

参赛队员姓名：庞泽堃

中学：中国人民大学附属中学

省份：北京市

国家/地区：中国

指导教师姓名：鲁安怀，万丹

指导教师单位：北京大学，中国人民大学附属中学

论文题目：利用土壤本源镰刀菌低成本绿色高效去除溶液中六价铬

利用土壤本源镰刀菌低成本绿色高效去除溶液中六价铬

作者：庞泽堃

摘要：本研究采用土壤中分离提取处理的耐铬镰刀菌（*Fusarium*），对废水中的Cr(VI)进行处理，去除方法低成本绿色高效。对除铬前后的真菌菌丝进行测试，除铬后菌丝表面出现铬元素并有新生成的矿物结晶，推测镰刀菌将六价铬还原为三价铬并固定在菌丝表面。设计一系列实验，改变废水中的碳源浓度、初始铬浓度、反应pH值等实验参数。研究表明，在实验研究范围内，碳源浓度越高，pH值越低，初始铬浓度越低，该镰刀菌对六价铬的去除效果越好。在同一梯度下，碳源浓度、pH值、初始铬浓度对六价铬去除率的影响依次减弱。该镰刀菌处理铬的效果在最佳状态下去除率达到100%。

关键词：本源微生物；六价铬；还原固定；最佳实验条件

目录

1. 前言	3
2. 实验方法	4
3. 实验结果及讨论	4
3.1 反应前后真菌形貌观测及表面元素分析	4
3.2 不同碳源浓度对真菌 <i>Fusarium</i> 除铬效率的影响	6
3.3 不同pH值对真菌除铬效率的影响	7
3.4 不同初始铬浓度对真菌除铬效率的影响	8
3.5 正交试验：不同碳源浓度、pH值、初始铬浓度对真菌除铬效率的影响	9
4. 结论	13
参考文献	14
致谢	15

1. 前言

铬是一种重金属，其价态为-2到+6价，而在实际情况下主要以+3价和+6价存在[1]。铬广泛应用于金属的清洗加工、合金制备、制革厂、电镀设施等领域[2]。然而研究表明，六价铬具有极其强烈的氧化性，它可以与人体血液中含有的血红蛋白结合，促使蛋白变性，减少身体供氧，形成呼吸不畅的症状[3]。研究表明，六价铬在灌溉水中的浓度为1mg/L时，就会导致水稻产量大幅度降低，而且六价铬可在水稻体内积累，威胁食品安全，危害消费者身体健康[4]。对于具有强烈毒性的六价铬，1994年我国规定地表水排放Cr(VI)的许可浓度为0.50 mg/L [5]，其化合物也在2012年被世界卫生组织列为A类致癌物。相比之下，元素相同但价态不同的三价铬的危害性较小，毒性较低，并且更易于沉淀，在环境中更加稳定[6]。由此，我们可以将被广泛应用的有害六价铬进行处理，还原为毒性更低，更容易进行沉淀处理的三价铬，以解决铬污染问题。

现有的将废水溶液中的六价铬转化为三价铬的方式一共分为三大类，即物理法、化学法与生物法。物理法包含物理吸附、离子交换、电渗析等多种方式[7]。而化学法通常使用还原剂将六价铬还原为三价铬，并调整溶液中的pH值促使三价铬沉淀[8]。然而，物理法操作过程复杂，步骤较多，使得处理成本较高；而化学法需要添加大量的化学试剂，导致其能耗较高，成本昂贵，并可能会产生大量污泥，造成二次污染。与此相比，生物法处理六价铬的方式既不需要添加大量试剂，也不需要配备防腐设备，且处理设施可以位于室外。其有着成本低廉、操作简便的特性，不易造成副作用，是现阶段的研究热点之一[9]。由此实验考虑研究生物法去除溶液中的六价铬。

大量研究表明，多种微生物对于Cr(VI)均有一定的耐受性，同时能将环境中的Cr(VI)通过吸附还原作用高效去除[10-13]。但是由于自然环境中微生物群落组成复杂，若在自然环境中随意引入大量菌群，会有可能导致环境微生物群落改变，甚至影响生态平衡。利用土壤本源微生物去除处理六价铬，可以有效减少对自然环境生物群落的危害。本文研究经过对铬污染土壤菌群进行培养驯化，得到一株土壤本源耐铬真菌。经过鉴定，该真菌为镰刀菌 (*Fusarium*)。在接下来的实验中利用镰刀菌进行探究。

在本实验中通过改变废水中的碳源浓度、初始铬浓度、反应 pH 值等实验参数，探究该镰刀菌去除 Cr(VI)的最佳实验条件。并进一步探究在同一梯度下，各因素对 Cr(VI)去除效果的影响强弱，为驯化使用活微生物除铬提供理论研究基础。

2. 实验方法

本实验配制的培养基中每升含 NaCl 2 g, NaNO₃ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 5 mg, NH₄Cl 0.1 g, 酵母膏 0.5 g, 牛肉膏 1 g, 色氨酸 3 g, 葡萄糖 3 g (pH 6.4)。

称取 0.1 g 土壤样品，并溶于 100 mL 的培养液中。于 HZQ-F100 型振荡培养箱中，在 150 r/min、30 °C 的条件下恒温培养 48 h；用移液枪取 1 mL 培养液，转移至 Cr(VI)浓度为 1000 mg/L 的液体培养基(100 mL)中，培养 48 h，重复上述操作 5 次。将以上菌液分别稀释，取 0.1 mL 稀释液滴加在 Cr(VI)浓度为 500 mg/L 的固体平板中央，并立即用无菌三角涂棒涂抹均匀。接种后移入恒温培养箱中，恒温(30 °C)培养 48 h，直到培养基表面观察到菌落。根据菌落形态不同，挑取单菌落，移种到液体培养基中，在 150 r/min、30 °C 的条件下恒温培养 48 h。反复进行以上操作，同时镜检直至获得纯菌株。将该菌株送至美吉生物进行菌株鉴定，其为镰刀菌 (*Fusarium*)。

实验通过稀释培养液，将碳源浓度控制为 25%、50%、75%及 100%。利用稀盐酸 (2%HCl 溶液) 及氢氧化钠溶液 (NaOH 溶液) 调节 pH 值。为配制含六价铬 500 mg/L 溶液，称取在 80 °C 下干燥 3 小时的重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇, 分析纯) 1.414 g, 用培养液溶解后移入 1000 mL 容量瓶中，并用提前配制好的培养液稀释至刻度线，摇匀，移入窄口瓶中。其他初始铬浓度废水通过减少重铬酸钾的添加量而得到。

使用上述方法改变溶液中的碳源浓度、pH 值和初始铬浓度至所需要的合适值。首先使用控制变量法探究每个因素对六价铬的去除率的影响。接着调整各个因素的数值，使得数值的分布更为合理。利用正交试验法设计实验，该实验为三因素四水平，共设计 16 组实验。将该真菌用移液枪从培养皿中转入配好的实验液体培养基培养，并记录 7 日后六价铬的浓度，以计算溶液中六价铬的去除率。

3. 实验结果及讨论

3.1 反应前后真菌形貌观测及表面元素分析

真菌除铬反应前后，利用 SEM 对其进行形貌观测，二次电子像如图 1 所示。

图 1A 为反应前，真菌菌丝表面没有明显的颗粒结晶，较为光滑。利用扫描电子显微镜搭载的 X 射线能谱对菌丝表面进行检测，发现反应前菌丝表面主要元素构成为 C 元素、O 元素、Na 元素、K 元素、Cl 元素，其中 Si 元素是由于基底硅片造成的。图 1B 显示，处理过六价铬溶液之后，菌丝上存留着大量块状结晶物质。经过原位化学元素成分分析，可以看出，菌丝表面主要以 C 元素、O 元素、Na 元素、K 元素、S 元素、P 元素构成。比较 C、D 两图可以发现，反应之后的菌丝表面显著出现 Cr 元素。

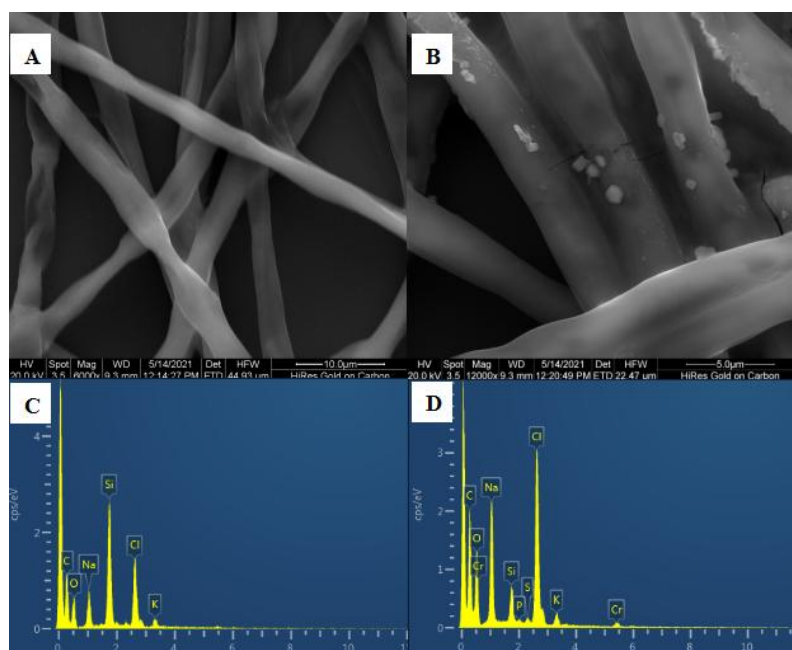


图 1 反应前后真菌二次电子像及表面元素能谱数据图

分别在无铬培养基和含铬培养基中培养该真菌，将菌丝包埋后进行切片处理，并用 SEM 观测菌丝切面的二次电子像，如图 2 所示，其中左图为无铬培养基培养后的菌丝切面图像，而右图是含铬培养基培养后的菌丝切面图像。无铬条件下生长的菌体细胞表面光滑平整，胞外无结晶生成，而在含铬条件下，该真菌细胞表面有大量的结晶附着。该结晶可能是真菌固定六价铬的产物。依据前人文献，推测该真菌可以利用胞外分泌物将 Cr(VI)还原并固定结晶于细胞表面。

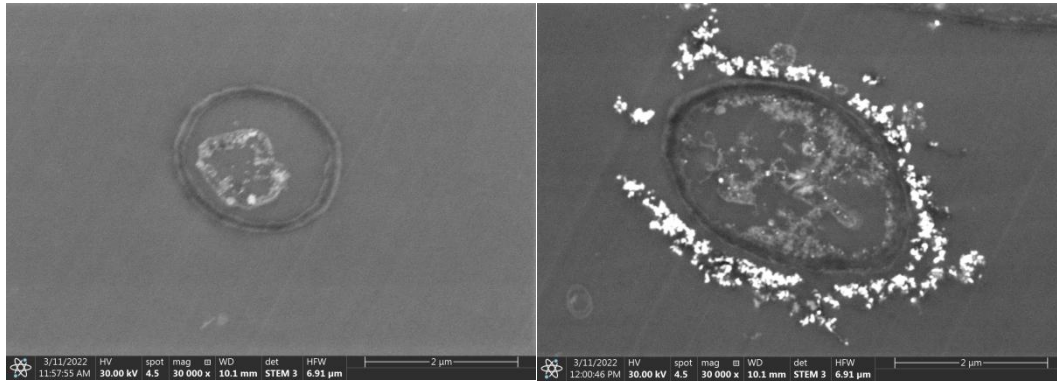


图2 无铬及含铬培养基培养后真菌二次电子像

3.2 不同碳源浓度对真菌 *Fusarium* 除铬效率的影响

为了模拟自然环境中的不同的营养条件，设计不同梯度的碳源浓度。将对照组的碳源含量设为 100%，实验组其他条件相同，碳源含量减少至 25%、50%、75%。溶液中 Cr(VI)浓度变化如图 3 所示。

随着碳源含量的增加，该真菌对溶液中 Cr(VI)的去除效果逐渐提升。不同碳源条件下，反应初期（前 12h）时溶液中 Cr(VI)下降均不明显，可能是因为微生物处于生长期。25%碳源条件下，这一过程持续至 36 h，溶液中的 Cr(VI)才出现明显的下降趋势，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 60 mg/L。而随着碳源的提升，微生物生长速率明显加快，Cr(VI)大幅下降时间点逐渐提前。50%碳源条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 51 mg/L。75%碳源条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 18 mg/L。100%碳源条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 2 mg/L。推测碳源含量的增加有利于微生物进行生命活动，从而促进了 Cr(VI)的去除。

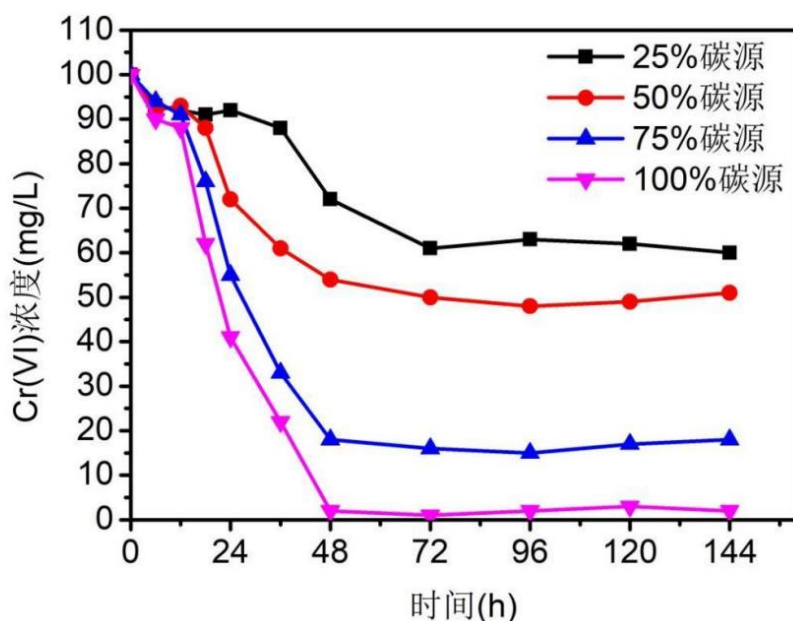


图 3 不同碳源浓度下除铬过程中的 Cr(VI)浓度变化

在不同碳源浓度下，真菌都可以去除溶液中的 Cr(VI)。同时，对溶液中的总 Cr 进行测试，测试结果如表 1 所示。发现不同碳源浓度下，溶液中的总 Cr 没有明显变化，不需要继续检测总铬浓度。表明溶液中 Cr(VI)以大量游离态的 Cr(III)存在于溶液中。而高浓度碳源条件下，溶液中的总 Cr 相对低浓度碳源时有所降低，表明微生物生长对总铬去除有一定影响。根据这一结果我们推测，该真菌对 Cr(VI)的去除作用以胞外分泌物对 Cr(VI)的还原为主，同时伴随有少量吸附作用。

表 1 不同碳源浓度下除铬过程中的总 Cr 浓度变化 (单位: mg/L)

碳源浓度	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
25%	100	99	99	99	96	92	92	90
50%	100	98	98	97	96	92	88	87
75%	100	97	95	94	90	88	87	85
100%	100	95	92	89	88	85	85	83

3.3 不同 pH 值对真菌除铬效率的影响

为了模拟自然环境废水中的不同 pH 状况，通过添加稀盐酸 (2% HCl) 及氢氧化钠 (NaOH) 调节溶液 pH 值分别为 5、6、7、8，经测量溶液初始 pH 值分别为 5.14、6.18、7.06、8.11，并保持其他条件相同。

去除效果如图 4 所示，随着 pH 值从 8 不断降低至 5，去除效果逐渐提升。在 8.11 的 pH 值条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 95 mg/L；7.06 的 pH 值条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 58 mg/L；6.18 的 pH 值条件下，

144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 54 mg/L；5.14 的 pH 值条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 44 mg/L。

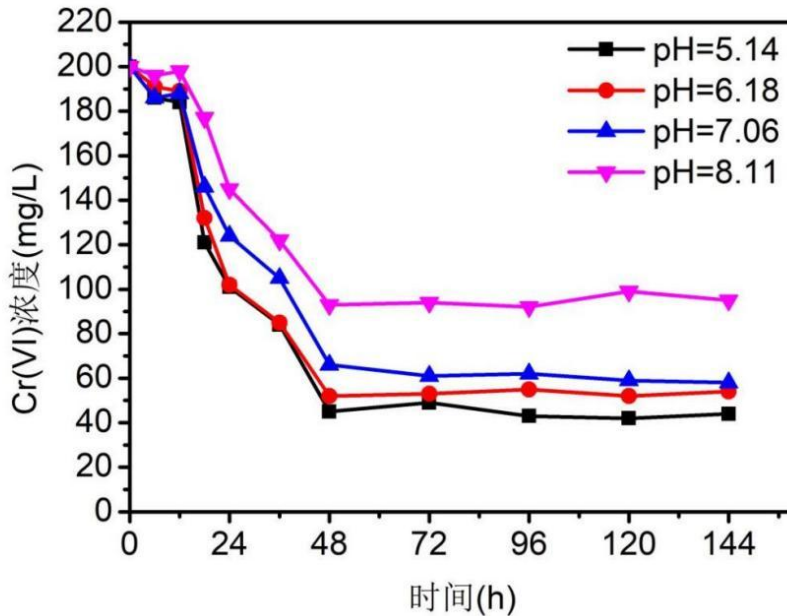


图 4 不同 pH 值下除铬过程中的 Cr(VI)浓度变化

对溶液中的总 Cr 进行测试，测试结果如表 2 所示。对比图 4 和表 2 可知，pH 在约等于 5 和 6 时，总 Cr 浓度和 Cr(VI)差别较大。而 pH 约等于 7 和 8 时，溶液中总 Cr 浓度和 Cr(VI)浓度差别不大。原因在于，中性及碱性条件下，Cr(III)易发生沉淀，才导致的总铬浓度和六价铬浓度相似的现象。

表 2 不同 pH 值条件下除铬过程中的总 Cr 浓度变化 (单位: mg/L)

pH 值	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
5.14	200	191	184	185	184	183	182	182
6.18	200	195	189	189	188	188	187	186
7.06	200	190	189	151	130	109	72	66
8.11	200	196	198	179	157	126	98	96

3.4 不同初始铬浓度对真菌除铬效率的影响

为了模拟自然环境中不同废水中的铬浓度，实验将最高铬浓度控制到 500 mg/L，通过改变添加重铬酸钾质量的方式将初始铬浓度控制为 50 mg/L，100 mg/L，200 mg/L，500 mg/L。

去除效果如图 5 所示，随着铬浓度的增加，去除之后的铬浓度逐渐增加。如图所示，500 mg/L 的初始铬浓度条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 130 mg/L；200 mg/L 的初始铬浓度条件下，144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 52

mg/L; 100 mg/L 的初始铬浓度条件下, 144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 2 mg/L; 50 mg/L 的初始铬浓度条件下, 144h 后溶液中剩余的 Cr(VI)浓度为 0 mg/L (去除率为 100%)。在初始铬浓度达到 500mg/L 时, 144h 后, 六价铬浓度得到显著降低, 表明本实验中所用的本源真菌具有较高的 Cr 耐受能力。

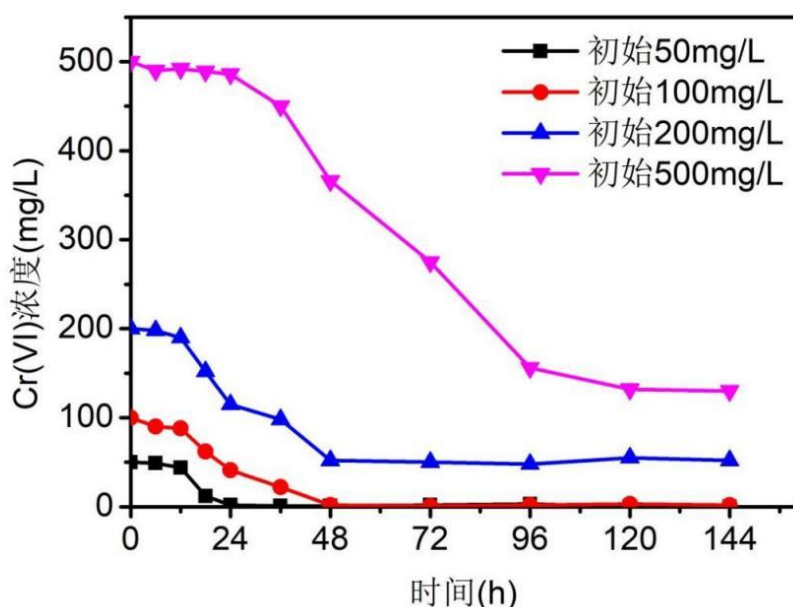


图 5 不同初始除铬过程中的 Cr(VI)浓度变化

对溶液中的总 Cr 进行测试, 测试结果如表 3 所示。当初始铬浓度为 500mg/L 时, 总铬 72h 后的浓度与图 5 中六价铬浓度差异较大, 推测虽然此时大部分六价铬已转化为三价铬, 但由于是酸性条件, 有大量未沉淀的三价铬存在于溶液中。

表 3 不同初始铬浓度下除铬过程中的总 Cr 浓度变化 (单位: mg/L)

初始 Cr 浓度	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h	72 h
50	50	49	44	44	42	41	41	41
100	100	90	88	88	83	82	82	82
200	200	198	190	190	185	182	182	182
500	500	490	492	489	486	486	486	482

3.5 正交试验: 不同碳源浓度、pH 值、初始铬浓度对真菌除铬效率的影响

为探究最佳实验条件, 寻找对铬处理效果影响最大的因素, 实验设计了三因素四水平的正交试验。将碳源浓度调整为 25%、50%、75%、100%, pH 值调整为 3、5、7、9, 初始铬浓度分别设定为 200mg/L, 300mg/L, 400mg/L, 500mg/L, 以探究在不同情况下镰刀菌对六价铬的去除效果。

经计算, 7 天后镰刀菌对六价铬的去除率如表 4 所示。每个因素数值之和用

K 表示，每个因素的平均去除率用 k 表示，R 为该因素的极差。如碳源浓度为 25%，碳源因素数值之和 $K_1=0.287+0.178+0.099+0.049=0.613$ ，碳源因素的平均去除率为 $k_1=K_1/4=0.15325$ ，碳源因素的极差 $R=k_{\max}-k_{\min}=0.7155-0.15325=0.56225$ 。

表 4 不同变量下该镰刀菌对六价铬的去除效果

实验编号	碳源浓度	pH 值	初始铬浓度(mg/L)	7 日后六价铬去除率
1	25	3	200	0.287
2	25	5	300	0.178
3	25	7	400	0.099
4	25	9	500	0.049
5	50	3	300	0.497
6	50	5	200	0.453
7	50	7	500	0.312
8	50	9	400	0.298
9	75	3	400	0.601
10	75	5	500	0.415
11	75	7	200	0.608
12	75	9	300	0.412
13	100	3	500	0.798
14	100	5	400	0.712
15	100	7	300	0.698
16	100	9	200	0.654
K1	0.613	2.183	2.002	
K2	1.560	1.758	1.785	
K3	2.036	1.717	1.710	
K4	2.862	1.413	1.574	
k ₁	0.15325	0.54575	0.5005	
k ₂	0.39	0.4395	0.44625	
k ₃	0.509	0.42925	0.4275	
k ₄	0.7155	0.35325	0.3935	
R	0.56225	0.1925	0.107	

碳源浓度为 25%时，六价铬去除率 k₁ 约为 0.15；碳源浓度为 50%时，六价铬去除率 k₂ 约为 0.39；碳源浓度为 75%时，六价铬去除率 k₃ 约为 0.51；碳源浓度为 100%时，六价铬去除率 k₄ 约为 0.72。pH 值为 3 时，六价铬去除率 k₁ 约为 0.55；pH 值为 5 时，六价铬去除率 k₂ 约为 0.44；pH 值为 7 时，六价铬去除率 k₃ 约为 0.43；pH 值为 9 时，六价铬去除率 k₄ 约为 0.35。初始铬浓度为 200mg/L 时，六价铬去除率 k₁ 为 0.50；初始铬浓度为 300mg/L 时，六价铬去除率 k₂ 为 0.45；初始铬浓度为 400mg/L 时，六价铬去除率 k₃ 为 0.43；初始铬浓度为 500mg/L 时，六价铬去除率 k₄ 为 0.39。

由表 4 数据绘制数据图，如图 6 所示，可以看出，在同一梯度下的三个变量中，碳源浓度、pH 值、初始铬浓度对六价铬的去除率的影响依次减弱。

此外，分析实验结果发现，在 pH=3 时，六价铬的去除率相较于 pH=5 时仍得到进一步提升，说明 pH=3 时镰刀菌仍能存活并发挥作用，进一步肯定 H⁺ 离子有助于将六价铬还原为三价铬吸附在菌丝表面的猜测，该真菌对六价铬的去除以胞外分泌物还原为主。

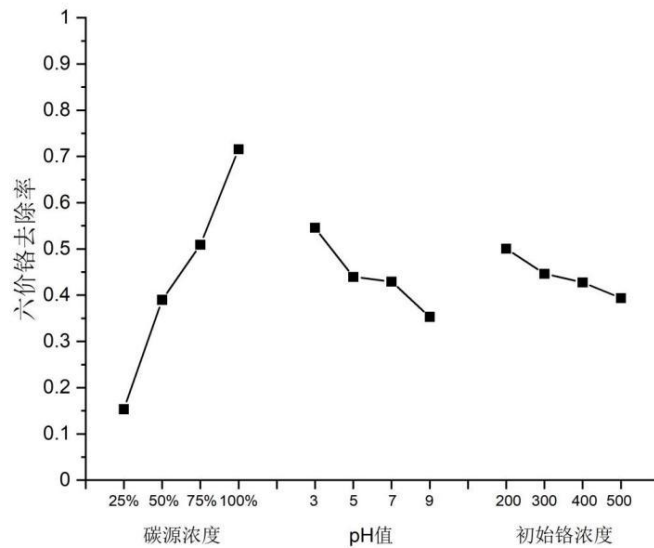


图 6 不同变量下该真菌对六价铬的去除效果图

为了更直观地体现变量对六价铬的去除效果的影响，利用表中计算出的影响较大的变量碳源浓度作为 x 轴，分别将 pH 值和初始铬浓度作为 y 轴，以六价铬去除效率为 z 轴，用表中数据绘制出碳源添加量和 pH 值对六价铬的去除效果影响图（图 7）与碳源添加量和初始铬浓度对六价铬的去除效果影响图（图 8）。从图中可以更直观地看出，在实验范围内，向修复体系投加更多的碳源能够促进真菌对六价铬的去除，同时较低的 pH 值以及较低的初始铬浓度有利于该真菌对六价铬的修复。

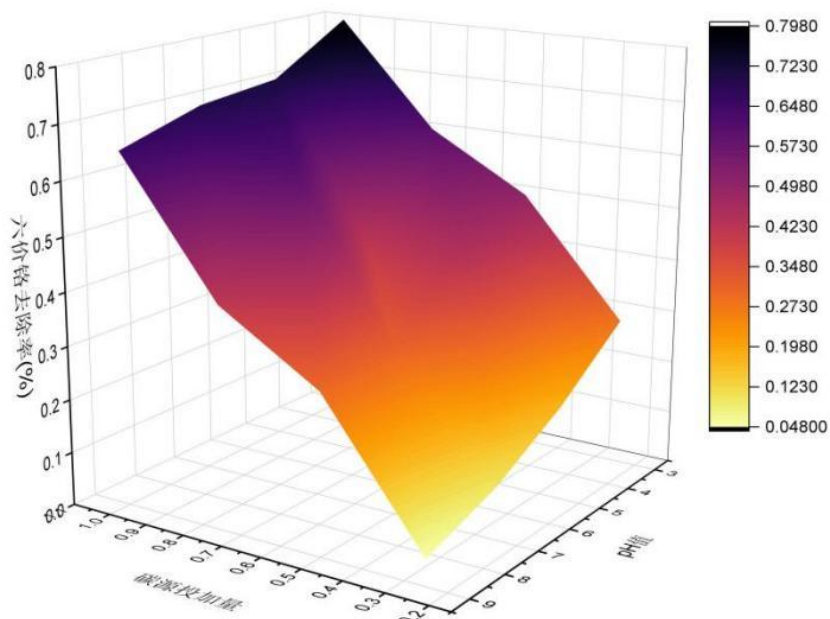


图 7 碳源添加量和 pH 值对六价铬的去除效果影响

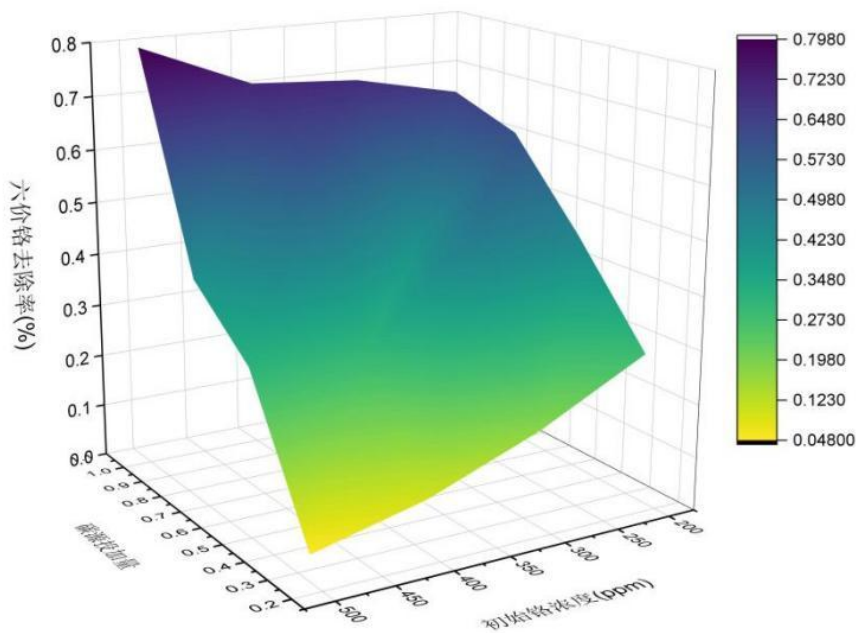


图 8 碳源添加量和初始铬浓度对六价铬的去除效果影响

正交试验表明，在实验研究范围内，同一梯度下，碳源浓度、pH 值、初始铬浓度对六价铬的去除率的影响依次减弱。碳源浓度越高，pH 值越低，初始铬浓度越低，该镰刀菌对六价铬的去除率越高，其去除效果越好。

4. 结论

实验表明,该本源镰刀菌 *Fusarium* 可以有效去除废水中的 Cr(VI)。废水中的铬浓度较低时,其在最佳状态下去除率可以达到 100%。通过实验发现,反应后菌丝表面有大量的次生结晶生成。实验推测该真菌可能通过胞外分泌物将溶液中的 Cr(VI)还原,以 Cr(III)结晶附着在菌丝的表面。在实验研究范围内,溶液中碳源浓度越高,pH 值越低,初始铬浓度越低,该镰刀菌对六价铬的去除率越高,去除效果越显著。在同一梯度下,碳源浓度、pH 值、初始铬浓度对六价铬的去除率的影响依次减弱。

该镰刀菌由于是由土壤中提取的本源微生物,所以其成本较低,对环境的危害较小,可低成本绿色高效地处理含铬废水。在日常的生产生活之中,废水中铬浓度即使高出安全标准,也比实验中的铬浓度要低。因此在实际使用中只需要添加足量的营养物质,增加足够的碳源,并利用稀盐酸等物质降低 pH 值至合适值即可使该镰刀菌达到最佳去除状态,甚至可能将溶液中的六价铬全部还原去除。综合来看,这种镰刀菌的去除方法效果好且适用范围广泛。

参考文献

- [1] 何凤娇主编, 无机化学[M] 科学出版社 2001: 214
- [2] 户晓英, 鲁安怀. 单斜与六方磁黄铁矿处理含 Cr(VI)废水过程中 pH 值变化规律[J]. 高校地质学报, 2000, 6(2):271-277.
- [3] 任守信, 水中铬的化学形态分布[J] 中国环境科学, 1989,9(1): 40-44
- [4] 徐衍忠, 秦绪娜, 刘祥红, 张乃香, 周英莲. 铬污染及其生态效应[J]. 环境科学与技术, 2002, 25(12):8-9,28
- [5] 鲁安怀.天然磁黄铁矿一步法处理含 Cr⁶⁺废水[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 1- 3.
- [6] Zhitkovich A. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks [J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(10):1617-1629.
- [7] Lu A , Zhong S , Chen J , et al. Removal of Cr(VI) and Cr(III) from aqueous solutions and industrial wastewaters by natural clino-pyrrhotite.[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(9):3064-3069.
- [8] Ahmad WA, Wan Ahmad WH, Karim NA, Santhana Raj AS, Zakaria ZA. 2013. Cr(VI) reduction in naturally rich growth medium and sugarcane bagasse by *Acinetobacter haemolyticus*. Int Biodeter Biodegr. 85:571-576.
- [9] 马锦民, 张烂漫, 夏君, 瞿建国, 李福德. 微生物处理含铬(VI)废水的研究进展[J]. 江苏化工. 2005,33(2):46-50
- [10] Xu H , Hao R X , Xu X Y , et al. Removal of Hexavalent Chromium by *Aspergillus niger* Through Reduction and Accumulation[J]. Geomicrobiology, 2020(9):1-9.
- [11] Sen M , Dastidar M G , Roychoudhury P K . Biological removal of Cr(VI) using *Fusarium solani* in batch and continuous modes of operation[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41(1–2):51-56.
- [12] Sen M , Dastidar M G . BIOSORPTION OF Cr(VI) BY RESTING CELLS OF *FUSARIUM SOLANI*[J]. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2011, 8(2).
- [13] Sen M . A Comparative Study on Biosorption of Cr(VI) by *Fusarium solani* under Different Growth Conditions[J]. Open Journal of Applied Sciences, 2012, 2(3):146-152.

致谢

我参加北京青少年科技后备人才早期培养计划，进入北京大学矿物环境功能北京市重点实验室。我了解到实验室正在着手进行铬污染等相关研究，而我也想通过自己的努力保护自然生态环境，于是选择“利用土壤本源镰刀菌低成本绿色高效去除溶液中六价铬”的课题进行深入研究。

在研究的过程中，我广泛调研、查阅资料，不断提升自我，克服失败与挫折，独立自主完成实验，严谨细致进行数据测量记录，并取得一系列研究成果。但我知道这些成果并不只是自己的付出，我由衷地感谢在研究的过程中对我无偿提供支持与鼓励的老师。

首先要感谢北京大学的鲁安怀老师。他向我介绍了实验室的研究方向，制定实验室学习日程，进行科研选题，并进一步规划实验细节。在科研活动中，他教导我进行具体实验操作，落实实验规划，并在我的论文完成后，对论文提出修改指导意见，使我得以在科研道路上不断进步。

我还需要感谢我们中国人民大学附属中学的万丹老师。她在我研究的整个过程中时刻关注我的实验进展，在我遇到问题时提供切实的帮助与教导，并及时指正研究计划中有漏洞的地方。当我的论文初稿思维不够清晰时，她指明我文章中的问题，使我的论文内容更加条理清晰。