



## 喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 在不同温度下基因组的可塑性

李小静<sup>1,3</sup>, 江宝塔·穆哈德斯<sup>1</sup>, 杨兰<sup>1</sup>, 郑华军<sup>4</sup>, 彭堂见<sup>5</sup>, 张旭<sup>2</sup>, 姜成英<sup>1\*</sup>, 刘双江<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup>华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

<sup>3</sup>中国科学院大学中丹学院, 北京 100190

<sup>4</sup>上海人类基因组研究中心, 上海 201203

<sup>5</sup>中南大学资源加工与生物工程学院, 湖南 长沙 410083

**摘要:**【目的】驯化得到喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*) SM-1 在低于最适生长温度下具有较高生长活力的突变菌株, 并认知喜温嗜酸硫杆菌在不同温度下的基因组可塑性。【方法】利用实验室长期进化实验对菌株进行 3 个温度的驯化: 37、40、45 °C。运用 454 测序技术对驯化获得的菌株进行基因组重测序, 通过比较基因组分析驯化株基因组单核苷酸位点变化(SNPs), 对包含位点变化的基因从功能上进行分类, 在此基础上, 分析可能与温度适应性相关的基因。【结果】通过不同温度下的长期驯化, 得到了在低于最适生长温度下具有较高活力的菌株; 重测序结果发现, SM-1 基因组具有较好的可塑性, 不同温度(37、40、45 °C)生长的菌株中, 基因组中分别有 418、384 和 347 个核苷酸位点发生累计变化, 其中 3 个温度下有 20 个相同的非同义突变位点, 分别分布于编码重金属和毒性抗性系统、DNA 甲基化和蛋白乙酰化酶、核酸代谢相关酶类等相关基因上; 相比而言, 在低于最适生长温度(37、40 °C)下生长菌株特有的位点变化涉及能量代谢、信号转导以及 DNA/RNA 稳定性相关基因; 其中, 2 个低温菌株共同发生位点变化的基因有 3 个, 其中两个编码转座相关的蛋白 Atc\_1031 与 Atc\_1623, 另一个编码假想蛋白 Atc\_1130, 该蛋白分别与外膜蛋白组装因子 B 和二硫键形成蛋白具有 23% 和 35% 的相似性。另外, 不同生长温度下相关蛋白中氨基酸的组成也发生变化。【结论】喜温嗜酸硫杆菌 SM-1 基因组具有较好的可塑性, 对于其基因组变化的研究结果为认识微生物温度适应性提供了组学数据。本研究揭示喜温嗜酸硫杆菌(*At. caldus*) SM-1 可能通过多种途径适应向低温过渡生长, 既包括微生物通用的环境适应机制, 也存在菌株特有的温度适应途径。

**关键词:** 喜温嗜酸硫杆菌, 生物冶金, 比较基因组, 基因组可塑性

基金项目: 国家自然科学基金(31171234); 科技创新专项(CXJJ-15M034); 生物反应器工程国家重点实验室开放课题

\*通信作者。Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: 刘双江, liusj@im.ac.cn; 姜成英, jiangcy@im.ac.cn

收稿日期: 2016-10-31; 修回日期: 2016-12-09; 网络出版日期: 2017-02-14

微生物冶金技术,是指利用微生物的氧化、还原等作用,用于将矿石中的有价金属浸取出来,例如从硫化物矿石中浸出铜、镍、钴等和从低品位铀矿石中浸出铀;也可用于脱除矿石中的有害杂质,例如含砷难处理金矿的微生物氧化预处理脱砷和高硫煤的微生物氧化脱硫等。与传统的物理或化学冶金技术相比,具有生产成本低、投资少、工艺流程短等优点<sup>[1]</sup>。微生物冶金技术中,堆浸法冶金的应用较为广泛<sup>[2]</sup>,然而容易受到外部环境条件的影响,例如芬兰、挪威等地,冬天时温度低至-30 °C<sup>[3]</sup>,我国有三分之二的有色金属资源分布在西部尤其是青藏高原地区,其中玉龙铜矿的铜金属储量为 3.8 Mt,但是常年的低温气候使得微生物浸矿的可行性减小。随着生长温度的降低,微生物的生长和代谢速率随之下降,严重影响生物冶金的速度和效率。

矿堆中的温度受多种条件限制,其中,矿堆规模、外界环境温度、内部放热反应等都影响其内部的温度。由于生物冶金过程是放热过程,有考察表明,矿堆内的温度随堆高呈梯度变化,内部温度最高可达 50 °C,但当外界环境温度较低时,矿堆表面温度的快速降低会使矿堆内部的温度降低至 30–40 °C,目前发现的能在 30–40 °C 发挥最大冶矿效率的微生物较少。*At. thiooxidans* 和 *At. caldus* 是专性硫氧化细菌,能够利用硫化矿物进行生长,但 *At. thiooxidans* 最适生长温度为 25–30 °C,而 *At. caldus* 最适生长温度为 45 °C,比 *At. thiooxidans* 更适用于矿物堆浸过程。作为主要的硫氧化细菌,对其进行低于最适温度的驯化,能够拓宽菌株的生长温度范围<sup>[4]</sup>,同时提高其在低于其最适温度时的冶金效率,促进工业冶金的进程。另外,探索冶金微生物在较低温度下适应性的特点也有助于应用在其他低温菌株的改造中。

由于能减少自然进化中的不可控因素,实验室进化实验目前被广泛应用在各菌株的驯化以及基因型改变和表型变化的关系研究中<sup>[5–7]</sup>。低温驯化作为一种有效的手段,可以通过连续低温下的驯养,得到稳定的耐低温菌株,因此也被广泛应用在生物冶金过程中,例如:王清良等采用现场吸附尾液对嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)进行了低温驯化,使其能够更好地适应环境,并保持活性<sup>[8]</sup>。*At. caldus* SM-1 是本实验室从生物反应器中分离得到的一株自养型细菌<sup>[9]</sup>,是生物冶金反应中一株重要的硫氧化细菌。转座原件以及质粒的存在是发生进化及新的表型产生的潜在动力。基因组分析发现,同其他菌株相比,SM-1 具有较多的转座原件以及质粒数目。*At. caldus* ATCC51756 基因组分析也发现含有较多的转座原件,这说明 *At. caldus* 的基因组具有较强的可塑性<sup>[10]</sup>。

目前文献报道的细菌对于低温的反应以及适应主要通过以下几种方式:(1) 改变蛋白质氨基酸残基的电荷状态。有研究表明在低温条件下,表面残基负电荷氨基酸增多,如谷氨酸、天冬氨酸比例增多,精氨酸和赖氨酸比例减少等。(2) 改变蛋白质本身结构,灵活小片段的增加、构型变化等被发现与低温生长相关<sup>[11–12]</sup>。(3) 促进蛋白、DNA 以及 RNA 的正确折叠。Ferrer 等在 2003 年的研究中通过引进 1 株嗜冷菌 *Oleispira Antarctica* 的伴侣蛋白 Cpn60 和 Cpn10 到大肠杆菌,证实了伴侣蛋白的活性是大肠杆菌在低温下生长的限速原因<sup>[13]</sup>。一些冷激蛋白(CSP)和冷诱导 DEAD box RNA 解旋酶能够在低温条件下防止 mRNA 的不正确折叠,从而维持低温下的转录起始<sup>[14]</sup>。(4) 改变脂肪酸的组成。细胞膜的流动性对于耐低温生长至关重要,脂肪酸的组成对于膜的流动性影响

较大。已有的研究发现, 低温条件下, 细胞通过改变不饱和脂肪酸含量适应环境, 不饱和脂肪酸越多, 膜的流动性越好, 有利于维持细胞的生命活动<sup>[15]</sup>。(5) 合成保护性溶质。细胞在应对极端生长条件时, 通过累积一些亲水性的物质, 例如糖、胺类物质、氨基酸、无机离子等维持细胞内部的稳态<sup>[16]</sup>。保护性溶质的累积主要通过 2 种方式: 体内合成和体外摄取。当外界环境中缺乏保护性溶质时, 只能通过自身的合成累积。海藻糖是普遍的应对低温条件的保护性溶质, 主要的作用是作为膜和蛋白的稳定剂和保护剂, 在高渗、超氧化物自由基以及高温条件下也可以发挥作用<sup>[17]</sup>。

由于对冶金微生物的低温驯化和冷适应机理的研究相对较少, 本研究选择 *At. caldus* SM-1 进行了低温驯化, 通过重测序手段, 比较驯化前后的基因组改变, 发现基因组中单核苷酸位点的突变, 对包含位点变化的基因从功能上进行分类, 分析可能与温度适应性相关的基因, 认知 SM-1 冷适应机制的基因基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 所用菌株以及培养条件

*Acidithiobacillus caldus* SM-1 是本实验室从生物反应器中分离得到的 1 株细菌, 其最适生长温度为 45 °C, 最适生长 pH 为 2.5; 用 BSM (basal salts medium)培养基加入单质硫粉进行培养。

培养基配方如下(g/L): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, KCl 0.1, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01, pH 2.5, 用 1 : 1 硫酸调至 pH 2.5, 加入过滤的微量元素液。接种前加入单质硫(S<sup>0</sup>), 硫粉采用常压间歇式灭菌法, 每天灭菌 1 h 连续灭菌 3 d<sup>[18]</sup>。

### 1.2 SM-1 菌株在不同温度下的进化培养

以下 2 组实验所用菌株, 为同一菌株进化而来。

**1.2.1 45 °C 培养实验:** 将菌株从甘油管中接种到新的 100 mL BSM 加硫粉培养基中, 所用三角瓶容量是 250 mL, 培养至细胞数目为 10<sup>7</sup>, 再将其以 10 倍的稀释倍数转接到新的 100 mL BSM 培养基中, 在 45 °C 条件下培养。将其定义为野生型 W45。

**1.2.2 低于最适温度(37、40 °C)驯化实验:** 将菌株从甘油管中接种到新的 100 mL BSM 培养基中, 所用三角瓶容量是 250 mL, 培养至细胞数目为 10<sup>7</sup> (约 5 d), 之后再将其转接到新的 BSM 培养基中, 分别在 37、40 °C 条件下培养, 连续转接 932 代。将在 37 °C 培养的菌株定义为 L37, 40 °C 培养的菌株定义为 M40。以上实验均设置 3 个平行。

### 1.3 不同温度培养菌株较低温适应能力的检测

首先将在 37、40、45 °C 连续传代培养的各菌株分别以 10 倍稀释浓度转接到新的 100 mL BSM 培养基中, 培养至对数生长期, 以便消除转接初期造成的误差。之后, 将菌体低速离心 4000 r/min, 浓缩, 分别将各菌株转接至加有 2 mL BSM 及 10 mmol/L 连四硫酸钾的 100 孔培养板中, 使初始 OD 值约为 0.1, 置于 Bioscreen 自动生长曲线测定仪、在 37 °C 低速振荡培养。每个样品设置 6 组重复, 以不加菌液的培养基作为对照。随着菌株的生长, 每隔 3 h 测定 OD<sub>600</sub>, 连续测定 36 h。

### 1.4 扫描电子显微镜观察细胞表面形态

收集处于生长对数后期的细胞, 用浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲溶液(PBS)清洗细胞, 然后用 2.5%的戊二醛溶液 4 °C 固定过夜后, 乙醇梯度脱水, 二氧化碳临界点干燥, 喷金。利用扫描电子显微镜(SU8010, Hitachi, Japan)观察细胞大小和表面形态, 每个样品用软件 Nano measure 从得到

的扫描图像中选取 3 个不同区域, 每个区域选取 30 个细胞进行长度测量及分组, 组间距为 0.4  $\mu\text{m}$ , 记录细胞长度的分布情况, 统计每个区域不同大小细胞在选取的总细胞数中所占比率  $R$  ( $R$ =各组内细胞数/总细胞数)。

## 1.5 基因组提取

选择在 3 个温度下驯化 24 个月和 48 个月的菌株, 用台式高速冷冻离心机(AllegraTM 64R, BECKMAN-COULTER)离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 12000 r/min, 10 min)收集处于对数生长后期的菌体, 将各温度下平行生长的菌体分别混合, 加无菌 BSM 培养基洗涤菌体。利用酚-氯仿法进行基因组提取<sup>[19]</sup>。

## 1.6 基因组重测序以及初始数据处理

对提取获得的 DNA 样品(共 6 个)通过高通量焦磷酸测序技术(454 GS FLX)进行测序。经过质控的基因序列分别与参考基因组 *Acidithiobacillus caldus* SM-1 (NC\_015850.1)序列进行比对, 所用软件是 454 GS Reference Mapper (version 2.3)。每一个比对结果生成一个“454HCDiffs.txt”文件, 文件中包含有比对出的高可信度突变列表。将 SNPs 和 Indels 从“454HCDiffs.txt”中以高可信度进行提取。应控制每个位点突变所占比率大于 10%, 且至少在 3 个 reads 中出现。

## 1.7 基因组数据统计和筛选

将得到的基因组重测序数据进行统计, 分别统计基因间及基因内的单核苷酸突变。比较 37、40  $^{\circ}\text{C}$  驯化株与 45  $^{\circ}\text{C}$  野生株中发生基因位点突变的异同; 进一步统计非同义突变位点, 并对发生氨基酸变化的蛋白的功能进行分析。

## 1.8 预测及注释所用软件

(1) tRNA 预测: tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)。

(2) rRNA 基因预测: RNAmmer (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>)。

(3) 启动子区域预测: <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>。

所用参考基因序列来自 NCBI, 蛋白序列从 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>)网站获得。

## 2 结果和分析

### 2.1 SM-1 菌株在不同温度下培养驯化结果

**2.1.1 不同温度下培养菌株在较低温度下的生长实验:** 经过 2 年(约 932 代)长期驯化, 获得了在低于最适生长温度下具有较高生长活力的菌株, 如图 1 所示, 将较低温驯化菌株与野生株在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养时, 驯化菌株 L37 表现出更好的生长活性, 3 株菌 L37、M40 和 W45 分别在 18、21 和 24 h 达到最大 OD 值 0.2930、0.2257 和 0.2345, 菌株 L37 相较于野生株 W45, 其最高 OD 值增加了 20%; 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下生长时, L37 生长最快, 3 株菌的生长代时分别为 14.3、19.5、22.7 h, 相比于 W45, L37 的代时缩短 37%。

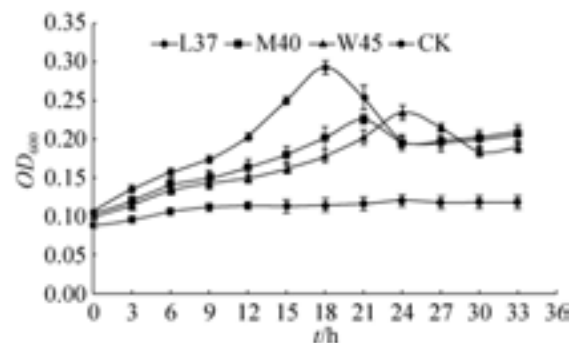


图 1. 菌株 L37、M40 及 W45 在 37  $^{\circ}\text{C}$  时的生长曲线  
Figure 1. Growth curve of three strains L37, M40 and W45 under 37  $^{\circ}\text{C}$ . The x-axis represents time, the y-axis represents the absorbance value on 600 nm wave length.

**2.1.2 不同温度下培养菌株的菌体形态变化:** 扫描电镜观察发现, 不同温度长期驯化的细胞表面没有发生明显变化, 但是菌体长度具有差异, 如图 2 所示。较低温驯化株 L37 和 M40 培养的菌体平均长度分别为 1.457  $\mu\text{m}$  和 1.315  $\mu\text{m}$ , 均小于 W45 的菌体长度 1.759  $\mu\text{m}$ 。

## 2.2 不同温度下培养菌株的基因组突变

**2.2.1 基因组单核苷酸位点突变:** 环境对基因型的改变具有选择作用, 当长期处于某一特定压力条件下时有益于突变累积, 因此我们只选择在 2 次测序中都发生突变, 且在群体中所占比例相同或者上升的单核苷酸位点进行分析, 发生突变的位点见表 1。从表 1 中可以看到, 经过筛选后, 菌

株 L37、M40、W45 分别有 418 个、384 个和 347 个核苷酸位点突变为 2 次测序的累积结果。对以上累积的突变位点进一步分析发现: L37 中发生

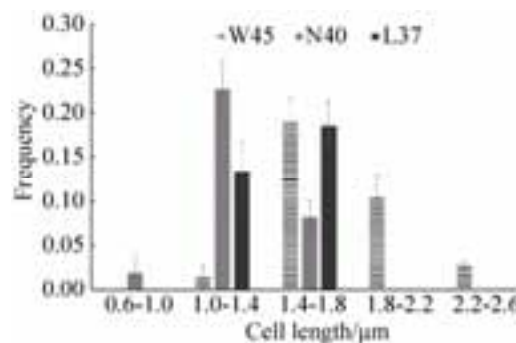


图 2. L37、M40 及 W45 菌体长度分布图

Figure 2. The length distribution of different strains, W45, M40 and L37, separately. The x-axis represents the length and group distance ( $\mu\text{m}$ ), the y-axis represents frequency of cells.

表 1. L37、M40、W45 各自的 SNPs (Single nucleotide polymorphisms) 数目统计

Table 1. The single nucleotide polymorphisms statistics from L37, M40 and W45

Strains	SNPs <sup>(1)</sup>	SNPs <sup>(+)</sup>	Non-synonymous SNPs	Synonymous SNPs	Intergenic SNPs	Genes effected
L37	675	418	86	164	168	27
M40	931	384	140	84	160	24
W45	764	347	143	79	125	29

SNPs<sup>(1)</sup>: The SNPs that are same in both sequencing; SNPs<sup>(+)</sup>: The SNPs have the same or increasing ratio in second sequencing. Gene effected: the genes containing the non-synonymous mutations among SNPs<sup>(+)</sup>.

86 个非同义突变, 共分布在 27 个不同的基因中。M40 中发生 140 个非同义突变, 共分布在 24 个不同的基因中。W45 中发生 143 个非同义突变, 共分布在 29 个不同的基因中。

**2.2.2 突变基因的功能分析:** 对上述不同温度培养菌株中发生突变的基因进行统计分析(图 3), 结果表明 3 个菌株共有的突变基因有 11 个(表 2), 2 个低温驯化菌株的共有突变基因有 3 个(表 3)。3 个不同温度培养的菌株也发生了各自的特异突变, W45 菌株在无温度变化下生长进化, 9 个基因发生了特异突变, L37 和 M40 基因组中, 分别有 9 个和 5 个基因发生特异突变。

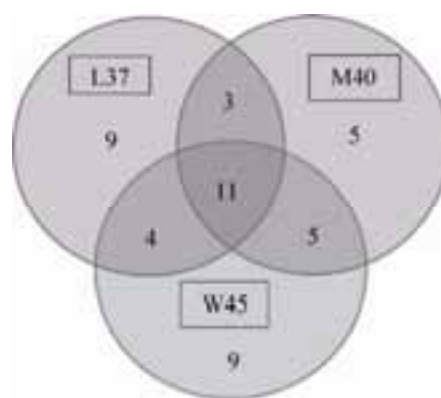


图 3. L37、M40、W45 共有和各自特有的突变基因的数目

Figure 3. The common or specific genes in three strains L37, M40 and W45.

表 2. L37、M40 和 W45 共有的 SNP 位置、所属基因、氨基酸变化及编码蛋白功能注释

Table 2. SNPs location, gens, the amino acid substitutions and annotation of proteins, which are common to strain L37, M40 and W45

SNP location	Locus_tag	Ref codon	SNP codon	Annotation
134030	Atc_0128	GAG->E	GAT->D	Transposase, IS5 family
134067	Atc_0128	AAG->K	CAG->Q	Transposase, IS5 family
134235	Atc_0128	GCG->A	ACG->T	Transposase, IS5 family
134236	Atc_0128	GCG->A	GTG->V	Transposase, IS5 family
221715	Atc_0212	CAC->H	TAC->Y	Hypothetical protein
892576	Atc_0891	ACC->T	ATC->I	EmrB/QacA subfamily drug resistance transporter
1243282	Atc_1228	ATC->I	AGC->S	DNA methylase
1243284	Atc_1228	GAC->D	GAA->E	DNA methylase
1244732	Atc_1229	CGG->R	CCG->P	Acyltransferase 3
1868188	Atc_1809	GAC->D	GCC->A	ArsR family transcriptional regulator
1876954	Atc_1818	AGA->R	AGC->S	Hypothetical protein
1876979	Atc_1818	ACC->T	AGC->S	Hypothetical protein
1876993	Atc_1818	GAC->D	GAG->E	Hypothetical protein
1876997	Atc_1818	GCC->A	GGC->G	Hypothetical protein
1877005	Atc_1818	GAG->E	GAC->D	Hypothetical protein
1877007	Atc_1818	GAG->E	AAG->K	Hypothetical protein
1877014	Atc_1818	CAC->H	CAG->Q	Hypothetical protein
1877027	Atc_1818	CCC->P	CAC->H	Hypothetical protein
-	Atc_1953	-	-	Integrase catalytic subunit
2128813	Atc_2081	GTC->V	GCC->A	Transposase
2164690	Atc_2120	AGG->R	AAG->K	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta
2583814	Atc_2529	ATC->I	ATG->M	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic) subunit beta
2584107	Atc_2529	GCC->A	ACC->T	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic) subunit beta
2584224	Atc_2529	ATC->I	GTC->V	Ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic) subunit beta

-: Represents that protein Atc\_1953 in strains L37, M40 and W45 all contained SNPs, but the SNP locations were not same, the details were not listed in table 2.

表 3. L37 与 M40 共有的 SNP 位置、所属基因、氨基酸变化及编码蛋白功能注释

Table 3. SNPs location, genes, the amino acid substitutions and annotation of proteins, which are common to strain L37 and M40

SNP location	Locus_tag	Ref	Var	Ref codon	SNP codon	Annotation
1021513	Atc_1031	A	G	ATC->I	GTC->V	ISAtfe-like protein
1021515	Atc_1031	C	G	ATC->I	ATG->M	ISAtfe-like protein
1135823	Atc_1130	A	G	TAG->*	CAG->Q	Hypothetical protein
1135886	Atc_1130	T	A	ATG->M	TTG->L	Hypothetical protein
1136027	Atc_1130	T	C	ACC->T	GCC->A	Hypothetical protein
1665500	Atc_1623	A	C	TTT->F	TTG->L	Integrase catalytic subunit

\*: represents stop codon.

对 3 个菌株共有的 11 个突变基因编码蛋白的功能分析表明, 这些蛋白主要涉及重金属抗性和毒性抗性(Atc\_0891, Atc\_1809), 负责毒性物质的

外排和抗性基因的转录调节; DNA 甲基化与蛋白乙酰化相关蛋白(Atc\_1228, Atc\_1229), 与基因组的结构稳定性和基因调控密切相关; 另外 2 个功

能蛋白(Atc\_2120, Atc\_2529)与核苷酸代谢相关, 参与细菌基本生命活动, 控制细胞生长。其他基因编码转座酶(Atc\_0128, Atc\_2081), 整合酶催化亚基(Atc\_1593)和假想蛋白(Atc\_0212, Atc\_1818)。

L37 与 M40 经过长期较低温度驯化, 发生了 3 个共有的基因突变(表 3), 其中 *atc\_1031* 与 *atc\_1623* 编码转座相关的蛋白, M\_1130 注释为假想蛋白, 序列比对分析发现其在同属微生物中均为假想蛋白, 与 *Pseudoalteromonas* 属细菌的外膜蛋白组装因子 BamB 具有约 23% 的同源性, 与 *Gallaecimonas xiamenensis* 的二硫键形成蛋白 B 具有 35% 的同源性, 该蛋白的功能需进一步验证。

除共有的基因突变外, 低温驯化菌株 L37 中有 2 个特有的功能基因发生改变(表 4), 1 个基因编码 DNA gyrase subunit B 蛋白(Atc\_0004), 该蛋白是依赖于 ATP 的拓扑异构酶类, 通过使 DNA 形成负超螺旋的形式, 调节和稳定 DNA 的拓扑结构, 利于双链的解旋、DNA 复制、重组和修复, 其表达量被认为与低温的适应性相关<sup>[20]</sup>。研究表明, DNA 结构中负超螺旋的增多能提高冷诱导蛋白的转录水平, 应对冷环境<sup>[21]</sup>。

另一个基因编码羧酶体壳蛋白 carboxysome

shell protein CsoS1 (Atc\_0932), 该蛋白在蓝藻细菌或化能自养型细菌的二氧化碳固定中发挥作用。喜温嗜酸硫杆菌是一株利用二氧化碳作为碳源生长的化能无机自养微生物, 二氧化碳的固定速率与细胞的生长直接相关<sup>[22]</sup>。

M40 菌株的基因组中, 也发生了 2 个特有的功能基因突变(表 5)。*atc\_1096* 编码 ATP-dependent RNA helicase, 属于 DEAD/DEAH box family 蛋白, 该家族蛋白酶为低温调节酶, 在细菌中, 能够与冷诱导蛋白 Csp 联合作用维持 mRNA 的正确结构<sup>[14]</sup>; 其在植物应答温度变化, 盐胁迫, 渗透胁迫等过程中也起重要作用<sup>[23]</sup>。有研究发现一株耐冷硫氧化细菌 *Sulfuricella denitrificans* skB26 中 DEAD/DEAH box RNA helicases 的低温表达量明显升高<sup>[24]</sup>。同样, 突变缺失 DEAD/DEAH RAN helicases 酶的 *Caulobacter crescentus* 菌株在低温 15 °C 条件下比野生菌株需要更长的生长周期<sup>[25]</sup>。这些发现表明, DEAD/DEAH box RNA helicases 在低于最适温度的适应过程中发挥重要作用。另一个基因 *atc\_1562* 编码酰基转移酶 acyltransferase, 经低温驯化后, 基因组的 1605242 位置突变为终止密码子, 酰基转移酶可以调节蛋白的活性及稳定性, 该酶低温失活的作用需进一步验证。

表 4. L37 菌株中特有的基因突变

Table 4. Specific mutant genes in L37

SNP location	Locus_tag	Ref	Var	Ref. codon	SNP codon	Annotation
5168	Atc_0004	A	G	ATC->I	GTC->V	DNA gyrase subunit B
5170	Atc_0004	C	G	ATC->I	ATG->M	DNA gyrase subunit B
5348	Atc_0004	G	A	GTC->V	ATC->I	DNA gyrase subunit B
929355	Atc_0932	C	G	ACC->T	AGC->S	Carboxysome shell protein CsoS1

表 5. M40 菌株特有的基因突变

Table 5. Specific mutant genes in M40

SNP location	Locus_tag	Ref	Var	Ref codon	SNP codon	Annotation
1098841	Atc_1096	G	T	CGT->R	CTT->L	ATP-dependent RNA helicase
1098843	Atc_1096	G	A	GCC->A	ACC->T	ATP-dependent RNA helicase
1605242	Atc_1562	G	T	GAA->E	TAA->*	Acyltransferase

\*: represents stop codon.



## 2.3 氨基酸组成变化

基因组重测序结果发现, 单核苷酸发生突变后, 基因组编码的氨基酸数量发生改变。如图 4 所示, L37 和 M40 的谷氨酸 Glu 减少, 而 W45 的谷氨酸数量不变, 谷氨酸 Glu 属于带负电荷氨基酸, 且侧链较长, 在低温条件下, 谷氨酸的减少往往伴随着 Asp 的增加, 这种替换可能会最优化蛋白的特性<sup>[26]</sup>。本研究中, 虽然 Glu 在 L37 及 M40 中均有减少, 但 Asp 数量只在 M40 中增加。

在低温菌株 M40 中苯丙氨酸 Phe 数量较 W45 中减少, Phe 属于带苯环的氨基酸, 能和正电荷氨基酸结合, 稳定蛋白的三维结构。苯环的结构容易形成疏水的内核, 而在低温条件下更倾向于亲水性的内核, 因此 Phe 的减少可能有助于疏水内核减少<sup>[26]</sup>。较低温菌株 L37 中甘氨酸 Gly 和丝氨酸 Ser 数量明显增加, 而 M40 和 W45 中变化较

小。甘氨酸 Gly 和丝氨酸 Ser 的增加有利于增加较低温下蛋白的柔韧性, 维持亲和力。L37 和 M40 菌株的精氨酸数量减少而赖氨酸数量增多, 有研究表明, 碱性氨基酸中精氨酸较赖氨酸具有相对强的稳定性和疏水性, 在低温适应性脂酶中也发现定性氨基酸例如精氨酸等的减少, 可能有利于形成灵活的三级结构<sup>[27]</sup>。重测序结果分析还发现, 甲硫氨酸和缬氨酸在 L37 和 M40 中均明显增多, 但原因不明, 需进一步确定。

## 3 讨论

喜温嗜酸硫杆菌是生物冶金过程中重要的菌种, 菌株 SM-1 是本实验室前期从生物冶金反应器分离获得的, 最适生长温度为 45 °C<sup>[28]</sup>, 在 30–40 °C 下生长缓慢, 冶金效率降低, 因此限制了其在生物冶金中的应用。为了增强菌株在 30–40 °C 浸矿的效果, 通过长期在 37、40 °C 驯化 SM-1 菌株, 获得了适应在低于最适生长温度下生长的菌株。进一步通过罗氏 454 测序技术对其基因组进行重测序分析, 发现了菌株 L37、M40 和 W45 在不同温度下基因组的改变。基因组重测序分析发现, 在不同温度下, 3 株菌均发生了大量位点突变, 且这些突变位点中, 有许多是相同的, 说明菌株的基因组可塑性较强。

经过 2 年驯化, 3 种温度(37、40 和 45 °C) 下都发生突变的基因主要涉及 3 方面的功能。(1) 抗性基因, 包括砷抗性相关蛋白和毒性物质外排系统。在复杂的冶金环境中, 重金属以及其他有毒物质的胁迫不可避免, 对 SM-1 以及同属中其他菌种的基因组分析表明, *Acidithiobacillus* 属具有较多的重金属抗性相关基因和毒性物质外排基因<sup>[29–30]</sup>, 这说明基因组的构成与环境息息相

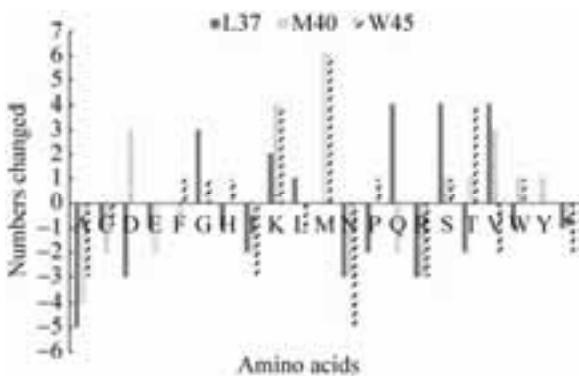


图 4. 不同温度菌株中氨基酸数量的变化

Figure 4. The changes of amino acids composition in different strains. The capital letters in x-axis represent the abbreviation of amino acid, the y-axis represents the variation numbers of amino acids. A: alanine; C: cysteine; D: aspartate; E: glutamate; F: phenylalanine; G: glycine; H: histidine; I: isoleucine; K: lysine; L: leucine; M: methionine; N: asparagine; P: proline; Q: glutamine; R: arginine; S: serine; T: threonine; V: valine; W: tryptophan; Y: tyrosine.



关, 本研究中抗性基因中的多个突变可能暗示这些基因在菌株对温度的适应过程中也起作用。ArsR family transcriptional regulator (Atc\_1809) 作为砷抗性基因操纵子的转录抑制因子, 通过与金属离子结合, 调节一些与金属离子排出相关蛋白的转录, 本研究中位于该基因的位点突变发生在 377 位, 通过 NCBI 比对, 该位点距离保守区域 6 个碱基。EmrB/QacA subfamily drug resistance transporter (Atc\_0891) 是一个毒性物质转运蛋白, 能够将胞内的有毒物质排出体外, 介导跨膜转运过程, 曾有研究表明在乳酸杆菌中, 具有类似功能的蛋白 Ir1584 能促进乳酸杆菌在胆汁中重新开始生长, 该结果表明, 转运蛋白在抗压环境中有利于细胞的生存, 本研究中该蛋白的 1337 位发生突变, 氨基酸由苏氨酸变为异亮氨酸(T466I)。这些结果启示我们探究毒性抗性系统在其他压力环境下的作用。(2) 基因调控相关基因。SM-1 基因组中, 分别编码 DNA 甲基化酶和蛋白酰基转移酶的基因 *atc\_1228*, *atc\_1229* 发生突变; DNA 甲基化酶甲基化程度的强弱可以控制基因的表达水平, 有文献报道, 在面对胁迫的植物中, DNA 甲基化水平明显下调, 更利于抗胁迫蛋白的表达从而适应环境。蛋白酰基转移酶的主要作用是催化蛋白质的酰基化和去酰基化, 能够同 DNA 甲基化过程共同调节某些抗胁迫基因的表达以应对环境压力。(3) 与核酸代谢相关的基因。ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta 和 ribonucleotide reductase of class Ia (aerobic) subunit beta 同属于核苷酸磷酸还原酶亚基, 催化脱氧核苷二磷酸形成, 与核苷酸代谢相关。有研究表明, 该酶提供必需的前体物质, 在 DNA 的修复中也具有重要作用, 核苷酸还原酶通过参与到细菌的基本生命代谢中, 控制细胞的生长、分

裂和繁殖, 在环境胁迫下, 直接调节 DNA 的合成速率, 影响细胞的生长和繁殖。突变发生在 DNA 合成的限速酶上, 其对于环境胁迫的适应性值得进一步分析和验证。

功能缺失也是基因组进化的选择之一<sup>[31]</sup>, 较低温驯化菌株 M40 中编码酰基转移酶的基因 *atc\_1562* 在基因组 1605242 位点突变为终止密码子, 推测该蛋白的功能在长期较低温驯化下缺失。

在较低温 37 °C 和 40 °C 驯化下, 各自所特有的突变基因涉及能量代谢以及 DNA/RNA 解旋作用等。细菌在压力条件下需要更多的能量提供给 DNA 修复系统, 因此能量的产生与环境适应性密切相关<sup>[32]</sup>, 在 L37 菌株中, 编码羧酶体壳蛋白 (carboxysome shell protein CsoS1) 的基因 *atc\_0932* 在 929355 位点发生突变。核酸结构的稳定性控制蛋白的表达, 已有研究证实, DNA 旋转酶及 RNA 解旋酶在细菌低温生存过程中发挥作用<sup>[20, 24]</sup>, 在 L37 及 M40 中, 编码 DNA 旋转酶的基因 *atc\_0004*<sup>[24]</sup> 及编码 RNA 解旋酶的基因 *atc\_1096* 分别发生突变。

较低温驯化的两个菌株 L37 和 M40 中 3 个分别编码转座酶、整合酶和假想蛋白的基因发生突变。由于这些突变只存在于较低温条件下, 推测其可能与菌体适应较低温度相关。但蛋白的具体功能和位点突变造成的影响仍需实验验证。

本研究对于较低温度适应性的研究是从单核苷酸的突变出发, 比较发现, 发生位点变化的功能基因在文献报道的对其他细菌的转录研究中, 处于低温条件时, 具有不同的表达水平, 这暗示硫代谢细菌可能具有与其他细菌相同的普遍的低温适应机制, 同时假想蛋白编码基因的突变, 又提示生物冶金微生物也具有特定的较低温适应机制。

## 参 考 文 献

- [1] Watling HR. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides-A review. *Hydrometallurgy*, 2006, 84(1/2): 81–108.
- [2] Meng CY, Jing QK, Ma J, Liu WY, Liu XY, Wen JK. Overview of microbiological technology for recovery of rare metal resources. *Chinese Journal of Rare Metals*, 2015, 39(4): 371–378. (in Chinese)  
孟春瑜, 荆乾坤, 马骏, 刘文彦, 刘兴宇, 温建康. 微生物技术在稀有金属资源利用中的研究概况. *稀有金属*, 2015, 39(4): 371–378.
- [3] Dopson M, Halinen AK, Rahunen N, Özkaya B, Sahinkaya E, Kaksonen AH, Lindström EB, Puhakka JA. Mineral and iron oxidation at low temperatures by pure and mixed cultures of acidophilic microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(5): 1205–1215.
- [4] Rawlings DE. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4: 13.
- [5] Lenski RE. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *International Microbiology*, 1998, 1(4): 265–270.
- [6] Sonderegger M, Sauer U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(4): 1990–1998.
- [7] Kuyper M, Toirkens MJ, Diderich JA, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Research*, 2005, 5(10): 925–934.
- [8] Wang QL, Hu EM, Yu RL, Zhang XW, Qiu GZ. Low-temperature bacteria domestication and leaching of sandstone-type refractory uranium ore. *Mining and Metallurgical Engineering*, 2011, 31(6): 6–8, 12. (in Chinese)  
王清良, 胡鄂明, 余润兰, 张晓文, 邱冠周. 细菌低温驯化及其浸出砂岩型铀矿试验研究. *冶矿工程*, 2011, 31(6): 6–8, 12.
- [9] Chen ZW, Liu YY, Wu JF, She Q, Jiang CY, Liu SJ. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 688–698.
- [10] You XY, Guo X, Zheng HJ, Zhang MJ, Liu LJ, Zhu YQ, Zhu BL, Wang SY, Zhao GP, Poetsch A, Jiang CY, Liu SJ. Unraveling the *Acidithiobacillus caldus* complete genome and its central metabolisms for carbon assimilation. *Journal of Genetics and Genomics*, 2011, 38(6): 243–252.
- [11] Russell RJM, Gerike U, Danson MJ, Hough DW, Taylor GL. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium. *Structure*, 1998, 6(3): 351–361.
- [12] Kube M, Chernikova TN, Al-Ramahi Y, Belouqui A, Lopez-Cortez N, Guazzaroni ME, Heipieper HJ, Klages S, Kotsyurbenko OR, Langer I, Nechitaylo TY, Lünsdorf H, Fernández M, Juárez S, Ciordia S, Singer A, Kagan O, Egorova O, Petit PA, Stogios P, Kim Y, Tchigvintsev A, Flick R, Denaro R, Genovese M, Albar JP, Reva ON, Martínez-Gomariz M, Tran H, Ferrer M, Savchenko A, Yakunin AF, Yakimov MM, Golyshina OV, Reinhardt R, Golyshin PN. Genome sequence and functional genomic analysis of the oil-degrading bacterium *Oleispira antarctica*. *Nature Communications*, 2013, 4: 2156.
- [13] Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(11): 1266–1267.
- [14] Hunger K, Beckering CL, Wiegshoff F, Graumann PL, Marahiel MA. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(1): 240–248.
- [15] Chintalapati S, Kiran MD, Shivaji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology*, 2004, 50(5): 631–642.
- [16] Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(15): 2819–2830.
- [17] Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2002, 99(15): 9727–9732.

- [18] Zhang MJ, Jiang CY, You XY, Liu SJ. Construction and application of an expression vector from the new plasmid pLAtc1 of *Acidithiobacillus caldus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(9): 4083–4094.
- [19] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3(2): 208–218.
- [20] Jones PG, Krahl R, Tafuri SR, Wolffe AP. DNA gyrase, Cs7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(18): 5798–5802.
- [21] Mizushima T, Kataoka K, Ogata Y, Inoue R, Sekimizu K. Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. *Molecular Microbiology*, 1997, 23(2): 381–386.
- [22] Esparza M, Cárdenas JP, Bowien B, Jedlicki E, Holmes DS. Genes and pathways for CO<sub>2</sub> fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, carbon fixation in *A. ferrooxidans*. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 229.
- [23] Vashisht AA, Tuteja N. Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, 84(2): 150–160.
- [24] Watanabe T, Kojima H, Fukui M. Draft Genome sequence of a psychrotolerant sulfur-oxidizing bacterium, *Sulfuricella denitrificans* skB26, and proteomic insights into cold adaptation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6545–6549.
- [25] Mazzon RR, Lang EAS, Braz VS, Marques MV. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 288(2): 178–185.
- [26] Metpally RPR, Reddy BVB. Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC Genomics*, 2009, 10: 11.
- [27] Arpigny JL, Feller G, Gerday C. Cloning, sequence and structural features of a lipase from the antarctic facultative psychrophile *Psychrobacter immobilis* B10. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1993, 1171(3): 331–333.
- [28] Hallberg KB, Lindström EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*, 1994, 140(12): 3451–3456.
- [29] Acuña LG, Cárdenas JP, Covarrubias PC, Haristoy JJ, Flores R, Nuñez H, Riadi G, Shmaryahu A, Valdés J, Dopson M, Rawlings DE, Banfield JF, Holmes DS, Quatrini R. Architecture and gene repertoire of the flexible genome of the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78237–e78237.
- [30] Travisany D, Cortés MP, Latorre M, Di Genova A, Budinich M, Bobadilla-Fazzini RA, Parada P, González M, Maass A. A new genome of *Acidithiobacillus thiooxidans* provides insights into adaptation to a bioleaching environment. *Research in Microbiology*, 2014, 165(9): 743–752.
- [31] Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genetics*, 2013, 9(7): e1003617.
- [32] Murata M, Fujimoto H, Nishimura K, Charoensuk K, Nagamitsu H, Raina S, Kosaka T, Oshima T, Ogasawara N, Yamada M. Molecular strategy for survival at a critical igh Temperature in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20063.

## Genomic plasticity of *Acidithiobacillus caldus* SM-1 at different temperatures

Xiaojing Li<sup>1,3</sup>, Jiangbao ta-Mahadesi<sup>1</sup>, Lan Yang<sup>1</sup>, Huajun Zheng<sup>4</sup>, Tangjian Peng<sup>5</sup>, Xu Zhang<sup>2</sup>, Chengying Jiang<sup>1\*</sup>, Shuangjiang Liu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

<sup>3</sup> Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

<sup>4</sup> Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China

<sup>5</sup> School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study is to gain the acclimated strain of *Acidithiobacillus caldus* SM-1 with high activity when growing at the temperatures below the optimum, and elaborate its genomic plasticity and adaptation at different temperatures. [Methods] Strains were incubated at 37 °C, 40 °C and 45 °C. We used 454 genome resequencing technology to find the single nucleotide mutant sites in genome. The genes including mutant sites were studied to understand their relationship with the temperature adaptation. [Results] By long-term breeding, we obtained strains with higher viability than unacclimated strain at temperatures (37 °C), which is lower than initial optimum growth temperature (45 °C). Resequencing results showed the genome of SM-1 with high plasticity. In the genome of different strains (incubated at 37 °C, 40 °C and 45 °C), 418, 384 and 347 single nucleotide mutation sites were accumulated, respectively. Among them, 20 mutant sites were commonly occurred in the three strains. The genes they affected are involved in heavy metals and toxic resistance system, DNA methylation and protein acylation, and nucleic acid metabolism. In comparison, the specific mutations of the strains, grown at the 37 °C and 40 °C, were related to energy metabolism, signal transduction and DNA/RNA stability. Three genes contained mutant sites are common in L37 and M40, of which, Atc\_1031 and Atc\_1623 encode proteins related to transposon insertion, Atc\_1130 encodes a hypothetical protein that is similar to the out membrane protein assembly factor B or the disulfide bond formation protein with 23% and 35% similarity. In addition, some single nucleotide mutations cause the amino acid changes of the related proteins during the adaption. [Conclusion] The genome of *At. caldus* SM-1 showed highly plasticity at different temperatures. The study provided a set of genomic data for understanding the temperature adaptability molecular mechanism of microorganisms. The study revealed that *At. caldus* SM-1 evolved to fit lower temperature through multiple pathways, not only by the general environment adaptation mechanism of microorganism, but also by the specific pathway of the strain.

**Keywords:** *Acidithiobacillus caldus*, bioleaching, comparative genomics, genomic plasticity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171234), by the Special Fund Project for Technology Innovation (CXJJ-15M034) and by the Open Funding Project of the State Key Laboratory of Bioreactor Engineering

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64807581; Fax: +86-10-64807421; E-mail: Shuangjiang Liu, liusj@im.ac.cn; Chengying Jiang, jiangcy@im.ac.cn

Received: 31 October 2016; Revised: 9 December 2016; Published online: 14 February 2017