

一株木霉菌的鉴定及其重金属-抗生素的复合抗性

林锦美¹, 陈锦芳¹, 段金明¹, 张金丽¹, 陈文熙²

(1. 集美大学港口与海岸工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 采用内转录间隔区(internal transcription spacer, ITS)序列分析和形态学鉴定相结合的方法,从腐烂的植物根中分离得到霉菌,利用真菌通用引物扩增菌株rDNA ITS区序列并对其进行鉴定。将序列提交至GenBank中以确定物种分类信息,进行物种同源序列比对分析,并通过Figtree构建物种进化系统发育树。ITS分子测序以及形态学鉴定结果表明,菌株LJM-001隶属于木霉菌属(*Trichoderma*)。同时,利用该菌株作为指示微生物,模拟重金属和抗生素复合污染的生存环境,并以霉菌的干重、还原型谷胱甘肽含量以及蛋白质含量为表征,分析复合污染下微生物的生理生化变化,并对其进行相关性分析。实验结果表明,抗生素胁迫下的重金属抗性变化主要为协同杀菌和协同抗性,重金属离子浓度和种类均对菌株LJM-001耐抗生素性能有显著影响。

[关键词] 木霉菌; 重金属; 抗生素; 菌种鉴定; 复合抗性

[中图分类号] Q 939.92

Identification and Heavy Metal Resistance of *Trichoderma koningiopsis* Under Antibiotic Stress

LIN Jinmei¹, CHEN Jinfang¹, DUAN Jinming¹, ZHANG Jinli¹, CHEN Wenxi²

(1. College of Harbour and Coastal Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Marine Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The molds isolated from rotting plant roots was identified by the method of combining internal transcription spacer (ITS) sequence and morphological identification, and the rDNA ITS region of the strain was amplified with fungal universal primers. Then the sequence was submitted to GenBank to obtain the species classification information, and compared with homologous sequence of the species to construct the species evolution phylogenetic tree with Figtree. The results of ITS molecular sequencing and morphological identification showed that the strain LJM-001 belongs to *Trichoderma koningiopsis*. At the same time, the strain LJM-001 as an indicator microorganism was used to living environment of compound with heavy metals and antibiotics, and explore the strain's adapting performance characterized by dry weight of mold, GSH content and protein content to analyzing the physiological and biochemical changes of microorganisms under compound pollution and analyzing their correlations. The results showed that the strain's response in heavy metal resistance under antibiotic stress were mainly synergistic bactericidal and synergistic resistance, and indicated that the concentration and

[收稿日期] 2021-03-23

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2018J01473, 2019J01700); 福建省中青年教育科研项目(JA15261, JAT200258); 福建省科技计划项目(2018Y0064); 厦门市科技计划项目(3502Z20173029); 集美大学国家基金培育计划项目(ZP2020067); 福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目(Z820267, Z820268)

[作者简介] 林锦美(1979—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事废水生物处理研究。

type of heavy metal both had a significant impact on the antibiotic resistance of strain LJM-001.

Keywords: *Trichoderma koningiopsis*; heavy metal; antibiotics; strain identification; combined resistance

0 引言

抗生素保障了人类及动物健康,促进了畜禽养殖业发展。抗生素早期对致病微生物具有良好的抑制作用,使得其在日常生活中的使用越来越频繁甚至滥用,因此,大量的携带有抗生素的代谢物和废弃物进入自然环境中,加剧了环境中微生物的抗性压力。已有的研究报道^[1],抗性基因很大程度上是由抗生素诱导而产生,该状况加速了大量抗性微生物的出现,因此,抗生素耐药性对全球人类健康构成威胁。随着工业的发展,重金属暴露在环境中的数量也越来越多,并和抗生素发生各种复合作用,通过协同、交叉等机制加剧了抗生素抗性基因的污染。研究表明^[2-4], *sul1*、*tetM*、*tetQ*、*ermB*、*mefA*等基因与环境中 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 等重金属浓度也有着显著关联作用。

霉菌作为一类广泛存在于土壤、腐烂植物体表面以及重金属污染度较高的多种生态环境中的真核微生物,对植物病原真菌具有拮抗和重寄生作用^[5-6],产生对抗生素、重金属离子等环境响应的酶如纤维素酶等^[7-8],在工业、农业、环境保护等领域有着广泛的应用前景^[9]。

本文从复合污染的环境中筛选获得抗性霉菌,以抗生素-重金属复合抗性菌为研究对象,进行了抗性菌的鉴定及其抗性研究。将头孢拉啶、盐酸黄连素等抗生素和 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 等重金属进行组合以获得不同培养条件,分析菌体对复合污染环境的响应,以菌体浓度、蛋白质含量、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量为指标,方差分析获得重金属、抗生素污染与抗性菌生长之间的相关性,进一步探究木霉菌的抗性变化及其机理,为重金属与抗生素复合污染环境下微生物的抗性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

1.1.1 菌种和培养基 菌株 LJM-001 分离于腐烂植物根部,并通过 ITS 分子鉴定保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。PDA 培养基制备:分别将马铃薯 200 g、葡萄糖 25 g、琼脂 20 g、磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 2 g 溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中,灭菌($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min)后冷却倒置保藏备用。

1.1.2 模拟废水配制 抗生素溶液的配制:盐酸黄连素、头孢拉啶储备液使用灭菌的超纯水配制,采用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜将储备液过滤,避光保存于冰箱,保存时间不超过一周。模拟重金属(Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 标准液)废水:分别称取 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 固体 1.413 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 固体 3.906 g、 $\text{CdSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 固体 2.291 g,分别溶于 1 000 mL 无菌蒸馏水中,配制好模拟废水污染液,保存于棕色试剂。

1.1.3 仪器和试剂 显微镜(OLYMPUS 生物显微镜);PCR 仪 9700(美国 ABI 公司);测序仪 3730(美国 ABI);电泳仪 DYCP-31DN(北京六一仪器厂);紫外可见分光光度计(UV751 GD);摇床(ZHWY-2112B);智能生化培养箱(PHX);台式高速离心机(H1650);XPS 能谱仪(PHI Quantum 2000)。酵母基因组提取试剂盒(Rapid Yeast Genomic DNA Isolation Kit);DNA 聚合酶;真菌通用引物 ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';低粘度树脂包埋试剂盒(Spurr Embedding Kit);考马斯亮蓝法蛋白质试剂盒;dNTPs; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; HNO_3 ;NaOH 试剂;谷胱甘肽,可溶性淀粉,均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 优势霉菌的分离纯化 参照程丽云等^[10]的方法,从腐烂植物根部经选择性培养基分离得到生长良好的霉菌,通过平板划线分离以获得单菌落,并通过斜面试管保藏法保存。

1.2.2 木霉菌特征和形态鉴定分析 将菌株 LJM-001 接种于马铃薯固体培养基,24 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 72 h,观察菌丝生长初期,使用插片法观察并记录菌落特征。通过光学显微镜观察菌株分枝状

况和形态特征以对菌株进行初步鉴定。

1.2.3 霉菌总 DNA 的提取 参照酵母基因组提取试剂盒 (Rapid Yeast Genomic DNA Isolation Kit) 说明书进行 DNA 提取。

1.2.4 PCR 扩增 ITS 区 以菌株基因组为扩增模板, 使用 50 μL 体系, 依次加入双蒸水、缓冲液、dNTP 38, 5, 2 μL , 再加入 ITS 引物 4 μL 、DNA 聚合酶 1 μL 、纯化后的霉菌 DNA 2 μL , 经过变形、退火、延伸等步骤扩增 30 个循环。

1.2.5 扩增产物的测序 扩增产物进行 Sanger 一代测序 (上海生工生物工程有限公司)。将测得的序列通过 DNASTar (v6.13) 将双端序列融合成一条完整序列, 然后将 DNA 序列提交至 NCBI 数据库以获得菌株详细分类信息, 并下载同源菌株序列, 利用软件 MEGA5.03 和 Figtree 进行比对分析, 构建物种进化系统发育树。

1.2.6 复合污染实验过程 根据文献 [11–12] 的研究结果, 重金属和抗生素对微生物复合污染实验选取的浓度如下: 抗生素盐酸黄连素、头孢拉肟的质量浓度设为 0, 5, 25, 50, 100, 200 mg/L。将制备好的重金属 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 标准液浓度分别稀释为 0, 5, 10, 50, 100, 200 mg/L 6 个浓度梯度。通过两两组合按照浓度梯度进行实验, 并接种培养相同时间, 然后分别测定不同抗生素浓度和不同重金属浓度组合中菌种的干重、GSH 含量以及蛋白质含量等, 从而表征抗生素与重金属复合污染对霉菌生长情况的影响以及霉菌在生长过程中对复合污染的响应机制。

1.2.7 GSH 提取及测定 通过热水抽提法测定 GSH 的含量, 将 1 g 干菌粉溶于 4 mL 蒸馏水后并加入 5 mL 沸水, 充分溶解后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 及时取出并进行冷却处理, 5 000 r/min 10 min 离心处理, 通过碘量法^[13]测定提取溶液中 GSH 含量。

1.2.8 蛋白质提取及测定 破碎菌体并离心 (4 000 r/min, 15 min), 取上清液加入硫酸铵, 4 $^{\circ}\text{C}$ 盐析并离心, 收集蛋白质沉淀。然后利用磷酸盐缓冲液 (pH = 7.0) 溶解, 并过滤。最后将过滤后的蛋白质复溶于缓冲液中。考马斯亮蓝法测定组织中的蛋白质含量并记录。蛋白质标准液为 0.563 g/L, 取 0.05 mL 稀释成 50 倍的待测酶样、0.05 mL 蛋白质标准储备液、0.05 mL 纯水, 分别加入 3 mL 考马斯亮蓝标准储备液, 混匀显色 10 min 后在波长为 595 nm 处测定其吸光度值, 用纯水做空白对照。每个体系重复 3 次作为平行实验, 并计算酶液中可溶性蛋白质含量。

1.2.9 数据统计与处理 采用 Origin 8.0 软件对 Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和抗生素共同作用下霉菌质量、GSH 含量以及蛋白质含量进行可视化处理。通过软件 SPSS 22.0 分析抗生素种类、重金属种类、浓度与霉菌重量、GSH 含量、蛋白质含量之间的相关关系, 同时进行单变量多因素方差分析, 显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 重金属 – 抗生素复合抗性菌的筛选及鉴定

2.1.1 菌落的形态特征 霉菌 24 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d, 菌落可生长覆盖整个培养皿。在平板上, 菌落初期呈白色, 后期出现轮状的菌丝密实产孢区, 颜色为绿色至深绿色, 产孢区最终覆盖整个平板。

2.1.2 菌体特征结构 显微镜观察发现, 霉菌分生孢子梗呈环状排列 (见图 1)。其中分生孢子主干生长呈树状分布, 并呈多向产生二级孢子分枝, 孢子芽部向周边延伸, 呈现以 2~3 个分支为一组的形状, 形成以根部收缩而中间膨大的趋势, 分生孢子则呈球形或倒卵圆形。

2.1.3 基于 ITS 基因序列的系统发育分析 通过 NCBI 比对获得物种详细信息, 并下载近缘物种序列通过 ClustalW 进行比对分析, 然后将比对序列结果利用软件 Figtree 构建系统发育树, 结果如图 2 所示。结果表明, 该菌株与 *Trichoderma koningiopsis* 相似系数为 99%。由图 2 可见, 该菌株与 *T. koningiopsis* 亲缘关系相近, 同为里氏木霉属 (*Trichoderma*)。

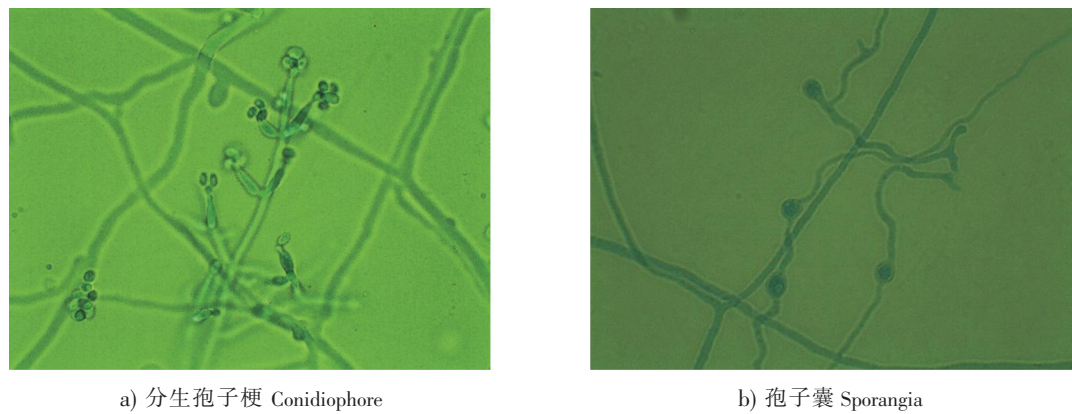


图 1 菌株 LJM-001 的菌丝形态

Fig.1 Hypha morphology of the strain LJM-001

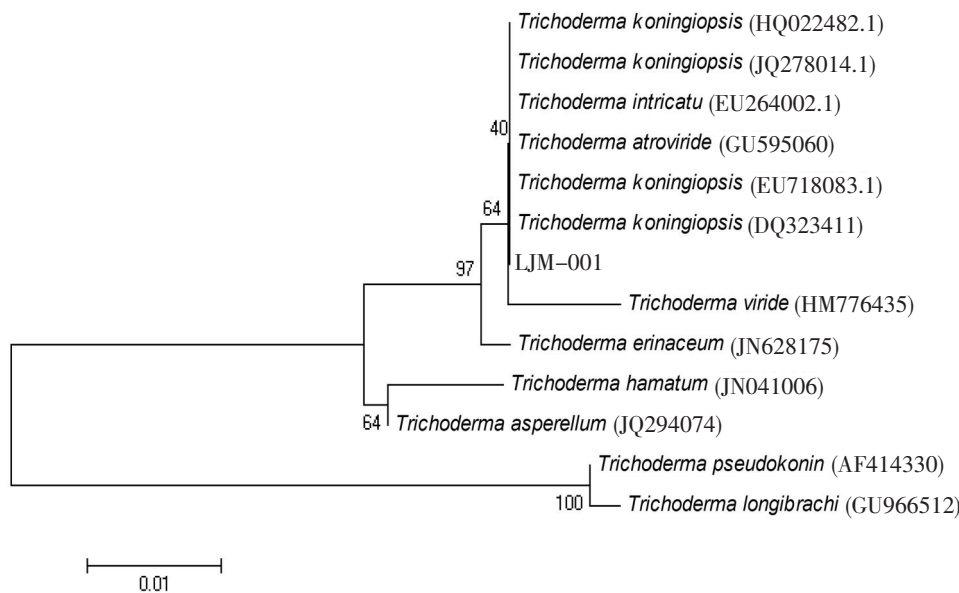


图 2 基于 ITS 基因系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on ITS gene sequences

2.2 抗生素对菌体重金属抗性的影响及其相关性

2.2.1 抗生素对菌体重金属抗性的影响 在头孢拉定、盐酸黄连素质量浓度 50 mg/L 下, 菌体对质量浓度分别为 0, 5, 10, 50, 100, 200 mg/L 的重金属 Cr⁶⁺、Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 产生的抗性结果见图 3、图 4。

不同浓度重金属与头孢拉定复合胁迫抗性结果见图 3。由图 3a 可得, 重金属质量浓度在 0 ~ 10 mg/L, 菌体量随重金属离子浓度的增加而增加, 当质量浓度为 10 mg/L 时, 霉菌表现出最适生长速度, 而随着重金属浓度的继续增加, 菌体量呈显著性下降。可能原因是, 重金属浓度增大导致重金属和抗生素间的交互作用而表现为先促进而后协同杀菌。相反, 图 3b 结果表明, GSH 含量与金属离子浓度成反比, 即随着重金属浓度的增加 GSH 含量明显减少, 说明重金属的存在加速了菌体的氧化损伤, 从而抑制了菌体内 GSH 的合成。而图 3c 显示, 重金属对蛋白质含量的影响主要表现为: 低重金属浓度下其值小幅增加, 然后随着重金属浓度的升高而下降, 当重金属浓度达到某一临界值时, 蛋白质含量趋于平稳。这可能是由于低浓度的头孢拉定在重金属的胁迫下对霉菌的抗氧化机制的抑制效果较显著^[14]。因此, 在重金属和抗生素的复合作用下, 低浓度重金属与抗生素共存时, 菌体量、GSH 和蛋白质含量均较高, 二者作用表现为协同抗性; 高浓度时, 菌体量、GSH 和蛋白质含量均较低, 主要表现为协同杀菌, 该趋势与文献 [15] 的研究结果一致。

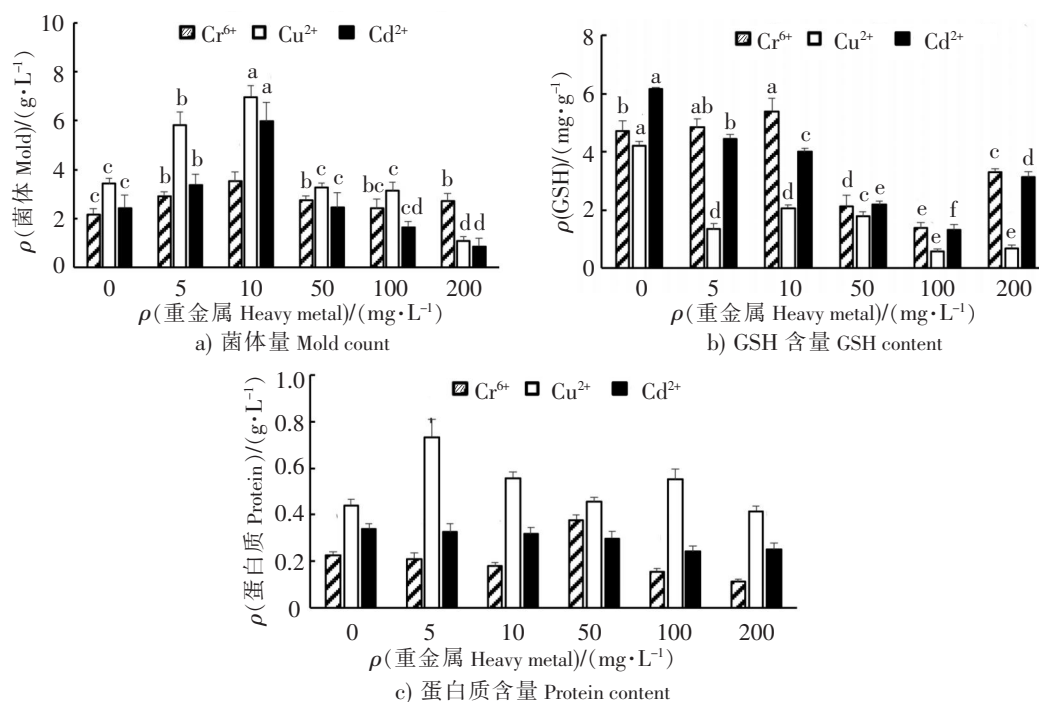


图 3 不同浓度重金属和头孢拉定对霉菌抗性的影响

Fig.3 The effect of different concentrations of heavy metals and cefradine on mold resistance

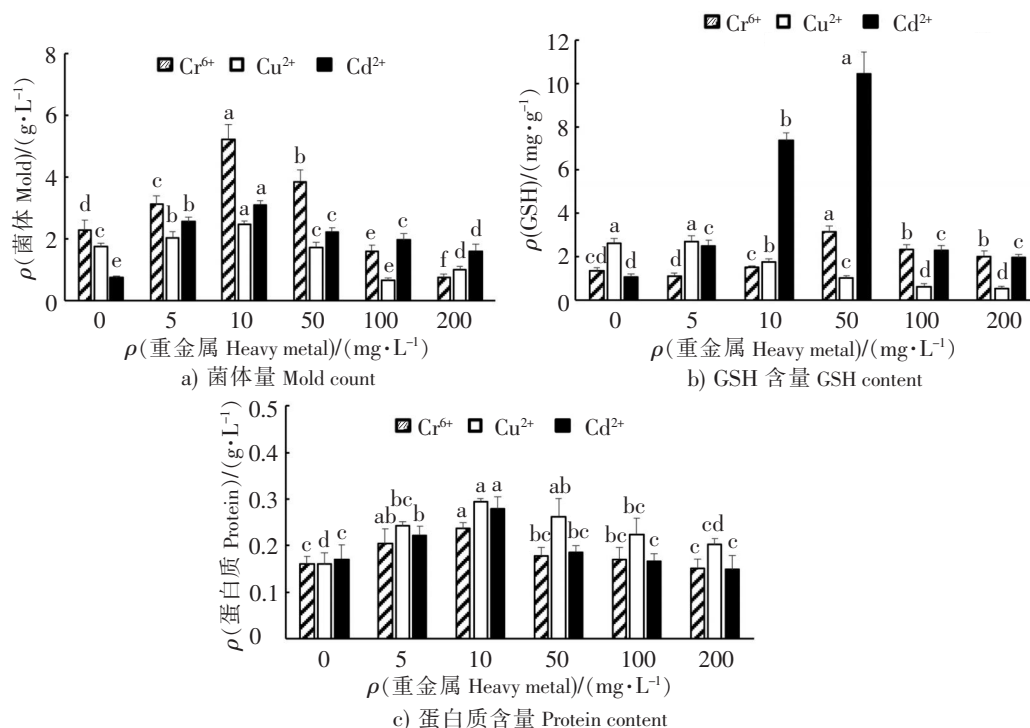


图 4 不同浓度重金属和盐酸黄连素对霉菌抗性的影响

Fig.4 The effect of different concentrations of heavy metals and berberine hydrochloride on mold resistance

不同浓度重金属与盐酸黄连素复合胁迫抗性见图 4。由 4a 可得, 当重金属质量浓度在 0 ~ 10 mg/L 时, 菌体生长随金属离子浓度的微量增加呈正相关; 当重金属离子质量浓度超过 10 mg/L 时, 菌体生长随金属离子浓度的微量增加呈负相关。这种变化趋势与头孢-金属复合影响的变化趋势一致, 即当质量浓度达到 10 mg/L 时, 霉菌出现最适生长速度。图 4b 结果表明, GSH 含量随重金属类型的不同而呈现

不同变化趋势, 其中, GSH 含量随 Cu^{2+} 浓度的升高而下降, GSH 随 Cd^{2+} 浓度的增加呈现先增加后下降的趋势, 当 Cd^{2+} 浓度为 50 mg/L 时, GSH 含量最高可达 12.454 mg/g, GSH 含量随 Cr^{6+} 浓度增加而变化不明显, 整体趋于稳定状态。这些变化趋势与文献 [16-17] 的研究结果相吻合。图 4c 结果显示, 在盐酸黄连素胁迫下, 3 种重金属离子对蛋白质含量的影响具有相同趋势, 即表现出溶液中蛋白质含量整体变化不大趋于平稳的状态, 说明重金属离子与盐酸黄连素复合作用对蛋白质含量的影响比菌体、GSH 的小。

结合图 3 与图 4 可以发现, 在不同抗生素胁迫作用下相同浓度相同种类的重金属体系中, 木霉菌菌体量、GSH 和蛋白质含量均呈现不同的变化特征。对菌体量而言, Cr^{6+} 与盐酸黄连素复合作用使得菌体量变化梯度更大, 说明其复合效应较 Cr^{6+} 与头孢拉定的大。相反, Cu^{2+} 与头孢拉定复合作用导致的菌体量变化显著, 因此其复合效应比 Cu^{2+} 与盐酸黄连素的大, 说明不同抗生素与同类重金属复合作用对菌体量影响不尽相同。同样的现象也出现在 GSH 中, 其中盐酸黄连素胁迫下, Cr^{6+} 、 Cu^{2+} 对 GSH 含量影响不明显, 不同浓度 Cd^{2+} 对 GSH 含量的影响较显著。而头孢拉定胁迫下, 不同浓度不同种类重金属对 GSH 含量的影响均相当显著。而对于蛋白质而言, 其中盐酸黄连素胁迫下, Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 对蛋白质含量影响不明显, 不同浓度 Cu^{2+} 对蛋白质含量的影响较显著; 而头孢拉定胁迫下, 不同浓度不同种类重金属对蛋白质含量的影响不明显。

2.2.2 重金属种类和浓度与抗生素抗性的相关性分析 为了进一步探究重金属种类、浓度、抗生素种类以及二者复合作用对于抗生素抗性的影响效应, 将重金属和抗生素对微生物复合作用的菌体量、GSH 及蛋白质含量进行方差分析, 结果见表 1~表 3。

表 1 霉菌菌体量的主效应方差分析
Tab.1 Main effect variance analysis of the mold count

方差来源 Source of variance	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
修正模型 Corrected model	2.992	11	0.272	1.467	0.208
截距平方和 Intercept sum of squares	18.443	1	18.443	99.449	0.000
抗生素种类 Kinds of antibiotics	1.111	1	1.111	5.988	0.022
重金属浓度 Concentration of heavy metal	1.320	5	0.264	1.423	0.252
重金属种类 Kinds of heavy metal	0.281	2	0.140	0.562	0.580
重金属种类 * 重金属浓度 Kinds of heavy metal,concentration of heavy metal	1.350	10	0.135	0.541	0.839
重金属种类 * 抗生素种类 Kinds of heavy metal,kinds of antibiotics	0.226	2	0.113	0.582	0.565
抗生素种类 * 重金属浓度 Kinds of antibiotics,concentration of heavy metal	0.561	5	0.112	0.605	0.696
误差 Error	4.451	24	0.185		
总偏差平方和 Sum of squares of total deviation	25.885	36			
修正总平方和 Corrected total sum of squares	7.443	35			

表 2 GSH 含量的主效应方差分析
Tab.2 Main effect variance analysis of the GSH content

方差来源 Source of variance	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
修正模型 Corrected Model	34.406	5	6.881	5.982	0.001
截距平方和 Intercept sum of squares	86.497	1	86.497	75.193	0.000
重金属种类 Kinds of heavy metal	24.744	2	12.372	10.755	0.000
重金属浓度 Concentration of heavy metal	8.625	5	1.725	0.766	0.584
抗生素种类 Kinds of antibiotics	1.533	1	1.533	1.332	0.258
重金属浓度 * 重金属种类 Concentration of heavy metal,kinds of heavy metal	12.671	10	1.267	1.020	0.469
抗生素种类 * 重金属浓度 Kinds of antibiotics,concentration of heavy metal	6.715	5	1.343	0.597	0.703
重金属种类 * 抗生素种类 Kinds of heavy metal,kinds of antibiotics	6.217	2	3.109	2.702	0.085
误差 Error	32.209	28	1.150		
总偏差平方和 Sum of squares of total deviation	152.447	34			
修正总平方和 Corrected total sum of squares	66.616	33			

表 3 蛋白质含量的主效应方差分析
Tab.3 Main effect variance analysis of the protein content

方差来源 Source of variance	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
修正模型 Corrected model	0.341	5	0.068	12.329	0.000
截距平方和 Intercept sum of squares	4.027	1	4.027	727.097	0.000
重金属种类 Kinds of heavy metal	0.100	2	0.050	9.071	0.001
抗生素种类 Kinds of antibiotics	0.003	1	0.003	0.514	0.479
重金属浓度 Concentration of heavy metal	0.070	5	0.014	0.790	0.568
抗生素种类 * 重金属浓度 Kinds of antibiotics, concentration of heavy metal	0.008	5	0.002	0.091	0.993
重金属种类 * 抗生素种类 Kinds of heavy metal, kinds of antibiotics	0.238	2	0.119	21.494	0.000
重金属浓度 * 重金属种类 Concentration of heavy metal, kinds of heavy metal	0.043	10	0.004	0.262	0.982
误差 Error	0.166	30	0.006		
总偏差平方和 Sum of squares of total deviation	4.534	36			
修正总平方和 Corrected total sum of squares	0.508	35			

由表 1 可以看出,对于霉菌菌体量而言,重金属种类影响效应最小,其次为重金属浓度,抗生素种类影响最显著 ($F = 5.988, P = 0.022 < 0.05$),重金属与抗生素的复合作用对菌体量的影响效应不大。由表 2 可知,对于霉菌的 GSH 含量而言,抗生素种类影响效应最小,其次是重金属浓度,而重金属种类有较大显著的影响 ($F = 10.755, P = 0 < 0.05$)。由表 3 可以看出,对于霉菌的蛋白质含量而言,重金属种类有极显著的影响 ($F = 9.071, P = 0.001 < 0.05$),并且,重金属种类 + 抗生素种类这种交叉污染的效应对于蛋白质含量也有较显著的影响 ($F = 21.494, P = 0 < 0.05$),说明重金属和抗生素存在交互作用,即重金属胁迫霉菌的抗生素抗性有较为明显影响。自然环境中,多数情况是污染物之间都以混合物状态存在,因此复合污染在一定程度上影响了微生物的生长,同时也加剧诱导微生物抗性基因的出现^[18]。相对于单一(抗生素或重金属)的污染情况而言,当两者以不同浓度在环境中混合时,其复合污染作用可能会发生显著性改变。这同文献 [19-20] 等在探究大肠杆菌经复合处理后的 MIC 增大幅度变小的结论相一致。

综合重金属变量和抗生素变量分析显示,两者皆是影响霉菌生长、GSH 以及蛋白质含量的重要因素,本研究利用不同重金属和不同抗生素胁迫实验证明两者存在交互作用,即重金属胁迫霉菌的抗生素抗性具有显著性影响。

3 结论

1) ITS 分子鉴定和形态学分析结果表明, LJM-001 菌株隶属于 *Trichoderma koningiopsis*。系统发育进化分析结果可得,该菌株同 *T. koningiopsis* 以及 *T. intricatu* 亲缘关系相近,同为里氏木霉属。

2) 重金属与抗生素复合污染下,当重金属的质量浓度较低时 (0 ~ 50 mg/L),处于协同抗性;当重金属的质量浓度较高时 (100 ~ 200 mg/L),则表现为协同杀菌。

3) 对重金属 - 抗生素复合抗性相关性分析表明,抗生素种类 + 重金属浓度复合效应对 GSH 含量影响显著,重金属种类 + 抗生素种类复合效应对于蛋白质含量及菌体量有较显著的影响。

[参 考 文 献]

- [1] 汪涛,杨再福,陈勇航,等. 磺胺类抗性基因的产生及演变研究进展 [J]. 环境污染与防治, 2017, 39(11): 1251.
- [2] 张俊亚,魏源送,陈梅雪,等. 畜禽粪便生物处理与土地利用全过程中抗生素和重金属抗性基因的赋存与转归特征研究进展 [J]. 环境科学学报, 2015, 35(4): 935-946.

- [3] GAO P, HE S, HUANG S L, et al. Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin resistance genes in urban wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(9): 3971-3980.
- [4] DEVARAJAN N, LAFFITE A, GRAHAM N D, et al. Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in central europe [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6528-6537.
- [5] HOWELL C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts [J]. *Plant Disease*, 2003, 87: 4-10.
- [6] 王勇, 王万立, 刘春艳, 等. 绿色木霉 Ti9701 对多种病原菌的抑制作用及其抑病机理 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24: 371-374.
- [7] 宋朝霞, 范玲, 李鹏, 等. 一株纤维素酶高产细菌的筛选及鉴定 [J]. *河南工程学院学报 (自然科学版)*, 2018, 30(4): 76-81.
- [8] 李晓鹏, 叶金鹏, 李振星, 等. 优化绿色木霉发酵培养基提升真菌几丁质含量 [J]. *生物加工过程*, 2020, 18(3): 283-288.
- [9] 杨合同. 木霉分类与鉴定 [M]. 北京: 中国大地出版社, 2009: 1-150.
- [10] 程丽云, 李梅婷, 刘国坤, 等. 从 3 种基质分离的木霉种类鉴定 [J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2006, 35(6): 94-98.
- [11] 林锦美, 陈锦芳, 刘启明, 等. 拟康宁木霉活菌体处理含铜废水 [J]. *环境工程学报*, 2015, 9(6): 2674-2680.
- [12] 李孟涵, 贺子琪, 苗家赫, 等. 重金属 Pb 与抗生素对发光菌的联合毒性研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(9): 1925-1936.
- [13] 廖飞, 杨晓, 康格非, 等. 紫外吸收碘量法测定微量维生素 C 和还原型谷胱甘肽 [J]. *重庆医科大学学报*, 2003, 28(3): 372-373.
- [14] 张亚妮. 谷胱甘肽与铜绿假单胞菌致病性及抗生素抗性的关系研究 [D]. 西安: 西北大学, 2009.
- [15] 温丽华, 许燕滨, 周艳, 等. 重金属胁迫对 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 抗生素抗性的影响 [J]. *生态学报*, 2015, 35(10): 3411-3418.
- [16] 黄熙瀛, 张俊涛, 邓丽莎, 等. 尾菜中一株抗生素和铅交叉抗性乳酸菌的筛选及抗性特征 [J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(2): 319-324.
- [17] 宋崇崇, 陶梦婷, 张瑾, 等. 3 种重金属对蛋白核小球藻的联合毒性及机理 [J]. *环境科学与技术*, 2020, 43(2): 88-95.
- [18] 丁婷婷, 董欣琪, 张瑾, 等. 3 种氨基糖苷类抗生素对水生生物的时间依赖联合毒性作用比较 [J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(1): 126-137.
- [19] 徐在超, 史亚楠, 张仁铎, 等. 三株具重金属抗性油菜内生真菌对镉铅锌富集特性研究 [J]. *中山大学学报 (自然科学版)*, 2016, 55(6): 153-160.
- [20] 计徐. 饲料高铜对猪肠道大肠杆菌抗生素耐药协同作用的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)