

1 株外生菌根真菌的分离与抗重金属能力测定

张琴, 杨芳显, 何凤扬, 刘杰, 陆燕勤 (桂林理工大学环境科学与工程学院, 广西桂林 541004)

摘要 从广西桂林青狮潭水库库区松林中分离得到 1 株外生菌根真菌, 初步鉴定为硬皮马勃目、硬皮马勃科、硬皮马勃属、黄硬皮马勃 (*Scleroderma flavidum*)。试验结果表明, 重金属 Zn、Cu、Hg、Cd 均对 *Scleroderma flavidum* 的生长有显著抑制作用, 其中 Cd 的抑制作用最强。同时, *Scleroderma flavidum* 具有较强的抗重金属能力, 且对 Zn、Cd 的耐性远大于对 Cu 与 Hg 的耐性。

关键词 外生菌根真菌; 分离; 抗重金属能力

中图分类号 X172 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16504-03

Isolation and Test of Heavy Metal Tolerance of An Ectotrophic Mycorrhiza Fungi

ZHANG Qin et al (Environmental Science and Engineering Institute, Guilin University of Technology, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract Ectotrophic mycorrhiza fungi anti-heavy metal was isolated from pine in Qingshitian Reservoir (Guilin, Guangxi), and was initially identified as *Sclerodermatales*, *Sclerodermataceae*, *Scleroderma*, *Scleroderma flavidum*. Tests showed that heavy metals Zn, Cu, Hg, Cd had significant inhibition on growth of *Scleroderma flavidum* and in which Cd was the strongest inhibitory. At the same time, *Scleroderma flavidum* had a strong ability of anti-heavy metal, and the tolerance to Zn, Cd is much larger than that to Cu, Hg.

Key words Ectotrophic mycorrhiza fungi; Isolation; Ability of anti-heavy metal

外生菌根真菌是一类重要的土壤真菌, 能与多种造林树种形成外生菌根, 可利用自身丰富的外延菌丝吸收养分供给共生植物, 并可通过多种方式增强植物对不良环境的抵御能力, 对植物的营养吸收、生存生长以及森林植被的发生、发展、演替和稳定具有重要意义^[1-3]。

在矿区、工业弃地等重金属污染严重的地区, 选择适宜的树种和适应性强的外生菌根真菌, 采用人工合成菌根技术可以大大提高造林的成活率, 加速植被的恢复, 防止地力衰退和环境的进一步恶化。早在 20 世纪 70 年代, Marx 利用彩色豆马勃接种, 以菌根化的松树苗在露天矿的废墟上造林就取得了显著成绩^[4]。Krupa 等的研究证明, 接种具铜抗性的 *Suillus luteus* 能显著增强松对铜的耐受能力^[5]。

然而同时, 众多研究表明, 大多数重金属如 Cu、Ni、Mn、Zn、Hg、Cd 等, 对外生菌根真菌的生长均具有抑制作用^[6-11], 不同菌种 (株) 对同一重金属可能表现出不同的抗耐能力, 有的可能相差近 10 倍^[12]。Jan 等对从 14 处不同程度 Zn 污染土壤中分离的 4 种 235 株外生菌根真菌的 Zn 耐受性作了调查, 结果表明: 3 株 *Suilloid clade* 具有 Zn 耐受性, *P. involutus* 没有, 且 *Suilloid* 的 Zn 耐受性与距污染源的距离密切相关, 距离越远, 出现耐受型菌株的机率越小^[13]。Adriaensen 等同样认为, 外生菌根真菌对重金属的特异性与其所处的生长环境相关^[14]。因此, 外生菌根真菌的抗重金属能力可能受其生长的环境和菌株自身生物学特性的共同影响, 发现具有重金属耐性的外生菌根真菌优良菌株, 是推广应用菌根技术的基础, 具有重要意义。

据报道, 能与林木共生形成外生菌根的外生菌根真菌具有 5 000 多种^[15], 已发现具有耐重金属能力的仅约数十种, 且菌株间具有显著的种间种内差异^[10]。笔者对从广西桂林青狮潭水库库区松林中分离的 1 株外生菌根真菌, 依照《真菌学鉴定手册》^[16]进行了初步鉴定, 并对其抗重金属能力进

行了测定。

1 材料与方法

1.1 菌株及来源 试验菌株从广西桂林青狮潭水库库区松林中采集的外生菌根子实体中分离得到。

1.2 菌种的保存及制备 菌种采用 Pachelwsky 斜面 4℃ 冷藏保存。试验前分别接种于 Pachelwsky 固体培养基上, 在 (25±2)℃ 条件下暗培养 2~3 周备用。

Pachelwsky 培养基的组成为 (g/L): 酒石酸铵 0.5、KH₂PO₄ 1.0、MgSO₄·7H₂O 0.5、麦芽糖 5、葡萄糖 20、琼脂 20、维生素 B₁ 0.1, 1 ml 微量元素混合液 (1 L 微量元素混合液含 8.45 g H₃BO₃、5.00 g MnSO₄、6.00 g FeSO₄、0.63 g CuSO₄·5H₂O、2.27 g ZnSO₄、0.27 g (NH₄)₂MoO₄)。

1.3 试验设计 用浓度 0.36 g/L 的硫酸铵代替 Pachelwsky 培养基中的酒石酸铵配制液体培养基。分别向培养基中添加 CdCl₂·5H₂O、HgCl₂、CuSO₄·5H₂O、ZnSO₄·7H₂O 配制浓度梯度为 0.5、10、20、40、80、120、160 mg/L 的重金属液体培养基, 重金属浓度以重金属离子计。以不加重金属为对照。

以 50 ml 三角瓶分装不同处理的液体培养基, 每瓶 20 ml。在 (121±2)℃、1.5 MPa 灭菌 30 min, 冷却后, 分别接入直径为 6 mm 的琼脂菌种, 于 (25±2)℃ 下暗培养 21 d。试验进行 2 次, 每处理 3 个重复。

1.4 测定项目与方法 过滤收集培养获得的菌丝体, 洗净、烘干 [(80±2)℃, 6 h]、称量, 测生物量。菌株抗重金属能力以耐性指数 (TI, Tolerance Index) 表示, $TI_{DW} = (DW_{处理} / DW_{对照}) \times 100\%$ ^[17-18]。

测定结果采用 Excel 2007 进行统计分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 菌种鉴定 由图 1 可见, 采集到的外生菌根子实体中等大小, 扁圆球形, 直径 4~6 cm, 杏黄色, 有深色小斑片和紧贴的小鳞片, 具不规则裂片, 基部似柄状, 由一团黄色的菌丝索固着于地上。孢子球形, 深褐色, 多刺 (图 2)。依照《真菌学鉴定手册》^[16]和《真菌分类学》^[20]初步鉴定为硬皮马勃目、硬皮马勃科、硬皮马勃属、黄硬皮马勃 (*Scleroderma flavidum*)。该鉴定和命名主要依据子实体和孢子形态特征。

基金项目 广西环境工程与保护评价重点实验室研究开放基金项目 (桂科能 0701K014); 桂林工学院科研项目硕士启动基金项目。

作者简介 张琴 (1975-), 女, 侗族, 贵州铜仁人, 硕士, 讲师, 从事环境微生物研究。

收稿日期 2009-09-07



图1 黄硬皮马勃子实体

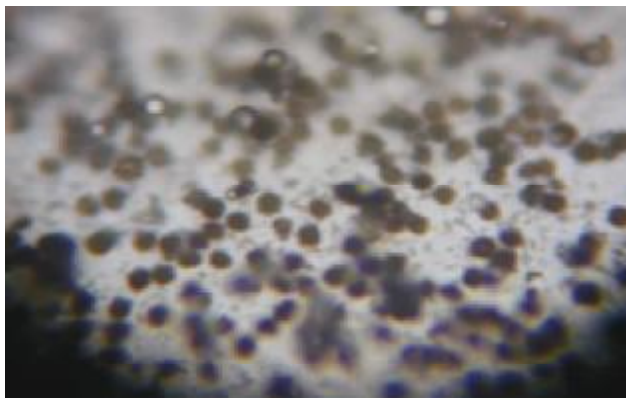
Fig.1 The fruiting body of *Sclerotinia sclerotiorum*

图2 黄硬皮马勃孢子(40×10)

Fig.2 The spores of *Sclerotinia sclerotiorum* (40×10)

2.2 抗重金属能力 由表1可知,重金属 Zn、Cu、Hg、Cd 对 *Sclerotinia sclerotiorum* 的生长有显著抑制作用,但抑制的强度

表1 不同重金属处理下 *Sclerotinia sclerotiorum* 的生物量和耐性指数Table 1 Biomass and TI (Tolerance index) of *Sclerotinia sclerotiorum* with different treatments

重金属浓度//mg/L Concentration of heavy metal	Zn		Cu		Hg		Cd	
	生物量//mg(DW) Biomass	TI	生物量//mg(DW) Biomass	TI	生物量//mg(DW) Biomass	TI	生物量//mg(DW) Biomass	TI
0	61.7 ± 5.0 ab	-	61.7 ± 5.0 a	-	61.7 ± 5.0 a	-	61.7 ± 5.0 a	-
5	67.8 ± 4.7 a	1.10	59.8 ± 4.4 a	0.97	77.4 ± 6.1 a	1.25	45.0 ± 3.7 ab	0.73
10	52.7 ± 3.6 ab	0.85	53.2 ± 6.9 a	0.86	57.8 ± 5.1 a	0.94	31.7 ± 3.0 b	0.51
20	45.6 ± 8.2 ab	0.74	42.7 ± 4.5 ab	0.69	49.7 ± 6.7 a	0.81	27.8 ± 4.3 b	0.45
40	50.8 ± 6.1 ab	0.82	20.4 ± 3.3 b	0.33	43.2 ± 8.4 a	0.70	27.7 ± 4.5 b	0.45
80	40.8 ± 15.4 b	0.66	0 b	0	0 b	0	28.3 ± 2.8 b	0.45
120	29.2 ± 2.6 b	0.47	0 b	0	0 b	0	26.4 ± 4.7 b	0.43
160	24.9 ± 5.0 b	0.40	0 b	0	0 b	0	23.3 ± 2.8 b	0.38

注:不同小写字母表示在 0.05 水平有差异。

Note: Different lowercase stand for difference at 0.05 level.

然而,目前已有的对外生菌根真菌与重金属的作用的研究较为有限,主要集中在少数种属如 *Laccaria*、*Pisolithus tinctorius*、*Sclerotinia*、*Paxillus involutus*、*Suillus* 及少数重金属如 Cd、Zn、Cu、Al、Ni、Pb 等上^[8,10,14,21-22]。同时,较大的金属特异性和种间差异性的存在,既增加了研究的难度,也使筛选出一些对重金属具有较高耐受力的优良外生菌根真菌成为必要。

黄硬皮马勃(*Sclerotinia sclerotiorum*)在林业生产中已得到一定应用^[15]。Jones 等曾报道液体培养条件下,Ni、Cu 对 *Sclerotinia sclerotiorum* 的半有效浓度(E_{50})分别小于 1.4 mg/L 和大于 4.0 mg/L^[23]。Prasun 等的研究表明,在含有重金属

有所差异。其中,Cd 的抑制作用最强,浓度为 10 mg/L 即使菌株的生物量显著下降约 50%,其后依次为 Cu、Hg、Zn,后三者使菌株的生物量显著下降的浓度分别为 40、80、80 mg/L,说明重金属对试验菌株的生长抑制作用与重金属的浓度有关。方差分析结果也表明,重金属浓度是试验的最主要影响因素。

从菌株对不同浓度 Zn、Cu、Hg、Cd 的耐性指数来看,*Sclerotinia sclerotiorum* 对 Zn、Cd 的耐性远大于对 Cu、Hg 的耐性。浓度 40 mg/L 重金属处理下,菌株的耐性指数 TI 由高到低分别为 $TI_{Zn} = 0.82$, $TI_{Hg} = 0.70$, $TI_{Cd} = 0.45$, $TI_{Cu} = 0.33$ 。在浓度 80 mg/L 重金属处理下,Cu、Hg 使菌株生长完全停止 ($TI = 0$),而 Zn、Cd 仅部分抑制 ($TI_{Zn} = 0.66$, $TI_{Cd} = 0.45$),即使是在 160 mg/L 的高浓度 Zn 或 Cd 处理下,菌株也表现出了一定的生长能力,说明试验菌株具有较强的抗重金属能力,但耐性大小受重金属种类的影响。不同重金属处理间同样具有显著的差异。

3 讨论

外生菌根技术在引种、菌根化育苗造林、逆境造林等方面的应用已取得了初步成效,这与外生菌根真菌能通过多种途径增强宿主的营养、抗逆性有关。Hartley 等对相关的研究进行了概括和比较后认为,具有某种抗重金属能力的外生菌根真菌往往能显著提高宿主的抗重金属能力^[10]。因此,从进一步推广利用菌根技术,实现在重金属污染土壤和矿墟的逆境造林和生态修复的角度出发,筛选具有重金属抗性的外生菌根真菌具有重要的意义。

Al(120 mg/L)、As(0.3 mg/L)、Cd(3 mg/L)、Cr(3 mg/L)、Ni(6 mg/L)和 Pb(3 mg/L)的培养基中,*Sclerotinia sclerotiorum* 的生长完全被抑制,重金属浓度若均降低 1/3 则仍可保持约 50% 的生长量^[22]。虽然二者在试验方法和结论上均有所差异,但不难看出黄硬皮马勃(*Sclerotinia sclerotiorum*)对重金属具有一定的耐性,这与该试验的结论也一致。

然而有关黄硬皮马勃与重金属相互作用的研究较少,该研究的结果虽然可以弥补一定的不足,但由于试验方法和重金属选择的不同,只能认为试验菌株是 1 株具有较强抗重金属能力的外生菌根真菌。鉴于实际情况下重金属的污染总是由多种重金属元素共同造成的,因此,Prasun 等的研究的多

种重金属联合作用对菌株生长的影响更具有应用的价值,也为以后研究指明了方向。

参考文献

- [1] 郭秀珍, 毕国昌. 林木菌根及应用技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [2] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇祿. 菌根研究及应用[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997.
- [3] YANG G T, SONG G L, GAO X X. The significance of ectomycorrhizas in forest ecosystems: the influence of ectomycorrhizas on the host trees[J]. Journal of Northeast Forestry University, 1999, 27(6): 72-77.
- [4] MARX D H. Mycorrhizae and establishment of trees on stripmined land[J]. The Ohio Journal of Science, 1975, 75: 288-297.
- [5] KRUPA P, OZDROJ K. Accumulation of heavy metals by ectomycorrhizal fungi colonizing birch trees growing in an industrial desert soil[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2004, 20(4): 427-430.
- [6] COLPAERT J V, VAN ASSCHE J A. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the growth of the ectomycorrhizal fungi[J]. Plant and Soil, 1992, 145: 237-243.
- [7] GADD G M. Interactions of fungi with toxic metals[J]. New Phytol, 1993, 124: 25-60.
- [8] BLAUDEZ D, JACOB C, TURANAU K, et al. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to heavy metals in vitro[J]. Mycol Res, 2000, 104(11): 1366-1371.
- [9] HUANG Y, TAO S. The effects of elevated Cu and Zn on the growth and accumulation of C, N and Cu of four ectomycorrhizal fungus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(6): 737-743.
- [10] HARTLEY J, CAIRNEY J W G, MEHARG A A. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive tolerance to potentially toxic metals in the environment[J]. Plant and Soil, 1997, 189: 303-319.
- [11] HUANG Y, TAO S. The effects of elevated Cu and Zn on the biomasses, respiration and the activities of glycolytic enzymes of *S. bovinus*[J]. Acta Phytophysiological Sinica, 2001, 27(4): 303-308.
- [12] THOMPSON G W, RICHARD J MEDVE. Effect of aluminum and manganese on the growth of ectomycorrhizal fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(3): 556-560.
- [13] JAN V COLPAERT, LUDO A H MULLER, MARC LAMBAERTS, et al. Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi[J]. New Phytologist, 2004, 162: 549-559.
- [14] ADRIAENSEN K, VRÅLSTAD T, NOBEN J P, et al. Copper-adopted suillus luteus, a symbiotic solution for pines colonizing Cu mine spoils[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7279-7284.
- [15] 仲凯, 刘红霞. 菌根研究的新特点及应用[J]. 生态科学, 2008, 27(3): 169-178.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [17] COLPAERT J V, VANDENKOORNHUYSE P, ADRIAENSEN K, et al. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*[J]. New Phytologist, 2000, 147: 367-379.
- [18] VODNIK D, BYRNE A R, GOGALA N. The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture[J]. Mycological Research, 1998, 102: 953-958.
- [19] 沈浩, 李亦兰, 王迎迎. Excel 高级应用与数据分析[M]. 北京: 电子工业出版社, 2008.
- [20] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1986.
- [21] FOMINAA M A, ALEXANDER B I J, COLPAERT J V, et al. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37: 851-866.
- [22] PRASUN RAY, RICHA TIWAN, REDDY U G, et al. Detecting the heavy metal tolerance level in ectomycorrhizal fungi in vitro[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(3): 309-315.
- [23] JONES M D, HUTCHINSON T C. The effects of nickel and copper on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi[J]. Canadian Journal of Botany, 1998, 66: 119-124.

(上接第 16454 页)

表 5 光照稳定性试验

Table 5 The experiment of light stability

时间//h	室内光照吸光度(A)	室外光照吸光度(A)
Time	Absorbance of indoor light	Absorbance of outdoor light
0	0.550	0.533
2	0.545	0.520
4	0.542	0.500
6	0.541	0.480
8	0.538	0.400

较好。该色素食用安全无毒,并且属于β-胡萝卜素类物质,因而既有食用天然色素的作用,又兼有维生素之营养强化剂的功效,符合天然食品添加剂“天然、营养、多功能”的发展方向。

(2)现已形成了多种辣椒色素分离提纯工艺,常规生产方法有有机溶剂萃取法、水蒸气蒸馏法等,但是这些方法都不能彻底回收辣味辣椒素,而且应用有机溶剂萃取法往往使产品中残留的有机溶剂如丙酮、二氯乙烷、正乙烷等超标,缩小了产品的适用范围^[8]。采用超临界CO₂流体萃取技术能够极大地提高辣椒色素产品的质量,产品色价高,有机溶剂

残留量小,没有热加工环节而保证天然物质中的原有成分不被破坏,节省能耗,并且能够去掉辣椒产品中的异味,但是该方法操作较复杂,且设备昂贵。在该试验中应用的以乙醇溶剂提取辣椒色素,操作简单,设备条件要求不高,分离效果较好,适合小规模研制和生产^[9]。

参考文献

- [1] 吴明光, 钟如兴, 洪居端, 等. 胡萝卜烯类色素的分离和稳定性研究[J]. 食品工业, 1995(3): 8-11.
- [2] 张继民, 胡林华. 辣椒色素提取工艺及稳定性[J]. 安徽机电学院学报, 1999, 14(1): 21-25.
- [3] 史兰香, 赵全海, 冯美卿, 等. 辣椒红素的应用及提取工艺评述[J]. 河北轻化工学院学报, 1998, 19(2): 77-79.
- [4] 赵宁, 王艳辉, 马润宇. 从辣椒中提取辣椒红素的研究[J]. 北京化工大学学报, 2004, 31(1): 15-17.
- [5] 中华人民共和国国内贸易部食品检测科学研究所. GB10738-1996 食品添加剂 辣椒红[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- [6] 陈连文. 对辣椒色素某些性能的测试[J]. 化学研究与应用, 1997, 9(1): 102-104.
- [7] 吴永兰. 甜椒红素的提取及性质的研究[J]. 精细化工中间体, 2005, 35(1): 62-65.
- [8] 贺文智. 辣椒红素提取精制方法[J]. 内蒙古工业大学学报, 2001, 20(1): 10-13.
- [9] 周菁, 王伯初, 彭亮. 辣椒红素提取精制工艺概述[J]. 重庆大学学报, 2004, 27(1): 116-119.