



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108114975 A

(43)申请公布日 2018.06.05

(21)申请号 201711279584.0

(22)申请日 2017.12.07

(71)申请人 中国科学院地球化学研究所
地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

申请人 广东省生态环境技术研究所

(72)发明人 童辉 刘承帅 陈曼佳 李芳柏
王琦 刘亚楠

(74)专利代理机构 贵阳春秋知识产权代理事务所(普通合伙) 52109

代理人 杨云

(51)Int.Cl.

B09C 1/10(2006.01)

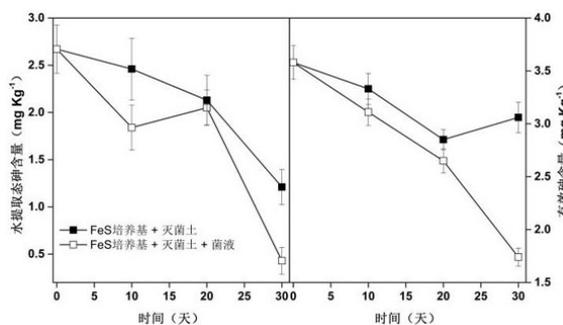
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法

(57)摘要

本发明公开了一种微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法,属于土壤重金属修复方法。其方法是从富铁土壤中分离纯化微好氧铁氧化菌团,将含有该微好氧铁氧化菌团的菌液接种于淹水的砷污染土壤中,添加薄层FeS培养基作为Fe(II)的来源;在25℃条件下遮光培养30天。本发明利用微生物铁氧化成矿过程固定砷,降低其移动性及生物有效性,具有菌液制备简单、处理成本低,对目标土壤不会产生二次污染等优点;是一种理砷污染土壤的方法。



1. 一种微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法,包括微好氧铁氧化菌团的富集与纯化;其特征在于方法如下:

1) 反向梯度培养管的配置

1.1) 将硫化亚铁悬液按1:5的体积比加入到含有MWMM培养基的玻璃管中形成反向铁氧浓度梯度;

1.2) 分别按1 ml L⁻¹的剂量向MWMM培养基中加入维生素混合液和矿物元素混合液,加入终浓度为5mM的NaHCO₃,通入过滤的CO₂,保证培养基的pH值为6.2,得培养管;

2) 微好氧铁氧化菌团的富集培养

2.1) 将新鲜水稻土与超纯水按1:1重量体积比混合后得接种液,然后接种10~50μl于所述培养管中;

2.2) 将上述接种有微好氧铁氧化菌团的培养管置于25℃环境中遮光培养30天,即可在培养管中形成明显的铁氧化带;

3) 微好氧铁氧化菌团的纯化

3.1) 吸取步骤2.2)培养管中的铁氧化带,在10⁻²~10⁻⁸范围内按10倍梯度稀释,将各梯度稀释液分别接入新的培养管中;

3.2) 将步骤3.1)中装有不同梯度稀释液的各培养管置于25℃环境中遮光培养30天;

3.3) 从产生铁氧化带各培养管中选取稀释倍数最高的那只培养管,按上述方法继续稀释培养四代,即得含有纯化微好氧铁氧化菌团的菌液;

4) 治理砷污染土壤

将pH值为6~6.8的砷污染土壤覆盖于FeS培养基上,按5~10u1/(g土壤)的接种量将步骤3.3)中制备得到的所述菌液接种于所述砷污染土壤中,然后加水淹没土壤;在25℃条件下遮光培养30天。

2. 根据权利要求1所述的微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法,其特征在于:过滤CO₂的滤孔为0.22μm。

3. 根据权利要求1所述的微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法,其特征在于:所述维生素混合液是每升去离子水中含2mg生物素、2mg叶酸、10mg维生素B6、5mg硫胺素、5mg核黄素、5mg烟酸、5mg泛酸钙、0.1mg维生素B12、5mg对氨基苯甲酸、5mg硫辛酸;

所述矿物元素混合液是每升去离子水中含1.5g氨三乙酸、3gMgSO₄·7H₂O、0.5gMnSO₄·H₂O、1gNaCl、0.1gFeSO₄·7H₂O、0.1gCoCl₂·6H₂O、0.1gCaCl₂、0.1gZnSO₄·7H₂O、0.01gCuSO₄·5H₂O、0.01gKAl(SO₄)₂·12H₂O、0.01gH₃BO₃、0.01gNa₂MoO₄·2H₂O。

4. 根据权利要求1所述的微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法,其特征在于:水淹深度为1cm。

微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种土壤重金属修复方法,具体涉及一种微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法。

背景技术

[0002] 砷(As)是一种广泛存在于自然界中的无机元素,具有类似金属特性,其在地壳、土壤和海洋中的质量丰度分别为 2.1mg kg^{-1} 、 5mg kg^{-1} 和 0.0023mg kg^{-1} 。主要通过地质运动、酸性矿水排放、农药及木材防腐剂等方式进入环境中。我国大面积的土壤受到砷污染,亟待开发一种能够快速推广、成本较低的技术方法以降低砷的活性和生物有效性。土壤砷等重金属行为是多种因素共同作用的地表过程,且多种元素的生物地球化学行为都会影响到这一过程。其中铁是土壤中最活跃的高丰度金属元素,其在微生物作用下的形态转化能够引起重金属砷赋存形态的变化,从而影响重金属砷的活性及生物有效性。因此,以铁循环的生物地球化学过程为基础,研制具有应用价值的产品降低土壤砷的移动性和生物有效性是切实可行的技术思路。

[0003] 厌氧/微氧条件下,微生物驱动的铁循环对于砷的迁移有着重要的作用。如异化铁还原微生物会诱导铁氧化物和铁氢氧化物的还原溶解,使吸附态的砷释放到环境中,从而促进砷的迁移;砷还原微生物将As(V)还原成As(III),不仅增加了砷的移动性,还降低了其在金属氧化物表面的吸附能力。因此,厌氧/微氧条件下微生物对砷和铁的还原将导致砷的移动性增强,从而造成水体和土壤的污染。厌氧/微氧环境中为了有效的固定砷,必须加强亚铁及砷的再氧化,从而减少砷的移动性。事实上,在有氧条件下生物氧化亚铁及砷并固定砷已经被用于矿山废水的治理。但由于环境中含有的有机质、硫化物及其他还原性化合物大量消耗氧,使得溶解氧浓度急剧下降,导致需氧微生物活动受到限制。因此,对于厌氧/微氧条件下生物亚铁氧化成矿机制的研究有助于砷污染水体或土壤治理新方法的建立。

[0004] 近年来,越来越多的研究表明在微氧或厌氧条件下,生物催化亚铁氧化在砷的固定中起着重要的作用。砷的固定不仅降低了其在土壤中的移动性,同时也降低了生物有效性。中性铁氧化菌(FeOB)氧化亚铁的产物主要为结晶度较差的水铁矿,其中以二线水铁矿形态为主,形成的铁氧化物由于有较高的零电荷点,使其表面带正电荷可作为吸附剂固定重金属。在土壤或者水体中,铁氧化物对砷有很强的吸附作用,且可以降低其生物可利用性,因此可利用亚铁氧化成矿过程降低砷的潜在风险。微氧型FeOB(*Gallionella*和*Leptothrix*)形成的铁氧化物通过表面吸附及共沉淀可以固定地下水中90%的砷。同时,吸附在铁氧化物表面的砷可能进入铁氧化物的晶格中形成Fe-As次生矿物,使其更稳定的被固定在矿物中。

[0005] 根据以上分析,利用铁的生物氧化成矿过程耦合砷固定研发降低土壤中砷的移动性及生物有效性的技术方法,达到砷污染土壤治理的目的,对重金属污染土壤修复和生态安全保障具有重要的社会意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的上述缺陷,本发明旨在提供一种微好氧铁氧化菌团治理砷污染土壤的方法。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案包括微好氧铁氧化菌团的富集与纯化,其步骤如下:

1) 反向梯度培养管的配置

1.1) 将硫化亚铁悬液按1:5的体积比加入到含有MWMM培养基的玻璃管中形成反向铁氧浓度梯度,玻璃管中形成环状铁氧化带;

1.2) 分别按1 ml L⁻¹的剂量向MWMM培养基中加入维生素混合液和矿物元素混合液,加入终浓度为5mM的NaHCO₃,通入过滤的CO₂,保证培养基的pH值为6.2;得培养管;

2) 微好氧铁氧化菌团的富集培养

2.1) 将新鲜水稻土与超纯水按1:1重量体积比混合后得接种液,然后接种10~50μl于所述培养管中;

2.2) 将上述接种有微好氧铁氧化菌团的培养管置于25℃环境中遮光培养30天,即可在培养管中形成明显的铁氧化带;

3) 微好氧铁氧化菌团的纯化

3.1) 吸取步骤2.2) 培养管中的铁氧化带,在10⁻²~10⁻⁸范围内按10倍梯度稀释,将各梯度稀释液分别接入新的培养管中;

3.2) 将步骤3.1) 中装有不同梯度稀释液的各培养管置于25℃环境中遮光培养30天;

3.3) 从产生铁氧化带各培养管中选取稀释倍数最高的那只培养管,按上述方法继续稀释培养四代,即得含有纯化微好氧铁氧化菌团的菌液;

4) 治理砷污染土壤

将pH值为6~6.8的砷污染土壤覆盖于FeS培养基上,按5~10ul/(g土壤)的接种量将步骤3.3) 中制备得到的所述菌液接种于所述砷污染土壤中,然后加水淹没土壤;在25℃条件下遮光培养30天。

[0008] 本发明的优选技术方案为:过滤CO₂的滤孔为0.22μm。

[0009] 本发明进一步的优选技术方案为:所述维生素混合液是每升去离子水中含2mg生物素、2mg叶酸、10mg维生素B6、5mg硫胺素、5mg核黄素、5mg烟酸、5mg泛酸钙、0.1mg维生素B12、5mg对氨基苯甲酸、5mg硫辛酸;

所述矿物元素混合液是每升去离子水中含1.5g氨三乙酸、3gMgSO₄·7H₂O、0.5gMnSO₄·H₂O、1gNaCl、0.1gFeSO₄·7H₂O、0.1gCoCl₂·6H₂O、0.1gCaCl₂、0.1gZnSO₄·7H₂O、0.01gCuSO₄·5H₂O、0.01gKAl(SO₄)₂·12H₂O、0.01gH₃BO₃、0.01gNa₂MoO₄·2H₂O。

[0010] 本发明更进一步的优选技术方案为:水淹深度为1cm。

[0011] 在上述技术方案中,所述MWMM培养基为改良后的矿物质培养基(modified Wolfe, s mineral medium, MWMM),所述纯化微好氧铁氧化菌团主要微生物为*Cupriavidus*、*Massilia*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Rudaea*、*Sphingomonas*和*Variovorax*。

[0012] 与现有技术比较,本发明由于采用了上述技术方案,从富铁土壤中分离纯化微好氧铁氧化菌团(其主要微生物为*Cupriavidus*、*Massilia*、*Pseudomonas*、*Ralstonia*、*Rudaea*、

*Sphingomonas*和*Variovorax*),将菌液接种于淹水的自然砷污染土壤中,能降低土壤中提取态砷及生物有效砷含量,减少其潜在风险。本发明方法利用微生物铁氧化成矿过程固定砷,降低其移动性及生物有效性;具有菌液制备简单,处理成本低,在应用过程中对目标土壤不会产生二次污染。具体表现为:

(1)本发明方法适用于土壤自身形成的微氧环境,激活土壤中微好氧铁氧化菌活性,从而加速铁氧化成矿过程;在这一过程中耦合砷固定,降低砷的移动性及活性。

[0013] (2)相对于纯厌氧菌剂治理重金属污染土壤修复,本发明方法工序简单,易于操作。

[0014] (3)相对于传统好氧处理耗能巨大及厌氧处理工艺复杂,本发明方法制备菌液投资较少,制备过程简单。

[0015] (4)本发明采用微好氧菌群,其生物成矿过程有较高的固砷效率(一般接种15天后砷的固定率达到90%以上)。

附图说明

[0016] 图1:微好氧FeOB菌群成矿图;

图2:微好氧FeOB菌群对亚铁氧化成矿的作用;

图3:微好氧FeOB对As(III)的固定作用;

图4:微好氧FeOB对As(V)的固定作用;

图5:微好氧FeOB对低浓度砷的固定作用;

图6:砷污染土壤接种微好氧FeOB后,土壤水提取态砷和有效砷含量的变化。

具体实施方式

[0017] 下面结合附图和具体的实施例对本发明作进一步说明,其步骤如下。

实施例

[0018] 1)反向梯度培养管的配置

1.1)将硫化亚铁悬液按1:5的体积比加入到含有MWMM培养基的玻璃管中形成反向铁氧浓度梯度;

1.2)分别按1 ml L⁻¹的剂量向MWMM培养基中加入维生素混合液和矿物元素混合液,加入终浓度为5mM的NaHCO₃,通入过滤的CO₂,保证培养基的pH值为6.2,得培养管;配置好的培养管在MWMM培养基液面以下约2cm处形成微氧区域;

2)微好氧铁氧化菌团的富集培养

2.1)将新鲜水稻土与超纯水按1:1重量体积比混合后得接种液,然后接种10~50μl于所述培养管中;

2.2)将上述接种有微好氧铁氧化菌团的培养管置于25℃环境中遮光培养30天,即可在培养管中形成明显的铁氧化带,(参见图1);

3)微好氧铁氧化菌团的纯化

3.1)吸取步骤2.2)培养管中的铁氧化带,在10⁻²~10⁻⁸范围内按10倍梯度稀释,将各梯度稀释液分别接入新的培养管中;

3.2) 将步骤3.1)中装有不同梯度稀释液的各培养管置于25℃环境中遮光培养30天;

3.3) 从产生铁氧化带各培养管中选取稀释倍数最高的那只培养管,按上述方法继续稀释培养四代,即得含有纯化微好氧铁氧化菌团的菌液;

4) 治理砷污染土壤

将pH值为6~6.8的砷污染土壤覆盖于FeS培养基上,按5~10u1/(g土壤)的接种量将步骤3.3)中制备得到的所述菌液接种于所述砷污染土壤中,然后加水淹没土壤;在25℃条件下遮光培养30天。

[0019] 在上述实施例中:

过滤CO₂的滤孔为0.22μm。所述维生素混合液是每升去离子水中含2mg生物素、2mg叶酸、10mg维生素B6、5mg硫胺素、5mg核黄素、5mg烟酸、5mg泛酸钙、0.1mg维生素B12、5mg对氨基苯甲酸、5mg硫辛酸。所述矿物元素混合液是每升去离子水中含1.5g氨三乙酸、3gMgSO₄·7H₂O、0.5gMnSO₄·H₂O、1gNaCl、0.1gFeSO₄·7H₂O、0.1gCoCl₂·6H₂O、0.1gCaCl₂、0.1gZnSO₄·7H₂O、0.01gCuSO₄·5H₂O、0.01gKAl(SO₄)₂·12H₂O、0.01gH₃BO₃、0.01gNa₂MoO₄·2H₂O。水淹深度为1cm。

[0020] 以下是采用本发明方法制备的纯化微好氧铁氧化菌团对As(III)、As(V)、低浓度砷进行固定,以及修复砷污染土壤所进行的四组实验。

[0021] 实验1,微好氧铁氧化菌团成矿作用及对As(III)的固定

1) 将上述实施例中得到的含有纯化微好氧铁氧化菌团的菌液按接种量为1~5μl/(ml培养基)的比例接种于新的培养管中,同时设置3个处理,分别为:不含FeS培养基+亚砷酸盐;含FeS培养基+亚砷酸盐;菌液+FeS培养基+亚砷酸盐,培养管中As(III)的初始浓度为600μgL⁻¹。于25℃恒温培养箱中静置避光培养,每个处理设置三个重复。

[0022] 2) 微好氧铁氧化过程形成铁氧化带在厌氧条件下用磷酸缓冲液(10 mM,pH7)洗涤两次,冷冻干燥,利用X射线衍射(XRD)测试其晶体结构。在厌氧箱中,每隔5天取接种体系中铁氧化带或为接种体系中相同高度的培养基990μl并过滤,在滤液中加入10μl浓硝酸(65%)防止砷形态的变化。采用HPLC-ICP-MS测定砷的浓度,验证微好氧铁氧化菌团的固砷能力。

[0023] XRD结果如图2所示,结果表明微好氧FeOB菌团生物成矿的类型主要为弱结晶或无定型铁氧化物。微好氧FeOB菌团对As(III)的固定作用实验结果如图3所示,在未接种且不含FeS的体系中,砷的含量没有变化。在未接种但含有FeS体系中,培养基中砷的含量减少,这是由于化学氧化作用在铁源附近形成铁氧化物吸附了培养基中的砷。在接种体系中,砷的含量急剧下降,在培养15天后,约90%的砷被固定在铁氧化带中。当培养时间到达30天后,培养基中的砷完全被固定。砷的形态测试结果表明,接种体系中在进行亚铁氧化的同时,也发生了砷的氧化。铁氧化带滤出液中基本上全部为As(V),说明As(III)的吸附过程可能是微生物先将As(III)氧化成容易被铁氧化物吸附的As(V),然后再固定。

[0024] 实验2,微好氧铁氧化菌成矿作用及对As(V)的固定过程

1) 将实施例中得到的菌液按接种量为1~5μl/(ml培养基)接种于新的培养管中,同时设置3个处理,分别为:不含FeS培养基+砷酸盐;含FeS培养基+砷酸盐;铁氧化菌液+FeS培养基+砷酸盐,培养管中As(V)的初始浓度为600 μg L⁻¹。于25℃恒温培养箱中静置避光培养,每个处理设置三个重复。

[0025] 2) 微好氧铁氧化过程形成铁氧化带在厌氧条件下用磷酸缓冲液(10 mM,pH7)洗涤

两次,冷冻干燥,利用XRD测试其晶体结构。在厌氧箱中,每隔5天取接种体系中铁氧化带或为接种体系中相同高度的培养基990 μ l并过滤,在滤液中加入10 μ l浓硝酸(65%)防止砷形态的变化。采用HPLC-ICP-MS测定砷的浓度,验证铁氧化菌的固砷能力。

[0026] 3) XRD结果如图2所示,结果表明微好氧FeOB菌团生物成矿的类型主要为弱结晶或无定型铁氧化物。微好氧FeOB菌团对As(V)的固定作用实验结果如图4所示,在未接种且不含FeS的体系中,砷的含量没有变化。在未接种但含有FeS体系中,培养基中砷的含量减少,这是由于化学氧化作用在铁源附近形成铁氧化物吸附了培养基中的砷。在接种体系中,砷的含量急剧下降,在培养10天后,约90%的砷被固定在铁氧化带中。当培养时间到达20天后,培养基中的砷完全被固定。说明微好氧FeOB菌团在氧化亚铁的同时能将砷吸附在铁氧化物表面,从而将砷固定在铁氧化带中。与As(III)相比,微好氧FeOB菌团对As(V)的固定能力明显强于As(III)。

[0027] 实验4,微好氧铁氧化菌成矿作用对低浓度砷的固定作用

1)将实施例4中得到的菌液按接种量为1~5 μ l/(ml培养基)接种于新的培养管中,同时设置4个处理,分别为:含FeS培养基+亚砷酸盐;含FeS培养基+砷酸盐;含铁氧化菌液+FeS培养基+亚砷酸盐;含铁氧化菌液+FeS培养基+砷酸盐,培养管中As(III)和As(V)的初始浓度均为20 μ g L⁻¹。于25 $^{\circ}$ C恒温培养箱中静置避光培养,每个处理设置三个重复。

[0028] 在厌氧箱中,每隔1~2天取接种体系中铁氧化带或为接种体系中相同高度的培养基990 μ l并过滤,在滤液中加入10 μ l浓硝酸(65%)防止砷形态的变化。采用HPLC-ICP-MS测定砷的浓度,验证铁氧化菌团的砷固定能力。

[0029] 实验结果如图5所示,接种菌液的体系中,培养4天后形成淡黄色铁氧化带,其铁氧化带的滤液中基本上没有砷,说明砷完全被固定在形成的铁氧化物中。在未接种但含有FeS体系中,培养基中砷的含量减少,这是由于化学氧化作用在铁源附近形成铁氧化物吸附了培养基中砷。

[0030] 实验5,微好氧铁氧化菌团在砷污染土壤治理中的应用

1)实验用土采自湖南省郴州市砷污染水稻土壤,土壤pH值为6.3,利用 γ 射线(50kGy)灭菌处理。实验设置2个处理,分别为:FeS培养基+灭菌土空白;FeS培养基+灭菌土+菌液,每个处理设置三个重复。在100 ml蓝盖瓶底部覆盖薄层FeS培养基,在FeS培养基上面覆盖50g灭菌土,将实施例4中得到的菌液按接种量为5~10 μ l/(g土)接种于蓝盖瓶中接近FeS培养基,保持1cm淹水层,在25 $^{\circ}$ C恒温培养箱中静置避光培养,培养周期30天。

[0031] 2)培养过程中,在接种土壤中形成松散的红褐色丝状物质即为形成的铁氧化带,取形成铁氧化物层的土壤和空白中相同高度的土壤,并分析土壤中水提取态砷和土壤有效砷含量。

[0032] 3)结果如图6所示,与对照组相比,砷污染土壤接种微好氧FeOB后,其水提取态砷和有效砷含量都分别降低了64.4%和41.2%,说明在接种铁氧化菌团后,形成的铁氧化物使土壤砷的活性大大降低,从而降低了砷的环境风险。

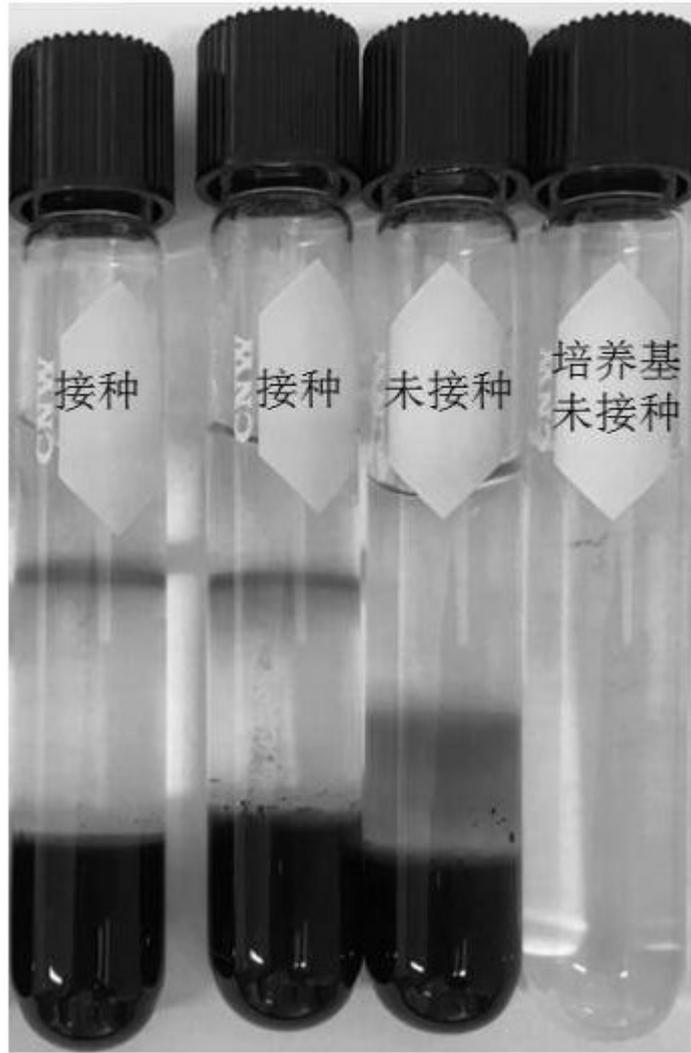


图1

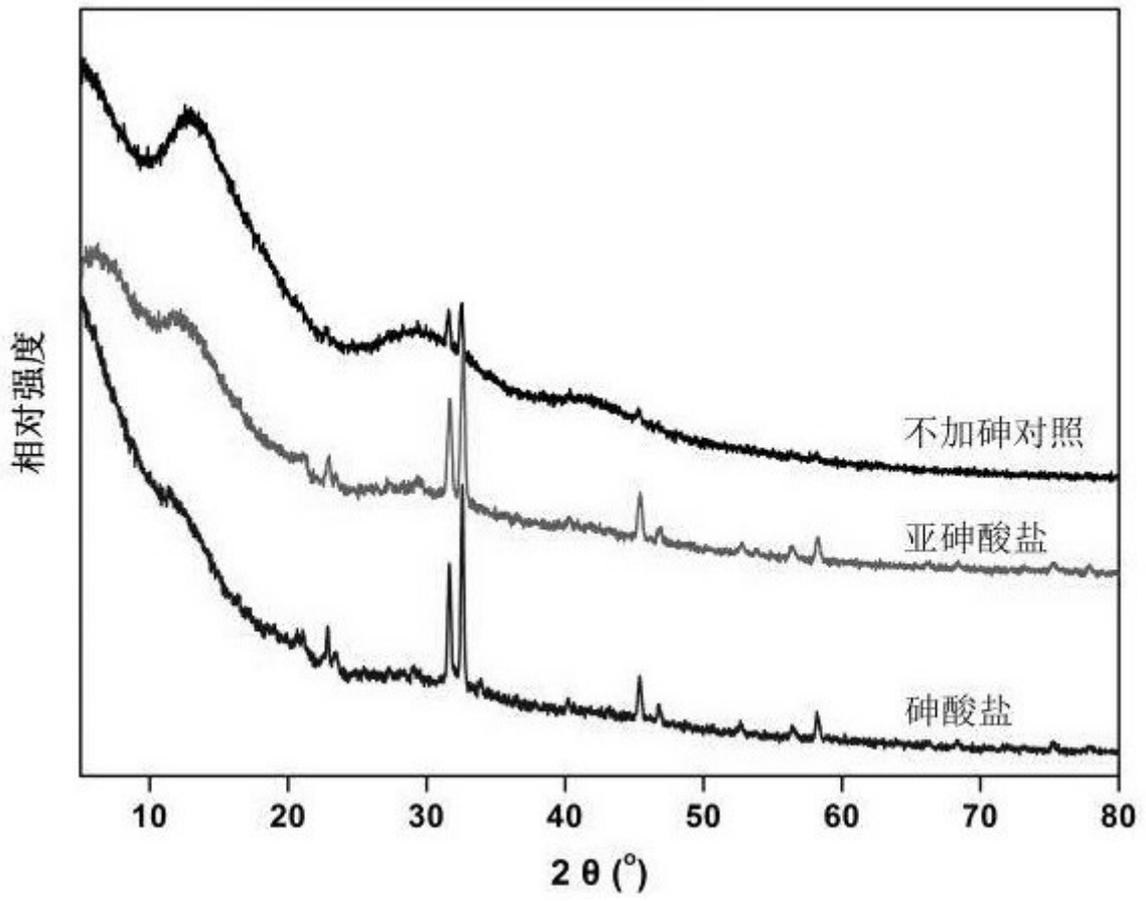


图2

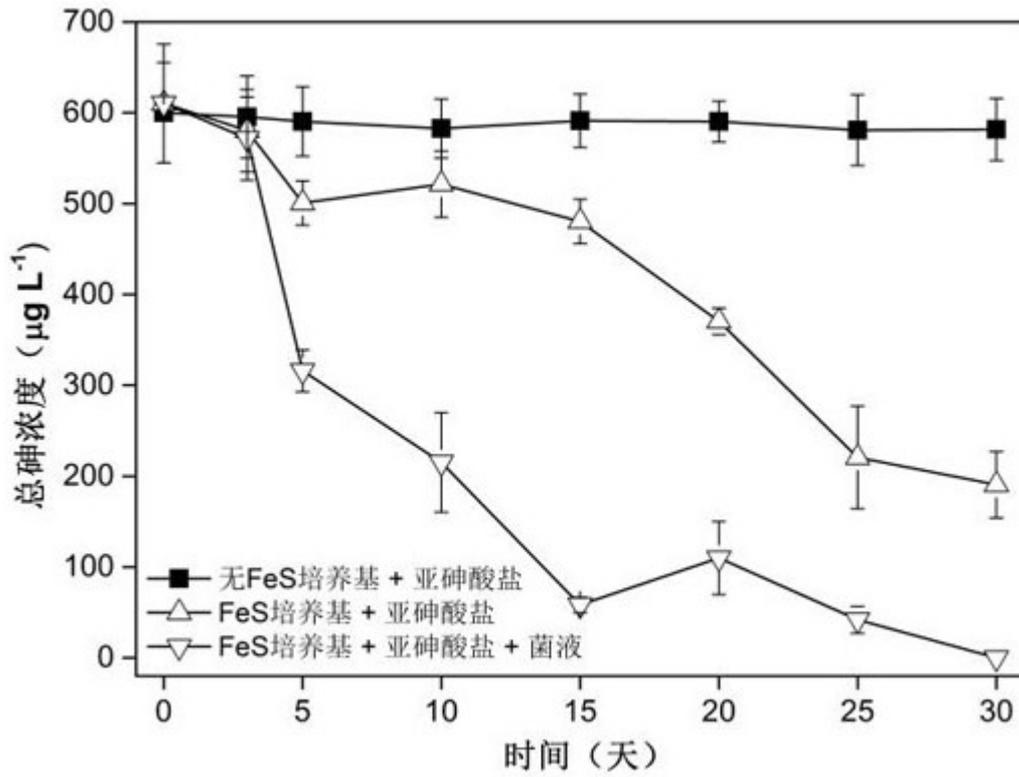


图3

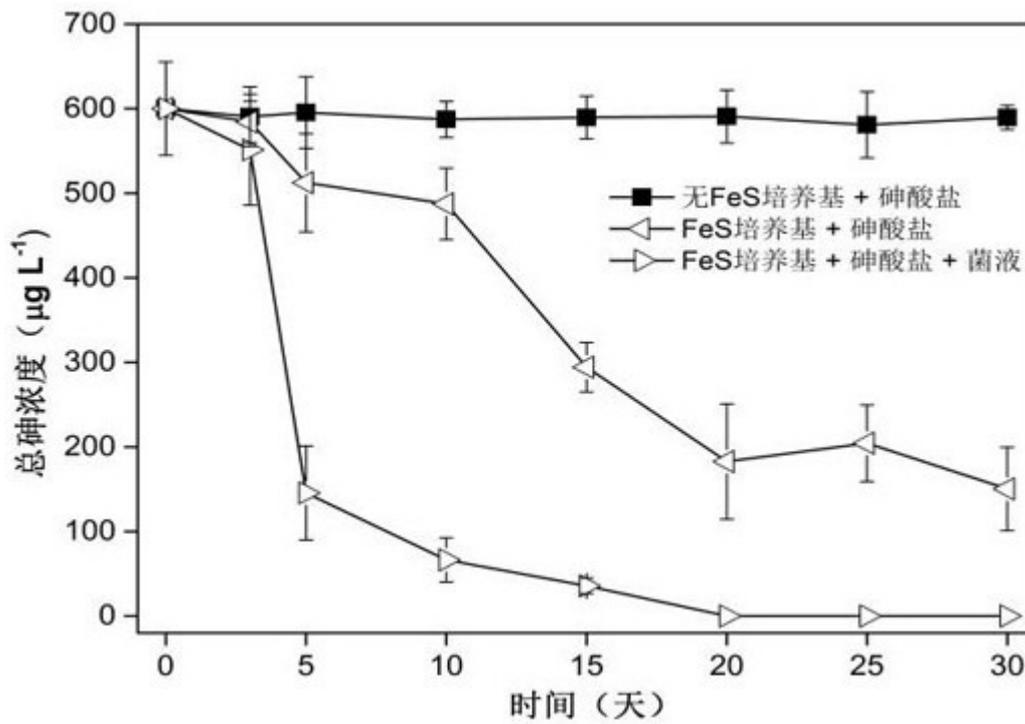


图4

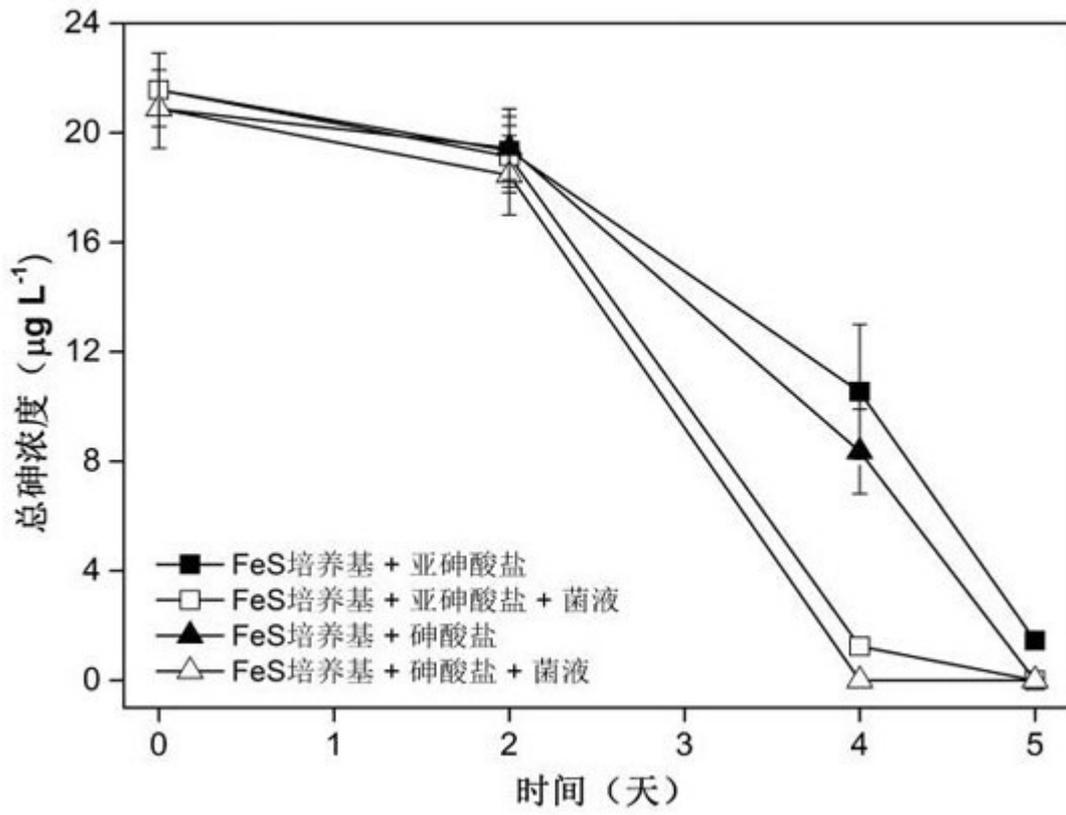


图5

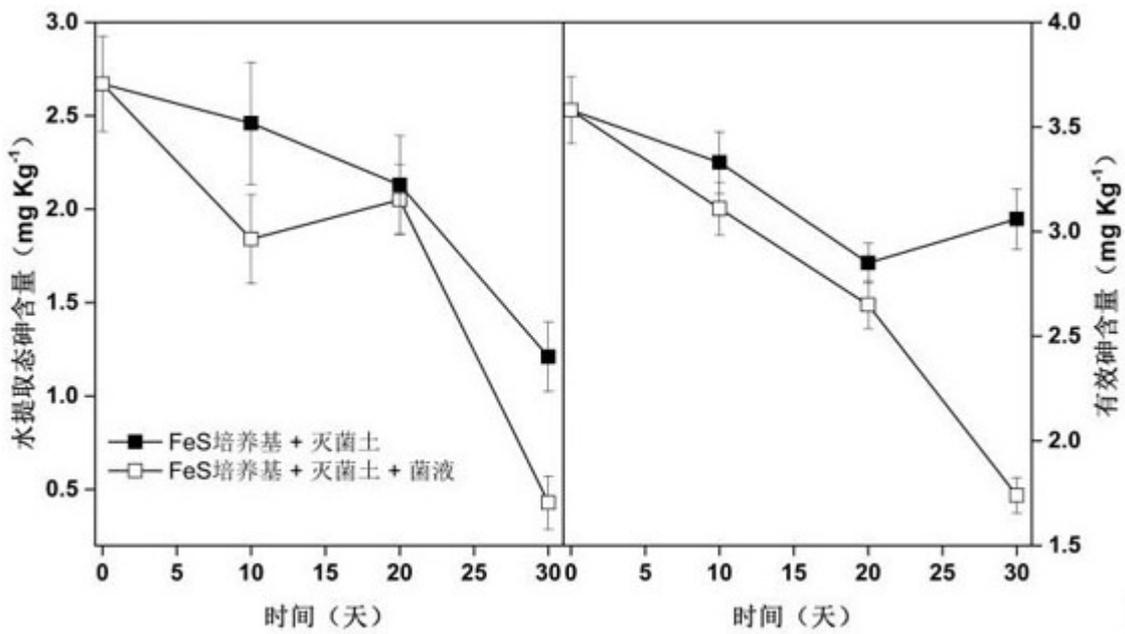


图6