

贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 的抑菌物质稳定性及活性代谢产物挖掘

娄向弟^{1,2}, 周强¹, 贺江², 张向向², 王永慧², 熊建华¹, 郜彦彦^{*1}

1 江西农业大学食品科学与工程学院, 江西 南昌 330045

2 江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002

娄向弟, 周强, 贺江, 张向向, 王永慧, 熊建华, 郜彦彦. 贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 的抑菌物质稳定性及活性代谢产物挖掘[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 935-949.

LOU Xiangdi, ZHOU Qiang, HE Jiang, ZHANG Xiangxiang, WANG Yonghui, XIONG Jianhua, GAO Yanyan. Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 935-949.

摘要:【背景】食源性致病菌在食品中易生长繁殖且致病性强, 严重威胁着公共卫生和食品安全。【目的】通过多个指标分析贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) PJP10 的抑菌物质稳定性, 利用基因组测序预测编码抑菌活性相关酶和代谢产物合成蛋白的基因并检测酶和代谢产物的离体活性, 为该菌工农业开发和应用提供参考数据。【方法】通过抑菌试验确定 pH、温度、蛋白酶、金属离子、紫外线照射和盐浓度等因素对抑菌物质稳定性的影响。利用全基因组测序了解菌株 PJP10 潜在的产酶基因, 并通过酶活试验检测其产酶能力。使用在线软件 antiSMASH 预测代谢产物合成基因簇, 并利用酸沉淀法和乙酸乙酯萃取法获得无菌发酵液粗提物, 通过高效液相色谱和抑菌试验初步探究菌株 PJP10 的胞外活性代谢产物成分。【结果】菌株 PJP10 无菌发酵液能够耐受强酸、强碱、高温、高盐和紫外线照射等环境, 对蛋白酶 K 和胃蛋白酶不敏感, 但对胰蛋白酶和金属离子敏感。全基因组中存在编码淀粉酶、氨基酸酶、蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶、酯酶、果胶酶、葡聚糖酶和酰胺酶等抑菌酶的基因, 酶活测定结果表明该菌株具有蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和酯酶活性。antiSMASH 预测发现菌株 PJP10 基因组中包含杆菌素(bacillaene)、地非西丁(difficidin)、大环内酰亚胺(macrolactin) H、表面活性素(surfactin)、杆菌霉素(bacillomycin) D、泛革素(fengycin)、溶杆菌素(bacilysin)、儿茶酚型铁载体(bacillibactin), 以及解淀粉芽孢杆菌素(amylocyclicin)和植物唑霉素(plantazolicin)等多种活性代谢产物合成基因簇。此外, 抑菌试验发现酸沉淀粗提物对沙门

资助项目: 江西省现代农业产业技术体系项目(JXARS-3); 江苏沿海地区农业科学研究所科研基金项目(YHS202213); 江西农业大学大学生创新创业训练计划(X202310410317)

This work was supported by the Modern Agricultural Research System of Jiangxi Province (JXARS-3), the Jiangsu Coastal Area Institute of Agricultural Science Research Fund (YHS202213), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Project of Jiangxi Agriculture University (X202310410317).

*Corresponding author. E-mail: gaoyy02@hotmail.com

Received: 2023-08-31; Accepted: 2023-10-31; Published online: 2023-12-06

氏菌和大肠杆菌抑菌活性显著,对辣椒青枯菌无抑菌活性,乙酸乙酯粗提物对金黄色葡萄球菌和辣椒青枯菌抑菌活性显著,对沙门氏菌和大肠杆菌抑菌活性明显减弱,根据 HPLC 结果推测,菌株 PJP10 无菌发酵液中的抑菌物质可能是 iturin、fengycin 和 surfactin 这 3 个家族的成员。【结论】菌株 PJP10 抑菌物质稳定性良好,基因组中含有丰富的活性酶基因和活性代谢产物合成基因簇,在工农业生产领域具有较好的应用潜力。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 抑菌活性; 稳定性; 全基因组测序; 抑菌代谢产物

Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10

LOU Xiangdi^{1,2}, ZHOU Qiang¹, HE Jiang², ZHANG Xiangxiang², WANG Yonghui², XIONG Jianhua¹, GAO Yanyan^{*1}

1 College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

2 Jiangsu Coastal Area Institute of Agricultural Science, Yancheng 224002, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Food-borne pathogens are easy to grow and reproduce in food and have high pathogenicity, posing critical threats to food safety and public health. [Objective] To analyze the antimicrobial stability of *Bacillus velezensis* PJP10 from multiple perspectives, discover the genes encoding antimicrobial enzymes and involved in the biosynthesis of antimicrobial substances by genome sequencing, and measure the *in vitro* activities of enzymes and active metabolites, so as to provide data for the application of this strain in industry and agriculture. [Methods] The microbial inhibition tests were carried out to examine the effects of pH, temperature, protease, metal ions, ultraviolet (UV), and salt concentration on the antimicrobial stability of the strain. The potential genes encoding antimicrobial enzymes of PJP10 were investigated by whole genome sequencing and the enzyme-producing abilities assessed by enzyme activity assays. The secondary metabolites of PJP10 were predicted by antiSMASH. HPLC and microbial inhibition tests were employed to analyze the components of the crude extract obtained by the acid precipitation and ethyl acetate extraction. [Results] The cell-free fermentation supernatant exhibited excellent stability at high temperatures, strong acid, strong alkali, high salt and UV, and was sensitive to trypsin and metal ions, but not proteinase K or pepsin. The genome of PJP10 carried abundant genes encoding amylase, aminopeptidase, protease, chitinase, cellulase, esterase, pectinase, glucanase, and amidase, and the strain could produce protease, amylase, cellulase, and esterase. The antiSMASH predicted that strain PJP10 had a variety of gene clusters for the synthesis of secondary metabolites, including bacillaene, difficidin, macrolactin H, surfactin, bacillomycin D, fengycin, bacilysin, bacillibactin, amylocyclicin, and plantazolicin. In addition, the extract obtained by acidification exhibited strong inhibitory activities against *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* but no activity against *Ralstonia solanacearum*. The ethyl acetate extract showed strong inhibitory effects on

Staphylococcus aureus and *R. solanacearum* and weak inhibitory effects on *S. enteritidis* and *E. coli*. According to HPLC results, we hypothesized that the antimicrobial substances in the cell-free supernatant of PJP10 were iturin, fengycin, and surfactin. **[Conclusion]** The strain PJP10 shows high antimicrobial stability and carries rich genes encoding active enzyme and abundant gene clusters for the synthesis of antimicrobial substances, demonstrating a promising prospect of application in industry and agriculture.

Keywords: *Bacillus velezensis*; antimicrobial activity; stability; whole genome sequencing; antimicrobial metabolites

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种常见的食源性致病菌,为革兰氏阳性菌,在自然界中分布广泛^[1]。该菌在食品中易生长繁殖且致病性强,多引起以呕吐和腹泻为主要症状的食物中毒反应^[2]。近年来,过量抗生素的使用导致大量耐药菌出现,尤其是多重耐药菌的出现,使得抗生素应用面临着严峻的挑战^[3],不仅给畜牧业造成严重的经济损失,也严重威胁着食品安全和公众健康^[4]。因此,寻找能够有效抑制食品中金黄色葡萄球菌生长的抑菌物,对于提高食品货架期并保证食品质量安全具有非常重要的意义。

芽孢杆菌广泛存在于自然界中,因其易培养、易储存、便于生物技术操作及具有广谱抑菌活性等优点吸引了大量研究学者的关注,是典型的植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR),在农业生产上被广泛应用^[5]。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)^[6]作为其中的一员,一经发现就展现出了良好的应用潜力,该菌能够产生抗生素、酶、植物激素、铁螯合剂、抗氧化剂、生长促进剂和抗肿瘤药物等丰富的活性代谢产物^[7-8]。贝莱斯芽孢杆菌能够抑制多种土传植物病原菌,促进植物生长并且诱导植物系统抗性,作为生防菌剂开发潜力巨大^[9-10]。也有少量研究显示贝莱斯芽孢杆菌对食源性致病菌具有很好的抑制作用,Zhang 等^[11]从长白山寒冷区域分离得到的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) CB6

对食源性病原菌表现出广谱抑制作用,能够产生一种抗菌蛋白 ATP-1,其是一种潜在的新型抗菌药物,并且该蛋白在促进活性代谢产物合成过程中起重要作用。Nam 等^[12]从土壤样品中分离获得的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) NST6 对致病菌金黄色葡萄球菌具有强烈的拮抗活性,并鉴定到 C15-bacillomycin D 是该菌拮抗金黄色葡萄球菌的主要化合物。朱亚珠等^[13]从自然发酵海洋鱼酱油中分离得到的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) SW5 对金黄色葡萄球菌等多种食品中的常见病原菌有抑制能力,飞行时间质谱(time of flight mass spectrometry, TOF-MS)分析表明,该菌发酵上清液中含有的抑菌物质为表面活性素、山茱萸苷 A、氨基糖苷类抗生素庆大霉素和异帕米星,以及链霉菌素类抗生素达福普丁。

本实验室前期从农家酱中分离鉴定出一株贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) PJP10,在抑菌谱测定试验中,该菌对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC 25923、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) ATCC BAA708 和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC 17802 等食源性致病菌表现出了显著的拮抗效果^[14]。本研究在此基础上继续以食品源贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) PJP10 为研究对象,分析其对食源性致病菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑菌活性稳定性,并对其进行全基因组测序与分析,预测产酶基因并对产酶活性进行验证。采用 antiSMASH 在线软件

挖掘其潜在的活性代谢产物合成基因簇,通过酸沉淀法和乙酸乙酯提取法结合高效液相色谱和抑菌试验研究菌株 PJP10 产生的胞外活性代谢产物,为该菌工农业开发和应用提供参考数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) PJP10 为本实验室分离菌株^[14]。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 35218、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) ATCC BAA708、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 和辣椒青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) QK2013 为本实验室保存菌株。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 10.0。固体培养基另加 20.0 琼脂粉。

蛋白酶测定培养基(g/L): 脱脂奶粉 5.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.0。

淀粉酶测定培养基(g/L): 酵母膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.0, 加入 20.0 可溶性淀粉。

果胶酶测定培养基(g/L): 蛋白胨 2.0, 果胶 5.0, K_2HPO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, 琼脂粉 20.0, pH 7.2。

纤维素酶测定培养基(g/L): 蛋白胨 1.00, 羧甲基纤维素钠 1.00, 酵母膏 0.50, NaCl 1.00, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, KH_2PO_4 0.10, 琼脂粉 20.00, pH 自然。

几丁质酶测定培养基(g/L): 胶体几丁质 15.00, 酵母粉 3.00, $(NH_4)_2SO_4$ 1.00, KH_2PO_4 1.36, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.30, 琼脂粉 20.00, pH 7.0。

葡聚糖酶测定培养基^[15](g/L): 葡聚糖 20.0, $NaNO_3$ 3.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $FeSO_4$

0.1, 琼脂粉 20.0, pH 7.0。

酯酶测定培养基^[16](g/L): NH_4NO_3 1.0, KH_2PO_4 0.5, K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, NaCl 1.0, 琼脂粉 20.0, pH 7.0, 使用前添加终浓度为 0.5 mmol/L 的邻苯二甲酸丁苄酯。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、酵母膏、果胶和羧甲基纤维素钠, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 邻苯二甲酸丁苄酯和葡聚糖, 阿拉丁试剂(上海)有限公司; 甲醇和乙酸乙酯, 天津市永大化学试剂有限公司。

电子天平, 上海菁海仪器有限公司; 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; 高效液相色谱仪, Waters 科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种抑菌活性的测定

菌种活化、培养与无菌发酵液的制备: 取出 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) PJP10, 快速划线至 LB 固体培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱活化过夜。取活化好的单菌落接种至 50 mL LB 液体培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 36 h, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤作为无菌发酵液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存待用。

打孔法测定抑菌活性: 以金黄色葡萄球菌为指示菌, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 作为指示菌种子液, 将指示菌种子液稀释到 1×10^8 CFU/mL, 取 50 μL 均匀涂布 LB 固体培养基, 晾干后打孔(孔径为 9.00 mm), 在各孔内分别加入 100 μL 经不同条件处理的菌株 PJP10 的无菌发酵液, 以 100 μL 未经处理的菌株 PJP10 的无菌发酵液为阴性对照, 每个处理 3 次重复, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后测量抑菌圈的大小, 计算不同条件处理后菌株 PJP10 无菌发酵液的相对抑菌率。

相对抑菌率(%)=处理组抑菌圈直径/对照组抑菌圈直径 $\times 100$ 。

1.2.2 抑菌物质稳定性测定

酸碱稳定性^[17]:取 10 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液,用 1 mol/L HCl 和 NaOH 将无菌发酵液的 pH 值分别调至 3.0、5.0、9.0 和 11.0,处理 1 h 后将 pH 值回调至 7.0,以未经处理的无菌发酵液为对照,测定不同 pH 值处理后无菌发酵液的抑菌活性。

热稳定性^[18]:将 10 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液分别置于 30、50、65、85 和 100 °C 水浴中处理 30 min,反应结束后置于冰水中冷却 5 min,以未经热处理的无菌发酵液为对照,测定经不同温度处理后无菌发酵液的抑菌活性。

蛋白酶稳定性^[19]:取 1 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液分别加入胃蛋白酶溶液、胰蛋白酶溶液和蛋白酶 K 溶液,酶的终浓度为 2 µg/mL,置于 37 °C 水浴中处理 6 h,然后在 80 °C 水浴中处理 30 min,冰浴待用,以未加蛋白酶的无菌发酵液为对照,测定经不同蛋白酶处理后无菌发酵液的抑菌活性。

金属离子稳定性:取 1 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液分别加入 Cu²⁺ (CuSO₄)、K⁺ (KCl)、Mn²⁺ (MnCl₂)金属离子溶剂,终浓度为 5 µmol/L,处理 2 h,以未加金属离子的无菌发酵液为对照,测定不同金属离子处理后无菌发酵液抑菌活性的变化。

紫外线稳定性:分别吸取 10 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液置于 9 cm 的玻璃平皿内,距离 30 W 紫外灯 30 cm 处,分别照射 30、60、120 和 240 s,以未经紫外线照射的无菌发酵液为对照,测定经紫外线照射不同时间处理后无菌发酵液的抑菌活性。

盐浓度稳定性:分别取 5 mL 菌株 PJP10 的无菌发酵液,加入终浓度为 2%、4%、6%、8% 和 10% 的 NaCl,再用 LB 液体培养基补足 10 mL,同时制备相同盐浓度的 LB 液体培养基作阴性对照,处理 3.5 h,以未经处理的无菌发酵液作阳

性对照,测定盐浓度对无菌发酵液抑菌活性的影响。

1.2.3 菌株 PJP10 全基因组测序

从 LB 固体培养基上挑取菌株 PJP10 单菌落转接至 100 mL LB 液体培养基中,于 37 °C、180 r/min 培养过夜。4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后弃上清,菌体送至武汉希望组生物技术有限公司进行 3 代 NanoPore 高通量测序。

采用 Prodigal v2.6.3 软件预测编码基因,采用 tRNAscan-SE v2.0 软件预测 tRNA 基因,采用 RNAmmer v1.2 软件预测 rRNA 基因,采用 Infernal v1.1.3 软件搜索 Rfam (<http://rfam.xfam.org/>)数据库对其他 ncRNA 进行预测,分别用 Mince v0.3.0 软件和 Islander v1.2 软件预测规律成簇间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 和基因岛,采用 Circos v0.69 软件绘制基因组圈图。

1.2.4 产酶基因预测与验证

提取基因组编码蛋白,用 InterProScan v5.25-64.0 软件进行注释,提取 TIGRFAMs 15.0 (<http://tigrfams.jcvi.org/cgi-bin/index.cgi>)、Pfam 31.0 (<https://pfam.xfam.org/>)和 GO (gene ontolog, <http://geneontology.org/>)数据库的注释信息;利用 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, <https://www.kegg.jp/kegg/>)、RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)和 COG (clusters of orthologous groups of proteins, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)数据库对编码蛋白进行功能注释,预测菌株 PJP10 基因组上是否包含淀粉酶、氨肽酶、蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶、酯酶、果胶酶、葡聚糖酶和酰胺酶的合成基因。

挑取活化好的 PJP10 菌落分别点接到蛋白酶、淀粉酶、果胶酶、纤维素酶、几丁质酶、葡聚糖酶和酯酶测定培养基上,37 °C 培养 48 h,

重复 3 次, 观察相应测定培养基上菌落周围是否有透明圈产生; 在长出菌斑的淀粉酶测定培养基中加入碘液, 观察菌落周围是否有透明圈; 在长出菌斑的纤维素酶和几丁质酶测定培养基中倒入 0.5% 的刚果红染料, 染色 50 min 后倒出染料, 加入 5% 的 NaCl 溶液, 浸泡 1 h 后倒出, 观察菌落周围有无透明圈。

1.2.5 活性代谢产物预测及 HPLC 初探

利用 antiSMASH v6.1.1 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) 进行代谢基因簇分析, 挖掘菌株 PJP10 的活性代谢产物合成基因簇。

酸沉淀法提取抑菌物质: 参考刘安等^[20]的提取方法并略作改动。取 200 mL 无菌发酵液用 6 mol/L 盐酸调节 pH 值至 2.0, 静置过夜, 于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后除去上清液, 将沉淀用甲醇溶解, 收集备用。

乙酸乙酯萃取法提取抑菌物质: 参考兰宝锋等^[21]的提取方法并略作改动。以少量多次的原则, 用乙酸乙酯将 200 mL 无菌发酵液多次萃取, 将萃取的有机相收集起来, 于 40 °C 的旋转蒸发仪中除去乙酸乙酯, 剩余沉淀用甲醇溶解, 收集备用。

抑菌试验分析: 采用打孔法检测 2 种不同提取方法获得的抑菌物质对 4 种不同的指示菌(金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌和辣椒青枯菌) 的抑制效果, 在各孔内分别加入 100 μ L 甲醇溶解物, 以 100 μ L 甲醇溶液为阴性对照, 每个处理 3 次重复, 37 °C 培养 24 h 后测量抑菌圈直径。

高效液相色谱法初步测定: 将 2 种方法收集到的甲醇溶解物分别用 0.22 μ m 滤膜去除杂质, 通过高效液相色谱仪检测活性物质, 高效液相色谱仪的参数为: 色谱柱 Alltima C18, 5 μ m, 250 mm \times 4.6 mm, 流动相 A: 1% 乙酸, 流动相 B: 乙腈, 检测波长 230 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 30 °C。

1.2.6 数据分析

试验数据使用 SPSS 25.0 软件进行统计分

析, 试验结果采用平均值 \pm 标准差表示, 每组设置 3 组平行, 试验重复 3 次。使用 SigmaPlot 14.0 和 Origin 2022 软件作图分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 PJP10 无菌发酵液抑菌物质的稳定性

2.1.1 酸碱稳定性

如图 1A 所示, pH 9.0 时相对抑菌率最大为 101.23%。pH 5.0 时, 相对抑菌率为 92.59%, 抑菌活性略有下降。强酸和强碱处理下抑菌活性均呈下降趋势, pH 3.0 和 pH 11.0 时, 相对抑菌率均为 81.48%, 但仍然保持在 80% 以上, 说明发酵液中的抑菌物质对强酸和强碱具有较好的耐受性。

2.1.2 热稳定性

30、50、65 和 85 °C 热处理对菌株 PJP10 无菌发酵液的抑菌活性无显著影响。当温度升高至 100 °C 时, 抑菌活性明显下降至 72% (图 1B), 说明菌株 PJP10 无菌发酵液中的抑菌物质在 30–85 °C 具有良好的热稳定性, 能够耐受 100 °C 高温, 100 °C 高温处理后相对抑菌活性保留在 70% 以上。

2.1.3 蛋白酶稳定性

菌株 PJP10 无菌发酵液经蛋白酶 K 处理后的抑菌活性未受到影响, 经胃蛋白酶处理后抑菌活性略有下降, 相对抑菌率为 96.70%, 经胰蛋白酶处理后抑菌活性下降明显, 相对抑菌率降至 73.63% (图 1C), 说明无菌发酵液中的抑菌物质对胰蛋白酶敏感, 对蛋白酶 K 和胃蛋白酶不敏感, 推测菌株 PJP10 的抑菌物质活性部位存在胰蛋白酶敏感区, 可能包含蛋白类拮抗物质。

2.1.4 紫外线稳定性

如图 1D 所示, 菌株 PJP10 无菌发酵液经紫外线照射处理后, 其抑菌活性受到影响, 经过 30 W 紫外线照射 30 s, 其相对抑菌率下降至 92.75%, 但是延长照射时间对其抑菌活性并无显著影响, 照射 60、120 和 240 s 之后的抑菌活

性几乎未发生变化, 相对抑菌率分别为 91.30%、92.75%和 91.30%, 相对抑菌率均保持在 90%以上, 由此可见菌株 PJP10 无菌发酵液具有良好的紫外线稳定性。

2.1.5 金属离子稳定性

图 1E 显示金属离子 Cu^{2+} 、 K^+ 和 Mn^{2+} 对于

菌株 PJP10 无菌发酵液的抑菌活性均有抑制作用, 相对抑菌率分别为 89.77%、82.95%和 69.32%, 其中 Mn^{2+} 对抑菌活性的抑制作用最强。

2.1.6 盐浓度稳定性

图 1F 显示了提高盐浓度对菌株 PJP10 无菌发酵液的抑菌活性具有显著影响, 盐浓度提高至

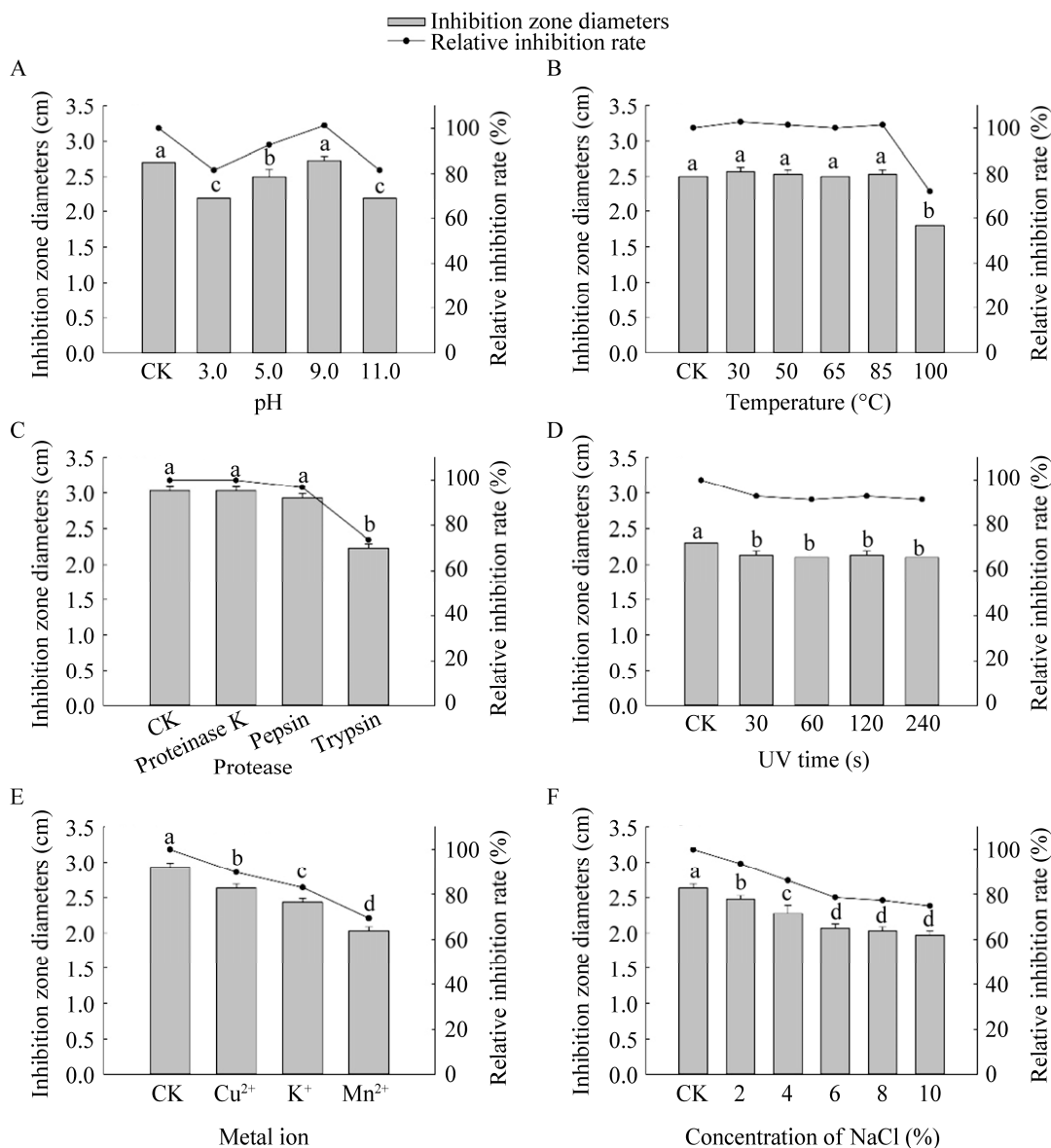


图 1 不同条件下贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 无菌发酵液的抑菌稳定性 A: pH. B: 温度. C: 蛋白酶. D: 紫外线. E: 金属离子. F: 盐浓度. 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Figure 1 Antimicrobial stability of *Bacillus velezensis* PJP10 cell-free fermentation supernatant under different conditions. A: pH. B: Temperature. C: Protease. D: UV light. E: Metal ion. F: NaCl. Different lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level.

2%和4%时,相对抑菌率分别为93.67%和86.08%。但是继续提高盐浓度至6%、8%和10%,相对抑菌活性无显著变化,分别为78.48%、77.22%和74.68%,这表明了大部分菌株PJP10抑菌活性物质不受盐浓度影响,具有较好的盐浓度稳定性。

2.2 菌株PJP10全基因组分析

为进一步明确菌株PJP10的抑菌机制,本研究对其全基因组进行测序,序列已上传至NCBI(GenBank登录号为CP117059)。测序结果显示菌株PJP10含有一条4 108 273 bp大小的染色体,不含质粒,其中G+C含量为46.21%。染色体包含4 026个编码序列(coding sequence, CDS),总长度占基因组长度的88.63%。含有87个tRNA,

27个rRNA(其中9个5S rRNA、9个16S rRNA和9个23S rRNA)。发现2个CRISPRs,全长3 058 bp(图2)。

2.3 产酶基因预测与验证结果

贝莱斯芽孢杆菌可产生多种具有拮抗活性的蛋白类抑菌物质,如蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶等,可以降解病原真菌的细胞壁,从而发挥拮抗病原真菌的作用^[22]。王青华等^[23]从深海海水中分离得到的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) DH82,其发酵上清液通过硫酸铵沉淀获得粗蛋白提取物,对金黄色葡萄球菌等多种病原菌具有明显的抑制作用。菌株PJP10基因组中包含淀粉酶、氨肽酶、蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶、酯

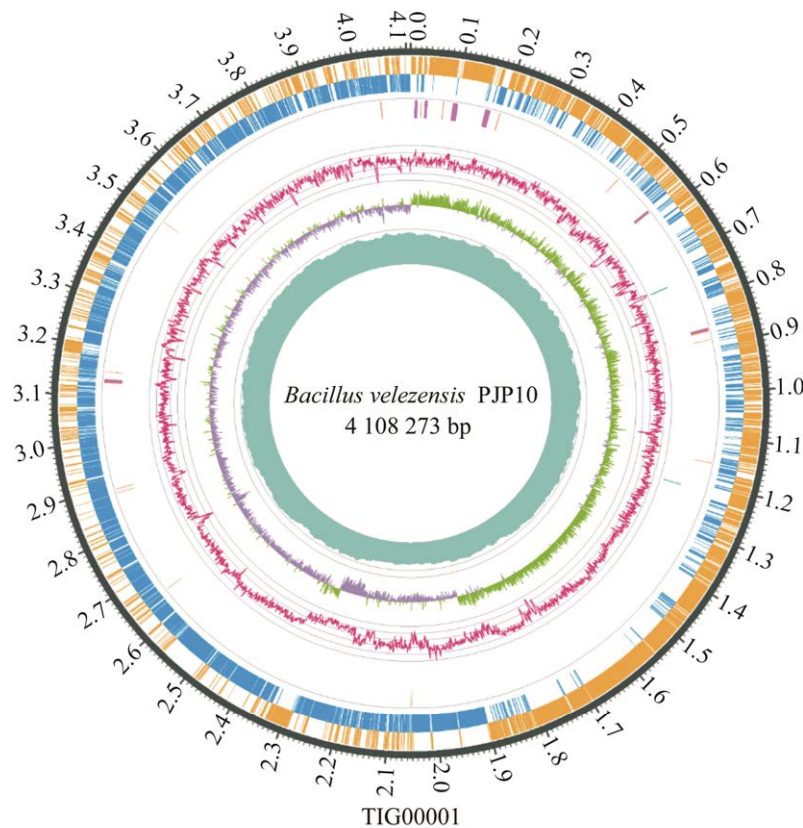


图2 菌株PJP10基因组圈图 由外到内依次为编码基因(正义链)、编码基因(负义链)、tRNA(橙色)和rRNA(紫色)、CRISPR(蓝色)和基因岛(绿色)、G+C比、G+C-skew和测序深度

Figure 2 Circular genome map of strain PJP10. From outer to inner: Forward strand gene, reverse strand gene, tRNA (orange) and rRNA (purple), CRISPR (blue) and gene island (green), G+C content, G+C-skew, sequencing depth, respectively.

酶、果胶酶、葡聚糖酶和酰胺酶等合成基因(表 1), 表明其含有丰富多样的拮抗酶合成基因, 具有分泌拮抗蛋白类抑菌物质的潜力。通过点接法检测菌株 PJP10 的产酶活性, 结果显示菌株 PJP10 能够在蛋白酶(图 3A)、淀粉酶(图 3B)、纤维素酶(图 3C)和邻苯二甲酸丁苄酯酶(图 3D)测定培养基上生长并产生透明圈, 在几丁质酶、果胶酶和葡聚糖酶的测定培养基上能生长但不产生透明圈, 表明菌株 PJP10 能够产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和酯酶, 但未检测到果胶酶、葡聚糖酶和几丁质酶活性。方园等^[24]从根际土壤中分离得到贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) SF327, 基因组 GO 分析显示该菌基因组中含有几丁质酶和纤维素酶编码基因, 但却不具有几丁质酶和纤维素酶活性。尽管基因组预测和酶活性验证结

果存在差异, 但菌株 PJP10 能够产生丰富的酶类活性物质, 这为其具有广谱的拮抗活性奠定了基础。

2.4 活性代谢产物预测与 HPLC 测定的结果分析

2.4.1 活性代谢产物预测

通过 antiSMASH 在线预测和 NCBI BLAST 比对分析, 发现菌株 PJP10 全基因组上包含大部分生防模式菌 *B. velezensis* FZB42^[7-8] 活性代谢产物合成的同源基因簇, 它们是 8 种非依赖核糖体合成的抑菌化合物, 其中包括 3 种聚酮类化合物, 分别为杆菌素(bacillaene)、地非西丁(difficidin)和大环内酰亚胺 H (macrolactin H), 3 种脂肽类化合物, 分别为表面活性素(surfactin)、杆菌霉素(bacillomycin) D 和泛革素(fengycin), 1 种二肽溶杆菌素(bacilysin)和 1 种

表 1 菌株 PJP10 基因组中几种酶类基因

Table 1 Several enzymes gene of the strain PJP10

Gene ID	Gene name	Gene size (bp)	Enzyme	Enzyme activity
BAM2021_00322	<i>AmyA</i>	1 980	Alpha-amylase	+
BAM2021_00511	<i>MenH</i>	804	Aminopeptidase	/
BAM2021_03877	<i>FlgD</i>	2 412	Serine protease	+
BAM2021_03327	<i>csn</i>	837	Chitosanase	-
BAM2021_01880	<i>BglC</i>	1 500	Endoglucanase	+
BAM2021_03442	<i>yvaK</i>	741	Carboxylesterase	+
BAM2021_03977	<i>PelB</i>	1 065	Pectate lyase	-
BAM2021_03960	<i>BglS</i>	732	Glucanase	-
BAM2021_00187	<i>cwlD</i>	714	Amidase	/

+: 阳性; -: 阴性; /: 未检测

+: Positive; -: Negative; /: No detection.

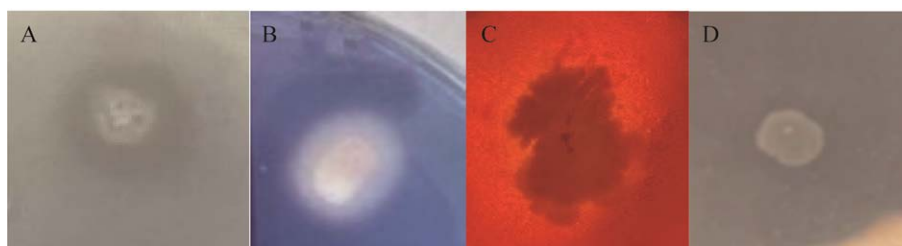


图 3 菌株 PJP10 酶活性结果平板图 A: 蛋白酶. B: 淀粉酶. C: 纤维素酶. D: 酯酶

Figure 3 Enzyme activity results of strain PJP10. A: Protease. B: Amylase. C: Cellulase. D: Esterase.

儿茶酚型铁载体(bacillibactin); 还有 2 种依赖核糖体合成的抑菌化合物, 分别为环肽解淀粉芽孢杆菌素(amylocyclicin)和植物唑霉素(plantazolicin)。此外, 还包含与 *Bacillus subtilis* 和 *Paenibacillus* sp. 全基因组中抑菌化合物 plipastatin、mycosubtilin、iturin、bacillibactin、paenilarvins、paenibacterin 和 paenibactin 等同源的合成基因簇。以上抑菌化合物除 surfactin 和 plantazolicin 的合成基因簇与 *Bacillus velezensis* FZB42 的相似性为 78%和 91%,

iturin 的合成基因簇与 *Bacillus subtilis* 的相似性为 88%, paenibacterin 合成基因簇与 *Paenibacillus* sp. OSY-SE 的相似性为 60%外, 其余抑菌化合物的合成基因簇与比对基因组的相似性均为 100% (表 2)。活性代谢产物预测的结果显示, 菌株 PJP10 基因组中包含大量的抑菌化合物合成基因簇, 对细菌和真菌具有广谱的抑制活性, 与前期该菌株抑菌谱研究的结果相一致, 充分说明菌株 PJP10 可能通过这些抑菌化合物发挥其拮抗功能。

表 2 贝莱斯芽孢杆菌 PJP10 基因组中预测的基因簇及其合成的抑菌物质

Table 2 Gene clusters predicted in the genome of strain PJP10 and the biosynthetic antimicrobial substance

MIBiG accession number	Gene cluster	Strain	Similarity (%)	Substance	Structure
BGC0000433		<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	78	Surfactin	
BGC0000569			91	Plantazolicin	-
BGC0000181			100	Macrolactin H	
BGC0001089			100	Bacillaene	
BGC0001095			100	Fengycin	
BGC0001090			100	Bacillomycin D	
BGC0000176			100	Difficidin	
BGC0000616			100	Amylocyclicin	-
BGC0001185			100	Bacillibactin	
BGC0001184			100	Bacilysin	
BGC0000407		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	100	Plipastatin	
BGC0001103		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	100	Mycosubtilin	
BGC0001098		<i>Bacillus subtilis</i>	88	Iturin	
BGC0000309		<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	100	Bacillibactin	
BGC0000402		<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM 25430	100	Paenilarvins	-
BGC0000400		<i>Paenibacillus</i> sp. OSY-SE	60	Paenibacterin	
BGC0000401		<i>Paenibacillus elgii</i> B69	100	Paenibactin	-

-: 无结构信息

-: No structure information available.

2.4.2 活性代谢产物 HPLC 结果分析

芽孢杆菌能够产生多种抗菌物质应用于农业和食品领域,其中脂肽类物质具有抑制病原细菌和真菌等多种活性,是主要的抑菌物质^[25-26]。本研究表明,酸沉淀粗提物对大肠杆菌(*E. coli*) ATCC 35218、沙门氏菌(*S. enteritidis*) ATCC BAA708 和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC 25923 具有较好的拮抗效果,其中对大肠杆菌(*E. coli*) ATCC 35218 和沙门氏菌(*S. enteritidis*) ATCC BAA708 的抑菌效果最显著,而对辣椒青枯菌(*R. solanacearum*) QK2013 无抑菌效果。乙酸乙酯粗提物对 4 种指示菌均有抑菌效果,其中对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) ATCC 25923 的抑菌效果最为显著,这与邓丽等^[27]研究结果中乙酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) PJ-1 具有良好的抑菌活性相一致。对辣椒青枯菌(*R. solanacearum*) QK2013 的抑菌效果稍弱于发酵原液,而对大肠杆菌(*E. coli*) ATCC 35218 和沙门氏菌(*S. enteritidis*) ATCC BAA708 的抑菌效果明显减弱(表 3)。由此也说明菌株 PJP10 能够产生多种抑菌物质,对于 4 种指示菌产生拮抗的物质并不相同,除了对食源性致病菌有较强的抑菌效果外,还对辣椒青枯菌(*R. solanacearum*) QK2013 展现了很好的抑菌活性,说明菌株 PJP10 在农业生防菌剂的开发方面也具有很大的潜力。

高效液相色谱法检测活性物质成分,发现 2 种提取方法所获得的粗提液的成分和含量存在差异。Yang 等^[28]以标准品为参照,采用 RP-HPLC 分析酸沉淀粗提物中成分发现,乙腈作为流动相,样品保留时间可分为 3 部分,即 6–10、10–16 和 16–25 min,对应的化合物分别为 iturin、fengycin 和 surfactin 家族的成员,并得到 MALDI-TOF-MS/MS 证实。参照 Yang 等^[28]的酸沉淀粗提物液相色谱条件,菌株 PJP10 的酸沉淀粗提取物和乙酸乙酯萃取粗提取物对应的色谱图大致可分成 3 部分,即保留时间 5–13、13–23 和 23 min 以后(图 4),推测粗提物的主要成分可能为 iturin、fengycin 和 surfactin 等家族的化合物,这一推测结果与 Lin 等^[29]报道的商业化标准品 iturin、fengycin 和 surfactin 混合物的色谱图划分相一致。不同提取方法获得的抑菌物质结构及含量不同,因而表现出的抑菌活性也不同,各组分的分子结构还有待进一步分析验证。

3 讨论与结论

本研究对菌株 PJP10 抑菌活性物质稳定性分析显示,菌株 PJP10 无菌发酵液对酸碱、高温和紫外线的耐受性较好,并且对蛋白酶 K 和胃蛋白酶不敏感,具有较好的抑菌稳定性。此外,本研究还对盐浓度稳定性进行分析,菌株 PJP10 产生的抑菌活性物质在 10% 的高盐环境中仍然

表 3 两种粗提物抑菌效果对比表

Table 3 Comparison of the antibacterial effect of crude extracts by two different methods

Indicator strains	Acid precipitation	Ethyl acetate extraction
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	++	+++
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC BAA708	+++	+
<i>Ralstonia solanacearum</i> QK2013	-	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	+++	+

+++：抑菌圈直径>2.5 cm；++：抑菌圈直径 1.5–2.5 cm；+：抑菌圈直径 0.8–1.5 cm；-：不抑菌

+++：Inhibition zone diameter>2.5 cm；++：Inhibition zone diameter 1.5–2.5 cm；+：Inhibition zone diameter 0.8–1.5 cm；-：No inhibition.

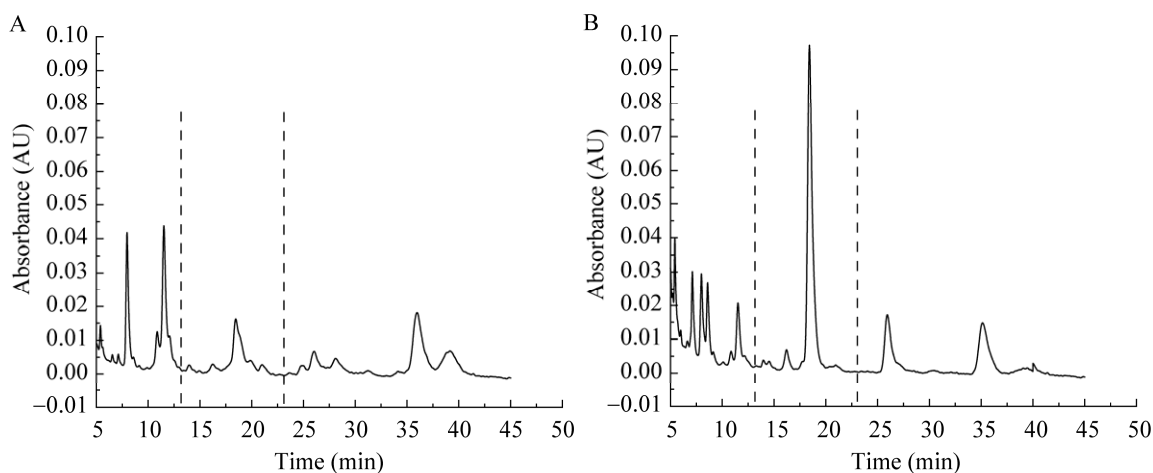


图 4 两种不同提取方法获得粗提取物的高效液相色谱图 A: 酸沉淀. B: 乙酸乙酯提取物

Figure 4 HPLC results of the crude extracts by two different methods. A: Acid precipitation. B: Ethyl acetate extraction.

具有较高的抑菌活性,显示了较好的在高盐食品防腐中的应用价值。李永丽等^[30]从新疆野苹果枝干中分离得到的内生菌贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) Pm9 对葡萄座腔菌的抑菌活性稳定,其无菌发酵滤液耐受酸碱范围广,对紫外线和蛋白酶 K 不敏感,且 80 °C 以内具有较强的热稳定性。结合本研究结果,表明了贝莱斯芽孢杆菌胞外产生的大多数抑菌活性物质具有较好的稳定性,在食品和农业领域应用价值和开发潜力巨大。

在对菌株 PJP10 的全基因组分析中发现,菌株 PJP10 基因组中不包含质粒和基因岛,但是含有 2 个 CRISPR 序列。酶活测定试验验证了菌株 PJP10 能够产生蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和酯酶等预测到的多种活性酶,胞外蛋白类拮抗物质丰富。antiSMASH 在线比对分析显示,与 *B. velezensis* FZB42 的活性代谢产物合成基因簇相比,菌株 PJP10 比对了大部分活性代谢产物的合成基因簇,预测到的代谢产物具有多种生物活性,在绿色防控、医药开发、食品安全和工业生产等领域均发挥着重要的作用^[31]。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) LM2303 基因组挖掘揭示了

其基因组中包含 13 个生物合成基因簇用来编码代谢产物的合成酶,对致病性真菌镰刀菌具有生物防控潜力^[32]。本研究对菌株 PJP10 的基因组进行挖掘分析,antiSMASH 在线比对到 13 个生物合成基因簇用来合成菌株 PJP10 的代谢产物,该比对结果与 Chen 等^[32]的比对结果一致,HPLC 分析菌株 PJP10 粗提物显示,其主要成分可能为 iturin、fengycin 和 surfactin 这 3 个家族的成员。其中 surfactin 被证实是一种强大有效的表面活性剂分子,对多种病原细菌具有拮抗活性,fengycin 对丝状真菌具有广谱的拮抗活性^[33],iturin 则对多种植物病原细菌和真菌均表现出拮抗活性^[34]。贝莱斯芽孢杆菌在生物防控方面的研究和应用逐年增加,从盆栽试验到田间防控都有大量的研究实施案例,但是在食品加工和保鲜领域的研究相对较少,菌株 PJP10 对多种食源性致病菌表现出显著的拮抗活性,并且抑菌稳定性较好,本研究可为其在食品加工和保鲜领域的开发和应用提供重要的研究基础,预测到的具有生防活性的代谢产物也展现了该菌在农业生产领域上的巨大应用潜力。

REFERENCES

- [1] 马晓姣, 赵艳坤, 邵伟, 武亚婷, 李明, 刘慧敏, 孟璐, 陈贺. 新疆部分地区生乳中金黄色葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(2): 789-797.
MA XJ, ZHAO YK, SHAO W, WU YT, LI M, LIU HM, MENG L, CHEN H. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Staphylococcus aureus* in raw milk in some areas of Xinjiang[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(2): 789-797 (in Chinese).
- [2] 张卯, 张业辉, 李惠, 肖性龙, 余以刚. 香茅醛对金黄色葡萄球菌的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 120-126.
ZHANG M, ZHANG YH, LI H, XIAO XL, YU YG. Antibacterial effect of citronellal against *Staphylococcus aureus*[J]. Modern Food Science & Technology, 2023, 39(1): 120-126 (in Chinese).
- [3] AL BSHABSHE A, JOSEPH MRP, AWAD EL-GIED AA, FADUL AN, CHANDRAMOORTHY HC, HAMID ME. Clinical relevance and antimicrobial profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on routine antibiotics and ethanol extract of mango kernel (*Mangifera indica* L.)[J]. BioMed Research International, 2020: 1-8.
- [4] WYRES KL, HOLT KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2018, 45: 131-139.
- [5] HASHEM A, TABASSUNM B, FATHI ABD_ALLAH E. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2019, 26(6): 1291-1297.
- [6] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [7] FAN B, WANG C, SONG XF, DING XL, WU LM, WU HJ, GAO XW, BORRISS R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1-14.
- [8] RABBEE MF, ALI MS, CHOI J, HWANG BS, JEONG SC, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(6): 1-13.
- [9] SUN XL, XU ZH, XIE JY, HESSELBERG-THOMSEN V, TAN TM, ZHENG DY, STRUBE ML, DRAGOŠ A, SHEN QR, ZHANG RF, KOVÁCS ÁT. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J]. The ISME Journal, 2022, 16(3): 774-787.
- [10] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [11] ZHANG HP, XU GY, MAO CS, XU YX, DONG WL, INAM M, PAN SY, HU RG, WANG YM, WANG Y, MA HX, KONG LC. Characterization and complete genome analysis of *Bacillus velezensis* CB6 revealed ATP synthase subunit α against foodborne pathogens[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(3): 1061-1069.
- [12] NAM J, ALAM ST, KANG K, CHOI J, SEO MH. Anti-staphylococcal activity of a cyclic lipopeptide, C15-bacillomycin D, produced by *Bacillus velezensis* NST6[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(1): 93-104.
- [13] 朱亚珠, 夏率博, 陈琳, 刘洋, 吴祖芳, 翁佩芳. 一株贝莱斯芽孢杆菌的生长特性及抑菌活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2022, 40(1): 85-92.
ZHU YZ, XIA LB, CHEN L, LIU Y, WU ZF, WENG PF. Study on growth characteristics and antimicrobial activities of *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2022, 40(1): 85-92 (in Chinese).
- [14] 姜向弟, 张向向, 贺江, 莫德钱, 王永慧, 熊建华, 郜彦彦. 一株贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及其益生潜力评价[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(5): 143-150.
LOU XD, ZHANG XX, HE J, MO DQ, WANG YH, XIONG JH, GAO YY. Isolation and identification of a *Bacillus venezensis* and its probiotic potential evaluation[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(5): 143-150 (in Chinese).

- [15] ZHAO YY, JIANG TP, XU HY, XU GG, QIAN GL, LIU FQ. Characterization of *Lysobacter* spp. strains and their potential use as biocontrol agents against pear anthracnose[J]. Microbiological Research, 2021, 242: 1-9.
- [16] 卢美玉. 增塑剂邻苯二甲酸酯降解菌的分离、降解途径解析及其水解酶基因的克隆和酶学特性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2019.
- LU MY. Isolation, degradation pathway analysis of plasticizer phthalate degrading bacteria, cloning and enzymatic characteristics of its hydrolase gene[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [17] 钟春英, 肖长生, 齐小琼, 董桃杏. 一株具有广谱抑菌活性的兵马俑芽孢杆菌 HS-15 的筛选及其抑菌活性研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2022, 56(2): 297-303, 362.
- ZHONG CY, XIAO CS, QI XQ, DONG TX. Screening of a broad-spectrum antimicrobial-producing strain *Bacillus bingmayongensis* HS-15 and study on its antimicrobial activity[J]. Journal of Central China Normal University (Natural Science Edition), 2022, 56(2): 297-303, 362 (in Chinese).
- [18] 赵雅, 张岱, 杨志辉, 朱杰华, 赵冬梅, 薛雪. 贝莱斯芽孢杆菌 HN-Q-8 菌株发酵液稳定性及抑菌活性成分分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 490-499.
- ZHAO Y, ZHANG D, YANG ZH, ZHU JH, ZHAO DM, XUE X. Determination of the stability of fermentation broth and analysis of active components of *Bacillus velezensis* HN-Q-8[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 490-499 (in Chinese).
- [19] 张强, 张艳茹, 霍云凤, 韩阳超, 王朋, 陆宁海. 禾谷镰刀菌拮抗菌 21-6 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4144-4157.
- ZHANG Q, ZHANG YR, HUO YF, HAN YC, WANG P, LU NH. Identification and activity of *Streptomyces* sp. 21-6 against *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4144-4157 (in Chinese).
- [20] 刘安, 赵华, 张朝正. 贝莱斯芽孢杆菌抑菌物质的分析及提取优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(12): 63-68.
- LIU A, ZHAO H, ZHANG CZ. Analysis and extraction optimization of bacteriostatic substances from *Bacillus velezensis*[J]. China Brewing, 2019, 38(12): 63-68 (in Chinese).
- [21] 兰宝锋, 王睿, 何双, 周礼芹, 蒙健宗. 解淀粉芽孢杆菌抑菌物质粗提取的优化及分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 195-199.
- LAN BF, WANG R, HE S, ZHOU LQ, MENG JZ. Optimization and analysis of crude extraction of bacteriostatic substances from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. China Brewing, 2022, 41(6): 195-199 (in Chinese).
- [22] 刘雪娇, 李红亚, 李术娜, 朱宝成, 高同国. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生防和促生机制[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(3): 302-310.
- LIU XJ, LI HY, LI SN, ZHU BC, GAO TG. Biocontrol and growth promotion mechanisms of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2019, 39(3): 302-310 (in Chinese).
- [23] 王青华, 唐旭, 孙晓晖, 万婧倢, 黄仕新, 徐长安. 深海贝莱斯芽孢杆菌 DH82 的抑菌活性物质初步分离纯化及其抑菌谱检测[J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 20-26.
- WANG QH, TANG X, SUN XH, WAN JL, HUANG SX, XU CA. Purification of antimicrobial substance produced by deep sea *Bacillus velezensis* strain DH82 and its inhibition spectrum[J]. Journal of Applied Oceanography, 2020, 39(1): 20-26 (in Chinese).
- [24] 方园, 彭勇政, 廖长贵, 陈路生, 周琦, 黄俭, 阎依超, 王慕媛, 张伟坤, 邹丽芳, 陈功夫. 一株具有防病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌 SF327[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 4071-4088.
- FANG Y, PENG YZ, LIAO CG, CHEN LS, ZHOU Q, HUANG J, YAN YC, WANG MY, ZHANG YK, ZOU LF, CHEN GY. *Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 4071-4088 (in Chinese).
- [25] ZHAO HB, SHAO DY, JIANG CM, SHI JL, LI Q, HUANG QS, RAJOKA MSR, YANG H, JIN ML. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 5951-5960.
- [26] REN ZH, XIE L, OKYERE SK, WEN J, RAN YN, NONG X, HU YC. Antibacterial activity of two metabolites isolated from endophytic bacteria *Bacillus velezensis* Ea73 in *Ageratina adenophora*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1-14.
- [27] 邓丽, 孙冉, 姚蒋庞, 谢毓丹. 贝莱斯芽孢杆菌粗提物

- 对金黄色葡萄球菌的抑菌机制[J]. 食品与发酵科技, 2021, 57(3): 1-9.
- DENG L, SUN R, YAO JP, XIE YD. Antibacterial mechanism of crude extract of *Bacillus velezensis* against *Staphylococcus aureus*[J]. Food and Fermentation Sciences & Technology, 2021, 57(3): 1-9 (in Chinese).
- [28] YANG H, LI X, LI X, YU HM, SHEN ZY. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(9): 2529-2542.
- [29] LIN LZ, ZHENG QW, WEI T, ZHANG ZQ, ZHAO CF, ZHONG H, XU QY, LIN JF, GUO LQ. Isolation and characterization of fengycins produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and its broad-spectrum antimicrobial potential against multidrug-resistant foodborne pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1-18.
- [30] 李永丽, 周洲, 曲良建, 尹新明. 贝莱斯芽孢杆菌 Pm9 生物防治潜力及全基因组分析[J]. 河南农业大学学报, 2021, 55(6): 1081-1088.
- LI YL, ZHOU Z, QU LJ, YIN XM. Biological control potential and complete genome analysis of *Bacillus velezensis* Pm9[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2021, 55(6): 1081-1088 (in Chinese).
- [31] ADENIJI AA, LOOTS DT, BABALOLA OO. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(9): 3669-3682.
- [32] CHEN L, HENG JY, QIN SY, BIAN K. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198560.
- [33] FAZLE RABBEE M, BAEK KH. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(21): 1-16.
- [34] WAN CP, FAN XY, LOU ZX, WANG HX, OLATUNDE A, RENGASAMY KRR. Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(29): 7976-7988.