

# 3 种微生物对 Cu Cd 生物吸附效应的研究

曹德菊，程 培

(安徽农业大学环境科技学院, 安徽 合肥 230036)

**摘 要:**利用常规微生物资源大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、酵母菌(*Saccharomyces sp.*),对重金属离子 Cu、Cd 进行生物修复试验,研究了不同菌种对 Cu、Cd 离子的吸附特性和环境的 pH 值变化对生物修复效应的影响。结果表明,当环境中 Cu、Cd 较低( $\leq 5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )时,微生物修复性能良好,去除率可达 25% ~ 60%;而当 Cu、Cd 浓度较高时,修复性能下降,且不同菌体对 Cu、Cd 的修复上存在一定差异。对于 Cu 来说,3 种微生物修复效果均较好,其修复性能顺序为枯草杆菌> 大肠杆菌> 酵母菌。而对 Cd 的生物吸附,3 种菌差异较大,大肠杆菌与枯草杆菌较好,酵母菌修复效果很差。环境 pH 值对 3 种微生物的生物吸附作用也产生一定影响,对 Cd 的影响表现为低 pH 值,降低其生物体的吸附效应,高 pH 值有利于生物吸附,但 pH 值变化对 Cu 的微生物吸附影响较为复杂。

**关键词:**生物修复; Cu; Cd; 大肠杆菌; 枯草杆菌; 酵母菌

**中图分类号:**X172      **文献标识码:**A      **文章编号:**1672 – 2043(2004)03 – 0471 – 04

## Bioremediation of Several Microorganisms Towards Cu and Cd by Adsorption

CAO De-ju, CHENG Pei

(Special of Environment Engineering Department, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** This investigation deals with bioremediation efficiency at different concentration heavy metals Cu and Cd by different kind of bacteria (*Escherichia coli*、*bacillus subtilis*、*Saccharomyces sp.*) and studied effects of changing pH values on bioremediation efficiency. The results showed that when the concentrations of ions of Cu and Cd were low ( $\leq 5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) the efficacy was fair (with removal rates of 25% ~ 60%). However, when the heavy metal concentrations were high, the removal efficacy was poor. The results also showed that the divergence existed among different kinds of bacteria. In terms of ion – Cu in the experiment, the bioremediation efficacy was generally good by the three kinds of microorganisms and in generally *bacillus subtilis* > *Escherichia coli* > *Saccharomyces sp.*. But for ion – Cd, the efficacy was very different for the three kinds of microbes studied. Generally, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* exhibited good efficacy and the *Saccharomyces sp.* was bad. The changing pH values influenced adsorbing property in some areas. The influences on Cd indicated that lower pH influenced the bioremediation and the higher pH values were beneficial to the bioremediation; but pH value effect to ion Cu was complex.

**Keywords:** Cu and Cd; bioremediation; *Escherichia coli*; *bacillus subtilis*; *Saccharomyces sp.*

水体重金属污染的传统处理方法包括:化学沉淀法、离子交换法、活性炭及硅胶吸附法、电化学法及膜分离法等<sup>[1~51]</sup>,但对于较低浓度的重金属离子废水处理效果不明显,操作费用和原材料成本相对较高且存在二次污染,对大面积水域更受限制。近年,生物修复技术得到广泛应用,取得较理想结果<sup>[3, 5~91]</sup>。而生物修复重金属污染国内外研究较少,董德明<sup>[61]</sup>等报道了

湿地水环境中采集的生物膜吸附铅、镉的特性,王亚雄<sup>[71]</sup>等报道了微生物吸附剂对重金属的吸附特性,周立祥等人研究了氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus*)对污泥中重金属生物淋滤的效果<sup>[91]</sup>。其实微生物吸附重金属的材料来源广泛,包括细菌、病毒、真菌以及一些小型的原生动物等在内的一大类生物群体,它个体微小,却与人类生活密切相关<sup>[8~101]</sup>。生物吸附法在低浓度下处理重金属的效果更佳,具有吸附容量大,速度快,选择性好等特点<sup>[8~101]</sup>,具有广阔的应用前景。然而,目前报道的多为混合菌体<sup>[61]</sup>及筛选驯化菌体<sup>[7, 91]</sup>对重金属的修复,而常规微生物,也是水处理工程实

收稿日期: 2003 – 10 – 07

基金项目:安徽省教育厅自然基金项目(2004kj418)

作者简介:曹德菊(1965—),女,硕士,副教授,主要从事环境污染生物修复研究。

际应用的常规菌种,对 Cu 和 Cd 的生物吸附效应,却鲜有涉及。本文研究了常规菌种大肠杆菌、枯草杆菌、酵母菌对 Cu、Cd 的生物吸附规律及影响因子,为常规菌种的重金属生物修复提供了基础资料。

## 1 试验材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌种

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、酵母菌 (*Saccharomyces sp.*)。

#### 1.1.2 仪器

超净工作台 (SPEG AIR TECH), 电热板, 高压灭菌锅, Thermo Element M5 型原子吸收分光光度计, QH2-98A 恒温振荡培养箱, SHA-C 水浴恒温振荡器, CENTRIFUGE TDL-S 型离心机。

#### 1.1.3 试剂

CuSO<sub>4</sub> (国产优级纯), CdSO<sub>4</sub> (国产优级纯), 其余试剂均为分析纯。

#### 1.1.4 培养基

普通细菌培养基 (液体) 配方: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 2.5 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 加热溶解, 调节 pH 值至 7.2~7.6。

真菌培养基 (液体) 配方: 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, 蒸馏水 1 000 mL 溶解, 自然 pH 值。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 Cu、Cd 修复试验方法

##### 1.2.1.1 吸附平衡试验

将微生物培养至对数增长期, 对低浓度 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和高浓度 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 Cu、Cd 分别进行修复平衡试验, 隔 4, 16, 24, 30 h 取样, 离心 (在转速  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下, 离心 15 min), 取上清液, 用原子吸收分光光度计测定离子 Cu、Cd 的残留浓度, 作吸附平衡试验分析。

##### 1.2.1.2 3 种微生物对不同浓度 Cu、Cd 的吸附作用比较

挑取斜面菌种 (细菌) 一环于盛有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中, 恒温水浴 ( $37^\circ\text{C}$ ) 振荡 24 h, 再取种子液 5 mL 于盛有 100 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中连续振荡培养 24 h, 后加入不同浓度重金属 (Cu 或 Cd), 吸附平衡后离心取上清液, 测定 Cu、Cd 的含量, 同时该试验做不加菌的对照和平行试验。酵母菌方法同上 (培养温度改为  $28^\circ\text{C}$ )。

##### 1.2.1.3 pH 对 Cu、Cd 生物修复的影响试验

菌体培养 24 h 后, (对数生长期) 调节菌液 pH 分别达 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 后加入重金属 Cu、Cd, 使其最终浓度为  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 吸附 24 h 后取样测定 Cu、Cd 浓度。

#### 1.2.2 Cu、Cd 的测定方法

取上述上清液 10 mL 于三角瓶中, 加 5 mL 浓硝酸浸泡过夜, 加热消解至清亮透明, 定容至 50 mL。根据需要再做一定稀释, 于 Thermo Element M5 型原子吸收分光光度计上测定 Cu、Cd 浓度。

#### 1.2.3 Thermo Element M5 型原子吸收分光光度计仪器测定条件

Cu: 波长 324.8 nm, 灯电流为 4.0 mA, 狭缝宽度为 0.5 nm, 火焰高度为 7.0 mm, 乙炔流量为  $1.1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Cd: 波长 228.8 nm, 灯电流为 4.0 mA, 狭缝宽度为 0.5 nm, 火焰高度为 7.0 mm, 乙炔流量为  $1.1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌种对 Cu、Cd 的生物修复平衡试验

按照 1.3.1 方法加入重金属 Cu、Cd, 分别吸附 4, 16, 24, 30 h 后, 高速离心分离 (在转速  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下, 离心 15 min), 取上清液用原子吸收分光光度计测定 Cu、Cd 离子的残留浓度, 研究微生物对 Cu、Cd 的吸附修复平衡规律。试验结果见图 1。

从图 1 可以看出, 微生物对 Cu 的修复表现为: 低浓度 Cu, 通过 24 h 修复后, 菌液中残留 Cu 浓度最小, 即吸附量最大, 达到平衡状态。超过 24 h 后如 30 h 取样, 菌液残留浓度加大, 即菌体开始脱附 Cu。而高浓度 Cu, 除枯草杆菌吸附平衡时间提前外, 其余都在 24 h 达吸附平衡; 微生物对 Cd 的吸附平衡时间则难以确定, 在选择 4 个时间段里, 培养液的残留浓度差异不大, 可能吸附平衡时间在 4 h 之前, 具体情况有待于进一步探讨。综合考虑, 并参考董德明<sup>[6]</sup>的结论, 选取 24 h 作为生物吸附试验时间, 以比较不同微生物对 Cu、Cd 的生物修复效应。

### 2.2 微生物对不同浓度 Cu、Cd 的生物修复效应

将微生物培养至对数生长期, 加入 Cu、Cd 使其浓度分别达到 1.0, 5, 25, 50 和 0.5, 5, 25, 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。进行修复试验, 24 h 后离心, 取上清液测定溶液中 Cu、Cd 的残留浓度, 求取微生物对 Cu、Cd 去除效果, 去除率 = (不加菌对照液浓度 - 加菌液浓度) / 不加菌对照液浓度  $\times 100\%$ 。结果见表 1、表 2。

对表 1 和表 2 数据进行分析可知, 微生物对 Cu

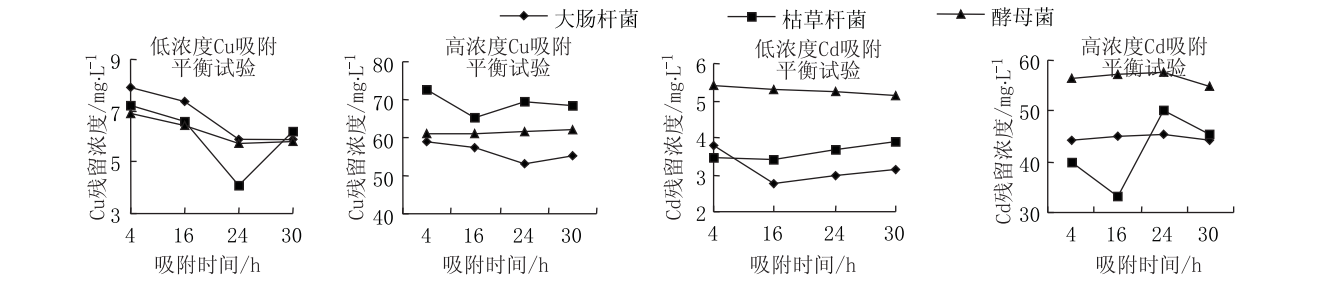


图 1 微生物对 Cu、Cd 的修复平衡情况

Figure 1 Bioremediation balance of Cu and Cd by the microorganisms studied

表 1 微生物对不同浓度 Cu 的修复作用

Table 1 Bioremediation efficiency at different concentrations of copper in the presence of different bacteria

| Cu 浓度<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 大肠杆菌                          |                              |           | 枯草杆菌                          |                              |           | 酵母菌                           |                              |           |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|-----------|
|                                | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% |
| 1.0                            | 1.300                         | 0.760 0*                     | 41.54A    | 1.300                         | 0.69*                        | 46.92A    | 0.790                         | 0.558 5                      | 29.30A    |
| 5.0                            | 7.899                         | 5.860 5*                     | 25.81B    | 7.899                         | 5.20*                        | 34.17B    | 7.021                         | 4.867 0                      | 30.68A    |
| 25.0                           | 41.965                        | 35.340 0                     | 15.79C    | 41.965                        | 36.55                        | 12.90C    | 26.955                        | 22.575 0                     | 16.25B    |
| 50.0                           | 72.810                        | 66.110 0                     | 9.20D     | 72.810                        | 56.00                        | 23.07D    | 54.235                        | 48.915 0                     | 9.81C     |

注:英文字母表示不同浓度组间差异;\* 表示处理内 0.1% 水平显著。

表 2 微生物对不同浓度 Cd 的修复作用

Table 2 Table1 Bioremediation efficiency at different concentrations of cadmium in the presence of different bacteria

| Cd 浓度<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 大肠杆菌                          |                              |           | 枯草杆菌                          |                              |           | 酵母菌                           |                              |           |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|-----------|
|                                | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% | 不加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 加菌液<br>/mg · L <sup>-1</sup> | 去除率<br>/% |
| 0.5                            | 0.478 5                       | 0.215 5**                    | 54.96A    | 0.478 5                       | 0.207 3**                    | 56.69A    | 0.658 5                       | 0.615 0                      | 6.61A     |
| 5.0                            | 4.862 0                       | 2.957 5**                    | 39.17B    | 4.862 0                       | 3.722 0**                    | 23.45B    | 5.484 5                       | 5.274 5                      | 3.83A     |
| 25.0                           | 23.907 5                      | 23.615 0                     | 1.22C     | 23.907 5                      | 23.215 0                     | 2.90C     | 28.54                         | 27.060 0                     | 5.18A     |
| 50.0                           | 44.465 0                      | 44.687 5                     | -0.50C    | 44.465 0                      | 44.490 0                     | -0.05D    | 56.95                         | 54.870 0                     | 3.65A     |

注:英文字母表示不同浓度组间差异;\* 表示处理内 0.1% 水平显著;\*\* 为 0.05% 水平显著。

的修复表现为,Cu 在低浓度组(1.0,5.0 mg · L<sup>-1</sup>)被去除的比率皆在 25% ~ 50% 之间,其中枯草杆菌对 Cu 的去除率最大,处理内与处理间的差异显著性检验见表 1,大肠杆菌对 Cu 的去除率比酵母菌高,且经方差分析在 0.05 水平显著。但随着 Cu 浓度增大,微生物的修复效果均有下降趋势;微生物对 Cd 的修复表现为:大肠杆菌与枯草杆菌在低浓度组(0.5,5.0 mg · L<sup>-1</sup>)对 Cd 的去除能力较强,达 23% ~ 60% 之间,而酵母菌对 Cd 的去除效果处理间不明显,不同微生物对 Cd 的处理内与处理间差异显著性分析见表 2。总之,在微生物对 Cu,Cd 污染进行生物修复时,水环境浓度较低时处理效果好,而当浓度超过 25.0 mg · L<sup>-1</sup>,去除效果相对较差。

2.3 pH 值对重金属离子吸附的影响

对微生物修复 Cu, Cd 的影响因子进行探讨,主

要研究了 pH 值变化对吸附效应的影响,当微生物培养至对数增长期,分别调节其菌液 pH 为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,再加入重金属 Cu, Cd 使其浓度达 5 mg · L<sup>-1</sup>,继续培养菌体进行重金属修复,24 h 后离心取上清液测定其中残留 Cu, Cd 浓度,结果见图 2。

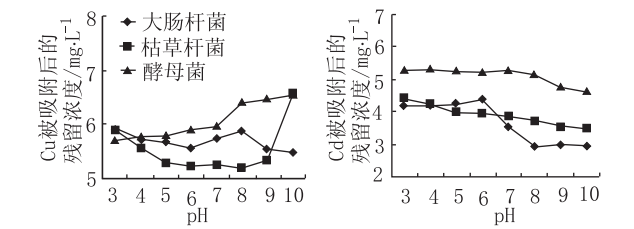


图 2 pH 值对微生物修复 Cu、Cd 的影响

Figure 2 Effect of pH values on bioremediation efficiency towards Cu and Cd

从图 2 可清楚地看出, pH 对微生物的修复效应产生较大影响, 从微生物修复 Cd 来说, 当 pH 值偏低即  $\text{pH} < 7$  时, 大肠杆菌修复实验培养液中残留 Cd 浓度大, 即修复效应低; 而  $\text{pH} > 8$  时则有利于生物修复, 与文献报道相符<sup>[8]</sup>。而酵母菌和枯草杆菌对 Cd 的修复则表现出 pH 值变化对修复影响不大, 但总的趋势是随 pH 升高, 吸附效应增强。但 pH 对于 Cu 生物修复效应影响, 不同菌体之间存在一定差异, 大肠杆菌当  $\text{pH} = 5 \sim 6$  和  $\text{pH} = 9 \sim 10$  时其培养液残留 Cu 浓度小, 而  $\text{pH} = 8$  时则出现异常现象, 枯草杆菌与酵母菌则在  $\text{pH} = 10$  时表现为高 pH 值环境不利于菌对 Cu 的吸附, 具体原因有待于进一步探讨。

### 3 小结与讨论

微生物对 Cu、Cd 存在生物吸附作用。从吸附平衡规律来看, Cu 和 Cd 存在一定差异, 微生物对 Cu 修复平衡时间为 24 h, 而 Cd 则难确定; 从微生物对 Cu、Cd 吸附效果比较可知, 当环境中 Cu、Cd 浓度较低时, 即污染不严重的情况下, 微生物修复性能良好, 特别是大肠杆菌与枯草杆菌。而当浓度较高即污染较严重时, 修复效果不理想。一般污染水体中 Cu 浓度是低于  $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的, 即利用普通微生物修复水体 Cu、Cd 污染, 并在进行水体 Cd 污染的生物修复时, 加大其中大肠杆菌与枯草杆菌的菌种比例, 会取得较理想的结果。

环境 pH 值变化对修复效应影响较大, 较低 pH 不利于 Cd 的生物吸附, 高 pH 值有利于 Cd 的生物吸附。pH 值对 Cu 的影响较为复杂, 对不同微生物影响

也不同, 大肠杆菌在  $\text{pH} = 5$ ,  $\text{pH} = 10$  时, 吸附效果较好, 而  $\text{pH} = 8$  时出现异常, 枯草杆菌和酵母菌表现为高 pH 值不利于菌体对 Cu 的吸附。具体原因有待于进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 张玉梅. 含镉废水处理的试验研究[J]. 环境工程, 1995, 13(1): 15 - 20.
- [2] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 488.
- [3] 夏星辉, 陈静生. 土壤重金属污染治理方法研究进展[J]. 环境科学, 1997, 18(3): 72 - 75.
- [4] 徐根良, 陈雪明, 陈海辉. 废渣法处理酸性重金属废水技术研究[J]. 水处理技术, 1994, 20(2): 116 - 120.
- [5] Eccles H. Removal of heavy metal from effluent streams by select a biological process Int. Biodegrad, 1995, 5 - 16.
- [6] 董德明, 李 鱼, 花修艺, 等. 湿地水环境中采集的生物膜吸附铅和镉的特性[J]. 环境科学, 2003, 24(1): 131 - 134.
- [7] 王亚雄, 郭瑾珑, 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.
- [8] 王建龙, 文湘华. 现代环境生物技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 2001. 306 - 312.
- [9] 周立祥, 王艮梅. 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.
- [10] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 488.
- [11] Veglio F Beolchini. Removal of heavy metals by bio - sorption: a review[J]. Hydrometallurgy, 1997, 44: 302 - 316.
- [12] Kapoor A, Viraraghavan T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review[J]. Biotechnol Prog, 1995, 13: 60 - 70.