008GA780032); 韩山师范学院科研基金项目

作者简介: 杨胜远(1972—),男,教授,博士,研究方向为食品微生物及生物技术。E-mail: yshengyuan2004@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

土壤样品取自潮州市湘桥区打索上埠村菜园。

### 1.2 活性检测靶菌

藤黄微球菌(*Mirococcus luteus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)为韩山师范学院食品与发酵研究所保藏菌种。

### 1.3 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶 立陶宛 MBI Fermentas 公司；dNTPs 天为时代公司；酵母膏和蛋白胨 Oxoid 公司；其他试剂均为国产分析纯。

PTC-100™ PCR 仪 MJ Research 公司；EPS604 水平电泳仪 南京科宝仪器公司。

### 1.4 培养基

细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[11]</sup>；霉菌采用 PDA 培养基<sup>[11]</sup>；酵母采用 YPD 培养基<sup>[12]</sup>。

### 1.5 PCR 引物

参照文献[11]设计通用引物，其中正向引物为 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，反向引物为 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'，由上海生物工程服务有限公司合成。

### 1.6 方法

#### 1.6.1 抗菌活性物质产生菌的分离筛选

取土壤 25g，放入装有 225mL 无菌水的锥形瓶中(含适量的玻璃珠)，振荡锥形瓶 20min，静置 20~30s，制成  $10^{-1}$  稀释液，再按 10 倍梯度稀释法分别将菌悬液稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ ，然后分别取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  菌悬液 0.1mL 于牛肉膏蛋白胨平板进行涂布，于 37℃ 恒温培养 24h。分别将单菌落进行编号，先采用无菌牙签转接于另一块平板进行备份，然后将单菌落以自制无菌打孔器切成直径为 5mm 的琼脂块，置于含藤黄微球菌为指示菌的平板上，于 37℃ 恒温培养 48h，观察抑菌情况。从备份平板上将具有产抑菌活性物质的菌株转接于牛肉膏蛋白胨平板斜面，于 37℃ 恒温培养 24h 后于 4℃ 冰箱中保藏备用。

#### 1.6.2 抗菌活性物质的初步分离纯化

将具有抗菌活性的菌株接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基，于 37℃ 摇床培养 24h，于  $10000 \times g$  离心 15min，取 300mL 上清液冷冻干燥，然后加入 30mL 无水甲醇进

行溶解，于  $10000 \times g$  离心 15min。沉淀物用 30mL 无菌水进行溶解，备用；上清液于 50℃ 旋转蒸发去除甲醇，再加入 30mL 无菌水进行溶解，备用。以牛肉膏蛋白胨液体培养基采用相同操作作为对照。分别取上述组分 200μL，采用管碟法<sup>[13]</sup>测定其对藤黄微球菌(37℃，培养 24h)的抑菌活性。

#### 1.6.3 抗菌活性物质的抗菌谱测定

按 1.6.2 节方法采用无水甲醇对抗菌活性物质进行提取纯化，再分别取 200μL 纯化液采用管碟法<sup>[13]</sup>测定其对活性检测靶菌的抑菌活性。用游标卡尺测抑菌圈的直径(diameter of antibiotic circle, DAC)，以抑菌圈的直径表示抗菌活性。

供试靶细菌和酵母的菌体密度以及霉菌孢子密度均为  $10^8$ /mL，细菌于 37℃ 培养 24h，酵母 30℃ 培养 48h，霉菌 28℃ 培养 60h。

#### 1.6.4 菌株 K6 的分类鉴定

##### 1.6.4.1 形态特征

参照文献[14]进行。将菌株 K6 接种到牛肉膏蛋白胨平板，于 37℃ 培养 24h，观察菌落形态及细胞形态。细胞形态采用革兰氏染色和简单染色进行观察。

##### 1.6.4.2 细菌总 DNA 的制备

吸取 10mL 培养好的细菌培养液， $5000 \times g$  离心 10min，沉淀用 TE 洗涤后，再次离心，菌体重悬于 4mL TE 溶液；加入 50mg/mL 溶菌酶溶液 8μL，37℃ 保温 20min；加入 RNase (10mg/mL) 10μL，至终质量浓度为 25μg/mL，然后加入 10g/100mL SDS 溶液 0.5mL，37℃ 保温 30min；加入蛋白酶 K(20mg/mL) 10μL，至终质量浓度为 50μg/mL，37℃ 保温 60~90min；加入等体积的苯酚、氯仿、异戊醇(25:24:1, V/V)，混匀，于  $8000 \times g$  离心 5min，取上清液转入另一离心管中，如此 2~3 次；将上清液中加入 0.1 倍体积的醋酸钠和两倍体积的冷的无水乙醇，旋转离心管，出现沉淀物 DNA；70% 乙醇洗涤一次，室温下干燥；加入 0.5mL TE 或双蒸水溶解 DNA 作为 PCR 模板。

##### 1.6.4.3 PCR 扩增

采用细菌 16S rDNA 的通用引物 27F 和 1541R 进行扩增。扩增体系为 10mmol/mL MgCl<sub>2</sub> 3μL，10 × PCR buffer 5μL，dNTP(2.5 μmol/L)4μL，Taq™ (5U/μL)0.25μL，上游引物和下游引物(2.5 μmol/L)各 1μL，模板 DNA 1μL，最后加双蒸水至 50μL，混合后瞬间离心，置于 PCR 仪上 95℃ 变性 5min，然后 94℃ 变性 30s，52℃ 退火 30s，72℃ 延伸 1min，共 30 个循环，最后 72℃ 延伸 10min。

## 1.6.4.4 16S rDNA 的测序

16S rDNA 的纯化和测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

## 1.6.4.5 序列比对

将所测定的 16S rDNA 序列通过 NCBI-NLM 中 Nucleotide-nucleotide BLAST(blastn)程序与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中核苷酸序列在线进行同源性分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)<sup>[15]</sup>。

## 1.6.4.6 系统发育分析

根据形态特征观察结果,通过 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库选取芽孢杆菌属的各个种的 16S rDNA 核苷酸序列,采用 BioEdit\_7.0.0 软件进行 Clustal W 多重比对,利用 Clustal X1.8 软件采用 Neighbour-joining 方法构建系统发育树,并进行 Bootstrap 分析,重复次数为 1000 次。

## 2 结果与分析

## 2.1 抗菌活性物质产生菌的分离筛选

从菜园土样中分离筛选到 1 株菌株 K6,其菌落琼脂块对藤黄微球菌具有抑菌作用(图 1),说明菌株 K6 具有产抗菌代谢物活性。

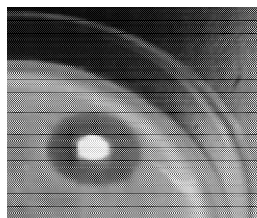
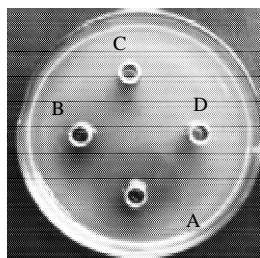


图 1 菌株 K6 琼脂块对藤黄微球菌的抑菌活性

Fig.1 Anti-*M. luteus* activity of agar piece with cultured strain K6

## 2.2 抗菌活性物质的初步分离纯化



A. 菌株 K6 发酵液的甲醇提取组分; B. 菌株 K6 发酵液甲醇沉淀组分; C. 牛肉膏蛋白胨培养基甲醇提取组分; D. 牛肉膏蛋白胨培养基甲醇沉淀组分。

图 2 解淀粉芽孢杆菌 K6 发酵液甲醇纯化组分对藤黄微球菌的抑菌活性

Fig.2 Anti-*M. luteus* activity of methanol soluble fraction of fermentation broth of strain K6

如图 2 所示,解淀粉芽孢杆菌 K6 的发酵液经无水

甲醇处理后,溶于无水甲醇的组分对藤黄微球菌具有较强的抑制作用,而不溶于无水甲醇的沉淀组分对藤黄微球菌没有抑菌作用,说明菌株 K6 的抗菌活性物质溶于甲醇。因此,可以采用无水甲醇对发酵液干燥物中的抗菌活性物质进行提取和初步纯化。

## 2.3 菌株 K6 抗菌活性物质的抗菌谱测定

表 1 菌株 K6 抗菌活性物质的抗菌谱  
Table 1 Antimicrobial spectrum of strain K6

靶菌	抑菌圈直径/mm	靶菌	抑菌圈直径/mm
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	12.5 ± 0.7	苏云金芽孢杆菌 ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	12.1 ± 0.3
藤黄微球菌 ( <i>Micrococcus luteus</i> )	35.2 ± 1.3	蜡样芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> )	13.3 ± 0.4
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	16.5 ± 0.6	酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	16.9 ± 0.3
枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	13.1 ± 0.2	白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	16.3 ± 0.9
巨大芽孢杆菌 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	16.1 ± 0.4	匍枝根霉 ( <i>Rhizopus stolonifer</i> )	9.1 ± 0.7

注:牛津杯的外径为 8 mm。

表 1 显示,菌株 K6 的抗菌活性物质对 *M. luteus*、*E. coli*、*S. cerevisiae*、*P. aeruginosa*、*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. megaterium*、*B. thuringiensis*、*R. stolonifer*、*C. albicans* 均有抑制作用。结果表明:菌株 K6 的抗菌活性物质对供试的革兰氏阳性和阴性细菌、酵母以及霉菌等靶菌都具有抗菌作用,抗菌谱较广。

## 2.4 菌株 K6 的分类鉴定

## 2.4.1 形态特征

菌株 K6 在牛肉膏蛋白胨培养基上呈淡黄色菌落,表面干燥且粗糙,边缘不整齐。革兰氏染色呈阳性,短杆状,两端钝圆,单个、成对或成串出现,有芽孢,芽孢囊不膨大,芽孢椭圆形,中生到次端生。根据形态特征初步判断菌株 K6 属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

## 2.4.2 菌株 K6 的 16S rDNA 序列分析

菌株 K6 的 PCR 扩增产物的电泳分析表明其大小在 1.5kb 左右。经测序,菌株 K6 的 16S rDNA 核苷酸序列大小为 1347bp,其序列已在 GenBank 中登记,登记号为 GU591157。经与 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 数据库中报道的 16S rDNA 核苷酸序列比对,结果显示菌株 K6 的 16S rDNA 核苷酸序列与 *Bacillus amyloliquefaciens*(登记号分别为 FJ960508、FJ705346、FJ889057、GU125644、GQ903336、DQ422953 等)、*Bacillus licheniformis*(登记号 FJ713021)、*Bacillus subtilis*(登记号分别为 EF377562、FJ437209、EF488103、EU771079、EU624322、EU564337、EU489517 等)和

*Bacillus velezensis*(登记号分别为 FJ426275、AB244441、AB244428 等)的 16S rDNA 核苷酸序列同源性最高,最大相似性(max ident)达到 99%,最大分值(max score)为 2447bits。

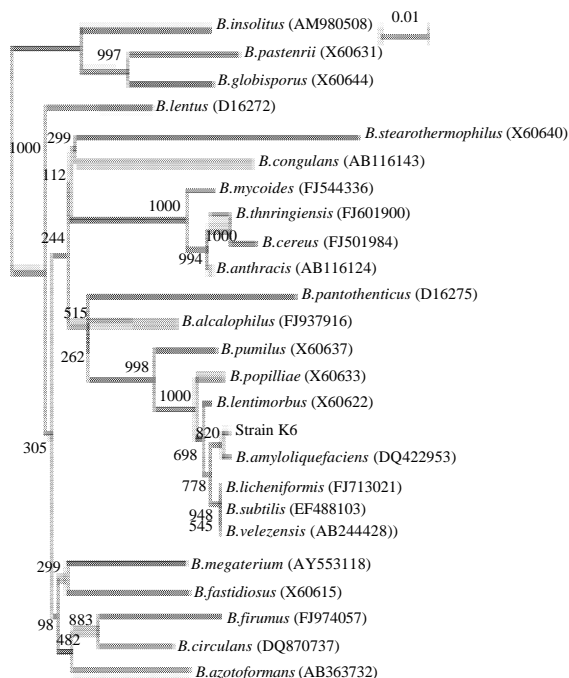


图3 基于 16S rDNA 序列同源分析的系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

根据菌株 K6 的形态特征和 16S rDNA 核苷酸序列的比对结果,选取芽孢杆菌属各个种的 16S rDNA 核苷酸序列与菌株 K6 的 16S rDNA 核苷酸序列构建系统发育树(图 3),结果显示菌株 K6 与 *B. amyloliquefaciens* (DQ422953)位于同一簇群,亲缘关系最近,在 1000 次 Bootstrap 分析中有 468 次支持该分支。

根据菌株 K6 的形态特征和 16S rDNA 核苷酸序列的分析以及系统发育分析,将菌株 K6 初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

### 3 讨论

在早期分类系统中,解淀粉芽孢杆菌归为枯草芽孢杆菌的一个亚种<sup>[16]</sup>,后来的分类系统才将两者划分开来<sup>[17]</sup>。*B. amyloliquefaciens* 许多表型特征与 *B. subtilis* 非常相似,仅通过形态、培养特征及其生理生化特性很难区分,只有通过进一步的基因序列比较才可以将两者区分<sup>[18]</sup>。本实验通过 16S rDNA 序列比对分析表明,菌株 K6 与 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* 的相似性均达到了 99%,图 3 也显示 *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 和 *B. velezensis* 位于同一分支,亲缘关系非常接近,仅从

序列比对结果很难将对它们进行鉴别,只有进一步采用系统发育分析,才能将菌株 K6 归属于 *B. amyloliquefaciens*。因此,对微生物鉴定必须结合多种分类技术和方法才能做出正确的分类结论。

生理生化特征是微生物分类的重要依据之一,理论上可以通过生理生化实验结果对 16S rDNA 序列分析结果进行验证。然而,利用生理生化特征对微生物进行鉴定也是依据最大相似性的原则进行分类,由于种间生理生化特征差异较小,并且一些生理生化特征因长期受到生长环境的影响会发生改变<sup>[19]</sup>,因此生理生化特征对种间的鉴定中区分度不大,并不适宜作为验证 16S rDNA 序列分析结果正确与否的手段。

解淀粉芽孢杆菌可产  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶、蛋白酶等多种酶类,已广泛用于酶制剂生产<sup>[20-22]</sup>。一些研究表明,解淀粉芽孢杆菌还能产生抗菌蛋白、iturin(伊枯草菌素)、surfactin(表面活性素)、fengycin(芬芥素)和 bacillomycin(杆菌霉素)等抗菌物质,抗菌谱广,特别是对于霉菌有较好的抑制作用<sup>[23-27]</sup>。本实验从菜园的土壤中分离筛选到了 1 株产广谱抗菌活性物质的 *B. amyloliquefaciens* K6,其甲醇提取物对细菌和酵母具有较好的抑制作用,对匍枝根霉的抗菌活性相对较弱,是否存在抗菌活性物质的结构或组分差异,还需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 王燕,车振明. 食品防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(5): 167-170.
- [2] 刘程国,魏立娜,邹鑫晶. 天然食品防腐剂的研究进展及前景[J]. 通化师范学院学报, 2008, 29(12): 39-41.
- [3] GROSS E, MORELL J L. The structure of nisin[J]. Journal of American Chemical Society, 1971, 93(18): 4634-4635.
- [4] KOONTZ J L, MARCY J E. Formation of natamycin: cyclodextrin inclusion complexes and their characterization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7106-7110.
- [5] ARIMA K, KAKINUMA A, TAMURA G. Surfactin acrylate lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1968, 31(3): 488-496.
- [6] 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.
- [7] MAGET-DANA R, PEYPOUX F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties[J]. Toxicology, 1994, 87(1/3): 151-174.
- [8] MOYNE A L, SHELBY R, CLEVELAND T E, et al. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4): 622-629.
- [9] LECLÈRE V, BÉCHET M, ADAM A, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4577-4584.

- [10] TSUGE K, ANO T, HIRAI M, et al. The genes *degQ*, *pps*, *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(9): 2183-2192.
- [11] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-215.
- [12] 王娟, 张玟洁, 曾雅雪, 等. 利用酿酒酵母转座子文库筛选 MTM1 基因缺失表型相关基因[J]. 微生物学报, 2010, 50(1): 126-131.
- [13] 孙力军, 陆兆新, 陈磊, 等. 金银花内生菌 EJH-1 抗菌作用发酵培养基响应面法优化[J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(3): 108-113.
- [14] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 62-65.
- [15] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [16] 蔡妙英. 细菌名称[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [17] SNEATH P H A. Bergey's manual of systematic bacteriology: vol 2[M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986: 1104-1138.
- [18] PRIEST F G, GOODFELLOW M, SHUTE L A, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. nom. rev[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37: 66-71.
- [19] 杨胜远, 韦锦, 李云. 两株植物内生巨大芽孢杆菌的生物学特性比较[J]. 生物技术通报, 2010(3): 185-190.
- [20] 史永昶, 姜涌明, 樊鹰, 等. 蛋白酶对解淀粉芽孢杆菌  $\alpha$ -淀粉酶活力的影响[J]. 微生物学通报, 1995, 22(1): 23-25.
- [21] 李永仙, 谢焱, 朱林江, 等. 解淀粉芽孢杆菌  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆及表达[J]. 生物工程学报, 2009, 25(4): 542-548.
- [22] 郝秋娟, 李树立, 陈颖, 等. 温度对淀粉液化芽孢杆菌 5582 产蛋白酶的影响[J]. 中国酿造, 2008(11): 37-39.
- [23] KOUMOUTSI A, CHEN Xiaohua, HENNE A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1084-1096.
- [24] HIRADATE S, YOSHIDA S, SUGIE H, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2[J]. Phytichemistry, 2002, 61(6): 693-698.
- [25] KIM P I, CHUNG K C. Production of an antifungal protein for control *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 [J]. FEMS Microbiology Letter, 2004, 234(1): 177-183.
- [26] WANG Sanlang, SHIH Inglung, LIANG Tzewun, et al. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(8): 2241-2248.
- [27] 方传记, 陆兆新, 孙力军, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 533-539.