

耐铜菌株的筛选及其对铜的去除特性

谢丽坤^{1,2,3}, 王景安^{1,2*}, 宋正国³, 刘仲齐³

(1.天津师范大学生命科学学院, 天津 300387; 2.天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387; 3.农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘 要:采用稀释平板法, 从铜污染红壤中分离得到 2 株耐铜真菌。对菌株的形态和 ITS 基因序列同源性进行分析。结果表明: 2 株真菌分别为淡紫色拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)和土曲霉(*Aspergillus terreus*), 最高可耐受铜浓度均为 300 mg/L。在 Cu^{2+} 质量浓度为 10 mg/L 的培养基中添加 10 g/L 湿菌, 在 pH 5、25 °C、120 r/min 条件下振荡吸附 30 min 后, *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 对 Cu^{2+} 的吸附率分别达 85.45% 和 87.54%。

关 键 词:耐铜真菌; 淡紫色拟青霉; 土曲霉

中图分类号: Q939.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0670-05

Screening of copper tolerance fungi strains and their characteristics for copper removal

XIE Li-kun^{1,2,3}, WANG Jing-an^{1,2*}, SONG Zheng-guo³, LIU Zhong-qi³

(1.Life of Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2.Key Laboratory of Animal and Plant Resistance in Tianjin, Tianjin 300387, China; 3.Agro-Environmental Protection Institute, Tianjin 300191, China)

Abstract: Two fungi strains with resistance to copper were isolated from red soil polluted by copper based on dilution plate method. The results from both morphology observation and ITS sequence analysis showed that the two fungi strains were *Paecilomyces lilacinus* and *Aspergillus terreus*. They both could endure copper concentration 300 mg/L at most. By added 10 g/L fungi strains into pH 5, temperature 25 °C culture medium with 10 mg/L Cu^{2+} and oscillated for 30 min with 120 r/min frequency, the removal rate of Cu^{2+} by *P. lilacinus* and *A. terreus* were 85.45% and 87.54%, respectively.

Key words: copper resistance fungi; *Paecilomyces lilacinus*; *Aspergillus terreus*

铜是生物生长发育必需的元素之一, 其生理功能主要是作为酶的组成成分, 直接参与生物体内代谢^[1]。近年来, 过量的铜被排放到环境中, 已对生物造成了严重威胁。土壤、水体的铜污染主要来自于工业“三废”的排放, 城市生活垃圾及污水、污泥农用, 含铜农药、化肥的施用等^[2], 土壤、水体中铜超标会导致植物黄萎病、人体坏死性肝炎和溶血性贫血^[3]等。目前, 国内外主要采用化学沉淀法、氧化还原法、离子交换法^[4]处理含铜等重金属的废

水, 成本较高, 尤其是对铜等重金属含量相对较低废水进行处理的效率低, 去除效果不理想^[5], 因此, 需要一种方便、快捷、去除效果更好的技术来解决铜等重金属给水体带来的污染。生物吸附是利用生物吸附剂从水中吸附某种离子或其他分子, 从而达到去除效果^[6]。微生物易获得, 且成本低, 因此, 利用微生物作为吸附剂去除重金属具有广阔的应用前景。目前的生物吸附材料主要为细菌^[7-9]、酵母^[10-12]、海藻^[13]、真菌等。从重金属污染土壤中分

收稿日期: 2013-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(41071217; 30900924)

作者简介: 谢丽坤(1989—), 女, 河北任丘人, 硕士研究生, 主要从事微生物筛选和吸附研究, xielikun0422@163.com; *通信作者, jinganwang899@126.com

离的微生物因受到生存环境中重金属离子的胁迫而对重金属产生了一定的耐受性^[14]。目前关于耐性微生物作为吸附剂方面的研究尚少。单一铜污染的农田土壤并不多见,大多农田土壤为重金属复合污染,所以,筛选单一耐铜微生物的难度较大。笔者从人工铜污染土壤中筛选出了具有高耐铜性的真菌菌株,通过测定 ITS 基因序列对分离到的真菌进行鉴定,并对其耐铜潜力和吸附性能进行研究,旨在为利用耐性真菌缓解和治理铜污染水体提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

土壤采自湖南祁阳中国农业科学院红壤试验站(N 26°45', E 111°52')无污染农田 0~20 cm 耕层。在红壤中加入硝酸铜溶液(由优级纯 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 配制),使土壤中铜含量达到 100 mg/kg,平衡培养 7 周后备用^[15]。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基组分:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 5 g/L, NaCl 5 g/L,琼脂 15 g/L。培养基 pH 为 7.0。

改良高氏 1 号琼脂培养基组分:可溶性淀粉 20 g/L, KNO_3 1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L,琼脂 15 g/L。培养基 pH 自然。

马丁氏琼脂培养基(筛选培养基)组分:葡萄糖 10 g/L,蛋白胨 5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L,琼脂 15 g/L。培养基 pH 自然。为了有效抑制细菌和放线菌生长,另添加 1%孟加拉红水溶液 3.3 mL/L 和 1%链霉素 3 mL/L^[16]。

液体培养基的成分除了没有添加琼脂外,其他成分与固体培养基相同。

接种前灭菌。灭菌条件为 1×10^5 Pa, 30 min。

1.2 菌株的筛选

1.2.1 耐铜菌株的筛选

将 10 g 新鲜土样装入含有玻璃珠和 90 mL 无菌水的三角瓶中,于摇床振荡,制成土壤悬液,静置,取上清液,在 Cu^{2+} 质量浓度分别为 50、100、200 mg/L 的培养基上涂布,30 °C 培养 24 h,挑选出能适应含高浓度 Cu^{2+} 的菌株。对初筛得到的菌株分离、纯化,

筛选出耐受性较强的菌株进行培养,保存。

1.2.2 菌悬液制备

在无菌条件下,取菌体孢子 5 g,接入装有 200 mL 无菌水的锥形瓶中,于 28 °C、120 r/min 振荡 2 h,于 4 °C 冰箱中保存,备用。

1.2.3 菌株的生长量测定和抗性试验

将 1 mL 孢子液接入 100 mL 液体培养基中,于 28 °C、120 r/min 振荡培养 7 d,每天定时取样,用重量法测定菌种的生长量。

生长量测定方法:将离心洗涤后的菌体放在已知质量的培养皿或烧杯内,于 80 °C 烘干至恒重,取出放入干燥器内冷却,再称取质量,绘制生长曲线。每个处理设 3 个平行。

菌株抗性试验方法:将 1 mL 孢子液接入 Cu^{2+} 质量浓度 0~800 mg/L 的液体培养基中,于 28 °C、120 r/min 振荡培养 7 d,用质量法测定菌种的生长量,确定最低抑菌浓度。每个处理设 3 个平行。

1.3 ITS 基因序列测定和鉴定

取适量新鲜菌体溶于 50 μL 裂解液中,于 80 °C 变性 15 min 后,吸取 1 μL 作为模板,采用真菌 18S rRNA 通用引物 ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS 86(5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC-3')^[17]。引物由上海生工生物工程有限公司合成。此对引物用于扩增分离得到的菌株的 rDNA 内转录间隔区(ITS II 区)。该区域通用性强,种属特异性高^[17]。采用 Ex Tag(TaKaRa)进行 PCR 反应。反应条件:95 °C 预变性 1 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物 -20 °C 保存。测序由上海生工生物工程有限公司完成。将待测序列提交到 NCBI 数据库,应用 BLAST 程序将其与数据库中已有的基因序列进行比对,获得相似性高的序列,进行同源性比对^[18-19]。

1.4 不同接触时间和不同 Cu^{2+} 浓度下菌株去除铜效率的试验

移取新鲜菌液到离心管中,离心 5 min,弃上清液;按 10 g/L 加入湿菌到含 Cu^{2+} 5、10、20、50、

100 mg/L 的溶液中, 25 °C、120 r/min 恒温振荡, 以不加菌的溶液为对照。分别在 15、30、60、120、180 min 取样, 离心, 取上清液, 采用原子吸收光谱仪(AAS ZEE nit700)测定待测液中的 Cu^{2+} 浓度。

$$R = (C_0 - C_t)/C_0, E = (C_0 - C_t)V/M_0$$

其中: R 为去除率; C_0 为吸附前溶液中的 Cu^{2+} 浓度, C_t 为吸附后 t 时刻溶液中的 Cu^{2+} 浓度; E 为生物单位吸附量; V 表示吸附体系的体积; M 表示菌体干质量。

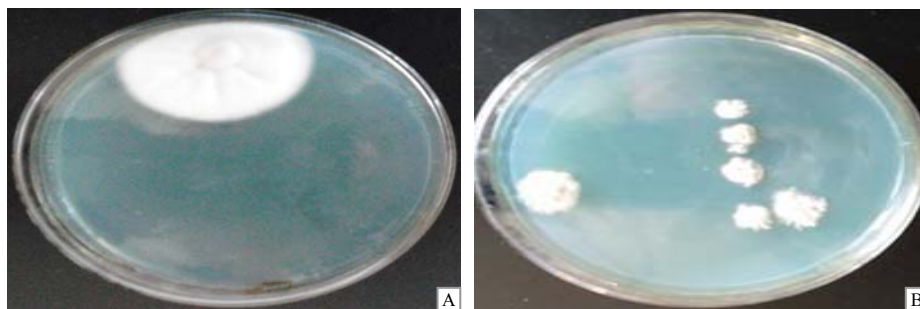


图 1 耐铜菌株 XB(A)和 XH(B)

Fig.1 Copper resistance fungi strains XB(A) and XH(B)

2.2 耐铜菌株的 ITS 基因序列测定和鉴定结果

将真菌 XB 和 XH 的 PCR 产物进行电泳检测, 发现其片段均约为 300 bp。将 XB 和 XH 的基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 比较, 选出数据库中具有代表性的几株菌株序列构建系统发育树。结果表明, XB 与 *Paecilomyces lilacinus* 基因序列具有 99%(最大)的同源性, XH 与 *Aspergillus terreus* 基因序列具有 99%(最大)的同源性, 因此, 菌株 XB 被鉴定为 *Paecilomyces lilacinus* (淡紫色拟青霉), 菌株 XH 被鉴定为 *Aspergillus terreus* (土曲霉)。

2 结果与分析

2.1 耐铜菌株的筛选结果

在含铜培养基(铜质量浓度为 200 mg/L)中筛选到 2 株真菌, 分别命名为 XB 和 XH。XB 菌丝体疏松(图 1-A), 菌落略成淡紫色, 产生孢子的小梗细长, 顶端稍尖; XH 菌落呈土褐色, 中心略凸起, 有放射状沟纹(图 1-B)。与真菌鉴定标准^[20]进行比对, 初步鉴定 XB 和 XH 分别隶属于青霉属和曲霉属。

2.3 耐铜真菌的生长特性和耐铜潜力

在马丁氏液体培养基振荡培养 7 d, *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 的生长曲线如图 2-A, 2 株真菌的生长曲线均呈“S”型。第 1 天时, *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 的生物量几乎没变化, 说明其在新环境中生长有一个适应过程; *P. lilacinus* 生长较快, 第 4 天时其生物量最大, 达 0.28 g/(100 mL), 而 *A. terreus* 生长相对较慢, 第 6 天时生物量最大, 达 0.19 g/(100 mL); *P. lilacinus* 在第 4 天后生长量变小, 而 *A. terreus* 在第 6 天后仍维持稳定的生物量。

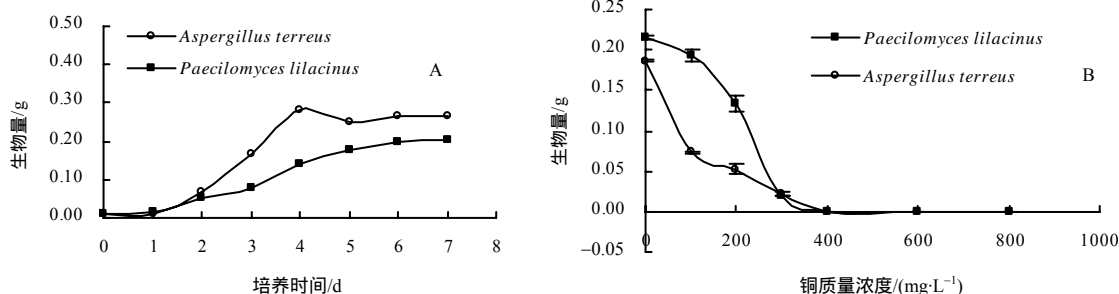


图 2 *Paecilomyces lilacinus* 和 *A. terreus* 的生长曲线(A)和抗性生长曲线(B)

Fig.2 Growth curve (A) and the resistance growth curve (B) of *Paecilomyces lilacinus* and *A. terreus*

从图 2-B 可以看出, 受不同 Cu^{2+} 浓度的胁迫后, 菌株 *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 的生长会受到不同程度的抑制。当 Cu^{2+} 质量浓度为 100 mg/L 时, *P. lilacinus* 表现出一定的耐受性, 生物量并没有显著减少, 而

A. terreus 的生长明显受到抑制, 生物量急剧下降; 当 Cu^{2+} 质量浓度为 200 mg/L 时, *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 呈现出相应的耐受性, 但其生物量依然下降; 当 Cu^{2+} 质量浓度为 300 mg/L 时, *P. lilacinus*

和 *A. terreus* 受到了严重抑制。用平板划线法发现，*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 在 Cu^{2+} 质量浓度为 300 mg/L 时依然有菌落出现；随着 Cu^{2+} 浓度继续增加，菌落不再出现，因此，300 mg/L 是 *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 的最高耐 Cu^{2+} 浓度。

2.4 平衡时间与 Cu^{2+} 初始浓度对菌株去除铜效率的影响

P. lilacinus 和 *A. terreus* 对 Cu^{2+} 具有较强的耐

性，且在其生长过程中表现出对 Cu^{2+} 的吸附能力。*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 对 Cu^{2+} 的去除效果见表 1 和表 2。当 Cu^{2+} 质量浓度为 5 mg/L 时，*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 对 Cu^{2+} 的去除率达 80% 以上。随着 Cu^{2+} 质量浓度增加，去除率呈下降趋势。从表 1、表 2 中还可以看出，*P. Lilacinus* 和 *A. terreus* 在 30 min 后对 Cu^{2+} 的去除率下降。这可能是 Cu^{2+} 胁迫使菌株因生理结构受到破坏而死亡。

表 1 不同平衡时间下 *Paecilomyces lilacinus* 对 Cu^{2+} 的去除率

平衡时间/min	去除率/%				
	5 mg/L Cu^{2+}	10 mg/L Cu^{2+}	20 mg/L Cu^{2+}	50 mg/L Cu^{2+}	100 mg/L Cu^{2+}
15	82.48	81.54	45.43	6.21	3.50
30	84.33	85.50	54.47	9.19	3.72
60	69.50	31.30	27.00	5.77	2.03
120	69.17	36.60	27.30	6.25	2.28
180	68.91	36.50	27.29	5.96	2.19

表 2 不同平衡时间下 *Aspergillus terreus* 对 Cu^{2+} 的去除率

平衡时间/min	去除率/%				
	5 mg/L Cu^{2+}	10 mg/L Cu^{2+}	20 mg/L Cu^{2+}	50 mg/L Cu^{2+}	100 mg/L Cu^{2+}
15	80.31	82.35	40.12	29.43	13.05
30	85.34	87.54	43.52	29.61	14.70
60	85.46	86.67	44.85	42.90	14.12
120	85.47	87.85	44.00	32.88	13.30
180	85.65	87.52	44.10	32.76	13.35

将 *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 吸附 Cu^{2+} 溶液 30 min 后的数据按公式进行计算，得到 2 株真菌的单位吸附量(图 3)。随着初始 Cu^{2+} 浓度的增加，*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 的单位吸附量也增加。

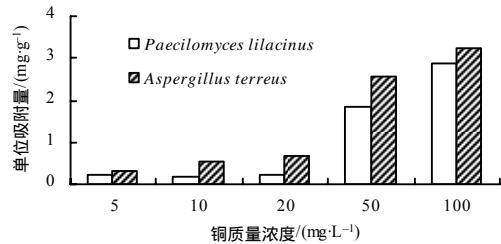


图 3 *Paecilomyces lilacinus* 和 *Aspergillus terreus* 对 Cu^{2+} 的单位吸附量

Fig.3 Unit adsorption capacity of Cu^{2+} by *Paecilomyces lilacinus* and *Aspergillus terreus*

3 结论与讨论

采用传统分离方法和现代鉴定技术，从人工

Cu^{2+} 污染的红壤中筛选到的耐铜真菌 *P. lilacinus* 和 *A. Terreus* 具有易培养、生长快、对 Cu^{2+} 的耐受性高的特点，耐 Cu^{2+} 质量浓度均为 300 mg/L。与黑曲霉对 Cu^{2+} 的耐受浓度 200 mg/L^[21] 相比，*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 耐 Cu^{2+} 能力更强，可以在更高 Cu^{2+} 浓度的环境中生存，可以作为有效治理环境铜污染的微生物菌株。

微生物作为生物吸附剂去除水环境中的重金属具有效率高、成本低的优点，所以，近年来已被广泛应用^[22-23]。本试验中从人工铜污染红壤中筛选出的真菌 *P. lilacinus* 和 *A. terreus* 对低浓度铜溶液有较好的去除效果，但对高浓度铜溶液中 Cu^{2+} 的去除率较低。该结果与生物适合从低污染浓度溶液中去除重金属的报道一致^[14]。这很可能是高浓度铜离子抑制了真菌细胞的生命活动，破坏了其细胞的生理结构^[9]。本试验中，*P. lilacinus* 和 *A. terreus* 对 Cu^{2+} 的

去除率与保留时间有关, 0~15 min 的去除率高达 80%以上, 而 15~30 min 的去除率只有 5%左右。研究^[1]表明, 活细胞对 Cu^{2+} 离子的吸附过程可能存在表面吸附机制和新陈代谢机制。细胞表面吸附为快速吸附, 一般出现在前 30 min; 新陈代谢吸附是比较缓慢的过程, 随着时间的延长, Cu^{2+} 可能透过胞壁进入胞内, 达到去除效果, 一般出现在吸附 30 min 后。从本试验结果看, 表面吸附时间的长短因材料不同而存在差异。

参考文献:

- [1] 李杰, 贺纪正, 马延和, 等. 生物耐铜的分子机理及铜污染环境的生物联合修复[J]. 生态学报, 2007, 27(6): 2615-2616.
- [2] Nur Liyana Iskandar, Nur Ain Izzati Mohd Zainudin, Soon Guan Tan. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(5): 824-830.
- [3] Patricia A Terry, Wendy Stone. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*[J]. Chemosphere, 2002, 47(3): 249-255.
- [4] Dugal S, Gangawane M. Metal tolerance and potential of *Penicillium* species for use in mycoremediation[J]. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2012, 4(5): 2362-2366.
- [5] Wang Jianlong, Chen Can. Biosorbents for heavy metals removal and their future[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(2): 195-226.
- [6] Volesky B. Biosorption and me[J]. Water Resource, 2007, 41(18): 4017-4029.
- [7] Bystrík Polek, Jana Godočíková. The effect of some factors of polluted environment on catalase responses and resistance of microbial isolates against toxic oxidative stress[J]. Current Microbiology, 2012, 65: 345-349.
- [8] 白洁琼, 尹华, 叶锦韶, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌对铜镉的吸附特性与离子交换[J]. 环境科学, 2013, 34(1): 217-225.
- [9] 周东琴, 魏德洲. 沟戈登氏菌对重金属的生物吸附——浮选和解吸性能[J]. 环境科学, 2006, 27(5): 960-964.
- [10] Yus Azila Yahaya, Mashitah Mat Don, Subhash Bhatia. Biosorption of copper (II) onto immobilized cells of *Pycnoporus sanguineus* from aqueous solution: Equilibrium and kinetic studies[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161: 189-195.
- [11] Peng Qingqing, Liu Yunguo, Zeng Guangming, et al. Biosorption of copper(II) by immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* on the surface of chitosan-coated magnetic nanoparticles from aqueous solution[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 177: 676-682.
- [12] Zhang Yunsong, Liu Weiguo, Xu Meng, et al. Study of the mechanisms of Cu^{2+} biosorption by ethanol/caustic-pretreated baker's yeast biomass[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 178: 1085-1093.
- [13] Karthikeyan S, Balasubramanian R, Iyer C S P. Evaluation of the marine algae *Ulva fasciata* and *Sargassum* sp. for the biosorption of Cu(II) from aqueous solutions[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2): 452-455.
- [14] 李慧芬, 林雁冰, 王娜娜, 等. 一株 Zn 抗性菌株的筛选鉴定及吸附条件优化[J]. 环境科学学报, 2010, 30(11): 2189-2196.
- [15] 宋正国, 于志红, 冯人伟, 等. 不同钝化材料对红壤中铜有效性的影响及机理[J]. 生态环境学报, 2012, 21(7): 1339-1344.
- [16] 姚槐应, 黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [17] Zheng Ke, Pan Jianwei, Ye Lan, et al. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals[J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 38-49.
- [18] Williams D W, Wilson M J, Lewis M A O, et al. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9): 2476-2479.
- [19] Monchy S, Sancier G, Jobard M, et al. Exploring and quantifying fungal diversity in freshwater lake ecosystems using rDNA cloning-sequencing and SSU tag pyrosequencing[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(6): 1433-1453.
- [20] 魏景超. 真菌鉴定手册[K]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 498, 505.
- [21] 樊霆, 周娜, 刘云国, 等. 黑曲霉对重金属 Cu(II) 和 Zn(II) 的抗性及其富集特性[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(9): 1836-1841.
- [22] Du Aixue, Cao Lixiang, Zhang Renduo, et al. Effects of a copper-resistant fungus on copper adsorption and chemical forms in soils[J]. Water Air Soil Pollution, 2009, 201: 99-107.
- [23] Chen Xincan, Wang Yuanpeng, Qi Lin, et al. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 46: 101-107.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库