

# 真菌对重金属 Pb(II), Cd(II), As(III)和 Cr(VI)耐受性的比较研究

杨振兴 田从魁 党晨原 常方 倪晋仁<sup>†</sup>

北京大学环境科学与工程学院, 水沙科学教育部重点实验室, 北京 100871; <sup>†</sup>通信作者, E-mail: nijinren@iee.pku.edu.cn

**摘要** 从两种不同土壤环境中筛选获得 19 株真菌, 并对其重金属耐受性进行比较分析。其中, 从重金属污染严重的湖南水口山有色金属矿区土壤中筛选获得 17 株真菌, 经鉴定分别属于曲霉属、木霉属、青霉属和镰孢属; 从重金属污染较轻的廊坊经济开发区绿化用地中筛选获得 2 株真菌, 经鉴定均为黑曲霉。研究重金属对不同土壤环境中分离的真菌的最小抑制浓度(MICs), 分析菌种、生存环境、重金属浓度等因素对真菌重金属耐受性的影响, 探讨真菌耐受高浓度重金属的机理。研究表明, 从矿区分离获得的真菌中, *Aspergillus niger* PTN84 等可耐受 144 mmol/L Pb(II), *A. terreus* PTN21, *A. flavus* PTN29 和 *Trichoderma asperellum* PTN1 可耐受 36 mmol/L Cd(II), *Fusarium* sp. PTN12, *A. terreus* PTN21 和 *T. asperellum* PTN1 可耐受 36 mmol/L Cu(II), *Fusarium* sp. PTN12 可耐受 72 mmol/L As(III), 整体上其重金属耐受能力高于文献报道的菌株, 在重金属土壤修复方面具有潜在的应用价值。

**关键词** 真菌; 重金属耐受性; 最小抑制浓度  
中图分类号 X172

## Comparative Study on Pb(II), Cd(II), As(III), Cr(VI) Resistance Characteristics of Fungus

YANG Zhenxing, TIAN Congkui, DANG Chenyuan, CHANG Fang, NI Jinren<sup>†</sup>

College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, The Key Laboratory of Water and Sediment Sciences (MOE), Beijing 100871; <sup>†</sup> Corresponding author, E-mail: nijinren@iee.pku.edu.cn

**Abstract** 19 fungus were isolated from two different soil environments and a comparative analysis of their heavy metal tolerance was conducted. Among them, 18 fungus, i.e. *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., were isolated respectively from the contaminated soil of Shuikoushan nonferrous metals mine in Hunan Province; 2 fungus, identified as *Aspergillus niger*., were isolated from non-contaminated soil in green land located in Langfang Economic Development Zone. Fungus isolated from the contaminated soil and non-contaminated green land as well as those reported previously are compared in terms of their heavy metal resistance characterized with the minimal inhibitory concentrations (MICs). As results, mechanism of fungal resistance of high concentrations of heavy metals was revealed. The fungus of heavy metal resistance primarily relies on the sites of their isolation, metal species, fungi species and metal speciation. Considering their high heavy-metal tolerance, e.g. MICs 144 mmol/L for Pb(II), 36 mmol/L for Cd(II) and Cu(II), and 72 mmol/L for As(III), the isolated fungus perform excellent and thus have higher potential for soil restoration.

**Key words** fungi; resistance to heavy metal; MICs

重金属具有微量致毒、不可降解和可在食物链中不断富集等特性,因此,电镀、冶金、矿山开发等工业生产过程中产生的重金属废水一旦排入自然环境中,就会对生态环境与公共健康造成严重危害<sup>[1]</sup>。重金属废水长期排放到土壤环境中会对微生物产生胁迫,降低活性微生物数量,抑制微生物活性和改变群落结构<sup>[2-3]</sup>。真菌是一类常见的重金属耐受性微生物,可以适应并生存在极端 pH 值、极端温度、寡营养和高浓度重金属环境中<sup>[4]</sup>。

重金属耐受性指微生物在重金属环境中生存的能力,重金属浓度、重金属种类、微生物种类是微生物重金属耐受性的重要影响因素。真菌耐受重金属的机制包括生物转化、微沉淀、络合、晶体化、吸附、分泌排出和胞内区域隔离固定<sup>[5]</sup>。目前,研究主要集中在从污染环境中筛选具有降解、富集和去除污染物功能的微生物,应用于污染环境生物修复。例如, Zafar 等<sup>[6]</sup>研究从重金属污染农田中分离的根霉属、曲霉属丝状真菌对  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Cr}^{6+}$  的吸附性能,认为从重金属污染环境中筛选的重金属耐受真菌具有修复重金属污染环境的潜力。

本文通过对比分离自重金属污染环境(湖南水口山有色金属矿区土壤)和普通土壤(廊坊经济开发区绿化用地)真菌的重金属耐受性,探讨菌种、生存环境、重金属浓度等因素对真菌重金属耐受性的影响,并与文献报道的真菌重金属最小抑制浓度进行比较,阐述真菌耐受高浓度重金属的机理。本研究涉及的重金属有 Pb(II), Cd(II), Cu(II), Mn(II), As(III), Mo(II), Cr(III), Ni(II), Co(II), Cr(VI) 和 Ag(I), 经鉴定,真菌菌属有曲霉属、木霉属、青霉属和镰孢属,筛选出的重金属耐受菌株对于土壤生物修复具有潜在的应用价值。本文涉及的真菌 ITS 核酸序列均已提交到 GenBank,并取得登录号,可供与生物修复相关的研究者参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

本试验中,提取真菌总 DNA 使用 ZP309-植物基因组提取试剂盒(CTAB 法),购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。扩增真菌 ITS 序列使用 Recombinant Taq DNA Polymerase,购自 TaKaRa 生物公司。琼脂糖为生化级纯,购自 Biowest agarose。DNA-marker 和 GoldView 核酸染料购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。引物 1

(ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和引物 2 (ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')由北京华大基因研究中心合成。MICs 测试涉及的 Pb(II), Cd(II), Cu(II), Mn(II), As(III), Mo(II), Cr(III), Ni(II), Co(II), Cr(VI) 和 Ag(I) 分别由  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AsCl}_3$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  和  $\text{AgNO}_3$  提供,金属盐均为分析纯,购自北京化工厂。测定土壤重金属含量使用的重金属标准溶液为优级纯,购自中国计量科学研究院。消解土壤样品使用硝酸、盐酸和高氯酸,均为优级纯,溶液配置使用 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 土壤样品表征

土壤样品采自湖南水口山有色金属矿区和廊坊经济开发区绿化用地,低温运输,冷藏保存(4℃)。消解土壤样品采用电热板消解法:取 0.5 g 土壤样品于 50 mL 聚四氟乙烯坩埚中,加入 10 mL 盐酸,电热板低温加热,使样品逐步分解。待蒸发至约 3 mL 时,取下冷却,依次加入 5 mL 硝酸、5 mL 氢氟酸、3 mL 高氯酸,电热板中温加热,直至白烟冒尽,坩埚内残渣呈黏稠状,加入 1:1 硝酸 2 mL 溶解残渣。将土壤消解液转移并定容至 50 mL 容量瓶中,备测。重金属浓度测定由 Quantima ICP-OES 完成。

### 1.3 培养基

分离真菌使用 PDA 培养基,配方为:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L, pH 6.8~7.2。真菌 MICs 测试使用含有重金属的 PDA 培养基,制备方法为:保持 PDA 培养基配方不变,调节 pH 至 5.0 (防止重金属沉淀),120℃ 高压湿热灭菌 30 分钟。待培养基冷却至 50℃ (防止重金属沉淀),加入金属盐,摇匀(使金属盐完全溶解,均匀分散到 PDA 培养基中)。再将其倒入平皿,待培养基凝固即制成重金属 PDA 培养基,置于超净台备用。PDB 培养基为 PDA 培养基的液态形式(不加琼脂),用于真菌发酵。

### 1.4 真菌分离与鉴定

分离真菌采用稀释涂布法:在无菌条件下,称取土样 10 g 加入装有 90 mL 无菌水的三角瓶中,在旋转式摇床上 28℃、150 r/min 振荡 30 分钟,用玻璃珠充分打散,制成土壤悬液后分别稀释到  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ 。取 100  $\mu\text{L}$  土壤悬液涂布于 PDA 培养基

上, 28℃恒温箱中培养 2~3 天, 待长出菌落后, 立即转接直至获得纯化菌株, 将纯化的菌株接种到 PDA 斜面培养基, 于 4℃冰箱保存。

挑取待鉴定的真菌菌丝于 PDB 培养基中, 28℃、150 r/min 培养 5~7 天, 真空抽滤, 收集菌体。取足量新鲜菌体, 加液氮研磨破除细胞壁, 采用改良 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取菌株总 DNA, 进行 ITS rDNA 基因的 PCR 扩增。PCR 采用 25 μL 体系: 18.8 μL dd H<sub>2</sub>O, 1 μL 模板 DNA, 2.5 μL 缓冲液, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μL, dNTPs 1.5 μL, TaKaRa Taq 0.2 μL; 扩增程序为: 94℃预变性 5 分钟, 94℃变性 1 分钟, 58℃退火 1 分钟, 72℃延伸 1 分钟, 72℃后延伸 10 分钟, 40 个循环。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度后送北京华大基因研究中心测序。

由 BioEdit 处理测序数据得到菌株的 ITS 序列, 并与 NCBI 上的已知序列进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), 再提交至 GenBank, 获取登录号。

### 1.5 重金属对真菌的最小抑制浓度(MICs)测定

测定真菌对重金属耐受性的方法主要有两种。第一种是重金属耐受指数( $T_i$ , tolerance index of heavy metal), 定义为

$$T_i = \frac{D_t}{D_u}$$

其中,  $D_u$  为没有添加重金属时形成菌落的直径(cm),  $D_t$  为添加一定量重金属后形成菌落的直径(cm)<sup>[8]</sup>。

这种方法可以准确地反映微生物对某种重金属的耐受程度, 但添加重金属的剂量因研究者和金属种类而异, 不同研究的测定结果之间难以进行比较。第二种是重金属最小抑制浓度(MIC, minimum inhibitory concentration), 定义为重金属抑制细胞生长的最低浓度。例如 Muñoz 等<sup>[8]</sup>采用 MIC 表征从工业废水中分离的微生物对 Pb(II), Zn(II)和 Ag(I)的耐受性。这种方法能够直观地反映微生物对重金属的耐受性, 且便于比较, 被广泛应用于表征微生物对重金属的耐受性<sup>[6,8-19]</sup>。因此, 本文采用 MIC 表征真菌的重金属耐受性。

本文研究的重金属包括 Pb(II), Cd(II), Cu(II), Mn(II), As(III), Mo(II), Cr(III), Ni(II), Co(II), Cr(VI)和 Ag(I); 筛选的真菌 19 株, 其中 17 株分离自重金属污染严重的矿区, 2 株分离自普通绿化用地; 测试重金属的浓度梯度为 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 18, 36, 72 和 144 mmol/L, 每组设置 3 个平行实验。

取 100 μL 已活化的真菌悬液接种到一定浓度的重金属 PDA 培养基上, 28℃培养 12 天<sup>[9]</sup>, 观察菌株的生长状况并统计结果。能够抑制真菌生长的最低浓度为该菌株的最小抑制浓度(MIC)<sup>[8]</sup>。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 土壤样品的表征

湖南水口山有色金属矿有 110 余年的开采历史, 从表 1 中可以看出矿区土壤的铅、镉、铜和锌的含量远高于普通地区的土壤。一方面是因为这几

表 1 实验菌株分离土样中各种重金属的含量  
Table 1 Metal concentration in soil sample from mining area with long-term exposure

重金属种类	重金属浓度/(μg · g <sup>-1</sup> )			
	普通土壤	重金属污染地区土壤		
		采集点 1	采集点 2	采集点 3
铅	14.08±0.06	719.77±9.77	1191.92±8.37	195.34±2.46
镉	2.06±0.08	55.19±1.13	5.43±0.40	37.98±0.63
铜	14.96±0.17	81.73±1.95	33.69±0.73	194.06±2.43
锌	54.47±0.07	613.18±34.61	410.34±3.39	552.62±3.51
砷	4.15±0.69	—	—	3.67±0.19
镍	10.41±0.68	4.06±3.53	7.01±3.22	15.94±3.37
锰	104.68±1.38	87.91±7.8	450.14±2.77	125.49±0.67
总铬	3.27±0.86	—	—	3.12±0.04

说明: 数据为平均值±误差; —表示未检测到; 普通土壤取自廊坊绿化用地; 重金属污染土壤取自湖南水口山金属矿区。

种重金属在矿床周围土壤中的背景值较高,另一方面长期开采使大量重金属暴露到矿区土壤中,致使该地区土壤中富集了大量的有毒重金属。铬、砷、镍和锰在两种土壤中的含量相差不大。

## 2.2 真菌菌种鉴定

对分离的 19 株丝状真菌进行 ITS rDNA 基因序列分析并进行测序。将测序结果与 NCBI 上的已知序列进行比对(提交比对的 ITS 序列长度为 450~600 bp),相似度介于 97%~100% 之间,具有很高的同源性。并将其 ITS rDNA 基因序列提交至 NCBI,获得相对应的 GenBank 登录号(表 2)。结合形态学观察,发现分离的 19 株真菌包括 14 株曲霉属真菌(*Aspergillus* sp.)、2 株木霉属真菌(*Trichoderma* sp.)、2 株青霉属真菌(*Penicillium* sp.)和 1 株镰孢属真菌(*Fusarium* sp.)。其中,14 株曲霉属真菌包括 7 株黑曲霉(*Aspergillus niger*)、3 株黄曲霉

(*Aspergillus flavus*)、2 株土曲霉(*Aspergillus terreus*)和 2 株其他曲霉(*Aspergillus* sp.); 2 株木霉属真菌均是木霉菌(*Trichoderma asperellum*); 分离自绿化用地的 2 株真菌均为黑曲霉。由此可见,在分离真菌中曲霉属属于优势菌属,占矿区分离菌株的 70.6%。

## 2.3 真菌对重金属的最小抑制浓度(MICs)

从表 3 可知,本研究的菌株对测试重金属的耐受性存在较大的差异,菌株对 Pb(II)和 Cr(III)的耐受性最强,对 Ni(II), Co(II), Cr(VI)和 Ag(I)的耐受性较弱。由菌株对测试重金属的 MICs 可知,真菌对本研究中已测试金属的耐受性按金属的种类排序,由强到弱依次为 Cr(III) > Pb(II) > Mn(II) > Mo(II) > Cu(II) > As(III) > Cd(II) > Co(II) > Ni(II) > Ag(I) > Cr(VI)。真菌对不同种类重金属耐受性的差异可能与其进入真菌体内后形成化合物

表 2 真菌的鉴定、PCR 产物长度、相似菌株及其 ITS 扩增序列的 Genbank 登录号  
Table 2 Characteristics of isolated fungus and Genbank accession numbers for target sequences

菌株编号	长度/bp	GenBank 登录号	鉴定种属	相似序列在 GenBank 登录号	相似度/%
MY1	538	KF589312.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF358715.1	100
MY2	539	KF589313.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF358715.1	100
1210	455	KF656708.1	<i>Aspergillus</i> sp.	KF059971.1	100
PTN1	536	KF656709.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	KC859432.1	100
PTN4	535	KF589301.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF059971.1	100
PTN7	548	KF589302.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	JX677934.1	99
PTN11	491	KF656710.1	<i>Aspergillus</i> sp.	KF304798.1	100
PTN12	501	KF589304.1	<i>Fusarium</i> sp.	KC690012.1	100
PTN13	565	KF656712.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KF562197.1	100
PTN19	562	KF656713.1	<i>Penicillium</i> sp.	KF367495.1	100
PTN21	585	KF656714.1	<i>Aspergillus terreus</i>	KC462061.1	100
PTN25	587	KF589305.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KC964102.1	100
PTN29	534	KF589306.1	<i>Aspergillus flavus</i>	KF358714.1	99
PTN31	553	KF664143.1	<i>Aspergillus niger</i>	FJ878651.1	97
PTN34	540	KF589307.1	<i>Penicillium</i> sp.	GU388431.1	99
PTN35	533	KF589308.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF059971.1	100
PTN42	533	KF589309.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF059971.1	100
PTN45	550	KF589310.1	<i>Aspergillus terreus</i>	JQ361749.1	100
PTN84	533	KF589311.1	<i>Aspergillus niger</i>	KF659971.1	100

表 3 分离真菌对重金属的最小抑制浓度测定结果  
Table 3 Minimum inhibitory concentration (MICs) for isolated fungal strains

菌株编号	MICs/(mmol · L <sup>-1</sup> )										
	Pb(II)	Cd(II)	Cu(II)	Mn(II)	As(III)	Mo(II)	Cr(III)	Ni(II)	Co(II)	Cr(VI)	Ag(I)
<i>A. niger</i> MY1	16	—	12	72	36	36	72	2	4	0.5	2
<i>A. niger</i> MY2	18	—	16	72	18	72	144	2	4	3	2
<i>A. flavus</i> PTN13	72	18	16	72	—	72	144	1	8	—	2
<i>A. flavus</i> PTN25	72	—	16	72	9	72	72	4	32	—	2
<i>A. flavus</i> PTN29	72	36	8	72	18	72	144	2	4	3	2
<i>A. niger</i> PTN4	72	9	4	72	18	72	72	1	4	3	2
<i>A. niger</i> PTN35	36	36	32	72	—	72	144	2	8	3	2
<i>A. niger</i> PTN42	72	—	12	72	18	72	72	2	4	1	2
<i>A. niger</i> PTN84	144	9	4	72	18	72	144	2	4	—	2
<i>A. terreus</i> PTN21	72	36	36	72	18	72	144	1	4	3	2
<i>A. terreus</i> PTN45	144	36	4	72	18	72	72	4	4	0.5	2
<i>Aspergillus</i> sp. PTN11	72	18	16	72	18	36	144	2	4	0.5	2
<i>Aspergillus</i> sp. 1210	72	18	4	72	18	72	144	1	4	3	2
<i>Fusarium</i> sp. PTN12	72	36	36	72	72	72	72	2	4	1	2
<i>Penicillium</i> sp. PTN34	36	—	16	72	9	72	72	2	8	2	2
<i>Penicillium</i> sp. PTN19	36	—	12	72	18	72	36	4	4	3	2
<i>T. asperellum</i> PTN1	144	36	36	72	18	72	72	2	4	0.5	2
<i>T. asperellum</i> PTN7	144	18	32	72	18	72	144	4	16	—	2

说明: *T. asperellum*, 木霉菌; *Penicillium* sp., 青霉菌属真菌; *Fusarium* sp., 镰孢属真菌; *A. niger*, 黑曲霉; *A. terreus*, 土曲霉; *A. flavus*, 黄曲霉; *Aspergillus* sp., 曲霉属其他种真菌。“—”表示代表在 0.1 mmol/L 重金属浓度下未发现菌落的形成。

的毒性相关: Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>和 Ag<sup>+</sup>形成剧毒的化合物, 真菌对其耐受性较弱; Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>等形成低毒化合物, 真菌对其耐受性较强<sup>[20]</sup>。

金属价态不同, 真菌对其耐受性有明显的差异。如图 1 所示, 本研究中真菌对铬的耐受性与其价态密切相关, Cr(VI)的毒性高出 Cr(III)数十倍, 甚至百倍。例如, *A. flavus* PTN13, *A. niger* PTN84 和 *T. asperellum* PTN7 能够耐受 144 mmol/L Cr(III), 但在含有 0.1 mmol/L Cr(VI)的 PDA 培养基上却没有菌落形成。除此之外, 砷的毒性也与其价态相关, As(III)的毒性较 As(V)强。例如 Banerjee 等<sup>[19]</sup>在砷污染地区分离的 10 株细菌, 对 As(V)和 As(III) 的 MICs 分别为 50~125 mmol/L 和 10~50 mmol/L。

不同属菌株对同种重金属的耐受性存在较大差

异, 例如, *Penicillium* sp. PTN34 和 *A. flavus* PTN25 对 As(III)的 MICs 为 9 mmol/L, 而 *Fusarium* sp. PTN12 的 MICs 为前者的 8 倍(表 3)。

同属不同种菌株对同种重金属耐受性存在差异, 例如 *A. terreus* PTN21 和 PTN45 对 Cd(II)敏感 (MIC<0.1 mmol/L), 而 *A. niger* PTN42 对 Cd(II)的 MIC 为 36 mmol/L (表 3); 即便是同种真菌的不同菌株之间, 重金属耐受性也呈现一定差异。如图 2 所示, 本研究中分离自矿区的黑曲霉, 对 Pb(II)的耐受性按菌株排序, 由强到弱依次为 *A. niger* PTN84 > *A. niger* PTN4 = *A. niger* PTN42 > *A. niger* PTN35; 对 Cd(II)的耐受性按菌种排序, 由强到弱依次为 *A. niger* PTN35 > *A. niger* PTN4 = *A. niger* PTN84 > *A. niger* PTN42; 对 As(III)的耐受性按菌

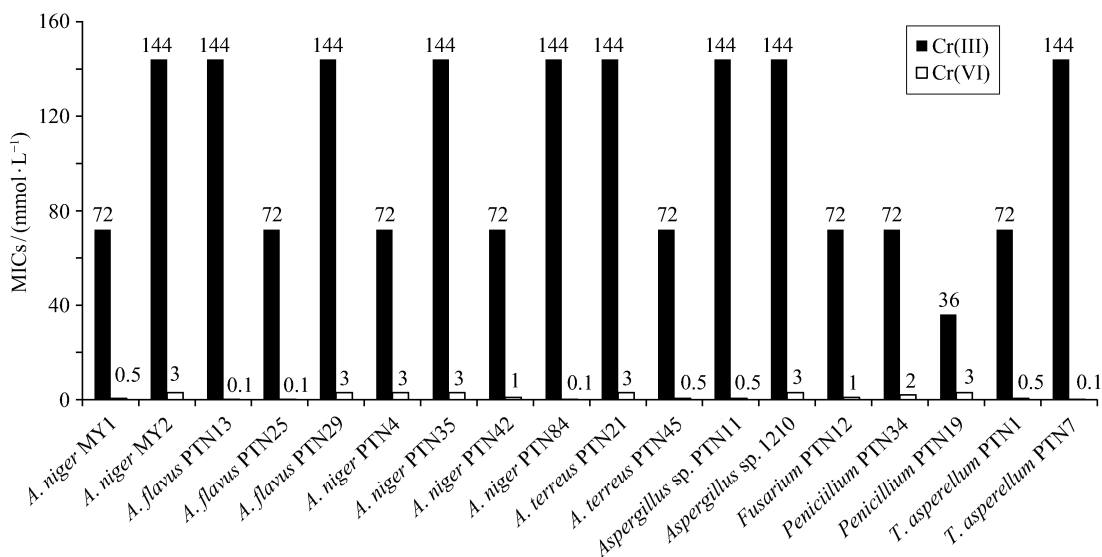


图 1 本研究中真菌对 Cr(III)和Cr(VI)的 MICs 比较  
Fig. 1 Comparison of fungal MICs between Cr(III) and Cr(VI) in this study

种排序, 由强到弱依次为 *A. niger* PTN84 = *A. niger* PTN4 = *A. niger* PTN42 > *A. niger* PTN35; 对 Cr(VI)的耐受性按菌种排序, 由强到弱依次为 *A. niger* PTN35 = *A. niger* PTN4 > *A. niger* PTN42 > *A. niger* PTN35。*A. flavus* PTN25 对 Cd(II) 敏感 (MIC<0.1 mmol/L), 而 *A. flavus* PTN13 和 *A. flavus* PTN29 分别能在 18 mmol/L 和 32 mmol/L Cd(II)的 PDA 培养基中生存。分离菌株的重金属耐受性存在较大的差异, 这可能与菌株之间的重金属耐受机制的差异有关<sup>[11]</sup>。

真菌菌株对重金属的耐受性与菌株分离环境有关。如图 3 所示, 本研究中分离自绿地的 *A. niger* MY1 和 *A. niger* MY2 对 Pb(II)和 Cd(II)的 MICs 明显较分离自矿区土壤的 *A. niger* PTN14, *A. niger* PTN35, *A. niger* PTN42 和 *A. niger* PTN84 低, 这与绿地和矿区土壤中 Pb(II)和 Cd(II)的含量保持一致。As(III)和 Cr(VI)在两种土壤中的含量相当, 因而从这两种土壤中分离的黑曲霉对这两种金属的耐受性没有显著差异。Vadkertiová 等<sup>[17]</sup>在不同的环境分离的酵母菌对重金属(铜、铅和镉)耐受性的研究中也得到相似的结果, 酵母对重金属耐受性按分离环境排序, 由强到弱依次为: 树叶>河流水体>农业用地>淡水湖泊>未开垦的土地, 从重金属污染越少的环境中分离的酵母对重金属的耐受性越弱。尽管大多数研究报道, 分离自重金属污染地区的真菌

对重金属耐受性强于普通地区的真菌, 这个结论目前仍然没有得到证实, 因为有的研究者发现分离自普通环境和重金属污染环境中的菌株对重金属的耐受性并没有显著差异。Cernansky 等<sup>[21]</sup>指出分离自重金属污染环境的真菌具有更强的重金属耐受性, 这与重金属环境对耐重金属真菌的筛选有关。

由表 4 数据可知, 从矿区分离的菌株对重金属具有良好的耐受性。*A. niger* PTN84, *A. terreus* PTN45, *T. asperellum* PTN1 和 *T. asperellum* PTN7 能够耐受 144 mmol/L Pb(II), 远高于文献报道值。*A. flavus* PTN29, *A. niger* PTN35, *A. terreus* PTN21, *A. terreus* PTN45, *Fusarium* sp. PTN12 和 *T. asperellum* PTN1 能够耐受 36 mmol/L Cd(II), 仅低于 *Penicillium* sp. 和 *Rhizopus* sp. 的 44.5 mmol/L, 因为这两株真菌分离自复合污染(Cu, Cd, Pb, As 和 Zn)的土壤, 具有独特的重金属耐受机制<sup>[6]</sup>。*Fusarium* sp. PTN12 对 As(III)的 MICs 为 36 mmol/L, 略低于 *Kocuria palustris* 的 50 mmol/L, 因为该细菌具有将 As(III)氧化为 As(V)或其他低毒物质的解毒机制<sup>[19]</sup>。*A. flavus* PTN29, *A. niger* PTN4, *A. niger* PTN35, *A. terreus* PTN21, *Aspergillus* sp. 1210 和 *Penicillium* PTN19 对 Cr(VI)的 MICs 为 3 mmol/L, 低于 *A. flavus* 和 *A. fumigatus* 的 19.23 mmol/L, 因为文献报道的这两株真菌分离自工业废水污染的土壤, 且具有通过改变生长模式来适应高浓度 Cr(VI)

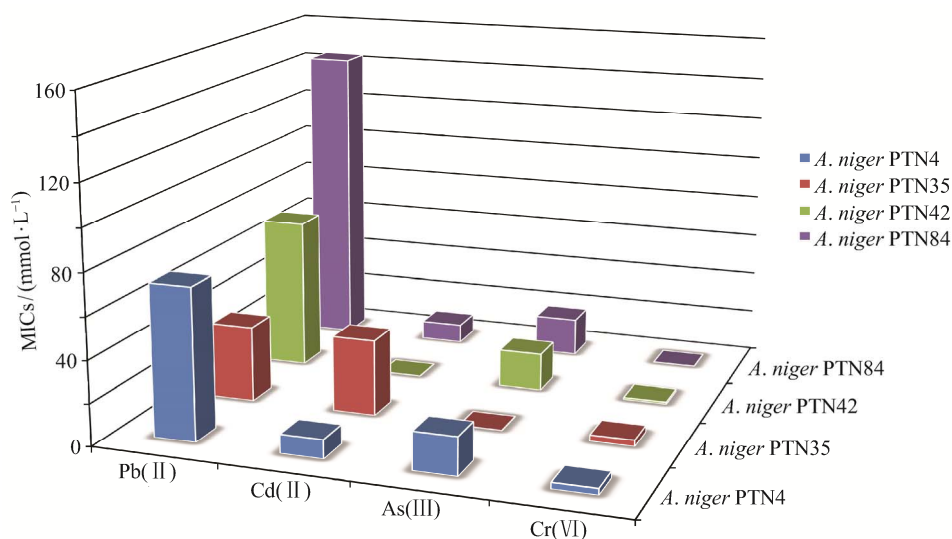


图 2 本研究中黑曲霉不同菌株对 Pb(II), Cd(II), As(III)和 Cr(VI)的 MICs 比较

Fig. 2 Comparison of MICs for Pb(II), Cd(II), As(III) and Cr(VI) by different *Aspergillus niger* in this study

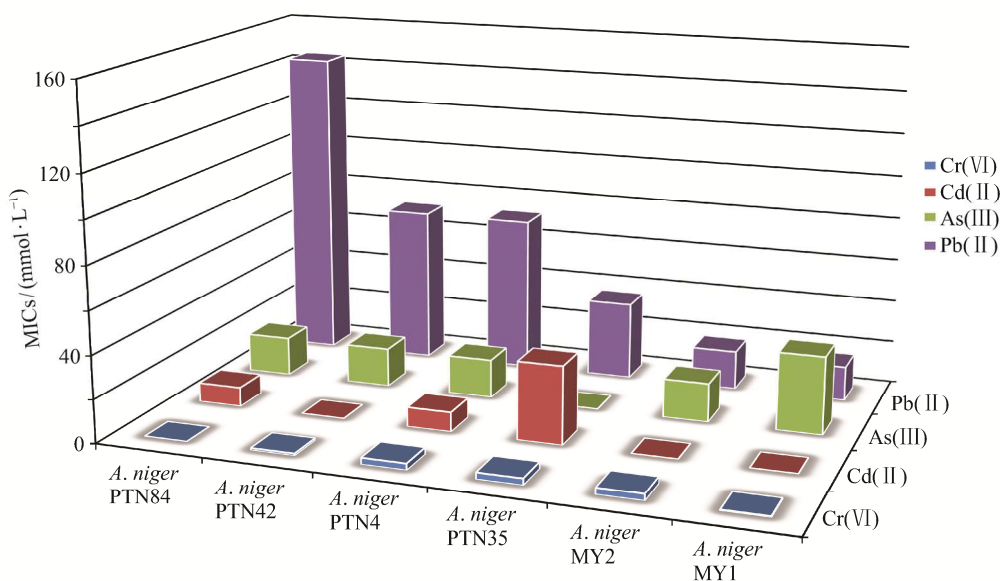


图 3 普通绿地和金属矿区的黑曲霉对 Pb(II), Cd(II), As(III)和 Cr(VI)的 MICs 比较

Fig. 3 Comparison of MICs for Pb(II), Cd(II), As(III) and Cr(VI) by *Aspergillus niger* isolated from green land and mining area

的耐受机制<sup>[12]</sup>。此外，从矿区分离的菌株对其他重金属也表现出极强的耐受性，例如 *Fusarium* sp. PTN12, *A. terreus* PTN21 和 *T. asperellum* PTN1 可耐受 36 mmol/L Cu(II)，整体上其重金属耐受能力高于文献报道。重金属污染地区是重金属耐受菌株的重要来源，从矿区分离的重金属耐受真菌在重金属土壤修复方面具有很大应用潜力。

从重金属矿区分离的真菌能够耐受高浓度的重金属，一方面是因为真菌长期受到生存环境中重金属的胁迫，真菌对重金属产生耐受性<sup>[22]</sup>；另一方面，真菌细胞也可以通过减少对重金属的吸收或降低体内重金属毒性的方式达到耐受重金属的目的<sup>[23]</sup>。

对于尚未进入真菌细胞的重金属，细胞壁和覆盖在其表面的胞外聚合物具有良好的重金属结合

表 4 本研究中菌株与文献报道菌株对重金属的 MICs 比较  
Table 4 Comparison of heavy metal minimum inhibition concentrations of fungus

金属	菌株名称	菌株分离环境	实验环境	MICs/(mmol · L <sup>-1</sup> )	文献
Pb(II)	<i>A. niger</i> PTN84	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	144	本研究
	<i>A. terreus</i> PTN45	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	144	本研究
	<i>T. asperellum</i> PTN1	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	144	本研究
	<i>T. asperellum</i> PTN7	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	144	本研究
	<i>Aspergillus</i> sp.	重金属污染土壤	PDA, 25°C, 7 天	20~25	[9]
	<i>A. niger</i>	河流水体	PDA, 28°C, 7 天	24.1	[10]
	<i>Trichosporon</i> sp. 4S3	城市和工业废水	PDA, 28°C, 12 天	32~35	[8]
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2S4	城市和工业废水	PDA, 28°C, 12 天	5~17	[8]
Cd(II)	<i>A. flavus</i> PTN29	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>A. niger</i> PTN35	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>A. terreus</i> PTN21	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>A. terreus</i> PTN45	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>Fusarium</i> sp. PTN12	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>T. asperellum</i> PTN1	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>Aspergillus</i> sp.	重金属污染农田	SDA, 29 ± 1°C, 2~5 天	35.6	[6]
	<i>Fusarium</i> sp.	重金属污染农田	SDA, 29 ± 1°C, 2~5 天	26.7	[6]
	<i>Penicillium</i> sp.	重金属污染农田	SDA, 29 ± 1°C, 2~5 天	44.5	[6]
	<i>Rhizopus</i> sp.	重金属污染农田	SDA, 29 ± 1°C, 2~5 天	44.5	[6]
As(III)	<i>Trichoderma</i> sp.	重金属污染农田	SDA, 29 ± 1°C, 2~5 天	26.7	[6]
	<i>Fusarium</i> sp. PTN12	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	36	本研究
	<i>Pseudomonas</i> sp.	砷污染地区	LB 固态培养基, 24 小时	10~50	[19]
Cr(VI)	<i>A. flavus</i> PTN29	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>A. niger</i> PTN4	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>A. niger</i> PTN35	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>A. terreus</i> PTN21	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>Aspergillus</i> sp. 1210	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>Penicillium</i> sp. PTN19	金属矿区土壤	PDA, 28°C, 12 天	3	本研究
	<i>A. niger</i>	重金属污染农田	PDA, 29°C, 7 天	15.39	[12]
	<i>A. flavus</i>	重金属污染农田	PDA, 29°C, 7 天	19.23	[12]
	<i>A. fumigatus</i>	重金属污染农田	PDA, 29°C, 7 天	19.23	[12]

能力, 可以将大部分重金属隔绝或者固定在细胞外<sup>[24-25]</sup>。黄艺等<sup>[26]</sup>指出, 外生菌根真菌(*Suillus bovinus*)的菌丝分泌物对重金属的固定能力较强;

对于进入真菌细胞的少量重金属, 真菌会产生金属结合蛋白(如 Metallothioneins, MTs), 菌丝内特定的金属结合蛋白可将重金属络合在细胞内或固定在液

泡内<sup>[27]</sup>。例如 *Rozites aperata* 产生金属结合蛋白络合 Cd, *Cortinarius* spp. 产生金属结合蛋白络合 Cs, 等等<sup>[28-29]</sup>。此外, 真菌体内的有机酸根离子或无机酸根离子可与重金属形成晶体或沉淀, 使得真菌体内重金属的浓度降低, 移动性减弱, 以达到增强真菌重金属耐受性的目的。Turnau 等<sup>[30]</sup>用能量分散 X 射线扫描电镜, 在真菌菌丝中发现含重金属的晶体, 并且该晶体在重金属存在时含量会有所增加。Vare 等<sup>[31]</sup>发现, 生长在更高浓度含可溶解铝盐的培养基中的外生菌根真菌(*Suillus variegatus*)菌丝形成的磷酸铝颗粒更多。Cromack 等<sup>[32]</sup>发现在外生菌根真菌中存在草酸钙晶体。

### 3 结论

1) 从湖南水口山有色金属矿区土壤中分离出 17 株真菌, 经鉴定分别属于曲霉属、木霉属、青霉属和镰孢属; 从廊坊经济开发区绿化用地中分离出 2 株真菌, 经鉴定属于黑曲霉。真菌对重金属的耐受性与真菌的种属、分离环境、金属的种类和价态有关, 分离自重金属污染环境的真菌对重金属耐受性明显强于分离自普通环境的真菌。

2) 从湖南水口山有色金属矿区土壤中筛选出多株具有良好重金属耐受性的真菌: *A. niger* PTN84 等可耐受 144 mmol/L Pb(II), *A. terreus* PTN21, *A. flavus* PTN29 和 *T. asperellum* PTN1 可耐受 36 mmol/L Cd(II), *Fusarium* sp. PTN12, *A. terreus* PTN21 和 *T. asperellum* PTN1 可耐受 36 mmol/L Cu(II), *Fusarium* sp. PTN12 可耐受 72 mmol/L As(III)。整体上的重金属耐受能力高于文献报道, 在重金属土壤修复方面具有潜在的应用价值。

### 参考文献

- [1] Amini M, Younesi H, Bahramifar N, et al. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154: 694-702
- [2] Jordan M J, Lechevalier M P. Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Canadian Journal of Microbiology*, 1975, 21: 1855-1865
- [3] Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, et al. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 420-428
- [4] Anand P, Isar J, Saran S, et al. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 1018-1025
- [5] Islam M, Saha A, Mosaddeque H, et al. In vitro studies on the reaction on fungi *Trichoderma* to different herbicides used in tea plantation. *Int J Sustain Crop Prod*, 2008, 3: 27-30
- [6] Zafar S, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 2557-2561
- [7] Murray M, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4326
- [8] Muñoz A J, Ruiz E, Abriouel H, et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 210: 325-332
- [9] Ezzouhri L, Castro E, Moya M, et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3: 35-48
- [10] Iskandar N L, Zainudin N A I M, Tan S G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23: 824-830
- [11] Iram S, Zaman A, Iqbal Z, et al. Heavy metal tolerance of fungus isolated from soil contaminated with sewage and industrial wastewater. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2013, 22: 691-697
- [12] Iram S, Waqar K, Shuja N, et al. Tolerance potential of different species of *Aspergillus* as bioremediation tool — comparative analysis. *E3 Journal of Microbiology Research*, 2011, 1: 001-008
- [13] Çolak F, Atar N, Yazıcıoğlu D, et al. Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 173: 422-428
- [14] Castro-Silva M A, Lima A O D S, Gerchenski A V, et al. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, 34: 45-47

- [15] Rossbach S, Wilson T L, Kukuk M L, et al. Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and a *zntA*-like gene in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 191: 61–70
- [16] Tam P C. Heavy metal tolerance by ectomycorrhizal fungi and metal amelioration by *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza*, 1995, 5: 181–187
- [17] Vadkertiová R, Sláviková E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 2006, 46: 145–152
- [18] Cánovas D, Durán C, Rodríguez N, et al. Testing the limits of biological tolerance to arsenic in a fungus isolated from the River Tinto. *Environmental Microbiology*, 2003, 5: 133–138
- [19] Banerjee S, Datta S, Chattopadhyay D, et al. Arsenic accumulating and transforming bacteria isolated from contaminated soil for potential use in bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2011, 46: 1736–1747
- [20] Nies D H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51: 730–750
- [21] Cernansky S, Urík M, Ševc J, et al. Biosorption of arsenic and cadmium from aqueous solutions. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6: 1932–1934
- [22] Valix M, Loon L. Adaptive tolerance behaviour of fungi in heavy metals. *Minerals Engineering*, 2003, 16: 193–198
- [23] 廖继佩, 林先贵, 曹志洪. 内外生菌根真菌对重金属的耐受性及机理. *土壤*, 2003, 35(5): 370–377
- [24] Galli U, Schüepp H, Brunold C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 1994, 92: 364–368
- [25] Harrison J J, Ceri H, Turner R J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5: 928–938
- [26] 黄艺, 陶澍. 外生菌根对欧洲赤松苗 (*Pinus sylvestris*) Cu, Zn 积累和分配的影响. *环境科学*, 2000, 21(2): 1–6
- [27] 焦芳婵, 毛雪, 李润植. 金属结合蛋白基因及其在清除重金属污染中的应用. *遗传*, 2002, 24(1): 82–86
- [28] Tyler G. Metals in sporophores of basidiomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 1980, 74: 41–49
- [29] Bakken L R, Olsen R A. Accumulation of radio-caesium in fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 1990, 36: 704–710
- [30] Turnau K, Kottke I, Dexheimer J. Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus/Pinus sylvestris* mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycological Research*, 1996, 100: 16–22
- [31] Väre H. Aluminium polyphosphate in the ectomycorrhizal fungus *Suillus variegatus* (Fr.) O. Kunze as revealed by energy dispersive spectrometry. *New Phytologist*, 1990, 116: 663–668
- [32] Cromack K Jr, Sollins P, Graustein W C, et al. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 1979, 11: 463–468