



一株枯草芽孢杆菌噬菌体 Bac-S 的生物学特性及全基因组序列分析

赵欣卓^{1,3}, 王鑫淼^{1,3}, 王丽艳^{1,3}, 吴楠¹, 李喜梅¹, 于镇华², 荆瑞勇^{1,3*}, 刘俊杰^{2*}

- 1 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319
- 2 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081
- 3 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163319

赵欣卓, 王鑫淼, 王丽艳, 吴楠, 李喜梅, 于镇华, 荆瑞勇, 刘俊杰. 一株枯草芽孢杆菌噬菌体 Bac-S 的生物学特性及全基因组序列分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3379-3392.

ZHAO Xinzhuo, WANG Xinmiao, WANG Liyan, WU Nan, LI Ximei, YU Zhenhua, JING Ruiyong, LIU Junjie. Biological characterization and genome sequence of a bacteriophage strain Bac-S infecting *Bacillus subtilis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3379-3392.

摘要:【目的】枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)施用于土壤可促进植物生长, 但针对土壤中枯草芽孢杆菌噬菌体的研究鲜有报道, 因此从土壤中分离出枯草芽孢杆菌噬菌体, 并深入研究其生物学特性及基因组特征, 不仅有助于枯草芽孢杆菌的实际应用, 还能丰富枯草芽孢杆菌噬菌体相关生物信息库。【方法】以枯草芽孢杆菌 SM13 为宿主, 从土壤中分离培养出一株噬菌体 Bac-S, 对其进行生物学特性测定、全基因组序列特征、基因功能注释和系统发育分析。【结果】透射电镜显示, 噬菌体 Bac-S 头部直径约为 43 nm, 尾部极短无法测量; 该噬菌体的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.1; 一步生长曲线显示, 潜伏期约为 10 min, 裂解量为 30 PFU/cell; 宿主谱广泛, 能实现跨属侵染; 测序结果显示其基因组长度为 150 019 bp, G+C 含量为 42.6%; 该噬菌体共有 237 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), BLASTn 比对显示该噬菌体与 NCBI 数据库中其他

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1500400); 国家自然科学基金(31870477, 31300425); 黑龙江省自然科学基金(C2017045)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1500400), the National Natural Science Foundation of China (31870477, 31300425), and the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (C2017045).

*Corresponding authors. E-mail: JING Ruiyong, jry_2002@126.com; LIU Junjie, liujunjie@iga.ac.cn

Received: 2024-03-02; Accepted: 2024-04-30; Published online: 2024-05-08

芽孢杆菌噬菌体相似性较高。【结论】从土壤中分离出了一株具有潜伏期短、宿主谱广泛、耐受高温、不耐紫外光照射的特征枯草芽孢杆菌噬菌体，拓宽了对枯草芽孢杆菌噬菌体的认知。

关键词：枯草芽孢杆菌；噬菌体；生物学特性；基因组

Biological characterization and genome sequence of a bacteriophage strain Bac-S infecting *Bacillus subtilis*

ZHAO Xinzhao^{1,3}, WANG Xinmiao^{1,3}, WANG Liyan^{1,3}, WU Nan¹, LI Ximei¹, YU Zhenhua², JING Ruiyong^{1,3*}, LIU Junjie^{2*}

1 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, Heilongjiang, China

3 Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeast Plain, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: [Objective] The application of *Bacillus subtilis* in soil can promote plant growth, while few studies have reported the bacteriophages infecting *B. subtilis*. Therefore, the isolation, biological characterization, and genome sequencing of bacteriophages infecting *B. subtilis* from soil will contribute to the application of *B. subtilis* and enrich the biological information of bacteriophages infecting *B. subtilis*. [Methods] *B. subtilis* SM13 was used as the host to isolate a bacteriophage strain Bac-S from soil. Biological characterization, whole genome sequencing, gene function annotation, and phylogenetic analysis were performed for this bacteriophage strain. [Results] Transmission electron microscopy showed that Bac-S had a head with the diameter of about 43 nm and a tail too short to be measured. The optimal multiplicity of infection of Bac-S was 0.1. The one-step growth curve showed that Bac-S had an incubation period of about 10 min and a burst size of 30 PFU/cell. Bac-S had a wide host spectrum and can infect hosts of different genera. The sequencing results showed that the genome of Bac-S was 150 019 bp, with the G+C content of 42.6% and 237 open reading frames (ORFs). The BLASTn comparison with the sequences in the NCBI database showed that Bac-S was similar to other bacteriophages infecting *B. subtilis*. [Conclusion] A bacteriophage strain infecting *B. subtilis* with a short incubation period, a wide host spectrum, tolerance to high temperature, and intolerance to UV light was isolated from soil. The biological and genetic characterization of this bacteriophage enriches our knowledge about the bacteriophages infecting *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*; bacteriophage; biological characteristics; genome

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)属革兰氏阳性细菌,在促进作物生长、产生植物激素、提高植物免疫力、形成根际生物膜、改良土壤质量、参与土壤碳氮循环、修复污染土壤等方面发挥重要作用^[1],作为生防菌剂在农业上具有广阔应用前景^[2]。枯草芽孢杆菌形成的生物肥可促进草莓植株营养元素积累^[3],减少黄瓜枯萎病原菌(尖孢镰孢菌)和腐霉菌引起的病害^[4],抵抗重金属的污染胁迫^[5]。枯草芽孢杆菌在作物(如玉米^[6]、番茄^[7]和马铃薯^[8]等)根际土壤常被分离获得,对相关病原菌(如玉米弯曲平脐蠕孢^[6]、匍柄霉^[7]和黑痣病的立枯丝核菌^[8]等)具有拮抗作用。本课题组从苏打盐碱地生长的水稻根内分离获得了一株枯草芽孢杆菌 SM13,具有耐盐碱、拮抗植物病原菌以及产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等功能^[9],可提高水稻产量^[10-11]。然而,枯草芽孢杆菌在土壤中持效时间有待深入研究,其中噬菌体是群落结构演替的重要驱动力^[12]。

噬菌体(bacteriophage)是一类个体微小、结构简单,能感染细菌、古生菌等原核生物的病毒,它会干扰宿主正常代谢过程,甚至导致宿主裂解死亡^[13],进而影响土壤微生物的群落结构和功能^[14]。研究表明,不同类型土壤中芽孢杆菌噬菌体的数量不同^[15],噬菌体会影响枯草芽孢杆菌在植物根际土壤中的定殖^[16]。目前,已分离的枯草芽孢杆菌噬菌体基因组大小在 18 000–160 000 bp^[17],包括短尾、肌尾和长尾噬菌体。近期从沙漠分离获得一株肌尾噬菌体^[18],从美国西南沙漠发现 6 株长尾噬菌体并进行了基因组比较^[19],关于枯草芽孢杆菌噬菌体的报道主要集中在酶制剂、食品行业领域^[20],而它在农业生产方面的相关研究相对较少。基于此,本研究从土壤中分离枯草芽孢杆菌噬菌体,对其生物学特性、宿主范围及基因组特征进行分

析,丰富了枯草芽孢杆菌噬菌体的生物信息库,为噬菌体与枯草芽孢杆菌在农业生产中应用提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 宿主菌和噬菌体来源

枯草芽孢杆菌 SM13 由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物实验室保存。噬菌体 Bac-S 分离自黑龙江八一农垦大学水稻育秧棚(N46°59', E125°17')采集的土壤样品。

1.2 培养基、缓冲液配方

NA 液体培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2–7.3, 121 °C 灭菌 20 min。

SM 缓冲液(g/L): NaCl 5.8, MgSO₄·7H₂O 1.968, Tris-HCl 6.057, 丙三醇 62.5 μL, pH 7.0, 121 °C 灭菌 20 min。

KCl 溶液(g/L): KCl 74.551, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 噬菌体的分离纯化

取 5 g 土样放入装有 10 mL 营养琼脂(nutrient agar, NA)液体培养基的 50 mL 锥形瓶中,25 °C、160 r/min 摇床培养 12 h,静置 24 h。混合培养液经 25 °C、8 000 r/min 离心 10 min 后,上清液过 0.22 μm 滤膜获得病毒悬液。取病毒悬液 1 mL 与 0.2 mL 对数生长期(*OD*₆₀₀ 为 0.8)的枯草芽孢杆菌 SM13 菌液混合至 10 mL 试管中,静置孵育 1 h,试管中加入 6 mL 预热的 NA 半固体培养基(琼脂含量 0.6%),混匀后立即倒入已凝固的 NA 固体培养基(琼脂含量 1.5%)上,待上层培养基凝固后置于 30 °C 培养箱倒置培养,24–48 h 后观察噬菌斑。

用 1 mL 蓝枪头扎取单个噬菌斑连带琼脂,收集到装有 1 mL NA 液体培养基的 EP 管中,4 °C 静置 24 h 浸出病毒。将浸出液 25 °C、8 000 r/min 离心 10 min,过 0.22 μm 滤膜后滤液作为噬菌体

悬液,继续侵染对数生长期(OD_{600} 为0.8)的枯草芽孢杆菌 SM13,重复5次以上,待观察到平板中噬菌斑形态大小相同即获得纯化的噬菌体 Bac-S。

1.4 噬菌体的浓缩及电镜观察

将200 mL噬菌体裂解液4 °C、8 000 r/min离心10 min后,取上清液过0.22 μ m滤膜,向滤液中加入8.3%的PEG6000和2.0%的NaCl,充分混匀后,4 °C静置20–24 h,4 °C、15 000 r/min离心30 min,弃上清,沉淀中加入300 μ L SM缓冲液与100 μ L KCl溶液混匀后转移至1.5 mL的EP管中,冰浴30 min后,4 °C、8 000 r/min离心10 min,上清即为病毒浓缩液。

将10 μ L噬菌体浓缩液滴于铜网,自然吸附20 min,用滤纸吸去病毒液,自然干燥后,将铜网置于10 μ L 0.2%的磷钨酸溶液中染色10 s,滤纸侧面吸去染色液,待样品干燥后用透射电子显微镜观察噬菌体形态并拍照记录。

1.5 噬菌体最佳感染复数

取对数生长期(OD_{600} 为0.8)的宿主 SM13菌液,按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)为100、10、1、0.1、0.01与噬菌体混合,将混合液加入到10 mL无菌试管中,加入液体培养基使每管的总体积至2 mL。将试管固定在摇床30 °C、160 r/min培养2 h,用0.22 μ m一次性无菌滤膜过滤病毒感染液,将滤液用无菌水梯度稀释后,双层平板法测定效价,并且制作空白对照,得出最佳感染复数。所有试验均重复3次。

1.6 噬菌体一步生长曲线、酸碱、温度及紫外光稳定性

将对数生长期(OD_{600} 为0.8)的枯草芽孢杆菌 SM13菌液与噬菌体按照最佳感染复数的比例混合,取混合液1 mL加入到EP管中,30 °C静置孵育30 min后,4 °C、12 000 r/min离心1 min,弃去上清,用SM缓冲液洗涤沉淀2次去除游离噬菌体后,再用5 mL SM缓冲液将沉淀涡悬

混匀,迅速放入30 °C、160 r/min摇床振荡培养,从0 min开始每隔10 min取出100 μ L混合液,测定其效价。所有试验均重复3次。裂解量=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度。

取10 μ L噬菌体原液加入0.99 mL的NA液体培养基(pH 3.0–13.0)中,30 °C静置孵育1 h后制成双层平板,观察噬菌体生长情况,测定其效价,制作噬菌体pH稳定性曲线。所有试验均重复3次。

取2 mL噬菌体原液,分别置于10、20、30、40、50、60、70 °C的恒温条件下处理1 h后,采用双层平板法测定噬菌体效价。所有试验均重复3次。

取10 mL噬菌体原液分别放置在3个90 mm无菌平皿中,将其置于紫外灯(30 W)下30 cm处进行照射,每3 min取样一次,采用双层平板法测定噬菌体效价。所有试验均重复3次。

1.7 噬菌体的宿主范围

供试宿主为本实验室分离获得的固氮、解磷细菌共12株,分别为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)、东洋芽孢杆菌(*Bacillus toyonensis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、花椒芽孢杆菌(*Bacillus zanthoxyli*)、寡养纤维素单胞菌(*Cellulomonas oligotrophica*)、冷芽孢杆菌(*Peribacillus frigiditolerans*)、印度微小杆菌(*Exiguobacterium indicum*)、栖土节杆菌(*Arthrobacter humicola*)、水稻节杆菌(*Arthrobacter oryzae*)、滋养节杆菌(*Arthrobacter pascens*)、阿氏普里斯特氏菌(*Priestia aryabhattai*)、巨兽普里斯特氏菌(*Priestia megaterium*)。取病毒液1 mL与0.2 mL对数生长期(OD_{600} 为0.8)的待测菌液混合至10 mL试管中,静置孵育1 h,试管中加入6 mL预热的NA半固体培养基(琼脂含量0.6%),混匀后立即倒入已凝固的NA固体培养基(琼脂含量1.5%)上,待上层培养基凝固后置于30 °C

培养箱倒置培养, 24–48 h 后观察噬菌斑。

1.8 噬菌体基因组提取及测序拼接

采用十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取噬菌体 DNA, 具体步骤参考文献[21]。提取后的 DNA 通过琼脂糖凝胶电泳法检验无蛋白等杂质污染后, 再进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增检测, 确认无宿主污染, 利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增。PCR 反应体系 (10 μ L): 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, DNA 模板 0.1 μ L, $2\times Taq$ PCR Master Mix 5 μ L, ddH₂O 4.5 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

噬菌体 Bac-S 的 DNA 由上海凌恩生物科技有限公司进行二代测序、序列拼接。全基因组序列已提交至国家微生物科学数据中心 (National Microbiology Data Center, NMDC), 编号为 NMDC60146592。

1.9 噬菌体基因组分析及基因功能注释

利用 BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对核苷酸序列相似性进行鉴定; 用 Easyfig 2.2.5 绘制 Bac-S 的全基因组比对图; 用 BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进一步校正预测注释蛋白的功能; 使用 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 搜索 tRNA 序列^[22]; 综合抗生素耐药性数据库 (comprehensive antibiotic resistance database, CARD, <https://card.mcmaster.ca/analyze/blast>) 用于识别抗菌素耐药性; 致病细菌毒力因子数据库 (virulence factors of bacterial pathogens database, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) 用于鉴定基因组中潜在的毒力基因。

使用软件 MEGA 7.0 对噬菌体保守序列编码的门户蛋白、末端酶大亚基以及 DNA 聚合酶

的氨基酸序列采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 噬菌体生物学特性

从供试土壤中分离到一株能够裂解枯草芽孢杆菌 SM13 的噬菌体 Bac-S, 噬菌斑清晰透亮, 圆形无晕圈 (图 1A)。经电镜观察噬菌体为短尾噬菌体, 直径约为 43 nm, 尾部极短无法测量 (图 1B)。

将噬菌体与宿主菌液按照浓度比例为 100:1、10:1、1:1、1:10 与 1:100 混合培养 2 h, 测定不同感染复数下的噬菌体效价, 噬菌体 Bac-S 达到最大效价时的感染复数为 0.1 (表 1)。

将噬菌体和宿主菌以最佳感染复数 0.1 的比例混合测定一步生长曲线, 噬菌体 Bac-S 的潜伏期较短, 约为 10 min, 暴发期约为 50 min, 裂解量为 30 PFU/cell (图 1C)。噬菌体 Bac-S 在 pH 4.0 的环境下完全丧失活性, 在中性环境 (pH 6.0–8.0) 时噬菌体效价最高, 随着 pH 的升高, 噬菌体的效价逐渐减少, 当 pH 12.0 时噬菌体均完全丧失活性 (图 1D)。噬菌体 Bac-S 在温度为 20–40 $^{\circ}$ C 时具有良好的活性, 而在 40 $^{\circ}$ C 以上时效价开始降低, 当温度达到 70 $^{\circ}$ C 时完全失活 (图 1E)。噬菌体 Bac-S 在距离 30 cm 的 30 W 紫外灯照射下 21 min 后完全失活 (图 1F)。

2.2 噬菌体的宿主范围

供试菌株中有 2 株具有固氮功能, 10 株具有解磷功能, 它们隶属于 6 个属, Bac-S 噬菌体均能够侵染它们, 见表 2、图 2。*C. oligotrophica* 和 *A. pascens* 具有固氮功能而不具有解磷功能, 而其他 10 株菌具有解磷功能而不具固氮功能。

2.3 噬菌体 Bac-S 基因组特征

噬菌体 Bac-S 的基因组为环状 DNA, 基因组全长 150 019 bp, 其中 G+C 含量为 42.6% (图 3)。

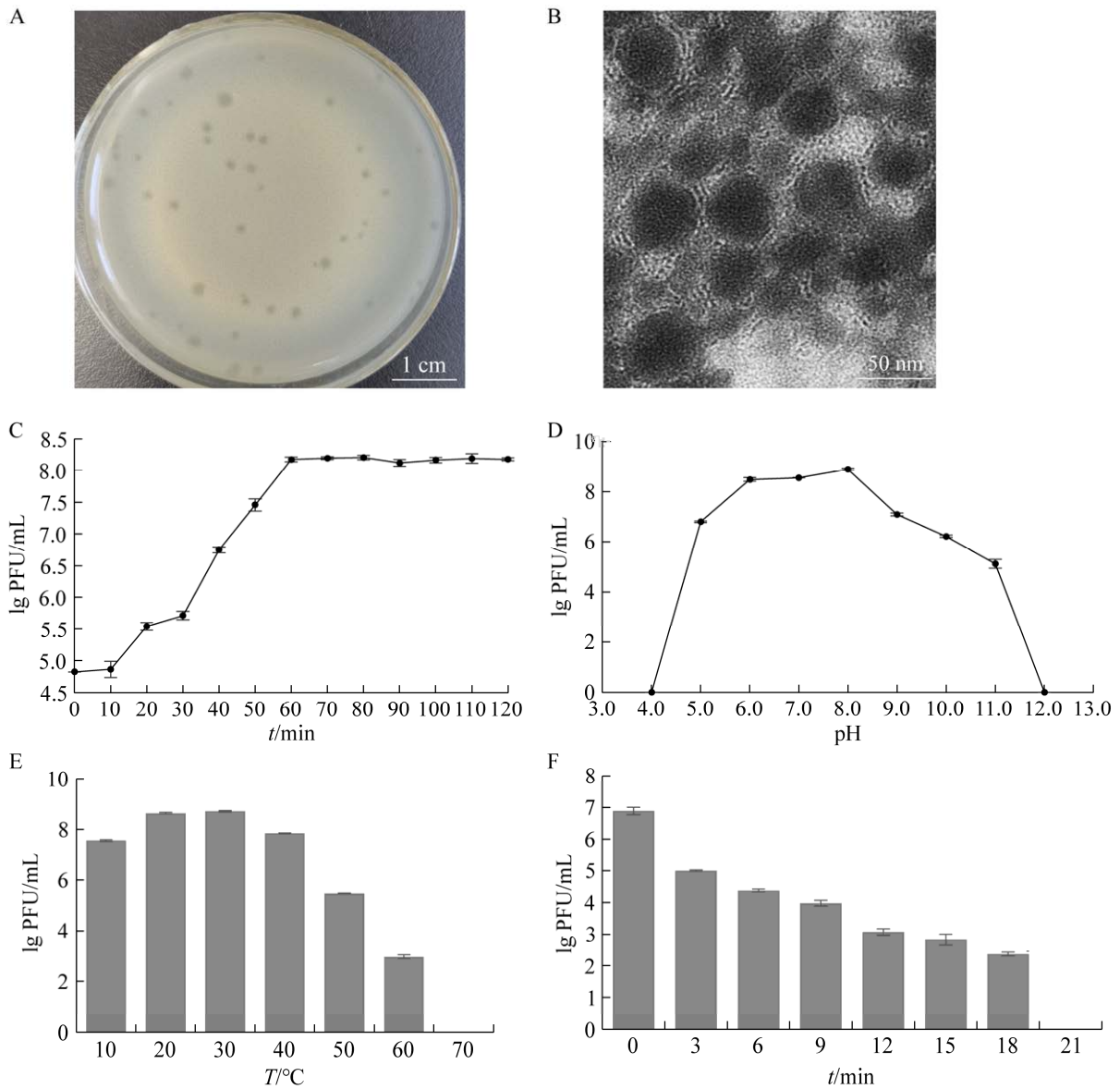


图 1 噬菌体 Bac-S 的生物学特性

Figure 1 The characteristics of phage Bac-S. A: Plaque. B: Transmission electron microscopy image. C: One-step growth curve. D: pH stability. E: Thermal stability. F: UV sensitivity.

表 1 噬菌体 Bac-S 最佳感染复数

Table 1 Multiplicity of infection of phage Bac-S

Multiplicity of infection (MOI)	Phage concentration (PFU/mL)	Bacteria concentration (CFU/mL)	Phage titer (PFU/mL)
0.01	10^6	10^8	6.50×10^8
0.1	10^7	10^8	1.36×10^9
1	10^8	10^8	8.03×10^8
10	10^8	10^7	7.60×10^8
100	10^8	10^6	1.83×10^8

表 2 噬菌体 Bac-S 宿主范围及宿主相关功能

Table 2 The host range and their related functions of bacteriophage Bac-S

Species	Strains	Bac-S	Nitrogen fixation	Phosphate-solubilizing
<i>Bacillus altitudinis</i>	DL-5	+	×	√
<i>Bacillus toyonensis</i>	SSL-14	+	×	√
<i>Bacillus cereus</i>	SL-18	+	×	√
<i>Bacillus zanthoxyli</i>	DSL-9	+	×	√
<i>Cellulomonas oligotrophica</i>	SMD-6	+	√	×
<i>Peribacillus frigiditolerans</i>	DSL-11	+	×	√
<i>Exiguobacterium indicum</i>	SSL-13	+	×	√
<i>Arthrobacter humicola</i>	DL-2	+	×	√
<i>Arthrobacter oryzae</i>	DL-3	+	×	√
<i>Arthrobacter pascens</i>	SD-17	+	√	×
<i>Priestia aryabhatai</i>	DL-15	+	×	√
<i>Priestia megaterium</i>	DSL-10	+	×	√

+: Lysis; -: No lysis; √: Means there is corresponding function; ×: Means there is no corresponding function.

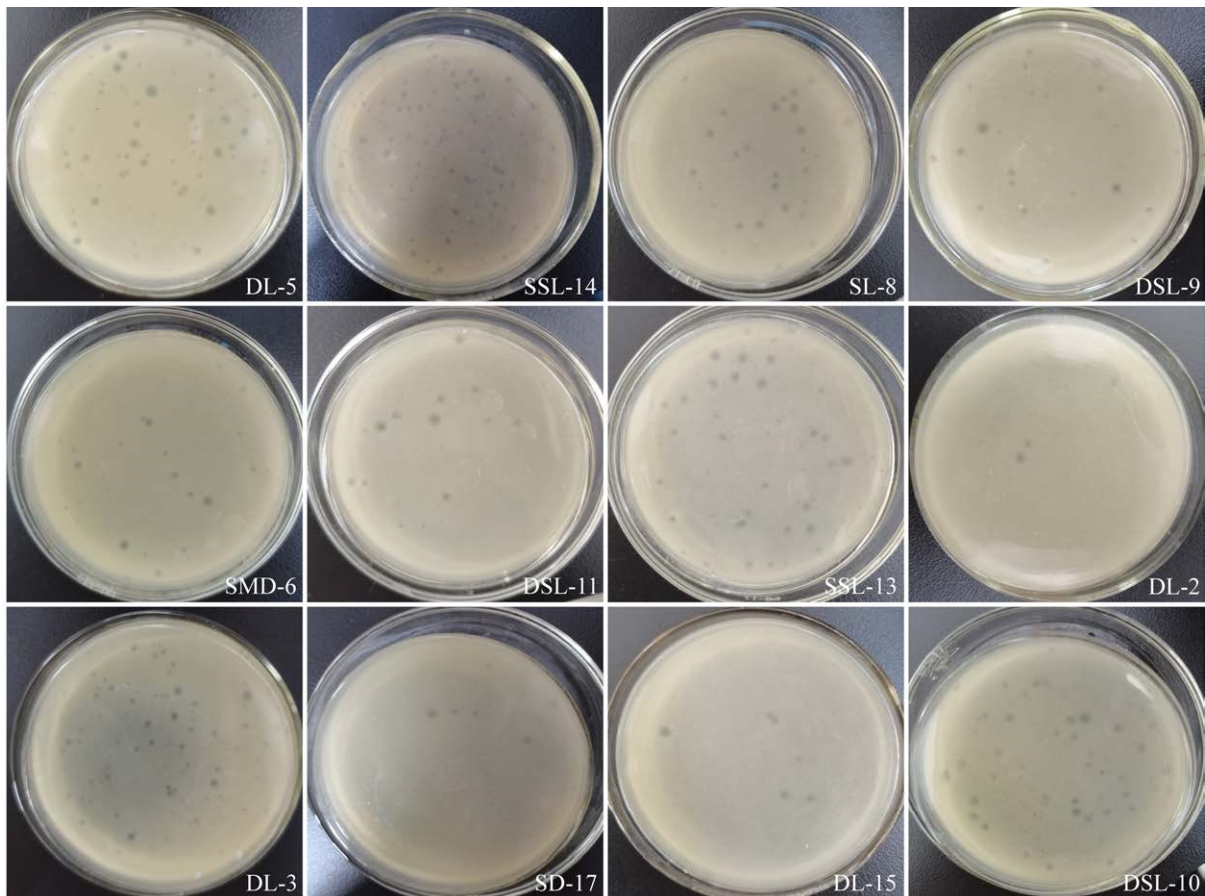


图 2 Bac-S 侵染不同供试菌株的噬菌斑

Figure 2 Plaque of Bac-S infecting different tested strains.

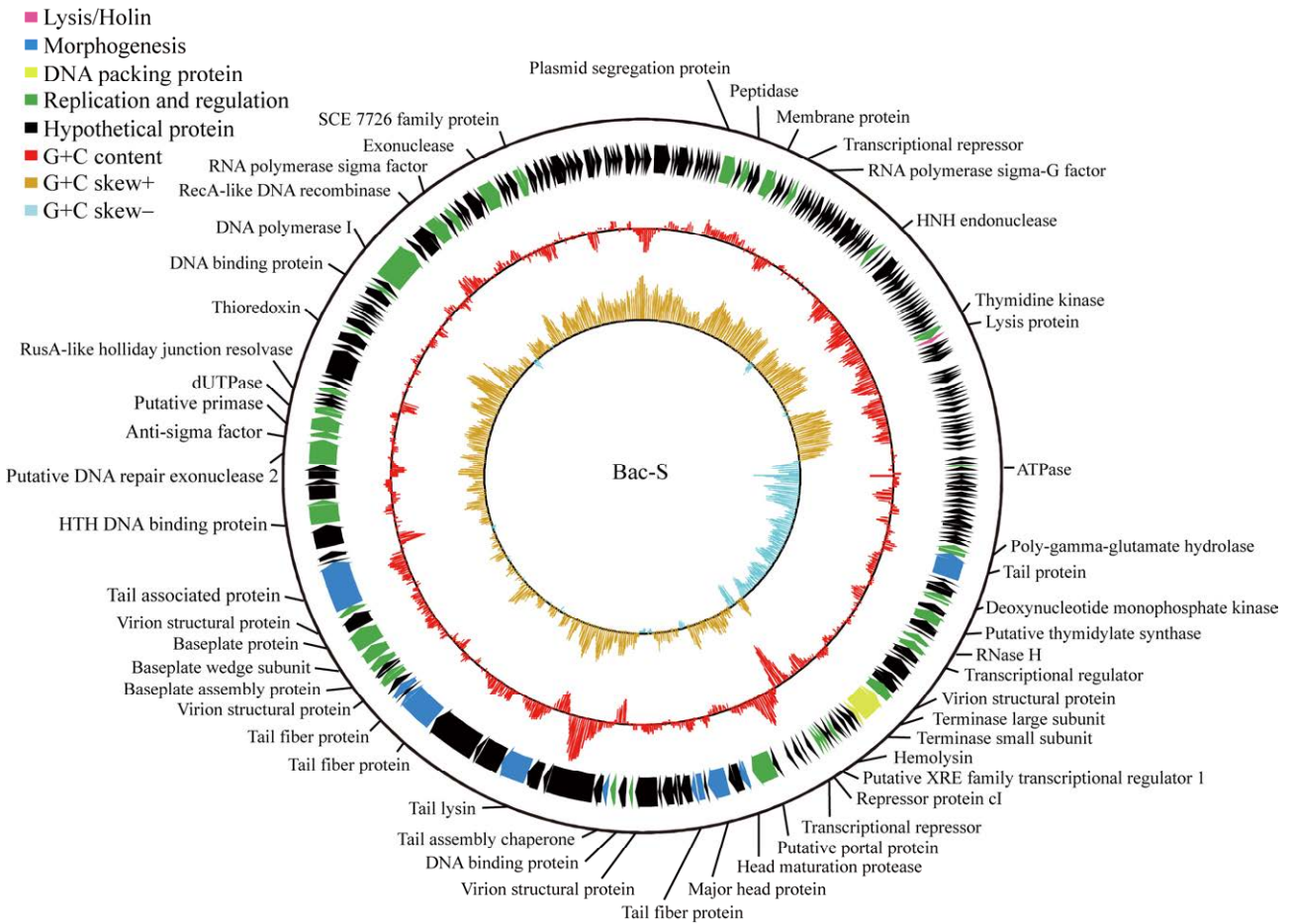


图 3 噬菌体 Bac-S 全基因组图谱

Figure 3 Genomic circle map of phage Bac-S.

基因组核酸序列 BLASTn 比对结果显示, 有 4 条噬菌体全基因组序列与 Bac-S 的相似度在 92.00% 以上, 均为以芽孢杆菌为宿主的噬菌体 *Bacillus* phage BSP18 (MH707433)、*Bacillus* phage BSTP3 (MW354667)、*Bacillus* phage phiNIT1 (NC_021856)、*Bacillus* phage BSP15 (MH707432) (表 3)。将基因组进行共线性比较(图 4), Bac-S 与其他 4 株噬菌体的基因组长度基本相同, 但局部基因与其他 4 株噬菌体存在差异且整体基因排布不同, 是一株新的噬菌体。基因组共预测到 4 个 tRNA 基因, 在 24 682–26 540 位点之间, 未预测到毒力和耐药基因, 绝大部分基因为正向转录(190 个), 剩余 47 个基因为反向转录。

2.4 噬菌体 Bac-S 功能注释

对噬菌体 Bac-S 的基因组进行功能注释, Bac-S 基因组共含有 237 个开放阅读框(open reading frames, ORFs), 通过 NCBI NR 进行在线注释后得到 235 个 ORFs, 占全部 ORF 的 99.16%。其中 184 个 ORFs 是假设蛋白, 剩余 51 个编码的

表 3 与 Bac-S 相似性较高的 4 株噬菌体

Table 3 Four phages with high similarity to Bac-S

Phages	Accession number	Coverage (%)	Identity (%)
<i>Bacillus</i> phage BSP18	MH707433	86	92.68
<i>Bacillus</i> phage BSTP3	MW354667	85	92.36
<i>Bacillus</i> phage phiNIT1	NC_021856	85	92.78
<i>Bacillus</i> phage BSP15	MH707432	84	92.24

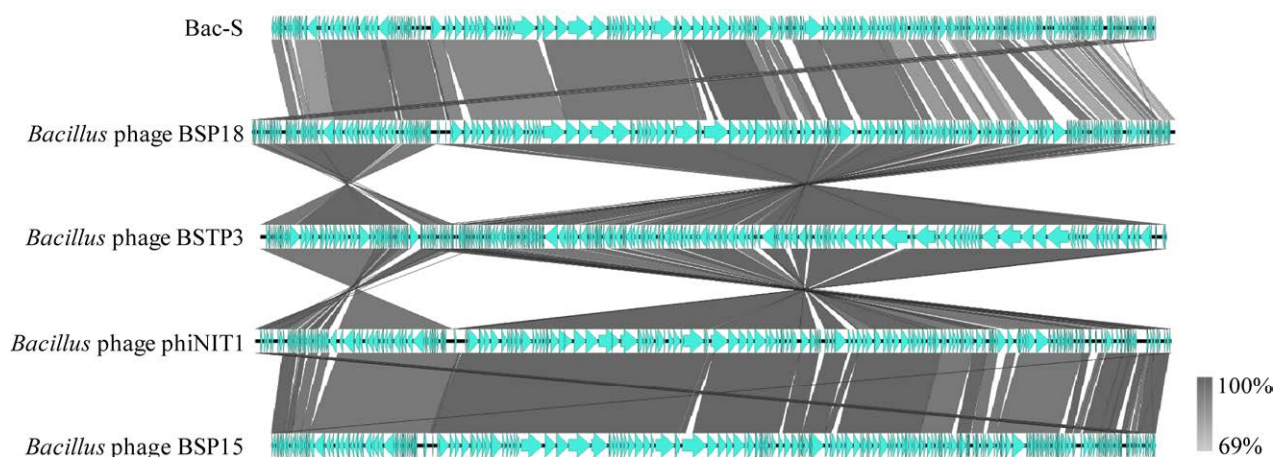


图 4 与 Bac-S 相似度较高的芽孢杆菌噬菌体的基因组比较

Figure 4 Genome comparison of *Bacillus* phage with high similarity to Bac-S.

功能分为宿主裂解蛋白(5 个 ORFs)、结构蛋白(14 个 ORFs)、DNA 包装蛋白(3 个 ORFs)、复制和调节蛋白(26 个 ORFs)、其他与噬菌体和宿主生命活动有关的功能蛋白(3 个 ORFs), 这些蛋白互相配合, 完成噬菌体复制、裂解宿主释放子代的过程。

宿主裂解蛋白: ORF16 编码 γ -聚谷氨酸水解酶, 参与破坏 γ -聚谷氨酸屏障使得噬菌体子代在宿主细胞中存活^[23]; ORF40 编码溶血素; ORF51 编码头部成熟蛋白酶; ORF68 编码尾部溶素; ORF207 为裂解蛋白。

结构蛋白: ORF17、ORF82 编码噬菌体尾部蛋白; ORF32、ORF61、ORF75、ORF81 编码病毒粒子结构蛋白; ORF53 编码主要头部蛋白; ORF55、ORF71、ORF73 编码尾纤维蛋白; ORF64 编码尾部总成伴侣, 参与噬菌体尾部的正确折叠和组装^[24]; ORF77、ORF78、ORF79 编码与噬菌体基板相关的蛋白。

DNA 包装蛋白: ORF33 编码末端酶大亚基; ORF34 编码末端酶小亚基; ORF50 编码门户蛋白。

复制和调节蛋白: ORF20 编码脱氧核苷酸单磷酸激酶; ORF22 编码胸苷酸合酶, 参与核

苷酸代谢; ORF25 编码核糖核酸酶; ORF26 编码转录调节因子; ORF43 编码异生素反应元件家族转录调节因子, 在病毒侵染过程中, 细菌及其噬菌体会调节彼此的转录以促进自身的适应性, 通常此因子会参与其中^[25]; ORF44、ORF45、ORF167 编码阻遏蛋白, 参与调节基因编码; ORF63、ORF86、ORF110 编码 DNA 结合蛋白; ORF89、ORF122 编码核酸外切酶; ORF91 为引物酶; ORF92 为 dUTP 酶主要功能为调节 dUTP 和 dTTP 的细胞水平, 从而在 DNA 修复机制中发挥关键作用^[26]; ORF96 (RusA Holliday junction resolvase)是一种对连接结构具有高度特异性的核酸酶^[27]; ORF101 为硫氧还蛋白, 是一种氧化还原酶; ORF112 为 DNA 聚合酶; ORF115 为 DNA 重组酶; ORF126 编码 sce7726 family protein, 与丝氨酸相关; ORF158 为质粒分离蛋白; ORF160 编码肽酶; ORF163 为膜蛋白; ORF206 为胸苷激酶; ORF233 为 ATP 酶; ORF187 为 HNH 核酸内切酶, 通常与核酸内切酶活性有关^[28]。

其他相关蛋白: ORF90 编码 anti-sigma factor, 与宿主细胞壁和细胞膜相关调节基因相

关^[29]; ORF117、ORF168 编码 RNA 聚合酶 sigma 因子, 控制宿主枯草芽孢杆菌中的芽孢形成^[30]。

2.5 噬菌体 Bac-S 系统发育分析

在 NCBI 中下载与噬菌体保守序列编码的

门户蛋白(ORF50)、末端酶大亚基(ORF33)以及 DNA 聚合酶(ORF112)同源性较高的氨基酸序列, 使用 MEGA 7.0 中的邻接法构建系统发育树(图 5)。门户蛋白、末端酶大亚基以及 DNA 聚

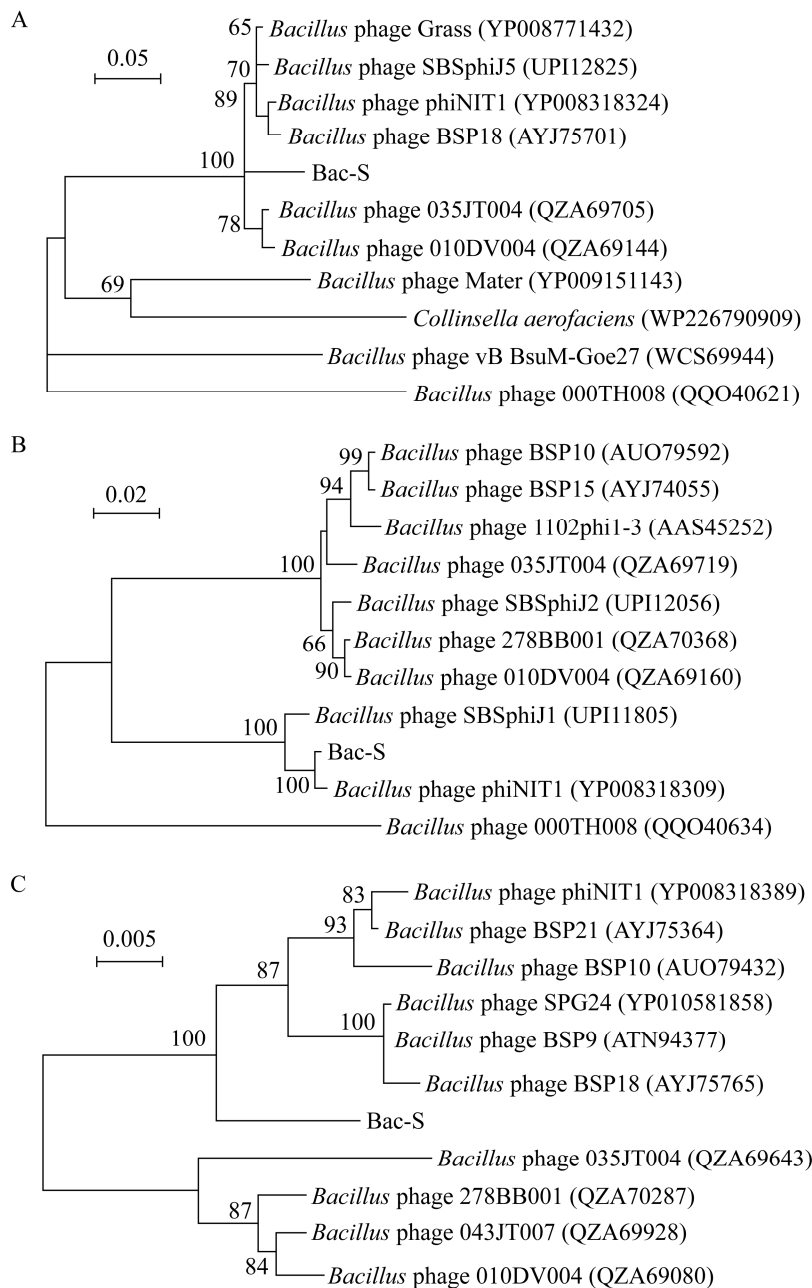


图 5 噬菌体 Bac-S 的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of bacteriophage Bac-S. A: Phylogenetic tree based on the portal protein. B: Phylogenetic tree based on the terminal enzyme large subunit. C: Phylogenetic tree based on DNA polymerase.

合酶的发育树结果显示, 虽然 3 个系统发育树存在一定差异, 但结果一致表明噬菌体 Bac-S 与 *Bacillus phage phiNIT1* 发育关系较为密切。

3 讨论与结论

对噬菌体生物学特性的研究能够基本了解其性能, 可通过已知噬菌体特性寻找抑制它生长的环境条件进而减少其对宿主促生作用的影响。噬菌体的潜伏期长短以及裂解量是衡量噬菌体裂解能力的指标之一, 前人对芽孢杆菌噬菌体的一步生长曲线进行测定结果显示潜伏期在 10–60 min 不等, 而本研究结果表明 Bac-S 噬菌体潜伏期为 10 min, 表明其为烈性噬菌体且潜伏期较短^[31]。一般来说, 噬菌体在中性的条件下效价最高, 在酸性与碱性环境下噬菌体效价会降低甚至灭活, Bac-S 能够耐受 pH 5.0–11.0 的环境, 这与已发表的噬菌体情况相似^[32]。不同噬菌体对温度的耐受能力不同, 研究结果显示部分芽孢杆菌噬菌体在 50 °C 已近乎失活^[33], 而 Bac-S 在 70 °C 时完全失活, 表明其具有一定的耐高温能力。紫外线可被蛋白质和核酸吸收并作用于 DNA, 使得 DNA 丧失转化能力从而令噬菌体失去活性^[34], Bac-S 在紫外照射 21 min 下失活, 因此可通过紫外光处理来抑制甚至消灭噬菌体。

噬菌体 Bac-S 的宿主范围广, 能够侵染 12 株归属于 6 个不同属的细菌, 噬菌体的宿主范围由它们尾部的受体结合蛋白, 如尾纤维和尾刺蛋白来决定^[35]。在 Bac-S 的序列中发现了 3 个编码尾纤维蛋白的基因 (ORF55、ORF71、ORF73)。ORF71 的氨基酸序列与 NCBI 数据库中 *Bacillus phage* 010DV004、043JT007、278BB001 和 035JT004 中的尾纤维蛋白的相似度均高于 80%, 其中 *Bacillus phage* 278BB001 宿主谱较广, 能够侵染 6 种不同的芽孢杆菌^[18]。

ORF73 的氨基酸序列与 NCBI 数据库内 *Bacillus phage* BSP38 中的尾纤维蛋白相似度为 89.11%, 它的宿主谱也较为广泛, 能够侵染 25 株不同的枯草芽孢杆菌和 2 株地衣芽孢杆菌^[36]。本研究的噬菌体 Bac-S 不仅能侵染一些芽孢杆菌属的细菌, 还可侵染 5 个属 (*Cellulomonas*、*Peribacillus*、*Exiguobacterium*、*Arthrobacter* 和 *Priestia*) 中的 8 种细菌, 这可能与尾纤维蛋白相关。Bac-S 的宿主细菌具有解磷或固氮功能, 可能涉及调控农业土壤中氮磷元素物质循环, 有待于深入研究。

噬菌体 Bac-S 的全基因组与 NCBI 数据库中宿主来源为芽孢杆菌的噬菌体具有高度相似性, 覆盖度为 80% 以上的情况下, 有 4 条噬菌体序列相似度在 90.00% 以上; 对保守序列编码的氨基酸序列进行系统发育分析也表明 Bac-S 与芽孢杆菌噬菌体发育关系较近, 基于这些认为其属于芽孢杆菌噬菌体。噬菌体 Bac-S 的基因组中含有 γ -聚谷氨酸水解酶、溶血素、异生素反应元件家族转录调节因子等基因, 这些基因编码的产物可能有助于噬菌体 Bac-S 对宿主的适应、感染, 从而起到侵染不同种类细菌的作用^[37]。Bac-S 基因组中未发现已知的毒力因子基因和抗生素耐药基因, 这显示其具有良好的生物安全性。在噬菌体中鉴定出与宿主细胞壁相关调节基因以及控制宿主枯草芽孢杆菌中芽孢形成的基因, 这些基因可能直接或间接参与噬菌体-宿主相互作用。同时, Bac-S 噬菌体中发现噬菌体尾蛋白、相关结构蛋白、裂解蛋白等与其生命周期有关的蛋白。

噬菌体是土壤微生物群落中的重要组成部分, 在土壤中通过侵染宿主微生物导致其裂解, 加速 C、N、P、S 等生命元素循环, 并且会携带辅助代谢基因影响宿主菌生长, 加速微生物群落更替以保持其活力, 影响微生物群落结构^[14,38]。

然而, 目前关于农业土壤中噬菌体功能、病毒纯培养株的分离以及基因组分析的研究相对较少。因此, 对土壤中噬菌体的分离与鉴定是扩大土壤病毒数据库的前提, 是开启土壤病毒基因宝库的钥匙^[39]。枯草芽孢杆菌在农业生产中已被广泛应用, 而侵染它们的噬菌体可能影响枯草芽孢杆菌在生产中的应用效果, 为深入了解枯草芽孢杆菌与其噬菌体的相互关系, 本研究分析了噬菌体的生物学特性与基因组信息, 丰富了芽孢杆菌噬菌体以及基因库。

参考文献

- [1] MAHAPATRA S, YADAV R, RAMAKRISHNA W. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 132(5): 3543-3562.
- [2] 陈向东. 枯草芽孢杆菌作为生防制剂在农业上的应用[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1323-1324.
CHEN XD. Application of *Bacillus subtilis* in agriculture as biocontrol agent[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1323-1324 (in Chinese).
- [3] LIU L, LI X, LI TY, XIE Y, CAO ZY, FANG P. Bio-organic fertilizer with *Bacillus subtilis* F₂ promotes strawberry plant growth and changes rhizosphere microbial community[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2022, 22(3): 3045-3055.
- [4] SAMARAS A, NIKOLAIDIS M, ANTEQUERA-GÓMEZ ML, CÁMARA-ALMIRÓN J, ROMERO D, MOSCHAKIS T, AMOUTZIAS GD, KARAOGLANIDIS GS. Whole genome sequencing and root colonization studies reveal novel insights in the biocontrol potential and growth promotion by *Bacillus subtilis* MBI 600 on cucumber[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 600393.
- [5] ILYAS N, AKHTAR N, NASEEM A, QURESHI R, MAJEED A, AL-ANSARI MM, AL-HUMAID L, SAYYED RZ, PAJEROWSKA-MUKHTAR KM. The potential of *Bacillus subtilis* and phosphorus in improving the growth of wheat under chromium stress[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(6): 3307-3321.
- [6] 张新杰, 刘彦策, 钱欣雨, 肖生林, 于波, 董金皋, 郝志敏. 弯曲平脐蠕孢拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗作用[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(8): 2417-2424.
- ZHANG XJ, LIU YC, QIAN XY, XIAO SL, YU B, DONG JG, HAO ZM. Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Bipolaris papendorffii*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2417-2424 (in Chinese).
- [7] 李新宇, 李磊, 陈利达, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 番茄匍柄霉叶斑病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. *园艺学报*, 2020, 47(4): 741-748.
LI XY, LI L, CHEN LD, SHI YX, CHAI AL, XIE XW, LI BJ. Screening and identification of antagonistic bacteria against gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(4): 741-748 (in Chinese).
- [8] 许丽婷, 陈佳欣, 李欢欢, 郝静, 姚琳, 郭长虹. 生防菌 XC-1 的筛选、鉴定及其对马铃薯黑痣病的防效研究[J]. *植物病理学报*, 2021, 51(3): 413-422.
XU LT, CHEN JX, LI HH, HAO J, YAO L, GUO CH. Screening, identification and detection of biocontrol effect of strain XC-1 on potato black scurf[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2021, 51(3): 413-422 (in Chinese).
- [9] 韩如月, 李睿瑞, 杨帆, 李红宇, 钱永德, 郑桂萍, 郭永霞, 荆瑞勇. 一株水稻根内生拮抗细菌 SM13 的分离及鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(5): 1030-1040.
HAN RY, LI RR, YANG F, LI HY, QIAN YD, ZHENG GP, GUO YX, JING RY. Isolation and identification of an endophytic and antagonistic bacterium from rice roots[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(5): 1030-1040 (in Chinese).
- [10] 宋维民, 王丽艳, 郭永霞, 孙强, 吕艳东, 荆瑞勇, 王海泽. 秸秆还田条件下固氮蓝藻复合菌剂与促生细菌 SM13 对水稻产量及稻米品质的影响[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(3): 762-768.
SONG WM, WANG LY, GUO YX, SUN Q, LÜ YD, JING RY, WANG HZ. Effects of nitrogen-fixing cyanobacteria complex microbial inoculant and growth-promoting bacteria SM13 on yield and quality of rice with straw turnover[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(3): 762-768 (in Chinese).
- [11] 宋维民, 赵坤, 杨帆, 王丽艳, 郭永霞, 王海泽, 荆瑞勇. 固氮蓝藻和促生细菌 SM13 对水稻产量和品质的影响[J]. *河南农业科学*, 2020, 49(10): 12-19.
SONG WM, ZHAO K, YANG F, WANG LY, GUO YX, WANG HZ, JING RY. Effects of nitrogen-fixing cyanobacteria and growth-promoting bacteria SM13 on yield and quality of rice[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2020, 49(10): 12-19 (in Chinese).

- [12] WEINBAUER MG. Ecology of prokaryotic viruses[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(2): 127-181.
- [13] SHARMA S, CHATTERJEE S, DATTA S, PRASAD R, DUBEY D, PRASAD RK, VAIRALE MG. Bacteriophages and its applications: an overview[J]. Folia Microbiologica, 2017, 62(1): 17-55.
- [14] WANG YJ, LIU Y, WU YX, WU N, LIU WW, WANG XF. Heterogeneity of soil bacterial and bacteriophage communities in three rice agroecosystems and potential impacts of bacteriophage on nutrient cycling[J]. Environmental Microbiome, 2022, 17(1): 17.
- [15] SHAH MAHMUD R, GARIFULINA KI, ULYANOVA VV, EVTUGYN VG, MINDUBAEVA LN, KHAZIEVA LR, DUDKINA EV, VERSHININA VI, KOLPAKOV AI, ILINSKAYA ON. Bacteriophages of soil bacilli: a new multivalent phage of *Bacillus altitudinis*[J]. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2017, 32(2): 87-93.
- [16] TZIPILEVICH E, BENFEY PN. Phage-resistant bacteria reveal a role for potassium in root colonization[J]. mBio, 2021, 12(4): e0140321.
- [17] HANDOKO YA, WARDANI AK, SUTRISNO A, WIDJANARKO SB. Current status: the morphology diversity of *Bacillus subtilis* phages and their genome size[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 475(1): 012088.
- [18] VILL AC, DELESALLE VA, MAGNESS LH, CHAUDHRY BE, LICHTY KB, STRINE MS, GUFFEY AA, DeCURZIO JM, KRUKONIS GP. Comparative genomics of *Bacillus subtilis* phages related to phiNIT1 from desert soils of the Southwest United States[J]. PHAGE, 2023, 4(4): 173-180.
- [19] VILL AC, DELESALLE VA, TOMKO BE, LICHTY KB, STRINE MS, GUFFEY AA, BURTON EA, TANKE NT, KRUKONIS GP. Comparative genomics of six lytic *Bacillus subtilis* phages from the Southwest United States[J]. PHAGE, 2022, 3(3): 171-178.
- [20] 刘文才, 钱敏桦, 潘灵婷, 林威, 许丽华, 任晓清, 李登峰, 童贻刚. 一株枯草芽孢杆菌原噬菌体 Bsu-yong1 的基因组分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 3905-3922.
- LIU WC, QIAN MH, PAN LT, LIN W, XU LH, REN XQ, LI DF, TONG YG. Genomic analysis of a *Bacillus subtilis* prophage vB_Bsu-yong1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 3905-3922 (in Chinese).
- [21] 李睿瑞. 大庆湿地水体中蓝藻和噬藻体的分布特征研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2020.
- LI RR. Distribution characteristics of cyanobacteria and cyanophages in Daqing wetland waters[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [22] CHAN PP, LOWE TM. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1962: 1-14.
- [23] KIMURA K, ITOH Y. Characterization of poly-gamma-glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly-gamma-glutamate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2491-2497.
- [24] WEI ZL, YANG F, LI B, HOU P, KONG WW, WANG J, CHEN YX, JIANG YL, ZHOU CZ. Structural insights into the chaperone-assisted assembly of a simplified tail fiber of the myocyanophage Pam3[J]. Viruses, 2022, 14(10): 2260.
- [25] McLAUGHLIN M, FIEBIG A, CROSSON S. XRE transcription factors conserved in *Caulobacter* and ϕ CbK modulate adhesin development and phage production[J]. bioRxiv: the Preprint Server for Biology, 2023: 2023.08.20.554034.
- [26] GLUKHOV A, MARCHENKOV V, DZHUS U, KRUTILINA A, SELIKHANOV G, GABDULKHAKOV A. Bacteriophage T5 dUTPase: combination of common enzymatic and novel functions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(2): 892.
- [27] LILLEY DMJ. Holliday junction-resolving enzymes-structures and mechanisms[J]. FEBS Letters, 2017, 591(8): 1073-1082.
- [28] ZHANG LK, HUANG YC, XU DD, YANG LX, QIAN KC, CHANG GZ, GONG Y, ZHOU XJ, MA KS. Biochemical characterization of a thermostable HNH endonuclease from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(18): 8003-8012.
- [29] KEI A. Anti-sigma factor-mediated cell surface stress responses in *Bacillus subtilis*[J]. Genes & Genetic Systems, 2018, 92(5): 223-234.
- [30] WANG ERICKSON AF, DEIGHAN P, CHEN SS, BARRASSO K, GARCIA CP, MARTÍNEZ-LUMBRERAS S, ALFANO C, KRYSZTOFINSKA EM, THAPALIYA A, CAMP AH, ISAACSON RL, HOCHSCHILD A, LOSICK R. A novel RNA polymerase-binding protein that interacts with a sigma-factor docking site[J]. Molecular Microbiology, 2017, 105(4): 652-662.

- [31] JOŃCZYK E, KŁAK M, MIĘDZYBRODZKI R, GÓRSKI A. The influence of external factors on bacteriophages: review[J]. *Folia Microbiologica*, 2011, 56(3): 191-200.
- [32] JI XL, ZHANG CJ, FANG Y, ZHANG Q, LIN LB, TANG B, WEI YL. Isolation and characterization of glacier VMY22, a novel lytic cold-active bacteriophage of *Bacillus cereus*[J]. *Virologica Sinica*, 2015, 30(1): 52-58.
- [33] PENG Q, YUAN YH. Characterization of a novel phage infecting the pathogenic multidrug-resistant *Bacillus cereus* and functional analysis of its endolysin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(18): 7901-7912.
- [34] GERRITY D, RYU H, CRITTENDEN J, ABBASZADEGAN M. Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light[J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2008, 43(11): 1261-1270.
- [35] NOBREGA FL, VLOT M, de JONGE PA, DREESENS LL, BEAUMONT HJE, LAVIGNE R, DUTILH BE, BROUNS SJJ. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16: 760-773.
- [36] GHOSH K, KIM KP. Complete nucleotide sequence analysis of a novel *Bacillus subtilis*-infecting phage, BSP38, possibly belonging to a new genus in the subfamily Spounavirinae[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(3): 875-878.
- [37] ZHANG YT, MIAO JJ, ZHANG N, WANG XY, LI ZJ, RICHARD OA, LI BX. The analysis of the function, diversity, and evolution of the *Bacillus* phage genome[J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1): 170.
- [38] 高瑞川, 胡敏, 李芳柏, 陈冠虹, 方利平. 土壤噬菌体的研究进展及生态功能解析[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(5): 1-11.
- GAO RC, HU M, LI FB, CHEN GH, FANG LP. Research progress and ecological function of phages in soil[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, 43(5): 1-11 (in Chinese).
- [39] 王光华, 刘俊杰, 朱冬, 叶茂, 朱永官. 土壤病毒的研究进展与挑战[J]. *土壤学报*, 2020, 57(6): 1319-1332.
- WANG GH, LIU JJ, ZHU D, YE M, ZHU YG. A review of researches on viruses in soil: advancement and challenges[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(6): 1319-1332 (in Chinese).