

大肠杆菌对铜离子的吸附行为研究

龚健东^{1,2}, 赵炳梓¹, 张佳宝¹, 卢 信¹, 陈效民²

(1. 封丘农业生态国家实验站, 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 江苏 南京 210008; 2. 南京农业大学 资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095)

摘 要:为阐明大肠杆菌 *Escherichia coli* 对 Cu^{2+} 的吸附特性, 本文利用批量平衡吸附实验法研究了大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附动力学及影响细菌吸附 Cu^{2+} 的主要影响因子, 包括溶液 pH、 Cu^{2+} 初始浓度、细菌初始浓度。结果表明, 大肠杆菌的 Zeta 电位随着溶液中离子强度和 Cu^{2+} 浓度的增加而降低, 说明大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附主要是通过静电引力作用; 在 Cu^{2+} 初始浓度为 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的背景溶液中, 吸附开始很快, 到 1 h 时即达到最大; pH 值显著影响大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附, 在 pH 值为 6 时, 其吸附量达最大; 大肠杆菌对 Cu^{2+} 吸附量随着菌体浓度、 Cu^{2+} 浓度增加而增加, 用 Langmuir 吸附等温模型能很好模拟该吸附过程, 吸附比率随着 Cu^{2+} 浓度增加而降低。通过对细菌吸附重金属的特性研究, 为环境中重金属污染的生物去除提供一定的理论依据。

关键词: 大肠杆菌; Cu^{2+} ; 吸附; Zeta 电位

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2007)06-2033-05

Adsorption of Cu on *Escherichia coli*

GONG Jian-dong^{1,2}, ZHAO Bing-zi¹, ZHANG Jia-bao¹, LU Xin¹, CHEN Xiao-min²

(1. State Experimental Station for Agro- Ecology, State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Adsorption kinetics of Cu^{2+} on *Escherichia coli* and their influencing factors including solution pH, initial Cu^{2+} concentration and initial bacterial concentration were studied to elucidate the adsorption characteristic of Cu^{2+} on *Escherichia coli* using batch equilibrium experiments. The results showed that the zeta potential of *Escherichia coli* decreased with increase of the ionic strength and the initial Cu^{2+} concentration, indicating that the adsorption of Cu^{2+} on *Escherichia coli* was probably mainly controlled by the electrostatic force. Quick adsorption was observed in solutions with initial Cu^{2+} of $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the maximum adsorption reached within 1 h. The pH value had significant effect on the Cu^{2+} adsorption, and the optimal pH for adsorption was 6. Copper adsorption onto the *Escherichia coli* increased with the concentration of bacteria applied and initial Cu^{2+} concentration, while the adsorption ratio decreased with initial Cu^{2+} concentration, which can be simulated by Langmuir isotherm model. These results provided some theoretic basis for effective removal of the heavy metals from the environment by biosorption.

Keywords: *Escherichia coli*; Cu^{2+} ; adsorption; Zeta potential

随着城市化和工业化的快速发展, 工业生产过程中产生大量金属和化学物质, 造成环境的严重污染。重金属污染的主要来源工矿企业(如采矿、冶金、电镀等)的废水、废气、废渣“三废”中, 通过径流和淋溶等

多种途径污染地表水和地下水。由于金属不容易被分解却容易被富集, 通过食物链对人体产生危害。铜在重金属中最为常见使用, 且容易积累在生物体的组织中而产生严重的健康问题。国外制定的饮用水质指标铜不能超过 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[1], 国内制定为不能超过 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

重金属对生态和人体健康的潜在危害主要在于金属的形态, 可溶性的金属形态有很高的迁移能力和

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB410808); 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA10Z406)

作者简介: 龚健东(1981—), 男, 主要从事污染物运移研究。

通讯作者: 赵炳梓 E-mail: bzhao@issas.ac.cn

生物活性。利用生物过程可以溶解或固定金属,从而增加或减少金属的生物活性。在过去的二十年里,国内外发展了利用细菌等微生物来处理被重金属污染的废水的生物修复技术^[2~4]。由于细菌来源丰富、吸附速度快、选择性好、容易操作等优点^[5],生物吸附法越来越多地被应用到废水处理、重金属污染的土壤修复等方面。

细菌是世界上微小的生物体,通过其表面的细胞壁与外界环境接触,细胞壁的主要组成成分是肽聚糖、脂多糖、磷壁酸和胞外多糖^[6],这些物质都含有许多官能团(如氨基、羧基、羟基、磷酸基等),去质子化后能强烈地吸附着各种重金属离子^[7]。细菌对重金属的吸附可以减少水中重金属污染的可能性,甚至可以改变金属的移动性^[8]。因此准确描述细菌和重金属之间的吸附对于理解金属的活性和预测重金属污染行为以及发展重金属污染修复技术都很重要。由于大肠杆菌生长繁殖速度快,自然环境中量大等特点,本文选择大肠杆菌作为 Cu^{2+} 的吸附剂,旨在研究大肠杆菌对重金属铜吸附特性及其影响因子。

1 材料与方法

1.1 菌体的培养及预处理

将一级大肠杆菌 *Escherichia coli* (编号 ATCC15597) 菌体接种到斜面培养基 [1 g 酵母膏 (Yeast Extract LP0021), 10 g 蛋白胨 (Tryptone LP0042), 18 g 琼脂, 8 g 氯化钠, 蒸馏水 1 000 mL 溶解, pH 为 7.2~7.4] 上,保存在 4℃ 的冰箱中备用。将斜面培养基中的大肠杆菌接种到灭菌 (LDZX-50FB 型高压灭菌锅) 后的液体培养基中(按 5% 的比例吸取菌种),在 37℃、200 r·min⁻¹ 的摇床(SHZ-88A 型水浴恒温振荡器)上培养 1.5~2 h,此时菌体处于对数增长期。吸取一定量的细菌溶液用 0.9% 的生理盐水洗涤 2~3 次,再用背景溶液 0.01 mol·L⁻¹ KCl 溶解洗涤后的大肠杆菌制成细菌悬液备用。

1.2 离子强度、pH 值、 Cu^{2+} 浓度对 Zeta 电位影响实验

在不同背景溶液浓度 KCl (0.1、0.01、0.001 mol·L⁻¹) 溶液中,用 0.01 mol·L⁻¹ HCl 和 NaOH 调节溶液 pH(2~10),细菌浓度为 4.9×10⁷ cfu·mL⁻¹(菌落形成单位 colony forming unit, cfu),利用显微电泳仪,测定菌体细胞的电泳速度,计算电动电位。

在不同的 Cu^{2+} 浓度 (0.01、0.1、1、10 mmol·L⁻¹) 的溶液中,背景溶液为 0.01 mol·L⁻¹ KCl,调节 pH 为 6.0,细菌浓度为 4.9×10⁷ cfu·mL⁻¹ 的条件下同样测定菌体

细胞的电泳速度,计算电动电位。

1.3 大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附动力学

将大肠杆菌培养至对数增长期预处理后,保持反应条件不变即 Cu^{2+} 初时浓度为 0.01 mmol·L⁻¹、pH 为 6、温度 4℃、菌体浓度为 3×10⁷ cfu·mL⁻¹。每隔一定时间取一次样,所取样品在离心机上 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,用原子吸收分光光度计测定 Cu^{2+} 的上清液浓度,通过吸附前后 Cu^{2+} 浓度的变化计算出细菌吸附 Cu^{2+} 的量,每个样重复 3 次并做空白对照。

1.4 静态吸附平衡实验

1.4.1 pH 对大肠杆菌吸附 Cu^{2+} 的影响实验

配制一定浓度用 0.01 mol·L⁻¹ 背景溶液溶解的 Cu^{2+} 溶液,用 0.01 mol·L⁻¹ HCl 和 NaOH 调 pH 值至 2、3、4、5.5、6、7.5、8、9,加入浓度为 3×10⁸ cfu·mL⁻¹ 大肠杆菌,最终浓度 Cu^{2+} 为 0.01 mmol·L⁻¹,大肠杆菌浓度为 3×10⁷ cfu·mL⁻¹,放入摇床,在 4℃ 下振荡吸附 1 h 后在离心机上以 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min。取上清液,用原子吸收分光光度计测定上清液中 Cu^{2+} 的浓度,实验均重复 3 次并做空白对照,结果按下面公式计算 Cu^{2+} 的吸附比率 R 和单位重量细菌的吸附量 W:

$$R = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

$$W = (A_0 - A) \cdot V / m$$

式中: A_0 , A 分别为吸附前后溶液中 Cu^{2+} 的初始浓度和平衡浓度, mg·L⁻¹; V 为溶液体积, L; m 为大肠杆菌湿重, g。

1.4.2 不同细菌浓度对细菌吸附 Cu^{2+} 影响

用移液管吸取重金属 Cu^{2+} 溶液浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 于 50 mL 离心管中,加入不同的细菌浓度,使细菌的最终浓度为 3×10⁷、3×10⁶、3×10⁵、3×10⁴ cfu·mL⁻¹,调整 pH 至 6,在水浴恒温振荡器中振荡 1 h 进行吸附实验,通过吸附前后 Cu^{2+} 浓度的变化来计算出菌体对 Cu^{2+} 的吸附量。

1.4.3 不同重金属浓度对细菌吸附 Cu^{2+} 影响

用移液管吸取已知浓度的重金属 Cu^{2+} 溶液于 50 mL 离心管中,使 Cu^{2+} 最终浓度为 10、1、0.1、0.01 mmol·L⁻¹,加入约 3×10⁸ cfu·mL⁻¹ 的大肠杆菌菌体,调整 pH 至 6。下面步骤同 1.4.2。

2 结果与讨论

2.1 pH 值、离子强度、 Cu^{2+} 浓度对 Zeta 电位影响

Zeta 电位是测定通过细菌细胞膜的电渗流速,主

要反映细菌的表面电化性质。图 1 是三个不同离子强度(I)和 pH 条件下的电动电位变化情况,细菌细胞和金属离子之间的作用主要取决于电动电位^[9],溶液中 pH 能显著影响大肠杆菌的电动电位。随着 pH 从 2 到 10,大肠杆菌的电动电位逐渐降低。在等电点(即在 Zeta 电位等于零时的 pH 值)大肠杆菌细胞表面质子达到平衡, pH 在等电点后细胞带负电荷越来越多。由图可知大肠杆菌的电动电位在 1 左右。当溶液 pH<1 时,细菌细胞表面带正电荷, pH>1 时则带负电荷。离子强度对细菌的电动电位影响也很明显,电动电位随着溶液中的离子强度的增大而降低。这是因为扩散层的有效厚度随着离子强度的增大而降低,离子强度的增大压缩扩散层,更多的反离子进入紧密层,导致扩散层中电荷密度更低^[10,11]。

图 2 是不同 Cu^{2+} 浓度对大肠杆菌 Zeta 电位的影响,结果显示细菌表面的 Zeta 电位随着溶液中金属离子浓度的增大而降低。这是由于细菌表面的负电荷基团吸附大量重金属离子后,使得细菌表面所带的负

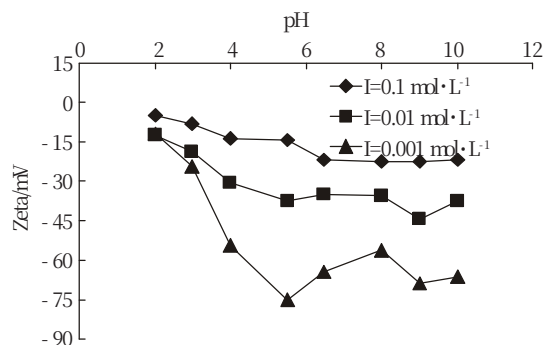


图 1 大肠杆菌在不同离子强度下的 Zeta 电位

Figure 1 Zeta value of *Escherichia coli* as affected by ionic strength

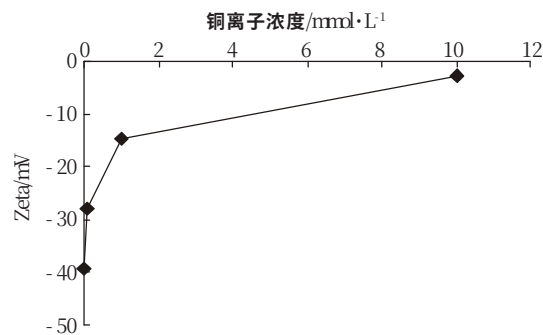


图 2 Cu^{2+} 浓度对大肠杆菌 Zeta 电位的影响(离子强度 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 2 Zeta value of *Escherichia coli* as affected by Cu^{2+} concentration (ionic strength of $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

电荷浓度降低,从而使细菌表面的 Zeta 电位降低,这说明大肠杆菌主要是通过静电引力来吸附 Cu^{2+} 。

2.2 大肠杆菌对 Cu^{2+} 吸附动力学

图 3 是 Cu^{2+} 的吸附率随时间的变化曲线。由图可见, Cu^{2+} 开始接触大肠杆菌时,其吸附速度很快,在 1 h 内吸附达到最高,随后吸附速度又开始降低。可能因为已吸附的 Cu^{2+} 开始解吸,从而导致吸附率的下降,到 7 h 后吸附又逐渐趋于平衡,而最大吸附量几乎等于 1 h 时的最大吸附量。细菌对重金属的整个吸附过程需要一定的时间, Kapoor 等^[12]研究认为,微生物对重金属吸附达到最大吸附一般需要 0.5~2 h,因此本试验大肠杆菌吸附 Cu^{2+} 适合时间为 1 h。大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附在吸附前期,吸附速率比较快,随着时间的增加,其吸附速率逐渐减少。这是因为细菌对金属的吸附可以分为两个阶段:快吸附和慢吸附。快吸附阶段是指直接结合在细胞表面的吸附,不需要能量;慢吸附阶段指依靠细胞代谢向细胞内传输,需要细胞代谢产生的能量^[2]。整个吸附过程符合一级动力学特征。为了能有效提高废水处理能力,快速吸附过程可以用作实际工业废水处理的一个重要参考参数。

2.3 大肠杆菌对 Cu^{2+} 的静态吸附

2.3.1 pH 对大肠杆菌吸附 Cu^{2+} 的影响

已有研究发现 pH 是影响重金属生物吸附的重要因素之一^[13,14]。本试验考察 pH 对吸附的影响,结果如图 4。从图中可看到,重金属离子在细菌表面吸附与溶液的 pH 值有很大关系。当 pH<3 时,细菌表面几乎对 Cu^{2+} 不吸附,其可能原因为:大肠杆菌表面有许多能吸附重金属离子的吸附位点,如羧基、氨基、磷酸基、羟基等官能团。在低 pH 条件下,溶液中大量的氢离子与金属离子竞争大肠杆菌表面的吸附位点^[15],氢离子容易使这些官能团质子化,对金属离子产生斥力

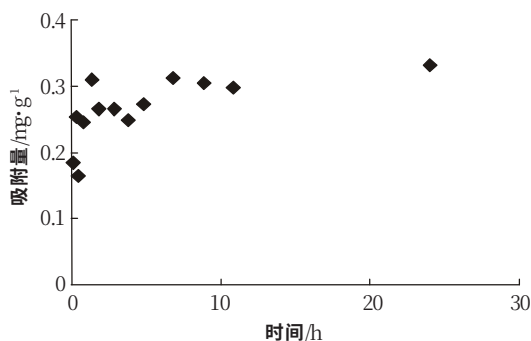


图 3 大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附动力学行为

Figure 3 Kinetic adsorption of Cu^{2+} onto the *Escherichia coli*

作用而降低细菌对重金属离子的吸附。随着 pH 的不断增加,细菌表面的这些暴露官能团上的质子去质子化增大,通过静电引力强烈地吸附重金属离子,因而大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附不断增加,在 $\text{pH}=3\sim6$ 范围内,细菌对 Cu^{2+} 的吸附上升最快。当 pH 值达到 6 时细菌表面对 Cu^{2+} 吸附趋于不变。由于溶液中的 pH 可以影响细菌细胞壁表面官能团的离子态也可以影响金属离子的可溶性,如果 pH 值再高则容易产生氢氧化物沉淀而影响吸附效果,因此本文所有试验的 pH 都选择为 6。

2.3.2 细菌浓度对吸附的影响

大肠杆菌不同浓度对其吸附 Cu^{2+} 浓度影响关系如图 5。结果表明,当所加的细菌浓度越高,细菌对 Cu^{2+} 的吸附也越高。但随着细菌浓度的增加,细菌对 Cu^{2+} 吸附率增加量逐渐降低,可以从与 x 轴所形成的斜率看出。这可能由于细菌浓度越高, Cu^{2+} 与细菌表面上的吸附位点碰撞的机会也越高,被吸附的可能性就越大。同时也说明细菌浓度与重金属浓度之间存在

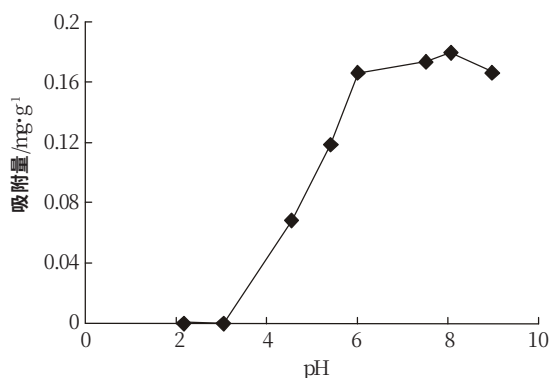


图 4 Cu^{2+} 在大肠杆菌表面吸附随溶液 pH 值的变化曲线

Figure 4 Effect of solution pH on Cu^{2+} adsorption onto the Escherichia coli

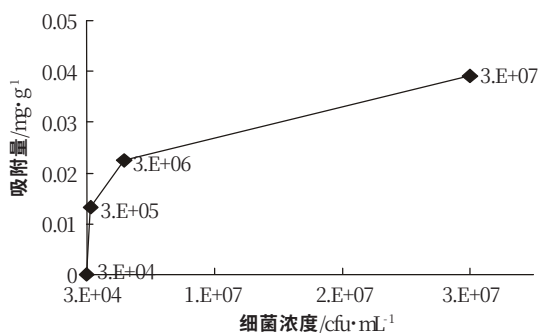


图 5 细菌用量对吸附率的影响

Figure 5 Adsorption ratio of Cu^{2+} as affected by the amount of Escherichia coli applied

一个最佳吸附比值。

2.3.3 重金属离子浓度对吸附的影响

重金属离子初始浓度对吸附率、吸附量影响的曲线见图 6。由图可见,吸附率随着 Cu^{2+} 初始浓度的增加而急剧降低,但吸附量随着 Cu^{2+} 浓度的增加而增加,且吸附率降低幅度随着 Cu^{2+} 浓度梯度的增加而逐渐趋缓。而吸附量增加的幅度随着 Cu^{2+} 浓度梯度的增加而急剧增加,这种现象与 Tony 等^[16]研究 Cu、Pb 等被细菌所产生的金属硫化物吸附所发现的一样,这是因为 Cu^{2+} 浓度越高,与细菌表面所带的负电荷产生的静电引力也就越大。由于吸附率、吸附量和 Cu^{2+} 浓度表现出来的趋势是相反的,因此如果要提高细菌对 Cu^{2+} 的去除效率就要选择一个最佳的 Cu^{2+} 浓度和细菌浓度的比值。而本实验的最佳比值即为两条曲线的交点。

2.4 Cu^{2+} 吸附等温模型

用 Langmuir 方程拟合图 6 中不同重金属浓度对大肠杆菌吸附量影响。Langmuir 吸附等温方程常用来模拟矿物表面及农药等静态吸附过程,其表达式如下:

$$S = \frac{S_m K C_e}{1 + K C_e}$$

双倒数变换为线性方程:

$$\frac{C_e}{S} = \frac{1}{S_m K} + \frac{C_e}{S_m}$$

式中: S 为平衡时大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附量, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; S_m 为最大吸附量, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; K 为吸附平衡常数; C_e 为平衡溶液中 Cu^{2+} 浓度, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

从图 7 拟合的结果看,用 Langmuir 吸附方程能很好拟合该吸附过程,其回归方程为 $1/S = 3.1689 + 1.1059 \times 10^{-3}/C_e$ 。试验所得结果具有良好的相关性,从所

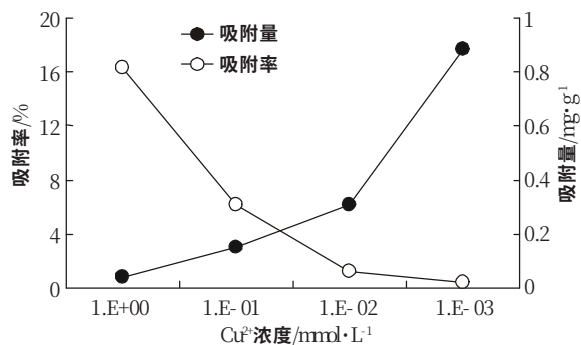
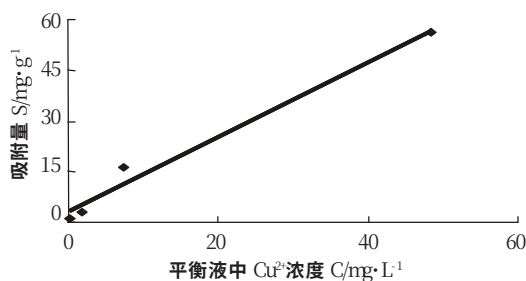


图 6 Cu^{2+} 初始浓度对吸附的影响

Figure 6 Effect of initial concentration of Cu^{2+} on its adsorption onto Escherichia coli

图 7 Cu^{2+} Langmuir 吸附等温模型Figure 7 Langmuir model of Cu^{2+} adsorption onto *Escherichia coli*

得到的确定性系数为 0.984 来看, 拟合结果符合实验所得结果。Langmuir 方程实际意义就是能够计算出大肠杆菌对 Cu^{2+} 最大吸附量, 本实验拟合得到的最大吸附量为 $0.91 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 结论

(1) 大肠杆菌的 Zeta 电位随着溶液中离子强度和 Cu^{2+} 浓度的增加而降低, 说明大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附主要是通过静电引力作用。

(2) 在 Cu^{2+} 初始浓度为 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的背景溶液中, 大肠杆菌对 Cu^{2+} 吸附刚开始 0.5 h 很快, 到 1 h 时即达到最高。

(3) pH 显著影响大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附, 大肠杆菌对 Cu^{2+} 的吸附量随着溶液中 pH 的增加而不断增加, 当 pH 值为 6 时, 吸附量达最大, 如果 pH 继续升高则可能产生氢氧化物沉淀影响吸附结果。

(4) 大肠杆菌对 Cu^{2+} 吸附量随着大肠杆菌浓度、 Cu^{2+} 浓度增加而增加。用 Langmuir 吸附方程能很好模拟该吸附过程, 从确定性系数来看, 模拟所得结果具有良好的相关性。

参考文献:

[1] Sheng P X, Ting Y P, Chen J P, et al. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms[J]. Journal of Colloid and In-

terface Science, 2004, 275:131-141.

- [2] 王亚雄, 郭瑾琰, 刘瑞霞. 微生物吸附剂对重金属的吸附特性[J]. 环境科学, 2001, 22(6):72-75.
- [3] 周立祥, 王良梅. 污水污泥中重金属的细菌淋滤效果研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(4):504-506.
- [4] 曹德菊, 程 培. 3 种微生物对 Cu Cd 生物吸附效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3):471-474.
- [5] Veglio F, Beolchini F. Removal of heavy metals by biosorption: a review[J]. Hydrometallurgy, 1997, 44:302-316.
- [6] Beveridge T J. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization[J]. Annual Review of Microbiology, 1989, 43:147-171.
- [7] Langley S, Beveridge T J. Effect of O- chain- lipopolysaccharide chemistry on metal binding [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(2):489-498.
- [8] Yee N, Fein J B. Does metal adsorption onto bacterial surface inhibit or enhance aqueous metal transport: column and batch reactor experiments on Cd - bacillus subtilis- quartz system[J]. Chemical Geology, 2002, 185:303-319.
- [9] Sadpawl Z. Effect of biosorption of $\text{Pb}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$ and $\text{Cd}(\text{II})$ on the zeta potential and flocculation of nocardia SP [J]. Minerals Engineering, 2001, 14(5):547-552.
- [10] Zhao Y J, Xing W H, Xu N P, et al. Effects of inorganic electrolytes on zeta potentials of ceramic microfiltration membranes[J]. Separation Purification Technology, 2005, 42:117-121.
- [11] Szymczyk A, Fievet P, Mullet M, et al. Comparison of two electrokinetic methods- electro- osmosis and streaming potential- to determine the zeta- potential of plane ceramic membranes [J]. Journal of Membrane Science, 1998, 143:189-195.
- [12] Ka Poor A, Virara Ghavan T. Fungal biosorption- an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review[J]. Bioresource Biotechnology, 1995, 53:195-206.
- [13] Beveridge T J, Murray R G E. Uptake and retention of metals by cell walls of bacillus subtilis[J]. Journal of Bacteriology, 1976, 127:1502-1518.
- [14] Antonio S, Antonio B, Maria L, et al. Biosorption of copper and zinc by *Cynodocea nodosa*[J]. Microbiology Reviews, 1999, 23:527-536.
- [15] Modak J M, Natarajan K A. Biosorption of metals using nonliving biomass- A review[J]. Miner Metall Process, 1995, 12(4):189-196.
- [16] Tony j, David L P. Adsorption of $\text{Pb}(\text{II})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{II})$, and $\text{As}(\text{V})$ on bacterially produced metal sulfides[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2004, 275:61-71.