

杨亮,郝瑞霞,吴津,等. 2012. 耐受铅真菌的筛选及其对 Pb^{2+} 吸附的初步研究[J]. 环境科学学报,32(10):2366-2374

Yang L, Hao R X, Wu F, et al. 2012. Isolation of lead-tolerant fungus and the adsorption effect to Pb^{2+} [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,32(10): 2366-2374

耐受铅真菌的筛选及其对 Pb^{2+} 吸附的初步研究

杨亮,郝瑞霞*,吴津,肖育雄

北京大学地球与空间科学学院造山带与地壳演化重点实验室,北京 100871

收稿日期:2011-12-23 修回日期:2012-02-17 录用日期:2012-03-05

摘要:从铅锌矿周围土壤样品中分离、筛选出一株耐铅真菌(命名为PY),对菌株进行了形态观察、生理生化实验及18S rRNA序列分析,并对该菌株的生物吸附性能进行了分析试验.结果表明,菌株PY为镰刀菌属(JQ267373),该菌株在 Pb^{2+} 浓度 $550\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、湿菌量 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH}=5.5$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下振荡吸附 75 min 时,对 Pb^{2+} 的吸附率可达到 84%,吸附量为 $46.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. 在 Pb^{2+} 浓度为 $750\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其吸附率为 77.9%. 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 时,菌株PY对 Pb^{2+} 的吸附模型符合 Langmuir 和 Freundlich 吸附等温方程.

关键词:镰刀菌属;铅;吸附

文章编号:0253-2468(2012)10-2366-09

中图分类号:X703

文献标识码:A

Isolation of lead-tolerant fungus and the adsorption effect to Pb^{2+}

YANG Liang, HAO Ruixia*, WU Feng, XIAO Yuxiong

Key Laboratory of Orogen and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871

Received 23 December 2011;

received in revised form 17 February 2012;

accepted 5 March 2012

Abstract: A lead-tolerant fungus strain (PY) was isolated from soil around the lead-zinc ore deposit. The morphological features, biochemical and physiological characteristics and 18S rRNA sequences of the strain were studied. Results indicated that PY belonged to *Fusarium* sp. (JQ267373). The biosorption experimental results of the strain to Pb^{2+} showed when Pb^{2+} concentration was $550\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, biomass was $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and pH was 5.5, the adsorption rate and adsorption capacity of the strain to Pb^{2+} was 84% and $46.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively, at $25\text{ }^\circ\text{C}$, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ with 75min. The adsorption rate was up to 77.9% when Pb^{2+} concentration was $750\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The adsorption models of strain PY to Pb^{2+} at $25\text{ }^\circ\text{C}$ were described with Langmuir and Freundlich isotherm.

Keywords: *Fusarium* sp.; lead; absorption

1 引言(Introduction)

环境中的铅主要来自灰尘、汽车尾气、煤燃烧、采矿、矿石熔炼及杀虫剂、肥料、染料和油漆的制造等,其对人体的毒害作用具有潜伏性和长期性的特点.由于铅对蛋白质上的巯基具有高亲和力,可直接影响血红素的生物合成过程,进而使人体的肝、脾、肾、大脑等组织受损.近年来,铅中毒事件不断发生,因此,如何有效处理环境中的铅污染也越来越受到人们的重视(吴求亮等,2000).

随着环境微生物学的发展,研究人员发现一些微生物(如细菌、真菌)能够吸附去除废水中的 Pb^{2+} ,如真菌秀珍菇(李维焕等,2011)、短小芽孢杆

菌(任广明等,2010)、曲霉(王俊丽等,2010;黄民生等,2001)、青霉(王俊丽等,2010)、葡萄孢霉属、头孢霉属、毛霉属、木霉属、铰链孢霉属、筒梗孢霉属、*Auricularia polytricha* (Pan et al., 2010)、镰刀菌属(潘蓉等,2010;周薇等,2009)、假单胞菌属(曹得菊等,2009)、拉微球菌(周薇等,2009)、*Pseudomonas aeruginosa* (Gabr et al., 2008)、克雷伯氏菌(陈吉群,2007)、芽孢杆菌(李青彬等,2007)、*Rhizopus arrhizus* (Tolga Bahadir et al., 2007)、浮游球衣菌(秦玉春等,2005)、*Enterobacter* sp. J1 (Wei et al., 2005)、啤酒酵母菌(周东琴等,2004)、*Phanerochaete chrysosporium* (Iqbal et al., 2004)、*Nocardia amarae* (朱一民等,2003)等.这些菌株对铅的吸附能力各

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2007CB815601)

Supported by the National Key Basic Research and Development Program of China(No. 2007CB815601)

作者简介: 杨亮(1987—),女,E-mail: yanglianghao@126.com; * 通讯作者(责任作者), E-mail: rxhao@pku.edu.cn

Biography: YANG Liang (1987—), female, E-mail: yanglianghao@126.com; * **Corresponding author**, E-mail: rxhao@pku.edu.cn

不相同,且其最佳吸附条件(如温度、菌体量、pH 等)也有所差异,这主要与各菌株的最适生长条件有关;同时,各菌株对铅的耐受能力也不是太高.因此,为了处理高浓度含铅废水,需要筛选分离出能够耐受高浓度铅的菌株,并进行吸附实验,以达到治理环境铅污染的目的.

基于此,本研究从铅矿厂周围的土壤中分离筛选出一株真菌菌株(命名为 PY),对其生物学特性和分子生物学特性进行研究.同时,对该菌株的生物吸附性能进行分析试验,评估该菌对铅的去除及吸附能力.

2 材料和方法(Materials and methods)

2.1 试剂与仪器

液体培养基:NaCl 0.5 g, $NaNO_3$ 0.5 g, $MgCl_2$ 0.01 g, NH_4Cl 0.1 g, 牛肉浸膏 1.0 g, 胰蛋白胨 3.0 g, 酵母浸粉 3.0 g, 葡萄糖 3.0 g, 蒸馏水 1 L, pH = 5.5. 固体培养基是在液体培养基中加入 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂. 硝酸铅(配制成 $2000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铅标准溶液待用)、硝酸、过氧化氢均为分析纯.

LRH-150 型生化培养箱, HZQ-F100 型振荡培养箱, 立式压力蒸汽灭菌锅, HC-3018R 型高速冷冻离心机, UV-2102 型紫外可见分光光度计, 5000 型原子火焰吸收分光光度计, K850 型临界点干燥仪, MG25 + 基因扩增仪.

含铅土样取自河北省涞源县乌龙沟镇铅锌矿选矿场尾矿堆. 先用采样铲铲去表层土(5 cm), 取 15 cm 处的土样 25 g, 装入事先准备好的纸袋内扎好, 并记录地点、时间及环境条件. 土样中可溶性铅的含量范围为 $0.5\sim 1.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.2 实验方法

2.2.1 微生物的富集和分离 取 0.1 g 土样溶于 100 mL 培养液中, 在 HZQ-F100 型振荡培养箱中 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温培养 48 h; 然后用移液枪取 1 mL 培养液转接到 Pb^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基(100 mL)中, 继续培养 48 h, 重复以上操作 5 次. 将上述菌液分别稀释, 取 0.1 mL 稀释液滴加在固体平板(Pb^{2+} 浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)中央, 并立即用无菌玻璃刮刀涂抹均匀. 接种后移入恒温培养箱中倒置恒温($25\text{ }^\circ\text{C}$)培养 48 h, 直到培养基表面观察到菌落. 根据菌落形态不同, 挑取单菌落, 移种转接到液体培养基中, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温培养 48 h. 反复进行上述操作, 同时镜检, 直至获得纯菌

株(以上操作均在严格无菌条件下进行).

2.2.2 菌株鉴定 配制固体培养基, 采用载玻片培养法进行真菌培养, 观察分生孢子形状及着生方式. 并进行包含 pH 生长范围、温度生长范围、过氧化氢酶测定等在内的生理生化试验.

采用酶法提取菌株 PY 的 DNA, 依据真菌 18S rRNA 中最保守的序列设计并合成引物(ITS1-ITS4), 然后进行 PCR 扩增. PCR 体系($50\text{ }\mu\text{L}$)为: 灭菌超纯 ddH_2O $36\text{ }\mu\text{L}$, buffer $5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP $4\text{ }\mu\text{L}$, 引物 primer (ITS1-ITS4) $1\text{ }\mu\text{L}$, rTap $1\text{ }\mu\text{L}$, DNA $2\text{ }\mu\text{L}$. PCR 运行程序为: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, $58\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 31 个循环; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存(时间最好不超过 12 h). 进行 PCR 扩增后, 委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行 18S rRNA 测定. 将所得序列与 NCBI 数据库中已有的 18S rRNA 序列进行 BLAST 分析, 分析其同源性, 利用 Clustal 进行对比, 通过 MEGA 4.1 软件生成系统发育树, 并申请国际基因库接收号.

2.2.3 不同 Pb^{2+} 浓度下菌株生长曲线的测定 配制 Pb^{2+} 浓度分别为 0、10、20、30、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液各 5 瓶(pH = 5.5)作为平行样, 同时做对照实验, 向每瓶加入 1 mL 新鲜菌株种子液, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下恒温($25\text{ }^\circ\text{C}$)振荡培养. 在 0 ~ 60 h 内, 间隔一定时间用离心法测定其细胞干重, 即先将离心管称重, 然后将待测培养液放入离心管中, $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 真空干燥后称菌体干重.

2.2.4 菌体对 Pb^{2+} 的去除 在新鲜液体培养基中配制菌株种子液, 然后取 1 mL 种子液分别加入 Pb^{2+} 浓度为 10、20、30、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 100 mL 液体培养基中, $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下恒温振荡培养. 以相同 Pb^{2+} 浓度(不加菌)的 100 mL 液体培养基作为对照, 同时做平行实验. 48 h 后, 将所得菌液离心, 加入双氧水与硝酸加热消解, 稀释. 使用日立 5000 型原子分光光度计测定溶液中 Pb^{2+} 浓度(空气-乙炔火焰法, 氘灯背景校正, 光谱缝宽 1.4 nm, 工作电流 7.0 mA, 波长 283.3 nm). 每测 10 个样, 用 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸铅标液进行校正. 以不加菌体组为对照组, 3 次重复, 若样品数据重复性不好, 则重复实验重新测试. Pb^{2+} 去除率(P)按照公式(1)进行计算.

$$P = (C_{\text{原}} - C) / C_{\text{原}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, $C_{\text{原}}$ 为原培养液中 Pb^{2+} 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), C 为菌体生长后培养液中 Pb^{2+} 浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.2.5 菌体对 Pb^{2+} 的吸附 移取 20 mL 新鲜菌株种子液于离心管中, 4000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 测得细菌湿重; 然后将其加入到 Pb^{2+} 浓度为 10、20、30、50 $mg \cdot L^{-1}$ 的溶液中, 160 $r \cdot \min^{-1}$ 、25 $^{\circ}C$ 下恒温振荡, 并以不加菌的铅溶液作为对照. 每间隔 15 min 取一次样, 离心、取上清液加入双氧水与硝酸加热消解, 测定其中的 Pb^{2+} 浓度. 吸附率和吸附量分别按公式(2)和(3)进行计算.

$$Q = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$q = (C_0 - C_t) \times V / m \quad (3)$$

式中, Q 为吸附率, C_0 为吸附前溶液中 Pb^{2+} 浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), C_t 为吸附 t 时刻后溶液中 Pb^{2+} 浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), q 为吸附量 ($mg \cdot g^{-1}$), V 为培养液体积 (L), m 为吸附剂质量 (g).

2.2.6 不同因素对菌株吸附 Pb^{2+} 效果的影响 在投菌量 10 $g \cdot L^{-1}$ 、pH = 5.5 的条件下, 分别调节 Pb^{2+} 浓度为 50、150、250、350、450、550、650、750 $mg \cdot L^{-1}$, 160 $r \cdot \min^{-1}$ 、25 $^{\circ}C$ 振荡 75 min, 1000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 消解, 测定 Pb^{2+} 浓度, 研究 Pb^{2+} 浓度对菌株吸附效果的影响.

将 Pb^{2+} 浓度为 550 $mg \cdot L^{-1}$ 溶液的 pH 分别调节至 1、2、3、4、5、6、7, 投菌量为 10 $g \cdot L^{-1}$, 重复上述离心、振荡操作后, 取上清液, 消解, 测定 Pb^{2+} 浓度, 研究 pH 对菌株吸附效果的影响.

在 Pb^{2+} 浓度为 550 $mg \cdot L^{-1}$ 、pH = 5.5 的溶液中, 分别加入菌量 2、4、6、8、10、12、14、16 $g \cdot L^{-1}$, 重复上述离心、振荡操作后, 取上清液, 消解, 测定 Pb^{2+} 浓度, 研究投菌量对菌株吸附效果的影响.

在 Pb^{2+} 浓度为 550 $mg \cdot L^{-1}$ 、pH = 5.5 的溶液中加入菌量 10 $g \cdot L^{-1}$, 160 $r \cdot \min^{-1}$ 、25 $^{\circ}C$ 下振荡吸附 15、30、45、60、75、90、105 min, 然后 1000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 消解, 测定 Pb^{2+} 的浓度, 研究吸附时间对菌株吸附效果的影响.

2.2.7 等温吸附方程 在 pH = 5.5、投菌量为 10 $g \cdot L^{-1}$ 的条件下, 设置原液中 Pb^{2+} 浓度分别为 50、150、250、350、450、550、650、750 $mg \cdot L^{-1}$, 160 $r \cdot \min^{-1}$ 、25 $^{\circ}C$ 振荡 75 min, 将测得的吸附量 q 和平衡浓度 C_e 转换成双倒数和对数, 并根据数据做图.

3 结果(Results)

3.1 菌株的生物学特征

在固体培养基上菌落表面呈白色, 反面呈淡黄色, 质地棉絮状, 生长快速, 在固体培养基生长 48 h

时, 其直径可达 3~5 cm. 利用固体培养基对其菌丝进行显微镜观察, 结果表明, 菌丝可产生两种类型的分生孢子, 大型分生孢子和小型分生孢子. 其中, 大型分生孢子由气生菌产生, 且形态多样, 其产孢细胞为简单瓶梗, 瓶梗较长, 孢子为卵圆形, 菌丝长 10~15 μm , 宽 3~10 μm . 菌株 PY 的生理生化特性见表 1.

表 1 菌株(PY)生理生化实验

测试项目	结果
孢子类型	大型分生孢子和小型分生孢子
孢子形状	卵圆形
过氧化氢酶测定	几乎没有气泡
麦芽糖	利用
纤维二糖	利用
麦芽糖	分解
蔗糖	利用
葡萄糖产酸	产酸
pH	3~12
温度	10~45 $^{\circ}C$
淀粉水解	不水解
硫化氢	产硫化氢
明胶液化	液化
甲基红生理生化试验	橙色

3.2 菌株的鉴定

18S rRNA 序列测定及序列比对结果显示, 菌株 PY 与镰刀菌属均具有较高的相似性, 其中与 *Fusarium* sp. (FJ175372) 的相似性为 99%, 且在进化上的距离相对较近, 处于同一分支, 而与 *Fusarium equiseti* (GQ365157) 在进化距离上相对较远(图 1). 结合菌株生理生化试验确定菌株 PY 为镰刀菌属, GenBank 登录号为 JQ267373.

3.3 不同 Pb^{2+} 浓度下菌株的生长曲线

由图 2 可知, 当液体培养基中不含 Pb^{2+} 时, 菌体生长最好. 随着 Pb^{2+} 浓度的逐渐升高, 菌株在 Pb^{2+} 液中的生长速度逐渐减缓, 菌株量也不断变少, 说明 Pb^{2+} 对菌体生长有一定的抑制作用, 但该菌株仍能在含 Pb^{2+} 培养液中生长, 表明镰刀菌属具有一定的耐铅能力. 这与其他学者研究的镰刀菌具有耐铅能力的实验结果相符(周薇等, 2009; Pan et al., 2009; 潘蓉等, 2010).

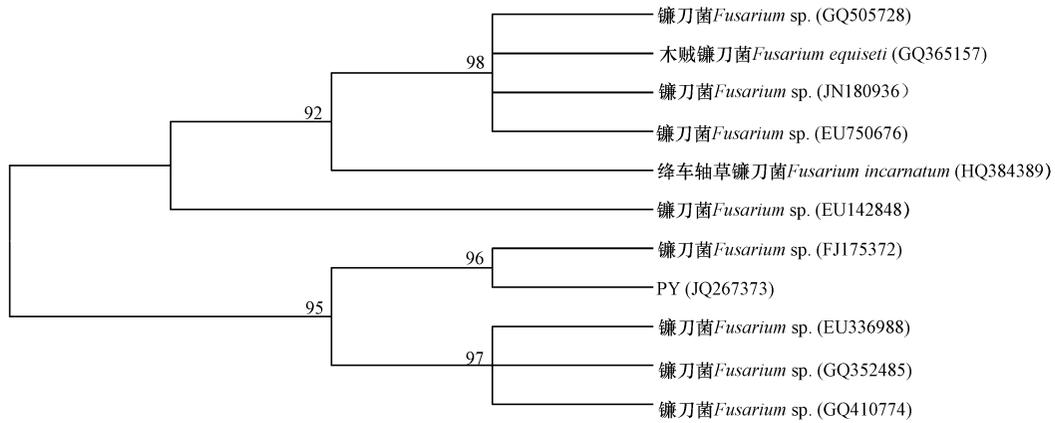


图 1 菌株 (PY) 的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of strain (PY)

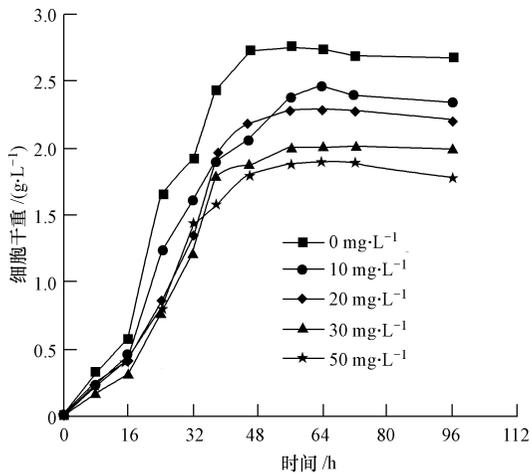


图 2 菌株 (PY) 在不同浓度 Pb²⁺ 溶液中的生长曲线
Fig. 2 Growth curve of strains (PY) in different concentrations of Pb²⁺

3.4 菌株对 Pb²⁺ 去除率与吸附率的比较

菌株 PY 对 Pb²⁺ 有吸附作用,但其对 Pb²⁺ 的吸附率小于去除率(表 2).这与假单胞菌属(曹德菊等,2009)类似,但没有假单胞菌对 Pb²⁺ 吸附率(57.68%)与去除率(87.75%)的差别大,推测可能与菌种不同有关.菌株对 Pb²⁺ 的去除率与吸附率存

表 2 菌株 (PY) 对 Pb²⁺ 去除率与吸附率的比较

Table 2 Comparison of Pb²⁺ removal rate and adsorption rate of strain (PY)

Pb ²⁺ / (mg·L ⁻¹)	去除率	吸附率
10	99.7%	93.2%
20	98.7%	92.3%
30	98.9%	93.3%
50	99.8%	92.6%

在不同,可能是因为菌体对 Pb²⁺ 的去除是菌体吸附作用和转化作用同时作用所致.

3.5 菌株对 Pb²⁺ 吸附效果影响因素研究

3.5.1 Pb²⁺ 浓度对吸附效果的影响 由图 3a 可知,Pb²⁺ 浓度为 50 ~ 750 mg·L⁻¹ 时,菌株 PY 对 Pb²⁺ 均有较好的吸附效果.随着 Pb²⁺ 浓度的升高,菌株对 Pb²⁺ 的吸附率呈下降趋势,但其对 Pb²⁺ 的吸附效果具有较好的稳定性,在 Pb²⁺ 浓度为 50 ~ 150 mg·L⁻¹ 时,吸附率均维持在 90% 以上;当 Pb²⁺ 浓度为 150 ~ 550 mg·L⁻¹ 时,吸附率均维持在 80% 以上;当 Pb²⁺ 浓度为 650 mg·L⁻¹ 时,吸附率下降,但仍高达 79.2%.这一结果与 *Nocardia amarae* 对 Pb²⁺ 的吸附特性相似(朱一民等,2003).

3.5.2 pH 对吸附效果的影响 pH 值较低时,菌株 PY 对 Pb²⁺ 的吸附率很低(图 3b),这是因为溶液中大量存在的水合氢离子会与 Pb²⁺ 离子竞争细胞壁上吸附活性位点,并使菌体细胞壁质子化,从而增加细胞表面的静电斥力,使得吸附率较低.随着溶液 pH 值的升高,超过菌体表面的等电点,菌体表面的负电荷增加,菌体表面活性基团的 N、O 原子活性增强,有利于 Pb²⁺ 的吸附,吸附率随之增加.当溶液 pH 较高时,会使 Pb²⁺ 形成氢氧化物的微沉淀沉积在菌体表面,从而造成吸附率下降.总体而言,随着 pH 的升高,吸附率也升高,表明菌株 PY 吸附重金属是一个随 pH 升高而上升的过程,在 pH 值为 5 ~ 6 时,对 Pb²⁺ 吸附效果较好,吸附率可达到 82%.因此,本实验确定最适 pH 为 5.5.同时,研究 pH 对 Pb²⁺ 吸附影响时,最大 pH 不能超过 6, pH = 6 时吸附率的上升只能归结于沉淀作用,而不能归结于生物吸附.

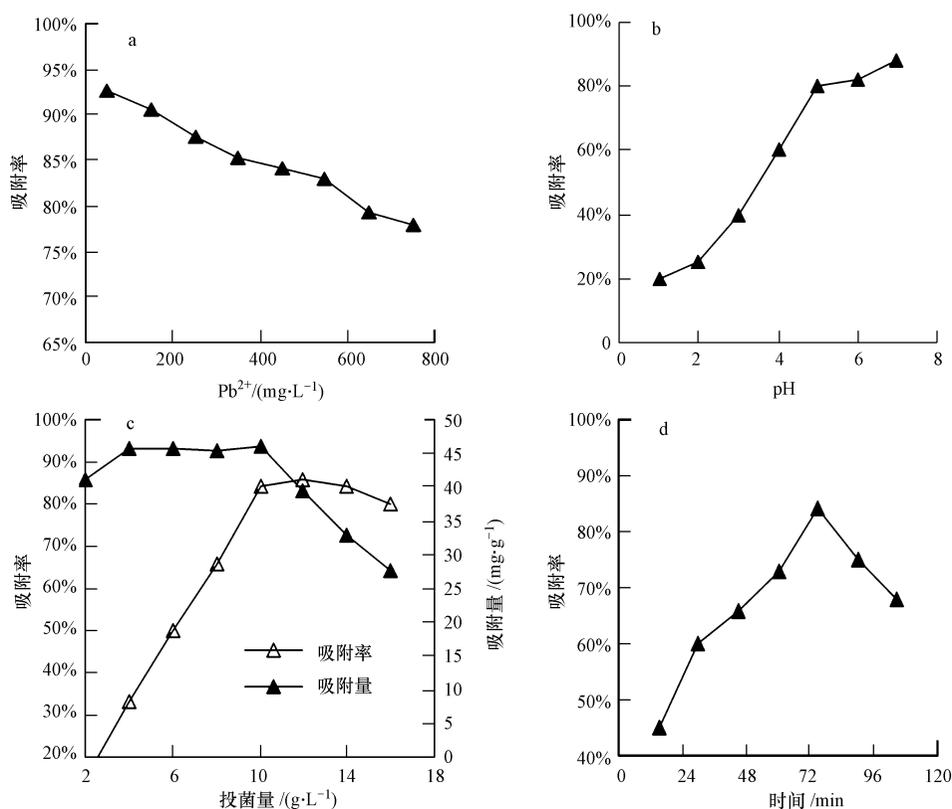


图3 不同因素对菌株吸附 Pb²⁺ 效果的影响(a. Pb²⁺ 浓度, b. pH, c. 生物量, d. 时间)

Fig. 3 Effect of different elements on strain PY biosorption (a. Pb²⁺ concentration, b. pH, c. biomass, d. time)

3.5.3 投菌量对吸附效果的影响 由图 3c 可知, 随着投菌量的增加(10 g·L⁻¹ 以下), 菌株 PY 对溶液中 Pb²⁺ 的吸附率显著升高, 吸附量也在不断增加. 这是因为适当地增大投菌量能够增加菌体表面与金属离子的接触和结合机会, 从而使菌体对溶液中 Pb²⁺ 的吸附能力提高. 但当投菌量超过 12 g·L⁻¹ 后, 吸附率趋于平缓, 吸附量反而下降. 这是由于随着投菌量的增加, 吸附率并不随菌体投加量的增加成比例增多, 说明在 Pb²⁺ 浓度确定的吸附体系中, 降低菌体浓度, 只要菌体仍未被 Pb²⁺ 饱和, 菌体的吸附量便会增加. 但当吸附剂投加量达到一定数量后, 再继续增加吸附剂用量对吸附率没有明显作用. 因此, 在实际应用中应该调节好投菌量, 既达到最佳吸附效果, 又节约成本.

投菌量 10 g·L⁻¹ 以下时, Pb²⁺ 吸附量与吸附率呈同向变化, 在 10 g·L⁻¹ 时呈反向变化, 这可能是由于菌体表面对金属离子的结合位点强弱不同, 使菌体之间发生了对金属离子的竞争吸附, 导致菌体的结合位点不能充分利用, 进而造成菌体的吸附量降低(Zumriye, 2001; Kapoor *et al.*, 1999). 从图 3c 可以看出, 在 Pb²⁺ 浓度为 550 mg·L⁻¹, 最佳投菌量为

10 g·L⁻¹ 时, 菌株对 Pb²⁺ 吸附量为 46.2 mg·g⁻¹, 吸附率为 84%.

3.5.4 吸附时间对吸附效果的影响 图 3d 为吸附率随时间的变化曲线, 在最初的 30 min 内, 菌株对 Pb²⁺ 的吸附率为 60%; 60~75 min 时, 吸附已趋于平衡; 75 min 时, 菌株对 Pb²⁺ 的吸附率达到 84%. 这与诸多文献报道的菌株对重金属的吸附特征有很大相似性(Zumriye, 2001; 任广明等, 2010; 赵玉清等, 2009; 周薇等, 2009).

3.6 吸附等温方程

合适的数学模型对于吸附过程的最优化十分重要, 好的过程模型不仅有助于分析和解释实验数据, 而且可以正确估计吸附条件变化的影响, 以确定最佳的吸附条件. 根据实验数据做出菌株对 Pb²⁺ 的吸附等温曲线, 结果如图 4 所示.

Pb²⁺ 的生物吸附可以等量地通过吸附平衡等温线模型估计, 通常采用 Langmuir 模型(Sibel Tunali *et al.*, 2006) 和 Freundlich 模型(Vitor *et al.*, 2005) 来描述, 具体如下:

$$1/q_e = 1/q_{\max} + 1/(K_L \times q_{\max} \times C_e) \quad (4)$$

$$\ln q_e = \ln K_F + a \ln C_e \quad (5)$$

式中, q_e 为平衡吸附量 ($mg \cdot g^{-1}$), q_{max} 为最大吸附量 ($mg \cdot g^{-1}$), C_e 为平衡浓度 ($mg \cdot L^{-1}$), K_L 、 K_F 分别为吸附常数.

根据图 4 的相应平衡吸附量数据及溶液平衡浓度数据,用 Langmuir 方程和 Freundlich 方程进行拟合,结果如图 5 所示,其中,Langmuir 方程拟合的最大吸附量为 $59.88 mg \cdot g^{-1}$.

由 R^2 值可知,两个方程对吸附过程的拟合均较好,且 Langmuir 方程比 Freundlich 方程的拟合效果更好.这进一步证明吸附过程是一个以表面吸附为主的过程,因此,用单分子层吸附模型 Langmuir 方程来拟合本吸附过程更适合.

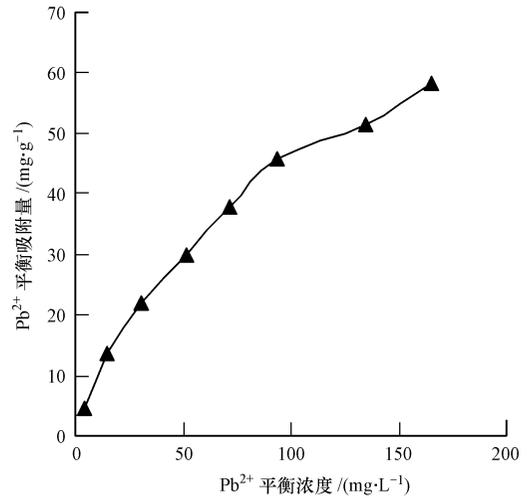


图 4 Pb^{2+} 吸附等温线

Fig. 4 Adsorption isotherm of Pb^{2+}

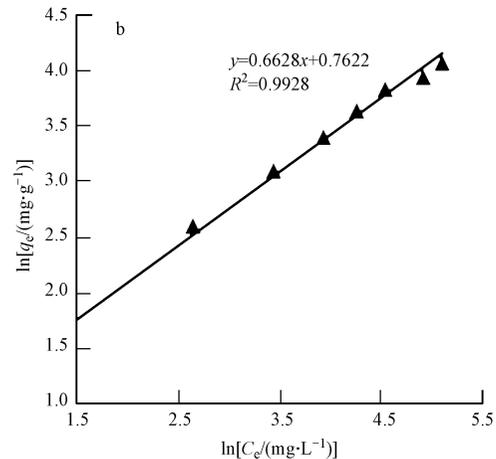
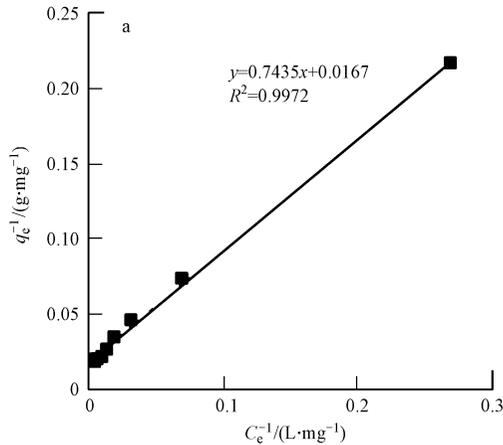


图 5 Langmuir (a) 和 Freundlich (b) 吸附等温线

Fig. 5 Adsorption isotherm of (a) Langmuir and (b) Freundlich

4 讨论 (Discussion)

在长期受某种或多种重金属污染的土壤中,存在一定数量、能抗或耐重金属污染并能富集、氧化或还原重金属的微生物类群.由于微生物种类繁多,因此,用重金属选择培养基,从中筛选出对土壤重金属具有专性高效富集作用的菌株,并进行分类鉴定是微生物修复技术应用的前提.在本实验中,采用含 Pb^{2+} 的培养基分离出的真菌对铅耐性较强 ($750 mg \cdot L^{-1}$),表明采用该方法能较好地分离出耐铅菌株.重金属可以改变微生物的数量、区系结构、生理类群及生理生化反应,同时微生物也通过调节其结构和生理状况,或者形成能在自然环境中广泛传播的质粒,从而完善遗传基因,以适应不良环境.同时,不同的微生物对重金属的敏感程度不同.研

究发现, Pb^{2+} 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的生长影响不明显,没有明显的规律性(李淑英等,2011).而在本研究中,当 Pb^{2+} 浓度为 $0 \sim 50 mg \cdot L^{-1}$ 时,随着 Pb^{2+} 浓度的升高,耐铅菌株 PY 的总数不断减少.

在初始 Pb^{2+} 浓度为 $10 \sim 50 mg \cdot L^{-1}$ 时,采用菌株 PY 的活体细胞对 Pb^{2+} 进行去除实验,同时采用菌株 PY 的离心生物物质对 Pb^{2+} 进行吸附实验,并对两者的实验结果进行比较.结果表明,菌株 PY 对 Pb^{2+} 的去除率高于吸附率,菌体对 Pb^{2+} 的去除不仅与菌体的细胞壁及各个功能团有关,可能也与菌株生长代谢过程中产生的代谢产物有关.微生物的代谢作用能产生多种低分子量的有机酸,简单的如甲酸、乙酸、丙酸和丁酸等,稍复杂的有柠檬酸、苹果酸、延胡索酸、琥珀酸、乳酸及各种氨基酸等,以此络合、吸附 Pb^{2+} ,从而达到去除、回收 Pb^{2+} 的目的.

(Francis *et al.*, 1988).

研究表明,微生物对重金属的吸附效果受到溶液 pH、初始金属浓度、生物量及吸附时间等因素的影响(Puranik *et al.*, 1999). 本研究中, pH 对菌株 PY 吸附 Pb^{2+} 的影响较大,最适吸附 pH 为 5.5. 任广民等(2010)研究发现,短小芽孢杆菌吸附 Pb^{2+} 的最佳 pH 值为 6;秦玉春等(2005)所研究的浮游球衣菌吸附 Pb^{2+} 的最佳 pH 为 5.5;周薇等(2009)所报道的拉微球菌和镰刀霉菌属吸附 Pb^{2+} 的较适 pH 范围为 5~6;朱一民等(2003)研究发现, *Nocardia amarae* 吸附 Pb^{2+} 的较适 pH 值为 3~6;顾超等(2003)报道的黑根霉菌吸附 Pb^{2+} 的最佳 pH 为 5;Ridvan 等(2001)发现 *Phanerochaete chrysosporium* 吸附 Pb^{2+} 的最佳 pH 为 6. 由此可知,本实验菌株的最适吸附 pH 值与大部分文献报道值比较接近. 菌株 PY 吸附特性实验结果表明,菌株 PY 的最佳湿菌投加量为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,高于拉微球菌与镰刀霉菌属的投加量(周薇等, 2009),低于短小芽孢杆菌(任广民等, 2010)、啤酒酵母(周东琴等, 2006)和 *Nocardia amarae* (朱一民等, 2003)的投加量. 微生物对重金属的吸附与重金属离子的初始浓度有关. 研究发现,随着金属离子浓度的升高,菌体对重金属的去除率降低(周东琴等, 2006),这与本研究中镰刀菌株对 Pb^{2+} 的吸附规律一致. 随着 Pb^{2+} 浓度的进一步增加($550\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 3a),菌丝体对 Pb^{2+} 的吸附率降低,而吸附量随着 Pb^{2+} 浓度的增加先逐渐增加,之后进一步提高 Pb^{2+} 浓度,吸附量只有较小的增幅. 生物吸附剂的吸附能力随着金属浓度的增加而增加,可能是由于金属离子和生物吸附剂之间相互作用的可能性更高,而且较高的初始浓度能增强金属离子克服水相和固相之间传质阻力所需的驱动力,加剧金属离子和吸附剂之间可能产生的碰撞,从而导致金属离子的吸附量较高(Chen *et al.*, 2005).

菌株 PY 对 Pb^{2+} 的平衡吸附量 q_e 与平衡浓度 C_e 之间的关系可以很好地用 Langmuir 和 Freundlich 等温吸附方程描述. 用 Langmuir 方程拟合的最大饱和吸附量高达 $59.88\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,明显高于文献(潘蓉等, 2010)所报道的青霉菌最大铅吸附量($34.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). 菌株 PY 能高效去除水溶液中的 Pb^{2+} , 为治理重金属铅污染提供了更多的选择,具有广阔的应用前景. 重金属污染环境中一般都是两种或多种重金属的复合型污染,多种重金属在迁移、吸附过

程中存在相互促进或拮抗作用(张汉波等, 2004; 边伟等, 2009), 而本试验仅考虑单一重金属铅, 使得试验结果存在一定的局限性. 因此, 要合理有效地研究修复重金属污染土壤的作用机制, 还需要更加深入的分析.

5 结论(Conclusions)

1) 本试验成功地从重金属污染土壤中分离筛选出一株耐铅真菌 PY, 经鉴定为镰刀菌属(JQ267373).

2) 菌株 PY 在 Pb^{2+} 浓度为 $10\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液中生长时, 与不含 Pb^{2+} 培养液中的菌株相比较, 其生长会受到抑制; 当 Pb^{2+} 浓度为 $10\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 菌株 PY 对 Pb^{2+} 的去除率均大于 95%, 吸附率虽低于去除率, 但仍大于 90%; 在 Pb^{2+} 浓度 $550\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、投菌量 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH = 5.5、25 °C、吸附时间 75 min 时, 菌株 PY 对 Pb^{2+} 的吸附量为 $46.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 吸附率为 84%; 在 Pb^{2+} 浓度为 $750\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 吸附率为 77.9%.

3) 在 25 °C、 Pb^{2+} 浓度为 $150\sim 750\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 菌株 PY 对 Pb^{2+} 的吸附过程可以用 Langmuir 和 Freundlich 等温线模型很好地描述.

责任作者简介: 郝瑞霞(1966—), 女, 硕士生导师, 主要从事于微生物地球化学、环境微生物地球化学、地质微生物学及微生物技术的应用研究. E-mail: rxhao@pku.edu.cn.

参考文献(References):

- 边伟, 郭勇, 胡振帮, 等. 2009. 重金属在施污土壤中分布及被大豆植物的吸收[J]. 东北农业大学学报, 40(8): 37-43
- Bian W, E Y, Hu Z B, *et al.* 2009. Distribution of heavy metals in cropland soils amended with sewage sludge and in the uptake by soybean [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 40(8): 37-43 (in Chinese)
- 曹德菊, 王方, 胡海荣. 2009. 抗铅微生物的筛选及去铅效果的研究[A]. 第三届全国农业环境科学学术研讨会[C]. 天津: 411-414
- Cao D J, Wang F, Hu H R. 2009. Isolation and biosorption characteristics of lead resistant microbe [A]. The Third National Agricultural Environmental Science Conference [C]. Tianjin: 411-414 (in Chinese)
- 陈吉群. 2003. 耐铅优势菌的筛选及其吸附应用研究[D]. 大连: 大连理工大学. 1-20
- Chen J Q. 2003. The screening of lead-resistant strain and study on its application [D]. Dalian: Dalian University of Technology. 1-20 (in Chinese)
- Chen X C, Wang Y P, Lin Q, *et al.* 2005. Biosorption of copper(II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1 [J].

- Colloid Surface B,46:101-107
- Francis A J, Dodge C J. 1988. Anaerobic microbial dissolution of transition and heavy metal oxides[J]. Appl Environ Microbiol, 54(4):1009-1014
- Gabr R M, Hassan S H A, Shoreit A A M. 2008. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 62: 195-203
- 顾超, 何池全, 李蕾. 2003. 黑根霉菌自由细胞和固定化细胞对重金属铅的生物吸附[J]. 污染防治技术, 16(4): 205-206
- Gu C, He C Q, Li L. 2003. Study on biosorption of lead on rhizopus stolonifer free cells and immobilized cells[J]. Pollution Prevention and Control Technology, 16(4): 205-206 (in Chinese)
- 黄民生, 施华丽, 郑乐平. 2001. 曲霉对水中重金属的吸附去除[J]. 化工装备技术, 22(4): 17-21
- Huang M S, Shi H L, Zheng L P. 2001. The adsorption of heavy metals in the water by aspergillus [J]. Chemical Equipment Technology, 22(4): 17-21 (in Chinese)
- Iqbal M, Edyvean R G J. 2004. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Miner Eng, 17: 217-223
- Kapoor A, Viraraghavan T, Cullimore D R. 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger* [J]. Biores Technol, 70: 95-104
- 李青彬, 韩永军, 刘雪平, 等. 2007. 土壤分离菌株去除水溶液中铅离子研究[J]. 环境工程学报, 1(3): 70-73
- Li Q B, Han Y J, Liu X P, et al. 2007. Removal of Pb(II) from aqueous solution by bacterial strain isolated from soil [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 1(3): 70-73 (in Chinese)
- 李淑英, 苏亚丽, 周元清, 等. 2011. 重金属胁迫培养对 2 种细菌生长曲线的影响[J]. 安徽农业科学, 39(1): 443-446
- Li S Y, Su Y L, Zhou Y Q, et al. 2011. Effects of heavy metal stress on the growth curves of two kinds of bacteria [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 39(1): 443-446 (in Chinese)
- 李维焕, 于兰兰, 程显好, 等. 2011. 两种大型真菌菌丝体对重金属的耐受和富集特性[J]. 生态学报, 31(5): 1240-1248
- Li W H, Yu L L, Cheng X H, et al. 2011. Growth tolerance and accumulation characteristics of the mycelia of two macrofungi species to heavy metals [J]. Acta Ecologica Sinica, 31(5): 1240-1248 (in Chinese)
- Norton L, Baskaran K, Mckenzie T. 2004. Biosorption of zinc from aqueous solutions using biosolids [J]. Adv Environ Res, 8: 629-635
- 潘蓉, 曹理想, 张仁铎. 2010. 青霉菌和镰刀菌对重金属 Cd²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 的吸附特性[J]. 环境科学学报, 30(3): 477-484
- Pan R, Cao L X, Zhang R D. 2010. Biosorption characteristics of heavy metals cadmium, copper, zinc, lead by *Penicillium* and *Fusarium fungi* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(3): 477-484 (in Chinese)
- Pan R, Cao L X, Huang H W, et al. 2010. Biosorption of Cd, Cu, Pb, and Zn from aqueous solutions by the fruiting bodies of *Jelly fungi* (*Tremella fuciformis* and *Auricularia polytricha*) [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 88: 997-1005
- Pan R, Cao L X, Zhang R D. 2009. Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19 [J]. Journal of Hazardous Materials, 171: 761-766
- Puranik P R, Paknikar K M. 1999. Biosorption of lead, cadmium and zinc by citrobacter strain MCM B-181 characterization studies [J]. Biotechnol Progr, 15: 228-237
- 秦玉春, 关晓辉, 魏德洲, 等. 2005. 浮游球衣菌的分布对其铅离子的吸附性能[J]. 东北大学学报(自然科学版), 26(7): 687-690
- Qin Y C, Guan X H, Wei D Z, et al. 2005. Isolation of sphaerotilus natans and its biosorption of Pb²⁺ [J]. Northeastern University (Natural Science), 26(7): 687-690 (in Chinese)
- 任广明, 曲娟娟. 2010. 铅抗性细菌的分离及吸附性能研究[J]. 东北农业大学学报, 41(2): 55-59
- Ren G M, Qu J J. 2010. Isolation and biosorption characteristics of lead resistant bacterium [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 41(2): 55-59 (in Chinese)
- Ridvan Say, Adil Denizli M, Yakup Arica. 2001. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Bioresource Technology, 76: 67-70
- Sibel Tunali, Tamer Akar A, Safaozcan, et al. 2006. Equilibrium and kinetics of biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Cephalosporium aphidicola* [J]. Sep Purif Technol, 47(3): 105-112
- Tolga Bahadir, Gulfem Bakan, Levent Altas, et al. 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters [J]. Enzyme and Microbial Technology, 41: 98-102
- Vitor J P Vilar, Ferdinand Sebesta, Cidalia M S Botelho, et al. 2005. Equilibrium and kinetics modelling of Pb²⁺ biosorption by granulated agar extraction algal waste [J]. Process Biochem, 40(10): 3276-3284
- Wang J L, Chen C. 2006. Biosorption of heavy metal by *Saccharomyces cerevisiae*; a review [J]. Biotechnology Advances, 24(5): 427-451
- Wei B L, Jun J S, Ching H W, et al. 2006. Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance [J]. Journal of Hazardous Materials B, 134: 80-86
- 王俊丽, 王忠, 任建国. 2010. 耐铅微生物的筛选及其吸附能力的初步研究[J]. 污染防治技术, 23(1): 15-17
- Wang J L, Wang Z, Ren J G. 2010. Isolation and biosorption characteristics of lead resistant microbe [J]. Pollution Control Technology, 23(1): 15-17 (in Chinese)
- 吴寿亮, 杨玉爱, 谢玉苗, 等. 2000. 微量元素与生物健康 [M]. 贵阳: 贵阳科学技术出版社. 56-89
- Wu Q L, Yang Y A, Xie Y M, et al. 2000. Trace Elements and Biological Health [M]. Guiyang: Guiyang Science and Technology Press. 56-89 (in Chinese)
- 湛方栋, 何永美, 李元, 等. 2010. 废弃铅锌矿区和非矿区小花南芥根际真菌的分离及其耐铅性研究[J]. 生态环境学报, 19(3): 599-604
- Zhan F D, He Y M, Li Y, et al. 2010. Isolation and Pb tolerance of rhizosphere fungi of arabis alpine in abandoned lead-zinc mining and

- non-mining area[J]. Ecology and Environmental Science, 19(3): 599-604 (in Chinese)
- 张汉波,王力,沙涛,等. 2004. 从铅锌矿渣中分离的微生物对重金属吸附特性的研究[J]. 微生物学杂志, 24(5):34-37
- Zhang H B, Wang L, Sha T, *et al.* 2004. Absorption of heavy metals by microorganisms isolated from lead-zinc tailing [J]. Journal of Microbiology, 24(5):34-37(in Chinese)
- 赵玉清,陈吉群,张凤杰,等. 2009. 嗜铅菌对水中重金属 Pb^{2+} 的吸附研究[J]. 离子交换与吸附, 56(6): 519-526
- Zhao Y Q, Chen J Q, Zhang F J, *et al.* 2009. Adsorption investigation of Pb^{2+} by dominant bacteria aqueous media [J]. Ion Exchange and Adsorption, 56(6): 519-526 (in Chinese)
- 周东琴,朱一民,魏德洲. 2004. 啤酒酵母菌对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 的生物吸附规律[J]. 东北大学学报(自然科学版), 25(9):911-913
- Zhou D Q, Zhu Y M, Wei D Z. 2004. Study on biosorption of Pb^{2+} and Zn^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Northeastern University (Natural Science), 25(9):911-913 (in Chinese)
- 周薇,张小平,康纪婷. 2009. 从矿区土壤中筛选微生物对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 吸附的研究[J]. 环境工程学报, 3(10):1906-1910
- Zhou W, Zhang X P, Kang J T. 2009. Absorption of Pb^{2+} and Zn^{2+} by microorganisms isolated from mine soil [J]. Journal of Environmental Engineering, 3(10):1906-1910(in Chinese)
- 朱一民,周东琴,魏德洲. 2003. *Nocardia amarae* 菌体对水相中 Pb^{2+} 的吸附特性[J]. 东北大学学报(自然科学版), 24(10): 978-981
- Zhu Y M, Zhou D Q, Wei D Z. 2003. Biosorption of journal of Pb^{2+} by biomass *Nocardia amarae* [J]. Northeastern University (Natural Science), 24(10):978-981 (in Chinese)
- Zumriye A. 2001. Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modeling [J]. Biochemical Engineering Journal, 7(1):79-84