

黄色链霉菌耐受铁离子的胁迫机制

张伟, 杨帅, 桑海洲, 万传星*, 张利莉*

塔里木大学 生命科学与技术学院, 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆 阿拉尔 843300

张伟, 杨帅, 桑海洲, 万传星, 张利莉. 黄色链霉菌耐受铁离子的胁迫机制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4004-4017.

ZHANG Wei, YANG Shuai, SANG Haizhou, WAN Chuanxing, ZHANG Lili. Iron tolerance mechanism of *Streptomyces flavus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4004-4017.

摘要: 【背景】铁是微生物生长与代谢所必需的一种微量元素, 在生物体中参与呼吸、DNA 前体合成、基因调节及抗氧化应激等重要生理活动。黄色链霉菌(*Streptomyces flavus*) TRM45540 是一株分离自新疆罗布泊的放线菌, 前期研究表现出对铁离子具有较强耐受性, 探索菌株 TRM45540 耐受铁离子胁迫的响应机制具有重要意义。【目的】揭示菌株 TRM45540 耐受铁离子胁迫的机制。

【方法】以菌株 TRM45540 为研究对象, 通过向 ISP4 液体培养基中添加不同质量的硫酸亚铁来胁迫菌株 TRM45540, 并对胁迫后的样本进行转录组测序与分析, 探索在铁离子胁迫条件下菌株 TRM45540 耐受铁离子的响应机制。同时通过扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)和能谱分析观察并检测铁离子胁迫下菌丝表面形态、元素种类及含量变化。【结果】低硫酸亚铁添加量(1–500 mg/L)和高硫酸亚铁添加量(2 500–4 500 mg/L)均不利于菌株 TRM45540 生长, 在硫酸亚铁添加量为 500–2 500 mg/L 时可以促进菌株 TRM45540 生物量的积累。扫描电子显微镜观察到随着硫酸亚铁添加量的增加, 菌株 TRM45540 菌丝体外有大量胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)生成; 能谱分析结果显示, EPS 中氧、铁元素含量升高, 氮元素含量降低, 推测 EPS 为多糖; 转录组分析结果表明, 受 Fe(III/II)胁迫后差异表达基因涉及 ABC 转运系统、二元信号系统、铁离子运输、氨基酸代谢、谷胱甘肽表达、卟啉类化合物代谢等多个代谢通路。【结论】菌株 TRM45540 受到 Fe(III/II)离子胁迫后, 触发了生物大分子分泌并输出到细胞表面形成多糖类 EPS, 菌体表面的 EPS 络合大量铁离子, 阻止铁离子内流。同时触发二元信号系统, 启动一系列耐受铁离子胁迫的响应机制, 酸性氨基酸大量表达, 络合铁离子的卟啉类化合物合成增加, 参与解毒的半胱氨酸和谷胱甘肽的生物合成加剧, 从而多途径减少高铁离子的伤害。

关键词: 铁离子胁迫; 黄色链霉菌; 转录组分析; 能谱分析

资助项目: 国家自然科学基金(31460138)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31460138).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Lili, zhanglily@taru.edu.cn; WAN Chuanxing, wanchuanxing@163.com

Received: 2024-01-14; Accepted: 2024-06-06; Published online: 2024-06-25

Iron tolerance mechanism of *Streptomyces flavus*

ZHANG Wei, YANG Shuai, SANG Haizhou, WAN Chuanxing^{*}, ZHANG Lili^{*}

State Key Laboratory Breeding Base for the Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin
Co-funded by Xinjiang Production and Construction Corps and the Ministry of Science and Technology, College
of Life Science and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

Abstract: **[Background]** Iron is a microelement essential for the growth and metabolism of microorganisms, playing a role in vital physiological activities like respiration, DNA precursor synthesis, gene regulation, and response to oxidative stress. Studies have confirmed the tolerance of *Streptomyces flavus* TRM45540, an actinomycete strain isolated from Lop Nur in Xinjiang, to ferric ions. It is of great significance to elucidate the response mechanism of *S. flavus* TRM45540 to iron stress. **[Objective]** To reveal the iron tolerance mechanism of *S. flavus* TRM45540. **[Methods]** *S. flavus* TRM45540 was cultured in the ISP4 liquid media supplemented with different levels of ferrous sulfate. Transcriptome sequencing was employed to explore the response mechanism to iron. Additionally, scanning electron microscopy and energy spectrum analysis were employed to observe changes in mycelial surface morphology as well as elemental species and content under ferric ion stress. **[Results]** The supplementation of ferrous sulfate at low (1–500 mg/L) and high (2 500–4 500 mg/L) levels had negative effects on the growth of *S. flavus* TRM45540. However, supplementing ferrous sulfate at 500–2 500 mg/L promoted the biomass accumulation of *S. flavus* TRM45540. With the increase in the supplementing level of ferrous sulfate, a large amount of extracellular polymers substances (EPSs) were generated outside the mycelia of *S. flavus* TRM45540. The energy spectrum analysis showed increases in the oxygen and iron content and a decrease in the nitrogen content of EPS, suggesting a polysaccharide composition. The transcriptome analysis showed that differentially expressed genes post ferric ion stress were associated with multiple metabolic pathways including the ABC transporter system, two component system, ferric ion transport, amino acid metabolism, glutathione expression, and porphyrin metabolism. **[Conclusion]** The ferric ion stress induced the secretion and export of biomolecules to the cell surface of *S. flavus* TRM45540, leading to the formation of polysaccharide-based EPS. The EPS was complexed with a large amount of ferric ions on the bacterial cell surface, thereby impeding the influx of ferric ions. Additionally, the activation of the two component system triggered a cascade of responses to ferric ion stress. This included upregulation of acidic amino acids, enhanced synthesis of porphyrins binding to ferric ions, and increased biosynthesis of cysteine and glutathione involved in ferric ion removal. These pathways coordinated to reduce the cellular damage caused by high ferric ion levels.

Keywords: ferric ion stress; *Streptomyces flavus*; transcriptome analysis; energy spectrum analysis

铁元素在微生物的生长与代谢过程中发挥着至关重要的作用。它是微生物呼吸作用、基因调节、DNA 前体合成及抗氧化应激反应中的关键参与者,铁还是许多代谢酶类活性中心所必需的金属元素辅基,包括细胞色素氧化酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶^[1-3]等。末端氧化酶在呼吸链中发挥着至关重要的作用,其功能主要依赖于其内部的 Fe-Cu 双金属活性位点。这一特殊的活性位点能够高效地将氧气还原成水,从而在生物体的呼吸过程中发挥至关重要的作用^[4]。

除了上述作用外,铁元素与病原体的病理特性及生物膜动态紧密相关。以沙门氏菌(*Salmonella*)为例,其体内铁含量的微小变化都能显著调节III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)的活性。T3SS 在沙门氏菌感染策略中发挥着重要的作用,因此,铁元素对 T3SS 调控的细微影响直接决定了这种细菌的入侵潜能^[5]。在类鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)中,摄取铁主要依赖于 *pvdA* 基因编码的鸟氨酸-N5-加氧酶和 *orbA* 基因编码的外膜受体, *pvdA* 和 *orbA* 基因是类鼻疽伯克氏菌毒力的必需基因^[6]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)中 *fyuA* 基因的表达量与铁离子浓度呈正相关^[7], *fyuA* 基因与大肠杆菌生物膜的形成和细菌毒性有关^[8]。在空肠弯曲杆菌(*Bacillus pumilus*)中, Fe(II)和 Fe(III)可以提高生物膜中总活性氧的含量,通过氧化应激刺激其生物膜的形成;同时, Fe(II)和 Fe(III)均能显著提高空肠弯曲杆菌胞外多糖的产量^[9]。铁离子对细菌来说十分重要,但过多的铁元素对细菌有一定的毒性。当细胞内铁元素含量过多,通过芬顿反应会产生大量的羟基自由基^[10-11],此时细胞会做出一系列反应来应对过量铁离子对自身的危害。鉴于铁对于微生物的重要性,同时为更好地将微生物应用于铁

离子污染治理与修复提供理论支持,研究铁在微生物中的代谢通路具有重要意义。目前研究放线菌对铁离子的耐受机制的文章较少,而对病原菌耐受重金属离子的研究较多,例如基氏含铜菌(*Cupriavidus gilardii*) CR3 可以耐受高浓度的铜离子,其耐受机制主要为胞外聚合物络合吸附铜离子,铜抗性基因表达将过量铜离子外排,硫代谢、半胱氨酸和谷胱甘肽代谢、Fe-S 簇显著响应螯合铜离子,起到解毒作用^[12]。

黄色链霉菌(*Streptomyces flavus*) TRM45540 是一株分离自新疆罗布泊的放线菌新种^[13]。课题组前期研究发现,向培养基中添加硫酸亚铁,可以提高菌株 TRM45540 的放线菌素 D 产量,在硫酸亚铁添加浓度为 1000 mg/L 时,激活了多烯类化合物对应的沉默基因簇的表达,并且菌株 TRM45540 对铁离子具有很高的耐受性^[14]。本研究以菌株 TRM45540 为研究对象,通过向培养基中加入不同浓度的硫酸亚铁来胁迫菌株 TRM45540,并对胁迫后的样本进行转录组测序与分析,探索菌株 TRM45540 耐受铁离子胁迫的响应机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

黄色链霉菌(*S. flavus*) TRM45540 由新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室提供。

1.1.2 培养基

高氏一号培养基(g/L)^[14]: 可溶性淀粉 20.0, K₂HPO₄ 0.5, KNO₃ 1.0, NaCl 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, 微量盐母液 1.0 mL/L, 琼脂 18.0 g, pH 7.0–7.2。

ISP4 培养基(g/L)^[14]: 可溶性淀粉 10.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, (NH₄)₂SO₄ 4.0, NaCl 1.0, CaCO₃ 1.0, pH 7.0–7.2。

1.1.3 主要试剂和仪器

硫酸亚铁和二价铁检测试纸, 中国医药集团有限公司; SweScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Remover), 武汉赛维尔生物科技有限公司。扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)和能谱仪, Sigma 公司; 原子吸收光谱仪, 岛津公司。

1.2 菌株的培养

将菌株 TRM45540 接种在高氏一号固体培养基上, 28 °C 恒温培养 7 d 后放在 4 °C 冰箱备用。

1.3 不同浓度硫酸亚铁对菌株 TRM45540 生物量的影响

将菌株 TRM45540 接种于添加不同浓度硫酸亚铁(1、100、500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000、4 500、5 000 mg/L)的 ISP4 培养基中 28 °C、120 r/min 培养, 每个浓度设置 3 个重复, 以无铁的 ISP4 培养基作对照。培养 7 d 后室温 10 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 用去离子水反复洗涤 3 次, 最后干燥, 称量细胞干重。

1.4 不同培养时间培养基上清液铁离子浓度的测定

将菌株 TRM45540 接种于添加不同浓度硫酸亚铁的 ISP4 培养基中培养, 选取 3 个样本(硫酸亚铁添加浓度为 1、100、1 000 mg/L), 使用原子吸收光谱仪监测 3 个样本不同培养时间(0、12、24、48、72、96、120、144 h)上清液中铁离子浓度。

1.5 胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)的形态观察和能谱分析

用 SEM 观察了不同浓度硫酸亚铁(1、100、1 000 mg/L)处理 7 d 后菌株 TRM45540 细胞表面的变化。用能谱仪观察添加不同浓度硫酸亚铁条件下细胞表面元素种类及占比的变化。所有的实验设置 3 次重复。

1.6 测序样品准备

将在高氏一号培养基上培养 7 d 的菌株 TRM45540 的菌体用 1 mL 枪头打取 3 个菌饼, 然后接种至高氏一号培养基(装液量 150 mL/500 mL), 28 °C、120 r/min 培养 4 d 至种子液颜色呈现明黄色, 将种子液按 4%接种量接种至添加不同浓度硫酸亚铁(1 mg/L、100 mg/L、1 g/L)的 ISP4 培养基(装液量 150 mL/500 mL), 28 °C、120 r/min 培养 7 d 后 12 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 置于液氮进行速冻后送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行后续的 RNA 提取、质检、建库和转录组分析。转录组原始数据 NMDC10018498 存储在国家微生物科学数据中心(National Microbiology Data Center, NMDC), 链接为 <https://nmdc.cn/resource/genomics/project/detail/NMDC10018498>。

1.7 测序数据质量评估

质量合格的总 RNA 和 mRNA 用于后续建库测序, 测序结果的原始数据经进一步过滤后得到 clean reads。构建参考基因组索引, 将 clean reads 与参照基因组进行比对以获得用于后续分析的 mapped data (reads)。基于负二项分布的 DESeq 软件进行统计分析, 定义 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.5$ 且 $P < 0.05$ 以获得显著差异表达基因并进行后续分析。高通量测序(Illumina HiSeqTM2500/MiSeqTM)得到的原始图像数据文件经 CASAVA 碱基识别(base calling)分析转化为原始测序序列(raw data 或 raw reads)。测序数据的质量评估一般会进行三方面的检查:(1) 除去 reads 中包含接头的所有序列;(2) 除去显示 N 碱基(无法确定碱基信息时显示 N 碱基)比例大于 10%的 reads;(3) 除去低质量 reads (质量值小于 20 的序列占 50%以上)。

1.8 差异表达基因及分析

通过对 3 组样本进行分析, 统计 3 组样品

中每个基因 FPKM 值, 通过 edgeR 计算成对样品间的差异(错误发现率, false discovery rate (FDR)<0.05, 差异倍数 ≥ 2)。对差异表达基因分别进行 gene ontology (GO)功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.9 实时荧光定量 PCR 验证

为验证转录组学数据的可靠性, 在二元信号转导系统、谷胱甘肽表达、卟啉类化合物代谢这 3 条代谢通路中分别随机选择 2 个基因 (FM21_RS26175、FM21_RS16470、FM21_RS16455、FM21_RS10065、FM21_RS28695、FM21_RS28700)用 RT-qPCR 验证 RNA-Seq 结果。使用武汉赛维尔生物科技有限公司生产的 RNA 提取液提取 3 个样品(测转录组的 3 个样本)的总 RNA, 每个样品 3 个生物学重复。采用 SweScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Remover)试剂盒将提取好的 RNA 按照以下反应体系反转录成 cDNA: 5 \times SweScript All-in-One SuperMix for qPCR 4 μ L, gDNA Remover 1 μ L, total RNA 10 μ L,

RNase free water 定容至 20 μ L, 反转录条件: 25 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 30 s。RT-qPCR 的扩增以 16S rRNA 基因的表达量为内参。反应体系: 2 \times SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX) 7.5 μ L, 正、反向引物(2.5 μ mol/L)各 1.5 μ L, cDNA 模板(10 ng/mL) 2 μ L, 去离子水 2.5 μ L。在 CFX Connect Real-time PCR Detection System (Bio-Rad)仪器上执行如下三步法扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 65–95 $^{\circ}$ C, 每 0.05 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C; 16 $^{\circ}$ C 保存。扩增结束后, 使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算基因的相对表达量。所使用引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 菌株 TRM45540 对硫酸亚铁耐受性分析

培养液中硫酸亚铁添加浓度与菌株 TRM45540 生物量的量效关系如图 1 所示, 菌株 TRM45540 在低浓度和高浓度硫酸亚铁胁迫下均不利于其生长, 硫酸亚铁添加浓度为

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Gene name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Description
FM21RS16470	AGGACCACCACCTGGACAACC	GATCATCTTCATCTGCGGCGAGTC	Decarboxylating 6-phosphogluconate dehydrogenase
FM21RS16455	CGTTCGAGCAGCTCCACAAGG	ACCGAGAGGTAGAAGGCGTAGTTG	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
FM21RS10065	GGCGTGGACAAGATCGGCAAG	GACGAGGGCTACCGGAGTCTC	Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase
FM21RS26175	CGCAACTACGAGGACGCCAAG	TCGGAGAGCAGCGAGTGGAAG	Glutamate-1-semialdehyde aminomutase
FM21RS28695	GTTCGTCTTGATCGCCGTCCTG	GTGAGCAGCCACACCTCGTTG	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II
FM21RS28700	GAGCAGCAGCCGATGAAGATGG	CCTCGTTGGTGTGCGTTGATGCC	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I
16S rRNA	TTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT	GTGGAATGTCGCCAACACCTAG	Reference gene

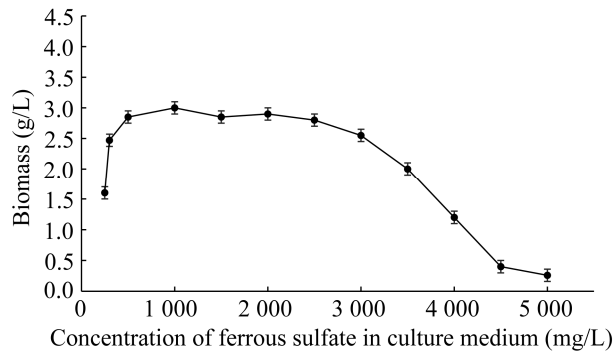


图1 不同浓度硫酸亚铁对菌株 TRM45540 生物量的影响

Figure 1 Effect of different concentrations of ferrous sulfate on the biomass of strain TRM45540.

500–2 500 mg/L 时, 菌株 TRM45540 的生物量维持在 3 g/L 的水平, 硫酸亚铁添加浓度为 1 000 mg/L 时, 菌株 TRM45540 生物量最高, 其耐受硫酸亚铁的最大添加浓度为 4 500 mg/L。

2.2 不同培养时间培养基上清液的 Fe(III) 离子浓度

经二价铁检测试纸检测, 培养基经高压蒸汽灭菌之后, 相较于硫酸亚铁添加量, 溶液中无二价铁离子, 溶液中能检测到的铁离子几乎均为三价铁离子。如图 2 所示, 在 0–72 h, 铁离子为三价铁絮凝沉淀状态, 铁离子溶解度极小。72–168 h, 由于菌株 TRM45540 在生长过程中

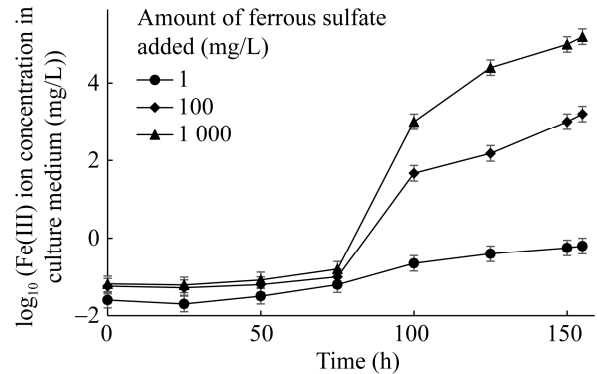


图2 不同培养时间培养基上清液的 Fe(III) 离子浓度

Figure 2 Ferric ion concentration in the supernatant of culture medium at different culture time

产酸, 培养液 pH 降低, 培养液中的三价铁离子浓度迅速升高。

2.3 不同浓度硫酸亚铁菌株 TRM45540 表面形态的响应

运用 SEM 观察在硫酸亚铁添加浓度为 1、100 与 1 000 mg/L 时培养 7 d 下菌株 TRM45540 的细胞形态和结构的变化。如图 3 所示, 在添加不同浓度硫酸亚铁的培养液胁迫下 SEM 观察到菌株 TRM45540 分泌至胞外的聚合物(EPS)有显著差别。随着培养液中硫酸亚铁添加浓度的增加, 菌株 TRM45540 表面的胞外聚合物呈现增加趋势。

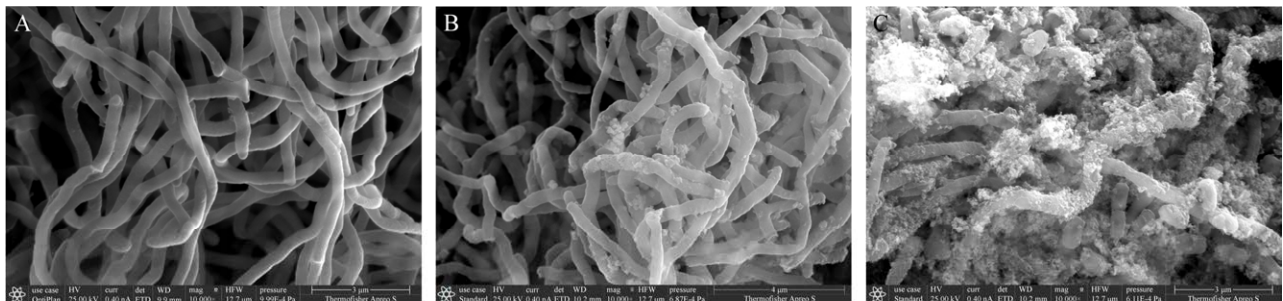


图3 添加不同浓度硫酸亚铁培养 7 d 后菌株 TRM45540 菌丝的扫描电子显微镜照片

Figure 3 Scanning electron microscopy of strain TRM45540 mycelia incubated for 7 d with different concentrations of ferrous sulfate. A: 1 mg/L ferrous sulfate. B: 100 mg/L ferrous sulfate. C: 1 000 mg/L ferrous sulfate.

2.4 不同浓度硫酸亚铁处理后菌株 TRM45540 能谱仪(energy dispersive spectrometer, EDS)的能谱分析

对在培养液中添加硫酸亚铁浓度为 1、100、

1 000 mg/L 条件下培养的菌株 TRM45540 细菌进行 EDS 能谱图分析。如图 4 所示, 菌株 TRM45540 细菌表面碳原子、氧原子、氮原子占主要成分, 还含有一定量的钠原子、镁原子、

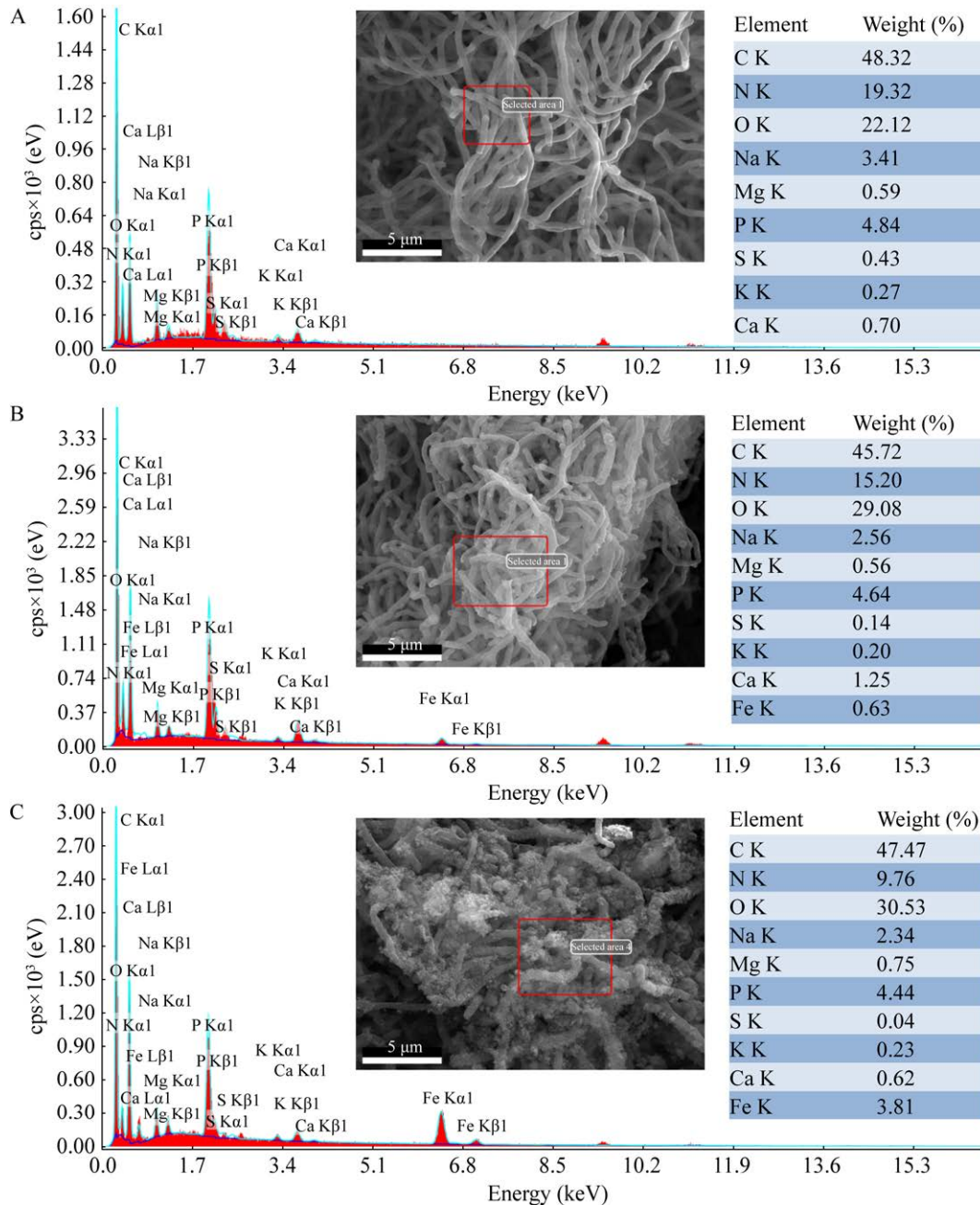


图 4 不同浓度硫酸亚铁培养 7 d 条件下菌株 TRM45540 的能谱图

Figure 4 Energy dispersive spectrometer spectra of strain TRM45540 incubated for 7 d with different concentrations of ferrous sulfate in culture medium. A: 1 mg/L ferrous sulfate. B: 100 mg/L ferrous sulfate. C: 1 000 mg/L ferrous sulfate.

磷原子、硫原子、钾原子和钙原子。更加重要的是硫酸亚铁胁迫后菌株 TRM45540 的 EDS 能谱中出现了 2 个铁信号(图 4B、4C)。这表明在铁胁迫下, 菌株 TRM45540 细胞表面分泌的胞外聚合物络合吸附了铁离子。并且 N 元素占比减少, C 元素占比基本不变, O 元素占比增加, 推测该胞外分泌物的主要成分为多糖。

2.5 转录组测序数据的评估

使用 Illumina HiSeq™2500/MiSeq™ 测序平台对不同浓度硫酸亚铁胁迫后菌株 TRM45540 的 cDNA 文库进行转录组测序, 3 个文库的样本获取情况见表 2。由表 2 可见, 每个样本的 clean reads 比率均在 98% 以上, Q20 值均在 96% 以上, Q30 值均在 91% 以上, G+C 含量的百分比也在 67% 以上, 表明测序准确度高, 测序结果质量可靠, 符合进一步分析要求。

2.6 不同浓度硫酸亚铁处理后菌株 TRM45540 差异表达基因数目

在 100 mg/L 硫酸亚铁胁迫下, 菌株 TRM45540 共有 1 401 个基因差异表达, 其中

表 2 数据产出质量情况一览表

Table 2 Output data quality

Sample names	FeSO ₄ _	FeSO ₄ _	FeSO ₄ _
	1 mg/L	100 mg/L	1 000 mg/L
Raw reads	11 643 918	13 284 110	16 014 558
Clean reads	11 499 642	13 082 134	15 806 616
Clean ratio (%)	98.76	98.48	98.70
Q20 (%)	96.67	96.81	96.92
Q30 (%)	91.69	92.04	92.20
G+C content (%)	67.04	69.16	67.89

Raw reads: 统计原始序列数据; Clean reads: 过滤后的 reads 数目; Clean ratio: Clean Reads 在 raw reads 中所占的比例; Q20、Q30: phred 数值大于 20、30 的碱基占总体碱基的百分比; G+C content: 碱基 G 和 C 占总碱基数的百分比

Raw reads: Counting the original sequence data; Clean reads: The number of reads after filtering; Clean ratio: The proportion of clean reads in raw reads; Q20, Q30: The percentage of bases with Phred scores greater than 20 and 30 among the total bases; G+C content: The percentage of bases G and C in the total bases.

997 个基因表达上调、404 个基因表达下调; 在 1 000 mg/L 硫酸亚铁胁迫下, 菌株 TRM45540 共有 1 459 个基因差异表达, 其中 886 个基因表达上调、573 个基因表达下调(图 5), 这说明菌株 TRM45540 对铁离子胁迫敏感。

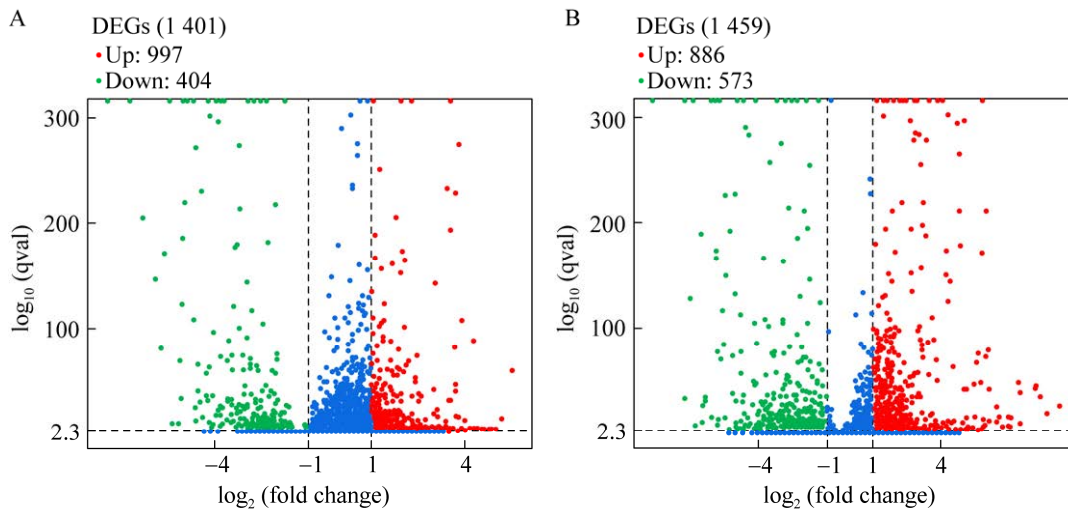


图 5 不同浓度硫酸亚铁处理 7 d 后菌株 TRM45540 差异表达基因火山图

Figure 5 Volcanic map of differentially expressed genes of strain TRM45540 treated with different concentrations of ferrous sulfate. A: 100 mg/L ferrous sulfate. B: 1 000 mg/L ferrous sulfate. DEGs: Differentially expressed genes.

2.7 不同浓度硫酸亚铁处理后菌株 TRM45540 差异表达基因的 GO 注释分析

对培养液中添加不同浓度 FeSO_4 胁迫下差异表达基因的 GO 分析发现, 在硫酸亚铁添加浓度为 100 mg/L 的胁迫下, 主要生物学过程变化涉及跨膜运输、脂肪酸代谢、脂肪酸生物合成、单羧酸生物合成和细胞脂质代谢等; 在硫酸亚铁添加浓度为 1 000 mg/L 的胁迫下, 生物学过程变化主要有有机化合物生物合成、有机酸代谢、羧酸代谢、小分子代谢和氨基酸代谢等(图 6)。

在分子功能分类里, 在硫酸亚铁添加浓度为 100 mg/L 的胁迫下, 主要分子功能变化涉及 3-氧代酰基-[酰基载体蛋白]合酶活性、脂肪酸合成酶活性、运输活动和受损 DNA 结合等。在硫酸亚铁添加浓度为 1 000 mg/L 的胁迫下, 主要分子功能变化涉及氧化还原酶活性、辅助因子结合和辅酶结合等。图 6 展示了 30 个富集最显著的条目。

2.8 不同浓度 FeSO_4 胁迫下菌株 TRM45540 差异基因的 KEGG 通路分析

KEGG 富集分析可以为后期挖掘菌株 TRM45540 对铁抗性调控相关基因提供思路, 但是与 GO 富集分析不同的是, KEGG 富集分析能够体现差异表达基因在不同代谢通路上的富集情况。

KEGG 富集分析表明, 在硫酸亚铁添加浓度为 100 mg/L 的胁迫下, 与菌株 TRM45540 耐受高浓度铁离子相关的 KEGG 代谢通路根据富集程度由高到低依次为: 次级代谢产物的生物合成、不同环境中的微生物代谢、ABC 转运、碳代谢、糖酵解/糖异生、氧化磷酸化等(图 7A)。在硫酸亚铁添加浓度为 1 000 mg/L 的胁迫下, 与菌株 TRM45540 耐受高浓度铁离子相关的 KEGG 代谢通路根据富集程度由高到低依次为:

代谢通路、次级代谢产物的生物合成, 氨基酸的生物合成, 碳代谢, 嘌呤代谢, 甘氨酸、苏氨酸和丝氨酸代谢, 嘧啶代谢等(图 7B)。图 7 展示了 20 条最显著的代谢通路。

2.9 实时荧光定量 PCR 验证结果

为了评估转录组数据的可靠性, 随机筛选 6 个差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证。由图 8 可知, RT-qPCR 验证结果与 RNA-Seq 数据具有良好的一致性, 证实本研究中 RNA-Seq 分析的结果具有可靠性。这 6 个基因包括脱羧基-6-磷酸葡萄糖脱氢酶(FM21RS26175)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(FM21RS16470)、吡啶原-3-C-甲基转移酶(FM21RS16455)、谷氨酸-1-半醛氨基变位酶(FM21RS10065)、细胞色素 D 泛喹酚氧化酶亚基 II (FM21RS28695)和细胞色素泛喹酚氧化酶亚基 I (FM21RS28700)。

3 讨论

黄色链霉菌(*S. flavus*) TRM45540 对高浓度的铁离子表现出较强的耐受性, 通过 SEM 观察、能谱分析和转录组分析, 推测该菌的主要耐受机制如下(图 9): 硫酸亚铁在 121 °C、30 min 高压有氧蒸汽灭菌过程中, 二价铁离子被氧化成三价铁离子, 菌株 TRM45540 受到外部环境中的 Fe(III/II) 离子胁迫后, 二元信号系统中的“感应器”组氨酸激酶(histidine kinase)感知 Fe(III/II) 离子胁迫, 通过磷酸化作用将信号传递给“效应器”。“效应器”接收到信号后进一步调控基因表达, 使细胞向外分泌 EPS、激活吡啶和谷胱甘肽的表达。EPS 通过在细胞表面络合吸附铁离子, 阻止铁离子内流, 从而抵抗铁胁迫, 吡啶和谷胱甘肽通过络合吸附铁离子, 提高自身解毒能力。以往的研究表明, EPS 主要成分为蛋白质和多糖, 具有一定的吸附金属离子的能力^[15-19],

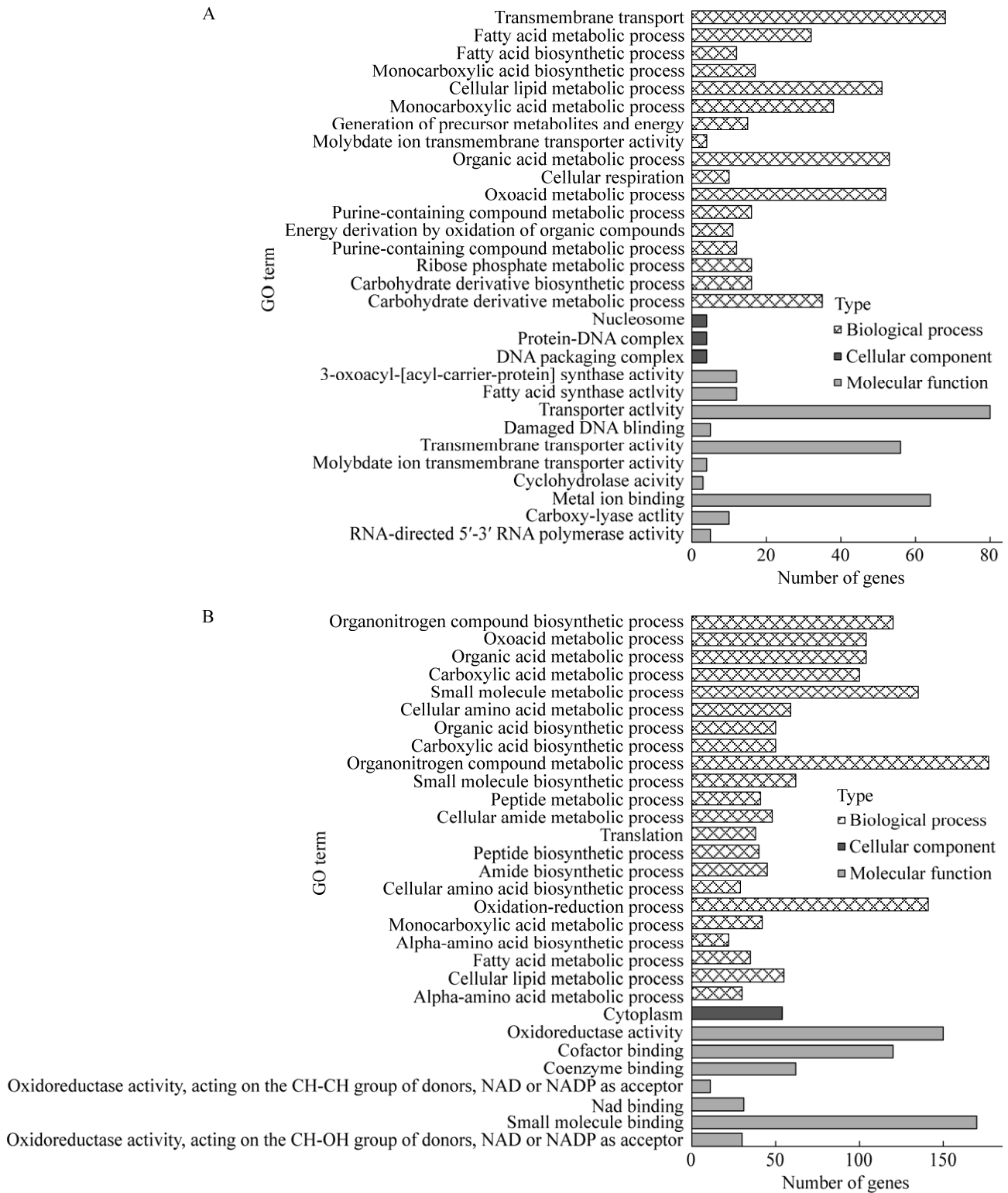


图 6 添加 FeSO₄ 后上调基因的 GO 富集分析

Figure 6 GO enrichment analysis of up-regulated genes after addition of FeSO₄. A: 100 mg vs. 1 mg. B: 1 000 mg vs. 1 mg.

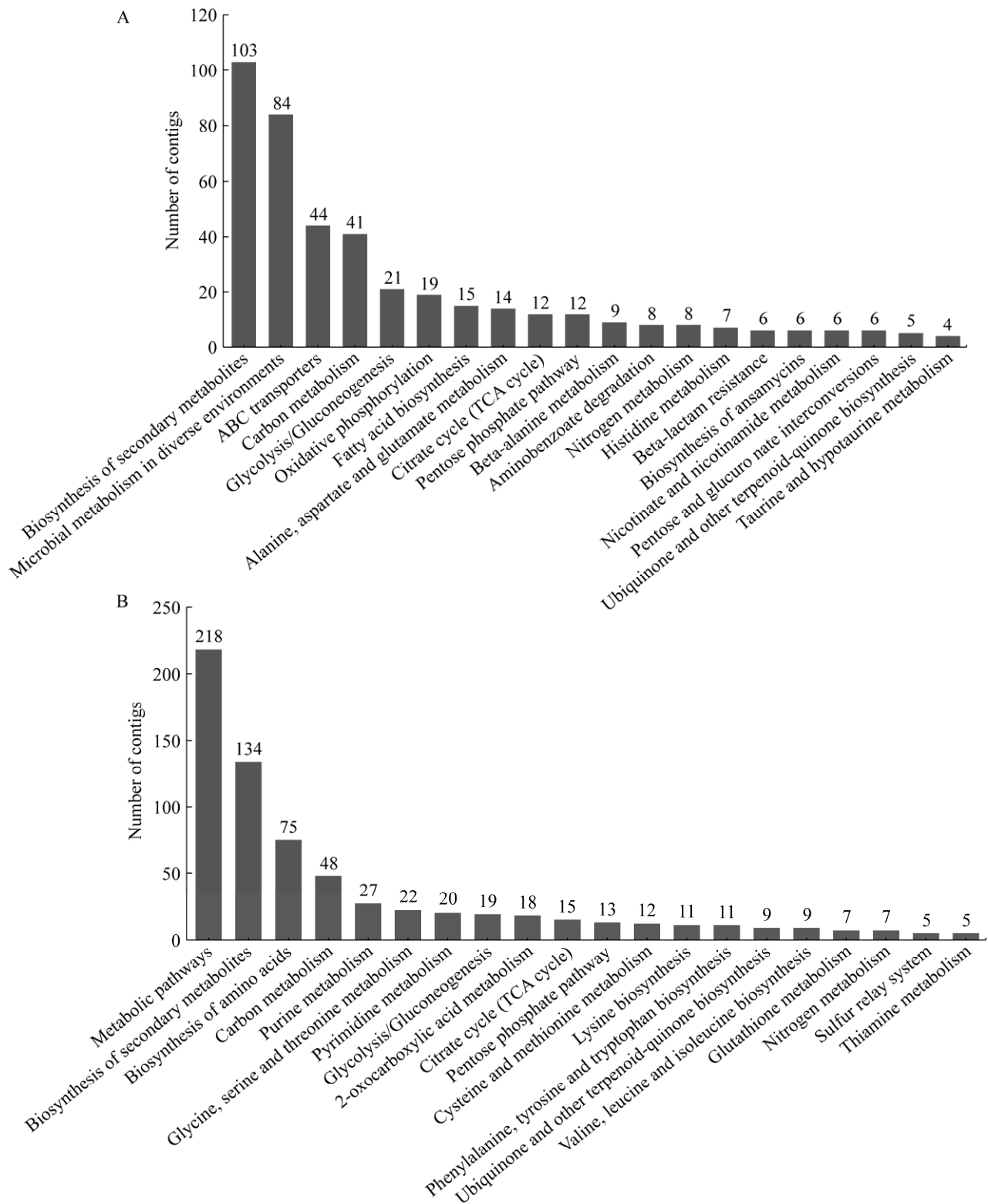


图 7 添加 FeSO_4 后上调基因的 KEGG 通路富集分析

Figure 7 KEGG pathway enrichment analysis of up-regulated genes after addition of FeSO_4 . A: 100 mg vs. 1 mg. B: 1 000 mg vs. 1 mg.

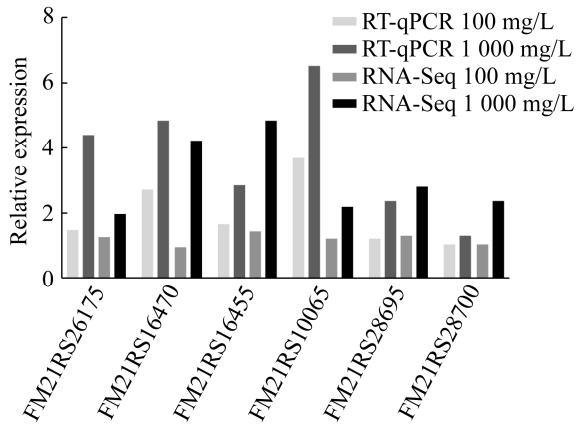


图 8 转录组数据的 RT-qPCR 验证
Figure 8 RT-qPCR validation of transcriptome data.

EPS 主要通过其羟基、羧基、氨基、磷基等官能团的静电作用与络合作用结合金属离子^[20]。通过能谱分析得知，随着 EPS 的增多，胞外聚合物的 N 元素占比减少、O 元素增加、C 元素基本保持稳定，推测该菌的胞外分泌物的主要成分为多糖。细菌响应金属离子胁迫分泌 EPS 容易被 SEM 观察，但较少通过 EDS 能谱图证实 EPS 对金属离子的络合。

4 结论

菌株 TRM45540 受到 Fe(III/II)离子胁迫后，触发了生物大分子分泌并输出到细胞表面形成

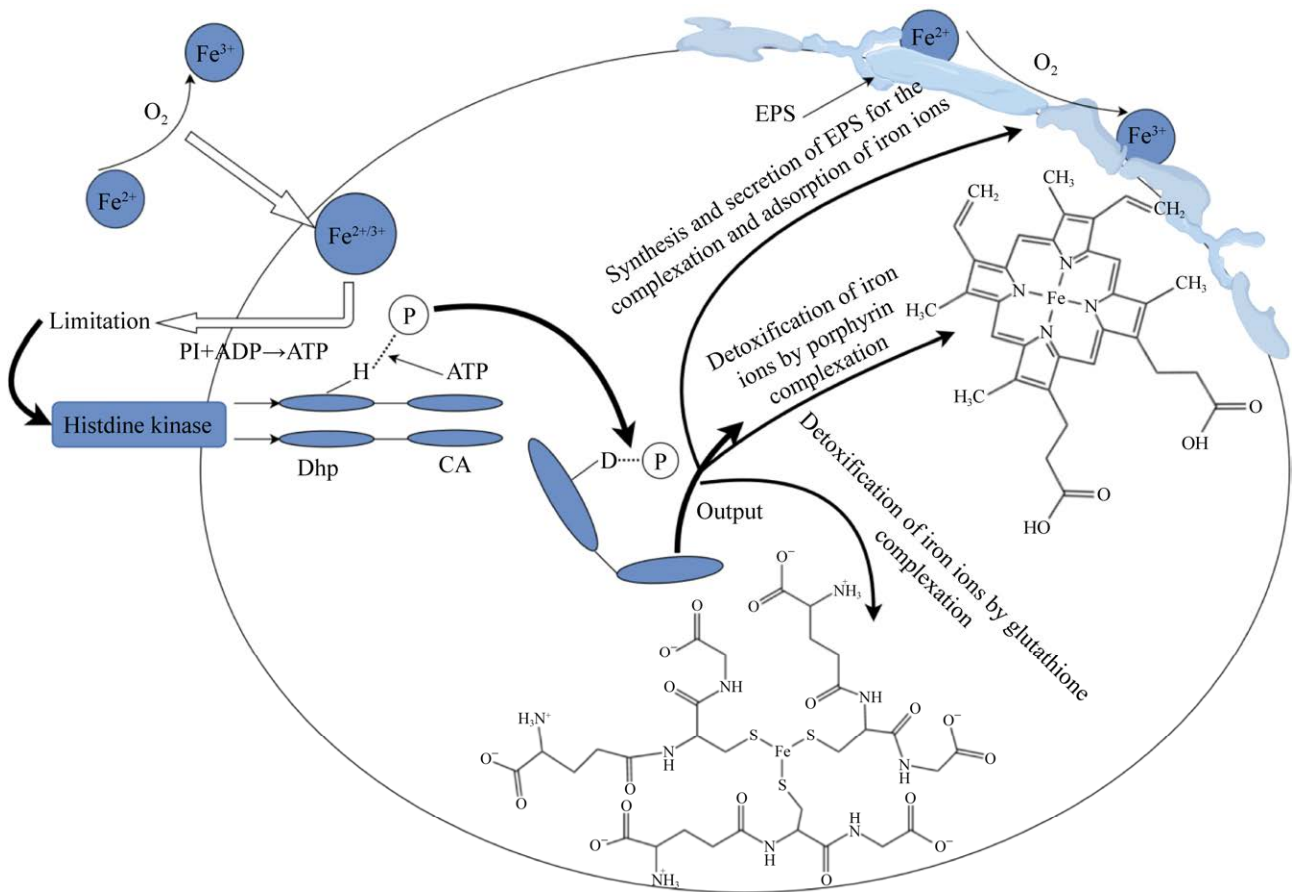


图 9 铁胁迫下菌株 TRM45540 产生的铁抗性响应机制
Figure 9 The iron resistance response mechanism of strain TRM45540 under iron stress.

多糖类 EPS, 菌体表面的 EPS 络合大量铁离子, 阻止铁离子内流。同时触发二元信号系统, 启动一系列耐受铁离子胁迫的响应机制, 酸性氨基酸大量表达, 络合铁离子的卟啉类化合物合成增加, 参与解毒的半胱氨酸和谷胱甘肽的生物合成加剧, 从而多途径减少高铁离子的伤害。

REFERENCES

- [1] 肖永红. 全面应对细菌耐药的公共卫生危机[J]. 临床药物治疗杂志, 2010, 8(3): 1-4.
XIAO YH. Comprehensive response to the public health crisis of bacterial resistance[J]. Clinical Medication Journal, 2010, 8(3): 1-4 (in Chinese).
- [2] 邹海杰. 铁离子调节革兰氏阴性菌外膜蛋白 OmpW 抗宿主氧化应激作用及机制的研究[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2012.
ZOU HJ. Iron ions regulated gram-negative bacteria OmpW to stand up host's oxidative stress action[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2012 (in Chinese).
- [3] KEZELE TG, ČURKO-COFEK B. Age-related changes and sex-related differences in brain iron metabolism[J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2601.
- [4] MELO AMP, TEIXEIRA M. Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: from cells and back[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016, 1857(3): 190-197.
- [5] JONES MA, HULME SD, BARROW PA, WIGLEY P. The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken[J]. Avian Pathology, 2007, 36(3): 199-203.
- [6] DUANGURAI T, INDRAWATTANA N, PUMIRAT P. *Burkholderia pseudomallei* adaptation for survival in stressful conditions[J]. BioMed Research International, 2018, 2018: 3039106.
- [7] SCHUBERT S, RAKIN A, HEESEMANN J. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects[J]. International Journal of Medical Microbiology: IJMM, 2004, 294(2/3): 83-94.
- [8] HANCOCK V, FERRIÈRES L, KLEMM P. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine[J]. Microbiology, 2008, 154(Pt 1): 167-175.
- [9] OH E, ANDREWS KJ, JEON B. Enhanced biofilm formation by ferrous and ferric iron through oxidative stress in *Campylobacter jejuni*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1204.
- [10] JEON J, KIM H, YUN JE, RYU S, GROISMAN EA, SHIN D. RstA-promoted expression of the ferrous iron transporter FeoB under iron-replete conditions enhances Fur activity in *Salmonella enterica*[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(22): 7326-7334.
- [11] RAJASEKARAN MB, NILAPWAR S, ANDREWS SC, WATSON KA. EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport[J]. BioMetals, 2010, 23(1): 1-17.
- [12] 黄宁. *Cupriavidus gilardii* CR3 对铜胁迫的响应机制研究[D]. 长春: 东北师范大学博士学位论文, 2019.
HUANG N. The response mechanism of *Cupriavidus gilardii* CR3 to copper stress[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Northeast Normal University, 2019 (in Chinese).
- [13] LUO XX, KAI L, WANG Y, WAN CX, ZHANG LL. *Streptomyces luteus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(3): 543-547.
- [14] 杨帅. 铁胁迫及强启动子 A4 插入对黄色链霉菌 TRM45540 次生代谢的影响[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2019.
YANG S. Effects of iron stress and strong promoter A4 insertion on the secondary metabolism of *Streptomyces luteus* TRM45540[D]. Alaer: Master's Thesis of Tarim University, 2019 (in Chinese).
- [15] CHEN J, YIN CQ, JIN J, WU K, YU ZM, DENG CX. Characteristics of different molecular weight EPS fractions from mixed culture dominated by AnAOB and

- their role in binding metal ions[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(6): 5491-5500.
- [16] SHAMEER S. Biosorption of lead, copper and cadmium using the extracellular polysaccharides (EPS) of *Bacillus* sp., from solar salterns[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 194.
- [17] NAIK MM, PANDEY A, DUBEY SK. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B[J]. *Biodegradation*, 2012, 23(5): 775-783.
- [18] 金睿男, 王小雨, 林雪, 霍明昕. 胞外聚合物及其对重金属吸附作用的研究进展[J]. *工业水处理*, 2019, 39(1): 8-13.
- JIN RN, WANG XY, LIN X, HUO MX. Research progress in the extracellular polymeric substances and their adsorption effects on heavy metals[J]. *Industrial Water Treatment*, 2019, 39(1): 8-13 (in Chinese).
- [19] HUANG N, MAO J, ZHAO Y, HU MZ, WANG XY. Multiple transcriptional mechanisms collectively mediate copper resistance in *Cupriavidus gilardii* CR3[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(8): 4609-4618.
- [20] 袁宇杰, 杨英, 储明, 李卫华, 程晓蕾, 王吉龙. 胞外聚合物对重金属及抗生素吸附研究进展[J]. *水处理技术*, 2022, 48(5): 24-28.
- YUAN YJ, YANG Y, CHU M, LI WH, CHENG XL, WANG JL. Advances in adsorption of heavy metals and antibiotics by extracellular polymers[J]. *Technology of Water Treatment*, 2022, 48(5): 24-28 (in Chinese).