

蜂蜜中细菌的筛选、鉴定及其抑菌作用

韩惠丽, 蔡宇杰, 管政兵, 孙付保, 廖祥儒*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘要:从4种蜂蜜中分离得到8株芽孢杆菌,通过生理生化实验及形态学观察,结合16S rRNA基因序列分析对这些菌株进行了鉴定。初步研究了8株分离菌对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae* S₇NaCl)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* SYBCT02)的抑菌作用。通过对这些分离菌的抑菌性质的研究,发现有些菌株是通过竞争作用抑制其他菌落的生长,还有些菌株是通过其代谢过程产生的抑菌物质来抑制其他菌落的生长。

关键词: 蜂蜜;芽孢杆菌;鉴定;抑菌作用

中图分类号: Q 819 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)02—0148—07

Screening and Identification and Study on Antimicrobial Activity of Bacterial Isolates from Honey

HAN Hui-li, CAI Yu-jie, GUAN Zheng-bing, SUN Fu-bao, LIAO Xiang-ru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Eight *Bacillus* strains were screened out successfully from four honey samples. These strains were identified by colony morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence analysis. Eight isolates exhibited antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* S₇NaCl and *Serratia marcescens* SYBCT02. Based on the study of antimicrobial activity by the isolates of bacteria, it was found that some strains might inhibit other colonies growth through competitive, and some strains might inhibit other colonies growth by its metabolism produced inhibitory substances.

Keywords: honey, *Bacillus*, identification, antimicrobial activity

蜂蜜是工蜂将采集的植物花蜜或分泌物经过充分酿造而贮存在蜂巢内的甜味物质,它是一种粘度高、透明或半透明的液体。蜂蜜不仅具有很高的营养价值,而且还具有多种生物学活性,如抗氧化、

解毒、抗菌、消炎、滋润、防腐、保护创面、促进细胞再生等^[1]。

由于蜂蜜具有渗透势低、水分质量分数低(17%~22%)、pH值低(3.2~4.5)、葡萄糖氧化酶催化葡萄糖

收稿日期: 2012-04-23

基金项目: 国家 863 计划项目(2010AA101501);重大科技支撑与自主创新专项引导资金项目(BY2010117);江苏高校优势学科建设工程项目。

* 通信作者: 廖祥儒(1964—),男,江西南康人,农学博士,教授,博士研究生导师,主要从事生物化学与分子生物学研究。

E-mail: 13771104596@163.com

氧化不断产生过氧化氢、粘度高、含有抗氧化剂和抗菌物质等特点^[2],故蜂蜜中所含营养生长阶段的细菌极少。微生物大部分以孢子的形式存在,使得蜂蜜能保存很长时间。有研究发现,蜂蜜对 60 多种细菌以及 7 种真菌有抑菌作用,其中对炭疽杆菌、短小芽孢杆菌、白喉状杆菌、大肠杆菌、肺炎杆菌等均有明显的杀菌作用^[3]。

大多数芽孢杆菌对蜂蜜的品质和人类健康影响较小,但肉毒杆菌危害较大。据报道,在蜂蜜中发现了肉毒梭状芽孢杆菌的孢子,其能够引发婴儿肉毒杆菌中毒^[4]。但也有研究从蜂蜜中筛选得到一些细菌,并发现其能产生一些抑菌物质进而抑制一些病原菌的生长^[5-6]。

作者从 4 种蜂蜜中筛选得到了 8 株细菌,通过生理生化实验及形态学观察,结合 16S rRNA 基因序列分析对这些菌种进行了鉴定,然后初步研究了 8 株菌对大肠杆菌、痢疾杆菌及粘质沙雷氏菌的抑菌作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原蜜 研究采用的 4 种蜂蜜为未经过加工的蜂蜜,分别为小茴香蜜(产于广西),桉树蜜(产于广西扶绥),五倍子蜜(产于广西南丹)和枣花蜜(产于河南)。使用前避光室温放置。

1.1.2 指示菌 大肠杆菌(*Escherichia coli*),痢疾杆菌(*Shigella dysenteriae* S₇NaCl),粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* SYBCT02)均保存于作者所在实验室。

1.1.3 培养基

1)营养琼脂培养基(组分 g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,琼脂 20.0;pH 7.2~7.4。

2)验证培养基:含葡萄糖的营养琼脂培养基,分别含质量分数 20%、30%、40%、50%的葡萄糖。

3)TSA 培养基(组分 g/L):胰蛋白胨 17.0,大豆胨 3.0,葡萄糖 2.5,NaCl 5.0,K₂HPO₄·3H₂O 2.5,琼脂 15.0(或 7.5);pH 7.1~7.5。

4)种子培养基(组分 g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,pH 7.2~7.4。

5)发酵培养基(组分 g/L):葡萄糖 20.0,蛋白胨 20.0,K₂HPO₄·3H₂O 1.5,MgSO₄·7H₂O 2.5;pH 7.0。

生理盐水:NaCl 0.85 g/dL。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选 4 种蜂蜜用灭过菌的生理盐水稀释到质量分数为 75%,分别取 200 μL 涂布在营养琼脂培养基上,放置在培养箱于 30 ℃培养。每天观察,每长出一个菌落都要转接到新鲜的培养基上,划线分离纯化直到长出单菌落,转接并保藏菌种。

1.2.2 菌种验证 用含糖培养基验证分离得到的菌,先在含糖 20 g/dL 的营养琼脂培养基上转接筛到的菌落,30 ℃培养一段时间观察菌落是否能够生长。把能够在含 20 g/dL 的葡萄糖培养基上生长的菌落再转接到含糖 30 g/dL 的培养基上,观察是否生长。依次再转接到含糖 40、50 g/dL 的培养基上,筛选出耐高糖的菌落,转接保藏菌种。

1.2.3 菌种鉴定

1)菌体形态观察和生理生化实验:把筛到的细菌转接到倒有营养琼脂培养基的平板上,30 ℃培养 24 h,观察菌落形态特征;根据《伯杰细菌手册》和《常见细菌鉴定手册》中的方法测定其生理生化特性。生理生化实验包括淀粉水解、V-P 试验、M-R 试验、过氧化氢酶的产生、反硝化、明胶液化试验、柠檬酸盐的利用、脲酶的测定以及糖发酵试验等。

2)系统进化树的构建:将筛到的细菌送到南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果通过与 NCBI 上已有序列进行 Blast 同源检索,通过 BioEdit 软件进行转换,并用 MEGA 4.0.2 软件采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建,重复取样 1 000 次进行自展值(bootstrap value)分析,以评估系统发育树的置信度,确定菌种在进化中的位置。

1.2.4 分离菌对指示菌的抑制作用 用接种针将分离得到的细菌分别点种到倒有 TSA (1.5 g/dL 的琼脂)的平板上,30 ℃培养 48 h,直到有菌落长出。然后把融化的 TSA (0.75 g/dL 的琼脂)培养基冷却到 40 ℃左右(以不烫手为准),取 2 mL 加入 200 μL 指示菌,混匀,分别涂布在已长有菌落的平板上,30 ℃培养 24 h,观察是否有抑菌圈^[7]。

1.2.5 分离菌发酵液的抑菌作用 将筛到细菌接入种子培养基中,30 ℃、200 r/min 摇 12 h。然后将种子液接入装液量 50 mL 的液态发酵培养基中,接种体积分数为 4%,30 ℃、200 r/min 恒温培养 72 h,得到发酵液。发酵液经 8 000 r/min 离心 15 min,得到上清液。上清液用 0.22 μm 的过滤器进行过滤除

菌。分别取 3 种指示菌 200 μL 涂平板,并在涂好的平板上打孔(9 mm),取 100 μL 过滤除菌的上清液加入孔中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察是否有抑菌圈。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选及验证

通过筛选及验证最终得到 8 株细菌,分别为: X1, X2 来自小茴香蜜; W1, W3 来自五倍子蜜; A1, A3 来自桉树蜜; Zao2, Zao3 来自枣花蜜。因为蜂蜜中的糖含量很高,从蜂蜜中筛选的微生物有可能是耐高糖的,所以要用高糖培养基验证以排除其它的杂菌。

8 株菌都能在含葡萄糖 20 g/dL 的培养基上生

长;其中 X1, X2, W1, A1, A3 能在含葡萄糖 30 g/dL 的培养基上生长;只有 A1 能在含葡萄糖 40 g/dL 的培养基上生长;8 株菌均不能在含葡萄糖 50 g/dL 的培养基上生长。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 菌体形态观察和生理生化实验 在营养琼脂培养基上菌落形态特征: X1 白色,边缘有树状分枝; X2 淡红色,菌落边缘呈绒毛状,菌落干燥; W1 黄色,菌落较规则; W3 浅黄色; A1 乳白色,菌落较光滑,边缘透明,产粘液; A3 乳白色,菌落边缘呈绒毛状,产粘液; Zao2 白色,边缘有绒毛状分枝,菌落较小; Zao3 白色,边缘有绒毛状分枝,菌落较大,与 Zao2 相比生长较快。生理生化实验结果见表 1。

表 1 生理生化特性

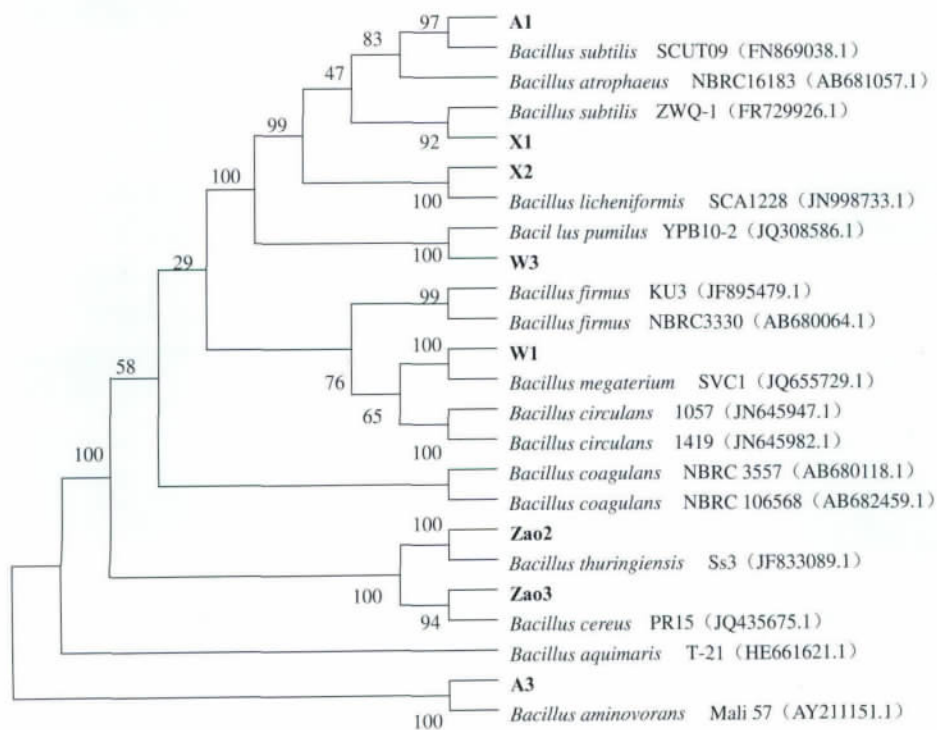
Table 1 Physiological and biochemical characteristics

性状	X1	X2	W1	W3	A1	A3	Zao2	Zao3
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+	+
芽孢	有	有	有	有	有	有	有	有
淀粉水解	-	+	+	-	+	+	+	+
V-P	+	+	-	+	+	+	-	-
M-R	-	-	+	+	-	-	+	+
过氧化氢酶	+	+	+	+	+	+	+	+
反硝化	+	+	+	+	+	+	+	+
明胶液化	+	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐利用	-	-	-	-	+	+	-	-
脲酶	-	+	+	-	+	+	+	+
糖发酵试验								
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+
鼠李糖	-	+	-	-	-	-	-	-
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖	+	+	+	+	+	+	-	+
D-甘露糖	+	+	-	+	+	+	+	+
α -乳糖	+	+	+	+	+	-	-	-
D-(+)-木糖	-	+	+	+	+	-	-	+
肌醇	+	+	+	-	+	+	-	-
D-山梨醇	+	+	-	-	+	+	-	-

注:“+”表示反应呈阳性或者可以生长、利用;“-”表示反应呈阴性或者不可以生长、利用;“+-”表示极少利用。

2.2.2 系统进化树的构建 通过 MEGA 4.0.2 软件采用邻接法(Neighbor-Joining method) 进行聚类分

析和系统进化树构建,得到的进化树见图 1。



注: X1, X2, W1, W3, A1, A3, Zao2, Zao3为8株分离菌, 其余为GenBank收录的菌株, 圆括号内为其GenBank中的收录号。

图 1 MEGA4.0.2 软件构建的 8 株分离菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the 8 isolated strains structure by MEGE4.0.2

经测定菌株 X1 的 16S rRNA 基因序列全长 1 424 bp, 与菌株 *Bacillus subtilis* ZWQ-1 (FR 729926.1) 的同源性水平最高, 置信度为 92%, 相似度为 99%, 并且菌株 X1 的菌落形态特征和生理生化性质大部分符合伯杰细菌鉴定手册中枯草芽孢杆菌的性质, 所以初步鉴定 X1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); 菌株 X2 的 16S rRNA 基因序列全长 1 423 bp, 和菌株 *Bacillus licheniformis* SCA1228 (JN998733.1) 的置信度为 100%, 相似度达到了 100%, 菌株 X2 的菌落形态特征和生理生化性质与伯杰细菌鉴定手册中的 *Bacillus licheniformis* 相似, 则认为 X2 属于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*); 菌株 W1 的 16S rRNA 基因序列全长 1 427 bp, 与 *Bacillus megaterium* SVC1 (JQ655729.1) 的置信度为 100%, 相似度为 99%, 结合菌株 W1 的菌落形态特征和生理生化性质, 可以认为 W1 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*); 菌株 W3 的 16S rRNA 基因序列全长 1 423 bp, 和菌株 *Bacillus*

pumilus YPB10-2 (JQ308586.1) 的置信度为 100%, 相似度为 100%, 菌株 W3 的菌落形态特征和生理生化性质与伯杰细菌鉴定手册中的 *Bacillus pumilus* 相符合, 则认为 W3 是短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*); 经测定菌株 A1 的 16S rRNA 基因序列全长 1 574 bp, 其与 *Bacillus subtilis* SCUT09 (FN869038.1) 同源性水平最高, 置信度为 97%, 相似度达到了 99%, 结合菌株 A1 的菌落形态特征和生理生化性质, 可以认为 A1 属于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); 菌株 A3 的 16S rRNA 基因序列全长 1 580 bp, 与 *Bacillus aminovorans* Mali 57 (AY211151.1) 同源性水平最高, 置信度为 100%, 相似度仅仅 94%, 而菌株 A3 的菌落形态特征和生理生化性质与伯杰细菌鉴定手册中枯草芽孢杆菌的性质符合, 暂且命名 A3 为 *Bacillus* sp. SYBC-hb6; 菌株 Zao2 的 16S rRNA 基因序列全长 1 577 bp, 与菌株 *Bacillus thuringiensis* Ss3 (JF833089.1) 同源性水平最高, 置信度为 100%, 相似度达到了 99%, 同时

结合其菌落形态特征和生理生化性质,认为 Zao2 属于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*);Zao3 的 16S rRNA 基因序列全长 1 433 bp,与菌株 *Bacillus cereus* PR15 (JQ435675.1) 的同源性最高,置信度为 94%,相似度为 99%,并且菌株 Zao3 的菌落形态特征和生理生化性质符合伯杰细菌鉴定手册中蜡样芽孢杆菌的性质,所以认为其为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。

最终确定 X1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),X2 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*),W1 为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*),W3 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*),A1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),Zao2 为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*),Zao3 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。分别命名 8 株菌见表 2。

表 2 菌种的命名及来源

Table 2 Honey isolates species name and species origin

原名	重命名	来源	产地	开花期
X1	<i>Bacillus subtilis</i> SYBC-hb1	小茴香蜜	广西	2011.06
X2	<i>Bacillus licheniformis</i> SYBC-hb2			
W1	<i>Bacillus megaterium</i> SYBC-hb3	五倍子蜜	广西南丹	2010.09.15
W3	<i>Bacillus pumilus</i> SYBC-hb4			
A1	<i>Bacillus subtilis</i> SYBC-hb5	桉树蜜	广西扶绥	2010.06.20
A3	<i>Bacillus sp.</i> SYBC-hb6			
Zao2	<i>Bacillus thuringiensis</i> SYBC-hb7	枣花蜜	河南	2010.05
Zao3	<i>Bacillus cereus</i> SYBC-hb8			

2.3 分离菌对指示菌的抑制作用

分离菌对指示菌的抑制作用的实验中见表 3。

表 3 分离菌对 3 种指示菌的抑制作用

Table 3 Antimicrobial activity of the bacterial isolates against three indicator bacteria

分离菌	指示菌		
	痢疾杆菌	粘质沙雷氏菌	大肠杆菌
X1	+	+	+
X2	-	-	-
W1	-	-	-
W3	-	-	-
A1	+	+	+
A3	+	+	+
Zao2	+	+	-
Zao3	+	-	-

注:“+”表示有抑菌圈;“-”表示无抑菌圈。

菌株 X2,W1,W3 周围没有抑菌圈;而菌株 X1,A1,A3,Zao2,Zao3 的周围有明显的抑菌圈,见图 2。说明其对三种或者其中的一种指示菌有抑制作用,

原因有两种:可能是分离菌和指示菌之间的生长有竞争作用,即生活在一起的两种微生物,为了生长争夺有限的同一营养或其他共同需要的生长条件而相互竞争,互相受到不利的影响称为竞争。另一种可能菌株 X1,A1,A3,Zao2,Zao3 适应环境快,生长的较快,使其在生长上占优势,而三种指示菌适应环境慢,生长的较慢,其在生长上处于不利的形势,导致菌株 X1,A1,A3,Zao2,Zao3 的周围形成了抑菌圈;也有可能是它们之间存在着拮抗现象,即两种微生物生活在一起,其中的一种能产生某些特殊的代谢产物或改变环境条件,从而抑制或杀死另一种微生物的现象称为拮抗。X1,A1,A3,Zao2,Zao3 这些菌株可能产生某些抑菌物质或改变环境条件,从而抑制或杀死指示菌,也导致菌株 X1,A1,A3,Zao2,Zao3 的周围形成了抑菌圈。

2.4 分离菌发酵液的抑菌作用

加有 X2,W1,W3 这些菌的发酵液的周围没有抑菌圈,见表 4。表明其发酵液对 3 种指示菌没有抑制作用,可能是 X2,W1,W3 在代谢过程中没有产生抑菌物质。



图2 Zao2对粘质沙雷氏菌的抑制作用

Fig. 2 Antibacterial activity of Zao2 against *Serratia marcescens* SYBCT02

菌株 X1, A1, A3 的发酵液抑菌效果较好, 在平板上有明显的抑菌圈, 见图 3、图 4。通过菌种的鉴定得知 X1, A1 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 而枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 在生长代谢过程中能够产生多种抗菌物质, 包括非核糖体合成的脂肽类抗生素 (lipopeptide antibiotics)、核糖体合成的羊毛硫抗生素 (lantibiotics) 和抗菌蛋白^[8-9]。这些抗菌物质可以抑制细菌、真菌和酵母, 在食品、医药、化工和防治植物病害等方面有重要的应用价值^[10]。加入 X1, A1 的发酵液后, 产生抑菌圈, 可能就是因为它们的发酵液含有这些抗菌物质。菌株 A3 的性质尚待进一步研究。

表4 分离菌的发酵液对指示菌的抑制作用

Table 4 Antimicrobial activity of the bacterial isolates of liquid fermentation against three indicator bacteria

分离菌	指示菌		
	痢疾杆菌	粘质沙雷氏菌	大肠杆菌
X1	+	+	+
X2	-	-	-
W1	-	-	-
W3	-	-	-
A1	+	+	+
A3	+	+	+
Zao2	-	-	-
Zao3	-	-	-

注: “+”表示有抑菌圈; “-”表示无抑菌圈。

菌株 Zao2, Zao3 的周围在分离菌对指示菌的抑制作用实验中有抑菌圈, 而在分离菌发酵液的抑菌作用实验中没有, 则有可能是分离菌和指示菌之间存在着生长竞争作用, 菌株 Zao2, Zao3 适应环境

快, 生长的速度也快于指示菌, 而使其在生长上占优势, 就在菌株 Zao2, Zao3 的周围形成了抑菌圈。



图3 A3, Zao2, Zao3 的发酵液对大肠杆菌的抑制作用

Fig. 3 Antimicrobial activity of the liquid fermentation of A3, Zao2, Zao3 against *Escherichia coli*

图4 X1, X2, A1, A3, Zao3 的发酵液对粘质沙雷氏菌的抑制作用

Fig. 4 Antimicrobial activity of the liquid fermentation of X1, X2, A1, A3, Zao3 against *Serratia marcescens* SYBCT02

3 结 语

作者从 4 种蜂蜜中筛选到 8 株细菌, 均为芽孢杆菌, 并通过验证这 8 株菌能够在耐高糖的环境下生长, 这与它们的生存环境有关: 蜂蜜中的含糖量很高 (平均超过了 85%), 包括果糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和其他碳水化合物^[11]。

通过对这些分离菌的抑菌性质的研究, 发现有些菌株是通过竞争作用抑制其他菌落的生长, 还有些菌株是通过其代谢过程产生的抑菌物质来抑制其他菌落的生长。通过菌种的鉴定得知有两株菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 枯草芽孢杆菌在生长代谢过程中能够产生两类抗菌物质, 一类是非核糖体合成的脂肽类抗生素 (lipopeptide antibiotics), 例如 surfactin, iturin, plipastatin 等^[12], 通常对植物病原真菌具有显著的抑菌活性, 对细菌、病毒和寄生虫也有一定抑制效果; 另一类为核糖体合成的细菌素 (bacteriocin), 例如 subtilosin, subblancin, subtilin^[13] 属于类似于 nisin 的羊毛硫抗生素 (lantibiotics), 能够

有效地杀死近缘细菌。因此研究 *Bacillus subtilis* 抗菌物质在医学、农业和食品上具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 玄红专, 胡福良. 过氧化氢与蜂蜜的抗菌活性[J]. 蜜蜂杂志, 2002, 9: 23-24.
XUAN Hong-zhuan, HU Fu-liang. Hydrogen peroxide and antimicrobial activity of honey [J]. *Journal of Bee*, 2002, 9: 23-24. (in Chinese)
- [2] 张金振, 赵静. 蜂蜜中微生物的污染与控制[J]. 中国蜂业, 2006, 57(9): 30.
ZHANG Jin-zhen, XIAO Jing. Microbial contamination and control in honey [J]. *Apiculture of China*, 2006, 57 (9): 30. (in Chinese)
- [3] 姚京辉, 陈云, 姚海春. 蜂蜜抗菌作用机理研究[J]. 蜜蜂杂志, 2009, 11: 41-42.
YAO Jing-hui, CHEN Yun, YAO Hai-chun. Research on antimicrobial function mechanism of honey [J]. *Journal of Bee*, 2009, 11: 41-42. (in Chinese)
- [4] Nakano H, Okabe T, Hashimoto H, et al. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origin[J]. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 1989, 43: 183-195.
- [5] Lee H, Churey J J, Worobo R W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126: 240-244.
- [6] López A C, Alippi A M. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117: 175-184.
- [7] Harding C D, Shaw B G. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against closely related species and *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990, 69: 648-654.
- [8] Moyne A L, Cleveland T E, Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 234: 43-49.
- [9] 孔建, 王文夕, 赵白鸽, 等. 枯草芽孢杆菌 B-903 菌株的研究及影响抗菌物质产生和积累的主要因素[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 65-68.
KONG Jian, WANG Wen-xi, ZHAO Bai-ge, et al. Research on *Bacillus subtilis* strain B-903 and the main factors affected antibacterial substances produced and accumulated [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2000, 16 (2): 65-68. (in Chinese)
- [10] Yeh M S, Wei Y H, Chang J S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41: 1799-1805.
- [11] Nakayma S, Takahashi M. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis* [J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 80-82.
- [12] Hansen J N. Antibiotics synthesized by post translational modification[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1993, 47: 535-564.