



生物大分子与重金属互作研究方法 with 微观机制

渠晨晨, 蔡鹏*, 史凯祥, 陈雯莉, 陈今朝, 高春辉, 吴一超, 黄巧云*

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: cp@mail.hzau.edu.cn; qyhuang@mail.hzau.edu.cn

2022-06-05 收稿, 2022-07-30 修回, 2022-08-10 接受, 2022-08-19 网络版发表

国家重点研发计划(2020YFC1806803)和国家自然科学基金(41877029, 42177281, 42007014)资助

摘要 深入理解生物大分子与重金属相互作用的微观机制对于生态环境污染治理具有重要意义. 近年来, 随着现代谱学、显微方法以及组学技术的应用, 生物大分子与重金属结合强度、配位结构、氧化还原过程及其生物学调控过程取得了重要进展, 这些研究在分子尺度极大丰富了相关机制的认识. 本综述在总结生物大分子与重金属相互作用最新研究方法及其机制的基础上, 指出未来亟须发展生物大分子结构与组成表征的方法体系, 探究功能性生物大分子参与的重金属吸附与氧化还原过程, 揭示复合生物膜系统中微生物功能和重金属形态转化之间的耦合机制, 推进重金属与环境组分相互作用的理解从官能团到功能分子尺度的跨越. 通过方法集成与创新、机制解析与应用, 为水体和土壤重金属污染治理提供有效策略与精准技术.

关键词 生物膜, 生物大分子, 重金属污染, 分子机制, 氧化还原

水体和土壤环境中重金属与生物大分子存在广泛的交互作用. 一方面, 重金属具有生物毒性, 环境中不同类型微生物针对不同污染元素发展出了一系列抗性和解毒策略^[1]. 微生物受到重金属的胁迫, 会主动调控其生理生化过程, 合成并分泌功能性生物分子以降低重金属生物毒性. 其中, 微生物表面的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)可占生物膜干重的90%以上, 是阻隔污染物、抵御不利环境因素的自然屏障^[2]. 另一方面, 这些生物分子通过吸附络合作用控制环境中重金属的迁移转化行为. 微生物及其分泌的生物大分子可占土壤有机质含量的50%以上, 是控制环境中污染物固定、迁移、转化等过程的关键因子^[3]. 因此, 研究重金属与生物大分子相互作用, 对于理解重金属毒理、微生物进化和适应机制、重金属环境化学行为等具有重要意义.

当前, 我国生态环境面临着严峻的重金属污染问

题, 主要污染物为镉(Cd)、镍(Ni)、铜(Cu)、砷(As)、汞(Hg)、铅(Pb)等. 围绕重金属与生物大分子互作, 近年来借助多种谱学和组学技术, 分别从化学和生物学角度出发, 在微观分子尺度获得了反应过程与机制等信息(图1). 其中, X射线吸收及发射(X-ray absorption/emission spectroscopy, XAS/XES)、三维荧光(three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, 3D-EEM)、傅里叶变换红外(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和拉曼(Raman)等光谱技术揭示了重金属在生物大分子中的配位结构和转化过程; 微量热、表面络合模型和动力学分析明确了反应的驱动机制和传质过程. 与重金属相互作用过程中, 微生物在群落组成和生理代谢途径方面均会受到影响. 基因组、转录组、蛋白质组等组学方法, 从微生物组成、潜在功能和代谢途径等不同层面揭示了微生物对重金属的响应机理^[4]. 研究发现, 硫代谢、能量代谢、金属

引用格式: 渠晨晨, 蔡鹏, 史凯祥, 等. 生物大分子与重金属互作研究方法 with 微观机制. 科学通报, 2022, 67: 4192–4205

Qu C C, Cai P, Shi K X, et al. Methods and mechanisms of the interactions between biomacromolecules and heavy metals (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 4192–4205, doi: [10.1360/TB-2022-0636](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0636)

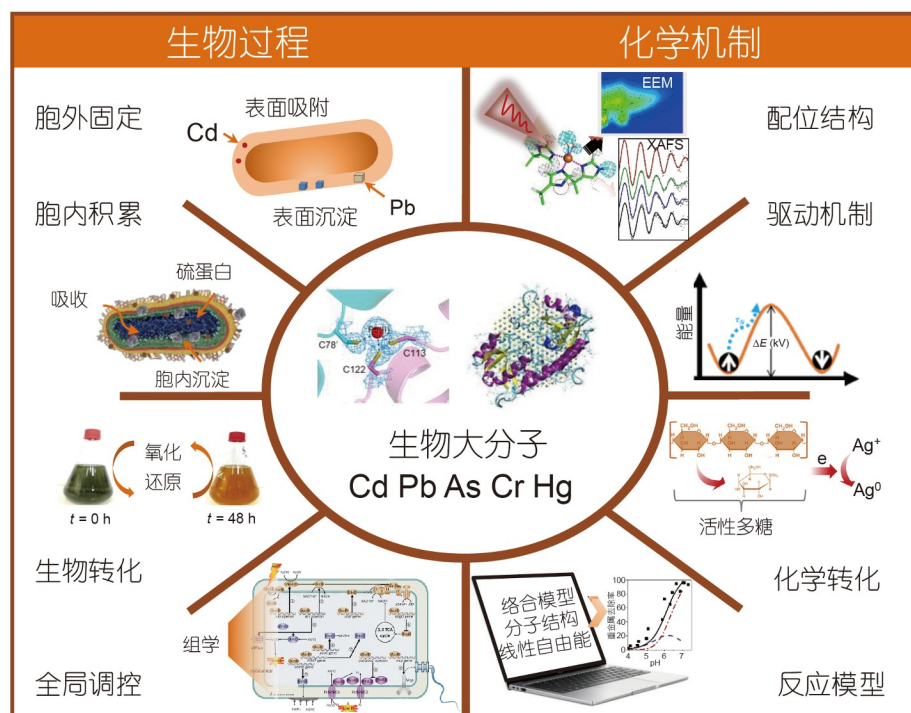


图1 生物大分子-重金属相互作用研究视角及相关技术方法

Figure 1 Research perspectives and related methods of biomacromolecules interactions with heavy metals

硫蛋白、氧化还原酶和金属离子转运蛋白等过程调控是微生物抵御重金属毒害的主要方式；同时，微生物对重金属的响应还表现出了物种特异性^[5-7]。

微生物与重金属互作的生物化学机制认识是利用微生物资源开展污染治理的前提。本文系统梳理了该领域近年来的代表性研究成果，总结重金属与生物大分子反应的配位结构和驱动机制、微生物通过合成功能蛋白质和EPS对重金属的阻控策略，以及生物大分子与微生物对变价重金属元素的转化机制。通过对不同分析技术和研究体系的比较，明确了不同研究方法的特色、优缺点和适用范围。在总结共性规律和微生物功能差异的基础上，对目前研究体系存在的问题、研究空白及未来研究方向作出展望。

1 多种谱学和显微方法解析重金属与生物大分子的配位机制

重金属与生物大分子的配位结构信息是其互作机制的核心(图2)。X射线自1895年被发现以来，为科学研究提供了丰富多样的探测和分析手段，用来解析局域结构、晶体结构、纳米尺度结构、表界面结构等。重金属元素在吸收X光过程中，吸收强度会受到元素价态

和配位环境的影响，产生X射线吸收精细结构(X-ray absorption fine structure, XAFS)。早期利用XAFS研究As₂O₃治疗急性早幼粒细胞性白血病，结果发现，As与癌蛋白锌指结构中的半胱氨酸结合，诱导蛋白质发生构象变化和多聚化，继而发生泛素蛋白修饰而被蛋白酶降解，导致癌细胞走向分化和凋亡^[12]。基于XAFS分析发现，在复杂的微生物体内，重金属的配位结构与金属类型、浓度、环境条件和微生物种类密切相关。例如，在*Burkholderia cepacia*和*Bacillus subtilis*细胞中，羧基主导了Cu(II)和Pb(II)的吸附^[13,14]。当pH低于4.4时，Cd(II)主要吸附于*B. subtilis*的磷酸基位点上，而随着pH升高，羧基的作用越来越显著^[15]。随着Pb(II)浓度的升高，*Pseudomonas putida*中巯基结合Pb(II)的比例从70.2%下降至3.3%，而与羧基和磷酸基结合的比例分别升高到39.3%和36.2%^[16]。细菌分泌的游离态EPS表现出更强的重金属结合能力，其表面活性位点浓度和重金属结合量是细菌的20~30倍；EPS主要通过单五元螯合环结构与Cu(II)发生络合^[17]。然而，常规XAFS分析难以区分原子序数接近的配位结构，例如含O或N的官能团。近年来，高分辨X射线吸收精细结构(high energy resolution fluorescence detected XAFS, HERFD-XAFS)

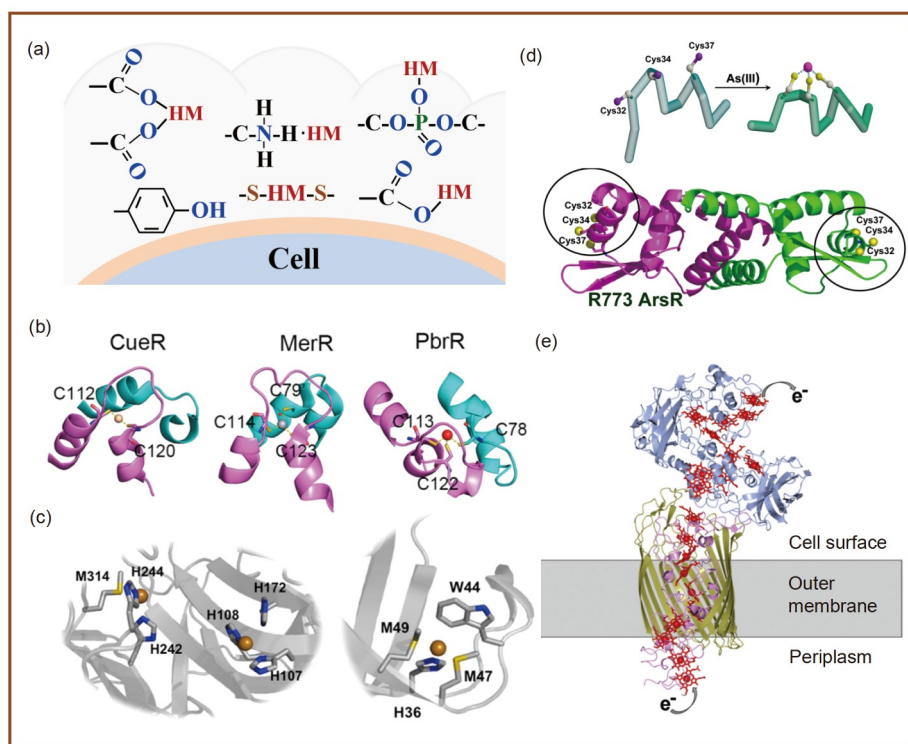


图2 生物大分子与重金属相互作用模式示意图。(a) 不同类型官能团对重金属的吸附; (b) MerR家族金属结合蛋白^[8]; (c) 肽酰甘氨酸 α 酰胺化单加氧酶和周质金属蛋白CusF中Cu离子配位结构^[9]; (d) 无机As(III)与阻遏蛋白ArsR的结合方式^[10]; (e) 电子传递外膜蛋白复合物MtrAB结构^[11]

Figure 2 Schematic diagram of biomacromolecules interactions with heavy metals. (a) Adsorption of heavy metals onto functional groups; (b) metal-binding domains of various MerR family proteins^[8]; (c) Cu binding sites in peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase and periplasmic metallochaperone CusF^[9]; (d) binding of inorganic As(III) to the ArsR repressor^[10]; (e) outer membrane electron transport protein complex MtrAB^[11]

技术克服了这一难题, 获得了更加精细的重金属配位和电子结构。例如, 高分辨X射线吸收近边分析提供了甘氨酸、半胱氨酸中Pb(II)与周围S、N、O形成多原子配位结构的信息^[18]。由于依靠近边分析就能获取配位结构, 而近边谱的采集可在较低金属浓度下实现, 这使得HERFD-XAFS具有在生理浓度下分析重金属配位结构的优势。在微摩尔浓度条件下, HERFD-XAFS可准确识别蛋白质分子和细菌细胞中Hg(II)、Cu(II)、Zn(II)等元素的配位结构^[19]。

被激发的高能态电子向内层空穴跃迁, 多余的能量以光子的形式向外辐射, 即为X射线发射过程。XES利用价-核跃迁(VtC)可以区分待测元素的近邻配位原子。Fe K β XES分析发现, 固氮酶以C作为辅酶因子的中心原子, 且中心原子的分布不受氧化态和自旋态的影响^[20]。利用共振XES研究绿藻中Pb配位结构随时间的动态变化, 结果发现Pb(II)进入胞内首先与氧化物和无机磷结合, 随后向有机磷结合态转化, 反应过程中只有少量Pb(II)与巯基结合^[21]。Cu是多种氧化还原蛋白和转

运蛋白的辅酶因子, 在这些酶分子中, Cu通过与组氨酸和蛋氨酸形成不同的配位模式, 维持了蛋白质氧化还原状态的平衡和功能发挥。XES研究发现, 由3个组氨酸或组氨酸-蛋氨酸组成的配位中心均能与Cu d^{10} 轨道杂化, 而S原子通过促进Cu的p-d轨道混合而提高了结合强度^[9]。在半乳糖氧化酶中, K $\beta_{2,5}$ 高能发射特征表明, Cu $3d_{x^2-y^2}$ 作为前线分子轨道参与了O₂的活化^[22]。随着我国新一代光源的规划建设, 未来将发展出更多、更先进的X射线谱学方法, 进一步揭示金属元素参与的生物地球化学过程与机制。

紫外、可见光可引起分子中外层电子的能级跃迁, 激发态分子通过辐射跃迁而返回基态, 产生的荧光可用三维荧光光谱仪探测(3D-EEM)。而金属离子与这些荧光组分发生作用, 促使荧光淬灭, 可作为有机分子与金属离子反应的直接证据。重金属离子可淬灭牛血清蛋白白色氨酸荧光, 淬灭强度为Cu(II) > Pb(II) > Cd(II)^[23]。同样, EEM分析表明, As趋化蛋白Mcp周质感应区可以

通过色氨酸基团特异性地结合As(III),但不与As(V)反应^[24];色氨酸基团也是*Escherichia coli*游离态EPS结合Cu(II)的主要活性位点^[25]。而来源于活性污泥的EPS可通过色氨酸、酪氨酸、胡敏酸、富里酸等不同荧光组分与Ca(II)、Hg(II)、Cu(II)结合^[26]。重金属对荧光分子的淬灭遵循Stern-Volmer方程,因此可以通过拟合荧光淬灭值,获得生物大分子不同荧光组分与重金属的亲合常数^[27]。由于EEM仅能探测生物分子中的荧光组分,很难获取重金属吸附反应的全部信息。

FTIR可以根据吸收峰位置和强度的变化定性反映重金属与不同类型有机官能团的作用。例如,细菌EPS与Cu(II)、Cd(II)、Zn(II)、Pb(II)等结合后,磷酸基、酰胺基和羧基的吸收峰发生变化,表明这些官能团参与了重金属离子的络合反应^[28]。传统FTIR存在谱峰重叠等问题,FTIR-二维相关分析(two-dimensional correlation spectroscopy, 2D-COS)可将一系列FTIR光谱在二维空间中展开并可视化,清晰展示重金属与不同类型官能团的反应顺序。2D-COS分析发现,Cu(II)首先与溶解性有机质中的羧基和多糖组分发生作用,随后腐殖质类官能团和蛋白质类物质参与了吸附,最后与氨基和脂肪族物质结合^[29]。Cd(II)与*Chlorella vulgaris* EPS中不同类型官能团的作用顺序为:羧基>羟基>酰胺I>胺基^[30]。Raman光谱对非极性键和对称分子具有较高的灵敏性,可与FTIR互补研究生物大分子-重金属作用机制^[31]。Raman分析表明,不同结构的金属硫蛋白与Zn(II)的结合方式存在差异,当分子中半胱氨酸残基和羧基含量较高时,易形成Zn-S双核团簇结构^[32]。*Burkholderia* sp. MBR-1胞外DNA可通过嘌呤和磷酸基结合Cd(II)与Ni(II),嘌呤与重金属的结合强度强于磷酸基,导致DNA结构改变^[33]。在上述谱学方法中,XAFS和XES直接探测复合物中的重金属元素,选择性和灵敏性高。而3D-EEM、FTIR和Raman光谱通过探测有机官能团的变化,间接反映重金属与生物分子的结合强度和作用方式,选择性和灵敏度较差。然而,受制于同步辐射有限的机时,XAFS和XES分析一般较难获取,荧光和分子振动光谱目前仍是研究中普遍使用的分析方法。

谱学方法获取的是重金属与生物大分子中不同类型官能团作用的平均信息。然而,对生物大分子而言,单个分子中可同时存在多种类型的官能团,位于生物大分子三维结构的不同区域;同时,重金属离子与生物大分子的相互作用,可改变分子的折叠方式和团聚结构^[34]。这些复杂的作用过程均难以用谱学方法进行捕

捉。近年来,冷冻电子显微镜(cryo-electron microscopy, Cryo-EM)已发展成为研究生物大分子三维结构及其与环境污染物的相互作用的强有力工具^[35]。利用不同原子对电子散射强度和散射角存在差异这一原理,低温环形暗场扫描透射电子显微镜(cryogenic annular dark-field scanning transmission electron microscopy, Cryo-STEM)结合单颗粒三维重构解析了蛋白质分子中金属元素的空间分布^[36]。结果表明,亚铁氧化酶中Zn(II)均匀分布在酶活性位点上,而Fe(III)则在相邻的酶活性位点之间呈弧形连续分布,发挥存储铁元素的作用。革兰氏阴性细菌利用RND(resistance-nodulation-cell division)家族外排泵系统将细胞内的有毒物质排出体外,但是这种转运蛋白与重金属离子的结合方式和工作原理仍不清楚。利用单颗粒Cryo-EM发现,*E. coli*重金属外排蛋白CusA中的3个单元可同时结合Cu(I)离子,且每个单元都能进行构象转变,独立发挥金属离子外排的作用^[37]。Cryo-EM通过准确定位金属原子在蛋白质分子中的位置,深化了对重金属-生物分子相互作用及蛋白质功能发挥的理解。上述重金属与生物大分子配位结构的认识为反应体系热力学和动力学机制的研究奠定了基础。

2 重金属与生物大分子结合的驱动机制及热力学、动力学模型

谱学和显微技术可以明晰重金属与生物大分子的作用方式,但是无法揭示相互作用的驱动机制和传质过程。重金属与生物大分子反应的热力学信息,如焓变、熵变、自由能等,可以指示两物质间的作用强度和驱动机制。等温滴定微量热技术(isothermal titration calorimetry, ITC)可以直接测定重金属吸附反应热量,结合模型计算可进一步获得反应的热力学参数。例如,热量分析表明,金属硫蛋白-3对Zn(II)和Pb(II)的吸附是吸热过程,同时伴随着熵值增大,表明蛋白质中的半胱氨酸残基与重金属结合时发生了质子和水分子的解离^[38]。牛血清蛋白对Zn(II)和Cd(II)的吸附主要受焓变驱动,Ca(II)和Fe(III)离子则通过静电作用和竞争结合位点阻碍重金属离子的吸附^[39]。Cu(II)与活性污泥EPS结合为焓熵共驱动过程,其焓变和熵变分别为-11.3 kJ/mol和64.3 J/(mol K)^[27]。分离自*B. subtilis*的游离态EPS通过熵增驱动Cu(II)吸附,焓变和熵变分别为55.57 kJ/mol和270.61 J/(mol K)^[17]。反应熵值越大,表明吸附导致水分子释放越多,金属离子与生物大分子

可能发生了内圈络合作用。不同类型细菌与重金属吸附热量的结果表明, Cu(II)在*B. thuringiensis*、*P. putida*、*Nitrosomonas europaea*等多种细菌上吸附均为吸热过程, 反应熵变在49.27~187 J/(mol K)之间^[40,41]。同样, *P. putida*和*B. subtilis*对Cd(II)的吸附为吸热过程, 反应主要受熵增驱动, 熵变在94.4~128.6 J/(mol K)之间^[42,43]。然而, Pb(II)与*Serratia* Se1998、*P. putida*的吸附为焓熵共驱动, 焓变在-2.1~-9.4 kJ/mol, 熵变在32.6~81.52 J/(mol K)之间^[44-46]。与标准化合物滴定热量对比, 可以推测Pb(II)主要与*P. putida*表面磷酸二酯键和羧基发生单齿络合, 可能通过多官能团羧酸形成双齿配位结构与*B. subtilis* EPS结合^[16]。综上所述, 不同类型重金属离子与细菌的反应热力学驱动机制不同, 而同一重金属离子与不同类型细菌及生物大分子反应的热力学驱动机制趋同。然而, ITC获取的是重金属离子与生物大分子中各种活性位点反应的平均热量, 不同位点与重金属反应的特异性热力学机制还有待进一步研究。

表面络合模型(surface complexation model, SCM)以热力学和表面配位理论为基础, 考察活性位点与重金属结合的化学计量数、电荷相互作用、位点异质性等, 实现对吸附过程的定量模拟和预测^[47]。早期模型研究发现, 细菌表面存在3~5个离散型的质子结合位点, 分别对应羧基、磷酸基、羟基、巯基、氨基等官能团, 这一模型可准确模拟细菌表面的质子化和重金属吸附反应^[48]。例如, 包含羧基、磷酸基、氨基3类位点的模型可准确模拟*S. oneidensis* MR-1对Zn(II)和Pb(II)的吸附反应; 模型计算发现EPS缺失的细菌有更多的磷酸基参与了重金属的吸附^[49]。厌氧生物反应器中EPS存在解离常数为4.6、6.6和9.7的3类位点, 弱酸性位点主要分布在分子量较小的有机分子中^[50]。对于不同类型细菌, 模型计算表明, 羧基和磷酸基对Cd(II)和Pb(II)吸附的相对贡献最大, 模拟结果也得到XAFS和ITC数据的验证^[42,45]。这些模型均通过酸碱滴定反应获得活性位点的数量和解离常数, 并假设活性位点与重金属离子按照1:1化学计量比结合, 进而模拟生物分子对重金属离子的吸附作用。然而, 现有模型模拟的位点数量、分布及其与重金属离子的结合方式是复杂反应体系中不同类型位点的平均信息。近年来, 随着傅里叶离子回旋共振质谱等有机质分析技术的进步, 逐渐发展出不同类型有机分子与重金属特异性作用的模型。根据质谱获取的有机质原子组成信息, 结合土壤有机质结构建模

(Vienna Soil-Organic-Matter-Modeler, VSOMM)、化学反应特性推导(SPARC performs automated reasoning in chemistry, SPARC)和线性自由能关系(linear free energy relationships, LFER)等理论, 建立了富里酸中模式分子与Cu(II)作用的位点特异性络合模型, 为复杂生物环境模型构建提供了新方法^[51]。此外, 越来越多的XAFS证据表明, 双齿、三齿等重金属配位模式在环境中也较为常见, 相关的SCM也逐渐建立^[52]。对于生物大分子, 目前建立的模型大部分都是单齿络合形式, 较少考察重金属离子与芳香结构等非质子位点的反应, 以及与S、C、N等不同元素形成的多齿配位结构。

重金属离子在生物大分子上的吸附本质上是一个传质过程。利用动力学模型拟合吸附数据, 可以获得反应速率常数并推导传质机制, 对理解反应过程和设计吸附反应体系至关重要^[53]。研究发现, Cu(II)、Zn(II)、Pb(II)等离子在污泥EPS上的吸附可分为快速和慢速两个阶段, 快速反应在15 min以内完成, 慢反应在2~3 h内达到平衡^[26,54]。利用动力学模型对吸附数据进行拟合, 发现吸附过程更加符合准二级动力学方程, 表明生物分子对重金属的吸附以化学作用为主。EPS还会影响细菌细胞对重金属的吸附速率, 去除EPS降低了*B. subtilis*和*C. vulgaris*对Cd(II)的吸附速率, 而显著提高了*B. subtilis*对Pb(II)的吸附速率^[30,55]。细菌存活状态也会影响重金属离子吸附的动力学过程, 死亡*Bacillus cereus*细胞对Cd(II)的吸附速率和吸附量均大于活细胞^[56]。在环境中, EPS黏附也改变了矿物对重金属的吸附, 显著提高了皂石对Pb(II)、Cu(II)、Zn(II)等离子的吸附速率, 而对水铁矿的影响较小^[57]。相比于热力学研究, 生物大分子与重金属作用的动力学过程分析较少, 尤其是重金属固定转化的动态过程与微生物生理调控的耦合机制尚不明确。

3 胞外聚合物分子组成及微生物对重金属的阻控策略

在自然环境中, 微生物可通过胞外和胞内不同类型的生物大分子与重金属离子发生反应。其中微生物EPS组成复杂, 含有蛋白质、多糖、核酸、脂类以及腐殖酸等多种类型有机分子, 是微生物应对环境胁迫的第一道屏障(表1)。近年来, 利用光谱、波谱和质谱等多种分析技术, 逐渐认识到EPS分子组成的复杂性、异质性和多变性^[71]。X射线吸收光谱分析表明, *B. subtilis*游离态EPS中含有丰富的芳香碳和酰胺碳, 硫以巯基为

表 1 微生物对重金属吸附、抗性和转化相关功能基因^{a)}

Table 1 Functional genes related to heavy metal adsorption, resistance and transformation in microorganisms

	基因或基因簇	产物及功能	重金属	微生物	参考文献
表面吸附	<i>eps_</i>	胞外多糖聚合、转运	—	多物种	[58]
	<i>wz_ kps</i>	胞外多糖聚合、转运	—	<i>E. coli</i> 等	[59,60]
	ABC transporter	EPS转运	—	多物种	[61]
	PEP-CTERM	形成网状胞外多聚物	—	多物种	[62]
吸附蛋白	<i>smtA cadB cadD</i>	金属硫蛋白	Cd等	多物种	[7]
	<i>cusF</i>	质周间隙Cu固定	Cu	<i>E. coli</i>	[63]
	<i>pbrR</i>	金属调节蛋白	Pb	<i>C. metallidurans</i>	[8]
	Flagellin	鞭毛蛋白	Pb	<i>Serratia</i> Se1998	[64]
氧化还原	<i>cueO</i>	多铜氧化酶	Cu(I)	<i>E. coli</i>	[65]
	<i>hydA</i>	NADH脱氢酶	Cu(II)	<i>E. coli</i>	[66]
	<i>aio_ arx_</i>	As(III)结合及氧化	As(III)	多物种	[67]
	<i>nema</i>	有机砷氧化	MAsIII	<i>Enterobacter</i> sp.	[68]
	<i>arsH</i>	有机砷、锑氧化酶	MAs(III)、PhAs(III)、Sb(III)	<i>P. putida</i>	[69]
	<i>arr</i>	异化砷还原酶	As(V)、Sb(V)	多物种	[67]
	<i>arsC</i>	砷酸盐还原酶	As(V)	多物种	[67]
	<i>mer</i>	Hg还原酶	Hg(II)、CH ₃ Hg	多物种	[70]

a) “—”表示无特异的重金属离子

主, 约35%的磷为有机磷酸; 而结合态EPS中酰胺碳的含量较低, 硫以磺酸根的形式存在^[16]。EPS中的糖类具有极高的化学多样性和可变性, Raman光谱结合质谱分析表明, *P. aeruginosa*生物膜EPS由糖脂、鼠李糖脂、多糖和蛋白质组成, 其中鼠李糖脂存在多种类型的分子结构^[72]。结合分子生物学及光谱、色谱、质谱等分析方法, 发现透明质酸、硫酸化黏多糖、唾液酸类有机高分子是氨氧化和好氧活性污泥EPS的重要组成部分^[73,74]。此外, EPS中含有大量的DNA、酶和结构蛋白质。蛋白质组学分析结果表明, *Shewanella* sp. HRCR-1生物膜EPS中包含膜蛋白BpfA、丝氨酸蛋白酶、核苷酸酶、脂肪酶、寡肽酶和多种氧化还原蛋白^[75]。这些大分子维持了生物膜结构的稳定性, 其中胞外DNA、淀粉样蛋白TasA和疏水性蛋白在*B. subtilis*细胞聚集和生物膜形成过程中起着重要作用^[76,77]。同时, 它们通过自组装或其他多糖和菌毛结合, 形成有机复合物, 进一步提高生物膜的机械稳定性。例如, 在氨氧化活性污泥中, 质谱分析鉴定出以异构O-聚糖结构为主的糖蛋白物质^[78]。目前对于EPS中不同类型有机分子结构的认识还比较欠缺, 生物膜中有机大分子的分布和功能尚未明确。

为了应对不利环境, 细菌发展出了一套EPS分泌、

分子组成调控以及生物膜形成的主动防御策略^[79]。早期的研究发现, EPS通过羧基和磷酸基团的络合作用增强细菌(如*P. putida*、*B. subtilis*)对重金属的结合能力^[80]。多种重金属离子均可促使微生物启动防御系统, 通过调控EPS组成和含量来应对有害物质。基于分子生物学技术, 发现低浓度Cd(II)、Cr(VI)和Cu(II)可刺激*Cupriavidus pauculus*和*Bacillus* spp. EPS合成基因*epsB*、*epsP*和*Wzz*表达的上调。FTIR和EEM分析进一步证实了EPS的积累, 其中蛋白质组分在重金属阻控中起着重要作用^[81,82]。随Pb(II)浓度升高, *Rhodotorula mucilaginosa* EPS中的蛋白质和谷胱甘肽类物质不断增加, 而多糖类物质只有在Pb(II)浓度高于1500 mg/L时才发挥重金属固定功能^[83]。FTIR分析发现, 羟基、羧基、羰基等多种官能团参与了*B. cereus* EPS对重金属的络合作用; 不同类型重金属离子对细菌分泌EPS的刺激作用存在差异, 作用强度顺序为Pb(II) > Cu(II) > Cd(II)^[84]。尽管微生物对重金属响应表现出了离子类型和物种特异性, EPS的合成和分泌是微生物抵御重金属胁迫的普遍机制。

4 结合重金属的微生物专性蛋白质

EPS的分泌是微生物应对不利环境的普适性机制,

而微生物在应对重金属胁迫过程中,也进化出具备重金属固定和解毒功能的特殊蛋白质类物质。细菌体内和胞外多种蛋白质分子,例如金属硫蛋白、鞭毛蛋白、淀粉样蛋白等发挥着重要的重金属固定功能(表1)。金属硫蛋白广泛存在于*Synechococcus*、*Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Anabaena*等多种类型微生物中,其分子量在3.5~14 kD,分子中半胱氨酸占总氨基酸含量的23%~33%^[85]。研究发现,*P. aeruginosa* WI-1中**bmtA**基因编码的金属硫蛋白分子量为11 kD,可促进细胞积累Pb(II)^[86]。不同类型微生物中金属硫蛋白的分子结构及其对重金属离子的结合能力存在显著差异。对ArsR-SmtB家族基因组的分析发现,不同类群细菌和古菌的金属硫蛋白分子量差异较大,且分子量与重金属离子结合量呈线性关系^[87]。*Pseudomonas*中90%的金属硫蛋白具备YCCxxC中心序列,结构中3个半胱氨酸残基可增强重金属的配位能力,利于微生物调控重金属离子在胞内的固定及转移^[88]。核磁共振分析发现,来源于*P. fluorescens*的金属硫蛋白PflQ2含有1个无序的C-末端,同时包含4个组氨酸残基,增强了蛋白质结构的稳定性^[89]。此外,在*Serratia* Se1998中发现了一种对Pb有高亲和力的鞭毛蛋白,1个蛋白质分子可结合16个Pb(II)离子^[64]。*Cupriavidus metallidurans* CH34可产生一种专性吸附蛋白PbrR,通过3个保守的半胱氨酸与Pb(II)配位,形成稳定的三角锥形结构^[8]。

巯基是蛋白质分子与重金属离子结合的关键基团,通常它们与重金属离子的结合常数比非巯基位点高一个数量级以上。细菌中巯基含量受养分调控,增加葡萄糖浓度可以促进*Bacillus*属细菌产生更多巯基,从而增加对Hg(II)、Cd(II)和Au(III)的吸附^[90]。电位滴定结合模型计算发现,细菌表面巯基含量在16.6~33.1 $\mu\text{mol/g}$ ^[91]。蛋白质组学技术从微生物硫代谢通路等角度,揭示了重金属固定蛋白质和多肽生物合成的调控机制。例如,*Penicillium oxalicum*在Pb(II)胁迫下,海藻糖通路被激活,结合类、抗氧化类及DNA损伤修复等相关蛋白质上调,同时促进胞内半胱氨酸合成酶及谷胱甘肽硫转移酶的表达^[92]。Cd(II)胁迫提高了*Burkholderia cepacia* ATP合成酶、金属离子外排系统和蛋白质分泌系统的表达,同时增强了谷胱甘肽硫转移酶的表达,促进了谷胱甘肽的生物合成^[93]。*Idiomarina* sp. OT37-5b可通过半胱氨酸的合成阻止Cd(II)向胞内转移^[94]。目前,对重金属固定功能蛋白质结构、功能和生理调控过程的认识还比较浅显,它们参与的重金属解毒过程,尤其是在

变价重金属元素转化过程中的作用还有待被深入研究。

5 生物大分子及微生物对变价重金属元素的转化机制

除了上述Pb(II)、Cd(II)、Zn(II)等非变价元素,环境中还存在As、Cr、Cu、Ag等多种变价(类)金属元素,广泛参与生物氧化还原过程(表2)。微生物胞内生物分子和胞外EPS中含有还原能力强的结构和组分,具备半导电特性,可介导金属离子的胞外还原(图2)。EPS可将Au(III)和Ag(I)等高价态金属阳离子还原为低价态或零价纳米金属颗粒。基于FTIR分析发现,EPS中还原性糖参与了反应,糖分子中的醛基被氧化成了羧基^[95,96]。*Shewanella oneidensis* MR-1 EPS还原Cr(VI)的研究发现,黄素和细胞色素c是参与还原反应的主要物质;动力学结果表明,细胞色素c对Cr(VI)还原的相对贡献高于黄素^[97]。此外,不同来源EPS均可通过还原性糖和醌类物质参与As(V)的还原,表明EPS可通过胞外非酶促途径还原As(V),且这一过程在不同来源EPS中具有普适性^[98]。来源于*Synechocystis* sp. PCC6803的EPS对As(V)的还原能力强于对As(III)的氧化,EPS中蛋白质和腐殖质等组分,以及羧基、氨基、羟基等官能团可能参与了反应^[99]。Cu作为许多金属蛋白的氧化还原中心,在生物系统中作为辅酶因子参与了多种类型的催化反应,过量的Cu也会造成细胞毒害。金属硫蛋白-3可将Cu(II)还原成Cu(I),在这一过程中,首先由蛋白质中的半胱氨酸残基还原Cu(II),产生二硫自由基阴离子,最终形成氧化还原惰性的Cu(I)₄-Cys_{5,6}团簇结构^[103]。还原态EPS具有更高的电子传递效率,对Cu(II)还原速率比原始EPS快10倍;还原过程中,*S. oneidensis* MR-1 EPS中80%的电子由细胞色素c提供,远高于*B. subtilis* EPS和*S. cerevisiae* EPS中细胞色素c的贡献^[101]。在复杂的生物体系中,微生物可通过生理调控,同时利用EPS中的活性组分和还原性酶促进Cu(II)还原成Cu(I)和Cu(0)^[102]。相较于重金属离子的吸附过程,微生物EPS作为电子供体和受体对污染物氧化还原作用的研究还较少,相关研究方法与作用原理值得深入探讨。

不同价态元素的移动性、化学能和生物毒性存在显著差异。为了利用金属离子中储存的能量或降低细胞毒害作用,微生物发展出一套精密的生物氧化或还原调控策略。*S. oneidensis* MR-1对Ag(I)的还原速率较高,而*cymA*和*mtrA*缺失菌株的还原速率则较低,表明外膜细胞色素c参与了Ag(I)的还原,还原过程中醇羟基被

表 2 参与重(类)金属氧化还原的生物分子及官能团

Table 2 Biomolecules and functional groups for the redox of heavy metals

生物大分子	元素及价态	反应产物	生物大分子功能组分	参考文献
<i>E. coli</i> EPS	Ag(I)、Au(III)	Ag(0) Au(0)	半缩醛基	[95,96]
<i>S. oneidensis</i> EPS	Cr(VI)	Cr(III)	黄素、细胞色素 c	[97]
生物膜EPS	As(V)	As(III)	还原性糖、醌类	[98]
<i>Synechocystis</i> spp. EPS	As(V) As(III)	As(III) As(V)	蛋白质、腐殖酸、羧基、氨基、羟基	[99]
膜生物反应器	V(V)	V(IV)	半缩醛基	[100]
EPS及还原态EPS	Cu(II)	Cu(I)	细胞色素 c 、酚类、酰胺	[101]
<i>Bacillus</i> spp.	Cu(II)	Cu(0)	还原酶、转运酶	[102]
金属硫蛋白-3	Cu(II)	Cu(I)	半胱氨酸残基、二硫自由基	[103]

氧化成羧基^[104]。对于不同类型的HgS纳米颗粒,它们与硫酸盐还原菌*Desulfovibrio desulfuricans* ND132的亲合力受矿物晶面性质控制; HgS(111)晶面与Hg转运蛋白的亲合力最强,促进细胞对Hg的吸收并转化形成甲基汞^[105]。在*Pannonibacter phragmitetus* BB中, Cr(VI)还原和转运蛋白的表达受重金属浓度调控;在生物还原过程中,超氧化物歧化酶主导了细胞蛋白质之间的相互作用^[106]。As是一种广泛存在于自然界中的类金属元素,微生物主导了环境中As的迁移转化行为^[107]。微生物可以通过异化砷还原和细胞质砷还原两种机制还原As(V),从而提高As的移动性,减少胞内积累。在磷匮乏的情况下, *Agrobacterium tumefaciens* GW4可通过调控能量流和代谢通路,利用As(V)合成多种磷脂类物质^[108]。

微生物介导的砷氧化能够将高毒性的As(III)氧化为毒性和迁移性较低的As(V),同时一些As(III)氧化细菌还可以利用氧化产生的能量维持其自身生长。砷氧化细菌通过特异性三组分调控系统AioXSR识别As(III)信号,其中AioX为细胞周质As(III)识别受体蛋白,在感受到外界砷信号后使下游组氨酸激酶AioS的His273发生磷酸化,磷酸化的AioR可以与砷氧化基因簇启动子区结合,从而激活砷氧化酶AioBA的表达,提高细菌砷氧化能力^[109]。转录组学和蛋白质组学分析发现, As(III)氧化组氨酸激酶AioS参与了砷氧化菌的砷、磷酸盐、碳水化合物、铁等的代谢;砷氧化调控蛋白AioR能够调控砷趋化、砷抗性、TCA循环、细胞壁/膜和氨基酸代谢等^[110,111]。色氨酸荧光光谱及凝胶迁移率实验表明, *Enterobacter* sp. Z1可以参与有机砷的氧化,调控蛋白NemR能够通过21、106和116位半胱氨酸结合有机

As(III),进而调控NemA编码基因的转录表达和有机砷氧化^[68]。环境中As代谢与其他生物地球化学过程存在密切的耦合关系。例如,湿地土壤中As的氧化还原与甲烷氧化、化能无机自养固碳过程密切偶联^[112]。As(V)的还原与甲烷氧化之间的计量比为4:1,这一耦合过程贡献了土壤中As溶解释放量的26%~49%^[113]。

6 展望

环境微生物是开展重金属污染生物修复的宝贵资源。随着一系列谱学、组学技术的广泛应用,重金属固定转化的生物与化学机制、生理调控策略等相关研究逐渐深入。然而,目前针对单一重金属与生物大分子作用的研究较多,复合污染及其耦合的养分元素转化机制的研究较少。重金属配位机制的研究多处于官能团水平,参与反应的相关生物大分子结构、功能及其与重金属的作用机制认识不足^[114]。在微生物类群方面,以浮游单物种微生物为主,针对自然环境生物膜的研究较少,生物膜中不同类型微生物协同应对重金属胁迫的机制尚不清楚。针对上述问题,需要进一步加强以下几个方面的研究: (1) 加强胞内、胞外生物大分子结构和组成解析的相关研究。对生物大分子结构和组成的认识是进一步开展其与重金属相互作用的基础。因此,需要发展EPS纯化、质谱分析等新技术与新方法,准确认识EPS、胞内功能生物大分子的分布、结构和组成^[115]。应用结构生物学和分子动力学模拟等方法,在单分子水平上理解生物大分子的功能特点及其与重金属离子络合和氧化还原的反应机制。在结构和功能研究的基础上,开发针对特定重金属污染治理的高效

微生物制剂。(2) 推进复合污染及重金属复合物与生物大分子作用的研究。例如, 近年来发现环境中的As以巯基结合态砷为主^[116], 而对于这些有机络合态重金属与生物大分子的作用机制却知之甚少。应综合应用多种谱学方法, 加强不同类型金属离子的竞争与协同吸附作用研究, 考察不同重金属离子与碳、氮、硫等生源要素之间的耦合关系。在机理认识的基础上, 建立符合生物体系重金属反应的定量计算模型。(3) 开展复合菌群及多物种生物膜与重金属作用机制的研究。环境中微生物多以复合生物膜的形式存在, 与浮游状态微生物相比, 生物膜在EPS组成、表面特性、生理代谢等方面存在显著差异^[117]。应加强生物膜与重金属相互作用

生物化学机制的研究, 揭示多物种生物膜协同固定转化重金属的分子机制, 查明调控重金属形态转化的关键微生物类群。在重金属污染修复中, 构建重金属阻控的复合菌群, 利用多物种生物膜提高污水处理及农业系统中重金属污染治理效果。(4) 加强谱学与组学技术联用, 明确重金属固定转化的微生物生理调控过程及功能基因。现有重金属-生物大分子作用的研究多从单一的化学或生物学角度出发, 导致无法将反应的化学机制与生理调控过程建立关联, 无法全面理解相互作用的生物化学机制。未来应重视化学与生物学领域的合作, 协同创新, 共同推进重金属生物地球化学反应机制与应用研究。

参考文献

- Chandrangsu P, Rensing C, Helmann J D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15: 338–350
- Cai P, Sun X, Wu Y, et al. Soil biofilms: Microbial interactions, challenges, and advanced techniques for *ex-situ* characterization. *Soil Ecol Lett*, 2019, 1: 85–93
- Qu C C, Ren W Y, Li X X, et al. Revisit soil organic matter (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2022, 67: 913–923 [渠晨晨, 任稳燕, 李秀秀, 等. 重新认识土壤有机质. *科学通报*, 2022, 67: 913–923]
- Manzoni C, Kia D A, Vandrovcova J, et al. Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief Bioinform*, 2018, 19: 286–302
- Das S, Dash H R, Chakraborty J. Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100: 2967–2984
- Lemire J A, Harrison J J, Turner R J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11: 371–384
- Mathivanan K, Chandirika J U, Vinothkanna A, et al. Bacterial adaptive strategies to cope with metal toxicity in the contaminated environment—A review. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 226: 112863
- Huang S, Liu X, Wang D, et al. Structural basis for the selective Pb(II) recognition of metalloregulatory protein PbrR691. *Inorg Chem*, 2016, 55: 12516–12519
- Martin-Diaconescu V, Chacón K N, Delgado-Jaime M U, et al. K β valence to core X-ray emission studies of Cu(I) binding proteins with mixed methionine—Histidine coordination. Relevance to the reactivity of the M- and H-sites of peptidylglycine monooxygenase. *Inorg Chem*, 2016, 55: 3431–3439
- Shen S, Li X F, Cullen W R, et al. Arsenic binding to proteins. *Chem Rev*, 2013, 113: 7769–7792
- Edwards M J, White G F, Butt J N, et al. The crystal structure of a biological insulated transmembrane molecular wire. *Cell*, 2020, 181: 665–673
- Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science*, 2010, 328: 240–243
- Moon E M, Peacock C L. Adsorption of Cu(II) to *Bacillus subtilis*: A pH-dependent EXAFS and thermodynamic modelling study. *Geochim Cosmochim Acta*, 2011, 75: 6705–6719
- Templeton A S, Trainor T P, Spormann A M, et al. Sorption versus biomineralization of Pb(II) within *Burkholderia cepacia* biofilms. *Environ Sci Technol*, 2003, 37: 300–307
- Boyanov M I, Kelly S D, Kemner K M, et al. Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim Cosmochim Acta*, 2003, 67: 3299–3311
- Qu C, Yang S, Mortimer M, et al. Functional group diversity for the adsorption of lead (Pb) to bacterial cells and extracellular polymeric substances. *Environ Pollut*, 2022, 295: 118651
- Fang L, Yang S, Huang Q, et al. Biosorption mechanisms of Cu(II) by extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Chem Geol*, 2014, 386: 143–151

- 18 Swarbrick J C, Skjellberg U, Karlsson T, et al. High energy resolution X-ray absorption spectroscopy of environmentally relevant Lead(II) compounds. *Inorg Chem*, 2009, 48: 10748–10756
- 19 Manceau A, Nagy K L, Glatzel P, et al. Acute toxicity of divalent mercury to bacteria explained by the formation of dicysteinate and tetracysteinate complexes bound to proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Environ Sci Technol*, 2021, 55: 3612–3623
- 20 Lancaster K M, Roemelt M, Ettenhuber P, et al. X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Science*, 2011, 334: 974–977
- 21 Stewart T J, Szlachetko J, Sigg L, et al. Tracking the temporal dynamics of intracellular lead speciation in a green alga. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 11176–11181
- 22 Lim H, Baker M L, Cowley R E, et al. K β X-ray emission spectroscopy as a probe of Cu(I) sites: Application to the Cu(I) site in preprocessed galactose oxidase. *Inorg Chem*, 2020, 59: 16567–16581
- 23 Plotnikova O A, Mel'nikov A G, Mel'nikov G V, et al. Quenching of tryptophan fluorescence of bovine serum albumin under the effect of ions of heavy metals. *Opt Spectrosc*, 2016, 120: 65–69
- 24 Shi K, Fan X, Qiao Z, et al. Arsenite oxidation regulator AioR regulates bacterial chemotaxis towards arsenite in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. *Sci Rep*, 2017, 7: 43252
- 25 Shou W, Kang F, Lu J. Nature and value of freely dissolved EPS ecosystem services: Insight into molecular coupling mechanisms for regulating metal toxicity. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 457–466
- 26 Huang L, Li M, Si G, et al. Assessment of microbial products in the biosorption process of Cu(II) onto aerobic granular sludge: Extracellular polymeric substances contribution and soluble microbial products release. *J Colloid Interface Sci*, 2018, 527: 87–94
- 27 Sheng G P, Xu J, Luo H W, et al. Thermodynamic analysis on the binding of heavy metals onto extracellular polymeric substances (EPS) of activated sludge. *Water Res*, 2013, 47: 607–614
- 28 Li W W, Yu H Q. Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresour Technol*, 2014, 160: 15–23
- 29 Chen W, Habibul N, Liu X Y, et al. FTIR and synchronous fluorescence heterospectral two-dimensional correlation analyses on the binding characteristics of copper onto dissolved organic matter. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 2052–2058
- 30 Xie Q, Liu N, Lin D, et al. The complexation with proteins in extracellular polymeric substances alleviates the toxicity of Cd(II) to *Chlorella vulgaris*. *Environ Pollut*, 2020, 263: 114102
- 31 Torreggiani A, Tinti A. Raman spectroscopy a promising technique for investigations of metallothioneins. *Metallomics*, 2010, 2: 246–260
- 32 Tomas M, Tinti A, Bofill R, et al. Comparative Raman study of four plant metallothionein isoforms: Insights into their Zn(II) clusters and protein conformations. *J Inorg Biochem*, 2016, 156: 55–63
- 33 Peng T, Liao W, Gu G, et al. Insights into the role of extracellular DNA in heavy metal adsorption. *Sci Total Environ*, 2022, 808: 152067
- 34 Tamás M J, Sharma S K, Ibstedt S, et al. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, 2014, 4: 252–267
- 35 Cheng Y. Single-particle cryo-EM—How did it get here and where will it go. *Science*, 2018, 361: 876–880
- 36 Elad N, Bellapadrona G, Houben L, et al. Detection of isolated protein-bound metal ions by single-particle cryo-STEM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 11139–11144
- 37 Moseng M A, Lyu M, Pipatpolkai T, et al. Cryo-EM structures of CusA reveal a mechanism of metal-ion export. *mBio*, 2021, 12: e00452-21
- 38 Carpenter M C, Shami Shah A, DeSilva S, et al. Thermodynamics of Pb(II) and Zn(II) binding to MT-3, a neurologically important metallothionein. *Metallomics*, 2016, 8: 605–617
- 39 Yan P, Xia J S, Chen Y P, et al. Thermodynamics of binding interactions between extracellular polymeric substances and heavy metals by isothermal titration microcalorimetry. *Bioresour Technol*, 2017, 232: 354–363
- 40 Gorman-Lewis D, Martens-Habbena W, Stahl D A. Cu(II) adsorption onto ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *Geochim Cosmochim Acta*, 2019, 255: 127–143
- 41 Fang L, Cai P, Li P, et al. Microcalorimetric and potentiometric titration studies on the adsorption of copper by *P. putida* and *B. thuringiensis* and their composites with minerals. *J Hazard Mater*, 2010, 181: 1031–1038
- 42 Qu C C, Chen W L, Fein J B, et al. The role of interfacial reactions in controlling the distribution of Cd within goethite-humic acid-bacteria composites. *J Hazard Mater*, 2020, 405: 124081
- 43 Du H, Qu C C, Liu J, et al. Molecular investigation on the binding of Cd(II) by the binary mixtures of montmorillonite with two bacterial species. *Environ Pollut*, 2017, 229: 871–878
- 44 Chen H, Xu J, Tan W, et al. Lead binding to wild metal-resistant bacteria analyzed by ITC and XAFS spectroscopy. *Environ Pollut*, 2019, 250: 118–126
- 45 Qu C, Du H, Ma M, et al. Pb sorption on montmorillonite-bacteria composites: A combination study by XAFS, ITC and SCM. *Chemosphere*, 2018, 200: 427–436

- 46 Du H, Qu C, Ma M, et al. Insights into Pb(II) binding by Fe/Al hydroxide-microbe composite: XAFS spectroscopy and isothermal titration calorimetry study. *Chem Geol*, 2019, 510: 84–90
- 47 Qu C, Chen W, Hu X, et al. Heavy metal behaviour at mineral-organo interfaces: Mechanisms, modelling and influence factors. *Environ Int*, 2019, 131: 104995
- 48 Borrok D, Fein J B, Kulpa C F. Proton and Cd adsorption onto natural bacterial consortia: Testing universal adsorption behavior. *Geochim Cosmochim Acta*, 2004, 68: 3231–3238
- 49 Ha J, Gélalbert A, Spormann A M, et al. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochim Cosmochim Acta*, 2010, 74: 1–15
- 50 Liu Y, Chang S, Defersha F M. Characterization of the proton binding sites of extracellular polymeric substances in an anaerobic membrane bioreactor. *Water Res*, 2015, 78: 133–143
- 51 Wang P, Ding Y, Liang Y, et al. Linking molecular composition to proton and copper binding ability of fulvic acid: A theoretical modeling approach based on FT-ICR-MS analysis. *Geochim Cosmochim Acta*, 2021, 312: 279–298
- 52 Wang Z, Giammar D E. Mass action expressions for bidentate adsorption in surface complexation modeling: Theory and practice. *Environ Sci Technol*, 2013, 47: 3982–3996
- 53 Wang J, Guo X. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. *J Hazard Mater*, 2020, 390: 122156
- 54 Wei D, Li M, Wang X, et al. Extracellular polymeric substances for Zn(II) binding during its sorption process onto aerobic granular sludge. *J Hazard Mater*, 2016, 301: 407–415
- 55 Zhang P, Chen Y P, Peng M W, et al. Extracellular polymeric substances dependence of surface interactions of *Bacillus subtilis* with Cd^{2+} and Pb^{2+} : An investigation combined with surface plasmon resonance and infrared spectra. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2017, 154: 357–364
- 56 Huang F, Dang Z, Guo C L, et al. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2013, 107: 11–18
- 57 Mikutta R, Baumgärtner A, Schippers A, et al. Extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis* associated with minerals modify the extent and rate of heavy metal sorption. *Environ Sci Technol*, 2012, 46: 3866–3873
- 58 Yoshida T, Ayabe Y, Yasunaga M, et al. Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylophilic *Methylobacillus* sp. strain 12S. *Microbiology*, 2003, 149: 431–444
- 59 Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 39–68
- 60 Pereira S B, Santos M, Leite J P, et al. The role of the tyrosine kinase Wzc (Slr0923) and the phosphatase Wzb (Slr0328) in the production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Synechocystis* PCC 6803. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8: e00753
- 61 Pereira S B, Mota R, Vieira C P, et al. Phylum-wide analysis of genes/proteins related to the last steps of assembly and export of extracellular polymeric substances (EPS) in cyanobacteria. *Sci Rep*, 2015, 5: 14835
- 62 Haft D H, Paulsen I T, Ward N, et al. Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: The PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol*, 2006, 4: 29
- 63 Yu P, Yuan J, Deng X, et al. Subcellular targeting of bacterial CusF enhances Cu accumulation and alters root to shoot Cu translocation in arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 1568–1581
- 64 Chen B, Fang L, Yan X, et al. A unique Pb-binding flagellin as an effective remediation tool for Pb contamination in aquatic environment. *J Hazard Mater*, 2019, 363: 34–40
- 65 Djoko K Y, Chong L X, Wedd A G, et al. Reaction mechanisms of the multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli* support its functional role as a cuprous oxidase. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 2005–2015
- 66 Volentini S I, Farias R N, Rodríguez-Montelongo L, et al. Cu(II)-reduction by *Escherichia coli* cells is dependent on respiratory chain components. *Biometals*, 2011, 24: 827–835
- 67 Zhu Y G, Xue X M, Kappler A, et al. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: Lessons from Arsenic. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 7326–7339
- 68 Shi K, Radhakrishnan M, Dai X, et al. NemA catalyzes trivalent organoarsenical oxidation and is regulated by the trivalent organoarsenical-selective transcriptional repressor NemR. *Environ Sci Technol*, 2021, 55: 6485–6494
- 69 Chen J, Bhattacharjee H, Rosen B P. ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol Microbiol*, 2015, 96: 1042–1052
- 70 Silver S, Phung L T. A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005, 32: 587–605
- 71 Yu H Q. Molecular insights into extracellular polymeric substances in activated sludge. *Environ Sci Technol*, 2020, 54: 7742–7750
- 72 Masyuko R N, Lanni E J, Driscoll C M, et al. Spatial organization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms probed by combined matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry and confocal Raman microscopy. *Analyst*, 2014, 139: 5700–5708

- 73 Boleij M, Kleikamp H, Pabst M, et al. Decorating the anammox house: Sialic acids and sulfated glycosaminoglycans in the extracellular polymeric substances of anammox granular sludge. *Environ Sci Technol*, 2020, 54: 5218–5226
- 74 Felz S, Vermeulen P, van Loosdrecht M C M, et al. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Res*, 2019, 157: 201–208
- 75 Cao B, Shi L, Brown R N, et al. Extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: Characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ Microbiol*, 2011, 13: 1018–1031
- 76 Arnaouteli S, Bamford N C, Stanley-Wall N R, et al. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 600–614
- 77 Peng N, Cai P, Mortimer M, et al. The exopolysaccharide-eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm. *BMC Microbiol*, 2020, 20: 115
- 78 Boleij M, Pabst M, Neu T R, et al. Identification of glycoproteins isolated from extracellular polymeric substances of full-scale anammox granular sludge. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 13127–13135
- 79 Ma W, Peng D, Walker S L, et al. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *npj Biofilms Microbiomes*, 2017, 3: 4
- 80 Wei X, Fang L, Cai P, et al. Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. *Environ Pollut*, 2011, 159: 1369–1374
- 81 Zeng W, Li F, Wu C, et al. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus* sp. S3 to multiple heavy metals. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2020, 43: 153–167
- 82 Zeng W, Zhang S, Xia M, et al. Insights into the production of extracellular polymeric substances of *Cupriavidus pauculus* 1490 under the stimulation of heavy metal ions. *RSC Adv*, 2020, 10: 20385–20394
- 83 Li J, Jiang Z, Chen S, et al. Biochemical changes of polysaccharides and proteins within EPS under Pb(II) stress in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 174: 484–490
- 84 Mathivanan K, Chandirika J U, Mathimani T, et al. Production and functionality of exopolysaccharides in bacteria exposed to a toxic metal environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: 111567
- 85 Chatterjee S, Kumari S, Rath S, et al. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: Metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*, 2020, 12: 1637–1655
- 86 Naik M M, Pandey A, Dubey S K. *Pseudomonas aeruginosa* strain WI-1 from Mandovi estuary possesses metallothionein to alleviate lead toxicity and promotes plant growth. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, 79: 129–133
- 87 Roy R, Samanta S, Patra S, et al. *In silico* identification and characterization of sensory motifs in the transcriptional regulators of the ArsR-SmtB family. *Metallomics*, 2018, 10: 1476–1500
- 88 Habjanič J, Chesnov S, Zerbe O, et al. Impact of naturally occurring serine/cysteine variations on the structure and function of *Pseudomonas* metallothioneins. *Metallomics*, 2020, 12: 23–33
- 89 Habjanič J, Zerbe O, Freisinger E. A histidine-rich *Pseudomonas* metallothionein with a disordered tail displays higher binding capacity for cadmium than zinc. *Metallomics*, 2018, 10: 1415–1429
- 90 Yu Q, Fein J B. Enhanced removal of dissolved Hg(II), Cd(II), and Au(III) from water by *Bacillus subtilis* bacterial biomass containing an elevated concentration of sulfhydryl sites. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 14360–14367
- 91 Yu Q, Szymanowski J, Myneni S C B, et al. Characterization of sulfhydryl sites within bacterial cell envelopes using selective site-blocking and potentiometric titrations. *Chem Geol*, 2014, 373: 50–58
- 92 Ye B, Luo Y, He J, et al. Investigation of lead bioimmobilization and transformation by *Penicillium oxalicum* SL2. *Bioresour Technol*, 2018, 264: 206–210
- 93 Zhang J, Li Q, Zeng Y, et al. Bioaccumulation and distribution of cadmium by *Burkholderia cepacia* GYP1 under oligotrophic condition and mechanism analysis at proteome level. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 176: 162–169
- 94 Ma N, Sha Z, Sun C. Formation of cadmium sulfide nanoparticles mediates cadmium resistance and light utilization of the deep-sea bacterium *Idiomarina* sp. OT37-5b. *Environ Microbiol*, 2021, 23: 934–948
- 95 Kang F, Alvarez P J, Zhu D. Microbial extracellular polymeric substances reduce Ag^+ to silver nanoparticles and antagonize bactericidal activity. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 316–322
- 96 Kang F, Qu X, Alvarez P J J, et al. Extracellular saccharide-mediated reduction of Au^{3+} to gold nanoparticles: New insights for heavy metals biomineralization on microbial surfaces. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 2776–2785
- 97 Liu T, Luo X, Wu Y, et al. Extracellular electron shuttling mediated by soluble *c*-type cytochromes produced by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ Sci Technol*, 2020, 54: 10577–10587
- 98 Zhou X, Kang F, Qu X, et al. Role of extracellular polymeric substances in microbial reduction of arsenate to arsenite by *Escherichia coli* and

- Bacillus subtilis*. [Environ Sci Technol](#), 2020, 54: 6185–6193
- 99 Naveed S, Li C, Zhang J, et al. Sorption and transformation of arsenic by extracellular polymeric substances extracted from *Synechocystis* sp. PCC6803. [Ecotoxicol Environ Saf](#), 2020, 206: 111200
- 100 Lai C Y, Dong Q Y, Chen J X, et al. Role of extracellular polymeric substances in a methane based membrane biofilm reactor reducing vanadate. [Environ Sci Technol](#), 2018, 52: 10680–10688
- 101 Xu H, He E, Peijnenburg W J G M, et al. Contribution of pristine and reduced microbial extracellular polymeric substances of different sources to Cu(II) reduction. [J Hazard Mater](#), 2021, 415: 125616
- 102 Gracioso L H, Peña-Bahamonde J, Karolski B, et al. Copper mining bacteria: Converting toxic copper ions into a stable single-atom copper. [Sci Adv](#), 2021, 7: eabd9210
- 103 Calvo J S, Villones R L E, York N J, et al. Evidence for a long-lived, Cu-coupled and oxygen-inert disulfide radical anion in the assembly of metallothionein-3 Cu(I)₄-thiolate cluster. [J Am Chem Soc](#), 2022, 144: 709–722
- 104 Ge C, Huang D, Wang D, et al. Biotic process dominated the uptake and transformation of Ag⁺ by *Shewanella oneidensis* MR-1. [Environ Sci Technol](#), 2022, 56: 2366–2377
- 105 Tian L, Guan W, Ji Y, et al. Microbial methylation potential of mercury sulfide particles dictated by surface structure. [Nat Geosci](#), 2021, 14: 409–416
- 106 Liao Q, Tang J, Wang H, et al. Dynamic proteome responses to sequential reduction of Cr(VI) and adsorption of Pb(II) by *Pannonibacter phragmitetus* BB. [J Hazard Mater](#), 2020, 386: 121988
- 107 Zhu Y G, Yoshinaga M, Zhao F J, et al. Earth abides arsenic biotransformations. [Annu Rev Earth Planet Sci](#), 2014, 42: 443–467
- 108 Zhuang W, Balasubramanian N, Wang L, et al. Arsenate-induced changes in bacterial metabolite and lipid pools during phosphate stress. [Appl Environ Microbiol](#), 2021, 87: e02261–20
- 109 Sardiwal S, Santini J M, Osborne T H, et al. Characterization of a two-component signal transduction system that controls arsenite oxidation in the chemolithoautotroph NT-26. [FEMS Microbiol Lett](#), 2010, 313: 20–28
- 110 Rawle R A, Kang Y S, Bothner B, et al. Transcriptomics analysis defines global cellular response of *Agrobacterium tumefaciens* 5A to arsenite exposure regulated through the histidine kinases PhoR and AioS. [Environ Microbiol](#), 2019, 21: 2659–2676
- 111 Shi K, Wang Q, Fan X, et al. Proteomics and genetic analyses reveal the effects of arsenite oxidation on metabolic pathways and the roles of AioR in *Agrobacterium tumefaciens* GW4. [Environ Pollut](#), 2018, 235: 700–709
- 112 Tong H, Zheng C, Li B, et al. Microaerophilic oxidation of Fe(II) coupled with simultaneous carbon fixation and As(III) oxidation and sequestration in karstic paddy soil. [Environ Sci Technol](#), 2021, 55: 3634–3644
- 113 Shi L D, Guo T, Lü P L, et al. Coupled anaerobic methane oxidation and reductive arsenic mobilization in wetland soils. [Nat Geosci](#), 2020, 13: 799–805
- 114 Aron A T, Petras D, Schmid R, et al. Native mass spectrometry-based metabolomics identifies metal-binding compounds. [Nat Chem](#), 2022, 14: 100–109
- 115 Zhang M, Cai P, Wu Y C, et al. Bacterial extracellular polymeric substances: From the perspective of soil ecological functions (in Chinese). *Acta Pedol Sin*, 2022, 59: 308–323 [张铭, 蔡鹏, 吴一超, 等. 细菌胞外聚合物: 基于土壤生态功能的视角. *土壤学报*, 2022, 59: 308–323]
- 116 Wang J, Kerl C F, Hu P, et al. Thiolated arsenic species observed in rice paddy pore waters. [Nat Geosci](#), 2020, 13: 282–287
- 117 Gillan D C. Metal resistance systems in cultivated bacteria: Are they found in complex communities? *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 38: 123–130

Summary for “生物大分子与重金属互作研究方法 with 微观机制”

Methods and mechanisms of the interactions between biomacromolecules and heavy metals

Chenchen Qu, Peng Cai^{*}, Kaixiang Shi, Wenli Chen, Jinzhao Chen, Chunhui Gao, Yichao Wu & Qiaoyun Huang^{*}

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

^{*} Corresponding authors, E-mail: cp@mail.hzau.edu.cn; qyhuang@mail.hzau.edu.cn

Heavy metal pollution is a serious threat to both human health and the economic development of China. In soil environments, microbial derived organic substances contribute more than 50% of soil organic matter, which controls the migration and transformation of heavy metals. Over time, the microorganisms have developed a range of resistance and detoxification strategies to deal with the toxicity of heavy metals. Microorganisms play important roles in pollution remediation, hence, a comprehensive understanding of the underlying interaction mechanisms between biomacromolecules and heavy metals is fundamental for the development of microbial remediation methods. In recent years, the application of spectroscopic, thermodynamic, and omics approaches has expanded our understanding of the binding strength, coordination structure, and redox mechanisms of heavy metals and biomacromolecules. X-ray absorption fine structure (XAFS) and X-ray emission spectroscopy (XES) measured the valence state, coordination atom, and the structure of heavy metals in biomacromolecules. Three-dimensional excitation-emission matrix (3D-EEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy detected the reactive groups in the biomacromolecules through changes in the fluorescent and vibrational spectrum. The thermodynamic information for the reactions between biomacromolecules and heavy metals was detected using isothermal titration calorimetry (ITC) and the surface complexation model (SCM). Most of the models assumed the interactions between carboxyl, phosphoryl, sulfhydryl groups, and heavy metal ions through a monodentate complex. The synthesis and secretion of extracellular polymeric substance (EPS) is the universal mechanism through which microorganisms resist heavy metal stress, though the composition of EPS varied among microorganisms and heavy metals. Furthermore, the microorganisms have evolved functional proteins to fix and detoxify heavy metals, mainly through the sulfhydryl groups in metallothionein, flagellin, and amyloid. The hemiacetal groups, *c*-type cytochromes, and related functional sites in biomacromolecules promoted the redox of As, Cr, Cu, Ag, and Hg. Meanwhile, the microorganisms regulate the redox processes through a variety of genetically encoded pathways. These in-depth understanding of the interactions between biomacromolecule and heavy metal is essential for the treatment of heavy metal pollution using microbial resources.

Despite the salient accomplishments cited above, there is a significant knowledge gap regarding the molecular level interactions between microorganisms and heavy metals. The structure and physiological regulation of the functional biomolecules involved in the stabilization and transformation of heavy metals are still unclear. Additionally, the behavior of heavy metals in combined pollution systems and the role of biofilms in their transformation is also not clear. Furthermore, the majority of available literature mainly adopted methodologies from either the chemical or biological field, and the absence of interdisciplinary studies may account for these knowledge gaps. Therefore, it is important to combine the biological and chemical technologies and focus on the interactions between the microbial community, function, and heavy metals in composite biofilms. It is paramount to develop methods for the extraction and characterization of the biomolecules and to investigate their electron transfer and complexation reactions with heavy metals. More attention should be given to combined pollution systems and the interactions between metal-small molecular complexes and biomacromolecules. These studies will promote the understanding of the interactions between heavy metals and functional biomolecules at the molecular level, and improve the effectiveness of microbial remediation for heavy metal pollution. Overall, this review summarizes the latest research methodologies and the underlying interaction mechanisms between biomacromolecules and heavy metals and suggests the directions for further research regarding the methodology and systems. The integration of the methodologies, innovation, and a vivid comprehension of the underlying mechanisms will contribute significantly to the development of microbial remediation strategies for heavy metal pollution in water and soil.

biofilm, biomacromolecules, heavy metal pollution, molecular mechanism, redox

doi: [10.1360/TB-2022-0636](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0636)