

研究报告

节杆菌 FX8 的分离筛选及其生物成矿除砷

范霞^{*1}, 吕锐玲¹, 王政¹, 郑永良¹, 史凯详², 王革娇²¹ 黄冈师范学院生物与农业资源学院, 湖北 黄冈 438000² 华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070

范霞, 吕锐玲, 王政, 郑永良, 史凯详, 王革娇. 节杆菌 FX8 的分离筛选及其生物成矿除砷[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 96-110.

FAN Xia, LÜ Ruiling, WANG Zheng, ZHENG Yongliang, SHI Kaixiang, WANG Gejiao. Isolation of *Arthrobacter* FX8 capable of removing arsenic by biomineralization[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 96-110.

摘要: 【背景】砷(arsenic, As)是一种剧毒的类金属, 水体砷污染问题日益突出, 严重威胁人类健康, 开发高效除砷方法迫在眉睫。【目的】吸附法是目前除砷应用最多的方法之一, 对从铁矿表层土壤分离得到的一株铁氧化菌 FX8 进行研究, 以期通过其氧化 Fe(II)生成的铁矿物作为吸附剂而去除砷。【方法】通过形态学特征、生理生化特性、全基因组测序分析对菌株进行鉴定, 采用邻菲罗啉分光光度法测定总 Fe 和 Fe(II), 利用 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)和能量色散谱(energy dispersive spectrometer, EDS)对铁氧化物沉淀进行分析, 采用高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱测定总 As。【结果】菌株 FX8 为革兰氏阳性、好氧, 其菌落为圆形、乳白色, 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)镜检细胞为杆状, 大小为(0.5–2.5) $\mu\text{m} \times$ (0.13–0.25) μm , 可归为节杆菌属(*Arthrobacter*)。菌株 FX8 能够氧化 Fe(II)并生成铁氧化物沉淀, 该沉淀为一种无定形的 Fe(III)矿物, 其结晶性差且含有大量生物杂质, 并且通过产生胞外酶氧化 Fe(II)。菌株 FX8 在 28 °C、150 r/min 条件下, 在加 As(III)和 As(V)体系中, 48 h 内总 Fe 的去除率均为 100%, 而对应的总 As 去除率分别为 99.54%和 99.86%; 在 As(III)和 As(V)体系中加入菌株 FX8 的胞外粗酶液, 2 h 内总 Fe 的去除率均为 100%, 相应的总 As 去除率为 99.45%和 100%。【结论】菌株 FX8 是一株铁氧化菌, 利用其胞外粗酶液生物矿化铁除砷的效果优于菌株-砷共培养, 本研究可为水体砷污染的高效生物修复提供新的生物材料及理论参考。

关键词: 砷污染; 除砷; 铁氧化菌; 生物矿化

资助项目: 国家自然科学基金(32100102); 湖北省教育厅科学研究计划(Q20212902)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32100102) and the Scientific Research Project of Education Department of Hubei Province (Q20212902).

*Corresponding author. E-mail: fanxia@hgnu.edu.cn

Received: 2023-05-26; Accepted: 2023-07-08; Published online: 2023-09-05

Isolation of *Arthrobacter* FX8 capable of removing arsenic by biomineralization

FAN Xia^{*1}, LÜ Ruiling¹, WANG Zheng¹, ZHENG Yongliang¹, SHI Kaixiang²,
WANG Gejiao²

¹ College of Biology and Agricultural Resources, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, Hubei, China

² National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Background] The contamination of arsenic (As), a highly toxic metalloid, in water is aggravating, which threatens human health. The common method used for removing As is adsorption, and it is urgent to develop efficient As removal methods. **[Objective]** To characterize an iron-oxidizing bacterial strain FX8 isolated from the surface soil of iron ore, so as to use the iron mineral (adsorbent) produced by the strain via oxidizing Fe(II) for removing As. **[Methods]** The strain was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and genome-wide sequencing evidence. The concentrations of total Fe and Fe(II) were determined by phenanthroline spectrophotometry. The iron oxide precipitates were analyzed by X-ray diffraction, X-ray photoelectron spectroscopy, and energy dispersive spectrometer. The concentration of total As was determined by high performance liquid chromatography in combination with hydride generation and atomic fluorescence spectroscopy. **[Results]** Strain FX8 was Gram-positive and aerobic, with white and round colonies. Its cells were rod-shaped with the size of $(0.5\text{--}2.5)\ \mu\text{m}\times(0.13\text{--}0.25)\ \mu\text{m}$. FX8 was identified as a strain of *Arthrobacter*. It could oxidize Fe(II) to generate iron oxide precipitates which were an amorphous Fe(III) mineral with poor crystallinity and a large amount of biological impurities. Strain FX8 oxidized Fe(II) by producing extracellular enzymes. The strain cultured with As(III) or As(V) at 28 °C and 150 r/min showed the total Fe removal rates of 100% in 48 h and the corresponding total As removal rates of 99.54% and 99.86%, respectively. When the extracellular enzyme liquid of strain FX8 was added into the As(III) or As(V) system, the total Fe removal rates reached 100% in 2 h, and the corresponding total As removal rates were 99.45% and 100%, respectively. **[Conclusion]** Strain FX8 is an iron-oxidizing bacterium, and the iron biomineralization with its extracellular enzyme liquid outperforms strain-arsenic coculture in the removal of As. The findings provide new biomaterials and theoretical references for the efficient remediation of As-contaminated water.

Keywords: arsenic contamination; arsenic removal; iron-oxidizing bacterium; biomineralization

砷(arsenic, As)是一种广泛存在于环境中的剧毒类金属元素,被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为 I 类人类致癌物^[1]。环

境中 As 来源主要是人为活动如砷产品的使用、含砷矿石的开采、工业砷的排放等^[2]。砷是最严重的水体污染物之一,据报道目前世界上

约有 1.5 亿人暴露在砷污染的环境中^[3], 砷污染极大地威胁着人体健康, 已知心血管疾病^[4]、糖尿病^[4]、周围神经病^[4]和黑足病^[5]都与砷的暴露有关。人类长期暴露在砷环境中也会引发多种如膀胱癌、肺癌和皮肤癌等癌症^[4]。因此, 砷污染治理迫在眉睫。

砷在自然界中常以亚砷酸盐[AsO₃³⁻, As(III)]和砷酸盐[AsO₄⁵⁻, As(V)]形态存在^[6]。砷在水体中的形态主要受氧化还原电位和 pH 影响, 在氧化条件下主要是 As(V)以带负电荷的 H₂AsO₄⁻和 HAsO₄²⁻形式存在; 在还原条件下砷的主要存在形式是不带电荷的亚砷酸(H₃AsO₃)^[2]。因此, As(V)相比于 As(III)更容易去除。目前水体砷污染治理主要有混凝沉淀法、膜分离法、离子交换和吸附法。混凝沉淀法结合氧化剂能去除 As(III)和 As(V), 方便且易于实施, 但是价格昂贵且会产生大量含砷废渣^[7]; 膜分离法需要经常去除导致膜结垢的物质, 价格昂贵^[8]; 离子交换法仅对形成离子的 As(V)有效而对中性的 As(III)无效, 且水中的其他离子也会和 As(V)形成竞争性吸附, 导致 As(V)去除率降低^[9]。吸附法因其效率高、操作简单及费用低等优势, 是目前研究最多的除砷方法之一, 其主要是通过固体去吸附共沉淀砷而将砷去除^[10-12]。铁(Fe)是地壳中含量第四丰富的化学元素。微生物能够将 Fe(II)氧化为 Fe(III), 通过生物矿化形成各种铁氧化物沉淀物, 如赤铁矿、针铁矿和磁铁矿等, 这类型的微生物叫作铁氧化菌^[13-14]。铁氧化菌通过生物矿化生成的铁氧化物沉淀具有更高的比表面积和更高的结合能, 是一种理想的除砷吸附剂。

本研究从湖北省鄂州市某铁矿表层土壤中分离得到一株铁氧化菌, 对菌株种属进行了鉴定、分析了菌株铁氧化发生的部位、探究了菌株铁氧化能力及其通过生物矿化除砷的能力, 以期砷污染水体修复提供新的生物材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

采集湖北省鄂州市鄂城区某铁矿(30°28'53"N, 114°23'3"E)表层土壤, 样品保存于干净的塑料袋中, 带回实验室备用。

1.1.2 培养基

铁氧化菌选择 Winogradsky 培养基和改良的蛋白胨酵母粉显色培养基(peptone yeast chromogenic medium, PYCM), 参照文献^[15]配制, LB 培养基参考文献^[16]配制, 相应的固体培养基为在液体培养基中加入 15 g/L 的琼脂。

1.1.3 主要试剂和仪器

本试验所使用的化学试剂均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 革兰氏染色试剂, 珠海贝索生物技术有限公司; API 20NE 试剂条和氧化酶测定试剂盒, 生物梅里埃公司; DNA 抽提试剂盒, QiAamp 公司。

紫外可见分光光度计, 翱艺仪器(上海)有限公司; 高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱, 北京吉天仪器有限公司; 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM), 武汉铄思百检测技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的筛选和分离

称量 10 g 采集的新鲜土样, 装到含有 90 mL 生理盐水的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、150 r/min 培养 2 h。随后, 样品室温静置 0.5 h, 取 1 mL 上清液加到 9 mL 生理盐水中, 进行梯度稀释至 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵。取 100 μL 上述稀释液均匀涂布于 Winogradsky 培养基上, 28 °C 培养 7 d。铁氧化菌在选择培养基上会呈现灰色絮状菌落, 因其能将 Fe(II)氧化为高价铁, 最终使菌落呈红棕色。平板上长出特征性菌落后, 挑取单菌落在 LB 平板上多次划线以分离、

纯化菌株。经筛选得到菌株 FX8, 挑 FX8 单菌落转接到 LB 液体培养基中 28 °C、150 r/min 培养 48 h, 取 1 mL 菌液与 50% 甘油 1:1 混合并保存于 -80 °C 冰箱中。

1.2.2 菌株 FX8 的鉴定

1) 菌株 FX8 的形态学特征及生理生化指标

用接种环挑取 FX8 单菌落到 LB 培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 48 h 后以 1% 的接种量转接于 100 mL LB 培养基中, 待菌液的 OD_{600} 大约为 1.0 时作为种子液用于以下试验。首先, 用接种环蘸取菌株 FX8, 分别划线于 Winogradsky 培养基和 LB 平板, 28 °C 培养 7 d 观察菌株 FX8 在两种培养基上的菌落形态和颜色; 其次, 收集 5 mL 的 FX8 菌株, 4 °C、8 000×g 离心 5 min 收集菌体, 0.9% NaCl 溶液洗涤菌体 3 次, 得到的菌体经 2.5% 戊二醛溶液固定 24 h 后, 利用 SEM 观察菌株 FX8 的细胞形态。

采用半固体穿刺培养的方法, 将菌株 FX8 接种于含 0.3% 琼脂的 LB 培养基中观察其运动性。革兰氏染色试验根据革兰氏染色试剂盒说明书进行操作。用接种环蘸取 FX8 菌液, 划线于 LB 平板, 用封口膜将平板密封后放入厌氧培养罐中, 将一袋配套除氧剂放入该培养罐中, 并置于 28 °C 培养箱中培养 7 d, 观察是否有菌落长出。将菌株 FX8 划线 LB 平板, 分别放置在不同温度 (15.0、20.0、25.0、28.0、37.0 和 40.0 °C) 培养 7 d, 每天观察菌株的生长状态; 分别配制不同 NaCl 浓度的 LB 培养基 (0.0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0% 和 5.0%) 和配制不同 pH 值的 LB 培养基 (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0), 1% 的接种量将菌株 FX8 接种于相应的培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 7 d 后测定 OD_{600} , 以不接种菌株的培养基作对照。接种环蘸取 FX8 菌液, 划线于 LB 平板, 28 °C 培

养 3 d, 将 5% H_2O_2 溶液滴加到 FX8 单菌落上, 观察是否产生气泡; 其次, 用接种环挑取单菌落涂于干净的滤纸上, 滴加一滴氧化酶试剂, 观察 10 s 内菌体是否出现蓝色。利用 API 20NE 试剂条来检测菌株 FX8 的酶活和碳源利用情况, 具体操作参考 API 20NE 说明书。

2) 菌株 FX8 的全基因组完成图测序分析

将菌株 FX8 接种到 LB 培养基中, 28 °C、150 r/min 条件下培养至其 OD_{600} 约为 1.0 时, 4 °C、8 000×g 离心 5 min 收集菌体, 根据 DNA 抽提试剂盒说明书提取菌株 FX8 DNA, 随后送至武汉博洪生物科技有限公司进行测序和组装, 采用的测序技术是 Oxford Nanopore GridION, 基因组组装采用的是 Canu v2.2 软件。测序和组装完成后, 将所得的数据上传至 NCBI 进行注释, 并得到登录号。根据注释后的基因组, 采用 proksee 绘制菌株 FX8 基因组环状图; 从菌株 FX8 的全基因组中提取其 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 11.0 采用邻近法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树^[17]; 利用 EzBioCloud web 2.0 计算菌株 FX8 以及与其 16S rRNA 基因相似性较高菌株的平均核苷酸相似性 (average nucleotide identity, ANI)。

1.3 菌株的铁氧化及生物矿化铁除砷

1.3.1 菌株 FX8 对铁的沉降作用、铁氧化及催化酶的细胞定位

菌株 FX8 在 LB 培养基中培养至 OD_{600} 约为 1.0, 4 °C、8 000×g 离心 5 min 收集菌体。然后用 0.9% NaCl 溶液洗涤细胞 3 次并悬浮细胞至悬浮液 OD_{600} 约为 1.0。最后, 将悬浮液以 1% 接种量接种到 100 mL 改良的 PYCM 培养基中, 28 °C、150 r/min 培养。按规定时间取细胞培养物, 8 000×g 离心 5 min 收集上清液, 0.22 μ m 薄膜过滤后测定总铁浓度。此外, 当细胞培养至

24 h 时, $1\ 000\times g$ 离心 10 min 收集培养基中产生的铁沉淀, ddH₂O 洗涤 3 次, 送至武汉铈思百检测技术有限公司进行 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)、X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)和能量色散谱(energy dispersive spectrometer, EDS)分析。总铁浓度根据参考文献[18]采用邻菲罗啉分光光度法测定。

为了定位菌株 FX8 氧化 Fe(II)的酶, 收集该菌株的胞外粗酶液和胞内粗酶液, 分别加入到 271 mg/L FeSO₄ 溶液[Fe(II)浓度为 100 mg/L]中。当菌株 FX8 在改良的 PYCM 培养基培养到 18 h 时, 分别收集上清和菌体, 检测菌株 FX8 的胞外粗酶液和胞内粗酶液对 Fe(II)的氧化能力, 具体步骤如下^[19-20]: (1) $1\ 000\times g$ 分离 10 min 去除培养物中的铁沉淀, 收集细胞菌液; (2) 细胞菌液以 $5\ 000\times g$ 离心 10 min, 分别得到上清液和菌体, 其中上清液即为胞外粗酶液, 菌体则用于胞内酶的提取; (3) 将不同体积的胞外粗酶液加入 FeSO₄ 溶液中以检测胞外粗酶液的 Fe(II)氧化能力, 以不添加胞外粗酶液的 FeSO₄ 溶液作为对照; (4) 使用 0.05 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.0)悬浮上述离心的菌体, 随后用超声破碎, 破碎后的液体 4 °C、 $10\ 000\times g$ 离心 30 min 去除细胞碎片, 得到胞内粗酶液; (5) 将不同体积的胞内粗酶液添加到 FeSO₄ 溶液中, 并在 FeSO₄ 溶液中加入等量的 0.05 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.0)作为对照。30 °C 下反应 1 h 后用 0.22 μm 薄膜过滤反应体系, 取样测定 Fe(II)的浓度。Fe(II)浓度根据参考文献[18]采用邻菲罗啉分光光度法测定。

1.3.2 菌株 FX8 生物矿化铁除砷

菌株 FX8 的培养和处理同 1.3.1 中种子液的获取方法。分别检测菌株 FX8 在培养过程中

和利用其胞外酶粗提取物生物矿化铁除砷的能力。培养条件如下: 分别向改良 PYCM 培养基中加入终浓度为 2 mg/L 经过滤除菌的 As(III) (NaAsO₂)或 As(V) (HAsNaO₄·7H₂O), 菌株 FX8 按 1%接种量接种于以上含砷培养基中, 以不加菌的培养基作对照, 28 °C、150 r/min 培养。特定时间取样, $8\ 000\times g$ 离心 5 min 收集上清液, 0.22 μm 薄膜过滤后, 测定总铁和总砷的浓度。此外, 当细胞培养至 24 h 时, $1\ 000\times g$ 离心 10 min 收集培养基中产生的沉淀物, ddH₂O 洗涤 3 次, 送至武汉铈思百检测技术有限公司进行 XPS 分析。为了验证菌株 FX8 产生的铁矿物沉淀对 As(III)和 As(V)的去除, 将菌株 FX8 按 1%接种量接种于 100 mL 改良 PYCM 培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 24 h 后, $1\ 000\times g$ 离心 10 min 分别收集培养物中的铁沉淀物和菌悬液, ddH₂O 洗涤 3 次铁沉淀物后进行冷冻干燥; 菌悬液则 4 °C、 $8\ 000\times g$ 离心 5 min 收集菌体, ddH₂O 洗涤 3 次。将收集到的铁沉淀物和菌体分别加入含 2 mg/L As(III)或 As(V)水溶液中(100 mL), 以不加铁沉淀物和菌体的含 2 mg/L As(III)或 As(V)水溶液作对照, 28 °C、150 r/min 反应 3 h, 特定时间取样, $8\ 000\times g$ 离心 5 min 收集上清液, 0.22 μm 薄膜过滤后, 测定总砷的浓度。利用菌株 FX8 的胞外酶粗提取物生物矿化铁: 菌株 FX8 在改良 PYCM 培养基中培养至 24 h, $1\ 000\times g$ 离心 10 min 去除铁沉淀, 上层细胞菌液 $5\ 000\times g$ 离心 10 min, 得到上清液即胞外酶粗提取物, 按 5%接种量接种于终浓度为 271 mg/L FeSO₄ 溶液中, 加入 2 mg/L As(III)或 As(V)于上述 FeSO₄ 溶液中, 以不加胞外粗酶液的含砷 FeSO₄ 溶液作对照。特定时间取样, $8\ 000\times g$ 离心 5 min 收集上清液, 0.22 μm 薄膜过滤后, 测定总铁和总砷的浓度。总砷的测定采用高压液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱^[21]。

2 结果与分析

2.1 菌株 FX8 的鉴定结果

2.1.1 形态学及生理生化特征

如图 1A 和 1B 所示, 在 Winogradsky 培养基和 LB 培养基的固体平板上, 菌株 FX8 的菌落均为圆形、边缘整齐且表面光滑; 在选择培养基上其菌落表面为灰色、菌落内部则为棕红色; 菌株在 LB 培养基上则为乳白色。扫描电镜结果显示菌株 FX8 的细胞为杆状, 大小为 $(0.5\text{--}2.5)\ \mu\text{m}\times(0.13\text{--}0.25)\ \mu\text{m}$ (图 1C)。

菌株 FX8 为革兰氏阴性菌、不运动、好氧。其温度生长范围为 $15.0\text{--}37.0\ ^\circ\text{C}$, 盐浓度生长范围为 $0.0\%\text{--}5.0\%$, pH 值生长范围为 $6.0\text{--}9.0$ 。过氧化氢酶活性为阳性, 氧化酶活性为阴性; 根据 API 20NE 试剂条结果显示: 菌株 FX8 能够还原硝酸盐, 但不能还原亚硝酸盐; 能够水解七叶灵, 但不水解明胶, 不产生吡啶; β -半乳糖苷酶活性为阳性, 而脲酶和精氨酸双水解酶为阴性; 能够同化葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、甘露醇、N-乙酰-葡萄糖胺、麦芽糖、葡萄糖酸盐、苹果酸和柠檬酸; 不能同化癸酸盐、

己二酸和苯乙酸(表 1)。

2.1.2 分子生物学鉴定结果

菌株 FX8 的全基因组已上传至 NCBI 并注释, 登录号为 CP113505.1。基因组大小为 4.55 Mb, G+C 含量为 65.9%, 共有 4 283 个基因, 其中编码蛋白的基因有 3 783 个、15 个 rRNA 基因、52 个 tRNA 基因、3 个其他类型的 RNA 基因和 430 个假定基因。菌株 FX8 的基因组环状图如图 2A 所示。从菌株 FX8 的基因组中提取到其全长为 1 523 bp 的 16S rRNA 基因序列, 通过 EzBioCloud 和 NCBI 比对分析, 菌株 FX8 与 *Arthrobacter nitrophenolicus* SJCon、*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* Sphe3、*Pseudarthrobacter defluvii* 4C1-a 和 *Arthrobacter pokkalii* P3B162 的 16S rRNA 基因相似性分别为 99.03%、98.89%、98.61%和 98.59%; 系统发育树结果显示, 菌株 FX8 与 *Arthrobacter* 的 *Arthrobacter pokkalii* P3B162、*Arthrobacter nitrophenolicus* SJCon 和 *Arthrobacter globiformis* NBRC 12137 聚在一个分支上, 而 *Pseudarthrobacter* 的菌株则单独聚集在另一个分支上(图 2B)。基因组 ANI 分析结

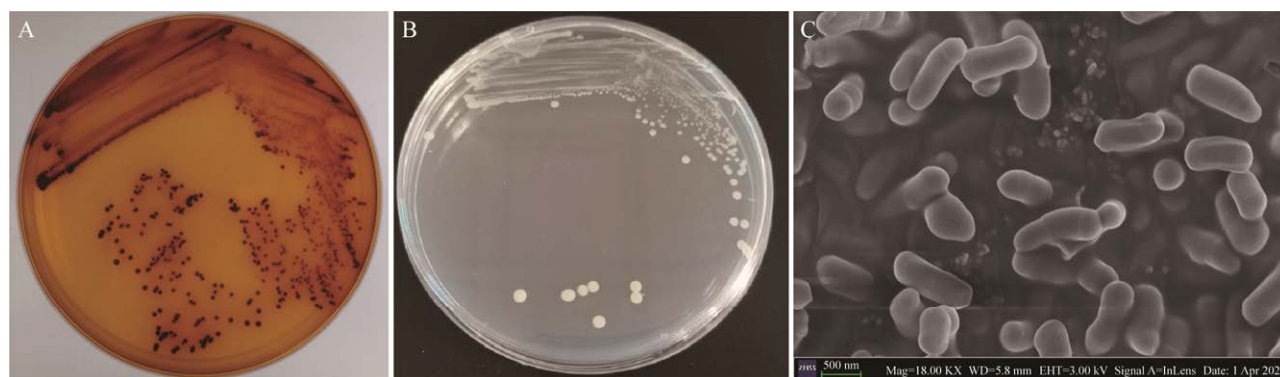


图 1 菌株 FX8 的形态学特征 A: 菌株 FX8 在 Winogradsky 固体培养基上的菌落形态特征. B: 菌株 FX8 在 LB 固体培养基上的菌落形态特征. C: 菌株 FX8 细胞的扫描电镜图像

Figure 1 The morphological characteristics of strain FX8. A: Colony morphology of strain FX8 on Winogradsky solid medium. B: Colony morphology of strain FX8 on LB solid medium. C: The image of strain FX8 cell by scanning electron microscope.

表 1 菌株 FX8 的生理生化特征

Table1 Physiological and biochemical characteristics of stain FX8

特性 Characteristics	Results	特性 Characteristics	Results
革兰氏反应 Gram's reaction	+	β -半乳糖苷酶 β -galactosidase	+
温度范围 Temperature range (°C)	15.0–37.0	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	–
pH 范围 pH range	6.0–9.0	同化利用 Assimilation	
盐浓度范围 NaCl range (% , W/V)	0.0–5.0	葡萄糖 Glucose	+
运动性 Motility	–	阿拉伯糖 Arabinose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	甘露糖 Mannose	+
亚硝酸盐还原 Nitrite reduction	–	甘露醇 Mannitol	+
吲哚生成 Indole production	–	N-乙酰-葡萄糖胺 N-acetylglucosamine	+
硫化氢生成 H ₂ S production	–	麦芽糖 Maltose	+
水解反应 Hydrolysis		葡萄糖酸盐 Gluconate	+
明胶 Gelatin	–	癸酸 Caprate	–
七叶灵 Esculin	+	己二酸 Adipic acid	–
酶反应 Enzyme activity		苹果酸 Malate	+
氧化酶 Oxidase	–	柠檬酸钠 Citrate	+
过氧化氢酶 Catalase	+	苯乙酸 Phenylacetate	–
脲酶 Urease test	–		

+: 阳性; –: 阴性

+: Positive; –: Negative.

果显示, 菌株 FX8 和 *A. nitrophenolicus* SJCon、*A. globiformis* NBRC 12137 的平均核苷酸相似性分别为 81.90% 和 78.72%, 与 *P. phenanthrenivorans* Sphe3 为 81.43%。以上结果表明, 菌株 FX8 与 *Arthrobacter* 的亲缘关系更加接近, 因此将菌株 FX8 归为节杆菌属 (*Arthrobacter*)。

2.1.3 菌株 FX8 催化亚铁氧化酶的定位

为了定位菌株 FX8 氧化 Fe(II)是由胞外酶还是胞内酶催化, 本研究分别提取了菌株 FX8 的胞外粗酶液和胞内粗酶液。不加胞外粗酶液的 FeSO₄ 溶液 1 h 后仍然清晰透明无黄色铁沉淀, 加入胞外粗酶液的 FeSO₄ 溶液迅速变浑浊, 并逐渐形成黄色铁沉淀。测定反应液中 Fe(II) 的浓度, 图 3A 结果显示, 不加胞外粗酶液的体系中 Fe(II) 的浓度为 99.82 mg/L, Fe(II) 浓度几乎不变; 在含有 1 mL 胞外粗酶液的体系中,

Fe(II) 的浓度显著减少, 为 58.48 mg/L, 并且随着胞外粗酶液浓度的增加, FeSO₄ 溶液中 Fe(II) 浓度逐渐下降, 在添加 5 mL 胞外粗酶液的体系中, Fe(II) 浓度仅为 3.04 mg/L; 图 3B 结果显示: 随着胞内粗酶液和磷酸盐缓冲液体积的增加, FeSO₄ 溶液中 Fe(II) 浓度均逐渐下降且二者并无明显区别。在加 1 mL 的磷酸缓冲液和胞内粗酶液体系中, Fe(II) 浓度分别为 1.22 mg/L 和 1.43 mg/L; 当加入 5 mL 胞内粗酶液或磷酸盐缓冲液时, FeSO₄ 溶液中 Fe(II) 浓度分别为 0.30 mg/L 和 0.33 mg/L, 这说明 FeSO₄ 溶液中 Fe(II) 的氧化主要依赖于磷酸盐缓冲液而不是胞内粗酶液。综上结果可知, 菌株 FX8 氧化 Fe(II) 主要通过胞外粗酶液而不是胞内粗酶液。

2.1.4 菌株 FX8 对铁的沉淀作用

由图 3 可知, 菌株 FX8 的胞外粗酶液可以氧化 Fe(II) 并生成铁沉淀。本试验将菌株 FX8

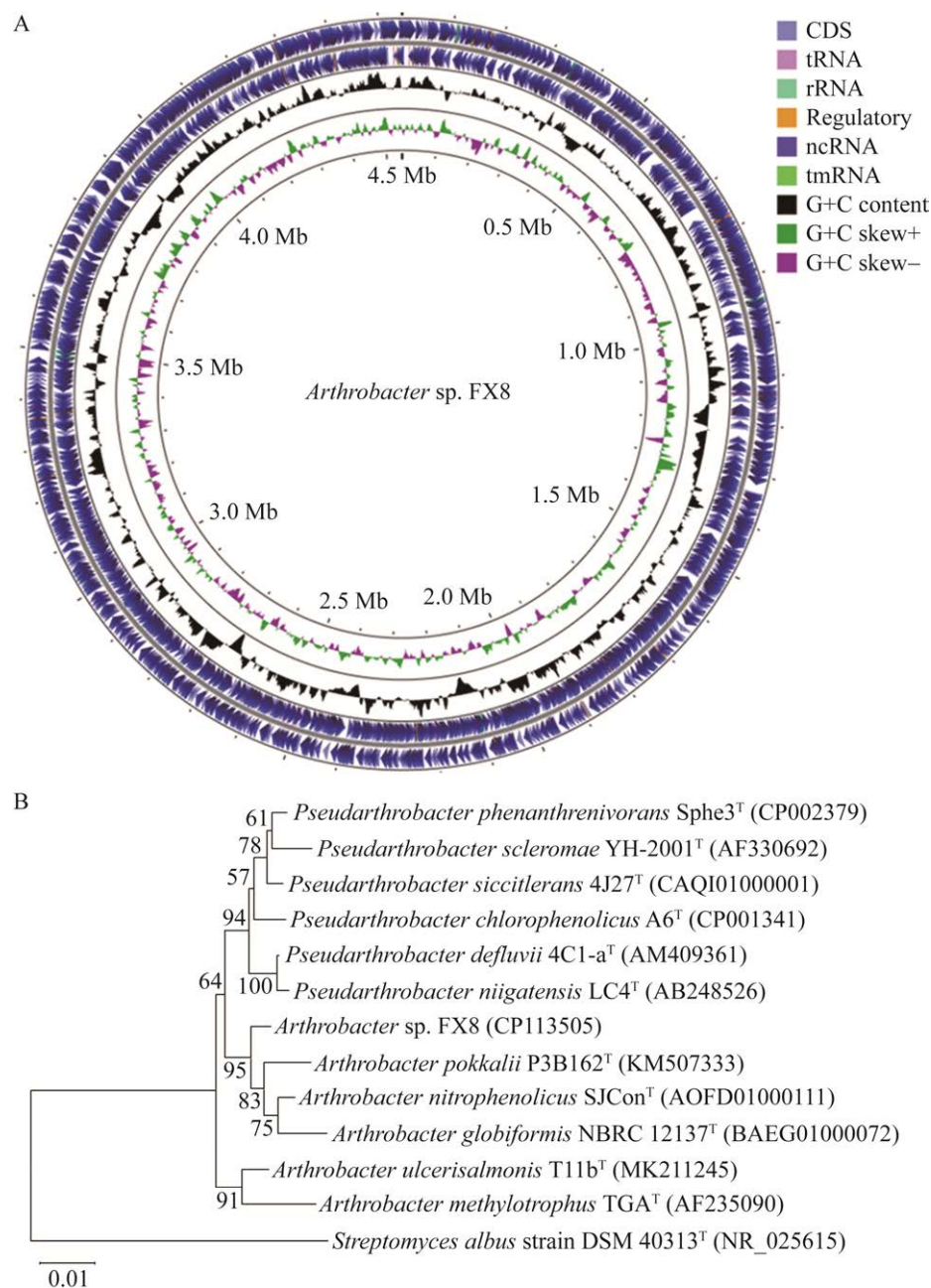


图 2 菌株 FX8 基因组环状图及其系统发育树 A: 菌株 FX8 基因组环状图, 由内到外: 第 1 环, GC 偏移; 第 2 环, 菌株 FX8 的 G+C 含量; 第 3 和 4 环: 菌株 FX8 的正义和反义链的编码序列. B: 菌株 FX8 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树. 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点数值代表 bootstrap 支持率; 刻度标尺 0.01 表示每个核苷酸位点 0.01 的置换率

Figure 2 The genome cycle map, phylogenetic tree and Venn diagram of strain FX8. A: Genome cycle map of strain FX8, from the inner ring to the outer ring: Ring 1, GC migration; Ring 2, the G+C content of strain B7; Rings 3 and 4, the CDS of the forward/reverse strand of strain FX8. B: Phylogenetic tree of strain FX8 based on 16S rRNA gene sequences. The number in parentheses is GenBank accession number; Number on the branch points represent the support percentages of bootstrap; Bar indicates 0.01 substitution per nucleotide position.

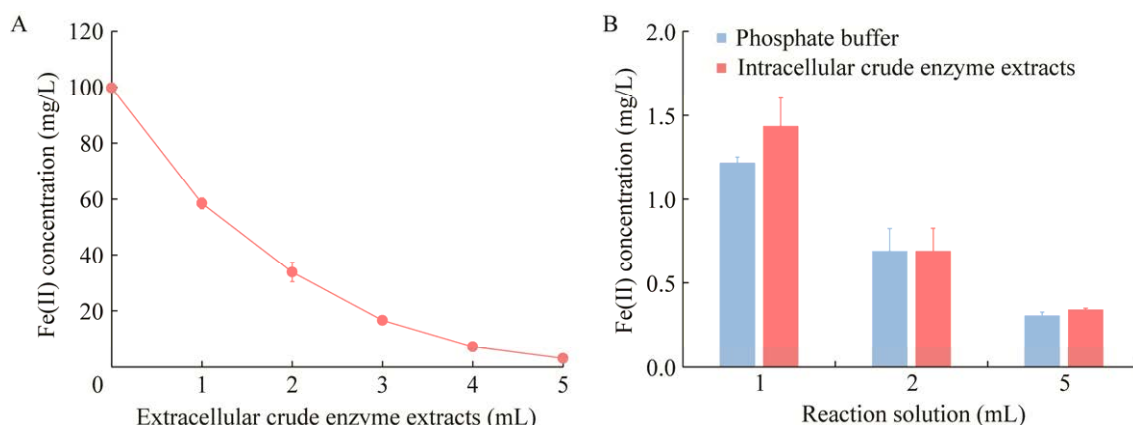


图3 菌株 FX8 的胞外粗酶液(A)和胞内粗酶液(B)对 Fe(II)的氧化

Figure 3 Fe(II) oxidation by extracellular enzyme extracts (A) and intracellular enzyme extracts (B) from strain FX8.

培养在含柠檬酸铁铵的培养基中,探究菌株 FX8 对可溶性 Fe 的沉淀能力。图 4 表明,菌株 FX8 在培养 36 h 后,在不添加菌株 FX8 的培养基中,培养基仍然呈现透明的红色(图 4A);在添加菌株 FX8 的对照组中,培养基变浑浊,底部出现大量的红棕色沉淀物(图 4B)。通过测定不同时间培养基中总 Fe 的浓度,不加菌株 FX8 的培养基中总 Fe 浓度几乎不变,而加菌株 FX8 的培养基在培养过程中逐步出现红色沉淀物,24 h 后培养基中 Fe 浓度从 171 mg/L 下降到 0.33 mg/L (图 4C)。以上结果表明,菌株 FX8 能够有效地促进铁沉淀的形成。

通过 SEM、XRD、XPS 和 EDS 对该铁沉淀进一步分析,SEM 结果显示铁沉淀为不规则团块,表面粗糙且有许多微孔(图 4B);XRD 结果显示,该铁沉淀物仅在 24°处有一个弱的宽峰,和其他铁矿物如水铁矿(XRD 特征峰值为 35°和 62°)、磁铁矿(XRD 特征峰值为 18.20°、30.0°、35.3°、42.9°、53.4°、56.9°、62.5°和 74.20°)、针铁矿(XRD 特征峰值为 21.32°、33.4°、34.84°、36.96°、40.06°、41.36°、53.46°和 59.26°)、纤铁矿(XRD 特征峰值为 14.1°、27.1°、36.3°、

38.1°、46.9°、52.8°和 60.8°)的 XRD 特征峰均不相符(图 4D),其为一种无定形的铁矿物沉淀;XPS 分析表明,菌株 FX8 产生铁矿物沉淀主要成分为 C、O、N、P 和 Fe,且 Fe 2p 的结合能为 711 eV 即代表 Fe(III),这进一步说明菌株 FX8 能够氧化 Fe(II)且产生的铁沉淀物为 Fe(III)沉淀物(图 4E);EDS 分析表明,菌株 FX8 生物矿化铁产生的铁氧化物沉淀主要由 O (34.68%)、Fe (27.73%)、C (20.37%)、P (5.17%)和 N (1.27%)组成(图 4F)。

2.1.5 菌株 FX8 生物矿化铁除砷

为了研究菌株 FX8 生物矿化铁除砷的能力,将菌株 FX8 培养在含 As(III)或 As(V)的 PYCM 培养基中。图 5 表明:在不添加菌株 FX8 的培养基中总 Fe 和总 As 浓度始终保持不变(图 5A–5D);在添加 As(III)的培养基中,总 Fe 和总 As 的浓度均在 12 h 内缓慢下降,12–24 h 则急剧减少,同时形成大量的红棕色沉淀物;48 h 时,总 Fe 和总 As 的去除率分别为 100%和 99.54%(图 5A、5B)。在添加 As(V)的培养基中,12–48 h 内,总 Fe 和总 As 浓度均快速下降,同时析出大量红棕色沉淀物,48 h 时总 Fe 和总

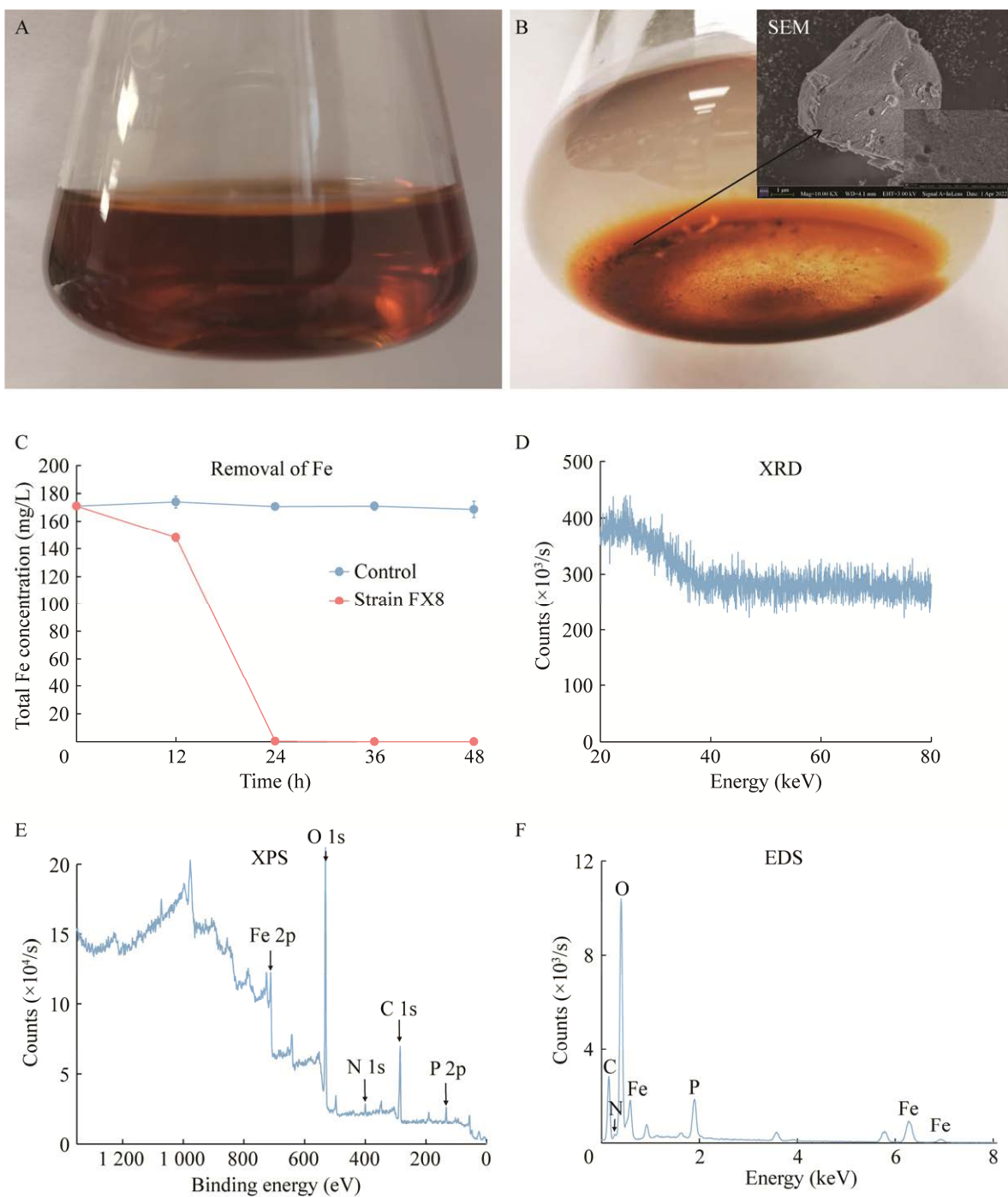


图 4 菌株 FX8 在改良的 PYCM 培养基中的生长状态及其产生的生物铁沉淀物的表征 A: 不加菌株 FX8 的培养物. B: 添加菌株 FX8 的培养物. C: 总 Fe 浓度的变化曲线. D: 铁沉淀的 XRD 表征. E: 铁沉淀的 XPS 表征. F: 铁沉淀的 EDS 表征

Figure 4 Growth status of strain FX8 in the modified PYCM liquid medium and the characterization of biologic iron precipitates produced by strain FX8. A: Cultures without adding strain FX8. B: Cultures with adding strain FX8. C: Change curve of total iron. D: XRD. E: XPS. F: EDS.

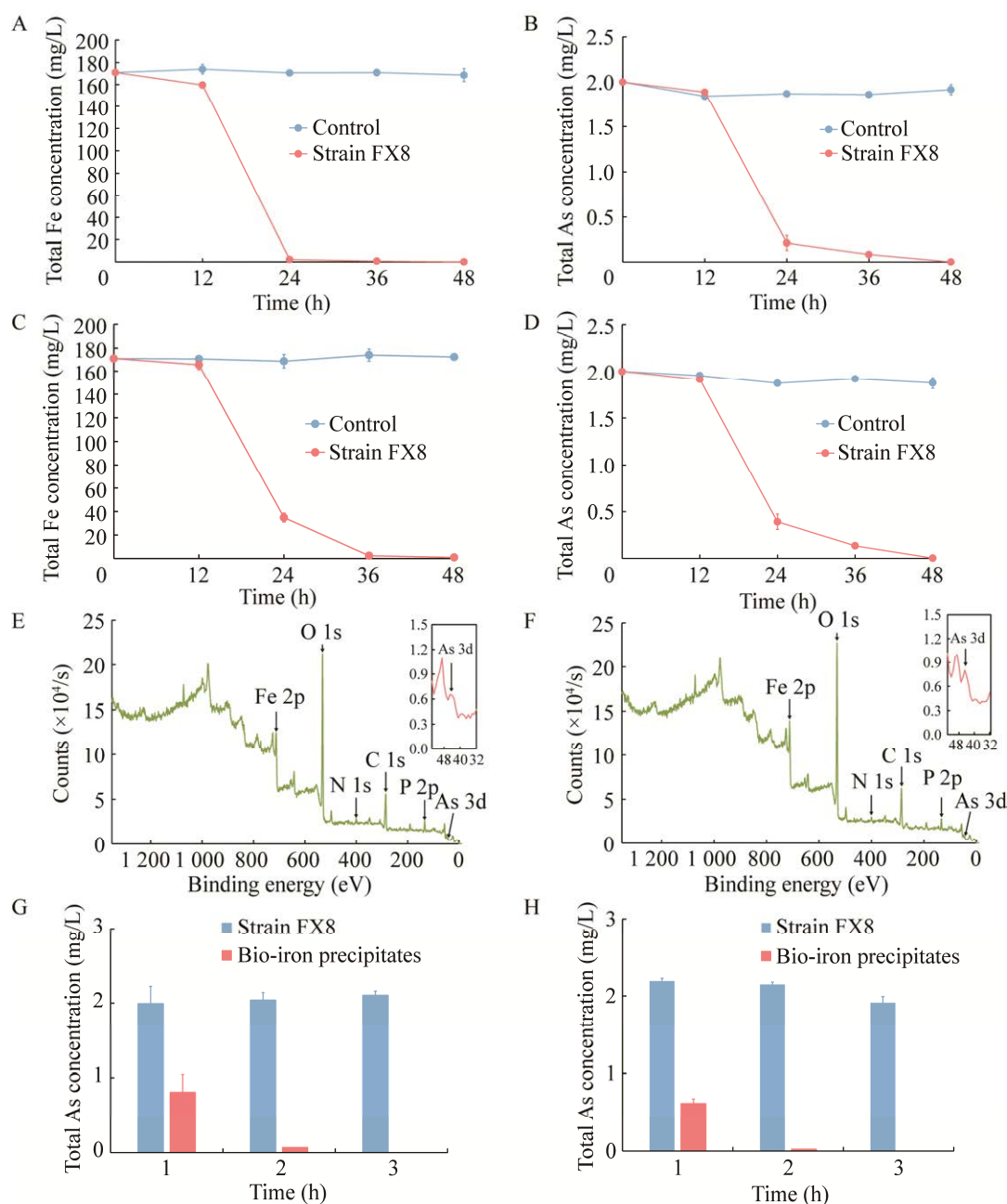


图 5 菌株 FX8 生物矿化 Fe(II)对总 Fe、总 As 的去除及铁矿物的表征 A: 在有 As(III)条件下总 Fe 的去除曲线. B: As(III)的去除曲线. C: 在有 As(V)条件下总 Fe 的去除曲线. D: As(V)的去除曲线. E: 菌株 FX8 在 As(III)存在下产生铁沉淀物的 XPS 图. F: 菌株 FX8 在 As(V)存在下产生铁沉淀物的 XPS 图. G: 菌株 FX8 和其产生的生物铁沉淀物对 As(III)的去除. H: 菌株 FX8 和其产生的生物铁沉淀物对 As(V)的去除

Figure 5 Removal of total Fe and total As by biom mineralized Fe(II) and the characterization of iron minerals. A: Fe removal curves in presence of As(III). B: As(III) removal curves. C: Iron removal curves in presence of As(V). D: As(V) removal curves. E: XPS pattern of iron precipitates produced by strain FX8 in presence of As(III). F: XPS pattern of iron precipitates produced by strain FX8 in presence of As(V). G: The removal of As(III) by strain FX8 and its produced bio-iron precipitates. H: The removal of As(V) by strain FX8 and its produced bio-iron precipitates.

As 去除率分别为 100% 和 99.86% (图 5C、5D)。此外, 通过 XPS 对两个体系中的铁沉淀物进一步分析, 结果发现, 在两种加 As 体系中, 均检测到了 As 元素(图 5E、5F); 分别将 FX8 菌体和其产生的生物铁沉淀物加入含 As(III) 或 As(V) 的水溶液中, 不加菌体 FX8 和铁沉淀物的对照中总 As 浓度几乎不变(数据未显示), 添加菌体 FX8 的两种 As 体系中总 As 浓度均几乎不变, 这说明 FX8 菌体本身无法去除 As, 而添加铁沉淀物的两种 As 体系中, 总 As 含量逐渐减少直至 3 h 时溶液中的 As 均被完全去除(图 5G、5H)。以上结果说明菌株 FX8 在培养过

程中可通过生物矿化铁、产生铁沉淀物去除砷。利用菌株 FX8 胞外粗酶液生物矿化铁除砷的结果见图 6: 2 h 内在对照体系(不加胞外粗酶液)中无沉淀物产生, 并且总 Fe 和总 As 浓度几乎不变(图 6); 在加 As(III) 和 As(V) 的两种体系中, 加入胞外粗酶液后溶液中逐渐析出铁沉淀物, 2 h 后两种体系中总 Fe 的去除率均为 100% (图 6A、6B), 总 As 的去除率则分别为 99.45% 和 100% (图 6C、6D)。综上结果可知, 菌株 FX8 在培养条件下和利用其胞外粗酶液均能矿化铁形成铁沉淀物, 且能通过产生的铁沉淀物去除砷。

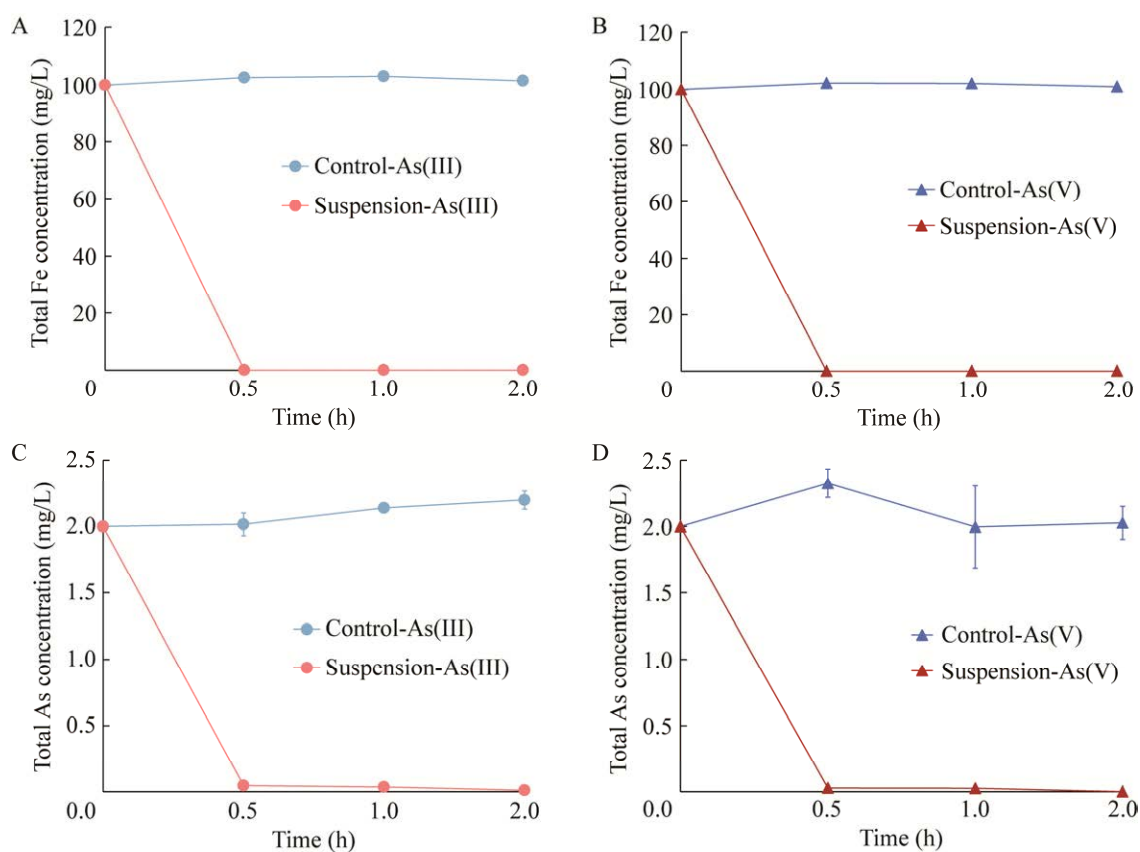


图 6 菌株 FX8 的胞外粗酶液生物矿化 Fe(II) 对总 Fe 和总 As 的去除 A: As(III) 存在时总 Fe 的去除曲线. B: As(V) 存在时总 Fe 的去除曲线. C: As(III) 去除曲线. D: As(V) 去除曲线

Figure 6 Removal of total Fe and total As by biomineralized Fe(II) from extracellular enzyme crude extracts of strain FX8. A: Curves of total Fe removal in presence of As(III). B: Curves of total Fe removal in presence of As(V). C: Curves of As(III) removal. D: Curves of As(V) removal.

3 讨论

砷污染是一种全球性的突出问题,砷污染修复受到人们的高度重视。铁氧化菌能够通过生物矿化铁吸附和共沉淀除砷,是一种十分有应用前景的修复砷污染的生物材料。本研究从铁矿表层土壤中分离得到一株铁氧化菌 FX8,该菌能够氧化 Fe(II)、生成 Fe(III)氧化物去除水体中的砷。对其形态学特征、生理生化特征及分子生物学特征进行观察和鉴定,将菌株 FX8 归属为节杆菌属(*Arthrobacter*)。

菌株 FX8 能够将 Fe(II)氧化为 Fe(III),酶活结果表明菌株 FX8 氧化 Fe(II)是由胞外粗酶液催化而不是胞内粗酶液(图 3)。许旭萍等分离出的 *Pseudomonas* sp. FE13-26^[22]、Liu 等分离出的 *Pseudomonas* sp. GE-1^[19]和 Sun 等分离出的 *Sphaerotilus* sp. Z1^[20]均发现胞外粗酶液中能有效的氧化 Fe(II)。在胞内粗酶液催化 Fe(II)试验中,不加胞内粗酶液的对照组和加胞内粗酶液的试验组之间,Fe(II)含量均减少且二者之间并无明显差别。这主要是因为对照组和试验组中的磷酸缓冲液可使 FeSO₄ 溶液中释放出 OH⁻,从而促进 Fe(OH)₂ 的生成,生成的 Fe(OH)₂ 被 O₂ 氧化生成 Fe(III)沉淀。Fe(II)氧化发生在细胞外,可以避免 Fe(III)沉淀物在胞内积累而损害细胞代谢。

不同种类的铁氧化菌氧化 Fe(II)生成的铁氧化物种类受多种因素的影响,同一铁氧化菌在不同条件下生成的铁氧化物也会有所不同^[23-24]。本研究中,菌株 FX8 生成的铁氧化物和菌株 GE-1 及菌株 Z1 氧化生成的铁氧化物均表现出结晶性较差的特性^[19-20]。不同的是假单胞菌 GE-1 和浮游球衣菌 Z1 生成的铁氧化物均为水铁矿^[19-20],而菌株 FX8 生成的铁氧化物不属于水铁矿(图 4B),其是一种类型未知的 Fe(III)矿物。EDS 的结果

表明菌株 FX8 生成的铁氧化物中含有 C、N 和 P 等元素,这说明该铁沉淀物中含有细胞、蛋白质等生物杂质,这也导致了其结晶差。

目前关于铁氧化菌应用于砷污染水体的修复已有一些报道。例如, Katsoyiannis 等研究发现铁氧化菌 *Gallionella ferruginea* 和 *Lepptothrix ochracea* 可作为过滤的介质去除水体中的 95% 以上的砷(砷浓度为 50–200 μg/L)^[25-26];菌株 GE-1 在培养条件下可通过生成水铁矿去除砷,在 96 h 除砷效率可达 100% (砷浓度为 1 000 μg/L)^[19];Xiu 等则探究了不同 As/Fe 比率下 *Pseudogulbenkiania* sp. strain 2002 通过生成纤铁矿去除砷的效果^[27]。本研究菌株 FX8 在培养条件下及非培养条件下的胞外粗酶液生物矿化铁除砷进行了探究。结果表明,在两种条件下菌株 FX8 均可通过生成铁氧化物去除砷,并且去除 As(V)的效果优于 As(III),这也和 As(III)和 As(V)本身的特性相符^[28]。好氧中性条件下,Fe(II)也可被化学氧化生成 Fe(III),进而形成铁氧化物沉淀^[29]。在培养条件的对照组中,由于柠檬酸铁铵是一种光敏感物质,在培养基中曝光时,少量溶解态的 Fe(III)会被还原为 Fe(II),Fe(II)也可被化学氧化为 Fe(III),Fe(II)和 Fe(III)之间的双向反应,使对照组中总 Fe 浓度几乎保持不变,该结果与铁氧化菌 GE-1、Z1 的结果一致^[19-20]。在非培养试验的对照组中,2 h 内对照组中的总 Fe 浓度几乎不变(放置 24 h 后,溶液中会出现红棕色沉淀物),而在添加胞外粗酶液的试验组中,0.5 h 内 100 mg/L Fe(II)即可被完全氧化而沉淀,从而将溶液中 As(III)和 As(V)去除,这也说明 Fe(II)的生物氧化要远高于化学氧化。培养条件下总 Fe 的含量为 171 mg/L,其去除 2 mg/L As 需要至少 48 h,而由胞外粗酶液催化下总 Fe 的含量为 100 mg/L,其仅在 2 h 内可去除超过 99% As(III)和 100% As(V) (图 5 和图 6)。这说明,

由胞外粗酶液催化生成的铁氧化物对砷具有更好的去除效果, 这为基于铁氧化菌去除砷提供一种新思路。

4 结论

本研究从铁矿表层土壤中分离得到一株铁氧化菌 FX8, 经鉴定为节杆菌属(*Arthrobacter*)。菌株 FX8 通过胞外粗酶液将 Fe(II)氧化为 Fe(III), 并生成铁氧化物沉淀。XRD、XPS 和 EDS 分析表明该铁氧化物沉淀是一种结晶性较差、含有大量生物质的 Fe(III)矿物。菌株 FX8 在与砷共培养和胞外粗酶液催化两种条件下均能生物矿化 Fe(II)、形成 Fe(III)沉淀并将 As(III)和 As(V)去除, 并且利用胞外粗酶液生物矿化铁对 As(III)和 As(V)去除效果优于菌株 FX8 在培养条件下的去除效果。本研究可为水体砷污染的高效生物修复提供新的生物材料及理论参考。

REFERENCES

- [1] ZUCKERMAN AJ. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans[J]. Journal of Clinical Pathology, 1995, 48(7): 691.
- [2] ZHU YG, YOSHINAGA M, ZHAO FJ, ROSEN BP. Earth abides arsenic biotransformations[J]. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2014, 42: 443-467.
- [3] BRAMMER H, RAVENSCROFT P. Arsenic in groundwater: a threat to sustainable agriculture in South and South-east Asia[J]. Environment International, 2009, 35(3): 647-654.
- [4] 殷园园. 砷代谢与癌症、心血管疾病以及糖尿病的关系: 流行病学证据的系统回顾[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(12): 1150-1161.
YIN YY. Relationship between arsenic metabolism and cancer, cardiovascular disease and diabetes: a systematic review of epidemiological evidence[J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2018, 35(12): 1150-1161 (in Chinese).
- [5] TSENG C, CHONG C, CHEN C, LIN BJ, TAI T. Abnormal peripheral microcirculation in seemingly normal subjects living in Blackfoot-disease-hyperendemic Villages in Taiwan[J]. International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental, 1995, 15: 21-27.
- [6] 蔡林, 王革娇. 抗砷性微生物及其抗砷分子机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1253-1259.
CAI L, WANG GJ. Advance on studies of arsenic-resistant microorganisms and molecular mechanisms[J]. Microbiology China, 2009, 36(8): 1253-1259 (in Chinese).
- [7] 关小红, 李修华, 姜利, 董浩然, 马军. 氧化-混凝法去除水中 As(III)的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(8): 88-92, 100.
GUAN XH, LI XH, JIANG L, DONG HR, MA J. Review on As(III)removal by oxidation and subsequent coagulation[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(8): 88-92, 100 (in Chinese).
- [8] 罗铭宇, 张丽娜, 杨海艳, 段红珍. 废水中砷去除的研究进展与展望[J]. 精细化工中间体, 2018, 48(6): 1-5.
LUO MY, ZHANG LN, YANG HY, DUAN HZ. Research progress and prospects of arsenic removal from wastewater[J]. Fine Chemical Intermediates, 2018, 48(6): 1-5 (in Chinese).
- [9] ZOUBOULIS AI, KATSOYIANNIS IA. Recent advances in the bioremediation of arsenic-contaminated groundwaters[J]. Environment International, 2005, 31(2): 213-219.
- [10] GUO H, LI Y, ZHAO K. Arsenate removal from aqueous solution using synthetic siderite[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 176(1/2/3): 174-180.
- [11] TRESINTSI S, SIMEONIDIS K, VOURLIAS G, STAVROPOULOS G, MITRAKAS M. Kilogram-scale synthesis of iron oxy-hydroxides with improved arsenic removal capacity: study of Fe(II) oxidation-precipitation parameters[J]. Water Research, 2012, 46(16): 5255-5267.
- [12] LIU BM, LIU ZX, WU HX, PAN SL, CHENG X, SUN YJ, XU YH. Effective and simultaneous removal of organic/inorganic arsenic using polymer-based hydrated iron oxide adsorbent: capacity evaluation and mechanism[J]. Science of the Total Environment, 2020, 742: 140508.
- [13] CORNELL RM, SCHWERMANN U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences, and Uses[M]. Weinheim: Wiley-VCH, 2003: 1-7.
- [14] QIAN ZY, WU C, HE X, XU SG. Study on the influence of iron redox cycling microorganisms on heavy metals in the environment[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(3): 834-835.

- [15] 姚远, 周志华, 许旭萍, 衡琰, 李敏. 铁锰氧化菌的筛选及其生物学特性研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2009, 25(4): 100-104.
- YAO Y, ZHOU ZH, XU XP, HENG L, LI M. The selection of Fe^{2+} removing and Mn^{2+} removing bacteria and the study of biological characteristics[J]. Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition), 2009, 25(4): 100-104 (in Chinese).
- [16] 王佳佳, 刘冬梅, 王革娇, 李明顺. 羧基酮丛毛单胞菌 JL40 中甲酸脱氢酶-O 的锑抗性及其氧化作用[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(9): 46-50, 60.
- WANG JJ, LIU DM, WANG GJ, LI MS. Antimony resistance and antimony oxidation of formate dehydrogenase-O in *Comamonas testosteroni* JL40[J]. Chemistry and Bioengineering, 2017, 34(9): 46-50, 60 (in Chinese).
- [17] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [18] 国家环境保护总局. 水质铁的测定邻菲罗啉分光光度法: HJ/T 345—2007[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2007.
- State Environmental Protection Administration of China. Water quality-Determination of iron-phenanthroline spectrophotometry: HJ/T 345—2007[S]. Beijing: China Environmental Science Press, 2007 (in Chinese).
- [19] LIU Q, GUO HM, LI Y, XIANG H. Acclimation of arsenic-resistant Fe(II)-oxidizing bacteria in aqueous environment[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 76: 86-91.
- [20] SUN PP, WANG XM, LIANG JR, ZHOU LX. Isolation and characterisation of Fe(II)-oxidising bacteria and their application in the removal of arsenic in an aqueous solution[J]. Environmental Technology, 2022: 1-11.
- [21] LIAO SJ, ZHOU JX, WANG H, CHEN X, WANG HF, WANG GJ. Arsenite oxidation using biogenic manganese oxides produced by a deep-sea manganese-oxidizing bacterium, *Marinobacter* sp. MnI7-9[J]. Geomicrobiology Journal, 2013, 30(2): 150-159.
- [22] 许旭萍, 杨冠彬, 王芳, 李敏. 假单胞菌产生铁氧化酶条件的研究[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 16-19.
- XU XP, YANG GB, WANG F, LI M. Ferro-oxidase producing conditions of *Pseudomonas* sp.[J]. Journal of Microbiology, 2009, 29(4): 16-19 (in Chinese).
- [23] 陈淋霞, 张萌, 石佳佳, 张笛, 郭永, 包智华. 铁氧化菌耐砷机制及其砷污染修复应用的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 3054-3064.
- CHEN LX, ZHANG M, SHI JJ, ZHANG D, GUO Y, BAO ZH. Advances in arsenic-resistant mechanism of Fe(II)-oxidizing bacteria and its arsenic pollution remediation applications[J]. Microbiology China, 2020, 47(9): 3054-3064 (in Chinese).
- [24] 林超峰, 龚骏. 嗜中性微好氧铁氧化菌研究进展[J]. 生态学报, 2012, 32(18): 5889-5899.
- LIN CF, GONG J. Recent progress in research on neutrophilic, microaerophilic iron(II)-oxidizing bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(18): 5889-5899 (in Chinese).
- [25] KATSOYIANNIS IA, ZOUBOULIS AI. Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters[J]. Water Research, 2004, 38(1): 17-26.
- [26] KATSOYIANNIS I, ZOUBOULIS A, ALTHOFF H, BARTEL H. As(III) removal from groundwaters using fixed-bed upflow bioreactors[J]. Chemosphere, 2002, 47(3): 325-332.
- [27] XIU W, GUO HM, LIU Q, LIU ZY, ZOU YE, ZHANG BG. Arsenic removal and transformation by *Pseudomonas* sp. strain GE-1-induced ferrihydrite: co-precipitation versus adsorption[J]. Water Air and Soil Pollution, 2015, 226(6): 167.
- [28] WANG Q, QIN D, ZHANG SZ, WANG L, LI JX, RENSING C, McDERMOTT TR, WANG GJ. Fate of arsenate following arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens* GW4[J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(6): 1926-1940.
- [29] 翟芳婷, 李辉辉, 胥聪敏. 2507 双相不锈钢在含铁氧化菌冷却水中的腐蚀行为[J]. 西安工业大学学报, 2015, 35(8): 654-659.
- ZHAI FT, LI HH, XU CM. Corrosion behavior of 2507 duplex stainless steel in cooling water with different IOB contents[J]. Journal of Xi'an Technological University, 2015, 35(8): 654-659 (in Chinese).