

耐铬 *Serratia sp.* CM01 基因组序列及铬代谢基因分析

吴焰清¹, 李星龙², 王梦佳³, 肖虹^{1*}

¹重庆医科大学公共卫生学院, 重庆

²四川省成都市双流区疾病预防控制中心, 微生物检验科室, 四川 成都

³华中科技大学同济医学院附属协和医院重庆医院门诊部, 重庆

收稿日期: 2024年10月26日; 录用日期: 2024年11月19日; 发布日期: 2024年11月25日

摘要

以耐铬(VI)菌株 *Serratia sp.* CM01 为研究对象, 探究其全基因组信息, 挖掘其潜在的铬代谢相关基因。本研究采用基因组测序技术对 CM01 进行全基因组测序并分析其基因序列特征; 同时, 结合前期差异蛋白研究结果, 进行铬代谢相关基因分析。测序结果表明, CM01 基因组大小为 4,902,254 bp, 预测编码蛋白序列的基因有 4547 个; 蛋白功能注释结果显示其涉及氧化还原、氨基酸代谢、碳水化合物和能量代谢编码的基因有较高的占比。结合前期蛋白组学的结果, 筛选出了 12 个与铬代谢相关的基因。qRT-PCR 分析结果显示, 在 Cr(VI) 胁迫下, *ChrA1*、*Srpc*、*GrxA* 和 *NemA* 基因的表达上调。CM01 基因组全序列已上传至 NCBI, 序列号: PRJNA675313。本研究通过对 CM01 的基因组序列分析, 为全面了解细菌的铬代谢机制提供基础, 为修复环境铬污染的新生物技术提供理论依据。

关键词

Serratia sp. CM01, 全基因组测序, 生物信息学, 铬代谢相关基因

Chromium-Resistant *Serratia sp.* CM01 Genome Sequence and Analysis of Chromium Metabolism Genes

Yanqing Wu¹, Xinglong Li², Mengjia Wang³, Hong Xiao^{1*}

¹School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing

²Microbiology Laboratory, The Disease Prevention and Control Center of Shuangliu District, Chengdu Sichuan

³Outpatient Department, Chongqing Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Chongqing

Received: Oct. 26th, 2024; accepted: Nov. 19th, 2024; published: Nov. 25th, 2024

*通讯作者。

文章引用: 吴焰清, 李星龙, 王梦佳, 肖虹. 耐铬 *Serratia sp.* CM01 基因组序列及铬代谢基因分析[J]. 生物物理学, 2024, 12(3): 39-50. DOI: 10.12677/biphy.2024.123005

Abstract

The study focused on the chromium (VI)-resistant bacterial strain *Serratia sp.* CM01 to explore its whole-genome information and to mine its potential chromium metabolism-related genes. In this research, genomic sequencing technology was employed to perform whole-genome sequencing on CM01 and to analyze its gene sequence characteristics. Additionally, the results from previous differential protein studies were integrated to analyze genes related to chromium metabolism. The sequencing results indicated that the CM01 genome is 4,902,254 base pairs in size, with 4547 genes predicted to encode protein sequences. Protein function annotation revealed a high proportion of genes involved in oxidation-reduction, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, and energy metabolism. Combining the outcomes from previous proteomics studies, 12 genes related to chromium metabolism were identified. Quantitative real-time PCR analysis showed that the expression of *ChrA1*, *Srpc*, *GrxA*, and *NemA* genes was upregulated under Cr(VI) stress. The complete genome sequence of CM01 has been uploaded to NCBI with the accession number PRJNA675313. Through the genomic sequence analysis of CM01, this study provides a foundation for a comprehensive understanding of bacterial chromium metabolism mechanisms and offers a theoretical basis for the development of new biotechnologies for the remediation of environmental chromium pollution.

Keywords

Serratia sp. CM01, Whole-Genome Sequencing, Bioinformatics, Chromium Metabolism-Related Genes

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

重金属污染环境对人类、植物以及水生动物具有破坏性影响。重金属铬(chromium, Cr)是常见的环境污染物之一, 被广泛应用于电镀、金属冶炼、皮革制造、印染等工业行业中[1]。重金属 Cr 的广泛使用, 以及含铬废水和铬渣处理不当造成了严重的环境污染问题[2]。重金属 Cr 有两种主要的氧化形态, 即六价铬[Cr(VI)]和三价铬[Cr(III)], 常以 Cr(VI)的形式存在于环境中。Cr(III)是人体必需的微量元素, 而 Cr(VI)具有剧毒性, 且有较强的溶解性和氧化性, 易进入生物体内并积累, 能引起皮肤刺激、过敏反应、长期暴露还可能引起人类细胞的癌变、畸变以及 DNA 的损伤[3]。因此, 将具有剧毒的 Cr(VI)转化为低毒的 Cr(III)是降毒的方法之一。

生物修复环境中的 Cr(VI)污染是一种环保且具有成本效益的方法, 它依赖于微生物的代谢活动来转化或去除环境中的有害化学物质, 如生物的吸附、还原、外排以及生物的积累等[4]。这种方法的优势在于其环境友好性、成本效益和可持续性, 尤其是在处理重金属污染如 Cr(VI)时。目前, 已经发现了多种具有除 Cr(VI)能力的微生物, 并能对环境中的 Cr(VI)污染进行生物修复。除了在 1977 年首次发现除 Cr(VI)的假单胞菌属[5], 此后有多种除 Cr(VI)微生物被陆续报道, 其中细菌占绝大多数, 如除 Cr(VI)细菌 *Bacillus cereus* (蜡样芽孢杆菌) (2020) [6]、*Sporosarcina saromensis* (沙罗孢子菌) (2021) [7]等。近年来, 也有研究者发现沙雷氏菌属也能处理环境污染中的重金属, 如 *Serratia sp.* GP01, 研究者发现该菌株能在 48 小时内减少 69.05 mg/L Cr(VI) [8]。此外, 研究发现从 Cr 污染的环境中分离出菌株 *Serratia sp.* Cr-10 [9], 对 Cr(VI)的耐受浓度达到了 1500 mg/L, 且能将 Cr(VI)还原为不溶性沉淀物来去除有毒的铬物质。

本研究中的 *Serratia sp.* CM01 (简称 CM01)是从重庆市某中小电镀厂聚集地区的铬污染环境分离得到的[10]。经逐步升高 Cr(VI)浓度的驯化筛选,最终得到能在含 140 mg/L Cr(VI)的 LB 肉汤培养基中正常生长的耐铬(VI)菌株[11]。因此,我们猜测 CM01 也具有除 Cr(VI)能力,可以为未来修复环境中 Cr(VI)的污染提供方向。本文利用基因组测序技术对 CM01 的基因组进行测序,分析其 Cr(VI)响应的相关基因,研究结果可为利用微生物和基因工程技术治理环境铬(VI)污染提供理论依据。

2. 材料和方法

2.1. 菌种及复苏

本模本研究从铬污染环境中分离的 CM01 菌株,于-80°C 保存。取-80°C 保存的 CM01,以 1:100 的比例,吸取 150 μ L 菌液于 15 ml 新鲜的 LB 液体培养基中,于 37°C,200 rpm 复苏 12 h;取上述菌液在 LB 固体培养基上进行三区划线,37°C 培养 12 h;挑取单菌落,接入 LB 液体培养基中,37°C,200 rpm 培养 12 h;取该菌液 5 ml,经液氮处理 15 min,送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行测序。

2.2. 基因组测序与组装

CM01 基因组测序是基于 IlluminaNovaSeq 和 PacBioSequel 测序平台,采用第二代和第三代测序技术进行测序。提取样品的 DNA,纯化后进行质检,使用荧光染料(Quant-It PicoGreen dsDNA Assay Kit)检测样品 DNA 总量,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性。检测合格的 DNA 样品,用于后续 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库和 Pacbio Template Prep Kit 1.0 文库的建立。对二代测序后获得的原始数据,去除引物、接头和筛除低质量的数据。将 Pacbio 获得的下机数据使用 HGAP [12],CANU [13]软件进行拼装,得到 contig 序列。二代数据对三代结果进行纠错,使用 pilon [14]软件基于二代的高质量数据对三代 contig 结果进行校正,最终拼接得到完整序列。

2.3. 基因预测与注释

采用软件 GeneMarkS [15]对上述得到的完整序列进行基因预测。全基因组中的 tRNA 基因由 RNAscan-SE 预测获得[16],rRNA 基因由 Barrnap 预测获得,通过与 Rfam 数据库进行比较获得其余非编码 RNA [17]。将编码基因的氨基酸序列与 NR、eggNOG、KEGG、Swiss-Prot、GO 等数据库进行对比,对蛋白功能进行注释。

2.4. 次级代谢基因簇预测

AntiSMASH [18]可用于细菌、真菌和植物基因组中次级代谢基因簇的预测分析,是基于特定类型基因簇基因信息的隐马尔可夫模型(HMM)来预测的。从 NCBI 上获得的 Genbank 文件上传到 AntiSMASH 中,对菌株 CM01 次级代谢物基因簇进行了预测。

2.5. 铬代谢相关基因分析

根据全基因组测序分析及蛋白编码基因功能注释结果,同时结合前期差异蛋白研究结果[19],筛选出与铬代谢相关的蛋白基因。

2.6. 铬代谢相关基因表达量验证

采用实时荧光定量 PCR 验证有无铬胁迫下,CM01 中 *ChrA1*、*Srpc*、*GrxA*、*Nema* 基因的表达量。利用 NCBI 设计引物,如表 1,以 *gyrB* 基因的 mRNA 水平作为内参。将 CM01 单菌落接种于 15 ml LB 液体培养基中,于 37°C,200rpm 培养箱中,过夜摇培 12 h,将该菌液以 1%的接种量接入 Cr(VI)浓度为 0

和 140 mg/L 的新鲜 LB 液体培养基中, 其中 0 mg/L Cr(VI)浓度作为对照组, 140 mg/L Cr(VI)浓度作为实验组, 于 37°C, 200 rpm 的下生长 12 h。采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。提取后的 RNA, 使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 完成基因组清除与逆转录反应。使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。qRT-PCR 反应体系: 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA (1 ug/mL) 1 μL, 2 × Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 加无酶水至反应管总体积为 20 μL。使用 qRT-PCR 程序为, 95°C, 30 s; 95°C, 10 s; 60°C, 30 s, 40 个循环; 65°C, 5 s。每次处理进行 3 次独立的定量 PCR 检测。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达量。

Table 1. List of primers used for quantitative PCR
表 1. qPCR 验证引物列表

引物名称	碱基序列(5'→3')
<i>ChrA1-F</i>	ATACGTTAAAACCGCACCCG
<i>ChrA1-R</i>	CCTAGCCACAGAAAGCCCAA
<i>Srpc-F</i>	CTTTATTGGCGTTCGGCGG
<i>Srpc-R</i>	ATCCACTGATGCACCTCCAC
<i>GrxA-F</i>	ATCGTCGCGTTCCTCAGTCA
<i>GrxA-R</i>	TTGCAGTAATCTTCGGGCGT
<i>Nema-F</i>	CGGCGATGTGAATGTAAGCG
<i>Nema-R</i>	GCAAAGAGAAACTGGGCGTG
<i>gyrB-F</i>	CATCTACTGCTTCACCAACAACATTCC
<i>gyrB-R</i>	CCTTCTTGCTGTAGCCTTCCTTCTC

3. 结果与分析

3.1. 基因组成分分析

对 CM01 基因组测序分析, 其结果显示 CM01 环状基因组长度为 4,902,254 bp, G+C 含量为 59.89%。开放阅读框数量有 4547 个, 即预测编码蛋白的序列的基因有 4547 个, 开放阅读框所占碱基数为 4,221,894 bp, 占基因组总长度的 86.12%。结果预测共有 RNA 314 个, 其中 rRNA 22 个(5S RNA 8 个, 16S RNA 7 个, 23S RNA 7 个), tRNA 87 个, ncRNA 205 个。将基因组序列、非编码 RNA 预测及基因预测等所有信息整合成 GBK (GenBank)格式文件, 然后采用 cgview 软件绘制 CM01 的基因组圈图, 如图 1 [20]。

3.2. 功能注释

将蛋白编码基因与 5 个数据库进行比对, 最后结果显示, 在 NR 数据库中发现蛋白 4473 个, eggNOG 中 4261 个, KEGG 中 2881 个, Swiss-Prot 中 3867 个, GO 中 3646 个。

3.2.1. 蛋白编码基因的 eggNOG(COG)注释

CM01 的蛋白编码基因最终在 eggNOG 数据库 25 类功能蛋白中对比到 20 类, 共 4261 个基因, 如图 2。除功能未知基因外, 其中“转录”基因数量最多(409 个), 其次是, “氨基酸转运和代谢”(386 个)、“碳水化合物运输和代谢”(336 个)、“无机盐离子转运和代谢”(323 个)、“能量产生与转化”(249 个)

和“细胞壁/膜/包膜生物发生”(262个)。此外,“DNA复制、重组和修复基因(139个)”、“辅酶的转运和代谢”基因(145个),“翻译、核糖体结构和生物发生”基因(174个)也存在一定比例,推断该菌株利用这些基因来对Cr(VI)进行代谢,并通过自我修复受损DNA来抵抗Cr(VI)的毒性作用。

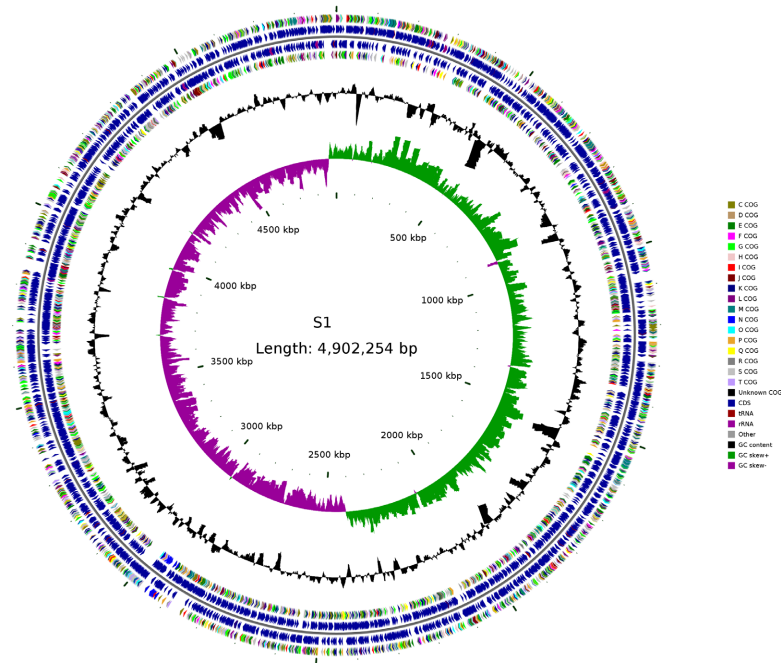


Figure 1. Genome circle map
图 1. 基因组圈图

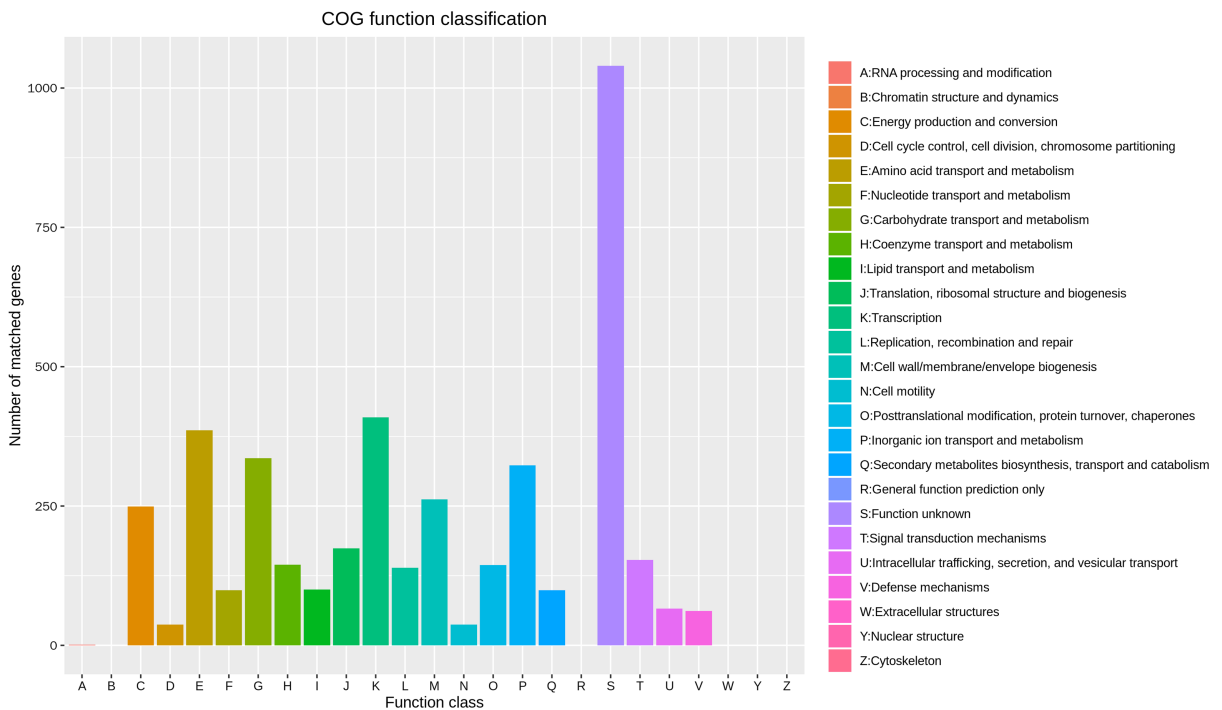


Figure 2. Bacterial eggNOG (COG) functional classification map
图 2. 细菌 eggNOG(COG)功能分类图

3.2.2. 蛋白编码基因的 KEGG 注释

采用 KEGG 数据库对 CM01 的蛋白编码基因比对, 最终在 51 类通路中对比到蛋白 2881 个, 如图 3。其中, 涉及信号传导和细胞过程、遗传信息处理、新陈代谢、膜转运、信号转导、氨基酸代谢、碳水化合物代谢和能量代谢蛋白编码的基因占比较高, 这表明该细菌具有很强的物质代谢能力。在 COG 和 KEGG 蛋白功能注释中, 均发现信号转导、膜转运、氨基酸代谢、碳水化合物代谢和能量代谢基因有较高的占比。因此, 我们猜测, 在铬污染的环境中, 当 Cr(VI) 进入细胞内时, 产生的应激反应可能涉及信号传导、膜转运和物质运输代谢, 其中大量的转运蛋白和通道蛋白可能在参与细菌对 Cr(VI) 的代谢中起关键作用。

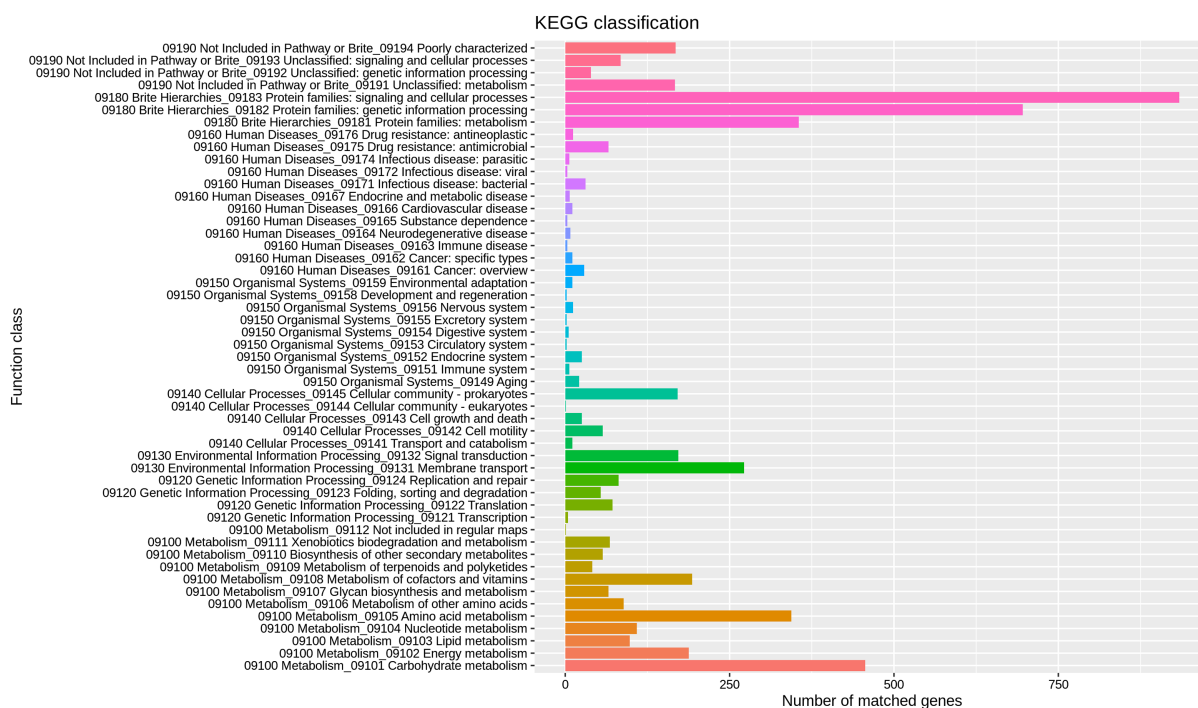


Figure 3. KEGG summary graph
图 3. KEGG 统计图

3.2.3. 蛋白编码基因的 GO 注释

GO 数据库根据蛋白基因分子功能、细胞所处位置和参与的生物学过程将所有蛋白基因分为三类。CM01 的蛋白编码基因最终在 GO 数据库的分子功能、细胞位置、生物学过程的三个 ontology 中对比到蛋白 3646 个, 如图 4。在细胞所处位置中, 发现涉及细胞、细胞膜和细胞组分的蛋白编码基因占比较多。生物学过程主要涉及小分子代谢、细胞氮化合物代谢、生物合成、分解代谢和翻译过程。在分子功能中主要涉及离子结合、氧化还原酶活性、DNA 结合等。这表明, CM01 可以通过胞内活动、物质代谢来完成 Cr(VI) 代谢以及可以通过氧化还原酶将 Cr(VI) 还原成 Cr(III)。

3.3. 次级代谢基因簇的预测分析

AntiSMASH 预测了 CM01 次级代谢产物合成的共 9 个基因簇, 见表 2, 包括非核糖体肽金属载体 (NRP-metallophore)、灵菌红素 (prodigiosin)、甜菜内酯 (thiopeptide)、舍内酯 (hserlactone)、3 个非核糖体肽合成酶 (NPRS)、氧化还原辅因子 (redox-cofactor) 和硫肽 (thiopeptide)。这些基因簇包括参与了与其他生物合成、核心生物合成、转运相关、调节和其他基因的基因。通过与已知相似基因簇比对发现, 在预测的 NRP-metallophore 基因簇中发现与 AntiSMASH 预测中 MIBIG 表征的三环菌素、环状三菌杆菌素、金黄素、双

金毒素有 46% 的相似度，这可能暗示 CM01 也会合成该类次级代谢产物。

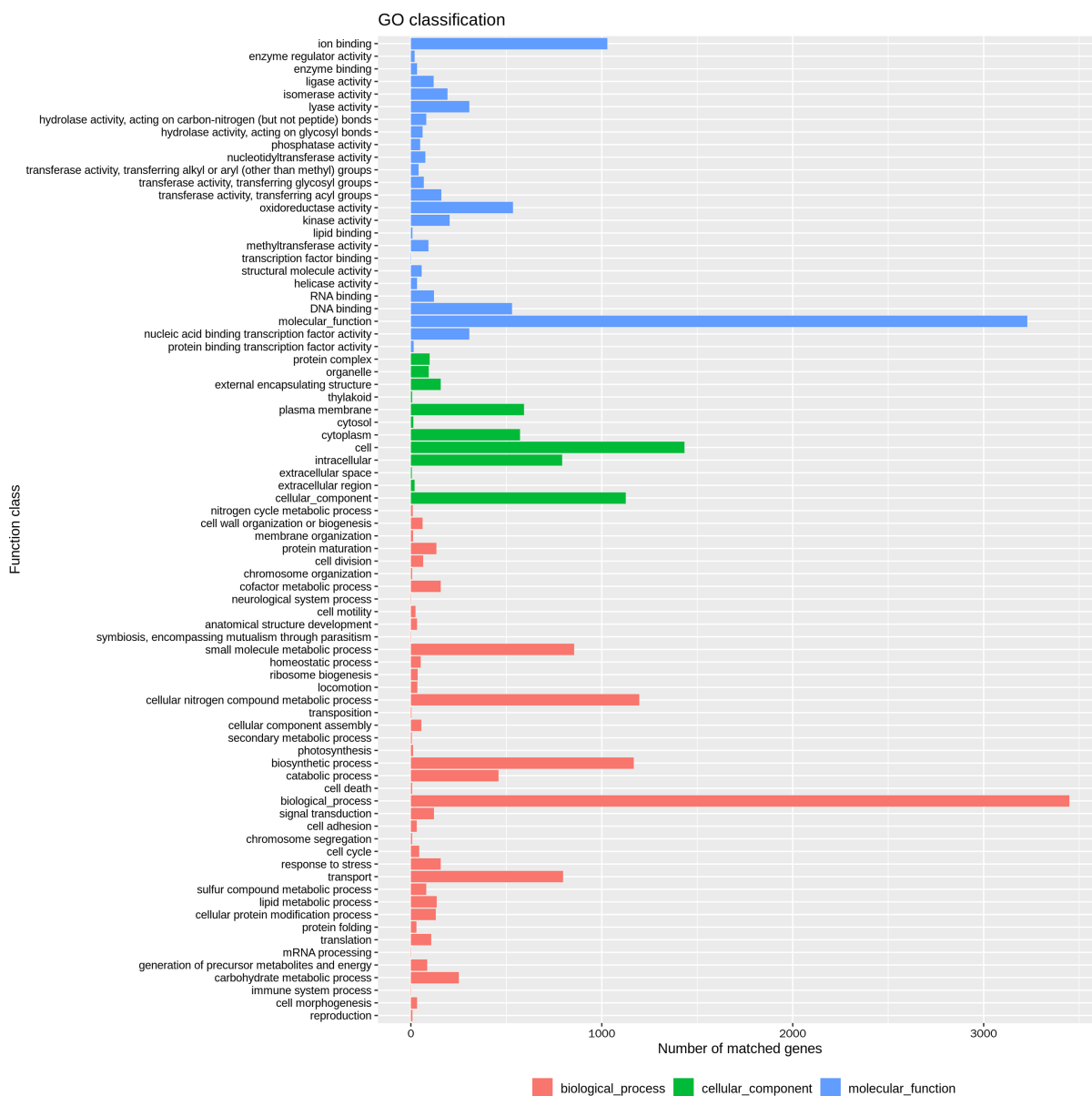


Figure 4. GOSlim annotation map

图 4. GOSlim 注释图

Table 2. Gene clusters related to secondary metabolite biosynthesis of *Serratia sp.* CM01

表 2. 沙雷氏菌 CM01 的次级代谢产物合成基因簇预测

区域	类型	起始位置	终止位置	已知相似基因簇	相似度
Region 1	NRP-metallophore	273382	337441	trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/chrysobactin/dichrysobactin	46%
Region 2	hserlactone	487975	508619	-	-
Region 3	betalactone	695078	720748	-	-

续表

Region 4	prodigiosin	1064633	1099653	prodigiosin	100%
Region 5	thiopeptide	1666460	1692904	O-antigen	14%
Region 6	NRPS	2230671	2278622	microcin H47	20%
Region 7	redox-cofactor	2355695	2377857	lankacidin C	13%
Region 8	NRPS	2406428	2454938	viobactin	46%
Region 9	NRPS	4358979	4402914	xantholipin	4%

3.4. 铬代谢相关基因分析

在 COG 数据库对比中, 我们从氨基酸运输和代谢类基因中筛选到了基因 *AraA* 和 *FliY*。在前期的蛋白组学研究中, 发现在有/无 Cr(VI)的条件下, *AraA* 和 *FliY* 的蛋白表达存在差异。在无机离子的转运和代谢类基因中筛选到基因 *ChrA1*、*Srpc*、*Fief* 和 *MT1781*。*ChrA1* 和 *Srpc* 都是编码 Cr(VI)转运蛋白的基因 [21], *Fief* 和 *MT1781* 则分别编码铁转运蛋白 [22] 和硫酸盐通道蛋白。在 KEGG 数据库比对过程中, 在受体信号通路中筛选到了基因 *TrxA*, 在能量代谢通路中筛选到了基因 *FldA*。*TrxA* 和 *FldA* 都各自负责编码一种氧化还原蛋白, 其中 *TrxA* 编码硫氧还蛋白, *FldA* 编码黄素氧化还原蛋白, 这两个基因在我们前期的蛋白组学研究中显示可能参与了 Cr(VI)的代谢。此外, 在 GO 功能注释中, 在分子功能 ontology 中筛选出基因 *NemA*, 其负责编码一种 NADH 黄素氧化还原酶 [23]。

最终, 结合我们蛋白组学的研究结果和蛋白编码基因的功能注释结果中, 筛选出与铬代谢相关的蛋白基因 12 个, 见表 3。其中包括 5 种编码氧化还原酶基因 *NemA*、*TrxA*、*FldA*、*GrxA*、*YdjA*; 4 种编码参与转运载体基因 *ChrA1*、*Srpc*、*FieF*、*MT1781*; 2 种参与氨基酸运输和代谢编码的基因 *AraA* 和 *FliY*; 还有参与核酸代谢基因 *FtnA*。

Table 3. Chromium transport-related genes in the genome of *Serratia sp.* CM01

表 3. 沙雷氏菌 CM01 基因组中的铬响应相关基因

蛋白功能分类	基因序号	基因名称	功能
氧化还原酶	Scaffold_70	<i>NemA</i>	NADH:flavin oxidoreductase
	Scaffold_108	<i>TrxA</i>	Thiol reductase thioredoxin
	Scaffold_1040	<i>FldA</i>	Flavodoxin
	Scaffold_1478	<i>GrxA</i>	Glutaredoxin
	Scaffold_2526	<i>YdjA</i>	Nitroreductase family protein
转运载体	Scaffold_2132	<i>ChrA1</i>	Chromate transporter
	Scaffold_2133	<i>Srpc</i>	Chromate transporter
	Scaffold_2312	<i>FieF</i>	Cation diffusion facilitator family transporter
	Scaffold_2481	<i>MT1781</i>	Sulfate transporter
氨基酸运输和代谢	Scaffold_1961	<i>AraA</i>	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
	Scaffold_2716	<i>FliY</i>	L-cystine transport system substrate-binding protein
核酸代谢	Scaffold_1756	<i>FtnA</i>	Ferritin

3.5. 铬代谢相关基因表达量结果分析

为了进一步验证上述基因在铬胁迫环境下的表达,我们选择了转运载体基因 *ChrA1*、*Srpc* 和编码氧化还原酶基因 *GrxA* 和 *NemA* 进行实时荧光定量 PCR 实验。相对荧光定量 PCR 结果,如图 5 所示,在有铬胁迫下,实验组与对照组基因 *ChrA1*、*Srpc*、*GrxA* 和 *NemA* 的表达量有显著差异($P < 0.05$),4 种基因的逆转录水平升高,与前期蛋白组学研究结果一致。在铬胁迫下,*ChrA1* 基因表达水平明显升高。相关研究表明,铬酸盐转运蛋白 *ChrA1* 起到化学渗透泵的作用,利用质子动力排出铬酸盐[24],从而降低 Cr(VI) 对细胞的毒性。

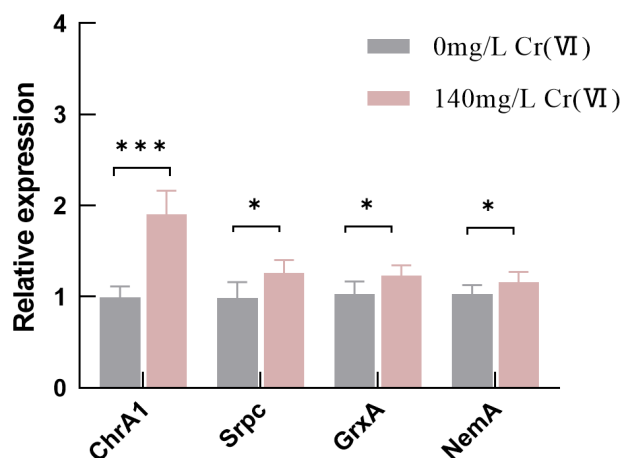


Figure 5. Expression of four target genes in CM01 of experimental group and control group. Note: “*” mean significant difference ($P < 0.05$) between the experimental group and the control group

图 5. 实验组和对照组 CM01 中 4 个目的基因的表达量。注: “*” 表示实验组与对照组相比差异显著($P < 0.05$)

4. 讨论

本文对 CM01 进行了全基因组测序以及蛋白功能注释分析。结果分析发现,CM01 基因组中确实存在与铬代谢相关基因和蛋白,并且通过蛋白功能注释的分析也发现,该菌株中涉及到多种代谢途径、分子功能等与铬的代谢有关。

将蛋白编码基因与 5 个数据库进行比对,我们在 COG 数据库中的无机盐离子转运和代谢途径中筛选到了 4 个与转运蛋白相关的基因。研究表明暴露于过量金属的细菌通常会表达编码转运蛋白的基因[25]。此外,重金属转运蛋白对细菌的金属抗性、解毒和体内平衡很重要[26]。其中,*ChrA* 基因所编码的 Cr(VI) 外排蛋白 *ChrA* (铬酸盐离子转运体) 隶属于 CHR 超家族,是目前被研究的最多的铬代谢蛋白,其作为膜蛋白,已经被证实可以利用膜电位提供的能量将 Cr(VI) 从胞内排至胞外[27],从而降低 Cr(VI) 的毒性。我们前期对 *Serratia sp.* S2 中对 *ChrA* 基因研究也证实了铬酸盐转运蛋白 *ChrA* 作为化学渗透泵的作用利用质子动力挤出铬酸盐[28]。同时,我们还发现了在 *ChrA1* 基因的下游与其相邻的部分存在着另一种编码铬转运蛋白的基因 *Srpc*,并且 *ChrA1* 和 *Srpc* 基因序列存在少部分的重叠序列。在基因表达量验证中发现,在铬胁迫下 CM01 中 *Srpc* 基因的表达量上调。在前期构建的工程菌研究中发现,*ChrA1-Srpc* 基因共表达时的抗 Cr(VI) 能力(耐受、去除)均优于两基因单独表达。因此,我们认为 *Srpc* 基因与 *ChrA1* 基因协同参与 CM01 中 Cr(VI) 的作用[29]。

碳水化合物和能量代谢是影响重金属适应的关键归因[30]。微生物在应对重金属胁迫时,需要更多的能量来维持其生命活动和激活解毒机制。碳水化合物作为主要的能量来源,其代谢过程如糖酵解和

三羧酸循环(TCA 循环)的增强,为微生物提供了必要的能量。我们在 COG 和 KEGG 数据库中均发现碳水化合物代谢和能量代谢基因有较高的占比。研究发现,重金属对极性酵母的糖酵解途径影响明显,在 Cu 胁迫下发现 26 种碳水化合物和能量代谢相关的蛋白发生显著变化,其中,糖原磷酸化酶、烯醇化酶和丙酮酸激酶的表达大量上调,表明铜应激通过糖酵解途径增强了碳水化合物分解代谢[31]。在我们前期研究中发现,在铬胁迫下,CM01 中关于能量代谢的 NAD(P)⁺依赖的琥珀酸半醛脱氢酶 *GabD*、NAD(P)⁺依赖的甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)上调明显,这表明,在铬胁迫下,CM01 会通过能量代谢途径来响应 Cr(VI)的胁迫。与此同时,我们发现磷酸戊糖途径中关键蛋白显著下调,表明 CM01 中碳水化合物代谢途径中的磷酸戊糖途径受到抑制[32]。而 CM01 是否通过碳水化合物其他途径来应对 Cr(VI)环境还需要进一步探究。

在次级代谢基因簇的预测分析中发现,在预测的 NRP-metallophore 基因簇中发现与 MIBIG 表征的三环菌素、环状三菌杆菌素、金黄素、双金毒素有 46% 的相似度。而上述表征的几种基因簇均属于铁载体分子家族[33]。关于铁载体有比较深入的研究,铁载体对不同的金属表现出不同的亲和力,具有巨大的修复潜力,含有铁载体的微生物,将其引入污染场地,利用它们来修复被重金属污染的土壤,可以促进微生物对金属的吸收[34]。因此,我们猜测金属载体基因簇的存在可能直接或间接影响该菌株对环境中 Cr(VI)的作用,为未来深入研究提供了新的思路。金属载体基因簇通常编码一些与金属运输、解毒和还原相关的蛋白。在未来的研究中,可以通过构建工程菌合成外源表达的金属载体基因簇并进行工程菌耐 Cr(VI)、除 Cr(VI)能力的研究,验证该金属基因簇的存在是否影响该菌株对环境中 Cr(VI)的作用。

此外,我们还筛选出了多种与铬代谢有关的氧化还原酶基因。在细菌中,氧化还原酶会被重金属铬诱导表达,以应对细胞遭受的氧化应激反应。氧化还原酶能够利用电子传递作用催化铬的还原反应,将有毒的 Cr(VI)还原为毒性较低的 Cr(III)。其中,黄素氧还蛋白基因 *FldA* 是细菌微生物中多种代谢所必需的电子转移蛋白。*FldA* 能够从 NADPH 依赖的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)含有的黄素氧还蛋白/铁氧还蛋白还原酶(*Fpr*)接受电子,并将这些电子传递给 Cr(VI),从而将其还原为较低毒性的 Cr(III) [35]。此外,*FldA* 有助于减少活性氧(ROS)的产生,从而减少铬胁迫引起的氧化损伤。NADH 黄素氧化还原酶 *Nema* 能够催化 Cr(VI)还原为 Cr(III),从而减少铬对细胞的毒性[36]。这些氧化还原酶可能共同驱动酶促氧化还原反应以实现 Cr(VI)的生物还原。

同时,结合我们前期的 CM01 差异蛋白研究结果,还筛选出了氧化还原蛋白编码基因 *DX900-04235*、双功能多粘菌素抗性蛋白编码基因 *ArnA*、硫酸盐饥饿诱导蛋白编码基因 *FliY_1* 和铁蛋白编码基因 *FtmA* 等,这些蛋白在 Cr(VI)压力下存在差异表达。因此,研究者认为它们可能直接或间接参与 CM01 的铬响应,但其具体作用机制仍需进一步研究。

5. 结论

本研究采用第二代和第三代全基因组测序技术对 CM01 基因组进行测序,并进行基因序列和铬代谢基因分析。结果表明,CM01 基因组中多种基因注释蛋白的代谢途径、分子功能等与铬的代谢有关。CM01 存在与 *ChrA1*、*Srpc* 等多个与铬代谢相关的基因,包括编码氧化还原酶和转运载体基因、参与氨基酸运输和代谢基因、参与核酸代谢基因等。采用 qRT-PCR 进一步验证了铬胁迫下基因 *ChrA1*、*Srpc*、*GrxA* 和 *Nema* 的表达上调。本研究结果说明基因组信息有助于挖掘 CM01 潜在的 Cr(VI)抗性基因,为利用微生物治理环境中的铬(VI)污染提供了理论基础。

致 谢

本项目所使用的大型仪器设备均由重庆医科大学公共卫生学院提供。

基金项目

本研究由国家自然科学基金(项目编号: cstc2020jcyj-msxmX0540)和重庆医科大学学生科研创新项目(项目编号: SIEP202142)提供资助。

参考文献

- [1] Jobby, R., Jha, P., Yadav, A.K. and Desai, N. (2018) Biosorption and Biotransformation of Hexavalent Chromium [Cr(VI)]: A Comprehensive Review. *Chemosphere*, **207**, 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>
- [2] Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K. and Sutton, D.J. (2012) Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: *Experientia Supplementum*, Springer, 133-164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- [3] Wang, S. and Shi, X. (2001) Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **222**, 3-9. <https://doi.org/10.1023/a:1017918013293>
- [4] Sharma, P., Singh, S.P., Parakh, S.K. and Tong, Y.W. (2022) Health Hazards of Hexavalent Chromium (Cr(VI)) and Its Microbial Reduction. *Bioengineered*, **13**, 4923-4938. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2037273>
- [5] Romanenko, V.I. and Koren'kov, V.N. (1977) Pure Culture of Bacteria Using Chromates and Bichromates as Hydrogen Acceptors during Development under Anaerobic Conditions. *Mikrobiologiya*, **46**, 414-417.
- [6] Hossain, M., Tasnim, S., Safa, A., Rayhan, A.B.H., Khan, M.T.I.A., Bulbul, N., *et al.* (2020) Draft Genome Sequence of *Bacillus Cereus* TN10, a Chromium-Resistant and -Reducing Strain Isolated from Tannery Effluent. *Microbiology Resource Announcements*, **9**, e00603-20. <https://doi.org/10.1128/mra.00603-20>
- [7] Li, J., Tang, C., Zhang, M., Fan, C., Guo, D., An, Q., *et al.* (2021) Exploring the Cr(vi) Removal Mechanism of *Sporosarcina Saromensis* M52 from a Genomic Perspective. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **225**, Article 112767. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112767>
- [8] Sahoo, H., Kumari, S. and Naik, U.C. (2021) Characterization of Multi-Metal-Resistant *Serratia* Sp. GP01 for Treatment of Effluent from Fertilizer Industries. *Archives of Microbiology*, **203**, 5425-5435. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02523-z>
- [9] Zhang, K. and Li, F. (2011) Isolation and Characterization of a Chromium-Resistant Bacterium *Serratia* Sp. Cr-10 from a Chromate-Contaminated Site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**, 1163-1169. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3120-y>
- [10] 贾燕, 白群华, 肖虹. 重庆市某电镀厂聚集区域铬污染状况调查[J]. 现代预防医学, 2014, 41(6): 978-980+983.
- [11] 刘媛, 白群华, 何劲, 等. 耐铬(VI)粘质沙雷氏菌 CM01 的筛选鉴定及其铬(VI)代谢特性研究[J]. 现代预防医学, 2020, 47(17): 3212-3216.
- [12] Chin, C., Peluso, P., Sedlazeck, F.J., Nattestad, M., Concepcion, G.T., Clum, A., *et al.* (2016) Phased Diploid Genome Assembly with Single-Molecule Real-Time Sequencing. *Nature Methods*, **13**, 1050-1054. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4035>
- [13] Koren, S., Walenz, B.P., Berlin, K., Miller, J.R., Bergman, N.H. and Phillippy, A.M. (2017) Canu: Scalable and Accurate Long-Read Assembly via Adaptivek-Mer Weighting and Repeat Separation. *Genome Research*, **27**, 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- [14] Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., *et al.* (2014) Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLOS ONE*, **9**, e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- [15] Besemer, J. (2001) Genemarks: A Self-Training Method for Prediction of Gene Starts in Microbial Genomes. Implications for Finding Sequence Motifs in Regulatory Regions. *Nucleic Acids Research*, **29**, 2607-2618. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.2607>
- [16] Chan, P.P., Lin, B.Y., Mak, A.J. and Lowe, T.M. (2021) Trnscan-Se 2.0: Improved Detection and Functional Classification of Transfer RNA Genes. *Nucleic Acids Research*, **49**, 9077-9096. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab688>
- [17] Kalvari, I., Argasinska, J., Quinones-Olvera, N., Nawrocki, E.P., Rivas, E., Eddy, S.R., *et al.* (2017) Rfam 13.0: Shifting to a Genome-Centric Resource for Non-Coding RNA Families. *Nucleic Acids Research*, **46**, D335-D342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1038>
- [18] Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, M.H., *et al.* (2021) Antismash 6.0: Improving Cluster Detection and Comparison Capabilities. *Nucleic Acids Research*, **49**, W29-W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- [19] 刘媛. 铬(VI)压力下沙雷氏菌 CM01 的蛋白差异表达及耐铬(VI)机制研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆医科

- 大学, 2021.
- [20] Stothard, P. and Wishart, D.S. (2004) Circular Genome Visualization and Exploration Using Cgview. *Bioinformatics*, **21**, 537-539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti054>
- [21] Chai, L., Ding, C., Tang, C., Yang, W., Yang, Z., Wang, Y., *et al.* (2018) Discerning Three Novel Chromate Reduce and Transport Genes of Highly Efficient Pannonibacter Phragmitetus BB: From Genome to Gene and Protein. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **162**, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.090>
- [22] Guillén-Jiménez, F.D.M., Morales-Barrera, L., Morales-Jiménez, J., Hernández-Rodríguez, C.H. and Cristiani-Urbina, E. (2008) Modulation of Tolerance to Cr(VI) and Cr(VI) Reduction by Sulfate Ion in a Candida Yeast Strain Isolated from Tannery Wastewater. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**, 1277-1287. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0425-7>
- [23] Shi, K., Radhakrishnan, M., Dai, X., Rosen, B.P. and Wang, G. (2021) Nema Catalyzes Trivalent Organoarsenical Oxidation and Is Regulated by the Trivalent Organoarsenical-Selective Transcriptional Repressor Nemr. *Environmental Science & Technology*, **55**, 6485-6494. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00574>
- [24] He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S.J., Rensing, C. and Wang, G. (2010) Characterization and Genomic Analysis of Chromate Resistant and Reducing *Bacillus cereus* Strain SJ1. *BMC Microbiology*, **10**, Article No. 221. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-221>
- [25] Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M. and Parsek, M.R. (2006) Survival and Growth in the Presence of Elevated Copper: Transcriptional Profiling of Copper-Stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **188**, 7242-7256. <https://doi.org/10.1128/jb.00837-06>
- [26] Argüello, J.M., Eren, E. and González-Guerrero, M. (2007) The Structure and Function of Heavy Metal Transport P1b-atpases. *Bio Metals*, **20**, 233-248. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9055-6>
- [27] Henne, K.L., Nakatsu, C.H., Thompson, D.K. and Konopka, A.E. (2009) High-Level Chromate Resistance in *Arthrobacter* Sp. Strain FB24 Requires Previously Uncharacterized Accessory Genes. *BMC Microbiology*, **9**, Article No. 199. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-199>
- [28] Zhou, S.M., Dong, L.L., He, Y. and Xiao, H. (2017) Characterization of Chromate Resistance in Genetically Engineered *Escherichia coli* Expressing Chromate Ion Transporter ChrA. *Journal of Southern Medical University*, **37**, 1290-1295.
- [29] 李星龙. 耐铬沙雷氏菌 CM01 基因组测序分析及关键基因对铬代谢的影响研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- [30] Kan, G., Wang, X., Jiang, J., Zhang, C., Chi, M., Ju, Y., *et al.* (2018) Copper Stress Response in Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AN5 Isolated from Sea Ice, Antarctic. *Microbiology Open*, **8**, e00657. <https://doi.org/10.1002/mbo3.657>
- [31] Cao, L., Lu, M., Zhao, M., Zhang, Y., Nong, Y., Hu, M., *et al.* (2023) Physiological and Transcriptional Studies Reveal Cr(VI) Reduction Mechanisms in the Exoelectrogen *Cellulomonas fimi* Clb-11. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1161303. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1161303>
- [32] Liu, Y., Qiu, Y., Yin, Q., Li, X., Bai, Q., Li, Y., *et al.* (2021) Itraq-Based Quantitative Proteomic Reveals Proteomic Changes in *Serratia* Sp. CM01 and Mechanism of Cr(VI) Resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **228**, Article 112899. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112899>
- [33] Nachin, L. (2003) SufC: An Unorthodox Cytoplasmic ABC/ATPase Required for [Fe-S] Biogenesis under Oxidative Stress. *The EMBO Journal*, **22**, 427-437. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg061>
- [34] Gomes, A.F.R., Almeida, M.C., Sousa, E. and Resende, D.I.S.P. (2024) Siderophores and Metallophores: Metal Complexation Weapons to Fight Environmental Pollution. *Science of the Total Environment*, **932**, Article 173044. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173044>
- [35] Gaudu, P. and Weiss, B. (2000) Flavodoxin Mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, **182**, 1788-1793. <https://doi.org/10.1128/jb.182.7.1788-1793.2000>
- [36] Shi, K., Radhakrishnan, M., Dai, X., Rosen, B.P. and Wang, G. (2021) Nema Catalyzes Trivalent Organoarsenical Oxidation and Is Regulated by the Trivalent Organoarsenical-Selective Transcriptional Repressor NemR. *Environmental Science & Technology*, **55**, 6485-6494. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00574>