

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620131152511

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

双孢蘑菇富集重金属初步探索

Preliminary exploration of heavy metal
accumulation in *Agaricus bisporus*

张维友

指导教师姓名: 王勤 副教授

专 业 名 称: 微生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月 15 日

论文答辩时间: 2016 年 5 月 14 日

学位授予日期: 2016 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2016年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密（√）

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应的内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均使用上述授权。）

作者签名：

日期：2016年 月 日

目录

摘要.....	1
Abstract.....	2
1 前言	4
1.1 重金属污染	4
1.1.1 重金属污染现状.....	4
1.1.2 重金属污染的危害.....	5
1.1.3 铅的危害.....	6
1.1.4 镉的危害.....	7
1.1.5 砷的危害.....	8
1.1.6 重金属污染治理面临的难题.....	9
1.2 生物修复简介	10
1.3 大型真菌富集重金属的优势	11
1.4 双孢蘑菇概述	12
1.5 生物修复重金属的机理探索	14
1.5.1 植物富集重金属的机理.....	14
1.5.2 大型真菌富集重金属的机理.....	14
1.6 本论文的研究内容与意义	15
2 材料与试剂	17
2.1 菌种来源	17
2.2 试剂	17
2.3 仪器	19
2.4 引物合成	20
2.5 试剂配置	20
2.5.1 培养基配置.....	20
2.5.2 磷酸缓冲液的配置.....	20

2.5.3 固定液的配置.....	21
2.5.4 Spurr 树脂包埋剂的配置.....	22
2.5.5 SDS-PAGE 蛋白质电泳试剂.....	22
2.5.6 总蛋白的提取.....	24
3 实验方法	25
3.1 重金属含量的测定	25
3.1.1 重金属母溶液的制备.....	25
3.1.2 菌株的培养.....	25
3.1.3 微波消解.....	25
3.1.4 重金属含量测定.....	25
3.2 菌丝生长抑制率测定	26
3.3 重金属初始浓度对菌丝富集 Pb、Cd、As 的影响.....	26
3.4 重金属对双孢蘑菇结构的影响	27
3.4.1 扫描电镜.....	27
3.4.2 透射电镜.....	27
3.4.3 能谱.....	29
3.4.4 傅里叶变换红外光谱 (FTIR)	29
3.5 重金属对双孢蘑菇各项指标的影响	29
3.5.1 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定.....	29
3.5.2 过氧化物酶 (POD) 活性测定.....	30
3.5.3 丙二醛 (MDA) 含量的测定	31
3.6 重金属对双孢蘑菇总蛋白和 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶的影响.....	32
3.6.1 双孢蘑菇总蛋白的提取.....	32
3.6.2 重金属对双孢蘑菇 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶的影响.....	32
3.7 数据分析	34
4 实验结果与分析	35
4.1 双孢蘑菇富集重金属能力的研究	35
4.1.1 三种大型真菌与双孢蘑菇重金属富集能力的比较.....	35
4.1.2 三种重金属对双孢蘑菇菌丝大小的影响.....	37

4.1.3 不同的重金属初始浓度对菌丝吸附量的影响.....	40
4.2 重金属对双孢蘑菇结构的影响	41
4.2.1 扫描电镜结果.....	41
4.2.2 透射电镜结果.....	43
4.2.3 X 射线能谱分析(EDX) 结果	44
4.2.4 傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 分析结果.....	46
4.3 重金属对双孢蘑菇过氧化酶体和丙二醛的影响	47
4.3.1 重金属对过氧化氢酶 (CAT) 酶活力的影响	47
4.3.2 重金属对过氧化物酶 (POD) 酶活力的影响.....	48
4.3.3 重金属对丙二醛 (MDA) 含量的影响	49
4.4 重金属对双孢蘑菇 γ-GCS 基因和总蛋白表达的影响.....	50
4.4.1 重金属胁迫对 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶基因表达的影响.....	50
4.4.2 重金属对双孢蘑菇总蛋白表达的影响.....	52
5 讨论	54
5.1 双孢蘑菇富集重金属能力的研究	54
5.2 重金属对双孢蘑菇结构的影响	54
5.3 重金属对双孢蘑菇过氧化酶体和丙二醛的影响	55
5.4 重金属对双孢蘑菇 γ -GCS 和总蛋白表达的影响.....	55
6 结论与展望	57
6.1 结论	57
6.2 展望	58
参考文献	59
致谢.....	64

Content

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	2
1 Foreword.....	4
1.1 Heavy metal pollution.....	4
1.1.1 Current situation of heavy metal pollution	4
1.1.2 The harm of heavy metal pollution	5
1.1.3 Damage of the Lead	6
1.1.4 Damage of the Cadmium	7
1.1.5 Damage of the Arsenic	8
1.1.6 Problems faced by the management of heavy metal pollution	9
1.2 Introduction of biological repair	10
1.3 Advantages of enriching heavy metals in macrofungus	11
1.4 An overview of <i>Agaricus bisporus</i>	12
1.5 Exploring mechanism of bio remediation of heavy metals	14
1.5.1 Mechanism of heavy metal accumulation in plants	14
1.5.2 Mechanism of heavy metal accumulation by macrofungus.....	14
1.6 Research contents and significance of this paper.....	15
2 Material reagent and instrument	17
2.1 Bacteria strain	17
2.2 Medium and reagent.....	17
2.3 Instruments.....	19
2.4 Primer synthesis	20
2.5 Preparation of solutions	20
2.5.1 Medium configuration	20
2.5.2 Configuration of acid-phosphate buffer	21
2.5.3 Configuration of fixed liquid	21
2.5.4 Configuration of Spurr resin embedding agent.....	22

2.5.5 Configuration of protein electrophoresis reagents	22
2.5.6 Total protein extraction	24
3 The experimental method	25
3.1 Determination of heavy metal content	25
3.1.1 Preparation of mother solution of heavy metals	25
3.1.2 Mushroom culture	25
3.1.3 Microwave digestion.....	25
3.1.4 Determination of heavy metal content	25
3.2 Determination of the inhibition rate of mycelium growth	26
3.3 The effect of initial concentration of heavy metals on the accumulation of Pb, Cd and As	26
3.4 The effect of heavy metals on the structure of <i>Agaricus bisporus</i>.....	27
3.4.1 Scanning electron microscope	27
3.4.2 Transmission electron microscope.....	27
3.4.3 X-ray energy spectrum.....	29
3.4.4 Fourier transform infrared spectra (FTIR).....	29
3.5 The effect of heavy metals on the indexes of <i>Agaricus bisporus</i>.....	29
3.5.1 Determination of catalase (CAT) activity	29
3.5.2 Determination of Peroxidase (POD) activity.....	30
3.5.3 Determination of malondialdehyde (MDA) content.....	31
3.6 Effects of heavy metals on the total protein and γ- glutamine synthetase in <i>Agaricus bisporus</i>	32
3.6.1 Extraction of total protein from <i>Agaricus bisporus</i>	32
3.6.2 Effect of heavy metals on the γ - glutamine synthetase of <i>Agaricus bisporus</i>	32
3.7 Data analysis.....	34
4 Experimental results and analysis.....	35
4.1 Study on the ability of heavy metals in <i>Agaricus bisporus</i>	35
4.1.1 Comparison of heavy metal accumulation ability of three kinds of	

macrofungus and <i>Agaricus bisporus</i>	35
4.1.2 Effects of three kinds of heavy metals on the mycelium size of <i>Agaricus bisporus</i>	37
4.1.3 Effects of different initial concentrations of heavy metals on the adsorption capacity of hyphae	40
4.2 The effect of heavy metals on the structure of <i>Agaricus bisporus</i>.....	41
4.2.1 Results of scanning electron microscopy.....	41
4.2.2 Results of transmission electron microscope	43
4.2.3 Results of X - ray energy spectrum analysis.....	44
4.2.4 Results of Fourier transform infrared spectroscop.....	46
4.3 The Effect of heavy metals on the peroxisome and malondialdehyde of <i>Agaricus bisporus</i>.....	47
4.3.1 Effect of heavy metals on the activity of catalase (CAT)	47
4.3.2 Effect of heavy metals on the activity of peroxidase (POD)	48
4.3.3 Effect of heavy metals on the content of malondialdehyde (MDA).....	49
4.4 Effect of heavy metals on the expression of γ-GCS gene and total protein in <i>Agaricus bisporus</i>	50
4.4.1 Effect of heavy metals stress on the expression of γ -glutamine gene synthetase	50
4.4.2 Effect of heavy metals on total protein expression of <i>Agaricus bisporus</i>	52
5 Discussion	54
5.1 Study on the ability of heavy metals in <i>Agaricus bisporus</i>	54
5.2 The effect of heavy metals on the structure of <i>Agaricus bisporus</i>.....	54
5.3 The Effect of heavy metals on the peroxisome and malondialdehyde of <i>Agaricus bisporus</i>.....	55
5.4 Effect of heavy metals on the expression of γ-GCS and total protein in <i>Agaricus bisporus</i>.....	55
6 Conclusions and Prospectives	57

6.1 Conclusions	57
6.2 Prospectives	58
References	59
Acknowledgements	64

厦门大学博硕士论文摘要库

主要缩略语表

英文简称	英文全称	中文全称
CAT	catalase	过氧化氢酶
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]propanesulfonate	3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基] 丙磺酸内盐
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DW	distilled water	蒸馏水
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EDX	X-ray Energy Dispersive	X 射线能谱
FW	fresh weigh	鲜重
FTIR	Fourier Transform infrared spectroscopy	傅里叶转换红外线光谱
Glu	Glutaric dialdehyde	戊二醛
γ -GCS	γ -glutamylcysteine synthetase	γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry	电感耦合等离子体质谱
MDA	malondialdehyde	丙二醛
PA	Paraformaldehyde	多聚甲醛
PBS	phosphate buffer	磷酸缓冲液
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
POD	peroxidase	过氧化物酶
SEM	scanning electron microscope	扫描电子显微镜

摘要

随着工业化和城镇化的快速发展,越来越多的重金属污染物通过各种途径被释放到土壤等环境中。其不仅直接毒害土壤生物和植物,破坏生态结构,还可以通过食物链迁移转化,危害人体健康。究竟如何修复重金属污染是当前重要的环境问题。

本课题以人工培养的双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) AS2796 为主要研究对象。对其以及杏鲍菇、茶树菇和秀珍菇菌丝体做不同浓度的重金属 Pb、Cd 和 As 胁迫处理,研究四种大型真菌重金属富集能力。检测结果表明双孢蘑菇较其他 3 个菌株而言,对 Pb 和 Cd 的富集能力更强。在 1 mg/L 条件下,双孢蘑菇对 Pb 和 Cd 的富集量达到最大,分别为 3.179、18.065 $\mu\text{g/L}$ 。随着重金属添加浓度的升高,与空白组相比,Pb 和 As 的胁迫对菌丝生长速度、菌丝大小几乎没有影响。而 Cd 的胁迫对菌丝生长速度与菌丝大小影响很大,在浓度 0.25 mg/L 时,抑制率就达到了将近 12%。

在 Pb、Cd 和 As 胁迫下,菌丝体间连接、菌丝大小及表面等都发生了变化,细胞壁和细胞膜等微观结构也发生了变化。细胞内部变得空洞,内部有明显的黑色重金属颗粒物堆积,主要是由于部分重金属离子在胞内形成金属沉淀物。通过傅里叶变换红外光谱分析结果表明,在 1 mg/L 的重金属胁迫下,其对双孢蘑菇体内重要的官能团几乎没产生影响。

在 1 mg/L Pb 和 As 的胁迫下,菌丝体中过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 的活力发生了一些变化,但是规律不明显,而 Cd 胁迫下,CAT 酶活力呈现先增加后减小的趋势,POD 酶活力总体趋势为变小。在 Pb 的胁迫下,MDA 含量随着 Pb 浓度的增加而先上升后下降,而添加 As 和 Cd 后,MDA 的含量与对照组相比变化不大。研究重金属对双孢蘑菇 $\gamma\text{-GCS}$ 基因表达的影响,发现在浓度 1 mg/L 范围内,Pb、As 和 Cd 对 $\gamma\text{-GCS}$ 的合成主要起促进作用。在 50 mg/L 范围内的 Pb 和 As 以及 1 mg/L 范围内的 Cd 的胁迫下,双孢蘑菇总蛋白的种类几乎没有变化,但是某些蛋白的表达量随着重金属含量的升高而略有上升。

关键词: 环境; 双孢蘑菇; 重金属 Pb、Cd 和 As 的胁迫;

Abstract

Recent studies have found that with the rapid development of industrialization and urbanization, more and more heavy metal pollutants are released into the soil and other environment through various means. It not only contaminate the soil organisms and plants directly, damage the ecological structure, but also through the food chain migration and transformation, harm to human health. How to repair the heavy metal pollution is an important environmental problem.

This topic takes the artificial cultivation of *Agaricus bisporus* (AS2796) as the main research object. Make it and *Pleurotus eryngii*, *Agrocybe aegerit*, *Pleurotus geesteranus* in different concentrations of Pb, Cd and As stress treatment,exploring the heavy metal accumulation ability of four kinds of macrofungi. The results showed that *Agaricus bisporus* had stronger enrichment ability of Pb and Cd than the other 3 strains. Under the conditions of 1 mg/L, the enrichment of Pb and Cd in *Agaricus bisporus* reached the maximum, which was 3.179 and 18.065 $\mu\text{g/L}$, respectively. With the increase of the concentration of heavy metals, the stress of Pb and As had little effect on the growth rate and the size of the mycelium compared with the blank group. The Cd stress had a great influence on the growth rate and the size of the mycelium, and the inhibition rate reached nearly 12% when the concentration of Cd was 0.25 mg/L.

We found that mycelium connection, the size of mycelium and surface have changed in under the stress of Pb, Cd and As,cell wall and cell membrane micro-structure has also changed. The inside of the cell becomes empty, and there are many significant accumulations of heavy metal particles inside the cell, which may be the result of some heavy metal ions forming metal deposits in the cell. The results of infrared spectrum analysis showed that the main functional groups of *Agaricus bisporus* were almost not affected by the heavy metal stress of 1 mg/L.

Under 1mg/L Pb and As stress, catalase (CAT)and peroxidase (POD) activity of mycelium mad some changes, but the rule is not obvious. Under Cd stress, catalase

activity showed the trend of first increased and then decreased, and the POD activity of the overall trend is decrease. Under the stress of Pb, the content of MDA increased first and then decreased with the increase of the concentration of Pb, while under As and Cd stress, the content of MDA changed little compared with the control group. To study the effect of heavy metals on the expression of γ -GCS gene of *Agaricus bisporus*, and found that Pb, As and Cd in the concentration range of 1mg/L to promote the synthesis of γ -GCS. Under the stress of Pb and As within 50 mg/L and 1 mg/L in the range of Cd, there was almost no change in the total protein of *Agaricus bisporus*, but the expression of some protein increased with the increase of heavy metal content.

Keywords: Environment; *Agaricus bisporus*; Stress of heavy metals Pb, Cd and As.

1 前言

1.1 重金属污染

1.1.1 重金属污染现状

随着我国工业化和城镇化的快速发展,各种生产中产生的废水、废气和废渣等的排放,严重威胁着我国生态环境,也违背了可持续发展这一理念,因此这一严重环境问题日益受到各界的高度关注^[1]。

重金属(通常是指密度大于 4.5 g/cm^3 的金属,包括金、银、铜、铅等)污染作为重要的环境污染源之一,是指重金属或其化合物造成的环境污染,其主要污染来源如图 1 所示。2012 年,环境保护部部长周生贤表示,应将防治重金属污染作为环保工作的重中之重,其原因有三个。

其一、我国重金属污染物排放量大。据调查显示,2007 年全国仅废水中铅、汞、铬、镉、砷五种重金属的产生量就达 2.54 万吨,排放量近 900 吨。而大气中上述五种重金属污染物排放量更高达约 9500 吨。

其二、部分地区的河流和土壤存在重金属超标的问题,像湖南、广西等地更是出现一些严重的污染事件。

另外,一些地区的土壤受到重金属污染之后,由于其不易降解等原因,通过食物链传入到人体内,严重影响人体健康,对群众健康造成了严重威胁。

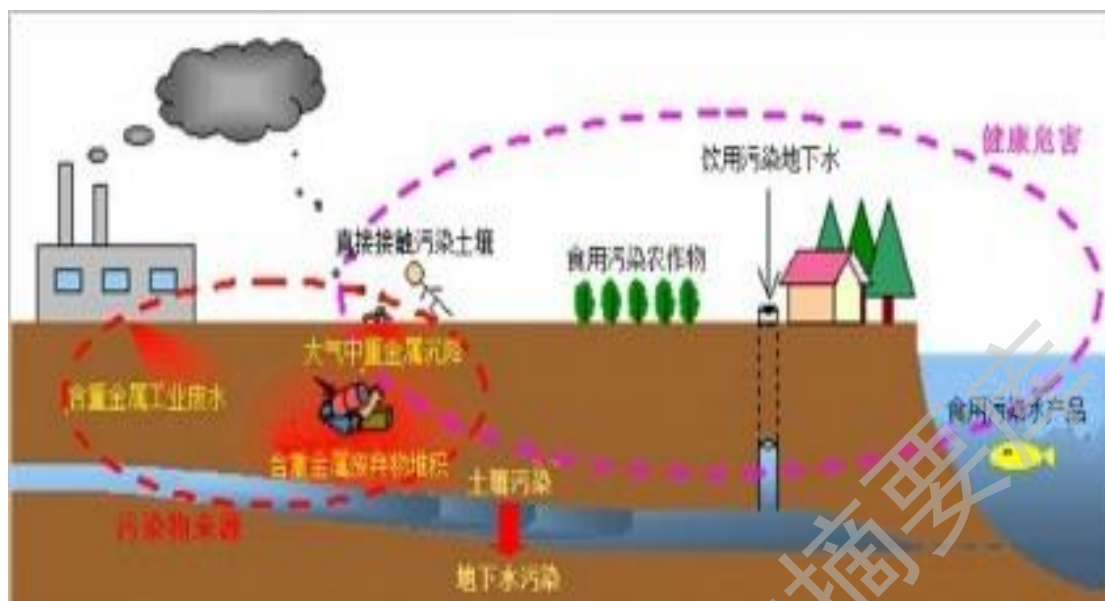


图 1 重金属主要污染来源

Fig.1 Main source of heavy metal pollution

(图片来源: www.iotbay.com)

1.1.2 重金属污染的危害

随着我国经济的快速发展,环境中重金属含量不断增加,重金属污染问题越来越受到人们的关注。由于重金属污染具有长期性、滞后性等特点,其可通过多种途径进入食物链累积放大,严重威胁人类的健康,甚至危及生命^[2-4]。到目前为止,已被确定对人类及环境危害较大的重金属元素主要包括:铅、砷、镉、汞等^[5]。其危害主要体现在以下两个方面:

首先,对环境的危害。重金属污染与其他有机化合物的污染不同的是,有机物可以通过自然界的降解使其毒性降低或者完全消除,而重金属在自然界当中很难被降解。当重金属进入大气、水体和土壤中,会造成大气、水体和土壤的污染,进而破坏生态结构,使生态失衡。

其次,对人体健康的危害。重金属通过污染的大气和水体等进而通过食物链的迁移转化富集到人体,与人体内的各种酶、蛋白发生作用,使其失活。如果富集的量超过人们所能耐受的限度,会引起人们急性或者慢性中毒,而且具有致癌、致畸等作用,对人体造成极大的伤害,甚至危及生命。如近些年频发的特大重金属污染事件——儿童血铅超标事件,在社会上引起极大的反响(如图 2a); 上世

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.