

砷代草丁膦的合成分子机制及其对水稻土壤细菌群落结构的影响

杨宇晗^{1,2,3}, 胡仕林^{1,3}, 黄丽婕^{1,3}, 段桂兰^{3,4}, 薛喜枚^{1,3*}

- 1 中国科学院城市环境研究所, 区域与城市生态安全全国重点实验室, 福建 厦门
- 2 福建农林大学 菌草与生态学院, 福建 福州
- 3 中国科学院大学, 北京
- 4 中国科学院生态环境研究中心, 区域与城市生态安全全国重点实验室, 北京

杨宇晗, 胡仕林, 黄丽婕, 段桂兰, 薛喜枚. 砷代草丁膦的合成分子机制及其对水稻土壤细菌群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(6): 2655-2666.

YANG Yuhan, HU Shilin, HUANG Lijie, DUAN Guilan, XUE Ximei. Synthesis molecular mechanism of arsinothricin and its impact on bacterial community structure of rice soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(6): 2655-2666.

摘要: 【目的】进一步探讨 *arsL*、*arsM* 基因在砷代草丁膦(arsinothricin, AST)合成中的作用, 以及 AST 对土壤细菌群落结构的影响。【方法】以俄克拉何马伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia oklahomensis*) NCTC 13388 为研究对象, 通过 PCR 扩增获得该菌株的 *BoarsL* 和 *BoarsM* 基因, 分别构建重组质粒 pET21b-*BoarsL* 和 pET28a-*BoarsM*。将重组质粒转化至大肠杆菌表达菌 Rosetta (DE3)感受态细胞中。采用高通量测序技术分析不同浓度 AST 处理对土壤细菌群落组成及多样性的影响。【结果】十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析显示, 重组菌株表达出相对分子质量分别为 47.79 kDa 和 41.50 kDa 的目的蛋白, 证实 BoArsL 和 BoArsM 蛋白成功表达。单独表达 *BoarsL* 基因的细胞产生 AST-OH 和少量的 AST, 而单独表达 *BoarsM* 基因的细胞仅产生少量的二甲基砷酸。统计分析表明, 不同浓度 AST 处理对土壤细菌群落的 α 多样性产生了显著影响($P < 0.05$), 具体表现为 Chao1 指数和 Shannon 指数均存在显著差异, 低浓度处理组土壤细菌多样性和丰富度高于对照组, 高浓度处理组则显著降低了土壤细菌的多样性和丰富度。进一步分析发现, 不同浓度 AST 处理组在属水平上的细菌群落组成也呈现显著差异($P < 0.05$), 高浓度 AST 显著富集了伯克霍尔德氏菌属-卡瓦列罗菌属-副伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*)细菌, 同时对梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto*)、沉积物杆菌属(*Sedimentibacter*)等细菌则表现出显著的抑制作用。【结论】*B. oklahomensis* NCTC 13388 菌株的 *BoarsL* 基因是 AST 生物合成所必需的。高浓度 AST

资助项目: 国家自然科学基金(42077289, 42277197)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42077289, 42277197).

*Corresponding author. E-mail: xmxue@iue.ac.cn

Received: 2025-02-24; Accepted: 2025-04-23; Published online: 2025-05-22

显著干扰了土壤细菌群落结构。

关键词：砷代草丁膦；有机砷抗生素；*Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388；土壤细菌群落结构

Synthesis molecular mechanism of arsinothricin and its impact on bacterial community structure of rice soil

YANG Yuhan^{1,2,3}, HU Shilin^{1,3}, HUANG Lijie^{1,3}, DUAN Guilan^{3,4}, XUE Ximei^{1,3*}

1 State Key Laboratory of Regional and Urban Ecology, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, Fujian, China

2 College of JunCao Science and Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

4 State Key Laboratory of Regional and Urban Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Abstract: [Objective] To further investigate the role of *arsL* and *arsM* genes in the synthesis of arsinothricin (AST) and the effects of AST on the community structure of soil bacteria. [Methods] Using *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 as the research object, we obtained its *BoarsL* and *BoarsM* genes via PCR amplification, constructed recombinant plasmids pET21b-*BoarsL* and pET28a-*BoarsM*, and transformed them into the competent cells of *Escherichia coli* expression strain Rosetta(DE3). In addition, we employed high-throughput sequencing technology to analyze the effects of different concentrations of AST treatment on the composition and diversity of soil bacterial communities. [Results] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) detected target proteins with relative molecular weights of 47.79 kDa and 41.50 kDa in recombinant strains, indicating successful expression of BoArsL and BoArsM. Cells expressing only the *BoarsL* gene produced AST-OH and a small amount of AST, while cells expressing only the *BoarsM* gene produced only a small amount of dimethylarsinic acid. Additionally, statistical analysis indicated that AST treatment at different concentrations had a significant impact on the alpha diversity of soil bacterial communities ($P < 0.05$), as evidenced by significant differences in both the Chao1 and Shannon indices. The low-concentration treatment group had higher soil bacteria diversity and richness than the control group, whereas the high-concentration treatment caused statistically significant declines in both diversity and species richness. Further analysis revealed that bacterial community composition at the genus level also exhibited significant differences among the AST treatment groups of different concentrations ($P < 0.05$), and high concentrations of AST significantly enriched bacteria of the genus *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* but significantly inhibited bacteria of the genera *Clostridium_sensu_stricto* and *Sedimentibacter*. [Conclusion] The *BoarsL* gene of *B. oklahomensis* NCTC 13388 is essential for the biosynthesis of AST. High concentrations of AST significantly affect the structure of soil bacterial communities.

Keywords: arsinothricin; organoarsenic antibiotic; *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388; community structure of soil bacteria

砷是一种广泛存在于自然界的有毒类金属, 主要以无机砷形式存在, 例如亚砷酸盐[As(III)]和砷酸盐[As(V)]^[1]。地质活动(如岩石风化、火山爆发和地热)以及人类活动(如采矿和冶炼)从岩石圈释放出砷, 使其进入陆地和海洋环境^[2]。值得注意的是, 尽管无机砷具有毒性, 但其在医学领域中的应用历史悠久, 并在现代临床治疗中持续发挥重要作用^[3]。例如砷可用作抗菌剂和抗癌剂^[4]。早期合成的含砷抗菌剂包括砷凡纳明(salvarsan)、对氨基苯砷酸(4-aminophenylarsonic acid)及其他芳香族砷剂, 如洛克沙砷(roxarsone)和硝苯砷酸(nitarsonic acid), 这些化合物曾被用于预防家禽鸡球虫病和组织滴虫病^[5]。此外, 三氧化二砷仍然是全球治疗急性早幼粒细胞白血病的标准药物^[6]。作为砷的解毒策略之一^[7-8], 细菌能够将无机砷转化为有机砷化合物, 如各种甲基砷^[9]、砷糖及其衍生物^[10], 这一转化过程在砷的生物地球化学循环和生物进化中起着关键作用^[11]。有些细菌还进化出了特定的代谢途径, 合成结构和生物学功能独特的含砷化合物^[12]。

先前的研究发现了一种天然含砷化合物——砷代草丁膦(arsinothricin, AST), 这是一种由水稻根际土壤细菌产生的防御性化合物^[13]。AST是一种广谱抗生素, 对多种病原微生物具有抑制作用^[14-15]。目前, 由结核分枝杆菌引起的人类结核病因多重耐药性问题被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为全球卫生紧急事件^[16], 并呼吁开发新的创新型抗菌药物。AST对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具有抗菌活性, 能有效抑制WHO重点关注的病原体——耐碳青霉烯阴沟肠杆菌(carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*)活性, 且其对人类单核细胞的毒性远低于As(III)。AST主要是通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)的活性位点结合, 竞争性抑制其催化功能^[14], 阻断结核分枝杆菌的氮代谢, 从而抑制其生长^[17]。综上所述, AST作为一种极具前景的抗菌药物候选物,

对其高效合成方法与生态效应的深入研究具有重要科学价值。已知AST生物合成菌唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*) GSRB05可将As(III)转化成2-氨基-4-(二羟基砷酰基)丁酸酯[2-amino-4-(dihydroxyarsinoyl) butanoate, AST-OH]和AST^[13]。在*B. gladioli* GSRB05的基因组中, 操纵子 $arsQML$ 基因簇被证实参与了AST及其前体AST-OH的生物合成。具体而言, $arsL$ 基因编码一种非典型的自由基S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)酶通过催化SAM中的3-氨基-3-羧基丙基基团与As(III)结合, 介导AST-OH的生成。随后, AST-OH在 $arsM$ 基因编码的SAM甲基转移酶作用下被甲基化成AST^[18]。

在本研究中, 首先验证了俄克拉何马伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia oklahomensis*) NCTC 13388可以合成AST, 并以该菌株为研究对象, 通过基因异位表达探究了 $BoarsL$ 和 $BoarsM$ 在AST合成过程中的功能。AST作为一种新型抗生素, 在未来的应用过程中不可避免地会进入环境, 但目前缺乏AST在环境中暴露及其潜在影响的研究。鉴于此, 本研究进一步利用不同浓度AST处理水稻土壤, 探究了AST对水稻土壤细菌群落结构和多样性的潜在生态效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件

B. oklahomensis NCTC 13388购自National Collection of Type Cultures (NCTC), 在30 °C好氧条件下培养于PY培养基中。大肠杆菌(*Escherichia coli*)在37 °C条件下于LB培养基中振荡培养^[19]。

1.1.2 培养基

LB培养基购自Difco公司; 蛋白胨酵母提取物(peptone yeast extract, PY)培养基(g/L): 蛋白胨 10.00、酵母提取物 5.00、NaCl 5.00; ST 10⁻¹

培养基(g/L): 蛋白胨 0.50、酵母提取物 0.05。

1.1.3 主要试剂和仪器

砷酸钠和亚砷酸钠均购自中国医药集团有限公司; 砷标准溶液: 以 2% (体积分数) 硝酸溶液为稀释剂, 将中国计量科学研究所的砷标准溶液(GSB04-1714-2004, 1 000 mg/L) 逐级稀释, 配制成浓度为 0、0.1、0.5、1、5、10、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的系列工作标准溶液; E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit, Omega Bio-Tek 公司; NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit, 上海新睿生物科技有限公司; AST 的制备: 将 PY 培养基中过夜培养的菌液离心后, 收集细胞沉淀, 并以 1/3 PY 培养基体积的 ST 10^{-1} 培养基[含 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 和 0.4% 甘油]重悬细胞, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 72 h, 离心取上清冷冻干燥, 用超纯水溶解后测定 AST 浓度。本研究所用引物(表 1)由生物工程(上海)股份有限公司合成。

高效液相色谱仪(HPLC)、电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS), Agilent 公司; Jupiter C18 300 \AA 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm), Phenomenex 公司; Milli-Q 超纯水机, 密理博公司; NanoDrop 2000, ThermoFisher Scientific 公司; 紫外可见分光光度计, Mapada 公司; Illumina NextSeq 2000, Illumina 公司。

1.2 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 对砷的抗性

将 *B. oklahomensis* NCTC 13388 的单克隆接种于 PY 培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜。将过夜培养的菌液接种至 10 mL PY 培养基中, 调整初始细胞密度(OD_{600})至 0.05, 并向培养基中添加不同浓度的 As(III) (0、0.01、0.1、1 和 10 mmol/L) 或 As(V) (0、0.01、0.1、1、10 和 100 mmol/L)。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养, 每组实验设置 4 个生物学重复, 每隔 2 h 时间间隔取样, 持续监测至细菌生长进入衰亡期。

每次取 200 μL 菌液, 使用紫外-可见分光光度计测定 OD_{600} 以监测细胞密度, 并记录实验数

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequences (5'→3')	限制酶切位点 Restriction site
<i>BoarsM-F</i>	<u>CATATGATATGGAAATGG</u> ATTCGTCATT	<i>Nde</i> I
<i>BoarsM-R</i>	<u>GCGGCCGCGCAGCAGA</u> AGGTGGAAGTAGT	<i>Not</i> I
<i>BoarsL-F</i>	<u>CATATGGCCAACTATCTA</u> GTTGTCTCCAC	<i>Nde</i> I
<i>BoarsL-R</i>	<u>GCGGCCGCGCACTTGAG</u> GCAGCATCGTTT	<i>Not</i> I
338F	ACTCCTACGGGAGGCAG CA	
806R	GGACTACHVGGGTWTC TAAT	

表中下划线标示的碱基对应限制性内切酶识别位点。

The underlined bases in the table correspond to restriction endonuclease recognition sites.

据, 绘制不同 As(III) 和 As(V) 浓度下 *B. oklahomensis* NCTC 13388 的生长曲线。

1.3 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 对砷的转化

将过夜培养的菌液 25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心去上清后, 重悬于等体积 ST 10^{-1} 培养基[含 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 或 As(V) 和 0.4% 甘油]继续培养 72 h。在培养过程中, 分别于 0、8、16、24、48、72 h 时间点采集等量样品(2 mL)。样品在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 条件下离心 2 min, 收集上清液, 并通过 0.22 μm 硝酸纤维素膜过滤器过滤。最后, 使用 HPLC-ICP-MS 测定上清液中水溶性砷形态。

1.4 基因克隆和体内表达

参考 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中 *B. oklahomensis* NCTC 13388 基因序列 (GenBank 登录号为 NZ_UFUH01000001) 设计特异性扩增引物, *BoarsM* 基因的扩增使用引物 *BoarsM-F* 和 *BoarsM-R*; *BoarsL* 基因的扩增使用引物 *BoarsL-F* 和 *BoarsL-R* (表 1)。PCR 扩增体系 (50 μL): 2 \times Premix Taq (*Ex Taq* version 2.0

plus dye) 25 μL , 上游引物(9.8 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、下游引物(10.0 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 22.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。

构建重组质粒 pET21b-*BoarsL* 和 pET28a-*BoarsM*, 并将其分别转化到 *E. coli* Rosetta(DE3) 和同时转化到 *E. coli* BL21(DE3)。此外, 将空白载体 pET21b 转化到 Rosetta(DE3) 中作空白对照。分别挑取重组菌株 Rosetta(pET21b-*BoarsL*)、Rosetta(pET28a-*BoarsM*)、Rosetta(pET21b)、BL21(pET21b-*BoarsL*+pET28a-*BoarsM*) 单克隆在 LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养过夜。菌液 25 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 后, 收集细胞沉淀, 3 倍浓缩至 ST 10⁻¹ 培养基[含 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 和 0.4% 甘油]中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下继续培养 72 h, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 经 0.22 μm 硝酸纤维素膜过滤, 加 1% 过氧化氢将其中三价砷氧化成相应五价砷后用于砷形态测定。

1.5 土壤微宇宙实验

土壤样品于 2024 年 5 月下旬采集自厦门市集美区(24 $^{\circ}$ 38'36.8"N, 117 $^{\circ}$ 59'34.7"E)的一片水稻田, 主要收集水稻根际土壤。

称取 0.5 g (湿重, 约合 0.35 g 干重) 水稻土样品置于无菌血清小瓶中, 分别添加 AST 溶液和 2.5 mL 超纯水与 ST 的混合液, 调整至 2 \times ST, 且使 AST 终浓度分别为 0、0.5、2.5、5.0、10.0 mg As/kg 干土。随后, 使用 N₂:Ar (20:80, 体积比) 混合气体冲洗 30 min 后, 以丁基橡胶塞密封小瓶, 并在 30 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下静置培养。所有实验处理(包括非生物对照)均设置 4 个生物学重复。培养 7 d 后, 培养样品在室温下以 8 000 r/min 离心 10 min, 将得到的土壤沉淀迅速冷冻于液氮中, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存, 用于后续土壤微生物总 DNA 的提取。

1.6 砷形态分析

采用 Jupiter C18 300 \AA 色谱柱进行不同形态砷的分离, 并利用 HPLC-ICP-MS 技术进行砷形态分析。

1.6.1 HPLC 条件

流动相: 3 mmol/L 丙二酸和 5% 甲醇(用四丁基氢氧化铵水溶液调节 pH 至 5.8), 进样体积: 30 μL , 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6.2 ICP-MS 仪器条件

RF 功率: 1 550 W, RF 匹配: 1.8 V, 采样深度: 10.0 mm, 雾化器气流量: 1.0 L/min, 蠕动泵速率: 0.50 r/s, 雾化室温度: 2 $^{\circ}\text{C}$, 稀释气流量: 0.30 L/min, 提取透镜 1 电压: 0 V, 提取透镜 2 电压: -195 V, 偏转电压: -80 V, 透镜电压: 10.2 V, 碰撞池入口电压: -40 V, 碰撞池出口电压: -60 V。

1.7 细菌群落结构分析

利用 E.Z.N.A.[®] Soil DNA Kit 提取土壤中微生物总 DNA, 并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 分析 DNA 的质量和浓度。使用特定引物 338F 和 806R (表 1)^[20] 对 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, PCR 反应由上海美吉生物医药科技有限公司完成。扩增产物经纯化回收后, 采用 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit 构建测序文库, 并在 Illumina NextSeq 2000 平台完成高通量测序。

采用 fastp^[21] (<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.19.6) 对双端原始测序数据进行质量控制, 并使用 FLASH^[22] (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.11) 进行序列拼接。基于 QIIME 2 流程^[23], 使用 DADA2 插件对质控后序列进行去噪、拼接和去嵌合体处理, 生成扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs)。为确保 α 多样性(alpha diversity) 和 β 多样性(beta diversity) 分析的可靠性, 将所有样本的序列数抽平至 20 000, 抽平后 Good's coverage 仍可达 99.09%, 表明测序深度足以覆盖样本中的主要物

种。基于 Silva 16S rRNA 基因数据库(version 138), 采用 QIIME 2 的 Naive Bayes、Vsearch 或 BLAST 分类器对 ASVs 进行物种分类学注释。

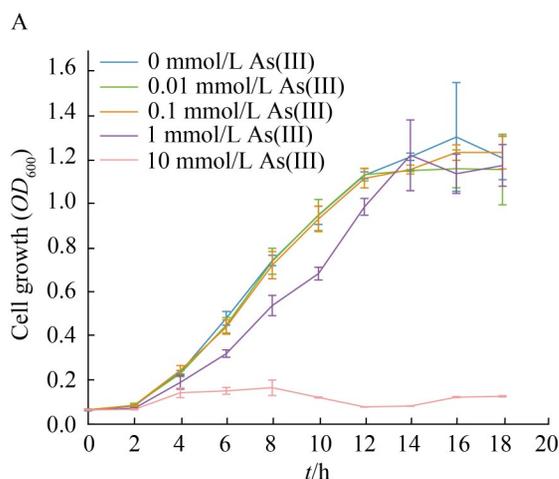
1.8 统计分析

计算 α 多样性指数, 包括 Chao1 指数(物种丰富度)和 Shannon 指数(物种多样性), 并采用 Wilcoxon 秩和检验评估不同组间 α 多样性差异的显著性。基于 Bray-Curtis 距离算法进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA), 以评估样本间细菌群落结构的相似性。同时, 结合非参数多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA) 检验, 分析不同实验组之间细菌群落结构的差异是否具有统计学显著性。此外, 采用线性判别分析效应大小(linear discriminant analysis effect size, LEfSe, LDA>2, $P<0.05$)筛选在门至属水平上具有显著丰度差异的细菌类群, 从而确定特定实验组中的优势菌群^[24-25]。

2 结果与分析

2.1 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 对砷的抗性

B. oklahomensis NCTC 13388 于 1973 年在



美国俄克拉何马州的一起农业事故导致的人类伤口感染病例中分离得到, 该菌最早被归类为 *Pseudomonas pseudomallei*, 后被更改为 *Burkholderia*^[26]。为了评估 *B. oklahomensis* NCTC 13388 对砷的耐受性, 分析了其在不同浓度 As(III)和 As(V)处理条件下的生长曲线。结果显示, 在 0.01、0.1 和 1 mmol/L 的 As(III)或 As(V)处理条件下, 该菌株生长未受到明显抑制(图 1)。然而, 当 As(III)浓度升高至 10 mmol/L 时菌株的生长被完全抑制, 而 10 mmol/L As(V)仅对菌株生长产生部分抑制。进一步实验发现, 当 As(V)浓度增加至 100 mmol/L 时, 菌株的生长被完全抑制(图 1B)。这些结果表明, *B. oklahomensis* NCTC 13388 具有较强的抗砷性, 且 As(III)对菌株的毒性明显高于 As(V)。

2.2 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 对无机砷的转化

为了探究 *B. oklahomensis* NCTC 13388 的 AST 生物合成过程, 将该菌株分别接种至含有 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III)或 As(V)的培养基中, 并在不同时间点检测砷形态的变化。在 As(III)处理条件下(图 2A), 培养 16 h 后开始检测到 AST-OH, 同时 As(III)浓度逐渐下降。至 24 h, AST 开始

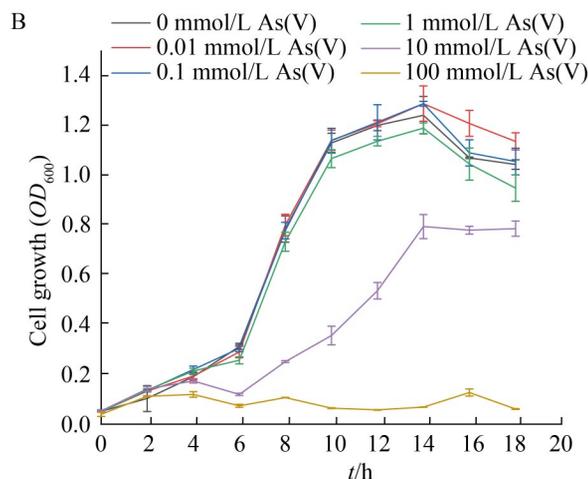


图1 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388对As(III) (A)和As(V) (B)的抗性

Figure 1 The resistance of *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 to As(III) (A) and As(V) (B).

出现, 并伴随 AST-OH 减少, 表明 AST-OH 可能是 AST 的前体, 并进一步转化为 AST。在 As(V) 处理条件下(图 2B), 培养 16 h 后 As(V) 浓度逐渐下降, 同时检测到 As(III) 和 AST-OH 的生成。至 48 h, AST 开始出现, 且 As(V) 被完全消耗。这些结果表明, 在 AST 的生物合成过程中, As(V) 需要先被还原为 As(III), 随后 As(III) 转化为 AST-OH, 最终 AST-OH 通过甲基化反应生成 AST。

2.3 BoArsM 和 BoArsL 参与 AST 生物合成

为了探究 *B. oklahomensis* NCTC 13388 中 *BoarsL* 和 *BoarsM* 是否参与 AST 的生物合成, 首先对 *B. gladioli* GSRB05 和 *B. oklahomensis* NCTC 13388 的基因组进行了比对分析(图 3A)。结果显示, 两者的 *ArsL* 或 *ArsM* 氨基酸序列相似性均超过 90%, 暗示 *BoarsL* 和 *BoarsM* 可能参与了 AST 的合成。为探究 *BoarsL* 和 *BoarsM*

在 AST 生物合成中的作用, 分别或同时在 *E. coli* 中异源表达这 2 个基因。BoArsL 由 428 个氨基酸残基组成, 分子量为 47.79 kDa; BoArsM 由 377 个氨基酸残基组成, 分子量为 41.50 kDa (图 3B)。实验中, 分别克隆 *BoarsM* 和 *BoarsL*, 并将其单独转化到 Rosetta(DE3) 菌株, 同时构建共同表达 *BoarsL* 和 *BoarsM* 的 BL21(DE3) 菌株。在 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) 处理条件下(图 3C), 携带 pET21b-*BoarsL* 的 Rosetta(DE3) 菌株将 As(III) 转化为 AST-OH 和极少量的 AST, 而携带 pET28a-*BoarsM* 的 Rosetta(DE3) 菌株则主要是将 As(III) 转化为 DMAs(V)。此外, 共表达 BoArsL 和 BoArsM 的 BL21(DE3) 菌株仅产生少量 DMAs(V), 并未检测到明显的 AST-OH 或 AST。上述结果表明, *BoarsL* 在 *E. coli* 中的异源表达能够参与 AST-OH 的生物合成, 而 BoArsM 则主要是催化 As(III) 甲基化生成 DMAs(V), 但并未直接促成 AST 的合成。

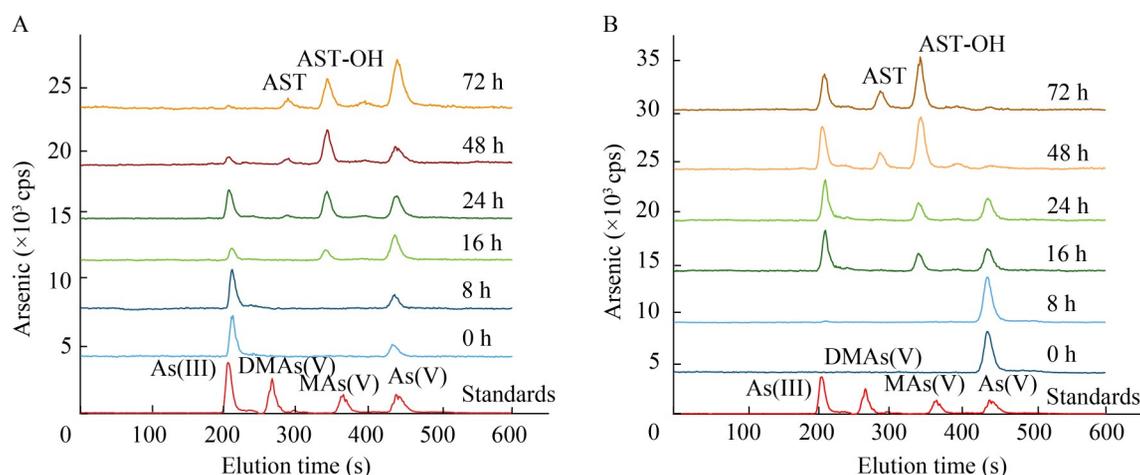


图2 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388对无机砷的生物转化。采用高效液相色谱法(HPLC-ICP-MS)测定了*Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388中1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) (A)和As(V) (B)转化的时间过程。cps (counts per second, 每秒计数)表示质谱检测器(ICP-MS)每秒检测到的目标元素离子化信号的数量。

Figure 2 Biotransformation of inorganic arsenic by *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388. The time course of conversion of 1 $\mu\text{mol/L}$ As(III) (A) and As(V) (B) from *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 was determined by high performance liquid chromatography (HPLC-ICP-MS). cps (counts per second) represents the number of ionized signals of target elements detected per second by the inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detector.

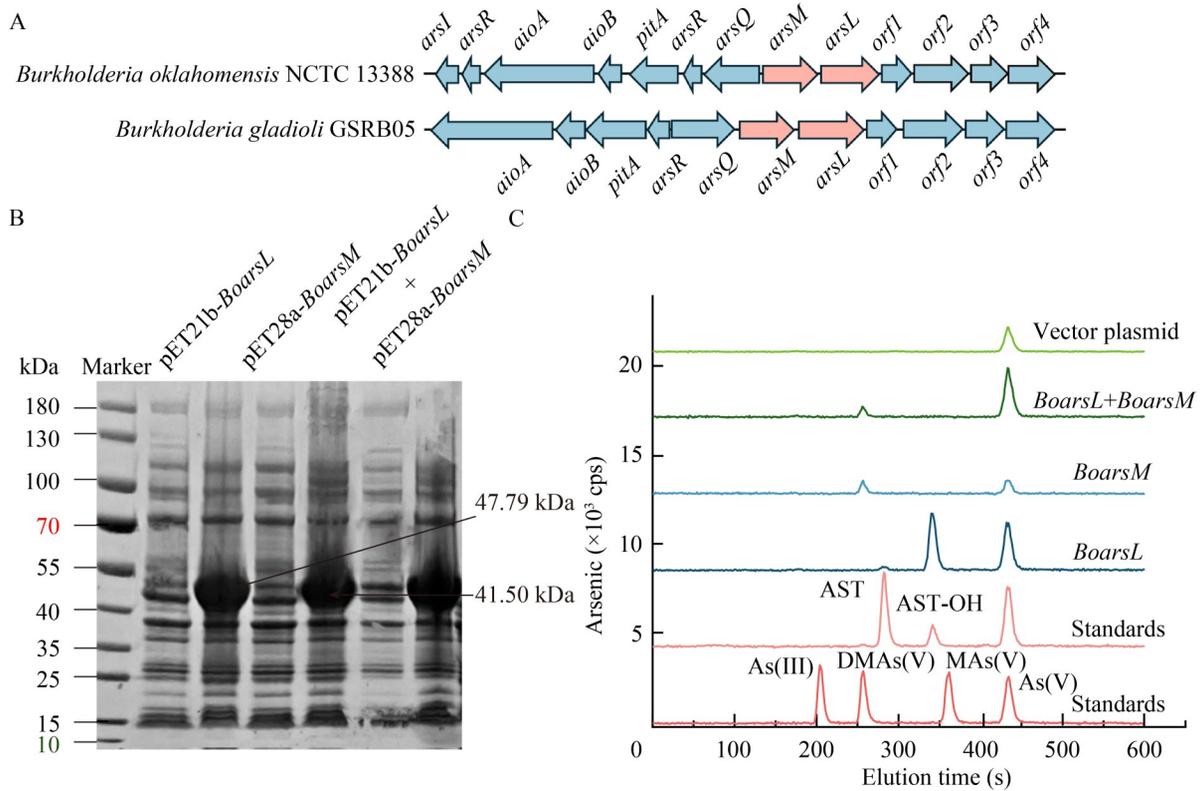


图3 *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388的BoArsL和BoArsM参与了AST的合成。A: *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 (登录号: NZ_UFUH01000000)和*Burkholderia gladioli* GSRB05 (登录号: JAGSIB000000000) AST生物合成基因簇对比; B: BoArsL和BoArsM重组蛋白诱导表达后的SDS-PAGE检测电泳对比图; C: 携带*BoarsL*或/和*BoarsM*的*E. coli*细胞中AST-OH和AST的生物合成。

Figure 3 BoArsL and BoArsM from *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 involved in AST synthesis. A: Comparative analysis of AST biosynthetic gene clusters between *Burkholderia oklahomensis* NCTC 13388 (accession No. NZ_UFUH01000000) and *Burkholderia gladioli* GSRB05 (accession No. JAGSIB000000000); B: The comparison figure of SDS-PAGE electrophoresis after the expression of recombinant proteins of BoArsL and BoArsM induced by induction; C: Biosynthesis of AST-OH or/and AST in *E. coli* cells harboring *BoarsL* or/and *BoarsM*.

2.4 AST 处理对土壤细菌群落结构的影响

对高通量测序结果的PCoA分析显示, 经过7 d不同浓度AST处理后, 5组土壤的细菌群落结构存在显著差异($P < 0.05$) (图4A), 表明AST处理显著影响了土壤细菌群落的组成。此外, 5组样本的Shannon指数和Chao1指数均表现出显著差异(图4B、4C)。多样性分析结果表明, 0.5 mg As/kg和2.5 mg As/kg AST处理组的土壤

细菌多样性显著高于对照组(0 mg As/kg) ($P < 0.05$), 而10.0 mg As/kg AST处理组则显著降低了土壤细菌的多样性和丰富度($P < 0.05$)。

基于高通量测序结果, 在属水平上对不同浓度AST处理的水稻土细菌群落结构进行了分析。共检测到909个细菌属, 结果表明AST处理显著改变了土壤细菌群落的属级组成(图5)。在对照组(未添加AST)中, 以下5个细菌属梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto*)、沉积物

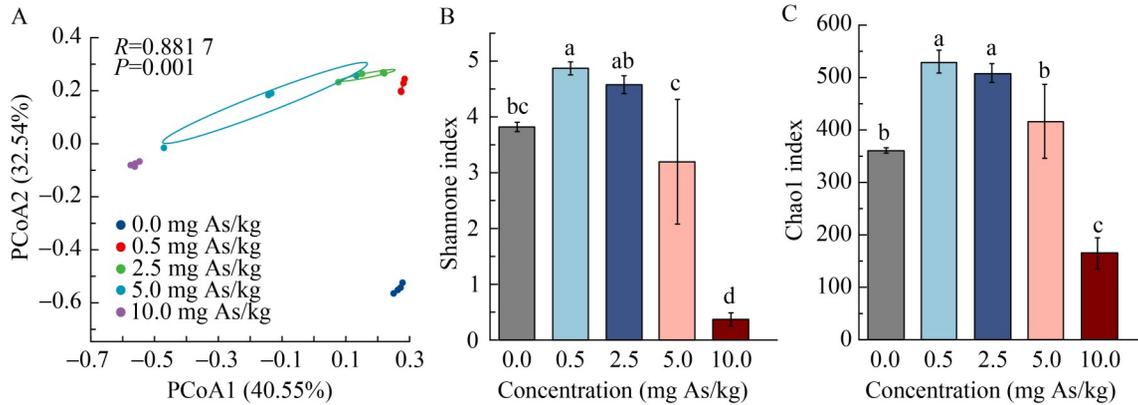


图4 不同浓度AST处理土壤细菌PCoA (A)、Shannon指数(B)和Chao1指数(C)分析。不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 4 Analysis of PCoA (A), Shannon index (B) and Chao1 index (C) of soil bacteria treated with AST at different concentrations. Different letters indicate significant differences between treatments with significance level ($P<0.05$).

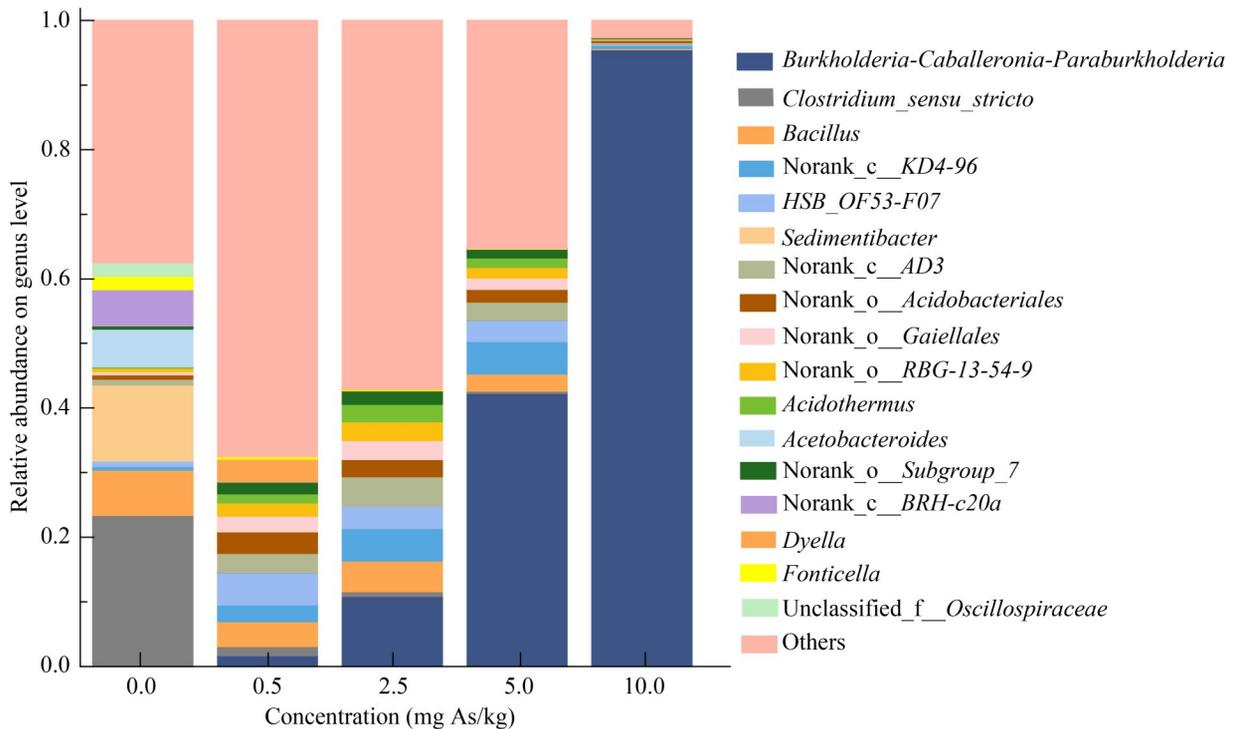


图5 不同浓度AST处理土壤属水平细菌群落组成

Figure 5 Composition of soil genus level bacterial community treated with different concentrations of AST.

杆菌属(*Sedimentibacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拟醋杆菌属(*Acetobacteroides*)、nonrank_c_BRH-c20a的相对丰度较高(>4%)。与对照组相

比, 不同浓度AST处理组的细菌属相对丰度显著下降, *Clostridium_sensu_stricto*、*Sedimentibacter*、*Bacillus*、*Acetobacteroides*、

nonrank_c_BRH-c20a 的相对丰度分别降低 93.6%–99.7%、99.9%–100%、91.1%–99.9%、100.0%。这些结果表明, AST 处理显著抑制了水稻土壤中优势菌群的生长, 尤其对 *Clostridium_sensu_stricto*、*Sedimentibacter* 和 *Bacillus* 的作用最为显著, 且这种抑制作用随 AST 浓度增加而增强。另外, 在 0.5、2.5、5.0、10.0 mg As/kg AST 处理组中伯克霍尔德氏菌属-卡瓦列罗菌属-副伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*)的相对丰度和对照组相比分别提高了 63.8、407、1 585 和 3 577 倍。此外, 在 2.5、5.0、10.0 mg As/kg AST 处理组中, 该菌群成为优势菌属, 且随 AST 浓度增高逐渐占据主导地位。

3 讨论

本研究首先通过实验验证了 *B. oklahomensis* NCTC 13388 中 AST 的生物合成过程, 明确了 AST-OH 和 AST 的生物合成顺序及其时间动态。在 72 h 的培养过程中, 首先检测到 AST-OH 的生成, 随后 AST 才开始出现, 同时培养过程中 As(III) [或 As(V)] 的浓度逐渐降低(图 2)。这一结果表明 As(III) 首先被转化为 AST-OH, 随后 AST-OH 进一步甲基化生成 AST。该结果也进一步支持了 AST 的两步生物合成途径^[27]: 第一步, BgArsL 催化 SAM 的 3-氨基-3-羧丙基基团转移至 As(III)^[28], 生成三价 AST-OH(III); 第二步, BgArsM 甲基化 AST-OH(III) 生成 AST(III), 后者经空气氧化形成 AST。

在 *B. oklahomensis* NCTC 13388 的砷代谢过程中, As(III) 和 As(V) 之间存在动态转化并影响 AST 的合成。在 As(III) 处理组中, 培养早期 As(III) 首先被氧化为 As(V), 这可能是微生物的一种解毒机制, 因为 As(V) 的毒性通常低于 As(III)。随后, As(V) 被砷酸还原酶 ArsC 还原为 As(III), 后者作为直接底物参与 AST 的合成(图 2A)。相比之下, 在 As(V) 处理组中, As(V) 逐渐

被还原为 As(III), 后者进一步被用于合成 AST-OH 和 AST (图 2B)。这一动态转化过程表明, AST 的合成依赖于 As(III) 的供应, 而 As(V) 的还原是 As(III) 的重要来源。微生物通过氧化 As(III) 为 As(V) 以降低其毒性, 同时通过还原 As(V) 为 As(III) 以满足 AST 合成的需求。此外, As(V) 的还原也可能是微生物应对高浓度砷压力的一种适应性策略, 通过将 As(V) 转化为 As(III) 并进一步被转化为对自身低毒性的有机砷化合物(如 AST), 以减轻砷的毒性效应。总之, *B. oklahomensis* NCTC 13388 通过 As(III) 氧化、As(V) 还原以及 AST 合成的多步反应, 实现了对砷的动态解毒和代谢。这种复杂的代谢途径不仅体现了微生物对砷的适应性, 也揭示了其在砷生物地球化学循环中的重要作用。

为了进一步验证 *BoarsL* 和 *BoarsM* 在 AST 合成中的功能, 本研究构建了重组表达菌株 Rosetta(pET21b-*BoarsL*)、Rosetta(pET28a-*BoarsM*) 及 BL21(pET21b-*BoarsL*+pET28a-*BoarsM*)。实验结果显示, 单独表达 *BoArsL* 的菌株可生成 AST-OH 以及少量 AST, 表明 *BoArsL* 参与了 AST-OH 的生物合成。单独表达 *BoArsM* 的菌株仅产生少量 DMAs(V), 这是因为菌株缺乏 *BoArsL*, 无法合成 *BoArsM* 甲基化的直接底物——AST-OH, 因此 *BoArsM* 只能利用 As(III) 进行初级甲基化, 导致代谢流向 DMA(V) 生成方向, AST 合成路径因底物缺失被完全阻断。然而, 共表达 *BoArsL* 和 *BoArsM* 的菌株未检测到 AST 或 AST-OH 的产生。对于这一现象, 可能是由于 AST 对 *E. coli* 具有较强的毒性, *E. coli* 通过调控其他相关途径抑制了 AST-OH 及 AST 的生成, 导致其在实验条件下难以被检测到。

抗生素耐药性危机作为全球公共卫生领域的重大挑战, 亟待开发具有广谱活性的新型抗生素。AST 及其衍生物因其独特的抗菌机制被视为新型抗生素候选, 但其环境归趋可能对土壤生态系统产生潜在风险。为评估 AST 对环境

微生物群落的影响, 本研究选择水稻土作为实验对象, 分析不同浓度 AST 处理对土壤细菌群落组成的影响。Shannon 指数分析结果表明, 在低浓度 AST 条件下土壤细菌多样性高于对照组, 然而随着 AST 浓度的增加, 土壤细菌多样性逐渐降低。Chao1 指数分析结果显示, 在低浓度 AST 处理组土壤细菌丰富度高于对照组, 当 AST 浓度增加至 10.0 mg As/kg 时, 土壤细菌丰富度显著下降。这种剂量依赖性生态响应模式与 Hormesis 理论具有显著一致性^[29], 通常表现为低剂量刺激(促进效应)和高剂量抑制(毒性效应)的双相反应。然而, 由于 Hormesis 现象的复杂性和多样性, 其分子机制尚未完全阐明, 特别是在不同生物体系和环境条件下的具体调控机制仍需进一步深入研究。

基于对属水平不同浓度 AST 处理的土壤微生物群落结构分析, 发现 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 在高浓度 AST 处理下的相对丰度显著上升, 并在 AST 浓度超过 2.5 mg As/kg 处理组中成为优势菌属。随着 AST 浓度的增加, 该菌群逐渐占据主导地位, 表明其能够耐受甚至适应高浓度 AST 环境。这一现象表明, 尽管 AST 对大多数土壤细菌具有抑制作用, 但 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 菌属可能具备独特的 AST 抗性或降解能力, 使其能够在高 AST 环境中维持生态优势。*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 的相对丰度与土壤 AST 浓度呈显著正相关, 暗示其可作为新型砷污染生物指示物的候选菌群。其生态优势的分子基础可能与 *arsN* 编码的 N-乙酰转移酶相关, 该酶通过催化 AST 的乙酰化修饰实现解毒代谢, 其底物特异性结合域可有效识别 AST 结构, 从而维持胞内氧化还原稳态^[14]。此外, 目前环境中未检测到高浓度 AST 的积累, 表明环境中可能存在 AST 及其乙酰化产物的降解机制, 这一机制的具体途径及其调控机制仍有待进一步研究。

4 结论

本研究成功构建了来自 *B. oklahomensis* NCTC 13388 菌株的 *BoarsL* 和 *BoarsM* 基因的异位表达菌, 并通过砷转化实验, 验证了两者在 AST 生物合成过程中的功能, *BoArsL* 参与了 AST-OH 的生物合成, 催化 As(III) 转化为 AST-OH, 而 *BoArsM* 优先将 As(III) 甲基化为 DMAs(V)。此外, 通过对 AST 处理后土壤细菌群落结构的分析, 发现 AST 对大多数土壤细菌具有一定的毒性, 随着 AST 浓度的增加, 细菌群落的多样性和丰富度显著降低。然而, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* 在高浓度 AST 处理组中显著富集, 表明其能够耐受甚至适应高浓度 AST, 可能具备较强的 AST 抗性或降解能力。本研究不仅揭示了 *B. oklahomensis* NCTC 13388 在 AST 生物合成过程中的关键基因, 也为 AST 在环境中的影响及其微生物降解机制提供了新的研究视角和理论基础。

作者贡献声明

杨宇晗: 实验操作、数据收集与分析, 论文撰写; 胡仕林: 论文审阅和修改; 黄丽婕: 实验操作、论文审阅和修改; 段桂兰: 论文审阅和修改; 薛喜枚: 实验设计、论文审阅和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HUGHES MF, BECK BD, CHEN Y, LEWIS AS, THOMAS DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective[J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 123(2): 305-332.
- [2] ZHU YG, YOSHINAGA M, ZHAO FJ, ROSEN BP. Earth abides arsenic biotransformations[J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2014, 42: 443-467.
- [3] CHOLUJOVA D, BUJNAKOVA Z, DUTKOVA E, HIDEHIMA T, GROEN RW, MITSIADES CS, RICHARDSON PG, DORFMAN DM, BALAZ P,

- ANDERSON KC, JAKUBIKOVA J. Realgar nanoparticles versus ATO arsenic compounds induce *in vitro* and *in vivo* activity against multiple myeloma[J]. *British Journal of Haematology*, 2017, 179(5): 756-771.
- [4] JOLLIFFE DM. A history of the use of arsenicals in man[J]. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 1993, 86(5): 287-289.
- [5] MANGALGIRI KP, ADAK A, BLANEY L. Organoarsenicals in poultry litter: detection, fate, and toxicity[J]. *Environment International*, 2015, 75: 68-80.
- [6] CHEN Z, CHEN SJ. Poisoning the devil[J]. *Cell*, 2017, 168(4): 556-560.
- [7] STYBLO M, VENKATRAMAN A, FRY RC, THOMAS DJ. Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects[J]. *Archives of Toxicology*, 2021, 95(5): 1547-1572.
- [8] CHEN J, ROSEN BP. The arsenic methylation cycle: how microbial communities adapted methylarsenicals for use as weapons in the continuing war for dominance[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2020, 8: 43.
- [9] ANDREWES P, DEMARINI DM, FUNASAKA K, WALLACE K, LAI VWM, SUN H, CULLEN WR, KITCHIN KT. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(15): 4140-4148.
- [10] GARCÍA-SALGADO S, RABER G, RAML R, MAGNES C, FRANCESCONI KA. Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae[J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 9(1): 63.
- [11] LI JJ, PAWITWAR SS, ROSEN BP. The organoarsenical biocycle and the primordial antibiotic methylarsenite[J]. *Metallomics*, 2016, 8(10): 1047-1055.
- [12] HOSHINO S, ONAKA H, ABE I. Recent advances in the biosynthetic studies of bacterial organoarsenic natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2025, 42: 663-671.
- [13] KURAMATA M, SAKAKIBARA F, KATAOKA R, YAMAZAKI K, BABA K, ISHIZAKA M, HIRADATE S, KAMO T, ISHIKAWA S. Arsinothricin, a novel organoarsenic species produced by a rice rhizosphere bacterium[J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 13(4): 723.
- [14] NADAR VS, CHEN J, DHEEMAN DS, GALVÁN AE, YOSHINAGA-SAKURAI K, KANDAVELU P, SANKARAN B, KURAMATA M, ISHIKAWA S, ROSEN BP, YOSHINAGA M. Arsinothricin, an arsenic-containing non-proteinogenic amino acid analog of glutamate, is a broad-spectrum antibiotic[J]. *Communications Biology*, 2019, 2: 131.
- [15] YOSHINAGA M, NIU GD, YOSHINAGA-SAKURAI K, NADAR VS, WANG XH, ROSEN BP, LI J. Arsinothricin inhibits *Plasmodium falciparum* proliferation in blood and blocks parasite transmission to mosquitoes[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(5): 1195.
- [16] GYGLI SM, BORRELL S, TRAUNER A, GAGNEUX S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(3): 354-373.
- [17] BERLICKI Ł, OBOJSKA A, FORLANI G, KAFARSKI P. Design, synthesis, and activity of analogues of phosphinothricin as inhibitors of glutamine synthetase[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2025, 48(20): 6340-6349.
- [18] LI H, CHEN FE, DING W, ZHANG Q. One-pot chemoenzymatic synthesis of arsinothricin and the mechanistic insights into the noncanonical radical SAM enzyme ArsL[J]. *ACS Catalysis*, 2024, 15(1): 494-501.
- [19] SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd Edition. New York: Bioscience, 1983: 721-722.
- [20] LIU CS, ZHAO DF, MA WJ, GUO YD, WANG AJ, WANG QL, LEE DJ. Denitrifying sulfide removal process on high-salinity wastewaters in the presence of *Halomonas* sp. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(3): 1421-1426.
- [21] CHEN SF, ZHOU YQ, CHEN YR, GU J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [22] MAGOC T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [23] EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [24] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12: 1-18.
- [25] BARBERÁN A, BATES ST, CASAMAYOR EO, FIERER N. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6: 343-351.
- [26] GLASS MB, STEIGERWALT AG, JORDAN JG, WILKINS PP, GEE JE. *Burkholderia oklahomensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species formerly known as the Oklahoma strain of *Pseudomonas pseudomallei*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 2171-2176.
- [27] GALVÁN AE, PAUL NP, CHEN J, YOSHINAGA-SAKURAI K, UTTURKAR SM, ROSEN BP, YOSHINAGA M. Identification of the biosynthetic gene cluster for the organoarsenical antibiotic arsinothricin[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(1): 502-521.
- [28] YAO Y, HE J, CHEN F, DONG M. Arsinothricin biosynthesis involving a radical SAM enzyme for noncanonical SAM cleavage and C-As bond formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146(31): 21214-21219.
- [29] CALABRESE EJ. Hormesis: a fundamental concept in biology[J]. *Microbial Cell*, 2014, 1(5): 145-149.