

大肠杆菌在饱和砂土中的运移及其模拟*

李桂花 李保国

(中国农业大学土壤和水科学系, 北京 100094)

TRANSPORT OF *ESCHERICHIA COLI* THROUGH SATURATED SANDY SOIL: EXPERIMENTS AND MODELLING

Li Gui-hua Li Bao-guo

(Department of Soil and Water Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

关键词 大肠杆菌, 吸附, 运移, 模拟

中图分类号 S154

细菌在土壤中的运移与农业、工业、环保、水资源保护等领域密切相关。从地下水的细菌污染、垃圾处理、污水灌溉到细菌对有机污染物的携带运移、根层病害的生物防治、原位生物修复和污染物的生物降解、提高采油量和冶炼率等, 都与细菌的运移和吸附密切相关。因此, 人们对细菌在土壤中的运移进行了大量试验研究^[1,2], 如发现土壤颗粒的特性、土壤溶液的组成、离子强度、pH 等都影响细菌在土壤中的迁移; 建立了数学模型来定量描述菌在土壤中的运移^[3-5], 其中绝大多数是以对流- 弥散为基础考虑吸附和解吸过程的机理模型。但 Bai 等^[5,6]认为细菌在土壤中运移时还存在不可逆的滤除过程, 并用一级动力学反应来表示该过程。

本研究通过控制温度来忽略细菌的生长、死亡、底物消耗, 在室内条件下研究菌在饱和砂土中的运移和吸附过程, 通过对其穿透曲线 (BTC) 进行模拟分析, 确定其运移、吸附、滞留参数, 为进一步研究细菌在土壤中运移提供依据和方法上的指导。

1 材料和方法

供试菌种: 选用抗青霉素的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 。由中国农业大学植物病理教研室从污水中分离, 并进行鉴定和抗性筛选。从多次在抗生素平板- 非抗生素平板间转接情况来看, 抗性很稳定。

供试土壤: 过 2 mm 筛的砂土, 粒径分布见表 1, 有机质含量 0.3g kg⁻¹。按国际制划分土壤质地为砂土。

表 1 供试砂土的粒径分析结果

土壤类型	各粒径含量 (g kg ⁻¹)				
	2~ 1 mm	1~ 0.25 mm	0.25~ 0.20 mm	0.20~ 0.05 mm	< 0.05 mm
砂土	9.5	256.1	452.7	266.7	15.1

菌悬液的制作: 将传代 1 至 2 次且处于指数生长期 (接种 18~ 24 h) 的菌从牛肉膏培养基上刮下来, 放入无菌去离子水中, 用漩涡混合器打散混匀, 做成菌悬液。

* 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999011700) 资助

收稿日期: 2001- 11- 27; 收到修改稿日期: 2002- 05- 20

砂土的处理: 将过 2 mm 筛的砂土浸在稀盐酸溶液中, 24 h 后, 用自来水冲洗至 pH 中性, 再用去离子水冲洗两遍, 烘干。然后装在布袋子中湿热灭菌 3 h。取出后烘干(80℃, 12 h 左右)。

吸附实验: 为独立获得细菌吸附的有关参数, 也可为穿透曲线确定 R 值提供一个参考的初值, 采用批量平衡法^[3, 7]测定了菌在砂土表面的吸附。本实验以 30 min 为间隔测定吸附量。悬液的浓度范围是 $10^3 \sim 10^8$ 个 ml^{-1} (每次实验必须至少是五个浓度梯度, 且是平行实验数据)。注意不要用塑料容器, 因为如果存在水-气界面, 塑料容器对细菌吸附影响很大。温度控制在 $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

土柱的混合置换实验: 采用长 20 或 30 cm, 内径 5 cm 的有机玻璃管。分段装砂, 层间打毛, 装填后容重为 $1.72 \pm 0.08 \text{ g cm}^{-3}$ 。用蠕动泵由下至上缓慢注入无菌去离子水饱和土柱, 用部分收集器(fractional collector)收集流出液, 直至达到稳态流, 测定水流量, 计算平均孔隙流速。然后分别以脉冲输入和阶跃输入方式切换加入已知浓度的菌液, 同时计时并收集流出液, 测定其浓度(平板稀释法, 为减少因量大测定时间过长而引起菌的死亡而导致误差, 因此选用二次重复), 并用相对浓度表示, 即流出液的浓度与注入菌液浓度之比。菌的脉冲注入时间为 50~60 min, 收集间隔随流速而不同。土柱穿透实验的处理见表 2(菌的注入浓度 C_0 的范围在 $74.5 \times 10^7 \sim 88 \times 10^7$ 个 ml^{-1})。所有实验温度都控制在 $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

表 2 大肠杆菌土柱穿透实验的参数

土柱编号	柱长 (cm)	平均孔隙流速 v (cm min^{-1})	容重 ρ (g cm^{-3})	含水量 θ ($\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$)	注入方法
A	30	0.304	1.72	0.331	脉冲
B	20	0.640	1.73	0.314	脉冲
C	20	0.318	1.72	0.332	脉冲
D	20	0.640	1.80	0.295	阶跃

NaCl 示踪剂实验: 菌的混合置换实验结束后, 用 0.01 mol L^{-1} NaCl 溶液做示踪剂实验(因为 NaCl 对菌运移有影响, 所以示踪剂实验另做)。Cl⁻ 的测定用 AgNO₃ 滴定法。

NaCl 对大肠杆菌运移的影响: 用无菌去离子水饱和土柱, 然后用 0.01 mol L^{-1} 无菌 NaCl 作为菌的溶剂, 以脉冲方式注入土柱($L=20$ cm)中, 进行混合置换实验。收集的流出液分别测定菌浓度和 Cl⁻ 浓度。

2 数学模型

本文选用一维对流-弥散方程来描述细菌在土柱中的运移。模型有以下 4 个假设前提: 1) 一维运移过程; 2) 稳态水流; 3) 菌在砂子表面的吸附是线性平衡吸附; 4) 除了线性平衡吸附外, 还有一个一级反应对细菌起滤除(包括机械过滤等)作用。在上述前提条件下, 菌的运移方程如下:

$$R \frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - v \frac{\partial C}{\partial x} - \mu RC \quad (1)$$

$$R = 1 + K/\theta \quad (2)$$

其中, C 是液相中菌的浓度(个 ml^{-1}); D 是水动力弥散系数($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$); μ 是一级滤除系数(min^{-1}); ρ 是土壤容重(g cm^{-3}); R 是延迟因子; K 是大肠杆菌在液相和砂土间的平衡分配系数($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$); θ 是体积含水量; v 是平均孔隙流速(cm min^{-1}); x 是距离(cm); t 是时间(min)。

本文应用软件 CXTFIT 2.0^[8]进行大肠杆菌和示踪剂 BTC 的模拟和求参。

3 结果与讨论

3.1 大肠杆菌在砂土中的吸附

批量平衡法测定吸附的结果表明, 大肠杆菌在砂土上的吸附符合 Freundlich 方程, 即 $S = KC^n$ 。用土水比 1:1 和 1:2 进行多次重复实验, 得到的大肠杆菌分配系数 K 范围为 0.127~0.3 ml g^{-1} , 绝大多数指数常数 n 在 0.96~1.07 间。在此情形下, Huysman^[2] 和 Bales^[3] 认为指数常数 n 在统计上与 1 无差别, 所以将吸附平衡简化成线性方程即 $S = KC$ 。

3.2 大肠杆菌和示踪剂 Cl^- 的运移

大肠杆菌和 Cl^- 在不同速度和不同注入方式条件下得到的穿透曲线见图 1。从图中可以看出, 大肠杆菌 BTC 与其相对应的 Cl^- 的 BTC 相比没有明显的延迟, 而峰值明显低于对应的 Cl^- 峰值。随水流速度的增大, 菌的流出量也增加(图 1c, b)。在速度相似的条件, 土柱越长, 流出量越小(图 1a, c)。在同样速度条件下, 脉冲输入(菌液和水交替注入)的 BTC 峰值大于阶跃式输入(图 1b, d)。

在已知平均孔隙流速(测定)条件下, 用 Cl^- 的 BTC 拟合求水动力弥散系数 D 。然后用大肠杆菌 BTC 拟合求参数 μ 和 R , 模拟结果见表 3。

表 3 用 Cl^- 和大肠杆菌的 BTC 拟合得到的参数结果

土柱编号	柱长 (cm)	平均孔隙流速 v (cm min^{-1})	水动力弥散系数 D ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$)	延迟因子 R	分配系数 K (ml g^{-1})	滤除因子 μ (min^{-1})	r^2
A	30	0.304	1.160	1.04	0.0077	0.0072	0.9411
B	20	0.640	1.031	1.10	0.0179	0.0054	0.9345
C	20	0.318	0.503	1.06	0.0098	0.0032	0.9366
D	20	0.640	1.590	1.11	0.0211	0.0077	0.9334

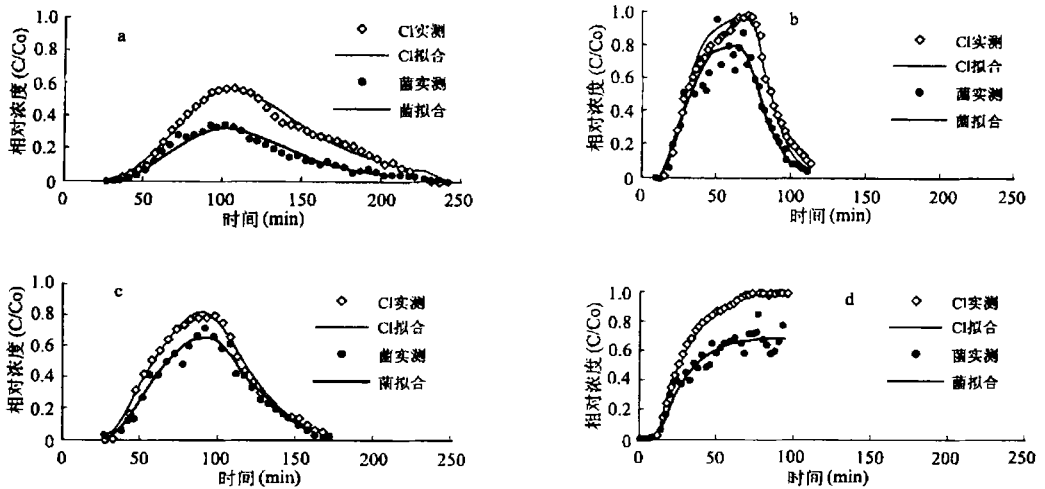


图 1 大肠杆菌和 Cl^- 在饱和砂柱中的穿透曲线及拟合值(a~d 与土柱编号 A~D 相对应)

以 0.01 mol L^{-1} NaCl 作为溶剂的菌的穿透曲线见图 2(菌液的注入时间为 50 min)。在 $v = 0.486$, $D = 1.17$ 情况下, 示踪剂 BTC 峰值处的 $C/C_0 = 0.84$, 而菌的 BTC 峰值处 C/C_0 只有 0.04。

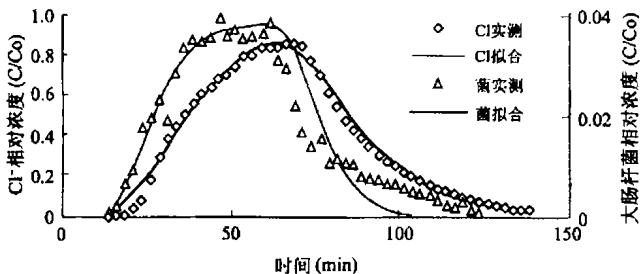


图 2 以 0.01 mol L^{-1} NaCl 为溶剂的大肠杆菌穿透曲线

3.3 讨论

由穿透曲线拟合得到的 R 中可求得菌在固-液相间的分配系数 K , 它与批量平衡法中测定的分配系数有差异。这与 Jin^[6] 和 Tan^[7] 等得到的结果相同。这可能是由于二者所处的作用力场不同^[9]。菌作为带负电物体与病毒相似, 在颗粒表面的吸附强烈地受静电作用力、双电层作用力、水动力作用力的影响, 批量平衡法是在无水流动的封闭系统中测定的, 而土柱实验是有对流的开放系统; 再加上批量法中存在水-气界面, 而菌优先在水-气界面上吸附, 但饱和土柱中无水-气界面, 因而 K 值不同。

从土柱实验中可以看出, 菌在运移中产生可逆吸附外, 还有不可逆滞留产生, 表现在大肠杆菌的 BTC 与示踪剂相比无明显的延迟, 而峰值明显低于示踪剂, 见图 1 和 2。滞留过程可用孔隙桥和多颗粒水动力排斥理论来解释^[1]。

菌的流出量随水流速度的增加而增加(图 1b 和 c), 这可能是由于水流速度造成的菌的强行移动, 或者是由于速度越快, 菌和砂子间相互作用时间少, 没能达到吸附平衡; 或者是在时间相同条件下, 速度越大, 菌的注入总量越大, 吸附或滞留的容量达到饱和越快, 菌的流出量增加。

在有 NaCl 的情况下, 菌的流出量显著下降, 比较图 1c 和图 2 可以看出, 下降幅度达一个数量级。这可能是随离子强度增加, 菌和砂土周围双电层结构的厚度减小, 使菌和菌、菌和砂土间更接近, 增加菌吸附或滞留的可能性^[9]。

从本实验结果来看(图 1b 和 d), 在速度和初始浓度相似条件下, 阶跃输入得到的峰值低于脉冲输入, 这可能是菌在注入口处形成阻塞, 阻碍后面菌的穿过; 脉冲输入时(水、菌交替), 原形成的阻塞因加水(而不是菌)作用下, 菌间作用力发生改变, 有些菌间形成的孔隙桥或滤网断裂, 随水流出。

本文在对流-弥散方程基础上, 把吸附当作线性过程、滞留作为一级动力学过程, 从求参和拟合结果来看, 较好地反映了菌的穿透结果, 通过所得参数可进一步对大肠杆菌在砂土中的运移行为进行分析。

致 谢 感谢赵小蓉博士在微生物测定和性质分析方面给予的帮助。

参考文献

1. Sarkar A K, Georgiou G, Shama M M. Transport of bacteria in porous media: An experimental investigation. *Biotech. and Bioeng.* 1994, 44: 489~ 497
2. Huysman F, Verstraete W. Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: Influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biol. Biochem.*, 1993, 25(1): 83~ 90
3. Bales R C, Hinkle S R, Kroeger T W, *et al.* Bacteriophage adsorption during transport through porous media: Chemical perturbations and reversibility. *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25: 2 088~ 2 095
4. Taylor S W, Jaffe P R. Substrate and biomass transport in a porous medium. *Water Resour. Res.*, 1990, 26(9): 2 181~ 2 194
5. Bai G Y, Brusseau M L, Miller R M. Influence of a Rhamnolipid Biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63(5): 1 866~ 1 873
6. Jin Y, Yates M V. Sorption of viruses during flow through saturated sand columns. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31: 548~ 555
7. Tan Y, Bone W J, Griffin D M. Transport of bacteria during unsteady unsaturated soil water flow. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1992, 56(5): 1 331~ 1 340
8. Toride N, Leij F J, van Genuchten M T. The CXTFIT code for estimating transport parameters from laboratory or field tracer experiments. Research Report No. 137, U.S. Salinity Laboratory, Riverside, California. 1995
9. Gannon J, Tan Y H, Bayevy P, *et al.* Effect of sodium chloride on transport of bacteria in a saturated aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57(9): 2 497~ 2 501