

研究报告

固氮氧化亚铁钩端螺旋菌产次生矿物的条件优化及矿物鉴定

张翠静¹, 张爽¹, 刘涛^{1,2}, 赵丹¹, 晏磊^{*1,2}

1 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163319

2 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 农业农村部东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163319

张翠静, 张爽, 刘涛, 赵丹, 晏磊. 固氮氧化亚铁钩端螺旋菌产次生矿物的条件优化及矿物鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 3954-3969.

ZHANG Cuijing, ZHANG Shuang, LIU Tao, ZHAO Dan, YAN Lei. Condition optimization and identification of secondary minerals produced by *Leptospirillum ferrodiazotrophum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 3954-3969.

摘要: 【背景】固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)培养过程中会产生大量次生矿物。【目的】通过条件优化探究固氮氧化亚铁钩端螺旋菌产次生矿物的最优条件, 为后续生物次生矿物的应用提供材料。【方法】通过单因素试验探究 pH、温度、转速、装液量对固氮氧化亚铁钩端螺旋菌次生矿物合成产量的影响, 并根据试验结果设计响应面试验对产矿条件进行优化。对制备的次生矿物进行表征测试。【结果】单因素试验结果表明, 在 pH 3.00、温度 35.0 °C、转速 150 r/min 条件下次生矿物的产量分别达到最高, 装液量对次生矿物产量影响不显著。选取 pH、温度、转速进行响应面试验得到产次生矿物最优条件为: pH 2.82、温度 31.7 °C, 转速 135 r/min。优化后生产率由单因素试验中最高值 57.714 mg/(L·h)提高到 65.436 mg/(L·h)。X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)结果表明矿物结晶度较差, 是一种无定形羟基高铁矿物, 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)结果表明矿物呈现表面片层短针状结构、具有较大的比表面积。【结论】通过单因素试验和响应面试验优化了次生矿物的生物合成条件, 为下一步次生矿物的应用打下了良好的基础。

关键词: 固氮氧化亚铁钩端螺旋菌; 次生矿物; 响应面法; 生物氧化

资助项目: 黑龙江省重点研发计划指导类项目(GZ20220051); 黑龙江八一农垦大学“三纵三横”支持计划(ZRCPY202320)
This work was supported by the Heilongjiang Provincial Key Research and Development Program Guidance Project (GZ20220051) and the Heilongjiang Bayi Agricultural University Support Program for “San Zong San Heng” (ZRCPY202320).

*Corresponding author. E-mail: hekouyanlei@gmail.com

Received: 2024-01-12; Accepted: 2024-02-04; Published online: 2024-03-22

Condition optimization and identification of secondary minerals produced by *Leptospirillum ferrodiazotrophum*

ZHANG Cuijing¹, ZHANG Shuang¹, LIU Tao^{1,2}, ZHAO Dan¹, YAN Lei^{*1,2}

1 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Argo-waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeastern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] *Leptospirillum ferrodiazotrophum* can produce a large amount of secondary minerals during the culture. [Objective] This study optimized the culture conditions of *L. ferrodiazotrophum* for secondary mineral production, aiming to provide materials for the subsequent application of biogenic secondary minerals. [Methods] Single factor tests were carried out to investigate the effects of pH, temperature, rotation speed and liquid loading on the production of secondary minerals by *L. ferrodiazotrophum*, on the basis of which the response surface method was employed to optimize the culture conditions. Subsequently, the produced secondary minerals were characterized and tested. [Results] The single factor tests showed that the secondary mineral yield reached the highest under the conditions of pH 3.00, 35.0 °C, and rotation speed of 150 r/min, and the effect of liquid loading on the secondary mineral production was insignificant. The optimal conditions for producing secondary minerals were pH 2.82, 31.7 °C, and rotation speed of 135 r/min. After the optimization, the yield increased from the highest value of 57.714 mg/(L·h) in the single factor tests to 65.436 mg/(L·h). X-ray diffraction results showed that the produced mineral had poor crystallinity and was an amorphous hydroxyl high-iron mineral. The mineral had a short needle-like structure and a large specific surface area. [Conclusion] This study optimized the biosynthesis conditions of secondary minerals through single factor tests and response surface design, laying a foundation for applying secondary minerals in the future.

Keywords: *Leptospirillum ferrodiazotrophum*; secondary mineral; response surface method; biooxidation

在酸性矿山废水及周围环境中次生矿物类型主要包括羟基硫酸高铁矿物,如施威特曼石[schwertmannite, 分子式 $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$]和黄铁矾[jarosite, 分子式 $(\text{K}^+, \text{Na}^+, \text{NH}_4^+, \text{H}_3\text{O}^+)\text{Fe}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2$]^[1]等, 以及一些含水氧化铁

矿物如水铁矿(ferrihydrite, 分子式 $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)和针铁矿(geothite, 分子式 $\alpha\text{-FeOOH}$)等^[2], 这些次生矿物具有巨大的比表面积、丰富的表面官能团、较强的吸附能力和良好的沉淀作用,如施威特曼石对重金属的吸附和黄钾铁矾对有毒物质

的去除^[3]可在不同 pH 条件下吸附、络合、共沉淀酸性矿山废水系统中的金属元素, 实现水体自净^[4-7]。

当 pH 值为 2.80–4.50 时, 酸性矿山废水环境中的 Fe^{3+} 和 SO_4^{2-} 共沉淀形成典型的施氏矿物, 当体系中存在一价阳离子且 pH 值为 1.50–3.00 时, 易形成以黄铁矾为主的矿物, 当 $\text{pH}>5.00$ 时, Fe^{3+} 水解产生的矿物主要为水铁矾^[8]。地球化学条件是多变的, 有时某些相变是可逆的, 如施威特曼石可能转化为针铁矿或黄钾铁矾, 黄钾铁矾可能被施威特曼石或针铁矿取代^[9]。由于类质同象作用, 这些含铁羟基硫酸盐次生矿物容易吸持重(类)金属离子, 对污染元素的行为起着重要的作用^[8,10]。研究发现, 酸性矿山废水在某些条件下实际重金属含量比理论计算值低很多, 有的酸性矿山废水在外排过程中存在明显的重金属或类金属砷(As)自然钝化现象^[11-12], 甚至有的在流入周边环境之前其含量可大幅度降低至 WHO 规定的饮用水标准之下^[13]。以上研究表明, 酸性废水中重金属钝化在 pH 2.50–3.00 附近最明显。在安徽铜陵鸡冠山铁帽型铁金矿酸性矿山废水的调查中也发现 pH 值为 3.00 左右的酸性矿山废水中微生物活性最好, 而恰好有毒金属浓度最低^[14]。这些生物成因铁矿物通过吸附、共沉淀、结构元素的结合和取代等机制, 能够有效去除污染水环境中的重金属等有毒有害元素^[7,15-16]。还有研究表明, 黄钾铁矾可以原位钝化土壤中的 Pb 和 As, 使其生物利用性降低, 从而减小对生物的毒害^[17]。以上研究从不同的角度证实了次生矿物具有环境污染治理潜力。

根据 16S rRNA 基因的系统发育分类, 钩端螺旋菌(*Leptospirillum*)被分为 I、II、III、IV 这 4 类^[18-21], 嗜酸性, 可以仅以 Fe^{2+} 为能源进行化学自养生长, 固氮氧化亚铁钩端螺旋菌

(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)属于 III 类且仅在 III 类中有固氮基因的发现^[18], 区别于其他类的是固氮氧化亚铁钩端螺旋菌在无氮源培养基中也可以生长^[19-20]。在富含 Fe^{3+} 的体系中, 水环境条件如 pH、氧化还原电位和溶液化学组成(H^+ 、 SO_4^{2-} 、金属离子)能够决定铁沉积矿物的形成种类或矿物性质^[22-24]。有学者会在次生矿物合成过程中进行修饰处理, 以此控制矿物合成^[25-26], 改性后的次生矿物可用来处理其他污染物^[27]。有研究对不同条件下使用嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)合成生物次生矿物进行探究, 并探究了合成的次生矿物对 As^{3+} 的吸附能力^[23-24]。在以往报道中, 有使用多种细菌生物合成次生矿物对污染物进行处理, 如使用氧化亚铁硫杆菌催化合成的施氏矿物, 具有吸持或钝化 Cr^{6+} ^[26,28]、 As^{3+} 或 As^{5+} 的能力^[29-30]。有学者还用嗜酸性氧化亚铁硫杆菌合成黄铁矾类矿物^[31]。也有研究使用希瓦氏菌(*Shewanella*)在硫代硫酸盐存在下驱动水铁矿转化为次生铁硫矿物, 制备次生矿物-微生物杂化体, 探究次生矿物微生物杂化体对六价铬的去除效果、影响因素和去除机理^[32]。

固氮氧化亚铁钩端螺旋菌在形成次生矿物过程中有两大优势: (1) 该菌在液体培养基中不额外添加氮源也可以生长, 与其名称相对应, 该菌正是在无氮源培养基中被分离而来, 那么同样在无氮源环境中生长时, 该菌较其他菌更有优势^[19-20]; (2) 本实验室对该菌进行培养过程中发现, 该菌活性好, 氧化亚铁能力强, 液体培养基纯培养时可以更快地达到对数生长期, 不易受杂菌的侵扰, 更适合作为发酵用菌。本研究通过对菌株 HBDY 3-31 使用次生矿物合成培养基进行单因素试验、响应面法优化培养和现代表征分析技术进行表征, 以进一步提高次生矿物合

成生产率并探究其组成,为下一步次生矿物的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*) HBDY 3-31 (GenBank 登录号为 KT834983),分离自湖北省黄石市大冶铜山口铜矿矿山酸性水沟水样品^[33]。

1.1.2 培养基

改良的9 K液体培养基(g/L)^[34-36]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.40, KCl 0.10, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01。使用 1.00 mol/L H_2SO_4 调 pH 值至 2.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 添加量为 40.00 g/L。

次生矿物合成培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.17, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40.00。使用 1.00 mol/L H_2SO_4 调 pH 值至 2.00^[1]。

1.1.3 主要试剂和仪器

二苯胺磺酸钠、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KCl, 天津市东丽区天大化学试剂厂; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 天津市大茂化学试剂厂; H_2SO_4 和 NH_4OH , 天津市百世化工有限公司。

立式压力蒸汽灭菌器, 冰山松洋生物科技有限公司; 电热鼓风干燥箱, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; pH 计, 北京堀场汇博隆精密仪器有限公司; 超净工作台, 上海苏净实业有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; X 射线多晶衍射仪, 电子株式会社; 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)和溅射镀膜仪, 株式会社日立制作所。

1.2 种子液的制备

使用 9 K 液体培养基连续传代培养保持稳定活性的菌株 HBDY 3-31, 经次生矿物合成培

养基连续传代 2 次, 接种量为 10%, 培养条件为 30.0 °C^[1]、120 r/min 培养 48 h 左右, 当培养基中 Fe^{2+} 氧化率达到 98%, 即第 2 次传代的菌体生长达到对数生长末期(菌液浓度达到 2×10^8 cells/mL 量级)时可用作次生矿物合成的种子液。

1.3 次生矿物合成步骤与流程

采用次生矿物合成培养基进行次生矿物合成, 在 250 mL 锥形瓶中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 121 °C 灭菌 15 min 后冷却至室温, 再加入经 0.22 μm 滤膜过滤除菌的 FeSO_4 溶液, 随后以 5% 的接种量接种菌株 HBDY 3-31 种子液, 进行后续发酵合成试验, 当 Fe^{2+} 氧化率达到 98% 时收集次生矿物。

1.4 次生矿物合成条件优化

首先选取 pH、温度、转速、装液量 4 个因素进行单因素试验。

单因素 pH 值试验各水平设置为 1.50、2.00、2.50、3.00 和 3.50, 温度与摇床转速分别设置为 30.0 °C、120 r/min。单因素培养温度试验各水平设置为 25.0、30.0、35.0、40.0 °C, pH 3.00, 摇床转速为 120 r/min。单因素摇床转速分别设置为 60、80、100、120、150、200 r/min, 温度 30.0 °C, pH 3.00。设置 20%、40%、60%、80% 装液量于 250 mL 锥形瓶中, 温度 30.0 °C, pH 3.00, 摇床转速 120 r/min。

1.5 次生矿物合成的响应面优化试验设计

根据单因素试验结果做单因素方差分析, 选出对次生矿物合成有显著性影响的因素, 以 pH、温度、转速为自变量, 根据 Box-Behnken 模型设计试验, 以生产率为响应值, 进行三因素三水平响应面设计, 优化次生矿物合成条件, 使用响应面设计软件 Design expert 10 对整组试验进行设计(表 1)。

表 1 响应面因素与水平设计

Table 1 Response surface factors and horizontal design

水平 Level	因素 Factor		
	A: pH	B: Temperature (°C)	C: Rotation speed (r/min)
-1	2.75	25.0	120
0	3.00	30.0	150
1	3.25	35.0	180

1.6 次生矿物的收集及生产率计算

使用重铬酸钾滴定法测定菌液中 Fe^{2+} 浓度, 二苯胺磺酸钠为显色剂, 取 200 μL 样品, 加入 1 mL 硫酸:磷酸:水体积比为 3:3:14 的硫磷混酸溶液, 加入 2 滴 0.2% 的二苯胺磺酸钠溶液, 用 0.005 mol/L 的重铬酸钾标准溶液滴定, 由无色变为紫色为滴定终点, 计算 Fe^{2+} 的氧化率:

$$\text{Fe}^{2+}\text{氧化率}(\%) = \frac{\text{体系初始样品滴定消耗重铬酸钾体积} - \text{实时取样滴定消耗重铬酸钾体积}}{\text{体系初始样品滴定消耗重铬酸钾体积}} \times 100 \quad (1)$$

次生矿物收集方法: 培养基中 Fe^{2+} 氧化率达到 98% 后收集次生矿物, 合成的次生矿物使用过滤方法进行收集^[1], 锥形瓶内液体通过预烘干称重的滤纸进行过滤, 待锥形瓶内仅余少量液体并倒不出时使用去离子水冲洗锥形瓶壁, 冲洗的液体同样通过滤纸进行过滤, 最后将滤纸及沉淀放回原瓶, 60 °C 烘干后使用千分天平称称量锥形瓶和瓶内沉淀、滤纸的总重量。

生产量由锥形瓶、沉淀、滤纸烘干总重减去空瓶和滤纸干重得出。

生产率由合成时间、合成体系体积、生产量计算得出:

$$\text{生产率}(\%) = \frac{\text{生产量}}{(\text{合成体系体积} \times \text{合成时间})} \times 100 \quad (2)$$

1.7 次生矿物的表征

采用 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和 SEM 分析鉴别晶型矿物种类并观察矿物表面形

貌特征。采用 X 射线多晶衍射仪对生物源次生矿物进行了 XRD 分析, 样品在电压 40 kV、5–90° 采集 XRD 数据, 步长为 0.02, 扫描速度为 10°/min。SEM 测试: 取微量次生矿物粉末样品直接粘到导电胶上, 并使用溅射镀膜仪喷金 60 s, 喷金电流为 10 mA; 使用 SEM 拍摄样品形貌, 形貌拍摄加速电压为 5 kV, 探测器为 SE2 二次电子探测器。

1.8 数据处理

方差分析使用 IBM SPSS Statistics 25.0, 每组试验重复 3 次, $P < 0.05$ 为差异显著。用 Origin 2018 绘图软件绘制实验结果图^[37]; 采用 Design Expert 10 软件进行响应面试验设计及结果分析。

2 结果与分析

2.1 各因素对次生矿物合成的影响结果

图 1A 为次生矿物单因素 pH 对生产率影响的结果, 其他合成条件一致时, 合成培养基初始 pH 值为 1.50 时生产率极低, pH 2.00 较 pH 1.50 生产率骤升, 然后缓慢升高, pH 值为 3.00 时次生矿物合成生产率最高, pH 3.50 时有所下降。图 1B 为次生矿物单因素装液量对生产率影响的结果, 其他合成条件一致时, 40% 和 60% 水平间装液量对生产率的影响不显著, 60% 装液量时生产率达到最高值。图 1C 为次生矿物单因素温度对生产率影响的结果, 其他合成条件一致时, 30.0 °C 和 35.0 °C 时次生矿物合成生产率最高, 该范围内温度对次生矿物合成生产率影响较小。图 1D 为次生矿物单因素摇床转速对生产率影响的结果, 其他合成条件一致时, 80、100、120 r/min 这 3 个水平之间无显著差异, 说明在该范围内合成转速对次生矿物生产率影响较小, 但并未达到最大值, 摇床转速 150 r/min 时次生矿物合成生产率最高。

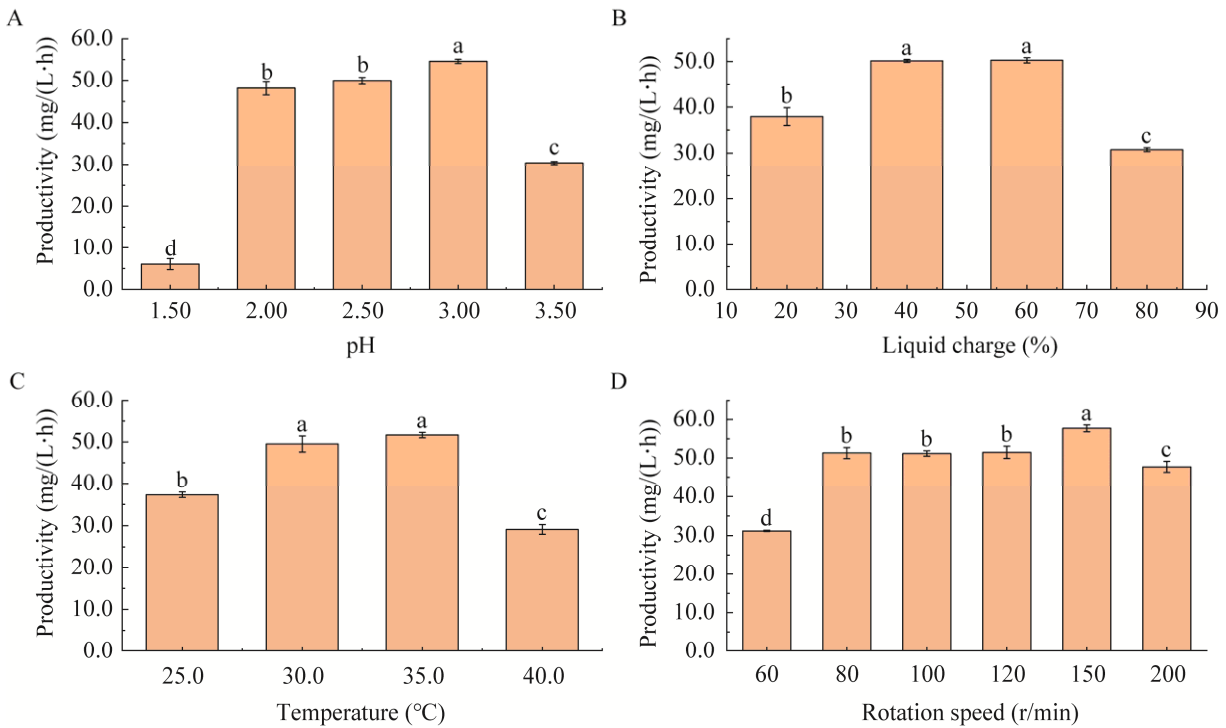


图 1 各因素对次生矿物合成生产率的影响 A: pH. B: 装液量. C: 温度. D: 转速. 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

Figure 1 Effects of various factors on productivity of secondary mineral synthesis. A: pH. B: Liquid charge. C: Temperature. D: Rotation speed. Different lowercase letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level.

2.2 响应面优化试验结果

2.2.1 响应面试验结果

根据单因素试验结果做单因素方差分析, 选出有显著性差异的因素, 由于单因素装液量在较大范围内对次生矿物生产率影响不显著, 响应面设计排除装液量因素的影响, 装液量固定为 50%, 结合实际生产应用条件, 以 pH、温度、转速为自变量, 根据 Box-Behnken 模型, 以生产率为响应值, 设计了 3 因素 3 水平响应面设计, 试验设计与结果见表 2。

2.2.2 响应面方差分析结果

对响应面优化试验结果进行显著性检查、方差分析, 结果如表 3 所示。

表 3 表示以生产率为响应值的模型方差分析结果, 试验所建立的模型拟合性显著 ($P < 0.01$), 失

拟项不显著, 表示该模型具有显著性。该模型的二次拟合回归方程为: $Y = 61.99 - 1.22A + 10.30B + 0.006918C - 0.37AB + 1.55AC - 1.76BC + 0.12A^2 - 15.65B^2 - 0.62C^2$, 其中 A、B、C 分别代表 pH、温度、转速。回归系数 R^2 为 0.9426, 修正后为 0.8688, 说明该模型能准确预测出次生矿物的生产率。从表 3 可以看出, 对次生矿物生产率影响程度为 $B > A > C$, 即影响最大的因素是温度, 其次是 pH 和转速。

图 2 每个方形散点代表每组观测值与预测值之间的内残差, 颜色代表观测值的大小, 从红到蓝代表逐渐降低的值, 模型的残差正态概率基本分布在同一条直线上, 模型符合正态假设, 说明次生矿物合成的实际测得值与模型预测值相差较小, 该模型具有良好的适应性^[38]。

表 2 响应面试验结果

Table 2 Response surface test results

试验号 Number	A: pH	B: Temperature (°C)	C: Rotation speed (r/min)	生产率 Productivity (mg/(L·h))
1	2.75	35.0	150	58.158
2	3.25	35.0	150	55.054
3	3.25	30.0	120	57.261
4	2.75	30.0	120	62.884
5	3.00	30.0	150	61.752
6	3.25	30.0	180	63.192
7	2.75	25.0	150	37.111
8	3.00	35.0	120	59.333
9	3.00	30.0	150	54.014
10	3.00	30.0	150	67.801
11	3.00	25.0	180	35.626
12	3.00	30.0	150	63.820
13	3.00	35.0	180	53.009
14	3.25	25.0	150	35.500
15	2.75	30.0	180	62.626
16	3.00	25.0	120	34.919
17	3.00	30.0	150	62.579

表 3 响应面试验模型回归分析

Table 3 Regression analysis of response surface test model

来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
Model	1 926.19	9	214.02	12.78	0.001 4	Significant
A: pH	11.94	1	11.94	0.71	0.426 5	
B: Temperature (°C)	848.68	1	848.68	50.66	0.000 2	
C: Rotation speed (r/min)	0.000 382 9	1	0.000 382 9	0.000 022 86	0.996 3	
AB	0.56	1	0.56	0.033	0.860 4	
AC	9.57	1	9.57	0.57	0.474 3	
BC	12.36	1	12.36	0.74	0.418 9	
A ²	0.056	1	0.056	0.003 358	0.955 4	
B ²	1 031.68	1	1 031.68	61.58	0.000 1	
C ²	1.61	1	1.61	0.096	0.765 6	
残差 Residual	117.27	7	16.75			
失拟项 Lack of fit	16.13	3	5.38	0.21	0.883 0	Not significant
纯误差 Pure error	101.14	4	25.28			
总和 Cor total	2 043.46	16				

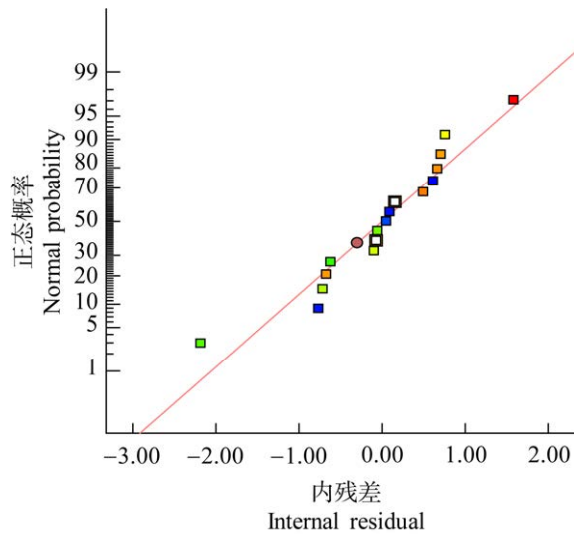


图 2 残差正态概率分布图 图中的散点表示响应值, 颜色由蓝色、绿色、浅绿色、黄色、浅黄色、橙色到红色, 表示响应值从小到大

Figure 2 Residual normal probability distribution diagram. The scattered dots in the figure represent the response values, with colors ranging from blue, green, light green, yellow, light yellow, and orange to red, indicating that the response values have increased from small to large.

利用 Design Expert 10 绘制的次生矿物合成条件各因素交互作用对次生矿物生产率影响的响应面和等高线图如图 3 所示^[39]。模型预测的最优条件为: pH 2.82、温度 31.7 °C、转速 135 r/min, 预测结果为 65.436 mg/(L·h)。

2.2.3 验证试验结果

使用响应面模型预测的最优条件进行试验验证, 预测结果为 65.436 mg/(L·h), 考虑试验的可操作性, 分别以 pH 2.82、温度 31.7 °C、转速 135 r/min 的条件进行次生矿物合成, 按照此条件进行重复试验, 测得生产率为 65.189 mg/(L·h), 与理论值相比较绝对误差 0.38%, 符合模型预测结果, 模型可以指导实际生产应用。

2.3 次生矿物表征测试结果

对细菌发酵合成的次生矿物进行 XRD 表征测试及 SEM 形貌测试, 以观察次生矿物结晶度

及形貌外观。

2.3.1 结晶度测试结果

XRD 分析是区分非晶型矿物与晶型矿物, 以及鉴别晶型矿物种类的最有效手段^[40]。XRD 图谱利用 XRD 原理, 测定次生矿物样品内部的微观结构, 从而进行矿物的物相分析, 属于定性分析和半定量分析, 结果见图 4。

根据 XRD 广角衍射图谱分析^[35], 生物法制备的次生矿物样品为多种矿物混合, 包括 Clairite: $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_4(\text{OH})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Mohrite, syn (synthesis, 人工合成): $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Ammoniojarosite, syn: $(\text{NH}_4)\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$; Sabieite, syn: $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$; Loncreekite, syn: $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 其中比对结果接近度由高到低分别为: Sabieite, syn; Loncreekite, syn; Mohrite, syn; Ammoniojarosite, syn; Clairite。图谱显示, 次生矿物样品为无定形粉末颗粒, 无固定晶型。

2.3.2 次生矿物形貌观察

利用 SEM 对次生矿物进行观察, 如图 5A 所示, 在较小的放大倍数下显示为无定形颗粒状, 表面非常粗糙, 大颗粒上附着许多较细小的颗粒; 如图 5B 所示, 在较大的放大倍数下, 次生矿物表面具有不整齐短针状凸起, 同时有脱落的不规则碎片。碎片的产生一定程度上与外部机械力磨损有关, 或因为不同的矿物成分呈现不同的外观; 部分区域呈现较均匀的片层短针状外观, 多缝隙, 极大地增加了次生矿物的比表面积。

3 讨论与结论

在自然极端环境下可能存在多种微生物同时对环境中的矿物诱导发生矿相转化^[9], 含铁矿物的形成受微生物群落结构、功能、代谢作用及环境化学条件共同控制^[41], 并且生物矿化中的生物矿物形态受分子模板、矿物-微生物界面

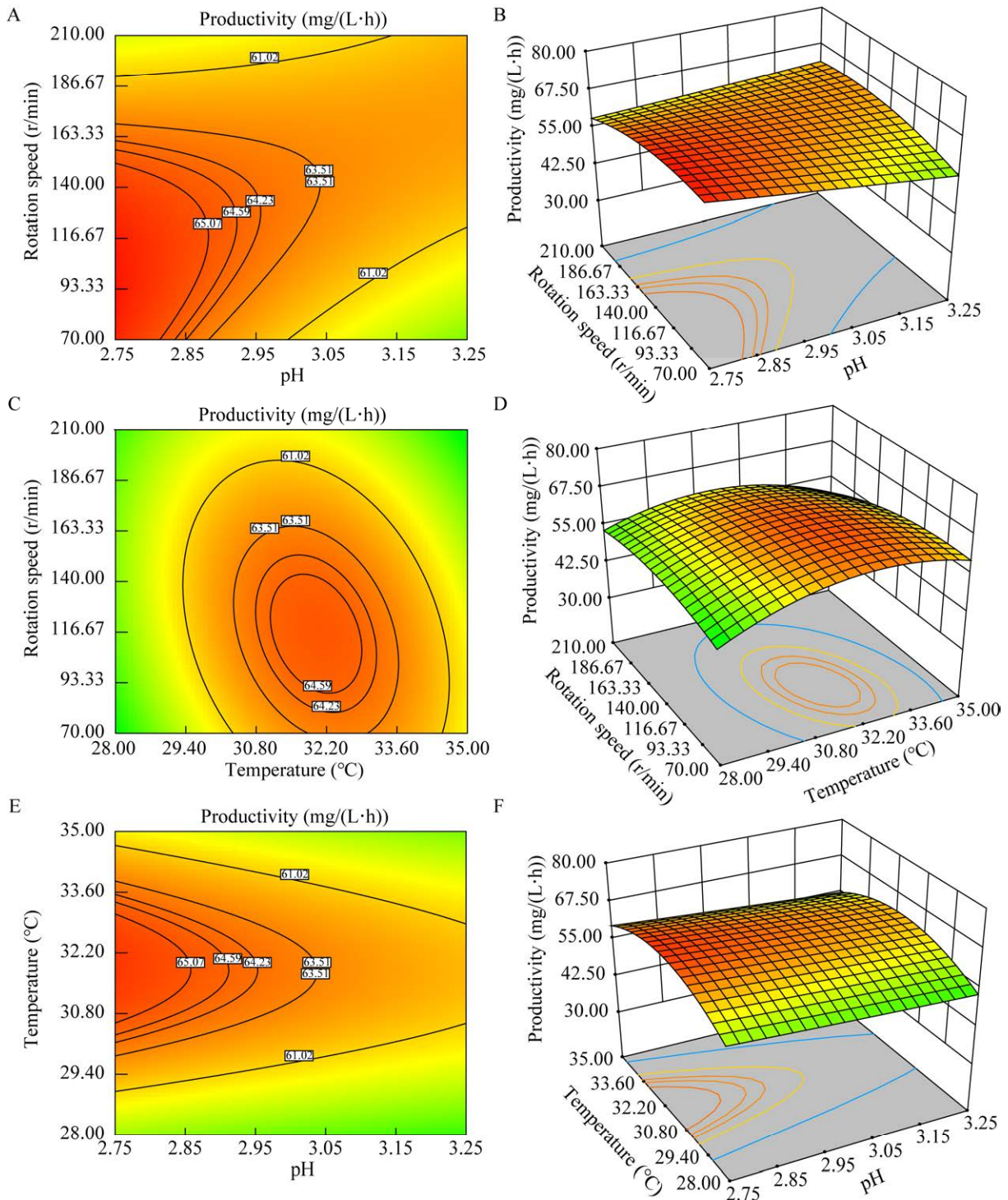


图3 各因素交互作用等高线和响应面图 A: pH和转速的等高线图. B: pH和转速的响应面图. C: 温度和转速的等高线图. D: 温度和转速的响应面图. E: pH和温度的等高线图. F: pH和温度的响应面图

Figure 3 Response surface and contour diagram of interaction of each factor. A: Contour plots of pH and rotation speed. B: Response surface plots for pH and rotation speed. C: Contour plots of temperature and rotation speed. D: Response surface plots for temperature and rotation speed. E: Contour plots of pH and temperature. F: Response surface plots for pH and temperature.

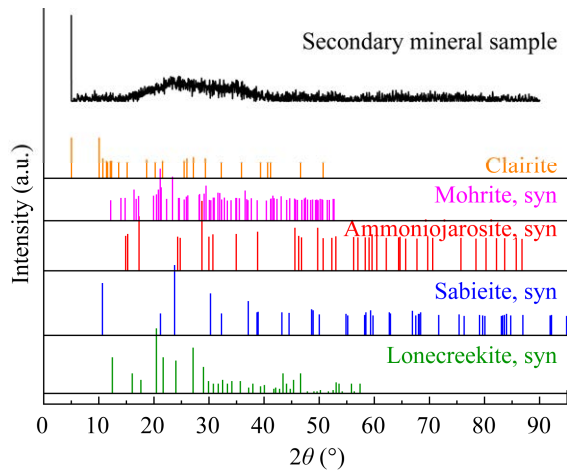


图4 XRD 衍射分析图

Figure 4 XRD diffraction analysis diagram.

性质等因素的影响^[42]。微生物膜与矿物界面是一个化学梯度大、反应活性分子集中、氧化还原作用活跃的微观界面，是矿物发生表面侵蚀和氧化分解的活跃界面^[43-44]。通过挖掘矿物-微生物界面表面微观结构、组成、形态和功能的演变，可以得到相关的微观表型性状，该性状可由矿物和微生物胞外聚合物的表面性质定义^[45-46]。由胞外聚合物(extracellular polymers, EPS)介导的细胞和矿物之间的接触促进了矿物的溶解，为矿物的化学行为提供了反应空间^[47-48]。微生物作用类型

及环境化学微环境决定了生物成矿的重点物质的类型、形态和性质^[49-51]。

在极端环境微生物合成次生矿物方向已有一些研究。例如，嗜酸性氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)游离悬浮细胞生长过程中利用 Fe^{2+} 合成黄钾铁矾，主要影响黄钾铁矾形成的参数是 pH，在 pH 1.60–1.70、温度 35 °C 条件下， Fe^{2+} 氧化速率可达最高，黄钾铁矾沉淀量最低，黄钾铁矾沉淀量为 0.012 5–0.020 9 g^[1]，由该研究可知在低 pH 条件下黄钾铁矾沉淀量较低，那么若想达到较高的次生矿物沉淀量，pH 条件应控制在更高的水平，正如本研究 pH 值为 1.50–3.50，单因素试验结果显示 pH 较低时黄钾铁矾生产率也低，与该研究目的虽相反，结果却相符。 NO_3^- 驯化的 *A. ferrooxidans* LX5 对 Fe^{2+} 氧化能力更强，并且低浓度 NO_3^- 驯化效果优于高浓度 NO_3^- 驯化^[52]。通过研究具有不同氧化能力的两株氧化亚铁硫杆菌对次生矿物施威特曼石和黄钾铁矾的合成并表征，发现氧化能力较低的 *A. ferrooxidans* 23270 在优化培养基中产生的沉淀结晶度更好，而且在优化培养基中，随着一价阳离子浓度降低，*A. ferrooxidans* Gf 倾向于介导施威特曼石的形成^[53]，正如本研究合成培

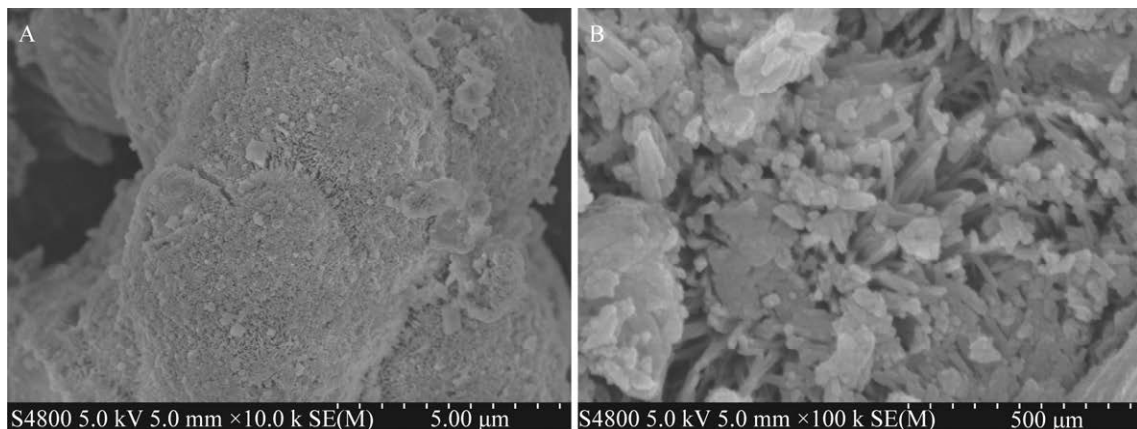


图5 次生矿物 SEM 图 A: 放大倍数为 10 000×. B: 放大倍数为 100 000×

Figure 5 SEM map of secondary minerals. A: Magnification of 10 000×. B: Magnification of 100 000×.

培养基中含大量 NH_4^+ , 产物中恰有铵黄钾铁矾, 与本试验结果具有一致性, 同时本研究制备的次生矿物结晶度差, 可能由所使用的菌株氧化 Fe^{2+} 能力较强所致。有研究者通过控制 K^+ 浓度来调控次生矿物生成的种类, 研究表明, 由于正吉布斯自由能, Fe^{3+} 不能自发水解生成施威特曼石, 但与微生物氧化 Fe^{2+} 反应偶联则吉布斯自由能为负值, 由微生物氧化形成的 Fe^{3+} 可以水解形成施威特曼石, 而 Fe^{3+} 虽可以自发形成黄钾铁矾, 但在微生物偶联 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 且 K^+ 存在的条件下更促进了黄钾铁矾的形成^[54], 本研究使用的合成培养基实行 NH_4^+ 添加, 减少 K^+ 对次生矿物合成的影响, 减少钾黄钾铁矾的形成。实验室培养微生物 *A. ferrooxidans* CC1、*A. ferrooxidans* ATCC 23270、*A. ferrooxidans* B5、*A. ferrooxidans* B20 在含砷条件下合成次生矿物, 黄钾铁矾形成过程中不会捕获大量砷, 亚砷酸盐与非晶相共沉淀, 或与施威特曼石共沉淀, 部分结合成 $\text{Fe}_6(\text{AsO}_3)_4\text{SO}_4(\text{OH})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ^[55], 该研究还表明, 合成时间越长, 次生矿物产物结晶度越高。与该研究不同的是, 本实验先行制备次生矿物, 将制备与下游吸附过程分离开来, 有利于分开进行次生矿物合成条件优化和吸附条件优化。

细菌可以适应一定 pH 范围内的培养基, 但是低 pH 条件导致溶液离子浓度大, 各种阴阳离子大量共存, 次生矿物不易发生沉淀^[1], 随着 pH 升高, 次生矿物沉淀量增加, 但是细菌对培养基的适应性变差, 导致生物合成次生矿物的量减少。在装液量较少的情况下, 种子液接入初期很容易混质均匀, 培养液中各处菌体分散稀薄, 降低了接菌初期细菌生长的正向的群体效应^[56]; 而随着装液量的增加, 在相同的振荡频率下培养液不易混质均匀, 可能存在局部菌体密度大的情况, 出现细菌生长群体效应增强, 加快细菌生长代谢的速度; 但装液量过多会影响培养基中的溶

氧量, 溶氧量降低从而影响细菌生长代谢, 所以当装液量达到 80% 时, 可以看出次生矿物生产率相对于装液量 60% 呈现断崖式下跌。在较低的温度, 细菌内用于各种生命活动的酶活性降低, 细菌处于缓慢生长的状态, 代谢速度相对较慢; 随着温度升高, 逐渐达到适合细菌生长代谢增殖的范围, 细菌代谢速度加快, 合成次生矿物的速率增加; 温度达到 40.0 °C 时, 过高的温度会直接破坏细菌内用于生命代谢活动的酶活性^[57], 生理状态较好的一部分细菌可以适应环境, 其他细菌无法适应环境直接死亡, 导致细菌生长增殖速率急速下降, 次生矿物合成速度也呈现断崖式下跌。在低转速条件下, 培养基匀质程度较低, 溶氧量较小, 不能够满足细菌快速生长代谢的需求; 提高转速使培养基物料混合均匀以及增加溶氧, 细菌生长代谢速度增加。而过高的转速导致培养基内各种物料和菌体产生摩擦、对菌体产生破坏, 菌体产生损伤后影响其生命活动, 菌代谢速度变慢甚至导致菌体过早死亡, 引起次生矿物生产率降低。由单因素试验结果进行影响因素对次生矿物合成的显著性分析, 选定响应面试验各因素水平范围, 在给定的水平范围内, 影响程度为: 温度 > pH > 转速, 这个结果与单因素试验结果一致。由于响应面进一步缩小了 pH 的水平范围, 可以解释拟合的响应面模型中 pH 因素的 *P* 值为不显著。而转速的单因素试验在较大的范围内表现出对次生矿物合成的显著影响, 但由于响应面进一步缩小了水平范围, 使得在选定水平范围内转速对次生矿物合成影响较小。由图 1 和图 3 可以看出, 单因素结果与响应面结果得出的结论基本一致。

由于 XRD 结果显示为多种物质的混合物, 结晶度差, 因此不能从 XRD 谱图中分析晶粒尺寸等晶体参数, 但可以由拟合的峰位与数据库 PDF 卡片中标准物质的峰位进行比对, 比对结

果已在本文结果与分析部分做陈述。本研究合成的次生矿物种类与之前的研究中产生的次生矿物种类有较大的差异,造成差异的原因猜想有以下几点:首先,最主要的差异为菌种差异,以往的研究所用菌种大多为氧化亚铁硫杆菌,而本研究所使用的菌种为固氮氧化亚铁钩端螺旋菌;其次,以往的研究中,培养基成分多含 K^+ ,而本研究所用培养基成分不含 K^+ ,一价阳离子由铵根离子替代,因此不能形成稳定的、结晶度高的黄钾铁矾,而是形成了一部分的铵黄钾铁矾^[58]。由于目前学术界对固氮氧化亚铁钩端螺旋菌的研究较少,不能够获得更多的固氮氧化亚铁钩端螺旋菌产次生矿物种类的证据,仅能作出以上猜想。从该菌产生的次生矿物的 SEM 图来看,与已有研究形成的沉淀中施威特曼石以及混合物沉淀的形貌外观较为相似^[59],均呈现表面粗糙、多枝丫、尖刺、针状凸起,而有此外观的矿物比表面积也较结晶度高的黄钾铁矾沉淀更大,更加有利于后续对重金属或其他有害物质的吸附。

通过选择对次生矿物合成影响显著的因素设计响应面实验,确定次生矿物高产条件为: pH 2.82、温度 31.7 °C、转速 135 r/min、装液量 50%,实际生产率达到 65.189 mg/(L·h),通过 XRD、SEM 表征手段对制备的次生矿物进行定性分析以及表面形貌观察, XRD 测试表明矿物结晶度较差,是一种无定形羟基高铁矿物。SEM 测试可以看出该次生矿物具有表面粗糙的片层状和短针状结构,具有相对较高的比表面积,为下一步次生矿物对重金属吸附研究打下了良好的基础。

REFERENCES

- [1] DAOUD J, KARAMANEV D. Formation of jarosite during Fe^{2+} oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Minerals Engineering, 2006, 19(9): 960-967.
- [2] 周立祥. 酸性矿山废水中生物成因次生高铁矿物的形成及环境工程意义[J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 74-82. ZHOU LX. Biogenic iron oxyhydrogensulfate and iron oxyhydroxide occurring in acid mine drainage and their environmental engineering implications[J]. Earth Science Frontiers, 2008, 15(6): 74-82 (in Chinese).
- [3] YANG MR, ZHAN Y, ZHANG S, WANG WD, YAN L. Biological materials formed by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and their potential applications[J]. 3 Biotech, 2020, 10(11): 475.
- [4] BURGOS WD, BORCH T, TROYER LD, LUAN FB, LARSON LN, BROWN JF, LAMBSON J, SHIMIZU M. Schwertmannite and Fe oxides formed by biological low-pH Fe(II) oxidation versus abiotic neutralization: impact on trace metal sequestration[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2012, 76: 29-44.
- [5] AYORA C, MACÍAS F, TORRES E, LOZANO A, CARRERO S, NIETO JM, PÉREZ-LÓPEZ R, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ A, CASTILLO-MICHEL H. Recovery of rare earth elements and yttrium from passive-remediation systems of acid mine drainage[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(15): 8255-8262.
- [6] BALEEIRO A, FIOL S, OTERO-FARIÑA A, ANTELO J. Surface chemistry of iron oxides formed by neutralization of acidic mine waters: removal of trace metals[J]. Applied Geochemistry, 2018, 89: 129-137.
- [7] ZHANG ZH, WANG L, ZHOU B, WANG SC, FAN L, HU SH, WU YG. Adsorption performance and mechanism of synthetic schwertmannite to remove low-concentration fluorine in water[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2021, 107(6): 1191-1201.
- [8] 林杰锐, 梁培芬, 文震, 谢莹莹. 可溶性硫化物介导对矿区拦泥库沉积物中重金属垂直迁移特征的影响[J]. 环境工程学报, 2022, 16(10): 3392-3401. LIN JR, LIANG PF, WEN Z, XIE YY. Effects of soluble sulfide on the vertical migration of heavy metals in the sediment of mine retaining reservoir[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(10): 3392-3401 (in Chinese).
- [9] 冯乙晴, 郝立凯, 郭圆, 徐绯, 徐恒. 酸性矿山废水微生物组时空演变特征及微生物-矿物互作机制[J]. 生态环境学报, 2022, 31(5): 1032-1046. FENG YQ, HAO LK, GUO Y, XU F, XU H.

- Spatio-temporal evolution characteristics of microbiome in acid mine drainage and microbial-mineral interaction mechanism[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2022, 31(5): 1032-1046 (in Chinese).
- [10] 欧莉莎. 含硫尾矿及酸性矿山排水环境中次生矿物的形成及环境意义[J]. *世界有色金属*, 2022(21): 130-132.
- OU LS. Formation and environmental significance of secondary minerals in sulfur bearing tailings and acid mine drainage environment[J]. *World Nonferrous Metals*, 2022(21): 130-132 (in Chinese).
- [11] OHNUKI T, SAKAMOTO F, KOZAI N, OZAKI T, YOSHIDA T, NARUMI I, WAKAI E, SAKAI T, FRANCIS AJ. Mechanisms of arsenic immobilization in a biomat from mine discharge water[J]. *Chemical Geology*, 2004, 212(3/4): 279-290.
- [12] ESPAÑA JS, PAMO EL, PASTOR ES, ANDRÉS JR, RUBÍ JAM. The natural attenuation of two acidic effluents in *Tharsis* and La Zarza-Perrunal mines (Iberian Pyrite Belt, Huelva, Spain)[J]. *Environmental Geology*, 2005, 49(2): 253-266.
- [13] FUKUSHI K, SASAKI M, SATO T, YANASE N, AMANO H, IKEDA H. A natural attenuation of arsenic in drainage from an abandoned arsenic mine dump[J]. *Applied Geochemistry*, 2003, 18(8): 1267-1278.
- [14] 陆建军, 陆现彩, 朱长见, 孙东平, 高剑锋, 王汝成. 氧化亚铁硫杆菌对矿山酸矿水中金属污染元素分布的影响[J]. *南京大学学报(自然科学版)*, 2005, 41(2): 113-119.
- LU JJ, LU XC, ZHU CJ, SUN DP, GAO JF, WANG RC. The effect of *Thiobacillus ferrooxidans* on the distribution of metal trace elements of acid mine drainage resulting in environmental pollution[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2005, 41(2): 113-119 (in Chinese).
- [15] 陈福星. 施氏矿物对污染水体中六价铬及三价砷的吸附去除研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2006.
- CHEN FX. Removal of chromium(VI) and arsenite(III) in polluted waters through adsorption onto biosynthetic schwertmannite[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [16] 王未. 生物成因铁矿物的形成及其对重金属的去除[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2016.
- WANG W. Formation of biogenic iron minerals and their adsorption capacities to heavy metals[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2016 (in Chinese).
- [17] SOWERS TD, BLACKMON MD, BETTS AR, JERDEN ML, SCHECKEL KG, BRADHAM KD. Potassium jarosite seeding of soils decreases lead and arsenic bioaccessibility: a path toward concomitant remediation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(50): e2311564120.
- [18] TYSON GW, CHAPMAN J, HUGENHOLTZ P, ALLEN EE, RAM RJ, RICHARDSON PM, SOLOVYEV VV, RUBIN EM, ROKHSAR DS, BANFIELD JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment[J]. *Nature*, 2004, 428: 37-43.
- [19] TYSON GW, LO I, BAKER BJ, ALLEN EE, HUGENHOLTZ P, BANFIELD JF. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 6319-6324.
- [20] ALIAGA GOLTSMAN DS, DENEV VJ, SINGER SW, VerBERKMOES NC, LEFSRUD M, MUELLER RS, DICK GJ, SUN CL, WHEELER KE, ZEMLA A, BAKER BJ, HAUSER L, LAND M, SHAH MB, THELEN MP, HETTICH RL, BANFIELD JF. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing "*Leptospirillum rubarum*" (Group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4599-4615.
- [21] ALIAGA GOLTSMAN DS, DASARI M, THOMAS BC, SHAH MB, VerBERKMOES NC, HETTICH RL, BANFIELD JF. New group in the *Leptospirillum* clade: cultivation-independent community genomics, proteomics, and transcriptomics of the new species "*Leptospirillum* group IV UBA BS"[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(17): 5384-5393.
- [22] SONG YW, LIU YL, WANG HR. Comparison of the biological and chemical synthesis of schwertmannite at a consistent Fe²⁺ oxidation efficiency and the effect of extracellular polymeric substances of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on biomineralization[J]. *Materials*, 2018,

- 11(9): 1739.
- [23] ZHOU JX, ZHOU YJ, ZHANG J, DONG Y, LIU FW, WU ZH, BI WL, QIN JM. Effect of pH regulation on the formation of biogenic schwertmannite driven by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its arsenic removal ability[J]. *Environmental Technology*, 2022, 43(24): 3706-3718.
- [24] ZHANG J, ZHOU JX, JI YP, BI WL, LIU FW. Effects of Fe(II) concentration on the biosynthesis of schwertmannite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and the As(III) removal capacity of schwertmannite[J]. *Environmental Technology*, 2023, 44(27): 4147-4156.
- [25] GAN M, SUN SJ, ZHENG ZH, TANG HJ, SHENG JR, ZHU JY, LIU XX. Adsorption of Cr(VI) and Cu(II) by AIPO₄ modified biosynthetic Schwertmannite[J]. *Applied Surface Science*, 2015, 356: 986-997.
- [26] SUN SJ, ZHU JY, ZHENG ZH, LI JY, GAN M. Biosynthesis of β -cyclodextrin modified Schwertmannite and the application in heavy metals adsorption[J]. *Powder Technology*, 2019, 342: 181-192.
- [27] DONG SX, DOU XM, MOHAN D, PITTMAN CU Jr, LUO JM. Synthesis of graphene oxide/schwertmannite nanocomposites and their application in Sb(V) adsorption from water[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 270: 205-214.
- [28] ZHU JY, CHEN F, GAN M. Controllable biosynthesis of nanoscale schwertmannite and the application in heavy metal effective removal[J]. *Applied Surface Science*, 2020, 529: 147012.
- [29] CHAI LY, TANG JW, LIAO YP, YANG ZH, LIANG LF, LI QZ, WANG HY, YANG WC. Biosynthesis of schwertmannite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its application in arsenic immobilization in the contaminated soil[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2016, 16(10): 2430-2438.
- [30] ZHANG J, SHI J, ZHANG SS, ZHOU LX, XU JM, GE YY, FAN WH, LIU FW. Schwertmannite adherence to the reactor wall during the bio-synthesis process and deterioration of its structural characteristics and arsenic(III) removal efficiency[J]. *Minerals*, 2017, 7(4): 64.
- [31] JONES FS, BIGHAM JM, GRAMP JP, TUOVINEN OH. Formation and characterization of ternary (Na, NH₄, H₃O)-jarosites produced from *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures[J]. *Applied Geochemistry*, 2018, 91: 14-22.
- [32] 邹龙, 朱菲, 唐洁, 朱祺, 倪海燕, 龙中儿, 黄运红. 细菌介导水铁矿合成铁硫矿物去除水体铬污染[J]. *中国环境科学*, 2023, 43(2): 610-619.
- ZOU L, ZHU F, TANG J, ZHU Q, NI HY, LONG ZE, HUANG YH. Bacterial synthesis of iron sulfur minerals from ferrihydrite for aqueous chromium pollutant removal[J]. *China Environmental Science*, 2023, 43(2): 610-619 (in Chinese).
- [33] 刘敏瑞, 蔺朋武, 齐兴娥, 倪永清. 基于 16S rRNA 和 RubisCO 基因对嗜酸硫杆菌的系统发育及多样性[J]. *微生物学报*, 2016, 56(4): 664-679.
- LIU MR, LIN PW, QI XE, NI YQ. Phylogenetic and diversity analysis of *Acidithiobacillus* spp. based on 16S rRNA and RubisCO genes homologues[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 664-679 (in Chinese).
- [34] 赵丹, 刘坤, 晏磊. 基于亚铁氧化率的铁硫混合腐蚀菌细胞固定化研究[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2021, 33(6): 79-86.
- ZHAO D, LIU K, YAN L. Study on cell immobilization of iron-sulfur mixed corrosion bacteria based on the ferrous oxidation[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2021, 33(6): 79-86 (in Chinese).
- [35] 黄海涛, 王崇, 耿康慧, 伍贤辉, 魏彩春. 富里酸对 *A. ferrooxidans* 活性和次生铁矿物形成的影响[J]. *环境科学学报*, 2023, 43(7): 112-120.
- HUANG HT, WANG C, GENG KH, WU XH, WEI CC. Effect of fulvic acid on the activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and the formation of secondary iron minerals[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2023, 43(7): 112-120 (in Chinese).
- [36] 王鹤茹, 杨琳琳, 王蕊, 吴怡谦, 宋永伟. 基于不同能源底物和营养水平的酸性矿山废水产生机制研究[J]. *环境科学学报*, 2021, 41(10): 4056-4063.
- WANG HR, YANG LL, WANG R, WU YQ, SONG YW. Study on the mechanisms of acid mine drainage generation based on different energy substrates and nutrient levels[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(10): 4056-4063 (in Chinese).
- [37] 黄克昌, 郭刚军, 马尚玄, 付稼榕, 徐文婷, 魏元苗, 杨悦雪, 贺熙勇. 响应面法优化澳洲坚果真空油炸工艺及品质分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(5): 197-204.
- HUANG KC, GUO GJ, MA SX, FU JR, XU WT, WEI

- YM, YANG YX, HE XY. Optimization of vacuum frying process and quality analysis of *Macadamia* kernels by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 197-204 (in Chinese).
- [38] 刘竹, 邹纯才, 鄢海燕, 陈涛. 基于 Box-Behnken 响应面法与 BP 神经网络的油菜花粉总黄酮提取工艺研究[J]. 吉林医药学院学报, 2023. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.20231122.004.
- LIU Z, ZOU CC, YAN HY, CHEN T. Study on extraction technology of total flavonoids from rape pollen based on Box-Behnken response surface method and BP neural network[J]. Journal of Jilin Medical University, 2023. DOI: 10.13845/j.cnki.issn1673-2995.20231122.004 (in Chinese).
- [39] 王胜, 于廷连, 张雪超, 李金涛, 闫梅霞. 响应面法优化灵芝胞外漆酶酶活测定反应体系[J]. 特产研究, 2023. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2023.203
- WANG S, YU TL, ZHANG XC, LI JT, YAN MX. Optimization of reaction system for determination of extracellular laccase activity in *Ganoderma lucidum* by response surface method[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2023. DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2023.203 (in Chinese).
- [40] 周顺桂, 周立祥, 黄焕忠. 黄钾铁矾的生物合成与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(9): 1140-1143.
- ZHOU SG, ZHOU LX, HUANG HZ. Biosynthesis and characterization of jarosite[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2004, 24(9): 1140-1143 (in Chinese).
- [41] JOHANNESSEN KC, VANDER ROOST J, DAHLE H, DUNDAS SH, PEDERSEN RB, THORSETH IH. Environmental controls on biomineralization and Fe-mound formation in a low-temperature hydrothermal system at the Jan Mayen Vent Fields[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2017, 202: 101-123.
- [42] GILBERT P, FRAZER B, ABRECHT M. The organic-mineral interface in biominerals[J]. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2005, 59(1): 157-185.
- [43] MIELKE RE, PACE DL, PORTER T, SOUTHAM G. A critical stage in the formation of acid mine drainage: colonization of pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* under pH-neutral conditions[J]. Geobiology, 2003, 1(1): 81-90.
- [44] ZHU TT, LU XC, LIU H, LI J, ZHU XY, LU JJ, WANG RC. Quantitative X-ray photoelectron spectroscopy-based depth profiling of bioleached arsenopyrite surface by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2014, 127: 120-139.
- [45] ZHANG P, CHEN YP, GUO JS, SHEN Y, YANG JX, FANG F, LI C, GAO X, WANG GX. Adsorption behavior of tightly bound extracellular polymeric substances on model organic surfaces under different pH and cations with surface plasmon resonance[J]. Water Research, 2014, 57: 31-39.
- [46] ZHU JY, WANG QF, ZHOU S, LI Q, GAN M, JIANG H, QIN WQ, LIU XD, HU YH, QIU GZ. Insights into the relation between adhesion force and chalcopyrite-bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2015, 126: 351-357.
- [47] 马莹, 姜岸, 石孝均, 李振轮, 陈新平. 微生物胞外多糖的合成及其在重金属修复中的作用机制与应用[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 701-719.
- MA Y, JIANG A, SHI XJ, LI ZL, CHEN XP. Synthesis of microbial exopolysaccharides and their mechanisms and applications in heavy metal remediation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 701-719 (in Chinese).
- [48] SAND W, GEHRKE T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(1): 49-56.
- [49] RODRIGUEZ-NAVARRO C, JIMENEZ-LOPEZ C, RODRIGUEZ-NAVARRO A, GONZALEZ-MUÑOZ MT, RODRIGUEZ-GALLEGO M. Bacterially mediated mineralization of vaterite[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2007, 71(5): 1197-1213.
- [50] BAUMGARTNER J, MORIN G, MENGUY N, GONZALEZ TP, WIDDRAT M, COSMIDIS J, FAIVRE D. Magnetotactic bacteria form magnetite from a phosphate-rich ferric hydroxide via nanometric ferric (oxyhydr)oxide intermediates[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(37): 14883-14888.
- [51] HASIOTIS ST, BRAKE SS. Macroscopic and microscopic morphological features of stromatolites related to activity of eukaryote-dominated biofilms in an acid mine drainage environment: biosignatures and understanding preservation of stromatolites as trace

- fossils[J]. Geomicrobiology Journal, 2019, 36(7): 651-671.
- [52] LIU FW, QIAO XX, XING K, SHI J, ZHOU LX, DONG Y, BI WL, ZHANG J. Effect of nitrate ions on *Acidithiobacillus ferrooxidans*-mediated bio-oxidation of ferrous ions and pyrite[J]. Current Microbiology, 2020, 77(6): 1070-1080.
- [53] ZHU JY, GAN M, ZHANG D, HU YH, CHAI LY. The nature of Schwertmannite and Jarosite mediated by two strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with different ferrous oxidation ability[J]. Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications, 2013, 33(5): 2679-2685.
- [54] SONG YW, YANG LL, WANG HR, SUN XX, BAI SY, WANG N, LIANG JR, ZHOU LX. The coupling reaction of Fe^{2+} bio-oxidation and resulting Fe^{3+} hydrolysis drastically improve the formation of iron hydroxysulfate minerals in AMD[J]. Environmental Technology, 2021, 42(15): 2325-2334.
- [55] EGAL M, CASIOT C, MORIN G, PARMENTIER M, BRUNEEL O, LEBRUN S, ELBAZ-POULICHET F. Kinetic control on the formation of tooeleite, schwertmannite and jarosite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains in an As(III)-rich acid mine water[J]. Chemical Geology, 2009, 265(3/4): 432-441.
- [56] 赵丹. DNA 介导的细菌可编程组装及群体效应调控[D]. 长沙: 湖南大学硕士学位论文, 2020.
- ZHAO D. DNA program the assembly of bacteria and regulating their quorum sensing system[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan University, 2020 (in Chinese).
- [57] 常婷婷, 赵妍, 杨焕玲, 宋晓霞, 余昌霞, 查磊, 董沁, 陈明杰. 食药菌高温胁迫应答研究进展[J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 124-134.
- CHANG TT, ZHAO Y, YANG HL, SONG XX, YU CX, ZHA L, DONG Q, CHEN MJ. Research progress on heat stress response in edible and medicinal fungi[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(1): 124-134 (in Chinese).
- [58] SONG YW, ZHANG JY, WANG HR. Initial pH and K^+ concentrations jointly determine the types of biogenic ferric hydroxysulfate minerals and their effect on adsorption removal of Cr(VI) in simulated acid mine drainage[J]. Water Science and Technology: a Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2018, 78(10): 2183-2192.
- [59] FU YR, ZHANG RX, WANG N, WU P, ZHANG YH, AN L, ZHANG YH. Effects of initial pH and carbonate rock dosage on bio-oxidation and secondary iron mineral synthesis[J]. Toxics, 2023, 11(3): 224.