

重金属离子胁迫对SRB修复酸性矿山废水效能的影响

——功能基因与污染物去除的双重视角

夏璐¹, 刘龙云¹, 李常锁^{2,3}, 高晓兵¹, 姜慧¹, 高宗军¹

(1. 山东科技大学地球科学与工程学院, 山东青岛266590;

2. 山东省地矿工程勘察院, 山东济南250061;

3. 山东省地下水环境保护与修复工程技术研究中心, 山东济南250014)

摘要:利用硫酸盐还原菌(SRB)修复酸性矿山废水具有成本低且金属沉淀可回收的优点。然而,废水中含有的重金属离子会对硫酸盐还原菌的生长产生抑制作用,进而影响其修复效能。为探究重金属离子对硫酸盐还原菌修复酸性矿山废水效能的影响,开展室内批量实验,结合荧光定量聚合酶链式反应,系统研究 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫下硫酸盐还原菌对酸性矿山废水中 SO_4^{2-} 及重金属离子的去除规律。结果表明:添加重金属离子后,体系pH值稳定于6.8~7.7,氧化还原电位持续降低;重金属离子对硫酸盐还原菌生长的抑制强度为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$;从 SO_4^{2-} 去除率来看,重金属离子对 SO_4^{2-} 去除的抑制作用强度排序为 Cu^{2+} (35.16%±6.55%)> Pb^{2+} (35.98%±6.46%)> Mn^{2+} (36.10%±5.37%)> Zn^{2+} (44.52%±11.53%)。此外,硫酸盐还原菌对 Pb^{2+} 去除率最高(99.85%±0.29%), Mn^{2+} 最低(75.19%±20.36%)。本研究从硫酸盐还原菌功能基因与污染物去除双重视角,揭示不同重金属离子对硫酸盐还原菌修复酸性矿山废水的影响机制。

关键词:硫酸盐还原菌;酸性矿山废水;重金属离子;荧光定量聚合酶链式反应

中图分类号:X751;X172

文献标志码:A

Effects of heavy metal ion stress on efficiency of SRB in remediating AMD:

Perspectives of functional genes and pollutant removal

XIA Lu¹, LIU Longyun¹, LI Changsuo^{2,3}, GAO Xiaobing¹, JIANG Hui¹, GAO Zongjun¹

(1. College of Earth Science and Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266590, China;

2. Shandong Provincial Geo-mineral Engineering Exploration Institute, Jinan 250061, China;

3. Shandong Engineering Research Center for Environmental Protection and Remediation on Groundwater, Jinan 250014, China)

Abstract: Using sulfate-reducing bacteria (SRB) to remediate for acid mine drainage (AMD) has the advantages of low cost and recoverable metal precipitation. However, the heavy metal ions in the drainage can inhibit the growth of SRB, thus influencing their efficiency. To investigate the effect of heavy metal ion stress on the efficiency of SRB in remediating AMD, this study systematically examined the laws of SRB in removing SO_4^{2-} and heavy metal ions in AMD under the stress of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , and Pb^{2+} via laboratory batch experiments integrated with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis. The results showed that after the addition of heavy metal ions, the system maintained a stable pH (6.8~7.7) while exhibiting progressive reduction in oxidation-reduction potential (ORP). The inhibition of heavy metal ions on the growth of SRB was $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. In view of SO_4^{2-} removal efficiency, the inhibition of heavy metal ions on the removal of SO_4^{2-} was Cu^{2+} (35.16%±

收稿日期:2025-01-22

基金项目:山东省地下水环境保护与修复工程技术研究中心开放基金项目(801KF2023-8)

作者简介:夏璐(1985—),女,山东淄博人,副教授,博士,主要从事地下水污染与防治研究。

高宗军(1964—),男,山东泰安人,教授,博士(后),主要从事地下水污染与防治研究,本文通信作者。

E-mail:gaozongjun@126.com

6.55%) > Pb²⁺ (35.98% ± 6.46%) > Mn²⁺ (36.10% ± 5.37%) > Zn²⁺ (44.52% ± 11.53%)。In view of metal removal efficiency, Pb²⁺ had the highest removal efficiency (99.85% ± 0.29%) and Mn²⁺ showed the lowest removal efficiency (75.19% ± 20.36%)。By taking the dual perspectives of functional genes and contaminant removal patterns, this study reveals the effect mechanism of different heavy metal ions on SRB's remediation of AMD。

Key words: sulfate-reducing bacteria; acid mine drainage; heavy metal ions; fluorescence quantitative polymerase chain reaction

酸性矿山废水(acid mine drainage, AMD)是在矿产资源开采和处理过程中,含硫矿物(主要是硫铁矿)暴露于空气中,在水、氧气和微生物的共同作用下产生的具有低 pH、高硫酸盐和有毒重金属的废水^[1]。AMD 中富含的硫酸根(SO₄²⁻)和重金属离子(如 Fe²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Pb²⁺等),若未经过处理直接排放,会导致严重的环境问题。目前,国内外学者针对 AMD 的治理已开展大量研究,主要分为源头控制法和末端控制法^[2]。源头控制法^[3-4]主要通过阻隔氧气、硫化物矿物钝化以及抑制产酸微生物活性等方法,从根源上减少 AMD 的形成。末端治理法^[5-6]是指在 AMD 产生后进行处理,主要包括吸附法、沉淀中和法、人工湿地法、可渗透反应墙法及微生物法等。

以硫酸盐还原菌(sulfate-reducing bacteria, SRB)为代表的微生物法具有清洁环保、处理效率高和成本低廉等优点,近年来被广泛认为是一种有潜力的替代技术^[7]。其作用原理主要是在厌氧条件下,SRB 以有机物(如乙醇、乳酸和乙酸等)为电子供体,以 SO₄²⁻ 为电子受体,通过异化作用获取能量将 SO₄²⁻ 还原为硫化物。与此同时,SRB 还可以去除 AMD 中的重金属离子,主要机制^[8]为:①SO₄²⁻ 还原生成的 S²⁻ 或 H₂S 与重金属离子(如 Cu²⁺、Pb²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺等)形成金属硫化物沉淀;②分解有机碳源在水中产生的 CO₃²⁻ 沉淀重金属离子;③生成的 OH⁻ 导致重金属离子沉淀;④SRB 在生长和代谢过程中分泌的胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)通过吸附和络合作用沉淀重金属。

酸性矿山废水的处理效果取决于 SRB 的活性,而 SRB 的生长往往受控于各种环境因素。重金属离子对酶活性有抑制作用^[9],能够破坏微生物酶结构,迫使脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和蛋白质变性^[10],是影响 SRB 生长和代谢的重要因素之一。王森等^[1]认为,不同重金属离子对 SRB 的抑制作用存在差别,表现为 Cu²⁺ > Cd²⁺ > Ni²⁺ > Zn²⁺ > Cr²⁺ > Pb²⁺。此外,重金属离子的赋存形态和价态也会影响 SRB 对 AMD 的处理效能。由此可见,明确 AMD 中重金属离子对 SRB 的胁迫作用,对于提高 SRB 修复效能具有重要意义。本研究通过室内批量实验,利用荧光定量聚合酶链式反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qPCR)等技术,探究不同重金属离子胁迫下 SRB 的生长规律及其对 SO₄²⁻ 的修复效果,揭示重金属离子对 SRB 修复效能的影响机制,以期为酸性矿山废水污染修复技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 硫酸盐还原菌

1.1.1 菌种来源

本研究选取厌氧环境中常见的 SRB 普通脱硫弧菌为对象,研究其对模拟酸性矿山废水的修复效能。实验所用菌种购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),菌种编号为 CGMCC-1.5190。

1.1.2 菌种活化

采用无菌移液枪吸取 0.2 mL 无菌去离子水,注入含冻干菌粉的安瓿瓶中,轻轻旋转安瓿瓶至冻干菌粉完全溶解,随后将菌液转接至脱硫弧菌液体培养基(*Desulfovibrio* medium)中,于 37 °C 恒温培养箱中厌氧培养 3~5 天。培养基参照文献[11]配制(单位 g/L):K₂HPO₄ (0.50)、NH₄Cl (1.00)、Na₂SO₄ (1.00)、CaCl₂ · 2H₂O (0.10)、MgSO₄ · 7H₂O (2.00)、酵母浸粉 (1.00)、刃天青 (1.00)、Na₂S₂O₃ (0.10)、FeSO₄ · 7H₂O (0.50)、抗坏血酸 (0.10),并添加乳酸钠 (3.33 mL, 60% (V/V))。若液体培养基颜色由浅蓝色变为黑色,并释放特征气体 H₂S,则表明硫酸盐还原菌(SRB)成功活化并增殖。

1.1.3 菌种扩大培养

采用无菌注射器吸取 1 mL 活化菌液接种至 100 mL 无 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 液体培养基中,于 37 ℃ 恒温厌氧培养箱中培养至菌液浑浊(菌体细胞密度(optical density 600, OD_{600})为 0.8)。在 1 L/min 氮气流保护下将菌液转移至离心管,4 000 r/min 离心 10 min(4 ℃),弃去上清液。菌体沉淀立即转入含 0.05% L-半胱氨酸(还原剂)的无菌磷酸盐缓冲液中,全程维持厌氧指示剂(刃天青)无色状态。收集菌液沉淀并用无菌去离子水重悬,采用紫外分光光度计调整菌悬液浓度至 OD_{600} 为 0.5,分装至厌氧瓶并于 4 ℃ 密封保存备用。

1.2 模拟酸性矿山废水

基于文献[11]方法配制模拟酸性矿山废水,总溶解性固体(total dissolved solids, TDS)、氧化还原电位(oxidation-reduction potential, ORP)、重铬酸盐氧化性(dichromate oxidizability, COD_{Cr})等含量如表 1 所示。根据舒卡列夫水化学分类法,该水质属氯化物硫酸盐-钠镁型水(分类代码 41-B),其水化学组成见表 1。

1.3 实验设计

前期研究^[5]表明,SRB 对酸性矿山废水中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 的耐受阈值分别为 51.2、98.07、82.88 mg/L。基于此,本研究分别选取 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Mn^{2+} 为研究对象,分别设置低(10 mg/L)、中(50 mg/L)、高(150 mg/L)浓度梯度,系统探究重金属离子胁迫对 SRB 去除 SO_4^{2-} 效能的影响机制。具体步骤:①将重金属盐完全溶解于模拟废水中,通入高纯

表 1 模拟酸性矿山废水水化学组成

Table 1 Hydrochemical composition of simulated acid mine drainage

水化学指标	数值	水化学指标	数值
pH	7.10	Ca^{2+}	0.024
TDS	5.37	Mg^{2+}	0.169
ORP	183.20	NH_4^+	0.324
COD_{Cr}	1.490	SO_4^{2-}	3.203
K^+	0.188	Cl^-	0.808
Na^+	0.336	PO_4^{3-}	0.238

注:pH 无量纲;ORP 单位为 mV;其余指标单位均为 g/L。

氮气至溶解氧(dissolved oxygen, DO)小于 1.0 mg/L;②经 121 ℃ 高压灭菌 20 min,调节 pH 值至 7.0±0.2,分装至厌氧瓶,设置空白对照组(无重金属添加),其他条件相同;③按 20%接种量(V/V)加入活化 24 h 的 SRB 菌悬液于 35 ℃ 厌氧培养箱中恒温培养,每组设 3 个平行;④分别于第 1、3、5、7 天取样,测定 pH 值、ORP、 SO_4^{2-} 浓度及重金属离子浓度;⑤采用 qPCR 技术定量检测反应体系中 16S rRNA 基因拷贝数(copies/mL),评估重金属离子对 SRB 生长的影响。

1.4 分析方法

反应体系中 pH 值和 ORP 采用哈希 HQ40D 便携式多参数水质分析仪(美国)测定,利用硫酸钡比浊法^[12]测定 SO_4^{2-} 浓度,利用火焰原子吸收分光光度法^[13-14]测定重金属离子浓度。采用 ABI7500 qPCR 仪(applied biosystems,美国)测定异化型亚硫酸盐还原酶(dissimilatory sulfite reductase, DSRB)基因丰度,以 16S rRNA 基因拷贝数(copies/mL)表征。

1.5 统计学分析

采用 SPSS(statistical product and service solution)软件进行数据分析,其中相关性采用 Pearson 相关分析,通过单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)评估不同浓度重金属离子组的显著性差异,当样本量较少时可用 *t* 检验分析。*p* 值为进行假设检验时,当原假设为真时,比所得的样本观察结果更极端结果出现的概率。本研究将 0.05 和 0.01 作为显著性阈值,符合费希尔^[15]的设定,同时也满足实验的要求。*p*>0.05 表示未达到显著检验水平,0.01<*p*<0.05 为显著水平,*p*<0.01 为极显著水平^[16]。若 *p*<0.05,则采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)进行事后多重比较。

2 结果与讨论

2.1 环境变量的变化

2.1.1 体系 pH 值

图 1 展示了不同重金属离子作用下体系 pH 值随时间的变化规律。由图 1(a)和图 1(c)可以看出, Pb^{2+}

组和 Mn^{2+} 组 pH 值均呈先上升后降低的趋势,峰值均出现在第 5 天。以 10 mg/L Pb^{2+} 组为例,体系 pH 值从初始 7.0 ± 0.2 升至 7.5 ± 0.3 (第 5 天),随后回落至 6.8 ± 0.2 。由图 1(b)和图 1(d)可以看出, Zn^{2+} 组和 Cu^{2+} 组 pH 值整体呈波动上升趋势。以 10 mg/L Zn^{2+} 组为例,pH 值从 7.0 ± 0.2 持续升至 7.7 ± 0.6 。因此,4 组重金属离子对反应体系 pH 值的调控作用存在差异,但整体波动范围在 6.8~7.7,未显著偏离 SRB 最适生长的 pH 值区间(6.5~8.0)。

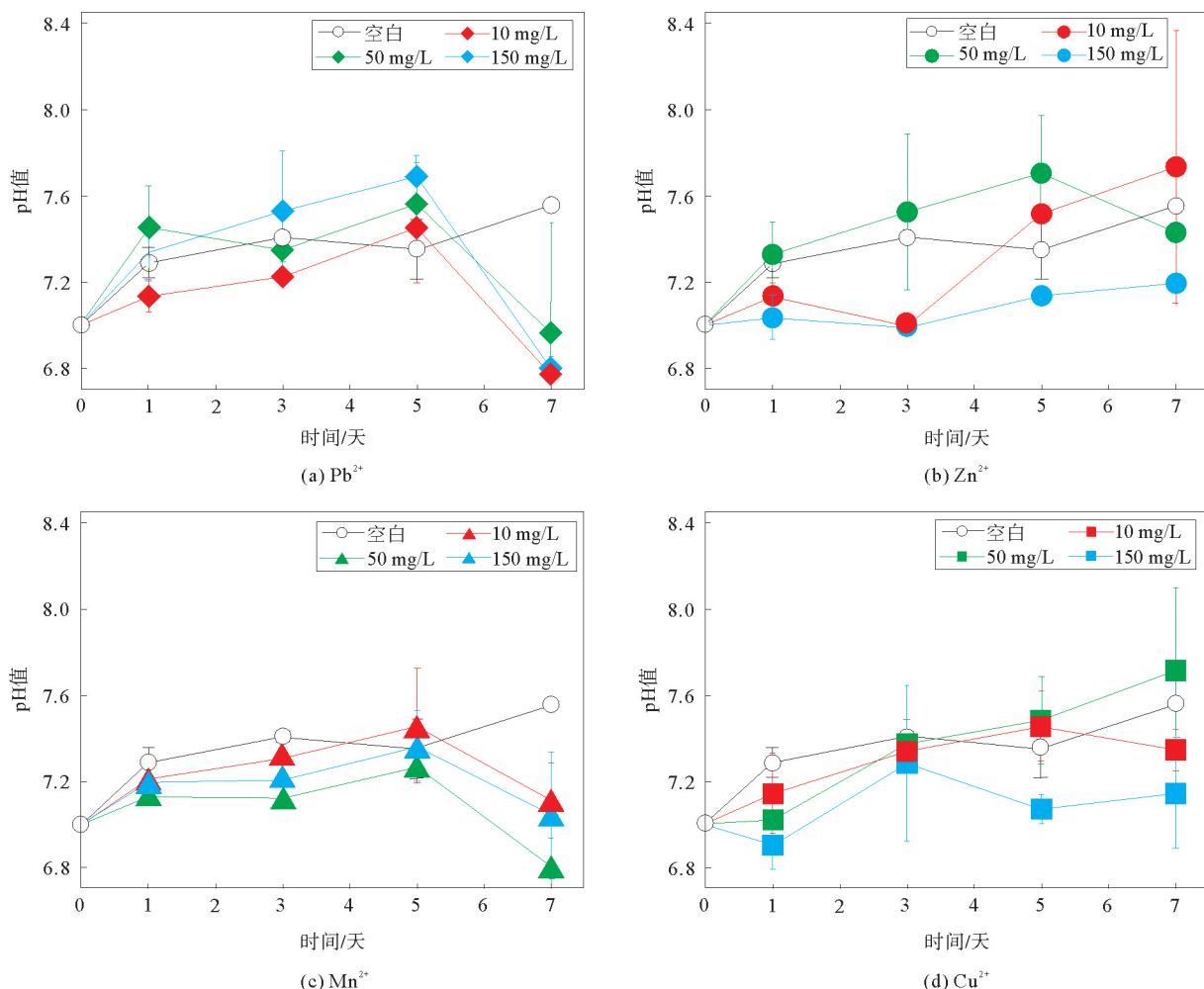


图 1 重金属离子作用下反应体系 pH 值随时间的变化趋势

Fig. 1 Time-dependent variation of pH in the reaction system under the influence of heavy metal ions

2.1.2 体系 ORP

ORP 是表征体系氧化还原状态的关键参数,其值越高表明氧化性越强,越低则还原性越强。在 SRB 还原 SO_4^{2-} 过程中,ORP 值因生物化学反应而持续降低,主要反应路径为:



式中, M^{2+} 为二价重金属离子。反应路径(1)中电子供体的消耗及还原性物质(HS^-)的生成导致 ORP 降低。文献[17]指出,SRB 活性维持需 $\text{ORP} \leq -150 \text{ mV}$ 的强还原环境。

图 2 是不同重金属离子胁迫下,反应体系 ORP 随时间的变化趋势。由图 2 可知,除 150 mg/L 的 Cu^{2+} 外,其余实验组的 ORP 均呈迅速下降再趋于平稳的趋势。以 Pb^{2+} 为例,体系 ORP 从初始的 55.30 mV 分别降至 $-301.00 \pm 71.64 \text{ mV}$ (10 mg/L)、 $-324.23 \pm 12.37 \text{ mV}$ (50 mg/L) 和 $-276.27 \pm 103.93 \text{ mV}$

(150 mg/L), 随后稳定在 -303.60 ± 15.05 mV 和 -344.67 ± 11.99 mV 之间。这是由于将 SRB 接种到模拟废水中, 细菌开始大量繁殖, 其还原 SO_4^{2-} 产生的代谢产物 S^{2-} 浓度增加, 而 S^{2-} 是一种还原剂, 可以增加体系的还原性, 从而导致 ORP 的迅速下降。而对于 150 mg/L 的 Cu^{2+} 来说, ORP 始终维持在 150 mV 左右, 并未达到适合 SRB 生长的还原环境^[17], 因此推断该组 SRB 生长受到抑制。

由图 2 还可以看出, 添加重金属离子后, 反应体系的 ORP 值均高于空白组。推测原因可能是重金属离子的存在对 SRB 的生长起到一定抑制作用, 导致其还原 SO_4^{2-} 的能力降低, 生成的还原产物(S^{2-})低于空白组, 反应体系 ORP 升高。

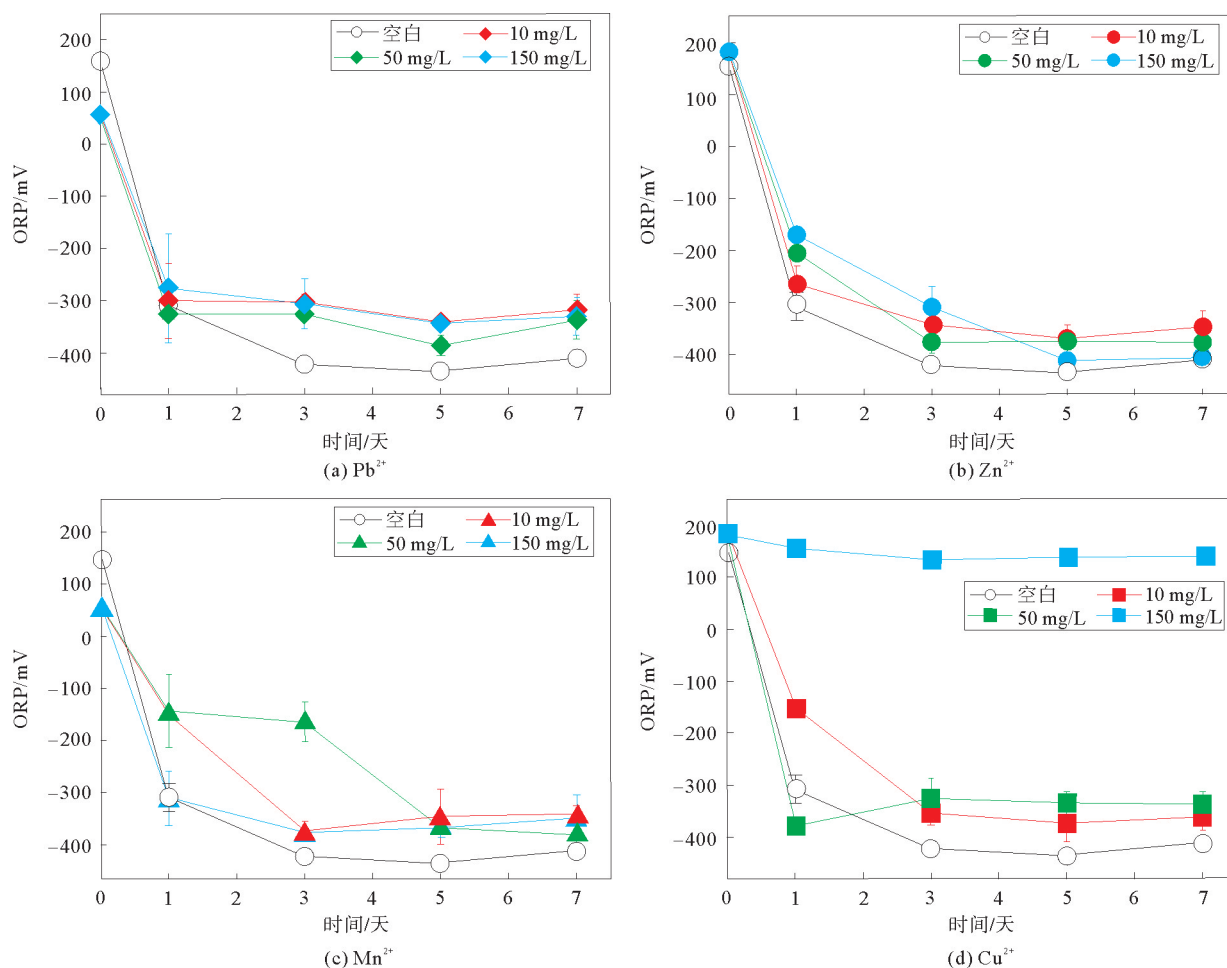


图 2 重金属离子作用下反应体系 ORP 随时间的变化趋势

Fig. 2 Time-dependent variation of ORP in the reaction system under the influence of heavy metal ions

2.2 重金属离子对功能基因 DSRB 的影响

为解析重金属离子对 SRB 生长的抑制效应, 本研究利用 qPCR 技术定量检测反应体系中 DSRB 功能基因拷贝数。如图 3 所示, 不同重金属离子作用下 DSRB 基因拷贝数(每毫升废水中的量, 单位为 copies/mL)存在差异。基因拷贝数的平均值以 Zn^{2+} 组最大, 为 $(1.14 \pm 1.25) \times 10^6$ copies/mL, Cu^{2+} 组和 Mn^{2+} 组次之, 分别为 $(7.68 \pm 8.91) \times 10^5$ copies/mL 和 $(6.44 \pm 7.46) \times 10^5$ copies/mL, Pb^{2+} 组最低, 仅为 $(5.57 \pm 6.33) \times 10^5$ copies/mL。DSRB 功能基因拷贝数可以作为衡量反应体系中 SRB 活性的指标, 基因拷贝数越低表示重金属离子对 SRB 的抑制作用越强。上述结果表明, 重金属离子对 SRB 生长的抑制作用强弱依次为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。该结果与王森等^[1]关于 Cu^{2+} 抑制作用最强的结论存在差异。原因可能是本研究以功能基因丰度为核心指标, 而文献^[1]基于平板计数评估, 另外不同 SRB 菌株对重金属离子胁迫的响应存在差异。

由图 3 还可以看出,当重金属离子浓度为 150 mg/L 时,各实验组 DSRB 基因拷贝数均达到最低值: Cu^{2+} 组为 $(4.72 \pm 3.53) \times 10^5$ copies/mL, Zn^{2+} 组为 $(1.19 \pm 0.49) \times 10^6$ copies/mL, Mn^{2+} 组为 $(1.61 \pm 1.06) \times 10^5$ copies/mL, Pb^{2+} 组为 $(1.42 \pm 0.79) \times 10^5$ copies/mL,表明高浓度重金属离子对 SRB 生长的抑制作用显著增强。通过 SPSS 软件进行 Pearson 相关性分析发现, Zn^{2+} 与 Mn^{2+} 浓度与 SRB 功能基因 (DSRB) 拷贝数呈负相关性 ($r = -1$), $p < 0.01$ 为极显著水平, Pb^{2+} 与 Cu^{2+} 浓度与 DSRB 拷贝数虽呈负相关趋势 ($r = -0.5$),但未达到显著检验水平 ($p > 0.05$)。上述结果表明, Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 对 SRB 生长的抑制作用随浓度的升高而显著增强,但 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 的浓度效应未达到显著水平。

2.3 SRB 对 SO_4^{2-} 的去除效能

2.3.1 SO_4^{2-} 浓度

图 4 展示了重金属离子作用下反应体系中 SO_4^{2-} 浓度随时间的变化规律。如图 4(a) 所示,添加不同浓度 Pb^{2+} 后, SO_4^{2-} 浓度均呈先下降后趋于稳定的趋势,其最终浓度分别为 $1\,939.13 \pm 129.75$ mg/L (10 mg/L)、 $1\,890.33 \pm 39.80$ mg/L (50 mg/L) 和 $1\,748.60 \pm 89.26$ mg/L (150 mg/L),显著高于空白对照组 ($1\,328.80 \pm 22.34$ mg/L, $p < 0.01$),表明 Pb^{2+} 的添加显著抑制了 SRB 对 SO_4^{2-} 的去除效率。如图 4(b) 所示, Zn^{2+} 作用组中 SO_4^{2-} 浓度从初始 3 000 mg/L 分别降至 $1\,347.40 \pm 117.65$ mg/L (10 mg/L)、 $1\,254.27 \pm 61.62$ mg/L (50 mg/L) 和 $1\,117.33 \pm 36.89$ mg/L (150 mg/L),高于空白组 ($p < 0.01$),达到极显著水平。有研究证明^[18],虽然 Zn^{2+} 是 SRB 生长的必需微量元素,但其浓度超过阈值时会产生毒性效应,抑制 SRB 活性并降低 SO_4^{2-} 还原效率,与本实验结果一致。如图 4(c) 所示, Mn^{2+} 组 SO_4^{2-} 浓度分别为 $1\,770.67 \pm 118.42$ mg/L (10 mg/L)、 $1\,719.33 \pm 191.41$ mg/L (50 mg/L) 和 $1\,645.07 \pm 52.16$ mg/L (150 mg/L),均高于空白对照组 ($p < 0.01$),达到极显著水平,证实 Mn^{2+} 对 SO_4^{2-} 的去除具有抑制作用。如图 4(d) 所示, Cu^{2+} 组 SO_4^{2-} 浓度随离子浓度增加呈上升趋势 ($1\,618.00 \pm 166.80$ 、 $1\,904.47 \pm 364.83$ 、 $2\,300.00 \pm 101.53$ mg/L),经 t 检验分析,各浓度组与空白组差异均达显著水平 ($p < 0.05$),说明 Cu^{2+} 对 SRB 的 SO_4^{2-} 还原功能具有显著抑制效应。

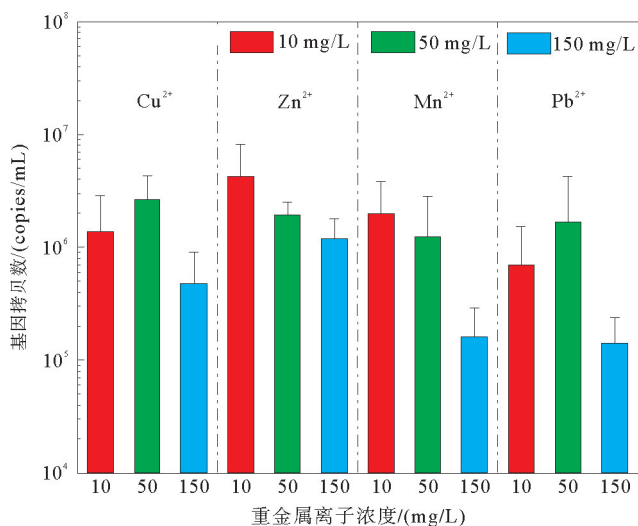
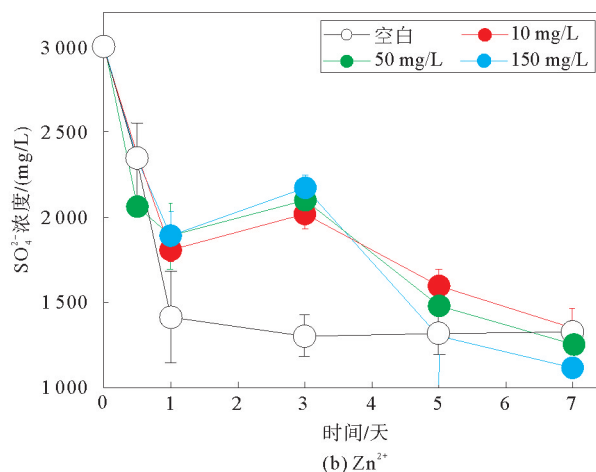
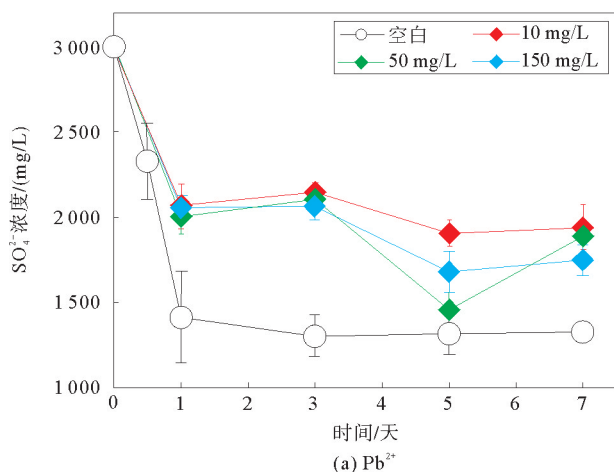


图 3 重金属离子作用下反应体系 DSRB 功能基因拷贝数

Fig. 3 DSRB functional gene copy number under the influence of heavy metal ions



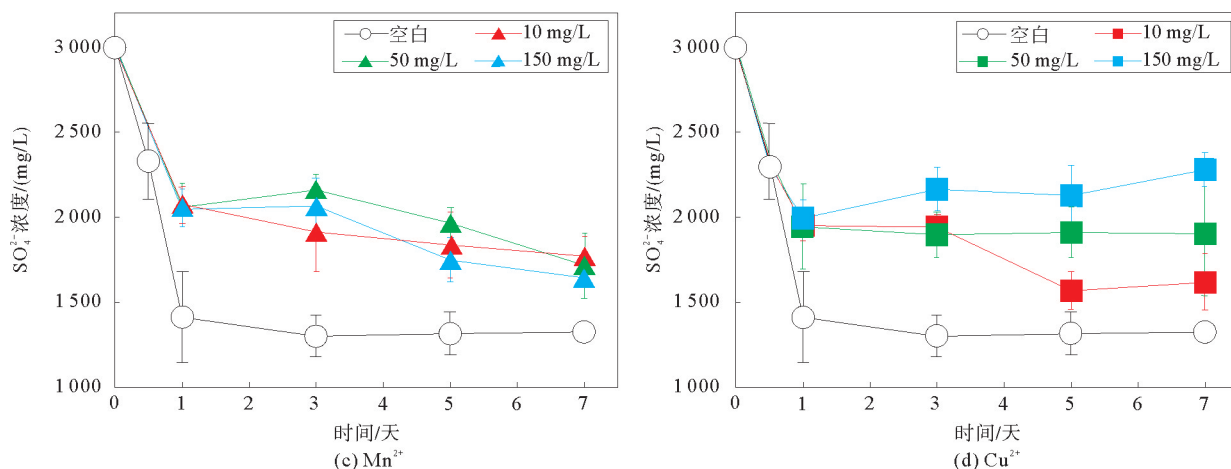
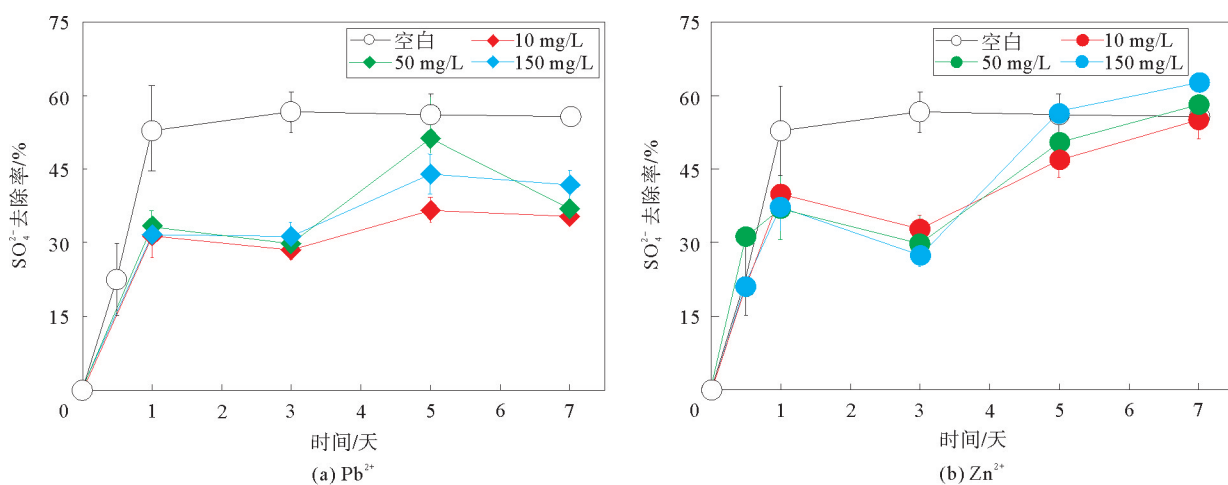
图 4 重金属离子作用下反应体系中 SO_4^{2-} 浓度随时间的变化趋势

Fig. 4 Time-dependent variation in the concentration of SO_4^{2-} under the influence of heavy metal ions

2.3.2 SO_4^{2-} 去除率

图 5 展示了不同重金属离子作用下 SO_4^{2-} 去除率随时间的动态变化。由图 5 可以看出,所有重金属离子组的 SO_4^{2-} 去除率均低于空白对照组。如图 5(a) 所示, Pb^{2+} 组实验 SO_4^{2-} 去除率分别为 $35.36\% \pm 4.32\%$ (10 mg/L)、 $36.99\% \pm 1.33\%$ (50 mg/L) 和 $41.71\% \pm 2.98\%$ (150 mg/L), 低于空白对照组 ($55.71\% \pm 0.74\%$), 达到极显著水平 ($p < 0.01$), 表明 Pb^{2+} 对 SRB 的 SO_4^{2-} 还原过程具有抑制作用。图 5(b) 中, Zn^{2+} 组中 SO_4^{2-} 去除率随浓度增加呈递增趋势 ($55.09\% \pm 3.92\%$ 、 $58.19\% \pm 2.05\%$ 、 $62.76\% \pm 1.23\%$), 均高于空白对照组。研究^[19]表明, SRB 可通过 EPS 吸附 Zn^{2+} 以缓解其毒性, 从而维持 SO_4^{2-} 还原活性。此外, 锌元素是 SRB 代谢必需的微量营养因子, 低浓度 (< 50 mg/L) Zn^{2+} 可促进菌体增殖, 因此建议将 Zn^{2+} 浓度控制在 50 mg/L 以下以优化 SRB 活性。图 5(c) 表明, Mn^{2+} 组 SO_4^{2-} 去除率分别为 $40.98\% \pm 3.95\%$ 、 $42.69\% \pm 6.38\%$ 和 $45.16\% \pm 1.74\%$, 低于空白组, 并达到极显著水平 ($p < 0.01$), 说明 Mn^{2+} 对 SO_4^{2-} 还原存在浓度依赖性抑制。图 5(d) 显示, Cu^{2+} 组 SO_4^{2-} 的去除率随浓度升高从 $46.07\% \pm 5.56\%$ (10 mg/L) 降至 $23.33\% \pm 3.38\%$ (150 mg/L), Pearson 相关性分析表明两者呈负相关性 ($r = -0.79$), 且达到极显著水平 ($p < 0.01$), 说明高浓度 Cu^{2+} 对 SRB 的抑制作用显著增强。此外, 通过 Pearson 相关性分析还发现, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 浓度与 SO_4^{2-} 去除率呈正相关性 ($r = 0.22$ 、 0.10 、 0.12), 但未达到显著检验水平 ($p > 0.05$)。



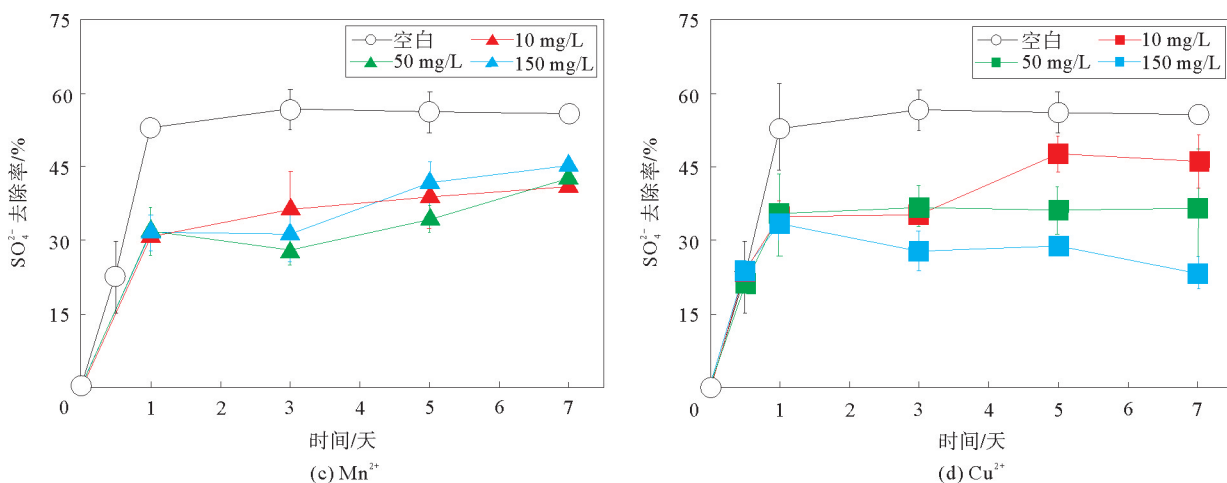


图 5 重金属离子作用下反应体系 SO_4^{2-} 去除率随时间的变化趋势

Fig. 5 Time-dependent variation in the removal efficiency of SO_4^{2-} under the influence of heavy metal ions

结合实验数据可知,4 组重金属离子对 SRB 的 SO_4^{2-} 去除率均产生抑制效应,但抑制强度存在差异:以 1~7 天 SO_4^{2-} 平均去除率为评价指标,抑制强度依次为 Cu^{2+} ($35.16\% \pm 6.55\%$) $>$ Pb^{2+} ($35.98\% \pm 6.46\%$) $>$ Mn^{2+} ($36.10\% \pm 5.37\%$) $>$ Zn^{2+} ($44.52\% \pm 11.53\%$),与已有研究^[10]中 Cu^{2+} 抑制最强、 Zn^{2+} 最弱的结论一致。然而,该抑制顺序与 DSRB 基因拷贝数反映的 SRB 生长抑制规律($\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$)存在显著差异,说明重金属离子除抑制菌体生长外,还可能通过干扰硫酸盐还原酶活性^[9]或电子传递功能等途径影响 SO_4^{2-} 代谢过程。此外, Cu^{2+} 抑制作用呈显著浓度依赖性(150 mg/L 时抑制最强),其作用机制可能与 Cu^{2+} 及其沉淀物对 SRB 细胞膜和酶活性的双重毒性有关。 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 的浓度变化与 SO_4^{2-} 去除率无明显的相关关系。

2.4 SRB 对重金属离子的去除效能

2.4.1 重金属离子浓度

图 6 为不同反应体系中重金属离子浓度随时间的动态变化规律。如图 6(a)所示, Pb^{2+} 浓度随反应时间的增加呈显著下降趋势,实验结束时降幅分别达 $99.70\% \pm 0.51\%$ (10 mg/L)、 $100\% \pm 0.00\%$ (50 mg/L) 和 $99.86\% \pm 0.10\%$ (150 mg/L)。如图 6(b)所示, Zn^{2+} 浓度也呈与 Pb^{2+} 类似趋势,降幅分别为 $92.61\% \pm 8.04\%$ (10 mg/L)、 $96.85\% \pm 3.84\%$ (50 mg/L) 和 $99.56\% \pm 0.13\%$ (150 mg/L),表明 SRB 对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 具有高效去除能力。研究^[8]表明,SRB 主要通过以下机制去除重金属:①生物还原作用生成 S^{2-} ,与重金属离子形成硫化物沉淀;②体系 pH 值上升促使氢氧化物/碳酸盐沉淀的生成;③SRB 细胞表面负电荷及 EPS 吸附金属离子。研究^[20]表明,EPS 中的羧基、脂肪烃及氨基官能团在吸附过程中起关键作用。由图 6(c)可知, Mn^{2+} 浓度分别降至 5.074 mg/L (10 mg/L)、8.974 mg/L (50 mg/L) 和 8.617 mg/L (150 mg/L),降幅分别为 $49.26\% \pm 1.26\%$ 、 $82.05\% \pm 4.75\%$ 和 $94.26\% \pm 3.08\%$,显著低于 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 组。推测原因可能与 MnS 溶度积较大 ($K_{sp} = 1.4 \times 10^{-15}$) 及沉淀所需 pH 值较高有关。由图 6(d)可知, Cu^{2+} 在低浓度 (10 mg/L 和 50 mg/L) 时去除效果良好,而 150 mg/L 组仅在反应前期部分去除。结合图 2(d)中 ORP 变化可知,高浓度 Cu^{2+} 导致体系 ORP 超出 SRB 代谢适宜范围,抑制其活性并阻碍 Cu^{2+} 的持续去除。

表 2 方差分析表明,三种浓度下重金属离子去除效果存在组间差异,且达到极显著水平 ($p < 0.01$)。具体而言,10 mg/L 组中,多重比较显示 Mn^{2+} 残留浓度最高, Pb^{2+} 最低,表明 Pb^{2+} 去除效果最好, Mn^{2+} 最差。50 mg/L 组重金属离子残留浓度排序与 10 mg/L 组一致。高浓度 150 mg/L 组中,残留浓度最低的重金属离子为 Zn^{2+} ,表明 Zn^{2+} 去除效果最优, Mn^{2+} 仍为最差。

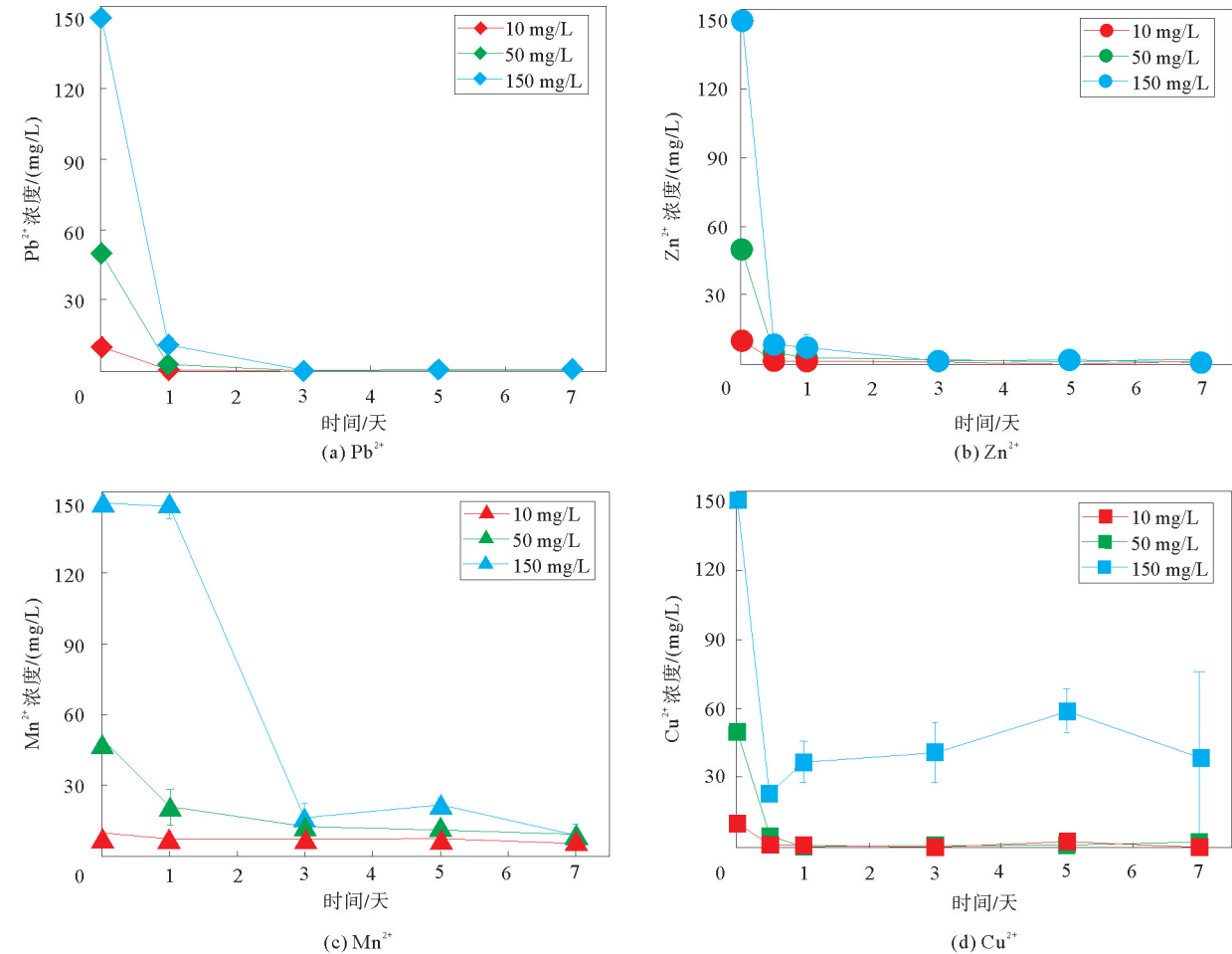


图 6 反应体系中重金属离子浓度随时间的变化趋势

Fig. 6 Time-dependent variation in the concentration of heavy metal ions

表 2 重金属离子浓度方差分析结果

Table 2 ANOVA results of heavy metal ion concentrations

浓度/(mg/L)	<i>p</i>	事后多重比较(LSD 检验)
10	<0.01	$\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, $\text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$
50	<0.01	$\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, $\text{Zn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$
150	<0.01	$\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, $\text{Mn}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$

2.4.2 重金属离子去除率

图 7 为重金属离子去除率随时间的动态变化规律。如图 7 所示,反应第 7 天时, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} 的平均去除率分别为 $99.85\% \pm 0.29\%$ 、 $96.34\% \pm 5.39\%$ 、 $75.19\% \pm 20.36\%$ 和 $89.29\% \pm 16.66\%$ 。SRB 对重金属离子的去除率排序为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, 表明 Pb^{2+} 与 Zn^{2+} 可被 SRB 高效去除,而 Mn^{2+} 及 150 mg/L Cu^{2+} 则存在显著残留。分析认为, PbS (溶度积 $K_{\text{sp}} = 2.3 \times 10^{-44}$)、 CuS ($K_{\text{sp}} = 8.5 \times 10^{-45}$) 和 ZnS ($K_{\text{sp}} = 1.6 \times 10^{-24}$) 的溶度积显著小于 MnS ($K_{\text{sp}} = 1.4 \times 10^{-15}$), 导致 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 更易与 S^{2-} 结合形成稳定硫化物沉淀,而 Mn^{2+} 因 MnS 在弱酸性条件下易分解,需通过氧化为 Mn^{4+} 或形成氢氧化物/碳酸盐沉淀去除。而在 150 mg/L 的 Cu^{2+} 组,DSRB 基因拷贝数未达最低值(图 3),表明其抑制作用并非直接抑制 SRB 生长。结合图 2(d)中 ORP 数据可知,当 ORP 大于 100 mV 时,SRB 代谢活性受阻,导致 S^{2-} 生成量减少,进而削弱 Cu^{2+} 的硫化物沉淀路径。

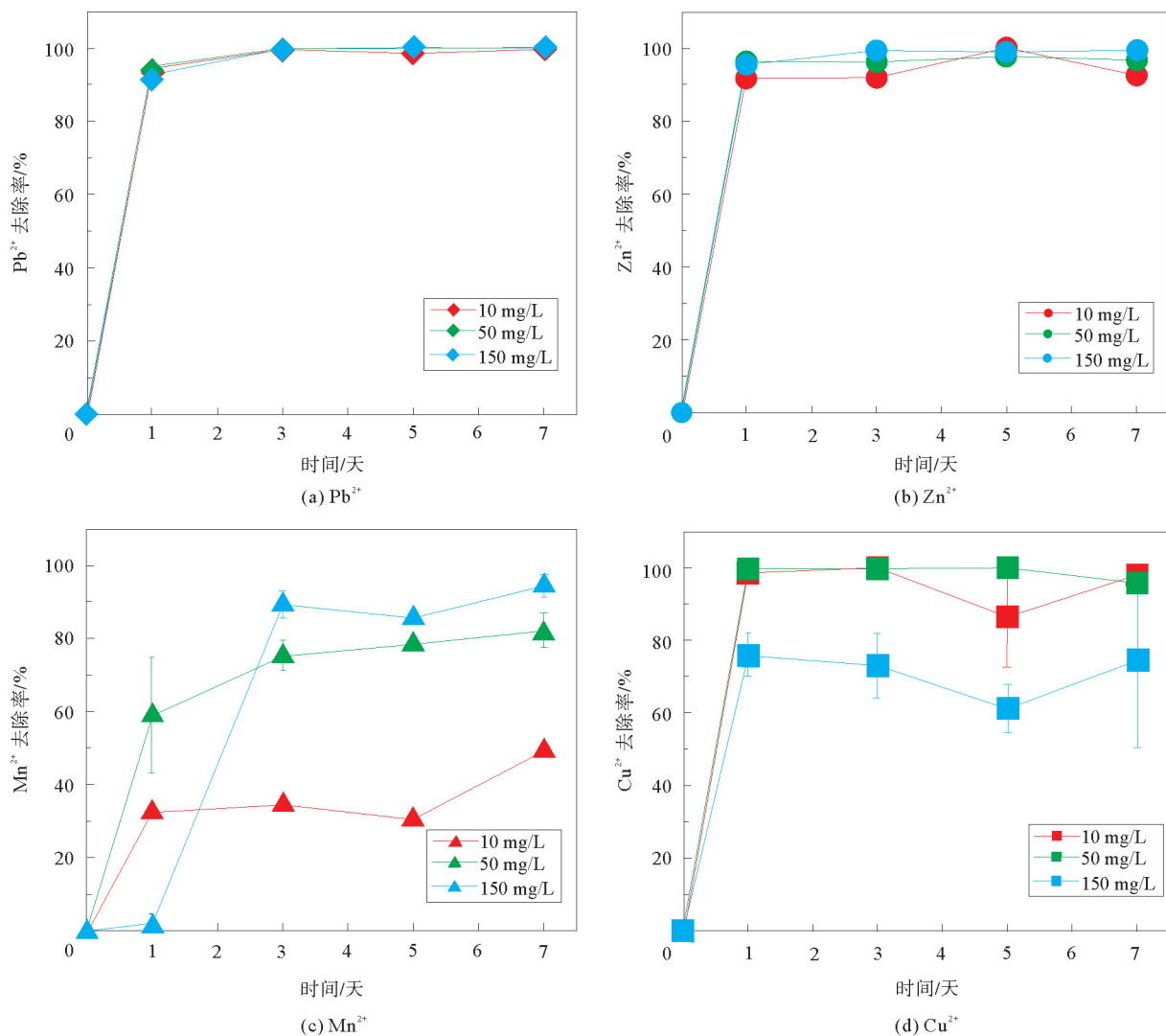


图 7 反应体系中重金属离子去除率随时间变化图

Fig. 7 Time-dependent variation in the removal efficiency of heavy metal ions

2.5 相关性分析

相关性分析可量化不同变量间的关系,解析其关联强度与显著性。本研究对实验结束时的水质参数进行 Pearson 相关性分析(图 8)。结果表明,pH 值与 SRB 基因拷贝数呈显著正相关性($r=0.78$),达到极显著水平($p<0.01$),表明中性环境(pH 值 6.5~8.0)更利于 SRB 维持代谢活性,其生长过程中可通过调节 H^+ 浓度优化局部微环境的 pH 值。重金属离子浓度与 ORP 呈正相关性($r=0.67$),达到显著水平($p<0.05$),与 SO_4^{2-} 去除率呈负相关性($r=-0.59$),达到显著水平($p<0.05$)。由此表明,高浓度重金属离子抑制 SRB 还原代谢功能,导致 S^{2-} 生成量减少(ORP 升高)及 SO_4^{2-} 去除率下降。重金属离子浓度与 SRB 基因拷贝数呈负相关关系($r=-0.33$),但未达到显著检验水平($p>0.05$)。pH 值与 ORP 呈弱负相关性($r=-0.26$),未达到显著检验水平($p>0.05$),这与文献[18]报道的 SRB 代谢导致 pH 值升高和 ORP 降低的规律一致。其机制为 SRB 还原 SO_4^{2-} 时消耗 H^+ ,同时生成的 S^{2-} 与游离 H^+ 结合($S^{2-} + 2H^+ \rightarrow H_2S \uparrow$),共同促使体系的 pH 值上升。

3 结论

本研究通过开展室内批量实验探究重金属离子胁迫下 SRB 对模拟酸性矿山废水的修复效能,得出以下结论。

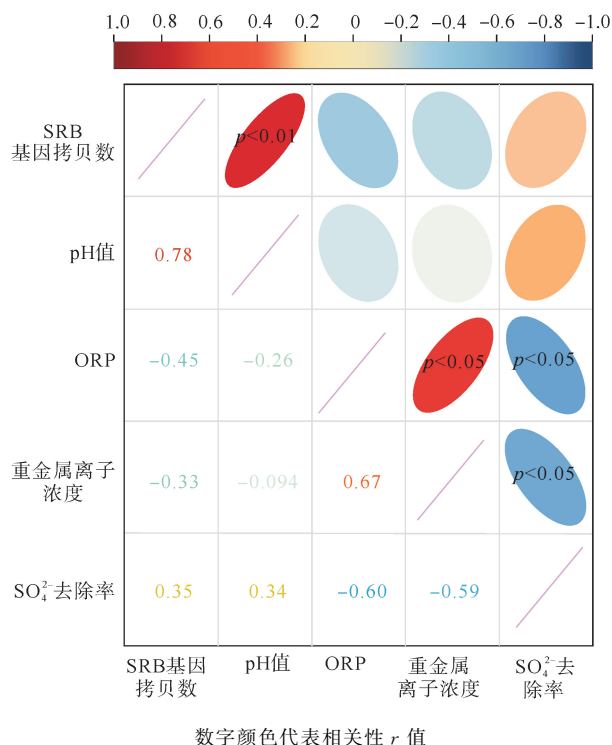


图 8 反应体系理化参数 Pearson 相关性热图

Fig. 8 Pearson correlation heat map of physicochemical parameters with significance levels

1) 添加重金属离子后,反应体系 pH 值为 6.8~7.7,而 ORP 整体呈下降趋势,表明 SRB 代谢活动促进还原环境的形成。

2) 不同重金属离子胁迫下,DSRB 基因拷贝数排序为 Zn^{2+} ($(1.14 \pm 1.25) \times 10^6$ copies/mL) $>$ Cu^{2+} ($(7.68 \pm 8.91) \times 10^5$ copies/mL) $>$ Mn^{2+} ($(6.44 \pm 7.46) \times 10^5$ copies/mL) $>$ Pb^{2+} ($(5.57 \pm 6.33) \times 10^5$ copies/mL),重金属离子对 SRB 生长的抑制作用强弱依次为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。以 SO_4^{2-} 平均去除率为评价指标,重金属离子对 SO_4^{2-} 去除率的抑制作用强弱排序为 Cu^{2+} ($35.16\% \pm 6.55\%$) $>$ Pb^{2+} ($35.98\% \pm 6.46\%$) $>$ Mn^{2+} ($36.10\% \pm 5.37\%$) $>$ Zn^{2+} ($44.52\% \pm 11.53\%$),其中 Cu^{2+} 抑制效应呈浓度依赖性,而 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 与浓度无显著相关性。

3) 重金属离子去除率排序为 Pb^{2+} ($99.85\% \pm 0.29\%$) $>$ Zn^{2+} ($96.34\% \pm 5.39\%$) $>$ Cu^{2+} ($89.29\% \pm 16.66\%$) $>$ Mn^{2+} ($75.19\% \pm 20.36\%$)。 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 及低浓度 Cu^{2+} (≤ 50 mg/L) 可被 SRB 高效去除,而 Mn^{2+} 与高浓度 Cu^{2+} (150 mg/L) 因硫化物溶度积较大 ($K_{\text{sp}} = 1.4 \times 10^{-15}$) 及 ORP 超阈值 (> 100 mV) 导致去除不完全。

参考文献:

- [1] 王森,李泽兵,孙晓宇,等. 硫酸盐还原菌处理酸性矿山废水研究进展[J]. 有色金属(矿山部分),2022,74(6):10-18.
WANG Miao, LI Zebing, SUN Xiaoyu, et al. Research progress on the treatment of acid mine drainage by sulfate-reducing bacteria[J]. Nonferrous Metals(Mining Section), 2022, 74(6): 10-18.
- [2] 张军伟,刘顺,文雯,等. 矿山酸性废水治理与综合利用研究进展[J]. 资源环境与工程,2023,37(6):734-740.
ZHANG Junwei, LIU Shun, WEN Wen, et al. Research progress in the treatment and comprehensive utilization of acid mine drainage water[J]. Resources Environment & Engineering, 2023, 37(6): 734-740.
- [3] YU M M, FENG J, YANG Q, et al. Inhibition of organosilane/ATP@HQ self-healing passivator for pyrite oxidation[J/OL]. Chemosphere, 2022, 287. DOI:10.1016/j.chemosphere. 2021. 132342.
- [4] 钟萍丽,伍赠玲,季常青,等. 酸性矿山废水生物矿化源头控制技术研究进展[J]. 湿法冶金,2022,41(4):289-294.

- ZHONG Pingli, WU Zengling, JI Changqing, et al. Research progress on source control technologies of biological mineralization for acid mine drainage[J]. Hydrometallurgy of China, 2022, 41(4): 289-294.
- [5] JIAO Y N, ZHANG C H, SU P D, et al. A review of acid mine drainage: Formation mechanism, treatment technology, typical engineering cases and resource utilization[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2023, 170: 1240-1260.
- [6] 李向东, 杜雪虹, 董佳甜. PRB处理酸性矿山废水的地球化学反应模拟研究[J]. 煤炭学报, 2023, 48(3): 1345-1352.
- LI Xiangdong, DU Xuehong, DONG Jiatian. Simulation study on geochemical reaction of PRB in treating acid mine drainage[J]. Journal of China Coal Society, 2023, 48(3): 1345-1352.
- [7] 李萌晓, 赵林, 陈达颖, 等. 硫酸盐还原菌处理酸性矿山废水的研究进展[J]. 应用化工, 2023, 52(12): 3439-3443.
- LI Mengxiao, ZHAO Lin, CHEN Daying, et al. Research progress of acid mine wastewater treatment by sulfate-reducing bacteria[J]. Applied Chemical Industry, 2023, 52(12): 3439-3443.
- [8] WANG H, WANG X H, ZHANG Y T, et al. Sulfate-reducing bacteria-based bioelectrochemical system for heavy metal wastewater treatment: Mechanisms, operating factors, and future challenges[J/OL]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2023, 951. DOI:10.1016/j.jelechem.2023.117945.
- [9] 闫函, 许真真, 李静, 等. 一种盐螺旋菌耐盐耐碱蛋白酶的分离纯化及性质研究[J]. 山东科技大学学报(自然科学版), 2021, 40(6): 37-42.
- YAN Han, XU Zhenzhen, LI Jing, et al. Purification and characterization of a salt and alkali tolerant protease from *Salinispirillum marinum*[J]. Journal of Shandong University of Science and Technology(Natural Science), 2021, 40(6): 37-42.
- [10] ZHANG Z, ZHANG C H, YANG Y, et al. A review of sulfate-reducing bacteria: Metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment[J/OL]. Journal of Cleaner Production, 2022, 376. DOI:10.1016/j.jclepro.2022.134109.
- [11] 董鹏. 以农林废弃物为碳源的SRB处理酸性矿山废水的研究[D]. 济南: 济南大学, 2023: 11-13.
- DONG Peng. Study on the treatment of acid mine drainage with SRB using agricultural and forestry wastes as carbon source[D]. Jinan: University of Jinan, 2023: 11-13.
- [12] 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准——引用天然矿泉水检验方法: GB 8538—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [13] 庞国涛, 李伟, 杨源祯, 等. 广西防城港海域表层海水重金属和富营养化特征分析与评价[J]. 中国地质调查, 2024, 11(4): 82-91.
- PANG Guotao, LI Wei, YANG Yuanzhen, et al. Analysis and evaluation of heavy metal and eutrophication characteristics in the surface seawater of Fangchenggang Sea in Guangxi[J]. Geological Survey of China, 2024, 11(4): 82-91.
- [14] 肖高强, 陈杰, 白兵, 等. 云南典型地质高背景区土壤重金属含量特征及污染风险评价[J]. 地质与勘探, 2021, 57(5): 1077-1086.
- XIAO Gaoqiang, CHEN Jie, BAI Bing, et al. Content characteristics and risk assessment of heavy metals in soil of typical high geological background areas, Yunnan Province[J]. Geology and Exploration, 2021, 57(5): 1077-1086.
- [15] FISHER R A. Statistical methods for research workers[M]. New York: Springer, 1925: 66-70.
- [16] 吕伟伟, 姚昕, 张保华, 等. 基于地统计学分析的太湖颗粒态和溶解态氮、磷营养盐时空分布特征及来源分析[J]. 环境科学, 2019, 40(2): 590-602.
- LÜ Weiwei, YAO Xin, ZHANG Baohua, et al. Temporal-spatial distribution of nitrogen and phosphorus nutrients in lake Taihu based on geostatistical analysis[J]. Environmental Science, 2019, 40(2): 590-602.
- [17] DONG Y R, WANG J B, GAO Z Q, et al. Study on growth influencing factors and desulfurization performance of sulfate reducing bacteria based on the response surface methodology[J]. ACS Omega, 2023, 8: 4046-4059.
- [18] DONG Y R, GAO Z Q, DI J Z, et al. Study on the effectiveness of sulfate-reducing bacteria to remove Pb(II) and Zn(II) in tailings and acid mine drainage[J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15. DOI:10.3389/fmicb.2024.1352430.
- [19] 甘雨, 宋卫锋, 杨佐毅, 等. 外源硫诱导下的 *Desulfovibrio desulfuricans* sub sp. EPS特性及对 Zn(II) 的吸附[J]. 中国环境科学, 2022, 42(11): 5144-5152.
- GAN Yu, SONG Weifeng, YANG Zuoyi, et al. The EPS characteristics of *desulfovibrio desulfuricans* sub sp. and its adsorption performance for Zn(II) under exogenous sulfur induction[J]. China Environmental Science, 2022, 42(11): 5144-5152.
- [20] SU Z, LI X, XI Y N, et al. Microbe-mediated transformation of metal sulfides: Mechanisms and environmental significance[J/OL]. Science of the Total Environment, 2022, 825. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.153767.

(责任编辑:高丽华)