

Łukasz Drewniak, Aleksandra Skłodowska

Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. Miecznikowa 1, 02-009 Warszawa, tel.: (+22) 5541 005, fax: (+22) 5541 006, e-mail: asklodowska@biol.uw.edu.pl

Wpłynęło w kwietniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Rozpowszechnienie arsenu w środowisku. 3. Mikrobiologiczne transformacje arsenu. 3.1. Biometylacja organicznych związków arsenu. 3.2. Redukcja arsenianów – mechanizmy oporności. 4. Procesy redoks – oddychanie tlenowe (utlenianie) i bez-tlenowe (redukcja). 4.1. Dysymilacyjna redukcja arsenianów. 4.2. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów. 5. Biogeochemiczny obieg arsenu. 6. Podsumowanie

The role of bacteria in biogeochemical cycle of arsenic

Abstract: Arsenic is widely distributed in the Earth's crust and is one of the most toxic elements. It is found in soil and natural minerals and it, therefore, may enter the atmosphere and water. Arsenic can exist in four valence states (-3, 0, +3, +5) and in a number of organic and inorganic forms. Organic forms are less harmful than the inorganic ones and arsenite [As(III)] is more toxic than arsenate [As(V)]. Some prokaryotes may use arsenic compounds for energy generation (either as electron donors or acceptors), whereas others are only resistant to arsenic. These microbes play an important role in speciation and mobilization of arsenic in nature. The review of microbial arsenic metabolism and the potential role of microbes in the biogeochemical cycle of arsenic are presented in this paper.

1. Introduction. 2. Arsenic in the environment. 3. Microbial transformation of arsenic. 3.1. Biomethylation of organic arsenic compounds. 3.2 Reduction of arsenate-resistance mechanism. 4. Redox reaction – aerobic (oxidation) and anaerobic (reduction) respiration. 4.1 Dissimilatory reduction of arsenate. 4.2 Microbial arsenite oxidation. 5. Biogeochemical cycle of arsenic. 6. Summary

Słowa kluczowe: arsen, toksyczność, oporność, mikroorganizmy, obieg biogeochemiczny

Key words: arsenic, toxicity, resistance, microorganism, biogeochemical cycle

1. Wstęp

Mikroorganizmy są stale narażone na działanie jonów metali występujących w środowisku. Niektóre z tych jonów (magnez, potas, miedź czy cynk) są pobierane jako istotne składniki odżywcze, podczas gdy inne są związkami toksycznymi (tj. rtęć, ołów, kadm, arsen czy srebro) [59].

Jednym z najbardziej toksycznych pierwiastków, występujących naturalnie w środowisku, jest arsen. Na działanie toksycznych związków arsenu są narażone zarówno organizmy prokariotyczne jak i eukariotyczne. U ludzi arsen działa teratogennie, kancerogennie i mutagennie. Działa on na skórę oraz różne organy, w tym: wątrobę, układ krwionośny, nerki, płuca, gruczoł krokowy. Może powodować cukrzycę, chorobę wieńcową, hiperpigmentację i zapalenie skóry, zmiany hematologiczne, obwodowe neuropatie i wiele innych schorzeń [22].

Toksyczność związków arsenu jest uzależniona od wartościowości tego pierwiastka oraz od postaci, w jakiej on występuje. Najbardziej groźne i toksyczne są nieorganiczne związki arsenu, przy czym związki As(III) są bardziej toksyczne niż związki As(V) [41]. Żywe komórki (bakteryjne, roślinne, zwierzęce, w tym

ludzkie) są narażone głównie na działanie arsenu w postaci arsenianów i arseninów. Arseniany (HAsO_4^{2-} i H_2AsO_4^-), są molekularnymi analogami fosforanów i hamują fosforylację oksydacyjną, tym samym blokując łańcuch oddechowy. Arseniny [$\text{As}(\text{OH})_3$ i H_2AsO_3^-] są bardziej toksyczne, ponieważ wiążą się z grupami tiolowymi, upośledzając funkcje wielu białek. Związki As(III) powodują także zaburzenia w utlenianiu, np. pirogronianu, alfa-ketoglutaranu i glutaminianu [40].

Mikroorganizmy wykształciły różne mechanizmy usuwania arsenu z komórki. Mogą one: (i) zmniejszyć pobieranie arsenianów przez systemy transportu fosforanów [14], (ii) przeprowadzić transformacje chemiczne toksycznych związków arsenu (metylacja, demetylacja, redukcja, utlenianie) oraz (iii) wykorzystać specjalne systemy detoksykacji arsenu, tzw. systemy ArsC [60].

W niniejszej pracy dokonano przeglądu bakterii odgrywających kluczową rolę w biogeochemicznym obiegu arsenu. Opisano: (i) bakterie odporne na związki arsenu, (ii) bakterie wykorzystujące arseniany jako końcowe akceptory elektronów w procesie oddychania beztlenowego, a także (iii) bakterie chemolitoautotroficzne uzyskujące energię z procesu utleniania arseninów.

2. Rozpowszechnienie arsenu w środowisku

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w skorupie ziemskiej, ale występuje w niej w ilościach śladowych (około 3,4 ppm) [74]. Występuje w glebie i w minerałach, i może być również uwalniany do wody i powietrza. Minerały arsenowe wchodziły w skład hydrotermalnych lub metasomatycznych złóż rud metali, a wśród ponad 150 istniejących minerałów najbardziej rozpowszechnionymi są: realgar (As_4S_4), aurypigment (As_2S_3), arsenit (As_2O_3), lelingit ($FeAs_2$) i arsenopiryt ($FeAsS$) [10, 11]. W Polsce najważniejsze złoża minerałów arsenowych znajduje się w Żłotym Stoku (Dolny Śląsk), a niewielkie ich ilości stwierdzono również w Miedziance i Czarnowie koło Kamiennej Góry (Dolny Śląsk).

Arsen jest uwalniany do środowiska pod wpływem: (i) wietrzenia skał, (ii) erupcji i emisji wulkanów, oraz (iii) innych naturalnych procesów (np. pod wpływem działania mikroorganizmów). Na obecność związków arsenu w glebie, wodzie i powietrzu ma także wpływ działalność człowieka. Do antropogenicznych źródeł arsenu można zaliczyć: (i) wydobywanie i wytopienie rud metali nieżelaznych, (ii) spalanie drewna i węgla brunatnego, (iii) stosowanie pestycydów, defoliantów i herbicydów [6], (iv) stosowanie związków arsenu jako dodatku do pasz dla zwierząt [Roxarsony (kwas 4-hydroksy-3-nitrofenyloarsenowy) i kwas *p*-arsanilowy (kwas 4-aminofenyloarsenowy)] [54]. Skażeniu ulega przede wszystkim gleba oraz środowisko wodne, a ilości uwolnionych związków prawie czterokrotnie przewyższają te pochodzące z naturalnych źródeł [19].

Arsen jest powszechnym zagrożeniem zdrowia w wielu częściach świata. Skażenie wód gruntowych tym pierwiastkiem stwierdzono w: Bangladeszu [8], Zachodnim Bengal w Indiach [21], Tajwanie [16], Chile [9], Północnym Meksyku [13], Argentynie [3, 23, 44] oraz w USA (W Stanach: Kalifornia, Utah, Nevada, Washington i Alaska) [72]. W Polsce największe ilości arsenu znajdują się w: (i) Bieszczadach, co związane jest z występowaniem minerałów arsenowych w okolicy Baligródu, (ii) na Górnym Śląsku, co wiąże się z rozwojem i działalnością hutnictwa i górnictwa rud metali, oraz (iii) na Dolnym Śląsku w dolinie potoku Trująca i w okolicach Żłotego Stoku, gdzie występują złoża arsenowe lelingitu i arsenopiryty [36].

3. Mikrobiologiczne transformacje arsenu

Arsen należy do pierwiastków bardzo mobilnych i w środowisku ulega różnorodnym transformacjom włączając: przemiany chemiczne (procesy redukcji/utleniania, metylacji/demetylacji) oraz zmiany postaci fizycznej (ciało stałe – ciecz – gaz). Głównym źródłem

transformacji arsenu w środowisku są organizmy żywe, a przede wszystkim mikroorganizmy.

Przemiany arsenu przeprowadzane przez drobno-ustroje prokariotyczne i eukariotyczne stanowią kluczowe etapy biogeochemicznego obiegu tego pierwiastka. Możemy wyróżnić trzy podstawowe typy biotransformacji:

- (i) procesy redukcji, metylacji i demetylacji związków arsenu (przeprowadzane przez grzyby, glony i bakterie),
- (ii) biosynteza organicznych związków arsenu (przeprowadzane przez grzyby, glony, bakterie i archeony),
- (iii) przemiany redoks pomiędzy arseninami a arsenianami (przeprowadzane przez prokarioty).

Procesy redoks „katalizowane” przez bakterie i archeony są najważniejszym elementem biogeochemicznego obiegu arsenu i dlatego zostały one omówione szerzej w rozdz. 4.

3.1. Biometylacja organicznych związków arsenu

Proces biometylacji pierwszy raz opisano w 1945 roku, gdy wykazano, że grzyb *Scopulariopsis brevicaulis* jest zdolny do metylacji arsenowodoru [15]. Od tego czasu opisano wiele gatunków grzybów metylujących związki arsenu. Interesującym przykładem jest *Candida humicola*. Gatunek ten wykazuje zdolność do metylacji arseninów, metyloarsenianów, oraz dime-tyloarsenku (DMA) do trimetyloarsenku (TMA) [18]. Z kolei szczep *Penicillium* sp., wyizolowany przez H u y s m a n s i F r a n k e r b e r g a w 1991 [30] jest zdolny nie tylko do metylacji arsenu, ale również do utleniania powstałego produktu.

Metylacja związków arsenu została wykryta także u wielu gatunków prokariotów. W 1971 roku M c B r i d e i W o l f e po raz pierwszy opisali ten proces u archeona *Methanobacterium bryantii* [37]. Kilka lat później wyizolowano *Aeromonas* sp. i *Flavobacterium* sp., które są zdolne do metylacji związków arsenu [75]. Obecnie wiadomo, że metylowe pochodne arsenu produkują też: *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Nocardia* sp. [7].

Co ciekawe, mikrobiologiczna metylacja związków arsenu wykazuje duże podobieństwo do procesów przeprowadzanych w tkankach zwierząt [60]. W tkankach zwierzęcych oraz u grzybów donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina, a produktem metylacji arseninów jest kwas dimetyloarsenowy. Z kolei u bakterii donorem grupy metylowej jest metylo-kobalamina. We wszystkich przypadkach w procesie metylacji niezbędne jest także cytoplazmatyczne białko, metylotransferaza, która wykorzystuje tioredoksynę (Trx) jako reduktor [60].

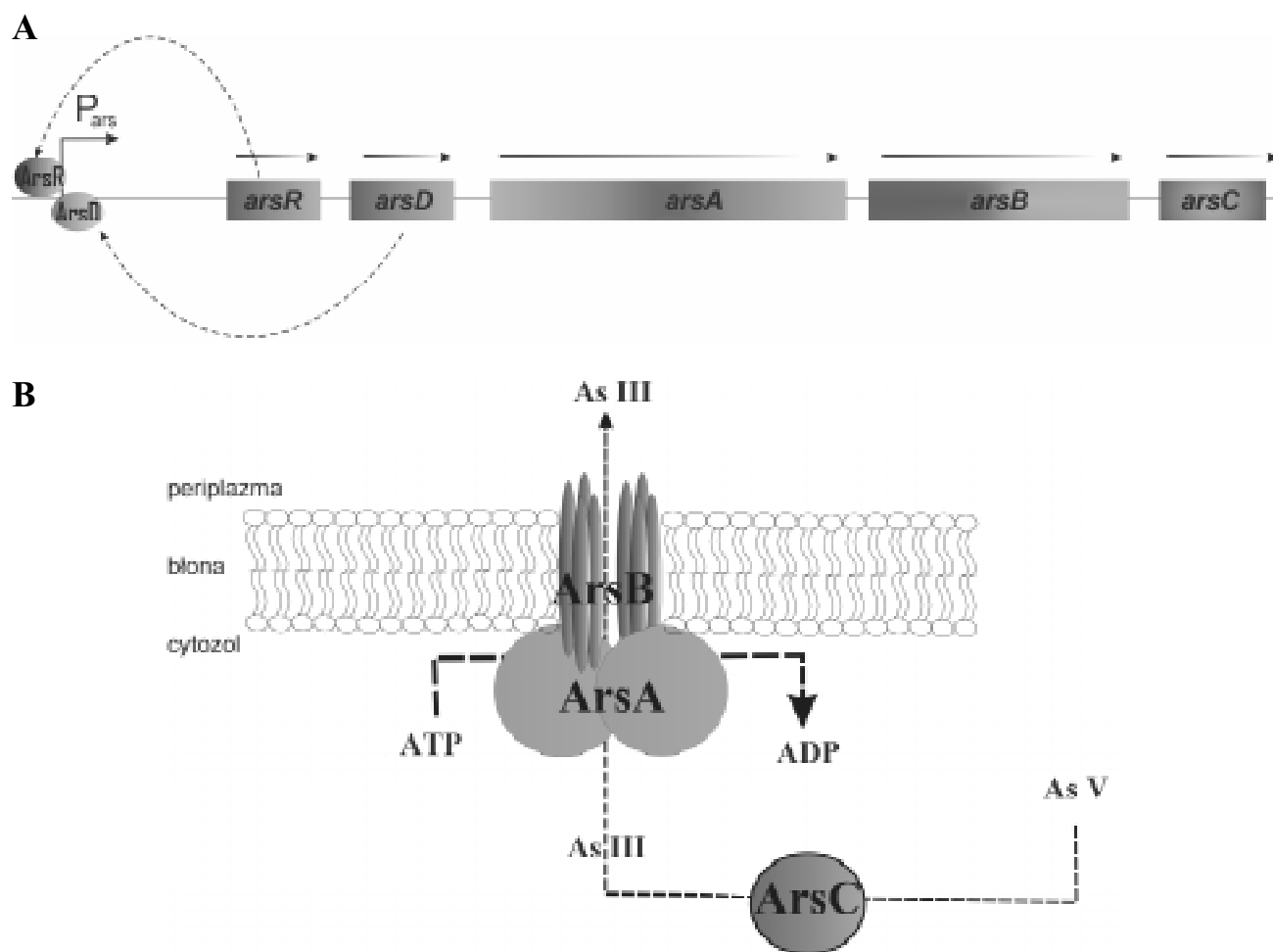
Warto zaznaczyć, że metylacja związków arsenu nie jest uniwersalnym mechanizmem oporności na arsen, a dla niektórych mikroorganizmów metylowane formy arsenu mogą być bardziej toksyczne niż formy niemetylowane [64]. Z kolei niewiele wiadomo na temat odwrotnego procesu, a mianowicie demetylacji organicznych pochodnych arsenu. Nie zidentyfikowano dotąd żadnych enzymów (ani genów) odpowiedzialnych za proces demetylacji organicznych pochodnych arsenu.

3.2. Redukcja arsenianów – mechanizm oporności

W celu ochrony przed toksycznym działaniem arsenu mikroorganizmy wykształciły różne strategie detoksykacji. Najbardziej powszechnym i najlepiej poznany mikrobiologicznym mechanizmem oporności na arsen są tzw. systemy *ars*. Mechanizm działania polega na redukcji arsenianów [As(V)], a następnie usuwaniu powstałych arseninów [As(III)] poza komórkę. Systemy *ars* występują zarówno u bakterii Gram-dodatnich, gramujemnych jak i u archeonów. Proces

redukcji As(V) do As(III) wykryto także u *Saccharomyces cerevisiae*.

Determinanty genetyczne odpowiedzialne za mechanizm redukcji arsenianów mogą znajdować się na chromosomach lub plazmidach i mogą występować razem z genami oporności na inne metale ciężkie, np. na antymon Sb(III) [12]. Systemy *ars* tworzą operony składające się z minimum trzech genów podlegających wspólnej transkrypcji: *arsR*, *arsB* i *arsC* [61]. Gen *arsR* koduje białko regulatorowe odpowiedzialne za ekspresję operonu *ars*, gen *arsB* – specyficzny transporter As(III), a *arsC* – cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową. W operonach *ars* mogą występować dodatkowe geny: *arsA* i *arsD*. Białko ArsA jest rozpuszczalną podjednostką ATPazy aktywowaną poprzez obecność metalu ciężkiego. ArsA tworzy kompleks z błonowym białkiem ArsB, i pośrednio (jako kompleks ArsAB) uczestniczy w usuwaniu As(III) poza komórkę [70]. Białko ArsD pełni funkcje drugiego, poza ArsR, regulatora operonu *ars*. Jak się wydaje, białko ArsD jest regulatorem działającym *in trans*, niezależnym od



Rys. 1. Schemat organizacji operonu *ars* [A] oraz mechanizm działania systemu *ars* [B]

Gen *arsR* koduje białko regulatorowe (ArsR) odpowiedzialne za ekspresję operonu *ars*, gen *arsD* koduje drugi regulator – białko ArsD. Gen *arsB* koduje specyficzny transporter As(III) (białko ArsB), *arsC* cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową (białko ArsC), z kolei *arsA* koduje ATPazę (białko ArsA), która tworzy kompleks z ArsB, i pośrednio (jako kompleks ArsAB) uczestniczy w usuwaniu As(III) poza komórkę.

czynników indukujących [27]. Schemat organizacji operonu *ars* oraz mechanizm działania systemu *ars* przedstawiono na rys. 1.

Podstawowym enzymem w systemach *arsC* jest cytoplazmatyczna reduktaza arsenianowa ArsC. Na podstawie przeprowadzonych analiz filogenetycznych sekwencji białkowych wykazano, że istnieją trzy oddzielne grupy cytoplazmatycznych reduktaz arsenianowych, które mają taką samą funkcję biochemiczną, ale różne pochodzenie ewolucyjne [38]. Archetypem pierwszej grupy reduktaz arsenianowych jest reduktaza kodowana przez plazmid R773 *E. coli*, która wykorzystuje glutaredoksynę (Grx) i glutation (GSH) jako reduktor. Reprezentantem drugiej rodziny jest reduktaza ArsC kodowana przez plazmid pI258 *Staphylococcus aureus*, która wykorzystuje tioredoksynę (Trx) jako reduktor i jest spokrewniona z rodziną LmwPTPaz (Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase). Trzecią rodzinę reprezentuje reduktaza Acr2p z *S. cerevisiae*, jedyna do tej pory zidentyfikowana eukariotyczna reduktaza arsenianowa. Należy ona do super-rodźni PTPaz (protein tyrosine phosphatase), w skład której wchodzi fosfatazy cyklu komórkowego Cdc25a.

4. Procesy redoks

Źródłem energii dla organizmów chemotroficznych są reakcje utleniania i redukcji (reakcje redoks), w których elektrony są przenoszone z jednego pierwiastka lub związku na inny związek lub pierwiastek. Reakcje redoks powodują zmiany konfiguracji elektronowej danego pierwiastka (związku), co bardzo często zmienia jego właściwości oraz reaktywność. Abiotyczne procesy redoks zachodzą bardzo powoli, zaś reakcje katalizowane przez mikroorganizmy są dużo szybsze i bardziej rozpowszechnione w środowisku naturalnym.

Reakcje utleniania i redukcji przeprowadzane przez mikroorganizmy są zazwyczaj wykorzystywane w procesach oddechowych do uzyskiwania energii. Utlenianie związków organicznych lub nieorganicznych (donory elektronów) sprzężone z redukcją tlenu cząsteczkowego (O_2) jest procesem oddychania tlenowego i wiąże się z powstawaniem wody. Z kolei w oddychaniu beztlenowym utlenianie donorów elektronów jest połączone z redukcją innych niż tlen akceptorów elektronów, w wyniku czego powstają inne produkty końcowe.

Zarówno mikrobiologiczne utlenianie arseninów jak i beztlenowe procesy oddychania arsenianowe znacząco wpływają na obieg biogeochemiczny arsenu. W pierwszej części tego rozdziału zostały umówione mikroorganizmy, które wykorzystują arseniany jako ostateczne akceptory elektronów, zaś w drugiej omówiono bakterie i archeony utleniające arseniny.

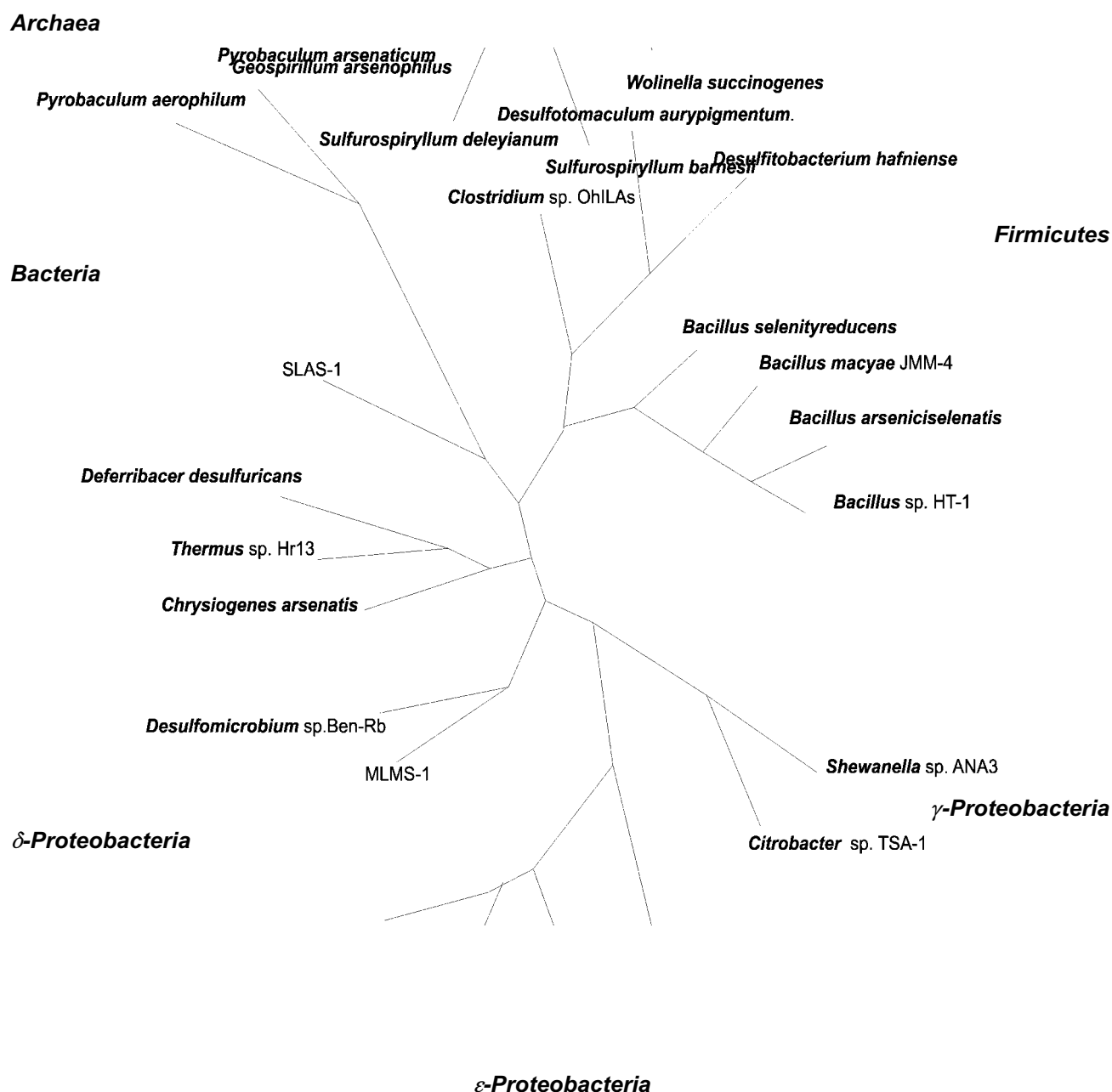
4.1. Dysymilacyjna redukcja arsenianów

Bakteryjny proces redukcji arsenianów do arseninów może towarzyszyć utlenianiu substratów organicznych lub wodoru, a wynikiem tego sprzężenia jest synteza ATP. Cały proces utleniania związków organicznych, w połączeniu z redukcją As(V) do As(III), jest korzystny energetycznie ze względu na powstający potencjał redoks As(V)/As(III), który wynosi + 135 mV.

Obecnie znanych jest około 30 organizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów. Wśród nich są beztlenowce z różnych grup *Bacteria* i *Archaea*. Ponad 20 gatunków mikroorganizmów oddychających arsenianami (redukcujących arseniany) zostało wyizolowanych w postaci czystych kultur i sklasyfikowanych do następujących typów prokariotów: *Proteobacteria* (γ , δ i ϵ), *Firmicutes*, „Deinococcus-Thermus”, *Chrysiogenetes* oraz do *Crenarchaeota* [48]. Zróżnicowanie filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów przedstawia rys. 2.

Mikroorganizmy zdolne do oddychania arsenianowego były izolowane z różnych środowisk w tym: z osadów słodkowodnych, ujść rzek, jezior, gorących źródeł, kopalni złota [47], z podpowierzchniowych formacji wodonośnych [55], z otworów termicznych w skorupie ziemskiej na dnie oceanu [68] oraz przewodu pokarmowego zwierząt [28]. Wśród mikroorganizmów wykorzystujących arseniany jako końcowe akceptory elektronów znajdują się także ekstremofile przystosowane do wysokich temperatur, pH czy zasolenia [26, 29, 67].

Pierwszymi opisanymi bakteriami zdolnymi do oddychania arsenianowego były dwa blisko spokrewnione gatunki należące do ϵ -*Proteobacteria*: *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 i *S. barnesii* SES-3 [1, 35, 65]. Szczep *S. arsenophilum* MIT-13 został wyizolowany z zanieczyszczonych arsenem osadów zlewiska Aberjona w USA [1]. Bakteria ta utlenia mleczan do CO_2 , jednocześnie redukując As(V) do As(III), dzięki czemu uzyskuje energię potrzebną do wzrostu. *S. arsenophilum* może również wykorzystywać: H_2 i octan, lub pirogronian jako alternatywne donory elektronów, oraz azotany i fumarany jako akceptory elektronów. Z kolei szczep *S. barnesii* SES-3 został wyizolowany z bogatych w związki selenu bagien we wschodniej Nowadzie (USA). Szczep SES-3 może wykorzystywać octan, pirogronian, mleczan i wodór jako donory elektronów, a jako akceptor elektronów oprócz arsenianów może wykorzystywać: fumarany, Fe(III), tiosiarczan, siarkę elementarną, azotany, DMSO i inne [66]. Bardzo interesującym przykładem jest także szczep Gram-dodatniej bakterii, *Desulfotomaculum auripigmentum* OREX-4, wyizolowanej ze słodkowodnych osadów jeziora Upper Mystic w Winchester, w USA [43]. Utle-



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych zdolnych do dysymilacyjnej redukcji arsenianów. Pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy genami 16S rRNA wyznaczono metodą największej parsymonii z metodą nieparametryczną bootstrap.

nia on: H_2 , H_2 i octan, maślan, pirogronian, mleczan, jabłczan, glicerol i etanol, wykorzystując: siarczany, siarczyny, tiosiarczany, fumaran i przede wszystkim arseniany jako akceptory elektronów.

Pierwszą oczyszczoną i scharakteryzowaną reduktazą odpowiedzialną za dysymilacyjną redukcję $As(V)$ był enzym wyizolowany z *Chrysiogenes arsenatis* [35]. Reduktaza tej bakterii jest peryplazmatycznym molibdoenzymem należącym do rodziny reduktaz DMSO. Składa się z dwóch podjednostek: większej ArrA (87 kD) zawierającej centrum żelazo-siarkowe [4Fe-4S], oraz mniejszej ArrB (29 kD) zawierającej zgrupowanie żelazo-siarkowe [Fe-S] [33]. Równie

dobrze została scharakteryzowana reduktaza arsenianowa gramodatniej, haloalkalofilnej bakterii *Bacillus selenityreducens*. Wykazuje ona duże podobieństwo, na poziomie sekwencji nukleotydowej (50% podobieństwa) oraz na poziomie aminokwasowym (obie podjednostki ArrA i ArrB wykazują 85% podobieństwa), do reduktazy *C. arsenatis*. Niezwykle interesująca jest także Gram-ujemna bakteria z rodzaju *Shewanella*. Na podstawie przeprowadzonej analizy *in silico* wykazano, że szczep *Shewanella* ANA-3 posiada w swoim genomie operon *ars* (kodujący reduktazę cytoplazmatyczną) oraz geny *arrA* i *arrB*, kodujące dysymilacyjną reduktazę arsenianową (zlokalizowaną

w błonie komórkowej). Geny te kodują odpowiednio: (i) potencjalne białko ArrA, zawierające motyw żelazo-siarkowy i molibdenowy kofaktor piranopterynowy oraz (ii) potencjalne białko ArrB, zawierające trzy [4Fe-4s] oraz jedno [3Fe-4S] zgrupowania żelazo-siarkowe [56]. Homologi operonu *arr* zostały także zidentyfikowane w genomach *Desulfofitobacterium hafniense* [45], *Wolinella succinogenes* [28], *Desulfosporosinus* sp. Y5 [51].

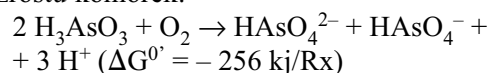
4.2. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów

Chemiczne utlenianie As(III) do As(V) w obecności samego tlenu jest procesem bardzo powolnym [17]. Aby zwiększyć szybkość reakcji utleniania, należy zastosować odpowiedni katalizator [33]. Skutecznymi utleniaczami chemicznymi są: wolny chlor (Cl₂), podchloryn, ozon czy nadmanganian. Ze względu na występowanie skutków ubocznych (utlenianie innych związków w środowisku, powstawanie produktów ubocznych oraz pozostałości po utleniaczach), wymienione wyżej chemiczne utleniacze nie są w zasadzie stosowane w środowisku naturalnym. Alternatywą do chemicznego utleniania As(III) w środowisku jest zastosowanie naturalnych katalizatorów biologicznych.

Większość arseninów występujących w środowisku jest utleniana z udziałem mikroorganizmów [69]. Pierwsze doniesienia o mikrobiologicznym utlenianiu arsenu pochodzą z roku 1918, kiedy to Green wyizolował i opisał szczep *Achromobacter* zdolny do utleniania arseninów do arsenianów [25]. Od tego czasu wyizolowano i scharakteryzowano wiele gatunków z różnych grup *Bacteria* i *Archaea* zdolnych do utleniania As(III) [42]. Wśród bakterii zdolnych do utleniania arseninów większość stanowią chemoorganoheterotrofy, które do wzrostu wymagają organicznego źródła węgla. Należą do nich: α, β i γ *Proteobakterie*, bakterie z grupy „Deinococcus-Thermus” oraz archeony z typu *Crenarchaeota*. Znane są również bakterie utleniające arseniny zdolne do wzrostu chemolitoautotroficznego. Do chemolitoautotroficznych bakterii arsenowych możemy zaliczyć sześć szczepów należących do α-*Proteobacteria*: Ben-5, NT-2, NT-3, NT-4, Nt-25 i NT-26 [57], dwa do γ-*proteobacteria* – szczep MHLE-1 [46] oraz *Pseudomonas arsenitoxidans* [31], oraz dwa szczepy zaliczone do β-*Proteobacteria*: *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 [39] oraz *Thiomonas arsenivorans* b6^T [5]. Zróżnicowanie filogenetyczne bakterii utleniających arseniny przedstawia rys. 3.

W przypadku bakterii heterotroficznych utlenianie arseninów jest głównie mechanizmem detoksykacji, polegającym na transformacji As(III) do mniej toksycznej formy As(V). Przedstawiona niżej reakcja utleniania arseninów przez bakterie heterotroficzne, pomimo że jest reakcją egzoergiczną, nie jest wyko-

rzystywana do zdobywania energii potrzebnej do wzrostu komórek:

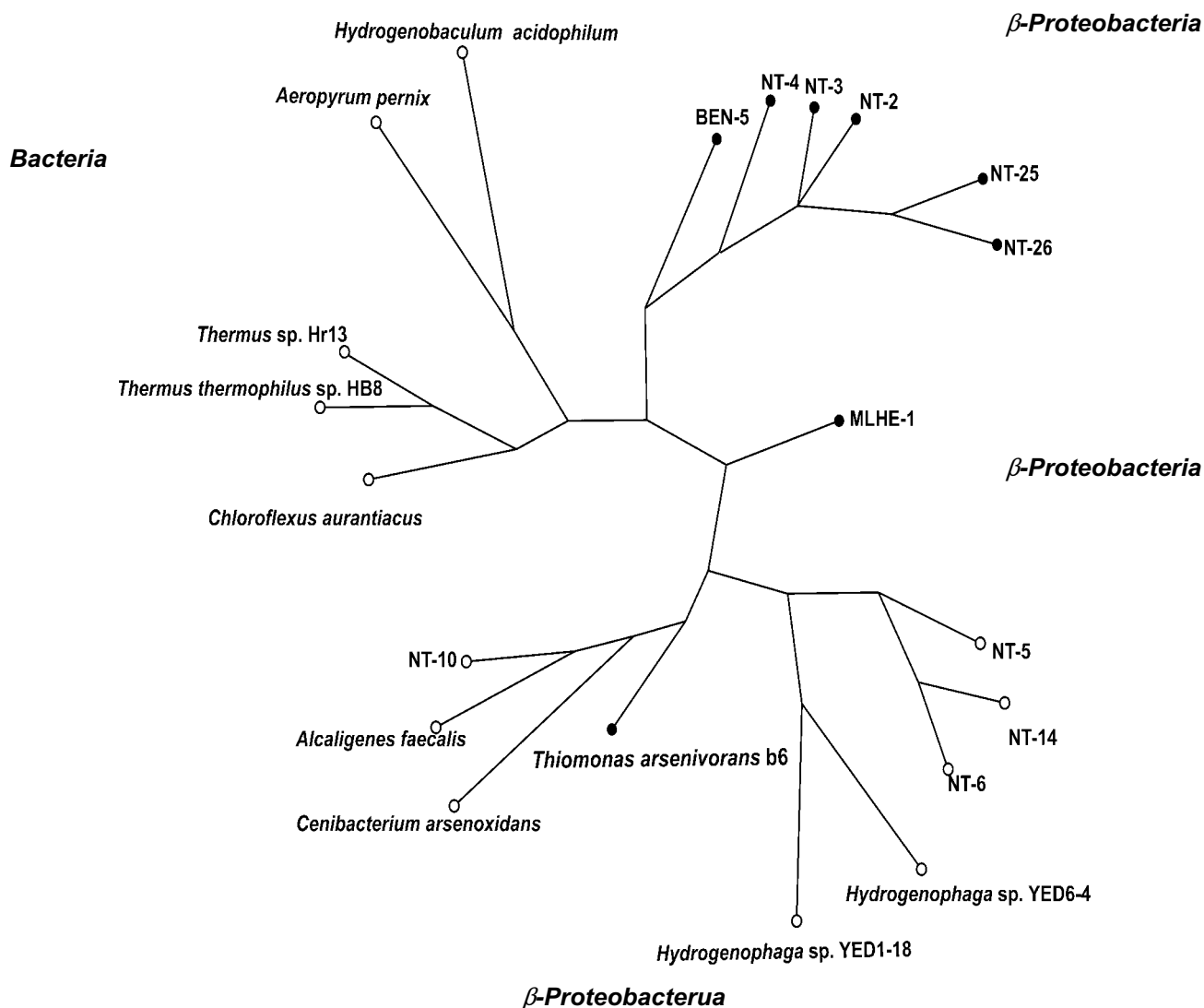


Zupełnie inaczej przedstawia się sytuacja w przypadku bakterii chemolitoautotroficznych. Utlenianie arseninów, pełniących funkcję donora elektronów, jest sprzężone z łańcuchem transportu elektronów i z redukcją tlenu lub azotanów oraz wiąże się z pozyskaniem energii do wiązania CO₂ i wzrostu komórek.

Ze wszystkich bakterii utleniających arseniny do arsenianów najlepiej poznana jest heterotroficzna bakteria *Alcaligenes faecalis* [50]. Oksydaza arseninowa *A. faecalis* jest częścią składową peryplazmatycznego łańcucha transportu elektronów, w którego skład wchodzi także: azuryn, cytochrom *c* i oksydaza cytochromu *c*. Oksydaza arseninowa tej bakterii jest jednorodzeniowym molibdoenzymem, należącym do rodziny reduktaz DMSO podobnych do reduktaz arsenianowych (Arr) [2]. Jest ona heterodimerem, z dużą podjednostką katalityczną AsoA (~85 kD), zawierającą atom molibdenu połączony z dwiema pterynami i zgrupowaniem [3Fe-4S], oraz z mniejszą podjednostką AsoB (~14 kD) (najprawdopodobniej pełniącą funkcję przenośnika elektronów), zawierającą motyw Rieske'go [2Fe-2S] [2], który jest typowy dla molibdoenzymów.

Scharakteryzowana została również oksydaza arseninowa chemolitoautotroficznego szczepu *Rhizobium* sp. NT-26 [58] oraz heterotroficznego szczepu *Hydrogenophaga* sp. NT-14 [73]. Podobnie jak w przypadku *A. faecalis* są to enzymy peryplazmatyczne składające się z dwóch heterologicznych podjednostek. Większa podjednostka AroA (98 kD) wykazuje duże podobieństwo do molibdenowych podjednostek reduktaz DMSO, zaś mniejsza podjednostka AroB (14 kD) zawiera motyw żelazowo-siarkowy Rieske'go [58].

Utlenianie As(III) z udziałem „mikrobiologicznych katalizatorów” staje się podstawą powstających obecnie systemów bioremediacyjnych usuwających arseniny. W 2002 roku zespół badawczy Battaglia-Brunet opisał proces utleniania arseninów przez populację bakterii nazwanych CASO1, a następnie immobilizację powstałych arsenianów [As(V)] na silnych adsorbentach [4]. Bardzo skutecznym mikrobiologicznym utleniaczem okazał się także szczep *Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 wyizolowany ze ścieków przemysłowych zanieczyszczonych arsenem [62]. Za interesowanie tematem bioremediacji arsenu ze środowiska i poszukiwania mikroorganizmów użytecznych w procesach detoksykacji środowisk skażonych As(III) doprowadziło do wyizolowania kilku nowych gatunków bakterii utleniających As(III). W 2001 roku Gihring i Banfield wyizolowali z gorących źródeł Growler Hot Spring w północnej Kalifornii w USA bardzo interesujący, termofilny szczep *Thermus*



Rys. 3. Drzewo filogenetyczne mikroorganizmów prokariotycznych utleniających arseniny

Pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy genami 16S rRNA wyznaczono metodą największej parsymonii z metodą nieparametryczną bootstrap.

○ – zaznaczono bakterie heterotroficzne, natomiast ● – zaznaczono bakterie chemilitoautotroficzne.

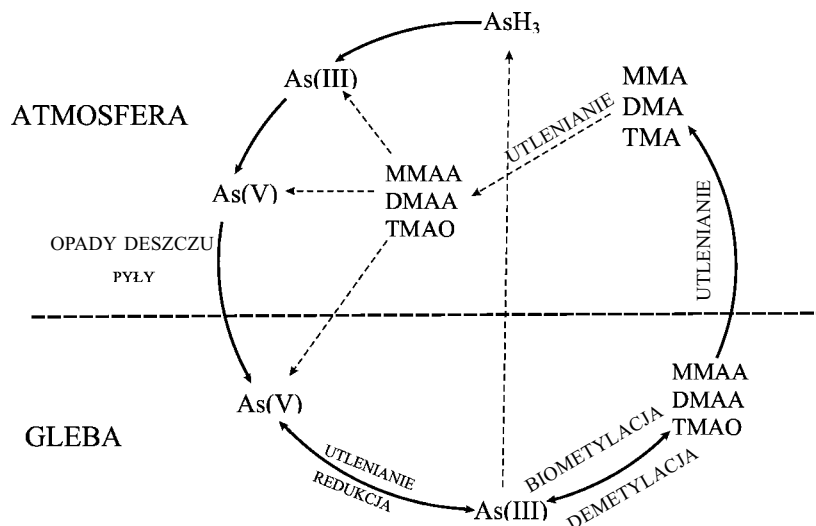
HR13 [26]. W warunkach tlenowych utlenia on As(III) w celach detoksykacji, nie wykorzystując powstałej energii. Natomiast w warunkach beztlenowych w obecności mleczanu wykorzystuje As(V) jako końcowy akceptor elektronów. Równie ciekawy jest chemilitoautotroficzny szczep MHLE-1, wyizolowany z Mono Lake w Kalifornii (USA) [46]. Może on wykorzystywać oprócz arseninów inne donory elektronów: siarczki lub gazowy wodór (H_2). Jest także zdolny do wzrostu heterotroficznego oraz potrafi wykorzystywać azotany jako końcowy akceptor elektronów [46].

5. Biogeochemiczny obieg arsenu

Mikroorganizmy pełnią istotną rolę w wielu reakcjach geochemicznych, które mają pośredni lub bezpośredni wpływ na specjację arsenu w środowisku. Nieorganiczne formy arsenu, arseniny [As(III)] i arse-

niany [As(V)], mogą być odpowiednio utleniane bądź zredukowane w zależności od aktywności mikroorganizmów. Arsen nieorganiczny ulega także metylacji i wówczas mogą powstawać: kwas monometyloarsenowy (MMAA – monomethylarsonic acid), kwas dimetyloarsenawy (DMAA – dimethylarsinic acid) oraz tlenek trójmetyloarsenu (TMAO – trimethyl arsine oxide) [71]. Niektóre mikroorganizmy są także zdolne do demetylacji organicznych form arsenu do związków nieorganicznych [63]. Rozpuszczalne związki arsenu mogą być przekształcone przez mikroorganizmy w gazowe arsenki. As(V) i As(III) mogą być zredukowane do arsenowodoru [AsH_3], MMAA do monometyloarsenu [MMA – monomethyl arsine], DMAA do dimetyloarsenu [DMA, dimethyl arsine] oraz TMAO do trójmetyloarsenu [TMA – trimethyl arsine] [19].

W zależności od typu środowiska oraz od mikroorganizmów w nim występujących możemy wyróżnić



Rys. 4. Schemat gazowego obiegu arsenu (wg Trupeinen i wsp., 2002 za zgodą wydawcy)

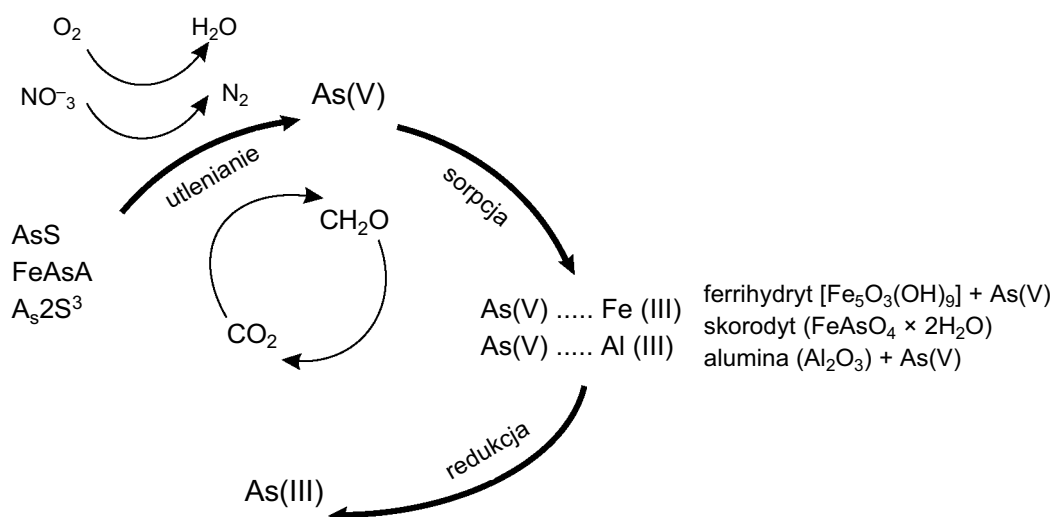
MMAA – kwas monometyloarsenowy (monomethylarsinic acid), DMAA – kwas dimetyloarsenawy (dimethylarsinic acid), TMAO – tlenek trójmetyloarsenu (trimethyl arsine oxide), MMA – monometylo arsenek (monomethyl arsine), DMA – dimetylo arsenek (dimethylarsine), TMA – trimetylo arsenek (trimethylarsine).

gazowy i sedymentacyjny obieg biogeochemiczny arsenu. O gazowym (globalnym) cyklu mówimy w przypadku, gdy arsen przechodzi w postać gazową i może przemieszczać się na większe odległości. Natomiast obieg sedymentacyjny ma miejsce, gdy arsen nie przechodzi w postać gazową, a jest jedynie osadzany w glebie lub na dnie oceanów lub zbiorników wodnych na skutek ciężenia, jest to więc cykl lokalny.

W 1977 roku Woolson [76] opisał „gazowe” przemiany arsenu występującego w glebie. As(V) jest redukowany do As(III), a następnie w wyniku kolejnych reakcji metylacji As(III) pojawia się trójmetylo-

arsenek (TMA). Powstałe arsenki mogą być przenoszone wraz z wiatrem na duże odległości lub w zależności od warunków środowiskowych mogą być od razu utleniane. Z kolei utlenianie metylowych pochodnych arsenu przywraca formy nieorganiczne, które wraz z deszczem lub jako pyły powracają do gleby [52]. Schemat gazowego obiegu arsenu przedstawia rys. 4.

Szlaki lokalnego (sedymentacyjnego) obiegu arsenu są bardziej złożone i ściśle zależą od warunków środowiska. W ostatnich latach zostało przedstawionych kilka teorii wyjaśniających mikrobiologiczną mobilizację arsenu w zbiornikach wodnych, osadach



Rys. 5. Schemat lokalnego obiegu arsenu wg Oremland i Stolz (2003)

Arsen pierwotnie występuje w zredukowanych minerałach takich jak: realgar (AsS), aurypigment (As_2S_3), czy arsenopiryty ($FeAsS$). Chemolitoautotroficzne bakterie zdolne do utleniania związków arsenu i asymilacji CO_2 do związków organicznych, „atakują” te minerały i uwalniają As(V) do środowiska. As(V) może być następnie adsorbowany na powierzchni utlenionych minerałów takich jak: ferrihydryt, skorodyt czy alumina. Jeżeli zostaną dostarczone związki organiczne (np. z pokładów torfu), to w warunkach beztlenowych As(V) może zostać zredukowany przez chemoorganoheterotrofy, a powstały As(III) jest uwolniony do środowiska, w związku z czym nie jest to obieg zamknięty

i glebie [49]. Wszystkie one opisują zależności biogeochemiczne pomiędzy mikroorganizmami, związkami arsenu, oraz innymi związkami nieorganicznymi (głównie żelaza, manganu oraz siarki). Ogólny schemat lokalnego obiegu arsenu przedstawiono na rys. 5. W środowiskach bogatych w związki żelaza następuje silna adsorpcja As(V) na Fe(III). Jeżeli w takich warunkach znajdzie się bakteria zdolna do redukcji Fe(III) do rozpuszczalnego Fe(II), następuje wówczas uwalnianie As(V) do środowiska. Taki mechanizm mobilizacji arsenu został opisany na przykładzie bakterii *Shewanella alga*. Jest ona zdolna do redukcji żelaza występującego w skorodycie ($\text{FeAsO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) [20]. Zupełnie inaczej jest w przypadku bakterii zdolnych do redukcji As(V). Wówczas do środowiska są uwalniane przede wszystkim jony As(III). W 1997 r. Ahmann i wsp. opisali proces uwalniania As(III) ze stałego arsenianu żelaza (FeAsO_4) za pośrednictwem *Sulfurospirillum arsenophilum* [1]. Bakterie zdolne do redukcji As(V) i Fe(III) uwalniają do środowiska As(III) oraz Fe(II). Należy do nich wspomniany wcześniej szczep *Sulfurospirillum barnesii* SES-3. Szczep SES-3, podobnie jak i inne bakterie zdolne do dysymilacyjnej redukcji arsenianów, może wykorzystywać różne akceptory elektronów. Może on uwalniać As(III) oraz Fe(II) z ferryhydrytu [$\text{Fe}_5\text{O}_3(\text{OH})_9$], na którym początkowo był wytrącony As(V).

6. Podsumowanie

W prawie wszystkich zsekwencjonowanych genomach bakterii i archeonów występują geny *ars* kodujące oporność na As(V) i/lub As(III). W bazie danych Entrez Nucleotide [76] obecnie znajduje się ponad 1000 sekwencji genu *arsC* (koduje cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową) oraz prawie 300 sekwencji genu *arsB* [koduje specyficzny transporter As(III)]. Ilość sekwencji genów *ars* zdeponowanych w bazach danych świadczy o ich rozpowszechnieniu u prokariotów oraz pośrednio o silnej toksyczności arsenu w środowisku.

W większości przypadków mikroorganizmy wykształciły tylko mechanizmy usuwające arsen poza komórkę. Mikroorganizmy redukujące As(V) uwalniają do środowiska bardziej toksyczne formy As(III), tym samym zwiększając stopień jego zanieczyszczenia. Z kolei bakterie utleniające arseniny mogą być wykorzystane w procesach bioremediacji wód pitnych skażonych arsenem. Mikrobiologiczne utlenianie arseninów [As(III)], a następnie adsorpcja powstałych arsenianów [As(V)] na silnych adsorbentach [np. Fe(III)] może w przyszłości stać się wydajnym sposobem usuwania arsenu. Oprócz bakterii w systemach bioremediacyjnych próbuje się także wykorzystać rośliny.

Bakteryjny gen *arsC* kodujący cytoplazmatyczną reduktazę arsenianową oraz gen kodujący enzym odpowiedzialny za nadprodukcję glutationu u roślin, zostały sklonowane w *Arabidopsis thaliana* [24]. Taka roślina transgeniczna jest oporna na bardzo duże stężenia As(V) i ma zdolność do odkładania przekształconego arsenu w przestrzeniach międzykomórkowych.

Obecnie prowadzone są także badania środowiskowe niezwiązane z technikami hodowli mikroorganizmów (z dziedziny tzw. metagenomiki), które mają na celu poznanie genów oraz białek związanych z metabolizmem arsenu. Jej największym osiągnięciem jest zidentyfikowanie ponad 160 różnych genów *aroA*, kodujących oksydazę arseninową. Ze skażonych arsenem gleb, osadów oraz gorących źródeł w USA i Australii wyizolowano DNA, na matrycy, którego zamplifikowano bakteryjne geny *aroA*. Zamplifikowane geny sklonowano i zsekwencjonowano. Z pobranych próbek wyizolowano ponadto RNA, a następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję (RT-PCR). Okazało się, że ekspresja genów *aroA* zachodzi podczas utleniania arseninów bezpośrednio w środowisku oraz w warunkach laboratoryjnych [32]. Uzyskane wyniki (160 różnych genów *aroA*) sugerują, że geny oksydazy arseninowej są rozpowszechnione wśród bakterii i ogrywiają istotną rolę w biogeochemicznym cyklu arsenu.

Podsumowując warto podkreślić rolę badań nad mikrobiologicznym metabolizmem arsenu. Poznanie i zrozumienie mikrobiologicznych mechanizmów transformacji arsenu być może pozwoli na skonstruowanie odpowiednich narzędzi biotechnologicznych umożliwiających efektywne oczyszczanie środowisk skażonych arsenem.

Piśmiennictwo

- Ahmann D., Krumholz L.R., Hemond H.F., Lovley D.R., Morel F.M.: Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2923–2930 (1997)
- Anderson G.L., Williams J., Hille R.: The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum containing hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **267**, 23674–23682 (1992)
- Astolfi E., Maccagno A., Garcia Fernandez J.C., Vaccaro R., Stimola R.: Relation between arsenic in drinking water and skin cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **3**, 133–143 (1981)
- Battaglia-Brunet F., Dictor M.C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M., Baranger P.: An arsenic (III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 1–12 (2002)
- Battaglia-Brunet F., Joulian C., Garrido F., Dictor M.C., Morin D., Coupland K., Barrie Johnson D., Hallberg K.B., Baranger P.: Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**, 99–108 (2006)

6. Bednar A.J., Garbarino J.R., Ranville J.F., Wildeman T.R.: Presence of organoarsenicals used in cotton production in agricultural water and soil of the southern United States. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7340–7344 (2002)
7. Bentley R., Chasteen T.G.: Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 250–274 (2002)
8. Biswas B.K., Dhar R. K. ; Samanta G. Mandal B. Chakraborti D. Faruk I.Kazi Saiful Islam ; Moniruzzaman Chowdhury M. Islam A. i Roy S.: Detailed study report of Samta, one of the arsenic-affected villages of Jessore District, Bangladesh. *Curr. Sci.* **74**, 134–145 (1998)
9. Borgono J.M., Vicent P., Venturino H.: Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: Epidemiological and clinical study before and after installation of a treatment plant. *Environ. Health Perspect.* **19**, 103–105 (1977)
10. Budavari S., O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E.: The Merck index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 13th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., 2001 s. 440, 462
11. Carapella S.C. Arsenic and arsenic alloys. In: Kroschwitz JI, Howe-Grant M, wyd. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York, NY: John Wiley and Sons, **3**, 624–633 (1992)
12. Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B.P.: The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 981–986 (1995)
13. Cebrian M.E., Albores A., Aguilar M., Blakely E.: Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Hum. Toxicol.* **2**, 121–133 (1983)
14. Cervantes C., Ji G., Ramirez J.L., Silver S.: Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 355–367 (1994)
15. Challenger F.: Biological methylation. *Chem. Rev.* **36**, 315–361 (1945)
16. Chen Y.C., Su H.J., Guo Y.L., Hsueh Y.M., Smith T.J., Ryan L.M., Lee M.S., Christiani D.C.: Arsenic methylation and bladder cancer risk in Taiwan. *Cancer Causes Control*, **14**, 303–310 (2003)
17. Cherry J.A., Shaikh A.U., Tallman D.E., Nicholson R.V.: Arsenic species as an indicator of redox conditions in groundwater. *J. Hydrol.* **43**, 373–392 (1979)
18. Cox D.P., Alexander M.: Production of trimethylarsine gas from various arsenic compounds by three sewage fungi. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 84–88 (1973)
19. Cullen W.R., Reimer K.J.: Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* **89**, 713–764 (1989)
20. Cummings D.E., Caccavo F.J., Fendorf S., Rosenweig R.F.: Arsenic mobilization by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 723–729 (1999)
21. Da D., Chatterjee A., Mandal B.K., Gautam S., Chakraborti D., Chanda B.: Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part 2. Arsenic concentration in drinking water, hair, nails, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst*, **120**, 917–924 (2005)
22. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.html>. (Wrzesień 2005)(online).
23. De Sastre M.R., Varillas A., Kirschbaum P.: Arsenic content in water in the northwest area of Argentina. Arsenic in the environment and its incidence on health (International seminar proceedings), Universidad de Chile, Santiago. pp. 91–99 (1992)
24. Dhanker O.P., Li Y., Rosen B.P., Shi J., Salt D., Senecoff J.F., Sashti N.A., Meagher R.B.: Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnol.* **20**, 1140–1145 (2002)
25. Green H.H.: Description of a bacterium that oxidizes arsenite to arsenate, and one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. *S. African. J. Sci.* **14**, 465–467 (1918)
26. Gihring T.M., Druschel G.K., McCleskey R.B., Hamers R.J., Banfield J.F.: Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 3857–3862 (2001)
27. Gladysheva T.B., Oden K.L., Rosen B.P.: Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry*, **33**, 7288–7293 (1994)
28. Herbel M.J., Switzer Bluma J., Hoefta S.E., Cohen S.M., Arnold L.L., Lisack J., Stolz J.F, Oremland R.S.: Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 59–67 (2002)
29. Huber R.M., Sacher M., Vollmann A., Huber H., Rose D.: Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. *Appl. Microbiol.* **23**, 305–314 (2000)
30. Huysmans K.D, Frankenberger W.T.: Evolution of trimethylarsine by a *Penicillium* sp. isolated from agricultural evaporation pond water. *Sci. Total Environ.* **105**, 13–28 (1991)
31. Ilyaletdinov A.N., Abdrashitova S.A.: Autotrophic oxidation of arsenic by a culture of *Pseudomonas arsenitoxidans*. *Mikrobiologiya*, **50**, 197–204 (1981)
32. Inskeep W., Macur R., Hamamura N., Masur D., Taylor W.P., Warelow T.P., Ward S.A., Santini J.M.: Bacterial arsenite oxidase genes detected in soil, Sediment and Geothermal Environments. The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings (November 12–16, 2006)
33. Jekel M.R.: Removal of arsenic in drinking water treatment. In: Arsenic in environment, part I: Cycling and Characterization, ed. Nriagu, J.O. pp. 119–132. New York NY: John Wiley & Sons 1994
34. Krafft T., Macy J.M.: Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 647–653 (1998)
35. Laverman A.M., Blum J.S., Schaefer J.K., Phillips E., Lovley D.R., Oremland R.S.: Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3556–3561 (1995)
36. Lis J., Pasieczna A.: Atlas geochemiczny Polski 1:2 500 000. Państw. Inst. Geol. Warszawa, 34 s. 74 (1995)
37. McBride B.C., Wolfe R.S.: Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry*, **10**, 4312–4317 (1971)
38. Mukhopadhyay R., Rosen B.P.: Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health Perspect.* **110** (Suppl 5), 745–748 (2002)
39. Muller D., Ličvremont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C.: Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant β -Proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**, 135–141 (2003)
40. National Research Council, Arsenic in Drinking Water, National Academy Press, Washington, DC, 1999
41. Neff J.M.: Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 917–927 (1997)

42. Newman D.K., Ahmann D., Morel F.M.: A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiology*, **15**, 255–268 (1998)
43. Newman D.K., Beveridge T.J., Morel F.M. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2022–2088 (1997)
44. Nicolli H.B., Suriano J.M., Gomez Peral M.A., Ferpozzi L.H., Baleani O.A.: Groundwater contamination with arsenic and other trace elements in an area of the Pampa province of Cordoba, Argentina. *Environ. Geol. Water Sci.* **14**, 3–16 (1989)
45. Niggenmeyer A., Spring S., Stackenbrandt E., Rosenzweig R.F.: Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5568–5580 (2001)
46. Oremland R.S., Hoefl S.E., Santini J.M., Bano N., Hollibaugh R.A., Hollibaugh J.T.: Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4795–802 (2002)
47. Oremland R. S., D. K. Newman, B. W. Wail, J. F. Stolz, in Environmental Chemistry of Arsenic, W. T. Frankenberger Jr., Ed. Dekker, New York, 2002, pp. 273–296.
48. Oremland R.S., The ecology of arsenic. *Science*, **300**, 939–944 (2003)
49. Oremland R.S., Stolz J.F.: Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* **13**, 45–49 (2005)
50. Osborne F.H., Ehrlich H.L.: Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 295–305 (1976)
51. Perez-Jimenez J.R., De Fraia C., Young L.Y.: Arsenate respiratory reductase gene (*arrA*) for *Desulfosporosinus* sp. strain Y5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 825–829 (2005)
52. Pongratz R.: Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. *Sci. Total. Environ.* **224**, 133–141 (1998)
53. Reyes Sierra-Alvarez, Cortinas I., Yenal U., Field J.A.: Methanogenic inhibition by arsenic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5688–5691 (2004)
54. Rosen B.P.: Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**, 86–92 (2002)
55. Saikat S.Q., Selim A.M., Kessi J., Wehrli K.E., Hanselmann W.: www.unizh.ch/_microeco/uni/kurs/mikoek/results/project2/arsen.html (2001)
56. Saltikov C.W., Cifuentes A., Venkateswaren K., Newman D.K.: 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.* **69**, 2800–2809 (2003)
57. Santini J.M., Sly L.I., Schnagl R.D., Macy J.M.: A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 92–97 (2000)
58. Santini J.M., vanden Hoven R.N.: Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* **186**, 1614–1619 (2004)
59. Silver S.: Bacterial interaction with mineral cations and anions: good ions and bad. In: Biomineralization and biological metal accumulation (Westbroek, P., de Jong, E.W., Eds.), pp. 439–457. D. Reidel, Dordrecht. 1983
60. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
61. Silver S., Phung L.T.: A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 587–605 (2005)
62. Simeonova D.D., Micheva K., Muller D.A., Lagarde F., Lett M.C., Groudeva V.I., Lievreumont D.: Arsenite oxidation in batch reactors with alginate-immobilized ULPAs1 strain. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 441–6 (2005)
63. Sohrin Y., Matsui M., Kawashima M., Hojo M., Hasegawa H.: Arsenic biogeochemistry affected by eutrophication in Lake Biwa, Japan. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2712–2720 (1997)
64. Stolz J.F., Basu P., Santini J.M., Oremland R.S.: Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 107–130 (2006)
65. Stolz J.F., Ellis D.J., Switzer Blum J., Ahmann D., Oremland R.S.: *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov., *Sulfurospirillum arsenophilus* sp. nov., and the *Sulfurospirillum* clade in the Epsilon Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1177–1180 (1999)
66. Stolz J.F., Oremland R.S.: Bacterial respiration of selenium and arsenic. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 615–627 (1999)
67. Switzer Blum J., Bindi A.B., Buzzelli J., Stolz J.F., Oremland R.S.: *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* **171**, 19–30 (1998).
68. Takai K., Kobayashi H., Nealson K.H., Horikoshi K.: *Deferritobacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 839–846 (2003)
69. Tamaki S., Frankenberger W.T.: Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **124**, 79–110 (1992)
70. Tisa L.S., Rosen B.P.: Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 190–194 (1990)
71. Turpeinen R., Panssar-Kallio M., Kairsalo T.: Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. *Sci. Total. Environ.* **285**, 133–145 (2002)
72. Valentine J.L.: Chapter 14 – Review of health assessments for US/Canada populations exposed to arsenic in drinking water. In: Chappell WR, Abernathy CO & Cothorn CR eds. Arsenic – Exposure and health. Northwood, UK, Science and Technology Letters, pp 139–152 (1994)
73. vanden Hoven R.N., Santini J.M.: Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1656**, 148–155 (2004)
74. Wedepohl K.H.: The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals. Metals in natural raw materials. Natural resources. In: Merian E, ed. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis, and biological relevance. New York, NY: VCH, s. 3–17, 1991
75. Wong P.T.S., Chau Y.K., Luxon L., Bengert G.A. Methylation of arsenic in the aquatic environment. In: Hemphill DD ed. Trace substances in environmental health. Proceedings of the University of Missouri's 11th Annual Conference, 7–9 June 1977, Columbia, MO, University of Missouri, pp. 100–106, 1977
76. Woolson EA. Fate of arsenicals in different environmental substrates. *Environ. Health. Perspect.* **19**, 73–81, (1977)
77. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=Nucleotide) Limits&DB=Nucleotide