

# 贝莱斯芽孢杆菌 K3 抗尖孢镰孢菌的特征及其作用机理

梁静娴, 刘唤明\*, 邓楚津\*, 周春霞, 洪鹏志

广东海洋大学 食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省现代农业科技创新中心,  
广东 湛江

梁静娴, 刘唤明, 邓楚津, 周春霞, 洪鹏志. 贝莱斯芽孢杆菌 K3 抗尖孢镰孢菌的特征及其作用机理[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2576-2589.

LIANG Jingxian, LIU Huanming, DENG Chujin, ZHOU Chunxia, HONG Pengzhi. Antagonistic characteristics and mechanism of *Bacillus velezensis* K3 against *Fusarium oxysporum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2576-2589.

**摘要:** 【目的】尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)是一种能引起植物枯萎病的真菌病原菌, 严重危害植物生长, 因此采用合适且绿色的生物方法进行防治十分必要。【方法】利用点菌法从红树林土壤中筛选出对尖孢镰孢菌有拮抗作用的海洋芽孢杆菌, 并通过生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析对该芽孢杆菌进行鉴定。提取并探究其抑菌物质对尖孢镰孢菌的体外生物防治活性及作用机制。【结果】从红树林土壤中筛选出一株对尖孢镰孢菌具有强拮抗活性的芽孢杆菌 K3。通过生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析鉴定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。菌株 K3 分泌的抗真菌物质具有广谱抗菌特性, 对细菌和真菌均有效, 该物质可能为蛋白或多肽类, 具有良好的热稳定性, 对尖孢镰孢菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)为 1 mg/mL, 能够显著抑制孢子萌发, 可导致尖孢镰孢菌胞内的电解质、核酸和蛋白外泄。在 3×MIC 浓度下处理尖孢镰孢菌孢子 10 h 后, 孢子萌发抑制率为 49.85%。经处理的尖孢镰孢菌菌丝细胞完整性受损, 细胞膜稳态失衡, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加, 膜内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性提升。【结论】从海洋源红树林筛选出的贝莱斯芽孢杆菌 K3 产生的抗真菌物质抑菌谱广, 对尖孢镰孢菌有较强抑制活性, 具有潜在的商业应用价值。

**关键词:** 抗真菌; 芽孢杆菌; 作用机理; 抑菌活性; 尖孢镰孢菌

资助项目: 湛江市科技计划(2020A02006)

This work was supported by the Zhanjiang Science and Technology Program (2020A02006).

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Huanming, liu241253@gdou.edu.cn; DENG Chujin, chujind@163.com

Received: 2025-02-06; Accepted: 2025-04-18; Published online: 2025-05-12

## Antagonistic characteristics and mechanism of *Bacillus velezensis* K3 against *Fusarium oxysporum*

LIANG Jingxian, LIU Huanming\*, DENG Chujin\*, ZHOU Chunxia, HONG Pengzhi

Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Guangdong Modern Agricultural Science and Technology Innovation Center, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong, China

**Abstract:** [Objective] *Fusarium oxysporum* is a fungal pathogen that causes plant wilt, severely affecting plant growth. Therefore, it is necessary to use appropriate and environmentally friendly biological methods for control of this pathogen. [Methods] We employed the point inoculation method to isolate a marine *Bacillus* strain antagonistic to *Fusarium oxysporum* from mangrove soil. The *Bacillus* strain was identified based on physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. The antifungal substance was extracted from the fermentation supernatant, and the inhibitory activity and mechanism of the substance against *Fusarium oxysporum* were evaluated *in vitro*. [Results] A *Bacillus* strain with strong antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* was isolated from mangrove soil and identified as *Bacillus velezensis*. The antifungal substance secreted by strain K3 exhibited broad-spectrum antimicrobial properties, being effective against both bacteria and fungi. This substance was likely a protein or peptide and had good thermal stability. It showed the minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/mL against *Fusarium oxysporum*, significantly inhibiting spore germination and causing leakage of electrolytes, nucleic acids, and proteins. The treatment with 3×MIC of the antifungal substance for 10 h showed the inhibition rate of 49.85% on the germination of *Fusarium oxysporum* spores. Moreover, the treated *Fusarium oxysporum* hyphal cells showed compromised cell integrity, disrupted membrane homeostasis, increased malondialdehyde content, and enhanced activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase in the membrane. [Conclusion] The antifungal substance produced by *B. velezensis* K3 isolated from mangrove soil of marine origin exhibits a broad antimicrobial spectrum and strong inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*, with potential commercial application value.

**Keywords:** antifungal; *Bacillus*; mechanism; antimicrobial activity; *Fusarium oxysporum*

尖孢镰孢菌是一种能在土壤中传播的植物病原菌, 具有在土壤中长期存活的能力, 难以被彻底清除<sup>[1]</sup>。该菌可导致植物维管束枯萎, 使植物整体呈现枯黄状态, 并能引起植物球茎和根部腐烂, 从而阻碍植物生长<sup>[2]</sup>, 严重影响植物的正常发育和农作物产量, 造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。采用绿色、高效、环境友好且生物安全的

生物防治方法来维护植物生长和食品安全, 更能契合当下人们的生活理念和消费模式。

红树林是热带和亚热带海岸潮间带特有的木本植物群落, 位于陆地与海洋的交界区域, 拥有丰富多样的微生物种群<sup>[4]</sup>。这些微生物在面对极端环境压力、温度波动、高盐度以及微量营养素稀缺等挑战时能够合成多种化合物以适

应恶劣条件,而这些化合物往往具有潜在的商业应用价值<sup>[5-6]</sup>。在微生物群落中,细菌是主要组成部分,其次是真菌,二者共同构成了微生物资源的绝大部分<sup>[7]</sup>。其中,芽孢杆菌作为细菌类群中的优势菌<sup>[8]</sup>,在产生活性物质方面表现出丰富的多样性,这些化合物也具有潜在的商业应用价值。

本研究旨在从红树林土壤和海泥样本中分离并筛选出一株具有抗尖孢镰孢菌活性的芽孢杆菌菌株,因其在自然界中广泛分布且具有产生多种抗真菌代谢物的能力。采用有机试剂萃取法得到抗菌肽粗提物,并对其抑菌机理进行了初步分析和表征。这些研究不仅丰富了我国海洋源红树林微生物资源库,还为开发新型生物防治方法提供了理论基础和技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、尖孢镰孢菌、黄曲霉、黑曲霉、产黄青霉、总状毛霉,所有菌株均购自广东省微生物菌种保藏中心。

### 1.2 主要试剂和仪器

营养琼脂、LB肉汤、PDA、PDB,购自北京陆桥技术股份有限公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;戊二醛、乙酸乙酯,购自西陇科学股份有限公司;愈创木酚,购自上海麦克林生化科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性检测试剂盒,购自北京盒子生工科技有限公司;HBI芽孢杆菌生化鉴定条,购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

### 1.3 拮抗菌株的筛选和鉴定

#### 1.3.1 菌株的分离

以采集自广东省湛江市徐闻县、霞山区、

麻章区以及广西壮族自治区钦州市钦南区的红树林根部泥土和附近海泥作为样品,每种土样取10 g样品与90 mL无菌水煮沸10 min后,混匀冷却,取上层稀释液做梯度稀释至 $10^{-7}$ ,取 $10^{-5}$ – $10^{-7}$ 的稀释液涂布于营养琼脂上,37 °C下倒置培养24 h。观察菌株生长情况,挑取疑似芽孢杆菌的菌株反复划线,纯化出单菌落,并用营养琼脂斜面 and 25%甘油保藏留样。

#### 1.3.2 菌株的初筛

采用点菌法<sup>[9]</sup>初步筛选出抗尖孢镰孢菌的菌株,从斜面中接取尖孢镰孢菌到马铃薯葡萄糖琼脂中,28 °C培养3 d后,用无菌1 mL移液枪枪头在尖孢镰孢菌菌落边缘打孔,用无菌牙签挑取菌块接种到营养琼脂平板中央,倒置于28 °C培养36 h后,挑取菌株点接在距离尖孢镰孢菌菌落边缘1 cm的平板上,于28 °C培养48 h,初步筛选出抑菌能力较强的菌株。

#### 1.3.3 菌株的复筛

用牛津杯法确认菌株发酵上清液的抑菌效果。选择抑菌圈直径大于10 mm的拮抗菌株接入50 mL LB培养基中,37 °C、180 r/min培养12 h得种子液,将种子液按3%比例接入100 mL LB肉汤中,37 °C、180 r/min培养72 h得发酵液,将发酵液4 °C、12 000 r/min离心10 min,取其上清液,用0.22 μm水相滤膜过滤除菌。取100 μL  $1 \times 10^6$  CFU/mL尖孢镰孢菌孢子悬浮液涂布在马铃薯葡萄糖琼脂中,每个牛津杯加入200 μL的发酵上清液,在28 °C培养24 h,测量其抑菌圈大小。

#### 1.3.4 菌株的鉴定

取复筛后的目标菌株在营养琼脂中纯化出单菌落,观察菌落形态并用HBI芽孢杆菌生化鉴定条鉴定。参考赖崇熙等<sup>[10]</sup>的方法,用无菌牙签挑取单菌落进行菌落PCR扩增。以细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')为PCR扩增引物。PCR反应体系(30 μL): 2×MightyAmp Buffer 15 μL, MightyAmp DNA

Polymerase (1.25 U/ $\mu$ L) 0.75  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.75  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.75  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测得的序列通过 NCBI 数据库对比, 采用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

## 1.4 拮抗菌株抗真菌物质活性分析

### 1.4.1 不同提取方法的活性分析

利用有机溶剂萃取法和酸沉淀法初步提取海洋芽孢杆菌的抗真菌物质, 确定最佳提取抗真菌物质的方法。有机溶剂萃取法: 将发酵上清液与乙酸乙酯等体积混合, 置于 36  $^{\circ}$ C、180 r/min 摇床萃取 6 h, 上层有机相使用旋转蒸发仪于 40  $^{\circ}$ C 下蒸干, 下层水相再与乙酸乙酯等体积混合, 步骤重复 3 次, 用去离子水收集残留的浓缩成分, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 使用乙酸乙酯萃取未接菌的 LB 液体培养基作为实验的空白对照。酸沉淀法: 发酵上清液中加入浓盐酸, 调 pH 至 2.0, 4  $^{\circ}$ C 过夜, 4  $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 20 min 后去除上清, 用少量甲醇溶解沉淀, 调节 pH 至 7.0, 10 000 r/min 离心 15 min 后得到的上清液即为含抗菌物质的甲醇溶液, 然后用旋转蒸发仪去甲醇, 并用去离子水收集残留的浓缩成分, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤, 将复溶液于 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。用  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的尖孢镰孢菌孢子悬浮液涂布在 PDA 培养基上, 用同样方法提取未接菌的 LB 液体培养基作为空白对照, 在牛津杯中加入 200  $\mu$ L 不同方法的提取液测定抗菌活性, 于 28  $^{\circ}$ C 培养 2 d, 观察抑菌圈大小, 确定提取活性菌抗真菌物质的最佳方法。

### 1.4.2 温度和蛋白酶对抗真菌物质稳定性的影响

将 1.4.1 节最佳方法提取的抗真菌物质浓缩后, 将粗提液放入离心管密封, 分别置于 25、45、75、100、121  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 随后将离心管插入冰上降温至 4  $^{\circ}$ C, 采用牛津杯法测定其

抗真菌活性, 以 4  $^{\circ}$ C 未经加热处理的粗提液作为对照。蛋白酶敏感实验需先将粗提液的 pH 调整为蛋白酶最适 pH, 然后分别加入木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶处理粗提液, 至酶反应终浓度为 10 mg/mL, 50  $^{\circ}$ C 恒温水浴 4 h 后, 调回原粗提液 pH。用牛津杯法测定其抗真菌活性, 以不加蛋白酶的粗提液作为空白对照。

### 1.4.3 抑菌谱测定

利用牛津杯法测定抗真菌物质对不同细菌和真菌的抑菌活性。

### 1.4.4 最小抑菌浓度的测定

测定粗提液对尖孢镰孢菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), 首先将尖孢镰孢菌孢子悬浮液加入灭菌的尚未凝固的 PDA 培养基中, 使其终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL, 混合均匀后将其倒入无菌平皿中。同时将冻干后的粗提液用无菌水分别制得终浓度为 0、1、2、4、8、16、32 和 64 mg/mL 的溶液, 并取 100  $\mu$ L 分别注入牛津杯中。将平板冷藏于 4  $^{\circ}$ C 中, 使粗提液在培养基中预先扩散 4 h, 随后将平板转移至 37  $^{\circ}$ C 的培养箱中培养 48 h, 并以无菌水作为对照, 观察尖孢镰孢菌生长及抑制效果。出现抑菌圈的组分里所使用的粗提液的最低浓度即为该粗提液对尖孢镰孢菌菌丝生长的最小抑制浓度。

## 1.5 抗真菌物质作用机理

### 1.5.1 对尖孢镰孢菌孢子细胞损伤试验

向尖孢镰孢菌孢子悬浮液加入粗提液使其最终浓度为  $1 \times \text{MIC}$  和  $3 \times \text{MIC}$ , 以无菌水为空白对照, 在 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养, 每隔 30 min 取 1 次样, 在 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 0.22  $\mu$ m 无菌滤膜过滤后用电导率仪测量上清液电导率的变化。

参考李天溪等<sup>[1]</sup>的实验方法, 用紫外分光光度计分别测定试验组及对照组孵育前后培养上清液在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值, 依据公式(1)和(2)计算, 评估经抗真菌物质粗提液

处理后尖孢镰孢菌孢子细胞核酸和蛋白质的相对泄漏程度。

$$\text{核酸泄漏度} = \Delta OD_{260}(\text{前}) - \Delta OD_{260}(\text{后}) \quad (1)$$

$$\text{蛋白泄漏度} = \Delta OD_{280}(\text{前}) - \Delta OD_{280}(\text{后}) \quad (2)$$

### 1.5.2 对尖孢镰孢菌孢子萌发的影响

精确移取 10  $\mu\text{L}$   $1 \times 10^6$  CFU/mL 孢子悬浮液与等体积  $1 \times \text{MIC}$  和  $3 \times \text{MIC}$  浓度抗菌粗提液混匀, 悬滴法置于无菌凹玻片中央, 凹玻片下面放置湿润的无菌滤纸,  $30^\circ\text{C}$  恒温培养。分别在 2、4、6、8、10 h 时在光学显微镜下观察孢子萌发情况, 每次处理在低倍镜下随机检查 100 个孢子, 按照公式计算出孢子萌发率和孢子萌发抑制率。以 10  $\mu\text{L}$  孢子悬浮液与等体积 PDB 混合作为对照, 每个处理 3 次重复。

$$\text{孢子萌发率} = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{萌发总数}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{孢子抑制率} = \frac{\text{对照组孢子萌发率} - \text{处理组孢子萌发率}}{\text{对照组孢子萌发率}} \times 100\% \quad (4)$$

### 1.5.3 对尖孢镰孢菌菌丝完整性的影响

取 1 mL 尖孢镰孢菌孢子悬浮液放入装有 5 mL PDB 培养基的 50 mL 离心管中, 在  $30^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 d 后, 分别加入粗提液使培养液终浓度为  $1 \times \text{MIC}$  和  $3 \times \text{MIC}$ , 继续培养 24 h 后取样观察菌丝形态。取样时去除培养基, 并用 PBS 缓冲液清洗 3 遍后备用。

将少量菌丝置于 1.5 mL EP 管中, 先用 0.01 g/L 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)溶液在  $30^\circ\text{C}$  下避光染色 20 min, 然后用 PBS 缓冲液清洗至无色, 最后分散菌丝并制作样本片, 以便在荧光显微镜下观察。

### 1.5.4 对尖孢镰孢菌菌丝细胞死亡的影响

参考刘奎<sup>[12]</sup>的测定方法, 取少许 1.5.3 节中清洗后的菌丝样本转移到 1.5 mL EP 管内, 使用 0.04% 台盼蓝溶液在  $30^\circ\text{C}$  下进行 3 min 的染色处理, 随后用 PBS 缓冲液进行冲洗直至蓝色退去, 接着将菌丝分散制备样本片, 最后在显微镜下观察。

### 1.5.5 对尖孢镰孢菌显微结构的影响

参考赵焕兰<sup>[13]</sup>的方法处理菌丝, 取少许 1.5.3 节中清洗后所得的菌丝。用体积分数 2.5% 的戊二醛固定液淹没菌体,  $4^\circ\text{C}$  固定 12 h, 用 0.2 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液清洗固定后的菌丝 3 次, 将清洗后的菌丝依次经 30%、50%、70%、85%、90% 的乙醇脱水 1 次, 每次 5 min, 100% 乙醇脱水 3 次, 每次 5 min。脱水后的菌丝冷冻干燥 48 h 后进行喷金处理, 用扫描电镜观察。

### 1.6 对尖孢镰孢菌菌丝膜脂过氧化的影响

取适量备用菌丝, 根据丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒说明书配制溶液, 参考操作表添加相关试剂, 混匀后室温放置 10 min, 使用酶标仪分别测定波长 532、450 和 600 nm 处的吸光度。

### 1.7 对尖孢镰孢菌的抗氧化酶活性的影响

取适量备用菌丝与提取液混合, 利用超声破碎仪进行处理, 设定超声功率为 200 W、超声时间为 3 s, 间隔时间为 10 s, 重复 30 次后,  $4^\circ\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 获得粗酶提取液, 用于测定总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性。

#### 1.7.1 总 SOD 活性测量

根据超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒说明书配制溶液, 按操作步骤添加相关试剂, 混匀后在室温下放置 10 min, 使用分光光度计测定波长 550 nm 处的吸光值。

#### 1.7.2 CAT 活性测量

依据过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒说明书进行操作, 按操作步骤配制相关试剂, 混匀后使用分光光度计测定波长 405 nm 处的吸光值。

#### 1.7.3 POD 活性测定

采用愈创木酚比色法测定样品过氧化物酶(POD)的活性。将 80  $\mu\text{L}$  粗酶液与 280  $\mu\text{L}$  质量

浓度为 0.3% 的愈创木酚溶液充分混匀后, 30 °C 恒温孵育 10 min。在酶标板孔中预加 30  $\mu$ L 0.1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应体系, 随后加入 270  $\mu$ L 预反应混合液, 立即使用酶标仪在 470 nm 波长处进行动态监测。设置 30 s 间隔连续采集 10 个时间点的吸光度数据(总时长 5 min), 以蒸馏水作为空白对照。结果计算: 以单位时间内吸光度变化 0.01 个单位定义为 1 个活性单位(U)。计算公式(5)所示。

$$\text{POD活性}\left(\frac{\text{U}}{\text{g}}\right) = \frac{\Delta A_{470} \times V_t}{0.01 \times V_s \times F_w \times t} \quad (5)$$

式中:  $\Delta A_{470}$  为反应时间内的吸光度变化值;  $V_t$  为提取粗酶液的总体积(mL);  $V_s$  为反应体系中粗酶液体积(mL);  $F_w$  为样品质量(g);  $t$  为反应时间(min)。

## 1.8 数据统计分析

所有实验数据均经过严谨的处理与分析, 实验数据通过 Origin 8.0 软件进行作图, 利用 IBM SPSS Statistics v26.0 软件对实验数据进行单因素方差分析。为确保结果的可靠性, 所有实验均进行了 3 次独立重复检验。实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗真菌海洋芽孢杆菌筛选

从湛江、广西等地采集的红树林海泥土壤样品中通过梯度稀释法和点菌法初步筛选出具有抑菌效果的菌株 21 株, 其中 5 株菌株(编号 K3、K5、J22、N1、N3)对尖孢镰孢菌的抑菌圈直径均大于 10 mm, 结果如表 1 所示。

采用牛津杯法对抑菌圈直径大于 10 mm 的菌株发酵上清液进行复筛, 结果如表 2 所示。菌株 K3 的发酵上清液抑菌活性大于其他菌株, 因此选用菌株 K3 进行后续实验。

### 2.2 菌株鉴定

菌株 K3 的生理生化鉴定结果如表 3 所示, 菌株 K3 在 D-木糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇、

表1 抗尖孢镰孢菌芽孢杆菌菌株初筛结果

Table 1 The initial screening results of *Fusarium oxysporum* spore-forming *Bacillus*

Strain	The diameter of the bacteriostasis circle (mm)	Screening site
A2	5.09 $\pm$ 1.48	Qinnan District, Qinzhou City
Z2	3.32 $\pm$ 2.09	Qinnan District, Qinzhou City
Z3	3.52 $\pm$ 0.73	Qinnan District, Qinzhou City
C2	6.02 $\pm$ 1.20	Qinnan District, Qinzhou City
B4	6.54 $\pm$ 0.87	Qinnan District, Qinzhou City
Y3	2.06 $\pm$ 1.96	Qinnan District, Qinzhou City
J11	1.62 $\pm$ 0.53	Mazhang District, Zhanjiang City
J12	4.76 $\pm$ 0.88	Mazhang District, Zhanjiang City
J22	14.2 $\pm$ 0.34	Mazhang District, Zhanjiang City
J24	9.47 $\pm$ 2.81	Mazhang District, Zhanjiang City
X2	5.48 $\pm$ 0.45	Xuwen County, Zhanjiang City
X3	9.22 $\pm$ 1.83	Xuwen County, Zhanjiang City
M2	6.14 $\pm$ 0.44	Xuwen County, Zhanjiang City
M4	7.83 $\pm$ 2.47	Xuwen County, Zhanjiang City
M5	4.48 $\pm$ 1.06	Xuwen County, Zhanjiang City
N1	13.36 $\pm$ 1.72	Xuwen County, Zhanjiang City
N3	15.94 $\pm$ 1.67	Xuwen County, Zhanjiang City
K1	6.68 $\pm$ 0.95	Xuwen County, Zhanjiang City
K3	18.24 $\pm$ 1.69	Xuwen County, Zhanjiang City
K5	12.12 $\pm$ 1.33	Xuwen County, Zhanjiang City
K7	8.64 $\pm$ 1.28	Xuwen County, Zhanjiang City

表2 抗尖孢镰孢菌芽孢杆菌菌株复筛结果

Table 2 The re-screening results of *Bacillus* against *Fusarium oxysporum* spores

Strain	The diameter of the bacteriostasis circle (mm)
J22	12.40 $\pm$ 0.42
N1	10.29 $\pm$ 0.26
N3	11.98 $\pm$ 0.17
K3	13.38 $\pm$ 0.29
K5	9.66 $\pm$ 0.35

7% NaCl 生长、pH 5.7 生长、淀粉水解(starch hydrolysis)、明胶液化(gelatin liquefaction)、硝酸盐还原(nitrate reduction)和厌氧生长试验中结果均为阳性; V-P 试验、柠檬酸盐(citrate)和丙酸盐

表3 K3的生理生化测定结果

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain K3

Determination item	Determination result	Determination item	Determination result
V-P test	-	Gelatin liquefaction test	+
Citrate test	-	Growth on 7% NaCl	+
Propionate salt test	-	Growth on pH 5.7	+
D-xylose	+	Nitrate reduction test	+
L-arabinose	+	Starch hydrolysis test	+
D-mannitol	+	Anaerobic growth	+

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

(propionate salt)结果均为阴性。根据其测定结果初步确定菌株 K3 为芽孢杆菌属。菌株 K3 经 PCR 扩增和 16S rRNA 基因测序后, 获得全长为 1 428 bp 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号为 PRJNA1243869)。经 NCBI GenBank 数据库 BLAST 比对分析显示, 该序列与贝莱斯芽孢杆菌的模式菌株(*B. velezensis*) CR-502<sup>T</sup> (AY603658) 显示出最高相似性(99.71%), 满足属内鉴定的基本要求<sup>[14]</sup>。采用 MEGA 11.0 软件进行系统发育分析, 通过多序列比对筛选出与菌株 K3 的 16S rRNA 基因相似度≥95% 的菌株序列, 随后基于邻接法构建系统发育树, 构建的系统发育树如图 1 所示。菌株 K3 与贝莱斯芽孢杆菌(*B.*

*velezensis*)聚为一支, 两者亲缘关系最近, 根据菌株的菌落形态和菌体特征可鉴定菌株 K3 为贝莱斯芽孢杆菌。

### 2.3 抗真菌物质不同提取方法的活性比较

分别采用有机溶剂萃取法和酸沉淀法初步提取 K3 的抗真菌物质, 并测定其抑菌活性。如表 4 所示, 2 种方法均可从 K3 的发酵上清液中提取抗真菌物质。其中, 有机溶剂萃取法提取的抗真菌物质具有较强的抑菌活性, 其抑菌圈直径达到 22.27 mm, 显著高于酸沉淀法提取的抗真菌物质, 说明有机溶剂萃取法提取的抗真菌物质更多。因此, 后续实验使用的粗提液均

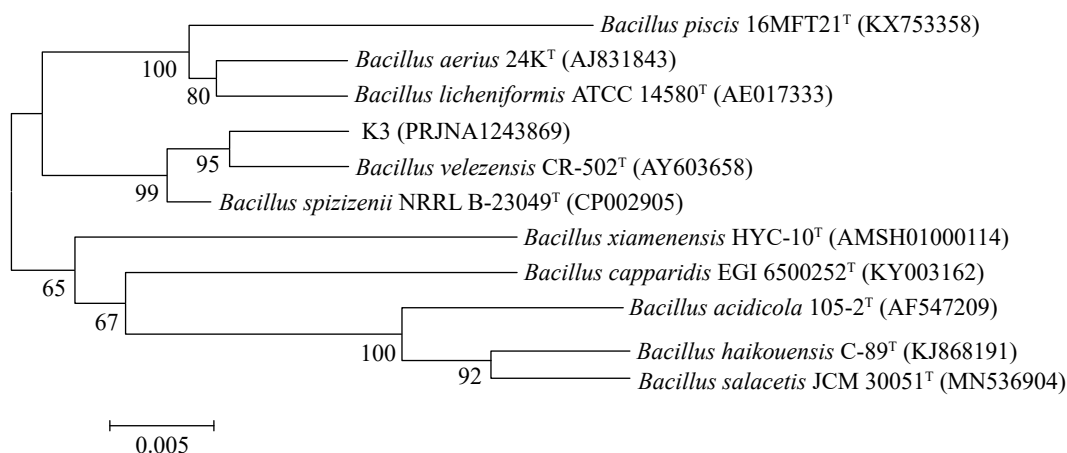


图1 菌株K3基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain K3 constructed based on 16S rRNA gene sequences. Numerical values at the nodes represent bootstrap support values; The scale bar indicates a branch length of 0.005 substitutions per site; The numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

表4 不同提取方法的抗真菌物质对尖孢镰孢菌的抑菌活性

Table 4 The inhibitory activity of antifungal substances extracted by different methods against *Fusarium oxysporum*

Extraction procedure	The diameter of the bacteriostasis circle (mm)
Organic solvent extraction method	22.27±0.43
Acid precipitation method	7.51±0.15
Control	0.00±0.00

由有机溶剂萃取法提取。

## 2.4 抗真菌物质的热稳定性和酶敏感性的分析结果

不同温度处理后抗真菌物质的稳定性评估结果如图 2A 所示。在 25 °C 和 45 °C 条件下，抗

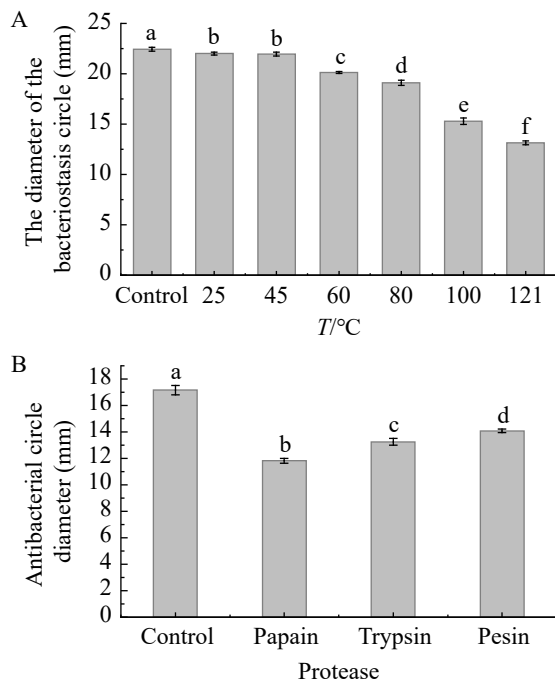


图2 温度(A)和蛋白酶(B)对抗真菌物质稳定性的影响

Figure 2 The influence of temperature (A) and protease (B) on the stability of antifungal substances. The different letters in the figure indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same as below.

真菌物质的活性保持相对稳定，几乎未下降。然而，当温度升高至 60–121 °C 时，抗真菌物质的活性逐渐减弱，表明该物质具有一定的热稳定性。图 2B 展示了木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理粗提液后的结果，发现这些酶处理后粗提液的抑菌活性均有所下降，表明抗真菌物质对这些蛋白酶敏感。这些结果初步表明，抗真菌物质很可能主要由蛋白质或多肽组成。

## 2.5 抑菌谱的分析结果

K3 抗真菌物质的抑菌谱测定结果如表 5 所示，K3 抗真菌物质显示出广谱的抑菌活性，对革兰氏阳性菌[如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)]、革兰氏阴性菌[如大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)]和副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)及多种真菌[如尖孢镰孢菌(*F. oxysporum*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)]均具有强的效抑制作用，其中对尖孢镰孢菌的平均抑菌圈直径达到 33.96 mm，显著高于对其他受试菌株的抑制效果。

## 2.6 最小抑菌浓度的测定结果

如图 3 所示，K3 的抗真菌物质粗提液的

表5 K3抗真菌物质的抑菌谱

Table 5 The antifungal spectrum of the K3 antifungal substance

Strain	The diameter of the bacteriostasis circle (mm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	33.96±0.34
<i>Aspergillus flavus</i>	21.84±0.57
<i>Aspergillus niger</i>	27.86±0.74
<i>Mucor racemosus</i>	16.94±0.17
<i>Aspergillus oryzae</i>	25.06±0.69
<i>Penicillium chrysogenum</i>	29.86±0.61
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.84±0.17
<i>Escherichia coli</i>	14.70±0.13
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15.11±0.24

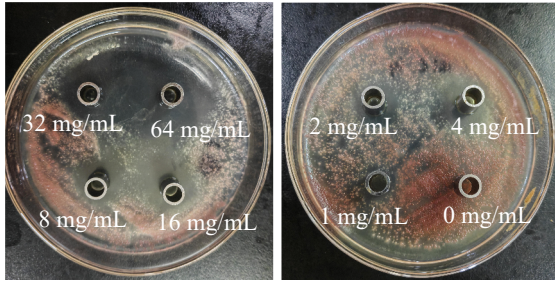


图3 最小抑菌浓度(MIC)测定结果

Figure 3 Determination results of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract.

MIC 为 1 mg/mL, 此时抑菌圈直径为 8.55 mm。随着浓度的增加, 抑菌圈直径逐渐增大。64 mg/mL 的粗提液可使抑菌圈达到 25.31 mm, 能有效抑制尖孢镰孢菌的生长。这表明抗真菌物质的抑菌效果具有浓度依赖性。

### 2.7 对尖孢镰孢菌细胞损伤的分析结果

抗真菌物质对尖孢镰孢菌孢子细胞的损伤可通过尖孢镰孢菌介质的电导率、胞外核酸和蛋白泄漏程度来衡量。与对照组相比, 抗真菌物质处理后, 上清液的电导率(图 4A)随粗提液浓度增加而增大, 且尖孢镰孢菌孢子细胞的核酸(图 4B)和蛋白泄漏程度(图 4C)均明显增加。这说明抗真菌物质会破坏尖孢镰孢菌的孢子完

整性, 使孢子膜透性增大, 导致细胞内的电解质、核酸和蛋白泄漏, 从而抑制尖孢镰孢菌孢子的萌发, 达到抑菌的作用。

### 2.8 对尖孢镰孢菌孢子萌发的影响结果

如图 5 所示, 随着粗提液浓度的增加, 尖孢镰孢菌孢子的萌发率呈现显著下降趋势。在培养 10 h 后, 对照组的孢子萌发率已达到 98.33%, 而 1×MIC 处理组的孢子萌发抑制率为 12.47%, 3×MIC 处理组的孢子萌发抑制率则高达 49.85%。这表明抗真菌物质能够明显抑制尖孢镰孢菌孢子的萌发, 且其抑制效果具有浓度依赖性。这种浓度依赖性的抑制效应可能与粗提液中抗真菌物质的作用机制有关, 其能够与真菌细胞膜的脂质相互作用, 破坏细胞膜的完整性, 从而抑制孢子的萌发。

### 2.9 对尖孢镰孢菌菌丝完整性的影响结果

细胞壁和细胞膜是真菌抵御外界伤害的第一道防御屏障。荧光染料 PI 是一种常用的细胞核荧光染料, 能够嵌入核酸并发出红色荧光, 虽然不能透过完整的细胞膜, 但可以渗透破损的细胞膜并对细胞核进行染色。因此, PI 常被用于检测细胞膜的完整性以及细胞的活性。如

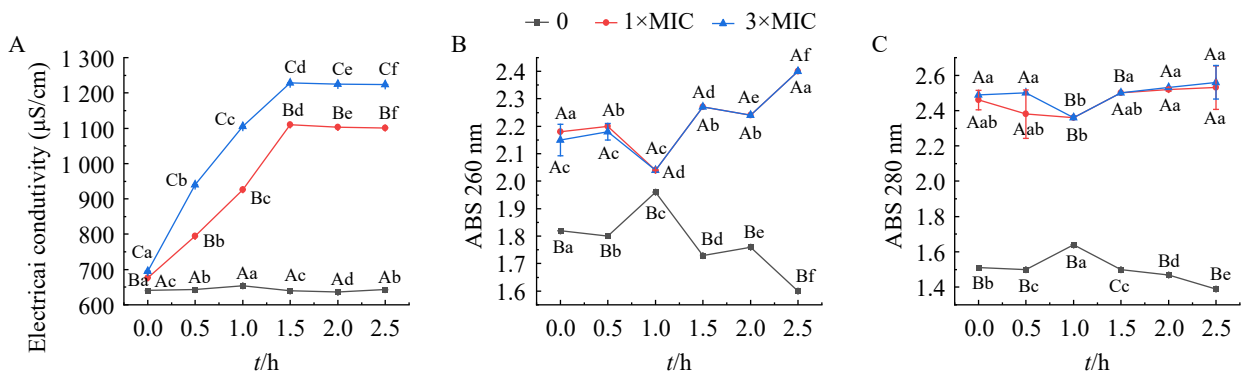


图4 尖孢镰孢菌细胞损伤的测定结果

Figure 4 The analysis results of cellular damage in *Fusarium oxysporum*. A: Electrical conductivity; B: Nucleic acid leakage degree; C: Protein leakage degree. Different uppercase letters indicate significant differences among crude extract concentrations at the same time point, while different lowercase letters represent significant differences across time points at the same concentration ( $n=3$ ,  $P<0.05$ ). The same as below.

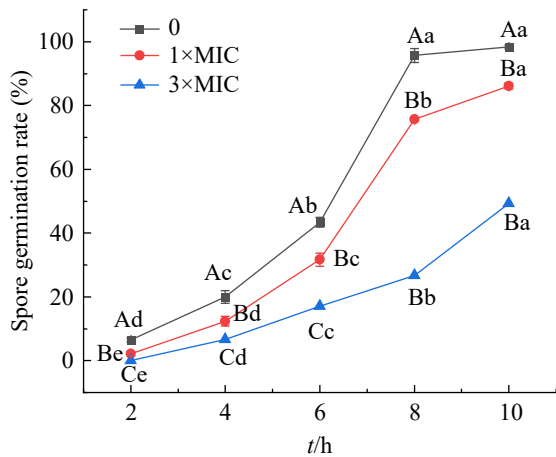


图5 各时间点尖孢镰孢菌孢子萌发的测定结果  
Figure 5 The measurement results of spore germination of *Fusarium oxysporum* under various treatment durations.

图 6 所示, 抗真菌物质能够破坏尖孢镰孢菌菌丝细胞的细胞膜, 随着粗提液浓度的增加, 菌丝细胞受损程度显著提高。具体表现为, 细胞膜的完整性被破坏, 导致 PI 能够进入细胞内部并与核酸结合, 从而发出红色荧光。这表明抗

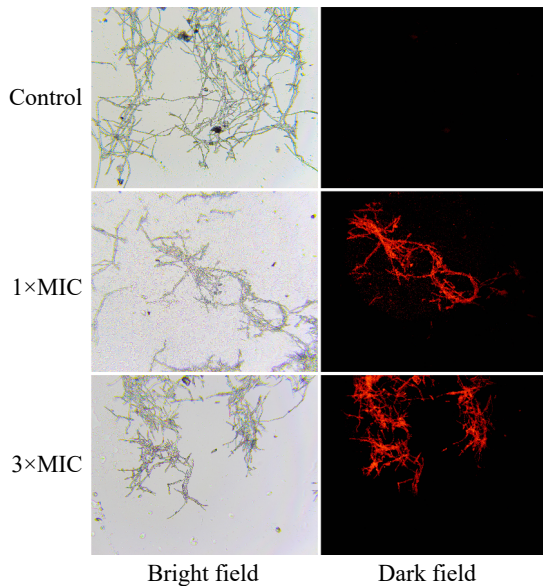


图6 尖孢镰孢菌菌丝完整性的测定结果  
Figure 6 The measurement results of hyphal integrity of *Fusarium oxysporum*.

真菌物质通过破坏细胞膜的完整性, 使细胞内部的核酸暴露于细胞外环境中, 从而导致 PI 能够进入细胞并与核酸结合。这种细胞膜的破坏作用可能是抗真菌物质发挥抗真菌活性的重要机制之一。此外, PI 染色的结果还间接说明了粗提液对尖孢镰孢菌的抑制作用具有浓度依赖性, 即浓度越高, 抑制效果越显著。

### 2.10 对尖孢镰孢菌菌丝细胞死活的影响结果

台盼蓝染色法通过检测细胞膜的完整性来区分菌丝细胞的死活状态。如图 7 所示, 对照组的菌丝无色, 表明其细胞膜完整, 能够阻止台盼蓝染料进入, 因此未被染成蓝色。相比之下, 经粗提液处理后的尖孢镰孢菌菌丝被台盼蓝染料染成蓝色, 且随着粗提液浓度的增加, 菌丝着色加深, 菌丝体还出现断裂现象。这说明粗提液破坏了菌丝细胞, 导致细胞死亡或细胞膜受损, 无法阻挡台盼蓝染料的渗透。

### 2.11 对尖孢镰孢菌显微结构的影响结果

扫描电镜结果显示(图 8), 对照组的孢子形态饱满、轮廓清晰, 菌丝体边缘光滑, 生长笔直, 尾端有正常萌发的孢子。经粗提液处理后的尖孢镰孢菌孢子与菌丝呈现出不同程度的形态异常, 孢子边缘萎缩不规则, 形态扭曲或表面凹凸不平; 菌丝体也发生畸变, 表面极不平整, 布满不规则凹陷, 且菌丝扭转、皱缩、干瘪, 形态扭曲多变。随着粗提液浓度增加, 损伤加剧。这进一步证实抗真菌物质通过破坏细胞膜和细胞壁, 导致细胞内容物泄漏和细胞形

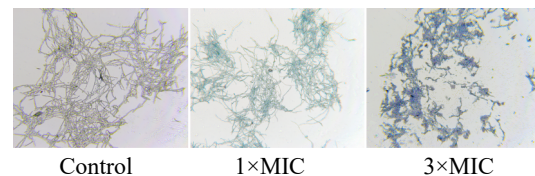


图7 尖孢镰孢菌菌丝细胞死活的测定结果  
Figure 7 The measurement results of the viability and death of *Fusarium oxysporum* hyphal cells.

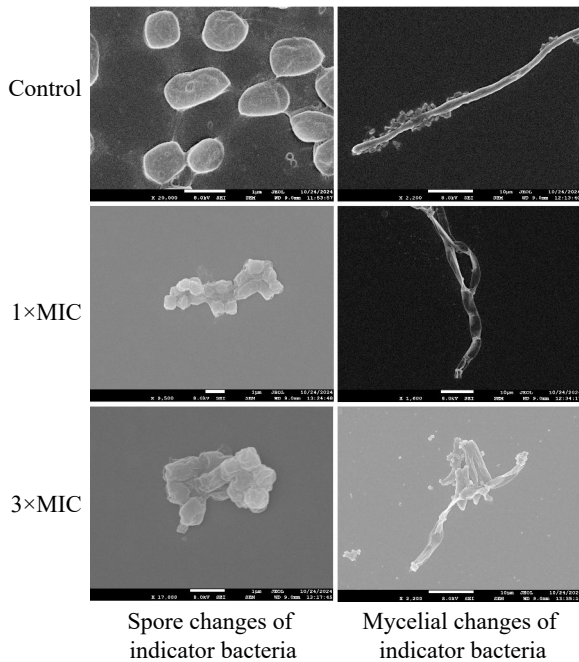


图8 尖孢镰孢菌超微结构的测定结果

Figure 8 The measurement results of the microscopic structure of *Fusarium oxysporum*.

态改变,从而抑制尖孢镰孢菌的生长和繁殖。

## 2.12 对尖孢镰孢菌丝丙二醛含量的影响结果

丙二醛(MDA)含量是反映机体抗氧化能力和细胞损伤程度的重要指标,可间接反映细胞膜脂质过氧化强度。如图9所示,经粗提液处理后,尖孢镰孢菌菌丝的MDA含量显著升高,高浓度处理后的MDA含量是对照组的5.5倍。这表明抗真菌物质诱导细胞内活性氧积累,加剧细胞膜脂质过氧化,破坏细胞膜结构,改变膜的通透性,进而影响细胞的正常生理功能。

## 2.13 参与清除 ROS 的 3 种抗氧化酶活测量

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)可调控细胞内的活性氧(ROS)水平。通过测定这些酶在菌丝体内的活性,探究它们是否协同作用以降低过量的活性

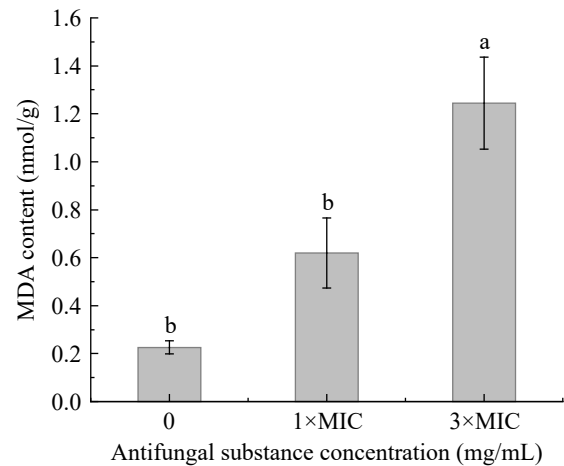


图9 尖孢镰孢菌菌丝MDA含量的测定结果

Figure 9 MDA contents in *Fusarium oxysporum* hyphae.

氧。如图10所示,经粗提液处理后,3种酶的活性均有所提升。经3xMIC处理后的SOD活性是对照组的13.05倍,而CAT和POD活性在不同浓度的粗提液处理后也缓慢增加。这说明粗提液处理后,菌丝体内活性氧积累增加,菌丝体分泌这3种酶协同作用以降低活性氧,维持细胞的正常生理功能。

## 3 讨论

近年来,国内外学术研究揭示了贝莱斯芽孢杆菌的多方面益处,包括其在促进动植物生长发育、抑制病原菌以及激发机体系统性抗性方面的潜力<sup>[15]</sup>。该细菌在抗菌领域的卓越表现受到了学术界的高度认可。此外,贝莱斯芽孢杆菌因其显著的商业潜力而备受重视,其应用范围覆盖了生物防控、药物开发、食品发酵以及工业应用等多个关键领域<sup>[16]</sup>。本研究从海洋源红树林中筛选出一株抗尖孢镰孢菌的贝莱斯芽孢杆菌,通过对比不同提取抗真菌物质的方法,发现有机溶剂提取的抗真菌物质具有较强的抑菌活性,抑菌圈直径达22.27 mm。乙酸乙酯作为有机溶剂在提取芽孢杆菌产生的抗菌肽方面表现出良好的效果,如Rabbee等<sup>[17]</sup>利用乙

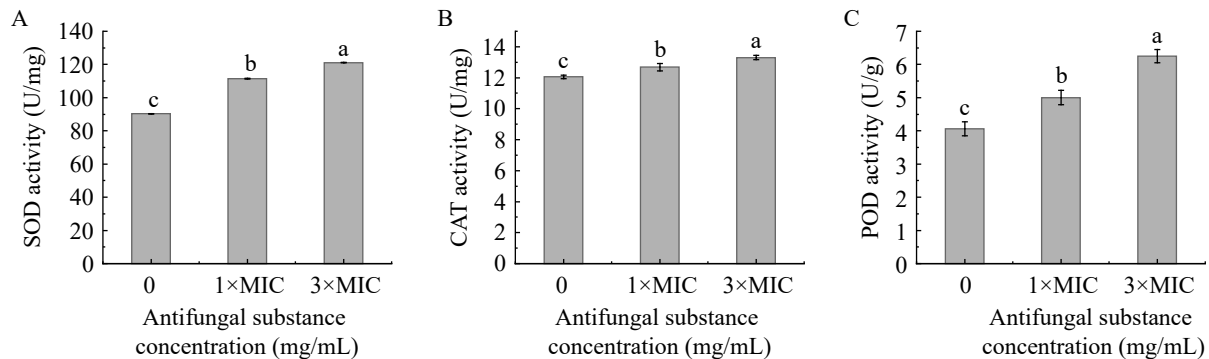


图10 尖孢镰孢菌抗氧化酶活性的测定结果

Figure 10 The determination results of antioxidant enzyme activity in *Fusarium oxysporum*. A: SOD activity; B: CAT activity; C: POD activity.

酸乙酯从 25 株芽孢杆菌中提取抗菌肽, 并通过圆盘扩散法筛选出对柑橘黄单胞菌有拮抗作用的菌株。芽孢杆菌能产生多种具有广泛抗菌作用的活性物质, 这些抗菌物质大多属于蛋白或多肽类<sup>[18]</sup>。利用蛋白酶敏感实验可以得出 K3 分泌的抗真菌物质大部分是蛋白或多肽类物质。此外, 抗真菌物质还具有一定热稳定性和广谱抑菌特性, 对 6 种病原真菌和 3 种致病菌都有明显的抑菌效果, 与高兆建等<sup>[19]</sup>的研究结果相似。

芽孢杆菌属作为生物防治剂的有效性主要依赖于 3 个关键机制: 空间和养分的竞争、产生抗生素、诱导寄主植物防御<sup>[20-21]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌抗真菌的拮抗机制主要是通过分泌抗真菌肽来达到抑制效果<sup>[22]</sup>, 抗真菌肽通过破坏病原真菌的细胞壁结构和扰乱细胞膜的通透性和稳定性<sup>[23]</sup>导致菌丝生长停滞、畸形、断裂以及孢子死亡, 从而引发真菌细胞死亡<sup>[24]</sup>。如 Malik 等<sup>[25]</sup>研究发现, 高地芽孢杆菌产生的脂肽不仅能抑制番茄病原菌生长, 还能显著提升番茄果实中多种防御酶的活性。卢麒宇<sup>[26]</sup>发现, 解淀粉芽孢杆菌 JK-1 产生的抗菌肽通过破坏灰葡萄孢霉的细胞膜和抑制其能量代谢发挥了抗真菌作用。芽孢杆菌 HY19 产生的抗真菌物质通过多种机制拮抗灰霉病菌, 并能提高番茄叶片的抗氧化能力, 有效控制番茄灰霉病的发生<sup>[27]</sup>。本

研究表明, 菌株 K3 分泌的抗真菌物质对尖孢镰孢菌具有显著的抑制效果, 其最小抑菌浓度(MIC)为 1 mg/mL。该抗真菌物质不仅能够损伤尖孢镰孢菌的孢子并抑制其萌发, 在超微结构下观察到尖孢镰孢菌孢子皱缩, 菌丝折叠断裂, 还会导致尖孢镰孢菌胞外出现明显的电解质、核酸和蛋白质泄漏, 这一现象与付克剑等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。在经过 3×MIC 处理 10 h 后, 尖孢镰孢菌孢子的萌发抑制率显著上升至 49.85%。此外, 经 K3 抗真菌物质处理后的尖孢镰孢菌菌丝细胞完整性受到破坏, 细胞膜稳态失衡, 丙二醛(MDA)含量显著增加, 而参与清除菌丝细胞活性氧的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性均有所提升, 这与陈少先<sup>[29]</sup>的研究结果相似。这些结果表明, 抗真菌物质通过抑制孢子的萌发破坏菌丝细胞膜完整性, 对菌丝细胞造成了氧化应激, 从而破坏了细胞的完整性, 抑制尖孢镰孢菌的生长。

本研究通过生理生化与 16S rRNA 基因系统发育分析初步明确了菌株 K3 是贝莱斯芽孢杆菌, 后续将进一步结合 *gyrB* 管家基因序列分析完善菌株分子鉴定。更重要的是, 针对 K3 的抗真菌作用机制, 我们还将聚焦于活性物质靶向解析和分子互作机制, 以明确抗菌物质的具体性质和分子层面抑菌机理。为了充分挖掘贝莱

斯芽孢杆菌的生防潜力并评估其商业价值，未来的研究还将扩展至该抗真菌物质在水果保护方面的应用效果评估。通过实验研究，深入了解贝莱斯芽孢杆菌粗提物对水果病害的防控效果，以及其在提升果实品质和延长货架寿命方面的潜力。

## 4 结论

从海洋红树林土壤中分离的贝莱斯芽孢杆菌 K3 展现出对尖孢镰孢菌的较强拮抗活性，其具有广谱抑菌特性，对尖孢镰孢菌的拮抗作用与破坏孢子萌发和菌丝完整性受损有关。贝莱斯芽孢杆菌 K3 表现出作为生物防治药剂候选菌株的巨大潜力，具有很好的商业价值。

## 作者贡献声明

梁静娴：实验及文章撰写；刘唤明：提出概念和数据分析；邓楚津：数据监管和文章编辑；周春霞：文章编辑和审阅；洪鹏志：文章编辑和审阅。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] ZHANG XZ, MENG XH, JIAO XD, SA RN, WANG BC, WANG Z, LI JW, LIU D, YANG B, ZOU CL, ZHANG YJ. Physiological mechanism beneath the inhibition of *Cleome spinosa* against the morphology and reproduction of *Fusarium oxysporum*[J]. *Heliyon*, 2023, 9(12): e22622.
- [2] 朱育菁, 车建美, 肖荣凤, 苏明星, 黄晓芸, 蓝江林. 尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum* Schl.)的生长特性[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(8): 373-376.  
ZHU YJ, CHE JM, XIAO RF, SU MX, HUANG XY, LAN JL. Growth characteristics of *Fusarium oxysporum* Schl. [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(8): 373-376 (in Chinese).
- [3] 李华平, 李云锋, 聂燕芳. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 128-136.  
LI HP, LI YF, NIE YF. Research status of occurrence and control of *Fusarium* wilt of banana[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(5): 128-136 (in Chinese).
- [4] 刘峰, 洪葵. 红树林微生物及其代谢产物多样性[J]. *海南医学*, 2006, 17(5): 171-173.  
LIU F, HONG K. The diversity of mangrove microorganisms and their metabolites[J]. *Hainan Medical*, 2006, 17(5): 171-173.
- [5] RATHOD K, RANA S, DHANDHUKIA P, THAKKER JN. Marine *Bacillus* as a potent biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*[J]. *Plant Stress*, 2023, 10: 100289.
- [6] De CARVALHO CCCR, FERNANDES P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(3): 705-727.
- [7] 杨秀文. 红树林源脂肽产生菌株筛选及发酵条件优化[D]. 湛江: 广东海洋大学硕士学位论文, 2018.  
YANG XW. Screening of lipopeptide producing strains from mangrove forests and optimization of fermentation conditions[D]. Zhanjiang: Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2018 (in Chinese).
- [8] 吴清娟, 黄惠琴, 许嘉芮, 胡永华, 莫坤联. 红树林沉积物细菌群落多样性及功能预测[J/OL]. *海南大学学报(自然科学版)*, 2024. <https://link.cnki.net/doi/10.15886/j.cnki.hdxzbkb.2024020201>.  
WU QJ, HUANG HQ, XU JR, HU YH, MO KL. Diversity of bacteria communities and prediction of ecological functions in mangrove sediments[J/OL]. *Journal of Hainan University (Natural Science)*, 2024. <https://link.cnki.net/doi/10.15886/j.cnki.hdxzbkb.2024020201> (in Chinese).
- [9] 李姝江, 朱天辉, 譙天敏, 韩珊. 花椒根腐病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及定殖和防治效果[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(4): 114-122.  
LI SJ, ZHU TH, QIAO TM, HAN S. Screening, identification, colonization and control effect of biocontrol *Bacillus* sp. against root rot of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(4): 114-122 (in Chinese).
- [10] 赖崇熙, 刘唤明, 贾瑞博, 邓楚津, 洪鹏志, 赵飞. 产细菌素海洋乳酸菌的筛选及细菌素抑菌机制[J]. *广东海洋大学学报*, 2024, 44(3): 95-102.  
LAI CX, LIU HM, JIA RB, DENG CJ, HONG PZ, ZHAO F. Screening of bacteriocin-producing marine lactic acid bacteria and bacteriocin-inhibiting mechanism[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2024, 44(3): 95-102 (in Chinese).
- [11] 李天溪, 龙淼. 解淀粉芽孢杆菌B10抑制黄曲霉生长活性物质克隆表达及作用效果研究[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(12): 8024-8035.  
LI TX, LONG M. Study on *Bacillus amyloliquefaciens* B10 inhibiting cloning and expression of growth active substance of *Aspergillus flavus* and its efficacy[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(12): 8024-8035 (in Chinese).
- [12] 刘奎. *Bacillus subtilis*对猕猴桃软腐病抑制机理及保鲜效果研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2021  
LIU K. Study on the Inhibition Mechanism and Fresh-keeping Effects of *Bacillus subtilis* on Kiwifruit Soft Rot[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of

- Technology, 2021 (in Chinese).
- [13] 赵焕兰. 贝莱斯芽孢杆菌对樱桃番茄采后灰霉病的抑制机理研究及保鲜效果评价[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2022.  
ZHAO HL. Inhibitory mechanism of *Bacillus velezensis* on gray mold caused by *Botrytis cinerea* and evaluation of its fresh-keeping effect on cherry tomato[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [14] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [15] 迟惠荣, 张亚惠, 曾欣, 陈卫良, 毛碧增. 多花黄精内生贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌与促生作用分析[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 122-131.  
CHI HR, ZHANG YH, ZENG X, CHEN WL, MAO BZ. Isolation and identification of antagonistic endophytic *Bacillus velezensis* from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua and analysis of its antimicrobial and growth-promoting activity[J]. Plant Protection, 2019, 45(4): 122-131 (in Chinese).
- [16] 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).
- [17] RABBEE MF, ISLAM N, BAEK KH. Biocontrol of citrus bacterial canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by *Bacillus velezensis*[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022, 29(4): 2363-2371.
- [18] 龚发源, 胡骏鹏, 曾雨雷, 戴晋军, 王玉莲. 芽孢杆菌源抗菌肽类物质研究进展[J]. 中国饲料, 2018(16): 86-92.  
GONG FY, HU JP, ZENG YL, DAI JJ, WANG YL. Research progress of antimicrobial peptides derived from *Bacillus*[J]. China Feed, 2018(16): 86-92 (in Chinese).
- [19] 高兆建, 秦宸锴, 黄亮浩, 朱双, 朱劲虎, 赵宜峰. 腊肉拮抗菌分离及抗真菌脂肽特性分析[J]. 食品科学, 2021, 42(8): 129-136.  
GAO ZJ, QIN CK, HUANG LH, ZHU S, ZHU JH, ZHAO YF. Isolation of antagonistic bacteria from smoked bacon and analysis of antifungal properties of its lipopeptides[J]. Food Science, 2021, 42(8): 129-136 (in Chinese).
- [20] ETESAMI H, JEONG BR, GLICK BR. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2023, 126: 102048.
- [21] PRASAD B, SHARMA D, KUMAR P, CHANDRA DUBEY R. Biocontrol potential of *Bacillus* spp. for resilient and sustainable agricultural systems[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2023, 128: 102173.
- [22] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33.  
TAO YM, PAN HJ, HUANG J, XI X, LI P, LU ZJ. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33 (in Chinese).
- [23] FIRA D, DIMKIĆ I, BERICĆ T, LOZO J, STANKOVIĆ S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285: 44-55.
- [24] 马乔女, 李心悦, 顾欣, 王新谱. 芽孢杆菌抗真菌肽的研究进展[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(5): 17-24.  
MA QN, LI XY, GU X, WANG XP. Research progress of *Bacillus antifungal* peptides[J]. China Plant Protection, 2023, 43(5): 17-24 (in Chinese).
- [25] MALIK J, MOOSA A, ZULFIQAR F, ASLAM MN, ALBALAWI MA, ALMOWALLAD S, MAHMOOD T, ALASMARI A, YONG JWH. Biocontrol potential of lipopeptides produced by the novel *Bacillus altitudinis* strain TM22A against postharvest *Alternaria* rot of tomato[J]. LWT, 2024, 191: 115541.
- [26] 卢麒宇. 解淀粉芽孢杆菌JK-1对蓝莓灰霉病生物防治效果评估及抑菌机理初探[D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.  
LU QY. Evaluation of biological control effect of *Bacillus amyloliquefaciens* JK-1 on blueberry *Botrytis cinerea* and preliminary exploration of its antibacterial mechanism[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [27] LI SP, XIAO QL, YANG HJ, HUANG JG, LI Y. Characterization of a new *Bacillus velezensis* as a powerful biocontrol agent against tomato gray mold[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 187: 105199.
- [28] 付克剑, 崔永和, 黄智华, 张继来, 张立猛, 邓毅书, 张智浩, 聂强, 周洪印, 苏友波. 抗烟草黑胫病菌生防细菌筛选、鉴定及体外拮抗机理初探[J]. 南方农业学报, 2023, 54(8): 2245-2256.  
FU KJ, CUI YH, HUANG ZH, ZHANG JL, ZHANG LM, DENG YS, ZHANG ZH, NIE Q, ZHOU HY, SU YB. Screening, identification and antagonistic mechanism *in vitro* of biocontrol bacteria against tobacco black shank pathogen[J]. Journal of Southern Agriculture, 2023, 54(8): 2245-2256 (in Chinese).
- [29] 陈少先. 贝莱斯芽孢杆菌zk1脂肽类次级代谢产物的抑菌机理研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院硕士学位论文, 2022.  
CHEN SX. Study on the antimicrobial mechanism of lipopeptide secondary metabolites of *Bacillus velezensis* zk1[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2022 (in Chinese).