

祝传静, 孙晶晶, 黄建洪, 等. 基于硫酸盐还原菌的气提内循环反应器处理酸性矿山废水[J]. 环境工程学报, 2020, 14(4): 970-976.

ZHU Chuanjing, SUN Jingjing, HUANG Jianhong, et al. Treatment of acid mine drainage by a gas stripping internal circulation reactor with sulfate reducing bacteria[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2020, 14(4): 970-976.

基于硫酸盐还原菌的气提内循环反应器处理酸性 矿山废水

祝传静,孙晶晶,黄建洪,李柳青,田森林,胡学伟*

昆明理工大学环境科学与工程学院,昆明 650500

第一作者:祝传静(1994—),女,硕士研究生。研究方向:水污染控制。E-mail: zc.jing135294@qq.com *通信作者:胡学伟(1979—),男,博士,教授。研究方向:水污染控制。E-mail: huxuewei.env@gmail.com

摘 要 针对硫酸盐还原菌 (SRB)处理酸性矿山废水 (AMD) 易受酸、重金属、代谢产物硫离子等多重毒性抑制的问题,采用气提内循环反应器对 AMD 进行处理,研究了反应器内涉硫组分的演变、产碱效率、微生物群落结构、重金属的去除效果。结果表明:气体内循环反应器可有效解除多重毒性抑制,体系中硫酸盐去除率由36.5%提升至91.24%;且其产碱效率提升了3倍,明显优于传统反应器,脱硫弧菌属的相对丰度也由48%提升至73%;硫化氢与重金属反应得到金属硫化物纯度可达98.12%,出水中 Cu²⁺和 Zn²⁺浓度分别为0和2 mg·L⁻¹,可达到《污水综合排放标准》二级标准。以上结果可为 SRB 生物技术处理 AMD 的高效控制提供参考。 关键词 酸性矿山废水;硫酸盐还原菌;气提内循环反应器;毒性抑制

矿山开发导致硫化矿物暴露于氧化环境中,产生大量的酸性矿山废水 (acid mine drainage, AMD), AMD 具有低 pH、高重金属和硫酸盐的特点^[1-3],会对矿区周围水生和土壤生态系统造成严重污染。传统处理方法为化学沉淀法^[4],如石灰中和,但其存在废渣产量大、重金属含量高、金属资源浪费等问题,故限制了其大规模的应用。

硫酸盐还原菌 (sulfate reducing bacteria, SRB) 生物处理技术是一种有效治理 AMD 的方法,其 主要反应过程为:SRB 在还原氛围中将SO₄²⁻还原为 S²⁻,代谢产物 S²⁻与 AMD 中重金属离子形成硫化矿 物^[5-7]。但 SRB 活性易受 AMD (酸、重金属)、代谢产物 S²⁻等毒性抑制,从而导致其处理 AMD 效率 降低。周立祥^[8]和狄军贞等^[9]发现,SRB 最适 pH 为中性,在 pH<5 的 AMD 中,其处理活性较差。 UTGIKAR 等^[10]、GUO 等^[11]、曹恒恒等^[12]发现,Zn²⁺、Cu²⁺(≥20 mg·L⁻¹)等重金属对 SRB 具有毒性 抑制作用,且金属硫化物 (金属离子与生物硫化物反应形成)是阻碍硫酸盐、有机物进入生物体系 的屏障。LEWIS 等^[13]将 SRB 生化出水直接与 AMD 混合反应,发现水相中多硫化物络合物不利于 金属去除,且金属沉淀物中包含未知复合物。BIJMANS 等^[14]报道,硫化物会抑制 SRB 生长,硫化 物的去除可提高 SRB 活性。汪琦^[15]采用两级循环气提工艺,有效解除了 H₂S 对菌群 (SRB、产酸

收稿日期: 2019-06-16; 录用日期: 2019-10-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (51668026);国家重点研发计划课题 (2018YFC1802603)

菌、产甲烷菌)的毒性抑制。任立人等^[16]采用两相厌氧-气提生化法,有效地解除了H₂S对高含硫 抗生素有机废水内SRB、产甲烷菌的毒性抑制。上述研究仅提出了对SRB活性抑制因素和单一因 素的解除,鲜少涉及全面解除SRB(处理AMD)的多重毒性抑制和有效促进SRB活性的研究。

本研究采用气提内循环反应器对 AMD 进行了处理,考察了反应器内涉硫组分的演变、产碱效率、微生物群落结构、重金属的去除,并对重金属沉淀物的纯度进行了分析;综合评估了气提内循环反应器内毒性抑制的解除效果及重金属回收,为 AMD 的 SRB 处理及有价金属回收提供应用指导和参考。

1 材料与方法

1.1 生物来源及培养

SRB 菌种由课题组前期驯化所得。培养基的组成为 0.06 g·L⁻¹ CaCl₂·6H₂O、1.0 g·L⁻¹ NH₄Cl、0.5 g·L⁻¹ K₂HPO₄、0.738 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.8 g·L⁻¹ Na₂SO₄、1 g·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O、6 mL·L⁻¹ 乳酸钠 (COD 为 2 000 mg·L⁻¹)。SRB 反应器运行控制参数为温度 (25±2) °C、pH 6.7~7.0。酸性矿山废水的水质参数 为 pH 3.01、21 mg·L⁻¹ Cu²⁺、199 mg·L⁻¹ Fe²⁺、30 mg·L⁻¹ Zn²⁺、28.5 mg·L⁻¹ Mn²⁺、1 098 mg·L⁻¹ SO₄²⁻。

1.2 实验装置及操作

实验装置如图 1 所示。主要由 SRB 反应器 (总体积 4 L,其底部设有曝气装置)、硫化沉淀反应器 (总体积 3 L)、气泵、中和沉淀池组成;反应装置制备材料均为有机玻璃;反应器中 AMD 的进水量为 3 L·d⁻¹,中和排水量为 3 L·d⁻¹;在反应器运行过程中,采用气泵将循环 N₂(气体流量为 0.005 L·min⁻¹)引入 SRB 反应器,SRB 代谢过程中产生的 H₂S 被吹脱至硫化沉淀反应器;将中和沉淀池的上清液与培养基混合作为物料引入 SRB 反应器。传统反应器为有机玻璃 SRB 反应器 (总体积 4 L),将AMD(进水量为 3 L·d⁻¹)和培养基混合,直接引入该 SRB 反应器,反应过程中不进行吹脱,反应后排水量为 3 L·d⁻¹。



图 1 气提内循环反应器操作流程 Fig. 1 Operation procedure of the gas stripping internal circulation reactor

1.3 实验方案

气提内循环反应器 (SRB 反应器)、传统反应器中菌液接种量均为 20%。每隔 2 h,对气提内循 环反应器 (SRB 反应器)、传统反应器内涉硫组分 (SO₄²⁻、SO₃²⁻、H₂S、S²⁻) 进行检测;每隔 3 h,对气 提内循环反应器 (SRB 反应器)、传统反应器内 pH 和 ORP 进行测定。在 10、20、30、40、50、60 min 和 24 h 时,在气提内循环反应器(硫化沉淀反应器)、传统反应器中取样,测定废水中金属离子的浓度。

1.4 分析方法

使用 pH 计 (上海雷磁, PHS-3C) 测定 pH; 采用自动电位滴定仪 (上海雷磁, ZD-2) 测定 ORP; 使用硫离子浓度计 (上海般特, Bante931-S) 测定 S²⁻; 采用吹脱-金属离子吸收法和火焰原子吸收光 谱仪 (普析通用, TAS-990) 测定 H₂S; 选用 16S rDNA 技术进行微生物群落结构分析; 采用火焰原 子吸收光谱仪 (普析通用, TAS-990) 测定重金属离子。

SO₃²⁻、S₂O₃²⁻、SO₄²⁻的样品预处理在4000 r·min⁻¹离心10 min, 经0.22 μm 滤膜过滤后,使用离子 色谱分析仪(北京东西分析, IC-2800)并搭配色谱柱(美国 Dionex, IonPacTMAS23 4×250 mm)进行测 定,淋洗液配比为4.5 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃和0.8 mmol·L⁻¹ NaHCO₃,抑制电流为30 mA,淋洗液泵流速 为1.0 mL·min⁻¹。

1.5 菌株 16S rDNA 测序

从气提内循环反应器 (SRB 反应器)、传统反应器中取3组平行菌液,离心收集菌体,采用 CTAB方法对样本的基因组 DNA进行提取,之后利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。取 适量的样本 DNA 于离心管中,使用无菌水稀释样本至1 ng·μL⁻¹。以稀释后的基因组 DNA 为模 板,引物对应区域: 16S V4 区引物 (515F 和 806R)鉴定细菌多样性,使用带 Barcode 的特异引物、 New England Biolabs 公司的 Phusion®带有 GC 缓冲液的高保真 PCR 预混液、高效高保真酶进行 PCR。

PCR产物使用 2% 浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测;根据 PCR产物浓度进行等量混样,充分 混匀后,使用 1×TAE 浓度 2% 的琼脂糖胶电泳,纯化 PCR产物,剪切回收目标条带。使用 Thermo Scientific 公司 GeneJET 胶回收试剂盒回收产物。

使用 Thermofisher 公司的 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建,构建 好的文库经过 Qubit 定量和文库检测合格后,使用 Thermofisher 的 Ion S5TMXL 进行上机测序。

2 结果与讨论

2.1 涉硫组分的演变

气提内循环反应器可有效解除代谢产物 H₂S 对 SRB 的毒性抑制,并提高SO₄²⁻的去除率。气提 内循环反应器与传统反应器的涉硫组分比率变化如图 2 所示。由图 2 可知,气提内循环反应器中 SO₄²⁻去除率为 91.24%;传统反应器因不能及时排出 H₂S(S²⁻),其SO₄²⁻去除率仅为 36.5%。在气提内 循环反应器中,SO₄²⁻主要转化为SO₃²⁻和 H₂S(图 2(a)),随着 H₂S 的产率增加,SO₃²⁻逐渐降低,SO₃²⁻作



Fig. 2 Change of sulfur-related components in the gas stripping internal circulation reactor and the traditional reactor

为SO₄²⁻和H₂S的中间产物,成为代谢转化的限速因素。H₂S作为SO₄²⁻还原的最终产物,其浓度较高时会对SRB产生毒性抑制。FIRMINO等^[17]、ZHAO等^[18]发现H₂S会导致反应器中微生物活性和硫酸盐降解率的下降。BIJMANS等^[14]对生物反应器内硫化物进行了去除,发现微生物代谢活性可由13 mmol·(L·d)⁻¹上升至51 mmol·(L·d)⁻¹。气提内循环反应器的SO₄²⁻去除率较传统反应器高,其原因是气提内循环反应器及时去除反应产物H₂S,从而促进反应的进行,且解除S²⁻累积富集对SRB的毒性抑制。

2.2 产碱效率

气提内循环反应器可避免 AMD 与 SRB 的直接接触所造成的毒性抑制与冲击,可实现较高的 产碱效率。气提内循环反应器的产碱量变化情况如图 3 所示。由图 3 可知,气提内循环反应器的

产碱量是传统反应器的3倍。在SRB代谢乳酸 盐过程中会产生HCO₃,使得反应器内碱度逐 渐增加^[19],其反应机理^[20]如式(1)和式(2)所示。

乳酸盐 + $0.5SO_4^{2-}$ → 乙酸盐 + HCO_3^- + $0.5HS^-$ (1)

系统中存在的 Fe²⁺能促进各种酶的合成, 缩短反应迟滞,促进 SRB 还原反应的进行^[21-23], 导致 pH上升。随着反应的进行, SO₄²⁻逐渐转 化为 H₂S,气提内循环反应器将 H₂S 去除,不 仅能使水体中 OH⁻增加,还能避免 S²⁻积累对 SRB 的毒性抑制。



图 3 气提内循坏反应器、传统反应器中产碱效率 Fig. 3 Alkali efficiency of the gas stripping internal circulation reactor and the traditional reactor

2.3 微生物群落结构

根据 Barcode 处理数据得到有效数据,再利用 Uparse 软件对所有样品的有效数据进行聚类,筛选出 OTUs(operational taxonomic units,默认以 97% 的一致性序列聚类),并利用 SSUrRNA 数据库对 OTUs 进行物种注释分析,获得目、科、属群落组成(图 4)。由图 4 可知,气提内循环反应器中脱硫



Fig. 4 Relative abundance in order, family, genus levels for microbes in the reactor

弧菌 (Desulfovibrio) 在目、科、属水平上的相对丰度均为 73%, 传统反应器中脱硫弧菌的相对丰度 (仅为 48%, 对比 2 个反应器中菌属丰度, 传统反应器中丛毛单胞菌 (Comamonas)、柠檬酸杆菌属 (Citrobacter)、假单胞菌 (Pseudomonas) 的相对丰度较气提内循环反应器明显增多。在适宜的环境条 件下, SRB 生长速度最快, 能竞争到更多的营养物, 使其在体系中的相对丰度较其他微生物高; 当 环境因素 (pH、毒性物质的产生及含量等) 改变时, SRB 会对环境条件做出快速反应 (调节体内代谢 过程或改变细胞结构等), 其内在生长速率也会发生变化^[24]。传统反应器中 pH(3.01) 较低、代谢 S²⁻ 积累和重金属离子的毒性抑制, 均会导致 SRB 的竞争能力变弱、数量减少, 而气提内循环反应器 可解除酸、重金属及代谢 S²⁻对 SRB 活性的多重抑制, 充分发挥系统内优势菌属脱硫弧菌的还原能力。

2.4 重金属的去除

气提内循环反应器对 AMD 中重金属离子的去除效果较传统反应器好。气提内循环反应器和传统反应器对金属离子的去除效果如图 5(a) 和图 5(b) 所示。气提内循环反应器内 Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺的去除率分别为 100%、86.67%、93.34%、90.14%, Cu²⁺和 Zn²⁺的出水浓度分别为 0 mg·L⁻¹和 2 mg·L⁻¹(表 1),可达到《污水综合排放标准》二级标准;而在传统反应器内,Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺的去除率分别仅为 96.6%、16.5%、21.4%、26.3%。反应器中 Cu²⁺较其他金属离子容易去除的原因是,CuS 的 K_{sp} 相较于 ZnS、MnS、FeS 等金属硫化物低,其溶度积常数顺序为 MnS>FeS>ZnS>CuS^[25-26];气提内循环反应器的金属去除率较传统反应器高,在气体内循环反应器中各金属的去除率为 Cu²⁺>Zn²⁺>Fe²⁺>Mn²⁺,但在传统反应器中 Fe²⁺的去除率较 Zn²⁺高,产生该结果的原因是传统反应器内 SRB 酶的合成需要消耗大量的 Fe^{2+[21]}。







传统 SRB 反应器采用生化出水直接与重 金属混合沉淀,但生化出水中除 S²⁻外,还含 有大量无效组分 (如硫代硫酸根以及溶解性微 生物产物、胞外多聚物等^[1]),导致沉淀物中除 金属硫化物外还含有其他复合物。气提内循环 反应器运用目标代谢产物 H₂S 与重金属沉淀, 反应结束后,对该反应器中的沉淀物进行了

Table 1	Concentration of heavy metal			mg·I ⁻¹
ions in enruent				Ing L
反应器种类	Cu^{2^+}	Zn^{2^+}	Fe ²⁺	Mn^{2^+}
气提内循环反应器	0	2	19.61	3.8
传统反应器	0.72	23.58	146.66	23.8

表1 出水中重金属离子浓度

XRF分析。结果表明,沉淀物中含有 3.9% Cu、4.27% Zn、5.28% Mn、35.78% Fe、48.89% S,这说 明目标代谢产物 H₂S 与重金属产生的金属硫化物不含其他复合组分,且该金属硫化物的纯度可达 98.12%。

3 结论

1) H₂S 作为SO₄²⁻还原的最终产物,会对 SRB产生毒性抑制;气提内循环反应器可有效解除 H₂S 对 SRB 的毒性抑制, SO₄²⁻去除率由 36.5%(传统反应器)提升至 91.24%。

2) 气提内循环反应器可避免 AMD 与 SRB 直接接触所造成的毒性抑制和冲击,实现较高的产碱效率,产碱效率是传统反应器的 3 倍。

3) 体系中环境条件会影响脱硫弧菌属与丛毛单胞菌、柠檬酸杆菌属、假单胞菌之间的竞争; 气提内循环反应器解除了多重抑制对脱硫弧菌属的活性影响,其相对丰度由传统反应器的48%提 升至73%。

4) 气提内循环反应器对 AMD 中重金属离子去除效果优于传统反应器。气提内循环反应器中 Mn²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺的去除率为 86.67%、93.07%、90.14%,其金属硫化物的纯度可达 98.12%,出水 Cu²⁺和 Zn²⁺浓度分别为 0 和 2 mg·L⁻¹,可达到《污水综合排放标准》二级标准。

参考文献

- [1] SÁNCHEZ-ANDREA I, SANZ J L, BIJMANS M F, et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 269: 98-109.
- [2] 陈莹,陈炳辉,邹琦,等.粤北大宝山AMD水-表层沉积物的重金属分布特征及其影响因素[J].环境科学学报,2018,38(1): 133-141.
- [3] 曹霏霏,李红丽,王岩.干式厌氧消化过程挥发酸对硫酸盐还原菌的影响[J].环境工程学报,2014,8(3):1169-1173.
- [4] ZHANG M L, WANG H X. Preparation of immobilized sulfate reducing bacteria (SRB) granules for effective bioremediation of acid mine drainage and bacterial community analysis[J]. Minerals Engineering, 2016, 92: 63-71.
- [5] YOREO J J D, GILBERT P U P A, SOMMERDIJK N A J M, et al. Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments[J]. Science, 2015, 349(6247): 6760.
- [6] 蒋永荣, 刘可慧, 刘成良, 等. UASB处理硫酸盐有机废水的启动[J]. 环境工程学报, 2014, 8(9): 3572-3576.
- [7] 李咏兰, 邱广亮, 王凯, 等. 磁性多孔微球固定化硫酸盐还原菌的研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(12): 2825-2829.
- [8] 周立祥. 生物矿化: 构建酸性矿山废水新型被动处理系统的新方法[J]. 化学学报, 2017, 75(6): 552-559.
- [9] 狄军贞, 江富, 朱志涛, 等. 混合硫酸盐还原菌处理煤矿酸性废水的固定载体研究[J]. 中国给水排水, 2015, 31(7): 100-108.
- [10] UTGIKAR V P, HARMON S M, CHAUDHARY N, et al. Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage[J]. Environmental Toxicology, 2010, 17(1): 40-48.
- [11] GUO J, KANG Y, FENG Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfatereducing bacteria in the presence of zero valent iron[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 203(1): 278-285.
- [12] 曹恒恒,张鸿郭,罗定贵,等.重金属对硫酸盐还原菌影响[J].环境科学与技术, 2012, 35(12): 208-211.
- [13] LEWIS A, HILLE R V. An exploration into the sulphide precipitation method and its effect on metal sulphide removal[J]. Hydrometallurgy, 2006, 81(3/4): 197-204.
- [14] BIJMANS M F, DOPSON M, ENNIN F, et al. Effect of sulfide removal on sulfate reduction at pH 5 in a hydrogen fed gas-lift bioreactor[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(11): 1809-1818.
- [15] 汪琦. 乙醇对硫酸盐还原-甲烷发酵效率影响的研究[J]. 环境科学, 2009, 30(3): 924-929.
- [16] 任立人, 张琳, 仝胜利, 等. 高含硫抗生素有机废水处理[J]. 水处理技术, 2001, 27(4): 225-228.
- [17] FIRMINO P I M, FARIAS R S, BUARQUE P M C, et al. Engineering and microbiological aspects of BTEX removal in bioreactors under sulfate-reducing conditions[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 260: 503-512.

- [18] ZHAO F, ZHOU J D, MA F, et al. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas* stutzeri Rhl: Applications for microbial enhanced oil recovery[J]. Bioresource Technology, 2016, 207: 24-30.
- [19] DENG D, WEIDHAAS J L, LIN L S. Kinetics and microbial ecology of batch sulfidogenic bioreactors for co-treatment of municipal wastewater and acid mine drainage[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 305: 200-208.
- [20] MUYZER G, STAMS A J M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6: 441-454.
- [21] 郭旭颖, 里莹, 董艳荣, 等. SRB协同自燃煤矸石处理含Fe²⁺、Mn²⁺煤矿废水研究[J]. 工业水处理, 2018, 38(6): 22-26.
- [22] WU P, ZHANG G M, LI J Z, et al. Effects of Fe²⁺ concentration on biomass accumulation and energy metabolism in photosynthetic bacteria wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 55-59.
- [23] 徐亦寒, 孔殿超, 岳正波, 等. 针铁矿对硫酸盐还原菌分解铅矾的影响[J]. 环境科学学报, 2017, 37(5): 1688-1694.
- [24] 宋福强. 微生物生态学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [25] SAHINKAYA E, YUCESOY Z. Biotreatment of acidic zinc- and copper-containing wastewater using ethanol-fed sulfidogenic anaerobic baffled reactor[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010, 33(8): 989-997.
- [26] SAHINKAYA E, DURSUN N, OZKAYA B, et al. Use of landfill leachate as a carbon source in a sulfidogenic fluidized-bed reactor for the treatment of synthetic acid mine drainage[J]. Minerals Engineering, 2013, 48(4): 56-60.
- (本文编辑:曲娜,郑晓梅,张利田)

Treatment of acid mine drainage by a gas stripping internal circulation reactor with sulfate reducing bacteria

ZHU Chuanjing, SUN Jingjing, HUANG Jianhong, LI Liuqing, TIAN Senlin, HU Xuewei*

Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China *Corresponding author, E-mail: huxuewei.env@gmail.com

Abstract The treatment of acid mine drainage (AMD) by sulfate-reducing bacteria (SRB) was susceptible to multiple toxicity inhibition such as acid, heavy metal and metabolic sulfur ion. In this study, the gas stripping internal circulation reactor was used to treat AMD, the evolution of sulfur-related components in the reactor, alkali production efficiency, microbial community structure and heavy metals removal were studied. The results showed that the gas stripping internal circulation reactor could effectively eliminate multiple toxicity inhibition, the sulfate removal rate in the system increased from 36.5% to 91.24%, and its alkali production efficiency increased by 3 times, which was obviously superior to the traditional reactor, the relative abundance of *Desulfovibrio* increased from 48% to 73%. The purity of metal sulfide precipitated by hydrogen sulfide and heavy metals reached 98.12%, the concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} in the effluent were 0 and 2 mg·L⁻¹, respectively, which could reach the secondary standard of Integrated Wastewater Discharge Standard. This study can provide reference for the efficient control of SRB biotechnology treating AMD.

Keywords acid mine drainage; sulfate-reducing bacteria; gas stripping internal circulation reactor; toxicity inhibition