

研究报告

抑水绵枯草芽孢杆菌的分离、鉴定及代谢组学特征

滕晨皓^{#1,2}, 王会聪^{#3}, 王友红⁴, 曹海鹏^{*1,2}, 盖春蕾^{*4}

1 上海海洋大学 水生动物病原库, 上海 201306

2 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306

3 江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212499

4 山东省海洋科学研究院(青岛国家海洋科学研究中心), 山东 青岛 266104

滕晨皓, 王会聪, 王友红, 曹海鹏, 盖春蕾. 抑水绵枯草芽孢杆菌的分离、鉴定及代谢组学特征[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2156-2171.

TENG Chenhao, WANG Huicong, WANG Youhong, CAO Haipeng, GAI Chunlei. Isolation, identification, and metabolomic characterization of an anti-*Spirogyra* strain of *Bacillus subtilis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2156-2171.

摘要:【背景】水绵是养殖水体常见的有害丝状藻类, 但具有生物控制水绵功能的微生物资源极其匮乏。【目的】分离鉴定高效抑水绵菌株, 分析其抑藻谱、抑藻方式和代谢组学特征, 丰富用于养殖水体水绵控制的菌种资源。【方法】以纤细水绵(*Spirogyra gracilis*) FACHB-354 株作为筛选指示藻, 从虾池底泥中分离高效抑水绵菌株, 采用 16S rRNA 基因序列分析和生理生化鉴定对高效抑水绵菌株进行鉴定, 并在分析高效抑水绵菌株的抑藻谱、抑藻方式的基础上, 采用比较代谢组学方法解析高效抑水绵菌株的代谢组学特征。【结果】从虾池底泥中分离筛选出 1 株高效抑水绵菌株 GT5, 经 16S rRNA 基因序列分析和生理生化鉴定确定菌株 GT5 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。此外, 菌株 GT5 具有广谱抑水绵活性, 抑藻方式为间接抑藻。以无抑藻活性的枯草芽孢杆菌 KC1 的胞外代谢组为对照, 菌株 GT5 表达量显著上调的代谢物 187 种, 表达量显著下调的代谢物 169 种。这些显著差异代谢物主要富集到精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸降解等 20 个代谢通路。其中, 精氨酸生物合成、组氨酸代谢、氨基苯甲酸酯降解、嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等 5 个代谢通路影响较大, 参与这 5 个代谢通路的显著上调的差异代谢物有 4-(谷氨酰氨基)丁酸酯、邻苯二酚、6-去氢鞣葡萄糖醛酸苷、N4-乙酰氨基丁醛、胍丁胺和 4-羟脯氨酸。【结论】枯草芽孢杆菌 GT5 是优良的抑水绵菌株, 其抑水绵活性可能与邻苯二酚、胍丁胺等潜在抑藻活性物质的产生有关。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 抑藻谱; 抑藻方式; 代谢组学特征

资助项目: 国家虾蟹产业技术体系项目(CARS-48); 江苏农林职业技术学院科技计划(2022kj58)

This work was supported by the National Shrimp and Crab Industry Technology System (CARS-48) and the Science and Technology Program of Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry (2022kj58).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. E-mail: CAO Haipeng, hpcao@shou.edu.cn; GAI Chunlei, 497931256@qq.com

Received: 2024-08-13; Accepted: 2024-12-08; Published online: 2024-12-27

Isolation, identification, and metabolomic characterization of an anti-*Spirogyra* strain of *Bacillus subtilis*

TENG Chenhao^{#1,2}, WANG Huicong^{#3}, WANG Youhong⁴, CAO Haipeng^{*1,2}, GAI Chunlei^{*4}

1 Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China

3 Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212499, Jiangsu, China

4 Marine Science Research Institute of Shandong Province (National Oceanographic Center), Qingdao 266104, Shandong, China

Abstract: [Background] *Spirogyra* is a genus of common harmful filamentous algae in aquaculture, while the microbial resources capable of controlling *Spirogyra* are extremely scarce. [Objective] To isolate and identify an efficient anti-*Spirogyra* strain and analyze its algicidal spectrum, algicidal mode, and metabolomic characteristics, enriching the strain resources for the control of *Spirogyra* in aquaculture. [Methods] With *Spirogyra gracilis* FACHB-354 as an indicator strain, the efficient anti-*Spirogyra* strain was isolated from the shrimp pond sediment and identified by 16S rRNA gene sequence analysis and physiological and biochemical tests. Furthermore, the comparative metabolomic method was used for metabolomic characterization after the algicidal spectrum and algicidal mode assays. [Results] An efficient anti-*Spirogyra* strain GT5 was isolated and identified as *Bacillus subtilis*. This strain had a wide algicidal spectrum against *Spirogyra* and showed an indirect algicidal mode. With the extracellular metabolome of *B. subtilis* KC1 without algicidal properties as the control, strain GT5 showed 187 up-regulated metabolites and 169 down-regulated metabolites. These differential metabolites were mainly involved in 20 metabolic pathways such as arginine and proline metabolism and lysine degradation. Among these metabolic pathways, the five significant metabolic pathways were arginine biosynthesis, histidine metabolism, degradation of aminobenzoate, pyrimidine metabolism, and arginine and proline metabolism. The significantly differential metabolites involved in the upregulation of these 5 metabolic pathways included 4-(glutamylamino) butanoate, pyrocatechol, 6-dehydrotestosterone glucuronide, N4-acetylaminobutanal, agmatine, and 4-hydroxyproline. [Conclusion] *B. subtilis* GT5 is confirmed as an efficient anti-*Spirogyra* strain, and its algicidal activity is probably associated with the production of potential algicidal substances such as pyrocatechol and agmatine.

Keywords: *Bacillus subtilis*; algicidal spectrum; algicidal mode; metabolomic characteristics

水绵(*Spirogyra* sp.)是养殖水体中常见的有害丝状藻类, 不仅会消耗水体中大量的营养盐类造成水体清瘦, 抑制水体饵料生物的生长, 造成水质恶化^[1], 而且还能附着在虾蟹的颊部、鳃等部位, 影响虾蟹的活动和摄食^[2-4]。因此, 养殖水体水绵高效控制技术是虾蟹养殖业的重

大技术需求。目前, 养殖业控制水绵主要采用硫酸铜、扑草净、肉桂酸^[5]、青苔净^[6]等化学药物, 但容易引起二次污染, 破坏生态平衡^[7], 甚至造成药害事故。例如, 2019年江苏、湖南、湖北等地养殖户使用特丁净灭杀水绵, 造成河蟹、青虾、小龙虾中毒死亡^[8]。因此, 研发养

殖水体水绵绿色控制技术对推进虾蟹养殖业绿色高质量发展至关重要。

微生物控藻技术是学术界公认的一种绿色控藻技术。近年来,我国从自然环境中挖掘了大量的抑藻微生物资源。例如,控制铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)、中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)、东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)等有害藻类的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) BJ-2^[9]、水域微小杆菌(*Exiguobacterium undae*) ZY-2^[9]、菲律宾链霉菌(*Streptomyces filipinesis*) LW9^[10]、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 2-4^[11]、寡养单胞菌(*Stentrophomonas* sp.) KT48^[12]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 5#^[13]、嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*) 9-13^[14]。然而,水绵作为同时断裂生殖和有性生殖的丝状藻类,其生长繁殖往往难以控制^[15]。因此,控制水绵的微生物菌种资源十分匮乏,仅有蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) W1、甲基营养芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) W3、侧孢短芽孢杆菌(*Brevibacillus laterosporus*) W4、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) NB2等^[16-17]少数菌种被报道具有抑水绵活性。因此,进一步挖掘具有高效抑制水绵活性的微生物资源对创新水绵的微生物控制技术具有重要价值。

本实验通过抑水绵芽孢杆菌的分离鉴定及其抑藻谱、抑藻方式和代谢组学特征研究,旨在丰富抑水绵微生物菌种资源,为挖掘抑水绵功能活性物质奠定良好的前期基础。

1 材料与方法

1.1 样品

底泥样品,取自山东省青岛市崂山区金海湾育苗养殖有限公司南美白对虾土池;纤细水绵(*Spirogyra gracilis*) FACHB-354、水绵(*Spirogyra* sp.) FACHB-737、FACHB-1484、FACHB-1990、FACHB-2906及鱼腥藻(*Anabaena* sp.) FACHB-82、颤藻(*Oscillatoria* sp.)

FACHB-528、水华束丝藻(*Aphanizomenon flosaquae*) FACHB-1168、念珠藻(*Nostoc* sp.) FACHB-1967,购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库;无抑藻活性的枯草芽孢杆菌 KC1,由上海海洋大学水生动物病原库提供。

1.2 培养基

API 50CHB 培养基,上海傲之珊实业发展有限公司;营养琼脂和营养肉汤,国药集团化学试剂有限公司;SE 培养基、BG11 培养基,参照文献^[18]配制。

1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;API 50 CH 细菌鉴定试剂条,上海傲之珊实业发展有限公司;甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、丙醇(色谱纯)和水(色谱纯)、液质联用仪 Q Exactive HF-X 质谱仪, Fisher 公司。摇床恒温培养箱、光照培养箱,杭州旌斐仪器科技有限公司;恒温培养箱、冷冻干燥机,上海力辰仪器科技有限公司;冷冻离心机, Eppendorf 公司;紫外分光光度计,科瑞恩特(北京)科技有限公司;高通量组织破碎机,上海净信实业发展有限公司。

1.4 抑水绵优良菌株的分离和筛选

参照袁轲婷等^[19]的方法,取 5 g 虾池底泥样品于 100 mL 无菌营养肉汤中混匀,于 100 °C 水浴 10 min 后^[20]在 30 °C、200 r/min 条件下摇床振荡培养 18 h,然后参照徐振权等^[21]的方法用无菌生理盐水对培养液进行 10 倍梯度稀释,分别取各稀释液 0.1 mL 均匀涂布于营养琼脂平板,经 30 °C 恒温培养 24 h 后选择单菌落进行分离纯化。将纯化后的分离菌株接种至无菌营养肉汤中,经 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h 后制成 1.0×10^8 CFU/mL 的分离菌株培养液。

参照刘佳敏等^[5]的方法将纤细水绵 FACHB-354 接种至 SE 培养基中,然后经 25 °C、光照强度 2 000 lx、光暗周期比 14 h:10 h 培养 7 d,制备叶绿素 a 浓度为 0.94 mg/L 的纤细水绵藻液。分别取 2 mL 菌浓度为 1.0×10^8 CFU/mL 的分离菌

株培养液加入 18 mL 叶绿素 a 浓度为 0.94 mg/L 的纤细水绵藻液中,经 25 °C、光照强度 2 000 lx、光暗周期比 14 h:10 h 培养 6 d 后,参照文献[22]测定纤细水绵叶绿素 a 浓度(mg/L)。以相同条件下不加任何物质的纤细水绵藻液为对照,每个处理 3 个平行。以最大能力降低纤细水绵藻液叶绿素 a 浓度的分离菌株作为抑水绵优良菌株,并参照顾颖^[23]的方法对抑水绵优良菌株处理的纤细水绵的细胞形态进行显微观察。

1.5 抑水绵优良菌株的鉴定

1.5.1 分子鉴定

参照孙丽萍等^[24]的方法对抑水绵优良菌株进行分子鉴定。以细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取的抑水绵优良菌株基因组 DNA 为模板,以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): Premix Taq 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板(20 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件:94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物的纯化与测序由上海迈普生物科技有限公司完成。将测得序列用 DNAMAN 6.0 软件编辑后,在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中利用 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已知的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较,选取相似性较高的 16S rRNA 基因序列并利用软件 BioEdit 7.0 和 MEGA 4.0 进行多重比较后通过邻接法构建系统发育树。

1.5.2 生理生化鉴定

参照韩北忠等^[25]的方法采用 API 50 CH 细菌鉴定试剂条对抑水绵优良菌株进行生理生化鉴定。即无菌操作挑取高效抑水绵菌株的菌落至 API 50 CHB 培养基中制成 2 麦氏浓度的菌悬液,然后将菌悬液分别接种到 API 50 CH 细菌鉴定试剂条的 50 个管中,经 30 °C 孵育 24 h 后参照说明书对生化反应结果进行判读,最后将生化反应结果与已知菌种的生化反应谱^[26]进行比

对,确定抑水绵优良菌株的生理生化鉴定结果。

1.6 抑水绵优良菌株的抑藻谱分析

参照洪桂云等^[27]的方法分析抑水绵优良菌株的抑藻谱。无菌操作分别将水绵 FACHB-737、FACHB-1484、FACHB-1990、FACHB-2906、鱼腥藻 FACHB-82、颤藻 FACHB-528、水华束丝藻 FACHB-1168、念珠藻 FACHB-1967 接种至 BG11 培养基中,然后经 25 °C、光照强度 2 000 lx、光暗周期比 14 h:10 h 培养 7 d,制备叶绿素 a 浓度分别为 1.24、1.15、1.06、1.07、15.59、17.13、7.02 和 8.54 mg/L 的藻液,然后立即取 2 mL 1.0×10^8 CFU/mL 的抑水绵优良菌株培养液分别加入 18 mL 上述各藻株藻液中,经 25 °C、光照强度 2 000 lx、光暗周期比 14 h:10 h 培养 6 d 后,参照文献[22]测定各藻株藻液的叶绿素 a 浓度(mg/L)。以相同条件下不加任何物质的各藻株藻液为对照。每个处理 3 个平行。

1.7 抑水绵优良菌株的抑藻方式分析

参照薛静静等^[28]的方法分析抑水绵优良菌株的抑藻方式。无菌操作将抑水绵优良菌株接种至无菌营养肉汤中,经 30 °C、200 r/min 培养 18 h 后制成 2.4×10^8 CFU/mL 的培养液,然后将培养液于 8 000 r/min 离心 8 min,取上清液经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤得到无菌上清液,同时将菌沉淀用无菌蒸馏水洗涤 2 遍,用新鲜无菌营养肉汤重悬得到菌悬液;同时参照 1.4 方法制备叶绿素 a 浓度为 1.58 mg/L 的纤细水绵 FACHB-354 的藻液。分别取 2 mL 抑水绵优良菌株培养液、菌悬液、无菌上清液加入 18 mL 纤细水绵 FACHB-354 的藻液中,经 25 °C、光照强度 2 000 lx、光暗周期比 14 h:10 h 培养 6 d 后,参照文献[22]测定纤细水绵藻液的叶绿素 a 浓度(mg/L)。以相同条件下不加任何物质的纤细水绵藻液为对照。每个处理 3 个平行。

1.8 抑水绵优良菌株的胞外代谢组学特征分析

1.8.1 样本采集

参照 Yang 等^[29]的方法采集样本。无菌操作

分别将抑水绵优良菌株和枯草芽孢杆菌 KC1 接种至无菌营养肉汤中,经 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后制成 3.0×10^9 CFU/mL 的培养液,然后分别将抑水绵优良菌株和枯草芽孢杆菌 KC1 的培养液于 12 000 r/min 离心 10 min,然后将上清液经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤,取滤液分装于 15 mL 离心管中,液氮速冻后使用冷冻干燥机进行冻干,制成冻干粉末。每个样本 3 个重复。

1.8.2 样本预处理与液相色谱-质谱 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS/MS) 分析

参照 Sun 等^[30]的方法进行样本预处理。将 3 g 抑水绵优良菌株和枯草芽孢杆菌 KC1 的冻干样品与 400 μ L 提取液(水:甲醇=1:4)混合,混合液于 -20 °C 孵育并用高通量组织破碎机处理 6 min 后,再经 5 °C 涡旋 30 s、40 kHz 低温超声处理 30 min、-20 °C 孵育 30 min 后,4 °C、13 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,然后参照 Yang 等^[31]的方法使用 UHPLC-Q Exactive HF-X 系统进行 LC-MS/MS 分析。以等体积的抑水绵优良菌株和枯草芽孢杆菌 KC1 的上清液混合样本作为质控样品。色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 1.8 μ m; Waters),流动相为溶剂 A [5%乙腈(含 0.1%甲酸)+95%水]和溶剂 B [5%水+47.5%异丙醇+47.5%乙腈(含 0.1%甲酸)],进样量 3 μ L,柱温 40 °C,检测分子量大小 <1 000 Da。采用电喷雾正离子模式和负离子模式采集质谱信号。每 6 个样品插入 1 个质控样品,以评估分析系统的稳定性和评估结果的可靠性。代谢组学原始数据通过 Progenesis QI 软件进行预处理,获得包含保留时间、质荷比、峰值强度信息的数据矩阵。

1.8.3 代谢通路关键差异代谢物分析

使用 R 语言中 ropls 包 v1.6.2 对各样本的数据矩阵进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)。通过 200 次循环交叉验证,对模型的稳健性进

行严格评估,检验 PLS-DA 模型的拟合程度。在此基础上,根据变量投影重要性(variable importance in projection, VIP)值(VIP>1)、差异倍数(fold change, FC)值及 student's *t* 检验的 *P* 值来筛选具有统计学意义的差异代谢物。差异代谢物通过 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)进行的代谢通路注释,获得差异代谢物参与的通路。利用 Python 软件包 scipy.stats 进行通路富集分析,并通过 Fisher 精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

1.9 数据处理与分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。采用 SPSS 15.0 对实验数据进行统计学分析,*P*<0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 抑水绵优良菌株的筛选与鉴定结果

从虾池底泥中共分离出 5 株对纤细水绵生长具有抑制活性的菌株,分别命名为 GT1、GT2、GT3、GT4 和 GT5,其处理的纤细水绵的叶绿素 a 浓度分别较对照组降低了 8.51% (*P*<0.05)、27.66% (*P*<0.05)、13.83% (*P*<0.05)、31.91% (*P*<0.05)、54.26% (*P*<0.05) (图 1),而且菌株 GT5 能导致纤细水绵的细胞壁和细胞膜破裂(图 2)。因此,优选菌株 GT5 作为抑水绵优良菌株。此外,菌株 GT5 在营养琼脂平板上培养 24 h 后,形成灰白色、圆形、表面粗糙、边缘有不规则褶皱的菌落,其 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号: PP864097)与 GenBank 数据库中枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列自然聚类,相似性为 99.50%–99.70%。基于菌株 GT5 的 16S rRNA 基因序列的系统发育树(图 3)进一步表明,菌株 GT5 与枯草芽孢杆菌 CTXW 7-6-2 (GenBank 登录号: ON076886)的亲缘关系最近,而且菌株 GT5 的生理生化特征(结果已提交到国家微生物科学数据中心,编号为 NMDCX0001758)与文献[26]报道的枯草芽孢杆

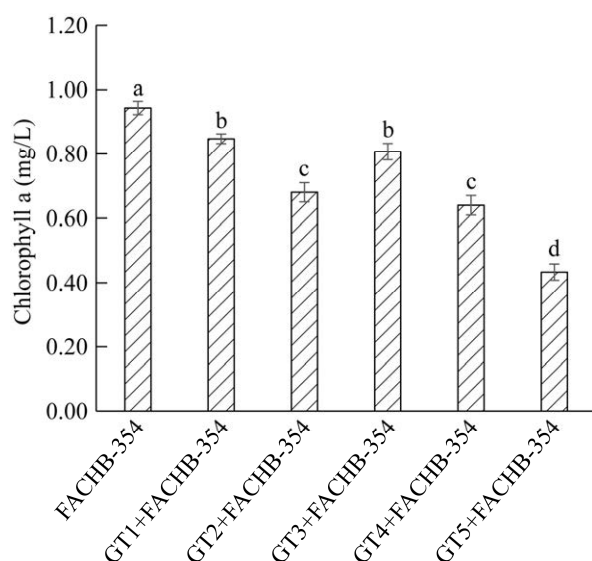


图1 分离株对纤细水绵生长的影响 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Figure 1 Effect of bacterial isolates on the growth of *Spirogyra gracilis*. Different lowercase letters are significantly different ($P<0.05$).



图2 菌株 GT5 处理的纤细水绵的细胞形态变化 箭头：细胞壁和细胞膜破裂。

Figure 2 The morphological change of *Spirogyra gracilis* treated with strain GT5. Arrow: The rupture of cell wall and membrane.

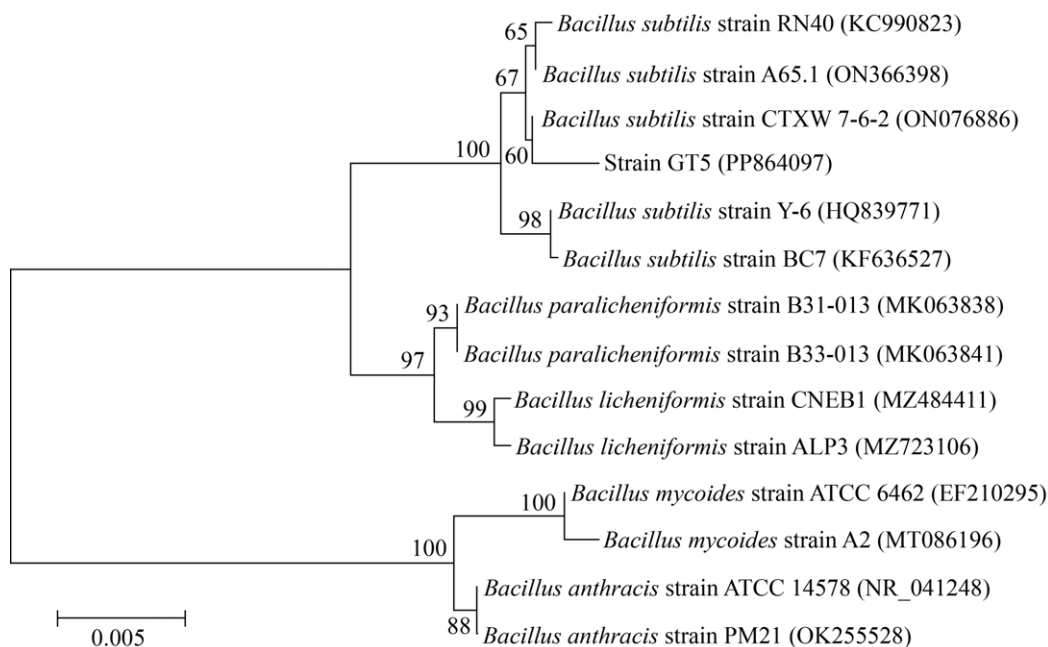


图3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 GT5 的系统发育树 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号；分支点上的数字表示分支的置信程度；标尺代表进化距离。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain GT5 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The sequence number in the bracket refers to the GenBank accession number of the strain; The number on the branch point indicates the confidence of the branch; The scale represents evolutionary distance.

菌的生理生化特性一致。结合分子鉴定与生理生化鉴定结果,确定菌株 GT5 为枯草芽孢杆菌。

2.2 抑水绵优良菌株的抑藻谱

图 4 结果表明,菌株 GT5 处理的水绵 FACHB-737、FACHB-1484、FACHB-1990、FACHB-2906、鱼腥藻 FACHB-82、颤藻 FACHB-528、水华束丝藻 FACHB-1168、念珠藻 FACHB-1967 的叶绿素 a 浓度分别较对照组降低了 54.84% ($P<0.05$)、55.65% ($P<0.05$)、52.83% ($P<0.05$)、62.62% ($P<0.05$)、67.94% ($P<0.05$)、55.60% ($P<0.05$)、76.40% ($P<0.05$)、46.63% ($P<0.05$),由此表明菌株 GT5 具有广谱抑藻活性,除了能够显著抑制水绵的生长外,还能够显著抑制鱼腥藻、颤藻、水华束丝藻和念珠藻的生长。

2.3 抑水绵优良菌株的抑藻方式

图 5 结果表明,菌株 GT5 的培养液、无菌上清液和菌悬液处理的纤细水绵 FACHB-354 的叶

绿素 a 浓度分别较未处理的叶绿素 a 度降低了 66.82% ($P<0.05$)、64.95% ($P<0.05$)和 3.08% ($P>0.05$),证实菌株 GT5 的培养液和无菌上清液均具有良好的抑藻效果,而菌悬液的抑藻效果却不显著。因此,菌株 GT5 的抑藻方式主要为间接抑藻。

2.4 抑水绵优良菌株的代谢组学特征

PCA 得分图(图 6A、6B)和 PLS-DA 得分图(图 6C、6D)显示,菌株 GT5 与菌株 KC1 的上清液样本点都在置信椭圆中,椭圆之间分离没有重合,所有样本均在 95%置信区间内,并且正、负离子代谢物能够明显区分开,第一主成分解释度分别占正、负离子代谢物变化的 52.70%和 56.80%,第二主成分解释度分别占正、负离子代谢物变化的 34.00%和 29.90%,表明菌株 GT5 与菌株 KC1 上清液中的代谢物在主成分上存在显著差异;而且 PLS-DA 置换检验正离子模式下 Q^2 回归线与 Y 轴的截距为-0.346 5,负离子

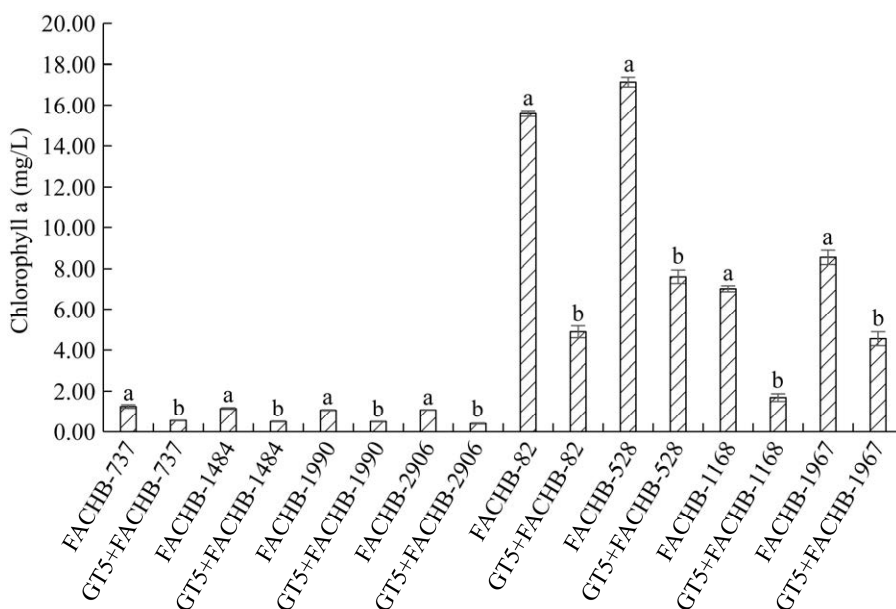


图 4 菌株 GT5 对不同水绵藻株生长的影响 不同小写字母表示同一藻株的对照组和处理组间数据差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 Effect of strain GT5 on the growth of *Spirogyra* strains. Data with different lowercase letters from the control and treatment groups of the same algae strain are significantly different ($P<0.05$).

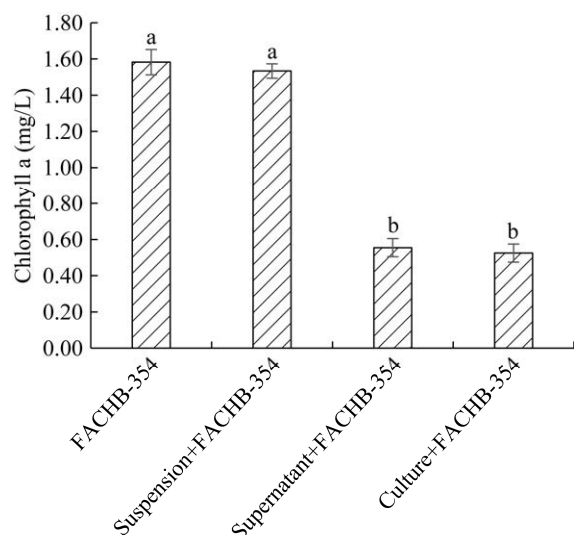


图5 菌株GT5的培养液、上清液和菌悬液对细水绵生长的影响 不同小写字母表示数据差异显著($P<0.05$)。

Figure 5 The effects of culture, supernatant, and bacterial suspension of strain GT5 on the growth of *Spirogyra gracilis*. Data with different lowercase letters are significantly different ($P<0.05$).

模式下 Q^2 回归线与 Y 轴的截距为 -0.421 ，均小于 0，表明 PLS-DA 未发生过拟合，模型稳健、可靠(图 6E、6F)。此外，基于 $VIP>1.0$ 、 $FC=1$ 且 $P<0.05$ 的筛选标准，筛选出菌株 GT5 与菌株 KC1 的上清液样本间的差异代谢物。相较于菌株 KC1 上清液样本中的代谢物，菌株 GT5 上清液样本中显著上调的代谢物有 187 种，显著下调的代谢物有 169 种(图 7)。这些差异代谢物主要富集到精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸降解、精氨酸生物合成、嘧啶代谢、花生四烯酸代谢、色氨酸代谢、嘌呤代谢、氨基酰基 tRNA 生物合成、甘油磷脂代谢、ABC 转运蛋白、氨基苯甲酸酯降解、香叶醇降解、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、 β -丙氨酸代谢、赖氨酸生物合成、戊糖磷酸途径、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、核苷类骨架生物合成、半乳糖代谢、组氨酸代谢等 20 个代谢通路(图 8)。在

这 20 个代谢通路中，精氨酸生物合成、组氨酸代谢、氨基苯甲酸酯降解、嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等 5 个代谢通路影响较大(图 9)，参与这 5 个代谢通路的差异代谢物共有 15 种，包括 4-(谷氨酰氨基)丁酸酯、邻苯二酚、6-去氢鞣葡萄糖醛酸苷、N4 乙酰氨基丁醛、胍丁胺、4-羟脯氨酸、瓜氨酸、4-羟基-L-脯氨酸、反式-4-羟基-L-脯氨酸、N2-乙酰-L-鸟氨酸、N-乙酰-L-谷氨酸、L-组氨酸、二氢乳清酸、5-氨基戊酸、尿苷-5'-单磷酸。其中，4-(谷氨酰氨基)丁酸酯、邻苯二酚、6-去氢鞣葡萄糖醛酸苷、N4 乙酰氨基丁醛、胍丁胺、4-羟脯氨酸分别上调了 1.17、1.13、1.11、1.11、1.06 和 0.93 倍，而瓜氨酸、4-羟基-L-脯氨酸、反式-4-羟基-L-脯氨酸、N2-乙酰-L-鸟氨酸、N-乙酰-L-谷氨酸、L-组氨酸、二氢乳清酸、5-氨基戊酸、尿苷-5'-单磷酸下调(表 1)。这些差异代谢物可能与菌株 GT5 的抑水绵活性有关。

3 讨论

3.1 枯草芽孢杆菌的抑藻活性

枯草芽孢杆菌是一种优良的抑藻微生物。例如，程瑞红^[32]发现枯草芽孢杆菌 S3 对太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacific*)的抑藻率为 73.12%；张睿等^[33]证实枯草芽孢杆菌 GIM1.372 对铜绿微囊藻的抑藻率达到 91.82%；程新等^[13]指出 5 株枯草芽孢杆菌 1#–5#对小球藻(*Chlorella* sp.)和铜绿微囊藻的生长均有抑制效果，对铜绿微囊藻的抑藻率均高于 35.00%，对小球藻的抑藻率均高于 15.00%；Ahn 等^[34]揭示出枯草芽孢杆菌 C1 对近亲鱼腥藻(*Anabaena affinis*)的抑藻率达 70%，对铜绿微囊藻的抑藻率达 85.00%。本实验也证实枯草芽孢杆菌 GT5 是一株优良的广谱抑水绵菌株，对水绵的抑藻效果优于孟凡奎等^[17]报道的地衣芽孢杆菌，预示着枯草芽孢杆菌 GT5 在水绵的生态控制方面具有潜在的应用价值。

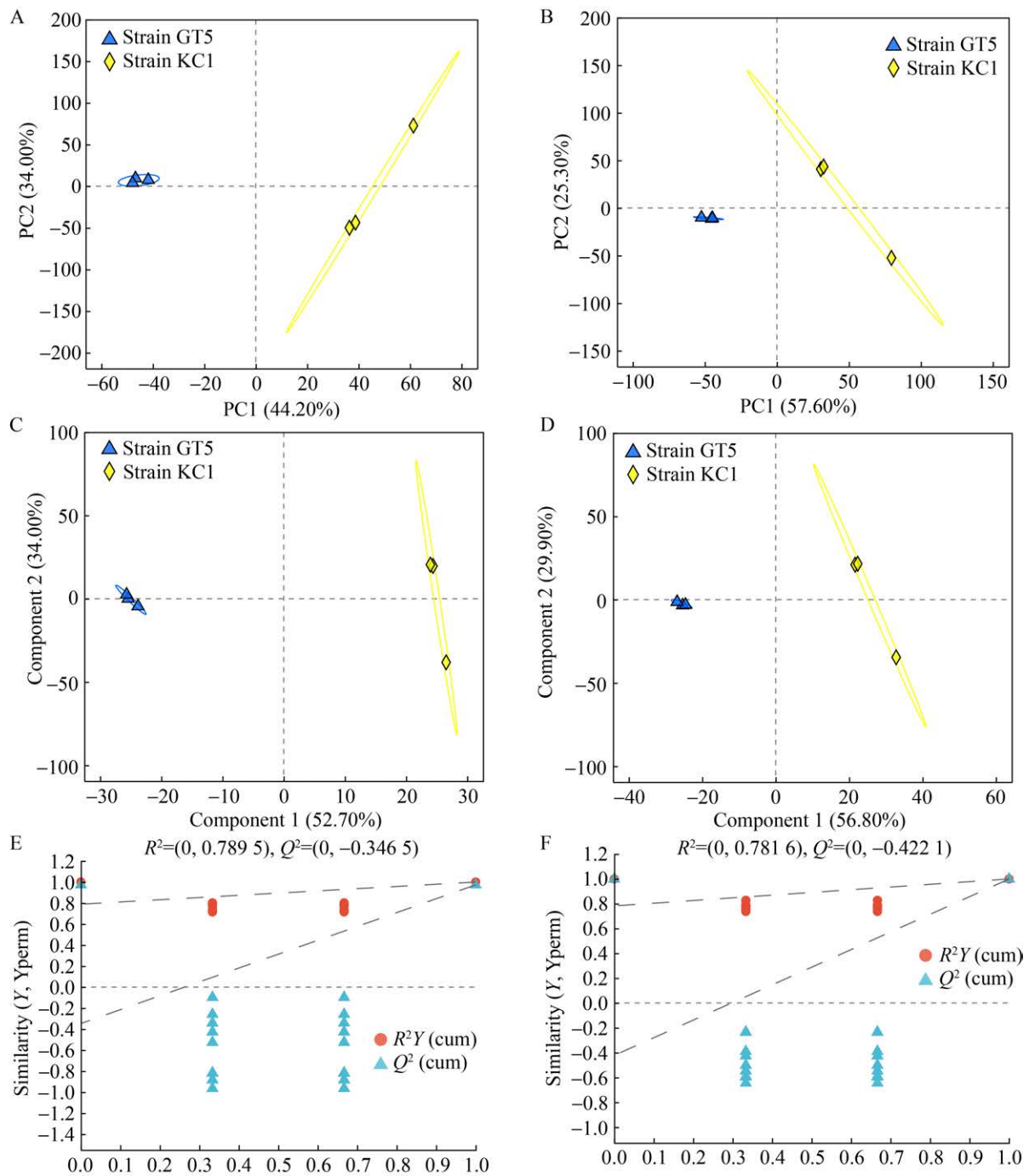


图 6 菌株 GT5 和 KC1 上清液样本的主成分分析得分图、偏最小二乘判别分析得分图和偏最小二乘判别分析置换检验图 A-F 分别为正离子模式 PCA 得分图、负离子模式 PCA 得分图、正离子模式 PLS-DA 得分图、负离子模式 PLS-DA 得分图、正离子模式 PLS-DA 置换检验图、负离子模式 PLS-DA 置换检验图。Figure 6 Principal component analysis (PCA) score map, partial least squares discrimination analysis (PLS-DA) score map, and PLS-DA displacement test map of the supernatant samples from strain GT5 and strain KC1. A-F show the positive ion mode PCA score, negative ion mode PCA score, positive ion mode PLS-DA score, negative ion mode PLS-DA score, positive ion mode PLS-DA displacement test, and negative ion mode PLS-DA displacement test, respectively.

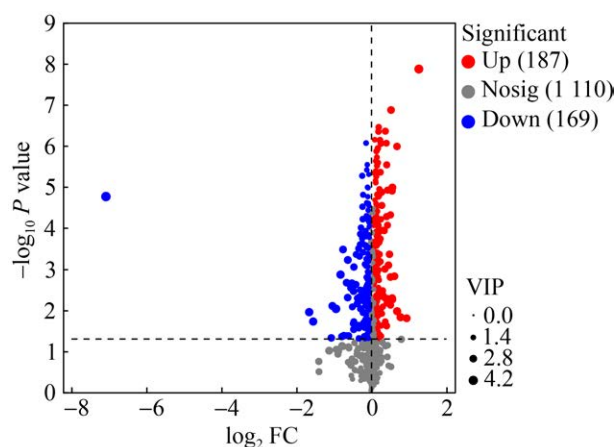


图7 菌株GT5和菌株KC1上清液中差异代谢物火山图 Up: 上调差异表达代谢物; Down: 下调差异表达代谢物; Nosig: 差异不显著的代谢物。
Figure 7 Volcano plot of differential metabolites in the supernatants from strain GT5 and strain KC1. Up: Up regulated differentially expressed metabolites; Down: Down regulated differentially expressed metabolites; Nosig: Metabolites with insignificant differences.

3.2 枯草芽孢杆菌的鉴定

目前, 枯草芽孢杆菌的鉴定包括生理生化鉴定^[35]和分子鉴定^[24]。生理生化鉴定一般采用生理生化试验、生化鉴定管和API鉴定试剂条等方法; 分子鉴定一般采用基于16S rRNA基因序列的系统发育分析法。然而, 无论生理生化鉴定还是分子鉴定均存在着一定的缺陷。例如, 生理生化鉴定方法耗时长、再现性差^[36]; 分子鉴定在种水平上的区分能力有限^[35], 因而只有将生理生化鉴定和分子鉴定相结合, 才能使枯草芽孢杆菌的鉴定更准确。例如, 孙丽萍等^[24]结合生理生化鉴定和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析法鉴定出鸡源枯草芽孢杆菌; 贺中华等^[26]结合生理生化鉴定和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析法鉴定出黄鳝源枯草芽孢杆菌。本实验也结合生理生化鉴定和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析法对菌株GT5进行了鉴定, 最终将菌株GT5鉴定为枯草芽孢杆菌。然而, 菌株GT5对甘露醇和

甘露糖的生理生化反应结果与高颖等^[37]报道的枯草芽孢杆菌SM2有所不同, 可能与菌株之间生长环境不同等因素有关^[38]。

3.3 枯草芽孢杆菌的抑藻方式

细菌的抑藻方式主要分为直接抑藻和间接抑藻。直接抑藻是细菌通过侵入藻细胞、摄食或寄生藻细胞来抑制藻的生长, 或者通过附着藻细胞表面分泌特定酶类物质抑制藻的生长; 间接抑藻是细菌通过分泌胞外活性物质、与藻类竞争营养物质等方式抑制藻的生长和繁殖^[39]。目前, 国内外学者^[32-33,40]一般通过对比细菌培养液、无菌上清液和菌悬液的抑藻效果进行抑藻方式分析。程瑞红^[32]发现枯草芽孢杆菌S3的无菌上清液和培养液对太平洋亚历山大藻的抑藻效果相同, 而菌悬液和LB培养基则无抑藻效果, 证实枯草芽孢杆菌S3的抑藻方式是间接抑藻; 程新等^[13]发现小球藻和铜绿微囊藻被枯草芽孢杆菌5#培养液、无菌上清液和菌悬液处理后, 培养液和无菌上清液均具有良好的抑藻效果, 而菌悬液抑藻效果却很差, 表明枯草芽孢杆菌的抑藻方式是间接抑藻。本实验结果表明, 菌株GT5的抑藻方式也是间接抑藻, 这与关于“枯草芽孢杆菌的抑藻方式是间接抑藻”的观点^[41]相同。究其原因, 可能与枯草芽孢杆菌胞外代谢物中存在邻苯二酚、胍丁胺等抑藻功能活性物质^[42-43]有关。

3.4 枯草芽孢杆菌的代谢组学特征

本实验从PCA得分图、PLS-DA得分图和PLS-DA置换检验图证实了菌株GT5与菌株KC1的上清液样本点重复性好、数据质量高, 不存在拟合现象, 为菌株GT5与对照菌株KC1上清液样本中的差异代谢物分析奠定了可靠的数据基础。据报道^[44], 氨基酸代谢不仅与微生物蛋白质合成密切相关, 而且还参与了ATP产生、核苷酸合成及氧化还原平衡, 对维持生物学功能具有关键作用。本实验发现菌株GT5与对照菌株KC1上清液样本中的代谢物存在显著差异, 可能与菌株的分离源不同有关^[45], 而且

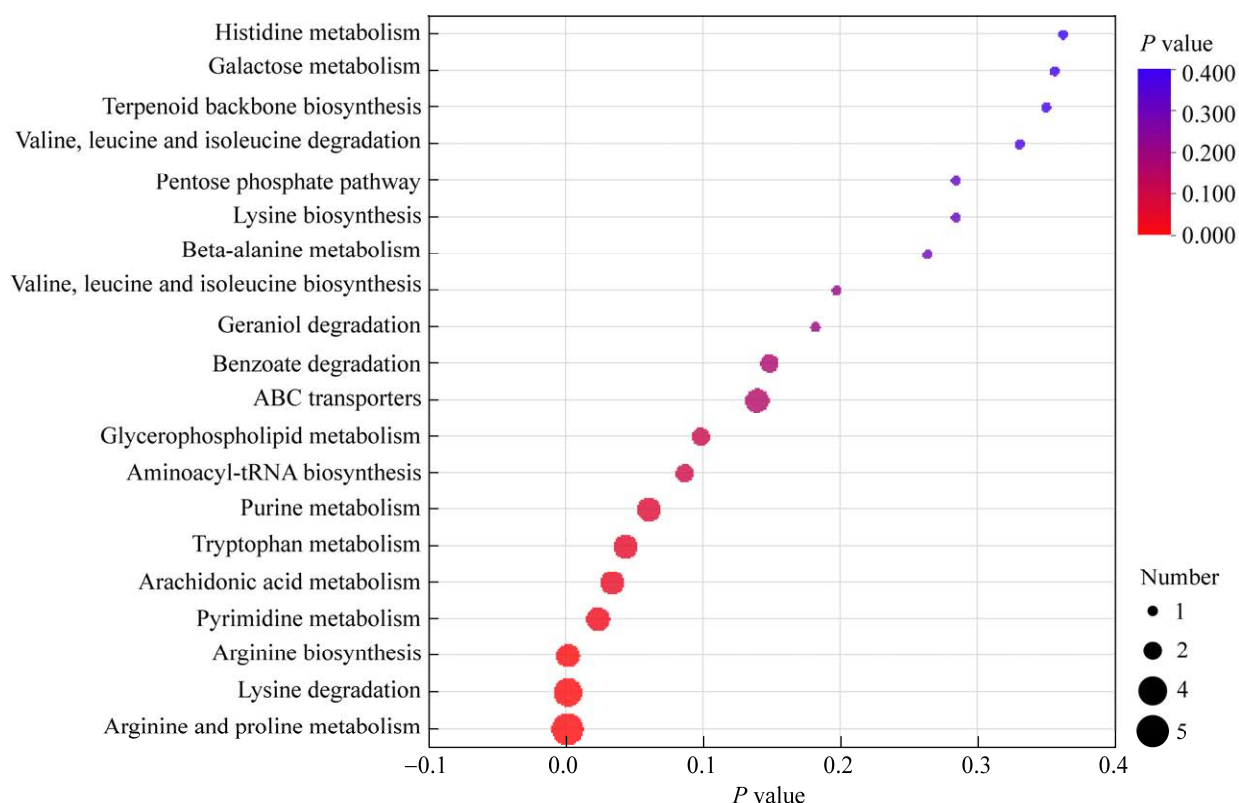


图8 菌株GT5和菌株KC1上清液中差异代谢物KEGG通路富集分析气泡图 横坐标为富集显著性 P 值, P 值越小,在统计学上就越有显著意义;纵坐标为富集通路;圆点为相应通路中富集的代谢物的数目。

Figure 8 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis of differential metabolites in the supernatants from strain GT5 and strain KC1. The abscissa is the P value of enrichment significance, and the smaller the P value, the more significant it is statistically; The ordinate is the enrichment pathway; Dots are the number of metabolites enriched in the corresponding pathways.

这些差异代谢物主要富集到精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸降解、精氨酸生物合成、色氨酸代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、 β -丙氨酸代谢、赖氨酸生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解、组氨酸代谢等氨基酸代谢通路,说明菌株GT5的抑水绵活性与这些氨基酸代谢密切相关。例如,本实验发现组氨酸代谢在这些氨基酸代谢通路中的影响较大,可能在菌株GT5的抑水绵过程中发挥了重要作用,这与Zhang等^[46]关于组氨酸代谢与细菌抑藻活性有关的观点一致。此外,胍丁胺和邻苯二酚是公认的抑藻活性物质,能够对藻细胞的酶系统

和氧化还原平衡产生毒性^[42-43]。本实验发现胍丁胺、邻苯二酚等精氨酸和脯氨酸代谢、氨基苯甲酸酯降解的产物在差异代谢物中显著上调,说明菌株GT5可能通过强化精氨酸和脯氨酸代谢、氨基苯甲酸酯降解大量产生抑藻活性物质发挥抑水绵作用,但这些抑藻活性物质对水绵的抑制效果及其作用机理还有待进一步研究。

3.5 枯草芽孢杆菌的安全性

枯草芽孢杆菌是水产养殖最常用的一种益生菌,在净化养殖水质方面具有显著功效^[47],但由于部分商品化枯草芽孢杆菌近年来相继被检出肠毒素基因^[48],因而水产养殖用枯草芽孢

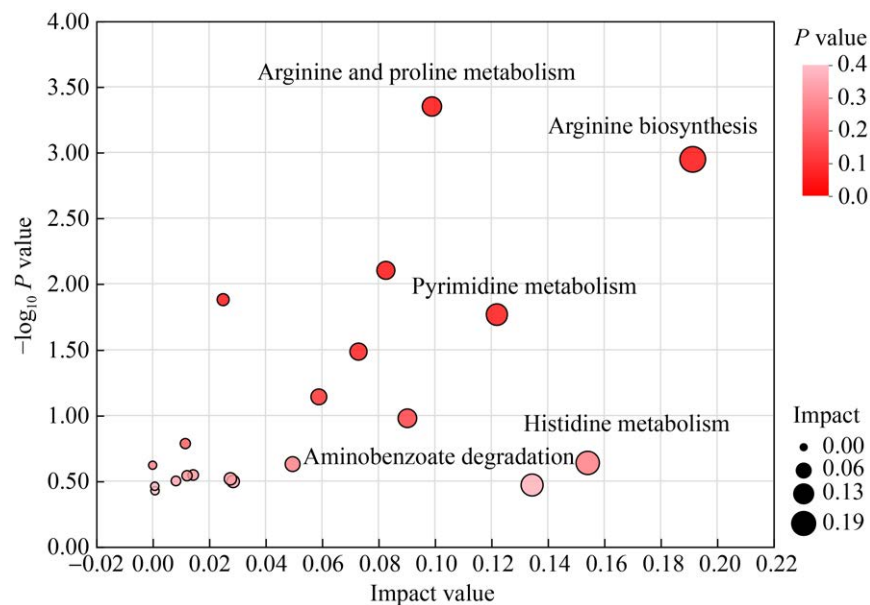


图 9 菌株 GT5 和 KC1 上清液中差异代谢物 KEGG 拓扑分析气泡图 图中每一个圆点表示一个代谢通路；横坐标表示通路中代谢物在通路中的相对重要性的大小；纵坐标表示代谢物参与通路的富集显著性；气泡大小代表 impact 值；气泡越大，表示通路重要性越大。

Figure 9 Bubble diagram of KEGG topological analysis of differential metabolites in the supernatants from strain GT5 and strain KC1. Each dot in the figure represents a metabolic pathway; The abscissa indicates the relative importance of metabolites in the pathway; The ordinate indicates the enrichment significance of metabolites participating in the pathway; The bubble size represents the impact value; The bigger the bubble, the greater the importance of the passage.

表 1 菌株 GT5 重要代谢通路中的差异代谢产物
Table 1 Differential metabolites involved in important metabolic pathways of strain GT5

KEGG 号	代谢物	KEGG 通路	趋向	FC 值	P 值
KEGG ID	Metabolite	KEGG pathway	Trend	Fold change	P value
map00220	Citrulline	Arginine biosynthesis	↓	1.32	0.00
map00330	4-(glutamylamino) butanoate	Arginine and proline metabolism	↑	1.17	0.00
map00626	Pyrocatechol	Aminobenzoate degradation	↑	1.13	0.00
map00240	6-dehydrotestosterone glucuronide	Pyrimidine metabolism	↑	1.11	0.01
map00330	N4-acetylaminobutanal	Arginine and proline metabolism	↑	1.11	0.00
map00330	4-hydroxy-L-proline	Arginine and proline metabolism	↓	1.10	0.00
map00330	Agmatine	Arginine and proline metabolism	↑	1.06	0.01
map00330	4-hydroxyproline	Arginine and proline metabolism	↑	0.93	0.00
map00330	Trans-4-hydroxy-L-proline	Arginine and proline metabolism	↓	0.93	0.00
map00220	N2-acetyl-L-ornithine	Arginine biosynthesis	↓	0.93	0.04
map00220	N-acetyl-L-glutamic acid	Arginine biosynthesis	↓	0.91	0.00
map00340	L-histidine	Histidine metabolism	↓	0.86	0.00
map00240	Dihydroorotic acid	Pyrimidine metabolism	↓	0.77	0.01
map00330	5-aminopentanoic acid	Arginine and proline metabolism	↓	0.70	0.00
map00240	Uridine-5'-monophosphate	Pyrimidine metabolism	↓	0.32	0.01

FC: 该代谢物在两组样本间的差异表达倍数；↑: 上调；↓: 下调；P value: 代谢物参与通路的富集显著性。
FC: The differential expression fold of this metabolite in FC between the two groups of samples; ↑: Upregulated; ↓: Down-regulated; P value: The enrichment significance of metabolites involved in pathways.

杆菌的安全性必须予以重视。目前,水产养殖用枯草芽孢杆菌的安全性评价缺乏统一标准。例如,尹文林等^[49]通过评价枯草芽孢杆菌 B115 对鲫鱼、淡水青虾的毒力,证实枯草芽孢杆菌 B115 的安全性;曹海鹏等^[50]从溶血性、有害代谢物产生能力、耐药性,以及对斑马鱼、大型蚤、中华绒螯蟹的毒力等方面评价枯草芽孢杆菌 A4 的安全性,证实枯草芽孢杆菌 A4 具有良好的生物安全性。然而,这些关于水产养殖用枯草芽孢杆菌菌株的安全性研究忽视了毒力基因、耐药基因等致病因子的检测。因此,建议参照文献^[51-52]等相关规范性文件,通过毒力基因与耐药基因检测、产毒能力与抗菌药物敏感性分析、致病力与毒力测定对水产养殖用枯草芽孢杆菌菌株的安全性进行综合评价。

4 结论

枯草芽孢杆菌 GT5 是一株优良的广谱抑水绵菌株,其抑藻方式为间接抑藻。此外,菌株 GT5 的差异代谢物主要富集到精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸降解、精氨酸生物合成、嘧啶代谢等 20 个代谢通路。其中,4-(谷氨酰氨基)丁酸酯、邻苯二酚、6-去氢鞣酮葡萄糖醛酸苷、N4 乙酰氨基丁醛、胍丁胺、4-羟脯氨酸等显著上调代谢物参与的精氨酸生物合成、组氨酸代谢、氨基苯甲酸酯降解、嘧啶代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等 5 个代谢通路影响较大。

作者贡献声明

滕晨皓:具体实验的执行、实验数据分析、论文初稿撰写;王会聪:具体实验的执行、研究项目管理、经费的申请与管理;王友红:参与研究课题指导及论文审阅;曹海鹏:实验方法设计、研究课题监管与指导;盖春蕾:研究项目管理、经费的申请与管理、论文审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 张曼, 郜小龙, 王一帆, 和子杰, 王康, 常缓缓, 贾祺, 王玉明, 曾大庆, 周传江. 生物操纵方法对水绵 (*Spirogyra*) 的调控效应[J]. 环境科学学报, 2019, 39(3): 722-729.
ZHANG M, GAO XL, WANG YF, HE ZJ, WANG K, CHANG HH, JIA Q, WANG YM, ZENG DQ, ZHOU CJ. Effects of biomanipulation control on *Spirogyra*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(3): 722-729 (in Chinese).
- [2] 唐玉华, 蔡建中, 郑广, 李洪进. 蟹池中青苔的危害与防控[J]. 水产养殖, 2013, 34(12): 48-49.
TANG YH, CAI JZ, ZHENG G, LI HJ. Harm and prevention of moss in crab pond[J]. Journal of Aquaculture, 2013, 34(12): 48-49 (in Chinese).
- [3] 丁常云. 蟹池青苔的防治[J]. 水产养殖, 2012, 33(8): 52.
DING CY. Prevention and control of moss in crab pond[J]. Journal of Aquaculture, 2012, 33(8): 52 (in Chinese).
- [4] 钟诗群. 青苔对淡水小龙虾的危害性及其防控技术[J]. 科学养鱼, 2020(3): 51-52.
ZHONG SQ. Harmfulness of moss to freshwater crayfish and its prevention and control techniques[J]. Scientific Fish Farming, 2020(3): 51-52 (in Chinese).
- [5] 刘佳敏, 周志杰, 黄民生, 袁育鑫, 何文辉. 三种药剂对水绵控制效果的比较分析[J]. 化学世界, 2024, 65(3): 163-170.
LIU JM, ZHOU ZJ, HUANG MS, YUAN YX, HE WH. Comparison and analysis of *Spirogyra* control with three kinds of chemicals[J]. Chemical World, 2024, 65(3): 163-170 (in Chinese).
- [6] 高俊杰, 权新芳. 宝鸡金渭湖景区水绵防控经验浅谈[J]. 水资源开发与管理, 2018, 4(4): 77-79.
GAO JJ, QUAN XF. On *Spirogyra* control experience in Baoji Jinwei Lake scenic spot[J]. Water Resources Development and Management, 2018, 4(4): 77-79 (in Chinese).
- [7] 廖正军, 安振华, 顾荣荣, 窦静怡, 秦舒蕾, 陆文燕, 吴雨衡. 稻虾专用青苔净对小龙虾的急性毒性和对青苔生长的影响[J]. 水产养殖, 2022, 43(6): 33-36.
LIAO ZJ, AN ZH, GU RR, DOU JY, QIN SL, LU WY, WU YH. Researches on the acute toxicity effect in the crayfish *Procambarus clarkii* and control effect of moss-cleaner for rice-crayfish complex culture[J]. Journal of Aquaculture, 2022, 43(6): 33-36 (in Chinese).
- [8] 葛家春, 沈伟健, 王志红, 余可垚, 付龙龙, 马行空, 田间. 南京市高淳区池塘青苔药害调查[J]. 水产养殖, 2021, 42(11): 66-67, 69.
GE JC, SHEN WJ, WANG ZH, YU KY, FU LL, MA XK, TIAN J. Investigation on phytotoxicity of pond moss in Gaochun district, Nanjing city[J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(11): 66-67, 69 (in Chinese).
- [9] 朱原, 田诗琦, 徐玉凤, 杨雪, 吴雷, 杨美英. 2 株溶藻菌的分离鉴定及其溶藻方式研究[J/OL]. 吉林农业大学学报, 2023. DOI: 10.13327/j.jjlau.2023.0027.
ZHU Y, TIAN SQ, XU YF, YANG X, WU L, YANG MY. Isolation and identification of two algicidal bacteria and study on their algicidal methods[J/OL]. Journal of Jilin Agricultural University, 2023. DOI: 10.13327/j.jjlau.2023.0027 (in Chinese).

- [10] 王素钦, 罗丛强, 朱晓漫, 杨品红, 罗玉双, 甘南琴. 高效溶藻放线菌 LW9 的分离鉴定及其溶藻特性[J]. 武汉大学学报(理学版), 2021, 67(1): 93-102.
WANG SQ, LUO CQ, ZHU XM, YANG PH, LUO YS, GAN NQ. Isolation and identification of an efficient algicidal actinomycetes strain LW9 and its algicidal characteristics[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2021, 67(1): 93-102 (in Chinese).
- [11] 叶益华, 杨旭楠, 陈进林, 陈乐天, 许玫英. 基于生态风险评估探究溶藻细菌 2-4 的抑藻特性[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3631-3645.
YE YH, YANG XN, CHEN JL, CHEN LT, XU MY. Algicidal characteristics of *Pseudomonas* 2-4: based on ecological risk assessment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3631-3645 (in Chinese).
- [12] 吕萍. 溶藻菌的分离及其对铜绿微囊藻溶藻特性的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学硕士学位论文, 2022.
LYU P. Isolation of algicidal bacteria and its algicidal characteristic against *Microcystis aeruginosa*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University of Technology, 2022 (in Chinese).
- [13] 程新, 李昆太, 黄林. 一株枯草芽孢杆菌的生长特性及抑藻效果研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 120-125.
CHENG X, LI KT, HUANG L. Research on growth characteristics and algicidal effects of *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 120-125 (in Chinese).
- [14] 张小倩. 抑藻芽孢杆菌的筛选及其对铜绿微囊藻的抑制效应和机理研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG XQ. Screening of *Microcystis*-inhibiting bacteria and elucidating its inhibitory effects and mechanism[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [15] 宣雄智, 洪国栋, 郭益红, 许爱国, 王栋. 虾蟹养殖池青苔防控原理与技术[J]. 农业与技术, 2021, 41(22): 114-117.
XUAN XZ, HONG GD, GUO YH, XU AG, WANG D. Prevention and control principle and technology of moss in shrimp and crab culture ponds[J]. Agriculture and Technology, 2021, 41(22): 114-117 (in Chinese).
- [16] 王宁, 王熙涛, 李晓宇, 王丽丽, 张美霞, 马超, 徐永平. 复合菌剂与小球藻联合应用防控刺参围水绵的研究[J]. 环境工程, 2019, 37(增刊): 191-196.
WANG N, WANG XT, LI XY, WANG LL, ZHANG MX, MA C, XU YP. Research on the combination of mixed bacteria agent and *Chlorella* sp. to prevent and control *Spirogyra* in the sea cucumber culture lagood[J]. Environmental Engineering, 2019, 37(Suppl.): 191-196 (in Chinese).
- [17] 孟凡奎, 刘宝同, 梁晶晶, 张洪玲, 郭衍林, 张婷婷, 李培根, 张宗国, 毛赛亚, 殷冀煜. 一种地衣芽孢杆菌及其后生元和在抑制青苔中的应用: CN202310964133.X[P]. 2023-10-31.
MENG FK, LIU BT, LIANG JJ, ZHANG HL, GUO YL, ZHANG TT, LI PG, ZHANG ZG, MAO SY, YIN JY. Application of a *Bacillus licheniformis* and its derived elements in inhibiting moss growth: CN202310964133.X[P]. 2023-10-31 (in Chinese).
- [18] 李新舟, 庄思娜. 培养基对小球藻 *Chlorella* sp. KM-201305 生长及产油的影响[J]. 化学与生物工程, 2019, 36(9): 35-38.
LI XZ, ZHUANG SN. Effects of medium on growth and lipid production of *Chlorella* sp. KM-201305[J]. Chemistry & Bioengineering, 2019, 36(9): 35-38 (in Chinese).
- [19] 袁轲婷, 任大钧, 万琼, 柴蓓蓓, 康爱卿, 雷晓辉, 陈彬, 陈翔. 一株来自水库底泥的溶藻菌 G2 溶藻特性研究[J]. 南方水产科学, 2022, 18(3): 139-146.
YUAN KT, REN DJ, WAN Q, CHAI BB, KANG AQ, LEI XH, CHEN B, CHEN X. Algae-lysing characteristics of an algicidal bacterium G2 from reservoir sediment[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(3): 139-146 (in Chinese).
- [20] 刘银坤, 李昊, 李子昕, 李知新, 张玉彦, 李文财, 任建军, 唐姝. 牦牛源短小芽孢杆菌 TS1 的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(1): 69-77.
LIU YK, LI H, LI ZX, LI ZX, ZHANG YY, LI WC, REN JJ, TANG S. Isolation, identification and biological characterization of a strain of *Bacillus pumilus* TS1 from yak cattle[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(1): 69-77 (in Chinese).
- [21] 徐振权, 韩国威, 任静, 张子轩, 孙敬锋, 韩卓然. 凡纳滨对虾肠道中地衣芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 大连海洋大学学报, 2024, 39(1): 74-82.
XU ZQ, HAN GW, REN J, ZHANG ZX, SUN JF, HAN ZR. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus licheniformis* from the intestine of Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2024, 39(1): 74-82 (in Chinese).
- [22] 中华人民共和国环境保护部. 水质 叶绿素 a 的测定分光光度法: HJ 897—2017[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2017.
Ministry of Environmental Protection of the People's Republic of China. Water quality: Determination of chlorophyll a: Spectrophotometric method: HJ 897—2017[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2017 (in Chinese).
- [23] 顾颖. 安全高效抑水绵枯草芽孢杆菌的分离、鉴定、保藏与作用机理研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2023.
GU Y. Isolation, identification, preservation and function mechanism of probiotic *Bacillus subtilis* with significant anti-*Spirogyra* effects[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [24] 孙丽萍, 胡馨元, 钮慧晶, 王琴, 裴彩霞, 李毅, 夏呈强. 1 株边鸡源产蛋白酶枯草芽孢杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 现代畜牧科技, 2024, 105(2): 33-38.
SUN LP, HU XY, NIU HJ, WANG Q, PEI CX, LI Y, XIA CQ. Isolation, identification and biological characteristics of protease-producing *Bacillus subtilis* from Bian chicken[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2024, 105(2): 33-38 (in Chinese).
- [25] 韩北忠, 吴戈, 翟永玲. 大豆发酵食品: 腐乳中芽孢杆菌的分离与鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(4): 103-107.
HAN BZ, WU G, ZHAI YL. Isolation and identification of spore: forming bacilli from sufu: a

- fermented soybean food[J]. Journal of China Agricultural University, 2001, 6(4): 103-107 (in Chinese).
- [26] 贺中华, 陈昌福, 高宇, 孟小亮, 田甜. 黄鳝肠道益生菌 HY-136 的鉴定与系统发育分析[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 715-718.
HE ZH, CHEN CF, GAO Y, MENG XL, TIAN T. Phylogenetic analysis and identification of probiotics HY-136 from ricefield eel (*Monopterus albus*) intestine[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2009, 28(6): 715-718 (in Chinese).
- [27] 洪桂云, 朱慧, 汪涛, 马少雄. 溶藻菌 *Serratia* sp. 对蓝、绿藻的去除研究[J]. 环境科学与技术, 2023, 46(12): 65-71.
HONG GY, ZHU H, WANG T, MA SX. Removal of cyanobacteria and green algae by *Serratia* sp.[J]. Environmental Science & Technology, 2023, 46(12): 65-71 (in Chinese).
- [28] 薛静静, 王美娟, 毛林强, 占明飞, 宁军, 张文艺. 一株具有溶藻功能的 *Paenibacillus* sp. XXG 的分离鉴定及溶藻特性研究[J]. 过程工程学报, 2020, 20(9): 1097-1105.
XUE JJ, WANG MJ, MAO LQ, ZHAN MF, NING J, ZHANG WY. Isolation and identification of XXG a strain of *Paenibacillus* with algae-lysing ability and study on algae-lysing characteristics[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2020, 20(9): 1097-1105 (in Chinese).
- [29] YANG XZ, HU WZ, XIU ZL, JIANG AL, YANG XY, SAREN GW, JI YR, GUAN YG, FENG K. Microbial community dynamics and metabolome changes during spontaneous fermentation of northeast sauerkraut from different households[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1878.
- [30] SUN H, XIE ZQ, YANG XZ, YANG B, LIAO BL, YIN JH, XIAO BH. New insights into microbial and metabolite signatures of coral bleaching[J]. Science of the Total Environment, 2023, 892: 164258.
- [31] YANG PX, YAO WX, WANG YY, LI ML, LI XQ, LENG XJ. Dietary effects of fish meal substitution with *Clostridium autoethanogenum* on flesh quality and metabolomics of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. Aquaculture Reports, 2022, 23: 101012.
- [32] 程瑞红. 枯草芽孢杆菌对太平洋亚历山大藻的溶藻以及毒素降解作用研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所)硕士学位论文, 2023.
CHENG RH. The algicidal effect of *Bacillus subtilis* to *Alexandrium pacific* and the research of toxin degradation[D]. Qingdao: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences (The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2023 (in Chinese).
- [33] 张睿, 王广军, 李志斐, 郁二蒙, 夏耘. 枯草芽孢杆菌对铜绿微囊藻抑制效果的研究[J]. 中国环境科学, 2015, 35(6): 1814-1821.
ZHANG R, WANG GJ, LI ZF, YU EM, XIA Y. Inhibition of *Microcystis aeruginosa* by *Bacillus subtilis*[J]. China Environmental Science, 2015, 35(6): 1814-1821 (in Chinese).
- [34] AHN CY, JOUNG SH, JEON JW, KIM HS, YOON BD, OH HM. Selective control of cyanobacteria by surfactin-containing culture broth of *Bacillus subtilis* C1[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(14): 1137-1142.
- [35] 刘岭萍, 谭玉冰, 薛明, 王优阳, 陈丽莹, 梁喜, 华郡, 梁华芳, 温崇庆. 枯草芽孢杆菌 LJ 的分离鉴定及其对凡纳滨对虾幼体弧菌病防治效果[J]. 广东海洋大学学报, 2024, 44(3): 34-41.
LIU LP, TAN YB, XUE M, WANG YY, CHEN LY, LIANG X, HUA J, LIANG HF, WEN CQ. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* LJ and its control effect against vibriosis in *Litopenaeus vannamei* larvae[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2024, 44(3): 34-41 (in Chinese).
- [36] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 968-974.
CAO FM, YANG XH, MA MC, CHEN HJ, SHEN DL, LI J. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 968-974 (in Chinese).
- [37] 高颖, 张弘弢, 陈媛媛. 一株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其体外降解 AFB1 的效果分析[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2022, 34(5): 54-60.
GAO Y, ZHANG HT, CHEN YY. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* FWJ16X degrading aflatoxin B1 and detoxification effect *in vitro*[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2022, 34(5): 54-60 (in Chinese).
- [38] DHAKAL R, CHAUHAN K, SEALE RB, DEETH HC, PILLIDGE CJ, POWELL IB, CRAVEN H, TURNER MS. Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci[J]. Food Microbiology, 2013, 34(2): 344-351.
- [39] 郑天凌, 苏建强. 海洋微生物在赤潮生消过程中的作用[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 291-295.
ZHENG TL, SU JQ. The role of marine microorganisms in the occurrence and declination of red-tide[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 291-295 (in Chinese).
- [40] MU RM, FAN ZQ, PEI HY, YUAN XL, LIU SX, WANG XR. Isolation and algae-lysing characteristics of the algicidal bacterium B5[J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(11): 1336-1340.
- [41] 马玉娇. 枯草芽孢杆菌对铜绿微囊藻的抑制作用研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学硕士学位论文, 2024.
MA YJ. Study on the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Microcystis aeruginosa*[D]. Qufu: Master's Thesis of Qufu Normal University, 2024 (in Chinese).
- [42] SAKEVICH AI, KIRPENKO NI, MEDVED' VA, USENKO OM, GORBUNOVA ZN. Influence of polyphenols of higher aquatic plants on the functional activity of plankton algae[J]. Hydrobiological Journal, 2005, 41(6): 99-110.
- [43] CZERPAK R, BAJGUZ A, PIOTROWSKA A, DOBROGOWSKA R, MATEJCZYK M, WIESLAWSKI W. Biochemical activity of di- and polyamines in the green Alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophyceae*)[J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2011, 72(1): 19-24.
- [44] KELLY B, PEARCE EL. Amino assets: how amino acids support immunity[J]. Cell Metabolism, 2020, 32(2): 154-175.
- [45] FIRN RD, JONES CG. The evolution of secondary metabolism: a unifying model[J]. Molecular Microbiology, 2000, 37(5): 989-994.

- [46] ZHANG B, YANG Y, HE W, LIU W. Algicidal process and mechanisms of *Enterobacter hormaechei* F₂ revealed by an integrated transcriptomic and metabolomic approach[J]. *Genomics*, 2023, 115(2): 110586.
- [47] 苏艳莉, 孙盛明, 朱健, 谢骏, 戈贤平. 枯草芽孢杆菌在水产养殖中的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2016, 6(6): 32-39.
SU YL, SUN SM, ZHU J, XIE J, GE XP. Advances of *Bacillus subtilis* application in aquaculture[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2016, 6(6): 32-39 (in Chinese).
- [48] 刘纯, 方莹, 龙祝, 胡佳, 郭小华. 商用益生芽孢杆菌的安全性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(8): 203-208.
LIU C, FANG Y, LONG Z, HU J, GUO XH. Safety analysis of commercial probiotic *Bacillus*[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(8): 203-208 (in Chinese).
- [49] 尹文林, 潘晓义, 曹铮, 沈智华, 吴颖蕾, 沈锦玉. 枯草芽孢杆菌 B115 株的毒性研究[J]. *中国水产*, 2006(11): 84-86.
YIN WL, PAN XY, CAO Z, SHEN ZH, WU YL, SHEN JY. Study on toxicity of *Bacillus subtilis* B115 strain[J]. *China Fisheries*, 2006(11): 84-86 (in Chinese).
- [50] 曹海鹏, 顾颖, 孙苗苗, 王会聪, 叶仁智, 安健. 中华绒螯蟹养殖用抑水绵枯草芽孢杆菌 A4 的安全性分析[J]. *淡水渔业*, 2023, 53(5): 104-112.
CAO HP, GU Y, SUN MM, WANG HC, YE RZ, AN J. Safety analysis of *Bacillus subtilis* A4 against *Spirogyra* in *Eriocheir sinensis* aquaculture use[J]. *Freshwater Fisheries*, 2023, 53(5): 104-112 (in Chinese).
- [51] 国家环境保护总局. 环保用微生物菌剂环境安全评价导则: HJ/T 415—2008[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2008.
State Environmental Protection Administration of the People's Republic of China. Guide of safety-assessment on application of microbial blends in the environmental protection: HJ/T 415—2008[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2008 (in Chinese).
- [52] 农牧办[2021]43 号直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南[N]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2021.
Agricultural and Animal Husbandry Office [2021] No. 43 Guidelines for identification and safety evaluation of microbial strains for direct-fed microorganism and fermented products production[N]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, 2021 (in Chinese).