



一株保护草鱼肠道和改善水质的枯草芽孢杆菌的分离鉴定及全基因组分析

资英娟¹, 秦真东¹, 詹凡玢¹, 谢昊堃², 张瀚云³, 黎烽¹,
李滨⁴, 赵皓翰⁴, 谢远崧⁴, 赵丽娟^{1*}, 林鑫^{1*}

- (1. 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东广州 510225;
2. 瑞奥登主教中学, 加利福尼亚旧金山 94112;
3. 伦敦帝国学院生命科学系, 伯克郡伯克斯 SL5 7PY;
4. 广东卓信环境科技股份有限公司, 广东番禺 511400)

摘要: 为研制可降解污染物的高效微生物制剂, 本研究从污水中分离到多株可高效降解化学耗氧量(COD)的菌株。通过16S rDNA测序及生理生化分析, 鉴定出其中一株为枯草芽孢杆菌, 命名为*Bacillus subtilis* H2。对其进行进化树构建, 发现该菌株与*B. subtilis* strain SCUT09的同源性高达98.8%。细菌最适生长条件探究发现, 该菌株的最适生长条件, 温度为42℃、pH值为6.5、盐度为1。耐受性实验发现, 该菌具有较强的盐度代谢能力和温度及酸碱度胁迫耐受性, 可以适应不同的温度和盐度环境。为了探究该菌在水产养殖中的作用, 将该菌株进行灌胃草鱼处理后, 再利用嗜水气单胞菌攻毒, H.E染色观察草鱼的肠道组织变化。结果显示, 灌胃枯草芽孢杆菌处理后, 草鱼肠道的完整性得到显著的保护。为了进一步探究该菌株的作用机理, 本研究测定了*B. subtilis* H2的全基因组, 结果显示, 基因组全长为4 111 243 bp, GC含量为43.46%, 编码4 213个基因, 其中包含31个核糖体rRNA和87个tRNA基因, 编码序列占整个基因组序列的87.67%。比较基因组学分析显示, 该菌株和*B. subtilis* 168全基因组共有基因有3 551个。研究表明, 本研究分离出的枯草芽孢杆菌在污水处理和水产养殖中具有重要的应用意义。

关键词: 草鱼; 枯草芽孢杆菌; 肠道; 最佳培养条件; COD降解; 全基因组测序

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

随着我国城市化进程的不断加快和工业化的不断推进, 水污染已成为社会关注的重点议题。目前国内污水处理工艺主要有物化处理法、土地处理法、生物处理法以及集合上述多种方法的综合处理方式等, 每种方法都有其相应的优缺点^[1-3]。微生物处理法是使用特异的微生物

降解废水中的污染物, 具有成本低、无环境污染、净化彻底等优点, 也越来越受到重视。随着水产养殖产量和密度的不断增加, 环境的恶化已经成为制约水产养殖产业十分重要的一个因素。目前多种微生态制剂已经广泛应用于水产养殖产业, 其中利用芽孢杆菌等微生物对养

收稿日期: 2019-11-09 修回日期: 2020-02-07

资助项目: 国家自然科学基金(31872606, 31572657, 31602190, U1701233); 广东省海洋与渔业局基金(GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); 广东省教育厅基金(KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); 2018广东省仲恺农业工程学院研究生科技创新基金(KA180582610); 广东卓信环境科技股份有限公司专项((D11722259))

通信作者: 赵丽娟, E-mail: 406856929@qq.com; 林鑫, E-mail: linli@zhku.edu.cn

殖水体进行修复是水产养殖业可持续发展的一个新兴趋势^[4]。有研究发现解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 在不同的条件下对污水中的氨氮和亚硝酸盐具有很好的去除效果^[5-6]。Kunadia 等^[7]使用芽孢杆菌作用于虾的养殖, 发现该细菌能有效地将有机物转化为二氧化碳。

益生菌是一种具有活性的微生物制剂, 在水产养殖上不仅可以减少废水积聚造成的环境负担, 还可以提高宿主的营养价值和利用, 改善宿主对疾病的反应^[8-9]。水产养殖中益生菌主要有光合细菌、乳酸菌、酵母菌、芽孢杆菌和其他菌类^[10]。枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 作为益生菌的一种, 常作为农业饲料添加剂^[11]。研究发现在水产养殖中, 芽孢杆菌作为益生菌, 在水生动物胃肠道中有一定的抗菌能力^[12-13]。此外, 芽孢杆菌作为水产养殖中很有发展前景的益生菌被大量研究, Cha 等^[14]研究发现枯草芽孢杆菌对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的生长性能、天然免疫和抗病能力以及养殖水质都有一定的促进作用; Liu 等^[15]发现芽孢杆菌对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 有同样的免疫和抗病能力; 李卓佳等^[16]和 Liu 等^[17]发现芽孢杆菌可促进养殖对虾肠道微生物群落的代谢功能; Madani 等^[18]发现添加芽孢杆菌可以显著改善凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的体长和体质量, 提高饲料转化率 (FCR)。

目前关于芽孢杆菌在水产养殖中的作用的相关研究已经成为新的热点领域, 同时随着高通量测序技术普遍化, 诸如全基因组测序等已经被广泛应用于揭示细菌作用的分子机制研究。从 1997 年起, 大量芽孢杆菌亚种的全基因组测序被报道, Rahimi 等^[19]从油污土壤中分离出新型生物降解菌株 *B. subtilis* MJ01 并测定了其基因组, Kunadia 等^[7]从纺织染料中分离脱色 *B. subtilis* C3 并报道了其基因组。本研究从污水中分离鉴定了一株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* H2, 并对其在污水处理和水产中的作用进行了探究。首先, 对其进行了污水中污染物降解能力和常见水质因子耐受性测定, 其次通过灌胃该枯草芽孢杆菌和攻毒嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 相结合的方式, 研究该菌对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肠道组织的保护作用。为了进一步探究该菌株的作用机理, 本研究测定了其全基因组,

并进行了进化树构建、COG 和 GO 聚类分析。结果表明, 该芽孢杆菌在水产养殖和污水处理中均具有应用意义, 本研究结果可为研制高效污水处理和水产养殖微生态制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验菌株来源于广州市兴丰垃圾填埋场的垃圾渗滤液分离菌株。

将污水离心过滤, 经过逐级稀释, 分别涂布在 LB 固体培养基 (酵母粉 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂 15 g, NaCl 10.0 g, 加蒸馏水至 1 L, 使用 Tris 缓冲液和 HCl 将 pH 调至 7.0)。通过多次稀释和挑选单菌落划线进行纯化, 获得多株菌株, 编号保存于本实验室。

实验鱼草鱼 [(50±10) g] 购自广东中山利维农水产合作社养殖场, 买回的实验鱼置于 200 L 的循环水养殖系统中, 保证氧气充足、水质清新, 并每天分别于早、晚进行投喂, 适应 2 周后开始实验。

1.2 菌株的 16S rDNA 鉴定和生理生化鉴定

采用细菌 16S rDNA 通用引物 (上游引物 16 S-27 F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 下游引物 16 S-1492 R: GGTTACCTTGTTACGACTT) 对纯化细菌进行 PCR 扩增^[20]。扩增反应体系: DNA mix 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/μL) 各 1 μL, 2 μL 菌体 DNA (约 150 ng/μL), 加 ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 16 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 切胶纯化后送广州天一辉远基因科技有限公司测序, 于 GenBank 中进行 BLAST 分析。

将纯化保种的菌种采用平板划线法接种于 LB 固体培养基, 37 °C 恒温过夜培养, 观察菌落形态, 参照《伯杰细菌鉴定手册》^[21]进行生理生化鉴定, 鉴定项目有革兰氏染色、接触酶实验、淀粉、酪氨酸水解实验、柠檬酸盐实验和各种糖类发酵等实验 (相关试剂购自广州环凯微生物科技有限公司)。

1.3 有机物降解菌分离

用纯化的菌株处理污水, 以验证菌株降解

COD的能力。具体实验方法: 从 -80°C 冰箱中取出需要的实验菌株, 分别接种于LB固体培养基, 37°C 培养箱中静置培养过夜, 挑取单克隆接种于液体LB培养基, 37°C 培养箱中170 r/min培养约4 h, 然后分别将细菌培养液与灭菌后的污水以1:1的比例混合, 空白对照组为使用同样的不含细菌的培养基和污水。定时观察、记录、测定COD。

在每支COD预制试剂(青岛路博建业环保科技有限公司)中加入2 mL样品液, DR B200数字式反应器(HACH, 青岛路博建业环保科技有限公司) 165°C 消化60 min, DR 1900便携式可见分光光度计(1 500 mg/L, HACH, 上海世禄仪器有限公司)测定光吸收值, 计算COD浓度。

数据使用GraphPad Prism 7作图软件作图, 使用SPSS 18软件的单因素方差分析对对照组和枯草芽孢杆菌H2处理组在不同时间点的显著性差异进行分析, 数据均为平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, $P<0.05$ 的值表示有显著差异。

1.4 细菌16S rDNA进化树分析

采用本实验筛选菌株的16S rDNA序列, 在NCBI数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中比对其同源性, 同时获取其他菌种的16S rDNA, 采用MEGA 6.0软件构建系统发育树。

1.5 确定筛选菌株的培养条件

为确定分离细菌的最适生长条件, 本研究分别从培养温度、pH值、盐度等方面探究其最佳生长曲线, 以了解菌株的生长周期^[22-23]。测定最适培养盐度时, pH保持为7.0, 使用8个不同盐度(0、1、5、10、20、40、60和100)的LB液体培养基, 37°C 培养4 h后, 测量其 OD_{620} 值。测定最适培养温度时, 盐度保持为10, pH为7.0, 分别在12、18、28、37、42和 50°C 下培养细菌4 h, 再测定 OD_{620} 值。测定最适培养pH时, 分别按pH 4.5、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0和8.5配制LB液体培养基, 盐度为10, 相同条件 37°C 培养4 h测定 OD_{620} 值。综合上述结果, 得到最适培养条件, 再在该条件下测定该菌株的最适生长曲线。

1.6 组织切片染色观察

适应环境2周后的草鱼被随机分成实验组

和对照组各30尾, 实验组灌胃2 mL 10^6 CFU/mL的枯草芽孢杆菌, 对照组灌胃等体积0.7%的生理盐水。养殖7 d后, 取实验组和对照组实验鱼各6尾, 采集肠道(分前肠、中肠和后肠3个部分)组织, 4%多聚甲醛固定液于室温下 $[(20\pm 1)^{\circ}\text{C}]$ 固定24 h后进行一系列的石蜡包埋和切片步骤。切片后进行苏木素—伊红(H.E)染色研究组织病理情况, 同时也通过高碘酸雪夫氏(PAS)染色(通过高碘酸把糖类相邻2个碳上的羟基氧化成醛基, 再用雪夫试剂和醛基反应使之呈现红色, 故该试剂可以将组织中的中性黏多糖或糖原染成红色), 用于检测肠道中杯状细胞的分泌以及分布情况。将各组剩下的24尾分成2组, 分别灌胃嗜水气单胞菌和等体积的生理盐水。处理3 d后, 分别采集前肠、中肠、后肠进行组织切片分析。

1.7 基因组DNA的提取和全基因组序列测定

在最适培养条件下, 用锥形瓶培养菌株4 h, 然后离心收集菌体, 按酵母提取法提取细菌基因组DNA。对提取的基因组DNA进行纯度和浓度检测, 合格后送上海欧易生物科技有限公司进行测序。

三代测序的数据首先使用falcon软件^[24]进行原始数据的自我矫正及基因组初步组装, 再进行序列矫正, 最后使用矫正过的原始序列作为辅助数据将组装出来的一致性序列进行circulator^[25]环化处理, 最终得到环化的细菌基因组, 再进行后续各数据库分析。

2 结果

2.1 菌株H2的生理生化鉴定

利用稀释涂布平板法和平板划线法分离纯化了几十株菌, 利用16S rDNA鉴定法对这些菌株做了初步鉴定, 结果表明大多数菌株为芽孢杆菌。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[21]对筛选的H2菌株进行以下各项生化实验^[26], 结果如表1所示。根据这些结果, 可以确定该菌株为枯草芽孢杆菌。

2.2 有机物降解效果

实验污水先通过高压灭菌以去除本身含有的细菌。经过前期实验, 得出污水: LB液体培养基: 水 = 1:1:8混合效果较好。经过72、

表 1 *B. subtilis* H2 的生理生化特征

Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strain *B. subtilis* H2

生理生化鉴定项目 physiological and biochemical identification	结果 results	生理生化鉴定项目 physiological and biochemical identification	结果 results
接触酶 catalase test	+	纤维二糖 cellobiose	+
酪氨酸水解 tyrosine hydrolysis test	-	果糖 fructose	+
淀粉水解 starch hydrolysis test	+	松三糖 melezitose	-
柠檬酸盐 citrate test	-	甘露糖 mannose	+
葡萄糖酸盐 gluconate test	-	葡萄糖 glucose	+
2% NaCl	+	阿拉伯糖 arabinose	+
7% NaCl	+	麦芽糖 maltose	+
10% NaCl	-	木糖 xylose	-
4 °C 生长 4 °C low temperature growth	-	棉子糖 raffinose	-
10 °C 生长 10 °C low temperature growth	-	半乳糖 galactose	-
55 °C 生长 55 °C high temperature growth	+	乳糖 lactose	-
60 °C 生长 60 °C high temperature growth	-	水杨苷 salicin	+
革兰氏染色 gram stain	+	蔗糖 sucrose	+

注：“+”表示生化反应为阳性；“-”表示生化反应为阴性

Notes: “+” means positive biochemical reaction; “-” means negative biochemical reaction

144、216、288、360、432、504 和 576 h 8 个不同时间的处理，与对照组比较，筛选的 *B. subtilis* H2 菌株可显著降低污水的 COD(图 1)。

2.3 枯草芽孢杆菌 H2 的培养条件

B. subtilis H2 在 37~42 °C 均可以很好地生长，其中在 42 °C 时生长情况最好，因此 42 °C 是该细菌的最适生长温度(图 2-a)。*B. subtilis* H2 在 pH

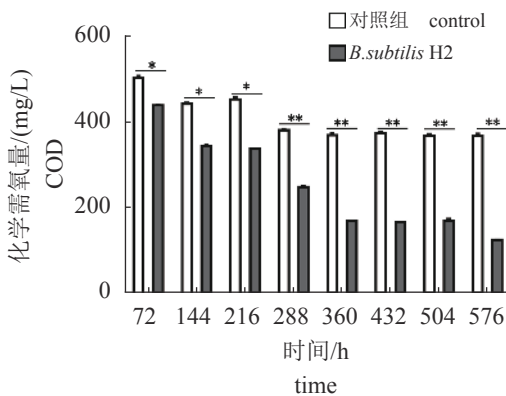


图 1 *B. subtilis* H2 菌株对 COD 的降解效果

单因素方差分析，与对照处理的 mean±SD 相比，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$

Fig. 1 Degradation of COD by *B. subtilis* H2 strain

These data are expressed as the mean±SD relative to the control. * $P < 0.05$ vs. control; ** $P < 0.01$ vs. control

6.5~7.5 均能很好地生长，pH 6.5 最适合其生长(图 2-b)。*B. subtilis* H2 在盐度 1~4 范围都可以较好地生长，最适盐度为 1(图 2-c)。*B. subtilis* H2 在最适生长条件下的生长曲线如图 2-d 所示。

2.4 筛选菌株 H2 的 16S rDNA 进化树

为了确认 *B. subtilis* H2 在芽孢杆菌中的进化位置^[27]，本研究将获得的 16S rDNA 和其他相关物种的 16S rDNA 序列进行比对，并构建系统发育树，如图 3 所示。从序列比对结果可知，同源性最高的菌株编号为 FN869038.1，对应于菌株 *B. subtilis* strain SCUT09，其序列相似性为 98.8%。

2.5 草鱼肠道组织切片分析

H.E 染色 为进一步探究所分离细菌对草鱼肠道的影响作用，本实验分别采集经过灌胃处理后草鱼的前肠、中肠和后肠组织进行 H.E 染色，结果显示对照组肠绒毛连贯完整、排列整齐，绒毛表面覆盖数量众多的柱状细胞，各细胞大小均匀一致(图版 I-1~3)；相比对照组，芽孢实验组的杯状细胞增多，尤其以中肠最为明显(图版 I-4~6)；而只灌胃嗜水气单胞菌实验组肠黏膜严重充血溃烂，杯状细胞增多，出血明显，黏膜褶皱末端明显膨大(图版 I-7~9)；当经过灌胃芽

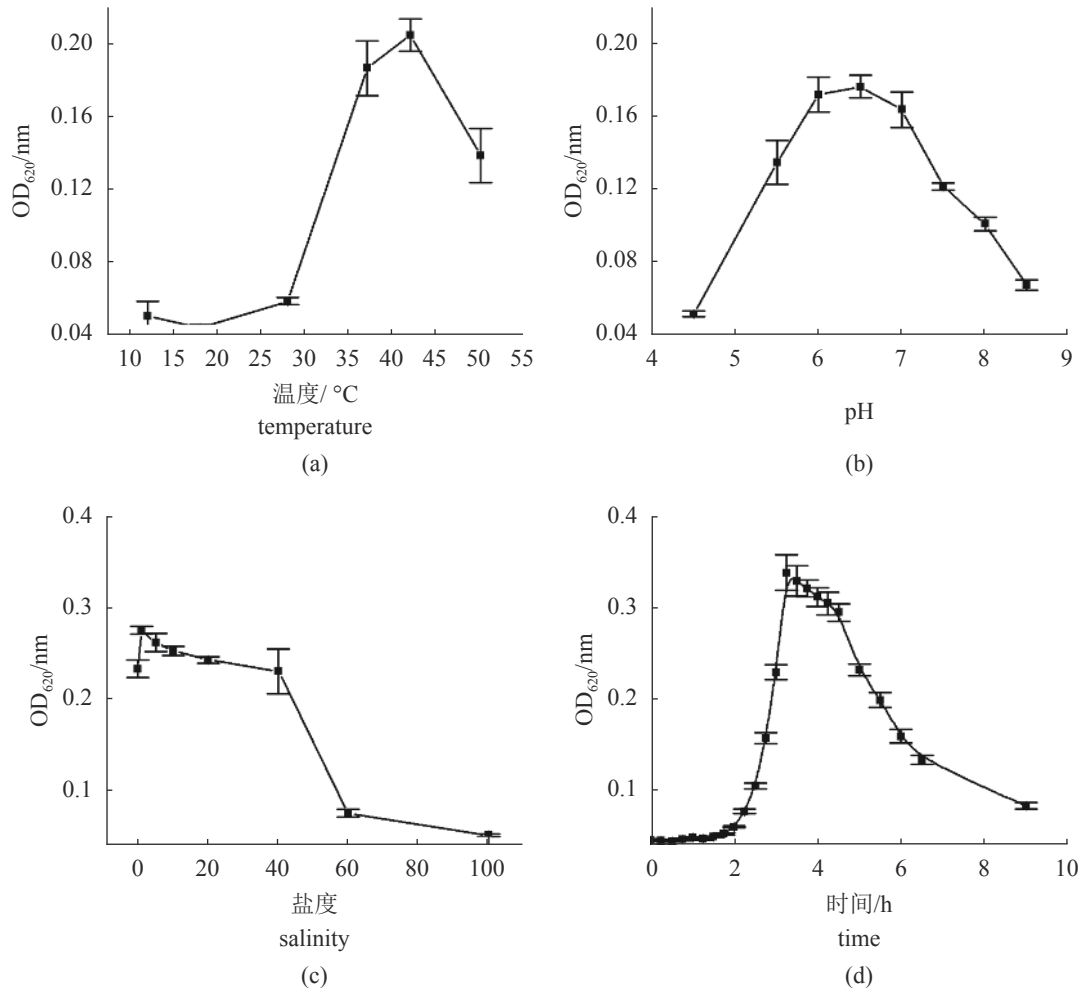


图2 *B. subtilis* H2 的最佳生长条件

(a) 最适生长温度, (b) 最适生长 pH, (c) 最适生长盐度, (d) 最佳生长曲线

Fig. 2 Optimal growth conditions for *B. subtilis* H2

(a) optimal growth temperature, (b) optimal growth pH, (c) optimal growth salinity, (d) optimal growth curve

孢杆菌后再用嗜水气单胞菌处理时, 肠道出现大量杯状细胞, 但肠道结构相对完整, 并无其他异常症状(图版 I -10~12)。

PAS 染色 PAS 染色结果显示, 与对照组相比(图版 II -1~3), 各实验组的中性黏多糖或糖原增多, 呈紫红色, 尤其以芽孢实验组的中肠最为明显(图版 II -4~6); 只灌胃嗜水气单胞菌实验组的中性黏蛋白或糖原含量比芽孢实验组少(图版 II -7~9); 当经过灌胃芽孢杆菌后再用嗜水气单胞菌处理时, 中性黏蛋白或糖原含量相对芽孢实验组要少, 但相对对照组增多(图版 II -10~12)。

2.6 全基因组分析

使用 PacBio 三代测序结果表明, *B. subtilis*

H2 的染色体全基因组序列全长为 4 111 243 bp, 其 GC 含量为 43.46%, 编码 4 213 个基因, 编码序列占整个基因组序列的 87.67%, 平均长度为 855.53 bp, 非编码 RNA 中 rRNA 有 31 个, tRNA 有 87 个。软件绘制基因组圈图见图 4。

COG 数据库注释 COG 数据库分析表明, *B. subtilis* H2 有 3 639 个 CDS 序列, COG 数据库比对的同源基因注释得到 4 大类功能蛋白, 分别为信息存储和处理 (information storage and processing), 细胞过程和信号传递 (cellular processes and signaling), 代谢 (metabolism), 以及未知功能的蛋白 (poorly characterized), 其中与代谢相关的基因最多, 含有 1 500 个。COG 功能注释的蛋白有 3 073 个, 其中与代谢相关的蛋白最多, 占总注释基因的 19.2%, 主要为氨基酸、碳水化合物、

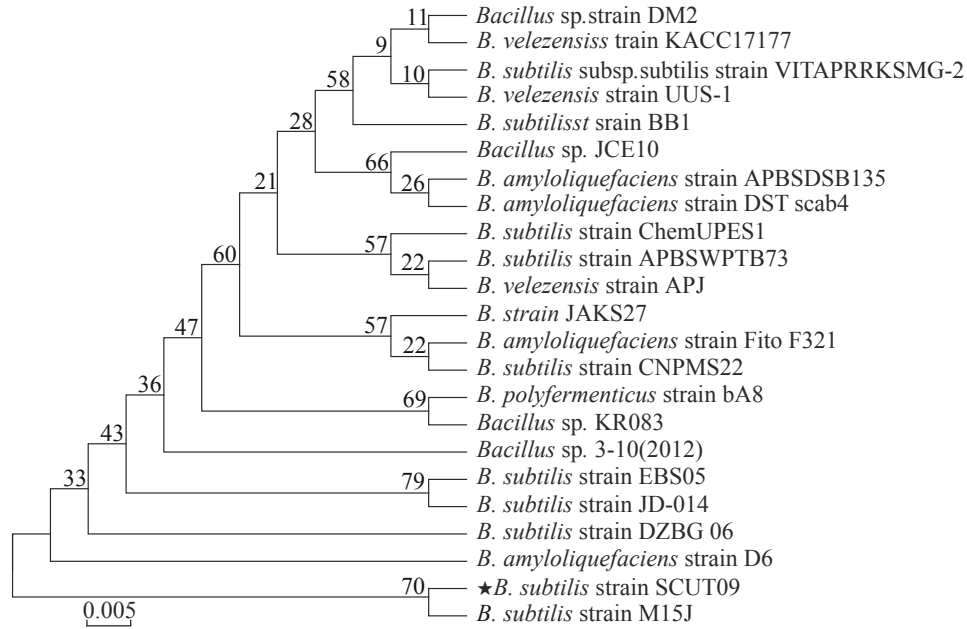
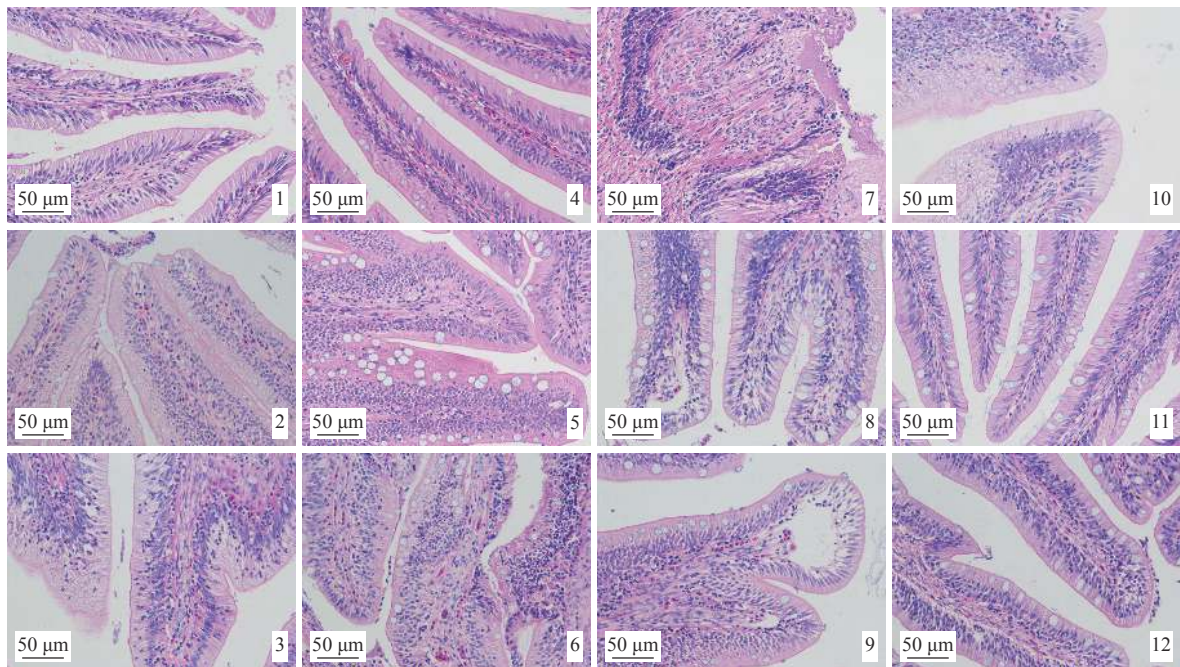


图 3 *B. subtilis* H2 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *B. subtilis* H2 based on the sequences of 16S rDNA



图版 I 肠道组织切片 H.E 染色

1-3 分别为对照组前肠、中肠和后肠；4-6 分别为芽孢杆菌实验组前肠、中肠和后肠；7-9 分别为嗜水气单胞菌实验组前肠、中肠和后肠；10-12 分别为芽孢杆菌+嗜水气单胞菌实验组前肠、中肠和后肠。下同

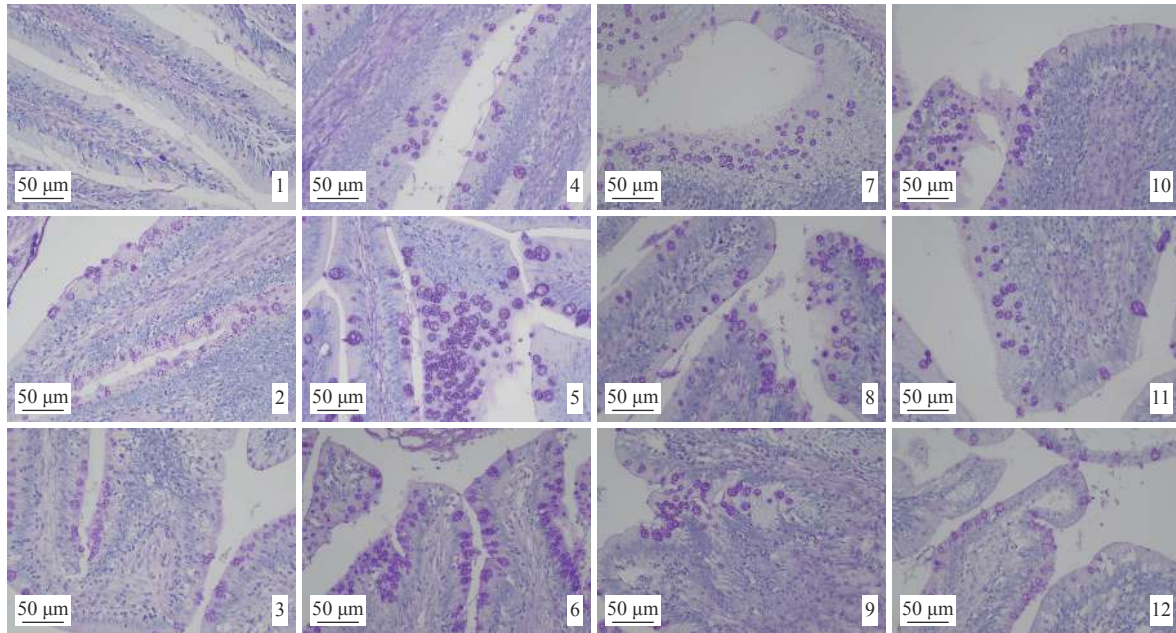
Plate I H.E staining of intestine tissue section

1-3. anterior intestine, middle intestine and posterior intestine of *C. idella* from the control group, respectively; 4-6. anterior intestine, middle intestine and posterior intestine from the *B. subtilis* experimental group, respectively; 7-9. anterior intestine, middle intestine and posterior intestine from the *A. hydrophila* experimental group, respectively; 10-12. anterior intestine, middle intestine and posterior intestine from the *B. subtilis* treatment group challenged with *A. hydrophila*, respectively. The same below

无机离子的转运与代谢 (E、G、P)(图 5), 从图中可以看出仍然有 11.1% 的未知功能蛋白 (S) 无法

获得功能注释, 有待进一步分析。

GO 数据库注释 基于 Swissprot 的结果,



图版 II 肠道组织切片 PAS 染色

Plate II PAS staining of intestine tissue section

将蛋白 ID 映射到 GO term, 获得 GO 注释信息 (图 6), GO 功能分类主要是对生物学途径 (biological process)、细胞学组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 进行分类, 3 个本体下又细分为约 41 个小类, 总的注释基因为 3 264 个。其中生物学途径的细胞过程、代谢过程、调节生物过程基因百分比最多; 细胞学组分的细胞/细胞部分、膜/膜部分、细胞器/细胞器部分基因百分比最多; 分子功能的黏合、催化活性、运输活性基因百分比最多。

KEGG 通路分析 KEGG 数据库将生物通路划分为 8 大类, 每一大类下还有细分, 以通路图的方式展示出来, 通过该数据库的注释, 可以通过通路的方式快速查询某一功能相关的所有注释基因^[28]。KEGG 功能分类主要对细胞内过程、环境信息处理过程、遗传信息处理过程、代谢过程进行功能分类 (图 7)。其中环境信息处理过程中的膜转运和信号传导基因数量最多; 遗传信息处理过程中的翻译基因数量最多; 而 4 个功能大类中与代谢途径相关的基因最多, 其基因数量占 KEGG 注释的总基因的 65.72%, 主要是碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素代谢。

特有功能数据库注释 特有功能数据库注释包括耐药基因 (CARD)^[29] 数据库注释、碳水

化合物相关酶 (CAZy) 数据库注释、细菌致病菌毒力因子 (VFDB) 注释、病原与宿主互作数据库 (PHI) 注释。本研究选择与代谢相关的 CAZy 作为分析对象, 结合 KEGG 代谢通路, 为查找所需相关基因做准备。CAZy 注释中, 糖苷水解酶相关基因最多, 此外还包括糖基转移酶、多糖裂解酶和糖类酯解酶, 以及结合碳水化合物的相关结构域 (图 8), 通过参与碳水化合物的结合、降解、转运来实现碳水化合物的利用和代谢。

比较基因组学分析 比较分析可知 *B. subtilis* H2 基因组大小为 4.11 Mb, 与同为枯草芽孢杆菌的 *B. subtilis* 168 (4.25 Mb, AL009126)、*B. subtilis* ATCC 13952 (3.88 Mb, CP009748.1) 和 *B. subtilis* TU-B-10 (4.21 Mb, NC_016047.1) 大小差不多, 共线性分析基本无偏差。本研究样本 *B. subtilis* H2 拼接出的基因组序列同参考基因组 *B. subtilis* 168、*B. subtilis* ATCC 13952 和 *B. subtilis* TU-B-10 之间的共线性比对, 通过维恩图分析共有和特有基因, 发现 4 个全基因组共有的 core 基因有 2 781 个 (图 9), 本研究样本 *B. subtilis* H2 基因组特有的基因有 309 个。

3 讨论

枯草芽孢杆菌是一种典型的革兰氏阳性好氧菌^[30], 是最早研究的细菌之一, 于 1835 年被

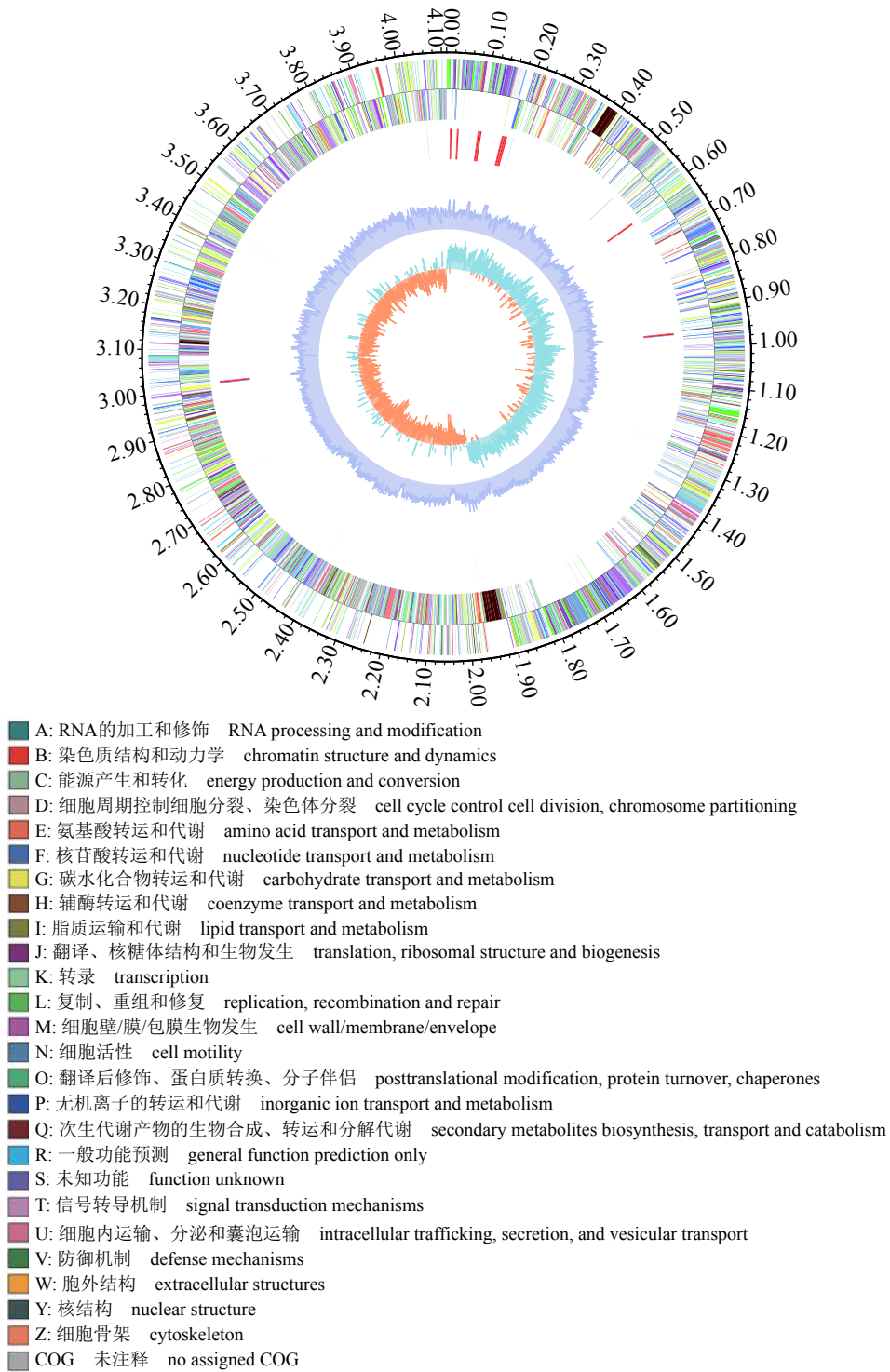


图 4 *B. subtilis* H2 基因组圈图

从内到外，第 1 圈为 GC-skew 的柱状图， $(G-C)/(G+C) > 0$ ，用蓝色表示； $(G-C)/(G+C) < 0$ ，用橘黄色表示。第 2 圈为 GC 含量，呈紫蓝色。第 3 圈表示非编码 RNA，红色为 rRNA，蓝色为 tRNA。4、5 圈表示基因组上基因的分布，不同颜色表示基因不同的 COG 注释。各字母的含义与图 5 一致

Fig. 4 Circular diagram of *B. subtilis* H2

From inside to outside, the first circle is GC skew, when $(G-C)/(G+C) > 0$ is indicated by blue and $(G-C)/(G+C) < 0$ is indicated by orange. The second circle is the GC content which is purple blue. The third circle represents non-coding RNA, red is rRNA, blue is tRNA. Circles four and five represent the distribution of genes on the genome, and different colors represent different COG annotations of the genes. The meaning of acronyms in this figure is the same as that in Fig.5

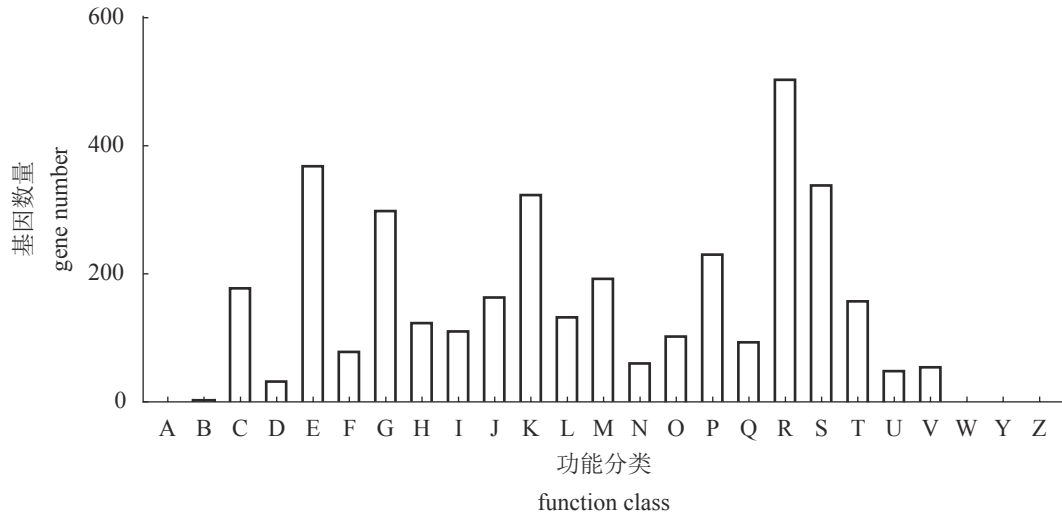


图5 *B. subtilis* H2 的 COG 聚类分析
 Fig. 5 COG cluster analysis of *B. subtilis* H2

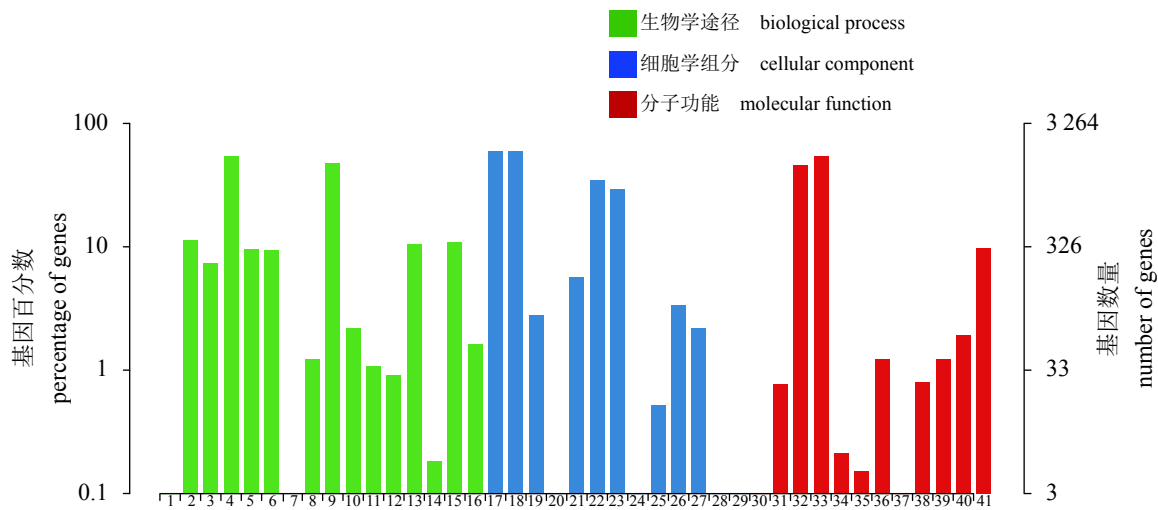


图6 *B. subtilis* H2 的 GO 聚类分析

1. 生物黏附, 2. 生物调节, 3. 组织或生物起源的细胞组件, 4. 细胞过程, 5. 发育过程, 6. 定位建立, 7. 定位, 8. 运动, 9. 代谢过程, 10. 多-生物过程, 11. 负调控的生物过程, 12. 正调节生物过程, 13. 调节生物过程, 14. 繁殖, 15. 应激反应, 16. 信号, 17. 细胞, 18. 细胞部分, 19. 细胞外区域, 20. 细胞外区域部分, 21. 分子复合物, 22. 膜, 23. 膜部分, 24. 膜—封闭腔, 25. 类核, 26. 细胞器, 27. 细胞器部分, 28. 病毒粒子, 29. 病毒粒子部分, 30. D-丙氨酰载体活动, 31. 抗氧化活性, 32. 黏合, 33. 催化活性, 34. 电子载体活性, 35. 酶调节活性, 36. 分子传感器活性, 37. 储层营养活性, 38. 蛋白结合转录因子活性, 39. 受体活性, 40. 结构分子活性, 41. 运输活动

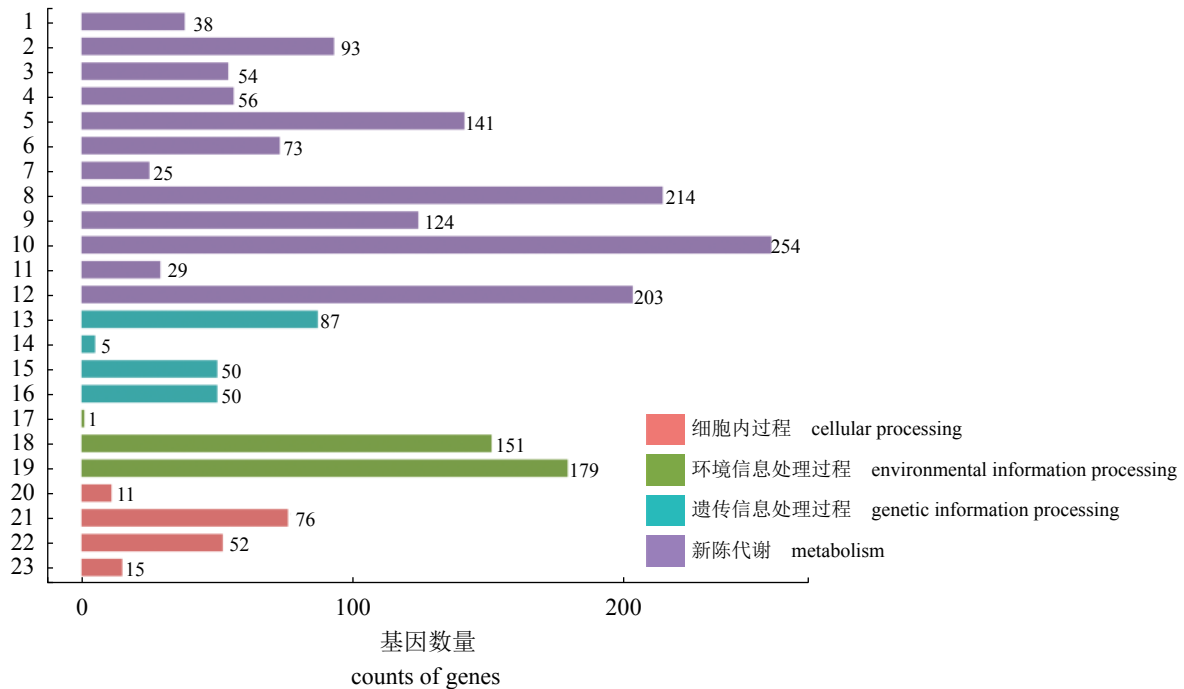
Fig. 6 GO cluster analysis of *B. subtilis* H2

1. biological adhesion, 2. biological regulation, 3. cellular component organization or biogenesis, 4. cellular process, 5. developmental process, 6. establishment of localization, 7. localization; 8. locomotion, 9. metabolic process, 10. multi-organism process, 11. negative regulation of biological process, 12. positive regulation of biological process, 13. regulation of biological process, 14. reproduction, 15. response to stimulus, 16. signaling, 17. cell, 18. cell part, 19. extracellular region, 20. extracellular region part, 21. macromolecular complex, 22. membrane, 23. membrane part, 24. membrane-enclosed lumen, 25. nucleoid, 26. organelle, 27. organelle part, 28. virion, 29. virion part, 30. D-alanyl carrier activity, 31. antioxidant activity, 32. binding, 33. catalytic activity, 34. electron carrier activity, 35. enzyme regulator activity, 36. molecular transducer activity, 37. nutrient reservoir activity, 38. protein binding transcription factor activity, 39. receptor activity, 40. structural molecule activity, 41. transporter activity

命名为枯草弧菌, 并于 1872 年更名为枯草芽孢杆菌。该菌具有抵抗环境因素(如热、酸和盐)的内生孢子, 可以在环境中长期存在。目前枯

草芽孢杆菌已广泛应用于水产养殖业, 主要用于鱼虾的生长和病害防治以及水质处理^[14, 31-32]。

本研究从污水中分离鉴定出一株枯草芽孢



- | | |
|---|---|
| 1: 外源性物质的生物降解 xenobiotics biodegradation and metabolism | 15: 复制和修复 replication and repair |
| 2: 核苷酸代谢 nucleotide metabolism | 16: 折叠、分类和降解 folding, sorting and degradation |
| 3: 萜类和多酮类的代谢 metabolism of terpenoids and polyketides | 17: 信号分子及相互作用 signaling molecules and interaction |
| 4: 其他氨基酸类代谢 metabolism of other amino acids | 18: 信号转导 signal transduction |
| 5: 辅助因子和维生素代谢 metabolism of cofactors and vitamins | 19: 膜转运 membrane transport |
| 6: 脂质代谢 lipid metabolism | 20: 转运和分解代谢 transport and catabolism |
| 7: 聚糖的生物合成和代谢 glycan biosynthesis and metabolism | 21: 细胞群体-原核生物 cellular community-prokaryotes |
| 8: 全局和概览图 global and overview maps | 22: 细胞运动 cell motility |
| 9: 能量代谢 energy metabolism | 23: 细胞生长和凋亡 cell growth and death |
| 10: 碳水化合物代谢 carbohydrate metabolism | |
| 11: 其他次生代谢产物的生物合成 biosynthesis of other secondary metabolites | |
| 13: 翻译 translation | |
| 14: 转录 transcription | |

图 7 *B. subtilis* H2 的 KEGG 功能分类

纵轴表示 Level2 pathway 通路名, 柱子右侧数字代表注释到该 Level2 pathway 下的基因数量

Fig. 7 KEGG functional analysis of *B. subtilis* H2

The vertical axis represents the name of Level2 pathway, and the number on the right of the pillars represents the number of gene annotated to the Level2 pathway

杆菌, 并对其最适生长条件进行了探究。为了进一步分析该菌株在水产养殖中的作用, 本研究探究了分离芽孢杆菌对草鱼肠道的保护作用。结果表明该菌导致肠道组织的杯状细胞数量增加, 这与 Reda^[33] 等发现解淀粉芽孢杆菌使尼罗罗非鱼的肠道组织杯状细胞和上皮内淋巴细胞数量增加的结果相似。其次, 嗜水气单胞菌攻毒结果发现, 分离的枯草芽孢杆菌对草鱼肠道的完整性具有显著的保护作用, 与任雨薇^[34] 发现枯草芽孢杆菌对嗜水气单胞菌具有直接抑制

作用相一致, 此外任雨薇^[34] 是从草鱼的肠道分离出一株枯草芽孢杆菌, 通过与嗜水气单胞菌的共培养, 发现枯草芽孢杆菌对嗜水气单胞菌的生长毒力具有抑制作用。多项研究表明枯草芽孢杆菌可以增强鱼类的吞噬作用、溶菌酶活性、呼吸爆发和补体活性等免疫参数^[35]。本研究结果揭示了枯草芽孢杆菌对草鱼肠道具有免疫保护作用, 其可能来源于枯草芽孢杆菌促进肠道细胞分泌的具有抗菌作用的物质, 也可能来源于芽孢杆菌与病原菌的直接相互作用, 但芽

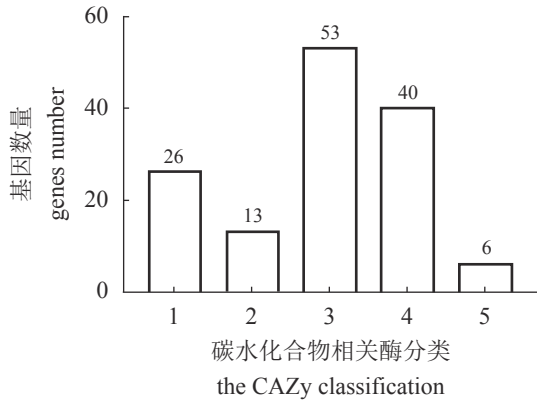


图8 CAZy 注释分布图

1. 糖类酯解酶, 2. 结合碳水化合物, 3. 糖苷水解酶, 4. 糖基转移酶, 5. 多糖裂解酶

Fig. 8 CAZy annotated class distribution map

1. carbohydrate esterases; 2. carbohydrate-binding modules; 3. glycoside hydrolases; 4. glycosyl transferases; 5. polysaccharide lyases

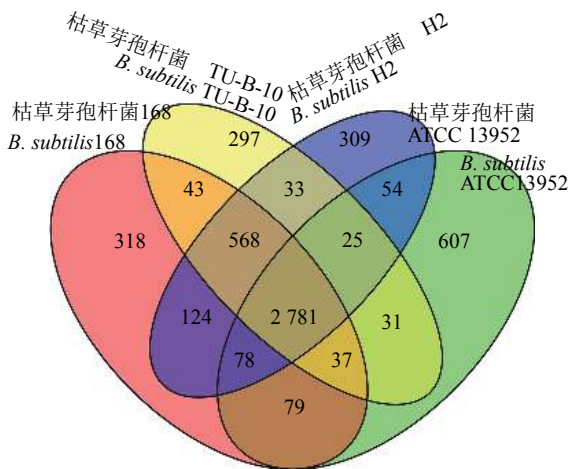


图9 四株不同枯草芽孢杆菌的共有和特有基因维恩图

两种颜色交接处的数字表示颜色所指菌株的共有基因数

Fig. 9 Venn diagram of common and specific genes of four strains of B. subtilis

The number at the junction of the two colors indicates the number of genes shared by the strains indicated by the color

孢杆菌对肠道微生物菌群结构及免疫调控机制尚需进一步研究。

高通量测序技术已经广泛用于在基因水平揭示研究对象的作用机制中, 更为后续研究提供基础。本研究通过全基因组测序对分离的芽孢杆菌进行基因组分析, COG 聚类图显示, 该菌能量的产生与转化、氨基酸的转运与代谢、转录, 无机离子的转运与代谢等都是高度富集的, 推测是由于在污水环境中筛选出的菌株以

污水中富集的有机物和无机离子为主要营养物质并赖以存活, 所以对能源生产和运输、碳水化合物运输和代谢具有高度的敏感性, 对环境具有高度的适应性^[36]。GO 聚类分析, 其中归类为细胞、细胞部位、催化、细胞内过程和代谢过程的基因数量最多, 说明菌株的分裂、催化和代谢蛋白活跃。分析 KEGG 通路注释可知, 其中与新陈代谢途径相关的基因最多, 这与 COG 数据库注释的结果相似。分析枯草芽孢杆菌的通路可知, 该菌含有丰富的异生素生物降解和代谢通路, 如萘降解通路、二甲苯降解通路、二噁英降解通路、苯乙烯降解通路等, 这些通路对微生物降解环境中的有机污染物提供了很好的分子上的解释。

本研究通过全基因组测序方法, 最终获得高质量芽孢属 *B. subtilis* H2 基因组。将 *B. subtilis* H2 的基因组序列与其他已经测序完成的芽孢杆菌基因组序列进行比较分析, 其中包括模式菌株枯草芽孢杆菌 168 株 (*B. subtilis* 168)、枯草芽孢杆菌株 (*B. subtilis* ATCC 13952) 和枯草芽孢杆菌亚种 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* TU-B-10, 三株菌的基因组序列下载自 GenBank 数据库^[37-38]。*B. subtilis* 168 是最早测序的全基因组模式菌株, 基因组大小为 4.25 Mb; *B. subtilis* ATCC 13952 是一株肌苷工业生产菌株, 李尔汉^[37]首次报道了该菌株的全基因组序列, 全基因组大小为 3.88 Mb; *B. subtilis* subsp *spizizenii* TU-B-10 为从土壤中新分离的菌株, 基因组为 4.21Mb。比较基因组分析显示与 3 个参考基因组的共线性关系基本无偏差, 说明该菌株具有保守的基因组结构。通过进一步分析 *B. subtilis* H2 菌株全基因组中 309 个特有基因, 发现很多与细胞过程和信号传递相关的基因, 将有可能解析 *B. subtilis* H2 菌株保护肠道组织和降解污水的分子机制。接下来可通过荧光定量 PCR、基因敲除等方法进一步研究相关基因功能。

综上所述, *B. subtilis* H2 在水产养殖和污水处理中均有很好的开发前景, 其在水产动物中的作用还需要进一步探究。本研究也为其他水产有益菌或污水处理细菌的研究提供了参考。

参考文献:

[1] 王凯, 武道吉, 彭永臻, 等. 垃圾渗滤液处理工艺研究及应用现状浅析[J]. 北京工业大学学报, 2018, 44(1): 1-

12.
Wang K, Wu D J, Peng Y Z, *et al.* Critical review of landfill leachate treatment technologies[J]. *Journal of Beijing University of Technology*, 2018, 44(1): 1-12(in Chinese).
- [2] 张铁军, 臧晓峰. 垃圾渗滤液处理技术研究进展[J]. *天津化工*, 2018, 32(6): 1-4.
Zhang T J, Zang X F. Research progress of landfill leachate treatment technology[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2018, 32(6): 1-4(in Chinese).
- [3] 李鸥, 高德堂. 填埋场垃圾渗滤液处理技术研究进展[J]. *清洗世界*, 2016, 32(11): 32-35.
Li O, Gao D T. Advances in technology landfill leachate treatment[J]. *Cleaning World*, 2016, 32(11): 32-35(in Chinese).
- [4] Divya M, Aanand S, Srinivasan A, *et al.* Bioremediation-an eco-friendly tool for effluent treatment: a review[J]. *International Journal of Applied Research*, 2015, 1(12): 530-537.
- [5] Xie F X, Zhu T C, Zhang F F, *et al.* Using *Bacillus amyloliquefaciens* for remediation of aquaculture water[J]. *SpringerPlus*, 2013, 2(1): 119.
- [6] Yu C H, Wang Y, Guo T, *et al.* Isolation and identification of ammonia nitrogen degradation strains from industrial wastewater[J]. *Engineering*, 2012, 4: 790-793.
- [7] Kunadia K, Nathani N M, Kothari V, *et al.* Draft genome sequence of commercial textile dye-decolorizing and -degrading *Bacillus subtilis* strain C3 isolated in India[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(2): e00104-16.
- [8] Iribarren D, Dagá P, Moreira M T, *et al.* Potential environmental effects of probiotics used in aquaculture[J]. *Aquaculture International*, 2012, 20(4): 779-789.
- [9] Bachruddin M, Sholichah M, Istiqomah S, *et al.* Effect of probiotic culture water on growth, mortality, and feed conversion ratio of Vaname shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone)[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2018, 137: 012036.
- [10] 田启文, 郭振, 嵇乐乐, 等. 水产养殖中益生菌研究进展[J]. *工业微生物*, 2019, 49(4): 50-55.
Tian Q W, Guo Z, Ji L L, *et al.* Research progress of probiotics in aquaculture[J]. *Industrial Microbiology*, 2019, 49(4): 50-55(in Chinese).
- [11] Soltani M, Ghosh K, Hoseinifar S H, *et al.* Genus *Bacillus*, promising probiotics in aquaculture: aquatic animal origin, bio-active components, bioremediation and efficacy in fish and shellfish[J]. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2019, 27(3): 331-379.
- [12] Chen Y, Li J, Xiao P, *et al.* Isolation and characterization of *Bacillus* spp. M001 for potential application in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) against *Vibrio anguillarum*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(2): 374-381.
- [13] Sumathi C, Nandhini A, Padmanaban J. Antagonistic activity of probiotic *Bacillus megaterium* against *Streptococcus mutans*[J]. *International Journal of Pharmacology and Biological Sciences*, 2017, 8: 270-274.
- [14] Cha J H, Rahimnejad S, Yang S Y, *et al.* Evaluations of *Bacillus* spp. As dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives[J]. *Aquaculture*, 2013, 402-403: 50-57.
- [15] Liu H T, Wang S F, Cai Y, *et al.* Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 enhances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 326-333.
- [16] 李卓佳, 林亮, 杨莺莺, 等. 芽孢杆菌制剂对凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 肠道微生物群落的影响[J]. *南方水产*, 2005, 1(3): 54-59.
Li Z J, Lin L, Yang Y Y, *et al.* Effect of *Bacillus* commercial probiotic on intestinal microflora of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2005, 1(3): 54-59(in Chinese).
- [17] Liu C H, Chiu C S, Ho P L, *et al.* Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(3): 1031-1041.
- [18] Madani N S H, Adorian T J, Farsani H G, *et al.* The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(5): 1926-1933.
- [19] Rahimi T, Niazi A, Deihimi T, *et al.* Genome annotation and comparative genomic analysis of *Bacillus subtilis* MJ01, a new bio-degradation strain isolated from oil-contaminated soil[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2018, 18(5): 533-543.
- [20] Edwards U, Rogall T, Blöcker H, *et al.* Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(19): 7843-7853.

- 7853.
- [21] Buehanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins Co., 1974.
- [22] 何义进. 微生态制剂降解养殖水体氨氮及亚硝酸盐的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
He Y J. Study on ammonia and nitrite reducing in the pond using microorganism[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007(in Chinese).
- [23] Shaheen M, Shah A A, Hameed A, *et al.* Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2008, 40(5): 2161-2169.
- [24] Chin C S, Peluso P, Sedlazeck F J, *et al.* Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(12): 1050-1054.
- [25] Hunt M, De Silva N, Otto T D, *et al.* Circlator: Automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 294.
- [26] 倪鑫鑫, 龚海燕, 马顶虹, 等. 芽孢杆菌生理生化特性分析[J]. *安徽农学通报*, 2015, 21(7): 47-48, 58.
Ni X X, Gong H Y, Ma D H, *et al.* Analysis of physiological and biochemical characteristics about *Bacillus*[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2015, 21(7): 47-48, 58(in Chinese).
- [27] 朱诗应, 戚中田. 16S rDNA扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J]. *微生物与感染*, 2013, 8(2): 104-109.
Zhu S Y, Qi Z T. Application of bacterial 16S rDNA amplification and sequencing in the classification and identification of bacteria[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2013, 8(2): 104-109(in Chinese).
- [28] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [29] Mistry J, Finn R D, Eddy S R, *et al.* Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(12): e121.
- [30] 李怡洁, 杨佐忠. 枯草芽孢杆菌主要作用机制与应用研究进展[J]. *四川林业科技*, 2019, 40(4): 126-130.
Li Y J, Yang Z Z. Advances in researches on main action mechanism and application of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2019, 40(4): 126-130(in Chinese).
- [31] 蔡艳, 曹根凤, 叶盛, 等. 枯草芽孢杆菌代替抗生素在水产养殖上的应用[J]. *山西农经*, 2018(19): 75.
Cai Y, Cao G F, Ye S, *et al.* Application of *Bacillus subtilis* in place of antibiotics in aquaculture[J]. *Shanxi Agricultural Economy*, 2018(19): 75(in Chinese).
- [32] 杨荣芳. 饲用枯草芽孢杆菌在水产养殖中的应用[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2015(12): 234-236.
Yang Y F. Application of *Bacillus subtilis* in aquaculture[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2015(12): 234-236(in Chinese).
- [33] Reda R M, Selim K M. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(1): 203-217.
- [34] 任雨薇. 枯草芽孢杆菌对嗜水气单胞菌毒力的影响以及群体感应基因 luxS 的表达 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
Ren Y F. The influences of *Bacillus subtilis* on the virulence of *Aeromonas hydrophila* and the expression of quorum sensing luxS gene[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017(in Chinese).
- [35] Soltani M, Lymbery A, Song S K, *et al.* Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2019, 11(4): 1325-1341.
- [36] 郭睿. 杀线虫芽孢杆菌 B16 的全基因组分析 [D]. 昆明: 云南大学, 2015.
Guo R. The complete genome sequence analysis of gram-positive bacterium *Bacillus nematocida* B16[D]. Kunming: Yunnan University, 2015(in Chinese).
- [37] 李尔汉, 杨慧林, 王筱兰, 等. 肌苷生产菌枯草芽孢杆菌 ATCC 13952 的全基因组测序及序列分析[J]. *微生物学报*, 2015, 55(12): 1560-1567.
Li E H, Yang H L, Wang X L, *et al.* Whole-genome sequencing and analysis of inosine-producing strain *Bacillus subtilis* ATCC 13952[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(12): 1560-1567(in Chinese).
- [38] Perera V R, Lapek J D J, Newton G L, *et al.* Identification of the S-transferase like superfamily bacillithiol transferases encoded by *Bacillus subtilis*[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(2): e0192977.

Isolation, identification and genome-wide analysis of a strain *Bacillus subtilis* H2 with the ability to protect *Ctenopharyngodon idella* gut and improve water quality

ZI Yingjuan¹, QIN Zhendong¹, ZHAN Fanbin¹, XIE Haokun², ZHANG Hanyun³, LI Feng¹,
LI Bin⁴, ZHAO Haohan⁴, XIE Yuansong⁴, ZHAO Lijuan^{1*}, LIN Li^{1*}

- (1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Archbishop Riordan High School, San Francisco 94112, USA;
3. Department of Life Sciences, Imperial College London, Berks SL5 7PY, United Kingdom;
4. AWS Technologies Co., Ltd., Panyu 511400, China)

Abstract: To obtain the microbes efficiently degrading pollutants, a new bacterial strain was successfully isolated that has the ability to degrade chemical oxygen demand (COD) from sewage efficiently. According to physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequencing phylogenetic analysis, the isolated strain is identified as *Bacillus subtilis* and named *B. subtilis* H2. A phylogenetic tree was constructed by comparing the 16S rDNA of the isolated strain and found to have a homology of 98.8% with *B. subtilis* strain SCUT09. The isolate H2 was found to be highly tolerant to a wide range of temperature, pH, and salinity conditions, however, the optimal growth conditions were at 42 °C, 6.5, and 1, respectively. Further, to explore its application in aquaculture, we investigated the *Ctenopharyngodon idella* intestine that was administered intragastrically with the *B. subtilis* H2 for 7 d then challenged with the pathogen *Aeromonas hydrophila* to observe the intestinal tissue changes of *C. idella*. *B. subtilis* H2 showed significant protection against *A. hydrophila* in the intestinal tract of *C. idella*. Moreover, to further explore the mechanism of action of this strain, the whole genome of *B. subtilis* H2 was determined in this study. The genome-wide sequencing of the H2 isolate resulted in 4 111 243 bp with GC content of 43.46%, encoding 4 213 genes that accounted for 87.67% of the gene coding region, including 31 rRNA and 87 tRNA genes. Comparative genomics analysis revealed, there were 3 551 core genes shared by this strain with *B. subtilis* 168. These results indicated that the isolated *Bacillus* strain could play significant roles in the treatment of sewage and aquaculture water.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *Bacillus subtilis*; intestine; optimal cultural conditions; COD degradation; genome-wide sequencing

Corresponding authors: ZHAO Lijuan. E-mail: 406856929@qq.com;
LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31872606, 31572657, 31602190, U1701233); Ocean and Fisheries Bureau Foundation of Guangdong (GDME-2018C006, D21822202, A201512C003, 2015-115); Fund of Guangdong Provincial Department of Education (KA170500G, TK222001G, KA18058B3, KA1819604); Zhongkai University of Agriculture and Engineering Graduate Technology Innovation Fund (KA180582610); AWS Technologies Co., Ltd.(D11722259)