

矿区植物根内嗜鱼外瓶霉对重金属的耐性和超积累作用^①

张玉洁^{1,2}, 李洪超⁴, 赵之伟³

(1 文山学院生化系, 云南文山 663000; 2 文山州生物资源开发研究中心, 云南文山 663000;

3 云南大学微生物资源保护和利用国家重点实验室, 昆明 650091; 4 麻栗坡县董干镇麻栗堡小学, 云南麻栗坡 663609)

摘要: 从云南会泽铅-锌矿区自然生长植物密序野古草 (*Arundinella bengalensis* (Spreng.) Druce) 的健康根内分离得到一株深色有隔内生真菌 (dark septate endophytes, DSE)。据其形态学特征和 ITS1-5.8S-rDNA-ITS2 序列分析, 鉴定为一株嗜鱼外瓶霉 (*Exophiala pisciphila*)。纯培养条件下研究了其对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 的耐性和超积累作用。结果表明, 此菌株在液体合成培养基上可以分别耐受 2、3 和 0.5 g/L 的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} ; 在含 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 培养基中生长其菌丝可以富集超过其干重 25% 以上的 Pb^{2+} 和 5% 以上的 Cd^{2+} ; 显示此菌株属于极端耐性并具有超积累作用的真菌。此真菌在植物根系的定殖或许可以通过菌丝体对金属离子的固持作用缓解植物根围土壤微环境中过量金属离子对植物的毒害作用。

关键词: 深色有隔内生真菌; 嗜鱼外瓶霉; 重金属耐性和超积累作用

中图分类号: Q938.1⁺3; Q142.3

矿产开发、金属冶炼在世界范围内造成大面积的土壤污染, 超量的金属离子在土壤中的存在对植物造成毒害作用从而使土壤荒漠化, 然而金属污染地区仍然会有少量植物稀疏生长。对这些地区自然生长植物根内共生微生物的调查结果显示, 植物根内有大量丛枝菌根真菌和深色有隔内生菌 (dark septate endophytes, DSE) 共生^[1], 推测共生真菌在植物抵御重金属毒害作用中发挥重要作用^[2]。本研究报道了金属污染地区植物根内分离到的一株内生真菌对重金属的耐性和结合积累作用。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物根采集于云南省会泽县铅-锌矿土法冶炼遗址 (103°03' ~ 103°55'E, 25°48' ~ 27°04'N 之间) 自然生长植物密序野古草 (*Arundinella bengalensis* (Spreng.) Druce)。此冶炼遗址的土壤可溶性重金属含量为: Cd 31.57 ~ 50.62 mg/kg, Pb 356.75 ~ 599.00 mg/kg, Zn 6500.12 ~ 6825.70 mg/kg^[1]。植物根样采自距地表 5 ~ 30 cm 土层中的根系, 将采集到的整株植物连同土壤带回实验室, 剪取根样立即处理。

1.2 菌株的分离和纯化

将植物的健康根剪下用自来水清洗, 并用刷子刷

去根上黏附的土壤颗粒, 选取在显微镜下可见有大量菌丝存在的根段作为目标根样进行内生真菌的分离。分离和纯化的方法参考 Silvani 等^[3]。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学鉴定 将经过纯化的菌株接种到 PDA 平板上进行培养, 于 28℃ 培养 4 周, 在生长过程中对菌落和菌丝的特征进行形态学观察, 包括菌落形态、菌丝、分生孢子的产生方式, 孢子的形状、颜色、大小等。

1.3.2 分子生物学鉴定 将菌种接种到 PDA 液体培养基中培养 5 天, 过滤收集菌丝, 于 40℃ 烘干。将新鲜培养菌丝冰浴研磨, 采用 CTAB (cetyl triethyl ammonium bromide) 法提取真菌 DNA。以提取的 DNA 为模板, 选用真菌通用引物 ITS5 和 ITS4 PCR 扩增真菌核糖体 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列^[4]。将得到的 PCR 产物进行纯化回收, 按照生产商推荐的标准程序在 ABI3700 自动测序仪上进行毛细管电泳测序。

将得到的序列递交 GenBank, 获得序列号为 EU797525 (H93)。并在线 Blast 工具, 将测定的序列与 GenBank 数据库中的真菌序列进行比对分析。构建系统发育树所选择的参考序列为 AF050272、DQ826739、DQ344031、AF050274、EU041814、EF025391、AM410603、AF502889、EU035416、

①基金项目: 国家自然科学基金项目 (NSFC40763003)、云南省教育厅重点基金项目 (2010Z038) 和文山学院生物学重点学科项目 (11WSXK02) 资助。

作者简介: 张玉洁 (1973—), 女, 山东临清人, 博士, 副教授, 主要从事植物内生真菌研究。E-mail: zyj2004666@163.com

AJ293878、AY354272 (序列下载于 GenBank)。将本研究测定的序列和参考序列用 DNASTAR 软件包的 Megalign 程序进行排序, 用 Mega 4 软件构建 NJ 树。

1.4 对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 的耐性和积累性质的研究

分别利用合成的基本培养基, PDA 液体、固体培养基添加各浓度梯度的重金属离子进行液体摇瓶培养。基本培养基含如下成分: KH_2PO_4 0.4 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g, $ZnCl_2 \cdot H_2O$ 2 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5 mg, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 3 mg, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05 mg, L-Lysine HCl 150 mg, L-Cystine 150 mg, DL-Methionine 150 mg, L-phenylalanine 100 mg, Sucrose 15 g/L, pH 6.5 (培养基的设计参考文献 [6-7])。

培养基金属离子的浓度设计和调整方法如下: 基本培养基分装于 250 ml 的三角瓶中, 100 ml/瓶, 调整 pH = 6.5, 进行高压灭菌; 将高浓度的 $PbCl_2$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$ 母液单独灭菌, 采用无菌操作方法用灭菌母液将培养基中 Pb、Zn、Cd 的浓度分别调整到如下水平: Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 为 0~10 mg/ml, Cd^{2+} 为 0~1 mg/ml。此金属浓度设计的依据是采样地土壤各种重金属的含量^[8]。PDA 固体培养基配备时在灭菌前加入金属离子和 1.5% 的琼脂, PDA 液体培养基不加琼脂。

接种方法: 菌株 H93 可产生大量分生孢子, 其接种方法将孢子先用少量的培养基无菌稀释成 10^6 cfu/ml, 然后取 100 μ l 加入到每个三角瓶中; 接种好的三角瓶放摇床 (28 ± 1) $^{\circ}C$ 、120 r/min 培养, 每天观察生长情况, 并记录在两周内没有菌丝生长的重金属浓度的最小值 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和半数抑菌浓度值 (growth inhibition by 50%, EC50)。

将在各种金属离子浓度培养基中培养的菌丝过滤, 并用去离子水充分洗涤, 在 $70^{\circ}C$ 烘箱过夜干燥至菌丝恒重。参照 Lu^[9] 的方法, 将各种待测菌丝 0.1~0.2 g 置于聚四氟乙烯坩埚中, 加入王水 (10 ml 65% HNO_3 + 6 ml 37% HCl), 于电热板上低温加热消化, 蒸发至白烟冒尽, 近粘稠状透明液体, 用稀酸溶液冲洗内壁及坩埚盖, 温热溶解残渣, 冷却后, 定容至 50 ml 容量瓶中, 用火焰原子吸收分光光度法测定 (原子吸收色谱分析仪采用 AAS, model TA990)。

为了判断和评价菌丝所富集的重金属离子属于简单的生物吸附还是紧密结合和/或被转运到细胞内, 本研究将部分过滤的菌丝用 1 mol/L 的 $CaCl_2$ 浸泡摇床震荡洗涤 10 min 后用去离子水洗涤干净并烘干至恒重后再检测重金属的含量。

2 结果与分析

2.1 菌种的获得和鉴定

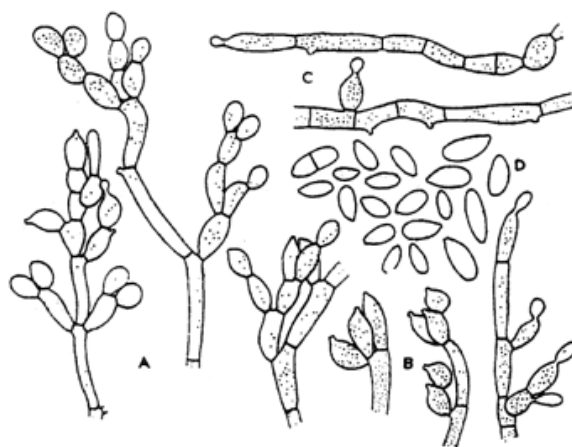
从样地植物密序野古草的根中经单孢分离得到一株可产大量分生孢子的深色有隔内生真菌, 编号为 H93。H93 在 PDA 固体和液体培养基生长迅速并可迅速产生大量孢子。在 PDA 固体培养基上生长, 菌落平铺, 边缘紧贴培养基向外蔓延很快; 菌落表面灰黑色, 背面黑色, 菌落疏松绒毛状; 镜检菌丝平滑、深色、有明显的隔; 菌丝、孢子及产孢结构如图 1, 其形态学特征符合嗜鱼外瓶酶的形态 (图 2)。



图 1 H93 在 PDA 平板上培养两周所获得的菌丝、

孢子及产孢结构的照片

Fig. 1 Morphology of H93 cultured on PDA medium for two weeks



(A-C: 产孢结构, D: 不同形态的孢子)

图 2 嗜鱼外瓶酶的菌丝、孢子和产孢结构示意图:

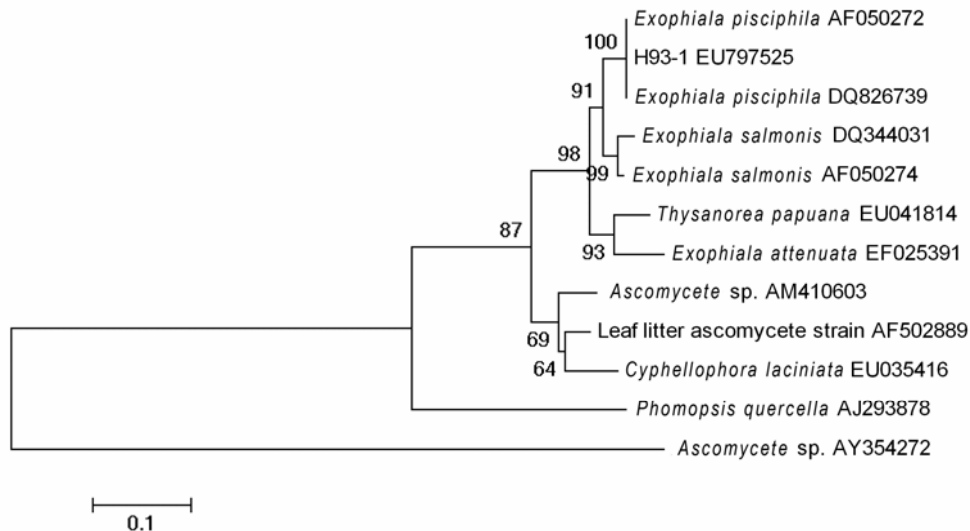
Fig. 2 *Exophiala pisciphila*

对 H93 ITS1-5.8S-ITS2 序列的 PCR 产物测序的结果, 得到 1 条 638 bp 的序列。把经过校对和验证的序列递交 GenBank, 获得序列号为 EU797525。

将 H93 序列与从 GenBank 所选 10 条序列一起构

建 NJ 树 (图 3)。从系统发育树可以看出, H93 与嗜鱼外瓶霉 (*E. pisciphila* strains) DQ826739 和 AF050272 菌株聚在一起, 其序列相似性为 99%

(GenBank 给出的值), 实际我们所得目标序列与此两条序列完全吻合, 表明 H93 和嗜鱼外瓶霉 (DQ826739, AF050272) 的亲缘关系非常近。



(此树为无根树, 分枝上的数值表示经 1000 次重复抽样的置信度值; 比例标尺表示遗传距离)

图 3 基于 H93 的 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建的 NJ 树

Fig. 3 NJ tree of the tested DSE strains

综合形态学特征和分子系统分析, 认为 H93 是一株嗜鱼外瓶霉 (*E. pisciphila*)。

2.2 H93 对重金属的耐性

嗜鱼外瓶霉 H93 对 Pb、Zn、Cd 均有较高的耐性, 在基本液体培养基中可以分别耐受 2、3 和 0.5 g/L 的 Pb、Zn、Cd; 在 PDA 液体培养基中的耐性更高, 向马铃薯葡萄糖液体培养基中分别加入 5 g/L 的 Pb^{2+} 或 Zn^{2+} , 接种的 H93 仍可缓慢生长。在 PDA 固体培养基中加入 7 g/kg Pb^{2+} , 接种菌丝培养 1 个月后可见 H93 在培养基上形成 2 cm 的稀疏菌丝, 菌落很薄, 紧贴培养基生长。根据 Wainwright 和 Gadd^[10] 的标准, H93 对 Pb、Zn、Cd 都属于极端耐性菌株。表 1 记录其对 Pb、Zn、Cd 的最小抑菌浓度 MIC 和 EC50 值; 图 4 显示 H93 在含不同浓度 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 的培养基中生长所得生物量和菌丝重金属含量, 显示 H93 在较高的有毒金属离子浓度下仍有较强的生长率和生物量。

2.3 菌丝对 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的富集能力

图 4 显示 H93 在含有不同浓度 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 的基本培养基中培养 2 周所获得的生物量以及单位菌丝干重所含 Pb、Cd 的量。结果表明, 随着培养基金属离子浓

表 1 H93 在基本培养基中对 Pb、Zn、Cd 的最小抑制浓度 (MIC) (mg/ml) 和 EC50 值。

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC) and EC50 of H93

Pb^{2+}		Cd^{2+}		Zn^{2+}	
MIC	EC50	MIC	EC50	MIC	EC50
2.3	0.8	0.51	0.27	3.1	1.5

度的增加, 菌丝生长速度变慢, 生物量减少, 但菌丝所富集金属离子的量逐渐增大。H93 在含 Pb^{2+} 培养基中生长, 菌丝 Pb 的含量可达其干重的 25%, 是培养基 Pb^{2+} 浓度的 100~300 倍; 在含 Cd^{2+} 培养基中得到的菌丝, 其 Cd 含量可超过 4.9%, 是培养基中 Cd^{2+} 浓度的 10~100 倍。

同时发现培养 2 周并未达到菌丝富集的最高峰, 随着培养时间的延长菌丝可以富集更大量的重金属离子。其中, H93 在含 1 g/L Pb 的培养基中培养一个月时菌丝 Pb 含量达 31%。说明菌丝吸收重金属可能有一个过程, 随着培养时间的延长、菌丝年龄的增加, 富集量增大。

将收集的菌丝用 $CaCl_2$ 溶液震荡洗涤后, 其中 Pb 的含量可以从 25% 降低到 17.9%, Cd 的含量从 4.94%

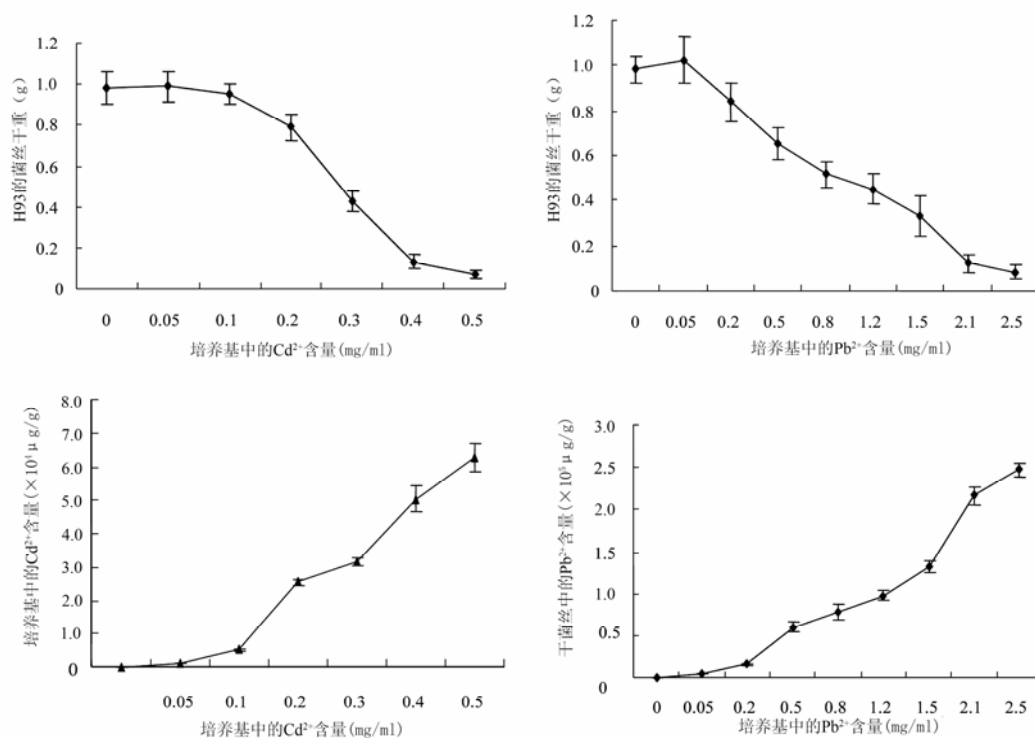


Fig. 4 Growth curves of H93 cultivated for two weeks in liquid basal medium supplemented with different concentrations of Pb^{2+} or Cd^{2+} , and increasing metal content in the mycelia

降低到 3.57%。说明 H93 所富集的 Pb、Cd 有少部分是简单吸附在细胞表面, 可以被 Ca^{2+} 置换, 而大部分是紧密结合在细胞表面或被转运到细胞内部。

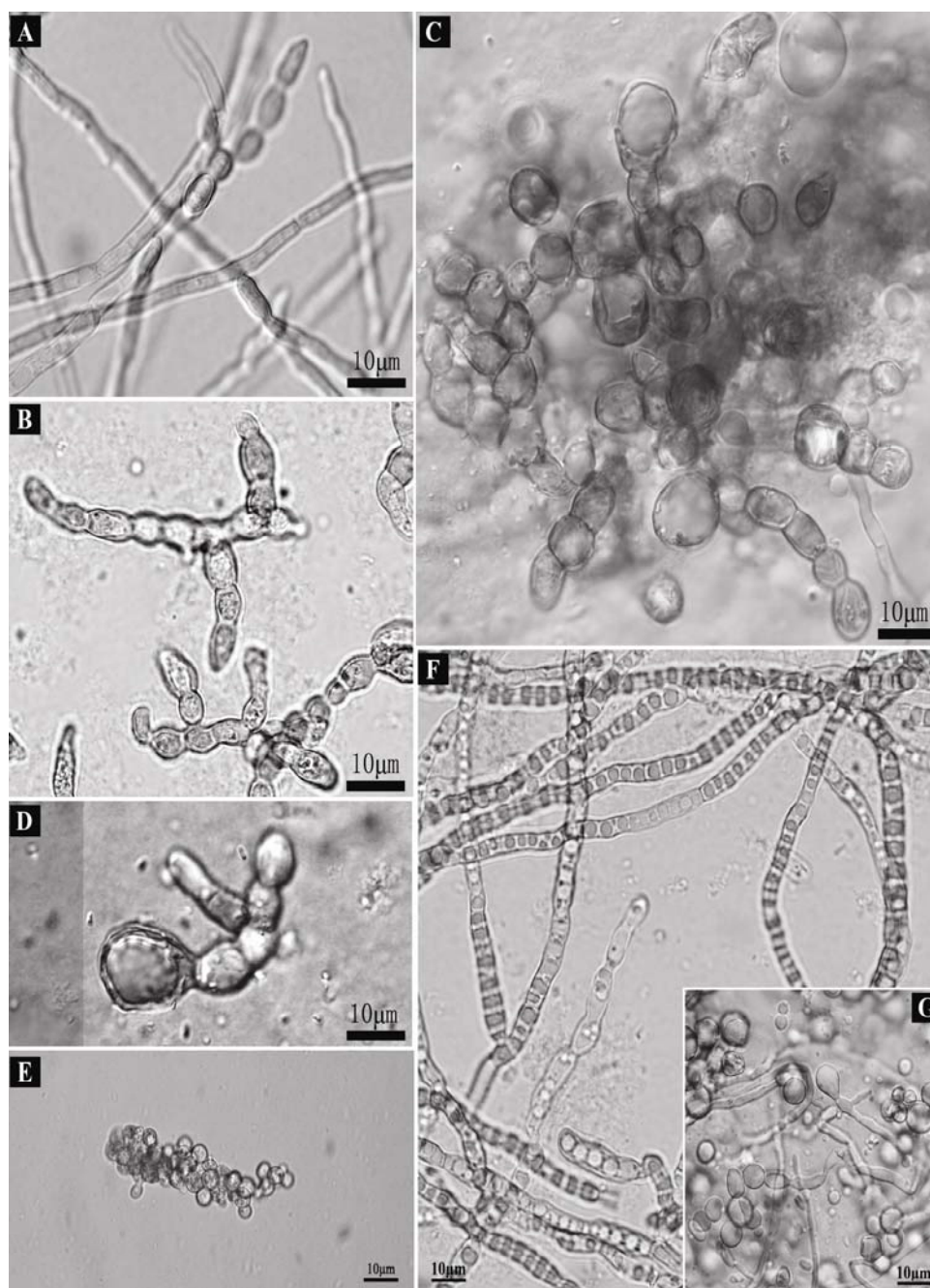
许多研究表明, 由于环境中的金属对微生物具有毒害作用, 所以随着土壤重金属含量的增加, 污染地区微生物的数量和活性会降低^[11-12], 其作用的结果是敏感菌难以生存而多数被排除, 只有耐性菌株可以生长。因此污染地区微生物物种多样性会减少, 种群组成发生变化。就真菌而言, 金属抗性通常是某些类群种的或菌株的内在特性, 抗性菌株在非污染地区通常低频存在, 而在污染地区往往属于优势种类^[13]。土壤微生物群体对有毒金属反应的结果是污染地区微生物的优势类群由单细胞细菌向链状细菌和丝状真菌转变^[12,14-15]。丝状真菌在植物根内和根际土壤中可以形成可观的生物量并通过细胞内外的结合作用结合 (sequester) 相当量的有毒金属^[15], 从而影响污染地区植物根际微环境中金属的存在状态及其是否向植物地上部分转移进而影响土壤中超量有毒金属对植物的毒害作用及植物在此生态环境中的定植状况。

2.4 培养状态和形态学变化

H93 在纯培养的条件下对 Pb、Zn、Cd 均有很高

的耐性, 但随着金属浓度的增加, 生长逐渐受到抑制, 生长变得缓慢, 生物量逐渐减少, 高浓度时菌丝不再长成大团大片状, 而变成散的、夹杂着不产黑色素样的白色东西的微团, 后期又全部黑化。可能的原因是在胁迫的条件下黑色素合成在菌丝生长的某个阶段受到抑制, 后期又诱导合成。显微镜下观察可见菌丝全部呈孢子串样、酵母样生长 (图 5D 和 E; 6C), 这应该是菌丝以孢子形式生长来耐受胁迫条件。陈保冬等^[2]报道, 受金属污染的废弃地上自然生长的植物根内有大量丛枝菌根真菌与其共生, 电镜染色观察结果显示丛枝菌根真菌的菌丝吸收的重金属离子在孢子内聚集。本研究显示 H93 在不同浓度 Pb、Zn、Cd 培养基中呈现孢子串样、酵母样生长, 且细胞内有大量的渣滓样颗粒 (图 5 和图 6), 推测是重金属在细胞内结合、聚集并区域化的结果。

所有金属超过一定临界浓度时都会对生物体构成毒害作用, 但仍有部分生物类群可以耐受较高浓度的金属离子。真菌耐受重金属的机制包括减少吸收、增加外排、细胞壁结合以及通过细胞内大量合成金属硫因等蛋白多肽分子来结合吸收到细胞内的金属离子、并进行细胞内区域化隔离, 从而减少细胞内游离态金



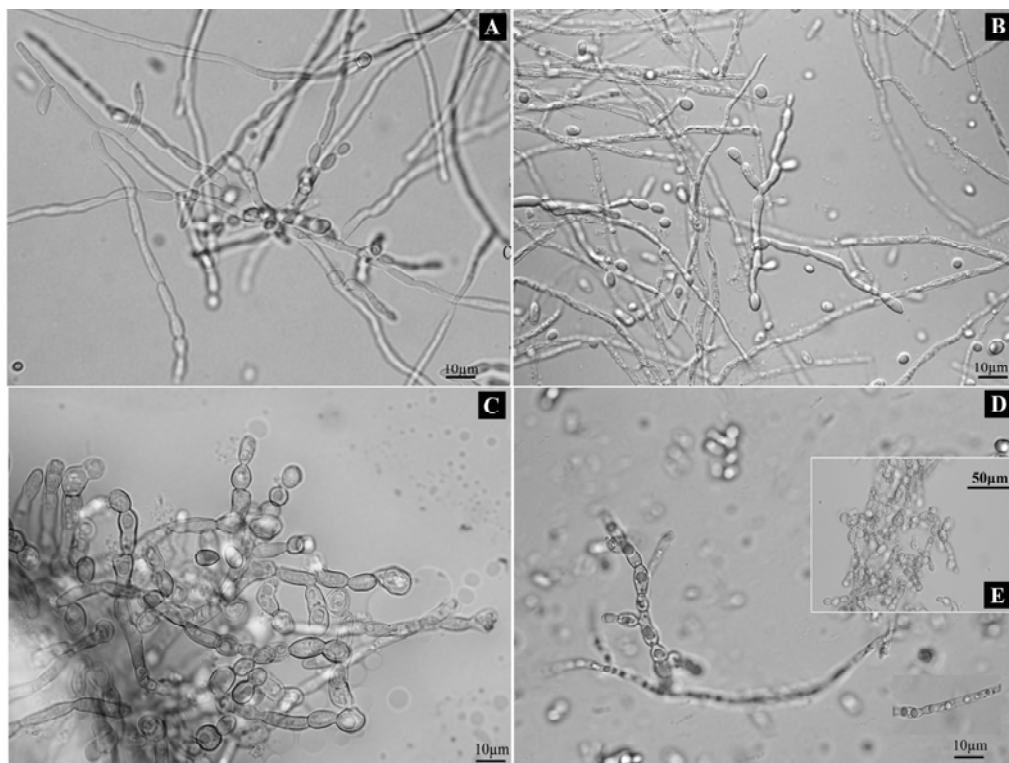
(A: H93 在液体基本培养基中培养 1 周时的菌丝形态; B: H93 孢子接种到含有 2 mg/ml Pb^{2+} 的基本培养基中培养 1 周时的形态; C、D: H93 孢子接种到含 2 mg/ml Pb^{2+} 的培养基中培养 30 天时的形态; E: H93 孢子接种到含 3 mg/ml Zn^{2+} 的基本培养基培养 2 周时的照片; F: 一株不产孢 DSE (对照) 在含 1 mg/ml Pb^{2+} 培养液中培养 2 周形态; G: H93 接种到 PDA 固体培养基 30 天时菌丝和孢子的显微照片)

图 5 H93 在不同培养条件下的形态学变化

Fig. 5 Morphological changes of H93 under different culture conditions

属离子对细胞的毒害作用^[16-17]。一个特定的生物体往往通过其中的一种或几种手段来达到耐受重金属的目的, 如合成金属硫蛋白并结合隔离铜离子是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 耐受 Cu 的一个手段, 但

细胞壁成分的增加和 Cu 在细胞壁的结合也是其对 Cu 胁迫的一个反应^[18]; Martino 等^[19]报道, 分离自欧拟石楠植物菌根真菌对抗重金属的一个手段是在细胞壁上沉积黑色素; Collin-Hansen 等^[17]从严重 Cd 污染土壤



(A: 在基本培养基中培养 2 周时 H93 的菌丝、孢子和孢子串; B: 在基本培养基中培养 30 天时的菌丝和孢子; C: 在含 0.35 mg/ml Cd^{2+} 的基本培养基中培养 2 周时膨胀的菌丝或以孢子串方式生长的菌丝; D: 在含 0.35 mg/ml Cd^{2+} 的基本培养基中培养 30 天时恢复生长和产孢的菌丝和孢子; E: 在高浓度 (0.5 mg/ml) Cd 培养基中 H93 完全以孢子串形、酵母样生长, 胞内有大量渣滓样颗粒)

图 6 H93 在不同培养条件下的形态学变化

Fig. 6 Morphological changes of H93 cultivated under different conditions and different culture periods

生长的美味牛肝菌的菌体内分离到了一种新的镉结合蛋白。同样, H93 在高浓度的 Pb、Zn、Cd 的培养基中培养时, 也可见细胞壁的增厚、细胞内的颗粒状渣滓等。

H93 在含 7 g/L Pb^{2+} 的固体培养基中培养 2 个月, 观察到大量堆积的或是膨大脱落的孢子或是菌丝顶端产孢处分泌的金属颗粒(图 5C)堆积在正常菌丝之间, 低倍显微镜下, 很象在植物根内观察到的微菌核。这应该是由固体培养基限制了金属离子的运动, 菌丝局部吸收金属离子并将其固定在厚垣孢子内, 降低了局部的离子浓度, 新生的菌丝而得以在局部正常生长, 延伸到金属离子浓度高的地方又开始以产孢的形式吸收重金属, 所以, 在固体培养基内即使加入比液体培养基高出两倍的金属离子浓度 (7 g/L Pb), 仍可见大量的正常菌丝, 同时可见大量大的颗粒或极度变形的脱落孢子沉积在菌丝之间(图 5G), 但此时菌丝生长极度缓慢, 而且菌落较薄、颜色较淡。

植物根围的土壤环境如同固体培养基, 植物根表

的菌丝应该可以吸收固定局部的重金属, 从而降低根部周围土壤可溶性重金属的浓度, 使植物得以获得可以生长的局部微环境。

参考文献:

- [1] 肖艳萍. 云南铅-锌矿区(会泽, 兰坪)丛枝菌根和 DSE 的资源调查 (硕士学位论文). 昆明: 云南大学, 2008: 9-10
- [2] 陈保冬, 陈梅梅, 白刃. 丛枝菌根在治理铊污染环境中的潜在作用. 环境科学, 2011, 32(3): 809-816
- [3] Silvani VA, Fracchia S, Fernández L, Pérgola M, Godeas A. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(5): 1259-1263
- [4] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [5] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving

- the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.*, 1994, 22: 4673–4680
- [6] Caldwell BA, Mastellano MA, Griffiths RP. Fatty acid esterase production by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 1991, 33: 233–236
- [7] Mandyam K, Jumpponen A. Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Stud. Mycol.*, 2005, 53: 173–189
- [8] Zafar S, Aqil F, Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 2007, 98: 2557–2561
- [9] Lu RK. *Methods of Soil and Agricultural Chemical Analysis*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press, 2000
- [10] Wainwright M, Gadd GM. Fungi and industrial pollutants // Wicklow DT, Söderström B. *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997: 85–97
- [11] Khan M, Scullion J. Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environmental Pollution*, 2000, 110: 115–125
- [12] Olayinka A, Babalola GO. Effects of copper sulphate application on microbial numbers and respiration, nitrifier and urease activities, and nitrogen and phosphorus mineralization in analfisol. *Biological Agriculture and Horticulture*, 2001, 19: 1–8
- [13] Kunito T, Oyaizu H, Matsumoto S. Ecology of soil heavy metal-resistant bacteria and perspective of bioremediation of heavy metal-contaminated soils. *Recent Research and Development in Agricultural and Biological Chemistry*, 1998, 2: 185–206
- [14] Khan M, Scullion J. Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology*, 2002, 20: 145–155
- [15] Kostov O, Van Cleemput O. Microbial activity of Cu contaminated soils and effect of lime and compost on soil resiliency. *Compost Science and Utilization*, 2001, 9: 336–351
- [16] Massaccesi G, Romero MC, Cazau MC, Bucsinszky AM. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18: 817–820
- [17] Collin-Hansen C, Adersen RA, Steinnes E. Molecular defense systems are expressed in the king bolete (*Boletus edulis*) growing near metal smelters. *Mycologia*, 2005, 97(5): 973–983
- [18] Gadd GM. Geomycology: Biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.*, 2007, 111(Pt 1): 3–49
- [19] Martino E, Turnau K, Girlanda M, Bonfante P, Perotto S. Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: Their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycol. Res.*, 2000, 104(3): 338–344

Tolerance and Accumulation of Heavy Metals by *Exophiala pisciphila* Strain Isolated From Plant Roots Growing in Metal Polluted Soils

ZHANG Yu-jie^{1,2}, LI Hong-chao⁴, ZHAO Zhi-wei³

(1 Department of Biology, Wenshan University, Wenshan, Yunnan 663000, China; 2 Center for Conservation and Utilization of Bio-Resources of Wenshan, Wenshan, Yunnan 663000, China; 3 Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, and Key Laboratory for Microbial Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China; 4 Elementary School of Malibao Village, Malipo County, Malipo, Yunnan 663609, China)

Abstract: A DSE stain was isolated from plant roots of *Arundinella bengalensis* (Spreng.) Druce, naturally growing on the plot of lead-zinc mine areas in Huize, Yunnan Province. The isolate was identified as an *Exophiala pisciphila* strain by morphological characteristics and ITS1-5.8S rDNA-ITS 2 sequence analysis. The tolerance to heavy metals and accumulation abilities of the *E. pisciphila* strain were investigated. MICs (minimum inhibitory concentration) to Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} of the fungus were 2.3, 0.51, and 3.1 mg/ml, respectively. The *E. pisciphila* strain was able to accumulate lead, zinc and cadmium over 20%, 15% and 5% of its biomass (by dry weight), respectively. It was demonstrated that the fungi was supper accumulative and multi-tolerant to these metals. Fungi colonization in the roots may play important roles in reducing toxicity to the plant root cells of heavy metals in soils.

Key words: Dark septate endophytes, *Exophiala pisciphila*, Tolerance and accumulation of heavy metals