

生物耐铜的分子机理及铜污染环境的生物联合修复

李 杰^{1,2}, 贺纪正², 马延和¹, 朱永官², 张 蕾^{1,*}

(1. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 铜是动植物和人类必需的微量元素, 缺乏或过多都将产生不良影响。随着社会经济的发展, 人类活动对环境的干扰日益加剧, 工业和农业生产活动常可导致土壤铜污染, 铜已成为土壤重金属污染的主要元素之一。总结了铜在植物体内的自发内稳态调节机制, 在细菌和真菌体内的吸收、分布、解毒和调节因子, 同时以蚯蚓为例简要阐述了土壤动物对铜的解毒机理; 从分子生物学角度对重金属铜在生物体内的代谢机理及生物对环境中过量铜的联合修复研究进展进行了综述, 以为铜污染环境的植物、微生物和动物联合修复的分子机理研究提供借鉴。

关键词 铜; 解毒; 分子机理; 生物联合修复

文章编号: 1000-0933 (2007) 06-2615-12 中图分类号: X17, X53 文献标识码: A

Molecular mechanisms of copper tolerance and co-bioremediation of copper contaminated environment

LI Jie^{1,2}, HE Ji-Zheng², MA Yan-He¹, ZHU Yong-Guan², ZHANG Lei^{1,*}

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Acta Ecologica Sinica 2007, 27 (6): 2615 ~ 2626.

Abstract: Copper is a well-known micro-nutrient that human, animals and plants need, and abnormal phenomena will be appeared under Cu deficient or toxic levels. Along with the fast economical development in China, industrial and agricultural events had resulted in severe soil Cu contamination, and Cu contamination in soil has now become one of the most serious problems. The paper gave a brief idea on mechanisms of copper metabolism in organisms at molecular level and the advances of co-bioremediation of copper contamination were also discussed. Copper homeostasis plays a key role in copper metabolism in organisms. Uptake, distribution, detoxification, and regulators of copper in plants, bacteria and fungi were highlighted. The molecular mechanism of copper detoxification in earthworm, a model animal to understand heavy metal detoxification in soil, was also briefly discussed. The understanding of copper homeostasis in plant, microbe and fauna might be helpful for research on molecular mechanism of bioremediation of Cu contaminated soils.

Key Words: copper; detoxification; molecular mechanism; Co-bioremediation

土壤中铜污染有自然源和人为源。土壤中本底铜主要来自原生矿物的各种风化作用。原生矿物的风化将铜导入土壤圈, 而土壤圈的物理化学性质可使铜在不同土壤及同一土壤的不同层次上重新分配。土壤中铜

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2004CB41850x)

收稿日期: 2006-05-12; 修订日期: 2007-01-19

作者简介: 李杰 (1975 ~), 女, 辽宁辽阳人, 博士, 主要从事土壤分子生态学研究。E-mail: jieli0542@yahoo.com.

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhanglei@im.ac.cn

Foundation item: The project was financially supported by National Key Basic Research Program of China (No. 2004CB41850x)

Received date 2006-05-12; **Accepted date** 2007-01-19

Biography LI Jie, Ph. D., mainly engaged in molecular ecology of soil. E-mail: jieli0542@yahoo.com

的自然富集或自然矿化可使局部地区土壤中的铜过量^[1]。土壤铜污染的人为来源则主要有工业“三废”排放、城市生活垃圾及污水污泥农用、含铜农药化肥施用等。随着我国居民生活水平的提高和肉类需求的迅速增长,畜牧业的快速发展以及由此引起的饲料添加剂的广泛应用已经成为环境铜污染的又一重要因子^[2]。作为最主要的饲料添加剂之一,铜对动物的营养生理功能主要有3点:一是作为金属酶的组成成分,直接参与体内代谢;二是维持铁的正常代谢,有利于血红蛋白的合成和红细胞的成熟;三是参与骨形成。目前在肥育猪的饲料中有添加大量铜的趋势,以促进猪的生长、提高饲料利用率。但高铜饲料对增重和耗料并无改善,而粪便中铜的排出量却递增,成为潜在的环境污染源之一^[3,4]。另一方面,动物体的富集作用可使添加的铜毒性增强,当人食用了这些超标的动物性食品后,会在人体内蓄积,产生诸多不良后果,甚至危害人体健康。因此,近年来对环境铜污染的研究和修复引起了人们的重视。本文拟对生物耐铜的分子机理及生物对重金属铜污染环境的联合修复研究进展加以综述。

1 生物修复及其作用机理

所谓生物修复 (bioremediation) 就是在人为作用下,利用活有机体 (微生物、植物和小型动物等) 促进环境中有毒有害物质的吸收、降解或固定,减少其对环境危害的技术。生物修复技术可分为原位生物修复 (*in situ* bioremediation) 和异位生物修复 (*ex situ* bioremediation) 两种。原位生物修复是通过物理或化学的方法为微生物创造有利的环境条件,或向污染环境补充高效有效微生物,必要时辅以工程措施,原位清除各类污染物^[5]。异位生物修复是指将被污染介质 (土壤、水体) 搬动和输送到它处进行生物修复处理。但这里的搬动和输送是有限度的,而且更强调人为调控和创造更加优化的降解环境。现在所说的生物修复主要是指原位生物修复。对于土壤有机污染物而言,生物修复就是利用土壤生物将有机污染物作为唯一碳源和能源,或者通过共代谢作用从其它化合物获得碳源和能源后,降解有机污染物大分子结构,使其成为简单无害的形式。重金属的原位生物修复也包括植物对重金属的吸收和去除。植物修复重金属污染治理技术即是用植物减少、去除或固定环境中重金属的一组治理技术^[6]。

2 生物耐铜机理

2.1 植物耐铜的分子机理

铜是植物体内重要氧化还原反应的催化剂,是许多参与氧化磷酸化和光合反应的电子传递载体的重要组成部分,此外还参与氧自由基的清除。铜在生态系统中的环境行为^[7]、过量铜对植物的毒性及其与植物蓄积的关系^[8]等已有专论,土壤-植物系统中铜污染与修复研究进展、超累积植物对重金属修复的分子机制和基因基础已有研究论述^[7,8]。

在真核生物体内存在着自发的内稳态 (homeostasis) 来调节胞内的铜水平。铜在酵母、人类和拟南芥中的运输途径已有研究^[9],本文以拟南芥为例简要介绍植物中可能的铜运输途径 (图 1)^[10]。首先,铜在位于质膜上的转运蛋白 COPT (Copper Transporters) 的作用下跨膜运输进入细胞质,细胞质中铜与 ATX1 (Antioxidant1) 及其同族体 HAH1、铜陪伴分子 CCH 结合,在 CCH 的作用下到达可溶性铜结合蛋白并与其结合。与 ATX1 和 HAH1 不同,CCH 具有一个功能不详的终端螺旋,可能起着寻靶作用或参与蛋白和蛋白之间的相互作用。CCH 可以与 RAN1 (Responsive-to-Antagonist1) 相互作用,运送铜到某一囊泡中,尽管铜的目的地暂不明确,但乙烯受体 ETR1 可能会依赖于 RAN1 运送铜^[11,12]。

阳离子的跨膜运输离不开生物能的驱动,更离不开生物能转换家族蛋白 P-type ATPases 的参与。拟南芥

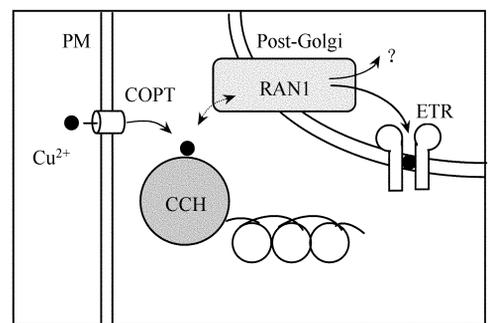


图 1 拟南芥中可能的铜运输途径^[10]

Fig. 1 Copper-trafficking pathway in plants^[10]

PM: 质膜 Plasma membrane; COPT: 铜转运蛋白 Copper Transporters; CCH: 铜陪伴分子 Copper Chaperone; RAN1: 响应-拮抗物 1 Responsive-to-Antagonist 1; ETR1: 乙烯受体 Ethylene Receptor

的基因组编码 46 种 P-type ATPases^[3],包含几种具有广泛阳离子和膜专一性的转运蛋白,在序列和功能上又可以分为多个亚族^[4],其中有 8 种属于与金属运输有关的 P_{1B}亚族^[5],即 HMA1 到 HMA8 (Heavy Metal-transporting P-types ATPase, HMAs)^[3],其中 HMA5 和 HMA8 参与 Cu⁺ 和 Ag⁺ 的运输。拟南芥中 HMA7 (即 RAN1)参与运送铜到乙烯受体,因为铜是乙烯结合到其重组受体时所必须的^[6]。HMA5 与 RAN1 的亲缘关系最近,44.6%的氨基酸序列相同,而与 PAA1 (P-type ATPase of Arabidopsis, HMA6)和 PAA2 (HMA8)的亲缘关系较远。PAA1 和 PAA2 蛋白都在叶绿体内起作用,PAA1 位于叶绿体膜上,也有研究表明 PAA1 也可以在根中表达^[7],在植物体内,PAA1 的主要功能在于其在叶绿体中运输铜,可以调节铜跨膜运输,并将铜运送到蛋白,如基质中的 Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (CSD2)^[8];而 PAA2 与 PAA1 的序列相似,编码铜运输 P-type ATPase,位于类囊体膜上,调节着铜到质体蓝素的运输 (图 2)^[9]。尽管两者的主要功能在空间上都发生在叶绿体的不同被膜上,但也不能排除少量 PAA2 在叶绿体膜上或少量 PAA1 在类囊体膜上起着作用^[7]。

植物叶绿体中在 PAA1 和 PAA2 参与下铜的运输 (图 2)。当铜有限时,野生型植物仍然可以产生质体蓝素,CSD1 (细胞质 Cu/Zn SOD)的 mRNA 和蛋白水平、CSD2 和 CCS (Cu/Zn 超氧化物歧化酶 Sod1 的陪伴分子)^[20]都会下降,而 FeSOD 的 mRNA 和蛋白则会变得丰富,这种调节会使 PAA2 有效地运送 Cu 到质体蓝素而不必与 CCS 竞争铜;在 Cu 充足的条件下,CSD2 被转录,随之发生到基质 CSD2 和质体蓝素的平衡输送;在质体中 Cu 浓度足够高的条件下,CSD1、CSD2 和 Cu 陪伴分子基因 CCS 都被转录,CSD2 会解毒由光合电子传递所产生的超氧化物,PAA2 可以运送 Cu 到质体蓝素,CSD1 和 CSD2 也可以帮助吸收过量的铜,避免铜中毒^[5]。在拟南芥中研究发现,Cu-转运 P-type ATPase (HMA5)与乙烯受体 RAN1 相关,通过对两种功能缺失突变体的研究发现,Cu-运输 P-type ATPase 主要在根中表达,且在整个植物中明显地、专一性地受铜的诱导,两个突变体对铜超敏感,但对铁、锌或镉却不敏感。因此,HMA5 在铜区隔化和解毒中起着作用^[21]。

随着基因和分子生物技术的广泛应用,植物体内重金属抗性基因^[22,23]和 PC 合成酶基因的分离鉴定^[24,25]、MTs (Metallothioneins)在转基因植物中的应用等,使超累积植物修复机理研究也进入了新的阶段,分子生理学让人们对于控制 Cu 累积的专一性基因有了深入的了解和认识,相信随着分子生物技术的发展与应用,人们将会对影响超累积表现型的基因和调控因子有更深入的理解。

2.2 微生物耐铜机理

在铜胁迫下,微生物一方面受到铜毒性的影响^[26];另一方面,铜能够提供和接受电子,参与氧化还原反应。在没有任何控制的情况下,铜能够对蛋白质、脂类和 DNA 造成毁灭性的、无法挽回的损害。微生物从环境中吸收铜到细胞内而又不导致过量积累对其自身造成伤害,有赖于微生物体内存在的控制铜的摄入、分配和解毒的机制,包括:(1)几个基因和它们相应的产物专一性地控制着铜的跨膜运输、铜到铜蛋白的运输以及过量铜的捕获或清除;(2)许多参与铜代谢的基因和蛋白受胞内铜浓度、转录水平、蛋白的定位或稳定性的控制;(3)在负责铜动态平衡的蛋白和蛋白定位的有机体、外在环境或其它细胞过程之间存在着相应的交流形式。目前已确定铜内稳态调节机制中的几种参与蛋白,但这些蛋白是如何被调控的还知之甚少,胞内的交流

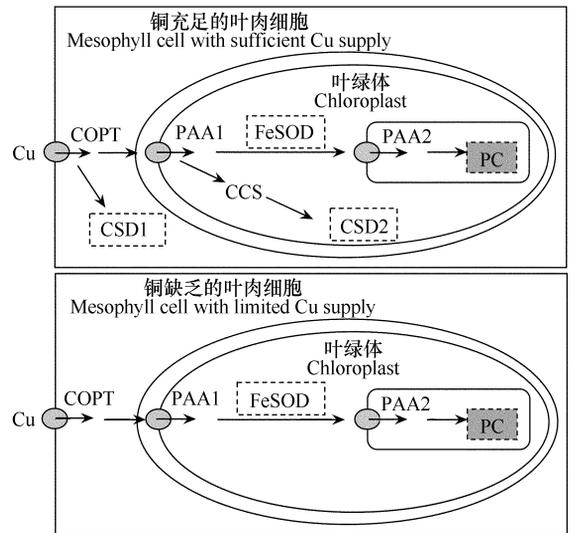


图 2 植物叶绿体中铜运输系统^[9]

Fig. 2 Copper delivery system in plant chloroplast^[9]

CSD1: 细胞质中 Cytoplasmic Cu/Zn SOD; CSD2: 基质中 Stromal Cu/Zn SOD; PAA1 和 PAA2: 拟南芥中 P-type ATPases P-type ATPase of Arabidopsis; PC: 质体蓝素 Plastocyanin

机制也尚不清楚。

2.2.1 细菌的耐铜机理

铜是参与重要生命代谢过程如呼吸、铁的吸收和氧胁迫保护中重要酶的辅助因子。除了铜/锌超氧化物歧化酶外,铜的重要功能是参与细胞色素 c 及其相关的在呼吸链中以氧作为终端的氧化。细胞色素 c 氧化酶中存在两个铜中心,而且它们在催化循环中起着不同的作用。 Cu_A 中心负责吸收来自可溶性细胞色素 c 的电子,并把它们传递到血红素 aa₃/ Cu_B 复合体,最终将分子氧还原为水,产生的能量用于质子的跨细胞膜运输^[27]。铜毒是由过氧化物自由基的产生及其与细胞膜相互作用的结果。

图 3 为革兰氏阴性和革兰氏阳性菌抗铜机理的示意图^[28]。在革兰氏阴性菌中,大肠杆菌体内质粒编码的铜抗性强烈地与染色体编码的功能相互作用^[29],其作用机理可能与生长阶段有关^[30]。大肠杆菌和假单胞杆菌中的铜抗性决定子同源,但二者在抗铜表现型上不同,大肠杆菌始终保持无色,而抗性假单胞杆菌在高铜的介质中会变成蓝色,因为铜会累积在外周胞质和外膜中^[31]。外周胞质 CopA 蛋白表现出几个预测的铜结合位点的保守性。CopC 和 CopD 蛋白似乎能够催化铜吸收进入细胞质中。相关的铜抗性决定子在不同的假单胞杆菌和野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 中也有报道^[32]。

革兰氏阳性菌小肠肠球菌 (*Enterococcus hirae*) 的铜代谢机制似乎比阴性菌清楚得多。如图 3 所示, Cu^{2+} 可能通过 CorA-Mg²⁺ 转运蛋白 (MIT) 和 P-type ATPase 在细胞内累积。*E. hirae* 具有编码 P-type ATPase 结构基因的两个 cop 操纵子, CopA 可能负责铜的吸收和营养,而 CopB (35% 与 CopA 完全相同) 负责铜的输出和解毒^[33,34],这两种蛋白也可以运输 Cu^+ 和 Ag^+ ^[35]。

与细菌相比,放线菌在铜抗性方面的研究相对更少。Albarraçin 等曾筛选出在 1000mg/L 铜下仍具有很强抗性的放线菌-天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)^[36]。但这部分工作也仅限于最初的筛选和鉴定,在分子水平上的工作还没有展开。

2.2.2 真菌的抗铜机理

在铜胁迫下,真菌和其它高等真核生物(如植物、苍蝇和哺乳动物)会通过调节体内铜的内稳态来维持生长。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是研究真菌体内铜内稳态最常用的模式菌种,对酵母体内铜内稳态的理解详见图 4^[37]。

2.2.2.1 铜的吸收、分布和解毒

(1) 吸收 胞外 Cu^{2+} 首先被金属还原酶 Fre1 和 Fre2 还原为 Cu^+ ^[38] (图 4),然后通过高亲和力的铜转运蛋白 Ctr1 和 Ctr3 跨越原生质膜而被吸收^[39,40]。铜转运蛋白 CTR 家族从酵母到人类是保守的,所有的 CTR 蛋白都具有 3 个跨膜区域和行使功能所需要的 MX_3M 基元^[41]。

(2) 分布 铜跨越细胞质膜后,小的可溶性蛋白即‘铜陪伴分子’^[42]通过 3 种主要途径运输铜到指定的目的地(图 4)。目前,陪伴分子直接还是间接地由 CTR 转运蛋白获得铜仍然不清楚。然而,Xiao 和 Wedd 发现酵母 Ctr1 的羧基末端可以快速地与铜陪伴分子交换 Cu^+ ,这一研究结果与潜在的 Ctr1-陪伴分子直接的相互作用相一致^[43]。陪伴分子 Atx1 运送铜到 Ccc2 (位于高尔基体膜上的 P-type ATPase),Ccc2 将铜运输到分泌途径的腔内,用于铜蛋白的合成^[44,45],该铜蛋白是一种多铜的高铁氧化酶 Fet3,与 Ftr1 共同运输铜到脂膜,用于还原铁的高亲和性吸收^[46]。

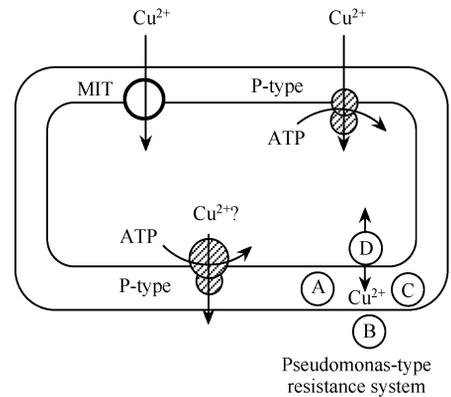


图 3 参与细菌中重金属代谢的蛋白家族^[28]

Fig. 3 Protein families involved in bacterial heavy-metal metabolism^[28]

(MIT: 金属运输系统 Metal transport system)

在当前已知的3种铜陪伴分子参与的运输途径中,线粒体途径最为复杂。铜对细胞色素c氧化酶(Cco)至关重要,该酶是位于线粒体内膜上的多亚基酶,不仅需要3个铜离子,还需要亚铁红素、锌、镁和钠辅助因子^[47]。Cu⁺到细胞色素氧化酶的运输依赖于位于细胞质和线粒体膜间隙(intermembrane space, IMS)的陪伴分子Cox17, Nittis和Winge认为Cox17在IMS中行使功能^[48]。Beers等^[49]曾提出Cox17负责从细胞质跨越线粒体外膜往复运输铜,但Carr和Winge^[47]的研究却发现Cox17在线粒体膜上的往返运输的设想并不是完全正确的。Cox17通过直接的蛋白-蛋白之间的相互作用运送Cu⁺至线粒体内膜蛋白Sco1^[50],而不是细胞色素氧化酶的多肽亚基Cox2的Cu_A位点^[47]。另一个线粒体内膜蛋白Cox11^[51]的功能与Sco1类似。同样,Cox17通过直接的蛋白-蛋白之间的相互作用运送Cu⁺到Cox11而非细胞色素氧化酶Cox1亚基的Cu_B位点^[52]。然而,Cox17将Cu⁺运送到线粒体膜内的过程还有很多问题尚不清楚:①Cu⁺由外膜复合体多亚基移位酶运输前,Cox17处于伸展或不成熟状态^[53],当Cu⁺由细胞质跨膜到IMS时,Cu⁺仍然能结合在Cox17上的机理还有待研究;②线粒体IMS中只有60%的Cox17^[43],而大约有40%的Cox17却存在于细胞质中^[49],这部分Cox17的作用尚不清楚;③Cu⁺到达线粒体并跨越外膜的过程及细胞质Cox17在这个过程中所起的作用也有待研究。同样,负责运送铜到Cox11的陪伴分子也还不清楚。

CCS和Sod1的直接相互作用导致配位基的交换而使Cu⁺从CCS上被转移到Sod1的活性位点上^[54,55]。CCS和Sod1的主要部分在细胞质中,但估计大约还有1%~5%的蛋白位于IMS中^[56]。因此存在着一个跨越线粒体外膜运输铜的线粒体铜输入体,它的存在能够解释Sod1蛋白如何通过CCS在IMS中获得铜。提高IMS中CCS的量会导致Sod1的滞留,参与CCS-Sod1相互作用的残基对这种滞留也是非常重要的^[57]。

(3)解毒 芽殖酵母解铜毒的机制是通过CUP1的基因产物——金属硫蛋白来实现的。这种金属硫蛋白能够捕获细胞质中游离的铜,提高对高铜的抗性^[58]。金属硫蛋白在高等真核生物中是保守的,是防御有毒金属的最初系统^[59]。另一种解毒途径是将捕获的铜在细胞器中区隔化贮存,用于以后的需求。蛋白Ctr6研究表明,铜贮存于液泡中。与其它CTR蛋白不同,Ctr6位于液泡膜上,当细胞质铜不足的情况下,其可以活化贮存的铜^[60];当细胞质铜过量时,Ctr6把过量的铜释放到细胞质或细胞核中时,铜感受转录因子(Cuf1)就会被细胞内的不稳定铜库失活,从而阻止细胞表面的运输基因Ctr4⁺和Ctr5⁺的表达,使Ctr家族蛋白在细胞膜表面的运输作用受到抑制^[60]。Ctr6的序列与酵母中第三CTR蛋白——Ctr2相似,与拟南芥中的铜转运蛋白COPT1属于同一族^[61]。Ctr2位于液泡膜上,尽管目前功能尚不清楚,但认为与Ctr6的功能相似^[62]。第3种解毒的机制是Fet3与Fet1的联合作用将Cu⁺氧化,在Cu⁺进入细胞前阻止铜毒^[63]。

2.2.2.2 转录、翻译后调节和胞间交流

(1)转录调节 酵母通过调节铜响应的转录因子来调控参与铜吸收、分布和捕获基因的表达。铜过量的情况下,Cu⁺与Ace1(Activating copper-metallothionein expression)结合,使Ace1能够结合到铜解毒和这些基因激活、转录所需要的启动子中的金属响应元素上。Ace1提高了金属硫蛋白基因CUP1、CRS5和SOD1基因的表达。在担子菌*Ceriporiopsis subvermispora*中,漆酶基因的转录水平在铜存在的情况下会提高,漆酶的启动子中有猜想的Ace1结合位点,这表明在有机体中存在1个Ace1的同源体。二形酵母*Yarrowia lipolytica*比*S. cerevisiae*更抗铜,其漆酶基因的表达依赖于铜的转录因子——CRF1(与Ace1同源),但在补充铜时,其只定位于细胞核。

缺铜时酵母*S. cerevisiae*中Mac1(Copper-sensing transactivator)与铜响应共有序列TTTGC(T/G)C(A/G)

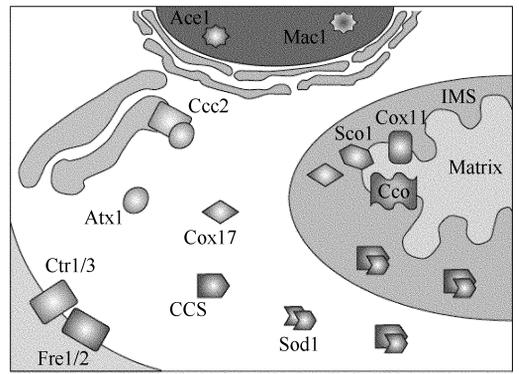


图4 酿酒酵母(*S. cerevisiae*)体内铜内稳态模型^[57]

Fig. 4 Model of copper homeostasis in *S. cerevisiae*^[57]

结合,该序列正向或反向重复地存在于启动子基因中,如 FRE1、CTR1 和 CTR3^[64]。Mac1 的目标-YFR055w 和 YJL217w 可能在铜动态平衡中扮演着重要的角色^[65]。尽管 YFR055w 与参与生成半胱氨酸的蛋白家族具有同源性,有效半胱氨酸的提高是铜缺乏的反映,但这些基因的功能尚不清楚。Mac1 同源体在其它真菌中也存在。在单一途径或个体生物分子研究基础之上,基因组层面的研究将会为更加综合和完整地研究如何通过调节铜动态平衡来影响所有分子组分和过程建立一个平台。

(2)翻译后调控 转录调控是真核生物体中铜内稳态调控的核心,但翻译后调控的例证也开始出现。早期的翻译调控机制是 *S. cerevisiae* 中 Ctr1 铜依赖的内吞作用和降解作用^[66],这一点在哺乳动物中也有观察到,但这种内吞作用功能目前尚不清楚^[67]。研究表明,酵母中 Mac1 不仅调控着转录,而且还通过借助于 Ctr1 的降解在翻译后水平控制着 Ctr1 的水平^[67]。因此,当转录调节在微生物体内成为主要的铜内稳态调节机制时,翻译后水平的调节很可能将会接着出现。

(3)胞间交流 参与铜的获取、分布和解毒的许多蛋白分子之间存在着交流机制。Mac1 和 Ace1 的活性和去活反应只是有助于确保在缺铜和铜过量条件间连续性的一种方式。Fet1 和 Fet3 相互作用来调节铜毒是另一种机制。但可能还存在着其它交流机制,感受到铜缺乏的细胞可以将信息传递给细胞内的铜贮存部位来刺激铜的活化,在铜严重缺乏的瞬时,陪伴子序位的存在可能导致对有效铜更为偏爱,胞内的含铜或铜蛋白可以将过量的铜区隔化贮存于不同部位,如液泡、细胞核、线粒体等,而且这些含铜或铜蛋白与细胞质和质膜中的铜蛋白之间也存在着交流。

Labbé 及其同事用 *S. pombe* 的 Ctr6 鉴定了这一交流模式^[66]。Ctr6 的过量表达会造成细胞对铜超敏感,但⁶⁴Cu 的吸收会降低大约 60%~70%。与铜吸收下降相一致,质膜上的高亲和铜转运蛋白 Ctr4 的转录水平也下降^[60]。因此他们提出了一个从液泡到质膜的交流模式。当 Ctr6 活化铜时,Cuf1 感受到一个更大的易变的铜库,这反过来下调依赖于铜的 Ctr4 的转录,从而导致铜吸收的下降。

2.3 土壤动物的耐铜机理

在评价污染物的生态学危害研究中,科研工作者对土壤动物并未给予足够的重视,所以与微生物相比,国内外的相关报道还不多。而在众多土壤动物中,普遍认为蚯蚓是改良土壤的能手,并且对土壤污染具有指示作用,增强修复的潜力。

除了生物体内普遍存在的与抗氧化有关的酶类和脂类的过氧化保护酶系统外,Stürzenbaum 等^[68]研究报道了一种铜响应的金属酶——前羧肽酶(pre-procarboxypeptidase)。羧肽酶是一类消化酶,是从食物中蛋白或多肽中释放氨基酸的关键酶,此类酶的催化中心是被 1 个水分子、1 个谷氨酸、和 2 个组氨酸包围的 Zn^{2+} 。当环境中 Cu^{2+} 大量存在时,酶的辅因子 Zn^{2+} 被 Cu^{2+} 取代而改变羧肽酶的三维结构,从而影响到该酶的动力学特征甚至使其失活。而在实际的研究中,结果并非完全如此,作者因此提出了一个假设,即在蚯蚓体内存在一个转录反馈调节机制,当 Cu^{2+} 代替羧肽酶中心的辅因子 Zn^{2+} 后,转录反馈调节机制可能被启动,从而提高了羧肽酶的转录水平,避免了该酶在蚯蚓体内功能的丧失。但这也仅限于假设,还需要大量的实验加以验证。

与微生物和植物相同,在重金属胁迫下,蚯蚓体内控制金属硫蛋白的基因表达量会增加,在 Cd 污染下,蚯蚓的金属硫蛋白转录水平会提高 3 个数量级,在 Cu 污染下会提高一个数量级^[69]。羧肽酶在转录水平上对铜的反应与金属硫蛋白表现出相似的特性^[68]。另外,线粒体中铜响应基因的表达量也会提高,这是能量需求增高的一种反映。Spurgeon 等^[70]测定了蚯蚓体内的代谢活性指示物-线粒体大核糖体亚基(*l-rRNA*)。在 $2.5 \mu\text{mol/L Cu g}^{-1}$ 的情况下,*l-rRNA* 的表达量会明显增加,这说明铜会改变线粒体的功能,但作者认为在实验中测得的 *l-rRNA* 转录变化不能简单地与通过线粒体的能量代谢相关联。另外一种可能是重金属铜对线粒体功能的作用。如前所述,在酵母中,线粒体是铜陪伴分子的目的地之一,由铜陪伴分子所提供线粒体的铜作为金属辅因子提供给细胞色素氧化酶。Boore 和 Brown^[71]曾测定了蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)线粒体基因组的全部序列,包含 37 种基因,编码细胞色素氧化酶亚基 I、II、III 和 *l-rRNA* 的基因也在其中。线粒体基因组中,转录开始于至少两个链专一启动子,然后继续转录产生多顺反子 RNAs。这一转录机制意味着存在一个由于联

合转录基因的上调而导致的某一基因上调的潜在可能。因此在铜污染下,蚯蚓体内 *l-rRNA* 不可能直接代表这一基因产物的转录变化,而是细胞内铜水平提高和铜运输变化下,细胞色素 *c* 氧化酶亚基转录变化的一个间接反映。

蚯蚓体内的重金属解毒包括金属硫蛋白和溶酶体机制^[72],Spurgeon 等^[66]研究发现铜不能降低溶酶体膜的稳定性,但能够上调金属硫蛋白基因 *mt-2* (metallothionein-2) 的表达,降低溶酶体有关的糖蛋白基因 *lgp* (lysosome-associated-glycoprotein) 的表达。对铜而言,并没有发现如同镉对蚯蚓繁殖的影响,因此根据现有的研究还无法将铜与蚯蚓的生命循环特点紧密联系起来。尽管目前的研究已经发现了基因表达、溶酶体状态、铜的累积及其对整个生命体的毒性之间可能存在着某种机制上的联系,但仍无法完整地理解铜对蚯蚓的毒害和相应的解毒机制。因此若要用蚯蚓来指示土壤环境中铜的生态毒性和生态风险,还需要进行大量的研究。尽管如此,蚯蚓已成为农业用地、城市及工业区土壤中监测各种污染的良好指示者^[73]。

3 植物-微生物-土壤动物交互作用在生物联合修复研究中的应用

土壤是包括植物、微生物、动物在内的复杂体系^[74],在这一体系中,植物、微生物和土壤动物彼此之间往往是紧密联系、相互作用,参与着环境中的各种反应。因此,上述植物、细菌、真菌和土壤动物耐/抗铜的分子机理的阐述为生物联合修复提供了理论基础,使三者联合修复中的应用成为可能。

3.1 植物与微生物联合修复

土壤微生物的分泌物对重金属具有活化作用。微生物通过对重金属元素的价态转化或通过刺激植物根系的生长发育而影响植物对重金属的吸收;另外,微生物也能产生有机酸,提供质子或与重金属络合的有机阴离子,交换或络合金属离子,使土壤溶液中金属浓度增加,有利于植物的吸收^[75]。而在重金属高浓度条件下某些微生物仍能存活或生长,表现出对重金属的抗性,有些微生物还能通过生物转化作用或生理代谢活动(如胞外络合作用,胞外沉淀作用,胞内积累与转化等),使金属由高毒状态变为低毒状态,使重金属离子对植物的毒性减弱。

目前丛枝菌根真菌(AMF)与植物联合作用在重金属修复研究中的应用较多。自1957年 Mosses^[76]发现丛枝菌根真菌能促进苹果幼苗对微量元素的吸收以来,接种丛枝菌根以提高宿主植物对土壤微量元素的吸收和利用的相关研究已受到广泛关注,特别是丛枝菌根能改善植株磷素营养状况已为众多研究所证实。自1981年 Bradley 等^[77]首次报道石楠属菌根能降低宿主植物对过量重金属锌和铜的吸收以来,菌根真菌对过量重金属耐受性的研究、重金属污染土壤中菌根-植物系统与重金属元素的相互作用、以及菌根植物对重金属污染的生物修复可行性等研究,已逐渐引起人们的关注。申鸿等^[78]通过对菌根对重金属铜修复的研究发现,菌根玉米地上部和根系铜浓度分别降低24.3%和24.1%,吸铜量分别提高了28.2%和60.0%,表明菌根植物对铜污染土壤具有一定的生物修复作用。但由于无法对AMF进行纯培养,菌根植物如何吸收、积累重金属元素的研究结果有较大分歧。

目前关于菌根-植物系统和重金属的交互作用机理尚不清楚,植物与其它微生物的相互作用研究则相对更少。

3.2 植物与土壤动物联合修复

以往土壤动物学家往往忽略了根际生物多样性,而只关注于土壤动物对微生物生物量的影响。直到90年代末期,土壤动物的取食作用对微生物体内N的释放、根际微生物结构的组成和植物激素的产生等方面的作用才受到重视^[79,80],土壤动物在生态系统中的作用详见图5^[81]。土壤动物通过取食作用会释放根际微生物消耗的 NH_4^+ 和植物激素等影响植物生长。就土壤动物而言,在重金属植物修复研究中应用最多的仍属蚯蚓,但关于它在铜污染土壤植物修复研究中的应用至今仍鲜见报道。

3.3 土壤动物-微生物的联合作用

以某些土壤真菌为食物的弹尾目昆虫和甲螨类土壤微生物通过选择性地取食真菌会影响真菌的群落结构^[81,82]。普遍认为节肢动物可以选择性地取食某些外生菌根真菌,尽管外生菌根并不是弹尾目昆虫和甲螨

类动物最偏爱的食物^[82],但这些微小的节肢动物却能够在基部切断菌丝而致命地影响菌丝网。田间和实验室的试验表明,食真菌的微小节肢动物通过对菌根的取食能够影响植物生长,但这种与取食相关的影响仍在争论中。Bonkowski 等^[82]阐述了线虫和菌根真菌之间的相互作用,及其对植物生长和植物病害方面的影响。但关于土壤动物和微生物之间的相互作用,则也仅限于在生理水平上阐述通过菌根的作用来影响植物的生长,最终有可能影响到植物对重金属的修复,并没有把这些土壤中小型动物和微生物之间的交互作用与重金属的生物修复结合起来。因此,目前土壤动物和土壤微生物之间的交互作用在重金属生物修复研究中的应用还处于起步阶段。

3.4 植物-微生物-动物联合修复

土壤动物、微生物和植物三者之间的交互作用在图 5^[81]中有一定的描述,但也仅限于描述该系统中各个主体之间的相互关系及其对植物生长的影响,而并没有针对其在重金属修复研究中的应用进行专门的讨论。目前这三者联合应用在重金属修复研究中应用最好的应属蚯蚓-菌根在植物对镉污染土壤修复中的应用^[83]。接种菌根不仅能促进黑麦草对 Cd 的吸收,而且还能促进 Cd 从植物根部向地上部分转移,由于接种蚯蚓可以提高菌根的浸染率,所以二者具有促进 Cd 向地上部转移的协同作用^[84],这对于重金属污染土壤的植物修复具有十分重要的意义。因此,在铜污染土壤的植物修复研究中也采用三者结合的方法来提高铜污染修复效率。

越来越多的证据表明植物的生长与根际微生物-动物之间相互作用密不可分,因此,需要植物生理学、土壤学、微生物学和动物学的知识,才能充分利用三者重金属污染土壤修复研究中的作用,才能够更深刻地理解调节矿化、养分循环和植物生长的根际过程。此外,生物修复强调的是多相、异源的环境,如在污染的土壤中,污染物的存在与土壤的粒径、土壤溶液中的溶解和土壤空气等都有关系。因此,成功的生物修复应是多学科交叉的结果,不仅需要上述学科,还需要生态学、工程学、地质学和化学等学科的共同参与来完成。

越来越多的证据表明植物的生长与根际微生物-动物之间相互作用密不可分,因此,需要植物生理学、土壤学、微生物学和动物学的知识,才能充分利用三者重金属污染土壤修复研究中的作用,才能够更深刻地理解调节矿化、养分循环和植物生长的根际过程。此外,生物修复强调的是多相、异源的环境,如在污染的土壤中,污染物的存在与土壤的粒径、土壤溶液中的溶解和土壤空气等都有关系。因此,成功的生物修复应是多学科交叉的结果,不仅需要上述学科,还需要生态学、工程学、地质学和化学等学科的共同参与来完成。

4 结语

基于植物原位生物修复的理论和技术在研究污染环境修复的实践中得以广泛应用。微生物和土壤微动物在生物修复研究中的应用更是极大地提高了生物修复的效率和能力,促进了生物修复的发展,使植物-微生物-动物联合的生物修复技术成为本世纪我国生态环境领域最有价值和最具有生命力的生物处理技术,同时也带动了新兴环保产业技术的发展。随着分子生物技术的发展,对生物耐铜机理的认识更加清楚,这为指导生物联合修复提供了理论支持。着眼于植物、微生物和动物的基因改良、应用及其对特定污染物的生物修复研究已成为这一领域的前沿,其研究技术和内容的不断发展、补充将会更加优化生物修复这一环境友好技术,通过与物理修复、化学修复方法组成统一的修复技术体系相结合,使其真正为解决人类所面临的最困难的环境问题——有机污染和重金属污染提供可能途径。从科学的角度客观地看,生物修复技术本身是一项复杂的系统工程,要使其成功地应用于实践,应尽可能解决其中涉及的技术难题,结合农业生产措施,充分发挥自然界生物作用,以尽早实现生物修复研究的技术转换。

References :

[1] Leep N W. Effects of Trace Metal on Plant Function. In :Leep. N W. ed. Effects of heavy metal pollution on plants. Applied Science Publishers ,

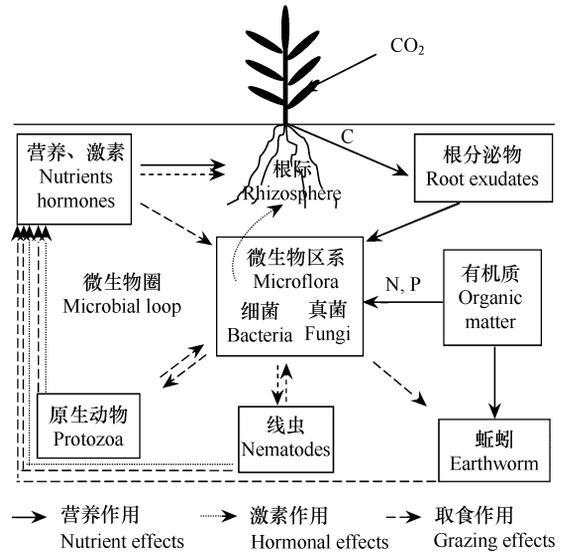


图 5 植物-土壤微生物-土壤动物之间可能的作用机制^[81]
Fig. 5 A conceptual model illustrating possible mechanisms among plant, microorganisms and soil animals^[81]

- London & New Jersey ,1981.
- [2] Thiele S , Leinweber P. Parameterization of Freundlich adsorption isotherms for heavy metals in soils from an area with intensive livestock production. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* ,2001 ,164 :623 — 629.
- [3] Nicholson F A , Chambers B J , Williams J R , *et al.* Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresearch and Technology* ,1999 ,70 :23 — 32.
- [4] Saviozzi A , Biasci A , Riffaldi R , *et al.* Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics. *Biology and Fertility of Soils* ,1999 ,30 :100 — 106.
- [5] Xia L J , Li N , Shen D Z , *et al.* The role and mechanism of *in situ* microbioremediation of mercury contamination. *Advances in Environmental Science* ,1998 ,6 (3) :48 — 52.
- [6] Peer W A , Baxter I R , Richards E L , *et al.* Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In : Tam s M J , Martinoia E. eds. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ,2005. 1 — 42.
- [7] Ni CY , Chen Y X , Luo Y M. Recent advances in research on copper pollution and remediation of soil-plant system. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)* ,2003 ,29 (3) :237 — 243.
- [8] Wang D , Li F M , Xiong Z T , *et al.* Relationship between copper's toxicity and phytoaccumulation. *Soil and Environmental Sciences* ,2000 ,9 (2) :146 — 148.
- [9] Yang X E , Jin X F , Feng Y , *et al.* Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* ,2005 ,47 (9) :1025 — 1035.
- [10] Himelblau E , Amasino R M. Delivering copper within plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* ,2000 ,3 (3) :205 — 210.
- [11] Hirayama T , Kieber J J , Hirayama N , *et al.* Responsive-to-antagonist1 , a Menkes/Wilson disease-related copper transporter , is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* ,1999 ,97 (3) :383 — 393.
- [12] Woste K E , Kieber J J. A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* ,2000 ,12 :443 — 455.
- [13] Baxter I , Tchieu J , Sussman M R , *et al.* Genomic comparison of P-Type ATPase ion pumps in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology* ,2003 ,132 (2) :618 — 628.
- [14] K hlandt W. Biology , structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* ,2004 ,5 (4) :282 — 295.
- [15] Arg ello J M. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport PiB-type ATPases. *The Journal of Membrane Biology* ,2003 ,195 :93 — 108.
- [16] Rodr guez F I , Esch J J , Hall A E , *et al.* A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* ,1999 ,283 :996 — 998.
- [17] Abdel-Ghany S E , M ller-Moul P , Niyogi K K , *et al.* Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* ,2005 ,17 :1233 — 1251.
- [18] Shikanai T , Muller-Moule P , Munekage Y , *et al.* PAA1 , a P-type ATPase of Arabidopsis , functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* ,2003 ,15 (6) :1333 — 1346.
- [19] Abdel-Ghany S E , Burkhead J L , Gogolin K A , *et al.* AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs/Lys7. *FEBS letters* ,2005 ,579 :2307 — 2312.
- [20] Culotta V C , Klomp L W J , Strain J , *et al.* The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* ,1997 ,272 (38) :23469 — 23472.
- [21] Andr s-Col s N , Sancen n V , Rodr guez-Navarro S , *et al.* The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal* ,2006 ,45 (2) :225 — 236.
- [22] Louie M , Kondor N , de Witt J G. Gene expression in cadmium-tolerant *Datura innoxia* : Detection and characterization of cDNAs induced in response to Cd²⁺. *Plant Molecular Biology* ,2003 ,52 :81 — 89.
- [23] Thomine S , Wang R , Ward J M , *et al.* Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,2000 ,97 :4991 — 4996.
- [24] Ha S B , Smith A P , Howden R , *et al.* Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* ,1999 ,11 :1153 — 1163.
- [25] Heiss S , Wachter A , Bogs J , *et al.* Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany* ,2003 ,54 :1833 — 1839.

- [26] Yang Y G , Paterson E , Campbell C . Study on microbial toxicity of heavy metal copper. Chinese Journal of Soil Science , 2002 , 33 (2) : 137 — 141.
- [27] Michel H , Behr J , Harrenga A , *et al.* Cytochrome *c* oxidase : structure and spectroscopy. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure , 1998 , 27 : 329 — 356.
- [28] Nies D H . Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology , 1999 , 51 : 730 — 750.
- [29] Gupta S D , Lee B T O , Camakaris J , *et al.* Identification of cutC and cutF (nlpF) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology , 1995 , 177 : 4207 — 4215.
- [30] Brown N L , Barrett S R , Camakaris J , *et al.* Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. Molecular Microbiology , 1995 , 17 : 1153 — 1166.
- [31] Cooksey D A . Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. FEMS Microbiology Reviews , 1994 , 14 : 381 — 386.
- [32] Lee Y A , Hendson M , Panopoulos N J , *et al.* Molecular cloning , chromosomal mapping , and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *Juglandis* : homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. Journal of Bacteriology , 1994 , 176 : 173 — 188.
- [33] Odermatt A , Suter H , Krapf R , *et al.* An ATPase operon involved in copper resistance by *Enterococcus hirae*. Annals of the New York Academy of Sciences , 1992 , 671 : 484 — 486.
- [34] Odermatt A , Suter H , Krapf R , *et al.* Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. Journal of Biological Chemistry , 1993 , 268 : 12775 — 12779.
- [35] Solioz M , Odermatt A . Copper and silver transport by CopA-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*. Journal of Biological Chemistry , 1995 , 270 : 9217 — 9221.
- [36] Albarrac in V H , Amoroso M J , Abate C M . Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. Chemie der Erde-Geochemistry , 2005 , 65 (Supplement 1) : 145 — 156.
- [37] Rees E M , Thiele D J . From aging to virulence : forging connections through the study of copper homeostasis in eukaryotic microorganisms. Current Opinion in Microbiology , 2004 , 7 (2) : 175 — 184.
- [38] Georgatsou E , Mavrogianis L A , Fragiadakis G S , *et al.* The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. Journal of Biological Chemistry , 1997 , 272 : 13786 — 13792.
- [39] Dancis A , Haile D , Yuan D S , *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p) — biochemical characterization , regulation by copper , and physiologic role in copper uptake. Journal of Biological Chemistry , 1994 , 269 : 25660 — 25667.
- [40] Knight S A , Labbe S , Kwon L F , *et al.* A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. Genes and Development , 1996 , 10 : 1917 — 1929.
- [41] Puig S , Lee J , Lau M , *et al.* Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. Journal of Biological Chemistry , 2002 , 277 (29) : 26021 — 26030.
- [42] Pufahl R A , Singer C P , Peariso K L , *et al.* Metal ion chaperone function of the soluble Cu (I) receptor Atx1. Science , 1997 , 278 : 853 — 856.
- [43] Xiao Z , Wedd A G . A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper (I) with the copper chaperone Atx1. Chemical Communications , 2002 , (Camb) : 588 — 589.
- [44] Lin S J , Pufahl R A , Dancis A , *et al.* A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. Journal of Biological Chemistry , 1997 , 272 : 9215 — 9220.
- [45] Yuan D S , Dancis A , Klausner R D . Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. Journal of Biological Chemistry , 1997 , 272 : 25787 — 25793.
- [46] Stearman R , Yuan D S , Yamaguchi-Iwai Y , *et al.* A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science , 1996 , 271 : 1552 — 1557.
- [47] Carr H S , Winge D R . Assembly of cytochrome *c* oxidase within the mitochondrion. Accounts of Chemical Research , 2003 , 36 (5) : 309 — 316.
- [48] Nittis T , George G N , Winge D R . Yeast Sco1 , a protein essential for cytochrome *c* oxidase function is a Cu (I)-binding protein. Journal of Biological Chemistry , 2001 , 276 (45) : 42520 — 42526.
- [49] Beers J , Glerum D M , Tzagoloff A . Purification , characterization , and localization of yeast Cox17p , a mitochondrial copper shuttle. Journal of Biological Chemistry , 1997 , 272 (52) : 33191 — 33196.
- [50] Lode A , Kuschel M , Paret C , *et al.* Mitochondrial copper metabolism in yeast : interaction between Sco1p and Cox2p. FEBS Letters , 2000 , 485

(1) : 19 - 24.

- [51] Glerum D M , Shtanko A , Tzagoloff A. SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* , 1996 , 271 (34) : 20531 - 20535.
- [52] Carr H S , George G N , Winge D R. Yeast Cox11 , a protein essential for cytochrome *c* oxidase assembly , is a Cu (I)-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* , 2002 , 277 (34) : 31237 - 31242.
- [53] Pfanner N , Wiedemann N. Mitochondrial protein import : two membranes , three translocases. *Current Opinion in Cell Biology* , 2002 , 14 (4) : 400 - 411.
- [54] Schmidt P J , Rae T D , Pufahl R A , *et al.* Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* , 1999 , 274 (34) : 23719 - 23725.
- [55] Lamb A L , Torres A S , O'Halloran T V , *et al.* Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry* , 2000 , 39 (48) : 14720 - 14727.
- [56] Sturtz L A , Diekert K , Jensen L T , *et al.* A fraction of yeast Cu/Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone , CCS , localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry* , 2001 , 276 (41) : 38084 - 38089.
- [57] Field L S , Furukawa Y , O'Halloran T V , *et al.* Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* , 2003 , 278 : 28052 - 28059.
- [58] Hammer D H , Thiele D J , Lemontt J E. Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* , 1985 , 228 : 685 - 690.
- [59] Hammer D H. Metallothionein. *Annual Reviews of Biochemistry* , 1986 , 55 : 913 - 951.
- [60] Bellemare D R , Shaner L , Morano K A , *et al.* Ctr6 , a vacuolar membrane copper transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* , 2002 , 277 (48) : 46676 - 46686.
- [61] Kampfenkel K , Kushnir S , Babiychuk E , *et al.* Molecular characterization of a putative *Arabidopsis Thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *Journal of Biological Chemistry* , 1995 , 270 (47) : 28479 - 28486.
- [62] Portnoy M E , Schmidt P J , Rogers R S , *et al.* Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* , 2001 , 265 : 873 - 882.
- [63] Szczyпка M S , Zhu Z , Silar P , *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in vacuole function are defective in copper detoxification and iron-responsive gene transcription. *Yeast* , 1997 , 13 : 1423 - 1435.
- [64] Labbe S , Zhu Z W , Thiele D J. Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *Journal of Biological Chemistry* , 1997 , 272 (25) : 15951 - 15958.
- [65] Gross C , Kelleher M , Iyer V R , *et al.* Identification of the copper regulation in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *Journal of Biological Chemistry* , 2000 , 275 (41) : 32310 - 32316.
- [66] Ooi C E , Rabinovich E , Dancis A , *et al.* Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO Journal* , 1996 , 15 : 3515 - 3523.
- [67] Yonkovich J , McKenndry R , Shi X L , *et al.* Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *Journal of Biological Chemistry* , 2002 , 277 (27) : 23981 - 23984.
- [68] St rzenbaum S R , Cater S , Morgan A J , *et al.* Earthworm pre-procarboxypeptidase : a copper responsive enzyme. *BioMetals* , 2001 , 14 : 85 - 94.
- [69] St rzenbaum S R , Kille P , Morgan A J. The identification , cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Letters* , 1998 , 431 : 437 - 442.
- [70] Spurgeon D J , St rzenbaum S R , Svendsena C , *et al.* Toxicological , cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology* , 2004 , 138 : 11 - 21.
- [71] Boore J L , Brown W M. Complete sequence of the mitochondrial-DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* , 1995 , 141 : 305 - 319.
- [72] Gao Y , Luo Y M. Earthworms as bioindicators of soil pollution and their potential for remediation of contaminated soils. *Acta Pedologica Sinica* , 2005 , 42 (1) : 140 - 147.
- [73] Paoletti G M. The role of earthworms for assessment of sustainability and bioindicators. *Agriculture , Ecosystems and Environment* , 1999 , 74 (1-3) : 137 - 155.
- [74] Lasat M M. Phytoextraction of toxic metals : A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* , 2002 , 31 (1) : 109 - 120.
- [75] Gadd G M. Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* , 2000 , 11

3) :271—279.

- [76] Mosses B. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. *Nature*, 1995, 179 :922—924.
- [77] Bradley R, Burt A J, Read D J. Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgar*. *Nature*, 1981, 292 :336—337.
- [78] Shen H, Liu Y, Li X L, *et al.* Influence of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on maize seedlings grown in copper contaminated soil. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 11 (2) :199—204.
- [79] Griffiths B S, Bonkowski M, Dobson G, *et al.* Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa. *Pedobiologia*, 1999, 43 :297—304.
- [80] Jentschke G, Bonkowski M, Godbold D L, *et al.* Soil protozoa and plant growth : Nonnutritional effects and interaction with mycorrhizas. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 20 :263—269.
- [81] Bonkowski M, Cheng W X, Griffiths B S, *et al.* Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 2000, 36 :135—147.
- [82] Fitter A H, Sanders I R. Interactions with the soil fauna. In : Allen, M F. ed. *Mycorrhizal Functioning*, London : Chapman and Hall, 1992. 333—354.
- [83] Cheng J M, Yu X Z, Huang W M. Roles of earthworm-mycorrhiza interactions on phytoremediation of Cd contaminated soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (6) :1256—1263.
- [84] Thimm T, Larink O. Grazing preferences of some collembola for endomycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 19 :266—268.

参考文献 :

- [5] 夏立江, 李楠, 沈德中, 等. 原位微生物修复治理汞害的机制及作用. *环境科学进展*, 1998, 6 (3) :48~52.
- [7] 倪才英, 陈英旭, 骆永明. 土壤-植物系统铜污染与修复的研究进展. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 2003, 29 (3) :237~243.
- [8] 王狄, 李锋民, 熊治廷, 等. 铜的植物毒性与植物蓄积的关系. *土壤与环境*, 2000, 9 (2) :146~148.
- [26] 杨元根, Paterson E, Campbell C. 重金属 Cu 的土壤微生物毒性研究. *土壤通报*, 2002, 33 :137~141.
- [72] 高岩, 骆永明. 蚯蚓对土壤污染的指示作用及其强化修复的潜力. *土壤学报*, 2005, 42 (1) :140~147.
- [78] 申鸿, 刘于, 李晓林, 等. 丛枝菌根真菌 (*Glomus caledonium*) 对铜污染土壤生物修复机理初探. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11 (2) :199~204.
- [83] 成杰民, 俞协治, 黄铭洪. 蚯蚓-菌根在植物修复镉污染土壤中的作用. *生态学报*, 2005, 25 (6) :1256~1263.