

枯草芽孢杆菌STO-12脂肽类物质抑菌活性及其特性分析*

黄华毅¹ 黄咏槐¹ 黄焕华¹ 梁英梅² 田呈明³

(1. 广东省森林培育与保护利用重点实验室 / 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520; 2. 北京林业大学标本馆, 北京 100083; 3. 北京林业大学 / 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083)

摘要 为了探索植物病害生物防治的新途径, 对枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) STO-12 的脂肽类物质的抑菌活性和特性进行分析, 采用滤纸片法、排油试验、乳化试验和表面张力测试检测脂肽类物质的抑菌活性和特性。研究表明, 枣缩果病菌 (*Alternaria tenuissima*)、杨树炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和杨树腐烂病菌 (*Cytospora chrysosperma*) 的生长受到脂肽类物质的强烈抑制, 最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.02, 0.04 和 0.02 mg·disc⁻¹; 分别在高温处理、强酸强碱处理、蛋白酶处理、紫外线处理及室温保存条件下, STO-12 的脂肽类物质仍能保持其抑菌活性的稳定; 另外, 通过 3 种不同的检测试验, 发现 STO-12 的脂肽类物质还具有较好的表面活性剂的特性。综上所述, 研究表明枯草芽孢杆菌 STO-12 分泌的脂肽类物质具有高效的抗真菌活性, 较好的抑菌活性稳定性和较强的表面活性剂的特性, 作为生防制剂和生物表面活性剂, 在工业和田间应用中具有较大的应用潜力。

关键词 枯草芽孢杆菌; 抑菌脂肽; 抑菌活性; 特性

中图分类号: S763.1 文献标识码: A 文章编号: 2096-2053 (2018) 04-0008-07

Antifungal Activities and Characterization of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* STO-12

HUANG Huayi¹ HUANG Yonghuai¹ HUANG Huanhua¹
LIANG Yingmei² TIAN Chengming³

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization / Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Museum of Beijing Forestry University, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 3. Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract In order to explore new pathways for biocontrol of plant diseases, the antifungal activity and characterization of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* STO-12 have been investigated. Filtering paper method, oil displacement test, emulsification activity test, and surface tension measurements were used to determine the antifungal activity and characterization of the lipopeptides. The results indicated that *Alternaria tenuissima*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Cytospora chrysosperma* were strong inhibited by the lipopeptides, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were revealed 0.02, 0.04, and 0.02 mg·disc⁻¹. Even after extreme temperature, pH, and protease treatments, UV radiation, and prolonged storage at room temperature, the antifungal activity of the lipopeptides remained stable. Moreover, the powerful biosurfactant properties of the lipopeptides had been found, as assessed by three different methods. This study demonstrates

* 基金项目: 北京市支持中央高校共建项目 (2050205); 国家自然科学基金 (31470647)。

第一作者: 黄华毅 (1989—), 男, 助理研究员, 主要从事林业有害生物防控技术研究, E-mail: hhy19890408@163.com。

通信作者: 田呈明 (1963—), 男, 教授, 主要从事森林病理及病害防治研究, E-mail: chengmt@bjfu.edu.cn。

that antifungal lipopeptides secreted by *B. subtilis* STO-12 possess strong antifungal activity, good stability, and powerful biosurfactant properties. They may be useful as biocontrol agents and biosurfactants and have potential in industrial and field applications.

Key words *Bacillus subtilis*; antifungal lipopeptides; antifungal activity; characterization

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 因其抑菌活性强、抑菌谱广、对环境和生态健康安全等优点, 已被广泛应用于植物病害的防治上。枯草芽孢杆菌防治植物病害的作用方式多种多样, 主要有拮抗作用、竞争作用、溶菌作用、诱导抗性及其促进植物生长等^[1-2]。其中, 通过产生抑菌活性物质抑制病原菌的生长、发展或直接杀死病原菌的拮抗作用是枯草芽孢杆菌表现出较强抑菌活性和较广抑菌谱的主要原因之一^[3]。枯草芽孢杆菌能产生多种类型的抑菌活性物质, 其中通过非核糖体途径合成的脂肽类抑菌活性物质是其产生的主要抑菌活性物质之一^[4]。

枯草芽孢杆菌产生的脂肽类物质主要分为三大家族: 伊枯草菌素 (iturins)、表面活性素 (surfactins) 和丰原素 (fengycins), 这些脂肽类物质在抑菌特性及其他特性上均有一定的差异^[5]。伊枯草菌素具有很强的溶血性及抑制真菌活性, 只有一定抑制细菌和病毒的能力^[5-6]。表面活性素也有很强的溶血性, 能有效抑制病毒和支原体并具有很广的抑菌谱, 但对病原真菌没有显著的抑菌活性^[5-6]。此外, 表面活性素还具有很强的表面活性特性^[7]。丰原素只对丝状真菌具有抑菌活性且有一定的溶血性^[8]。前期研究发现拮抗菌枯草芽孢杆菌 STO-12 分泌的蛋白类物质、脂肽类物质及挥发性气体均能有效抑制多种植物病原真菌的生长^[9-10]。本研究进一步分析了枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽类物质对多种植物病原真菌的抑菌活性及特性, 为该菌株及其脂肽类物质的进一步开发和应用提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

枯草芽孢杆菌 STO-12 由北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室分离和保存。供试植物病原真菌: 枣缩果病菌 (*Alternaria tenuissima*)、杨树炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和杨树腐烂病菌 (*Cytospora chrysosper-*

ma) 均保存于中国林业微生物菌种保藏管理中心 (CFCC)。

1.2 培养基

枯草芽孢杆菌 STO-12 的平板培养和斜面保存采用 LB 固体培养基; 枯草芽孢杆菌 STO-12 的种子液的制备采用 LB 液体培养基; 病原真菌的培养和抑菌活性的检测采用 PDA 培养基; 枯草芽孢杆菌 STO-12 的发酵培养采用优化培养基 (葡萄糖 22.64 g, 蛋白胨 11.93 g, 大豆粉 5.00 g, KH_2PO_4 1.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, NH_4Cl 3.00 g, Na_2HPO_4 1.00 g, 酵母浸粉 1.86 g, pH 7.0~7.2)^[11]。

1.3 STO-12 脂肽类物质的提取

挑取 STO-12 的单菌落, 接种至盛有 100 mL LB 培养液的三角瓶中 (规格 250 mL), 于 28 ℃、200 r·min⁻¹ 的条件下振荡培养 24 h 得到 STO-12 种子液。按 1% (V/V^{-1}) 的量将种子液接入装有 100 mL 优化培养基的三角瓶 (规格 500 mL) 中, 于 28 ℃、200 r·min⁻¹ 条件下振荡培养 4 d 后, 于 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 的条件下离心 30 min 后收集上清液, 再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到无菌培养滤液。用 6.0 mol·L⁻¹ 的盐酸调节无菌培养滤液的 pH 至 2.0, 于 4 ℃冰箱中静置过夜。然后在 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 的条件下离心 30 min 后收集沉淀, 将沉淀溶解在无菌水中并用 1.0 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠调节溶液 pH 至中性, 冻干溶液获得干燥物。用甲醇萃取干燥物 3 次, 合并萃取液, 然后在旋转蒸发器中减压蒸干得到脂肽类提取物粉末并置于 4 ℃冰箱中保存备用^[10]。

1.4 STO-12 脂肽类物质对 3 种病原真菌的最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

脂肽类提取物粉末溶于无菌水中并分别配制成不同浓度的脂肽液 (2.0、1.5、1.0、0.5、0.25、0.125、0.062 5 mg·mL⁻¹), 采用滤纸片法^[12]分别测定其抑菌活性。具体为: 用无菌水从已产孢的植物病原真菌平板上冲洗孢子, 将孢子浓度配成 1×10^5 cfu·mL⁻¹, 然后将配好浓度的孢子液

以 1 : 10 ($V \cdot V^{-1}$) 的比例与加热冷却至 40~50 ℃ 的 PDA 混合, 倒平板, 待平板冷却凝固后, 将无菌的 6 mm 滤纸片置于平板上, 采取逐滴滴加的方法往不同滤纸片上分别滴加 40 μL 的不同浓度脂肽液, 28 ℃ 倒置培养, 待菌丝长满平板后测定滤纸片周围抑菌圈直径 (mm)。最小抑菌浓度 (MIC) 是能明显抑制病原真菌菌丝生长的单个滤纸片上最低的脂肽类物质含量 ($\text{mg} \cdot \text{disc}^{-1}$)。

1.5 STO-12 脂肽类物质抑菌活性稳定性的测定

以枣缩果病菌为指示菌, 分别测定枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽类物质在不同极端环境下的抑菌活性稳定性, 抑菌活性的检测采用滤纸片法, 每项测定每个处理均设 3 次重复。供试的 STO-12 脂肽液的浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4 ℃ 保存备用。

1.5.1 pH 的稳定性 将脂肽液分别用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 盐酸和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调成不同 pH 值, 4 ℃ 放置过夜, 再调回中性 ($\text{pH}=7.0$), 并检测抑菌活性, 以不经酸、碱处理的原样品为对照^[13-14]。

1.5.2 温度的稳定性 取适量脂肽液分别于 30、40、50、60、70、80、90、100、110 ℃ 条件下处理 30 min, 或高温高压 (121 ℃、100 KPa) 下处理 20 min 后置于冰块上快速冷却, 以 4 ℃ 放置的脂肽液为对照, 检测抑菌活性^[13-14]。

1.5.3 蛋白酶的稳定性 分别取 180 μL 的脂肽液加入到 4 个离心管 (规格 2 mL) 中, 并依次往离心管中加入 20 μL 的 $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的木瓜蛋白酶 (Papain)、胃蛋白酶 (Pepsin)、胰蛋白酶 (Trypsin) 和蛋白酶 K (Protease K), 添加木瓜蛋白酶的脂肽液于 65 ℃ 作用 2 h, 添加其他蛋白酶的脂肽液于 37 ℃ 作用 2 h, 最后分别测定抑菌活性, 以 180 μL 的脂肽液中添加 20 μL 无菌水的处理和以 180 μL 的无菌水中分别单独添加 20 μL 的 4 种不同蛋白酶的的处理作为对照^[13]。

1.5.4 紫外线的稳定性 将脂肽液倒入到无盖的培养皿中, 用磁力搅拌器缓慢搅拌培养皿中的脂肽液, 并置于 30 W 的紫外灯下, 距离 30 cm 分别照射 1、2、3、4 h 后, 检测抑菌活性, 对照组为未经紫外处理的原样品^[13]。

1.5.5 常温保存稳定性 分别取 1 mL 的脂肽液加入到 7 个离心管 (规格 2 mL) 中, 其中 1 管保存于 4 ℃ 冰箱中作为对照, 另外 6 管置于常温条件下保存, 并依次于 1、2、3、4、5 和 6 个月后取出 1 管, 并测定其抑菌活性^[15]。

1.6 STO-12 脂肽类物质表面活性剂特性的测定

利用无菌水配置的浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽液和三种碳氢化合物溶液 (矿物油、大豆油和香柏油) 来检测脂肽类物质的表面活性剂特性, 包括排油能力、乳化作用和表面张力检测。

1.6.1 排油能力检测 采用文献^[16]的方法。具体为: 向 15 cm 直径培养皿中加入 40 mL 蒸馏水, 在培养皿中央滴加 20 μL 碳氢化合物溶液并使其扩散到蒸馏水表面。后慢慢向油膜中心表面滴加 10 μL 脂肽液, 室温放置 30 s, 测量排油圈的直径, 每次检测重复 3 次。空白对照为向油膜表面加 10 μL 的无菌水。

1.6.2 乳化作用检测 采用文献^[17]的方法。具体为: 吸取 2 mL 的碳氢化合物溶液分别与等体积的脂肽液加入到试管中, 漩涡震荡 5 min 后于 25 ℃ 条件下放置 24 h, 后测量其乳化层高度以及总高度, 并计算脂肽类物质对三种碳氢化合物的乳化系数 E_{24} 。乳化系数的计算采用如下公式:

$$E_{24}(\%) = 100 \times \frac{E}{E'}$$

其中 E 为乳化层的高度, E' 为混合物液体总高度。

1.6.3 表面张力系数测定 采用改良后的毛细管法^[18]测定脂肽类物质的表面张力系数, 以无菌水的表面张力系数为空白对照。检测枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽类物质对水的表面张力的影响。表面张力在 25 ℃ 环境中测量, 检测前将毛细管及盛装脂肽液或无菌蒸馏水的烧杯用酒精洗涤干净, 然后将毛细管插入烧杯中的液面中并保持与液面垂直, 用温度计上的刻度标记出毛细管中液面以上的高度 h , 并用游标卡尺测量出高度值, 并计算表面张力系数。表面张力系数的计算采用如下公式:

$$\alpha = \frac{\rho g r h}{2}$$

其中 α 、 ρ 、 g 、 h 、 r 分别为表面张力系数、被测液体的密度、重力常数、毛细管中液面以上的液柱高度和毛细管的半径。

1.7 数据分析

采用 Excel 2010 (Microsoft, USA) 和 SPSS 20.0 (IBM, USA) 软件对实验数据进行统计分析, 对不同处理组间的差异进行单因素方差分析, 应用 Duncan 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 STO-12 脂肽类物质对 3 种病原真菌的最小抑菌浓度 (MIC)

不同浓度的 STO-12 脂肽类物质的抑菌活性检测结果表明,随着滤纸片上脂肽类物质浓度的逐渐降低,对病原真菌的抑菌活性逐渐降低,滤纸片周围形成的抑菌圈直径也逐渐减小。对枣缩果病菌、杨树炭疽病菌和杨树腐烂病菌,分别第 5、第 4、第 5 号滤纸片周围未见到明显的抑菌圈出现,只有在滤纸片上的脂肽类物质的含量分别大于或等于 0.02 mg (枣缩果病菌 4 号滤纸片上脂肽的含量)、0.04 mg (杨树炭疽病菌 3 号滤纸片上脂肽的含量)、0.02 mg (杨树腐烂病菌 4 号滤纸片上脂肽的含量)时,滤纸片周围能观察到明显的抑菌圈存在,所以确定了枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质对枣缩果病菌、杨树炭疽病菌和杨树腐烂病菌的最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.02、0.04 和 0.02 mg·disc⁻¹ (图 1)。

2.2 STO-12 脂肽类物质的抑菌活性稳定性

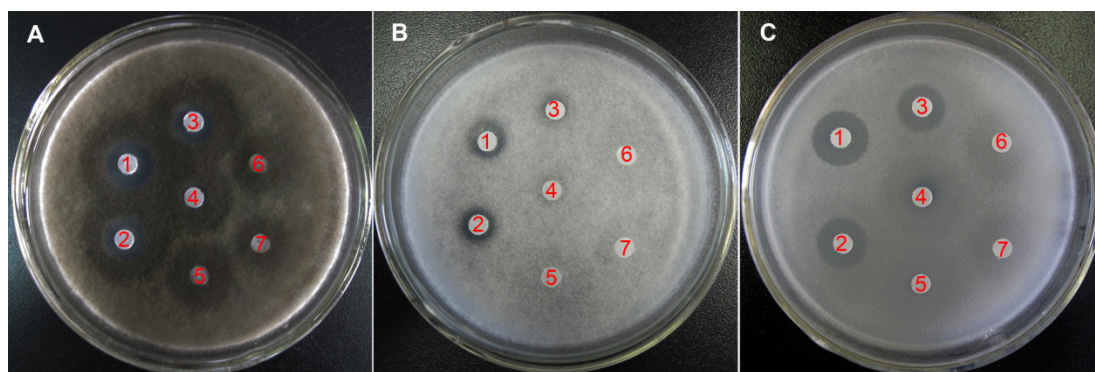
经酸碱和不同温度处理后发现,枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质具有较好的耐酸碱和耐高温能力,经 pH 2.0~11.0 的酸碱处理后其抑菌活性没有明显的变化 (图 2); 经 30~110 °C 温度处理 30 min 或者经高温高压 (121 °C、100 KPa) 处理 20 min 后,脂肽类物质的抑菌活性没有明显的减弱 (图 2); 枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质对多种蛋白酶处理和紫外线处理均不敏感,在分

别经胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和蛋白酶 K 处理后的枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质的抑菌活性没有明显减弱 (图 2); 枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质即使经紫外线照射 4 h 后,其抑菌活性依然没有显著的降低 (图 2)。

此外,枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质常温保存稳定性检测结果显示,在常温条件下保存 6 个月后,脂肽类物质的抑菌活性和对照组比没有明显减弱 (图 3),说明了枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质在常温条件下能很好的保持其抑菌活性的稳定。

2.3 STO-12 脂肽类物质表面活性剂特性

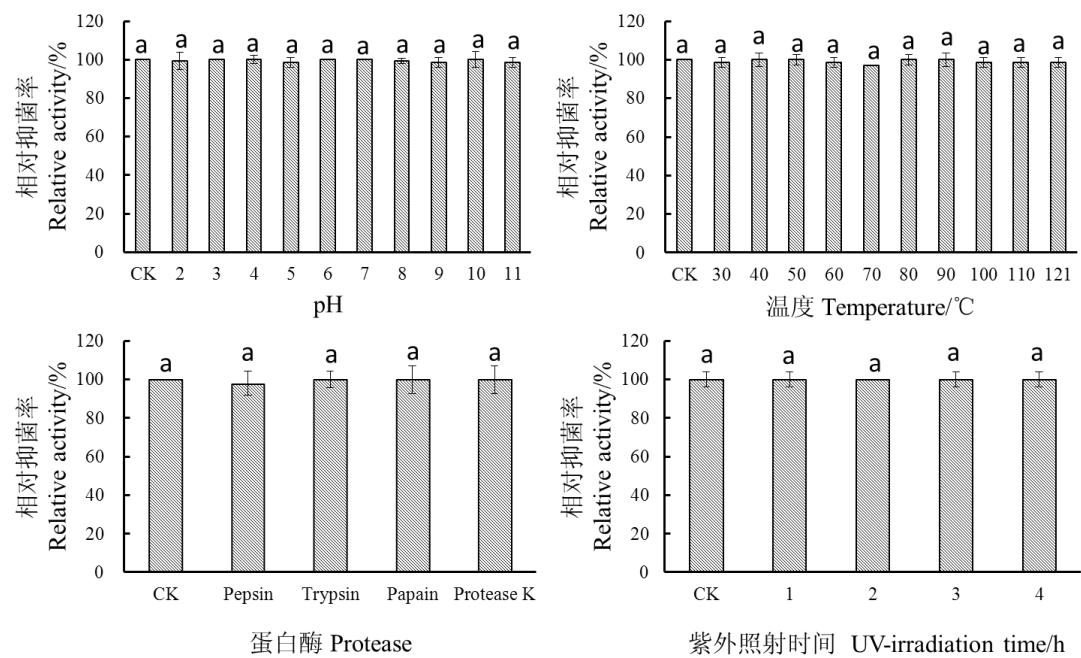
枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽类物质具有较好的驱油能力和乳化能力,1.5 mg·mL⁻¹ 的胞外脂肽液驱散蒸馏水表面的矿物油、香柏油和大豆油油膜形成的排油圈直径分别为 38.07、13.07 和 28.13 mm,而对矿物油、香柏油和大豆油的乳化系数分别为 58.75%、42.36% 和 56.61% (表 1)。表面张力系数检测结果表明,在 25 °C 温度条件下,枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽液 (浓度为 1.5 mg·mL⁻¹) 和无菌蒸馏水的表面张力系数分别为 54.6 和 71.2 mN/m,其中无菌蒸馏水的表面张力系数和同一温度下水的标准表面张力系数 72.0 mN/m 非常接近,说明试验测量方法有效准确。枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽液在同样的条件下相对无菌蒸馏水表面张力系数减小了 23.3%,说明枯草芽孢杆菌 STO-12 脂肽能有效降低水的表面张力。



注: 1~7 号分别含有 40 μ L 不同浓度的脂肽类物质, 1: 2.0 mg·mL⁻¹; 2: 1.5 mg·mL⁻¹; 3: 1.0 mg·mL⁻¹; 4: 0.5 mg·mL⁻¹; 5: 0.25 mg·mL⁻¹; 6: 0.125 mg·mL⁻¹; 7: 0.062 5 mg·mL⁻¹。Note: Discs 1 to 7 contained 40 μ L of different concentrations of lipopeptides, as follows: 1-2.0 mg·mL⁻¹; 2-1.5 mg·mL⁻¹; 3-1.0 mg·mL⁻¹; 4-0.5 mg·mL⁻¹; 5-0.25 mg·mL⁻¹; 6-0.125 mg·mL⁻¹; 7-0.062 5 mg·mL⁻¹.

图 1 不同浓度脂肽类物质对枣缩果病菌 (A)、杨树炭疽病菌 (B) 和杨树腐烂病菌 (C) 的抑菌活性

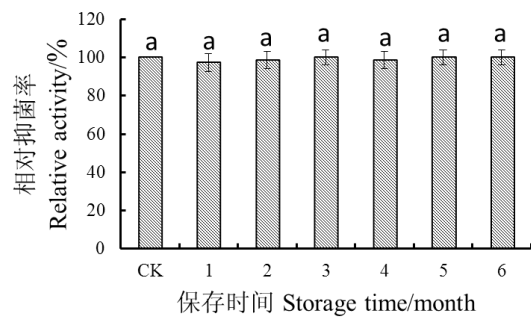
Fig. 1 Antifungal activity of different concentrations of lipopeptides on *A. tenuissima* (A), *C. gloeosporioides* (B), and *C. chrysosperma* (C), respectively



注：图中数据为平均数 ± 标准差。柱上有相同小写字母表示在 0.05 的水平上差异不显著。Note: The data are mean ± SD. Clones with the same letter indicates that the difference in grafting survival rate is not significant ($P = 0.05$).

图 2 pH、温度、蛋白酶和紫外线对脂肽类物质抑菌活性的影响

Fig. 2 Effects of pH, temperature, protease, and ultraviolet ray on inhibition activity of lipopeptides



注：图中数据为平均数 ± 标准差。柱上有相同小写字母表示在 0.05 的水平上差异不显著。Note: The data are mean ± SD. Clones with the same letter indicates that the difference in grafting survival rate is not significant ($P = 0.05$).

图 3 常温保存对脂肽类物质抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of stored under room temperature on inhibition activity of lipopeptides

表 1 脂肽类物质生物表面活性作用

Tab. 1 Biosurfactant effects of lipopeptides on hydrocarbon samples

碳水化合物 Hydrocarbon	驱油作用检测 Oil displacement test /mm	乳化系数 E_{24} Emulsification index $E_{24}/\%$
矿物油	38.07 ± 1.63	58.75 ± 0.60
香柏油	13.07 ± 0.45	42.36 ± 1.10
大豆油	28.13 ± 0.40	56.61 ± 2.54

注：表中数据为平均数 ± 标准差。Note: The data are mean ± SD.

3 结论与讨论

本研究中, 枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质表现出了较强的抑菌活性, 能有效抑制枣缩果病菌、杨树炭疽病菌和杨树腐烂病菌的生长, 其对 3 种病原真菌的最小抑菌浓度 (MIC) 分别为 0.02、0.04 和 0.02 mg·disc⁻¹。枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质具有较好的抑菌活性的稳定性, 具有显著的耐高温和耐酸碱能力, 对紫外线和多种蛋白酶处理均不敏感, 常温条件下保存 6 个月后仍能保持抑菌活性稳定。脂肽类物质还具有较强的生物表面活性剂的特性。

枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质具有较好的抑菌活性稳定性, 这和前人的研究结果一致, 死亡谷芽孢杆菌 (*B. vallismortis*) ZZ185 的抑菌脂肽在 120 °C 下处理 30 min 或 pH 1.0~8.0 的条件下均能保护抑菌活性的稳定^[20]。解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) Q-426 对紫外线和蛋白酶不敏感^[13]。脂肽类物质结构中存在的肽环 (peptide ring) 结构可能是脂肽类物质保持较高稳定性的重要原因之一^[13]。枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质的卓越的稳定性表明了其能在很多极端的环境条件下依然能起到抑菌作用, 如极端高温环境、酸性和碱性环境等。

驱油能力、乳化能力和表面张力是评判具有生物表面活性性的 3 个主要指标^[13]。本研究中, 通过测定枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质的这 3 个指标, 显示了枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质具有较强的生物表面活性特性。前人报道了很多种类的芽孢杆菌的胞外脂肽具有生物表面活性特性, 如贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)^[21]、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)^[22]、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)^[13] 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)^[23] 等。芽孢杆菌产生的脂肽类物质具有高效的生物表面活性素特性与其结构中肽环上的极性基团有关。与化学合成的表面活性剂相比较, 生物合成的表面活性剂具有很多天然的优势, 包括低毒性、易降解、广谱的抗生素活性、良好的环境兼容性、可利用再生原料合成等, 近几年来芽孢杆菌产生的脂肽类生物表面活性剂引起了商业团体的广泛关注和兴趣^[24-25]。枯草芽孢杆菌 STO-12 胞外脂肽的卓越生物表面活性特性, 使其在表面活性剂的多个应用领域具有巨大的开发前景,

如化妆品、制药、食品、采油和环境修复等^[24-25]。

综上所述, 表明枯草芽孢杆菌 STO-12 的脂肽类物质具有较强的抑菌活性、较好的抑菌活性的稳定性和较强的生物表面活性剂特性, 使其作为生防制剂和生物表面活性剂, 在工业和田间应用中具有较大的应用潜力。

参考文献

- [1] 黄海婵, 裘娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2005 (3): 213-215.
- [2] 姜莉莉, 陈彦闯, 辛明秀. 枯草芽孢杆菌在防治植物病害上的应用及研究进展[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(7): 37-39.
- [3] MELIN P, SUNDH I, HAKANSSON S, et al. Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(8): 1147-1154.
- [4] CAWOY H, DEBOIS D, FRANZIL L, et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens*[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 281-295.
- [5] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115-125.
- [6] NIHORIMBERE V, CAWOY H, SEYER A, et al. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 79(1): 176-191.
- [7] PEYPOUX F, BONMATIN JM, WALLACH J. Recent trends in the biochemistry of surfactin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 553-563.
- [8] YAO SY, GAO XW, FUCHSBAUER N, et al. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*[J]. Current Microbiology, 2003, 47: 272-277.
- [9] 武自强, 马荣, 游崇娟, 等. 枣缩果病拮抗菌的鉴定及其拮抗效应[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1321-1330.
- [10] 黄华毅, 王佳琳, 马荣, 等. 枯草芽孢杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(1): 81-88.
- [11] HUANG H Y, YU D M, TIAN C M, et al. Optimization of medium to improve the antifungal activity of *Bacillus atrophaeus* XW2 using response surface methodology[J].

- JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, 2015, 9(3): 1783-1792.
- [12] CHEN ZT, AO JQ, YANG WC, et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(24): 10381-10390.
- [13] ZHAO P, QUAN C, JIN L, et al. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(3): 401-409.
- [14] SHI B, ZHENG H, HUANG J, et al. Purification and partial characterization of a thermostable antimicrobial protein from *Bacillus subtilis* FB123[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(8): 1285-1290.
- [15] 叶慧敏, 张殿朋, 刘霞, 等. 类芽孢杆菌 Bg1 抗真菌蛋白的分离及其特性分析[J]. 核农学报, 2014, 28(1): 29-35.
- [16] MORIKAWA M, DAIDO H, TAKAO T, et al. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(20): 6459-6466.
- [17] WILLUMSEN PA, KARLSON U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers[J]. Biodegradation, 1996, 7(5): 415-423.
- [18] 汤传义. 水的表面张力与温度的关系[J]. 安庆师范学院学报 (自然科学版), 2000, 6(1): 73-74.
- [19] 秦颖, 张瑞斌, 王茂仁. 毛细管法测量表面张力系数测量精度的提高[J]. 实验科学与技术, 2013, 11(5): 23-25.
- [20] ZHAO Z, WANG Q, WANG K, et al. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components[J]. Biore-source technology, 2010, 101(1): 292-297.
- [21] LIU X, REN B, CHEN M, WANG H, et al. Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2010, 87(5): 1881-1893.
- [22] VELHO RV, MEDINA LFC, SEGALIN J, et al. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi[J]. Folia microbiologica, 2011, 56(4): 297-303.
- [23] LIU Q, LIN J, WANG W, et al. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93(1): 31-37.
- [24] BANAT IM, MAKKAR RS, CAMEOTRA SS. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2000, 53(5): 495-508.
- [25] MUKHERJEE S, DAS P, SEN R. Towards commercial production of microbial surfactants[J]. TRENDS in Biotechnology, 2006, 24(11): 509-515.