

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52 (12) : 1497 - 1507; 4 December 2012
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

紫色非硫细菌的砷代谢机制

吕常江¹, 赵春贵^{1*}, 杨素萍^{1*}, 曲音波²

¹ 华侨大学生物工程与技术系, 厦门 361021

² 山东大学, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 【目的】系统阐述紫色非硫细菌(PNSB)砷代谢机制和砷代谢基因簇的进化关系。【方法】通过生物信息学方法分析了 PNSB 砷代谢基因簇的分布、组成、排布方式。采用 UV-Vis 和 HPLC-ICP-MS 方法, 研究了 3 个 PNSB 种类对砷的抗性、砷形态及价态的转化、砷在细胞中的积累和分布以及磷酸盐对 As 细胞毒性的影响。【结果】砷基因簇分析表明: 已公布全基因组序列的 17 个 PNSB 菌株基因组中均含有以 *ars operon* 为核心的砷代谢基因簇, 由 1-4 个操纵子组成, 主要含有与细胞质砷还原和砷甲基化代谢相关的基因, 但基因的组成和排列方式因种和菌株而异, 尤其是 *arsM* 和两类进化来源不同的 *arsC*。实验结果表明: 光照厌氧条件下, 3 个 PNSB 种类对 As(V) 和 As(III) 均具有抗性, As(V) 和 As(III) 均能进入细胞; 在胞内 As(V) 能够还原为 As(III) 并被排出胞外, 但不能将 As(III) 氧化为 As(V), 也未检测到甲基砷化物; 磷酸盐浓度升高, 能够抑制 As(V) 进入细胞, 降低 As(V) 对细胞的毒性, 而不能抑制 As(III) 进入细胞。【结论】PNSB 砷代谢机制主体为细胞质 As(V) 还原, 也还有砷甲基化途径。通过对砷代谢基因簇结构多样性特点和进化方式分析, 提出了与 Rosen 不同的 *ars operon* 进化途径。这对深入开展 PNSB 砷代谢和基因之间的相互作用研究奠定基础。

关键词: 紫色非硫细菌, 砷, 基因簇, 代谢机制

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2012)12-1497-11

砷(As)的剧毒性和存在的广泛性, 以及对人类健康的危害性使得环境砷污染问题成为全球极具关注焦点。在与砷长期的相互作用中, 微生物进化出了多种类型的砷代谢机制。近年来, 微生物砷代谢研究发展迅速, 对砷元素有了新的认识和评价, 例如, 砷具有生物毒性, 但也在特定条件下参与生命代谢过程^[1-2]。目前主要报道了 7 种砷代谢类型^[3-5], 其中 As(V) 细胞质还原和异化砷还原、As(III) 化能有机异养型和无机自养型氧化, 以及 As

(III) 甲基化机制等 5 种代谢类型已得到广泛认同, 并在砷代谢相关基因及表达调控、催化酶的结构与功能等方面均有相对较为深入的研究。2008 年, *Science* 杂志报道了 As(III) 氧化与厌氧光合作用偶联机制^[1]。2010 年, *Science* 杂志又报道出 As(V) 代替磷参与 DNA 组成供细菌生长的代谢机制^[2], 但这种机制目前还存在争议。

不产氧光合细菌(APB)早于放氧光合生物数十亿年出现在地球上, 它们能利用地球早期最大能源

基金项目: 国家自然科学基金(31070054, 31270106); 福建省自然科学基金(2010J01209, 2012J01136); 中国科学院城市环境与健康重点实验室基金(KLUEH201005)

* 通信作者: Tel: +86-592-6166178; E-mail: chungui@hqu.edu.cn, yangsuping@hqu.edu.cn

作者简介: 吕常江(1985-), 男, 满族, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为环境生物技术。

收稿日期: 2012-05-16; 修回日期: 2012-07-10

太阳能和原始大气成分 N_2 、 H_2S 、 H_2 、 CO_2 和 NH_3 等在厌氧环境中进行不放氧光合作用,在生命起源和地球进化中起关键作用,其中紫色非硫细菌(PNSB)更是因代谢类型灵活多样,已成为光合作用、生物固氮、氢代谢、 CO_2 固定等机理研究的优良模式生物^[6-7]。目前关于 APB 砷代谢机制的研究较少,主要有甲基化途径和 As(III)与光合作用偶联机制的报道。2006年, Qin 等在分析基因组信息基础上,从一株 PNSB 中克隆并表达了砷甲基化基因(*arsM*),首次为细菌类砷甲基化途径提供了分子水平上的证据^[8]。2008年, Kulp 等^[1]在美国谟诺湖发现一株紫色硫细菌,能以 As(III)作唯一电子供体在光照厌氧环境中偶联光合作用将 As(III)氧化成 As(V)。此外,在 *Chlorobium limicola*、*Chlorobium phaeobacteroides* 和 *Chloroflexus aurantiacus* 等绿色硫细菌和绿色非硫细菌基因组中发现了含有氧化 As(III)的同源基因^[9],在 *Rhodobacter sphaeroides* 菌株中发现有 As(V)还原操纵子^[10]。这些研究与发现使人们开始密切关注 APB 在砷代谢循环中的生态学作用,但目前对 APB 砷代谢还缺乏全面系统的认识,尤其缺乏实验研究。PNSB 包括 21 属近百种,是 APB 的一个重要组成,也是生理生化和遗传学研究的典型类群^[11]。因此,本文选择 PNSB 为研究对象,通过对已公布全基因组序列菌株的搜集与分析,从基因水平上系统地研究了 PNSB 砷代谢基因簇的结构,推理了其砷代谢机制和相关基因的进化关系;在此基础上,选取了 PNSB 典型属 *Rhodobacter* 和 *Rhodospirillum rubrum* 的 3 个菌株,通过测定菌株对砷的抗性及其形态转化,进一步探究了 PNSB 砷代谢机制。本文为深入理解 APB 对砷的地球化学循环中的作用奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 沼泽红假单胞菌 CQV97 (*Rhodospirillum rubrum* CQV97, *Rps. palustris* CQV97), 固氮红细菌 134K20 (*Rhodobacter azotoformans* 134K20, *Rba. azotoformans* 134K20) 和 荚膜红杆菌 XJ-1 (*Rhodobacter capsulatus* XJ-1, *Rba. capsulatus* XJ-1)。这 3 个菌株的 GenBank 登录号分别为 EU882154, EU883587 和 HM370064, 本实验室

分离、鉴定并保存。

1.1.2 主要仪器及试剂: UV-3200PCS 紫外可见分光光度计(MAPADA)。智能人工气候培养箱(ZRX-300E型)。台式高速离心机(3K30型, Sigma)。超速离心机(CS150GXL, Hitachi)。Milli-Q 超纯水机(Millipore)。真空冷冻干燥机(FDU-2100, EYELA)。压力破碎仪(FA, Thermo)。微波消解仪(MARS-X, CES)。HPLC(Agilent 1200, Agilent)。ICP-MS(Agilent 7500cx, Agilent), 色谱柱包含 Hamilton 预处理柱(25 mm × 2.3 mm)和 Hamilton PRP-X100 10 μm 阴离子交换柱(250 mm × 4.1 mm)。 $NH_4H_2PO_4$ (GR, 天津福晨), NH_4NO_3 (GR, Fluka), 65% HNO_3 (GR, Merck), $NaAsO_2$ 和 $Na_3AsO_4 \cdot 12H_2O$ (AR, Merck), 其它试剂为国产分析纯。

1.2 基于全基因组序列的砷代谢机制分析

1.2.1 基因组序列的收集和一般特性: 在 LPSN、IJSEM、ATCC 和 DSMZ 网站上 (<http://www.bacterio.cict.fr/>, <http://ijs.sgmjournals.org/>, <http://www.atcc.org/>, <http://old.dsmz.de/index.htm>) 搜集目前所有已报道的 PNSB 物种。以属名为关键词,于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及 MicrobesOnline (<http://microbesonline.org/>) 数据库搜索并获取全基因组序列,对基因组的一般特性进行描述。

1.2.2 16S rRNA 基因系统发育树的构建:

用 ClustalX 2.0 软件对选择菌株的 16S rRNA 基因的序列进行比对分析,于 Mega 4.0 软件上采用邻接法(Neighbor Joining, NJ)进行聚类分析。

1.2.3 砷代谢相关基因及定位: 以报道的砷代谢相关基因为参照^[3-5, 12-13], 在获取的全基因组序列中搜索目标基因。通过 GenBank 注释获取相关基因的定位及功能,利用 BLAST 工具获取同源序列及基因注释,并综合分析所在操纵子的结构特征,以确认基因功能注释的准确性。同时利用 EMBL (<http://www.embl.org/>) 与 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) 数据库,对获取基因信息进一步确定。

1.3 砷抗性和砷代谢的测定

1.3.1 培养基和培养条件: 采用改良的 Ormerod 培养基^[14], 分别用 2.5 g/L CH_3COONa 和 0.5 g/L NH_4Cl 替代 6.0 g/L $C_4H_4O_5Na_2$ 和 0.5 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 。培养条件为 30℃、3000 lux 光照厌氧培养。

1.3.2 细菌砷抗性测定:将厌氧光照培养至 OD_{660} 约 0.4 的细菌悬液,分装至含有不同浓度砷的螺口试管中光照厌氧培养,定时取样测定菌体生物量(以 OD_{660} 计),绘制生长曲线,计算平均生长速率,求得砷对细菌平均生长速率抑制 50% 的砷浓度 (EC_{50})^[15]。

1.3.3 细菌对 As 形态的转化作用:将细菌培养至 OD_{660} 约 0.4,分别加入 As(III) 和 As(V),其终浓度分别为 0.2 mmol/L 和 1.0 mmol/L,同时设置无 As 对照组(CK),继续培养 80 h,4℃ 6700 × g 离心 20 min 收集菌体及上清液,进行样品预处理,测定上清液及细胞组分中 As 的形态。

1.3.4 细胞积累砷形态及其含量的测定:将细菌培养至 OD_{660} 约 0.4,加入 As(V) 与 As(III) 至终浓度为 0.10 mmol/L,继续培养 80 h,4℃ 6700 × g 离心 20 min 收集菌体,平均分成 2 份。其中一份测定细胞积累 As 形态的含量。另一份参考 Takeuchi 等方法^[16],将细胞用超纯水洗涤 3 次,悬浮于 20 mL 超纯水中,4000 psi 压力破碎细胞。细胞破碎液经 4℃ 10400 × g 离心 10 min 去除细胞碎片,取上清液经 700000 × g 超速离心 30 min,测定上清液(细胞溶质)中 As 的形态和含量。

1.3.5 样品预处理:离心收集上清液样品经 0.22 μm 滤膜过滤后用于 As 的测定。菌体细胞用超纯水洗涤 3 次,取菌体于 -80℃,真空度 9.7 pa,真空冷冻干燥 48 h。冷冻干燥菌体用 10 mL 1% (V/V) 的 HNO₃ 充分溶解后转入消解管中于微波消解仪上进行微波辅助消解,消解参数参照 Zhu 等方法设置^[17]。消解样品溶解定容,4℃ 6700 × g 离心 10 min 取上清液,0.22 μm 膜滤液用于 As 测定。

1.3.6 砷形态及其含量的测定:采用高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱联用技术(HPLC-ICP-MS),参照 Zhang 等方法^[18]进行。高效液相色谱流动相为 6.67 mmol/L NH₄H₂PO₄ 和 6.67 mmol/L NH₄NO₃,用 NH₃·H₂O 调整 pH 至 6.2。砷标准样品为 As(III)、As(V)、MMA 及 DMA 混合标准液,各形态砷浓度为 10 μg/L,绘制标准曲线。砷的形态通过与标准品保留时间对比鉴定,含量通过标准曲线计算。

1.3.7 磷酸盐对 CQV97 菌株砷抗性的影响:厌氧光照培养至 OD_{660} 约 0.4 的细菌采用无菌生理盐水离心洗涤 3 次后分别重悬于等体积的含有 6 mmol/L 和 12 mmol/L Na₂HPO₄ 培养基中。将上述菌悬液分装至含有 200 μL 不同浓度砷的 20 mL 螺口试管中,继续光照厌氧培养 60 h,测定菌体生物量(以 OD_{660} 计)。砷对菌株生长的抑制率按公式: I (inhibition ratio) = [1 - (实验组平衡期生物量 - 初始生物量) / (对照组平衡期生物量 - 初始生物量)] × 100% 进行计算。

2 结果和分析

2.1 PNSB 菌株基因组的一般特征

从 PNSB 21 属近百种中共收集到 17 个菌株的全基因组序列,隶属于 4 属 6 种,菌株及其基因组的一般特性如表 1 所示。*Rhodobacter* 属 6 菌株中,其中有 4 株含有 2 条染色体(Chr),Chr2 大小为 0.9 - 1.3 Mb,约为 Chr1 的 1/3。*Rps. palustris* 染色体相对较大,除 BisB5 菌株染色体较小外,其它 6 株染色体大小约为 5.5 Mb。*Rps. palustris* CGA009 与 *Rsp. rubrum* 11170 及 *Rhodobacter* 属 6 个菌株均含有 1 - 5 个大小不等的质粒。*Rps. palustris* 染色体 GC 含量相对较低,*Rba. sphaeroides* 染色体 GC 含量相对较高。在染色体组成与大小、质粒的数量及 GC 比例等方面均有较大的差异,表明 PNSB 是一个多样化和异质化类群。PNSB 种属的多样性与细菌所在的环境息息相关^[19],环境胁迫是细菌进化的一个重要因素。PNSB 一直被认为是研究生命进化的模式菌属^[11],研究不同 PNSB 种属和菌株之间砷代谢基因之间的关系和差异,有助于深入理解 PNSB 砷代谢机制及其进化关系。

2.2 PNSB 砷代谢基因簇分析

17 株已公布全基因组 PNSB 菌株、本研究选用的 3 个菌株及 13 株已公布全基因组序列的非光合生物的 16S rRNA 基因序列的系统发育分析,及其砷代谢相关基因的分布与结构如图 1 所示。*Rhodobacter* 属的菌株 16S rRNA 基因序列相对保守,聚类在同一分支上,而 *Rhodospseudomonas* 属菌株则聚类在不同的分支上。

表 1 已测序 PNSB 典型菌株基因组一般特征

Table 1 Genomes features of sequenced seventeen strains of PNSB

Organisms	Chromosome	Plasmid	Size (Mb)	Chr 1 (Mb)	Chr 2 (Mb)	G + C%	protein	gene
1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2. 4. 1	2	5	4. 6	3. 19	0. 94	68. 8	4, 242	4, 370
2 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	2	1	4. 49	3. 15	1. 22	69	4, 131	4, 254
3 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	1	5	4. 56	3. 22	-	68. 2	4, 333	4, 466
4 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131	2	2	4. 71	3. 15	1. 3	69. 1	4, 569	4, 638
5 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> WS8N	2	2	4. 42	3. 14	0. 97	-	4, 203	4, 266
6 <i>Rhodobacter capsulatus</i> SB 1003	1	1	3. 87	3. 74	-	66. 6	3, 642	3, 740
7 <i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	1	1	4. 41	4. 35	-	65. 3	3, 838	3, 917
8 <i>Rhodospirillum rubrum</i> F11	1	-	4. 35	4. 35	-	65. 4	3, 878	3, 946
9 <i>Rhodospirillum centenum</i> SW	1	-	4. 36	4. 36	-	70. 5	4, 003	4, 102
10 <i>Rhodomicrobium vannielii</i> ATCC 17100	1	-	4. 01	4. 01	-	62. 2	3, 565	3, 793
11 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	1	1	5. 47	5. 46	-	65	4, 820	4, 898
12 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2	1	-	5. 33	5. 33	-	66	4, 683	4, 772
13 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18	1	-	5. 51	5. 51	-	65	4, 886	5, 016
14 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5	1	-	4. 89	4. 89	-	64. 8	4, 397	4, 492
15 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisA53	1	-	5. 51	5. 51	-	64. 4	4, 878	4, 972
16 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1	1	-	5. 74	5. 74	-	64. 9	5, 246	5, 382
17 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> DX-1	1	-	5. 40	5. 40	-	65. 4	4, 917	5, 082

17 株 PNSB 均含有以细胞质 As(V) 还原酶操纵子 (*ars* operon) 为主体的砷代谢基因簇, 由调节基因 (*arsR*)、As(V) 还原酶基因 (*arsC*)、As(III) 甲基化基因 (*arsM*)、As(III) 外排蛋白基因 (*arsB* 或 *acr3p*)、辅助外排蛋白基因 (*arsA* 和 *arsD*)、砷抗性相关功能基因 (*arsH*) 和未知功能基因等组成。每个基因簇由 1 至 4 个操纵子组成, 不同种属和菌株之间均有差异。除 *Rba. capsulatus* SB 1003 质粒上也含有这些基因以外, 各菌株的抗性基因均定位于染色体组上。除 *Rba. sphaeroides* KD131 Chr2 外, 在含有两条染色体菌株中, 2 条染色体均含有砷代谢基因。*ars* operon 最基本的结构分为 3 种类型, 分别为 *arsR* (*acr3p*) *C*、*arsR* (*acr3p*) *CDA*、*arsRM*。在不同的基因簇中, 各基因的排列顺序和方向不同, 另外还有 *arsH* 及未知功能基因, 也可以排列在前两种类型的操纵子中, 使砷抗性基因操纵子更加复杂。在分析的 PNSB 菌株中, *acr3p* 普遍存在, 而功能相同的 *arsB* 却较为少见, 甚至存在于质粒中, 这表明 PNSB 中 *arsB* 来源于基因的横向转移, 且 *acr3p* 进化相对较早。PNSB 基因中含有两类进化来源不同的 *arsC*, 第一类 *arsC* 的表达产物与谷氧还蛋白及谷胱甘肽相偶联共同催化 As(V) 的还原 (图 1 中橘黄色标识基因); 第二类 *arsC* 的表达产物与硫氧还蛋白相偶联共同催化细胞质中 As(V) 的还原 (图 1 中红色标识基因)。同一染色体上含有两类 *arsC* 的报道较少, 其调控和协同作用机制尚不清楚。第一类

arsC 存在于分析的各个菌株中, *Rps. palustris*, *Rba. capsulatus* 与 *Rm. vannielii* 含有两类进化来源不同的 *arsC*。此外, *arsH* 主要分布在 *Rba. sphaeroides*, *arsM* 则主要分布在 *Rps. palustris*, 但这两个基因不普遍存在。

通过对已公布全基因组序列菌株的砷代谢基因簇分析, 表明 PNSB 将具有 As(V) 细胞质还原和 As(III) 外排砷代谢机制, 以及 As(III) 甲基化代谢机制。因此, 在基因组分析的砷代谢机制的指导下, 我们研究了 PNSB 3 个菌株对砷的抗性、对砷形态和价态的转化、砷在菌体细胞内的积累和分布, 以及磷酸盐对砷细胞毒性的影响, 系统地探讨了 PNSB 砷代谢机制。

2.3 细菌砷抗性的测定

砷对 3 个 PNSB 菌株 (CQV97、134K20 和 XJ-1) 生长的影响结果见图 2。随着培养体系中 As(V) 或 As(III) 浓度的升高, 对 3 个菌株生长的抑制作用逐渐增强, 但不同菌株对砷的抗性有所不同。以细菌平均生长速率为指标, 计算了砷对 3 个菌株生长抑制的 EC_{50} 值。As(V) 对菌株 CQV97、134K20 和 XJ-1 的 EC_{50} 分别为 2.4 mmol/L、1.6 mmol/L 和 1.9 mmol/L, As(III) 对 3 个菌株的 EC_{50} 分别为 0.9 mmol/L、0.2 mmol/L 和 0.3 mmol/L。结果表明, 在光照厌氧培养过程中, As(V) 和 As(III) 均能进入细胞, 高浓度抑制菌体的生长。3 个菌株对 As(V) 和 As(III) 均具有抗性, 且对 As(V) 的抗性明显高

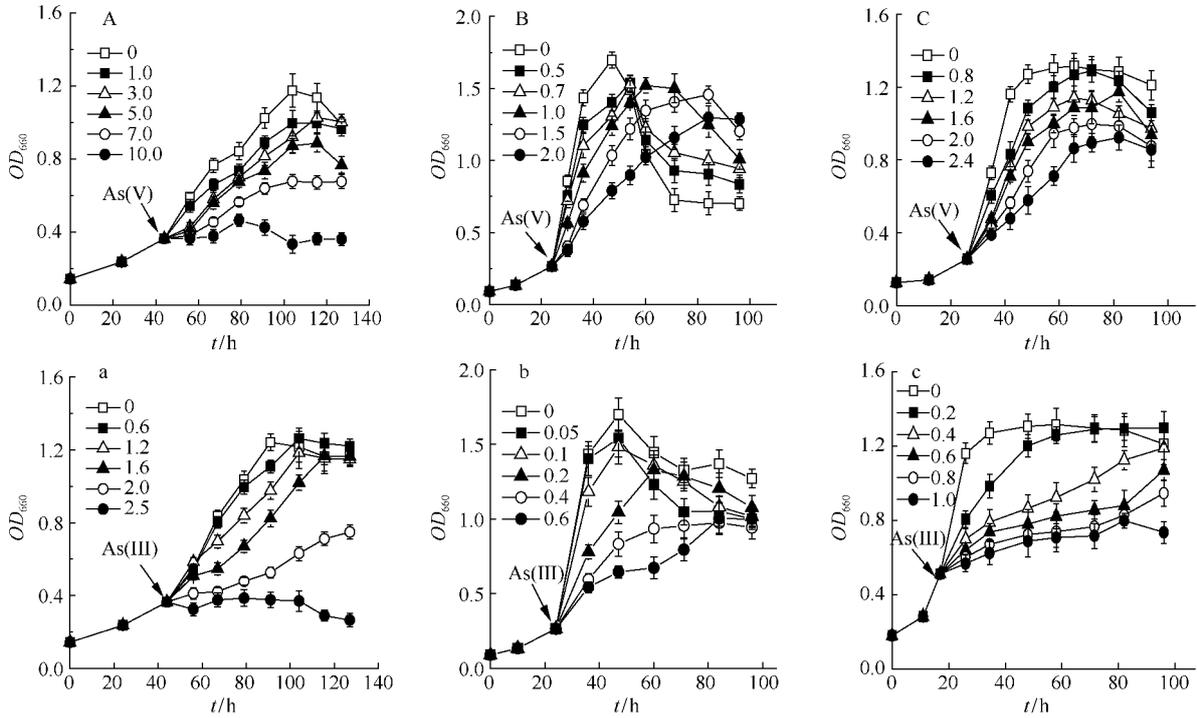


图2 厌氧条件下砷浓度对细菌生长的影响

Fig.2 Growth curves of three bacterial strains ((A, a): strain CQV97. (B, b): strain 134K20. (C, c): strain XJ-1) exposed to different concentrations of arsenic (mmol/L) under anaerobic conditions. A, B, C: exposed to As (V). a, b, c: exposed to As (III). Data are mean ± SE, n = 3.

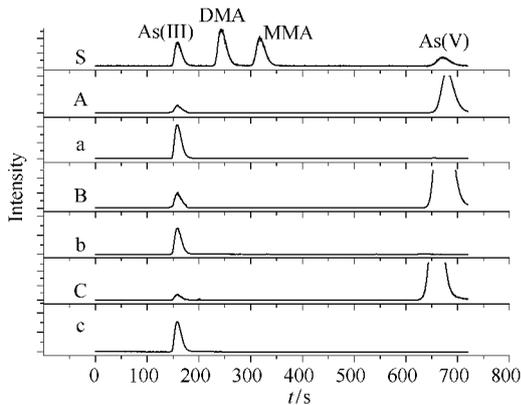


图3 细菌对 As(V) 和 As(III) 形态转化的检测

Fig.3 Arsenic speciation of cells was performed by anion exchange HPLC - ICP - MS. (S) Chromatogram of the standards, including arsenite, arsenate, dimethylarsinic acid (DMA) and monomethylarsonic acid (MMA). (A, a): speciation of arsenic in the cells of strain CQV97. (B, b): strain 134K20. (C, c): strain XJ-1. A, B, C: exposed to As (V). a, b, c: exposed to As (III).

内,并于胞内被还原为 As(III) 排出胞外。由此表明:光照厌氧培养条件下,PNSB 具有细胞质 As(V) 还原,As(III) 外排的砷解毒机制,这与 PNSB 普遍含

有 *ars* operon 相符合。

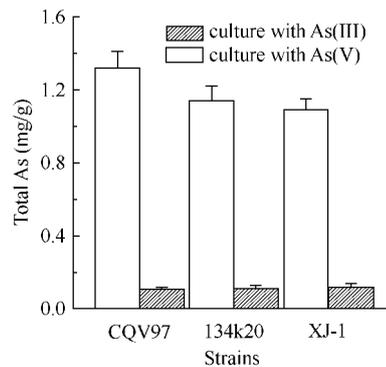


图4 菌体细胞积累砷的总量

Fig.4 Total arsenic amount in the cells of three bacteria cultured with 0.1 mmol/L of arsenite or arsenate.

2.6 磷酸盐对砷抑制 CQV97 菌株生长的影响

在含有 6 mmol/L 和 12 mmol/L Na_2HPO_4 培养体系中,分别测定了磷酸盐对 As(III) 与 As(V) 抑制 CQV97 菌株生长的影响,如图 6 所示。随着砷浓度的增加,对 CQV97 菌株生长抑制率逐渐增大;与低磷酸盐浓度相比,高浓度磷酸盐明显降低了 As(V) 对 CQV97 菌株的生长抑制率,而 As(III) 对

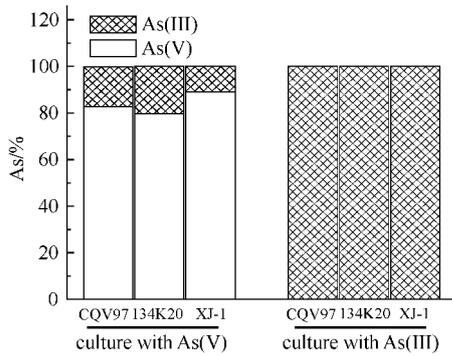


图5 菌株细胞中砷种类及含量比例

Fig. 5 Arsenic species in the cells of three bacteria cultured with 0.1 mmol/L of arsenite or arsenate.

CQV97 菌株的生长抑制率没有明显降低。结果表明, 磷酸盐与 CQV97 菌株对 As(V) 的抗性息息相关, 磷酸盐浓度升高, 能够抑制 As(V) 进入细胞, 提高菌株对 As(V) 的抗性, 而不能抑制 As(III) 进入细胞, 因而表明: As(V) 可以通过磷酸盐通道系统进入菌体细胞, 而 As(III) 不依赖于磷酸盐通道系统进入菌体细胞。这与目前研究报道的 As(V) 与 As(III) 分别通过磷酸盐通道蛋白和甘油-水通道蛋白进入细胞的结果相符合^[20]。

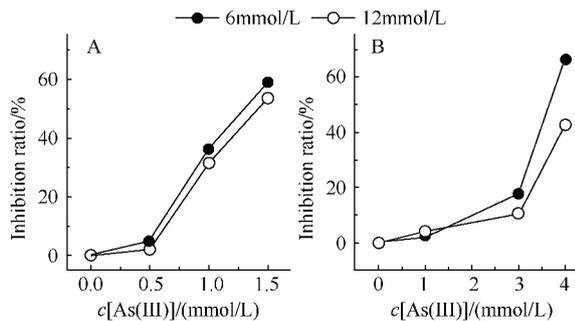


图6 磷酸盐对砷抑制 CQV97 菌株生长的影响

Fig. 6 Effect of arsenic on cell growth of strain CQV97 cultured in different phosphate concentrations. A: exposed to As(III). B: exposed to As(V).

3 讨论

研究 PNSB 砷代谢机制, 对于深入理解自然界中微生物对砷的地球化学循环具有重要作用。目前, 已公布了许多生物的全基因组序列, 通过基因组序列的分析对于研究生物的代谢活动具有重要的指导作用。因此, 利用生物信息学的方法, 基于已公布的全基因组序列抗砷基因簇的分析, 解析和讨论了

PNSB 砷代谢机制和砷代谢基因簇进化。分析结果表明, PNSB 具有 As(V) 细胞质还原和 As(III) 外排砷代谢机制, 以及砷甲基化代谢机制。以此为指导, 只要证明细菌对砷有抗性, 在细胞中检测到砷形态的转化, 即可阐明研究菌株的砷代谢机制。因此, 我们选择了 3 个 PNSB 菌株, 研究了其对砷的抗性、对砷形态和价态的转化、以及砷在菌体细胞中的积累和分布, 系统地探讨了 PNSB 砷抗性机制。

3.1 PNSB 砷代谢途径分析

以典型非光合生物基因和代谢途径^[4-5, 12-13]为参照, 通过对 PNSB 砷代谢基因簇结构与功能分析, 以及一株 PNSB 砷甲基化酶 (ArsM) 的实验证据^[8], 并结合我们对 PNSB 典型属的 3 个菌株的砷转化特性、细胞质砷还原特性以及磷酸盐对菌株砷抗性影响的实验研究, 描绘了 PNSB 的一般砷代谢途径, 如图 7 所示。砷具有强毒性, PNSB 并未进化出特定的通道蛋白系统摄入砷, 但由于物质结构的相似性, As(III) 可通过水甘油通道蛋白 (Aqua glyceroporin, GlpF), As(V) 可通过磷酸盐通道蛋白 (Phosphate transporter, Pit/Pst) 进入细胞。进入胞内的 As(III) 可与 *ars operon* 上的调节蛋白 ArsR 结合, 使其改变构象, 启动 *ars operon* 转录。进入胞内的 As(V) 被生理量表达的 ArsC 还原为 As(III), 于胞内积累达到一定水平诱导 *ars operon* 基因表达, 进而加速 As(V) 还原过程。最后, 环境中进入细胞内或胞内所形成的 As(III) 被运载蛋白泵出胞外, 使胞内砷浓度降低, 达到解毒作用。另外, 胞内 As(III) 也可以启动 *arsRM* 表达, 产生转甲基酶 (ArsM), 将 As(III) 经一系列的转甲基化作用生成有机态砷化物, 并最终生成三甲基砷 (TMA) 后排出胞外。

17 株 PNSB 菌株基因组中均具有介导细胞质砷还原途径的基因簇, 其中一些菌株还具有砷甲基化相关基因, 如 *Rps. palustris* 中 CGA009、TIE-1、BisB5、HaA2、DX-1 菌株, *Rm. vanniellii* 17100 及 *Rba. capsulatus* SB 1003 菌株, 同时也应该具有砷甲基化代谢的潜力。Qin 克隆表达了 CGA009 砷甲基化酶 (ArsM), 提供了 PNSB 具有砷甲基化代谢的实验证据^[8]。本研究 3 株 PNSB 菌株砷代谢的实验结果与介导细胞质砷还原途径的基因簇分析的结果相一致, 但没有发现砷甲基化途径。由此表明, PNSB 砷代谢的主体为 *ars operon* 介导的细胞质 As(V) 还原和外排 As(III) 机制, 另外也具有甲基化机制, 其

砷代谢机制因种和菌株有所差异。

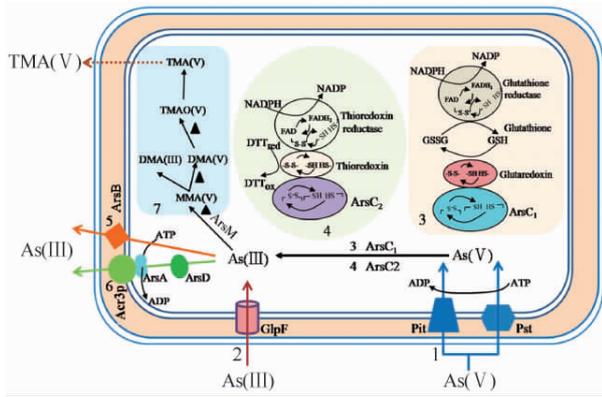


图7 PNSB 砷代谢途径 [4-5, 12-13]

Fig. 7 Arsenic metabolism pathways in PNSB. (1) Arsenate enters the cells through the phosphate transporters and (2) arsenite through the aqua-glyceroporins. Once inside the cells, arsenate is reduced to arsenite by (3) the glutaredoxin-coupled ArsC, or (4) the thioredoxin-coupled ArsC, and the arsenite further extruded out of the cell by the specific pump (5) ArsB or (6) Acr3p. (7) inorganic arsenic can also be transformed into organic species in a methylation

3.2 PNSB 砷代谢基因簇结构与进化

PNSB 菌株 *ars* operon 基因的组成及排布方式存在较大差异,表明不同菌株 *ars* operons 的进化程度不同。PNSB 菌株典型砷代谢基因簇的结构分析见图 8, *Rba. sphaeroides* 2.4.1、WS8N 及 17029 Chr2 的砷代谢基因簇为 *arsR (acr3p) C*, 操纵子结构相同, 较为保守。 *Rsp. centenum* SW 基因簇中含有相同基因, 但排布方式为 *arsRC (acr3p)*。 *Rsp. rubrum* F11 和 11170 的 *ars* operons 组成、排布较特殊, 不仅含有

arsD、*arsA*, 而且 *arsC* 远离 *arsR (acr3p)* DA 操纵子单独出现。与上述菌株相比, *Rps. palustris* 基因组中 *ars* operons 呈现多样化, 不同菌株的基因簇中含有 1 至 4 个操纵子, 每个操纵子基因的组成和排布有所不同。例如: BisB18 基因簇排布方式为 *arsRCC (acr3p)*, 其中 2 个 *arsC* 进化来源不同; HaA2 基因簇排列方式为 *arsRM* 和 *arsRC (acr3p)*, 又进化出了 *arsRM*, 形成了含有 2 类操纵子结构的基因簇; 与 BisB18 相比, BisA53 砷基因簇又进化出了一个目前功能未知但与砷代谢相关的操纵子, 亦形成了 2 个操纵子结构的砷代谢基因簇。与 BisA53 相比, BisB5 与 DX-1 又进化出了 *arsRM* 操纵子, 形成含有 3 个操纵子结构的砷代谢基因簇, 但两菌株操纵子在染色体上排布顺序不同。CGA009 菌株在 3 个操纵子结构基础上又进化出了 *arsRCBH*, 形成了砷代谢基因簇最为复杂的 4 个操纵子结构, 除含有外排基因 *acr3p* 外, 还含有 PNSB 砷基因簇中不普遍存在在外排基因 *arsB*。结果表明: PNSB 菌株砷代谢基因簇的进化趋向于结构更为复杂的“多操纵子”, 尤其是 *Rps. palustris* 趋于“多操纵子”, 不同菌株间存在着砷代谢基因的易位与倒位。染色体重排 (chromosome rearrangement, CR) 与基因水平转移 (horizontal gene transfer, HGT) 是 PNSB 砷代谢基因进化的动力。总之, 17 株 PNSB 中仅有 4 菌株含有典型的 *arsR (acr3p) C* 结构, 多数菌株 *ars* operon 与典型的操纵子结构均有所不同。这些非典型的 *ars* operon 在非光合生物中也普遍存在, 如 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 含有两个转录方向相反的操纵子 *arsRC* 与 *arsBH*, *Pseudomonas putida* 的操

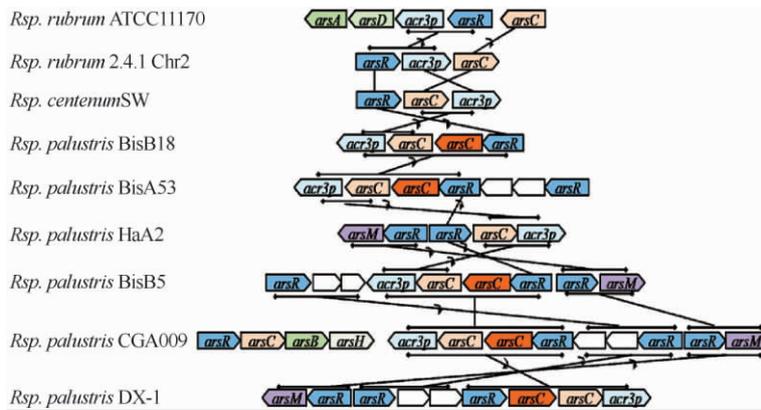


图8 PNSB 菌株典型的砷代谢基因簇结构分析

Fig. 8 Schematic comparison of arsenic gene clusters from various PNSB. Lines with arrows represent translocations and inversion of gene between two arsenic gene clusters.

纵子为 *arsRC* (*acr3p*) *H* (图 1)。但不同基因型的 *ars* operons 在砷抗性进化上的优劣及其相互作用目前未见全面报道。

3.3 PNSB 中 *ars* operon 的进化分析

典型的 *ars* operon 有 *arsRBC* 与 *arsRDABC* 两种类型^[12-13,21-22], 如: 大肠杆菌染色体及葡萄球菌质粒 p1258 和 pSX267 上含有典型的 *arsRBC* 操纵子; 大肠杆菌质粒 R773 和 R46 上含有典型的 *arsRDABC* 操纵子。在比较分析 *ars* operon 组成特点的基础上, Rosen 推测了 *ars* operon 的进化途径^[20], 他认为还原性原始地球环境中的砷主要为 As(III), *ars* operon 进化历程为 *arsB* (*acr3p*) → *arsR* → 地球出现 O₂ → *arsC* → 高砷环境 → *arsDA* → *arsRDAB* (*acr3p*) *C*。目前普遍认为 *arsD* 与 *arsA* 是同时进化的, 且 *arsD* 位于 *arsA* 的上游^[20,22]。PNSB 不同菌株进化出了不同的砷代谢机制, 但其主体为 *ars* operon 介导的细胞质砷还原途径和砷甲基化代谢途径。对 PNSB 基因组分析发现, *Rsp. rubrum* 中 *arsD* 和 *arsA* 联合出现在砷基因簇中, 但 *arsC* 独立出现, 远离操纵子 *arsR* (*acr3p*) *DA*, 非光合生物中也存在这样的排列方式, 如 *Lactococcus lactis* MG1363。这种现象是由细菌染色体重排所引起, 还是 *arsC* 在进化过程中尚未完成操纵子的聚集, 目前尚不清楚。还原性原始地球中亦可能存在高浓度砷环境, 那么, 厌氧环境中的早期生命 (例如不产氧光合细菌) 是如何在高浓度砷环境中生存的, 因此, *ars* operon 中 *arsC* 与 *arsDA* 两者的进化关系值得深入探索。根据 PNSB 在生物进化中的地位、砷代谢基因的排布特点及原始地球大气的自然界中亦可能存在高浓度砷的环境, 我们提出了与 Rosen 不同的 *ars* operon 进化途径, 见图 9。当原始地球的大气以还原性气体为主时, 在 As(III) 环境中细菌进化出 *arsRB/acr3p*, 而在含有高浓度 As(III) 的环境中, 细菌又进化出了 *arsDA*, 随着地球大气变成氧化性环境后, 进而进化出了 As(V) 还原基因 *arsC*, 因此 *arsDA* 的进化可能早于 *arsC*。

3.4 PNSB 砷代谢分析

有研究认为细胞质 As(V) 还原是 ArsC 在有氧条件下催化的, 但从已报道的 *ars* operon 调节方式、*arsC* 的表达及 ArsC 的功能上, 还没有氧气调控的直接证据。PNSB 代谢机制多样, 在厌氧光照环境中生长良好。本研究表明: 光照厌氧环境中, 菌株

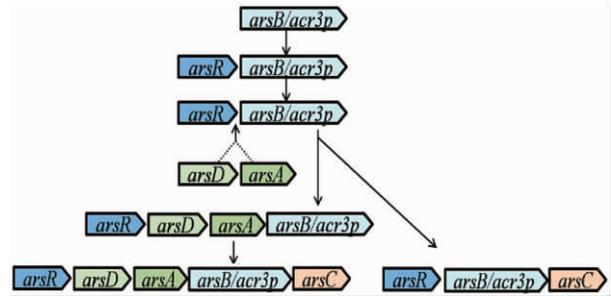


图 9 PNSB *ars* operons 进化

Fig. 9 Evolution of *ars* operons in PNSB.

CQV97、134K20 和 XJ-1 不仅对无机砷具有较高抗性, 而且能够将 As(V) 还原为 As(III)。因此, 我们认为氧气并非细胞质 As(V) 还原所必须。值得关注的是, 砷代谢基因簇分析显示 PNSB 普遍含有以谷胱甘肽和谷氧还蛋白作为电子供体的第一类 ArsC, 而一些菌株同时还含有以硫氧还蛋白为电子供体的第二类 ArsC。由此我们认为, PNSB 中第一类 ArsC 进化较早, 但第二类 ArsC 的基因是否通过基因水平转移获得, 尚无足够的证据。不同环境中, 两类 *arsC* 如何表达, 是否更有利于细胞内物质的有效利用, 并增强细菌对砷的抗性? 值得进一步研究。

此外, *arsM* 也是 PNSB 砷代谢多样性的一个体现。17 株 PNSB 均含有细胞质 As(V) 还原途径, 但 *Rps. palustris* 中 CGA009、TIE-1、BisB5、HaA2、DX-1 菌株, *Rm. vannielii* 17100 及 *Rba. capsulatus* SB 1003 等 7 个菌株中还存在 *arsM*, 可通过转甲基酶 (ArsM) 的作用, 将细胞内的 As(III) 转化为有机态砷化物, 并最终生成挥发性三甲基砷 (TMA) 后排出胞外。As(III) 甲基化现象在细菌、真菌、原生动物及高等动物中均存在^[23]。有研究表明 As(III) 甲基化过程中形成一些毒性更强的中间产物^[24], 因此 As(III) 甲基化是不是一个解毒途径尚存在一些争议。但 Qin 等研究发现细菌在 As(III) 甲基化过程中虽然形成了毒性更强的中间代谢产物, 但在细胞内存在时间极短, 最终形成具有挥发性产物排出胞外^[8], 并且降低了微生物环境中砷的含量。由此认为 As(III) 甲基化过程不仅是微生物对砷毒性的适应性过程, 亦被认为是理想的砷污染的生物修复过程^[21,25]。但目前 As(III) 甲基化产物排出细胞的机制尚不清楚。

arsM 在光合及非光合生物中并不广泛存在, 主要集中在代谢机制多样、环境适应能力较强的种属

中。因此, *arsM* 的进化可能晚于细胞质 As(V) 还原操纵子。PNSB 中 *arsRM* 与 As(V) 还原操纵子彼此相对独立, 其进化来源于自身染色体基因的演化还是通过基因的水平转移从其它物种中获取, 目前亦无足够的证据。同样值得关注的是, 本研究选用的 3 个菌株 CQV97、134K20 和 XJ-1 的 16S rRNA 基因序列同源性分别与 *Rps. palustris* DX-1 (99%)、*Rba. sphaeroides* 17025 (99%) 和 *Rba. capsulatus* SB 1003 (99%) 最高, *Rps. palustris* DX-1 与 *Rba. capsulatus* SB 1003 除含有 *ars* operon 外, 亦含有 *arsM* (图 1), 而这 2 菌株在含有 As(V) 及 As(III) 的培养体系中生长时均未检测到有机态砷化物。是由于 PNSB 高度异质化, CQV97 与 XJ-1 菌株未含有 *arsM*, 还是由于 *arsM* 的表达调控所致, 也是值得探索的问题。

参考文献

- [1] Kulp TR, Hoefft SE, Madigan M, Madigan MT, Hollibaugh JT, Fisher JC, Stolz JF, Culbertson CW, Miller LG, Oremland RS. Arsenic (III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science*, 2008, 321 (5914): 967-970.
- [2] Wolfe-Simon F, Blum JS, Kulp TR, Gordon GW, Hoefft SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PCW, Anbar AD, Oremland RS. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science*, 2011, 332 (6034): 1149-1153.
- [3] 王革娇, 黄银燕, 李洁. “吃”砷霜的细菌——解析微生物的砷代谢. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2011, 51 (2): 154-160.
- [4] Rosen BP. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, 2002, 592 (1): 86-92.
- [5] Tsai SL, Singh S, Chen W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 2009, 20 (6): 659-667.
- [6] Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. 3rd Edition. New York: Springer, 2006, 32-85.
- [7] Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty J Th. The purple phototrophic bacteria. The Netherlands: Springer, 2009, 577-689.
- [8] Qin J, Rosen BP, Zhang Y, Wang GJ, Franke S, Rensing C. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103 (7): 2075-2080.
- [9] Stolz JE, Basu P, Santini JM, Oremland RS. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60 (2): 107-130.
- [10] Yang HC. Functional and structural studies of a novel arsenic detoxification pathway in the legume symbiont *Sinorhizobium Meliloti*. Wayne State University, Doctor Dissertation, 2008.
- [11] 杨素萍, 林志华, 崔小华, 连建科, 赵春贵, 曲音波. 不产氧光合细菌的分类学进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 48 (11): 1562-1566.
- [12] Silver S, Phung LT. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (2): 599-608.
- [13] Paez-Espino D, Tamames J, de Lorenzo V, Canovas D. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 2009, 22 (1): 117-130.
- [14] Ormerod JG, Ormerod KS, Gest H. Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1961, 94 (3): 449-463.
- [15] Rider CV, LeBlanc GA. An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixture. *Toxicological Sciences*, 2005, 87 (2): 520-528.
- [16] Takeuchi M, Kawahata H, Gupta LP, Kita N, Morishita Y, Ono Y, Komai T. Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127 (3): 434-442.
- [17] Zhu YG, Sun GX, Lei M, Liu YX, Chen NC, Wang LH, Carey AM, Deacon C, Raab A, Meharg AA, Williams PN. High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted Chinese rice. *Environment Science Technology*, 2008, 42 (13): 5008-5013.
- [18] Zhang X, Zhao FJ, Huang Q, Williams PN, Sun GX, Zhu YG. Arsenic uptake and speciation in the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *New Phytologist*, 2009, 182 (2): 421-428.
- [19] Oda Y, Larimer FW, Chain PSG, Malfatti S, Shin MV, Vergez LM, Hauser HL, Land ML, Braatsch S, Beatty

- JT, Pelletier DA, Schaefer AL, Harwood CS. Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105 (2): 18543-18548.
- [20] Rosen BP. Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology*, 1999, 7 (5): 207-212.
- [21] 杨婧, 朱永官. 微生物砷代谢机制的研究进展. 生态毒理学报 (*Asian Journal of Ecotoxicology*), 2009, 4 (6): 761-769.
- [22] 蔡林, 王革娇. 抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2009, 36 (8): 1253-1259.
- [23] Bentley R, Chasteen TG. Microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66 (2): 250-271.
- [24] Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 184: 97-149.
- [25] Moore AJ, Kukuk PF. Quantitative genetic analysis of natural populations. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3: 971-978.

Arsenic metabolism in purple nonsulfur bacteria

Changjiang Lv¹, Chungui Zhao^{1*}, Suping Yang^{1*}, Yinbo Qu²

¹ Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

² State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: [Objective] To elucidate the arsenic metabolic pathway of purple nonsulfur bacteria (PNSB). [Methods] We investigated the distribution within their genomes, organization, composition, arrangement, core genes and coding proteins of arsenic gene clusters found in complete genome from 17 strains of PNSB by comparing the genomes analysis, and studied the arsenic metabolism in 3 members of PNSB under anaerobic conditions by UV-Vis and HPLC-ICP-MS. [Results] Arsenate reduction and arsenite methylation pathways mediated by *ars* operon are the dominating arsenic metabolic processes. The arsenic gene clusters differ vastly in composition and arrangement. Some members of PNSB evolved two independently families of arsenate reduction genes (*arsC*). The cells of *Rhodopseudomonas palustris* CQV97, *Rhodobacter azotoformans* 134K20 and *Rhodobacter capsulatus* XJ-1 could reduce As (V) to As (III), whereas As (III) could not be transformed back to As (V). Higher concentration phosphate competitively inhibited arsenate toxicity to cells. [Conclusion] Our investigations shed light on the evolution and functional implications in arsenic gene clusters of PNSB, and support the notion that arsenate reduction and arsenite methylation appears to be the dominant process in PNSB.

Keywords: purple nonsulfur bacteria, arsenic, gene cluster, metabolic mechanism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070054, 31270106), by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2010J01209, 2012J01136) and by the Foundation of Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment of Chinese Academy of Sciences (KLUEH201005)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6166178; E-mail: chungui@hqu.edu.cn, yangsuping@hqu.edu.cn

Received: 16 May 2012/Revised: 10 July 2012