

抗 Cd 菌株的筛选及其对 Cd 的去除特性

应娇妍¹, 袁红莉¹, 孙 英², 李宝珍¹, 何红蓼³

(1. 农业部农业微生物资源及其应用重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学理学院, 北京 100094; 3. 国家地质实验测试中心, 北京 100038)

摘要: 从高 Cd 含量的闪锌矿土样中进行了抗 Cd 并富集 Cd 菌株的筛选, 并对高效菌株的吸附和去除 Cd 特性作了分析。结果得到一株对 Cd 具有很强抗性和富集能力的茎点霉菌 F2, 该菌可在 $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 浓度下存活, 在液体培养下对培养基中 Cd 尤其是高浓度 Cd 具有较好的去除作用, 菌体 Cd 含量可达 28%。F2 干菌体对重蒸水中 Cd 的吸附动力学研究表明, 吸附过程符合一级吸附动力学方程, 同时计算了动力学参数。冷冻干燥菌体对 Cd 的吸附能力远大于烘干菌体, 并在较大 Cd 浓度范围和 pH 值范围内对 Cd 具有较好的去除效果。

关键词: Cd; 茎点霉菌; 富集; 吸附

中图分类号: X144 文献标识码: A 文章编号: 1672-2043(2004)02-0292-04

Isolation of Cadmium – Resistant Fungi and their Cadmium Removal Behavior

YING Jiao-yan¹, YUAN Hong-li¹, SUN Ying², LI Bao-zheng¹, HE Hong-liao³

(1. Key Laboratory of Agro – Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. National Research Center of Geoanalysis, Beijing 100038, China)

Abstract: In this study, one strain of fungi identified as *Phoma* sp. F2 with high ability of cadmium resistance and accumulating the heavy metal was screened from a mineral blende, then removal and adsorptive behavior for cadmium by F2 were studied. We discovered that F2 survived as high concentration as at $2\ 000\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of cadmium. When cultured in liquid, cadmium in medium was removed effectively, especially, with highly initial concentration of cadmium, and cadmium content of dried biomass reached 28%. Adsorption of cadmium by dried biomass of F2 was in accordance with stair adsorption kinetics, and kinetic parameters were calculated in the present study. We also found that the adsorption ability of lyophilized biomass was much higher than oven dried biomass. It was suggested that the fungi remove effectively cadmium at wide ranges of pH and cadmium concentrations.

Keywords: cadmium; *Phoma* sp.; accumulation; adsorption

Cd 是公认的高毒性重金属元素, Cd 在环境中的积累会通过食物链对人体产生危害, 比如引发“痛痛病”。治理重金属污染传统的物理法和化学法存在许多缺点, 如能量消耗大、成本高、容易造成二次污染、破坏土壤结构等。重金属污染的生物修复近十年来受到了普遍的重视, 其中微生物吸附剂的研究已成为热点之一。微生物吸附剂的优点是原料来源广泛, 具有在低浓度下处理重金属效果更高, 吸附容量大, 速度快, 选择性好, 吸附设备简单, 易操作, 对生态环境的

破坏小等特点^[1, 2], 在去除水中重金属方面有广阔的应用前景。其中以霉菌研究较多, 多数集中在生产上常用的微生物如根霉、青霉、毛霉、担子菌等^[3-7], 而高效菌株的筛选工作较少。目前寻找特殊微生物, 研究富集特性与机理, 探索提高富集能力的方法已成为研究的热点。

本研究从高 Cd 含量的闪锌矿土样中筛选得到一株具有强抗 Cd 和富集 Cd 特性的茎点霉菌 F2, 同时研究了 F2 对 Cd 的去除和吸附特性, 以期对 Cd 污染环境的生物整治提供材料、方法和理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 抗 Cd 与富集 Cd 菌株筛选

收稿日期: 2003-07-22

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目资助(G1999045709)

作者简介: 应娇妍(1976—), 硕士研究生, 参加“重金属污染土壤的综合治理方案”研究工作。

联系人: 袁红莉, E-mail: hlyuan@cau.edu.cn

1.1.1 高 Cd 含量的土样为 2002 年 6 月采自河北省赤城县青羊沟闪锌矿矿池旁边,经测定该样品含 Cd $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 锌 $2\ 010\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.1.2 抗 Cd 菌株筛选

选将 1 g 土样接种于 100 mL 初始 Cd 浓度为 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基中,培养基配方为:牛肉膏 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 为 7.0。经 28°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 7 d, 取 2 mL 培养液接种于 100 mL 含 Cd $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的新鲜培养基中,在同样条件下也培养 7 d, 如此逐步提高培养基中 Cd 浓度为 1 000, 1 500, 2 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行富集培养。取 0.1 mL 最终培养液涂布在 Cd 浓度为 $2\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的平板上分离抗性菌株。

1.1.3 抗性菌株富集 Cd 能力测定

首先对抗性菌株进行培养条件优化,改进培养基配方为: NaNO_3 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.0。 28°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养。按需要加入通过细菌过滤器除菌的 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 浓缩液配制成一定 Cd 浓度。

将抗性菌株接种于含 Cd 为 0.912, 163.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体培养基中,定时过滤收集菌体,用蒸馏水洗涤两次, $70^\circ\text{C}\sim 80^\circ\text{C}$ 烘干至恒重,以干重绘制生长曲线,同时测定溶液及菌体 Cd 含量。用细菌过滤器 ($0.22\ \mu\text{m}$) 分离菌丝和溶液,测定滤液作为溶液 Cd 含量。菌丝经滤纸过滤收集后,用二次蒸馏水洗 2 遍, $70^\circ\text{C}\sim 80^\circ\text{C}$ 烘干后测定 Cd 含量,下同。

1.2 干菌体对 Cd 的吸附特性

1.2.1 菌体培养及干菌体制备

离心收集液体培养(同优化后培养条件)1 周的菌体,蒸馏水洗涤 2 次,分为冷冻干燥或 $70^\circ\text{C}\sim 80^\circ\text{C}$ 烘干处理,研碎过 70 目筛。

1.2.2 干菌体对 Cd 的吸附

以 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的干菌体量加入装有 20 mL 不同浓度 Cd 溶液的 50 mL 三角瓶中,封口, 28°C , $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡反应。定时取样,测定菌丝和溶液中 Cd 含量。初始 Cd 浓度为约 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时比较烘干与冻干菌体对 Cd 的吸附情况。此外,在初始 Cd 浓度为 0.96、9.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时分析冻干菌体对 Cd 的吸附作用。Cd 溶液用二次蒸馏水配得,初始 pH 值用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 或 NaOH 调至 5.0。

1.2.3 pH 值对吸附作用的影响

用冷冻干燥菌体,溶液初始 Cd 浓度为 $1.04\text{ mg}\cdot$

L^{-1} , 反应时间为 1 h。在 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 干菌体量的情况下研究不同初始 pH 值(分别为 3.24, 4.24, 5.46, 6.22, 7.50, 8.38, 8.92, 9.7) 下冻干菌体对 Cd 的吸附作用。测定反应完毕后 pH 值及溶液中的 Cd 浓度。

1.3 Cd 含量测定

用原子吸收光谱(AA-670, Shimadzu, Japan) 测定 Cd 含量。溶液中的 Cd 直接测定,菌体经硝化后测定^[8]。

2 结果与分析

2.1 抗 Cd 菌株的选育及其富集 Cd 能力分析

经 5 次富集后,最终在 Cd 浓度为 $2\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的平板上分离得到 1 株长势良好的真菌,编号为 F2。根据形态学特征鉴定为茎点霉菌(*Phoma* sp.)^[9]。丝状真菌的体积和生物量较大,作为生物吸附剂在重金属污染的治理中有较大的应用优势,所以对 F2 的富集 Cd 能力作了进一步分析。

改变培养基后,在初始 Cd 浓度为 0.912 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 163.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下液体培养时分别研究 F2 对低浓度和高浓度 Cd 的富集与去除情况,结果见图 1。由图 1A 可见,起始 Cd 浓度为 $0.912\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,溶液中 Cd 浓度较快(3 d 左右)降到最低,去除率为 68%,此时,菌体生长较少,菌体处在对数生长期。之后,随着培养时间的增长, Cd 浓度基本不再下降,而且在 5 d 之后逐渐上升,尤其在进入衰亡期后, Cd 含量大幅度回升,可能菌体裂解或衰老后释放出 Cd。此外,液体培养时富集作用的环境较为复杂, pH 值变化,培养基中的有机物、阴阳离子等都可能影响对 Cd 的富集作用,从而导致去除率降低或不稳定,具体影响因素有待进一步研究。由图 1B 可见,在 $163.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 浓度下,菌体的生长受到较大抑制,但仍有明显生长。溶液中 Cd 含量在 4 d 时基本达到最低水平,之后在 12 d 的培养期内一直维持在较低水平。值得注意的是:最大 Cd 去除率达到 96%,菌体 Cd 含量随着菌体的生长而降低,在 13%~28% 之间,一般报道的菌体最大 Cd 含量很少超过 20%,所以 F2 具有很强的富集 Cd 能力。相关研究表明, F2 在高浓度 Cd 下培养时对 Cd 的抗性和富集作用可能与胞内外 Cd 沉淀物的形成有关^[9]。

2.2 干菌体对水中 Cd 的吸附作用

2.2.1 烘干菌体与冷冻干燥菌体对 Cd 的吸附作用比较

用制备好的干菌体作为吸附剂在水体中应用较

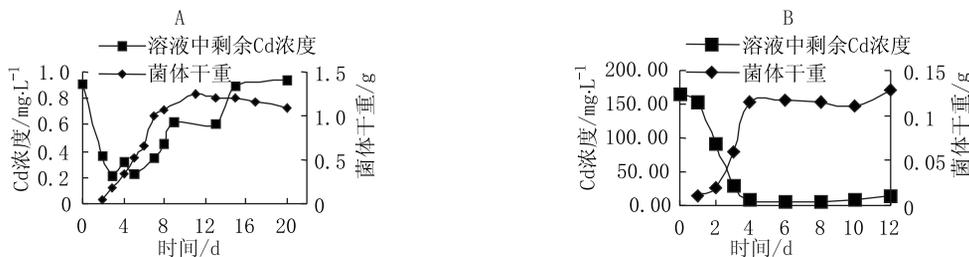


图 1 不同初始 Cd 浓度 (A: $0.912 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, B: $163.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 下液体培养时 F2 的生长与培养基中 Cd 的去除状况

Figure 1 Removal of cadmium from the medium during the culture of F2 with two initial cadmium concentrations

(A. $0.912 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B. $163.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

为方便,受到的限制因素较小,可以重复使用,而且有的会比湿菌体具有更强的吸附能力,因此干菌体吸附的研究也备受关注^[4,10]。经烘干处理和冷冻干燥处理的 F2 菌体对 Cd 浓度分别为 51.7 , $51.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液中 Cd 的吸附曲线见图 1。可见,吸附反应速率很快,在 60 min 左右去除率基本达到最大。冷冻干燥菌体对溶液中 Cd 具有较强的吸附能力,其最大去除率约为 91%,菌体 Cd 含量为 $15680 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,约是烘干菌体 Cd 含量($7538 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的两倍。由此可见,烘干对菌体的吸附能力影响较大,这可能与烘干引起粒度变化从而减小吸附的有效面积有关,此外,烘干也可能破坏了菌体中与吸附有关的活性基团。

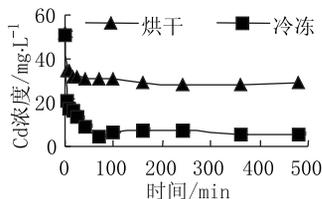


图 2 溶液 Cd 浓度约 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下不同方式处理干菌体对 Cd 的吸附

Figure 2 Adsorption of Cd by differently pretreated dried biomass with concentration of about $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2.2 吸附动力学研究

由于实际水中 Cd 污染的浓度较低,所以进一步分析了冷冻干燥菌体在 $0.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $9.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 溶液中的吸附作用,得出吸附曲线如图 3 所示。可以看出,与图 2 中的趋势相同,溶液中的 Cd 浓度在实验一开始均迅速降低,菌体吸附 Cd 的速率迅速增加,大约在 60 min 左右的去除率分别达到最大, Cd 浓度在 $0.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时最大去除率为 88%,在 $9.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为 95%。测定此时干菌体中 Cd 含量,在溶液 Cd 浓度为 $0.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $9.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分别为 356 , $2914 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

冷冻干燥菌体对重金属的吸附特征可用下述方程描述。一级吸附动力学方程见(1)式:

$$\ln = \left(-\frac{q_t}{q_\infty} \right) - kt \quad (1)$$

式中: q_t 为时刻 t 时的累积吸附量;

q_∞ 为平衡吸附量; k 为吸附速率常数。

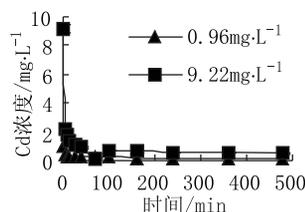


图 3 冷冻干燥后菌体对不同浓度 Cd 的吸附

Figure 3 Adsorption of Cd at different concentrations by lyophilized biomass

由图 2 和图 3 可以看出,吸附反应速率很快,但随着时间的延续,尽管吸附量增大的幅度越来越慢,在实验时间内,并没有观察到某个吸附量不随时间而显著改变的情况,即无法用实验数据直接估算平衡吸附量。因此,可以考虑运用数值方法对实验数据进行非线性拟合,从而确定动力学参数。在拟合过程中,既要使有误差的数据平滑,又要使误差不能在整个数据系列中传播,因此采用 5 点三次多项式(2)来平滑数据,即在每个数据点 (q_i , t_i) 前后各取两点,分别为 (q_{i-2} , t_{i-2})、(q_{i-1} , t_{i-1}) 和 (q_{i+1} , t_{i+1})、(q_{i+2} , t_{i+2}),用三次多项式对这 5 点的数据进行拟合,其中系数 a_1 , a_2 , a_3 , a_4 根据最小二乘法确定,根据(2)式可以计算平滑吸附量,用(3)式可以计算各点的速率:

$$q = a_1 + a_2 t + a_3 t^2 + a_4 t^3 \quad (2)$$

$$v = a_2 + 2 a_3 t + 3 a_4 t^2 \quad (3)$$

当 i 等于 1, 2 时,采用 $i=3$ 的系数,当 i 等于 $n-1$, $n-2$ 时,采用 $i=n-3$ 的系数,一级动力学的微分方程见(4)式。因为 q_i , v_i 已知,则可以通过对 $q_i \sim v_i$ 作直线最小二乘法求算 k , q_∞ 。

$$v_i = \frac{dq_i}{dt} = k(q_\infty - q_i) \quad (4)$$

利用上述实验数据进行非线性回归表明, 菌体对 Cd 的吸附过程的拟合方程在 95% 置信水平上符合一级吸附动力学方程。根据(4)式计算出的菌体不同方式处理以及不同 Cd 浓度下的动力学参数, 见表 1。

由表 1 可知, 菌体进行不同处理后, 对 Cd 的吸附

表 1 菌体不同处理方式和不同 Cd 浓度下的吸附动力学参数
Table 1 Kinetic parameters of adsorption at different cadmium concentrations and by different pretreated biomass

溶液中的初始 Cd 浓度 /mg · L ⁻¹	冷冻干燥处理			烘干处理
	0.96	9.22	51.3	51.7
k/min^{-1}	0.015 7	0.018 1	0.018 5	0.010 0
$q_{\infty}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.828	8.80	46.96	23.85
r	0.965	0.967	0.927	0.990

能力不同, 冷冻干燥处理的菌体吸附性能要好于烘干处理的菌体, 其平均吸附速率常数为 0.017 4 min⁻¹, 而烘干处理的菌体的吸附速率常数为 0.010 0 min⁻¹; 冷冻干燥处理的菌体在不同 Cd 浓度下对 Cd 的去除率均能达 88% 以上, 远远超出烘干处理菌体的去除率(为 47%), 这进一步验证了 2.2.1 的结果。

2.3 pH 对吸附作用的影响

溶液的 pH 可能会影响菌体中多种基团的存在状态和电荷情况以及 Cd 的形态, 是吸附作用的一个重要影响因素。由于 Cd 是一种毒性很强的重金属, 在很低浓度下就有很大毒性, 实际环境中的污染浓度也较低, 多在 1 mg · L⁻¹ 以下, 因此本实验选用在 1.04 mg · L⁻¹ 的 Cd 浓度下研究 pH 值对其吸附 Cd 作用的影响, 以探索其实际应用潜力。

F2 在不同初始 pH(3.24 ~ 8.92) 下吸附 Cd 的影响情况如表 2 所示。该条件下, 溶液中没有 Cd 沉淀物存在, Cd 的减少可认为是被 F2 吸附所致。表 2 数据表明, 吸附效果以初始 pH = 5 ~ 6 间为最佳。多数菌体的吸附能力受 pH 值的影响较大^[7, 10, 11], F2 则与此不同, 在 3 ~ 9 之间的范围内, F2 对 Cd 的去除率变化幅度不是很大, 约在 76% ~ 85% 之间, 而且反应之后, pH 值均变化至 7 左右, 可能该菌体具有明显的酸碱缓冲能力。因为实际环境中的 pH 值一般不会超出此范围, 所以 F2 对 Cd 的吸附能力受环境 pH 值的限

表 2 pH 对 F2 去除溶液中 Cd(浓度为 1.04 mg · L⁻¹) 作用的影响

Table 2 Effect of pH on removal of Cd by F2 in a solutions with cadmium concentration of 1.04 mg · L⁻¹

初始 pH	3.24	4.24	5.46	6.22	7.50	8.38	8.92
最终 pH	6.50	6.80	6.90	7.06	7.12	7.15	7.25
去除率/%	7.69	82.5	84.7	83.8	81.2	78.6	77.7

制作用较小, 这将为该菌在实际应用中提供 1 个较大的优势。

3 结论

从高 Cd 含量的闪锌矿土样中分离到 1 株对 Cd 具有很强抗性和富集能力的茎点霉菌 (Phoma. sp) F2。F2 在液体培养时 4d 内可对培养基中的 Cd 尤其是高浓度 Cd 达到较好的去除效果。此外, 其冷冻干燥处理的菌体在较大的 pH 和 Cd 浓度范围内对溶液中 Cd 的去除率都在 88% 以上, 吸附过程符合一级吸附动力学方程。所以, F2 在去除水体 Cd 污染中具有较大的应用潜力, 而且关于茎点霉菌真菌在重金属污染的治理中未见报道, 本研究为该领域提供了新的材料来源。同时动力学分析和动力学参数的计算为该菌的实际应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Kapoor A, Viraraghavan T. Fungal biosorption – an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review[J]. *Biotechnol Prog*, 1995, 13: 60 – 70.
- [2] Veglio F, Beolchini F. Removal of heavy metals by biosorption: a review [J]. *Hydrometallurgy*, 1997, 44: 302 – 316.
- [3] Yin P H, Yu Q M, Jin B, et al. Biosorption removal of cadmium from aqueous solution by using pretreated fungal biomass cultured from starch waste water[J]. *Wat Res*, 1999, 33 (8): 1960 – 1963.
- [4] Delgado A, Anselmo AM, Novais JM. Heavy metal biosorption by dried powdered mycelium of *Fusarium flocciferum*[J]. *Water Environment Research*, 1998, 70 (3): 370 – 375.
- [5] Viraraghavan T, Yan GY. Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 3: 243 – 249.
- [6] Say R, Denizli A, Arica M Y. Biosorption of cadmium(II), lead (II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Bioresource tech nology*, 2001, 76 (1): 67 – 70.
- [7] Ridvan S, Nalan Y, Adil D. Biosorption of cadmium, lead, mercury, and arsenic ions by the fungus *Penicillium purpurogenum*[J]. *Separation Science and Technology*, 2003, 38 (9): 2039. – .2053.
- [8] 应娇妍, 袁红莉, 李宝珍. 一株茎点霉菌的抗镉机制[J]. *中国环境科学*, 2003, 23(6): 575 – 578.
- [9] Hambuckers – Berhin F. and Remacle J. Cadmium sequestration in cells of two strains of *Alcaligenes eutrophus*[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 1990, 73: 309 – 316.
- [10] Adhiya J, Cai X H, Sayre R T, et al. Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Colloids and Surfaces A: Phys Eng Asp*, 2002, 210 (1): 1 – 11.
- [11] Yee N, Fein J. Cd adsorption onto bacterial surface: A universal adsorption edge? [J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2001, 65(13): 2037 – 2042.