

抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展

蔡 林 王革娇*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘 要: 砷(Arsenic, As)是一种剧毒类金属(Metalloid), 在自然环境中主要以三价亚砷酸盐[Arsenite, AsO_2^- , As(III)]和五价砷酸盐[Arsenate, AsO_4^{3-} , As(V)]的无机形式广泛存在。许多微生物在含砷环境的长期适应过程中, 进化了多种不同的砷解毒抗性机制。目前研究发现主要存在 4 种类型的砷抗性机理, 包括: As(III)氧化, 细胞质 As(V)还原, 呼吸性 As(V)还原, As(III)甲基化, 这些机制赋予微生物砷抗性并在砷的转化和地球化学循环中起着极其重要的作用。本文主要介绍这几种微生物砷抗性机理的机理及研究概况和潜在的砷污染生物修复功能。

关键词: 砷, 抗砷性微生物, 砷氧化, 砷还原, 砷甲基化, 砷污染, 生物修复

Advance on Studies of Arsenic-resistant Microorganisms and Molecular Mechanisms

CAI Lin WANG Ge-Jiao*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Arsenic is known as a toxic metalloid, which mainly exists in inorganic forms such as arsenite and arsenate in the natural environment. A number of microorganisms have evolved different resistant mechanisms for arsenic detoxification to cope with the widespread distribution of the poisonous arsenic. Four distinct microbial arsenic-resistant mechanisms have been described including As(III) oxidation, cytoplasmic As(V) reduction, respiratory As(V) reduction, and As(III) methylation. These mechanisms confer arsenic resistance in microorganisms that play important roles in the transformation and geological cycle of arsenic. This review mainly focuses on the researches on these molecular mechanisms and potential application for environmental arsenic bioremediation using microorganisms.

Keywords: Arsenic, Arsenic-resistant microorganisms, Arsenite oxidation, Arsenate reduction, Arsenite methylation, Arsenic contamination, Bioremediation

砷是自然界中普遍存在的一种剧毒元素, 在地壳、土壤、海水、河水及大气中广泛存在。我国民间俗称的砒霜(As_2O_3)、雄黄(As_2S_3)、雌黄(As_2S_5)和毒砂(FeAsS)都是砷的化合物。由砷导致的污染除了地质因素外, 更重要的是人为因素, 例如金属矿的开

采和冶炼、砷产品的加工与使用、煤的燃烧等。目前砷污染已成为最为严重的重(类)金属污染之一, 已经上升为一个全球性的问题。世界卫生组织公布, 全球至少有 5000 多万人正面临着砷中毒(Arsenism, arsenicosis, arseniasis)的威胁, 其中, 大多数为亚洲

国家, 中国是受砷中毒危害最为严重的国家之一。砷污染正向人们步步逼近, 严重威胁着人们的健康和生命安全, 由砷污染引起的地方性砷中毒病例不断增加^[1], 因此, 对砷污染的防治刻不容缓。

自然环境中的砷毒性主要体现在 As(III)和 As(V)上, 其中 As(III)的毒性比 As(V)强约 100 倍, 且 As(III)不带电荷, 移动性强, 危害性大, 而 As(V)带负电, 易被吸附。很多研究报道微生物对环境中的砷的氧化还原转化及甲基化和去甲基化等起着主导作用, 微生物砷代谢已表明参与地表水、地下水、高盐湖和沉积物等地质环境中砷的动态循环^[2-5]。本文旨在综述与砷代谢有关的微生物及其分子代谢机理, 一方面让我们更好地了解它们, 认识它们并利用它们为我们服务; 另一方面, 为砷污染的防治工作和生物修复提供理论基础。

1 As(III)氧化

As(III)氧化菌(Arsenite-oxidizing bacteria)在 1918 年首次被报道^[6], 随着研究的不断进展, 越来越多的 As(III)氧化菌被发现, 研究较多的典型菌株包括 *Alcaligenes faecalis* NCIB 8687^[7], *Rhizobium* sp. NT-26^[8], *Agrobacterium tumefaciens* 5A^[9], *Hermiimonas arsenicoxydans* ULPAs1^[10], *Thiomonas* sp. 3As^[11]等, 这些菌株都能够将毒性强的 As(III)氧化为毒性弱的 As(V)。本实验室已从我国不同砷污染源分离鉴定近 20 种 As(III)氧化菌^[5,12,13]。研究发现存在 2 种类型的 As(III)氧化菌^[14], 一类是化能无机自养型(Chemolithoautotroph), 不但起到解毒作用, 而且能够利用 As(III)为电子供体和 CO₂ 为主要碳源进行生长, 如 NT-26 和 3As 等; 另一类是化能有机异养型(Chemoorganoheterotrophic), 仅仅利用 As(III)的氧化作为解毒机制, 如 NCIB 8687, 5A 和 ULPAs1 等。

As(III)氧化活性是由 As(III)氧化酶(Arsenite oxidase)催化的, 此酶属于二甲基亚砷(DMSO)还原酶家族^[15]。目前酶学研究得最清楚的是 NCIB 8687 的 As(III)氧化酶^[7,16], 其晶体结构表明 As(III)氧化酶由大小两个亚基组成, 一个是以 [3Fe-4S] 和钼蝶呤为核心的大亚基(α 亚基), 另一个是以 [2Fe-2S] 为中心的小亚基(β 亚基)。成熟蛋白是由大小两个亚基组成的约 100 kD 的异形二聚体($\alpha_1\beta_1$)^[16], 但也有 As(III)氧化菌的成熟 As(III)氧化酶是异形四聚体($\alpha_2\beta_2$), 如

NT-26^[17], 甚至也有异形六聚体($\alpha_3\beta_3$), 如 NT-14^[18]。As(III)氧化酶大小亚基都含有特定的保守区, 如小亚基 N 端的双精氨酸信号肽(Twin arginine translocation, TAT)识别区和 [2Fe-2S] 结合区 (Cys-X-His-X₁₅-Cys-X₂-His), 大亚基的 [3Fe-4S] 结合区 (Cys-X₂-Cys-X₃-Cys-X₇₀-Ser) 和 As(III)结合残基 (His-X₇-Glu, Arg-X₃-His)^[16]。

As(III)氧化酶基因的表达受 As(III)氧化酶操纵子(*aox* operon)控制, 一个完整的 *aox* operon 除结构基因外还包括上游的调控基因和下游的辅助基因。目前基因表达调控唯一研究得较为清楚的就是菌株 5A^[9], 表明 As(III)氧化酶结构基因(*aoxAB*)的表达受上游编码组氨酸激酶基因(*aoxS*)和反应调控子基因(*aoxR*)的双组分系统调控, 用组氨酸激酶 AoxS 接收 As(III)等周质信号后, 由反应调控子 AoxR 传递信号并调控 *aox* operon 的表达。下游辅助基因包括编码细胞色素 c 基因(*aoxC*)和钼生物合成辅因子基因(*aoxD*) (图 1A)。通过 RT-PCR 引物首尾相连扩增的方法证实了 *aoxSRABCD* 六个基因共转录, 而且受 As(III)诱导后表达上调。研究还发现密度感应系统(Quorum sensing)也参与 *aox* operon 的调控, 因为 *aoxAB* 在不含 As(III)的对数生长期前期细胞中不表达, 但到了对数生长期后期则表达, 而且用乙酸乙酯提取该时期的培养液得到的上清液就能诱导 *aoxAB* 表达(原因是 quorum sensing 产生的信号分子能够诱导 *aox* operon 表达, 如 N-酰基高丝氨酸内酯类信号分子, 即 AHLs)。尽管如此, 但是关于 As(III)氧化的详细调控机理还不是很清楚。需要注意的是还有一种类型的 *aox* operon, 以 ULPAs1 为代表^[10], 上游调控基因转录方向与下游结构基因相反, 且在调控基因上游多了一个额外的基因(*aoxX*), 这样上下游基因分别转录(图 1A)。目前 AoxX 的确切功能还不知道, 其 N 端含有 TAT 信号肽, BlastX 预测它与含氧阴离子的运输和代谢有关, 笔者推测 AoxX 是 As(III)结合蛋白, 在细胞周质中协助 AoxS 感应 As(III)或信号分子。

根据蛋白家族保守区和功能域等综合分析, 笔者提出了一个 As(III)氧化调控和代谢路径图(图 1B)。AoxS 的周质环直接感应 As(III)或通过其它周质蛋白[如潜在的 As(III)结合蛋白 AoxX]间接感应 As(III)后, AoxS 就被输入外部信号, 其保守的组氨酸残基自磷酸化, 再将高能磷酸基团转移给 AoxR N

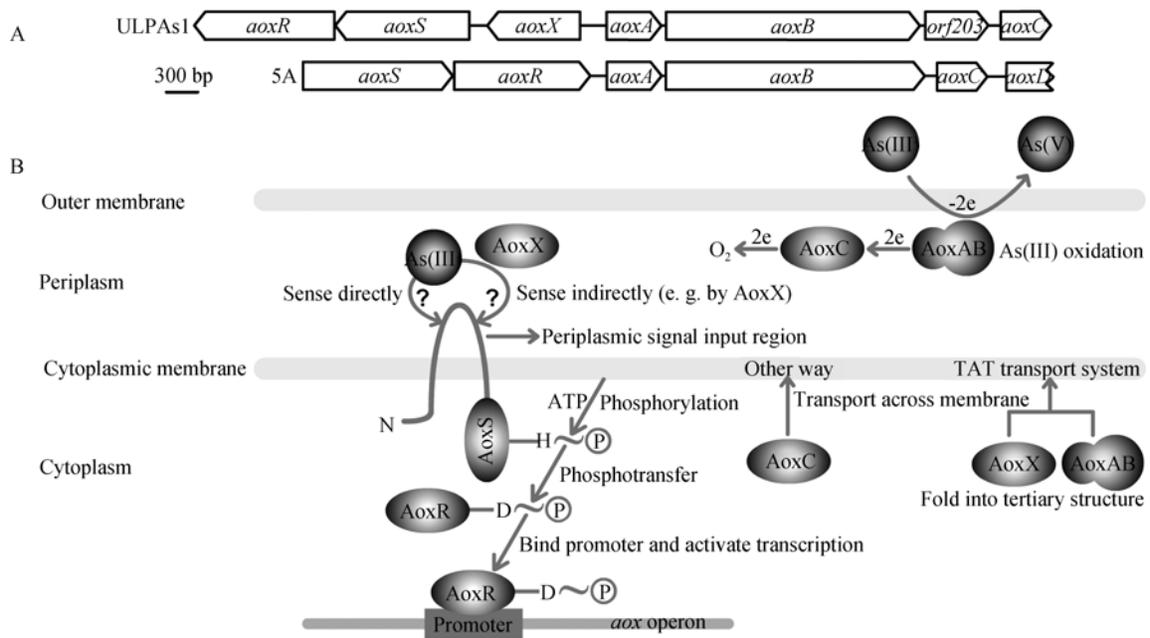


图 1 *aox* operon 物理图谱(A)和 *As(III)*氧化调控及代谢路径(B)

Fig. 1 Physical maps of *aox* operons (A) and *As(III)*-oxidizing regulation and metabolic pathway (B)

注: 菌株(GenBank 注册号): *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 (NC_009138); *Agrobacterium tumefaciens* 5A (DQ151549).

Note: Strain (GenBank accession number): *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 (NC_009138); *Agrobacterium tumefaciens* 5A (DQ151549).

端保守的天门冬氨酸残基, 被磷酸化的 *AoxR* 构象发生改变, 与 *aox* operon 的启动子区结合以激活整个操纵子的基因转录, 翻译后的蛋白 *AoxX* 和 *AoxAB* 在胞内正确折叠后经 TAT 转运系统运输到细胞周质发挥功能, 而 *AoxC* 则经其它转运系统(如伴侣蛋白)运输到细胞周质。*As(III)*的氧化过程发生在细胞周质, 氧化电子传递路径为 *As(III)*传递 2 个电子到 *AoxB* 的钼蝶呤, 接着到 *AoxB* 的[3Fe-4S], 然后到 *AoxA* 的[2Fe-2S], 再到 *AoxC*, 最后到呼吸链中的 O_2 。

2 细胞质 *As(V)*还原

细胞质 *As(V)*还原是在有氧条件下细胞质 *As(V)*还原酶(Cytoplasmic arsenate reductase)将进入细胞质的 *As(V)*还原成 *As(III)*, 随后再通过 *As(III)*通道蛋白(Arsenite transporter)排出 *As(III)*。迄今为止, 有大量的细胞质 *As(V)*还原菌被报道和研究, 典型菌株有大肠杆菌^[19], 金黄色葡萄球菌^[20], 枯草芽孢杆菌^[21], 嗜盐古菌^[22]和啤酒酵母^[23]。

细胞质 *As(V)*还原活性由 *As(V)*还原酶催化, 研究共发现了 3 种不同类型的 *As(V)*还原酶。一类命名为 *ArsC*, 位于大肠杆菌质粒 R773 上^[19], 成熟蛋白是一个约 16 kD 的单体, 以谷胱甘肽和谷氧还蛋

白作为电子供体; 另一类也命名为 *ArsC*, 位于金黄色葡萄球菌质粒 pI258 上和枯草芽孢杆菌染色体上^[20,21], 成熟蛋白都是与前者差不多大小的单体, 电子供体是硫氧还蛋白; 第三类命名为 *Arr2p*, 位于啤酒酵母第 16 号染色体上^[23], 成熟蛋白是一个约 34 kD 的同型二聚体, 电子供体与第一类相同。3 种类型的 *As(V)*还原酶的活性均依赖于对应的电子供体, 交换使用则没有 *As(V)*还原活性。晶体结构和进化分析都表明这三类 *As(V)*还原酶属于不同的进化分支, 没有相同的保守区和功能域^[24]。

*As(V)*在细胞内被 *As(V)*还原酶还原成毒性更强的 *As(III)*后, 有两种途径将其解毒, 一是外排(Extrusion), 这就用到 *As(III)*通道蛋白, 目前细菌中广泛存在两大类 *As(III)*通道蛋白^[25], 分别是 *ArsB* 和 *Acr3p* (其中 *Acr3p* 含有 2 个进化分支), 除了功能相同外, 它们没有任何进化上的关联, 随着微生物基因组的测序工作不断完善, 相关数据分析表明 *Acr3p* 比 *ArsB* 更广泛存在; 二是扣押(Sequestration), 在啤酒酵母中 *As(III)*除了能经通道蛋白 *Arr3p* 排出外, 还能与谷胱甘肽结合后被液泡扣押^[26], 当然只有真核生物才会有这种解毒路径。成熟的 *ArsB*、*Acr3p* 和 *Arr3p* 都是大小约 45 kD 的单体。

许多微生物与细胞质 *As(V)*还原的相关基因成

簇构成了 As(V)还原酶操纵子(*ars operon*), 不像 *aox operon* 正调控那样复杂, 相比而言, *ars operon* 属于一个典型的负调控机制, 研究得比较深入, 也容易理解。典型的 *ars operon* 包括共转录的 3 个基因(*arsRBC*)或 5 个基因(*arsRDABC*)^[27]。ArsR 是转录调控因子, 即与启动子区结合的阻遏蛋白用来调控 *ars operon*; ArsA 是 As(III)激活的 ATPase, 能够与 ArsB 形成复合泵以增强 As(III)的外排能力^[28]; ArsD 具有双功能, 一是作为弱的阻遏蛋白调控 *ars operon*^[29,30], 二是作为 As(III)伴侣蛋白, 将 As(III)传递给 ArsA 并增强它们的亲和力和 ArsA 的催化活性^[31]。成熟的 ArsR 和 ArsD 都是大小约 13 kD 的同型二聚体, 但成熟 ArsA 是大小约 63 kD 的单体。还有一个与砷解毒有关的基因(*arsH*), 有时也会出现在 *ars operon* 中, 尽管已经做了蛋白晶体结构分析^[32], 但是目前对于 *arsH* 的功能仍然不清楚, 实验表明 ArsH 是一个依赖于 NADPH 和 FMN 的黄素蛋白, 能够催化 O₂ 还原成 H₂O₂^[32]。

笔者根据 *ars operon* 各基因的功能和角色, 绘制了细菌细胞质 As(V)还原调控和代谢路径图(图 2A)。环境中的 As(III)通过水甘油通道蛋白(Aquaglyceroporin, GlpF)进入细胞, As(V)则通过磷酸通道蛋白(Phosphate transporter, Pit/Pst)进入细胞, 因为 As(III)和 As(V)分别与甘油和磷酸基团具有相似的分子结构。进入细胞内的 As(III)与结合在 *ars operon* 上的 ArsR 结合后, ArsR 构象发生改变, 从启动子区解离下来后 *ars operon* 开始转录。翻译和定位后的蛋白各司其职, 进入胞内的 As(V)经 ArsC 还原成 As(III)与直接进入细胞的 As(III)一起经 Acr3p 或 ArsB 或 ArsAB 排到细胞外, 其中 ArsD 作为 As(III)伴侣蛋白与 ArsAB 复合泵互助。

关于 *ars operon* 的进化分析已有报道^[27], 原始地球大气是以还原气体为主的还原性环境, 环境中的砷以 As(III)为主, 微生物为了解毒进化了组成型通道蛋白基因(*arsB/ACR3*), 后来为了基因表达经济, 在 *arsB/ACR3* 前加入了转录调控因子 *arsR*, 蓝细菌爆发后, 光合作用产生了氧气, 地球大气变成氧化性环境, 就产生了 As(V), 又进化了 As(V)还原酶基因(*arsC*), 这样就形成了至今都普遍存在的 3 个基因操纵子结构, 后来为了应对环境中高浓度的砷, 提高砷解毒效率, 在 *arsR* 和 *arsB/ACR3* 之间同时引入了 *arsD* 和 *arsA*, 最终进化成 5 个基因的高级操纵子结构(图 2B)。需要指出的是 *arsD* 和 *arsA* 是同时进

化的, 而且 *arsD* 位于 *arsA* 上游, 即它们要么一起出现在 *ars operon* 中, 要么一起单独出现在基因组中。微生物基因组数据相关分析表明上述 4 种进化历程的基因结构都存在相关证据。在单个基因进化上, 目前基本赞同上述的三类 As(V)还原酶基因和三类 As(III)通道蛋白基因都属于趋同进化(Convergent evolution), 除了功能相同外, 在蛋白结构上没有相似之处^[24]。笔者等研究发现长期受砷污染的环境中抗砷性微生物的多样性丰富而且 As(III)抗性水平高, 进一步分析发现水平基因转移(Horizontal gene transfer, HGT)起很重要的作用, 说明 HGT 加速了抗砷性微生物的侧向进化^[13]。

3 呼吸性 As(V)还原

10 多年前发现微生物可以利用 As(V)作为终极电子受体进行厌氧呼吸而生长^[33], 由于关系到剧毒砷的呼吸, 对这个机理的研究引起了人们的广泛兴趣。呼吸性 As(V)还原发生在细胞周质, 是在厌氧条件

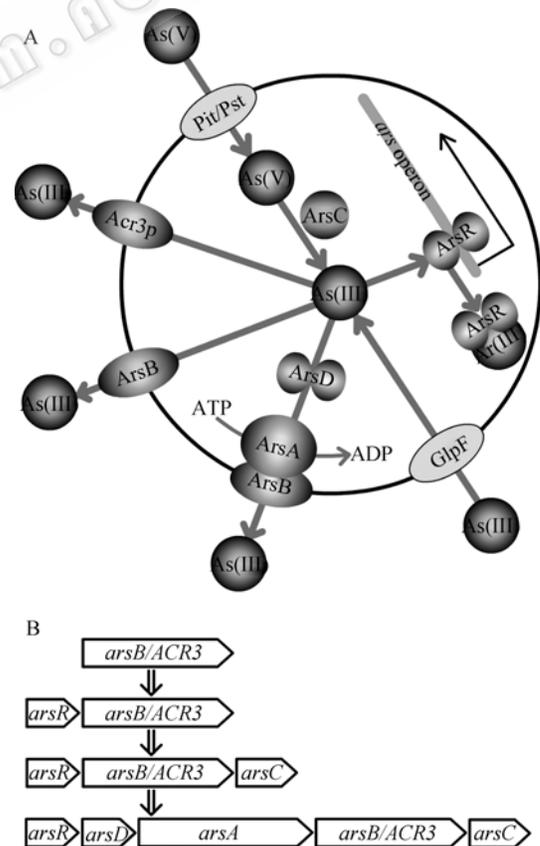


图 2 细菌细胞质 As(V)还原调控及代谢路径(A)和 *ars operon* 进化(B)

Fig. 2 Regulation and metabolic pathway of bacterial cytoplasmic As(V) reduction (A) and evolution of *ars operon* (B)

下呼吸性 As(V)还原酶(Respiratory arsenate reductase)以 As(V)作为终极电子受体催化 As(V)的还原^[34]。目前研究深入的菌株只有希瓦氏菌 ANA-3^[35,36], 芽胞杆菌 MLS10 和 SF-1 也有一些研究^[37,38]。酶学研究最为清楚的是希瓦氏菌 ANA-3 的呼吸性 As(V)还原酶, 成熟蛋白是一个约 131 kD 的异形二聚体, 由约 95 kD 的大亚基(ArrA)和约 27 kD 的小亚基(ArrB)组成^[36]。在结构上与 As(III)氧化酶具有一定的相似性, 都存在 TAT 信号肽, 都是铁硫蛋白, 大亚基都含有钼蝶呤结构, 都属于二甲基亚砷(DMSO)还原酶家族。不同的是 ArrAB 不存在[2Fe-2S]和[3Fe-4S]结构, 但成熟的 ArrAB 有 4~5 个[4Fe-4S]结构, 还有在 ArrA(大亚基)和 AoxA(小亚基)的 N 端存在 TAT 信号肽^[39]。

目前呼吸性 As(V)还原的研究主要集中在生理、生化、生态和酶学等方面, 关于分子机理的研究较少, 希瓦氏菌 ANA-3 的 *arrAB* 序列已被分离和鉴定^[35], 发现仅结构基因构成 *arr* operon, 上下游没有发现调控基因和其它相关的基因, 除了在上游的相反方向含有 *ars* operon(图 3), 但研究已表明该 *ars* operon 的解毒系统并不是 As(V)呼吸还原所必需的^[40]。与前面讲的两大类砷抗性菌相比, 目前发现的呼吸性 As(V)还原菌要少很多, 有限的种质资源在很大程度上就限制了以基因水平为基础的机理研究。

4 As(III)甲基化

As(III)甲基化现象不仅在细菌和真菌中存在^[41], 而且在高等动物大鼠和人也存在^[42,43]。事实上当 As(III)引入甲基后其毒性反而增强, 人们就质疑 As(III)甲基化是不是一个砷解毒途径, 目前在这方面的分子机理研究很少, 有一篇关于细菌 As(III)甲基化的研究回答了这个问题^[44]。研究发现 As(III)甲基化细菌 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 的 As(III)甲基化活性是由转甲基酶(Methyltransferase, ArsM)催化的, 存在 As(III)不同程度甲基化的中间产物, 终产物是气态的三甲砷[Trimethylarsine, (CH₃)₃As]^[44], 因而, ArsM 的解毒机理就是 As(III)经三次甲基化后可以转化为气态的砷化合物挥发出去(在细胞和培养液中检测发现总砷的含量减少了)。此外, *arsM* 的表达受 As(III)诱导且受 ArsR 类型的阻遏蛋白调控, 异源表达发现 ArsM 能赋予 As(III)敏感菌株砷抗性, 这些都充分说明了 As(III)甲基化是一个砷解毒机制。

5 四类砷抗性机理的潜在联系

迄今为止, 一共发现了以上综述的 4 种微生物砷抗性机理, 都是由操纵子或基因控制的, 那么这些操纵子或基因之间有内在联系吗? 是各司其职还是存在相互作用? 这方面的研究目前还没有人报道, 但是我们可以做一分析和预测。随着微生物基因组的测序工作不断开展, 分析发现很多微生物都含有与砷解毒有关的基因, 经常一起成簇出现, 笔者叫它们“砷解毒基因岛”(图 3), 可以发现不同机理的操纵子或基因相互渗透, 这并非偶然。还有一个有趣的现象是野生型菌株 5A 表现 As(III)氧化表型, 当 As(III)氧化活性丧失后就表现出 As(V)还原表型^[9], 可以推测 As(III)氧化和 As(V)还原在 5A 中同时发生, 很可能存在一个动态平衡且氧化速率远大于还原速率。这两点都说明了四种抗性机理之间会存在某种联系或相互作用。当然, 这有待于以后的研究去证实。

6 砷污染的生物修复

目前砷污染环境的修复有传统的化学氧化、沉淀和物理吸附、离子交换等方法, 效果虽好, 但有产生的废渣难以处理、成本高、会带来二次污染等缺点。后来出现了植物修复方法, 有些植物(如蜈蚣草)可以通过根吸收高浓度的砷并富集在体内, 大量种植收集后妥善处理, 此法不适宜大规模含砷污水的治理。近几年新出现了微生物活性污泥法, 主要是培养微生物菌群, 加入曝气池混合液以达到对重金属离子的代谢和吸附作用, 此法具有经济、高效且无害等优点, 具有广泛的应用前景, 但在工艺上的局限是活性污泥对 As(V)的去除率高, 而对毒性更强的 As(III)的去除率低。主要是因为 As(V)带负电、易被污泥吸附而 As(III)不带电荷, 所以为了提高去除效率, 需要将 As(III)氧化成 As(V), 如果在活性污泥中加入氧化剂进行化学氧化, 就会影响到污泥的活性, 但使用 As(III)氧化菌进行生物氧化, 就能很好解决这一难题。目前国际上有利用 As(III)氧化菌固定化和转 As(V)还原酶基因到拟南芥中的研究^[45,46]。两者的修复策略不一样, 前者是在反应器中先将 As(III)生物氧化成 As(V), 再利用矿石吸附带负电的 As(V); 后者是转基因拟南芥根吸收的 As(V)被还原成

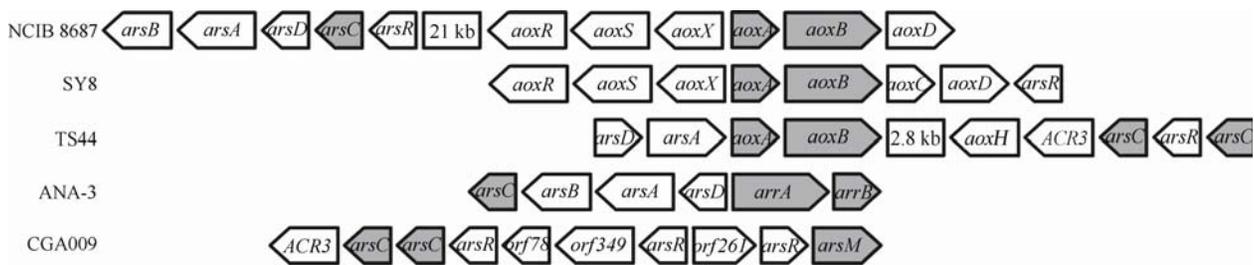


图3 细菌砷解毒基因岛

Fig. 3 Bacterial arsenic detoxification gene islands

注: 四类砷解毒结构基因着灰色, 相关基因在文中均有注释。菌株(GenBank 注册号): *Alcaligenes faecalis* NCIB 8687 (AY297781), *Achromobacter* sp. SY8 (EF523515), *Pseudomonas* sp. TS44 (EU311944), *Shewanella* sp. ANA-3 (AY271310), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (NC_005296)。

Note: Four types of structural gene for arsenic detoxification are painted gray. All related genes are annotated in the text. Strain (GenBank accession number): *Alcaligenes faecalis* NCIB 8687 (AY297781), *Achromobacter* sp. SY8 (EF523515), *Pseudomonas* sp. TS44 (EU311944), *Shewanella* sp. ANA-3 (AY271310), *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (NC_005296)。

As(III), 谷胱甘肽再与 As(III)结合后被扣押在液泡中, 即富集在拟南芥体中。我国受砷污染迫害严重, 目前更是迫切需要研究和发 展一些经济高效的水土砷污染净化技术。

7 展望

随着经济发展加快, 因人类活动给环境带来的负担越来越大, 如重(类)金属被从地壳中释放出来, 加上微生物的代谢作用, 对环境造成了很大的污染。就砷污染而言, 一方面要严格控制人为污染, 保护好环境, 另一方面, 要进行有效治理和修复, 将环境中的砷控制在允许的范围之内(世界卫生组织推荐水体中的砷不超过 50 ppb)。本文主要阐述了四种类型的抗砷性微生物及其抗砷机理的研究概况, 不难发现, 只有 As(III)氧化菌做到了自身和环境都解毒, 两类 As(V)还原菌自身虽解毒了, 但把负担抛给了环境, As(III)甲基化菌将砷释放到大气中, 加快了砷的扩散和流动。这些抗砷性微生物对砷的转化和毒性有重大影响, 我们掌握了它们的代谢机理, 将为生物修复提供理论支撑和可行对策, 使利用微生物与砷的互作机制来控制环境砷形态和去向的目标得以实现, 具有重要的环保意义。

参 考 文 献

- [1] Yoshida T, Yamauchi H, Sun GF. Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, **198**: 243–252.
- [2] Oremland RS, Stolz JF. The ecology of arsenic. *Science*,

2003, **300**(5621): 939–944.

- [3] Oremland RS, Kulp TR, Blum JS, *et al.* A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science*, 2005, **308**(5726): 1305–1308.
- [4] Stolz JF, Basu P, Santini JM, *et al.* Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol*, 2006, **60**: 107–130.
- [5] Fan H, Su C, Wang Y, *et al.* Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China. *J Appl Microbiol*, 2008, **105**(2): 529–539.
- [6] Green HH. Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattle-dipping baths. *Rep Dir Vet Res S Afr*, 1918, **6**: 593–599.
- [7] Anderson GL, Williams J, Hille R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem*, 1992, **267**(33): 23674–23682.
- [8] Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, *et al.* A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(1): 92–97.
- [9] Kashyap DR, Botero LM, Franck WL, *et al.* Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 2006, **188**(3): 1081–1088.
- [10] Muller D, Medigue C, Koechler S, *et al.* A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet*, 2007, **3**(4): 518–530.
- [11] Duquesne K, Lieutaud A, Ratouchniak J, *et al.* Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ Microbiol*, 2008, **10**(1): 228–237.
- [12] Xiong J, Wang W, Fan H, *et al.* Arsenic resistant bacteria in mining wastes from Shangrao coal mine of China. *Environmental Science and Technology (I)*. In *Environmental Science and Technology (I)* ed. Lyon, WG, Starrett, SK, Hong, J. 2006, pp.536–540. Cambridge, MA, USA: American Science Press.
- [13] Cai L, Liu G, Rensing C, *et al.* Genes involved in arsenic

- transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol*, 2009, **9**: 4.
- [14] Oremland RS, Stolz JF. Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol*, 2005, **13**(2): 45–49.
- [15] Inskeep WP, Macur RE, Hamamura N, *et al.* Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ Microbiol*, 2007, **9**(4): 934–943.
- [16] Ellis PJ, Conrads T, Hille R, *et al.* Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 angstrom and 2.03 angstrom. *Structure*, 2001, **9**(2): 125–132.
- [17] Santini JM, vanden Hoven RN. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol*, 2004, **186**(6): 1614–1619.
- [18] vanden Hoven RN, Santini JM. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1656**(2-3): 148–155.
- [19] Gladysheva TB, Oden KL, Rosen BP. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry*, 1994, **33**(23): 7288–7293.
- [20] Ji G, Silver S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, **89**(20): 9474–9478.
- [21] Sato T, Kobayashi Y. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J Bacteriol*, 1998, **180**(7): 1655–1661.
- [22] Wang G, Kennedy SP, Fasiludeen S, *et al.* Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *J Bacteriol*, 2004, **186**(10): 3187–3194.
- [23] Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik G, *et al.* Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1997, **13**(9): 819–828.
- [24] Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, *et al.* Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, **26**(3): 311–325.
- [25] Achour AR, Bauda P, Billard P. Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res Microbiol*, 2007, **158**(2): 128–137.
- [26] Rosen BP. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett*, 2002, **529**(1): 86–92.
- [27] Rosen BP. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol*, 1999, **7**(5): 207–212.
- [28] Dey S, Rosen BP. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J Bacteriol*, 1995, **177**(2): 385–389.
- [29] Wu J, Rosen BP. The *arsD* gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Mol Microbiol*, 1993, **8**(3): 615–623.
- [30] Chen Y, Rosen BP. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. *J Biol Chem*, 1997, **272**(22): 14257–14262.
- [31] Lin YF, Walmsley AR, Rosen BP. An arsenic metallo-chaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(42): 15617–15622.
- [32] Ye J, Yang HC, Rosen BP, *et al.* Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett*, 2007, **581**(21): 3996–4000.
- [33] Ahmann D, Roberts AL, Krumholz LR, *et al.* Microbe grows by reducing arsenic. *Nature*, 1994, **371**(6500): 750.
- [34] Stolz JF, Oremland RS. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **23**(5): 615–627.
- [35] Saltikov CW, Newman DK. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(19): 10983–10988.
- [36] Malasarn D, Keffe JR, Newman DK. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J Bacteriol*, 2008, **190**(1): 135–142.
- [37] Afkar E, Lisak J, Saltikov C, *et al.* The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **226**(1): 107–112.
- [38] Yamamura S, Ike M, Fujita M. Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. *J Biosci Bioeng*, 2003, **96**(5): 454–460.
- [39] Silver S, Phung LT. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(2): 599–608.
- [40] Saltikov CW, Cifuentes A, Venkateswaran K, *et al.* The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(5): 2800–2809.
- [41] Bentley R, Chasteen TG. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(2): 250–271.
- [42] Lin S, Shi Q, Nix FB, *et al.* A novel S-adenosyl-L-methionine: arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13): 10795–10803.
- [43] Wood TC, Salavagionne OE, Mukherjee B, *et al.* Human arsenic methyltransferase (AS3MT) pharmacogenetics: gene resequencing and functional genomics studies. *J Biol Chem*, 2006, **281**(11): 7364–7373.
- [44] Qin J, Rosen BP, Zhang Y, *et al.* Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(7): 2075–2080.
- [45] Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, *et al.* Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(11): 1140–1145.
- [46] Lievreumont D, N'Negue MA, Behra P, *et al.* Biological oxidation of arsenite: batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite. *Chemosphere*, 2003, **51**(5): 419–428.