

# 微生物耐受重金属的作用机制

郭俊<sup>1</sup>, 潘虎<sup>1,2</sup>, 张晓明<sup>3</sup>, 王翀<sup>1</sup>, 刘虎虎<sup>1</sup>, 林元山<sup>1</sup>, 卢向阳<sup>1</sup>, 田云<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 西藏自治区农牧科学院农业质量标准与检测研究所, 拉萨 850032; 3. 湖南省烟草公司常德市公司, 湖南 常德 415000)

**摘要:** 微生物在重金属污染治理中具有重要作用, 本文从生物吸附、生物转化和外排作用等方面系统阐述了微生物耐受重金属的作用机制, 并对其发展趋势作出展望, 有助于促进微生物在重金属修复中的应用进程。

**关键词:** 重金属; 生物吸附; 生物转化; 外排作用

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)01-0136-04

## Advance on Mechanisms for Heavy Metals Tolerance of Microorganisms

GUO Jun<sup>1</sup>, PAN Hu<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiaoming<sup>3</sup>, WANG Chong<sup>1</sup>, LIU Huhu<sup>1</sup>, LIN Yuanshan<sup>1</sup>, LU Xiangyang<sup>1</sup>, TIAN Yun<sup>1\*</sup>

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; 2. Institute of Agricultural Product Quality Standard and Testing Research, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850032; 3. Changde City Company of Hunan Tobacco Company, Changde 415000, China)

**Abstract:** Microorganisms play the vital role in the treatment of heavy metals pollution. In this paper, the mechanism of microbial tolerance to heavy metals is systematically described from the aspects of biosorption, biotransformation and efflux, and its development trend is prospected, which is helpful to promote the application process of microorganisms in heavy metal remediation.

**Key words:** Heavy metal; Biosorption; Biotransformation; Exocytosis

重金属污染是目前主要的环境污染问题之一。从国务院2016年5月印发的《土壤污染防治行动计划》可知, 如何有效防治重金属污染是我们面临的重要工作之一。传统物理、化学方法耗材耗力、二次污染、破坏大, 生物修复更符合可持续发展的要求。微生物个体微小、比表面积大, 且繁殖快, 适应能力强、易培养, 一些长期处在重金属胁迫下的微生物对重金属可形成一定的耐性和抗性, 能适应重金属对其细胞生长的毒害。随着重金属抗性微生物被分离筛选, 一些抗性基因或基因簇得到克隆和验证, 为微生物防治重金属污染提供了重要依据<sup>[1-3]</sup>。但微生物与重金属相互作用机制较为复杂, 且不同种类微生物对重金属耐受程度也有所区别。目前国内外的主流观点

认为微生物对重金属的耐受机制主要有三个方面: 一为生物吸附, 通过细胞表面的官能团及胞外产物结合重金属, 将重金属离子隔绝在胞外; 二为生物转化, 进入胞内的重金属被某些蛋白、代谢产物沉淀或被氧化还原成其他存在形式, 降低了毒性甚至无毒; 三为外排作用, 重金属离子通过外排机制被排出胞外。本文从上述三个方面综述了微生物耐受重金属的机制以及相关研究进展, 为重金属污染防治和生物修复提供理论基础。

## 1 生物吸附

### 1.1 菌体表面吸附

表面吸附是指微生物通过络合、螯合作用或静电结合等方式将重金属固定在菌体表面。细胞壁作为第一道屏障, 首先与重金属离子接触, 其组成与结构决定着耐受重金属能力。真菌的细胞壁多含有几丁质; 革兰氏阳性菌细胞壁主要由肽聚糖和磷壁酸组成; 革兰氏阴性菌细胞壁主要存在多种酶、糖蛋白、脂多糖等。微生物细胞表面带负电荷的官能团如羟基、磷酸基、羧基等以离子键或共价键的形式结合重金属离子, 其中氮、

收稿日期: 2020-02-26

基金项目: 湖南省科技厅项目(2018RS3086); 西藏自治区自然科学基金[XZ2019ZRG-79(Z)]; 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(SCX1832)

作者简介: 郭俊(1995-), 女, 在读硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

通讯作者: 田云, 男, 博士, 教授, E-mail: tianyun79616@163.com

氧、磷、硫为关键配位原子。邵鑫等<sup>[4]</sup>采用红外光谱和扫描电镜结合的方法分析了乳酸菌在镉处理前后的微观结构及形态变化,结果表明乳酸菌中参与镉吸附的官能团有羟基、羧基、磷酸基、酰胺基以及烃基等,吸附机制包括络合反应、物理吸附等。通过分析黑曲霉吸附金属离子前后的光谱变化,Guibal等<sup>[5]</sup>发现当铬酸根阴离子、铀酰离子吸附在细胞壁时,氨基大量解离,真菌细胞壁带正电荷,从而使更多的铬酸根离子、铀酰离子结合到细胞壁上。

环境中的重金属取代细胞表面的阳离子与结合位点结合,被吸附到细胞的过程称为离子交换,在这个过程中,一般可检测到其他阳离子的释放。如通过X射线能量散射光谱分析细菌分别经 $Pb^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 和 $Cd^{2+}$ 处理之后细胞壁的成分,发现主要成分钾和钙峰消失,重金属谱峰出现,而钾、钙离子逐渐被取代释放到外界;运用质子激发X荧光光谱分析法测定经铀处理前后的芽孢杆菌的元素组分,处理后出现了新的铀吸收峰,而镁和钾的吸收峰消失,进一步证实了重金属可以通过离子交换与细胞结合<sup>[6]</sup>。

## 1.2 胞外沉淀

微生物细胞在生长代谢过程中,主动分泌或细胞裂解释放出大量代谢物,这些代谢物主要由有机酸、蛋白质、多糖、糖醛酸等大分子混合组成,其中胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)是微生物在极端条件下释放出来的。EPS含有可电离的官能团和非碳水化合物取代基,可使聚合物整体带负电荷,与金属阳离子和细胞表面之间相互作用形成复合物<sup>[7]</sup>。EPS吸附重金属的原因是生物膜受到重金属胁迫后保护自身免受毒害的一种应激反应,如亚砷酸单胞属在砷离子处理下,首先诱导形成生物膜来响应砷离子胁迫,将砷离子隔绝在胞外,再分泌胞外多糖清除砷离子,耐砷极限高达5 mM<sup>[8]</sup>。在重金属胁迫时,细菌胞内的蛋白总量下降,EPS的产量显著增高,且随菌体存活时间延长而增多,所吸附的重金属量也增多,将EPS从培养液中分离提取之后,细菌表面的重金属积累量显著减少<sup>[9]</sup>,这也表明EPS具有作为重金属离子吸附剂的开发潜力。

## 2 生物转化

### 2.1 胞内沉淀

进入到细胞内的重金属离子通常被转运至液泡或者在胞质中与磷酸根或金属硫蛋白等结合形成沉淀。

磷酸根离子不仅与生物的生长繁殖有关,在多种微生物的耐逆性上也起着重要作用。研究发现一株可耐受高浓度镉的嗜酸硫杆菌,在低镉处理时磷酸盐对镉耐受性没有产生相关的效应;当镉含量较高时,磷酸盐浓度的增加会导致细菌数量增加,磷酸盐在一定程度上保护细菌免受镉的毒性侵入<sup>[10]</sup>。重金属进入胞内刺激多磷酸盐水解,形成的金属-磷酸盐复合物被转运出细胞,Alvarez等<sup>[11]</sup>发现一株对重金属具有高抗性的氧化亚铁硫杆菌在高铜或高镉、高锌浓度处理下,胞内的多磷酸盐含量快速下降,磷酸盐增多,并且在溶液中检测到重金属-磷酸盐复合物。

在胞质中,重金属离子被金属硫蛋白(metallothionein, MT)螯合,固定在特定区域。金属硫蛋白是一类含多个巯基的小分子蛋白,与重金属螯合后,会将其“锚定”在胞内特定部位,降低可溶性重金属离子对胞内的影响<sup>[12]</sup>。金属硫蛋白的N末端,具有三个二价金属结合位点, C末端具有四个二价金属结合位点,主要由多个半胱氨酸、组氨酸、谷氨酸等氨基酸残基组成。半胱氨酸是含硫氨基酸之一,其含有的巯基可与重金属离子形成难溶性硫醇盐,且重金属离子的氧化电位比必需金属离子高,对巯基的亲合力更强,极易取代必需金属离子。重金属离子也可结合半胱氨酸的氨基和羧基,达到降低胞内重金属离子含量的目的。金属硫蛋白对汞、锌、镉、铜等重金属离子均具有较强亲和性,能够在细菌胞内结合形成沉淀<sup>[13]</sup>。

### 2.2 氧化还原

有的微生物可分泌某些酶,在酶的催化下,通过氧化还原反应改变具有多种价态重金属离子的存在形式,从而降低溶解度或降低毒性,在有重金属,特别是土壤和沉积物中的 $Cr^{6+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Co^{3+}$ 等和类金属 $As^{5+}$ 、 $Se^{6+}$ 转化中起着至关重要的作用。如耐汞细菌分泌的有机汞裂解酶可以将低价态的甲基汞转化为毒性比甲基汞低一百倍的汞(II);抗汞细菌利用MerA酶将汞(II)还原成挥发性的Hg,挥发到空气中;如假单胞菌属可以将 $Cr^{4+}$ 还原为流动性和毒性较小的 $Cr^{3+}$ <sup>[14]</sup>。硫酸盐还原细菌通过将硫酸盐还原成硫化物与重金属产生沉淀,从而间接地还原重金属。另外,研究发现肠状菌属也可还原硫酸盐生成硫化氢,硫化氢进一步与 $Hg^{2+}$ 结合形成HgS沉淀。

## 3 外排作用

当微生物胞内的重金属浓度达到其承受能力

时,将重金属排出胞外是最直接有效的解毒方法,重金属离子会通过一些特殊“泵”或者转运体被排出细胞外。在微生物体内常见的外排机制有以下三种。

### 3.1 P1B-ATPase

P-ATPase 是一个跨细胞膜离子泵和脂质泵的大型蛋白质家族,分为5个亚家族,其中,P1B-ATPase 与细菌运输金属离子密切相关,又被称为重金属泵。P1B-ATPase 包括由6~8个跨膜螺旋形成TM结构域、2个细胞质催化域、ATP结合结构域等,还具有特殊的富含Cys或His残基的末端延伸,这些残基可以配位金属离子。在P1B-ATPase的N末端具有高度保守的区域-金属结合域(Metal-binding domain, MBD),它含有一个与 $\text{Cu}^{2+}$ 或 $\text{Zn}^{2+}$ 离子结合的CxxC基序,可以特异性结合 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Zn}^{2+}$ <sup>[15]</sup>。大多数P1B-ATPase的MBD都具有金属离子结合位点,但大肠杆菌ZntA的N末端MBD被切断或CxxC基序突变,将导致ZntA活性降低而功能不被改变<sup>[16]</sup>。在细菌中P1B-ATPase只能运输包括质子在内的一价、二价阳离子,且具有选择性。Drees等研究了在不同重金属离子处理下结核分歧杆菌P1B-ATPases的活性和表达情况,发现尽管 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 都能刺激质膜中的P1B-ATPase的活性,但是结核分歧杆菌只耐受高浓度的 $\text{Cd}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ ,在含其他离子的溶液中无法存活<sup>[17]</sup>。

### 3.2 CDF家族

阳离子扩散促进因子(Cationic diffusion facilitators, CDFs)是一个膜结合蛋白家族,能够转运 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 和 $\text{Co}^{2+}$ 等重金属离子。CDF蛋白由跨膜结构域(Transmembrane domain, TMD)和C末端结构域(C-terminal domain, CTD)组成,TMD结构域含有重金属结合位点A,与CDFs的金属选择性密切相关,位点A的四聚体残基的置换可导致蛋白功能的降低或金属选择性的改变<sup>[18]</sup>。如在大肠杆菌中,位点A四聚体是一个DD-HD基序,负责Cd和Zn的转运,突变成HD-HD后转运 $\text{Zn}^{2+}$ 的能力不变,但减少了对 $\text{Cd}^{2+}$ 的转运<sup>[19]</sup>。位点A是CDF蛋白内唯一被证明保守的金属结合位点,而其他位点,如富含组氨酸的区域或细胞质结构域,并没有在所有的CDF蛋白中发现。

### 3.3 CBA转运体

CBA转运体是由质子驱动的重金属转运子,主要存在于革兰氏阴性菌中,是由外膜因子CzcC、周质耦合蛋白CzcB以及内膜蛋白CzcA组

成的一个离子外排通道,可介导 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 和 $\text{Cd}^{2+}$ 排出胞外。CzcA是CBA系统的主要组成部分,当重金属离子进入到胞质膜,CzcA可以将其识别,将其泵出外膜组织。CzcB蛋白是一种膜融合蛋白,定位在细胞膜上,横跨周质空间将内膜外膜紧密相连,与CzcA共同作用结合重金属阳离子排出膜外。CzcC与CBA特异性外排 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 有关,含有特殊的阳离子识别位点<sup>[20]</sup>。但有研究发现CzcCBA的存在会抑制P-ATPase的表达,可能是与CBA转运子和P-ATPase同是受质子驱动的转运子,存在竞争性有关<sup>[21]</sup>。

## 4 结 语

从细胞和分子的水平上分析微生物耐受重金属机制可以发现,微生物和重金属相互作用是一个复杂的过程,包括了体内和体外两种方式。如图1所示,当微生物处在重金属环境受到胁迫时,通过合成和分泌一些次生代谢物与重金属螯合或者络合反应,阻止重金属离子被细胞吸收,细胞壁上的基团作用也会将重金属阻隔在胞外,减少其进入胞内。当重金属进入胞内时,磷酸或者金属硫蛋白等与之结合形成复合物沉淀,或通过一些酶促反应将重金属的高毒形态转化成低毒或无毒的形态存在,还可以通过外排的方式将重金属离子排出细胞外以降低对胞内结构的毒害作用。

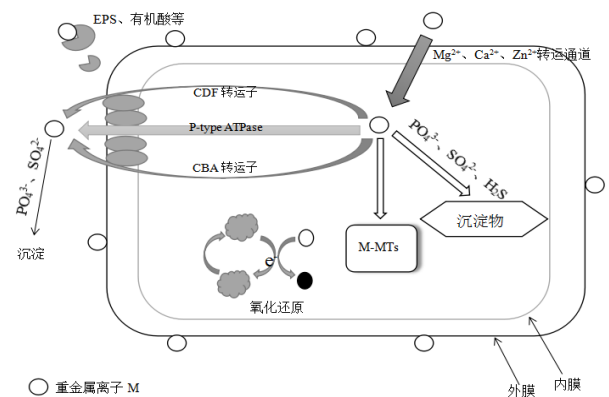


图1 微生物耐受重金属的主要作用机制

微生物对重金属的耐受机制及微生物投入实际生产应用仍存在以下问题有待进一步深入探究:(1)微生物耐受重金属不局限于某种机制单独作用,往往伴随着复杂的调控方式,目前尚未形成完整的调控网络,仍需利用不断革新的实验技术调整实验方案进行探索。(2)已分离得到的耐受重金属菌株一般只对某种单一的重金属具有很高的耐受能力,而重金属污染地区通常受多种

重金属污染,因此,利用现代生物技术获得同时耐受多种重金属的微生物是可行的方法之一,或考虑多种菌株协同作用联合修复的方法。(3)微生物的次生代谢物具有较强的重金属结合能力,发展微生物菌剂在应用上具有广阔的前景。但不可忽略的是微生物易受生长条件以及环境中土著微生物的影响,同时细胞内的某些酶对微生物耐受重金属的影响也需要考虑。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ayangbenro A S, Babalola O O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents [J]. *International Journal of Environment Research and Public Health*, 2017, 14(1): 94.
- [ 2 ] 曹铁华,牟忠生,王淑萍,等.抗铅微生物的筛选及EDDS螯合诱导黑麦草修复铅污染土壤的效应初探[J]. *吉林农业科学*, 2012, 37(6): 32-34, 50.
- [ 3 ] 李晓云,史良图,王海文,等.微生物在污染蔬菜土壤修复中的作用[J]. *吉林农业科学*, 2007, 32(4): 26-28, 34.
- [ 4 ] 邵鑫,孙凯,熊婧,等.耐镉乳酸菌对重金属镉的吸附机制[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(3): 48-53, 60.
- [ 5 ] Guibal E, Roulph C, Le Cloirec P. Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin[J]. *Environment Science Technology*, 1995, 29(10): 2496-2503.
- [ 6 ] Zhang J, Song H, Chen Z, et al. Biomineralization mechanism of U(VI) induced by *Bacillus cereus* 12-2: The role of functional groups and enzymes[J]. *Chemosphere*, 2018, 206: 682-692.
- [ 7 ] Gupta P, Diwan B. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies[J]. *Biotechnology Reports*, 2016, 13: 58-71.
- [ 8 ] Marchal M, Briandet R, Koechler S, et al. Effect of arsenite on swimming motility delays surface colonization in *Herminiimonas arsenicoxydans*[J]. *Microbiology*, 2010, 156(8): 2336-2342.
- [ 9 ] Mohite B V, Koli S H, Patil S V. Heavy Metal Stress and Its Consequences on Exopolysaccharide (EPS)-Producing *Pantoea agglomerans*[J]. *Application Biochemistry Biotechnology*, 2018, 186(1): 199-216.
- [ 10 ] Ulloa G, Quezada C P, Araneda M, et al. Phosphate Favors the Biosynthesis of CdS Quantum Dots in *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19703 by Improving Metal Uptake and Tolerance[J]. *Front Microbiology*, 2018(9): 234.
- [ 11 ] Alvarez A, Saez J M, Davila Costa J S, et al. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals[J]. *Chemosphere*, 2017, 166: 41-62.
- [ 12 ] Liu Y, Wu H, Kou L, et al. Two metallothionein genes in *Oxya chinensis*: molecular characteristics, expression patterns and roles in heavy metal stress[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112759.
- [ 13 ] Gadd G M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation[J]. *Microbiology*, 2010, 156(3): 609-643.
- [ 14 ] Rajapaksha A U, Vithanage M, Ok Y S, et al. Cr(VI) Formation related to Cr(III)-muscovite and birnessite interactions in ultramafic environments[J]. *Environment Science Technology*, 2013, 47(17): 9722-9729.
- [ 15 ] Lekeux G, Crowet J M, Nouet C, et al. Homology modeling and in vivo functional characterization of the zinc permeation pathway in a heavy metal P-type ATPase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(1): 329-341.
- [ 16 ] Rosenzweig A C, Argüello J M. Toward a molecular understanding of metal transport by P(1B)-type ATPases[J]. *Current Topics in Membranes*, 2012, 69: 113-136.
- [ 17 ] Drees S L, Beyer D F, Lenders-Lomscher C, et al. Distinct functions of serial metal-binding domains in the *Escherichia coli* P1B-ATPase CopA[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(3): 423-438.
- [ 18 ] Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes K A, et al. Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(12): 1283-1295.
- [ 19 ] Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, et al. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity[J]. *BMC Genomics*, 2007(8): 107.
- [ 20 ] Hoch E, Lin W, Chai J, et al. Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn<sup>2+</sup> over Cd<sup>2+</sup> selectivity[J]. *PNAS*, 2012, 109(19): 7202-7207.
- [ 21 ] Barber-Zucker S, Shaanan B, Zarivach R. Transition metal binding selectivity in proteins and its correlation with the phylogenomic classification of the cation diffusion facilitator protein family[J]. *Science Reports*, 2017, 7(1): 16381.

(责任编辑:王丝语)