

专论与综述

真菌对重金属的抗性及其解毒作用

王保军 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所, 北京)

微生物与重金属之间相互作用的研究已有数十年之久。随着采矿业的发展和重金属在工业、农业及医药等方面的应用, 环境污染问题已日趋受到关注。在长期的理论研究和实际应用中, 人们发现: 包括真菌在内的许多种微生物对一些金属均具有抗性。并已证明: 微生物在自然界对重金属的迁移转化起着重要的作用。因此, 深入研究微生物对重金属的抗性, 不仅能丰富微生物的生理学、生态学、生物化学及遗传学的理论, 而且在应用生物技术治理工业废物污染、保护人类生存环境等方面也具有重要的意义。

一些金属元素(例如铜、锰、镁、钙、钾等)在真菌的生长代谢过程中不可缺少, 个别真菌还需要钴^[1]。当这些金属的浓度很高时, 会阻碍以至破坏菌的生长代谢。银、汞、钡等金属的浓度很低时也会有很强的毒性。Hosfall^[2]总结出金属阳离子对真菌的毒性顺序为: 银>汞>铜>镉>铬>镍>铝>钴>锌>铁>钙, 此种顺序可因生物种类不同而略有差异。

就真菌而言, 重金属的毒性效应表现在:

(1) 杀死全部或具有一定百分比的菌丝、细胞或孢子; (2) 抑制细胞的生长或孢子的萌发; (3) 抑制菌体某些正常的生长特性(如孢子形成)或某些正常的代谢活动(如呼吸作用等)^[3]。

尽管重金属离子浓度增大时会对菌体产生毒害作用, 但仍有一些真菌在此条件下能够生存。Ashida^[3]提出, 判别一种真菌对金属毒物是否产生抗性有两个标准: (1) 提高毒物浓度才能达到以往相同的毒性效果; (2) 用相同的毒物浓度所得到的毒性效果比以往所得效果小的多。

获得对重金属具有抗性的菌株方法很多。例如将真菌培养在含有适宜浓度的重金属化合

物培养基中; 通过诱变从野生种群中选择; 从含有高浓度重金属的自然环境如土壤、河流、湖泊、泥炭沼泽、工业废水中分离筛选等。人们已从生理学、生态学等方面对抗性菌株进行了大量的研究, 并探讨了某些真菌对重金属的解毒机理。

(一) 对铜的抗性

在过去很长时间内硫酸铜被用作保护农作物的一种有效杀菌剂。在上世纪末, 研究者发现, 灰绿青霉(*Penicillium glaucum*)能够在用2%硫酸铜浸泡过的麦粒上和含有9.5%的硫酸铜培养基上生长。数年后, 将该种霉菌置于含多种重金属盐的培养基中培养后, 该菌获得了对铜、锌、镉等多种重金属的抗性^[4]。1943年, Starkey等^[4]从含有4%硫酸铜的酸性溶液中分离到一种*Scytalidium*菌, 此菌甚至能在含饱和硫酸铜的(约1mol/L)培养基中生长。此后, 人们陆续报道了赤霉(*Gibberella zeae*)、出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)、链格孢霉(*Alternaria kikuchiana*)、镰刀霉(*Fusarium* sp.)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及一些腐木真菌(wood-rotting fungi)对铜的抗性^[4,5]。

真菌可经人为的定向培养或在受铜污染的自然环境中获得对铜的抗性, 但有些真菌例如稻梨孢霉(*Piricularia oryzae*)在无铜的加有二乙基二硫甲氨酸钠(添加浓度抑制生长达40%)的培养基中培养, 竟然也获得了对硫酸铜的高抗性^[5], 其原因可能是二乙基二硫甲氨酸钠起着化学诱变剂的作用而使该菌变为抗性菌。抗铜真菌在无铜培养基中连续转接后有可能保留或者丧失其抗性。Partridge^[5]等将抗铜的青霉菌(*Penicillium*)在无铜培养基中转接十几次后, 该菌仍保留了对铜和汞的抗性。

Starkey^[4]也曾报道,他们分离的抗高浓度铜的真菌在无铜培养基中转接20余年,对铜的抗性并未明显的降低,而果生核盘菌(*Sclerotinia fructicola*)在无铜培养基上转接10次以后抗铜性即丧失殆尽。上述例证说明,真菌的抗铜稳定性有明显的差异。有些抗性是属于生理学上的适应性,易丧失,而抗性稳定的则是由于遗传适应性所决定的。

有关真菌抗铜的机理已有较深入的研究,几种抗性类型可概括如下:(1)某些真菌能够产生硫化氢,在铜透过细胞壁进入细胞内之前,硫离子与铜结合,形成硫化铜沉淀。进一步的研究证实了抗铜酵母在硫化氢的产生与形成硫化铜之间的关系。硫化氢的产生是真菌细胞中高含量的硫酸盐-亚硫酸盐反应后释放的结果。过量的亚硫酸盐转化成为硫化氢而不是半胱氨酸(正常反应顺序应为:硫酸盐→亚硫酸盐→半胱氨酸)^[5]。(2)某些真菌能够产生有机酸如柠檬酸、草酸等。柠檬酸是一种有效的金属螯合剂,而草酸则与铜形成不溶性的草酸铜结晶,此晶体在光学显微镜下可以观察到,并经X-晶体衍射检验予以确证。腐木真菌及褐色腐木真菌如 *Poria monticola*、*Corirolellus palustris* 等均属于此种抗铜类型^[6]。(3)对铜的吸收:有些真菌的孢子和菌丝能够吸收数量可观的铜,例如尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 在含有100 mg/L铜的培养基中,吸收铜量为9.75 mg/g(干)菌体,而点青霉吸收铜量可达80 mg/g(干)菌体^[6]。真菌吸收铜后如何解毒?一直是科学家们感兴趣的问题,现今已有几种理论。有的提出,在抗性菌体内存在着能与铜复合的物质,如形成铜-硫化物;铜-卟啉复合物等。有的发现,在某些抗铜真菌细胞内含有一种低分子量的(2 000—10 000)富含半胱氨酸的蛋白质——金属硫蛋白(metallothioneins)。1975年,Prinz等^[7]首先证实了酿酒酵母细胞中金属硫蛋白的存在,分子量约9500,随后进一步研究了此种蛋白质的结构。现已证明,此类金属硫蛋白广泛存在于生物体系中,其最主要的生物功能是储备、调节或解毒细胞内的金

属离子^[8]。(4)抗铜真菌在含高浓度重金属的环境中可以通过细胞膜渗透性的改变阻止重金属离子进入细胞,*Scytalidium* 菌及出芽短梗霉等与此种抗性类型有关^[9]。

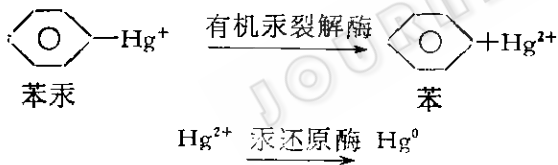
(二) 对汞的抗性

汞是一种高毒性的重金属,有机汞制剂对于微生物的毒性一般都高于无机汞化合物,例如甲基汞的毒性是无机汞毒性的100多倍。汞化合物在脂类中的溶解性以及和酶和膜蛋白中硫氢基的结合是导致细胞中毒的重要原因^[10]。根据此种特性,汞化合物曾被用作有效的杀菌剂和消毒剂,至今在一些国家中仍在使用。

汞的毒性很强,但有关真菌抗汞的报道还不少。1955年和1959年,Russel和Bartlette等先后报道了青霉菌(*Penicillium roqueforti*)对杀菌剂醋酸苯汞的抗性^[11]。经人为“驯化”培养,一株灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)也获得了对此种汞化合物的抗性,抗性水平为原菌株的32倍。采用点青霉(*Penicillium notatum*)、果生核盘菌(*Sclerotinia fructicola*)、束状匍柄霉(*Stemphylium sarciniiforme*)、燕麦核腔菌(*Pyrenophora avenae*)等试验也获得了对多种汞化合物的抗性。一株黑曲霉(*Aspergillus niger*)对有机汞杀菌剂——甲基汞双氰胺的抗性水平较之汞敏感菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和终极腐霉(*Pythium ultimum*)要高的多^[11]。在长期使用有机汞杀菌剂的高尔夫球场草地中分离出抗汞的*Chrysosporium pannorum*菌,其出现机率远远超过附近未施用此种汞制剂的地区^[12]。1974年,Brunker等^[13]从山间小溪中分离到抗氯化汞的隐球酵母菌(*Cryptococcus* sp.),抗汞浓度为180 mg/L。近几年,我们研究了从受氯化汞严重污染的土壤中分离的一种霉菌——烟草头孢霉(*Cephalosporium tabacinum*),抗汞($HgCl_2$)浓度达400 mg/L,该菌对乙酸汞和其它多种重金属化合物也具有较强的抗性^[14,15]。

迄今对真菌抗汞的机理已有很多研究报告。1971年,Greenaway^[1]发现,抗汞的燕麦核腔菌能分泌一种红色素与汞结合,他认为这可

能是该菌去除汞毒的一种方式。Botaly 研究了产蛋白假丝酵母菌 (*Candida utilis*) 对汞的抗性后提出, 具抗性的菌体内存在着能与汞结合的高含量的非蛋白硫化合物库。1964年, Ashworth 等^[11]研究了抗汞的黑曲霉及汞敏感菌立枯丝核菌和终极腐霉, 经化学分析, 证明抗性菌体内的非蛋白硫化合物含量明显高于敏感菌。前者为 100 $\mu\text{g/g}$ (干) 菌体, 而后者含量仅为 5 $\mu\text{g/g}$ (干) 菌体或未检出。1974年, Bruner 等^[12]首次报道一株隐球酵母菌将氯化汞还原成为金属汞, 汞结合在细胞壁和细胞膜上, 还可积累在细胞质的空泡中。固体培养时, 在菌落表面有银色光泽的物质出现, 这可能是还原后形成的金属汞微粒。离子汞还原成为金属汞(即元素汞)在细菌、放线菌等原核微生物中已被证明是由于胞内汞还原酶的催化作用, 此类研究已有大量报道^[10], 但真核生物中有关汞还原酶的研究极少报道。最近, 日本的手塚敏幸^[16]证实丝状真菌青霉菌 (*Penicillium* sp.) 中也有汞还原酶存在。该菌能够象抗汞细菌那样将有机汞化合物醋酸苯汞转化成为金属汞。该菌具有两种酶, 催化下列反应:



该菌的有机汞裂解酶与细菌的酶不同, 它是固有酶, 而细菌的酶则是诱导酶。离子汞还原酶与细菌的汞还原酶相同, 都是诱导酶。汞还原酶能利用 NADPH 作为电子供体, 但不能利用 NADH 作为电子供体。我们对抗汞真菌烟草头孢霉 *F₂* 菌株的汞解毒机理研究结果表明, 该菌中具有汞还原酶活性, 能够将 Hg^{2+} 还原成为 Hg^0 。在对底物特异性、对巯基化合物的需要、对某些重金属离子的敏感性和热稳定性等特性上, 与细菌中的汞还原酶及青霉菌中的汞还原酶性质相似, 但不同之处在于其酶反应需 NADH 作为电子供体。上述研究表明, 汞还原酶作为一种重要的汞解毒酶, 不仅广泛分布于抗汞细菌内, 而且也存在于某些抗汞的真

菌细胞内。在某些真菌中除具有上述抗汞解毒机制外, 还存在着其它的解毒机制。如 1971 年 Lander^[17]报道, 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的变异株在有半胱氨酸或高半胱氨酸及氯化汞存在时, 首先由半胱氨酸或高半胱氨酸与离子汞结合, 然后在甲基供体(胆碱或甜菜碱)以及甲基转移酶的催化下形成甲基汞。研究者提出, 尽管甲基汞的毒性高于无机汞, 但它更易挥发, 从而解除汞对菌体的毒性。此外, 有些真菌还具有吸收汞的特性。Williams 等^[12]研究了 *Chrysosporium pannorum* 菌对有机汞杀菌剂 Verdasan (含汞 2.5%) 的抗性, 结果表明, 该菌可将培养液中的大部分汞吸收。经电镜观察发现, 在细胞中存在着许多异形的电子稠密颗粒。他提出, 在抗性菌体内存在着许多汞结合位点。

(三) 对镉的抗性

本世纪初, Pulst^[13]用含镉、铜、铅等多种重金属化合物的培养基“驯化”灰绿青霉 (*Penicillium glaucum*), 该菌获得了对镉等重金属的抗性。Hartman 等^[6]从受镉污染的土壤中分离出具有抗性的尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*), 它在镉浓度为 200 mg/L 的培养基中生长后, 每克干菌体能吸收 14.3mg 的镉。用有机镉杀菌剂——琥珀酸镉研究对菌体生长的影响时发现, 炭色旋孢腔菌 (*Cochliobolus carb-onum*) 中抗性菌的抗镉浓度达 1800 mg/L , 而敏感菌株在镉浓度为 400 mg/L 时生长即被抑制。研究还证明, 此种真菌对镉的抗性是受遗传控制的。抗性菌株与敏感菌株配合产生的子代具有抗性, 而敏感菌株互相配合产生的子代对镉仍是敏感的。1986年, Cooley 等^[18]分离到抗镉的构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*), 它们是经诱变后获得的突变株, 抗镉水平超过了亲株。通过对突变株的遗传学研究表明, 3株菌的抗镉基因位于染色体 IV 区段, 另外 10株菌的抗镉基因与染色体中 VI meth B 基因紧密相联。关于该菌的抗镉机理仍在研究中。日本 Inouhe 等^[19]最近报道, 在抗镉的酿酒酵母菌中也存在着一种能与镉结合的金属硫蛋白。

与前述结合铜的硫蛋白相似,富含半胱氨酸,分子量为 9000。该菌吸收的 75% 铜是以此种结合蛋白形式存在的。

(四) 对银的抗性

1981 年, Belly 等^[20]从“驯化”的影印废水污泥中分离到几株真菌,能在含 50—100mg/L 硝酸银的培养基中生长,而敏感菌在银浓度 1—10 mg/L 时生长即被抑制。1986 年, Thomas 等^[21]从银矿区的土壤中分离到抗银的丝孢菌类及酵母菌。丝孢菌能在含银为 1mmol/L 的培养基中生长,积累银量为 20mg/g (干) 菌体。关于抗银机制已有一些初步的研究。Zimmerman 曾报道^[22], 抗性真菌与银作用后菌落表面颜色变深,而敏感菌则无此现象。虽然金属银的形成尚缺乏化学分析予以验证,但研究者认为,抗性菌株能将银离子还原成为金属银,菌落表面颜色变深有可能是因极小的金属银微粒沉积所致。Klein 和 Sckol^[23]于 1976 年也曾证实,从土壤上层部分分离的微生物能够将 AgNO_3 、 Ag_2O 和 AgI 还原成金属银。这是由于菌株产生挥发性的甲胺和二甲胺,使离子银还原。还有研究表明,某些酵母菌可将硝酸银吸收到细胞内,这也是真菌抗银的一种方式^[24]。

(五) 对其它重金属的抗性

Perlman 等^[25]发现,抗钴的酿酒酵母能够在含 750mg/L 钴的培养基中生长,吸收的钴量占其细胞重量的 9.9%。经“驯化”得到抗钴的粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*), 抗性水平为亲株的 10 倍。抗钴的黑曲霉突变株已获得,尚待进一步研究。铅可引起真菌细胞膜的损伤,抗铅的尖孢镰刀菌在含铅 600mg/L 的培养基中可吸收铅量为 132mg/g (干) 菌体。另有证据表明,黑曲霉产生的柠檬酸能与铅结合,可以解除铅对真菌的毒性。某些真菌对锌、锰、铀、铊等重金属也有抗性,例如酿酒酵母能吸收占其自身干重 10—15% 的铀。还有些酵母菌通过氧化解毒过程将氧化铊沉积在线粒体中,然后再排到细胞外^[26]。

综上所述,对金属具有抗性的真菌在自然

界组成中已成为不可忽视的一部分,尤其是在受重金属污染的区域,有时可成为占有优势的生物种群,因此研究真菌对重金属的抗性就更具有重要的意义。迄今,人们对真菌的抗性及其解毒作用已有不同程度的研究,但对其抗性的遗传学和生物化学研究还有待深入。通过此领域的研究,不仅从理论上了解到微生物在特殊环境中的生存及其解毒作用,微生物与重金属之间的相互作用对生态环境的影响;而且从工、农业生产实践中看到了微生物所起的指导和推动作用,对由致病真菌引起的农、林业病害,可有针对性的选择最佳条件或选取更为有效的低残留的药剂予以防治。在工业上,利用对重金属具有抗性的真菌,选择性地回收工业废水中有价值、有战略意义的金属;净化被重金属污染的环境。

参 考 文 献

1. Ross I S: *Trans Br Mycol Soc* 64(2): 175—193, 1975.
2. Vincent W C: *Physiology of Fungi*. 479, 1958.
3. Ashida J: *Annual Review of Phytopathology*. 3: 153—174.
4. Starkey R L et al: *Journal of General Microbiology*. 78: 217—225, 1973.
5. Yamasaki T et al.: *Bull Natl Inst Agr Sci*. 11: 79—84, 1964.
6. Babich H et al.: *Advances In Applied Microbiology*. 23: 55—117, 1978.
7. Prinz R et al.: *Physiol Chem*. 356: 767—776, 1975.
8. Christie N T et al.: *Nature*. 284: 368—370, 1980.
9. 卫扬保编: 微生物生理学,高等教育出版社,北京,392, 1989.
10. Robinson J B et al.: *Microbiological Reviews*. 48(2): 95—124, 1984.
11. Ashworth L J Jr et al.: *Phytopathology*. 54: 1439—1463, 1964.
12. Williams J I et al.: *Trans Br Mycol Soc*. 64(2): 255—263, 1975.
13. Brunner R L et al.: *Appl Microbiol*. 27: 870—873, 1974.
14. 王保军等: 微生物学通报, 15(2): 77—79, 1988.
15. 王保军等: 环境科学学报, 8(1): 72—78, 1988.
16. 手塚敏幸: バイオイニキストリ, 7(9): 18—24, 1990.
17. 翁稣颖等: 环境微生物学, 科学出版社, 第83页, 1985.
18. Cooley R N et al.: *Current Microbiology*. 13: 265—268, 1986.
19. Inouhe M et al.: Fifth International Symposium On Microbial Ecology. 110, 1989.
20. Belly R T et al.: *Developments In Industrial Microbiology*. 23: 567—577, 1981.

21. Thomas Pumpel et al.: *Appl Microbiol Biotechnol.* 24: 244—247, 1986.
22. Zimmerman W Z: *Z Hyg.* 135: 403—413, 1952.
23. Klein D A et al.: *J Appl Meteorol.* 14: 673—680, 1975.
24. Brown T A et al.: *Microbios Lett.* 3: 155—162, 1976.
25. Perlman D et al.: *J Bacterial.* 68: 167—170, 1952.
26. Gadd G M: *Extreme Environmental Microorganisms.* 83—108, 1986.