

# 三株具重金属抗性油菜内生真菌 对镉铅锌富集特性研究\*

徐在超<sup>1</sup>, 史亚楠<sup>1</sup>, 张仁铎<sup>2</sup>, 谢华蓉<sup>1</sup>, 袁保红<sup>1</sup>, 王卓娅<sup>1</sup>, 邓祖军<sup>1</sup>

(1. 广东药科大学基础学院, 广东 广州 510006;

2. 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 为了筛选到对重金属具良好富集活性的微生物吸附剂, 以分离于大宝山矿区重金属富集植物油菜的3株具重金属抗性的内生真菌 *Fusarium* sp. CBRF14, *Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 为研究对象, 分析了 Cd、Pb 和 Zn 的初始浓度对其活菌体的生物量、富集率及富集量的影响。研究发现, 随着重金属初始浓度(试验设置的浓度范围内)的升高, *Fusarium* sp. CBRF14、*Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 对 Cd 和 Zn 的富集率呈下降趋势, 而对 Pb 的富集率则存在“先升高再下降”的过程; 该3株内生真菌的生物量随着 Cd、Pb 和 Zn 初始浓度增加呈下降趋势, 而对 Cd、Pb 和 Zn 的富集量则不断增加, 它们对 Cd 的最大富集量介于 20.5 ~ 53.4 mg · g<sup>-1</sup>, 对 Pb 的最大富集量介于 188.9 ~ 356.6 mg · g<sup>-1</sup>, 对 Zn 的最大富集量介于 28.4 ~ 292.8 mg · g<sup>-1</sup>。研究表明这3株油菜内生真菌可在含重金属液体条件下生长并具有良好的重金属富集能力, 其在重金属污染废水的生物修复中具有潜在的应用前景, 同时也表明重金属抗性植物内生真菌是获得具重金属富集能力微生物的重要资源库。

**关键词:** 内生真菌; 生物富集; 生长菌体; 重金属

**中图分类号:** Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2016) 06-0153-08

## Bioaccumulation of Cd, Zn and Pb by three heavy metal-resistant endophytic fungi isolated from rapes

XU Zaichao<sup>1</sup>, SHI Yanan<sup>1</sup>, ZHANG Renduo<sup>2</sup>, XIE Huarong<sup>1</sup>,  
YUAN Baohong<sup>1</sup>, WANG Zhuoya<sup>1</sup>, DENG Zujun<sup>1</sup>

(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University,  
Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The aim of this study was to select the effective microbial agents to remediate heavy metal pollutants by investigating the potential of the growing biomass of the three endophytic fungi through bioaccumulation to remove metals from contaminated water. In this study, three endophytic fungi *Fusarium* sp. CBRF14, *Penicillium* sp. CBRF65, *Alternaria* sp. CBSF68 tolerant Cd, Pb, and Zn were isolated from rapes growing in DaBao metal contaminated soils. And then we investigated the effects of initial metals (Cd, Pb and Zn) concentrations on the biomass, the metal bioaccumulation capacities and bioaccumulation percentages of the endophytic fungi. The results showed that the bioaccumulation percentages of Cd and Zn by CBRF14, CBRF65 and CBSF68 decreased with the increase of initial concentrations of Cd and

\* 收稿日期: 2016-03-16

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(31400111); 广东省自然科学基金资助项目(S2013040016110); 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室(中山大学)开放基金资助项目(2013K0005)

**作者简介:** 徐在超(1992年生), 男; **研究方向:** 微生物资源开发; **通讯作者:** 邓祖军; E-mail: dengzujun66@163.com

Zn in general, however, the bioaccumulation percentage of Pb by CBRF14 and CBSF68 showed a pattern of “increase-decline”. With the increase of the initial Cd, Pb, and Zn concentrations, the biomass of CBRF14, CBRF65 and CBSF68 showed the declined trend, but the bioaccumulation capacities of metals increased. The maximum bioaccumulation capacities of CBRF14, CBRF65 and CBSF68 were 20.5 ~ 53.4 mg · g<sup>-1</sup> for Cd, 188.9 ~ 356.6 mg · g<sup>-1</sup> for Pb, and 28.4 ~ 292.8 mg · g<sup>-1</sup> for Zn, respectively. The results indicated that the three heavy metal-resistant endophytic fungi from rapes could live and accumulate metals in solutions with heavy metals, which suggested that they had the potential to remove heavy metals from metal-contaminated water. The results also indicated that plants accumulating multiple metals might harbor diverse fungal endophytes suitable for bioaccumulation of metals.

**Key words:** fungal endophytes; bioaccumulation; growing mycelium; heavy metals.

随着工业废水的排放和其他人类的活动, 有毒金属特别是 Cd、Zn 和 Pb, 正越来越多地被释放到环境中<sup>[1]</sup>。微生物的菌丝体能集中和吸收水溶液中的重金属, 从而将其从环境中去除, 因此微生物对重金属的吸附作用可以应用于重金属污染废水的修复研究中<sup>[2]</sup>。相对于物理化学修复, 微生物修复具有环保, 成本低等优势, 近年来其在重金属污染修复中的作用正得到广泛关注<sup>[3]</sup>。微生物对重金属的吸附分为两种类型, 其一是生物吸附, 主要利用微生物死亡的菌体细胞或停止生长的活菌体作为吸附材料, 这是一个被动的吸附过程; 另一种是生物富集, 主要利用生长中的活细胞或菌体对重金属进行富集的过程, 这主要是一个主动的耗能的吸附过程<sup>[2]</sup>。目前对微生物的重金属吸附作用已引起广泛关注, 但利用生长中的微生物对重金属的富集研究还比较少见, 特别对复合重金属污染体系的富集研究更为少见<sup>[4-5]</sup>。由于活细胞具有自我补充的能力, 物理吸附完成后还能进行新陈代谢不断吸收重金属, 而且省去了生物吸附所需要的菌体生产等工序, 因此利用微生物生长菌体做生物吸附剂将是一个更好的选择<sup>[4, 6-7]</sup>。

重金属的微生物富集修复系统构建的前提条件是筛选出具重金属抗性, 可在重金属环境中生长繁殖的微生物菌株。目前应用于生物富集的重金属抗性微生物菌株多数分离于重金属污染的土壤、污水、植物根际等环境<sup>[8-11]</sup>。重金属富集植物体内的重金属浓度, 由于植物的富集和萃取能力, 相对其他污染环境要更高<sup>[12]</sup>。植物内生真菌 (Fungal endophytes) 是指在生活于健康植物体内, 通常情况下并不引发植物出现明显病症的一类真菌<sup>[13]</sup>。已有研究表明重金属耐性植物来源的内生真菌蕴含着丰富的重金属抗性菌株, 而且其抗性水平和抗性菌株的比例也高于其他环境微生物<sup>[14-15]</sup>, 目前环境污染修复的研究主要集中在根际细菌和内生细菌

上, 而关于重金属耐性植物内生真菌在重金属生物富集中的作用尚未引起关注。本研究以分离于韶关大宝山矿区富集植物油菜根部和茎部的 3 株具有重金属抗性内生真菌 *Fusarium* sp. CBRF14, *Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 为实验对象, 对其在液体实验条件下富集 Cd、Pb 和 Zn 的特性进行了初步研究, 所得结果将为开发可高效富集重金属的微生物吸附剂提供实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 重金属污染区油菜来源内生真菌的分离与鉴定

健康的油菜 *Brassica napus* 根部样本采集于韶关市翁源县上坝村 (24°33'36.6"N, 113°43'14.0"E)。由于该处土壤长期受大宝山矿区采矿废水的污染, 多种重金属含量较高, 其中总  $w$  (Cd) 为 9.17 mg · kg<sup>-1</sup>, 总  $w$  (Pb) 为 496 mg · kg<sup>-1</sup>, 总  $w$  (Zn) 为 214 mg · kg<sup>-1</sup>。将油菜根部样品用自来水冲洗掉泥土, 然后进行严格的表面消毒程序: 依次浸泡在  $\varphi = 75\%$  酒精 1 min,  $w = 3\% \sim 5\%$  有效氯的次氯酸钠溶液 3 min,  $\varphi = 75\%$  的酒精 0.5 min, 然后再用无菌水冲洗 3 遍。晾干后, 将其剪成约 0.5 cm<sup>2</sup> 小片。然后采用参考文献 [16] 的方法对油菜内生真菌进行分离和纯化。然后根据真菌的菌落形态, 菌丝、孢子的显微结构<sup>[17]</sup> 以及基于真菌 ITS1 - 5.8S - ITS2 (简称 ITS) 基因序列分析方法<sup>[18]</sup> 来对内生真菌进行鉴定。

### 1.2 内生真菌对重金属抗性测定

向 PDA 培养基分别加入 Cd [Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]、Pb [Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]、Zn [Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] 溶液获得一系列不同浓度梯度的重金属抗性平板 (Cd: 0.5 ~ 5 mmol/L; Pb 1 ~ 40 mmol/L; Zn: 10 ~ 100 mmol/L), 调节 pH 在 6.5 ~ 7.0 范围内, 121 °C 灭菌 20 min。然后将待筛内生真菌接种至前面配置好的抗性

PDA 平板中 28 ℃ 培养 1~2 周，能形成肉眼可见菌落的最高抗性水平平板中的重金属浓度，即为试验真菌对该重金属的最高抗性浓度。

### 1.3 内生真菌的重金属富集试验

为了研究内生真菌对单一重金属 (Cd、Pb 或 Zn) 的富集活性，本实验参考试验菌株在 PDA 平板上对重金属的抗性水平来设定富集试验中液体培养基中 Cd、Pb、Zn 的初始浓度 (表 1)。将马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) (pH5.0) 分装到 250 mL 三角瓶 (每瓶装 100 mL PDB) 中，121 ℃ 灭菌 20 min。在无菌试验台上向灭菌后的三角瓶中加入含有 Cd、Pb 或 Zn 的重金属储备液配置获得相应的重金属富集初始浓度。然后从 PDA 平板上生长旺盛的菌落边缘挑取直径 3 mm 的菌丝体接种到 PDB 中，放置到 30 ℃ 摇床振荡 (150 r/min) 培养 5 d。培养结束后，用滤纸过滤收集菌体，用去离子蒸馏水清洗 3 遍后放入 65 ℃ 烘箱中烘至恒质量，测定菌体生长量。用电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定滤液中重金属含量。以上试验每个处理均设 3 个重复。

表 1 内生真菌富集实验中 Cd、Pb 和 Zn 的初始浓度

Table 1 The initial concentrations of Cd, Pb and Zn used in the bioaccumulation assays

金属种类	设定的浓度梯度/ (mmol · L <sup>-1</sup> )						
Cd	0	0.1	0.3	0.5	0.7	1	1.5
Pb	0	1	1.5	2	2.5	3	4
Zn	0	1	2	3	4	5	6

### 1.4 测定项目及方法

1) 重金属离子浓度：过滤后的重金属溶液稀释后用 ICP-OES 测溶液中各重金属离子的浓度。内生真菌对重金属的富集量和吸附量利用文献 [19] 中公式 (1) 来进行计算，其对重金属的富

集率和吸附率则利用参考文献 [19] 中公式 (2) 来计算。

2) 菌丝体干质量：称干燥并标号的定量滤纸的质量，用滤纸滤出全部菌丝体，然后将菌丝与滤纸放在 80 ℃ 干燥箱中烘干 24 h 至恒质量后，用电子天平称量，减去滤纸质量，得出菌丝体干质量 (g)。

### 1.5 数据分析

运用数据统计软件 SPSS，对生物量和重金属富集量或吸附量进行  $\chi^2$  检验，包括对同一重金属处理下不同接菌和同一接种时不同重金属处理作显著性分析。显著性水平以  $P < 0.05$  为检验标准。

## 2 结果

### 2.1 油菜内生真菌的分离、鉴定及重金属抗性分析

从油菜根部共分离到 137 株内生真菌，主要有镰孢属、毛霉属、木霉属、青霉属、枝孢属、交链孢属等种类。其中内生真菌 CBRF14 对 1 mmol/L Cd、15 mmol/L Pb 和 40 mmol/L Zn 具有抗性；CBRF65 对 2 mmol/L Cd、20 mmol/L Pb 和 50 mmol/L Zn 具有抗性；CBSF68 对 1 mmol/L Cd、10 mmol/L Pb 和 30 mmol/L Zn 具有抗性。这 3 株内生真菌对 Cd、Pb 和 Zn 均表现出较好的抗性，因此本研究选择它们进行后续的重金属富集特性研究。结合内生真菌的孢子形态 (图 1) 及 ITS1-5.8S-ITS2 基因序列比对结果 (表 2) 分析发现，内生真菌 CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 的孢子形态结构及 ITS 基因序列相似度分别与 *Fusarium* 属、*Penicillium* 属、*Alternaria* 属相符 (ITS 基因相似度均在 97% 以上)，因此它们可分别被鉴定为 *Fusarium* sp. CBRF14，*Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68。

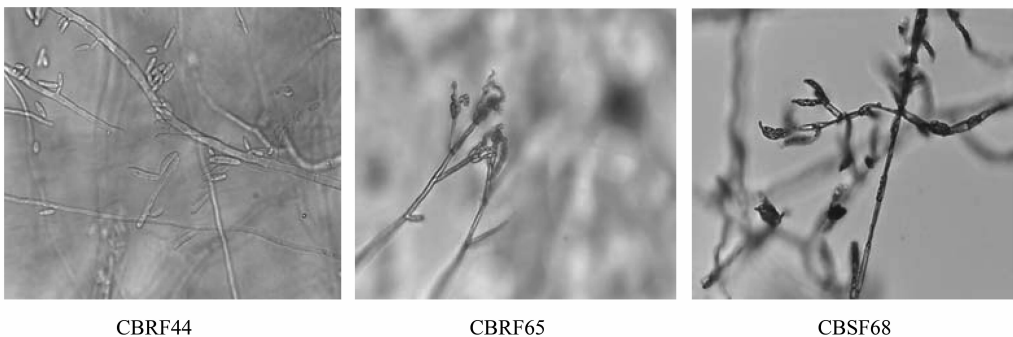


图 1 内生真菌 CBRF65、CBRF14、CBSF68 的孢子形态

Fig. 1 The spores morphology of endophytic *Fusarium* sp. CBRF44, *Penicillium* sp. CBRF65 and *Alternaria* sp. CBSF68

表 2 内生真菌 ITS 序列与 GeneBank 中最相似序列的比较

Table 2 The comparison between the ITS sequences of endophytic fungi and the most similar ITS sequences in GeneBank

内生真菌编号及 GeneBank 登录号	相似菌株及 GeneBank 登录号	相似度/%
CBRF65 (KU663376)	<i>Penicillium citrinum</i> FJAT-30994 (KU687813)	97
CBRF14 (KU255178)	<i>Fusarium oxysporum</i> LCF32 (FJ867936)	99
CBSF68 (KU663377)	<i>Alternaria porri</i> AP-12 (JF422727)	99

## 2.2 重金属起始浓度对油菜内生真菌生长的影响

由图 2 可见,随着 Cd 初始浓度 (0 ~ 1.5 mmol/L) 的升高,内生真菌 CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 的生物量均呈下降趋势。其中 CBRF65 对 Cd 毒性最为敏感,在 Cd 初始由 0 mmol/L 升高至 0.5 mmol/L 时其生物量就显著下降,仅为对照组的 5.05%,而当 Cd 初始浓度由 0.5 mmol/L 升至 1.5 mmol/L 时,CBRF65 的生物量则没有显著降低。Cd 初始浓度的升高对 CBRF14 和 CBSF68 生长抑制作用基本相似: Cd 初始浓度为 0 mmol/L 升高至 0.1 mmol/L,这两种内生真菌的生物量均没有显著改变;随着 Cd 的初始浓度由 0.1 mmol/L 升至 1.0 mmol/L 时二者的生物量均显著减少;而当 Cd 的初始浓度由 1.0 mmol/L 增至 2.0 mmol/L 时,

它们的生物量呈平缓下降趋势。

随着 Pb 初始浓度的升高, CBRF65 生物量呈逐渐下降趋势。CBRF14 和 CBSF68 在 Pb 初始浓度由 0 mmol/L 升至 2.0 mmol/L 时,它们的生物量都没有显著变化,而由 2.0 mmol/L 升至 4.0 mmol/L 时,其生物量则不断减少。

随着 Zn 初始浓度 (0 ~ 6 mmol/L) 的升高,内生真菌 CBRF65 和 CBSF68 的生物量均呈下降趋势,其中 CBRF65 对 Zn 的毒性更为敏感,下降斜率更大。CBRF14 随着 Zn 初始浓度的升高,其生物量呈现先增加后减少的变化趋势: Zn 初始浓度由 0 mmol/L 升至 1 mmol/L 时, CBRF14 的生物量增加了 12%; 而当 Zn 浓度由 1.0 mmol/L 升至 6 mmol/L 时,其生物量则不断减少。

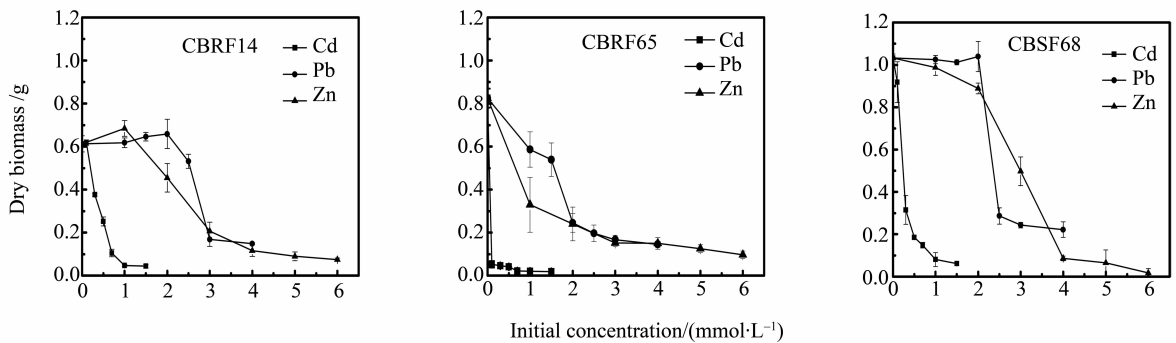


图 2 重金属 Cd、Pb、Zn 初始浓度对内生真菌 CBRF14、CBRF65、CBSF68 生长的影响

Fig. 2 Effects of Cd, Pb, Zn on biomass of CBRF14, CBRF65 and CBSF68

## 2.3 重金属起始浓度对油菜内生真菌富集量和富集率的影响

从图 3 可以看出,随着 Cd 初始浓度 (0.1 ~ 2 mmol/L) 的升高,3 株内生真菌对 Cd 的富集率均显著下降。CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 在低浓度 Cd 下 (0.1 mmol/L) 对 Cd 有较好的去除能力,其富集率分别为 85%、100% 和 73%,其中 CBRF65 的去除效果最佳。随着 Cd 初始浓度的升高, CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 对 Cd 的富集量则不断升高,其最大富集量分别为 20.5、53.4 和 27.3  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (图 4)。

Pb 初始浓度由 1.0 mmol/L 升至 4 mmol/L 时,内生真菌 CBRF14 和 CBSF68 对 Pb 的富集率均呈现先升高后下降的趋势 (图 3): 当 Pb 初始浓度由 1 mmol/L 升至 2.5 mmol/L 时, CBRF14 和 CBSF68 对 Pb 富集率均显著增加,并在 Pb 初始浓度为 2.5 mmol/L 达到最大值,分别为 78%、72%; 当 Pb 初始浓度继续由 2.5 mmol/L 升至 4 mmol/L 时,它们对 Pb 的富集率则明显下降,分别降至 54%、50%。CBRF65 对 Pb 的富集率随着 Pb 初始浓度的升高则呈现与 CBRF14 和 CBSF68 不同的变化趋势 (图 3): Pb 初始浓度由 1.0 mmol/L 升至 1.5

mmol/L 时, 其富集率没有明显变化, 其富集率均为 95%; Pb 初始浓度由 1.5 mmol/L 升至 2.0 mmol/L 时, 其富集率则显著下降至 46%; Pb 初始浓度继续升至 2.5 mmol/L 时, CBRF65 对 Pb 的富集率又升高至 79%; 而当 Pb 初始浓度由 2.5 mmol/L 增至 4.0 mmol/L, CBRF65 对 Pb 的富集率再次由 79% 下降至 62%。CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 对 Pb 的富集量都随着其初始浓度的升高而增加, 其最大富集量分别为 299.8、356.6 和 188.9  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (图 4)。

随着 Zn 初始浓度的升高, CBRF14 和 CBSF68

对 Zn 富集率呈下降趋势, 而 CBRF65 对 Zn 富集率则没有明显改变 (图 3)。CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 对 Zn 的最大富集率均在 Zn 初始浓度为 1.0 mmol/L 时获得, 其值分别为 78%、36% 和 76%。由上面结果可以看出在低浓度 Zn ( $\leq 2.0$  mmol/L) 下, CBRF14 的去除能力最强, 而在高浓度 Zn ( $\geq 3.0$  mmol/L) 下 CBRF65 去除效果最优。与 Cd、Pb 相似, CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 对 Zn 的富集量也随着其初始浓度的升高而增加, 其最大富集量分别为 28.4、117.9 和 292.8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  (图 4)。

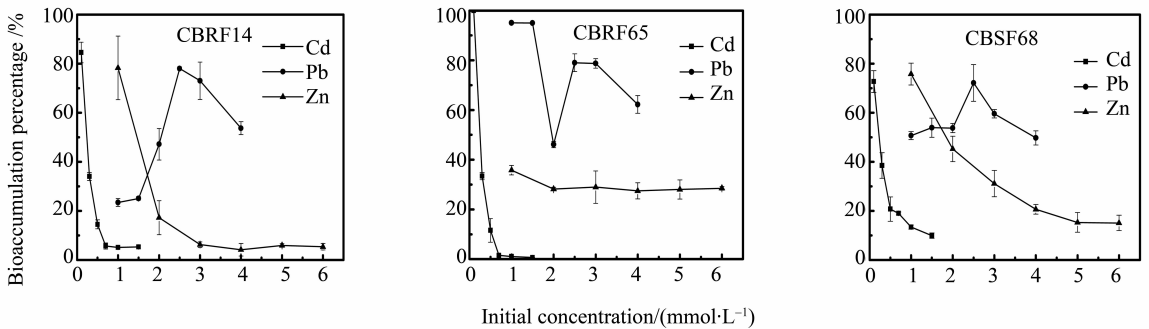


图 3 重金属 Cd、Pb、Zn 初始浓度对内生真菌 CBRF14、CBRF65、CBSF68 富集率的影响

Fig. 3 Effects of initial concentrations of Cd, Pb and Zn on their bioaccumulation percentages by CBRF14, CBRF65, and CBSF68

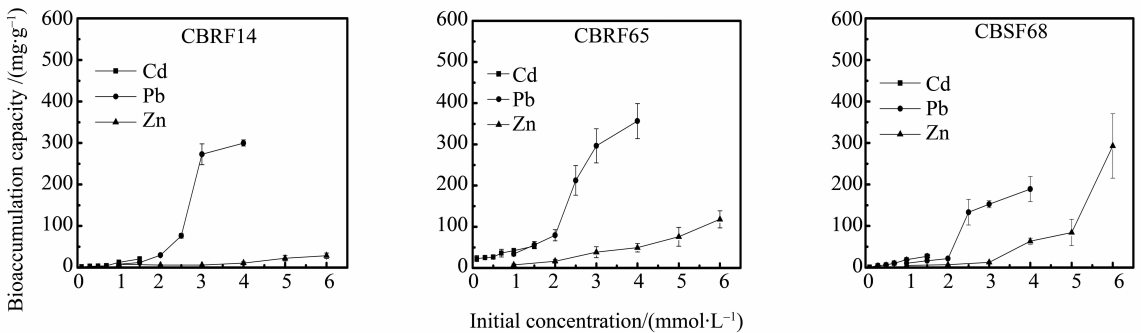


图 4 重金属 Cd、Pb、Zn 初始浓度对内生真菌 CBRF14、CBRF65、CBSF68 富集量的影响

Fig. 4 Effects of initial concentrations of Cd, Pb and Zn on their bioaccumulation capacities by CBRF14, CBRF65 and CBSF68

### 3 讨论

在表 3 中, 我们将内生真菌 *Fusarium* sp. CBRF14 富集 Pb、Cd、Zn 的能力与已有文献报道的微生物, 如 *Rhizopus arrhizus*、*Mucor rouxii*、*Cupriavidus taiwanensis* TJ208、*Bacillus jeotgali*、*Aspergillus niger*、*Caulerpa lentillifera* [7, 20-25] 进行了比较, 这些微生物对 Cd 的最大吸附量介于 8.46 ~ 19.6  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对 Pb 的最大吸附量介于 16.9 ~ 50.1  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对 Zn 的最大吸附量介于 2.66 ~

19.06  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。而本研究中 *Fusarium* sp. CBRF14、*Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 对 Cd 的最大富集量介于 20.5 ~ 53.4  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对 Pb 的最大富集量介于 188.9 ~ 356.6  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 对 Zn 的最大富集量介于 28.4 ~ 292.8  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 均高于前面文献报道的微生物。以上结果表明重金属富集植物来源的内生真菌是获得具重金属富集能力微生物的良好资源库 [26]。

目前关于微生物修复重金属的研究太多集中在生物吸附上, 即利用死菌体或停止的固定活细胞进

行吸附<sup>[5,27]</sup>。然而微生物吸附剂的获得需要经过多种繁琐的生产程序,如菌体培养、收获、干燥、加工、储存等,且重复利用率不高,费用较高,这都限制了生物吸附剂的使用<sup>[4,27]</sup>。因此使用生长中的微生物进行生物富集是修复重金属污染的废水一个更好的选择,因为生长中的微生物能进行新陈代谢,在物理吸附后还能靠自身的能量系统和酶系统持续吸收富集重金属,其富集量往往更大,同时生物富集还省去了菌体的生产过程,它们具有重金属抗性,可以在重金属溶液中生长增殖<sup>[28]</sup>。当然环境因子比如高浓度的重金属,以及极端的 pH 都会严重影响微生物在修复系统的生长,限制它们的应用<sup>[30]</sup>。因此分离筛选获得具有重金属抗性,且能在多种重金属浓度和 pH 值范围都能生长的微生物菌株就显得尤为重要。一旦获得能在重金属溶液中

良好生长并能富集重金属的菌株,就能建立一个具有自我更新能力的连续修复系统<sup>[27]</sup>。本研究发现内生真菌 CBRF65、CBRF14 和 CBSF68 能在含较高浓度 Pb、Zn 的培养液中生长,并对它们具有较好的去除能力:例如当 Pb 初始浓度为 2.5 mmol/L 时, CBRF65、CBRF14 和 CBSF68 对 Pb 的富集率均在 70% 以上;而当 Zn 初始浓度为 1 mmol/L 时, CBRF14 和 CBSF68 对 Zn 的富集率都超过 80%。另外 CBRF14、CBRF65 和 CBSF68 在 Cd 初始浓度为 0.1 mmol/L 培养液中生长良好,其 Cd 富集率分别高达 85%、100% 和 73%,它们在低浓度 Cd 条件下也显示出良好的富集能力。以上结果表明这些具有重金属抗性和富集能力的内生真菌有潜力通过其生物富集作用构建一个连续处理系统,应用到重金属污染废水的处理中。

表 3 本研究中内生真菌重金属 Cd, Pb, Zn 吸收量与已有文献报道菌株的比较

Table 3 Comparison of uptake capacities ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) of Cd, Pb, Zn between the endophytic fungi in this study and microorganisms reported in the literature

Microorganisms	Maximum Cd uptake capacities	Maximum Pb uptake capacities	Maximum Zn uptake capacities	Reference
Growing <i>Rhizopus arrhizus</i>	17.7	16.9		[7]
Live <i>Mucor rouxii</i> biomass	8.46	35.7		[20]
<i>Cupriavidus taiwanensis</i> TJ208	19.6	50.1		[21]
NaOH pretreated <i>Aspergillus niger</i>		34.9		[22]
<i>Caulerpa lentillifera</i>	4.69	28.99	2.66	[23]
Dried non-living biomass (NB) of different <i>Pseudomonas</i> strains		45.58	19.06	[24]
<i>Myriophyllum spicatum</i> L.			6.8	[25]
Growing endophytic fungus CBRF14	20.54	299.8	28.43	This study
Growing endophytic fungus CBRF65	53.43	356.6	117.9	This study
Growing endophytic fungus CBSF68	27.25	188.9	292.8	This study

微生物对重金属的抗性机制主要包括富集机制、外排机制及其他机制。在生长菌体细胞中,富集过程主要通过依赖于新陈代谢活动将重金属由细胞外通过细胞膜转移到细胞内的一个耗能的过程。在微生物富集重金属的过程中,外排机制可能在某一特定的重金属浓度启动,以阻止更多的重金属进入胞内<sup>[31-32]</sup>。因此生长中的微生物活细胞富集重金属的能力受到胞外环境的重金属浓度的影响。在对 CBRF14 和 CBRF68 富集 Pb 的过程发现,随着 Pb 浓度的升高,其富集率存在先升高后降低的过程。当 Pb 的浓度由 1 mmol/L 升高到 2.5 mmol/L 时, CBRF59 对 Pb 以富集为主,所以富集率升高。Perez - Rama 等<sup>[33]</sup>也发现相似的现象,当 Cd 质量浓度由 0.6  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  升至 45  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, *Tetraselmis*

*suecica* 生长细胞对 Cd 的去除率也升高,尽管 Cd 的毒性增强,影响了它的生长。而当 Pb 浓度由 2.5 mmol/L 升高到 4.0 mmol/L, CBRF14 和 CBRF68 对 Pb 的抗性以外排机制为主,所以富集率下降<sup>[28]</sup>。不同微生物对重金属的感受阈值不同,其启动富集或外排机制的浓度范围或方式可能有差异,因而其富集率可能会随着重金属起始浓度的变化表现出不同的变化趋势,例如 CBRF65 当 Pb 初始浓度由 1.5 mmol/L 升至 2 mmol/L 时,它以外排机制为主,对 Pb 的富集率下降;当 Pb 浓度由 2 mmol/L 上升至 3 mmol/L,它可通过合成生物酶或重金属结合肽等物质来抵抗 Pb 的毒性,富集过程重新启动,从而导致富集率升高;而当 Pb 初始浓度由 3 mmol/L 进一步升高至 4 mmol/L,它

可能为了防止 Pb 的过高浓度对细胞的毒性作用, 再次启动外排机制, 因而其富集率再次下降<sup>[34]</sup>。

介导细菌重金属抗性的基因常表达具外排泵活性的蛋白(也可导致药物外排), 或与抗生素抗性基因位于同一遗传元件上(如质粒、转座子或整合子), 因而细菌的重金属抗性与抗生素抗性存在着紧密的协同选择作用<sup>[35]</sup>。已有报道环境中分离到的一些重金属抗性细菌也显示出较强的抗生素抗性<sup>[36-37]</sup>, 因此重金属抗性细菌在污染修复中的应用存在导致耐药基因在环境中传播和扩散的风险<sup>[38]</sup>。但真菌对抗生素与重金属的抗性机制不同<sup>[39]</sup>, 减少了这种共选择的风险, 因而内生真菌在重金属污染修复应用中相对于内生细菌更具优势。本研究中分离到的内生真菌 *Fusarium* sp. CBRF14、*Penicillium* sp. CBRF65 和 *Alternaria* sp. CBSF68 能在重金属溶液中生长并具有高效的重金属去除能力, 同时由于其呈菌丝生长、易于收集, 且与抗生素共选择风险低, 不易导致耐药基因的扩散, 因此它们在重金属污染修复中具有良好的应用前景。

#### 参考文献:

[1] LO Y C, CENG C L, HAN Y L, et al. Recovery of high-value metals from geothermal sites by biosorption and bioaccumulation [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 160: 182 - 190.

[2] CHOJNACKA K. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications [J]. *Environment International*, 2014, 36: 299 - 307.

[3] DIXIT R, WASIULL A H, MALAVIYA D, et al. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes [J]. *Sustainability*, 2015, 7(2): 2189 - 2212.

[4] HUANG F, GUO C L, LU G N, et al. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC - 1 and its mechanism [J]. *Chemosphere*, 2014, 109: 134 - 142.

[5] AHLUWALIA S, GOYAL D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 2243 - 2257.

[6] USLU G, DURSUN A, EKIZ H, et al. The effect of Cd (II), Pb (II) and Cu (II) ions on the growth and bioaccumulation properties of *Rhizopus arrhizus* [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 39: 105 - 110.

[7] XIN Baoping, CHEN Gang, ZHENG Wenchai. Bioaccumulation of Cu-complex reactive dye by growing pellets of

*Penicillium oxalicum* and its mechanism [J]. *Water Research*, 2010, 44: 3565 - 3572.

- [8] AHMED M, MALIK A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater [J]. *Bacteriology Journal*, 2012, 2: 12 - 21.
- [9] TASTAN B E, ERTUGRUL S, DONMEZ G. Effective bioremoval of reactive dye and heavy metals by *Aspergillus versicolor* [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(3): 870 - 876.
- [10] WEI Gehong, FAN Lianmei, ZHU Wenfei, et al. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWR33 - 2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 162 (1): 50 - 56.
- [11] JOSHI P K, SWARUP A, MAHESHWARI S, et al. Bioremediation of heavy metals in liquid media through fungi isolated from contaminated sources [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2011, 51: 482 - 487.
- [12] 李文学, 陈同斌. 超富集植物吸收富集重金属的生理和分子生物学机制 [J]. *应用生态学报*, 2003, 14(4): 627 - 631.
- [13] 黄梅香, 胡谷平, 陈彬, 等. 大花绿绒蒿内生真菌 *Neurospora* sp. DHLRH-F 次级代谢产物研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2016, 55 (2): 81 - 84.
- [14] IDRIS R, TRIFONOVA R, PUSCHENREITER M, et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 2667 - 2677.
- [15] 姜敏, 曹理想, 张仁铎. 重金属抗性内生真菌与其宿主植物重金属抗性关系初探 [J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26 (6): 2038 - 2042.
- [16] 邓祖军, 曹理想, 周世宁. 红树林内生真菌的分离及代谢产物生物活性的初步研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2010, 49(2): 100 - 104.
- [17] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 9 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 5 - 201.
- [18] 邓祖军, 曹理想, 陆勇军, 等. 红树林植物桐花树内生真菌主要无孢类群的分子鉴定 [J]. *海洋学报*, 2010, 32(2): 161 - 167.
- [19] DENG Zujun, ZHANG Renduo, SHI Yang, et al. Characterization of Cd -, Pb -, Zn-resistant endophytic *Lasiodiplodia* sp. MXSF31 from metal accumulating *Portulaca oleracea* and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21: 2346 - 2357.

- [20] YAN G, VIRARAGHAVAN T. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii* [J]. Water Research, 2003, 37: 4486 – 4496.
- [21] CHEN Wenming, WU C, JAMES E, et al. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 151: 364 – 371.
- [22] DURSUN A Y. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper (II) and lead (II) ions onto pretreated *Aspergillus niger* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 28: 187 – 195.
- [23] PASAVANT P, APIRATIKUL R, SUNGKHUN V, et al. Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera* [J]. Bioresource Technology, 2006, 97: 2321 – 2329.
- [24] SHAKER M. Thermodynamic profile of some heavy metal ions adsorption onto biomaterial surfaces [J]. American Journal of Applied Sciences, 2007, 4: 605 – 612.
- [25] LESAGE E, MUNDIA C, ROUSSEAU D, et al. Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* L [J]. Ecological Engineering, 2007, 30: 320 – 325.
- [26] XIAO Xiao, LUO Shenglian, ZENG Guangming, et al. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L [J]. Bioresource Technology, 2010, 161 (6): 1668 – 1674.
- [27] CONGEEVARAM S, DHANARANI S, PARK J. Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates [J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 146 (1/2): 270 – 277.
- [28] MALIK A. Metal bioremediation through growing cells [J]. Environment International, 2004, 30: 261 – 278.
- [29] PAN Rong, CAO Lixiang, ZHANG Renduo. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19 [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 171: 761 – 766.
- [30] MOORE B, DUNCAN J, BURGESS J. Fungal bioaccumulation of copper, nickel, gold and platinum [J]. Minerals Engineering, 2008, 21: 55 – 60.
- [31] VELASQUEZ L, DUSSAN J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 167: 713 – 716.
- [32] RAMIREZ M, DIAZ C, VARGAS E, et al. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds [J]. Biometals, 2008, 21: 321 – 332.
- [33] PEREZ-RAMA M, ALONOSO J, LOPEZ C, et al. Cadmium removal by living cells of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* [J]. Bioresource Technology, 2002, 84: 265 – 270.
- [34] DENG Zujun, CAO Lixiang, HUANG Haiwei, et al. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil [J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185: 717 – 724.
- [35] 季秀玲, 魏云林, 林连兵. 细菌抗生素和重金属协同选择抗性机制研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010, 5: 65 – 69.
- [36] SHENG Xiafang, XIA Juanjuan, JIANG Chunyu, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape [J]. Environmental Pollution, 2008, 156: 1164 – 1170.
- [37] WRIGHT M S, PELTIER G L, STEPANAUSKAS R, et al. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 58: 293 – 302.
- [38] RYAN R, GERMAINE K, FRANKS A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278: 1 – 9.
- [39] WANG Wenfeng, DENG Zujun, TAN Hongming, et al. Effects of Cd, Pb, Zn, Cu-resistant endophytic *Enterobacter* sp. CBSB1 and *Rhodotorula* Sp. CBSB79 on the growth and phytoextraction of *Brassica* plants in multimedial contaminated soils [J]. International Journal of Phytoremediation, 2013, 15(5): 488 – 497.