

## 铊在真菌亚细胞中的分布特征

孙嘉龙<sup>1,2</sup>, 肖唐付<sup>1</sup>, 宁增平<sup>1</sup>, 贾彦龙<sup>1,3</sup>, 杨菲<sup>1,3</sup>, 彭景权<sup>2</sup>

(1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002;  
2. 贵州省环境科学研究设计院, 贵阳 550002; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:** 将前期从铊污染区筛选得到的9株高耐受性真菌菌株用于微生物对铊的富集和亚细胞分布实验, 采用酶解和差速离心法分离各亚细胞组分, 并检测其中铊的质量分数。结果表明, 生物富集量随着铊处理浓度上升而降低, 其影响趋势与对生物量的影响趋势基本一致, 最高可达7 189 mg/kg, 最大富集系数为7.19。在亚细胞水平上, 铊的富集优先顺序为: 细胞质—细胞壁—细胞器。亚细胞水平的区隔化作用是真菌对铊的主要耐受机制, 细胞质是赋存铊的主要场所(53.83%~79.45%)。

**关键词:** 铊; 微生物; 真菌; 亚细胞; 分布; 富集

中图分类号: P 593

文献标志码: A

文章编号: 0254-0037(2013)06-0941-07

## Sub-cellular Distribution of Thallium in *Fungus*

SUN Jia-long<sup>1,2</sup>, XIAO Tang-fu<sup>1</sup>, NING Zeng-ping<sup>1</sup>, JIA Yan-long<sup>1,3</sup>, YANG Fei<sup>1,3</sup>, PENG Jing-quan<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Guizhou Institute of Environmental Science Research and Design, Guiyang 550002, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 10039, China)

**Abstract:** This paper focused on the sub-cellular distribution of thallium in several different fungus strains. The fungus strains were isolated from the Lanmuchang thallium-mineralised area in southwest Guizhou Province, and were used in the bio-concentration experiments. The sub-cellular supernatants including cytoplasmic, cellwall and cell organelles were separated by the differential centrifuge after treated with snailase. Results show that the bio-concentration rate of thallium in the nine strains decreases with increasing thallium contents in the culture, the maximum at 7 189 mg/kg and the maximum bio-concentration factor (BCF) at 7.19. In the sub-cellular supernatants detected by ICP-OES, the majority of thallium (up to 79.45%) was found in cytoplasmic organelles, and the concentrations of thallium in the order of priority are as follows: cytoplasmic-cellwall-cell organelles. Cytoplasmic supernatant is apparently a major storage site for thallium, which is a possible detoxification of thallium by the fungus.

**Key words:** thallium; microbe; fungus; subcellular; distribution; bio-concentration

重金属污染对于多数微生物生长有毒害作用。但在污染环境中, 往往也存在一些对重金属胁迫具有高耐受性的微生物菌种, 它们可用于生物修复、工业废水处理等实际应用<sup>[1-2]</sup>。重金属对微生物的毒

害作用及微生物对重金属的耐受性, 主要与微生物对重金属的吸收与运输、重金属在微生物体内各部位的分配及其与微生物体内物质的结合形态等因素有关<sup>[3]</sup>。微生物耐金属毒害的机制较为复杂, 包括

收稿日期: 2011-06-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41063005); 中国科学院知识创新工程重要方向项目(kzcx2-yw-135)。

作者简介: 孙嘉龙(1978—)男, 高级工程师, 主要从事环境微生物学方面的研究, E-mail: danielsjl@163.com.

通信作者: 肖唐付(1969—)男, 研究员, 主要从事环境地球化学方面的研究, E-mail: xiaotangfu@vip.gyig.ac.cn.

细胞壁钝化、跨膜运输减少、主动外排、区隔化分布、整合、合成逆境蛋白等,但其中最主要、最普遍的机制是通过诱导金属配位体的合成,形成金属配位体复合物,并在器官、细胞和亚细胞水平呈区隔化分布<sup>[4]</sup>.近年来,许多学者对微生物吸附重金属离子的现象和机理进行的大量研究<sup>[5-6]</sup>表明,微生物吸附重金属存在静电吸引、络合、沉积和主动运输等作用<sup>[7]</sup>.但是这些研究大多以死菌体为研究对象,而对于活菌体的研究报道较少.铊是一种典型的有毒有害重金属元素,国内外有关这方面的研究主要集中在铊的毒理、环境地球化学等方面<sup>[8-9]</sup>,关于铊与微生物之间相互作用的相关研究较少.本论文以前期筛选出的耐铊性真菌菌株为研究对象,采用差速离心法(differential centrifugation),分离并检测各亚细胞组分中铊和其他常量元素的质量分数,初步揭示亚细胞水平上铊的分布特征,并探讨真菌细胞对铊的耐受机理,为进一步阐明微生物对铊的解毒/耐毒机制提供理论依据,以期应用这些菌株进行矿山废水处理.

## 1 研究方法

### 1.1 富集实验

以前期筛选得到的9株铊高耐受性真菌菌株为研究对象<sup>[10]</sup>,依次编号为T01~T09,其中T01、T02、T04、T08和T09为木霉属(*Trichoderma*),T03为马利亚霉(*Mariannaea*),T05为拟青霉属(*Paecilomyces*),T08和T09为青霉属(*Penicillium*).

采用液体培养的方式进行真菌对铊的富集实验.液体培养基选择马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基.根据预实验结果,设置3个处理水平,在三角瓶添加适量 $TlNO_3$ (Merck, Germany)和PD,配成铊质量浓度分别为1 000、1 200和1 500 mg/L的培养液.

将9株菌株依法配制成 $1 \times 10^4$ 个/mL孢子悬液.混匀后,取1 mL孢子悬浮液接入三角瓶中,每个处理均设3个平行处理.然后,置于摇床培养(26 °C, 250 r/min).

培养结束后,将发酵液用定性滤纸过滤,并用200 mL 0.05% Twin-80溶液反复冲洗,然后称取0.2 g菌丝体(A)置于4 °C冰箱,备用.剩余菌丝体(B)置于80 °C的烘箱内烘干至恒重,用于分析生物样品中对铊的富集量.

### 1.2 亚细胞组分分离

采用蜗牛酶酶解法对真菌细胞破壁处理,剩下

的为仅由细胞膜包裹着的细胞(称为原生质体),含细胞质、细胞核等亚组分,然后采用差速离心的方法分别收集各亚细胞组分.

称取适量溶壁酶(Snailase,美国Ameresco公司)配制成20 g/L酶液.然后,按质量体积比1:10往菌丝体(A)加入酶液,30 °C, 80 r/min酶解3 h.

将酶解后的溶液转入5 mL离心管中,采用差速离心法分离不同大小的细胞组分.首先在4 °C、1 600 r/min离心15 min,所得沉淀为细胞壁组分,上层液备用;此后在4 °C、18 000 r/min离心45 min,上层液为细胞液,所得沉淀为细胞器组分.

### 1.3 样品处理与测定

将分离后的各亚细胞组分移入Teflon管(此前用超纯 $HNO_3$ 煮洗过),加入0.8 mL HF + 1 mL  $HNO_3$ (将Teflon管放置于钢罐中密封),烘箱中加热(180~190 °C)24~30 h,冷却.将Teflon管取出,放置在电热板上蒸干(140 °C),再加入少许 $HNO_3$ (<1 mL),蒸干(干透),加入2 mL  $HNO_3$  + 3 mL Millipore超纯水,密封,烘箱内加热(140 °C)4~5 h,冷却,然后定容到100 mL.另将烘干后的菌丝体(B)多次研磨至200目,同样方法消解,备用.

分析仪器为中国科学院地球化学研究所Perkin Elmer电感耦合等离子体质谱仪(inductively coupled plasmas mass spectrometry, ICP-MS),铊的检测限为0.005  $\mu\text{g/L}$ .其他常量元素采用电感耦合等离子发射光谱仪(inductively coupled plasmas optical emission spectrometry, ICP-OES)(Vista MPX型,美国Varian公司)进行测定.通过重复样、空白样和标样的QA/QC控制测试,分析结果误差在95%置信度水平上均控制在 $\pm 10\%$ 以内;空白样测试结果都低于检测限;标样测试结果与推荐值的误差为 $\pm 10\%$ .

### 1.4 数据处理

本研究中得出的数据分析结果均采用SPSS 11.5软件完成方差分析和最不显著差异法(least significant difference, LSD)多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著性.

## 2 结果分析

### 2.1 各菌株铊的富集量比较

各菌株富集铊的结果见表1.在1 000 mg/L处理中,各个菌株对铊的富集量为255.96~7 189.06  $\mu\text{g/g}$ ,平均富集量为2 309.18  $\mu\text{g/g}$ ;在1 200 mg/L处理中,9株菌株中仅存3株菌株继续生长,各个菌

株对铊的富集量为 930.72 ~ 6 165.42  $\mu\text{g/g}$ , 平均富集量为 2 428.58  $\mu\text{g/g}$ ; 在 1 500 mg/L 处理中 9 株菌株中仅存 3 株菌株继续生长, 各个菌株对铊的富集

量为 189.60 ~ 5 819.13  $\mu\text{g/g}$ , 平均富集量为 2 915.01  $\mu\text{g/g}$ .

表 1 不同铊处理各菌株铊的富集量(干质量)比较  
Table 1 Concentrations of thallium in individual strain

| 菌株  | 1 000 mg/L                        | 1 200 mg/L                         | 1 500 mg/L                         |
|-----|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| T01 | 2 217 $\pm$ 175.53 <sup>BC</sup>  |                                    |                                    |
| T02 | 2 775 $\pm$ 296.88 <sup>C</sup>   |                                    |                                    |
| T03 | 1 657 $\pm$ 199.35 <sup>ab</sup>  | 931 $\pm$ 62.03 <sup>ba</sup>      | 669 $\pm$ 58.76 <sup>ba</sup>      |
| T04 | 2 662 $\pm$ 199.48 <sup>abc</sup> | 2257 $\pm$ 13.29 <sup>ba</sup>     | 190 $\pm$ 19.60 <sup>cb</sup>      |
| T05 | 2 042 $\pm$ 384.19 <sup>bc</sup>  |                                    |                                    |
| T06 | 1 639 $\pm$ 159.53 <sup>B</sup>   |                                    |                                    |
| T07 | 345 $\pm$ 64.31 <sup>A</sup>      |                                    |                                    |
| T08 | 256 $\pm$ 43.82 <sup>A</sup>      |                                    |                                    |
| T09 | 7 189 $\pm$ 300.83 <sup>D</sup>   | 6 165.42 $\pm$ 433.41 <sup>B</sup> | 5 819.13 $\pm$ 196.75 <sup>C</sup> |

注: 同一行肩标不同小写字母和同一列肩标大写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ).

利用 SPSS 软件对实验数据进行 LSD 法多重比较分析结果(表 1)表明: 3 个处理水平对 T03 和 T04 富集量的影响具有明显差异, 而对 T09 菌株则不明显. 随着处理浓度的变化, 其富集量都不同程度地表现出下降, 这表明随着处理浓度的增大, 菌株的生长受到抑制, 生物量也随之下降, 导致富集量也随之下降.

## 2.2 各菌株生物富集系数比较

为了有效地评价此次分离到的各菌株对铊的富集能力, 计算了各菌株不同处理批次的生物富集系数 ( $\text{BCF} = \text{微生物体内铊质量浓度} / \text{培养基中铊质量浓度}$ ) 如表 2 所示.

表 2 不同铊处理各菌株铊的 BCF 比较  
Table 2 BCF of thallium in individual strain

| 菌株  | 1 000 mg/L | 1 200 mg/L | 1 500 mg/L |
|-----|------------|------------|------------|
| T01 | 2.22       |            |            |
| T02 | 2.78       |            |            |
| T03 | 1.66       | 0.78       | 0.45       |
| T04 | 2.66       | 1.50       | 0.60       |
| T05 | 2.04       |            |            |
| T06 | 1.64       |            |            |
| T07 | 0.34       |            |            |
| T08 | 0.26       |            |            |
| T09 | 7.19       | 5.14       | 3.88       |

\* 在 1 200 和 1 500 mg/L 处理中, 部分菌株不能生长, 故无数据.

在 1 000 mg/L 处理水平, 除 T07 和 T08 菌株的生物富集系数低于 1 以外, 其他菌株均在 1 以上, 其中 T09 菌株的 BCF 最高 (7.19); 在 1 200 mg/L 处理水平, 除 T03 菌株低于 1 以外, 其他菌株均在 1 以上, 其中 T09 菌株的 BCF 最高 (5.14); 在 1 500 mg/L 处理水平, 除 T03 和 T04 菌株低于 1 以外, 其他菌株均在 1 以上, 其中 T09 菌株的 BCF 最高 (3.88). 从以上分析结果可看出, 随处理浓度的上升, 各菌株的 BCF 均有不同程度的下降.

## 2.3 铊在细胞内各亚细胞组分中的分布

铊在真菌细胞中各亚细胞分布实验结果(表 3)表明, 细胞内一半以上的铊集中在细胞质, 其次是细胞壁和细胞器. 但由于各菌株之间的物种差异, 铊在亚细胞水平上的分布也有所差别.

在 1 000 mg/L 铊处理水平, 铊在细胞质组分中的质量分数为 4.62 ~ 50.41  $\mu\text{g/g}$ , 平均质量分数为 22.41  $\mu\text{g/g}$ , 所占比例为 56.76%; 铊在细胞壁组分中的质量分数为 2.87 ~ 29.98  $\mu\text{g/g}$ , 平均质量分数为 4.94  $\mu\text{g/g}$ , 所占比例为 29.94%; 铊在细胞器组分中的质量分数为 1.23 ~ 12.55  $\mu\text{g/g}$ , 平均质量分数为 11.41  $\mu\text{g/g}$ , 所占比例为 13.30%. 在 1 200 mg/L 铊处理水平, 铊在细胞质组分中的质量分数为 35.55 ~ 49.89  $\mu\text{g/g}$ , 平均质量分数为 42.93  $\mu\text{g/g}$ , 所占比例为 71.34%; 铊在细胞壁组分中的质量分数为 6.30 ~ 30.80  $\mu\text{g/g}$ , 平均质量分数为 14.59  $\mu\text{g/g}$ , 所占比例为 21.11%; 铊在细胞器组分中的质量

表3 不同菌株亚细胞组分中铊的分布

Table 3 Sub-cellular distribution of thallium in individual strain

| 菌株  | 铊处理/<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 铊质量分数(0.2 g 鲜重菌丝体) / ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |                              |                              |                            |
|-----|---|--|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
|     |   | 细胞壁  | 细胞器                          | 细胞质                          | 总铊                         |
| T01 | 1 000                                     | 10.3 ± 0.82 <sup>bBC</sup>                               | 4.33 ± 1.05 <sup>cAB</sup>   | 15.45 ± 1.15 <sup>bA</sup>   | 30.04 ± 2.57 <sup>B</sup>  |
| T02 | 1 000                                     | 15.95 ± 1.51 <sup>bDE</sup>                              | 4.49 ± 1.35 <sup>cAB</sup>   | 30.05 ± 0.68 <sup>aBC</sup>  | 50.48 ± 3.53 <sup>C</sup>  |
| T03 | 1 000                                     | 16.28 ± 1.07 <sup>bDE</sup>                              | 8.70 ± 2.27 <sup>cBCD</sup>  | 25.56 ± 3.46 <sup>aB</sup>   | 50.54 ± 6.81 <sup>C</sup>  |
|     | 1 200                                     | 6.50 ± 0.20 <sup>bAB</sup>                               | 1.62 ± 0.97 <sup>eA</sup>    | 48.65 ± 1.24 <sup>aD</sup>   | 56.78 ± 2.01 <sup>C</sup>  |
|     | 1 500                                     | 4.04 ± 0.94 <sup>bA</sup>                                | 2.25 ± 0.14 <sup>bA</sup>    | 48.53 ± 1.48 <sup>aD</sup>   | 54.82 ± 2.29 <sup>C</sup>  |
| T04 | 1 000                                     | 16.83 ± 0.07 <sup>bE</sup>                               | 9.75 ± 2.80 <sup>bCD</sup>   | 35.87 ± 2.50 <sup>aBCD</sup> | 62.44 ± 5.24 <sup>C</sup>  |
|     | 1 200                                     | 7.73 ± 0.68 <sup>bAB</sup>                               | 3.83 ± 0.53 <sup>cAB</sup>   | 37.58 ± 2.03 <sup>aBCD</sup> | 49.14 ± 1.89 <sup>C</sup>  |
|     | 1 500                                     | 14.77 ± 2.00 <sup>bCDE</sup>                             | 2.80 ± 1.29 <sup>eA</sup>    | 34.71 ± 1.04 <sup>aBCD</sup> | 52.28 ± 1.74 <sup>C</sup>  |
| T05 | 1 000                                     | 6.50 ± 0.47 <sup>aAB</sup>                               | 1.79 ± 0.56 <sup>bA</sup>    | 8.34 ± 1.80 <sup>aA</sup>    | 16.63 ± 0.77 <sup>AB</sup> |
| T06 | 1 000                                     | 14.27 ± 0.18 <sup>bCDE</sup>                             | 6.09 ± 0.83 <sup>eABCD</sup> | 44.72 ± 3.63 <sup>aCD</sup>  | 65.08 ± 3.63 <sup>C</sup>  |
| T07 | 1 000                                     | 3.84 ± 0.52 <sup>bA</sup>                                | 2.13 ± 0.26 <sup>bA</sup>    | 9.17 ± 0.96 <sup>aA</sup>    | 15.14 ± 0.73 <sup>AB</sup> |
| T08 | 1 000                                     | 3.71 ± 0.43 <sup>bA</sup>                                | 1.91 ± 0.43 <sup>caA</sup>   | 6.51 ± 1.13 <sup>aA</sup>    | 12.13 ± 1.08 <sup>A</sup>  |
| T09 | 1 000                                     | 29.41 ± 0.54 <sup>bF</sup>                               | 10.71 ± 1.78 <sup>cD</sup>   | 46.11 ± 4.30 <sup>D</sup>    | 86.23 ± 6.61 <sup>D</sup>  |
|     | 1 200                                     | 29.53 ± 1.27 <sup>bF</sup>                               | 9.87 ± 0.85 <sup>cCD</sup>   | 42.55 ± 2.76 <sup>aCD</sup>  | 81.94 ± 3.18 <sup>D</sup>  |
|     | 1 500                                     | 11.19 ± 2.79 <sup>bBCD</sup>                             | 5.33 ± 1.43 <sup>cABC</sup>  | 74.89 ± 7.45 <sup>aE</sup>   | 91.40 ± 9.71 <sup>D</sup>  |

注: 同一行肩标不同小写字母和同一列肩标大写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

分数为 0.65 ~ 10.72  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 平均质量分数为 5.11  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 所占比例为 7.55%。

利用 SPSS 软件对实验数据进行单因素方差分

析。因此, 可认为在不同菌株中, 铊的亚细胞分布存在着显著差异, 如表 4 所示。

表4 铊在亚细胞水平分布的单因素方差分析表

Table 4 Oneway ANOVA of thallium in the sub-cellular fractions

| 亚细胞组分 | 差异源  | 平方和(SS)    | 自由度(df) | 均方(MS)     | $F_{0.05}$ | $P$   |
|-------|------|------------|---------|------------|------------|-------|
| 细胞壁   | 组间变异 | 2 998.744  | 1       | 2 998.744  | 174.178    | 0.000 |
|       | 组内变异 | 275.465    | 16      | 17.217     |            |       |
|       | 总变异  | 3 274.209  | 17      |            |            |       |
| 细胞器   | 组间变异 | 298.477    | 1       | 298.477    | 37.072     | 0.000 |
|       | 组内变异 | 128.819    | 16      | 8.051      |            |       |
|       | 总变异  | 427.296    | 17      |            |            |       |
| 细胞质   | 组间变异 | 11 723.467 | 1       | 11 723.467 | 533.596    | 0.000 |
|       | 组内变异 | 351.531    | 16      | 21.971     |            |       |
|       | 总变异  | 12 074.998 | 17      |            |            |       |

随着铊处理水平的上升, 细胞质中铊的质量分数也随着上升, 而细胞壁和细胞器中铊的质量分数则随之下降。这表明, 在高铊环境背景中, 微生物细胞中细胞质显然是吸附铊的一个重要储存部位。

2.4 各常量元素与亚细胞组分中铊分布之间的关系  
表5 为样本数  $n = 42$  时, 亚细胞组分中各常量

元素与铊的相关系数。研究表明, 铊在农作物内的富集常与钙呈密切相关<sup>[11]</sup>。本研究发现在细胞壁中铊与钙呈显著相关关系( $r = 0.2820$ ), 这与前人研究结果一致<sup>[12]</sup>。

此外, 在细胞壁中, 铊与钙呈显著相关关系( $r = 0.2820$ ), 与钠呈极显著相关( $r = 0.7929$ ), 而与镁

表5 亚细胞组分中各常量元素与铊的相关系数  $r$ 

Table 5 Person's matrix of Ca, Fe, K, Mg, Na and Tl in the sub-cellular fractions

| 亚细胞组分         | Ca       | Fe       | K         | Mg       | Na        |
|---------------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| 细胞壁( $n=42$ ) | 0.282 0* | 0.045 7  | 0.127 2   | -0.164 4 | 0.792 9** |
| 细胞器( $n=42$ ) | -0.184 3 | 0.224 3  | 0.399 9** | -0.136 7 | 0.445 0** |
| 细胞质( $n=42$ ) | 0.075 7  | -0.039 0 | -0.169 3  | -0.017 9 | 0.362 4*  |

\* 显著水平  $P < 0.05$ ; \*\* 显著水平  $P < 0.01$ .

呈负相关;在细胞器中,铊与钾、钠呈极显著相关,  $r$  分别为0.399 9和0.445 0,与镁也呈负相关;在细胞质中,铊与钠呈极显著相关,  $r = 0.362 4$ ,与铁、钾和镁均呈负相关性。

### 3 讨论

#### 3.1 富集能力与生物量的关系

金属元素对微生物来说,是生长所需的微量元素,又是具有抑制作用的有毒物质,特别是一些重金属离子,对于多数微生物有毒害作用,但从另一角度来看,一些具高耐受性的微生物菌种也正被用于生物修复、工业废水处理等实际应用<sup>[1-2]</sup>.

本研究也得出类似的结果,在1 000 mg/L处理中,各个菌株均能生长,但在1 200和1 500 mg/L处理中,9株菌株中仅存3株菌株能继续生长,且随着处理质量浓度的上升,菌株生物量显著减少,这表明铊对真菌菌株有着明显的毒害作用。同时,随着处理浓度的变化,其富集量都不同程度表现出下降,这表明随着处理浓度的增大,其生长受到抑制,生物量也随之下降,导致富集量也随之下降。

此外,生物富集系数表征生物对某种重金属元素的富集能力,富集系数越大,其富集能力越强。有研究者指出,只有富集系数大于1的元素,才能谈得上在生物体内富集<sup>[13]</sup>。在本研究中,随处理浓度的上升,各菌株的BCF均有不同程度的下降。这也从侧面表明外围环境高浓度的 $Tl^+$ 对真菌菌株产生了较大的抑制作用,其正常代谢机理不能加以维持,从而导致富集系数的下降。

从应用前景的角度,本研究中所筛选到的具有高耐受性的真菌菌株可用于铊矿区废水或含铊废水处理、铊污染土壤的生物修复等应用研究。

#### 3.2 从亚细胞分布特征探讨真菌对铊的耐受机制

多数重金属作为生物生长的一种非必需元素,进入细胞后可扰乱生物的正常代谢,产生毒害作用。目前有关植物对重金属的耐受机制研究较多,许多研究都表明,无论是在植物细胞还是微生物细胞中,

液泡(亚细胞细胞器中的一部分)除具有生物大分子的降解、代谢物的储存和维持氢离子浓度的平衡外,还具有解除金属离子毒害的作用<sup>[14]</sup>。

微生物的这种耐重金属毒害机制与植物很相似。有研究表明,酵母在抗重金属离子的毒害中,液泡主要利用的是液泡 $H^+ - ATPase$ ,而不是以前认为的线粒体 $F_1F_0 - ATPase$ ,并提出了一个以液泡 $H^+ - ATPase$ 为能量来源的重金属离子跨膜机制假说<sup>[15]</sup>。

以往的研究只发现铊可在植物中大量富集<sup>[16-17]</sup>,并对植物(主要是甘蓝)富集铊的机理作了探讨<sup>[18]</sup>,但是对微生物与铊相互作用的研究相对较少。

本研究通过对真菌菌株的研究,也得出与前人研究相类似的结论,在1 000 mg/L铊处理水平,53.83%的铊富集于细胞质中;在1 200 mg/L铊处理水平,71.34%的铊富集于细胞质中;在1 500 mg/L铊处理水平,79.45%的铊富集于细胞质中。这表明,在3个处理水平上,细胞质中的铊质量分数都维持在一个较高水平上,而细胞器中的铊质量分数一直维持在较低水平。因此,在微生物亚细胞水平上,铊的富集优先顺序为:细胞质—细胞壁—细胞器。

#### 3.3 细胞壁上有关 $Tl^+$ 通道的探讨

细胞壁是防止细胞外物质进入细胞的屏障,大多数的金属离子等都是通过主动运输或协同运输通过细胞壁进入细胞内的,如 $Na^+$ 、 $K^+$ 是通过钠-钾泵进入细胞的, $Ca^{2+}$ 是通过钙离子泵进入细胞内的。除此之外,细胞壁上还存在专门对 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 的通道<sup>[19]</sup>。

铊的毒理学实验表明,由于 $Tl^+$ 和 $K^+$ 的离子半径非常相近( $Tl^+$  150 nm,  $K^+$  151 nm)<sup>[20]</sup>,细胞壁可能无法准确分辨 $K^+$ 和 $Tl^+$ <sup>[21]</sup>,因此, $Tl^+$ 很容易混入细胞内,代替 $K^+$ 参加某些生物化学反应,与 $K^+$ 发生竞争,影响有 $K^+$ 参与的生理活动如神经冲动的传导等<sup>[22-24]</sup>。在浮萍(*Lemna minor*)水培实验中,当水培溶液中 $K^+$ 浓度从0.93 mmol/L逐步升高到50

mmol/L 时在 2、24 和 48 h 的暴露时间内 植物里面  $Tl^+$  的质量分数分别降低了 60%、75% 和 69%<sup>[25]</sup>。

本研究结果显示 在细胞壁组分中 铊与  $Na^+$  的极显著正相关表明 可能是由于细胞壁无法准确分辨  $K^+$  和  $Tl^+$  细胞壁上的钠-钾泵 ( $Na^+-K^+$  ATPase, 每一循环转运出 3 个  $Na^+$ 、转进 2 个  $K^+$  并消耗 1 个 ATP) 参与了对  $Tl^+$  的运输。与此同时 铊与钾的相关系数只为 0.127 2, 这可能是由于细胞壁上除了钠-钾泵运输  $K^+$  外 还存在另外一种  $K^+$  通道——电位门通道 (voltage gated channel) 它能在细胞内外的离子浓度发生变化时 致使其构象变化, “门”打开,  $K^+$  进入细胞内, 以维持正常生理代谢<sup>[19]</sup>。因此 铊与钾在细胞运输方式上并无相互竞争作用 (图 1)。

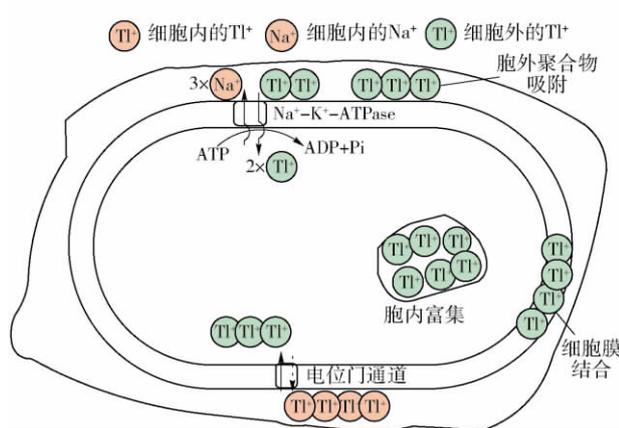


图 1 真菌细胞转运铊的假想机制

Fig. 1 Hypothesis for transportation of thallium in the fungus cell

铊与钙呈显著相关性也表明 它们之间存在一种协同关系。曾有研究表明 在  $Ca^{2+}$  活化的  $K^+$  通道里面  $Tl^+$  和  $K^+$  的离子选择性非常类似<sup>[12]</sup>。

综上所述 可以初步推断  $Tl^+$  主要是以其与  $K^+$  的相似性 通过细胞壁的  $Na^+-K^+$  ATPase 和  $K^+$  电位门通道进入细胞内从而影响细胞的正常代谢的 而  $Ca^{2+}$  的活化更有助于这一过程。同时 由于电位门通道受胞内外浓度差变化的影响 当胞内浓度高于胞外浓度时 它又成为细胞将铊外排出细胞的一种通道 从而降低铊对细胞的胁迫 维持正常生理代谢。

#### 4 结论

1) 本研究将前期从铊污染区筛选得到的 9 株高耐受性菌株用于微生物对铊的富集实验 在 1 000 mg/L 处理中 各个菌株对铊的富集量为 255.96 ~

7 189.06  $\mu\text{g/g}$  平均富集量为 2 309.18  $\mu\text{g/g}$  生物富集系数最高可达 7.19。

2) 亚细胞组分实验表明 在亚细胞水平上 铊的富集优先顺序为: 细胞质—细胞壁—细胞器。关于铊的耐受机制 本文提出亚细胞水平的区隔化作用是微生物对铊的主要耐受机制 细胞质是赋存铊的主要场所 (53.83% ~ 79.45%)。

3) 在此基础上 本文探讨了真菌细胞壁的  $Tl^+$  通道 认为  $Tl^+$  主要是以其与  $K^+$  的相似性 通过细胞壁的  $Na^+-K^+$  ATPase 和  $K^+$  电位门通道进入细胞内从而影响细胞的正常代谢的 而  $Ca^{2+}$  的活化更有助于这一过程。

#### 参考文献:

- [1] ANAND P, ISAR J, SARAN S, et al. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride* [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97(8): 1018-1025.
- [2] BOSECKER K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 20(3/4): 591-604.
- [3] ABOU-SHANAB R A I, VAN BERKUM P, ANGLE J S. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale* [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(2): 360-367.
- [4] 荚荣, 裴明军, 史银, 等. 真菌 (*Aspergillus* sp.) 吸附  $Cu^{2+}$  的研究 [J]. *中国环境科学*, 2003(3): 263-266. JIA Rong, PEI Ming-jun, SHI Yin, et al. Studies on adsorption of  $Cu^{2+}$  by the fungus *Aspergillus* sp [J]. *China Environmental Science*, 2003(3): 263-266. (in Chinese)
- [5] 杜爱雪, 曹理想, 张仁铎. 高抗铜青霉菌的筛选及其对重金属的吸附 [J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(5): 650-653. DU Ai-xue, CAO Li-xiang, ZHANG Ren-yi. Screening of *Penicillium* strain with high copper resistance and its adsorption of heavy metals [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14(5): 650-653. (in Chinese)
- [6] AKSU Z, BALIBEK E. Chromium (VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 145(1/2): 210-220.
- [7] DACERA D D M, BABEL S. Removal of heavy metals from contaminated sewage sludge using *Aspergillus niger* fermented raw liquid from pineapple wastes [J].

- Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1682-1689.
- [8] AMIRI A, FATEMI S, FATEMI S. Removal of thallium by combining desferrioxamine and deferiprone chelators in rats [J]. BioMetals, 2007, 20(2): 159-163.
- [9] JACOBSON A R, KLITZKE S, MCBRIDE M B, et al. The desorption of silver and thallium from soils in the presence of a chelating resin with thiol functional groups [J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2005, 160(1): 41-54.
- [10] 孙嘉龙, 肖唐付, 邹晓, 等. 黔西南滥木厂铊矿化区铊污染的微生物效应 [J]. 地球与环境, 2009, 37(1): 62-66.  
SUN Jia-long, XIAO Tang-fu, ZOU Xiao, et al. Microbial effects induced by thallium accumulation in the Lanmuchang Tl mineralised area, southwest Guizhou province [J]. Earth and Environment, 2009, 37(1): 62-66. (in Chinese)
- [11] XIAO T F, GUHA J, BOYLE D, et al. Environmental concerns related to high thallium levels in soils and thallium uptake by plants in southwest Guizhou, China [J]. The Science of the Total Environment, 2004, 318(1-3): 223-244.
- [12] GORMA A L F, WOOLUM J C, CORNWALL M C. Selectivity of the  $Ca^{2+}$ -activated and light-dependent  $K^{+}$  channels for monovalent cations [J]. Biophysical Journal, 1982, 38(3): 319-322.
- [13] PEREL Man A И. 后生地球化学 [M]. 龚子同, 译. 北京: 科学出版社, 1975.
- [14] YANG X, FENG Y, HE Z L, et al. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 18(4): 339-353.
- [15] HAMILTON C A, TAYLOR G J, GOOD A G. Vacuolar  $H^{+}$ -ATPase, but not mitochondrial  $F_1F_0$ -ATPase, is required for NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(2): 227-232.
- [16] LEBLANC M, PETIT D, DERAM A, et al. The phytomining and environmental significance of hyperaccumulation of thallium by *Iberis intermedia* from southern France [J]. Economic Geology, 1999, 94(1): 109-113.
- [17] WIERZBICKA M, SZAREK-LUKASZEWSKA G, GRODZINSKA K. Highly toxic thallium in plants from the vicinity of Olkusz (Poland) [J]. Ecotoxicology And Environmental Safety, 2004, 59(1): 84-88.
- [18] 何立斌. 甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) 吸收富集铊的环境地球化学研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2008.  
HE Li-bin. Environmental geochemistry study on high uptake of thallium by green cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) [D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2008. (in Chinese)
- [19] 翟中和. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [20] SHANNON R. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides [J]. Acta Crystallographica Section A, 1976, 32(5): 751-767.
- [21] MULLINS L J, MOORE R D. The movement of thallium ions in muscle [J]. Journal of General Physiology, 1960, 43: 759-773.
- [22] MULKEY J P. A review of thallium toxicity [J]. Veterinary and Human Toxicology, 1993, 35(6): 511.
- [23] SIEGEL B Z, SIEGEL S M. Thallium antagonism toward potassium dependent systems [J]. Bioinorganic Chemistry, 1976, 6(3): 229-232.
- [24] BRISMAR T, ANDERSON S, COLLINS V P. Mechanism of high  $K^{+}$  and  $Tl^{+}$  uptake in cultured human glioma-cells [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 1995, 15(3): 351-360.
- [25] KWAN K H M, SMITH S. Some aspects of the kinetics of cadmium and thallium uptake by fronds of *Lemna minor* L [J]. New Phytologist, 1991, 117(1): 91-102.

(责任编辑 吕小红)