

云南会泽废弃铅锌矿区和非矿区 小花南芥根际真菌的耐镉性*

湛方栋 何永美 李元 祖艳群**

(云南农业大学资源与环境学院 昆明 650201)

摘要 采用常规、含 Cd^{2+} 和含 Pb^{2+} 的马丁氏培养基,对云南省会泽县废弃铅锌矿区和非矿区小花南芥(*Arabis alpine*)根际真菌进行分离,将分离的菌株接种到含不同浓度(0、0.05、0.5、5 mmol L^{-1}) Cd^{2+} 的马铃薯葡萄糖培养液中,比较废弃铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的镉耐性。结果表明: Cd^{2+} 显著抑制铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的生长;常规、含 Cd^{2+} 和含 Pb^{2+} 的马丁氏培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌 Cd^{2+} 的生长半数抑制浓度(EC_{50} 值)平均值和最大值均明显大于非矿区,表明铅锌矿区小花南芥根际真菌对 Cd^{2+} 的耐性强于非矿区;3种培养基分离的真菌中,含 Cd^{2+} 培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌对 Cd^{2+} 的耐性最强。表3 参26

关键词 铅锌矿区;小花南芥;根际真菌;镉

CLC S154.36 : X171.5

Cadmium Tolerance of Rhizosphere Fungi of *Arabis alpina* in Abandoned Lead-zinc Mining and Non-mining Area in Huize, Yunnan, China*

ZHAN Fangdong, HE Yongmei, LI Yuan & ZU Yanqun**

(College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract Culturable rhizosphere fungi of *Arabis alpina* in abandoned lead-zinc mining and non-mining area in Huize, Yunnan, China were isolated with normal, Cd^{2+} and Pb^{2+} containing Martin's media. Cd^{2+} tolerance of those isolated fungi were investigated with potato dextrose fluid media containing 0, 0.05, 0.5 and 5 mmol L^{-1} Cd^{2+} . The results showed that the growth of rhizosphere fungi of *Arenaria orbiculata* in the abandoned lead-zinc mining and non-mining area was significantly suppressed by Cd^{2+} . The mean and maximum lethal concentrations of 50% (EC_{50} value) of Cd^{2+} to the rhizosphere fungi in the abandoned lead-zinc mining area isolated by normal, Cd^{2+} and Pb^{2+} containing media were obviously greater than those in the non-mining area, which indicated that Cd^{2+} tolerance of the rhizosphere fungi in the abandoned lead-zinc mining area was greater than that in the non-mining area. Among these fungi isolated by these 3 media, the rhizosphere fungi of *A. alpina* in the abandoned lead-zinc mining area isolated by Cd^{2+} containing medium were the most tolerant to Cd^{2+} . Tab 3, Ref 26

Keywords lead-zinc mining area; *Arabis alpina*; rhizosphere fungi; cadmium

CLC S154.36 : X171.5

土壤系统中的有毒重金属污染和防治一直是污染生态研究的难点和热点。受重金属污染的土壤,往往积累耐重金属的微生物,这些微生物影响土壤重金属的毒性和生物可利用性,目前报道较多的是外生菌根^[1]和丛枝菌根^[2-3]。由于根际真菌能吸附植物根际土壤内的重金属,因此接种耐受重金属的根际真菌,能提高植物对重金属的耐受,可用于发展根际真菌-植物联合修复重金属污染土壤的新途径,现已受到土壤环境科技工作者的普遍关注^[4-5]。

筛选耐受重金属的微生物是发展植物-微生物联合修复技术的基础。重金属污染土壤中存在大量重金属耐性微生物,采用常规培养基可以获得耐重金属的微生物,但采用含

重金属的培养基是更常用的分离耐重金属微生物的方法^[6-7]。然而,重金属污染土壤通常由多种重金属共同污染,制备含重金属的培养基时选择何种重金属,才能有效分离到重金属耐性强的微生物,含重金属的培养基与常规培养基分离获得的土壤微生物在重金属耐性上是否存在巨大差异,均值得探讨。

会泽县位于云南省东北部,介于东经 $103^{\circ}03' \sim 103^{\circ}55'$ 、北纬 $25^{\circ}48' \sim 27^{\circ}04'$ 之间。会泽铅锌矿的采矿历史最早可以追溯到西汉时期,由于长期、大面积的开矿和冶炼,留下许多铅(Pb)和镉(Cd)等重金属严重污染的采矿废弃地。小花南芥是云南会泽县铅锌矿区野生的重金属耐性植物^[8],在周边非矿区也有生长。本试验采集会泽铅锌矿区和非矿区小花南芥根际土壤,利用常规、含 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的马丁氏培养基分离小花南芥根际真菌,测定不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下小花南芥根际真菌的生物量,计算 Cd^{2+} 对小花南芥根际真菌生长的半数抑制浓度(EC_{50} 值),比较不同培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌镉耐性差异,明确采用哪种培养基能够有效分离获得重金属耐性强的小花南芥根际真菌,为筛选重

收稿日期: 2009-10-16 接受日期: 2010-02-10

*国家自然科学基金项目(No. 30560034)、云南省学术带头人后备人才项目(No. 2006 PY01-34)和云南省教育厅青年科研基金项目(No. 6Y032B0)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30560034), the Program of Yunnan, China for Reserve Talents of Academic Leaders (No. 2006 PY01-34), and the Youth Foundation of Department of Education of Yunnan, China (No. 6Y032B0)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zuyanqun@yahoo.com.cn)

属耐性菌株提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

小花南芥 (*Arabis alpina* Linn), 十字花科南芥属, 二年生野生草本植物, 生长在1 600~3 000 m的山坡林下、草丛中或沟旁, 分布在云南、贵州、四川等地^[9]。

1.2 样品采集与根际真菌分离

在会泽县者海镇民兵应急营Pb/Zn矿区(海拔2 463~2 516 m, 103°42'44 E, 26°38'58N), 铅锌矿区土壤全氮0.5 g kg⁻¹, 全磷0.8 g kg⁻¹, 全钾3.9 g kg⁻¹, pH值6.03, 全Pb 3 156.28 mg kg⁻¹, 全Zn 45 308.21 mg kg⁻¹, 全Cd 55.92 mg kg⁻¹。非矿区土壤全氮0.5 g kg⁻¹, 全磷0.8 g kg⁻¹, 全钾3.9 g kg⁻¹, pH值7.01, 全Pb 56.28 mg kg⁻¹, 全Zn 175.21 mg kg⁻¹, 全Cd 1.92 mg kg⁻¹。随机连根带土挖取野生小花南芥健壮植株10株, 塑料纸包扎密封根部, 保持湿度和鲜活性, 带回实验室, 备用。

选用依然鲜活的野生小花南芥植株, 轻轻抖动除去粘附在根表面的土壤, 混合10株根系为一样品, 置于盛有100 mL无菌水的三角瓶中, 振荡15 min, 获得铅锌矿区和非矿区野生小花南芥的根际土壤悬浊液, 用于根际真菌的分离^[10]。

根际真菌分离的常规培养基为马丁氏培养基。采用氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O)和醋酸铅[Pb(CH₃COO)₂·3H₂O]分析纯固体试剂, 配制浓度为100 mmol L⁻¹的Cd²⁺和Pb²⁺母液。马丁氏培养基灭菌后冷却至50 ℃时, 加入Cd²⁺母液使得培养基分别含1、2、5 mmol L⁻¹的Cd²⁺, 作为含Cd²⁺培养基; 添加Pb²⁺母液使得培养基含2、4、10 mmol L⁻¹的Pb²⁺, 作为含Pb²⁺培养基^[11]。采用稀释平板法, 根际真菌培养3 d后, 依据真菌的菌落形态挑取菌株, 采用PDA培养基分离纯化和保存。

1.3 Cd²⁺处理下小花南芥根际真菌生长量和EC₅₀测定

采用马铃薯葡萄糖培养基, 添加定量的Cd²⁺储备液, 制备Cd²⁺浓度分别为0、0.05、0.5、5 mmol L⁻¹的培养液, 50 mL三角瓶分装, 每个三角瓶装入20 mL培养液, 灭菌后备用。

利用直径为6 mm的打孔器, 获得培养7 d的小花南芥根际真菌菌落, 每20 mL培养液接种1片直径为6 mm的菌落, 28 ℃静止培养7 d后, 用已在80 ℃烘了24 h的干滤纸过滤, 得到

真菌菌丝体, 再将滤纸和菌丝体置于80 ℃烘干24 h后, 取出称重, 该重减去滤纸干重, 从而得到菌丝体生物量。用直线内插法求出小花南芥根际真菌生物量为50%时所对应的Cd²⁺浓度, 即Cd²⁺对小花南芥根际真菌的EC₅₀值。

1.4 数据分析

采用统计软件DPS6.55, Duncan新复极差法分析铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的不同Cd²⁺浓度处理间生物量的差异显著性(N=3), 并计算Cd²⁺与根际真菌生物量之间的相关系数。

2 结果与分析

2.1 常规培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的耐镉性

对比菌落形态, 从常规马丁氏培养基上挑取和保存5个铅锌矿区和6个非矿区小花南芥根际真菌菌株。常规培养基分离的5个铅锌矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液Cd²⁺浓度为0.5 mmol L⁻¹时, 4个菌株生长显著下降; Cd²⁺浓度5 mmol L⁻¹时, 5个菌株生长均显著下降。铅锌矿区小花南芥根际真菌的生长随加入的Cd²⁺浓度升高而下降, Cd²⁺与铅锌矿区小花南芥根际真菌生长量呈极显著或显著负相关。Cd²⁺对5株铅锌矿区小花南芥根际真菌的平均EC₅₀值为0.61 mmol L⁻¹, 其中, 2株铅锌矿区小花南芥根际细菌的EC₅₀值大于1.00 mmol L⁻¹, 最大EC₅₀值为1.21 mmol L⁻¹(表1)。

6个常规培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液Cd²⁺浓度为0.05 mmol L⁻¹时, 1个菌株生长均显著下降; Cd²⁺浓度为0.5和5 mmol L⁻¹时, 6个菌株生长均显著下降。可见, Cd²⁺浓度达到0.5 mmol L⁻¹, 显著抑制非矿区小花南芥根际真菌的生长, 根际真菌的生长随加入的Cd²⁺浓度的升高而下降, Cd²⁺与非矿区小花南芥根际真菌生长量呈显著或极显著负相关。Cd²⁺对6株小花南芥根际细菌的平均EC₅₀值为0.37 mmol L⁻¹, 最大EC₅₀值为0.54 mmol L⁻¹(表1)。

2.2 含Cd²⁺培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的耐镉性

从含Cd²⁺的马丁氏培养基上挑取与保存10个铅锌矿区和13个非矿区小花南芥根际真菌菌株。10个含Cd²⁺培养基分

表1 Cd²⁺处理下马丁氏培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的生长量、EC₅₀值和相关系数
Table 1 Comparison of biomass, EC₅₀ value and correlation coefficient of *A. alpina* isolated by Martin's media between lead-zinc mining area and non-mining area under Cd²⁺ treatment

样地 Sampling site	菌株 Strain	生物量 Biomass (m/mg)				EC ₅₀ (c/mmol L ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient
		无Cd ²⁺ No Cd ²⁺	0.05 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺	0.5 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺	5 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺		
矿区 Lead-zinc mining area	KXF-1	73.7±25.3 a	70.9±10.9 a	48.2±11.6 ab	8.7±3.3 b	1.21	-0.74**
	KXF-2	195.2±51.9 a	112.9±10.3 ab	83.6±13.8 bc	0 c	0.27	-0.74**
	KXF-3	137.5±7.8 a	113.6±18.5 a	28.7±6.6 b	8.0±2.0 c	0.36	-0.80**
	KXF-5	156.9±17.2 a	113.6±18.5 a	39.0±12.1 b	31.1±21.9 b	0.20	-0.60*
	KXF-7	137.5±20.9 a	97.4±16.0 ab	76.2±19.9 bc	30.4±9.0 c	1.00	-0.73**
非矿区 Non-mining area	FXF-1	102.6±15.0 a	92.5±7.0 a	42.7±10.3 b	34.0±9.2 b	0.39	-0.64*
	FXF-2	135.2±13.7 a	78.5±18.1 b	43.5±10.6 c	24.9±10.0 c	0.14	-0.60*
	FXF-5	138.3±17.9 a	133.5±8.7 a	66.0±10.6 b	50.5±19.7 b	0.47	-0.66*
	FXF-7	143.7±38.4 a	106.3±11.4 ab	54.9±3.4 bc	17.7±3.7 c	0.32	-0.70**
	FXF-8	140.3±21.6 a	116.2±7.5 ab	71.2±17.5 b	12.3±2.2 c	0.54	-0.83**
	FXF-9	70.7±8.8 a	55.8±5.7 a	27.3±5.2 b	0 c	0.34	-0.83**

* P<0.05, **P<0.01. 下同 The same below

离的铅锌矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液 Cd^{2+} 浓度为 0.05 mmol L^{-1} 时, 3个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 0.5 mmol L^{-1} 时, 7个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 5 mmol L^{-1} 时, 10个菌株生长均显著下降, 1个菌株没有生长. 可见, 含 Cd^{2+} 培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌的生长随加入的 Cd^{2+} 浓度升高而下降, Cd^{2+} 与9个菌株生长量呈极显著或显著负相关. Cd^{2+} 对含 Cd^{2+} 培养基分离的10株铅锌矿区小花南芥根际真菌的平均 EC_{50} 值为 1.22 mmol L^{-1} , 其中, 6株铅锌矿区小花南芥根际细菌的 EC_{50} 值大于 1.00 mmol L^{-1} , 2株铅锌矿区小花南芥根际细菌的 EC_{50} 值大于 2.00 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值为 2.37 mmol L^{-1} (表2).

13个含 Cd^{2+} 培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液 Cd^{2+} 浓度为 0.05 mmol L^{-1} 时, 3个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 0.5 mmol L^{-1} 时, 7个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 5 mmol L^{-1} 时, 13个菌株生长均显著下降, 3个菌株没有生长. 可见, 含 Cd^{2+} 培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌的生长随加入的 Cd^{2+} 浓度升高而下降, Cd^{2+} 与11个菌株生长量呈极显著或显著负相关. Cd^{2+} 对含 Cd^{2+} 培养基分离的13株非矿区小花南芥根际真菌的平均 EC_{50} 值为 0.62 mmol L^{-1} , 2株铅锌矿区小花南芥根际细菌的 EC_{50} 值大于 1.00 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值为 1.42 mmol L^{-1} (表2).

2.3 含 Pb^{2+} 培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的镉耐性

从含 Pb^{2+} 的马丁氏培养基上均挑取和保存10个铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌菌株. 10个含 Pb^{2+} 培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液 Cd^{2+} 浓度为 0.05 mmol L^{-1} 时, 3个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 0.5 mmol L^{-1}

时, 8个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 5 mmol L^{-1} 时, 10个菌株生长均显著下降, 2个菌株没有生长. 可见, 含 Cd^{2+} 培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌的生长随加入的 Cd^{2+} 浓度升高而下降, Cd^{2+} 与9个菌株生长量呈极显著或显著负相关. Cd^{2+} 对含 Pb^{2+} 培养基分离的10株铅锌矿区小花南芥根际真菌的平均 EC_{50} 值为 0.76 mmol L^{-1} , 4株铅锌矿区小花南芥根际细菌的 EC_{50} 值大于 1.00 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值为 1.84 mmol L^{-1} (表3).

10个含 Pb^{2+} 培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌菌株, 在培养液 Cd^{2+} 浓度为 0.05 mmol L^{-1} 时, 3个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 0.5 mmol L^{-1} 时, 6个菌株生长显著下降; Cd^{2+} 浓度为 5 mmol L^{-1} 时, 10个菌株生长均显著下降, 3个菌株没有生长. 可见, 含 Cd^{2+} 培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌的生长随加入的 Cd^{2+} 浓度升高而下降, Cd^{2+} 与10个菌株生长量呈极显著或显著负相关. Cd^{2+} 对含 Pb^{2+} 培养基分离的10株非矿区小花南芥根际真菌的平均 EC_{50} 值为 0.60 mmol L^{-1} , 2株铅锌矿区小花南芥根际细菌的 EC_{50} 值大于 1.00 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值为 1.13 mmol L^{-1} (表3).

2.4 不同培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的镉耐性比较

Cd^{2+} 对常规、含 Cd^{2+} 、含 Pb^{2+} 的马丁氏培养基分离的铅锌矿区小花南芥根际真菌的 EC_{50} 值平均分别为 0.61 、 1.22 、 0.76 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值分别为 1.21 、 2.37 、 1.84 mmol L^{-1} , 对非矿区小花南芥根际真菌的 EC_{50} 平均值分别为 0.37 、 0.62 、 0.60 mmol L^{-1} , 最大 EC_{50} 值分别为 0.54 、 1.42 、 1.13 mmol L^{-1} , 表明铅锌矿区小花南芥根际真菌对 Cd^{2+} 的耐性强于非矿区, 在铅锌矿区小花南芥根际存在镉耐性强的真菌.

表2 Cd^{2+} 处理下含 Cd^{2+} 马丁氏培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的生长量、 EC_{50} 值和相关系数

Table 2 Comparison of biomass, EC_{50} value and correlation coefficient of *A. alpine* isolated by Martin's media with Cd^{2+} between lead-zinc mining area and non-mining area under Cd^{2+} treatment

样地 Sampling site	菌株 Strain	生物量 Biomass (m/mg)				EC_{50} ($\text{c}/\text{mmol L}^{-1}$)	相关系数 Correlation coefficient
		无 Cd^{2+} No Cd^{2+}	0.05 mmol L^{-1} Cd^{2+}	0.5 mmol L^{-1} Cd^{2+}	5 mmol L^{-1} Cd^{2+}		
矿区 Lead-zinc mining area	KCF-1	$56.4 \pm 7.7 \text{ a}$	$54.1 \pm 15.0 \text{ a}$	$30.6 \pm 2.2 \text{ ab}$	$19.9 \pm 8.3 \text{ b}$	1.35	-0.62*
	KCF-2	$147.5 \pm 2.0 \text{ a}$	$114.0 \pm 8.8 \text{ b}$	$104.9 \pm 5.0 \text{ b}$	$27.9 \pm 10.0 \text{ c}$	1.70	-0.93**
	KCF-3	$109.0 \pm 5.3 \text{ a}$	$108.4 \pm 6.8 \text{ a}$	$46.1 \pm 22.5 \text{ b}$	$40.6 \pm 4.8 \text{ b}$	0.41	-0.61*
	KCF-4	$145.1 \pm 4.6 \text{ a}$	$137.8 \pm 39.3 \text{ a}$	$101.4 \pm 7.1 \text{ ab}$	$46.5 \pm 5.6 \text{ b}$	2.04	-0.76**
	KCF-5	$122.1 \pm 15.8 \text{ a}$	$87.7 \pm 8.5 \text{ b}$	$48.0 \pm 9.0 \text{ c}$	0 d	0.32	-0.82**
	KCF-6	$82.1 \pm 21.7 \text{ a}$	$50.3 \pm 11.9 \text{ ab}$	$33.7 \pm 5.8 \text{ b}$	$26.5 \pm 6.2 \text{ b}$	0.28	-0.49
	KCF-7	$121.1 \pm 13.4 \text{ a}$	$97.0 \pm 12.4 \text{ a}$	$79.8 \pm 21.9 \text{ a}$	$30.4 \pm 8.9 \text{ b}$	1.78	-0.79**
	KCF-8	$84.7 \pm 6.4 \text{ a}$	$82.0 \pm 10.0 \text{ a}$	$52.3 \pm 8.6 \text{ b}$	$20.0 \pm 10.4 \text{ c}$	1.49	-0.82**
	KCF-9	$169.8 \pm 7.5 \text{ a}$	$151.2 \pm 6.2 \text{ ab}$	$124.9 \pm 9.3 \text{ b}$	$49.5 \pm 17.3 \text{ c}$	2.37	-0.91**
	KCF-10	$154.8 \pm 14.0 \text{ a}$	$119.1 \pm 11.9 \text{ b}$	$76.8 \pm 9.0 \text{ b}$	$8.6 \pm 4.8 \text{ c}$	0.49	-0.87**
非矿区 Non-mining area	FCF-1	$97.1 \pm 36.3 \text{ a}$	$90.6 \pm 12.7 \text{ a}$	$42.7 \pm 5.4 \text{ a}$	$36.9 \pm 14.4 \text{ a}$	0.42	-0.48
	FCF-2	$130.0 \pm 19.0 \text{ a}$	$105.0 \pm 25.6 \text{ a}$	$66.2 \pm 14.2 \text{ ab}$	$26.1 \pm 13.9 \text{ b}$	0.59	-0.72**
	FCF-3	$39.5 \pm 4.7 \text{ a}$	$23.9 \pm 8.2 \text{ ab}$	$19.3 \pm 13.3 \text{ ab}$	0 b	0.46	-0.68*
	FCF-4	$91.1 \pm 8.6 \text{ a}$	$82.8 \pm 15.4 \text{ a}$	$60.6 \pm 15.6 \text{ a}$	$10.6 \pm 4.4 \text{ b}$	1.24	-0.85**
	FCF-5	$126.5 \pm 18.9 \text{ a}$	$78.1 \pm 13.5 \text{ ab}$	$76.7 \pm 16.6 \text{ ab}$	$13.2 \pm 1.0 \text{ b}$	1.42	-0.70**
	FCF-6	$107.2 \pm 38.5 \text{ a}$	$74.3 \pm 10.5 \text{ ab}$	$60.0 \pm 6.1 \text{ ab}$	$10.2 \pm 3.7 \text{ b}$	0.79	-0.70**
	FCF-7	$185.9 \pm 21.3 \text{ a}$	$126.9 \pm 12.4 \text{ b}$	$97.6 \pm 17.7 \text{ b}$	$27.7 \pm 13.1 \text{ c}$	0.67	-0.80**
	FCF-9	$107.9 \pm 46.6 \text{ a}$	$60.6 \pm 9.5 \text{ ab}$	$48.3 \pm 8.0 \text{ ab}$	$18.4 \pm 2.7 \text{ b}$	0.28	-0.53
	FCF-10	$162.4 \pm 22.7 \text{ a}$	$128.0 \pm 9.1 \text{ ab}$	$86.6 \pm 12.6 \text{ b}$	$36.3 \pm 9.0 \text{ c}$	0.83	-0.80**
	FCF-11	$88.6 \pm 27.6 \text{ a}$	$69.5 \pm 12.4 \text{ ab}$	$27.1 \pm 11.2 \text{ bc}$	0 c	0.26	-0.69**
	FCF-12	$70.0 \pm 3.9 \text{ a}$	$38.5 \pm 6.3 \text{ b}$	$27.2 \pm 6.2 \text{ b}$	0 c	0.17	-0.79**
	FCF-13	$63.8 \pm 16.6 \text{ a}$	$57.8 \pm 10.7 \text{ a}$	$36.9 \pm 10.5 \text{ a}$	0 b	0.31	-0.80*
	FCF-14	$130.2 \pm 7.7 \text{ a}$	$93.9 \pm 35.1 \text{ a}$	$24.6 \pm 5.3 \text{ b}$	0 b	0.17	-0.67*

表3 Cd²⁺处理下含Pb²⁺马丁氏培养基分离的铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的生长量、EC₅₀值和相关系数
Table 3 Comparison of biomass, EC₅₀ value and correlation coefficient of *A. alpine* isolated by Martin's media with Pb²⁺ between lead-zinc mining area and non-mining area under Cd²⁺ treatment

样地 Sampling site	菌株 Strain	生物量 Biomass (m/mg)				EC ₅₀ (c/mmol L ⁻¹)	相关系数 Correlation coefficient
		无Cd ²⁺ No Cd ²⁺	0.05 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺	0.5 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺	5 mmol L ⁻¹ Cd ²⁺		
矿区 Lead-zinc mining area	KPF-1	129.8±7.1 a	117.6±28.3 a	55.7±13.8 b	9.8±4.1 b	0.41	-0.78**
	KPF-2	149.2±7.2 a	96.0±4.2 b	98.6±5.4 b	22.3±7.3 c	1.34	-0.89**
	KPF-3	123.8±9.9 a	131.9±11.1 a	83.2±7.6 b	6.9±4.7 c	1.03	-0.93**
	KPF-4	174.1±14.7 a	126.7±10.4 b	86.8±6.4 c	10.3±3.7 d	0.50	-0.87**
	KPF-6	87.0±14.9 a	52.0±4.7 b	28.3±6.9 b	0 c	0.18	-0.75**
	KPF-8	105.6±4.5 a	78.6±18.5 a	26.2±7.1 b	0 b	0.21	-0.74**
	KPF-9	170.9±28.2 a	141.1±17.8 a	109.3±17.1 a	17.0±5.7 b	1.10	-0.89**
	KPF-10	61.0±26.6 a	33.7±1.9 a	29.3±3.2 a	14.5±3.7 a	0.37	-0.48
	KPF-11	130.4±8.7 a	90.8±15.9 ab	77.4±10.2 b	43.5±21.3 c	1.84	-0.68*
	KPF-13	91.4±16.5 a	78.8±10.9 ab	46.9±13.1 bc	21.4±4.3 b	0.65	-0.73**
非矿区 Non-mining area	FPF-1	129.5±4.1 a	90.2±10.4 b	74.8±12.7 b	26.7±5.7 c	1.13	-0.87**
	FPF-2	88.5±23.9 a	87.6±32.6 a	48.2±19.1 ab	10.4±2.9 b	0.75	-0.65*
	FPF-3	57.4±9.1 a	37.2±12.5 ab	32.5±17.3 ab	11.8±9.5 b	1.05	-0.57*
	FPF-5	145.5±5.3 a	82.3±12.2 b	56.5±11.3 b	0 c	0.20	-0.80**
	FPF-6	115.2±10.9 a	90.4±14.1 a	29.5±9.1 b	0 b	0.23	-0.76**
	FPF-7	94.8±4.4 a	60.7±4.8 b	40.9±10.9 bc	17.2±7.9 c	0.33	-0.74**
	FPF-8	90.7±37.4 a	69.5±17.2 ab	23.4±4.5 ab	0 b	0.23	-0.62*
	FPF-11	114.8±23.0 a	80.8±12.2 ab	61.3±12.8 bc	24.0±8.1 c	0.82	-0.72**
	FPF-12	104.7±29.6 a	70.7±4.8 a	62.0±8.8 ab	12.8±3.5 b	0.98	-0.75**
	FPF-13	94.9±21.2 a	57.5±12.1 ab	37.7±8.7 bc	11.1±1.9 c	0.26	-0.68*

采用常规、含Cd²⁺和含Pb²⁺的马丁氏培养基分别分离出Cd²⁺的EC₅₀值大于1.00 mmol L⁻¹的铅锌矿区小花南芥根际真菌2株、6株和4株,采用含Cd²⁺和含Pb²⁺的马丁氏培养基均分离出Cd²⁺的EC₅₀值大于1.00 mmol L⁻¹的非矿区小花南芥根际真菌2株,而采用常规马丁氏培养基分离的非矿区小花南芥根际真菌Cd²⁺的EC₅₀值均小于1.00 mmol L⁻¹,结合比较这3种培养基分离的小花南芥根际真菌Cd²⁺的EC₅₀的平均值和最大值,可见采用含Cd²⁺的选择性培养基分离出的小花南芥根际真菌对Cd²⁺的耐性较强,尤其以从铅锌矿区分离的小花南芥根际真菌对Cd²⁺耐性最强。

3 讨论

从Cd²⁺污染土壤能够分离获得Cd²⁺耐性很强的真菌,如Zafar等从污水灌溉导致Cd²⁺污染的农田筛选的丝状真菌对Cd²⁺的MIC值达到0.2~5 mg L⁻¹ [12];杜爱雪等从铜矿尾矿土壤中分离得到一株高抗重金属的青霉菌,对Cd²⁺的抗性水平为5 mmol L⁻¹ [13-14];此外,姜敏等还从重金属富集植物——大叶相思根内分离到抗重金属的青霉、曲霉、镰刀菌、木霉等与植物有密切关系的真菌 [15]。这些研究表明Cd²⁺耐性真菌通常存在镉严重污染的生境中。本试验采用含Cd²⁺培养基分离获得的铅锌矿区小花南芥根际真菌Cd²⁺耐性也较强,由于Cd²⁺的生物毒性强,迁移性强,易被生物吸收和积累,生物半衰期长,是限制铅锌矿区生物生存的关键因子 [16],铅锌矿区小花南芥长期生长于Cd²⁺污染严重的土壤上,其根际真菌对Cd²⁺产生了适应。

试验采用马铃薯蔗糖培养基测定小花南芥根际真菌的Cd²⁺耐性,该类培养基制备简单,营养丰富,适宜真菌生长,但由于该培养基含有较多的有机物,在该培养基添加Cd²⁺后产生较多沉淀,沉淀的产生量随加入Cd²⁺的浓度增加而增多,推测这些沉淀可能是培养基内的天然有机物与Cd²⁺形成

了络合物 [17],可能导致培养基内Cd²⁺浓度低于试验设计的Cd²⁺浓度,使得测定出的小花南芥根际真菌Cd²⁺的EC₅₀值比实际EC₅₀值偏大。采用MMN [18]、查氏 [19]等合成培养基评价真菌的重金属耐性,由于合成培养基成分明确,组成较简单,有机化合物含量少,在添加重金属离子后,不形成或少形成沉淀,培养液内有效重金属离子浓度可能更接近人为设计加入的浓度。因此,采用合成培养基 [18-19]和天然培养基 [20-21]评价真菌重金属耐性的研究均有报道。虽然天然培养基通常较适宜真菌生长和降低重金属离子的生物有效性,将导致采用天然培养基比采用合成培养基测定出的真菌重金属耐性大,但采用天然培养基测定和比较不同真菌的重金属耐性,在培养条件一致情况下,仍可以反映不同真菌重金属耐性的大小。

从重金属严重污染的土壤上分离重金属耐性强的根际真菌后,通过接种,利用根际真菌的生物吸附、富集、溶解、沉淀、氧化与还原等作用,改变重金属的形态,影响重金属的生物有效性,从而提高植物修复效率 [22-23]。另外可以直接筛选重金属耐性强、生物量大、重金属吸附去除能力强的真菌用于生物吸附,达到去除污染环境重金属的目的 [24-26]。因此,从重金属污染严重的土壤筛选重金属耐性强的根际真菌,可以为开展耐性植物-微生物联合修复或微生物修复提供新途径。

References

- Krzmaric E, Verbruggen N, Wevers JH, Carleer R, Vangronsveld J, Colpaert JV. Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd. *Environ Poll*, 2009, **157**: 1581-1588
- Bafeel SO. Contribution of mycorrhizae in phytoremediation of lead contaminated soils by *Eucalyptus rostrata* plants. *World Appl Sci J*, 2008, **5** (4): 490-498

- 3 Redon PO, Béguiristain T, Leyval C. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza*, 2009, **19** (3): 187~195
- 4 Lynch JM, Moffat AJ. Bioremediation – prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann Appl Biol*, 2005, **146** (2): 217~221
- 5 Jiang M, Cao L, Zhang R. Effects of *Acacia* (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn)-associated fungi on mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) growth in Cd- and Ni-contaminated soils. *Lett Appl Microbiol*, 2008, **47**: 561~565
- 6 Xia JJ (夏娟娟), Sheng XF (盛下放), Jiang CY (江春玉). Screening of cadmium-resistant strains and their effects on cadmium activation. *Chin J Ecol* (生态学杂志), 2005, **24** (11): 1357~1360
- 7 Liu AM (刘爱民), Huang WY (黄为一). Separation of tolerant cadmium bacterium strain and its accumulation adsorption of Cd²⁺. *China Environ Sci* (中国环境科学), 2006, **26** (1): 91~95
- 8 Zu YQ, Li Y, Chen JJ, Chen HY, Qin L, Schvartz C. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China. *Environ Intern*, 2005, **31** (5): 755~762
- 9 China Flora Editing Group (中国科学院中国植物志编辑委员会). Flora of China, Volume 33rd. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1996. 253~254
- 10 Microbiology Laboratory, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences (中国科学院南京土壤研究所微生物室). Study Methods of Soil Microbiology. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1985. 67~153
- 11 Zhan FD (湛方栋), He YM (何永美), Li Y (李元), Zu YQ (祖艳群). Rhizosphere microorganisms of 3 wild plants in abandoned lead-zinc mine and non-mining area in huize, yunnan, China. *Chin J Soil Sci* (土壤通报), 2010, **41** (2): 337~341
- 12 Zafar S, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol*, 2007, **98** (13): 2557~2561
- 13 Du AX (杜爱雪), Cao LX (曹理想), Zhang RD (张仁铎). Screening of *Penicillium* strain with high copper resistance and its adsorption of heavy metals. *Chin J Appl & Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (5): 650~653
- 14 Du AX, Cao LX, Zhang RD, Pan R. Effects of a copper-resistant fungus on copper adsorption and chemical forms in soils. *Water Air & Soil Poll*, 2009, **201**: 99~107
- 15 Jiang M (姜敏), Cao LX (曹理想), Zhang RD (张仁铎). The relationship of heavy metal resistant endophyte and the heavy metal resistance ability of their host plants. *J Agro-Environ Sci* (农业环境科学学报), 2007, **26** (6): 2038~2042
- 16 Shu WS (束文圣), Lan CY (蓝崇钰), Zhang ZQ (张志权). Analysis of major constraints on plant colonization at Fankou Pb/Zn mine tailings. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 1997, **8**(3): 314~318
- 17 Zhang GC (张广才), Yan XM (燕香梅), Guang LZ (关连珠), Yan L (颜丽). Advances in effects of organic complex matters on phosphorus and particulate trace metals in soil. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 2002, **33** (3): 215~218
- 18 Li FY (李芳一), Zhang JL (张俊伶), Feng G (冯固), Li XL (李晓林). The tolerance of ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *Paxillus involutus* to heavy metals Zn, Cd, Pb. *Acta Sci Circumst* (环境科学学报), 2003, **23** (6): 807~802
- 19 Pan R, Cao L, Zhang R. 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 Hazardous Mat*, 2009, **171** (1~3): 761~766
- 20 Iram S, Ahmad I, Stuben D. Analysis of mines and contaminated agricultural soil samples for fungal diversity and tolerance to heavy metals. *Pak J Bot*, 2009, **41** (2): 885~895
- 21 Ezzouhri L, Castro E, Moya M, Espinola F, Lairini K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *Afr J Microbiol Res*, 2009, **3** (2): 35~48
- 22 Johansson EM, Fransson PMA, Finlay RD, van Hees PAW. Quantitative analysis of root and ectomycorrhizal exudates as a response to Pb, Cd and As stress. *Plant Soil*, 2008, **313**: 39~54
- 23 White PJ. Phytoremediation assisted by microorganisms. *Trends Plant Sci*, 2001, **6** (11): 502
- 24 Gadd GM. Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J Chem Technol Biotechnol*, 2009, **84**: 13~28
- 25 Wang JL, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**: 195~226
- 26 Yuan HL, Li ZJ, Ying JY, Wang ET. Cadmium(II) removal by a hyperaccumulator fungus *Phoma* sp. f2 isolated from blende soil. *Curr Microbiol*, 2007, **55**: 223~227