

几株真菌对铊吸附作用的初步研究

孙嘉龙^{1,2}, 肖唐付¹, 宁增平¹, 贾彦龙^{1,3}, 杨 菲¹, 彭景权²

1. 中国科学院 地球化学研究所, 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002;
2. 贵州省环境科学研究设计院, 贵阳 550002; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100049

摘要:铊是13种优先控制的有毒有害重金属元素之一, 研究微生物与铊之间的相互作用有重要的理论意义和应用价值。在黔西南滥木厂铊矿区采集土壤和沉积物, 借助平板筛选法在铊浓度为1000 mg/L水平筛选得到九株高耐受性菌株, 用于真菌对铊的胞外吸附作用实验, 并采用液体发酵法考察真菌对铊的胞外吸附作用, 实验设计了1000 mg/L、1200 mg/L和1500 mg/L三种铊处理水平, 借助ICP-MS检测分析样品的铊含量, 以此计算吸附效率。结果表明, 三种处理水平中, 真菌菌株对铊的吸附效率为4.63%~16.89%, 且随着环境中铊浓度的上升, 菌丝体(或菌丝球)生物量明显减少, 导致吸附效率的下降; 真菌对常量元素如钙、钠、钾的吸附与对铊的吸附呈显著正相关。这表明真菌细胞对钙、钾的吸附方式可能与对铊的吸附方式类似。

关键词:铊; 微生物; 真菌; 吸附

中图分类号: P593 文献标识码: A 文章编号: 1007-2802(2011)03-0341-04

Adsorption of Thallium by Microbes: A Case Study of Fungus

SUN Jia-long^{1,2}, XIAO Tang-fu¹, NING Zeng-ping¹, Jia Yan-long^{1,3},
Yang Fei¹, PENG Jing-quan²

1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Guizhou Institute of Environmental Science Research and Design, Guiyang 550002, China; 3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Thallium is in the thirteen priority heavy metals list of USEPA. It's of great significance to study the interaction between thallium and microbes. At 1000 mg/L Tl level, nine strains with high tolerance of thallium were screened from the Lanmuchang thallium-mineralised area in the southwest Guizhou province, and were applied to adsorption experiments using submerged culture. In the present work involved three treatments of 1000, 1200 and 1500 mg/L Tl concentrations, and the levels of the heavy metals were detected by ICP-MS. The results showed that the rates of Tl being adsorbed varied from 4.63 to 16.89% for the nine strains. The increments of thallium content in the cultures resulted from decreasing of biomass and decreasing of adsorption rates of Tl. The adsorption amount of Tl correlated positively with the adsorption amounts of the major elements, i. e. Ca, K and Na, which could be concluded that the adsorption mechanism of Tl is similar to those of Ca, Na and K.

Key words: thallium; microbe; fungus; adsorption

重金属是对生态环境危害极大的一类污染物, 进入环境后不能被生物降解, 往往参与食物链循环

并最终在生物体内积累, 破坏生物体正常生理代谢活动, 危害人体健康^[1,2]。

收稿日期: 2010-12-05 收到, 2011-01-12 改回

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2009CB426307); 中国科学院知识创新工程重要方向资助项目(kzcx2-yw-135); 国家自然科学基金资助项目(41063005); 贵州省科技基金资助项目金(黔科合J字[2009]2009号)

第一作者简介: 孙嘉龙(1978—), 男, 博士研究生, 从事环境微生物学研究。E-mail: daniel_sjl@163.com.

通讯作者: 肖唐付, 研究员, 从事环境地球化学研究。E-mail: xiaotangfu@vip.gyig.ac.cn.

已有研究^[3-5]表明,一些微生物如细菌、真菌和藻类等对重金属都有很强的吸附能力。在过去十年中,微生物吸附重金属的研究取得很大进展,并且对生物吸附的机理也有了一定了解^[6]。微生物吸附作为处理重金属污染的一项新技术与其他同类技术(如蒸发、沉淀、活性炭吸附、离子交换树脂和电渗析等)相比,有许多优点^[2,7]。因此,微生物吸附技术处理重金属污染有广阔的应用前景,有较好的经济价值和社会效益。由于受自身生理结构和外界环境因素的复合影响,生物吸附剂的吸附机理尚无明确而完整的定论,还需进一步探索和研究^[8]。

铊(Tl)是一种典型有毒有害的重金属。在黔东南铊矿区人群慢性铊中毒的研究中,发现长期食用种植于高铊土壤中的农作物和长期受铊污染的地下水是人群铊中毒的主要途径^[9]。目前,有关微生物对铊的吸附研究还较少。为此,本文以选取铊高耐受性真菌菌株作为研究对象,以探讨真菌对 Tl 的吸附效果及机理。

1 材料与方 法

1.1 铊高耐受性菌株的筛选

本实验培养基选择马丁氏培养基,配方如下:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,孟加拉红(1 mg/mL)3.3 mL,琼脂 20 g。向培养基中添加适量 TlNO_3 (Merck, Germany)后,加去离子水至 1000 mL,用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.4~7.6,分别获得 Tl^+ 浓度为 200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L 和 1000 mg/L 的五组培养基,在 121℃ 下灭菌 30 min 后备用。

用无菌水制备 1×10^4 个/mL 孢子悬液。混匀后,取 0.2 mL 孢子悬浮液均匀涂布于 5 组含铊的平板培养基中,每个处理 3 个重复,26℃ 培养。

1.2 吸附实验

采用液体培养的方式进行微生物对铊的吸附实验。液体培养基选择马铃薯(Potato Dextrose)液体培养基:200 g 马铃薯洗净去皮切成小块,加水 1000 mL,煮沸 30 min,纱布过滤,滤液中加入 20 g 葡萄糖,然后添加适量 TlNO_3 (Merck, Germany),补加去离子水至 1000 mL,最终分别配成 Tl^+ 浓度为 1000 mg/L、1200 mg/L 和 1500 mg/L 的培养液,各取 50 mL 分装入容量为 250 mL 的三角锥形瓶中,121℃ 灭菌 30 min 后取出,冷却后备用。选取未添加 TlNO_3 的培养液作为对照。

将前期筛选得到的 9 株铊高耐受性菌株依次配

制成 1×10^4 个/mL 孢子悬液。混匀后,取 1 mL 孢子悬浮液接入三角瓶中,每个处理均设 3 个平行处理。然后,置于 26℃ 和转速为 250 rpm 的摇床培养。培养结束后,将发酵液用定性滤纸过滤,并用 200 mL 0.05% Twin-80 溶液(这是一种优良的表面活性剂,能起到捕收剂和起泡剂的双重作用)反复冲洗,滤液用以铊及常量元素的检测。收集菌丝体置 80℃ 烘箱内烘干至恒重,用于计算生物量。

1.3 样品中元素测定

滤液中铊含量用 Perkin Elmer 等离子体质谱仪(ICP-MS)检测分析,其他常量元素采用 ICP-OES(Vista MPX 型,美国 Varian 公司)进行测定。通过重复样、空白样和标样的 QA/QC 控制测试,分析结果误差在 95% 置信度水平上均控制在 $\pm 10\%$ 以内;空白样测试结果都低于检测限;标样测试结果与推荐值的误差为 $\pm 10\%$ 。

1.4 吸附率的计算

吸附率的计算公式如下:

$$Q = \frac{C}{C_0} \times 100(\%)$$

式中, Q 为吸附率, C_0 为吸附前溶液中的铊浓度, C 为滤液中的铊浓度。

1.5 数据处理

本实验中得出的数据分析结果均采用 SPSS 11.5 软件完成方差分析和 LSD 法(Least Significant Difference)多重比较。

2 结果与讨论

2.1 铊高耐受性菌株筛选

在菌株初次分离中,总共分离得到真菌、细菌菌株约 200 株^[10],最终在 1000 mg/L 水平下,筛选得到 9 株铊高耐受性真菌菌株(表 1)。

表 1 分离筛选出的铊高耐受性菌株

Table 1 Isolated strains with high tolerance to thallium

菌株代码	分离来源
T01	沉积物,清水河龙潭溶洞水源头下 30 m 处
T02	沉积物,下龙洞水
T03	耕作土
T04	耕作土
T05	清水河岸边耕作土,种植甘蓝
T06	山顶耕作土,种植甘蓝
T07	山顶坡积土
T08	剖面样品,30~60 cm,表层种植甘蓝
T09	剖面样品,180~200 cm,表层种植甘蓝

2.2 铊对不同菌株生长的影响

经液体培养后,以菌丝体为生物量来考察铊对

不同菌株生物量的影响。结果表明(表 2),当铊处理浓度为 0 mg/L 时,9 个菌株均能很好生长,菌丝体干重为 0.1673~1.1942 g,平均 0.4011 g;当铊处理浓度为 1000 mg/L 时,9 个菌株均能较好的生长,菌丝体干重为 0.0782~0.7960 g,平均 0.2900 g;当铊处理浓度达到 1200 mg/L 时,仅有 3 株生长(即 T03、T04 和 T09),且生物量很低,为 0.0490~0.1065 g,平均 0.0693 g;当铊处理浓度达到 1500 mg/L 时,仅有 3 株生长(即 T03、T04 和 T09),且生物量很低,为 0.0195~0.0880 g,平均 0.0393 g。

即使在同一处理浓度水平,菌株 T01~T09 的生长受铊的影响也不尽相同。T03 菌株对铊的耐受能力比其它菌株高很多,这可能是由于菌株之间对铊胁迫的响应机制不同而导致的,其中 T03、T04 和 T09 菌株分别分离自矿区矿渣土和剖面样品(样品中铊含量较高),使其在长期的生长代谢中形成了自己独特的耐受机制。

表 2 不同浓度铊对真菌生长的影响(菌丝体干重)

Table 2 Effects of the different thallium concentrations to the biomass of fungus strains mg/L

菌株	0	1000	1200	1500
T01	0.1986	0.1236	N/A	N/A
T02	1.1673	0.0782	N/A	N/A
T03	1.1942	0.7960	0.1065	0.0880
T04	0.1683	0.0722	0.0490	0.0105
T05	0.1738	0.0959	N/A	N/A
T06	0.1824	0.1216	N/A	N/A
T07	0.1758	0.1172	N/A	N/A
T08	0.1867	0.1111	N/A	N/A
T09	0.1632	0.1088	0.0525	0.0195
平均值	0.4011	0.1805	0.0693	0.0393

注:N/A 表示在 1200 mg/L 和 1500 mg/L 处理中,部分菌株不能生长,故无数据

与对照组相比,各菌株的生物量均有不同程度的下降。当培养液中铊浓度水平从 0 mg/L 上升到 1000 mg/L,生物量下降了 54.99%;当培养液中铊浓度水平从 1000 mg/L 上升到 1200 mg/L,生物量下降了 61.61%;当培养液中铊浓度水平从 1200 mg/L 上升到 1500 mg/L,生物量下降了 43.29%。由此可见,环境铊浓度的升高而菌株生物量则下降,二者呈相关,表明铊对真菌的生长产生了胁迫,影响其正常生理代谢,因此菌丝体减少,生物量下降。

2.3 真菌对铊的吸附特性

2.3.1 不同处理水平对吸附效率的影响 铊的吸附实验结果(表 3)表明,在 1000 mg/L 处理中,各个菌株对铊的吸附率为 8.07%~16.89%,平均

8.90%;在 1200 mg/L 处理中,9 个菌株中仅存 3 株菌株继续生长,各个菌株对铊的吸附率为 7.77%~8.28%,平均 7.97%;在 1500 mg/L 处理中,仅存 3 株菌株继续生长,各菌株对铊的吸附率为 4.63%~6.76%,平均 5.38%。

表 3 不同菌株对铊的吸附效率
Table 3 Adsorption rates of thallium by different strains %

菌株	1000 mg · L ⁻¹	1200 mg · L ⁻¹	1500 mg · L ⁻¹
T01	8.07±1.16 ^B	N/A	N/A
T02	16.9±2.2 ^A	N/A	N/A
T03	8.73±0.27 ^{ab}	7.77±0.73 ^{bb}	6.76±1.20 ^{bb}
T04	10.2±1.7 ^{ab}	8.28±0.22 ^{bb}	4.63±0.30 ^{bb}
T05	9.75±1.18 ^B	N/A	N/A
T06	8.97±0.16 ^B	N/A	N/A
T07	9.39±0.80 ^B	N/A	N/A
T08	9.02±1.21 ^B	N/A	N/A
T09	12.4±0.2 ^{ab}	7.91±0.28 ^{bb}	4.75±0.19 ^{bb}

注:同一行肩标不同小写字母和同一列肩标大写字母表示差异显著(P<0.05)

利用 SPSS 软件对实验数据进行 LSD(Least Significance Difference,最不显著差异法)多重比较分析结果表明,1000 mg/L 处理浓度与 1200 mg/L 处理浓度及 1500 mg/L 处理浓度下铊的吸附效率存在明显的差异,而 1200 mg/L 处理浓度和 1500 mg/L 处理浓度对吸附效率并无明显差异。

有研究表明,青霉属(*Penicillium*)微生物在 100 mg/L Cu⁺ 水平上的吸附率可达到 38%^[3],但本实验中真菌菌株对铊的吸附率仅在 5.38~8.90%。这可能表明真菌菌丝体对重金属离子的吸附可能与其背景浓度值有关系,由于高背景浓度值对真菌生长产生较大的抑制作用,菌丝体产生量小,因此吸附效率也随之下降。

在高铊的生长环境中,当铊浓度水平从 1000 mg/L 上升到 1200 mg/L,菌株对铊的吸附效率则下降了 10.45%;当铊浓度水平从 1200 mg/L 上升到 1500 mg/L,而菌株对铊的吸附效率则下降了 32.75%,这表明外界铊浓度的变化对生物量与吸附效率的影响具有较好的一致性。因此,可以据此推断真菌对铊的吸附主要依赖于菌丝体的表面吸附作用,菌丝体越多,吸附位点越多。

2.3.2 不同菌株对铊的吸附差异 为了考察不同菌株对铊的吸附能力,对实验数据进行了单因素方差分析。分析结果(表 4)表明, F_{0.05} = 3.863, P = 0.003,可见不同菌株对铊的吸附效率有着显著差异。

表 4 不同菌株吸附效率的单因素方差分析表
Table 4 ANOVA analysis of adsorption rates
of thallium by strains

差异源	SS	df	MS	$F_{0.05}$	P
组间变异	167.774	8	20.972	3.836	0.003
组内变异	174.937	32	5.467	—	—
总变异	342.712	40	—	—	—

注:—表示无数值

虽然以上结果表明不同菌株对铊的吸附效率有明显差异,但这不等于表明任何两株菌株间对铊的吸附效率有明显差异。根据 LSD 多重比较分析(表 4),在菌株的吸附差异上,除 T02 外,其余 8 株菌株对铊吸附效率无明显差异,这进一步表明真菌对铊的吸附主要依赖于菌丝体的表面吸附作用。

真菌细胞壁是多层微纤维结构,其组成一般都含有多糖,其次为蛋白质、类脂,它们含有大量氨基、酰胺基、醛基、羟基、硫醇等功能团,能与外界环境中的金属离子发生吸附作用^[11]。在不同类群的真菌中,细胞壁多糖类型不同,对铊的吸附位点也不一样,因此对环境中铊离子的吸附能力也有差异。

2.4 各常量元素与真菌吸附效果的关系

滤液中各常量元素的含量分析结果表明(表 5),真菌对铊的吸附与钙、钾、钠等元素呈明显的正相关,其中真菌对铊的吸附与钙元素呈现高度的正相关性(0.8712)。

表 5 各常量元素与铊的相关系数矩阵
Table 5 Matrix of the correlation coefficients
of Thallium and major elements

	Ca	K	Na	Tl
Ca ($n=42$)	1.0000	0.7316 [⊙]	0.6875 [⊙]	0.8712 [⊙]
K ($n=42$)	0.7316 [⊙]	1.0000	0.9035 [⊙]	0.5755 [⊙]
Na ($n=42$)	0.6875 [⊙]	0.9035 [⊙]	1.0000	0.5373 [⊙]
Tl($n=42$)	0.8712 [⊙]	0.5755 [⊙]	0.5373 [⊙]	1.0000

注:⊙显著水平 $P < 0.01$

真菌对金属离子的吸附主要以离子交换为主,因为真菌细胞壁提供了大量的分子团体以进行离子交换,如羧基、硫酸盐、磷酸盐、胺盐,这些团体对生物吸附起着主要作用。有研究发现,当 pH 很低时,酵母细胞官能团质子化,其吸附 Na、K、Ca、Mg 离子的过程伴随 H 离子释放,其中一价金属 Na、K 主要因质子交换机理被吸附(Na、K 吸附量与 H 离子释放量相当),二价金属 Ca、Mg 的吸附量高于单价金属,吸附机理不限于质子交换^[12]。

基于上述机理,在高铊环境中,真菌细胞壁对铊离子的吸附与钙离子的吸附呈显著正相关,也与其它一价金属如钠与钾呈正相关性(相关系数为 0.9035)。

3 结 论

通过对从铊污染区初筛菌株的铊耐受性实验,最终在 1000 mg/L 水平筛选得到 9 株高耐受性菌株,用于吸附实验。三个梯度的吸附实验表明,真菌菌株对铊的吸附效率为 4.63%~16.89%,且随着环境中铊浓度的上升而降低,这可能是因为铊浓度的升高加大了对真菌生长的抑制作用,所形成的菌丝体(或菌丝球)减少,表面积也相应减少,从而导致了吸附效率的下降。各种常量元素和铊的关系呈显著相关性,钙、钾和钠等常量元素也是真菌赖以维持生存的因子,可能由于真菌细胞对钙、钾的吸附方式与对铊的吸附方式类似。

由于微生物生长还受到处理温度、营养元素等其它条件的影响,因此有必要在此基础上设计正交实验进一步优化吸附条件。此外,鉴于所筛选菌株对铊的富集特性,还有待在铊污染区的土壤修复及矿区废水治理中进行应用研究。

参考文献 (References):

- [1] Ahluwalia S S, Goyal D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(12): 2243—2257.
- [2] Canhoto O F, Magan N. Potential for detection of microorganisms and heavy metals in potable water using electronic nose technology[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18(5—6): 751—754.
- [3] 杜爱雪,曹理想,张仁铎.高抗铜青霉菌的筛选及其对重金属的吸附[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(5): 650—653. Du Aixue, Cao Lixiang, Zhang Renyi. Screening of *Penicillium* strain with high copper resistance and its adsorption of heavy metals[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2008, 14(5): 650—653. (in Chinese with English abstract)
- [4] 徐雪芹,李小明,杨麒,廖德祥,曾光明,张昱,刘精今.丝瓜瓢固定菌青霉吸附废水中 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的机理[J]. *环境科学学报*, 2008(1): 95—100. Xu Xueqin, Li Xiaoming, Yang Qi, Liao Dexiang, Zeng Guangming, Zhang Yu, Liu Jingjin. Biosorption of lead and copper ions by *Penicillium simplicissimum* immobilized on a loofa sponge immobilized biomass[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008(1): 95—100. (in Chinese with English abstract)

(下转第 349 页)

