

铅锌尾矿中耐重金属镉的丝状真菌的分离鉴定

隆美容^{1,2} 谢小林² 冯广达² 姚青³ 朱红惠^{2*}

- (1. 塔里木大学 生命科学学院 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室
新疆 阿拉尔 843300)
- (2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室
广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地 广东 广州 510070)
- (3. 华南农业大学 园艺学院 广东 广州 510642)

摘要:【目的】旨在从重金属污染地分离出耐重金属镉真菌, 获得耐受重金属镉污染的高效菌株, 为重金属污染微生物修复提供菌种资源。【方法】利用稀释平板涂布法, 采用4种培养基对粤东北梅州市梅县铅锌尾矿废弃地9个样品进行分离, 并结合形态学和 ITS rDNA 基因序列分析, 鉴定分离到的耐镉真菌, 最后对分离到的耐镉真菌进行最小抑制浓度(MIC)检测。【结果】从粤东北梅州市梅县铅锌尾矿废弃地分离出72株丝状真菌, 经形态学和分子技术鉴定, 它们主要属于曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、油瓶霉属(*Lecythophora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、镰刀孢属(*Fusarium*)等。MIC检测发现有4株丝状真菌耐镉浓度较高, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p), *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p), *Penicillium rolfii* Thom (6-16m) 和 *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p) 分别为200、40、25和15 mmol/L。【结论】从粤东北梅州市梅县铅锌尾矿废弃地分离到的72株丝状真菌, 不同程度耐受重金属镉, 在重金属污染的治理中有可能发挥作用。本研究为镉污染环境的微生物修复提供了重要菌株。

关键词: 镉, 丝状真菌鉴定, 最小抑菌浓度

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070103); 广东省自然科学基金重点项目(No. 10251007002000001); 广东省科技攻关项目(No. 2009B030802013)

*通讯作者: Tel: 86-20-37656629; 信箱: zhuhh@gdim.cn

收稿日期: 2012-12-18; 接受日期: 2013-04-16

Isolation and identification of cadmium-tolerant filamentous fungi from lead-zinc tailings

LONG Mei-Rong^{1,2} XIE Xiao-Lin² FENG Guang-Da² YAO Qing³
ZHU Hong-Hui^{2*}

- (1. Xinjiang Production & Struction Corps Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)
- (2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou, Guangdong 510070, China)
- (3. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to isolate efficient cadmium-tolerant fungi from soils contaminated by heavy metals, and thereby to provide strains for heavy metals' bioremediation. [Methods] Nine soil samples from Bingcun Pb-Zn mining waste land, Mei County, Guangdong Province, were used to isolate by dilution plate coating method with four different media. Strains were identified by morphology and ITS rDNA sequence analyses. Minimum inhibitory concentration (MIC) for the isolated strains was also determined. [Results] Seventy-two cadmium-tolerant filamentous fungi belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Lecythophora*, *Paecilomyces*, *Fusarium* and others were isolated from the mining land. Four strains, i.e. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p), *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p), *Penicillium rolfsii* Thom (6-16m) and *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p), were resistant to high cadmium concentrations of 200, 40, 25, and 15 mmol/L, respectively. [Conclusion] The strains isolated from contaminated soils showed minimum cadmium-tolerance to 1 mmol/L, thus they may play a role in the bioremediation of heavy metal pollution soils. The results imply the promising biosorption of cadmium-tolerant strains for bioremediation of heavy metals.

Keywords: Cadmium, Filamentous fungi identification, Minimum inhibitory concentration

由于工业活动和科技进步, 释放到环境中的重金属不断加剧, 对环境和人类健康造成了严重威胁^[1]。在众多的重金属污染中, 镉污染相对突出, 镉也是污染面积最广、危害最大的重金属元素之一。据统计, 截止到 2002 年, 我国受镉污染的耕地面积约 140 万 km², 涉及 11 个省市的 25 个地区^[2], 每年因镉污染超标的农产

品高达 14.6 亿 kg^[3]。镉极易蓄积在土壤中, 由于其较强的生物活性, 可被植物吸收、积累, 进入到植物的可食部分而污染农产品, 通过食物链流入人体。当其超过一定限量时, 会对生态环境和人体造成危害。

目前, 现有的镉污染土壤修复方法有工程措施(主要包括客土、换土、深耕翻土等措施)、

物理化学(吸附、土壤淋洗)、化学(共沉淀、土壤改良剂)^[4-8], 其缺点普遍存在着二次污染、成本高和修复效果不理想等问题, 而微生物修复技术在治理重金属污染方面具有广泛的应用前景, 因其具有处理费用低, 对环境影响小、效率高优点, 在治理土壤污染方面的作用也受到广泛的关注^[9]。长期生活在富镉环境中的微生物群对镉形成了一定的耐性和抗性, 因此, 从被污染的土壤中分离耐镉微生物用于吸附和积累重金属镉是治理镉污染的有效措施之一。本试验从粤东北梅州市梅县铅锌尾矿废弃地采取土壤样品, 并对土壤样品的重金属含量进行了测定, 结果发现镉的含量都超过了国家土壤质量二级标准。本研究的重点是从该土壤样品中分离筛选和鉴定具有耐镉特性的丝状真菌, 并对其耐镉能力进行评估, 获得能够修复重金属镉污染的高效菌株, 为污染环境的微生物修复提供重要菌株。

1 材料与方 法

1.1 土壤样品来源

土壤样品采集于粤东北梅州市梅县丙村铅锌尾矿废弃地。该尾矿闲置时间约为 30 年, 属于亚热带季风气候, 年平均气温 21.2 °C, 年均降水量 1 472.9 mm, 年均相对湿度 78%, 年均无霜期 306 d。目前调查发现, 铅锌尾矿地的优势定居植物有类芦(*Neyraudia reynaudiana*)、黄荆(*Vitex negundo*)、盐肤木(*Rhus chinensis*)。采集的土样立即带回实验室, 于 4 °C 保存直至分析。采样地土壤样品重金属镉含量(表 1)都超出了国家土壤环境质量标准(GB15618-1995)的二级土壤规定值 Cd (0.3 μg/g)^[10]。

1.2 耐 Cd²⁺真菌的分离鉴定

1.2.1 真菌分离培养基: 用于真菌分离的培养基包括 PDA^[11] (马铃薯 200.0 g, 煮沸 20 min,

用 8 层纱布过滤, 葡萄糖 20.0 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL)、CA^[11] (NaNO₃ 3.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 蔗糖 30.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0)、马丁氏琼脂培养基^[11] (葡萄糖 10.0 g, 蛋白胨 5.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 1/3 000 孟加拉红(Rose bengal, 玫瑰红水溶液) 100 mL, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 800 mL, 临用前加入 0.03%链霉稀释液 100 mL, 使每毫升培养基中含链霉素 30 μg)和 SDA^[12] (葡萄糖 40.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL)。培养基经过 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min 后, 加入单独灭菌的 CdCl₂·2.5H₂O 溶液, 使 Cd²⁺的终浓度为 1 mmol/L, 与培养基混合倒平板, 分离耐 Cd²⁺真菌。采用 PDA 培养基进行耐 Cd²⁺真菌活化及 MIC 检测。

1.2.2 耐 Cd²⁺菌株的分离: 真菌的分离采用稀释平板法。在无菌操作下称取土样 10 g 加入 90 mL 无菌水的三角瓶中, 在旋转式摇床上 150 r/min、28 °C 振荡 30 min, 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。各吸取 0.1 mL 分别涂布在含有 1 mmol/L Cd²⁺的 PDA、CA、马丁氏琼脂培养基、SDA 培养基上, 28 °C 恒温箱中培养至少 3 d, 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 °C 冰箱保存。

1.2.3 耐 Cd²⁺真菌菌落形态观察: 将菌丝体分别接种在 PDA、CA、CYA^[13] (NaNO₃ 3.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 酵母膏 5.0 g, 蔗糖 30.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0)及 MEA^[13] (麦芽汁 20.0 g, 蛋白胨 1.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1 000 mL)上, 重复 2 次, 28 °C 培养 7 d 或更长。肉眼或借助放大镜、低倍镜观察菌落特征, 包括生长速度、颜色^[14]、

表面纹饰、表面质地、边缘、渗出物、可溶性色素等。

1.2.4 耐 Cd²⁺真菌光学显微镜观察: 滴一滴无菌水于洁净载玻片中央,用无菌解剖针挑取少量培养物,放入无菌水内,利用解剖针将菌丝团撕开,使其全部打湿,盖上盖玻片,于高倍显微镜下观察并拍照。

1.2.5 耐 Cd²⁺真菌的 ITS rDNA 基因序列分析: 采用改良 CTAB 法^[15]提取菌株总 DNA,进行 ITS rDNA 基因的 PCR 扩增。采用的引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系为 10×Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL、ITS1 (10 μmol/L) 0.5 μL、ITS4 (10 μmol/L) 0.5 μL、模板 DNA (10–20 mg/L) 1 μL、dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL,加 ddH₂O 补齐到 25 μL。反应程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 45 s, 72 °C 60 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送上海英骏公司测序。测序结果与 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。

1.3 最低抑制浓度(MIC)的测定

将筛选出的耐镉菌株依次转接到含浓度为 1、3、5 至 200 mmol/L Cd²⁺ PDA 平板上,平行 3 次,以不加金属离子作为对照,至少培养 7 d,观察菌株在含不同 Cd²⁺ PDA 平板上的生长状况。能够抑制细胞生长的最低浓度为该菌株的最低抑制浓度(MIC)。

2 结果与分析

2.1 不同培养基分离效果

本研究采用 4 种不同培养基,从粤东北梅州市梅县丙村铅锌尾矿废弃地 9 个样品中共分离到 72 株丝状真菌(表 1)。由表 1 可知,PDA、CA、马丁氏琼脂培养基和 SDA 分别分离到 18、19、18 和 17 株丝状真菌,4 种不同培养基对分离到的丝状真菌总数效果差异不大。PDA 中有 4 个样品未分离到真菌,SDA 中有 2 个样品未分离到真菌,而 CA、马丁氏琼脂培养基中只有 1 个样品未分离到真菌。

表 1 土壤样品中重金属镉的含量及不同培养基中丝状真菌分离情况

样品 Sample	Cd 总含量 Total Cd content (μg/g)	真菌菌株数(株) Fungal strain				总分离数(株) Total fungal strain
		PDA	CA	Martin	SDA	
1#	49.0	–	2	1	–	3
2#	69.0	3	2	1	3	9
3#	48.1	–	–	2	–	2
4#	42.6	–	1	1	1	3
5#	53.0	–	2	–	3	5
6#	89.2	8	6	7	4	25
7#	65.5	1	3	1	1	6
8#	87.0	3	2	3	2	10
9#	76.3	3	1	2	3	9
总数 Total	–	18	19	18	17	72

2.2 分子鉴定和菌株形态特征观察^[13,16]

对分离到的 72 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, 并将所有序列上传至 NCBI, 获得相对应的 GenBank 登录号(表

2)。最后再结合形态学观察, 发现 66 株真菌隶属于 28 个属, 其余 6 株未鉴定。其中 *Aspergillus*、*Penicillium*、*Cladosporium* 和 *Lecytophora* 属于优势菌属, 占分离到的菌株的比例分别为 16.70%、9.72%、8.33%和 6.94%(表 3)。

表 2 分离的 72 株真菌及 GenBank 登录号
Table 2 Seventy-two isolated fungi and their GenBank accession numbers

菌株号 Strain No.	属名 Generic name	登录号 Accession No.	菌株号 Strain No.	属名 Generic name	登录号 Accession No.
1-11c	<i>Cladosporium</i>	KC790467	6-16m	<i>Penicillium</i>	KC790501
1-11h	<i>Penidiella</i>	KC790468	6-16p	<i>Penicillium</i>	KC790502
1-12c	<i>Toxicladosporium</i>	KC790469	6-17c	<i>Aspergillus</i>	KC790503
2-11c	<i>Paraconiothyrium</i>	KC790470	6-18m	<i>Lecytophora</i>	KC790504
2-11s	<i>Lophiostoma</i>	KC790471	6-18p	<i>Aspergillus</i>	KC790505
2-11h	<i>Togninia</i>	KC790472	6-18s	<i>Cochliobolus</i>	KC790506
2-12p	Uncultured	KC790473	6-19p	<i>Aspergillus</i>	KC790507
2-12s	<i>Cladosporium</i>	KC790537	6-19s	<i>Lecytophora</i>	KC790508
2-13c	<i>Hyaloscypha</i>	KC790474	6-20c	<i>Aspergillus</i>	KC790509
2-13p	Uncultured	KC790475	6-20p	<i>Paecilomyces</i>	KC790510
2-13s	<i>Aspergillus</i>	KC790538	6-20s	<i>Aspergillus</i>	KC790511
2-14p	<i>Scolecobasidium</i>	KC790476	7-11h	<i>Myrmecridium</i>	KC790512
3-11h	<i>Paecilomyces</i>	KC790477	7-11p	Uncultured	KC790513
3-12h	Uncultured	KC790478	7-11s	<i>Phoma</i>	KC790514
4-11c	<i>Exophiala</i>	KC790479	7-13c	Uncultured	KC790515
4-11m	<i>Exophiala</i>	KC790480	7-14c	<i>Cladosporium</i>	KC790516
4-11s	<i>Cladosporium</i>	KC790481	7-15c	<i>Aspergillus</i>	KC790517
5-11c	<i>Phaeosphaeria</i>	KC790482	8-11h	<i>Cochliobolus</i>	KC790518
5-11s	<i>Aspergillus</i>	KC790483	8-11p	<i>Fusarium</i>	KC790519
5-12c	<i>Pyrenochaeta</i>	KC790484	8-12c	<i>Penicillium</i>	KC790520
5-12s	<i>Pseudocercospora</i>	KC790485	8-12h	<i>Nigrospora</i>	KC790521
5-13s	<i>Dokmaia</i>	KC790486	8-12s	<i>Penicillium</i>	KC790522
6-11m	<i>Neodeightonia</i>	KC790487	8-13c	<i>Neosartorya</i>	KC790523
6-11p	<i>Penicillium</i>	KC790488	8-13h	<i>Fusarium</i>	KC790524
6-12c	<i>Aspergillus</i>	KC790489	8-13p	<i>Fusarium</i>	KC790525
6-12m	<i>Fusarium</i>	KC790490	8-14s	<i>Phaeosphaeriopsis</i>	KC790526
6-12p	<i>Curvularia</i>	KC790491	8-16p	<i>Paecilomyces</i>	KC790527
6-12s	<i>Penicillium</i>	KC790492	9-11c	<i>Aspergillus</i>	KC790528
6-13c	<i>Aspergillus</i>	KC790493	9-11m	<i>Arthrinium</i>	KC790529
6-13m	<i>Curvularia</i>	KC790494	9-11p	Uncultured	KC790530
6-13p	<i>Lecytophora</i>	KC790495	9-11s	<i>Cladosporium</i>	KC790531
6-14c	<i>Lecytophora</i>	KC790496	9-12p	<i>Arthrinium</i>	KC790532
6-14m	<i>Paecilomyces</i>	KC790497	9-12s	<i>Arthrinium</i>	KC790533
6-14p	<i>Chaetomium</i>	KC790498	9-13m	<i>Lecytophora</i>	KC790534
6-15m	<i>Aspergillus</i>	KC790499	9-13p	<i>Phoma</i>	KC790535
6-16c	<i>Penicillium</i>	KC790500	9-13s	<i>Cladosporium</i>	KC790536

表3 分离丝状真菌所属及最低抑制浓度
Table 3 The generic attributions and minimal inhibitory concentrations (MIC) of isolated filamentous fungi

属名 Generic name	真菌菌株数 (株) Fungal strain									总数 Total	出现率 Occurrence rate (%)	最低抑浓度 Minimal inhibitory concentrations (mmol/L)
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#			
<i>Cladosporium</i>	1	1		1			1		2	6	8.33	5-12
<i>Penidiella</i>	1									1	1.39	<2
<i>Toxicladosporium</i>	1									1	1.39	<3
<i>Paraconiothyrum</i>		1								1	1.39	<3
<i>Lophiostoma</i>		1								1	1.39	<7
<i>Togninia</i>		1								1	1.39	<6
<i>Hyaloscypha</i>		1								1	1.39	<2
<i>Scolecobasidium</i>		1								1	1.39	<3
<i>Aspergillus</i>		1			1	8	1		1	12	16.7	2-6
<i>Paecilomyces</i>			1			2		1		4	5.56	<200
<i>Exophiala</i>				2						2	2.78	<3
<i>Phaeosphaeria</i>					1					1	1.39	<2
<i>Pyrenochaeta</i>					1					1	1.39	1-6
<i>Pseudocercospora</i>					1					1	1.39	<5
<i>Dokmaia</i>					1					1	1.39	<3
<i>Neodeightonia</i>						1				1	1.39	<6
<i>Penicillium</i>						5		2		7	9.72	6-40
<i>Curvularia</i>						2				2	2.78	6-13
<i>Lecythophora</i>						4			1	5	6.94	6-20
<i>Chaetomium</i>						1				1	1.39	<6
<i>Cochliobolus</i>						1		1		2	2.78	<20
<i>Fusarium</i>						1		3		4	5.56	10-15
<i>Myrmecridium</i>							1			1	1.39	<5
<i>Phoma</i>							1		1	2	2.78	<7
<i>Nigrospora</i>								1		1	1.39	<9
<i>Neosartorya</i>								1		1	1.39	<9
<i>Phaeosphaeriopsis</i>								1		1	1.39	<6
<i>Arthrinicum</i>									3	3	4.17	<5
Uncultured		2	1					2	1	6	8.33	2-10

2.3 最低抑制浓度(MIC)测定

本试验分离到的真菌菌株均耐受 $Cd^{2+} \geq 1$ mmol/L (表 3)。其中 5 个属的真菌对 Cd^{2+} 均有较强的耐受性, MIC 均在 15 mmol/L 以上, 分别为 *Paecilomyces*、*Penicillium*、

Lecythophora、*Cochliobolus* 和 *Fusarium*, 其编号依次为 6-20p、6-16p、6-16m、8-11p 的菌株耐 Cd^{2+} 能力分别达 200 mmol/L (图 1)、40 mmol/L (图 2)、25 mmol/L (图 3) 和 15 mmol/L (图 4)。

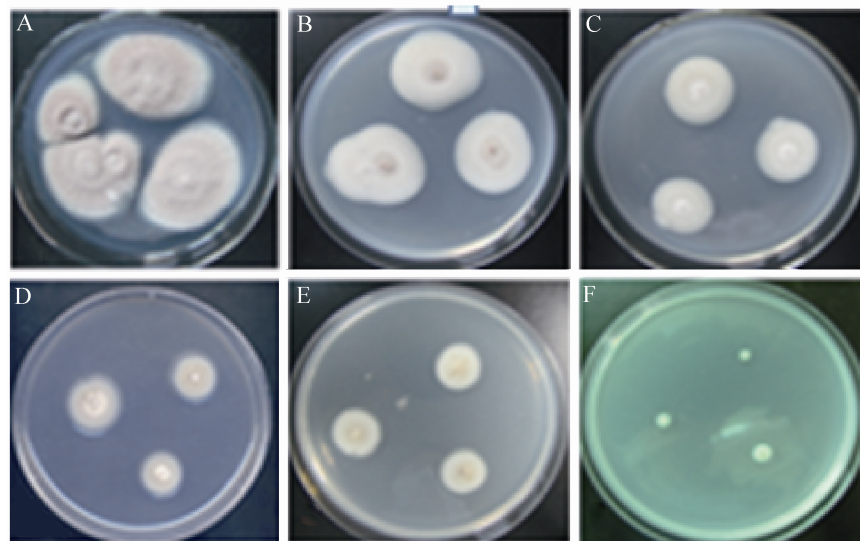


图 1 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p)在不同 Cd^{2+} 浓度 PDA 培养 10 d 的生长状况

Fig. 1 Growth of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p) after exposure to different concentrations of cadmium ions for 10 days

Note: A: 0 mmol/L; B: 7 mmol/L; C: 21 mmol/L; D: 50 mmol/L; E: 80 mmol/L; F: 200 mmol/L.

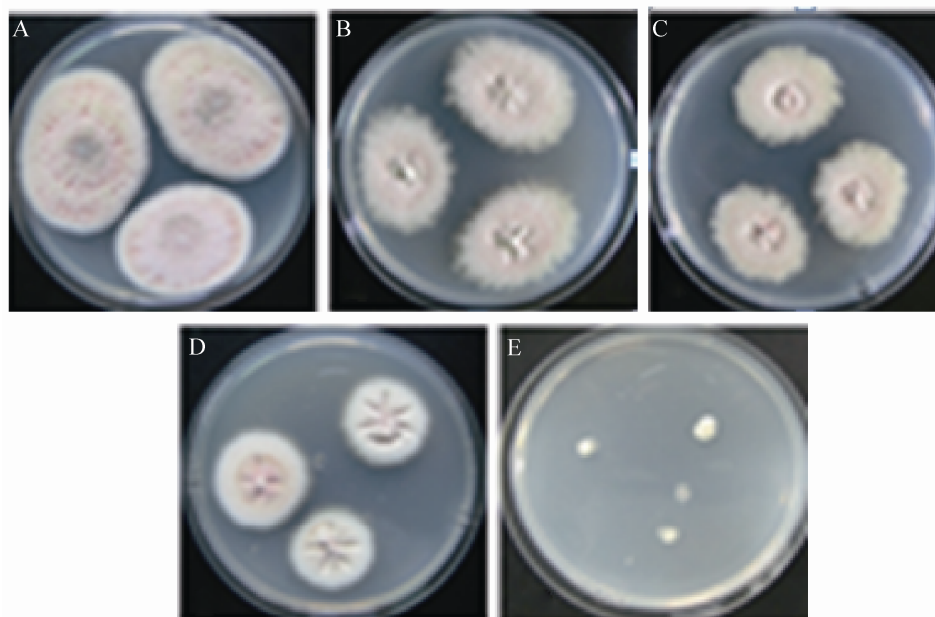


图 2 *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p)在不同 Cd^{2+} 浓度 PDA 培养 10 d 的生长状况

Fig. 2 Growth of *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p) after exposure to different concentrations of cadmium ions for 10 days

Note: A: 4 mmol/L; B: 17 mmol/L; C: 23 mmol/L; D: 30 mmol/L; E: 40 mmol/L.

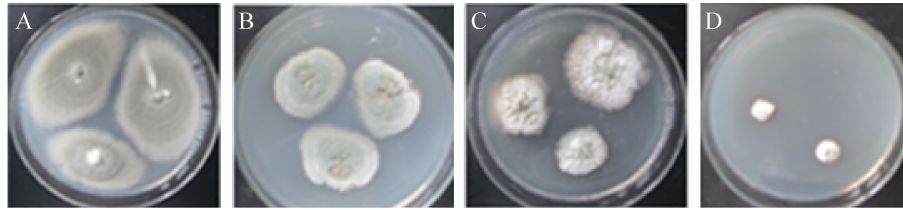


图3 *Penicillium rolfsii* Thom (6-16m)在不同 Cd^{2+} 浓度 PDA 培养 22 d 的生长状况

Fig. 3 Growth of *Penicillium rolfsii* Thom (6-16m) after exposure to different concentrations of cadmium ions for 22 days

Note: A: 5 mmol/L; B: 13 mmol/L; C: 17mmol/L; D: 25mmol/L.

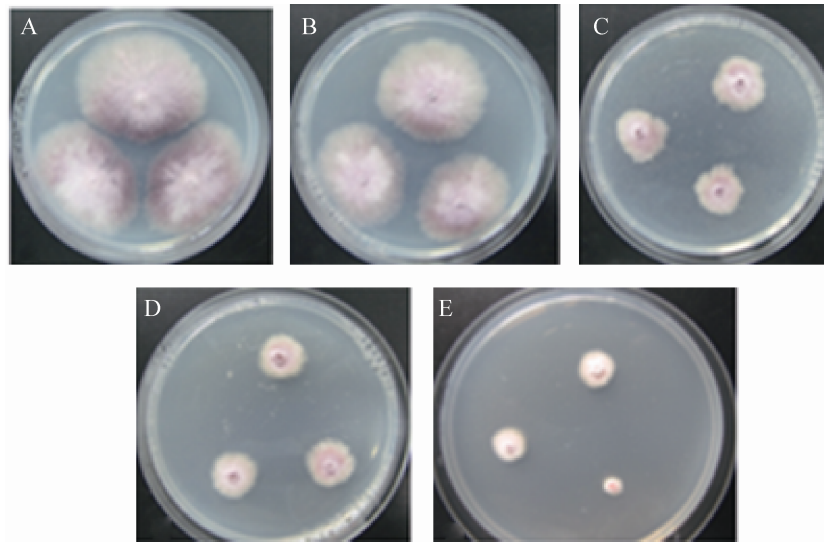


图4 *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p)在不同 Cd^{2+} 浓度 PDA 培养 10 d 的生长状况

Fig. 4 Growth of *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p) after exposure to different concentrations of cadmium ions for 10 days

Note: A: 3 mmol/L; B: 5 mmol/L; C: 8 mmol/L; D: 11 mmol/L; E: 15 mmol/L.

2.4 高耐镉菌株鉴定

通过 MIC 检测,发现有 4 株菌具有高耐镉能力,分别为 6-20p、6-16m、6-16p、8-11p,其鉴定结果如下。

菌株 6-20 p

淡紫拟青霉 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson

菌落于 PDA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 25 mm–40 mm, 菌落稍隆起;质地绒状兼絮状;分生孢子结构大量产生,分生孢子面近于玫瑰

灰色;菌丝体白色;表面无渗出液(图 5A);反面近于紫褐色、白色,可溶性色素缺乏(图 5B)。菌落在 CA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 25 mm–28 mm, 菌落稍隆起;质地绒状兼絮状;分生孢子结构大量产生,分生孢子面近于红白色或粉红白至红灰色;表面无渗出液(图 5C);反面近于白色至乳白色,可溶性色素缺乏(图 5D)。菌落在 CYA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 41 mm, 菌落稍隆起;有明显或不明显的放射状皱纹;质地绒状兼絮状;分生孢子结构大量

产生, 分生孢子面近于红白色或粉红白至红灰色; 表面有少量淡黄色渗出液(图 5E); 反面颜色近于淡黄色、奶油色, 无可溶性色素(图 5F)。菌落在 MEA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 27 mm–29 mm, 菌落中心稍隆起; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构产生, 分生孢子面近于玫瑰灰色; 表面无渗出液(图 5G); 反面颜色近于淡黄色、奶油色至深金色, 无可溶性色素(图 5H)。光学显微镜下显示其营养菌丝壁光滑, 菌丝无色透明, 直径 1.5 μm –3.1 μm 。分生孢子梗光滑无色, 248 μm –600 μm , 单个小梗直立于营养菌丝上, 瓶梗(6.4–9.2) μm ×(1.7–2.1) μm ,

基部膨大(图 5I), 孢梗上具 2–4 个瓶梗状的轮生分枝, 顶端渐细成明显的细长颈。顶部锥形变细, 形成一薄的独特的颈, 分生孢子自顶向下成链状, 卵形或椭圆形, (2.3–2.7) μm ×(1.6–2.7) μm , 成熟后表面粗糙, 透明无色, 堆积时呈淡紫色(图 5K)。未见厚垣孢子。ITS rDNA 序列长为 569 bp (GenBank 登录号: KC790510), 与 *Paecilomyces lilacinus* 的 UWFP 853 菌株 (GenBank 登录号: AF548079.1) 的 ITS rDNA 序列有 99% 的一致性。综合以上结果, 将该菌鉴定为 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson。

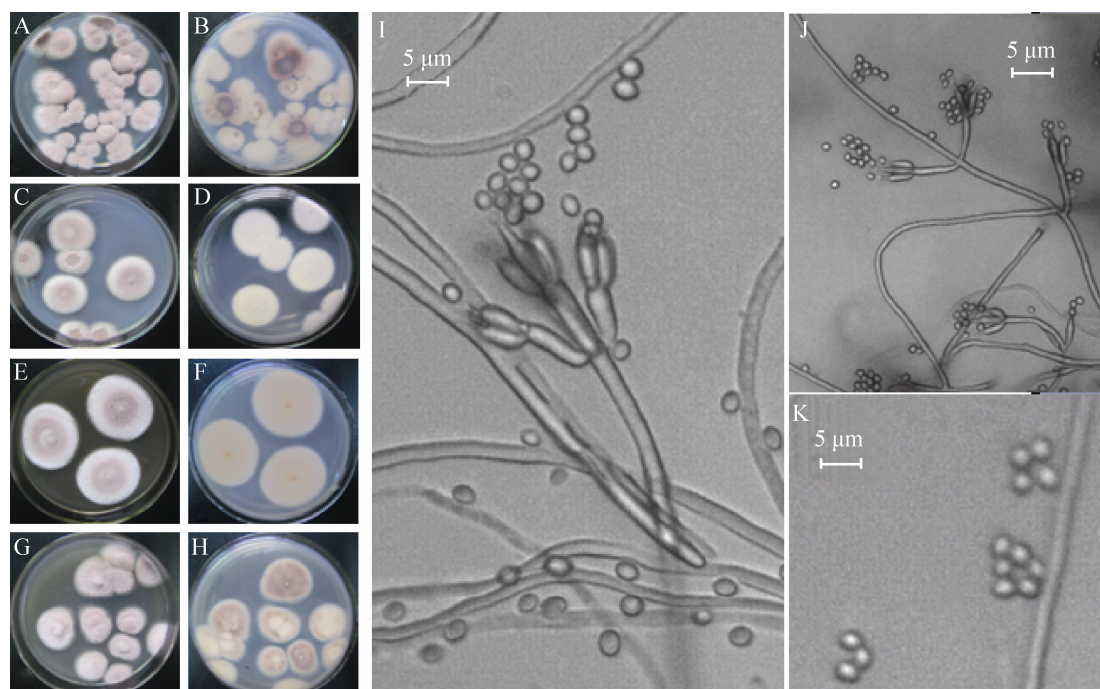


图 5 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p) 在不同培养基上培养特征

Fig. 5 Cultural characteristics of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (6-20p) on different culture media

注: A: PDA, 7 d, 正面; B: PDA, 7 d, 反面; C: CA, 7 d, 正面; D: CA, 7 d, 反面; E: CYA, 7 d, 正面; F: CYA, 7 d, 反面; G: MEA, 7 d, 正面; H: MEA, 7 d, 反面; I, J: 产孢结构; K: 分生孢子。

Note: A: PDA, 7 d, obverse; B: PDA, 7 d, reverse; C: CA, 7 d, obverse; D: CA, 7 d, reverse; E: CYA, 7 d, obverse; F: CYA, 7 d, reverse; G: MEA, 7 d, obverse; H: MEA, 7 d, reverse; I, J: Conidiogenous structure; K: Conidiospore.

菌株 6-16 m

罗尔夫青霉 *Penicillium rolfsii* Thom

菌落在 PDA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 38 mm–48 mm, 菌落稍平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构大量产生, 分生孢子面近于灰绿色、紫青色; 菌丝体白色; 表面有少量无色渗出液(图 6A); 反面近于金黄色、金红色, 可溶性色素缺乏(图 6B)。菌落在 CA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 16 mm–33 mm, 菌落平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构产生, 分生孢子面近于淡灰橄榄色、沙色; 表面有少量无色渗出液或缺乏(图 6C); 反面近于淡红褐色, 可溶性色素缺

乏(图 6D)。菌落在 CYA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 34 mm–48 mm, 菌落稍平坦; 有明显的放射状皱纹; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构产生, 分生孢子面近于暗灰绿色、灰橄榄色; 表面有少量无色或黄色渗出液(图 6E); 反面颜色近于红褐色, 无可溶性色素(图 6F)。菌落在 MEA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 33 mm–35 mm, 菌落稍隆起; 质地绒状兼粉末状; 分生孢子结构产生, 分生孢子面近于灰绿色; 表面无渗出液(图 6G); 反面颜色近于香槟酒色, 无可溶性色素(图 6H)。光学显微镜下显示其分生孢子梗发生于基质, 孢梗茎(165.4–258.3) $\mu\text{m}\times$

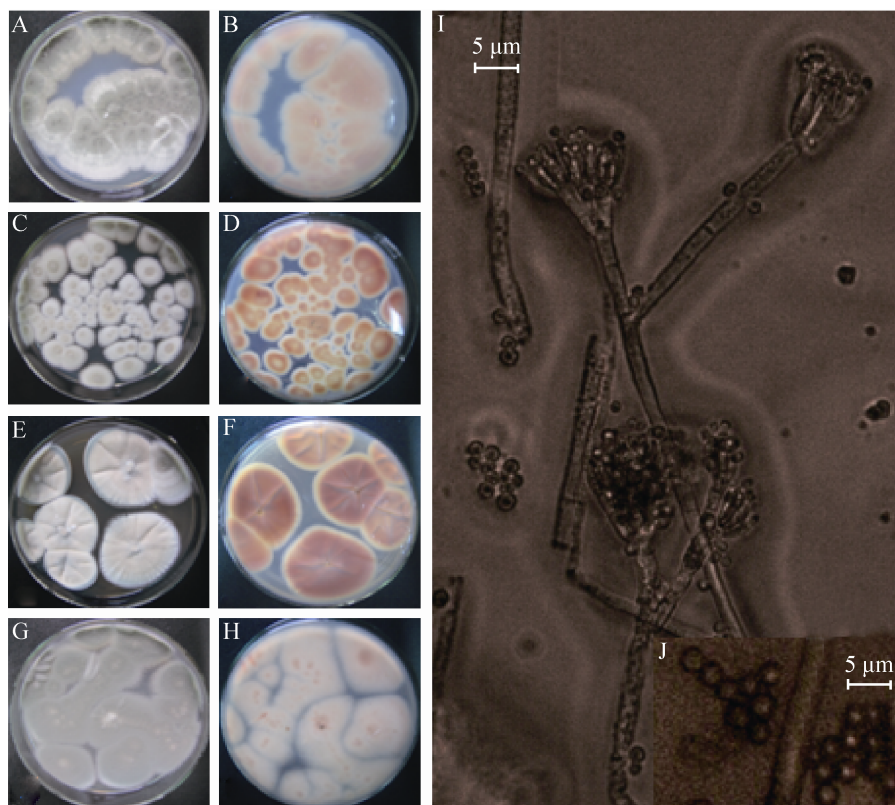


图 6 *Penicillium rolfsii* Thom (6-16m)在不同培养基上培养特征

Fig. 6 Cultural characteristics of *Penicillium rolfsii* Thom (6-16m) on different culture media

注: A: PDA, 7 d, 正面; B: PDA, 7 d, 反面; C: CA, 7 d, 正面; D: CA, 7 d, 反面; E: CYA, 7 d, 正面; F: CYA, 7 d, 反面; G: MEA, 7 d, 正面; H: MEA, 7 d, 反面; I: 产孢结构; J: 分生孢子。

Note: A: PDA, 7 d, obverse; B: PDA, 7 d, reverse; C: CA, 7 d, obverse; D: CA, 7 d, reverse; E: CYA, 7 d, obverse; F: CYA, 7 d, reverse; G: MEA, 7 d, obverse; H: MEA, 7 d, reverse; I: Conidiogenous structure; J: Conidiospore.

(2.7–5.0) μm , 壁平滑; 帚状枝双轮生, 单轮生少, 通常彼此紧贴; 梗基每轮 2–6 个, (8.3–12.9) $\mu\text{m} \times (1.4–3.2) \mu\text{m}$; 瓶梗每轮 5–7 个, (8.5–10.1) $\mu\text{m} \times (1.3–1.9) \mu\text{m}$, 瓶状(图 6I); 分生孢子通常呈现椭圆形, (2.2–2.9) $\mu\text{m} \times (1.9–2.8) \mu\text{m}$, 少量的球形或近球形, 壁平滑(图 6J); 分生孢子链较疏松。ITS rDNA 序列长为 556 bp (GenBank 登录号: KC790501), 与 *Penicillium rolfsii* 的 NRRL 1078 菌株 (GenBank 登录号: AF033439) 的 ITS rDNA 序列有 98% 的一致性。根据以上结果, 将

该菌鉴定为 *Penicillium rolfsii* Thom。

菌株 6-16 p

嗜松青霉 *Penicillium pinophilum* Hedgcock

菌落于 PDA 上 28 °C 培养 7 d, 直径 42 mm–47 mm, 菌落平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构大量产生, 分生孢子面黄绿色、灰绿色; 菌丝体淡黄色; 菌落表面有呼吸状水滴(图 7A); 反面粉黄色; 可溶性色素缺乏(图 7B)。菌落在 CA 上 28 °C 培养 7 d, 直径 31 mm–39 mm, 菌落平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子面结构大量产生, 分生孢子面近于黄绿色、灰

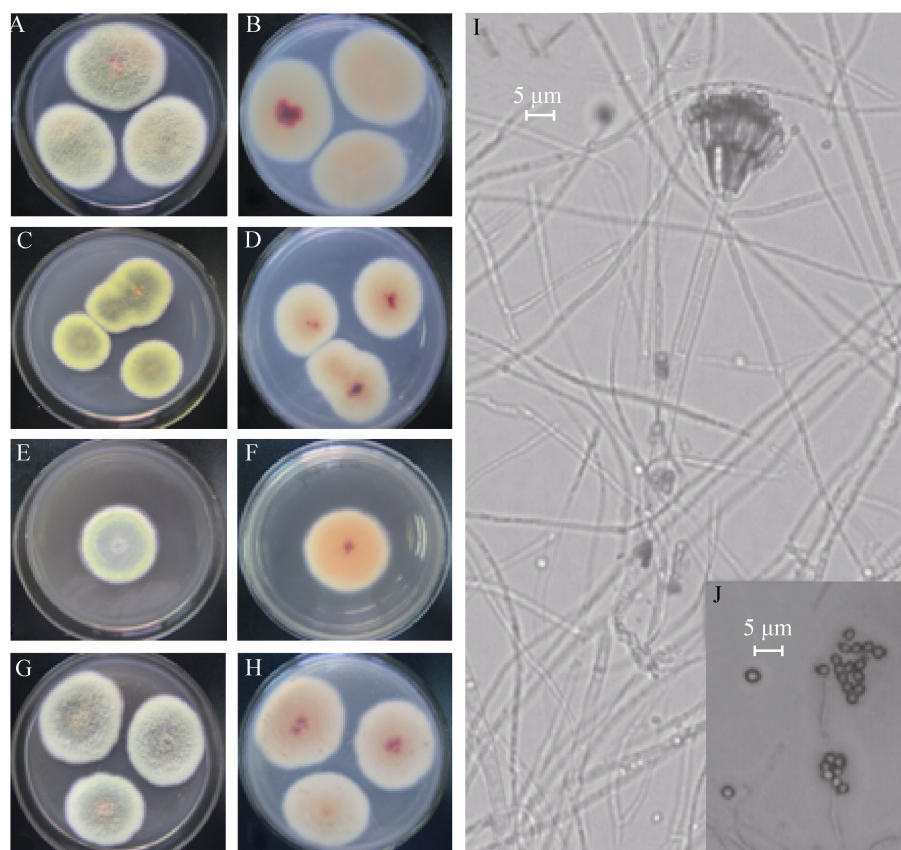


图 7 *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p) 在不同培养基上的培养特征

Fig. 7 Cultural characteristics of *Penicillium pinophilum* Hedgcock (6-16p) on different culture media

注: A: PDA, 7 d, 正面; B: PDA, 7 d, 反面; C: CA, 7 d, 正面; D: CA, 7 d, 反面; E: CYA, 7 d, 正面; F: CYA, 7 d, 反面; G: MEA, 7 d, 正面; H: MEA, 7 d, 反面; I: 产孢结构; J: 分生孢子。

Note: A: PDA, 7 d, obverse; B: PDA, 7 d, reverse; C: CA, 7 d, obverse; D: CA, 7 d, reverse; E: CYA, 7 d, obverse; F: CYA, 7 d, reverse; G: MEA, 7 d, obverse; H: MEA, 7 d, reverse; I: Conidiogenous structure; J: Conidiospore.

绿色、胆汁黄;菌丝体黄色或橘黄色;菌落表面无渗出液(图 7C);反面粉黄色、淡橘色、石榴棕色;可溶性色素缺乏(图 7D)。菌落在 CYA 上 28 °C 培养 7 d, 直径 35 mm–38 mm, 菌落平坦;质地绒状兼絮状;分生孢子结构大量产生,分生孢子面铜锈绿、灰绿色或雪松绿色;菌丝体淡黄色;无渗出液(图 7E);反面橙褐色、棕红色;可溶性色素缺乏(图 7F)。菌落在 MEA 上 28 °C 培养 7 d, 直径 40 mm–43 mm, 菌落平坦;质地绒状兼絮状;分生孢子面结构大量产生,分生孢子面近于浅绿色、胆汁黄色;菌丝体淡黄色;菌落表面无渗出液(图 7G);反面淡橙色、金小麦色;可溶性色素缺乏(图 7H)。光学显微镜下显示其分生孢子梗主要发生于气生菌丝者,孢梗茎(120–185) $\mu\text{m}\times(2.6\text{--}3.5)$ μm , 壁平滑,顶端通常膨大;帚状枝双轮生;梗基每轮 7–12 个,(9.8–11.2) $\mu\text{m}\times(1.2\text{--}2.8)$ μm ;瓶梗每轮 4–8 个,

(8.9–12.1) $\mu\text{m}\times(2.0\text{--}2.4)$ μm , 披针形, 梗颈明显(图 7I);分生孢子球形、椭圆形,(2.1–2.7) $\mu\text{m}\times(2.1\text{--}2.8)$ μm , 壁平滑(图 7J);分生孢子链疏松至不规则。ITS rDNA 序列长为 538 bp (GenBank 登录号: KC790502), 与 *Penicillium pinophilum* 的 FKI-5653 菌株 (GenBank 登录号: AB606412.1) 的 ITS rDNA 序列有 99% 的一致性。根据以上结果, 将该菌鉴定为 *Penicillium pinophilum* Hedgcock。

菌株 8-11p

尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schlecht.

菌落于 PDA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落长满整平皿, 菌落平薄;质地绒状兼絮状;分生孢子结构不产生,但不影响菌落颜色,菌落颜色为白色;表面有白色渗出液(图 8A);菌丝体白色,反面近于黄白色、黑色,可溶性色素缺乏(图 8B)。菌落在 CA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落长满整

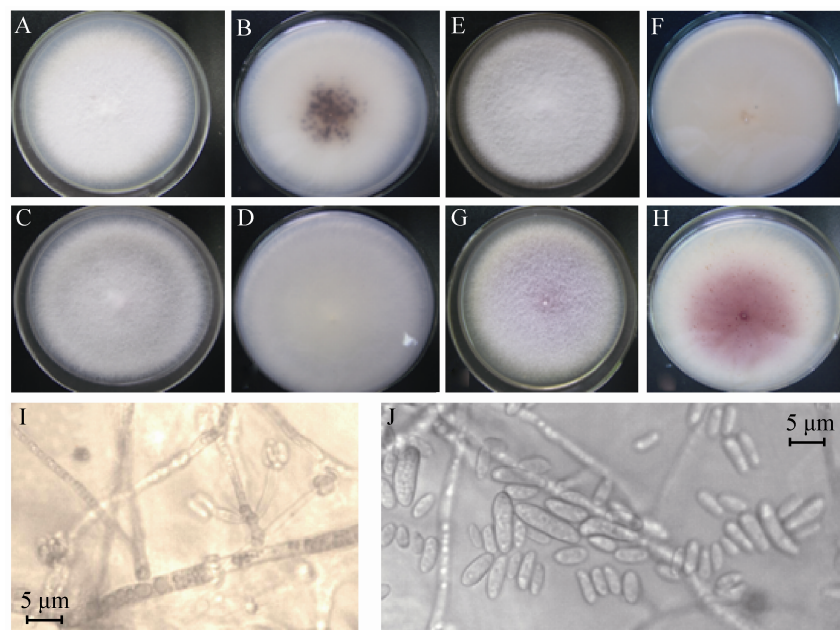


图 8 *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p) 在不同培养基上的培养特征

Fig. 8 Cultural characteristics of *Fusarium oxysporum* Schlecht. (8-11p) on different culture media

注: A: PDA, 7 d, 正面; B: PDA, 7 d, 反面; C: CA, 7 d, 正面; D: CA, 7 d, 反面; E: CYA, 7 d, 正面; F: CYA, 7 d, 反面; G: MEA, 7 d, 正面; H: MEA, 7 d, 反面; I: 产孢结构; J: 分生孢子。

Note: A: PDA, 7 d, obverse; B: PDA, 7 d, reverse; C: CA, 7 d, obverse; D: CA, 7 d, reverse; E: CYA, 7 d, obverse; F: CYA, 7 d, reverse; G: MEA, 7 d, obverse; H: MEA, 7 d, reverse; I: Conidiogenous structure; J: Conidiospore.

个平皿, 菌落平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构不产生, 但不影响菌落颜色, 菌落颜色为白色; 表面无渗出液(图 8C); 菌丝体白色, 反面近于黄白色, 可溶性色素缺乏(图 8D)。菌落在 CYA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落长满整个平皿, 菌落平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构不产生, 但不影响菌落颜色, 菌落白色; 菌丝体白色; 表面无渗出液(图 8E); 反面颜色香槟酒色, 无可溶性色素(图 8F)。菌落在 MEA 上 28 °C 培养 7 d, 菌落直径 80 mm, 菌落极平坦; 质地绒状兼絮状; 分生孢子结构产生, 分生孢子面玫瑰灰色、灰洋红; 菌丝体白色; 表面无渗出液(图 8G); 反面颜色灰红色, 无可溶性色素(图 8H)。光学显微镜下显示其菌丝淡色; 小型分生孢子着生于侧生的瓶状小梗上或短的侧生分生孢子梗上的瓶状小梗上(图 8I), 卵圆形至椭圆形的圆柱形体, 淡色, 少数呈腊肠形, 色深, 壁厚, 大小为(3.7–9.8) $\mu\text{m} \times$ (2.2–4.2) μm ; 大型分生孢子纺锤形至镰刀型, 间有 3 个隔膜, 大小为(9.7–23.1) $\mu\text{m} \times$ (2.5–5.6) μm (图 8J); 厚垣孢子间生或顶生于短侧枝上, 一般单生。ITS rDNA 序列长为 491 bp (GenBank 登录号: KC790519), 与 *Fusarium oxysporum* 的 16 菌株 (GenBank 登录号: EU839368) 的 ITS rDNA 序列有 99% 的一致性。根据以上结果, 将该菌鉴定为 *Fusarium oxysporum* Schlecht.。

3 讨论

近年来, 利用微生物修复重金属污染研究已成为人们关注的热点^[17], 并取得了一些成就。由于在重金属污染的土壤中, 微生物长期受到生存环境中重金属的胁迫, 并对重金属产生了一定的耐性, 因此从受重金属污染的土壤中分离筛选出对重金属具有耐性的微生物是可行的, 而从污染土壤中筛选耐受重金属微生物

是利用微生物解决重金属污染的基础, 这对重金属的工业化处理和矿物及尾矿的生态修复具有重要意义。本研究的样品来源为粤东北铅锌尾矿区, 是 Cd^{2+} 污染重区, 其土壤中 Cd^{2+} 等含量远超出了国家土壤环境质量二级标准。

采用常规培养基添加不同浓度重金属的方法, 制备含重金属的选择性培养基, 筛选土壤中重金属耐性微生物是较常用的一种方法^[18–20]。本试验采用 4 种含重金属 Cd^{2+} 的培养基, 从粤东北铅锌尾矿废弃地分离到 72 株耐镉的丝状真菌, 其中 4 株具高耐镉能力, 最高耐镉能力可达 200 mmol/L, 表明这些真菌对 Cd^{2+} 均具有较强的适应性, 不同种属的菌株对 Cd^{2+} 的适应性有所差异。与本研究相比, 刘爱民等^[21]分离到一株在琼脂平板上耐 Cd^{2+} 浓度为 75 mmol/L 的丝状真菌; 韦名肯等^[22]从广西某矿区污泥中分到一株抗重金属青霉菌, 在 PDA 中对 Cd^{2+} 的抗性水平达到 50 mmol/L。结合本研究的结果, 表明了微生物对重金属抗性的多样性, 同时也暗示了微生物在重金属降解和修复中有着良好的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Cerbasi IH, Yetis U. Biosorption of Ni(II) and Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system-kinetics[J]. Water SA, 2001, 27(1): 15–20.
- [2] 顾继光, 周启星, 王新. 土壤重金属污染的治理途径及其研究进展[J]. 应用基础与工程科学学报, 2003, 11(2): 143–151.
- [3] 曹仁林, 贾晓葵, 张建顺. 镉污染水稻土防治研究[J]. 天津农林科技, 1999(6): 12–17.
- [4] Al-Garni S, Ghanem K, Bahobail A. Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution[J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(17): 4163–4172.
- [5] Ezzouhri L, Castro E, Moya M, et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted

- sites in Tangier, Morocco[J]. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(2): 35-48.
- [6] 崔斌, 王凌, 张国印, 等. 土壤重金属污染现状与危害及修复技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 373-375.
- [7] Hassan SW, El-Kassas HY. Biosorption of cadmium from aqueous solutions using a local fungus *Aspergillus cristatus* (glaucus group)[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(9): 2276-2286.
- [8] Shinde NR, Bankar AV, Kumar AR, et al. Removal of Ni(II) ions from aqueous solutions by biosorption onto two strains of *Yarrowia lipolytica*[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 102: 115-124.
- [9] Maria L. Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems[J]. Earth Science Reviews, 2000, 51(1/4): 1-31.
- [10] 国家环境保护局. GB15618-1995土壤环境质量标准[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1995: 1-3.
- [11] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-242.
- [12] Ibanez JG, Hernandez-Esparze M, Doria-Serrano C, et al. Microorganism in Soil, Water, and Air[J]. Environmental Chemistry, 2008: 211-218.
- [13] 孔华忠. 中国真菌志[M]. 第35卷(青霉属及相关有性型属). 北京: 科学出版社, 2007.
- [14] Kornerup A, Wanscher JH. Methuen Handbook of Colour[M]. London: Eyre Methuen, 1978: 1-252.
- [15] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-780.
- [17] 刘爱民, 黄为一. 镉铜污染尾矿土中添加耐镉铜菌剂 J5 后微生物区系多样性的变化[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(3): 265-270.
- [18] 湛方栋, 何永美, 李元, 等. 云南会泽废弃铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的耐镉性[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(4): 572-576.
- [19] 夏娟娟, 盛下放, 江春玉. 重金属镉抗性菌株的筛选及其对镉活化作用的研究[J]. 生态学杂志, 2005, 24 (11): 1357-1360.
- [20] 刘爱民, 黄为一. 耐镉菌株的分离及其对 Cd^{2+} 的吸附富集[J]. 中国环境科学, 2006, 26(1): 91-95.
- [21] 刘爱民, 黄为一. 应用红外方法探讨耐镉菌株积累 Cd^{2+} 的机理[J]. 环境科学学报, 2005, 25(11): 1502-1506.
- [22] 韦明肯, 唐华英, 梁铃, 等. 青霉菌 *Penicillium janthinellum* 菌株 GXCR 的高抗重金属盐及其对 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 离子吸收的特性[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 616-623.