

煤矿区耐镉青霉菌的分离鉴定

李霞¹ 张玉秀^{1*} 刘金光¹ 柴团耀²

(1. 中国矿业大学(北京) 化学与环境工程学院 北京 100083)

(2. 中国科学院大学 生命科学学院 北京 100049)

摘要: 【目的】分离鉴定煤矸石中耐 Cd²⁺ 菌株。【方法】用菌落形态和 18S rRNA 序列分析鉴定菌株, 研究菌株的重金属耐性和在酸性煤矸石浸出液的生长能力, 分析其抗氧化酶活性对重金属复合污染的响应。【结果】BJKD4 菌株为青霉属(*Penicillium* sp.) 菌, 能耐 29 mmol/L 的 Cd²⁺, 不同重金属对 BJKD4 的毒性大小依次为: Cu²⁺>Ni²⁺>Cd²⁺>Pb²⁺ 或 Zn²⁺>Mn²⁺。正交试验表明 BJKD4 菌株能在不同浓度重金属 Cd、Zn、Ni 和 Mn 等复合污染条件下生长, SOD 活性在重金属复合污染时升高, CAT 活性变化依重金属的种类和浓度不同而不同; 此外, BJKD4 能在含有煤矸石酸性浸出液的培养基中生长, 并提高其 pH。【结论】BJKD4 菌株能耐多种重金属, 具有阻止煤矸石山淋溶液酸化的应用潜力。抗氧化酶在减缓重金属诱导的氧化胁迫中起重要作用。

关键词: 青霉菌, 重金属, 耐性, 煤矸石

Isolation and characterization of cadmium-resistant *Penicillium* sp. from coal mining area

LI Xia¹ ZHANG Yu-Xiu^{1*} LIU Jin-Guang¹ CHAI Tuan-Yao²

(1. China University of Mining and Technology (Beijing), School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing 100083, China)

(2. University of Chinese Academy of Sciences, College of Life Science, Beijing 100049, China)

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项项目(No. 2009ZX08009-130B); 国家 863 计划项目(No. 2009AA06Z320); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. 2010YH05); 中国矿业大学(北京)课程建设与教学改革项目(No. t120301)

***通讯作者:** Tel: 86-10-62331792; 信箱: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn

收稿日期: 2012-11-01; **接受日期:** 2012-12-24

Abstract: [Objective] We isolated cadmium-resistant fungi from gangue pile of coal area and characterized their heavy-metal resistance. **[Methods]** The strain was identified by the morphological properties and 18S rDNA sequence homology analysis. Heavy-metal tolerance and the growth in acid leaching liquid of coal gangue were evaluated. The antioxidant enzyme activity of SOD (superoxide dismutase) and CAT (catalase) was assayed under mixed heavy-metals stress. **[Results]** The BJKD4 strain is the genus *Penicillium* sp. and could tolerate up to 29 mmol/L Cd^{2+} , the optimum pH is 4.0–9.0. The order of heavy-metal toxicity to BJKD4 growth is: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ or $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Orthogonal experiment indicated that BJKD4 strain could survive in the medium containing different concentrations of a variety of heavy-metal ions, such as Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} and Mn^{2+} . SOD activity of BJKD4 is increased in response to heavy-metals, while the activity of CAT depended on the species and concentration of heavy-metal. Furthermore, BJKD4 could grow in medium containing an acidic leaching solution of coal gangue at alkali pH. **[Conclusion]** BJKD4 strain is tolerant to various heavy-metals and has the potential to prevent acidification of the gangue hill leachate, the antioxidant enzyme plays important role in alleviating the oxidative stress induced by heavy-metal ions.

Keywords: *Penicillium*, Heavy-metal, Tolerance, Coal gangue

高硫煤矸石经风化淋溶作用可产生强酸性的淋溶液, 导致其中的重金属被淋溶出来, 致使矸石山及周边土壤和水体严重酸化和受到重金属污染, 如镉、铜、铅和锌等。铜和锌是有机体生命活动不可缺少的元素, 但过量时则产生毒性效应。重金属污染土壤修复的物理或化学方法费用昂贵, 易造成环境二次污染, 而且当重金属含量低于 100 mg/L 时这些方法都不能有效降低重金属毒性^[1]。生物修复被认为是一种无污染且修复效率高的方法, 特别是微生物修复技术越来越受到广大学者关注。

修复重金属污染的微生物主要是土著真菌和细菌, 不同微生物对重金属污染的耐性也不同, 通常为真菌>细菌>放线菌^[2]。真菌在自然界中分布很广, 对环境适应能力强, 在生物修复中得到广泛关注。污染土壤中的土著微生物往往具有较高的重金属抗性^[3], 从中分离的微生物由于适应当地的自然环境, 所以能有效修复重金属污染。

杜爱雪等^[4-5]从铜矿尾矿土壤中分离出一株高抗 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 等重金属的青霉菌。在铜矿冶炼废水中筛选出高抗铜的恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida* strain S4) 能有效去除水体中的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ^[6]。白腐真菌对铅有较强的去除作用, 其最大吸附量可达 108.4 mg/g, 吸附率可达 95%^[7-8]。

菌株受到重金属胁迫时, 活性氧自由基在细胞中累积, 当超过一定阈值时, 会与膜质和生物大分子反应, 导致膜质过氧化、丙二醛(MDA)累积, MDA 可与蛋白质、核酸等活性物质交联, 破坏生物膜结构。在低浓度重金属胁迫下, 生物体内的抗氧化酶被激活, 如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等, 进而可以清除重金属胁迫产生的过量活性氧(ROS), 但是在高浓度重金属胁迫下, 生物体内活性氧的增加程度超过了正常的清除能力, 细胞膜及酶系统受到破坏, 酶活性急剧下降^[9], 细胞受伤害。因此, 在煤矸石污染

土壤中分离耐重金属 Cd 的真菌, 研究其生长特性和重金属耐性, 以期对煤矸石山重金属污染的修复提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 耐镉真菌的驯化、筛选及鉴定

富集、驯化和分离菌株的过程: 将 5 g 矸石样品加入到 45 mL 马丁氏液体培养基中, 28 °C、180 r/min 富集培养 48 h 后, 取 2 mL 富集菌液接种于含 0.9 mmol/L Cd^{2+} 的新鲜培养基中培养, 浑浊后取 1 mL 富集培养液接种于含 1.8 mmol/L Cd^{2+} 的液体培养基中培养, 依此类推, 逐级提高 Cd^{2+} 浓度, 在 2.7–45.0 mmol/L Cd^{2+} 的培养基中进行驯化培养。取 0.2 mL 9 mmol/L Cd^{2+} 的菌液涂布在 45 mmol/L Cd^{2+} 的固体培养基上, 倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 120 h, 分离耐 Cd^{2+} 菌株。

菌株的形态和生理生化特征鉴定参见《真菌鉴定手册》^[10]、《普通真菌学》^[11]。根据菌落形态初步观察 BJKD4 单菌落菌株为青霉属(保藏编号为 CGMCC No. 6620), 将其接种到查氏培养基中培养, 进行菌种鉴定和耐重金属特性研究。菌株的 18S rRNA 序列分析: 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取基因组, DNA 序列由北京华大基因公司测定, 用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 程序进行 DNA 序列比对。

马丁氏培养基(g/L): 葡萄糖 10, 磷酸二氢钾 1, 蛋白胨 5, 硫酸镁 0.5, 1/3000 孟加拉红 100 mL。1.0×10⁵ 灭菌 30 min, 用前加入 0.03% 链霉素 100 mL。固体培养基加入 15–20 g 琼脂。

查氏培养基(g/L): 硝酸钠 2, 磷酸氢二钾 1, 氯化钾 0.5, 硫酸镁 0.5, 硫酸亚铁 0.01, 蔗糖 30。重金属筛选培养基是在查氏培养基中加入不同浓度的重金属盐。

1.2 pH 对菌株生长的影响

用 3 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 将培养液的

pH 分别调节至 4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 将活化 2 d 的菌种接种到不同 pH 的查氏固体培养基, 倒置于恒温培养箱中, 28 °C 培养, 第 8 天测菌落直径。

1.3 重金属镉对菌株生长的影响

将活化 2 d 的菌株接种到含 0、1、3、9、18 或 36 mmol/L Cd^{2+} 的查氏固体培养基, 28 °C 培养 16 d, 从第 3 天起开始测菌落直径。

1.4 不同重金属对菌株生长的影响

菌株在液体查氏培养基中活化 2 d, 取 2 μL 菌液接种到含有单一不同浓度重金属 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 或 Mn^{2+} 的查氏固体培养基, 倒置于恒温培养箱中, 28 °C 培养 8 d 时测菌落直径。

1.5 复合重金属污染对菌株生长的影响

根据单一重金属(Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})对菌株生长的影响, 设计 $L_{25}(5^4)$ 正交试验, 配制不同重金属复合污染的固体培养基, 接种 2 μL 菌液, 28 °C 培养 8 d, 测菌落直径。实验重复 3 次, 用 SPSS 软件分析。

1.6 复合重金属胁迫对菌株抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

根据 1.5 中复合重金属(Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})对菌株生长的影响, 选取前 3 个浓度梯度, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 测定其酶活性变化。取 1 mL 活化 2 d 的菌液接种于液体查氏培养基中, 28 °C 恒温振荡培养 5 d, 再根据已设定的浓度加入不同重金属, 培养 24 h 后, 测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性以及菌体产生的丙二醛(MDA)含量。MDA 含量测定采用三氯乙酸(TCA)-硫代巴比妥酸法测定^[12]; SOD 活性采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定; CAT 活性根据 H_2O_2 在 240 nm 波长下吸收值的减少量进行测定^[13]。用 SPSS 软件分析结果。

1.7 不同浓度煤矸石浸出液对菌株生长的影响

取过 1 mm 筛的煤矸石粉末 500 g, 加入 2.5 L

水浸泡, 每 24 h 测定浸出液的 pH, 7–10 d 时达到稳定值 pH 2.72。将浸泡 10 d 的煤矸石浸出液抽滤, 上清液分别用查氏培养基或去离子水按不同体积比稀释, 得到 40 mL 含 0、1/4、1/3、1/2、3/4 或 1 (*V/V*) 的煤矸石浸出液的培养液。分别接种 1 mL 活化 2 d 的菌液, 培养 5 d 后离心收集菌体, 一批用于测 MDA 含量, 另一批于 80 °C 烘干测干重。

2 结果与分析

2.1 青霉菌 BJKD4 的筛选鉴定

通过富集筛选, 分离出一株耐 Cd^{2+} 的霉菌菌株 BJKD4, 驯化后菌株能耐 29 mmol/L Cd^{2+} 。BJKD4 菌株在固体查氏培养基中培养 14 d 后 (图 1), 菌落为毡状, 表面有渗出液, 有规则的放射状褶裂, 中心有脐状突起并有几道同心纹。BLAST 比对分析表明, BJKD4 的 18S rRNA 序列与青霉属 (*Penicillium* sp.) 菌、正青霉属 (*Eupenicillium* sp.) 菌和子囊菌纲 (*Ascomycete* sp.) 菌的同源性均为 99%, 用 MEGA 5.0 软件构建 18S rRNA 系统发育树。结合形态观察和分子分析, 认为 BJKD4 属于青霉属 (*Penicillium* sp.) 菌。

2.2 pH 对菌株生长的影响

平板培养基中菌落直径大小可以反映真菌生长的生物量大小。BJKD4 菌株在查氏平板培养基



图 1 BJKD4 菌落形态

Fig. 1 Colony form of BJKD4 strain

中生长 8 d (图 2), 其菌落直径在 pH 4.0–6.0 时最大, pH 7.0 时显著降低, pH 7.0–9.0 时 BJKD4 菌落直径无显著差异。表明 BJKD4 菌株生长最适 pH 为 4.0–6.0, 且有较宽的酸碱适应范围。

2.3 重金属 Cd 对菌株生长的影响

BJKD4 菌株在含 0–36 mmol/L Cd^{2+} 的查氏固体培养基中生长 16 d, 其菌落直径随着培养天数的延长而增加, 而随着 Cd^{2+} 浓度的增加而降低 (图 3)。在无 Cd^{2+} 培养基 (对照) 中, 菌落生长的延滞期为 0–4 d, 对数生长期为 4–15 d, 16 d 时进入稳定期; 而添加重金属 Cd^{2+} (1–36 mmol/L) 后, 延滞期延长到第 6 天, 14–15 d 时达到稳定期。与对

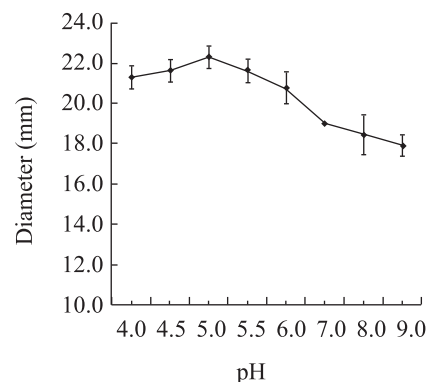


图 2 不同 pH 对菌株 BJKD4 生长的影响

Fig. 2 Effects of pH values on growth of BJKD4 strain

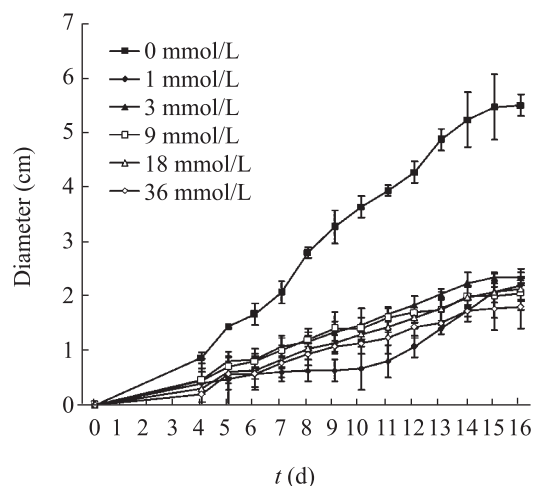


图 3 镉对 BJKD4 菌株生长曲线的影响

Fig. 3 Effect of Cd^{2+} concentration in the culture on growth curves of BJKD4 strain

照相比, BJKD4 菌株在 1–36 mmol/L Cd^{2+} 平板上生长 5–16 d 时, 其菌落直径显著低于对照, 而不同浓度 Cd^{2+} 处理对菌落直径大小无明显影响, 说明 BJKD4 为耐镉菌。

2.4 不同重金属对菌株生长的影响

不同重金属对 BJKD4 菌株生长的抑制效果不同(图 4), 其菌落直径随着重金属浓度的升高逐渐减小。BJKD4 菌落直径在含有 0.05 mmol/L Cu^{2+} 培养基中迅速下降, 含 0.2 mmol/L Cu^{2+} 时菌株不能生长; Cd^{2+} 浓度为 1 mmol/L 时, 菌落直径显著降低, 之后随着 Cd 浓度的增加缓慢减小; 随着 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度的升高, 菌落直径直线下降, 且重金属浓度相同时, Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 胁迫时菌斑直径大于 Ni^{2+} 胁迫时的直径; 在小于 20 mmol/L Mn^{2+} 时可以促进 BJKD4 菌株生长, 而在大于 20 mmol/L Mn^{2+} 时其直径随 Mn^{2+} 浓度升高而迅速减小。比较 EC_{50} 得知不同重金属对 BJKD4 的毒性大小依次为: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 或 $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ 。

2.5 复合重金属污染对菌株生长的影响

正交实验结果表明: 在 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Mn^{2+} 等 4 种重金属复合污染条件下, BJKD4 菌落直径均减小, 说明重金属复合污染显著影响菌株生长; 从直观分析表中 K 值的变化(表 1)看出:

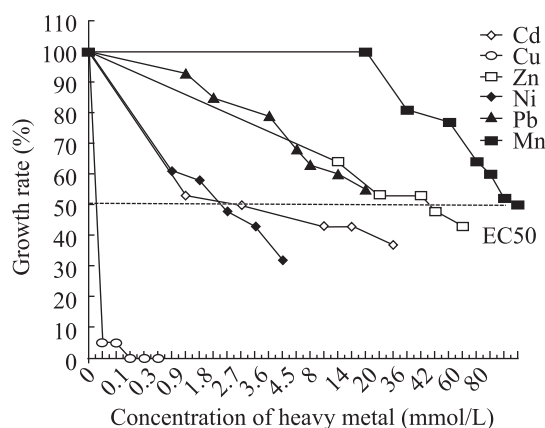


图 4 不同重金属对菌株 BJKD4 生长的影响

Fig. 4 The growth curves of BJKD4 in the culture containing different heavy-metals

Cd^{2+} 和 Mn^{2+} 抑制菌株生长, Zn^{2+} 在 0–50 mmol/L 时, 促进菌株生长, 大于 50 mmol/L 时, 抑制其生长。

方差分析(表 2)表明: Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 显著影响 BJKD4 的生长, Ni^{2+} 没有显著作用, 可能由于实验中所选 Ni^{2+} 浓度较小, 对菌株生长影响较小。此外, 浓度为 2.25 mmol/L Cd^{2+} , 15 mmol/L Zn^{2+} , 0–2.4 mmol/L Ni^{2+} 和 80 mmol/L Mn^{2+} 等复合重金属对 BJKD4 生长的抑制作用小于其他组合, 表明 BJKD4 菌株可耐复合重金属污染。

2.6 复合重金属污染对 BJKD4 抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响

在重金属复合污染胁迫 24 h 时(表 3) BJKD4 菌株的 SOD 活性均高于对照, Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 均显著影响 SOD 活性, 其中 0–2 mmol/L Ni^{2+} 对菌株 SOD 活性影响最小; BJKD4 菌株的 CAT 活性表现出升高和降低两种变化趋势, 与对照相比, Cd^{2+} 和 Ni^{2+} 显著降低 CAT 活性, Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 显著提高菌株 CAT 活性。 Cd^{2+} 胁迫时, SOD 活性上升, CAT 活性下降, 表明 SOD 起主要作用; Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 胁迫下 SOD 和 CAT 均发挥作用, 而 Ni^{2+} 胁迫时, 对抗氧化酶活性影响较小, 说明同一菌株对不同重金属的抗性机制不同。方差分析(表 4)表明: 在 $P > 0.01$ 水平时, Cd^{2+} 和 Ni^{2+} 对 MDA 含量无显著影响。原因可能是 BJKD4 为耐 Cd^{2+} 菌; 实验所选 Ni^{2+} 低, 对菌株生长无显著影响, 因此 MDA 含量变化较小; Mn^{2+} 胁迫时 MDA 含量显著提高, 可能是由于 Mn^{2+} 浓度较大, 菌株累积大量 ROS, 虽然抗氧化酶活性提高, 但不足以清除过多 ROS, 导致 MDA 含量累积。 Zn^{2+} 胁迫时, 抗氧化酶活性提高, 可有效清除 ROS, 减少了 MDA 的产生。

2.7 不同浓度煤矸石浸提液对 BJKD4 生长的影响

煤矸石浸出液 pH 在 3 左右, 水 pH 为 6.8, 查

表 1 正交实验 BJKD4 的直径及直观分析
Table 1 Orthogonal experiment scheme and the colony diameter of BJKD4 strain

处理 Project	Cd ²⁺ (mmol/L)	Zn ²⁺ (mmol/L)	Ni ²⁺ (mmol/L)	Mn ²⁺ (mmol/L)	直径 Diameter (cm)
1	0	0	0	0	1.90±0.06
2	0	15	2.7	80	1.57±0.06
3	0	30	2.4	90	1.00±0.10
4	0	50	2.0	72	1.00±0.06
5	0	70	1.5	85	0.80±0.11
6	2.25	0	2.7	90	0.57±0.05
7	2.25	15	2.4	72	1.33±0.10
8	2.25	35	2.0	85	1.23±0.10
9	2.25	50	1.5	80	0.90±0.10
10	2.25	70	1.5	0	1.40±0.15
11	5	0	0	80	0.90±0.06
12	5	15	2.4	85	0.63±0.00
13	5	30	2.0	0	1.33±0.07
14	5	50	0	90	0.67±0.13
15	5	75	2.7	72	0.53±0.00
16	7	0	2.0	80	0.90±0.00
17	7	15	1.5	90	1.20±0.05
18	7	30	0	72	0.93±0.10
19	7	50	2.7	85	0.97±0.10
20	7	70	2.4	0	1.33±0.07
21	9	0	1.5	72	0.77±0.10
22	9	15	0	85	0.80±0.05
23	9	30	2.7	0	1.43±0.06
24	9	50	2.4	80	0.90±0.00
25	9	70	2.0	90	0.70±0.10
<i>K</i> ₁	18.80	14.30	15.60	22.20	
<i>K</i> ₂	16.30	18.71	15.20	13.70	
<i>K</i> ₃	12.20	16.50	15.50	15.50	
<i>K</i> ₄	16.00	14.80	15.60	13.30	
<i>K</i> ₅	13.80	12.80	15.20	12.40	
<i>R</i>	6.60	4.40	0.40	9.80	

表 2 不同重金属对菌株生长的正交试验方差分析
Table 2 Variance analysis of orthogonal experiment of different heavy-metals on the growth of strains

源 Source	III 型平方和 Type III sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方差 Mean square	<i>F</i>	显著性 <i>P</i> Sig.
校正模型 Corrected model	7.245a	16	0.453	16.766	0
截距 Intercept	79.259	1	79.259	2 934.761	0
Cd	1.702	4	0.425	15.754	0
Zn	1.362	4	0.340	12.607	0
Ni	0.011	4	0.003	0.104	0.981
Mn	4.170	4	1.042	38.600	0
误差 Error	1.566	58	0.027		
总计 Total	88.070	75			
校正的总计 Corrected total	8.811	74			

表 3 菌体 BJKD4 的 SOD、CAT、MDA 含量变化及直观分析
Table 3 Effect of different metal concentrations on SOD, CAT activity and MDA contents of BJKD4

处理 Project	Cd ²⁺ (mmol/L)	Zn ²⁺ (mmol/L)	Ni ²⁺ (mmol/L)	Mn ²⁺ (mmol/L)	SOD	CAT	MDA
1	0	0	0	0	1.17±0.53	19.18±0.74	0.92±0.01
2	0	15.00	1.50	72.00	8.26±1.10	28.51±0.90	0.91±0.24
3	0	30.00	2.00	80.00	2.33±0.10	19.91±2.68	0.41±0.18
4	2.25	0	1.50	80.00	6.89±0.30	19.86±1.76	2.34±0.11
5	2.25	15.00	2.00	0	11.42±2.05	28.08±1.14	0.81±0.33
6	2.25	30.00	0	72.00	2.24±1.01	18.09±3.47	0.19±0.31
7	5.00	0	2.00	72.00	4.90±0.31	15.82±3.69	1.76±0.12
8	5.00	15.00	0	80.00	1.23±0.98	10.34±1.38	0.06±0.04
9	5.00	30.00	1.50	0	5.43±0.56	18.05±2.46	0.39±0.64
SOD							
<i>K</i> ₁	35.59	39.20	54.38	13.91			
<i>K</i> ₂	61.65	62.43	46.20	61.74			
<i>K</i> ₃	34.39	29.99	31.04	55.97			
<i>R</i>	27.27	32.44	23.35	47.82			
CAT							
<i>K</i> ₁	202.77	164.58	195.91	142.85			
<i>K</i> ₂	198.09	200.77	187.26	199.24			
<i>K</i> ₃	132.63	168.14	150.32	191.41			
<i>R</i>	70.14	36.20	45.59	56.40			
MDA							
<i>K</i> ₁	7.51	15.06	6.36	3.49			
<i>K</i> ₂	9.99	6.10	9.36	11.69			
<i>K</i> ₃	6.62	2.97	8.41	8.95			
<i>R</i>	3.37	12.09	3.00	8.20			

表 4 MDA 的方差分析
Table 4 Variance analysis of orthogonal experimental of MDA

源 Source	III 型平方和 Type III sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i>	显著性 <i>P</i>
校正模型 Corrected model	13.820	8	1.727	21.150	0
截距 Intercept	21.526	1	21.562	263.990	0
Cd	0.677	2	0.339	4.174	0.033
Zn	8.747	2	4.374	53.549	0
Ni	0.524	2	0.262	3.205	0.064
Mn	3.871	2	1.936	23.698	0
误差 Error	1.470	18	0.082		
总计 Total	36.852	27			
校正的总计 Corrected total	15.290	26			

氏培养基 pH 为 7.2。为了研究 BJKD4 菌株能否在酸性废水中生长, 将 BJKD4 菌株接种在经水或培养基稀释后的煤矸石浸出液中, 生长 5 d 时分析其生物量及培养液的 pH 变化。结果表明 (图 5): BJKD4 菌株在水稀释的一系列煤矸石浸出液中生长时: 其鲜重在含 1-1/4 (V/V)煤矸石浸

出液的水中没有明显上升, 但高于水中的生物量; Δ pH 分析表明在含有 1-1/4 (V/V)煤矸石浸出液的水中其 Δ pH 缓慢升高, 且略高于水的 Δ pH。在查氏培养基中稀释的一系列煤矸石浸出液中生长 5 d 时, 其鲜重随着煤矸石浸出液含量 (1-1/4, V/V)的降低而显著升高, 在 1/2-3/4 (V/V)煤矸石浸出液中的鲜重明显高于查氏培养基。在含有 1-1/2 (V/V)煤矸石浸出液的培养液中 Δ pH 明显上升(与菌体生物量的增加趋势一致), 并在含有 1/2-1/4 (V/V)煤矸石浸出液的培养基中达到最大值 Δ pH。而接菌培养 5 d 后, 不含煤矸石浸出液的水的 Δ pH 为 0.09, 不含煤矸石浸出液的查氏培养基的 Δ pH 为 -1.98, 说明该菌株能有效提高浸出液 pH 值, 具有调节环境 pH 的能力。菌株在含低浓度煤矸石浸出液中, 菌种生物量也大于对照, 说明煤矸石浸出液中含其生长所需营养。

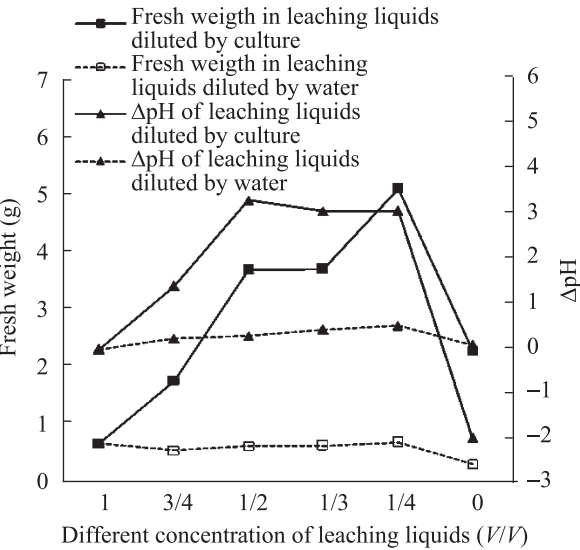


图 5 不同浓度煤矸石浸出液对 BJKD4 生长的影响
Fig. 5 Effects of different concentration of leaching liquid on growth of BJKD4 strain

3 讨论

土著微生物因受到重金属元素的长期胁迫, 对重金属离子产生了一定的耐性, 并且对重金属具有高效的吸附特性。经驯化所得青霉菌, 能在

Cd^{2+} 浓度为 29 mmol/L 或 pH 为 4.0–9.0 的查氏培养基中生长, 单一重金属对 BJKD4 的毒性大小依次为: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 或 $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ 。重金属复合胁迫时, 对 BJKD4 的毒性大小依次为: $\text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$; 且 Zn^{2+} 对菌株表现为低浓度促进, 高浓度抑制, Ni^{2+} 对菌株生长无明显影响。表明该耐铜真菌对多种重金属也有较强的耐性, 且有较宽的酸碱适应范围。BJKD4 菌株可利用煤矸石浸出液中营养物质, 并提高污染基质的 pH, 表明该菌可以降低煤矸石酸化引起的重金属淋溶作用。

抗氧化酶 SOD 和 CAT 在清除生物体内 ROS 的过程中具有重要作用, 能够阻止活性氧在生物体内的积累, 从而使生物体免受或少受重金属毒害^[14]。因此, SOD 和 CAT 活性的变化可以反映菌株在逆境胁迫下对环境胁迫的应急反应。嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*) LR 在黄铜矿处理 10 d 后 SOD 活性显著增加^[15]。BJKD4 菌株在重金属复合胁迫时, SOD 活性均高于对照组, 且根据 K 值变化得出, 除 Ni^{2+} 外, 其酶活性随着重金属浓度的提高呈先增加后减少; CAT 活性呈上升和下降不同趋势, 根据 K 值变化得出 Cd^{2+} 或 Ni^{2+} 胁迫时 CAT 活性随重金属浓度的增加而减小; Zn^{2+} 或 Mn^{2+} 胁迫时菌株 CAT 活性随重金属浓度的提高而表现为先增加后减少, 且均高于对照, 表明抗氧化酶活性的提高可以增强抵抗重金属诱导的氧化胁迫作用, SOD 和 CAT 活性的增加可能是 BJKD4 菌株耐重金属的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 195–226.
- [2] 陈玉成. 污染环境生物修复工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 304.
- [3] Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(8): 909–916.
- [4] 杜爱雪, 曹理想, 张仁铎. 高抗铜青霉菌的筛选及其对重金属的吸附[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 75(5): 650–653.
- [5] Du A, Cao L, Zhang R, et al. Effects of a copper-resistant fungus on copper adsorption and chemical forms in soils[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2009, 201: 99–107.
- [6] Choudhury R, Srivastava S. Zinc accumulative properties of *Pseudomonas putida* strain S4[J]. *Asian Journal Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*, 2002, 4(2): 197–202.
- [7] 黄民生, 施华丽, 郑乐平. 曲霉对水中重金属的吸附去除[J]. *上海环境科学*, 2002, 21(2): 89–92, 125.
- [8] Ruchi G, Saxena RK, Rani G. Fermentation waste of *Aspergillus terreus*: a potential copper biosorption[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(5): 379–401.
- [9] 周希琴, 莫灿坤. 植物重金属胁迫及其抗氧化系统[J]. *新疆教育学院学报*, 2003, 19(2): 103–108.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [12] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第3版. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [13] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [14] 沙伟, 师帅, 罗新义, 等. 低温胁迫对东方山豆幼苗生理特性的影响[J]. *北方园艺*, 2007(11): 59–60.
- [15] Rodrigues VD, Martins PF, Gaziola SA, et al. Antioxidant enzyme activity in *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR maintained in contact with chalcopyrite[J]. *Process Biochemistry*, 2010, 45(6): 914–918.