

## 研究报告

## 黄河下游支流铬污染沉积物中耐 Cr(VI)真菌的分离及转化机制

王青青<sup>1</sup>, 曹宇<sup>1</sup>, 李欣雷<sup>1</sup>, 曾祥朋<sup>1</sup>, 王强<sup>1,2</sup>, 王瑞民<sup>1,2</sup>, 王建英<sup>3</sup>, 杨清香<sup>\*1,2</sup>

1 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

2 河南省农业微生物生态与技术国际联合实验室, 河南 新乡 453007

3 河南省生态环境监测和安全中心, 河南 郑州 450046

王青青, 曹宇, 李欣雷, 曾祥朋, 王强, 王瑞民, 王建英, 杨清香. 黄河下游支流铬污染沉积物中耐 Cr(VI)真菌的分离及转化机制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 3910-3926.

WANG Qingqing, CAO Yu, LI Xinlei, ZENG Xiangpeng, WANG Qiang, WANG Ruimin, WANG Jianying, YANG Qingxiang. Isolation and transformation mechanism of Cr(VI)-tolerant fungi from Cr-contaminated sediments in the downstream tributary of the Yellow River[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 3910-3926.

**摘要:**【背景】黄河下游支流——蟒河因长期受重金属废水排放的影响, 其沉积物存在以铬污染为主的重金属复合污染, 污染区形成独特的微生物群落。【目的】从该污染区的沉积物中筛选耐受和转化高浓度 Cr(VI)污染的真菌, 并对其 Cr(VI)转化能力和机理进行探究。【方法】采用梯度培养法进行耐受和转化高浓度 Cr(VI)污染真菌的筛选; 采用形态学观察和 ITS 序列分析的方法进行菌种鉴定; 通过菌株不同组分对 Cr(VI)的还原能力、扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)及 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)对菌株转化 Cr(VI)的机理进行探究。【结果】筛选得到 2 株真菌 p18 和 p20 耐受 1 000 mg/L Cr(VI), 经鉴定分别为云南木霉(*Trichoderma yunnanense*)和环形镰刀菌(*Fusarium annulatum*)。2 株菌在 100 mg/L Cr(VI)培养 120 h 的 Cr(VI)去除率分别达到 79.40%和 63.48%, Cr(VI)还原率分别为 73.55%和 50.94%; 对积累铬能力的测定发现, 500 mg/L Cr(VI)条件下 p18 和 p20 每克菌体干重积累铬含量达到最大, 分别为 10.84 mg 和 6.98 mg。通过 SEM 菌体表征分析发现铬处理后的菌株 p18 和 p20 菌体表面附着铬颗粒; FTIR 测定表明氨基、羟基、羧基、C-H 和酰胺基参与了铬的吸附; 通过 XPS 和 XRD 分析证实了菌体转化 Cr(VI)生成 Cr(OH)<sub>3</sub>, 处于无定形和晶体之间。进一步测定菌体不同组分对 Cr(VI)的还原能力, 结果表明 Cr(VI)还原物质主要位于胞外分泌物(extracellular secretion)。【结论】筛选得到的 2 株高耐

资助项目: 国家自然科学基金-河南省联合基金重点项目(U1904205)

This work was supported by the Key Project of the National Natural Science Foundation of China-Henan Joint Fund (U1904205).

\*Corresponding author. E-mail: yangqx@htu.edu.cn

Received: 2024-01-17; Accepted: 2024-03-14; Published online: 2024-04-23

Cr(VI)真菌 *T. yunnanense*、*F. annulatum* 对 Cr(VI)具有高效的转化能力，为河流长期污染下重金属转化过程和污染修复提供依据。

关键词：铬污染；云南木霉；环形镰刀菌；微生物修复；吸附；Cr(VI)转化

## Isolation and transformation mechanism of Cr(VI)-tolerant fungi from Cr-contaminated sediments in the downstream tributary of the Yellow River

WANG Qingqing<sup>1</sup>, CAO Yu<sup>1</sup>, LI Xinlei<sup>1</sup>, ZENG Xiangpeng<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1,2</sup>,  
WANG Ruimin<sup>1,2</sup>, WANG Jianying<sup>3</sup>, YANG Qingxiang<sup>\*1,2</sup>

1 College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

2 Henan International Joint Laboratory of Agricultural Microbial Ecology and Technology, Xinxiang 453007, Henan, China

3 Henan Ecological Environment Monitoring and Safety Center, Zhengzhou 450046, Henan, China

**Abstract:** [Background] The Manghe River, a downstream tributary of the Yellow River, suffers from heavy metal-containing wastewater discharge over a long period of time, and its sediments are characterized by the presence of heavy metal composite pollution dominated by chromium contamination, with the formation of a unique microbial community in the contaminated area. [Objective] To screen the fungi capable of tolerating and transforming high concentrations of Cr(VI) in the sediments of the contaminated area and explore the Cr(VI) transformation ability and mechanism. [Methods] The fungi capable of tolerating and transforming high concentrations of Cr(VI) were screened by the gradient culture method and identified by morphological observation and ITS sequencing. The mechanism of Cr(VI) transformation by the strains was investigated based on the reduction ability of different components of the strains, scanning electron microscopy (SEM), Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and X-ray diffraction (XRD). [Results] Two fungal strains p18 and p20 tolerant to 1 000 mg/L Cr(VI) were isolated and identified as *Trichoderma yunnanense* and *Fusarium annulatum*, respectively. The two strains showed the Cr(VI) removal rates of 79.40% and 63.48% and the Cr(VI) reduction rates of 73.55% and 50.94%, respectively, after being cultured with 100 mg/L Cr(VI) for 120 h. In the medium with 500 mg/L Cr(VI), p18 and p20 accumulated the highest amounts of Cr per gram of dry mycelia, which reached 10.84 mg and 6.98 mg, respectively. SEM revealed that the surfaces of p18 and p20 cells were adorned with Cr particles after exposure to Cr treatment. FTIR indicated that -NH, -OH, C=O, C-H, and -CONH<sub>2</sub> were involved in the adsorption of Cr. XPS and XRD confirmed that the strains transformed Cr(VI) into Cr(OH)<sub>3</sub>, which existed in an intermediate state between amorphous and crystalline forms. The predominant substances responsible for Cr(VI) reduction were the extracellular secretion of the two strains. [Conclusion] The two highly Cr(VI)-tolerant fungal strains, *T. yunnanense* and *F. annulatum*,

demonstrate efficient transformation of Cr(VI), which provide a basis for the heavy metal transformation and remediation of the river suffering from long-term contamination.

**Keywords:** Cr contamination; *Trichoderma yunnanense*; *Fusarium annulatum*; microbial remediation; absorption; Cr(VI) transformation

自古以来,“黄河宁,天下平”,黄河流域作为我国北方重要的生态屏障,其生态安危事关国家盛衰与民族复兴<sup>[1]</sup>。黄河流域的生态保护和高质量发展是重大国家战略,而掌握流域的生态质量状况和变化特征是战略实施的首要工作<sup>[2]</sup>。研究表明,黄河流域水环境污染空间差异较大,黄河中下游地区和部分支流污染严重,沉积物因在水体中停留期较长,常被用来评估河流水环境的污染状况<sup>[3-4]</sup>。位于黄河下游的支流蟒河,因长期受周边毛皮加工产业废水的排放,其沉积物中铬含量可达 226.2–2 966.9 mg/kg,超出河南省土壤背景值 19 倍;地质累积指数评价表明,铬污染较严重,最高污染等级达极强污染<sup>[5]</sup>。铬在生态环境中主要以 Cr(III)和 Cr(VI)两种稳定价态存在<sup>[6]</sup>,Cr(VI)因其强毒性、难降解性等特点被许多国家列为优先处理的污染物<sup>[7-8]</sup>。因此,修复 Cr(VI)污染的关键在于将高毒性的 Cr(VI)转化为低毒性的 Cr(III),使铬以沉淀的状态稳定存在。目前微生物修复技术因其修复效果好、成本低、不产生二次污染的优点,日益受到人们的广泛关注,成为修复重金属污染场地的研究热点<sup>[9]</sup>。然而,微生物在高浓度 Cr(VI)污染环境中其生物活性会显著降低<sup>[10-11]</sup>。因此,分离筛选出同时具备耐受、转化高浓度 Cr(VI)能力的微生物是非常必要的。

研究发现一些微生物在自身防御机制、生长代谢过程中具备耐受、转化 Cr(VI)的能力<sup>[12]</sup>,如芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) CRB-B1<sup>[13]</sup>、解糖假苍白杆菌(*Pseudochrobactrum saccharolyticum*) W1<sup>[14]</sup>、*Bacillus* strain TCL<sup>[15]</sup>、布氏假单胞菌

(*Pseudomonas brenneri*)<sup>[16]</sup>和芬克纤维微菌(*Cellulosimicrobium funkei*) strain AR6<sup>[17]</sup>等细菌类微生物,以及黄曲霉(*Aspergillus flavus*) CR500<sup>[18]</sup>和草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) SL2<sup>[19]</sup>等真菌类微生物。同时关于微生物耐受 Cr(VI)的机制也逐渐被发现,包括吸附作用、转化作用等去除机制,以及生物累积、外排作用、抗氧化应激反应等抗性机制<sup>[20-21]</sup>。相较于细菌,真菌因具有较大的生物量、特殊的细胞壁组成而在去除 Cr(VI)方面具有很大的优势<sup>[22]</sup>。然而,已报道的具备耐受高浓度 Cr(VI)、转化 Cr(VI)能力强的菌种资源非常有限,转化 Cr(VI)的相关机制尚有待研究。

本研究从黄河下游因长期受铬污染的支流——蟒河沉积物中筛选同时具备耐受、转化高浓度 Cr(VI)能力的真菌,并对其进行菌种鉴定、生长及转化机制研究,以期应用于铬污染场地修复提供菌种资源和实践指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

供试沉积物采自河南省焦作市温县的黄河下游支流——蟒河浅层沉积物(0–20 cm)。采集后带回实验室进行真菌的分离纯化。

#### 1.1.2 培 养 基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基参考文献[19]配制。

液体沙氏培养基(g/L):蛋白胨 10.0、葡萄糖 40.0, pH 7.0。

筛选培养基:以  $K_2Cr_2O_7$  为 Cr(VI)源,配制 Cr(VI)浓度为 25 g/L 的标准贮备液,使用 0.22  $\mu m$  无菌过滤器过滤后保存,与 PDA 培养基按比例混合配制成含 Cr(VI)为 500、1 000 和 3 000 mg/L 的筛选培养基。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨,北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖、 $K_2Cr_2O_7$ 、 $HNO_3$  和  $H_2O_2$ ,天津市德恩化学试剂有限公司; $HClO_4$ ,天津市永大化学试剂有限公司;M5 Fungal Genomic DNA Kit,北京聚合美生物科技有限公司;KBr,麦克林试剂(上海)有限公司;蜗牛酶,上海源叶生物科技有限公司。

普通光学显微镜,奥林巴斯株式会社;紫外可见分光光度计,岛津公司;原子吸收光谱仪,耶拿分析仪器(北京)有限公司;扫描电镜(scanning electron microscope, SEM),捷欧路(北京)科贸有限公司;傅里叶变换红外光谱仪,布鲁克(北京)科技有限公司;X 射线光电子能谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;X 射线粉末衍射仪,帕纳科公司。

## 1.2 污染区真菌的分离和耐 Cr(VI)真菌的筛选

取 10 g 沉积物样品按照武芳等<sup>[23]</sup>的方法制备梯度土壤悬浮液,并将其均匀涂布至 PDA 培养基,28  $^{\circ}C$  培养。待长出单菌落后根据菌落的形态、大小、颜色等特征进行反复平板划线直至获得单一菌株,保存于低温冰箱中。

将保存的 69 株真菌划线至含 Cr(VI)浓度为 500、1 000 和 3 000 mg/L 的筛选培养基上,28  $^{\circ}C$  培养 14 d,观察菌株生长情况,初步筛选出耐受 Cr(VI)能力最强的真菌 p18 和 p20。

## 1.3 菌株 p18 和 p20 的鉴定

### 1.3.1 形态学鉴定

按照薛德星等<sup>[24]</sup>的方法接种单一菌株于

PDA 培养基上,28  $^{\circ}C$  恒温培养,于每天观察菌落生长变化情况并拍照记录。利用普通光学显微镜观察菌体产孢结构,利用 SEM 观察孢子特征。

### 1.3.2 分子生物学鉴定

从固体培养基上收集新鲜菌丝,使用 M5 Fungal Genomic DNA Kit 提取基因组 DNA。采用真菌 ITS 序列通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3')<sup>[25]</sup>进行 PCR 扩增<sup>[26]</sup>。PCR 反应体系(25  $\mu L$ ): 2 $\times$ PCR Mix 12.5  $\mu L$ , 无菌双蒸水 9.9  $\mu L$ , 上、下游引物(10  $\mu mol/L$ )各 0.8  $\mu L$ , DNA 模板 1  $\mu L$ , 其中菌株 p18 和 p20 的 DNA 模板浓度分别为 134.1 ng/ $\mu L$  和 214.0 ng/ $\mu L$ 。PCR 反应条件:94  $^{\circ}C$  5 min; 94  $^{\circ}C$  30 s, 54  $^{\circ}C$  30 s, 72  $^{\circ}C$  1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}C$  10 min。扩增的 ITS 序列经纯化后委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果利用 NCBI 数据库进行 ITS 序列比对,用 MEGA 11 软件的 NJ 法构建系统发育树以确定菌株的分类水平。

## 1.4 真菌耐 Cr(VI)能力的测定

将菌株 p18 和 p20 的菌丝悬浮液以 2%接种量接种于含 Cr(VI)浓度为 0、100、200 和 500 mg/L 的液体沙氏培养基中,28  $^{\circ}C$ 、180 r/min 条件下培养,于 12、24、48、72、96 和 120 h 取样。使用 0.22  $\mu m$  的微孔滤膜过滤菌丝体,烘干至恒重以获得生物量,测定在不同 Cr(VI)浓度的液体培养基培养条件下真菌的生长能力。过滤后的溶液于 4  $^{\circ}C$  保存。

## 1.5 耐 Cr(VI)真菌对铬的积累作用

采用菌丝块接种法<sup>[27]</sup>将直径为 0.5 cm 的耐 Cr(VI)真菌菌丝块分别接种至含 Cr(VI)浓度为 100、200 和 500 mg/L 的 PDA 培养基上。待长满菌丝后收集培养基表面的菌丝,60  $^{\circ}C$  烘箱烘干至恒重并记录菌体干重。按照刘奎艳等<sup>[28]</sup>的方法

中配制 10 mL 含有浓  $\text{HNO}_3$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{HClO}_4$  的菌体消解液对烘干的菌体进行消解, 菌体呈黏稠状时温度由  $90\text{ }^\circ\text{C}$  调节加热至  $150\text{ }^\circ\text{C}$ , 溶液变为澄清, 随后进行赶酸、冷却、定容。采取火焰原子吸收分光光度法对定容后的溶液进行总铬含量的测定<sup>[29]</sup>。

### 1.6 耐 Cr(VI) 真菌对 Cr(VI) 的去除、还原作用

将 1.4 中过滤后的溶液用于总铬、Cr(VI) 浓度的测定。采用火焰原子吸收分光光度法测定总铬浓度, 采用二苯碳酰二肼分光光度法于  $540\text{ nm}$  处测定 Cr(VI) 浓度<sup>[29]</sup>。Cr(III) 浓度为总铬与 Cr(VI) 浓度的差值<sup>[30]</sup>。

Cr(VI) 去除率( $R$ )<sup>[31]</sup>、Cr(VI) 还原率( $Y$ ) 的计算公式如下:

$$R(\%) = (C_i - C_f) / C_i \times 100 \quad (1)$$

$$Y(\%) = (C_b - C_f) / C_b \times 100 \quad (2)$$

式中:  $C_i$  为初始 Cr(VI) 浓度(mg/L);  $C_b$  为不同培养时间上清液的总铬浓度(mg/L);  $C_f$  为不同培养时间上清液 Cr(VI) 浓度(mg/L)。

### 1.7 Cr(VI) 处理下菌体表面结构观察及吸附官能团表征

表面结构观察: 分别取浓度为 0 和 500 mg/L Cr(VI) 培养 5 d 的细胞, 经 8 000 r/min 离心 15 min 后用 pH 7.2–7.4、浓度为 2.5% 的戊二醛溶液悬浮并置于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  静置过夜固定; 固定后用浓度为 30%、50%、70%、90%、95% 和 100% 的无水乙醇梯度脱水; 丙酮将无水乙醇置换 2 次后进行冷冻干燥、喷金, 上机进行 SEM 分析<sup>[32–33]</sup>。

吸附官能团表征: 收集 0、500 mg/L Cr(VI) 培养 5 d 的细胞, 于  $60\text{ }^\circ\text{C}$  烘箱干燥后研磨成粉末。菌体粉末、KBr 按 1:100 的比例进行充分混匀研磨、压片<sup>[18]</sup>, 上机进行傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析。

### 1.8 耐 Cr(VI) 菌株还原 Cr(VI) 的产物价态、物相确定

采用 X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)分析耐 Cr(VI) 菌株作用 Cr(VI) 后铬的价态变化, 采用 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析 Cr(VI) 还原产物的物相。将 1.7 中 500 mg/L Cr(VI) 处理下的菌体粉末, 上机进行 XPS 和 XRD 分析<sup>[34]</sup>。

### 1.9 菌体不同组分对 Cr(VI) 的还原能力

将耐 Cr(VI) 菌体分离为胞外分泌物(extracellular secretion)、胞内分泌物(intracellular secretion)和细胞碎片(cell debris)这 3 个细胞组分。各组分分离方法如下<sup>[31,35–36]</sup>: 接种菌体至液体沙氏培养基中  $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 2 d。8 000 r/min 离心 15 min 后用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  无菌过滤器过滤上清液, 得到胞外分泌物; 菌体沉淀用磷酸缓冲液洗涤 3 次后定体积悬浮, 置于冰浴中使用超声波破碎菌体 30 min (功率 400 W, 工作 2 s, 间歇 4 s),  $37\text{ }^\circ\text{C}$  加入蜗牛酶破壁至澄清, 10 000 r/min 离心 15 min 后同样用  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  无菌过滤器过滤上清液, 得到胞内分泌物; 沉淀用相同体积的磷酸缓冲液悬浮后得到细胞碎片。将含 Cr(VI) 浓度为 20 mg/L 的菌体不同组分放入  $37\text{ }^\circ\text{C}$  水浴锅孵育, 于 6 h 和 24 h 测定上清液 Cr(VI) 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐 Cr(VI) 真菌的筛选鉴定及对 Cr(VI) 的去除能力

在含 Cr(VI) 浓度为 500、1 000 和 3 000 mg/L 的筛选培养基上通过梯度培养法从保存的 69 株真菌中初步筛选得到 2 株耐受 Cr(VI) 能力最强的真菌, 最高可耐受 1 000 mg/L Cr(VI), 分别为菌株 p18 和菌株 p20 (图 1)。

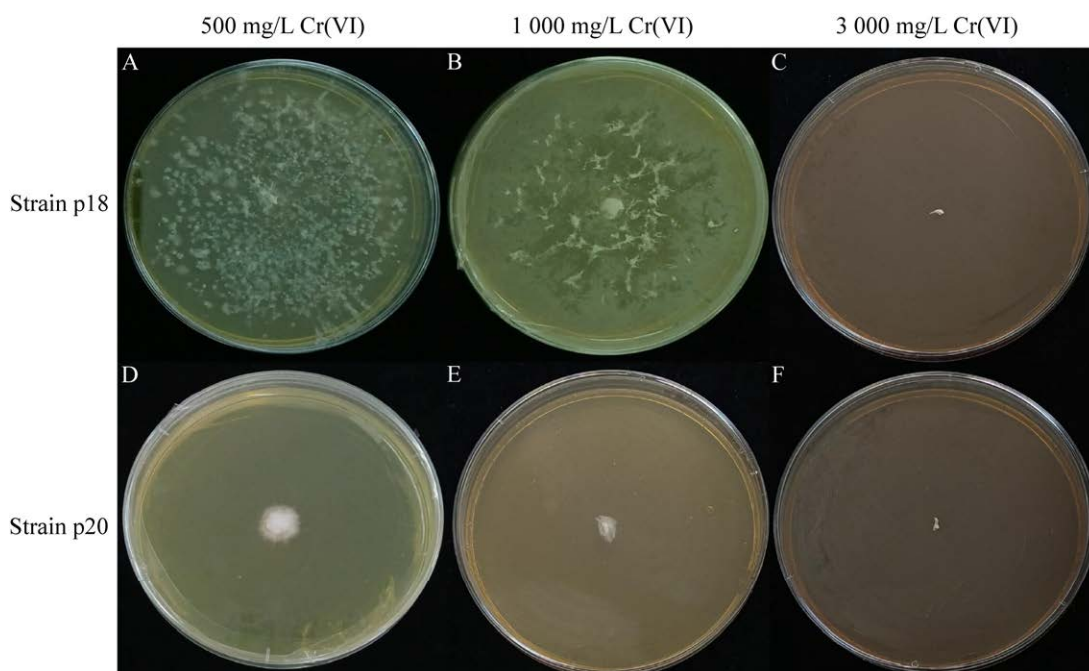


图 1 菌株 p18 和 p20 在不同 Cr(VI)浓度的筛选培养基上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of strains p18 and p20 on screening media with different Cr(VI) concentrations.

在 PDA 培养基上培养 7 d 后, 菌株 p18 气生菌丝呈绒毛状, 前期菌丝呈白色, 后期中心菌丝首先产孢呈绿色并向外围扩展(图 2A); 孢子梗对生生长且中部膨大, 产孢丰富, 分生孢子多生于菌丝短枝终末端, 薄壁光滑, 孢子大小为(2–5)  $\mu\text{m}$  × (3–5)  $\mu\text{m}$ , 为近球形或椭圆形(图 2B 和图 2C)。菌株 p20 前期气生菌丝为白色, 后期菌落中心为淡粉色, 随着菌落直径变大, 外围气生菌丝由淡粉色变为淡黄色, 边缘为白色(图 2D); 产孢较少, 菌丝顶端中部膨大, 分生孢子呈镰刀形, 顶端变尖稍弯曲, 孢子大小为(5–6)  $\mu\text{m}$  × (1–2)  $\mu\text{m}$  (图 2E 和图 2F)。经 ITS 测序, 在 NCBI 中进行比对并构建系统发育树, 菌株 p18 与云南木霉(*Trichoderma yunnanense*) CBS 121219 具有最大相似性为 99.83%; 菌株 p20 与环形镰刀菌(*Fusarium annulatum*) CBS 258.54 具有最大相似性为 99.46% (图 3A 和图 3B)。结

合形态学和分子生物学鉴定结果表明, 菌株 p18 为 *Trichoderma yunnanense*<sup>[37]</sup>, 菌株 p20 为 *Fusarium annulatum*<sup>[38]</sup>。

进一步于液体培养条件下对 2 株真菌进行耐 Cr(VI)能力的测定, 菌株 p18 和 p20 的生物量随着 Cr(VI)浓度上升而显著降低(图 4A 和图 4B)。菌株 p18 在小于 500 mg/L Cr(VI)条件下均能生长(图 4A), 而菌株 p20 在 Cr(VI)浓度为 500 mg/L 时生长已受到明显的抑制作用(图 4B)。测定不同 Cr(VI)浓度胁迫时 2 株菌去除 Cr(VI)的能力, 随着 Cr(VI)浓度的增加, 菌株 p18 和 p20 的 Cr(VI)去除率呈下降趋势; 随着培养时间的延长, 2 株菌的 Cr(VI)去除率均呈上升趋势(图 4C 和图 4D)。2 株菌在 100 mg/L Cr(VI)培养 120 h, Cr(VI)去除率达到最大, 分别为 79.40%和 63.48%。Cr(VI)浓度的升高对菌体去除 Cr(VI)的能力有显著影响。

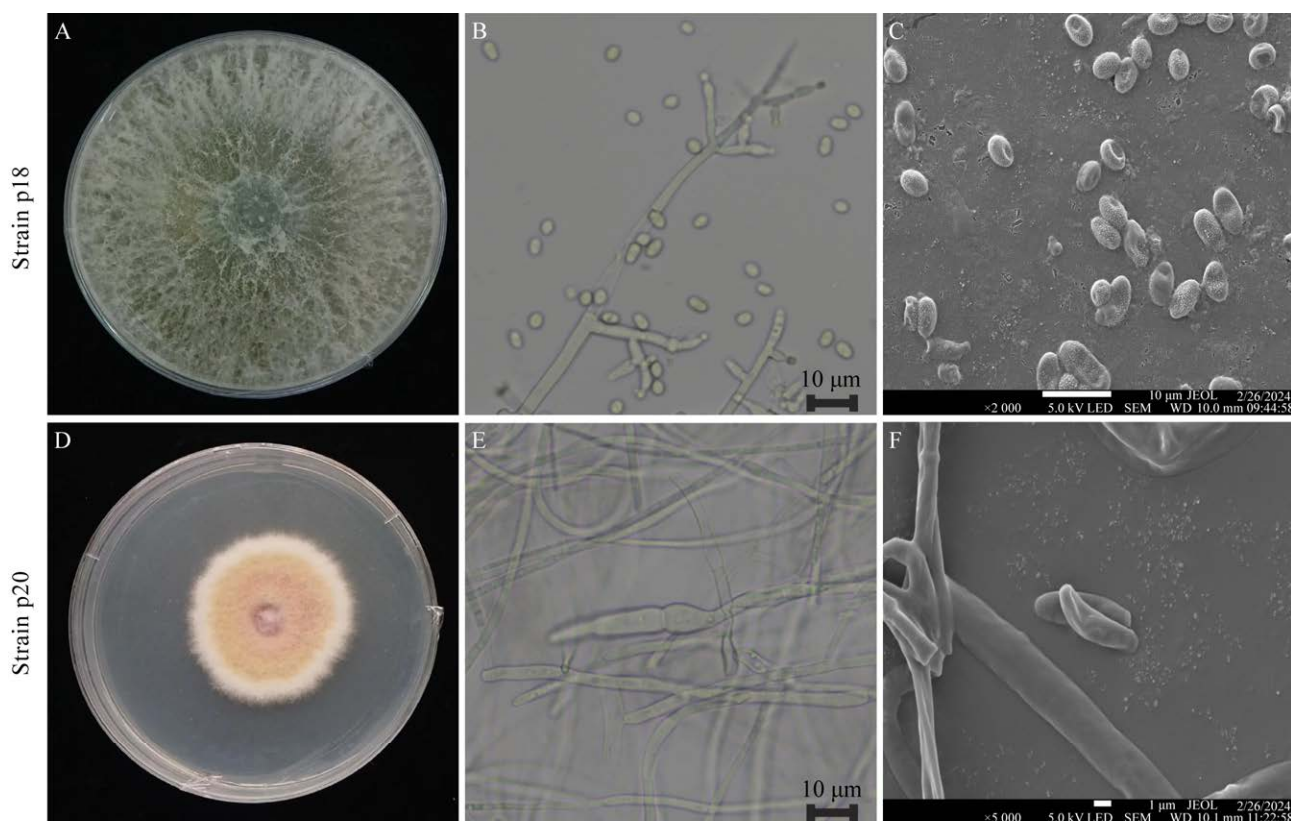


图 2 菌株 p18 和 p20 的形态学特征 A: 菌株 p18 在 PDA 培养基上的菌落形态特征. B、C: 菌株 p18 的菌丝和孢子特征. D: 菌株 p20 在 PDA 培养基上的菌落形态特征. E、F: 菌株 p20 的菌丝和孢子特征

Figure 2 The morphological characteristics of strains p18 and p20. A: Colony morphology of strain p18 on PDA culture medium. B and C: Characteristics of mycelium and spores of strain p18. D: Colony morphology of strain p20 on PDA culture medium. E and F: Characteristics of mycelium and spores of strain p20.

## 2.2 Cr(VI)处理下菌体表面特征及吸附官能团分析

在 0 和 500 mg/L Cr(VI)液体培养条件下对菌株 p18 和 p20 的形貌进行 SEM 观察, 如图 5 所示, 相较于 0 mg/L Cr(VI)组(图 5A 和图 5B), 暴露于 500 mg/L Cr(VI)组(图 5C 和图 5D)的菌体表面粗糙, 有铬颗粒附着。此现象是由于暴露于 Cr(VI)环境下的菌体利用表面的多糖、脂类及蛋白质等生物大分子与铬螯合形成复合物, 或通过羟基、羧基等官能团将铬吸附于菌体表面。

在相同的液体培养条件下测定菌体的 FTIR 以探究菌体表面吸附铬的具体官能团。相较于对照, Cr(VI)处理下菌体的各种功能基团峰发生移位, 菌株 p18 各种功能基团峰移位范围为  $0.46\text{--}8.08\text{ cm}^{-1}$  (图 5E), 菌株 p20 各种功能基团峰移位范围为  $3.95\text{--}35.92\text{ cm}^{-1}$  (图 5F)。菌株 p18 和 p20 较宽的  $3\ 426.83\text{ cm}^{-1}$ 、 $3\ 405.58\text{ cm}^{-1}$  谱带(蛋白质或几丁质的  $\text{NH}_2$ 、 $\text{O-H}$ )发生明显的振动带改变。然而, 菌株 p18 和 p20 的  $2\ 832.06\text{ cm}^{-1}$  和  $2\ 852.63\text{ cm}^{-1}$  谱带(羰基化合物  $\text{C-H}$ 、 $\text{C=O}$ )、 $1\ 595.18\text{ cm}^{-1}$  和  $1\ 595.22\text{ cm}^{-1}$  (酰胺

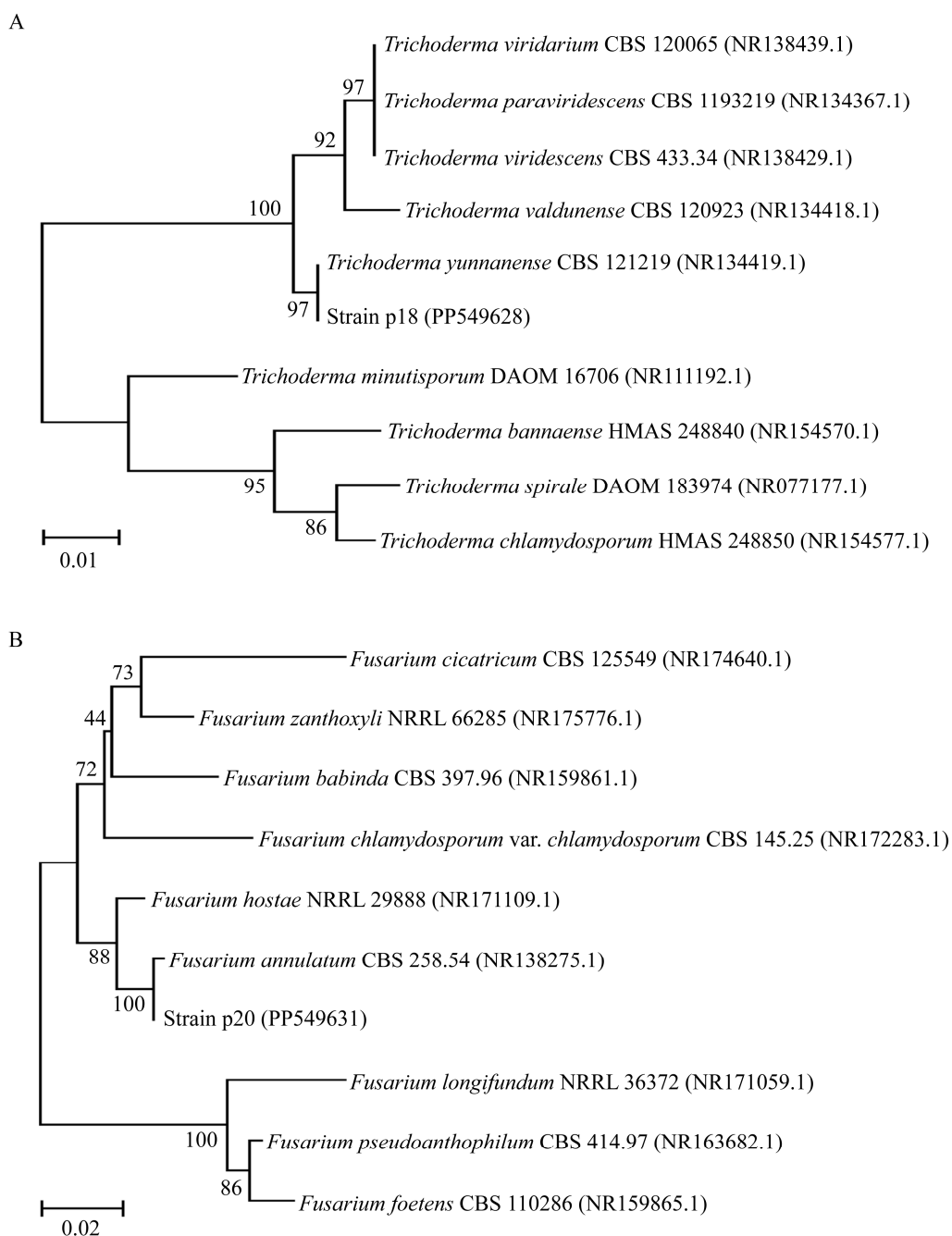


图3 基于 ITS 序列构建的菌株 p18 和 p20 系统发育树 A: 菌株 p18 基于 ITS 序列的系统发育树. B: 菌株 p20 基于 ITS 序列的系统发育树. 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点数值代表 bootstrap 支持率; 刻度标尺 0.01 和 0.02 表示每个核苷酸位点 0.01 和 0.02 的置换率

Figure 3 Phylogenetic tree of strains p18 and p20 constructed based on the ITS sequence. A: Phylogenetic tree based on the ITS sequence of strain p18. B: Phylogenetic tree based on the ITS sequence of strain p20. The number in parentheses is GenBank accession number; Number on the branch points represent the support percentages of bootstrap; Bar 0.01 and 0.02 indicate 0.01 and 0.02 substitution per nucleotide position.



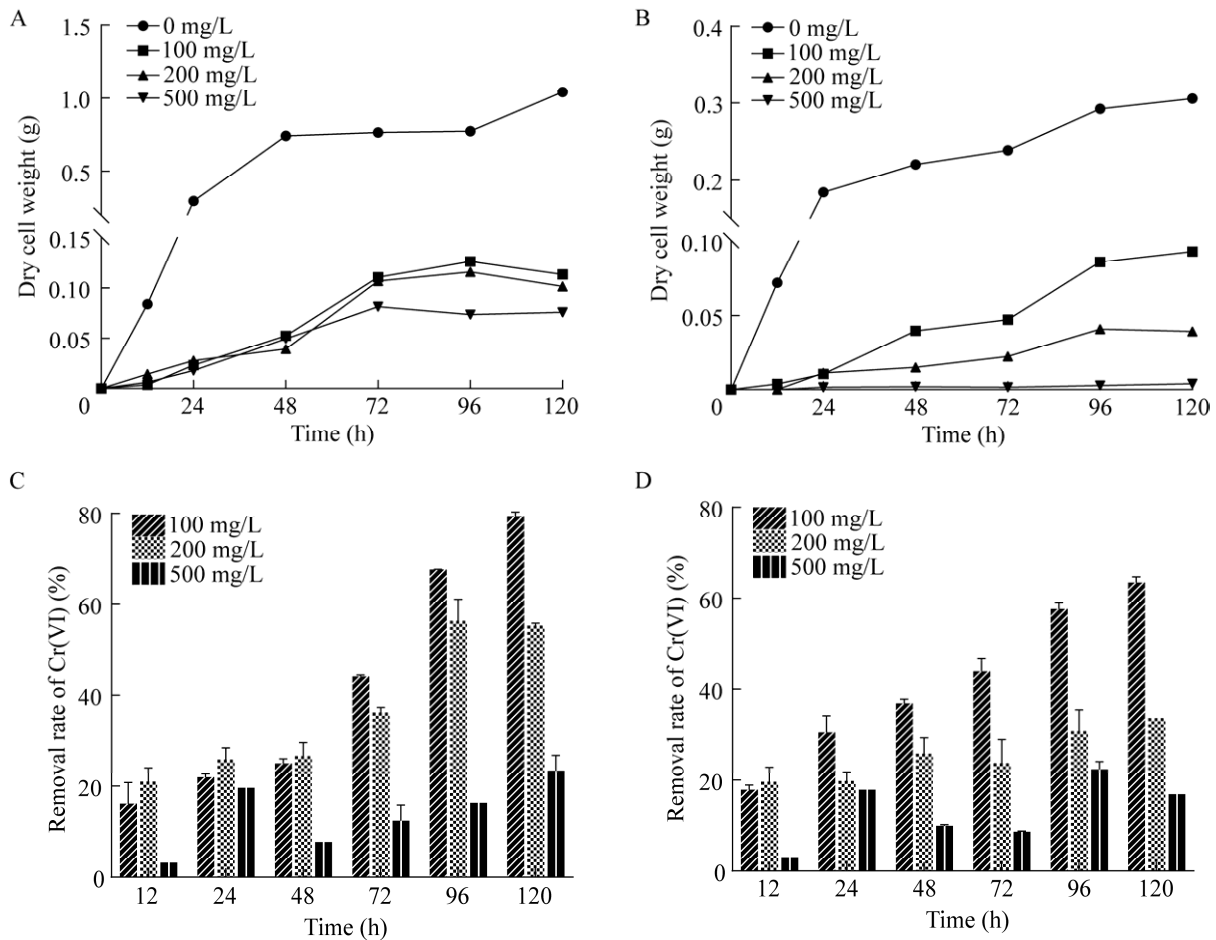


图4 不同Cr(VI)浓度对菌株p18、p20生物量和Cr(VI)去除率的影响 A、B: 菌株p18、p20的生物量. C、D: 菌株p18、p20的Cr(VI)去除率

Figure 4 Effects of different Cr(VI) concentrations on the biomass and removal rate of Cr(VI) of strains p18 and p20. A and B: The biomass of strains p18 and p20. C and D: Removal rate of Cr(VI) of strains p18 and p20.

II带 N-H、C-N)、 $1362.42\text{ cm}^{-1}$  和  $1356.6\text{ cm}^{-1}$  谱带(C-H)、 $1079.59\text{ cm}^{-1}$  和  $1074.29\text{ cm}^{-1}$  谱带(C-N)发生较小的振动带变化。FTIR 光谱分析说明了菌株 p18 和 p20 菌体表面的氨基、羟基、羰基、C-H 和酰胺基参与了铬的吸附。

### 2.3 耐 Cr(VI)真菌细胞对铬的积累能力

收集在含不同 Cr(VI)浓度的 PDA 培养基上生长的菌丝以测定菌丝内积累的铬含量。结果如图 6 所示, 随着 Cr(VI)浓度增加, 菌株 p18

和 p20 胞内积累铬含量随之上升, 并且在 500 mg/L Cr(VI)浓度下积累铬含量达到最大, 每克菌体(干重)分别可积累 10.84 mg 和 6.98 mg 的铬。在 100 mg/L 和 200 mg/L 的 Cr(VI)浓度下, 菌株 p20 胞内积累铬含量显著大于菌株 p18 的胞内积累铬含量, 而在 500 mg/L 的 Cr(VI)浓度下, 菌株 p18 的胞内积累铬含量较多, 表明在不同 Cr(VI)浓度下因菌株对其去除方式发生变化, 因而积累铬能力发生转变。

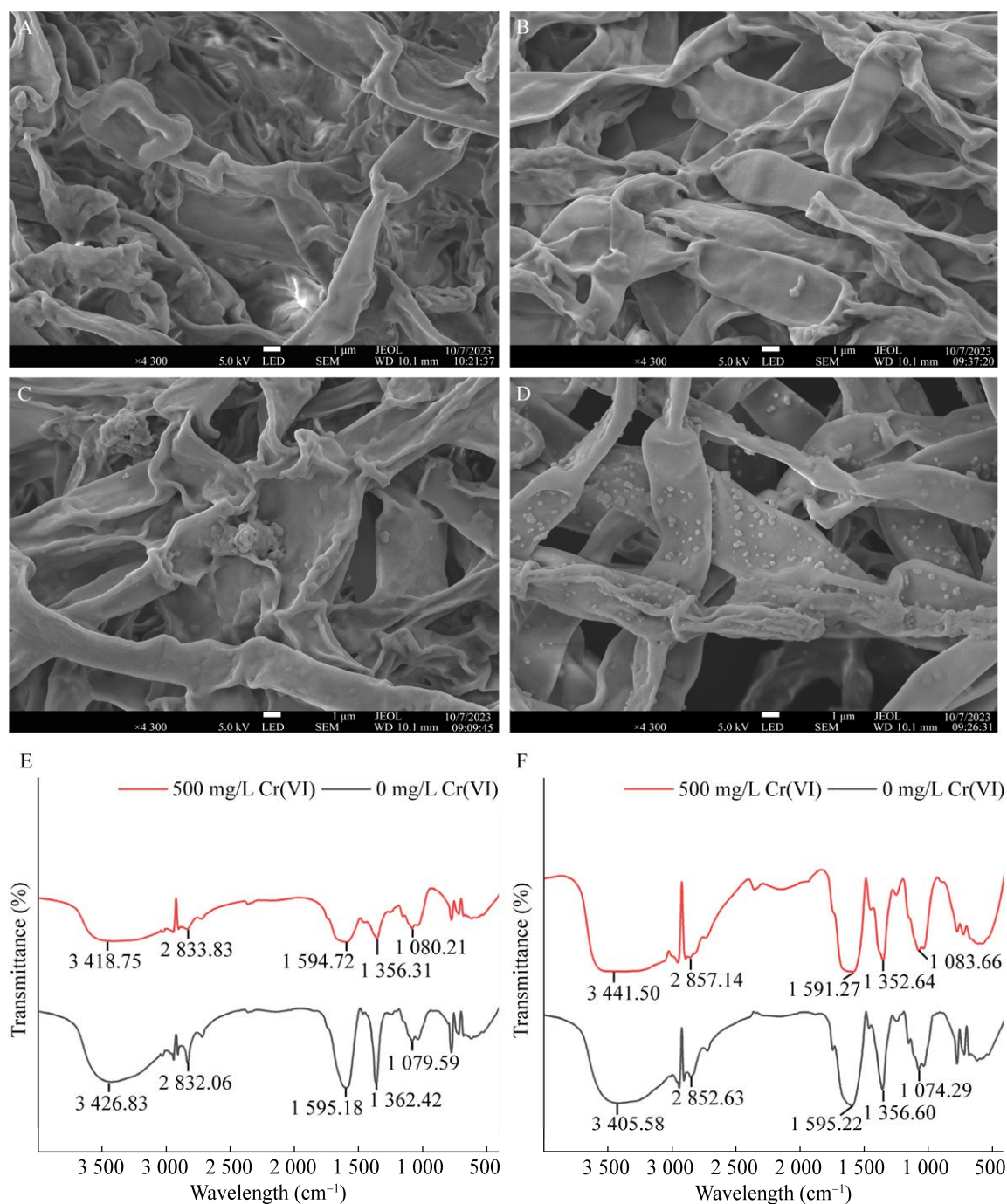


图 5 0、500 mg/L Cr(VI)浓度下菌株 p18、p20 的表征分析 A、B: 0 mg/L Cr(VI)浓度下菌株 p18 和 p20 的 SEM 显微图. C、D: 500 mg/L Cr(VI)浓度下菌株 p18 和 p20 的 SEM 显微图. E、F: 菌株 p18 和 p20 的 FTIR 图谱

Figure 5 Characterization of strain p18 and p20 under 0 mg/L and 500 mg/L concentrations of Cr(VI). A and B: SEM micrographs of strains p18 and p20 under 0 mg/L concentrations of Cr(VI). C and D: SEM micrographs of strains p18 and p20 under 500 mg/L concentrations of Cr(VI). E and F: FTIR spectrum of strains p18 and p20.

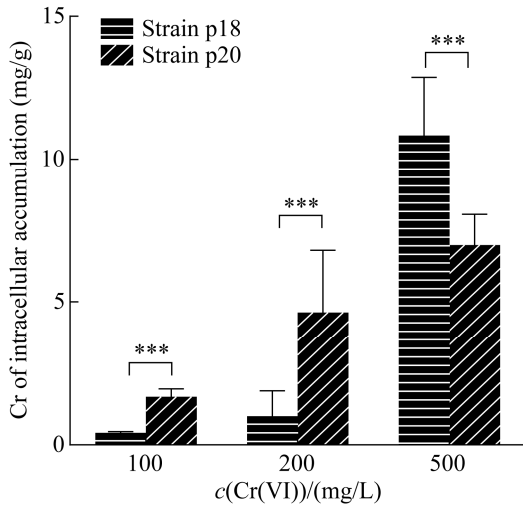


图6 不同Cr(VI)浓度对菌株p18、p20每克菌体干重积累铬含量的影响

Figure 6 Effects of different Cr(VI) concentrations on the accumulation of Cr per gram of dry mycelium of strains p18 and p20. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

#### 2.4 耐Cr(VI)真菌对Cr(VI)的还原作用及Cr(VI)还原产物价态、物相分析

液体培养条件下测定不同Cr(VI)浓度胁迫时2株菌的还原Cr(VI)能力,菌株p18在不同Cr(VI)浓度处理下,Cr(VI)还原率在120 h达到最大,分别为73.55%、37.7%和27.08%(图7A);菌株p20在120 h、100 mg/L Cr(VI)浓度时Cr(VI)还原率达最大值,为50.94%(图7B)。随着Cr(VI)浓度增加,Cr(VI)还原率减小,这表明Cr(VI)通过抑制菌体生长,进而减小菌体对Cr(VI)的转化。随着培养时间的增加,Cr(VI)还原率增大,这表明菌体因适应Cr(VI)胁迫环境,活性增强,使之对Cr(VI)转化能力增强。

为验证菌体具有将Cr(VI)还原为Cr(III)的能力,在500 mg/L Cr(VI)浓度液体培养条件下利用XPS、XRD技术对菌体还原Cr(VI)产物进行价态、物相分析。图8A和图8B分别为菌株p18和p20的Cr2p轨道能谱图。Cr2p轨道峰显示结合能为576–579 eV和结合能为581–587 eV处可见2处

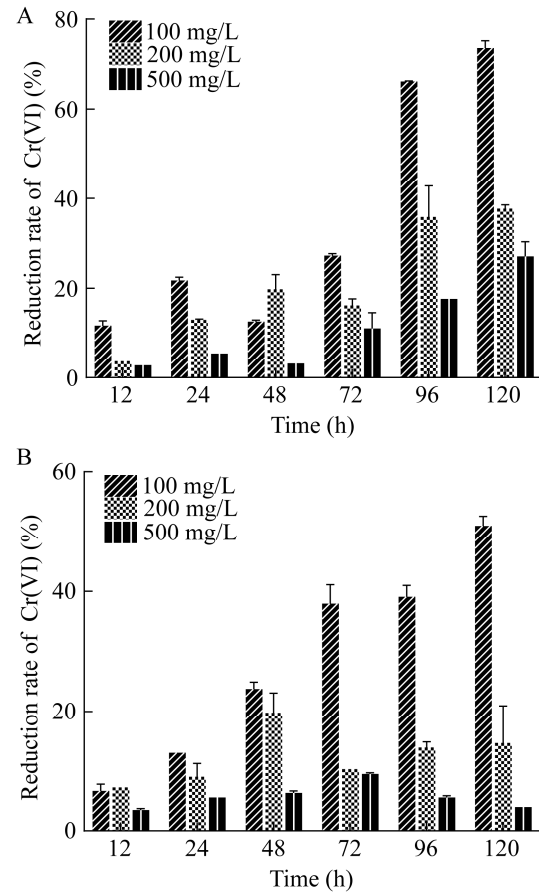


图7 不同Cr(VI)浓度对菌株p18 (A)、p20 (B) Cr(VI)还原率的影响

Figure 7 Effects of different Cr(VI) concentrations on reduction rate of Cr(VI) of strains p18 (A) and p20 (B).

明显的出峰,分别为Cr2p<sub>3/2</sub>轨道和Cr2p<sub>1/2</sub>轨道。菌株p18和p20的Cr2p<sub>3/2</sub>轨道峰结合能均为577.2 eV,对应氢氧化物形式的Cr(III),表明菌株p18和p20具有转化Cr(VI)的能力。图8C为菌株p18和p20在500 mg/L Cr(VI)处理下菌体粉末的衍射图,未见明显的衍射峰,表明形成的Cr(III)物质结晶度不高,为非晶态性质<sup>[39]</sup>。

#### 2.5 耐Cr(VI)真菌不同组分对Cr(VI)的还原能力

在20 mg/L的Cr(VI)浓度下测定菌体不同组分胞外分泌物(extracellular secretion)、胞内分

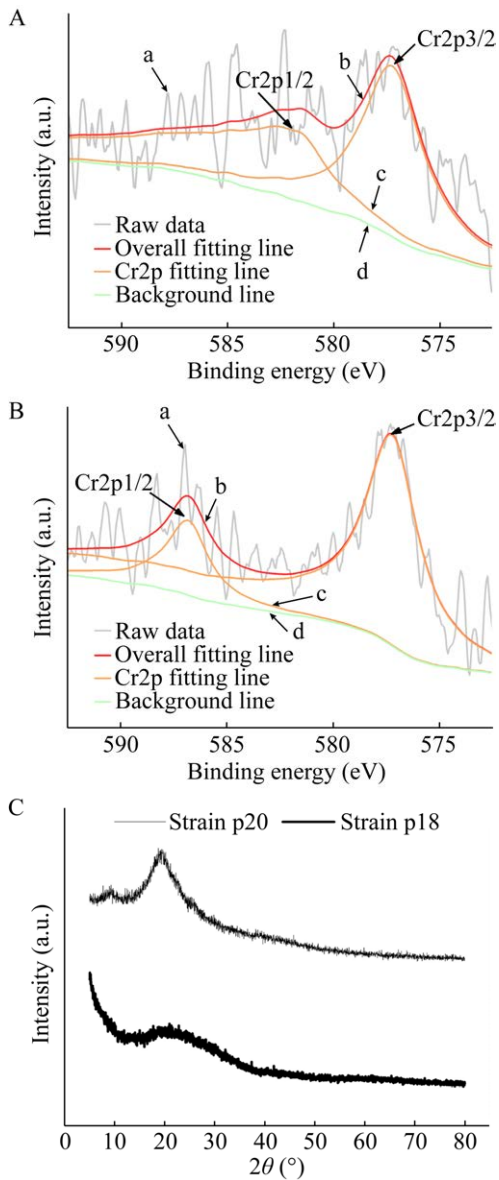


图 8 500 mg/L Cr(VI)浓度下菌株 p18、p20 的 Cr(VI)还原产物分析 A、B: 菌株 p18 和 p20 的 XPS 图谱. a 线代表原始数据, b 线代表整体拟合线, c 线代表 Cr2p 拟合线, d 线代表背底线. C: 菌株 p18 和 p20 的 XRD 图谱

Figure 8 Analysis of Cr(VI) reduction products in strains p18 and p20 under 500 mg/L concentration of Cr(VI). A and B: XPS spectrum of strains p18 and p20. Line a represents the raw data, line b represents overall fitting line, line c represents the Cr2p fitting line, and line d represents background line. C: XRD spectrum of strains p18 and p20.

泌物 (intracellular secretion) 和细胞碎片 (cell debris) 对 Cr(VI) 的还原能力。如图 9 所示, 菌株 p18 和 p20 的胞外分泌物 24 h 还原 Cr(VI) 含量分别为 10.20 mg/L 和 8.81 mg/L; 胞内分泌物 24 h 还原 Cr(VI) 含量分别为 3.60 mg/L 和 3.23 mg/L。结果表明, 2 株菌的胞外分泌物具有较强的还原 Cr(VI) 能力, 其次为胞内分泌物, 而细胞碎片还原 Cr(VI) 含量在 24 h 内呈先升后降的趋势, 可能是由于物理吸附, 为动态吸附过程。

### 3 讨论

在修复铬污染场地中, 微生物修复技术因具备应用潜力而受到广泛关注。微生物转化 Cr(VI) 的先决条件是对 Cr(VI) 的耐受能力, 转化 Cr(VI) 的能力直接影响了在实际应用中的价值。本研究以长期受铬污染的黄河下游支流——蟒河为研究区域, 其沉积物中的铬含量高达 2 966.9 mg/kg, 超过河南背景值的 19 倍<sup>[5]</sup>, 从该污染区筛选得到的菌株 p18 和 p20 均可耐受 1 000 mg/L 的 Cr(VI)。以往文献报道的耐 Cr(VI) 微生物, 如 *Aspergillus flavus* CR500 可耐受 800 mg/L 的 Cr(VI)<sup>[18]</sup>、钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*) 可耐受 500 mg/L 的 Cr(VI)<sup>[28]</sup>、*Bacillus* sp. CRB-B1 可耐受 420 mg/L 的 Cr(VI)<sup>[13]</sup>、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 可耐受 800 mg/L 的 Cr(VI)<sup>[40]</sup>、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和厦门芽孢杆菌 (*Bacillus xiamenensis*) 最高可耐受 950 mg/L 的 Cr(VI)<sup>[40]</sup>, 由此可见本研究中的菌株 p18 和 p20 的耐 Cr(VI) 能力高于大多数报道的耐 Cr(VI) 微生物。

随着 Cr(VI) 浓度的上升, 其毒性会抑制菌株 p18 和 p20 的生长以降低菌株活性, 进而影响菌株的去除能力, 这与 Shan 等<sup>[31]</sup>的报道一致。在 100 mg/L Cr(VI) 浓度下培养 120 h, 菌株

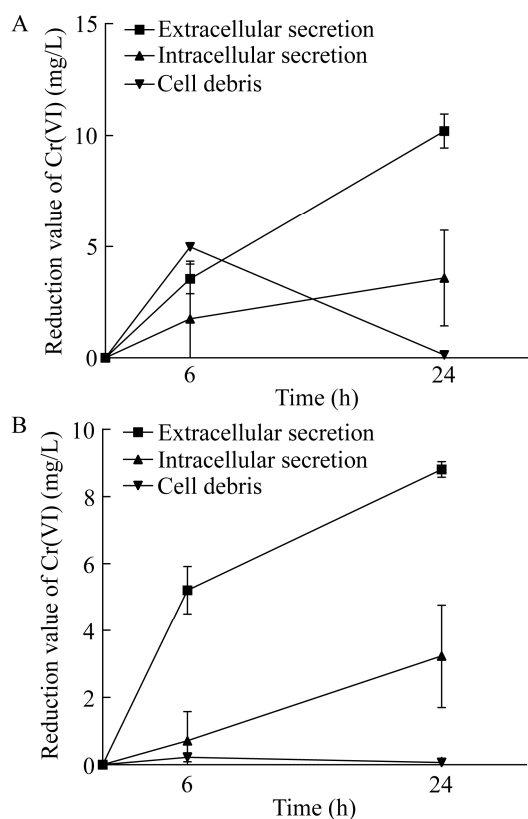


图9 20 mg/L Cr(VI)浓度下菌株 p18 (A)、p20 (B) 不同组分的 Cr(VI)还原量

Figure 9 Cr(VI) reduction value of different components of strains p18 (A) and p20 (B) under 20 mg/L concentration of Cr(VI).

p18 和 p20 的 Cr(VI)去除率可达 79.40% 和 63.48%。而 Kumar 等<sup>[18]</sup>报道的菌株 *Aspergillus flavus* CR500 在 Cr(VI)浓度为 70 mg/L 时去除率为 73.4%；Yang 等<sup>[41]</sup>研究中好热黄无氧芽孢菌 (*Anoxybacillus flavithermus*) ABF1 在 Cr(VI)浓度为 70 mg/L 时去除率为 45.67%，因此菌株 p18 和 p20 在去除 Cr(VI)能力方面优于多数已报道的菌株，并且菌株对 Cr(VI)的去除能力很大程度上受 Cr(VI)初始浓度的影响，并依赖于菌株的生长及其活性。

SEM 发现，暴露于 Cr(VI)的菌株 p18 和 p20 菌体表面粗糙，均有铬颗粒附着，但颗粒的含量和分布略有差异。结合 2.1 研究结果，在同

一放大倍数下，所观察到的菌株 p18 菌体表面的颗粒含量较少，有颗粒成团聚集现象；菌株 p20 菌体表面的颗粒含量较多，颗粒之间分布较分散。此现象可能是由于在 500 mg/L Cr(VI)环境下，菌株 p18 具更高的生物活性，可即时分泌生物大分子与铬重金属离子螯合，而菌株 p20 生物活性低，甚至不具有生物活性，只通过吸附作用将铬吸附于菌体表面而导致的。阚洪媛等<sup>[42]</sup>发现蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) MZ-11 分泌的多糖、蛋白质等生物大分子在菌体表面与 Cr(VI)螯合形成复合物，从而降低 Cr(VI)对菌体的毒性。另有研究表明，真菌细胞壁主要成分如葡聚糖、几丁质、蛋白质等聚合物中含 C、N 的官能团可与金属离子发生配位或氧化还原反应<sup>[43-44]</sup>。进一步经 FTIR 分析发现，Cr(VI)可与菌体表面的氨基、羟基、羰基、C-H 和酰胺基等官能团结合以吸附在菌体表面，相较于菌株 p18，在 0 和 500 mg/L Cr(VI)浓度处理下菌株 p20 结合 Cr(VI)的各种功能基团峰移位较明显。本研究中，菌株 p18 和 p20 在应对 Cr(VI)胁迫环境时，由于菌株种类差异，其表面结构会存在差异，因而会导致对 Cr(VI)解毒方式、去除能力等的差异<sup>[20]</sup>。

为探究菌株 p18 和 p20 细胞对铬的积累能力，测定生长在含 Cr(VI)固体培养基上表面菌丝的铬含量。在 500 mg/L Cr(VI)浓度下培养 7 d，菌株 p18 和 p20 每克菌体干重积累铬含量达到最大，分别为 10.84 mg 和 6.98 mg。由于固体培养基表面的菌丝为真菌的气生菌丝，与培养基中的铬并未直接接触，因此初步推断为细胞内的积累。Flores-Alvarez 等<sup>[45]</sup>研究的丝状真菌粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 也具有累积铬能力，其编码的 CHR-1 蛋白作为一种铬酸盐转运体，可引起该菌株积累 Cr(VI)。本研究筛选的 2 株真菌是否具有这种转运蛋白还需要进一

步研究,但是这2株菌可以通过吸附和胞内积累2种方式达到去除环境介质中铬的目的。

测定菌株 p18 和 p20 对 Cr(VI)的还原能力发现,2株真菌均具有将 Cr(VI)还原为 Cr(III)的潜力,从而降低 Cr(VI)毒性。在 100 mg/L Cr(VI)浓度下培养 120 h,菌株 p18 和 p20 的 Cr(VI)还原率达 73.55%和 50.94%,其中菌株 p18 的转化 Cr(VI)能力是 Coreño-Alonso 等<sup>[46]</sup>报道的菌株 *Aspergillus niger* var. *tubingensis* strain Ed8 转化 Cr(VI)能力的 1.31 倍。另有研究报道,沙雷氏菌(*Serratia*) sp.在 Cr(VI)浓度为 20 mg/L 时 Cr(VI)还原率为 71.8%<sup>[47]</sup>,*Aspergillus flavus* A1120 在 Cr(VI)浓度为 50 mg/L 时 Cr(VI)还原率为 78%<sup>[48]</sup>,层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*) S4 在 Cr(VI)浓度为 50 mg/L 时 Cr(VI)还原率为 58.24%<sup>[31]</sup>,因此菌株 p18 和 p20 在转化 Cr(VI)能力方面同样优于大多数已报道的菌株。在未来研究中可通过条件优化试验进一步提高菌株去除和转化 Cr(VI)的能力。SEM 和 FTIR 的局限性在于不能区分吸附在菌体表面铬的价态<sup>[48]</sup>,因此通过 XPS 和 XRD 深入分析菌株 p18 和 p20 还原 Cr(VI)的产物的价态和物相,表明 Cr(VI)还原为 Cr(III),以 Cr(OH)<sub>3</sub> 的形式沉淀在菌体表面。Vajpai 等<sup>[48]</sup>报道的 *Aspergillus flavus* strain SFL 和 *Aspergillus flavus* strain A1120 以及黄顺红<sup>[49]</sup>报道的潘隆尼亚碱湖杆菌(*Pannonibacter phragmitetus*) BB 均具有将 Cr(VI)还原为 Cr(III),生成 Cr(OH)<sub>3</sub> 的能力,与本研究的结果一致。而在 500 mg/L Cr(VI)浓度处理下对菌体粉末进行 XRD 分析未见明显的衍射峰,分析形成的 Cr(III)物质结晶度不高,为非晶态性质,这在 Mushtaq 等<sup>[39]</sup>研究中有过报道。

对耐 Cr(VI)真菌菌株 p18 和 p20 不同组分进行分离,并测定还原 Cr(VI)的能力。结果发现,2株菌均是胞外分泌物具有较强的转化

Cr(VI)能力,其次为胞内分泌物,而细胞碎片未表现出明显的转化效果,表明2株真菌可以通过分泌胞外还原性物质来转化六价铬。对于分泌的胞外分泌物还需要进一步研究。但该结果与 Yang 等<sup>[41]</sup>研究的 *Anoxybacillus flavithermus* ABF1 转化 Cr(VI)作用类似。

由此可见,本研究从黄河下游高污染支流沉积物中分离筛选的2株耐铬真菌菌株 p18 和 p20 可以通过吸附、胞内累积、胞外转化等方式对 Cr(VI)进行解毒,达到耐受高浓度铬的目的,其耐受能力大于目前报道的菌株。

## 4 结论

从长期受铬污染的黄河下游支流——蟒河沉积物中分离筛选得到的耐 Cr(VI)真菌菌株 p18 和 p20,经形态学和分子生物学鉴定分别为云南木霉(*Trichoderma yunnanense*)和环形镰刀菌(*Fusarium annulatum*),均具备耐受、转化高浓度 Cr(VI)的能力。菌株 p18 和 p20 可通过菌体表面的多糖、蛋白质等大分子物质、细胞壁的氨基、羟基、羰基、C-H 和酰胺基等官能团将铬吸附于菌体表面,也可通过积累作用将 Cr(VI)转运至胞内。此外,菌体分泌到胞外的细胞分泌物更有效地将 Cr(VI)还原为 Cr(III)。这些结论表明菌株 p18 和 p20 是可通过吸附、转化和积累作用以解毒 Cr(VI)的候选菌株,可用于修复铬污染场地。

## REFERENCES

- [1] 王金南. 黄河流域生态保护和高质量发展战略思考[J]. 环境保护, 2020, 48(Z1): 18-21.  
WANG JN. A primary framework on protection of ecological environment and realization of high-quality development for the Yellow River Basin[J]. Environmental Protection, 2020, 48(Z1): 18-21 (in Chinese).
- [2] 计伟, 刘海江, 高吉喜, 马欢, 宋婷, 高艳妮, 冯朝阳. 黄河流域生态质量时空变化分析[J]. 环境科学

- 研究, 2021, 34(7): 1700-1709.
- JI W, LIU HJ, GAO JX, MA H, SONG T, GAO YN, FENG CY. Spatial-temporal variations of ecological quality in the Yellow River Basin[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2021, 34(7): 1700-1709 (in Chinese).
- [3] 李文婧, 周凌峰, 赵晓丽, 吴小伟, 刘玲玲, 刘文丰, 吴丰昌. 黄河流域水环境问题研究现状、挑战与展望[J]. *环境科学研究*, 2024, 37(1): 32-41.
- LI WJ, ZHOU LF, ZHAO XL, WU XW, LIU LL, LIU WF, WU FC. Research status, challenges and prospects of water environment problems in the Yellow River Basin[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2024, 37(1): 32-41 (in Chinese).
- [4] 盛媛. 水体沉积物重金属污染风险评价与迁移途径的研究进展[J]. *中国资源综合利用*, 2017, 35(11): 59-60, 68.
- SHENG Y. Research progress on risk assessment and migration of heavy metal pollution in water sediments[J]. *China Resources Comprehensive Utilization*, 2017, 35(11): 59-60, 68 (in Chinese).
- [5] 赵记红. 黄河河南段重金属复合污染对微藻群落及其固碳功能影响的研究[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2022.
- ZHAO JH. Effects of heavy metal complex pollution on microalgae communities and their carbon sequestration in the southern section of the Yellow River[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2022 (in Chinese).
- [6] 李维宏, 杨宁, 魏晓峰, 岳秀萍, 徐建. 一株 Cr(VI) 还原菌的筛选鉴定及其还原特性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(11): 2133-2139.
- LI WH, YANG N, WEI XF, YUE XP, XU J. Isolation, identification and Cr(VI)-reducing capacity of a Cr(VI)-reducing strain *Enterobacter hormaechei*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(11): 2133-2139 (in Chinese).
- [7] GARAVAGLIA L, CERDEIRA SB, VULLO DL. Chromium (VI) biotransformation by *beta*- and *gamma*-*Proteobacteria* from natural polluted environments: a combined biological and chemical treatment for industrial wastes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1/3): 104-110.
- [8] 张建荣, 李娟, 许伟. 原位生物稳定固化技术在铬污染场地治理中的应用研究[J]. *环境科学*, 2013, 34(9): 3684-3689.
- ZHANG JR, LI J, XU W. Research on the application of in-situ biological stabilization solidification technology in chromium contaminated site management[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(9): 3684-3689 (in Chinese).
- [9] 黄益宗, 郝晓伟, 雷鸣, 铁柏清. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(3): 409-417.
- HUANG YZ, HAO XW, LEI M, TIE BQ. The remediation technology and remediation practice of heavy metals-contaminated soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(3): 409-417 (in Chinese).
- [10] LIU YY, MOU HY, CHEN LQ, MIRZA ZA, LIU L. Cr(VI)-contaminated groundwater remediation with simulated permeable reactive barrier (PRB) filled with natural pyrite as reactive material: environmental factors and effectiveness[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298: 83-90.
- [11] CHENG GJ, LI XH. Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated from soils of iron mineral area[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2009, 45(5/6): 483-487.
- [12] 肖文丹, 叶雪珠, 孙彩霞, 张棋, 徐萍. 铬耐性菌对土壤中六价铬的还原作用[J]. *中国环境科学*, 2017, 37(3): 1120-1129.
- XIAO WD, YE XZ, SUN CX, ZHANG Q, XU P. The effect of chromium-resistant bacteria on reduction of hexavalent chromium in soils[J]. *China Environmental Science*, 2017, 37(3): 1120-1129 (in Chinese).
- [13] TAN H, WANG C, ZENG GQ, LUO Y, LI H, XU H. Bioreduction and biosorption of Cr(VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 386: 121628.
- [14] LI MK, ZHUO YT, HU YT, LI SZ, HU L, ZHONG H, HE ZG. Exploration on the bioreduction mechanism of Cr(VI) by a gram-positive bacterium: *Pseudochrobactrum saccharolyticum* W1[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109636.
- [15] BANERJEE S, MISRA A, CHAUDHURY S, DAM B. A *Bacillus* strain TCL isolated from Jharia coalmine with remarkable stress responses, chromium reduction capability and bioremediation potential[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 367: 215-223.
- [16] BANERJEE S, KAMILA B, BARMAN S, JOSHI SR, MANDAL T, HALDER G. Interlining Cr(VI) remediation mechanism by a novel bacterium *Pseudomonas brenneri* isolated from coalmine wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 233: 271-282.
- [17] KARTHIK C, RAMKUMAR VS, PUGAZHENDHI A, GOPALAKRISHNAN K, ARULSELVI PI. Biosorption and biotransformation of Cr(VI) by novel

- Cellulosimicrobium funkei* strain AR6[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017, 70: 282-290.
- [18] KUMAR V, DWIVEDI SK. Hexavalent chromium reduction ability and bioremediation potential of *Aspergillus flavus* CR500 isolated from electroplating wastewater[J]. Chemosphere, 2019, 237: 124567.
- [19] LUO YT, YE BH, YE JE, PANG JL, XU Q, SHI JX, LONG BB, SHI JY. Ca<sup>2+</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> accelerate the reduction of Cr(VI) by *Penicillium oxalicum* SL2[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 382: 121072.
- [20] 彭蕾, 姜岩, 夏如馨. 微生物修复 Cr(VI)污染作用机制及研究进展[J]. 化工学报, 2021, 72(9): 4458-4468. PENG L, JIANG Y, XIA RX. The mechanism and research progress of bioremediation of Cr(VI) pollution[J]. CIESC Journal, 2021, 72(9): 4458-4468 (in Chinese).
- [21] JOUTEY NT, SAYEL H, BAHAFID W, EL GHACHTOULI N. Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms[A]//WHITACRE DM. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233[M]. Cham: Springer, 2015, 233: 45-69.
- [22] BENILA SMILY JRM, SUMITHRA PA. Optimization of chromium biosorption by fungal adsorbent, *Trichoderma* sp. BSCR02 and its desorption studies[J]. HAYATI Journal of Biosciences, 2017, 24(2): 65-71.
- [23] 武芳, 李勇, 路兆军. 盐碱土壤中微生物菌株的分离、筛选与功能评价[J]. 安徽农学通报, 2019, 25(23): 24-27, 35. WU F, LI Y, LU ZJ. Isolation, screening and functional evaluation of microbial strains in saline alkali soil[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2019, 25(23): 24-27, 35 (in Chinese).
- [24] 薛德星, 李美, 高兴祥, 李健. 生防菌棘孢木霉的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 山东农业科学, 2023, 55(10): 118-123. XUE DX, LI M, GAO XX, LI J. Isolation, identification and biological characteristics of *Trichoderma asperellum* GT30[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2023, 55(10): 118-123 (in Chinese).
- [25] 李瑞平, 宋莹莹, 李丽莉, 孙康文, 门兴元, 尹淑艳. 一种适于 PCR 的植物内生真菌 DNA 提取方法及应用[J]. 山东农业科学, 2022, 54(12): 143-149. LI RP, SONG YY, LI LL, SUN KW, MEN XY, YIN SY. A rapid extraction method of plant endophytic fungal DNA suitable for PCR and its application[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(12): 143-149 (in Chinese).
- [26] 王亚利, 康春晓, 杨传臻, 魏艺璇, 王瑞飞, 李明军, 杨清香. 一株地黄根腐病原菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 37-44. WANG YL, KANG CX, YANG CZ, WEI YX, WANG RF, LI MJ, YANG QX. Isolation and identification of a root rot pathogen of *Rehmannia glutinosa* and its characterization[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 37-44 (in Chinese).
- [27] 王媛. 杨树与溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*)互动中的细胞生物学、活性氧代谢及细胞过敏性反应[D]. 北京: 中国林业科学研究院博士学位论文, 2007. WANG Y. Cell biology, reactive oxygen metabolism and cell hypersensitive response of poplar-canker pathogen interaction[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Forestry, 2007 (in Chinese).
- [28] 刘奎艳, 祝天宇, 范鑫, 李蕾, 冀琛, 李媛媛, 张杰. 一株耐 Cr(VI)木霉的筛选鉴定及其 Cr(VI)还原特性[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2018, 35(3): 324-333. LIU KY, ZHU TY, FAN X, LI L, LI C, LI YY, ZHANG J. Study on the characteristics of Cr(VI) removal by Cr(VI)-resistant fungi[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2018, 35(3): 324-333 (in Chinese).
- [29] GU YL, XU WH, LIU YG, ZENG GM, HUANG JH, TAN XF, JIAN H, HU X, LI F, WANG DF. Mechanism of Cr(VI) reduction by *Aspergillus niger*: enzymatic characteristic, oxidative stress response, and reduction product[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(8): 6271-6279.
- [30] SHEN YS, WANG SL, TZOU YM, YAN YY, KUAN WH. Removal of hexavalent Cr by coconut coir and derived chars: the effect of surface functionality[J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 165-172.
- [31] SHAN B, HAO RX, XU H, ZHANG JM, LI JN, LI YH, YE YB. Hexavalent chromium reduction and bioremediation potential of *Fusarium proliferatum* S4 isolated from chromium-contaminated soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 29(52): 78292-78302.
- [32] LIAQUAT F, MUNIS MFH, HAROON U, ARIF S, SAQIB S, ZAMAN W, KHAN AR, SHI JX, CHE SQ, LIU QL. Evaluation of metal tolerance of fungal strains isolated from contaminated mining soil of Nanjing, China[J]. Biology, 2020, 9(12): 469.
- [33] KUMAR V, DWIVEDI SK. Hexavalent chromium stress response, reduction capability and bioremediation potential of *Trichoderma* sp. isolated from electroplating wastewater[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 185: 109734.



- [34] 沈薇, 杨树林, 李校堃, 袁辉, 高力虎. 木霉 (*Trichoderma* sp.) HR-1 活细胞吸附 Pb(II)的机理[J]. 中国环境科学, 2006, 26(1): 101-105.  
SHEN W, YANG SL, LI XK, YUAN H, GAO LH. The mechanism of Pb(II) sorption by living cell of *Trichoderma* sp. HR-1[J]. China Environmental Science, 2006, 26(1): 101-105 (in Chinese).
- [35] DESAI C, JAIN K, MADAMWAR D. Evaluation of *in vitro* Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6059-6069.
- [36] KANG CX, WU PX, LI LP, YU LF, RUAN B, GONG BN, ZHU NW. Cr(VI) reduction and Cr(III) immobilization by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB93066: spectroscopic, microscopic, and mass balance analysis[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(6): 5949-5963.
- [37] YU ZF, QIAO M, ZHANG Y, ZHANG KQ. Two new species of *Trichoderma* from Yunnan, China[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2007, 92(1): 101-108.
- [38] BUSTAMANTE MI, EL FAR K, SMITH R, BETTIGA L, TIAN T, TORRES-LONDOÑO GA, ESKALEN A. First report of *Fusarium annulatum* associated with young vine decline in California[J]. Plant Disease, 2022, 106(10): 2752.
- [39] MUSHTAQ S, BAREEN FE, TAYYEB A. Equilibrium kinetics and thermodynamic studies on biosorption of heavy metals by metal-resistant strains of *Trichoderma* isolated from tannery solid waste[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(4): 10925-10954.
- [40] YOUNAS H, NAZIR A, LATIF Z, THIES JE, SHAFIQ M, BAREEN FE. Biosorption potential and molecular characterization of metal-resistant autochthonous microbes from tannery solid waste[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(10): 651.
- [41] YANG WJ, HONG WQ, HUANG YJ, LI SZ, LI MK, ZHONG H, HE ZG. Exploration on the Cr(VI) resistance mechanism of a novel thermophilic Cr(VI)-reducing bacteria *Anoxybacillus flavithermus* ABF1 isolated from Tengchong geothermal region, China[J]. Environmental Microbiology Reports, 2022, 14(5): 795-803.
- [42] 阚洪媛, 杨世鑫, 孙梁伦, 杨月伟, 唐美珍, 高燕, 刘振路, 贾婧兰. 一株耐铅、锌、铬菌株的分离鉴定及其吸附能力[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 3974-3986.  
KAN HY, YANG SX, SUN LL, YANG YW, TANG MZ, GAO Y, LIU ZL, JIA RL. Isolation, identification and adsorption capacity of a strain resistant to lead, zinc and chromium[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 3974-3986 (in Chinese).
- [43] JAVANBAKHT V, ALAVI SA, ZILOUEI H. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent[J]. Water Science and Technology, 2014, 69(9): 1775-1787.
- [44] 王兴润, 李磊, 颜湘华, 田永强. 铬污染场地修复技术进展[J]. 环境工程, 2020, 38(6): 1-8, 23.  
WANG XR, LI L, YAN XH, TIAN YQ. Progress in remediation of chromium-contaminated sites[J]. Environmental Engineering, 2020, 38(6): 1-8, 23 (in Chinese).
- [45] FLORES-ALVAREZ LJ, CORRALES-ESCOBOSA AR, CORTÉS-PENAGOS C, MARTÍNEZ-PACHECO M, WROBEL-ZASADA K, WROBEL-KACZMARCZYK K, CERVANTES C, GUTIÉRREZ-CORONA F. The *Neurospora crassa chr-1* gene is up-regulated by chromate and its encoded CHR-1 protein causes chromate sensitivity and chromium accumulation[J]. Current Genetics, 2012, 58(5): 281-290.
- [46] COREÑO-ALONSO A, SOLÉ A, DIESTRA E, ESTEVE I, GUTIÉRREZ-CORONA JF, REYNA LÓPEZ GE, FERNÁNDEZ FJ, TOMASINI A. Mechanisms of interaction of chromium with *Aspergillus niger* var *tubingensis* strain Ed8[J]. Bioresource Technology, 2014, 158: 188-192.
- [47] UPADHYAY S, TARAFDAR A, SINHA A. Assessment of *Serratia* sp. isolated from iron ore mine in hexavalent chromium reduction: kinetics, fate and variation in cellular morphology[J]. Environmental Technology, 2020, 41(9): 1117-1126.
- [48] VAJPAI S, TAYLOR PE, ADHOLEYA A, ACKLAND ML. Chromium tolerance and accumulation in *Aspergillus flavus* isolated from tannery effluent[J]. Journal of Basic Microbiology, 2020, 60(1): 58-71.
- [49] 黄顺红. *Pannonibacter phragmitetus* BB 的分离、鉴定及其对 Cr(VI)还原研究[J]. 湖南有色金属, 2010, 26(6): 52-57.  
HUANG SH. Study on the isolation and identification of *Pannonibacter phragmitetus* BB and its reducing Cr(VI)[J]. Hunan Nonferrous Metals, 2010, 26(6): 52-57 (in Chinese).