



水体硝化体系中砷的解毒机制探讨

卢璇¹, 王云燕^{1,2}, 瞿才燕^{1,2}, 唐溪^{1,2}, 唐崇俭^{1,2*}

1 中南大学冶金与环境学院, 湖南 长沙 410083

2 国家重金属污染防治工程技术研究中心, 湖南 长沙 410083

卢璇, 王云燕, 瞿才燕, 唐溪, 唐崇俭. 水体硝化体系中砷的解毒机制探讨. 微生物学报, 2022, 62(6): 2212–2225.

Lu Xuan, Wang Yunyan, Qu Caiyan, Tang Xi, Tang Chongjian. Detoxification mechanisms of arsenic in nitrification in water systems. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(6): 2212–2225.

摘 要: 硝化是目前废水生物脱氮中应用最为广泛的工艺之一, 其功能菌为化能自养型细菌, 生长缓慢, 对重金属十分敏感。砷是一种剧毒的类金属元素, 主要以无机形式的亚砷酸盐[AsO₂⁻, As(III)]和砷酸盐[AsO₄³⁻, As(V)]存在, 尤以 As(III)毒性最强。但研究发现, 在硝化体系中, 高浓度 As(III)(约 400 mg/L)未对硝化功能微生物产生明显毒性。深入比较发现, As(III)的生物氧化与硝化过程具有一定的关联性。化能自养型 As(III)氧化菌不仅可在有氧条件下将 As(III)氧化, 还可在缺氧条件下以 NO₂⁻或 NO₃⁻为电子受体氧化 As(III)。而硝化细菌也是典型的化能自养菌, 且硝化体系内存在氧气及硝化产物 NO₂⁻、NO₃⁻等电子受体, 理论上均可接受电子实现 As(III)的氧化。本文结合硝化反应特性, 综述了 As(III)在硝化体系下的解毒机制, 主要为胞外聚合物的保护、As(III)的氧化、砷还原和外排、砷甲基化以及抗氧化机制。这些机制赋予了硝化细菌抵抗 As(III)毒性的能力, 并在砷的生物转化和地球化学循环中起到重要作用。

关键词: As(III); 硝化细菌; 解毒; 砷氧化; 胞外聚合物

基金项目: 国家自然科学基金(U21A20294, 51878662, 52000182)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U21A20294, 51878662, 52000182)

*Corresponding author. Tel: +86-731-88830511; E-mail: chjtang@csu.edu.cn

Received: 30 March 2022; Revised: 8 May 2022; Published online: 7 June 2022

Detoxification mechanisms of arsenic in nitrification in water systems

LU Xuan¹, WANG Yunyan^{1,2}, QU Caiyan^{1,2}, TANG Xi^{1,2}, TANG Chongjian^{1,2*}

¹ School of Metallurgy and Environment, Central South University, Changsha 410083, Hunan, China

² Chinese National Engineering Research Center for Control and Treatment of Heavy Metal Pollution, Changsha 410083, Hunan, China

Abstract: Via chemoautotrophic bacteria which are featured by slow growth and high sensitivity to heavy metals, nitrification has been one of the most prevalent biological processes for removing nitrogen species from wastewater. Arsenic, generally existing in two oxidation states of arsenite [AsO_2^- , As(III)] and arsenate [AsO_4^{3-} , As(V)], is highly toxic, particularly the As(III). However, high concentration of As(III) (about 400 mg/L) shows no obvious toxicity to nitrifying bacteria in the nitrification system. Through in-depth analysis, we found that the microbial oxidation of As(III) was in close relationship with the nitrification. Chemoautotrophic As(III)-oxidizing bacteria can not only directly oxidize As(III) under aerobic conditions, but also use NO_2^- or NO_3^- as electron acceptors to oxidize As(III) under anoxic conditions. As typical chemoautotrophic bacteria, nitrifying bacteria may oxidize As(III) with O_2 , NO_2^- , and NO_3^- as electron acceptors in the nitrification system. In this review, we summarized the detoxification mechanisms of As(III) in the nitrification system, such as the EPS adsorption, As(III) oxidation, As(V) reduction and efflux, arsenic methylation and antioxidant defense. These detoxification mechanisms enhance the resistance to As(III) in nitrifying bacteria and play an important role in arsenic biotransformation and geochemical cycling.

Keywords: arsenite; nitrifying bacteria; detoxification; arsenite oxidation; extracellular polymeric substances

砷(As)是自然界中广泛存在的一种类金属元素, 因其较大的毒性和对环境的危害性, 常被归为重金属, 且与汞、镉、铅、铬并称“五毒重金属”。砷主要以无机形式的亚砷酸盐[AsO_2^- , As(III)]和砷酸盐[AsO_4^{3-} , As(V)]广泛存在于水环境中, 其中 As(III)的生物毒性是 As(V)的 60 倍^[1]。As(III)会破坏细胞内酶的结构, 干扰 DNA 复制, 对于人类、动物及植物, 乃至微生物都有强烈的毒害作用。

近年来, 随着工农业的发展, 水体中的氮素污染日益严重, 废水脱氮技术愈受重视, 虽然以厌氧氨氧化为代表的新型生物脱氮工艺获得极大关注, 但硝化反硝化以其工艺稳定、使

用面广等优势仍是目前应用最为广泛的生物脱氮工艺之一。硝化是该工艺中的第一步, 也是关键一步。硝化工艺由硝化细菌主导, 包括氨氧化菌(ammonia oxidizing bacteria, AOB)和亚硝酸盐氧化菌(nitrite oxidizing bacteria, NOB), 它们可分别将水中的氨氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)氧化为亚硝态氮($\text{NO}_2^-\text{-N}$), 以及将亚硝态氮氧化为硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)^[2], 为后续的反硝化脱氮奠定基础。AOB 和 NOB 均以化能无机自养型为主, 生长缓慢, 平均世代周期长。已有大量研究表明硝化体系对重金属十分敏感^[3-5], 如 Kapoor 等发现低于 3 mg/L 的 Cd 和 Ni 即能对硝化造成 60%以上的抑制^[6]。但随后研究者^[7-9]发现,

硝化体系对高浓度的 As(III)并不敏感,并可将 As(III)氧化为 As(V)。深入比较发现,As(III)的生物氧化与硝化过程具有一定的关联性,化能自养型 As(III)氧化菌不仅可在有氧条件下将 As(III)氧化,还可在缺氧条件下以 NO_2^- 或 NO_3^- 为电子受体氧化 As(III)^[10-11]。而氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌也是典型的化能自养菌,且硝化体系内存在氧气及硝化产物 NO_2^- 、 NO_3^- 等电子受体^[2],理论上均可接受电子实现 As(III)的氧化。此外,微生物具有多种 As(III)抗性机制和解毒基因^[12-15],但针对硝化生物脱氮体系的 As(III)解毒机制尚缺乏系统总结归纳。因此,本文结合作者的研究经验,对硝化体系中可能存在的 As(III)解毒机制进行综述,以期微生物氮砷循环的基础研究及生物脱氮工艺的推广应用提供参考。

1 As(III)的毒性机理及微生物摄砷方式

砷共有 4 种价态,分别为+5、+3、0 和-3^[16]。在水环境中,砷主要以无机态的 As(III)和 As(V)形式出现^[17]。As(III)进入细胞后会干扰 DNA 复制,增加 DNA 的转录错误率,并通过与蛋白中的巯基结合而改变酶的结构和活性,从而损害细胞^[18];As(V)因其与磷酸盐的结构类似,进入胞内后可替代磷酸盐,生成不稳定的砷副产物,干扰正常的磷酸化过程,导致氧化磷酸化的解偶联,从而破坏 ATP 的合成^[19-20]。由此可见,砷具有剧毒性,但其产生毒性的前提是通过细胞膜进入细胞内部。

细胞膜上存在着细胞生命活动所需的多种转运通道,水通道蛋白便是其中之一。顾名思义,水通道蛋白是为细胞输送水的通道,它有 2 个亚族,分别为水通道蛋白(aquaporins)和水

甘油通道蛋白(aquaglyceroporins, AQP)。前者为真正意义上的水通道,只允许水通过。而水甘油通道蛋白,如大肠杆菌中发现的 GlpF (glycerol facilitator),具有更大的孔径,除了水之外还可允许其他不带电的溶质通过,比如甘油。As(III)在水溶液中常被认为是以含氧阴离子形态存在,但实际上亚砷酸的酸度系数(pKa)为 9.2,因此在中性 pH 下基本不存在阴离子型的亚砷酸盐,而主要为亚砷酸分子(H_3AsO_3)。 H_3AsO_3 与甘油的电荷分布相似,但分子体积比甘油稍小(H_3AsO_3 为 $59 \text{ cm}^3/\text{mol}$,甘油为 $71 \text{ cm}^3/\text{mol}$),更易通过水甘油通道中的狭窄区域进入细胞^[21]。更为有趣的是,Yang 等^[22]发现 As(V)进入 *Sinorhizobium meliloti* 细胞后首先会被还原为 As(III),继而 As(III)会顺浓度梯度通过水甘油通道流出细胞,这说明水甘油通道蛋白不仅能够摄入 As(III),在一定条件下还能作为 As(III)的外排泵,具有砷抗性作用。

在有氧条件下,砷酸盐为水环境中砷的主要形态,多以 H_2AsO_4^- 和 HAsO_4^{2-} 形式存在^[23]。砷酸盐是磷酸盐的结构类似物,可直接被磷酸盐转运蛋白运输进入细胞。在大肠杆菌中存在 2 种磷酸盐转运系统,分别为无机磷酸盐转运系统(Pit)和磷酸盐特殊转运系统(Pst)^[24],它们都能促进 As(V)的摄取,但 Pit 系统起主要作用^[22]。在氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌中,同样存在水甘油通道蛋白和磷酸盐转运系统^[25],因此能够将外界 As(III)和 As(V)转运进细胞。

2 硝化污泥对 As(III)的胞外抵抗机制

胞外聚合物(EPS)是微生物在其代谢过程中分泌的包围在细胞壁外,用于自我保护和相互黏附,并在饥饿环境下为微生物本身提供碳源和能量的一类有机高分子多聚化合物^[26]。EPS 的主要成分是蛋白质和多糖,约占有机物

总量的 70%–80%，核酸、脂类、腐殖酸等占 10%–20%^[27]。

EPS 是微生物细胞在水环境中与重金属接触和相互作用的第一道屏障，对保护微生物细胞至关重要^[28]。EPS 中含有丰富的官能团，如羧基、磷酸基、胺基和羟基^[29]，这些官能团能通过静电吸引或络合等作用与金属离子形成有机配合物，从而阻挡金属离子进入细胞。Liu 等^[30]发现 10 mg/L Cr^{3+} 能被活性污泥中提取的 EPS 完全吸附，除此之外， Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 也能被去除 97% 以上，表明 EPS 对阳离子型重金属具有较强的吸附能力。在同样条件下发现 CrO_4^{2-} 只能被吸附 39%，可能原因是 EPS 中虽含有能吸附阴离子的官能团，但由于 EPS 整体带负电，会与金属含氧阴离子之间存在一定的斥力，因此吸附能力有限。此外还有研究发现^[31]，*Rhizobium radiobacter* VBCK1062 产生的 EPS 中羧基、羟基、酰胺基和葡萄糖醛酸等官能团能与 As(V) 离子相互作用，在金属和 EPS 之间架起静电桥梁，生成链网状聚合物，从而吸附砷。

EPS 中含有丰富的多糖和蛋白等有机组分，砷胁迫会使 EPS 组分和含量发生变化，以应对砷的毒害。Mohite 等^[32]发现 100 mg/L 的砷使得 *Pantoea agglomerans* 产生大量胞外多糖，从而形成一层保护层，将有毒分子限制在细胞表面。在砷的刺激下，*Exiguobacterium profundum* PT2 和 *Ochrobactrum ciceri* SW1 分泌的 EPS 总量及多糖和蛋白含量均上升，EPS 与砷产生交互作用，生成结构致密的大团块，来阻止砷进入胞内^[33]。有研究表明^[34]，与多糖相比，蛋白质中的醇羟基、氨基、羧基、醛基、酚羟基及醌基等活性基团能更显著地螯合重金属，形成螯合沉淀，将不稳定的重金属转化为稳定组分。除直接吸附重金属外，微生物还能通过增加

EPS 分泌量来促进生物膜的形成，从而限制 As(III) 的进入^[35]。

研究发现，好氧方式培养的污泥比厌氧污泥具有更强的吸附能力，这是因为氧气为产 EPS 的细菌提供了更有利的条件，微生物可分泌更多的 EPS 用于吸附金属离子^[36]。此外，还有研究表明自养型脱氮细菌比异养菌能分泌更多的 EPS^[37]，Song 等^[38]的研究也证实了这一观点。硝化作为好氧的无机自养型体系，具有产生丰富 EPS 的先天优势，并且随着 AOB 数量的增加，硝化污泥 EPS 中的蛋白质/多糖比例也会增加^[39]，较高的蛋白质含量能带来更大的重金属吸附量^[40]。硝化污泥已被多次报道能够吸附或与重金属离子相互作用来抵抗重金属的毒害^[36,38,41]。因此，硝化体系中 EPS 的吸附络合作用是保护微生物的第一道“防线”。虽然 EPS 对于硝化细菌抵抗 As(III) 的毒性有一定作用，但由于 EPS 生成量有限，对 As(III) 的吸附结合位点也相对有限，故当 As(III) 浓度较高时仍会有部分 As(III) 穿过 EPS 的“防线”进入微生物细胞。

3 硝化过程与 As(III) 的氧化

据文献报道，As(III) 的毒性是 As(V) 的 60 倍^[1]，砷的生物毒性与其价态密切相关^[42]。As(III) 的氧化是一种潜在的解毒过程，早在 1918 年就有微生物将亚砷酸盐氧化成砷酸盐的报道^[43]。根据代谢方式的不同，As(III) 氧化菌主要分为无机自养型和有机异养型，前者能够在有氧或缺氧的条件下利用无机态 As(III) 为电子供体， O_2 、 NO_2^- 、 NO_3^- 或 ClO_3^- 等为电子受体， CO_2 为碳源，在氧化 As(III) 的同时为微生物生长提供能量；而后者需利用有机碳源，氧化 As(III) 仅为解毒，不产生生长所需的能量^[44–45]。

As(III)的生物氧化依赖于一种细胞周质酶——As(III)氧化酶,目前已知的As(III)氧化酶分为2种,一种是Aio氧化酶,另一种是Arx氧化酶。

3.1 Aio氧化酶介导的As(III)氧化

Aio氧化酶由一个大 α 亚基AioA (93 kDa)和一个小 β 亚基AioB (14 kDa)组成,大 α 亚基包含一个含双钼喋呤鸟嘌呤二核苷酸的活性位点和一个[3Fe-4S]簇蛋白,小 β 亚基包含一个Rieske[2Fe-2S]簇蛋白^[46]。

Aio氧化酶位于细胞内膜的外表面,在氮素或细胞色素c作为电子受体的情况下表现出亚砷酸盐氧化活性。亚砷酸盐在AioA的Mo位点上氧化为砷酸盐,同时Mo从+VI还原为+IV。由于[3Fe-4S]簇是一个单电子受体,每次从钼喋呤接收一个电子后转移到AioB亚基的Rieske[2Fe-2S]簇。接着,电子再从Rieske中心转移到电子受体(如细胞色素c),在好氧条件下最后转移到细胞色素氧化酶,同时氧气被还原为水^[46]。化能无机自养型 α 变形杆菌*Rhizobium* sp. NT-26含有Aio氧化酶^[47],该酶可参与呼吸过程,将As(III)的氧化耦合氧还原,同时产生ATP^[48]。除了自养型以外,异养型的*Alcaligenes faecalis*也含有Aio氧化酶,但*Alcaligenes faecalis*的Aio为异二聚体,NT-26的Aio为异四聚体,两者之间有很高的总体相似性,只在Rieske[2Fe-2S]簇周围的结构上存在显著差异^[46],此外*Alcaligenes faecalis*氧化As(III)只为解毒,不获得能量。

3.2 Arx氧化酶介导的As(III)氧化

微生物As(III)氧化除了由Aio氧化酶催化外,还可由Arx氧化酶催化^[49]。Arx氧化酶由*arx*A/B基因编码,最早在从盐碱湖分离的 γ 变形杆菌*Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1中发现,可通过厌氧As(III)氧化耦合硝酸盐还原过

程进行化能自养生长^[50]。Arx在体内是一种As(III)氧化酶,但在体外它兼具As(V)还原和As(III)氧化双功能活性,在进化上它与ArrA(一种砷还原酶)比与AioA关系更近^[15]。此前的研究认为ARX系统可能具有特异性,只在少数 γ 变形菌门中存在,且主要从高pH高盐湖泊中分离^[51]。直到首次在低盐环境中分离出一株具有*arx*基因的 β 变形菌门砷氧化菌株M52,发现该菌在微氧和硝酸盐还原条件下的中性环境中也可氧化As(III)^[49]。有研究者指出,*arx*基因广泛分布于环境中^[52],但目前发现Arx氧化酶介导的As(III)氧化仅在厌氧条件下发生^[52-54],不存在于严格好氧的硝化体系中。

在好氧硝化体系中,硝化细菌以 NH_4^+ 或 NO_2^- 为电子供体, CO_2 为碳源, O_2 为电子受体,氧化产物为 NO_3^- 。该体系中存在As(III)氧化所需的多种电子受体,且硝化细菌主要为化能自养型,体系中有着适宜As(III)氧化的环境条件,因此硝化体系中极有可能同时存在As(III)氧化与硝化。近年来,不断有研究者在生物脱氮体系中发现As(III)氧化现象。Andrianisa和Ito等人^[7,55]在从未接触过砷的活性污泥中检测到As(III)能够被氧化为As(V),且从中分离出了砷氧化菌。另有研究者^[56]通过宏基因组分析在活性污泥中检测到了砷代谢相关基因,包括As(III)氧化(*aioA/B*)、砷还原(*arsC*)和砷外排(*arsA/B*)等基因,为活性污泥的砷代谢能力找到了来源。Papirio等^[9]发现,硝化污泥能在3 h内将100 mg/L的As(III)完全氧化为As(V),但未进一步追究砷氧化能力的来源,从已有结果来看,该硝化体系的主要功能菌种为*Nitrospira defluvii*,这一菌种早已被前人报道携带丰富的*aioA*类基因^[56],因此这可能是硝化体系具有较强As(III)氧化能力的重要因素。以上结果表明,硝化细菌既有可能与As(III)氧化菌共存于硝化

体系中, 还有可能自身拥有 As(III)氧化机制, 因此硝化体系具有潜在的 As(III)氧化解毒能力。

除了好氧体系, 在厌氧脱氮体系中也存在 As(III)氧化现象。在砷污染土壤中, 厌氧砷氧化可耦合反硝化过程, 其中 As(III)氧化基因 *aioA* 是厌氧砷氧化的关键基因, *Azoarcus* 和 *Rhodanobacter* 是厌氧砷氧化的主要微生物^[57]。在未被砷污染的水稻土壤中, 亦发现了耦合关系, *Pseudogulbenkiania* 驱动硝化盐还原, *Azoarcus* 驱动 As(III)氧化, 砷氧化基因(*aioA*、*aioB*)和反硝化基因(*narG*、*nirS*、*norBC*、*napA*、*nirK*、*nosZ*)大量共存, 共同驱动反硝化耦合砷氧化过程^[58]。通过大量研究表明, 反硝化耦合 As(III)氧化是一种广泛存在于厌氧体系中的微生物活动^[10,59]。

4 硝化过程与 As 外排和 As(V)还原

4.1 As(III)的外排

地球早期是缺氧的, 环境中的砷主要为 As(III)形式。原核生物在此环境中进化, 因而获得了能在 As(III)中生存下来的基因^[60], 即砷抗性基因。在细菌中, 砷抗性基因通常位于 *ars* 操纵子中, 这些操纵子存在于质粒和染色体上, 它们的表达受砷抗性调控蛋白(ArsR)控制。几乎每个 *ars* 操纵子都有编码 As(III)外排蛋白的基因, 能将进入细胞的 As(III)排至胞外, 使胞内 As(III)处于低水平, 从而减小 As(III)对细胞的毒害作用。

As(III)外排蛋白主要分为 2 类, 一类为 ArsB 外排蛋白, 由 *arsB* 基因编码。在革兰氏阳性菌中, *arsB* 位于操纵子 *arsRBC* 上, ArsB 利用细胞膜电位提供的能量将 As(III)排出; 在革兰氏阴性菌中, *arsB* 位于操纵子 *arsRDABC* 上, ArsB 与 ATP 酶 ArsA 连接, 依赖于 ArsA

所产的 ATP 将 As(III)泵出^[61]。

另一类为 Acr3 外排蛋白, 由 *acr3* 基因编码, 在细菌、古生菌和真菌均有分布, 且在植物和动物中发现了其同源物, 比 ArsB 分布更为广泛。Acr3 比 ArsB 结构更小, 与 ArsB 没有明显的序列相似性。Fu 等^[62]将金属嗜碱菌 (*Alkaliphilus metalliredigens*)和谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamiaceae*)的 *acr3* 基因在大肠杆菌中异位表达, 发现 Cys138 和 Cys129 半胱氨酸残基被修饰后使 Acr3 丢失了转运活性, 表明这 2 种半胱氨酸残基在 Acr3 的转运功能中发挥关键作用。而 ArsB 对 As(III)的转运不需要半胱氨酸残基参与, 因此表明 Acr3 与 ArsB 的转运机制不同^[62-63]。在真菌中, 酵母菌可利用质膜载体蛋白 Acr3p 外排 As(III), 或利用 ABC 转运蛋白 Ycf1p 将 As(III)作为谷胱甘肽结合物封存在液泡中^[61]。若将细菌内编码 As(III)外排泵 ArsB 和 Acr3 的基因都灭活, 菌株将获得在胞内积累砷的能力^[64]。

4.2 As(V)的外排

As(III)的外排机制在微生物中广泛存在, 但直接将 As(V)作为底物外排的生物机制却鲜有报道。直到近来有研究发现^[65], 微生物可通过甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 ArsJ 协同作用将 As(V)的转化物排至胞外, 虽然 As(V)不是直接底物, 但这已是目前唯一发现的不涉及 As(V)还原的 As(V)外排机制。关键基因 *gapdh* 和 *arsJ* 分别编码 GAPDH 和 ArsJ 蛋白, 它们分布于许多微生物的 *ars* 操纵子上, 常以成对的形式出现。Chen 等^[65]将铜绿假单胞菌中的 *gapdh* 和 *arsJ* 基因共同表达于大肠杆菌后发现大肠杆菌对 As(V)产生了特异性抗性, 胞内 As(V)积累明显减少。而单独表达 *gapdh* 或 *arsJ* 基因时, 大肠杆菌不表现 As(V)抗性, 表明只有 2 个基因的产物协同才能产生作用。该研究

者推测在 As(V)存在下, GAPDH 催化甘油-3-磷酸(G3P)与 As(V)反应生成 1As3PG, 进而 ArsJ 将 1As3PG 作为底物迅速排至胞外。1As3PG 半衰期小于 2.5 s, 极不稳定, 一旦排出, 会自发水解为 As(V)和 G3P, 从而实现 As(V)的外排。

4.3 As(V)的还原

虽然有研究者提出了 GAPDH 和 ArsJ 介导 As(V)外排的可能性, 但在细菌中更为广泛存在和被研究的仍是将 As(V)还原后由 As(III)外排泵排出从而实现自我解毒的机制。

在“大氧化事件”(约 24 亿年前)发生之前, 地球处于缺氧状态, 环境中 As(III)占据多数, 砷解毒基因主要为砷甲基化基因和 As(III)外排基因。随着氧气的出现, 地表水环境中大部分 As(III)被氧化为 As(V), 毒性有所降低, 但 As(V)通过磷酸盐转运体进入细胞后, 会抑制氧化磷酸化和光合磷酸化。彼时多数微生物胞内仅存在 As(III)外排泵, 为了应对 As(V)毒害, 微生物进化出了砷酸盐还原酶, 当 As(V)进入胞内后可被此酶还原为 As(III), 再由 As(III)外排泵排出。砷酸盐还原酶常见 ArsC 型和 ArrAB 型, ArsC 还原酶广泛存在于好氧和厌氧体系中, 主导胞内还原, 主要控制水相中砷的形态; ArrAB 还原酶存在于厌氧体系中^[66-67], 位于细胞周质, 属于 DMSO 还原酶家族, 结构与 Aio 氧化酶相似, 由大亚基 ArrA 和小亚基 ArrB 组成^[68]。ArrAB 作为厌氧酶, 基因表达会受氧气和硝态氮的抑制, 因此无法在好氧硝化体系中发挥作用, 故在此不作详细介绍。ArsC 是一种细胞质酶, 由 *ars* 操纵子上的 *arsC* 基因编码。目前已知的 ArsC 还原酶根据进化关系分为 3 支: (1) 与谷氧还蛋白-谷胱甘肽偶联的砷酸盐还原酶, 以谷氧还蛋白和谷胱甘肽为还原剂, 存在于许多革兰氏阴性细菌的质粒和染色体

上, 如大肠杆菌。(2) 酵母中依赖谷氧还蛋白的砷酸盐还原酶, 以谷氧还蛋白作为还原剂。(3) 与硫氧还蛋白偶联的砷酸盐还原酶, 以硫氧还蛋白为还原剂, 最初在革兰氏阳性细菌中发现, 后来也在革兰氏阴性变形杆菌中被发现。这 3 种砷还原酶具有共同的生化功能, 但没有进化关系^[66]。

由此发现, 砷酸盐还原酶将原本低毒性的 As(V)转化为了高毒性的 As(III), 随后与之偶联的 As(III)外排机制立刻将 As(III)排至胞外, 使细胞远离砷, 因此砷的价态变化有利于细胞的进一步解毒。虽然目前尚未有研究报道过硝化体系中的 As(III)外排、As(V)外排和 As(V)还原机制, 但这些机制相关基因分布的广泛性为它们在硝化体系中的存在提供了可能。且作者通过前期宏基因组研究发现, 硝化细菌 *Nitrosomonas* 和 *Nitrospira* 属中的确携带大量的 *arsA*、*arsB*、*arsC* 和 *gapdh* 基因。

5 硝化过程与砷甲基化

砷甲基化过程广泛存在于自然界中, 从陆地到海洋, 从细菌到人类, 许多生物都能不同程度地甲基化砷^[69-70]。对于生物来说, 不同形态的砷毒性大小相差甚远, 几种常见的砷化合物毒性排序如下: 一甲基亚砷酸盐[MMAs(III)]和二甲基亚砷酸盐[DMAs(III)]>亚砷酸盐[As(III)]>砷酸盐[As(V)]>一甲基砷酸盐[MMAs(V)]和二甲基砷酸盐[DMAs(V)]>三甲基砷氧化物[TMAs(V)O]^[71]。许多微生物能够通过甲基化将无机砷转化为毒性极低的 DMAs(V)和 TMAs(V)O, 或者转化为毒性高但挥发性强的三甲基砷[TMAs(III)], 继而释放到大气中被稀释而解毒。因此, 砷甲基化是微生物的重要解毒途径, 也是砷生物地球化学循环的重要组成部分^[70]。

砷甲基化由 As(III)S-腺苷甲基转移酶(ArsM)催化,该酶可将 S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)上的甲基转移到 As(III),从而生成甲基砷化合物^[72]。在细菌中, ArsM 由 *arsM* 基因编码,该基因位于 *ars* 操纵子上或与之相邻,其表达通常受砷抗性调控蛋白基因 *arsR* 控制。近年来,国内外学者对砷甲基化进行了初步研究,并取得了一定的进展。Qin 等人^[72]将革兰氏阴性菌 *Rhodopseudomonas palustris* 中的 ArsM 异位表达在对砷敏感的大肠杆菌中,重组后的大肠杆菌可将培养基中的砷转化为相对无毒的 DMAs(V)、TMAOs 以及毒性较大但不会积累的瞬态中间体 MMAs(III)和 DMAs(III),同时还会产生气态产物 TMA(III)从而减少基质中的砷含量,这表明 ArsM 在微生物的砷解毒过程中发挥了重要作用。

作者研究发现,在硝化连续流反应器中添加不同浓度 As(III)时,硝化污泥会将 As(III)转化为 As(V)和 DMAs(V),这 2 种形态的砷毒性远低于 As(III),且在宏基因组信息中发现硝化体系中携带砷甲基化基因 *arsM*。由此可见,硝化体系拥有通过甲基化将 As(III)解毒的潜力。

6 硝化细菌与抗氧化机制

当受到重金属胁迫时,微生物会产生氧化应激行为,生成活性氧(ROS),如超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(OH^{\cdot})。ROS 具有强氧化性,会损伤 DNA、蛋白质等结构,从而损害细胞^[73]。为了防止重金属诱导产生的 ROS 对细胞造成损害,微生物进化出了多种抗氧化机制,以应对氧化应激产物的毒害。

大多生物体内含有多种重金属抗氧化酶,它们分工协作,共同抵抗重金属所带来的毒害,在细菌中常见的抗氧化机制如下:(1) 超氧化物

歧化酶(SOD)催化超氧阴离子发生歧化反应,生成 O_2 和 H_2O_2 ,为清除自由基奠定基础,是抵御机体氧化应激的第一道防线。SOD 是一种广泛存在于微生物、动植物细胞的抗氧化酶,根据所含金属辅基的不同,可分为 CuZn-SOD、Fe-SOD 和 Mn-SOD 3 种。其中 Fe 和 Mn-SOD 氨基酸组成相似,可能起源于同一祖先。细菌中既可能同时含有 2 种 SOD,如大肠杆菌中含 Fe 和 Mn-SOD^[74],也可能只含有其中一种,如枯草芽孢杆菌中只存在单一的 Mn-SOD。*Rhizobium* sp. NT-26 在含 As(III)环境中生长时,超氧化物歧化酶的积累量大幅增加,与不接触 As(III)相比提升了 3 倍^[47]。Steunou 等^[75]发现镉和铜离子会引起金属外排机制缺失的 *Rubrivivax gelatinosus*、*Vibrio cholerae*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Bacillus subtilis* 中 Fe 或 Mn-SOD 的大量表达,这说明 SOD 有利于减小重金属在胞内积累造成的毒害。但 SOD 活性不是总与重金属浓度呈正相关的,在 *Bacillus* sp. P1 中出现了随着金属离子浓度升高,SOD 活性先上升后下降的现象,当高浓度重金属的刺激过度消耗 SOD 后,SOD 合成能力下降,从而会限制其产生和降低活性^[76]。(2) 存在于细胞过氧化物体内的过氧化氢酶(CAT)进一步催化 H_2O_2 分解成无毒害的 O_2 和 H_2O ^[77]。在 10 mg/L Cu 的胁迫下,*E. coli* ASU3 胞内 CAT 的活性比对照组提高了 17 倍^[78]。在砷的刺激下,*Bacillus* sp. MDPMK-02 和 *Pseudomonas taiwanensis* 中 SOD、CAT 活性均明显上升^[79-80]。当 SOD 清除 $O_2^{\cdot-}$ 后,CAT 开始发挥作用分解 H_2O_2 ,所以 CAT 的反应速度常低于 SOD^[76]。(3) 谷胱甘肽(GSH)等低分子量抗氧化物质通过螯合金属离子,保护蛋白质免受氧化,修复氧化蛋白以及清除脂质和脂肪酸过氧化物来维持细胞功能的完整性^[81]。GSH 对重金属等污染物有

一定的保护作用,但当污染物浓度过高时,GSH就会消耗殆尽,因此 GSH 在细菌中常被用于低浓度 H_2O_2 的处理,而其他抗氧化酶(如 CAT)则在高浓度下受到青睐^[76,82]。SOD、CAT、GSH 等抗氧化酶和低分子量抗氧化物质,一起构成机体抗氧化系统,用于清除机体所产生的大量活性氧,以维持细胞结构和遗传物质的完整性^[83]。

重金属的加入会提高脱氮体系中抗氧化酶的活性,有助于抑制过量活性氧的产生,从而减轻重金属的毒害作用^[84]。对于硝化体系,已在多种氨氧化菌(*Nitrosomonas europaea*、*Nitrospira multififormis*、*Nitrospira AV*)中检测到过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性,其中 *Nitrosomonas europaea* 对过氧化氢酶具有最高的比活性^[85]。而高浓度高毒性的金属离子也会促进亚硝酸盐氧化菌 *Nitrospirae* 的过氧化氢酶

产量增加^[86],可增强硝化细菌对重金属毒性的抵抗能力。

综上所述,硝化体系对 As(III)的解毒是一个多途径共同作用的复杂过程(图 1)。硝化细菌可通过分泌胞外聚合物以吸附或络合重金属,将其隔离在胞外,从而减轻重金属对细胞的毒害;通过自身的 As(III)氧化机制或体系中其他具有 As(III)氧化能力的微生物将 As(III)氧化为低毒性的 As(V);通过直接将 As(III)和 As(V)外排,或将 As(V)还原为 As(III)后外排,使微生物细胞远离重金属;通过甲基化酶将 As(III)转化为相对无毒的 DMA(V)和 TMAO 或变成挥发态的 TMA(III)逸散出去;通过重金属抗氧酶的作用清除活性氧,应对氧化应激行为等途径来抵抗 As(III)的毒性,为硝化细菌的生存提供安全保障。

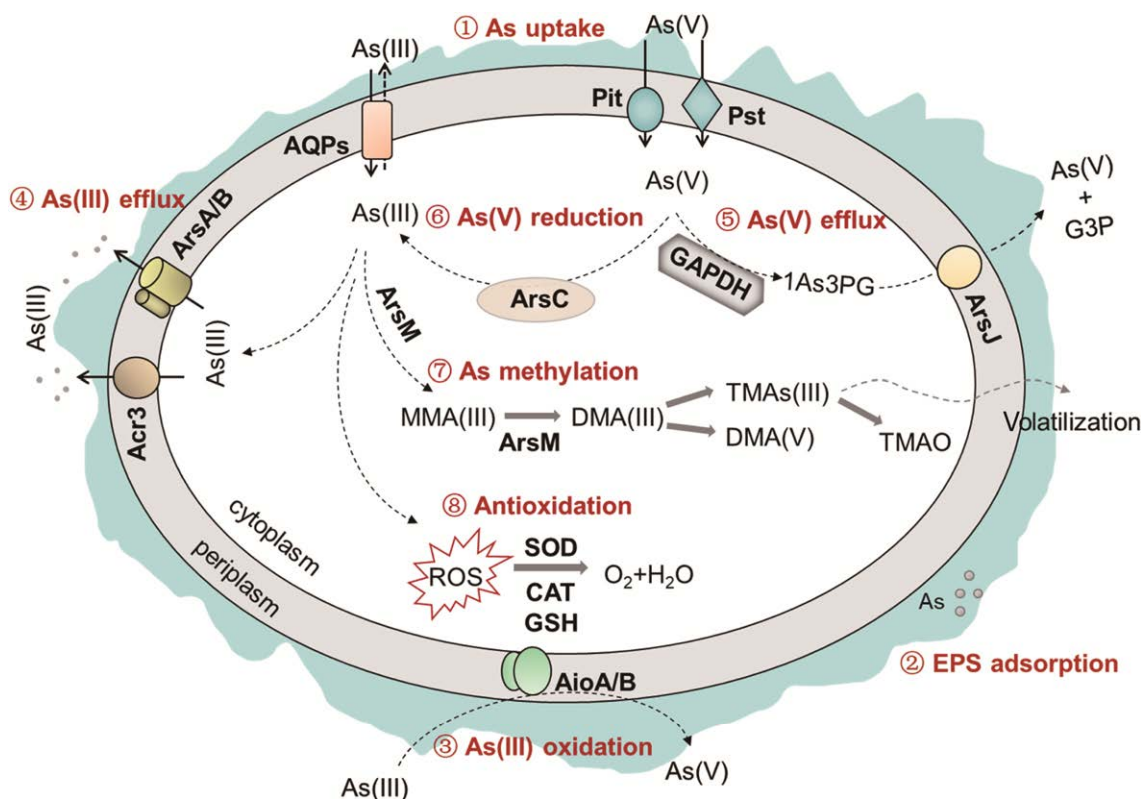


图 1 硝化体系中的 As(III)解毒机制示意图

Figure 1 Schematic diagram of detoxification mechanisms of As(III) in the nitrification system.

7 总结与展望

近来,有研究者发现硝化生物脱氮体系能够耐受并氧化高浓度的 As(III)^[7,9],但其具体的解毒机制未被进一步探究。通过本文的综述,发现在硝化体系中可能存在的 As(III)解毒机制主要包括 EPS 的保护、As(III)的氧化、砷还原和外排、砷甲基化及抗氧化机制,这些机制单独或联合作用,为 As(III)存在下硝化功能菌 AOB 和 NOB 的生存提供有力庇护,也为好氧生物脱氮体系的耐砷潜力提供理论支持。

含 As(III)废水毒性大、污染广、迁移能力强,可在生物体内积累,对机体产生损害,因此含砷废水的处理已经成为研究者关注的焦点。传统的物理和化学处理法价格昂贵,经济效益低。相较而言,微生物处理是一种新兴技术,成本低,效果好,而且不会对环境产生二次污染。通过微生物处理含砷废水的方法已有不少报道,但应用硝化体系同时脱氮和处理 As(III)的研究尚为少见,若能保证高效稳定地实现脱氮的同时将 As(III)转化为 As(V),降低其迁移能力,将显著减小其毒性并有利于砷的彻底去除;或者更进一步能在脱氮体系中直接将 As(III)从水中去除,实现同步脱氮除砷,其应用价值和经济效益将更为显著。但如何保持脱氮微生物和 As(III)氧化微生物的长期友好共存,以及含砷污泥的处置问题仍值得进一步思考。

参考文献

- [1] Miller SM. Toward sustainable water treatment: use of biomaterials in water purification. Yale University (Doctoral dissertation), 2011.
- [2] Sepehri A, Sarrafzadeh MH. Activity enhancement of ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge process: metabolite reduction and CO₂ mitigation intensification process. *Applied Water Science*, 2019, 9(5): 1–12.
- [3] Kapoor V, Elk M, Li X, Impellitteri CA, Santo Domingo JW. Effects of Cr(III) and Cr(VI) on nitrification inhibition as determined by SOUR, function-specific gene expression and 16S rRNA sequence analysis of wastewater nitrifying enrichments. *Chemosphere*, 2016, 147: 361–367.
- [4] Feng B, Fang Z, Hou J, Ma X, Huang Y, Huang L. Effects of heavy metal wastewater on the anoxic/aerobic-membrane bioreactor bioprocess and membrane fouling. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 32–38.
- [5] Hu ZQ, Chandran K, Grasso D, Smets BF. Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(4): 728–734.
- [6] Kapoor V, Li X, Elk M, Chandran K, Impellitteri CA, Santo Domingo JW. Impact of heavy metals on transcriptional and physiological activity of nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(22): 13454–13462.
- [7] Andrianisa HA, Ito A, Sasaki A, Aizawa J, Umita T. Biotransformation of arsenic species by activated sludge and removal of bio-oxidised arsenate from wastewater by coagulation with ferric chloride. *Water Research*, 2008, 42(19): 4809–4817.
- [8] Tang CJ, Duan CS, Liu P, Chai X, Min X, Wang S, Xiao R, Wei Z. Inhibition kinetics of ammonium oxidizing bacteria under Cu(II) and As(III) stresses during the nitrification process. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352: 811–817.
- [9] Papirio S, Zou G, Ylinen A, Di Capua F, Pirozzi F, Puhakka JA. Effect of arsenic on nitrification of simulated mining water. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 149–154.
- [10] Sun WJ, Sierra R, Field JA. Anoxic oxidation of arsenite linked to denitrification in sludges and sediments. *Water Research*, 2008, 42(17): 4569–4577.
- [11] Wang J, Wan JF, Wu ZH, Li HL, Li HS, Dagot C, Wang Y. Flexible biological arsenite oxidation utilizing NO_x and O₂ as alternative electron acceptors. *Chemosphere*, 2017, 178: 136–142.
- [12] Cervantes C, Ji GY, Ramirez JL, Silver S. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15(4): 355–367.
- [13] Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and

- enzymes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(3): 311–325.
- [14] Ben Fekih I, Zhang CK, Li YP, Zhao Y, Alwathnani HA, Saquib Q, Rensing C, Cervantes C. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2473.
- [15] Yan G, Chen XX, Du SM, Deng ZX, Wang LR, Chen S. Genetic mechanisms of arsenic detoxification and metabolism in bacteria. *Current Genetics*, 2019, 65(2): 329–338.
- [16] Sharma VK, Sohn M. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environment International*, 2009, 35(4): 743–759.
- [17] Akin I, Arslan G, Tor A, Cengelloglu Y, Ersoz M. Removal of arsenate [As(V)] and arsenite [As(III)] from water by SWHR and BW-30 reverse osmosis. *Desalination*, 2011, 281(1): 88–92.
- [18] Wang TS, Hsu TY, Chung CH, Wang AS, Bau DT, Jan KY. Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001, 31(3): 321–330.
- [19] Flora SJS. Handbook of Arsenic Toxicology. Oxford: Academic Press, 2015: 51–72.
- [20] Nihal RR. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal*, 2003, 79(933): 391–396.
- [21] Porquet A, Filella M. Structural evidence of the similarity of Sb(OH)₃ and As(OH)₃ with glycerol: implications for their uptake. *Chemical Research in Toxicology*, 2007, 20(9): 1269–1276.
- [22] Yang HC, Cheng JJ, Finan TM, Rosen BP, Bhattacharjee H. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(20): 6991–6997.
- [23] Salameh Y, Albadarin AB, Allen S, Walker G, Ahmad MNM. Arsenic(III,V) adsorption onto charred dolomite: charring optimization and batch studies. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 259: 663–671.
- [24] Rosenberg H, Gerdes RG, Chegwidden K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1977, 131(2): 5–11.
- [25] Starkenburg SR, Chain PSG, Sayavedra-Soto LA, Hauser L, Land ML, Larimer FW, Malfatti SA, Klotz MG, Bottomley PJ, Arp DJ, Hickey WJ. Genome sequence of the chemolithoautotrophic nitrite-oxidizing bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(3): 2050–2063.
- [26] Sheng GP, Yu HQ, Li XY. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 882–894.
- [27] Fong JC, Yildiz FH. Biofilm matrix proteins. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): 201–222.
- [28] Ozturk S, Aslim B, Suludere Z. Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology*, 2009, 100(23): 5588–5593.
- [29] Liu H, Fang HH. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 80(7): 806–811.
- [30] Liu Y, Lam MC, Fang HH. Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology*, 2001, 43(6): 59–66.
- [31] Deepika KV, Raghuram M, Kariali E, Bramhachari PV. Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 134P1: 1–10.
- [32] Mohite BV, Koli SH, Patil SV. Heavy metal stress and its consequences on exopolysaccharide (EPS)-producing *Pantoea agglomerans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(1): 199–216.
- [33] Saba, Rehman Y, Ahmed M, Sabri AN. Potential role of bacterial extracellular polymeric substances as biosorbent material for arsenic bioremediation. *Bioremediation Journal*, 2019, 23(2): 72–81.
- [34] Dai QX, Ma LP, Ren NQ, Ning P, Guo ZY, Xie LG. Research on the variations of organics and heavy metals in municipal sludge with additive acetic acid and modified phosphogypsum. *Water Research*, 2019, 155: 42–55.
- [35] Michel C, Jean M, Coulon S, Dictor MC, Delorme F, Morin D, Garrido F. Biofilms of As(III)-oxidising bacteria: formation and activity studies for bioremediation process development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 457–467.
- [36] Song JS, Maeng M, Lee K, Pack SP, Lee JW. The role of extracellular polymeric substances in reducing copper inhibition to nitrification in activated sludge.

- Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2016, 21(5): 683–688.
- [37] Hou XL, Liu ST, Zhang ZT. Role of extracellular polymeric substance in determining the high aggregation ability of anammox sludge. *Water Research*, 2015, 75: 51–62.
- [38] Song YX, Lu CH, Liu P, Chai XL, Chen X, Min XB, Tang CJ, Chai LY. Insights into the role of extracellular polymeric substances in Zn^{2+} adsorption in different biological sludge systems. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(36): 36680–36692.
- [39] Liang ZW, Li WH, Yang SY, Du P. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere*, 2010, 81(5): 626–632.
- [40] Shao Y, Zhang H, Buchanan I, Mohammed A, Liu Y. Comparison of extracellular polymeric substance (EPS) in nitrification and nitrification bioreactors. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 143: 104713.
- [41] Zheng XY, Wang MY, Chen W, Ni M, Chen Y, Cao SL. Effect of Cr(VI) on the microbial activity of aerobic granular sludge. *Desalination and Water Treatment*, 2016, 57(15): 7000–7008.
- [42] Jain CK, Ali I. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*, 2000, 34(17): 4304–4312.
- [43] Green HH. Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *South African Journal of Science*, 1918, 14: 465–467.
- [44] Slyemi D, Bonnefoy V. How prokaryotes deal with arsenic. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(6): 571–586.
- [45] Dong D, Ohtsuka T, Dong DT, Amachi S. Arsenite oxidation by a facultative chemolithoautotrophic *Sinorhizobium* sp. KGO-5 isolated from arsenic-contaminated soil. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2014, 78(11): 1963–1970.
- [46] Warelou TP, Oke M, Schoepp-Cothenet B, Dahl JU, Bruselat N, Sivalingam GN, Leimkühler S, Thalassinou K, Kappler U, Naismith JH, Santini JM. The respiratory arsenite oxidase: structure and the role of residues surrounding the rieske cluster. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72535.
- [47] Andres J, Arsène-Ploetze F, Barbe V, Brochier-Armanet C, Cleiss-Arnold J, Coppée J, Dillies MA, Geist L, Joubin A, Koechler S, Lassalle F, Marchal M, Médigue C, Muller D, Nesme X, Plewniak F, Proux C, Ramírez-Bahena MH, Schenowitz C, Sismeiro O, Vallenet D, Santini JM, Bertin PN. Life in an arsenic-containing gold mine: genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26. *Genome Biology and Evolution*, 2013, 5(5): 934–953.
- [48] Santini JM, Kappler U, Ward SA, Honeychurch MJ, Vanden Hoven RN, Bernhardt PV. The NT-26 cytochrome c552 and its role in arsenite oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1767(2): 189–196.
- [49] Ospino MC, Kojima H, Fukui M. Arsenite oxidation by a newly isolated betaproteobacterium possessing *arx* genes and diversity of the *arx* gene cluster in bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1210.
- [50] Oremland RS, Hoefl SE, Santini JA, Bano N, Hollibaugh RA, Hollibaugh JT. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4795–4802.
- [51] Andres J, Bertin PN. The microbial genomics of arsenic. *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, 40(2): 299–322.
- [52] Zargar K, Conrad A, Bernick DL, Lowe TM, Stolc V, Hoefl S, Oremland RS, Stolz J, Saltikov CW. ArxA, a new clade of arsenite oxidase within the DMSO reductase family of molybdenum oxidoreductases. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(7): 1635–1645.
- [53] Durante-Rodríguez G, Fernández-Llamas H, Alonso-Fernandes E, Fernández-Muñiz MN, Muñoz-Olivas R, Diaz E, Carmona M. ArxA from *Azoarcus* sp. CIB, an anaerobic arsenite oxidase from an obligate heterotrophic and mesophilic bacterium. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 01699.
- [54] Hamamura N, Damdinsuren N, Nakajima N, Yamamura S. Draft genome sequence of the anaerobic arsenite-oxidizing *Halomonas* sp. strain ANAO-440, isolated from an alkaline saline lake in Khovsgol, Mongolia. *Microbiology Resource Announcements*, 2021, 10(42): 00899–21.
- [55] Ito A, Miura JI, Ishikawa N, Umita T. Biological oxidation of arsenite in synthetic groundwater using immobilised bacteria. *Water Research*, 2012, 46(15): 4825–4831.
- [56] Cai L, Yu K, Yang Y, Chen BW, Li XD, Zhang T.

- Metagenomic exploration reveals high levels of microbial arsenic metabolism genes in activated sludge and coastal sediments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(21): 9579–9588.
- [57] Zhang M, Li Z, Haggblom MM, Young L, He Z, Li F, Xu R, Sun X, Sun W. Characterization of nitrate-dependent As(III)-oxidizing communities in arsenic-contaminated soil and investigation of their metabolic potentials by the combination of DNA-stable isotope probing and metagenomics. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(12), 7366–7377.
- [58] Li XM, Qiao JT, Li S, Haggblom MM, Li FB, Hu M. Bacterial communities and functional genes stimulated during anaerobic arsenite oxidation and nitrate reduction in a paddy soil. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(4): 2172–2181.
- [59] Rodríguez-Freire L, Sun WJ, Sierra-Alvarez R, Field JA. Flexible bacterial strains that oxidize arsenite in anoxic or aerobic conditions and utilize hydrogen or acetate as alternative electron donors. *Biodegradation*, 2012, 23(1): 133–143.
- [60] Zhu YG, Xue XM, Kappler A, Rosen BP, Meharg AA. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: lessons from arsenic. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13): 7326–7339.
- [61] Rosen BP. Families of arsenic transporters. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(5): 207–212.
- [62] Fu HL, Meng YL, Ordóñez E, Villadangos AF, Bhattacharjee H, Gil JA, Mateos LM, Rosen BP. Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(30): 19887–19895.
- [63] Sato T, Kobayashi Y. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(7): 1655–1661.
- [64] Sousa T, Branco R, Piedade AP, Morais PV. Hyper accumulation of arsenic in mutants of *Ochrobactrum tritici* silenced for arsenite efflux pumps. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131317.
- [65] Chen J, Yoshinaga M, Garbinski LD, Rosen BP. Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Molecular Microbiology*, 2016, 100(6): 945–953.
- [66] Silver S, Phung LT. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 599–608.
- [67] Tian HX, Shi QT, Jing CY. Arsenic biotransformation in solid waste residue: comparison of contributions from bacteria with arsenate and iron reducing pathways. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(4): 2140–2146.
- [68] Glasser NR, Oyala PH, Osborne TH, Santini JM, Newman DK. Structural and mechanistic analysis of the arsenate respiratory reductase provides insight into environmental arsenic transformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(37): 8614–8623.
- [69] Di X, Beesley L, Zhang Z, Zhi S, Jia Y, Ding Y. Microbial arsenic methylation in soil and uptake and metabolism of methylated arsenic in plants: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(24): 0131317.
- [70] Bentley R, Chasteen TG. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2): 250–271.
- [71] Akter KF, Owens G, Davey DE, Naidu R. Arsenic speciation and toxicity in biological systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 184: 97–149.
- [72] Qin J, Rosen BP, Zhang Y, Wang GJ, Franke S, Rensing C. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7): 2075–2080.
- [73] Wu XY, Cobbina SJ, Mao GH, Xu H, Zhang Z, Yang LQ. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(9): 8244–8259.
- [74] Geslin C, Llanos J, Prieur D, Jeanthon C. The manganese and iron superoxide dismutases protect *Escherichia coli* from heavy metal toxicity. *Research in Microbiology*, 2001, 152(10): 901–905.
- [75] Steunou AS, Babot M, Bourbon ML, Tambosi R, Durand A, Liotenberg S, Krieger-Liszkay A, Yamaichi Y, Ouchane S. Additive effects of metal excess and superoxide, a highly toxic mixture in bacteria. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(5): 1515–1529.
- [76] Liu SH, Zeng ZT, Niu QY, Xiao R, Zeng GM, Liu Y, Cheng M, Hu K, Jiang LH, Tan XF, Tao JJ. Influence

- of immobilization on phenanthrene degradation by *Bacillus* sp. P1 in the presence of Cd(II). *Science of the Total Environment*, 2019, 655: 1279–1287.
- [77] Pandey S, Barai PK, Maiti TK. Influence of heavy metals on the activity of antioxidant enzymes in the metal resistant strains of *Ochrobactrum* and *Bacillus* sp. *Journal of Environmental Biology*, 2013, 34(6): 1033–1037.
- [78] Abskharon RNN, Hassan SH, Kabir MH, Qadir SA, El-Rab SMFG, Wang MH. The role of antioxidants enzymes of *E. coli* ASU3, a tolerant strain to heavy metals toxicity, in combating oxidative stress of copper. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 26(2): 241–247.
- [79] David M, Krishna PM, Sangeetha J. Elucidation of impact of heavy metal pollution on soil bacterial growth and extracellular polymeric substances flexibility. *3 Biotech*, 2016, 6(2): 1–11.
- [80] Satapute P, Paidi MK, Kurjogi M, Jogaiah S. Physiological adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution*, 2019, 251: 555–563.
- [81] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, de Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66(8): 1499–1503.
- [82] Vergauwen B, Pauwels F, van Beeumen JJ. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against respiration-generated hydrogen peroxide in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(18): 5555–5562.
- [83] Medinas DB, Augusto O. Mechanism of the peroxidase activity of superoxide dismutase 1. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 49(4): 682.
- [84] Ye JY, Gao H, Wu JK, Chang Y, Chen ZK, Yu R. Responses of nitrogen transformation processes and N₂O emissions in biological nitrogen removal system to short-term ZnO nanoparticle stress. *The Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135916.
- [85] Wood NJ, Sørensen J. Catalase and superoxide dismutase activity in ammonia-oxidising bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 38(1): 53–58.
- [86] Zhang J, Shi Q, Fan S, Zhang Y, Zhang M, Zhang J. Distinction between Cr and other heavy-metal-resistant bacteria involved in C/N cycling in contaminated soils of copper producing sites. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 402: 123454.

唐崇俭，中南大学冶金与环境学院教授、博士生导师，教育部青年长江学者、湖南省杰出青年基金获得者、青年芙蓉学者、湖湘青年英才，全国高校黄大年式教师团队骨干成员。现任中南大学环境工程研究所书记、冶金与环境学院教授委员会副主任。主要从事复杂废水污染控制与资源化技术及原理、氮循环及其环境应用等相关的研究工作。主持国家自然科学基金重点基金、国家重点研发计划课题等国家级项目 5 项，湖南省科技重大专项、湖南省国际科技合作重点项目等 10 余项，在 *Water Research* 等期刊发表 SCI 论文 70 余篇，授权专利 30 余项，获省部级科技奖励 3 项。

