

# *Bacillus* sp. ZJS3 基因组测序及砷胁迫下相关基因表达分析

李靖宇<sup>\*1,2,3</sup>, 段晓敏<sup>1,3</sup>, 李艳楠<sup>1,2</sup>, 袁存霞<sup>1,2</sup>, 杨瑞<sup>1,2</sup>, 程欣怡<sup>1,2</sup>, 何艳婷<sup>1,2</sup>, 刘建利<sup>1,2,3</sup>

1 北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021

2 宁夏特殊生境微生物资源开发与利用重点实验室, 宁夏 银川 750021

3 国家民委黄河流域农牧交错区生态保护重点实验室, 宁夏 银川 750021

李靖宇, 段晓敏, 李艳楠, 袁存霞, 杨瑞, 程欣怡, 何艳婷, 刘建利. *Bacillus* sp. ZJS3 基因组测序及砷胁迫下相关基因表达分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4269-4280

Li Jingyu, Duan Xiaomin, Li Yannan, Yuan Cunxia, Yang Rui, Cheng Xinyi, He Yanting, Liu Jianli. Genome sequencing and expression of related genes of *Bacillus* sp. ZJS3 under As<sup>3+</sup> stress[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4269-4280

**摘要:** 【背景】环境中高毒性 As<sup>3+</sup> 的微生物氧化在砷的生物地球化学循环中起重要作用, 具有潜在的应用价值。【目的】*Bacillus* sp. ZJS3 菌株是本实验室前期分离鉴定的一株 As<sup>3+</sup> 耐受菌株, 而且对多种重金属具有耐受性, 期望进一步明确该菌株在 As<sup>3+</sup> 胁迫下菌体形态变化及应对砷胁迫的遗传基础, 为 As<sup>3+</sup> 耐受细菌的研究提供基础数据。【方法】使用单分子实时测序(single-molecule real-time sequencing, SMRT)及 Illumina 测序技术对 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株进行全基因组测序, 对其基因进行功能注释和生物信息学分析, 并结合绝对定量 PCR 技术对砷抗性及砷代谢相关基因进行分析。【结果】*Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组大小为 5.82 Mb, GC 含量为 35.9%, 包含染色体 1 个、质粒 3 个、CDS 数量为 5 981 个、tRNA 104 个、sRNA 136 个、rRNA 42 个、串联重复序列 173 个、基因岛 13 个、转运蛋白 1 023 个、跨膜蛋白 1 717 个和双组分调控基因 160 个。NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库分别可注释 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组中 97.66%、69.30%、78.52%、65.49%、67.65% 和 43.87% 的基因。绝对定量 PCR 结果表明, *arsC* 基因在砷处理条件下显著高于对照组, 而 *arsB* 基因在砷处理条件下显著低于对照组。【结论】*Bacillus* sp. ZJS3 菌株在 As<sup>3+</sup> 胁迫下可能导致细胞分裂无法正常进行, 进而影响细胞形态。基因组中 *aqpZ*、*arsA*、*arsB*、*arsC* 等基因的存在表明该菌株具有 As<sup>3+</sup> 外排和还原 As<sup>5+</sup> 的能力, *phoUpstBACS* 的存在表明菌株可以吸收 As<sup>5+</sup>, 但菌株受到外界环境 As<sup>3+</sup> 胁迫时 *arsB* 表达水平降低。

**关键词:** As<sup>3+</sup> 胁迫; 耐砷细菌; 基因组测序; 砷抗性基因; 砷代谢基因

基金项目: 宁夏回族自治区青年科技人才托举工程; 国家自然科学基金(32160306, 41661053)

Supported by: Young Science and Technology Talents Promotion Project of Ningxia Hui Autonomous Region; National Natural Science Foundation of China (32160306, 41661053)

\*Corresponding author: E-mail: lijingyu1986@126.com

Received: 2022-02-21; Accepted: 2022-03-29; Published online: 2022-04-25

## Genome sequencing and expression of related genes of *Bacillus* sp. ZJS3 under As<sup>3+</sup> stress

LI Jingyu<sup>\*1,2,3</sup>, DUAN Xiaomin<sup>1,3</sup>, LI Yannan<sup>1,2</sup>, YUAN Cunxia<sup>1,2</sup>, YANG Rui<sup>1,2</sup>, CHENG Xinyi<sup>1,2</sup>, HE Yanting<sup>1,2</sup>, LIU Jianli<sup>1,2,3</sup>

1 School of Biological Science & Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 Ningxia Key Laboratory of Microbial Resources Development and Applications in Special Environment, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 Key Laboratory of Ecological Protection of Agro-Pastoral Ecotones in the Yellow River Basin, National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Yinchuan 750021, Ningxia, China

**Abstract:** [Background] Microbial oxidation of highly toxic As<sup>3+</sup> in the environment plays an important role in the biogeochemical cycle of arsenic, which has potential application value. [Objective] *Bacillus* sp. ZJS3 has been identified to be tolerant to As<sup>3+</sup>, among other heavy metals. This paper aims to clarify the morphological changes of ZJS3 in response to As<sup>3+</sup> stress and the genetic basis for arsenic response, which is expected to provide basic data for research on As<sup>3+</sup>-tolerant bacteria. [Methods] The whole genome of ZJS3 was sequenced by single-molecule real-time (SMRT) sequencing and Illumina, followed by functional annotation and bioinformatics analysis of the genes. Genes related to arsenic resistance and arsenic metabolism were analyzed by absolute quantitative PCR. [Results] The genome of ZJS3 was 5.82 Mb, which contained 1 chromosome and 3 plasmids, with GC content of 35.9%, 5 981 coding sequences (CDSs), 104 tRNA genes, 136 sRNA genes, 42 rRNA genes, 173 tandem repeats, 13 gene islands, 1 023 transporter-coding genes, 1 717 transmembrane protein-coding genes, and 160 two-component regulatory genes. A total of 97.66%, 69.30%, 78.52%, 65.49%, 67.65%, and 43.87% of the genes in the genome of ZJS3 were annotated in NR, Swiss-Prot, Pfam, COG, GO and KEGG, respectively. *arsC* expression was significantly higher in the arsenic treatment group than in the control group, while the level of *arsB* was significantly lower in the arsenic treatment group than in the control group. [Conclusion] Under As<sup>3+</sup> stress, they block cell division, further influencing cell morphology. The presence of *aqpZ*, *arsA*, *arsB* and *arsC* in ZJS3 genome indicates that the strain has the ability of As<sup>3+</sup> efflux and As<sup>5+</sup> reduction, and the presence of *phoUpstBACS* suggests that the strain can absorb As<sup>5+</sup>. However, the expression of *arsB* decreases in response to external As<sup>3+</sup> stress.

**Keywords:** As<sup>3+</sup> stress; arsenic-resistant bacteria; genome sequencing; arsenic resistance gene; arsenic metabolism gene

由于自然地球化学过程和人类活动, 重金属污染已成为环境和人类健康最严重的威胁之一<sup>[1-2]</sup>。砷是类金属, 广泛分布于环境中, 最常见的氧化状态是 As<sup>5+</sup>和 As<sup>3+</sup>, 而 As<sup>3+</sup>的毒性比 As<sup>5+</sup>大得多<sup>[3]</sup>。亚砷酸盐可与蛋白质的巯基和二硫醇基结合, 也可作为磷酸盐的化学类似物抑

制氧化磷酸化<sup>[4]</sup>。As<sup>3+</sup>还通过与激素受体结合, 作为内分泌干扰物, 干扰正常细胞信号<sup>[5]</sup>。亚砷酸盐刺激产生的活性氧会损害蛋白质、脂质和 DNA, 可能是亚砷酸盐致癌性的直接原因<sup>[5]</sup>。

为了在金属胁迫条件下生存, 微生物已经进化出耐受重金属离子的多种机制<sup>[4]</sup>。微生物

参与砷的生物地球化学循环的相关基因通常分为两类: 抗性基因和代谢基因<sup>[6]</sup>。抗砷基因通常组织在 *ars* 操纵子中, 包括 *arsRBC* 或 *arsRDABC* 基因; 砷代谢包括甲基化(*ArsM*)、氧化(*AioAB*、*ArxAB*)、还原(*ArsC*)和异化还原(*ArrAB*)<sup>[5-6]</sup>。截至目前, 研究者已从细菌染色体和质粒中鉴定出多个 *ars* 操纵子, 其广泛分布与水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)有关<sup>[3]</sup>。许多革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都有 2 种必要的成分: 一种是将  $As^{5+}$  还原为  $As^{3+}$  的还原酶(*arsC*), 一种是  $As^{3+}$  排出泵(*arsB*)<sup>[5]</sup>。*ars* 操纵子可以保护微生物细胞免受砷的侵害, 但不会使环境中的砷解毒<sup>[6]</sup>。 $As^{5+}$  的可溶性较低, 可通过物理化学方法有效去除, 因此,  $As^{3+}$  的氧化对于砷的去除非常重要<sup>[5]</sup>。研究指出, 将 *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 菌株用于砷生物修复的第一步, 该菌株将  $As^{3+}$  氧化为毒性较小且更容易固定化的  $As^{5+}$ <sup>[7]</sup>。利用微生物对重金属进行生物修复受到了广泛关注, 微生物在砷的生物化学循环中起着重要作用, 可以转化砷为具有不同溶解度、迁移率和毒性的不同氧化状态, 具有潜在的应用价值<sup>[4]</sup>。研究者已开发出几种类型的转基因微生物, 通过表达细胞内砷结合蛋白来产生高砷生物累积率。例如, 一株过度表达 *arsR* 的大肠杆菌比野生型积累的砷多 5–60 倍<sup>[2]</sup>。近年来, 基因组测序等组学技术允许从全局角度深入了解生物体的生理学问题, 这些方法极大地提高了对微生物代谢的理解<sup>[8]</sup>。已在 *H. arsenicoxydans* 和 *Thiomonas* sp. 3As 中证明, 砷的存在导致参与抗性和氧化的基因和蛋白质的表达, 但也诱导各种途径和代谢过程, 揭示砷响应的多因素特征。这些包括氧化应激、硫代谢、DNA 修复、鞭毛生物合成和磷酸盐转运<sup>[2]</sup>。在实验室条件下获得的这些数据大大增强了人们对微生物应对砷挑战行为的理解<sup>[2]</sup>。

我们实验室前期筛选得到一株 *Bacillus* sp. ZJS3, 该菌对多种重金属具有耐受性, 特别是在砷胁迫下, 菌体形态发生明显变化, 由褶皱的粗短杆状变成表面鳞片状粗糙的细长杆状, 部分菌体表面附着晶状物质<sup>[9]</sup>。而且 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株能将  $As^{3+}$  氧化成  $As^{5+}$ , 对砷具有吸附作用<sup>[10]</sup>。为了对该菌株进行深入了解, 本研究采取 Illumina HiSeq 和 PacBio RS II 单分子实时测序技术对 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株进行了基因组测序, 并对其在未受砷胁迫和砷胁迫条件下有关砷抗性和代谢基因进行了定量比较分析, 以探究 *Bacillus* sp. ZJS3 对  $As^{3+}$  耐受的遗传基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

*Bacillus* sp. ZJS3 为北方民族大学生物科学与工程学院微生物生态学实验室保存菌株<sup>[9-10]</sup>。

LB 培养基参照文献<sup>[9]</sup>配制。

Wizard<sup>®</sup>基因组 DNA 纯化试剂盒, Promega 公司; E.Z.N.A.<sup>®</sup> Mag-Bind Soil DNA 试剂盒, Omega 公司; NEXTflex Rapid DNA-Seq Kit, Bioo Scientific 公司; Agencourt AMPure XP beads, Beckman 公司; AceQ qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

旋涡振荡器, 江苏省海门市麒麟医用仪器厂; 台式高速冷冻离心机, 上海力申科学仪器有限公司; 普通 PCR 仪, 北京东胜创新生物技术有限公司; 电泳仪, Major Science 公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 苏州雅睿生物技术有限公司; 荧光仪, Turner Bio Systems 公司; NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计, Gene 公司; G-tubes, Covaris 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的培养

从  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱取出保存菌种的甘油管, 置

于冰上融化后吸取 50  $\mu\text{L}$  接种到 LB 固体培养基上, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后挑取单菌落, 接种到 LB 固体培养基上重复培养 2–3 次后, 于 LB 液体培养基中于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 24 h。在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用于菌株的 DNA 提取。选取  $\text{As}^{3+}$  的浓度为 0 mg/L 和 180 mg/L<sup>[9]</sup> 加入 LB 液体培养基, 培养 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株用于后续定量 PCR 分析。

### 1.2.2 菌株 DNA 提取

按照 Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提取基因组 DNA。纯化的基因组 DNA 采用荧光仪进行定量。*Bacillus* sp. ZJS3 菌株 DNA 提取浓度为 125 ng/ $\mu\text{L}$ , DNA 总量为 12.5  $\mu\text{g}$ ,  $OD_{260}/OD_{280}$  为 1.9,  $OD_{260}/OD_{230}$  为 2.2, 可用于后续的 Illumina 建库和 PacBio RS II 单分子实时测序。

### 1.2.3 Illumina 文库构建和测序

取至少 1  $\mu\text{g}$  基因组 DNA, 利用 G-tubes 进行基因组 DNA 片段化, 将 DNA 样本剪切成约 400 bp 的片段, 琼脂糖凝胶鉴定片段大小分布, 富集 300–500 bp 范围的基因组片段, 使用 NEXTflex Rapid DNA-Seq Kit 进行文库制备。制备的文库在 Illumina HiSeq X Ten 仪器上进行双端测序(2 $\times$ 150 bp)。

### 1.2.4 PacBio RS II 单分子实时测序

取 15  $\mu\text{g}$  基因组 DNA, 利用 G-tubes 将基因组 DNA 处理成约 10 kb 的片段, 然后根据 PacBio 说明书进行片段纯化, 末端补平, 两端分别连接 SMRT bell 测序接头。得到的测序文库用 0.45 倍体积的 Agencourt AMPure XP beads 试剂进行 3 次纯化, 然后将文库单链环退火, 结合到固定的零模波导孔(zero-mode waveguides, ZMW)底部的聚合酶上, 加入测序反应试剂, 每个碱基配对合成后会发出相应的光并被检

测, 每合成一个碱基即显示为一个脉冲峰, 用高分辨率的光学检测系统进行实时检测。

### 1.2.5 基因组组装、基因预测与注释

利用 PacBio RS II 和 Illumina 平台生成的数据进行生物信息学分析。所有分析均在上海美吉生物的 I-Sanger 云平台(www.i-sanger.com)上进行。二代测序原始数据(raw data)以 fastq 格式储存, 为了使后续的组装更加准确, 对原始数据进行质量剪切, 去除测序质量较低、含 N 比例较高及质量修剪后长度较小的 reads, 得到高质量的 clean data。利用 Canu<sup>[11]</sup>及 HGAP 软件进行 PacBio 数据组装, 将 reads 组装成 contigs。然后判断是否成环, 得到完整的染色体和质粒基因组。最后利用 Illumina 测序数据对组装结果进行校正, 并判断环状基因组的起始位点。利用 Glimmer<sup>[12]</sup>对基因组中的编码序列(coding sequence, CDS)进行预测, 质粒基因采用 GeneMark<sup>[13]</sup>软件预测, 用 tRNAscan-SE<sup>[14]</sup>进行 tRNA 预测, 用 Barrnap (<https://github.com/tseemann/barrnap>) 进行 rRNA 预测。利用 BLASTpDiamond、HMMER 等序列比对工具, 运用 NR、Swiss-Prot、Pfam、GO、COG、KEGG 数据库对预测到的 CDS 进行功能注释。菌株 *Bacillus* sp. ZJS3 基因组(1 个染色体和 3 个质粒)的 NCBI 数据库登录号为 CP094455–CP094458。

### 1.2.6 砷胁迫下相关基因表达分析

基因组 DNA 的提取严格按照 E.Z.N.A.<sup>®</sup> Mag-Bind Soil DNA 试剂盒说明书进行。后续采用 SYBR Green 染料法进行砷代谢相关基因的 real-time PCR 绝对定量实验。主要选择了基因组中注释到的基因  $\text{As}^{3+}$  外排基因(*arsB*)和  $\text{As}^{5+}$  还原基因(*arsC*), 引物见表 1。构建标准品及标准曲线, 将以上目的基因进行 PCR 扩增, 纯化 PCR 产物后和 pMD18-T vector 连接, 转化感受

表 1 砷代谢相关基因引物

Table 1 Primers for arsenic metabolism related genes

编码蛋白 Encoded protein	基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
亚砷酸盐外排基因 Arsenite transporter	<i>arsB</i>	darsB1F	GGTGTGGAACATCGTCTGGAACGCACGTAC
		darsB1R	CAGGCCGTACACCACCAGAGTACATACGTCC
砷酸盐还原基因 Arsenate reductase	<i>arsC</i>	amlt-42-F	TCGCGTAATACGCTGGAGAT
		amlt-376-R	ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT

态细胞对转化菌进行培养和 PCR 扩增, 根据目的片段大小判断是否有相应条带, 如果有条带且条带亮度较高说明转化成功, 相应编号的菌液可进行质粒抽提。利用 NanoDrop 2000 超微量紫外分光光度计测定质粒的浓度和纯度, 根据质粒拷贝数( $\text{copies}/\mu\text{L}$ )= $6.02 \times 10^{23} \times \text{DNA 浓度}(\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{DNA 长度} \times 660)$ 公式得到质粒拷贝数。将质粒依次用 ddH<sub>2</sub>O 进行 10 倍比系列稀释, 每个模板重复 3 次。PCR 反应体系: 2×AceQ qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 引物 F/R (10 mmol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 超纯水 7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。反应结束后, 以 Log<sub>10</sub> 逐级稀释后的质粒拷贝数为横坐标、对应的 C<sub>t</sub> 值为纵坐标, 绘制标准曲线。计算砷处理前后 *arsB* 和 *arsC* 基因的表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 *Bacillus* sp. ZJS3 的基因组基本情况

对菌株 *Bacillus* sp. ZJS3 进行了 Illumina 和 PacBio RS II 单分子实时测序, 基于 GC-depth 和 K-mer 频率分布对其基因组组装质量进行了评估, K-mer 值为 17, 测序深度为 208。结果表明, 该菌基因组包含 1 个染色体和 3 个质粒, 基因组大小为 5.82 Mb, 其中染色体大小为 5.28 Mb (表 2)。基因组 GC 含量为 35.9%, CDS 数量为

5 981 个, tRNA 104 个, sRNA 136 个和 rRNA 42 个; 串联重复序列 173 个, 基因岛 13 个, 转运蛋白 1 023 个, 跨膜蛋白 1 717 个, 双组分调控基因 160 个(表 2)。

### 2.2 菌株 *Bacillus* sp. ZJS3 基因组注释

通过 NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库注释, *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组 5 981 个 coding sequence (CDS) 中, NR 数据库可注释 5 841 个, 占比为 97.66%; Swiss-Prot 数据库可注释 4 145 个, 占比为 69.30%; Pfam 数据库可注释 4 696 个, 占比为 78.52%; COG 数据库可注释 3 917 个, 占比为 65.49%; GO 数据库可注释 4 046 个, 占比为 67.65%; KEGG 数据库可注释 2 624 个, 占比为 43.87%。

COG 数据库可注释的 3 917 个基因中, 1 096 个基因功能未知, 370 个基因注释到氨基酸转运与代谢(amino acid transport and metabolism), 307 个基因注释到转录(transcription), 264 个基因注释到无机离子转运与代谢(inorganic ion transport and metabolism), 230 个基因注释到碳水化合物运输和代谢(carbohydrate transport and metabolism), 224 个基因注释到细胞壁/膜/包膜生物发生(cell wall/membrane/envelope biogenesis), 210 个基因注释到复制、重组和修复(replication, recombination and repair), 195 个基因注释到翻译、核糖体结构与生物发生(translation, ribosomal structure and biogenesis), 192 个基因注释到能

表 2 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组分析统计表  
Table 2 Statistics of genome analysis of *Bacillus* sp. ZJS3 strain

基因组生物信息学分析 Genomic bioinformatics analysis	统计内容 Statistic content
染色体数 Chromosome number	1
质粒数 Plasmid number	3
基因组大小 Genome size	5 822 498 bp
GC 含量 GC content	35.9%
CDS 数量 CDS number	5 981
tRNA 数量 tRNA number	104
sRNA 数量 sRNA number	136
rRNA 数量 rRNA number	42
16S rRNA	14
23S rRNA	14
5S rRNA	14
串联重复数 Tandem repeats number	173
基因岛数 Gene island number	13
前噬菌体数 Prophage number	1
CRISPR-Cas 数 CRISPR-Cas number	37
毒力因子数 Virulent factor number	570
抗生素耐药基因数 Antibiotic resistance gene number	325
病原-宿主相互作用基因数 Pathogen host interactions gene number	983
转运蛋白数 Transport protein number	1 023
跨膜蛋白数 Transmembrane protein number	1 717
双组分调控基因数 Two-component regulatory gene number	160

量产生和转换(transcription), 161 个基因注释到信号转导机制(signal transduction mechanisms), 126 个基因注释到辅酶转运与代谢(coenzyme transport and metabolism), 其他功能注释见图 1。

GO 数据库可注释的 4 046 个基因中, 1 744 个基因与生物过程(biological process)相关, 2 075 个基因与细胞组分(cellular component)相关, 3 051 个基因与分子功能(molecular function)相关。生物过程模块中, 转录调控/DNA 模板相关基因

122 个, 跨膜转运相关基因 86 个, 甲基化相关基因 81 个, 翻译相关基因 66 个, 磷脂酶信号转导系统相关基因 51 个, 碳水化合物代谢过程相关基因 50 个, 细胞分裂相关基因 47 个, 孢子形成相关基因 39 个, 无性孢子形成相关基因 39 个, DNA 重组相关基因 31 个, 细胞壁组织相关基因 30 个, 细胞形态调节相关基因 29 个(图 2)。细胞组分模块中, 膜的组成成分相关基因 1 420 个, 其他见图 2。分子功能模块中, ATP 结合相关基因 419 个, DNA 结合相关基因 395 个, 水解酶活性相关基因 234 个, 金属离子结合相关基因 203 个, 转移酶活性相关基因 167 个, 转录因子活性/序列特异性 DNA 结合相关基因 148 个, 跨膜转运蛋白活性相关基因 131 个, ATP 酶活性相关基因 131 个, 催化活性相关基因 98 个, 激酶活性相关基因 98 个, N-乙酰转移酶活性相关基因 90 个, 氧化还原酶活性相关基因 83 个, 甲基转移酶活性相关基因 76 个, 锌离子结合相关基因 76 个(图 2)。

KEGG 数据库可注释的 2 624 个基因中, 203 个基因与细胞过程相关, 2 096 个基因与代谢相关, 220 个基因与遗传信息处理相关, 322 个基因与环境信息处理相关(图 3)。

### 2.3 菌株 *Bacillus* sp. ZJS3 在砷胁迫条件下相关基因的表达分析

对 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株在  $As^{3+}$  的浓度为 0 mg/L 和 180 mg/L 条件下于 30 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 对其亚砷酸盐外排基因(*arsB*)和砷酸盐还原基因(*arsC*)进行了定量 PCR 比较分析, 标准曲线和  $C_t$  值见图 4。绝对定量 PCR 结果表明, 亚砷酸盐外排基因 *arsB* 在砷处理条件下  $[(7.11 \pm 0.69) \times 10^3 \text{ copy/g}]$  显著低于对照组  $[(1.80 \pm 0.45) \times 10^4 \text{ copy/g}]$ ; 砷酸盐还原基因 *arsC* 在砷处理条件下  $[(3.77 \pm 1.05) \times 10^7 \text{ copy/g}]$  显著高于对照组  $[(8.46 \pm 2.17) \times 10^6 \text{ copy/g}]$ 。

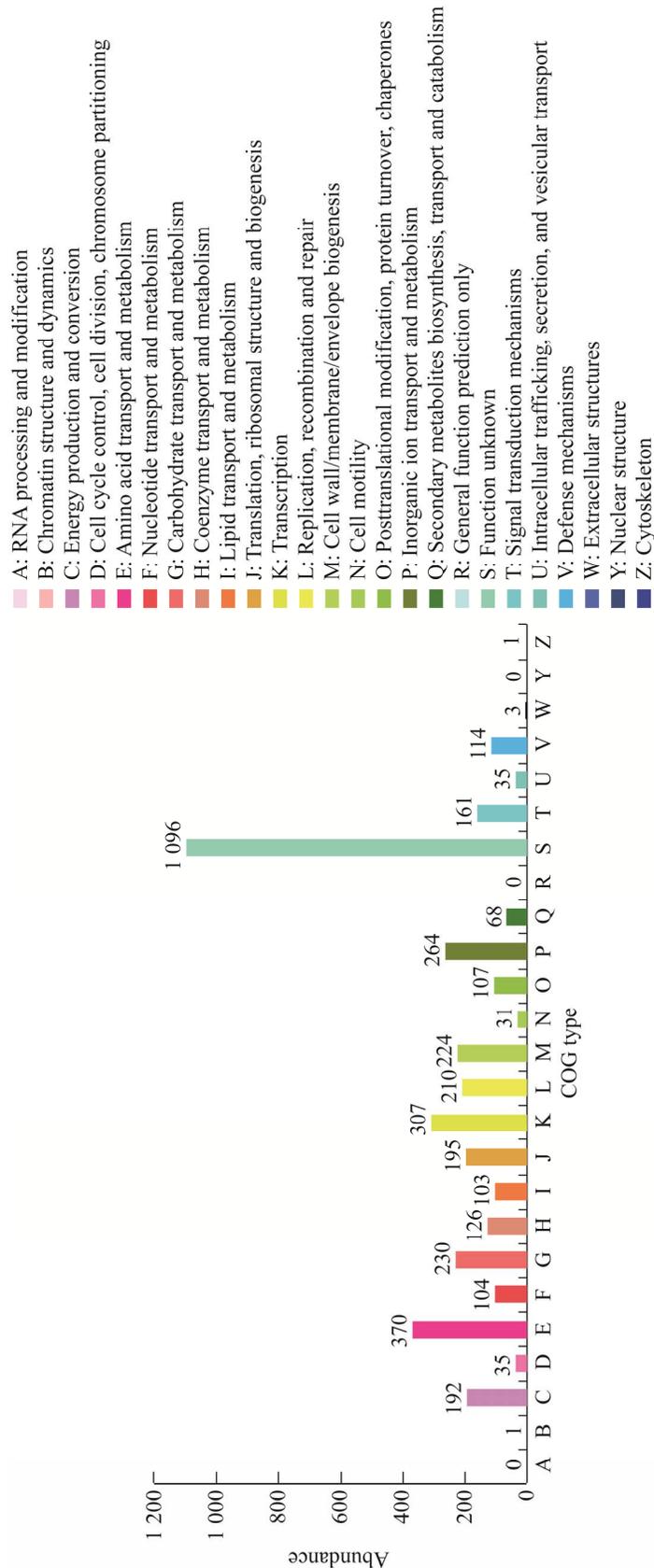


图 1 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组 COG 功能注释  
 Figure 1 Genomic COG function annotation of *Bacillus* sp. ZJS3 strain.

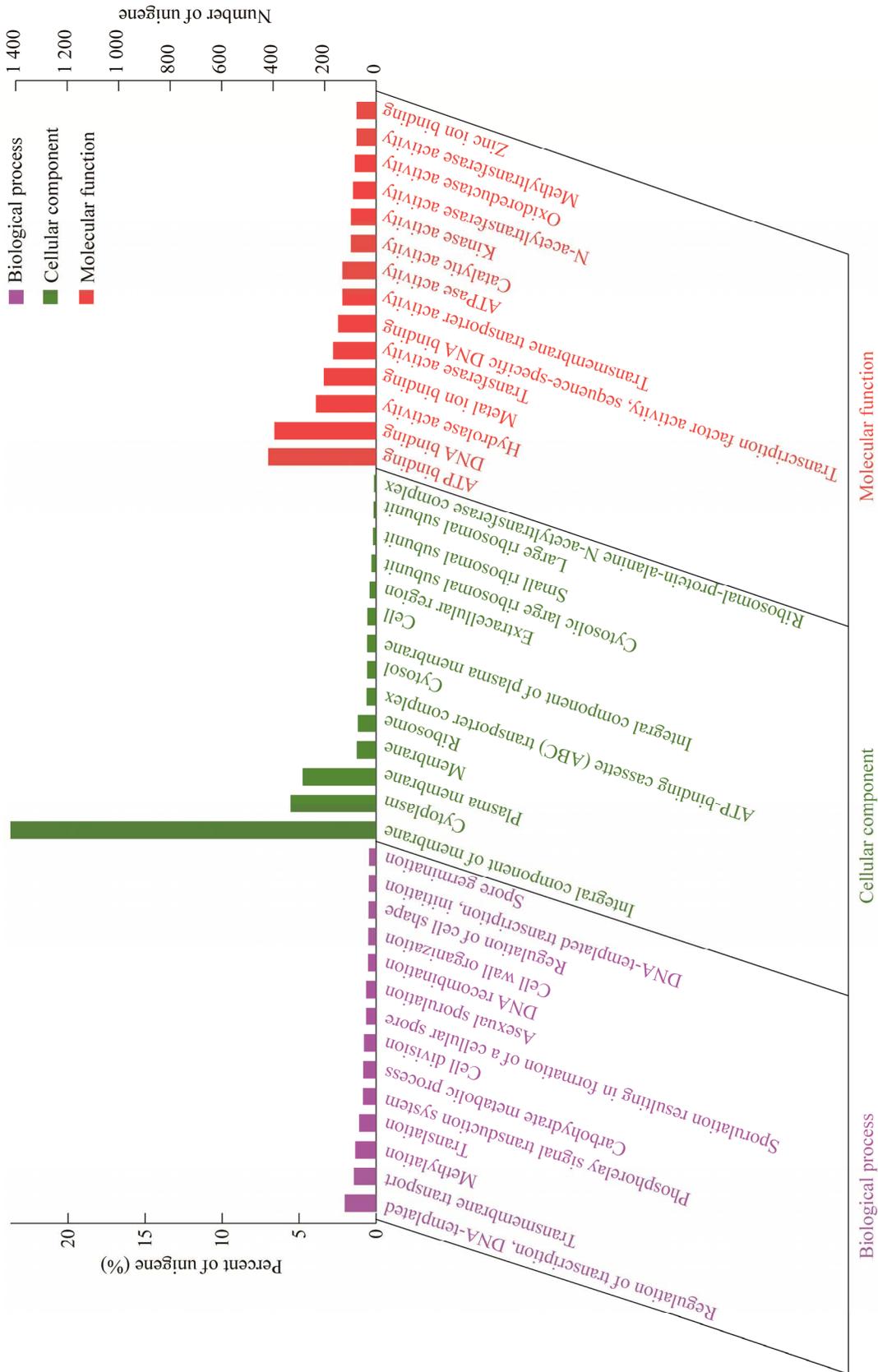


图 2 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组 GO 功能注释  
Figure 2 Genomic GO function annotation of *Bacillus* sp. ZJS3 strain.

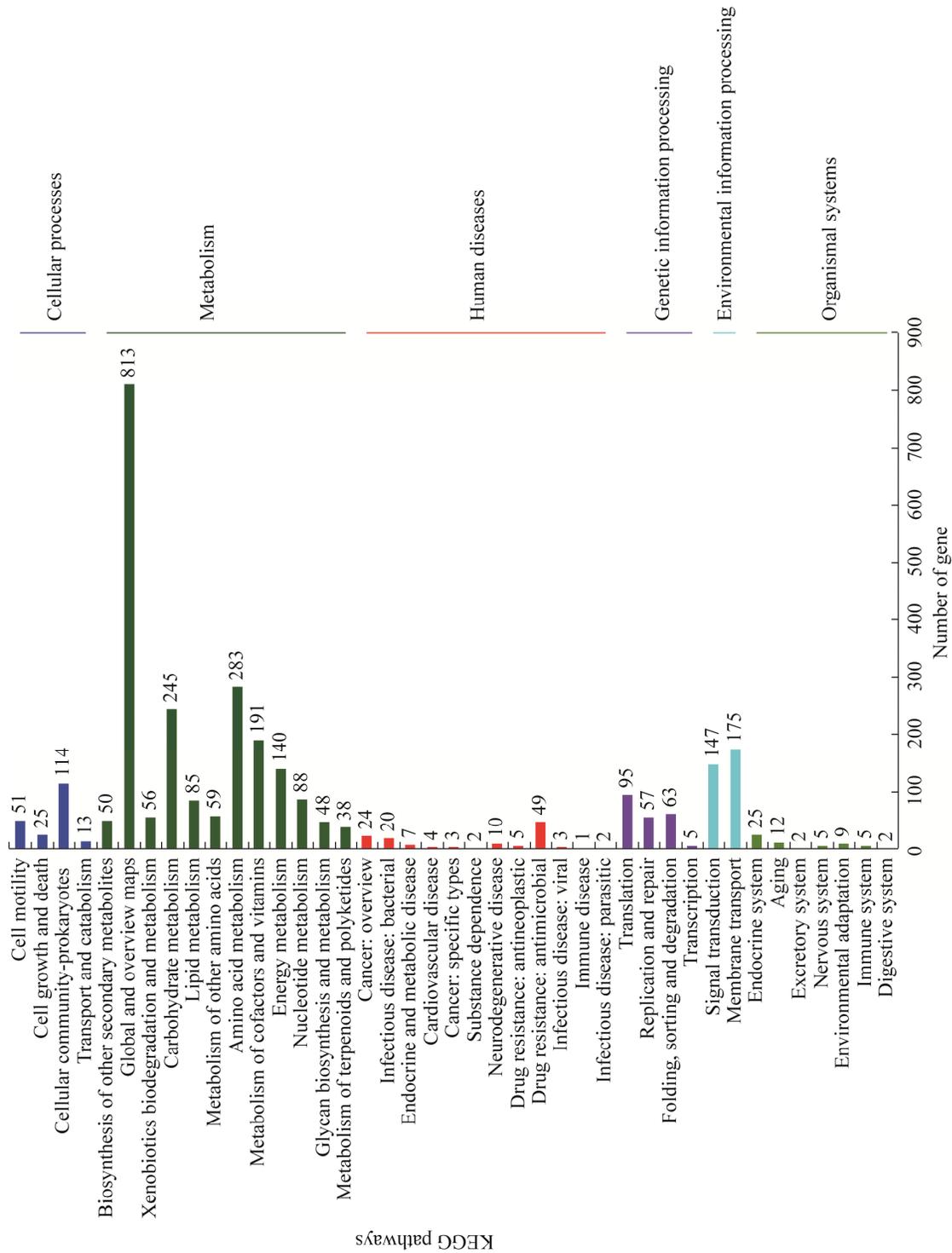


图 3 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株基因组 pathway 功能注释  
Figure 3 Genomic pathway function annotation of *Bacillus* sp. ZJS3 strain.

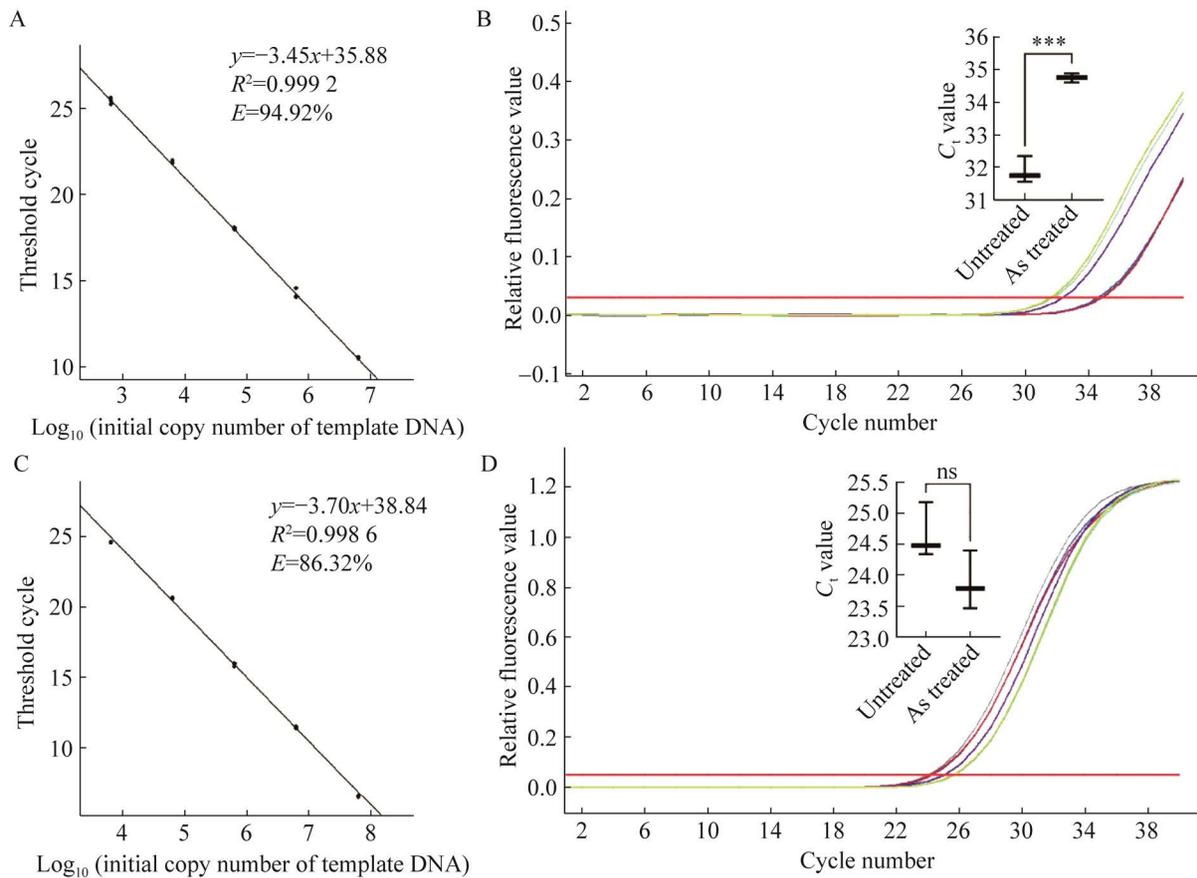


图4  $As^{3+}$ 胁迫下 *Bacillus sp. ZJS3* 菌株相关基因定量分析 A和B分别表示 *arsB* 基因标准曲线和扩增曲线；C和D分别表示 *arsC* 基因标准曲线和扩增曲线

Figure 4 Quantitative analysis of related genes of *Bacillus sp. ZJS3* strain under  $As^{3+}$  stress. A, B represent *arsB* gene standard curve and amplification curve, respectively. C, D represent *arsC* gene standard curve and amplification curve, respectively.

### 3 讨论

从基因组水平了解 *Bacillus sp. ZJS3* 菌株的基因多样性可为理解其表型变化和生理生化特征提供基础数据，但二者的直接关系还需要转录组数据加以支撑。该菌株在含有  $As^{3+}$  培养基环境中生长，具有将  $As^{3+}$  氧化为低毒性  $As^{5+}$  的能力<sup>[10]</sup>，但基因组未注释到与  $As^{3+}$  氧化相关的 *aioA* 或 *arxA* 基因。已有研究表明，抗砷菌株在其代谢中利用砷，作为化学自养亚砷酸盐氧化产生能量的手段<sup>[4]</sup>。然而该菌株液体培养基中

$As^{5+}$  的出现可能通过操纵子 *phoUpstBACS* 产物将其吸收进入细胞质<sup>[10]</sup>。已有研究使用透射电镜和能谱分析证实了砷在细胞内的积累<sup>[4]</sup>，而针对 *Bacillus sp. ZJS3* 菌株在细胞内积累砷及以何种形态积累无直接的实验证据。Pst系统具有P特异性，编码一个调节蛋白PhoU、一个ATP结合蛋白PstB、两个完整的内膜通透性PstA和PstC，以及一个周质底物结合PstS<sup>[3]</sup>。*Bacillus sp. ZJS3* 菌株基因组中存在操纵子 *phoUpstBACS*，表明该基因产物可能为环境中  $As^{5+}$  进入菌体细胞提供潜在通道，需要后续开展实验验证。基

基因组注释结果表明该菌有将 $\text{As}^{5+}$ 还原为 $\text{As}^{3+}$  (*arsC*等基因)及 $\text{As}^{3+}$ 外排(*arsR*、*arsA*、*arsB*、*aqpZ*等基因)的能力。操纵子*arsRBC*与砷抗性有关,其中*arsR*编码 $\text{As}^{3+}$ 反应性转录阻遏物(控制*ars*基因表达);*arsC*编码一种砷酸盐还原酶,通过将砷酸盐转化为亚砷酸盐而产生对砷酸盐的抗性;以及编码 $\text{As}^{3+}$ 外排蛋白的*arsB*基因<sup>[15]</sup>。*Bacillus* sp. ZJS3菌株基因组中存在操纵子*arsRBC*,而且砷酸盐还原酶基因*arsC*在砷处理条件下显著高于对照组,表明外界环境中形成的 $\text{As}^{5+}$ 进入了*Bacillus* sp. ZJS3菌株细胞,并在细胞中被砷酸盐还原酶ArsC还原。菌株*Bacillus* sp. ZJS3基因组中*arsA*基因的存在表明,ArsA可通过ATP水解提供必要的能量协助ArsB排出 $\text{As}^{3+}$ <sup>[3,5]</sup>。在地球早期的历史中,原核生物在富含 $\text{As}^{3+}$ 的缺氧环境中进化,获得了能够在 $\text{As}^{3+}$ 环境中生存的基因。ArsB是第一个被鉴定的 $\text{As}^{3+}$ 外排系统,被许多细菌用于砷耐受,其次是Acr3<sup>[16]</sup>。*arsRBC*操纵子通常存在于革兰氏阴性细菌中,如*Staphylococcus aureus* pI258。然而,在细菌尤其是芽孢杆菌属中,经常观察到*acr3*而不是*arsB*基因<sup>[17]</sup>,这与菌株*Bacillus* sp. ZJS3不同;而亚砷酸盐外排基因*arsB*在 $\text{As}^{3+}$ 胁迫下显著低于对照组,表明*Bacillus* sp. ZJS3菌株编码亚砷酸盐膜转运蛋白的*arsB*基因在外界高 $\text{As}^{3+}$ 环境中工作效率降低,这可能也是该菌株应对外界环境高浓度 $\text{As}^{3+}$ 胁迫的主要手段之一。因此,*Bacillus* sp. ZJS3菌株在 $\text{As}^{3+}$ 胁迫下,细胞内砷积累与否及积累的价态( $\text{As}^{3+}$ 和/或 $\text{As}^{5+}$ )对于深入理解其对砷的行为具有重要意义。

## 4 结论

*Bacillus* sp. ZJS3菌株基因组大小为5.82 Mb,注释结果表明该菌株基因组具有调控细胞形态特征的相关基因,这些基因在 $\text{As}^{3+}$ 胁迫下的差

异表达可能导致菌体伸长,具体如何变化还需后期开展表达谱差异分析。在 $\text{As}^{3+}$ 胁迫下,与细胞分裂相关基因的表达调控可能出现变化,导致正常分裂无法进行,进而影响细胞形态。然而菌株基因组中与砷抗性及砷代谢相关基因的存在表明该菌株具备 $\text{As}^{3+}$ 外排和 $\text{As}^{5+}$ 还原的能力。

## REFERENCES

- [1] Drewniak L, Styczek A, Majder-Lopatka M, Sklodowska A. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution[J]. Environmental Pollution, 2008, 156(3): 1069-1074
- [2] Kruger MC, Bertin PN, Heipieper HJ, Arsène-Ploetze F. Bacterial metabolism of environmental arsenic: mechanisms and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3827-3841
- [3] Han YH, Yin DX, Jia MR, Wang SS, Chen YS, Rathinasabapathi B, Chen DL, Ma LQ. Arsenic-resistance mechanisms in bacterium *Leclercia adecarboxylata* strain As3-1: biochemical and genomic analyses[J]. Science of the Total Environment, 2019, 690: 1178-1189
- [4] Banerjee S, Datta S, Chattopadhyay D, Sarkar P. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2011, 46(14): 1736-1747
- [5] Tsai SL, Singh S, Chen W. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(6): 659-667
- [6] Dunivin TK, Yeh SY, Shade A. A global survey of arsenic-related genes in soil microbiomes[J]. BMC Biology, 2019, 17(1): 45
- [7] Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, Bonnefoy V, Krin E, Arsène-Ploetze F, Carapito C, et al. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments[J]. PLoS Genetics, 2007, 3(4): e53
- [8] Andres J, Arsène-Ploetze F, Barbe V, Brochier-Armanet C, Cleiss-Arnold J, Coppée JY, Dillies MA, Geist L,

- Joublin A, Koechler S, et al. Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(5): 934-953
- [9] 李艳楠, 袁存霞, 张肖冲, 杨瑞, 何艳婷, 程欣怡, 刘建利, 刘秉儒, 李靖宇. 耐多种重金属细菌的筛选、鉴定和酶活测定[J]. *环境科学与技术*, 2021, 44(10): 44-52  
Li YN, Yuan CX, Zhang XC, Yang R, He YT, Cheng XY, Liu JL, Liu BR, Li JY. Isolation, identification and enzyme activity determination of heavy metal tolerant bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 44(10): 44-52 (in Chinese)
- [10] 袁存霞, 李艳楠, 张肖冲, 杨瑞, 刘建利, 李靖宇.  $As^{3+}$  胁迫下 *Bacillus* sp. ZJS3 菌株的生理生化响应特性[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(7): 50-61  
Yuan CX, Li YN, Zhang XC, Yang R, Liu JL, Li JY. Physiological and biochemical response characteristics of *Bacillus* sp. ZJS3 under  $As^{3+}$  stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(7): 50-61 (in Chinese)
- [11] Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation[J]. *Genome Research*, 2017, 27(5): 722-736
- [12] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(6): 673-679
- [13] Besemer J, Borodovsky M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl 2): W451-W454
- [14] Chan PP, Lowe TM. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2019, 1962: 1-14
- [15] Aulitto M, Gallo G, Puopolo R, Mormone A, Limauro D, Contursi P, Piochi M, Bartolucci S, Fiorentino G. Genomic insight of *Alicyclobacillus* Mali FL18 isolated from an arsenic-rich hot spring[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 639697
- [16] Garbinski LD, Rosen BP, Chen J. Pathways of arsenic uptake and efflux[J]. *Environment International*, 2019, 126: 585-597
- [17] Jia MR, Tang N, Cao Y, Chen YS, Han YH, Ma LQ. Efficient arsenate reduction by As-resistant bacterium *Bacillus* sp. strain PVR-YHB<sub>1</sub>-1: characterization and genome analysis[J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 1061-1070