

DOI:10.19431/j.cnki.1673-0062.2019.02.003

一株耐铀镉真菌菌株的筛选及其耐铀镉特性的研究

胡 南^{1,2}, 陈思羽^{1,2}, 胡劲松¹, 沙银花^{1,2}, 朱若南^{1,2}, 李广悦^{1,2}, 丁德馨^{1,2*}

(1. 南华大学 铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 衡阳 421001;
2. 南华大学 极贫铀资源绿色开发技术湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001)

摘 要:从生长在铀尾矿库区的博落回的根系中,分离出了一株耐铀镉真菌菌株 A-2。在固体培养基上,铀和镉对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)为 160 mg/L 和 160 mg/L,而在液体培养基中,铀和镉对该菌株的 MIC 为 80 mg/L 和 80 mg/L。经形态学观察和分子鉴定,该菌株属于镰刀菌属,其 GenBank 登录号为 MH978624,可命名为 *Fusarium* sp. A-2。进一步的试验研究结果表明,该菌株在铀镉胁迫下会分泌大量草酸、苹果酸和丁二酸,与铀镉络合,降低了铀镉对菌株的毒性,这可能是该菌株具有高耐铀镉性及能减轻铀镉毒害的机理之一。该菌株在土壤铀镉复合污染治理中具有潜在应用前景。

关键词:土壤铀镉复合污染;耐铀镉真菌;*Fusarium* sp. A-2;耐铀镉特性

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-0062(2019)03-0016-06

Screening of a Uranium-Cadmium Tolerant Fungal Strain and its Uranium-Cadmium Tolerance

HU Nan^{1,2}, CHEN Siyu^{1,2}, HU Jingsong¹, SHA Yinhua^{1,2}, ZHU Ruonan^{1,2},
LI Guangyue^{1,2}, DING Dexin^{1,2*}

(1. Key Discipline Laboratory of National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;
2. Key Laboratory of Hunan Province for Green Technology for Development of Extremely Low Grade Uranium Resources, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: A uranium-cadmium tolerant fungal strain A-2 was isolated from the roots of *Macleaya cordata* growing in the uranium tailings repository. In solid medium, the minimum

收稿日期:2019-03-04

基金项目:国家自然科学基金重点项目(U1401231);湖南省科技厅重点项目(2017RS3050;2018CT5009);湖南省自然科学基金项目(2016JJ2103;2018JJ3445);南华大学研究生科研创新资助项目(2018KYY137)

作者简介:胡 南(1982-),男,高级实验师,博士,主要从事放射性污染环境修复方面的研究。E-mail:hn12352000@163.com。* 通信作者:丁德馨(1958-),男,教授,博士,主要从事铀矿采冶及相关环境问题等方面的研究。E-mail:dingdxzzz@163.com

inhibitory concentration (MIC) of uranium and cadmium for this strain is 160 mg/L and 160 mg/L. In liquid medium, the MIC of uranium and cadmium for this strain is 80 mg/L and 80 mg/L, respectively. The morphological observation and molecular identification confirmed that the strain belongs to the *Fusarium*, its GenBank accession number is MH978624, and it can be named *Fusarium* sp. A-2. In addition, the results from further experiments show that under uranium-cadmium co-stress, the strain can secrete large amounts of organic acids including oxalic, malic and succinic acids, which can complex with uranium and cadmium to reduce the toxicity of uranium and cadmium to the strain. This may be the mechanism by which the strain can resist high concentrations of uranium and cadmium and reduce uranium and cadmium toxicities. *Fusarium* sp. A-2 may have potential application prospects in the remediation of the uranium-cadmium contaminated soils.

key words: uranium-cadmium contaminated soil; uranium-cadmium tolerant fungal; *Fusarium* sp. A-2; uranium-cadmium tolerance

0 引言

铀矿开采、铀水冶以及磷肥施用等人类活动会导致土壤铀镉复合污染^[1-2]。有研究报道,在某些铀矿开采区附近及某些铀污染场地,每千克土壤的铀含量可高达几十至几百毫克,同时每千克土壤的镉含量也可达几十毫克^[3]。

如何高效治理土壤铀镉复合污染,是人类面临的一大难题。与传统的物理化学修复技术相比,微生物修复技术具有环境友好、不破坏土壤生态环境、成本低廉等优势^[4]。因此,治理土壤铀镉复合污染的微生物修复技术受到了农业以及环境领域研究者的青睐^[5]。其中,耐重金属真菌对重金属污染土壤具有更强的适应性,在铀镉复合污染土壤的治理中具有得天独厚的优势^[6]。而耐铀镉真菌可通过络合铀镉降低它们对自身的毒害,还可通过与铀镉生成沉淀减少其向环境的迁移和扩散^[6]。近年来,越来越多的耐铀及耐镉真菌从铀及镉污染场地的超富集植物中分离出来。其中,耐铀真菌有 *Candida sorbophila*、*Serratia marcescens*、*Microbacterium oxydans* 等^[7-9],耐镉真菌有 *Phomopsis fukushii* PDL-10、*Glomerella truncata* PDL-1、*Streptomyces* sp. strain CdTB01 等^[10-12]。但是,既耐铀又耐镉的真菌目前尚未见报道。因此,有必要开展耐铀镉真菌的筛选及其耐铀镉特性的研究。

本研究从生长在 272 铀尾矿库区的博落回的根系中筛选出了一株耐铀镉真菌菌株,采用形态学和分子鉴定技术对该菌株进行了鉴定,并进一步研究了铀镉胁迫对其分泌有机酸的影响,探讨了其耐铀镉的机理,为采用耐铀镉菌株强化修复铀镉复合污染土壤提供了试验材料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料采集与处理

本实验采集的材料为长期生长在湖南省 272 退役铀尾矿库区的博落回 (*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.), 其对铀镉均具一定耐受和富集能力^[13-14]。采集方式为随机连根带土挖起健康博落回植株,并抖落多余的土壤,将博落回根系装入黑色塑料袋后立刻带回实验室,用于真菌的分离。

1.2 培养基

分离培养基为孟加拉红培养基 (rose Bengal medium, RBM), 铀镉耐性筛选培养基为液体和固体查氏培养基 (CDM (Czapek-dox medium) 和 CDA (Czapek-dox medium agar)), 其他培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA)。

1.3 真菌的分离

将采集回的健康博落回植株的根系,用自来水和去离子水洗净表层土壤,晾干。将根切割成长 5 cm 的根段,分别于体积分数为 75% 酒精和体积分数为 0.2% 升汞溶液中浸泡 5 min 和 2 min,取出根段,用无菌水冲洗 3 次,随即用无菌纱布蘸干根段表面水分。挑取根段,切割成长为 1 cm 的斜段,用镊子挑起接至孟加拉红培养基 (RBM) 上并将其置于生化培养箱 25 °C 培养。取最后一次清洗根段的无菌水 0.2 mL 涂布于 PDA 上,置于生化培养箱 25 °C 培养,检测根段表面是否消毒彻底^[12]。每日观察,待组织切块面长出菌后及时采用尖端菌丝挑取法,将不同形态的菌落分别在 RBM 上连续转接 2~3 次,最后将分离纯化得到的博落回真菌转入装有 RBM 三角瓶中,放

入 4 ℃ 冰箱中保存,备用。

1.4 真菌铀镉耐受性测定

用分析天平准确称取 1.792 8 g 六水硝酸铀酰($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)和 1.630 8 g 氯化镉(CdCl_2),配制质量浓度为 1 g/L 铀和镉母液,并用 0.22 μm 滤膜对其过滤除菌。向灭菌液体 CDM 和固体 CDA 培养基中同时加入适量的铀、镉母液,使 CDM 和 CDA 培养基中铀和镉的质量浓度如表 1 所示。用打孔器($D=4\text{ mm}$)从培养 5 d 的菌落边缘打取菌饼,接种至上述不同浓度的 CDM 和 CDA 培养基中,并将其分别置于摇床中(28 ℃, 160 r/min, 7 d)和生化培养箱(28 ℃, 15 d)培养。在处理结束后,收集 CDM 菌丝于烘箱 80 ℃ 烘干,测其质量(烘干后),培养基用于测定有机酸质量浓度。而在 CDA 培养基上的菌落则采用十字交叉法^[15]测量其直径。每个处理 3 个重复。采用最小抑菌浓度(MIC)来衡量菌株耐铀镉性能^[12]。

表 1 不同培养基中铀和镉的质量浓度

Table 1 Mass concentrations of uranium and cadmium in different media ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

培养基	处理组	铀的质量浓度	镉的质量浓度
CDM	CK	0	0
	10+5	10	5
	20+10	20	10
	30+20	30	20
	40+40	40	40
	80+80	80	80
	160+160	160	160
CDA	CK	0	0
	10+5	10	5
	20+10	20	10
	30+20	30	20
	40+40	40	40
	80+80	80	80
	160+160	160	160

1.5 耐铀镉真菌的鉴定

通过形态学观察和分子鉴定来确定耐铀镉真菌的分类学地位。分子鉴定参照 A. R. Khan 等人的文献^[12],采用核糖体内转录间隔区序列(internal transcribed spacer, ITS)方法。将 ITS 测序结果利用局部序列比对基本检索工具(basic local alignment search tool, BLAST)同美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology

Information, NCBI)上已有的数据进行比对,使用 MEGA4.1 绘制系统发育树。

1.6 铀和镉共同胁迫下耐铀镉真菌所分泌有机酸的测定

液体培养基中有机酸的测定参照陈威等人的文献^[14]。为了避免色素对有机酸测定的干扰,采用 C18 固相萃取柱过滤培养基。本研究测定的有机酸包括草酸、柠檬酸、酒石酸、苹果酸、丙二酸和丁二酸六种。

1.7 数据分析

本研究所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS20.0 软件对数据进行方差及显著性分析(Tukey's 多重比较分析, $P<0.05$ 表示差异显著)。

2 结果与讨论

2.1 耐铀镉真菌的筛选

采用分离纯化的方法从博落回的根部分离出 8 株真菌菌株如图 1。通过测定在不同质量浓度的铀和镉胁迫下 8 株菌株的菌落直径和菌丝体质量,筛选出了一株耐铀镉性最强的菌株 A-2(图 1(b))。

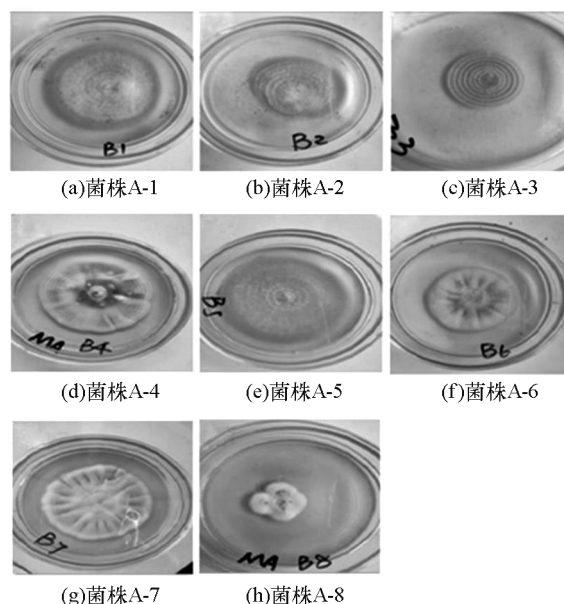


图 1 博落回根部分离出的真菌菌株

Fig. 1 Fungal strains isolated from the roots of *M. cordata*

2.1.1 铀和镉共同胁迫下菌株 A-2 的菌落直径

真菌的生长状况可直接反映其对铀和镉耐性^[15]。图 2 为铀和镉共同胁迫下,菌株 A-2 的菌落直径。由图 2 可知,铀和镉的质量浓度分别低于 30 mg/L 和 20 mg/L 时,菌落直径与对照组相

比没有显著差异;而铀和镉的质量浓度分别高于 30 mg/L 和 20 mg/L 时,菌落直径分别比对照组下降了 40.0%、80.7% 和 91.6%。铀和镉质量浓度为 160 mg/L 和 160 mg/L 时,A-2 菌落完全停止生长。在固体培养基上,铀和镉对菌株 A-2 的最小抑菌浓度为 160 mg/L 和 160 mg/L。

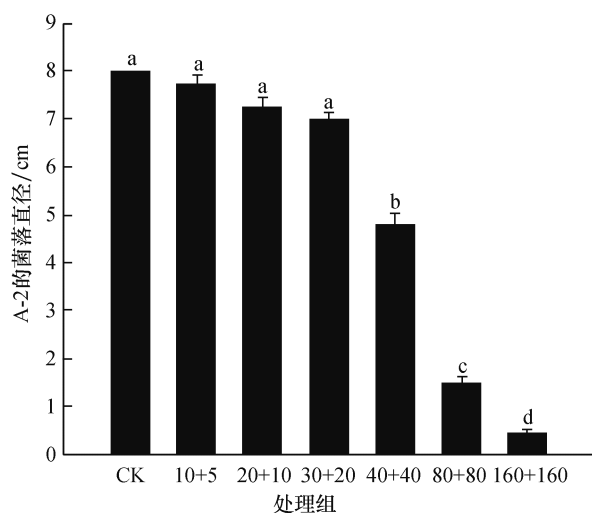


图2 铀和镉共同胁迫下 A-2 的菌落直径

Fig.2 Colony diameter of A-2 under uranium and cadmium co-stress

2.1.2 铀和镉共同胁迫下菌株 A-2 的菌丝干质量

菌株 A-2 菌丝质量(烘干后)随铀、镉质量浓度的增加而降低(图3)。其中,铀和镉质量浓度分别为 10 mg/L 和 5 mg/L 时,菌丝质量(烘干后)开始显著下降,铀和镉质量浓度分别为 80 mg/L 和 80 mg/L 时,菌丝停止生长,菌丝体的质量(烘干后)较对照组降低了 91.2%。在液体培养基中,铀和镉对菌株 A-2 的最小抑菌浓度为 80 mg/L 和 80 mg/L。本研究表明,液体培养时该菌株耐铀镉性弱于固体培养。主要原因可能是固体培养基中铀、镉离子不能自由移动,被菌丝吸收或固定后局部培养基中铀、镉质量浓度降低,而液体培养基中铀、镉分布均匀,与菌丝接触充分,故抑制作用较强^[15]。

2.2 耐铀镉真菌 A-2 的鉴定

2.2.1 形态学观察

在 CDA 培养基上,菌株 A-2 正面菌落凸起呈絮状,菌落粉白色;菌落反面淡黄色,随着时间增加,菌落颜色逐渐加深;菌丝为气生型,质密(图4(a)、(b)、(c))。光学显微镜下观察该菌可见小型分生孢子,呈椭圆形;厚壁垣孢子,球形,表面光

滑,单个顶生或多个菌丝中间串生;单瓶梗产孢(图4(d)、(e)、(f));培养时会产淡黄色可溶性色素。

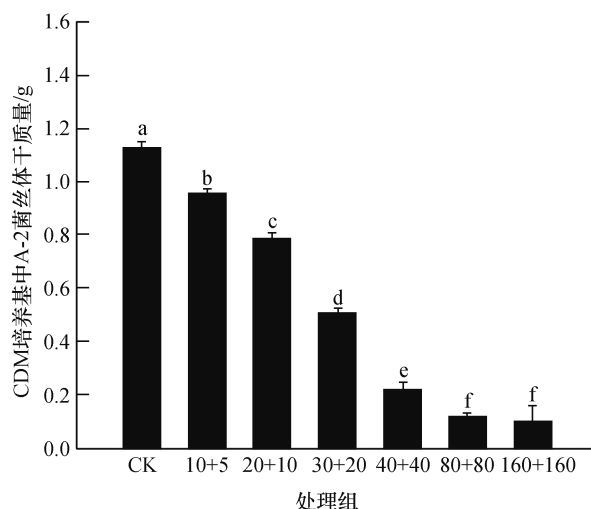


图3 铀和镉共同胁迫下 A-2 的菌丝体质量(烘干后)

Fig.3 Mass of mycelium of A-2 under uranium and cadmium co-stress (after drying)

2.2.2 分子鉴定

为了进一步确定 A-2 的分类地位,扩增 A-2 菌株的核糖体 ITS 序列并测序,得到 1 条 529 bp 的序列。根据图 5 系统发育树可知,菌株 A-2 和 *Fusarium* sp. T19 聚在同一分枝上,且序列相似性为 100%,从分子生物学的角度上表明两者属于同种真菌。因此,依据形态学特征和分子生物学分析,菌株 A-2 初步鉴定为镰刀菌属真菌,命名为 *Fusarium* sp. A-2,GenBank 登录号为 MH978624。

2.3 铀和镉共同胁迫下对耐铀镉真菌所分泌有机酸的影响

从 CDM 培养基中只检测到了草酸、苹果酸、丁二酸和丙二酸,未检测到柠檬酸和琥珀酸。表 2 为铀、镉共同胁迫下 *Fusarium* sp. A-2 有机酸的分泌情况。由表 2 可知,随着铀、镉质量浓度的增加,草酸、苹果酸和丁二酸的含量呈现先增加后降低的趋势,在铀和镉质量浓度分别为 30 mg/L 和 20 mg/L 时,上述 3 种有机酸的质量浓度均达到最大,比对照组分别增加了 89.4%、86.7% 和 181.4%。丙二酸仅在铀和镉质量浓度分别为 30 mg/L 和 20 mg/L 才开始检测到,并在此时达到最大(23.5 mg/L),随后其含量显著降低。而铀和镉质量浓度大于或等于 80 mg/L 和 80 mg/L 时,培养基中未检测到有机酸。此外,本研究还发

现,在同一处理组中,培养基中有机酸质量浓度为:草酸>苹果酸>丁二酸>丙二酸。

耐性真菌在重金属胁迫时可通过分泌有机酸螯合或固定重金属来减轻重金属离子对其的毒害。Y. Ban 等^[16]研究表明,在铅胁迫, *G. cylindrosporus* 会通过分泌大量的草酸来改变环境中铅的形态并阻止其进入细胞,从而缓解铅对其的胁迫。冷阳^[17]研究表明,在镉处理下,黄孢原毛平革菌也会产生大量草酸,并与镉形成草酸镉沉淀固定镉,以抵抗镉对其的胁迫。本研究发现, *Fusarium* sp. A-2 不仅可以通过调节有机酸的质量浓度,还

可以通过调节有机酸的种类来缓解铊、镉对其胁迫。在铊和镉质量浓度低于 30 mg/L 和 20 mg/L 时,草酸、苹果酸、丁二酸质量浓度增加,在高质量浓度铊和镉胁迫下 3 种有机酸质量浓度下降。究其原因可能是较低质量浓度的铊和镉会刺激菌丝新陈代谢,高质量浓度的铊和镉则严重抑制了菌丝的生长,进而影响其新陈代谢活动^[15]。在铊和镉共同胁迫下,草酸分泌量最多,而苹果酸、丁二酸和丙二酸分泌量相对较少,推测草酸可能是该菌株缓解铊和镉共同胁迫最重要的有机酸,而其他 3 种有机酸可辅助该菌缓解铊和镉的胁迫。

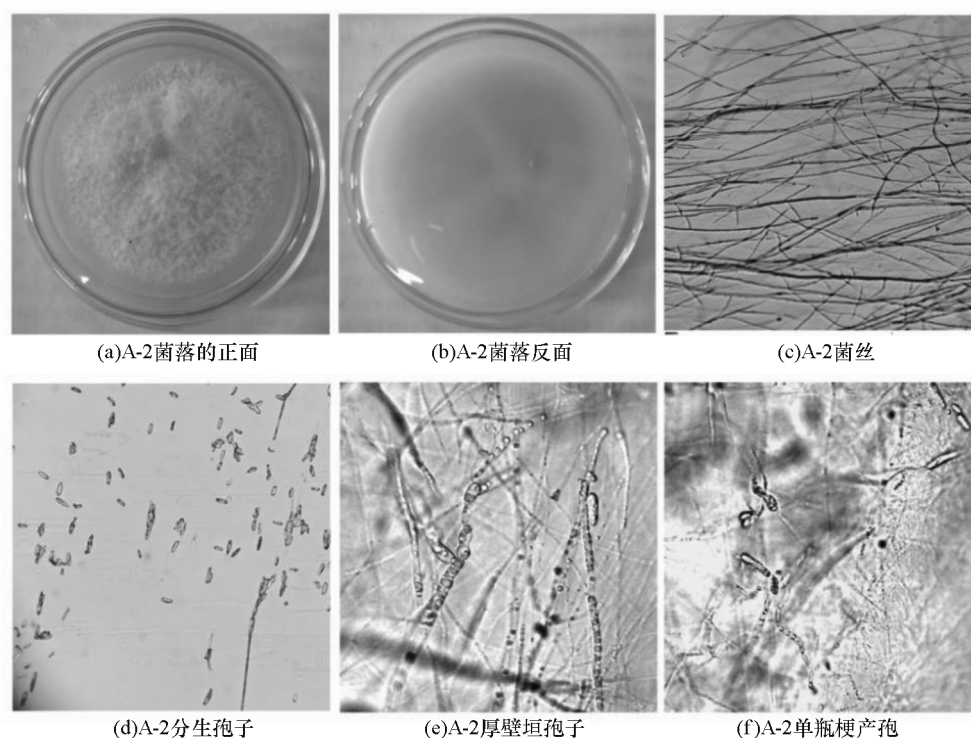


图 4 菌株 A-2 在 CDA 平板上的形态特征

Fig. 4 Morphological features of strain A-2 on CDA media

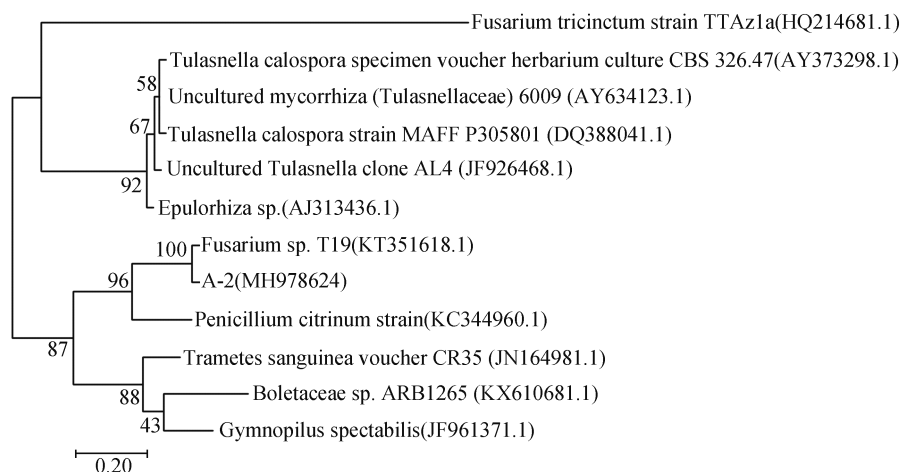


图 5 基于 A-2 的 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the ITS sequence of strain A-2

表 2 铀镉共同胁迫下 *Fusarium* sp. A-2 CDM 培养基中有机酸质量浓度

Table 2 Organic acid mass concentration in CDM medium of <i>Fusarium</i> sp. A-2 under uranium and cadmium co-stress (mg · L ⁻¹)				
处理组	草酸 质量浓度	苹果酸 质量浓度	丙二酸 质量浓度	丁二酸 质量浓度
CK	755.2±12.9 ^a	38.5±1.1 ^a	—	20.4±2.1 ^a
10+5	826.3±15.0 ^b	43.0±1.7 ^a	—	43.5±2.4 ^b
20+10	959.1±23.8 ^c	55.7±2.4 ^b	—	48.5±2.3 ^b
30+20	1430.4±29.5 ^d	71.9±1.5 ^c	23.5±1.7 ^b	57.4±1.1 ^c
40+40	834.8±20.4 ^b	37.7±1.3 ^a	10.2±0.8 ^a	21.4±0.9 ^a
80+80	—	—	—	—
160+160	—	—	—	—

注:“—”表示未检测有机酸的分泌;同列中不同小写字母表示不同处理对指标影响差异显著($P<0.05$)

3 结 论

1)本研究从博落回根部分离出了一株耐铀镉真菌菌株 A-2,在固体培养基上,铀和镉对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)为 160 mg/L 和 160 mg/L,在液体培养基中,铀和镉对该菌株的 MIC 为 80 mg/L 和 80 mg/L。经形态学观察和分子鉴定,该菌株为镰刀菌属真菌,GenBank 登录号为 MH978624,命名为 *Fusarium* sp. A-2。

2)在铀和镉共同胁迫下, *Fusarium* sp. A-2 能分泌大量草酸、苹果酸和丁二酸,这可能是该菌株具有高耐铀镉性及能减轻铀镉毒害的机理之一。

参考文献:

[1] VANHOUDT N, VANDENHOVE H, HOREMANS N, et al. Study of oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana* following mixed exposure to uranium and cadmium [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2010, 48(10): 879-886.

[2] HOREMANS N, VAN HEES M, VAN HOECK A, et al. Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in *Lemna minor* L [J]. *Plant biology*, 2015, 17(1): 91-100.

[3] PLANT J A, SIMPSON P R, SMITH B, et al. Uranium ore deposits; products of the radioactive Earth [J]. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 1999, 38(1): 255-319.

[4] DAS S, DASH R H. 1-Microbial Bioremediation; a potential tool for restoration of contaminated areas [J]. *Microbial biodegradation & bioremediation*, 2014, 2014:

1-21.

[5] ABHILASH P C, POWEL J R, SINGH H B, et al. Plant-microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies [J]. *Trends in biotechnology*, 2014, 30(1): 416-420.

[6] WU G, SUN M, LIU P, et al. *Enterococcus faecalis* strain LZ-11 isolated from Lanzhou reach of the Yellow River is able to resist and absorb Cadmium [J]. *Journal of applied microbiology*, 2014, 116(5): 1172-1180.

[7] MARÍA-ISABEL DE S, EVA-MARÍA P, CALLEJO M A, et al. Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap [J]. *Fems microbiology Letters*, 2002, 210(2): 233-237.

[8] KUMAR R, ACHARYA C, JOSHI R S. Isolation and analyses of uranium tolerant *Serratia marcescens* strains and their utilization for aerobic uranium U(VI) bioadsorption [J]. *Journal of microbiology*, 2011, 49(4): 568-574.

[9] NEDELKOVA M, MERROUN M L, ROSSBERG A, et al. *Microbacterium* isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium [J]. *Fems microbiology ecology*, 2010, 59(3): 694-705.

[10] 周赓, 杨辉, 潘虎, 等. 一株耐镉链霉菌的筛选、鉴定与基本特性分析 [J]. *环境科学学报*, 2017, 37(6): 2076-2084.

[11] TAMANDEGANI P R, ZAFARI D. Evaluation of different *Fusarium* species-wheat interactions effect on Cd bio-sorption by wheat seedlings [J]. *International journal of environmental science & technology*, 2017(1): 1-12.

[12] KHAN A R, WAQAS M, ULLAH I, et al. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation [J]. *Environmental & experimental botany*, 2016, 135: 126-135.

[13] NIE J, LIU Y, ZENG G, et al. Cadmium accumulation and tolerance of *Macleaya cordata*; a newly potential plant for sustainable phytoremediation in Cd-contaminated soil [J]. *Environmental science & pollution research*, 2016, 23(10): 10189-10199.

[14] 陈威, 胡南, 陈可, 等. 博落回和竹柳间作修复铀污染土壤的研究 [J]. *原子能科学技术*, 2018, 52(10): 1748-1755.

[15] 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.

[16] BAN Y, TANG M, CHEN H, et al. The response of dark septate endophytes (DSE) to heavy metals in pure culture [J]. *Plos one*, 2012, 7(10): 479-68.

[17] 冷阳. 黄孢原毛平革菌对重金属镉的富集及其交互作用机理研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2014.

(责任编辑:周泉)