

研究报告



重金属胁迫对真菌生长及发酵液 pH 的影响

王雪莹¹ 刘圆¹ 高天鹏^{*2,3} 薛林贵¹ 刘玉冰⁴ 万子栋⁵ 李昌明³ 常国华³

1 兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070

2 西安文理学院生物与环境工程学院 陕西 西安 710065

3 甘肃省矿区污染治理与生态修复工程研究中心 甘肃 兰州 730070

4 中国科学院西北生态环境资源研究院 甘肃省寒区旱区逆境生理与生态重点实验室 甘肃 兰州 730000

5 西北师范大学地理与环境科学学院 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】矿区废渣堆重金属污染严重,废渣堆分布着一些耐重金属的微生物。【目标】探究重金属胁迫对真菌生长及发酵液 pH 的影响。【方法】从金川矿区废渣堆采集土样,分离培养具有产酸能力的真菌,采用形态学与分子生物学技术鉴定这些菌株,并测定其产酸能力及其对 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的耐受性。【结果】形态学及 18S rRNA 基因序列分析获得黑曲霉 ZJ-I (*Aspergillus niger* ZJ-I) 和产黄青霉 ZJ-V (*Penicillium chrysogenum* ZJ-V) 两个产酸菌株。未加重金属培养时,与不接种真菌对照相比,上述 2 个菌株的发酵液 pH 分别下降 0.58 和 0.69;添加重金属处理后,随着重金属浓度的增加, pH 变化幅度变小,不同浓度 Pb^{2+} 使 *A. niger* ZJ-I 发酵液 pH 值分别下降 0.53、0.39、0.34 和 0.39,使 *P. chrysogenum* ZJ-V 发酵液 pH 值分别下降 0.21、0.23、0.14 和 0.09;不同浓度 Cd^{2+} 使 *A. niger* ZJ-I 发酵液 pH 值分别下降 0.75、0.43、0.39 和 0.32,使 *P. chrysogenum* ZJ-V 发酵液 pH 值分别下降 0.62、0.46、0.38 和 0.49;不同浓度 Zn^{2+} 可使 *A. niger* ZJ-I 发酵液 pH 分别下降 0.87、0.61、0.57 和 0.43,使 *P. chrysogenum* ZJ-V 发酵液 pH 分别下降 1.1、0.34、0.44 和 0.49;低浓度的 Zn^{2+} 对菌株 *A. niger* ZJ-I 和 *P. chrysogenum* ZJ-V 产酸都有促进作用,低浓度的 Cd^{2+} 对 *A. niger* ZJ-I 产酸有促进作用。当 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 的浓度分别超过 200、400、2 000 mg/L 时,3 种不同浓度的重金属对菌株 *A. niger* ZJ-I 的抑制率达到 80% 以上,抑制效果显著;当 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 浓度分别超过 200、1 000、2 000 mg/L 时,3 种不同浓度的重金属对菌株 *P. chrysogenum* ZJ-V 抑制率达到 80% 以上,抑制效果显著。【结论】两株真菌均具有产酸能力和一定的重金属耐受性,菌株 *P. chrysogenum* ZJ-V 发酵液产酸性能与重金属耐受能力都要优于 ZJ-I,菌株 ZJ-V 具备潜在的淋洗重金属污染土壤的能力。

关键词: 重金属胁迫, 真菌生长, 发酵液 pH, 矿区

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31860176, 41977204, 31860163, 31460162); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2020ZDLSF06-06)

***Corresponding author:** E-mail: zkgtp@163.com

Received: 02-07-2020; **Accepted:** 31-08-2020; **Published online:** 08-09-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31860176, 41977204, 31860163, 31460162); 陕西省重点研发计划(2020ZDLSF06-06)

***通信作者:** E-mail: zkgtp@163.com

收稿日期: 2020-07-02; **接受日期:** 2020-08-31; **网络首发日期:** 2020-09-08

Effect of heavy-metal stress on fungal growth and pH of fermentation broth

WANG Xue-Ying¹ LIU Yuan¹ GAO Tian-Peng^{*2,3} XUE Lin-Gui¹ LIU Yu-Bing⁴
WAN Zi-Dong⁵ LI Chang-Ming³ CHANG Guo-Hua³

¹ School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China

² School of Biology and Environmental Engineering, Xi'an University, Xi'an, Shaanxi 710065, China

³ Gansu Mining Area Pollution Control and Ecological Rehabilitation Engineering Research Center, Lanzhou, Gansu 730070, China

⁴ Key Laboratory of Stress Physiology and Ecology in Cold and Arid Regions of Gansu Province, Northwest

Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

⁵ College of Geography and Environmental Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] Soil heavy metal pollution is serious in the slag heap of mining area. There are some microorganisms in the slag heap of mining area that are resistant to heavy metals. [Objective] To investigate the effects of heavy metal stress on the growth of fungi and pH of fermentation broth. [Methods] The acid-producing ability of two fungi (*Aspergillus niger* ZJ-I, *Penicillium chrysogenum* ZJ-V) isolated from the slag heap of mining area as materials and their tolerance to different heavy metal ions Pb^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} were studied by using traditional microbial culture method. [Results] The results showed that these two strains ZJ-I and ZJ-V were *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* respectively by morphological and 18S rRNA gene sequence analysis. When the metal culture was not increased, the pH of the fermentation broth of the above two strains decreased by 0.58 and 0.69, respectively, compared with the control without inoculation of fungi and when the two strains were under heavy metal tolerance, the pH range decreased with the increase of heavy metal concentration, pH of the fermentation broth with different concentrations of Pb^{2+} decreased by 0.53, 0.39, 0.34 and 0.39 respectively, and by 0.21, 0.23, 0.14 and 0.09 respectively to *P. chrysogenum* ZJ-V. The pH of the fermentation broth with different concentrations of Cd^{2+} was decreased by 0.75, 0.43, 0.39 and 0.32 respectively on *A. niger* ZJ-I and 0.62, 0.46, 0.38 and 0.49 respectively on *P. chrysogenum* ZJ-V. The pH of the fermentation broth with different concentrations of Zn^{2+} decreased by 0.87, 0.61, 0.57 and 0.43 respectively, by 1.1, 0.34, 0.44 and 0.49 respectively to *P. chrysogenum* ZJ-V. The low concentration of Zn^{2+} promoted the acid production of *A. niger* ZJ-I and *P. Chrysogenum* ZJ-V, and the low concentration of Cd^{2+} promoted the acid production of *A. niger* ZJ-I. When the concentration of heavy metal ions Cd^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} was more than 200, 400, 2 000 mg/L respectively, *A. niger* ZJ-I had significant inhibition rate reached 80%, when the concentration of heavy metal ions Cd^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} was more than 200, 1 000, 2 000 mg/L respectively, *P. chrysogenum* ZJ-V had significant inhibition rate reached 80%, [Conclusion] Both fungi have acid production ability and heavy metal tolerance, strain *P. chrysogenum* ZJ-V is superior to *A. niger* ZJ-I in acid production and heavy metal tolerance, so strain *P. chrysogenum* ZJ-V can be used as the dominant strain for bioremediation of heavy metal contaminated soil.

Keywords: Heavy metals tolerance, Fungi growth, Fermentation pH, Mining area

土壤重金属污染已成为一个日趋严重的问题。矿区周围的重金属污染最为严重,露天堆放的废矿、尾矿被自然雨水淋滤后,重金属随地表水渗透污染土壤和流域。重金属已成为土壤中污

染的主要来源^[1-3]。

土壤中微生物种类丰富,主要包括细菌、真菌和放线菌。真菌作为土壤生态系统的重要调节者之一,其群落多样性、生物活性及代谢行为都会影响

土壤中重金属的存在形态、毒性和含量^[4]。一些土壤真菌(如青霉菌、黑曲霉菌)会产生大量低分子有机酸,如柠檬酸、草酸、苹果酸等^[5-6],这些小分子有机酸通过与土壤重金属螯合形成溶解性复合体,通过自身 H^+ 替代重金属离子等机制来改变土壤中重金属的存在形态,起到去除或转移重金属的作用^[7]。

不同种类、不同浓度的重金属离子对土壤真菌产酸行为代谢效果不同,低浓度重金属与低分子有机酸相结合,增加土壤表面重金属的解吸与溶解,改变重金属形态,降低毒性,提高真菌的耐受性;高浓度重金属抑制土壤真菌生长,破坏其生物活性,进而影响其代谢能力^[8]。

在矿区重金属污染严重的土壤中,曾有学者分离出大量耐重金属的土壤微生物^[9-11]。但不同浓度的重金属胁迫对真菌产酸性能影响的报道较少。甘肃金川矿区主要产品是镍(nickel, Ni)和铜(copper, Cu), Ni、Cu 被提取后,铅(lead, Pb)、镉(cadmium, Cd)、锌(zinc, Zn)是废渣堆主要污染物,结合该地区土壤理化性质和本团队此前在金川矿区就 Ni、Cu 对土著微生物影响相关成果^[12],表明该地区主要潜在生态危害指数为 $Pb > Cu > Zn > Cd > Ni$ 。本文以甘肃金川矿区废渣堆土壤中分离的产酸真菌为研究对象,探究不同质量浓度 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 对产酸真菌产酸能力与重金属耐受能力的影响,以期为干旱荒漠金属矿区重金属污染土壤修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 供试土壤

土壤样品采自甘肃省金昌市金川矿区北部某废弃镍铜矿废渣堆(38°30'57.5"N, 102°09'4.2"E)。采集表层 5–15 cm 处土壤用于产酸真菌的分离、土壤理化性质测定和潜在生态危害评价^[13],每组 3 个平行。

潜在生态危害指数(potential ecological risk index)是根据重金属性质及其环境行为,从沉积学角度提出的对土壤或沉积物中重金属污染进行评

价的方法。其计算公式为:

(1) 单个元素的污染系数(C_r^i)

$$C_r^i = C_{\text{实测}}^i / C_n^i$$

(2) 某一重金属的潜在生态危害指数(E_r^i)

$$E_r^i = T_r^i \times C_r^i$$

(3) 某一点沉积物多种重金属综合潜在生态危害指数(RI)

$$RI = \sum_{i=1}^n E_r^i$$

式中, C_r^i 为某一种金属的污染系数, $C_{\text{实测}}^i$ 为表层沉积物重金属元素的实测含量, C_n^i 为该元素的评价标准, E_r^i 为某一重金属的潜在生态危害指数, T_r^i 为各种金属的毒性响应系数, RI 为某一点沉积物多种重金属综合潜在生态危害指数。

1.1.2 真菌培养基

PDA 固体培养基和蔗糖发酵培养基的配制参照文献[14]; 查氏鉴别培养基的配制参照文献[15]。

1.1.3 主要试剂和仪器

溴甲酚紫, 天津市鲁鑫化工科技有限公司; Taq Plus DNA 酶, 生工生物工程(上海)股份有限公司。pH 计, 上海力辰仪器科技有限公司; PCR 仪, ABI; 凝胶成像仪, 上海复日科技有限公司。

1.2 产酸真菌的分离

称取 1 g 土壤样品溶于 9 mL 无菌水, 稀释 10^2 、 10^3 、 10^4 倍后分别涂布 PDA 培养基, 30 °C 恒温箱中培养 72 h。挑选出不同形状菌落涂布查氏鉴别培养基, 于 30 °C 恒温箱中培养, 观察真菌生长及变色圈变化过程, 选择变色能力最好的 2 种菌落反复划线分离获得纯种菌株, 斜面保藏于试管中。取菌株接种于 PDA 培养基于 30 °C 培养 5 d, 运用直接制片观察法制片, 镜检进行形态学鉴定。

1.3 产酸真菌鉴定

1.3.1 形态学鉴定

对分离到的菌株采用 PDA 培养基平板菌落观察, 于 30 °C 恒温培养 5 d, 参照《真菌鉴定手册》^[16] 对菌落形态和显微形态进行观察与鉴定。

1.3.2 分子生物学鉴定

对分离纯化菌株采用 CTAB 法^[17]提取的基因组 DNA 作为模板,采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: DNA 样品 0.5 μ L, 10 \times Buffer (with Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μ L, *Taq* Plus DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 引物 ITS1 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 引物 ITS4 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 加双蒸 H_2O 至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}C$ 4 min; 94 $^{\circ}C$ 45 s, 55 $^{\circ}C$ 45 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min; 4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 产物采用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,并用 BioEdit 软件进行多序列比对,提交序列至 GenBank,比对后从 GenBank 中选择和下载近缘菌株 18S rRNA 基因序列,用 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.4 产酸真菌产酸水平及重金属耐受度

取 30 $^{\circ}C$ 恒温培养 5 d 的产酸真菌 PDA 平板,用无菌水洗下孢子制成孢子悬浮液(孢子数约为 3.2×10^6 spores/mL),吸取 2%孢子液于不同重金属发酵培养基的摇瓶中,30 $^{\circ}C$ 、160 r/min 摇床振荡培养,每 12 h 取 1 mL 发酵液测定 pH 值^[18]。

分别用 $Pb(NO_3)_2$ 、 $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (分析纯)配制 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 为 50 000 mg/L 重金属母液,采用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后备用,取一定量的母液与灭菌 PDA 培养基混合均匀后倒平板,设置 Pb^{2+} 的浓度为 0、300、500、700、1 000、1 500、2 000 mg/L,设置 Cd^{2+} 的浓度为 0、50、100、200、300、400、500 mg/L,设置 Zn^{2+} 的浓度为 0、100、200、300、400、500、1 000 mg/L。

每个处理重复 3 次。产酸真菌经平板活化 10 d 后在菌落边缘用直径 3 mm 打孔器打孔,再接种于重金属平板中央,置于 30 $^{\circ}C$ 恒温箱中培养 10 d 后,采用十字交叉法测量各重金属平板上产酸真菌直

径,计算产酸真菌对重金属的抑制率,表征产酸真菌对重金属的耐受性。

抑制率(%)=(空白平板直径-重金属平板直径)/(空白直径-3 mm) $\times 100$ ^[14]。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

该地区土壤为碱性土壤(pH>7.0),其中重金属 Cd、Cu、Ni、Pb 和 Zn 的含量分别为 0.24 ± 0.061 、 141.03 ± 0.8 、 114.04 ± 0.51 、 2024.99 ± 0.20 和 11913.36 ± 1.46 。在 pH>7.5 条件下,Cu、Ni、Pb、Zn 的浓度均显著超过农用地土壤污染风险国家二级标准筛选值^[19]。

2.2 潜在生态危害指数

为了反映区域差异性,根据潜在生态危害指数(RI)评价方法,选择甘肃省土壤环境背景值^[20]作为参比值:Cd、Cu、Ni、Pb 和 Zn 的环境背景值分别为 0.1、24.1、35.2、18.8 和 69.3,结合各种金属的毒性系数:Cd、Cu、Ni、Pb 和 Zn 的毒性系数分别为 30、5、5、5 和 1,计算出该矿区土壤样品中各重金属的潜在生态危害单项指数 E_r^i 及潜在生态危害综合指数 RI,结果见表 1。重金属潜在生态危害单项指数和潜在生态危害综合指数分级标准见表 2。

表 1 重金属潜在生态危害单项指数 E_r^i 及潜在生态危害综合指数 RI

Table 1 The single index E_r^i and the composite index RI of potential ecological hazard

重金属种类	E_r^i	RI
Heavy metal species		
镉	62.07	1 025.46
Cadmium (mg/kg)		
铜	236.73	
Copper (mg/kg)		
镍	16.20	
Nickel (mg/kg)		
铅	538.55	
Lead (mg/kg)		
锌	171.91	
Zinc (mg/kg)		

表 2 潜在生态危害单项指数 E_r^i 和潜在生态危害综合指数 RI 与污染程度的关系
Table 2 Relationship between pollution level and potential ecological hazard index E_r^i , RI

E_r^i 与污染程度 E_r^i and pollution levels		RI 与污染程度 RI and pollution levels	
$E_r^i < 40$	轻微生态危害 Minor ecological hazard	$RI < 40$	轻微生态危害 Minor ecological hazard
$40 \leq E_r^i < 80$	中等生态危害 Medium ecological hazard	$150 \leq RI < 300$	中等生态危害 Medium ecological hazard
$80 \leq E_r^i < 160$	强生态危害 Strong ecological hazard	$300 \leq RI < 600$	强生态危害 Strong ecological hazard
$160 \leq E_r^i < 320$	很强生态危害 Very strong ecological hazard	$RI \geq 600$	很强生态危害 Very strong ecological hazard
$E_r^i \geq 320$	极强生态危害 Extreme ecological hazard		

5 种重金属中, Cd 的平均含量虽然较低, 但构成了中度生态危害, 原因在于其毒性系数较大; Cu 构成强度生态危害; Ni 的平均含量虽然很高, 但只构成轻度生态危害; Pb 构成极强生态危害; Zn 构成强生态危害。少量 Cd 在生态环境中对生态系统和人类健康可以构成很大的威胁, 应格外引起注意。重金属 Pb 潜在生态危害单项指数 E_r^i 最大, 并且潜在生态危害综合指数 $RI \geq 600$, 说明该地区重金属污染严重, 具有很强的生态危害, 而且主要污染物为铅污染。

2.3 菌株的分离和鉴定

从矿区土壤中分离到 2 株产酸效果较好的菌, 编号分别为 ZJ-I 与 ZJ-V, 在 PDA 培养基中 30 °C

培养 5 d, 两株菌形态如图 1 所示。
菌株 ZJ-I: 菌落呈圆形, 中间黑色呈厚绒毛状, 菌丝为黑褐色, 长有大量黑褐色孢子。显微镜下观察, 菌丝发达, 多分枝; 分生孢子梗细长, 分生孢子头为穗球形, 上面有大量分生孢子, 分生孢子梗末端有球形顶囊(图 1A、B)。
菌株 ZJ-V: 菌落呈辐射性波纹, 边缘菌丝体白色, 质地绒状, 表面呈黄色, 分生孢子结构大量分枝, 边缘白色(图 1C、D)。
参照《真菌鉴定手册》^[16]对菌株的形态描述, 初步确定所筛菌株 ZJ-I 和 ZJ-V 为黑曲霉和产黄青霉。
菌株 ZJ-I、ZJ-V 经过 PCR 扩增后的电泳图见图 2。将菌株 ZJ-I、ZJ-V 的 18S rRNA 基因序列登

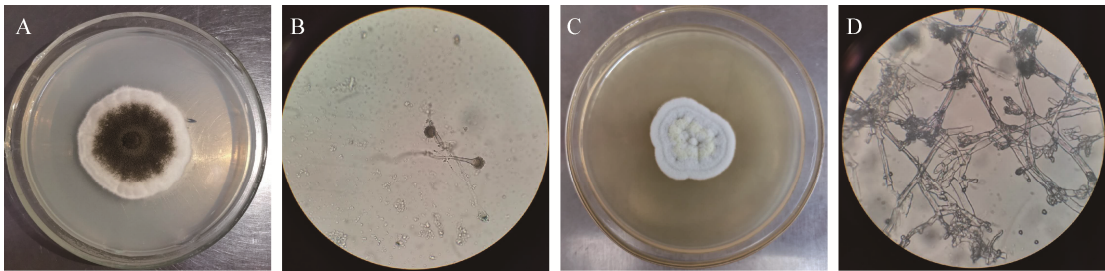


图 1 产酸真菌在 PDA 培养基与显微镜下的形态
Figure 1 Morphology of acid-producing fungi under PDA medium and microscope

注: A: 菌株 ZJ-I 在 PDA 培养基上的形态; B: 菌株 ZJ-I 在显微镜下的孢子形态; C: ZJ-V 在 PDA 培养基上的形态; D: 菌株 ZJ-V 在显微镜下的孢子形态。
Note: A: Strain ZJ-I in PDA medium morphology; B: Strain ZJ-I in microscope spore morphology; C: Strain ZJ-V in PDA medium morphology; D: Strain ZJ-V in microscope spore morphology.

录 GenBank, 与 GenBank 中的 18S rRNA 基因序列进行同源性比较, 采用 MEGA 5.0 软件构建菌株 ZJ-I、ZJ-V 的系统发育进化树(图 3)。综合分析菌株 ZJ-I、ZJ-V 平板菌落形态特征、显微形态特征和同源性、进化树等参数, 分别将菌株 ZJ-I 和 ZJ-V 鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*)。

2.4 菌株的产酸分析

未进行重金属处理时, 菌株 *Aspergillus niger* ZJ-I 和 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V 真菌培养液初始 pH 值为 5.44, 菌株 *Aspergillus niger* ZJ-I 培养 15 h 后培养液 pH 值降至最小值 4.86, 菌株培养液 pH 值下降了 0.58; 菌株 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V 培养 15 h 后培养液 pH 值降至最小值 4.58, 菌株培养液 pH 值下降了 0.86, 菌株 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V 的产酸效果优于 *Aspergillus niger* ZJ-I。

重金属胁迫下, 随重金属浓度的增加, 菌株 *Aspergillus niger* ZJ-I、*Penicillium chrysogenum* ZJ-V

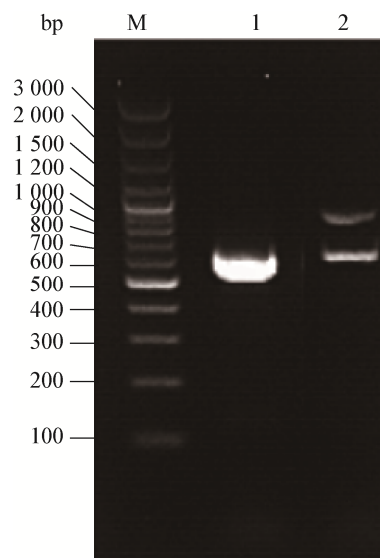


图 2 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 2 Agarose gel electrophoretogram

注: M: 3 000 bp DNA Marker; 1: 菌株 ZJ-I 目的条带; 2: 菌株 ZJ-V 目的条带。

Note: M: 3 000 bp DNA Marker; 1: Strain ZJ-I target band; 2: Strain ZJ-V target band.

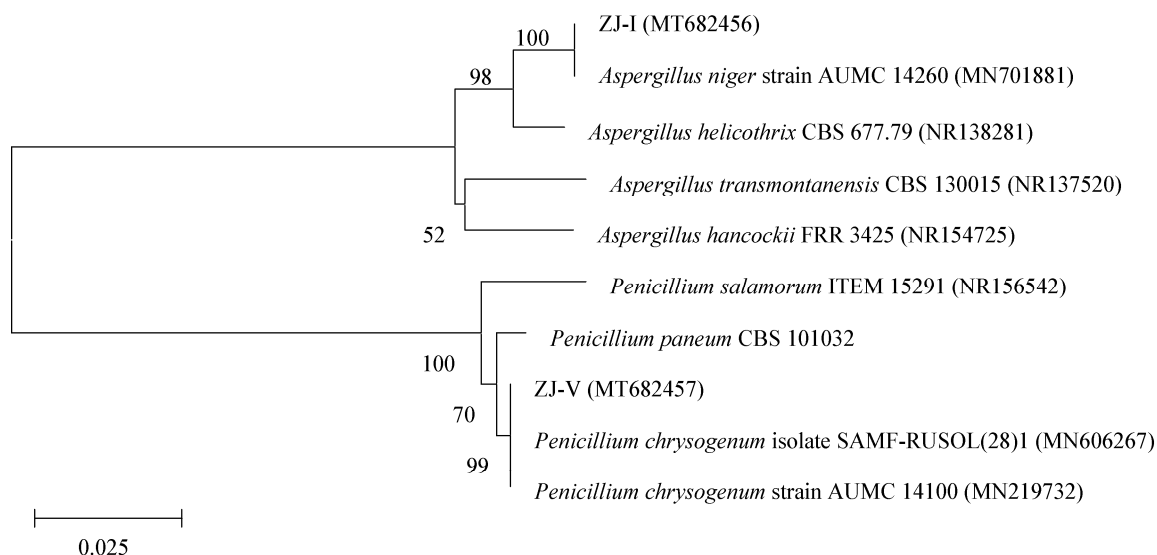


图 3 基于 18S rRNA 基因序列的产酸真菌系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of acid-producing fungi based on 18S rRNA gene sequence

注: 分支上的数字表示构建系统发育树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 分支的长度代表进化距离, 系数为 0.025; 括号内的序号为已知菌株的 GenBank 登录号。

Note: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.025; The number in parentheses is the GenBank accession number of a known strain.

的初始培养液 pH 值降低、pH 变化幅度变小、到达最低 pH 时间延长,培养液在发酵初期出现 pH 上升趋势。重金属 Pb 胁迫时, pH 值降幅最大者为菌株 *Aspergillus niger* ZJ-I, 在 0.97 mmol/L Pb 处理该菌株 27 h 后培养液 pH 值下降了 0.53; 重金属 Cd 胁迫时, pH 降幅最大者为菌株 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V, 在 0.44 mmol/L Cd 处理该菌株 15 h 后培养液 pH 下降了 0.62; 重金属 Zn 胁迫时, pH 值降幅最大者为菌株 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V, 在 1.53 mmol/L Zn 处理该菌株 15 h 后培养液 pH 值下降了 1.1 (图 4、图 5)。

2.5 产酸真菌对重金属的耐受性

观测菌株 ZJ-I 与 ZJ-V 在不同浓度的 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 平板上培养 10 d 后的菌落直径大小, 考察这两株产酸真菌对重金属的耐受性。如图 6 所示, 随着重金属离子浓度的增加, 菌株 ZJ-I 与 ZJ-V 均受到不同程度的抑制情况, Cd^{2+} 浓度为 100 mg/L 时对菌株 ZJ-I 的抑菌率达到了 80% 左右, 显著抑制真菌生长, 但是 Cd^{2+} 浓度在 200、300 mg/L 时抑菌率并没有显著变化, 保持在 80% 左右, Cd^{2+} 浓度在 400、500 mg/L 时完全抑制, 而在 Cd^{2+} 浓度为 200 mg/L 时对菌株 ZJ-V 的抑菌率达到 80% 左右, 显著抑制菌的生长, 随着 Cd^{2+} 浓度增加, 抑菌率也在增大, 在 300 mg/L 时抑菌率超过 90%, 几乎完全抑制了菌的生长; 在 Pb^{2+} 浓度为 200、300 mg/L 时, 对 ZJ-I 的抑制效果较少, 当 Pb^{2+} 在高浓度 2 000 mg/L 的时候抑制率达到 80% 以上。然而对于菌株 ZJ-V, Pb^{2+} 浓度为 200 mg/L 时其抑制率仅为 20% 左右, 几乎没有影响; 当 Pb^{2+} 浓度为 500 mg/L 时其抑菌率仅为 40% 左右; 当 Pb^{2+} 浓度为 2 000 mg/L 时抑菌效果显著, 达到 80% 以上。在 Zn^{2+} 浓度上升至 400 mg/L 时对菌株 ZJ-I 的抑菌率达到了 95%, 在 Zn^{2+} 浓度上升至 1 000 mg/L 时对菌株 ZJ-V 的抑菌率达到了 80% 以上, 均显著抑制菌的生长。

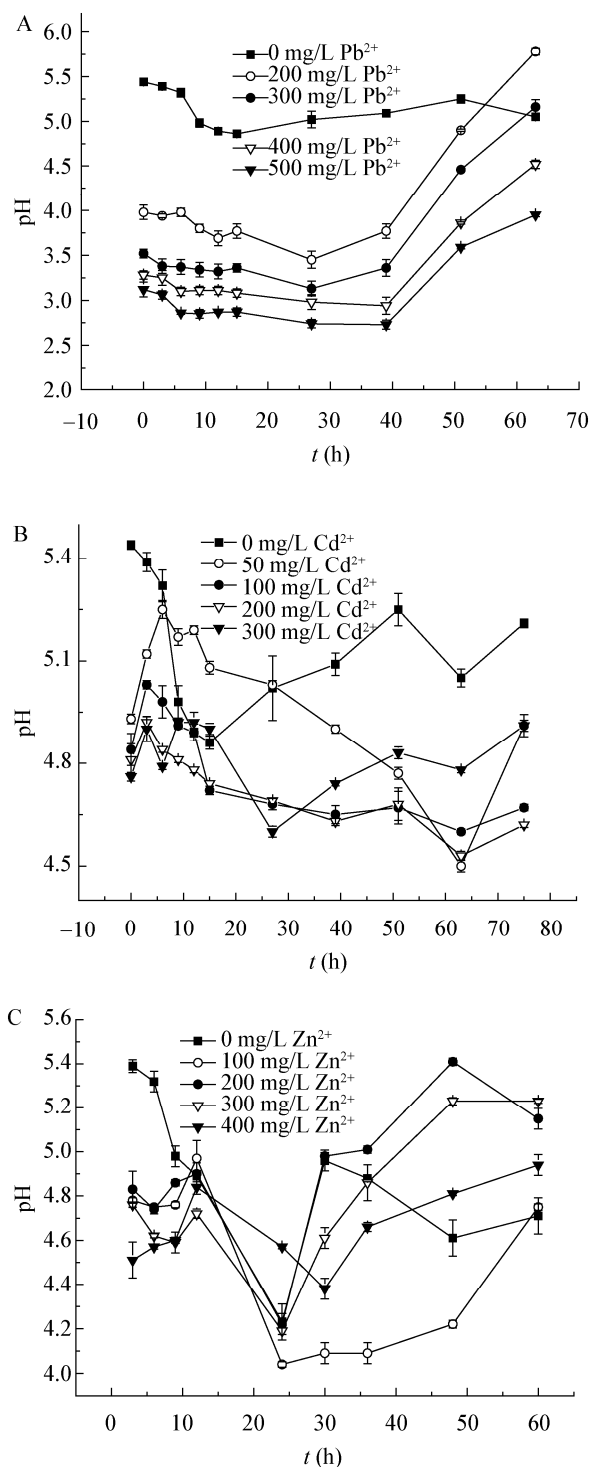


图 4 不同浓度 Pb^{2+} (A)、 Cd^{2+} (B) 与 Zn^{2+} (C) 处理下菌株 *Aspergillus niger* ZJ-I 的 pH

Figure 4 pH of *Aspergillus niger* ZJ-I under different treatments of Pb^{2+} (A), Cd^{2+} (B) and Zn^{2+} (C)

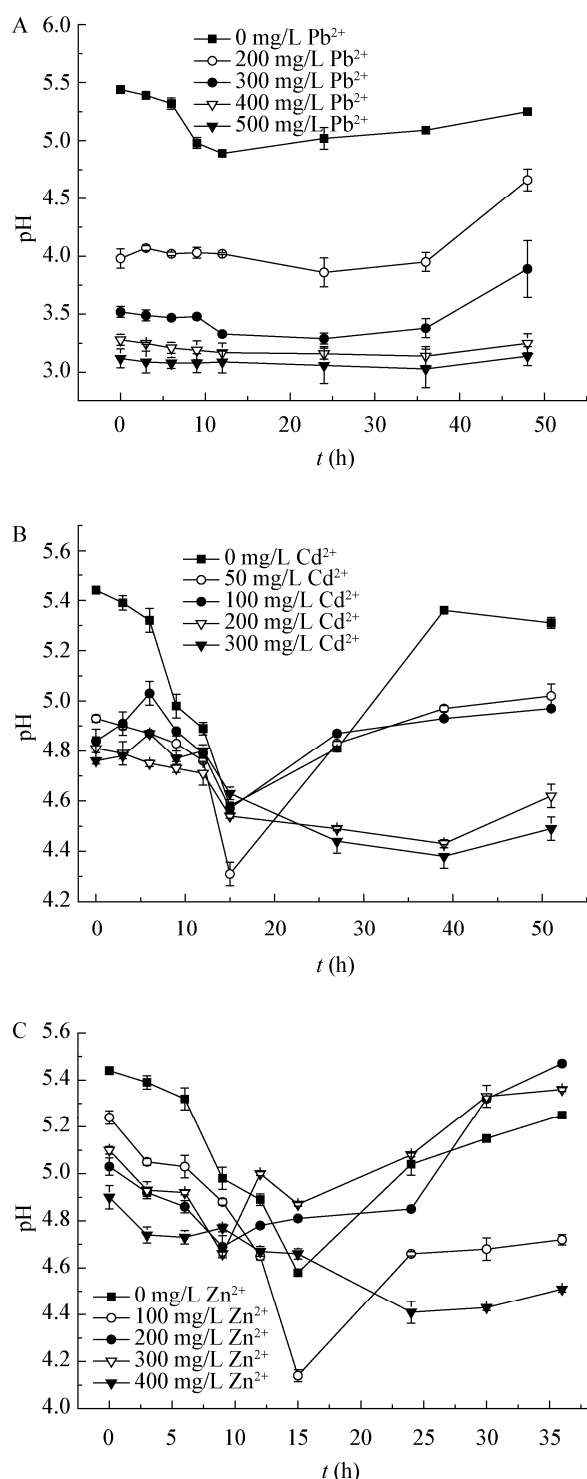


图5 不同浓度 Pb²⁺ (A)、Cd²⁺ (B)与 Zn²⁺ (C)处理下菌株 *Penicillium chrysogenum* ZJ-V 的 pH

Figure 5 pH of *Penicillium chrysogenum* ZJ-V under different treatments of Pb²⁺ (A), Cd²⁺ (B) and Zn²⁺ (C)

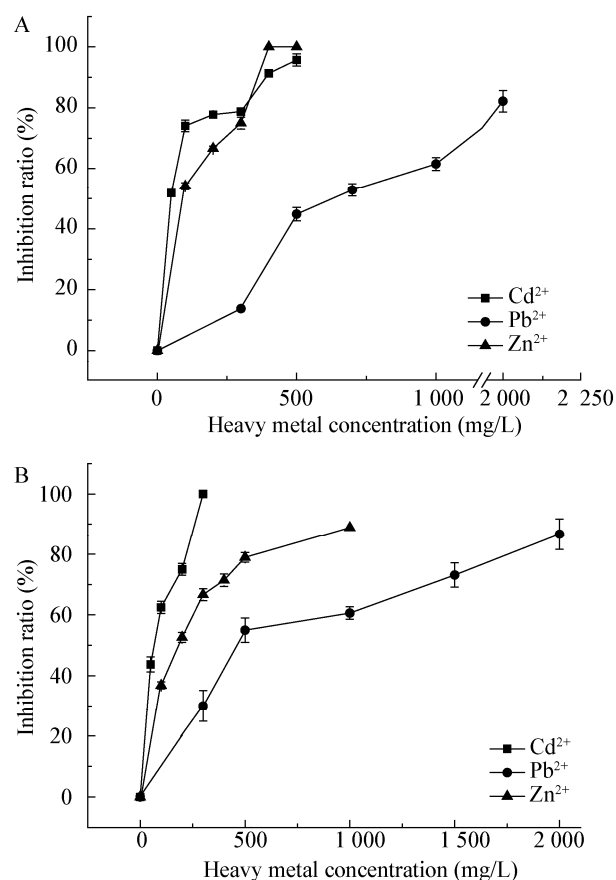


图6 重金属 Cd、Pb 和 Zn 对菌株 ZJ-I (A)与菌株 ZJ-V (B)生长的影响

Figure 6 Effects of heavy metal Cd, Pb and Zn on the growth of strain ZJ-I (A) and strain ZJ-V (B)

3 讨论与结论

重金属胁迫会促进微生物分泌小分子有机酸来抵抗重金属的毒害,有机酸是微生物的重要酸性代谢产物,微生物分泌小分子有机酸受到许多因素的影响^[21-23],如基因、温度和 pH 等。代谢产生的有机酸可以与重金属发生螯合作用形成金属配位体复合物,使离子态金属转变成低毒或无毒的螯合态,进而提高生物内部耐受力^[24]。不同有机酸对不同土壤吸附重金属离子的影响既与土壤理化性质有关,又与有机酸种类、重金属离子价态有关。本文中菌株 ZJ-I、ZJ-V 在不同时期所产生有机酸种类及有机酸含量需要进一步分析表征。已有研究发现,高浓度重金属离子对微生物生长产生明显抑制的

原因在于高浓度重金属对微生物生物活性及结构产生了毒害^[25], 微生物对金属离子耐受机制主要包括沉淀、生物转化、细胞内隔离以及对细胞膜和细胞外聚物质中电负性成分的物理排斥。重金属离子刺激微生物产生更多分泌物, 如细胞外聚物质^[25]、谷胱甘肽^[26]、氨基酸^[27], 高浓度重金属会引起蛋白质变性及改变生物膜透性, 从而影响土壤微生物数量、土壤微生物群落、土壤微生物功能基因/蛋白质和代谢活动^[28], 这与 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 在高浓度下抑制菌株 ZJ-I、ZJ-V 数据变化趋势一致。环境中不同浓度重金属对微生物的生长有不同的影响, 某些高浓度重金属对微生物生长抑制效果较弱, 是由于微生物本身对某些重金属离子具有一定的抗性, 例如高浓度 Pb^{2+} 对菌株 ZJ-I 与 ZJ-V 的抑制较弱。菌株 ZJ-I、ZJ-V 对 Pb^{2+} 具有较好的耐受性, 可能是由于该菌生长过程产生了较多的草酸, 形成了草酸铅沉淀, 从而降低了游离态 Pb^{2+} 对该菌的毒害^[29], 或者是微生物体内分泌物的自我调节起到了缓解重金属胁迫的作用, 毒性减小^[26]。不同种类重金属对微生物的毒性效应从大到小的排列为 $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Al} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn}$, 某些非生物学功能的金属离子如 Hg 、 Ag 和 Cd^{2+} 低浓度时就具有高毒性^[8]。这与本文菌株 ZJ-I 与 ZJ-V 在低浓度 Cd^{2+} 胁迫时被抑制率升高的变化趋势一致, 表明菌株 ZJ-I、ZJ-V 对 Cd 的耐受性较低。高浓度的 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 对两株产酸真菌的抑菌率都达到 80% 以上, 菌株生长受到强烈的抑制, 而低浓度的 Pb^{2+} 对菌株生长的影响不大, 但高浓度的 Pb^{2+} 对两株产酸真菌都会产生抑制效果。本文筛选出的菌株 ZJ-I、ZJ-V 耐重金属 Zn 、 Pb 效果明显好于林璟等^[18] 筛选出的用于去除土壤中重金属的黑曲霉, 研究表明两株真菌均具有一定的产酸能力及重金属耐性, 菌株 ZJ-V 优于菌株 ZJ-I, 可以考虑利用菌株 ZJ-V 发酵淋洗重金属污染的土壤, 为微生物在重金属污染严重土壤中的生物修复提供理论支持。

REFERENCES

- [1] Zhang SR, Wang CY, Liu JH, et al. Assessment of heavy metal pollution and ecological risk in soils of the southwestern part of the Xiongan New Area[J]. *Earth Science Frontiers*, 2020: 1-13 (in Chinese)
张素荣, 王昌宇, 刘继红, 等. 雄安新区西南部土壤重金属污染特征及生态风险评价[J]. *地学前缘*, 2020: 1-13
- [2] Ren XH, Gao ZJ, An YH, et al. Pollution characteristics and ecological risk assessment of soil heavy metals in northern Ganzhou district, Zhangye city[J]. *Journal of Arid Land resources and Environment*, 2020, 34(7): 163-169 (in Chinese)
任晓辉, 高宗军, 安永会, 等. 张掖市甘州区北部土壤重金属污染特征及生态风险评价[J]. *干旱区资源与环境*, 2020, 34(7): 163-169
- [3] Du XL, Li B, Cui JH, et al. Assessment of heavy metal pollution and risk of farmland soil and agricultural products around a smelter in Liaoning[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020: 1-14 (in Chinese)
都雪利, 李波, 崔杰华, 等. 辽宁某冶炼厂周边农田土壤与农产品重金属污染特征及风险评价[J]. *农业环境科学学报*, 2020: 1-14
- [4] Lei Q, Xie CQ, Liu LF, et al. Effects of Cadmium on the hydrogen ion secretion of rhizosphere fungi of *Oxyria sinensis* hemsle in abandoned lead-zinc mining area in Huize, Yunnan[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(17): 177-181 (in Chinese)
雷强, 谢春琼, 刘鲁峰, 等. 镉对铅锌矿区中华山蓼根际真菌氢离子分泌的影响[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(17): 177-181
- [5] Jiang YN, Gu XR, Zhou Q, et al. Organic acid secretion and aluminum absorption kinetics by *Lactarius deliciosus* and *Pisolithus tinctorius* under aluminum stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(11): 3441-3449 (in Chinese)
江亚男, 辜夕容, 周倩, 等. 铝胁迫下两种外生菌根真菌的有机酸分泌与吸收动力学特征[J]. *生态学杂志*, 2019, 38(11): 3441-3449
- [6] Deng XH. Bioremediation on the soil at Pb/Zn smelting slag site using *Penicillium chrysogenum* F1[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Central South University, 2013 (in Chinese)
邓新辉. 铅锌冶炼废渣堆场土壤产黄青霉菌 F1 浸出修复研究[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2013
- [7] Burgstaller W, Schinner F. Minireview: Leaching of metals with fungi[J]. *Journal of Biotechnology*, 1993, 27(2): 91-116
- [8] Li SY, Ma YQ, Su YL, et al. Effect of heavy metal stress on microbial growth[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012, 40(2): 90-94 (in Chinese)
李淑英, 马玉琪, 苏亚丽, 等. 重金属胁迫培养对微生物生长的影响[J]. *贵州农业科学*, 2012, 40(2): 90-94
- [9] Zhang XD, Li YS, Chen J, et al. Screening and identification of bacteria resistant to heavy metals such as iron, manganese, copper and chromium in soil of Baorixile

- mining area[J]. Journal of China Coal Society, 2019, 44(12): 3790-3796 (in Chinese)
- 张晓东, 李雅舒, 陈金, 等. 宝日希勒矿区土壤耐重金属铁、锰、铜、铬细菌的筛选与鉴定[J]. 煤炭学报, 2019, 44(12): 3790-3796
- [10] Li J, Cheng XF, Liao P, et al. Chromium-resistant rhizosphere actinomycetes from *Deyeuxia scabrescens* in Panzhihua mine area: Isolation, screening and plant growth promoting[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, 38(3): 1197-1206 (in Chinese)
- 李静, 程雪芬, 廖萍, 等. 攀枝花矿区糙野青茅根际耐铬放线菌筛选及促生能力评价[J]. 环境科学学报, 2018, 38(3): 1197-1206
- [11] Jiang YR, Liang Y, Zhang XH, et al. Vertical microbial community structure of heavy metal contaminated soils from mine tailings of different degrees in lead-zinc mining areas[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2019, 28(10): 2079-2088 (in Chinese)
- 蒋永荣, 梁英, 张学洪, 等. 铅锌矿区不同程度尾矿砂重金属污染土壤的纵向微生物群落结构分析[J]. 生态环境学报, 2019, 28(10): 2079-2088
- [12] Lu TX. Study on diversity and screening of soil microbes in Jinchuan mining area[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou Jiaotong University, 2016 (in Chinese)
- 路桃香. 金川矿区土壤微生物的分离鉴定及多样性研究[D]. 兰州: 兰州交通大学硕士学位论文, 2016.
- [13] Huang H, Nan ZR, Hu XN, et al. Spatial distributions of heavy metals and assessment of potential ecological risk in Jinchang urban area[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2009, 21(5): 30-34 (in Chinese)
- 黄璜, 南忠仁, 胡小娜, 等. 金昌市城区土壤重金属空间分布及潜在生态危害评价[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(5): 30-34
- [14] Zha H. Isolation and identification of *Penicillium chrysogenum* ZG-16 and its role in removal of heavy metals from sludge[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- 查慧. 产黄青霉(*Penicillium chrysogenum* ZG-16)的分离鉴定及其去除污泥中重金属的效果研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2015
- [15] Wang YD. Screening of heterotrophic microorganism for uranium leaching and study on uranium leaching mechanism of *Aspergillus niger*[D]. Hengyang: Doctoral Dissertation of Institute of University of South China, 2014 (in Chinese)
- 王永东. 浸铀异养微生物的筛选及黑曲霉浸铀机理研究[D]. 衡阳: 南华大学博士学位论文, 2014
- [16] Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979 (in Chinese)
- 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979
- [17] He YQ. An improved protocol for fungal DNA preparation[J]. Mycosystema, 2000, 19(3): 434
- [18] Lin J, Xu HY, Zhang MJ, et al. Isolation and identification of a strain of *Aspergillus niger* producing acid and its heavy metal tolerance[J]. Journal of Zhejiang Shuren University, 2019, 19(3): 18-21 (in Chinese)
- 林璟, 徐好仪, 张梦婕, 等. 一株产酸黑曲霉的分离鉴定及其重金属耐受性[J]. 浙江树人大学学报(自然科学版), 2019, 19(3): 18-21
- [19] Ministry of Ecology and Environment, State Administration for Market Regulation. GB 15618-2018 Soil environmental quality Risk control standard for soil contamination of agricultural land[S]. Beijing: China Standard Press, 2018 (in Chinese)
- 生态环境部, 国家市场监督管理总局. GB 15618-2018 土壤环境质量 农用地土壤污染风险管控标准(试行)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018
- [20] China National Environmental Monitoring Centre. Background Values of Soil Elements in China[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990 (in Chinese)
- 中国环境监测总站. 中国土壤元素背景值[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990
- [21] Qin L, Zhou XY, Wang LJ, et al. Knock-out and functional analysis of citrate synthase gene from *Aspergillus niger*[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1740-1752 (in Chinese)
- 秦娜, 周翔宇, 王丽娟, 等. 黑曲霉菌株柠檬酸合成酶基因的敲除及功能分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1740-1752
- [22] Zhang DL, Li SL, Lu RL, et al. Influence of incubation time on metabolites in mycelia of *Paecilomyces militaris*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(12): 1477-1488 (in Chinese)
- 张德龙, 李淑林, 陆瑞利, 等. 培养时间对蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)菌丝体中代谢产物的影响[J]. 微生物学报, 2012, 52(12): 1477-1488
- [23] Chen MJ, Liu QW, Tan JY, et al. Research advance on effects of heavy metal stress on plant organic acid metabolism[J]. Guangdong Agricultural Science, 2015, 42(24): 86-91 (in Chinese)
- 陈美静, 刘倩雯, 谭佳缘, 等. 重金属胁迫对植物有机酸代谢影响研究进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(24): 86-91
- [24] Fu XP, Dou CM, Hu SP, et al. A review of progress in roles of organic acids on heavy metal resistance and detoxification in plants[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(11): 1354-1358 (in Chinese)
- 傅晓萍, 豆长明, 胡少平, 等. 有机酸在植物对重金属耐受性和解毒机制中的作用[J]. 植物生态学报, 2010, 34(11): 1354-1358
- [25] Dang CY, Yang ZX, Liu W, et al. Role of extracellular polymeric substances in biosorption of Pb^{2+} by a high metal ion tolerant fungal strain *Aspergillus niger* PTN31[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2018, 6(2): 2733-2742
- [26] Ye BH, Luo YT, He JY, et al. Investigation of lead bioimmobilization and transformation by *Penicillium*

- oxalicum* SL2[J]. Bioresource Technology, 2018, 264: 206-210
- [27] Li XN, Gitau MM, Han SJ, et al. Effects of cadmium-resistant fungi *Aspergillus aculeatus* on metabolic profiles of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] under Cd stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 114: 38-50
- [28] Liu SS, Fu JP, Cai XD, et al. Effect of heavy metals pollution on ecological characteristics of soil microbes: a review[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2018, 27(6): 1173-1178 (in Chinese)
- 刘沙沙, 付建平, 蔡信德, 等. 重金属污染对土壤微生物生态特征的影响研究进展[J]. 生态环境学报, 2018, 27(6): 1173-1178
- [29] Long BB, Ye JE, Ye Z, et al. Cr(VI) removal by *Penicillium oxalicum* SL2: Reduction with acidic metabolites and form transformation in the mycelium[J]. Chemosphere, 2020, 253: 126731

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2020 年每册定价 130 元, 全年 1560 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413