

抗铅锌功能菌生长菌株和干菌体吸附 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 性能优化及机理分析

李进 冯冲凌* 李科林* 廖佳

(中南林业科技大学 环境科学与工程研究中心 湖南 长沙 410004)

摘要:【目的】针对湖南资兴铅锌矿污染问题, 筛选本土耐性菌株用作生物修复。【方法】供试菌株 J3 筛选自湖南资兴铅锌矿区的尾砂矿渣, 利用正交实验分析其生长菌株及干菌体最佳吸附条件以优化其吸附效果, 同时对相关数据进行动力学拟合以探讨其吸附机理, 最后结合形态观察和 18S rRNA 基因序列分析对其进行分类鉴定。【结果】在最佳条件下, J3 生长菌株对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 的去除率分别为 92.2% 和 87.7%; 干菌体对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 去除率分别为 72.6% 和 23.8%, 反应动力学模型研究表明, 生长菌株吸附过程中吸附速率受重金属浓度影响, 对 Zn^{2+} 吸附主要为颗粒内扩散作用; 干菌体对 Pb^{2+} 吸附推测为膜扩散和颗粒内扩散作用, 而对 Zn^{2+} 的吸附则由膜扩散控制。根据形态特征和系统发育分析, J3 初步鉴定为虫生轮枝菌。【结论】生长菌株吸附效果好于干菌体, 二级动力学方程拟合结果可为生物吸附反应器的设计提供理论参考和实践指导。

关键词: 生长菌株, 干菌体, 吸附, Pb^{2+} , Zn^{2+} , 吸附机理

Biosorption of Pb(II) and Zn(II) by the growing strain/dry biomass of a resistant fungus: optimization and mechanism studies

LI Jin FENG Chong-Ling* LI Ke-Lin* LIAO Jia

(Institute of Environmental Science and Engineering Research, Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to screen lead-zinc tolerant fungus for the bioremediation of heavy metal pollution in Zixing, Hunan. [Methods] The fungus J3 which was isolated from the local tailing of lead-zinc deposit was used. Orthogonal test was carried out for studying adsorption conditions optimization and biosorption mechanism was discussed by kinetics

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(No. 2012BAC09B03); 国家“十二五”科技惠民计划项目(No. 2012GS430203); 湖南省高校科技创新平台开放基金项目(No. 10k082); 湖南省环境科学与工程重点学科建设项目(No. 2310006)

*通讯作者: Tel: 86-731-85623459

✉: 冯冲凌: ddukepet@163.com; 李科林: csfuklli@163.com

收稿日期: 2014-09-18; 接受日期: 2014-11-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-21

simulation. And morphological characteristics and 18S rRNA gene sequence analysis were used for identification. **[Results]** Under the optimal conditions, the results showed that the removal rate of Pb^{2+} and Zn^{2+} by growing strains reached 92.2% and 87.7%, while the removal rate of Pb^{2+} and Zn^{2+} by dry biomass was 72.6% and 23.8%. The results of kinetics study indicated that the absorption by growing strain was affected by the concentration of Pb^{2+} and Zn^{2+} . The intra-particle diffusion was the main rate-controlling step for the adsorption of Zn^{2+} . The adsorption of Pb^{2+} by dry biomass may be affected with membrane diffusion and intra-particle diffusion at the same time. And the adsorption process of Zn^{2+} was controlled by membrane diffusion. According to the morphological characterization and phylogenetic tree, J3 was preliminarily identified as *Verticillium insectorum*. **[Conclusion]** The growing strain had better adsorption effect than the dry. The result which fitted to the second-order equation can provide the basis and guidance for bioreactor settings.

Keywords: Growing strain, Dry biomass, Adsorption, Pb^{2+} , Zn^{2+} , Adsorption mechanism

湖南是有色金属之乡，大量有色金属矿的开采造成了重金属污染加速及污染面积的扩大。其中资兴铅锌矿资源丰富，由于规划布局的不合理及滥采滥挖等因素，造成了严重的生态破坏以及重金属污染。土壤重金属污染威胁着当地的食物安全，污染废水超标排放对当地水质造成了较大影响。因此，当地土壤和水重金属污染修复和研究迫在眉睫，微生物修复因其天然优势而具有巨大的研究价值与应用前景。本土耐性微生物的分离及修复应用在国内外已有不少报道，Park 等^[1]发现细菌可以帮助固定土壤中的铅，Chatterjee 等^[2]的研究表明，分离自铅污染水中的耐性菌株可以有效地修复污染水体。微生物修复重金属可大致分为两种：一是在微生物生长过程中修复重金属，另一种是利用微生物生长完毕后的菌体(一般制为干菌体)作为生物吸附剂进行修复。干菌体吸附在废水的重金属污染治理中应用较多^[3]，然而在重金属污染土壤治理中，活性生长菌株的应用前景广阔。因重金属对活菌的毒害作用，目前对生长菌株吸附重金属研究很少^[4]，干菌细胞(包括活细胞和死细胞吸附)吸附在国内外已经有不少研究^[5-8]，但是由于菌种抗性大小和机理各有不同，所以根据实际需要特异性研究也很有意义。目前极少研究者同时研究生长菌株及干菌体的吸附特性及动力学特征，本实验自湖南资兴铅锌矿区以分离得到一株具有优良抗性及其修复效果的真菌 J3，在单因素实验基础上，设计正交实验进一步优化生长菌株及干菌体的吸附效果，并进行动力学实

验，分别对生长菌株及干菌体进行动力学拟合，探究其吸附机制及速率等，为生长菌株和干菌体在重金属治理不同方面的应用提供条件。

1 材料与方 法

1.1 材料和主要仪器

供试真菌 J3 筛选自湖南资兴铅锌矿区的尾砂矿渣，作为去除重金属的功能菌株。根据需要，培养生长菌株及制备干菌体。基础培养基(g/L)：葡萄糖 10、蛋白胨 5、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5，溶于超纯水；选择培养基：在基础培养基中加入 $Pb(NO_3)_2$ 、 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 调节至所需浓度。固体培养基加琼脂(15–20 g/L)，氢氧化钠和硝酸调节溶液 pH。

干菌体以真空冷冻干燥机(FD-1B-50 北京博医康实验仪器有限公司)进行干燥，重金属含量采用原子吸收光谱仪(AA-7000，岛津制作所)测定。

1.2 菌株的筛选

取 5 g 尾砂矿渣于 45 mL 含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度各 500 mg/L 的液体培养基中，30 °C、120 r/min 摇床培养 3 d，静置后取 1 mL 培养液转接至新鲜液体培养基中，每转接一次 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度以 500 mg/L 递增，直到 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度达到 1 500 mg/L。把每次获得的富集培养物分别接种到含相应浓度铅锌的固体培养基中 30 °C 恒温培养 2–4 d，挑取真菌菌落在基础培养基上反复划线纯化，直至获得纯培养物。

1.3 重金属胁迫下功能菌株生长曲线的测定

将功能菌株接入含 100 mg/L Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的培养

基中培养, 每天取样至生长停滞, 以菌体干重绘制生长曲线。

1.4 生长菌株的培养及干菌体的制备

生长菌株吸附试验根据需要在液态选择培养基中连续培养; 干菌体是菌株在基础培养基中培养完毕后, 过滤, 冷冻干燥, 制成颗粒均匀的菌球备用。

1.5 生长菌株及干菌体吸附效果的优化

根据生长菌株及干菌体吸附单因素实验结果, 分别选取各个单因素(pH、铅锌离子浓度、生长/培养时间、接种量/菌量)中去除率较好的 3 个水平, 设计正交试验。正交试验采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交表, 以吸附率为指标进行最佳条件的确定。生长菌株及干菌体正交试验中 pH 值和 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 浓度(mg/L)设计相同, 其他设计见表 1。

生长菌株吸附试验按正交表设计, 吸取一定量的菌悬液加入到含铅离子和锌离子的液体培养基中, 振荡培养过滤, 滤液消解后, 采用原子吸收分光光度计(AA-7000 型)测定重金属含量。干菌体实验同样根据表 1, 投加一定量冷冻干燥后的菌体到含铅锌离子的溶液中, 过滤后测定重金属含量。吸附反应均设置 3 个平行样、1 个金属空白样(不加菌体)。

重金属去除率的计算^[6]: $\eta = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100\%$; 吸附量的计算: $q_t = (C_0 - C_e) \times V / M$

式中, C_0 为菌处理前重金属浓度(mg/L); C_e 为

菌处理后重金属浓度(mg/L), V 为反应溶液的体积(L); M 为吸附菌体的干重(g)。

1.6 动力学实验

为了研究菌体吸附的时间过程, 对生长菌株和干菌体分别进行动力学实验。生长菌株实验接种 1 mL 的菌悬液到含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度为 100 mg/L 的培养基中, 定时过滤取样直至其达到生长平衡, 取样时间分别为 72、96、120、144、168、192 h。干菌体添加 0.2 g (根据 J3 同体积下培养基中最终生物量确定)到含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度为 100 mg/L 的溶液中, 过滤取样, 取样时间为 1、2、4、6、8、10 h。不同时间取样后, 用 ICP-OES 测定滤液中的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度。

研究中所涉及的反应动力学模型见表 2, 其中 k_1 、 k_2 、A、B 为模型参数; t 为反应时间; q_t 为 t 时间的吸附量; q_e 为反应达到平衡的吸附量。

1.7 菌种鉴定

为确定其分类学地位, 对 J3 菌株进行形态观察并进行 18S rRNA 基因序列同源性分析。菌株采用真菌通用引物 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3') 和 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') 进行 PCR 扩增, 由上海美吉生物医药有限公司完成纯化测序, 测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析, 利用 Clustal 和 MEGA 3.0 软件, 构建系统发育树。

表 1 J3 生长菌株/干菌体吸附 $L_9(3^4)$ 正交实验设计
Table 1 Sheet of $L_9(3^4)$ orthogonal test of growing/dry J3

水平 Level	因素 Factors			
	pH 值 pH value	浓度 Concentration (mg/L)	时间(生长菌株/干菌) Time (Growing strain/Dry biomass, d/h)	接种量/菌量(生长菌株/干菌) Inoculation amount/biomass dose (mL/g, Growing strain/Dry biomass)
1	4.0	75	6/4	1/0.2
2	5.0	100	7/6	2/0.4
3	6.0	125	8/8	3/0.6

注: 生长菌株生长时间单位为天(d), 干菌体振荡时间为小时(h); 生长菌株接种量单位为毫升(mL), 干菌体添加量单位为克(g)。

Note: The unit time for growing strain and dry biomass was day (d) and hour (h), and the unit of inoculation amount and biomass dose was mL and g, respectively.

表 2 反应动力学方程模型

Table 2 Equation models of reaction kinetics

方程名称 Equation models	方程的线性形式 Equation of linear forms
一级动力学方程 First-order kinetics equation	$\ln(q_t - q_e) = \ln q_e - k_1 t$
二级动力学方程 Second-order kinetics equation	$t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e$
颗粒内扩散方程 Intra-particle diffusion model	$q_t = A + Bt^{1/2}$
Elovich 方程 Elovich equation	$q_t = A + B \ln t$

2 结果与讨论

2.1 功能真菌的筛选

从每次获得的富集培养物中共分离得到 7 株耐性真菌，将纯化后的耐性菌株接种到含 Pb²⁺、Zn²⁺ 100 mg/L 的选择液体培养基中，待生长完毕后分别测其去除率，比较其去除率的大小及生长状况，初步筛选，再进行单因素试验，因 J3 生长菌株在 Pb²⁺ 浓度为 300 mg/L 时去除率仍能达到 90.0%，确定 J3 为供试功能菌株。

2.2 重金属胁迫下功能菌株的生长曲线

由图 1 可知，J3 菌株生长较为缓慢，1-5 d 为延滞期，其中第 1-2 天生物量几乎没有增加，第 3 天开始缓慢生长，第 5 天进入生长对数期，第 8 天达到生长平衡，9 d 以后进入衰亡期，菌丝球老化变黄，液体培养基变得比较浑浊。1-7 d，铅锌离子去除率随着 J3 的生物量增加而逐渐增大，第 6 天铅离子去除率迅速增长到 70.0%，第 7 天时锌离子去除率达到最大，生长第 8 天，铅离子去除率达到 90.0% 左右。

2.3 生长菌株及干菌体吸附效果的优化结果分析

采用 L₉(3⁴) 正交表，对影响 J3 去除效果的 pH 值、重金属初始浓度、菌量、吸附时间 4 个因素进行优化，得出 J3 去除 Pb²⁺、Zn²⁺ 最佳条件及分析各因素对其影响程度。生长菌株及干菌体正交实验结果见表 3，方差分析结果见表 4。

通过表 3 数据分析可知，J3 生长菌株去除 Pb²⁺ 的最佳条件为：当 pH 值为 6.0 时，向 125 mg/L Pb²⁺

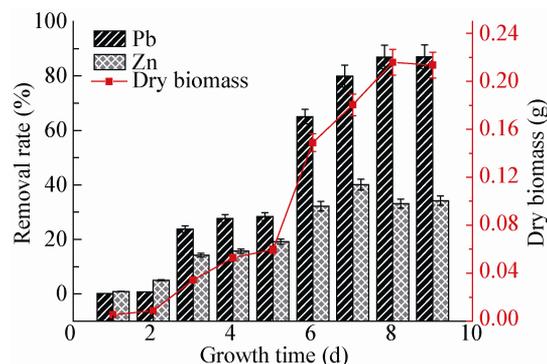


图 1 重金属胁迫下 J3 菌株生长曲线

Figure 1 The growth curve of J3 under heavy metal stress

溶液中接种 3 mL 菌悬液，培养时间为 7 d；去除 Zn²⁺ 的最佳条件为：当 pH 值为 6.0 时，向 125 mg/L Zn²⁺ 溶液中接种 2 mL 菌悬液，培养时间为 8 d。由表 4 可知，在生长菌株正交试验中，Pb²⁺ 浓度是影响 J3 菌株 Pb²⁺ 去除的显著因素，4 个影响因素的影响程度的大小为：Pb²⁺ 的初始浓度 > 培养时间 > 接种量 > pH；Zn²⁺ 浓度是影响 J3 菌株 Zn²⁺ 去除的显著因素，4 个影响因素的影响程度的大小为：Zn²⁺ 的初始浓度 > pH > 接种量 > 培养时间。

由表 3 可知，J3 干菌体吸附 Pb²⁺ 的最佳条件为：当 pH 值为 6.0 时，向 100 mg/L Pb²⁺ 溶液中投加 0.6 g 干菌体，振荡时间为 8 h；吸附 Zn²⁺ 的最佳条件为：当 pH 值为 6.0 时，向 125 mg/L Zn²⁺ 溶液中投加 0.4 g 干菌体，振荡时间为 6 h。干菌体正交实验方差分析显示，菌量是影响 J3 干菌体吸附 Pb²⁺ 的极显著因素，pH、吸附时间是影响吸附 Pb²⁺ 的显著因素，4 个影响因素的影响程度的大小为：菌量 > pH > 吸附时间 > Pb²⁺ 的初始浓度；Zn²⁺ 浓度是影响 J3 干菌体吸附 Zn²⁺ 的极显著因素，pH 是影响吸附 Zn²⁺ 的显著因素，4 个影响因素的影响程度的大小为：Zn²⁺ 的初始浓度 > pH > 吸附时间 > 菌量。

通过对最佳条件下的吸附情况的验证试验，发现在最佳条件下，J3 生长菌株对 Pb²⁺ 的去除率达到 92.2%，吸附量为 43.9 mg/g，Zn²⁺ 的去除率为 87.7%，吸附量为 34.4 mg/g；干菌体对 Pb²⁺ 去除率为 72.6%，

表3 J3 生长菌株及干菌体正交实验结果
Table 3 The result of orthogonal test of growing or dry J3

实验号 Number	pH	浓度 Concentration (mg/L)	时间 Time (d/h)	接种量/菌量 Inoculation amount/ Biomass dose (mL/g)	生长菌株去除率		干菌体去除率	
					The removal rate of growing strain (%)		The removal rate of dry biomass (%)	
					Pb ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
1	4.0	75	6/4	1/0.2	86.4	45.1	13.4	5.9
2	4.0	100	7/6	2/0.4	89.9	71.0	33.8	14.5
3	4.0	125	8/8	3/0.6	90.8	71.1	62.6	20.0
4	5.0	75	7/6	3/0.6	88.7	45.6	47.2	7.1
5	5.0	100	8/8	1/0.2	87.8	67.5	23.2	13.3
6	5.0	125	6/4	2/0.4	91.4	69.8	30.8	19.9
7	6.0	75	8/8	2/0.4	87.0	70.3	67.5	8.2
8	6.0	100	6/4	3/0.6	90.4	74.7	73.8	14.6
9	6.0	125	7/6	1/0.2	91.9	85.7	28.8	21.9
K1	89.04	87.35	89.40	88.68				
K2	89.28	89.35	90.16	89.47				
K3	89.78	91.40	88.55	89.95				
R	0.73	4.05	1.61	1.27				
K1	62.41	53.65	63.23	66.09				
K2	60.96	71.07	67.40	70.37				
K3	76.88	75.52	69.62	63.79				
R	15.92	21.87	6.40	6.58				
K1	36.61	42.69	39.33	21.81				
K2	33.73	43.60	36.61	44.03				
K3	56.67	40.72	51.07	61.17				
R	22.94	2.88	14.46	39.36				
K1	13.47	7.18	13.48	13.70				
K2	13.56	14.15	14.64	14.21				
K3	14.90	20.59	13.80	14.01				
R	1.43	13.41	1.15	0.51				

吸附量为 12.1 mg/g, Zn²⁺ 的去除率为 23.8%, 吸附量为 6.0 mg/g。在表 4 的方差分析中, 铅锌离子浓度虽然是影响生长菌株去除率的显著因素, 但显著性较低, 其他 3 个因素影响都不显著, 说明了生长菌株去除效果的稳定性。干菌体菌量是影响 Pb²⁺ 吸附的极显著因素, 吸附最优条件为投加菌量的最大化, 说明干菌体 Pb²⁺ 吸附与吸附位点的数量有关, 菌量的增加意味着吸附位点的增加^[9-10], 在重金属

浓度条件一定的情况下, 提高菌体与重金属的浓度比, 只要吸附未饱和, 去除率便会增大^[11]。干菌体 pH 也是影响其吸附 Pb²⁺ 的较显著因素, 吸附的最佳 pH 值为 6.0, 较低的 pH 不利于干菌体的吸附作用, 这与 Carlos 等^[12]和 Wang 等^[13]报道结果相一致。干菌体 Zn²⁺ 吸附主要受离子浓度和 pH 影响, 但其去除率相对很低, 或许 Pb²⁺、Zn²⁺ 有竞争吸附作用或 J3 菌株上存在选择吸附受体^[14]。

表4 J3生长菌株及干菌体吸附 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的方差分析表
Table 4 The analysis of variance on absorption of Pb^{2+} , Zn^{2+} by growing or dry J3

	因素 Factors	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	F比 F value	F临界值 F critical value	显著性 Significance
生长菌株(Pb^{2+}) Growing strain (Pb^{2+})	pH	0.84	2	1.00	9	
	Pb^{2+} 浓度	24.56	2	29.24	9	*
	时间	3.89	2	4.63	9	
	接种量	2.48	2	2.95	9	
	误差	0.84	2			
生长菌株(Zn^{2+}) Growing strain (Zn^{2+})	pH	464.96	2	7.35	9	
	Zn^{2+} 浓度	801.56	2	12.67	9	*
	时间	63.28	2	1.00	9	
	接种量	66.99	2	1.06	9	
	误差	63.28	2			
干菌体(Pb^{2+}) Dry biomass (Pb^{2+})	pH	937.34	2	72.09	9	*
	Pb^{2+} 浓度	13.00	2	1.00	9	
	吸附时间	354.37	2	27.25	9	*
	菌量	2 337.06	2	179.73	9	**
	误差	13.00	2			
干菌体(Zn^{2+}) Dry biomass (Zn^{2+})	pH	3.81	2	9.51	9	*
	Zn^{2+} 浓度	269.88	2	673.08	9	**
	吸附时间	2.13	2	5.30	9	
	菌量	0.40	2	1.00	9	
	误差	0.40	2			

2.4 生长菌株及干菌体对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 吸附的动力学特性

吸附过程的动力学研究主要是用来描述吸附剂吸附质的速率快慢,通过动力学模型对数据进行拟合,从而探讨其吸附机理。Arica 等^[15]研究发现,可以用一级和二级动力学速率方程描述活性和非活性 *Funalia trogii* 吸附 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 离子的过程,其相关系数均在 0.962 以上,黄飞^[4]对生长中的活菌进行动力学方程拟合,发现一级动力学模拟相关系数 R^2 都大于 0.95,而且预测的平衡吸附量 q_e 非常接近实验值,二级动力学相关系数 R^2 都大于 0.99; Bai 等^[16]对生长中的菌株进行一级动力学与二级动力学方程拟合,发现二级动力学方程的拟合度高于一级动力学模型。本研究对于生长菌株及干菌体分别进行了几种动力学方程拟合,以探索生长菌株与干菌体在吸附动力学方面的特点。生长菌株及干菌体对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的吸附动力学数据与几种方

程的拟合见表 5。

表 5 反应了生长菌株及干菌体吸附动力学数据与几种方程的拟合情况,生长菌株及干菌体作吸附剂时,准二阶模型铅锌离子吸附相关系数均在 0.93 以上,说明二级动力学模型可以描述生长菌株及干菌体吸附过程,二级动力学方程揭示出吸附过程包含多个步骤的反应,这些反应中可能是物理吸附,也可能是化学吸附,还有可能是生物代谢型吸附,它表达了多重吸附机理的复合效应^[17-18]。

除二级动力学方程外,生长菌株吸附动力学数据与一级动力学方程拟合的相关系数也达到显著水平,由于一级动力学方程是基于反应物浓度与反应速度之间调控关系的方程,说明在生长菌株的吸附过程中,溶液中重金属的浓度一定程度上影响吸附反应,这与正交试验中方差分析结果相一致,但由于生长菌株的吸附时间较长,平衡吸附容量难以确定,因此一级动力学方程有一定的局限性。生长

表5 J3 生长菌株及干菌体吸附 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 动力学模型拟合
Table 5 Fitting of kinetic functions for absorption of Pb^{2+} , Zn^{2+} by growing or dry J3

反应动力模型 Equation models of reaction kinetics	拟合方程(Pb^{2+}) Fitted equation (Pb^{2+})	R^2	拟合方程(Zn^{2+}) Fitted equation (Zn^{2+})	R^2
生长菌株 Growing strain	$\ln(q_t - q_e) = \ln q_e - k_1 t$ $t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e$ $q_t = A + Bt^{1/2}$ $q_t = A + B1nt$	$y = -0.458 8x + 4.509 7$ $y = 0.029 7x - 0.039 5$ $y = -23.108 0x + 103.620 0$ $y = -26.512 0x + 93.909 0$	$y = -0.357 5x + 4.392 6$ $y = 0.085 8x - 0.226 0$ $y = -23.124 0x + 81.659 0$ $y = -25.758 0x + 70.669 0$	0.933 1 0.950 5 0.833 5 0.877 4
干菌体 Dry biomass	$\ln(q_t - q_e) = \ln q_e - k_1 t$ $t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e$ $q_t = A + Bt^{1/2}$ $q_t = A + B1nt$	$y = -0.315 2x + 2.354 2$ $y = 0.036 3x + 0.023 5$ $y = 2.883 8x + 17.115 0$ $y = 2.607 1x + 19.707 0$	$y = -0.149 7x + 0.342 4$ $y = 0.126 3x + 0.022 1$ $y = -0.131 0x + 8.040 8$ $y = -0.155 8x + 7.974 6$	0.930 6 0.930 4 0.971 2 0.961 4 0.263 0 0.967 6 0.018 9 0.030 1

菌株二级动力学方程拟合相关系数大于一级动力学方程，并且一级动力学方程拟合平衡吸附量与实测值相差较大，所以反应物浓度并不是控制其吸附反应的决定因素。在生长菌株的锌离子吸附动力学拟合中，其对 Zn^{2+} 的吸附数据与颗粒内扩散方程、一级动力学方程及 Elovich 方程拟合相关性都达到显著水平，其拟合相关性是：颗粒内扩散方程 > Elovich 方程 > 二级动力学方程 > 一级动力学方程，这说明 Zn^{2+} 在颗粒内部的扩散决定反应速度，但同时吸附过程可能是反应速率与扩散因子调控的非均相扩散过程，这反映了生长菌株吸附机理存在多重复合效应。干菌体一级动力学方程拟合相关系数不显著，因此重金属浓度对其吸附反应速度影响不大。由 Ozer 等^[19] 动力学研究可知，吸附过程包括 3 个步骤，首先是重金属离子通过溶液扩散到菌体表面(液膜扩散)，其次是重金属离子在菌体内部的扩散(颗粒扩散)，然后是吸附反应阶段。一般来说，如果吸附反应速率很快，总吸附速率由膜扩散、内扩散或两者共同控制，干菌体吸附是一个相对较快的过程，而且 Pb^{2+} 吸附数据与颗粒内扩散方程相关系数也达到显著水平，拟合方程不过原点，说明干菌体 Pb^{2+} 吸附反应由膜扩散及颗粒内扩散共同控制， Zn^{2+} 颗粒内扩散不明显，吸附速率或为膜扩散作用决定。

根据上述方程对本实验数据的拟合结果，无论是生长菌株还是干菌体，二级动力学方程均能较好

地模拟吸附 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的过程。根据二级动力学方程的表达式，以 t/q_t 对时间 t 作图，见图 2 和图 3，根据图 2 和图 3 中直线的斜率和截距，求出动力学方程的参数见表 6。

由表 6 可以看出，二级动力学方程拟合常数中生长菌株 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 的平衡吸附量分别为 33.7 mg/g 和 11.7 mg/g，根据动力学实验结果，其实测平衡吸附量 Pb^{2+} 为 40.3 mg/g、 Zn^{2+} 为 16.0 mg/g，稍高于二级动力学方程拟合值，这反映出活性生物系统的复杂性。干菌体平衡吸附量(Pb^{2+} 27.6 mg/g、 Zn^{2+} 7.9 mg/g) 则与实测值(Pb^{2+} 26.4 mg/g、 Zn^{2+} 7.9 mg/g) 十分接近，与二级动力学方程的拟合优于生长菌株。表 6 中生长菌株拟合结果 k_2 为负值，说明吸附过程十分缓慢，这可能与其生长周期长有关，推测化学吸附在整个吸附过程中可能起到了主导作用，比如发生表面络合和酶促反应等^[20]，而且生长菌株重金属去除过程同时还伴随生物代谢。综合分析，无论是生长菌还是干菌体，二级动力学方程都可以大致确定其平衡吸附量、金属离子吸附率、速率常数及初始吸附速率，为生物吸附反应器的设计提供依据。

2.5 菌种鉴定

J3 菌株在基础培养基上生长较慢，菌落凸起，菌丝致密。正面初期呈白色，生长后期菌落颜色泛黄，菌落背面为红色。生长 14 d 后菌落直径约为 3.5 cm，边缘整齐，背部脊状线明显。菌丝为有隔菌丝，孢子呈柱状或棒状。

18S rRNA 基因序列测序结果表明，菌株 J3 与 *Verticillium insectorum*、*Paecilomyces fumosoroseus* 的序列一致性均为 100%，可判定 J3 为轮枝菌属或拟青霉属，根据 GenBank 比对结果及先后顺序，初步判定为虫生轮枝孢(*Verticillium*

insectorum)。菌株 J3 的系统发育树见图 4。因基因库中与 J3 同源性较高的菌种均为虫生真菌，因此 J3 除抗重金属外，极可能兼有抗虫属性，但有待进一步研究，这为 J3 的实际应用提供了更广泛的空间。

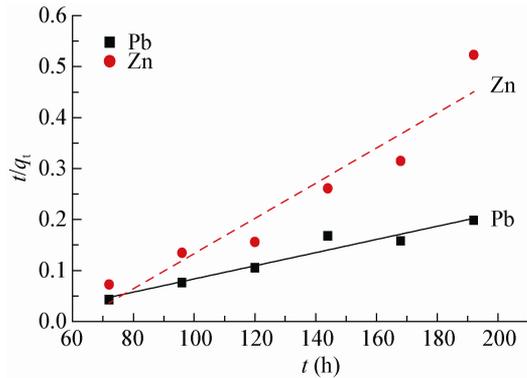


图 2 生长菌株对铅、锌离子吸附的二级动力学模型
Figure 2 Second-order equation for growing strain

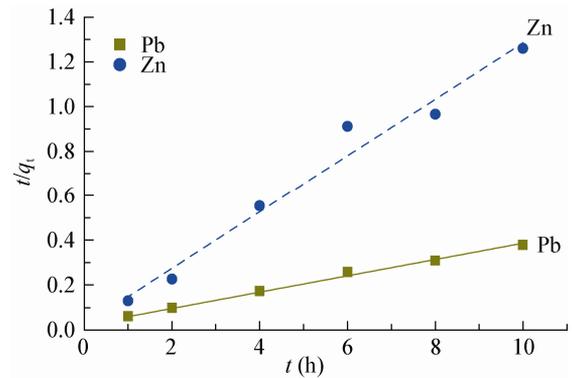


图 3 干菌体对铅、锌离子吸附的二级动力学模型
Figure 3 Second-order equation for dry biomass

表 6 J3 生长菌株及干菌体对铅锌离子吸附的二级动力学常数
Table 6 Second-order equation constants for growing or dry J3

二级动力方程 Second-order equation	生长菌株 Growing strain		干菌体 Dry biomass	
	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺
q _e (mg/g)	33.7	11.7	27.6	7.9
k ₂ (g/(mg·h))	-0.022	-0.033	0.056	0.016
R ²	0.950 5	0.930 4	0.991 7	0.967 6

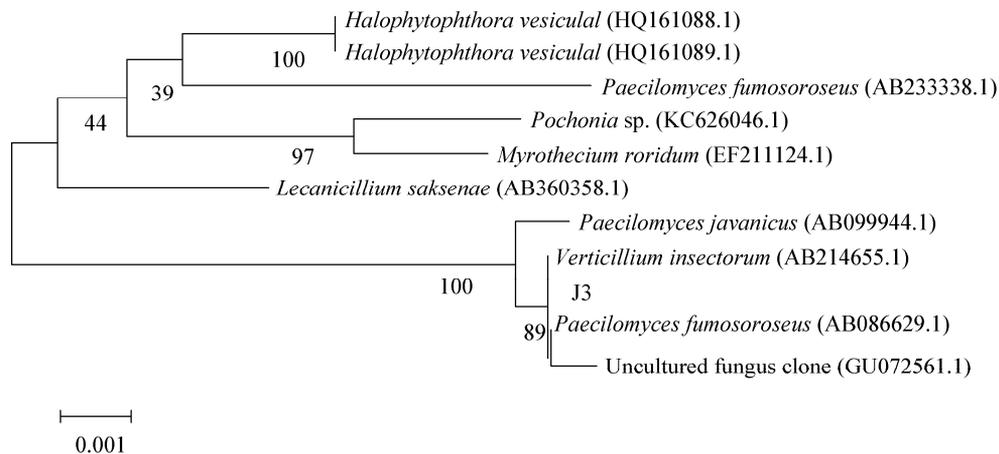


图 4 依据 18S rRNA 基因序列构建的 J3 及相关种的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of J3 and some related species based on 18S rRNA gene sequences

注：括号中的序号表示 GenBank 登录号；树枝上的数字表示 Bootstrap 值；标尺表示分支长度。

Note: The numbers in parenthesis represent GenBank accession numbers. The numbers on each branch indicate the bootstrap values (1 000 bootstrap replicates). The scale bar defines branch length.

3 结论

(1) 分离筛选出一株高抗铅锌真菌作为微生物修复的功能菌, 初步鉴定为虫生轮枝菌(*Verticillium insectorum*)。

(2) J3 生长菌株去除 Pb^{2+} 的最佳条件为: 当 pH 值为 6.0 时, 向 125 mg/L Pb^{2+} 溶液中接种 3 mL 菌悬液, 培养时间为 7 d; 去除 Zn^{2+} 的最佳条件为: 当 pH 值为 6.0 时, 向 125 mg/L Zn^{2+} 溶液中接种 2 mL 菌悬液, 培养时间为 8 d。 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度是影响生长菌株去除率的显著因素。在最佳条件下, J3 生长菌株对 Pb^{2+} 的去除率达到 92.2%, 吸附量为 43.9 mg/g; Zn^{2+} 的去除率为 87.7%, 吸附量为 34.4 mg/g。

(3) J3 干菌体吸附 Pb^{2+} 的最佳条件为: 当 pH 值为 6.0 时, 向 100 mg/L Pb^{2+} 溶液中投加 0.6 g 干菌体, 振荡时间为 8 h; 吸附 Zn^{2+} 的最佳条件为: 当 pH 值为 6.0 时, 向 125 mg/L Zn^{2+} 溶液中投加 0.4 g 干菌体, 振荡时间为 6 h。菌量、pH、吸附时间分别是影响 J3 干菌体吸附 Pb^{2+} 的极显著因素和显著因素, Zn^{2+} 浓度、pH 分别是影响其吸附锌离子的极显著和显著因素。最佳条件下, 干菌体对 Pb^{2+} 去除率为 72.6% 吸附量为 12.1 mg/g Zn^{2+} 的去除率为 23.8%, 吸附量为 6.0 mg/g。

(4) 生长菌株对铅锌离子去除效果好于干菌体。生长菌株吸附过程中吸附速率受重金属浓度影响, Zn^{2+} 吸附主要为颗粒内扩散作用; 干菌体 Pb^{2+} 吸附推测为膜扩散和颗粒内扩散共同作用, Zn^{2+} 吸附速率则由膜扩散控制。二级动力学方程可为生物吸附反应器的设计提供依据。

本研究从实际应用角度出发, 优化功能菌 J3 生长菌株和干菌体最佳吸附条件, 研究生长菌株和干菌体吸附性能与特点, 并从动力学方面研究其吸附机理, 值得注意的是, 干菌体吸附机理研究比较成熟, 一般认为死细胞或非活性细胞主要受细胞表面组分和性质影响, 通过物理化学机制来去除重金属离子。然而生长菌株去除重金属是一个生物过程, 动力学模型从整个吸附过程中的行为状态来描

述其吸附过程, 但是其去除机理如菌体表面的官能团及代谢产物等与重金属离子怎样发生反应, 有哪些物理化学作用, 重金属胁迫下菌体发生了哪些变化, 这些生物物理化学反应怎样相互或联合作用从而达到去除效果, 都需要进一步的探索。此外, 生长菌株还应研究其是否具有抗虫作用, 抗虫种类及抗性大小, 以拓展其应用空间。

参考文献

- [1] Park JH, Bolan N, Megharaj M, et al. Bacterial-assisted immobilization of lead in soils: implications for remediation[J]. *Pedologist*, 2011, 5: 162-174
- [2] Chatterjee S, Mukherjee A, Sarkar A, et al. Bioremediation of lead by lead-resistant microorganisms, isolated from industrial sample[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, 3(3): 290-295
- [3] Zhou W. Study on screening of tolerant - lead & zinc strains and its adsorption capability[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [4] 周薇. 耐铅锌微生物的筛选及吸附性能的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2009
- [5] Huang F. Study on the removal of Cd(II) from aqueous solutions by *Bacillus cereus* RC-1: biosorption characteristics and mechanism[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2013 (in Chinese)
- [6] 黄飞. 蜡状芽孢杆菌对水体中镉的吸附特性与机理研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2013
- [7] Olak F, Atar N, Yazicioğlu D, et al. Biosorption of lead from aqueous solutions by *Bacillus* strains possessing heavy-metal resistance[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 173(2): 422-428
- [8] Yin H, He B, Peng H, et al. Removal of Cr(VI) and Ni(II) from aqueous solution by fused yeast: study of cations release and biosorption mechanism[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 158: 568-576
- [9] Pagnanelli F, Viggi CC, Toro L. Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: biosorption versus bioprecipitation[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9): 2981-2987
- [10] Liu YG, Feng BY, Fan T, et al. Study on the biosorption of heavy metals by fungi[J]. *Journal of Hunan University (Natural Science Edition)*, 2008, 35(1): 71-74 (in Chinese)
- [11] 刘云国, 冯宝莹, 樊霆, 等. 真菌吸附重金属离子的研究[J]. *湖南大学学报: 自然科学版*, 2008, 35(1): 71-74
- [12] Du LN, Wang B, Li G, et al. Biosorption of the metal-complex dye Acid Black172 by live and heated biomass of *Pseudomonas* sp. strain DY1: kinetics and sorption mechanisms[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012(205/206): 47-54
- [13] Lin Y, Wang X, Wang B, et al. Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinciresistens*, a novel actinomycete[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 77: 7-17
- [14] Çigdem A, Özcan AS, Erdoğan Y. Characterization of *Punica granatum* peels and quantitatively determination of its biosorption behavior towards lead(II) ions and Acid Blue 40[J].

- Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 100: 197-204
- [12] Green-Ruiz C, Rodriguez-Tirado V, Gomez-Gil B. Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3864-3870
- [13] Wang BE, Hu YY, Xie L, et al. Biosorption behavior of azo dye by inactive CMC immobilized *Aspergillus fumigatus* beads[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(4): 794-800
- [14] Liu YX, Yang YL, Liu YX. Screening of microbe tolerant of lead and zinc ions and its adsorption capability[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(4): 126-129 (in Chinese)
刘永霞, 杨友联, 刘永翔. 耐铅锌离子微生物的筛选及其吸附特性[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(4): 126-129
- [15] Arica MY, Bayramoglu G, Yilmaz M, et al. Biosorption of Hg²⁺, Cd²⁺, and Zn²⁺ by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia troglitii*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2004, 109(1/3): 191-199
- [16] Bai HJ, Zhang ZM, Yang G, et al. Bioremediation of cadmium by growing *Phodobacter sphaeroides*: kinetics characteristic and mechanism studies[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(16): 7716-7722
- [17] Fan T, Liu YG, Feng BY, et al. Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: isotherms, kinetics and thermodynamics[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 160(2/3): 655-661
- [18] Liang S. Study on preparation of chemically modified adsorbents and their adsorption behavior for heavy metal ions[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Central South University, 2012 (in Chinese)
梁莎. 化学改性生物吸附剂合成及其对重金属离子吸附行为研究[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2012
- [19] Ozer A, Ozer D, Ekiz H. The equilibrium and kinetic modelling of the biosorption of copper(II) ions on *Cladophora crispata*[J]. Adsorption-Journal of the International Adsorption Society, 2004, 10(4): 317-326
- [20] Kadukova J, Vircikova E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption[J]. Environment International, 2005, 31(2): 227-232

2015 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	第二届国际重症休克与脓毒症高峰论坛	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	3 月底	1500 人	广东 广州	张庆红 010-66867382 z_qinghong@aliyun.com
2	全国“发酵工程课程研讨会”	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	4 月	120	上海	夏建业 jyxia@ecust.edu.cn
3	兽医微生物教学研讨	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	5 月	30	山东 泰安	13683505108
4	《海洋生物高技术丛书》分册 5 : 海洋微生物资源开发利用审稿会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	5 月	30	山东 青岛	焦炳华
5	第六届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物专业委员会	6 月	300	待定	吕相征 lvxz@cma.org.cn
6	第十五届微生物学教学和科研及成果产业化研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会和普通微生物学专业委员会联合主办	7 月	200	新疆乌 鲁木齐	努尔古丽·热合曼 nurgulum@163.com
7	第三届全国昆虫-微生物联合转化有机废弃物机制及资源化利用研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7 月	150	山东 泰安	刘玉升 ysl8877@163.com
8	全国酶工程学术研讨会	酶工程专业委员会	7-8 月	200	待定	
9	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8 月	150	北京	010-53218310
10	第 12 届全国海洋药物论坛	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	200	浙江 舟山	林文瀚 13701285168
11	第 7 届全国微生物资源学术暨国际微生物系统与分类学研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	8 月 25-30 日	400	浙江 杭州	阮志勇 010-82108651-620 许学伟 0571-81963208