



# 枯草芽孢杆菌斯氏亚种胞外产物的抑菌活性及其特性分析

刘妮<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>2</sup>, 于永翔<sup>2\*</sup>, 张正<sup>2</sup>, 王春元<sup>2</sup>, 荣小军<sup>2</sup>, 廖梅杰<sup>2</sup>, 李彬<sup>2</sup>, 葛建龙<sup>2</sup>, 庞明海<sup>2</sup>

1 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

2 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室, 山东 青岛 266071

刘妮, 王印庚, 于永翔, 张正, 王春元, 荣小军, 廖梅杰, 李彬, 葛建龙, 庞明海. 枯草芽孢杆菌斯氏亚种胞外产物的抑菌活性及其特性分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(8): 2967-2985.

LIU Ni, WANG Yingeng, YU Yongxiang, ZHANG Zheng, WANG Chunyuan, RONG Xiaojun, LIAO Meijie, LI Bin, GE Jianlong, PANG Minghai. Antibacterial activity and characterization of extracellular products of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(8): 2967-2985.

**摘要:**【目的】研究枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) Bspi2104 胞外抑菌物质的理化特性及抗菌活性组分。【方法】选取具有广谱抗菌活性的枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 菌株和无抗菌作用的枯草芽孢杆菌斯氏亚种 BspiL6 菌株, 结合牛津杯法和代谢组学检测技术对菌株胞外产物的抑菌活性和理化特性及其抗菌活性组分进行研究。【结果】胞外产物理化稳定性试验表明, 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶和脂肪酶处理对胞外产物的抑菌活性无显著影响; 胞外产物经 80 °C 和 100 °C 处理后丧失抑菌活性; pH 9.0 和 pH 11.0 条件下胞外产物的抑菌活性下降, pH 值越大抑菌活性越弱; 经过紫外处理的胞外产物与未经紫外处理的胞外产物抑菌活性无明显差异( $P>0.05$ )。60%、70% 和 80% 饱和度下的硫酸铵沉淀产物具有抑菌活性, 硫酸铵饱和度为 70% 时抑菌活性最强; 菌株胞外产物进行盐酸沉淀后, 分别通过甲醇抽提提取、乙酸乙酯萃取提取和氯仿萃取提取后的产物均有抑菌活性, 其中菌株 Bspi2104 的乙酸乙酯萃取提取产物抑菌效果最好。通过 LC-MS/MS 检测技术对菌株 Bspi2104 和 BspiL6 不同提取方式下枯草芽孢杆菌胞外产物组分进行分析, 差异代谢物筛选表明, 两株菌的不同提取方式产物中共有的差

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400701); 山东省重点研发计划(科技示范工程)(2021SFGC0701); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2023TD29)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400701), the Key Research and Development Program of Shandong Province (Science and Technology Demonstration Project) (2021SFGC0701), and the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2023TD29).

\*Corresponding author. E-mail: yuyx@ysfri.ac.cn

Received: 2024-01-26; Accepted: 2024-04-18; Published online: 2024-04-24

异代谢物有 35 种；差异代谢产物主要分属于羧酸及其衍生物、脂肪酸类、有机含氧化合物、有机含氮化合物、甾体及其衍生物、孕烯醇酮脂类、酚类、生物碱及其衍生物、甘油磷脂类、异黄酮类、苯及其取代衍生物等 37 类物质，包括苦参素、表面活性素 B 等多种抑菌物质。【结论】枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外产物的理化稳定性较好，在多种蛋白酶和脂肪酶、pH 1.0–11.0、–20–60 °C 和紫外照射 3 h 处理下仍然具备较高的抑菌活性。枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外产物的硫酸铵沉淀、盐酸沉淀甲醇抽提、乙酸乙酯萃取和氯仿萃取提取物均有抑菌活性，其中 70% 硫酸铵沉淀提取物和乙酸乙酯萃取提取物抑菌效果最好，菌株具有多种类型的抑菌活性物质。相关研究结果为芽孢杆菌抑菌活性组分的发现和筛选提供了理论参考，相关代谢产物具有一定的研究前景。

关键词：枯草芽孢杆菌；胞外产物；理化稳定性；抑菌活性成分

## Antibacterial activity and characterization of extracellular products of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

LIU Ni<sup>1,2</sup>, WANG Yingeng<sup>2</sup>, YU Yongxiang<sup>2\*</sup>, ZHANG Zheng<sup>2</sup>, WANG Chunyuan<sup>2</sup>, RONG Xiaojun<sup>2</sup>, LIAO Meijie<sup>2</sup>, LI Bin<sup>2</sup>, GE Jianlong<sup>2</sup>, PANG Minghai<sup>2</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

**Abstract:** [Objective] To study the physicochemical properties and active components of extracellular antibacterial substances from *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* Bspi2104. [Methods] The Oxford cup method was employed to determine the antibacterial activities and physicochemical properties of *B. subtilis* subsp. *spizizenii* Bspi2104 with broad-spectrum antibacterial activity and *B. subtilis* subsp. *spizizenii* BspiL6 without antibacterial activity. Metabolomics was employed to detect the antibacterial components of the extracellular products of the strain Bspi2104. [Results] The treatment with trypsin, papain, protease K, pepsin, and lipase had no significant effect on the antibacterial activity of extracellular products. Extracellular products lost the antibacterial activity after treatment at 80 °C and 100 °C and presented decreased antibacterial activity at pH 9.0 and pH 11.0, especially at higher pH values. There was no significant difference in the antibacterial activity between the extracellular products treated with and without UV ( $P>0.05$ ). The ammonium sulfate precipitates at 60%, 70%, and 80% saturation exerted antibacterial activities, which was the strongest at the saturation of 70%. The extracellular products of the two strains were extracted by hydrochloric acid precipitation, combined with methanol extraction, ethyl acetate extraction, and chloroform extraction, and all the extracts showed antibacterial activities. The ethyl acetate extract had the strongest antibacterial activity. LC-MS/MS was employed to analyze the composition of extracellular products of Bspi2104 and BspiL6 extracted with different

methods. There were 35 common differential metabolites in the extracellular products of the two strains extracted with different methods. The differential metabolites belonged to 37 categories of compounds, including carboxylic acids and derivatives, fatty acids, organic oxygen-containing compounds, organic nitrogen-containing compounds, steroids and derivatives, pregnenolone lipids, phenols, alkaloids and derivatives, glycerol phosphates, isoflavonoids, and benzene and substituted derivatives. Some of these compounds, such as kurarinone, and surfactin B, had antibacterial activities. **[Conclusion]** The extracellular products of *B. subtilis* subsp. *spizizenii* Bspi2104 had good physicochemical stability and maintained high antibacterial activity after treatment with various proteases and lipases, and at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 1.0–11.0, and UV irradiation for 3 h. The ammonium sulfate precipitates and the extracts from hydrochloric acid precipitation combined with methanol extraction, ethyl acetate extraction, and chloroform extraction of the extracellular products of *B. subtilis* subsp. *spizizenii* Bspi2104 had antibacterial activities. Among them, the 70% ammonium sulfate precipitate and ethyl acetate extract had the best antibacterial effects. The extracellular products of the strain contained diverse categories of antibacterial compounds. The findings provide theoretical reference for the discovery and screening of antibacterial components of *Bacillus*, and the related metabolites have research prospects.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; extracellular products; physical and chemical stability; antibacterial components

近年来,随着水产养殖规模化和集约化程度的日益加深导致了各种病害问题日益严重,抗生素等传统病害防控药物的滥用增加了病原生物抗药性增强和药物残留的风险,同时对环境生态和生物安全产生重要隐患,因此,寻找绿色、安全、无公害的抗生素替代品对水产养殖业的发展至关重要<sup>[1]</sup>。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)因具有稳定性强、抗逆性强和抗菌性能好等特性,同时具有调节水产动物肠道微生态平衡、提高动物机体免疫力、促进动物生长、抑制病原菌的生长和改善养殖水质等多种作用,被用作抗生素替代品在水产养殖中广泛应用,在水产养殖病害防控领域发挥了重要作用<sup>[2-4]</sup>。

枯草芽孢杆菌主要包括枯草亚种(*B. subtilis* subsp. *subtilis*)、斯氏亚种(*B. subtilis* subsp. *spizizenii*)、沙漠亚种(*B. subtilis* subsp. *inaquosorum*)和粪便亚种(*B. subtilis* subsp. *stercoris*)等,这些亚种

在抑菌方面均有相关报道<sup>[5-9]</sup>。枯草芽孢杆菌能产生多种抑菌成分,通过改变病原菌细胞膜的通透性,造成胞体的原生质泄漏、内部离子释放、菌丝畸形,并抑制孢子萌发等,从而达到抑制病原菌生长的目的<sup>[10-12]</sup>。枯草芽孢杆菌能产生的抑菌活性物质主要有抗菌蛋白<sup>[13]</sup>、脂肽类<sup>[14]</sup>、聚酮类<sup>[15]</sup>、酶类<sup>[16]</sup>和挥发性物质<sup>[17]</sup>等。由于不同类型抗菌活性物质需要采取不同的提取方法,对于枯草芽孢杆菌,其抗菌活性物质通常从其胞外产物中提取,常用的提取方法包括硫酸铵沉淀法、盐酸沉淀甲醇抽提法、有机溶剂萃取提取法等<sup>[18-20]</sup>。

前期研究发现一株具有广谱抗菌特性的枯草芽孢杆菌斯氏亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) Bspi2104,其对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、坎氏弧菌(*Vibrio campbellii*)和美人鱼发光杆菌

美人鱼亚种 (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*)等多种病原菌均具有拮抗作用,但对其拮抗功效组分缺乏了解<sup>[21]</sup>。本研究着重对枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外代谢产物的理化性质进行了研究,并通过不同方式对菌株的胞外代谢物进行提纯,将其与无抑菌活性的枯草芽孢杆菌斯氏亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) BspiL6 的胞外产物进行比较分析,研究了枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 的抑菌活性物质。相关研究结果为芽孢杆菌抑菌活性物质的筛选与新型抗菌制剂的研发提供了理论参考和数据支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

本研究所用芽孢杆菌和病原菌均保存于中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖病原库,包括:枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104、枯草芽孢杆菌斯氏亚种 BspiL6、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、坎氏弧菌和美人鱼发光杆菌美人鱼亚种。

### 1.2 胞外产物的制备

在 TSB 固体培养基<sup>[21]</sup>上活化并纯化枯草芽孢杆菌 Bspi2104 和 BspiL6 菌株,分别挑取单菌落,接种于 100 mL 的 TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 8 h 制备种子液,取 5 mL 种子液接种于 500 mL 的 TSB 液体培养基中 28 °C、180 r/min 振荡培养 24 h,获得菌悬液,经 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 去除菌体,收集上清液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,即获得菌株的胞外产物(extracellular product, ECP)<sup>[22]</sup>。吸取 100 μL 的 ECP 接种在 TSB 固体培养基上,28 °C 培养 24 h 后无菌落长出,以验证其无菌性,确定无菌后装入灭菌离心管中,保存于-80 °C 冰箱中备用。

### 1.3 胞外产物抑菌活性检测

采用牛津杯法测定菌株 Bspi2104 和 BspiL6 的 ECP 对副溶血弧菌、哈维氏弧菌、美人鱼发光杆菌和坎氏弧菌共 4 种病原菌的抑菌活性。挑取纯化后的副溶血弧菌、哈维氏弧菌、美人鱼发光杆菌和坎氏弧菌菌落,使用无菌 1.5% NaCl 溶液制备成浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 菌悬液(*OD*<sub>600</sub> 为 0.5)。吸取 100 μL 病原菌菌悬液涂布于 TSB 培养基表面,随后在牛津杯孔内加入 200 μL 的待测 ECP 溶液,以孔中加入等体积空白 TSB 液体培养基为对照,每个处理重复 3 次。静置 10 min 后置于 28 °C 条件下培养 12 h,观察枯草芽孢杆菌 Bspi2104 和 BspiL6 的 ECP 对 4 种病原菌的抑制作用,并测量抑菌圈直径。

### 1.4 不同胁迫条件下枯草芽孢杆菌胞外产物抑菌活性变化分析

#### 1.4.1 消化酶

参考试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)操作说明,将 Bspi2104 胞外产物溶液分别用终浓度为 1 mg/mL 的胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶和脂肪酶进行酶解消化,37 °C 中水浴 1 h,以未经酶处理的胞外产物为对照,测定抑菌活性,每个处理重复 3 次。

#### 1.4.2 温度

将 Bspi2104 胞外产物分别置于-20、4、30、60、80、100 °C 条件下处理 30 min,待缓解至室温后,再次过滤除菌防止操作过程污染,以未经温度处理的胞外产物作为对照,测定抑菌活性,每个处理重复 3 次。

#### 1.4.3 pH

将 Bspi2104 胞外产物分别用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0,室温静置 2 h 后再将 pH 调至中性,再次过滤除菌防止操作过程污染,以未经处理的胞外产物作为对照,测定抑菌活性,每个处理重复 3 次。

#### 1.4.4 UV 照射

将 Bspi2104 胞外产物置于无菌培养皿中, 在紫外灯下分别照射 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h, 再次过滤除菌防止操作过程污染, 以未经处理的胞外产物作为对照, 测定抑菌活性, 每个处理重复 3 次。

### 1.5 不同提取方式下枯草芽孢杆菌胞外产物抑菌活性变化分析

#### 1.5.1 硫酸铵沉淀提取

取制备好的枯草芽孢杆菌胞外产物 200 mL, 分别缓慢加入硫酸铵粉末至饱和度为 30%、40%、50%、60%、70%和 80%, 4 °C 沉淀过夜。8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 并用 PBS (pH 7.0) 溶解定容至 10 mL, 测定其抑菌活性, 以硫酸铵饱和度为 80% 的空白培养液做同样的处理后所得的沉淀溶解液为对照, 每个处理重复 3 次, 活性最强组分的硫酸铵饱和度即为制备抗菌粗提物所需的硫酸铵最佳浓度。

按照 1.2 中的方法制备 Bspi2104 和 BspiL6 菌株的胞外产物, 取制备好的胞外产物各 200 mL, 分别缓慢加入硫酸铵粉末至饱和度为最佳浓度, 4 °C 沉淀过夜。4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀, 沉淀用 PBS (pH 7.0) 溶解并定容至 10 mL, 测定其抑菌活性, 以最佳硫酸铵饱和度的空白培养液做同样的处理后所得的沉淀溶解液为对照, 每个处理重复 3 次。

#### 1.5.2 盐酸沉淀甲醇抽提提取

取 200 mL 胞外产物用 6 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0, 4 °C 下沉淀过夜后, 置于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 用甲醇反复抽提沉淀 3 次, 振荡 10 min 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 将上清在 40 °C、60 r/min 条件下旋转蒸发浓缩至 10 mL, 冷冻干燥后溶于 10 mL 的甲醇溶液中, 用 1 mol/L NaOH 调节至 pH 7.0, 0.22 μm 有机滤膜过滤后即制备的脂肽类活性物质溶液, -20 °C 冰箱中存放备用<sup>[23]</sup>。

#### 1.5.3 乙酸乙酯萃取提取

取 200 mL 胞外产物, 加入等体积乙酸乙酯, 振荡 3–5 min 后静置, 待水相有机相分离后, 收集上层有机相, 用旋转蒸发仪在 40 °C、60 r/min 条件下旋转蒸发浓缩至 10 mL, 冷冻干燥后用 10 mL 甲醇复溶, 测定其抑菌活性, 每组 3 个重复, 以甲醇为对照。

#### 1.5.4 氯仿萃取提取

取 200 mL 胞外产物, 加入等体积氯仿, 振荡 3–5 min 后静置, 待水相有机相分离后, 收集下层有机相, 用旋转蒸发仪在 40 °C、60 r/min 条件下旋转蒸发浓缩至 10 mL, 冷冻干燥后用 10 mL 甲醇复溶, 测定其抑菌活性, 每组 3 个重复, 以甲醇为对照。

### 1.6 LC-MS 组分分析

通过硫酸铵沉淀、盐酸沉淀甲醇抽提、乙酸乙酯萃取和氯仿萃取 4 种提取方式对 Bspi2104 和 BspiL6 的胞外产物进行提取, 利用高效液相色谱串联质谱联用 (high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 技术进行检测, 随后进行差异代谢物比较分析, 筛选可能介导芽孢杆菌 Bspi2104 抑菌的活性物质, 并对其化学属性进行注释分析。

### 1.7 数据处理和分析

试验数据采用平均值±标准差表示; 用 Excel 2016 进行柱状图的制作; 采用 *t* 检验 (Student's *t* test) 结合多元分析的方法, 筛选出组间差异代谢物 [同时满足 variable importance in the projection (VIP) > 1, *P*-value < 0.05], 之后与人类代谢组数据库 (Human Metabolome Database, HMDB)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) compound 数据库和脂质地图 (Lipid Maps) 数据库进行比对, 确定差异代谢物的种类。

## 2 结果与分析

### 2.1 枯草芽孢杆菌胞外产物抑菌活性分析

枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 和 BspiL6 菌株 ECP 抑菌活性检测结果表明, 枯草芽孢杆菌 Bspi2104 菌株 ECP 对坎氏弧菌、 Harvey 氏弧菌、美人鱼发光杆菌和副溶血弧菌均具有良好的抑菌活性, 其中对美人鱼发光杆菌的抑菌效果最好, 抑菌圈直径达(27.5±0.2) mm, 而 BspiL6 菌株 ECP 对 4 种病原菌均无抑制效果(表 1)。

### 2.2 消化酶处理对芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物抑菌活性的影响

菌株 Bspi2104 的胞外产物在经过 4 种蛋白酶和 1 种脂肪酶处理 1 h 前后对 4 种病原菌的抑菌效果相差较小, 对 Harvey 氏弧菌和坎氏弧菌的抑菌活性未发生明显改变, 对美人鱼发光杆菌和副溶血弧菌的抑制活性有所下降, 但仍能保持 90.80% 以上的抑菌活性, 无显著差异(图 1)。说明菌株 Bspi2104 的胞外产物中的抗菌活性物质

对测定的 5 种酶类不敏感, 胞外产物中的抑菌活性物质不是相应蛋白。

### 2.3 温度对芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物抑菌活性的影响

温度耐受性试验表明, 芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物在-20、4 °C、室温下处理后的抑菌活性相差不大, 高于 30 °C 处理后, ECP 抑菌活性呈下降趋势, 80 °C 和 100 °C 处理后的 ECP 完全丧失了抑菌活性(图 2)。因此, Bspi2104 菌株 ECP 中的抑菌活性物质具有温度敏感性。

表 1 Bspi2104 和 BspiL6 菌株 ECP 的抑菌活性  
Table 1 Antibacterial activity of ECP from *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 and BspiL6

Pathogenic bacteria	Antibacterial circle diameter (mm)	
	Bspi2104	BspiL6
<i>V. campbellii</i>	24.3±0.2	0
<i>V. harveyi</i>	22.8±0.1	0
<i>P. damsela</i>	27.5±0.2	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	18.5±0.2	0

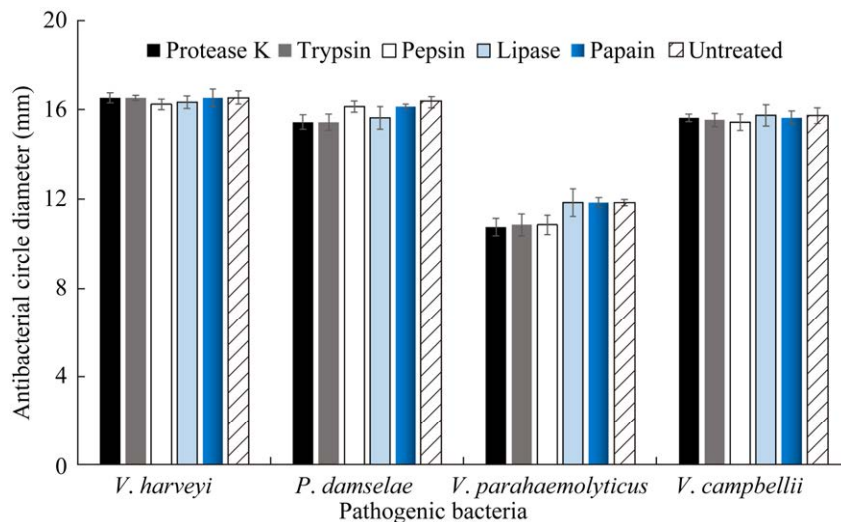


图 1 不同酶处理下 Bspi2104 菌株 ECP 的抑菌效果

Figure 1 Antibacterial effect of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 ECP under different enzymes. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±SD”.

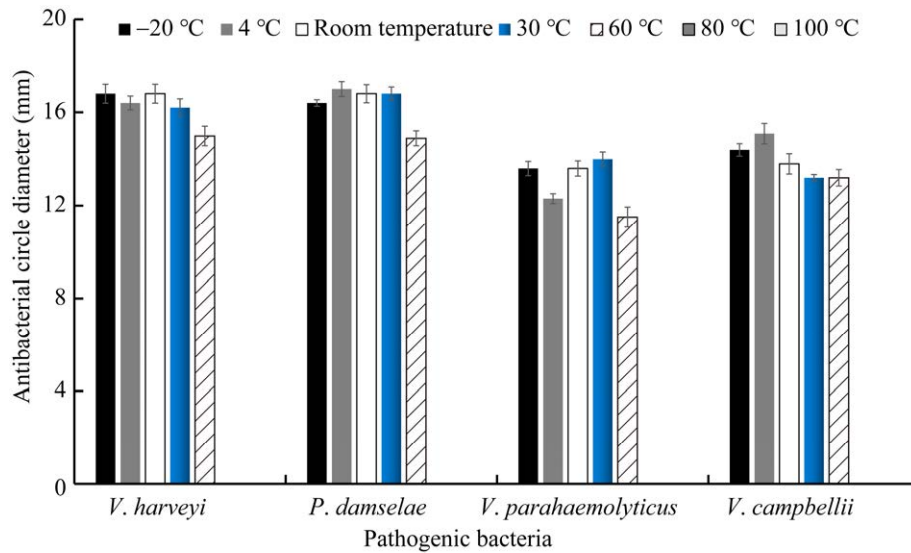


图 2 不同温度处理后 Bspi2104 菌株 ECP 的抑菌效果

Figure 2 Antibacterial effect of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 ECP under different temperatures. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±SD”.

### 2.4 pH 对芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物抑菌活性的影响

酸碱耐受试验表明, 当 pH 值在 1.0–5.0 范围内时, 芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物的抑菌活性随着 pH 值升高而增大; pH 7.0 时, 抑菌活性略有下降, 其中对坎氏弧菌的抑菌活性下降显著 ( $P < 0.05$ ); 随着 pH 增大到 9.0–11.0 时, 抑菌活

性明显下降, pH 11.0 时抑菌活性最弱, 但最低仍有 68.26% 的抑菌率; 未经 pH 处理的 ECP 的抑菌活性与 pH 7.0 处理后的 ECP 的抑菌活性无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。表明枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 菌株 ECP 抑菌活性组分中含有对酸碱有较强的耐受性的抑菌活性物质和酸碱敏感类物质。

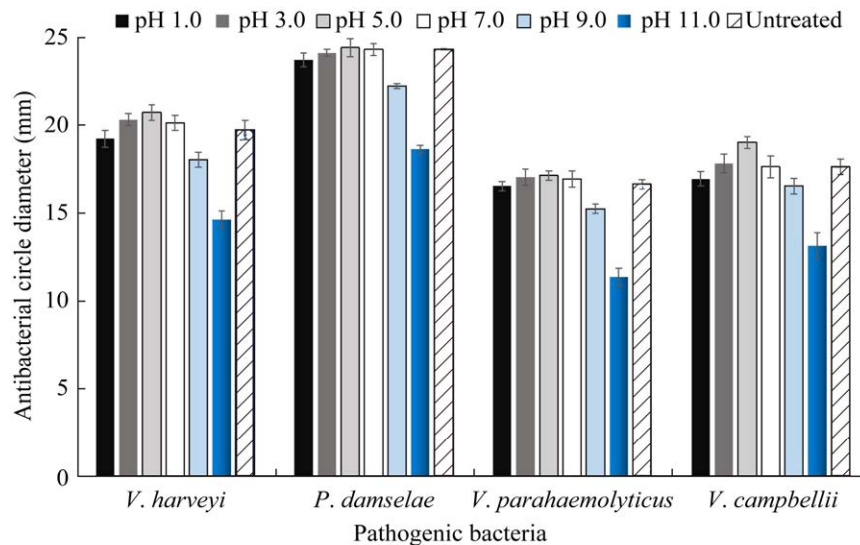


图 3 不同 pH 处理下 Bspi2104 菌株 ECP 的抑菌效果

Figure 3 Antibacterial effect of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 ECP under different pH treatments. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±SD”.



## 2.5 UV 处理对芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物抑菌活性的影响

紫外照射处理 Bspi2104 菌株的胞外产物 15 min、30 min、45 min、1 h、2 h、3 h 后，其

抑菌活性无明显差异( $P>0.05$ ) (图 4)。这一结果表明，枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 菌株 ECP 中的抗菌活性物质对紫外线不敏感，菌株 Bspi2104 抑菌活性物质具有良好的紫外稳定性。

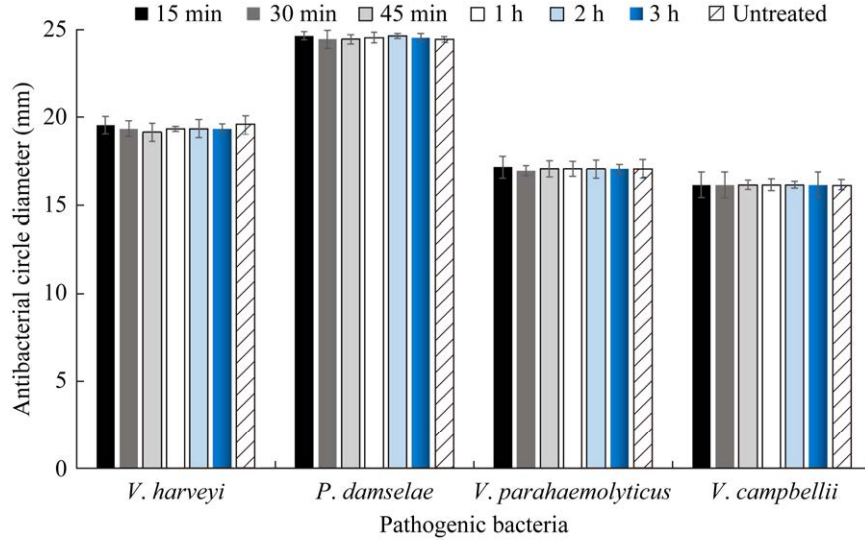


图 4 不同紫外时间下 Bspi2104 菌株 ECP 的抑菌效果

Figure 4 Antibacterial effect of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 ECP under different UV times. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±SD”.

## 2.6 硫酸铵沉淀饱和度筛选

枯草芽孢杆菌 Bspi2104 菌株在硫酸铵饱和度为 30%–50% 下的沉淀产物均无抑菌活性，在硫酸铵饱和度为 60% 下的沉淀产物开始具有抑菌活性，饱和度为 70% 时沉淀产物的抑菌活性最强，饱和度为 80% 时抑菌活性略有下降(图 5)。因此，实验中选择饱和度为 70% 的硫酸铵溶液对枯草芽孢杆菌 Bspi2104 菌株的胞外产物进行沉淀。

## 2.7 不同提取方式下枯草芽孢杆菌胞外产物抑菌活性变化特征

枯草芽孢杆菌 Bspi2104 的 70% 硫酸铵沉淀提取物、盐酸沉淀甲醇抽提提取物、乙酸乙酯萃取提取物和氯仿萃取提取物均具有较强的抑菌效果，而菌株 BspiL6 的 4 种提取物均未检测出抑菌活性。其中枯草芽孢杆菌 Bspi2104 胞外产物的 70% 硫酸铵沉淀提取物和乙酸乙酯萃取提取物的抑菌效果最好，对坎氏弧菌的抑菌圈直径

最高为(17.2±0.1) mm (表 2)。初步判断枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 中可能包含蛋白类、脂肽类和极性有机物质等多种类型的抑菌活性物质。

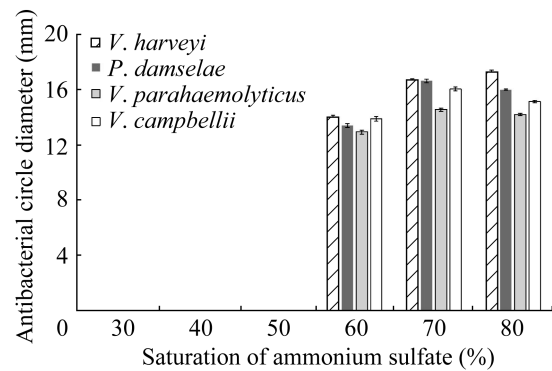


图 5 硫酸铵梯度沉淀 Bspi2104 菌株 ECP 的抑菌效果

Figure 5 Antibacterial effect of ammonium sulfate gradient precipitation of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 ECP. Each test was repeated three times in parallel, and the data was expressed as “mean±SD”.



表 2 不同方式提取物的抑菌圈直径

Table 2 The diameter of antibacterial circles of extracts from different methods

Strain	Extract	<i>V. campbellii</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>P. damsela</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Bspi2104 (mm)	ECP	24.3±0.2	22.8±0.1	27.5±0.2	18.5±0.2
	70% ammonium sulfate precipitation	14.6±0.2	16.7±0.2	16.7±0.1	16.1±0.1
	Acid precipitation	16.1±0.1	13.5±0.1	13.5±0.2	12.6±0.2
	Ethyl acetate extraction	17.2±0.1	15.6±0.2	17.0±0.2	15.2±0.2
	Chloroform extraction	16.7±0.2	16.6±0.2	15.6±0.2	14.6±0.2
BspiL6 (mm)	ECP	0	0	0	0
	70% ammonium sulfate precipitation	0	0	0	0
	Acid precipitation	0	0	0	0
	Ethyl acetate extraction	0	0	0	0
	Chloroform extraction	0	0	0	0

## 2.8 不同提取方式下 2 株菌胞外产物代谢物差异研究

主成分分析(principal component analysis, PCA)结果表明, 菌株 Bspi2104 和 BspiL6 的 70%硫酸铵沉淀、酸沉淀、乙酸乙酯萃取提取和氯仿萃取提取 4 种提取方式间存在显著差

异, 但组内无显著差异, 说明本次实验的稳定性较好。第一主成分的贡献率是 48.5%, 第二主成分的贡献率是 15.0%, PC1 和 PC2 的贡献和为 63.5% (图 6), 该分析结果能较好地说明菌株 Bspi2104 和 BspiL6 4 种提取物中的代谢物组成差异。

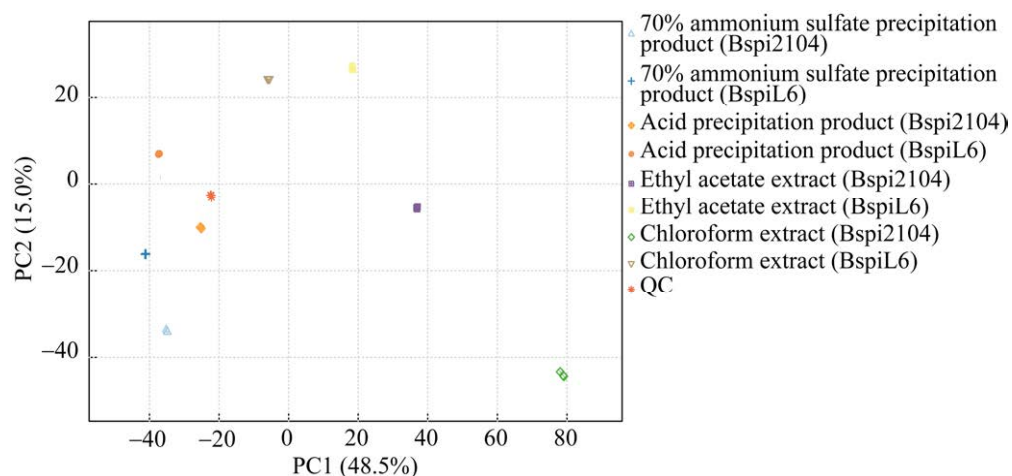


图 6 Bspi2104 和 BspiL6 菌株不同提取产物的主成分分析图

Figure 6 Principal component analysis score of different extracts from *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 and BspiL6.

以  $VIP > 1$  和  $P < 0.05$  为筛选条件对菌株 BspiL6 和 Bspi2104 的 4 种提取产物中的差异代谢物进行筛选, 菌株 BspiL6 和 Bspi2104 的 70% 硫酸铵沉淀溶解产物中显著差异代谢物为 952 种 (上调: 611 种; 下调: 341 种), 酸沉淀提取产

物中显著差异代谢物为 1 303 种 (上调: 1 021 种; 下调: 282 种), 乙酸乙酯萃取提取物中显著差异代谢物为 1 280 种 (上调: 1 050 种; 下调: 230 种), 氯仿萃取提取物的显著差异代谢物为 1 394 种 (上调: 1 274 种; 下调: 120 种) (图 7)。

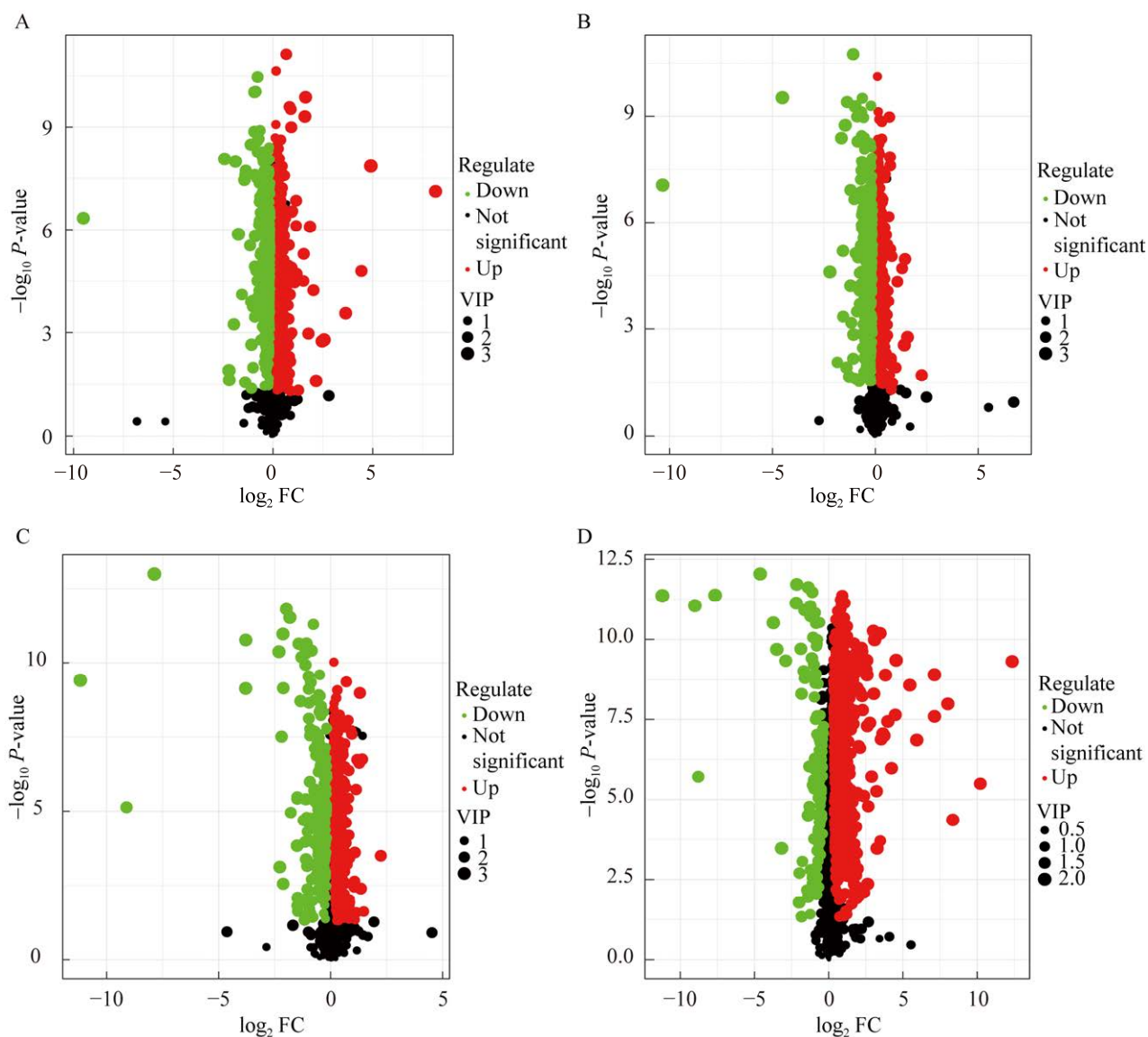


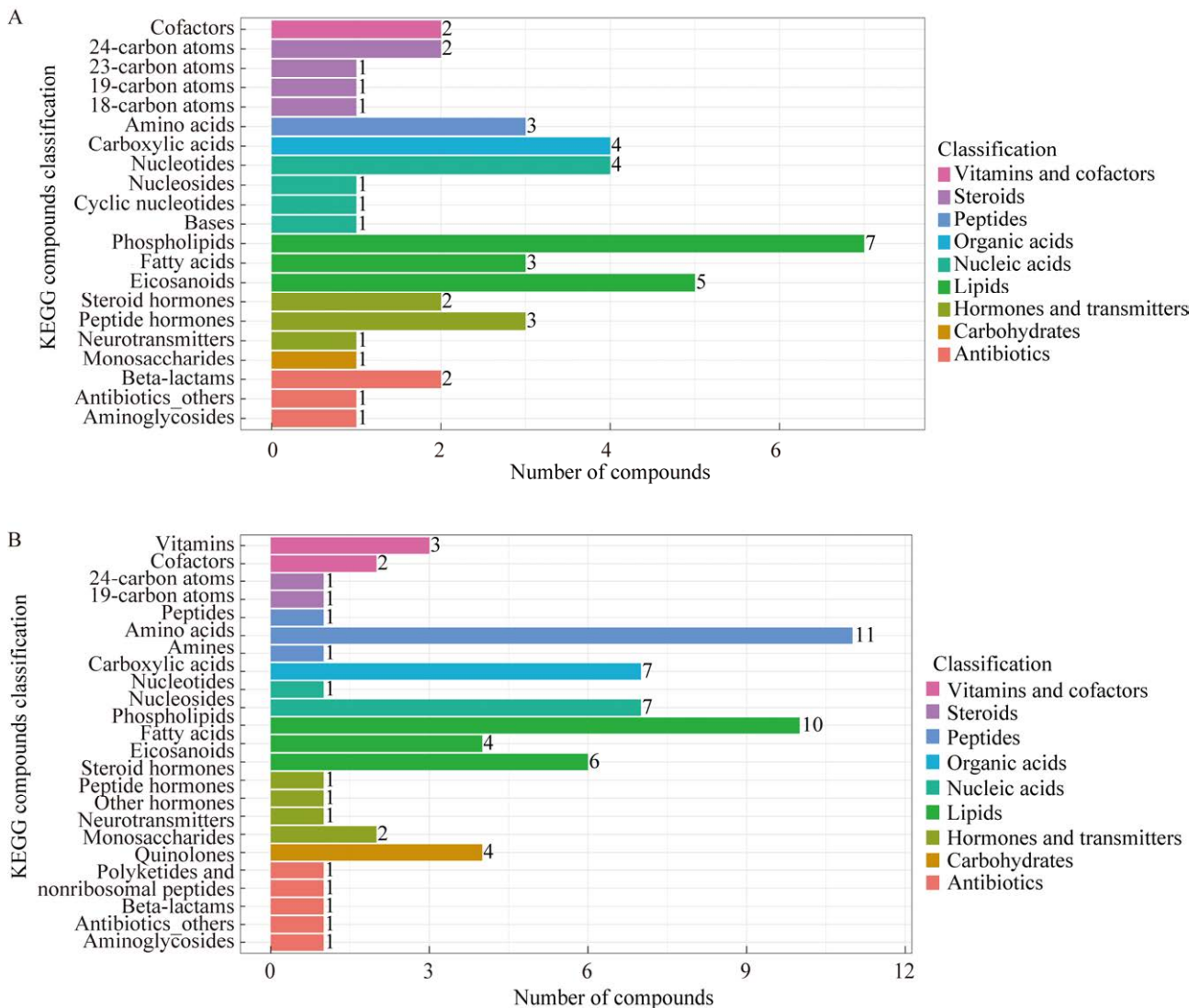
图 7 BspiL6 菌株和 Bspi2104 菌株差异代谢物火山图

Figure 7 Volcano plot of differential metabolites of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 and BspiL6. A: Differential metabolites of 70% ammonium sulfate precipitated extracts. B: Differential metabolites of acid precipitation extracts. C: Differential metabolites of ethyl acetate extracted extracts. D: Differential metabolites of chloroform extracted extracts.

将菌株 Bspi2104 和 BspiL6 的 4 种提取产物中的显著差异代谢物进行 KEGG 分类, 这些代谢物主要归属于以下类别: 维生素和辅因子、甾体、有机酸、核酸、脂类、激素和递质、糖类、抗生素类差异代谢物分类。具体而言, 这些显著差异代谢物主要包含花生四烯酸、硫酸新霉素、亚胺培南、四氢叶酸、维生素 K1、白三烯 C4 和多种氨基酸类物质等(图 8)。

将菌株 BspiL6 和 Bspi2104 的 4 种提取产物中的显著下调差异代谢物在 HMDB 数据库中注释获得相关差异代谢物的分类信息, 将差异代谢

物数量最多的前 20 种类别作图如下, 区域面积的大小表示各分类中代谢物的相对比例(图 9)。结果表明, 4 种提取产物中显著下调差异代谢物主要分属于羧酸及其衍生物、脂肪酸类、有机含氮化合物、有机含氮化合物、甾体及其衍生物、孕烯醇酮脂类、酚类、生物碱及其衍生物、甘油磷脂类、异黄酮类、苯及其取代衍生物等 37 类。菌株 Bspi2104 与菌株 BspiL6 中同种提取方式下提取产物的差异代谢物数量最多的前 3 种物质类别依次为: 70%硫酸铵沉淀提取物, 包括羧酸及其衍生物类(29.35%)、脂肪酸类(7.61%)、有机



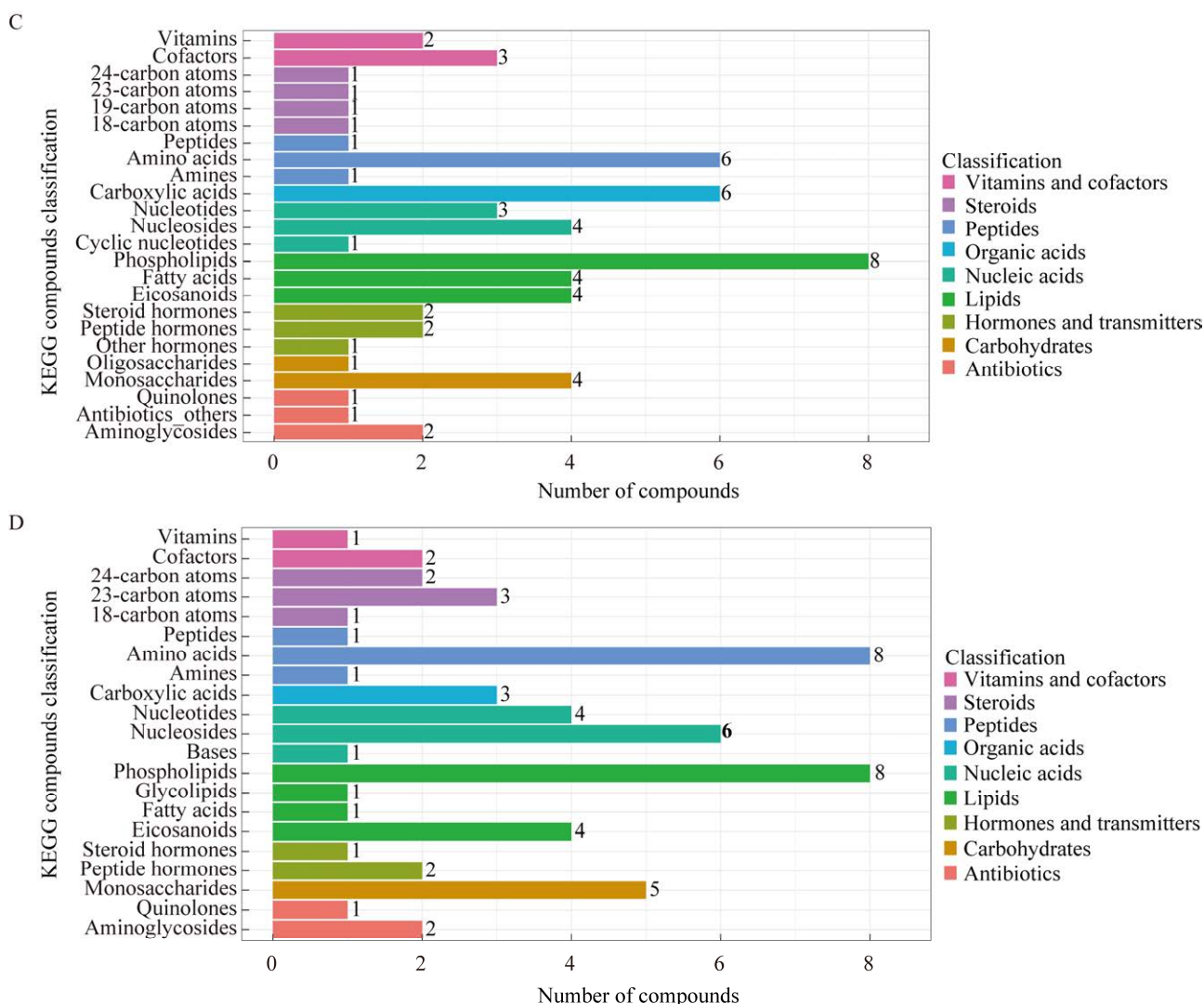


图 8 差异代谢物 KEGG 分类图

Figure 8 KEGG classification of differential metabolites of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 and BspiL6. A: Differential metabolites of 70% ammonium sulfate precipitated extracts. B: Differential metabolites of acid precipitation extracts. C: Differential metabolites of ethyl acetate extracted extracts. D: Differential metabolites of chloroform extracted extracts.

含氧化合物(7.61%); 酸沉淀提取物, 包括羧酸及其衍生物(34.48%)、脂肪酸类(15.09%)、有机含氮化合物(8.62%); 乙酸乙酯萃取提取物, 包括羧酸及其衍生物(23.20%)、脂肪酸类(11.05%)、孕烯醇酮脂类(9.94%); 氯仿萃取提取物, 包括羧酸及其衍生物(21.21%)、有机含氮化合物(13.13%)、脂肪酸类(7.07%)。其中羧

酸及其衍生物、脂肪酸类、有机含氧化合物、孕烯醇酮脂类和甾体及其衍生物这 5 类物质最多, 占比为 59.62%, 包括科罗索酸、莪术酮、柠檬苦素、胆绿素和惕格酸等多种物质。通过对 4 种提取方式下的共有差异代谢物进行比较分析, 其共有的差异代谢物有 35 种, 包括苦参素、表面活性素 B 等抑菌物质(表 3)。





表 3 共有差异代谢物

Table 3 Common differential metabolites

Metabolite	Retention time (min)	VIP	FC	P-value
Fenpyroximate	5.91	1.90	0.69	<0.01
1-hydroxytrimazosin	5.91	1.87	0.75	<0.01
Cyclolinopeptide A	6.44	1.63	0.77	<0.01
PS (DiMe(13,5)/DiMe (13,5))	6.44	2.32	0.55	<0.01
Taraxacoside	5.34	1.49	0.71	<0.01
Acetophenone, 4'-hydroxy-3'-methoxy-2-(2-piperidyl)-	5.53	1.77	0.76	<0.01
Mascaroside	5.71	2.17	0.47	<0.05
(S)-(4-hydroxy-phenyl)-(S)-piperidin-2-yl-acetic acid methyl ester hydrochloride	5.87	2.62	0.46	<0.01
Fursultiamine	5.53	2.41	0.50	<0.01
N-palmitoyl serine	6.53	1.63	0.74	<0.01
Kurarinone	5.93	2.00	0.74	<0.01
Ketotrexate	6.05	1.05	0.89	<0.01
L-alanine, 3-(((3-(4-(aminoiminomethyl)phenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl)acetyl)amino)-N-(butoxycarbonyl)-, (R)-	5.90	2.28	0.63	<0.01
Histidylglycine	5.74	2.89	0.54	<0.01
Ximoprofen	5.87	1.50	0.81	<0.01
Cyclohexaneundecanoic acid	6.20	1.88	0.68	<0.01
Dehydromonocrotaline	6.07	2.72	0.47	<0.01
Glabric acid	6.38	2.11	0.66	<0.01
Na-hexanoyl-Nb-inosityltryptophan	5.87	1.83	0.76	<0.01
4-hydroxytoremifene	5.55	1.89	0.75	<0.01
Normetanephine	5.63	2.07	0.64	<0.01
Glutamine-betaxanthin	5.72	2.65	0.37	<0.01
(2E)-tetradec-2-enediolcarnitine	5.60	3.10	0.22	<0.05
Ligusticide	5.71	2.43	0.52	<0.01
$\beta$ -D-xylopyranosyl-(1->4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1->2)-L-arabinose	5.53	2.31	0.59	<0.01
Nimodipine	5.71	2.69	0.48	<0.01
Dukunolide D	5.92	2.21	0.53	<0.01
7-aminomethyl-7-carbaguanine	5.88	2.85	0.22	<0.05
N-myristoyl glutamine	6.42	1.51	0.76	<0.01
Xi-2,2,6-trimethyl-1,4-cyclohexanedione	4.35	1.79	0.63	<0.01
5-(4-methyl-5-Oxo-2H-Furan-3-Yl) pentanoic acid	4.35	1.10	0.82	<0.01
Benazepril	5.91	2.52	0.56	<0.01
Surfactin B	6.78	2.24	0.69	<0.01
Petasitenine	6.24	2.28	0.34	<0.01
(2S,3R)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-[[[(2S)-2-pyrrolidin-1-ylpropyl]oxy]phenyl]-2,3-dihydro-1,4-benzoxathiin-6-OL	5.54	1.85	0.67	<0.01

差异代谢物 MetPA 分析结果表明, Bspi2104 和 BspiL6 菌株 70%硫酸铵沉淀产物中的差异代谢物主要分布在 84 条代谢通路中, 影响最大的通路为叶酸一碳库(one carbon pool by folate)、亚油酸代谢(linoleic acid metabolism)、色氨酸代谢

(tryptophan metabolism)、花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism)通路。BspiL6 和 Bspi2104 菌株硫酸沉淀产物中的差异代谢物主要分布在 110 条代谢

通路中,影响最大的通路为叶酸一碳库、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、色氨酸代谢、花生四烯酸代谢、咖啡因代谢(caffeine metabolism)通路。BspiL6 和 Bspi2104 菌株乙酸乙酯萃取产物中的差异代谢物主要分布在 106 条代谢通路中,影响最大的通路为叶酸一碳库、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成(flavone and

flavonol biosynthesis)、烟酸和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)通路。BspiL6 和 Bspi2104 菌株氯仿萃取中的差异代谢物主要分布在 87 条代谢通路中,影响最大的通路为叶酸一碳库、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、色氨酸代谢、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)和咖啡因代谢通路中(图 10)。综上,

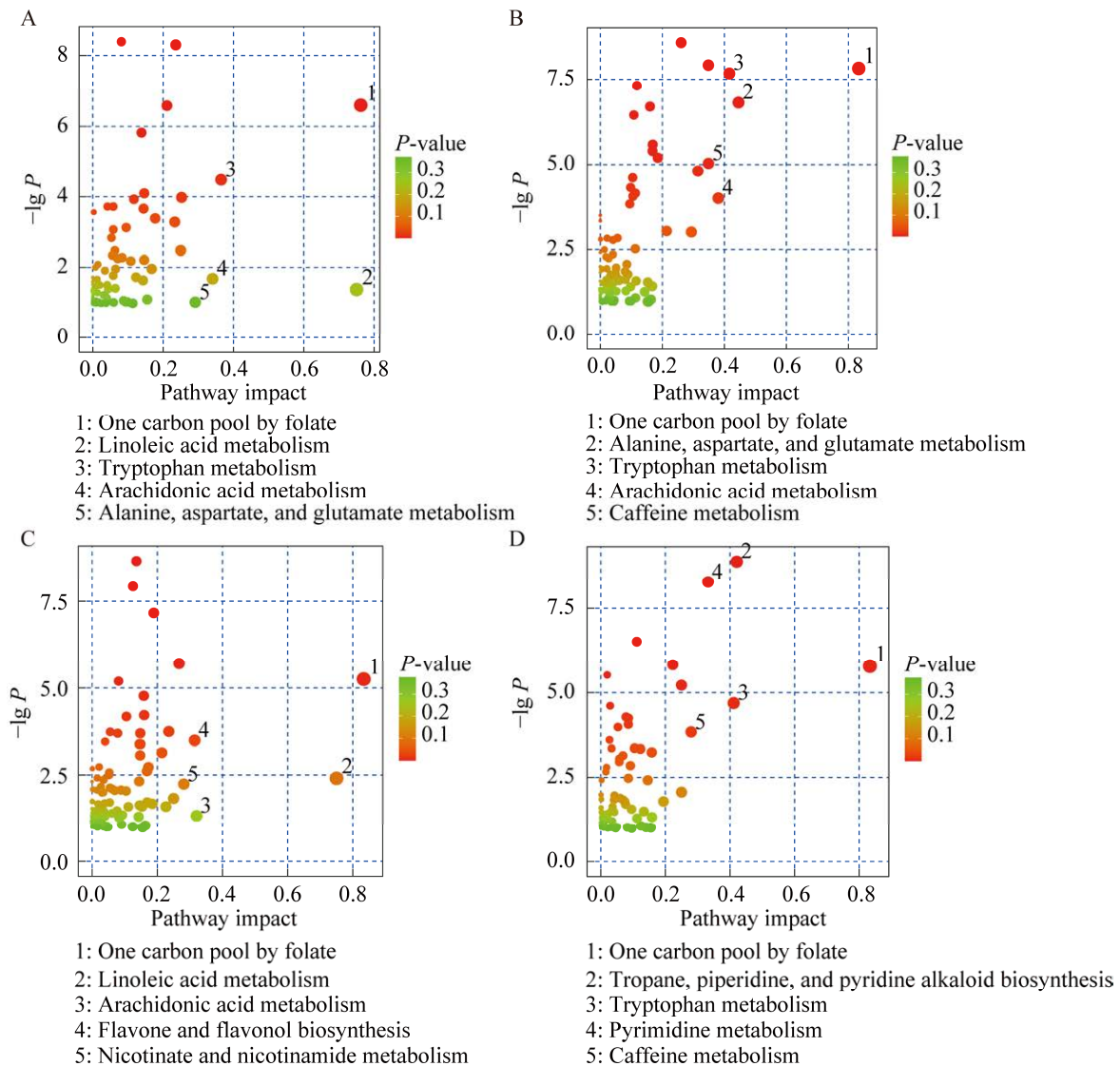


图 10 KEGG 拓扑学分析气泡图

Figure 10 KEGG topology analysis bubble plot of differential metabolites of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* strain Bspi2104 and BspiL6. A: Differential metabolites of 70% ammonium sulfate precipitated extracts. B: Differential metabolites of acid precipitation extracts. C: Differential metabolites of ethyl acetate extracted extracts. D: Differential metabolites of chloroform extracted extracts.



Bspi2104 菌株抑菌活性物质的产生可能与多种氨基酸的代谢和脂肪酸代谢、叶酸—碳库、烟酸和烟酰胺代谢、嘧啶代谢、黄酮和黄酮醇的生物合成密切相关。

### 3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌具有稳定性强、抗逆性强和抗菌性能好等特性,主要通过分泌抗菌蛋白、脂肽类等抑菌活性物质对病原菌进行拮抗,其抗菌活性物质具有一定的稳定性和环境适应能力<sup>[2,13,24]</sup>。Wu 等<sup>[25]</sup>研究发现,枯草芽孢杆菌 UV254-B 的抗菌物质对蛋白酶 K 和脂肪酶敏感,但对酯酶具有抗性,在 pH 值为 3.0–11.0 时均显示出抑菌活性,而且在 pH 值为 9.0 时活性最大,即使在温度为 80 °C 下时仍有抗菌活性。Lee 等<sup>[26]</sup>从枯草芽孢杆菌 SC-8 中分离出一种对蜡样芽孢杆菌有良好拮抗作用的活性物质,经纯化其抑菌活性物质的 pH 稳定性范围较宽,为 pH 4.0–10.0,在 pH 10.0 时仍有抑菌活性,该物质在 60 °C 以下具有热稳定性,蛋白酶 K、蛋白酶和脂肪酶处理后抑菌活性下降。Lee 等<sup>[27]</sup>纯化并鉴定了源自枯草芽孢杆菌 SN7 的细菌素,这一抑菌活性物质在 pH 值为 3.0–9.0、加热和有机溶剂(甲醇、乙醇、乙腈和丙酮溶液)处理下均展现出卓越的稳定性,经蛋白酶和肽酶处理后丧失抑菌活性,而经  $\alpha$ -淀粉酶或脂肪酶处理后仍有抑菌活性。本研究对枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外代谢产物的抑菌稳定性进行研究,经胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、蛋白酶 K、胃蛋白酶和脂肪酶处理后的胞外产物的抑菌活性无显著变化,60 °C 下仍有抑菌活性,pH 值在 1.0–11.0 范围内处理后的胞外产物仍有较强的抑菌活性,紫外照射处理 3 h 与未处理的胞外产物相比无明显差异,表明广谱拮抗芽孢杆菌 Bspi2104 的抗菌活性物质类别丰富且理化稳定性较强。

枯草芽孢杆菌在生长代谢过程中会产生很多种类的抑菌活性物质,这些抑菌物质的产生是枯草芽孢杆菌表现较高抑菌活性和较广抑菌谱的主要原因之一<sup>[15,28–29]</sup>。Karagiota 等<sup>[30]</sup>通过硫酸铵沉淀、有机溶剂沉淀、硫酸铵沉淀上清液有机溶剂萃取这 3 种方式对枯草芽孢杆菌 NCIB 3610 菌株进行纯化后发现,3 种方式下的提取产物对粪肠球菌均有抑制效果,其中 70%硫酸铵沉淀产物的抑菌率最高,约为 74.5%,进一步研究发现其抑菌活性物质主要为抗菌肽。Jiang 等<sup>[20]</sup>对从养殖水体中分离出的对副溶血弧菌具有抑制作用的枯草芽孢杆菌 B.HLJ1 发酵上清液进行了乙酸乙酯萃取,通过进一步纯化和 LC/MS 检测分析表明,此抑菌物质为异香豆素类化合物。Chakraborty 等<sup>[31]</sup>对嗜水气单胞菌、创伤弧菌和副溶血弧菌均具有抑制作用的广谱拮抗枯草芽孢杆菌 MTCC 10407 进行了研究,从该菌株的乙酸乙酯提取物中分离了两种新的属于聚酮来源的抑菌化合物。Li 等<sup>[32]</sup>对枯草芽孢杆菌 N-2 固态发酵得到的发酵产物进行了水提、酸沉淀、甲醇萃取后,通过 LC-MS/MS 鉴定得到了一种对恶臭假单胞菌具有抑制作用的脂肽类物质。本研究通过硫酸铵沉淀、酸沉淀、乙酸乙酯萃取和氯仿萃取 4 种方式对枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 的胞外抑菌代谢产物进行了提取,结果显示 4 种提取产物对坎氏弧菌、美人鱼发光杆菌、副溶血弧菌和哈维氏弧菌均表现出抑菌活性,说明菌株的胞外产物中可能包含蛋白类、脂肽类和极性有机物质等多种类型的抑菌活性物质。

代谢物的鉴定通常采用核磁共振波谱法、质谱法和色谱质谱联用法,其中色谱质谱联用技术由于其具有分析范围广、分辨率高、定性和定量效果好和重复性好等优势被广泛应用于物质的鉴定<sup>[33–34]</sup>。Qin 等<sup>[35]</sup>通过有机溶剂萃取和反相高

效液相色谱相结合的方法从枯草芽孢杆菌 TD7 中分离到了一株新的微生物脂肽表面活性素家族成员, 并通过 LC-MS/MS、GC-MS 等多种分析检测技术确定了其化学结构, 最终鉴定为表面活性素 C17, 其对革兰氏阳性微球菌具有良好的抑菌效果, 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为 60 mg/L。Lv 等<sup>[36]</sup>从南美白对虾池塘中分离到了一株对副溶血弧菌 VP02r 具有抑制活性的枯草芽孢杆菌 JK08 菌株, 其对副溶血弧菌 VP02r 的抑菌圈直径大于多种常用抗生素, LC-MS 分析结果表明, 该抗菌物质中存在表面活性素(C12-C17)、伊枯菌素 A (C14-C17)、丰原素 A (C14-C17)和 B (C17) 3 种脂肽类化合物, 这可能是导致枯草芽孢杆菌 JK08 菌株具有拮抗活性的关键成分。Knight 等<sup>[8]</sup>研究发现一株对多种真菌具有明显抑制作用的枯草芽孢杆菌沙漠亚种 HU Biol-II, 通过基因组学技术挖掘出了 8 个生物活性代谢产物簇, 对菌株发酵上清液进行 HPLC-MS/MS 检测, 确定了其中产生了 7 种抑菌代谢物。本研究对枯草芽孢杆菌 Bspi2104 菌株的胞外代谢产物粗提后进行 LC-MS/MS 检测, 结果显示显著差异代谢物中羧酸及其衍生物、脂肪酸类、有机含氧化合物、孕烯醇酮脂类和甾体及其衍生物这 5 类物质占比约 60%, 为菌株的可能抑菌物质类型。结合抑菌产物特性, 共有差异代谢物中 kurarinone、surfactin B 等已有抑菌相关报道<sup>[37-38]</sup>, 这些物质可能为枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 的抑菌活性物质, 值得我们进一步关注。

综上所述, 本研究对具有广谱拮抗作用的枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外代谢产物的理化特性及其抗菌活性组分进行了研究, 结果表明枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 的胞外产物的理化稳定性较好, 在多种蛋白酶和脂肪酶、-20-60 °C、pH 1.0-11.0 和紫外照射 3 h 处理下

仍然具备较高的抑菌活性。对枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 的胞外代谢产物通过硫酸铵沉淀、盐酸沉淀甲醇抽提、乙酸乙酯萃取和氯仿萃取后的产物均有抑菌活性, 其中 70%硫酸铵沉淀产物和乙酸乙酯萃取产物抑菌效果最好。LC-MS/MS 检测结果表明菌株可能具有羧酸及其衍生物、脂肪酸类、有机含氧化合物、孕烯醇酮脂类和甾体及其衍生物等 37 类物质, 包括 kurarinone、surfactin B 等多种已有报道的抑菌物质。研究初步揭示了枯草芽孢杆菌斯氏亚种 Bspi2104 胞外抑菌活性物质及其理化稳定性, 相关研究结果为芽孢杆菌抑菌活性组分的发现和筛选提供了理论基础, 相关代谢产物具有一定的研究前景。

## 参考文献

- [1] SHAO YT, WANG YP, YUAN YW, XIE YJ. A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 798: 149205.
- [2] RANJIT KUMAR N, RAMAN RP, JADHAO SB, BRAHMCHARI RK, KUMAR K, DASH G. Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879)[J]. *Aquaculture International*, 2013, 21(2): 387-403.
- [3] 王凯, 杨华, 王路英, 沈娟娟. 芽孢杆菌在水产养殖中的应用研究进展[J]. *当代水产*, 2021, 46(2): 74-77. WANG K, YANG H, WANG LY, SHEN JJ. Research progress on application of *Bacillus* in aquaculture[J]. *Current Fisheries*, 2021, 46(2): 74-77 (in Chinese).
- [4] CHENG AC, LIN HL, SHIU YL, TYAN YC, LIU CH. Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal and its use for preventing *Vibrio* infection in shrimp aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 270-279.
- [5] DUNLAP CA, BOWMAN MJ, ZEIGLER DR. Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis*

- subsp. *stercoris* to species status[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(1): 1-12.
- [6] ELSHARKAWY MM, ELSAWY MM, ISMAIL IA. Mechanism of resistance to cucumber mosaic virus elicited by inoculation with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*[J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(1): 86-94.
- [7] GUILLÉN-NAVARRO K, LÓPEZ-GUTIÉRREZ T, GARCÍA-FAJARDO V, GÓMEZ-CORNELIO S, ZARZA E, de la ROSA-GARCÍA S, CHAN-BACAB M. Broad-spectrum antifungal, biosurfactants and bioemulsifier activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*-a potential biocontrol and bioremediation agent in agriculture[J]. *Plants*, 2023, 12(6): 1374.
- [8] KNIGHT CA, BOWMAN MJ, FREDERICK L, DAY A, LEE C, DUNLAP CA. The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain[J]. *Microbiological Research*, 2018, 216: 40-46.
- [9] YE J, FUGABAN JII, DIOSO CM, VAZQUEZ BUCHELI JE, CHOI GH, KIM B, HOLZAPFEL WH, TODOROV SD. *Bacillus* strains isolated from Korean fermented food products with antimicrobial activity against *Staphylococci*, an alternative for control of antibiotic-resistant pathogens[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2023, 20(7): 279-293.
- [10] VACA J, ORTIZ A, SANSINENEA E. *Bacillus* sp. bacteriocins: natural weapons against bacterial enemies[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2022, 29(12): 2093-2108.
- [11] ZHANG D, QIANG R, ZHAO J, ZHANG JL, CHENG JN, ZHAO DM, FAN YN, YANG ZH, ZHU JH. Mechanism of a volatile organic compound (6-methyl-2-heptanone) emitted from *Bacillus subtilis* ZD01 against *Alternaria solani* in potato[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 808337.
- [12] EREGA A, STEFANIC P, DOGSA I, DANEVČIČ T, SIMUNOVIC K, KLANČNIK A, SMOLE MOŽINA S, MANDIC MULEC I. Bacillaene mediates the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(12): e0295520.
- [13] SHARMA G, DANG S, GUPTA S, GABRANI R. Antibacterial activity, cytotoxicity, and the mechanism of action of bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101[J]. *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 2018, 27(2): 186-192.
- [14] PINKAS D, FIŠER R, KOZLÍK P, DOLEJŠOVÁ T, HRYZÁKOVÁ K, KONOPÁSEK I, MIKUŠOVÁ G. *Bacillus subtilis* cardiolipin protects its own membrane against surfactin-induced permeabilization[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2020, 1862(10): 183405.
- [15] KAI M. Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 559.
- [16] SABER WIA, GHONEEM KM, AL-ASKAR AA, RASHAD YM, ALI AA, RASHAD EM. Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato[J]. *Acta Biologica Hungarica*, 2015, 66(4): 436-448.
- [17] RAJER FU, WU HJ, XIE YL, XIE SS, RAZA W, TAHIR HAS, GAO XW. Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato[J]. *Microbiology*, 2017, 163(4): 523-530.
- [18] LUO Y, SUN LF, ZHU Z, RAN W, SHEN QR. Identification and characterization of an anti-fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* protease from the *Bacillus subtilis* strain N7[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(3): 359-366.
- [19] 姜向弟, 周强, 贺江, 张向向, 王永慧, 熊建华, 郝彦彦. 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 XD, ZHOU Q, HE J, ZHANG XX, WANG YH, XIONG JH, GAO YY. Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(3): 935-949 (in Chinese).
- [20] JIANG N, HONG B, LUO K, LI YM, FU HX, WANG JF. Isolation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* with anti-*Vibrio parahaemolyticus* activity and identification of the anti-*Vibrio parahaemolyticus* substance[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(7): 1667.
- [21] 张杨. 广谱性拮抗重要病原菌的益生菌复方筛选及应用效果研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2023.
- ZHANG Y. Study on the screening and application effect of probiotic compound for broad-spectrum antagonism of important pathogens[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2023 (in Chinese).

- [22] 熊静, 赖晓健, 余钦, 郭松林, 徐继松, 黄文树. 7株鳗鲡致病性气单胞菌毒力基因胞外产物及其活性比较[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(1): 76-85.  
XIONG J, LAI XJ, YU Q, GUO SL, XU JS, HUANG WS. Analysis of virulence genes, extracellular products and activities among seven *Aeromonas* strains isolated from eels[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(1): 76-85 (in Chinese).
- [23] ALAJLANI M, SHIEKH A, HASNAIN S, BRANTNER A. Purification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strain BIA[J]. Chromatographia, 2016, 79(21): 1527-1532.
- [24] 许本宏. 暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) JFL15抗菌物质的纯化鉴定及其生物合成途径解析[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2018.  
XU BH. Purification, identification and biosynthesis pathway analysis of antimicrobial compounds produced by *Bacillus siamensis* JFL15[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [25] WU WJ, PARK SM, AHN BY. Isolation and characterization of an antimicrobial substance from *Bacillus subtilis* BY08 antagonistic to *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(2): 433-440.
- [26] LEE NK, YEO IC, PARK JW, KANG BS, HAHM YT. Isolation and characterization of a novel analyte from *Bacillus subtilis* SC-8 antagonistic to *Bacillus cereus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(3): 298-303.
- [27] LEE SG, CHANG HC. Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7[J]. LWT Food Science & Technology, 2018, 87: 8-15.
- [28] 姜北辰, 贺凯茹, 杨姗姗, 李欣霏, 包雨飞, 杨慧, 武俊瑞. 枯草芽孢杆菌抑菌成分研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2023, 46(2): 35-41.  
JIANG BC, HE KR, YANG SS, LI XF, BAO YF, YANG H, WU JR. Advances in the study of bacteriostatic substances from *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2023, 46(2): 35-41 (in Chinese).
- [29] KASPAR F, NEUBAUER P, GIMPEL M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review[J]. Journal of Natural Products, 2019, 82(7): 2038-2053.
- [30] KARAGIOTA A, TSITSOPOULOU H, TASAKIS RN, ZOUMPOURTIKOUDI V, TOURAKI M. Characterization and quantitative determination of a diverse group of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 antibacterial peptides[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2021, 13(2): 555-570.
- [31] CHAKRABORTY K, THILAKAN B, CHAKRABORTY RD, RAOLA VK, JOY M. O-heterocyclic derivatives with antibacterial properties from marine bacterium *Bacillus subtilis* associated with seaweed, *Sargassum myriocystum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 569-583.
- [32] LI M, MOU HJ, KONG Q, ZHANG T, FU XD. Bacteriostatic effect of lipopeptides from *Bacillus subtilis* N-2 on *Pseudomonas putida* using soybean meal by solid-state fermentation[J]. Marine Life Science & Technology, 2020, 2(2): 172-180.
- [33] VIANT MR, KURLAND IJ, JONES MR, DUNN WB. How close are we to complete annotation of metabolomes?[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2017, 36: 64-69.
- [34] YU MQ, ZHU Y, CONG QW, WU CY. Metabonomics research progress on liver diseases[J]. Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2017, 2017: 8467192.
- [35] QIN WQ, FEI D, ZHOU L, GUO YJ, AN S, GONG OH, WU YY, LIU JF, YANG SZ, MU BZ. A new surfactin-C<sub>17</sub> produced by *Bacillus subtilis* TD7 with a low critical micelle concentration and high biological activity[J]. New Journal of Chemistry, 2023, 47(16): 7604-7612.
- [36] LV R, LI B, XIAO Y, ZHANG JW, MAI YL, HU XY, CHEN JZ. Isolation and characterization of a lipopeptide-producing *Bacillus* sp. strain JK08 with antagonistic activity against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(4): lxad084.
- [37] SON GH, KIM J, MUTHAIYA MJ, LEE S, KIM HY, LEE CH. Antimicrobial compounds profile during *Cheonggukjang* fermentation against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(11): 1147-1150.
- [38] 郭斯崖, 郑慧芳, 张森, 蔡静, 王鑫彤, 郭雷. 苦参抗水产病原哈氏弧菌活性物质的提取、鉴定及作用机制[J]. 水产学杂志, 2023, 36(4): 29-37.  
GUO SY, ZHENG HF, ZHANG M, CAI J, WANG XT, GUO L. Extraction, identification and mechanism of action of antibacterial substances of Chinese herb medicine *Sophora flavescens* against aquatic pathogen *Vibrio harveyi*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2023, 36(4): 29-37 (in Chinese).