

## 用 EDTA 法研究镰刀菌胞内、胞外 $Pb^{2+}$ 的分布特征

吴泮 郝瑞霞\* 鲁安怀 杨诗琴 姜源

(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)

**摘要:**【目的】建立一种方便、快捷、相对准确、能够定量地测定镰刀菌细胞内、外  $Pb^{2+}$  分布的技术手段。【方法】用 EDTA 溶液浸泡镰刀菌细胞,使其胞外(表面)  $Pb^{2+}$  被螯合、洗脱并测定,之后将被浸泡、清洗过的细胞消解、测铅。【结果】EDTA 可以将镰刀菌表面的  $Pb^{2+}$  螯合,且在 99 min 内不损伤镰刀菌细胞;以 EDTA 为反应介质和滴定剂, XO 为指示剂,测定镰刀菌胞内、胞外  $Pb^{2+}$  分布是可行的。依据此实验方法,测定了镰刀菌在  $Pb^{2+}$  浓度为 500 mg/L 的培养基中的生长曲线、培养基中  $Pb^{2+}$  浓度和细胞内、外  $Pb^{2+}$  的含量。【结论】镰刀菌固定  $Pb^{2+}$  的过程是先将  $Pb^{2+}$  吸附在菌体胞外,之后转运至细胞内部,菌体胞外  $Pb^{2+}$  的容纳量是有限的,每克菌体胞外  $Pb^{2+}$  饱和和吸附量约 1.37 mg,通过计算可得,每克菌体用于吸附  $Pb^{2+}$  的胞外活性位点约  $3.97 \times 10^{18}$  个。

**关键词:** 络合滴定, 乙二胺四乙酸, 镰刀菌, 铅离子含量, 胞内, 胞外

## Distribution characteristics of intracellular and extracellular lead of strain (*Fusarium* sp.) determined by EDTA method

WU Feng HAO Rui-Xia\* LU An-Huai YANG Shi-Qin JIANG Yuan

(The Laboratory of Orogenic Belts and Crustal Evolution, School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

**Abstract:** [Objective] To establish a kind of technology which is able to measure the distribution of the intracellular and extracellular  $Pb^{2+}$  of *Fusarium* sp.. [Methods] Soaked the mycelium pellet in EDTA solution to elute and measure the extracellular  $Pb^{2+}$ , then digested the soaked mycelium pellet to measure the intracellular  $Pb^{2+}$ . [Results] EDTA can elute the extracellular  $Pb^{2+}$ , but the cells will not be damaged in 99 minutes; and that it is feasible to measure the concentrations of  $Pb^{2+}$  ions within cells, on the surface of cells and in the medium, with EDTA as reaction medium and titrant and XO as the indicator. On the basis of this experimental method, the growth curve of the strain in medium with 500 mg/L  $Pb^{2+}$  was determined, and the  $Pb^{2+}$  concentrations of medium, and intracellular and extracellular lead contents were measured. [Conclusion]  $Pb^{2+}$  will be adsorbed on the surface of cells at first, and then transported into cells. Results show that the  $Pb^{2+}$  adsorbance on the surface of fusaria cells is 1.37 mg/g, and the  $Pb^{2+}$  adsorption site on the surface of fusaria cells are about  $3.97 \times 10^{18}$ /g.

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2014CB846003); 国家自然科学基金重点项目(No. 41230103); 国家地调资助项目(No. 1212011120284)

\*通讯作者: Tel: 86-10-62754156; ✉: rxhao@pku.edu.cn

收稿日期: 2014-03-05; 接受日期: 2014-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-21

**Keywords:** Complexometry, EDTA, *Fusarium* sp., Lead ion content, Intracellular, Extracellular

作为一种具有重要应用价值的元素,铅在储能电池制造、X 射线防护等方面具有不可替代的作用。同时,铅也对动物、植物、微生物以及人体有一定的危害作用<sup>[1]</sup>。随着铅矿的大规模开采和应用,我国的大气、土壤和水体都存在着不同程度的铅污染<sup>[2]</sup>。国内外目前报道的修复铅污染的方法主要有植物修复<sup>[3-9]</sup>、电动修复<sup>[10-13]</sup>、矿物修复<sup>[14]</sup>和微生物修复<sup>[15]</sup>等。一般情况下,微生物修复铅污染环境时,难以对其进行回收,无法降低环境中 Pb<sup>2+</sup>的总含量,而是通过甲基化、矿化、吸附等作用降低 Pb<sup>2+</sup>的生物有效性,并将游离于环境中的 Pb<sup>2+</sup>固定下来,以减少 Pb<sup>2+</sup>对环境的毒害。与传统的物理、化学方法相比,微生物法修复铅污染具有材料来源广泛、高效、廉价、无二次污染等优点,已成为近代铅污染处理的研究热点。许多研究者正在致力于筛选更加高效、安全的菌种用于固定 Pb<sup>2+</sup>,修复铅污染环境<sup>[16]</sup>。目前报道比较多的有效固定 Pb<sup>2+</sup>的菌种有:白腐真菌<sup>[17-19]</sup>、黑曲霉<sup>[20-23]</sup>、酵母菌<sup>[24]</sup>、木霉<sup>[25]</sup>、青霉和镰刀菌<sup>[26]</sup>等。

本实验室从某铅锌矿的尾矿沉积物中分离、筛选一株镰刀菌(JQ267373),在 Pb<sup>2+</sup>初始浓度为 550 mg/L,投菌量为 10 g/L, pH 为 5.5,温度为 25 °C、160 r/min 条件下,镰刀菌在 75 min 内对 Pb<sup>2+</sup>的吸附率可达 84%;同等条件下,Pb<sup>2+</sup>初始浓度为 750 mg/L 时,吸附率达 77.9%。杨亮等研究了该菌株对 Pb<sup>2+</sup>的吸附特性,认为其符合 Langmuir 吸附等温方程,该吸附过程是一个以表面吸附为主的过程<sup>[27]</sup>,但尚未对该吸附过程作进一步研究,也未确定 Pb<sup>2+</sup>的吸附部位以及确切的吸附量。

EDTA (乙二胺四乙酸)是一种常用的氨羧络合剂,可以和 Pb<sup>2+</sup>以 1:1 的比例生成可溶的无色络合物,其稳定常数为  $1 \times 10^{18}$  (通过计算:EDTA 可溶解绝大多数难溶含铅化合物),常被用作 Pb<sup>2+</sup>的滴定剂。XO (二甲酚橙)是一种常见金属指示剂,当 pH 在 5.0-6.0 范围内时,XO 与 Pb<sup>2+</sup>生成的络合物

呈紫红色,EDTA 可以将其中的 Pb<sup>2+</sup>夺取,使 XO 游离并呈现出明亮橙黄色,从紫红色转变为橙黄色时  $pM_{\text{转}}=8.2$  (约等于 0.003 mg/L Pb<sup>2+</sup>),反应灵敏、终点锐利<sup>[28]</sup>。以肉眼判断终点时,当待测溶液中 Pb<sup>2+</sup>分析浓度 10 mg/L 时,通过与火焰原子吸收法、双硫脲光度法测定结果对比可知:以 EDTA 作为滴定剂,XO 为指示剂,在 pH 为 5.0-6.0 条件下,对 Pb<sup>2+</sup>的滴定结果,与上述两种方法相符度较高,且可以避免消解、标准曲线绘制等繁琐操作以及剧毒物质(KCN)的使用<sup>[29]</sup>。

原子吸收、ICP-AES 等方法具有精确度高、检测下限低等优点,常用来测定溶液中微量、痕量金属离子浓度,但所需仪器比较昂贵,一般为大量用户共享,须预约机时。对于含有微生物的样品,等待机时期间,微生物持续作用于样品中的 Pb<sup>2+</sup>,无法保证测定时 Pb<sup>2+</sup>浓度和取样时一致。滴定操作所需装置、试剂价格不高,任何实验室皆可配备。在测定常规浓度(10 mg/L) Pb<sup>2+</sup>时,选择该测定方法,既可以保证测定精度符合实验需要<sup>[29]</sup>,又可以节约大量测试经费。同时可以做到样品随取随测,能获得更加真实的 Pb<sup>2+</sup>浓度数据。

动物细胞传代培养时,EDTA 作为消化液常规组份,起到螯合 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>作用,夺取细胞表面蛋白的 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>,以使细胞能够更好地分散,在一定时间内不损伤细胞内部物质<sup>[30]</sup>。本文实验结果显示:EDTA 可以溶出被镰刀菌(JQ267373)吸附的 Pb<sup>2+</sup>,且其仅溶出菌体表面的 Pb<sup>2+</sup>,无法透过细胞膜释放胞内 Pb<sup>2+</sup>。利用这一性质,设计实验:用定量 EDTA 浸洗已吸附 Pb<sup>2+</sup>的菌体,倘若菌体胞外 Pb<sup>2+</sup>被洗脱完全,以标准铅溶液返滴定浸洗液,即可测定菌体表面所吸附的 Pb<sup>2+</sup>量。消解经 EDTA 浸泡、清洗之后的菌体,消解液中 Pb<sup>2+</sup>全部来源于菌体胞内,测定并经过计算即可得到菌体胞内 Pb<sup>2+</sup>含量。镰刀菌胞内、外 Pb<sup>2+</sup>分布特征的测定,能够为研究镰刀菌吸附 Pb<sup>2+</sup>机理的后续工作积累

基础数据, 有一定参考意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株:** 从某铅锌矿尾矿中分离、筛选到一株镰刀菌(JQ267373), 该菌株对  $Pb^{2+}$  具有较高的耐受性和吸附能力, 现保存于北京大学微生物地球化学实验室。

**1.1.2 主要仪器和试剂:** 振荡培养箱 HZQ-F100, 东联电子公司; 高压蒸汽灭菌锅 LS-B50L, 滨江医疗设备有限公司; 高速冷冻离心机 HC-3018, 科大创新有限公司; 真空冷冻干燥机 2KBTES, SP Industries 公司; 万分天平 AL204-IC, 梅特勒公司; 1 mL 微量滴定管、超声波振荡器 KQ-100B, 昆山超声仪器有限公司。

NaCl、 $NaNO_3$ 、 $MgCl_2$ 、 $NH_4Cl$  购自北京化工厂, 分析纯; 牛肉浸膏购自国药集团, 生物试剂; 胰蛋白胨、酵母粉购自 OXOID LTD, IVD; 葡萄糖购自北化精细化学品有限公司, 分析纯。

**1.1.3 培养基(g/L):** NaCl 0.50,  $NaNO_3$  0.50,  $MgCl_2$  0.010,  $NH_4Cl$  0.10, 牛肉浸膏 1.00, 胰蛋白胨 3.00, 酵母粉 3.00, 葡萄糖 3.00, 去离子水 1 L, pH 5.5。

**1.1.4 溶液:** 0.04、1.00、4.00 mmol/L EDTA 溶液, 西陇化工有限公司, 分析纯; 铅标准溶液 1 000 mg/L, 国家标准物质研究中心提供; 0.5% XO 溶液, 北京化工厂, 分析纯; 10%  $H_2O_2$  溶液, 西陇化工有限公司, 分析纯; 100 g/L 六次甲基四胺缓冲溶液(硝酸调节其 pH 为 5.95), 北京化工厂, 分析纯; 2.5% 戊二醛溶液(以 0.1 mol/L, pH 7.2 磷酸盐缓冲溶液进行稀释定容), 国药集团, 分析纯; 0.5% 美蓝, 国药集团, 分析纯; 硝酸, 北京化学试剂研究所, MOS。

### 1.2 实验方法

**1.2.1  $Pb^{2+}$  络合滴定:** (1) 直接滴定。用 0.5% 电子纯硝酸将  $Pb^{2+}$  标准溶液稀释为 1、10、100、500、1 000 mg/L。各取 1 mL 于 5 mL 烧杯, 添加 0.5 mL 缓冲溶液, 1 滴 0.5% XO 溶液, 以灌注相应浓度

EDTA 标准溶液的微量滴定管进行滴定, 每样重复测定 10 次, 测定滴定度并验证精确度。

(2) 返滴定。用 0.5% 电子纯硝酸将  $Pb^{2+}$  标准溶液稀释为 1、10、100、500、1 000 mg/L。各取 1 mL 于 5 mL 烧杯, 添加 0.5 mL 缓冲溶液, 1 滴 0.5% XO 溶液, 分别添加相应浓度且过量的 EDTA 标准溶液, 以灌注相应浓度  $Pb^{2+}$  标准溶液的微量滴定管进行滴定。每样重复测定 10 次, 测定滴定度并验证精确度。

**1.2.2 镰刀菌对不同浓度  $Pb^{2+}$  的去除:** 制作培养基 10 瓶, 每瓶 250 mL, 并配制 159.9 g/L  $Pb(NO_3)_2$  溶液 1 瓶, 250 mL。共同灭菌后放置于超净工作台。冷却后依次在其中 9 瓶培养基中缓慢滴加一定体积  $Pb(NO_3)_2$  溶液, 使其  $Pb^{2+}$  浓度约为 0、100、200、300、400、500、600、700、800 mg/L (编号 0、1、2、3、4、5、6、7、8), 各添加新鲜镰刀菌(JQ267373)种子液 1 mL。同上调节剩下的 1 瓶培养基  $Pb^{2+}$  浓度为 500 mg/L, 不接入菌种。25 °C、160 r/min 振荡培养。从 0 时刻起, 每 4 h 取样一次, 以 1.2.1 直接滴定方法测定其  $Pb^{2+}$  浓度(以  $Pb^{2+}$  浓度为 0 mg/L 菌液为背景值), 每样测定 3 次, 求其平均值。至前后两次取样所测数据基本相等时停止测定。

**1.2.3 镰刀菌吸附  $Pb^{2+}$  的微观研究:** 制作  $Pb^{2+}$  浓度为 0、500 mg/L 培养基各 250 mL, 分别接种 1 mL 镰刀菌新鲜种子液, 培养 48 h。各取菌液 5 mL, 5 000 r/min 离心 3 min, 弃清液, 在离心管中添加 2.5% 戊二醛溶液 5 mL, 固定菌体。室温存放 2 h 后, 放入 4 °C 保存过夜。翌日携样至中国科学院微生物研究所电镜制样室, 进行漂洗(0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 5 次, 每次 7 min), 后固定(以 1% 锇酸固定 2 h), 再次漂洗(0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 5 次, 每次 7 min), 梯度脱水(50%、70%、85%、95%、100% 乙醇各 1 次, 每次 15 min, 100% 乙醇 3 次), 浸透(乙醇:包埋液=1:1, 2 h), 纯包埋液过夜, 换包埋液浸泡 2 h 后于 60 °C 烘箱中包埋 24 h。将制成的胶块切成 40 nm 薄片, 固定于铜网。在北

京大学电镜中心,使用 F30 透射电进行分析和研究。

**1.2.4 EDTA 测定镰刀菌(JQ267373)对  $Pb^{2+}$  的吸附:**制作  $Pb^{2+}$  浓度为 0、500 mg/L 培养基各 250 mL,分别接入镰刀菌新鲜种子液 1 mL,培养 48 h。取 30 mL  $Pb^{2+}$  浓度为 0 mg/L 的菌液,移入 50 mL 离心管中,标号为 0。连续 8 次移取初始  $Pb^{2+}$  浓度为 500 mg/L 菌液,每份 30 mL,分别移入 50 mL 离心管中,标号 1-8 号。0-8 号菌液 7 500 r/min 离心 3 min,弃上清液后,各离心管加 10 mL 去离子水,放入超声波清洗器,室温超声 1 min。重复离心、清洗 3 次。

0-8 号离心管真空冷冻干燥后,用万分天平称重,称量结果记为  $m_{1n}$  ( $n=0, 1, 2, \dots, 8$ )。称重后在 0-8 号离心管中各加 4 mL 浓度为 1 mmol/L 的 EDTA 溶液,室温超声 1 min。取出后,室温下分别放置 5、2、5、8、18、28、38、68、98 min。之后,离心 3 min 并以 1.2.1 返滴定方法测定上清液  $Pb^{2+}$  浓度。离心管中菌体离心、清洗 3 次,分别移入 10 mL 烧杯,编号为 I-IX。0-8 号离心管清洗、烘干、称重,结果记为  $m_{2n}$ ,原 0-8 号离心管 30 mL 菌液所含菌量  $m_n = m_{1n} - m_{2n}$ 。

蘸取少量 I-IX 号烧杯中的菌体,光学显微镜下以美蓝染色法鉴定菌体细胞活性。蘸取少量 V 号烧杯(原  $Pb^{2+}$  浓度 500 mg/L)菌体,同 1.2.3,制作超薄切片并使用 F30 透射电镜分析、研究。

消解 I-IX 号烧杯剩余菌体(消解液 10%  $HNO_3$ :10%  $H_2O_2$  体积比为 1:1),以 0.5%硝酸溶液定容,以 1.2.1 直接滴定方法测定  $Pb^{2+}$  浓度,以 I 号菌体消解溶液作背景,处理 II-IX 号菌体消解溶液的  $Pb^{2+}$  浓度数据,以排除其他离子存在时产生的误差。

**1.2.5 镰刀菌培养过程中,培养基中、胞外、胞内  $Pb^{2+}$  的测定:**制作  $Pb^{2+}$  浓度为 0、500 mg/L 培养基各 500 mL,分别接种镰刀菌新鲜种子液 2 mL,培养 48 h。0 时刻起,每 4 h 一次,各取样 30 mL。同 1.2.2,测定初始  $Pb^{2+}$  浓度为 500 mg/L 培养基的

$Pb^{2+}$  浓度。同 1.2.4 测定镰刀菌胞外、胞内  $Pb^{2+}$  含量和菌液中菌体质量。每次测定结束,配制 30 mL  $Pb^{2+}$  浓度与测定结果相近的培养基溶液并添加到原培养基中,以尽量减少取样产生的干扰。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $Pb^{2+}$ 络合滴定

为了验证络合滴定法测定  $Pb^{2+}$  浓度的准确性,分别用直接滴定和返滴定法滴定已知浓度的  $Pb^{2+}$  标准溶液。每种方法重复测定 10 次,处理数据,汇总结果制作表 1、2。

根据络合滴定终点误差理论<sup>[28]</sup>可知:lgCK' - 6 ( $C$ :  $Pb^{2+}$  分析浓度,  $K'$ :  $Pb^{2+}$  与 EDTA 生成络合物的表观稳定常数)时能保证  $Pb^{2+}$  的测定精度 99.9%,一定范围内,  $Pb^{2+}$  的分析浓度越高,终点误差

表 1 直接滴定测定的  $Pb^{2+}$  浓度  
Table 1 Concentration of  $Pb^{2+}$  determined by direct titration

$\rho_0$ (mg/L)	$\rho_{sp}$ (mg/L)	RSD (%)
1	1.36	4.12
10	10.43	0.44
100	103.53	0.17
500	502.34	0.12
1 000	1 002.10	0.07

注:  $\rho_0$ :  $Pb^{2+}$  分析浓度;  $\rho_{sp}$ :  $Pb^{2+}$  实测浓度; RSD: 相对标准偏差。

Note:  $\rho_0$ : Analytical concentration of  $Pb^{2+}$ ;  $\rho_{sp}$ : Measured concentration of  $Pb^{2+}$ ; RSD: Relative standard deviation.

表 2 返滴定测定的  $Pb^{2+}$  浓度  
Table 2 Concentration of  $Pb^{2+}$  determined by back titration

$\rho_0$ (mg/L)	$\rho_{sp}$ (mg/L)	RSD (%)
1	1.11	2.13
10	10.27	0.27
100	102.61	0.14
500	501.92	0.12
1 000	1 001.70	0.11

注:  $\rho_0$ :  $Pb^{2+}$  分析浓度;  $\rho_{sp}$ :  $Pb^{2+}$  实测浓度; RSD: 相对标准偏差。

Note:  $\rho_0$ : Analytical concentration of  $Pb^{2+}$ ;  $\rho_{sp}$ : Measured concentration of  $Pb^{2+}$ ; RSD: Relative standard deviation.

差越小。由表 1 和表 2 数据可见, Pb<sup>2+</sup> 的分析浓度从 1 mg/L 至 1 000 mg/L 逐渐增大, 标准偏差(RSD) 逐渐减小, 测定数据与真实值越接近。通过本实验直接滴定、返滴定实际操作发现: 1 mg/L 至 1 000 mg/L 范围内, Pb<sup>2+</sup> 的分析浓度越大终点越容易判断。

## 2.2 镰刀菌对不同浓度 Pb<sup>2+</sup> 的去除

镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup> 的去除率表示为:

$$A = (C_0 - C_n) / C_0 \times 100\%$$

A: 去除率; C<sub>0</sub>: 培养基中 Pb<sup>2+</sup> 的初始浓度; C<sub>n</sub>: t 时刻编号 n 培养基中 Pb<sup>2+</sup> 的浓度; n: 实验 2.2.2 培养基编号。

以时间 t 为横轴, 去除率为 A 为纵坐标, 将不同 Pb<sup>2+</sup> 浓度培养基在 t 时刻所测得数据进行计算并作图(图 1)。

培养基中 Pb<sup>2+</sup> 的浓度为 100、200……800 mg/L, 镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup> 去除率分别为 99.31%、99.21%、98.76%、98.14%、97.50%、95.21%、92.91% 和 90.79%。可见随着 Pb<sup>2+</sup> 浓度的升高, 镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup> 的去除率逐渐下降。该现象与杨亮对该菌株的研究结论“随培养基中 Pb<sup>2+</sup> 浓度的升高, 该菌株对 Pb<sup>2+</sup> 去除率下降”<sup>[27]</sup> 相符。由图 1 可见, 随 Pb<sup>2+</sup> 浓度升高, 镰刀菌对培养基中 Pb<sup>2+</sup> 的去除率达到最大值所需时间增长, 原因可能是 Pb<sup>2+</sup> 的浓度越高, 对菌体的毒害作用越强, 对其生长的延滞作用也就越明显。菌体生物量较小, 导致其对 Pb<sup>2+</sup> 的总吸附速率较低。

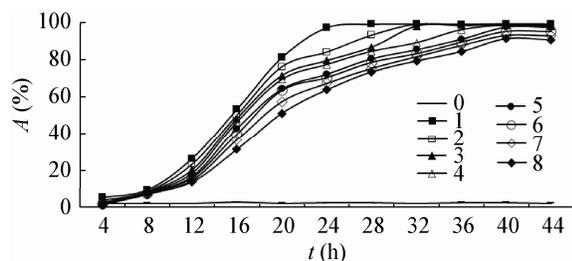


图 1 镰刀菌在不同 Pb<sup>2+</sup> 浓度下对 Pb<sup>2+</sup> 的去除率  
Figure 1 Removal rate of lead by strain (*Fusarium* sp.) in different Pb(II) concentration

## 2.3 镰刀菌(JQ267373)吸附 Pb<sup>2+</sup> 的微观研究

多数丝状真菌的生命活动过程中存在两型现象(Dimorphism), 根据生存条件的变化, 其生存形态可以从菌丝型(M 型)转变为类酵母型(Y 型), 一些真菌在液体环境中生长时, 会以单细胞的孢子或营养细胞等形态适应其生存环境<sup>[31]</sup>。图 2 是镰刀菌在 Pb<sup>2+</sup> 浓度为 500 mg/L 的液体培养基培养 48 h 后, 菌液离心、固定、切片的 TEM 照片。从图 2 可以看出, 在该培养条件下, 镰刀菌以 Y 型存在。图 2A 为小型分生孢子, 呈卵圆形, 直径 3–4 μm, 中部有隔膜。图 2B 为其大型分生孢子, 长梭状, 长约 26–30 μm, 中部直径约 2–3 μm, 存在多核现象。实验过程中未有 M 型菌丝形态检出。在 TEM 模式下, 颜色越深, 该部位重元素含量越高, 对各个区域分别进行能谱分析, 结果显示, 两种类型孢子细胞壁外、细胞质、细胞核等部位都有 Pb 赋存。

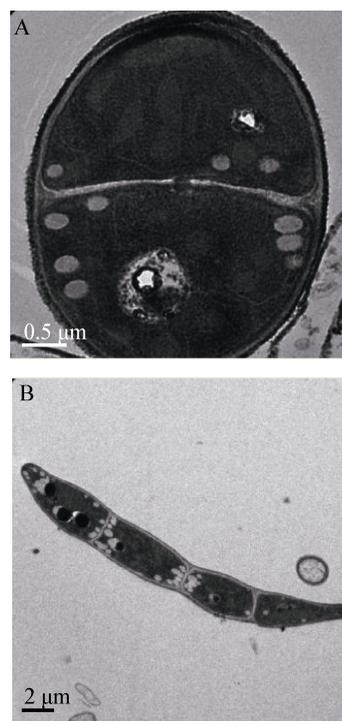


图 2 吸附 Pb<sup>2+</sup> 后镰刀菌的透射电镜图  
Figure 2 TEM images of strain (*Fusarium* sp.) after adsorbing Pb<sup>2+</sup>  
注: A: 小型分生孢子; B: 大型分生孢子。  
Note: A: TEM picture of microconidium; B: TEM picture of macroconidium.

图 3A 为镰刀菌小型分生孢子的 STEM 照片, 与 TEM 模式相反, 在 STEM 模式下, 重元素含量越高该部位亮度越高。图 3B 为 3A 图标线 1 位置, 从左至右 0–2  $\mu\text{m}$  线性区间上, 铅含量的能谱分析图。图 3A、B 均显示镰刀菌小型分生孢子细胞壁外、细胞质、细胞核等部位有 Pb 赋存。

#### 2.4 EDTA 法测定 $\text{Pb}^{2+}$ 在镰刀菌胞内、外的分布

表 3 数据表明, 镰刀菌接种于不加铅的液体培养基 48 h 后, 30 mL 菌液的生物量约为 0.449 8 g, 接种于  $\text{Pb}^{2+}$  浓度为 500 mg/L 的液体培养基 48 h 后, 30 mL 菌液的平均生物量为 0.377 2 g。对比无  $\text{Pb}^{2+}$  添加的培养基, 有  $\text{Pb}^{2+}$  添加的培养基生物量明显较低, 可见  $\text{Pb}^{2+}$  对镰刀菌生长存在影响。

1–8 号离心管中菌体与 EDTA 的反应时间包括超声和室温存放两个时间段, 依次共计 3、6、9、19、29、39、69、99 min。据表 4 (表中  $\rho_{\text{pb}}$  代表  $\text{Pb}^{2+}$  质量浓度, 下同) 数据, 6 min 后 EDTA 所溶出的  $\text{Pb}^{2+}$  并不再随浸泡时间的延长而增加, 由此可以得知, EDTA 和菌体上的  $\text{Pb}^{2+}$  在 6 min 内即已充分反应。

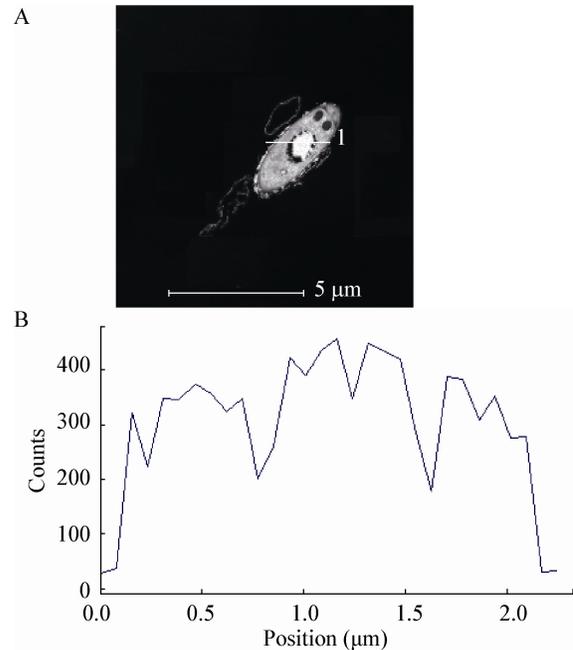


图 3 镰刀菌小型分生孢子的 STEM 分析

Figure 3 STEM analysis of microconidium of strain (*Fusarium* sp.)

注: A: 小型分生孢子的 STEM 照片; B: A 图中线段 1 的  $\text{Pb}^{2+}$  能谱分析。

Note: A: STEM picture of microconidium; B: EDS of the line 1 in picture A.

表 3 0–8 号离心管的生物量

Table 3 Biomass of No.0 to No.8 centrifuge tubes

n	0	1	2	3	4	5	6	7	8
$m_{1n}-m_{2n}$ (g)	0.449 8	0.375 4	0.384 1	0.367 1	0.387 3	0.354 8	0.398 1	0.372 4	0.378 4

表 4 EDTA 浸泡后镰刀菌胞外  $\text{Pb}^{2+}$  含量测定数据

Table 4 Adsorption capacity of lead by strain (*Fusarium* sp.) after soaked by EDTA

t (min)	$\rho_{\text{pb}}$ (mg/L)	EA (mg/g)
3	74.0	0.788 5
6	126.0	1.372 9
9	125.0	1.301 7
19	122.0	1.260 0
29	119.0	1.341 6
39	121.0	1.215 8
69	120.8	1.299 7
99	126.0	1.331 9

注: t: 浸泡时间;  $\rho_{\text{pb}}$ : 浸泡液中  $\text{Pb}^{2+}$  浓度; EA: 胞外  $\text{Pb}^{2+}$  吸附量。

Note: t: Steeping time;  $\rho_{\text{pb}}$ : Concentration of  $\text{Pb}^{2+}$  in EDTA solution; EA: Extracellular adsorbance of  $\text{Pb}^{2+}$ .

图 4A 为镰刀菌被 EDTA 浸泡 29 min 后, 菌体切片的透射电镜 STEM 照片。如图显示: 经 EDTA 浸洗, 菌体细胞壁外侧未发现明显含铅物质附着, 对图 4A 中细胞壁(图 4A 中部位 1)进行能谱分析, 无 Pb 检出, 且亮度明显比胞内暗。结合前述 EDTA 浸泡 6 min 后, 所溶出的  $Pb^{2+}$  量不随时间延长而增加, 可以认为: 被吸附于镰刀菌菌体表面的  $Pb^{2+}$  经 EDTA 溶液浸泡 6 min 后已基本被洗脱完全。

综上所述, 经 EDTA 浸泡, 细胞表面所吸附的  $Pb^{2+}$  已被洗脱。所以 II-IX 号菌体消解后, 溶液中  $Pb^{2+}$  均来自于细胞内部。以表 5 所测各烧杯  $Pb^{2+}$  总量除以该烧杯中菌体质量, 即得到单位质量菌体胞内的  $Pb^{2+}$  含量, 最小值为 32.89 mg/g, 最大值为 35.15 mg/g, 平均值为 34.22 mg/g。

0-8 号离心管中菌体经 EDTA 不同时间的浸泡, 在光学显微镜下通过美兰染色法鉴定其细胞活性, 所有菌体均不呈蓝色。该现象表明: 经过 EDTA

浸泡 3-99 min 后, 菌体并未失活, EDTA 并未损伤细胞内部结构和物质。

表 5 数据显示: 胞内  $Pb^{2+}$  含量并不明显随 EDTA 浸泡时间延长而减少, 综合美兰活性鉴定结果, 说明 EDTA 并未破坏细胞结构释放胞内  $Pb^{2+}$ 。证明表 4 数据确实表征镰刀菌胞外  $Pb^{2+}$  含量, 其最小值为 1.215 8 mg/g, 最大值为 1.372 9 mg/g, 平均值为 1.303 4 mg/g。

综合表 3、4、5 数据: 经 48 h 培养, 接种于 250 mL,  $Pb^{2+}$  浓度为 500 mg/L 培养基中的镰刀菌生物量约 3.15 g, 单位质量菌体胞外  $Pb^{2+}$  含量约为 1.30 mg/g, 胞内  $Pb^{2+}$  含量为 34.22 mg/g, 胞内、外  $Pb^{2+}$  含量比值约为 26.3。单位质量菌体  $Pb^{2+}$  吸附总量为 35.5 mg/g, 则 250 mL 菌液中菌体的  $Pb^{2+}$  吸附总量为  $3.15 \text{ g} \times 35.5 \text{ mg/g} = 112 \text{ mg}$ 。2.2 结果表明同条件下镰刀菌对  $Pb^{2+}$  的去除率为 97.5%, 即培养基中尚存游离  $Pb^{2+}$  量为 3.13 mg, 则吸附于菌体胞内、外和游离于培养基中  $Pb^{2+}$  量共计约 115 mg。菌体对  $Pb^{2+}$  的去除不仅可以通过吸附作用, 将其吸附于胞外活性部位并经某些生理作用转移于胞内, 还可能通过代谢产物的沉淀、络合等作用对培养基中的  $Pb^{2+}$  予以去除<sup>[32]</sup>。培养基中初始添加的  $Pb^{2+}$  量为 125 mg, 除了吸附于菌体、游离于培养基, 尚有

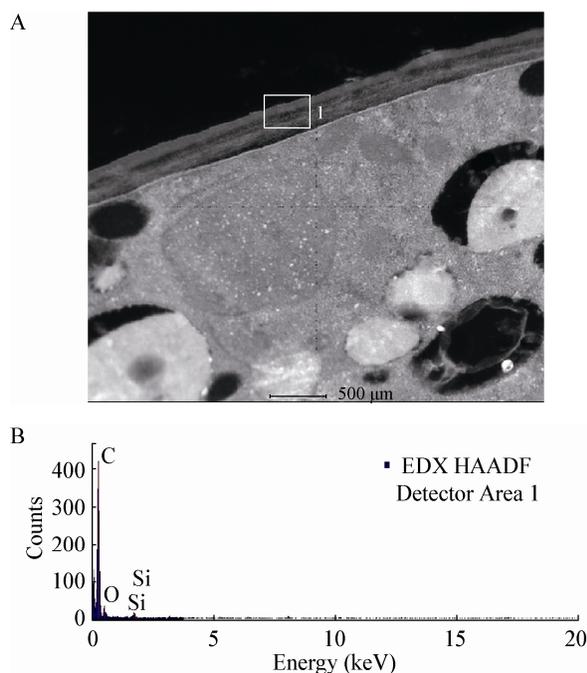


图 4 EDTA 浸泡后细胞的 STEM 分析

Figure 4 STEM analysis of the cell soaked by EDTA

注: A: 经 EDTA 浸泡的细胞的 STEM 图; B: A 图中方框 1 处能谱分析。

Note: A: STEM picture of the cell soaked by EDTA; B: EDS of the spot 1 in picture A.

No.	$\rho_{pb}$ (mg/L)	IA (mg/g)
I	0	0
II	253.7	33.79
III	261.2	34.00
IV	258.1	35.15
V	264.0	34.08
VI	248.9	35.08
VII	261.9	32.89
VIII	257.3	34.55
IX	259.2	34.25

注: No.: 1.2.4 实验中烧杯编号;  $\rho_{pb}$ : 消解液中  $Pb^{2+}$  浓度; IA: 胞内  $Pb^{2+}$  吸附量。

Note: No.: Number of beaker in 1.2.4;  $\rho_{pb}$ : Concentration of  $Pb^{2+}$  in digested solution; IA: Intracellular adsorbance of  $Pb^{2+}$ .

125–115=10 mg Pb<sup>2+</sup>可能被镰刀菌的代谢产物通过沉淀、络合等作用去除,固定于培养基底部等处。究竟是否如此,尚待日后更加深入的研究进行验证。

杨亮等详细地研究了镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup>的吸附特性,认为在一定范围内,随初始 Pb<sup>2+</sup>浓度升高,吸附量升高,并在 550 mg/L 达到最大值(46.2 mg/g),之后随 Pb<sup>2+</sup>浓度的降低,吸附量降低<sup>[27]</sup>。潘蓉等<sup>[26]</sup>的研究显示初始 Pb<sup>2+</sup>浓度为 300 mg/L 时,镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup>的吸附量为 26.5 mg/g。本文实验中初始 Pb<sup>2+</sup>浓度为 500 mg/L 时,镰刀菌对 Pb<sup>2+</sup>的吸附量为 35.5 mg/g,介于二者之间,与杨亮等研究结果一致。

EDTA 作为细胞传代培养时消化液的常规组分之一,可以螯合细胞表面的 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等离子,并且在短时间内并不影响细胞活性<sup>[30]</sup>。本实验证实镰刀菌菌体浸泡于 1 mmol/L 的 EDTA 中 99 min 内不损伤菌体细胞活性,且也可以螯合菌体胞外的 Pb<sup>2+</sup>。以 XO 为指示剂,EDTA 为滴定剂,在 pH

5.0–6.0 范围内,滴定 Pb<sup>2+</sup>浓度已经是一项成熟的常规检测手段。本实验结合该两项实验技术手段,证实以 EDTA 作为反应介质,测定镰刀菌在吸附 Pb<sup>2+</sup>后,Pb<sup>2+</sup>在胞内、胞外的分布、比例是可行的。

## 2.5 培养基、胞外和胞内 Pb<sup>2+</sup>的分布特征

汇总实验 2.2.5 测定结果,制作表 6,包含 0–48 h 内,接种于 Pb<sup>2+</sup>浓度为 0、500 mg/L 培养基的镰刀菌生物量,培养基中 Pb<sup>2+</sup>浓度,镰刀菌胞内、胞外 Pb<sup>2+</sup>含量及其比值,相对误差等数据。表 6 表明:0–32 h 菌液的生物量逐渐增加,在 32 h 达到最大,为 0.371 0 g/30 mL (0.01 g/mL),之后生物量开始下降,即 32 h 后进入衰亡期。胞外 Pb<sup>2+</sup>含量在 0–20 h 内增加,第 20 h 达到最大值,之后在最大值附近波动,比生物量更早达到最大值。0、4 h 胞内 Pb<sup>2+</sup>含量低于检测限,无明显检出。8–48 h 内胞内 Pb<sup>2+</sup>含量持续升高。胞内、胞外 Pb<sup>2+</sup>含量比值在 0–48 h 内,持续升高。

表 6 生物量与不同微环境中 Pb<sup>2+</sup>的含量  
Table 6 Biomass and Pb<sup>2+</sup> contents in different microenvironments

<i>t</i> (h)	<i>m</i> (g/30 mL)	$\rho_{pb}$ (mg/L)	Pb <sub>1</sub> (mg/g)	Pb <sub>2</sub> (mg/g)	Pb <sub>1</sub> +Pb <sub>2</sub> (mg/g)	Pb <sub>2</sub> /Pb <sub>1</sub>	$\delta$ (%)
0	0.029 2	494.0	0.01	–	0.01	0	1.20
4	0.063 0	496.7	0.14	–	0.14	0	0.60
8	0.162 8	490.8	0.47	0.18	0.65	0.39	1.13
12	0.244 0	461.6	0.76	1.97	2.73	2.59	3.19
16	0.274 2	417.2	1.23	4.66	5.89	3.79	5.48
20	0.305 9	285.8	1.34	13.88	15.22	10.36	10.84
24	0.324 4	179.0	1.29	21.52	22.81	16.68	12.05
28	0.346 1	139.2	1.37	24.26	25.63	17.71	7.24
32	0.371 0	97.6	1.24	27.35	28.59	22.06	0.44
36	0.370 5	73.2	1.31	29.01	30.32	22.15	3.10
40	0.362 3	44.7	1.37	30.98	32.35	22.61	5.14
44	0.351 4	11.9	1.34	33.34	34.68	24.88	6.38
48	0.320 7	12.5	1.29	33.34	34.63	25.85	4.17

注: *t*: 培养时间; *m*: 30 mL 菌液中生物量;  $\rho_{pb}$ : 培养基中 Pb<sup>2+</sup>浓度; Pb<sub>1</sub>: 胞外 Pb<sup>2+</sup>吸附量; Pb<sub>2</sub>: 胞内 Pb<sup>2+</sup>吸附量; Pb<sub>2</sub>/Pb<sub>1</sub>: 胞内、外 Pb<sup>2+</sup>吸附量比值;  $\delta$ : 相对误差。

Note: *t*: Incubation time; *m*: Biomass in 30 mL broth;  $\rho_{pb}$ : Concentration of Pb<sup>2+</sup> in broth; Pb<sub>1</sub>: Extracellular adsorbance of Pb<sup>2+</sup>; Pb<sub>2</sub>: Intracellular adsorbance of Pb<sup>2+</sup>;  $\delta$ : Relative error.

为验证 1.2.5 实验数据测定的准确性, 根据质量守恒定律, 引入相对误差公式, 验证各时间点, 由测定结果计算得出的培养基中  $Pb^{2+}$  总质量与最初培养基中实际添加的  $Pb^{2+}$  质量的相符度。以公式 (1) 计算 2.2.5 实验所得数据的相对误差。公式 (1) 中“ $0.5C_t$ 、 $A_t \times M_t \times 30/500$ 、 $B_t$ ”等 3 项分别代表游离于培养基中  $Pb^{2+}$  的总质量、培养基中菌体所吸附的  $Pb^{2+}$  总质量、被历次取样所取出菌体吸附的  $Pb^{2+}$  累加质量, 3 项之和: “ $0.5C_t + A_t \times M_t \times 30/500 + B_t$ ”代表  $t$  时刻 (来源于) 培养基的  $Pb^{2+}$  总质量的测定值,  $0.5 \times 500$  为培养基的  $Pb^{2+}$  总质量实际添加值。相对误差数据表明, 多数  $Pb^{2+}$  总质量的测定值, 与培养基  $Pb^{2+}$  初始实际添加质量基本吻合。

$$\delta = \frac{|0.5C_t + A_t \times M_t \times 30/500 + B_t - 0.5 \times 500|}{0.5 \times 500} \times 100\% \quad (1)$$

$\delta$ : 相对误差;  $C_t$ :  $t$  时刻培养基中游离  $Pb^{2+}$  浓度,  $0.5C_t$  为 500 mL 培养基中游离  $Pb^{2+}$  总质量;  $A_t$ :  $t$  时刻菌体对  $Pb^{2+}$  总吸附量, 包括胞内、胞外两部分;  $M_t$ :  $t$  时刻 30 mL 菌液中菌体质量;  $B_t$ :  $t$  时刻前, 历次取样, 被取出菌体所吸附的  $Pb^{2+}$  质量累积之和;  $0.5 \times 500$ : 培养基初始  $Pb^{2+}$  总质量。

为更加形象、直观地考察表 6 数值的变化趋势及其变化的相关性, 对表 6 数据进行处理: 分别找到各列 (除时间和  $\rho_{pb}$  数据列) 数据最大值, 并以该列每个数据除以该最大值, 以计算得到的比值为纵坐标, 时间为横坐标作图。 $\rho_{pb}$  列数据用与 1.2.2 一样的处理方法得到各个时刻点的  $Pb^{2+}$  去除率 (以小数值表示), 以去除率为纵坐标, 时间为横坐标作图 (图 5)。图 5 中曲线 a 为 0–48 h 生物量的变化曲线, 可见在 32 h 生物量达到最大值, 之后生物量下降。曲线 b 为镰刀菌对培养基中  $Pb^{2+}$  的去除率曲线, 去除率随生物量的增加而升高, 但相对于生物量的增加稍有滞后。曲线 c 为菌体胞外  $Pb^{2+}$  含量变化曲线, 比生物量更早达到最大值, 且在最大值附近波动。d 为菌体胞内  $Pb^{2+}$  含量变化曲线, 随着生物量以及  $Pb^{2+}$  去除率的增加而增加。e 为菌体胞内、外  $Pb^{2+}$  含量之和的变化趋势, 其走势和  $Pb^{2+}$  去除率基本平行。f 为菌体胞内、外  $Pb^{2+}$  含量比值, 随胞内

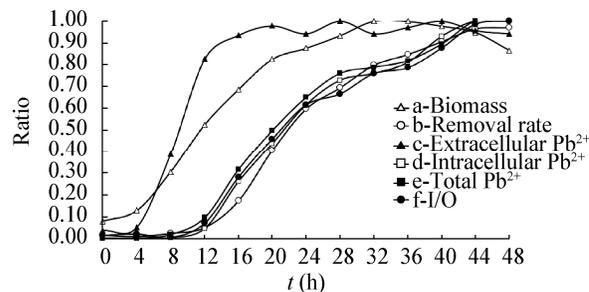


图 5 不同参数随时间的变化

Figure 5 Changes of different parameters with time

$Pb^{2+}$  含量增加而增加。

从图 5 曲线的变化趋势可以推断: 镰刀菌对  $Pb^{2+}$  的去除是一个由胞外到胞内的过程, 先由菌体胞外活性物质将  $Pb^{2+}$  吸附在其表面, 然后通过某些生理生化作用转运到胞内, 胞内  $Pb^{2+}$  含量持续增加。菌体胞外  $Pb^{2+}$  含量在生物量达到峰值以前即已达到峰值, 并围绕该峰值波动, 指示菌体表面能够吸附  $Pb^{2+}$  的位点或活性物质数量是有限的, 饱和之后其含量将不再增加。表 6 数据显示, 菌体细胞外活性位点吸附  $Pb^{2+}$  达到饱和时, 每克菌体最多吸附 1.37 mg  $Pb^{2+}$ , 约  $6.6 \times 10^{-6}$  mol, 此值与阿伏伽德罗常数的乘积为  $3.97 \times 10^{18}$ , 指示每克菌体表面吸附  $Pb^{2+}$  的活性位点数量约  $3.97 \times 10^{18}$  个, 该活性位点 (物质) 的物性、结构尚不明确, 有待于日后深入的研究工作加以探索。

### 3 结论

(1) 镰刀菌的生物量在添加  $Pb^{2+}$  的培养基中明显小于无  $Pb^{2+}$  添加的培养基, 表明  $Pb^{2+}$  对镰刀菌有一定毒性。

(2) 镰刀菌吸附  $Pb^{2+}$  微观研究表明:  $Pb^{2+}$  被镰刀菌吸附后分别固定于胞外、胞内两个部位。

(3) 实验验证以 EDTA 为反应介质和滴定剂, XO 为指示剂, 通过络合滴定技术, 测定  $Pb^{2+}$  在镰刀菌胞内、外分布及比值是可行的。胞内、外  $Pb^{2+}$  分布特征研究结果表明, 在  $Pb^{2+}$  浓度 500 mg/L 培养基中, 镰刀菌吸附  $Pb^{2+}$  达到饱和时, 胞内  $Pb^{2+}$  含量远高于胞外, 胞内  $Pb^{2+}$  含量是胞外的 26 倍之多。

(4) 镰刀菌胞内、外  $Pb^{2+}$  动态分布特征研究结果表明, 镰刀菌胞外最先检测到  $Pb^{2+}$ , 且其胞外用

以吸附  $Pb^{2+}$  的活性物质或位点是有限的。 $Pb^{2+}$  在每克镰刀菌胞外的饱和吸附量为 1.37 mg。由此计算得知, 每克镰刀菌在其胞外约含有  $3.97 \times 10^{18}$  个用于吸附  $Pb^{2+}$  的活性位点。

致谢: 中国科学院微生物研究所电镜室梁静楠老师和北京大学电镜室尤力平老师, 为本研究提供了许多帮助, 在此表示衷心感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 韩磊, 张恒东. 铅、镉的毒性及其危害[J]. 职业卫生与工伤, 2009, 24(3): 173-178.
- [2] 冯福建, 王兰, 虞江萍, 等. 我国铅污染的时空走势[J]. 辽宁工程技术大学学报: 自然科学版, 2001, 20(6): 840-843.
- [3] 钟珍梅, 王义祥, 杨冬雪, 等. 4种植物对铅、镉和砷污染土壤的修复作用研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(21): 123-126.
- [4] María J, María L. Lead accumulation in plants grown in polluted soils[J]. Journal of Geochemical Exploration, 2014, 137(2): 29-36.
- [5] Núñez-López RA, Meas Y, Gama SC, et al. Leaching of lead by ammonium salts and EDTA from *Salvinia minima* biomass produced during aquatic phytoremediation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154(1): 623-632.
- [6] Cho Y, Bolick JA, Butcher DJ. Phytoremediation of lead with green onions and uptake of arsenic compounds by moonlight ferns[J]. Microchemical Journal, 2009, 91(1): 6-8.
- [7] Lim JL, Salido AL, Butcher DJ. Phytoremediation of lead using Indian mustard with EDTA and electronics[J]. Microchemical Journal, 2004, 76(1): 3-9.
- [8] Wang HQ, Lu SJ, Li H, et al. EDTA-enhanced phytoremediation of lead contaminated soil by *Bidens maximowicziana*[J]. Environmental Sciences, 2007, 19(12): 1496-1499.
- [9] Dinesh M, Hemant K, Ankur S, et al. Cadmium and lead remediation using magnetic oak wood and oak bark fast pyrolysis bio-chars[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 236(1): 513-528.
- [10] Probststein RF, Hicks RE. Removal of contaminants from soils by electric fields[J]. Science, 1993, 260(5107): 498-503.
- [11] Peng JF. The remediation of heavy metals contaminated sediment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161(2): 633-640.
- [12] Rudy S, Shunitz T. Aluminum drinking water treatment residuals as an entrapping zone for lead in soil by electrokinetic remediation[J]. Separation and Purification Technology, 2011, 79(2): 208-215.
- [13] Alcántara M, Gómez J, Pazos M, et al. Electrokinetic remediation of lead and phenanthrene polluted soils[J]. Geoderma, 2012, 173(3): 128-133.
- [14] 钱功名, 钟康年, 罗惠华. 改性磷灰石处理含铅废水应用研究[J]. 武汉化工学院学报, 2004, 26(2): 25-27.
- [15] 杨亮, 郝瑞霞, 吴津, 等. 耐铅微生物的筛选及其铅去除能力的初步研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2012, 48(6): 965-970.
- [16] 周薇, 张小平, 康纪亭. 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, 2009, 3(10): 1907-1913.
- [17] 吴涓, 李清彪, 邓旭, 等. 白腐真菌吸附铅的研究[J]. 微生物学报, 1999, 39(1): 87-90.
- [18] Zeng GM, Huang DL, Huang GH, et al. Composting of lead - contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus[J]. Bioresource Technology, 2007, 98 (2): 320-326.
- [19] Baldrian P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32(1): 78-91.
- [20] 尹利利, 臧淑艳, 侯雪敏, 等. 黑曲霉对含铅废水的生物吸附研究[J]. 沈阳化工学院学报, 2013, 27(1): 15-19.
- [21] Amini M, Younesi H, Bahramifar N, et al. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 154(1/3): 694-702.
- [22] Wang JL. Biosorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*[J]. Biotechnology, 2001, 87(3): 273-277.
- [23] Dursun AY, Uslu G, Cuci Y, et al. Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing *Aspergillus niger*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(12): 1647-1651.
- [24] 韩润平, 石杰, 鲍改玲. 酵母菌对铅离子的生物吸附研究[J]. 河南科学, 2000, 18(1): 52-55.
- [25] 沈薇, 杨树林, 李校堃, 等. 木霉 (*Trichoderma* sp.) HR-1活细胞吸附  $Pb(II)$  的机理[J]. 中国环境科学, 2006, 26(1): 101-105.
- [26] 潘蓉, 曹理想, 张仁铎. 青霉菌和镰刀菌对重金属  $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Pb^{2+}$  的吸附特性[J]. 环境科学学报, 2010, 30(3): 477-484.
- [27] 杨亮, 郝瑞霞, 吴津, 等. 耐受铅真菌的筛选及其对  $Pb^{2+}$  吸附初步研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(10): 2366-2374.
- [28] 李克安. 络合滴定法. 分析化学教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005: 109-134.
- [29] 李文方, 魏先勋, 李彩亭, 等. 络合滴定法测定废水中铅离子浓度[J]. 工业水处理, 2002, 22(10): 38-39.
- [30] 丁明孝, 苏都莫日根, 王喜忠, 等. 细胞生物学实验指南[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 81-87.
- [31] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 94-97.
- [32] Francis AJ, Dodge CJ. Anaerobic microbial dissolution of transition and heavy metal oxides[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(4): 1009-1014.