

枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 对苹果采后 致病真菌的抑制作用

孙 卉, 师俊玲, 杨保伟

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 液体培养物和固体培养中的挥发性气体产物对多种苹果致病真菌的抑菌活性, 初步确定发酵液中抑制扩展青霉的活性物质的特性, 为其在生物防治中的应用提供理论依据。【方法】以扩展青霉、圆弧青霉、皮落青霉、矮棒曲霉、黑曲霉、黄柄曲霉为指示菌, 用对峙培养法检测菌体的抑菌活性, 用杯碟法检测无菌体发酵液及其提取物的抑菌活性, 用平板对扣法测定挥发性气体产物的抑菌活性, 以确定枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的各种培养物对苹果采后致病真菌的抑制作用。【结果】枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的菌体、无菌体发酵液和挥发性气体产物对多种苹果致病真菌, 特别是扩展青霉有显著抑制作用, 其中菌体和无菌体发酵液的抑菌圈直径分别为 (19.0 ± 0.82) mm 和 (18.9 ± 0.57) mm, 挥发性气体产物对扩展青霉的抑菌率可以达到 $(87.2 \pm 4.19)\%$; 发酵液中抑制扩展青霉的活性物质能够溶于 50% 体积分数乙醚; 发酵液经 50% 硫酸铵饱和度提取后, 抑菌活性保持率为 84.4%。【结论】枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的发酵液和挥发性气体产物能够抑制多种苹果致病真菌, 特别是扩展青霉的生长。

【关键词】 枯草芽孢杆菌; 抑菌活性; 致病真菌; 苹果; 扩展青霉

【中图分类号】 S482.2⁺92

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0168-07

Antifungal activity of *Bacillus subtilis* CCTCC M207209 on rot-causing fungi in postharvest apples

SUN Hui, SHI Jun-ling, YANG Bao-wei

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100 China)

Abstract: 【Objective】 The paper aimed at evaluating the antifungal activity of the liquid culture and the organic volatile products in solid-state cultivation of *Bacillus subtilis* CCTCC M207209 in inhibiting the rot-causing fungi in postharvest apples and primarily identifying the antifungal substance on inhibiting *Penicillium expansum*. 【Method】 Six rot-causing fungi, including *Penicillium expansum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus clavatonanicus*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus flavipes*, were used as indicators in the study. In order to identify the inhibitory activity of different products of *Bacillus subtilis* CCTCC M207209 against apples rot-causing fungi, the dual-culture plate method, the cup-plate method, and the two-sealed-base-plates method were used to test the antifungal activity of cells, cell-free liquid culture and extracts in different solvents of the liquid culture, and volatile products in the solid-state cultivation of *B. subtilis* CCTCC M207209, respectively. 【Result】 Cells and the cell-free liquid culture of *B. subtilis* CCTCC M207209 show significant inhibitory activity to most of the rot-causing fungi, especially *P. expansum*. The diameter of antibacterial zone of the cell plug and cell-free liquid culture are

* [收稿日期] 2009-03-30

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A24)

[作者简介] 孙 卉(1983—), 女, 河北献县人, 在读硕士, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: huihuicici@yahoo.com.cn

[通信作者] 师俊玲(1972—), 女, 陕西渭南人, 教授, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: sjlshi2004@yahoo.com.cn

(19.0 ± 0.82) mm and (18.9 ± 0.57) mm, respectively. The volatiles products can inhibit *P. expansum* growth, the inhibitory rate reaching (87.2 ± 4.19)% The anti-fungal substance in the liquid culture of *B. subtilis* CCTCC M207209 against *P. expansum* could be dissolved in 50% (V/V) ether and precipitated by 50% saturation degree ammonia sulphate, 84.4% of the antibacterial activity is maintained. 【Conclusion】 The liquid culture and volatile products in solid-state cultivation of *B. subtilis* CCTCC M207209 could inhibit many rot-causing fungi, especially *P. expansum*, in apples.

Key words: *Bacillus subtilis*; anti-fungal activity; rot-causing fungus; apple; *Penicillium expansum*

腐烂是水果采后贮藏过程中发生的主要病害。曲霉和青霉是苹果采后贮藏中主要的致腐菌^[1],而腐烂的伤口有利于展青霉素产生菌的侵入与生长^[2-3]。展青霉素是一种对动物具有致癌、致畸、致突变的真菌毒素,在苹果汁中污染十分严重^[4],展青霉素的产生菌主要是扩展青霉^[5]。因此,寻找能够有效抑制苹果致腐真菌和扩展青霉生长的微生物,对于苹果腐烂病和展青霉素的生物防治具有重要意义。已有报道指出,一些酵母菌、乳酸杆菌、芽孢杆菌、腐生性细菌、放线菌等可以抑制扩展青霉的生长^[6-8]。其中枯草芽孢杆菌是目前生物防治方面最有应用潜力的一种菌,它能够抑制多种细菌和真菌的生长,而且对人体和牲畜无毒,因而在多种病菌的生物防治中得到广泛应用^[9]。大量研究发现,一些枯草芽孢杆菌菌株的发酵液对水稻白叶枯萎病、香蕉冠腐病、苹果采后青霉病和柑橘采后青霉病都有很好的抑制作用^[10-14]。据分析,这些抗菌物质主要是细菌素^[15]、酶类^[16-17]、活性蛋白类^[18-19]、脂肽类^[20-22]、多肽类^[23-25]、多烯类化合物^[26-27]等。汤超兰^[28]和黄继翔^[29]指出,枯草芽孢杆菌所产抑制扩展青霉生长的活性物质可能是 4.5 ku 的抗菌蛋白和几丁质酶。Chen 等^[30]认为,枯草芽孢杆菌菌株的挥发性气体产物能够抑制葡萄灰霉病病原菌的孢子萌发和菌丝体的生长。目前,有关枯草芽孢杆菌所产抑扩展青霉活性物质,以及其挥发性气体产物对扩展青霉抑制作用的相关研究尚未见报道。为此,本研究在前期菌种分离筛选的基础上,进一步研究了枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的发酵液和挥发性气体产物对苹果致腐真菌,特别是扩展青霉的抑制活性,并初步确定了其发酵液中的抑菌活性物质,以期为枯草芽孢杆菌应用于实际生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) CCTCC M207209; 西北农林科技大学食品科学与工程学院

发酵工程与食品生物技术实验室从土壤中分离保藏,经中国典型微生物保藏中心鉴定为枯草芽孢杆菌。

苹果致腐真菌:扩展青霉 (*Penicillium expansum*) SP-2205、圆弧青霉 (*Penicillium cyclopium*) SP-01、皮落青霉 (*Penicillium crustosum*) SP-02、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) SP-03、矮棒曲霉 (*Aspergillus clavatonanicus*) SP-04、黄柄曲霉 (*Aspergillus flavipes*) SP-05,来源于腐烂苹果,由西北农林科技大学食品科学与工程学院食品微生物学实验室提供。

1.2 培养基

营养肉汤 (NB) 培养基:牛肉膏 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 20 g/L、NaCl 5 g/L, pH 6.5~6.7,用于枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的液体培养及其发酵液的制备。

营养肉汤琼脂 (NA) 培养基:在 NB 培养基中加入 20 g/L 的琼脂粉,用于枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的保存与活化。

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基:用 200 g/L 土豆浸出液配制,含葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 20 g/L, pH 7.0,用于抑菌活性检测。

1.3 枯草芽孢杆菌菌碟和无菌体发酵液的制备

在装有 15 mL NA 培养基、直径 90 mm 的培养皿中,接入 0.1 mL 菌体密度为 1.0×10^8 mL⁻¹ 的枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209,在 37 ℃ 下培养 24 h 后,用打孔器打取直径为 7 mm 的圆形菌块,即为该菌的菌碟。取上述菌碟 3 块,接入装有 100 mL NB 培养液的 250 mL 摇瓶中,在 32 ℃、200 r/min 条件下恒温培养 44 h 后,取出培养物,在 10 000 r/min 下离心 15 min,取上清液经 0.22 μm 无菌滤膜过滤,所得滤液即为无菌体发酵液,其 pH 为 6.57。

1.4 硫酸铵沉淀物的制备

参考文献[24],在上述无菌体发酵液中添加固体硫酸铵至 50% 饱和度,置 4 ℃ 下过夜,在 4 ℃、12 000 r/min 下离心 20 min。将每 100 mL 培养液

所得沉淀用 50 mL 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮,备用。

1.5 有机溶剂萃取物的制备

取 20 mL 无菌体发酵液,分别加入等量的石油醚、乙醚、乙酸乙酯萃取,重复 3 次,每次 5 min。萃取液经 40 ℃真空旋转蒸发,回收溶剂后用蒸馏水定容至 20 mL,检测其对扩展青霉的抑菌活性。

1.6 抑菌活性检测

1.6.1 致腐真菌的活化与培养 将各种致腐真菌接种于 PDA 培养基上,28 ℃培养 7 d,用含有少量 Tween-80 的无菌水冲洗孢子,充分振荡、混合均匀后,用血球计数板计数,调整孢子密度为 1.5×10^7 mL⁻¹,分装至 1 mL 无菌离心管中,4 ℃保存,1 周内使用。

1.6.2 菌体抑菌活性的检测(对峙培养法) 在培养皿中的 PDA 培养基上,均匀涂布 100 μL 上述致腐真菌的孢子悬浮液,然后用打孔器在平板中央打一直径 7 mm 的孔洞,在洞中放入 1.3 中制备好的枯草芽孢杆菌菌碟。对照为无孔洞、无枯草芽孢杆菌菌碟的致腐真菌 PDA 培养物。

1.6.3 无菌体发酵液及其提取物抑菌活性的检测 参考文献[31],采用杯碟法进行抑菌活性的测定。具体方法为:在培养皿中的 PDA 培养基上,均匀涂布 100 μL 上述致腐真菌的孢子悬浮液,在该培养物的中央置一外直径为 8 mm 的牛津杯,在杯中加入 200 μL 无菌体发酵液、硫酸铵沉淀物、有机溶剂萃取物或对照。除硫酸铵沉淀物的对照为 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液外,其他样品的对照均为无菌水。

将 1.6.2 和 1.6.3 中接种好的培养皿在 28 ℃

下培养 72 h,按照十字交叉法用直尺测量牛津杯周围的抑菌圈直径,每个处理设 3 个重复,取平均值。

1.6.4 挥发性气体产物抑菌活性的检测(平板对扣法) 参考文献[32],采用平板对扣法进行测定。具体操作为:在培养皿中的 PDA 培养基上,用打孔器在中央打一直径 7 mm 的孔洞,在其中放入相同直径的霉菌菌丝块(PDA 培养基上培养 1 d)。另取一涂布有 100 μL 枯草芽孢杆菌菌体悬浮液的 NA 平板,与上述霉菌平板倒扣在一起,并用透明胶带密封。以对扣的致腐真菌的 PDA 平板和空白 NA 平板为对照。PDA 平板在下、NA 平板在上培养 7 d 后,测定致腐真菌的菌落直径。每个处理设 3 个重复,取平均值。

上述试验中所用培养皿的直径均为 90 mm,其中培养基的装量均为 15 mL。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌菌碟和液体培养物对苹果致腐真菌的抑制作用

分别测定了枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的菌碟、无菌体发酵液和硫酸铵沉淀物对不同苹果致腐真菌的抑制效果,结果见表 1。由表 1 可知,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的菌碟和硫酸铵沉淀物对矮棒曲霉的生长有轻微的抑制作用,无菌体发酵液对矮棒曲霉的生长无抑制作用;菌碟、无菌体发酵液和硫酸铵沉淀物对其他苹果致腐真菌的生长均有显著抑制作用,其中菌碟和无菌体发酵液对扩展青霉的抑制作用最大,硫酸铵沉淀物对黄柄曲霉的抑制作用最大。

表 1 枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 菌碟和液体培养物对苹果致腐真菌的抑制作用
Table 1 Inhibitory action of the cell plug and liquid culture of *B. subtilis* CCTCC M207209 on the rot-causing fungi in apples

致腐真菌 Rot-causing fungus	抑菌圈直径/mm Diameter of the inhibitory zone		
	菌碟 Cell plug	无菌体发酵液 Cell-free liquid culture	硫酸铵沉淀物 Saturation degree ammonia sulphate precipitate
扩展青霉 <i>Penicillium expansum</i>	19.0±0.82 a	18.9±0.57 a	17.2±1.02 b
圆弧青霉 <i>Penicillium cyclopium</i>	14.5±1.95 bc	16.3±1.71 b	17.4±1.36 b
皮落青霉 <i>Penicillium crustosum</i>	13.2±0.62 c	17.6±0.48 ab	16.0±0.33 c
矮棒曲霉 <i>Aspergillus clavatonanicus</i>	10.0±0.01 d	8.0±0.01 c	11.5±0.46 d
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	14.0±1.15 bc	17.1±0.30 b	17.6±1.17 b
黄柄曲霉 <i>Aspergillus flavipes</i>	15.3±0.48 b	16.5±1.29 b	18.9±0.85 a

注:同列数据后标不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。下表同。
Note:Data with different letters in the same line showed significant difference at level of $P<0.05$. The following table is the same.

2.2 枯草芽孢杆菌发酵液提取物对扩展青霉的抑制作用

以扩展青霉为指示菌,测定枯草芽孢杆菌不同

发酵液提取物的抑菌活性。检测结果(表 2)显示,石油醚提取物和乙酸乙酯提取物对扩展青霉的生长无抑制作用,乙醚提取物对扩展青霉生长有抑菌作

用。由表 2 可知,枯草芽孢杆菌发酵液中硫酸铵沉淀物的抑菌活性是无菌体发酵液的 84.4%。说明

枯草芽孢杆菌发酵液中抑制扩展青霉生长的主要活性物质可以用硫酸铵沉淀。

表 2 枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 不同发酵液提取物对扩展青霉生长的抑制作用

枯草芽孢杆菌提取物 Products of <i>Bacillus subtilis</i> CCTCC M207209	抑菌圈直径/mm Diameter of the inhibitory zone	
	样品处理组 Sample	对照组 Control
无菌体发酵液 Cell-free liquid culture	18.9±0.57 a	8.0
硫酸铵沉淀物 Saturation degree ammonia sulphate precipitate	17.2±1.02 b	8.0
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts	8.0±0.01 d	8.0
石油醚提取物 Petroleum ether extracts	8.0±0.01 d	8.0
乙醚提取物 Ethyl oxide extracts	15.0±0.71 c	8.0

根据以上结果推测,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 发酵液中,抑制扩展青霉生长的主要活性物质可以溶于 50%乙醚(乙醚与发酵液的体积比为 1:1),并可被 50%硫酸铵饱和度沉淀。关于该物质有待进一步研究。

2.3 枯草芽孢杆菌挥发性气体产物对苹果致病真菌的抑制作用

表 3 结果显示,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物对所有参试的苹果致病真菌均有显著抑制作用。其中对扩展青霉的抑制作用最强,抑

制率可达 87.2%;对圆弧青霉的抑制作用最小,抑制率仅有 20.0%;对其他真菌的抑制率均在 60%以上,抑制作用由大到小依次为皮落青霉、矮棒曲霉、黑曲霉、黄柄曲霉。

枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物对 6 种苹果致病真菌的抑制效果如图 1 所示。由图 1 可以看出,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物的抑菌作用极好,不仅明显抑制了气生菌丝,而且同时也强烈抑制了基内菌丝。

表 3 枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物对苹果致病真菌的抑制作用

致病真菌 Rot-causing fungus	菌落直径/mm Diameter of the fungal colonies		抑制率/% Inhibitory rate
	对照 Control	处理 Treatment with the volatiles	
扩展青霉 <i>Penicillium expansum</i>	43.5	11.7±1.53	87.2±4.19 a
圆弧青霉 <i>Penicillium cyclopium</i>	32.0	27.0±2.00	20.0±8.00 d
皮落青霉 <i>Penicillium crustosum</i>	34.5	11.7±0.46	82.8±1.68 ab
矮棒曲霉 <i>Aspergillus clavatonanicus</i>	75.0	20.3±1.53	80.4±2.25 ab
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	60.2	19.9±2.61	75.7±4.91 b
黄柄曲霉 <i>Aspergillus flavipes</i>	65.0	28.0±2.65	63.8±4.56 c

3 讨 论

本研究综合考察了枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 对多种苹果采后致病真菌和扩展青霉的抑制作用。结果表明,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 除能够有效抑制扩展青霉、皮落青霉等展青霉素产生菌外,还能有效抑制黑曲霉、黄柄曲霉、矮棒曲霉、圆弧青霉等苹果采后致病真菌的生长。这说明该菌株在抑制苹果采后腐烂和展青霉素污染方面有很好的应用潜力。

在后期试验中发现,在接种有扩展青霉的苹果和苹果汁中接入菌株 CCTCC M207209 的无菌体发

酵液,培养一段时间后,其对苹果上扩展青霉生长的抑制作用可达 40%以上,对苹果汁中扩展青霉的生长和产毒的抑制作用可达 80%以上。因此,该菌株的无菌体发酵液在抑制苹果和苹果汁加工过程中扩展青霉的二次生长和产毒方面也有一定的应用潜力。

菌株 CCTCC M207209 对不同致病真菌的抑制机理和抑菌活性物质可能有所不同。据报道,枯草芽孢杆菌能够产生多种抑菌活性物质,它们能够通过抑制原核生物的蛋白合成、产生抗菌蛋白和竞争作用等途径来杀灭或抑制病原菌的生长^[33]。本研究发现,菌株 CCTCC M207209 的无菌体发酵液中

硫酸铵沉淀物对扩展青霉的抑制作用显著小于无菌体发酵液,而对黄柄曲霉的抑制作用显著大于无菌体发酵液。这说明,该菌株的发酵液中抑制扩展青霉和黄柄曲霉的活性物质并不相同,或者不完全相

同;抑制黄柄曲霉的活性物质可以用 50%硫酸铵饱和度全部沉淀下来,而抑制扩展青霉的活性物质不能完全沉淀出来。

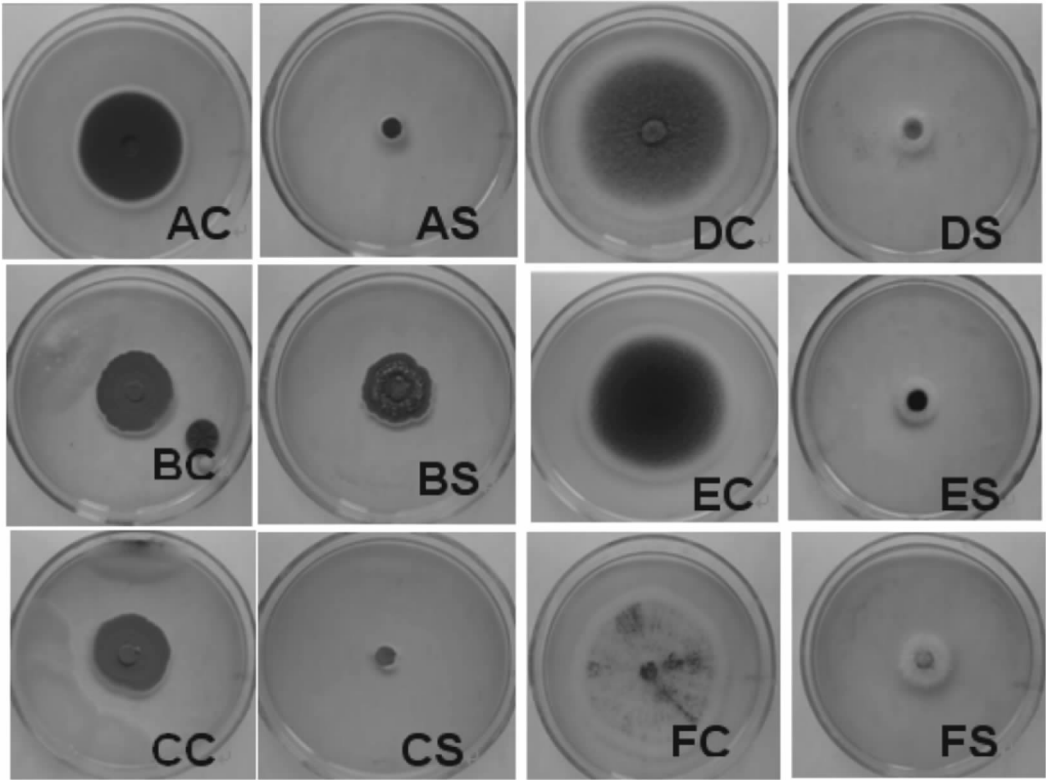


图 1 枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物对苹果致病真菌的抑制效果

AC、BC、CC、DC、EC、FC 分别为扩展青霉、圆弧形青霉、皮落青霉、矮棒曲霉、黑曲霉、黄柄曲霉等苹果致病真菌的对照;

AS、BS、CS、DS、ES、FS 分别为上述苹果致病真菌经枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 挥发性气体产物处理后的结果

Fig. 1 Inhibitory action of the volatile products of *B. subtilis* CCTCC M207209 on the rot-causing fungi in apples

AC、BC、CC、DC、EC、FC are the control of *Penicillium expansum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum*,

Aspergillus clavatonanicus, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavipes*, respectively; and AS、BS、CS、DS、ES、FS are their samples treated by the volatile products of *B. subtilis* CCTCC M207209, respectively

枯草芽孢杆菌产生的抑菌活性物质主要有细菌素及脂肽类、多肽类和活性蛋白类物质等。根据汤超兰^[28]和黄继翔^[29]的报道,枯草芽孢杆菌产生的 4.5 ku 的抗菌蛋白和几丁质酶可能是抑制扩展青霉的主要活性物质。本研究结果表明,扩展青霉的 50%硫酸铵饱和度下沉淀物的抑菌活性是无菌体发酵液的 84.4%,乙醚萃取物的抑菌活性是无菌体发酵液的 64.2%。

在已有报道中,能够用 50%硫酸铵饱和度沉淀下来的抑菌活性蛋白的分子质量均在 40 ku 以上^[9]。但是在后续试验中,将本研究所得的硫酸铵沉淀物经 SDS-PAGE 电泳后分为 4 个蛋白质条带,分子质量分别是 37.5,28.53,21.74 和 15.31 ku,高

压灭菌后的发酵液在最低分子质量为 6.5 ku 的电泳系统中无蛋白条带出现。

据已有报道,枯草芽孢杆菌所产耐热性好的抑菌活性物质多为分子质量为 1.08~1.46 ku 的抗菌肽^[34-35],但其提取方法为直接过吸附柱或凝胶柱,或先用酸沉淀再经有机溶剂提取,与本文所用 50%硫酸铵饱和度沉淀法不同。因此,本研究所得抑制扩展青霉活性物质的具体成分还需进一步研究。

已有报道指出,枯草芽孢杆菌的一些挥发性气体产物对葡萄灰霉病病原菌的生长有抑制作用^[30]。本研究发现,枯草芽孢杆菌挥发性气体产物对扩展青霉、黑曲霉、黄柄曲霉、矮棒曲霉、皮落青霉也有很好的抑制效果,能够为这些病原菌的生物防治提供

新途径,为其在控制苹果腐烂和展青霉素污染方面的应用提供参考。后期研究还发现,有菌株 CCTCC M207209 的气体产物存在时,接种有扩展青霉的苹果发病率由 100%降低至 55%。这说明,该菌株的挥发性气体产物在抑制苹果扩展青霉污染方面具有一定的应用潜力。

4 结 论

本研究发现,枯草芽孢杆菌 CCTCC M207209 的菌体、无菌体发酵液、50%硫酸铵饱和度沉淀物和挥发性气体产物均能够有效抑制多种苹果致病真菌,特别是扩展青霉的生长。发酵液中抑制扩展青霉的活性物质能够溶于 50%体积分数乙醚,可在 50%硫酸铵饱和度下沉淀。

[参考文献]

- [1] Hasan H A H. Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, 16(7): 607-612.
- [2] Barkai G R, Paster N. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: Part 1 [J]. World Mycotoxin Journal, 2008, 1(2): 147-159.
- [3] Barkai G R, Paster N. Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: Part 2 [J]. World Mycotoxin Journal, 2008, 1(4): 385-396.
- [4] 张小平, 李元瑞, 师俊玲, 等. 苹果汁中棒曲霉素控制技术研究进展 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1672-1676.
Zhang X P, Li Y R, Shi J L, et al. A review on the control of patulin in apple juice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1672-1676. (in Chinese)
- [5] Morales H, Marin S, Rovira A, et al. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages [J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(1): 30-35.
- [6] Florianowicz T. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum* [J]. European Food Research and Technology, 2001, 212(3): 282-286.
- [7] 朱从会, 师俊玲, 杨保伟. 展青霉素产生菌拮抗放线菌的分离、筛选与初步鉴定 [J]. 农业机械学报, 2008, 39(3): 86-90.
Zhu C H, Shi J L, Yang B W. Isolation, screening and identification of antagonistic *Actinomycetes* having ability in inhibiting patulin-producing *Penicillium* [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(3): 86-90. (in Chinese)
- [8] 朱从会, 师俊玲, 杨保伟, 等. 放线菌 CCTCC M207210 所产青霉抑制物的稳定性及应用 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(2): 636-641.
Zhu C H, Shi J L, Yang B W, et al. Stability of antifungal substance produced by *Actinomycete* CCTCC M207210 and its application [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(2): 636-641. (in Chinese)
- [9] 李 晶, 杨 谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 106-111, 132.
Li J, Yang Q. Research progress on biocontrol *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(1): 106-111, 132. (in Chinese)
- [10] 林 东, 徐 庆, 刘忆舟, 等. 枯草芽孢杆菌 SO113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 77-80.
Lin D, Xu Q, Liu Y Z, et al. The antibacterial effect of the secreted peptide from *Bacillus subtilis* SO113 and separation and purification of the antibacterial peptides [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2001, 9(1): 77-80. (in Chinese)
- [11] 王星云, 宋卡魏, 张荣意. 枯草芽孢杆菌 B68 拮抗物质对香蕉冠腐病菌的抑菌作用及其稳定性测定 [J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 391-393.
Wang X Y, Song K W, Zhang R Y. Antagonism against *Fusarium semitectum* and properties of antifungal substance from *Bacillus subtilis* B68 strain [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2007, 23(4): 391-393. (in Chinese)
- [12] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109-112.
Cheng H B, Liu X Q, Chen H M. Research advance in controlling plant fungous diseases by *Bacillus subtilis* [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2006, 22(1): 109-112. (in Chinese)
- [13] 齐东梅, 惠 明, 梁启美, 等. 枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果 [J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 171-174.
Qi D M, Hui M, Liang Q M, et al. Postharvest biological control of blue mold and blackspot on apple-pear fruit by *Bacillus subtilis* H110 [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(2): 171-174. (in Chinese)
- [14] 范 青, 田世平, 李永兴, 等. 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 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 343-348.
Fan Q, Tian S P, Li Y X, et al. Postharvest biological control of green mold and bluemold of citrus fruits by *Bacillus subtilis* B-912 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2000, 30(4): 343-348. (in Chinese)
- [15] Zheng G, Slavik M. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain [J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 28: 363-367.
- [16] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 174-177.
Lin F C, Li D B. Cell-lytic effect of *Bacillus subtilis* on plant fungal pathogens [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 174-177. (in Chinese)
- [17] 顾真荣, 马承铸, 韩长安. 产几丁质酶芽孢杆菌的筛选鉴定和酶活力测定 [J]. 上海农业学报, 2001, 17(3): 92-96.
Gu Z R, Ma C Z, Han C A. Screening and identification of

- chitinase producing *Bacillus* spp. and determination of their chitinase activity [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2001, 17 (3): 92-96. (in Chinese)
- [18] 刘永峰, 陈志谊, 张杰. 枯草芽孢杆菌 B-916 胞外抗菌蛋白质的性质 [J]. 江苏农业学报, 2005, 21(4): 288-293.
Liu Y F, Chen Z Y, Zhang J. Properties of antifungal proteins secreted by *Bacillus subtilis* strain B-916 [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2005, 21(4): 288-293. (in Chinese)
- [19] 刘振宇, 柳韶华, 赵春青, 等. 枯草芽孢杆菌对桑炭疽病的抑制作用 [J]. 农业科学, 2005, 31(4): 409-412.
Liu Z Y, Liu S H, Zhao C Q, et al. Inhibition effect of *Bacillus subtilis* on colletotrichum morifolium [J]. Agricultural Sciences, 2005, 31(4): 409-412. (in Chinese)
- [20] Besson F, Michel G. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E [J]. Journal of Antibiotics, 1987, 40: 437-442.
- [21] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1968, 31: 488-494.
- [22] 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 等. *Bacillus subtilis* fmbR 抗菌物质的分离和鉴定 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2327-2334.
Bie X M, Lu Z X, Lü F X, et al. Isolation and identification of the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbR [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(11): 2327-2334. (in Chinese)
- [23] 刘伊强, 王雅平, 潘乃穰, 等. 拮抗菌 TG26 的鉴定及其抗菌蛋白 BI 的纯化和部分特性 [J]. 植物学报, 1994, 36(3): 197-203.
Liu Y Q, Wang Y P, Pan N S, et al. Identification of antagonistic strain TG26 and purification of its antifungal protein [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1994, 36(3): 197-203. (in Chinese)
- [24] 何青芳, 陈卫良, 马志超. 枯草芽孢杆菌 A30 菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究 [J]. 中国水稻科学, 2002, 16(4): 361-365.
He Q F, Chen W L, Ma Z C. Purification and properties of antagonistic peptide produced by *Bacillus subtilis* A30 [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16(4): 361-365. (in Chinese)
- [25] Wu S M, Jia S F, Sun D D. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM42A and subpeptin JM42B produced by *Bacillus subtilis* JM4 [J]. Current Microbiology, 2005, 51(5): 292-296.
- [26] Patel P S, Huang S, Fisher S. Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physicochemical characterization and biological activity [J]. Antibiotics, 1995, 48(9): 997-1003.
- [27] Zimmerman S B, Schwartz C D, Monaghan R L, et al. Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I: Production, taxonomy and antibacterial activity [J]. Antibiotics, 1987, 40(12): 1677-1681.
- [28] 汤超兰. 产儿丁质酶芽孢杆菌的筛选、发酵及抗真菌初步研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
Tang C L. Studies on the screening, fermentation and preliminary antifungal application of chitinase-producing *Bacillus* spp. [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [29] 黄继翔. 抑扩展青霉芽孢杆菌的筛选鉴定及抑菌物质研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
Huang J X. Screen and identification of *Bacillus* spp. inhibiting *Penicillium expansum* and research on antifungal component [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [30] Chen H, Xiao X, Wang J, et al. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea* [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(5): 919-923.
- [31] Tramer J, Fowler G G. Estimation of nisin in food [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1964, 15(8): 522-528.
- [32] Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48(1): 113-121.
- [33] 刘雪, 穆常青, 蒋细良, 等. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用 [J]. 中国生物防治, 2006, 22 (增刊): 179-184.
Liu X, Mu C Q, Jiang X L, et al. Research progress of the metabolic substances produced by *Bacillus subtilis* and their application on biocontrol of plant disease [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22 (Supplement): 179-184. (in Chinese)
- [34] 张崇, 赵秀香, 宋影, 等. 枯草芽孢杆菌 SN-02 发酵液的抑菌谱及稳定性研究 [J]. 生物技术, 2007, 17(4): 71-73.
Zhang C, Zhao X X, Song Y, et al. Antimicrobial spectrum and stability of the fermentation broth of *Bacillus subtilis* SN-02 [J]. Biotechnology, 2007, 17(4): 71-73. (in Chinese)
- [35] 刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化 [J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 511-514.
Liu J, Wang J, Yao J M, et al. Properties of the crude extract of *Bacillus subtilis* and purification of antimicrobial peptides [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 511-514. (in Chinese)