Bacillus amyloliquefaciens MBRC1 的鉴定与抗菌活性研究

陈建军[1]，郝之奎[1]，廖祥儒[2]，吴翰桂[*1]

（1. 台州职业技术学院 应用生物技术研究所，浙江 台州 318000；2. 江南大学 生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：从台州市剑门港海区的海底淤泥中采集样品分离得到 4 株具抗菌活性的微生物，其中一株具有较强的抗菌活性。对该菌作了形态学、生理生化、分子生物学、(G+C)mol%含量等研究，确定该菌株属于芽孢杆菌属，命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1。采用 BLAST Clustal W(V 1.83)及 Mega(V 5.1)等软件对其进行了系统发育树的分析，确立了该菌株在系统发育上的地位。采用不同的培养基对该菌株进行发酵培养，利用牛津杯法对该菌胞外的抑菌活性物质的抑菌效果进行了研究，结果显示：*Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 胞外具有较强的抑菌活性物质，且对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、枯草杆菌(*B. subtilis*)和大肠杆菌(*E. coli*)均有较好的抑菌效果。

关键词：*Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1；抗菌；鉴定

中图分类号：TQ 920.1　**文章编号**：1673-1689(2019)02-0126-07　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.018

Study on Antibacteria Activity and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1

CHEN Jianjun[1]，*HAO Zhikui*[1]，*LIAO Xiangru*[2]，*WU Hangui*[*1]

（1. Institute of Applied Biotechnology，Taizhou Vocational & Technical College，Taizhou 318000，China；2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education ，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Four bacterial strains with antibacteria activity are isolated from Jianmen harbour seafloor mud in Taizhou of Zhejiang Province，China. Thus，further studying on one of the stronger antibacteria activity strain is undertaken. This strain belongs to the genus *Bacillus amyloliquefaciens*，named as *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 through molecular biology，(G+C) mol% content，colony and morphological identification. The separation position also has been identified by the analysis on phylogenetic tree with such softwares：BLAST Clustal W （V 1.83） and Mega （V 5.1）.

收稿日期：2016-05-17

基金项目：台州市海洋生物资源开发与利用科技创新团队课题（MBR2012011）；台州市市级创新团队自主设计科技计划项目（1403ky07）。

作者简介：陈建军(1967—)，男，硕士，副教授，主要从事微生物发酵及其产物分离研究。E-mail：cjjkey@126.com

***通信作者**：吴翰桂(1957—)，男，医学硕士，教授，主要从事天然药物研究与利用。E-mail：haozhikui123@126.com

引用本文：陈建军，郝之奎，廖祥儒，等. *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 的鉴定与抗菌活性研究 [J]. 食品与生物技术学报，2019，38(02)：126-132.

Fermented *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 with different media and then investigates the effect of antimicrobial in extra using the method of oxford cup. The results show that *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 could generate better antimicrobial substances and has good antimicrobial effect on *S. Aureus*、*B. Subtilis* and *E. coli.*

Keywords：*Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1，antibacteria activity，identification

生物拮抗菌是近年来食品微生物研究的热点之一，逐步广泛应用于食品防腐保鲜中领域。解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）所产的抑菌活性物质的研究越来越受到关注的菌株之一。其优良的光谱抑菌效果在多种果蔬采摘之后保鲜应用中，是一种新型保鲜技术，它具有利于人体安全、不产生抗药性、无污染等特点，有着广阔的应用前景[1-2]。

解淀粉芽孢杆菌在其代谢过程中可产生多种抗菌物质，如张宝俊等从解淀粉芽孢杆菌 LP-5 发酵液分离得到的抗菌粗蛋白[3]。刘俏等分离得到的解淀粉芽孢杆菌活性蛋白[4]等均为抑菌蛋白。信珊珊等分离解淀粉芽孢杆菌 WH1 代谢产物得到产抗菌活性物质为 Surfactin 类脂肽[5]。Caldeira 等从解淀粉芽孢杆菌 CCMI 1051 分离得到为具有抗真菌活性 Iturin 及 Surfactin[6]。Yu 等从解淀粉芽孢杆菌 B94 分离得到有效成分为 3 种 Iturin A 的同分异构体[7]。Rao 等从解淀粉芽孢杆菌 B128 分离得到具有抗菌活性 Iturin A 以及 Iturin A 的同分异构体均为脂肽类物质[8]。Chen 等从解淀粉芽孢杆菌 FZB42 分离得到的具抗菌作用物质为聚酮化合物[9]。

在果蔬保鲜上的应用方面，解淀粉芽孢杆菌 C Ⅲ-l 对于香蕉枯萎病菌（*Fusarium oxysporum f.sp. cubense*）具有较好抑制效果；解淀粉芽孢杆菌 FZB42 产生的聚酮化合物对于由欧文氏菌（*Erwinia amylovora*）引起的梨火疫病具有防治效果[10]；解淀粉芽孢杆菌 K6 对于大肠杆菌（*Escherichia coli*）及藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）均有着抑制作用；解淀粉芽孢杆菌 SYX-l 对于黄瓜枯萎病病原菌尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum Schlecht*）有着拮抗作用以及防治效果[11]；解淀粉芽孢杆菌 TB2 对于辣椒疫霉（*Phytophthora capsici*）所造成的果疫病防治有极好的效果；解淀粉芽孢杆菌 CH-2 可抑制油菜核盘菌（*Sclerotinia sclerotiorum*）菌核的形成及菌丝生长[12]；在肉类保鲜上，时威等在利用解淀粉芽孢杆菌发酵液在保鲜冷却猪肉方面取得好的效果[13]。总之对于解淀粉芽孢杆菌在食品防腐领域的研究日趋广泛。

从剑门港海区海底生境采集淤泥样本，通过稀释涂布法从中分离筛选获取具有产生抗菌活性物质的解淀粉芽孢杆菌纯培养并对其作了深入抑菌研究，为开发出新型食品保鲜抗菌化合物菌株作准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样本 实验样本采集区位于浙江省台州市路桥剑门港海区（28°1′57″N，121°36′38″E）。

1.1.2 指示菌（由本实验室保存） 金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）；枯草杆菌（*B. subtilis*）；大肠杆菌（*E. coli*）。

1.1.3 实验仪器及设备 回转式恒温摇床（HZQ-X400）、超净工作台（ZHJH-C2112C）、立式压力蒸汽灭菌器（LDZX-50FB）、pH 计（雷磁 Phb-4）、紫外分光光度计（UV-3000，HITACHI）、水浴锅（HH-S）、培养箱（HZQ-F 160A）、冷冻离心机（Centrifuge 5430）、扫描电子显微镜（Quanta 200）、光学显微镜（NIKON eclipse 50i）、微量移液器（Eppendorf）、枪头、Ep 管等。

1.1.4 培养基 斜面培养基以及平板基础培养基（LB 固体培养基）：氯化钠 10.0 g/L，胰蛋白胨 10.0 g/L，酵母提取物 5.0 g/L，琼脂 15.0 g/L，pH 7.2~7.4。

种子液体培养基（LB 液体培养基）：氯化钠 10.0 g/L、胰蛋白胨 10.0 g/L、酵母提取物 5.0 g/L、pH 7.2~7.4。

发酵液体培养基Ⅰ：氯化铵 1.2 g/L，葡萄糖 5.5 g/L，氯化镁 3.0 g/L，牛肉膏 1.0 g/L，pH 6.8~7.0。

发酵液体培养基Ⅱ：酵母膏 5.5 g/L，葡萄糖 4.0 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 5g/L，氯化钠 5 g/L，蛋白胨 7.5 g/L，pH 7.0~7.2。

发酵液体培养基Ⅲ：氯化钠 5 g/L，蔗糖 12 g/L，酵母膏 8 g/L，pH 5.8~6.0。

发酵液体培养基Ⅳ：氯化钠 5 g/L，葡萄糖 1 g/

L,蛋白胨 10 g/L,酵母膏 3 g/L,pH 7.2~7.4。

1.2 方法

1.2.1 淤泥样本微生物分离 在三角烧瓶中加入 90 mL 生理盐水及适量的玻璃珠灭菌，然后将 10.0 g 淤泥样本加入,在常温下振荡均匀 20 min,摇床转速为 200 r/min。按 10 倍稀释法用已灭菌的生理盐水将上述淤泥悬浮液依次稀释到 10^{-2}~10^{-6} 倍,吸取范围在 10^{-4}~10^{-6} 稀释倍数的样品各 0.1 mL 到 LB 培养基平板上分别涂布、倒置,温度在 37 ℃培养箱中培养,2 d 后观察生长情况。无菌条件下挑取单菌落转接在 LB 固体培养基平板上,连续操作,直至获取纯培养为止。

1.2.2 产抗菌活性物质微生物的初筛 将已经筛选获得的微生物纯培养分别使用点接种技术接种在已涂布有指示菌的固态 LB 培养基平板上,37 ℃条件下倒置培养,24 h 后观察抑菌结果，利用斜面保存能够形成抑菌圈的菌株复筛或备用。

1.2.3 具抗菌活性菌株形态学以及生理生化特征分析研究 将筛选获得具抗菌活性的纯培养接种在 LB 固体培养基平板上,37 ℃条件下倒置培养 24 h,察看其菌落的生长状态。

参照伯杰氏细菌鉴定手册[14-15]及工业微生物实验技术手册[16]对具抗菌活性菌株形态以及生理生化进行实验。同时在恒温培养箱察看其在 5~50 ℃(间隔 5 ℃)范围之间的生长情况。

1.2.4 具抗菌活性菌株 (G+C)mol%含量测定 样品基因组提取纯化方法参照文献[17],(G+C)mol%含量测定参照高相液相法[18]。

1.2.5 具抗菌活性菌株的分子生物学研究 基因组提取：采用接种环在培养皿上刮取小量菌体,纯培养总 DNA 提取方法参考试剂盒说明书使用（赛百盛基因技术有限公司,中国)。

采用通用引物以扩增 16S rRNA 基因。引物提供由 Saibaisheng Gene Co. 合成:5'-ACA AGC CCT GGA AAC GGG GT-3' 和 5'-CAC CAG GAA TTC CGA TCT'[19]。PCR 反应条件是:94 ℃温度条件下预变性 4 min,然后进入循环,在温度 94 ℃条件下变性 50 s,在温度 55 ℃条件下退火 50 s,在温度 72 ℃条件下延伸 2 min,35 个循环后,72 ℃温度条件下延伸 10 min 后 4 ℃条件下保存。利用 UltraClean PCR Clean-up kit 进行纯化 PCR 产物,之后寄往上海生物工程有限公司进行测序。

系统发育以及序列分析法[20]采用 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) 对所得到的菌株 Bacillus amyloliquefaciens MBRC1 的 16S rRNA 基因序列进行同源性分析。使用 Clustal W(V 1.83)[21]软件进行多序列 BLAST 比对,用 BioEdit(V 7.01)进行相关的序列调整。(Kimura 2-parameter distance calculation) 进化树[22] 使用 Mega 软件(V 5.1)采用邻位相连法(neighbor-joining,NJ)构建,1000 bootstrap 检验[23]。

1.2.6 抑菌菌株复筛及抑菌谱活性实验 该实验方法使用双层琼脂管碟法[24]。

具指示菌双层琼脂培养基制备方法：移入 20 ml LB 琼脂培养基至每个培养皿，水平凝固以作为基础底层培养基,取含指示菌悬浮液 100 uL 加入到已经灭菌后温度降到 65 ℃的 100 mL LB 固态培养基后混合均匀，移入 5 mL 上述培养基至具基础底层培养基培养皿上，铺平后作为含菌上层培养基,冷却凝固后可倒置备用。

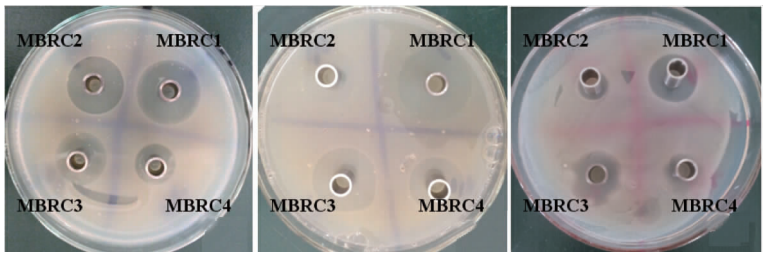
抑菌谱实验:在冷藏保存斜面试管中挑适量菌体接种至液体种子培养基中，在温度为 30 ℃条件下培养 16 h，移取 2 mL 种子培养液到已经灭菌的液体发酵培养基，在温度 37 ℃下培养 38 h 得到发酵培养液。上述种子培养以及发酵培养的装液用量均为 20 mL/250 mL 摇瓶,摇床转速均为 180 r/min。取以上获得的发酵培养液 10 mL 在转速 12 000 r/min,保持 30 min 下离心分离,取上清液作为抗菌粗提液。在含具指示菌双层固体培养基平皿上均匀摆放牛津杯,移入 200 uL 抗菌粗提液至牛津杯,然后盖陶瓦盖。在温度为 37 ℃条件下培养 24 h,抑菌圈直径使用游标卡尺测量,样本数为 3,取平均值作为该样本抑菌直径。

2 结果与分析

2.1 目标微生物的筛选

微生物所的代谢产物可在琼脂培养基中加以渗透,若这些化合物具有抗菌活性且该抑菌活性物质浓度达到一定值后即可抑制指示微生物的生长,在具指示菌的培养皿周围由于抗菌活性物质的作用使微生物不能生长从而出现抑菌圈。此种方法能够迅速有效地确认微生物所分泌的代谢产物是否具有抗菌活性,已被用于抗菌微生物筛选。本实验分离获得多株海洋微生物纯培养，以 *B. Subtili*、*E.*

coli 及 *S. aureus* 作为指示菌利用双层琼脂管碟法筛选获得 4 株具有抗菌活性的微生物，编号分别为 MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4,见图 1。



(a)*B. subtili* (b)*E. coli* (c)*S. aureus*

图 1 具有抑菌功能的菌株在培养基上形成的抑菌圈

Fig. 1 Formation of inhibition zone on the petri dish

2.2 目标菌的分子生物学研究及系统发育树构建

本实验室自行设计引物对 MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4 菌株的基因组进行扩增,回收并纯化扩增产物后测序，分别获得 4 个片段基因序列，长度分别为 1 030,1 046,1 172 bp 和 1 080 bp。对于具有抑菌活性较强且有应用潜力的 MBRC1 进行深层次研究，分子经过鉴定并被命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1,登录 GenBank 并注册,登录号是 KP247460。采用 BLAST 将该菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 的 16S rRNA 基因序列通过同源分析,结果显示该菌株为芽孢杆菌属的解淀粉芽孢杆菌,选取与该种菌株同源性接近的相应菌株,利用软件 BioEdit(V 7.01)和 MEGA(V 5.1)采用邻位相连法(neighbor-joining,NJ)构建系统发育树(见图 2)，从图 2 可以得知,*Bacillus* sp. Q2 16S (JN132107.1),*Endophytic bacterium* MD3 (HM160161.1)等遗传距离较为接近。

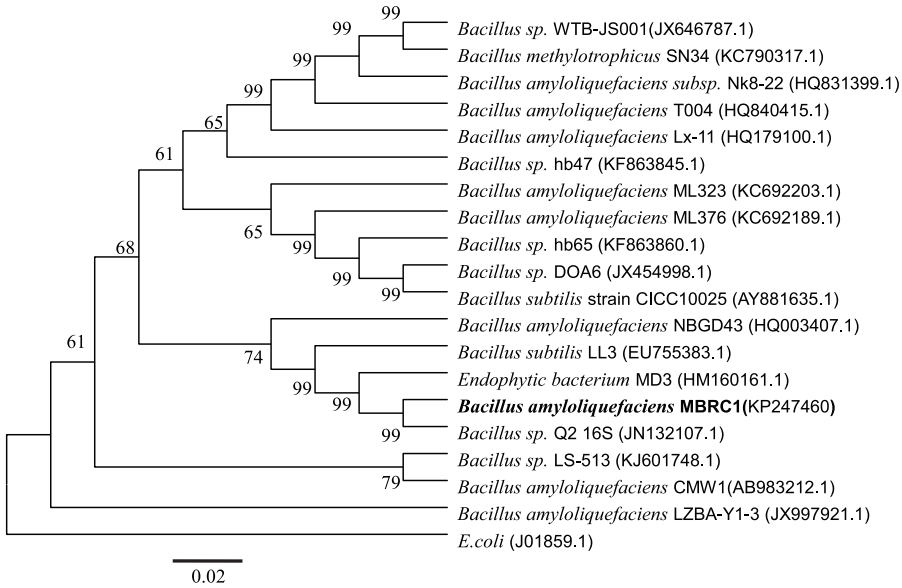


图 2 基于 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 16S rRNA 基因序列的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree resulting from analysis of the 16S rRNA gene sequences for *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1

2.3 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 形态学及生理生化特征研究

从生理生化研究实验结果得知，菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 为革兰氏染色呈阳性;生长温度在 10~45 ℃之间,28~32 ℃为该菌株的最适温度,菌落呈类圆形,该菌株边缘不规则,菌落隆起

有皱褶,不透明,色呈浅黄且表面较为粗糙,菌落有清晰的轮廓(图 3),呈杆状(图 4)。(G+C)mol%含量测定结果为 44.2%。



图 3　拮抗菌 MBRC1 菌落形态

Fig. 3　Colony morphology antagonistic of MBRC1

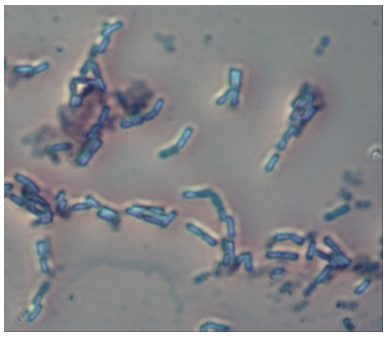


图 4　拮抗菌 MBRC1 菌丝形态

Fig. 4　Hyphae morphology antagonistic of MBRC1

主要生理生化特征由表 1 可知，菌株 MBRC1 的对明胶水解、淀粉水解、接触酶、厌氧生长、V-P 反应和硝酸盐还原呈阳性反应；苯丙氨酸脱氨酶、吲哚产生、柠檬酸盐、酪氨酸水解利用呈阴性反应；能够利用蔗糖、D-葡萄糖、D-甘露醇等糖类物质。

从观察可得知,菌株 MBRC1 在 50 ℃温度条件下不生长;在酸度 pH 值 5.6 条件下可生长;在盐度 5%NaCl 条件下不生长。结合菌株 MBRC1 形态学研究,同时参照文献[25],可确认菌株 MBRC1 是类芽孢杆菌或芽孢杆菌属。

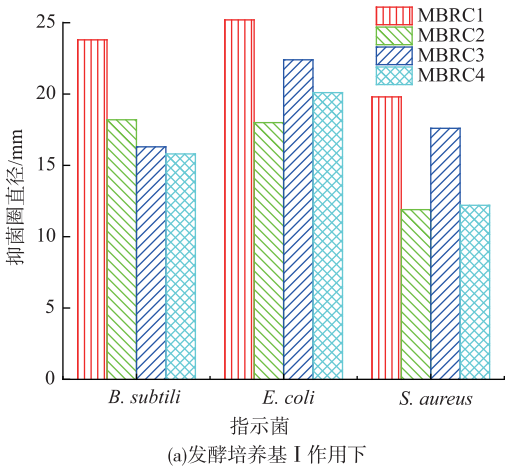
表 1　菌株 MBRC1 的生理生化特征

Table 1　Characteristics of strain MBRC1

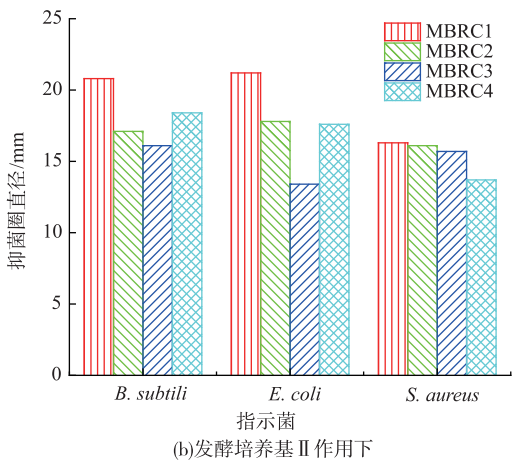
检测项目	特征	检测项目	特征
明胶水解	+	V-P 反应	+
淀粉水解	+	酪氨酸水解	-
D-葡萄糖	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
D-甘露醇	+	5% NaCl	-
蔗糖	+	生长温度:30 ℃	+
接触酶	+	生长温度 5 ℃	-
厌氧生长	+	生长温度:50 ℃	-
柠檬酸盐利用	-	生长 pH 5.6	+
硝酸盐还原	+	2% NaCl	+

2.4　目标菌株的复筛及对指示菌的抑菌效果研究

采用 4 种发酵液体培养基分别对 MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4 进行发酵，离心处理发酵液获得上清液,采用琼脂双层管碟法复筛出具有能产生抗菌活性微生物菌株。从图 5 可知,采用不同发酵培养基培养，结果显示 MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4 均能够产生较强的对指示菌有抑菌效果的抗菌活性物质,其中对 3 种指示菌均有较为明显的抑制作用。在不同的培养基中，菌株 MBRC1 较另外 3 种菌种显示出较大的抗菌活性,因此具有潜在的应用前景。



(a)发酵培养基Ⅰ作用下



(b)发酵培养基Ⅱ作用下

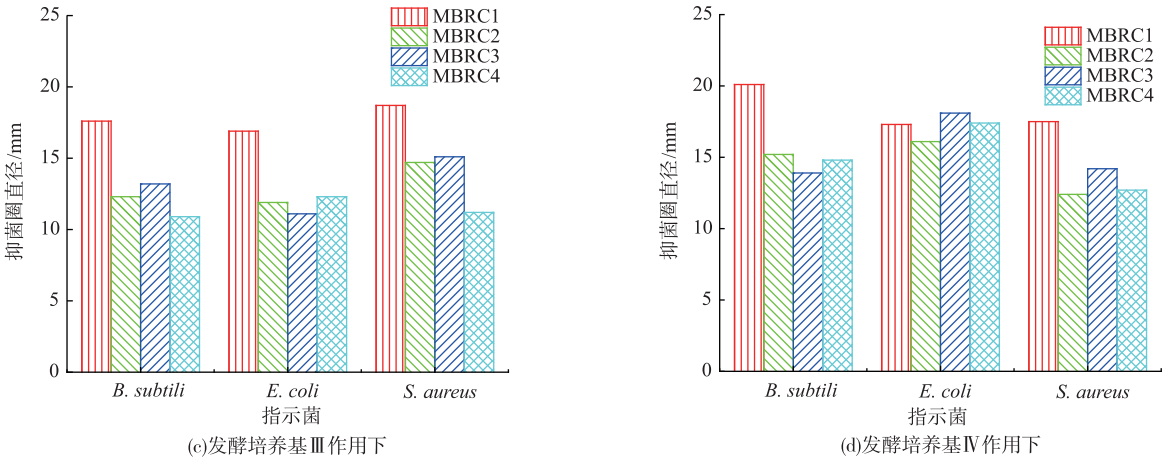


图 5　MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4 在不同发酵培养基作用下所得发酵液对不同指示菌的抑菌作用

Fig. 5　Antimicrobial activity of the liquid fermentation of MBRC1,MBRC2,MBRC3,MBRC4 against *B. subtile, E. coli, S. aureus* in the different fermentation mediums

3 讨　论

微生物自身在生命过程中由于环境的影响不断进行变化,而那些能从环境得到资源或在代谢中能产生一些能干扰或抑制其他非同类微生物细胞发育功能的微生物能够有利于生存及繁殖。目前,已知能够产生抑菌活性物质的微生物有以下属[26-27]:希瓦菌属(*Shewanella*)、莫拉菌属(*Moraxella*)、小红卵菌属(*Rhodvulum*)、红细菌属(*Ruegeria*)、微球菌属(*Micrococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、着色菌属(*Chromatium*)、弧菌属(*Vibrio*)、玫瑰杆菌属(*Roseobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、节杆菌属(*Arthobacter*)、短杆菌属(*Brachybacterium*)、盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、拟诺卡菌属(*Nocardiopsis*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)、交替单胞菌属(*Alteromonas*)。这些种属主要来源于陆生微生物,从目前情况来说,陆地上已较难再发现新的抗菌化合物,海洋因其具有复杂生态环境储藏着丰富的微生物资源,是新型抗菌活性物质的主要来源之一,从海洋生境中发现抗菌活性物质已经成为现阶段研究热点。

4 结　语

本实验从浙东剑门港海区生境采样分离筛选获得产抗菌活性物质较强的微生物为 *Bacillu* 属的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* ,命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1。解淀粉芽孢杆菌是普遍生存于自然环境中的一种非致病性细菌,通过研究可知解淀粉芽孢杆菌在其生长过程中可分泌多种抑菌物质,比如通过产生多肽、抗菌蛋白以及抗生素等活性成份来抑制真菌、植物病原菌、线虫、病毒等,起到了生物防治的效果。并且由于解淀粉芽孢杆菌是非致病性细菌,因此可将其作为一种新型的高效的天然生物防腐剂来开发,比如可以用在食品防腐等方面应用,从而可更好地服务人类。*Bacillus amyloliquefaciens* MBRC1 筛选及鉴定极大地丰富了抗菌微生物资源,它具有潜在的开发出新的抗菌化合物的可能,对具体的抑菌物质分离及其结构分析鉴定有待于进一步研究。

参考文献:

[1] LI Jing,LIU Lina,WANG Anjian,et al. Research progress of microbial preservation technology on fruits and vegetables[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(4):337-343.(in Chinese)

[2] ZHANG Min,LIU Qian. Study on present situation and development trends of fruit & vegetable preservation in the world[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(8):785-792.(in Chinese)

[3] ZHANG Baojun,ZHANG Jiarong,HAN Jucai,et al. Purification and characterization of an antifungal protein from endophytic

Bacillus amyloliquefaciens LP-5[J]. **Acta Phytophylacica Sinica**, 2010, 37(2): 143-147. (in Chinese)

[4] LIU Qiao, QUAN Chunshan, FAN Shengdi. Extraction of antimicrobial substances from fermentation of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-12 by ultra filtration[J]. **Food Science and Technology**, 2006, 32(7): 70-72. (in Chinese)

[5] XIN Shanshan, QI Gaofu, ZHU Fayin, et al. Research on optimization of fermentation medium of *Bacillus amyloliquefaciens* and its control effect to colletotrichum gloeosporioides[J]. **Journal of Huazhong Agricultural University**, 2011, 30(4): 411-415. (in Chinese)

[6] CALDEIRA A T, ARTEIRO J M S, COELHO A V, et a1. Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 [J]. **Process Bidchemistry**, 2011, 46(9): 1738-1746.

[7] YU G Y, SINCLAIR J B, HARTMAN G L, et a1. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing rhizoctonia solani[J]. **Soil Biology and Biochemistry**, 2002, 34(7): 955-963.

[8] RAO Y K, LIN H Y, WU W S, et a1. Evaluation of HPLC and MEKC methods for the analysis of lipopeptide antibiotic iturin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. **International Journal of Applied Science and Engineering**, 2008, 6(2): 85-96.

[9] CHEN X H, KOUMOUTSIA A, SCHOLZA R, el a1. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens[J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 140(1/2): 27-37.

[10] CHEN X H, SCHOLZ R, BORRISS M, et a1. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. **Journal of Biotechnology**, 2009, 140(1/2): 38-44.

[11] SUN Yanxia, ZHAN Runqing, LIU Baoyou, et al. Control effect of Geotrichum candidum and *Bacillus amyloliquefaciens* on cucumber fusarium wilt[J]. **Shandong Agricultural Sciences**, 2010(12): 55-57. (in Chinese)

[12] CHEN Shiyun, YANG Baoyu, GAO Meiying, et al. Inhibition of sclerotia formation of sclerotinia sclerotiorum by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, 2005, 11(3): 373-376. (in Chinese)

[13] SHI Wei, XIE Weitian, ZHANG Yan, et al. Preliminary research on effect of fermentation broth of *Bacillus amyloliquifaciens* on fresh-keeping of chilled meat[J]. **China Brewing**, 2011, 235(10): 51-53. (in Chinese).

[14] KMPFER P, YOUNG C C, SRIDHAR K, et al. Transfer of [Flexibacter] sancti, [Flexibacter] filiformis, [Flexibacter] japonensis and [Cytophaga] arvensicola to the genus *Chitinophaga* and description of *Chitinophaga skermanii* sp. nov [J]. **Int J Syst Evol Micr**, 2006, 56(9): 2223-2228.

[15] R.E.布坎南, N.E.吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.

[16] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.

[17] MARMUR J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms[J]. **J Mol Bio**, 1961, 3(2): 208-218.

[18] MESBAH M, PREMACHANDRAN U, WHITMAN W B. Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 1989, 39(2): 159-167.

[19] BROSIUS J, DULL T J, SLEETER D D, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli1*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1981, 148(2): 107-127.

[20] XI Fengyuan, XUE Changyan, HAO Zhikui. Research on antibacterial activity and identification of *Nocardia asteroides* XI [J]. **Chinese Journal of Antibiotics**, 2014, 39(5): 394-398. (in Chinese)

[21] WEON H, KIM B, YOO S, et al. Andreprevotia chitinilytica gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil from Halla Mountain, Jeju Island, Korea[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 2007, 57(7): 1572-1575.

[22] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. **Mol Biol Evol**, 1987, 4(4): 406-425.

[23] KIMURA M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. **J Mol Evol**, 1980, 16: 111-120.

[24] 岑沛霖, 蔡谨. 工业微生物学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

[25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[26] DOBRETSOV S, DAHMS H U, QIAN P Y. Antibacterial and antidiatom activity of Hong Kong sponges [J]. **Aquat Microb Ecol**, 2005, 38: 191-201.

[27] HENTSCHEL U, SCHMID M, WAGNER M, et al. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activeties from *Mediterranean sponges Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*[J]. **FEMS Microbiol Ecol**, 2001, 35: 305-312.