

网络出版时间:2019-06-12 09:41 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.12.014  
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190612.0939.028.html

# 津田弯孢 C12 铅耐受性研究

张收霞, 楚文卉, 杨超, 刘莹, 冯欢, 谢清哲, 蒙盼盼, 王春燕

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】测定津田弯孢 C12(*Curvularia tsudae* C12)对重金属铅的耐受性,并分析相关的理化机制,为该菌在重金属环境污染治理中的应用提供理论基础,并丰富真菌重金属抗性机制理论。【方法】采用固、液两种培养方法,分别检测不同  $Pb^{2+}$  质量浓度(0, 200, 400, 800, 1 200, 1 600, 2 000 mg/L)胁迫下津田弯孢 C12 的生长状况,并依据菌丝体干质量计算铅对该菌的半效应浓度( $EC_{50}$ ),明确该菌对铅的耐受性;测定不同  $Pb^{2+}$  质量浓度胁迫下津田弯孢 C12 培养液的 pH 值和有机酸含量、菌丝体中的谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量,初步分析津田弯孢 C12 可能的铅耐受性机制。【结果】津田弯孢 C12 在所测  $Pb^{2+}$  质量浓度下均能生长,但相同  $Pb^{2+}$  质量浓度下液体培养的菌丝体干质量和  $EC_{50}$ (990.8 mg/L)均显著高于固体培养( $P < 0.05$ );铅胁迫下(200~2 000 mg/L),津田弯孢 C12 菌落直径、菌丝体干质量和培养液 pH 值均显著( $P < 0.05$ )低于不加铅(0 mg/L)的对照,而培养液中 4 种有机酸含量和有机酸总量及菌丝体内 GSH 含量均高于不加铅的对照,且草酸和柠檬酸含量显著( $P < 0.05$ )高于酒石酸和苹果酸。随培养基中  $Pb^{2+}$  质量浓度的增加,菌落直径和菌丝体干质量呈逐渐降低的趋势;草酸含量先升高后稳定,在  $Pb^{2+}$  质量浓度 800~2 000 mg/L 时达到最大;酒石酸、苹果酸、柠檬酸的含量和有机酸总量都呈先升高后降低并趋于平稳,在  $Pb^{2+}$  质量浓度 400~800 mg/L 时达到最大值;培养液 pH 则呈先降低后升高并稳定的趋势,  $Pb^{2+}$  质量浓度为 800 mg/L 时培养液 pH 值最低;菌丝体内 GSH 含量逐渐上升,低  $Pb^{2+}$  质量浓度(200~1 200 mg/L)下显著低于( $P < 0.05$ )高  $Pb^{2+}$  质量浓度(1 600~2 000 mg/L),而 MDA 含量则是先增加后降低再升高,但各个  $Pb^{2+}$  质量浓度下均无显著变化( $P > 0.05$ )。【结论】津田弯孢 C12 对重金属铅具有较高的耐受性,其在液体振荡培养条件下的生长状况和铅耐受性均明显优于固体培养,改变形态以增加吸附表面积、分泌黑色素、积累 GSH 和有机酸,尤其是草酸和柠檬酸,可能是该菌减轻重金属铅毒害、具有较高铅耐受性的潜在机制。

**【关键词】** 津田弯孢 C12; 重金属污染; 铅耐受性

**【中图分类号】** S718.81

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2019)12-0115-08

## Lead tolerance of *Curvularia tsudae* C12

ZHANG Shouxia, CHU Wenhui, YANG Chao, LIU Ying, FENG Huan,

XIE Qingzhe, MENG Panpan, WANG Chunyan

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 To provide premise and theoretical basis for application of *Curvularia tsudae* C12 in treatment of heavy metal environmental pollution and enrich theory of fungal heavy metal resistance mechanism, the tolerance of *Curvularia tsudae* C12 to heavy metal lead was determined and the related physiochemical mechanism was analyzed in this study. 【Method】 The growth statuses of *C. tsudae* C12 under different  $Pb^{2+}$  concentrations (0, 200, 400, 800, 1 200, 1 600 and 2 000 mg/L) were measured by both solid and liquid culture methods. The  $EC_{50}$  value of  $Pb^{2+}$  was calculated according to hyphal dry weight, pH

**【收稿日期】** 2018-11-02

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(31300543);西北农林科技大学基本科研创新一般项目(2452013QN108, 2452015343);西北农林科技大学引进人才科研启动费项目(Z111021204)

**【作者简介】** 张收霞(1993-),女,甘肃平凉人,在读硕士,主要从事森林微生物学研究。

**【通信作者】** 王春燕(1979-),女,河南漯河人,副教授,硕士生导师,主要从事森林微生物学研究。E-mail:chunyan@nwsuaf.edu.cn

value and organic acids concentration in liquid culture medium. The contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in liquid culture hyphae were also analyzed. 【Result】 *C. tsudae* C12 could grow under all tested  $Pb^{2+}$  concentrations, but the hyphal dry weights and  $Pb^{2+}$   $EC_{50}$  values (990.8 mg/L) in liquid culture condition were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than those in solid culture condition at same concentration. Under  $Pb^{2+}$  stress (200—2 000 mg/L), the colony diameter, hyphal dry weight and pH value of liquid culture medium were significantly ( $P < 0.05$ ) decreased compared to the control (0 mg/L), but the concentrations of organic acids in liquid culture medium and hyphal GSH were increased. The concentrations of oxalic acid and citric acid were significantly higher than tartaric acid and malic acid. With the increase of  $Pb^{2+}$  concentration in culture media, the hyphal color and morphological characteristics of *C. tsudae* C12 were varied and the colony diameter and hyphal dry weight were decreased gradually. The oxalic acid concentration was increased firstly and reached the maximum value under 800—2 000 mg/L, but the concentrations of tartaric acid, malic acid, citric acid and total organic acids increased firstly and then decreased with maximum values under 400—800 mg/L. The pH value of liquid culture medium decreased firstly and then increased with the lowest value under 800 mg/L. The hyphal GSH content was increased gradually and significantly lower ( $P < 0.05$ ) under low  $Pb^{2+}$  concentrations (200—1 200 mg/L) than under high  $Pb^{2+}$  concentrations (1 600—2 000 mg/L). The hyphal MDA content was increased firstly, then decreased and increased again without significant changes ( $P > 0.05$ ) under all concentrations. 【Conclusion】 *C. tsudae* C12 showed higher lead tolerance, especially under liquid culture condition. The morphological changes, secretion of melanin, and accumulation of hyphal GSH and organic acids, especially oxalic acid and citric acid, may be one of the potential mechanisms for *C. tsudae* C12 to reduce damage of lead.

**Key words:** *Curvularia tsudae* C12; heavy metal pollution; lead tolerance

随着我国工农业快速发展和人民生活、经济水平的提高,各种形态的重金属污染物伴随工业废水的排放和农药化肥的滥用以及重金属矿的开采和冶炼等源源不断的输入生态系统,造成严重的环境污染<sup>[1-2]</sup>。铅是最普遍的重金属污染物,但它不是植物生长所必需的元素。Pb 进入土壤后,不仅会污染环境、破坏植被、降低作物产量、打破生态系统的平衡,而且还可通过食物链在生物体内富集,对环境安全和人类健康构成极大的威胁<sup>[3]</sup>。我国污染农田土壤的铅含量较高,大型冶炼厂周围土壤铅含量甚至可高达 2 900 mg/kg<sup>[4]</sup>,远远高于《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准》(试行,2018)规定的污染土壤风险筛选值(70~240 mg/kg)。土壤中许多真菌对一些重金属离子具有较强的耐受性。研究表明,米曲霉(*Aspergillus oryzae*)能够耐受较高浓度的铅、锌胁迫<sup>[5]</sup>;低浓度(<150  $\mu\text{g/g}$ )钴、铜、锰等重金属离子可以促进黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的生长<sup>[6]</sup>;一些外生菌根真菌(ECMF)和深色有隔内生真菌(DSE)也表现出了较好的重金属铅耐受性<sup>[7]</sup>;抗氧化酶活性的提高、有机酸和谷胱甘肽(GSH)的积累等,可能是这些真菌具有较高重金属耐受性的一种潜在机制<sup>[8]</sup>。

弯孢属(*Curvularia*)真菌大多数是植物病原菌,国内外对其致病性已有大量的研究报道<sup>[9-11]</sup>,但关于其重金属耐受性的研究却鲜有报道。已有研究表明,津田弯孢 C12(*Curvularia tsudae* C12)具有很强的镉耐受性和吸附能力<sup>[12]</sup>。为了进一步探究该菌对其他重金属离子的耐受性,本研究采用固、液两种培养方法,通过分析不同质量浓度重金属铅离子胁迫下津田弯孢 C12 菌丝的生长状况,以及培养液中有有机酸含量、菌丝中丙二醛(MDA)和谷胱甘肽含量的变化,评价该菌对重金属铅的耐受性,并从生理水平上初步揭示该菌相关的耐受性机制,为该菌在重金属污染治理方面的应用提供理论支持,对污染环境微生物修复技术的开发和应用,以及全面揭示真菌的重金属抗性机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种活化

津田弯孢 C12(*Curvularia tsudae* C12),从渭河陕西省杨凌示范区段的芦苇根内分离、纯化得到,在 PDA 斜面上 4  $^{\circ}\text{C}$  保存于西北农林科技大学林学院森林微生物实验室。使用前将保存的菌种接种到新鲜的 PDA 平板上,25  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 5 d,用打孔器

( $d=5\text{ mm}$ ) 在生长旺盛的菌落边缘打取菌饼,用作后续试验的接种体。

## 1.2 硝酸铅母液的配制

精确称取 16 g 分析纯  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,用无菌(121  $^\circ\text{C}$ ,30 min)蒸馏水溶解并定容到 400 mL,配制成  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度为 25 mg/mL 的硝酸铅母液,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌后待用。

## 1.3 铅对津田弯孢 C12 生长的影响

1.3.1 固体培养 冷却到 60  $^\circ\text{C}$  左右的无菌(121  $^\circ\text{C}$ ,30 min)PDA 培养基中加入适量硝酸铅母液,振荡均匀后倒入无菌玻璃平板中,配制成不同  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度(0,400,800,1 200,1 600,2 000 mg/L)的 PDA 平板。分别挑取 1 个津田弯孢 C12 菌饼转接到不同  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度的 PDA 平板中央,25  $^\circ\text{C}$  暗培养 10 d 后观察菌落形态,采用十字交叉法<sup>[13]</sup>测量菌落直径,然后将培养好的玻璃平板放在微波炉中加热,待琼脂完全融化后收集菌丝体,用沸腾的去离子水冲洗 3 次,80  $^\circ\text{C}$  烘干至恒质量后称量其干质量。每处理 5 个重复。

1.3.2 液体培养 将 150 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基 PDB 装入 250 mL 的三角瓶中灭菌(121  $^\circ\text{C}$ ,30 min),冷却至室温后加入适量的  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  母液配制成不同  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度(0,400,800,1 200,1 600,2 000 mg/L)的液体培养基。每瓶液体培养基中接入 2 个津田弯孢 C12 菌饼,25  $^\circ\text{C}$ 、121 r/min 振荡培养 7 d 后观察菌丝体形态,用滤纸过滤后分别收集滤液和菌丝体。滤液用于 pH 值和有机酸含量的测定;菌丝体用去离子水冲洗 3 次后用滤纸去除多余水分,称取 1 g 新鲜菌丝体用于谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量测定,剩余菌丝体 80  $^\circ\text{C}$  烘干至恒质量后称量干质量。为了明确津田弯孢 C12 与 pH 和有机酸的关系,设置不接菌的不同  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度(0,400,800,1 200,1 600,2 000 mg/L)培养液为对照。每处理 4 个重复。

## 1.4 铅胁迫对津田弯孢 C12 培养液 pH 值和有机酸含量的影响

用 pH 计(ST2100,奥豪斯仪器有限公司)直接测定 1.3.2 节收集的滤液 pH 值。用 Agilent 7890A/5975C 气-质联用仪(安捷伦,美国)测定滤液中的有机酸含量。色谱条件:色谱柱 HP-5MS 毛细管柱(5% phenyl methyl silox;30 m $\times$ 250  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ; agilent J&W scientific, Folsom, CA);分流进样,进样量 1  $\mu\text{L}$ ,分流比 20:1;进样口温度 280  $^\circ\text{C}$ ,离子源温度 230  $^\circ\text{C}$ ,传输线温度 250

$^\circ\text{C}$ ;程序升温,起始温度 60  $^\circ\text{C}$ ,保持 5 min;以 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$  升至 300  $^\circ\text{C}$ ,保持 5 min。采用外标法<sup>[14]</sup>,分别以标准品和去离子水为对照,根据峰面积测算草酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、乳酸和酒石酸的质量浓度。

## 1.5 铅胁迫对津田弯孢 C12 液体培养菌丝中 GSH 和 MDA 含量的影响

精确称取 0.5 g 1.3.2 节中的新鲜菌丝体,加入少量 50 g/L 偏磷酸溶液冰浴研磨至匀浆后定容至 6 mL,4  $^\circ\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液用紫外分光光度计在波长 412 nm 处测定吸光值,计算菌丝内 GSH 的含量<sup>[15-16]</sup>。

另取新鲜菌丝 0.5 g,加入少许石英砂和 2 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.8)冰浴研磨至匀浆,4  $^\circ\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min,取上清液并加入等体积的 5 g/L 硫代巴比妥酸,混匀后置于沸水浴中反应 15 min,迅速冷却后于 4  $^\circ\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液。以 5 g/L 硫代巴比妥酸为空白对照,用紫外分光光度计分别在波长 450,532,600 nm 处测定上清液的吸光值,计算菌丝内的 MDA 含量<sup>[17]</sup>。

## 1.6 数据处理与分析

采用 Excel 软件进行试验数据整理,试验数据用“平均值 $\pm$ 标准差”表示;根据不同  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度下菌丝体的干质量,分别计算固、液培养条件下  $\text{Pb}^{2+}$  对津田弯孢 C12 的半效应浓度( $\text{EC}_{50}$ )<sup>[18]</sup>。采用 SPSS 20.0 进行差异显著性方差分析,采用 SigmaPlot12.0 进行绘图。

# 2 结果与分析

## 2.1 铅胁迫对津田弯孢 C12 生长的影响

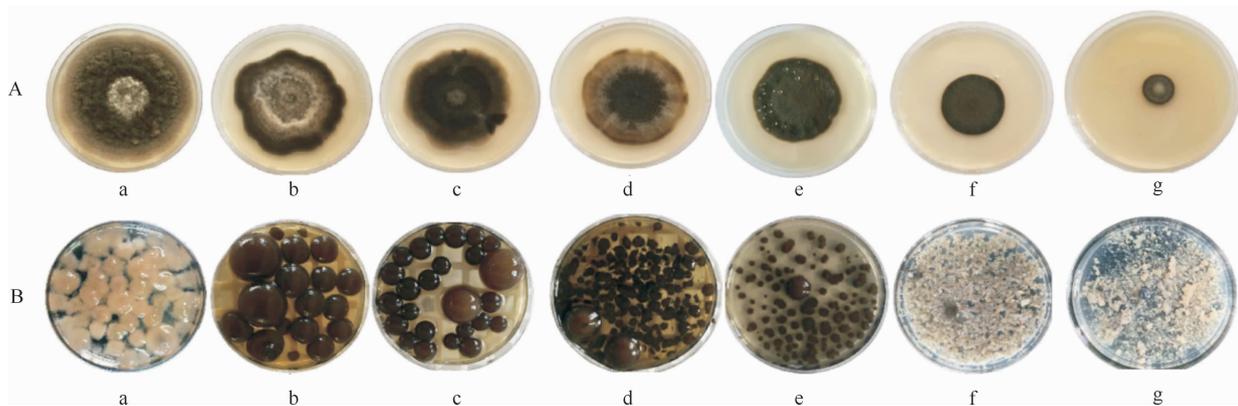
真菌的生长状况可以直接反映重金属对其造成的毒害程度。固体培养条件下,随着  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度的不断增加,津田弯孢 C12 的菌丝体由疏松到致密,菌落颜色加深,边缘由灰黄色逐渐变为灰色、青黑色,中央由灰褐色逐渐加深变成黑色再到灰褐色(图 1-A)。液体振荡培养条件下,不加  $\text{Pb}^{2+}$ (0 mg/L)津田弯孢 C12 的菌丝体形成黄白色、表面毛绒状、大小均一的菌丝球。随着  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度的不断增加,菌丝球颜色逐渐加深变为黄褐色、黑色;表面先变光滑后再出现不规则的刺突和棘;菌丝球大小不一,整体上直径先增大后减小,并在  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度 200 mg/L 时达到最大;高  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度(1 600~2 000 mg/L)下菌丝球很小或不形成菌丝

球,小片状或块状的菌丝体与培养基中的沉淀混在一起呈豆腐渣样;培养液的颜色由不加铅时的无色透明逐渐加深变成黑色透明最后再变浅(图 1-B)。低  $Pb^{2+}$  质量浓度(200~1 200 mg/L)下津田弯孢 C12 菌落、菌丝球和培养液颜色加深、变黑可能是由于津田弯孢 C12 的菌丝产生了黑色素,用以缓解铅的毒害、进而提高铅耐受性;而高  $Pb^{2+}$  质量浓度(1 600~2 000 mg/L)下铅的毒害作用较强,显著抑制了菌丝的生长,导致黑色素分泌量降低,最终表现为菌落、菌丝球和培养液颜色变浅或变淡。

重金属铅除了对津田弯孢 C12 菌丝形态特征有一定的影响外,还能影响津田弯孢 C12 的生长。由图 1 和图 2 可知,固、液两种培养条件下津田弯孢 C12 在所测  $Pb^{2+}$  质量浓度(0~2 000 mg/L)下均能生长,但  $Pb^{2+}$  质量浓度为 2 000 mg/L 时仅有少量菌丝生长,菌落直径较对照降低了 79.76%,固、液

培养条件下菌丝干质量分别较对照降低了 95.42% 和 85.72%。

由图 1 和图 2 还可知,与对照相比,  $Pb^{2+}$  质量浓度 200~2 000 mg/L 培养基上津田弯孢 C12 的菌落直径和菌丝体干质量均显著( $P<0.05$ )降低,由此可见津田弯孢 C12 对重金属铅具有较高的耐受性,但铅对其生长也有一定的毒害和抑制作用,且随  $Pb^{2+}$  质量浓度的不断增加,这种生长抑制作用也逐渐加大,且具有浓度依赖性。此外,相同  $Pb^{2+}$  质量浓度下,液体振荡培养时津田弯孢 C12 菌丝体干质量和重金属铅的  $EC_{50}$  值(990.8 mg/L)均显著高于( $P<0.05$ )固体培养(表 1)。这表明培养条件对津田弯孢 C12 的生长和铅耐受性有一定程度的影响,本研究中该菌在液体振荡培养条件下的生长状况和重金属铅耐受性均明显优于固体培养。

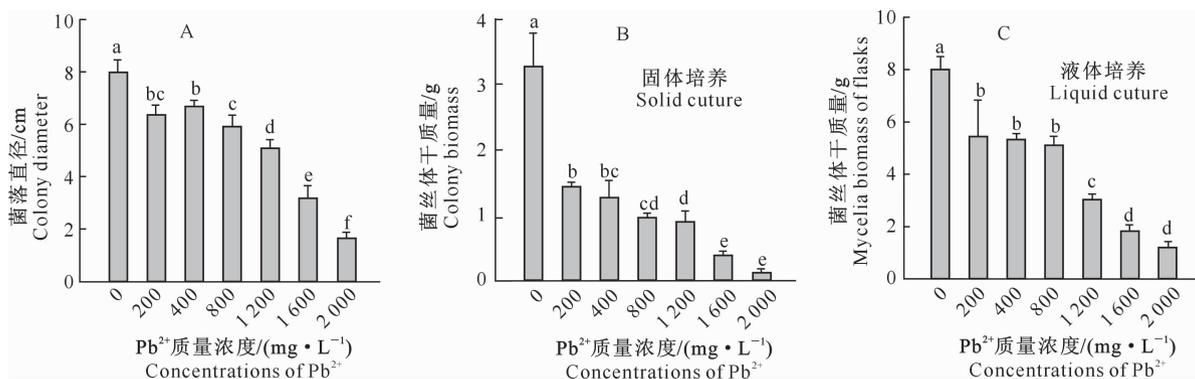


a—g 表示  $Pb^{2+}$  质量浓度依次为 0,200,400,800,1 200,1 600,2 000 mg/L

a—g indicate  $Pb^{2+}$  mass concentrations of 0,200,400,800,1 200,1 600,and 2 000 mg/L, respectively

图 1 津田弯孢 C12 在 PDA(25 °C, 10 d)和 PDB(25 °C, 7 d)培养基上的形态特征

Fig. 1 Morphology characteristics of *Curvularia tsudae* C12 on PDA (25 °C, 10 d) and PDB (25 °C, 7 d) media



图柱上不同小写字母表示不同处理之间差异显著( $P<0.05$ )。下同

Different lowercase letters mean significant difference at  $P<0.05$  level. The same below

图 2 铅胁迫对津田弯孢 C12 生长的影响

Fig. 2 Influence of  $Pb^{2+}$  on growth of *Curvularia tsudae* C12

表 1 固、液培养条件下铅对津田弯孢 C12 的 EC<sub>50</sub>

Table 1 Half effect concentrations (EC<sub>50</sub>) of Pb<sup>2+</sup> to *Curvularia tsudae* C12 under solid and liquid culture conditions

培养方式 Training mode	毒力回归方程(Y=aX+b) Regression equation	决定系数(R <sup>2</sup> ) Determination coefficient	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
固体培养 Solid culture	Y=1.455 7X+1.652 8	0.830 0	199.1
液体培养 Liquid culture	Y=3.509 7X-5.513 7	0.997 5	990.8

注: X 表示 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度, Y 表示生长抑制率几率值。

Note: X represents Pb<sup>2+</sup> mass concentration, Y represents the probability value of growth inhibition rate.

## 2.2 铅胁迫对津田弯孢 C12 培养液中有有机酸含量和 pH 的影响

从津田弯孢 C12 培养液中共检测到草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸 7 种小分子有机酸, 其中乙酸、琥珀酸和乳酸的含量非常低, 故不作分析。由图 3 可知, 随着培养液中 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度的增加, 津田弯孢 C12 培养液中草酸含量先是显著(P<0.05)升高, Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为 800 mg/L 时达到最大, 并趋于稳定。酒石酸、苹果酸和柠檬酸的含量均表现为随 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度增加先升高后降低并趋于平稳, 均在 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度 400 mg/L 时达到最大值。4 种有机酸相比而言, 草酸和柠檬酸的含量在所测 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度(200~2 000 mg/L)下均显著高于(P<0.05)酒石酸和苹果酸, 且柠檬酸的含量在 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为(200~800 mg/L)时显著高于

(P<0.05)草酸, 但在 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为(1 200~2 000 mg/L)时显著低于(P<0.05)草酸。总的来说, 有机酸总量随 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度增加呈先升高后降低并趋于稳定。可见, 重金属铅能刺激津田弯孢 C12 分泌多种小分子有机酸, 尤其是 Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为 800 mg/L 时能最大限度地刺激有机酸的分泌, 而较高质量浓度 Pb<sup>2+</sup> 胁迫(1 200~2 000 mg/L)会抑制有机酸的分泌。这与液体培养条件下重金属铅对津田弯孢 C12 生长的影响一致, 表明有机酸分泌量的增加可能是津田弯孢 C12 应对铅胁迫、具有较高铅耐受性的潜在机制。Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为 200~800 mg/L 胁迫下, 津田弯孢 C12 以分泌草酸和柠檬酸来提高自身的耐受性; Pb<sup>2+</sup> 质量浓度为 1 200~2 000 mg/L 胁迫下, 津田弯孢 C12 则主要通过维持较高的草酸含量来减轻重金属铅的毒害。

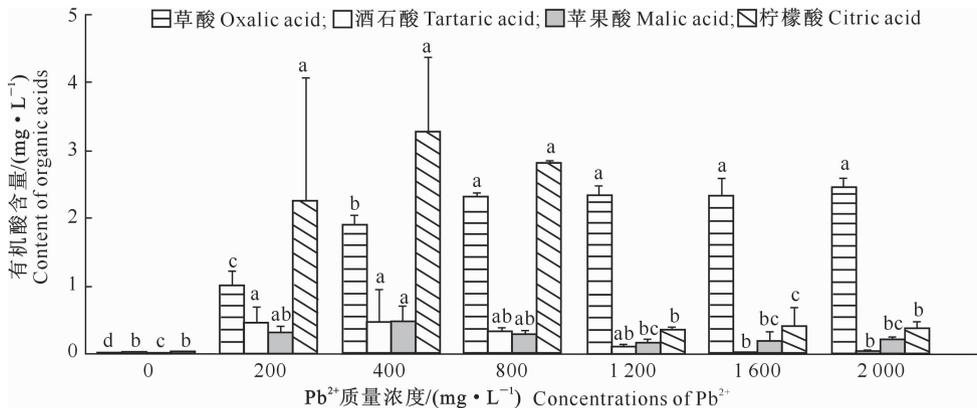


图 3 铅胁迫对津田弯孢 C12 培养液中有有机酸含量的影响

Fig. 3 Effects of Pb<sup>2+</sup> on organic acid content in liquid culture medium of *Curvularia tsudae* C12

铅胁迫下津田弯孢 C12 对液体培养基 pH 值的影响见表 2。

表 2 铅胁迫下津田弯孢 C12 对液体培养基 pH 值的影响

Table 2 Effects of Pb<sup>2+</sup> on pH value in liquid culture medium of *Curvularia tsudae* C12

Pb <sup>2+</sup> 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> ) Pb <sup>2+</sup> mass concentration	pH 值 pH value		Pb <sup>2+</sup> 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> ) Pb <sup>2+</sup> mass concentration	pH 值 pH value	
	津田弯孢 C12 培养液 <i>Curvularia tsudae</i> C12	对照 Control		津田弯孢 C12 培养液 <i>Curvularia tsudae</i> C12	对照 Control
0	6.42±0.114 b	6.83±0.15 a	1 200	3.53±0.030 jk	3.86±0.01 f
200	3.76±0.056 g	5.25±0.07 c	1 600	3.52±0.020 jk	3.68±0.01 h
400	3.57±0.020 ij	4.97±0.02 d	2 000	3.48±0.040 k	3.62±0.01 hi
800	3.39±0.010 l	4.24±0.01 e			

注: 表中所有不同的小写字母表示差异性显著(P<0.05)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05).

由表 2 可知,不接菌时,PDB 培养液中  $Pb^{2+}$  质量浓度从 0 增加到 2 000 mg/L 时其 pH 值逐渐降低,这表明硝酸铅致使 PDB 培养液的 pH 值降低。 $Pb^{2+}$  胁迫下,接种津田弯孢 C12 的 PDB 培养液 pH 值均显著低于不接菌的对照 ( $P < 0.05$ ),特别是  $Pb^{2+}$  质量浓度在 200~800 mg/L 时,接津田弯孢 C12 的 PDB 培养液 pH 值明显低于不接菌的对照,这表明津田弯孢 C12 可使 PDB 培养液的 pH 值降低,这与该菌在低  $Pb^{2+}$  质量浓度下的生长较好、有机酸产量较高相一致。

### 2.3 铅胁迫对津田弯孢 C12 菌丝体中 GSH 和 MDA 含量的影响

由图 4 可以看出,随培养液中  $Pb^{2+}$  质量浓度的增加,津田弯孢 C12 菌丝体内 GSH 的含量呈逐渐上升趋势,并在  $Pb^{2+}$  质量浓度 2 000 mg/L 时达到最大值,较对照升高了 80.6%。在较低  $Pb^{2+}$  质量浓度(200~1 200 mg/L)胁迫下,菌丝中的 GSH 含量

差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但显著低于 ( $P < 0.05$ ) 高  $Pb^{2+}$  质量浓度(1 600~2 000 mg/L)胁迫下的 GSH 含量。可见,重金属铅胁迫刺激了津田弯孢 C12 菌丝中 GSH 的产生,且菌丝中 GSH 的含量与  $Pb^{2+}$  质量浓度呈正相关。这表明菌丝中 GSH 含量的积累可能是津田弯孢 C12 应对铅胁迫,尤其是高  $Pb^{2+}$  质量浓度胁迫,提高铅耐受性的潜在机制之一。

MDA 是生物在逆境条件下产生的膜脂过氧化产物之一,生物细胞内的 MDA 含量可表征其受损伤的程度。由图 4 可以看出,随着培养液中  $Pb^{2+}$  质量浓度的升高,津田弯孢 C12 菌丝体中 MDA 的含量呈先增加后降低再升高的趋势,在  $Pb^{2+}$  质量浓度 400 和 1 200 mg/L 时分别达到最大值和最小值,但在所测  $Pb^{2+}$  质量浓度(0~2 000 mg/L)下均无显著性变化 ( $P > 0.05$ )。可见,本研究中重金属铅对津田弯孢 C12 菌丝体内的 MDA 含量无显著性影响。

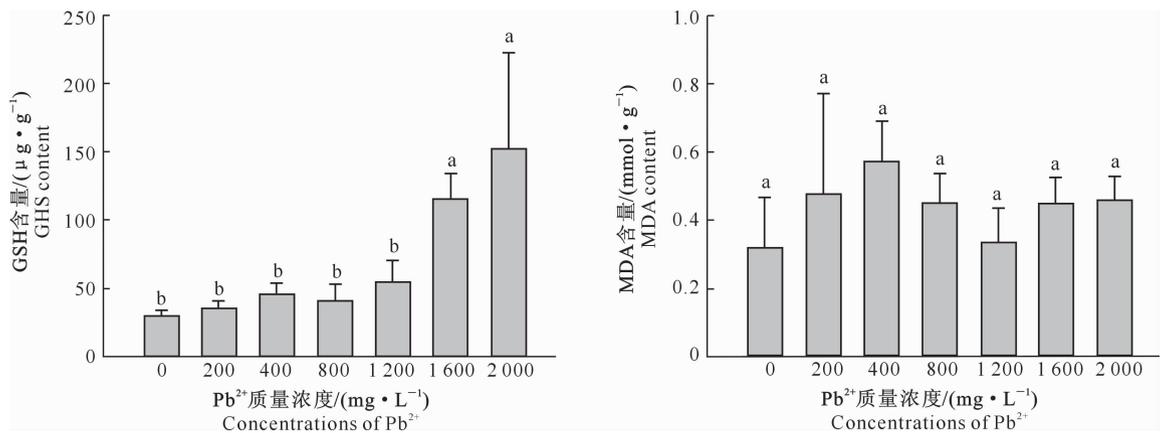


图 4 铅胁迫对津田弯孢 C12 菌丝中 GSH(A) 和 MDA(B) 含量的影响

Fig. 4 Effects of  $Pb^{2+}$  on mycelial GSH (A) and MDA (B) contents of *Curvularia tsudae* C12

## 3 讨论与结论

### 3.1 津田弯孢 C12 的铅耐受性

真菌的生长状况可以直接反映重金属对其造成的毒害程度以及真菌对重金属的耐受力。楚文卉等<sup>[12]</sup>研究发现,津田弯孢 C12 具有较强的重金属镉耐受性。本研究中该菌在  $Pb^{2+}$  质量浓度高达 2 000 mg/L 时仍有少量菌丝生长,在液体培养条件下铅对该菌的  $EC_{50}$  值为 990.8 mg/L,高于铅对 2 种 DSE *Phialocephala fortinii* 和 *Phaeoacremonium mortoniae* 的  $EC_{50}$  值(951 和 431 mg/L)<sup>[7]</sup>,表明津田弯孢 C12 的铅耐受性也较高。由以上推测,津田弯孢 C12 的重金属耐受性较强,后续研究可以检测该菌对其他重金属的耐受性,如铜、锌等,或者检测

该菌对复合重金属胁迫(如铅和镉)的耐受性。刘红玲等<sup>[19]</sup>研究表明,橙黄疣柄牛肝菌(*Leccinum aurantiacum*)在液体培养条件下的生物量与重金属离子浓度成反比,随重金属离子浓度的升高而减小;杨超等<sup>[7]</sup>发现,2 种 DSE *P. fortinii* 和 *P. mortoniae* 的菌丝体干质量随培养液  $Pb^{2+}$  质量浓度的增加而逐渐减少。这与本研究结果一致,本研究中津田弯孢 C12 的菌丝体干质量在固、液两种培养条件下均随  $Pb^{2+}$  质量浓度的增加呈逐渐降低的趋势。但是,楚文卉等<sup>[12]</sup>发现,在固体培养条件下,低浓度镉能刺激津田弯孢 C12 的生长,菌丝体干质量随  $Cd^{2+}$  浓度的增加呈先增加后降低的趋势;而液体培养条件下菌丝体干质量随  $Cd^{2+}$  浓度的增加逐渐降低。可见,同一种真菌对不同重金属胁迫的响应不同。

## 3.2 津田弯孢 C12 耐铅的潜在机制

3.2.1 改变形态,增加表面积 真菌可以通过菌丝的吸附作用,直接将重金属固定在菌丝表面,进而减少进入菌丝内部的重金属量,从而减轻重金属的毒害作用<sup>[20]</sup>。本研究发现,津田弯孢 C12 的菌丝球形态发生了明显的变化。黄健<sup>[21]</sup>研究发现,黄孢原毛平革菌在  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下菌丝球球体周围有许多突出的“毛刺”,而不规则刺突的形成可以增大菌丝球的表面积,进而增加重金属离子的吸附位点,利于真菌吸附、固定重金属,从而降低重金属的毒害作用<sup>[22]</sup>。因此,笔者推测改变菌丝球形态、增加菌丝球表面积可能是津田弯孢 C12 应对重金属铅胁迫的一种潜在机制。

3.2.2 分泌黑色素 本研究发现,铅胁迫下津田弯孢 C12 的菌落、菌丝球和培养液颜色随  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度的增加逐渐加深、变黑。可见,铅胁迫能刺激津田弯孢 C12 的菌丝产生黑色素,少部分黑色素还被释放到培养液中。黑色素具有螯合重金属的作用,黑色素的产生也是真菌用以抵抗重金属胁迫、提高重金属耐受性的一种常见机制<sup>[23]</sup>,如培养液中  $\text{Cd}^{2+}$  质量浓度在 50~350 mg/L 时可以促进嗜鱼外瓶霉 (*Exophiala pisciphila*) 菌丝合成黑色素<sup>[13]</sup>。黑色素的产量与菌丝体的生长密切相关,本研究中高  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度(1 600~2 000 mg/L)胁迫显著抑制了津田弯孢 C12 菌丝的生长,导致黑色素产量降低,菌落、菌丝球和培养液颜色变浅。楚文卉等<sup>[12]</sup>研究发现,镉胁迫下津田弯孢 C12 菌丝体呈黄白色,并不产生黑色素。这与本研究结果不一致,说明同一真菌对不同重金属胁迫的应对机制不同。

3.2.3 产生有机酸 有机酸可以螯合或改变重金属的价态,从而减轻重金属的毒害作用<sup>[24]</sup>。向外分泌小分子有机酸是真菌抵抗重金属胁迫的一个重要机制<sup>[25]</sup>。黄孢原毛平革菌通过分泌苹果酸和富马酸以螯合重金属镉,从而减轻镉对自身的毒害作用<sup>[26]</sup>;白腐真菌则是通过分泌草酸与铅离子形成草酸铅以达到稳定重金属铅,从而降低铅的毒性和生物可利用性<sup>[27]</sup>;ECMF 点柄粘盖牛肝菌和草地马勃主要是通过分泌酒石酸、苹果酸和琥珀酸来螯合重金属铅,从而提高铅耐受性;铅胁迫下 2 种 DSE *P. fortinii* 和 *P. mortoniae* 培养液中仅检测到草酸和乙酸 2 种小分子有机酸<sup>[7]</sup>。本研究中,津田弯孢 C12 的培养液中检测到 7 种小分子有机酸,其中 4 种达到了可分析水平,且在铅胁迫下 4 种有机酸的含量和有机酸总量明显增加。在  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度

200~800 mg/L 胁迫下能显著刺激津田弯孢 C12 有机酸的分泌,尤其是草酸和柠檬酸,二者在该菌抵抗低浓度铅胁迫中发挥着至关重要的作用;较高质量浓度  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫(1 200~2 000 mg/L)在不同程度上抑制了酒石酸、苹果酸和柠檬酸的分泌,但草酸的含量依然维持在最高水平,可见草酸是津田弯孢 C12 抵抗高质量浓度铅胁迫的主要因子。重金属镉胁迫下,津田弯孢 C12 培养液中并未检测到酒石酸和草酸,而柠檬酸和苹果酸的含量较高,琥珀酸仅在高质量浓度  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下产生<sup>[12]</sup>。这表明津田弯孢 C12 对不同重金属的耐受机制不同,可以通过调节有机酸的种类和含量来应对不同的重金属胁迫。此外,柠檬酸和苹果酸在津田弯孢 C12 抗铅和镉胁迫中都发挥着重要作用,可能是该菌抵抗不同重金属胁迫的一个共性组分,这有待进一步的研究验证。

3.2.4 积累 GSH GSH 是生物细胞中含量最丰富的非蛋白质硫醇化合物,直接或间接参与真菌抗逆过程中的许多功能性活动,维持细胞氧化还原状态的平衡,也能螯合进入真菌细胞中的重金属离子以缓解重金属毒性,保护细胞免受重金属离子引起的氧化压力<sup>[28]</sup>。本研究中,重金属铅胁迫刺激津田弯孢 C12 菌丝中 GSH 的产生,菌丝中 GSH 的含量与  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度呈正相关。重金属镉胁迫下,津田弯孢 C12 菌丝中的 GSH 含量随  $\text{Cd}^{2+}$  浓度增加也呈逐渐升高的趋势,GSH 含量的大量积累可能是该菌提高镉耐受性的潜在机制之一<sup>[12]</sup>,这与本研究结果基本一致。因此可以推断,GSH 的产生和积累可能是津田弯孢 C12 应对不同重金属胁迫、提高重金属耐受性的一种共性机制。

综上所述,改变菌丝球形态以增加吸附表面积、分泌黑色素、积累 GSH 和有机酸,尤其是草酸和柠檬酸可能是津田弯孢 C12 具有较高重金属铅耐受性的潜在机制。

## [参考文献]

- [1] 李维焕,于兰兰,程显好,等. 两种大型真菌菌丝体对重金属的耐受和富集作用 [J]. 生态学报,2011,31(5):1240-1248.  
Li W H, Yu L L, Cheng X H, et al. Growth tolerance and accumulation characteristics of the mycelia of two macrofungi species to heavy metals [J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(5): 1240-1248.
- [2] 陈灿灿,谢英荷,洪坚平,等. 土壤中耐铅生物的筛选 [J]. 中国生态农业学报,2007,15(2):85-87.  
Chen C C, Xie Y H, Hong J P, et al. Selection of lead-resistant strains of microorganisms from soil [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2007, 15(2): 85-87.

- [3] 雷良奇,陈斯耐,莫家,等. 黄沙坪碳酸盐型尾矿中重金属的赋存状态与污染评价 [J]. 岩石矿物学杂志, 2015, 34(6): 844-852.  
Lei L Q, Chen S N, Mo J, et al. Modes of occurrence and pollution risk of heavy metals within the carbonate type tailings of the Huangshaping [J]. Acta Petrologica Et Mineralogica, 2015, 34(6): 844-852.
- [4] 黄顺红,杨伊,范文玉,等. 铅锌矿区土壤重金属空间分布及生态风险评价 [J]. 环境科学与技术, 2016, 39(2): 186-192.  
Huang S H, Yang Y, Li W Y, et al. Spatial distribution and ecological risk assessment of heavy metals in soil around lead~zinc mining area [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(2): 186-192.
- [5] 廖佳,冯冲凌,李科林,等. 耐性真菌 HA 吸附铅、锌的影响因素及吸附机理研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 254-263.  
Liao J, Feng C L, Li K L, et al. Influence factors and absorption mechanism of Pb(II) and Zn(II) by resistant fungus HA [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 254-263.
- [6] Falih A M. Influence of heavy-metals toxicity on the growth of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Bioresource Technology, 1997, 60(1): 87-90.
- [7] 杨超,谢清哲,楚文卉,等. 两种深色有隔内生真菌的铅耐受性 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2018, 46(11): 1-9.  
Yang C, Xie Q Z, Chu W H, et al. Lead tolerance of two dark septate endophytes [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2018, 46(11): 1-9.
- [8] 冯欢,豆青,王海华,等. 2 种外生菌根真菌的铅耐受性及相关机制 [J]. 西北林学院学报, 2017, 32(2): 188-196.  
Feng H, Dou Q, Wang H H, et al. Lead tolerance of two ectomycorrhizal fungi and related mechanisms [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(2): 188-196.
- [9] McGinnis M R, Rinaldi M G, Winn R E. Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum* [J]. Journal of Clinical Microbiolog, 1986, 24(2): 250-259.
- [10] Flanagan K L, Bryceson A D. Disseminated infection due to *Bipolaris australiensis* in a young immunocompetent man: casereport and review [J]. Clinical Infectious Diseases, 1997, 25: 311-313.
- [11] Newell C K, Steinmetz R L, Brooks H L. Chronic postoperative endophthalmitis caused by *Bipolaris australiensis* [J]. Retina, 2006, 26: 109-110.
- [12] 楚文卉,谢清哲,杨超,等. 1 株镉耐受真菌 C12 的鉴定及其镉耐受性研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(9): 71-80.  
Chu W H, Xie Q Z, Yang C, et al. The identification and study on Cd tolerance of C12, a fungus which shows high tolerance to Cd [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2017, 45(9): 71-80.
- [13] 湛方栋. 嗜鱼外瓶霉(*Exophiala pisciphila* ACCC32496)镉耐受性机制研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2012.  
Zhan F D. Study on the tolerance mechanisms of *Exophiala pisciphila* ACCC32496 for cadmium [D]. Kunming: Yunnan University, 2012.
- [14] Fomina M A, Hillier S, Charnock J M, et al. Role of oxalic acid overexcretion in transformations of toxic metal minerals by *Beauveria caledonica* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(1): 371-381.
- [15] Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal M H, et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean [J]. Plant Science, 1997, 127(2): 139-147.
- [16] Zhan F, He Y, Li T, et al. Tolerance and antioxidant response of a dark septate endophyte (DSE), *Exophiala pisciphila*, to cadmium stress [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2015, 94(1): 96-102.
- [17] Gallego S M, Benavides M P, Tomaro M L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress [J]. Plant Science, 1996, 121(2): 151-159.
- [18] 陈照,张欣,蒲金基,等. 内吸性杀菌剂对橡胶白根病菌的室内毒力测定 [J]. 农药, 2007, 46(9): 641-643.  
Chen Z, Zhang X, Pu J J, et al. Toxicity test of the systemic fungicides for rubber white root disease in laboratory [J]. Agrochemicals, 2007, 46(9): 641-643.
- [19] 刘红玲,贺亚玲,蒋存凯,等. 新疆橙黄疣柄牛肝菌菌丝对 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Pb<sup>2+</sup> 的耐受性研究 [J]. 北方园艺, 2010(8): 197-200.  
Liu H L, He Y L, Jiang C K, et al. Study on the toleration of hypha of *Leccinum aurantiacum* (Bull.) Gray to heavy metals Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> [J]. Northern Horticulture, 2010(8): 197-200.
- [20] 朱萌,李维焕,程显好,等. 真菌对重金属生物吸附机理的研究进展 [J]. 工业用水与废水, 2012(6): 7-10.  
Zhu M, Li W H, Cheng X H, et al. Research progress on bio-sorption mechanisms of heavy metals by fungus [J]. Industrial Water & Wastewater, 2012(6): 7-10.
- [21] 黄健. 废水处理中黄孢原毛革菌对 Cd 胁迫的适应性及抗性反应研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2014.  
Huang J. Adaptability and resistance of *Phanerochaete chrysosporium* with Cd(II) in wastewater treatment [D]. Changsha: Hunan University, 2014.
- [22] Blaudez D, Jacob C, Turnau K, et al. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals *in vitro* [J]. Mycological Research, 2000, 104(11): 1366-1371.
- [23] Butler M J, Day A W. Fungal melanins: a review [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(12): 1115-1136.
- [24] Zhang J E, Ouyang Y, Ling D J. Impacts of simulated acid rain on cation leaching from the latosol in South China [J]. Chemosphere, 2007, 67(11): 21-31.

- sica napus* [J]. Acta Agricultural Universitatis Jiangxiensis, 2016,38(2):248-254.
- [14] 马田田,陈 锋,张 维,等. 油菜菌核病鉴定方法的比较研究 [J]. 上海农业学报,2014,30(6):39-43.  
Ma T T, Chen F, Zhang W, et al. Comparison of *Sclerotinia identification* methods in rapeseed (*Brassica napus* L) [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2014, 30(6):39-43.
- [15] 冉 毅,文成敬,牛应泽. 油菜菌核病抗性鉴定方法的比较及抗源的筛选 [J]. 植物保护学报,2007,34(6):601-606.  
Ran Y, Wen C J, Niu Y Z. Comparison of methods for identification of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and screening of resistant materials in rapeseed [J]. Journal of Plant Protection, 2007, 34(6):601-606.
- [16] 张志元,官春云. 油菜对菌核病抗(耐)病性鉴定与抗病育种研究进展 [J]. 湖北农业科学,2003(3):38-43.  
Zhang Z Y, Guan C Y. Rape resistance (tolerance) to *Sclerotinia* blight appraising and research progress of resistance to disease breeding [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2003(3):38-43.
- [17] 胡宝成, Rimmer S R. 油菜菌核病离体叶片接种法研究初报 [J]. 安徽农业科学,1989(3):56-58.  
Hu B C, Rimmer S R. Preliminary study of artificial inoculation for resistance (tolerance) to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed using detached leaves [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1989(3):56-58.
- [18] 张耀伟,苗国辉. 大白菜对褐腐病抗性的快速鉴定方法研究 [J]. 植物保护,2014,40(3):117-121.  
Zhang Y W, Miao G H. Methods for rapid identification of Chinese cabbage resistance to brown rot [J]. Plant Protection, 2014, 40(3):117-121.
- [19] 王玉杰,高凤竹,曹 雄,等. 向日葵品种资源对菌核病抗性室内鉴定 [J]. 中国油料作物学报,2010,32(4):540-545.  
Wang Y J, Gao F Z, Cao X, et al. Resistance evaluation of different sunflower cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2010, 32(4):540-545.
- [20] 孙敬贤,张鲁刚. 大白菜菌核病原菌鉴定及其主要生物学特性 [J]. 华北农学报,2015,30(S1):321-328.  
Sun J X, Zhang L G. Identification and main biological characteristics of *Sclerotinia* rot pathogen in Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2015, 30(S1):321-328.
- [21] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展 [M]. 北京:科学出版社,1995.  
Li S D. Advances in main vegetable crops breeding for diseases resistance in China [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [22] 孙明明,韩英鹏,赵 雪,等. 大豆菌核病鉴定方法研究进展 [J]. 大豆科学,2017,36(3):470-474.  
Sun M M, Han Y P, Zhao X, et al. Research development of identification methods in soybean white mold [J]. Soybean Science, 2017, 36(3):470-474.
- [23] 解永梅,张 薇,赵永强,等. 山东省白菜黑腐病苗期抗病性鉴定方法 [J]. 植物保护学报,2007(6):661-662.  
Xie Y M, Zhang W, Zhao Y Q, et al. Screening method for resistance to black rot of Chinese cabbage in seedling stage in Shandong Province [J]. Journal of Plant Protection, 2007(6):661-662.
- [24] 刘 佳,张匀华,孟庆林,等. 向日葵菌核病接种方法及品种抗病性鉴定 [J]. 植物保护,2016,42(2):136-141.  
Liu J, Zhang Y H, Meng Q L, et al. Inoculation methods of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower heads and identification of variety resistance [J]. Plant Protection, 2016, 42(2):136-141.
- [25] 张晓娟,张 羽,胡胜武. 油菜菌核病抗性机理及抗病遗传育种研究进展 [J]. 分子植物育种,2016,14(3):704-711.  
Zhang X G, Zhang Y, Hu S W. Progress on resistance mechanism of *Sclerotinia sclerotiorum* and genetic breeding program on disease resistant rapeseed [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(3):704-711.

(上接第 122 页)

- [25] 豆 青. 外生菌根真菌对杨树 Pb 耐受性的影响及相关机制 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2016.  
Dou Q. Influence of ectomycorrhizal fungi on the lead tolerance of poplar and related mechanism [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2016.
- [26] 冷 阳. 黄孢原毛平革菌对重金属 Cd 的富集及其交互作用机理研究 [D]. 长沙:湖南大学,2014.  
Leng Y. Research on Cd(II) enrichment and its mechanism of interaction with *Phanerochaete chrysosporium* [D]. Changsha: Hunan University, 2014.
- [27] 王 亮. 白腐真菌胞外聚合物的产量、组分及其对菌体吸附铅的机理研究 [D]. 长沙:湖南大学,2010.  
Wang L. Yield and composition of extracellular polymeric substances (EPS) by white-rot fungi and mechanism of its bio-sorption of Pb<sup>2+</sup> [D]. Changsha: Hunan University, 2010.
- [28] 黄 超. 白腐真菌强化处理铅污染农业废物及其对铅的抗性机理研究 [D]. 长沙:湖南大学,2017.  
Huang C. Enhanced treatment of lead contaminated agricultural wastes by white rot fungus and its resistance analysis [D]. Changsha: Hunan University, 2017.