

## 酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌前噬菌体的鉴别

傅文博<sup>1,2</sup>, 杜海<sup>\*1,2</sup>, 徐岩<sup>\*1,2</sup>

1 江南大学酿造微生物与应用酶学研究室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

傅文博, 杜海, 徐岩. 酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌前噬菌体的鉴别[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3567-3580

Fu Wenbo, Du Hai, Xu Yan. Identification of prophages in *Bacillus licheniformis* in sauce-flavor *baijiu* fermentation[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3567-3580

**摘要:** 【背景】噬菌体是微生物群落的重要组成部分, 但传统白酒发酵中噬菌体的分类和存在尚不清楚。【目的】通过检测公共数据库和酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)基因组中的前噬菌体整合区域, 探究传统酱香型白酒发酵中关键功能菌株的前噬菌体分类和侵染情况。【方法】使用未培养(细菌全基因组分析)和可培养(菌株筛选和特异性 PCR 反应)技术对不同环境来源和来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌前噬菌体的分类和存在进行解析。【结果】细菌全基因组分析显示, 30 株来自不同环境的地衣芽孢杆菌基因组中共注释到 165 个前噬菌体, 其中 63.6% (105/165)为完整前噬菌体序列。97.1%感染地衣芽孢杆菌的噬菌体属于长尾噬菌体科(Siphoviridae), 2.9%属于肌尾噬菌体科(Myoviridae), 53.0%完整前噬菌体的基因功能未知。在来自酱香型白酒发酵的 *B. licheniformis* MT-B06 中检测到 7 个前噬菌体整合序列, 其中 57.1% (4/7)为完整前噬菌体序列, 来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌存在多种不同前噬菌体的共感染。来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌前噬菌体存在来自细菌基因组上相邻 CotD 孢子外壳蛋白(CotD family spore coat protein)基因的水平基因转移。在 26 株来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中, 69.2% (18/26)存在噬菌体编码主要衣壳蛋白的基因, 100.0% (26/26)存在噬菌体编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因。【结论】来自不同环境的地衣芽孢杆菌和酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中存在高水平的前噬菌体整合, 来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌前噬菌体中广泛存在来源于宿主的 CotD 孢子外壳蛋白基因的水平基因转移。本研究为首次对传统发酵白酒中噬菌体的分类和存在进行探究, 有助于对发酵微生物群落中噬菌体-细菌相互作用加深理解。

**关键词:** 前噬菌体; 地衣芽孢杆菌; 细菌基因组; 水平基因转移; 酱香型白酒

基金项目: 国家自然科学基金(32172176); 国家重点研发计划(2018YFC1604100); 江苏省自然科学基金(BK20201341)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32172176); National Key Research and Development Program of China (2018YFC1604100); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20201341)

\*Corresponding authors: E-mail: DU Hai: duhai88@126.com; XU Yan: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-01-07; Accepted: 2022-03-29; Published online: 2022-04-12

## Identification of prophages in *Bacillus licheniformis* in sauce-flavor *baijiu* fermentation

FU Wenbo<sup>1,2</sup>, DU Hai<sup>\*1,2</sup>, XU Yan<sup>\*1,2</sup>

1 Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Phages are an important part of microbial community, but the classification and presence of them in traditional *baijiu* fermentation are still unclear. [Objective] By exploring prophage regions in the genomes of *Bacillus licheniformis* in public databases and in sauce-flavor *baijiu* fermentation, we intend to clarify the classification and infection of prophages in key functional strains in traditional sauce-flavor *baijiu* fermentation. [Methods] With culture-independent (bacterial whole genome analysis) and culture-dependent (strain screening and specific PCR) techniques, the classification and presence of prophages in *B. licheniformis* from different natural habitats and sauce-flavor *baijiu* fermentation were analyzed. [Results] The whole genome analysis of bacteria detected 165 prophages in genomes of 30 *B. licheniformis* strains from different habitats, of which 63.6% (105/165) had intact sequences. A total of 97.1% of the prophages in the *B. licheniformis* belonged to Siphoviridae, and 2.9% Myoviridae. The functions of 53.0% genes of the intact prophages were unknown. Seven integrated prophage regions were detected in sauce-flavor *baijiu*-derived *B. licheniformis* MT-B06, of which 57.1% (4/7) were intact prophage regions. Co-infection of multiple prophages was detected in *B. licheniformis* from sauce-flavor *baijiu* fermentation. There was horizontal gene transfer of CotD family spore coat protein gene on the bacterial genome to the prophage. In the 26 sauce-flavor *baijiu*-derived *B. licheniformis* strains, 69.2% (18/26) were detected positive of prophage-encoded major capsid protein gene, and 100.0% (26/26) positive of prophage-encoded CotD family spore coat protein gene. [Conclusion] High level of prophage integration was found in *B. licheniformis* from different natural habitats and sauce-flavor *baijiu* fermentation. Horizontal gene transfer of CotD family spore coat protein gene from host to the prophage of *B. licheniformis* in sauce-flavor *baijiu* fermentation was widely observed. This study is the first time to explore the classification and presence of bacteriophages in traditional *baijiu* fermentation, which helps to deepen the understanding of bacteriophage-host interaction in the fermenting microbial community.

**Keywords:** prophage; *Bacillus licheniformis*; bacterial genome; horizontal gene transfer; sauce-flavor *baijiu*

噬菌体是寄生于原核微生物细胞内的生命实体。通过影响宿主细胞的生命机制,烈性噬菌体大量繁殖并破坏受感染的宿主细胞,而溶原性噬菌体在进入宿主细胞后并不一定立刻开始复制和破坏细胞,其基因组可能整合到宿主

细胞基因组中以等待激活时机。溶原性噬菌体的基因组整合到宿主基因组后被称为前噬菌体(prophage),并可以随宿主繁殖传递给宿主子细胞。噬菌体是细菌水平基因转移(horizontal gene transfer)的主要参与者,大多数前噬菌体通过位

点特异性重组将其基因组整合到宿主基因组中,重组发生在噬菌体和宿主 DNA 的同源序列之间,并由噬菌体编码的整合酶介导<sup>[1]</sup>。由于其存活依赖于宿主细胞,前噬菌体通常表达增加宿主细胞适应性的基因<sup>[2-3]</sup>。前噬菌体可以对细菌产生多种生理功能影响,增加抗生素抗性<sup>[4]</sup>、逃避免疫防御<sup>[5-6]</sup>、增加抗氧化活性<sup>[7]</sup>或编码增加毒力的毒素<sup>[8]</sup>。前噬菌体还可以通过重编码宿主代谢基因来调控细菌种群<sup>[9-10]</sup>。

细菌是食品发酵中的主要参与者,决定发酵产品的风味和质量<sup>[11]</sup>。烈性噬菌体对乳酸菌(lactic acid bacteria)的感染被广泛研究,被认为是乳制品行业发酵失败的主要原因<sup>[12]</sup>。在大豆发酵产品中的噬菌体显著抑制了发酵中枯草芽孢杆菌的生长,并在发酵产品和原材料中广泛存在<sup>[13]</sup>。由于前噬菌体诱导的不确定性,前噬菌体和温和噬菌体的研究比烈性噬菌体少得多<sup>[14]</sup>。近年来,随着二代测序技术的快速发展,基于细菌基因组的前噬菌体预测成为研究热点。基于 1 472 个乳酸杆菌属基因组的研究显示前噬菌体广泛分布于乳酸杆菌中,并且可以介导抗生素抗性基因,从而增强植物乳杆菌的抗性表型<sup>[15]</sup>。超过 1 300 个链球菌属基因组的研究表明前噬菌体在链球菌中广泛分布并具有保守的结构组成,而且存在前噬菌体的跨物种传播<sup>[16]</sup>。

目前已在来自白酒发酵生态系统的厌氧菌株(*Clostridium butyricum* JKY6D1)的基因组中检测到前噬菌体序列<sup>[17]</sup>。酱香型白酒是中国传统发酵酒类,发酵过程主要由核心细菌和真菌驱动<sup>[18]</sup>。核心功能微生物群在不同发酵过程中对风味代谢物有显著影响,其中一些在驱动微生物群的多样性方面起着关键作用。地衣芽孢杆菌是酱香型白酒发酵中重要的淀粉酶、地衣素和酱香风味生产者<sup>[19-21]</sup>。由于依赖培养的方法对白酒发酵系统中噬菌体分离的局限性,目

前还缺乏相关研究。因此,利用细菌全基因组探究白酒发酵地衣芽孢杆菌中的前噬菌体分类和侵染情况对提高白酒发酵中噬菌体的认识具有积极的意义。

本研究通过运用未培养(细菌全基因组分析)和可培养(菌株筛选和特异性 PCR 反应)技术,探究了地衣芽孢杆菌中前噬菌体的种类和分布,解析了酱香型白酒发酵中地衣芽孢杆菌中前噬菌体的存在情况,以期深入探究噬菌体在白酒发酵过程中的作用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

用于筛选地衣芽孢杆菌的高温大曲和酒醅收集于贵州省某酱香型白酒厂,共采集高温大曲样品 10 份及发酵酒醅样品 1 份,所有收集好的样品置于 4 °C 冰箱保存直至开始筛选。

### 1.2 主要试剂和仪器

氯化钠、胰蛋白胨、酵母提取物和琼脂粉,国药集团化学试剂(北京)有限公司;Taq Mix 酶,诺唯赞公司。高速冷冻离心机,Eppendorf 公司;PCR 仪,Bio-Rad 公司。

### 1.3 生物信息学分析

从 NCBI Nucleotide Sequence 数据库中下载了 30 株地衣芽孢杆菌全基因组信息,提取基因组中所有注释为末端酶大亚单位(terminase large subunit, TerL)的基因序列,将其翻译为蛋白序列后通过 NCBI BLAST 软件与 NCBI RefSeq 数据库中所有的末端酶大亚单位蛋白序列比较,然后利用 MAFFT 软件将地衣芽孢杆菌基因组中的末端酶大亚单位序列与数据库中的参考序列进行对齐。

使用 PHASTER 工具鉴别 30 株地衣芽孢杆菌基因组中的前噬菌体整合区域。将 30 株地衣芽孢杆菌基因组中所有注释为完整前噬菌体整

合区域的基因序列通过 MetaGeneMark 软件预测编码蛋白的开放阅读框(open reading frame, ORF), 通过 eggNOG 数据库注释获得 Cluster of Orthologous Groups of Proteins (COG) 功能注释。

30 株地衣芽孢杆菌基因组中所有的完整前噬菌体整合区域基因序列通过 MAFFT 软件进行比对, 然后使用 MEGA-X 软件构建系统发育树。

将前噬菌体序列上的基因分布排列情况通过 SnapGene 软件可视化呈现。将来源于高温大曲的 *B. licheniformis* MT-B06 基因组中编码“CotD 孢子外壳蛋白”的 5 个基因序列通过 MAFFT 软件进行对齐, 然后将对齐后的序列通过 MEGA-X 软件构建基于最大似然法的系统发育树。

#### 1.4 地衣芽孢杆菌前噬菌体验证

首先从酱香型白酒发酵酒醅和高温大曲中筛选地衣芽孢杆菌, 将 10 g 样品加入 100 mL 无菌生理盐水中稀释并振荡 30 min, 再连续 4 次 10 倍稀释, 获得总稀释倍数最高为  $10^{-5}$  倍的菌悬液, 将 0.1 mL 菌悬液涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h, 挑取单菌落连续划线 2 次, 纯化后采用原核微生物通用正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和反向引物 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): *Taq* Mix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 基因组模板 DNA (50 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 超纯水补足至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 6 min; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。基因扩增产物经过金唯智公司测序后与 NCBI 数据库中 16S rRNA 基因序列进行对比, 得到目标菌株的具体分类信息。最终获得 26 株地衣芽孢杆菌, 在 20% 甘油中保藏于

-80 °C 冰箱。

通过 DNAMAN 软件设计 *B. licheniformis* MT-B06 基因组中被注释为“PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167” (region 3) 的完整前噬菌体整合序列中, 编码主要衣壳蛋白(major capsid protein; WP\_017475036.1)和 CotD 孢子外壳蛋白 (CotD family spore coat protein; WP\_003185368.1) 基因序列的特异性引物。分别为正向引物 MCP\_F (5'-GCAAGAGGGAAA TACAGAAGAG-3') 和反向引物 MCP\_R (5'-CCG AACAGAAGGAAGTTGTC-3'), 以及正向引物 SCP\_F (5'-CGCCAATTGTACACCCGAC-3') 和反向引物 SCP\_R (5'-CACATTTGTTACATGCTGG-3')。提取 26 株地衣芽孢杆菌的基因组后分别进行 PCR 反应, 基因扩增产物加载在 1.5% 琼脂糖凝胶上成像。

## 2 结果与分析

### 2.1 地衣芽孢杆菌前噬菌体基因多样性

有尾噬菌体目(Caudovirales)是目前研究最广泛的噬菌体群体, 其为具有尾状结构典型特征的双链 DNA 噬菌体, 并且通常是环境中被检测到最多的噬菌体<sup>[22]</sup>。有尾噬菌体目的多样性可以通过噬菌体序列中编码保守的末端酶大亚单位的基因来评估<sup>[23]</sup>。在 30 株地衣芽孢杆菌基因组中共提取出 140 个编码末端酶大亚单位的基因(表 1)。共比对到 11 个数据库中的末端酶大亚单位参考序列, 97.1% (136/140) 编码末端酶大亚单位的基因比对到属于长尾噬菌体科的参考序列, 2.9% (4/140) 编码末端酶大亚单位的基因比对到属于肌尾噬菌体科的参考序列(图 1)。结果表明感染地衣芽孢杆菌的溶原性噬菌体绝大部分属于长尾噬菌体科, 并且地衣芽孢杆菌中整合的前噬菌体基因多样性较少, 但菌株中整合前噬菌体基因数量较多, 地衣芽孢杆

菌中广泛存在前噬菌体共感染的情况。从高温大曲中分离的 *B. licheniformis* MT-B06 基因组 (NZ\_CP032538.1) 中提取出 6 个编码末端酶大亚

单位的基因, 均比对到长尾噬菌体科的参考序列, 说明在酱香白酒发酵中的地衣芽孢杆菌存在来自长尾噬菌体科噬菌体多重感染的情况。

表 1 30 株来自不同环境的地衣芽孢杆菌基因组

Table 1 30 *B. licheniformis* genomes from different habitats

<i>B. licheniformis</i> strain	Number of TerL	Percentage of prophages to bacterial genome (%)	Source	Country	NCBI accession No.
MT-B06	6	8.7	高温大曲 High-temperature <i>daqu</i>	China	NZ_CP032538.1
CSL2	4	6.2	淤泥 Silt	China	NZ_CP041154.1
WX-02	4	4.2	盐矿土 Salt mine soil	China	NZ_CP012110.1
BL-010	6	6.4	土壤 Soil	China	NZ_CP022477.1
TCCC11148	4	6.1	土壤 Soil	China	NZ_CP033218.1
LCDD6	4	5.0	核桃 Walnut	China	NZ_CP065029.1
H2	4	3.6	肠道 Ileum	China	NZ_CP065943.1
NCTC10341	2	4.2	NA	United Kingdom	LR134392.1
MCC2514	4	4.1	生牛奶 Raw milk	India	NZ_CP038186.1
MBGJa67	6	5.0	肠道 Excreta	India	NZ_CP026522.1
OK12	3	3.1	粗盐 Crude salt	Turkey	NZ_CP060498.1
TAB7	4	6.2	堆肥 Manure compost	Japan	NZ_CP027789.1
ATCC 9789	5	3.8	牛奶 Milk	United States	NZ_CP023729.1
FDAARGOS_923	7	10.2	NA	United States	NZ_CP065647.1
ATCC 14580	5	4.2	NA	United States	NZ_CP034569.1
KS28	5	7.4	血液 Blood	Korea	CP043490.1
SRCM103608	4	5.9	食品 Food	Korea	NZ_CP035405.1
SRCM103529	5	7.8	食品 Food	Korea	NZ_CP035228.1
SRCM103914	5	4.5	食品 Food	Korea	NZ_CP035188.1
SRCM103583	7	6.4	食品 Food	Korea	NZ_CP035404.1
PB3	4	5.1	成人粪便 Adult feces	Korea	NZ_CP025226.1
CP6	4	4.9	海水 Seawater	Korea	NZ_CP049330.1
SCDB14	3	2.3	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP014842.1
BL1202	8	8.5	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP017247.1
SCKB11	4	6.1	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP014795.1
SCDB34	5	7.4	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP014793.1
SCCB37	6	8.2	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP014794.1
HRBL-15TDI7	2	3.5	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP014781.1
0DA23-1	6	8.2	大酱 Soybean paste	Korea	NZ_CP031126.1
P8_B2	4	6.7	NA	Denmark	NZ_CP045814.1

Note: NA: Not available.

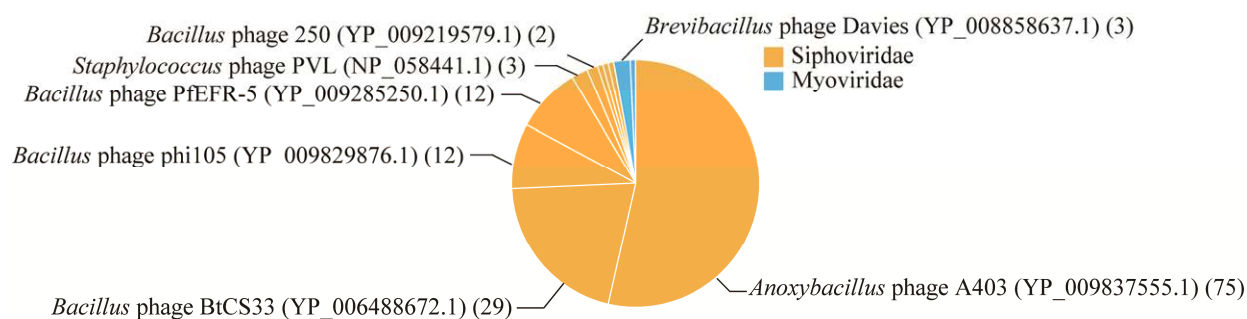


图 1 地衣芽孢杆菌基因组中前噬菌体末端酶大亚单位序列的分类

Figure 1 Classification of terminase large subunit sequences of prophages in *B. licheniformis* genomes.

## 2.2 地衣芽孢杆菌中的前噬菌体整合区域

为了确定地衣芽孢杆菌中的总体前噬菌体分布,使用 PHASTER 软件鉴定了来自不同环境的 30 个地衣芽孢杆菌基因组中的前噬菌体序列。总体而言,在分析的 100.0% (30/30) 基因组序列中鉴定出 165 个原噬菌体区域,表明前噬菌体在不同环境的地衣芽孢杆菌中高度流行(图 2A)。菌株之间的前噬菌体数量差异很大,在每个菌株中发现了 2–8 个前噬菌体区域,每个菌株平均整合 5.5 个前噬菌体区域。在预测的 165 个前噬菌体区域中,大部分被标记为有问题或不完整的原噬菌体片段,其中 105 个前噬菌体区域被标记为完整的前噬菌体 (score>90),分布在 100.0% (30/30) 的地衣芽孢杆菌菌株中,从 1 个到 7 个不等。大量完整前噬菌体的存在表明潜在的功能性前噬菌体(完整的、诱导型或可转移的)广泛分布于地衣芽孢杆菌中,这些预测的完整前噬菌体作为进一步分析的主要对象。

在检测出的完整前噬菌体中,注释占比最多的是 35.2% (37/105) 注释为“PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167”的完整前噬菌体,其次是 16.2% (17/105) 注释为“PHAGE\_Brevib\_Jimmer2\_NC\_041976”的完整前噬菌体(图 2B)。来自不同环境的地衣芽孢杆菌具有相似的完整

前噬菌体整合区域,表明地衣芽孢杆菌对能够整合进基因组的前噬菌体具有相似的选择性。

在来源于高温大曲的 *B. licheniformis* MT-B06 基因组(NZ\_CP032538.1)中检测到 7 个前噬菌体基因整合区域(图 3)。其中有 4 个完整的前噬菌体基因整合区域,包括“PHAGE\_Staphy\_tp310\_1\_NC\_009761” (region 1; 25.3 kb)、“PHAGE\_Staphy\_tp310\_3\_NC\_009763” (region 2; 54.7 kb)、“PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167” (region 3; 39.9 kb)和“PHAGE\_Brevib\_Jimmer2\_NC\_041976” (region 6; 65.4 kb)。

## 2.3 地衣芽孢杆菌前噬菌体的基因功能

在 30 株地衣芽孢杆菌的 105 个完整前噬菌体基因整合序列中共预测得到 6 904 个开放阅读框。经过 eggNOG 数据库注释后得到基因的 COG 功能分类,其中以 53.0% (2 094/6 904) 的“未知功能”分类最多,其次是 12.1% (480/6 904) 的“复制、重组和修复”分类、11.4% (451/6 904) 的“转录”分类和 5.3% (209/6 904) 的“细胞壁/膜/包膜生物合成”分类等(图 4)。这些功能性开放阅读框的类别与常规噬菌体功能表现出较强的一致性,它们对噬菌体的繁殖和生存至关重要。完整前噬菌体的大多数开放阅读框基因功能未知,这表明地衣芽孢杆菌基因组中大量未鉴定的前噬菌体基因对宿主的作用仍待探索。

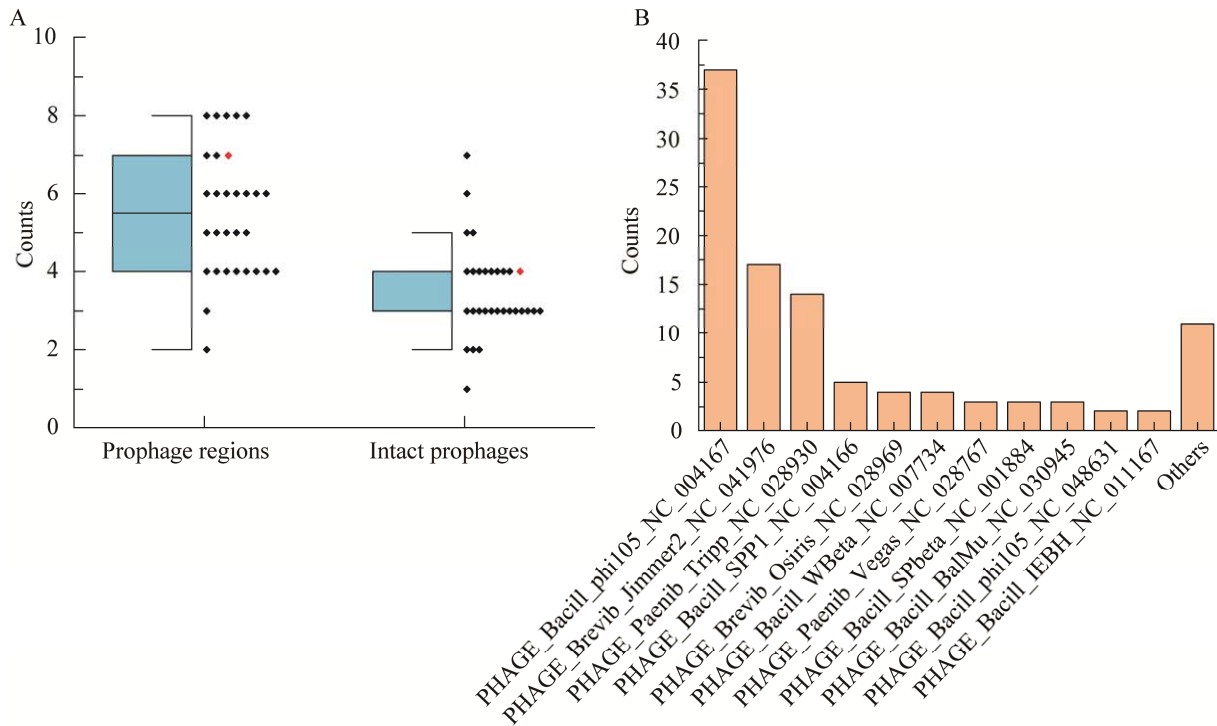


图 2 30 株地衣芽孢杆菌中检测到的前噬菌体基因整合区域 A: 地衣芽孢杆菌所有前噬菌体基因整合区域数量和完整前噬菌体基因整合区域数量的统计; 红色: 来酱香型白酒, 黑色: 来自其他环境; B: 完整前噬菌体的注释分类统计

Figure 2 The prophage integration regions detected in 30 *B. licheniformis* strains. A: Statistics of the number of the all prophage integration regions in *B. licheniformis* and the intact prophage integration regions; Red: From sauce-flavor baijiu fermentation; Black: From other habitats; B: Annotated taxonomy statistics of the intact prophages.

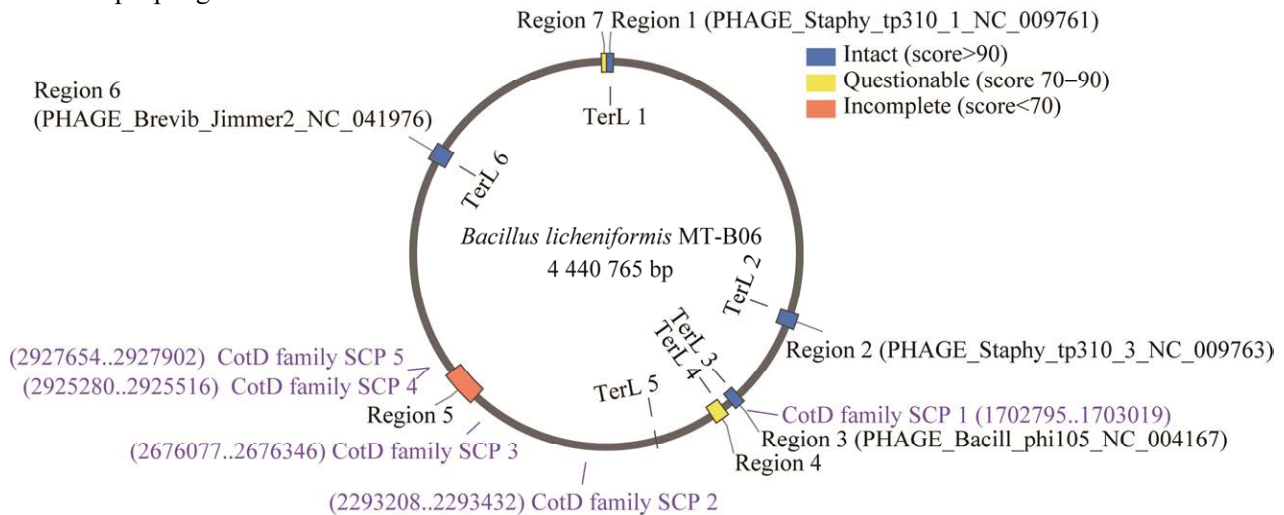


图 3 来自高温大曲的 *B. licheniformis* MT-B06 的基因组 基因组中包括前噬菌体整合区域以及编码 CotD 孢子外壳蛋白和末端酶大亚单位的基因

Figure 3 The genome of high-temperature *daqu* derived *B. licheniformis* MT-B06. The genome included the prophage integration regions and the genes encoding CotD family spore coat protein and TerL.

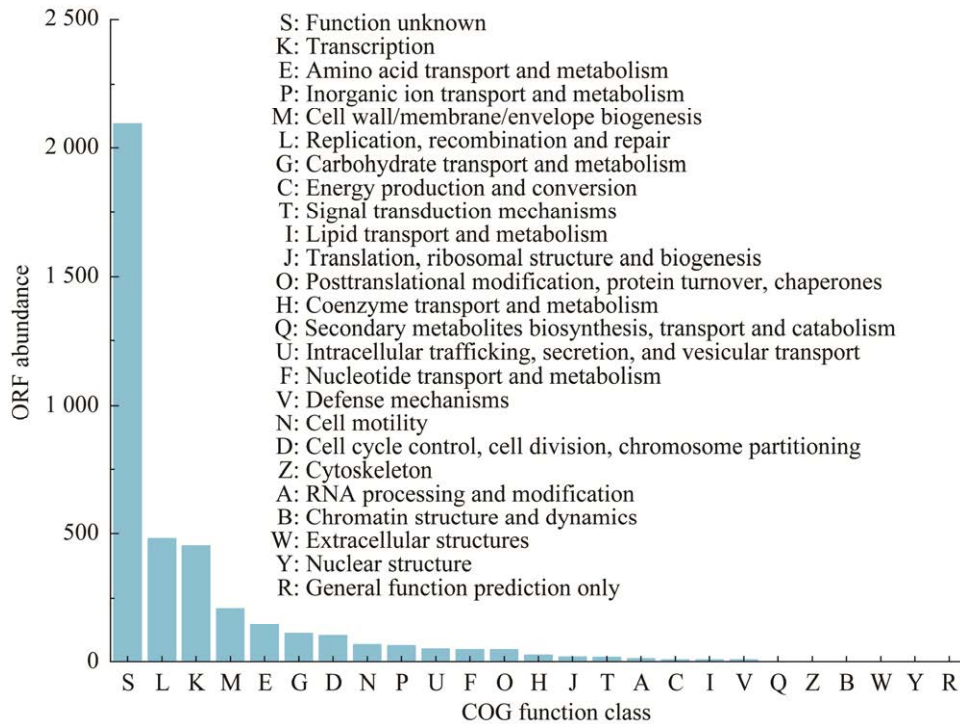


图 4 来自 30 株地衣芽孢杆菌的 105 个完整前噬菌体基因的 COG 功能分类

Figure 4 COG functional classification of genes of 105 intact prophage from 30 *B. licheniformis* strains.

#### 2.4 地衣芽孢杆菌前噬菌体系统发育树的建立

NCBI 数据库中具有全基因组序列的 30 株地衣芽孢杆菌是从多种环境中分离出来的, 将 30 株地衣芽孢杆菌基因组中检测到的 105 条完整前噬菌体基因整合区域经过比对后构建系统发育树(图 5)。结果发现系统发育树中 105 条前噬菌体基因整合序列主要分为 2 个部分, 分别为 21 条无明显相似性的前噬菌体序列和 84 条具有相似性的前噬菌体序列。在 84 条具有相似性的前噬菌体序列的系统发育树中, 来自相同地衣芽孢杆菌基因组的前噬菌体相似性较差。如来源于高温大曲的 *B. licheniformis* MT-B06 的 4 个完整前噬菌体序列分散在系统发育树的不同部分, 表明酱香型白酒发酵的地衣芽

孢杆菌可以受到多种不同的前噬菌体侵染和整合。

在 *B. licheniformis* MT-B06 基因组中的完整前噬菌体整合区域 Region 3 中发现前噬菌体编码的 CotD 孢子外壳蛋白基因序列(图 6A)。将此孢子外壳蛋白基因序列与 *B. licheniformis* MT-B06 基因组中其余 4 个非前噬菌体基因整合区域的 CotD 孢子外壳蛋白基因进行系统发育分析, 发现前噬菌体编码的 CotD 孢子外壳蛋白基因与其在基因组上相邻最近的宿主 CotD 孢子外壳蛋白基因相似性最高(图 6B)。表明前噬菌体基因整合到宿主基因组后可能发生 CotD 孢子外壳蛋白基因的噬菌体-宿主水平基因转移。



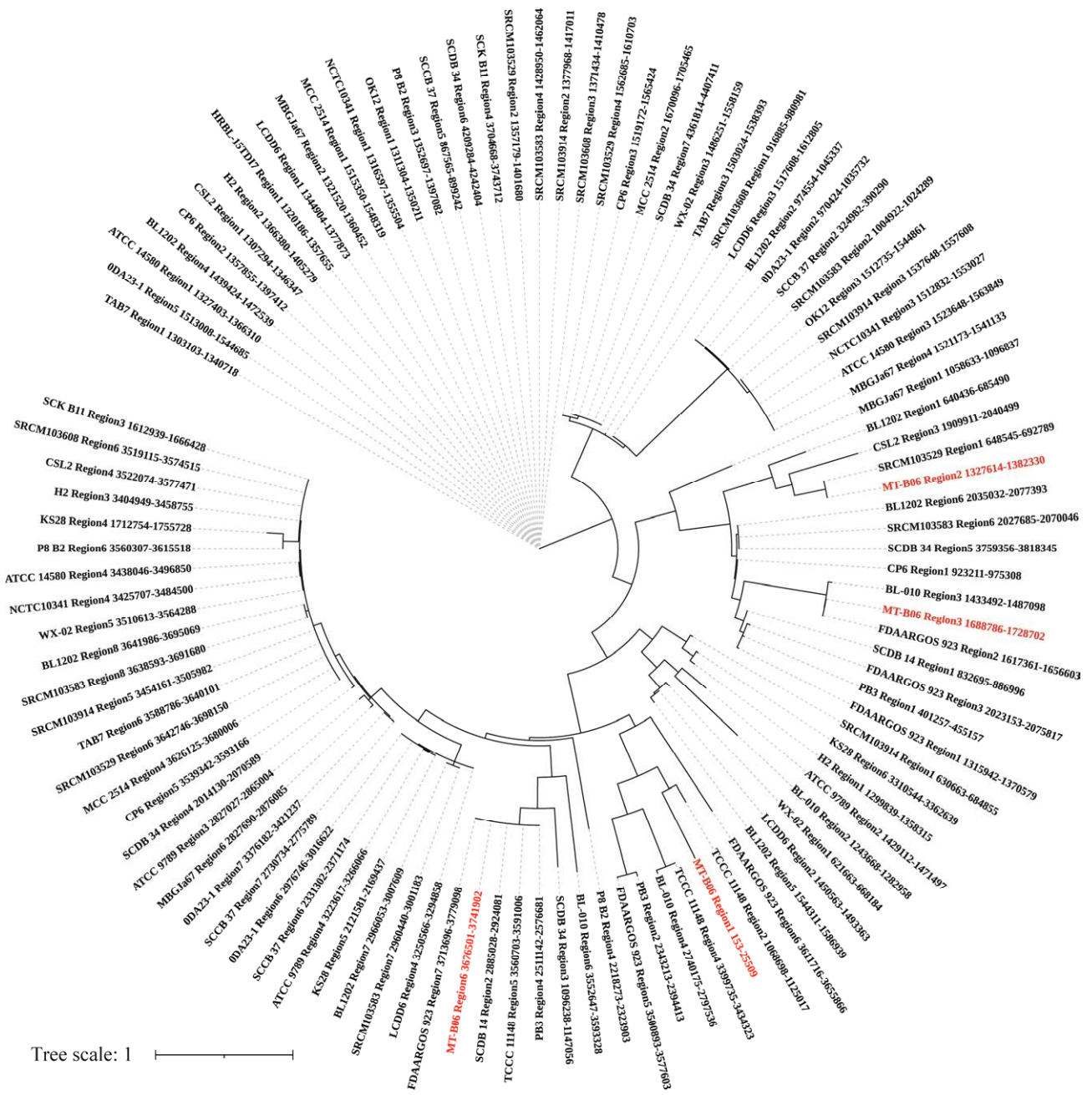


图 5 30 株地衣芽孢杆菌中 105 条完整前噬菌体序列的系统发育树 *B. licheniformis* MT-B06 中完整前噬菌体序列标记为红色

Figure 5 Phylogenetic tree of 105 intact prophage regions in 30 *B. licheniformis* strains. The intact prophage sequences of *B. licheniformis* MT-B06 were marked with red.

### 2.5 酱香白酒发酵中地衣芽孢杆菌的溶原分布

根据来自不同环境的地衣芽孢杆菌中共同被注释为“PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167”

(region 3)的完整前噬菌体中编码“major capsid protein”的基因序列和 *B. licheniformis* MT-B06 中编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因设计特异性 PCR 引物 (图 7), 引物在模板上的位置如图 7A 所示。

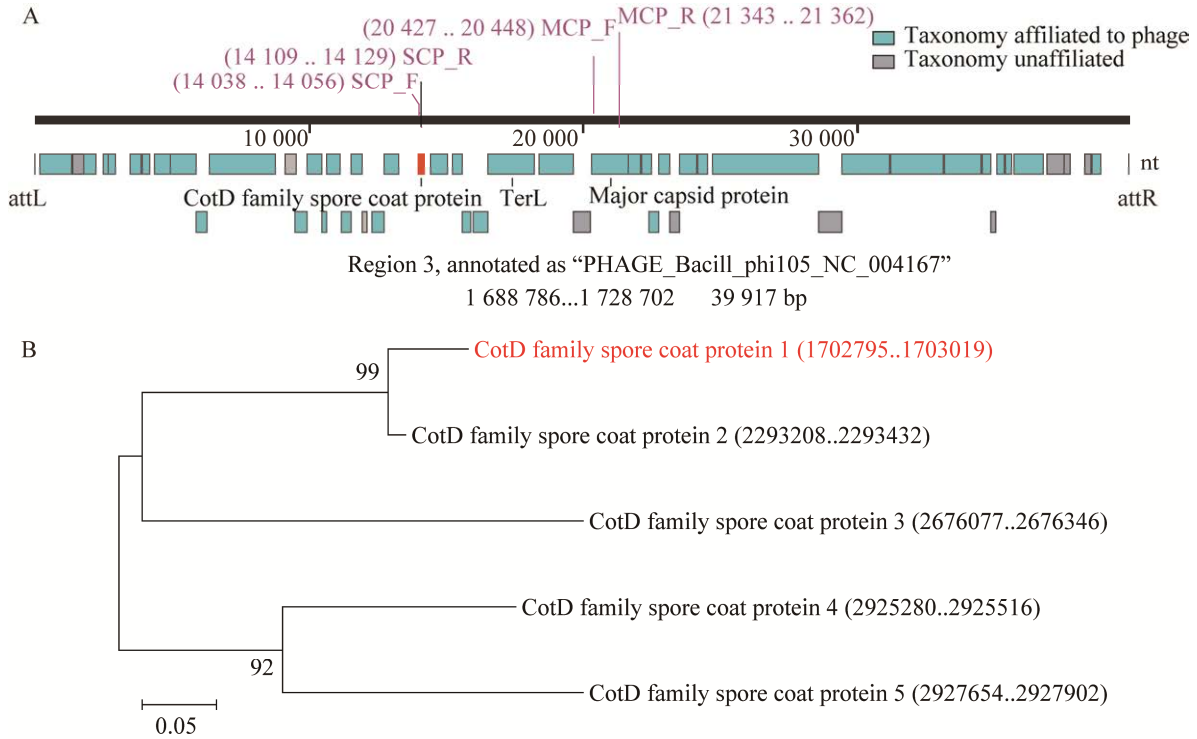


图 6 *B. licheniformis* MT-B06 中前噬菌体编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因分布(A)及其系统发育树(B)属于前噬菌体序列中的基因使用红色标注

Figure 6 Gene distribution (A) and phylogenetic tree (B) of prophage-encoded CotD spore coat proteins in *B. licheniformis* MT-B06. The gene belonging to the prophage sequence was marked with red.

从高温大曲和酒醅样品中共分离得到 26 株地衣芽孢杆菌。分别提取这 26 株菌的 DNA 后,使用 MCP\_F/MCP\_R 和 SCP\_F/SCP\_R 两对特异性引物进行 PCR。其中,69.23% (18/26)地衣芽孢杆菌鉴定到存在前噬菌体编码主要衣壳蛋白的基因,100.0% (26/26)地衣芽孢杆菌鉴定出存在前噬菌体编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因(表 2)。我们的研究表明在酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中存在广泛的前噬菌体基因整合,以及 CotD 孢子外壳蛋白基因的噬菌体-宿主水平基因转移。

### 3 讨论与结论

噬菌体是传染性颗粒生命体,只能在细菌或古菌的细胞内繁殖。与我们对细菌、真菌和其他单细胞微生物多样性的了解相比,人们对

噬菌体颗粒之间的遗传多样性知之甚少。这种知识的缺乏阻碍了我们对噬菌体在微生物群落及其相关生态系统进化中所起作用的理解,特别是在传统食品发酵系统中。目前基于未培养的测序技术研究噬菌体的困难主要在于噬菌体无通用的“标记”基因可用于识别环境样本中的所有噬菌体<sup>[24]</sup>。此外,公共数据库中许多已测序的噬菌体基因尚未与其宿主联系起来。许多噬菌体将其基因组整合到宿主细胞的基因组中,而且已经有可用的计算工具利用噬菌体特异片段来识别噬菌体序列并将它们与宿主联系起来。因此,利用二代测序技术组装出完整的细菌基因组,并研究基因组中整合的前噬菌体序列,成为目前研究噬菌体-细菌相互作用的一种可行的方法。

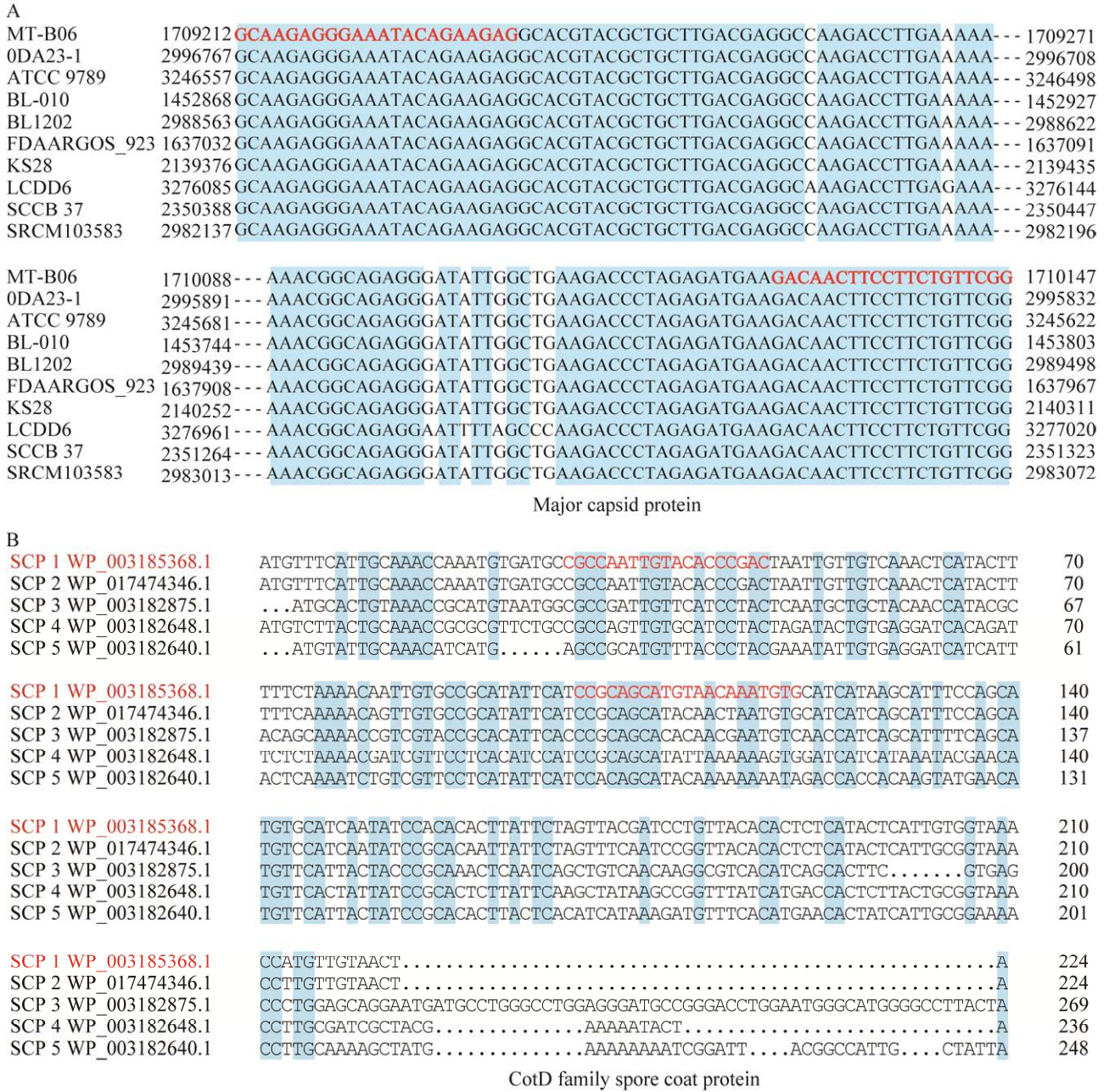


图 7 完整前噬菌体中主要衣壳蛋白和 CotD 孢子外壳蛋白基因的特异性引物设计 A: 均来源于被注释为“PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167”的完整前噬菌体序列; B: *B. licheniformis* MT-B06 中编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因序列; 相同位点使用蓝色标注, 引物使用红色标注

Figure 7 Design of specific primers for genes of “major capsid proteins” and “CotD spore coat proteins” in the intact prophage. A: It all derived from the intact prophage sequences annotated as “PHAGE\_Bacill\_phi105\_NC\_004167”; B: “CotD family spore coat protein” gene sequences in *B. licheniformis* MT-B06; The same positions were marked with blue, and the primers were marked with red.

表 2 26 株来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中前噬菌体基因的特异性 PCR 结果

Table 2 Specific PCR results of prophage genes of 26 *B. licheniformis* strains from sauce-flavor *baijiu* fermentation

<i>B. licheniformis</i> strain	Major capsid protein (region 3)	CotD family spore coat protein (region 3)	Source
A10	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A14	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A17	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A18	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A19	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A2	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A5	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A6	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A8	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B2	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B-3	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
H1	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
H2	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
H3	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
J4	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
J7	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
M6	+	+	Starter ( <i>daqu</i> )
P2	+	+	Fermented grain
A1	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
A15	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B1	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B-2	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B3	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
B3-4	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
J1	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )
J2	-	+	Starter ( <i>daqu</i> )

Note: +: Presence; -: Absence.

在发酵过程中,噬菌体通常被视为潜在的威胁,然而噬菌体赋予宿主许多优势。某些前噬菌体可以改善甚至恢复枯草芽孢杆菌中的孢子形成<sup>[25]</sup>,这表明某些噬菌体和孢子形成体之间可能存在合作关系。我们的研究发现,编码孢子外壳蛋白的基因广泛存在于来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌的前噬菌体中(表 2),并且这个孢子结构基因可能来源于宿主基因组上邻近基因的水平基因转移(图 6B)。在酱香型白酒发酵体系中存在高温、高酸、高醇的胁迫因

子,而芽孢杆菌的孢子可以抵御发酵极端条件,从而使芽孢杆菌成为酱香型白酒发酵中主要的发酵微生物<sup>[26]</sup>。因此,含有前噬菌体整合且前噬菌体能够编码孢子结构相关基因的地衣芽孢杆菌可能非常适合在酱香型白酒发酵环境中生存。

水平基因转移在生物适应中的作用是进化生物学中一个主要的问题。水平基因转移导致的基因重组被认为是细菌基因组进化的关键因素<sup>[27]</sup>。由噬菌体介导的水平基因转移通常涉及

温和噬菌体<sup>[28]</sup>, 因此, 调查发酵体系中温和噬菌体对细菌的影响具有极大的意义。Canchaya 等<sup>[29]</sup>发现用于奶酪发酵的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 菌株在受到噬菌体的极大压力下会携带更多的前噬菌体。因此, 整合更多的前噬菌体以响应各种环境压力似乎是细菌的一种抵御胁迫压力的机制。在本研究中, 来源于酱香型白酒发酵的 *B. licheniformis* MT-B06 携带 7 个前噬菌体区域和 4 个完整前噬菌体区域, 具有较高的前噬菌体整合水平(图 3)。我们发现传统白酒发酵中多种不同的前噬菌体可以侵染和整合进核心细菌基因组中, 噬菌体对白酒发酵的影响需要更多的细菌基因组测序和前噬菌体可培养诱导实验加以证明。

在本研究中, 来自酱香型白酒发酵 *B. licheniformis* MT-B06 的前噬菌体整合区域 region 3 中的主要衣壳蛋白在 10 株不同环境来源的地衣芽孢杆菌基因组中较为保守(图 7A), 因此被用作鉴定地衣芽孢杆菌中前噬菌体存在的标记。在 26 株酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中 69.2% 存在这种前噬菌体主要衣壳蛋白基因(表 2), 表明在微生物密度较高的发酵体系中, 同种噬菌体可能具有广泛的传播范围, 并且倾向于溶原感染。选择与宿主基因具有差异的 *B. licheniformis* MT-B06 中前噬菌体编码 CotD 孢子外壳蛋白的基因片段作为引物(图 7B), 检测出 26 株来自酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中 100.0% 具有这种孢子外壳蛋白基因, 表明前噬菌体-宿主水平基因转移在来源于酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中非常普遍。而且在“主要衣壳蛋白(region 3)”缺失的菌株中也具有“CotD 孢子外壳蛋白(region 3)” (表 2), 表明具有编码孢子外壳蛋白基因的前噬菌体的主要衣壳蛋白基因可能不同, 或者此主要衣壳蛋白基因已经缺失。

本研究调查了 30 株不同环境来源的地衣芽孢杆菌和 26 株酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中前噬菌体的整合情况, 前噬菌体对地衣芽孢杆菌具有高感染率, 感染地衣芽孢杆菌的前噬菌体绝大部分属于长尾噬菌体科。在来源于酱香型白酒发酵的地衣芽孢杆菌中广泛存在前噬菌体整合和 CotD 孢子外壳蛋白基因的水平基因转移。本研究揭示了地衣芽孢杆菌前噬菌体的分类和存在, 加深了对传统白酒发酵中地衣芽孢杆菌前噬菌体的认识, 为探究传统发酵微生物群落中噬菌体-细菌相互作用提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Fogg PCM, Colloms S, Rosser S, Stark M, Smith MCM. New applications for phage integrases[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(15): 2703-2716
- [2] Boyd EF, Brüssow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved[J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10(11): 521-529
- [3] Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49(2): 277-300
- [4] Debroas D, Siguret C. Viruses as key reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(11): 2856-2867
- [5] Miroid S, Rabsch W, Rohde M, Stender S, Tschäpe H, Rüssmann H, Igwe E, Hardt WD. Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella typhimurium* strain[J]. *PNAS*, 1999, 96(17): 9845-9850
- [6] Bulgin R, Raymond B, Garnett JA, Frankel G, Crepin VF, Berger CN, Arbeloa A. Bacterial guanine nucleotide exchange factors SopE-like and WxxxE effectors[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(4): 1417-1425
- [7] Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(2): 260-272
- [8] Mellor GE, Sim EM, Barlow RS, D'Astek BA, Galli L, Chinen I, Rivas M, Gobius KS. Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157

- isolates are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(13): 4724-4731
- [9] Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(10): 641-650
- [10] Balasubramanian D, Ragnathan PT, Fei JY, Vanderpool CK. A prophage-encoded small RNA controls metabolism and cell division in *Escherichia coli*[J]. *mSystems*, 2016, 1(1): e00021-e00015
- [11] Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, Mayo B, Westerik N, Hutkins R. Fermented foods in a global age: East meets West[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(1): 184-217
- [12] Garneau JE, Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations[J]. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(Suppl 1): S20
- [13] Ghosh K, Kang HS, Hyun WB, Kim KP. High prevalence of *Bacillus subtilis*-infecting bacteriophages in soybean-based fermented foods and its detrimental effects on the process and quality of Cheonggukjang[J]. *Food Microbiology*, 2018, 76: 196-203
- [14] Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(7): 1511-1520
- [15] Pei ZM, Sadiq FA, Han X, Zhao JX, Zhang H, Ross RP, Lu WW, Chen W. Comprehensive scanning of prophages in *Lactobacillus*: distribution, diversity, antibiotic resistance genes, and linkages with CRISPR-cas systems[J]. *mSystems*, 2021, 6(3): e0121120
- [16] Rezaei Javan R, Ramos-Sevillano E, Akter A, Brown J, Brueggemann AB. Prophages and satellite prophages are widespread in *Streptococcus* and may play a role in pneumococcal pathogenesis[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4852
- [17] Zou W, Ye GB, Zhang KZ, Yang HQ, Yang JG. Analysis of the core genome and pangenome of *Clostridium butyricum*[J]. *Genome*, 2021, 64(1): 51-61
- [18] Song ZW, Du H, Zhang Y, Xu Y. Unraveling core functional microbiota in traditional solid-state fermentation by high-throughput amplicons and metatranscriptomics sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1294
- [19] Wu Q, Zhang R, Peng SQ, Xu Y. Transcriptional characteristics associated with lichenysin biosynthesis in *Bacillus licheniformis* from Chinese Maotai-flavor liquor making[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(3): 888-893
- [20] Wu Q, Xu Y. Transcriptome profiling of heat-resistant strain *Bacillus licheniformis* CGMCC3962 producing Maotai flavor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(8): 2033-2038
- [21] Wang P, Wu Q, Jiang XJ, Wang ZQ, Tang JL, Xu Y. *Bacillus licheniformis* affects the microbial community and metabolic profile in the spontaneous fermentation of Daqu starter for Chinese liquor making[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 250: 59-67
- [22] Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 125-138
- [23] Adriaenssens EM, Cowan DA. Using signature genes as tools to assess environmental viral ecology and diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(15): 4470-4480
- [24] Moon K, Cho JC. Metaviromics coupled with phage-host identification to open the viral 'black box'[J]. *Journal of Microbiology: Seoul, Korea*, 2021, 59(3): 311-323
- [25] Silver-Mysliwiec TH, Bramucci MG. Bacteriophage-enhanced sporulation: comparison of spore-converting bacteriophages PMB12 and SP10[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(4): 1948-1953
- [26] Wang WY, Liu RL, Shen Y, Lian B. The potential correlation between bacterial sporulation and the characteristic flavor of Chinese Maotai liquor[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1435
- [27] Frazão N, Sousa AN, Lässig M, Gordo I. Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut[J]. *PNAS*, 2019, 116(36): 17906-17915
- [28] Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brüssow H. Phage as agents of lateral gene transfer[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(4): 417-424
- [29] Canchaya C, Fournous G, Brüssow H. The impact of prophages on bacterial chromosomes[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(1): 9-18