

一株耐镉真菌的鉴定及其吸附性研究

田康欣^{1*}, 黄建伟¹, 彭梦婷¹, 李翰霖¹, 晁夫奎², 施 娴^{1#}

¹红河学院生物科学与农学学院, 云南 蒙自

²徐州新盛绿源循环经济产业投资发展有限公司, 江苏 徐州

Email: 1228994786@qq.com, #shixiang841123@163.com

收稿日期: 2021年5月7日; 录用日期: 2021年6月4日; 发布日期: 2021年6月16日

摘 要

目的: 以采于个旧市老厂尾矿区周边土壤中筛选出的一株耐镉菌株(编号: IS0675-1)为试验材料, 对该菌株进行初步鉴定和吸附性研究。方法: 采用形态学观察、系统发育学分析对该菌株进行初步鉴定, 并探究菌株在温度、重金属浓度、菌量、pH梯度下对重金属的吸附特性。结果: 耐镉菌株(IS0675-1)初步鉴定属于枝孢属(*Cladosporium*), 温度为40℃, pH = 6, Cd²⁺浓度为50 mg/L, 菌量0.3 g时IS0675-1菌株吸附重金属镉(Cd²⁺)的整体效果最佳。

关键词

耐镉菌株, 鉴定, 吸附性

Identification and Biosorption Characteristics of a Cadmium Resistant Fungus

Kangxin Tian^{1*}, Jianwei Huang¹, Mengting Peng¹, Hanlin Li¹, Fukui Chao², Xian Shi^{1#}

¹College of Biological and Agricultural Sciences, Honghe University, Mengzi Yunnan

²Xuzhou Xinheng Lvyuan Cyclic Economy Investment & Development Co., Ltd., Xuzhou Jiangsu

Email: 1228994786@qq.com, #shixiang841123@163.com

Received: May 7th, 2021; accepted: Jun. 4th, 2021; published: Jun. 16th, 2021

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

Objective: A cadmium tolerant strain (IS0675-1) was isolated from the surrounding soil of Laochang tailings area in Gejiu City. The strain was preliminarily identified and its adsorption capacity was studied. **Methods:** Morphological observation and phylogenetic analysis were used to preliminarily identify the strain, and to explore the adsorption characteristics of the strain under temperature, heavy metal concentration, bacterial biomass and pH gradient. **Results:** The results showed that the cadmium tolerant strain (IS0675-1) belonged to *Cladosporium*. When the temperature was 40°C, pH = 6, the concentration of Cd²⁺ was 50 mg/L, and the amount of strain was 0.3 g, the overall adsorption effect of IS0675-1 was the best.

Keywords

Cadmium Tolerant Strain, Identification, Biosorption Characteristics

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在开发矿产资源的同时,伴随着重金属对土壤、地下水、环境及农作物的影响[1]。部分文献资料[2][3][4]表明,矿区周围土壤中重金属污染严重。镉(Cd)、砷(As)、铅(Pb)和铬(Cr)等重金属元素在矿区周围的土壤中均出现富集的现象。重金属镉(Cd)具有较强的迁移能力,矿产资源开采的过程中产生的废矿、废渣中的镉可直接或间接的向周围的土壤和地下水等周围环境中迁移扩散[5]。采矿之后的矿区废弃地不仅占用大量的土地资源,还对周围的植被造成了破坏,且土壤理化性质差,植物难以生长[6]。在进行土壤重金属污染修复时,需要充分考虑技术可行性、污染状况、施工周期和工程费用等因素[7][8]。土壤重金属污染修复技术中,生物修复技术治理效果好、操作简单、适用范围广、治理成本低廉,日益受到人们的重视[9]。微生物的抗性和解毒作用也被积极应用在环境保护中,来实现重金属污染土壤的修复,但同时也存在一定的局限性[10][11]。环境条件(如温度、pH、水分等)会对微生物的活性产生影响,并且受环境因素的影响较大。所以还需进一步进行对耐重金属菌株的生物特性以及吸附特性进行研究,对土壤修复提供比较实际的理论依据。本研究菌株来源于前期课题组成员通过平板划线法筛选一株能耐受 500 mg/L 镉(Cd²⁺)浓度的真菌(编号: IS0675-1),该菌株采集于个旧老厂尾矿区根际土壤,通过形态学特性、分子生物学方法鉴定菌种;同时探索不同温度、pH、Cd²⁺浓度、菌量条件下该菌株对重金属镉的吸附特性研究。为治理本地重金属镉污染土壤提供优质的菌株。

2. 材料与方法

2.1. 材料

菌株来源于前期课题组筛选出的一株耐镉菌株(编号: IS0675-1),能耐受 Cd²⁺ 500 mg/L 浓度。菌株采集于个旧市老厂尾坝矿区根际土壤(北纬 23°15'56"~23°21'39",东经 103°07'28"~103°09'14")。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(g/L): 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18.0 g,水 1 L。硝酸镉(天津市复精细化研究所生产,分析纯)。ICP-OES 分析仪(美国 perkinelmer 公司, optima 8000)。

2.2. 方法

2.2.1. 耐镉菌株纯化

将前期课题组挑选出的耐镉能力强的 IS0675-1 在平板上划线转接 3 次以上进行菌株纯化[12]，并挑选长势好、菌落饱满的单菌接种到马铃薯培养基平板，进行下一步菌株鉴定和吸附性能研究。

2.2.2. 耐镉菌株的形态观察与鉴定

分离和纯化后获得的菌株接种到马铃薯培养基平板中央，28℃培养 10 d，观察菌落形态。同时，IS0675-1 菌株送上海生工生物工程有限公司测序。将序列进行 Blast 序列分析，确定各菌株边缘种及相似性。使用 MEGA 5.2 软件构建系统发育树。

2.2.3. 耐镉菌株对镉吸附性能研究

在无茵的三角瓶中加入去离子水，采样单因素实验，选择不同温度、pH、重金属浓度、菌量，分别接种微生物菌丝，置于摇床培养，具体实验过程见表 1。实验结束后，用滤纸过滤菌丝，用 ICP-OES 测定溶液中残余的 Cd 的浓度，同时设置对照实验，三次重复。

Table 1. Biosorption experiment design

表 1. 吸附实验设计

序号	温度	pH	重金属含量(mg/L)	菌量	时间
1	20, 30, 40	6	100	0.2	12
2	30	4, 6, 8	100	0.2	12
3	30	6	50, 100, 200	0.2	12
4	30	6	100	0.1, 0.2, 0.3	12

2.2.4. 重金属镉吸附率

重金属吸附率 = (空白样品重金属浓度 - 实验样品残留浓度) / 空白样品重金属浓度 × 100%。

2.3. 数据处理

实验数据采用 Excel 2013 分析，利用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 检验多重比较(P < 0.05)，结果以平均值 ± 标准差表示。

3. 结果与分析

3.1. 菌株的形态观察

由图 1 可以看出，IS0675-1 菌株菌落呈褐绿色凸点状，外部及边缘菌丝呈白色绒毛状，较为致密；菌落呈凸起状，圆形向四周扩散；铺散在培养基表面，从中央向四周发散，菌落背面呈现墨绿色。菌丝有分隔，分生孢子梗直立，分身孢子呈椭圆形或者梭型，初步鉴定为暗色孢科。IS0675-2 菌株的菌落成乳白色绒毛状，多呈现圆形点状分布，四周相对整齐，白色菌丝紧贴平板上。菌丝并未有发现明显的孢子的迹象。

3.2. 菌株的鉴定

将筛选出的 IS0675-1 菌株送上海生工生物工程有限公司测序。通过 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽取试剂盒提取菌株 DNA，进行 PCR 扩增，基因测序结果显示 IS0675-1 菌株的长度约为 525 bp (见图 2)。使

用核糖体数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)在线对比分析, 结果显示 IS0675-1 菌株与其系列同源性高的菌株有 10 株, 同源性都达到了 100%。登录号分别为 MK813961.1, MK813962.1, MK813959.1, MN077441.1, MN128233.1, MK355726.1, MN186996.1, MN186740.1, MK780233.1, MN696552.1。结合 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线分析以及图 3 系统发育树分析, 初步鉴定 IS0675-1 菌株属于枝孢菌属(*Cladosporium*)。



Figure 1. Colony morphology
图 1. 菌株菌落形态

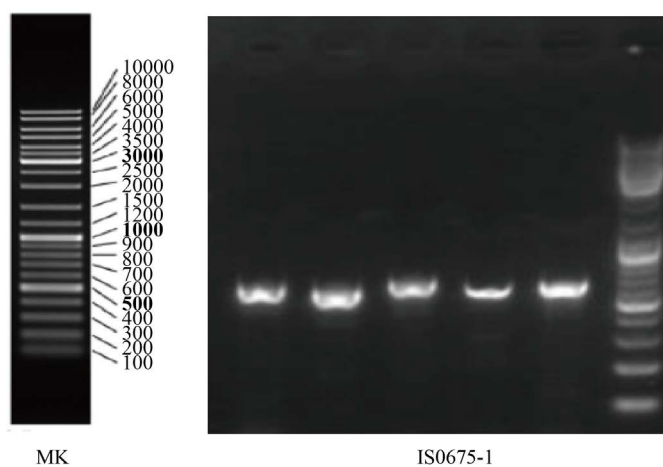


Figure 2. Results of PCR amplification
图 2. PCR 扩增结果

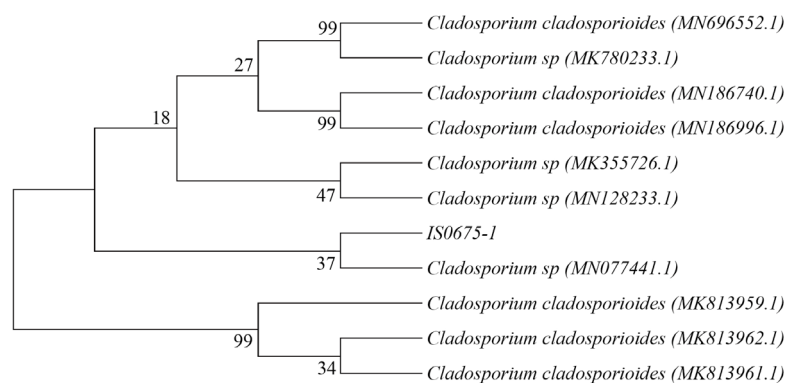


Figure 3. Phylogenetic tree of IS0675-1
图 3. IS0675-1 系统发育树

3.3. 耐镉菌株的吸附特性研究

3.3.1. 温度

由图 4 可知, 菌株 IS0675-1 在不同的温度下, 对重金属镉(Cd^{2+})的吸附特性具有一定影响, 随温度增加表现出增加趋势, 各处理表现各异。其中, 40℃处理下最大达 72.2%, 其次 30℃达 65.85%, 最少的处理为 20℃达 65.75%, 40℃处理下吸附率比 30℃, 20℃分别高出 6.35%、6.45%, 但各处理之间未达显著差异。

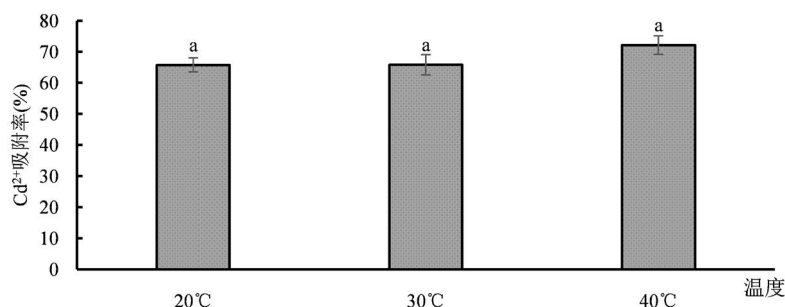


Figure 4. Effect of temperature on the adsorption rate of IS0675-1 strain

图 4. 温度对 IS0675-1 菌株吸附率影响

3.3.2. pH

由图 5 可知, 菌株在不同的 pH 处理下表现出的吸附率也不相同。pH6 的处理下 IS0675-1 菌株的吸附率最大达 68.85%, 其次为 pH8 处理吸附率为 62.6%, pH4 处理下菌株的吸附率最低, 只有 58.65%。pH 对 IS0675-2 菌株的吸附率存在很大的影响, 其吸附曲线与 pH 有一定的相关性。在 pH 在 4~8 的范围时, 随着 pH 的增加吸附率逐渐增加。pH 值为 4、6、8 的吸附率分别达到 67.9%、82.6%、79.6%, 以 pH = 8 的吸附效果较好。

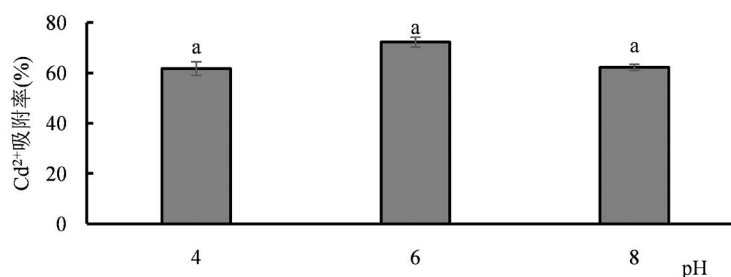


Figure 5. Effect of pH on the adsorption rate of IS0675-1 strain

图 5. pH 对 IS0675-1 菌株吸附率影响

3.3.3. 重金属浓度

由图 6 可知, 菌株对 Cd^{2+} 的吸附率随重金属浓度的增加, 表现出减少的趋势。50 mg/l 处理下菌株吸附率最大为 89.6%, 其次 100 mg/l 处理下菌株的吸附率为 46.53%, 200 mg/l 处理下吸附率最低仅为 46.53%。经过方差分析, 发现 50 mg/L 处理与 100 mg/L 和 200 mg/L 处理达显著差异。100 mg/L 处理和 200 mg/L 处理达显著差异。

3.3.4. 菌量

由图 7 可知, 不同菌量的菌株 IS0675-1 对重金属镉的吸附量也不同, 在一定的菌量范围内, 该菌株

的吸附率随着菌量增加而升高。菌量 0.3 g 处理下菌株对重金属镉(Cd^{2+})的吸附率最大达到 76.4%，0.2 g 菌量的吸附率为 67.28%，菌量为 0.1 g 处理下的吸附率最低仅 56.55%。菌量 0.3 g 处理下吸附率比菌量为 0.1 g 时高出 19.85%，比 0.2 g 菌量高出 9.12%。

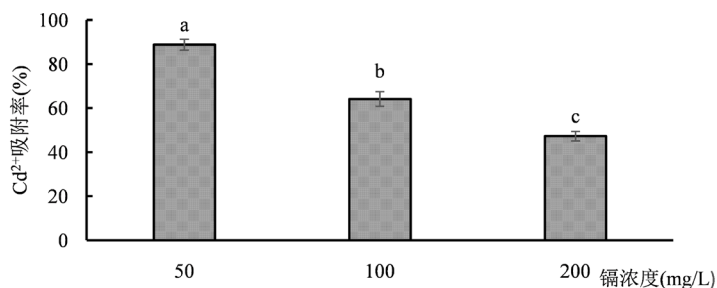


Figure 6. Effect of heavy metal concentration on adsorption rate of strain IS0675-1

图 6. 重金属浓度对 IS0675-1 菌株吸附率影响

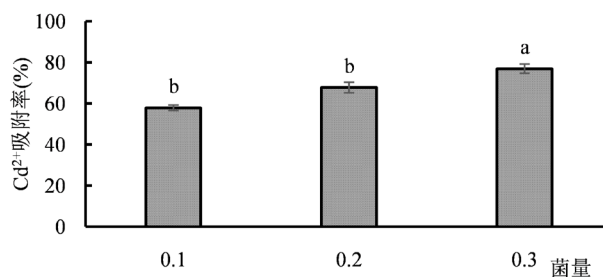


Figure 7. The effect of the amount of bacteria on the adsorption rate of IS0675-1 strain

图 7. 菌量对 IS0675-1 菌株吸附率影响

4. 讨论与结论

本研究采用来自于前期在个旧市老厂尾坝矿区土壤中筛选出的一株耐镉菌株编号：IS0675-1，经初步分析鉴定，鉴定出该菌株为枝孢菌属，属于半知菌亚门。前人关于半知菌亚门其他属的研究还有很多，如马连营等[13]从粤东北梅州市梅县尾矿废弃地分离出的一株耐镉(Cd^{2+})浓度 15 mmol/L 以上的真菌菌株 6~20 p，经鉴定为淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus* Samson)。胡南[14]等人从博落回根部土壤筛选出的一株耐镉真菌 A-2，属于镰刀菌属(*Fusarium* sp.)，魏本杰[15]从株洲冶炼厂分离出一株耐镉真菌属于拟青霉属(*Paecilomyces lilacinus* M1)，它能在 40 mmol/L 的液体培养基中生长；本次实验经筛选鉴定发现了新的耐重金属镉的枝孢菌属，目前还没有枝孢菌属修复重金属土壤的相关研究，为治理重金属镉污染土壤提供了新的菌株。

真菌对重金属的吸附能力受温度、pH、重金属浓度、菌量等多因素的影响。马连营等[13]从粤东北梅州市梅县尾矿废弃地分离出的真菌菌株 6~20 p 拟青霉属(*Paecilomyces lilacinus*)，温度为 30℃时吸附率最佳为 56.6%，pH 增大到 3.5 时菌体对重金属镉(Cd^{2+})吸附率最佳去除率为 56.3%，同时包括时间条件的对比，108 h 时达到最佳吸附率 56.8%。刘云国[16]等利用筒青霉(*Penicillium simplicissimum*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)吸附镉(Cd^{2+})的最佳 pH 值为 5，本次试验中最佳 pH 与以上试验中最佳的 pH 相比有较大差距，可能是由于菌株本身对 pH 的耐受性不同造成的最佳 pH 的不同。本实验中菌株 IS0675-1 的重金属吸附能力受重金属浓度的影响最为明显，当环境重金属的浓度较低时，如 50 mg/l 时菌株的吸附能力达

到了本次实验中的最佳值 89.6%，200 mg/L 时吸附能力大幅度的降低仅有 46.53%，达到本实验中吸附率的最低值。研究以上的因素对重金属吸附的影响，对优化菌株的吸附条件提高其吸附能力有重要意义，也将有利于菌株的合理利用。综上所述，温度为 40℃，pH = 6，Cd²⁺ 50 mg/L，菌量 0.3 g 时为 IS0675-1 菌株吸附重金属镉(Cd²⁺)的整体最佳条件。不同菌量和温度对重金属镉的吸附量也不同，在一定的菌量和温度范围内，随菌量与温度升高，菌株对重金属镉(Cd²⁺)的吸附率呈现增加的趋势。

基金项目

云南省地方本科高校联合基金专项项目——青年项目(矿区重金属复合污染土壤中菌肥 - 土壤 - 玉米协同修复机理研究 2018FH001-115)，红河学院大学生创新创业训练计划项目(DCXL190029)。

参考文献

- [1] 杨凯. 多金属矿区土壤重金属污染状况及生态环境治理的紧迫性问题研究[J]. 中国金属通报, 2019(5): 286-288.
- [2] 刘记. 四川省主要矿山地质环境特征及其影响评价[D]: [博士学位论文]. 成都: 成都理工大学, 2016.
- [3] 耿印印, 王旭梅, 王红旗, 等. 污染土壤中耐镉菌株的筛选、鉴定及吸附试验研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(11): 59-65.
- [4] 杨蕾. 我国土壤重金属污染的来源、现状、特点及治理技术[J]. 中国资源综合利用, 2018, 36(2): 151-153.
- [5] 赵蒙. 露天矿区雨水管(沟)沉积物重金属迁移分析与生态风险评价[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 南昌工程学院, 2019.
- [6] 沈乾杰, 刘品桢, 杜启露, 等. 废弃铅锌矿区复耕后土壤-作物重金属污染特征及修复措施[J]. 水土保持通报, 2019, 39(5): 223-230
- [7] 陈俊清. 重金属污染土壤修复技术及工程应用[J]. 工程技术研究, 2019, 4(18): 239-240.
- [8] 陈亮妹, 马友华, 王陈丝丝, 等. 不同污染程度农田土壤重金属修复技术研究[J]. 中国农学通报, 2016, 32(32): 94-99.
- [9] 唐浩, 朱江, 黄沈发, 等. 蚯蚓在土壤重金属污染及其修复中的应用研究进展[J]. 土壤, 2013, 45(1): 17-25.
- [10] 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究[J]. 应用生态学报, 2002(2): 239-242.
- [11] 杨萌, 孙叶芳, 邢海, 等. 微生物修复土壤重金属污染的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(9): 1509-1514.
- [12] 咸洪泉, 郭立忠. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010.
- [13] 马连营, 隆美容, 冯广达, 等. 耐镉真菌 *Paecilomyces lilacinus* 6-20p 对 Cd²⁺ 的吸附特性研究[J]. 生物技术进展, 2017, 7(3): 241-246.
- [14] 胡南, 陈思羽, 胡劲松, 等. 一株耐铊镉真菌菌株的筛选及其耐铊镉特性的研究[J]. 南华大学学报(自然科学版), 2019, 33(2): 16-21.
- [15] 魏本杰, 曾晓希, 刘志成, 等. 产铁载体菌的筛选鉴定及活化镉的性能探究[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(11): 26-31.
- [16] Liu, Y.-G., Li, T.-T., Zeng, G.-M., et al. (2016) Removal of Pb(II) from Aqueous Solution by Magnetic Humic Acid/Chitosan Composites. *Journal of Central South University*, 23, 2809-2817. <https://doi.org/10.1007/s11771-016-3344-1>