

# 一株分离于湘江污染水域的酵母(*Candida fermentati*)的鉴定及其 $\text{Cd}^{2+}$ 的吸附特性\*

高 健 邓先余 康 健 王志勇

(湖南科技大学生命科学学院 湘潭 411201)

**提要** 对湘江湘潭段周边污染水域的微生物群落结构进行调查, 筛选出一株能够耐受较高浓度镉的野生型酵母样真菌, 命名为 XTWJX 菌株, 并对其进行形态学特征、生理试验以及 ITS 序列和 26S rDNA D1/D2 区序列分析。结果表明, 该菌株属于假丝酵母属的发酵假丝酵母 *Candida fermentati*。金属抗性试验表明, XTWJX 菌株对测试的 9 种不同金属离子显示出较高的抗性能力, 尤其是对毒性较大的  $\text{Cd}^{2+}$  的抗性能力高达 6mmol/L, 暗示该菌株可能具有应用前景。研究了 XTWJX 菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附特性, 结果表明, 在  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 10mg/L 的水溶液中, 该菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  显示出有较强的吸附能力。这一结果暗示 XTWJX 菌株的分离很可能为  $\text{Cd}^{2+}$  污染的河流和湖泊等水生环境的生物修复提供了一种新型的生物材料。

**关键词** 发酵假丝酵母, 形态学特征, 生理试验, 序列分析, 金属抗性,  $\text{Cd}^{2+}$  吸附特性

**中图分类号** X172

湘江、资江、沅江和澧水是湖南省境内的四大河流, 其中最大的河流——湘江发源于广西兴安海洋山麓, 向东北注入湖南省东部, 在永州市区与潇水汇合, 向东流经衡阳、湘潭、长沙, 至湘阴县入洞庭湖后归长江。湘江是湖南省生活用水及工农业生产的主要供应水源之一。但近年来, 在长沙、株洲、湘潭城市群工农业快速发展的同时, 也存在一些其它不容忽视的问题, 如沿江排放的各种有机质和重金属污染物越来越多, 导致湘江河流的水环境遭受严重污染, 尤其是重金属污染源中的镉污染是导致湘江湘潭段水质恶化的一个重要的方面, 已成为湘潭地区老工业基地振兴与可持续发展的障碍(秦普丰等, 2008)。

如何高效治理河流和湖泊等水生环境中有机质和重金属的污染, 是一个严峻的课题(邓先余等, 2009; 许秀琴等, 2007)。研究表明, 利用环境中原位微生物进行水环境的治理和修复, 是既经济又可避免二次污染的绿色技术, 因此, 充分了解受污染河流中微生物的绝对数量及群落结构, 不仅可以判断污染物对

水环境的影响, 而且通过人工参与改变环境条件, 将有助于受污染河流的治理, 提高自净效率(丁凯等, 2005; 王莹, 2008)。

为获得具有应用潜力的原位微生物来治理和修复污染的河流和湖泊等水生环境, 作者对湘江湘潭段竹埠港化工区和湘潭县吴家巷工业区等周边水域的微生物群落结构进行了初步调查, 从中筛选出一株能够耐受较高浓度镉的野生菌株 XTWJX。该菌株经形态学、生理试验和分子生物学鉴定, 命名为发酵假丝酵母 *Candida fermentati* XTWJX。同时, 根据其能够耐受较高浓度镉的特征, 考察了该菌株对镉离子的吸附特性, 以期利用该菌株治理含镉废水提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 XTWJX 菌株的分离与纯化

用于分离 XTWJX 菌株的液体样品来自湘潭市某工业区周边水域, 该样品的 pH 值为  $6.4 \pm 0.2$ 。将 1ml 水样放入装有 100ml 富集培养基的 250ml 三角瓶中,

\* 湖南省教育厅资助项目, 09C378 号。高 健, 博士, 副教授, E-mail: xtgojian@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-09-25, 收修改稿日期: 2009-11-27

置于 28 ℃、150r/min 摇床培养。富集培养基采用改良的嗜酸细菌培养基(Bridge *et al*, 2000), 其组成(g/L)主要包括: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2%; KCl, 0.01%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05%; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05%。另加入 0.5%的葡萄糖和 0.2%的酵母浸出粉(V/V), 用稀硫酸调节培养基的 pH 为 5.5。121 ℃ 灭菌 15min。

获得的富集培养物采用 YEPD (奥斯伯等, 2005) 平板划线分离法, 于 28 ℃ 下倒置培养培养 2—4 天后, 选择具有代表性的单菌落镜检, 重复划线分离 3—5 次, 直至获得目的菌株的纯培养物, 并斜面保存备用。用于配制培养基的试剂为化学纯或分析纯。

## 1.2 形态学观察与生理测试

XTWJX 菌株的形态学观察采用扫描电镜(JEOL JSM-6360 LV)完成。子囊孢子的观察及其生理生化特征按照文献《酵母菌的特征与鉴定手册》(巴尼特等, 1991)进行。用于生理测试的微量生化管购自杭州天和微生物试剂有限公司, 其它相关生化试剂购自广东环凯微生物科技公司。

### 1.3 XTWJX 菌株最适生长 pH 和温度测定

**1.3.1 温度对 XTWJX 生长的影响** 取 99ml 的 YEPD 液体培养基装于 250ml 三角瓶中, 调节 pH 为 5.5, 121 ℃ 灭菌 15min, 冷却, 在无菌室校准 pH 值后分别接种在对数生长期离心浓缩的新鲜细胞培养物于上述培养基中, 接种的量以保证培养基中初始 OD 值为 0.15 左右, 然后分别置于 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃ 和 42 ℃ 培养 36h, 摇床转速为 150r/min。测定培养液在 600nm 处的 OD 值。上述试验重复 3 次。

**1.3.2 pH 值对 XTWJX 生长的影响** 取 99ml 的 YEPD 液体培养基装于 250ml 三角瓶中, 将 pH 分别调节为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 共 9 个梯度, 121 ℃ 下, 灭菌 15min, 冷却, 在无菌室校准 pH 值。然后分别接种在对数生长期离心浓缩的新鲜细胞培养物于上述培养基中, 接种的量以保证培养基中初始 OD 值为 0.15 左右, 然后置于最适宜温度(根据上面的结果)下培养, 在转速为 150r/min 的摇床中培养 36h。测定培养液在 600nm 处的 OD 值。上述试验重复 3 次。

### 1.4 基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

**1.4.1 DNA 的提取** 离心收集 5ml XTWJX 菌体, 用 pH 8.0 的 TE 缓冲液洗涤三次, 弃上清, 沉淀备用。XTWJX 菌株基因组 DNA 的提取参照文献(周小玲等, 2004)进行。

**1.4.2 ITS 序列和 26S rDNA 的 D1/D2 区的 PCR 扩增** ITS 序列的 PCR 扩增采用通用引物对(Anderson *et al*, 2003): ITS1(5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系(50μl): 10×PCR 缓冲液, 5.0μl; Mg<sup>2+</sup> (5mmol/L), 3.0μl; dNTP(各 5mmol/L), 2.0μl; 引物(20μmol/L)各 1.0μl; *Taq* DNA 聚合酶(1U/μl, MBI), 1.0μl; 模板 2.0μl 约 20ng; 去离子水 35μl。扩增程序为: 94 ℃ 预变性 3min: 94 ℃, 40s; 52 ℃, 1.0m, 72 ℃, 1.0m; 32 个循环后 72 ℃ 8min。取 5μl 产物于 1%的琼脂糖凝胶电泳。在紫外灯下观察结果。

26S rDNA 的 D1/D2 区的 PCR 扩增采用引物对(白逢彦等, 2002): NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG G-3')。除 94 ℃, 30s; 52 ℃, 30s; 72 ℃, 40s; 30 个循环外, 其它扩增条件与 ITS 序列的 PCR 扩增基本相同。所用试剂除 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司外, 其它如 *Taq* 酶、dNTPs 等分子生物学试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。

### 1.5 PCR 扩增产物的纯化、测序与系统发育分析

**1.5.1 PCR 扩增产物的纯化、测序** 扩增的 PCR 产物用 Omega 生产的凝胶回收试剂盒纯化。纯化产物由上海生工生物工程技术有限公司完成测序工作。

**1.5.2 系统发育分析** 根据供试菌株的 ITS 序列和 D1/D2 区序列, 运用 BLAST 程序在 GenBank 数据库中分别进行同源序列搜索。根据同源序列搜索结果, 下载相关菌种的 ITS 序列和 D1/D2 区域序列, 与供试菌株的序列放在一起, 用 MEGA4.1 软件进行匹配排列, 然后采用邻接法(Neighbor-Joining)(Saitou *et al*, 1987)进行系统树的构建并用 MEGA4.1 软件自带的 BOOTSTRAP 程序对进化树进行 1000 次可信度分析(Felsenstein, 1985)。

### 1.6 XTWJX 菌株对不同金属离子的抗性

据上述结果, 调节培养基的 pH 为最适, 然后分别接种 1.0ml 的 XTWJX 新鲜培养物于三角瓶中, 在最适宜生长温度、摇床转速为 150r/min 条件下培养, 待 OD<sub>600</sub> 值达到 0.3 左右时, 再向三角瓶中加入不同浓度的金属离子, 继续培养 72h, 然后测定含各种不同金属离子的菌液 OD<sub>600</sub> 值。各种金属离子抑制培养液中 XTWJX 菌株生长的最低浓度定义为最低抑菌浓度(minimal inhibition concentrations, MICs)。由于添加到一定浓度有沉淀反应, 在观察或测量光密度值时

都以同浓度但不接种试管作为对照。试验采用的金属盐均为硫酸盐, 购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

### 1.7 XTWJX 菌株的镉吸附特性

**1.7.1 菌体制备与 Cd<sup>2+</sup>含量的测定** 湿菌体和冻干菌体的制备以及 Cd<sup>2+</sup>含量的测定均按照文献(王能飞等, 2004)描述的方法进行。原子吸收光谱仪的型号为日本生产的 ZV800 型。

**1.7.2 Cd<sup>2+</sup>的吸附试验** 向 250ml 的三角瓶中加入 100ml 含一定浓度的 Cd<sup>2+</sup>溶液, 初始 pH 用盐酸调节, 冻干菌体和湿菌体被分别加入到三角瓶中, 然后将三角瓶置于 30、150r/min 振荡 4h。反应混合物用滤纸过滤, 滤液用来分析吸附前后溶液中 Cd<sup>2+</sup>的浓度。

**1.7.3 Cd<sup>2+</sup>的解吸试验** 将上述同样条件下吸附 Cd<sup>2+</sup>后的负载 XTWJX 菌体离心收集、烘干, 加入盛有一定体积、一定浓度盐酸溶液的三角瓶中, 置于 30、150r/min 振荡 4h。根据负载 XTWJX 菌体上 Cd<sup>2+</sup>的吸附量和解吸后溶液中 Cd<sup>2+</sup>的浓度计算 Cd<sup>2+</sup>的解吸率, 考察解吸时间和盐酸浓度对解吸的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株的形态学特征

普通光学显微镜下, XTWJX 菌株形成的菌落为乳白色, 圆形, 隆起, 表面光滑, 边缘规则。扫描电镜

下, XTWJX 菌株的单细胞形态为卵圆型, 进行出芽生殖(图 1)。麦氏琼脂培养基上培养 5 天后的细胞经孔雀绿染色、乙醇脱色及番红复染后光学显微镜下观察, 没有发现子囊孢子的形成。菌株的菌落与细胞形态表明, 该菌株属于不产子囊孢子的酵母菌一类。

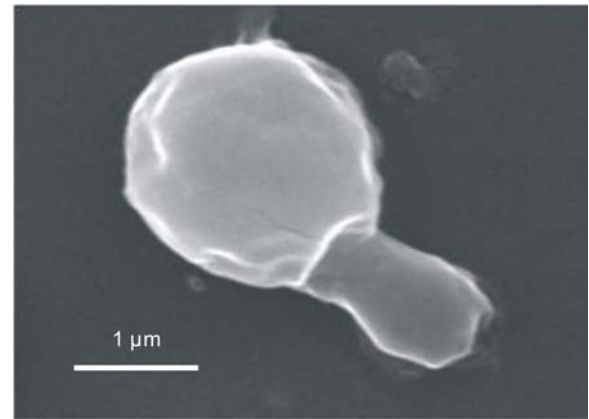


图 1 XTWJX 菌株的扫描电镜照片  
Fig.1 SEM photograph of strain XTWJX

### 2.2 生理特征

XTWJX 菌株的生理特征见表 1。对照《酵母菌的特征与鉴定手册》(巴尼特等, 1991)检索表, XTWJX 菌株应该属于假丝酵母属的成员, 而根据 Suh 等(2004)的描述, XTWJX 菌株与发酵假丝酵母 *C. fer-*

表 1 XTWJX 菌株的生理特征  
Tab.1 Physiological traits of strain XTWJX

发酵试验							
葡萄糖	+	蔗糖	+	淀粉	-	乳糖	-
D-半乳糖	+D	麦芽糖	-	松三糖	-	棉子糖	+D
海藻糖	+D	纤维二糖	V	菊糖	-		
碳同化试验							
L-山梨糖	+D	蜜二糖	+	D-甘露醇	+	DL-乳酸	+
D-葡萄糖胺	+D	棉子糖	+	半乳糖醇	+	琥珀酸	+
D-核糖	+D	松三糖	+	麦芽糖	+	菊糖	+
D-木糖	+D	蔗糖	+	D-葡萄糖酸	+W	乙醇	+
L-阿拉伯糖	+D	赤藓糖醇	-	D-阿拉伯糖	+D		
氮同化试验							
硝酸盐	-	乙胺	+	赖氨酸	+	亚硝酸盐	-
好氧条件下以 D-葡萄糖为唯一碳源的生长试验							
0.1%放线菌酮	+	50%D-葡萄糖	+	无吡哆醇	+	16%氯化钠	W
无生物素和硫胺素	-	60%D-葡萄糖	W	无硫胺素	+	10%氯化钠	+
其它试验							
DBB	-	尿素水解	-				

注: +为阳性, - 为阴性, D 为延迟阳性, W 为弱阳性, V 为可变

*mentati* 这个种的特征相似。

### 2.3 XTWJX 菌株最适生长 pH 和温度测定

影响微生物生长的重要因素是 pH 和温度, 本实验条件下测定了 XTWJX 菌株在不同 pH 和不同温度条件下的生长情况。表 2 表明, 在 pH = 4—7 时, XTWJX 菌株生长良好, 当 pH < 4.0 时, 生长受到一定的抑制, 但 pH = 2.0 时, 仍然能够生存, 这表明该菌株对极端酸性环境具有较好的耐受能力, 而当 pH 分别为 1.0 和大于 9.0 时, 在误差允许的范围内, 其生长完全受到了抑制。

表 3 表明, XTWJX 菌株在 25—30 条件下生长最好, 但温度高于 35、低于 40 时, 其生长受到一定的影响, 但仍然能够生长, 超过 42 时, 在误差允许的范围内, 该菌株的生长完全受到抑制。由此说明该酵母菌是一个中温型的微生物, 易于在常温下培养。

### 2.4 系统发育分析

**2.4.1 ITS 序列的系统发育分析** 研究表明 (Vaughan-Martini *et al.*, 2005), *P. guilliermondii* / *C. guilliermondii* 复合群内包括 *P. guilliermondii* (无性型形式为 *C. guilliermondii*)、*P. carpophil* (无性型形式为 *C. fermentati*) 和 *C. carpophila* (其异名为 *C. guilliermondii* var. *carpophila*, *C. fukuyamaensis*, *C. xestobii*) 3 个种。从图 2 可以看出, XTWJX 菌株 (ITS 序列登陆号, GU248264) 与 *C. fermentati* 和 *C. guilliermondii* var. *carpophila* 两个不同种模式菌株类聚在相同的一组, 这表明该菌株与它们具有高度的亲缘关系。由此可以推断, XTWJX 菌株可能属于 *P. guilliermondii* / *C. guilliermondii* 复合群内的 *C. fermentati* 或者 *C. carpophila*。

**2.4.2 26S rDNA D1/D2 区序列的系统发育分析** 对真菌特别是酵母菌进行系统分类时, 采用单一的基因序列有时并不能达到目的。基于 ITS 序列的分辨能力, 作者从另一个分子水平, 即 26S rDNA D1/D2 序列探讨了 XTWJX 菌株 (26S rDNA D1/D2 序列登陆

号, GU248265) 与基因库中相关菌种 (株) 的系统发育关系, 以进一步确认该菌株的分类地位 (图 3)。从图 3 可见, 所研究的 14 株菌可分为三个类群。很明显, XTWJX 菌株落在第 3 个类群, 即与 *P. carpophila* 和 *C. fermentati* 处在同一分支, 这一结果进一步支持基于 ITS 序列分析所得出的结论。此外, 形态学特征表明 XTWJX 菌株不产子囊孢子, 因此, 它不可能属于有性形式的 *P. carpophila*。基于上述形态学特征、生理特征以及 ITS 序列和 26S rDNA D1/D2 序列的系统学分析, XTWJX 菌株属于 *C. fermentati* 这个种。

### 2.5 XTWJX 菌株对不同金属离子的抗性

考虑到 XTWJX 菌株来源于重金属污染水域, 作者考察了该菌株对 9 种不同金属离子的 MICs 值 (表 4), 以期获得该菌株的重金属抗性能力, 为利用该菌株处理含重金属污水提供理论依据。一般认为, MICs 值越大, 重金属对菌体的毒性越小, 反之对菌体的毒性就越大。本研究中, 9 种金属离子对 XTWJX 菌株的毒性强弱依次为:  $Fe^{2+} < Mn^{2+} < Al^{3+} < Zn^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} < Cd^{2+} < Cr^{6+}$ 。XTWJX 菌株对 9 种不同金属离子的抗性能力, 尤其是对毒性较大的  $Cd^{2+}$  的抗性能力高达 6mmol/L, 这暗示该菌株可能具有应用前景。

### 2.6 XTWJX 菌株的镉吸附特性

**2.6.1 时间对相同生物量的湿菌体和冻干菌体吸附  $Cd^{2+}$  的影响** 为获得达到吸附平衡所需求的时间, 考察了相同生物量的湿菌体 (1.59g) 和冻干菌体 (0.21g) 在 100ml  $Cd^{2+}$  浓度为 10mg/L 的水溶液 (pH = 5.5) 中对  $Cd^{2+}$  的吸附量与吸附时间的关系, 见表 5。从图 6 可以看出, 在本试验条件下, 冻干菌体在 10min 左右达到了吸附平衡, 对  $Cd^{2+}$  的去除率高达 96% 左右。而湿菌体在 30min 左右才达到吸附平衡, 对溶液中  $Cd^{2+}$  的去除率也达到 94%。随着吸附时间的延长, 冻干菌体的  $Cd^{2+}$  去除率基本保持平衡, 而湿菌体的  $Cd^{2+}$  去除率却出现了下降, 这种现象可能是湿菌体的  $Cd^{2+}$

表 2 XTWJX 菌株在不同 pH 下的生长  
Tab.2 The growth of strain XTWJX in different pH

pH	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
OD 值	0.15±0.07	0.45±0.08	1.13±0.07	2.15±0.10	2.1±0.08	2.2±0.10	1.62±0.07	0.56±0.07	0.18±0.07

表 3 XTWJX 菌株在不同温度下的生长  
Tab.3 The growth of strain XTWJX in different temperatures

温度 (°C)	5	10	15	20	25	30	35	40	42
OD 值	0.3±0.05	0.7±0.06	1.35±0.06	2.1±0.08	2.3±0.08	2.35±0.07	2.23±0.06	0.8±0.05	0.2±0.06

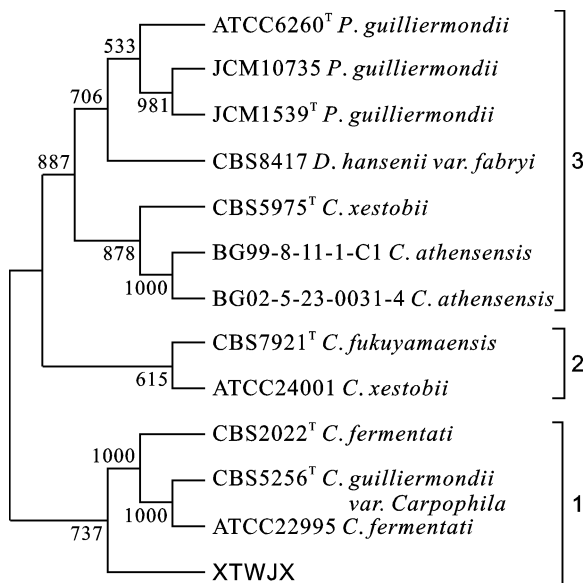


图 2 基于 ITS 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis based on ITS sequences  
分枝上的数值表示 Bootstrap 检验的支持百分率, T 表示模式菌株

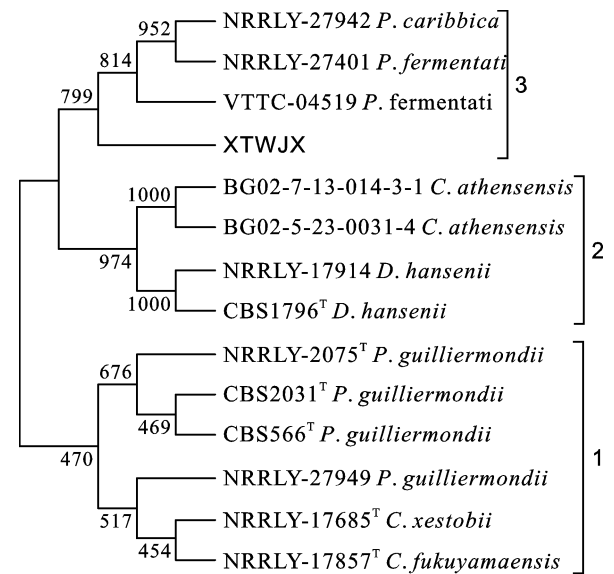


图 3 基于 26S rDNA D1/D2 序列和 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain  
分枝上的数据表示 Bootstrap 检验的支持百分率, T 表示模式菌株  
Bootstrap percentages are shown. T denotes typical strain.

表 4 XTWJX 菌株的重金属抗性  
Tab.4 Heavy metal resistance in strain XTWJX

金属离子	Fe <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Cr <sup>6+</sup>
MICs(mmol/L)	48	32	30	24	12	10	8	6	1

表 5 等生物量的 XTWJX 冻干菌体与湿菌体对 Cd<sup>2+</sup>的吸附量与吸附时间的关系  
Tab.5 Time course of Cd<sup>2+</sup> adsorption by equal biomass of wet and lyophilized strain XTWJX

时间(min)	0	5	10	15	20	25	30	60	120	180	240
剩余 干菌	100	47±2.5	4±3	5±3	4.5±3	5±3	4±2.4	4.6±2.5	4±3.5	4±4	3.7±7
Cd <sup>2+</sup> (%) 湿菌	100	68±2.5	50±3	36±3	28±3	14±3	6±4	7.8±3.5	10±3.5	9±2	10±3

吸附属于物理吸附而不是共价吸附的缘故(Li *et al*, 2008)。基于冻干菌体对 Cd<sup>2+</sup>吸附过程的相对快速稳定性, 以下试验都采用冻干菌体, 而且, 由于 4h 的时间足以达到吸附平衡, 因此, 在本试验系统中统一采用震荡时间为 4h。

**2.6.2 pH 对吸附的影响** 研究表明, pH 很可能影响金属溶液的化学特性、生物官能团的活性以及多金属溶液中离子间的竞争, 因此, 体系中的 pH 对生物吸附的影响非常大(Yan *et al*, 2003)。此外, Kiff 等(1986)研究证实, 冻干真菌菌体对 Cd<sup>2+</sup>的最大吸附量发生在 pH = 8.0。基于此, 本研究在 pH ≤ 8.0 条件下, 考察了 1.0g 冻干菌体在 100ml Cd<sup>2+</sup>浓度为 10mg/L 的水溶液中, 单位质量的菌体对 Cd<sup>2+</sup>的吸附量与体系

初始 pH 的关系。

结果表明, pH 值是影响 XTWJX 菌体从体系中去除 Cd<sup>2+</sup>的关键性因素。当 pH < 5.0 时, XTWJX 菌体的 Cd<sup>2+</sup>吸附能力明显降低, 这很可能是由于 H<sup>+</sup>与 Cd<sup>2+</sup>竞争菌体表面的结合位点的缘故。体系中的 pH 在 5.0—7.0 之间时, XTWJX 菌体吸附 Cd<sup>2+</sup>的效果最好。事实上, 当 pH 在这个区间进行一定时间的吸附反应后, 体系中的 pH 基本保持在 5.5 左右(数据未标明), 这很可能是由于菌体具有调节体系 pH 的作用。

**2.6.3 HCl 的解吸试验** 研究表明, 用来从负载金属的生物吸附剂中回收金属的解吸剂包括 HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和 EDTA 等(王能飞等, 2004; Wang, 2002; Kapoor *et al*, 1999), 其中, 在已报道各种化学解吸剂中,

HCl 的解吸效果最好, 因此, 本研究采用 HCl 作为解吸剂。

(1) 不同 pH 对解吸率的影响 为了确定不同 pH 对负载菌体上  $\text{Cd}^{2+}$  的解吸的影响, 将分离出的负载酵母菌体置于 HCl 处理过的 pH 分别为 8、7、6、5、4、3、2、1 的体系中解吸 4h, 释放的  $\text{Cd}^{2+}$  的量用原子分光光度计测量, 试验设置三个平行样。结果表明随着 pH 的升高,  $\text{Cd}^{2+}$  离子的解吸率呈下降趋势, 解吸率由最高 78.4% 下降到 3.32%。由此表明, 菌体吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  在低 pH 值条件下容易被洗脱, 较高的 pH 值不利于  $\text{Cd}^{2+}$  的洗脱。

(2) 时间对解吸率的影响 为考察解吸时间对解吸率的影响, 本试验将分离出的负载 XTWJX 菌体于 30℃ 下在体积为 100ml、浓度为 0.1mmol/L 的 HCl 溶液中分别解吸 5、10、20、30、40、50、60min, 测定解吸液中的  $\text{Cd}^{2+}$  离子浓度, 试验设置三个平行样。结果表明整个解吸过程可以分为 2 个阶段。第一阶段, 解吸速度很快, 在 10min 内达到了吸附平衡, 大约 78% 的  $\text{Cd}^{2+}$  离子被回收; 第二阶段, 随着解吸时间的延长, 解吸趋于平衡。

### 3 结论

(1) 从湘江湘潭段污染水域中筛选出一株能够耐受较高浓度镉的野生菌株 XTWJX。该菌株经形态学、生理试验和分子生物学鉴定, 命名为发酵假丝酵母 *Candida fermentati* XTWJX。

(2) XTWJX 菌株对 9 种不同金属离子的抗性能力, 尤其是对毒性较大的  $\text{Cd}^{2+}$  的抗性能力高达 6mmol/L, 这暗示着该菌株可能具有应用前景。

(3) XTWJX 菌株的  $\text{Cd}^{2+}$  吸附特性表明, 在  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 10mg/L 的水溶液中(这种浓度通常比自然环境中  $\text{Cd}^{2+}$  浓度要大得多), 该菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  显示出有较强的吸附能力。这一结果暗示, XTWJX 菌株的分离为处理含  $\text{Cd}^{2+}$  废水提供了一种新的生物材料。

### 参 考 文 献

丁 凯, 郭泗勇, 2005. 利用微生物技术治理城市河湖水质. 北京水利, 5: 3—5

王 莹, 2008. 污染河流中微生物群落结构的空变化解析. 吉林: 东北师范大学出版社, 1—3

王能飞, 袁红莉, 应娇妍等, 2004. 一株分离自矿区土壤的酵母菌富集 Cd 的特性. 农业环境科学学报, 23(4): 674—677

邓先余, 高 健, 谭树华等, 2009. 一株甲胺磷高效降解菌——巴氏葡萄球菌(*Staphylococcus pasteurii*)的筛选及其分子鉴

定. 海洋与湖沼, 40(5): 551—555

白逢彦, 贾建华, 梁慧燕, 2002. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 21(1): 27—32

许秀琴, 朱 勇, 杨 挺等, 2007. 水体重金属污染的危害及其修复技术. 污染防治技术, 20(4): 67—69

周小玲, 沈 微, 饶志明等, 2004. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法. 微生物学通报, 31(4): 89—92

秦普丰, 雷 鸣, 郭 雯, 2008. 湘江湘潭段水环境主要污染物的健康风险评价. 环境科学研究, 21(4): 190—195

巴尼特 J A, 佩恩 R W, 亚罗 D 著, 胡瑞卿译, 1991. 译酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 60—117

奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G 等著, 马学军, 舒跃龙, 颜子颖等译, 2005. 精编分子生物学实验指南(第四版中译版). 北京: 科学出版社, 547—548

Anderson L C, Campbell C D, Prosser J I, 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. Environmental Microbiology, 5(1): 36—47

Bridge T A M, Johnson D B, 2000. Reductive dissolution of ferric iron minerals by *Acidiphilium* SJH. Geomicrobiology Journal, 17(3): 193—206

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783—791

Kapoor A, Viraraghavan T, Cullimore D R, 1999. Removal of heavy metals using the fungal *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 70: 95—104

Kiff R J, Little D R, 1986. Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. In: Eccles H H, Hunt S ed. Immobilization of ions by biosorption. Ellis Horwood, Chichester, UK, 71—80

Li H D, Liu T, Li Z *et al*, 2008. Low-cost supports used to immobilize fungi and reliable technique for removal hexavalent chromium in wastewater. Bioresource Technology, 99(7): 2234—2241

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406—425

Suh S O, Blackwell M, 2004. Three new beetle-associated yeast species in the *P. guilliermondii* clade. FEMS Yeast Research, 5: 87—95

Vaughan-Martini A, Kurtzman C P, Meyer S A *et al*, 2005. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov.. FEMS Yeast Research, 5: 463—469

Wang J L, 2002. Microbial immobilization techniques and water pollution control. Beijing, Science Press, 261—271

Yan G Y, Viraraghavan T, 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. Water Research, 37: 4486—4496

## IDENTIFICATION OF CADMIUM-ABSORBING STRAIN OF *CANDIDA FERMENTATI* FROM A POLLUTED AREA IN THE XIANGJIANG RIVER IN XIANGTAN

GAO Jian, DENG Xian-Yu, KANG Jian, WANG Zhi-Yong

(School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan, 411201)

**Abstract** A Cd<sup>2+</sup>-resistant strain of wild yeast-like fungus in polluted rivers and lakes was isolated in Xiangjiang River near Xiangtan City, named by strain XTWJX. Researches in morphology, physiology, and molecular biology (ITS and 26S rDNA D1/D2) were conducted. Result shows that it belongs to *Candida fermentati*, could survive in high cadmium concentration of 6.0mmol/L, and could adsorb cadmium in 10mg/L cadmium solution. Therefore, the strain may be applied potentially as a new biomaterials for treatment of cadmium-polluted water.

**Key words** *Candida fermentati*, Morphological characteristics, Physiological test, Sequence analysis, Metal resistance, Cadmium absorption