

· 医药生物技术 ·

贝莱斯芽孢杆菌抗真菌能力及基因组分析

陈芳芳^{1,2}, 余小妹^{2,3}, 韩晶晶^{2,3}, 吴春^{4,5}, 庞海月^{1,2}, 张书迪^{1,2}, 陈煜沛^{1,2,5}

- 1 厦门医学院 公共卫生与医学技术系, 福建 厦门 361023
- 2 天然化妆品福建省高校工程研究中心, 福建 厦门 361023
- 3 厦门医学院 药学系, 福建 厦门 361023
- 4 厦门医学院 临床医学系, 福建 厦门 361023
- 5 厦门医学院 呼吸疾病研究所, 福建 厦门 361023

陈芳芳, 余小妹, 韩晶晶, 吴春, 庞海月, 张书迪, 陈煜沛. 贝莱斯芽孢杆菌抗真菌能力及基因组分析. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2292-2307.

CHEN FF, YU XM, HANG JJ, WU C, PANG HY, ZHANG SD, CHEN YP. Antifungal activity and genomic analysis of *Bacillus velezensis* X49. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2292-2307.

摘要: 蛋白水解酶及脂肽类化合物具有广谱的抑菌活性, 这些抑菌活性蛋白及物质拥有巨大的研究和开发潜力。本研究通过蛋白水解酶平板筛选到一株对 6 种不同病原真菌有较明显抑菌效果的菌株, 命名为 X49, 对该菌株进行理化分析, 并由 16S rRNA 基因测序、API 测试和电镜分析鉴定菌种, 进一步分析其基因组序列, 再利用偶氮酪蛋白方法分析蛋白水解酶活性及提取脂肽类化合物进行抗真菌测试。结果表明, 该菌株在 10–50 °C、pH 4.0–9.0 范围内均可以生长, 对环境盐浓度的适应性较强, 在 10% NaCl 浓度下仍然能够生长。菌种鉴定发现 X49 菌株属于贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。基因组分析则显示, *B. velezensis* X49 菌株有 11 个编码的丝氨酸蛋白酶, 其基因编号 1_894 属于 S8 枯草杆菌蛋白酶家族, 与已知具有抗真菌能力的丝氨酸蛋白酶有高达 99% 的相似度。另外有多达 30 个编码的非核糖体肽合成酶, 其中包含参与合成已知的表面活性素、伊枯草菌素、丰原素、杆菌肽及短杆菌肽脂肽类化合物。胞外蛋白水解酶活性分析发现其在高温下仍具有一定的活性。将 *B. velezensis* X49 菌株与中药干姜共发酵后, 提取出的脂肽类化合物, 其抑菌功效大大提高。由此可见, 本研究筛选出的 *B. velezensis* X49 菌株对于植物及人类病原菌都有很显著的抑制作用。而与中药共发酵的活性物质可作为未来药物的研究开发。

关键词: 真菌; 非核糖体肽合成酶; 蛋白酶; 丝氨酸蛋白酶; 芽孢杆菌; 干姜

Received: October 26, 2021; **Accepted:** January 10, 2022

Supported by: Fujian Provincial Health Technology Project, China (2019-ZQNB-20, 2019-ZQNB-23)

Corresponding author: CHEN Yupei. Tel: +86-592-5923631; E-mail: 201600080006@xmmc.edu.cn

基金项目: 福建省卫生健康科技计划项目 (2019-ZQNB-20, 2019-ZQNB-23)

Antifungal activity and genomic analysis of *Bacillus velezensis* X49

CHEN Fangfang^{1,2}, YU Xiaomei^{2,3}, HANG Jingjing^{2,3}, WU Chun^{4,5}, PANG Haiyue^{1,2}, ZHANG Shudi^{1,2}, CHEN Yupei^{1,2,5}

1 Department of Public Health and Medical Technology, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian, China

2 Engineering Research Center of Natural Cosmeceuticals College of Fujian Province, Xiamen 361023, Fujian, China

3 Department of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian, China

4 Department of Clinical Medicine, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian, China

5 Institute of Respiratory Diseases, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, Fujian, China

Abstract: Proteolytic enzymes and lipopeptides contain broad-spectrum antimicrobial activities, which have great potential for research and development. A microbial strain X49 obtained from protease screening plate showed antifungal activities against six fungi. Biochemical analysis, 16S rRNA sequencing, API identification system, and electron microscope analysis were carried out to identify the bacterium. Azocasein method was used to analyze the protease activity. Lipopeptides were extracted for antifungal analysis. The result indicated that strain X49 grew in the range of 10–50 °C and pH 4.0–9.0. Moreover, it survived in 10% NaCl, showing good halotolerance. Strain X49 was identified as *Bacillus velezensis*. Genomic analysis of *B. velezensis* X49 revealed eleven genes encoding serine protease. The ID 1_894 belonging to S8 subtilisin family was 99% similar to the serine protease with known antifungal ability. On the other hand, thirty genes encoding non-ribosomal peptide synthetase involved in the lipopeptide biosynthesis, including surfactin, iturin, fengycin, bacitracin, and gramicidin, were identified. Part of the extracellular proteolytic activity remained under high temperature. After co-fermentation of *B. velezensis* X49 with *Zingiber officinale* Rosc., the antifungal activity of the lipopeptide extract from the co-fermentation was greatly improved. In conclusion, *B. velezensis* X49 showed clear inhibitory effect on both plant and human pathogens. The active substances co-fermented with Chinese herbs and microbes can be utilized for further drug development.

Keywords: fungal; non-ribosomal peptide synthase; protease; serine protease; *Bacillus*; *Zingiber*

镰刀菌 (*Fusarium*) 是一类世界性分布的真菌, 镰刀菌所产生的次级代谢产物镰刀菌素常侵害玉米等谷类作物、谷类食品和饲料进而影响人类和动物的健康, 甚至导致农作物减产, 直接对农业经济产生巨大影响^[1]。有报道称, 侵入玉米丝中的真菌病原体包含禾谷镰刀菌、串珠镰刀菌和黄曲霉及其真菌毒素^[2], 甚至在

残根中还可以发现导致玉米茎腐病、穗腐病的轮状镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) (*Fusarium moniliforme*), 被轮状镰刀菌产生的伏马菌素污染的饲料将导致马出现白质脑瘤, 猪出现肺水肿和肝综合征, 还与大鼠体内的致癌活性物及人类神经管的缺陷有关, 从而导致伏马菌素成为动物和人类的致癌物质^[3]。除此之外, 其他

真菌对人体也会造成严重的健康影响,拟青霉属 (*Paecilomyces*) 是一种罕见的病原真菌,它在免疫功能低下的人群甚至免疫功能正常的宿主中均会产生严重感染,而变异拟青霉在空气和食物中很常见,与多种人类感染相关,例如真菌血症、心内膜炎、腹膜炎和骨髓炎^[4]。

蛋白水解酶的催化功能是水解蛋白质的肽键。蛋白水解酶可以攻击植物病原真菌细胞壁,导致细胞溶解和随后的死亡^[5]。到目前为止,已经对微生物拮抗剂中的几丁质酶和葡聚糖酶进行了研究。然而,关于微生物蛋白酶的信息非常有限。蛋白水解酶根据其催化活性位点的性质和作用条件分为 4 大类,包括天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和金属蛋白酶^[6]。蛋白水解酶与特定基团的结合取决于催化位点的结构和对其活性至关重要的氨基酸,因此,蛋白酶水解各种肽键的能力不同。很多研究发现,丝氨酸蛋白酶具有抗真菌能力,Zhang 等从出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 菌中发现对于核果链核盘菌 (*Monilinia laxa*)、灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 及扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 真菌具有抑菌能力的丝氨酸蛋白酶^[7]。Ji 等从地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 中克隆出丝氨酸蛋白酶,也证实其具有抗真菌的能力^[5]。

脂肽类抗生素是非核糖体合成的次级代谢产物,其结构含有肽链和脂肪烃链,从结构上可分为环状脂肽和线性脂肽^[8]。环状脂肽类抗生素是一类结构新颖的环状肽类,包括单环肽和双环肽,是一种特殊的分子模式,可作为抗生素、生物表面活性剂等,在生物防治和药物开发等方面广泛应用。非核糖体机制已被运用在肽合成,通过采用多酶复合物逐步催化合成环化肽。而脂肽的作用机制取决于其两亲性

质及其与靶生物细胞膜相互作用的能力,含有亲水性氨基酸,在 pH 调节下分子带负电荷,具有很好的水溶性;脂肪酸链和疏水性基团具有很好的脂溶性,容易与细菌磷脂层反应,由此决定了其良好的抗菌效果^[9]。由芽孢杆菌和类芽孢杆菌属产生的大量脂肽可归类为环状阳离子脂肽。它们在 C-端通过酯键或酰胺键进行环化,通过非核糖体酶生物合成环脂肽^[8]。其他来自芽孢杆菌的环脂肽可广泛归类为环非阳离子脂肽,它们包括伊枯草菌素、表面活性素、丰原素和镰刀菌素。还有一类线性阳离子脂肽是从蜡样芽孢杆菌中分离得到的蜡样芽孢毒素。它们对革兰氏阳性微生物,包括金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌,具有很强的抗菌活性^[10]。

芽孢杆菌菌株主要通过抑制植物病原菌的生长、诱导植物的系统抗性以及与植物病原菌争夺生态位来表现其生物防治能力^[11]。枯草芽孢杆菌是工业上生产活性脂肽应用最广泛的微生物之一。枯草杆菌还可以分泌多种酶和抗生素,因此在农业、食品、医药和饲料生产中得到了广泛的应用。先前的研究已经报道,蜡样芽孢杆菌菌株在体外或体内表现出对米曲霉的抗真菌活性,可被开发为控制稻瘟病的杀菌剂^[12-14]。这些研究为杀菌剂的开发提供了良好的前期研究。本研究从环境中筛选出具有较强蛋白水解酶的芽孢杆菌菌株,再进一步利用拮抗分析其抗真菌能力,获得一株具广谱抗真菌的细菌,命名为 X49,再从分子、生理生化及形态特征鉴定出此菌株,从此菌株的基因组研究发现,其具有多种的非核糖体合成酶及蛋白水解酶,我们进一步研究此菌株培养液胞外蛋白水解酶的活性特征,同时与不同中药共发酵培养,提取出脂肽类发酵化合物,也发现此中药发酵提取物具有明显的抑制真菌功效。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

本研究所用真菌串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) CICC2490、宛氏拟青霉 (*Paecilomyces variotii*) CICC40716、绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*) CICC40279、镰孢菌 (*Fusarium concentricum*) CICC41030、黄肉座菌 (*Hypocrea lutea*) CICC40381 及黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CICC40374 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection)。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar) 及马铃薯葡萄糖肉汤 (potato dextrose broth), 购自广东环凯微生物科技有限公司。

LB 液体培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10; 固体培养基加琼脂粉 20。

胰蛋白胨大豆琼脂 (tryptose soya agar), 购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、PCR 扩增试剂盒、引物合成, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; API 试纸条, 购自生物梅里埃法国股份有限公司; 偶氮酪蛋白、源于米曲霉蛋白酶 (protease from *Aspergillus oryzae*) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 孜然、干姜、花椒、川椒、独活、广藿香、白芍及细辛, 购自北京同仁堂中药材有限公司。

PCR, C1000 TOUCH, Bio-Rad 公司; 高速离心机, MIKRO 220R, 德国 Hettich 科学仪器有限公司; 摇床培养箱, THZ-98C, 上海一恒科学仪器有限公司; 冷冻干燥机, EYELA

PDU-1200, 东京理化器械株式会社; 电泳仪, Tanon EPS 300、凝胶成像仪, Tanon 2500, 上海天能科技有限公司; pH 计, NanoDrop, Thermo Fisher 公司; 酶标仪, SpectraMax, 美谷分子仪器 (上海) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选及生长特性分析

利用蛋白水解酶培养基 (LB 琼脂培养基及 1%脱脂奶粉) 筛选来自福建省厦门市、福建省泉州市晋江市、江西省赣州市会昌县等地的菌株, 将筛选到透明圈较大的菌株与真菌 (*F. moniliforme* CICC2490, *P. variotii* CICC40716, *P. funiculosum* CICC40279, *F. concentricum* CICC41030, *H. lutea* CICC40381 及 *A. niger* CICC40374) 在 PDA 琼脂培养基上进行拮抗分析。筛选到具有明显抗真菌能力的菌株命名为 X49。利用 LB 液体培养基, 在摇床培养箱中 (150 r/min) 培养, 针对其不同的培养温度及 pH 值进行探讨。同时配制含有不同 NaCl 浓度的 LB 固体培养基, 利用划线方式进行菌株培养观察。

1.2.2 16S rRNA 基因测序

利用 LB 培养基培养 X49 菌株后, 离心收集菌体, 用 DNA 抽提试剂盒进行总 DNA 的提取。使用 16S rRNA 基因通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增, 扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 最后再以 72 °C 7 min 完全延伸。PCR 完成及纯化后, 由金唯智公司进行 DNA 测序。通过 MEGA 软件分析 16S rRNA 基因的系统发育树, 比较不同微生物的分类^[15]。

1.2.3 电镜扫描分析

委托厦门市自然资源部第三海洋研究所进行电镜扫描分析。将 X49 菌株培养在 LB 平板上, 利用配备有 Quorum PP3000T (Quorum

Technologies Ltd.) 的扫描电子显微镜 (FESEM; FEI Quanta 450 FEG FESEM) 分析 X49 菌株的形态。琼脂样品在室温下用液氮玻璃化, 之后在 $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 经过 12 min 升温至 $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 然后涂覆铂金。利用电子束强度为 15 kV 的 FESEM (FEI Quanta 450 FEG FESEM) 获得样品图像。

1.2.4 API 测试

利用 3 种试纸条 (API ZYM、API 20E、API 50 CH) 检测菌株对不同底物的代谢情况, 用接种环蘸取适量 X49 菌液在胰蛋白胨大豆琼脂培养基上进行划线培养, 然后放入培养箱中, 24 h 后利用接种环挑取单一菌落并将其溶于生理盐水中, 吹打混匀, 再加入试纸条中, 最后放入培养箱, 4 h、24 h 或 48 h 后观察试纸条的颜色变化, 根据颜色变化来判断实验菌的生化特性。

1.2.5 基因组测序和注释

将获得的 X49 菌株的基因组数据, 利用二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 方法进行分析。首先提取 X49 菌株的基因组 DNA, 获得其 DNA 的 $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.0 范围内, 然后将此 DNA 委托金唯智公司 (苏州) 进行文库构建、全基因组测序和基因组生物信息分析。测序仪使用 Illumina Novaseq 6000 (Illumina, 美国), 使用 2×150 配对末端 (PE) 进行测序。Prodigal 软件作为编码基因的搜索^[16]。进一步使用 BLASTP 在 NCBI 数据库中搜索基因。功能性基因由 gene ontology 进行注释^[17]。代谢路径则由 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 注释^[18]。基因编码的蛋白质通过 COG (clusters of orthologous groups) 数据库进行系统发育分类。X49 菌株的基因组序列已上传到 NCBI 数据库, Bioproject 编号为 PRJNA769515, Biosample 编号为 SAMN22138608。

1.2.6 蛋白水解酶活性分析

参照 Azeredo 等的方法进行偶氮酪蛋白活

性分析^[19], 取 $30\text{ }\mu\text{L}$ 的样品或未接入菌种的培养基、 $270\text{ }\mu\text{L}$ 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0)、 $250\text{ }\mu\text{L}$ 含 2% 偶氮酪蛋白的 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 10% 三氯乙酸, 离心取上清, 在 440 nm 处测定蛋白酶活性。其中未接入菌种的培养基作为空白对照。采用阳性对照品源于米曲霉蛋白酶 (protease from *Aspergillus oryzae*) (酶活性为 500 U/mL), 梯度稀释测其 OD_{440} , 制作标准曲线。在偶氮酪蛋白活性分析的基础上, 改变检测反应温度进行蛋白酶活性分析。

1.2.7 中药共发酵培养及脂肽类抗菌活性物质的纯化

取适量中药磨成细粉, 称取 2 g 加入锥形瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水, 高压灭菌。按 1:100 接入菌种, 150 r/min、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d。参照 Chen 和 Juang 的方法^[20]提取脂肽类抗菌活性物质。将发酵液离心后收集上清液并去掉菌体, 用浓盐酸将上清液 pH 值调到 4 左右, 并且在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存 24 h, 之后离心 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min, 15 min) 收集沉淀, 冷冻干燥后称重记录, 以获得脂肽类抗菌活性物质。取固定重量提取后的脂肽类抗菌活性物质, 加入适量体积二甲基亚砜溶解, 将其配制成浓度为 10、5、2.5、1.25 mg/mL 的溶液, 再经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤。以加入 2 g 中药细粉和 50 mL 蒸馏水为对照组, 高压灭菌后收集上清液, 按以上方法获得纯中药提取物, 然后配制相同浓度的溶液, 利用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌过滤器过滤。

1.2.8 抗真菌活性分析

将 *F. moniliforme* CICC2490 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上培养, 利用马铃薯葡萄糖肉汤刮取平板上的孢子, 使孢子溶液的 OD_{600} 处于 0.1–0.2 之间。在 96 孔板内加入 $190\text{ }\mu\text{L}$ 的菌液和 $10\text{ }\mu\text{L}$ 不同浓度的发酵提取物溶液, 每个浓

度设置 3 个平行实验。另取一块 96 孔板, 分别加入 190 μL 菌液和 10 μL 纯中药提取物溶液, 作为对照实验, 同时设置一个阴性对照组 (190 μL 菌液加 10 μL 的二甲基亚砷溶液)。将 96 孔板放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 72 h 进行观察, 并检测 OD_{600} 值。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选及生长培养分析

本研究从福建省厦门市、福建省泉州市晋江市、江西省赣州市会昌县等地的土壤筛选出 215 株菌株, 利用蛋白水解酶的培养基观察其透明圈, 从结果可看出大部分菌株具有较弱的蛋白水解酶活性, 只有其中 4 株菌株的透明圈较大, 其透明圈与菌株直径比例超过 3 倍。同时将此 4 株菌株进行抗真菌的分析, 发现菌株 X49 具有广谱的抑制真菌功效, 对 *F. moniliforme* CICC2490, *P. variotii* CICC40716, *P. funiculosum*

CICC40279, *F. concentricum* CICC41030, *H. lutea* CICC40381 及 *A. niger* CICC40374 都有明显的拮抗作用 (图 1)。此外, X49 菌株在 10–50 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内均可以生长, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 可达最高生长密度 (图 2), 且在 pH 4.0–9.0 范围内均有明显的生长。在含有不同氯化钠浓度 (1%、2%、5%、7% 及 10%) 的 LB 平板培养基上培养观察, 结果显示 X49 菌株对环境盐浓度的适应性较强, 在 10% NaCl 浓度下仍然能够生长。

2.2 X49 菌株 16S rRNA 基因测序及形态分析

使用 16S rRNA 基因通用引物扩增 X49 菌株的 16S rRNA 基因, 结果显示可扩增出大约 1.5 kb 长度的 DNA 片段, 经由 DNA 测序后, 通过 NCBI 数据库进行 BLAST 分析, 显示 X49 与 *Bacillus* 菌属同源性较高。进一步选取 *Bacillus* 不同种的模式菌株构建系统发育树 (图 3), 对比

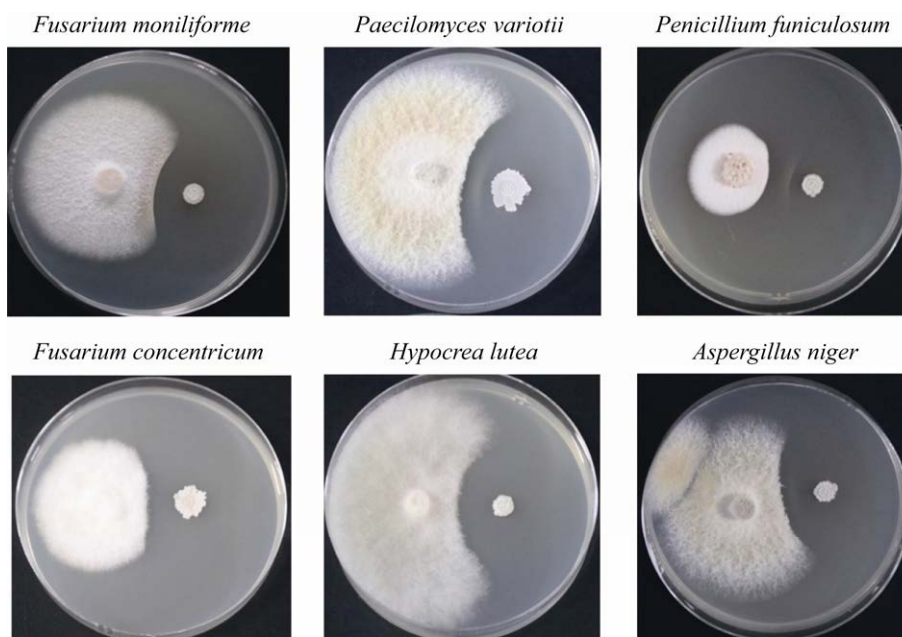


图 1 X49 菌株与不同真菌在马铃薯葡萄糖琼脂平板培养基上的拮抗分析

Figure 1 Antagonistic analysis of *Bacillus* sp. X49 against different fungi on PDA plate.

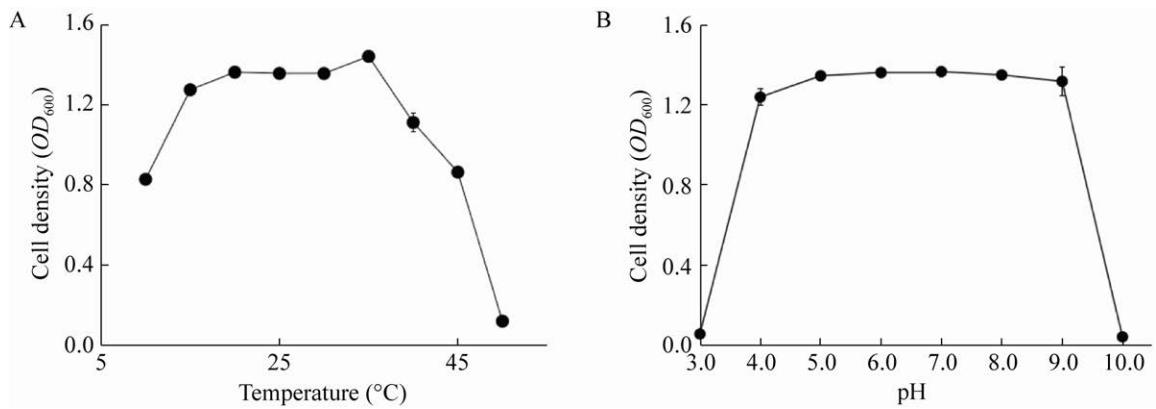


图 2 X49 菌株在不同温度 (A) 及 pH (B) 条件下培养 72 h 后的菌体生长密度

Figure 2 Cell density of *Bacillus* sp. X49 cultivated under different temperature (A) and pH (B) for 72 h.

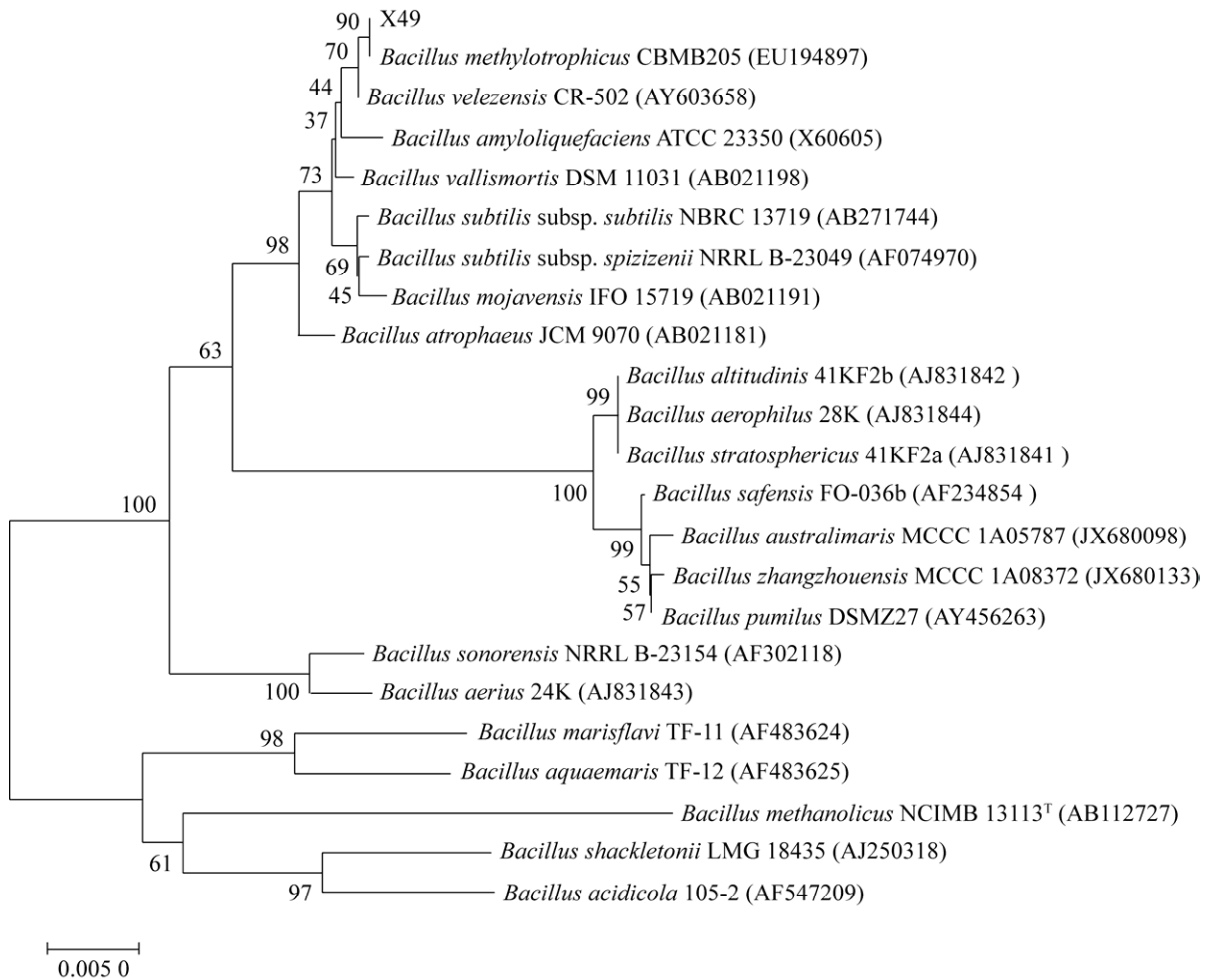


图 3 X49 菌株与不同种 *Bacillus* 模式菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 3 16S rRNA gene-based phylogenetic tree of different *Bacillus* type strains including *Bacillus* sp. X49.

结果显示 X49 菌株与甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) CBMB205^T 的同源性最为接近。X49 菌株在 LB 平板培养基上呈现乳白色外观,根据扫描电镜分析其外观形态 (图 4),菌体呈现杆状,其大小约为 $0.5 \mu\text{m} \times (1-2) \mu\text{m}$,从电镜图可见菌株以单个或成对排列,少数成短链排列。

2.3 X49 菌株生理生化分析

X49 菌株与 *B. methylotrophicus* CBMB205^T[21]、漳州芽孢杆菌 (*Bacillus zhangzhouensis*) 及南海芽孢杆菌 (*Bacillus australimaris*)[22] 的 API ZYM 反应进行对比 (表 1), X49 菌株对碱性磷酸酶、酯酶 C4、类脂酯酶 C8、白氨酸芳胺酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚磷酸水解酶、 α -葡萄糖苷酶及 β -葡萄糖苷酶呈现阳性反应,相较于 *B. methylotrophicus* CBMB205^T 模式菌株具有较多种类的酶活性。API 20E 测试则只有丙酮酸盐及明胶呈现阳性反应。此外,API 50CH 测试显示甘露醇、L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、肌醇、甘露醇、山梨醇、甲基- α -D-吡喃葡

萄糖苷、苦杏仁苷、熊果苷、七叶灵柠檬酸铁、水杨苷、D-纤维二糖、D-麦芽糖、D-乳糖、D-密二糖、D-蔗糖、D-海藻糖、菊粉、D-松三糖、D-棉子糖、淀粉、糖原、木糖醇及 D-龙胆二糖呈现阳性反应。

2.4 X49 菌株基因组测序分析

X49 菌株经基因组测序后,共获得 23 318 120 个 reads 及 3 483 188 362 个 bp (表 2),将其进行拼接,只有 31 个 contig,显示 DNA 测序的完整度较高。经过生物信息分析,X49 菌株基因组全长为 3 929 913 bp,共有 3 766 个基因,G+C 含量占比为 46.55%,相较于 *B. methylotrophicus* FKM10 及 *B. methylotrophicus* B25 都较为接近。此外,X49 菌株非编码 RNA 的数量为 189 个。分析可能参与抗菌的丝氨酸蛋白酶 (表 3) 及非核糖体肽合成酶 (表 4),结果显示共发现 11 个编码的丝氨酸蛋白酶,其中包含有 S8 枯草杆菌蛋白酶家族 (subtilisin family), S1-C 亚家族 (subfamily), 扁菱形蛋白家族 (rhomboid family), V8-like Glu-specific 内肽酶 (endopeptidase) 及 ATP-dependent 蛋白水解酶 (protease)。根据非

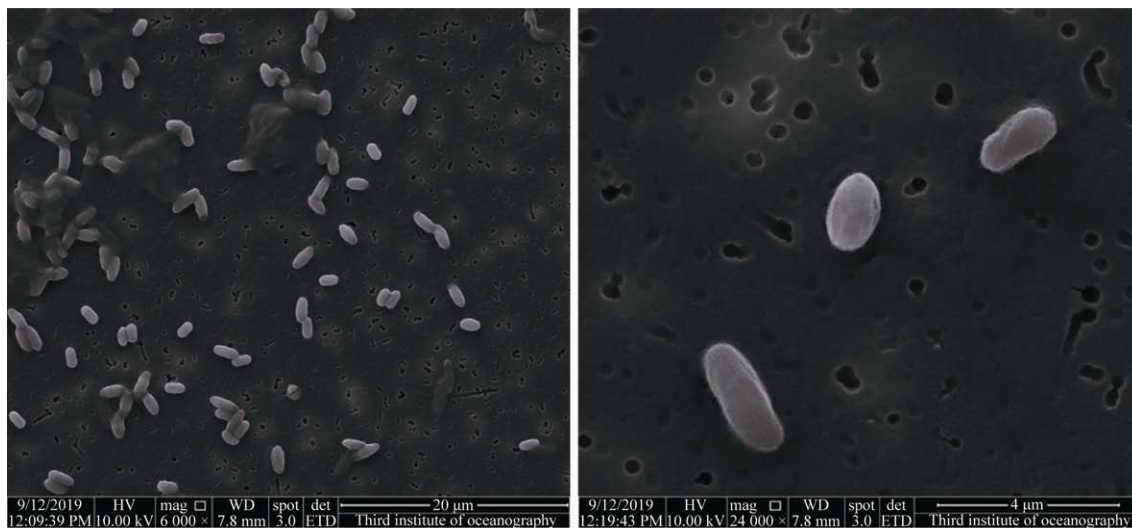


图 4 X49 菌株在 LB 平板培养基上的扫描电镜分析

Figure 4 SEM analysis of *Bacillus* sp. X49 grown on LB plate.

表 1 芽孢杆菌 X49 菌株与芽孢杆菌模型菌株的表型特征比较

Table 1 Phenotypic comparison among X49 strain and other type strains of *Bacillus*

Characteristic	X49	1	2	3
Pigmentation	Creamy white	Creamy white	Creamy white	Light yellow
Growth in 10% NaCl	+	-	+	+
Maximum growth temp (°C)	50	45	45	45
Minimum growth temp (°C)	10	15	8	8
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	w	w
Leucine arylamidase	+	-	+	-
Valine arylamidase	-	-	w	-
Cystine arylamidase	-	-	-	w
Trypsin	-	-	-	-
Chymotrypsin	+	-	+	+
Acid phosphatase	+	-	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+
α -galactosidase	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	w
α -glucosidase	+	+	-	-
β -glucosidase	+	-	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	-
α -mannosidase	-	-	w	-
α -fucosidase	-	-	-	-
DNA G+C content	46.5	45	41.4	41.3

1: *B. methylotrophicus*; 2: *B. zhangzhouensis*; 3: *B. australimaris*. +: positive; -: negative; w: weakly positive.

表 2 芽孢杆菌 X49 菌株和已发表的 *B. methylotrophicus* 基因组序列概要Table 2 Summary of the genomic features of *Bacillus* sp. X49 and the published *B. methylotrophicus*

Category	X49	NKG-1	FKM10	B25
Total reads after quality trim	23 318 120	-	-	-
Total base after quality trim (bp)	3 483 188 362	-	-	-
Total number of contigs	31	-	-	-
Genome size (bp)	3 929 913	4 197 217	3 928 789	3 862 757
Gene annotation	3 766	4 432	3 783	3 679
GC%	46.55	47.06	46.49	46.7
Total ncRNA	189	228	-	-
References	This study	[23]	[24]	[25]

表 3 芽孢杆菌 X49 菌株中的丝氨酸蛋白酶

Table 3 Serine proteases present in *Bacillus* sp. X49

Serine proteases	Gene ID	Amino acids	Homologous accession number	Protein identity	Homologous species
S8 subtilisin family	1_499	319	WP_014304883	319/319 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
	1_894	442	WP_024085327	442/442 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
S1-C subfamily	2_85	398	WP_015387437	398/398 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
	2_563	396	WP_060387189	396/396 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Rhomboid family	6_121	199	WP_057080626	199/199 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
V8-like Glu-specific endopeptidase	5_221	303	WP_003155497	303/303 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
ATP-dependent protease	1_541	698	WP_043867039	697/698 (99%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	2_621	198	WP_003151513	198/198 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
	3_250	420	WP_003152620	420/420 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
	3_251	552	WP_003152622	552/552 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
	8_4	810	WP_007410388	810/810 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.

核糖体肽合成酶的分析显示,共有 30 个编码的非核糖体肽合成酶,其中包含有表面活性素、伊枯草菌素、丰原素、杆菌肽及短杆菌肽非核糖体肽,另有 10 个未知参与何种非核糖体肽的编码基因。

2.5 X49 菌株蛋白水解酶活性分析

根据阳性对照进行不同浓度稀释得出酶活性标准曲线(图 5),将 X49 菌株胞外培养液换算成 U/mL,结果显示在 15 °C 培养 72 h 后,其酶活性呈现最高,其余温度条件酶活性基本呈下降趋势(图 6)。在不同 pH 条件下培养 72 h, X49 菌株在 pH 6.0 条件下生长的酶活性最高,在 pH 4.0–5.0 及 pH 7.0–8.0 条件下呈下降趋势, pH 3.0 及 pH 9.0 培养基中生长 72 h 后,则不具有酶活性。将菌株接种于 LB 液体培养基中,于 15 °C 的环境中培养 72 h,测其不同温度条件下培养液与底物反应的酶活性,结果显示胞外蛋白水解酶在 45 °C 条件下活性最高,即使温度升高至 55 °C,其活性仍维持在 45 °C 条件下的 91%。当反应温度超过 70 °C 或低于 15 °C 时,活性才大幅下降。

2.6 X49 菌株发酵提取物的抗真菌活性分析

将 X49 菌株与不同中药共发酵后,提取培养液中脂肽类化合物,以此提取物对 *F. moniliforme* CICC2490 生长的抑制作用进行探讨,结果显示使用 LB 培养基发酵后的提取物对该真菌具有明显的抑制作用,随着提取物浓度的升高,抑制率也明显增加(图 7)。但在第 3 天培养后,0.5 mg/mL 提取物的抑菌率明显下降 15%,其余浓度的抑菌率也都下降超过 10%。此外, X49 菌株与孜然、干姜、花椒、川椒、独活、广藿香、白芍及细辛培养后的提取物,经抑菌研究发现,纯中药干姜的提取物在浓度为 0.5 mg/mL 时,经第 2 天培养后不具有明显的抑制真菌功效,第 3 天培养后则完全失去抑制真菌能力,但与 X49 菌株共发酵后,0.5 mg/mL 提取物在第 2 天培养后达到 78% 的抑菌率,第 3 天培养后也只稍微降到 74%,在 0.062 5 mg/mL 低浓度时, X49 菌株与干姜共发酵提取物的抑菌率是与 LB 培养基发酵后提取物的 4.5 倍。其余中药共发酵提取物的抑菌率也都没有比干姜的功效更好。进一步将 X49 菌

表 4 芽孢杆菌 X49 菌株中的非核糖体肽合成酶

Table 4 Non-ribosomal peptide synthetases present in *Bacillus* sp. X49

NRPS	Gene ID	Amino acids	Homologous genes	Homologous accession number	Protein identity	Homologous species
	6_1	654	SrfAB	WP_046559337	654/3 586 (18%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	6_2	1 278	SrcAC	WP_044053264	1 278/1 278 (100%)	<i>Bacillus subtilis</i>
	6_3	243	SrfAD	WP_014304324	243/243 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
Surfactin	7_1	2 613	SrfAA	WP_057080002	2 613/2 711 (96%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	13_1	2 610	SrfAB	WP_101311882	2 610/3 586 (73%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	13_2	649	SrfAA	WP_139885552	649/3 584 (26%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	18_1	414	SrfAA	WP_219194687	414/3 584 (12%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	1_995	2 617	ItuC	WP_173602848	2 617/2 617 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
Iturin	1_996	5 362	ItuB	WP_173602849	5 362/5 362 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	1_997	3 982	ItuA	WP_173602850	3 982/3 982 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	4_367	2 552	FenA	WP_201488931	2 551/2 552 (99%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	4_368	2 565	FenB	WP_073982297	2 564/2 565 (99%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Fengycin	4_369	1 173	FenC	WP_208557787	1 173/1 173 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	12_1	2 201	FenD	WP_215601758	2 201/2 201 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	12_2	1 422	FenC	WP_215601759	1 422/1 422 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
Bacitracin	14_1	1 414	BacA	WP_139891865	1 414/1 414 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	2_565	219	LgrE	WP_088005439	219/219 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	3_37	177	GrsT	WP_079979109	177/177 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
Gramicidin	7_114	2 442	GrsB	WP_164691742	2 442/2 442 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
	14_2	977	GrsB	WP_208557997	977/977 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
NRPS	1_1021	1 267	NRPS	WP_069013589	1 267/1 267 (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
NRPS	1_1022	1 293	NRPS	WP_101311967	1 293/3 591 (58%)	<i>Bacillus velezensis</i>
NRPS	2_895	2 375	NRPS	WP_052586507	2 375/2 375 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
NRPS	3_39	1 371	NRPS	WP_213403547	1 085/1 157 (94%)	<i>Bacillus velezensis</i>
NRPS	7_109	2 206	NRPS	WP_069013416	2 205/2 206 (99%)	<i>Bacillus velezensis</i>
NRPS	10_43	834	NRPS	WP_024084831	834/3 568 (23%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
NRPS	15_1	670	NRPS	WP_131258854	670/670 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>
NRPS	24_1	189	NRPS	WP_225046443	187/189 (99%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
NRPS	25_1	202	NRPS	WP_227560965	181/183 (99%)	<i>Bacillus velezensis</i>
NRPS	30_1	93	NRPS	WP_222122394	92/93 (100%)	<i>Bacillus velezensis</i>

^a Homologous gene of *Bacillus* spp. with whole genome.

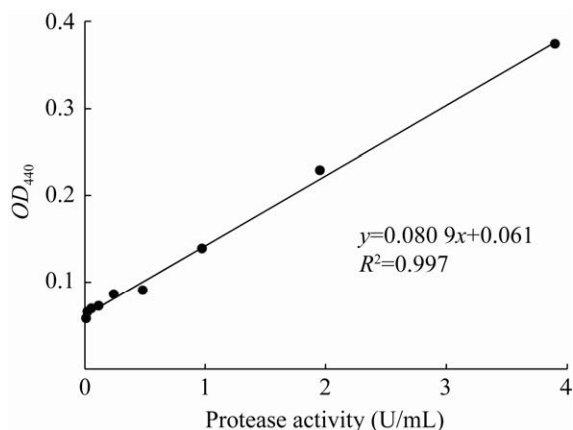


图 5 阳性对照品源于米曲霉蛋白酶 (Merck) 的标准曲线

Figure 5 Standard curve of protease from *Aspergillus oryzae* (Merck), which is used as a positive control.

株与干姜共发酵培养液进行涂盘培养, 也确认 X49 菌株经过 10 d 培养后, 菌落数可达约 5.6×10^7 CFU/mL。

3 讨论

本研究筛选的菌株经过 16S rRNA 序列分析后, 使用 MEGA 软件, 采用邻接 (neighbour-joining) 方法构建系统发育树^[26]。结果表明, X49 菌株在系统发育上隶属于芽孢杆菌属。X49

菌株与模式菌株 *B. methylotrophicus* CBMB205、*B. velezensis* CR-502、解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) ATCC 23350 及死亡谷芽胞杆菌 (*Bacillus vallismortis*) DSM 11031 密切相关, 显示出序列的相似性, 其中 X49 菌株与模式菌株 *B. methylotrophicus* CBMB205 的相似度几乎为 100%。模式菌株 *B. methylotrophicus* CBMB205 无法在超过 4% 的 NaCl 环境下生长^[21], 最优化的生长温度为 28 °C、pH 为 7.0, 而本研究筛选出来的菌株 X49 对于 NaCl 的耐受度较高, 并且有较广的生长温度。其形态大小特征与模式菌株 *B. methylotrophicus* CBMB205 ((0.63–0.64) × (1.8–2.7) mm) 相似, 并以单一或成对的菌株呈现。在针对 API ZYM 生化反应上, X49 菌株也与模式菌株较为相近, 但比模式菌株多出亮氨酸氨基肽酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶及 β-葡萄糖苷酶 4 种酶活性。在利用 API 50CH 分析 49 种碳水化合物代谢情况时, 发现 X49 菌株能够利用其中的 30 种不同碳水化合物。然而根据过去的研究显示, *B. methylotrophicus* 及 *B. velezensis* 属于异模式异名 (heterotypic synonym)^[27], 根据基因组分析, 此 2 种模式菌株的基因组差异不大, *B. velezensis* 的发现较

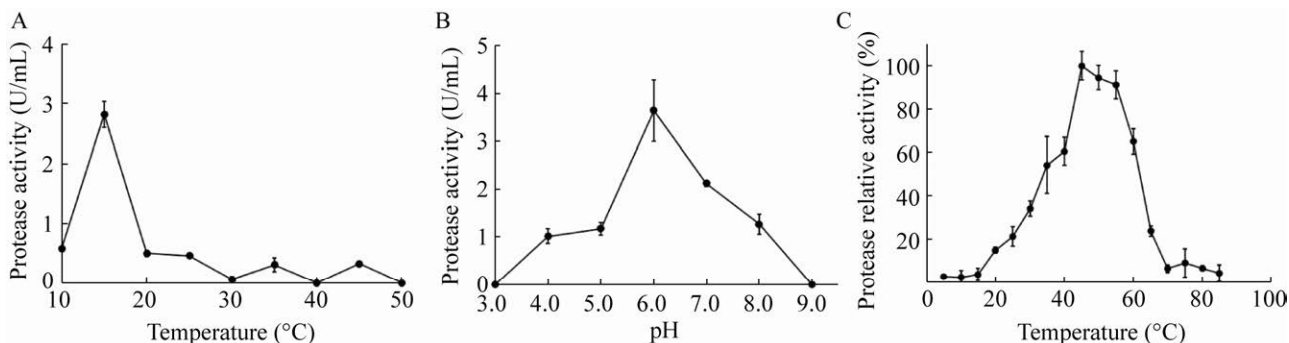


图 6 不同培养温度 (A)、培养 pH (B) 及蛋白水解酶反应温度 (C) 条件下 X49 菌株蛋白水解酶的活性

Figure 6 Protease activity of *Bacillus* sp. X49 cultivated under different temperature (A), pH (B) and temperature of enzymatic reaction (C).

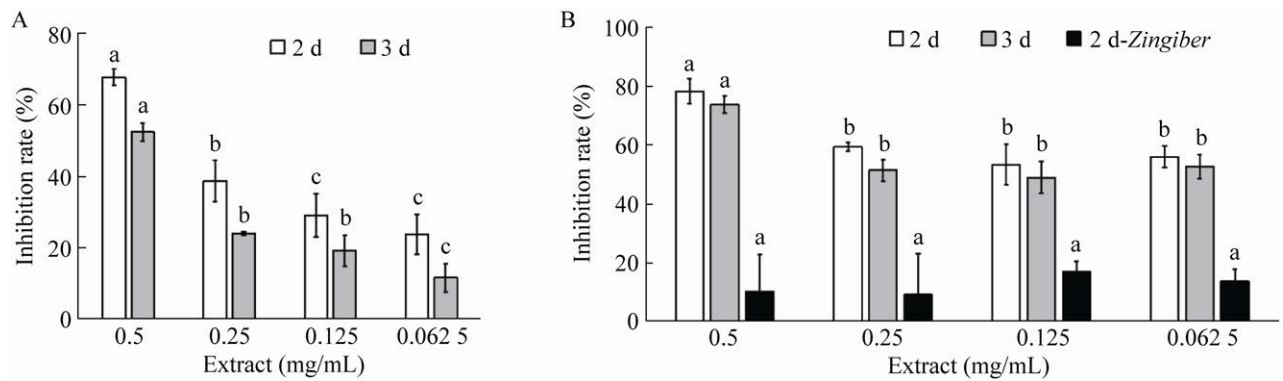


图7 X49菌株与LB (A) 及干姜 (B) 共同培养后的提取物对 *F. moniliforme* CICC2490 生长的抑制影响分析

Figure 7 Antifungal effect of the extract of the co-culture containing *Bacillus* sp. X49, LB medium and *Zingiber officinale* Rosc. on the growth of *F. moniliforme* CICC2490. The 2 d-Zingiber and 3 d-Zingiber indicated the fungal inhibition rate by the extract of *Zingiber officinale* Rosc. against *F. moniliforme* CICC2490 at 2 d and 3 d incubation. The fungal inhibition rate of 3 d-Zingiber was 0%.

B. methylotrophicus 来得早^[28], 因此, 本菌株可命名为 *B. velezensis* X49。过去的研究显示, *B. methylotrophicus* 菌株对于病原菌尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia* sp.)、花生根结线虫 (*Meloidogyne hapla*) 具有明显的拮抗作用^[29], 并且也属于一种植物促根圈细菌 (plant growth-promoting rhizobacterium, PGPR)^[21], 除了能有效抑制病原菌之外, 对于促进植物生长也有所帮助, 所以此菌株具有成为生物肥料的潜力。本研究也显示 X49 菌株对于植物 (*F. moniliforme*) 及人类 (*P. variotii*) 病原菌也都有很显著的抑制作用。

已有多篇的研究证实丝氨酸蛋白酶具有抗真菌的能力^[5,7,30], 分析 X49 菌株基因组的丝氨酸蛋白酶发现, 其基因编号 1_894 属于 S8 枯草杆菌蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶, 拥有 442 个氨基酸, 分子量预估为 48.2 kDa, 其与 Ji 等^[5]报道具有抗真菌能力的丝氨酸蛋白酶有高达 99% 的相似度。该蛋白经实验证实对于果树病原真菌 *B. cinerea* 具有明显的抑制作用。丝氨酸蛋白酶主要会与底物中的羰基相互作用^[31], 达

到水解蛋白的目的。它在生物体内具有广泛的生理作用, 通过激活或抑制调节蛋白水解酶的前体, 在细胞分化、凝聚、组织重建、胚胎发育及病原菌入侵上扮演很重要的角色^[32-33]。这类家族的丝氨酸蛋白酶具有一个 peptidase_S8 的功能结构域 (functional domain), 通常是由 152 到 437 个氨基酸组成, 是枯草芽孢杆菌中数量排名在第二的家族。本研究经由胞外培养液的分析证实了 X49 菌株的蛋白水解酶活性, 并且此胞外蛋白水解酶在 45–55 °C 条件下, 仍保有较高的酶活性, 这与 Ji 等^[5]发现的耐高温丝氨酸蛋白酶有相似的结果。此外, 本研究也发现 X49 菌株的胞外蛋白水解酶会受到低温诱导, 当菌株在 15 °C 培养条件下, 胞外蛋白水解酶的活性达到最高, 这在过去的研究中尚未被发现, 值得进一步去探讨 X49 菌株如何调节蛋白水解酶的表达。

脂肽类是芽孢杆菌的次级代谢产物, 其具有抑制病毒、细菌、真菌和肿瘤等多种活性, 在农业和医学领域具有非常大的应用潜力^[34]。本研究经过基因组分析后发现, X49 菌株有多

达 30 个编码的非核糖体肽合成酶,其中包含已知的表面活性素、伊枯草菌素、丰原素、杆菌肽及短杆菌肽脂肽类化合物。表面活性素、伊枯草菌素及丰原素是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 研究最多的脂肽类化合物。表面活性素主要会扰动或破坏细胞膜的完整性,达到抗菌的功效。除了抗菌之外,表面活性素还具有溶血、抗病毒、抗炎、抗肿瘤和免疫调节等活性^[35]。伊枯草菌素对于酵母菌及霉菌具有非常广谱的抑菌医药疗效,同样也被应用在农业领域。伊枯草菌素抑制真菌的作用机制类似表面活性素,它会与胆固醇形成化合物,影响细胞膜,并在其表面造成小孔洞^[36]。丰原素对于多种不同的病原细菌及真菌的抑制也多有报道,这类脂肽类化合物对细菌类的黄色微球菌 (*Micrococcus flavus*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、普通变形菌 (*Proteus vulgaris*) 及产气克雷伯氏菌 (*Klebsiella aerogenes*) 与真菌类的意大利青霉 (*Penicillium italicum*)、大刀镰刀霉 (*Fusarium culmorum*)、*B. cinerea*、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 及小麦白粉病菌 (*Erysiphe graminis*) 都具有明显的抑制作用^[37]。Bacitracin 及 Gramicidin 均具有抗菌的功效。这些特征也表明芽孢杆菌在医疗及农业领域非常值得深入研究。根据 Chen 和 Juang 的研究显示^[20],利用酸沉淀法对于脂肽类化合物的提取率可达 53%,我们根据该方法进行小部分修改后,针对 X49 菌株进行脂肽类化合物的提取,并进行抗真菌的测试。结果发现在利用 LB 培养 X49 菌株的提取物对于 *F. moniiforme* CICC2490 具有明显的抑制作用。除此之外,因为 X49 菌株具有丰富的酶系统,因此使用 X49 菌株与中药共发酵培养,期望除了产生有效的

脂肽类化合物之外,还可透过对中药的生物转化,获得更多抗菌化合物,提高抗菌能力。有研究显示,枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 与 50 种中药发酵培养后,只有连翘、土茯苓、射干、淡豆豉、王不留行及西青果在发酵后,其抑菌能力均有增强的现象^[38]。本研究在与孜然、干姜、花椒、川椒、独活、广藿香、白芍及细辛发酵培养后,相较于 LB 培养液,在与干姜发酵培养后的提取物能具有更高的抑菌功效。过去研究显示,干姜在利用乙醇及超临界 CO₂ 萃取后^[39-40],具有明显的抑菌效果,但在本研究以酸沉淀处理,对于 *F. moniiforme* CICC2490 无显著的抑菌能力,但经由 X49 菌株的发酵后,抑菌功效则提高非常多,这表明 X49 菌株能将干姜的化合物进行有效的生物转化,使有效的活性成分提高,这些发酵化合物值得我们进一步去做单体化合物的纯化及分析,以作为未来药物的研究开发。

REFERENCES

- [1] Deepa N, Achar PN, Sreenivasa MY. Current perspectives of biocontrol agents for management of *Fusarium verticillioides* and its fumonisin in cereals—a review. *JoF*, 2021, 7(9): 776.
- [2] Thompson MEH, Raizada MN. Fungal pathogens of maize gaining free passage along the silk road. *Pathogens*, 2018, 7(4): E81.
- [3] Nagaraj D. Fumonisin: a review on its global occurrence, epidemiology, toxicity and detection. 2017.
- [4] Steiner B, Aquino VR, Paz AA, et al. *Paecilomyces variotii* as an emergent pathogenic agent of pneumonia. *Case Rep Infect Dis*, 2013, 2013: 273848.
- [5] Ji ZL, Peng S, Chen LL, et al. Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: a potential antifungal agent. *Int J Biol Macromol*, 2020, 145: 594-603.
- [6] Barrett A, Rawlings N, Woessner J. *The Handbook of Proteolytic Enzymes*, London: Academic Press, 1998.
- [7] Zhang DP, Spadaro D, Valente S, et al. Cloning,

- characterization, expression and antifungal activity of an alkaline serine protease of *Aureobasidium pullulans* PL5 involved in the biological control of postharvest pathogens. *Int J Food Microbiol*, 2012, 153(3): 453-464.
- [8] Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med Res Rev*, 2016, 36(1): 4-31.
- [9] 陈萍, 冯芬, 杨恬然, 等. 脂肽类抗生素及其作用机制. *微生物学杂志*, 2015, 35(5): 89-93.
Chen P, Feng F, Yang TR, et al. Lipopeptide antibiotics & its action mechanism. *J Microbiol*, 2015, 35(5): 89-93 (in Chinese).
- [10] Shoji J, Kato T, Matsumoto K, et al. Production and isolation of cerexins C and D studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XVII. *J Antibiot*, 1976, 29(12): 1281-1285.
- [11] Fira D, Dimkić I, Berić T, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol*, 2018, 285: 44-55.
- [12] Huang W, Liu X, Zhou X, et al. Calcium signaling is suppressed in *Magnaporthe oryzae* conidia by *Bacillus cereus* HS24. *Phytopathology*, 2020, 110(2): 309-316.
- [13] Jiang CH, Fan ZH, Li ZJ, et al. *Bacillus cereus* AR156 triggers induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by suppressing miR472 and activating CNLs-mediated basal immunity in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol*, 2020, 21(6): 854-870.
- [14] Etesami H, Alikhani HA, Hosseini HM. Root bacterial endophytes as potential biological control agents against fungal rice pathogens. *Arch Phytopathol Plant Prot*, 2019, 52(7/8): 560-581.
- [15] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [16] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with glimmer. *Bioinformatics*, 2007, 23(6): 673-679.
- [17] Harris MA, Clark J, Ireland A, et al. The gene ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(database issue): D258-D261.
- [18] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [19] Azeredo LAI, Lima MB, Coelho RRR, et al. A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Curr Microbiol*, 2006, 53(4): 335-339.
- [20] Chen HL, Juang RS. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. *Biochem Eng J*, 2008, 38(1): 39-46.
- [21] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2010, 60(10): 2490-2495.
- [22] Liu Y, Lai QL, Du J, et al. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(3): 1193-1199.
- [23] Liu BH, Ge BB, Azhar N, et al. Complete genome sequence of *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from the Changbai mountains, China. *Genome Announc*, 2018, 6(3): e01454-e01417.
- [24] Wang CQ, Hu XN, Liu K, et al. Draft genome sequence of *Bacillus methylotrophicus* FKM10, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from apple rhizosphere. *Genome Announc*, 2016, 4(1): e01739-15.
- [25] Gerbore J, Brutel A, Lemainque A, et al. Complete genome sequence of *Bacillus methylotrophicus* strain B25, a potential plant growth-promoting rhizobacterium. *Genome Announc*, 2016, 4(2): e00058-16.
- [26] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406-425.
- [27] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(3): 1212-1217.
- [28] Jeong H, Park SH, Choi SK. Genome sequence of antibiotic-producing *Bacillus amyloliquefaciens* strain KCTC 13012. *Genome Announc*, 2015, 3(5): e01121-15.
- [29] Ma L, Cao YH, Cheng MH, et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(2): 299-312.
- [30] Singh AK, Chhatpar HS. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6. *J Basic Microbiol*, 2011, 51(4): 424-432.

- [31] Jablaoui A, Kriaa A, Akermi N, et al. Biotechnological applications of serine proteases: a patent review. *Recent Pat Biotechnol*, 2018, 12(4): 280-287.
- [32] Gohara DW, Di Cera E. Allosteric in trypsin-like proteases suggests new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(11): 577-585.
- [33] Patel S. A critical review on serine protease: key immune manipulator and pathology mediator. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2017, 45(6): 579-591.
- [34] Zhao HB, Shao DY, Jiang CM, et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(15): 5951-5960.
- [35] Théâtre A, Cano-Prieto C, Bartolini M, et al. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 623701.
- [36] Bonmatin JM, Laprèvote O, Peypoux F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6(6): 541-556.
- [37] Sivapathasekaran C, Mukherjee S, Samanta R, et al. High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(3): 845-854.
- [38] 李国红, 张克勤, 沈月毛. 枯草芽孢杆菌对 50 种中药的发酵及抗菌活性检测. *中药材*, 2006, 29(2): 154-157.
- Li GH, Zhang KQ, Shen YM. The fermentation of 50 kinds of TCMs by *Bacillus subtilis* and the assay of antibacterial activities of fermented products. *J Chin Med Mater*, 2006, 29(2): 154-157 (in Chinese).
- [39] 王梦, 钱红美, 苏简单. 干姜乙醇提取物解热镇痛及体外抑菌作用研究. *中药新药与临床药理*, 2003, 14(5): 299-301.
- Wang M, Qian HM, Su JD. Antipyretic and analgesic effects of rhizoma *Zingiberis* alcoholic extract and its *in-vitro* antibacterial actions. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2003, 14(5): 299-301 (in Chinese).
- [40] 谢晓林, 杨世祥, 胡玉松, 等. 超临界 CO₂ 萃取黔产干姜挥发油的化学成分及抑菌活性研究. *贵阳学院学报(自然科学版)*, 2013, 8(3): 15-18.
- Xie XL, Yang SX, Hu YS, et al. Studies on the chemical constituents and antibacterial activity of the volatile oil from the rhizoma of *Zingiber officinale* in Guizhou province by supercritical CO₂ fluid extraction. *J Guiyang Coll (Nat Sci Ed)*, 2013, 8(3): 15-18 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)