

凝结芽孢杆菌 TQ33 产抗疫霉物质特性研究

肖瑞峰, 闫艳华, 宗志友, 王海宽

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 凝结芽孢杆菌 TQ33 是从脱脂奶粉中分离出来的, 发现其发酵液中活性代谢产物对甜瓜疫霉菌 (*Phytophthora drechsleri* Tucker)、灰葡萄孢霉菌 (*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、苹果炭疽病菌 (*Glomerella cingulate*) 植物致病真菌有很好的抑制作用, 其中对甜瓜疫霉菌具有较强的抑制作用, 同时对抗甜瓜疫霉物质特性进行了研究, 将具有抑菌活性的发酵液分别经过调节 pH、加热、蛋白酶处理后发现, 凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液具有一定的热稳定性; 在 pH 5~6 时具有最大抑菌活性, 发酵液经胰蛋白酶、中性蛋白、蛋白酶 K 处理后失去部分抑菌活性, 初步分离纯化实验表明其中一种抗菌物质可能是苯乳酸, 这表明凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液中可能含有苯乳酸, 以及其他蛋白类抑菌物质。

关键词: 植物致病真菌; 抗真菌活性; 凝结芽孢杆菌 TQ33; 甜瓜疫霉菌

中图分类号: Q93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2011)06-0001-06

Activity against *Phytophthora drechsleri* Tucker of *Bacillus coagulans* TQ33 and the Properties of Bioactive Substance

XIAO Rui-feng, YAN Yan-hua, ZONG Zhi-you, WANG Hai-kuan

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Antifungal effects on plant pathogenic fungi growth and characteristics of the active antifungal substances were produced by *Bacillus coagulans* TQ33, which isolated from the skimmed milk powder. *B. coagulans* TQ33 has a broad antifungal spectrum including *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* and *Glomerella cingulate*, particularly against *P. drechsleri* Tucker. The effect of pH, temperature and protease on the antifungal activity of *B. coagulans* TQ33 was determined. The activity substance was heat stable. Out of this it showed the maximum antifungal activity at pH 5.0–6.0. The initial isolation and purification indicated that there maybe phenyllactic acid of the activity substance, so protein substances and phenyllactic acid may be the main antifungal substances.

Keywords: plant pathogenic fungi; antifungal activity; *Bacillus coagulans* TQ33; *Phytophthora drechsleri* Tucker

植物真菌病害给农业生产带来了巨大的损失^[1], 随着病害的日趋严重以及大量化学农药的频繁使用, 环境污染和农药残留的问题已经不容忽视; 而且长期使用化学农药还会使某些病原真菌的抗药性增加^[2-3], 不能达到根治病害的效果. 因此, 生物农药的开发迫在眉睫. Clark 等^[4]报道细菌可以有效地控制甜菜、莴苣、洋葱叶片上的灰霉病, 而芽孢杆菌则是目前生物防治中研究和应用的主要细菌菌株^[5].

芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.) 细菌是广泛存在于自然界的好氧和兼性厌氧、产生抗逆性内生孢子的杆状细菌, 其生理特性丰富多样, 是土壤和植物微生物生态优势种群之一^[6]. 它可产生多种抗生素, 包括脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类、核酸类物质, 对多种动、植物及人类病原菌起到很好的抑制作用; 而且芽孢杆菌还具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性. 因此, 芽孢杆菌被广泛应用于医药、农药、食品、

收稿日期: 2011-06-13; 修回日期: 2011-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20876116, 30900961)

作者简介: 肖瑞峰 (1985—), 女, 内蒙古人, 硕士研究生; 通信作者: 王海宽, 副教授, 博士, haikuanwangcn@yahoo.com.cn.

饲料加工、环境污染治理等各个行业^[7]。

凝结芽孢杆菌是芽孢杆菌的一种,其主要特征与普通乳酸菌十分相似,因抑菌效果而迅速发展的凝结芽孢杆菌是国际市场上新一代的益生菌类保健产品。

近年来,尽管凝结芽孢杆菌及其代谢产物抑制有害微生物的效果已获得了广泛的认同^[8],但有关凝结芽孢杆菌的抗真菌活性及其抑制真菌的能力研究较少。真菌毒素的生物降解研究是一个非常重要和备受关注的领域。因此,本文对从脱脂乳粉中分离得到的凝结芽孢杆菌 TQ33 及其发酵液中活性代谢产物抑制甜瓜疫霉菌(*Phytophthora drechsleri* Tucker)作用及理化性质进行研究,为凝结芽孢杆菌在生物农药方面的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*),工业发酵微生物教育部重点实验室保藏菌种。

指示菌:甜瓜疫霉菌(*Phytophthora drechsleri* Tucker)、灰葡萄孢霉菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulate*)来源于天津市植物保护研究所。

1.1.2 培养基(g/L)

斜面培养基:蛋白胨 20.0,酵母膏 3.0,葡萄糖 2.0,琼脂 2.0,麸皮水定容至 1 L, pH 7.0~7.2。

种子培养基:蛋白胨 10.0,酵母膏 10.0,葡萄糖 60.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 10.0, pH 7.2~7.4。

发酵培养基:蛋白胨 10.0,酵母膏 10.0,葡萄糖 6.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, K₂HPO₄ 2.0, MnSO₄ 0.05, pH 7.0。

GYP 培养基:蛋白胨 5.0,酵母膏 10.0,葡萄糖 10.0,牛肉膏 2.0,盐溶液 5(其中每毫升的盐溶液包括 MgSO₄·7H₂O 40 mg, MnSO₄ 2 mg, FeSO₄·7H₂O 2 mg, NaCl 2 mg), 50 mg/mL 的吐温 80 溶液 10.0, CaCO₃ 5.0,琼脂 20.0, pH 6.8。

指示真菌培养基:PDA 培养基^[9]。

1.2 抑菌能力的测定

以 5%接种量将种子接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,38 °C、140 r/min 摇瓶培养 67 h。

抑菌率的测定采用抑制菌丝生长速率法^[10],将发酵液以 8 000 r/min 离心 10 min,然后用 0.22 μm 的膜过滤去除菌体,与冷却至 60 °C 的 PDA 培养基混合,配制成含有 10%发酵液的培养基。用打孔器(直径 5 mm)从培养 5~7 d 的甜瓜疫霉菌落边缘制取菌饼,接种于含发酵液培养基平皿中央,每皿接一个菌饼。以与发酵培养基 pH 相同的无菌水代替无菌上清液为对照,每个处理均设 3 次重复,置于 27 °C 培养箱中避光培养。当对照组菌丝长至平皿边缘时,用直尺交叉测量菌落直径,并计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (d_{\text{对照}} - d_{\text{处理}}) / (d_{\text{对照}} - 5) \times 100\%$$

式中: $d_{\text{对照}}$ 为用与发酵培养基 pH 相同的无菌水作为对照培养基的菌落直径; $d_{\text{处理}}$ 为经过酶、温度、pH 等条件处理后的无菌上清液为培养基的菌落直径。

1.3 常见植物病害菌抑菌活性测定

采用抑制菌丝生长速率法^[10],测定凝结芽孢杆菌的抗菌谱。指示菌为甜瓜枯萎病菌、番茄早疫病菌、灰葡萄孢霉菌、甜瓜疫霉菌、苹果炭疽病菌。

1.4 乳酸测定及其对指示菌的影响

移取 0.5 mL 凝结芽孢杆菌的发酵液置于 10 mL 的容量瓶,加 0.1 mol/L 的硫酸溶液 8 mL,摇匀后定容,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.45 μm 膜过滤,待进样分析。

采用高效液相色谱法(HPLC)分析发酵液中乳酸含量(乳酸标准品, Sigma 公司)。HPLC 分析条件:Agilent 1200 液相色谱仪, Zorbax SB-Aq 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm),流动相 V(0.010 mol/L 的磷酸-磷酸盐缓冲液, pH 2.3) : V(甲醇) = 97 : 3,流量为 1 mL/min,紫外检测波长为 210 nm,柱温为 35 °C,进样量为 5 μL。用 HPLC 法测定凝结芽孢杆菌发酵液中乳酸的浓度后,以加入相同含量的乳酸溶液的液体培养基作为对照,采用抑制菌丝生长速率法测定其抑菌率。

1.5 抗真菌活性物质的基本性质

1.5.1 TQ33 菌株生长曲线的绘制

菌株生长曲线的测定采用活菌总数测定法(稀释平板计数法)^[9],将出发菌株接入斜面培养基活化后,分别转接到 11 个装有 100 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中(用接种环使每个三角瓶均匀接 1 环菌),38 °C、140 r/min 摇瓶培养,每隔一段时间取出相应的三角瓶,将一定量的待测样品适当稀释后,接种到平板上培养,选择菌落数在 30~300 的平板,计算原菌液的菌数。以培养时间为横坐标,以菌落数

和相对抑菌率为纵坐标,绘制菌体的生长曲线。

1.5.2 加热对发酵液抗真菌活性的影响

将未加热的无菌上清液(CFS)分别在 60、80、100 °C 水浴 1 h 以及 120 °C 处理 20 min 后,用抑制菌丝生长速率法测定其抑菌活性。

1.5.3 pH 对发酵液抗真菌活性的影响

将原始 pH 6.2 的无菌上清液,分别用 1 mol/L 的 NaOH 或 1 mol/L 的 HCl 调至 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,在室温下保持一定时间后,用抑制菌丝生长速率法^[10]测定其抑菌活性。

1.5.4 酶处理对发酵液抗真菌活性的影响

将原始 pH 6.2 的无菌上清液用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0 后,分别加入胰蛋白酶、中性蛋白酶和蛋白酶 K,于 37 °C 水浴处理无菌上清液 2 h,然后 100 °C 下加热 15 min,目的是使 3 种蛋白酶都失活。然后将处理后的发酵液调回原始 pH,用抑制菌丝生长速率法^[10]测定其抑菌活性。

1.6 抗菌物质的初步分离提取

1.6.1 粗提液的制备

将凝结芽孢杆菌接种到发酵培养基,38 °C、140 r/min 摇瓶培养 67 h。8 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀。上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,即得到抗菌物质的粗提液。

1.6.2 粗提液的分离纯化

将粗提液分别用不同的有机溶剂(石油醚、环己烷、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯等)萃取后,分别将有机相在旋转蒸发仪上蒸干,水相置于通风处使有机溶剂挥发。将萃取得到的物质称量后,加去离子水悬浮,配成相同浓度,用抑制菌丝生长速率法^[10]测定抑菌活性。

将萃取得到的活性组分,用薄板层析法^[11]选择合适的展开剂,对活性物质进行进一步分析,同时用经典的硅胶柱层析法分离收集不同的组分。

将上步所收集的活性物质冻干,用乙腈溶解,用 Agilent 1200 液相色谱仪进行检测,检测硅胶柱层析馏分条件:所用色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm),流动相为 3%~100% 乙腈,进行梯度洗脱,流量为 1 mL/min,检测波长为 220 nm。

1.6.3 抗菌物质相对分子质量的测定

检测柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm),质谱全扫描相对分子质量为 100~1 800,流动相为 A:0.1% FA H₂O, B: CH₃CN。

2 结果与讨论

2.1 抑菌能力的测定结果

以甜瓜疫霉病菌为指示菌,凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵上清液对甜瓜疫霉菌的抑菌作用如图 1 所示。与对照平板相比,用 10% 凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液处理后,菌落直径很小,菌丝生长几乎完全被抑制,表明凝结芽孢杆菌 TQ33 对甜瓜疫霉具有很强的抑菌作用。

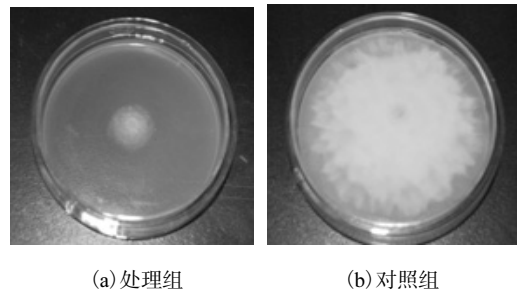


图 1 凝结芽孢杆菌 TQ33 对甜瓜疫霉菌的抑菌活性
Fig.1 Antifungal activity of *B. coagulans* TQ33 against *Phytophthora drechsleri* Tucker

2.2 对几种常见植物病害菌的抑菌活性

以甜瓜疫霉菌(*Phytophthora drechsleri* Tucker)、灰葡萄孢霉菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulate*)为指示菌,用平板生长速率抑制法测定凝结芽孢杆菌 TQ33 的抑菌谱,结果见表 1。

表 1 抗植物致病真菌谱的测定结果
Tab.1 Anti-plant pathogenic fungal spectrum

| 植物致病菌 | 抑菌率/% |
|--------|------------|
| 甜瓜疫霉病菌 | 95.4 ± 2.1 |
| 甜瓜枯萎病菌 | 88.3 ± 1.7 |
| 灰葡萄孢霉菌 | 80.9 ± 1.4 |
| 苹果炭疽病菌 | 60.0 ± 2.0 |
| 番茄早疫病菌 | 48.6 ± 1.9 |

从表中可以看出,凝结芽孢杆菌对这 5 种植物致病菌的菌丝生长都有抑制作用,其中对甜瓜疫霉菌株的抑菌作用最强。

2.3 凝结芽孢杆菌 TQ33 生长曲线的绘制

以培养时间为横坐标,活菌数和相对抑菌率为纵坐标,绘制抑菌率随时间变化曲线如图 2 所示。

由图 2 可知,发酵培养 0~10 h 为凝结芽孢杆菌

生长停滞期,细菌数量极少;自 14 h 以后进入对数生长期,菌体数量急剧增多;在 18 h 时达到生长的高峰期,在 18~20 h 时为凝结芽孢杆菌生长的稳定期,菌体生长缓慢.自 20 h 后,凝结芽孢杆菌进入生长的衰亡期.

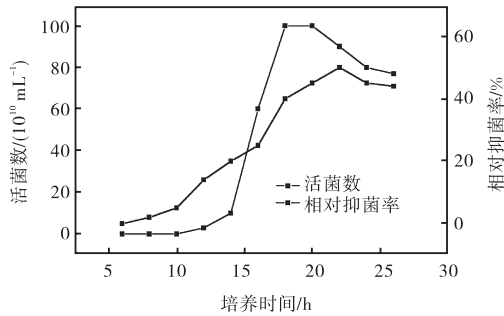


图2 凝结芽孢杆菌 TQ33 的生长曲线
Fig.2 Growth curve of *B. coagulans* TQ33

细胞的代谢产物种类繁多,根据产物生成速率(q_p)以及细胞生长速率(μ)之间的关系,可以将产物生成类型分为三类^[12].第一类是生长相关模型(图3(a)),产物的生成与细胞生长相关.这一类产物主要是和细胞能量代谢相关的直接结果,代谢产物的生成与细胞的生长是相关的,比如乙醇、乳酸等.第二类是部分生长相关模型(图3(b)),产物的生成与细胞生长部分相关或者间接产生关系,比生长速率下降后产物生成比速率才有所增加,进入产物合成期后, q_p 与 μ 接近同步.这类产物大多数是细胞异常代谢的结果,比如柠檬酸、氨基酸等.第三类是非生长相关模型(图3(c)),产物生成与细胞生长不相关或无直接关系,其特点是细胞生长期无代谢产物生成,细胞停止生长后代代谢产物才大量合成.属于这类产物大多数是次级代谢产物,比如抗生素、色素、毒素等.

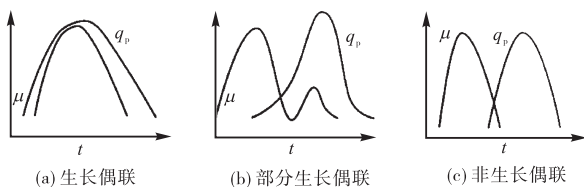


图3 产物生成动力学
Fig.3 Formation kinetics of product

实验结果表明,凝结芽孢杆菌 TQ33 菌株在培养的过程中,菌株的抑菌率是随着菌体生长而逐渐增加的,说明抑菌物质属于第一类,产物的生成与生长是同步的.

2.4 HPLC测定发酵乳中乳酸含量

HPLC 测定凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液中乳酸的

含量,结果如图4所示.

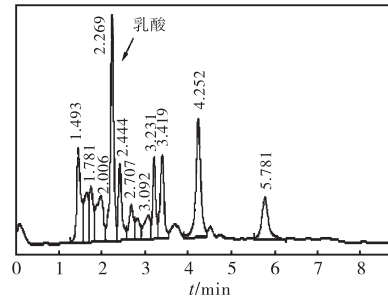


图4 HPLC测定乳酸菌发酵液中乳酸含量
Fig.4 HPLC analysis of lactic acid in culture filtrates

经 HPLC 测得发酵液中乳酸浓度为 85 mmol/L,在已配制好的发酵培养基中加入与凝结芽孢杆菌 TQ33 相同含量的乳酸标品,与 PDA 培养基混合,使其终浓度与凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液中乳酸的含量相同,以此作为实验培养基,用抑制菌丝生长速率法^[10]测定其抑菌活性.结果如图5所示,乳酸对指示菌的生长有一定的影响,但是低于发酵液的抑菌活性,因此起主要作用的并不是乳酸,发酵液中还含有其他对指示菌生长具有抑制作用的物质.

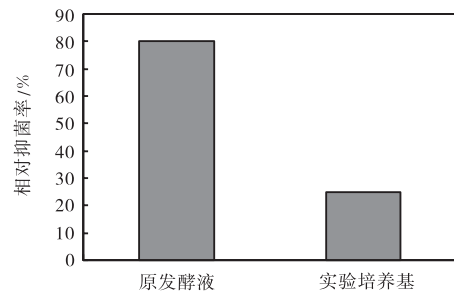


图5 乳酸对指示病菌生长的影响
Fig.5 Growth inhibition of indicator by lactic acid

2.5 温度对发酵液抑菌活性的影响

温度对发酵液抑菌活性的影响如图6所示.经过不同温度处理实验结果发现,在 60、80 °C 时凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液的相对抑菌率为 75%左右,并且随着温度的增加而逐渐降低.在 100 °C 处理 1 h 后,相对抑菌率为 60%,120 °C 处理 20 min 后,抑菌率下降为 5%.这表明凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液能够在高温下保持较高的抑菌活性.

2.6 pH对发酵液抑菌活性的影响

经不同 pH 处理发酵液的实验结果表明(图7),凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液在 pH 为 5~6 时保持较高的抑菌活性,而随着 pH 的相对升高或降低抑菌活性都会迅速下降.

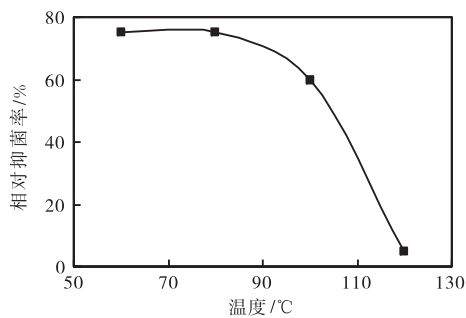


图 6 温度对凝结芽孢杆菌 TQ33 抑菌活性的影响

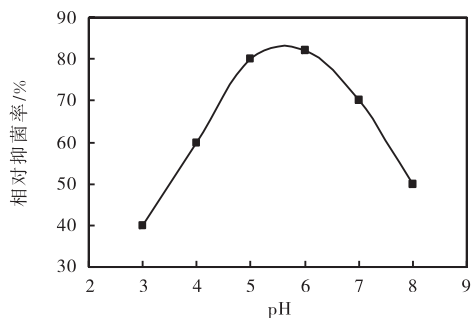
Fig.6 Effect of the temperature on the antifungal activity of *B. coagulans* TQ33

图 7 pH 对凝结芽孢杆菌 TQ33 抑菌活性的影响

Fig.7 Effect of pH on the antifungal activity of *B. coagulans* TQ33

2.7 蛋白酶对发酵液抑菌活性的影响

凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液经蛋白酶 K、胰蛋白酶、中性蛋白酶处理后, 其结果如图 8 所示, 相对抑菌率在不同程度上都有所下降. 经过胰蛋白酶处理后发酵液的抑菌活性相对较高达到 60%, 蛋白酶 K 和中性蛋白酶处理后抑菌活性减少了将近 50% 左右, 但仍具有一定的抑菌活性, 这表明凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液中可能含有一定的蛋白类抑菌物质.

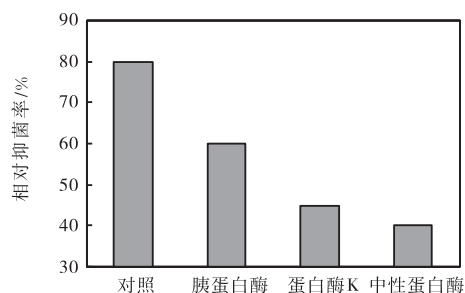


图 8 蛋白酶对凝结芽孢杆菌 TQ33 抑菌活性的影响

Fig.8 Effect of protease on the antifungal activity of *B. coagulans* TQ33

2.8 活性物质的分离纯化

2.8.1 有机溶剂的选择

通过有机溶剂萃取实验发现, 使用乙酸乙酯萃取

后, 抑菌物质可以从水相转至有机相, 而且通过对照实验发现, 乙酸乙酯有机相的抑菌活性最高. 因此, 确定用乙酸乙酯作为下一步萃取的有机溶剂.

2.8.2 薄层层析

在本实验中底剂选择石油醚、环己烷、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯, 极性调节剂选择无水乙醇、甲醇, 拖尾抑制剂选用乙酸. 将底剂和极性调节剂分别配成不同的体积比, 添加 2% 的乙酸作为拖尾抑制剂, 分别进行展开, 选择合适的展开系统. 发现选择石油醚和甲醇作为展开剂的层析结果较好, 层析结果表明该粗提物不是单一组分, 而是由极性不同的多个物质组成的混合活性物质. 254 nm 紫外光下观察, 分别出现 3 个较清晰的点. 因此选择石油醚、甲醇作为洗脱溶剂, 进行色谱柱的分离分析. 并收集各个组分, 进行抑菌活性分析, 发现只有第 2 个点的组分有抑菌活性. 所以, 选择有抑菌活性的组分 2 进行进一步的 HPLC 定性分析.

2.8.3 HPLC 以及质谱分析

将上述活性组分通过 HPLC 分析得到了 3 个含量较高的组分, 如图 9 所示.

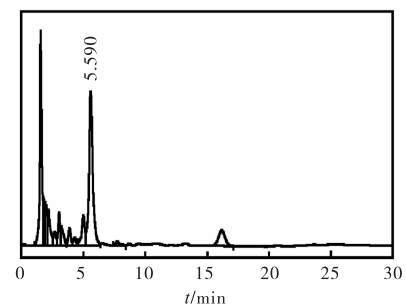


图 9 组分 2 的液相色谱图

Fig.9 Chromatogram of the sample 2

质谱图显示第 2 个峰, 即出峰时间为 5.590 min 这个峰代表的化合物的相对分子质量是 165, 如图 10 所示.

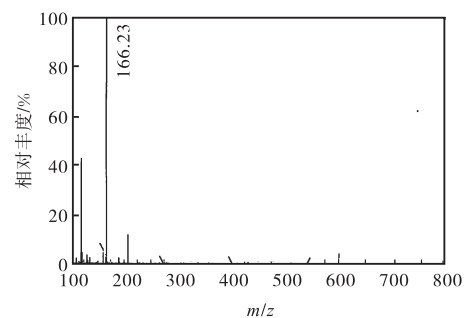


图 10 质谱图

Fig.10 Mass spectra

化合物的相对分子质量按正离子图谱峰值处减1计算. 然后查阅文献得知苯乳酸的相对分子质量为165, 与实验结果相符, 因此可以推测, 该化合物有可能为苯乳酸. 而且关于苯乳酸抑制真菌生长的报道层出不穷.

3 结 论

从脱脂乳粉中分离得到的凝结芽孢杆菌 TQ33 抗植物致病真菌谱进行研究后发现, 其对甜瓜疫霉病菌、甜瓜枯萎病菌、灰葡萄孢霉、番茄早疫病菌和苹果炭疽病菌都有较强的抑菌活性. 其中凝结芽孢杆菌 TQ33 对甜瓜疫霉病菌和甜瓜枯萎病菌的抑菌活性较高.

抗菌活性物质性质实验结果显示: 当用不同 pH 处理凝结芽孢杆菌发酵液后测得抑菌率发现, 凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液在 pH 为 5~6 时保持较高的抑菌活性, 而随着 pH 的相对升高或降低, 抑菌活性都会迅速下降.

不同温度条件下处理后, 在 60、80 °C 时凝结芽孢杆菌 TQ33 发酵液的相对抑菌率为 75% 左右, 并且随着温度的增加而逐渐降低. 在 100 °C 处理 1 h 后, 相对抑菌率为 60%; 120 °C 处理 20 min 后, 抑菌率下降为 5%. 这表明乳酸芽孢杆菌 TQ33 发酵液能够在高温下保持较高的抑菌活性.

经过不同的酶处理后, 相对抑菌率在不同程度上都有所下降. 经过胰蛋白酶处理后, 发酵液的抑菌活性相对较高, 达到 60%. 蛋白酶 K 和中性蛋白酶处理后, 抑菌活性减少了 50% 左右, 但仍具有一定的抑菌活性. 这表明乳酸芽孢杆菌 TQ33 发酵液中可能含有一定的蛋白类抑菌物质.

根据 HPLC 及质谱分析得到其中一种抗真菌物质, 相对分子质量为 165. 根据以上实验结果, 初步推断乳酸芽孢杆菌 TQ33 所产抗真菌活性物质其中一

种可能是苯乳酸.

参考文献:

- [1] Souto G I, Correa O S, Montecchia M S, et al. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified iturin like compounds[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6): 1247-1256.
- [2] 陈士云, 杨宝玉, 高梅影, 等. 一株抑制油菜核盘菌核形成的解淀粉芽孢杆菌[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(3): 373-374.
- [3] 刘颖, 徐庆, 陈章良. 抗真菌肽 LP-1 的分离纯化及特性分析[J]. *微生物学报*, 1999, 39(5): 441-443.
- [4] Clark C A, Lorbear J W. The role of phyllosphere bacteria in pathogenesis by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development[J]. *Annals of Applied Biology*, 1977, 109: 545-559.
- [5] Chell R M, Sundaram T K, Wilkinson A E. Isolation and characterization of isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. [J]. *Biochemical Journal*, 1978, 173: 165-177.
- [6] 廖延雄, 傅筱冲. 芽孢杆菌属(*Bacillus*)二分检索表[J]. *江西科学*, 1998, 16(2): 118-125.
- [7] 唐娟, 张毅, 李雷雷, 等. 地衣芽孢杆菌应用研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2008, 47(3): 351-354.
- [8] 董惠钧, 姜俊云, 郑立军, 等. 新型微生态益生菌凝结芽孢杆菌研究进展[J]. *食品科学*, 2010, 31(1): 292-294.
- [9] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006.
- [10] 姬志勤, 刘伟. 农药活性天然产物及其分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 25-28.
- [11] 汪茂田, 谢培山, 王忠东. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 133-139.
- [12] 曲音波. 微生物技术开发原理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.