丝状真菌黑曲霉对放射性核素U(VI)的吸附、富集和转化

梁君¹, 刘磊², 汤克来³, 宋文成^{2*}

1. 安徽大学江淮学院, 合肥 230039

2. 中国科学院合肥物质科学研究院医学物理与技术中心, 医学物理与技术安徽省重点实验室, 合肥 230031

3. 安徽省合肥市庐江县石头镇农技站, 合肥 231524

*通讯作者, E-mail: wencsong@cmpt.ac.cn

收稿日期: 2018-06-07; 接受日期: 2018-07-31; 网络版发表日期: 2018-11-12

国家自然科学基金(编号: 21607156)和中国博士后科学基金(编号: 2015M581047)资助项目

摘要 本文采用批试验和X射线吸收精细结构谱学(XAFS)技术系统研究了黑曲霉菌丝体对放射性核素U(VI)的吸附、富集和转化. 宏观研究表明, 时间、菌丝体浓度、pH和温度显著影响菌丝体吸附U(VI), 吸附动力学符合准二级动力学模型; 吸附等温线符合Langmuir模型, 在pH 6.0, $T=298\text{ K}$ 条件下, 菌丝体吸附U(VI)的最大吸附量是83.73 mg/g, 比其他生物吸附剂有较高的吸附U(VI)能力. 黑曲霉富集U(VI)后, 胞内外形态结构明显改变, 并且胞内 H_2O_2 、丙二醛(MDA)和巯基化合物浓度显著增加. 使用X射线吸收近边缘结构(XANES)分析证实黑曲霉胞内U(VI)减少, 被还原为U(IV); 扩展X射线吸收精细结构(EXAFS)数据表明, U(IV)产物是由单核U(IV)原子紧密包围的轻元素壳组成的形态, 这种原子排列可能由U(IV)和C/N/O-或含P/S的配体(如碳酸根或磷酸根)之间的内球键产生. 研究表明, 丝状真菌黑曲霉有望应用于放射性核素U(VI)污染的修复治理.

关键词 黑曲霉, 吸附, 富集, U(VI), X射线吸收精细结构谱学(XAFS)

1 引言

由于化石能源的日渐枯竭和不可持续性等问题, 各国越来越重视开发利用经济、高效的核能, 并考虑或启动建造核电站的计划. 在今后相当长时间里, 铀(^{235}U)是我国乃至世界核电的主要燃料, 从其开采到核废料处置整个过程中, 都会有放射性核素进入到生态圈, 危害动物和人类的健康^[1-3]. 如何修复治理这些放射性核素污染, 备受关注. 在多数情况下, 采用物理-化

学方法处理废水中的放射性核素^[4-9], 但是这些方法处理成本昂贵, 而且不易管理与操作, 会造成二次污染. 丝状真菌修复因无二次污染、效果好和成本低廉等优点, 成为近年来放射性核素修复领域中的研究热点^[10].

丝状真菌易于生长在潮湿的环境下, 特别是偏酸性的基质当中, 这与放射性核素污染的介质偏酸性相似^[11]. 丝状真菌是土壤微生物群中生物地球化学活性最强的组分之一, 丝状真菌转化和/或富集放射性核素的能力是它们在放射性核素生物修复中的重要组成部

引用格式: Liang J, Liu L, Tang K, Song W. Adsorption, bioconcentration and transformation of radioactive U(VI) on filamentous fungi *Aspergillus Niger*. *Sci Sin Chim*, 2019, 49: 113–122, doi: 10.1360/N032018-00134

分^[12]。丝状真菌菌丝体已应用于放射性核素吸附去除研究。例如, Lujanienė等^[13]研究了细菌和丝状真菌对Pu(V)的吸附, 结果显示, 丝状真菌*Penicillium chrysogenum*在pH 4.1时最大吸附比达到100%, 而细菌*Bacillus cereus*在pH 6~7时只有82%~84%。Vinichuk等^[14]研究发现, 在砂壤土和壤质土中丛枝菌*Glomus mosseae*吸附¹³⁷Cs, 并促进向日葵吸附¹³⁷Cs; Zhao等^[15]研究表明, 在pH 4.0时*Pleurotus ostreatus*吸附U可达到 19.95 ± 1.17 mg/g; Ding等^[16]研究发现, 真菌*Geotrichum sp. dwc-1*对钍具有良好的清除效果, 分布系数 K_d 高达0.93 mL/mg; 本课题组^[17]前期从放射性核素污染的土壤中筛选出抗性丝状真菌*Aspergillus niger* (*A. niger*), 发现其能高效吸附Co(II)和Eu(III)。放射性核素都具有放射性, 部分还具有强氧化性, 一旦进入菌体内可产生大量活性氧, 活性氧可破坏蛋白质、核酸和脂质等, 最终导致细胞死亡。H₂O₂是细胞内主要的活性氧之一, 丙二醛(MDA)是膜脂质过氧化的最终产物反应膜脂质过氧化程度。放射性核素限制了一般丝状真菌的生长, 而长期生活在放射性核素污染环境中的抗性丝状真菌通过细胞内产生了一系列抗氧化防御机理, 如巯基蛋白(PB-SH)和谷胱甘肽(GSH), 迅速清理胞内活性氧, 强烈螯合进入胞内的放射性核素, 从而降低其活性并区室化固定, 减轻其对丝状真菌个体的毒害作用^[18-21]。

同步辐射X射线吸收精细结构(XAFS)已应用于丝状真菌转化放射性核素的机制研究。例如, Vázquez-Campos等^[11]采用XAFS研究了耐酸真菌(*Coniochaeta fodinicola*)绑定U的机制; Günther等^[22]使用扩展X射线吸收精细结构(EXAFS)研究发现*Schizophyllum commune*在吸附U(IV)期间, U的氧化价态保持不变, 但U的形态显著变化, 主要与胞内丰富的磷酸基团结合; Yu等^[23]利用X射线吸收近边缘结构(XANES)等技术研究发现, 在二价锰的生物氧化过程中, 丝状真菌*Acremonium strictum*促进了镧系元素Ce的转化; 本课题组^[24]使用XAFS研究发现, *Mucor circinelloides*将U(VI)还原为U(IV), 而As(V)的存在降低了*Mucor circinelloides*的还原能力。

本文通过批试验、电镜分析、生化和XAFS分析等方法, 研究了黑曲霉(*Aspergillus niger*)对放射性核素U(VI)吸附和富集特性、富集U(VI)后菌丝体胞内外形态变化、氧化应激和抗氧化应激水平的变化, 以及U

(VI)在黑曲霉胞内的价态转化和微观结构。研究结果将为丝状真菌修复放射性核素污染提供理论依据。

2 实验部分

2.1 菌种及培养

采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)液体和固体培养基, 以及含U(VI)的PDA液体和固体培养基。培养基接种实验室前期在放射性污染地区筛选保存黑曲霉后, 在转速为150 r/min, 温度为25℃的摇床上培养^[17]。

2.2 吸附试验

使用批试验法, 称取一定量的菌丝体于100 mL溶液中, 然后通过加入U(VI)储存液来调节不同U(VI)浓度, 通过滴加微量的0.01 M HNO₃或者NaOH溶液来调节pH。振荡吸附平衡后, 9000 r/min离心10 min, 取上清液采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(inductive coupled plasma emission spectrometer, ICP-AES; Perkin-Elmer, USA)检测溶液中U(VI)的浓度。通过计算起始浓度和平衡浓度的差值可以计算出吸附在黑曲霉上的U(VI)的量。

$$\text{吸附率}(\%) = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{吸附量} Q = (C_0 - C_e) \times V / m \quad (2)$$

$$\text{分配系数} K_d = (C_0 - C_e) / C_e \times V / m \quad (3)$$

式中, C_0 为离子起始浓度(mg/L), C_e 为平衡时离子浓度(mg/L), m 是菌丝体的质量(g), V 是溶液的体积(mL)。

2.3 生物富集

收集上述不同时间段以及不同U(VI)浓度胁迫下黑曲霉, 离心分离出菌丝体, 采用Xu等^[19]方法清洗表面吸附的U(VI)。称取0.50 g冷冻干燥后的菌丝, 加入6 mL HNO₃和2 mL H₂O₂, 采用Mendil方法消解, 最后定容混匀^[25]。利用ICP-MS测定样品中的U。

2.4 生物量测定

黑曲霉于PDA培养基上活化培养一段时间后, 将相同生长速率的菌丝体接入含不同U(VI)浓度梯度的100 mL液态PDA培养基中。培养不同天数后烘干至恒重, 测定菌丝体干重。

2.5 生化指标的测定及检测方法

H_2O_2 和MDA浓度采用试剂盒测定. 对于总硫醇检测, 将2.0 g新鲜菌丝体用液氮冷冻并研磨成粉末, 然后加入10 mL提取溶液(50 mM磷酸钠, 1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和0.1 mM 乙二胺四乙酸(EDTA)). 将0.1 mL上述提取物与0.3 mL 0.2 M Tris和0.02 mL 0.01 M 5,5-二硫二硝基苯甲酸(DTNB)混合, 用无水甲醇调节至2.0 mL, 15 min后用紫外可见分光光度计(Shimadzu, Kyoto, Japan)在412 nm检测. 对于GSH检测, 将1 mL真菌提取物与0.8 mL去离子水和0.2 mL 50%三氯乙酸混合. 之后, 将该溶液与4 mL的0.4 M Tris和0.1 mL的0.01 M DTNB混合, 然后以8000 r/min离心10 min, 再在412 nm检测. 通过总硫醇和GSH的差值获得PB-SH的浓度^[26].

2.6 电镜分析

取100 μM U(VI)胁迫的菌丝体和对照组菌丝体, 用去离子水洗涤3次去除菌体表面培养液, 5%戊二醛固定12 h后, 0.1 M磷酸缓冲液(PBS)缓冲液(pH 7.2)冲洗浸泡3次, 每次15 min. 然后用乙醇梯度脱水、乙酸异戊酯置换2次; 临界点干燥、样品离子溅射后用扫描电子显微镜(SEM)观察富集前后菌体表面的特征变化. 取100 μM U(VI)胁迫的菌丝体和对照组菌丝体, 清洗后置入预冷的5%戊二醛固定液中, 经树脂包埋, 切片后使用透射电子显微镜(TEM)观察富集前后菌丝体内部的特征变化.

2.7 XAFS分析

黑曲霉在含有100 μM U(VI)的液体PDA培养基中培养不同时间后(6 h、3 d和6 d), 离心并弃上清液, 采用0.2 M HNO_3 清洗细胞壁外吸附的U. 最后将胞内含有U的黑曲霉菌丝体通过上海同步辐射装置(SSRF)的BL14W1光束线进行分析, 用平面双晶Si(111)单色器和谐波抑制高次谐波的出现. 采集得到的EXAFS谱图能量和荧光停歇时间校正以及数据拟合通过IFEFFIT安装包中的Athena和Artemis软件进行分析^[27-31].

2.8 数据分析

用SPSS19.0统计软件进行单因素或双因素方差分析, Student-Newman-Keuls事后分析, 试验数据用平均

值 $\pm$ 标准差表示, p 值 <0.05 被认为显著性差异.

3 结果与讨论

3.1 吸附动力学

图1(a)显示黑曲霉菌丝体动态吸附U(VI)的过程. 0~24 h为第一阶段, 吸附率较高, 对U(VI)吸附量为40 mg/g, 占总吸附量的80%以上. 此阶段菌丝体壁上丰富的官能团能快速地与U(VI)结合. 随着吸附进行, 表面吸附的U(VI)持续升高, 并向菌丝体内富集, 最后逐渐达到饱和. 24~48 h为第二阶段, 吸附率减慢, 48 h达到吸附平衡. 菌丝体对溶液中U(VI)的吸附过程采用准一级和准二级动力学模型进行拟合, 其公式为:

$$\ln(Q - Q_t) = \ln Q - K \times t \quad (4)$$

$$t / Q_t = 1 / (K' \times Q^2) + t / Q \quad (5)$$

图1 (a) 黑曲霉吸附U(VI)动力学; (b) 吸附剂浓度对吸附U(VI)的影响. $T=298\text{ K}$, $C_{\text{initial}}=20\text{ mg/L}$, pH 6.0 (网络版彩图)
Figure 1 (a) Kinetics of U(VI) on *A. niger*; (b) the effect of mycelia content on adsorption of Co(II) U(VI) by *A. niger*. $T=298\text{ K}$, $C_{\text{initial}}=20\text{ mg/L}$, pH 6.0 (color online).

式中, Q 为平衡时的吸附量(mg/g), Q_t 为 t 时刻的吸附量(mg/g), K (1/h)和 K' (g/(mg h))分别为准一级动力学和准二级动力学速率常数. 拟合参数见表1, 与准一级动力学模型相比, 准二级动力学模型能更好地拟合黑曲霉对U(VI)吸附的动态过程($R^2=0.999$), 这与毛霉吸附U(VI)的动力学模型相似^[24].

3.2 菌丝体浓度对吸附效果的影响

图1(b)所示是不同菌丝体浓度对黑曲霉吸附U(VI)的影响. 随着菌丝体的增加, 黑曲霉吸附U(VI)的量逐渐增加, 当菌丝体浓度超过0.6 g/L后, 吸附U(VI)的量略微增加. 分配系数 K_d 随着菌丝体的增加而逐渐降低. 在U(VI)离子浓度固定的溶液体系中, 如果菌丝体表面活性位点未饱和, 其对U(VI)的去除率会随着菌丝用量的上升而增加, 但当到达平衡点后, 再增加菌丝体, 不能升高吸附率. 因而, 为了保持高的吸附率又节约成本, 菌丝添加量为0.6 g/L比较合理.

3.3 溶液pH对菌丝体吸附的影响

如图2(a)所示在pH 2.0~5.0时, 吸附量迅速上升, 在pH 5.0~7.0时保持较高的吸附量, 当pH>7时吸附量迅速下降. 初始pH决定着U(VI)的形态分布和菌丝体的表面电荷性质, 并且菌丝体表面官能团的质子化和去质子化反应能促进或抑制其对U(VI)的吸附. 在pH<5时, 黑曲霉菌丝体带正电荷^[17]. 而此时, U(VI)主要以 UO_2^{2+} 的形式存在^[32], 菌丝体和 UO_2^{2+} 之间的电荷排斥作用使得吸附降低. 随着pH的增加, 菌丝体表面渐渐变成带负电. 更重要的是, 菌丝体表面官能团变得更加分散^[17]. pH在5.0~8.0时, U(VI)的主要存在形式为 $(UO_2)_3(OH)_5^+/(UO_2)_4(OH)_7^+$, 以上两种变化增加了菌丝体和U(VI)之间的吸附量. 当pH>8.0时, 菌丝体表面负电荷增多, 并且U(VI)主要以 $UO_2(OH)_3^-$ 形式存在. $UO_2(OH)_3^-$ 和表面负电荷之间的排斥使得吸附量降低. UO_2^{2+} 在茶叶废料和等离子体功能化碳纳米管表面吸

图2 (a) pH对吸附U(VI)的影响. $T=298\text{ K}$, $m/V=0.4\text{ g/L}$, $C_{\text{initial}}=20\text{ mg/L}$. (b) Langmuir和Freundlich拟合黑曲霉吸附U(VI)的等温线. pH 6.0, $m/V=0.4\text{ g/L}$ (网络版彩图)

Figure 2 (a) Effect of pH on adsorption of U(VI) by *A. niger*. $T=298\text{ K}$, $m/V=0.4\text{ g/L}$, $C_{\text{initial}}=20\text{ mg/L}$. (b) The isotherms of U(VI) adsorption on *A. niger*; the solid line stands for Langmuir model and the dash line stands for Freundlich model, pH 6.0, $m/V=0.4\text{ g/L}$ (color online).

附也有类似性质^[33,34].

3.4 吸附等温线

为了进一步研究反应吸附本质, 等温线使用Langmuir和Freundlich模型拟合, 公式如下:

$$C_s = \frac{bC_{s\text{max}}C_e}{1+bC_e} \quad (6)$$

$$C_s = K_F C_e^n \quad (7)$$

式中, C_e 是U(VI)平衡后溶液中最终浓度(mg/g), C_s 是吸附到菌丝体上的U(VI)的量(mg/g), $C_{s\text{max}}$ 是完全单层吸

表1 准一级和准二级动力学模型拟合参数

Table 1 Parameters for the kinetic data of Pseudo-first-order and Pseudo-second-order models

准一级动力学模型			准二级动力学模型		
Q (mg/g)	K (1/h)	R^2	Q (mg/g)	K' (g/(mg h))	R^2
42.33	0.223	0.981	45.27	0.0131	0.999

附到菌丝体上的U(VI)的最大吸附量(mg/g), b 是与吸附热有关的Langmuir常量(L/mg), K_F ($\text{mg}^{1-n} \text{L}^n/\text{g}$)和 n 为Freundlich模型常量. Langmuir和Freundlich模型的相关参数见表2. 由 R^2 值可知, Langmuir模型更符合菌丝体吸附U(VI)的等温线. 在pH 6.0, $T=298 \text{ K}$ 条件下, 菌丝体吸附U(VI)的 $C_{s \max}$ 为83.73 mg/g. 与其他材料的 $C_{s \max}$ 相比, 如原始碳纳米管(16.2 mg/g U(VI), pH 5.0, $T=298 \text{ K}$)^[35], 等离子功能化碳纳米管(75.1 mg/g U(VI), pH 5.6, $T=303 \text{ K}$)^[34], 海洋藻类和酵母固定化的硅胶(56.7 mg/g U(VI), pH 4, $T=303 \text{ K}$)^[36], 氧化锰包覆的沸石(17.6 mg/g U(VI), pH 6, $T=293 \text{ K}$)^[37], 黑曲霉菌丝体具有较高吸附U(VI)能力.

3.5 黑曲霉胞内富集U(VI)

图3(a)所示是144 h内吸附过程中黑曲霉胞内富集U(VI)浓度的变化情况. 0~84 h内黑曲霉富集U(VI)的量持续升高; 84 h后, 富集U(VI)量基本不变. 并且U(VI)浓度越高黑曲霉体内U(VI)富集量也越大, 与黄孢原毛平革菌富集Cd的结果相似^[38]. 400 μM U(VI)培养基中黑曲霉富集U(VI)的量是200 μM U(VI)培养基中黑曲霉富集U(VI)的量的2倍.

3.6 U(VI)胁迫对黑曲霉生物量的影响

图3(b)所示为U(VI)浓度增加对菌丝体生物量的影响. 从图中可知, 未添加U(VI)时, 5 d内黑曲霉生物量不断增加. 添加U(VI)时, 前3 d黑曲霉生物量微量增加, 而后基本不变. 在培养初期, 培养液中营养充分, 黑曲霉可有效利用培养液中的有机质及无机营养元素, 将其转化为自身组分导致生物量的增加, 菌体处于生长营养期, 3 d后黑曲霉生物量变化很小, 可见U(VI)胁迫抑制了黑曲霉的生长^[38].

表 2 Langmuir和Freundlich等温线相关参数

Table 2 Parameters for the Langmuir and Freundlich models

T (K)	Langmuir model			Freundlich model		
	$C_{s \max}$ (mg/g)	b (L/mg)	R^2	K_F ($\text{mg}^{1-n} \text{L}^n/\text{g}$)	n	R^2
298	83.73	0.0531	0.996	26.46	0.448	0.963
308	97.08	0.0653	0.995	28.54	0.462	0.958
318	110.04	0.0801	0.992	30.87	0.483	0.949

图 3 (a) 黑曲霉富集U(VI); (b) 不同U(VI)浓度胁迫条件下黑曲霉的生物量变化情况. $T=298 \text{ K}$, pH 6.0 (网络版彩图)

Figure 3 (a) U(VI) bioconcentration on *A. niger*; (b) change of biomass under U(VI) stress. $T=298 \text{ K}$, pH 6.0 (color online).

3.7 SEM和TEM分析

采用SEM观察了富集U(VI)前后菌丝体表面形态. 由图可以看出, 富集前的菌丝体较完整, 表面光滑无颗粒(图4(a)), 而富集后的菌丝体表面颗粒较多, 菌丝分枝较多(图4(b)). 表面颗粒可能是U(VI)与菌丝体表面的胞外聚合物作用而形成的沉淀. 同时, U(VI)对黑曲霉产生毒害作用, 影响菌丝的生长而产生较多分枝.

图4 (a) 黑曲霉的SEM图; (b) U(VI)胁迫的黑曲霉SEM图; (c) 黑曲霉的TEM图; (d) U(VI)胁迫的黑曲霉TEM图

Figure 4 SEM images of *A. niger* at 0 μM U(VI) (a) and 200 μM U(VI) (b); TEM images of *A. niger* at 0 μM U(VI) (c) and 200 μM U(VI) (d).

采用TEM观察菌丝体富集U(VI)前后的胞内形态。富集前的菌丝体横切面呈椭圆形, 胞壁致密、完整、无颗粒(图4(c)); 富集后的菌丝体胞壁变得疏松增大, 有大小不等的颗粒, 这可能是由于部分U(VI)形成了U(VI)沉淀物(图4(d)). 从上述研究可知, U(VI)与黑曲霉细胞作用后, 首先是吸附在真菌细胞壁上, 在此过程中可能会影响真菌细胞壁的结构, 然后通过代谢依赖或非依赖方式一部分U(VI)进入菌丝体胞内^[24].

3.8 氧化应激水平

图5显示, 正常条件下菌丝体胞内 H_2O_2 和MDA浓度变化幅度不大. 但是在U(VI)存在下, 在培养前2 d, H_2O_2 和MDA浓度明显升高, 且 H_2O_2 和MDA浓度随着U(VI)浓度的升高而升高. 前3 d, U(VI)胁迫产生的 H_2O_2 和MDA浓度升高最显著. 这可能是菌丝体正在生长, 没有应对的抵抗体系, U(VI)对菌丝体毒害较大, 导致菌丝体 H_2O_2 的产生. U(VI)存在条件下会产生大量的 H_2O_2 , 可作用于膜脂质发生过氧化反应, 致使MDA含量升高. 3 d后, 不同U(VI)浓度下MDA逐渐降低, 表明菌丝体内抗氧化体系形成, 促使菌丝体的正常生长代谢^[38].

3.9 GSH和PB-SH的含量变化

图6显示在U(VI)胁迫下, 黑曲霉胞内的活性氧水平上升可以显著诱导菌体内抗氧化物质的合成. GSH和PB-SH含量是先增加后减少, GSH和PB-SH的释放量与U(VI)的富集量呈正比. GSH和PB-SH不断中和菌丝体内过多的 H_2O_2 等, 维持胞内的氧化还原状态. 另外, GSH可作为螯合剂参与到U(VI)的解毒机制. 类似的结果如*Phanerochaete chrysosporium*内GSH强力螯合Cd, 将Cd变为低毒的形态^[39].

3.10 黑曲霉转化U(VI)机制

图7(a)为XANES分析黑曲霉胞内U的形态, 其胞内U的形态随着时间的增加显著地发生变化. 在XANES图谱中较高的吸收边能量是表示U的较高氧化态, 低级吸收边能量对应于一个较低的氧化态. 通过与标准样品的吸收边比较, 可以得知黑曲霉胞内U的形态变化, 在17175和17178 eV的峰分别对应 UO_2 和U(VI)的吸收边能量^[40-42]. 在pH 6.0, $t=6$ h条件下的黑曲霉胞内U基本上是U(VI); 在pH 6.0, $t=3$ d条件下的黑曲霉胞内U是U(VI)和U(IV); 在pH 6.0, $t=6$ d条件下黑

图 5 不同U(VI)浓度胁迫条件下黑曲霉氧化损伤变化情况(网络版彩图)

Figure 5 Concentration of H_2O_2 (a) and O_3^- (b) in *A. niger* under different U(VI) stress (color online).

曲霉胞内U形态主要是U(VI) (图3). 这表明U(VI)在黑曲霉胞内被还原为U(IV). 丝状真菌是一种天然抗氧化剂, 具有还原性^[43], 如*Mucor circinelloides*将U(VI)还原为U(IV)^[24].

图7(b)为傅里叶变换(FT)后EXAFS光谱, U的第一壳层是O, 在1.8 Å位置为2个轴向的O(U-O_{ax}), 在2.32~2.36 Å位置为赤道面的O(U-O_{eq}), 不同数量的O_{eq} (2~7)揭示了不同的相互作用机制^[44](表3). U-P/C配位数和配位峰都随时间的增加而减少^[31]; U-U配位数和配位峰都随时间的增加而变化, 表明经过一段时间后U(VI)还原为U(IV)^[42], 这个结果与XANES分析一致. 为了进一步表征还原产物, 将黑曲霉胞内的U(IV)的EXAFS谱与已知结构的U(IV)标准进行比较, 结晶 UO_2 标准物中U(IV)相的EXAFS光谱显示3~4.2之间的双峰^[45,46]. 在黑曲霉胞内的U(IV)不显示该双重峰, 并且U(IV)的EXAFS谱与铀系EXAFS模型的拟合相比, 明显缺少沥青铀矿 $[\text{U}(\text{SiO}_4)_9(\text{OH})_4]$ 中见到的双齿U(IV)-O₂-U(IV)配位^[42]. 因此, 还原的U(IV)原子或者单独与

图 6 不同U(VI)浓度下黑曲霉内GSH (a)和PB-SH (b)含量的变化情况(网络版彩图)

Figure 6 Concentration of GSH (a) and PB-SH (b) in *A. niger* under different U(VI) stresses (color online).

配体结合, 或者以分子U(IV)矿物如 $\text{CaU}(\text{PO}_4)_2$ 的形式存在^[47]. 在黑曲霉胞内获得的EXAFS谱图中观察到的2.4~3.6 Å的FT光谱特征不是邻近O原子在1.8 Å处的主峰贡献的一部分. 这表明附加EXAFS谱特征与在3.0~3.8 Å之间的U(IV)原子距离处存在至少两个轻原子壳(如C/N/O或S/P). 由于小振幅和重叠峰, 不能明确指定壳的确切壳层. 然而, 附加EXAFS谱结构的存在, 表明U(IV)原子可能与轻元素含氧阴离子配体(如碳酸盐、羧基、磷酸基)^[45].

4 结论

本文采用批试验和X射线吸收精细结构谱学(XAFS)技术系统研究了黑曲霉对放射性核素U(VI)的吸附、富集和转化. 宏观研究表明, 时间、菌丝体浓度、pH和温度显著影响黑曲霉菌丝体吸附U(VI), 吸附动力学符合准二级动力学模型; 吸附等温线符合Langmuir模型, 在pH 6.0, $T=298\text{ K}$ 条件下, 菌丝体吸

图 7 (a) XANES分析黑曲霉菌丝体内U的价态变化; (b) 经傅里叶变换得到的径向结构函数, 图中实线和虚线分别代表试验谱图和对应的拟合曲线(网络版彩图)

Figure 7 Uranium L_{III}-edge XANES (a) and EXAFS (b) spectra of U(VI) bioaccumulation in *A. niger* at different time. Solid and dash lines in (b) represent experimental spectra and spectral fits, respectively (color online).

表 3 黑曲霉富集U(VI)的U L_{III}边EXAFS拟合参数

Table 3 Uranium L_{III}-edge EXAFS spectra for U(VI) bioconcentration by *A. niger* at different conditions

样品	壳层	R (Å) ^{a)}	CN ^{b)}	σ^2 (Å ²) ^{c)}
pH 6.0, $t=6$ h	U-O _{ax}	1.79	2.01	0.006
	U-O _{eq}	2.36	6.12	0.041
	U-P/C	3.68	3.60	0.005
	U-U	3.99	2.64	0.016
pH 6.0, $t=3$ d	U-O _{ax}	1.82	2.02	0.006
	U-O _{eq}	2.35	5.10	0.007
	U-P/C	3.69	2.70	0.005
	U-U	3.92	4.70	0.006
pH 6.0, $t=6$ d	U-O _{ax}	1.90	2.04	0.025
	U-O _{eq}	2.34	5.87	0.009
	U-P/C	3.68	1.90	0.008
	U-U	3.89	5.12	0.008

a) R 是键长; b) CN 是配位数; c) σ^2 是德拜-瓦勒因数因子

附U(VI)的最大吸附量是83.73 mg/g, 比其他生物吸附剂有较高的吸附U(VI)能力. 黑曲霉富集U(VI)后, 胞内外形态结构明显改变, 并且胞内H₂O₂、MDA和巯基

化合物浓度显著增加. XAFS分析表明, 在黑曲霉胞内U(VI)还原为U(IV). 这些研究结果表明, 黑曲霉菌丝体有望应用于从大规模污水中富集去除U(VI).

参考文献

- 1 Richard A, Rozsypal C, Mercadier J, Banks DA, Cuney M, Boiron MC, Cathelineau M. *Nat Geosci*, 2012, 5: 142–146
- 2 Zheng T, Yang Z, Gui D, Liu Z, Wang X, Dai X, Liu S, Zhang L, Gao Y, Chen L, Sheng D, Wang Y, Diwu J, Wang J, Zhou R, Chai Z, Albrecht-Schmitt TE, Wang S. *Nat Commun*, 2017, 8: 15369
- 3 Cai Y, Wu C, Liu Z, Zhang L, Chen L, Wang J, Wang X, Yang S, Wang S. *Environ Sci-Nano*, 2017, 4: 1876–1886
- 4 Geckeis H, Lützenkirchen J, Polly R, Rabung T, Schmidt M. *Chem Rev*, 2013, 113: 1016–1062
- 5 Pang H, Wang X, Yao W, Yu S, Wang X. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 58–73 (in Chinese) [庞宏伟, 王祥学, 姚文, 于淑君, 王祥科. 中国科学: 化学, 2018, 48: 58–73]
- 6 Sheng D, Zhu L, Xu C, Xiao C, Wang Y, Wang Y, Chen L, Diwu J, Chen J, Chai Z, Albrecht-Schmitt TE, Wang S. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 3471–3479
- 7 Xu L, Zheng T, Yang S, Zhang L, Wang J, Liu W, Chen L, Diwu J, Chai Z, Wang S. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 3852–3859
- 8 Liang Y, Gu P, Yao W, Yu S, Wang J, Wang X. *Prog Chem*, 2017, 29: 1062–1071 (in Chinese) [梁宇, 顾鹏程, 姚文, 于淑君, 王建, 王祥科. 化学进展, 2017, 29: 1062–1071]
- 9 Sun Y, Lu S, Wang X, Xu C, Li J, Chen C, Chen J, Hayat T, Alsaedi A, Alharbi NS, Wang X. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 12274–12282
- 10 Tkavc R, Matrosova VY, Grichenko OE, Gostinčar C, Volpe RP, Klimenkova P, Malfatti SA. *Front Microbial*, 2017, 8: 1–21
- 11 Vázquez-Campos X, Kinsela AS, Collins RN, Neilan BA, Aoyagi N, Waite TD. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 8487–8496
- 12 Gadd GM, Fomina M. *Geomicrobiol J*, 2011, 28: 471–482
- 13 Lujanienė G, Levinskaitė L, Kačergius A, Gavutis M. *J Radioanal Nucl Chem*, 2017, 311: 1393–1399
- 14 Vinichuk M, Mårtensson A, Ericsson T, Rosén K. *J Environ Radioact*, 2013, 115: 151–156
- 15 Zhao C, Liu J, Tu H, Li F, Li X, Yang J, Liao J, Yang Y, Liu N, Sun Q. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23: 24846–24856
- 16 Ding C, Feng S, Li X, Liao J, Yang Y, An Z, Wu Q, Zhang D, Yang J, Tang J, Zhang J, Liu N. *Radiochim Acta*, 2014, 102: 175–184
- 17 Song W, Liang J, Wen T, Wang X, Hu J, Hayat T, Alsaedi A, Wang X. *Chem Eng J*, 2016, 304: 186–193
- 18 Jiang GCT, Hughes S, Stürzenbaum SR, Evje L, Syversen T, Aschner M. *Toxicol Sci*, 2009, 111: 345–354
- 19 Xu P, Liu L, Zeng G, Huang D, Lai C, Zhao M, Huang C, Li N, Wei Z, Wu H, Zhang C, Lai M, He Y. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 6409–6418
- 20 Xu H, Song P, Gu W, Yang Z. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2011, 74: 1685–1692
- 21 Schneider J, Bundschuh J, Rangel WM, Guilherme LRG. *Environ Pollut*, 2017, 224: 125–135
- 22 Günther A, Raff J, Merroun ML, Roßberg A, Kothe E, Bernhard GI. *Biometals*, 2014, 27: 775–785
- 23 Yu Q, Ohnuki T, Tanaka K, Kozai N, Yamasaki S, Sakamoto F, Tani Y. *Geochim Cosmochim Acta*, 2016, 174: 1–12
- 24 Song W, Wang X, Chen Z, Sheng G, Hayat T, Wang X, Sun Y. *Environ Pollut*, 2018, 237: 228–236
- 25 Mendil D, Doğan Uluözlü Ö, Hasdemir E, Tüzen M, Sari H, Suiçmez M. *Food Chem*, 2005, 90: 175–179
- 26 Guimarães-Soares L, Pascoal C, Cássio F. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2007, 66: 36–43
- 27 van Veelen A, Bargar JR, Law GTW, Brown Jr GE, Wogelius RA. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 3435–3443
- 28 Sun Y, Li J, Wang X. *Geochim Cosmochim Acta*, 2014, 140: 621–643
- 29 Yang S, Wang X, Chen Z, Li J, Wei B, Wang X. *Prog Chem*, 2018, 30: 225–242 (in Chinese) [杨姗也, 王祥学, 陈中山, 李倩, 韦犇犇, 王祥科. 化学进展, 2018, 30: 225–242]
- 30 Sheng G, Yang S, Zhao D, Sheng J, Wang X. *Sci Sin Chim*, 2012, 42: 60–73 (in Chinese) [盛国栋, 杨世通, 赵东林, 盛江, 王祥科. 中国科学: 化学, 2012, 42: 60–73]
- 31 Ding C, Cheng W, Sun Y, Wang X. *Geochim Cosmochim Acta*, 2015, 165: 86–107
- 32 Yang S, Zong P, Hu J, Sheng G, Wang Q, Wang X. *Chem Eng J*, 2012, 214: 376–385
- 33 Ding DX, Liu XT, Hu N, Li GY, Wang YD. *J Radioanal Nucl Chem*, 2012, 293: 735–741
- 34 Song M, Wang Q, Meng Y. *J Radioanal Nucl Chem*, 2012, 293: 899–906
- 35 Shao D, Jiang Z, Wang X, Li J, Meng Y. *J Phys Chem B*, 2009, 113: 860–864

- 36 Aytaş S, Turkoz DA, Gök C. *Desalination*, 2011, 280: 354–362
- 37 Han R, Zou W, Wang Y, Zhu L. *J Environ Radioact*, 2007, 93: 127–143
- 38 许飘. 白腐真菌对重金属的吸附富集特性及其重金属耐受性和抗性机制研究. 博士学位论文. 长沙: 湖南大学, 2016. 45–48
- 39 Xu P, Zeng G, Huang D, Liu L, Zhao M, Lai C, Li N, Wei Z, Huang C, Zhang C. *Ecol Eng*, 2016, 87: 150–156
- 40 O'Loughlin EJ, Kelly SD, Kemner KM. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 1656–1661
- 41 Troyer LD, Tang Y, Borch T. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 14326–14334
- 42 Sun Y, Wu ZY, Wang X, Ding C, Cheng W, Yu SH, Wang X. *Environ Sci Technol*, 2016, 50: 4459–4467
- 43 Smith H, Doyle S, Murphy R. *Food Chem*, 2015, 185: 389–397
- 44 Bernier-Latmani R, Veeramani H, Vecchia ED, Junier P, Lezama-Pacheco JS, Suvorova EI, Sharp JO, Wigginton NS, Bargar JR. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 9456–9462
- 45 Fletcher KE, Boyanov MI, Thomas SH, Wu Q, Kemner KM, Löffler FE. *Environ Sci Technol*, 2010, 44: 4705–4709
- 46 Burgos WD, McDonough JT, Senko JM, Zhang G, Dohnalkova AC, Kelly SD, Gorby Y, Kemner KM. *Geochim Cosmochim Acta*, 2008, 72: 4901–4915
- 47 Dusauroy Y, Ghermani NE, Podor R, Cuney M. *Eur J Mineral*, 1996, 8: 667–674

Adsorption, bioconcentration and transformation of radioactive U(VI) on filamentous fungi *Aspergillus Niger*

Jun Liang¹, Lei Liu², Kelai Tang³, Wencheng Song^{2*}

¹ Jianghuai College, Anhui University, Hefei 230039, China

² Anhui Province Key Laboratory of Medical Physics and Technology, Center of Medical Physics and Technology, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China

³ Agricultural Technology Station, Stone Town, Lujiang County, Hefei City, Anhui Province, Hefei 231524, China

*Corresponding author (email: wencsong@cmpt.ac.cn)

Abstract: The adsorption, bioconcentration and transformation of radionuclides U(VI) by *Aspergillus niger* (*A. niger*) were studied. Batch experiments showed that the adsorption of U(VI) by *A. niger* was influenced by time, adsorbent concentration, pH value and temperature. The adsorption reached equilibrium within 48 h, and the adsorption kinetics complied with the pseudo-second-order kinetics model. The Langmuir model was more consistent with the adsorption isotherm than the Freundlich model, and the maximum adsorption of U(VI) by mycelia was 83.73 mg/g at pH 6.0 and $T=298$ K, which was higher than other biosorbents. After bioconcentration of U(VI) by *A. niger*, the intracellular and extracellular morphological structures changed significantly, and the concentrations of intracellular H_2O_2 , malonaldehyde (MDA) and thiol compounds in mycelia increased obviously. X-ray absorption near-edge structure (XANES) analysis confirmed that the intracellular U(VI) of *A. niger* was reduced to U(IV), and EXAFS data indicated that the U(IV) product was a phase composed of mononuclear U(IV) atoms closely surrounded by light element shells. The results showed that the filamentous fungus *A. niger* can be used as a potential biological material for radionuclide removal, which has important scientific significance and potential application value.

Keywords: *Aspergillus niger*, adsorption, bioconcentration, U(VI), X-ray absorption fine structures (XAFS)

doi: [10.1360/N032018-00134](https://doi.org/10.1360/N032018-00134)