

fliY 基因失活减弱沙福芽孢杆菌 ST7 菌株的锰氧化能力

朱忠梅¹, 吴莉丹¹, 张心仪¹, 方争林¹, 牛熙¹, 黄世会², 王嘉福^{*1}
冉雪琴^{*2}

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省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025

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 Zhongmei, WU Lidan, ZHANG Xinyi, FANG Zhenglin, NIU Xi, HUANG Shihui, WANG Jiafu, RAN Xueqin. Inactivation of *fliY* attenuates the manganese-oxidizing capacity of *Bacillus safensis* ST7[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 107-117.

摘要:【背景】沙福芽孢杆菌 ST7 菌株具有较强的锰氧化能力, 但其分子机制不清楚。【目的】着重研究鞭毛马达开关蛋白基因(*fliY*)对沙福芽孢杆菌锰氧化能力的影响。【方法】根据同源重组原理, 以沙福芽孢杆菌 ST7 菌株为起始菌株, 构建 *fliY* 基因敲除的突变株 $\Delta fliY$, 测定菌落迁徙、细菌生物膜和锰氧化率等, 研究 *fliY* 基因突变后菌株的运动能力、生物膜生成和锰氧化能力是否发生变化。【结果】经克隆测序, 证实突变株 $\Delta fliY$ 中 *fliY* 基因的后半段被卡纳霉素抗性基因取代, *fliY* 基因失活; 与野生型菌株 ST7 相比, 突变株 $\Delta fliY$ 在全营养的 LB 培养基中生长变化不大, 但在含锰的 PYCM 培养基中, 突变株的生长速度减慢、菌落较小、生物膜生成量显著下降, 运动性和锰氧化能力分别下降 65%和 20%。【结论】*fliY* 基因不仅影响菌株的生长和运动, 而且参与细菌的趋化和锰氧化等生物学过程。

关键词: 沙福芽孢杆菌; 鞭毛马达开关蛋白基因; 生物膜; 鞭毛; 锰氧化

资助项目: 国家自然科学基金(31960641); 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 National Natural Science Foundation of China (31960641), the Guizhou Provincial Science and Technology Projects (QKHPTRC[2019]5615), and the Guizhou “Hundred” Innovative Talents Project (QKHRC[2016]4012).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Jiafu, jfwang@gzu.edu.cn; RAN Xueqin, xqran@gzu.edu.cn

Received: 2022-04-18; Accepted: 2022-08-18; Published online: 2022-10-10

Inactivation of *fliY* attenuates the manganese-oxidizing capacity of *Bacillus safensis* ST7

ZHU Zhongmei¹, WU Lidan¹, ZHANG Xinyi¹, FANG Zhenglin¹, NIU Xi¹, HUANG Shihui², WANG Jiafu^{*1}, RAN Xueqin^{*2}

1 The Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education), College of Life Sciences, Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

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

Abstract: [Background] *Bacillus safensis* ST7 has strong ability of oxidizing manganese, the molecular mechanism of which, however, remains unclear. [Objective] The aim is to study the effect of the flagellar motor switch protein FliY on the manganese-oxidizing ability of *B. safensis*. [Methods] Based on the principle of homologous recombination, a *fliY*-deleted mutant (Δ fliY) was constructed using *B. safensis* ST7 as the starting strain. The changes in mobility, biofilm formation, and manganese-oxidizing capacity of Δ fliY were evaluated based on colony migration, biofilm production, and Mn(II)-oxidizing rate. [Results] After cloning and sequencing, it was confirmed that *fliY* was inactivated with the last part replaced by kanamycin resistance gene in Δ fliY. The growth of Δ fliY in LB medium was similar to that of the starting strain. However, Δ fliY showed retarded logarithmic growth, small colonies, and reduced biofilm production in the PYCM medium containing Mn(II). The motility and Mn(II)-oxidizing rate of Δ fliY decreased by about 65% and 20%, respectively. [Conclusion] The gene *fliY* not only affects the growth and motility but also participates in biological processes such as chemotaxis and manganese oxidation of *B. safensis*.

Keywords: *Bacillus safensis*; *fliY*; biofilm; flagellum; manganese oxidation

锰矿开采产生的尾矿、废渣、废弃地等常导致严重的土壤重金属污染, 锰矿区周边土壤中的锰(II)普遍超标, 直接影响农作物生长, 并通过食物链影响人类食品安全。目前, 常用的治理方法有化学沉淀、离子交换、吸附与微生物氧化等, 其中微生物氧化可彻底清除锰(II)污染, 具有良好的应用潜力^[1]。沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)属于厚壁菌门, 分布于土壤环境中, 是自然界中可分离培养的锰氧化类细菌^[2]。研究表明, 锰氧化细菌能产生多种氧化酶, 将溶解态的锰(II)氧化成锰(III/IV)沉淀, 从而解除锰(II)对生物体的毒性^[3]。锰的氧化主要通过直接氧化和间接氧化

等方式完成锰的价态转变, 直接氧化是指锰氧化细菌分泌特定的氧化酶氧化锰(II)^[4]。锰氧化酶主要有铜氧化酶(multicopper oxidase, MCO)、锰过氧化物酶(manganese peroxidases, MnPs)^[5]和过氧化氢酶(manganese catalase, MnC)等^[6]。已知芽孢杆菌 PL-12 和 SG-1 含有 MCO^[7-8]; MnPs 为胞外分泌的过氧化物酶, 存在于细菌、真菌和藻类等多种微生物中^[5,9]。此外, 从 *Pediococci*^[10] 和 *Lactobacilli*^[11-12] 的部分菌株中分离出不含血红素的过氧化氢酶, 能够催化锰的氧化^[6]。锰的间接氧化是指细菌通过代谢活动改变周围微环境的 pH 和 Eh 值, 或释放代谢终产物氧化锰(II)或加速锰(II)自发

形成高价锰矿的热力学过程^[2]。

细菌鞭毛为超级大分子复合物,由基底体、钩状体和丝状体三部分组成^[13]。细菌 *fliY* 基因编码鞭毛马达开关蛋白,对于鞭毛合成是必需的^[14]。枯草芽孢杆菌的 *fliY* 基因与 *FliMC* 和 *FliN* 基因高度同源,枯草芽孢杆菌的 *fliY* 蛋白与 *FliG*、*FliM* 共同构成基底体的 C 环,组装方式与大肠杆菌和沙门氏菌的 C 环结构相似^[15]; *fliY* 蛋白由 1 个 *fliN* 样结构域、1 个与 *CheY* 结合的 N 端肽和 1 个 *CheC/CheX/FLiY (CXY)* 样的中间结构域组成^[16]。幽门螺杆菌的 *fliY* 还含有 *SpoA* 结构域,与 *FliN* 和 *FliM* 形成功能性复合物,确保鞭毛的正常组装和旋转^[17]。弯曲杆菌和幽门螺杆菌的 *fliY* 缺乏 *CheY-P* 结合位点,但 *fliY* 是这两种细菌的鞭毛运动和趋化的必要条件^[17-18]。

我们的前期研究发现,沙福芽孢杆菌 (*Bacillus safensis*) ST7 菌株具有较高的锰耐受能力^[19],可在 2 200 mg/L 的锰(II)培养基中存活;通过转录组测序发现锰胁迫下沙福芽孢杆菌的 *fliY* 基因在对数生长期上调、平台期下调,推测 *fliY* 基因的表达可能与锰(II)氧化有关。为了揭示沙福芽孢杆菌 *fliY* 基因(参考基因编号为 BSL056_RS07925)在锰胁迫中的作用,本研究采

用同源重组技术^[20],敲除沙福芽孢杆菌 ST7 菌株的 *fliY* 基因,研究 *fliY* 基因缺失后突变株的运动、生长以及锰氧化能力是否发生变化。

1 材料与方法

1.1 样品

1.1.1 菌株来源

锰污染土壤样品采自贵州松桃县寨英镇锰冶炼区,经鉴定为沙福芽孢杆菌 ST7^[19]。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

含氯化锰的 LB、PYCM 液体培养基参考文献[2]配制;复苏培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母提取物 5.0,氯化钠 10.0,山梨醇 91.0,甘露醇 69.0。上述培养基以 121 °C 灭菌 20 min。

质粒 pPIC9K 和大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保藏载体和菌株;引物合成(表 1)及核苷酸序列测定、*Pfu* DNA 聚合酶和卡那霉素,生工生物工程(上海)股份有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技有限公司;CCK-8 试剂盒,武汉赛维尔生物科技有限公司。PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、电穿孔仪, Bio-Rad 公司;全波长多功能酶标仪,北京普天新桥技术有限公司。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	产物长度
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>fliY</i> -F1	CGGGATCCCGTTCCTCATCCGTATGTCGCTAT	682
<i>fliY</i> -R1	GTTCTTCCAAGTTCCACCGTAA	
<i>fliY</i> -F2	TTACGGTGGAACTTGAAGAACGGGAGCTGCATGTGTC	2 217
<i>fliY</i> -R2	CGGGATCCCGGTAGGTGGACCAGTTGG	
<i>fliY</i> -F3	ATACGGAAGGTTTCAGCGCA	1 327
<i>fliY</i> -R3	TCAGCATTTGTCCCGTCTCC	
<i>fliY</i> -qF	ATACGGAAGGTTTCAGCGCA	100
<i>fliY</i> -qR	TCAGCATTTGTCCCGTCTCC	

GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点

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

1.2 沙福芽孢杆菌 *fliY* 基因表达量检测

挑取沙福芽孢杆菌 ST7 单菌落于 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜, 以 1:100 (体积比) 接种于锰浓度为 0、250 和 500 mg/L 的 PYCM 培养基, 28 °C 培养 16、32 h, 用 TRIzol 法提取菌株的总 RNA 并反转录获得 cDNA 模板。以 5 倍梯度稀释的 cDNA 为模板, 绘制 RT-qPCR 的标准曲线计算扩增效率。利用 Applied Biosystems 7500 平台进行 RT-qPCR 反应, 采用特异性引物 *fliY*-qF/qR (表 1), 以 16S rRNA 基因为内参基因^[21]。RT-qPCR 反应体系 (20 μ L): cDNA (100 ng/ μ L) 0.5 μ L, 2 \times Talent qPCR PreMix 10.0 μ L (终浓度为 1 \times), 上、下游引物 (*fliY*-qF/*fliY*-qR, 10 μ mol/L) 各 0.6 μ L, 8.3 μ L ddH₂O。qPCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s; 56 °C 40 s, 40 个循环。每个反应重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.3 *fliY* 基因敲除载体构建

1.3.1 沙福芽孢杆菌 ST7 基因组提取

挑取沙福芽孢杆菌 ST7 单菌落于 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组, 操作过程严格按照说明书进行。

1.3.2 *fliY* 基因上、下游同源臂片段的扩增

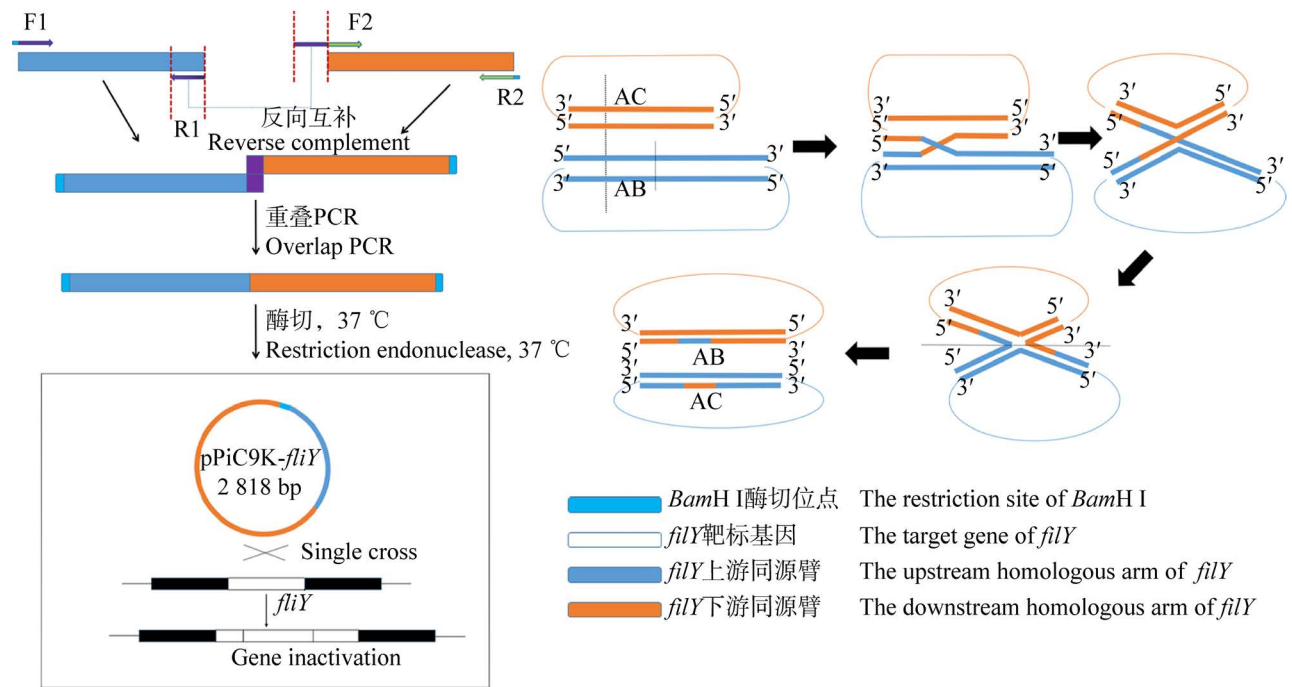
以沙福芽孢杆菌 ST7 基因组为模板, 采用引物对 *fliY*-F1/R1 扩增 *fliY* 基因的上游同源臂片段, 以引物对 *fliY*-F2/R2 扩增下游同源臂片段。PCR 反应体系 (20 μ L): 基因组 DNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, 2 \times PCR Mix 10 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 94 °C 30 s, 57–58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 *fliY* 基因的上、下游同源臂片段, 于 -20 °C 保存。

1.3.3 重叠延伸 PCR 连接 *fliY* 基因上、下游同源臂片段

由于 *fliY* 基因上、下游同源臂片段之间设计有互补的重叠区, PCR 退火时借助配对的碱基可将两个片段相连接。PCR 反应体系 (25 μ L): *fliY* 基因上、下游同源臂 DNA (75 ng/ μ L) 各 2 μ L, 2 \times PCR Mix 12.5 μ L, *Pfu* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。第 1 次 PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 5 次循环; 72 °C 10 min。第 2 次 PCR 反应体系: 第 1 次扩增产物中加入引物 *fliY*-F1/*fliY*-R2 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 2 \times PCR Mix 12.5 μ L, *Pfu* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 4 min 30 s, 34 个循环; 72 °C 10 min。第 2 次 PCR 反应完成后, 使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收及纯化, 得到 *fliY* 上游同源臂片段 (623 bp) 和 *fliY* 下游同源臂片段 (2 217 bp)。如图 1 所示, 采用重叠延伸 PCR 技术连接 *fliY* 上、下游同源臂, 获得融合片段 pPIC9K- Δ *fliY* (约 2 818 bp)。

1.3.4 酶切

融合片段 pPIC9K- Δ *fliY* 的两端均含有 *Bam*H I 位点, 经 *Bam*H I 酶切割后形成交错切口的黏性末端, 由于两个末端的碱基序列是互补的, 自连后可形成环化的融合片段 pPIC9K- Δ *fliY*。酶切体系 (40 μ L): 20 μ L 纯化的融合片段 pPIC9K- Δ *fliY* (100 ng/ μ L), 10 \times Buffer K 4 μ L, *Bam*H I (20 U/ μ L) 4 μ L, ddH₂O 12 μ L, 37 °C 酶切 4 h。加入 4 μ L 3 mol/L 的 NaAc 与 100 μ L 无水乙醇, 置 -20 °C 沉淀 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min 除去上清, 加入 300 μ L 75% 乙醇重悬沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min 除去乙醇, 37 °C 风干 20 min, 加入 10 μ L ddH₂O, 于 -20 °C 保存。

图 1 沙福芽孢杆菌 ST7 *fliY* 基因敲除示意图Figure 1 Knockout pattern of *fliY* gene from *Bacillus safensis* strain ST7.

1.3.5 环化融合片段的转化及突变株 $\Delta fliY$ 筛选鉴定

参照文献[22-23]方法制备沙福芽孢杆菌 ST7 感受态细胞。将酶切回收的环化融合片段 pPIC9K- $\Delta fliY$ 转入感受态 ST7 细胞, 加入 500 μ L 复苏培养基, 37 °C、180 r/min 培养 4 h; 8 000 r/min 离心 5 min, 除去上清, 保留 100 μ L 培养液重悬细胞, 用含卡那霉素(5 μ g/mL)的 LB 平板进行筛选, 以引物 *fliY*-F3/*fliY*-R3 进行菌落 PCR 检测, 测序正确的克隆作为突变株 $\Delta fliY$ 。

1.4 突变株 $\Delta fliY$ 生长曲线测定

挑取突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 单菌落, 分别接种于 LB 液体培养基, 28 °C、180 r/min 培养过夜。按 1% 比例转接于含 250 mg/mL 锰的 LB 和 PYCM 培养基中, 在转接 PYCM 培养基之前, LB 过夜培养物用生理盐水清洗 1 次, 以除去 LB 培养基中的营养成分。每隔 2 h 测定培养物的 OD_{600} 值, 每组实验重复 3 次, 绘制菌株

的生长曲线。

1.5 突变株 $\Delta fliY$ 生物膜测定

将突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 培养至 OD_{600} 为 0.01, 分别接种于含 250 mg/L 锰(II)的 LB 液体培养基(96 孔板), 28 °C 分别静置培养 48、72、96 h。分别测定突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 的活细胞数量及生物膜生成量。生物膜生成量采用结晶紫法测定^[24]: 缓慢取出 96 孔板, 小心吸出生物膜下层的培养液, 加 PBS 洗涤孔内保留的生物膜 1 次; 每孔加入 200 μ L 的 0.1% 结晶紫(质量体积分数), 室温染色生物膜 30 min; 将多孔板孔内残留的溶液吸干, 用 PBS 轻柔洗涤 3 次, 再加入 200 μ L 95% 乙醇, 静置 30 min 混匀, 稀释 1 倍测定 OD_{595} 值。活细胞数量测定: 取 96 孔板, 每孔接种 200 μ L 菌液, 28 °C 培养 48 h, 每孔加 20 μ L CCK-8 溶液(5 mg/mL), 混匀, 37 °C 孵育 4 h, 测定 OD_{450} 值。

1.6 突变株 $\Delta fliY$ 的运动性测定

取对数期突变株 $\Delta fliY$ (16 h)和野生株 ST7 (8 h)培养液各 3 μL , 垂直悬滴于 0.6%的 LB 琼脂平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 分别测定 8、16、32 h 的菌落直径, 以评估菌株的运动性^[25], 每组实验重复 3 次。

1.7 突变株 $\Delta fliY$ 锰氧化能力测定

按 1%比例将对数期突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 分别接种于含 250 mg/L 氯化锰的 PYCM 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d, 取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液加入 100 μL 的 0.04% LBB 溶液, 静置 30 min, 记录颜色变化。每组 3 次生物学重复。采用 LBB (亮柏蓝)法测定样品的锰(II)含量^[26]。

2 结果与分析

2.1 锰胁迫下 $fliY$ 基因的表达

为了验证锰胁迫环境下沙福芽孢杆菌 ST 菌株 $fliY$ 基因的表达变化, 利用 RT-qPCR 分析氯化锰浓度为 0、250、500 mg/L 处理 16、32 h 的 $fliY$ 基因表达水平, 图 2 结果显示, 在锰胁迫环境中, ST7 菌株的 $fliY$ 基因表达下调, 低浓度锰

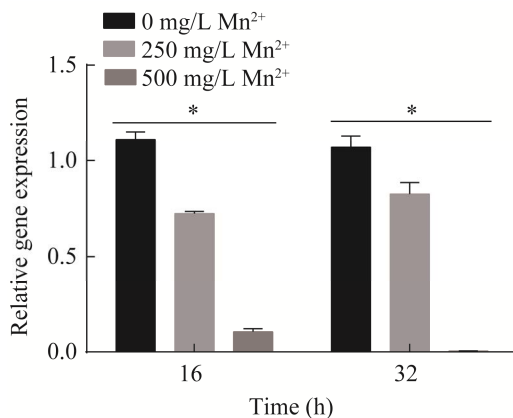


图 2 锰胁迫下 ST7 菌株 $fliY$ 基因转录水平

Figure 2 The transcription levels of $fliY$ gene in strain ST7 under different Mn concentrations. *: $P < 0.05$.

(250 mg/L)处理 16 h 时, $fliY$ 基因下调了 35%, 32 h 基因的表达略有回升, 下调 22%; 高浓度锰(500 mg/L)处理 16 h 时 $fliY$ 下调了 90%, 32 h 时 $fliY$ 的表达几乎被完全抑制。锰胁迫呈现浓度和时间依赖方式下调 $fliY$ 基因的表达。

2.2 构建突变株 $\Delta fliY$

以沙福芽孢杆菌 ST7 菌株的基因组 DNA 为模板, 用特异性引物分别扩增 $fliY$ 基因的上、下游同源臂, 基于同源重组原理构建基因敲除的融合片段。电泳检测 $fliY$ 上游同源臂片段为 620 bp 左右, $fliY$ 下游同源臂片段长 2 200 bp 左右, 与预期片段相符; 采用重叠延伸 PCR 技术连接 $fliY$ 上、下游同源臂, 获得融合片段 pPIC9K- $\Delta fliY$, 长 2 818 bp。将酶切后环化的融合片段 pPIC9K- $\Delta fliY$ 电转化沙福芽孢杆菌 ST7 感受态细胞, 经卡那霉素筛选, 得到突变株 $\Delta fliY$ 。菌落 PCR 检测得到 1 200 bp 片段(图 3), 测序证实前半段 613 bp 与沙福芽孢杆菌参考基因组 $fliY$ 相应序列的相似性为 99%, 对应 $fliY$ 基因的上半段; 后半段包含完整的卡那霉素抗性基因。突变株 $\Delta fliY$ 的 $fliY$ 基因片段只能编码前 204 个氨基酸, 翻译出的 $fliY$ 蛋白不完整, 证实突变株 $\Delta fliY$ 的 $fliY$ 基因被敲除。

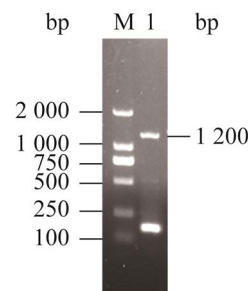


图 3 突变株 $\Delta fliY$ 菌落 PCR 检测 M: DL2000 DNA Marker; 1: 突变菌株 $\Delta fliY$ 的菌落 PCR 检测产物

Figure 3 Dection of $fliY$ insertion in mutant $\Delta fliY$ by PCR method. M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products of mutant $\Delta fliY$.

2.3 突变株 $\Delta fliY$ 生长特性测定

为了检测 *fliY* 基因缺失对细菌生长的影响, 在全营养的 LB 培养基中, 比较突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 的生长及生物膜的形成(图 4)。相比之下, 突变株的生长曲线与野生株的差别主要是对数生长期, 突变株达到对数生长期中点的时间明显延后, 在 LB-Mn 培养条件下由 8 h 延长至 10 h, PYCM-Mn 培养基中由 10 h 延长为 14 h。表明 *fliY* 基因缺失导致沙福芽孢杆菌的对数生长期延滞。

为了研究 *fliY* 基因敲除对细菌的固着生长有无影响, 采用结晶紫染色方法检测突变株的生物膜生成量。培养 72 h 时, 野生株与突变株的生物膜形成量分别为 1.460 和 1.289, 突变株生物膜形成抑制率为 12%; 培养 96 h 时, 2 个菌株的生物膜形成量分别为 1.490 和 1.350, 突变株的生物膜形成量呈上升趋势, 但仍低于野生株(图 5)。采用 CCK-8 试剂盒测定各时间点的活细菌数量, 随着培养时间的增加活细菌数量呈递减趋势, 与对照组相比差异不明显。

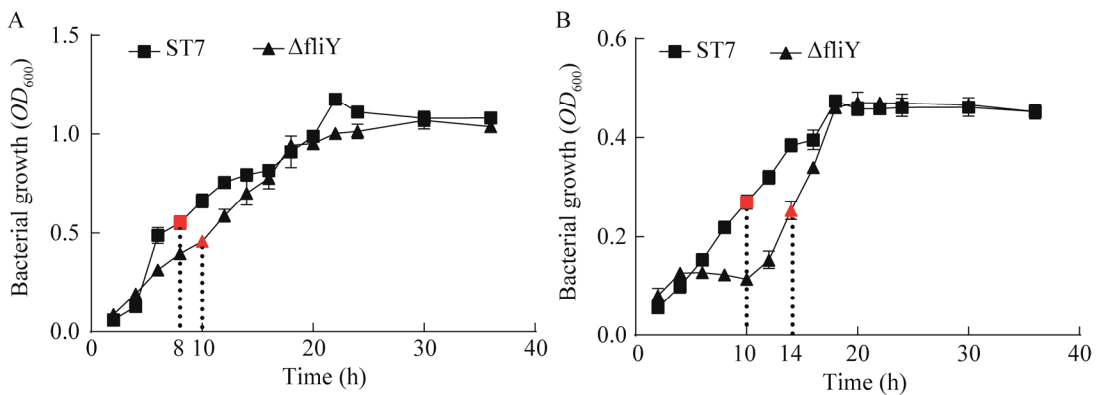


图 4 野生型菌株 ST7 和突变株 $\Delta fliY$ 的生长曲线 A: LB-Mn 培养基. B: PYCM-Mn 培养基. 图中红色三角形或正方形为菌株的对数生长期中点

Figure 4 Growth curves of wild-type strain ST7 and the mutant $\Delta fliY$. A: LB medium-Mn. B: PYCM medium-Mn. The midpoint of the logarithmic growth period of the strains were marked in red square or triangle.

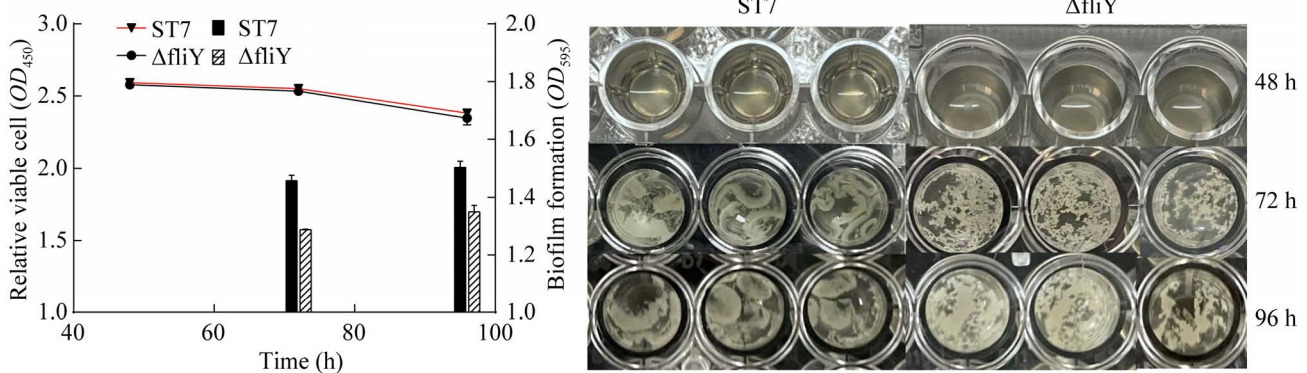


图 5 野生型菌株 ST7 与突变株 $\Delta fliY$ 的生物膜形成量及细胞活性比较

Figure 5 Comparison of biofilm formation and cellular activity between wild-type strain and mutant $\Delta fliY$ in LB medium-Mn.

2.4 突变菌株 $\Delta fliY$ 运动性分析

比较 LB 软琼脂中突变株 $\Delta fliY$ 和野生株 ST7 的运动性(图 6), 培养 16、32 h 时, 突变株 $\Delta fliY$ 的菌落直径明显小于野生株; 培养 32 h 时, 野生株 ST7 的菌落直径平均为 1.53 cm, 而突变株 $\Delta fliY$ 的菌落直径平均为 1.00 cm。突变株 $\Delta fliY$ 的运动能力为野生株的 65%。

2.5 突变株 $\Delta fliY$ 锰氧化能力测定

将突变株 $\Delta fliY$ 接种于含 250 mg/mL 氯化锰的 PYCM 培养基中, 培养 7 d 观察突变株的锰去除效率(图 7)。与野生型菌株 ST7 相比, 突变

株 $\Delta fliY$ 的除锰率减弱了 20% ($P < 0.05$), 经 LBB 检测溶液的蓝色明显变浅。

3 讨论

鞭毛是细菌运动最高效的方式之一, 在粘附、生物膜形成和环境适应中起关键作用。细菌鞭毛基底体的底座中包含 1 个可逆旋转电机, 由 1 个转子、1 个驱动轴、1 个衬套和大约 12 个定子组成。大量研究表明, *fliY* 蛋白的主要功能是控制鞭毛运动的方向。枯草芽孢杆菌 *fliY* 的缺失导致鞭毛丢失^[16]。同时, 幽门螺杆菌 C 环蛋白

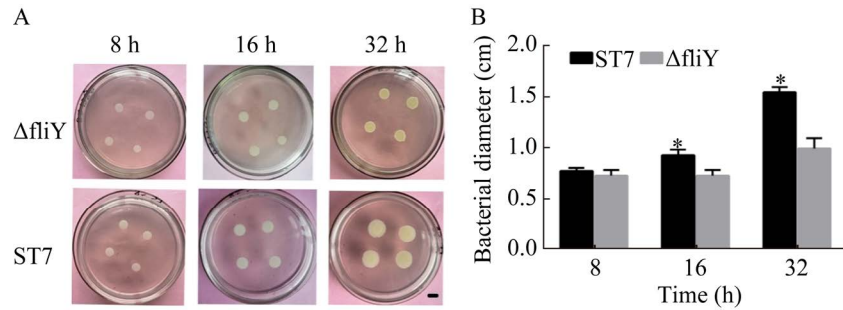


图 6 突变株 $\Delta fliY$ 的运动性测定 A: $\Delta fliY$ 与野生株 ST7 不同时段菌株运动情况. B: $\Delta fliY$ 与野生株 3 个时段的菌落直径. 标尺为 1 cm. *: $P < 0.05$

Figure 6 The motility assay of mutant $\Delta fliY$. A: Movement of $\Delta fliY$ and wild strain ST7 at different times of cultivation. B: Colonial diameters of $\Delta fliY$ and wild strain at three time periods. Bar: 1 cm. *: $P < 0.05$.

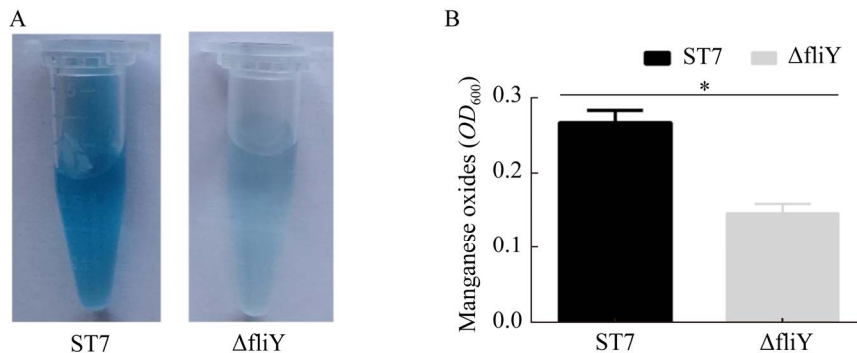


图 7 突变株 $\Delta fliY$ 的锰氧化能力变化 A: LBB 法测定突变株 $\Delta fliY$ 的锰氧化能力的颜色反应. B: 锰氧化 OD_{600} 值柱图. *: $P < 0.05$

Figure 7 Changes of manganese oxidation capacity in the mutant $\Delta fliY$. A: Color response of the $\Delta fliY$ for the determination of manganese oxidation capacity by the LBB method. B: Manganese oxidation OD_{600} value bar chart. *: $P < 0.05$.

含 FliY, 其 C 末端结构域被敲除时, 鞭毛的装配和形成被抑制, 但敲除 N 端时鞭毛结构不受影响^[27]。表明 *fliY* 的 C 端是影响鞭毛形成的部位。沙福芽孢杆菌 ST7 具有良好的锰氧化能力, FliY 蛋白和其他鞭毛相关蛋白参与了锰适应过程^[2]。

沙福芽孢杆菌 *fliY* 基因突变株表现出明显的生长缺陷。与野生株 ST7 相比, 突变株 $\Delta fliY$ 的运动性明显降低, 突变株菌落面积缩小, 菌落表面不规则且边缘出现褶皱; 突变株 $\Delta fliY$ 的生物膜形成能力减弱、锰氧化能力下降。应用 CCK-8 测定了活细菌的数量, 提示突变株生物膜形成量减少的主要原因可能不是活细菌数量的下降。根据膜形成初始模型^[15], 鞭毛蛋白介导细菌的运动性与趋化, 促使细菌向周围扩散, 缺失了 *fliY* 基因的突变株 $\Delta fliY$ 不仅运动性降低, 而且难以形成生物膜。枯草芽孢杆菌的旋转运动停止可能是启动生物膜形成的信号^[28]; 蜡样芽孢杆菌鞭毛缺陷型的生物膜形成受阻, 可能与鞭毛基因缺陷降低了运动性、细菌无法附着于介质表面有关。此外, 生物膜的形成能力可能与释放的胞外代谢产物有关。当霍乱弧菌生成的弧菌多糖过量时, 细菌出现褶皱并促进生物膜的形成^[29]。截至目前, 沙福芽孢杆菌的生物膜与锰氧化间的关系未见报道。锰对细菌生物膜的形成有种属特异性, 锰促进变形链球菌、绿脓杆菌和根癌土壤杆菌的生物膜形成, 但抑制鼠疫耶尔森氏菌和恶臭假单胞菌的生物膜形成^[30]。对锰氧化菌的模式菌恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) MnB1 的研究证明, 锰(II)上调磷酸二酯酶基因表达, 抑制生物膜形成; 而且锰的氧化始于生物膜形成之后, 锰的氧化可能是群体应对锰胁迫的方式之一^[31]。说明锰的氧化与生物膜的形成关系密切。沙福芽孢杆菌转录组研究证明^[32], 高浓度的锰(II)使磷

酸二酯酶基因(BSL056_RS03825)的表达量上调了 7.7 倍。本研究证明, *fliY* 基因敲除突变株的生物膜形成能力下降。推测沙福芽孢杆菌 *fliY* 基因的功能缺失影响生物膜的生成量, 可能与鞭毛基因敲除后运动能力下降、影响生物膜早期形成阶段的黏着过程有关。沙福芽孢杆菌突变株 $\Delta fliY$ 的生物膜形成与磷酸二酯酶表达量、c-di-GMP 水平及介导的基因等有待进一步研究。

突变株 $\Delta fliY$ 的锰(II)氧化能力明显下降, 目前还不清楚 *fliY* 基因如何影响细菌的锰氧化能力。*fliY* 基因编码基底体 C 环的马达开关蛋白, 主要控制鞭毛的旋转运动和方向。将恶臭假单胞菌 *GB-1* 基底体 M 环的 *fliF* 编码基因敲除, 锰氧化能力下降^[33]。说明细菌鞭毛基因与锰氧化之间关系密切。此外, 解淀粉芽孢杆菌的旋转运动受 c-di-GMP 调控^[28]; 趋化因子 SwrA 与磷酸化的 DegU 相结合, 抑制 *fla/che* 启动子的转录活性, 抑制细菌的运动能力^[34]。表明 *DegU* 基因可调节芽孢杆菌的运动性。沙福芽孢杆菌 *fliY* 基因敲除后锰氧化能力下降, 是否由 c-di-GMP、DegU 介导有待进一步研究。尽管沙福芽孢杆菌 ST7 催化锰(II)氧化的酶尚未明确, 但将野生型沙福芽孢杆菌 ST7 的 RS03010 基因敲除, 突变株的锰氧化能力从 82%降至 26.22%, 降幅超过 50%^[32]; 生物信息学分析显示, RS03010 基因编码的蛋白含有多铜氧化酶结构域, 可能是沙福芽孢杆菌 ST7 的锰氧化酶^[32]。与沙福芽孢杆菌 ST7 的 RS03010 基因高度同源的 *cotA* 基因, 已被证明是枯草芽孢杆菌的锰氧化酶, 同时 *cotA* 基因编码的 CotA 蛋白也是孢子生成所需的蛋白, 位于前孢子的衣壳中^[35]。沙福芽孢杆菌 FliY 蛋白 C 端含有一个 Spo0A 结构域, 位于 279–373 肽段。已知枯草芽孢杆菌的 Spo0A 被激活是孢子生成的起始标志^[36]。沙福芽孢杆菌突变株 $\Delta fliY$ 中包含

Spo0A 结构域在内的 *fliY* 蛋白 C 端被删除, 可能以复杂的机制影响突变株 $\Delta fliY$ 的锰氧化酶活性, 降低锰氧化能力。

4 结论

综上所述, 沙福芽孢杆菌 ST7 的 *fliY* 基因失活减弱了菌株的运动性、生物膜形成及锰氧化能力。

REFERENCES

- [1] 刘学鹏, 潘高峰, 赵遥菲, 肖娟宜, 徐豪, 曹运江. 地下水中锰污染现状及治理技术进展[J]. 当代化工研究, 2021(23): 89-91.
LIU XP, PAN GF, ZHAO YF, XIAO JY, XU H, CAO YJ. Current status of Mn pollution in groundwater and progress in treatment technology[J]. Modern Chemical Research, 2021(23): 89-91 (in Chinese).
- [2] 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 of *Bacillus safensis*[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [3] 段国文, 耿新燕, 魏绪宇, 赵国琰. 锰氧化细菌的生理生态功能与作用机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 3039-3053.
DUAN GW, GENG XY, WEI XY, ZHAO GY. Advances in physiological and ecological functions of manganese oxidizing bacteria and the underlying molecular mechanisms[J]. Microbiology China, 2020, 47(9): 3039-3053 (in Chinese).
- [4] 张震, 李林, 刘凡. 细菌氧化锰的分子机制[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 170-177.
ZHANG Z, LI L, LIU F. Molecular mechanism of bacterial manganese(II) oxidation: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 170-177 (in Chinese).
- [5] ZHANG H, ZHANG J, ZHANG XY, GENG AL. Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP₆ and its application in dye decolorization and denim bleaching[J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 222-229.
- [6] KONO Y, FRIDOVICH I. Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1983, 258(10): 6015-6019.
- [7] BUTTERFIELD CN, SOLDATOVA AV, LEE SW, SPIRO TG, TEBO BM. Mn(II, III) oxidation and MnO₂ mineralization by an expressed bacterial multicopper oxidase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(29): 11731-11735.
- [8] SOLDATOVA AV, BUTTERFIELD C, OYERINDE OF, TEBO BM, SPIRO TG. Multicopper oxidase involvement in both Mn(II) and Mn(III) oxidation during bacterial formation of MnO₂[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2012, 17(8): 1151-1158.
- [9] CHOWDHARY P, YADAV A, KAITHWAS G, BHARAGAVA RN. Distillery wastewater: a major source of environmental pollution and its biological treatment for environmental safety[A]//Green Technologies and Environmental Sustainability[M]. Cham: Springer International Publishing, 2017: 409-435.
- [10] DELWICHE EA. Catalase of pedicoccus cerevisiae[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 81(3): 416-418.
- [11] JOHNSTON MA, DELWICHE EA. Isolation and characterization of the cyanide-resistant and azide-resistant catalase of *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Bacteriology, 1965, 90(2): 352-356.
- [12] BARYNIN VV, WHITTAKER MM, ANTONYUK SV, LAMZIN VS, HARRISON PM, ARTYMIUK PJ, WHITTAKER JW. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Structure, 2001, 9(8): 725-738.
- [13] MORIMOTO YV, MINAMINO T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor[J]. Biomolecules, 2014, 4(1): 217-234.
- [14] HUMMELS KR, KEARNS DB. Suppressor mutations in ribosomal proteins and *FliY* restore *Bacillus subtilis* swarming motility in the absence of EF-P[J]. PLoS Genetics, 2019, 15(6): e1008179.
- [15] WARD E, KIM EA, PANUSHKA J, BOTELHO T, MEYER T, KEARNS DB, ORDAL G, BLAIR DF. Organization of the flagellar switch complex of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2019, 201(8): e00626-e00618.
- [16] BISCHOFF DS, ORDAL GW. Identification and characterization of *FliY*, a novel component of the *Bacillus subtilis* flagellar switch complex[J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(18): 2715-2723.
- [17] LAM KH, XUE CL, SUN KL, ZHANG HW, LAM WWL, Zhu ZY, Ng JTY, Sause WE, Lertsethtakarn P, Lau KF, OTTEMANN KM, AU SWN. Three SpoA-domain proteins interact in the creation of the flagellar type III secretion system in *Helicobacter pylori*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(36): 13961-13973.
- [18] LOWENTHAL AC, HILL M, SYCURO LK,

- MEHMOOD K, SALAMA NR, OTTEMANN KM. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* flagellar switch proteins[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(23): 7147-7156.
- [19] 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).
- [20] BRYKSIN AV, MATSUMURA I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids[J]. BioTechniques, 2010, 48(6): 463-465.
- [21] 贺婷婷, 宋婷, 王超, 张长斌, 王海燕. 短小芽孢杆菌实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 99-106.
- HE TT, SONG T, WANG C, ZHANG CB, WANG HY. Screening of reference genes in *Bacillus pumilus* by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(11): 99-106 (in Chinese).
- [22] 李瑞芳, 薛雯雯, 黄亮, 熊前程, 王彬. 枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究[J]. 生物技术通报, 2011(5): 227-230.
- LI RF, XUE WW, HUANG L, XIONG QC, WANG B. Competent preparation and plasmid transformation of *Bacillus subtilis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(5): 227-230 (in Chinese).
- [23] 温赛, 杨建国. 地衣芽孢杆菌原生质体电转化方法的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(7): 76-82.
- WEN S, YANG JG. Transformation of undomesticated strains of *Bacillus licheniformis* by protoplast electroporation[J]. China Biotechnology, 2015, 35(7): 76-82 (in Chinese).
- [24] 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.
- [25] JUNG HI, KIM YJ, LEE YJ, LEE HS, LEE JK, KIM SK. Mutation of the cyclic di-GMP phosphodiesterase gene in *Burkholderia lata* SK875 attenuates virulence and enhances biofilm formation[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(10): 800-808.
- [26] SHU JC, WU HP, CHEN MJ, PENG H, LI B, LIU RL, Liu ZH, Wang B, Huang T, Hu ZB. Fractional removal of manganese and ammonia nitrogen from electrolytic metal manganese residue leachate using carbonate and struvite precipitation[J]. Water Research, 2019, 153: 229-238.
- [27] LU P, ZHANG HW, GAO YZ, JIA XD, LIU Z, WANG DP, AU SWN, ZHANG QF. Cryo-electron tomography reveals the roles of FliY in *Helicobacter pylori* flagellar motor assembly[J]. mSphere, 2022, 7(1): e00944-e00921.
- [28] 范萌, 黄升泉, 李昱龙, 赵银娟, 樊奔. 芽孢杆菌鞭毛及其运动相关特性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1832-1845.
- FAN M, HUANG SQ, LI YL, ZHAO YJ, FAN B. Flagella and motility-related properties of *Bacillus*: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1832-1845 (in Chinese).
- [29] ZHU J, MEKALANOS JJ. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*[J]. Developmental Cell, 2003, 5(4): 647-656.
- [30] 郑艳晶. 恶臭假单胞菌 MnB1 生物膜对环境因素 Mn(II) 和 H₂O₂ 的响应及其机制研究[D]. 南京: 南京大学硕士学位论文, 2017.
- ZHENG YJ. Study on the responses and mechanisms of *Pseudomonas putida* MnB1 biofilm to environmental factors Mn(II) and H₂O₂[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University, 2017 (in Chinese).
- [31] ZHENG YJ, LI YM, LONG HY, ZHAO XJ, JIA KK, LI J, WANG LY, WANG RY, LU XC, ZHANG DM. *bifA* regulates biofilm development of *Pseudomonas putida* MnB1 as a primary response to H₂O₂ and Mn²⁺[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:1490.
- [32] 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.
- [33] GESZVAIN K, YAMAGUCHI A, MAYBEE J, TEBO BM. Mn(II) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 is influenced by flagella synthesis and surface substrate[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(8): 605-614.
- [34] ERMOLI F, BONTÀ V, VITALI G, CALVIO C. SwrA as global modulator of the two-component system DegSU in *Bacillus subtilis*[J]. Research in Microbiology, 2021, 172(6): 103877.
- [35] HULLO MF, MOSZER I, DANCHIN A, Martin-Verstraete I. *CotA* of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5426-5430.
- [36] DHUNGEL BA, GOVIND R. Spo0A suppresses *sin* locus expression in *Clostridioides difficile*[J]. mSphere, 2020, 5(6): e00963-e00920.