

嗜酸性硫杆菌抗铜机制研究进展

王鹏^{1,3} 黄晓东² 林建群³ 戴九兰^{1*} 庞昕^{3*}

(1. 山东大学 环境研究院 山东 济南 250100)

(2. 山东省生物药物研究院 山东 济南 250101)

(3. 山东大学 微生物技术国家重点实验室 山东 济南 250100)

摘要: 嗜酸性硫杆菌是一类重要的浸矿微生物, 其抗铜机制研究备受人们关注。本文在分析相关文献的基础上, 从嗜酸性硫杆菌对铜的耐受能力、细胞质中铜的外排、细胞质中铜浓度的控制、无机多聚磷酸盐参与铜的解毒、新发现的基因组岛和氧化压力应激反应等方面对当前的研究进展进行综述, 并对未来相关研究方向做出展望, 旨在为嗜酸性硫杆菌抗铜机制的深入研究提供参考。

关键词: 嗜酸性硫杆菌, 生物浸矿, 抗铜机制

Advance on study of copper-resistance mechanism in *Acidithiobacillus* spp.

WANG Peng^{1,3} HUANG Xiao-Dong² LIN Jian-Qun³ DAI Jiu-Lan^{1*} PANG Xin^{3*}

(1. Environment Research Institute, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

(2. Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan, Shandong 250101, China)

(3. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: *Acidithiobacillus* spp. is important for bioleaching because of the copper-resistance mechanism. Many data suggest that *Acidithiobacillus* spp.'s tolerance to copper is much higher

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30800011); 国家 973 计划项目(No. 2010CB630902); 山东大学自主创新基金自然科学基金类专项项目(No. 2010TS055, 2012TS040)

*通讯作者: 戴九兰: Tel: 86-531-88364425; 邮箱: daijiulan@sdu.edu.cn

庞昕: Tel: 86-531-88365990; 邮箱: pangxin@sdu.edu.cn

收稿日期: 2012-07-05; 接受日期: 2012-12-13

than common bacteria. In the present paper, we reviewed the current knowledge on copper-resistance mechanism in *Acidithiobacillus* spp., including: eliminating copper from the cytoplasm of the cells; reducing copper concentration in the periplasm; a polyphosphate-based copper-resistance system; a newfound genomic island and an oxidative stress response generated by copper. Furthermore, we discussed methods in transcription-regulation and protein-function, to address future research needs.

Keywords: *Acidithiobacillus* spp., Bioleaching, Copper-resistance mechanism

嗜酸性硫杆菌是一类革兰氏阴性的化能自养细菌, 其中被人们广泛研究的主要有 3 种, 即嗜酸性氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. thiooxidans*), 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. ferrooxidans*)和嗜酸性喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*, *A. caldus*)。它们均是好氧型细菌, 能运动, 最适 pH 在 2.0 到 3.5 之间, 是浸矿微生物的重要组成部分。由于长期生存在特殊的环境中(酸性且多种金属离子浓度较高), 这类细菌进化形成了独特的代谢特点和对环境的适应能力, 如能够氧化硫化矿中的低价硫元素产能以及耐受多种高浓度的金属离子。这使嗜酸性硫杆菌在生物冶金、煤炭脱硫和生活污水净化方面的应用具备了特殊的优势。

近年来, 生物冶金技术在处理贫矿、废矿、尾矿和难处理矿等方面取得了迅猛发展。但是, 由于浸矿体系中存在高浓度的各种金属离子, 这严重抑制浸矿细菌的细胞活性, 显著降低了浸矿效率。因此, 解析浸矿细菌对金属离子的抗性机制, 并努力提高其耐受能力, 具有巨大的理论意义和实用价值。当前, 生物冶铜发展迅速, 嗜酸性硫杆菌作为其中一类重要的浸矿菌, 其铜抗性机制相关研究已成为生物冶金领域中的一个重要研究方向。另外, 嗜酸性硫杆菌在铜的污染治理特别是生物修复方面也有巨大的应用潜力^[1]。

本文将综述近年来嗜酸性硫杆菌的铜抗性基

因及抗铜机制的研究进展, 为深入研究浸矿菌及其它微生物的抗铜机制提供参考和借鉴。

1 嗜酸性硫杆菌极高的耐铜能力

由于长期生活在酸性矿坑等高铜环境中, 与其它种类微生物相比, 嗜酸性硫杆菌表现出更强的抗铜能力。例如: Franke 等(2003)报道的铜对大肠杆菌的最低抑制浓度为 3 mmol/L^[2]; Puig 等(2002)报道的铜对丁香假单胞菌的最低抑制浓度为 8 mmol/L^[3]。而嗜酸性硫杆菌对铜的抗性一般比它们高出约一到两个数量级。当然, 嗜酸性硫杆菌的抗铜能力与其分离环境密切相关, 这种差异不仅表现在不同的种之间, 也表现在同一个种的不同菌株之间。

据研究报道: *A. ferrooxidans* ATCC 19859 能够在铜离子浓度为 100 mmol/L 的含硫培养基中生长^[4]; 吴学玲等在研究中使用的 3 种 *A. ferrooxidans* 菌株 26#, DC (分离自不同的铜矿)以及 26#的突变株, 其铜抗性分别为 220 mmol/L, 40 mmol/L 和 250 mmol/L^[5]; 而 Dew 等(1999)报道的 *A. ferrooxidans* 对铜的耐受浓度高达 800 mmol/L^[6]。Barreira 等^[7]和 Chen 等^[8]在对 *A. thiooxidans* 研究时发现了相似的结果, *A. thiooxidans* SFR01 (来源于厌氧污泥)对铜和锌的耐受水平分别达到 20 mmol/L 和 200 mmol/L, 超过了这些金属在污水污泥中的一般浓度^[7], 而 *A. thiooxidans* BC1 对铜的耐受阈值约为

6.3 mmol/L, 耐受能力较弱^[8]。此外, *A. caldus* KU 能在铜浓度为 158–397 mmol/L、锌浓度为 25 mmol/L 的浸矿体系中生长并能促进闪锌矿的浸矿^[9], 而本实验室分离的 *A. caldus* MTH-04 对铜的耐受阈值约为 150 mmol/L。

研究者认为, 中性细菌中金属离子脱毒的主要机制包括离子外排、细胞内络合、还原性积累、细胞外络合以及周质空间的隔离等^[10–11]。而嗜酸性浸矿细菌的抗性机制通常更为丰富, 效率更高。目前, 国内外的研究者在浸矿细菌的不同菌株中发现了一些铜抗性相关基因, 并初步阐释了其蛋白功能和调控机制。在此基础上, Orell 和 Navarro 等总结得出浸矿细菌抗铜能力较强的 5 个关键因素为: (1) 存在广泛的铜抗性基因; (2) 某些铜抗性基因存在多重拷贝; (3) 存在新式的铜分子伴侣; (4) 存在基于多聚磷酸盐的铜抗性系统; (5) 存在氧化压力防御系统。同时他们认为浸矿细菌具有高的抗铜能力是以上全部或大部分因素协同作用的结果^[12]。

A. ferrooxidans 是生物冶金中的关键微生物之一, 也是嗜酸性硫杆菌中研究最为深入的菌种, 取得了较大的研究进展。下面重点以 *A. ferrooxidans* 为例介绍嗜酸性硫杆菌的抗铜机制。

2 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌的铜抗性基因及其调控机制

2.1 细胞质中铜的外排

2.1.1 *A. ferrooxidans* 中存在铜外排泵编码基因: 细胞质蛋白种类丰富, 其中大多数对铜离子十分敏感。因此细胞质中铜离子浓度必须严格控制在稳态水平。为解决这一问题, 细胞通常诱导表达内膜上的多种转运蛋白(铜外排泵等), 并通过这些蛋白将多余铜离子排到细胞膜外。从基因组水平上研究发现, 在 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 中存在两个编码铜转运 P 型 ATPase 的开放阅读框

架, 分别为 *afcopA* 和 *afcopB*^[13]。进一步分析得到, *afcopA* 存在两个拷贝, 即 *afcopA1* 和 *afcopA2*, 而在大肠杆菌中只存在一个拷贝^[14], 这可能是 *A. ferrooxidans* 抗铜能力更强的原因之一。Navarro 等的研究表明, *afcopA1* 在大肠杆菌中表达后使其铜抗性增强, 这暗示 *afcopA1* 是 *A. ferrooxidans* 的一个功能性铜抗性基因^[14]。Luo 等(2008)研究发现, 铜离子存在时 *afcopA2* 的表达量比 *afcopA1* 更高, 推测 *afcopA2* 可能在铜压力应答过程中发挥更为重要的作用^[15]。Navarro 等(2009)的实验表明在 *A. ferrooxidans* 生长过程中加入铜离子以后, *afcopB* 呈现过表达现象; 在 *E. coli* 中成功表达 *afcopB* 后, 能够使其获得更高的抗铜能力。他们进一步研究发现, afCopB 与其它已被鉴定的铜转运子共有一些特征性同源序列, 并推测 afCopB 也是一个转运铜的外排泵^[14]。

2.1.2 外排 ATPase 中的特征性结构域和基序: *A. ferrooxidans* 中的 ATPase 存在几个保守的特征性结构域和基序^[16–17], 见表 1。它们分属于 P 型 ATPase 中的 CPx (Cys-Pro-X)型亚家族。这些 ATPase 最保守的核心区域是位于膜上螺旋中间的 CPC 或 CPH (有时是 SPC)基序, 该基序中第一个脯氨酸侧翼的几个氨基酸在不同的金属运输酶中随金属离子的特异性而发生变化。大多数铜转运 ATPase 中的基序是 CPCALGLA。

2.1.3 外排 ATPase 的表达调控: 在大肠杆菌中, CopA ATPase 和 CueO 氧化酶以及转录调控子 CueR 共同组成 *cue* (Cu-efflux, 铜外排系统)操纵子。Outten 等(2000)对大肠杆菌的 *copA* 和 *cueO* 的启动子进行了分析, 从中找到了铜离子存在时与 CueR 结合的回文序列, 其作用是上调表达 *cue* 系统蛋白^[18]。在 *A. ferrooxidans* 中没有找到类似 *cueO* 的 ORF, 却发现了与大肠杆菌 CueR (ec-CueR)的 DNA 结合结构域相似度达 37% 的 afCueR, 不过尚未在其启动子中发现类似 *eccueR*

表1 *A. ferrooxidans* 中推定的 Cop 蛋白与其它细菌中实验鉴定后的铜转运蛋白的序列比对^[14]
Table 1 Alignment of putative Cop proteins from *A. ferrooxidans* with experimentally characterized Cu transporters from other bacteria^[14]

蛋白质 Protein	金属结合 结构域 Metal binding domain	磷酸酶结 合结构域 Phosphatase domain	6' 转运结构域 6' translocat- ion domain	磷酸化作用 结构域 Phosphoryla- tion domain	保守的 HP 基序 Conserved HP motif	保守的 GXGXXG/A 基序 Conserved GXGXXG/A motif	TGDN 基序 TGDN motif	GDGXNDXP 基序 GDGXNDXP motif
CopA (<i>E. coli</i>)	CASC...CASC	TGEP	CPCALGLA	FDKTGTLT	SSHPL	GLGVSG	TGDN	GDGINAP
CopA (<i>E. hirae</i>)	CANC	TGES	CPCALGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GAGISG	TGDN	GDGINAP
CopB (<i>E. hirae</i>)	No	TGES	CPHALGLA	LDKTGTLT	No	GVGLEA	TGDN	GDGINDAP
CopA _{1Af}	No	TGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GKGAQA	TGDS	GDGVNDAP
CopA _{2Af}	No	TGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GKGAQA	TGDS	GDGVNDAP
CopB _{Af}	CASC...CASC	TGEP	CPCAMGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GKGVRG	TGDL	GEDINDSP

注: ...: 两个金属结合结构域之间存在间隔。

Note: ...: Separation between two existing metal binding domains.

启动子的回文区域。这表明在 *A. ferrooxidans* 中可能存在不同的调控元件^[12]。

2.2 周质内铜浓度的控制

相对于革兰氏阳性菌, 革兰氏阴性菌不仅要保护细胞质组分免受高浓度铜的毒害, 还要将金属离子运出外膜来保护周质空间中的重要成分^[19]。

在大肠杆菌的染色体中, 存在两个转录方向相反的操纵子, 即 *cusCFBA* 和 *cusRS*。*cusCBA* 编码外排泵复合物, 属于抗性/结瘤/细胞分裂 (Resistance nodulation cell division, RND) 家族^[2]。CusF 位于细胞周质, 是铜的分子伴侣。它有一个铜结合位点, 结合铜(I)并将其运输到 CusCBA 外流泵上, 进而泵出到细胞外环境^[2]。Su 等(2009)报道的大肠杆菌 CusB 的晶体结构支持了这一观点, 并通过实验证实 ecCusB 能识别并运出铜^[20]。*cusRS* 编码双组分调控系统: CusS 是位于细胞膜上的组氨酸蛋白激酶, 作用是感应周质空间中的铜离子浓度; CusR 作为响应调节因子, 激活 *cusCFBA* 的转录。

Navarro 等(2009)在 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 中已鉴定到推定的 *cus* 操纵子, 并通过 qRT-PCR 证明铜离子存在时, 该操纵子的大多数 ORF 表达上调。该操纵子包括 *cusCBA*, 然而却缺少 *cusF*。不过, 在该菌株染色体上距离 *cusCBA* 和 *copA2* 都较远的位置发现一个 ORF, 其编码的蛋白(推定的 afCusF)与 *E. coli* 的 CusF (ecCusF) 同一度为 25%, 并且信号肽表明 afCusF 是向外输送蛋白(很可能是被输送到周质空间)^[14]。进一步研究表明, afCusF 推定的氨基酸序列存在一个可能的铜结合位点, 与 ecCusF 仅有一个氨基酸的差异, 即蛋氨酸代替组氨酸(MXXXXXXXXWX XMXMXF)。对 ecCusF 和 afCusF 的结构模型进行比对, 发现结构上的相似性很强并且铜结合位点的结构保守性很高(尽管存在一个氨基酸的差异), 如图 1 所示。这种微小的改变能够增强 afCusF 对 *A. ferrooxidans* 细胞周质酸性环境的适应性。因为大肠杆菌周质中的 pH 在 7 附近, 组氨酸表现为中性, 而 *A. ferrooxidans* 细胞周质中的 pH 在 2.5 附近, 组氨酸会质子化, 额外的正电

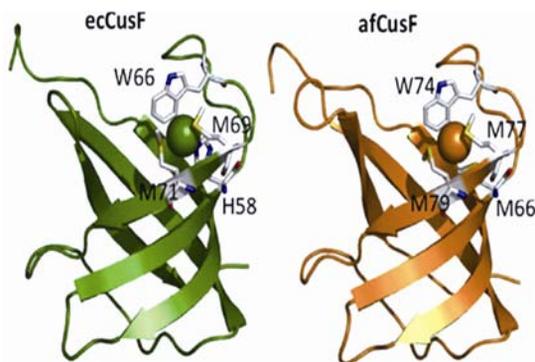


图1 ecCusF和afCusF结构比较图^[12]

Fig. 1 Comparison between ecCusF and afCusF^[12]

注: ecCusF晶体结构图的分辨率为1.0 Å, afCusF由ecCusF模拟出(使用MODELLER软件)。

Note: The high resolution crystal structure of ecCusF was resolved at 1.0 Å resolution and afCusF was based on ecCusF (the program MODELLER was used).

荷会使蛋白与阳离子的结合变得困难;而蛋氨酸的侧链基团不结合质子,能避免上述情况的发生。这种推测尚待取得实验的支持^[12]。

此外,通过生物信息学的方法在*A. ferrooxidans*中预测到分别编码CopC (af-CopC)、CopD的ORF^[14];Chi等(2007)通过高通量蛋白质组的方法,在细胞周质中发现了afCopC^[21]。通过结构模型分析,在afCopC和psCopC(*P. syringae*中的CopC)中发现一个非常保守的结构域^[14]。psCopC是拥有铜离子结合位点的分子伴侣,存在两个铜结合位点,分别与铜(I)和铜(II)结合^[22]。而目前在afCopC中只发现一个结合铜(II)的保守位点,是否存在铜(I)的结合位点还有待研究^[14]。

2.3 无机多聚磷酸盐参与铜的解毒

2.3.1 嗜酸菌中普遍存在多聚磷酸盐:

除了诱导表达铜的外排泵以外,嗜酸性硫杆菌合成的长链无机多聚磷酸盐能显著地提高铜的解毒效率^[23]。多聚磷酸盐是由数以百计的正磷酸盐通过磷酸酐键连接的线状多聚物。多聚磷酸盐有许多生理功能,可以作为磷酸盐库,ATP的替代物,ATP

的来源,金属离子的螯合剂,并可以缓和细胞内压力^[24-25]。多聚磷酸盐的合成是在多聚磷酸盐激酶(PPK)的催化下,可逆地将ATP的末端磷酸转移到多聚磷酸盐链末端。而多聚磷酸盐外切酶(PPX)可以将多聚磷酸盐水解为无机磷酸盐^[23]。编码这两种酶的基因序列高度保守^[26-27]。Vera等(2003)已在*A. ferrooxidans*中鉴定到PPK和PPX这两种酶^[28]。2004年,Alvarez和Jerez利用透射电镜研究*A. ferrooxidans*时,从中发现了由多聚磷酸盐组成的电子致密颗粒。同时,在*A. thiooxidans*、*A. caldus*及嗜酸性的古菌*Sulfolobus metallicus*中,也发现了多聚磷酸盐颗粒^[29]。

2.3.2 多聚磷酸盐充当媒介物和能量来源参与铜的外排:

Alvarez和Jerez在深入研究铜和细胞内多聚磷酸盐的关系以后,发现*A. ferrooxidans*在铜离子浓度较高的环境中生长时,其细胞内的多聚磷酸盐水平迅速降低,同时多聚磷酸盐外切酶活性提高。最后,他们得出如下结论:抗铜能力强的菌株,其细胞内的多聚磷酸盐水平更高;微摩尔水平的铜能够刺激*A. ferrooxidans*的无细胞抽提液中的PPX的活性,将多聚磷酸盐降解成无机磷酸盐单体;这些单体依次结合细胞质中的金属离子(产生暂时的隔离效果,避免游离的铜浓度过高),并以金属磷酸盐复合物的形式通过类似酵母Pho84(磷酸盐载体)的转运蛋白泵出到细胞周质;多聚磷酸盐水解会释放大量的能量,合成的ATP被用于铜磷酸盐复合物的外排^[29]。因此,多聚磷酸盐可同时作为物质和能量上的储备,显著地增强*A. ferrooxidans*的抗铜能力。

2.4 新发现的基因组岛^[30]

2011年,Orellana和Jerez报道了在*A. ferrooxidans* ATCC 53993中发现的基因组岛,为研究*A. ferrooxidans*的铜抗性机制开辟了新的方向,

该研究指出极端微生物不仅可以通过基因拷贝数的增加,还可以通过基因的水平转移来获得更大的金属抗性。

如前所述,同一种菌的不同菌株之间的抗性水平存在较大差异。例如 *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (>100 mmol/L)对铜的抗性比菌株 ATCC 23270 (<25 mmol/L)大得多。*A. ferrooxidans* ATCC 53993 与 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 的基因组都拥有上面介绍的铜抗性基因和无机多聚磷酸盐,那么怎么解释这两个菌株在抗铜能力上的显著差异呢?研究发现, *A. ferrooxidans* ATCC 53993 基因组中拥有一个 160 kb 的基因组岛(Genomic island, GI)。通过生物信息学分析,在该 GI 上预测到编码铜抗性及其它重金属抗性的基因,如汞抗性相关的 *merA*、*merC*、*merR* 和铜转位 ATPase 编码基因,以及编码砷抗性组分和重金属 P 型 ATPase 的基因簇,如图 2 所示。其中与铜抗性相关的基因有 Lferr0167 (*afcopA3*), Lferr0170、Lferr0171、Lferr0172 (分别相当于推定的 *cus* 系统的成员 *cusC3*、*cusB3*、*cusA3*), Lferr0174 (*cusF3*)、Lferr0186 (重金属 P-ATPase)、Lferr0199 (*cusF4*)。这些基因的功能已在大肠杆菌突变株中得到验证^[30]。

当前, *A. ferrooxidans* ATCC 53993 中的铜抗性基因尚未得到全面揭示,包含丰富铜抗性基因的GI将成新的研究热点。先前在非耐酸微生物(例如 *Cupriavidus metallidurans*)中发现的铜抗性也被归因于其中存在的GI,说明GI的存在可能是微生物避免铜毒害的一种普遍策略。此外, *A. fer-*

rooxidans ATCC 53993的GI包含的铜抗性基因在大肠杆菌中的成功表达,表明微生物群落成员之间也可以通过基因交流来增强适应极端环境的能力。现在专家们的兴趣集中在发掘GI中未知金属抗性基因以及研究这些基因的功能等方面。

2.5 金属产生的氧化压力反应

铜浓度高于稳态水平时,细胞内会产生大量自由基和过氧化物,严重损害细胞的正常代谢活动。为免受毒害,细胞诱导产生一系列氧化压力反应。Imlay等(2008)和Teitzel等(2006)从基因组水平上分别研究 *E. coli* 和 *P. aeruginosa* 对铜与其他重金属的应答响应,获得了一些发现,如大肠杆菌中的转录调控子 OxyR 以及用于防御过氧化物和超氧化物毒害的二级 SoxRS 系统^[31-32]。但目前嗜酸性硫杆菌中的相关研究较少。

Orell 和 Navarro 根据其它微生物先前报道的氧化压力应答基因,在 *A. ferrooxidans* ATCC 23270 的全基因组序列中进行比对搜索,得到的基因有 *gshB* (参与抗氧化剂谷胱甘肽的合成,由 GSSG 到 GSH)、*sod* (编码超氧化物歧化酶)、Sigma factor 32 (热休克因子,激活其他压力反应基因的转录)、*ahpC* (编码烷基过氧化物酶)、*groES* (参与各种压力应答的分子伴侣)和 *gor* (编码谷胱甘肽还原酶),并发现这些基因在细胞受到铜刺激后表达量上调^[12]。但是,具体的分子机制还有待进一步研究。

总之,当细胞内铜浓度升高时,所有的铜抗性基因表达量上升,将铜从细胞质和细胞周质中清除。这个过程中需要高水平的 ATP 来激活金属



图 2 *A. ferrooxidans* ATCC 53993 基因组岛的结构示意图^[30]

Fig. 2 Structure diagram of the GI in *A. ferrooxidans* ATCC 53993^[30]

注:黑色大箭头表示基因组岛中的铜抗性相关基因,基因名标注为黑体字。

Note: Copper-resistance genes present in the GI are named with bold lettering and are indicated by large black arrows.

外排ATPase,同时为了运出Cus外流泵产生的过多质子,也需要较多的能量。除了正常的能量代谢系统,多聚磷酸盐的水解是另一个主要的能量来源。此外,多聚磷酸盐的水解产物磷酸盐单体可作为载体,结合铜离子并将其运出细胞,进一步增强了细胞的抗铜能力。对铜离子引发的氧化压力,细胞通过一系列的应答反应,合成相关酶类,清除细胞内产生的过氧化物和自由基。以上是当前对*A. ferrooxidans*抗铜机制的初步认识,深入的分子机制和作用模式还有待研究。

3 嗜酸性氧化硫硫杆菌和嗜酸性喜温硫杆菌中的铜抗性

相对于 *A. ferrooxidans*, *A. caldus* 和 *A. thiooxidans* 的铜抗性相关研究还较少,仅仅局限在铜抗性能力的检测、铜对菌株生理特性的影响及相关基因的生物信息学分析方面。如前所述,*A. caldus* 和 *A. thiooxidans* 的某些菌株也具有非常强的铜抗性。

中南大学通过研究 *A. caldus* 在铜压力下的代谢变化,发现 *A. caldus* 在铜浓度约为 63 mmol/L 的培养基中对数期生长时,随着细菌生长,细胞的总铜浓度和细胞表面铜浓度增加,而细胞内的铜浓度在第 4 天到第 9 天内不断下降,说明细胞内的铜在持续的向细胞外运出。分别用蛋白酶 K 处理细胞表面蛋白和用缬氨霉素抑制磷酸化产能发现,培养 2 d 后细胞内的铜浓度持续增加而不再降低,说明铜的外流依赖细胞膜上的铜转运蛋白以及 ATP 提供的能量,推测细胞表面存在依赖 ATP 的铜离子外流泵。

对我们实验室的菌株 *A. caldus* MTH-04 进行研究,发现其铜耐受阈值为 150 mmol/L。对该菌在对数期进行铜刺激,发现菌体颜色随时间由浅

变深,又由深变浅,同时根据它在硫酸铜存在时生长量的变化,推测其具有典型的诱导型铜外排机制,而具体的分子机制还需进一步进行研究。如前所述,在 *A. thiooxidans* 和 *A. caldus* 中也存在由多聚磷酸盐组成的电子致密颗粒,因此推测多聚磷酸盐也应该是 *A. thiooxidans* 和 *A. caldus* 细胞抗铜机制的重要组成部分。

A. caldus 和 *A. thiooxidans* 全基因组的测序已经完成,为铜抗性相关的研究奠定了基础。我们实验室正通过基因芯片表达谱技术研究 *A. caldus* 全基因组在铜刺激下的差异表达,进而分析研究差异表达基因的功能和调控机制,这将有助于进一步阐释它的铜抗性机制。

4 研究展望

目前对于 *A. ferrooxidans* 铜抗性的研究工作取得了较大进展,发现并证实了许多铜抗性相关基因,初步预测了相应编码蛋白的表达和调控,但仍可能存在许多潜在的铜抗性相关基因。对于 *A. caldus* 和 *A. thiooxidans* 要做的工作更多。总之,目前许多基因和蛋白的功能尚不能确定,完整的代谢调控过程还不清晰。

今后的研究重点会集中在基因和蛋白的协同调控上,主要包括:通过转录组学研究细胞整个调控网络的变化;通过基因敲除对某些关键基因及其编码蛋白的功能验证;通过对调控子和启动子的研究,阐述细胞从接受铜刺激到启动相关基因并最终表达功能蛋白的精确分子机制;通过对外排泵蛋白的分离纯化和结构解析,探究外排泵与细胞内铜离子的作用模式和控制机制;通过基因重组使高抗性基因在其它浸矿细菌及环境污染治理工程菌中高效表达。

嗜酸性硫杆菌铜抗性机制的研究,将会积极的促进生物冶金中相关微生物基因改造工作的开展,有助于构建抗铜能力更强的工程菌,提高

低品位矿和难处理矿的生产效率, 并降低冶金工业带来的环境压力, 极大推动生物冶金特别是冶铜工业的发展, 产生巨大的社会效益和环保效益。

参 考 文 献

- [1] Bosecker K. Microbial leaching in environmental clean-up programmes[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2/3): 245–248.
- [2] Franke S, Grass G, Rensing C, et al. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(13): 3804–3812.
- [3] Puig S, Rees EM, Thiele DJ. The ABCDs of periplasmic copper trafficking[J]. Structure, 2002, 10(10): 1292–1295.
- [4] Alvarez S, Jerez CA. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(9): 5177–5182.
- [5] Wu X, Hu Q, Hou D, et al. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains possessing dissimilar copper resistance[J]. Journal of General and Applied Microbiology, 2010, 56(6): 491–498.
- [6] Dew DW, Muhlbauer R, van Buuren C, et al. Bioleaching of copper sulphide concentrates with mesophiles and thermophiles[R]//ALTA Copper 1999: copper Sulphides Symposium & Copper Hydrometallurgy Forum. Brisbane, Australia, 1999.
- [7] Barreira RPR, Villar LD, Garcia O. Tolerance to copper and zinc of *Acidithiobacillus thiooxidans* isolated from sewage sludge[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(1): 89–91.
- [8] Chen BY, Chen YW, Wu DJ, et al. Metal toxicity assessment upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1[J]. Environmental Engineering Science, 2003, 20(4): 375–385.
- [9] Das A, Modak JM, Natarajan KA. Studies on multi-metal ion tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Minerals Engineering, 1997, 10(7): 743–749.
- [10] Rouch DR, Lee BT, Camakaris J, et al. Genetics and molecular basis of copper resistance in *Escherichia coli*[A]//Hamer DH, Winge DR. Metal homeostasis. New York: Alan Liss Inc, 1989: 439–446.
- [11] Harwood VJ, Gordon AS. Regulation of extracellular copper-binding proteins in copper-resistant and copper-sensitive mutants of *Vibrio alginolyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 1749–1753.
- [12] Orell A, Navarro CA, Arancibia R, et al. Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals[J]. Biotechnology Advances, 2010, 28(6): 839–848.
- [13] Quatrini R, Lefimil C, Veloso FA, et al. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(7): 2153–2166.
- [14] Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C, et al. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of Copper[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6102–6109.
- [15] Luo Y, Liu Y, Zhang C, et al. Insights into two high homogenous genes involved in copper homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Current Microbiology, 2008, 57(4): 274–280.
- [16] Solioz M, Vulpe C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(7): 237–241.
- [17] Ward SK, Hoye EA, Talaat AM. The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2939–2946.
- [18] Outten FW, Outten CE, Hale J, et al. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(40): 31024–31029.
- [19] Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms

- of Copper homeostasis in a changing environment[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27(2/3): 197–213.
- [20] Su CC, Yang F, Long F, et al. Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 393(2): 342–355.
- [21] Chi A, Valenzuela L, Beard S, et al. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(12): 2239–2251.
- [22] Cha JS, Cooksey DA. Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(5): 1671–1674.
- [23] Kornberg A, Rao NN, Ault-Riché D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1999, 68(1): 89–125.
- [24] Seufferheld MJ, Alvarez HM, Farias ME. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(19): 5867–5874.
- [25] Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2009, 78(78): 605–647.
- [26] Tzeng CM, Kornberg A. Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 29(1): 381–382.
- [27] Cardona ST, Chávez FP, Jerez CA. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in Archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4812–4819.
- [28] Vera M, Guiliani N, Jerez CA. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Hydrometallurgy*, 2003, 71(1/2): 125–132.
- [29] Alvarez S, Jerez CA. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(9): 5177–5182.
- [30] Orellana LH, Jerez CA. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(4): 761–767.
- [31] Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77(77): 755–776.
- [32] Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, et al. Survival and growth in the presence of elevated Copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(20): 7242–7256.