

# 龙须菜几株附生细菌对铜离子吸附性能的比较

徐永健\* 廖 律 倪梦菊

(宁波大学 生命科学与生物工程学院 浙江 宁波 315211)

**摘 要:** 重金属污染和富营养化是沿岸海域的主要污染形式,造成沿海生态功能的退化。在重金属污染区域往往伴随着富营养化现象。本文对分离来自电镀废水中铜污染海域内的龙须菜体表的附生微生物对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸附进行试验,分析和比较这些微生物对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸收性能。共分离到6株优势附生细菌:人苍白杆菌GF-S1、杀鲑气单胞菌GF-S2、莱拉微球菌GF-S3、纹带棒杆菌GF-S4、假交替单胞菌GF-S5和弗氏弧菌GF-S6。经对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸附试验发现,GF-S2效果最好,GF-S6最差,其余间于这两者之间。对GF-S2、GF-S4和GF-S6进行了最佳吸附时间和pH筛选,以及使用不同化学试剂对细菌 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附的影响试验。结果显示:最佳吸附时间在40 min~60 min, pH介于4~5对GF-S2、GF-S4吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的效果较好;HCl处理导致GF-S2丧失吸附能力,NaOH和乙醇能提高其吸附性能;3种试剂都能较大地提高GF-S4和GF-S6的吸附性能,尤其对GF-S4经处理后,环境中的 $\text{Cu}^{2+}$ 的去除率得以大幅度提高,去除较彻底。

**关键词:** 铜离子,生物吸附,附生细菌,海藻

## Comparison Copper Absorption Capacity with Several Bacteria Strains from the Surface of Macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)

XU Yong-Jian\* LIAO Lv NI Meng-Ju

(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China)

**Abstract:** The main pollution of coastal sea is heavy metal and eutrophication, which resulted in degeneration of its eco-function. Pollution of heavy metal is accompanied with eutrophication in sea water. This article studied on copper absorption capacity of several bacteria strains which were isolated from the surface of macroalga *Gracilaria lemaneiformis* that was cultivated in copper polluted sea. We got 6 strains of epiphytic bacteria from the seaweed, *Ochrobactrum anthropi*, *Aeromonas salmonicida*, *Micrococcus lylae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Vibrio fluvialis*. Attained from the experiment of copper biosorption, *A. salmonicida* had a maximal biosorption capacity among them, and *Vibrio* minimal. Based on this trail, *A. salmonicida*, *C. ulcerans* and *Vibrio* were selected for next trails included optimal biosorption time, optimal pH value and effect of pre-disposal by several chemical reagents on biosorption capacity. The results showed: optimal biosorption time was between 40 minutes and 60 minutes, and optimal pH value 4~5.

Pre-disposal by HCl leaded to lost the absorption capacity of *A. salmonicida*, but was opposite by NaOH and ethanol. For *C. ulcerans* and *Vibrio*, the copper absorption capacities were increased by them.

**Keywords:** Copper, Biosorption, Epiphytic bacteria, Seaweed

$\text{Cu}^{2+}$ 是工业废水中普遍存在的重金属污染源<sup>[1]</sup>。传统的处理方法(如化学沉淀法、离子交换法、活性炭吸附法、电化学及膜分离法等)在处理较低浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ 时,其操作费用和原材料吸附成本都相对较高<sup>[2]</sup>。生物吸附法是一种新颖的处理方法,是利用生物材料吸附水体中的重金属物质。在过去的20年间,细菌、藻类和真菌以及它们的某些组分作为生物吸附剂已被成功地应用于水体中重金属离子(包括 $\text{Cu}^{2+}$ )的吸附与去除。在这些微型生物中,细菌由于其较高的比表面积而受到广泛关注<sup>[3-5]</sup>。微生物细胞表面通常都呈负电性,因此它们可以结合重金属阳离子。生物吸附法具有在低浓度下处理重金属效果更好、易操作等特点,在去除水中重金属方面有广阔的应用前景。

我国正逐步向工业化迈进,重金属的污染也日益严重,尤其在沿海较发达地区,重金属的排放导致了沿海水体的污染,造成海洋生态系统功能的退化。沿海水体重金属的去除问题已引起社会的广泛关注。而这些海区往往也是富营养化程度较高的区域。如何能够同时处理两类污染,达到较好的效果,是今后较长时间内的重点问题。大型海藻龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)是有效的海水富营养化修复生物之一,在我国沿海有广泛的栽培。本试验对分离自电镀废水中铜污染海域内的龙须菜体表的附生微生物对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸附进行试验,分析和比较这些微生物对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸收性能,以期为沿海富营养化海水重金属的去除和污染的净化提供一种解决方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

龙须菜采自宁波象山港内的某电镀厂废水排放口海域,该厂已停止生产近3年,但在附近海区水体中仍有较高浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 的存在。实验菌株分离自龙须菜体表<sup>[6]</sup>,共获得附生菌优势菌株6株,分别为:人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*),记为GF-S1,  $\text{G}^-$ ;杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*), GF-S2,  $\text{G}^-$ ;莱拉微球菌(*Micrococcus lylae*), GF-S3,  $\text{G}^-$ ;纹

带棒杆菌(*Corynebacterium ulcerans*), GF-S4,  $\text{G}^+$ ;假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas spp*), GF-S5,  $\text{G}^-$ ;弗氏弧菌(*Vibrio fluvialis*), GF-S6,  $\text{G}^-$ 。分离纯化后,这些菌株都保存在2216E培养基上备用。

### 1.2 实验方法

细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附:用硫酸铜粉末(AR级,上海产)配制浓度为 $10.0 \mu\text{g/mL}$ 的 $\text{Cu}^{2+}$ 标准贮备溶液。在100 mL的三角烧瓶内,加60 mL的细菌液体培养基(2216E),调节pH,控制培养摇床内的温度为 $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,200 r/min。培养48 h后,使细菌达到指数生长期。此时在各细菌的菌液中加入 $\text{Cu}^{2+}$ 标准贮备液至 $\text{Cu}^{2+}$ 终浓度为 $1.0 \text{ mg/L}$ ,将pH设置为5.0,并且每株菌设6个重复,在恒温摇床中振荡培养40 min后,采用二乙基二硫代氨基甲酸钠分光光度法<sup>[7]</sup>测定介质中游离的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度。

在此基础上,GF-S2、GF-S4和GF-S6被选择用来作进一步的后续试验,用以分析各菌株的最佳吸附时间,不同的环境pH值及不同酸碱等化学试剂预处理等对各菌株吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的影响。为得到上述细菌的最佳吸附时间,将 $\text{Cu}^{2+}$ 贮备液加入到含有60 mL的处于指数生长期细菌的培养液的100 mL三角烧瓶中,使 $\text{Cu}^{2+}$ 的终浓度为 $1.0 \text{ mg/L}$ ,将各细菌在摇床中振荡培养共70 min,每株菌设6个重复,并且每隔10 min取样测定介质中的游离 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度,作时间与吸附量的变化曲线,比较不同菌株对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附变化;为研究各菌株在不同pH对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附情况,首先取处于对数生长期的菌液,用 $1.0 \text{ mol/L}$ 的NaOH溶液和 $1.0 \text{ mol/L}$ 的HCl溶液调节其pH值(pH = 2、3、4、5、6),加入 $\text{Cu}^{2+}$ 使溶液浓度达到 $1.0 \text{ mg/L}$ ,再经恒温摇床培养50 min后,结束试验,离心除去菌体,取上清液使用分光光度法<sup>[7]</sup>测定溶液的 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度,比较分析不同pH值对菌株吸附的影响;为了解化学试剂对细菌吸附作用的影响,分别加入NaOH、HCl溶液以及乙醇溶液到菌液当中,使它们的浓度最终为 $0.1 \text{ mol/L}$ 的,1 mol/L和95%,另在设一组空白对照,处理30 min后,将这4组菌液离心并弃上清,所得沉淀即为菌体,将它们移入含有 $1.0 \text{ mg/L}$   $\text{Cu}^{2+}$ 的液体培养基中,充分混匀后,进

行吸附试验, 50 min后, 检测出细菌的对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附情况。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对所得结果进行数据分析与比较。对每个处理的平均数和标准差进行计算与分析 ( $n=6$ ), 不同处理间的差异比较与分析采用 Student's  $t$ -检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 几种菌对比吸附实验结果

从图 1 中可以看出, GF-S2 菌株处理中剩余 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度最小, 为 0.01 mg/L, 表明其对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性最强; 而GF-S6 菌株处理最差, 几乎没有作用。其余各菌株对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性处于二者之间, 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附率介于 40%~60%。GF-S1 和GF-S4 稍优于另两菌株 ( $P < 0.05$ )。可以看出, GF-S2 和GF-S6 菌株虽然同属于弧菌科, 但他们对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性质却完全不同。此外, GF-S3 和GF-S4 为 $G^+$ 。因此, 选择GF-S2、GF-S4 和GF-S6 用来进行下述试验。

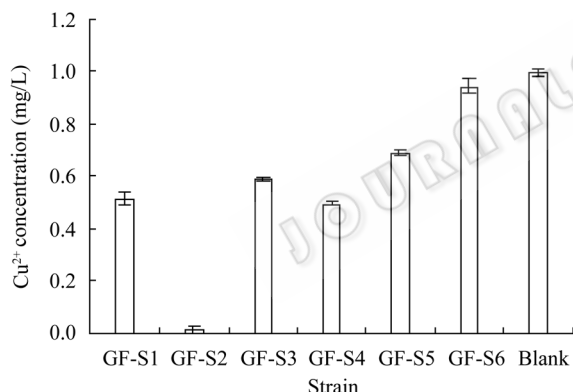


图 1 各菌株对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附比较

Fig. 1 Comparison of copper biosorption capacity among several bacteria strains

Note: pH 5.0; 200 r/min;  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; 40 min.

### 2.2 最佳吸附时间的选择

GF-S2、GF-S4 和GF-S6 三株菌的最佳吸附时间试验结果见图 2。可以看出, GF-S6 菌株从实验开始的 70 min内, 对介质中的 $\text{Cu}^{2+}$ 无吸附作用; 而GF-S2 和GF-S4 都有较明显地对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附。其中, GF-S4 从第 40 min开始至 60 min时, 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附量最大, 与第 30 min间差异显著 ( $P < 0.05$ )。表明第 30 min时, 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附没有达到最大。GF-S2 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的最大吸附量发生在第 50 min~70 min时, 其中第 60 min时几

乎测不到介质中的 $\text{Cu}^{2+}$ 。因此, 可以推定在 1 h内细菌对铜离子吸附将完全发生。在后续实验中, 吸附时间设定为 50 min~60 min。

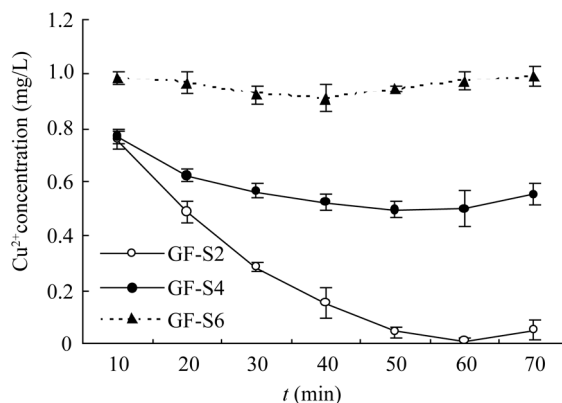


图 2 GF-S2、GF-S4 和 GF-S6 三株细菌的最佳吸附时间比较

Fig. 2 Comparison of optimal absorption time to copper among GF-S2, GF-S4 and GF-S6 strains

Note: pH 5.0; 200 r/min;  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 2.3 介质 pH 值对吸附性能的影响

不同介质的pH值对细菌 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附的影响见图 3。从图中可以看出, pH < 5 对GF-S6 吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 无影响。但对GF-S2 和GF-S4 的影响较大, 调节介质的pH 值对该两株菌的 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附性能产生很大的影响, 尤其对于GF-S2。经比较与分析, pH值为 4 或 5 的介质环境中, GF-S2 和GF-S4 对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附最佳。在此两株菌中, 也存在着不同的最适pH, 其中GF-S2 对 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附最适pH 4, 大于或小于 4 的pH都将对菌体吸附性能产生负影响; 实验中还可以看出,

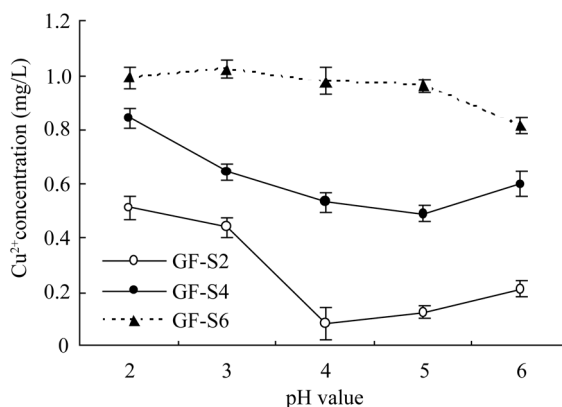


图 3 不同pH值对三株细菌 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附的影响

Fig. 3 Effect of different pH value on copper absorption capacity among GF-S2, GF-S4 and GF-S6 strains

Note: 200 r/min;  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ; 50 min.

降低pH(2 或 3)对菌体造成很大破坏, 大部分菌体死亡(变白), 从而影响到对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附, 而高pH(5 或 6)虽然也使菌体对 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附降低, 但仍保持一定的对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附量。而GF-S4 的最适pH值为 5。相对的, GF-S6 在本实验中有着比前述试验中更高的 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附量, 说明该菌可能更适宜在偏中性环境中处理 $\text{Cu}^{2+}$ 污染。

#### 2.4 预处理对菌体吸附性能的影响

从图 4 中可以看出, 用不同化学试剂对菌体进行预处理使菌体对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性产生很大影响。对于菌株GF-S2, HCl的处理使菌体完全失去了对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性能, 但NaOH和乙醇的预处理, 都使该菌株更佳地吸附 $\text{Cu}^{2+}$ (与未处理组比较,  $P < 0.05$ )。对于菌株GF-S4, 3 种试剂的处理都能更好地促进该菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附, 提高吸附性能(与未处理组比较,  $P < 0.01$ )。GF-S6 菌株, 经过 3 种试剂分别处理后, 其对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性能大大提高了, 明显存在对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性(与未处理组比较,  $P < 0.01$ )。从实用性上看, GF-S4 经 3 种试剂处理, 对介质环境中的 $\text{Cu}^{2+}$ 的去除率得以大幅度提高, 去除较彻底, 有一定的应用价值。

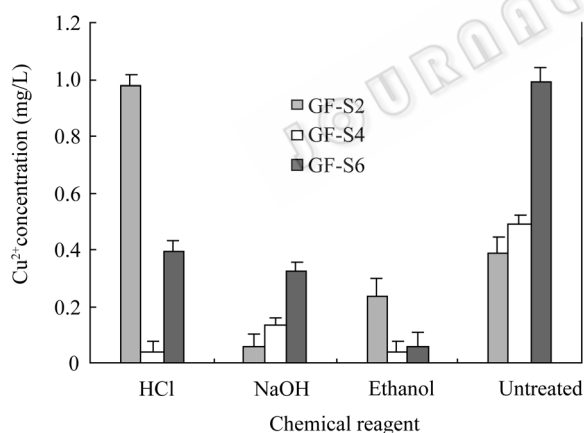


图 4 不同预处理对三株细菌 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附的影响

Fig. 4 Effect of different pre-disposal on copper absorption capacity among GF-S2, GF-S4 and GF-S6 strains

Note: 200 r/min;  $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 50 min.

### 3 讨论与结论

沿岸海水的富营养化和重金属污染, 导致了海洋生态功能的退化, 影响了海洋经济的发展。生物吸附法能高效处理低浓度的重金属污染, 在去除水

中重金属方面有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。本试验以从重金属 $\text{Cu}^{2+}$ 污染海区的富营养化修复植物龙须菜体分离纯化的附生细菌作为材料, 分析对 $\text{Cu}^{2+}$ 的生物吸附性能。将重金属去除(微生物吸附)和富营养化修复(植物修复)协同进行作初步探索。

本试验结果显示分离自海藻体表的附生菌有较好地吸附低浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 的效果。但不同的细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性能不同, 这很可能与各菌株产生的胞外产物及其细胞壁构成有关<sup>[8]</sup>。本文并没有确切地得出某一株细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性能, 但也能看出细菌对铜离子的吸附在种与种之间都有很大的差异<sup>[9]</sup>, 如杀鲑气单胞菌(GF-S2)与弗氏弧菌(GF-S6)对 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附有显著的差异。前者有明显的优势, 可作为研究细菌对重金属吸附性能的极佳材料, 也能较好地处理工业废水中的重金属 $\text{Cu}^{2+}$ <sup>[10]</sup>, 仅需用一定的脱吸材料回收 $\text{Cu}^{2+}$ , 处理后的废水达标后方能排放。对于一般水体重金属 $\text{Cu}^{2+}$ 污染, 可以考虑提取该菌的胞外产物或者该菌的干物质制品投放水体中进行吸附。而后者, 尽管与前者都属于弧菌科, 但较难形成产品。

细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附是一个相对较快的过程, 一般在 1 h 内就能达到最大的吸附量, 随后吸附量不再上升, 这与前人报道的结果较一致<sup>[2,8,11]</sup>。说明细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附以速率较快的物理吸附为主, 即以表面活性基团残基和 $\text{Cu}^{2+}$ 的结合为主。因此加大细菌的量将会对吸附产生明显的正面影响, 这样在短时间内就能吸附较多量的 $\text{Cu}^{2+}$ 。在本试验中, 附生菌的吸附时间达到 70 min 时,  $\text{Cu}^{2+}$ 的量反而会增加, 这可能是由于附生菌暴露过长会对其造成一定的毒害作用, 一些细菌甚至死亡, 从而导致细胞破裂,  $\text{Cu}^{2+}$ 重新释放到溶液中。pH 是影响细菌吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的重要环境因子(图 3)。在适宜的 pH 环境中, 细菌能很好地吸附环境中的 $\text{Cu}^{2+}$ 。但对于不同的菌株, 其适宜 pH 值各不相同, 这可能与细菌的嗜好与耐受性有关。本实验环境中细菌的适宜 pH 在 4~5, 偏酸性。这与董新姣<sup>[12]</sup>报道的结果相似。但该适宜 pH 值与自然海水的 pH 值有一定的差异, 如何较好地应用这些产品还需要进一步研究。

经过 NaOH、HCl 和乙醇等化学试剂浸泡处理的菌体能改变菌体吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的能力, 不同细菌对相同的处理结果也不相同(图 4)。细菌在经过处理后, 暴

露出更多吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的活性基团<sup>[8]</sup>。因此在应用中可以先使用一定的化学试剂充分浸泡菌体,使菌体更快地吸收 $\text{Cu}^{2+}$ 。而用不同化学试剂对菌体进行预处理使菌体对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性有产生很大影响,如,对于菌株GF-S2, HCl的处理使菌体完全失去了对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性,推断 30 min的处理时间由于菌体耐受不住该浓度的环境导致菌体死亡失活破碎,失去了吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 的活性基团,或者活性物质从细胞表面脱落;而使用NaOH和乙醇处理菌体,都能使菌体更快地吸附 $\text{Cu}^{2+}$ ,说明经过该处理,菌体表面有更多的活性基团暴露,从而加快对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附,在这个过程中,NaOH的作用更加明显,由于细菌主要通过细胞壁上带负电荷的官能基团如羧基、磷酸基来吸附重金属离子,NaOH的加入使得原本结合在这些基团上的阳离子被置换出来,从而为更多地吸附 $\text{Cu}^{2+}$ 创造了条件。乙醇可以作为消毒剂,它能造成细菌蛋白质的凝固变性,具有一定的杀菌功效,最佳的杀菌浓度是 70%,大于或小于这个值的效果都不好,若用 95%的乙醇作用细菌,只能导致细胞膜上的蛋白快速变性,从而在细菌表面形成一层保护膜,无法将细菌杀死,表面的变性更造成蛋白质的高级结构破坏,使得大量基团暴露出来,相应地增强了细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附作用。而菌株GF-S2 的未处理组吸附效果明显低于前面最佳时间比较试验( $P < 0.05$ ),这可能是该组菌株经过离心处理的缘故,离心分离的过程中可能对这株细菌造成了一定的损伤,从而使得该菌株的吸附作用大不如前。GF-S6 在经过 3 种化学试剂处理后,表现出了对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附性能,表明试剂的处理使其表面的活性基团得以一定的暴露,也许结合pH等环境条件的选择,该菌的吸附性能会得以大大的提高。本研究中的GF-S4 菌株,属 $G^+$ ,在经化学处理后,其对 $\text{Cu}^{2+}$ 的去除率极大地提高了。根据文献报道,化学处理使其细胞壁膜上的肽聚糖(PEG)层、内膜和外膜等功能基团充分暴露,大大地提高了吸附性能<sup>[13-15]</sup>。通过扫描电镜技术以及X-射线衍射技术可以对能与重金属结合的细胞官能团的活动状态和结构特性做进一步研究,从而得出在不同环境条件下的细菌对 $\text{Cu}^{2+}$ 的吸附情况,确认各条件下的细菌吸附能力的大小。要得到比较成熟的产品,该方面的工作以后还需进一步探讨。

## 参考文献

- [1] 尹 华, 叶锦韶, 彭 辉, 等. 酵母菌-活性污泥法吸附处理含铬电镀废水的性能. 环境科学, 2004, 25(3): 61-64.
- [2] 黄富荣, 尹 华, 彭 辉, 等. 红螺菌吸附铜的动力学与脱附研究. 生态科学, 2004, 23(1): 35-37.
- [3] Sze KF, Lu YJ, Wong PK. Removal and recovery of copper ion from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5-x. *Resour Conserv Recycl*, 1996, 18 (1): 175-193.
- [4] 郭学军, 黄巧云. 微生物对土壤环境中重金属活性的影响. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 105-110.
- [5] 胡志钰, 张秀丽, 李仁忠, 等. 细菌吸附 $\text{Pd}^{2+}$ 的研究. 微生物学报, 2000, 40(5): 535-539.
- [6] 徐永健, 乐观宗, 张友平. 龙须菜体表附生细菌的几种分离方法比较. 微生物学通报, 2007, 34(1): 123-126.
- [7] 魏复盛. 水和废水监测分析方法. 北京: 中国环境科学出版社, 1993, pp.237-315.
- [8] 康铸慧, 王 磊, 郑广宏, 等. 恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 5-x 细胞壁膜系统的 $\text{Cu}^{2+}$ 吸附性能. 环境科学, 2006, 27(5): 965-971.
- [9] 陈志英, 王 磊, 周 琪. 菌龄对恶臭假单胞菌吸附铜离子能力的影响. 中国环境科学, 2006, 26: 97-101.
- [10] 邱廷省, 江乐勇, 唐海峰. 矿山含铜重金属废水微生物处理试验研究. 矿冶工程, 2005, 25: 50-53.
- [11] 席 宇, 朱大恒, 刘江涛, 等. 假交替单胞菌及其胞外生物活性物质研究进展. 微生物学通报, 2005, 32(3): 108-112.
- [12] 董新姣. 一株高耐铜菌株的分离及特性的研究. 环境保护科学, 2003, 29(1): 16-19.
- [13] Schiewer S, Volesky B. Environmental microbe-metal interactions. Washington DC: ASM Press, Inc., 2000, pp.329-362.
- [14] Wang L, Zhou Q, Chuan H. Contribution of cell outer membrane and inner membrane to  $\text{Cu}^{2+}$  adsorption by cell membranes of *P. putida* 5-x. *Environ Sci Heal Part-A*, 2004, 39(8): 2071-2080.
- [15] Macaskie LE, Bonthron KM, Yong P, et al. Enzymically mediated bioprecipitation by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for extracellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology*, 2000, 146: 1855-1867.