

王培培, 陈松灿, 朱永官, 等. 微生物砷甲基化及挥发研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(7): 1377-1385.

WANG Pei-pei, CHEN Song-can, ZHU Yong-guan, et al. Advances in the research of arsenic methylation and volatilization by microorganisms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(7): 1377-1385.

## 微生物砷甲基化及挥发研究进展

王培培<sup>1</sup>, 陈松灿<sup>2</sup>, 朱永官<sup>2,3</sup>, 孙国新<sup>2\*</sup>

(1. 农业部环境保护科研监测所生态毒理与环境修复研究中心, 天津 300191; 2. 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085; 3. 中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 福建 厦门 361021)

**摘要:**砷(As)是一种全球关注的有毒元素。在自然环境中,砷主要以无机形态存在。环境微生物对无机砷的甲基化及挥发对砷的生物地球化学循环有重要影响。利用微生物砷挥发来削减土壤砷浓度,是具有应用前景的土壤修复技术。本文综述了砷甲基化机理、砷甲基化基因起源和进化的最新进展,不同物种之间砷甲基化基因的水平转移是该基因传播的主要途径;阐述了目前报道的砷甲基化过程的几种可能机制。鉴于微生物砷甲基化在生物地球化学循环及环境健康方面的重要作用,该综述对未来该领域研究有重要指导意义。

**关键词:**砷;甲基化;生物地球化学循环;基因进化;机制

中图分类号:X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)07-1377-09 doi:10.11654/jaes.2018-0542

### Advances in the research of arsenic methylation and volatilization by microorganisms

WANG Pei-pei<sup>1</sup>, CHEN Song-can<sup>2</sup>, ZHU Yong-guan<sup>2,3</sup>, SUN Guo-xin<sup>2\*</sup>

(1. Research Center for Ecotoxicology and Environmental Remediation, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; 2.State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 3.Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Arsenic(As) is a toxic element with global concern. In natural environment, arsenic mainly exists in the inorganic forms. Arsenic methylation and volatilization driven by microorganisms play important roles in As biogeochemical cycle. Bio-volatilization of As can decrease As concentration in the soil, which could be used as a promising technology for As bioremediation. This paper reviewed recent advances in the principle of As methylation and the origin and evolution of As methyltransferase gene (*arsM*). It is speculated that the *arsM* genes were spread to other kingdoms of life through horizontal gene transfer. The predicted mechanisms of As methylation were elaborated as well. Considering the key role of As methylation in its biogeochemical cycle and environmental health, this review is of great significance for future research in this field.

**Keywords:** arsenic; methylation; biogeochemical cycle; gene evolution; mechanism

砷(As)是一种全球分布广泛的有毒类金属元素。人类长时间的生产活动,如含砷采矿、金属冶炼、化石燃烧以及含砷化学品过量使用等,导致大气、土壤、河

流和地下水等都遭受到了不同程度的砷污染<sup>[1-2]</sup>。稻米主要生产区(东南亚地区)的土壤和灌溉水中砷污染十分严重,这极易导致稻米中的砷过量积累。孟加

收稿日期:2018-04-25 录用日期:2018-05-28

作者简介:王培培(1983—),女,黑龙江尚志人,助理研究员,主要从事重金属生态毒理研究。E-mail:wangpeipei2468@163.com

\*通信作者:孙国新 E-mail:gxsun@cees.ac.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(41571130062,41601271);国家重点研发计划项目(2017YFD0800303)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41571130062,41601271); National Key R&D Program of China(2017YFD0800303)

放国每公顷农田土壤每年约有 10 kg 砷通过灌溉或以大气沉降的形式进入<sup>[3]</sup>。我国的稻米主产区湖南省多地的农田土壤砷含量高达每千克几百毫克<sup>[4]</sup>。通过食物链传递以及地下水饮用等,砷污染已严重威胁到人类的身体健康<sup>[5-6]</sup>。砷污染问题促使砷的生物地球化学循环成为近年来的研究热点。

自然界中的砷可以通过氧化还原作用、甲基化和去甲基化作用、配位体交换、颗粒物表面的化学和物理吸附、金属离子共沉淀等过程引起其化学形态和物理状态的改变<sup>[7-10]</sup>,如图 1 所示,从而形成砷的生物地球化学循环。在自然条件下的土壤与水体环境中,砷主要以无机形态存在,如亚砷酸盐  $\text{As}(\text{III})$  和砷酸盐  $\text{As}(\text{V})$ 。环境微生物能够将无机砷转化为有机砷形态<sup>[10-11]</sup>,此外藻类、植物和动物等也能使该过程发生。不同的是,哺乳动物甲基化砷的终产物是二甲基砷,而微生物甲基化砷的产物以三甲基砷为主<sup>[12-13]</sup>。有机砷主要有甲基砷化物、含硫甲基砷化物、含氯甲基砷化物等。甲基化砷一方面能被微生物脱甲基化生成无机砷<sup>[14-15]</sup>,另一方面则被进一步转化为挥发的甲基砷氢化合物(单甲基砷氢化物  $\text{MMAsH}_2$ , 二甲基砷氢化物  $\text{DMAsH}$ , 三甲基砷  $\text{TMA}_3$ ), 形成砷的挥发过程。目前也有研究发现地热环境释

放的砷气中,除  $\text{TMA}_3$  外,还存在甲基砷氯气体以及甲基砷硫气体<sup>[16]</sup>。

不同形态砷的生物有效性和毒性不同。一般对生物体而言,无机砷的毒性显著高于有机砷。二甲基砷酸盐  $\text{DMAs}(\text{V})$  和三甲基砷氧化物  $\text{TMA}_3\text{O}$  的毒性均显著低于  $\text{As}(\text{III})$  的毒性<sup>[17]</sup>,但是当  $\text{DMAs}(\text{V})$  和  $\text{TMA}_3\text{O}$  被还原为二甲基亚砷酸盐  $\text{DMAs}(\text{III})$  和三甲基砷  $\text{TMA}_3(\text{III})$  ( $\text{TMA}_3$ ) 后,毒性则大幅增加<sup>[18]</sup>。因此,当环境中或生物体内的无机砷被转化为毒性较弱的有机砷或以气体形式挥发到大气中,一定程度上能够降低砷的环境风险和健康毒害。砷甲基化过程是能有效调控砷污染行为的一个手段,值得深入研究。本文对微生物砷甲基化和挥发做了系统综述,对后续研究工作有一定参考和指导意义。

## 1 微生物砷甲基化机理

十九世纪末期,人们就已经发现某些细菌和真菌可将无机砷转化为有蒜臭味的气体<sup>[19]</sup>。Challenger 等<sup>[20]</sup>通过实验证实了蒜臭味的砷气体为三甲基砷 ( $\text{TMA}_3$ )。细胞内  $\text{As}(\text{III})$  在砷甲基转移酶作用下,以 S-腺苷甲硫氨酸 (S-Adenosyl-Methionine, SAM) 或者甲基钴胺素 (甲基维生素 B12) 作为甲基供体,将 As

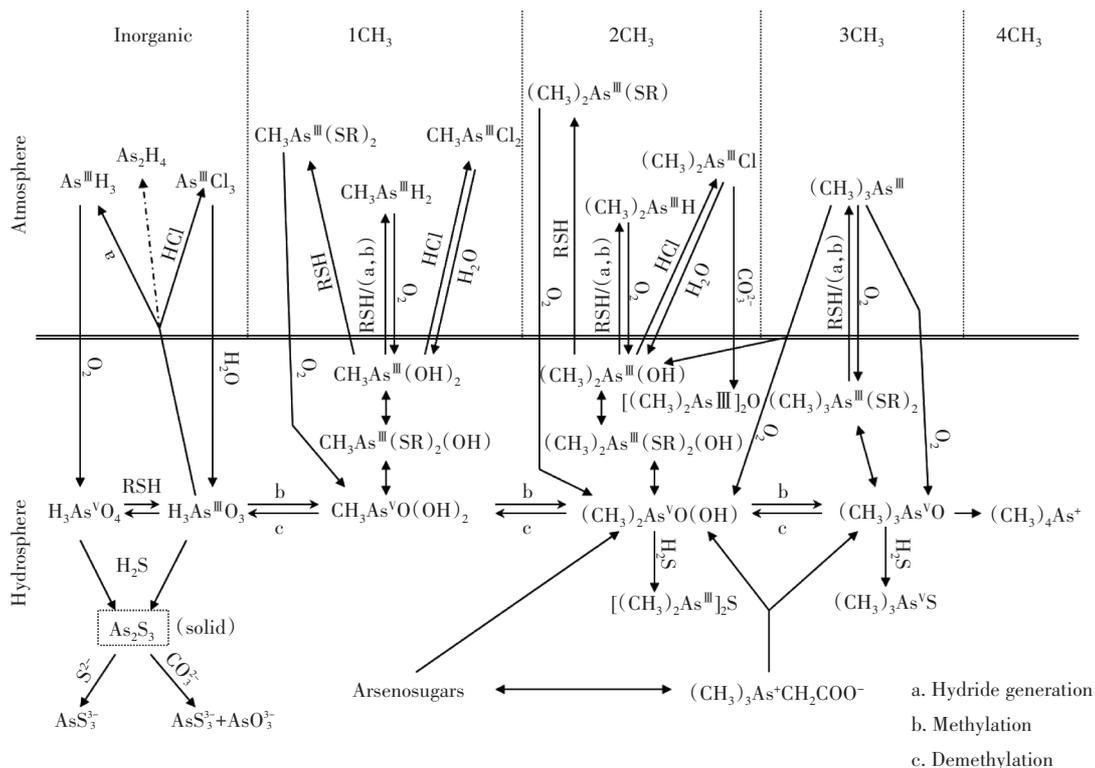


图 1 环境砷各种物理和化学形态之间的相互转化<sup>[10]</sup>

Figure 1 The transformation scheme of different physical and chemical arsenic species in the environment<sup>[10]</sup>

(Ⅲ)转化为一甲基砷和二甲基砷化合物,或者进一步生成挥发性的三甲基砷化物TMA<sub>s</sub>等。目前已发现多种微生物能通过甲基化过程将砷挥发到大气中,包括多种真菌、细菌、古菌、真核藻类、原生动物以及哺乳动物及人体细胞中均有报道。但是他们挥发砷的种类和数量不尽相同<sup>[10]</sup>。

砷甲基转移酶首先在大鼠体内发现<sup>[21-23]</sup>。随着微生物基因组测序技术的发展,在微生物中已识别了多种砷甲基转移酶同源基因。Chen等<sup>[24]</sup>利用ArsM的直系同源蛋白序列构建了ArsM系统发育树。在ArsM发育树中,上述六个类群的ArsM序列聚类成六枝可靠性较高(Bootstrap>50)的进化分支。Qin等<sup>[25-26]</sup>从革兰氏阴性细菌*Rhodopseudomonas palustris* CGA009和嗜热红藻*Cyanidioschyzon* sp. 5508基因组中分别克隆到了*arsM*同源基因并验证了其生理功能。原生动物四膜虫*Tetrahymena pyriformis*<sup>[27]</sup>、硫酸还原菌*Clostridium* sp. BXM<sup>[28]</sup>、产甲烷古菌*Methanosarcina acetivorans* C2A<sup>[29]</sup>、噬纤维菌属*Cytophagaceae* sp. SM-1<sup>[30]</sup>的*arsM*基因及功能也被报道,并详细研究。蓝藻中的砷甲基化基因相对复杂,属于不同的类群(第一和第二类群),Yin等<sup>[31]</sup>成功克隆了三种淡水蓝藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803, *Microcystis* sp. PCC 7806, *Nostoc* sp. PCC 7120)中*arsM*同源基因,并对其功能进行了表征。

通过对比所有已报道的砷甲基转移酶的氨基酸序列可以看出,这些蛋白的长度大约在248~400个氨基酸之间<sup>[32]</sup>。虽然砷甲基转移酶可以分为多个类群,但所有砷甲基转移酶都存在一些非常保守的区域。这些保守区域大约位于中间的150个氨基酸左右,都有保守的半胱氨酸位点。其中一些保守区域可能参与和SAM之间的相互作用,但目前还没有直接证据的报道<sup>[32]</sup>。另一些保守区域被证明参与砷的结合与甲基化。例如蓝藻*Synechocystis* sp. PCC6803甲基化酶序列中第48、143和195位置处的半胱氨酸是保守的<sup>[33]</sup>。硫酸盐还原细菌*Clostridium* sp. BXM中,甲基化酶序列第65、153和203位置处的半胱氨酸是保守的<sup>[28]</sup>。而产甲烷八叠球菌*Methanosarcina acetivorans* C2A甲基化酶第62、150和200位置的半胱氨酸为保守氨基酸<sup>[29]</sup>。已有研究证明这些保守半胱氨酸在结合As(Ⅲ)及砷甲基化中起非常关键的作用<sup>[33]</sup>。然而最近有研究发现,*Bacillus* sp. CX-1菌株的甲基化酶仅有两个保守的半胱氨酸位点在砷甲基化过程中发挥作用<sup>[34]</sup>。在一般的

保守区域以外,这些甲基转移酶序列的多态性可能决定了酶的功能特异性,它们的作用有待于进一步研究。

## 2 砷甲基化基因的进化

砷的生物甲基化在自然界中非常普遍,砷甲基化基因(*arsM*)广泛分布于不同门类物种的基因组中。Chen等<sup>[24]</sup>利用生物信息学的方法搜索了EggNOG数据库收录的2031个物种中ArsM的直系同源蛋白(Ortholog),发现ArsM直系同源蛋白在细菌、古菌以及真核生物等三域(Domain)中均有分布,见图2。根据序列相似性,ArsM同源蛋白大致聚成六个类群(Group),各个类群内的ArsM蛋白序列相较于不同类群间具有更高的序列相似性。第一个类群包括蓝藻门(Cyanobacteria)以及拟杆菌门(Bacteroidetes)的ArsM;第二个类群的ArsM主要来自蓝藻门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)以及变形菌门(Proteobacteria)的微生物;第三个ArsM类群由动物(Metazoan)、原生生物(Protist)、红藻(Red algae)等真核生物以及变形菌门(Proteobacteria)等原核生物组成;第四个ArsM类群来源于真菌(Fungi)以及浮霉菌门(Planctomycetes);第五个类群的微生物聚类了厌氧细菌中的ArsM,包括绿菌门(Chlorobi)以及厌氧变形菌门(Proteobacteria)的细菌;第六类ArsM由不同门类的细菌以及古菌构成。*arsM*同源基因序列聚类的结果表明来自不同域物种的ArsM具有较高的序列相似性(第三类群和第四类群),这暗示*arsM*基因可能存在跨域物种间基因水平转移(Inter-domain horizontal gene transfer)。

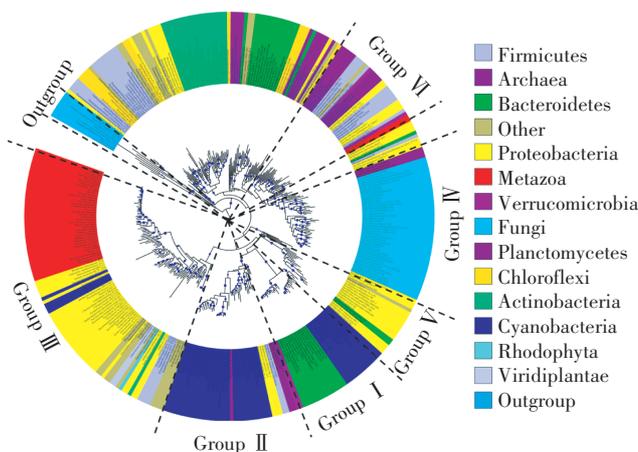


图2 砷甲基转移酶ArsM系统发育树<sup>[24]</sup>

Figure 2 Phylogeny of ArsMs-As(Ⅲ) SAM methyltransferases<sup>[24]</sup>

利用 *ArsM* 的直系同源蛋白序列构建了 *ArsM* 系统发育树<sup>[24]</sup>。对六个系统发育分支进一步分析表明, *ArsM* 可能起源于 25 亿年前发生的大氧化事件(Great Oxidation Event, GOE)之前。在 *ArsM* 系统发育树第一分支中, 蓝藻门的最基部类群紫色粘杆菌(*Gloeobacter violaceus*)在 *ArsM* 系统发育树相较于其他蓝藻类群处于最基部, 这表明 *ArsM* 可能存在于蓝藻的共同祖先(Least Cyanobacterial Common Ancestor, LCCA)中(图3)。对于 *ArsM* 系统发育树其他分支的分析表明, 跨域物种间基因水平转移可能在 *ArsM* 的进化历史中发挥过重要的作用。比如, 动物甲基化酶 AS3MT 与变形菌门来源的 *ArsM* 在系统发育树上形成一个单系群(第三类群), 这暗示动物的甲基化酶可能来源于细菌。进一步分析 *arsM* 直系同源基因在动物中的分布及其系统发育分支, 推测 *arsM* 基因从细菌到动物的水平转移时间大约距今 6.35 亿年。类似的, 真菌中的 AS3MT 直系同源基因也可能来源于细菌的水平转移(第四类群)。通过系统分析 *ArsM* 进化树上的各个分支, 推测跨域物种间基因水平转移事件在物种演化过程中至少发生过 6 次。*ArsM* 在远缘物种之间的频繁基因水平转移显示其对于生命适应环境砷压力的重要作用(图3)。

### 3 砷甲基化机制的几种预测

#### 3.1 Challenger 砷甲基化机制

Challenger 等<sup>[36]</sup>提出了砷甲基化的第一个模型(图4A)。甲基化过程为  $As(V) \rightarrow As(III) \rightarrow MMAs$

(V)  $\rightarrow MMAs(III) \rightarrow DMAs(V) \rightarrow DMAs(III)$ 。该模型认为: 无机砷的甲基化过程是由三价砷化物的氧化甲基化与五价砷化物的还原交替进行的<sup>[37]</sup>。As(III)在砷甲基转移酶的催化下首先生成一甲基砷酸[MMAs(V)], 生成的 MMAs(V)再被还原为 MMAs(III), 之后进行氧化甲基化, MMAs(III)被甲基化为二甲基砷酸[DMAs(V)], DMAs(V)接着被还原为 DMAs(III), DMAs(III)最终被甲基化为三甲基砷 TMA 或四甲基砷。该模型未指出所需的甲基供体以及还原砷化合物所必需的还原剂或还原酶等。

但是在哺乳动物体内, 还原型甲基化砷含量很低, MMAs(V)  $\rightarrow MMAs(III)$ 和 DMAs(V)  $\rightarrow DMAs(III)$ 的过程可能很少发生。Cohen 等<sup>[38]</sup>通过给大鼠喂食 MMAs(V)和 DMAs(V)研究五价甲基砷的还原。结果发现暴露于 MMAs(V)和 DMAs(V)的大鼠肝细胞中, 只有极少部分的五价砷被还原为三价砷代谢产物<sup>[39]</sup>。Yamauchi 等利用口服 DMAs(V)的大鼠, 检测发现体内的 DMAs(V)会立即从尿液中排出, 而无任何还原发生<sup>[39]</sup>。这些表明甲基化过程中五价砷的还原存在一定争议。

#### 3.2 Hayakawa 砷甲基化机制

Hayakawa 等<sup>[40]</sup>提出了砷甲基化机制的第二个模型(图4B)。该模型认为: 还原型谷胱甘肽 GSH 与砷结合形成的复合体是甲基转移酶的最适合底物, 而不是三价砷本身作为酶的底物。与 Challenger 模型不同的是, 该模型认为一系列甲基化反应是连续进行的, 中间不涉及氧化还原价态的变化。体内 S 腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基化过程中的甲基供体。As(III)与 GSH 形成的复合体  $As(GS)_3$  被甲基化生成 MMAs(GS)<sub>2</sub>和 DMAs(GS)。MMAs(GS)<sub>2</sub>和 DMAs(GS)通过解离生成 MMAs(III)和 DMAs(III), 这些还原型甲基砷化合物很不稳定, 很快被氧化生成 DMAs(V)和 MMAs(V)(图4B)。

该模型目前也存在一些争议, 比如 GSH 与砷化合物结合产生的复合物形态, 尚无可靠的实验证据。体外实验表明, 当体系中没有酶蛋白时, 通过色谱分析(阴离子交换柱)能检测到 As(III)和 MMAs(III)与 GSH 的结合态, 即  $As(GS)_3$ 和  $MMAs(GS)_2$ 形态, 但当添加了砷甲基转移酶后, 之前检测到的  $As(GS)_3$ 和  $MMAs(GS)_2$ 复合物则消失, 推测是大部分的三价砷化合物与砷甲基转移酶的结合取代了与 GSH 的结合<sup>[41]</sup>。

#### 3.3 Naranmandura 砷甲基化机制

Naranmandura 等<sup>[42]</sup>提出了第三种砷甲基化机制

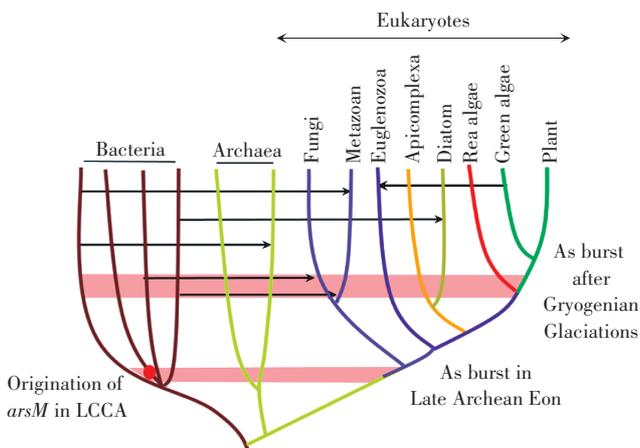
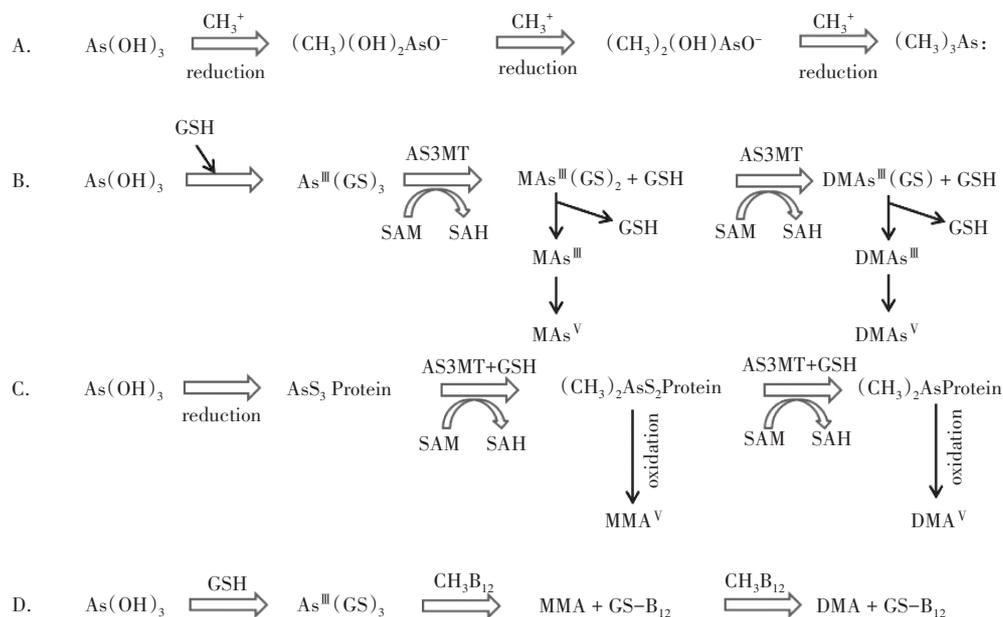


图3 砷甲基化基因 *arsM* 的跨域物种水平转移示意图<sup>[24]</sup>

Figure 3 Diagram illustrating the inter-kingdom HGT of *arsM* gene(Horizontal lines and arrows show HGT donors and recipients. LCCA, last cyanobacterial common ancestor)<sup>[24]</sup>

图4 微生物中预测的几种砷甲基化机制<sup>[37]</sup>Figure 4 Proposed methylation pathways for inorganic As in the microorganism<sup>[37]</sup>

(图4C)。该机制认为三价砷被生物体吸收后,首先与蛋白质结合成复合物,而非与GSH结合,然后经还原甲基化过程,生成MMAs(Ⅲ)和DMAs(Ⅲ),三价甲基砷化合物不稳定,最后被氧化生成五价的甲基砷产物(图4C)。甲基化过程需要SAM和GSH的参与,前者属于甲基供体,后者可能起到还原三价砷的作用。该模型与Hayakawa砷甲基化模型的相同点在于,都认为MMAs(V)和DMAs(V)是砷甲基化过程的终产物,而不是中间产物;不同之处在于,由于蛋白上的巯基比非蛋白化合物(GSH)上的巯基更加稳定<sup>[12,43-45]</sup>,所以该模型认为蛋白巯基更容易与三价砷化合物结合成复合物进行反应<sup>[45-48]</sup>。

### 3.4 甲基钴胺素依赖的非酶砷甲基化机制

在GSH存在条件下,甲基钴胺素[即甲基维生素B12,  $\text{CH}_3\text{Cob}(\text{III})$ ]和As(Ⅲ)能够在体外生成单甲基砷和少量二甲基砷,这个过程不需要酶的参与<sup>[36,49]</sup>(图4D)。向体系中加入肝脏细胞匀浆(其内没有检测到砷甲基转移酶蛋白),对这种甲基钴胺素依赖的砷甲基化过程既没有抑制作用也没有促进作用。此外,在产甲烷古菌中,砷的甲基化过程还可能与甲烷生成途径密切相关。Thomas等<sup>[50]</sup>报道了产甲烷古菌*Methanosarcina mazei*中多种(类)金属(包括砷)的甲基化不是依赖于金属特异性的甲基转移酶来完成的,而是与甲烷生成过程中的主要辅酶甲基钴

胺素和它的去甲基化代谢产物钴胺素[Cob(I)]参与的反应相耦合进行的。

## 4 环境中砷挥发及影响因素

砷甲基化和挥发是砷的生物地球化学循环的重要组成部分。但目前砷由陆地或海洋生态系统向大气中的挥发效率的研究十分有限<sup>[51]</sup>。Savage等<sup>[52-53]</sup>研究了海洋体系中砷的挥发。海水中挥发砷的产生可能主要源于海水中的有机砷,挥发砷产物主要是TMA<sub>s</sub>和少量的DMA<sub>s</sub>H。研究发现海水发源地的海岸沉积物中普遍存在着TMAO和DMA<sub>s</sub>(V),这些砷化合物向海水的砷输入率( $0.3\sim 0.5 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ )与海水中砷的挥发率( $0.9 \text{ nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ )在同一个数量级,说明二者可能存在相关性。海水经过两周的培养时间,大约0.04%的总砷能被挥发出去。Zhang等<sup>[54]</sup>研究了海洋微藻类生物能够将无机砷转化成气态砷,并且三价砷的挥发效率显著高于五价砷。Mestrot等<sup>[55-56]</sup>对陆地系统土壤(尾矿,稻田土壤,河口沉积物或泥炭土)的砷挥发做了分析,砷挥发的速率在( $0.5\pm 0.2$ )与( $69.2\pm 33.1$ ) $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{a}^{-1}$ 之间,而泥炭土的砷移除率可达0.17%。Turpeinen等<sup>[57]</sup>分析了三种高砷污染( $2125\sim 3632 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )沙土的砷挥发率在0.02%~0.3%之间。所有土壤的挥发砷都以TMA<sub>s</sub>为主,伴随少量的DMA<sub>s</sub>H和AsH<sub>3</sub>。从目前的研究来

看,自然土壤中挥发的砷量一般在1%以下。陆地系统挥发的砷量可能高于海洋系统。有关砷挥发的试验表明,砷挥发的水平与体系中的营养条件和微生物活性有直接的关系。土壤的微生物丰度和多样性高于海洋系统,有利于解释陆地系统中砷挥发量更高的原因<sup>[58]</sup>。有机物质例如粪肥等的添加可以明显促进土壤砷的挥发<sup>[59-60]</sup>,外来物质的添加可能增加了体系中的微生物多样性和丰度,包括砷甲基化微生物,因此引起砷挥发的升高。三叶草和酒糟的添加可以大幅提高水稻土的砷挥发量,然而,灭菌和非灭菌的酒糟添加物对砷挥发的影响没有显著性差异,说明酒糟携带的外来微生物没有对砷挥发产生明显影响<sup>[61]</sup>。也可能是酒糟添加提高了土著微生物的生长活性,其中砷甲基化微生物丰度的显著增加提高了砷挥发效率。一些非生物条件也可以显著影响砷挥发效率,包括砷底物的形态、浓度、土壤湿度、温度、氧化还原电势和pH等<sup>[59,62-63]</sup>。外界条件的改变对砷挥发的影响,可能一方面归因于对微生物活性的影响,另一方面归于对砷化合物反应过程的调控,例如氧化还原电势和pH等都能够影响酶学反应效率。Chen等<sup>[64]</sup>向水稻土中添加了钼酸盐后显著提高了土壤砷挥发量,钼酸盐改变了土壤的微生物群落结构,增加了甲基砷还原微生物的丰度,上调了砷还原酶基因的表达,进而将更多的甲基砷酸盐转变为甲基砷气挥发出去。此外,最近有学者克隆了砷的脱甲基化基因<sup>[14-15]</sup>,砷的脱甲基化过程可能同时存在于土壤环境中,从而抑制土壤的砷挥发比率。目前对砷挥发的影响机制,以及砷甲基化和脱甲基化的动态机制,认知还有限,缺乏系统研究,有待进一步探索。

微生物的砷甲基化及挥发不但使砷的生物地球化学循环成为可能,也能达到降低环境中的砷毒害、修复砷污染环境的目的。目前国际上对重金属污染问题倡导“绿色可持续修复”理念(ITRC)<sup>[65]</sup>。鉴于生物修复能较好保持土壤结构和生态平衡,并具有成本低、环境友好和简便易行等优点,重金属修复由物理和化学手段逐渐向生物修复的方向发展。微生物的砷挥发作用可能是一种具有应用前景的砷污染生物修复技术<sup>[66-68]</sup>。然而,已报道微生物的砷挥发量都比较微弱,一方面可能源于微生物本身的挥发能力低,另一方面可能由于甲基化微生物在环境中的生物量较低。Huang等<sup>[30]</sup>从砷污染水稻土中分离出砷甲基化能力很强的*Cytophagaceae* sp. SM-1菌株。水稻土本身甲基化和挥发砷的能力很低,而一旦添加了富集

培养的SM-1后,土壤的甲基化和挥发能力都显著提高,挥发砷量与土壤中的SM-1菌丰度呈现正相关。为了提高生物修复效率,目前诸多研究采用生物工程改造菌的手段,促进砷挥发。在染色体上稳定表达外来*arsM*基因的*Pseudomonas putida* KT2440工程菌,能够将土壤的砷挥发量提高9倍,增加土壤中砷的生物有效性之后,挥发砷含量提高至49倍<sup>[66]</sup>。这也进一步说明了生物和非生物因素共同决定了土壤的砷挥发效率。此外,微生物和植物联合修复的手段也有一定前景,Zhang等<sup>[69]</sup>将莱茵衣藻*arsM*基因转入根瘤菌中表达,该菌与豆科植物形成共生体,体系甲基化无机砷量高达75%。而将莱茵衣藻*arsM*基因转入拟南芥中,试图通过基因工程植物进行修复时,转基因植物虽然获得了较强砷甲基化和一定的砷挥发能力,但对甲基砷毒性更加敏感,植物生物量显著降低<sup>[70]</sup>。微生物-植物联合修复手段的可行性有待进一步分析,值得深入研究。除了土壤修复,微生物修复还可以应用到工业污水和堆肥处理中,这些处理下释放的砷气体较易进行回收利用,减少砷的二次污染。地热环境中生存的嗜热藻*Cyanidioschyzon* sp. 5508甲基化和挥发砷的最适温度高达60~70℃,转化和表达该藻*arsM*基因的耐高温菌*Bacillus subtilis* 168经富集后被添加到50℃的堆肥处理中,显著增加了砷挥发量<sup>[71]</sup>,一方面保障了堆肥安全利用,另一方面对投菌堆肥挥发的气态砷加以收集处理,避免造成挥发砷的二次污染和可能的毒害作用。

## 5 研究展望

环境中砷的甲基化和挥发已被发现数十年,普遍认为微生物是驱动砷甲基化和挥发过程的主要因素。近十年,各种微生物的砷甲基化基因相继被报道。而近两年来,微生物砷甲基化研究已经不局限在纯培养生物上,土壤或者水体中微生物群落结构多样性和丰度与砷甲基化的联系也开始被关注,更能综合反映环境中砷甲基化的效率。未来的研究重点在于:(1)在分子水平上对微生物甲基化砷和脱甲基化砷的酶学机理进一步研究,研究砷甲基化基因的分子调控,探索抑制微生物脱甲基过程的因素,以提高微生物挥发砷的效率;(2)目前仅少数研究对环境中砷挥发量进行了原位监测,多数研究还只局限在实验室条件下分析砷挥发速率。因此,未来有必要对砷的挥发行为进行更多和更大范围的原位监测和模型预测,合理估测砷挥发对于全球范围内砷的生物地球化学循环的贡

献率;(3)在更大的时间和空间尺度上研究砷挥发与各种环境因素的关系,这些研究将为利用砷挥发来原位修复环境砷污染提供可靠理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Popovic A, Djordjevic D, Polic P. Trace and major element pollution originating from coal ash suspension and transport processes[J]. *Environment International*, 2001, 26(4):251-255.
- [2] Bhattacharya P, Mukherjee A B, Jacks G, et al. Metal contamination at a wood preservation site: Characterization and experimental studies on remediation[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 290(1):165-180.
- [3] Department of Public Health and Engineering, British Geologic Survey. Groundwater studies for arsenic contamination in Bangladesh[R]. Department of Public Health and Engineering, Government of Bangladesh, 2000.
- [4] 李莲芳, 曾希柏, 白玲玉, 等. 石门雄黄矿周边地区土壤砷分布及农产品健康风险评估[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(11):2946-2951.  
LI Lian-fang, ZENG Xi-bai, BAI Ling-yu, et al. Soil arsenic content and health risk assessment of agricultural products in the region surrounding Shimen arsenic sulphide mine[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(11):2946-2951.
- [5] Harvey C F, Swartz C H, Badruzzaman A B M, et al. Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh[J]. *Science*, 2002, 298(5598):1602-1606.
- [6] Bhattacharya P, Welch A H, Stollenwerk K G, et al. Arsenic in the environment: Biology and chemistry[J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 379(2/3):109-120.
- [7] Planer-Friedrich B. Volatile arsenic in aquatic environments[D]. Freiberg: Technische Universität Bergakademie Freiberg, 2004.
- [8] Amstaetter K, Borch T, Larese-Casanova P, et al. Redox transformation of arsenic by Fe(II): Activated goethite( $\alpha$ -FeOOH)[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(1):102-108.
- [9] Mumford A C, Barringer J L, Benzel W M, et al. Microbial transformations of arsenic: Mobilization from glauconitic sediments to water[J]. *Water Research*, 2012, 46(9):2859-2868.
- [10] Wang P, Sun G, Jia Y, et al. A review on completing arsenic biogeochemical cycle: Microbial volatilization of arsines in environment[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(2):371-381.
- [11] Bentley R, Chasteen T G. A review on microbial methylation of metalloids: Arsenic, antimony, and bismuth[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2002, 66(2):250-271.
- [12] Suzuki K T, Mandal B K, Ogra Y. Speciation of arsenic in body fluids[J]. *Talanta*, 2002, 58(1):111-119.
- [13] Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1984, 74(1):134-140.
- [14] Yoshinaga M, Rosen B P. A C-As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21):7701-7706.
- [15] Yan Y, Ye J, Xue X M, et al. Arsenic demethylation by a C-As lyase in cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(24):14350-14358.
- [16] Planer-Friedrich B, Lehr C, Matschullat J, et al. Speciation of volatile arsenic at geothermal features in Yellowstone National Park[J]. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 2006, 70(10):2480-2491.
- [17] Hirano S, Kobayashi Y, Cui X, et al. The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: Important roles of thiol compounds[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(3):458-467.
- [18] Styblo M, Del Razo L M, Vega L, et al. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells[J]. *Archives of Toxicology*, 2000, 74(6):289-299.
- [19] Gosio B. Action of microphytes on solid compounds of arsenic: A recapitulation[J]. *Science*, 1892, 19(472):104-106.
- [20] Challenger F, Higginbottom C, Ellis L. The formation of organo-metalloidal compounds by microorganisms. Part I. Trimethylarsine and dimethylethylarsine[J]. *Journal of the Chemical Society*, 1933:95-101.
- [21] Lin S, Shi Q, Nix F B, et al. A novel S-adenosyl-L-methionine: Arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(13):10795-10803.
- [22] Thomas D J, Waters S B, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(3):319-326.
- [23] Waters S B, Devesa V, Fricke M W, et al. Glutathione modulates recombinant rat arsenic(+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2004, 17(12):1621-1629.
- [24] Chen S C, Sun G X, Rosen B P, et al. Recurrent horizontal transfer of arsenite methyltransferase genes facilitated adaptation of life to arsenic[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):7741-7750.
- [25] Qin J, Rosen B P, Zhang Y, et al. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(7):2075-2080.
- [26] Qin J, Lehr C R, Yuan C G, et al. Biotransformation of arsenic by a yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(13):5213-5217.
- [27] Ye J, Chang Y, Yan Y, et al. Identification and characterization of the arsenite methyltransferase from a protozoan, *Tetrahymena pyriformis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 149(1):50-57.
- [28] Wang P P, Bao P, Sun G X. Identification and catalytic residues of the arsenite methyltransferase from a sulfate-reducing bacterium, *Clostridium* sp. BXM[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(1):1-8.
- [29] Wang P P, Sun G X, Zhu Y G. Identification and characterization of the arsenite methyltransferase from an archaeon, *Methanosarcina acetivorans* C2A[J]. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(21):12706-12713.
- [30] Huang K, Chen C, Zhang J, et al. Efficient arsenic methylation and volatilization mediated by a novel bacterium from an arsenic-contaminated paddy soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(12):6389-6396.
- [31] Yin X X, Chen J, Qin J, et al. Biotransformation and volatilization of

- arsenic by three photosynthetic cyanobacteria[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3):1631-1638.
- [32] Ye J, Rensing C, Rosen B P, et al. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(3):155-162.
- [33] Marapakala K, Qin J, Rosen B P. Identification of catalytic residues in the As(III) S-adenosylmethionine methyltransferase[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(5):944-951.
- [34] Huang K, Xu Y, Packianathan C, et al. Arsenic methylation by a novel ArsM As(III) S-adenosylmethionine methyltransferase that requires only two conserved cysteine residues[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(2):265-276.
- [35] Challenger F. Biological methylation[J]. *Chemical Reviews*, 1945, 36:315-361.
- [36] Sun H J, Rathinasabapathi B, Wu B, et al. Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans[J]. *Environment International*, 2014, 69(4):148-158.
- [37] Cullen W R, McBride B C, Reglinski J. The reduction of trimethylarsine oxide to trimethylarsine by thiols: A mechanistic model for the biological reduction of arsenicals[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1984, 21(1):45-60.
- [38] Cohen S M, Arnold L L, Eldan M, et al. Methylated arsenicals: The implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, 36(2):99-133.
- [39] Yamauchi H, Yamamura Y. Metabolism and excretion of orally administered dimethylarsinic acid in the hamster[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1984, 74(1):134-140.
- [40] Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, et al. A new metabolic pathway of arsenite: Arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19[J]. *Archives of Toxicology*, 2005, 79(4):183-191.
- [41] Rehman K, Naranmandura H. Arsenic metabolism and thioarsenicals[J]. *Metallomics*, 2012, 4(9):881-892.
- [42] Naranmandura H, Suzuki N, Suzuki K T. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19(8):1010-1018.
- [43] Vahter M, Marafante E. Reduction and binding of arsenate in marmoset monkeys[J]. *Archives Für Toxicology*, 1985, 57(2):119-124.
- [44] Lu M, Wang H, Li X F, et al. Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2004, 17(12):1733-1742.
- [45] Vahter M, Marafante E, Dencker L. Metabolism of arsenobetaine in mice, rats and rabbits[J]. *Science of the Total Environment*, 1983, 30(30):197-211.
- [46] Bogdan G M, Sampayo-Reyes A, Aposhian H V. Arsenic binding proteins of mammalian systems: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver[J]. *Toxicology*, 1994, 93(2/3):175-193.
- [47] Styblo M, Thomas D J. Binding of arsenicals to proteins in an in vitro methylation system[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 147(1):1-8.
- [48] Suzuki K T, Katagiri A, Sakuma Y, et al. Distributions and chemical forms of arsenic after intravenous administration of dimethylarsinic and monomethylarsinic acids to rats[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 198(3):336-344.
- [49] Zakharyan R A, Aposhian H V. Arsenite methylation by methylvitamin B12 and glutathione does not require an enzyme[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 154(3):287-291.
- [50] Thomas F, Diaz-Bone R A, Wuerfel O, et al. Connection between multimetal (loid) methylation in methanoarchaea and central intermediates of methanogenesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(24):8669-8675.
- [51] Mestrot A, Planer-Friedrich B, Feldmann J. Biovolatilisation: A poorly studied pathway of the arsenic biogeochemical cycle[J]. *Environmental Science Processes and Impacts*, 2013, 15(9):1639-1651.
- [52] Savage L, Carey M P, Hossain M, et al. Elevated trimethylarsine oxide and inorganic arsenic in northern hemisphere summer monsoonal wet deposition[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21):12210-12218.
- [53] Savage L, Carey M P, Williams P N, et al. Biovolatilization of arsenic as arsines from seawater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(7):3968-3974.
- [54] Zhang S Y, Sun G X, Yin X X, et al. Biomethylation and volatilization of arsenic by the marine microalgae *Ostreococcus tauri*[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(1):47-53.
- [55] Mestrot A, Uroic M K, Plantevin T, et al. Quantitative and qualitative trapping of arsines deployed to assess loss of volatile arsenic from paddy soil[J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(21):8270-8275.
- [56] Mestrot A, Feldmann J, Krupp E M, et al. Field fluxes and speciation of arsines emanating from soils[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 45(5):1798-1804.
- [57] Turpeinen R, Pansar-Kallio M, Kairesalo T. Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 285(1/2/3):133-145.
- [58] Vriens B, Lenz M, Charlet L, et al. Natural wetland emissions of methylated trace elements[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(5):3035.
- [59] Edvantoro B B, Naidu R, Megharaj M, et al. Microbial formation of volatile arsenic in cattle dip site soils contaminated with arsenic and DDT[J]. *Applied Soil Ecology*, 2004, 25(3):207-217.
- [60] Mohapatra D, Mishra D, Chaudhury G R, et al. Removal of arsenic from arsenic rich sludge by volatilization using anaerobic microorganisms treated with cow dung[J]. *Journal of Soil Contamination*, 2008, 17(3):301-311.
- [61] Huang H, Jia Y, Sun G X, et al. Arsenic speciation and volatilization from flooded paddy soils amended with different organic matters[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(4):2163-2168.
- [62] Gao S D, Burau R G. Environmental factors affecting rates of arsine evolution from and mineralization of arsenicals in soil[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1997, 26(3):753-763.
- [63] Sanford R A, Klein D A. Environmental bioremediation for organometallic compounds: Microbial growth and arsenic volatilization from soil and retorted shale[J]. *Applied Organometallic Chemistry*, 1988, 2(2):159-169.
- [64] Chen C, Huang K, Xie W Y, et al. Microbial processes mediating the

- evolution of methylarsine gases from dimethylarsenate in paddy soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(22): 13190–13198.
- [65] Interstate Technology and Regulatory Council(ITRC). Green and sustainable remediation: A practical framework[R]. Washington, DC: ITRC report GSR-2. ITRC, 2011.
- [66] Chen J, Sun G X, Wang X X, et al. Volatilization of arsenic from polluted soil by *Pseudomonas putida* engineered for expression of the *arsM* arsenic(III) S-adenosine methyltransferase gene[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(17): 10337–10344.
- [67] Chen P, Li J, Wang H Y, et al. Evaluation of bioaugmentation and biostimulation on arsenic remediation in soil through biovolatilization[J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2017, 24(9): 21739–21749.
- [68] Yin X X, Wang L H, Zhang Z C, et al. Biomethylation and volatilization of arsenic by model protozoan *Tetrahymena pyriformis* under different phosphate regimes[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(2): 188.
- [69] Zhang J, Xu Y, Cao T, et al. Arsenic methylation by a genetically engineered *Rhizobium*-legume symbiont[J]. *Plant and Soil*, 2017, 416(1/2): 259–269.
- [70] Tang Z, Lü Y, Chen F, et al. Arsenic methylation in *Arabidopsis thaliana* expressing an algal arsenite methyltransferase gene increases arsenic phytotoxicity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(13): 2674–2681.
- [71] Huang K, Chen C, Shen Q, et al. Genetically engineering *Bacillus subtilis* with a heat-resistant arsenite methyltransferase for bioremediation of arsenic-contaminated organic waste[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(19): 6718–6724.