

# 黑水虻肠道细菌抗菌筛选及其活性物质分子鉴定

周定中 曹露 王茂淋 喻子牛 张吉斌\*

(华中农业大学 农业微生物学国家重点实验室 微生物农药国家工程研究中心 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 【目的】从昆虫黑水虻分离的肠道细菌进行抗植物病原菌的拮抗菌筛选,对获得有拮抗活性的肠道细菌进行活性物质的分子鉴定。【方法】用稀释涂布法从水虻肠道中分离菌株,采用平板对峙法进行抗菌筛选,对有抗菌活性的菌株通过生理生化实验、16S rRNA 鉴定和进化树分析确定其种属。参考已知脂肽合成关键基因设计引物,以拮抗菌总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,对目的片段进行测序。【结果】通过抗菌筛选获得一株对水稻黄单胞菌以及小麦纹枯病病原菌等有很强抑制效果的水虻肠道细菌 BSF-CL,经鉴定为枯草芽胞杆菌。脂肽合成关键基因 PCR 结果显示 BSF-CL 菌株具有脂肽 Iturin 和 Surfactin 合成的关键基因。推测 BSF-CL 很可能合成脂肽 Iturin 和 Surfactin。【结论】从水虻肠道中分离出对水稻黄单胞菌有很强抑菌活性的菌株,分离菌被鉴定为一种枯草芽胞杆菌,通过活性物质的分子克隆鉴定初步推测其活性物质可能为脂肽 Iturin 和 Surfactin。

**关键词:** 黑水虻, 枯草芽胞杆菌, 脂肽, 筛选, 分子鉴定

## Screening of antagonistic bacteria from gut of black soldier fly and the molecular identification of antimicrobial active substances

ZHOU Ding-Zhong CAO Lu WANG Mao-Lin YU Zi-Niu ZHANG Ji-Bin\*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology and National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** [Objective] The bacteria from gut of black soldier fly were screened against plant

基金项目: 湖北省基金依托基地项目

\*通讯作者: ✉: zhangjb@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-08; 接受日期: 2012-04-28

pathogenic bacteria, Molecular method was used to identify the active substances from the antagonist bacteria. **[Methods]** Eleven strains have been isolated with diluted coating method from the gut of black soldier fly. The antagonistic strains were screened using the plate confrontation method. The species was identified through the physiological, biochemical experiments and 16S rRNA phylogenetic analysis. Primers of key genes of known lipopeptide, synthesis were designed and purpose fragments were amplified by PCR and sequencing. **[Results]** A gut bacteria, named BSF-CL, was obtained with strong inhibitory effect to *Xanthomonas oryzae* PXo99 and *Rhizoctonia solani* AG-8, and identified as *Bacillus subtilis*. The result of PCR showed that strain BSF-CL possibly has the key genes which synthesis lipopeptide Iturin and Surfactin. We speculate that strain BSF-CL can synthesize lipopeptide iturin and surfactin. **[Conclusion]** A strong active *Bacillus subtilis* strain BSF-CL against bacterial and fungal pathogen was screened from the gut of black soldier fly. We preliminary speculated that the active substance may be lipopeptide iturin and surfactin through the molecular cloning and identification.

**Keywords:** Black soldier fly, *Bacillus subtilis*, Lipopeptide, Screening, Molecular identification

昆虫肠道微生物的研究不但有利于昆虫资源的开发利用,而且有利于从昆虫肠道这一特殊环境中获得特殊功能的细菌资源,用于控制动物疫病的传播以及植物病害的防治<sup>[1]</sup>。高等动物肠道微生物的研究比较多,而昆虫肠道微生物的研究零星见于几种重要经济昆虫如家蚕、白蚁以及桑粒肩天牛等昆虫<sup>[2-4]</sup>,且主要研究其肠道微生物对纤维素降解和有害昆虫防治等方面,拮抗细菌的筛选主要针对非昆虫类动物肠道微生物有少量报道。例如庄国宏<sup>[5]</sup>从动物肠道分离、筛选出一株能产生具有广谱抗菌活性的嗜酸乳杆菌。杨怀文<sup>[6]</sup>从昆虫病原线虫肠道内得到抗细菌活性的共生菌。到目前为止,对昆虫肠道细菌的研究仍停留在初级阶段,且肠道细菌应用的报道也很有限。但是从人们对哺乳动物肠道细菌的研究来看,昆虫肠道微生物的研究有很大的发展空间。

从昆虫肠道微生物中筛选有抗菌功能的菌株及其抗菌活性物质研究的报道甚少,从水虻<sup>[7-8]</sup>(双翅目,水虻科)肠道微生物中筛选出有抗菌活性的菌株目前未见报道。水虻能生长在腐物、粪

便和垃圾等含有大量细菌的恶劣环境中,其自身却不会因为感染病原菌而死亡,除了水虻本身产生抗菌肽外,其肠道共生菌可能对动植物病原微生物具有拮抗作用。因此本实验开展水虻肠道细菌的抗菌筛选研究,以期获得具有较好抗植物病原菌效果的菌株,通过活性物质分子鉴定初步推测其可能产生的活性物质,为其活性物质的分离纯化及其抗菌机制提供分子理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 昆虫和菌株:**亮斑扁角水虻 [*Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae)]是来自海南野外产卵在猪粪生长的幼虫;小麦纹枯病病原菌 (*Rhizoctonia solani* AG-8)由美国农业部根病生物防治实验室 David Weller 博士提供,水稻白叶枯病病原水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae* PXo99)由华中农业大学王石平教授提供。

**1.1.2 培养基:**酪蛋白培养基( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.36 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.3 g, NaCl 0.1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.02 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.002 g, Casein 4 g, 琼脂 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0)、羧甲基纤维素钠培养基( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g, NaCl 5 g, CMC-Na 10 g, Peptone 5 g, 酵母膏 0.5 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0)、LB 液体培养基(胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0)、LB 琼脂培养基(LB 液体培养基加 1.5%–2.0%琼脂)、PSA 液体培养基[马铃薯 300 g, 蔗糖 15 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 蛋白胨 5.0 g, 蒸馏水 1 L]、PSA 琼脂培养基[马铃薯 300 g, 蔗糖 15 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 蛋白胨 5.0 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 L],  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.1.3 主要试剂:** AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit, 美国 Axygen 公司; T4 DNA Ligase、Ex Taq™ Polymerase, 大连宝生物工程有限公司; EDTA (0.5 mol/L), 国药集团化学试剂有限公司; 溴化乙锭贮存液(EB 染色液) (10 g/L), 上海时代生物科技有限公司; 1%琼脂糖凝胶, Gene 公司; Amp (50 g/L), Amersco 公司; 蛋白酶 K, 北京天根生物科技有限公司。

**1.1.4 主要设备:** PCR 仪器, 德国 Biometra; 小型高速离心机, 德国 Eppendorf; 超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; Alpha Imager 220 凝胶成像系统, 美国 Alpha Innotech Corporation; ASTELL 高压灭菌锅, 英国 Astell; 隔水式恒温培养箱, 上海索普仪器有限公司; 恒温摇床, 武汉中科科仪技术发展有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 水虻肠道植物病原菌拮抗菌的分离:** 取 4 头水虻幼虫, 首先用无菌水清洗 3 次, 然后用 75%乙醇浸泡幼虫 1 min, 用 0.1%的升汞泡 2 min, 再用无菌水清洗幼虫 3 次, 无菌条件下进行解剖。取出幼虫的肠道后加入 0.5 mL 无菌水于研钵体中进行研磨, 然后再加入 1.5 mL 无菌水, 10 倍

稀释成不同浓度梯度菌悬液, 取合适的稀释度涂布酪蛋白筛选培养基, 纤维素酶筛选培养基进行筛选。将所得分离菌以抗水稻白叶枯病原菌效果较好的菌株为对象做后续实验。

**1.2.2 水虻肠道菌对植物病原菌的抗菌谱测定:** 采用打孔平板对峙法检测。吸取 100  $\mu\text{L}$  对数期水稻黄单胞菌悬液, 均匀涂布相应固体琼脂培养基平板, 然后在培养基上用 5 mm 直径打孔器均匀打 6 个孔, 挑出琼脂块。精确吸取水虻肠道菌发酵上清 50  $\mu\text{L}$ , 加入到琼脂平板已经制备好的孔中, 每个病原菌做 3 个重复。病原细菌培养 24 h, 病原真菌培养 48 h, 观察抑制效果。

**1.2.3 菌株 BSF-CL 的分类鉴定:** 菌株 BSF-CL 于 LB 固体培养、37 °C 培养 24 h 后观察菌落形态; 另取部分在 LB 液体培养基培养 24 h 的菌苔, 用相差显微镜观察菌 BSF-CL 及其芽胞的形态。涂布在干净载玻片上蒸馏水中, 进行固定; 按照革兰氏染色步骤进行染色, 用高倍显微镜观察菌体形态。

菌株 BSF-CL 的生理生化测定项目包括: (1) 接触酶(过氧化氢酶)测定; (2) 甲基红(M.R) 试验; (3) V-P 测定; (4) 吲哚试验; (5) 淀粉水解试验; (6) 明胶水解试验; (7) 柠檬酸盐试验; (8) 糖、醇、糖苷类碳源的分解实验。

以菌株 BSF-CL 基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板进行 16S rRNA 扩增反应。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 测序工作由上海生物工程有限公司完成。将测序结果通过 NCBI 数据库进行 BLAST, 找出与菌 BSF-CL 同源性较高的序列, 然后通过 MEGA 软件采用 NJ 方法生成系统树。

**1.2.4 活性物质分子检测:** 根据枯草芽胞杆菌产生的脂肽合成关键基因设计引物, 详见表 1。

(1) 水虻肠道分离菌总 DNA 的提取: LB 液体培养基培养菌 BSF-CL 至菌体长到一定浓度 ( $OD_{600} \approx 1.0$ ) 后, 取发酵液 1–5 mL 收集菌体去尽

表 1 脂肽合成关键基因引物  
Table 1 Primers for lipopeptide synthesis genes

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	靶标基因对 应的活性物质 Corresponding active substances	扩增产物大小 PCR product size (bp)
ITUD-F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	Iturin <sup>[9]</sup>	647
ITUD-R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG		
BACC-F	GAAGGACACGGCAGAGAGC	Bacillomycin <sup>[9]</sup>	875
BACC-R	CGCTGATGACTGTTCATGCT		
SUR-F	ACAGTATGGAGGCATGGTC	Surfactin <sup>[9]</sup>	441
SUR-R	TTCCGCCACTTTTTTCAGTTT		
FEND-F	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	Fengycin <sup>[9]</sup>	964
FENA-F	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC		
FEND-R	GACAGTGTGCTGCCTGATGAAA	Fengycin <sup>[9]</sup>	964
FENA-R	GTCGGTGCATGAAATGTACG		
FENB-F	CAAGATATGCTGGACGCTGA	Fengycin <sup>[9]</sup>	964
FENB-R	ACACGACATTGCGATTGGTA		

上清, 用溶菌酶处理 30 min, 加入蛋白酶 K 20  $\mu$ L 后再用细菌基因组 DNA 提取试剂盒来提取, 具体步骤详见细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)说明书。

(2) 脂肽的 PCR 扩增: 根据设计好的引物利用菌 BSF-CL 的 DNA 为模板扩增脂肽的关键基因。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 53  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

(3) PCR 产物的回收: 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。具体步骤详见 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(爱思进生物技术有限公司)使用说明书。

(4) 目的片段 T-A 克隆与测序分析: 将目的片段与 pMD<sup>®</sup>18-T Vector 连接后克隆至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, Amp 抗性筛选后挑取白色菌斑做菌落 PCR。经菌落 PCR 鉴定后, 将阳性克隆子对应的菌液送去测序。测序所得序列拼接后,

将拼接序列在 NCBI 网站上进行序列同源性比对分析。

## 2 实验结果

### 2.1 水虻肠道植物病原拮抗菌的分离

昆虫肠道样本经过梯度稀释法涂布在酪蛋白培养基和羧甲基纤维素钠(CMC-Na)培养基等筛选培养基进行筛选, 共筛到 11 株产酶的细菌, 其中对水稻黄单胞菌抑菌作用最强的菌株命名为 BSF-CL, 并以其为研究对象。

### 2.2 水虻肠道菌 BSF-CL 抗菌谱检测

以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等 4 株病原细菌以及稻瘟病病原菌、油菜核盘菌等 10 株病原真菌作为指示剂进行菌株 BSF-CL 的抑菌实验, 结果显示对水稻黄单胞菌和小麦纹枯病病原菌的抑制效果较好, 详见表 2。

### 2.3 菌株 BSF-CL 分类鉴定

#### 2.3.1 菌株 BSF-CL 的生理生化鉴定(表 3): 将菌

表 2 菌株 BSF-CL 抗菌谱测定  
Table 2 The antimicrobial spectrum assay of strain BSF-CL

病原菌 Pathogens	抑制效果 Inhibitory effect	病原菌 Pathogens	抑制效果 Inhibitory effect
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	-	小麦赤霉病原菌 <i>Fusarium graminearum</i>	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	辣椒灰霉病原菌 <i>Botrytis cinerea Pers</i>	+
丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	-	核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-
水稻黄单胞菌 <i>Xanthomonas</i>	++	油菜白斑病原菌 <i>Pseudocercospora capsella</i>	-
小麦纹枯病原菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	++	白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	-
水稻纹枯病原菌 <i>Xanthomonas oryzae</i>	+	稻瘟病病原菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	+
西瓜枯萎病原菌 <i>Watermelon fusarium wilt</i>	+	棉花枯萎病原菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	-

注: -: 无抑制作用(抑菌圈直径<5 mm); +: 较弱抑制作用(抑菌圈直径为 5 mm-15 mm); ++: 较强抑制作用(抑菌圈直径>15 mm).

Note: -: No inhibition ( $d < 5$  mm); +: Weak inhibition ( $5 \text{ mm} \leq d \leq 15$  mm); ++: Strong inhibition ( $d > 15$  mm).

表 3 菌株 BSF-CL 生理生化特性  
Table 3 Physiological phenotype of strain BSF-CL

特征反应 Characteristic reaction	反应结果 Reaction results	特征反应 Characteristic reaction	反应结果 Reaction results
过氧化氢酶 Peroxide hydroxide enzyme	+	淀粉水解 Hydrolysis of starch	+
接触酶 Catalase	+	吲哚反应 Indole reaction	-
甲基红 Methyl red	-	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
V-P 实验 V-P experiment	+	葡萄糖产酸 Glucose acid production	+

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

株 BSF-CL 在 LB 培养基上 37 °C 培养 48 h 后, 其菌落为乳白色、隆起、边缘不整齐、不规则、表面干燥、不透明、不分泌色素。菌体为革兰氏阳性、产芽胞、短杆状、能运动。通过形态及生理生化测定结果可初步判断该菌株为枯草芽胞杆

菌(*Bacillus subtilis*)。

**2.3.2 菌株 BSF-CL 的 16S rRNA 的基因鉴定和进化树分析:** 菌株 BSF-CL 的 16S rRNA 测序结果显示扩增片段大小为 1 563 bp。然后通过 NCBI 数据库 BLAST, 结果表明, 菌株 BSF-CL

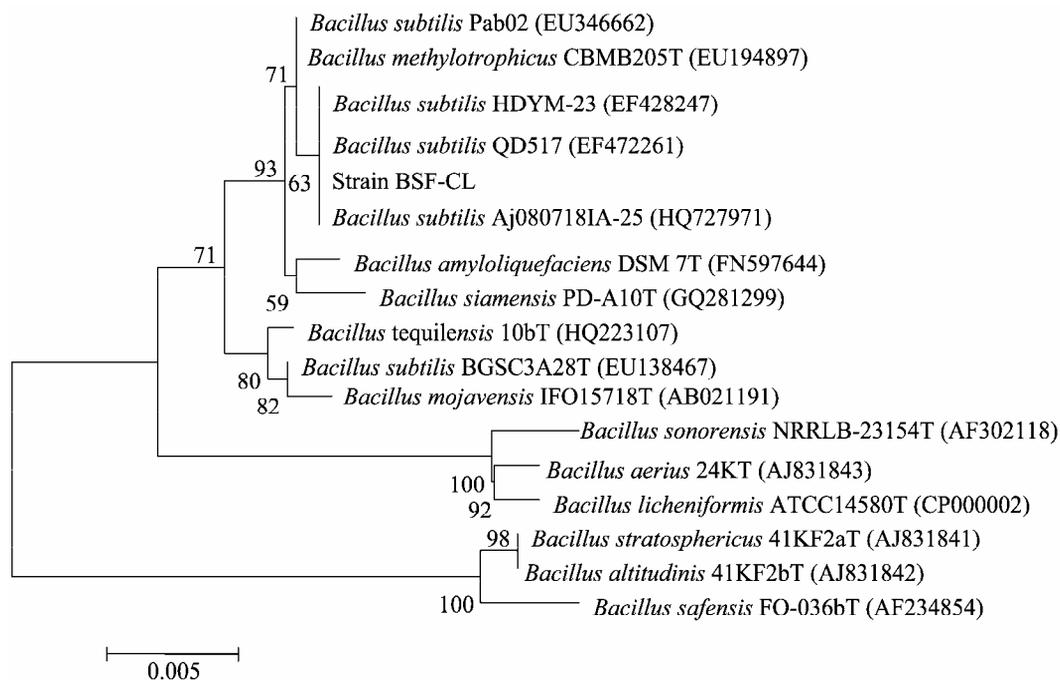


图 1 菌株 BSF-CL 系统进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of strain BSF-CL

注: 标尺表示 100 个核苷酸中有 5 个替换; 标注在分支处的数字为 Bootstrap 值(百分值)。

Note: Bar indicates 5 substitutions per 100 nucleotide positions. The number showed in branches are bootstrap percentages.

与 *Bacillus subtilis* strain HDYM-23 亲缘较近, 生成的进化树如图 1 所示, 通过生理生化实验、16S rRNA 鉴定和进化树分析可以鉴定菌株 BSF-CL 为枯草芽胞杆菌。

## 2.4 BSF-CL 活性物质的分子鉴定

**2.4.1 脂肽合成关键基因引物的合成与脂肽的扩增:** 以菌株 BSF-CL 总 DNA 为模板进行脂肽合成关键基因 PCR 扩增, 产物电泳检测如图 2 所示。

**2.4.2 PCR 产物的回收:** 对获得目的片段的脂肽 Iturin 和 Surfactin 合成关键基因, 分别进行大量 PCR 扩增, 回收 PCR 扩增产物, 结果见图 3。

**2.4.3 测序结果与分析:** 表 4 结果说明从水虻肠道分离拮抗菌 BSF-CL 中扩增出了合成 Iturin 与 Surfactin 的关键基因。

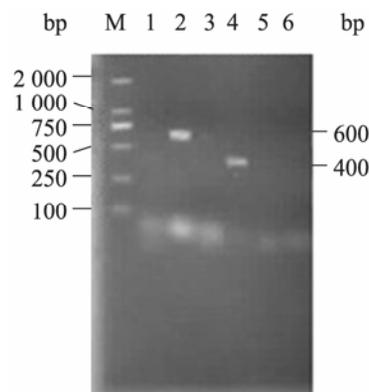


图 2 菌株 BSF-CL 脂肽 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplification for lipopeptide synthesis

注: 以菌株 BSF-CL 总 DNA 为模板。M: DL2000 marker; 1-6: Bacillomycin, Iturin, Fengycin B, Surfactin, Fengycin A, Fengycin D 合成关键基因。

Note: Take the total DNA of strain BSF-CL as template. M: DL2000 marker; 1-6: Bacillomycin, Iturin, Fengycin B, Surfactin, Fengycin A, Fengycin D synthesis key genes, respectively.

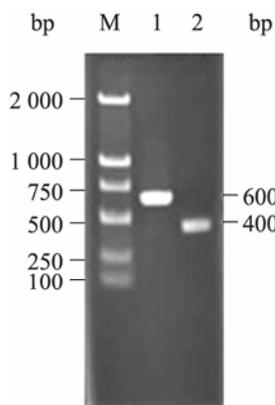


图3 脂肽 Iturin 和 Surfactin 合成关键基因 PCR 产物回收电泳

Fig. 3 Electrophoresis of iturin and surfactin PCR products

注: M: DL2000 marker; 1: Iturin 合成关键基因扩增片段; 2: Surfactin 合成关键基因扩增片段.

Note: M: DL2000 marker; 1: Key genes for iturin synthesis; 2: Key genes for surfactin synthesis.

### 3 讨论

微生物代谢产物有很大的化学多样性, 是多种抗生素、表面活性剂、功能性化学品的重要来源<sup>[10]</sup>。提取样品中混合微生物总基因组 DNA<sup>[11]</sup>, 通过筛选目的克隆, 寻找活性代谢产物, 将在开发新资源中将发挥巨大作用<sup>[10-11]</sup>。

国内外通过设计特定引物从微生物 DNA 中 PCR 扩增目的片段<sup>[12-13]</sup>非常普遍, 我们从枯草芽胞杆菌中可能产生的脂肽合成关键基因设计多对引物, 对水虻肠道分离菌的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 经条件优化后扩增出 2 个片段, 经测序以及序列分析后确定扩增片段为 Iturin 和 Surfactin 合成的关键基因, 推测菌株 BSF-CL 可以合成两种脂肽 Iturin 和 Surfactin。根据已经报

表4 抗菌活性物质的分子克隆结果

Table 4 The results of molecular cloning of antibacterial substances

引物名称 Name of primers	对应脂肽 Correspond lipopeptide	PCR 扩增产物与已知脂肽合成关键基因同源性分析结果 Results for homology analysis of PCR fragment and known synthetic lipopeptide gene
ITUD-F/ITUD-R	Iturin	与 <i>Bacillus</i> sp. CY22 iturin synthetase gene cluster 相似度 98%
SUR-F/SUR-R	Surfactin	与 <i>Bacillus subtilis</i> strain BS3 surfactin synthetase gene 相似度 99%

道 Iturin 与 Surfactin 的抗菌活性<sup>[14-15]</sup>可以推测出: 本文中从小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌抑制作用的活性物质为 Iturin<sup>[16]</sup>; 而对小麦纹枯病菌、稻瘟病菌起抑制作用的活性物质为 Surfactin<sup>[17]</sup>; 对水稻纹枯病菌起抑制作用的为 Iturin<sup>[16,18]</sup>与 Surfactin<sup>[19-20]</sup>; 但对水稻白叶枯病原菌的抑制作用是国内首次报道, 对其抗菌活性物质还不清楚, 推断可能为 Iturin 和 Surfactin 的结合作用, 也有可能是其他的未扩增出的物质, 需要进一步研究。另外, 本研究首次报道从水虻肠道分离的细菌具有两种广谱抗菌脂肽, 该研究为枯草芽胞杆菌生物农药的研究与开发提供了新的生物资源。

### 参考文献

- [1] 黄云, 詹先进, 蓝家样, 等. 昆虫肠道微生物的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2888-2890.
- [2] 袁志辉, 蓝希钳, 杨廷, 等. 家蚕肠道细菌群体调查与分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 285-291.
- [3] 杨红, 彭建新, 刘凯于, 等. 低等白蚁肠道共生微生物的多样性及其功能[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 496-499.
- [4] 何正波, 殷幼平, 曹月青, 等. 桑粒肩天牛幼虫肠道菌群的研究[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 741-744.

- [5] 庄国宏. 嗜酸乳杆菌细菌素高产菌株的诱变选育及其发酵工艺的初步研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2007.
- [6] 杨怀文. 昆虫病原线虫共生细菌杀虫抗菌活性物质的研究进展[C]. 第五届生物多样性保护与利用高新科学技术国际研讨会, 2005.
- [7] DuPont MW, Linda BL. Soldier Fly[J]. Livestock Management Insect Pests, 2003.
- [8] Tomberlin JK, Sheppard DC. Lekking behavior of the black soldier fly[J]. The Florida Entomologist, 2001, 84(4): 729-730.
- [9] Athukorala SNP, Fernando WGD, Rashid KY. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(9): 1021-1032.
- [10] 杨福廷. 脂肽类生物表面活性剂研究进展[J]. 精细化工, 2006, 23(2): 121-125.
- [11] 许晓妍, 崔承彬, 朱天骄, 等. 宏基因组技术在开拓天然产物新资源中的应用[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 108-116.
- [12] Palashpriya D, Mukherjee S, Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2008, 25: 165-186.
- [13] Velho RV, Caldas DGG, Medina LFC, et al. Real-time PCR investigation on the expression of *sboA* and *ituD* genes in *Bacillus* spp.[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 52(6): 660-666.
- [14] 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.
- [15] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(4): 430-440.
- [16] 陈华, 袁成凌, 郑之明, 等. 枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素—Iturin A 的纯化及电喷雾质谱鉴定[J]. 微生物学报, 2008, 48(1): 116-120.
- [17] 高学文, 姚仕义, Pham H, 等. 基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1496-1501.
- [18] 郭丽清. 苏云金芽孢杆菌中脂肽类抗生素 Iturins 的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2010.
- [19] 张荣胜, 刘永锋, 刘邨洲, 等. 枯草芽孢杆菌离子突变菌株 H-74 脂肽类抗菌物质对水稻抗性诱导作用[J]. 西南农业学报, 2009, 22(5): 1322-1326.
- [20] 王晓宇, 罗楚平, 刘永锋, 等. 生防菌 Bs-916 突变菌株 M49 芽胞形成和感受态形成能力[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1295-1300.