

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (6) :700 - 706; 4 June 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140491

陈皮中微生物的分离与鉴定

阳洁¹, 尹坤¹, 谭习羽², 袁涛¹, 江院¹, 谭志远^{1*}

¹华南农业大学农学院, 广东 广州 510642

²湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

摘要:【目的】陈皮保存的时间越长即陈皮越老其药用功效越显著。本工作拟从7年陈皮中分离有益微生物,并制成相应的微生物产品,应用于高品质耐储存陈皮的生产。【方法】以7年陈皮为材料,用4种培养基分离微生物;采用SDS-PAGE全细胞蛋白电泳和IS-PCR指纹图谱对所分离到的微生物进行聚类分析,再选取每个类群的代表菌株进行分子系统发育分析及生理生化鉴定。【结果】从7年陈皮中分离、纯化23株细菌,但没有分离到真菌与放线菌。23株细菌聚为4个类群,其中类群I属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),类群II、类群III、类群IV属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。【结论】4个类群中只有类群II代表菌株cp20具有明显的柠檬酸盐利用能力,在陈皮的试验制作过程中具有防腐耐储存作用。

关键词: 陈皮, 芽孢杆菌属, 类芽孢杆菌属

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209(2015)06-0700-07

陈皮,又名橘皮、桂老、红皮、黄橘皮、广橘皮、新会皮、柑皮、或广陈皮。陈皮具有行气健脾,燥湿化痰的功效,常用于治疗胸膈胀满,食少吐泻,咳嗽痰多等症状,是我国传统中草药之一。一般,陈皮保存时间越长药用功效越显著,但长期储藏陈皮会发霉甚至腐烂。近年来,国内对陈皮的研究主要集中于化学成分、药理作用等方面^[1],但对陈皮内微生物的研究少有相关文献的报道。张鲁冀等^[2]从酸菜中筛选得到了大量的乳杆菌,这对于开发利用酸菜中的微生物资源提供了有力依据。因此,将从老陈皮中分离有益微生物,制成微生物制剂应用于陈皮的生产当中,可能对陈皮防腐与风味的维持发挥一定的作用。本工作从7年陈皮中分离纯化微生物,并采用生理生化特性和分子生物学的方法对所分离

的菌株进行鉴定,为开发利用陈皮中的微生物资源,发展相应的微生物制剂的生产奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料: 试验所用的陈皮为广东新会品质较好的7年陈皮。

1.1.2 培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基、LB培养基、PDA培养基及高氏一号培养基参照《微生物学实验》^[3]。

1.1.3 主要试剂和仪器: 试剂均为广州化学试剂厂生产,电泳仪为Bio-Rad公司生产,电泳槽为北京六一厂生产,紫外成像仪为Tanon GIs-2008,PCR仪和

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370052);广东省科技项目(2012B010300018,2013B060400020)

* 通信作者。E-mail: zytan@scau.edu.com

作者简介: 阳洁(1986-),男,湖南邵阳人,硕士,研究方向为微生物的分离与鉴定。E-mail:814736451@qq.com

收稿日期: 2014-10-15; **修回日期:** 2014-12-10

离心机均购于德国 Eppendorf 公司, 引物合成由深圳华大基因科技有限公司完成。

1.2 陈皮的处理

用镊子分别夹取 3 块大小一致的 7 年陈皮 (每块陈皮约 0.5 g) 于 3 个无菌培养皿中。接着分别加入 20 mL 75% 酒精浸泡 5 min, 浸泡完之后, 浸泡液倒出。再分别加入 20 mL 0.1% HgCl_2 浸泡 3 min, 倒掉浸泡液。接着无菌水洗 5 次, 每次 15 min。

用灭过菌的剪刀将 3 个培养皿中的陈皮剪碎, 剪碎后的陈皮用灭过菌的镊子夹入到 3 个无菌的 1.5 mL 离心管中并分别加入 0.5 mL 无菌水, 再分别记为 A, B, C。最后将离心管放到震荡器上震荡, 使离心管中的陈皮与无菌水混合均匀。

1.3 陈皮中微生物的分离与纯化

细菌的分离: 无菌操作台中用移液枪吸取 A、B 和 C 中的混合液各 50 μL 于 LB 平板及牛肉膏蛋白胨平板上涂布均匀, 并分别记为 A1、B1、C1、A2、B2 和 C2, 再将此 6 个平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。真菌的分离: 移液枪吸取 A、B 和 C 中的混合液各 50 μL 于 PDA 平板上进行均匀涂布, 并分别记为 A3、B3、C3, 再将此 3 个平板于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。放线菌的分离: 移液枪吸取 A、B 和 C 中的混合液各 50 μL 于高氏一号平板上进行均匀涂布, 并分别记为 A4、B4、C4, 再将此 3 个平板于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。24 h 后分别从平板中挑取形态不同的菌落于新的相对应的培养基中进行平板划线, 当所生长的菌落大小、形态特征一致时, 用石炭酸复红染液染色后镜检, 确定其是否纯化。未纯化, 则继续挑取菌落, 进行平板划线直至纯化。纯化后的菌株用 15% (V/V) 的甘油于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 菌株 DNA 的提取

DNA 小量提取方法: 收集对数生长期菌株于无菌 1.5 mL 的离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 溶菌酶破壁 30 min, 再加入 1.5 倍体积的十二烷基肌氨酸钠 (TE 溶解, 5% 浓度) 60 $^{\circ}\text{C}$ 保温 0.5 h, 酚/氯仿/异戊醇抽提 (1:24:25), 异丙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后溶于 50 μL TE (pH 8.0) 中, 制备的 DNA 样品保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用^[4]。

1.5 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类分析

收集对数生长期的菌体于 1.5 mL 预称重的离心管中, 用无菌双蒸水洗涤一次, 加入 4 倍上样缓冲液 [ddH₂O 4 mL, 0.625 mol/L Tris-HCl (pH 6.8) 1 mL, glycerol 0.8 mL, 10% SDS 1.6 mL, β -mercaptoethanol

0.4 mL, 1% brophenol blue 0.2 mL] 裂解细胞, 使其浓度为 150 mg/mL, 放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。临用前在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 10 min, 并以 14000 r/min 离心 8 min。选择 10% 分离胶、5% 浓缩胶进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳条件为 60 V 恒压 30 min, 30 mA 恒流跑完分离胶, 方法见文献 [5]。

1.6 IS-PCR 指纹图谱扩增及分析

采用 Insertion Sequence-based PCR (IS-PCR) DNA 指纹图谱的方法, 以单引物 J3 (5'-GCTCAG GTCAGGTGGCCTGG-3') 作为 IS-PCR 引物^[6]。PCR 反应条件见文献 [7], 反应总体积为 25 μL 。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖电泳初步聚类, 将条带一致的归为同一类群, 再用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步聚类。

1.7 16S rDNA 的扩增

PCR 扩增引物^[8] 分别为: 上游引物 25f (5'-AACTKAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3') 和下游引物 1492r (5'-TACGGCTACCTTGTACGACT-3')。PCR 反应条件见参考文献^[9]。

1.8 16S rDNA 测序与同源性分析

16S rDNA 扩增完成后, 扩增产物交中美泰和生物技术有限公司测序。将所得序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST。然后将代表菌株序列和相似性较高的模式菌株序列输入到 GeneDoc 软件进行人工比对和格式转换, 最后用 TREECONW 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析并构建系统发育树。

1.9 菌株生理生化特性检测

1.9.1 菌株生理生化鉴定: 柠檬酸钠利用试验、甲基红测定、乙酰甲基甲醇试验、过氧化氢酶产生、明胶液化与淀粉水解均参照《微生物学实验》^[3] 进行。

1.9.2 菌株对 pH、NaCl 和抗生素耐受性测定: 试验用 Bio-BIQB 板进行测定。将供试菌株在 LB 培养基上活化, 挑取培养至对数生长期的菌体, 用 0.2% 无菌琼脂水稀释到 $OD_{600} = 0.06$, 然后用 8 孔移液枪将菌液加入 Bio-BIQB 板, 每孔 130 μL , 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。24 h 后进行观察并拍照, 以无菌水点样孔为对照, 观察各个点样孔的颜色透明度变化, 培养基变模糊表示该菌能在此条件下生长, 记为 "+", 否则为不生长, 记为 "-"。

1.10 类群 II 代表菌株 cp20 对桔皮防腐试验

将供试菌株 cp20 培养至对数生长期, 收集菌体, 用无菌水制备菌悬浮液, 调整细胞密度为

$OD_{600} = 1$ 。喷洒 8 mL 菌液于 80 g 左右的新鲜橘子皮中,对照组喷洒 8 mL 无菌水于 80 g 左右的新鲜橘子皮中。经自然风干后分别装入抽真空的封口袋中,放置干燥阴凉处,120 d 后取样拍照记录。

2 结果和分析

2.1 菌株的分离

从 7 年陈皮中共分离纯化到 23 株细菌,其中在 LB 培养基上培养纯化获得 9 株,从牛肉膏蛋白胨培养基中获得 14 个纯培养物(表 1)。没有分离纯化到真菌与放线菌,通过对 7 年陈皮的原始样品进行显微镜观察,结果原始样品中没有检测到真菌,表明样品中可能没有真菌。

表 1. 从 7 年陈皮中通过不同培养基分离菌株结果

Table 1. The result of strains isolated from the 7-year orange peel using different medium

Medium	Strain								
LB	cp01	cp02	cp03	cp04	cp05	cp06	cp07	cp08	cp09
Peptone beef	cp10	cp11	cp12	cp13	cp14	cp15	cp16	cp17	cp18
Peptone beef	cp19	cp20	cp21	cp22	cp23				

2.2 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类

亲缘关系相近的菌株的全细胞蛋白图谱有一定的相似性, SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳可将细菌的蛋白质分离,根据蛋白质图谱的相似性可对细菌进行聚类分析^[10]。本工作中的 23 个分离菌株聚为 4 个类群:类群 I 有 7 个菌株,类群 II 有 3 个菌株,类群 III 含 9 个菌株,类群 IV 含 4 个菌株。

2.3 IS-PCR 指纹聚类

通过 IS-PCR 指纹图谱分析,可以区分不同种的细菌。采用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳对 IS-PCR 多态性指纹图谱检测,表明 23 株细菌分为 4 种谱型(图 1)。

2.4 16S rRNA 序列相似性分析

将类群 I 代表菌株 cp06、类群 II 代表菌株 cp20、类群 III 代表菌株 cp16 及类群 IV 代表菌株 cp12 的 16S rRNA 基因序列输入到 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对。将相似性相近的序列采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析并构建系统发育树(图 2)。结果表明类群 I 代表菌株 cp06 与 *Bacillus thuringiensis* (DSM 2046^T)、*Bacillus weihenstephanensis* (DSM 11821^T) 处在同一分支中,与 *Bacillus thuringiensis* (DSM 2046^T) 序列相似性为

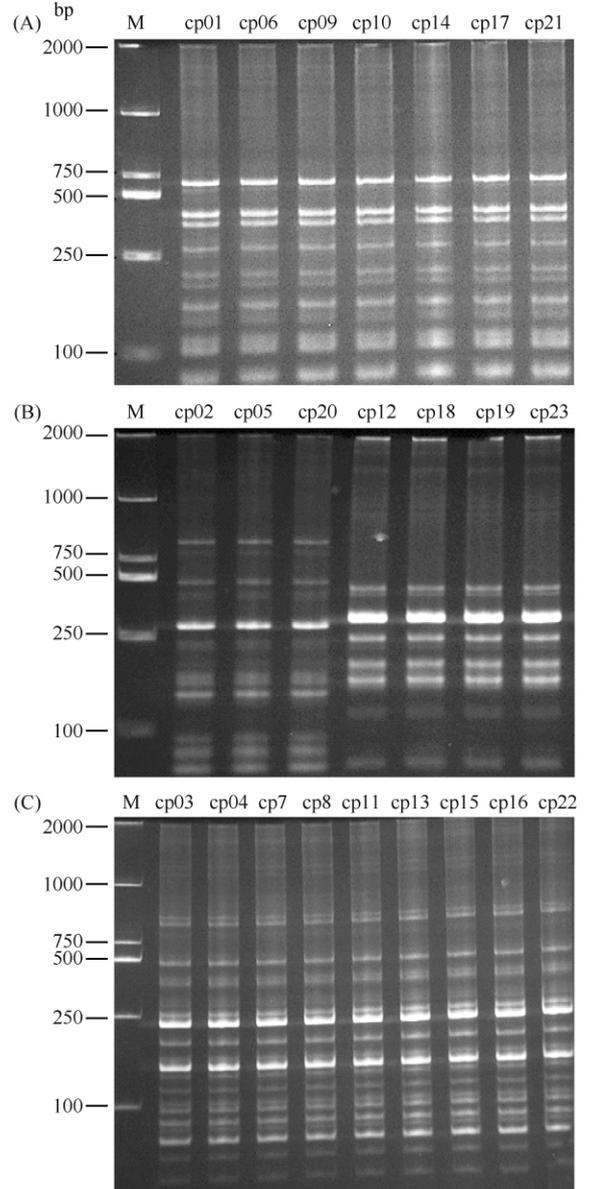


图 1. 从陈皮中分离的 23 株菌 IS-PCR 指纹电泳图谱

Figure 1. IS-PCR DNA fingerprinting patterns of 23 strains isolated from pericarpium citri reticulatae. A: Group I; B: Group II and group IV; C: Group III.

99.8%; 类群 II 代表菌株 cp20 与 *Paenibacillus thailandensis* (PCU 275^T) 的序列相似性为 99.4%; 类群 III 代表菌株 cp16 与 *Paenibacillus cineris* (LMG 18439^T) 的序列相似性为 99.7%; 类群 IV 代表菌株 cp12 与 *Paenibacillus barengoltzii* (NBRC 101215^T) 亲缘关系较近,其序列相似性为 99.2%。

2.5 各类群代表菌株生理生化特性

类群 I 代表菌株 cp06 和类群 III 代表菌株 cp16 均能分解葡萄糖并产生丙酮酸,使培养液呈酸性

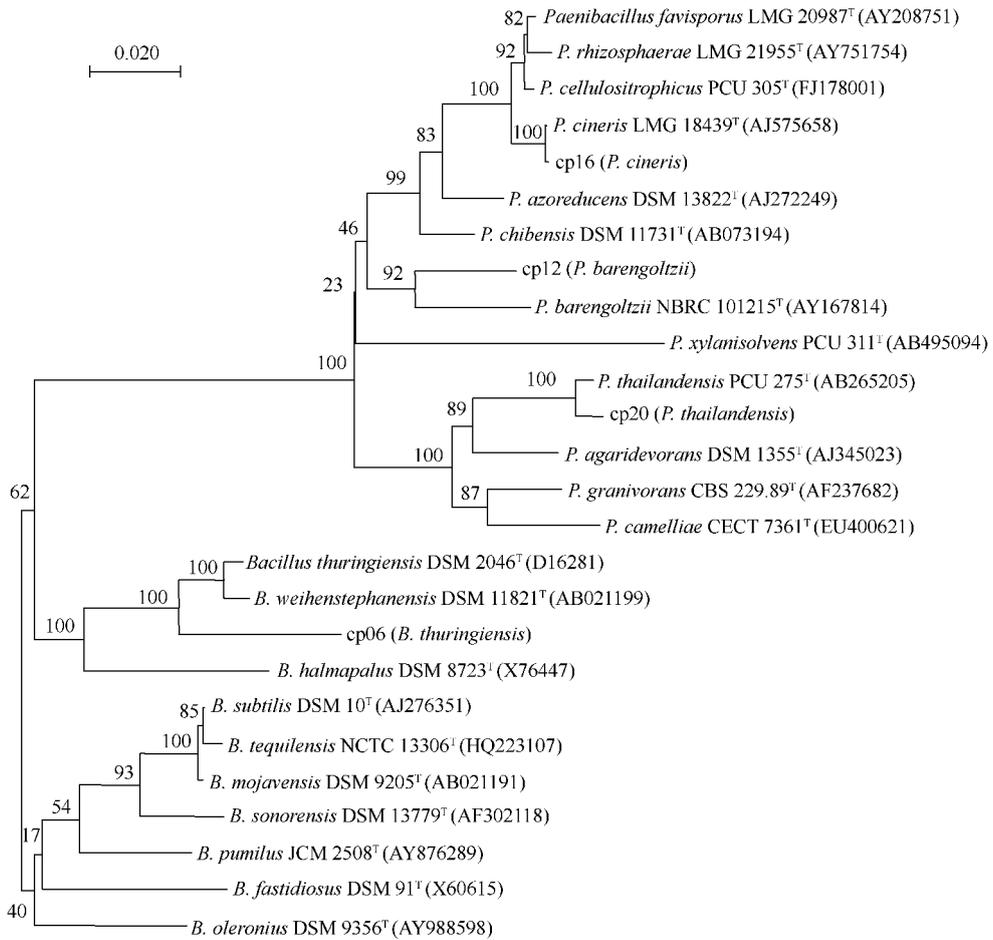


图 2. 陈皮中各类群代表菌株及与之相关菌株构建的系统发育树

Figure 2. 16S rRNA gene homology based phylogenetic tree of the isolates. The tree was constructed by neighbor-joining method, isolates of cp06, cp20, cp16 and cp12 were represented the strains of group I, II, III, and IV respectively. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by boot strap. Bar, 2% sequence divergence.

pH < 5.4, 甲基红反应呈阳性。在乙酰甲基甲醇试验中类群 I 代表菌株 cp06 和类群 IV 代表菌株 cp12 呈阳性反应, 表明这两个菌株不仅能使葡萄糖分解成丙酮酸还能使其再脱羧、氧化 (在碱性溶液中) 生成二乙酰。4 个类群的代表菌株均具有过氧化氢酶活性, 表明它们都能将代谢过程产生的具有毒性的过氧化氢水解成水和氧气, 以保护细菌不被伤害; 只有类群 I 中的代表菌株 cp06 具有明胶酶, 能将明胶先水解为多肽, 又进一步水解为氨基酸, 失去凝胶性质而液化。在柠檬酸钠利用试验中只有类群 II 代表菌株 cp20 呈阳性反应, 表明 cp20 能分解柠檬酸钠并产生碳酸钠, 从而使培养基中的溴百里香酚蓝指示剂由绿色变为深蓝色。淀粉水解试验中各类群的代表菌株都具有淀粉水解酶, 能将淀粉水解为麦芽糖或葡萄糖 (表 2)。

2.6 各类群代表菌株对 pH、NaCl 和抗生素耐受性分析

所有类群的代表菌株均能在 pH 3.0 - 9.0 生长, 类群 II 代表菌株 cp20 及类群 III 代表菌株 cp16 可耐受 3.0% NaCl, 而类群 I 代表菌株 cp06 与类群 IV 代表菌株 cp12 则可耐受高达 5.0% NaCl。

所有类群的代表菌株均耐受 300 μg/mL 氨苄青霉素。不同的菌株对链霉素、四环素、红霉素的耐受性差异较大。类群 I 代表菌株 cp06、类群 II 代表菌株 cp20 及类群 III 代表菌株 cp16 在 300 μg/mL 的四环素下仍能生长。类群 II 代表菌株 cp20 及类群 III 代表菌株 cp16 对 50 μg/mL 的红霉素具有耐受性, 但类群 I 代表菌株 cp06 与类群 IV 代表菌株 cp12 对红霉素的耐受性较差, 只能在 5 μg/mL 的低浓度下生长。而 5 μg/mL 的卡拉霉素、庆大霉素、

表 2. 陈皮分离菌株各类群代表菌株的生理生化特性

Table 2. The physiological and biochemical properties of representative strains isolated from pericarpium citri reticulatae

Strain	M. R	V-P	Catalase	Gelatin liquefaction	Citrate utilization	Amylolysis
cp06	+	+	+	+	-	+
cp12	-	+	+	-	-	+
cp16	+	-	+	-	-	+
cp20	-	-	+	-	+	+

氯霉素、新霉素就能抑制所有供试菌株的生长。

2.7 桔子皮防腐试验

从陈皮分离的 4 个类群菌株中, 只有类群 II (group II) 的代表菌株 cp20 能够利用柠檬酸盐, 说明该菌株对于桔子皮中柠檬酸的转化起着作用。将该菌株制成菌悬液喷施桔子皮 (见图 3)。结果表

明: 对照组即喷洒无菌水的桔子皮有较重的腐烂气味, 里面有少量的白色霉斑 (图 3-A, 白色圈所圈的部分), 外表伴随着大量的白色霉点, 色泽较差; 试验组即喷洒 cp20 菌液的桔子皮无腐烂气味, 里面无白色霉斑, 外表没有白色霉点, 色泽较好, 有明显的陈皮复合香味 (图 3-B, D)。

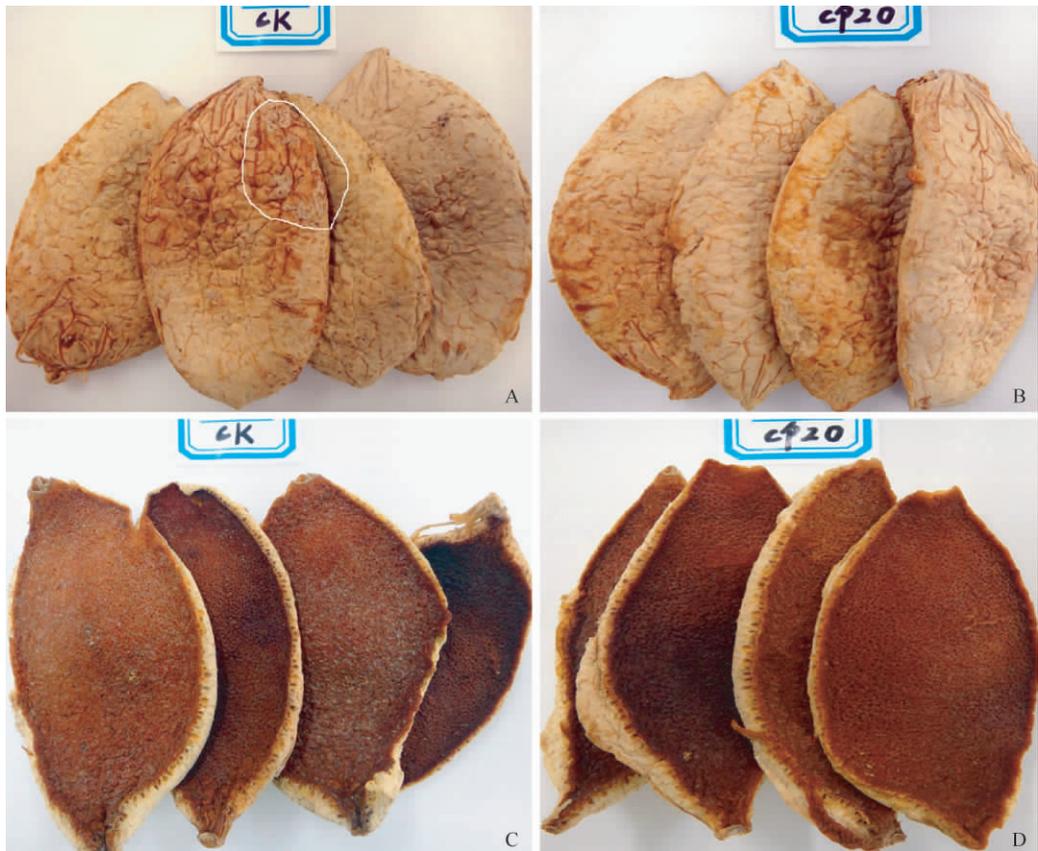


图 3. 陈皮中分离的菌株 cp20 菌液喷施桔皮防腐结果

Figure 3. Spraying test to orange peel with strain cp20 isolated from pericarpium citri reticulatae. A and C: CK, spraying water to orange peel with inner side and outer side, respectively; B and D: spraying the strain cp20 to the orange peel with inner side and outer side, respectively.

3 讨论

研究表明陈皮中富含多种人体必需的营养物质, 如蛋白质、维生素 C、类胡萝卜素及生命必需微量元素。陈皮在补益药 24 项指标中有 15 项起作

用^[11]。长期以来, 对陈皮的研究主要集中在化学成分与药理作用, 但对陈皮内微生物的研究报道甚少。

本研究从 7 年陈皮中分离与纯化, 获得 23 株细菌, 聚为 4 个类群, 其中类群 I 划归于芽孢杆菌属, 类群 II、III、IV 均为类芽孢杆菌属。但没有分离到真菌与放线菌, 一方面可能是由于陈皮经过 75% 酒

精及 0.1% HgCl₂ 的消毒处理之后对陈皮中的真菌与放线菌起到一定的抑杀作用, 而芽孢杆菌及类芽孢杆菌因为芽孢有较强的保护作用而未能致死; 另一方面通过对陈皮的原始样品进行显微镜观察, 样品中没有检测到真菌, 表明该陈皮样品中可能没有真菌。而有研究表明陈皮能够抑制多种真菌的生长^[12]。近年来, 有关芽孢杆菌在防腐、抑菌及对植物病害的防治等方面屡见报道。有些芽孢杆菌除了能产生抗菌物质外, 还能产生噬铁素及蛋白酶^[13]。有研究表明枯草芽孢杆菌对番茄^[14]、黄瓜^[15]、辣椒^[16]等多种作物的根腐病都具有一定的防治作用。本研究类群 II 中的代表菌株 cp20 属于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*), 在桔皮防腐试验中, cp20 菌液具有抑制霉菌生长的特性, 对此种现象的出现可能是桔皮当中含有大量的柠檬酸盐等物质, 在这种酸性条件下正好适宜菌株 cp20 的生长, 菌株 cp20 再通过自身的代谢产生某些抗菌物质对桔皮的防腐及风味的维持起到了一定的作用。如郭娟华等^[17]报道类芽孢杆菌能有效的保持南丰蜜桔果实贮藏品质, 提高果实的抗病能力及减缓果实的衰老。多粘类芽孢杆菌分泌的抗菌物质对油菜腐烂病^[18]、荔枝霜疫霉菌^[19]和黑松根腐病^[20]等多种病原真菌具有较强的抑杀作用。因此, 将从老陈皮中分离得到的有益微生物, 制成相应的微生物制剂来生产出品质较好的陈皮, 从而满足市场的需求, 有着很大的潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Zhao X, Lv W. Progress of Pericarpium Citri Reticulatae. *China Pharmaceuticals*, 2006, 15: 68-70. (in Chinese)
赵小艳, 吕武清. 陈皮的研究概况. *中国药业*. 2006, 15: 68-70.
- [2] Wang X, Li M. Isolation and identification of *Lactobacillus Plantarum* from naturally fermented northeast auerkraut. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, (11): 125-131. (in Chinese)
张鲁冀, 孟祥晨. 自然发酵东北酸菜中乳杆菌的分离与鉴定. *东北农业大学学报*, 2010, (11): 125-131.
- [3] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] Tan Z, Fu Q, Peng G, Yuan H, Cheng Y, Jiang Y. Identification and characterization of endophytic diazotrophs isolated from *Cymbopogon caesius* and *Miscanthus floridulus*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, (4): 643-649. (in Chinese)
谭志远, 傅琴梅, 彭桂香, 原红娟, 程艳波, 江院. 青香茅和五节芒内生固氮菌的分离与生理生化鉴定. *应用与环境生物学报*, 2013, (4): 643-649.
- [5] Wang H, Peng G, Zhang G, Hou W, Tan Z. Characterization of endophytic diazotrophs isolated from molasses grass. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, (8): 2566-2571. (in Chinese)
王华荣, 彭桂香, 张国霞, 侯伟, 谭志远. 糖蜜草 (*Melinism inutiflora* Beauv.) 内生固氮菌分离鉴定. *生态学报*, 2006, (8): 2566-2571.
- [6] Wang C, Zhang Q, Zhou Y, Zhao B. Genetic diversity of pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from southern region of Yangtze River in China. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, (2): 52-57. (in Chinese)
王春连, 章琦, 周永力, 赵炳宇. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析. *中国水稻科学*, 2001, (2): 52-57.
- [7] Peng G, Wang H, Zhang G, Hou W, Yuan Q, Tan Z. Molecular study of endophytic nitrogen fixing bacteria isolated from *Melinism inutiflora*. *Journal of South China Agricultural University*, 2005, (4): 73-76. (in Chinese)
彭桂香, 王华荣, 张国霞, 侯伟, 袁清华, 谭志远. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析. *华南农业大学学报*, 2005, (4): 73-76.
- [8] Peng G, Chen W, Tan Z. Identification and phylogenetic analysis of closely related rhizobium species by rRNA gene intergenic spacer sequence. *Journal of South China Agricultural University*, 2004, (4): 58-62. (in Chinese)
彭桂香, 陈文新, 谭志远. rRNA 基因间隔区序列用于亲缘关系密切的根瘤菌群鉴定及系统发育分析. *华南农业大学学报*, 2004, (4): 58-62.
- [9] Tan Z, Hurek T, Vinuesa P. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67 (8): 3655-3664.
- [10] Wei G, Zhu M. Applications of molecular biological methods on taxonomy of rhizobia. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, 1999, (2): 87-89. (in Chinese)
韦韦宏, 朱铭莪. 分子生物学新方法在根瘤菌分类中的应用. *西北农业大学学报*, 1999, (2): 87-89.
- [11] Zhang L. Exploration on the benefit and function of pericarpium citri reticulatae. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2005, (8): 754-757. (in Chinese)
张理平. 陈皮补益效用的探讨. *中国中西医结合杂志*, 2005, (8): 754-757.

- [12] Fang Y, Wei Y, Yu X, Liu B, Luo Z, Bai Y. Antibacterial experiment and clinical observation of Pericarpium Citri Reticulatae. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 1997, (5): 20. (in Chinese)
方玉复,魏玉平,于香安,刘薄,骆志成,白瑛. 陈皮对浅部真菌的试管内抑菌实验及临床疗效观察. *中国皮肤性病杂志*, 1997, (5): 20.
- [13] 林玲. 内生芽孢杆菌及抗菌物质的鉴定和对作物黄萎病的防治效果. 南京农业大学学位论文, 2009.
- [14] Hou C, Ren J, Zhao S, Zhang H, Du J. Efficacy and mechanism of two *Bacillus subtilis* against processing tomato root-rot disease. *Journal of Shihezi University*, 2012, (2): 152-156. (in Chinese)
侯彩霞,任娟,赵思峰,张慧,杜娟. 2株枯草芽孢杆菌防治加工番茄根腐病的效果和防治机理研究. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2012, (2): 152-156.
- [15] 李晶. 黄瓜枯萎病高效拮抗枯草芽孢杆菌的筛选及生防机制研究. 哈尔滨工业大学学位论文, 2010.
- [16] 刘培福. 枯草芽孢杆菌 D221 发酵条件优化及对辣椒根腐病防治效果初探. 东北农业大学学位论文, 2011.
- [17] Guo J, Chen M, Chen C, Tu Q, Chen J. Effects of *Paenibacillus brasiliensis* YS-1 Crude extracts on storage of nanfeng mandarin. *Modern Food Science and Technology*, 2014, (1): 63-68. (in Chinese)
郭娟华,陈明,陈楚英,涂起红,陈金印. 类芽孢杆菌 YS-1 粗提液对南丰蜜橘贮藏效果的影响. *现代食品科技*, 2014, (1): 63-68.
- [18] Landa BB, Navas-Cortes JA, Hervas A. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of *Fusarium wilt* of chickpea by rhizosphere bacteria. *Journal of Phytopathology*. 2001, 91, (8): 807-816.
- [19] Chen H, Lin J, Liao F, Lin B. Antibacterial activity and mechanism of *Paenibacillus polymyxa* CP7 against *Peronophythora litchi*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, (7): 1047-1056. (in Chinese)
陈海英,林健荣,廖廖蕻,林碧敏. 多粘类芽孢杆菌 CP7 对荔枝霜疫霉菌的抗菌活性及其作用机制. *园艺学报*, 2010, (7): 1047-1056.
- [20] Beatty PH, Jensen SE. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48, (2): 159-169.

Isolation and Characterization of Microbes from Pericarpium Citri Reticulatae

Jie Yang¹, Kun Yin¹, Xiyu Tan², Tao Yuan¹, Yuan Jiang¹, Zhiyuan Tan^{1*}

¹College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China

Abstract: [Objective] The longer the Pericarpium Citri Reticulatae is preserved, the better medicinal values will be. The present work aims to isolate beneficial microbes isolated from the 7-year orange peel that might be used to produce high quality Pericarpium Citri Reticulatae. [Methods] The microbes isolated from the 7-year orange peel using 4 mediums were grouped by SDS-PAGE patterns of the whole-cell protein electrophoresis and IS-PCR DNA fingerprinting. The representative strains were further studied by physiological and biochemical tests, and phylogeny analysis. [Results] Total 23 bacteria were obtained from the 7-year orange peel. These strains were classified into 4 groups: the strains of group I belonged to *Bacillus*; the strains of group II, group III and group IV were closed to *Paenibacillus*. [Conclusion] Among the representative strains of group I, II, III and IV, only the representative strain cp20 of group II has the ability of strong utilizing citrate obviously. The strain cp20 of group II were further applied to making Pericarpium Citri Reticulatae.

Keywords: Pericarpium Citri Reticulatae, *Bacillus*, *Paenibacillus*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370052) and by the Science and Technology Program of Guangdong Province (2012B010300018, 2013B060400020)

* Corresponding author. E-mail: zytan@scau.edu.com

Received: 15 October 2014/ Revised: 10 December 2014