

研究报告

sigW 与 *rsiW* 失活对沙福芽孢杆菌 ST7 耐锰能力的影响

方争林¹, 王嘉福*¹, 冉雪琴², 牛熙¹

1 贵州大学 生命科学学院 贵州大学农业生物工程研究院 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学 动物科学学院, 贵州 贵阳 550025

方争林, 王嘉福, 冉雪琴, 牛熙. *sigW* 与 *rsiW* 失活对沙福芽孢杆菌 ST7 耐锰能力的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1323-1336.

FANG Zhenglin, WANG Jiafu, RAN Xueqin, NIU Xi. Deletion of *sigW* and *rsiW* affects the manganese tolerance of *Bacillus safensis* ST7[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1323-1336.

摘要: 【背景】前期转录组学研究提示 RNA 聚合酶 σ 因子 W (sigma factor W, SigW) 和反 σ 因子 W (anti-sigma factor W, RsiW) 可能参与沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*) 锰胁迫应激途径。【目的】研究 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对沙福芽孢杆菌 ST7 的运动能力、生物膜形成能力和锰氧化能力的影响。【方法】以沙福芽孢杆菌 ST7 为研究对象, 使用同源重组敲除技术构建沙福芽孢杆菌 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 缺失突变株, 检测野生株与突变株在运动能力、生物膜形成能力和锰氧化能力方面的差异, 比较鞭毛形成相关基因的表达变化。【结果】在非锰胁迫培养条件下 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对 ST7 突变株的生长无明显影响; 锰胁迫培养条件下 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失迟滞突变株的生长。相较于野生株, *sigW* 突变株的运动能力和锰氧化能力减弱, 生物膜形成能力增强; *rsiW* 突变株的运动能力减弱, 生物膜形成能力和锰氧化能力增强。并且 *sigW* 和 *rsiW* 突变株中与鞭毛合成相关基因 *flim*、*flgD*、*flii* 的表达量下降。【结论】*sigW* 和 *rsiW* 基因可促进沙福芽孢杆菌的鞭毛合成和运动能力, 促进细菌的生长, 共同调控菌株的锰氧化能力。

关键词: 沙福芽孢杆菌; *sigW* 和 *rsiW* 基因敲除; 鞭毛; 运动性; 生物膜; 锰氧化

资助项目: 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2019]5615); 贵州省“百”层次创新型人才培养项目(黔科合人才[2016]4012)

This work was supported by the Guizhou Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Project (Qiankehe Platform Talent [2019]5615) and the Guizhou Provincial “100” Level Innovative Talent Cultivation Project (Qiankehe Talent [2016]4012).

*Corresponding author. E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

Received: 2024-06-13; Accepted: 2024-07-31; Published online: 2024-08-22

Deletion of *sigW* and *rsiW* affects the manganese tolerance of *Bacillus safensis* ST7

FANG Zhenglin¹, WANG Jiafu^{*1}, RAN Xueqin², NIU Xi¹

¹ Key Laboratory of Conservation of Mountain Plant Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Education, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

² College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: [Background] Previous transcriptomics studies suggested that the RNA polymerase sigma factor (SigW) and the anti-sigma factor W (RsiW) might be involved in the manganese stress response of *Bacillus safensis*. [Objective] To investigate the effects of *sigW* and *rsiW* deletion on the motility, biofilm formation, and manganese-oxidizing ability of *B. safensis* ST7. [Methods] We employed homologous recombination to construct the *sigW*- and *rsiW*-deleted mutant strains of *B. safensis* ST7. Furthermore, we compared the motility, biofilm formation, manganese oxidation, and expression of flagellum formation-related genes between the wild type and the mutant strains. [Results] The deletion of *sigW* and *rsiW* had no significant effect on the growth of ST7 cultured without manganese stress, whereas it retarded the growth of ST7 under manganese stress. Compared with the wild type, $\Delta sigW$ showed reduced motility and manganese-oxidizing ability and enhanced biofilm formation, while $\Delta rsiW$ showed reduced motility and enhanced biofilm formation and manganese-oxidizing ability. In addition, the expression levels of genes (*flim*, *flgd* and *flii*) related to flagellum formation were downregulated in $\Delta sigW$ and $\Delta rsiW$. [Conclusion] *sigW* and *rsiW* can promote the flagellum formation, motility, and growth and co-regulate the manganese-oxidizing ability of *B. safensis*.

Keywords: *Bacillus safensis*; deletion of *sigW* and *rsiW*; flagellum; motility; biofilm; manganese oxidation

细菌的转录起始是由 sigma 因子启动的, sigma 因子能将核心 RNA 聚合酶募集到基因启动子区域^[1]。细菌中一部分 sigma 因子能选择性识别位于转录起始位点上游的-35 和-10 启动子元件, 由此诱导下游基因的表达^[2]。研究表明, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在碱胁迫、盐胁迫、噬菌体感染和某些影响细胞壁生物合成的抗生素等不同胁迫下可诱导 RNA 聚合酶 σ 因子 W (sigma factor W, SigW)的表达^[3]。SigW 和反 σ 因子 W (anti-sigma factor W, RsiW)是一对转录因子, 其中 SigW 定位于细胞膜, 属于胞外功能类型的 σ 因子; RsiW 是反 sigma 因子, 含有

锌指结构 CHCC^[4]。对假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)和枯草芽孢杆菌等的研究表明, SigW 的活性受 RsiW 的调节, 正常条件下 SigW 与 RsiW 紧密结合构成 sigma 因子系统, 同时 RsiW 抑制 SigW 发挥作用; 当受到外界刺激时, 蛋白酶被激活降解 RsiW, 对 SigW 的抑制作用解除, SigW 得以发挥作用调控毒力、应激等相关蛋白的表达^[4-5]。SigW 属于 sigma70 家族成员, sigma70 家族参与细菌大部分的压力应激调控, 包括孢子形成、鞭毛合成、离子运输及辅助性的代谢过程等^[6]。此外, *sigW* 基因参与细菌的解毒和逆境胁迫调控, 细菌能够在高盐胁迫下生长, *sigW*

发挥了重要作用,其次 *sigW* 基因参与协调抗生素应激反应和细胞包膜的稳态^[7]。对非应激条件下枯草芽孢杆菌 *sigW* 突变体的转录组进行分析,选择 SigW 调控的候选基因,将候选基因的转录谱与在 104 种不同条件下生长的亲本枯草芽孢杆菌转录组数据进行比较,验证了候选基因的 SigW 依赖性;枯草芽孢杆菌在抗生素或碱性条件的刺激下,RsiW 被水解,释放出 SigW 调控靶基因的表达^[8]。*sigW* 负调控 7-羟基环庚三烯酚酮(7-hydroxytropolone, 7-HT)及相关铁载体的合成,同时抑制 Gac/Rsm 级联系统等调节蛋白的转录,该系统可调控生物膜的形成、毒力、代谢物合成等^[9]。

沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)能够在极端环境中生存,对高温、紫外线辐射和化学药剂具有较强的抵抗力,可以通过氧化途径、代谢途径、应激途径、转运蛋白的运输作用、孢子形成及鞭毛合成途径等方式适应锰胁迫^[10]。前期研究发现,在 250 mg/L 的锰胁迫条件下,沙福芽孢杆菌可能通过 *sigB* 应激途径适应锰胁迫,并且 *sigW* 和 *rsiW* 基因被诱导表达,推测 *sigW* 和 *rsiW* 基因可能参与沙福芽孢杆菌锰胁迫的应激途径^[4]。为进一步解析锰胁迫条件下 *sigW* 和 *rsiW* 基因在沙福芽孢杆菌中的作用,本研究使用同源重组技术敲除沙福芽孢杆菌 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 基因,研究 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对沙福芽孢杆菌 ST7 的影响。

1 材料与方 法

1.1 样品

沙福芽孢杆菌 ST7,由本实验室从锰污染土壤中分离和保藏^[11];质粒 pPIC9K 为本实验室保藏。

1.2 培养基、主要试剂及仪器

100 g/L 的 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 母液、含氯化锰的

蛋白胨酵母完全培养基(peptone yeast complete medium, PYCM)、LB 培养基(Luria-Bertani complete medium)、0.04% I,N,N-二甲氨基-P,P-三苯代甲烷酸性硫酸(I,N,N-dimethylamino-P,P-triphenylmethane acid sulfuric acid, LBB)试剂均参考文献[12]配制。MSgg 培养基(g/L):色氨酸 50.000,苯丙氨酸 50.000,谷氨酸 0.5%,丙磺酸 20.927,磷酸钾 1.061,氯化钙 0.103,氯化铁 0.006,氯化锰 0.010,氯化锌 0.001,氯化镁 0.407,维生素 B1 0.675,甘油 0.5%,121 °C 灭菌 15 min。0.5%的 LB 半固体培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,琼脂粉 5.0,调节 pH 至 7.2–7.4,121 °C 灭菌 20 min。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)、细菌总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(普通离心柱型),天根生化科技(北京)有限公司;1×PBS 漂洗缓冲液(即用型)、反转录试剂盒,武汉塞维尔科技有限公司。引物合成(表 1)和核苷酸序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

超微量分光光度计,北京凯奥科技发展有限公司;全波长多功能酶标仪,北京普天新桥技术有限公司;台式高速冷冻离心机,贵州宝辰科技有限公司;电转化仪和荧光定量 PCR 仪,Bio-Rad 公司;PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司。

1.3 锰胁迫下 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达检测

将菌株 ST7 接种于 LB 液体培养基中,30 °C、160 r/min 培养 20 h 后以 2%的接种量分别接种于氯化锰含量为 0 和 1 500 mg/L 的 PYCM 培养基中,30 °C、160 r/min 进行培养,设 3 个生物学重复。分别在 12、24 和 36 h 时取样,用细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并反转录为 cDNA。反转录反应体系(20 μL):5×SweScript All-in-One SuperMix for qPCR 4 μL, gDNA Remove 1 μL, Total RNA (1 μg/μL) 1 μL,无

表1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product size (bp)
sigW-qF	GGAGGCGTTTATTCGTGCTT	105
sigW-qR	ATACGGTCGATGGTCAGGTTG	
sigW-ΔF	CGCGGATCCGGAGGCGTTTATTCGTGCTT	105
sigW-ΔR	ATACGGTCGATGGTCAGGTTG	
Kan-sigW-ΔF	CAACCTGACCATCGACCGTAT.GGGAGCTGCATGTGTC	2 209
Kan-sigW-ΔR	CGCGGATCCGTAGGTGGACCAGTTGG	
rsiW-qF	GGGAGGCAGTCTGTTTACGAG	185
rsiW-qR	TGACGACGGTGACATTTCCA	
rsiW-ΔF	CGCGGATCCGGGAGGCAGTCTGTTTACGAG	185
rsiW-ΔR	TGACGACGGTGACATTTCCA	
Kan-rsiW-ΔF	TGGAAATGTCACCGTCGTCA.GGGAGCTGCATGTGTC	2 209
Kan-rsiW-ΔR	CGCGGATCCGTAGGTGGACCAGTTGG	

GGATCC 为 *Bam*H I 的酶切位点。

GGATCC is the digested site of *Bam*H I.

核酸酶水补足 20 μL。反应条件: 25 °C 5 min; 42 °C 30 min; 85 °C 5 s。选择沙福芽孢杆菌 16S rRNA 为内参基因,应用 primer5 设计 *sigW*、*rsiW* 和 16S rRNA 基因的特异性引物,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。荧光定量 PCR 反应体系 (10 μL): 2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 5.0 μL, *sigW*-qF/*rsiW*-qF (10 μmol/L) 0.5 μL, *sigW*-qR/*rsiW*-qR (10 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 1.0 μL, ddH₂O 3.0 μL。荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 45 个循环; 60 °C 30 s, 以 0.5 °C 为梯度递增至 95 °C, 并且每 0.5 °C 记录 1 次荧光信号。每个基因 3 个技术重复, 3 个生物学重复。

1.4 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失突变株的构建

1.4.1 *sigW* 和 *rsiW* 基因上、下游同源臂片段扩增

提取菌株 ST7 的基因组 DNA 作为上游同源臂扩增的模板,使用引物 *sigW*-ΔF/*sigW*-ΔR 和 *rsiW*-ΔF/*rsiW*-ΔR 扩增上游同源臂;提取质粒 pPIC9K 基因组作为下游同源臂扩增模板,使用

引物 Kan-*sigW*-ΔF/Kan-*sigW*-ΔR 和 Kan-*rsiW*-ΔF/Kan-*rsiW*-ΔR 扩增下游同源臂。PCR 反应体系 (20.0 μL): 2×*Taq* PCR Master Mix II (with dye) 10.0 μL, 上游引物(10 μmol/L) 0.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, DNA 1.0 μL, ddH₂O 8.0 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,若所得条带符合预期,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对上、下游同源臂进行回收,并将回收产物保存于 -20 °C。

1.4.2 重叠延伸

由于上、下游同源臂在设计引物时设计了反向互补区域,所以可以利用碱基互补配对的原理将上、下游同源臂 2 个片段相连。第 1 次 PCR 反应体系(20.0 μL): 上、下游同源臂各 1.0 μL, BeyoFusion™ PCR Master Mix (2×) 10.0 μL, ddH₂O 8.0 μL。第 1 次 PCR 反应条件: 92 °C 3 min; 92 °C 30 s, 60 °C 30 s, 68 °C 1 min, 8 次循环; 68 °C 10 min。第 2 次 PCR 反应体系(40.0 μL): 向第 1 次 PCR 反应体系加入 *sigW*-ΔF/*rsiW*-ΔF

(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Kan-*sigW*- ΔR /Kan-*rsiW*- ΔR (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , BeyoFusion™ PCR Master Mix (2 \times) 10.0 μL , ddH₂O 9.0 μL 。第 2 次 PCR 反应条件: 92 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 92 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。第 2 次 PCR 反应完成后, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 按照说明书的操作方法进行胶回收, 得到菌株 ST7 *sigW* 和 *rsiW* 基因与卡那霉素抗性基因的融合片段 C-pPIC9K- ΔsigW /C-pPIC9K- ΔrsiW 。

1.4.3 酶切

在菌株 ST7 的融合片段 C-pPIC9K- ΔsigW /C-pPIC9K- ΔrsiW 的两端分别含有 *Bam*H I 酶切位点, 经过酶切后可以形成互相交错的黏性末端, 而黏性末端的碱基是互补配对的, 自连后可以形成环状的融合片段 pPIC9K- ΔsigW 和 pPIC9K- ΔrsiW 。酶切体系(40 μL): 10 \times Buffer K 4 μL , *Bam*H I (20 U/ μL) 4 μL , 融合片段 pPIC9K- ΔsigW /pPIC9K- ΔrsiW 20 μL , ddH₂O 12 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1 h。酶切完成后, 加入 100 μL 无水乙醇和 4 μL 3 mol/L NaAc, 放于-20 $^{\circ}\text{C}$ 环境中沉淀 30 min 后 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 除去上清液, 再加入 300 μL 75%乙醇重悬, 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干, 加入 10 μL ddH₂O, 用超微量紫外分光光度计检测酶切产物的浓度, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.4 转化与菌落 PCR

参照文献[12]制备 ST7 感受态细胞, 采用电转化方法将环状融合片段 pPIC9K- ΔsigW /pPIC9K- ΔrsiW 转入 ST7 的感受态细胞, 将转化后的感受态细胞涂布到含卡那霉素(5 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1-2 d, 挑取单菌落进行菌落 PCR, PCR 反应体系(20.0 μL): 2 \times Taq PCR Master Mix II (with dye) 10.0 μL , *sigW*- ΔF /*rsiW*- ΔF (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Kan-*sigW*- ΔR /Kan-*rsiW*- ΔR (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 菌液 1.0 μL , ddH₂O 8.0 μL 。

菌落 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。若琼脂糖凝胶电泳观察到条带符合预期, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序正确的菌株即为 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 基因的突变株。ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失突变株命名为 S- ΔsigW 和 S- ΔrsiW 。

1.5 突变株生长曲线的测定

将野生株 ST7、突变株 S- ΔsigW 和 S- ΔrsiW 分别接种于 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$, 再按 2% 的接种量分别接种于氯化锰含量为 0 和 1 500 mg/L 的 LB 培养基中, 隔 4 h 测 1 次 OD_{600} , 绘制生长曲线。每组实验设置 3 个重复。

1.6 突变株运动能力的检测

将野生株 ST7、突变株 S- ΔsigW 和 S- ΔrsiW 分别接种于 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$, 各取 2 μL 菌液垂直滴在含 0.5%琼脂的 LB 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 分别于 12、24 和 36 h 时测量菌落直径, 以菌落直径的大小表示菌株的运动能力, 每个平板上设 4 个重复。

1.7 突变株生物膜含量测定

MSgg 培养基有助于细菌生物膜的生长。将野生株 ST7 和突变株 S- ΔsigW 、S- ΔrsiW 接种到 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养过夜至 $OD_{600}=0.8$, 取 1 mL 菌液于 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 去除上清液, 加入 1 \times PBS 缓冲液重悬, 将其稀释至 $OD_{600}=0.5$ 。在无菌条件下, 取 100 μL 菌液接种于 2 mL MSgg 培养基中(24 孔板), 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 7 d, 每个菌株设 3 个重复。生物膜含量检测使用结晶紫染色法^[13-14], 主要方法包括: 去除 24 孔板的培养基, 用 PBS 缓冲液轻柔洗涤孔内保留的生物膜, 每孔加入 500 μL 0.1%结晶紫室温染色 30 min; 缓慢吸出孔中结晶紫染液, 用 PBS 缓冲液轻柔洗涤 3 次, 加入

500 μL 的 95%乙醇混匀, 室温静置 30 min, 稀释 1 倍, 取 200 μL 测定 OD_{595} 。

1.8 *sigW* 和 *rsiW* 调节鞭毛基因的检测

SigW 的激活和环境信号的接收依赖 *RsiW* 因子, 已知 *SigW* 参与调控细菌鞭毛的合成过程^[6]; 同时, 研究表明生物膜的形成与鞭毛有关^[15], 所以挑选了 3 个与鞭毛合成相关的基因进行荧光定量 PCR 实验, 从分子生物学的角度验证 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对沙福芽孢杆菌鞭毛基因的影响。具体操作步骤为: 将菌株 ST7、S- $\Delta sigW$ 和 S- $\Delta rsiW$ 接种到 LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$ 左右, 按 2% 的接种量接种到氯化锰浓度为 1 500 mg/L 的 PYCM 培养基中分别培养 12、24 和 36 h, 按照 1.3 的实验操作取样并提取 RNA 进行反转录, 进行荧光定量 PCR 实验^[12], 每个样本分别设 3 个生物学重复、3 个技术重复。

1.9 突变株锰氧化能力的测定

LBB 显色反应具有专一性, 其显色基团能够与高价锰发生反应, 使溶液由无色变为蓝色, 蓝色越深表示氧化能力越强。将野生株 ST7 和突变株 S- $\Delta sigW$ 、S- $\Delta rsiW$ 接种到 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养至 $OD_{600}=0.8$, 按 2% 的接种量接种于氯化锰含量为 1 500 mg/L 的 PYCM 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 4 d。取 1.5 mL 菌液加入 200 μL 0.04% 的 LBB, 室温暗室静置 2 h, 10 000 r/min 离心 1 min, 取 200 μL 反应液于 96 孔板中, 用酶标仪测定反应液 OD_{620} , 颜色越深锰氧化能力越强。每组实验 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 菌株 ST7 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量检测

以 0 h 时的样本为对照组, 采用荧光定量 PCR 法检测非锰胁迫条件(0 mg/L)和锰胁迫条件

(1 500 mg/L)下处理 12、24 和 36 h 时 *sigW* 和 *rsiW* 基因的表达水平。相较于非锰胁迫条件, 在锰胁迫培养条件下培养 12 h 时 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量分别显著上调 2.99 和 3.94 倍($P<0.01$); 培养 24 h 时 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量分别显著下调 22.97% 和 42.05% ($P<0.05$); 培养 36 h 时 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量无明显变化($P>0.05$) (图 1)。非锰胁迫培养条件下菌株 ST7 中 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量几乎不随时间发生变化($P>0.05$), 锰胁迫培养条件下菌株 ST7 中 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量在 12 h 升高, 24 h 时下降, 36 h 时无明显变化。结果表明锰胁迫时 *sigW* 和 *rsiW* 基因的表达量发生变化。

2.2 菌株 ST7 *sigW* 和 *rsiW* 缺失突变株构建结果

基于同源重组敲除技术, 以菌株 ST7 基因组 DNA 为模板, 用特异性引物分别扩增 *sigW* 和 *rsiW* 基因部分片段作为 *sigW* 和 *rsiW* 突变株的上游同源臂, 以质粒 pPIC9K 的基因组为模板, 用特异性引物扩增含有卡那霉素抗性基因的完整区域作为 *sigW* 和 *rsiW* 突变株的下游同源臂, 经过重叠延伸、酶切、转化、菌落 PCR、测序, 构建菌株 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 基因的缺失突变株。*sigW* 突变株融合片段 C-pPIC9K- $\Delta sigW$ 上游同源臂长度为 105 bp, 下游同源臂长度为 2 209 bp, 整个融合片段长度为 2 314 bp; *rsiW* 突变株融合片段 C-pPIC9K- $\Delta rsiW$ 上游同源臂长度为 185 bp, 下游同源臂长度为 2 209 bp, 整个融合片段长度为 2 394 bp。将环化融合片段 pPIC9K- $\Delta sigW$ 和 pPIC9K- $\Delta rsiW$ 转入感受态细胞中, 用卡那霉素-LB 平板筛选。菌落 PCR 检测(图 2), 得出目标条带大小与预期符合。经 Sanger 测序证实 *sigW* 和 *rsiW* 突变株前 100 bp 和 180 bp 左右的序列分别为 *sigW* 和 *rsiW* 的部分序列, 剩余序列含完整的卡那霉素抗性基因序列, *sigW* 和 *rsiW* 部分序列翻译为蛋白的截短肽, 不是完

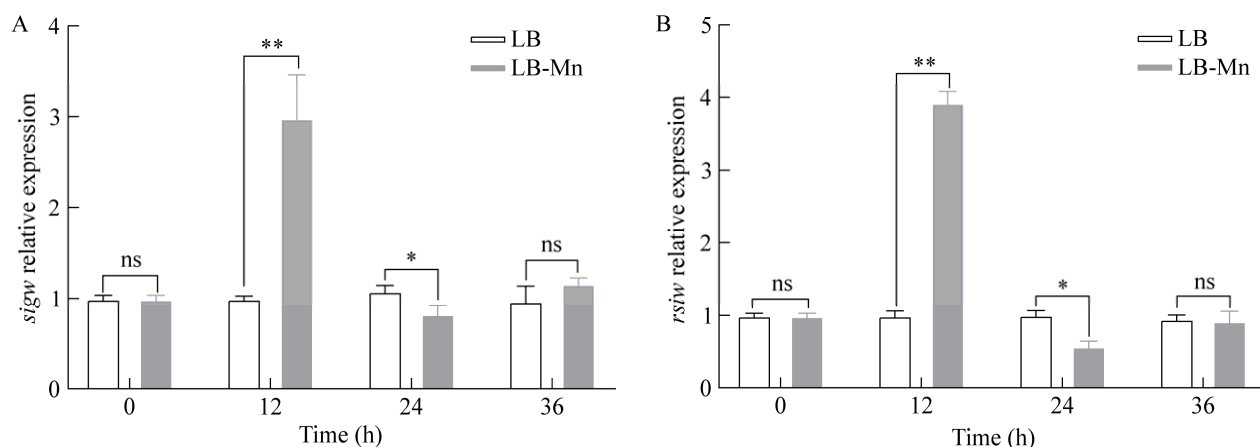


图1 菌株 ST7 *sigW* 和 *rsiW* 基因表达量检测 A: *sigW* 基因表达量检测; B: *rsiW* 基因表达量检测。
Figure 1 Detection of *sigW* and *rsiW* gene expression in strain ST7. A: *sigW* gene expression; B: *rsiW* gene expression. The error line in the graph indicates the standard deviation, the same as following. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

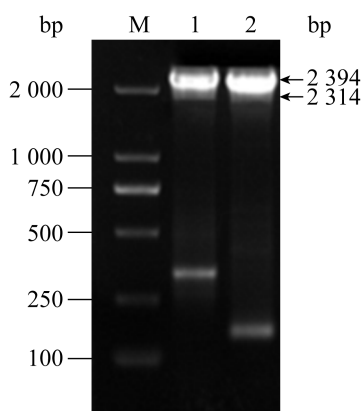


图2 *sigW* 和 *rsiW* 突变株菌落 PCR 检测 M: DL2000 DNA marker; 1: 突变株 S- Δ *rsiW*; 2: 突变株 S- Δ *sigW*。

Figure 2 PCR detection of *sigW* and *rsiW* in mutant colonies. M: DL2000 DNA marker; 1: Mutant S- Δ *rsiW*; 2: Mutant S- Δ *sigW*.

整的蛋白而失活,表明菌株 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 缺失突变株构建成功。

2.3 突变株的生长曲线

为了解 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对菌株 ST7 生长的影响,在非锰胁迫(0 mg/L)和锰胁迫(1 500 mg/L)条件下,用 PYCM 培养基培养野生

株 ST7、突变株 S- Δ *sigW* 和 S- Δ *rsiW* 并测定生长曲线。在无锰 LB 培养基中培养的野生株和突变株的生长曲线无明显差异,表明非锰胁迫条件下 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对菌株 ST7 的生长无影响(图 3A)。用氯化锰含量为 1 500 mg/L 的 LB 培养基进行培养,在 20 h 前突变株 S- Δ *sigW* 和 S- Δ *rsiW* 生物量低于菌株 ST7 的生物量,20 h 后突变株 S- Δ *rsiW* 生物量高于菌株 ST7 和突变株 S- Δ *sigW* 的生物量(图 3B),表明锰胁迫条件下 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对菌株 ST7 生长有一定影响。

2.4 突变株运动能力检测结果

为了解 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对菌株 ST7 运动能力的影响,将野生株 ST7、突变株 S- Δ *sigW* 和 S- Δ *rsiW* 接种在 LB 半固体培养基上,用菌落直径的大小表示其运动能力。菌株 ST7、S- Δ *sigW* 和 S- Δ *rsiW* 培养至 12 h 时的平均菌落直径为 0.66、0.60 和 0.55 cm(图 4A),相较于野生株 ST7,突变株 S- Δ *sigW* 和 S- Δ *rsiW* 的运动能力分别下降 9.09%和 16.67%,差异显著($P<0.05$)(图 4B);培养至 24 h 时的平均菌落直径为 1.13、0.82 和 0.78 cm,相较于野生株 ST7,突变株 S- Δ *sigW* 和

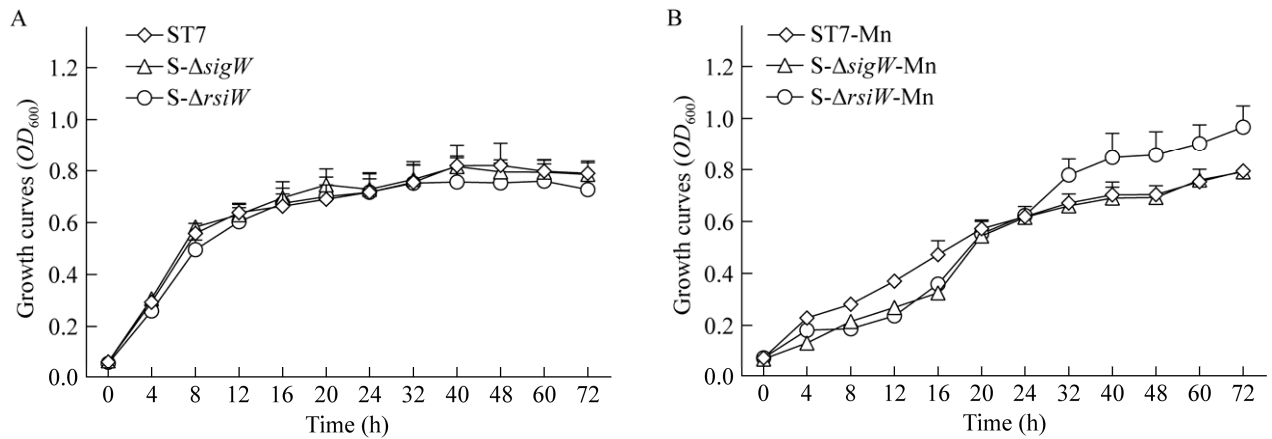


图3 野生株 ST7 和 *sigW*、*rsiW* 突变株生长曲线 A: 非锰胁迫条件下菌株生长曲线; B: 锰胁迫条件下菌株生长曲线。

Figure 3 Growth curves of wild strain ST7, *sigW* and *rsiW* mutants. A: Growth curve under non-Mn-stressed condition; B: Growth curve under Mn-stressed condition.

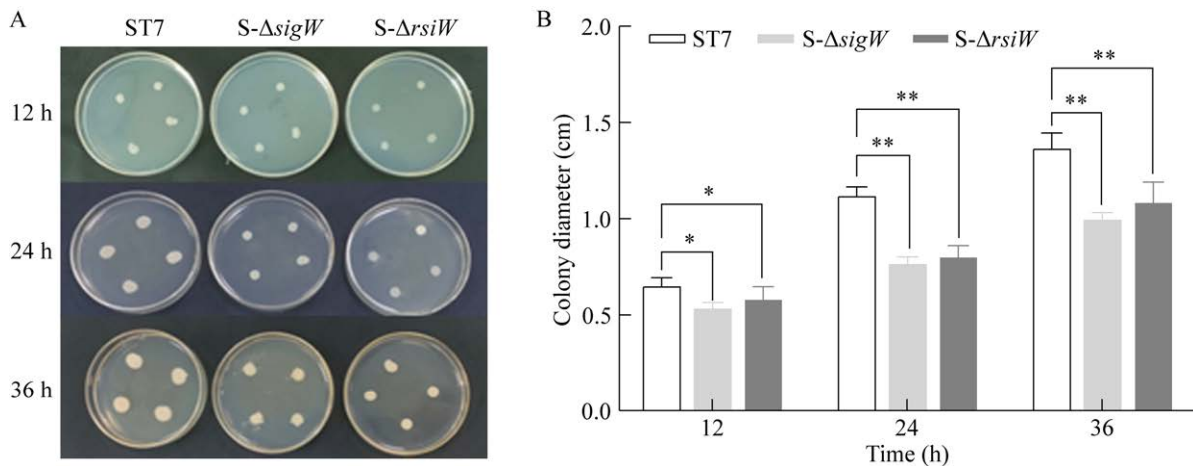


图4 菌株 ST7 和突变株运动能力检测 A: 软琼脂平板上菌落的生长; B: 运动能力比较。

Figure 4 The motility assay of wild and mutant strains. A: Colony growth on soft-agar plates; B: Comparison of motility. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

S-ΔrsiW 的运动能力分别下降 27.43%和 30.97%，差异显著($P<0.01$)；培养至 36 h 时的平均菌落直径为 1.37、1.00 和 1.09 cm，相较于菌株 ST7，突变株 *S-ΔsigW* 和 *S-ΔrsiW* 的运动能力分别下降 27.01%和 20.44%，差异显著($P<0.01$)。实验结果表明 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失会显著减弱菌株 ST7 的运动能力。

2.5 突变株生物膜含量测定结果

为了解 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对沙福芽孢杆菌生物膜形成能力的影响，采用结晶紫染色法检测培养 7 d 的野生株、*sigW* 突变株和 *rsiW* 突变株的生物膜含量，用 OD_{595} 表示生物膜含量。菌株 ST7、*sigW* 突变株和 *rsiW* 突变株生物膜的生成量分别为 0.243、0.342 和 0.369，*sigW*

和 *rsiW* 突变株较野生株 ST7 生物膜的生成量分别增加 1.41 倍 ($P<0.05$) 和 1.52 倍 ($P<0.01$) (图 5), 表明 *sigW* 和 *rsiW* 缺失能够显著促进生物膜的形成。

2.6 突变株鞭毛相关基因表达量变化

为了解 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失是否影响鞭毛相关基因的表达, 筛选与鞭毛合成相关的基因 *flim*、*flii* 和 *flgd* 进行荧光定量 PCR 定量检测。结果如图 6 所示: 在锰胁迫下培养 12 h 时, 相较于菌株 ST7, *sigW* 缺失突变株 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因的表达量分别下调 99.52%、97.35% 和 94.36% ($P<0.01$); 菌株 ST7 的 *rsiW* 缺失突变株中 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因表达量分别下调 97.97%、97.81% 和 54.62% ($P<0.01$)。培养至 24 h 时, 菌株 ST7 的 *sigW* 缺失突变株中 *flim* 基因表达量上调 1.70 倍 ($P<0.01$), *flii* 和 *flgd* 基因表达量下调 50.64% 和 93.26% ($P<0.01$), 菌株 ST7 的 *rsiW* 缺失突变株中 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因表达量分别下调 94.64%、97.55% 和 95.75% ($P<0.01$); 培养至 36 h 时, 菌株 ST7 的 *sigW* 缺失突变株中 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因的表达量分别下调 99.68%、80.57%

和 99.69% ($P<0.01$), 菌株 ST7 的 *rsiW* 缺失突变株中 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因表达量分别下调 96.74%、91.89% 和 93.92% ($P<0.01$)。相较于菌株 ST7, 总体上 *sigW* 和 *rsiW* 突变株中 *flim*、*flii* 和 *flgd* 基因表达量下降, 表明 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失能抑制鞭毛相关基因的表达。

2.7 突变株锰氧化能力比较

为了解 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对菌株 ST7 锰氧化能力的影响, 将菌株 ST7、S- $\Delta sigW$ 和 S- $\Delta rsiW$ 分别接种于氯化锰含量为 1 500 mg/L 的 PYCM 培养基中培养 4 d, 用 OD_{620} 表示其锰氧化能力。菌株 ST7、S- $\Delta sigW$ 和 S- $\Delta rsiW$ 在相同条件下培养 4 d, 加入等量 0.04% 的 LBB 进行反应, 发现 S- $\Delta sigW$ 反应液颜色比 ST7 反应液颜色浅, S- $\Delta rsiW$ 反应液颜色比 ST7 反应液颜色深, 其锰氧化能力分别为 0.352、0.145 和 0.557 (图 7A), 相较于菌株 ST7, 突变株 S- $\Delta sigW$ 锰氧化能力下降 58.01% ($P<0.05$), 突变株 S- $\Delta rsiW$ 锰氧化能力上升 1.58 倍 ($P<0.05$) (图 7B)。表明 *sigW* 基因缺失能够显著降低菌株 ST7 的锰氧化

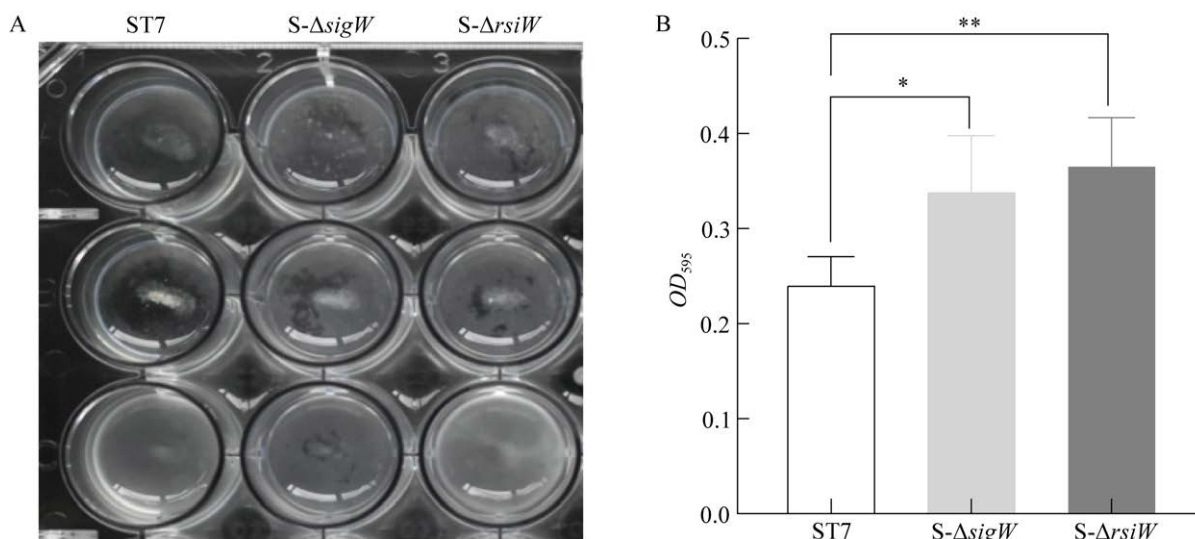


图 5 菌株 ST7 和突变株生物膜生成量 A: 生物膜生长情况; B: 生物膜形成能力比较。

Figure 5 Biofilm production of wild strain ST7 and the mutant strains. A: Biofilm growth; B: Comparison of biofilm formation ability. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

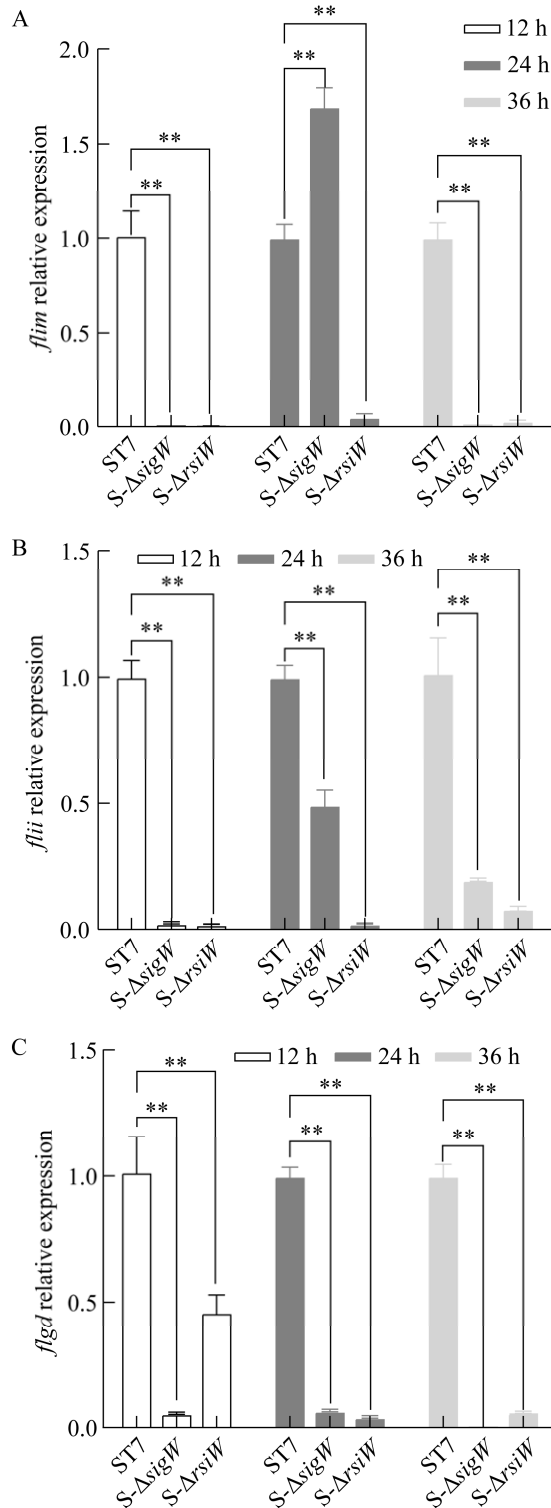


图6 *sigW* 和 *rsiW* 突变株鞭毛基因表达
Figure 6 The expression of flagella genes in *sigW* and *rsiW* mutants. A: *flim*. B: *flII*. C: *flgD*. **: $P < 0.01$.

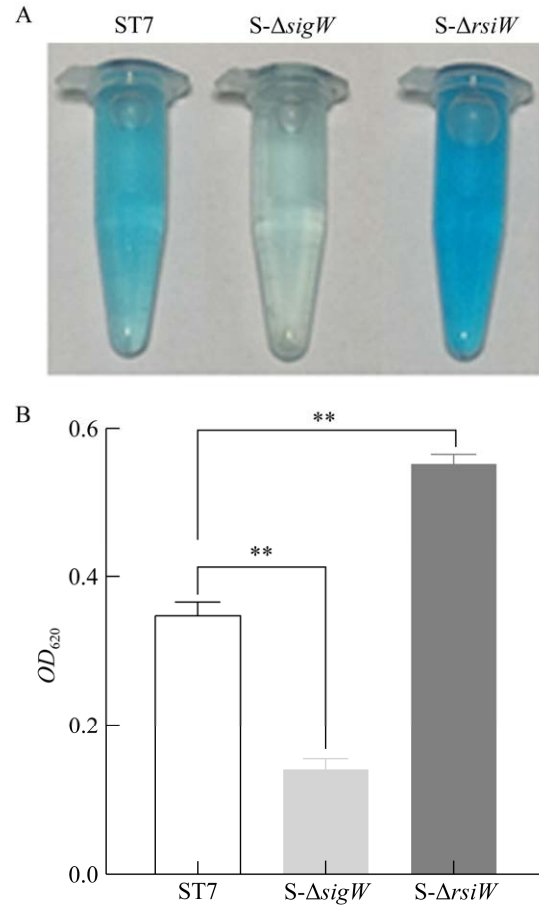


图7 野生株 ST7 和突变株锰氧化能力检测 A: 锰氧化反应情况; B: 锰氧化能力比较。
Figure 7 Detection of manganese oxidizing ability of wild strain ST7 and the mutants. A: The manganese oxidizing reaction situation; B: Comparison of manganese oxidizing ability. **: $P < 0.01$.

能力, *rsiW* 基因缺失能够显著增强菌株 ST7 的锰氧化能力。

3 讨论

原核生物中能够与 RNA 聚合酶结合的 sigma 因子有 2 种, 分别是 sigma54 和 sigma70 因子。Sigma54 因子广泛存在于细菌中, 是行使细胞基本功能所必需的因子, sigma70 因子是细菌的非必需 sigma 因子, 只有受到外界环境

刺激或者特定的诱导时才发挥作用^[16-17]。转录因子 SigW 是胞外功能(extracellular function, ECF) sigma 因子, 与 RsiW 在同一转录起始位点共转录, 属于 sigma70 因子, 主要作用是响应胞外环境信号^[3,18]。ECF sigma 因子至少具有 3 个作用: (1) 与细胞膜外的功能有关; (2) 所识别的启动子区域大多数是-35 元件; (3) 正常情况下, sigma 因子与反 sigma 因子共同发挥作用, 后者能够传递胞外信号且对 sigma 因子具有抑制作用^[19]。多数情况下 ECF sigma 因子因相应的反 sigma 因子的存在, 不能与核心 RNA 聚合酶结合发挥作用, 只有受到外界刺激或者特定诱导时反 sigma 因子失活, ECF sigma 因子才能发挥作用^[20-21]。SigB 与 SigW 同属于胞外 sigma 因子。炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*) 的野生株与 *sigB* 缺失突变株用脑心浸液肉汤培养基(brain-heart infusion broth, BHI)在相同培养条件下培养, 野生株与突变株的生长曲线无明显差异^[22]。本研究中用普通 LB 培养基测定 ST7 的野生株与突变株的生长曲线, 无明显差异。推测在无锰胁迫条件下, *sigW* 和 *rsiW* 突变株未接收到外界环境的刺激信号, *sigW* 不发挥作用, *rsiW* 没有被水解, 所以 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失对 ST7 的生长无明显影响。加入锰胁迫后, *sigW* 突变株的生长减慢; 而 *rsiW* 突变株的生物量 20 h 前低于野生株, 20 h 后略高于野生株。推测在锰胁迫条件下, *sigW* 突变株缺少完整的 *sigW* 基因, 没有 Sigw 蛋白表达; 但 *sigW* 突变株中 *rsiW* 基因可正常表达并接收到外界锰胁迫的信号。有研究表明 *sigW* 有可能被同类型的 sigma 因子替换^[5]。枯草芽孢杆菌用可替代的 sigma_w 亚基协助 RNA 聚合酶识别启动子, 调节枯草芽孢杆菌的生长、运动、孢子形成等相关基因的表达^[23]。推测 *sigW* 突变株中 *rsiW* 传递的锰胁迫信号通过未知的途径下调了生长相关基

因的表达, 使得 *sigW* 突变株的生长变慢。*rsiW* 突变株中, 没有 RsiW 蛋白可以接收锰胁迫信号, 20 h 前的生长变慢, 可能主要表现为高锰对细菌的毒害作用^[24]; 同时, *rsiW* 突变株中 SigW 可正常表达且不受 RsiW 的抑制。有研究表明, 枯草芽孢杆菌在碱性胁迫条件下, SigW 可上调 80 多个基因, 下调 60 余个基因的表达^[25], 表明胁迫条件下, SigW 可调控的基因众多。推测 20 h 后 *rsiW* 突变株中 SigW 引起的生长和应对锰胁迫相关基因的表达可能占优势, 使得 20 h 后 *sigW* 突变株的生长略高于野生株, 但这种促生长效应在 20 h 前未表现出来的原因目前尚不清楚。

Sigma70 因子中有一部分 sigma 因子需要激活调节子以响应外界特定信号, 调节的靶蛋白在孢子形成、鞭毛合成或热休克反应中发挥作用^[6]。环境压力能够促进 *sigW* 表达, 生长在极端环境中芽孢杆菌的 ECF sigma 因子和反 sigma 因子能够在枯草芽孢杆菌中发生异源表达^[26]。采用 DNA 微阵列证明枯草芽孢杆菌 *sigA*、*sigB*、*sigW* 基因的表达模式一致, 参与应激反应的多数基因受 SigW 的调控^[27]。盐胁迫下枯草芽孢杆菌 *sigB* 突变株的转录谱研究表明, SigW 可正向调控 *flim*、*flii* 等鞭毛合成基因的表达^[28]。在菌株 ST7 的 *sigW* 和 *rsiW* 缺失突变株中, 鞭毛合成相关 *flim*、*flii* 和 *flgd* 的表达量总体呈下降趋势, 表明 SigW 和 RsiW 可调控沙福芽孢杆菌鞭毛合成基因; 同时检测到 *sigW* 和 *rsiW* 突变株在软琼脂平板上的运动能力减弱。细菌在软琼脂中的运动完全依赖细菌的鞭毛数量。*sigW* 突变株中没有 SigW 蛋白表达, 不能促进鞭毛合成相关基因的表达, 鞭毛数量减少, 菌株在软琼脂中的运动能力减弱。*rsiW* 突变株中没有 RsiW 蛋白表达, 信号传递受阻, 影响 SigW 正常发挥作用, 同样抑制鞭

毛合成基因表达,菌株运动能力减弱。基因 *flim* 编码鞭毛的马达蛋白,能够与磷酸化的 *chey* 结合,控制鞭毛的旋转方式,最终决定细菌的运动方向^[29]。*flii* 基因编码细胞质鞭毛 ATP 酶,参与鞭毛III型分泌系统,是输出系统中唯一的 ATP 酶,在细菌运动过程中为细菌提供能量^[30]。*flgd* 基因编码鞭毛钩帽蛋白,参与鞭毛 C 环的合成,与细菌的运动方向有关^[31]。本研究中 *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失使得 *flim* 和 *flgd* 基因表达量下调,影响突变株调控运动方向;同时 *flii* 基因的下调,影响菌体为运动提供能量,综合作用导致突变株的运动能力下降。*rsiW* 基因缺失突变株 *flim* 的表达量于 12 h 时下调 97.97%; *sigW* 基因缺失突变株 *flim* 的表达量 36 h 时下调 99.68%,提示 SigW 和 RsiW 对 *flim* 基因的调控较强。

生物膜对细菌适应环境发挥重要作用,生物膜上含有的多种蛋白与细菌运输系统、分泌系统、定殖等密切相关^[32]。有研究表明,东湖假单胞菌(*Pseudomonas donghuensis*) *sigW* 突变株的 Gac/Rsm 系统中的关键基因 *gacs*、*gaca*、*rsmY*、*rsmZ* 的表达量与野生株相比显著上调, SigW 蛋白能够负向调控 Gac/Rsm 系统^[9]。RsmZ 蛋白可作为信号放大器把翻译阻遏蛋白 RsmA 从 PslA 和 SadC 中分离出来触发生物膜形成, RsmZ 的高表达可以促进生物膜的形成^[33]。与野生株 ST7 相比, *sigW* 和 *rsiW* 突变株的生物膜含量增加。推测 *sigW* 突变株中 SigW 可能负调控 Gac/Rsm 系统,当缺少 SigW 蛋白时促进了 *rsmZ* 等基因的表达,进一步促进了生物膜的形成; *rsiW* 突变株中缺少 RsiW 传递信号, SigW 不能正常发挥作用,生物膜生成量增加。

锰氧化细菌能够将二价锰氧化为高价锰,锰氧化细菌氧化方式分为直接氧化和间接氧化,其中直接氧化是指锰氧化细菌直接产生氧

化酶改变锰的价态,这些酶主要为过氧化氢酶、锰过氧化氢酶和多酮氧化酶等^[13,34]。研究发现细菌在有毒害作用的不利生存条件下,发生氧化应激可以激活转录因子的表达,而这些转录因子可以促进超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物等的表达,应对氧化应激损伤^[35]。枯草芽孢杆菌从指数晚期到静止期的基因表达研究,提示受 SigW 调控的基因中有参与氧化应激的基因^[28]。此外,盐胁迫条件下,枯草芽孢杆菌通过 SigW 和 Perr 调节子成员响应氧化应激^[36]。沙福芽孢杆菌 ST7 的 *sigW* 突变株与野生株相比锰氧化能力下降 58.01%, *rsiW* 突变株的锰氧化能力提高了 1.58 倍。推测 SigW 和 RsiW 通过调控锰氧化酶的表达适应锰胁迫, *sigW* 突变株没有完整的 SigW,锰氧化酶的表达可能不足,锰氧化能力减弱; *rsiW* 突变株中 RsiW 缺失, SigW 被释放促进了锰氧化酶的表达,锰氧化能力增强。

4 结论

本研究发现, *sigW* 和 *rsiW* 基因参与沙福芽孢杆菌锰胁迫的应激途径,调控沙福芽孢杆菌对锰胁迫的适应过程; *sigW* 和 *rsiW* 基因缺失影响沙福芽孢杆菌 ST7 的生物膜形成能力、运动能力和鞭毛基因的表达,调节锰胁迫条件下菌株的锰氧化能力和生长。

REFERENCES

- [1] SAECKER RM, RECORD MT, DEHASETH PL. Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase-promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 412(5): 754-771.
- [2] FEKLÍSTOV A, SHARON BD, DARST SA, GROSS CA. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2014, 68: 357-376.
- [3] SCHÖBEL S, ZELLMEIER S, SCHUMANN W,

- WIEGERT T. The *Bacillus subtilis* sigmaW anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(4): 1091-1105.
- [4] DEVKOTA SR, KWON E, HA SC, CHANG HW, KIM DY. Structural insights into the regulation of *Bacillus subtilis* SigW activity by anti-sigma RsiW[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0174284.
- [5] 伍婷婷. σ factor *SigW*/anti- σ factor *RsiW* 系统参与东湖假单胞菌 HYS 毒性相关功能的研究[D]. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2020.
- WU TT. The study on the toxicity-related function of σ factor *SigW*/anti- σ factor *RsiW* system involved in *Pseudomonas donghuensis* HYS[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University, 2020 (in Chinese).
- [6] PAGET MSB, HELMANN JD. The sigma70 family of sigma factors[J]. *Genome Biology*, 2003, 4(1): 203.
- [7] CAO M, WANG T, YE R, HELMANN JD. Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(5): 1267-1276.
- [8] ZWEERS JC, NICOLAS P, WIEGERT T, van DIJL JM, DENHAM EL. Definition of the σ (W) regulon of *Bacillus subtilis* in the absence of stress[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48471.
- [9] TENG SY, WU TT, GAO DH, WU SY, XIAO YQ, LONG Y, XIE ZX. Insight into the global negative regulation of iron scavenger 7-HT biosynthesis by the SigW/RsiW system in *Pseudomonas donghuensis* HYS[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1184.
- [10] RAN XQ, ZHU ZM, LONG H, TIAN Q, YOU LJ, WU XD, LIU Q, HUANG SH, LI S, NIU X, WANG JF. Manganese stress adaptation mechanisms of *Bacillus safensis* strain ST7 from mine soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 758889.
- [11] 田群, 许瑶, 喻昌燕, 王嘉福, 冉雪琴. 耐锰细菌鉴定与锰胁迫下的生理响应[J]. *山地农业生物学报*, 2017, 36(3): 23-28.
- TIAN Q, XU Y, YU CY, WANG JF, RAN XQ. Identification of manganese-resistant bacteria and their physiological response under manganese stress[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2017, 36(3): 23-28 (in Chinese).
- [12] 龙红. 沙福芽孢杆菌耐锰基因的筛选与鉴定[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2020.
- LONG H. Screening and identification of manganese tolerance genes from *Bacillus safensis*[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [13] 朱忠梅, 吴莉丹, 张心仪, 方争林, 牛熙, 黄世会, 王嘉福, 冉雪琴. *fliY* 基因失活减弱沙福芽孢杆菌 ST7 菌株的锰氧化能力[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(1): 107-117.
- ZHU ZM, WU LD, ZHANG XY, FANG ZL, NIU X, HUANG SH, WANG JF, RAN XQ. Inactivation of *fliY* attenuates the manganese-oxidizing capacity of *Bacillus safensis* ST7[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(1): 107-117 (in Chinese).
- [14] AUGER S, KRIN E, AYMERICH S, GOHAR M. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 937-941.
- [15] 王海燕, 贺婷婷, 李昊阳. 细菌非编码小 RNA 的生物学特征及作用机制研究进展[J]. *四川师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 46(5): 581-590, F0002.
- WANG HY, HE TT, LI HY. Biological characteristics and regulation mechanisms of bacterial non-coding small RNA[J]. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science Edition)*, 2023, 46(5): 581-590, F0002 (in Chinese).
- [16] REITZER L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 155-176.
- [17] MISSIAKAS D, RAINA S. The extra cytoplasmic function sigma factors: role and regulation[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 28(6): 1059-1066.
- [18] WÖSTEN M. Eubacterial sigma-factors[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1998, 22(3): 127-150.
- [19] POTVIN E, SANSCHAGRIN F, LEVESQUE RC. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(1): 38-55.
- [20] HELMANN JD. Anti-sigma factors[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(2): 135-141.
- [21] CHEVALIER S, BOUFFARTIGUES E, BAZIRE A, TAHRIQUI A, DUCHESNE R, TORTUEL D, MAILLOT O, CLAMENS T, ORANGE N, FEUILLOLEY MGJ, LESOUHAITIER O, DUFOUR A, CORNELIS P. Extra cytoplasmic function sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 2019, 1862(7): 706-721.
- [22] 顾梦恩, 陈蒙, 王东澍, 吕宇飞, 王恒樑, 刘先凯. 炭疽芽孢杆菌 *sigB* 基因缺失株的构建与研究[J]. *军事医学*, 2019, 43(1): 57-62.
- GU ME, CHEN M, WANG DS, (LÜ/LV/LU/LYU) YF, WANG HL, LIU XK. Construction of *sigB* deletion mutant of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R[J]. *Military Medical Sciences*, 2019, 43(1): 57-62 (in Chinese).
- [23] HELMANN JD. Deciphering a complex genetic regulatory network: the *Bacillus subtilis* sigmaW protein and intrinsic resistance to antimicrobial compounds[J]. *Science Progress*, 2006, 89(3/4): 243-266.
- [24] AGGARWAL S, KUMARASWAMI M. Managing manganese: the role of manganese homeostasis in streptococcal pathogenesis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 921920.
- [25] WIEGERT T, HOMUTH G, VERSTEEG S, SCHUMANN W. Alkaline shock induces the *Bacillus*

- subtilis* σ W regulon[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(1): 59-71.
- [26] YANO K, INOUE H, MORI H, YEE LM, MATSUOKA S, SADAIE Y, ASAI K. Heterologous expression of the *Oceanobacillus iheyensis* SigW and its anti-protein RsiW in *Bacillus subtilis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75(5): 966-975.
- [27] YANG CK, TAI PC, LU CD. Time-related transcriptome analysis of *B. subtilis* 168 during growth with glucose[J]. Current Microbiology, 2014, 68(1): 12-20.
- [28] STEIL L, HOFFMANN T, BUDDE I, VÖLKER U, BREMER E. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(21): 6358-6370.
- [29] 雷诗敏, 欧阳燕菲, 吴侨智, 许力丹, 曾晨, 伍慧红, 谢云巧, 何勇强. 水稻白叶枯病菌的一个非典型趋化受体基因与游动性和早期侵染相关[J]. 植物病理学报, 2024, 54(3): 522-534.
- LEI SM, OUYANG YF, WU QZ, XU LD, ZENG C, WU HH, XIE YQ, HE YQ. An atypical chemotactic receptor gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is associated with bacterial swimming and early infection[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024, 54(3): 522-534 (in Chinese).
- [30] 李琴, 周静茹, 张旭华, 倪萍, 任海燕, 陈邬锦. 铜绿假单胞菌鞭毛基因 *flil* 的敲除对其鞭毛形成及生物膜生成的影响[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 39(9): 837-842.
- LI Q, ZHOU JR, ZHANG XH, NI P, REN HY, CHEN WJ. Influence of *Pseudomonas aeruginosa flil* gene deletion on flagellar and biofilm formation[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2023, 39(9): 837-842 (in Chinese).
- [31] 田延, 丁雪燕, 岑雪, 周明旭, 羊扬, 朱国强. 大肠杆菌鞭毛研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(6): 649-653.
- TIAN Y, DING XY, CEN X, ZHOU MX, YANG Y, ZHU GQ. Progress in the study of *Escherichia coli* flagella[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(6): 649-653 (in Chinese).
- [32] THORMANN KM, BETA C, KÜHN MJ. Wrapped up: the motility of polarly flagellated bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2022, 76: 349-367.
- [33] SHANG LG, YAN YL, ZHAN YH, KE XB, SHAO YH, LIU YQ, YANG H, WANG SS, DAI SL, LU JS, YAN N, YANG ZM, LU W, LIU Z, CHEN SC, ELMERICH C, LIN M. A regulatory network involving Rpo, Gac and Rsm for nitrogen-fixing biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri*[J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2021, 7(1): 54.
- [34] 杨晓敏, 杨凯, 李玲玲, 王刚. 含 Mn(II)/Mn(VII)废水处理技术研究进展[J]. 应用化工, 2024, 53(3): 687-693.
- YANG XM, YANG K, LI LL, WANG G. Research progress on the treatment technology of wastewater containing Mn(II)/Mn(VII)[J]. Applied Chemical Engineering, 2024, 53(3): 687-693 (in Chinese).
- [35] SUDHARSAN M, RAJENDRA PN, RAJENDRASOZHAN S. Bacterial redox response factors in the management of environmental oxidative stress[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 39(1): 11.
- [36] HÖPER D, BERNHARDT J, HECKER M. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach[J]. Proteomics, 2006, 6(5): 1550-1562.