



一株嗜酸硫杆菌 M4-422-6 的分离及其全基因组测序和比较基因组学分析

俞添天, 徐莹, 金佳凡, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚*

浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

俞添天, 徐莹, 金佳凡, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 一株嗜酸硫杆菌 M4-422-6 的分离及其全基因组测序和比较基因组学分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1274-1288.

YU Tiantian, XU Ying, JIN Jiafan, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang. Isolation, whole genome sequencing, and comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus* strain M4-422-6[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1274-1288.

摘要:【目的】开展具有硫氧化能力的嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)的分离及其比较基因组学分析, 不仅可以丰富硫氧化细菌菌种资源, 而且有助于加深理解嗜酸硫杆菌的分子进化与生态适应机制。【方法】利用以硫代硫酸钠为唯一能源的培养基分离具有硫氧化能力的细菌; 利用 Illumina HiSeq X 和 Oxford Nanopore 测序平台对一株嗜酸硫杆菌 M4-422-6 进行全基因组测序; 利用相关生物信息学分析软件对原始数据进行组装和基因组注释, 并与一株亲缘关系最近的菌株 *Igneacidithiobacillus copahuensis* VAN18-1 进行比较基因组学分析。【结果】分离获得一株具有硫氧化能力的嗜酸硫杆菌 M4-422-6。基因组注释结果显示, 菌株 M4-422-6 基因组由 1 个染色体和 2 个质粒组成, 基因组大小为 2 917 823 bp, G+C 含量为 58.54%, 共编码 2 925 个蛋白。16S rRNA 基因和基因组系统发育树显示, 菌株 M4-422-6 代表嗜酸硫杆菌属的一个潜在新种。功能基因注释结果显示, 菌株 *Acidithiobacillus* sp. M4-422-6 拥有与菌株特性相关的众多基因, 包括硫氧化相关基因、CO₂ 固定相关基因和耐酸相关基因。比较基因组学分析发现, 虽然菌株 M4-422-6 与 VAN18-1 的亲缘关系最近, 但两者仍拥有众多的差异基因, 主要包括噬菌体抗性相关基因和移动元件编码基因。【结论】菌株 M4-422-6 代表嗜酸硫杆菌属的一个潜在新种, 该菌株具有同种内菌株所不具有的特有基因, 并据此推测嗜酸硫杆菌种内分化可归因于对特定生态位的适应。

关键词: 硫氧化细菌; 嗜酸硫杆菌; 基因组测序; 比较基因组学分析

资助项目: 浙江省生物工程一流学科创新基金(CX2022029, KF2022009)

This work was supported by the First-class Discipline of Biological Engineering of Zhejiang Province (CX2022029, KF2022009).

*Corresponding author. E-mail: jgchen@zww.edu.cn

Received:2023-11-14; Accepted: 2024-01-24; Published online: 2024-01-29

Isolation, whole genome sequencing, and comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus* strain M4-422-6

YU Tiantian, XU Ying, JIN Jiafan, ZHU Sidong, YANG Jifang, CHEN Jigang*

College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract:[Objective] The isolation and comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus* capable of oxidizing sulfur will enrich our knowledge about not only sulfur-oxidizing bacterial strains but also the molecular evolution and ecological adaptation mechanisms of *Acidithiobacillus*. **[Methods]** The medium with sodium thiosulfate as the sole energy source was used to isolate the strain capable of oxidizing sulfur, which was followed by Illumina HiSeq X and Oxford Nanopore sequencing of strain M4-422-6. Bioinformatics tools were used for sequence assembly and gene annotation, and the comparative genomic analysis was performed with *Ignacidithiobacillus copahuensis* VAN18-1. **[Results]** An *Acidithiobacillus* strain M4-422-6 capable of oxidizing sulfur was isolated. The genome annotation results showed that the genome of strain M4-422-6 consisted of one chromosome and two plasmids, with a length of 2 917 823 bp and G+C content of 58.54%, encoding a total of 2 925 proteins. The 16S rRNA gene sequence and the phylogenetic tree built by the type (strain) genome server (TYGS) revealed that strain M4-422-6 represented a novel species of *Acidithiobacillus*. Functional gene annotation showed that strain M4-422-6 carried numerous genes involved in sulfur oxidation, CO₂ fixation, and acid resistance. The comparative genomic analysis revealed that although strain M4-422-6 had the closest genetic relationship with *Ignacidithiobacillus copahuensis* VAN18-1, and the two strains possessed numerous different genes, which were mainly involved in phage resistance and mobile element encoding. **[Conclusion]** Strain M4-422-6 represents a novel species of *Acidithiobacillus* and has unique genes that are not present in strains of the same species. Therefore, we hypothesize that the intra-species differentiation of *Acidithiobacillus* can be attributed to adaptation to specific niches.

Keywords: sulfur-oxidizing bacteria; *Acidithiobacillus*; genome sequencing; comparative genomic analysis

嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*)成员是目前研究最广泛的极端嗜酸原核生物之一^[1]。它们广泛分布在陆地或海洋的酸性含硫环境中,包括土壤、沉积物、温泉、铁硫矿床和酸性矿山排水系统,它们不仅参与了酸性栖息地的形成和水体的酸化过程,还在铁和/或硫的生物地球化学循环中发挥至关重要的作用^[2]。嗜酸硫杆菌属成员均为严格嗜酸菌,且都能催化含硫化

化合物的异化氧化,其中一些成员还能以分子氧作为电子受体,通过氧化亚铁来获得能量。嗜酸硫杆菌所具备的这些综合生理性状使它们成为生物冶金和生物采矿中最活跃的细菌,而且在解决重金属和无机硫化物造成的环境污染问题方面也显示出巨大的应用价值^[3-5]。就基础研究而言,嗜酸硫杆菌是研究酸性条件下化能自养能量转化反应和途径的模式菌^[6]。近期,

对嗜酸硫杆菌细胞色素氧化酶的研究为细菌有氧呼吸的进化提供了关键的见解^[7]。

自第一株嗜酸硫杆菌被成功分离并命名以来,来源于各种环境的嗜酸硫杆菌数量不断增加^[8]。许多嗜酸硫杆菌分离株^[9]和克隆^[10]已被分配到不同的系统发育亚群或基因组型中^[11],其中一些可能代表新的分类单元^[12]。目前,嗜酸硫杆菌属包括 9 个有效命名种(<https://lpsn.dsmz.de/search?word=Acidithiobacillus>),其中嗜酸性氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)^[13]、*A. albertensis*^[14]、嗜酸性喜温硫杆菌(*A. caldus*)^[15]和 *A. sulfurphilus*^[16]这 4 个种能够将单质硫和还原态无机硫化合物的氧化与分子氧偶联。其他 5 个物种,包括嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans*)^[17]、耐冷嗜酸硫杆菌(*A. ferrivorans*)^[18]、*A. ferridurans*^[19]、铁氧化嗜酸硫杆菌(*A. ferriphilus*)^[20]和 *A. ferrianus*^[21],还能够以亚铁作为电子供体(有氧时)或铁作为电子受体,并在无氧时偶联硫的氧化。此外,嗜酸硫杆菌还普遍存在以氢为电子供体,以氧或铁为电子受体进行生长的能力^[22]。尽管嗜酸硫杆菌属中的一些成员具有优良的生理特征,但仍存在未获得纯培养种群或其具体的分类地位不清,导致对它们的代谢特性知之甚少^[23]。

嗜酸硫杆菌属中各种代表菌株数量少,且代表菌株的栖息地或地理分布存在局限性^[23]。然而,嗜酸硫杆菌的基因组可塑性极强,不同地理来源的嗜酸硫杆菌的基因组成及其数量差异较大^[24]。因此,非常有必要开展不同地理来源的嗜酸硫杆菌的分离,进行分离菌株的遗传特征分析,并通过比较基因组学分析种内不同地理来源菌株的基因差异。本研究结果不但可加深对嗜酸硫杆菌生理特征的认知,而且可为嗜酸硫杆菌属成员的精细遗传谱系构建提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试剂和培养基

4 号液体培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 0.40, MgSO₄·7H₂O 0.50, CaCl₂ 0.25, KH₂PO₄ 4.00, Na₂S₂O₃·5H₂O 5.00, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH 4.0–4.5。KH₂PO₄和 Na₂S₂O₃·5H₂O 均采用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,其余成分 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。培养基使用前加入 1% 溴酚蓝溶液 700 μL。

4 号固体培养基: 在 4 号液体培养基中加入终浓度质量体积分数 4% 的琼脂粉。

单质硫(S⁰)培养基: 将 4 号液体培养基中的 Na₂S₂O₃·5H₂O 替换为硫粉(2 g/L)。

单质硫, aladdin[®]公司; Na₂S₂O₃·5H₂O, Bio Basic Inc.公司; 溴酚蓝,北京拜尔迪生物技术有限公司; 2.5% 戊二醛固定液、琼脂粉, Solarbio[®]公司。

1.2 菌株分离纯化

菌株分离用污泥采集于宁波市新周某污水厂。无菌状态下称取样品,按照质量体积比 1:100 转接到 4 号液体培养基中,30 °C、180 r/min 振荡培养 3 d,培养期间定期观察培养基的颜色变化。当培养基的颜色由蓝色变为黄色时,取菌液用无菌水进行 10 倍梯度稀释至 10⁻⁷,将每一个梯度稀释液涂布至 4 号固体培养基表面,30 °C 恒温培养 3–8 d。培养期间不定期观察菌落周围颜色变化,挑选菌落周围有黄色晕圈,且菌落特征存在差异的单菌落划线接种至 4 号固体培养基,待菌落长出后再进行平板划线分离纯化 2–3 代。

1.3 16S rRNA 基因扩增

挑取单菌落置于含有 50 μL 无菌水的 EP 管中,12 000 r/min 离心 5 min 后吹打混匀,作为 PCR 扩增模板。利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[25],参照陈

婷等^[26]报道的方法进行菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增与单端测序。将有效 16S rRNA 基因序列提交 EzBioCloud 云平台^[27]进行菌株的比对。根据比对结果, 选取隶属于嗜酸硫杆菌属的一株潜在新菌 M4-422-6, 进行全长 16S rRNA 基因序列扩增、测序与同源比对分析。利用 MEGA 7.0^[28]构建 16S rRNA 基因系统发育树, 采用邻位加入法(neighbor-joining), Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter model), 1 000 次自展(bootstrap)来评估所建进化树的准确性。

1.4 形态观察

取对数生长期的细菌培养物进行革兰氏染色后, 在光学显微镜下观察细胞的显微形态。将对数生长期的菌液以 1% 的接种量接种至 S⁰ 培养基中, 并在培养基中加入粒径较大的硫颗粒, 30 °C、80 r/min 培养至细菌对数生长期。从培养液中取出硫颗粒, 30 °C 静置 24 h, 用 2.5% 戊二醛固定液固定后, 使用扫描电镜观察细胞的超显微形态。收集在 S⁰ 培养基中处于对数生长期的细菌培养物, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 2.5% 戊二醛固定液固定细胞, 制备超薄切片, 使用扫描电镜观察细胞的内部超显微结构。

1.5 酸耐受能力测试

挑取经 4 号培养基平板活化的单菌落, 接种至 4 号液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养至细菌对数生长期, 取培养液按 1% 的接种量接种至 6 个起始 pH 值(1.8、2.5、3、3.5、4、4.5)的 S⁰ 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 6 d 后, 测定培养液的 OD₆₀₀ 值。

1.6 硫氧化能力分析

取处于对数生长期的培养液, 按体积比 1:100 接种至 S⁰ 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养, 定时取多份培养液, 分光光度计测定菌液的 OD₆₀₀ 值; 离心取上清, 分别采用碘量法^[29]、

硫酸钡比浊法^[30]和亚甲基蓝分光光度法^[31]测定上清液中的 S₂O₃²⁻、SO₄²⁻、S²⁻ 离子浓度。

1.7 菌株基因组测序与注释

取在 S⁰ 培养基中处于对数生长期的菌液, 8 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 提取菌株基因组 DNA, 委托上海美吉生物医药科技有限公司进行菌株的测序、组装与在线云平台注释。

1.8 菌株的基因组水平分类及比较基因组学分析

基于 EzBioCloud 云平台的 16S rRNA 基因序列比对结果, 选取隶属于嗜酸硫杆菌属, 且在 NCBI 数据库中已公开基因组序列的模式菌株, 包括 *A. albertensis* DSM14366^T (GCA_001931655.1)、*A. caldus* ATCC51756^T (GCA_000175575.2)、*A. concretivorus* ATCC19703^T (GCA_018853445.1)、*A. ferrianus* MG^T (GCA_010378095.1)、*A. ferridurans* JCM18981^T (GCA_003966655.1)、*A. ferriphilus* DSMZ100412^T (GCA_018854775.1)、*A. ferrivorans* DSM22755^T (GCA_018853935.1)、*A. ferrooxidans* ATCC23270^T (GCA_000021485.1)、*A. sulfuriphilus* CJ-2^T (GCA_003721225.1)、*A. thiooxidans* ATCC19377^T (GCA_009662475.1) 和 *Igneacidithiobacillus copahuensis* VAN18-1 (GCA_018854015.1)。使用 JSpeciesWS (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) 和 GGDC (<https://ggdc.dsmz.de/>) 平台计算菌株 M4-422-6 与以上各菌株基因组间的平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)^[32]和数字 DNA-DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)^[33]。使用模式(菌株)基因组服务器[type (strain) genome server, TYGS] (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/tygs/>)^[34], 确定基于基因组水平上的菌株 M4-422-6 的分类地位。将 M4-422-6 基因组提交至 JGI IMG 数据

库(<https://img.jgi.doe.gov/>)进行基因组注释, 继而采用 JGI 数据库中的相关软件进行比较基因组学分析。

1.9 菌株的碳氮代谢、耐酸及硫氧化相关基因分析

基于 KEGG 数据库中的硫代谢(sulfur metabolism)通路注释结果, 获得菌株 M4-422-6 的单质硫和无机硫化合物氧化相关基因; 基于碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和碳固定(carbon fixation)通路注释结果, 获得菌株 M4-422-6 的碳代谢相关基因; 利用已知的与嗜酸菌抗酸机制相关的基因^[35]进行同源比对搜索, 获得与菌株 M4-422-6 耐酸性状相关的基因, 并绘制该菌株的耐酸机制预测模型。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与鉴定

利用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 为能源物质的 4 号培养基, 分离获得能够使培养基发生颜色变化的一株细菌, 将其命名 M4-422-6。EzBioCloud 云平台同源比对结果显示, 菌株 M4-422-6 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号: OR958617)与模式菌株 *A. caldus* ATCC51756^T 的一致性最高(95.0%), 低于种间界限域值(97.0%)。此外, 基

于 16S rRNA 基因序列构建的遗传进化树显示, 菌株 M4-422-6 在进化树中形成一个独立分支(图略)。

2.2 超显微结构

透射电镜观察结果显示(图 1A), 菌株 M4-422-6 细胞具有多层膜结构, 以及胞内可见多个膜包裹的多角体, 其内含有呈中等电子密度的颗粒, 这些形态特征符合羧酶体的形态特征。此外, 胞质内还可见深染的黑色颗粒聚集体, 这些结构很可能是胞内贮藏物。扫描电镜显示细胞吸附在硫颗粒表面, 以及在多处细菌吸附位点和无菌附着的硫颗粒表面均可见凹陷, 这些凹陷可能是由细菌对单质硫的氧化作用所导致(图 1B)。此外, 细胞间及细胞表面可见丝状结构(图 1B), 这些结构可能是细胞分泌的胞外聚合物, 以增强细胞间的联系和加强细胞对颗粒硫的固着作用。

2.3 酸耐受能力及硫氧化能力分析

耐酸能力检测结果显示, 菌株 M4-422-6 在 pH 值为 1.8–4.5 的 S^0 培养基中均能良好生长(图略)。单质硫氧化能力检测结果显示, 菌株 M4-422-6 能够有效地氧化单质硫, 且在氧化过程中形成硫代硫酸和硫酸, 但几乎不产生 H_2S (图 2)。

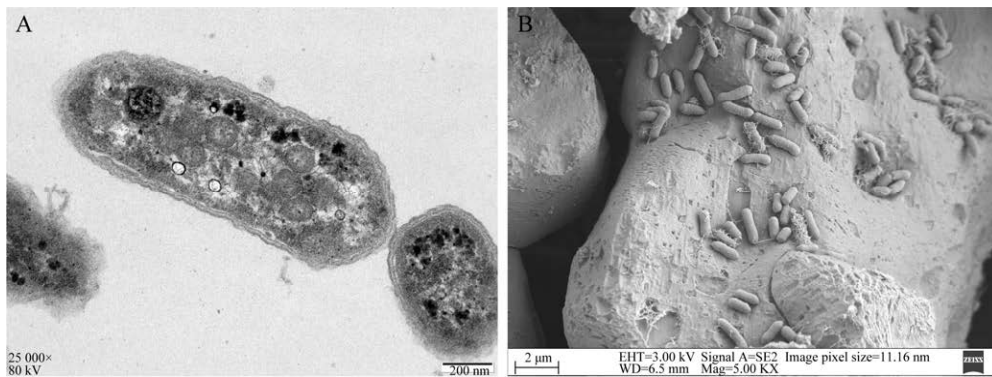


图 1 菌株 M4-422-6 细胞透射电子显微镜(A)和扫描电子显微镜(B)观察
Figure 1 Transmission (A) and scanning (B) electron micrographs of strain M4-422-6.

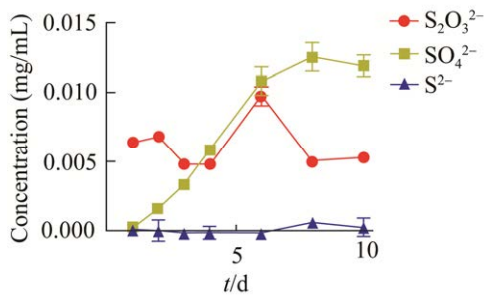


图 2 菌株 M4-422-6 单质硫氧化能力分析
Figure 2 Analysis of sulfur oxidation capacity of strain M4-422-6. All treatments were performed in duplicate, and error bars are standard deviations of the means. Most error bars are within the size of the symbol.

2.4 全基因组基本特征

菌株 M4-422-6 的基因组由 1 个环状染色体 (GenBank 登录号: CP136767), 以及 pLA (GenBank 登录号: CP13676) 和 pLB (GenBank 登录号: CP136769) 两个质粒组成 (图 3), 基因组大小 2 917 823 bp, G+C 含量为 58.54%。从基因组中的边缘 GC 偏斜变异以及 *dnaA* 和 *dnaN* 基因的定位中鉴定出染色体的复制的假定起点。基因组注释出的 2 个 rRNA 操作子、47 个 tRNA 基因和 19 个 sRNA 均位于染色体。菌株 M4-422-6 基因组共编码 2 925 个蛋白, 编码基

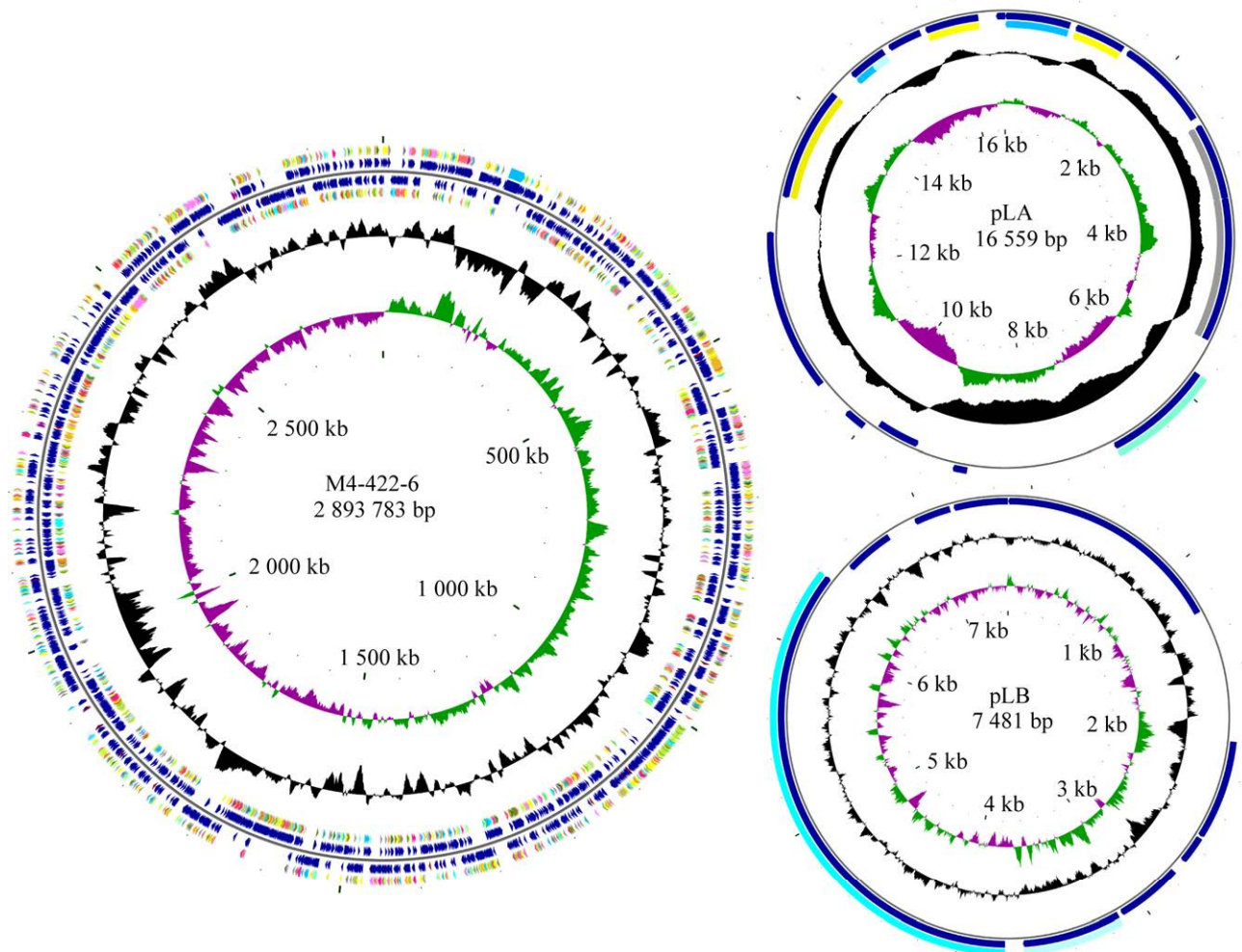


图 3 菌株 M4-422-6 基因组圈图

Figure 3 Genomic circle of strain M4-422-6. The first and fourth circles of the circle diagram from outside to inside represent coding sequence (CDS) on positive and negative chains, with different colors representing different COG functional classifications; The second and third circles are CDS, tRNA, and rRNA on the positive and negative chains, respectively; The fifth circle represents G+C content; The sixth circle represents G+C skew values, and the innermost circle represents genome size markers.

因总长度为 2 712 369 bp, 占基因组总长度的 92.96%。2 925 个编码蛋白中, 可预测功能的蛋白数量为 2 466 个, 其中 1 701 个蛋白可被 KEGG 注释。这些可被 KEGG 通路注释的蛋白中, 隶属于代谢碳水化合物代谢通路的蛋白数量最多(239 个), 其次依次为能量代谢(168 个)、氨基酸代谢(161 个)、辅因子和维生素代谢(118 个)、信号转导(96 个)、复制和修复(87 个), 以及膜运输(69 个)。此外, 菌株 M4-422-6 基因组共编码 499 个转运蛋白、699 个跨膜蛋白、232 个分泌蛋白、70 个双组份调控系统组成蛋白和 34 个碳水化合物活性酶。

2.5 二氧化碳的固定与糖的中枢代谢和同化

菌株 M4-422-6 能在不添加任何碳源的 4 号培养基中生长, 提示该菌株能以空气中的 CO_2 作为生长的唯一碳源。一些化学自养生物普遍利用经卡尔文循环 (Calvin-Benson-Bassham, CBB) 固定与转化 CO_2 , 其中位于胞质内的羧酶体是组成 CBB 的核心部件。基因组注释结果显示, 菌株 M4-422-6 含有编码完整 CBB 通路的一系列基因(图 4), 其中包括位于同一基因簇中的羧酶体合成相关基因。进一步分析发现, 菌株 M4-422-6 羧酶体相关基因的数量、排列顺序和方向与嗜酸硫杆菌属中的 2 个模式菌株 (*A. thiooxidans* ATCC 19377^T 和 *A. caldus* ATCC 51756^T) 最为相似, 即它们的羧酶体相关基因均由 LysR 家族调控因子编码基因 *cbbR*、酮糖 1,5 二磷酸羧化酶 (ribulose-bisphosphate carboxylase, Rubisco) 编码基因、羧酶体组装蛋白编码基因、碳酸酐酶编码基因、羧酶体肽酶 A 和 B 编码基因、多个含 BMC 结构域蛋白的编码基因、羧酶体壳蛋白编码基因, 以及细菌铁蛋白编码基因组成, 并按照固定的顺序与方向排列。此外, 菌株 M4-422-6 的羧酶体合成相关基因簇的

下游含有一个不完整的质粒分离系统 ParAB 编码基因 *parA*, 该基因同样存在于 *A. thiooxidans* ATCC 19377^T 和 *A. caldus* ATCC 51756^T 的羧酶体合成基因簇的下游。

基因组注释结果显示, 与其他已报道的嗜酸硫杆菌属成员中央代谢途径相似, 菌株 M4-422-6 具有完整的糖酵解途径 (embden-meyerhof-parnaspathway, EMP) 和磷酸戊糖途径 (pentose phosphate pathway, PPP), 以及具有不完整的“马蹄形”柠檬酸途径 (citric acid pathway, TCA) (图 4)。此外, 菌株 M4-422-6 基因组编码多个推定碳水化合物转运蛋白, 包括 4 个 OprD 家族外膜孔蛋白、1 个糖类 ABC 转运蛋白和 10 个主要协助转运蛋白超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 转运蛋白。

2.6 氮代谢与硫氧化通路分析

基因组分析表明, 菌株 M4-422-6 基因组中含有一个负责氮摄取和利用的基因簇, 其中含有一个氨转运蛋白编码基因 *amt*、一个 I 类谷氨酰胺酰胺基转移酶编码基因 *yfeJ*、2 个 P-II 调节蛋白编码基因 *glnB* 和 *glnK*, 以及一个 I 型谷氨酰胺合酶编码基因 *glnA* (图 4)。此外, 菌株 M4-422-6 基因组中含有一个负责硝酸盐摄取与还原的基因簇, 其中包含一个硝酸盐/亚硝酸盐转运蛋白编码基因 *narK*、一个硝酸盐还原酶编码基因 *nasA* 和亚硝酸盐还原酶复合体编码基因 *nirBD*, 据此推测该菌株能够耦合异化硝酸盐还原作用和同化硝酸盐还原作用将硝酸盐转化为氨(图 4)。

菌株 M4-422-6 具有 SOX 系统和连四硫酸盐中间代谢物途径 (S₄I) (图 4)。菌株 M4-422-6 的硫氧化系统 (sulfur oxidation system, SOX) 编码基因均为 2 个拷贝, 该系统能够将硫代硫酸盐 ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) 分解为硫酸盐 (SO_4^{2-})。S₄I 途径由硫酸盐泛醌氧化酶还原酶 TQO 和连四硫酸水解酶 TetH 组成, 前者负责将 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 氧化成连四硫酸

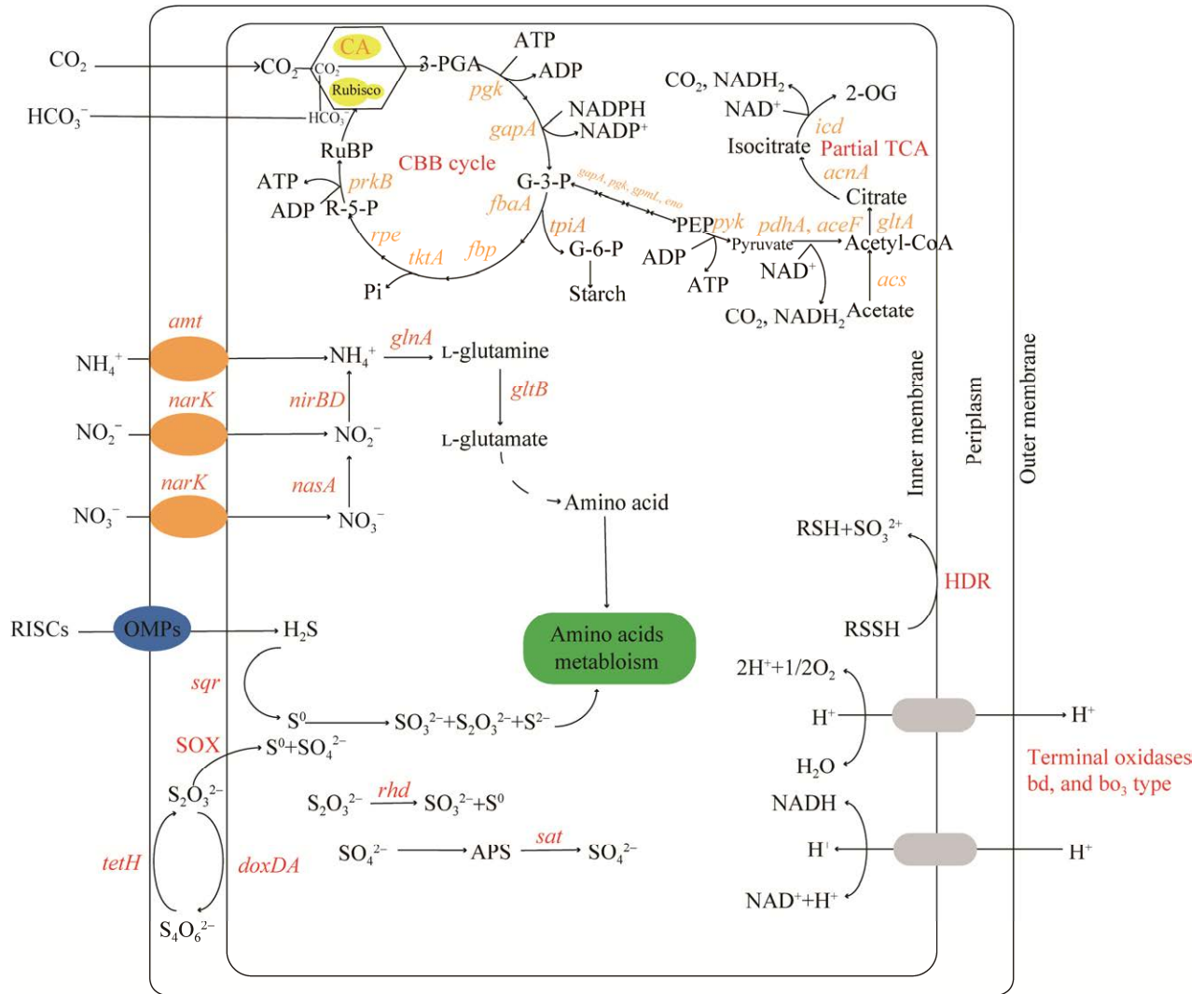


图4 菌株 M4-422-6 碳氮和硫代谢预测模式图

Figure 4 Predictive cartoon diagram of carbon metabolism, nitrogen metabolism and sulfur metabolism in strain M4-422-6. CBB cycle: Calvin-Benson-Bassham cycle; 3-PGA: 3-phosphoglycerate; G-3-P: Glyceraldehyde 3-phosphate; R-5-P: Ribulose-5-phosphate; RuBP: Ribulose 1,5-bisphosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; 2-OG: Oxoglutarate; RISCs: Reduced inorganic sulfur compounds; APS: Adenylyl sulfate; RSH: Persulfide sulfur; RSSH: Hydropersulfides; Rubisco: Ribulose-bisphosphate carboxylase; OMPs: Outer membrane proteins; SOX: Sulfur oxidation system; HDR: Heterodisulfide reductase; CA: Carbonic anhydrase; *pgk*: Gene of phosphoglycerate kinase; *gapA*: Gene of glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase; *gpmL*: Gene of 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase; *eno*: Gene of enolase; *fbaA*: Gene of fructose-bisphosphate aldolase; *tpiA*: Gene of triosephosphate isomerase; *fbp*: Gene of fructose-1,6-bisphosphatase; *tktA*: Gene of transketolase; *rpe*: Gene of ribulose-phosphate 3-epimerase; *prkB*: Gene of phosphoribulokinase; *pyk*: Gene of pyruvate kinase; *pdhA*: Gene of pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit; *aceF*: Gene of pyruvate dehydrogenase E2 component; *acs*: Gene of acetyl-CoA synthase; *gltA*: Gene of citrate synthase; *acnA*: Gene of aconitate hydratase; *icd*: Gene of isocitrate dehydrogenase; *amt*: Gene of ammonium transporter; *narK*: Gene of MFS transporter; *nasA*: Gene of assimilatory nitrate reductase catalytic subunit; *nirB*: Gene nitrite reductase (NADH) large subunit; *nirD*: Gene nitrite reductase (NADH) small subunit; *glnA*: Gene of glutamine synthetase; *gltB*: Gene of glutamate synthase (NADPH) large chain; *sqr*: Gene of sulfide quinone oxidoreductase; *sat*: Gene of sulfate adenylyl transferase; *doxDA*: Gene of thiosulfate dehydrogenase (TQO); *tetH*: Gene of tetrathionate hydrolase; *rhd*: Gene of rhodanese.

盐($S_4O_6^{2-}$),而后者则负责将 $S_4O_6^{2-}$ 进一步水解成 $S_2O_3^{2-}$ 和其他一些产物。除了SOX系统和S₄I途径外,菌株M4-422-6的硫氧化系统中还包含具有H₂S氧化能力的硫泛醌氧化还原酶(sulfide quinone oxidoreductase, SQR)、能够催化S⁰发生歧化反应的硫加氧还原酶(sulfur oxygenation reductase, SOR)、能够氧化硫烷硫原子(hydropersulfides, RSSH)的硫双加氧酶(sulfur dioxygenase, SDO)、能够将RSSH转化为硫醇(persulfide sulfur, RSH)和亚硫酸盐(SO_3^{2-})的异二硫化物还原酶复合体(heterodisulfide reductase, HdrABC)、具有硫原子转移能力的硫氰酸酶(rhodanese, RHD)和硫酸腺苷转移酶(sulfate adenosyltransferase, SAT),以及能将 SO_3^{2-} 转化为 SO_4^{2-} 的脱氢酶复合体(sulfite dehydrogenase, SoeABC)。

2.7 耐酸机制分析

菌株M4-422-6基因组编码众多与其耐酸特性相关的蛋白(图5),包括:具有细胞质缓冲功能的腐胺(putrescine)合成相关蛋白(AguBA和SpeDEA);具有质子阻断能力的水通道蛋白(aquaporin);具有控制胞外质子跨膜内流功能的膜蛋白(NlpC、BamD和CoaD);作为细胞机械防护层,具有阻止质子内流功能的荚膜多糖合成相关蛋白,包括荚膜多糖合成Kps通路相关蛋白(KfiCD和KpsEMT)、荚膜多糖合成Wzy依赖途径相关蛋白(Wzx、Wzz、Wza、Wzb和WbaP),以及荚膜多糖合成Lpt系统相关蛋白(LptABCDEF);具有增加膜内正电位的高亲和力K⁺转运系统Kdp(KdpABCDEF);具有调节膜流动性,维持膜完整性和渗透性功能的藜烷(hopanoid)合成相关蛋白(HpnFGAIJKNLHMB);具有质子浓度缓冲能力的磷酸盐特异性转运系统(phosphate transport system, PST)组成蛋白(PstACSB和PhoUR);具有防止内膜超极化能力

的逆向转运蛋白,包括2个Cl⁻/H⁺逆向转运蛋白ClcA、2个H⁺/K⁺逆向转运蛋白NhaP、1个H⁺/K⁺逆向转运蛋白KefB,以及1个Na⁺/H⁺逆向转运蛋白NhaA;具有催化胞内质子转化能力的谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GadB);拥有碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA),该酶通过催化CO₂转化为HCO₃⁻以维持胞内pH稳态。

2.8 可移动遗传元件与噬菌体防御系统

通过水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)事件获取基因的方式在微生物中频繁发生,这有利于微生物快速适应不断变化的环境^[36]。HGT中的大部分是由可移动遗传元件促进的,这些遗传元件通常整合在tRNA基因周围,具有异常的G+C含量或不同的密码子使用偏好^[37]。基因组注释结果显示,菌株M4-422-6存在15个整合酶和94个转座酶,其中94个转座酶隶属于IS3、IS4、IS5、IS21、IS66、IS256、IS408、IS630、ISL3和ISNCY 10个家族。此外,菌株M4-422-6基因组中的5个区域整合有前噬菌体相关基因序列,其中3个区域内的前噬菌体序列被预测为细纹病毒科(*Siphoviridae*)病毒来源,另2个前噬菌体的分类地位未知。

为了抵御噬菌体或质粒等的侵袭,原核生物进化产生多种防御机制。CRISPR-Cas系统和限制-修饰(restriction-modification, R-M)系统是细菌普遍采用的两种噬菌体防御系统。菌株M4-422-6不存在CRISPR-Cas系统相关组件,但存在3种R-M系统,包括5个I型R-M系统、2个II型R-M系统,以及3个III型R-M系统。除此之外,菌株M4-422-6基因组中还存在多个毒素-抗毒素(toxin-antitoxin, TA)系统,包括ChpSB(1)、MazEF(1)、YefM/YoeB(2)、ParDE(2)、StbD/RelE(1)、DinJ/YafQ(1)和RelE/ParE(1)共9个TA系统,以及14个“孤儿”毒素和抗毒素。

2.9 菌株 M4-422-6 的分类地位及与 VAN18-1 的比较基因组学分析

菌株 M4-422-6 与嗜酸硫杆菌属中模式菌株基因组间的 ANI 和 *d*DDH 最高值分别为 71.4% 和 20.2%，明显低于种间界限的 ANI 和 *d*DDH 域值

(95.0% 和 70.0%)^[38-39], 进一步说明菌株 M4-422-6 代表嗜酸硫杆菌属中的一个潜在新种。基于 TYGS 分析构建的系统发育树显示, 菌株 M4-422-6 与 *A. caldus* ATCC 51756^T 形成一个单独的分枝(图 6)。

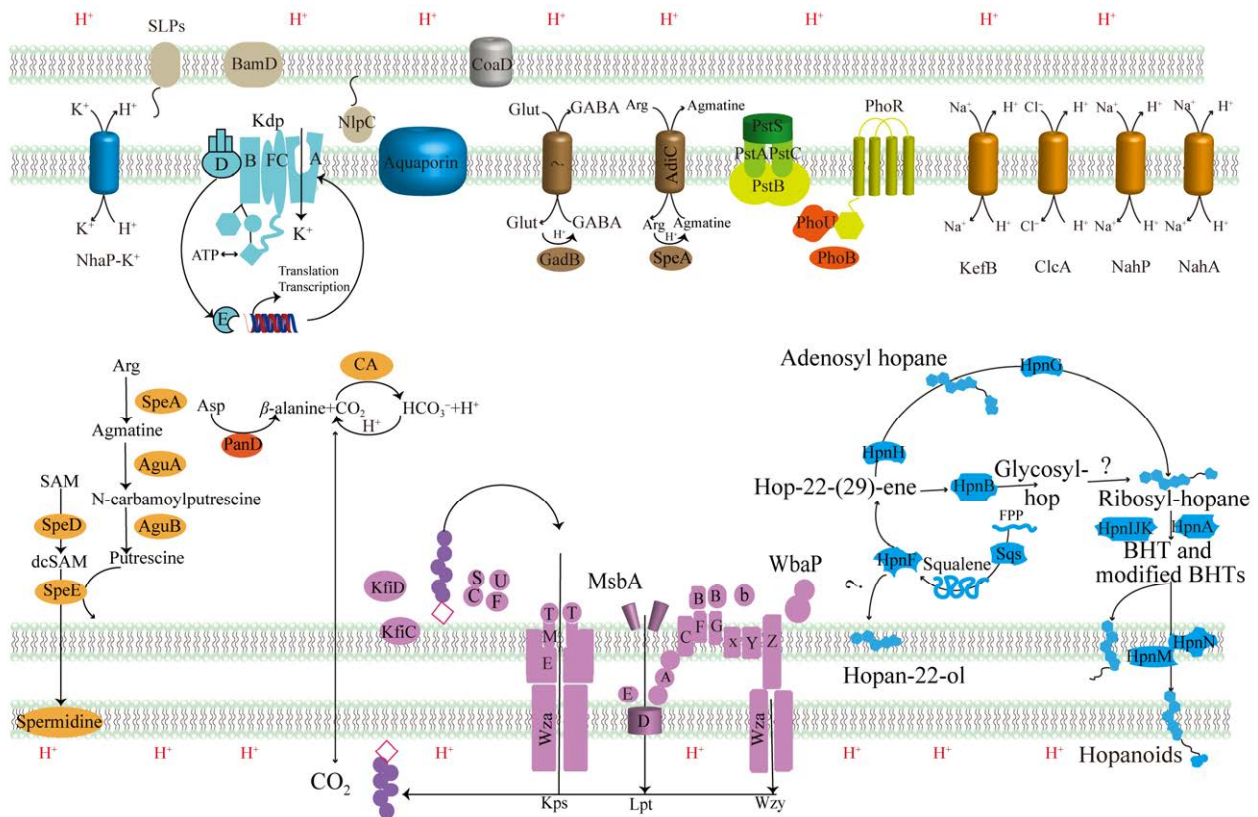


图 5 菌株 M4-422-6 耐酸机制预测模型

Figure 5 Predictive model of acid resistance mechanism in strain M4-422-6. SLPs: Outer membrane lipoproteins; NlpC: C40 family peptidase; CoaD: Pantetheine-phosphate adenylyltransferase; BamD: Outer membrane protein assembly factor; PstAC: Phosphate ABC transporter permease; PstS: Phosphate transport system substrate-binding protein; PstB: Phosphate ABC transporter ATP-binding protein; PhoU: Phosphate signaling complex protein; PhoB: Phosphate regulon response regulator; PhoR: Phosphate regulon sensor histidine kinase; AdiC: Amino acid permease; CA: Carbonic anhydrase; PanD: Aspartate 1-decarboxylase; SpeA: Arginine decarboxylase; SpeD: Adenosylmethionine decarboxylase; SpeE: Spermidine synthase; AguB: N-carbamoylputrescine amidase; AguA: Agmatine deiminase family protein; KfiCD: Glycosyltransferase; KpsE: Capsule biosynthesis protein; KpsMT: Capsular polysaccharide transport system permease; Wza: Polysaccharide biosynthesis/export protein; Wzz: Polysaccharide biosynthesis tyrosine autokinase; Wzx: Oligosaccharide flippase family protein; Wzb: Protein-tyrosine phosphatase; WbaP: Undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase; Lpt: Lipopolysaccharide transport protein; MsbA: ATP-binding cassette (ABC) transporter; TrkA: Voltage-gated potassium channel protein; ClcA: H⁺/Cl⁻ antiporter; NhaA: Na⁺/H⁺ antiporter; NhaP: Monovalent cation:H⁺ antiporter; KefB: Monovalent cation:H⁺ antiporter; KdpABC: An oligomeric K⁺ transport complex; KdpD: Membrane-bound histidine kinase sensor; KdpE: Cytoplasmic response regulator; HpnFGAIJKNLHMB: Hopanoid biosynthesis protein; Sqs: Squalene synthase; GABA: Glutamate/ γ -aminobutyric acid; GadB: Glutamic acid decarboxylase.

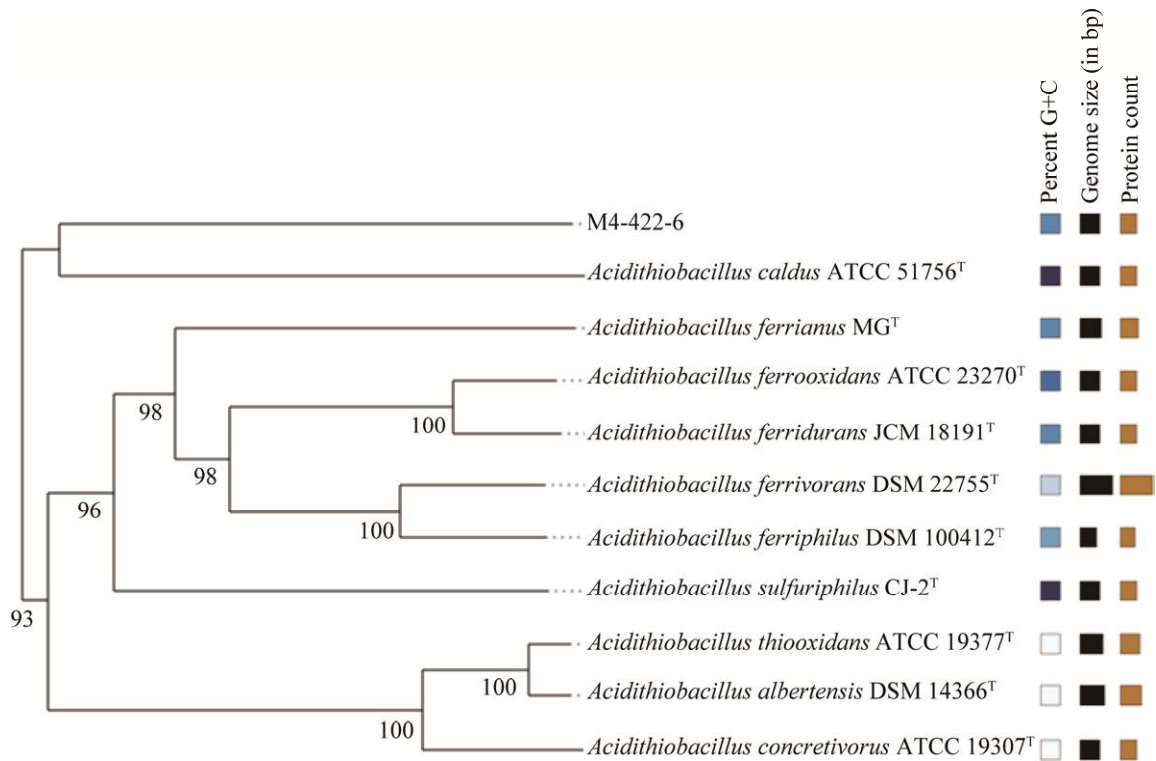


图 6 基于 TYGS 构建的菌株 M4-422-6 与嗜酸硫杆菌模式菌株的系统发育树

Figure 6 Phylogenomic tree based on genome sequences in the TYGS tree inferred with FasnMe 2.1.6.1^[34] from genome BLAST distance phylogeny approach (GBDP); distances calculated from genome sequence. The branch lengths are scaled in terms of GBDP distance formula d_5 . The numbers above branches are GBDP pseudo-bootstrap support values >50.0% from 100 replications. The tree was rooted at the midpoint^[34]. Leaf labels with different colors indicate percent G+C (blue), genome size (black) and protein count (brown).

菌株 M4-422-6 与 *Igneacidithiobacillus copahuensis* VAN18-1^[23] 的 ANI 值和 *d*DDH 值最高, 分别为 99.2% 和 96.4%。比较基因组分析发现, 菌株 M4-422-6 的编码蛋白数量和 rRNA 操纵子数量均多于菌株 VAN18-1, 后者编码 2 939 个蛋白, 仅拥有 1 个 rRNA 操纵子。两菌株拥有 2 433 个共有蛋白, 氨基酸序列一致性位于 60.2%–100.0% 之间, 其中 2 000 个蛋白序列同源率为 100.0%, 其中包括参与硫氧化通路的所有基因。菌株 M4-422-6 拥有特有蛋白 528 个 (序列一致性 <80.0%; e 值 < 10^{-5}), 其中包括假定蛋白 (hypothetical protein) 295 个。菌株 M4-422-6 所拥有的特有蛋白编码序列普遍以基因簇的形式出

现, 其中包含所有的前噬菌体序列、2 个质粒所携带的基因、10 个整合酶和 43 个转座酶编码基因。除了含有 53 个特有的转座元件外, 菌株 M4-422-6 还拥有 I、II、III 型 R-M 系统编码基因、TA 系统编码基因、染色体及质粒分离系统编码基因, 以及 K^+ 转运二元信号通路系统编码基因等特有基因。菌株 VAN18-1 拥有特有蛋白 491 个 (序列一致性 <80.0%; e 值 < 10^{-5}), 其中包括假定蛋白 285 个。菌株 VAN18-1 所拥有的特有蛋白编码序列也普遍以基因簇的形式出现, 其中包含 6 个整合酶和 16 个转座酶编码基因。此外, 菌株 VAN18-1 还拥有多个 TA 系统编码基因、染色体及质粒分离系统编码基因、肽/镍 ABC 转运

系统编码基因、CRISPR-Cas 系统编码基因、多个重金属抗性相关基因,以及荚膜多糖合成基因等特有基因。

3 讨论与结论

基因组注释结果表明,菌株 M4-422-6 具有完整的鞭毛编码基因,但是超显微结构图片中未见鞭毛结构,其原因尚不清楚。菌株 M4-422-6 胞内含有羧酶体样结构,且菌株基因组中含有编码羧酶体的所有基因和完整的 CBB 通路,这些基因组特征与菌株能够利用空气中的 CO₂ 为唯一碳源生长的生理特征相符。

基因组注释结果表明,菌株 M4-422-6 的 SOX 系统缺失 SoxCD,该“截断型”SOX 系统也见于 *A. caldus*、*A. thiooxidans*、*A. albertensis* 和 *A. ferrivorans*^[6]。菌株 M4-422-6 的 SOX 系统编码基因位于 *soxXYZA-hp-soxB*、*soxB-hp-resB-soxXA* (SoxII)和 *soxYZ* 这 3 个独立的基因簇中,而其他嗜酸硫杆菌的 SOX 系统编码基因则通常位于 2 个基因簇中^[6]。基于目前已发现的嗜酸硫杆菌的 SOX 系统普遍缺失 SoxCD 这一现象,有学者提出了 SoxYZ 再生的两种途径,包括硫烷中间体(SoxYZ-S-S-)的硫原子切割和被硫双加氧酶氧化^[40-41]。由于硫双加氧酶可将单质硫氧化为亚硫酸盐^[42],因此有学者推断硫烷中间体的硫原子通过未知的机制被裂解形成单质硫,从而使 SoxYZ 再生^[6]。

基于 16S rRNA 基因序列和基因组水平的分类结果显示,菌株 M4-422-6 应代表嗜酸硫杆菌属中的一个潜在新种,且该种与建议种(proposed species) *Ignacidithiobacillus copahuensis* 的亲缘关系最近。比较基因组学分析表明,菌株 M4-422-6 和菌株 *I. copahuensis* VAN18-1 拥有 2 433 个共有蛋白,分别占编码蛋白总数的 82.3%

(2 433/2 957)和 82.8% (2 433/2 939)。两菌株所特有的特有基因均以基因簇的形式出现,且其中含有大量的转移元件、假定蛋白和噬菌体蛋白编码基因,说明两菌株的特有基因均是通过水平基因转移的方式获得。这再次证明嗜酸硫杆菌种内特异性变异归结于质粒^[43],以及高度多样化的可移动遗传元件^[44-45]。此外,两菌株所含有的特有基因可以反映它们对不同生存环境的适应策略。菌株 M4-422-6 具有更多的 rRNA 操纵子,暗示该菌株具有更快的繁殖速度;菌株 M4-422-6 拥有特有且多样的 R-M 系统,说明该菌株主要采用 R-M 系统防御噬菌体的侵染,而菌株 VAN18-1 则主要采用 CRISPR-Cas 系统抵御噬菌体的侵染;菌株 VAN18-1 拥有更多的荚膜多糖合成基因,以及特有的重金属抗性基因,暗示该菌株可能具有更强的重金属抗性;菌株 VAN18-1 拥有特有肽 ABC 转运系统编码基因,说明该菌株获得氨基酸的方式更加多样。尽管两菌株拥有的染色体及质粒分离系统同源性较低而被归类为特有蛋白,但这些特有蛋白均可以确保质粒能够被稳定地传递给子代细胞。最后,菌株 M4-422-6 所特有的 K⁺转运二元信号通路系统可能赋予该菌株更强的耐酸特性。分析可见,两菌株的 DNA 序列的种内分化可归因于对特定生态位的适应。

参考文献

- [1] QUATRINI R, JOHNSON DB. *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(3): 282-283.
- [2] JONES DS, ALBRECHT HL, DAWSON KS, SCHAPERDOTH I, FREEMAN KH, PI Y, PEARSON A, MACALADY JL. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm[J]. The ISME Journal, 2012, 6(1): 158-170.
- [3] PATHAK A, DASTIDAR MG, SREEKRISHNAN TR. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: a

- review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90(8): 2343-2353.
- [4] VALDÉS J, PEDROSO I, QUATRINI R, HOLMES DS. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillusferrooxidans*, *A.thiooxidans* and *A.caldus*: insights into their metabolism and ecophysiology[J]. *Hydrometallurgy*, 2008, 94(1): 180-184.
- [5] VERA M, SCHIPPERS A, HEDRICH S, SAND W. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of microbial metal sulfide oxidation-part A[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106(21): 6933-6952.
- [6] WANG R, LIN JQ, LIU XM, PANG X, ZHANG CJ, YANG CL, GAO XY, LIN CM, LI YQ, LI Y, LIN JQ, CHEN LX. Sulfur oxidation in the acidophilic autotrophic *Acidithiobacillus* spp.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3290.
- [7] ESPOSTI MD. On the evolution of cytochrome oxidases consuming oxygen[J]. *Biochimica et Biophysica acta Bioenergetics*, 2020, 1861(12): 148304.
- [8] JOHNSON DB, QUATRINI R. Acidophile microbiology in space and time[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2020, 39: 63-76.
- [9] NI YQ, HE KY, BAO JT, YANG Y, WAN DS, LI HY. Genomic and phenotypic heterogeneity of *Acidithiobacillus* spp. strains isolated from diverse habitats in China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 64(2): 248-259.
- [10] JONES DS, SCHAPERDOTH I, MACALADY JL. Biogeography of sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus* populations in extremely acidic cave biofilms[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(12): 2879-2891.
- [11] AMOURIC A, BROCHIER-ARMANET C, JOHNSON DB, BONNEFOY V, HALLBERG KB. Phylogenetic and genetic variation among Fe(II)-oxidizing acidithiobacilli supports the view that these comprise multiple species with different ferrous iron oxidation pathways[J]. *Microbiology*, 2011, 157(1): 111-122.
- [12] NUÑEZ H, MOYA-BELTRÁN A, COVARRUBIAS PC, ISSOTTA F, CÁRDENAS JP, GONZÁLEZ M, ATAVALES J, ACUÑA LG, JOHNSON DB, QUATRINI R. Molecular systematics of the genus *Acidithiobacillus*: insights into the phylogenetic structure and diversification of the taxon[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 30.
- [13] WAKSMAN SA, JOFFE JS. Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil: II. *Thiobacillusthiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil[J]. *Journal of Bacteriology*, 1922, 7(2): 239-256.
- [14] BRYANT RD, MCGROARTY KM, COSTERTON JW, LAISHLEY EJ. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T.albertis*) [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1983, 29(9): 1159-1170.
- [15] HALLBERG KB, LINDSTR MÖEB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile[J]. *Microbiology*, 1994, 140(12): 3451-3456.
- [16] FALAGÁN C, MOYA-BELTRÁN A, CASTRO M, QUATRINI R, JOHNSON DB. *Acidithiobacillusulfuriphilus* sp. nov.: an extremely acidophilic sulfur-oxidizing chemolithotroph isolated from a neutral pH environment[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2019, 69(9): 2907-2913.
- [17] TEMPLE KL, COLMER AR. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1951, 62(5): 605-611.
- [18] HALLBERG KB, GONZ LEZ-TORIL E, JOHNSON DB. *Acidithiobacillusferrivorans* sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments[J]. *Extremophiles*, 2010, 14(1): 9-19.
- [19] HEDRICH S, JOHNSON DB. *Acidithiobacillusferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic *Gammaproteobacterium*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(11): 4018-4025.
- [20] FALAGÁN C, JOHNSON DB. *Acidithiobacillusferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(1): 206-211.
- [21] NORRIS PR, FALAGÁN C, MOYA-BELTRÁN A, CASTRO M, QUATRINI R, JOHNSON DB. *Acidithiobacillusferrianus* sp. nov.: an ancestral

- extremely acidophilic and facultatively anaerobic chemolithoautotroph[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(2): 329-337.
- [22] HEDRICH S, JOHNSON DB. Aerobic and anaerobic oxidation of hydrogen by acidophilic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 349(1): 40-45.
- [23] MOYA-BELTRÁN A, BEARD S, ROJAS-VILLALOBOS C, ISSOTTA F, GALLARDO Y, ULLOA R, GIAVENO A, DEGLI ESPOSTI M, JOHNSON DB, QUATRINI R. Genomic evolution of the class *Acidithiobacillia*: deep-branching *Proteobacteria* living in extreme acidic conditions[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15: 3221-3238.
- [24] BEARD S, OSSANDON FJ, RAWLINGS DE, QUATRINI R. The flexible genome of acidophilic prokaryotes[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 40: 231-266.
- [25] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [26] 陈婷, 陈秀暖, 任娜, 薛泽豪, 朱四东, 杨季芳, 陈吉刚. 西太平洋多金属结核区 12 个站位沉积物中可培养潜在腐殖质转化菌的多样性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(5): 1541-1552.
CHEN T, CHEN XN, REN N, XUE ZH, ZHU SD, YANG JF, CHEN JG. Diversity of potential culturable humic substance-transforming bacteria in sediments from 12 stations in the western Pacific polymetallic nodule province[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(5): 1541-1552 (in Chinese).
- [27] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [28] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [29] 王惠祥, 姜理英, 吴晓薇, 陈建孟. 硫氧化细菌的分离鉴定及降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(5): 706-710.
WANG HX, JIANG LY, WU XW, CHEN JM. Isolation, identification and degradation characteristics of a sulfide-oxidizing bacterium[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(5): 706-710 (in Chinese).
- [30] 彭安安. 嗜酸硫氧化细菌元素硫活化氧化机制研究[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2014.
Peng AA. Study on the sulfur activation and oxidation mechanism of acidophilic sulfur-oxidizing bacteria[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Central South University, 2014 (in Chinese).
- [31] 刘阳. 海洋硫氧化菌 *Thioclava* 分类鉴定及其硫氧化机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2020.
LIU Y. Classification, identification and sulfur oxidation mechanisms of marine sulfur-oxidizing bacterium *Thioclava*[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Engineering of Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese).
- [32] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [33] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*. 2013, 14: 60.
- [34] MEIER-KOLTHOFF JP, CARBASSE JS, PEINADO-OLARTE RL, GÖKER M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(1): 801-807.
- [35] GONZÁLEZ-ROSALES C, VERGARA E, DOPSON M, VALDÉS JH, HOLMES DS. Integrative genomics sheds light on evolutionary forces shaping the *Acidithiobacillia* class acidophilic lifestyle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 822229.
- [36] GOGARTEN JP, DOOLITTLE WF, LAWRENCE JG. Prokaryotic evolution in light of gene transfer[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2002, 19(12): 2226-38.
- [37] WAACK S, KELLER O, ASPER R, BRODAG T, DAMM C, FRICKE WF, SUROVCIK K, MEINICKE P, MERKL R. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models[J]. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7: 142.

- [38] COLSTON SM, FULLMER MS, BEKA L, LAMY B, GOGARTEN JP, GRAF J. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case[J]. *mBio*, 2014, 5(6): e02136.
- [39] CHUN J, OREN A, VENTOSA A, CHRISTENSEN H, ARAHAL DR, DA COSTA MS, ROONEY AP, YI H, XU XW, DE MEYER S, TRUJILLO ME. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466.
- [40] CHEN ZW, LIU YY, WU JF, SHE Q, JIANG CY, LIU SJ. Novel bacterial sulfur oxygenase reductases from bioreactors treating gold-bearing concentrates[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 688-698.
- [41] YIN H, ZHANG X, LI X, HE Z, LIANG Y, GUO X, HU Q, XIAO Y, CONG J, MA L, NIU J, LIU X. Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfur oxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 179.
- [42] WU W, PANG X, LIN J, LIU X, WANG R, LIN J, CHEN L. Discovery of a new subgroup of sulfur dioxygenases and characterization of sulfur dioxygenases in the sulfur metabolic network of *Acidithiobacillus caldus*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0183668.
- [43] 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*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78237.
- [44] BUSTAMANTE P, COVARRUBIAS PC, LEVICÁN G, KATZ A, TAPIA P, HOLMES D, QUATRINI R, ORELLANA O. ICE Afe 1, an actively excising genetic element from the biomining bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(6): 399-407.
- [45] COVARRUBIAS PC, MOYA-BELTRÁN A, ATAVALES J, MOYA-FLORES F, TAPIA PS, ACUÑA LG, SPINELLI S, QUATRINI R. Occurrence, integrity and functionality of AcaML1-like viruses infecting extreme acidophiles of the *Acidithiobacillus* species complex[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 169(10): 628-637.