



研究报告

棘孢木霉菌对钠胁迫的生理响应机制

唐家全^{1,2} 郝大志^{1,2} 李婷婷^{1,2} 张慧^{1,2} 陈捷^{*1,2}

1 上海交通大学农业与生物学院 上海 200240

2 上海交通大学微生物代谢国家重点实验室 上海 200240

摘要:【背景】棘孢木霉菌制剂被广泛应用于生物防治和次生盐渍化土壤的微生物修复,但是关于棘孢木霉在盐渍化胁迫条件下生长的耐盐机理及其富集盐离子的能力尚缺乏深入研究。【目的】揭示一株耐盐棘孢木霉菌(*Trichoderma asperellum*) CTCCSJ-W-SBW10264 (T264)对钠胁迫的生理响应机制及其对钠离子的吸附和累积特性。【方法】设计梯度浓度钠胁迫培养实验,采集不同培养时期的菌丝样本,测定细胞氧化损伤相关指标 H_2O_2 和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的含量及细胞抗氧化相关酶的活性变化。【结果】钠胁迫实验表明,棘孢木霉 T264 能够在 1.22 mol/L 的钠胁迫环境中生存,在低于 0.25 mol/L 的钠胁迫下其生长不会被明显抑制。细胞氧化损伤及氧化损伤响应相关指标的研究结果表明,培养液中钠离子浓度越高,棘孢木霉的膜系统氧化水平(MDA 含量)越高,而且随着细胞中 MDA 和 H_2O_2 的累积,细胞抵御氧化损伤相关酶的活性也有明显提高,在钠盐处理 24 h 后,0.5、1.0 和 1.22 mol/L 的钠离子胁迫分别使过氧化物酶(Peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性达到峰值,依次为 36.66、3.34 和 233.3 U/mg。钠离子吸附和累积特性实验结果表明,棘孢木霉 T264 的菌丝对钠离子有强的吸附能力。在 0.05 mol/L 的钠离子环境中培养 72 h 后,菌丝表面钠离子吸附量为 1 347.6 mg/g,菌丝内部钠离子累积量为 218.6 mg/g,木霉菌菌丝通过菌丝表面吸附和菌丝内部累积对培养液中钠离子的去除率达到 32%。【结论】T264 的抗氧化损伤相关酶在其耐受钠离子胁迫过程中发挥重要作用,菌株 T264 对高浓度钠离子有强适应性,而且对环境中钠离子有高效的吸附和累积作用。

关键词: 棘孢木霉, 钠胁迫, 氧化损伤, 生理响应

Physiological response of *Trichoderma asperellum* to Na^+ stressTANG Jiaquan^{1,2} HAO Dazhi^{1,2} LI Tingting^{1,2} ZHANG Hui^{1,2} CHEN Jie^{*1,2}

1 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] *Trichoderma asperellum* agent has been widely used in biological control and secondary bioremediation of soil secondary salinization, while less is known about the salt-tolerant mechanism and salt accumulation potential of this strain under stress of salinization. [Objective] This

Foundation item: Shanghai Science and Technology Commission Projects (18391902400)

*Corresponding author: E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

Received: 08-05-2020; Accepted: 17-06-2020; Published online: 11-09-2020

基金项目: 上海市科学技术委员会研发项目(18391902400)

*通信作者: E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-05-08; 接受日期: 2020-06-17; 网络首发日期: 2020-09-11

research aimed to reveal the physiological response of *Trichoderma asperellum* CTCCSJ-W-SBW10264 (T264) to Na^+ -induced oxidative stress and the Na^+ adsorption and accumulation characteristics of this strain. **[Methods]** Gradient concentrations of Na^+ in broth were designed as stress factor in fermentation experiment of strain T264, then mycelia samples at different culture stages were collected for the measurement of cell oxidative damage indices including H_2O_2 content and malondialdehyde (MDA) level together with the activity of cellular antioxidant related enzymes. **[Results]** Result of Na^+ stress cultivation experiment indicated that T264 could survive with Na^+ concentration of 1.22 mol/L, and the growth of T264 was not significantly inhibited with Na^+ concentration lower than 0.25 mol/L. The results of study on oxidative damage and oxidative damage responses revealed that the higher Na^+ concentration lead to the higher cellular oxidation level (MDA content). Moreover, with the accumulation of MDA and H_2O_2 in hyphae of T264, the activity of antioxidative damage enzymes in cells was also increased significantly. After Na^+ treatment for 24 h, the activities of peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were respectively highest under the Na^+ stress of 0.5, 1.0 and 1.22 mol/L, respectively, which were 36.66, 3.34 and 233.3 U/mg. The experimental results of Na^+ adsorption and accumulation characteristics showed that hyphae of T264 had a strong adsorption capacity for Na^+ . After being cultured in the 0.05 mol/L Na^+ environment for 72 h, the surface Na^+ adsorption capacity of mycelia was 1 347.6 mg/g, and the internal Na^+ accumulation capacity of mycelia was 218.6 mg/g. The remove rate of Na^+ in the culture medium reached 32% through surface adsorption and internal accumulation of T264 mycelia. **[Conclusion]** This experiment showed that the antioxidant damage-related enzymes of T264 play an important role in its resistance to Na^+ stress, and the strain T264 has a strong adaptability to high concentration of Na^+ and an efficient adsorption and accumulation effect of Na^+ in the environment.

Keywords: *Trichoderma asperellum*, Na^+ stress, oxidative damage, physiological response

土壤盐渍化是世界范围内农业发展所面临的严重问题之一^[1]。据统计,全世界次生盐渍土约 $8 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 占陆地面积的 2%, 中国次生盐渍土约占耕地面积的 6.6%, 远高于世界平均水平^[2]。次生盐渍化不仅会影响植物生长, 降低农作物产量^[3], 同时也会对土壤微生物造成损害, 导致土质恶化^[4], 是农业可持续发展所面临的主要问题之一, 因此, 土壤次生盐渍化的修复技术被广泛研究^[5]。其中, 土壤次生盐渍化的微生物修复技术因其环境友好、无污染、持续时间长、稳定性较强等特点受到广泛关注, 相关研究也日益增多^[6]。宋玉珍^[7]的研究表明微生物修复剂可以改善盐渍化土壤的孔隙度和渗透性。韦婉玲等^[8]通过微生物菌肥改造盐碱地, 成功解除了盐渍化对木薯生长的抑制。

木霉菌作为一种土壤习居真菌广泛存在于不同的生态环境, 其因植物病害防治、生长促进、抗逆性增强以及土壤修复的丰富功能, 被广泛应用于

生防制剂和生物修复剂的研发和农业生产^[9]。近年来, 木霉菌也开始用于土壤盐渍化的生物修复研究中。梁荣等^[10]关于哈茨木霉防治葡萄病害及修复土壤盐渍化的研究表明, 每 667 m^2 的盐渍化土壤施用 10 kg 的哈茨木霉菌剂可以有效降低土壤盐分。除了研究木霉对土壤盐渍化的修复效果之外, 关于木霉菌提高作物耐盐机理以及木霉菌本身的耐盐机理相关研究也有一些报道。李哲等^[11]的研究表明, 哈茨木霉 LTR-2 能够增强椒样薄荷的耐盐性, 解除盐渍化对椒样薄荷生长的胁迫作用。向杰等^[12]关于哈茨木霉 ACCC32527 对钠胁迫的分子机理研究表明, 钠胁迫会导致哈茨木霉的抗氧化酶相关基因的表达部分上调。金属离子的胁迫会导致生物细胞中积累大量过氧化物如 H_2O_2 等^[13], 过氧化物的存在会干扰细胞正常的代谢活动^[14]。微生物主要通过抗氧化酶, 如过氧化物酶(Peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)等去除胞内积累的过

氧化物,以抵御由金属离子导致的氧化胁迫^[15]。目前虽然已有关于木霉菌耐受钠胁迫的分子机理相关研究,但是钠胁迫下木霉菌的生理响应机制尚未见报道。

本研究选用一株分离自盐田土壤的耐盐棘孢木霉菌 T264 作为供试菌株,通过对不同浓度钠离子胁迫条件下菌丝中抗氧化酶活的变化进行分析,揭示木霉菌耐盐的生理机制;同时对菌丝表面吸附和胞内积累钠离子进行分析,以期为开发木霉菌土壤盐渍化修复剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

棘孢木霉菌(*T. asperellum*) CTCCSJ-W-SBW10264 保藏于上海交通大学菌种保藏库。

1.1.2 主要试剂和仪器

菌丝 H_2O_2 、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量测定试剂盒以及菌丝 SOD、POD、CAT 酶活测定试剂盒均购自北京雷根生物技术有限公司。

直径 90 mm 的 0.22 μm 孔径聚醚砜微孔滤膜,海盐新东方塑化科技有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;全自动样品研磨仪,上海净信实业发展有限公司;多功能酶标仪, Molecular Devices 公司;原子吸收光谱仪, PerkinElmer 公司。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂固体培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)用于木霉菌的活化培养^[16],不加琼脂的马铃薯葡萄糖液体培养基(Potato Dextrose Broth, PDB)^[17]用于木霉菌的液体培养。培养基配制完成后分装到 250 mL 的三角瓶中, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min,冷却后备用。

1.2 棘孢木霉菌的盐胁迫培养

1.2.1 木霉菌的活化

将棘孢木霉菌 T264 在 PDA 培养基上活化, 28 $^{\circ}C$ 恒温培养 4 d 后,在无菌工作台用灭菌水吹打菌落

表面收集孢子悬液,备用。

1.2.2 建立木霉菌生长曲线

为了确定盐胁迫处理的时间点,需要获得棘孢木霉菌 T264 的生长曲线如图 1 所示。将 1.2.1 中收集的木霉菌孢子悬浮液用无菌水稀释至 2.0×10^6 个/mL 后,取 1 mL 接种到 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,然后在 28 $^{\circ}C$ 、180 r/min 的条件下振荡培养。每隔 12 h 取 5 mL 培养物,用直径 90 mm 的 0.22 μm 孔径聚醚砜微孔滤膜抽滤,以分离菌丝和发酵液。称量不同时间段收集的 5 mL 培养物中菌丝鲜重的变化,实验设置 3 组生物学重复。

1.2.3 钠胁迫培养

由图 1 可知,实验所用的棘孢木霉菌在接种 PDB 后 48 h 进入指数生长期,因此,首先按照 1.2.2 中的培养和接种方式将木霉菌在 PDB 中培养 48 h,然后在无菌操作台里向培养液中加入不同浓度的灭菌 NaCl 溶液,使得培养液中钠离子浓度依次为 0.00、0.25、0.50、1.00、1.22 mol/L。然后继续在 28 $^{\circ}C$ 、180 r/min 的条件下振荡培养。

钠离子处理 2、12、24、48、72 和 96 h 后分别取样,每个样品每次收集 5 mL 用于菌丝鲜重

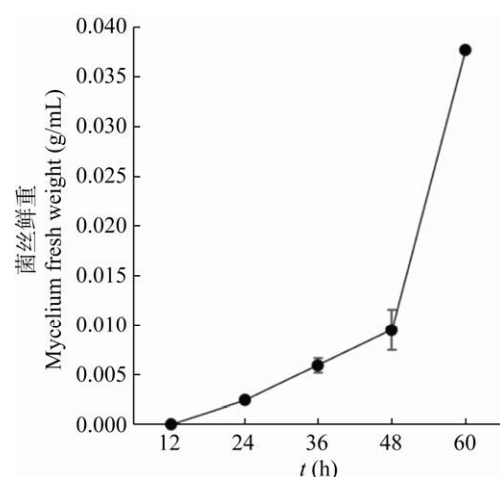


图 1 棘孢木霉菌 T264 的生长曲线

Figure 1 Growth curve of *Trichoderma asperellum* T264

注: 误差棒表示标准偏差($n=3$)

Note: The error bar represents standard deviation of three replicates ($n=3$)

的测定,菌丝和发酵液的分离方法及材料与 1.2.2 一致。其中,在 12 h 和 24 h 两个时间点,每个样品另取 10 mL 培养物收集菌丝,用无菌水洗涤 3 次后 -80°C 保存,用于后续实验。

1.3 钠胁迫对棘孢木霉导致的氧化压力分析

1.3.1 菌丝 MDA 含量测定

使用雷根微量法 MDA 测定试剂盒依据硫代巴比妥酸法测定菌丝 MDA 含量。取 1.2.3 中收集的菌丝 0.05 g 置于冰上,然后向其中加入 1 mL 10%三氯乙酸。 4°C 下用全自动样品研磨仪破碎木霉菌丝,50 Hz 的工作频率下连续研磨 2 min,然后于 4°C 、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。测定操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 菌丝 H_2O_2 含量测定

取 1.2.3 中收集的不同样本的菌丝 0.05 g,加入 1 mL 丙酮后液氮研磨,于 4°C 、12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液。然后参考黄超^[18]的方法用雷根微量法 H_2O_2 测定试剂盒进行上清液 H_2O_2 含量的批量测定。

1.4 棘孢木霉抗氧化酶活性测定

取 1.2.3 中收集的不同钠胁迫处理的菌丝样本 0.05 g 于液氮中充分研磨,然后加入 1.5 mL 蛋白提取缓冲液, 4°C 、12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清液,用于总蛋白含量和抗氧化酶的活性测定。采用二喹啉甲酸法测定菌丝总蛋白含量。菌丝 SOD、POD 及 CAT 活性分别采用雷根真菌 SOD、POD 和 CAT 蛋白酶酶活(微量法)测定试剂盒完成。SOD 测定试剂盒依据的测定方法是蓝四唑比色法。POD 测定试剂盒依据的是在过氧化氢存在下 POD 可以氧化愈创木酚生成茶褐色产物,可以通过测定产物的生成量衡量 POD 活性。CAT 测定试剂盒主要通过测定反应体系中加入的过氧化氢下降速率来表征 CAT 酶活。

1.5 棘孢木霉对钠的吸附及累积特性研究

由 1.2.3 的测定结果可知,研究所用棘孢木霉菌株在浓度低于 0.25 mol/L 钠离子胁迫下菌丝生长基本不受影响。为了进一步评价该菌株的钠离子

去除能力,设置 0.00、0.05 及 0.25 mol/L 的钠离子浓度梯度处理在 PDB 中振荡培养了 48 h 的木霉菌,然后按照 1.2.2 中的培养条件继续培养。在钠盐处理后 2、12、24、48 及 72 h 分别取 5 mL 培养物,用 0.22 μm 聚醚砜微孔滤膜抽滤以分离菌丝和发酵液。用火焰原子吸收分光光度法测定滤液中钠离子的含量。参考黄超^[18]的方法对棘孢木霉菌菌丝表面的钠离子进行洗脱,然后用浓硝酸加热消解洗脱液后,用原子吸收分光光度法测定洗脱液中钠离子的含量,以表征菌丝表面吸附的钠离子含量。在菌丝表面钠离子充分洗脱后,用浓硝酸加热消解菌丝释放菌丝内部积累的钠离子,然后测定消解液中的钠离子含量,以衡量胞内累积的钠离子含量。

1.6 数据处理

数据的差异显著性及因子相关分析均通过 R 语言完成。柱状图和折线图用 Excel 绘制。

2 结果与分析

2.1 钠胁迫对木霉菌生长的影响

钠胁迫对木霉菌生长的影响结果如图 2 所示。结果表明,钠盐处理后 72 h 木霉菌的生长停止,96 h 的菌丝鲜重与 72 h 的菌丝鲜重差异不显著。此外,与不加钠盐的对照组相比,不同浓度的钠胁迫对木霉菌的生长有不同程度的抑制效应。96 h 培养结果表明,当钠离子浓度高于 0.5 mol/L 时木霉菌的生长被抑制 52.8%,而且钠离子的浓度越高对木霉菌的生长抑制效果越明显。此外,实验结果还表明选用的木霉菌株可以在超过 1.0 mol/L 的钠胁迫条件下存活,而且浓度低于 0.25 mol/L 的钠离子胁迫对菌丝生长无明显抑制作用。

2.2 钠胁迫对木霉菌的氧化损伤效应

为了评估钠胁迫对棘孢木霉 T264 的氧化损伤效应,对菌丝中 H_2O_2 以及 MDA 的含量进行了测定。图 3A 的结果表明,与对照组相比,不同浓度钠盐处理 12 h 后菌丝内 H_2O_2 的含量普遍升高。在钠离子浓度低于 1 mol/L 时,随着钠离子浓度

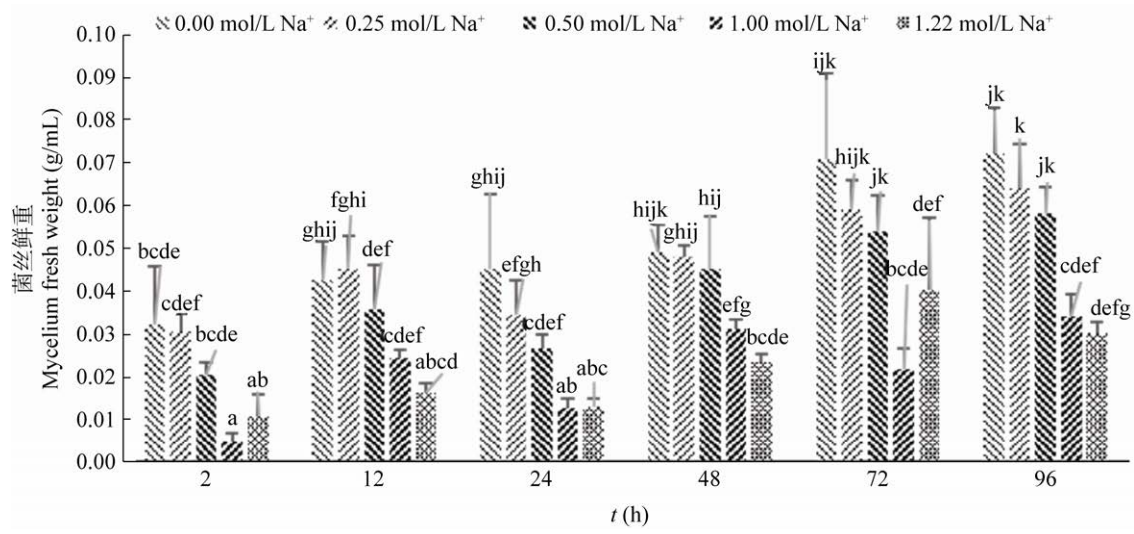


图 2 钠胁迫对棘孢木霉菌生长的影响

Figure 2 Effect of Na⁺ stress on the growth of *T. asperellum*

注：双因素方差分析结果表明，培养时间和钠胁迫的交互作用对菌丝鲜重的影响显著($P<0.001$)，因此用培养时间和钠胁迫双因素交互作用描述方差分析结果，柱形图上不同小写字母表示双因素交互作用的结果在 $P<0.05$ 的水平差异显著， $n=3$

Note: The result of two-factor ANOVA showed that the interaction effect of cultivation time and Na⁺ stress on mycelium fresh weight was significant ($P<0.001$). Therefore, two-factor interaction between cultivation time and Na⁺ stress was used to describe the ANOVA results. Different lowercase letters above the bars represent significant difference among treatments at the 0.05 probability level, $n=3$

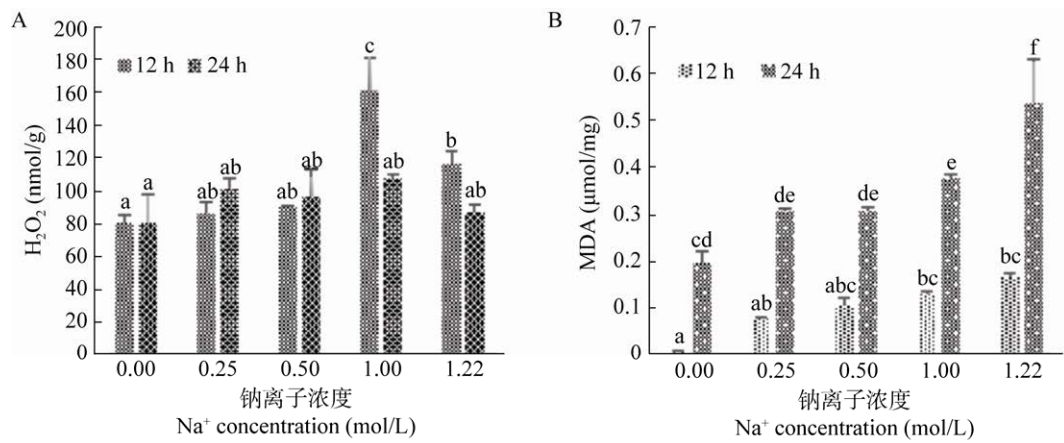


图 3 钠胁迫对菌丝 H₂O₂ (A)及 MDA (B)积累的影响

Figure 3 Effect of Na⁺ stress on mycelium H₂O₂ (A) and MDA (B) accumulation

注：双因素方差分析结果表明，培养时间和钠胁迫的交互作用对菌丝 H₂O₂ 和 MDA 的含量影响显著($P<0.001$)，因此用培养时间和钠胁迫双因素交互作用描述方差分析结果，柱形图上不同小写字母表示在 $P<0.05$ 的水平差异显著， $n=3$ 。12 h 代表处理后 12 h 取样；24 h 代表处理后 24 h 取样

Note: The result of two-factor ANOVA showed that the interaction effect of cultivation time and Na⁺ stress on mycelium H₂O₂ and MDA content was significant ($P<0.001$). Therefore, two-factor interaction between cultivation time and Na⁺ stress was used to describe the ANOVA results. Different lowercase letters above the bars represent significant difference among treatments at the 0.05 probability level, $n=3$. 12 h: Samples collected 12 h after Na⁺ stress treatment; 24 h: Samples collected 24 h after Na⁺ stress treatment

的升高, H_2O_2 的含量也逐渐升高, 1 mol/L 的钠离子胁迫导致 H_2O_2 的积累量是对照组的 200.0%; 与 1 mol/L 钠离子处理相比, 1.22 mol/L 的钠离子胁迫导致的菌丝 H_2O_2 积累量降低了 27.8%。此外, 与 12 h 的结果相比, 对照组的菌丝 H_2O_2 含量在 24 h 时无明显变化, 在低于 1 mol/L 的钠离子处理条件下菌丝中 H_2O_2 含量在 12–24 h 有上升现象, 但上升幅度低于 17.5%。在钠离子浓度不低于 1 mol/L 时, 12 h 时菌丝的 H_2O_2 累积量与对照组相比显著提高, 但是在 24 h 时菌丝 H_2O_2 含量与 12 h 的结果相比明显下降。不同浓度的钠离子处理 24 h 后, 与对照组相比, 菌丝 H_2O_2 含量提高了 7.8%–26.5%, 与 12 h 的结果相比提高幅度显著降低。

MDA 是细胞脂质过氧化的最主要终产物, 因而其可作为真菌细胞膜氧化损伤程度的指标。本研究除了用菌丝 H_2O_2 衡量钠胁迫导致的木霉菌细胞氧化损伤之外, 还测定了不同浓度钠离子处理后菌丝的 MDA 含量。图 3B 的结果表明, 随着钠离子浓度的升高, 菌丝 MDA 含量有上升趋势, 而且 24 h 的菌丝 MDA 含量普遍高于 12 h 的水平。对照组的实验结果表明, 在正常的生长过程中, MDA 含量也会随着菌丝的生长而显著升高。24 h 时的结果表明, 与对照组相比, 钠胁迫会导致菌丝 MDA 的含量提高 55.7%–172.3%。

2.3 木霉菌对盐胁迫氧化损伤的生理响应

生物体主要通过抗氧化酶抵御由胁迫因子导致的细胞氧化压力, 因而抗氧化酶也被视为生物体耐受胁迫因子的第一道防线。实验研究了在钠胁迫下棘孢木霉菌胞内不同种类抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)的活性变化情况。蛋白质分子不仅是生物体的结构组成成分, 同时也是生物体的功能大分子, 影响着生物体的各种代谢活动。图 4A 的结果表明, 与对照组(不加 NaCl)相比, 12 h 时低于 1.00 mol/L 的钠离子胁迫不会导致菌丝的蛋白含量发生明显变化, 但是 1.00 mol/L 及 1.22 mol/L 的钠离子胁迫导致菌丝蛋白含量分别下降了

26.8% 和 45.6%。24 h 的蛋白含量结果表明, 与对照组相比, 0.25 mol/L 的钠离子处理提高了 31.3% 的菌丝蛋白含量, 但是高于 0.25 mol/L 的钠离子胁迫会导致菌丝蛋白含量降低 10.5%–62.7%, 而且降低的幅度随着钠离子浓度的升高而提高。如图 4B 所示, 与 12 h 的结果相比, 24 h 时 SOD 酶活普遍升高, 其中 1.00 mol/L 钠离子处理导致的 SOD 酶升高幅度最大为 527.5%。24 h 时在 0.25–1.00 mol/L 的钠离子胁迫下, SOD 酶活随着钠离子浓度的升高而升高, 在 1.00 mol/L 的钠离子胁迫下 SOD 酶活达到最高, 为 3.34 U/mg, 然而当钠离子浓度超过 1.00 mol/L 后 SOD 酶活不再随着钠离子浓度的升高而继续升高。由图 4C 的结果可知, 处理 24 h 后 0.25–0.50 mol/L 钠离子胁迫会导致 POD 酶活显著升高至对照组的 6.3–15.0 倍, 而当钠离子浓度高于 0.50 mol/L 后 POD 酶活显著降低至 0.05 U/mg, 在 0.50 mol/L 钠离子胁迫下 POD 酶活达到最高, 为 36.66 U/mg。图 4D 中菌丝 CAT 酶活的结果表明, 对照组中 24 h 的酶活较 12 h 时低, 而钠离子处理后 24 h 的 CAT 酶活普遍比 12 h 的酶活高, 其中 1.22 mol/L 的钠离子胁迫对 CAT 酶活的提高最显著为 1 926.5%。12 h 时对照组的 CAT 酶活最高, 而 24 h 时 1.22 mol/L 钠离子处理导致 CAT 酶活达到最高为 233.3 U/mg。

2.4 木霉菌对盐离子的吸附和富集作用

图 2 中关于盐胁迫影响棘孢木霉菌生长的实验结果表明, 浓度低于 0.25 mol/L 的钠离子胁迫对菌丝生长无明显抑制作用。在此基础上, 为了进一步评价棘孢木霉菌对钠离子的吸附及累积特性, 设计 0.05 mol/L 和 0.25 mol/L 钠离子梯度浓度处理, 以研究在保证棘孢木霉菌正常生长的前提下菌丝对钠离子的吸附及累积能力。图 5A 的结果表明, 2 h 时菌丝表面可以迅速吸附大量钠离子, 而且培养液中钠离子浓度越高菌丝表面吸附钠离子含量越高, 具体而言, 在 0.05 mol/L 的钠离子处理下棘孢木霉菌新鲜菌丝对钠离子的吸附量为

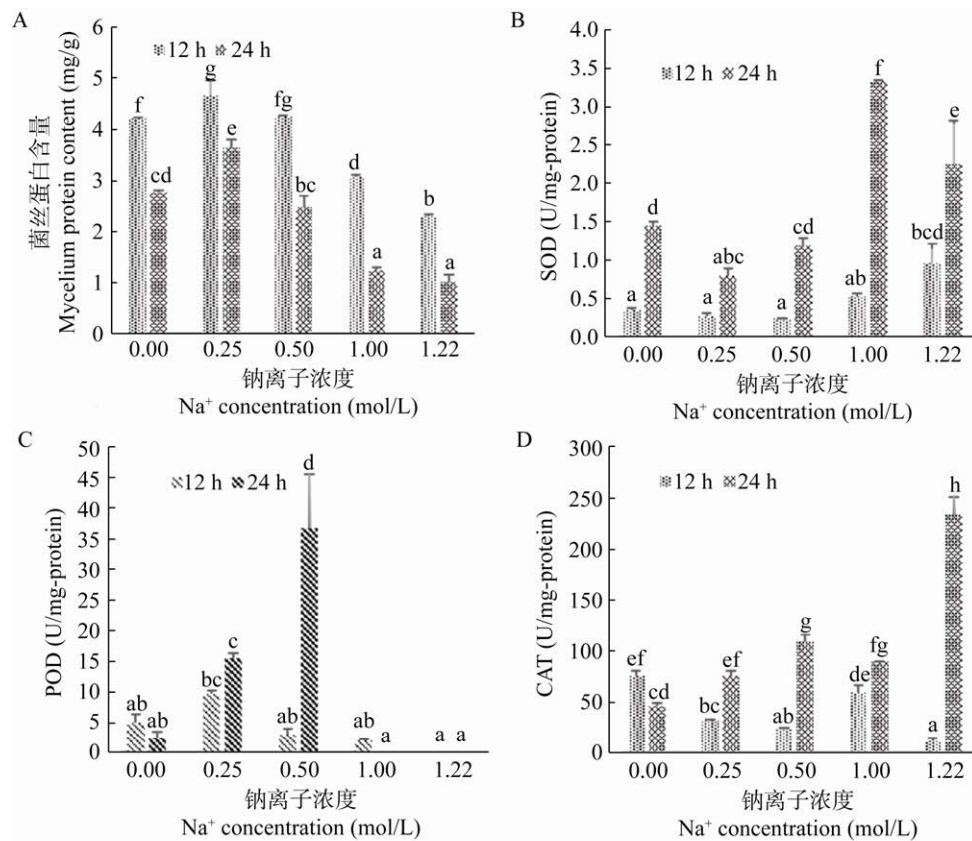


图4 钠胁迫对菌丝蛋白含量(A)、SOD酶活(B)、POD酶活(C)以及CAT酶活(D)的影响

Figure 4 Effect of Na⁺ stress on *T. asperellum* protein content (A), SOD activity (B), POD activity (C) and CAT activity (D)

注: 双因素方差分析结果表明, 培养时间和钠胁迫的交互作用对菌丝蛋白含量 SOD、POD 和 CAT 酶活影响显著($P < 0.001$), 因此用培养时间和钠胁迫双因素交互作用描述方差分析结果, 柱形图上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 的水平差异显著, $n = 3$ 。12 h: 处理后 12 h 取样; 24 h: 处理后 24 h 取样

Note: The result of two-factor ANOVA showed that the interaction effect of cultivation time and Na⁺ stress on mycelium protein content SOD, POD and CAT activity was significant ($P < 0.001$). Therefore, two-factor interaction between cultivation time and Na⁺ stress was used to describe the ANOVA results. Different lowercase letters above the bars represent significant difference among treatments at the 0.05 probability level, $n = 3$. 12 h: Samples collected 12 h after Na⁺ stress treatment; 24 h: Samples collected 24 h after Na⁺ stress treatment

661.5 mg/g, 在 0.25 mol/L 的钠离子处理下吸附量为 2 489.8 mg/g。在 0.25 mol/L 钠盐处理后的 2–72 h, 棘孢木霉菌丝表面钠离子吸附量呈现先略微下降后回升的趋势, 而 0.05 mol/L 钠离子处理导致的菌丝表面钠离子吸附量在 2–48 h 之间相对稳定, 在 48–72 h 迅速由 423.6 mg/g 上升至 1 347.6 mg/g。

与菌丝表面吸附钠离子不同, 菌丝内部积累的钠离子含量相对菌丝表面吸附量要低。由图 5B 可知, 在 0.25 mol/L 钠离子处理后的 2–72 h, 棘孢木霉菌丝胞内钠离子累积量逐步由 363.7 mg/g 降

至 175.1 mg/g。0.05 mol/L 钠离子处理后 2–48 h, 菌丝内部钠离子积累量逐步由 193.0 mg/g 降低至 72.5 mg/g, 在 48–72 h 菌丝内部钠离子积累量回升至 218.6 mg/g。图 6 中培养液钠离子去除率的变化表明, 棘孢木霉菌能够迅速降低环境中的钠离子含量, 在 0.25 mol/L 的钠离子处理 2 h 后木霉菌对培养液中的钠离子去除率达 44%, 在 48 h 时去除率达 49%。0.05 mol/L 钠离子处理 2 h 后钠离子去除率达到 33%, 最终在 72 h 时菌丝对钠离子去除率为 32%。

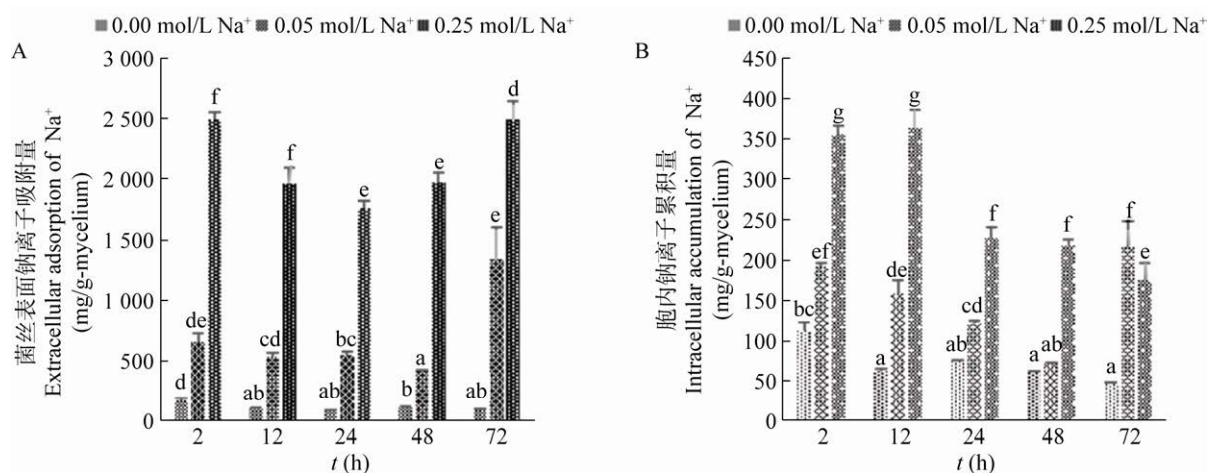


图5 棘孢木霉 T264 菌丝表面吸附钠离子含量(A)以及菌丝内部累积钠离子含量(B)

Figure 5 The extracellular adsorption (A) and intracellular accumulation (B) of Na^+ by *Trichoderma asperellum* T264

注：双因素方差分析结果表明，培养时间和钠胁迫的交互作用对菌丝表面钠离子吸附量和胞内钠离子累积量影响显著($P < 0.001$)，因此用培养时间和钠胁迫双因素交互作用描述方差分析结果，柱形图上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 的水平差异显著， $n=3$

Note: The result of two-factor ANOVA showed that the interaction effect of cultivation time and Na^+ stress on mycelium extracellular adsorption and intracellular accumulation of Na^+ was significant ($P < 0.001$). Therefore, two-factor interaction between cultivation time and Na^+ stress was used to describe the ANOVA results. Different lowercase letters above the bars represent significant difference among treatments at the 0.05 probability level, $n=3$

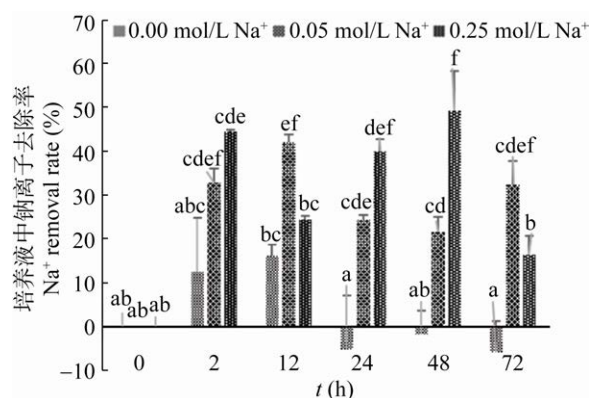


图6 棘孢木霉 T264 对钠盐的去除效率

Figure 6 Removal rate of Na^+ by *Trichoderma asperellum* T264

注：双因素方差分析结果表明，培养时间和钠胁迫的交互作用对培养液中钠离子去除率影响显著($P < 0.001$)，因此用培养时间和钠胁迫双因素交互作用描述方差分析结果，柱形图上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 的水平差异显著， $n=3$

Note: The result of two-factor ANOVA showed that the interaction effect of cultivation time and Na^+ stress on Na^+ removal rate was significant ($P < 0.001$). Therefore, two-factor interaction between cultivation time and Na^+ stress was used to describe the ANOVA results. Different lowercase letters above the bars represent significant difference among treatments at the 0.05 probability level, $n=3$

2.5 因子相关分析

为了进一步研究棘孢木霉菌对钠离子胁迫的细胞抗氧化防御机理，对由钠胁迫导致的木霉菌细胞氧化损伤效应因子(H_2O_2 、MDA)水平和抵御细胞氧化的应答因子(SOD、POD 和 CAT)水平进行了相关性分析。图 7A 为钠离子处理 12 h 后的相关性分析结果，分析表明 POD 的含量与 H_2O_2 及 MDA 的含量显著负相关($P < 0.05$)，而 MDA 的含量与 CAT 酶的活性显著负相关($P < 0.01$)。24 h 的相关分析结果表明，CAT 酶活在 24 h 时与 MDA 的含量显著正相关($P < 0.001$)。

3 讨论与结论

作为一种功能多样的生物修复和生物防治微生物资源，木霉菌在农业领域应用广泛^[19]。目前大多数研究主要集中在木霉菌防治植物病害和促进作物生长等方面^[20-21]。关于木霉菌修复土壤重金属和有机物污染的研究也有部分报道^[22-23]，但是很少有关于木霉菌耐盐和解盐机理的相关研究。王强强等^[24]从滩涂湿地生态系统中分离了不同耐盐水

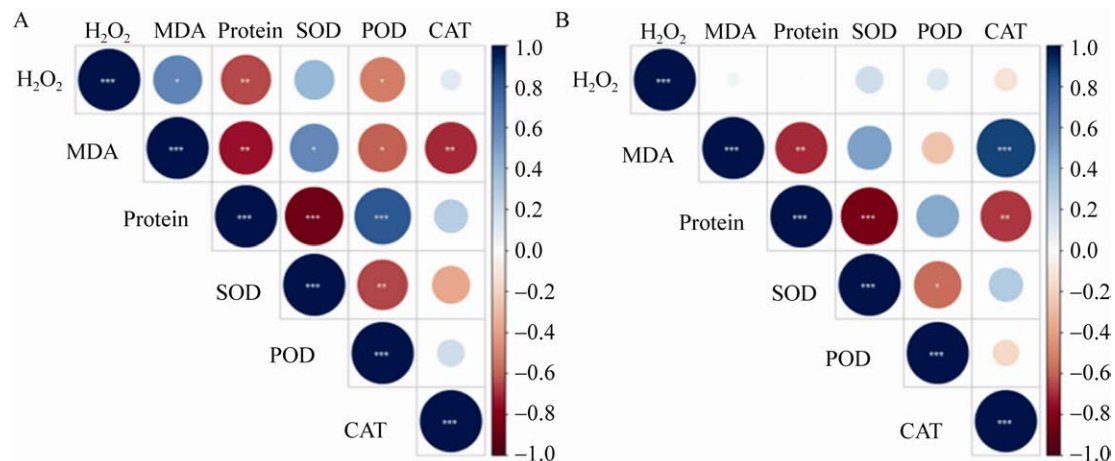


图 7 钠离子胁迫导致的菌丝氧化损伤效应因子和应答因子的相关性

Figure 7 Correlation among oxidative stress and antioxidants brought by Na⁺ stress

注: A: 12 h 分析结果; B: 24 h 分析结果。颜色的深浅代表相关系数的大小, 星号的个数代表显著性(*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)。H₂O₂: 菌丝 H₂O₂ 积累量; MDA: 菌丝 MDA 积累量; Protein: 菌丝蛋白含量; SOD: 棘孢木霉 T264 胞内 SOD 酶活; POD: 棘孢木霉 T264 胞内 POD 酶活; CAT: 棘孢木霉 T264 胞内 CAT 酶活

Note: A: Correlation analysis of 12 h result; B: Correlation analysis of 24 h result. The correlation coefficients are indicated by color intensity and the significance levels are marked with asterisk (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$). Abbreviations are as follows: H₂O₂: Mycelium H₂O₂ accumulation; MDA: Mycelium MDA content; Protein: Mycelium protein content; SOD: SOD activity; POD: POD activity; CAT: CAT activity

平的木霉菌株, 研究了木霉菌的抗逆性筛选标准; 向杰等^[12]报道了 NaCl 胁迫下一株哈茨木霉的基因表达以及代谢水平的差异。然而, 目前尚未发现关于棘孢木霉耐受钠离子胁迫生理机制的报道。本研究设计了梯度钠离子胁迫处理一株分离自盐田湿地的耐盐棘孢木霉的培养实验, 明确了该菌株的耐盐和吸附盐的能力, 揭示了该菌株利用抗氧化酶系统抵御钠胁迫导致的细胞氧化损伤的生理机制。

在盐胁迫等逆境条件下真菌细胞内会产生大量的活性氧, 而活性氧的大量积累会导致菌体的细胞膜脂和蛋白质严重损伤, 影响真菌的正常代谢活动, 甚至导致菌体失活^[18]。为了抵御由胁迫因子导致的细胞氧化损伤, 真菌会建立抗氧化防御系统清除胞内累积的活性氧^[25]。SOD、POD 和 CAT 这 3 种抗氧化酶是真菌抗氧化系统的主要组成部分, SOD 是最先参与活性氧自由基作用的酶, 其可以将 O₂⁻ 转化为毒性较小的 H₂O₂ 和 O₂, 然后 POD 和 CAT 可以进一步清除 H₂O₂ 最终生成 H₂O 和 O₂, 通过这 3 种酶的协同作用最终解除胁迫因子对机

体造成的氧化损伤^[26-27]。本研究通过对棘孢木霉 T264 进行不同浓度梯度的钠胁迫培养, 发现培养液中一定水平的钠胁迫会引起 T264 菌丝积累 H₂O₂ (图 3A) 并造成细胞膜脂氧化 (图 3B)。然而, 为了抵御由钠胁迫带来的氧化压力, 菌丝中 SOD、POD 和 CAT 这 3 种抗氧化酶的活性也会出现不同程度的提高 (图 4)。其中, POD 可能是 T264 解除低盐胁迫的关键酶, 而 SOD 和 CAT 是解除高盐胁迫的关键酶, 3 种酶协同作用有助于木霉菌抵御不同浓度的钠离子胁迫。

关于机体在盐胁迫下抗氧化酶系统功能的研究表明, 生物的抗氧化酶对盐胁迫有耐受阈值。比如, 朱晓华^[28]研究表明好氧细菌 HN-02 在盐度低于 15 g/L 时 SOD 的活力随着盐度升高而提高, 而当盐度高于 15 g/L 时 POD 和 CAT 活性受到抑制。何庆元等^[29]关于盐胁迫对大豆 SOD、POD 和 CAT 同工酶影响的研究表明, 大豆的抗氧化酶活性在 0.05 mol/L 的 NaCl 胁迫下有一定的增加, 但盐浓度增加到 0.075 mol/L 后酶的活性降低。结合图 2-4

的结果可以发现,棘孢木霉 T264 的抗氧化酶系统对盐胁迫也存在耐受阈值,超过耐受阈值的盐胁迫处理会抑制抗氧化酶系统解除氧化压力的功能(图 3 和图 4)并显著影响木霉菌的正常生长(图 2)。具体而言,图 4B 中 SOD 酶活 24 h 的实验结果表明,当钠离子浓度低于 1 mol/L 时,随着钠离子浓度的升高 SOD 酶活也会提高;而当钠离子浓度超过 1 mol/L 后,随着钠离子浓度的进一步提高,SOD 的酶活不升反降,所以推测棘孢木霉 T264 的 SOD 酶对钠胁迫的耐受阈值为 1 mol/L。同时,由图 4C 的实验结果也可以推测,POD 酶对钠胁迫的耐受阈值为 0.5 mol/L,而 CAT 酶对钠离子的耐受阈值可能超过 1.22 mol/L(图 4D)。

生物体需要 SOD、POD 和 CAT 这 3 种抗氧化酶协同作用共同抵御由钠胁迫导致的氧化损伤压力^[30],但相比较而言,棘孢木霉菌 T264 对钠胁迫的耐受阈值最低的 POD 酶可能决定了该菌株抗氧化酶系统耐受钠胁迫水平,并最终影响 T264 对钠胁迫的耐受性^[31]。图 2 中关于钠胁迫对 T264 生长影响的结果也表明,超过 0.5 mol/L 的钠胁迫会显著抑制菌丝生长,这个浓度和 POD 酶对钠离子的耐受阈值一致,佐证了抗氧化酶系统对钠离子的耐受阈值会影响 T264 本身对钠胁迫的耐受性的猜想。此外,图 7 相关分析结果也表明,钠胁迫处理 24 h 后,随着钠离子浓度的升高,CAT 酶活不断升高,但是菌丝 MDA 含量也在升高,这说明仅仅依赖 CAT 酶解除由高浓度钠离子胁迫导致的木霉菌丝氧化压力是不够的,可能需要 POD 与 CAT 协同作用共同清除细胞中累积的过氧化物。为了进一步印证以上猜想,还需要通过代谢通路分析等方法,深入研究棘孢木霉菌丝中不同功能的抗氧化酶如何通过相互协作共同抵御由钠胁迫导致的氧化压力^[32]。

微生物研究者们通常会从极端环境中寻找可利用的微生物资源,因为在极端环境中生存的微生物往往具有较强的抗逆性和特殊的代谢机制^[33]。

本研究所选用的棘孢木霉菌株分离自盐田湿地,因而对盐胁迫有相对较强的耐受性。尹大川等^[34]关于一株哈茨木霉 T28 的盐胁迫耐受性研究表明,在 0.2 mol/L 的钠胁迫条件下 T28 的菌丝生长被抑制 66.7%,而钠离子浓度超过 0.8 mol/L 时 T28 的生长完全停止。相比之下,本实验筛选的耐盐木霉菌株则能够在超过 1 mol/L 的钠胁迫环境中生长,而且浓度低于 0.5 mol/L 的钠胁迫对其生长无明显抑制作用。此外,对棘孢木霉 T264 解盐能力的研究结果也表明,该菌株对培养液中 0.05 mol/L 钠离子的去除率达到 32%。梁荣等^[10]关于哈茨木霉用于葡萄病害防治和土壤盐渍化修复的研究表明,施用哈茨木霉菌剂可以降低 0–10 cm 土壤含盐的 21%。然而王强强等^[24]关于拮抗性木霉菌抗逆性的研究也表明,棘孢木霉 T264 对盐胁迫的耐受能力超过从不同生态环境中分离的大部分木霉菌株,因而推测该菌株具有被开发成生物修复剂用于盐渍化土壤修复的潜力。后续需要将其制备成木霉菌土壤修复剂,通过田间试验评价其对土壤盐渍化障碍的解除效果及其功能的稳定性^[35]。另一方面,也要开发提高棘孢木霉生存能力的保护剂,防止木霉菌修复剂处理后期出现由于菌丝裂解导致的钠离子去除率下降的问题。

总之,本研究探讨了一株棘孢木霉菌耐受钠离子胁迫的生理机制以及该菌株的钠离子吸附和累积能力,为进一步研究木霉菌耐盐机理以及开发木霉菌盐渍化土壤修复剂提供了理论参考和实验依据。

REFERENCES

- [1] Zhou D, Lin ZL, Liu LM, Zimmermann D. Assessing secondary soil salinization risk based on the PSR sustainability framework[J]. *Journal of Environmental Management*, 2013, 128: 642–654
- [2] Ghassemi F, Jakeman AJ, Nix HA. *Salinisation of Land and Water Resources: Human Causes, Extent, Management and Case Studies*[M]. Australia: CAB International, 1995
- [3] Yu HY, Li TX, Zhou JM. Secondary salinization of greenhouse soil and its effects on soil properties[J]. *Soils*, 2005, 37(6): 581–586 (in Chinese)

- 余海英, 李廷轩, 周建民. 设施土壤次生盐渍化及其对土壤性质的影响[J]. 土壤, 2005, 37(6): 581-586
- [4] Shen WS, Ni YY, Gao N, Bian BY, Zheng SN, Lin XG, Chu HY. Bacterial community composition is shaped by soil secondary salinization and acidification brought on by high nitrogen fertilization rates[J]. Applied Soil Ecology, 2016, 108: 76-83
- [5] Munns R, Cramer GR, Ball MC. Interactions between rising CO₂, soil salinity, and plant growth[A]//Luo YQ, Mooney HA. Carbon Dioxide and Environmental Stress[M]. San Diego: Academic Press, 1999: 139-67
- [6] Arora S, Vanza M. Microbial approach for bioremediation of saline and sodic soils[A]//Arora S, Singh AK, Singh YP. Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective[M]. Cham: Springer, 2017: 87-100
- [7] Song YZ. Study on application of microbiological fertilizer afforestation on songnen plain saline alkali land[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Forestry University, 2009 (in Chinese)
宋玉珍. 微生物肥料在松嫩平原盐碱地造林中的应用研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学博士学位论文, 2009
- [8] Wei WL, Luo XL, Li L, Zhu YM, Fan WJ. Cassava yield, and soil physical and chemical properties under different application rates of soil conditioners[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(4): 623-627 (in Chinese)
韦婉玲, 罗兴录, 李亮, 朱艳梅, 樊吴静. 土壤调理剂不同用量对木薯产量和土壤理化性状的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(4): 623-627
- [9] Tripathi P, Singh PC, Mishra A, Chauhan PS, Dwivedi S, Bais RT, Tripathi RD. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up[J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2013, 15(4): 541-550
- [10] Liang R, Sun XP. *Trichoderma harzianum* control efficiency on grape diseases and soil salinization[J]. Northern Horticulture, 2016, 40(23): 108-110 (in Chinese)
梁荣, 孙新平. 哈茨木霉菌剂防治葡萄病害及土壤盐渍化[J]. 北方园艺, 2016, 40(23): 108-110
- [11] Li Z, Guo K, Wu XQ, Chen Q, Li JS, Yang HT. Impacts of *Trichoderma harzianum* LTR-2 on salt-tolerant physiological characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.)[J]. Shandong Science, 2014, 27(4): 17-24, 41 (in Chinese)
李哲, 郭凯, 吴晓青, 陈泉, 李纪顺, 杨合同. 哈茨木霉 LTR-2 对椒样薄荷耐盐生理特性的影响[J]. 山东科学, 2014, 27(4): 17-24, 41
- [12] Xiang J, Chen JS, Xia XX, Liu K, Li SG, Gu JG. Molecular regulation of *Trichoderma harzianum* ACCC32527 response to NaCl based on transcriptome and metabolome analysis[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(12): 2079-2091 (in Chinese)
- 向杰, 陈敬师, 夏鑫鑫, 刘快, 李世贵, 顾金刚. 基于转录-代谢联合分析哈茨木霉 ACCC32527 对 NaCl 胁迫的分子调节[J]. 中国农业科学, 2019, 52(12): 2079-2091
- [13] Li QX. Research on preparation and application of *Trichoderma asperellum* capsules agent on reduce heavy metals[D]. Tianjin: Master's thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
李起祥. 棘孢木霉降重金属菌剂制备及应用研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2018
- [14] Luo LX, Sun TH, Jin YH. Accumulation of superoxide radical in wheat leaves under cadmium stress[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 1998, 18(5): 495-499 (in Chinese)
罗立新, 孙铁珩, 靳月华. 镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累[J]. 环境科学学报, 1998, 18(5): 495-499
- [15] Song DJ, Li H, Yu ZL. Effect of Na⁺ ion implantation on SOD, CAT, POD activity of different radiosensitivity microorganisms[J]. Acta Biophysica Sinica, 1998, 14(2): 325-330 (in Chinese)
宋道军, 李红, 余增亮. Na⁺离子注入对不同辐射敏感性微生物超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的影响[J]. 生物物理学报, 1998, 14(2): 325-330
- [16] Adesemoye AO, Adedire CO. Use of cereals as basal medium for the formulation of alternative culture media for fungi[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(3): 329-336
- [17] Zhao SG, Shamoun SF. Effects of potato dextrose broth and gelatin on germination and efficacy of *Phoma exigua*, a potential biocontrol agent for salal (*Gaultheria shallon*)[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2005, 27(2): 234-244
- [18] Huang C. Enhanced treatment of lead-contaminated agricultural wastes by white-rot fungus and its resistance analysis[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan University, 2017 (in Chinese)
黄超. 白腐真菌强化处理铅污染农业废物及其对铅的抗性机理研究[D]. 长沙: 湖南大学博士学位论文, 2017
- [19] He C, Wang WQ, Hou JL. Advances in mechanism and application of *Trichoderma viride* on biodegradation and biological control[J]. Journal of Microbiology, 2019, 39(3): 122-128 (in Chinese)
贺超, 王文全, 侯俊玲. 绿色木霉对生物降解和生物防治的影响机理与应用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(3): 122-128
- [20] Chen J. *Trichoderma* biology and application—review and prospect[J]. Mycosystema, 2014, 33(6): 1129-1135 (in Chinese)
陈捷. 木霉菌生物学与应用研究—回顾与展望[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1129-1135
- [21] Yuan Y, Wang YC, Han YZ, Zhang JH, Zeng B. Advance

- of application of *Trichoderma* in agricultural produce[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(3): 10-14 (in Chinese)
- 袁扬, 王胤晨, 韩玉竹, 张锦华, 曾兵. 木霉菌在农业中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 10-14
- [22] Nongmaithem N, Roy A, Bhattacharya PM. Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(2): 305-313.
- [23] Alothman ZA, Bahkali AH, Elgorban AM, Al-Otaibi MS, Ghfar AA, Gabr SA, Wabaidur SM, Habila MA, Ahmed AYBH. Bioremediation of explosive TNT by *Trichoderma viride*[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1393
- [24] Wang QQ, Dou K, Chen J, Jiang XL, Yang HT, Wang W. The standards and methods for efficient evaluation of tolerance of antagonistic *Trichoderma* strains[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(1): 99-111 (in Chinese)
- 王强强, 窦恺, 陈捷, 蒋细良, 杨合同, 王伟. 拮抗性木霉菌株抗逆性筛选评价标准与方法[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(1): 99-111
- [25] Angelova MB, Pashova SB, Spasova BK, Vassilev SV, Slokoska LS. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat[J]. Mycological Research, 2005, 109(2): 150-158
- [26] Xiao SS, Wang J. Relationship among generation rate of superoxide, resistance of rice to blast fungi and activation of inducible phenylalanine ammonia-lyase, chitinase, β -1,3-glucanase[J]. Chinese Journal of Rice Science, 1997, 11(2): 93-102
- [27] Ghorbanli M, Ebrahimzadeh H, Sharifi M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(4): 575-581
- [28] Zhu XH. Study on characteristics of denitrification performance and antioxidant enzyme system of HN-02 bacteria under salt stress[D]. Chengdu: Master's thesis of Chengdu University of Technology, 2015 (in Chinese)
- 朱晓华. HN-02 菌脱氮性能与抗氧化酶体系对盐胁迫响应特征研究[D]. 成都: 成都理工大学硕士学位论文, 2015
- [29] He QY, Xiang SH, Wu P, Wang SH, Li ZP, Zhu CW, Zhang XH. Effects of salt stress in soybean (*Glycine max*) isoenzyme of POD, SOD and CAT[J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 2015, 29(3): 10-13 (in Chinese)
- 何庆元, 向仕华, 吴萍, 王松华, 李正鹏, 祝嫦巍, 张晓红. 盐胁迫对大豆 POD、SOD 和 CAT 同工酶的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2015, 29(3): 10-13
- [30] Verma S, Mishra SN. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system[J]. Journal of Plant Physiology, 2005, 162(6): 669-677
- [31] Hashem A, Abd_Allah EF, Alqarawi AA, Aldubise A, Egamberdieva D. Arbuscular mycorrhizal fungi enhances salinity tolerance of *Panicum turgidum* Forssk by altering photosynthetic and antioxidant pathways[J]. Journal of Plant Interactions, 2015, 10(1): 230-242
- [32] Tugay TI, Zheltonozhskaya MV, Sadovnikov LV, Tugay AV, Farfán EB. Effects of ionizing radiation on the antioxidant system of microscopic fungi with radioadaptive properties found in the Chernobyl exclusion zone[J]. Health Physics, 2011, 101(4): 375-382
- [33] Schimel J, Balser TC, Wallenstein M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function[J]. Ecology, 2007, 88(6): 1386-1394
- [34] Yin DC, Deng X, Zheng Y, Song RQ. Effects of salt-alkali stress on growth and nutritional metabolism of *Trichoderma harzianum* T28[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2014, 36(5): 109-116 (in Chinese)
- 尹大川, 邓勋, 郑宇, 宋瑞清. 盐碱胁迫对哈茨木霉 T28 的生长及营养代谢的影响[J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(5): 109-116
- [35] Zafra G, Moreno-Montaña A, Absalón ÁE, Cortés-Espinosa DV. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(2): 1034-1042