

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021123104

高羽, 韩玮, 张桂香, 等. *Shewanella* sp. JN01 对水体系不同络合态 Cu 的去除效果及机理[J]. 环境化学, 2023, 42(6): 2087-2095.

GAO Yu, HAN Wei, ZHANG Guixiang, et al. Removal efficiency and mechanism of different kinds of copper complexes from aqueous system by *Shewanella* sp. JN01 [J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (6): 2087-2095.

Shewanella sp. JN01 对水体系不同络合态 Cu 的去除效果及机理*

高羽 韩玮 张桂香 郭晓方** 吉莉 柳丹丹

(太原科技大学环境科学与工程学院, 太原, 030024)

摘要 土壤淋洗废液处理难点在于废水中含有高浓度的稳定重金属络合物. 本研究分离了一株硫酸盐还原菌 (*Shewanella* sp. JN01), 探讨了其对模拟淋洗废液中不同络合态 Cu (Cu-乙二胺四乙酸 (Cu-EDTA)、Cu-谷氨酸 N, N-二乙酸 (Cu-GLDA)、Cu-柠檬酸 (Cu-CA) 和 Cu-混合淋洗剂 (Cu-MC)) 的去除效果及机理. 结果表明, 活菌体和死菌体对不同络合态 Cu 的去除率分别大于 80% 和小于 8%. 显然, 死菌体细胞表面吸附作用对络合态 Cu 去除效率的贡献十分有限. 因此, *Shewanella* sp. JN01 去除络合态 Cu 的主要机制是先破络, 再形成 CuS 沉淀. *Shewanella* sp. JN01 对不同络合态 Cu 的去除率为 Cu-CA > Cu-MC > Cu-GLDA > Cu-EDTA, 这一变化趋势与它们的稳定性常数和毒性的变化趋势相反, 结果进一步证实了破络是微生物去除络合态重金属的限制性步骤. *Shewanella* sp. JN01 能够有效去除土壤淋洗废液中重金属络合物, 在淋洗废液再生利用方面具有潜在应用前景.

关键词 土壤淋洗废液, 络合态 Cu, *Shewanella* sp. JN01, 硫化物, 沉淀.

Removal efficiency and mechanism of different kinds of copper complexes from aqueous system by *Shewanella* sp. JN01

GAO Yu HAN Wei ZHANG Guixiang GUO Xiaofang** JI Li LIU Dandan

(School of Environmental Science and Engineering, Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan, 030024, China)

Abstract The difficulty in the treatment of soil washing effluent lies in its high concentrations of stable heavy metal complexes. This study isolated a strain of sulfate-reducing bacteria (*Shewanella* sp. JN01) to explore the removal efficiency and mechanism of different heavy metal complexes [Cu-ethylenediaminetetraacetic acid (Cu-EDTA), Cu-N, N-bis(carboxymethyl) glutamic acid (Cu-GLDA), Cu-citrate (Cu-CA) and Cu-mixed chelator (Cu-MC)] from the simulated soil washing effluent by *Shewanella* sp. JN01. The results showed that removal efficiencies of different Cu complexes by the alive and dead *Shewanella* sp. JN01 were above 80% and below 8%, respectively. Evidently, the contribution of sorption of Cu complexes by cell surface of the dead strain to its total removal efficiency was limited. Therefore, the dominant removal mechanism of Cu complexes by *Shewanella* sp. JN01 was related to dechelation first and then formation of CuS precipitation. The removal efficiencies of different Cu complexes by *Shewanella* sp. JN01 varied as the trend of Cu-CA

2021年12月31日收稿(Received: December 31, 2021).

* 山西省自然科学基金(20210302123204)和国家自然科学基金(42177057, 41401584)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (20210302123204) and National Natural Science Foundation of China (42177057, 41401584).

** 通信联系人 **Corresponding author**, Tel: 13994214814, E-mail: guoxiaofang@tyust.edu.cn

> Cu-MC > Cu-GLDA > Cu-EDTA, which was opposite to the trend of their stability constants and toxicity. This finding further confirmed that the dechelation was a limiting step to remove heavy metal complexes by microorganisms. Collectively, the results of this study indicate that *Shewanella* sp. JN01 can effectively remove the heavy metal complexes from soil washing effluent, which has potential application prospects for recycling use of soil washing effluent.

Keywords soil washing effluent, copper complexes, *Shewanella* sp. JN01, sulfide, precipitation.

土壤重金属污染是影响人类健康和生态环境质量的世界性问题^[1-2]。固定/稳定化和直接去除是重金属污染土壤修复的两种主要方法^[1,3]。修复技术主要有固定化、玻璃化、电动修复、植物修复和化学淋洗修复^[1-3]。土壤淋洗修复技术可以将重金属转移至液相以达到永久去除土壤中重金属的目的,是一种高效、低成本的方法,尤其适用于重度污染土壤^[2,4-5]。尽管淋洗剂(乙二胺四乙酸(EDTA)、谷氨酸 N, N-二乙酸(GLDA)、乙二胺二琥珀酸(EDDS)和柠檬酸)对土壤中重金属去除效率高,但产生大量的淋洗废液中重金属主要以稳定的络合物形式存在,在较宽的 pH 范围内均有较高的稳定性,易造成二次污染问题^[6]。去除络合态重金属常用的方法有化学沉淀法、化学氧化法和离子交换法,但普遍存在产泥量大、处理条件复杂、费用较高等问题^[6-8]。与传统的化学处理方法相比,生物处理具有微生物来源广泛、适应性强、成本低、效率高、对环境友好等优点而有广阔应用前景^[9]。

近年来,学者们对硫酸盐还原菌(SRB)处理重金属污染废水进行了广泛的研究^[9-11]。研究表明,SRB 可以去除传统废水中 90% 以上的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Cr^{6+} ^[9-11]。一般来说,SRB 去除废水中重金属离子主要通过硫化物沉淀和死菌体吸附^[11-12]。硫化物沉淀的形成过程分为两个阶段:(1) SRB 利用硫酸盐作为电子受体氧化简单有机化合物生成碳酸氢根离子和硫化氢;(2)生物生成的硫化氢与游离重金属阳离子反应生成金属硫化物沉淀^[9]。此外,死菌体通过细胞壁上的官能团直接吸附重金属,有利于废水中重金属的去除^[12]。

虽然 SRB 对传统废水中的重金属离子具有很高的去除效率,但淋洗废液中的重金属主要以络合态形式存在^[7],有研究报道 SRB 可以通过还原反应机理有效地去除 Fe(III)和 Cr(VI)的络合形态^[13-14],与高价态重金属相比,对于二价态重金属络合物去除的报道较少。Hakansson 等^[15]利用 SRB 产生的 H_2S 处理络合态 Pb 和 Cu 的沉淀率达 98%。然而,据我们所知,二价重金属络合物的去除机理还不清楚。不同络合剂如何影响 SRB 对络合态重金属的去除率,除形成金属硫化物沉淀外,细菌对络合态重金属的吸附效率几乎没有报道。

为了深入了解 SRB 对二价态重金属络合物的去除机理,利用不同络合剂形成 Cu(II)络合物,研究了分离 SRB (*Shewanella* sp. JN01)对不同络合态 Cu 的去除效果及不同途径对菌株去除 Cu(II)络合物的贡献及其机理,以期达到淋洗废液资源化再生和无害化处理提供科学依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 SRB 菌株的分离与鉴定

采集自山西省山阴县大营村(39°22'20.12" N, 112°52'54.69" E)地下井挖掘过程中 21 m 深的土柱。将土柱置于手套箱(Whitley DG250, 英国 Don Whitley Scientific)中 30 °C 下厌氧培养 1 周。将土柱中央的土样置于无菌水中,用稀释涂布法富集培养菌株 1 周。然后用富集培养基进一步的扩大培养。每周更换新鲜培养基,连续培养 4 周后获得实验菌株。将培养基(表 1)调至 pH=7.2, 121 °C 高压灭菌 30 min。在富集培养基中加入 2% 的琼脂(W/V)制备固体培养基。将纯化后的菌株 JN01 按平板划线法接种在固体培养基上。使用 DNA 提取试剂盒(Sangon Biotech, 生工生物工程(上海)股份有限公司)提取总 DNA。采用热循环仪(Bio-Rad, C1000 Touch, 美国 Bio-Rad 公司)进行聚合酶链反应(PCR)。用细菌通用引物从总 DNA 中扩增 16S rRNA 基因。采用上游引物(27F 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3')和下游引物(1492R 5'AGAGTTTGTATCTGGCTCAG3')扩增菌株 16S rRNA 基因。PCR 反应体系: 2×Taq PCR

Master 12.5 μL , DNA 模板 1 μL , 上游引物 2 μL , 下游引物 2 μL , dd H₂O 7.5 μL . 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min; 54 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min; 72 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min; 30 次循环. 将 16S rRNA 基因序列在 ClustalX 2.0^[16] 和 GenBank 核酸数据库中比对. 用 Mega 6.0 进行邻接法(NJ)、最大似然法(ML)和最大简约法(MP)分析.

表 1 SRB 富集培养基的组成

Table 1 Composition of SRB enrichment medium

药品名称 Pharmaceutical ingredients	质量浓度/(g·L ⁻¹) Mass concentration
K ₂ HPO ₄	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5
NaHCO ₃	0.5
CaCl ₂	0.2
MgSO ₄	1
乳酸钠 sodium lactate	20 mL·L ⁻¹
L-抗坏血酸 L-Ascorbic acid	0.1
L-半胱氨酸盐酸盐 L-Cysteine hydrochloride monohydrate	0.5
酵母膏 yeast extract	1.5
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.5

1.2 实验设计

所用试剂参照之前的研究^[17]. 以 5% *V/V* 将 SRB 菌液分别接种至初始 pH 值为 7.0 的培养基中, 加入高浓度 Cu²⁺、EDTA、GLDA、CA 和 MC 储备溶液. Cu²⁺浓度为 50 mg·L⁻¹. *n* (Cu²⁺): *n* (EDTA) 分别为 1:0、1:1、1:5、1:10 和 1:25. 当物质的量比超过 1:25, 混合溶液将会出现体积变化较大或 EDTA 溶解度较低. *n* (Cu²⁺): *n* (GLDA、CA 或 MC) 分别为 1:0、1:1、1:5、1:10、1:25、1:50、1:75 和 1:100. 处理 1、3、5、7 d 后, 测定溶液中 Cu²⁺浓度. 所有处理设置 3 组平行, 并做空白对照.

死菌体吸附实验将厌氧培养 24 h 后的 SRB 悬浮液在 121 $^{\circ}\text{C}$ 下灭菌 30 min, 然后混匀分装至装有不同络合态 Cu 溶液 ($C(\text{Cu}^{2+})=50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{络合剂})=1:10$) 的锥形瓶中, pH 调至 5.5. 于 0、0.17、0.5、1、2、4、8、20 h 后取样, 测定溶液中 Cu²⁺浓度. 所有处理设置 3 组平行, 并做空白对照.

1.3 测定和表征方法

采用火焰原子吸收光谱仪 (AAS, Z-2300, 日本 Hitachi) 测定样品中 Cu 浓度; 扫描电子显微镜 (SEM-EDS, S-3400 N, 日本 Hitachi) 和 X 射线衍射仪 (XRD, Empyrean, 荷兰 PANalytical) 对 *Shewanella* sp. JN01 处理不同络合态 Cu 的沉淀物进行表征.

1.4 数据处理及分析

采用 Excel、SPSS 22.0 和 Origin 2018 进行数据整理、统计分析及作图. 采用 Duncan 检验确定各处理之间的统计学差异 ($\alpha=0.05$).

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 *Shewanella* sp. JN01 的鉴定与形态

SRB 与希瓦氏菌 16S rDNA 基因序列同源性达 99%, 构建系统发育树如图 1 所示, 因此, 分离菌株命名为 *Shewanella* sp. JN01. *Shewanella* sp. JN01 菌落形态在固体培养基上边缘规则, 光滑圆润, 中间呈凸起的黑色菌落 (图 2). *Shewanella* sp. JN01 的 SEM 图表明, 菌体为杆状、质地略光滑, 聚集较多, 宽×长约为 0.5 $\mu\text{m}\times(2-5) \mu\text{m}$ (图 2).

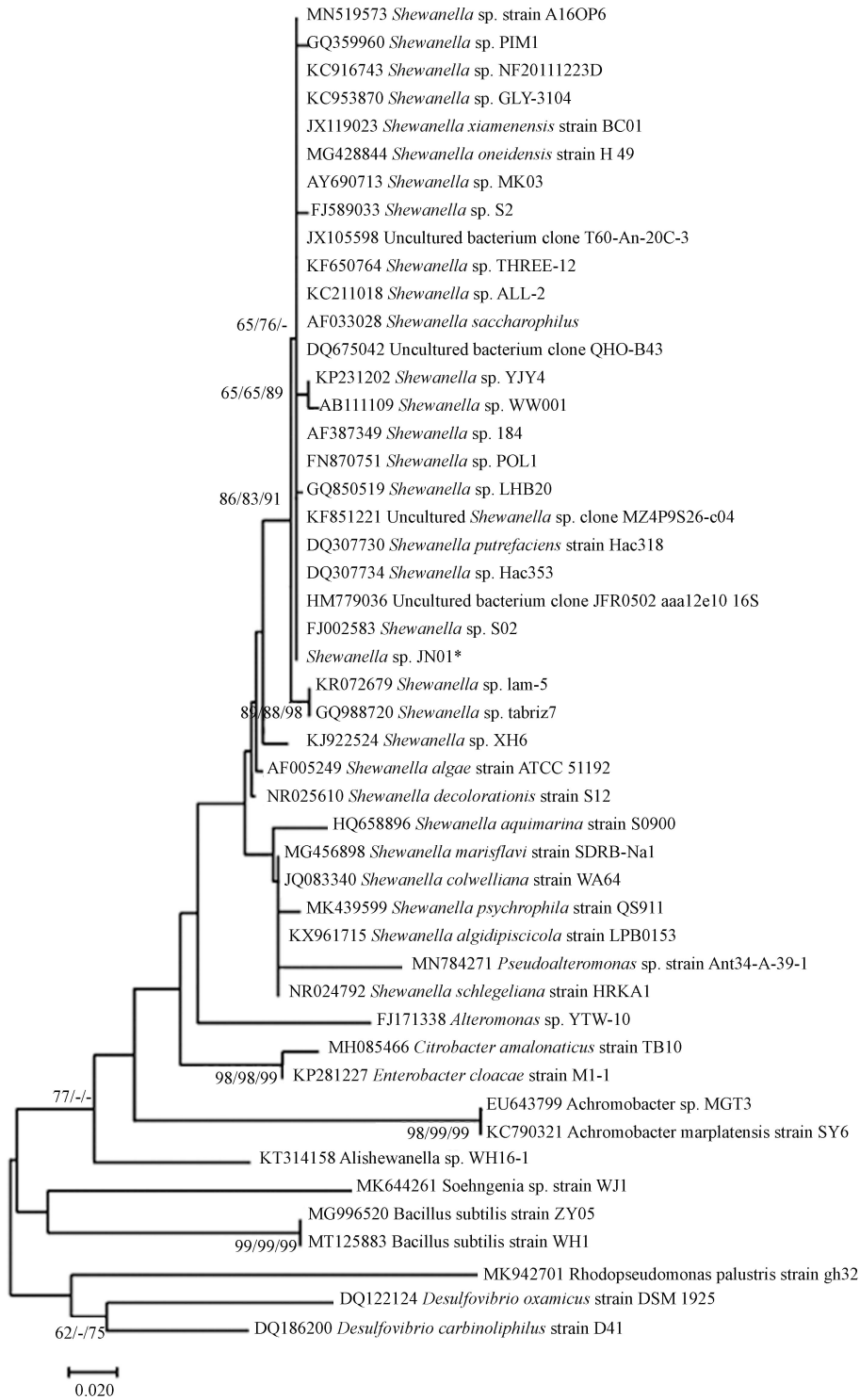


图 1 菌株 *Shewanella* sp. JN01 的系统发育树

Fig.1 The phylogenetic position of *Shewanella* sp. JN01

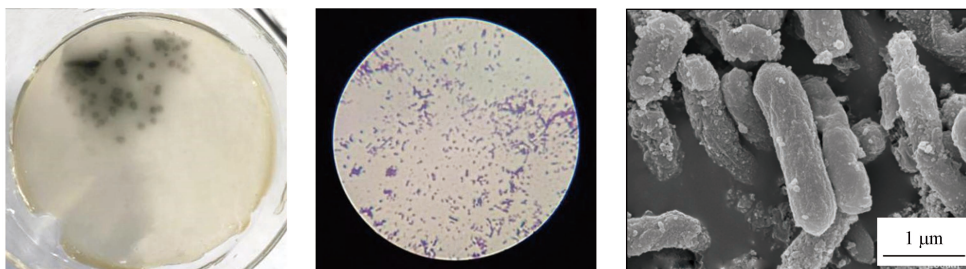


图 2 *Shewanella* sp. JN01 形态特征

Fig.2 Morphology of *Shewanella* sp. JN01.

2.2 *Shewanella* sp. JN01 对不同络合态 Cu 的去除效率

Shewanella sp. JN01 对水溶液中不同络合态 Cu (Cu-EDTA、Cu-GLDA、Cu-CA 和 Cu-MC) 的去除率与反应时间、络合剂类型和 Cu 与络合剂的物质的量比有关(图 3)。不同物质的量比下, *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 的去除率均低于 Cu^{2+} (1:0) 的去除率(图 3)。与 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 相比, 游离 Cu^{2+} 更易与 H_2S 反应形成金属硫化物沉淀, 并被细菌细胞活性成分吸附^[18]。在物质的量比较低的情况下 ($n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{EDTA/GLDA})=1:1-1:10$), *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 的最佳去除率一般在 90% 以上。但是, 随着 EDTA 与 GLDA 物质的量比增加(除 $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{GLDA})=1:25$ 外), *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 的去除率显著降低至 10% 以下。溶液中大量游离的 EDTA 和 GLDA 对 *Shewanella* sp. JN01 的毒性大于其络合形态, 因为络合剂可通过抑制酶活性和改变细胞膜渗透压导致细胞死亡^[19]。此外, 在 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 溶液中, EDTA 和 GLDA 能抑制硫化物沉淀的形成, 降低 Cu^{2+} 的去除率^[19-20]。当 $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{EDTA/GLDA})=1:25$ 时, *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-GLDA 的去除率为 64.07%, 而对 Cu-EDTA 的去除率小于 10%, 这可能是由于 GLDA 对微生物的毒性小于 EDTA^[5,21]。同时, Cu-GLDA 的稳定性 ($\lg K_{\text{Cu-GLDA}}=13.03$) 低于 Cu-EDTA ($\lg K_{\text{Cu-EDTA}}=18.80$), 表明 *Shewanella* sp. JN01 更易破络 Cu-GLDA 生成 CuS 沉淀^[6,21]。

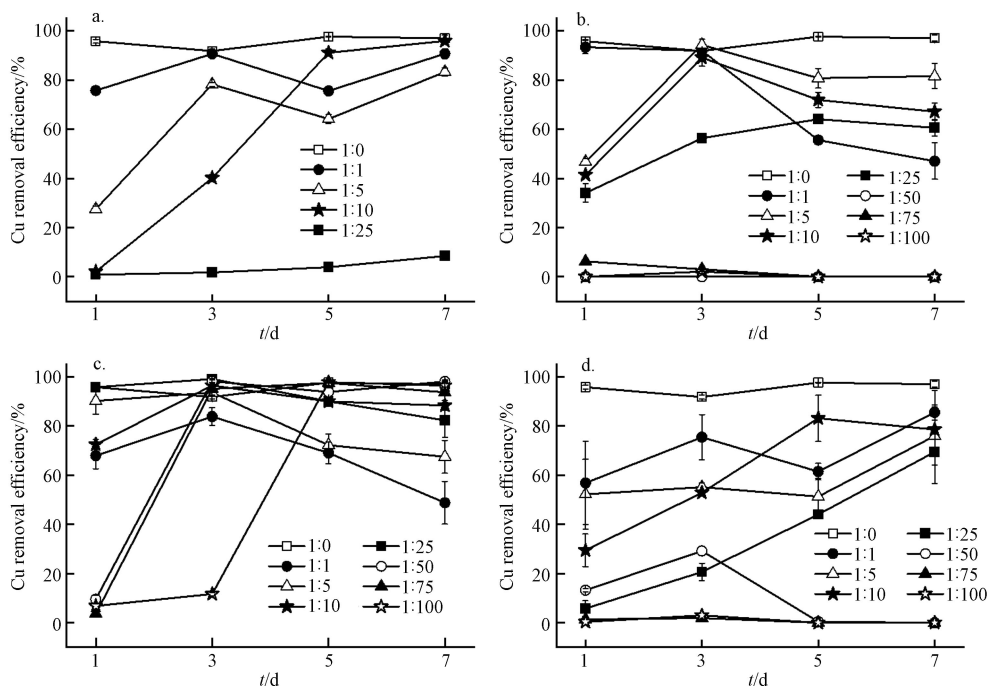


图 3 *Shewanella* sp. JN01 对不同物质的量比的络合态 Cu 的去除率

(a. Cu-EDTA, b. Cu-GLDA, c. Cu-CA, d. Cu-MC)

Fig.3 Remove efficiency of Cu in different molar ratios

Cu-CA 的去除率随 CA 物质的量比的增加而变化, 与 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 的去除率差异显著。当 $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{CA})$ 为 1:1—1:25 时, Cu-CA 的最佳去除率由 83.83% 提高到 99.11%。随着 CA 物质的量比的进一步增加, Cu-CA 的去除率由不足 10% 显著提高到 97% 以上, 并保持相对稳定。在 CA 的高物质的量比条件下, *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-CA 的高去除效率的延迟可能是由于 CA 浓度过高, *Shewanella* sp. JN01 需要时间来适应其环境^[18]。与 EDTA 和 GLDA 不同, 过量的 CA 并不会对 Cu-CA 的去除产生负面影响。这很可能是由于 *Shewanella* sp. JN01 以 CA 为碳源, 促进 *Shewanella* sp. JN01 的生长, 从而去除 Cu-CA^[13]。

Shewanella sp. JN01 对 Cu-MC 的最佳去除率明显低于其他络合态 Cu。当 $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{MC})=1:1-1:25$ 时, *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-MC 的最佳去除率由 85.50% 降至 69.40%。当 $n(\text{Cu}^{2+}):n(\text{MC})=1:50$ 时, 络合态 Cu 的去除率先显著升高后降低, 5 d 后 Cu-MC 的去除率为 0。这可能与 *Shewanella* sp. JN01 死后释放 Cu 有关。尽管 CA 对 *Shewanella* sp. JN01 的生长没有明显抑制作用, 但

MC 中的 EDTA 和 GLDA 会破坏其细胞结构的完整性^[19]. Cu-CA 在物质的量比为 1:25 和 1:50 时的去除率高于 Cu-EDTA 和 Cu-GLDA, 这说明 MC 对 *Shewanella* sp. JN01 的毒性作用低于 EDTA 和 GLDA.

Cu 与络合剂物质的量比较低时, Cu-GLDA 和 Cu-CA 在 3 d 后的去除率下降, 主要是受 Cu 和络合剂的胁迫所致. *Shewanella* sp. JN01 细胞表面活性成分受损, 导致累积的 Cu 再次释放^[22]. 此外, 细胞表面附着的硫化物沉淀, 由于传质阻力增加, 对菌株的代谢产生不利影响^[23].

在一定的 Cu 与络合剂的物质的量比下, 第 7 天的去除率基本稳定, *Shewanella* sp. JN01 对不同络合态 Cu 的去除率为 Cu-CA > Cu-MC > Cu-GLDA > Cu-EDTA. 这主要与他们的稳定常数有关, 其稳定性为 $\lg K_{\text{Cu-EDTA}}(18.80) > \lg K_{\text{Cu-GLDA}}(13.03) > \lg K_{\text{Cu-CA}}(5.95)$ ^[6,21,24]. 络合态 Cu 稳定越高, *Shewanella* sp. JN01 破络难度越大, 去除效果越差^[15,18]. 结果表明, Cu-CA 的去除率最高, 尤其是在络合剂的物质的量比较高时. 与 GLDA 和 EDTA 相比, CA 对菌株生长代谢和硫酸盐还原途径的抑制作用较小^[13-14]. 此外, CA 是小分子、可降解的络合剂, 为微生物生长提供碳源^[13,18]. 这进一步说明, MC 对 *Shewanella* sp. JN01 的毒性较 EDTA 和 GLDA 温和, 是因为 MC 中减少了 EDTA 和 GLDA 的用量, CA 所占比例较大.

2.3 死菌体对不同络合态 Cu 的吸附去除效果

死菌体对络合态 Cu 的最佳去除率低于游离 Cu^{2+} (图 4). 死菌体对 Cu^{2+} 的吸附率缓慢增加, 20 h 后达到 8.92%. 死菌体对 Cu^{2+} 的去除主要是由于 Cu^{2+} 直接吸附在细胞壁上^[18]. 高压灭菌后, 许多带负电荷的官能团(如羟基、氨基或羧基)暴露在菌体表面, 增加了对带正电荷离子如 Cu^{2+} 的结合位点^[22].

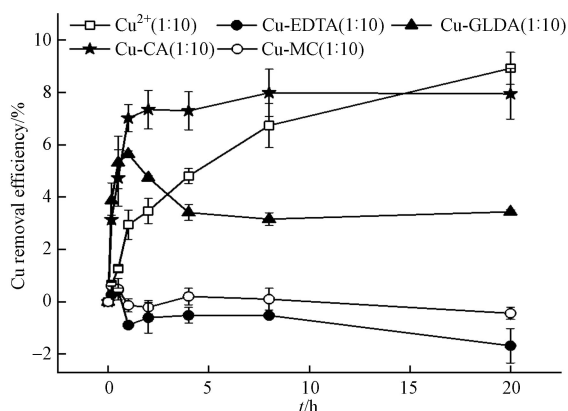


图 4 相同物质的量比下(1:10)死菌体对不同络合态 Cu 的吸附去除效率

Fig.4 Sorption removal efficiency of different Cu complexes by dead bacteria at the same molar ratio (1:10).

死 *Shewanella* sp. JN01 对络合态 Cu 的吸附去除率趋势与 Cu^{2+} 明显不同(图 4). 对于络合态 Cu, 死 *Shewanella* sp. JN01 对 Cu-CA 的吸附率在 1 h 内迅速增加, 之后基本保持不变. 死菌体对 Cu-CA 的吸附去除率高达 7.99%, 与 Cu^{2+} 的吸附率相当($P > 0.05$). 这是因为 CA 是易降解的有机物, 对细菌表面损害较小^[13,18]. Cu-CA 主要以 CuL^- (H_3L 代表柠檬酸) 的形式存在, 通过静电吸引与氨基结合^[24-25]. 死菌体对 Cu-GLDA 的吸附率在 1 h 内达到最佳值(5.65%), 随后逐渐下降后平稳; 对 Cu-EDTA 的吸附率仅为 0.44%; 对 Cu-MC 的吸附率介于两者之间. Cu-EDTA 的吸附去除率较差, 这是由于 Cu-EDTA 在 $\text{pH}=5.5$ 时主要以 CuEDTA^{2-} 形式存在^[6], CuEDTA^{2-} 络合物为六配位八面体结构, Cu^{2+} 被包裹于络合物内部, 无法与吸附位点接触^[26-27]. Cu-GLDA 的吸附去除率高于 Cu-EDTA, 这是因为 Cu-GLDA 对死菌细胞的结合亲和力强^[28].

Cu-EDTA 和 Cu-GLDA 的吸附去除率达到最佳后下降, 很可能是 EDTA 和 GLDA 的毒性作用使细胞壁破坏, 导致吸附的络合态铜又释放回水溶液中^[19,22]. 相比而言, 络合态 Cu 经过破络后形成硫化物沉淀的途径去除率高(> 80%, 图 3), 死菌体对络合态 Cu 的吸附去除率只占 *Shewanella* sp. JN01 对络合态 Cu 总去除率的一小部分(< 8%, 图 4).

2.4 *Shewanella* sp. JN01 对络合态 Cu 的主要去除机理

考虑到 *Shewanella* sp. JN01 去除络合态 Cu 的主要途径是先破络进而形成硫化物沉淀, 实验收集并表征了 *Shewanella* sp. JN01 处理含 Cu 络合物水溶液后的沉淀. XRD 衍射仪分析了所得沉淀物的晶

体结构(图 5). 沉淀物的无定型(2θ 值为 20°)很可能是由于菌体细胞中多糖、蛋白质和脂质的存在^[12]. 在 2θ 值为 28.68° 、 47.71° 和 56.62° 处有较强的衍射峰, 对照 CuS 标准图谱 (PDF No.89-2073) 中的 (111)、(220) 和 (311) 晶面. *Shewanella* sp. JN01 只在 47.71° 处有微弱的峰. 然而, Cu^{2+} 处理后的沉淀物在 28.68° 和 47.71° 处的峰强度低于络合态铜, 这可能是细菌在 Cu^{2+} 处理过程中产生的硫化铜颗粒较小^[15]. 此外, 在金属离子的胁迫下, 菌株分泌的代谢物能吸附铜离子并与铜离子络合, 阻碍了结晶度高的硫化铜的形成^[29]. 尽管培养基中存在磷酸盐, 但对 Cu 的沉淀影响较小. 一方面, 每个处理组接菌量均为 5%, 因此, 每个实验组的磷酸盐含量相同; 另一方面, 磷酸根的浓度远远低于硫酸根(表 1). 在 XRD 衍射图中也未检出 Cu 的磷酸盐沉淀物. 因此, 培养基中磷酸盐对不同处理组 Cu 沉淀差异的影响很小.

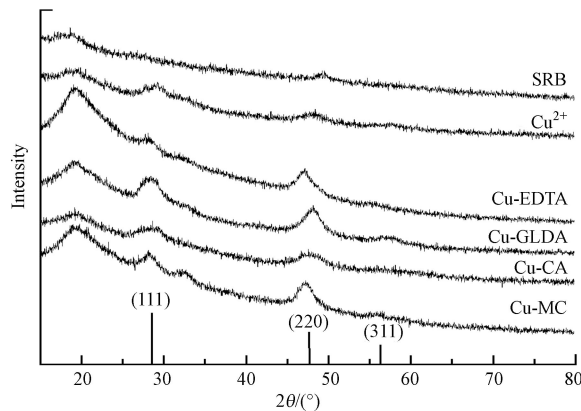


图 5 不同处理中沉淀物的 XRD 图谱(Cu 与络合剂物质的量比为 1:10)

Fig.5 XRD patterns of precipitates from different treatments (molar ratio of Cu and complexing agent =1:10).

SEM 图像进一步证实了 *Shewanella* sp. JN01 处理不同络合态 Cu 溶液后存在沉淀颗粒^[12]. EDS 结果表明, 沉淀物中存在 Cu 和 S, 不同处理的 Cu 和 S 的含量变化较大(图 6).

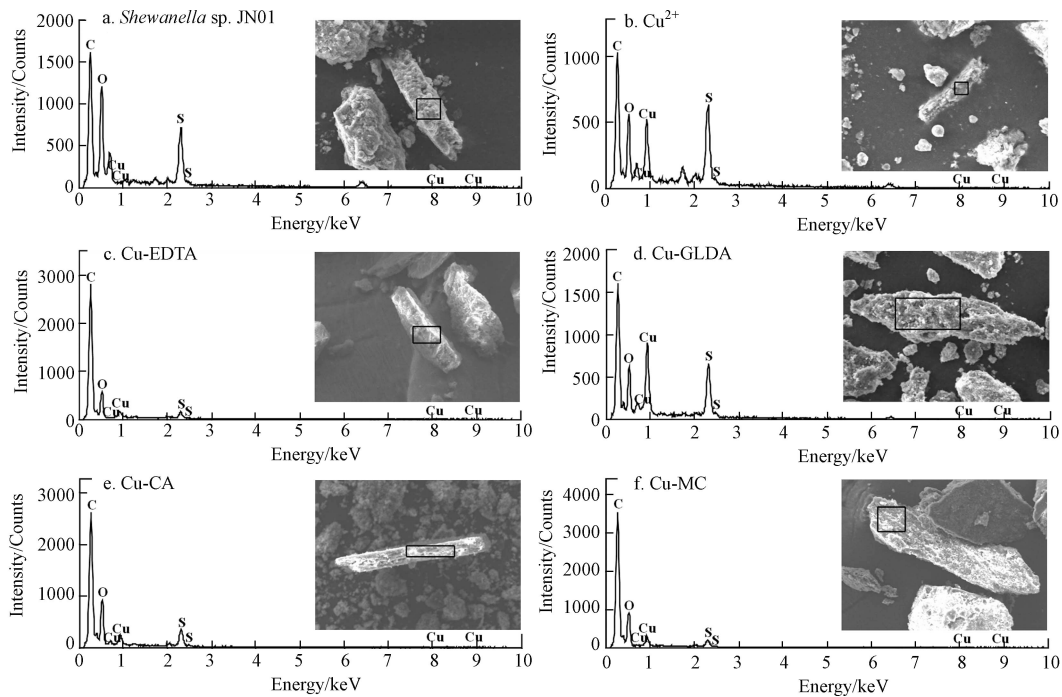


图 6 不同处理中沉淀物的 SEM-EDS 图谱(Cu 与络合剂物质的量比为 1:10)

Fig.6 SEM-EDS image of precipitates from different treatments (molar ratio of Cu and complexing agent =1:10).

Shewanella sp. JN01 沉淀物中 O 和 S 的原子比分别为 29.85% 和 6.85%, 其中未检测到 Cu 的含量. 加 Cu^{2+} 处理后的沉淀物中 O 的原子比降低到 19.45%, S 和 Cu 的含量增加到 9.07% 和 4.34%. 其中 O 的

原子比下降很可能是由于 Cu^{2+} 抑制了 *Shewanella* sp. JN01 的生长, 因为沉淀物中 O 主要来自菌株的生长. S 和 Cu 原子比的增加是由于加入 CuSO_4 后, *Shewanella* sp. JN01 在氧化还原反应中生成了 CuS. 不同络合态 Cu 处理后的沉淀物中 O、S 和 Cu 的原子比分别为 16.13%—23.28%、1.57%—6.64% 和 1.07%—5.38% (表 2). O 的含量与细菌活性密切相关, 这在一定程度上可以解释菌株对 Cu 的去除效率随细菌活性的降低而降低^[18]. 与其他 Cu 络合物相比, Cu-CA 处理后的沉淀物中 O 原子比最高, 说明柠檬酸可以作为碳源, 提高细菌的代谢活性, 从而产生更多的 H_2S , 对 Cu 络合物去除率更高. 由于 Cu 和 S 的化学计量比为 1:1, 但 S 的原子比略高于 Cu, 这一结果很可能是由于 *Shewanella* sp. JN01 通过硫酸盐还原产生大量的硫化氢, 使溶液中的 Cu 几乎都生成硫化铜沉淀被去除^[30](图 3). 不同络合态 Cu 处理后沉淀物中 Cu 和 S 的强峰表明, 沉淀物中 CuS 是主要产物, 这与 XRD 结果一致. 此外, 无论溶液的 pH 值如何, CuS ($K_{\text{sp}}=6.3\times 10^{-36}$) 的溶解度低且稳定性高^[31]. 实验结果表明, 模拟淋洗废液中 Cu 络合物的去除机理主要是经 *Shewanella* sp. JN01 破络后生成硫化物沉淀.

表 2 不同处理中沉淀物中的原子比 (Cu 与络合剂物质的量比为 1:10)

Table 2 The atomic ratios of precipitates from different treatments (molar ratio of Cu and complexing agent =1:10).

元素 Element	原子比/% Atom					
	<i>Shewanella</i> sp. JN01	Cu^{2+}	Cu-EDTA	Cu-GLDA	Cu-CA	Cu-MC
C	63.30	67.13	78.21	71.85	72.00	75.19
O	29.85	19.45	19.03	16.13	23.28	21.69
S	6.85	9.07	1.70	6.64	3.36	1.57
Cu	ND	4.34	1.07	5.38	1.36	1.56

ND., 未检出. ND., not detected.

3 结论 (Conclusion)

SRB (*Shewanella* sp. JN01) 对水溶液中的 Cu 络合物具有较高的去除效率, 主要通过先破络后形成硫化物沉淀. *Shewanella* sp. JN01 对不同 Cu 络合物的最佳去除率为 Cu-CA (99.11%) > Cu^{2+} (97.69%) > Cu-EDTA (95.90%) > Cu-GLDA (94.22%) > Cu-MC (85.5%). 络合剂对 *Shewanella* sp. JN01 的抑制作用为 EDTA > MC > GLDA > CA. 本研究的结果为从水溶液中去除 Cu 络合物提供了一种有效、节约成本和环境友好的方法. 然而, 由于实际淋洗废液中所含物质比模拟淋洗废液更为复杂, 因此有必要进一步探索 SRB (*Shewanella* sp. JN01) 对实际淋洗废液中多种重金属络合物的最佳去除效率.

参考文献 (References)

- [1] LIU L W, LI W, SONG W P, et al. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 633: 206-219.
- [2] WANG Z Z, WANG H B, WANG H J, et al. Effect of soil washing on heavy metal removal and soil quality: A two-sided coin [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 203: 110981.
- [3] GONG Y Y, ZHAO D Y, WANG Q L. An overview of field-scale studies on remediation of soil contaminated with heavy metals and metalloids: Technical progress over the last decade [J]. *Water Research*, 2018, 147: 440-460.
- [4] 郭军康, 李艳萍, 李永涛, 等. 采用草酸和 EDTA 去除农田土壤中砷和镉污染 [J]. *环境工程*, 2019, 37(5): 70-75.
GUO J K, LI Y P, LI Y T, et al. Treatment of arsenic and cadmium in contaminated farmland soil with oxalic acid and EDTA [J]. *Environmental Engineering*, 2019, 37(5): 70-75 (in Chinese).
- [5] WANG G Y, PAN X M, ZHANG S R, et al. Remediation of heavy metal contaminated soil by biodegradable chelator-induced washing: Efficiencies and mechanisms [J]. *Environmental Research*, 2020, 186: 109554.
- [6] GUAN W, ZHANG B F, TIAN S C, et al. The synergism between electro-Fenton and electrocoagulation process to remove Cu-EDTA [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2018, 227: 252-257.
- [7] 郑雄开, 陶雪琴, 杜建军, 等. 模拟土壤淋洗废液中重金属的选择性去除与淋洗液的回收研究 [J]. *环境科学学报*, 2020, 40(3): 995-1003.
ZHENG X K, TAO X Q, DU J J, et al. Selective removal of heavy metals from simulated wastewater from leaching soil and recovery of

- eluent [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(3): 995-1003 (in Chinese).
- [8] 薛璐璐, 袁翔, 朱梦玲, 等. 高级氧化法破络处理柠檬酸铜镍电镀废水 [J]. *净水技术*, 2019, 38(3): 9-14,50.
XUE L L, YUAN X, ZHU M L, et al. Complex breakdown treatment for copper-nickel citrate electroplating wastewater by advanced oxidation process(AOP) [J]. *Water Purification Technology*, 2019, 38(3): 9-14,50 (in Chinese).
- [9] LI X, LAN S M, ZHU Z P, et al. The bioenergetics mechanisms and applications of sulfate-reducing bacteria in remediation of pollutants in drainage: A review [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 158: 162-170.
- [10] KIEU H T Q, MÜLLER E, HORN H. Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria [J]. *Water Research*, 2011, 45(13): 3863-3870.
- [11] 董净, 代群威, 赵玉连, 等. 硫酸盐还原菌的分纯及对Cd²⁺钝化研究 [J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(5): 34-40.
DONG J, DAI Q W, ZHAO Y L, et al. Isolation of sulfate-reducing bacteria and study on its passivation of Cd²⁺ [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(5): 34-40 (in Chinese).
- [12] MOHAPATRA R K, PARHI P K, PANDEY S, et al. Active and passive biosorption of Pb(II) using live and dead biomass of marine bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202: Kinetics and isotherm studies [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 247: 121-134.
- [13] GU W Z, ZHENG D C, LI D P, et al. Integrative effect of citrate on Cr(VI) and total Cr removal using a sulfate-reducing bacteria consortium [J]. *Chemosphere*, 2021, 279: 130437.
- [14] CASTRO L, BLÁZQUEZ M L, GONZÁLEZ F, et al. Anaerobic bioleaching of jarosites by *Shewanella putrefaciens*, influence of chelators and biofilm formation [J]. *Hydrometallurgy*, 2017, 168: 56-63.
- [15] HÅKANSSON T, SJÖBERG S, MATTIASSON B. Treatment of metal ions and metal-chelate complexes in water with biologically produced H₂S [J]. *International Journal of Environment and Waste Management*, 2012, 9(3/4): 330.
- [16] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [17] GUO X F, ZHAO G H, ZHANG G X, et al. Effect of mixed chelators of EDTA, GLDA, and citric acid on bioavailability of residual heavy metals in soils and soil properties [J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 776-782.
- [18] PENG H L, LI D, YE J, et al. Biosorption behavior of the *Ochrobactrum* MT180101 on ionic copper and chelate copper [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 235: 224-230.
- [19] CHEN M X, ZHANG Y, ZHOU J T, et al. Sulfate removal by *Desulfovibrio* sp. CMX in chelate scrubbing solutions for NO removal [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 143: 455-460.
- [20] WANG Q W, CHEN J J, ZHENG A H, et al. Dechelation of Cd-EDTA complex and recovery of EDTA from simulated soil-washing solution with sodium sulfide [J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 1200-1207.
- [21] WANG G Y, ZHANG S R, XU X X, et al. Heavy metal removal by GLDA washing: Optimization, redistribution, recycling, and changes in soil fertility [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 569/570: 557-568.
- [22] HUANG F, DANG Z, GUO C L, et al. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 107: 11-18.
- [23] SHAHSAVARI S, SETH R, CHAGANTI S R, et al. Inhibition of anaerobic biological sulfate reduction process by copper precipitates [J]. *Chemosphere*, 2019, 236: 124246.
- [24] GUZMAN J, SAUCEDO I, REVILLA J, et al. Copper sorption by chitosan in the presence of citrate ions: Influence of metal speciation on sorption mechanism and uptake capacities [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 33(1/2/3): 57-65.
- [25] LU P J, HU W W, CHEN T S, et al. Adsorption of copper-citrate complexes on chitosan: Equilibrium modeling [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1127-1134.
- [26] 袁媛, 刘自成, 李杰, 等. 新型生物质基复合水凝胶球珠高效吸附去除Ni-EDTA络合物的特性与机制 [J]. *离子交换与吸附*, 2021, 37(1): 1-13.
YUAN Y, LIU Z C, LI J, et al. The removal of Ni-EDTA complex by a novel biomass based MCS/SA@PEI composite hydrogel beads [J]. *Ion Exchange and Adsorption*, 2021, 37(1): 1-13 (in Chinese).
- [27] ZHANG X L, HUANG P, ZHU S Y, et al. Nanoconfined hydrated zirconium oxide for selective removal of Cu(II)-carboxyl complexes from high-salinity water via ternary complex formation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(9): 5319-5327.
- [28] PARSADOUST F, SHIRVANI M, SHARIATMADARI H, et al. Effects of GLDA, MGDA, and EDTA chelating ligands on Pb sorption by montmorillonite [J]. *Geoderma*, 2020, 366: 114229.
- [29] TYAGI S, MALIK W, ANNACHHATRE A P. Heavy metal precipitation from sulfide produced from anaerobic sulfidogenic reactor [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 32: 936-942.
- [30] BAI H, KANG Y, QUAN H E, et al. Treatment of copper wastewater by sulfate reducing bacteria in the presence of zero valent iron [J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2012, 112/113: 71-76.
- [31] ZHANG M L, WANG H X, HAN X M. Preparation of metal-resistant immobilized sulfate reducing bacteria beads for acid mine drainage treatment [J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 215-223.