

# 安徽铜陵尾矿堆中三价砷抗性菌株的分离、鉴定及 16S rDNA 分析

赵兴青 李成祥 王汝成 陆现彩 陆建军 胡 欢

(内生金属矿床成矿机制研究国家重点实验室, 南京大学 地球科学与工程学院, 江苏 南京 210093)

**摘要:** 从安徽铜陵杨山冲尾矿库采集表层尾矿样品, 通过丰富集培养, 从 3 份样品中筛选得到 3 株具有较强 As(Ⅲ) 抗性的细菌 WK-21、WK-31 和 WK-32, 用不同 NaAsO<sub>2</sub> 浓度的 LB 培养基对菌株进行砷抗性检测, 结果这 3 株菌分别能耐受 32、56 和 50 mmol/L 的 As(Ⅲ), 具有较高的耐砷性。对这 3 株菌进行不同梯度浓度 As(Ⅲ) 环境中的生长规律研究, 结果表明砷在低浓度时对细菌生长有轻微促进作用或者几乎没影响, 但随着砷浓度增大, 抑制作用明显增强。根据对这 3 株菌进行形态观察、生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列比对分析, 鉴定出这 3 株菌分别属于 *Arthrobacter* sp.、*Rhodococcus equi* 和 *Paenibacillus* sp. 菌属。由于这些菌株分离于尾矿库的尾矿堆中, 因此, 本文研究结果为进一步研究尾矿库金属污染的微生物修复及微生物抗金属机制提供了材料。

**关键词:** 尾矿 分离鉴定 砷抗性菌 耐受性 16S rDNA 进化树

中图分类号: X172; Q93-335

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2009)06-0513-07

## Isolation, identification and 16S rDNA sequences analysis of arsenic-resisting bacteria from mine tailing dumps of Tongling in Anhui Province

ZHAO Xing-qing, LI Cheng-xiang, WANG Ru-cheng, LU Xian-cai, LU Jian-jun and HU Huan  
(State Key Laboratory for Mineral Deposit Research, School of Earth Sciences and Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Three bacteria strains resistant to arsenic(Ⅲ), named WK-21, WK-31 and WK-32, were enriched with  $2 \times 10^{-3}$  mol/L NaAsO<sub>2</sub> and isolated on plates from the three pieces of rock (or soil) samples from Yangshanchong mine tailing dumps of Tongling in Anhui Province. These strains are all aerobiotic and have a high resistance to arsenic(Ⅲ), and are respectively resistant to the most arsenic(Ⅲ) of 32, 56 and 50 mmol/L after being cultivated for 48 hours on the solid LB medium. Through a study of their growth in different concentrations of arsenic(Ⅲ), the authors found that the arsenic of low concentration made a small impact on or even slightly promoted the bacteria's growth and that, when the concentration of arsenic(Ⅲ) increased, the suppression of the growth was clearly enhanced. Based on a careful observation of the three strains' morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences, the authors identified the three strains as *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus equi* and *Paenibacillus* sp., respectively. Since these arsenic-resisting strains were isolated from the soil samples of mine tailing dumps, the data obtained are likely to provide valuable materials for further studies of the environmental microbial remediation in the same kind of areas polluted by heavy metals and the mechanism for microbial resistance to heavy metals.

**Key words:** mine tailing; isolation and identification; arsenic-resisting bacteria; tolerance; 16S rDNA; phylogeny

砷元素在元素周期表中位于第 33 位, 是一种类金属, 广泛存在于岩石圈、水圈和生物圈(Cullen and Reimer, 1989)。

砷是一种无色无味的有毒元素, 超过一定剂量时会对人体健康产生毒害, 造成皮肤角质化, 甚至诱发皮肤癌、肺癌和肝癌。

收稿日期: 2009-09-01; 修订日期: 2009-10-15

基金项目: 国家重点基础研究发展规划"973"项目(2007CB815603); 中国博士后科学基金项目(20080431089)

作者简介: 赵兴青(1974-), 女, 博士后, 主要研究领域为环境生物学和地质微生物学, 通讯作者: 王汝成, E-mail: rcwang@nju.edu.cn

因而引起世界范围内社会各界的广泛关注 (Hughes, 2002; USEPA, 2003)。2001年,世界卫生组织建议将饮用水中砷的最高限度由原来的  $50 \mu\text{g/L}$  降为  $10 \mu\text{g/L}$  (WHO, 2001)。砷化物对细菌也同样有害,主要由于作为磷酸盐类似物的砷酸盐,可被细菌的磷酸盐转移系统所转移 (Willsy and Malamy, 1981),从而干扰细胞内磷酸化中间体的形成,使细菌表现出“磷酸盐饥饿”症状 (Kaur and Rosen, 1992)。亚砷酸盐毒性更大,它可与蛋白的巯基作用,使酶失活 (Knowles and Benson, 1983)。因此,某些具有抗砷能力,可在一定浓度的砷污染环境正常生长的细菌,引起了人们的极大兴趣。近年来的研究表明,自然界中砷代谢微生物广泛参与了砷的地球化学循环,在砷的迁移与转化过程中起到关键作用 (Santini *et al.*, 2000; Saltikov *et al.*, 2003; Oremland *et al.*, 2004, 2005; Silver and Phung, 2005)。微生物在砷的生物地球化学循环中的作用得到了越来越多的地球化学家、微生物学家和环境科学家等的广泛关注,已逐渐成为国内外学者关注的焦点。

目前已发现了高砷环境中有一些菌种能够影响砷的迁移转化,如砷酸盐异化还原菌 (DARP)、亚砷酸盐氧化菌 [包括自养亚砷酸盐氧化菌 (CAO) 和异养亚砷酸盐氧化菌 (HAO)] (唐小惠等, 2008)。越来越多的与砷代谢有关的微生物被不断从环境中分离出来。目前报道的砷抗性菌主要有 *Bacillus arsenoxydans* (Green, 1918), *Pseudomonas arsenoxydans*, *Xanthomonas arsenoxydans*, *Achromobacter arsenoxydans* (Turner, 1949, 1954; Legge and Turner, 1954; Legge, 1954), *Alcaligenes faecalis* (Philips and Taylor, 1976), *Zoogloea* sp. ULPAs1 (Weeger *et al.*, 1999), *Agrobacterium* sp. NT-25、NT-26 (Santini *et al.*, 2000), *Hydrogenophaga* sp. YED6-4、YED6-21 和 YED1-18 (Salmassi *et al.*, 2006)。这些菌对三价砷的抗性一般在  $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  以下,而报道的最高抗性可达到  $100 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。它们主要来源于砷污染水 (Weeger *et al.*, 1999)、牛羊圈 (Green, 1918; Turner, 1949, 1954; Legge and Turner, 1954; Legge, 1954)、各种矿场 (Santini *et al.*, 2000)、海洋沉积物 (陈双喜等, 1995) 和热泉 (Salmassi *et al.*, 2006)。

很多天然矿床,特别是硫铁矿、金矿等,常常含有一定量的砷。酸性尾矿是常见的砷污染源 (Smith *et al.*, 1998)。本研究运用富集筛选,从安徽铜陵杨山冲尾矿库高砷污染环境中筛选出 3 株抗砷菌,并进行了形态学检验、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列比对,对它们的砷抗性范围及生长特性进行了初步分析,以期为后来的微生物参与的砷生物地球化学循环机制研究以及采用微生物治理砷污染问题提供宝贵的基础研究资料和试验材料。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

$\text{NaAsO}_2$ , 分析纯; PCR 相关试剂由 TaKaRa 提供; 立式双层恒温摇床 (江苏太仓市实验仪器厂); 生化培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); 超净工作台 (上海智诚分析仪器制造有限公司); PCR 扩增仪 (PTC-200, 美国 Bio-Rad); 紫外可见分光光度计 (UV-1800, 上海美诺达仪器有限公司); 扫描电镜 (JSM-6490, 日本)。

### 1.2 样品采集

于 2009 年 5 月在位于安徽省铜陵市狮子山鸡冠山铁矿附近的杨山冲尾矿库采集样品,采集后的样品立即于无菌的自封袋中带回实验室,于  $4^\circ\text{C}$  冰箱冷藏保存。3 个样品依次标记为: 1# (尾矿堆,  $\text{N}30^\circ 54' 32''$ 、 $\text{E}117^\circ 53' 40''$ , 砷含量  $1716.2 \text{ mg/kg}$ )、2# (矽卡岩风化后的矿山堆,  $\text{N}30^\circ 54' 17''$ 、 $\text{E}117^\circ 53' 50''$ , 砷含量  $174.5 \text{ mg/kg}$ )、3# (浅灰色沙质尾矿,  $\text{N}30^\circ 54' 32''$ 、 $\text{E}117^\circ 53' 40''$ , 砷含量  $158.1 \text{ mg/kg}$ ) (图 1)。

### 1.3 砷抗性菌的富集和分离

抗砷富集培养基: 每升双蒸水中含  $2.0 \text{ g NH}_4\text{NO}_3$ 、 $2.0 \text{ g}$  无水乙酸钠、 $0.5 \text{ g}$  酵母提取物、 $1.0 \text{ g}$  胰蛋白胍和  $0.2 \text{ g}$  葡萄糖, pH 值 7.5。灭菌后加入无菌  $\text{NaAsO}_2$  至终浓度  $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 。制备固体培养基时加入  $15.0 \text{ g}$  琼脂。

取尾矿样品  $1.0 \text{ g}$  于抗砷富集培养基中 (含  $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L NaAsO}_2$ )、 $30^\circ\text{C}$ 、 $150 \text{ r/min}$  摇床培养 3 天,取  $1 \text{ mL}$  富集液转接到新的抗砷富集培养基中,转接两次,同时将第 3 次

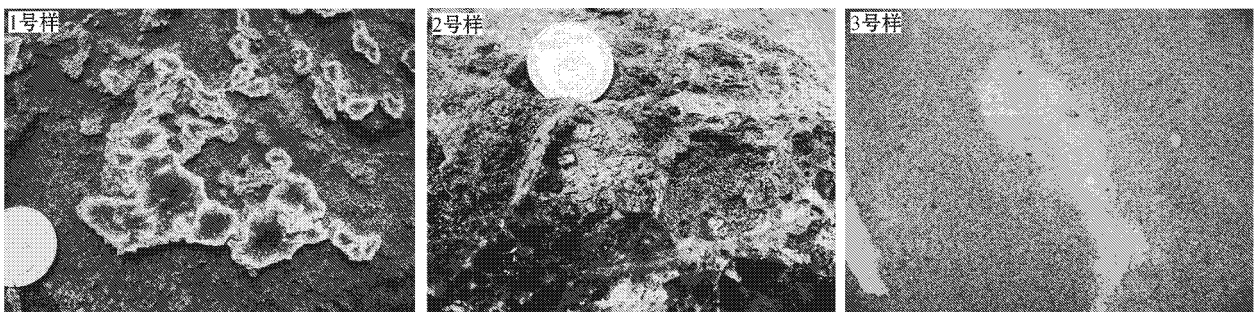


图 1 安徽铜陵狮子山尾矿样品

Fig. 1 Samples of Shizishan mine tailings in Tongling, Anhui Province

转接的富集物梯度稀释后涂布于含  $2 \times 10^{-3}$  mol/L NaAsO<sub>2</sub> 的富集培养基平板上, 30℃ 温箱培养 3 天后划线分离至纯培养, 获得单菌株, 将纯化的菌种放入 4℃ 冰箱中保存备用。

#### 1.4 砷抗性菌的筛选

在固体培养基中加入一定量的 NaAsO<sub>2</sub> 标准液, 使固体平板中 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 含量为  $5 \times 10^{-3}$  mol/L, 并将所筛选出的单菌株接种到该浓度平板上, 培养 2~3 d 后, 挑选出长势较好的菌株再接种到 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 含量为  $10 \times 10^{-3}$  mol/L 的培养基中再次培养筛选, 将筛选出的菌株依次接种到浓度为 20、30、40、50、60 mmol/L 的培养基中, 观察其生长情况, 逐步淘汰耐砷能力差的菌株, 并记录不同细菌的最高耐受浓度, 筛选出耐受力最高的菌株。

#### 1.5 分离菌株的鉴定

分离菌株的鉴定参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(Garrity *et al.*, 2004) 采用革兰氏染色法在光学显微镜下观察菌体形态, 并采用戊二醇固定, 乙醇逐级脱水, 冷冻干燥, 扫描电镜下放大观察细菌形态。生理生化测定采用微量生理生化测定管(杭州天和微生物试剂厂产品), 每管穿刺接种, 每一测试指标重复 3 管, 于 30℃ 培养, 定期观察结果。

#### 1.6 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

取对数期的菌液, 离心后收集菌体, 抽提基因组 DNA。依照细菌 16S rDNA 中最保守的序列设计并合成引物, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (由上海英骏生物技术有限公司合成) (Zheng *et al.*, 2009)。

PCR 反应体系 (50 μL) 为: 20 ng 的模板、20 pmol 正反向引物、200 μmol/L dNTP、5 μL 的 10×PCR buffer (不含 Mg-Cl<sub>2</sub>)、1.5 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>、2U 的 ExTaqDNA 聚合酶和适量的双蒸水补足 50 μL。

PCR 扩增反应程序, 即: 预变性条件为 94℃ 5 min, 30 个循环为 94℃ 1 min, 55℃ 1 min 和 72℃ 3 min, 最后在 72℃ 下延伸 8 min, 4℃ 保存。PCR 反应的产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 扩增产物送上海英骏生物技术有限公司测序, 最后将所得的序列提交到 GeneBank 登记, 在 GeneBank 数据库中用 BLAST 分析, 利用 ClustalX 1.8 进行比对, 通过 MEGA4 软件选用 Kimura-parameter 距离模型进行 neighbour-joining 分析生成系统发育树, 发育树用 Bootstrap 法 (1 000 次重复) 检验 (Kumar *et al.*, 2004)。

#### 1.7 不同砷浓度条件下细菌的生长曲线的测定

取新鲜培养基, 加入无菌的 NaAsO<sub>2</sub> 标准液, 培养液浓度梯度调整为 0、1、5、10 mmol/L, 同时接种受试菌 (处于对数期), 并保持初始的 OD 均为 0.03, 置于 30℃、150 r/min 的摇床之中进行培养, 每隔 4 h 用分光光度计测定 OD 值一次, 并做好记录, 共计 60 h, 绘制细菌在不同 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 浓度条件下细菌的生长曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 砷抗性菌的分离

经过含  $2 \times 10^{-3}$  mol/L NaAsO<sub>2</sub> 液体选择性培养基富集、同样浓度的抗性平板筛选, 初步筛选得到 10 株菌株, 通过复筛最终获得 3 株耐受力较强的 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 抗性菌。其中 1# 采样点未能获得纯培养, 2# 采样点样品中分离得到 1 株菌, 编号为 WK-21, 其对 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 的最高耐受性为 32 mmol/L, 3# 采样点样品中分离得到 2 株菌, 编号分别为 WK-31 和 WK-32, 对 A<sub>s</sub>(Ⅲ) 的最高耐受性分别为 56 mmol/L 和 50 mmol/L。3 株菌均为好氧菌, 其菌落特征如表 1, 其扫描电镜照片见图 2。

表 1 菌落的形态特征

Table 1 Characteristics of colonies

菌落	菌落形态	菌落大小/mm	细胞形态	表面
WK-21	圆形、隆起、边缘整齐、黄色	2	长杆状	湿润光滑
WK-31	圆形、淡粉色、蜡状、不透明	6	短杆状	湿润光滑
WK-32	圆形、淡粉色、边缘整齐、不透明	5	短杆或棒状	湿润光滑

### 2.2 生理生化试验结果

分离菌株的具体的生理生化实验结果见表 2, 从表 2 可知, 3 株菌均属于革兰氏阳性菌, 菌株 WK-21 与 WK-31 的理化性质较相近, 与 WK-32 性质差异明显, 不同种属的细菌生理生化性质不尽相同。

### 2.3 16S rDNA 序列分析

对 3 株菌的 16S rDNA 进行了扩增和测序。3 株菌的序列长度为 1 405、1 395 和 1 437 bp, 将序列输入生物技术信息

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) 与 GenBank 中已知序列比对, 发现它们与数据库中的已知序列相似性均大于 99%。从图 2 可以看出, 菌株 WK-21 与 *Arthrobacter* sp. J3.41 (DQ157999) 最相似, 相似性达到 100%; WK-31 和 *Rhodococcus equi* strain ATCC 6939 (FJ468329) 相似性也达到 100%; WK-32 和 *Paenibacillus* sp. 6495m-C2 (AJ509004) 应为同属, 它们的相似性达到 99%。将这 3 株菌的 16S rDNA 序列与已知相关种序列比对后构建了系统发育树 (图 3), 发现 WK-21、WK-31 和 WK-32 均处于一个独立的分支。

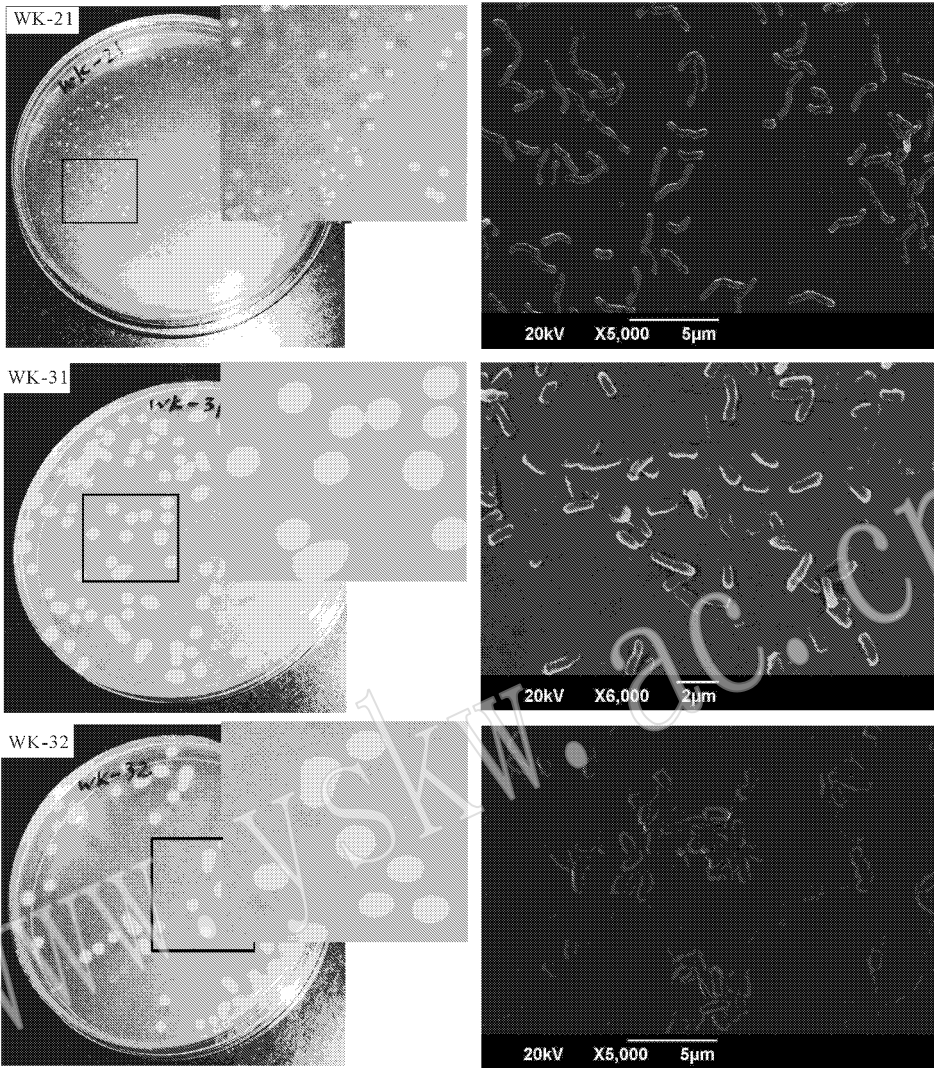


图 2 分离得到的 3 株砷抗性菌的电子扫描照片

Fig. 2 Electron micrographs of three isolated arsenic-resisting bacteria

表 2 分离得到的 3 株耐砷菌的表型特征

Table 2 Phenotypic features of three isolated arsenic-resisting bacteria

菌株	WK-21	WK-31	WK-32	菌株	WK-21	WK-31	WK-32
革兰氏染色	+	+	+	葡萄糖发酵(OF)	发酵型	发酵型	发酵型
运动性(半固体琼脂)	-	-	+	吡啶(蛋白胨水)	-	-	-
鞭毛(扫描电镜)	ND	ND	ND	半乳糖	-	-	+
生化	0% NaCl	+	+	柠檬酸盐枸橼酸盐	+	+	+
	3% NaCl	+	+	阿拉伯糖	-	-	+
	6% NaCl	-	+	葡萄糖酸盐	-	-	-
	过氧化氢酶	+	+	苹果酸	-	-	-
氧化酶	-	-	甘露糖	-	-	+	
脲酶	-	+	甘露醇	-	-	+	
精氨酸双水解酶	-	-	麦芽糖	-	-	+	
赖氨酸脱羧酶	+	+	松三糖	-	-	+	
鸟氨酸脱羧酶	+	+	棉子糖	-	-	+	
硝酸盐还原	+	+	核糖	+	+	+	
硝酸盐产气	-	-	乳糖	-	-	+	

+ 阳性; - 阴性; ND 无数据。

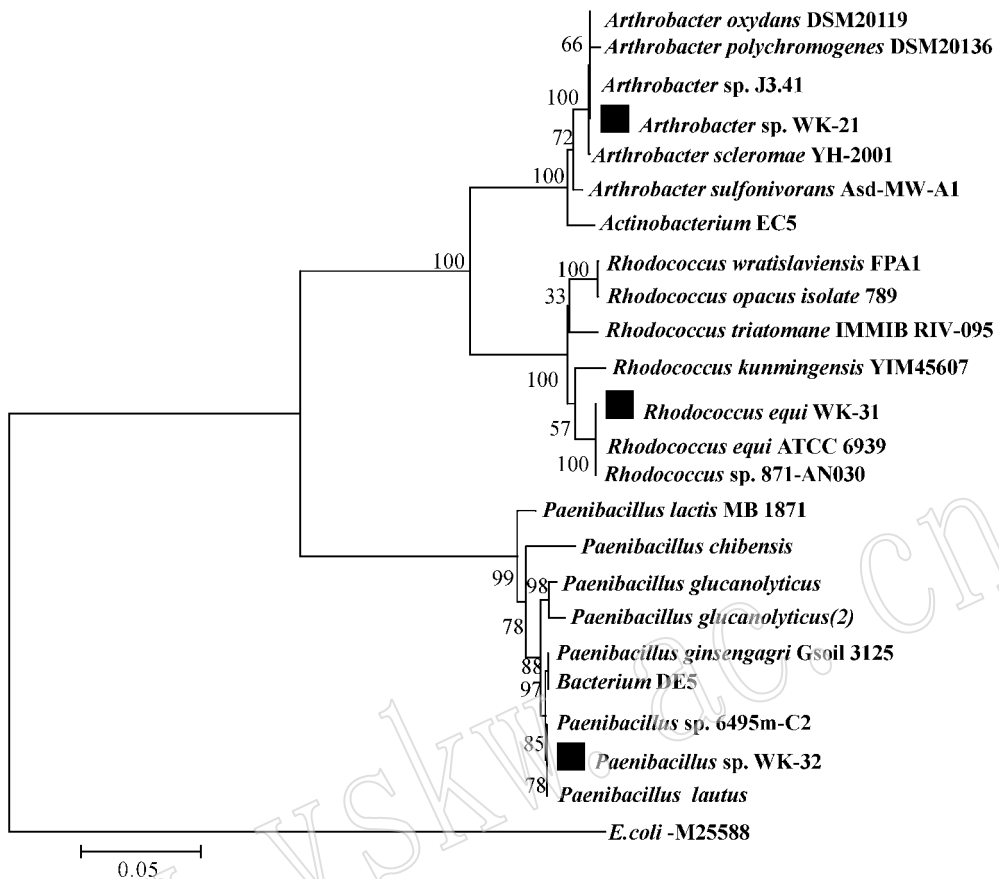


图 3 分离得到的 3 株耐砷菌的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of three isolated arsenic-resisting bacteria

## 2.5 不同砷浓度条件下细菌生长规律

图 4(a, b, c) 分别表示了 WK-21、WK-31 和 WK-32 在不同砷浓度条件下细菌的生长情况。

从图 4a 可知,在初期阶段(约 0~20 h),WK-21 细菌在含砷培养基中比在不含砷培养基中生长更为缓慢,尤其是 5 mmol/L 和 10 mmol/L 的迟缓期明显变长,更晚进入对数期,且对数期的上升斜率不大,说明砷对 WK-21 细菌的生长具有一定的抑制作用,且浓度越高,抑制作用越大,在 20 h 菌群数量进入稳定期后,可观察到 As 浓度为 1 mmol/L 的培养液中细菌数量又有一个缓慢的上升阶段,甚至细菌数量超过空白培养液,说明在细菌适应了低浓度的 As 溶液条件后,As 可能转变为促进细菌生长的一个有利因素,但反之之含高浓度 As 的培养液,细菌量仍保持较少数量,说明高浓度的 As 对 WK-21 组细菌生长仍有一定的抑制作用。

图 4b 表示 WK-31 细菌生长情况,可以观察到,整体上 1 mmol/L 的 As 浓度对细菌的影响并不明显,只是在最后进入到稳定期和衰亡期后细菌总量比空白组稍低,说明 WK-31 组细菌对低浓度的 As 抗性较强;而 5、10 mmol/L 的浓度则对细菌生长影响较大,不管处于何种阶段,细菌量一直少于空白组,说明高浓度的 As 会对 WK-31 组细菌生长产生抑制作用;

在迟缓期阶段,可明显观察到 As 对细菌的生长抑制作用,在 As 浓度越高的培养液中,细菌的增加量越少,增长速度越慢,说明细菌对含 As 环境的适应更加困难;但当进入到对数期时,含砷溶液中的细菌增长速度同样很高,说明细菌在适应含 As 环境后,生长能力仍然很强,且进入稳定期的时间也后延,说明 As 对其生长规律影响不是很大,仅是对生物量稍有影响。

图 4c 为 WK-32 组实验的结果,可以观察到,在培养初期阶段(约 0~20 h),空白组细菌生长依然较快,低浓度 As(1 mmol/L)对其影响不大,而高浓度则会对其产生明显的抑制作用,尤其是 10 mmol/L 的迟缓期大大延长(约 0~15 h),说明细菌需要一定的时间来调整以适应高浓度的含 As 环境,进而再进行增殖;此外,在 12 h 左右 5 mmol/L 的细菌量经过高速增长后赶上空白组,并在 24 h 左右超过空白组,同时 1 mmol/L 的细菌量也开始超越空白组和 5 mmol/L;当在 48 h 其他组进入到衰亡期后,10 mmol/L 的细菌量开始超越其他组,并有一个小幅度的增长,最后反而成为细菌量最大的一组;由此可见,As 在 WK-32 组细菌的生长初期产生抑制作用,但是当其适应含 As 环境后,便会正常增殖,最后与不含砷环境中的生物量相当或稍高,说明此组菌对 As 的抗性较强。

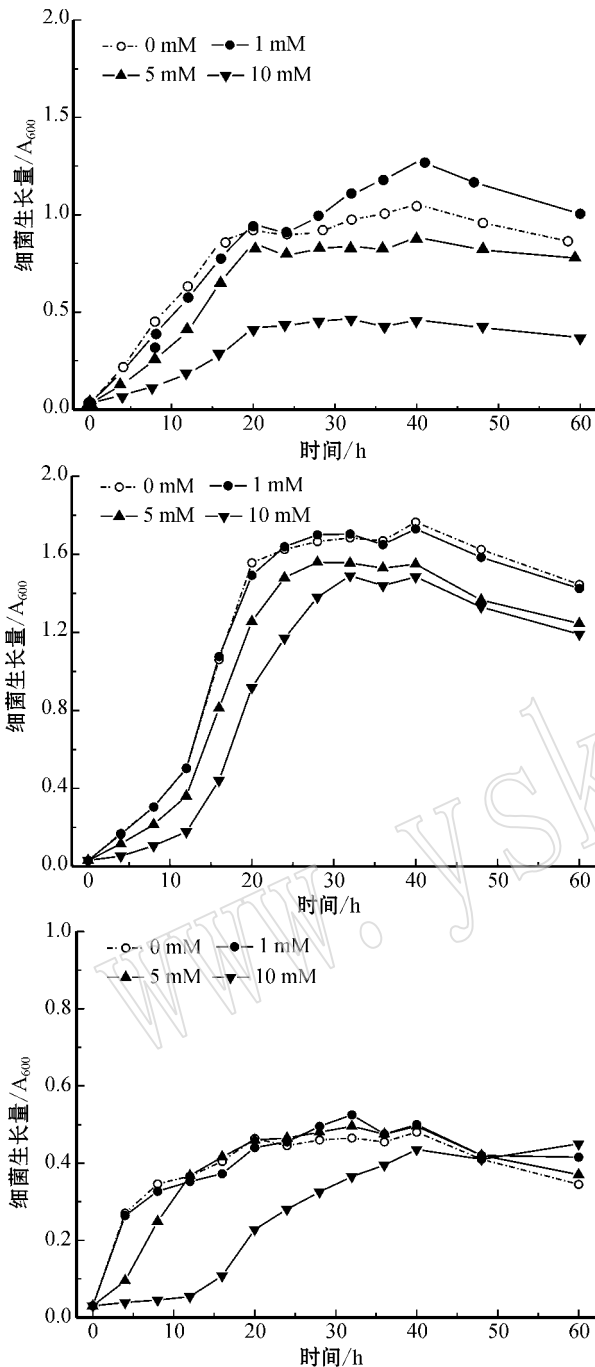


图 4 不同砷浓度条件下 3 株分离菌株的生长曲线  
Fig.4 The growth of three isolated bacteria under the condition of different concentrations of arsenic

### 3 讨论与结论

(1) 从样品中分离出的菌株种类较少, 这可能和样品采集点的污染程度有关。铜陵市狮子山鸡冠山铁矿附近的杨山冲尾矿库污染严重, 尾矿中由于选矿工艺的药剂的添加以及

有机物的缺乏, 致使绝大多数种类的细菌没法生存, 所以尾矿库中生物种类偏少。本次试验从样品中筛选出 3 株抗砷细菌, 分别为 *Arthrobacter* sp. 节杆菌属、*Rhodococcus equi* 马玫瑰球菌、*Paenibacillus* sp. 类芽孢杆菌。而在 1 号样品并未筛选出抗砷细菌, 可能是由于 1 号样品中含砷量过高而不适宜细菌生存。

(2) 从生理生化特征来看, 3 株菌均属于革兰氏阳性菌, 这可能与采样点地区的污染特征、分离方法和培养条件相关。

(3) 从细菌的生长实验来看, 总体上,  $As$  对 3 种细菌的生长都有不同程度的抑制作用, 而且不同浓度的  $As$  对细菌生长的抑制程度不同。低浓度  $As$  对细菌生长影响不大, 甚至有可能促进细菌生长, 而随着浓度的增加, 抑制作用也随之增强。同时, 3 种细菌均能在一定  $As$  浓度的环境中成活、生长并繁殖, 说明这 3 株菌在对  $As$  具有一定的抗性, 并且, 不同菌种对  $As$  的耐受性不同, 不同菌种对  $As$  的抗性能力的比较发现, WK-31 组菌和 WK-32 组菌对  $As$  的抗性较强, 而 WK-21 稍弱, 主要表现在 WK-31 菌的生长能力很强, 且达到稳定期后生物量较高, 而 WK-21 组较少, 此外, WK-31 和 WK-32 的最高砷耐受浓度值也较 WK-21 高。

(4) 本次实验所作的工作还是很有限的, 只是分离出了三价砷抗性菌株, 并不清楚这些菌株对砷是否具有氧化还原能力, 能力有多强, 在什么条件下氧化还原效果最好, 是否能用于砷污染环境的治理。或者更进一步, 其与砷相互作用的相关机理是什么, 是否对含砷矿物(如毒砂等)具有氧化分解作用等等, 这些都需要更深入的工作与研究。

### References

- Chen Shuangxi and Shao Zongze. 1995. Enrichment and diversity analysis of arsenite-resistant bacteria in deep sea sediment samples from southwest Indian Ocean ridge [J]. *Acta Microbiol. Sinica*, 48(10): 1351~1355 (in Chinese with English abstract).
- Cullen W R and Reimer K J. 1989. Arsenic speciation in the environment [J]. *Chem. Rev.*, 89(4): 713~764.
- Garrity G M, Bell J A and Lilburn T G. 2004. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [M]. New York: Springer.
- Green H H. 1918. Description of a bacterium that oxidizes arsenite to arsenate, and one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank [J]. *S. African J. Sci.*, 14: 465~467.
- Hughes M F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action [J]. *Toxicolo. Lett.*, 133: 1~16.
- Kaur P and Rosen B P. 1992. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony [J]. *Plasmid*, 27(1): 29~40.
- Knowles F C and Benson A A. 1983. The biochemistry of arsenic [J]. *Trends Biochem Sci.*, 8: 178~180.
- Kumar S, Tamura K and Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief. Bioinformatics*, 5: 150~163.
- Legge J W. 1954. Bacterial oxidation of arsenite. IV. Some properties

- of bacterial cytochromes[J]. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7(4): 504~514.
- Legge J W and Turner A W. 1954. Bacterial oxidation of arsenite. III. Cell-free arsenite dehydrogenase[J]. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7(4): 496~503.
- Oremland R S, Kulp T R, Blum J S, *et al.* 2005. A microbial arsenic cycle in a saltsaturated, extreme environment[J]. *Science*, 308: 1305~1308.
- Oremland R S, Stolz J F and Hollibaugh J T. 2004. The microbial arsenic cycle in Mono Lake, California[J]. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48: 15~27.
- Phillips S E and Taylor M L. 1976. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*[J]. *Appl. Environ. Microb.*, 32(3): 392~399.
- Saltikov C W, Cifuentes A, Venkateswaran K, *et al.* 2003. The arsenic detoxification system is advantageous but not required for *As(V)* respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 2800~2809.
- Salmassi T M, Walker J J, Newman D K, *et al.* 2006. Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek[J]. *Environ. Microbiol.*, 8(1): 50~59.
- Santini J M, Sly L I, Schnagl R D, *et al.* 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 92~97.
- Silver S and Phung L T. 2005. Genes and enzyme involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 599~608.
- Smith E, Naidu R and Alston A M. 1998. Arsenic in the soil environment: A review[J]. *Adv. Agron.*, 64: 149~195.
- Tang Xiaohui, Guo Huaming and Liu Fei. 2008. Review of microbes and their effects in arsenic-rich waters[J]. *Hydroge. Eng. Geol.*, 3: 104~109 (in Chinese with English abstract).
- Turner A W. 1949. Bacterial oxidation of arsenite[J]. *Nature*, 164: 76~77.
- Turner A W. 1954. Bacterial oxidation of arsenite. I. Description of bacteria isolated from arsenical cattle dipping fluid[J]. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7(4): 452~476.
- USEPA. 2003. Arsenic Rule Implementation. (<http://www.epa.gov/safewater/arsenic.html>).
- Weeger W, Lievreumont D, Perret M, *et al.* 1999. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment[J]. *Bio. Metals*, 12(2): 141~149.
- WHO. 2001. Environmental Health Criteria 224: Arsenic and Arsenic Compounds. World Health Organization, Geneva. (<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm#1.7>).
- Wilsky G R and Malamy M H. 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*[J]. *J. Bacteriol.*, 144(1): 366~374.
- Zheng C L, Qu B, Wang J, *et al.* 2009. Isolation and characterization of a novel nitrobenzene-degrading bacterium with high salinity tolerance: *Micrococcus luteus*[J]. *J. Hazard. Mater.*, 165: 1152~1158.

#### 附中文参考文献

- 陈双喜, 邵宗泽. 1995. 西南印度洋中脊深海沉积物砷抗性菌的富集分离与多样性分析[J]. *微生物学报*, 48(10): 1351~1355.
- 唐小惠, 郭华明, 刘菲. 2008. 富砷水环境中微生物及其环境效应的研究现状[J]. *现状水文地质工程地质*, 3: 104~109.