

As(V)对嗜酸性氧化亚铁硫杆菌混合培养物氧化性能的影响

王红梅 杨小芬 龚林锋 江政波

(生物地质与环境地质教育部重点实验室, 中国地质大学, 湖北 武汉 430074)

摘要:通过对 pH、Eh、溶液中 Fe^{2+} 浓度的定期监测以及对实验结束时生成沉淀的 XRD、SEM 和元素能谱扫描等手段, 对比研究了不同初始浓度的 As(V) 对 Fe^{2+} 的化学氧化和嗜酸性氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 氧化的影响, 同时就 As(V) 在实验体系中固液相之间的分配行为进行了分析。结果表明, Fe^{2+} 的化学氧化速率极低, 最终氧化率低于 8%, As(V) 的浓度对 Fe^{2+} 的化学氧化没有影响。有 *A. ferrooxidans* 的实验体系, 100 mg/L As(V) 对 Fe^{2+} 的氧化具有一定的促进作用。当 As(V) 浓度为 500 mg~1 g/L 时, Fe^{2+} 的氧化率在约 60 h 左右即可达到 100%, 但 4g/L 的 As(V) 则会明显抑制 Fe^{2+} 的氧化, Fe^{2+} 的完全氧化大约需要 106 h。体系中初始的 100 As/(As+S) 摩尔比会对沉淀物的物相及结晶程度造成一定影响。As(V) 浓度为 0 g/L 时, 微生物体系中生成的固体沉淀物黄钾铁矾的特征峰明显, 随着 As(V) 浓度的提高, 沉淀物的结晶程度逐步下降, 至 4 g/L 时沉淀物全部为无定形。元素能谱扫描检测到有大量的 As(V) 存在于固体沉淀物中, 表明在 Fe^{2+} 的氧化过程中, As(V) 可能会以吸附或共沉淀的形式被固定在固相沉淀物中, 这为酸性矿坑水 (AMD) 地区 As(V) 污染的治理提供了重要的参考。

关键词: *A. ferrooxidans*; As(V); 黄钾铁矾; 酸性矿坑水 (AMD)

中图分类号: Q93-3; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2009)06-0507-06

The effect of As(V) on the oxidizing capacity of the mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

WANG Hong-mei, YANG Xiao-fen, GONG Lin-feng and JIANG Zheng-bo

(Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology of Ministry of Education, China University of Geosciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Comparable studies were conducted between chemical oxidation and microbial oxidation of ferrous sulfate by a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of different concentrations of As(V). Eh, pH and Fe^{2+} concentration were monitored periodically and the final precipitation was analyzed by X-ray diffraction (XRD) and SEM. The data obtained showed and chemical oxidation of Fe^{2+} was very slow with a final oxidizing ratio of <8% and As(V) had no effect on Fe^{2+} oxidation chemically. Slight enhancement of Fe^{2+} oxidation was observed by 100 mg/L As(V) in the microbial system. Complete oxidation of Fe^{2+} could be reached in about 60 hours in the presence of *A. ferrooxidans* with 500 mg~1 g/L As(V). However, microbial Fe^{2+} oxidation was greatly inhibited by 4 g/L As(V) and about 106 hours were needed for complete oxidation. Initial mole ratios of 100 As/(As+S) affected the final solid phase and the crystallization of the precipitation. In the microbial system, typical symmetric peaks of jarosite were clearly distinguished in the precipitates with ≤ 1 g/L As(V) but the crystallization was decreasing with the increase of As(V) concentration. Only amorphous solid was observed in the precipitate with 4 g/L As(V). Elemental mapping indicated that

收稿日期: 2009-08-27; 修订日期: 2009-10-10

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2007CB815601); 国家自然科学基金资助项目(40672081)

作者简介: 王红梅(1970-), 女, 汉族, 博士, 教授, 主要从事地球微生物学方面的研究, 包括洞穴微生物学及与酸性矿坑水相关的地球微生物学过程, E-mail: wanghmei04@163.com。

As was evenly distributed in the precipitates either by adsorption or by structural incorporation during the iron oxidation. These results provide important information for the treatment of As contamination in AMD regions.

Key words: *A. ferrooxidans*; As(V); jarosite; acid mine drainage (AMD)

嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, 简称 *A. ferrooxidans*) 是一种化能自养的铁氧化细菌,革兰氏阴性,好氧嗜酸,主要生长在 pH=1~3 的环境中。在有氧条件下 *A. ferrooxidans* 依靠氧化 Fe^{2+} 及各种还原性硫化物提供的能量生长,并加速酸性矿坑水(AMD)的形成,同时形成各种不同的次生硫酸盐矿物(如黄钾铁矾和 schwertmannite 施氏矿物)。这些矿物对重金属往往具有很强的吸附能力,可以在 AMD 地区的重金属污染的环境治理中发挥重要作用。如施氏矿物具有很高的比表面积,在土壤、河流沉积物和酸性矿山水中对溶解态微量重金属元素的吸附和沉淀起着重要的调节作用(Bigham *et al.*, 1996; Swedlund and Webster, 2001; Carlson *et al.*, 2002),是这些地区微量重金属最主要的固相吸附剂,某些矿区的重金属污染通过施氏矿物的调节可以降至背景值以下,从而达到自净目的(Lee *et al.*, 2002; Fukushi *et al.*, 2003)。同样,在某些矿区黄钾铁矾中 As 的含量可达 $100 \times 10^{-6} \sim 2\,000 \times 10^{-6}$ (Savage *et al.*, 2000) 并且 As 与黄钾铁矾的结合方式能够进一步影响 As 在环境中的活性及其对生物的毒害性(Savage *et al.*, 2005)。

砷是酸性矿坑水中常见的重金属元素,主要以无机形态的 $As(III)$ 和 $As(V)$ 存在于酸性矿山水中。*A. ferrooxidans* 可以氧化含砷黄铁矿,并从中获得能量,同时将不同形态的硫与砷的氧化物转移至环境中(Collinet and Morin, 1990)。*A. ferrooxidans* 对不同形态砷具有不同的耐受性。10 g/L 的亚砷酸足以杀死所有的微生物,而 *A. ferrooxidans* 对砷酸盐的耐受浓度则可达 14.7~40 g/L(Collinet and Morin, 1990; Dave *et al.*, 2008)。微生物对砷的耐受性除了和砷的价态有关外(Cervantes *et al.*, 1994) 还与培养基有关。*A. ferrooxidans* 在硫化物培养基中,对砷的耐受性更强(Tuovinen *et al.*, 1971)。此外,*A. ferrooxidans* 纯培养与混合培养物均可在 $As(V)$ 体系中对 Fe^{2+} 进行氧化,通过产生黄钾铁矾对实验体系中 $As(V)$ 进行吸附或共沉淀(Yang *et al.*, 2009)。

因此,*A. ferrooxidans* 氧化性能直接关系到 Fe、S 的地球化学循环以及环境中一些重金属的沉淀、迁移和转化等,对了解酸性矿坑水的形成、重金属的释放、次生重金属矿物的形成以及重金属在固液相中的分配规律等至关重要。本文在探讨 $As(V)$ 对 *A. ferrooxidans* 氧化性能影响的同时,研究不同条件下的固相沉淀物特征及 As 在固液相中的分配规律,以期防治 AMD 地区的 $As(V)$ 污染提供参考。

1 实验材料

1.1 样品的采集

沉积物样品采自安徽省铜陵铅锌矿的杨山冲尾矿库周边的酸性矿坑水区域,采集时间为 2008 年 4 月,采样的具体

地理位置为 N 30°54'10.6", E 117°53'36.2"。采样时戴一次性无菌手套,取一定量沉积物样品,置入 50 mL 无菌离心管,盖好盖子后,置入冷冻保温箱,运回实验室,以备微生物培养。

1.2 沉积物微生物的富集培养

应用 Wang 等(2006)的基本培养基配方,进行沉积物中微生物的富集培养。培养基配方如下:在 4.05 mM H_2SO_4 溶液中加入 1.6 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 3.0 mM $(NH_4)_2 SO_4$ 以及 3.0 mM KH_2PO_4 , 并加入 120 mM Fe^{2+} 作为化能微生物的营养物质(以 $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 形式加入)。沉积物接种量为 2% (质量分数),放入恒温摇床中培养,培养条件:230 r/min, 温度 30℃。富集的混合培养物记为 S3,并用于后续的实验。

2 实验及分析过程

本实验设化学对照组和微生物组,化学对照组除不接种微生物外,其余条件与对应的微生物组完全相同。微生物组接种以 *A. ferrooxidans* 为优势菌株的 S3 混合培养物。配制 0 mg/L、100 mg/L、500 mg/L、1 g/L 和 4 g/L 等不同 $As(V)$ 浓度的溶液,每个浓度设 4 个平行,2 个用于化学对照组,2 个用于微生物组的实验。仍采用 Wang 等(2006)的培养基,向培养基中加入不同量的 Na_3AsO_4 后,用 H_2SO_4 调节培养基的 pH 值至 2.5~2.7 之间。实验过程中定期测量实验体系上清液的 pH、Eh 值以及溶液中剩余 Fe^{2+} 的浓度,考察微生物体系与化学体系之间 Fe^{2+} 的氧化行为以及不同浓度的 $As(V)$ 对微生物氧化 Fe^{2+} 能力的影响,同时收集实验过程中产生的沉淀,并对其扫描电镜(SEM)观察和 X 衍射(XRD)分析,对其表面形态及矿物相进行分析。

溶液中 Fe^{2+} 含量采用重铬酸钾滴定法进行测定(张子间, 2004)。pH 和 Eh 值由 pH/Eh 复合电极(PHS-3C, 上海雷磁)进行测定;X 粉晶衍射和 SEM 图像扫描以及元素能谱分析在中国地质大学地质过程与矿产资源国家重点实验室完成。元素分布扫描制片过程按照电子背散射衍射(EBSD)的测试方法进行,将少许实验中产生的沉淀物质与环氧树脂混合均匀,然后粘在玻璃片上,待其完全干燥。因为样品细小,直接用 0.3 μm 的 α 氧化铝溶液,抛光处理 15~200 min。为增强样品导电性,用高真空溅射镀膜仪对样品表面镀膜厚度 5~10 nm 左右的碳膜,然后在低真空扫描电镜下进行观察和能谱扫描。

3 结果与讨论

3.1 pH 值的变化

含有不同 $As(V)$ 浓度的化学对照组 pH 值随时间增加均

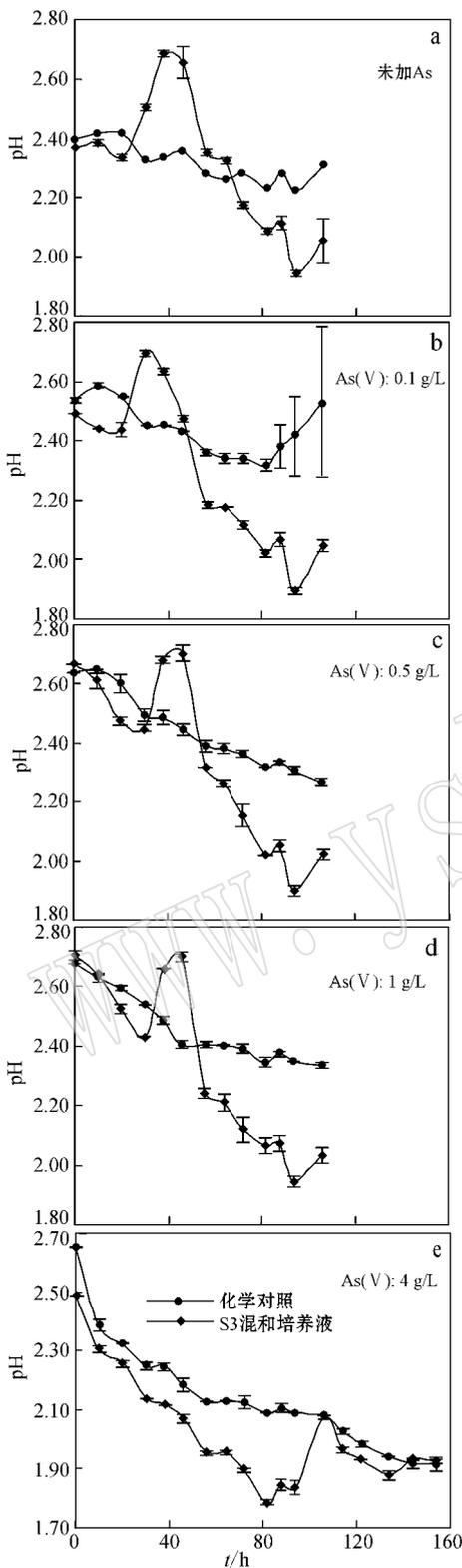


图 1 含有不同浓度 As(V) 的 S3 混合培养液及化学对照 pH 值随时间的变化

Fig. 1 Variation of pH with time in the chemical controls and S3 mixed cultures amended with different concentrations of As(V)

呈现持续下降的趋势(图 1 a~e),且下降幅度随 As(V) 浓度的升高而增大。其中 4 g/L 的化学体系中 pH 值降低到 1.9 左右,其他浓度的对照组 pH 值降低到 2.3 左右。当 As(V) 浓度 ≤ 1 g/L 时, S3 培养液 pH 值在开始的 20~30 h 内有小幅度下降,之后 30~38 h 内达到最高值 2.7 左右,随后缓慢下降至 2.0 左右。其中 500 mg/L、1 g/L 与未加 As(V) 空白对照的峰值、到达峰值所用时间、最低值等极其接近。值得注意的是,100 mg/L As(V) S3 培养液 pH 到达峰值时间比未加 As(V) S3 培养液对照略早(图 1 b),其他差别不大。4 g/L 培养液与未加 As(V) 的空白对照系列相比,差别最为显著(图 1 e),前者 pH 值在前 94 h 内持续下降,最低降至 1.8,在 106 h 内达到最高值 2.0,随后降至 1.9(图 1 e)。整个实验过程中,微生物参与下反应体系的 pH 值变化范围比化学对照组的大,而且最终的 pH 值较低。这种变化趋势与 Pb^{2+} 与 S3 的相互作用结果相似(结果整理中)。

3.2 Eh 值的变化

溶液的 Eh 值反映了溶液的氧化还原状况。在本实验中,溶液中的氧化还原电位的大小可反映 Fe^{3+} 与 Fe^{2+} 的浓度比,电位越高, Fe^{3+} 浓度越高。

化学空白对照体系中, Eh 值升高缓慢,在 300 mV 左右形成一个平台(图 2 a~e)。加入 S3 培养液的 Eh 值上升至 400 mV 左右达到短暂的平台后,迅速在 72 h 内上升至 630 mV 左右,并保持平稳。相比之下 4 g/L 培养液 Eh 达到最高值约需 120 h,显示了该体系中 Fe^{2+} 的氧化受到了抑制(图 2 e)。同样,在 100 mg/L As(V) 的 S3 体系中, Eh 到达最大值的时间也较其他低浓度 As(V) 的 S3 体系早 6~8 h,表明该浓度的 As(V) 可能对 Fe^{2+} 的氧化具有一定的促进作用(图 2 b)。

3.3 Fe^{2+} 氧化率

Fe^{2+} 氧化率可以通过下式进行计算,它直接反映了 *A. ferrooxidans* 的氧化性能: Fe^{2+} 氧化率 = $(\text{Fe}^{2+}$ 的初始浓度 - 溶液中剩余 Fe^{2+} 的浓度) / Fe^{2+} 的初始浓度 $\times 100\%$ 。化学对照系列在长时间的反应后,亚铁氧化率仍然低于 8%。加入 S3 的培养液,除了 4 g/L As(V) 的体系需要 106 h 外,其他浓度条件下均只需 60 h 左右亚铁氧化率即可达到 100%(图 3 a~e),表明低浓度 As(V) 的加入对 S3 混合培养物氧化铁的能力没有显著影响。100 mg/L As(V) 的体系中, Fe^{2+} 完全氧化的时间比其他低浓度体系提前了 8 h,显示出该浓度的 As(V) 对 *A. ferrooxidans* 氧化 Fe^{2+} 有促进作用(图 3 b);而 4 g/L 的 As(V) 的浓度则对 S3 混合培养物的氧化能力产生了较大的抑制作用(图 3 e)。

3.4 沉淀物 XRD 测试结果与分析

对不同浓度 As(V) 的 S3 反应体系中的最终沉淀物进行了 XRD 分析,结果显示,随着 As(V) 浓度的升高,基线波动越来越大(图 4 a~e),黄钾铁矾的特征峰越来越不清晰,直至 4 g/L 时,黄钾铁矾的特征峰完全消失。

研究表明初始溶液的 100As/(As+S) (摩尔比)会直接影响体系中最终的沉淀物生成(Savage et al., 2005),本研究

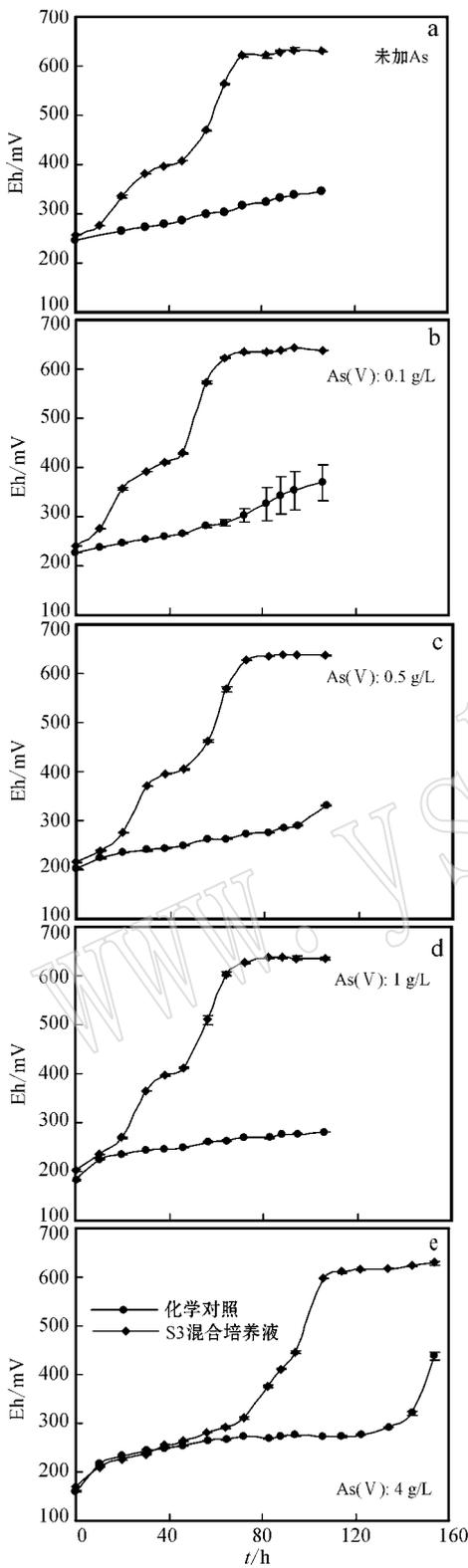


图 2 含有不同浓度 As(V) 的 S3 混合培养液及化学对照 Eh 随时间的变化

Fig. 2 Variation of Eh with time in the chemical controls and S3 mixed cultures amended with different concentrations of As(V)

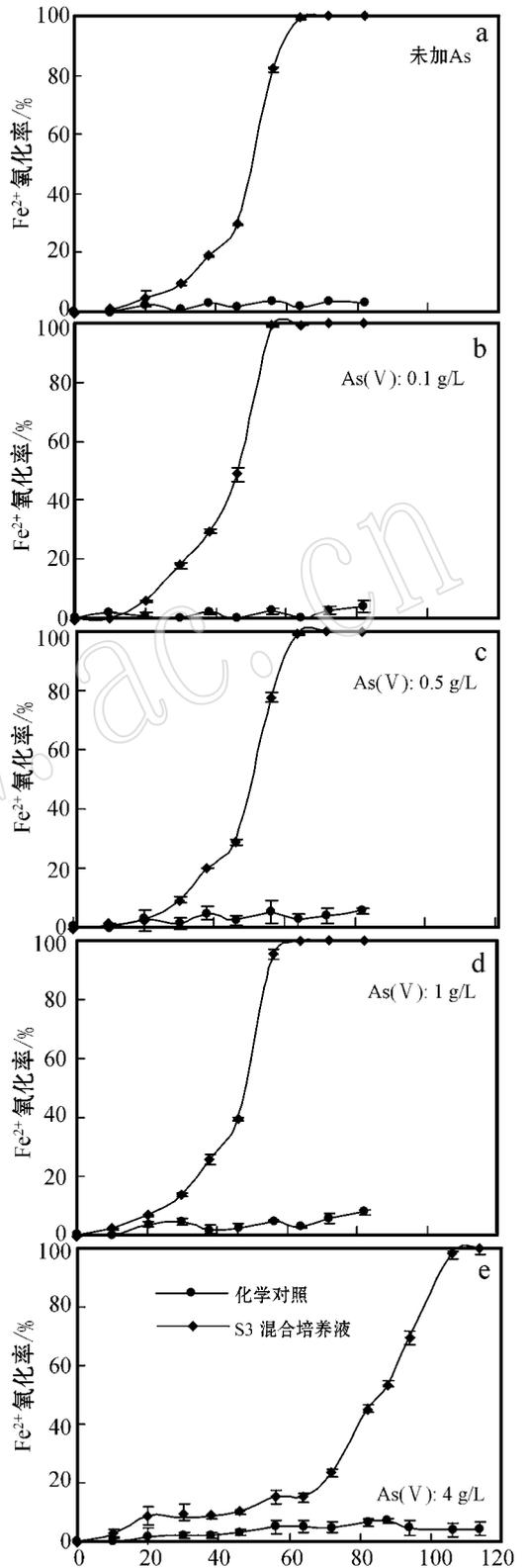


图 3 不同浓度 As(V) 在化学对照及微生物体系中对 Fe^{2+} 氧化率的影响

Fig. 3 The effect of As(V) on Fe^{2+} oxidation in chemical controls and microbial systems

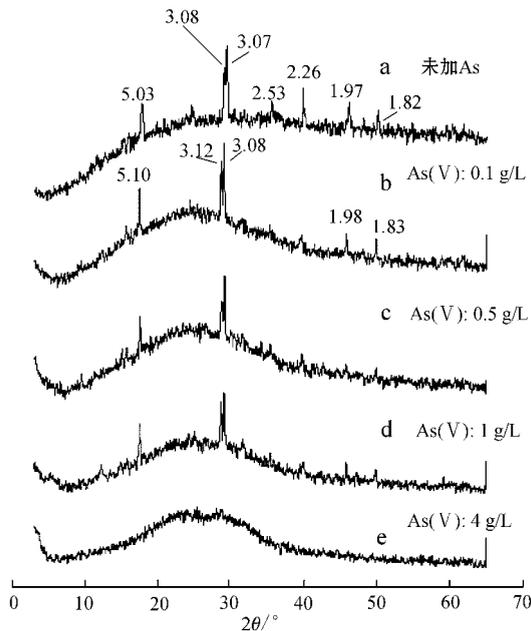


图 4 微生物体系中不同浓度 As(V) 条件下形成沉淀的 XRD 图谱

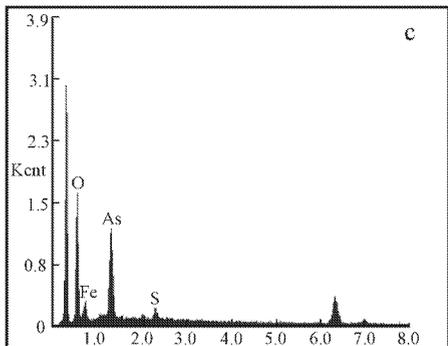
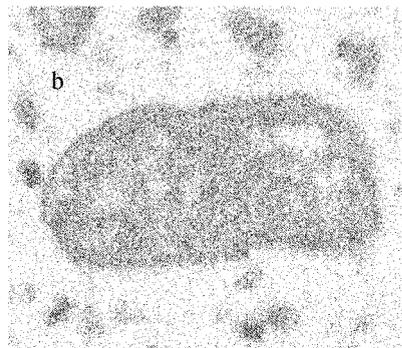
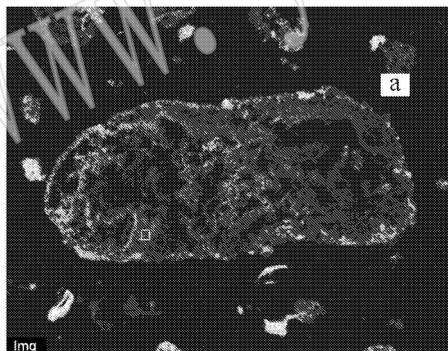
Fig. 4 XRD spectra of precipitates in microbial systems

结果也证实了这一点。As(V) 浓度为 0、0.1 g/L 对应的 100 As/(As+S) 摩尔比) 分别为 0 和 1.03 时, 从 XRD 图谱上来看, 黄钾铁矾的特征峰非常明显(图 3a、3b); As(V) 浓度为 0.5、1.0 g/L 对应的 100As/(As+S) 摩尔比) 分别为 4.94 和 9.43 时, 沉淀组分主要为黄钾铁矾, 但是也存在无定形矿物(图 4c、4d); 当 As(V) 浓度达到 4 g/L、摩尔比为 29.41 时, 生成的沉淀已完全为无定形矿物(图 4e)。

此外, 体系中 Fe^{3+} 的供应速率也会影响黄钾铁矾的形成及晶体形态(Lazaroff *et al.*, 1985; Sasaki *et al.*, 2000; 朱长见等, 2005; Jensen *et al.*, 1995)。当实验体系中 As(V) 浓度达到 4 g/L 时, Fe^{2+} 的氧化受到明显抑制, 使得 Fe^{3+} 供应速率显著降低, 直接抑制了黄钾铁矾的形成。

3.5 沉淀物能谱结果分析与讨论

能谱扫描结果(图 5c、5d)显示 4 g/L 的 S3 体系中最终沉淀的元素组成为 O、As、S、Fe。C 的检出可能是样品表面喷碳或细菌胞外聚合物的结果。值得注意的是 As 在沉淀物中均匀分布(图 5b), 表明 As(V) 在 Fe^{2+} 的氧化过程中已进入矿物的晶格或被固体沉淀物所吸附。此外, 该沉淀物的能谱扫描中没有发现 K, 而 1g/L 的 S3 体系得沉淀物中仍有 K 的检出, 这可能是由于 As 浓度的提高导致 K 的沉淀行为发生了改变, 在较高的 As 浓度体系中, K 不再发生沉淀。



d

Element	Wt%	At%
O	21.49	20.70
As	9.56	1.97
S	0.60	1.97
C	57.78	74.13
Fe	10.58	2.92

图 5 As(V) 初始浓度为 4 g/L 微生物作用下沉淀的能谱扫描及 As 在沉淀中的分布

Fig. 5 SEM-EDX and As mapping of precipitate in the microbial system amended with 4 g/L As(V)

4 结论

与亚铁的微生物氧化相比,其化学氧化极其缓慢,至实验结束,仅有<8%的 Fe^{2+} 被氧化,且该氧化率不受 $A(V)$ 浓度的影响。相反,微生物参与下 Fe^{2+} 的氧化速率大大提高,但4 g/L的 $A(V)$ 会显著抑制微生物对 Fe^{2+} 的氧化, Fe^{2+} 完全被氧化的时间较其他条件下推迟了约46 h。100 mg/L的 $A(V)$ 对 Fe^{2+} 的氧化具有一定的促进作用。

体系中初始的100 $A_s/(A_s+S)$ (摩尔比)直接影响最终沉淀物的性质。当该比值为0~1.03时,沉淀物中黄钾铁矾的特征峰非常明显;当该比值为4.94~9.43时,沉淀组分中仍可检测到黄钾铁矾,但是也存在无定形矿物;当该比值达到29.41时,沉淀则完全为无定形矿物。

能谱扫描结果显示 A_s 在固相沉淀中均匀分布,表明在 Fe^{2+} 的氧化过程中, $A_s(V)$ 从液相向固相中转移,可能被沉淀吸附或进入了矿物的晶格结构。这对AMD地区 $A(V)$ 的治理具有重要指导意义。

References

Bigham J M, Schwertmann U, Traina S J, et al. 1996. Schwertmannite and the chemical modelling of iron in acid sulfate waters[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60: 2111~2121.

Carlson L, Bigham J M, Schwertmann U, et al. 2002. Scavenging of As from acid mine drainage by schwertmannite and ferrihydrite: a comparison with synthetic analogues[J]. *Environ Sci Technol*, 36: 1712~1719.

Cervantes C, Ji Guangyong, Ramirez J, et al. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 15: 355~367.

Collinet M N and Morin D. 1990. Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(4): 237~244.

Dave S R, Gupta K H and Tipre D R. 2008. Characterization of arsenic resistant an arsenopyrite oxidizing *Acidithiobacillus ferrooxidans* from Hutti gold leachate and effluents[J]. *Bioresource Technology*, 99: 7514~7520.

David D J, Pradhan D and Das T. 2008. Evaluation of iron oxidation rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ion[J]. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy*, 117: 56~61.

Fukushi K, Sasaki M, Sato T, et al. 2003. A natural attenuation of arsenic in drainage from an abandoned arsenic mine dump[J]. *Appl. Geochem.*, 18: 1267~1278.

Jensen A B and Webb C. 1995. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a Review[J]. *Process Biochemistry*, 30(3): 225~236.

Lazaroff N, Melanson L, Lewis E, et al. 1985. Scanning electron microscopy and infrared spectroscopy of iron sediments formed by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Geomicrobiology J.*, 4(3): 231~268.

Lee G, Bigham J M and Faure G. 2002. Removal of trace metals by coprecipitation with Fe, Al and Mn from natural waters contaminated with acid mine drainage in Ducktown mining district, Tennessee[J]. *Appl. Geochem.*, 17: 569~581.

Sasaki K and Konno H. 2000. Morphology of jarosite-group compounds precipitated from biologically and chemically oxidized Fe ions[J]. *The Canadian Mineralogist*, 38: 45~56.

Savage K S, Bird D K and Ashley R P. 2000. Legacy of the California gold rush: environmental geochemistry of arsenic in the southern Mother Lode Gold District[J]. *Int. Geol. Rev.*, 42: 385~415.

Savage K S, Bird K D and O'Day P A. 2005. Arsenic speciation in synthetic jarosite[J]. *Chemical Geology*, 215: 473~498.

Swedlund P J and Webster J G. 2001. Cu and Zn ternary surface complex formation with SO_4 on ferrihydrite and schwertmannite[J]. *Appl. Geochem.*, 16: 503~511.

Tuovinen O H, Niemelä S I and Gyllenberg H G. 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metal[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 37: 489~496.

Wang H, Bigham J M and Tuovinen O H. 2006. Formation of schwertmannite and its transformation to jarosite in the presence of acidophilic iron-oxidizing microorganisms[J]. *Material Science and Engineering C*, 26: 588~592.

Yang Xiaofen, Wang Hongmei, Gong Linfeng, et al. 2009. $Fe(II)$ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures in the presence of arsenate[J]. *Frontiers of Earth Science in China*, 3: 221~225.

Zhang Zijian. 2004. Study on the Bio-tricking Filter Flue Gas Desulphurization Techniques and Its Mechanism[D]. Guangdong University of Technology (in Chinese with English abstract).

Zhu Changjian, Lu Jianjun, Lu Xiancai, et al. 2005. SEM Study on Jarosite Mediated by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Geological Journal of China Universities*, 11(2): 234~238 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

张子间. 2004. 生物滴滤池烟气脱硫工艺与机理的研究(硕士学位论文[D]). 广东工业大学, 18~19.

朱长见, 陆建军, 陆现彩, 等. 2005. 氧化亚铁硫杆菌作用下形成的黄钾铁矾的 SEM 研究[J]. *高校地质学报*, 11(2): 234~238.