

重金属生物吸附研究中蜡状芽孢杆菌菌体微观形貌的原子力显微镜观察与表征

葛小鹏, 潘建华, 刘瑞霞, 汤鸿霄 (中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要:对蜡状芽孢杆菌在重金属生物吸附条件下细胞的界面形态及其变化情况进行了原子力显微镜成像观察与表征. 结果表明, 在严格实验对照条件下未加入 Pb(II) 的空白菌体细胞呈杆状, 单个细胞长约 $3.3\mu\text{m}$, 横截面分析结果为宽 $1.9\mu\text{m}$ 左右, 高为 $0.3\sim 0.4\mu\text{m}$, 细胞壁表面比较光滑, 细胞之间以竹节结构首尾相连排列成长杆状; 吸附 Pb(II) 后细胞的体积则发生膨胀, 单个细胞长约 $3.9\mu\text{m}$, 横截面分析结果为宽 $3.1\mu\text{m}$ 左右, 高约为 $1.15\mu\text{m}$, 细胞壁表面变得比较粗糙, 细胞之间较容易发生粘结, 与对照空白菌体相比, 细胞之间呈长杆状的竹节结构排列则变得很少. 采用截面分析曲线中形貌特征的高宽度比 R 对细菌细胞在云母基底表面的横向铺展变形作用进行了定量表征 (吸附铅离子后 R 值由 0.165 变为 0.416), 同时探讨了细胞在基底表面的横向铺展变形作用可能与细胞表面电荷影响细胞在基底表面的粘附性能密切相关, 并受溶液 pH、离子强度以及金属离子的暴露与吸附等外界因素影响而发生改变. 有关其详细机理, 还有待在以后的研究工作中作进一步探讨.

关键词:原子力显微镜; 蜡状芽孢杆菌; 生物吸附; 微观形貌

Application of atomic force microscopy in the characterization of cell morphology of *Bacillus Cereus* bacteria in the biosorption process of heavy metal ions

GE Xiaopeng, PAN Jianhua, LIU Ruixia TANG Hongxiao (SKLEAC State Key Laboratory for Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract: Atomic force microscopy (AFM) has been used to investigate the morphology of the cell surfaces of *Bacillus Cereus* in the biosorption process of heavy metal ions. Changes in the cell surface structures including the size, shape and properties of the bacteria under different media conditions and the Pb() ion exposure as well are probed and characterized through sectional analysis. While newly cultivated *Bacillus cereus* cells usually have a smooth surface and may have a variety in their cell dimensions from different bacterial colonies, cells after treated in $0.1\text{ mol L}^{-1}\text{ HNO}_3$ or EDTA for overnight become more rough in their cell surface, but remain to preserve the integrity of their cell structure such as the shape and size, implying that the treatment with $0.1\text{ mol L}^{-1}\text{ HNO}_3$ or EDTA does not cause any major change in the cell structure and probably can release only the acidic or binding sites occupied by the metal ions on the cell surface. The morphology of *Bacillus Cereus* bacteria in the control blank without Pb() is rod-like in shape with a smooth surface, the size dimension of which is about $3.3\mu\text{m}$ in length with a section profile of $1.9\mu\text{m}$ in width and $0.3\sim 0.4\mu\text{m}$ in height. The bacteria cells are usually found to form a larger rod-like ultra-structure with internal cells connected from end to end. With the Pb() ion exposure the larger ultra-structures of the bacteria cells are mostly disconnected, and the size dimensions of the bacteria cells are enlarged. The length of the bacteria cells is $3.9\mu\text{m}$, the width and height in the section profile are $3.1\mu\text{m}$ and $1.15\mu\text{m}$, respectively. Further more, the surfaces of the bacteria cells are more roughened, and the cells are more likely to adhere to each other randomly.

Through the use of section analysis, one interesting phenomenon in the morphological observation of *Bacillus Cereus* bacteria has been found, i. e. the distortion of section profile in the vertical direction relative to the lateral direction. The cross section shape is far from a circle

收稿日期:2003-11-19;修订日期:2004-02-12

基金项目:国家自然科学基金重点项目(20037010);国家自然科学基金面上基金项目(20277042)

作者简介:葛小鹏(1966—),男,博士研究生, gexiaopeng@hotmail.com

or a semi-circle, but like an arch. This is attributed to the morphological changes of the soft sample itself when adsorbed onto mica substances, and is believed to be due to the different interaction forces between the bacteria and substrate surfaces, such as the surface charges (both sample and substrate surfaces) in cooperation with internal forces of the bacteria sample etc. This type of change has no range limit and varies quite a lot, depending on sample and surface properties in the particular environment. Nevertheless, it can be characterized by the ratio of vertical vs. lateral distances in the sectional profile, through which the morphological changes of the bacteria cells with Pb() exposure in relation to the control blank without Pb() are found, the R value varying from 0.165 to 0.416.

Key words: atomic force microscopy (AFM); *Bacillus Cereus* bacteria; biosorption; cell morphology

近年来,有关生物吸附和生物蓄积现象的研究已引起了人们的普遍兴趣与广泛关注^[1~6].大量研究表明,一些藻类、真菌、酵母菌等原核及真核微生物细菌的细胞壁表面富含可以键合金属离子的活性基团,如羧基^[7~11]、磺酰基、磷酰基^[9~11]、酚羟基、羟基^[8]、氨基^[8,9]、羰基、酰胺基、硫醚等,这些基团对重金属等具有极强的吸附能力.利用生物吸附剂对重金属污染废水如电镀、印染、制革、防腐等工业废水进行处理,因其原料来源丰富,价格便宜,对重金属废水净化处理程度高等^[12]独特优点而日益受到人们的青睐^[13~16].作为一种经济、简便、实用的新型水处理替代工艺与技术,生物吸附剂处理重金属污染废水具有良好的市场开发与应用前景.因此,广泛开展生物吸附机理及其吸附模式等方面的基础研究,从微观结构方面深入探索重金属生物吸附机理,并与各种宏观吸附模式研究相结合,不仅可以加深人们对水质净化生物吸附处理中金属离子的吸附行为的认识,而且在选择新型高效生物吸附剂、进一步提高吸附处理效能等方面也起着重要的指导作用^[17].

目前,已有包括傅立叶红外(FT-IR)、Eu³⁺发光光谱^[7]、电子顺磁共振(EPR)^[8]、激光诱导荧光光谱(Laser-induced Fluorescence Spectroscopy)^[11]、X-射线能量散射光谱(Energy-Dispersive X-ray spectra)^[6]、X-射线吸收超精细结构(Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS)^[10,18]、扫描及透射电子显微镜(SEM及TEM)^[19,20]等在内的多种现代仪器分析技术手段用于金属离子生物吸附研究中微生物细胞的表面结构表征工作.作为一种新型的仪器分析技术,原子力显微镜自1986年首次发明并投入商业应用以来,因其独特的高分辨成像能力、观察样品不受样品导电性限制、可在各种环境条件下进行成像观察等优点,而在生物医学^[21]、高分子材料^[22~23]、纳米材料及表面科学^[24]等领域得到了广泛的应用.本文将从原子力显微镜在环境样品中的应用角度出发,对重金属生物吸附实验研究中微生物菌体的微观形貌进行成像观察,并对蜡状芽孢杆菌在重金属吸附实验中微观形貌的变化进行分析与表征,以期对重金属在其表面的吸附行为有一个更加清晰的认识.

1 实验部分

1.1 细菌菌体的培养

将从官厅水库天然水体中分离纯化得到的野生 *Bacillus cereus* 菌株接入牛肉蛋白胨培养基中,在恒温摇床上(30℃, 160 r·min⁻¹)培养 72 h,将培养液在 7000 r·min⁻¹下离心 30 min,去除上清液,用蒸馏水洗涤菌体 4~6 遍,再次将上清液去除,菌体冷冻干燥,部分菌体配成 4 g·L⁻¹ 的悬浮液,备用.

1.2 细菌菌体对重金属离子的吸附

取一定体积(5 mL)的上述菌体悬浮液置于 50 mL 塑料离心管中,加入一定量的重金属离子(以 Pb²⁺ 为代表)溶液,用 0.1 mol·L⁻¹ NaNO₃ 调节悬浮液的离子强度为 0.01 mol·L⁻¹,使悬浮

液最终体积为 20 mL,菌体浓度为 1 g L^{-1} , Pb^{2+} 离子溶液浓度为 $0 \sim 50 \text{ mg L}^{-1}$,用稀 NaOH 或 HNO_3 溶液调节体系 pH 值为 5.5,于恒温摇床上 (25°C , 150 r min^{-1}) 振荡 20 h. 吸附处理后的菌体悬浮液经离心分离 (7000 r min^{-1}),菌体用事先配好的离子强度为 0.01 mol L^{-1} (pH 值为 5.5) 的洗涤液洗涤两遍,并冷冻干燥,用于制备原子力显微镜观察样品;上清液中重金属离子的残留量用原子吸收光谱进行分析,以计算菌体对 Pb^{2+} 的饱和吸附容量.

1.3 重金属吸附处理菌体微观形貌的原子力显微镜观察

在严格对照实验条件下,向上述 $\text{Pb}(\text{II})$ 吸附处理后的菌体及空白菌体中加入 50 mL 去离子水,经超声波 (Tansistor/Ultrasonic T-7, 220 V, 50/60 Hz, 55 W, 0.5 A, L & R Manufacturing company, U. S. A.) 震荡分散 5 min 后,重新配成悬浮液. 取 20 μL 菌体悬浮液置于新解理的直径为 10 mm 的天然云母片基底上,在室温下自然干燥沉积,进行 AFM 实验样品制备. 应用美国 DI 仪器公司 Nanoscope a Multimode 原子力显微镜,采用接触模式在大气环境下进行成像观察,所用探针为商用 V-型 Si_3N_4 探针,微悬臂长度为 200 μm ,力常数为 0.12 N m^{-1} . 所有图像均在恒力模式下获得,采用高度与偏折 (Deflection) 两种信号采集模式同时进行扫描图像输出. 扫描器采用 E 型压电陶瓷扫描管,扫描参数如扫描尺度、Setpoint 值、扫描速率、增益参数 Fgain 及 Pgain 值等在成像扫描过程中根据实际情况进行调节,并以使得探针针尖加载到样品上的作用力最小且能获得稳定扫描图像质量为依据,以防止因针尖压力过大造成样品损坏及扫描图像因假象的存在而失真等情况出现. 每一实验条件均制备两个平行样品,每一样品至少进行 3 次不同位置的 AFM 观测. 存储后的图像经 Nanoscope Image Analysis 分析处理软件进行平滑处理 (必要时) 后,进行菌体形貌的截面分析 (Section Analysis) 与测量.

2 结果与讨论

2.1 菌体细胞的微生物学鉴定及其对重金属离子 $\text{Pb}(\text{II})$ 的吸附性能

将从官厅水库天然水体中分离纯化的 *Bacillus Cereus* 菌株经牛肉蛋白冻接种培养后的菌体进行微生物学性能鉴定,试验了包括革兰氏染色、细胞形状、大小及芽孢位置观测以及不同生长条件实验观察等 28 个项目的测试性能,结果表明该细菌属于中-亚端生芽孢类杆菌,呈革兰氏阳性反应,细胞直径在 1 μm 以上. 由重金属离子吸附实验结果计算得到 pH = 5.5 条件下蜡状芽孢杆菌 (干细菌) 对 $\text{Pb}(\text{II})$ 的吸附量为 36.7 mg g^{-1} [25],表明该菌体对 $\text{Pb}(\text{II})$ 具有一定的吸附能力.

2.2 菌体细胞在重金属吸附处理实验条件下微观形貌的原子力显微镜观察

为了深入了解蜡状芽孢杆菌对 $\text{Pb}(\text{II})$ 等重金属离子的吸附行为及其微观机理,我们对蜡状芽孢杆菌在重金属吸附、 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 及 EDTA 浸泡处理等实验条件下的界面形态进行了原子力显微镜成像观察,结果如图 1 至 5 所示. 在接触扫描模式下,采用高度与偏折 (Deflection) 两种信号采集模式同时进行扫描图像输出,利用偏折信号对样品表面特征边界高度变化比较敏感的特点,将之与高度形貌图结合起来,获得了有关样品表面结构特征的具体细节 (图 3 及图 4 分别给出了两种图像的相互对照).

图 1 给出了新培养的蜡状芽孢杆菌在不同批次以及不同介质处理等实验条件下细胞个体形态差异及受不同环境条件影响其微观形貌的变化情况. 可以看出,不同批次的菌体细胞因细菌培养条件上的细微差异个体形态也会有所不同,但其形貌均呈杆状,且细胞表面比较光滑. 经 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 及 EDTA 浸泡处理后,细胞表面变得比较粗糙,但仍然保持其杆状的整

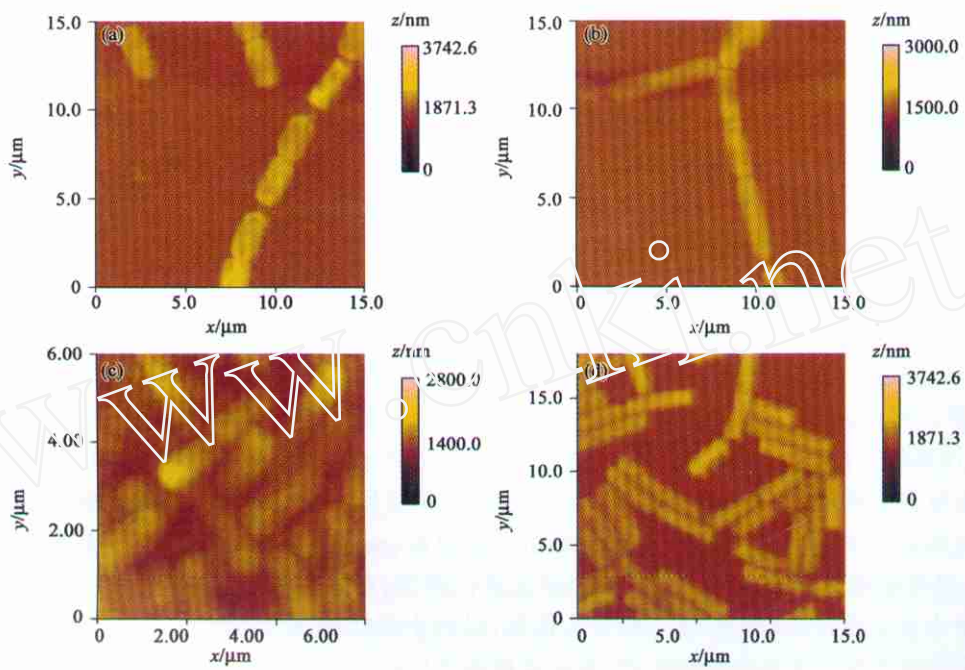


图1 蜡状芽孢杆菌细胞个体形态差异以及菌体在不同介质中处理后细胞表面微观形貌的变化情况

((a)和(b) 新培养的不同批次细菌单个细胞形态差异的相互对照; (c) 经 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 浸泡过夜后细胞表面形态的变化情况; (d) 经 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ EDTA}$ 溶液浸泡过夜后细胞表面形态的变化情况)

Fig. 1 AFM images of the morphology of *Bacillus cereus* cells at mica surface and the changes of cell surface structure under different media conditions ((a) and (b) newly cultivated bacteria cells with variety in size; (c) after treated in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ for overnight; (d) after treated in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ EDTA}$ for overnight)

体形貌,表明稀 HNO_3 及 EDTA 浸泡处理可能只会将细胞壁表面键合的金属离子溶出,从而释放其占用的表面吸附位,细胞的细胞壁结构并未遭受破坏.而在重金属吸附处理实验条件下,细菌细胞的形貌变化则比较大.图2给出了蜡状芽孢杆菌经不同量的重金属 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子暴露后细胞形貌的变化情况.可以看出,在严格实验对照条件下,未加入 $\text{Pb}(\text{II})$ 的对照空白菌体呈杆状(细胞周围少量球状颗粒聚集,可能为其它菌属类杂质),而经 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子暴露后的菌体细胞则变为梭形.图3给出了两种情况下细胞形貌的放大对照图片及其截面分析曲线.从偏折信号图(图3a)中可观察到一些结构细节,杆状结构实际上是由数个细胞以竹节结构首尾排列而成,单个细胞大小为:长约 $3.3 \mu\text{m}$ 、宽约 $1.9 \mu\text{m}$ 、高为 $0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}$.细胞的细胞壁表面比较光滑.吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后细胞体积发生膨胀,单个细胞大小变为:长 $3.9 \mu\text{m}$ 左右、宽约 $3.1 \mu\text{m}$ 、高 $1.15 \mu\text{m}$ 左右;同时,吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后细胞壁表面变得粗糙,细胞的表面性能(如表面电荷等)可能发生某些改变,使得细胞之间粘附力增强,细胞之间更容易发生聚集粘结(图4),与对照空白菌体相比,竹节结构排列则变得较少.另外,吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后,部分细胞的细胞壁遭到破坏,从而导致细胞结构产生塌陷(图5),这可能是由于细胞壁表面呈多孔状的表面层中的官能团与铅离子发生键合反应,使其表面结构变得更加粗糙,加之细胞在溶液中因渗透作用等而发生溶胀,从而导致其部分细胞结构发生破坏.

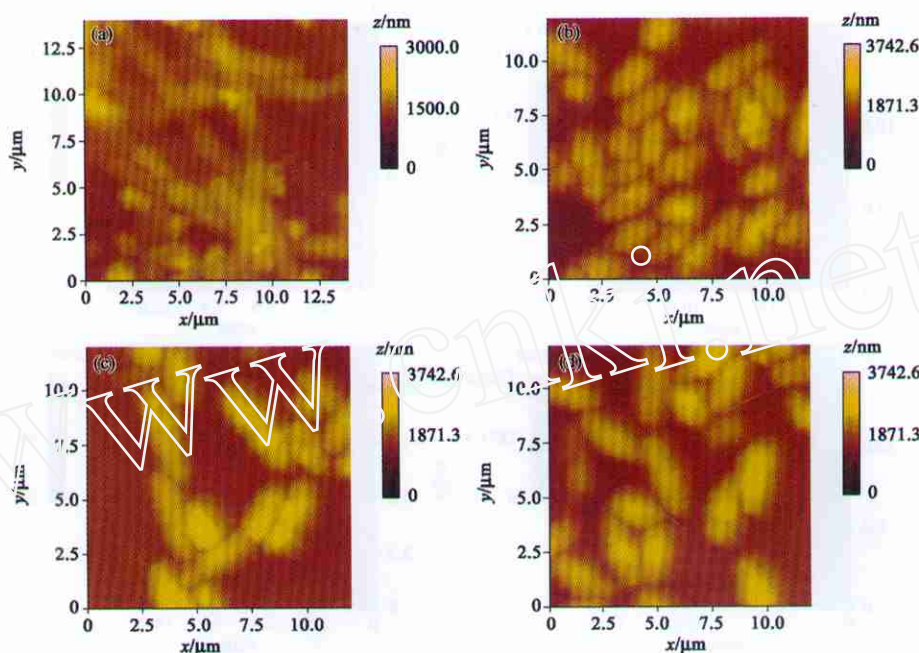


图2 蜡状芽孢杆菌在不同浓度的 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子溶液中暴露后细胞形貌的变化情况 (离子强度 0.01 mol L^{-1} ; $\text{pH}=5.5$) ((a) *Bacillus Cereus* 菌体对照空白; (b) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ 装载下的菌体; (c) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ 装载下的菌体; (d) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ 装载下的菌体)

Fig. 2 AFM images of *Bacillus Cereus* bacteria under the exposure to different amounts of $\text{Pb}(\text{II})$ ions (Ion strength 0.01 mol L^{-1} ; $\text{pH}=5.5$) ((a) Control blank of *Bacillus Cereus*; (b) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ ion-exposed cells; (c) $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ ion-exposed cells; (d) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{II})$ ion-exposed cells)

从细胞微观形貌的截面分析曲线(图 3e 及 3f)可以看出,杆状细胞在云母基片上的附着使得其微观形貌的横截面曲线并不呈圆形或半圆形,而是呈拱形,细胞形貌特征的高度与宽度显得不很成比例,表明细胞在云母基片表面发生了明显的铺展作用,而单个细胞在 $\text{Pb}(\text{II})$ 暴露条件下长度变化则相对较小. 上述横向铺展作用实际上反映了细胞等软性生物样品在云母基片上附着时自身形貌的变化,这种变化是与特定环境条件下样品与基底表面的相互作用紧密相连的. 虽然目前对此类复杂的形貌变化现象的机理还缺乏深刻的认识,很难提出具有普遍适用性的理论模型,但是,根据热力学理论,总表面能的最小化将在此类形貌改变中起着重要作用. 其中,表面电荷(包括细胞样品和云母基底)以及细胞内部的作用力(如渗透压等)的改变起着重要的支配作用,并在控制细胞与基底表面间的粘附、细胞与细胞之间的粘结、凝聚以及细胞与各种金属离子的吸附、蓄积作用等方面起着重要作用. 研究表明,大多数微生物组织在通常的生理条件下,由于其表面羧基和磷酸阴离子官能团的存在而具有负的表面电荷. 在不同 pH 及离子强度、金属离子暴露等外界环境条件影响下,由于其表面官能团的离子化状态将发生变化,从而影响其粘附性能也会发生变化. 在此,我们以细胞形貌特征的截面分析曲线的高度与宽度的比值 R 的大小作为此类形貌变化的定量表征. 可以看出,吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后的菌体与对照实验条件下未加入 $\text{Pb}(\text{II})$ 的对照菌体相比,其表面形态发生了明显的改变,截面分析曲线中形貌特征的高宽比 R 由 0.165 增加到 0.416,表明在弱酸性溶液条件下 ($\text{pH}=5.5$),未吸

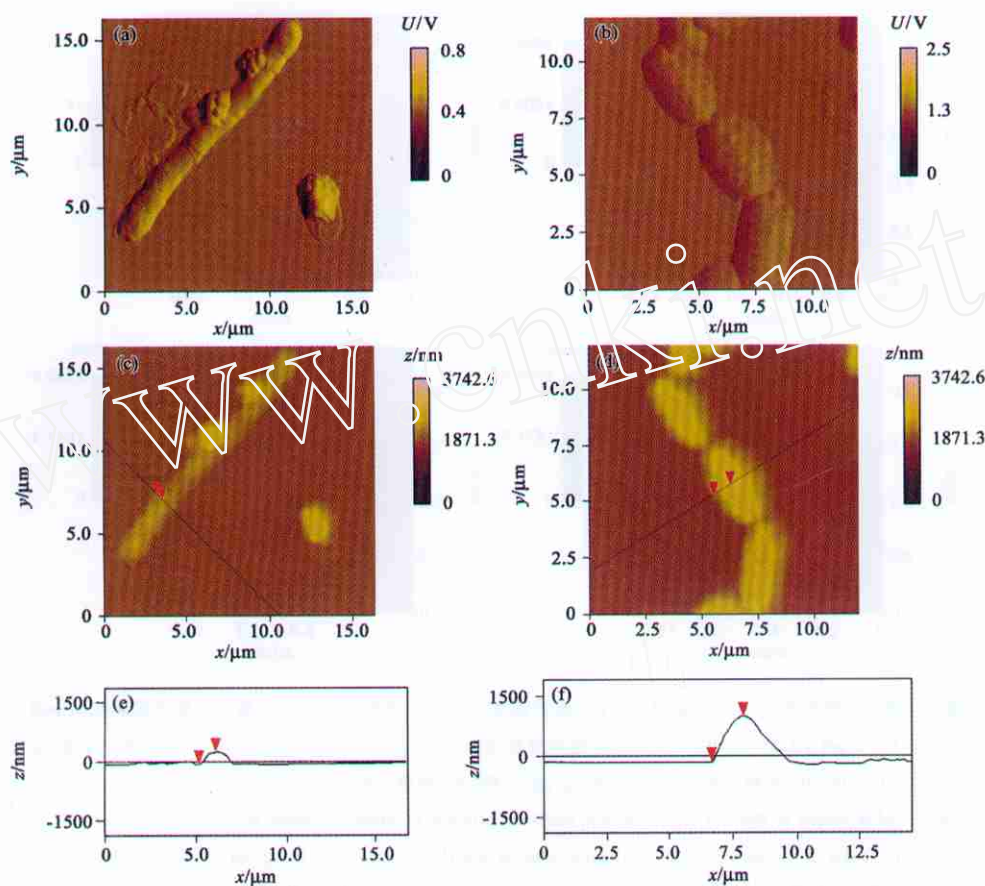


图3 吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后的蜡状芽孢杆菌与实验对照空白菌体细胞微观形貌的 AFM 放大图像及其截面分析曲线对照

((a)和(b)为菌体形貌的偏折信号图;(c)和(d)为菌体形貌的高度信号图;(e)和(f)为菌体细胞的截面分析曲线;左边(a, c, e)为菌体对照空白,右边(b, d, f)为 $50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Pb}(\text{II})$ 装载下的菌体)

Fig. 3 Close-up AFM images of *Bacillus Cereus* bacteria cells under exposure to $\text{Pb}(\text{II})$ ions in comparison with the control blank and their sectional analysis ((a) and (b) Deflection images of the bacteria; (c) and (d) Topographical images of the cells; (e) and (f) Section analysis profiles of the bacteria; Left (a, c, e) Control blank of the *Bacillus Cereus* bacteria; Right (b, d, f) $50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{Pb}(\text{II})$ ion-exposed bacteria cells)

附 $\text{Pb}(\text{II})$ 时细胞表面与云母基底表面之间具有较强的粘附作用,细胞在云母基底表面的横向铺展变形作用较大;吸附 $\text{Pb}(\text{II})$ 后细胞与基底表面之间的粘附作用减弱,横向铺展变形作用减小。

应当指出,微生物对重金属离子的生物吸附是一个非常复杂的界面反应过程,包括有表面络合、离子交换(质子置换等)、静电作用以及吸附与表面微沉淀等多种作用机理。由于微生物吸附材料本身来源及组成的复杂性、多样性以及受生长介质及环境(如溶液组成、pH、离子强度等因素)、细胞新陈代谢状态等影响,其界面形态都可能会发生变化。本文仅对从天然水体中分离纯化得到的蜡状芽孢杆菌菌株经接种培养后的活性菌体在 $\text{Pb}(\text{II})$ 吸附实验条件下的界面形态及其变化情况进行了 AFM 初步观察与表征,进一步的深入研究还有待以后工作中继续进行。

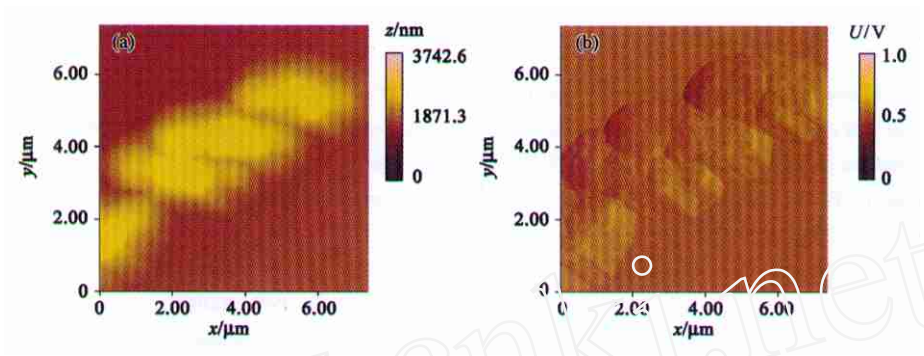


图4 蜡状芽孢杆菌在 Pb() 暴露后细胞表面性质的改变及细胞之间的粘连情况 ((a) 高度形貌图; (b) 偏折信号图)

Fig. 4 Changes of the cell surface properties of Bacillus Cereus bacteria and cells adhering to each other after Pb() exposition ((a) Topographical image; (b) Deflection image)

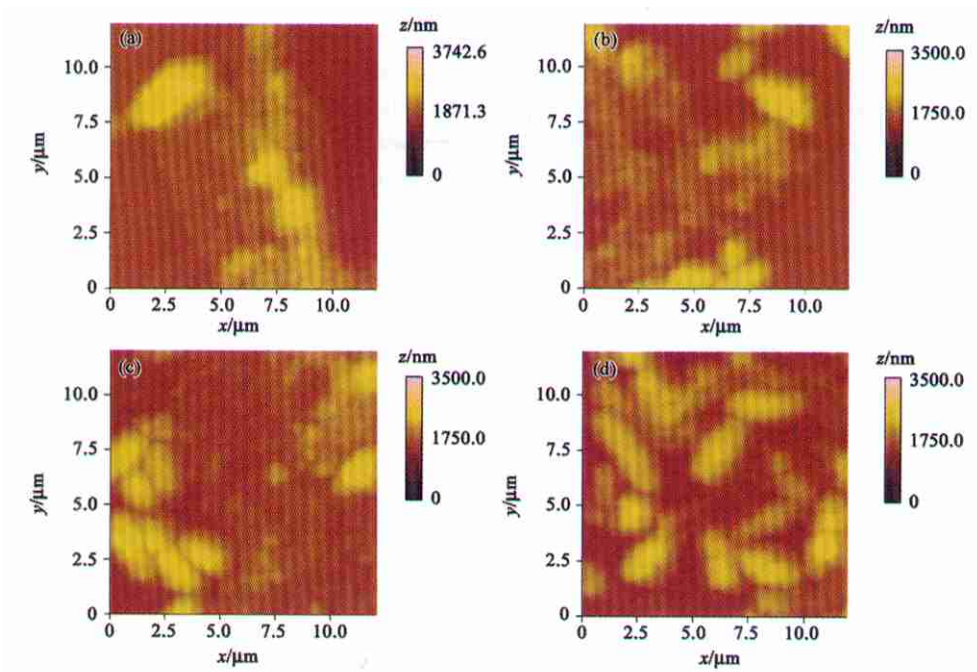


图5 蜡状芽孢杆菌在吸附 Pb() 后部分细胞的微观形貌的改变及其结构破损情况((a)为 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() 装载下的菌体; (b)和(c)为 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() 装载下的菌体; (d)为50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() 装载下的菌体)

Fig. 5 Changes and the collapse of cell structure of the Bacillus Cereus bacteria after uptake of Pb() ((a) 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() ion-exposed cells; (b) and (c) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() ion-exposed cells; (d) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Pb() ion-exposed cells)

致谢：感谢英国诺丁汉大学药学院生物物理与表面分析研究室陈新勇教授以及中科院微生物研究所刘英昊老师在本文起草过程中所给予的无私帮助和不吝赐教。

参考文献:

- [1] Volesky B. Biosorption of heavy metals [M]. Boca Raton (FL.): CRC Press, 1990
- [2] Garnham G W, Codd G A, Gadd G M. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by Estuarine Green Microalga *Chlorella Salina* immobilized in alginate microbeads [J]. *Environ Sci Technol*, 1992, 26(9): 1764—1770
- [3] Fehrmann C, Pohl P. Cadmium adsorption by the non-living biomass of microalgae grown in axenic mass culture [J]. *J Applied Phycology*, 1993, 5(6): 555—562
- [4] Plette A C C, Benedetti M F, Van Riemsdijk W H. Competitive binding of protons, calcium, cadmium, and zinc to isolated cell walls of a Gram-positive soil bacterium [J]. *Environ Sci Technol*, 1996, 30(6): 1902—1910
- [5] Klimmek S, Stan H J, Wilke A, Bunke G, Buchholz R. Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae [J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35(21): 4283—4288
- [6] 刘瑞霞, 潘建华, 汤鸿霄, 等. Cu(Ⅱ)离子在 *Micrococcus luteus* 细菌上的吸附机理[J]. *环境化学*, 2002, 21(1): 50—55
- [7] Ke H Y D, Anderson W L, Moncrief R M, *et al.* Luminescence studies of metal ion-binding sites on *Datura Innoxia* biomaterial [J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28(4): 586—591
- [8] Kiefer E, Sigg L, Schosseler P. Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces [J]. *Environ Sci Technol*, 1997, 31(3): 759—764
- [9] Cox J S, Smith D S, Warren L A, Ferris F G. Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33(24): 4514—4521
- [10] Sarret G, Manceau A, Spadini L, *et al.* Structural determination of Zn and Pb binding sites in *Penicillium chrysogenum* cell walls by EXAFS spectroscopy [J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(11): 1648—1655
- [11] Texier A-C, Andres Y, Illemassene M, *et al.* Characterization of lanthanide ions binding sites in the cell wall of *pseudomonas aeruginosa* [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(4): 610—615
- [12] Schiewer S, Volesky B. Modeling multi-metal ion-exchange in biosorption [J]. *Environ Sci Technol*, 1996, 30(10): 2921—2927
- [13] Kapoor A, Viraraghavan T. Fungal biosorption - An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: A review [J]. *Bioresource Technology*, 1995, 53(3): 195—206
- [14] Sag Y. Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: A review [J]. *Separation and Purification Reviews*, 2001, 30(1): 1—48
- [15] Pagnanelli F, Esposito A, Toro L, Veglio F. Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus Natans*: Langmuir-type empirical model [J]. *Water Research*, 2003, 37(3): 627—633
- [16] Gupta V K, Shrivastava A K, Jain N. Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species [J]. *Water Research*, 2001, 35(17): 4079—4085
- [17] 刘瑞霞, 汤鸿霄, 劳伟雄. 重金属的生物吸附机理及吸附平衡模式研究 [J]. *化学进展*, 2002, 14(2): 87—92
- [18] Watkins J W, Elder R C, Greene B, Darnall D W. Determination of gold binding in an algal biomass using EXAFS and XANES spectroscopies [J]. *Inorganic Chemistry*, 1987, 26(7): 1147—1151
- [19] Kuyucak N, Volesky B. Desorption of cobalt-laden algal biosorbent [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 33(7): 815—822
- [20] Kuyucak N, Volesky B. The mechanism of cobalt biosorption [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 33(7): 823—831
- [21] 鲍幸峰, 方积年. 原子力显微镜在生物大分子结构中的应用进展 [J]. *分析化学*, 2000, 28(10): 1300—1307
- [22] 屈小中, 史焱, 金熹高. 原子力显微镜在分子领域的应用 [J]. *功能高分子学报*, 1999, 12(2): 218—224
- [23] Yip C M. Atomic force microscopy of macromolecular interactions [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(5): 567—572
- [24] 白春礼, 林璋. 扫描探针显微镜在材料表面纳米级结构研究中的新进展 [J]. *物理*, 1999, 28(1): 27—30
- [25] 潘建华, 刘瑞霞. 蜡状芽孢杆菌 *Bacillus Cereus* 吸附铅的研究 [J]. *环境科学*, 2004, 25(2): 166—169