

抗氯化汞真菌的分离和鉴定

王保军 张鸿翼 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所)

摘要 从受汞污染的土壤中分离到一种抗汞真菌,经鉴定为烟草头孢霉 (*Cephalosporium tabacinum*),并初步研究了 F2 号菌的某些特性。该菌不仅对汞化合物有较强的抗性,同时对其它多种重金属的抗性也较强。

关键词 烟草头孢霉;氯化汞;抗性。

汞是一种重要的重金属。现已证明,在自然界汞的循环和转化过程中,微生物起着重要的作用。细菌对汞的抗性已有广泛的研究^[1-3],在真菌抗汞方面也有若干报道,如黑曲霉、青霉、粗糙脉孢菌和燕麦核腔菌对无机汞或有机汞化合物具有一定的抗性^[4]。在国内,有关真菌抗汞的报道还未见到。本文研究了从受氯化汞严重污染的土壤中分离到的一种抗高浓度氯化汞的真菌,根据其形态特征定名为烟草头孢霉 (*Cephalosporium tabacinum*),并对 F2 号菌株的抗汞特性作了初步研究。

材料和方法

1. 供试菌株的来源: F1—F13 号菌株分离自天津化工厂氯碱车间旁的土壤中。对照菌株有五通桥毛霉(3.25)、少根根霉(3.2893)和黑曲霉(3.883)由本所菌种保藏室提供。未鉴定的酵母菌(Y1)由本实验室自空气中分离到。

2. 菌种的分离和驯化: 土样稀释后加到分离培养基琼脂平板上(培养基成份: 葡萄糖 10g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂粉 13g, 土豆汁 1000ml, pH 6.5), 均匀涂布, 30℃ 培养 4 天, 挑出的单菌落在马丁孟加拉红琼脂平板上纯化。纯化后的菌株在含 HgCl₂ 的土豆汁液体培养基中(其成份除了不加琼脂粉外,其余同固体培养基)梯度驯化(10—800 mg/L)。

3. 汞化合物 无机汞是氯化汞(HgCl₂), 有机汞是乙酸汞(Hg(C₂H₃O₂)₂)和醋酸苯汞(HgC₆H₅O₂)。

4. 真菌生长的测定: (1) 在琼脂平板上点植, 30℃ 培养 10 天, 测量菌落直径; (2) 过滤收集培养液中的菌体, 在烘箱中干燥至恒重, 每一样品作两份, 取平均值。

结果和讨论

(一) 分离菌株的抗汞水平(表 1)

经分离、纯化获得 13 株真菌(编号为 F1—13)。将菌株在含 HgCl₂ 的培养基中梯度驯

表 1 分离菌株与对照菌株抗汞水平的比较

菌 株	来 源	最高抗汞浓度 (mg/L)
F1	受 HgCl ₂ 污染的土壤	500
F2	同上	600
F3	同上	500
F4	同上	500
F5	同上	500
F6	同上	500
F7	同上	500
F8	同上	500
F9	同上	500
F10	同上	500
F11	同上	500
F12	同上	500
F13	同上	500
五通桥毛霉 (3.25)	本所菌保室提供	50
少根根霉 (3.2893)	同上	50
黑曲霉 (3.883)	同上	50
未鉴定的酵母 (Y1)	实验室空气中分离	100

汞为氯化汞 (HgCl₂)

本研究课题属于国家自然科学基金委员会基金资助课题。本所陈庆涛先生在菌种鉴定上给予热情指导, 特此致谢。

化, 观察菌株的抗性水平, 与对照菌株进行比较。从表 1 的结果可见, 不同来源的菌株抗汞水平有明显的差异。从受 $HgCl_2$ 严重污染的土壤中分离的 13 株菌均能在含 500 mg/L $HgCl_2$ 的培养基中生长, 其中以 F2 号菌株的抗汞水平最高, 在汞浓度达 600 mg/L 时仍能生长, 而来自菌保室和空气中分离的菌株只能在 50—100 mg/L 的含汞培养基中生长。这些对照菌株一般都是在无汞或极低汞浓度的环境中生长的。由此可见, 微生物对汞的抗性水平与其所处环境条件有着紧密的关系。

(二) 菌种形态特征鉴定

分离纯化后的 13 株菌在土豆汁葡萄糖琼脂平板上点植培养, 30℃ 生长 10 天, 巨大菌落直径为 38—40 mm。菌落质地似花丝状 (图版 I-1 a)、絮状、山羊毛状 (图版 I-1 b) 等。菌落颜色初始生长时为白色, 随培养时间的延长逐步变成橙色或橙红色。载片培养镜检菌的特征如下: 菌丝直径 1.2—2.8 μm , 有明显横隔; 分生孢子梗呈瓶状 (图版 I-2)。分生孢子透明, 形状为椭圆形, 棒状, 卵圆形等, 大小在 3—8 \times 2—4 μm , 大部份为 5—6 \times 3 μm 左右, 孢内含 2—3 个或多个小油滴 (图版 I-3)。该菌的上述特征与 *Beyma* 的原始描述^[5]比较基本相似, 定名为烟草头孢霉 (*Cephalosporium tabacinum*)。

(三) F2 号菌株对碳源和氮源的利用 (表 2)

表 2 烟草头孢霉 F2 对各种碳源和氮源的利用

碳 源	菌体干重 mg/ml 菌液	氮 源	菌体干重 mg/ml 菌液
葡萄糖	5.36	硝酸钠	5.50
蔗糖	6.54	亚硝酸钠	6.30
棉子糖	5.74	硝酸铵	8.60
核糖	0.61	蛋白胨	10.30
淀粉	6.40	牛肉膏	11.00
甘油	8.02	天门冬氨酸	10.00
甜醇	1.56	赖氨酸	4.80
酒石酸钠	0.80	蛋氨酸	2.72
麦芽汁	15.10	谷氨酸	11.38
天门冬氨酸	4.28	尿素	3.30
丙酮酸钠	0.48	乙酰胺	3.0

所用碳源、氮源浓度为 1%, 氨基酸均为 L-型。

表 2 结果表明, F2 号菌株对葡萄糖、蔗糖、淀粉等较易利用, 对核糖利用较差, 而丙酮酸钠和酒石酸钠更不适宜菌的生长。氮源利用方面, 除了乙酰胺、尿素和蛋氨酸不宜作为氮源外, 其它有机或无机氮化物均能被菌株良好利用。

(四) 氯化汞对 F2 号菌株生长因素的影响

1. 对 pH 值影响: 烟草头孢霉 F2 号菌株在无汞条件下可在 pH 3—10 范围内生长, 最适 pH 为 3.0, 而在含有 300 mg/L $HgCl_2$ 的土豆汁葡萄糖蛋白胨液体培养基中, 30℃ 振荡培养 3 天, 该菌的生长量受到一些抑制, 菌生长的最适 pH 值移动到 5.9 (图 1)。

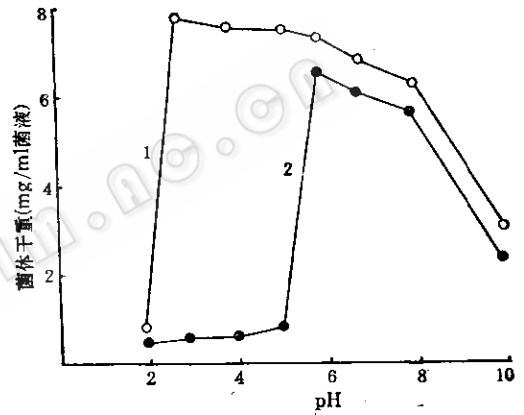


图 1 汞对烟草头孢霉 F2 号菌生长 pH 的影响
1. 未加 $HgCl_2$, 2. 在含 300 mg/L $HgCl_2$ 培养基中

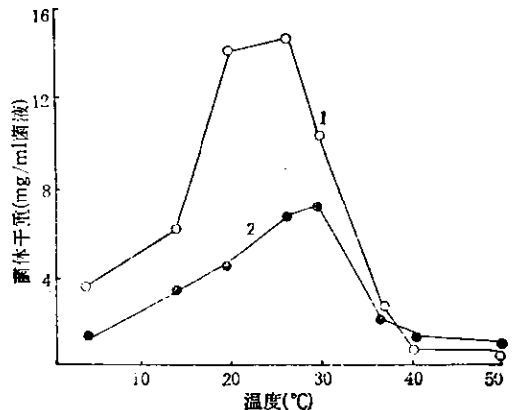


图 2 汞对烟草头孢霉 F2 号菌生长温度的影响
1. 未加汞 2. 在含有 200 mg/L $HgCl_2$ 培养基中生长

2. 对温度影响: F2 号菌的生长温度范围是 15—37℃, 最适生长温度为 28℃, 在含 HgCl₂ 的培养基中 (HgCl₂ 浓度为 200mg/L), 最适生长温度为 30℃。当有汞存在时温度在 30℃ 以下菌的生长均低于无汞条件(图 2)。

(五) F2 号菌株的多种抗性

1. 对有机汞化合物的抗性: 将菌株点植于含乙酸汞和醋酸苯汞的土豆汁葡萄糖蛋白胨琼脂平板上(汞浓度 0—900mg/L), 30℃ 培养 10 天, 测量菌落直径。结果见表 3。表 3 中可见, 该菌对乙酸汞抗性较强, 而对醋酸苯汞的抗性就较弱。只能在汞浓度为 50mg/L 以下生长。

2. 对重金属的抗性: 试验方法同前。试验结果(表 4)表明, 抗汞的烟草头孢霉 F2 菌株对 6 种重金属化合物均有不同程度的抗性, 以

表 3 烟草头孢霉 F2 号对有机汞化合物的抗性

乙酸汞浓度 (mg/L)	菌落直径 (mm)	醋酸苯汞浓度 (mg/L)	菌落直径 (mm)
0	34	0	34
5	34	5	30
10	34	10	24
20	34	20	15
50	34	50	未长
100	32	100	未长
300	28	300	未长
500	21	500	未长
900	17	900	未长

对铜、锌的抗性为强, 在浓度高达 8000 mg/L 时仍可生长。从菌的生长情况看, 该菌对 6 种重金属的抗性顺序为: Cu > Zn > Pb > Co > Cd > Cr。

表 4 烟草头孢霉 F2 对 6 种重金属化合物的抗性

重金属化合物	不同重金属化合物浓度 (mg/L) 中菌落直径 (mm)							
	0	100	300	500	800	1000	3000	8000
CuSO ₄	40	39	38	32	27	24	14	12
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	39—40	39	30	25	23	15	12	11
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	40	37	34	31	19	13	8	未生长
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	40	40	33	25	17	14	未生长	未生长
Pb(NO ₃) ₂	40	35	42	43	41	35	9	未生长
CrO ₃	40	31	29	15	未生长	未生长	未生长	未生长

目前, 在国外已陆续报道了真菌对汞的抗性, 然而有关烟草头孢霉对汞的抗性还未见有报道。我们的试验结果表明: 该种真菌对重金属的抗性是多样性的, 即非专一性的。研究真菌对汞和其它重金属的抗性不仅具有一定的理论意义, 而且能够为去除环境中重金属化合物的污染以及回收重金属提供一种可行的手段。有关烟草头孢霉对汞的抗性将另作报道^[6]。

参 考 文 献

- [1] Robinson, J. B. and Tuovinen, O. H.: *Microbiol. Rev.* 48:95—124, 1984.
- [2] 杨惠芳等: *生态学报*, 2(3): 211—215, 1982.
- [3] 杨惠芳等: *生态学报*, 6(2): 120—126, 1986.
- [4] Ross, I.S.: *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64(2): 175—193, 1975.
- [5] Beyma. *Zentbl. Bakt. Parasitkde (Abt. II)*, 89, 239—241, 1933.
- [6] 王保军等: *环境科学学报*, 8(1): 72—78, 1988.