



## 三株真菌对重金属锰的耐受性和吸附特性研究

韦天慧, 宋金柱\*, 刘诗宇, 宫殿良, 王棋, 孙瑶

哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150000

韦天慧, 宋金柱, 刘诗宇, 宫殿良, 王棋, 孙瑶. 三株真菌对重金属锰的耐受性和吸附特性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1023-1034.

WEI Tianhui, SONG Jinzhu, LIU Shiyu, GONG Dianliang, WANG Qi, SUN Yao. Tolerance of three fungal species to heavy metal manganese and the adsorption of the metal[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1023-1034.

**摘要:**【目的】研究3种真菌对锰离子的耐受性,并研究其对溶液中 $Mn^{2+}$ 吸附的最佳条件和吸附机理,为治理锰离子污染提供技术参考。【方法】测定哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)和棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)三株真菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),探究最佳吸附条件,并利用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy, SEM-EDS)和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)对吸附前后菌体进行分析。【结果】哈茨木霉、深绿木霉、棘孢木霉对重金属锰耐受的浓度可达到1 600、1 800、2 000 mg/L,最佳吸附条件为pH为7,吸附时间80 h,温度28 °C,吸附率最高可达23.7%,哈茨木霉参与吸附的官能团有-OH、胺基中的-C-N-、-C=O。棘孢木霉参与吸附的官能团有-OH和-NH。深绿木霉参与吸附的官能团主要有-C-H、磷酸基团P=O、P-OH和 $PO_4^{3-}$ 。【结论】哈茨木霉、深绿木霉、棘孢木霉对重金属锰有较好的吸附作用,可为治理土壤中的锰污染提供重要的参考和依据。

**关键词:** 锰污染; 生物吸附; 生理特性

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200407)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200407).

\*Corresponding author. E-mail: sjz@hit.edu.cn

Received: 2022-07-08; Accepted: 2022-09-05; Published online: 2022-09-14

# Tolerance of three fungal species to heavy metal manganese and the adsorption of the metal

WEI Tianhui, SONG Jinzhu<sup>\*</sup>, LIU Shiyu, GONG Dianliang, WANG Qi, SUN Yao

School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150000, Heilongjiang, China

**Abstract:** [Objective] To explore the tolerance of three fungal species to manganese ion, the optimal conditions for them to adsorb  $Mn^{2+}$  in solution, and the mechanism for the adsorption, and thus to provide technical reference for the control of manganese ion pollution. [Methods] The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride* and *T. asperellum* was determined and the optimal adsorption conditions were explored. Based on scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), fungal cells before and after the adsorption were analyzed. [Results] *T. harzianum*, *T. atroviride*, and *T. asperellum* could tolerate the maximum manganese concentration of 1 600 mg/L, 1 800 mg/L, and 2 000 mg/L, respectively. The optimum adsorption conditions are pH 7, adsorption time of 80 h, and temperature of 28 °C, and the highest adsorption rate was up to 23.7%. The functional groups involved in the adsorption of *T. harzianum* were -OH, and -C-N- and -C=O in the amine group, and those of *T. asperellum* were -OH and -NH. The functional groups of *T. atroviride* were -C-H, and phosphate groups P=O, P-OH, and  $PO_4^{3-}$ . [Conclusion] The screened *T. harzianum*, *T. atroviride*, and *T. asperellum* showed strong adsorption of heavy metal manganese, which can serve as a reference the treatment of manganese pollution in soil.

**Keywords:** manganese contamination; biosorption; physiological properties

金属是生态系统的天然成分，原子量大于40.04的金属，通常被认为是重金属<sup>[1]</sup>。重金属对环境的污染是由于工业活动<sup>[2]</sup>造成的，同时土壤中重金属污染的状况越来越严重，我国现阶段约有20%的土地受到了严重的重金属污染，总计面积达0.11亿 $km^2$ <sup>[3]</sup>，土壤作为人类重要的基础资源，影响作物质量和人类健康<sup>[4]</sup>，因此重金属污染的问题亟待解决。

土壤中锰的浓度范围为40–900 mg/kg<sup>[5]</sup>，重金属锰通过人为采矿、工业废弃物释放到空气、水源和土壤中，高浓度的锰破坏植被和作物，同时锰作为人体必需的微量元素，在全身都有分布，人体摄入锰过多，会导致细胞毒性，

导致神经和运动异常、心脏功能下降、急性肝中毒<sup>[6]</sup>。传统的修复技术物理修复，主要通过换土或土壤冲洗的方法，但具有局限性，只能处理受到严重污染且成本非常昂贵的较小区域<sup>[7]</sup>；化学修复主要是通过固定或提取重金属，固定过程采用向土壤中添加化学试剂来降低金属的溶解度，不仅污染土壤还影响植物生长；生物修复是利用生物、微生物作用的方法，吸附土壤中的重金属，利用它们固有的生物学机制来消除有害污染物使生态系统恢复原状<sup>[8]</sup>。与传统的化学法和物理法相比，生物修复因其不会污染环境、成本更加低廉<sup>[9–10]</sup>，可以作为修复重金属污染土壤的有效方法。

有研究表明, 环境中的细菌、真菌和微藻类均对重金属有吸附作用<sup>[11]</sup>, 可用来制成吸附剂。Fadel 等<sup>[12]</sup>利用 *Saccharomyces cerevisiae* 用于水溶液中  $Mn^{2+}$  的生物吸附和生物积累, 吸附量可达 41.3 mg/g; 解琳等<sup>[13]</sup>利用 *Beauveria bassiana* 对铅和镉进行生物吸附, 吸附量可达 19.60 mg/g 和 3.98 mg/g; 上述内容证明, 不同菌种对于不同金属的吸附情况各有不同, 刘冬梅等<sup>[14]</sup>利用小球藻 *Chlorella vulgaris* 对镍、铬和镉进行吸附, 其中对镍的吸附能力最强, 这些研究表明, 微生物有吸附重金属的功能, 但吸附能力与微生物种类有关, 还与细胞活性有关。

木霉属真菌对多种植物病虫害有生物防治效果<sup>[15]</sup>, 其中棘孢木霉可以抑制草莓炭疽病, 哈茨木霉和棘孢木霉可以抑制黄瓜立枯病<sup>[16]</sup>, 并且可以提高草莓幼苗的株高、根长、植物总鲜重和干重<sup>[17]</sup>, 对农作物的产量提高有重要作用。同时木霉属真菌对修复土壤和水中的污染物有广泛作用, Hussain 等<sup>[18]</sup>在废水处理中使用哈茨木霉对重金属进行生物降解, 发现该菌对锰的去除率为 94.35%, 证明了哈茨木霉在生物修复中的效果。

基于上述情况, 本实验筛选 3 株锰耐受真菌, 测定真菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC), 探究最佳吸附条件, 并利用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectroscopy, SEM-EDS)和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)对吸附前后菌体进行吸附机理分析, 以期为后续治理土壤中的锰污染提供重要的参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种来源

哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)、棘孢木霉(*Trichoderma*

*asperellum*)三株真菌保藏在哈尔滨工业大学生命科学与技术学院微生物实验室。

#### 1.1.2 培养基

(1) 马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基: 取土豆 200 g, 加入蒸馏水大火煮开 30 min 后过滤, 在滤液中加入葡萄糖 20 g, 加水补足至 1 000 mL。固体培养基向其中加入琼脂 20 g/L。(2) 金属锰培养基: 在 PDA 培养基中加入  $MnSO_4$  溶液, 配制成相应浓度。

### 1.2 孢子悬液的制备

将长满菌体的固体培养基上的菌体用接种铲刮除, 放入装有 5 mL 去离子水和少量玻璃珠的三角瓶中, 在 180 r/min、28 °C 的条件下培养 1 h, 随后将滤纸放入漏斗中, 将 5 mL 菌液过滤, 将过滤后的液体与等量 50%甘油混合, 装入离心管中, 放入-80 °C 中保存。将保存好的孢子悬液吸取 5  $\mu$ L 滴在血球计数板上, 盖好盖玻片, 用去离子水将孢子浓度调至  $10^7$  CFU/mL。

### 1.3 最大生物量的测定

用干重法测定真菌的最大生物量, 将保存好的浓度为  $10^7$  CFU/mL 的孢子悬液 50  $\mu$ L 接种到 100 mL PDA 液体培养基中, 在 180 r/min、28 °C 的条件下培养, 每 12 h 取样测定, 8 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 将沉淀用无菌水冲洗再烘干至恒重, 然后称量菌体和滤纸干重, 菌体重量为两者的质量差。横坐标为培养时间, 纵坐标为菌体干重, 绘制曲线。

### 1.4 金属 MIC 测定

将配制好的金属锰母液按照不同梯度加入到预热的 100 mL PDA 固体培养基中, 每瓶培养基倒 3 个平板, 凝固后, 用移液枪吸取 100  $\mu$ L 保藏好的孢子悬液, 涂布在凝固的平板上, 封口膜包好后, 放置 28 °C 倒置培养, 然后 5 d 后观察是否有菌落长出, 从而测定菌株的最大 MIC 值。

### 1.5 不同条件下真菌对锰离子的吸附

将 30  $\mu$ L 孢子悬液接种到锰离子浓度为

1 000 mg/L 的 100 mL PDA 液体培养基中, 分别在 pH 为 5、6、7、8、9, 吸附时间为 40、60、80、100、120 h, 其余条件为 180 r/min、28 °C 的条件下培养, 吸附后 5 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 吸取 0.5 mL 上清液, 加入 4 mL 浓盐酸, 用消解仪在 100 °C 回流消解 1 h, 1 h 后, 冷却至室温, 再用超纯水定容至 100 mL, 采用电感耦合等离子体光谱仪测定其中锰离子浓度, 并计算去除率。

## 1.6 不同菌种对吸附的影响

将 3 株真菌保存好的孢子悬液各吸取 100  $\mu$ L, 同时将哈茨木霉:棘孢木霉=1:1、哈茨木霉:深绿木霉=1:1、棘孢木霉:深绿木霉=1:1、哈茨木霉:棘孢木霉:深绿木霉=1:1:1、哈茨木霉:棘孢木霉:深绿木霉=1:2:1、哈茨木霉:棘孢木霉:深绿木霉=2:1:1、哈茨木霉:棘孢木霉:深绿木霉=1:1:2 按比例吸取共 100  $\mu$ L 加入到 100 mL PDA 液体培养基中, 同时向其中加入 200  $\mu$ L 金属锰母液, 使溶液中锰离子浓度为 40 mg/L。随后于 28 °C、180 r/min 的条件下培养 5 d, 培养结束后 5 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 吸取 0.5 mL 上清液, 加入 4 mL 浓盐酸, 用消解仪在 100 °C 回流消解 1 h, 1 h 后, 冷却至室温, 再用超纯水定容至 100 mL, 采用电感耦合等离子体光谱仪测定其中锰离子浓度, 并计算去除率(公式 1)。

$$P = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中  $P$  为去除率;  $C_0$  为初始金属浓度;  $C_1$  为最终的金属浓度。

## 1.7 真菌对 $Mn^{2+}$ 吸附机理分析

### 1.7.1 SEM-EDS 样品制备

制备  $Mn^{2+}$  浓度为 1 000 mg/L 的固体平板, 将孢子悬液涂布在 PDA 平板和含有锰离子的平板上, 待菌体完全长出后, 用刀片将培养基连同菌体一同切下, 切成边长为 0.5 cm 的正方

形, 每种平板取 3 个位置的样品, 用 2.5%戊二醛在 4 °C 条件下固定 24 h, 随后弃去, 按照 30%、40%、50%、70%、80%、90%、95%和 100%的乙醇进行梯度逐级脱水, 每次 15 min, 并用丙酮脱水, 干燥后喷金, 利用扫描电子显微镜 GEG250 型和能谱仪进行分析。

### 1.7.2 FT-IR 样品制备

将孢子悬液接种到 PDA 液体培养基和含有锰离子的液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 3 d, 离心菌体, 用蒸馏水洗涤 2–3 次, 放入 80 °C 烘箱干燥 24 h, 将菌体研磨, 随后取研磨后的菌体粉末 1 mg 与 150 mg KBr 粉末在玛瑙研钵中研磨, 边研磨边转动研钵, 使样品充分混合, 随后用压片机压片, 用傅里叶变换红外光谱仪对样品进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌丝体的最大生物量测定

不同时间对 3 株真菌菌丝体生长量的研究, 如图 1 所示, 可以看出 3 株真菌前 24 h 生长缓慢, 棘孢木霉和深绿木霉在 24 h 到 60 h 增

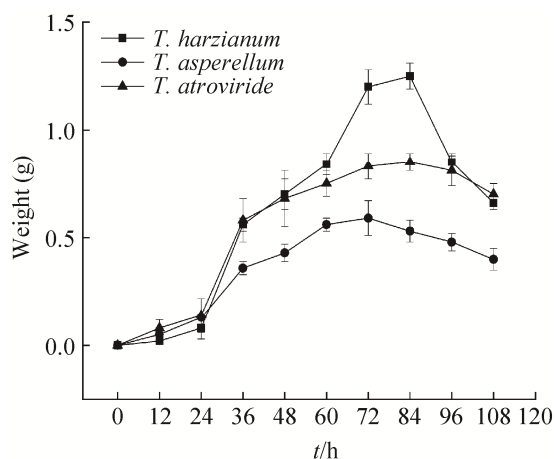


图 1 不同培养时间对 3 株真菌菌丝体生物量的影响  
Figure 1 Effects of different culture time on mycelial biomass of three fungal. Error bars in figure represent standard deviation.

长幅度最大, 处于对数期, 微生物繁殖大于死亡, 数量迅速增长, 而哈茨木霉 36 h 到 72 h 生长迅速, 3 株真菌在 72 h 到 96 h 进入稳定期, 在 96 h 后进入衰亡期。

## 2.2 金属 MIC 值测定

不同锰离子浓度对哈茨木霉、棘孢木霉、深绿木霉的生长影响如图 2 所示, 随着锰离子浓度的升高, 菌落生长直径逐渐减小, 当锰离子浓度达到 1 600 mg/L 时, 哈茨木霉停止生长, 同样情况, 棘孢木霉在锰离子浓度达到 2 000 mg/L 时停止生长, 深绿木霉在锰离子浓度达到 1 800 mg/L 时停止生长。

## 2.3 不同条件下真菌对锰离子的吸附

### 2.3.1 吸附时间对吸附的影响

图 3 显示 3 株真菌吸附时间对吸附的影响, 吸附 40 h 时哈茨木霉和棘孢木霉的吸附率达到 38.8% 和 38.3%, 深绿木霉吸附率达到 27%; 到 60 h 时, 吸附过程变得缓慢, 80 h 时, 吸附率达到峰值, 哈茨木霉吸附率达到 43%, 棘孢木霉吸附率达到 33%, 深绿木霉吸附率达到 36%, 说明 80 h 是吸附剂效果最佳的时间点, 随着时间的增加, 吸附率略有下降, 可能由于脱附现象<sup>[13]</sup>。所以, 哈茨木霉和深绿木霉最佳吸附时间为 80 h, 棘孢木霉最佳吸附时间为 60 h。

### 2.3.2 培养基初始 pH 对吸附的影响

pH 对吸附效果有重要影响, 会影响生物质的官能团活性和金属离子的竞争<sup>[19]</sup>, 在一定范围的 pH 内, 较高 pH 可以促进  $\text{OH}^-$  与锰离子结合, 形成氢氧化物沉淀, 超过范围的较高 pH 会导致形成的氢氧化物沉淀抑制对锰离子的结合<sup>[20]</sup>。不同培养基初始 pH 值对 3 株真菌吸附的影响如图 4 所示, 可以发现随着 pH 的增加, 对锰离子的吸附率呈现升高的趋势, 在 pH 为 7 时达到峰值, 深绿木霉的吸附率可达 23.7%, 在 pH 为 8 及以上时, 沉淀的氢氧化锰会阻碍 3 种真菌对锰离子的吸附, 所以 3 株真菌的最

佳吸附 pH 为 7。

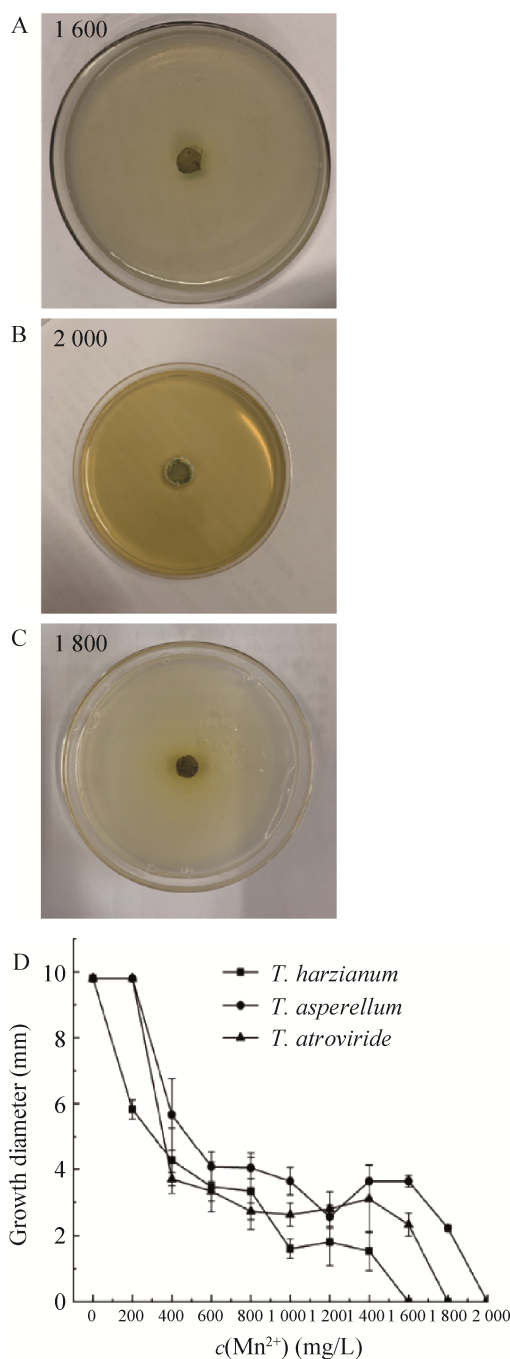


图 2 哈茨木霉(A)、棘孢木霉(B)、深绿木霉(C)在不同浓度  $\text{Mn}^{2+}$  培养基上生长情况

Figure 2 Growth of *Trichoderma harzianum* (A), *Trichoderma asperellum* (B), and *Trichoderma atroviride* (C) on different concentrations of  $\text{Mn}^{2+}$  medium. Error bars in figure represent standard deviation.

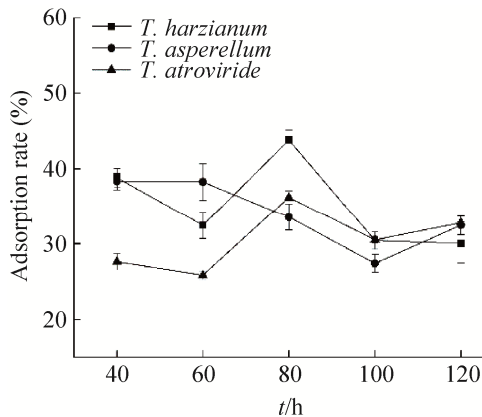


图3 三株真菌不同吸附时间对吸附的影响

Figure 3 Effect of different adsorption time on adsorption of three fungal. Error bars in figure represent standard deviation.

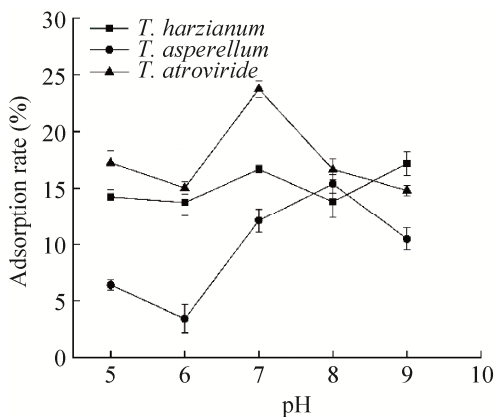


图4 不同培养基初始 pH 对 3 株真菌吸附的影响

Figure 4 Effect of initial pH of different medium on adsorption of three fungal. Error bars in figure represent standard deviation.

## 2.4 不同菌种对吸附的影响

结果如图 5 所示, 我们比较了表 1 中 3 种单一菌种以及两两菌种组合或 3 种菌种按比例混合的复合菌剂对锰离子吸附的效果。我们测定了吸附后培养基中剩余锰离子的浓度, 由图可以看出作为对照组初始浓度为 5 mg/L, 而其他实验组的锰离子的含量均有减少, 通过多重比较分析后, 所有实验组均与对照组有显著性差异。其中深绿木霉: 哈茨木霉: 棘孢木霉(1:1)、哈茨木霉: 深绿木霉(1:1)、棘孢木霉: 深绿木霉

(1:1)、哈茨木霉: 棘孢木霉: 深绿木霉(1:1:1, 1:2:1, 2:1:1)的实验组有极显著的差异(\*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ), 其中通过去除效率的公式计算即

$$P = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

其中  $P$  为去除率;  $C_0$  为初始金属含量;  $C_1$  为最终的金属含量; 得知哈茨木霉: 棘孢木霉: 深绿木霉(1:2:1)组去除效率最高, 为 15.62%。同时与 2.5.2 中 EDS 分析结果相同, 在比较 3 种单一菌种对锰离子吸附效果中, 深绿木霉吸附效果最好, 通过计算深绿木霉的锰离子去除效率为 12.43%。

表 1 菌种组合

Table 1 Combination of strains

Experiment number	Strain combination
1	<i>T. harzianum</i>
2	<i>T. asperellum</i>
3	<i>T. atroviride</i>
4	<i>T. harzianum</i> : <i>T. asperellum</i> =1:1
5	<i>T. harzianum</i> : <i>T. atroviride</i> =1:1
6	<i>T. asperellum</i> : <i>T. atroviride</i> =1:1
7	<i>T. harzianum</i> : <i>T. asperellum</i> : <i>T. atroviride</i> =1:1:1
8	<i>T. harzianum</i> : <i>T. asperellum</i> : <i>T. atroviride</i> =1:2:1
9	<i>T. harzianum</i> : <i>T. asperellum</i> : <i>T. atroviride</i> =2:1:1
10	<i>T. harzianum</i> : <i>T. asperellum</i> : <i>T. atroviride</i> =1:1:2

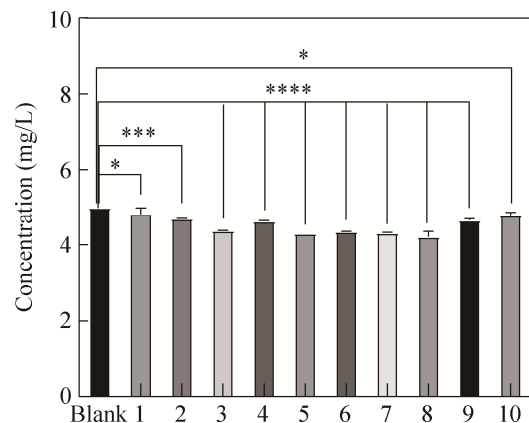


图5 不同混合菌种上清液  $Mn^{2+}$  的浓度

Figure 5 Concentration of  $Mn^{2+}$  in the supernatant of different mixed strains. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .



## 2.5 真菌对 $Mn^{2+}$ 吸附机理分析

### 2.5.1 SEM 结果分析

如图 6 所示, 木霉吸附  $Mn^{2+}$  后, 通过扫描

电镜可以观察到菌体表面结构, 根据结果可以看出, 吸附前 3 种木霉形态成圆球状, 表面光滑且分生孢子间无明显物质附着, 吸附后菌体

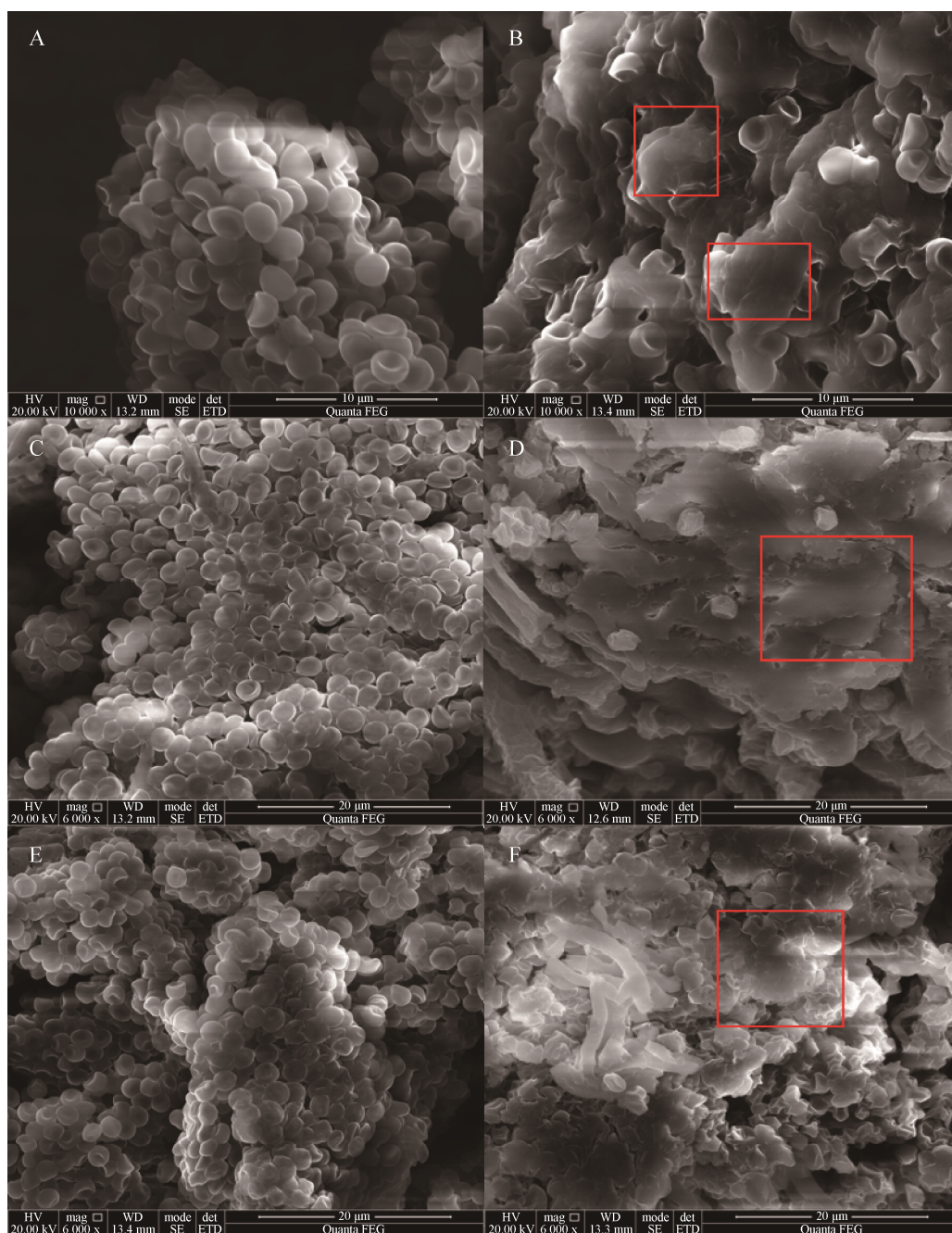


图 6 三种真菌吸附锰离子前后电镜图

Figure 6 SEM of three fungal before and after adsorption of manganese ions. A: Before *Trichoderma harzianum* adsorbs  $Mn^{2+}$ . B: After *Trichoderma harzianum* adsorbs  $Mn^{2+}$ . C: Before *Trichoderma asperellum* adsorbs  $Mn^{2+}$ . D: After *T. asperellum* adsorbs  $Mn^{2+}$ . E: Before *T. atroviride* adsorbs  $Mn^{2+}$ . F: After *T. atroviride* adsorbs  $Mn^{2+}$ .

表面粗糙, 形态皱缩, 且在孢子之间有大量絮状物质出现。由此初步判断, 3 种木霉吸附  $\text{Mn}^{2+}$  是其细胞表面的吸附沉淀作用; 另一方面菌株通过分泌大量的多糖等胞外多聚物来吸附  $\text{Mn}^{2+}$ , 活体微生物通过分泌胞外产物与重金属

离子结合, 从而降低重金属离子的危害<sup>[21]</sup>。

### 2.5.2 EDS 分析

对 3 种木霉吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前后菌体进行了 EDS 能谱分析, 如图 7 所示, 吸附后, 出现 Mn 的吸收峰, 进一步验证出 3 种木霉菌对  $\text{Mn}^{2+}$  具有

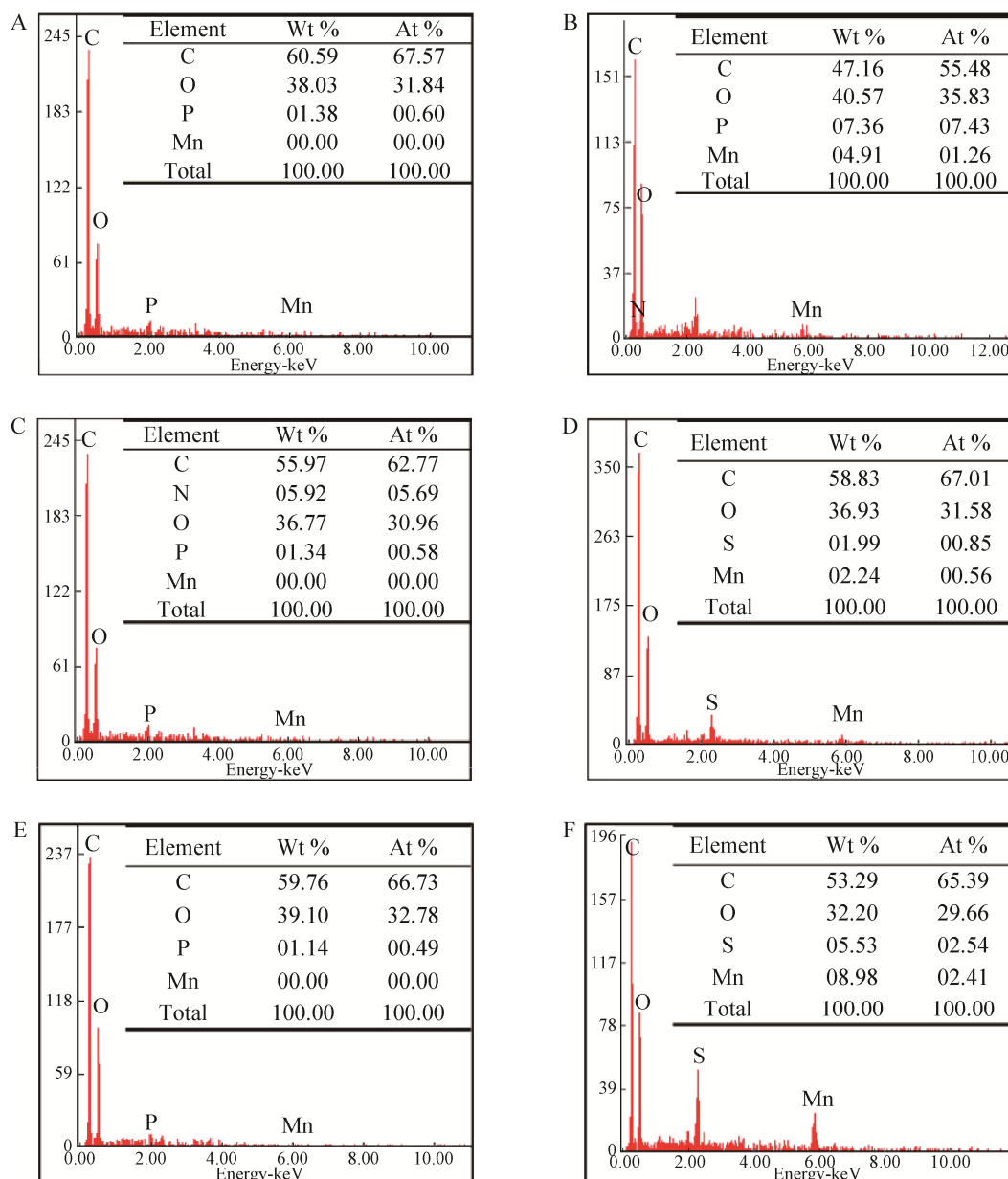


图 7 吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前、后的 EDS 元素分析图

Figure 7 Element analysis diagram before and after the adsorption of  $\text{Mn}^{2+}$ . A: Before *T. harzianum* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ . B: After *T. harzianum* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ . C: Before *T. asperellum* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ . D: After *T. asperellum* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ . E: Before *T. atroviride* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ . F: After *T. atroviride* adsorbs  $\text{Mn}^{2+}$ .



吸附作用。同时通过计算锰离子含量占总元素的百分比得知, 哈茨木霉中锰元素含量占总元素质量百分比的 4.91%, 棘孢木霉为 2.24%, 深绿木霉为 8.90%。由此可证明深绿木霉在相同  $\text{Mn}^{2+}$  浓度下, 吸附  $\text{Mn}^{2+}$  的效果最好, 与结果 2.4 中得出的结论一致。

### 2.5.3 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)结果分析

由上述 2.5.2 的分析可知 3 种真菌是基于细胞表面的吸附沉淀作用来吸附金属离子。将 3 种真菌暴露于金属溶液中, 真菌细胞壁多糖上含有较多活性基团(如巯基、羧基、羟基等), 与重金属之间形成范德华力、静电作用力等发生生物附着, 同时, 较高浓度的锰离子抑制 3 种真菌的生长, 一部分锰离子被吸收到细胞内, 与细胞内的蛋白及其他生物大分子发生作用, 引起吸收峰的变化。哈茨木霉菌丝吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前后的傅里叶变换红外光谱结果如图 8A 所示, 波数在  $3\,328\text{ cm}^{-1}$  有一个宽吸收峰, 对应  $-\text{OH}$  基团振动, 在吸附后特定的吸收峰增宽增强, 并且移动到波数  $3\,242\text{ cm}^{-1}$  [22]。在波数  $1\,627\text{ cm}^{-1}$  处的吸附带可以归因于  $\text{C}=\text{O}$  的拉伸, 这是由于蛋白质肽键和壳聚糖的  $-\text{CN}$  (酰胺 I) 基团的  $-\text{NH}$  变形共轭 [23]。在波数  $1\,366\text{ cm}^{-1}$  处的红外光谱峰略微增强, 峰型变宽, 此处为磷酸基的吸收峰即  $\text{P}=\text{O}$  伸缩振动 [24]。

棘孢木霉菌丝吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前后的傅里叶变换红外光谱结果如图 8B 所示, 吸收后的图谱与吸收前的图谱相比, 红外图谱基本相似, 将图谱进行归属, 发现  $3\,500\text{--}3\,200\text{ cm}^{-1}$  有较大变化, 这些变化来自于细胞外分泌的孢外多糖(extraspore polysaccharides, EPS)具有离子化的官能团所导致的, 具体为碳水化合物中  $-\text{OH}$  的伸展振动和  $-\text{NH}$  的伸缩振动共同作用的结果 [25-27]。吸附前的  $3\,506\text{ cm}^{-1}$  处的  $-\text{OH}$  基团的伸展振动, 蓝移到  $3\,452\text{ cm}^{-1}$  处。同时  $3\,395\text{ cm}^{-1}$

处出现新的特征吸收峰, 此吸收峰主要是  $-\text{NH}$  的伸缩振动产生的。

深绿木霉菌丝吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前后的傅立叶红外光谱结果如图 8C 所示, 吸收后的图谱与吸收前

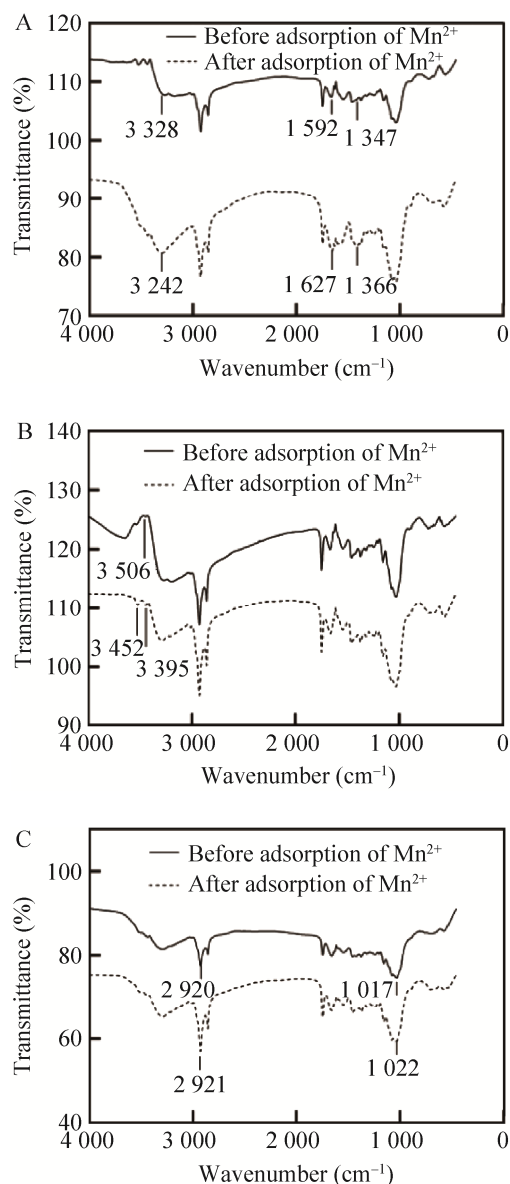


图 8 三种真菌菌丝吸附  $\text{Mn}^{2+}$  前后的傅里叶变换红外光谱结果

Figure 8 Fourier transform infrared spectroscopy results of three fungal hyphae before and after adsorption of  $\text{Mn}^{2+}$ . A: *T. harzianum*. B: *T. asperellum*. C: *T. atroviride*.

的图谱相似,主要由蛋白质、糖类等物质中C-H键伸缩振动引起的。同时 $1\,022\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰变强主要由于磷酸基团P=O、P-OH和 $\text{PO}_4^{3-}$ 等伸缩振动产生的<sup>[28]</sup>。

### 3 讨论

本研究对3株真菌进行重金属锰的耐受和吸附实验,3株真菌对锰有较高的耐受能力,随着锰离子浓度的升高,3株真菌的生长受到影响,最终哈茨木霉、深绿木霉、棘孢木霉对锰离子的耐受浓度分别达到了1 600、1 800、2 000 mg/L,与曹礼等<sup>[29]</sup>筛选的*Promicromonospora* sp.对锰耐受浓度达到2 000mg/L的研究结果相似,比较3种单一菌种对锰离子吸附效果中,深绿木霉吸附率效果最好的,去除效率达到12.43%,进一步优化吸附条件,发现在pH为7,哈茨木霉和深绿木霉在80 h时,棘孢木霉在60 h时,培养温度为28 °C的条件下吸附效果最好,深绿木霉的吸附率达到20%左右。

重金属污染的土壤中通常混合有多种真菌,同时3株真菌也是主要的生物防治菌,在生物防治、促进种子萌发和幼苗生长方面起到良好的作用<sup>[30]</sup>,因此在本实验中采用了将3种真菌混合,制备复合菌种吸附重金属锰的方法,在复合菌种哈茨木霉:棘孢木霉:深绿木霉(1:2:1)组去除效率最高,为15.62%,相比于单独的菌种,吸附效率有较大提高。

与细菌相比较,真菌的细胞壁由几丁质和壳聚糖组成,可以更好地吸附重金属<sup>[19]</sup>,因此通过扫描电子显微镜(SEM)观察,在3种真菌的孢子间析出了大量絮状物质,初步判断是细胞表面的吸附沉淀作用,也有可能是胞外产物与重金属结合的产物,同时对菌体表面进行元素分析,发现深绿木霉吸附后锰元素质量分数达到8.98%,再次证明深绿木霉在3种菌株中吸附

效果最佳。

微生物对金属的吸收分为两个阶段:被动吸收和主动吸收。第一个阶段是细胞表面的物理吸附或离子交换,在30–40 min内达到吸附平衡。因此,被动模式不依赖于能量,主要是通过材料的化学官能团<sup>[31]</sup>,为探究具体参与吸附的官能团,采用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析,比较吸附前后的曲线,发现哈茨木霉参与作用的基团有-OH、胺基中的-C-N-、-C=O。棘孢木霉的吸附作用官能团为-OH和-NH。深绿木霉主要由-C-H、磷酸基团P=O、P-OH和 $\text{PO}_4^{3-}$ 参与了整个吸附过程,同时较高浓度的锰离子抑制3种真菌的生长,一部分锰离子被吸收到细胞内,与细胞内的蛋白及其他生物大分子发生作用,引起吸收峰的变化。与王建才等<sup>[32]</sup>和李倩等<sup>[33]</sup>的研究结果相似,均表现为-OH、-C=O、磷酸基团的作用。

本实验测试3株真菌对锰的耐受能力,对重金属锰有一定的抗性,并可以吸附不同浓度的重金属锰,而且在生物防治上有重要作用,对病原真菌和细菌有拮抗作用,并能抑制其在土壤中的传播,可为后续重金属修复同时防治病原菌提供理论基础。

### 参考文献

- [1] ALVAREZ A, SAEZ JM, DAVILA COSTA JS, COLIN VL, FUENTES MS, CUOZZO SA, BENIMELI CS, POLTI MA, AMOROSO MJ. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals[J]. Chemosphere, 2017, 166: 41-62.
- [2] FERNÁNDEZ DS, PUCHULU ME, GEORGIEFF SM. Identification and assessment of water pollution as a consequence of a leachate plume migration from a municipal landfill site (Tucumán, Argentina)[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2014, 36(3): 489-503.
- [3] 刘佳麟, 张家铜. 土壤重金属污染的现状及其治理

- [J]. 山东工业技术, 2019(7): 229.
- LIU JL, ZHANG JT. Present situation and treatment of heavy metal pollution in soil[J]. Shandong Industrial Technology, 2019(7): 229 (in Chinese).
- [4] 赵其国, 骆永明. 论我国土壤保护宏观战略[J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4): 452-458.
- ZHAO QG, LUO YM. The macro strategy of soil protection in China[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2015, 30(4): 452-458 (in Chinese).
- [5] PINSINO A, MATRANGA V, CARMELA M. Manganese: A New Emerging Contaminant in the Environment[M]. Environmental Contamination. InTech, 2012.
- [6] das AP, GHOSH S, MOHANTY S, SUKLA LB. Consequences of manganese compounds: a review[J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2014, 96(7): 981-997.
- [7] YAO ZT, LI JH, XIE HH, YU CH. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals[J]. Procedia Environmental Sciences, 2012, 16: 722-729.
- [8] EKPERUSI OA, AIGBODION FI. Bioremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil-contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus africanus*[J]. 3 Biotech, 2015, 5(6): 957-965.
- [9] 肖春文, 罗秀云, 田云, 卢向阳. 重金属镉污染生物修复的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(8): 1-4.
- XIAO CW, LUO XY, TIAN Y, LU XY. Research progress of bioremediation of heavy metal cadmium pollution[J]. Chemistry & Bioengineering, 2013, 30(8): 1-4 (in Chinese).
- [10] 王建龙, 陈灿. 生物吸附法去除重金属离子的研究进展[J]. 环境科学学报, 2010, 30(4): 673-701.
- WANG JL, CHEN C. Research advances in heavy metal removal by biosorption[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(4): 673-701 (in Chinese).
- [11] IGWE J, ABIA A. A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbents[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(12): 1167-1179.
- [12] FADEL M, HASSANEIN NM, ELSHAFEI MM, MOSTAFA A H, AHMED M A, KHATER H M. Biosorption of manganese from groundwater by biomass of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. HBRC Journal, 2017, 13(1): 106-113.
- [13] 解琳, 郝宇, 齐欣, 刘本松, 温昱晨, 刘丽杰, 杨晓杰, 金忠民. 一株耐铅镉真菌的分离鉴定及其吸附特性的研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 780-788.
- XIE L, HAO Y, QI X, LIU BS, WEN YC, LIU LJ, YANG XJ, JIN ZM. Isolation, identification and biosorption characteristics of a lead and cadmium resistant fungus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 780-788 (in Chinese).
- [14] 刘冬梅, 倪佳鑫, 江苗苗, 付艺伟, 孙辉, 鲁晶. 小球藻对多种重金属吸附性能的研究[J]. 环境科学学报, 2020, 40(10): 3710-3718.
- LIU DM, NI JX, GANG MM, FU YW, SUN H, LU J. Research on adsorption properties of several heavy metals by chlorella[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2020, 40(10): 3710-3718 (in Chinese).
- [15] 尤佳琪, 吴明德, 李国庆. 木霉在植物病害生物防治中的应用及作用机制[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 966-976.
- YOU JQ, WU MD, LI GQ. Application and mechanism of *Trichoderma* in biological control of plant disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 966-976 (in Chinese).
- [16] 马光恕, 梁泉, 李梅, 刘明鑫, 陈玉蓉, 廉华. 木霉菌对黄瓜生理特性及立枯病防治效果的影响[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 277-285.
- MA GS, LIANG X, LI M, LIU MX, CHEN YR, LIAN H. Effect of *Trichoderma* on cucumber damping-off and physiological characteristics[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 277-285 (in Chinese).
- [17] 赵玳琳, 何海永, 吴石平, 陈小均, 谭清群, 杨学辉. 棘孢木霉GYSW-6m1对草莓炭疽病的生防机制及其防病促生作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(4): 587-595.
- ZHAO DL, HE HY, WU SP, CHEN XJ, TAN QQ, YANG XH. Biocontrol mechanisms and control effects of *Trichoderma asperellum* GYSW-6m1 on strawberry anthracnose and growth-promoting effects on strawberry[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(4): 587-595 (in Chinese).
- [18] HUSSAIN DF, MUTLAG NH. Assessment the ability of *Trichoderma harzianum* fungi in bioremediation of some of heavy metals in waste water[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 790(1): 012087.
- [19] das N, RV, KARTHIKA P. Biosorption of heavy metals- an overview[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2008, 7(2): 159-169.

- [20] 铁文周, 农小芳, 赵伊, 梁康, 黄雪娇. 微生物除 Mn(II) 机制及影响因素研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 14-25.  
TIE WZ, NONG XF, ZHAO Y, LIANG K, HUANG XJ. The mechanism of microbial removal of Mn(II) and its influencing factors: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 14-25 (in Chinese).
- [21] 刘磊, 宋文成. 微生物吸附重金属离子机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(5): 15-17.  
LIU L, SONG WC. Research advance in the mechanism of microbial absorption of heavy metal ions[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(5): 15-17 (in Chinese).
- [22] ZENG XX, CHAI LY, TANG JX, LIU XD, YANG ZH. Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain[J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013, 23(9): 2759-2765.
- [23] KHALILNEZHAD R, OLYA ME, KHOSRAVI M, MARANDI R. Manganese biosorption from aqueous solution by *Penicillium camemberti* biomass in the batch and fix bed reactors: a kinetic study[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(5): 1919-1934.
- [24] XU ZG, DING Y, HUANG HM, WU L, ZHAO YL, YANG GY. Biosorption characteristics of Mn(II) by *Bacillus cereus* strain HM-5 isolated from soil contaminated by manganese ore[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2018, 28(1): 463-472.
- [25] MA L, PENG YH, WU B, LEI DY, XU H. *Pleurotus ostreatus* nanoparticles as a new nano-biosorbent for removal of Mn(II) from aqueous solution[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 225: 59-67.
- [26] KURNIAWAN A, SISNANDY VOA, TRILESTARI K, SUNARSO J, INDRASWATI N, ISMADJI S. Performance of durian shell waste as high capacity biosorbent for Cr(VI) removal from synthetic wastewater[J]. Ecological Engineering, 2011, 37(6): 940-947.
- [27] JIN L, BAI RB. Mechanisms of lead adsorption on chitosan/PVA hydrogel beads[J]. Langmuir, 2002, 18(25): 9765-9770.
- [28] HU XJ, GU HD, ZANG TT, JIN Y, QU JJ. Biosorption mechanism of Cu<sup>2+</sup> by innovative immobilized spent substrate of fragrant mushroom biomass[J]. Ecological Engineering, 2014, 73: 509-513.
- [29] 曹礼, 郭图丽, 周宏鑫, 刘月桃, 陈杰, 李婷, 雷玉明. 两株耐锰菌株的分离鉴定及其生长特性研究[J]. 环境工程2017增刊2, 2017: 10-14+20.  
CAO L, GUO TL, ZHOU HX, LIU YT, CHEN J, LI T, LEI YM. Isolation and identification of two manganese- resistance strains and research on their growth characteristics[J]. Environmental Engineering 2017 Supplement 2, 2017: 10-14+ 20. (in Chinese).
- [30] 胡琼, 邵菲菲. 木霉对植物促生作用的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5077-5079.  
HU Q, SHAO FF. Research advances on the growth-promoting effect of *Trichoderma* on plants[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(10): 5077-5079 (in Chinese).
- [31] 蔡青云. 耐铅镉菌株的分离筛选及其吸附特性研究[D]. 赣州: 江西理工大学硕士学位论文, 2015.  
CAI QY. Screening of lead and cadmium-resistant bacterium and research of their adsorption[D]. Ganzhou: Master's Thesis of Jiangxi University of Science and Technology, 2015 (in Chinese).
- [32] 王建才, 刘兴华, 王怀中, 呼红梅, 庞丽丽, 黄保华, 朱荣生. 耐铅镉菌株的分离鉴定及其吸附能力[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1600-1609.  
WANG JC, LIU XH, WANG HZ, HU HM, PANG LL, HUANG BH, ZHU RS. Isolation, identification and heavy metals biosorption of a lead and cadmium-tolerant strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1600-1609 (in Chinese).
- [33] 李倩, 张平, 廖柏寒, 彭佩钦, 梅金星, 徐继敏. 一株耐 Cd 菌株的分离、鉴定及基本特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 11-24.  
LI Q, ZHANG P, LIAO BH, PENG PQ, MEI JX, XU JM. Isolation, identification and characterization of a Cd resistant bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 11-24 (in Chinese).