



砷氧化菌株的筛选及 *Bosea* sp. AS-1 基因组分析

柳朝阳¹, 向利¹, 王红梅^{1,2}, 鲁小璐^{1*}

¹中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北 武汉 430074

²中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要:【目的】对湖南省锡矿山地区的砷氧化菌株的种属进行初步鉴定, 并对砷铈氧化菌株 *Bosea* sp. AS-1 (简称AS-1)进行全基因组测序和生物信息学分析。【方法】分离砷氧化菌株, 并利用16S rRNA 基因测序进行菌种鉴定。在此基础上, 对能够高效氧化砷的菌株AS-1进行全基因组测序, 对测序数据进行基因组组装和功能注释、COG、GO及KEGG聚类分析, 以及次级代谢产物合成基因簇与代谢途径预测等。【结果】湖南省锡矿山的砷氧化菌株主要分布在 α -、 β -、 γ -变形菌纲以及厚壁菌门。菌株AS-1基因组的测序结果显示AS-1基因组包含一条大小为5.536 Mb环状染色体和两个大小分别为189.9 kb和112.1 kb的质粒。对AS-1基因组进一步分析发现该菌株的基因组中包含砷铈代谢相关基因, 还有鞭毛形成、鞭毛运动及生物膜形成的基因, 这些基因的存在可能与AS-1能高效耐受和氧化砷和铈的特性相关。此外, 菌株AS-1中还存在部分碳固定基因和硫氧化基因, 这暗示着AS-1能够进行自养生长并氧化环境中的硫元素。【结论】菌株AS-1可以在自养条件下生长并且能够氧化Sb(III)为Sb(V)。

关键词: *Bosea* sp. AS-1, 全基因组测序, 砷、铈代谢基因, 代谢通路

砷(As)和铈(Sb)是位于元素周期表中第 V 主族元素, 它们具有相似的化学和毒理性质^[1]。长期暴露于砷、铈污染的环境中会损害人们的肝脏、心脏和心血管系统等^[2], 对人类的健康造成严重危害, 因此砷和铈及其化合物被美国环境保护署和欧盟视为主要污染物^[3-4]。近年来由于人类

活动导致砷和铈的大量释放, 引发各种环境污染问题^[5]。尽管砷和铈具有毒性, 但是很多微生物可以在高砷和/或高铈的环境中存活, 并且对As(III)和/或Sb(III)进行生物氧化, 将它们由毒性较高的三价转换为五价, 从而降低砷和铈在环境中的毒性。

基金项目: 国家自然科学基金(41877320, 41402300)

*通信作者。E-mail: 37113603@qq.com

收稿日期: 2020-02-14; 修回日期: 2020-04-12; 网络出版日期: 2020-05-21

目前已报到的砷氧化菌株种类很多, 广泛分布于各种环境, 如矿区尾矿、土壤、沉积物、酸性矿坑水、地下水以及热泉等。这些菌株主要隶属于变形菌门中的 α -、 β -、 γ -变形菌纲、异常球菌门以及厚壁菌门^[6-8]。目前对微生物参与砷代谢的机理已经研究得比较清楚: 微生物对亚砷酸盐的摄入主要是通过细胞膜上的甘油通道蛋白 GlpF, 使亚砷酸盐进入微生物细胞内, 此外甘油通道蛋白 GlpF 的同源蛋白 FpsIP 也发挥相似的功能^[9]。细胞中一部分未被氧化的 As(III) 通过由 ArsB 形成的 ATP 依赖性亚砷酸盐转运体外排出^[10], 或通过另一种亚砷酸盐转运体 ACR3 将其外排出体外^[11]。微生物对亚砷酸盐的氧化过程主要由砷氧化操纵子 *aio* 操纵子调控。该操纵子主要包括的基因有: 亚砷酸盐氧化酶基因 *aioBA*、c 型细胞色素 (*cytC*)、钼蛋白合成基因 (*chlE*)^[12]、感应器激酶基因 *aioS* 和响应器基因 *aioR*。在含有亚砷酸盐的情况下, *aio* 操纵子的各个基因共同控制微生物对 As(III) 的氧化功能和耐受功能。另外, 细菌编码砷抗性 (*ars*) 操纵子中除了基因 *arsC* 外, 还包含 *arsH*^[13]、硫氧还原蛋白基因 *arsTX*^[14] 以及乙酰胺转移酶基因 *arsN*^[15] 等, 这些基因共同构成了砷抗性系统, 帮助微生物细胞耐受环境中高浓度的砷。

到目前为止已被鉴定的砷氧化菌株有 70 多株, 它们分离于被砷污染的沉积物、矿井废水、工厂含砷排污水以及砷矿尾矿中, 这些砷氧化菌株主要分布在 α -、 β -、 γ -变形杆菌纲和放线杆菌门。在这些已报道的砷氧化菌株中只有两株分离自岩石矿物中的菌株 *Stibiobacter senarmontii*^[16] 和 IDSBO-4^[17] 能够在自养条件下氧化砷, 其他菌株则是在异养条件下进行砷氧化。在大肠杆菌中的研究发现微生物对 Sb(III) 的摄入可以通过甘油转

运体 GlpF 进行^[18]。砷氧化菌株对胞内的 Sb(III) 的外排则主要是通过外排蛋白 ArsB 和 Acr3 作用^[19]。2015 年在菌株 *Agrobacterium tumefaciens* 5A 中的研究发现, 砷氧化酶 AioAB 不仅可以氧化砷, 还可以催化对 Sb(III) 的氧化过程^[20]; 此外, Li 等在菌株 GW4 中鉴定出另一种 Sb(III) 氧化酶 AnoA^[21], 并且在后续的研究中发现在该菌株中的氧化应激反应产生的 H₂O₂ 可以作为非生物因子催化从 Sb(III) 到 Sb(V) 的氧化过程^[22]。另外在对菌株 *Agrobacterium tumefaciens* GW4 的研究中发现, 基因 *phoB2* 对 Sb(III) 的氧化具有正向调节作用, 且该基因与菌株对 Sb(III) 的抗性有关^[23]。

中国湖南省锡矿山有世界上最大的锑矿, 被誉为“世界锑都”。由于常年锑矿的开采和冶炼活动导致该地区土壤和地下水中砷、锑污染严重^[24]。因此, 该地区为研究微生物和砷、锑的相互作用以及微生物的砷、锑代谢研究提供了理想场所。在本研究中, 我们从锡矿山采集并分离纯化砷氧化菌株, 以了解该地区砷氧化菌的群落组成; 另外对其中的一株能够高效氧化砷和锑的菌株 AS-1 进行了全基因组测序, 通过分析该菌株的基因组组成与结构, 尝试从基因组的层面理解该菌株能较好适应矿区污染环境的原因。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 本研究所用的样品采集于湖南省冷水江市锡矿山锑矿区, 样品的种类主要有矿渣、尾矿和尾矿渗水等 10 个样品组。将所采集的样品封装在无菌的采样袋中并置于低温保温箱中带回实验室, 立即进行富集、分离、纯化筛选菌株。

1.1.2 培养基: 实验中所用的培养基为改良后的 CDM 培养基^[25]和 MSM 培养基^[26]。CDM 培养基配方为: 0.975 g/L MgSO₄, 1.00 g/L NH₄Cl, 0.014 g/L K₂HPO₄, 0.994 g/L Na₂SO₄, 0.051 g/L CaCl₂, 0.1% (W/V) yeast extract, pH 7.2。MSM 培养基配方为: 7.9 g/L Na₂HPO₄, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.3 g/L NH₄Cl, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 5 mL/L 微量元素, 10 mL/L 维生素溶液, 10 mmol/L 的 HCO₃⁻ (NaHCO₃), pH 7.2。微量元素配方为: 50 g/L EDTA, 22 g/L ZnSO₄·7H₂O, 5.54 g/L CaCl₂, 5.06 g/L MnCl₂·4H₂O, 4.99 g/L FeSO₄·7H₂O, 1.1 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1.57 g/L CuSO₄·7H₂O, 1.61 g/L CoCl₂。维生素溶液配方: 0.002 g/L 生物素(Biotin), 0.002 g/L 叶酸, 0.01 g/L 盐酸吡哆醇, 0.005 g/L 烟酸, 0.005 g/L 泛酸, 0.0001 g/L 维生素 B12, 0.005 g/L 对氨基苯甲酸, 0.005 g/L 硫辛酸。

1.2 砷氧化菌株的富集与分离纯化

向 100 mL 含 As(III) (终浓度 1 mmol/L)的 CDM 培养基加入 1 g (水样为 1 mL)采集的样品, 将其置于恒温振荡摇床(37 °C, 150 r/min)中培养 72–84 h, 然后取 200 μL 涂平板, 于恒温培养箱中培养 48 h 后, 挑取不同形态的菌株利用平板划线法进行进一步的分离、纯化。

1.3 菌株的鉴定与系统发育树分析

将实验纯化得到的单菌株接种到含有 2 mmol/L As(III)的 CDM 液体培养基中培养 72–96 h, 取菌液, 离心取上清, 然后用高锰酸钾法对菌株的砷氧化能力进行检测^[27]。记录具有砷氧化能力的菌株并对他们的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, PCR 扩增过程所需的引物 27F (5'-AGAGTTTGGATCCPTGGCTCAG-3') 和 1492R

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增的体系为: Ex Taq (12.5 μL)、27F (1 μL)、1492R (1 μL)、DNA (2 μL)、ddH₂O (8.5 μL); 扩增的程序为 94 °C 5 min, 30 个循环(94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min。将扩增成功的 PCR 产物送测序公司测序, 利用 NCBI 对测序成功的序列进行 BLAST 比对, 并和各个菌株同属的砷氧化菌株的 16S rRNA 序列用 MEGA7.0 软件利用邻接法建进化发育树。

1.4 菌株 AS-1 基因组 DNA 的提取与全基因组测序

将纯化后的菌株 AS-1 接种到 CDM 液体培养中于 30 °C、150 r/min 条件下培养至稳定期, 后用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 AS-1 的基因组 DNA, 送到上海美吉生物医药科技有限公司进行基因组测序。

1.5 菌株 AS-1 的全基因组测序与基因注释

菌株 AS-1 全基因组测序与基因注释过程如下。(1) 基因组测序主要分为两部分, 一部分是利用 CovarsM22 仪器将基因组 DNA 片段化处理, 然后构建小片段 PE 文库并对片段进行 Illumina Hiseq 测序。另一部分利用 G-tubes 方法将基因组 DNA 处理成片段并将片段两端分别连接成环状单链, 然后对单链片段进行三代单分子测序并单分子测序质量评估。(2) 对原始测序数据进行质控和对原始数据质量剪切。(3) 利用 SOAPdenovo (v2.04)初步组装 Illumina 测序数据, 利用 blasR 比对 Pacbio 的测序数据, 根据比对结果对单分子测序数据进行矫正与纠错; 然后基于 PacBio 校正后的原始测序数据, 利用 HGAP 组装软件对原始测序数据进行组装, 最终拼接得到 0 GAP 的全基因

组序列。(4) 利用 Glimmer 3.02 软件进行菌株 AS-1 的基因预测。用 Barmao7.0 和 tRNA-SE v1.3.1 软件预测基因组中的 rRNA 和 tRNA; 利用 NR 数据库、GOC 数据库、CO 数据库、KEGG 数据库等对菌株 AS-1 基因组中的基因进行预测和注释。

1.6 GenBank 登录号

菌株 AS-1 的基因组序列已提交 GenBank, 登录号为 CP022372。

1.7 菌株 AS-1 的自养生长及其对 Sb(III)的氧化

将活化后的 AS-1 的菌液接种到液体 CDM 培养基中于 35 °C、150 r/min 振荡培养至 OD_{600} 值约为 0.8, 按照实验 MSM 培养基体积的 1% (W/V), 取菌液于无菌的离心管中离心 (3000 r/min, 5 min)、弃上清, 然后用无菌的生理盐水洗涤菌株沉淀, 重复 3 次, 以除去其中的 CDM 培养基的成分。最后将含有菌株 AS-1 的悬浊液接种到含 1 mmol/L Sb(III)的 MSM 液体培养基中于 35 °C、150 r/min 恒温振荡培养。每隔 12 h 取 1 次样并用紫外分光光度计测定 OD_{600} 值, 将所取的样品进行离心 (12000 r/min, 3 min), 取上清保存, 待取样结束之后用高效液相色谱仪 (LC-20AT, 日本岛津公司, 日本)与原子荧光光谱仪 (SA-10, 北京吉天仪器有限公司, 中国)联用测定样品中不同价态 Sb 的浓度。

2 结果和讨论

2.1 菌株的鉴定及筛选

实验总共分离出 17 株不同的砷氧化菌株。通过利用邻接法将这 17 株菌株的 16S rRNA 序列和 18 株已发表的砷氧化菌菌株的 16S rRNA 序列构建系统进化发育树 (图 1), 发现本研究分离得到

17 株菌株主要分布在变形菌门中的无色杆菌属 (*Achromobacter*)、农杆菌属 (*Agrobacterium*)、申氏杆菌属 (*Shinella*)、剑菌属 (*Ensifer*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、包西氏属 (*Bosea*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*)和厚壁菌门中。这些菌属中均报道过砷氧化菌株的存在, 与我们的结果一致。Yamamura 等在 2014 年利用已报道的砷氧化菌株的 16S rRNA 基因构建进化发育树后发现, 砷氧化菌株主要分布现在 α -、 β -、 γ -变形菌纲、厚壁菌门和异常球菌门中^[28]。本研究分离的砷氧化菌株的分类和 Yamamura 等的研究结果相吻合。

2.2 锡矿山可培养砷氧化菌的特点

分离自湖南锡矿山的砷氧化菌株主要分为以下几个属 (图 1): *Bosea* 属主要包含菌株 XMN06、AS-1 和 XS20Y11; *Ochrobacterum* 属包含 XT06A08; *Shinella* 属包含 XWTS06 和 XSWE030701; *Agrobacterium* 属包含 XWTS03; *Rhizobium* 属包含菌株 XM20Y0701、XM20Y02 和 XT03A04; *Ensifer* 属包含 XRGM02; *Bacillus* 属包含 A01.9; *Pseudomonas* 属包含 XSWR0312; *Achromobacter* 属包含菌株 XS08A06、XSWR0309、B01.10 及 XM0Y04。 *Bosea* 属的 3 株菌株中 AS-1 的 16S rRNA 基因与 XMN06 在进化距离上更为接近, 而且这 3 株菌株的 16S rRNA 基因与分离自高砷地下水中的好氧自养型砷氧化菌株 *Bosea* sp. L7506^[29]的 16S rRNA 基因的相似度最高。分离的砷氧化菌株 XWTS06 属于 *Shinella* 属, 该菌株和分离于含砷铀矿的能够耐受高浓度砷的砷氧化菌株 *Shinella* sp. EIKU6 相似, 研究结果表明菌株 *Shinella* sp. EIKU6 不仅能够在不同的培养条件下

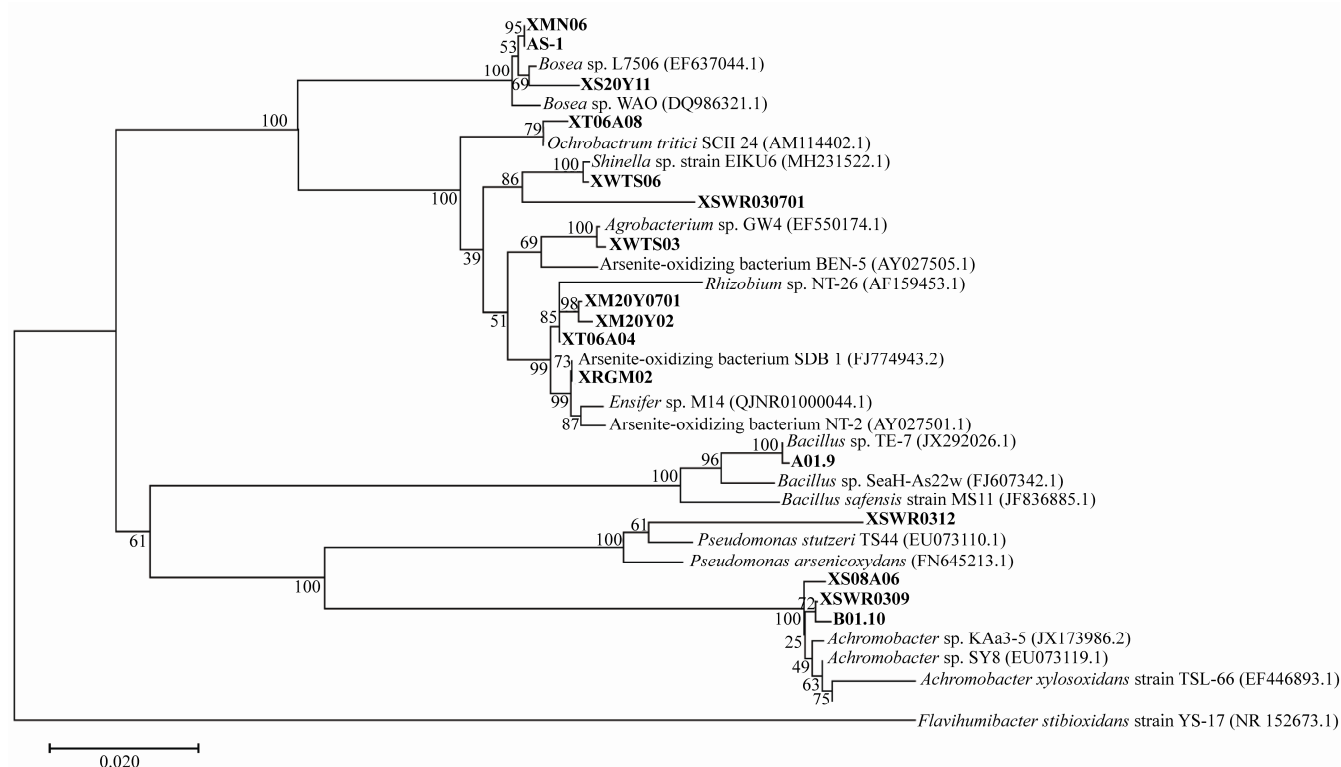


图 1. 基于 16S rRNA 和 NJ 法构建的湖南锡矿山锡矿区砷氧化菌的系统发育进化树

Figure 1. The phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene of arsenate-oxidizing bacteria at Xikuangshan mining area of Hunan province via N-J method with bootstrap values of 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets followed each bacterial name are 16S rRNA sequence accession numbers in NCBI.

进行砷氧化，而且对镉、铬、钴、锌等重金属也具有一定的抗性^[30]。XRGM02 隶属于 *Ensifer* 属，在进化树中和分离自韩国 Sangdong 矿区尾矿中的砷氧化菌株 SDB1 最为接近，SDB1 既可以在异养条件下高效氧化砷，又可以在自养条件下对砷进行氧化^[31]。在 *Agrobacterium* 属中和分离的菌株 XWTS03 相似的菌株是分离于山西省山阴市地下水沉积物中的砷锑氧化菌 *Agrobacterium tumefaciens* GW4，研究结果表明菌株 GW4 既可以氧化砷又可以氧化锑^[32]。和 XM20Y04 同属的菌株 *Achromobacter* sp. SY8 与菌株 XSWR0312 同属的砷氧化菌株 *Pseudomonas stutzeri* TS44 都分

离自湖北省黄石市高砷污染环境^[33]，与菌株 XT06A08 同属的砷氧化菌株是分离自农田土壤的砷氧化菌株 *Ochrobactrum tritici* SCII24^T，实验结果显示该菌株不仅能够耐受 50 mmol/L 的亚砷酸盐和 200 mmol/L 的砷酸盐，而且该菌株也能耐受 10 mmol/L 的亚锑酸盐^[34]。与菌株 A01.9 同属的砷氧化菌株有 3 株，由进化树可以看出，菌株 A01.9 和分离自印度马哈拉施特拉邦制革厂污水的砷氧化菌株 *Bacillus* sp. TE-7 进化距离比较近，实验表明 TE-7 能够在 12 h 内完全氧化 2 mmol/L 的 As(III)，另外研究表明该菌株不仅能够氧化 As(III)，还能够还原 Cr(VI)^[35]。综上所述，上述

已发表砷氧化菌株主要分离自含砷矿物、高砷或砷污染的水体以及砷污染的土壤和沉积物等环境中。这与本文筛选的砷氧化菌株的分离环境具有相似之处,如矿渣和尾矿、受污染的水体——尾矿渗水以及受污染的土壤中。由此推测这些菌株之间的砷氧化特性可能会相似,但是具体的砷砷氧化特性需要进一步的研究。

2.3 菌株 AS-1 基因组基本信息

我们前期的实验研究发现菌株 *Bosea* sp. AS-1 是一株高效的砷砷氧化菌株,且能耐受高达 120 mmol/L 的 As(III)和 50 mmol/L 的 Sb(III)^[36]。因此我们对菌株 AS-1 进行了全基因组测序进一步探究该菌株耐受砷砷的分子机制,测序结果显示本次测序获得的 reads 的长度大小主要集中在 0–20000 bp,测序质量良好,测序深度为 296X,最终拼接得到 0 GAP 的全基因组序列。经过对测序结果分析我们发现菌株 AS-1 的基因组中包括一条大小为 5.53 Mb 环状的染色体,以及 2 个大小分别为 189990 bp 和 112144 bp 的质粒(图 2),其 GC 含量分别为 65.86%、63.25%、66.89%(表 1);通过基因注释,在菌株 AS-1 染色体上共发现 5514 个 CDS (coding sequences),两个质粒中的 CDS 分别为 260 (质粒 1)和 152 个(质粒 2)。AS-1 的基因组中含有 50 个 tRNA 和 6 个 rRNA。

将菌株 AS-1 的全基因组信息利用 COG 数据库进行功能注释(图 3-A),我们发现 AS-1 的基因可分为 25 个功能分类,其中注释基因数量最多的 4 个组别为氨基酸转运和代谢(16.6%)、无机盐离子转运和代谢(9.79%)、能量产生和转换(7.57%)以及碳水化合物的转运和代谢(9.87%)。

利用 GO (gene ontology)数据库对 AS-1 的基

因组进行功能注释(图 3-B)后发现,AS-1 的基因总共可分为 37 类,其中和代谢基因相关的基因数量最多,为 1323,参与细胞过程的基因有 1041 个,参与单一生物过程中的基因为 925 个。

通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)注释(图 4),结果显示 AS-1 基因组中共注释到了 2795 个基因(50.69%)分布于 197 个代谢途径中。从图中可以看出,注释基因中和代谢相关的基因最多,包括碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢以及脂类代谢等。

将 AS-1 的基因组数据和同属中已完成全基因组测序的其他菌株的基因组数据进行比较(表 3),发现 *Bosea* 属基因组大小为 5.5–7.0 Mb,GC 含量在 65%左右。基因数量在 5100 到 6500 之间。本研究中的菌株 AS-1 的基因组大小、GC 含量以及基因数量和 CDS 数量接近于平均值。此外,将菌株 AS-1 的基因组信息和 Alexandra 等研究中与菌株 WAO 比较的 *Bosea* 属中其他 10 株菌株的基因组信息进行比较^[37],发现菌株 AS-1 的基因大小、功能基因数以及 COG 等均高于这 10 株菌株基因组的平均值。

2.4 菌株 AS-1 中砷砷代谢相关基因

对菌株 AS-1 基因组的进一步分析发现,菌株 AS-1 的基因组中含有许多与砷代谢相关基因:其

表 1. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 全基因组基本信息表

Table 1. The basic genome information of the *Bosea* sp. AS-1

Features	Chromosome	Plasmid 1	Plasmid 2
Gene num (#)	5514	260	152
Gene total length/bp	5536255	189990	112144
Gene average length/bp	905.27	640.68	653.76
GC%	65.86	63.25	66.89
Gene density/(number/kb)	1	1.37	1.36

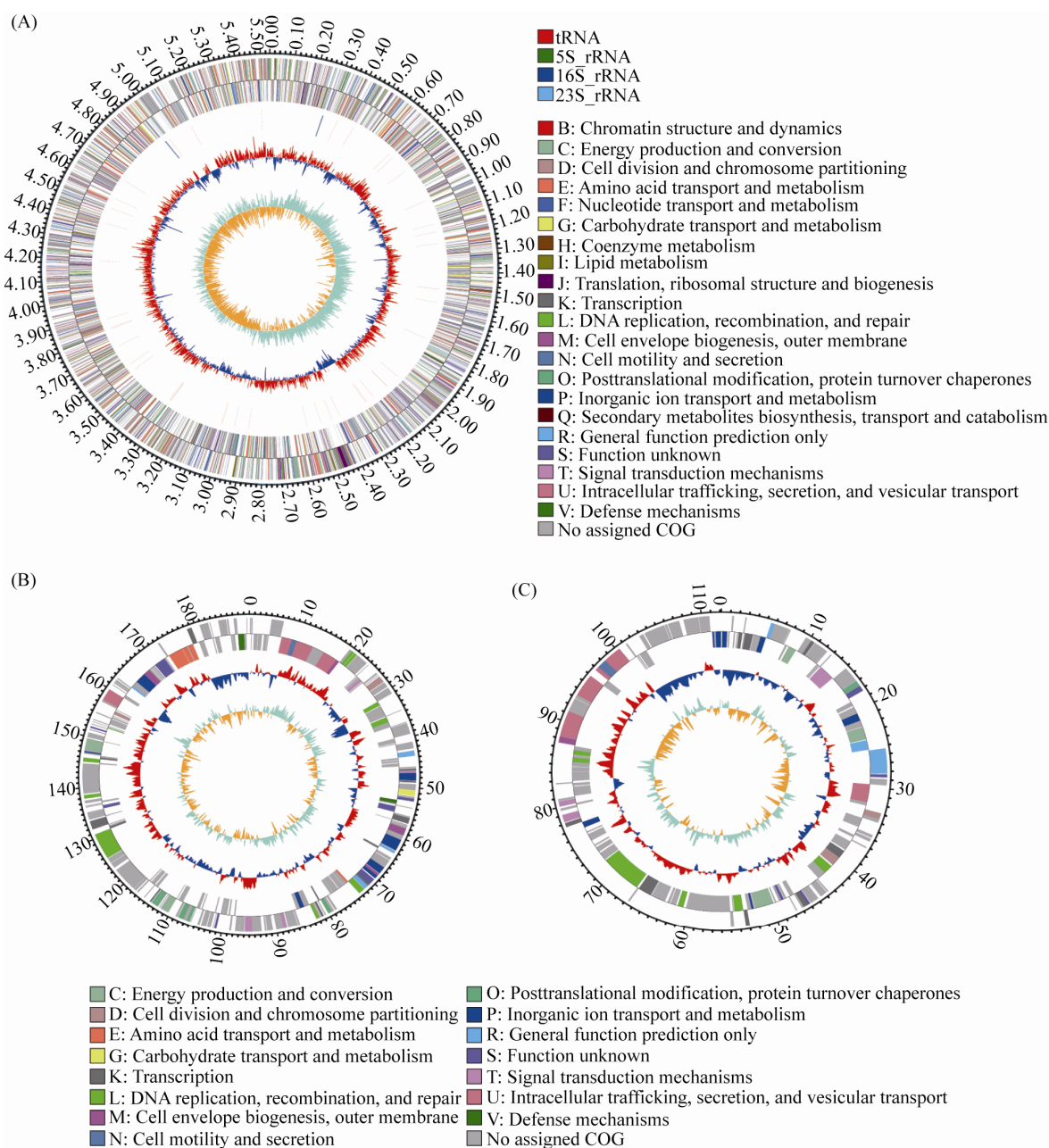


图 2. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 基因组基因圈图

Figure 2. The genomic map of chromosome (A), plasmid 1 (B) and plasmid 2 (C) of *Bosea* sp. AS-1. The outermost circle of the circle diagram is the genome-sized logo with 0.1 Mb between each scale value. The second and third circles are CDS on the positive and negative chains, and the different colors indicate the functional classification of different COGs of the CDS. The fourth circle is rRNA and tRNA; the fifth circle is GC content (Figure B, C does not have this circle). The outward red portion indicates that the GC content in the region is higher than the whole genome average GC content, and the inward blue portion indicates that the GC content in the region is lower than the whole genome average GC content. The innermost circle is the GC skew value 100 bp. The specific algorithm is G-C/G+C. In the biological sense, the positive value is more inclined to transcribe CDS, and the negative chain is more inclined to transcription CDS.

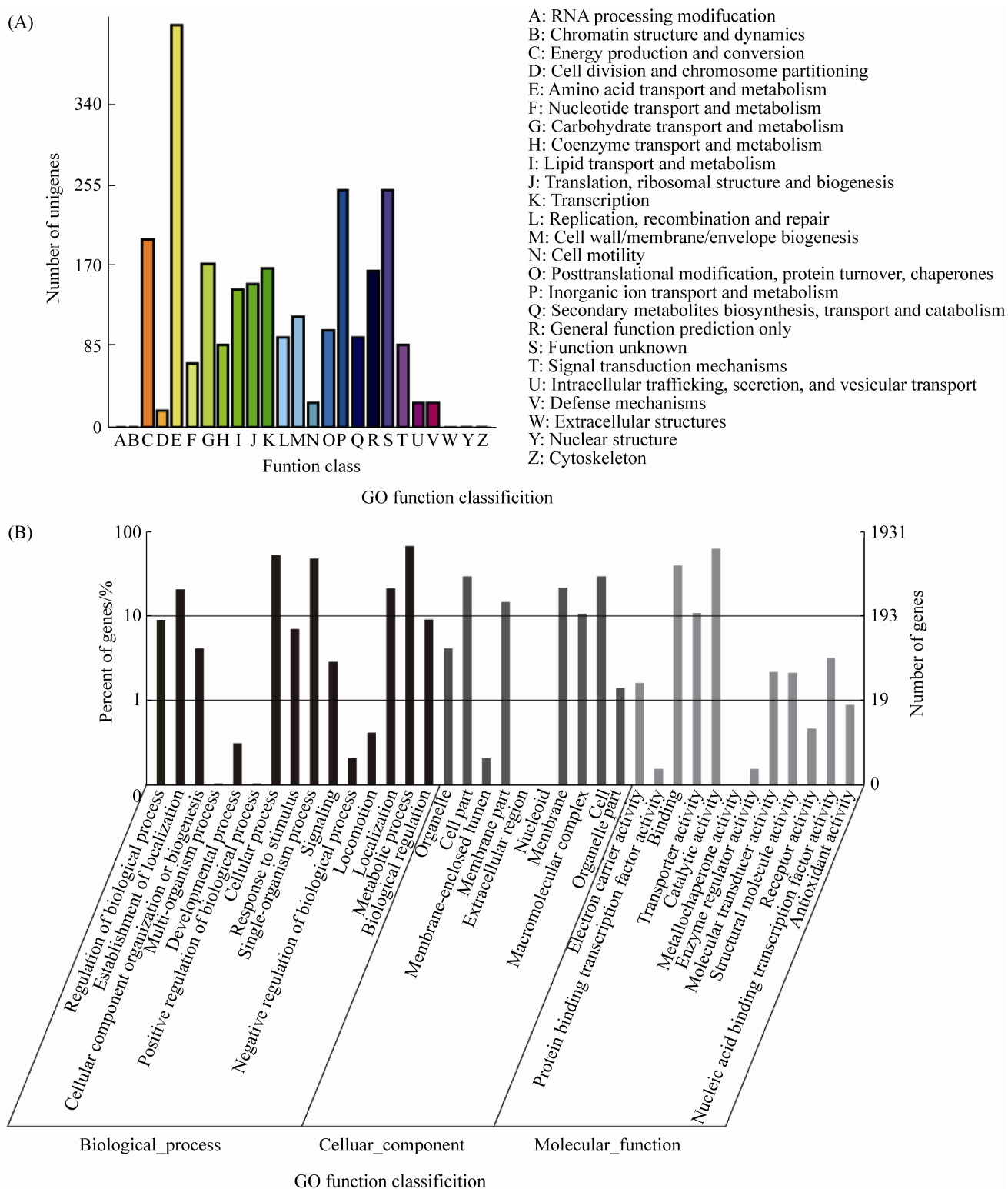


图 3. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 基因组中 COG 数据库(A)和 GO (B)数据库的功能注释

Figure 3. Functional annotations of *Bosea* sp. AS-1 genome against the COG database (A) and GO database (B).

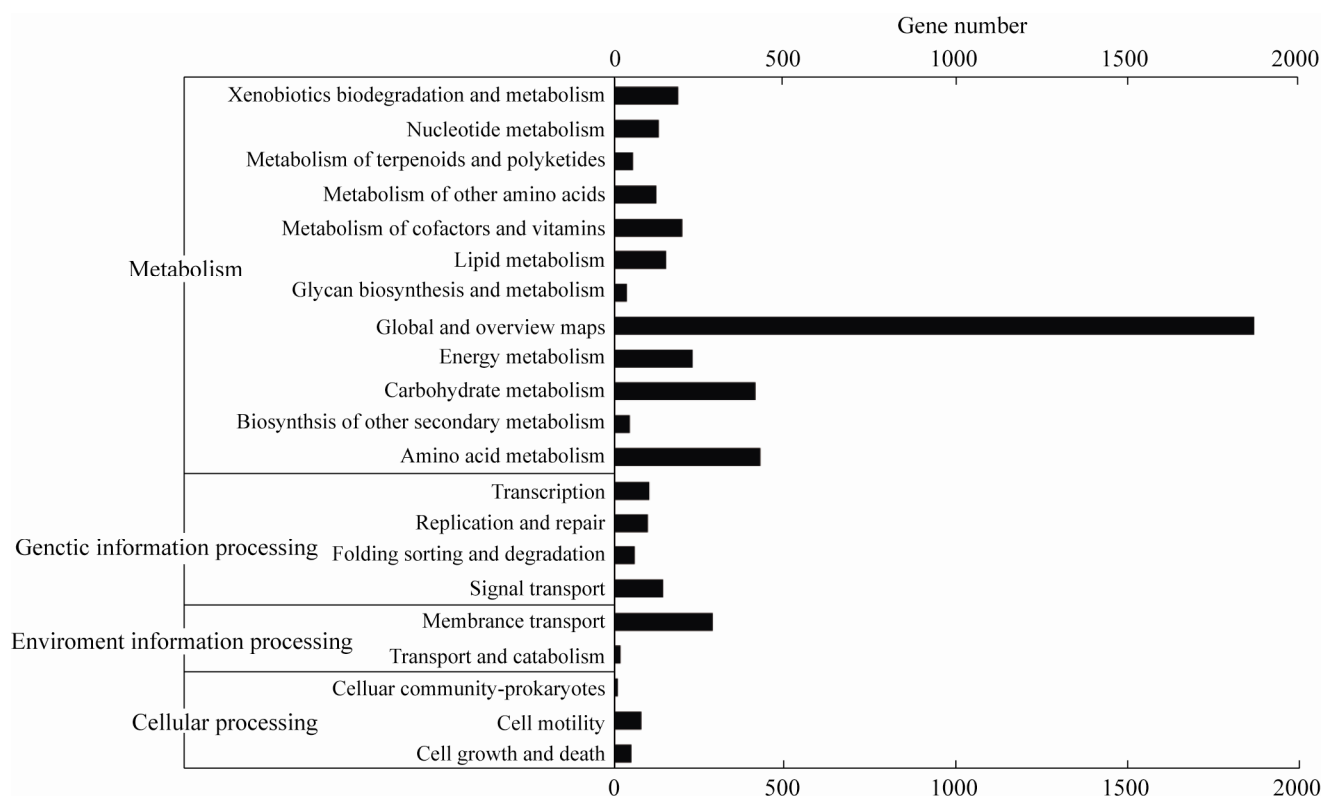


图 4. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 基因组中 KEGG 代谢通路注释图

Figure 4. Annotation map of KEGG metabolic pathways in the genome of *Bosea* sp. AS-1.

表 3. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 菌株与 *Bosea* 属其他菌株的全基因基本信息比较表

Table 3. Comparison of complete gene information among *Bosea* sp. AS-1 and other strains in the genus of *Bosea*

#Organism name	Size/Mb	GC/%	Scaffolds	Genes	Proteins	Level	Replicons
<i>Bosea</i> sp. F3-2	7.044	65.4	3	6594	6305	Complete genome	Chromosome: NZ_CP042331.1/CP042331.1; plasmid pB32-1: NZ_CP042332.1/CP042332.1; plasmid pB32-2: NZ_CP042333.1/CP042333.1
<i>Bosea</i> sp. Tri-49	6.45	65.9	2	6242	6096	Complete genome	Chromosome: NZ_CP017946.1/CP017946.1; plasmid unnamed1: NZ_CP017947.1/CP017947.1
<i>Bosea</i> sp. AS-1	5.53	63.25	3	5667	5501	Complete genome	Chromosome: NZ_CP022372.1/CP022372.1; plasmid unnamed1: NZ_CP022370.1/CP022370.1; plasmid unnamed2: NZ_CP022371.1/CP022371.1
<i>Bosea</i> sp. PAMC 26642	5.51	65.2	2	5294	5153	Complete genome	Chromosome: NZ_CP014301.1/CP014301.1; plasmid unnamed: NZ_CP014302.1/CP014302.1
<i>Bosea</i> sp. RAC05	5.62	67.6	2	5412	5274	Complete genome	Chromosome: NZ_CP016464.1/CP016464.1; plasmid pBSY19_1: NZ_CP016463.1/CP016463.1

染色体上有完整的 *aio* 操纵子, 包含 *aioBA*、*cytc*、*moeA*、*aioS* 和 *aioR* 基因; 负责细胞内 As(III)和 As(V)转运的相关基因, 如亚砷酸盐载体基因家族中的 *acr3*、磷酸盐转运蛋白 Pit、Pst 以及砷抗性相关基因 *arsC*、*arsH* 和 *arsR* (图 5)。有研究报道, *aioR* 可能通过调节 Ars 释放细胞质中的 As(III), 和/或调节 *anmK* 参与细胞壁/膜的代谢, 以阻止 As(III)的进入, 从而避免了 As(III)对细胞的毒害^[38]。实际上, 本课题组前期的研究表明, AS-1 可以在 24 h 内完全氧化 2 mmol/L 的 As(III)^[36]。因此, 这些砷代谢基因的存在可能帮助 AS-1 氧化和耐受砷, 从而更好地生存于高砷环境中。

通过比较菌株 AS-1 和 *Bosea* 属中其他几个已测序菌株(*Bosea* sp. 117、*Bosea* sp. WAO、*Bosea* sp. 67-29、*Bosea* sp. DSM18164 及 *Bosea vavilaviae* SD260)的砷代谢相关基因簇(图 6), 笔者发现这几个菌株中均含有与 *aio* 操纵子相关的基因和与砷

抗性相关的基因 *arsC*、*arsH* 以及 *arsR* 等, 且这些菌株中的砷代谢相关的基因在染色体上的排列顺序基本是一致的(图 6)。由此推测菌株 AS-1 中砷代谢基因的进化和同属的菌株可能是一致的。其中菌株 AS-1 的 *aio* 操纵子和菌株 *Bosea* sp. WAO 和 *Bosea* sp. 117 的 *aio* 操纵子中各个基因的排列相似度最高, 而且这 3 株菌株都具有砷氧化能力, 这说明这 AS-1 的砷氧化机制可能与菌株 WAO 和 117 相似。但 AS-1 和其他 5 株菌株的砷代谢基因簇表现出差异(图 6)。其中, 117 菌株中缺失了 *moeA* 和 *cytC* 基因, 而菌株 *B. vavilaviae* SD260 的 *aio* 操纵子中只含有 *aioB* 基因; 菌株 *B. sp.* DSM18164 的砷代谢基因簇在染色体上的顺序与菌株 AS-1 的基因顺序相反。发生这种变化的原因可能是菌株在进化过程中发生了基因的水平转移, 使得这些菌株中虽然含有和砷代谢相关的基因簇, 但是各菌株中基因簇中的基因具有差异。

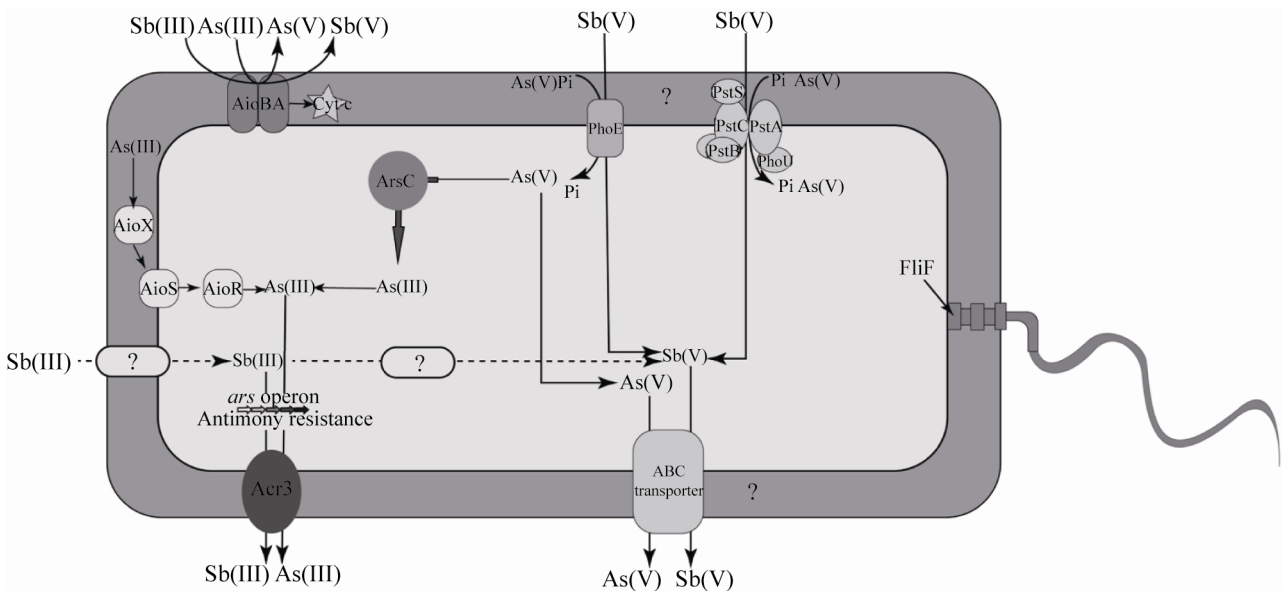


图 5. 菌株 *Bosea* sp. AS-1 中砷、锑代谢相关基因

Figure 5. Possible arsenic and antimony metabolism genes in strain *Bosea* sp. AS-1. The solid line represents the metabolic process verified in other arsenite- or antimonite-oxidizing bacteria, while ? indicates that the metabolic mechanism is unknown.

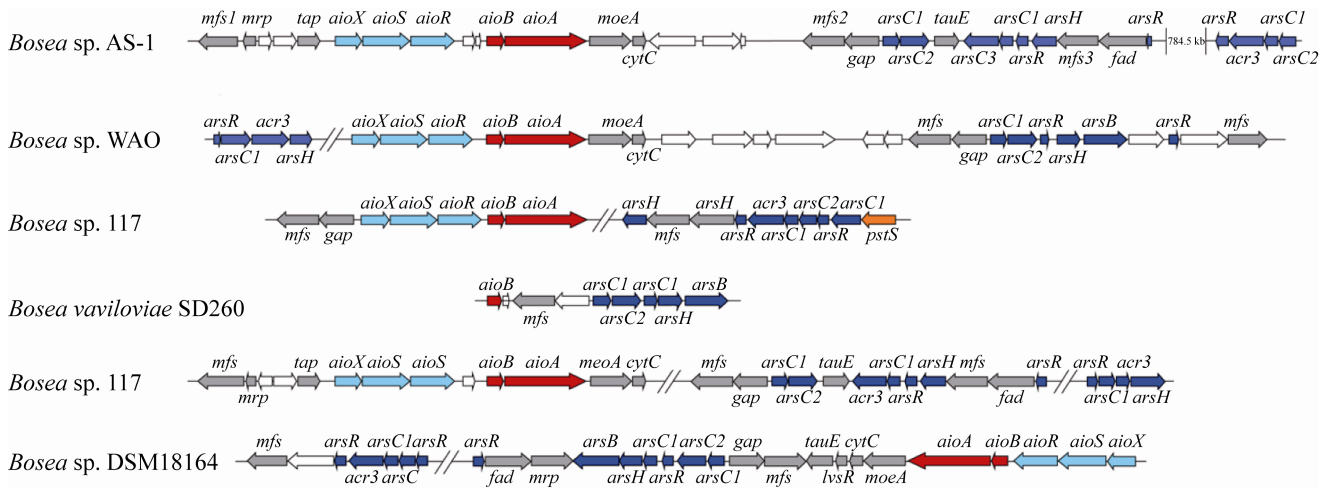


图 6. *Bosea* 属菌株中砷代谢基因簇

Figure 6. Arsenic metabolism gene cluster in *Bosea*. The white arrow indicates the unknown functional protein, and the double slash indicates that the genes on both sides belong to different scaffolds.

另外，在 AS-1 的基因组中发现了一些已报道的和砷代谢相关的基因，包括能够进行砷氧化的基因 *aioBA*，能够将细胞内 Sb(III)排出的 *acr3*，将 Sb(V)运输出细胞外的 ABC 转运子，以及能够转运 Sb(V)的磷酸盐通道蛋白 Pit 和 Pst 等。课题组前期研究表明，AS-1 具有很高的砷氧化和砷耐受能力^[36]，AS-1 基因组中这些砷代谢相关基因的存在表明 AS-1 可能通过这些基因的表达，增强菌株对砷的耐受性，减少 Sb(III)对细胞的毒害和胁迫作用，从而在含砷的环境中更好地生长。

此外，笔者还发现部分和砷代谢相关的基因在 AS-1 染色体和质粒上都存在，而且一些基因在染色体和质粒上存在着多拷贝，如 *aioA*、*arsC*、*arsR*、*GHS*、*arc3*、*cytC* 以及磷酸转运通道 Pst 相关基因等(图 5)。这些基因分布在染色体和质粒上，以及它们多拷贝特点可能和菌株 AS-1 能够耐受高浓度的砷、砷以及 AS-1 高效的砷氧化能力有关。进一步分析发现，分布在基

因组上不同位置的这些砷代谢基因的氨基酸序列所注释到的源菌株不同，如 AS-1 染色体上的 *aioA* 基因注释的源菌株为 *Xanthobacter autotrophicus*^[39]，质粒上的 *aioA* 基因的源菌株是一株分离自美国黄石公园热泉中的嗜热砷氧化菌株 *Thermocrinis ruber* DSM 12173^[40]。这说明 AS-1 的染色体和质粒上的 *aioA* 基因可能有不同的来源，发生这种现象的原因可能是细菌在进化的过程中发生了基因的水平转移。

前人研究表明，菌株 *A. tumefaciens* 5-A 可以利用自身的砷氧化酶 AioBA 对 Sb(III)进行氧化^[20]。我们的前期实验发现，AS-1 在不同碳源条件下对砷表现出不同的氧化特性，在以酵母提取物为碳源时，菌株 AS-1 对砷的氧化能力强于砷，但是在以乳酸钠为碳源的条件菌株对砷的氧化效率优于砷^[36]，这说明菌株 AS-1 对 As(III)、Sb(III)的氧化可能是由不同的代谢途径所控制，暗示 AS-1 中可能存在 AioBA 之外的酶负责对砷的氧化。目前已发现的另一个细菌砷氧化酶是 *anoA*，

但在 AS-1 的基因组中并没有发现 *anoA* 基因, 因此 AS-1 中可能存在新的锑氧化酶基因。

另外, 基因组分析发现菌株 AS-1 中缺少可介导 As(III)和 Sb(III)外排的转运蛋白基因 *arsB*, 但是 AS-1 中含有一种三价类金属或 H^+ 逆向转运基因 *acr3*。研究表明基因 *acr3* 可与 *arsC* 进行共转录, 并代替 *arsB* 发挥功能使得细胞内的 As(III)和 Sb(III)的外排至体外^[40]。在 AS-1 的基因组中并未发现编码吸收 As(III)和 Sb(III)的通道蛋白甘油通道蛋白的基因 *glpF*, AS-1 能够耐受高浓度的 Sb(III)并具有高效的 Sb(III)氧化效率^[35], 这说明菌株 AS-1 中可能存在非 GlpF 依赖的其他的 Sb(III)吸收途径。

2.5 重金属抗性的基因

AS-1 基因组中还包含许多与重金属抗性相关的基因, 如铜抗性的基因, 铜转运 P 型 ATP 酶(可能涉及铜、铅、镉、锌和汞的转运), 钴、锌和镉的抗性基因 *czcA* 等, 暗示着 AS-1 可能具有这些重金属抗性, 这与课题组前期的实验结果菌株 AS-1 可以在含有 Zn(II)、Pb(II)、Cu(II)的环境中生长相一致^[36]。这也和菌株 AS-1 的分离地环境相符合, 锑矿在生成时会和一些其他重金属共生生成矿, 因此分离地含有多种重金属污染。AS-1 的这些重金属抗性基因可以增加自身对生存环境的适应能力。

2.6 AS-1 基因组中其他的代谢途径

碳代谢途径: 在 AS-1 基因组中含有与碳代谢以及碳固定相关的基因大约 200 个。目前已发现的微生物碳固定的途径有 6 条, 分别是卡尔文循环、还原乙酰辅酶 A 途径、还原柠檬酸途径、3-羟基丙酸双循环、3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环、

二羧酸/4-羟基丁酸循环^[41-42]。AS-1 基因组中含有 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环和还原乙酰辅酶 A 途径中的一些基因。AS-1 基因组中含有 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环中的关键酶基因——乙酰辅酶 A 羧化酶基因。而且据研究该固碳途径可以存在于严格的厌氧菌株如 *Stygiolobus azoricus*, 也可在微厌氧微生物存在^[43]。而且在一些 *Acidanus* spp. 和 *Sulfolobus* spp. 种中也检测到 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环途径中的关键酶基因^[43-44]。另外在 AS-1 基因组中还发现了还原乙酰辅酶 A 途径中的关键酶基因——一氧化碳脱氢酶和乙酰辅酶 A 合成酶。因此我们推测菌株 AS-1 中可能进行自养生长。此外菌株中还有完整的三羧酸循环、戊糖磷酸途径 D-核糖利用、脱氧核糖和脱氧核苷酸分解代谢以及乳酸利用等生理代谢途径。

为验证 AS-1 是否能进行自养生长, 我们将 AS-1 于含 Sb(III)的 MSM 培养基中培养, 结果发现在培养第 11 天时 OD_{600} 达到 0.048 且菌株 AS-1 对 Sb(III)的氧化效率可达到 80%左右, 对照组无明显生长和氧化现象, 这说明菌株 AS-1 能够在自养条件下缓慢生长并且对 Sb(III)进行氧化(图 7)。MSM 培养基中包含多种的电子供体(如 Sb^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 等), 但是除了 Sb^{3+} 之外, 其他的电子供体在溶液中的浓度非常低, 而且实验结果显示, 随着实验时间的增加, 溶液中的 Sb(III)浓度减少, Sb(V)浓度显著增加。因此我们推测菌株 AS-1 通过对亚锑酸盐[Sb(III)]的氧化以获取自养生长所需的能源, 促进其在自养条件下的生长。

硫代谢途径: 基因组分析表明菌株 AS-1 中含有完整的 *sox* 基因簇和硫代谢相关的一些基因, *sox* 基因簇由 7 个基因 *soxXYZABCD* 组成, 编码将

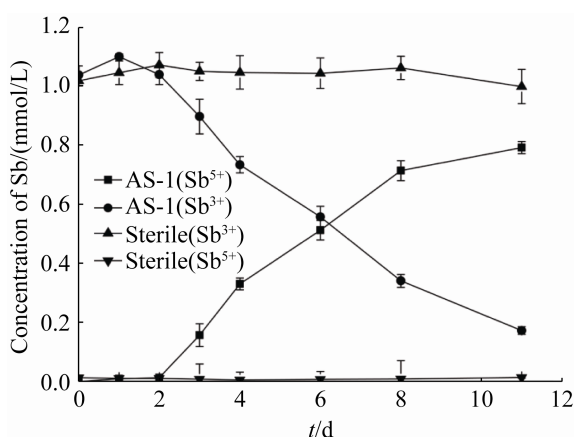


图 7. 自养条件下菌株 *Bosea sp.* AS-1 对 Sb(III) 的氧化

Figure 7. The Sb(III) oxidation curve of *Bosea sp.* AS-1 under autotrophic conditions. The standard deviation of the mean value and the measured value indicates the error bar.

硫化物氧化成硫酸盐所需的蛋白质^[44]。在与 AS-1 同属的菌株 *Bosea sp.* WAO、*B. thiooxidans* CGMCC 9174 V5_1、*Bosea sp.* 117、*Bosea sp.* LC85 和 *B. lupini* 中也发现了完整的 *sox* 系统。经过对菌株 AS-1 的基因组中 *sox* 系统分析发现 *soxX*、*soxA* 基因位于染色体的负链，*soxY*、*soxB*、*soxC*、*soxD* 基因位于 AS-1 染色体正链上。对比 *Bosea* 属中其他菌株基因组中的 *sox* 系统分析发现，菌株 *Bosea sp.* 117 和 *Bosea sp.* LC85 中 *sox* 系统的基因在其染色体上的分布与 AS-1 相同，而菌株 *Bosea sp.* WAO 和 *B. lupini* 中的 *sox* 系统染色体的分布与 AS-1 相反，*soxX*、*soxA* 基因位于染色体的正链，*soxY*、*soxB*、*soxC*、*soxD* 基因位于染色体负链上^[37]。通过比较菌株 AS-1 和菌株 *Bosea sp.* 117、*Bosea sp.* LC85 以及 *Bosea sp.* WAO 中的关键硫氧化酶基因 *soxB* 的氨基酸序列发现，AS-1 的 *soxB* 基因和菌株 *Bosea sp.* WAO 最相似，相似度为 85.66%，前人研究发现菌株 *Bosea sp.* WAO

在自养生长条件下能够将硫化物氧化为硫酸盐。由于 AS-1 分离于锑矿尾矿中，并且其基因组中具有完整的 *sox* 系统，由此我们推测菌株 AS-1 可能具有能够将硫化物氧化成硫酸盐的能力。

菌株 AS-1 基因组中除了硫代谢相关的基因外，还具有和氮代谢相关的基因，主要包括编码硝酸盐还原、亚硝酸盐还原和一氧化氮还原酶基因：*napEFABC*、*nirK* 以及 *norCBQD*。而且据研究 Nap 系统对于菌株的好氧反硝化作用极为重要^[45]。

2.7 鞭毛基因分析

菌株 AS-1 具有鞭毛^[36]。通过对菌株 AS-1 中的鞭毛基因进行分析发现，AS-1 总共有 35 个和鞭毛相关的基因，鞭毛 M 蛋白编码基因 *fliF*，鞭毛运动旋转蛋白编码基因 *motA*、*motB*，参与鞭毛和细菌运动调节的基因 *qseBC*、*flhA*、*flhB*、*flhCD*、*flhB2*、*flgABCDEFGHIK*、*fliEFGHILMNPQR*、*noeJ* 和 *kdsA* 等基因。Jérémy 等对砷氧化菌株 *Rhizobium sp.* NT-26 研究发现，其对亚砷酸盐的氧化会影响鞭毛形成与菌株运动，在亚砷酸盐存在的情况下 NT-26 基因组中和鞭毛相关的基因表达上调^[46]，而当把 NT-26 的 *aioA* 和 *aioR* 基因突变后，菌株的运动能力下降，作者认为这可能是由于 *aioA* 和 *aioR* 的缺失使得菌株无法代谢亚砷酸盐，从而导致了细菌能量的减少^[46-47]。另外，在菌株 NT-26 中发现编码甘露糖-1-磷酸鸟苷基转移酶基因 *noeJ* 和编码 2-脱氢-3-脱氧磷辛酸醛缩酶基因(*kdsA*)在有 As(III)的条件下会诱导菌株胞外多糖基质合成基因的表达，这说明 As(III)与菌株 NT-26 的鞭毛合成(即运动型)和生物膜的形成有关系^[46,48-49]。另外有研究报道 As(III)存在的条件下，基因 *qseBC* 通过群体感应机制参与鞭毛和细菌运动的调节，

通过 *qseB* 与 *fhDC* 操纵子上的启动子直接结合, 从而增强 *qseBC* 诱导菌株鞭毛基因发生转录^[50]。菌株 AS-1 中的这些鞭毛相关基因可能发挥类似的功能, 在 As(III) 存在的情况下, 使得菌株 AS-1 的耐受性与运动性增强, 从而在含有高浓度的 As(III) 的环境中更好地生存。

3 结论

本文通过纯化分离砷氧化菌株, 利用 16S rRNA 基因测序进行菌种鉴定, 发现采自湖南省锡矿山锑矿区不同样品中的砷氧化菌株主要分布在 α -、 β -、 γ -变形菌纲以及厚壁菌门。通过全基因组测序的方法, 获得了菌株 *Bosea* sp. AS-1 全基因组序列。通过对菌株 AS-1 基因组进一步分析我们发现, AS-1 基因组中含有砷锑氧化以及和砷锑抗性相关的基因和重金属抗性基因, 这与 AS-1 能高效氧化砷锑、耐受砷锑和多种重金属的特性相符; 菌株 AS-1 基因组中含有一些碳固定基因以及完整的 *sox* 系统; 暗示菌株 AS-1 可能具有自养生长和将硫化物氧化为硫酸盐的能力, 进一步实验证明菌株 AS-1 能够在自养条件下生长。此外, AS-1 中含有的众多鞭毛相关基因, 可能帮助菌株提高对砷的耐受性及增强运动性, 从而在高砷环境中更好地生存。

参考文献

- [1] Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere*, 2013, 91: 869–881.
- [2] Feng RW, Wei CY, Tu SX, Ding YZ, Wang RG, Guo JK. The uptake and detoxification of antimony by plants: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 2013, 96: 28–34.
- [3] Filella M, Belzile N, Chen YW. Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. *Earth-Science Reviews*, 2002, 57(1/2): 125–176.
- [4] Wang N, Lu XL, Wu MXJ, Wang M, Wang HM. Progress in microbial oxidation of As(III) and Sb(III). *Microbiology China*, 2017, 44(3): 689–700. (in Chinese)
王年, 鲁小璐, 邬梦晓俊, 王猛, 王红梅. 微生物氧化 As(III) 和 Sb(III) 的研究进展. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 689–700.
- [5] Reimann C, Matschullat J, Birke M, Salminen R. Antimony in the environment: lessons from geochemical mapping. *Applied Geochemistry*, 2010, 25(2): 175–198.
- [6] Oremland RS, Stolz JF, Hollibaugh JT. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(1): 15–27.
- [7] Quéménéur M, Heinrich-Salmeron A, Muller D, Lièvrement D, Jauzein M, Bertin PN, Garrido F, Joulian C. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(14): 4567–4573.
- [8] Fan H, Su C, Wang Y, Yao J, Zhao K, Wang Y, Wang G. Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(2): 529–539.
- [9] Wysocki R, Chéry CC, Wawrzycka D, Van-Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(6): 1391–1401.
- [10] Martin P, DeMel S, Shi J, Gladysheva T, Gatti DL, Rosen BP, Edwards BFP. Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure*, 2001, 9(11): 1071–1081.
- [11] Nakajima T, Hayashi K, Nagatomi R, Matsubara K, Moore JE, Millar BC, Matsuda M. Molecular identification of an arsenic four-gene operon in *Campylobacter lari*. *Folia Microbiologica*, 2013, 58(3): 253–260.
- [12] Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, Hassett DJ, McDermott TR. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(3): 1081–1088.
- [13] Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsène-Ploetze F, Carapito C, Chandler M, Cournoyer B, Cruveiller S, Dossat C, Duval S, Heymann M, Leize E, Lieutaud A, Lièvrement D, Makita Y,

- Mangenot S, Nitschke W, Ortet P, Perdrial N, Schoepp B, Siguier P, Simeonova DD, Rouy Z, Segurens B, Turlin E, Vallenet D, van Dorsselaer A, Weiss S, Weissenbach J, Lett MC, Danchin A, Bertin PN. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genetics*, 2007, 3(4): e53.
- [14] Achour AR, Bauda P, Billard P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Research in Microbiology*, 2007, 158(2): 128–137.
- [15] Chauhan NS, Ranjan R, Purohit HJ, Kalia VC, Sharma R. Identification of genes conferring arsenic resistance to *Escherichia coli* from an effluent treatment plant sludge metagenomic library. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 67(1): 130–139.
- [16] Lialikova NN. *Stibiobacter senarmontii*-a new microorganism oxidizing antimony. *Mikrobiologiya*, 1974, 43(6): 941–943.
- [17] Terry LR, Kulp TR, Wiatrowski H, Miller LG, Oremland SR. Microbiological oxidation of antimony(III) with oxygen or nitrate by bacteria isolated from contaminated mine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(24): 8478–8488.
- [18] Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 31010–31017.
- [19] Meng YL, Liu ZJ, Rosen BP. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(18): 18334–18341.
- [20] Lehr CR, Kashyap DR, McDermott TR. New insights into microbial oxidation of antimony and arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2386–2389.
- [21] Li JX, Wang Q, Li MS, Yang BR, Shi MM, Guo W, McDermott TR, Rensing C, Wang GJ. Proteomics and genetics for identification of a bacterial antimonite oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(10): 5980–5989.
- [22] Li JX, Yang BR, Shi MM, Yuan K, Guo W, Wang Q, Wang GJ. Abiotic and biotic factors responsible for antimonite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43225.
- [23] Li JX, Qiao ZX, Shi MM, Zhang YX, Wang GJ. Regulation of antimonite oxidation and resistance by the phosphate regulator PhoB in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Microbiological Research*, 2019, 226: 10–18.
- [24] Zhou JW, Nyirenda, MT, Xie LN, Li Y, Zhou BL, Zhu Y, Liu HL. Mine waste acidic potential and distribution of antimony and arsenic in waters of the Xikuangshan mine, China. *Applied Geochemistry*, 2017, 77: 52–61.
- [25] Weeger W, Lièvreumont D, Perret M, Lagarde F, Hubert JC, Leroy M, Lett MC. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals*, 1999, 12(2): 141–149.
- [26] Rhine ED, Onesios KM, Serfes ME, Reinfelder JR, Young LY. Arsenic transformation and mobilization from minerals by the arsenite oxidizing strain WAO. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(5): 1423–1429.
- [27] Salmassi TM, Venkateswaren K, Satomi M, Newman DK, Hering JG. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiology Journal*, 2002, 19(1): 53–66.
- [28] Yamamura S, Amachi S. Microbiology of inorganic arsenic: from metabolism to bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(1): 1–9.
- [29] Liao VHC, Chu YJ, Su YC, Hsiao SY, Wei CC, Liu C, Liu CW, Liao CM, Shen WC, Chang FJ. Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2011, 123(1/2): 20–29.
- [30] Bhakat K, Chakraborty A, Islam E. Characterization of arsenic oxidation and uranium bioremediation potential of arsenic resistant bacteria isolated from uranium ore. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(13): 12907–12919.
- [31] Lugtu RT, Choi SC, Oh YS. Arsenite oxidation by a facultative chemolithotrophic bacterium SDB1 isolated from mine tailing. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(6): 686–692.
- [32] Wang Q, Qin D, Zhang SZ, Wang L, Li JX, Rensing C, McDermott TR, Wang GJ. Fate of arsenate following arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(6): 1926–1940.
- [33] Cai L, Rensing C, Li XY, Wang GJ. Novel gene clusters involved in arsenite oxidation and resistance in two arsenite oxidizers: *Achromobacter* sp. SY8 and *Pseudomonas* sp. TS44. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(4): 715–725.
- [34] Branco R, Chung AP, Morais PV. Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in

- the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24^T. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 95.
- [35] Bagade A, Nandre VS, Ghosh S, Battu S, Haram S, Giri A, Kodam K. Rapid and efficient sequestration of arsenic from contaminated water using hypertolerant *Bacillus* L-148 sp.: a two-step process. *Green Chemistry*, 2019, 21(9): 2245–2251.
- [36] Lu XL, Zhang YN, Liu CY, Wu MXJ, Wang HM. Characterization of the antimonite- and arsenite-oxidizing bacterium *Bosea* sp. AS-1 and its potential application in arsenic removal. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 527–534.
- [37] Walczak AB, Yee N, Young LY. Draft genome sequence of *Bosea* sp. WAO an arsenite and sulfide oxidizer isolated from a pyrite rock outcrop in New Jersey. *Standards in Genomic Sciences*, 2018, 13: 6.
- [38] Shi KX, Wang Q, Fan X, Wang GJ. Proteomics and genetic analyses reveal the effects of arsenite oxidation on metabolic pathways and the roles of AioR in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 700–709.
- [39] Stolz JF, Oremland RS. Microbial metal and metalloid metabolism: advances and applications. Washington: ASM, 2011.
- [40] Härtig C, Lohmayer R, Kolb S, Horn MA, Inskeep WP, Planer-Friedrich B. Chemolithotrophic growth of the aerobic hyperthermophilic bacterium *Thermocrinis ruber* OC 14/7/2 on monothioarsenate and arsenite. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 90(3): 747–760.
- [41] Yuan HZ, Qin HL, Liu SL, Nie SA, Wei WX, Wu JS. Advances in research of molecular ecology of carbon fixation microorganism. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(14): 2951–2958. (in Chinese)
袁红朝, 秦红灵, 刘守龙, 聂三安, 魏文学, 吴金水. 固碳微生物分子生态学研究. *中国农业科学*, 2011, 44(14): 2951–2958.
- [42] Berg IA, Ramos-Vera WH, Petri A, Huber H, Fuchs G. Study of the distribution of autotrophic CO₂ fixation cycles in Crenarchaeota. *Microbiology*, 2010, 156(1): 256–269.
- [43] Ishii M, Miyake T, Satoh T, Sugiyama H, Oshima Y, Kodama T, Igarashi Y. Autotrophic carbon dioxide fixation in *Acidianus brierleyi*. *Archives of Microbiology*, 1996, 166(6): 368–371.
- [44] Friedrich CG, Rother D, Bardischewsky F, Quentmeier A, Fischer J. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 2873–2882.
- [45] Bedmar EJ, Robles EF, Delgado MJ. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33(1): 141–144.
- [46] Andres J, Arsène-Ploetze F, Barbe V, Brochier-Armanet C, Cleiss-Arnold J, Coppée JY, Dillies MA, Geist L, Joubin A, Koechler S, Lassalle F, Marchal M, Médigue C, Muller D, Nesme X, Plewniak F, Proux C, Ramírez-Bahena MH, Schenowitz C, Sismeiro O, Vallenet D, Santini JM, Bertin PN. Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(5): 934–953.
- [47] Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, Macy JM. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(1): 92–97.
- [48] Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsène-Ploetze F, Carapito C, Chandler M, Cournoyer B, Cruveiller S, Dossat C, Duval S, Heymann M, Leize E, Lieutaud A, Lièremont D, Makita Y, Mangenot S, Nitschke W, Ortet P, Perdrial N, Schoepp B, Siguier P, Simeonova DD, Rouy Z, Segurens B, Turlin E, Vallenet D, van Dorsselaer A, Weiss S, Weissenbach J, Lett MC, Danchin A, Bertin PN. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genetics*, 2007, 3(4): e53.
- [49] Marchal M, Briandet R, Koechler S, Kammerer B, Bertin PN. Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas arsenicoxydans*. *Microbiology*, 2010, 156(8): 2336–2342.
- [50] Clarke MB, Sperandio V. Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and σ^{28} (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(6): 1734–1749.

Screening and genome analysis of arsenite-oxidizing strain *Bosea* sp. AS-1

Chaoyang Liu¹, Li Xiang¹, Hongmei Wang^{1,2}, Xiaolu Lu^{1*}

¹ School of Environmental Studies, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, Hubei Province, China

² State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] In this study, we aimed to characterize the community structure of arsenite-oxidizing bacteria in Xikuangshan of Hunan Province, and the whole genome of an arsenite-antimonite-oxidizing strain *Bosea* sp. AS-1 (Abbreviation: AS-1). [Methods] Arsenite-oxidizing bacterial strains were isolated from the samples collected in Xikuangshan, and 16S rRNA genes were sequenced for phylogenetic analysis. Whole genome of strain AS-1 was sequenced and analyzed using relevant software and databases for genome assembly, gene prediction and functional annotation. [Results] The arsenite-oxidizing bacteria in Xikuangshan were mainly distributed in α -, β -, γ -*Proteobacteria* and *Firmicutes*. AS-1's genome contained one circular chromosome with a size of 5.536 Mb and two plasmids of 189.9 kb and 112.1 kb, respectively. Further analysis on AS-1's genomic data reveal many genes related to arsenic and antimony metabolism, as well as flagella formation, flagellar movement, and biofilm formation. These genes may be involved in AS-1's resistance to high level of arsenic and antimony in environment. Besides, several carbon-fixation genes and sulfur-oxidizing genes were also found in the genome of AS-1, suggesting that AS-1 may grow autotrophically and oxidize sulfur. [Conclusion] Subsequent experiments confirmed autotrophic growth of AS-1.

Keywords: *Bosea* sp. AS-1, whole genome sequencing, arsenic and antimony metabolism genes, metabolic pathways

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41877320, 41402300)

*Corresponding author. E-mail: 37113603@qq.com

Received: 14 February 2020; Revised: 12 April 2020; Published online: 21 May 2020