

研究报告

Sigma B 对沙福芽孢杆菌锰胁迫响应及运动性和芽孢形成的影响

付雨婷¹, 韦永琴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 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

付雨婷, 韦永琴, 牛熙, 黄世会, 王嘉福, 冉雪琴. Sigma B 对沙福芽孢杆菌锰胁迫响应及运动性和芽孢形成的影响[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3084-3097.

FU Yuting, WEI Yongqin, NIU Xi, HUANG Shihui, WANG Jiafu, RAN Xueqin. Effects of sigma B on the manganese stress response, motility, and sporulation of *Bacillus safensis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3084-3097.

摘要:【背景】Sigma B (SigB)是 RNA 聚合酶的辅因子, 决定特异性转录, 在芽孢杆菌响应高温等环境胁迫过程中起作用。研究发现沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*) ST7 *sigB* 基因在锰胁迫时表达上调, 可能参与锰的应答过程, 其分子调节机制需要进一步研究。【目的】揭示 *sigB* 在沙福芽孢杆菌响应锰胁迫中的调节作用。【方法】以沙福芽孢杆菌 ST7 为起始菌株, 采用同源重组单交换方法构建缺失突变株 $\Delta sigB$, 分析突变株对锰的耐受性、运动能力、生物膜形成能力和芽孢形成率等变化, 应用 RT-qPCR 分析突变菌株 $\Delta sigB$ 生物膜和芽孢相关基因 *spo0A*、鞭毛相关基因 *flgD* 的转录水平。【结果】经测序证明, 沙福芽孢杆菌 ST7 突变株 $\Delta sigB$ 中 *sigB* 基因的后半段被完整的卡那霉素抗性基因取代, *sigB* 表达量为 0, 并且对锰的耐受性下降; 相较于野生菌株, 突变株 $\Delta sigB$ 的浮游运动能力、生物膜形成能力和芽孢形成率降低, 鞭毛合成相关基因 *flgD* 的表达量上调, 而生物膜形成相关基因 *spo0A* 的表达量下调。【结论】*sigB* 基因可调控沙福芽孢杆菌鞭毛、芽孢生成和生物膜相关基因表达, 影响菌体的运动性和锰耐受性, 在响应锰胁迫过程中发挥重要作用。

关键词: 沙福芽孢杆菌; *sigB* 基因敲除; 生物膜; 运动性; 芽孢

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)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31960641) and the Guizhou Provincial Science and Technology Innovation Talent Team Project (Qiankehe Platform Talent [2019]5615).

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

Received: 2024-11-25; Accepted: 2025-01-26; Published online: 2025-02-24

Effects of sigma B on the manganese stress response, motility, and sporulation of *Bacillus safensis*

FU Yuting¹, WEI Yongqin¹, NIU Xi¹, HUANG Shihui², WANG Jiafu^{*1}, RAN Xueqin^{*2}

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

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

Abstract: [Background] Sigma B (SigB) is an RNA polymerase cofactor that determines specific transcription, playing a role in the responses of *Bacillus* to environmental stress conditions such as high temperatures. Studies have shown that *sigB* in *B. safensis* ST7 is upregulated under manganese stress, which indicated that SigB may be involved in the manganese response. However, its molecular regulatory mechanism needs further investigation. [Objective] To reveal the regulatory role of *sigB* in the response of *B. safensis* ST7 to manganese stress. [Methods] A *sigB*-deleted mutant $\Delta sigB$ was constructed by homologous recombination (single-switching method) with *B. safensis* ST7 as the starting strain. Changes in tolerance to manganese, motility, biofilm formation, and sporulation rate of the mutant were analyzed, and the transcript levels of the biofilm- and spore-associated gene *spo0A* and the flagellum-associated gene *flgD* in $\Delta sigB$ were determined by RT-qPCR. [Results] The sequencing results demonstrated that the last part of *sigB* was replaced by a kanamycin resistance gene in $\Delta sigB$ without *sigB* expression. Compared with the wild type, $\Delta sigB$ showed decreases in the tolerance to manganese, swimming motility, biofilm formation, and sporulation rate. In addition, the deletion of *sigB* up-regulated the expression of *flgD* while down-regulating the expression of *spo0A*. [Conclusion] The results suggest that *sigB* changes the motility and manganese sensitivity of *B. safensis* by regulating the expression of genes associated with flagellum, sporulation, and biofilm formation to participate in the response to manganese stress.

Keywords: *Bacillus safensis*; *sigB* deletion; biofilm; motility; sporulation

细菌基因表达调控的核心过程主要发生在转录水平,其关键步骤在于 RNA 聚合酶介导的转录起始阶段;该酶由核心酶($\alpha 2$, β , β' , ω)以及 1 个可独立分离的 σ 亚基组成^[1]。 σ 亚基,又称 σ 因子,是 RNA 聚合酶转录特异性的关键,它通过识别 DNA 模板上特异的核心启动子序列,进而调控基因表达;绝大部分的细菌都包含多种 σ 因子,它们可以选择性地与 RNA 核心酶结合,形成各种不同的全酶,并能识别各种不同的启动子序列^[2]。Sigma B (SigB)因子是由 *sigB* 基因所编码的,是革兰氏阳性菌在面对环境压力时的主要响应调节因子,它在芽孢杆菌属

(*Bacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和李斯特氏菌属(*Listeria*)等低 G+C 含量的革兰氏阳性细菌中广泛存在^[3]。当细菌处于环境压力和营养被限制时,可激活 *sigB* 重编程细胞的转录和翻译机制,合成有助于细菌存活的蛋白质,协助细菌在恶劣环境下生存^[4]。芽孢杆菌转录因子 SigB 能特异性识别靶基因的保守序列(KTTTW-N12-17-GGGWAW, K 表示 G/T, W 表示 A/T, N 表示 ACTG 任意碱基),从而调控特定基因的转录^[5]。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)介导特定基因的表达,如过氧化氢酶基因(*katB*, *katX*)、修复氧化损伤的基因(*ohrB*)、渗透抗性

相关基因(*opuD*, *opuE*, *yerD*)、耐热应激基因(*clpC*, *clpP*)、耐冷应激基因(*gsiB*)、应激相关基因(*ctc*)、芽孢形成反应基因(*spo0E*)等,有助于枯草芽孢杆菌应对低 pH、高渗透压、高温、低温、氧化环境、乙醇和高胆汁酸盐等环境胁迫^[4,6]。地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) SigB 通过调控具有核酸内切酶活性的基因 *mcrA*、Na/溶质同向转运基因 *bli02212*、精氨酸酶同源基因 *bli00198* 等的表达,应对乙醇胁迫和热应激^[7-8]。蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) SigB 可调节编码超氧化物歧化酶基因 *sodA2*、编码芽孢外壳基因 *gerQ*、编码细菌铁蛋白基因 *orf4*、硫胺素生物合成基因 *thiG* 应对乙醇、酸、热、氧化应激和葡萄糖饥饿^[9-11]。这些研究表明, SigB 因子作为转录的全局调控者,能够调节大量基因的表达,以应对环境胁迫和胞内外变化,确保细胞在不利条件下的生存与适应。

沙福芽孢杆菌(*B. safensis*) ST7 是一种能够在高浓度锰等极端环境中生存的微生物,其可

能通过改变氧化、代谢、转运蛋白的运输作用、芽孢形成以及鞭毛合成等方式适应锰胁迫,转录组测序证明,在 250 mg/L 锰胁迫下,该菌株的 *sigB* 基因表达显著上调,这提示 *sigB* 基因可能在锰的应答过程中发挥重要作用^[12],其分子调节机制需要进一步研究。为了揭示 *sigB* 基因在沙福芽孢杆菌锰胁迫响应中的调节作用,本研究利用同源重组技术,敲除沙福芽孢杆菌 *sigB* 基因,研究 *sigB* 基因敲除后细菌的生长、生物膜形成能力、运动性和芽孢生成变化,检测鞭毛、芽孢和生物膜形成相关基因的表达,以期阐明 SigB 因子在沙福芽孢杆菌抵抗锰胁迫中的作用机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究所用菌株和质粒列于表 1,其中沙福芽孢杆菌 ST7 分离自贵州松桃县寨英镇锰冶炼区^[13]。引物信息详见表 2。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain and plasmid	Relevant phenotypes and characteristic	Source
ST7	Wild-type of <i>Bacillus safensis</i> strain	[13]
$\Delta sigB$	<i>sigB</i> gene mutant strain of <i>B. safensis</i>	This study
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Host for plasmids	[14]
pPIC9K	Shuttle vector contains the kanamycin resistance gene	[14]

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>sigB</i> -up-F	CGGGATCCCGCTCGTCGGTAAATCAT	350
<i>sigB</i> -up-R	CGTTCGTAGCCCTCTTCCTG	
<i>sigB</i> -down-F	CAGGAAGAGGGCTACGAACGGAGCTGCATGTGTC	2 183
<i>sigB</i> -down-R	CGGGATCCGTAGGTGGACCAAGTTGG	
<i>sigB</i> -F3	CGGGATCCCGCTCGTCGGTAAATCAT	970
<i>sigB</i> -R3	AGACTATCTCGGTTATGACAG	
<i>sigB</i> -qF	CAACAGAGACACAGAAATCACC	149
<i>sigB</i> -qR	ACTTCCTTCAGAATCAGCCT	
<i>flgD</i> -qF	ACAGGCGAAATGGATGCAGA	162
<i>flgD</i> -qR	CGCTGAAAAATGCGTGTTGA	
<i>spo0A</i> -qF	GCGTGGCGTATAATGGTCAGGAAT	117
<i>spo0A</i> -qR	GGAGGCGTTCTAGTACAGCAAGAC	

GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点。

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

1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基、蛋白胨酵母膏完全培养基 (peptone yeast extract complete medium, PYCM) 参考文献[13]配制; 含有甘油和锰的 LB 培养基(LB glycerol MnCl₂, LBGM) (g/L): LB 培养基中加入 1%甘油和 0.1 mmol MnSO₄; 复苏培养基参考文献[14]配制。

BamH I 限制性内切酶, New England Biolabs 公司; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)和 4-羟乙基哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES] 缓冲液, 上海碧云天生物技术股份有限公司; RNA 提取试剂盒、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒, 普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 2×Universal SYBR Green qPCR Master Mix、DL2000 DNA marker 和 DL5000 DNA marker、24 孔细胞培养板, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 卡那霉素 A, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 白贝林蓝 I (leucoberbelin blue I, LBB), 上海易恩化学技术有限公司。PCR 仪、荧光定量 PCR 仪、电穿孔仪和凝胶成像系统, 伯乐生命医学产品(上海)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。

1.3 sigB 敲除菌株的构建

参照朱忠梅等^[14]的方法利用重叠延伸 PCR 技术两步构建敲除片段, 酶切后转化至沙福芽孢杆菌 ST7 感受态细胞中, 通过一次同源单交换, 在目的基因内部插入一段含有筛选标记基因的序列, 实现目的基因的敲除。首先, 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒和高纯度质粒小提试剂盒参考说明书提取菌株基因组, 利用 sigB-up-F/sigB-up-R 引物和 sigB-down-F/sigB-down-R 引物分别从沙福芽孢杆菌 ST7 和质粒 pPIC9K 基因组中扩增出长度分别为 350 bp 和 2 183 bp 的上、下游同源臂片段。PCR 反应体系和条件参考文献[15]。用琼脂糖凝胶 DNA 回收

试剂盒对上、下游同源臂进行纯化回收, 并将回收产物于-20 °C保存。利用正向引物 sigB-up-F 和反向引物 sigB-down-R 采用重叠延伸 PCR^[15]技术进行扩增, 获得 2 533 bp 的融合片段 kan^R-ΔsigB。将重组片段纯化回收后经限制性内切酶 BamH I 酶切 4 h, 经 BamH I 酶切割后形成交错切口的黏性末端, 连接后形成环化的融合片段 kan^R-ΔsigB。参考文献[14]方法制备沙福芽孢杆菌 ST7 感受态细胞, 将环化融合片段 kan^R-ΔsigB 以电穿孔法转入 ST7 感受态细胞, 加入 500 μL 复苏培养基, 37 °C、180 r/min 培养 4 h 后 8 000 r/min 离心 5 min, 除去上清, 保留 100 μL 培养液重悬细胞, 用含 5 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板进行筛选证实 sigB 片段中插入了抗性基因, 通过菌落 PCR 检测, 挑选阳性克隆, 提取菌株基因组, 使用引物 sigB-F3/sigB-R3 验证 PCR 片段的大小, 测序正确的克隆作为突变株 ΔsigB。

1.4 基因表达的荧光定量 PCR 检测

将培养过夜的野生菌株 ST7 以 2%接种量转接于 100 mL LB 液体培养基中, 培养至 OD₆₀₀ 值达到 1.0 后迅速将培养物分装至预先添加了终浓度为 250 mg/L 锰(II)溶液的 PYCM 培养基中 28 °C、160 r/min 培养 2–24 h, 每隔 4 h 取 1 次菌液, 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min, 去除上清, 并用预冷的 PBS 缓冲液重悬, 洗涤后提取菌体总 RNA 并反转录为 cDNA, 采用特异性引物 sigB-qF/sigB-qR (表 2), 以 16S rRNA 为内参基因进行荧光定量 PCR。反应体系(20 μL): 2×Universal SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL, sigB-qF 和 sigB-qR (10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 1.0 μL, ddH₂O 补足 20 μL。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 45 个循环后立即进行熔解曲线分析, 验证引物扩增的特异性。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因的相对表达量, 分析菌株 ST7 的 sigB 在不同培养时间的表达水平; 将野生株和突变株 ΔsigB 活化培养后按 2%接种量转接于含 250 mg/L 锰(II)的 PYCM 培养基中培养 12 h, 将两者 OD₆₀₀ 调为一致后, 提取菌体总 RNA, 方

法同前;以野生株的各基因表达量为1,分析突变株 $\Delta sigB$ 中 *spo0A* 和 *flgD* 的表达水平。

1.5 锰氧化能力测定

利用 LBB 试剂能特异性结合锰(IV)和锰(III)这一特点,测定样品中剩余的锰(II)含量^[16]。将培养至 OD_{600} 为 1.0 的菌株 ST7 按 1% 比例分别接种于无锰和含 250 mg/L 锰(II)的 PYCM 液体培养基中,28 °C、180 r/min 分别培养 2 h 和 24 h,随后,取 1 mL 菌液 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 HEPES 缓冲液洗涤并重悬,再加入 250 μ L 0.04% LBB 试剂,25 °C 暗室反应 30 min。酶标仪测定上述反应液的 OD_{620} 值,并记录颜色变化。

1.6 锰胁迫耐受性及生长曲线测定

将菌株 ST7 在 LB 固体培养基表面进行划线接种,37 °C 培养过夜,随后,挑取单菌落转移至 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养过夜。将培养过夜的细菌分别用新鲜的 PYCM 液体培养基按 1:10 比例依次稀释到不同梯度(10^{-1} – 10^{-6}),分别取 10 μ L 菌液点在添加 250 mg/L 锰(II)的 PYCM 固体培养基上,28 °C 培养 24 h 后,以野生菌株作为对照,测定突变株对锰的耐受性。按 1% 比例将菌株 ST7 分别接种于无锰和含 250 mg/L 锰(II)的 LB 液体培养基中,于 28 °C、180 r/min 条件下培养,每隔 4 h 测定 OD_{600} 值,绘制生长曲线。

1.7 生物膜形成能力测定

参照郭云学等^[17]的方法并作适当修改,首先将菌液用 LB 培养基培养过夜,移取 1 mL 培养至 OD_{600} =1.0 的新鲜菌液,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 1 mL LBGM 培养基洗涤 2 次后重悬。取 100 μ L 悬浮液分别与 1 900 μ L 无锰、含 250 mg/L 锰(II)的 LBGM 培养基混合后加入 24 孔细胞培养板进行培养,每个处理 3 个重复。30 °C 培养 48 h 后观察成膜情况,从孔板中吸出培养基,利用无菌水冲洗 2–3 次,以清洗未附着的菌体,待其在常温下自然风干后,滴加 1% 结晶紫染色剂,静置 20 min 着色,

最后,再次使用无菌水对染色后的生物膜进行冲洗,去除多余的染色剂。室温干燥,去除多余水分,加入乙醇-丙酮溶液(80:20)脱色 15 min。用酶标仪测定 OD_{595} 处的光密度值,用于生物膜的定量分析。

1.8 运动性测定

参照王旭东等^[18]的方法并作适当修改,为了评估应激条件下菌株的运动性,在含有 0.3% 琼脂的 PYCM 固体培养基上测定浮游运动;在含有 1.5% 琼脂的 PYCM 固体培养基上测定群集运动,将菌株培养至 OD_{600} =0.3,取 1 mL 菌液并向其加入 250 mg/L 锰(II)刺激 1 h,然后 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,弃上清液,将细菌重悬于 1 mL PBS 缓冲液中,以标准化初始接种水平,将 5 μ L 无锰和含 250 mg/L 锰(II)的重悬液滴到 PYCM 固体培养基中,在超净工作台中干燥,并在 28 °C 孵育过夜后对所有平板进行拍照,并测量菌落直径表示菌株运动能力。

1.9 芽孢形成率测定

按 1% 比例将 OD_{600} =1.0 菌株 ST7 和突变菌株 $\Delta sigB$ 分别接种于无锰和含 250 mg/L 锰(II)的 PYCM 培养基培养 3 d,分别取 1 mL 进行梯度稀释(10^{-1} – 10^{-6})后涂布于 LB 平板,28 °C 培养过夜,以菌落数为 100–300 个/平板为准,计算总细胞数(菌落数 $\times$ 稀释倍数);取剩余菌液于 65 °C 水浴加热,30 min 后吸取 100 μ L 进行梯度稀释,计算芽孢数(菌落数 $\times$ 稀释倍数)和芽孢形成率(芽孢数/总细胞数)。

1.10 统计分析

通过 IBM SPSS Statistics 26 统计分析工具对数据进行分析、并借助 GraphPad Prism 软件完成图表绘制;所有数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示;数据采用 Student's *t*-test 法比较不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *sigB* 基因在不同培养时间的表达量

为了探究 *SigB* 因子在不同生长阶段的生

理变化,对野生型菌株内 *sigB* 基因在各生长阶段的转录水平进行了测定。在无锰和有锰胁迫下, *sigB* 表达水平在对数生长期(2 h)和对数末期(20–24 h)时的表达量最高,而在对数中期(12 h)时的表达量最低(图 1A)。进一步利用 LBB 试剂检测菌体中锰(II)的含量, 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,蓝色越深表示菌株的氧化能力越强。在培养 2 h 时,溶液颜色较浅,说明菌体中锰(II)含量较高;培养 24 h 时溶液颜色加深(图 1B),说明锰(II)已被氧化为高价锰,菌体中锰(II)含量降低, OD_{620} 值代表其锰氧化能力,相比之下,24 h 时锰氧化能力上升了 62% (图 1C)。

2.2 $\Delta sigB$ 敲除株的构建及鉴定

利用同源重组方法构建基因缺失菌株,以沙福芽孢杆菌 ST7 的基因组 DNA 作为模板,用特异性引物 *sigB*-up-F 和 *sigB*-up-R 扩增 *sigB* 基因上游半段,电泳检测出 350 bp 条带(图 2A),成功获得 *sigB* 基因敲除所需的上游同源臂 *sigB1*;随后,以质粒 pPIC9K 为模板,采用引

物 *sigB*-down-F 及 *sigB*-down-R 进行 PCR 扩增(图 2B),电泳检测出 2 183 bp 条带,获得下游同源臂为卡那霉素抗性基因(*kan^R*),与预期相符。分别回收 *sigB1* 和 *kan^R* 片段为模板,以 *sigB*-up-F 和 *sigB*-down-R 为引物,采用重叠延伸 PCR 技术进行连接,获得融合片段 *kan^R- $\Delta sigB$* ,长度 2 533 bp (图 2C)。将酶切后环化的融合片段 *kan^R- $\Delta sigB$* 电转化沙福芽孢杆菌 ST7 感受态细胞,经卡那霉素筛选,用引物 *sigB*-F3 和 *sigB*-R3 对平板上生长的菌落进行验证,检测得到 970 bp 片段(图 2D),测序证实前半段 350 bp 与沙福芽孢杆菌参考基因组 *sigB* 相应序列的一致性为 100%,对应 *sigB* 基因的上半段,后半段包含完整的卡那霉素抗性基因(图 2E),表明环化的 *kan^R- $\Delta sigB$* 与野生型的 *sigB* 基因发生了同源重组,突变株 $\Delta sigB$ 的 *sigB* 基因编码区(coding region, CDS)不完整,翻译为蛋白的截短肽,导致 SigB 蛋白失活,获得突变菌株 $\Delta sigB$ 。RT-qPCR 结果显示,在突变株 $\Delta sigB$ 中未检测到 *sigB* 的表达,证明突变株中的 *sigB* 基因已被敲除(图 2F)。

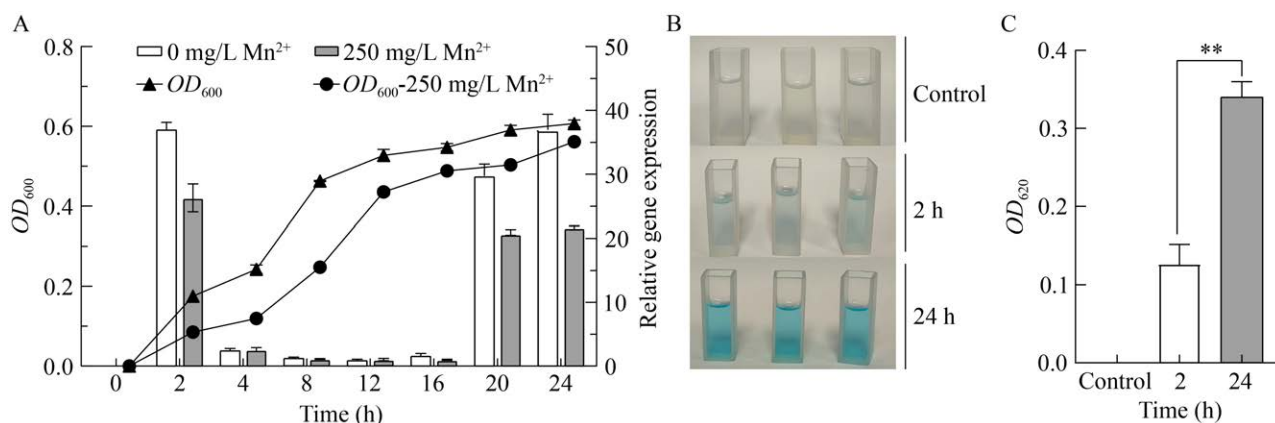


图 1 菌株 ST7 的 *sigB* 基因转录水平及锰氧化能力测定 A: *sigB* 基因在不同培养时间的表达量检测 (PYCM 培养基, 28 °C 培养)。B: LBB 法测定菌株 ST7 的锰氧化能力。C: 菌株 ST7 的锰氧化能力比较。Control: 无锰对照; 2 h、24 h: 表示菌株 ST7 在 PYCM 培养基中加锰(II)培养 2 h、24 h 时检测的锰氧化能力。

Figure 1 Determination of the transcriptional level of the *sigB* gene and manganese oxidation capacity of strain ST7. A: Detection of *sigB* gene expression at different culture times (PYCM medium, culture at 28 °C). B: Determination of the manganese oxidation capacity of strain ST7 by LBB method. C: Comparison of manganese oxidation ability of strain ST7. Control: No manganese control; 2 h, 24 h: Detection of the manganese oxidation capacity strain ST7 with manganese in PYCM for 2 h and 24 h. **: $P < 0.01$.

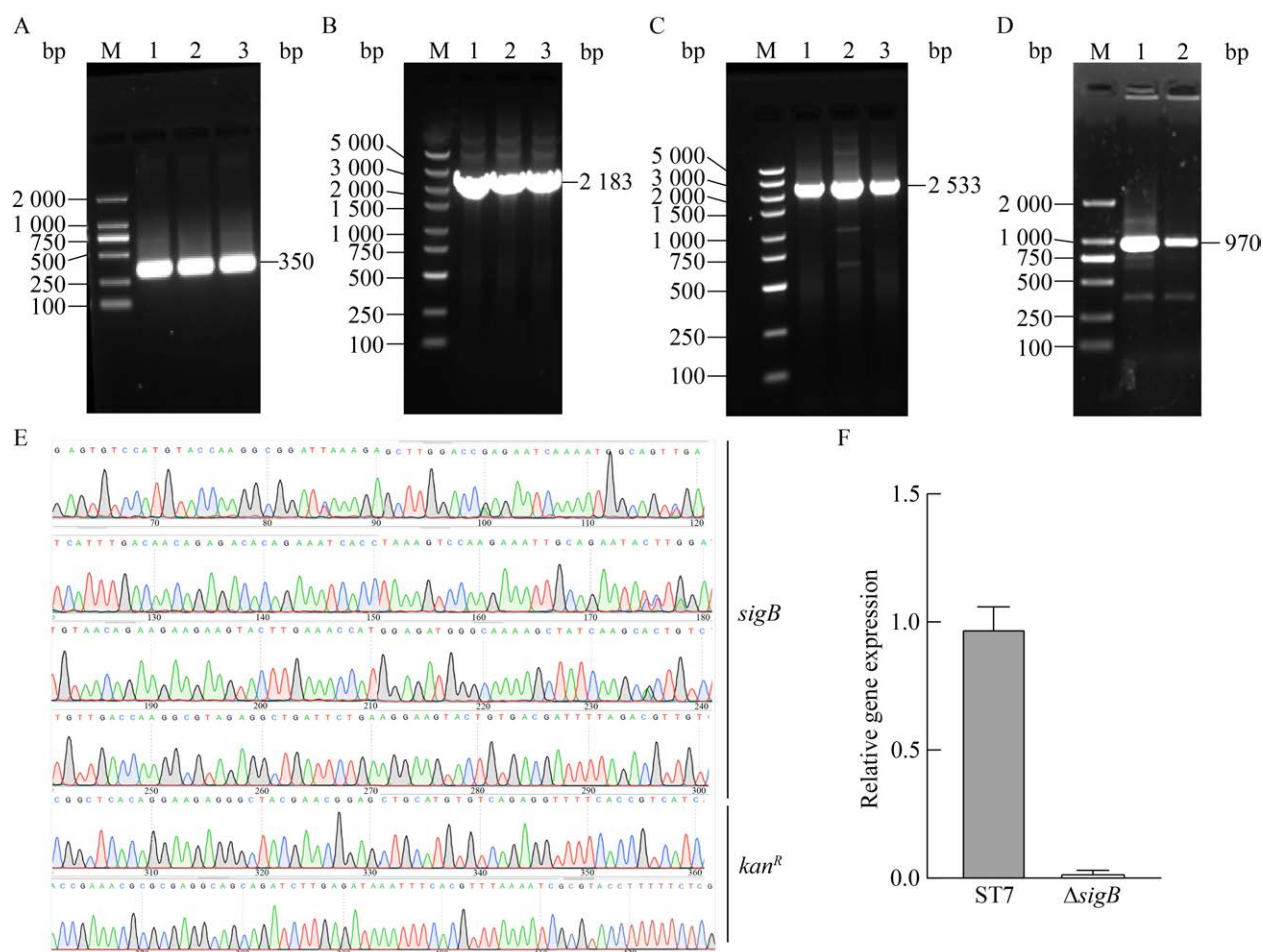


图2 同源重组敲除沙福芽孢杆菌 ST7 的 *sigB* 基因 A: 上游同源臂 *sigB* 基因前半段的扩增(M: DL2000 DNA marker; 1–3: *sigB* 基因片段)。B: 下游同源臂卡那霉素抗性基因 *kan^R* 的扩增(M: DL5000 DNA marker; 1–3: 卡那霉素抗性基因片段)。C: 重叠延伸 PCR 扩增, 获得融合片段 *kan^R-ΔsigB* (M: DL5000 DNA marker; 1–3: 重叠延伸 PCR 产物 *kan^R-ΔsigB*)。D: 突变株 *ΔsigB* 鉴定(M: DL2000 DNA marker; 1–2: 菌落 PCR 产物)。E: 突变株 *ΔsigB* 测序峰图。F: 突变株 *ΔsigB* 中 *sigB* 的表达。

Figure 2 Homologous recombination deletion of the *sigB* gene from *B. safensis* ST7. A: Amplification of the homology arm of *sigB* first part (M: DL2000 DNA marker; 1–3: *sigB* gene fragments). B: Amplification of kanamycin resistance gene (M: DL5000 DNA marker; 1–3: Kanamycin gene regions). C: The fusion fragment *kan^R-ΔsigB* of overlapping extension PCR amplification (M: DL5000 DNA marker; 1–3: The overlapped PCR products of *kan^R-ΔsigB*). D: Identification of mutant *ΔsigB* (M: DL2000 DNA marker; 1–2: The colony PCR products). E: Sequencing peak plot of mutant strain *ΔsigB*. F: The *sigB* expression detection of mutant strain *ΔsigB*.

2.3 *sigB* 影响沙福芽孢杆菌对锰耐受性

将培养过夜的野生株 ST7 和突变株 *ΔsigB* 分别用新鲜的 PYCM 液体培养基按 1:10 比例依次稀释到不同梯度(10^{-1} – 10^{-6}), 稀释度为 10^{-6} 时, 野生株 ST7 依然可见生长良好的清晰菌落,

LBB 检测溶液颜色较深(图 3A、3B), 而突变株 *ΔsigB* 菌落生长不良, 并且 LBB 检测菌体中高价锰含量时呈色较浅(图 3C、3D), 表明突变株 *ΔsigB* 对锰耐受性减弱, 并且锰氧化能力降低; 在无锰 PYCM 培养基中培养的野生株和突变株的生长

曲线无显著差异(图 3E), 表明非锰胁迫条件下 *sigB* 基因缺失对菌株 ST7 生长几乎无影响; 用含 250 mg/L 锰(II)的 PYCM 培养基进行培养, 在 36 h 前突变株 $\Delta sigB$ 的 OD_{600} 值显著低于野生株 ST7 (图 3F), 表明锰胁迫下 *sigB* 基因缺失对 ST7 生长有很大影响, 而 36 h 后突变株 $\Delta sigB$ 和野生株 ST7 的 OD_{600} 值之间差异不显著, 综上所述表明基因 *sigB* 缺失后沙福芽孢杆菌 ST7 对高浓度锰的耐受性下降。

2.4 *sigB* 调控沙福芽孢杆菌生物膜的形成

生物膜可以保护微生物免受极端环境的影响, 可以提高微生物对金属离子等不良条件的耐受性。比较沙福芽孢杆菌野生型和 $\Delta sigB$ 突变株的生物膜生成量, 有锰和无锰培养条件下野生株 ST7 表面均出现大量生物膜, 形成深而厚的褶皱(图 4A); 而突变株 $\Delta sigB$ 的生物膜分散且量少(图 4A)。无锰培养基中野生株 ST7 和

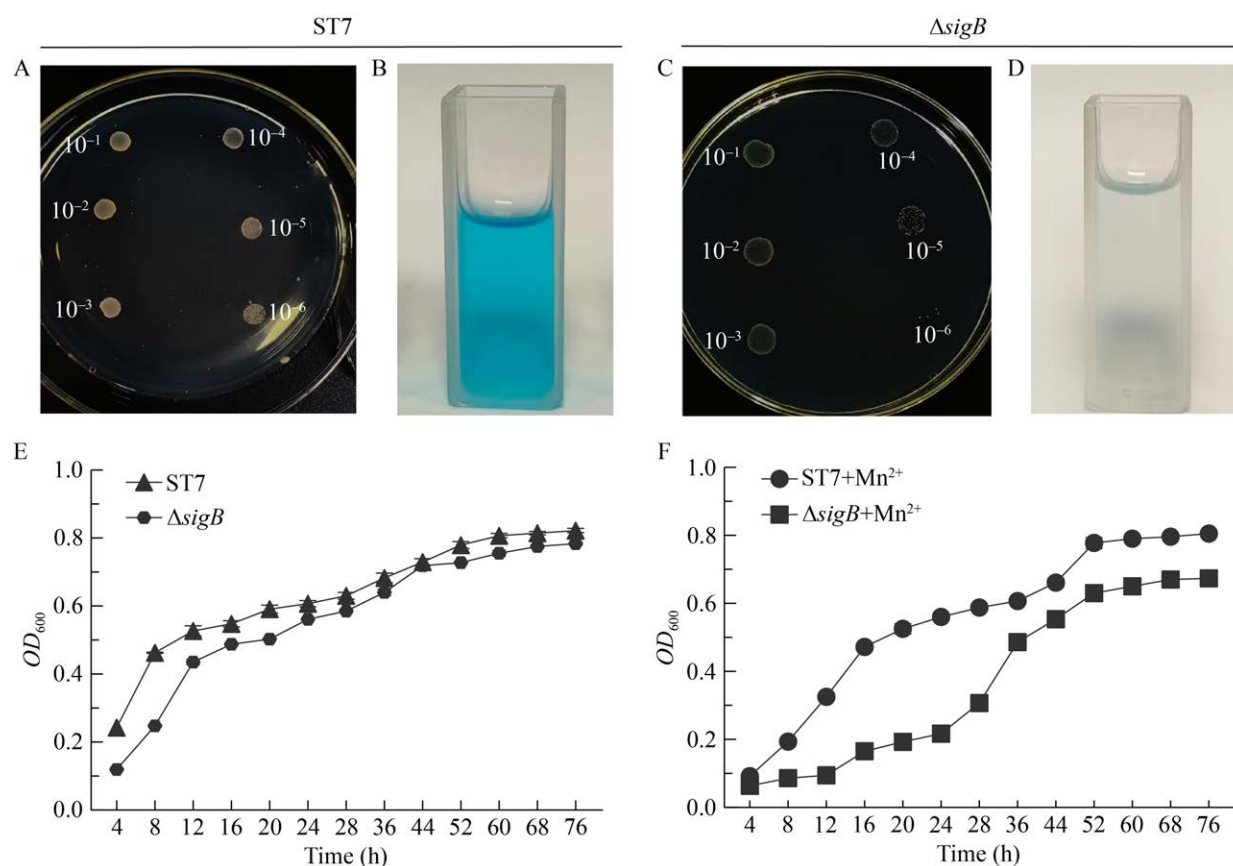


图 3 菌株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 对锰耐受性试验及生长曲线测定 A: 250 mg/L 锰(II)条件下 PYCM 固体培养基中 28 °C 培养 24 h 野生株 ST7 的耐受性检测。B: LBB 法测定野生株 ST7 锰氧化能力的颜色反应。C: 突变株 $\Delta sigB$ 对锰耐受性试验。D: LBB 法测定突变株 $\Delta sigB$ 锰氧化能力的颜色反应。E: 非锰胁迫条件下菌株生长曲线。F: 锰胁迫条件下菌株生长曲线。

Figure 3 Manganese tolerance test and growth curve determination of strain ST7 and mutant $\Delta sigB$. A: Detection of tolerance of wild strain ST7 cultured in PYCM solid medium at 28 °C for 24 h under 250 mg/L manganese condition. B: Determination of Color response of manganese oxidation capacity of wild ST7 by LBB method. C: Manganese tolerance test of mutant strain $\Delta sigB$. D: Determination of color response of manganese oxidation capacity of mutant strain $\Delta sigB$ by LBB method. E: Growth curves of strains under non-manganese stress conditions. F: Growth curves of strains under manganese stress.

突变株 $\Delta sigB$ 生物膜生成量分别为 1.64 和 1.20, 突变株 $\Delta sigB$ 生物膜生成量下降了 27% (图 4B); 有锰培养基中野生株和突变株 $\Delta sigB$ 生物膜生成量分别为 1.50 和 0.65, 突变株 $\Delta sigB$ 生物膜生成量下降了 57% (图 4B)。表明锰胁迫条件下, 突变株生物膜生成能力降低, 提示 *sigB* 可调控沙福芽孢杆菌生物膜的形成。

2.5 *sigB* 调控菌株 ST7 的运动性

芽孢杆菌属有鞭毛, 具有运动能力。细菌的运动性主要包括浮游运动 (swimming motility) 和群集运动 (swarming motility) 这 2 种方式^[19]。在无锰和有锰的培养基中, 野生株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 的群集运动范围的直径差异不大 (图 5A、5B)。突变株 $\Delta sigB$ 的浮游运动范围发生明显变化 (图 5C)。在无锰培养基中, 野生株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 浮游运动范围的直径平均为 1.90 cm 和 1.30 cm, 突变株 $\Delta sigB$ 浮游运动能力下降了 32% (图 5D); 在添加锰的培养基中, 野生株 ST7 和 $\Delta sigB$ 突变株浮游运动直径平均为 2.30 cm 和 1.20 cm, 突变株 $\Delta sigB$ 浮游运动能力下降了 48% (图 5D)。表明 *sigB* 基因缺失后不影响菌株 ST7 的群集运动能力, 但细菌的浮游运动能力下降。

2.6 *sigB* 调控菌株 ST7 的芽孢形成

当营养消耗至底限时, 细菌可形成芽孢维持生命。菌株 ST7 和突变体 $\Delta sigB$ 在无锰和添加锰(II)的 PYCM 培养基中培养, 直至释放超过 90% 的芽孢 (约 3 d), 然后进行芽孢计数分析。在芽孢计数之前, 通过 65 °C 水浴热处理 30 min 来消除营养体细胞, 加热前的细胞数记录为总细胞数, 而热处理后存活的细胞数被视为芽孢数。结果显示无锰培养下突变株 $\Delta sigB$ 芽孢形成率与野生株 ST7 相比下降了 88%, 而有锰培养下突变株 $\Delta sigB$ 芽孢形成率与野生株 ST7 相比下降了 99%, 并且锰(II)对野生株 ST7 的芽孢形成无显著影响, 而锰(II)对突变株 $\Delta sigB$ 的芽孢形成有显著影响 (图 6), 以上结果说明 *sigB* 基因对芽孢形成有影响, 但锰胁迫下 *sigB* 基因缺失对芽孢形成的影响更为显著。

2.7 突变株 $\Delta sigB$ 的 *flgD*、*spo0A* 基因表达变化

为了解析 *sigB* 基因调节鞭毛、生物膜和芽孢形成的机制, 采用荧光定量 PCR 方法检测 $\Delta sigB$ 突变株鞭毛合成相关基因 *flgD* 和生物膜、芽孢形成相关基因 *spo0A* 的表达量。在锰胁迫

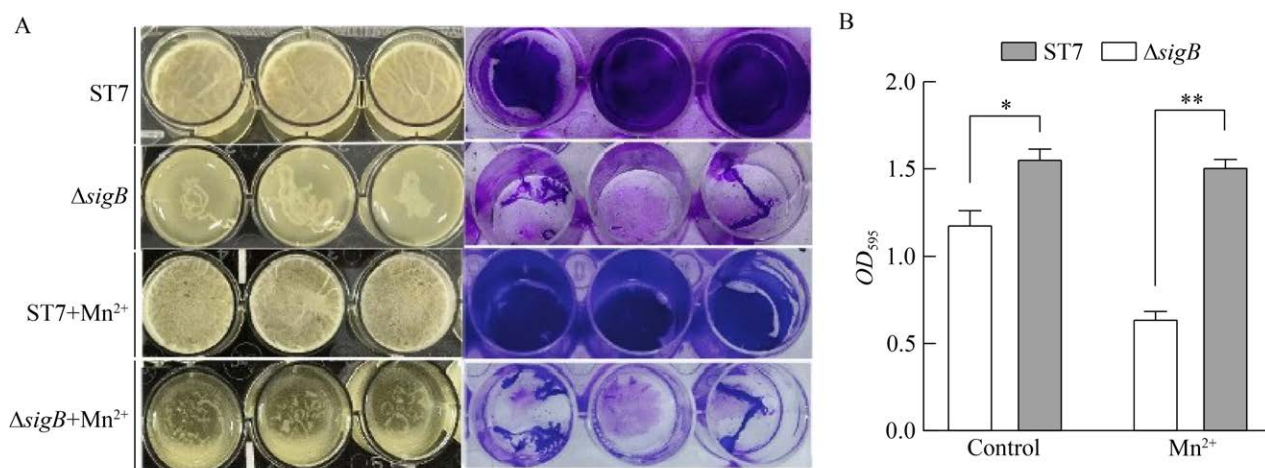


图 4 野生株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 生物膜生成量 A: LBGM 培养基中测定生物膜生长情况(左)和结晶紫染色生物膜(右)。B: 生物膜形成能力比较。

Figure 4 Biofilm formation of wild strain ST7 and mutant strain $\Delta sigB$. A: Biofilm growth measured in LBGM medium (left) and crystal violet stained biofilm (right). B: Comparison of biofilm formation capacity. t-test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

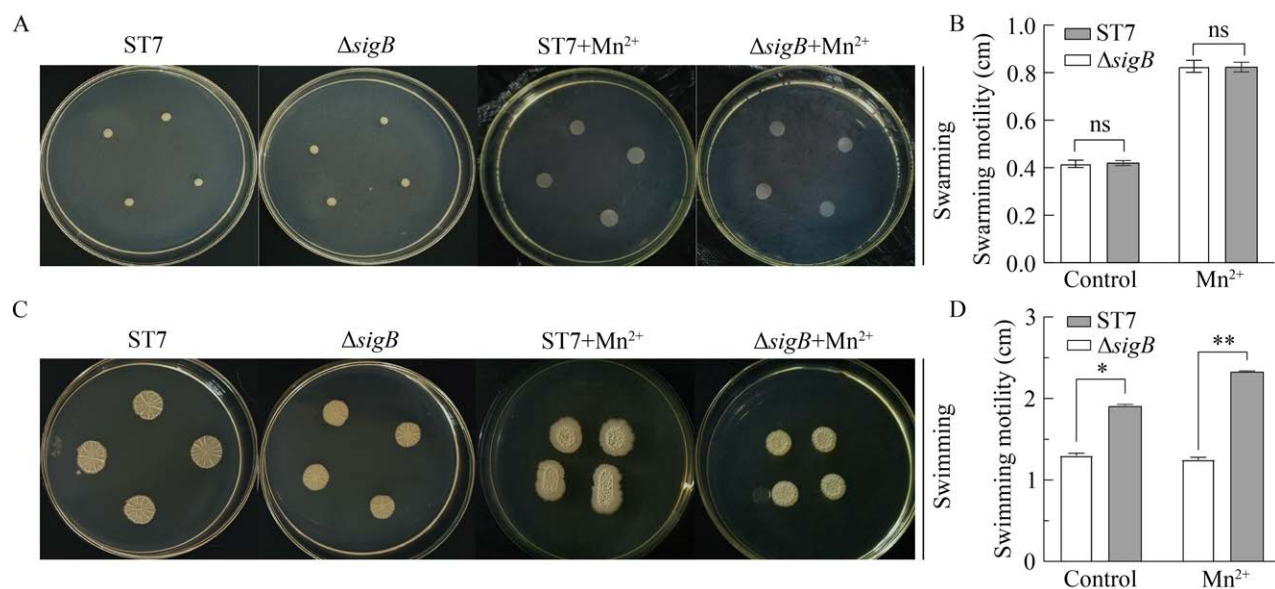


图 5 野生株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 运动能力检测 A: PYCM 软琼脂平板上检测菌株的群集运动能力。B: 群集运动能力直径比较。C: PYCM 软琼脂平板上检测菌株的浮游运动能力。D: 浮游运动能力直径比较。

Figure 5 Motility detection of wild strain ST7 and mutant strains $\Delta sigB$. A: Swarming motility of strains on PYCM soft agar plates. B: Comparison of swarming motility. C: Swimming motility of strains on PYCM soft agar plates. D: Comparison of swimming motility. t-test. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

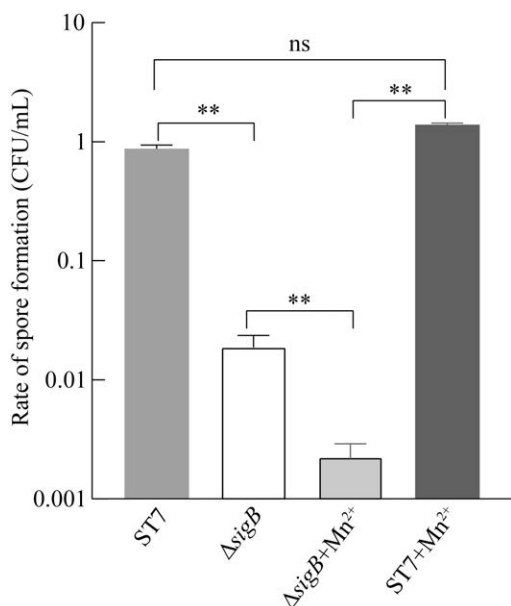


图 6 野生株 ST7 和突变株 $\Delta sigB$ 芽孢形成率测定

Figure 6 Sporulation rate of wild strain ST7 and mutant $\Delta sigB$. ns: $P > 0.05$; **: $P < 0.01$.

下培养 12 h 时, 相较于野生株, $\Delta sigB$ 突变株的 *flgD* 基因表达量上调了 6 倍, *spo0A* 基因的表达量下调了 2 倍, 表明 *sigB* 基因缺失可促进鞭毛相关基因的表达, 抑制生物膜形成相关基因的表达(图 7)。

3 讨论

SigB 因子在应激等压力暴露时被激活, 参与细菌营养细胞和固定细胞的适应性反应^[20]。沙福芽孢杆菌 ST7 在锰胁迫下 *sigB* 基因被诱导表达(图 1A), 并且敲除菌株 ST7 的 *sigB* 基因对锰的耐受力下降(图 3C), 表明 SigB 因子参与沙福芽孢杆菌 ST7 菌株的锰适应性反应。锰胁迫促进 ST7 菌株 *sigB* 基因的表达, 可能与 Mn(II) 诱导了菌株 ST7 的激酶 *rsbT* 基因表达有关^[12,21]。有研究证明 SigB 因子的调节功能受 RsbW 和 RsbV 的调控, 其中 RsbW 为反式 σ 因子, 形成 RsbW-SigB 复合物, 特异性结合并抑制 SigB 的

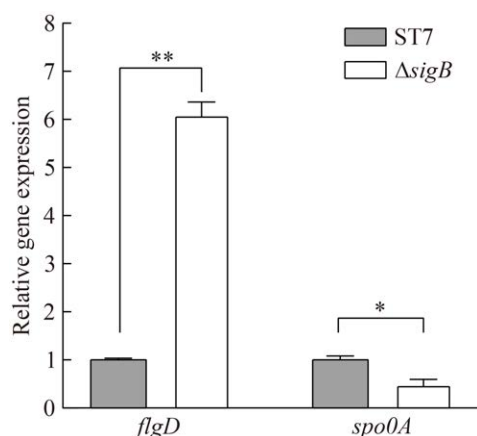


图7 突变株 $\Delta sigB$ 的 *flgD*、*spo0A* 表达水平

Figure 7 The expression levels of genes *flgD* and *spo0A* in mutant strain $\Delta sigB$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

功能^[22]。RsbT 蛋白可使 RsbV-Pi 去磷酸化, 释放出的磷酸酶 RsbV 得以结合 RsbW, 游离 SigB 增加, 与 RNA 聚合酶结合形成全酶诱导应激相关的靶基因表达^[23], 使得菌株在锰胁迫条件下得以生存。进一步分析锰胁迫时, 沙福芽孢杆菌不同生长阶段基因的表达变化, 得出 *sigB* 基因在菌株 ST7 进入对数生长期(2 h)和对数生长末期(20–24 h)时的表达量最高(图 1A), 与此相似, 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) *sigB* 基因表达在指数生长期末进入稳定期前表达量最高^[24]。应用 RT-qPCR 和 immuno-blot (使用 SigB 特异的多克隆抗体)研究单核增生李斯特氏菌(*L. monocytogenes*)生长过程中 SigB 因子的转录表达时发现, 在 *L. monocytogenes* 生长到 3–4 h 时 *sigB* 基因大量表达, 生长到 8 h 时 *sigB* 基因表达下降^[25]。采用 LBB 法测定 ST7 菌体中的高价锰含量, 提示对数中期后(24 h)的胞内溶液中高价锰的含量增加明显高于 2 h, 表明菌株 ST7 的锰氧化能力增加(图 1B), 将较多的 Mn(II)氧化成了高价锰, 胞内有毒的 Mn(II)浓度降低, 有助于 *sigB* 基因的表达。但 2 h 时 *sigB* 基因的高表达原因未知。在无锰胁迫下 *sigB* 基因对锰的生长无影响, 同样, 在炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)中 *sigB* 基因缺失对菌

株生长无影响^[26], 说明 *sigB* 基因的缺失并未影响其正常的生长代谢; 而在锰胁迫下突变株 $\Delta sigB$ 进入对数期的时间变慢, 可能是 *sigB* 基因缺失后细菌无法感知外界环境变化且锰氧化能力降低, 培养基中高浓度的有毒锰抑制菌株生长; 而 36 h 后与野生株相比其生物量差异较小, 可能是培养基中锰(II)被氧化, 有毒锰浓度下降, 细菌生长速率变快(图 3), 但具体原因有待研究。与此类似, *L. monocytogenes* 加入氨苄西林青霉素后, 突变株 $\Delta sigB$ 的生长立即出现迟滞现象, 活细胞量减少, 生长曲线呈下降趋势, 经过一段时间的适应后, 耐药的细菌细胞恢复生长, 曲线上升^[27]。以上研究说明 SigB 因子可能在细菌快速生长过程中对环境变化进行调节。

受到环境胁迫时, 细菌可采取一系列的响应策略: 例如改变运动形式、产生生物膜和形成芽孢等^[28]。饥饿或胁迫开始发生时, 枯草芽孢杆菌放弃自由运动, 形成串联的链式形态, 分泌胞外基质, 形成生物膜, 胁迫持续时, 枯草芽孢杆菌进入芽孢发生过程^[29]。受到锰胁迫时, 野生菌株 ST7 的浮游运动增加, 而突变株 $\Delta sigB$ 的浮游运动明显下降(图 5)。枯草芽孢杆菌中鞭毛相关基因在指数生长期表达, 而固着相的生物膜形成相关基因在平台期被诱导^[30]。表明鞭毛是浮游运动所必需的, 已有研究表明在固着期多数细菌的鞭毛脱落并交联在一起形成生物膜漂浮在培养基表面^[31]。我们检测到锰胁迫条件下, $\Delta sigB$ 突变株的鞭毛基因 *flgD* 表达量增加(图 7), 敲除 *sigB* 基因的突变株生物膜生成量下降, 提示 *sigB* 负调控鞭毛基因 *flgD* 的表达, 有助于浮游运动向群集性运动的转换, 也有助于生物膜的形成。SigB 可能调节生物膜的生长和适应性, 因为已有研究表明 SigB 是维持生物膜中 *sinR* 表达所必需的^[23]。SinR 是生物膜形成的抑制剂, 其抑制操纵子 *epsA-O* 和 *tapA-sigW-tasA* 表达, 这些操纵子负责合成胞外多糖和生物膜细胞外基质的淀粉样蛋白纤维

TasA^[32-33]。在枯草芽孢杆菌的 $\Delta sigB$ 突变株中观察到生物膜形成减少是由于生物膜抑制剂 SinR^[22], SinR 的活性对于鞭毛介导的枯草芽孢杆菌运动也是必不可少的, 并且 *sinR* 突变菌株是非运动的^[34-35]。突变株 $\Delta sigB$ 的浮游运动能力降低, 说明 SigB 可能通过 SinR 影响菌株的运动性。*flgD* 编码鞭毛钩组装蛋白^[36], 在 *L. monocytogenes* 中许多编码鞭毛蛋白的基因在 $\Delta sigB$ 突变体中显示出较高的转录水平^[37]; 盐胁迫下 DegU 和 SigB 共同调节许多基因的表达, 特别是与运动和趋化性相关的基因^[38]。DegU 是一种反应调节因子, 控制自由运动与固着相的转换, 以复杂的方式调节细菌的运动和生物膜形成^[30]。当细菌磷酸化 DegU 的浓度较低时, 群集运动和鞭毛基体基因表达被激活, 然而, 随着磷酸化 DegU 含量的增加, DegU-Pi 会抑制鞭毛基体基因的表达^[30]。枯草芽孢杆菌中磷酸化的 DegU-Pi 通过抑制编码鞭毛特异性 σ 因子 (SigD) 来抑制运动基因的转录^[39], 而在 *L. monocytogenes* 中则不存在^[38]。这些研究提示不同细菌鞭毛蛋白表达的调控可能由多个调控因子协同作用实现。磷酸化的 DegU-Pi 可促进 Spo0A-Pi 水平, 驱动细胞走向芽孢发生的命运^[40]。

其次, 细菌在受到胁迫时的另一个适应性反应是形成芽孢^[4]。Spo0A 是一种高度保守的转录调节因子, 在芽孢杆菌的芽孢形成中起关键作用^[41]。枯草芽孢杆菌从链状结构到形成生物膜, 再到芽孢发生的过程受转录因子 Spo0A 控制^[42]。Spo0A-Pi 借助 SinI-SinR-SlrR 网络间接激活操纵子 TapA-SipW-TasA 的表达产生胞外基质, 促进生物膜形成^[42], 同时 Spo0A-Pi 可直接或间接控制产孢基因。丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) 中过表达 *spo0A* 基因可加速芽孢形成, 并提高胁迫耐性相关基因表达, 增强菌株对丁醇胁迫耐受性^[43]; 本研究野生株 ST7 在加锰培养基中芽孢形成率与无锰培养相比无显著变化, 而突变株 $\Delta sigB$ 在有锰和无锰条件下其芽孢形成率均降低且 *spo0A* 表达

下调(图 6、图 7), 提示 *sigB* 基因可能通过调控 *spo0A* 表达来调控芽孢形成, 进而影响锰耐受性。与此相似, 在枯草芽孢杆菌中 *sigB* 基因突变后不能诱导 *spo0E* 表达从而阻断 *spo0A* 特异性转录, 并使芽孢形成受阻^[44]。

4 结论

SigB 因子通过调节鞭毛合成基因 *flgD*、生物膜和芽孢形成基因 *spo0A* 等的表达, 影响沙福芽孢杆菌的运动性、生物膜和芽孢生成, 参与细菌对锰的适应反应, 在响应锰胁迫过程中发挥重要作用。

作者贡献声明

付雨婷: 完成试验、数据分析及文章初稿的撰写; 韦永琴: 协助完成试验及部分数据处理; 牛熙: 实验所需试剂购买、实验方法及仪器使用指导; 黄世会: 数据收集与监管; 王嘉福: 提出概念、提供资源、获取基金、方法论指导; 冉雪琴: 获取基金、文章思路提供及对文章进行修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] PÁTEK M, NEŠVERA J. Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 154(2/3): 101-113.
- [3] MORIKAWA K, MARUYAMA A, INOSE Y, HIGASHIDE M, HAYASHI H, OHTA T. Overexpression of sigma factor, sigma(B), urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 288(2): 385-389.
- [4] HECKER M, PANÉ-FARRÉ J, VÖLKER U. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2007, 61: 215-236.
- [5] VOHRADSKY J, SCHWARZ M, RAMANIUK O, RUIZ-LARRABEITI O, VAŇKOVÁ HAUSNEROVÁ

- V, ŠANDEROVÁ H, KRÁSNÝ L. Kinetic modeling and meta-analysis of the *Bacillus subtilis* SigB regulon during spore germination and outgrowth[J]. Microorganisms, 2021, 9(1): 112.
- [6] HECKER M, SCHUMANN W, VÖLKER U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 1996, 19(3): 417-428.
- [7] VOIGT B, SCHROETER R, JÜRGEN B, ALBRECHT D, EVERS S, BONGAERTS J, MAURER KH, SCHWEDER T, HECKER M. The response of *Bacillus licheniformis* to heat and ethanol stress and the role of the SigB regulon[J]. PROTEOMICS, 2013, 13(14): 2140-2161.
- [8] SCHROETER R, HOFFMANN T, VOIGT B, MEYER H, BLEISTEINER M, MUNTEL J, JÜRGEN B, ALBRECHT D, BECHER D, LALK M, EVERS S, BONGAERTS J, MAURER KH, PUTZER H, HECKER M, SCHWEDER T, BREMER E. Stress responses of the industrial workhorse *Bacillus licheniformis* to osmotic challenges[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80956.
- [9] CHEN JC, CHANG CF, HSU DW, SHU JC, CHEN HY, CHEN CY, LU CY, CHEN CC. Temporal regulation of σ B by partner-switching mechanism at a distinct growth stage in *Bacillus cereus*[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2017, 307(8): 521-532.
- [10] GAO TT, LI Y, CHAI YR, WANG Q, DING MZ. SigB regulates stress resistance, glucose starvation, MnSOD production, biofilm formation, and root colonization in *Bacillus cereus* 905[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(14): 5943-5957.
- [11] van SCHAIK W, van der VOORT M, MOLENAAR D, MOEZELAAR R, de VOS WM, ABEE T. Identification of the sigma B regulon of *Bacillus cereus* and conservation of sigma B-regulated genes in low-GC-content Gram-positive bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(12): 4384-4390.
- [12] 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.
- [13] 田群. 耐锰细菌的分离鉴定及耐受性机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- TIAN Q. Isolation and identification of manganese-resistant strains and mechanism of manganese adaptation[D]. Guiyang: Guizhou University, 2017 (in Chinese).
- [14] 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).
- [15] 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 ZL, WANG JF, RAN XQ, NIU X. Deletion of *sigW* and *rsiW* affects the manganese tolerance of *Bacillus safensis* ST7[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1323-1336 (in Chinese).
- [16] 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.
- [17] 郭云学, 蔡兴盛, 古嘉瑜, 王晓雪. 海洋假交替单胞菌端生和侧生鞭毛对生物膜形成的影响[J]. 热带海洋学报, 2023, 42(3): 126-135.
- GUO YX, CAI XS, GU JY, WANG XX. Effects of polar and lateral flagella on biofilm formation in marine *Pseudoalteromonas*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2023, 42(3): 126-135 (in Chinese).
- [18] 王旭东, 林鑫广, 左佳坤, 许媛媛, 王志豪, 陈兆国, 韩先干, 苗晋锋. *yeaI* 基因对奶牛源大肠杆菌 NJ17 生物学特性的影响[J]. 微生物学报, 2020, 60(10): 2362-2373.
- WANG XD, LIN XG, ZUO JK, XU YY, WANG ZH, CHEN ZG, HAN XG, MIAO JF. Effect of *yeaI* gene on biological characteristics of *Escherichia coli* of cattle origin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(10): 2362-2373 (in Chinese).
- [19] TAKAHASHI D, MIYATA M, FUJIWARA I. Assembly properties of bacterial actin MreB involved in *Spiroplasma* swimming motility[J]. Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(6): 104793.
- [20] YEAK KYC, BOEKHORST J, WELS M, ABEE T, WELLS-BENNIK MHJ. Prediction and validation of novel SigB regulon members in *Bacillus subtilis* and regulon structure comparison to *Bacillales* members[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 17.
- [21] PANÉ-FARRÉ J, JONAS B, HARDWICK SW, GRONAU K, LEWIS RJ, HECKER M, ENGELMANN S. Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(8): 2561-2573.
- [22] RODRIGUEZ AYALA F, BARTOLINI M, GRAU R. The stress-responsive alternative sigma factor SigB of *Bacillus subtilis* and its relatives: an old friend with new functions[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1761.
- [23] BARTOLINI M, COGLIATI S, VILETA D, BAUMAN C, RAMIREZ W, GRAU R. Stress-responsive alternative sigma factor SigB plays a positive role in the antifungal proficiency of *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(9): e00178-19.
- [24] LARISCH C, NAKUNST D, HÜSER AT, TAUCH A, KALINOWSKI J. The alternative sigma factor SigB of *Corynebacterium glutamicum* modulates global gene expression during transition from exponential growth to stationary phase[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 4.
- [25] HAIN T, HOSSAIN H, CHATTERJEE SS, MACHATA S, VOLK U, WAGNER S, BRORS B, HAAS S, KUENNE CT, BILLION A, OTTEN S, PANE-FARRE J, ENGELMANN S, CHAKRABORTY T. Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e sigma B regulon[J]. BMC Microbiology, 2008, 8: 20.
- [26] 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 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).
- [27] 王莉, 冯飞飞, 张强, 冯晓琴, 尹晓蛟, 罗勤. Sigma B 对单核细胞增生李斯特菌耐受抗生素作用的影响[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(2): 1-6.
- WANG L, FENG FF, ZHANG Q, FENG XQ, YIN XJ, LUO Q. Effects of σB on *Listeria monocytogenes* against antibiotic tolerance[J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(2): 1-6 (in Chinese).
- [28] ARNAOUTELI S, BAMFORD NC, STANLEY-WALL NR, KOVÁCS ÁT. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(9): 600-614.
- [29] CHAI YR, KOLTER R, LOSICK R. Reversal of an epigenetic switch governing cell chaining in *Bacillus subtilis* by protein instability[J]. Molecular Microbiology, 2010, 78(1): 218-229.
- [30] KOBAYASHI K. Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2007, 66(2): 395-409.
- [31] DANIELS R, VANDERLEYDEN J, MICHIELS J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(3): 261-289.
- [32] KEARNS DB, CHU F, BRANDA SS, KOLTER R, LOSICK R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(3): 739-749.
- [33] CHU F, KEARNS DB, BRANDA SS, KOLTER R, LOSICK R. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(4): 1216-1228.
- [34] FREDRICK K, HELMANN JD. FlgM is a primary regulator of sigma D activity, and its absence restores motility to a *sinR* mutant[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(23): 7010-7013.
- [35] GRAU RR, de OÑA P, KUNERT M, LEÑINI C, GALLEGOS-MONTERROSA R, MHATRE E, VILETA D, DONATO V, HÖLSCHER T, BOLAND W, KUIPERS OP, KOVÁCS ÁT. A Duo of potassium-responsive histidine kinases govern the multicellular destiny of *Bacillus subtilis*[J]. mBio, 2015, 6(4): e00581.
- [36] COLIN R, NI B, LAGANENKA L, SOURJIK V. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(6): fuab038.
- [37] BEGLEY M, HILL C, ROSS RP. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on SigB[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 2231-2234.
- [38] RAENGPRADUB S, WIEDMANN M, BOOR KJ. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(1): 158-171.
- [39] AMATI G, BISICCHIA P, GALIZZI A. DegU-P represses expression of the motility *fla-Che* operon in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(18): 6003-6014.
- [40] MARLOW VL, PORTER M, HOBLEY L, KILEY TB, SWEDLOW JR, DAVIDSON FA, STANLEY-WALL NR. Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(1): 16-27.
- [41] SUN J, LIU Y, LIN F, LU Z, LU Y. CodY, ComA, DegU and Spo0A controlling lipopeptides biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(3): 1289-1304.
- [42] CHEN Z, SRIVASTAVA P, ZARAZÚA-OSORIO B, MARATHE A, FUJITA M, IGOSHIN OA. *Bacillus subtilis* histidine kinase KinC activates biofilm formation by controlling heterogeneity of single-cell responses[J]. mBio, 2022, 13(1): e0169421.
- [43] HARRIS LM, WELKER NE, PAPOUTSAKIS ET. Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(13): 3586-3597.
- [44] REDER A, GERTH U, HECKER M. Integration of σB activity into the decision-making process of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(5): 1065-1074.