

微生物砷还原机制的研究进展

陈倩, 苏建强, 叶军*, 朱永官

中国科学院城市环境研究所 中国科学院城市环境与健康重点实验室 厦门 361021

摘要: 砷是一种剧毒物质, 环境中的砷对人体健康存在潜在威胁, 因此长期以来备受关注。微生物的各种代谢过程对砷在环境中的归趋起着重要作用, 其中砷还原微生物能将吸附于固体矿物中的 $As(V)$ 还原为可溶性强的 $As(III)$, 使砷进入液相, 从而加剧了地下水等饮用水源的砷污染。论文主要介绍了两种微生物砷还原机制(异化砷还原和细胞质砷还原)在作用机理、蛋白质结构和表达调控等方面的研究进展, 旨在为更深入理解微生物介导砷的生物地球化学循环以及砷污染的微生物修复技术提供参考。

关键词: 砷还原; 微生物; 异化砷还原; 细胞质砷还原

文章编号: 1673-5897(2011)6-225-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Advances in Mechanisms of Microbial Arsenate Reduction

Chen Qian, Su Jianqiang, Ye Jun*, Zhu Yongguan

Key Lab of Urban Environment and Health Institute of Urban Environment Chinese Academy of Sciences Xiamen 361021 China

Received 28 March 2011 accepted 29 April 2011

Abstract: Arsenic is of great concern for a long time due to its poisonous potential to human health. Microbes play an important role in the transformation of arsenic in the environment. It has been suggested that arsenate reducing bacteria could reduce $As(V)$ on mineral surfaces to the aquifer $As(III)$, resulting in the contamination of groundwater. This review mainly focuses on the advances of two arsenate reducing systems in prokaryotes (dissimilatory arsenate reduction and cytoplasmic arsenate reduction), including their molecular mechanisms, regulations of gene expression, crystal structures of proteins which involved in the reduction of arsenate. The aim is to provide better understanding on the microbial mediated biogeochemical cycle of arsenic and information for the development of novel remediation strategies.

Keywords: arsenate reduction; microbes; dissimilatory arsenate reduction; cytoplasmic arsenate reduction

砷是自然界中普遍存在的有毒类金属。1993年世界卫生组织将饮用水中的砷标准由原来的 $50 \mu g L^{-1}$ 降为 $10 \mu g L^{-1}$ 。2006年美国环保局将其列为第一位饮用水污染物^[1,2]。我国从2007年7月开始也以 $10 \mu g L^{-1}$ 作为生活饮用水中允许的砷浓度上限。砷在环境中共有4种价态: $As(-III)$ 、 $As(0)$ 、 $As(III)$ 和 $As(V)$, 其中以 $As(III)$ 和 $As(V)$ 较为常见, 它们也是造成环境砷污染的主要形态^[3]。

微生物在长期的历史演化过程中进化出了各种

抗砷机制, 更有最新的研究表明有细菌 (*Halomonas* GFAJ-1 strain)能以砷代替磷作为细胞中DNA的组成成分供细菌生长^[4], 但是这项研究发表后亦颇有争议, 需要有进一步可靠的数据支持。目前研究发现的微生物砷代谢包括氧化、还原和甲基化^[5]。砷氧化是通过将较高毒性的 $As(III)$ 转化为较低毒性的 $As(V)$ 来解毒; 砷甲基化是通过生成挥发性的甲基化砷来降低砷对细胞的毒性^[6,7]; 而砷还原有两种机制: 一种是细胞质砷还原, 将进入细胞内

收稿日期: 2011-03-28 录用日期: 2011-04-29
基金项目: 中国科学院知识创新工程青年人才类重要方向项目 (KZCX2-EW-QN410); 国家自然科学基金面上项目 (No. 31070101)
作者简介: 陈倩 (1985-), 女, 硕士生, 研究方向: 环境微生物学, E-mail: qcher@iue.ac.cn *通讯作者 (Corresponding author, E-mail: jy@iue.ac.cn)
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 $As(V)$ 还原为 $As(III)$, 再通过膜蛋白将 $As(III)$ 泵出细胞以降低细胞内砷浓度达到细胞解毒的目的; 另一种是异化砷还原, 以 $As(V)$ 作为电子受体将其还原为 $As(III)$, 并从中获取能量供自身生长。研究表明, 环境中微生物的砷还原作用是导致水体砷污染加剧的重要原因, 特别是异化砷还原微生物可将吸附在矿物或者沉积物上的 $As(V)$ 还原为具有移动性和毒性强的 $As(III)$, 这就把砷从固相释放到了液相中, 从而引起地下水等水源的砷污染^[8]。由于微生物的作用导致饮用水的砷污染问题在南亚三角洲地区以及周边一些区域 (中国台湾和柬埔寨) 特别严重^[3], 因此关于砷还原微生物的研究对环境砷污染的问题具有重要意义。本文介绍了两种砷还原机制在分子生物学、酶学和作用机理等方面的研究成果以及在生物修复中的一些尝试, 旨在为微生物砷还原机理的进一步研究以及微生物在砷污染治理中的应用提供参考。

1 微生物的砷还原机制

1.1 异化砷还原

异化砷还原是在厌氧条件下, 微生物以乳酸盐、乙酸盐和芳香类化合物等为电子供体^[9-10], 以 $As(V)$ 为电子受体将 $As(V)$ 还原为 $As(III)$, 并利用这一过程中产生的能量进行自身生长的一个代谢过程。Orenlan 等将这些能进行异化砷还原作用的微生物统称为 DARPs (dissimilatory arsenate reducing prokaryotes)^[11]。目前研究发现的 DARP 已经超过了 20 种^[3]。

1.1.1 异化砷还原菌

第一株异化砷还原菌 (DARPs) 发现于 1994 年, 由 Almar 等从美国麻州的砷污染沉积物中分离得到, 并将其命名为 MIT-13^[12]。MIT-13 在进化上接近于 ϵ 变形菌纲, 能以乳酸盐为电子供体还原 $As(V)$ 为 $As(III)$, 也可还原硫酸盐获得能量。在 MIT-13 报道之后, 人们相继在矿区和热泉等地区都分离出了具有异化砷还原功能的微生物^[13-15], 这些微生物广泛分布于革兰氏阳性菌、 β 、 γ 和 ϵ 变形菌以及产金菌等, 显示出了很高的生物多样性^[15-17]。

Pyrobaculum arsenaticum 是来自于意大利热泉中的一株古菌, 它和 *Pyrobaculum aerophilum* 是目前为止发现的仅有的两株异化砷还原嗜热古菌。*Pyrobaculum arsenaticum* 的特别之处在于, 当它利用砷酸盐和硫代砷酸盐或者砷酸盐和 L-半胱氨酸生长时会生成 As_2S_3/As_4S_6 (即俗称的雄黄) 沉淀^[17]。大多数异化砷还原菌都能利用砷酸盐以外的电子受体,

如硝酸盐、硫酸盐和延胡索酸盐等, 但菌株 MIMS-1 只能以 $As(V)$ 作为专一性的电子受体, 氧化硫化物成为硫酸盐来进行化能自养^[18]。位于加利福尼亚的 Mono 和 Searles 两个湖属于高碱高盐且富砷的极端水体环境, 是研究砷代谢极端微生物的天然实验区。从 Searles 湖分离出来的 SIAS-1 既能以乳酸盐为电子供体进行异养生长, 又能以硫化物为电子供体进行化能自养^[19]; 从 Mono 湖中分离出的 *Bacillus arsenicoferans* 和 *Bacillus selenitireducens*, 则能利用 $As(V)$ 和 $Se(V)$ 进行异化还原作用^[20]。2001 年 Ghring 等从富砷的地热环境中分离出了既可氧化砷又可还原砷的细菌, 该菌在有氧条件下氧化 $As(III)$, 而在厌氧条件下利用乳酸盐还原 $As(V)$ 进行异化生长^[21]。

1.1.2 异化砷还原酶

异化砷还原酶 (ArAB) 结构上与亚砷酸盐氧化酶相似^[22], 由大亚基 ArA 和小亚基 ArB 组成, 与 DMSO 还原酶家族有一定亲缘关系, 目前只有 *C. arsenatis*^[23]、*B. selenitireducens*^[24] 和 *Shewanella sp. strain ANA-3*^[25] 3 株菌的 ArAB 得到了分离鉴定。1998 年 Kraff 和 Mac 率先从 *C. arsenatis* 中分离纯化了异化砷还原酶^[23]。该菌 ArAB 位于细胞间质中, 是一个 123 kDa 大小的异质二聚体, 钼、铁、硫和锌作为辅助因子。大亚基 ArA 87 kDa, 含有一个钼原子和铁硫中心 [4Fe-S], 其 N 末端与许多原核含钼多肽相似; 小亚基 ArB 29 kDa, 为具有 [Fe-S] 的小蛋白, N 末端类似于铁硫蛋白。该酶对砷酸盐有一定特异性, 不能利用硝酸盐、硫酸盐、硒酸盐和延胡索酸盐作为电子受体, 在进化上与 DMSO 还原酶家族的 DmsB 以及硝酸盐还原酶族中的 NarC 有一定亲缘关系。

与 *C. arsenatis* 不同, 属于革兰氏阳性菌的 *B. selenitireducens* 菌株的 ArAB 则连接在细胞膜上, 同样是由大小亚基 ArA (110 kDa) 和 ArB (34 kDa) 组成的异质二聚体 (150 kDa)^[24]。2008 年 Malasam 等通过将 *Shewanella sp. strain ANA-3* 的 ArAB 在大肠杆菌中表达, 得到了分离纯化的异化砷还原酶, 大小约 131 kDa, 位于细胞间质, 包含 ArA (~95 kDa) 和 ArB (~27 kDa), 同时还含有 1 个钼原子、4 个硫原子和 4—5 个 [4Fe4S]^[25]。至今对异化砷还原酶还仅限于组成成分和氨基酸序列的初步认识, 具体的空间晶体结构以及砷还原的作用机理尚未有明确的报道, 因此有待进一步研究探索。

1. 1. 3 异化砷还原基因及表达调控

目前文献中仅报道 *B. selenitireducens*和 *Shewanella* sp. Strain ANA-3两个菌株的 *arr*基因全序列^[24-26]。*Shewanella* sp. Strain ANA-3是被研究得比较深入的异化砷还原菌^[26-28]。*Salnikov*等通过利用缺失 *arrA*或者 *arrB*的 ANA-3突变菌株证实 *arrAB*都是异化砷还原必需的基因,并测得 *arr*基因编码区序列约 11 kb 含有两个方向相反的转录操纵子,*arrB*后紧随一个疑似转录终止信号的序列和另两个不相关的基因(图 1)。在 *arrAB*的上游是调控细胞质砷还原的 *arsDABC*操纵子,证明 *Shewanella* sp. Strain ANA-3同

时拥有异化砷还原和细胞质砷还原两种砷代谢功能。*ArrA*由 TAT前导序列开始,具有一个富含半胱氨酸的 $CX_2CX_3CX_7C$ 超二级结构,该结构可能用于固定一个 $[4Fe_4S]$ 簇。*ArrB*亚基不含 TAT前导序列,其中有 4个模序结构(各含 4个半胱氨酸)可以参与与 $[Fe_4S]$ 中心的结合。*Shewanella* sp. Strain ANA-3和 *B. selenitireducens*的 *ArrA*蛋白质序列相似性为 47%^[24]。2007年 *Murphy*等人研究发现与膜相连的 C型细胞色素(*CymA*)也是 *Shewanella*菌群进行异化砷还原所必需的,在反应中负责电子的传递^[29]。

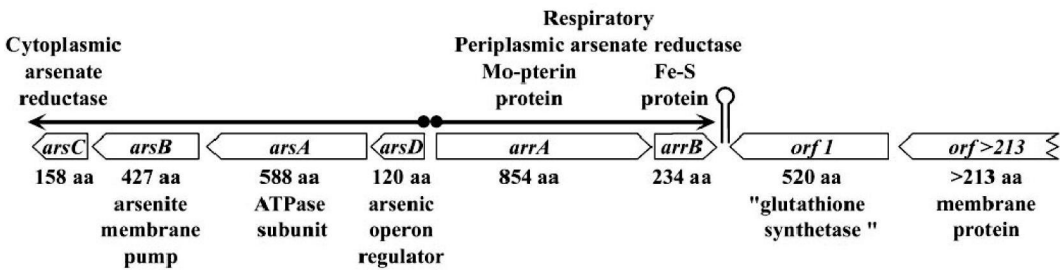


图 1 *Shewanella* sp. Strain ANA-3的砷还原基因图谱^[22]

Fig. 1 Genes for respiratory (*arrAB*) and cytoplasmic (*arsC*) arsenate reductases of *Shewanella* sp. Strain ANA-3

关于异化砷还原基因表达调控机理的研究不多,且多集中于希瓦氏菌。*Murphy*等在 *Shewanella* sp. Strain ANA-3的 *arr*和 *ars*操纵子中都未发现表达调控基因 *arsR*。通过基因组序列分析找到了六个类似 *arsR*的基因,将其分别编码为 *arsR1-arsR6*。他们研究发现缺失 *arsR2*的 *Shewanella* sp. Strain ANA-3突变株在高浓度 $As(III)$ (3 mM)下比野生菌生长得快,且在厌氧无砷的环境中 *arrA*和 *arsC*的表达量增加。研究还发现三价砷(亚砷酸盐和苯胂)会削弱 *ArrR2*与 *arr*启动子的结合,砷酸盐则不会。由此可证明 *ArrR2*在 *Shewanella* sp. Strain ANA-3的 *arr*和 *ars*基因的表达调控中起一定的作用,且其调控作用受 $As(III)$ 浓度的控制^[27]。*Murphy*的另一研究表明,在 *Shewanella* sp. Strain ANA-3中 cAMP-CRP可激活 *arr*转录。同时该菌中有 4个类似腺苷酸环化酶的 *cya*基因,缺失其中两个 *cya*的变异菌不能以砷酸盐作为电子受体生长,而加入外源 cAMP后可以使变异菌恢复生长。由此可以证明代谢阻遏系统(*crr*和 *cya*)是 ANA-3中调节异化砷还原所必需的^[28]。目前对 *arr*基因表达调控机理研究甚少,基因敲除等分子生物学技术为这方面工作的开展提供了有力的技术支持,更深入了解 *arr*基因

的表达调控是一个值得努力的方向。

1. 1. 4 环境中异化砷还原的研究

2004年, *Malasam*等根据 *ArrA*的保守序列设计引物用于检测 *arrA*基因,他们将此引物应用于 13株有异化砷还原作用的不同种细菌和一株古菌,除了古菌外所有的细菌都能扩增出相应片段的目的基因,此结果证明了该引物能够用于环境中大多数细菌 *arrA*基因的检测,但检测不出古菌的 *arrA*基因^[30]。

2006年, *Kull*等在 *Malasam*设计的引物基础上增添了古菌偏好的密码子,将这一引物 *HAarrA*应用于 *Mono*和 *Searle*两个极端湖泊沉积物中的 *arrA*基因检测。实验表明该引物相比前一引物能显著增加 *arrA*基因扩增量,但所扩增基因是否为古菌 *arrA*基因仍有待进一步考证^[32]。同时通过克隆文库所得到的 *arrA*基因序列与 *Hollibaugh*发表的关于 *Mono*湖水体的序列相似度普遍为 80%^[32],显示了此序列具有一定的基因多样性。

*Song*等使用 *Malasam*设计的引物检测不到美国受砷污染的切萨皮克湾(*Chesapeake Bay*)沉积物中的 *arrA*基因。随后他们根据 *B. selenitireducens*, *C. arsenatis*, *Shewanella* sp. Strain ANA-3, *D. hafniense*和 *Wolfinella succinogenes* 5种菌的 *arrA*保守序列设

计了 3 个引物 (AS1F、AS1R 和 AS2F)。Lear、Pedrick、Oates 和 Song 等人利用该引物成功扩增了砷污染沉积物和地下水中的 *arsA* 基因^[33-35]。Song 等在此基础上又增加了一个特异性高于 AS1R 的引物 AS2R 同样通过巢式 PCR 检测到了切萨皮克湾沉积物中的 *DARPs*^[36]。本研究组也正在开展对水稻土中 *arsA* 等砷还原基因的定量及多样性研究,以期了解水稻根际环境中砷还原微生物的种群、数量及其与水稻吸收砷的关系。

1.2 细胞质砷还原

细胞质砷还原是微生物抗砷的一种重要解毒机制。该机制由 *ars* 操纵子编码的一系列酶共同协作,先将进入细胞质内的 $As(V)$ 还原为 $As(III)$,再通过一定的运载蛋白将 $As(III)$ 泵出细胞,降低细胞内砷浓度从而达到对细胞解毒的作用。目前对细胞质砷还原的基因、表达调控机制以及相关酶的结构等方面都研究的比较充分。

1.2.1 *ars* 操纵子基因类型

调控细胞质砷还原过程的 *ars* 基因操纵子广泛分布于许多革兰氏阴性菌 (α 变形菌纲和 β 变形菌纲)以及革兰氏阳性菌厚壁菌门^[9],有多种不同的基因编排方式,最常见的是 *arsRDABC* 和 *arsRBC*。*arsRDABC* 是最早测到的 *ars* 基因型,大肠杆菌质粒 R773、R46 以及 *Acidophilus multivorum* 的 *ars* 基因属于此种类型^[37-38],R46 跟 R773 的 *ars* 蛋白氨基酸序列只有 7%—15% 的差异,可以推测该基因在 1 200 万年前就开始在进化上出现分歧^[39]。另一种研究较深入且分布更广泛的基因型是 *arsRBC* 典型例子是大肠杆菌染色体^[40]、*P. fluorescens* MSP 染色体^[41]和葡萄球菌质粒 (Pb58、PSX267)^[37]。*arsRDABC* 和 *arsRBC* 都只有一个起始位点,朝一个方向转录。还有其他一些菌株具有特殊的基因型,如 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 的 *ars* 基因由转录方向相反的两个操纵子 *arsRC* 和 *arsBH* 组成^[42],而 *Yersinia* 质粒 YopB 与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 一样具有 4 个基因 *arsHRBC*,但在编排顺序和转录方向上又有所不同^[39]。*ars* 基因类型的多样化,也进一步验证了该基因在很早的时候就开始进行多次不同方向的进化。不同基因型在砷抗性和环境耐受性方面是否有进化上的先后及优劣目前未见全面的报道。

1.2.2 *ars* 操纵子调控机制

虽然拥有多种基因类型,但 *arsR*、*arsD* 和 *arsC3* 个基因是 *ars* 操纵子的核心部分。*ArR* 是阻遏蛋

白,主要作用是调节其他 *ars* 基因的表达,当与 *ars* 启动子结合时会抑制其他 *ars* 基因的转录表达;*ArB* 是膜载体蛋白,能单独利用膜势能 (membrane potential) 将亚砷酸盐排出细胞,也可与 *ArA* 形成复合物,利用 *ArA* (ATP 酶) 水解产生的能量排出 $As(III)$;*ArC* 是砷酸盐还原酶,负责将进入细胞内的 $As(V)$ 还原为 *ArB* 的底物 $As(III)$ 。*ArD* 是金属伴侣,能增强 $As(III)$ 与 *ArA* 的结合能力。下文将逐一介绍 *ars* 操纵子各部分表达产物的晶体结构和作用机理等进行描述。

(1) *ArR* *ArR* 是一个约 13 kDa 大小的二聚体蛋白质^[43-44]。正常状态下,*ArR* 上起主要作用的 3 个半胱氨酸残基 (Cys32、Cys34 和 Cys37) 区域形成 α -helix-helix 超二级结构,此时 *ArR* 结合于其他 *ars* 基因的启动子上从而遏制其他基因的转录。当细胞内存在一定浓度的 $As(III)$ 、 $As(V)$ 或 $Sb(III)$ 时,*ArR* 被诱导发生构象改变,此时 3 个半胱氨酸残基经过翻转和相互靠近形成能结合 $As(III)$ 或 $Sb(III)$ 的构象,并与 $As(III)$ 或 $Sb(III)$ 结合,结合后的 Cys32 和 Cys37 不能形成 α 螺旋结构,从而 *ArR* 由 DNA 上脱落下来使得其他 *ars* 基因得以表达 (图 2)。目前发现的 *ArR* 基因相似性都比较高,同时也与其他金属的抗性基因 (包括 Cd(II)、Hg(II)、Pb(II) 和 Zn(II) 等) 的阻遏蛋白相似^[44]。

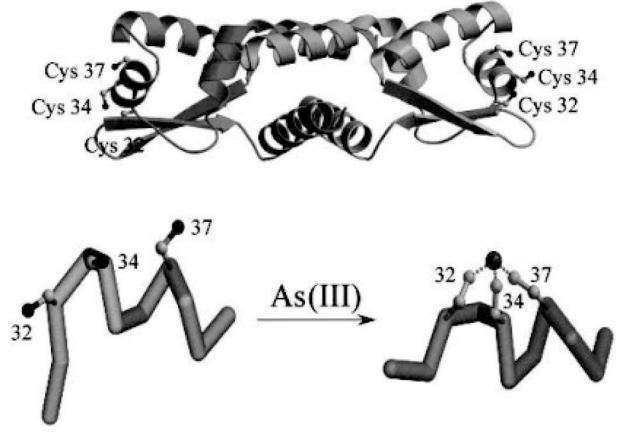


图 2 基于蓝藻金属硫蛋白 (smA) 的 mRNA 合成阻遏蛋白 SmB 晶体结构建立的 *ArR* 阻遏蛋白结构模拟图^[39] (注:上图为带有能与 DNA 操纵子结合的 α -helix-loop- α -helix 结构的 *ArR* 二聚体;下图左为 Cys32、Cys34 和 Cys37 3 个半胱氨酸区域折叠成不能结合 $As(III)$ 的 α 螺旋;下图右为 3 个半胱氨酸区域展开形成能结合 $As(III)$ 的结构。)

Fig. 2 Model for *ArR* repressor protein based on crystal structure of the related SmB repressor of cyanobacterial metallochionein (smA) mRNA synthesis

(2) *ArsB*和 *ArsA* *ArsB*是一个约 45 kDa大小的膜蛋白, N和 C末端均在细胞质内, 有 12个跨膜片段贯穿细胞膜^[46]。在一些革兰氏阴性菌的质粒中编码的 *ArsB*与 ATP酶 *ArsA*组成 *ArsAB*复合物, *As(III)*可激发 *ArsA*活性使其提供能量给 *ArsB*从而将 *As(III)*泵出细胞外。而大多数具有细胞质砷还原基因的细菌染色体以及革兰氏阳性菌的质粒中, 未发现有 *arsA*基因, 此时 *ArsB*通过膜势能 (membrane potential)单独将 *As(III)*运出体外^[47]。不同菌种的 *ArsB*序列相似性较高, *Pb58*的 *arsB*基因能在大肠杆菌中表达, 甚至 *Pb58*与 *R773*的 *arsB*杂合体也能在大肠杆菌中表达^[48-49]。由于膜蛋白的提取纯化较困难, 因此目前还没有 *ArsB*晶体结构的报道。

*R773*的 *ArsA*由 583 个氨基酸残基组成, 能被 *As(III)*和 *Sb(III)*诱导, 通过一个短肽连接 *A1*和 *A2*两部分。在 *A1*和 *A2*交界处有一个金属结合位点 MBD和两个核苷酸结合位点 NBD。两个 NBD分别位于 *A1*和 *A2*上。MBD拥有 3 个能高度结合 *As(III)*的半胱氨酸残基 (*A1*上的 *Cys113*和 *Cys172*以及 *A2*上的 *Cys442*)。它与 *As(III)*或 *Sb(III)*结合后能触发 ATP水解, 从而为 *ArsB*排出 *As(III)*提供能量^[50-52]。

(3) *ArsC* 研究发现 *ArsC*序列有 3 个亲缘关系疏远的分支, 它们的还原机制以及活性区域半胱氨酸残基的位置不同, 但却同样有还原砷的功能。第一种与硫氧还蛋白还原酶 (*Trx reductase*)相近, 最早发现于革兰氏阳性细菌中, 而后在许多革兰氏阴性菌中也有发现, *Staphylococcus aureus*质粒 *Pb58*, *B. subtilis*和 *P. putida*均属此类; 第二种与谷氧还蛋白—谷胱甘肽还原酶 (*Glx-GSH reductase*)相近, 大肠

杆菌质粒 *R773*, *R46* *Shewanella Alcaligenes*以及大多数革兰氏阴性菌的质粒和染色体上的 *ArsC*属于此类; 第三种是依赖于谷氧还蛋白的砷酸盐还原酶, 多分布在真菌中^[22-39-53]。

第一个砷酸盐还原酶发现于葡萄球菌质粒 *Pb58* 与硫氧还蛋白型还原酶相似, 是 LMW PTPase (low molecular weight Protein Tyrosine Phosphatase)类似物 (图 3)。该 *ArsC*还原酶是一个约 135 个氨基酸残基组成的单亚基蛋白, 含有 3 个参与酶活性必须的半胱氨酸, 未发现其他无机盐辅助因子。位于 *ArsC*上的 3 个半胱氨酸中, *Cys10*先与 *As(V)*形成 *As-S*键, 而后 *As(V)*被还原为 *As(III)*, 从 *ArsC*上脱落同时形成第一个中间体 *Cys10-S-S-Cys82*。紧接着第一个二硫键断裂形成第二个中间体 *Cys82-S-S-Cys89*。最后依次由硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶和 NADH将二硫键断裂, 恢复还原态的半胱氨酸。*Pb58*的 *ArsC*与 *R773*和真菌的 *ArsC*同源性很低, 但都同样有一个 *Cys-Xn-Alg*离子结合模序 (*P-loop*), 它同时也是酪氨酸磷酸酶的催化模序, 其相似度达到了 64%^[54]。

大肠杆菌质粒 *R773*的 *ArsC*与谷氧还蛋白—谷胱甘肽还原酶相似 (图 3); *As(V)*先与 *ArsC*上的半胱氨酸 *Cys12*形成 *As-S*共价键, 随后谷胱甘肽 (*GSH*)上的半胱氨酸与 *Cys12*形成 *Cys-S-S-Cys*中间体, 这一过程中将 *As(V)*还原为 *As(III)*, 并从半胱氨酸残基上释放。最后谷氧还蛋白 (*Glx*)上的半胱氨酸残基再将中间体 *Cys-S-S-Cys*的二硫键打破, 形成还原态半胱氨酸供下一次还原 *As(V)*用。催化残基 *Cys12*被两个 β 折叠组成的环抱于中间, 由邻近的正电荷激发, 环以 *His8*起始终止于 *Ser15*^[55]。

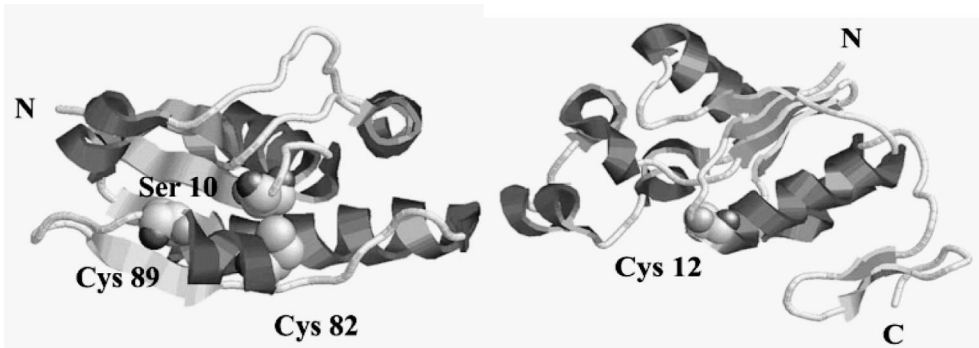


图 3 葡萄球菌质粒 *Pb58*(左)和大肠杆菌质粒 *R773*的 *ArsC*(右)晶体结构图^[53]
Fig 3 The crystal construction of *ArsC* from *Staphylococcus Pb58* (left) and *E. Coli R773* (right)

(4) *ArsD*和 *ArsH* *ArsD*是 *ArsAB*复合物的金属分子伴侣,负责将 $As(V)$ 或 $Sb(III)$ 转运给 *ArsA*增加 *ArsA*与 $As(III)$ 的结合,从而加强细胞对 $As(III)$ 的排出和在环境中的砷抗性。大肠杆菌 R773 的 *ArsD*拥有 3 对半胱氨酸,每对由相邻的两个半胱氨酸残基组成 ($Cys12-Cys13$, $Cys112-Cys113$ 和 $Cys119-Cys120$),这些残基可各自结合一个 $As(III)$ 或 $Sb(III)$ 。Li 等通过缺失单个或一对半胱氨酸的突变菌实验,证明 $Cys12$ 、 $Cys13$ 和 $Cys18$ 是转运 $As(III)$ 的必要元件并且具有活化 *ArsAB*的功能^[50]。

*ArsH*是依赖于 $NADH$ 、 FMN 的黄素蛋白,可将 O_2 还原为过氧化氢,也可催化偶氮染料的还原,目前已有来自于 *Shigella flexneri*、*Sinorhizobium meliloti* 的 *ArsH*晶体结构^[56-58],但对 *ArsH*在细胞砷抗性中的作用仍不清楚^[57]。

1.2.3 真菌中的细胞质砷还原

在真菌和藻类中砷还原基因的研究不多。1997 年在真菌 *Saccharomyces cerevisiae* 中发现了砷还原基因簇,其 3 个基因 *ARR1*、*ARR2*、*ARR3* 表达的蛋白功能分别可对应于 *ArsR*、*ArsC*、*ArsB*^[59]。分别单独敲除 *ARR1* 和 *ARR3* 基因都会导致对砷酸盐和亚砷酸盐的高敏感性,而敲除 *ARR2* 只会降低对砷酸盐的抗性^[60-61]。真菌 *ARR2* 基因可在大肠杆菌中表达,与大肠杆菌 R773 的 *ArsC* 相似,*ARR2* 同样由还原酶上的半胱氨酸与 GSH 的半胱氨酸形成二硫键来还原 $As(V)$,同时自身形成氧化态的中间体,最后由谷氧还蛋白将其还原^[62]。除了 *ARR* 基因簇之外,还有另一种真菌蛋白 *Ycf1p* 通过将谷胱甘肽络合物 $As(GS)_3$ 从细胞质泵入液泡中达到抗砷目的。该蛋白位于液泡内,是一种 *ABC* *ATP* 酶^[60]。

2 微生物砷还原作用在环境砷污染治理中的意义

微生物的砷还原作用,使砷在环境中的可移动性和毒性增强,并能够引起地下水等饮用水源的砷污染,对人体健康造成潜在的威胁。但从另一方面讲,微生物将 $As(V)$ 从固体矿物中释放出来,还原为可溶性强的 $As(III)$,这一作用可用于尾矿区等砷污染严重地区土壤中砷的去除。2008 年 Yamamura 等人利用异化砷还原菌 *Bacillus selenatarsenatis* 进行土壤除砷实验,两种砷污染土壤都来自日本一工厂旧址,砷含量分别为 250 和 1 400 $mg\ kg^{-1}$ 。他们在实验中加入醌类物质 (*AQDS*) 与 *Bacillus selenatarsenatis* 共同作用,对两种土壤中砷的去除率分别达到 56% 和 40%。实验证明 *AQDS* 在有 *Bacillus selenatarsenatis*

atarsenatis 的实验条件下可以还原 $Fe(III)$ 并使其溶解,使吸附的 $As(V)$ 得以释放从而提高砷的去除效率,同时实验还证明除砷后土壤的其他矿质营养元素并无太大的流失^[63]。蜈蚣草是典型的砷超积累植物,目前已很好地应用于砷污染土壤的治理。Zhao 等^[64] 将含有 *arsB* 基因的丛毛单胞菌 *Coccomonas* sp. TS37 接种于蜈蚣草根际土中,结果证明接种该菌能增加蜈蚣草对砷的积累。利用微生物与砷超积累植物的联合修复作用去除砷也是科学家们在积极探索的一个土壤砷污染治理途径。

ArsR 对砷有很强的亲和性,过量表达的 *ArsR* 能将大量砷积累在细胞内,达到从环境中去除砷的效果。Kosta 等将 *ArsR* 与类似弹性蛋白的多肽融合后在大肠杆菌中过量表达,证明该工程菌在不影响自身生长的情况下,对 $As(V)$ 和 $As(III)$ 的积累量相比对照组细菌分别提高了 5 和 60 倍;*ArsR* 对 $As(III)$ 的高效富集使该菌 1 h 内对含 50 $\mu g\ L^{-1}$ $As(III)$ 的污水去除率达到 100%^[65]。另有研究将 *ArsC* 基因与能大量生产半胱氨酸的 γ 谷酰基半胱氨酸合成酶基因同时在模式植物拟南芥中表达,*ArsC* 在植物体内将 $As(V)$ 还原成 $As(III)$,过量的谷胱甘肽再将 $As(III)$ 整合固定在液泡内,通过此方法拟南芥不仅增强了耐砷性并且能超量富集砷^[66]。基因工程技术在环境砷污染治理中的应用仍处在基础研究阶段,如何将其推广应用到实际工程上仍是需要突破的一大难点。

3 展 望

杀虫剂的使用和中水农田灌溉等人为活动导致的环境砷污染问题仍普遍存在。地下水等饮用水源的砷污染已经威胁到了区域人群的健康,而微生物的砷还原作用将吸附于固体上的砷引入液相恰恰会加重这一污染过程。因此其作用机理和影响因子等方面研究日显重要。目前关于微生物砷还原作用大多基于纯培养细菌的研究,但环境中存在众多不可培养的砷还原菌,这些细菌也有着不可忽视的影响,对它们的研究有助于更全面地认识环境中的微生物砷还原作用。*PCR* 等分子生物学技术为检测环境中具有特殊功能的不可培养的微生物提供了重要手段,设计适用范围广且特异性高的引物仍是需要不断完善的一个研究方向。

对于异化砷还原微生物,还需要更多关于异化砷还原酶晶体结构和作用机理方面的研究来增加对其还原机制的认识,通过基因敲除等分子生物学技

术研究, an 基因的表达调控机理也是值得深入的领域。同时, 研究环境中微生物砷还原基因表达的影响因素 (pH 值、营养盐和温度等) 有助于了解其在环境尺度上的作用条件, 一方面可以为抑制环境中的不利表达提供参考, 另一方面可以为砷污染的微生物修复提供依据。在技术上, mRNA 提取和基因芯片等应用也为功能基因的表达研究提供了可能。

通讯作者简介: 叶军 (1971—), 男, 理学博士, 现任中国科学院城市环境研究所副研究员。

参考文献:

- [1] Smith A H, Lopez P A, Bates M N, et al. Arsenic epidemiology and drinking water standards [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2145—2146
- [2] Tsai S L, 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
- [3] Orm and R S, Saltikov C W, Wolfe-Simon F, et al. Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2009, 26(7): 522—536
- [4] Wolfe-Simon F, Blum J S, Kulp T R, et al. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus [J]. *Science*, 2011, 332(6034): 1149
- [5] Paez Espino D, Tananes J, De Lorenzo V, et al. Microbial responses to environmental arsenic [J]. *Biomaterials*, 2009, 22(1): 117—130
- [6] Tanaka S, Frankenberger W T Jr. Environmental biochemistry of arsenic [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 124: 79—110
- [7] Lloyd J R, Orm and R S. Microbial transformations of arsenic in the environment: From soda lakes to aquifers [J]. *Elements*, 2006, 2(2): 85
- [8] Reyes C, Lloyd J R, Saltikov C W. Geomicrobiology of Iron and Arsenic in Anoxic Sediments [M]. *Arsenic Contamination of Groundwater: Mechanism, Analysis and Remediation*, 2008, 123—146
- [9] Niggemeyer A, Spring S, Stackebrandt E, et al. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium. Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfobacterium* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5568—5580
- [10] Liu A, Garcia-Dominguez E, Rhine E, et al. A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 48(3): 323—332
- [11] Orm and R S, Solz J F. The ecology of arsenic [J]. *Science*, 2003, 300(5621): 939—944
- [12] Ahmann D, Roberts A L, Krumholz L R, et al. Microbe grows by reducing arsenic [J]. *Nature*, 1994, 371(6500): 750
- [13] Jackson C R, Dugas S L, Harrison K G. Enumeration and characterization of arsenate resistant bacteria in arsenic free soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(12): 2319—2322
- [14] Ahmann D, Krumholz L R, Hemond H F, et al. Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed [J]. *Environmental Science & Technology*, 1997, 31(10): 2923—2930
- [15] Macy J M, Nunan K, Hagen K D, et al. *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate respiring bacterium isolated from gold mine wastewater [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1996, 46(4): 1153—1157
- [16] Newman D K, Beveridge T J, Morel F M M. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(5): 2022—2028
- [17] Huber R, Sacher M, Vollmann A, et al. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(3): 305—314
- [18] Hoeft S E, Solz J S, Orm and R S. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: Experiments with Mono Lake water and isolation of strain MIMS-1, a chemolithotrophic arsenate respirer [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 2741—2747
- [19] Blum J S, Han S, Lanoil B, et al. Ecology of "Halarsenatibacter silvemanii" strain SLAS1 (T), gen. nov., sp. nov., a facultative chemolithotrophic arsenate respirer from salt saturated Searles Lake, California [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(7): 1950—1960
- [20] Blum J S, Bums B A, Buzzelli J, et al. *Bacillus arsenicoelenatis* sp. nov., and *Bacillus selenitireducens* sp. nov.: Two halobacterial Philes from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic [J]. *Archives of Microbiology*, 1998, 171(1): 19—30
- [21] Ghring T M, Banfield J F. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 204(2): 335—340
- [22] Silver S, Phung L T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(2): 599—608
- [23] Krafft T, Macy J M. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 255(3): 647—653
- [24] Afkar E, Lisak J, Saltikov C W, et al. The respiratory

- arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10 [J]. *FEMS Microbiology Letters* 2003 226 (1): 107—112
- [25] Majum D, Keeffe JR, Newman DK. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3 [J]. *Journal of Bacteriology* 2008 190 (1): 135—142
- [26] Saltikov CW, Newman DK. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 100(19): 10983—10988
- [27] Murphy JN, Saltikov CW. The ArsR repressor mediates arsenite dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp. Strain ANA-3 [J]. *Journal of Bacteriology* 2009 191(21): 6722—6731
- [28] Murphy JN, Durbin K J, Saltikov CW. Functional roles of *arcA*, *etfA*, cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein, and *cya* in the arsenate respiration pathway in *Shewanella* sp. Strain ANA-3 [J]. *Journal of Bacteriology* 2009 191(3): 1035—1043
- [29] Murphy JN, Saltikov CW. The *cymA* gene encoding a tetraheme c-type cytochrome is required for arsenate respiration in *Shewanella* species [J]. *Journal of Bacteriology* 2007 189(6): 2283—2290
- [30] Majum D, Saltikov CW, Campbell KM, et al. *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration [J]. *Science* 2004 306(5695): 455
- [31] Kulp TR, Hoeft SE, Miller LG, et al. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in sediments of two hypersaline arsenic-rich soda lakes, Mono and Searles Lakes, California [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2006 72(10): 6514—6526
- [32] Hollibaugh JT, Budinoff C, Hollibaugh RA, et al. Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a soda Lake [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2006 72(3): 2043—2049
- [33] Lear G, Song B, Gault AG, et al. Molecular analysis of arsenate reducing bacteria within cambodian sediments following amendment with acetate [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2007 73(4): 1041—1048
- [34] Oates H, Song B. Molecular Detection of Dissimilatory Arsenate respiring Bacteria in North Carolina Groundwater [M]. *Arsenic Contamination of Groundwater: Mechanism, Analysis and Remediation* 2008 83—94
- [35] Pederick R, Gault A, Chamock J, et al. Probing the biogeochemistry of arsenic: Response of two contrasting aquifer sediments from Cambodia to stimulation by arsenate and ferric iron [J]. *Journal of Environmental Science and Health* 2007 42(12): 1763—1774
- [36] Song B, Chyun E, Jaffé P R, et al. Molecular methods to detect and monitor dissimilatory arsenate respiring bacteria (DARB) in sediments [J]. *FEMS Microbiology Ecology* 2009 68(1): 108—117
- [37] Silver S. Genes for all metals— a bacterial view of the periodic table [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998 20(1): 1—12
- [38] Suzuki K, Wakao N, Kinura T, et al. Expression and regulation of the arsenic resistance operon of acidophilic multivitamin AU 301 Plasmid pKW301 in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 1998 64(2): 411—418
- [39] Silver S, Phung L T, Rosen B P. Arsenic Metabolism: Resistance, Reduction, and Oxidation [M]. *Environmental Chemistry of Arsenic* 2002 247—272
- [40] Carlin A, Shi W, Dey S, et al. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance [J]. *Journal of Bacteriology* 1995 177(4): 981—986
- [41] Prithiviraj Singh S, Mishra S K, Mahadevan A. Detection and analysis of chromosomal arsenic resistance in *Pseudomonas fluorescens* Strain MSP3 [J]. *Biophysical and Biophysical Research Communications* 2001 280(5): 1393—1401
- [42] Butcher BG, Deane SM, Rawlings DE. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2000 66(5): 1826—1833
- [43] Shi W, Dong J, Scott RA, et al. The role of arsenic thiol interactions in metal regulation of the *ars* operon [J]. *Journal of Biological Chemistry* 1996 271(16): 9291—9297
- [44] Xu C, Rosen B P. Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metal regulatory protein of *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry* 1997 272(25): 15734—15738
- [45] Xu C, Rosen B P. Metal regulation of soft metal resistance pumps [M]. *Metals and Genes* 1999 5—19
- [46] Wu J, Tisa L, Rosen B. Membrane topology of the ArsB protein: the membrane subunit of an anion translocating ATPase [J]. *Journal of Biological Chemistry* 1992 267(18): 12570
- [47] Dey S, Rosen B. Dual mode of energy coupling by the oxyanion translocating ArsB protein [J]. *Journal of Biological Chemistry* 1995 177(2): 385—389
- [48] Ji G, Silver S. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pB58 [J]. *Journal of Biological Chemistry* 1992 174(11): 3684—3694
- [49] Dou D, Dey S, Rosen B P. A functional chimeric mem-

- brane subunit of an ion translocating ATPase [J]. *Antonie van Leeuwenhoek* 1994 65(4): 359—368
- [50] Zhou T Radaev S Rosen B P et al Structure of the ArsA ATPase: The catalytic subunit of a heavy metal resistance pump [J]. *The EMBO Journal* 2000 19(17): 4838—4845
- [51] Zhou T Radaev S Rosen B P et al Conformational changes in four regions of the Escherichia coli ArsA ATPase link ATP hydrolysis to ion translocation [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2001 276(32): 30414—30422
- [52] Lin Y F Yang J Rosen B P Arsd An As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase [J]. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2007 39(5): 453—458
- [53] Mukhopadhyay R Rosen B P Pung L T et al Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes [J]. *FEMS Microbiology Reviews* 2002 26(3): 311—325
- [54] Zegers J Martins J C Willen R et al Arsenate reductase from *S. aureus* Plasmid P_{h58} is a Phosphatase drafted for redox duty [J]. *Nature Structural Biology* 2001 8: 843—847
- [55] Martin P D Miel S Shi J et al Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase: a novel arsenic detoxification enzyme [J]. *Structure* 2001 9(11): 1071—1081
- [56] Vorontsov I I Minasov G Brunzelle J S et al Crystal structure of an apo form of Shiga toxin A₁ protein with an NADPH-dependent IMN reductase activity [J]. *Protein Science* 2007 16(11): 2483—2490
- [57] Ye J Yang H C Rosen B P et al Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti* [J]. *FEBS Letters* 2007 581(21): 3996—4000
- [58] Wu X L Miao B Han J et al Purification and enzymatic properties of arsenic resistance protein ArsH from heterogeneous expression in *E. coli* BL21 [J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2010 20(10): 1987—1992
- [59] 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* [J]. *Yeast* 1997 13(9): 819—828
- [60] Ghosh M Shen J Rosen B P Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999 96(9): 5001—5006
- [61] Mukhopadhyay R Rosen B P *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase [J]. *FEMS Microbiology Letters* 1998 168(1): 127—136
- [62] Mukhopadhyay R Shi J Rosen B P Purification and characterization of Acr2p the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2000 275(28): 21149—21157
- [63] Yamamura S Watanabe M Kanazaki M et al Removal of arsenic from contaminated soils by microbial reduction of arsenate and quinone [J]. *Environmental Science & Technology* 2008 42(16): 6154—6159
- [64] 赵根成, 廖晓勇, 阎秀兰, 等. 微生物强化蜈蚣草累积土壤砷能力的研究 [J]. *环境科学*, 2010 31(2): 431—436
- Zhao G C Liao X Y Yan X L et al Enhancement of As accumulation by *Pteris vittata* L. affected by microorganisms [J]. *Environmental Sciences* 2010 31(2): 431—436 (in Chinese)
- [65] Kosal J Yang R Wu C H et al Enhanced arsenic accumulation in engineered bacterial cells expressing ArsR [J]. *Applied and Environmental Microbiology* 2004 70(8): 4582—4587
- [66] Dhankher O P Li Y Rosen B P et al Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression [J]. *Nature Biotechnology* 2002 20(11): 1140—1145