

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2018033002

王黎芸, 方迪, 周立祥. 一株嗜酸硫单质还原菌的分离鉴定及其在酸性重金属废水处理中的作用[J]. 环境化学, 2019, 38(2): 370-376.

WANG Liyun, FANG Di, ZHOU Lixiang. Isolation and identification of a sulfur-reducing bacterium and its role in treatment of heavy metal-loaded acidic wastewater[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(2): 370-376.

## 一株嗜酸硫单质还原菌的分离鉴定及其在酸性 重金属废水处理中的作用\*

王黎芸 方迪\*\* 周立祥

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京, 210095)

**摘要** 采用 Hungate 厌氧滚管法, 从酸性重金属废水中筛选了 1 株嗜酸性的硫单质还原菌 NAU-16. 经形态学和 16S rDNA 基因序列分析鉴定为脱硫菌属硫磺细菌种 *Desulfurella amilsii*. 研究了其在不同温度 (20—60 °C)、pH (1.0—7.0) 和碳源 (乙酸、丙醇、乳酸、葡萄糖、丙三醇、丙酮酸) 条件下的生长特性, 并通过序批式厌氧瓶培养考察了该菌株对污泥生物沥浸酸液中  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  的去除效果. 结果表明, 菌株 NAU-16 最适生长温度为 35—45 °C, 可在 pH 值 3.0—7.0 范围内较好生长, 能利用乙酸、葡萄糖作为电子供体和碳源. 同时, *Desulfurella amilsii* NAU-16 介导的生物硫单质还原可有效处理含  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  的污泥生物沥浸酸液. 对于初始 pH 3.0—4.0 的沥浸液, 处理 12 d,  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  的去除率达 99% 以上,  $Ni^{2+}$  的去除率 90%—99%. 上述研究结果为酸性重金属废水生物处理提供了一种新途径.

**关键词** 生物硫还原, 硫单质还原菌, 分离鉴定, 低 pH, 重金属废水.

## Isolation and identification of a sulfur-reducing bacterium and its role in treatment of heavy metal-loaded acidic wastewater

WANG Liyun FANG Di\*\* ZHOU Lixiang

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China)

**Abstract:** Strain NAU-16 was isolated from heavy metal-loaded acidic wastewater by the method of Hungate operation. According to its morphology and 16S rDNA gene sequencing, this strain was identified to be *Desulfurella amilsii*. Its growth property and sulfur reduction ability at different temperatures (20—60 °C), initial pH (1.0—7.0) and electron donors (acetate, propionate, lactate, glucose, glycerol, pyruvate) were investigated. The role of this strain in removing heavy metals in acid wastewater containing  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  were evaluated in sequencing batch. The results showed that strain NAU-16 grew at optimum temperatures from 35 °C to 45 °C and a broad pH range from 3.0 to 7.0. It was able to couple the oxidation of acetate and glucose to the reduction of elemental sulfur. Furthermore, this isolate-mediated biological sulfur reduction strain NAU-16 showed efficient removal of  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ . Up to 99%  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and up to 90%—99%  $Ni^{2+}$  were removed after 12 days, with initial pH 3.0 and 4.0 treatment. Strain NAU-16 could be a good candidate to cope with low pH and high metal concentration wastewater.

**Keywords:** biological sulfur reduction, sulfur-reducing bacterium, isolation and identification, low

2018年3月30日收稿 (Received: March 30, 2018).

\* 国家自然科学基金 (21677077) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21677077).

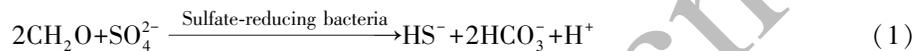
\*\* 通讯联系人, Tel: 025-84399018, E-mail: di.fang@njau.edu.cn

Corresponding author, Tel: 025-84399018, E-mail: di.fang@njau.edu.cn

pH, heavy metal-loaded wastewater.

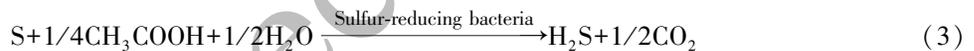
金属矿山开采、选矿和冶炼,机械加工,电镀,含重金属固体废物脱毒处理等工业活动会产生大量的酸性重金属废水<sup>[1]</sup>.低 pH 值(pH<5.0)且富含高浓度的重金属离子(Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>等含量可达几十至上百 mg·L<sup>-1</sup>)是此类废水最主要的特征<sup>[2]</sup>.化学沉淀、吸附、电解、反渗透等方法用于酸性重金属废水处理中普遍存在投资运行成本高、操作和管理复杂、重金属去除不完全等问题,在工程实践中常难以推行<sup>[3]</sup>.

20 世纪 90 年代,生物硫还原开始被人们尝试用于酸性重金属废水的处理,并取得了较好的效果<sup>[4]</sup>.该方法是通过硫还原菌(主要是硫酸盐还原菌 Sulfate reducing bacteria, SRB)以有机碳(如乙醇、甘油、乳酸钠)为电子供体的厌氧还原反应,产生硫化物,将废水中溶解态重金属转化为极难溶的硫化物(CuS、ZnS、PbS 溶度积常数  $K_{sp}$  为  $10^{-37}$ — $10^{-20.4}$ )而加以去除<sup>[5-6]</sup>,反应途径如公式 1 和 2.近年来,该方法由于具有成本低、实用性强、重金属去除彻底且金属沉渣量小等优点而受到国内外研究者的广泛关注<sup>[7-8]</sup>.



式中,CH<sub>2</sub>O 是有机碳源,Me<sup>2+</sup>是二价重金属离子.

从已有的研究实践来看,限制生物硫还原迈向工程应用的技术瓶颈是:酸性重金属废水中的内源的有机碳含量通常较低,需要额外投入较多的有机物(电子供体),导致水处理的成本较高<sup>[9-10]</sup>.最近,有研究报道,在生物硫还原过程中存在硫单质(S<sup>0</sup>)还原的途径.一些硫单质还原的功能菌:脱硫菌属(*Desulfurella*)、硫螺菌属(*Desulfurispira*)、脱硫弧菌属(*Desulfurivibrio*)也被分离报道<sup>[11-12]</sup>.相较于硫酸盐还原(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>→S<sup>2-</sup>需要 8 个电子),硫单质还原有更显著的优越性,因为,其还原反应所需要的电子供体(碳源)仅为前者的 1/4(S<sup>0</sup>→S<sup>2-</sup>仅需 2 个电子,反应途径如公式 3),水处理成本将大幅降低.然而,由于硫单质还原的发现历史较短,目前有关其用于酸性重金属废水处理的研究还十分少见.



式中,CH<sub>2</sub>O 是有机碳源.

本文尝试筛选分离嗜酸性的硫单质还原菌,分析生长特性,并探讨将其用于含 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>的污泥生物沥浸酸液的处理,旨在为酸性重金属废水的生物处理提供一种新方法.

## 1 材料与方 法 (Materials and methods)

### 1.1 供试废水

本研究采用酸性重金属废水为含重金属的污泥经过微生物沥浸脱毒处理后产生的污泥沥浸酸液(pH 2.0)<sup>[13]</sup>.该废水主要含较高的 Zn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>等重金属离子,含量分别为 65、54、12 mg·L<sup>-1</sup>.

### 1.2 嗜酸硫单质还原菌的分离、鉴定

培养基:采用厌氧基础培养基 BM<sup>[14]</sup>,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 1.06, NH<sub>4</sub>Cl 0.6, NaCl 0.3, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.2, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.11, 硫粉 0.8, 乙酸 0.3, 单位为 mg·L<sup>-1</sup>(pH 4.0).

菌种的富集与分离:取污泥生物沥浸酸液 10 mL,将其接入含 100 mL 的 BM 培养基的厌氧瓶,30 ℃ 静置培养至有大量的硫离子产生.随后将上述培养液转接 10 mL 至 100 mL 新鲜的 BM 培养基,相同培养条件下继续培养至大量硫离子生成.如此重复 4—5 次转接,将所获得的培养液适当稀释,取不同稀释度的培养液于 Hungate 滚管,置于 30 ℃ 培养箱中静置培养 10 d,最终获得分离菌株 NAU-16.

形态学鉴定:将分离纯化的菌株进行革兰氏染色,并用透射电子显微镜观察菌体形态.根据《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[15]</sup>对分离菌株进行初步的鉴定.

分子生物学鉴定:细菌总 DNA 采用 AxyPrep 细菌基因组小量试剂盒提取,引物采用 27F(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)和 1492R(TACGGYTACCTTGTACGACTT).反应程序为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 24 次循环,72 ℃ 延伸 10 min.PCR 测序由上海美吉

生物科技有限公司进行双向测序.将测序结果登录 GenBank 进行同源性比较,应用 MEGA5.1 软件构建 16S rRNA 的系统发育树.

### 1.3 分离菌株的生长特性

**温度的影响:**吸取 1% 分离菌株的菌液(菌密度  $3.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ )于 50 mL BM 培养基中,设置不同的培养温度(20、25、30、35、40、45、50、55、60 °C),3 组平行试验,厌氧、静置培养 10 d.采用亚甲基蓝分光光度法,取样后立即测定不同温度条件下的硫离子浓度,并采用吸光度  $\text{OD}_{600}$  计算菌体的生物量.

**pH 的影响:**将 BM 培养基 pH 值调节为 1.0—7.0 的不同的 pH,分别向 50 mL 不同 pH 的培养基中接入 1% 分离菌株的菌液(菌密度  $3.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),3 组平行试验,厌氧、30 °C 静置培养 10 d.采用上述同样的方法测定不同分组 pH 条件下的硫离子含量和生物量.

**碳源类型的影响:**将 1% 分离菌株的菌液(菌密度  $3.0 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ )接种于 50 mL BM 培养基,将培养基中的碳源(乙酸)分别替换为相同浓度的丙醇、乳酸、葡萄糖、丙三醇、丙酮酸,考察分离菌株对不同底物的利用状况.培养条件和测定方法同上.

### 1.4 嗜酸硫单质还原菌对污泥生物沥浸酸液的处理

硫单质还原菌处理含重金属的污泥生物沥浸酸液的试验在 250 mL 的厌氧瓶中完成.为考察不同初始 pH 的酸性重金属废水的生物处理效果,本试验设置了初始 pH 值 2.0、3.0、4.0 等 3 组处理,在 100 mL 上述废水中分别接种 1% 分离菌株的菌液,置于 30 °C、100  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床上厌氧避光振荡培养.试验中同步设置了不接种的空白对照.培养过程中每 3 d 取样,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤头过滤所得清液,用电感耦合等离子光谱(ICP, Angilent 720)测定供试废水中  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  浓度.根据处理前后废水中重金属离子含量的变化,计算重金属去除率.

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 菌株鉴定

分离菌株 NAU-16 在 Hungate 滚管中 30 °C 培养 10 d 后,形成图 1 所示的白色、圆形透明状的菌落,菌落直径 0.3—0.4 cm,表面平整,边缘整齐、光滑.延长培养时间后,菌落中心逐渐变为灰黄色.镜检观察,分离菌株 NAU-16 革兰氏染色呈阴性,菌体着色均一.透射电镜显示该菌株为短杆状,菌体大小 (0.3—0.5)  $\mu\text{m} \times (1.8—2.0) \mu\text{m}$ ,长有鞭毛.参照《伯杰氏细菌鉴定手册》,分离菌株与脱硫菌属 (*Desulfurella*) 的主要形态特征较为一致.

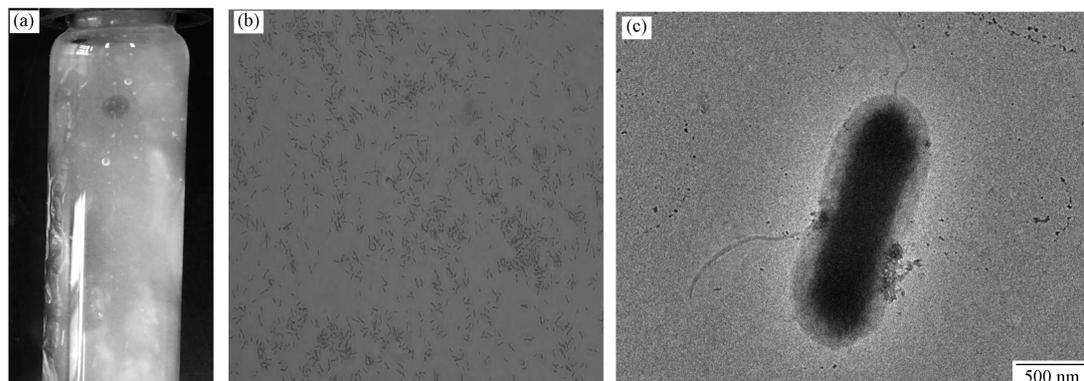


图 1 分离菌株 NAU-16 的菌落形态(a),显微镜革兰氏染色图片(b,  $\times 100$ ),和透射电镜 TEM(c,  $\times 40000$ )

Fig.1 Morphological photographs of strain NAU-16 colonies (a), microscope (b,  $\times 100$ ) and TEM (c,  $\times 40000$ )

将分离菌株 NAU-16 的 16S rRNA 基因测序结果登录 NCBI 网站,用 BLAST 与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行同源比较,发现该菌株与脱硫菌属 (*Desulfurella amilsi*) 同源性达 99%.分离菌株 NAU-16 的 16S rRNA 在 GenBank 中登录的序列号为 MH121321.下载相似序列构建出该菌株的系统发育

进化树(图2).结合形态特征与分子生物学鉴定,鉴定分离菌株 NAU-16 属于脱硫菌属中的硫磺细菌种(*Desulfurella amilsii*).

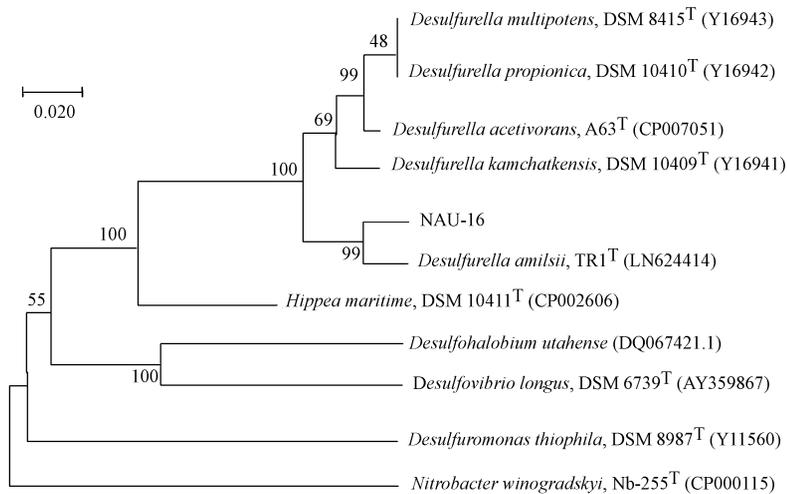


图2 分离菌株 NAU-16 的 16S rRNA 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic analysis of strain NAU-16 based on 16S rRNA

## 2.2 分离菌株的生长特性

分离菌株 NAU-16 在不同的温度条件下的生长状况和产硫化物的变化如图 3a 所示.结果表明,该菌株在 25—60 °C 较宽泛的温度下都能良好的生长,最适温度区间为 35—45 °C;当温度低于 20 °C 或高于 60 °C 时,其生长明显受到抑制.大部分已知的硫单质还原菌的适宜生长温度均为中温,例如:脱硫单胞菌属 *Desulfuromonas* (37 °C)、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* (37 °C)、硫螺菌属 *Sulfurospirillum* (37 °C)<sup>[11,16]</sup>.近期也有一些研究显示,在热泉和火山等极端高温环境也存在某种特异的嗜高温(>65 °C)的硫单质还原菌,如脱硫杆菌属 *Desulfurobacterium* (70 °C)<sup>[17]</sup>.在不同的温度条件下, $S^{2-}$  的产生动态总体上与生物量的变化一致,在细菌生长受到抑制 20 °C 和 60 °C,也几乎检测不到硫化物.然而,值得注意的是,在分离菌株 NAU-16 生物量较小的 55 °C 和 60 °C,也有较多的  $S^{2-}$  产生(150—350  $mg \cdot L^{-1}$ ).产生这一现象的原因可能是某些微生物在恶劣的逆境生长条件下,比如高温,能更高效地激发其功能性,将能量较多集中在其功能性而不是生长性,铁还原菌(*Shewanella*)等细菌也曾有过相似的报道<sup>[18]</sup>.

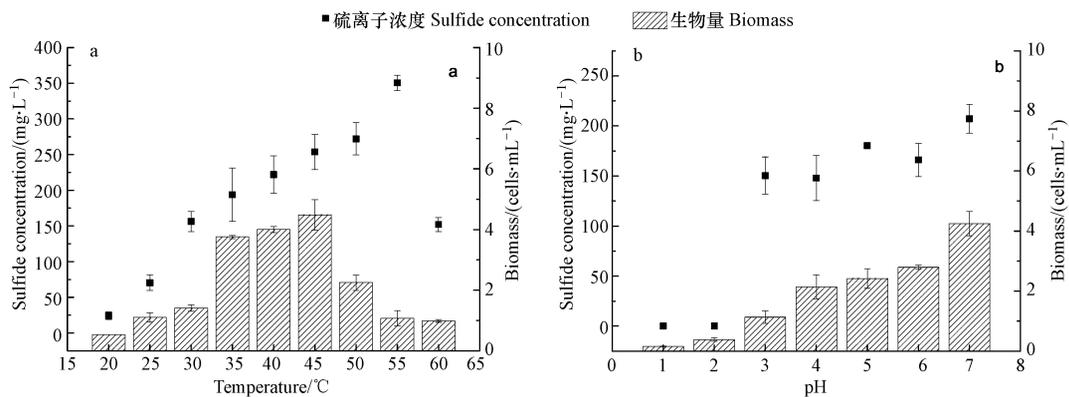


图3 温度(a)和 pH(b)对分离菌株 NAU-16 的生长和硫离子产生的影响

Fig.3 Influence of temperature (a) and pH (b) on the biomass and sulfide concentrations of strain NAU-16

在 pH 1.0—7.0 条件下分离菌株 NAU-16 的生长如图 3b 所示.由图 3b 可见,在 pH 1.0—2.0 的极端酸性条件下,该菌株基本没有生长,也无硫离子的明显产生;不难发现,pH 3.0 是分离菌株 NAU-16 大量生长的临界点,此时硫单质还原菌的生长代谢旺盛,溶液中产生了大量的硫离子(150  $mg \cdot L^{-1}$ );当 pH 值升至 7.0 时,硫化物的产量则变化不大,但生物量有所提高.已有的文献报道中所分离出的硫单质还原

菌的适宜生长 pH 值范围通常较窄,几乎都仅限于中性 pH 条件下生长(pH 6.0—7.0)<sup>[11]</sup>.这也暗示了分离菌株 NAU-16 或许可适用于较宽泛的废水 pH 值范围,应用的空间更广.

分离菌株 NAU-16 对不同碳源的利用效果不尽相同.由图 4 可知,乙酸、葡萄糖、丙三醇、丙酮酸能作为碳源被 NAU-16 利用,供其生长,而丙酸、乳酸则几乎不能被利用.同时乙酸和葡萄糖还能作为 NAU-16 的电子供体,与硫发生氧化还原反应产生硫离子.不同的硫单质还原菌属在电子供体的利用上略有差异,硫单胞菌属(*Desulfuromonas*),脱硫菌属(*Desulfurella*)都能利用乙酸,其他菌属希瓦氏菌属(*Shewanella*)能利用乳酸.一般而言,菌株可利用碳源的种类受其自身细胞色素影响<sup>[19]</sup>,不同种属的细菌在碳源利用上有一定的差异性.

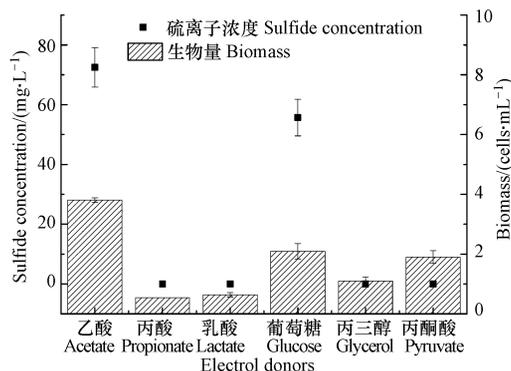


图 4 不同碳源对分离菌株 NAU-16 的生物量和硫离子含量的影响

Fig.4 Influence of carbon sources on the biomass and sulfide concentrations of strain NAU-16

### 2.3 嗜酸硫单质还原菌对污泥生物沥浸酸液的处理效果

图 5 显示了不同初始 pH 值的污泥生物沥浸酸液在生物硫单质还原处理过程中重金属浓度的变化.由图 5 可见,随着硫单质还原的进行,体系中的 3 种重金属离子( $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ )浓度均稳步降低;随着废水初始 pH 的升高,3 种重金属去除的速率相应加快.对于初始 pH 2.0 的处理,在反应进行至第 3 d 以后,体系中  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  的浓度明显降低,但此后,3 种重金属浓度基本不变,说明了在极端酸性的低 pH 条件下,硫单质的生物还原反应受到了抑制.推测可能反应前期废水中 3 种重金属浓度降低主要是因为接种的硫单质还原菌液中携带的  $HS^-$ ,沉淀了部分的重金属.对于初始 pH 3.0 的处理,在第 12 d,废水中  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  的去除率均达 99% 以上, $Ni^{2+}$  去除率约 90%.对于 pH 4.0 的处理,3 种重金属的去除率均高达 99% 以上.在此试验中,重金属的去除原理是通过其新陈代谢产生的硫化物与重金属离子结合,形成沉淀的方式来实现的.同时,根据预实验观测,硫还原菌的微生物细胞及其分泌物对废水重金属离子的吸附作用甚微,可忽略不计.许多研究表明,大多数的硫单质还原菌(包括硫酸盐还原菌)对重金属都有较强的耐受性<sup>[14]</sup>.在预实验中也发现,分离菌株 NAU-16 可耐受  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Zn}^{2+}$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Ni}^{2+}$ 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$ <sup>[13]</sup>.

通过对反应体系中硫离子的产量和各类重金属硫化物的生成量的物料平衡计算可知,对于发生硫单质过程的初始 pH 3.0 和 pH 4.0 的处理,投加的硫单质的转化率约为 25%—30%,因为硫单质的水溶性较低,在硫还原过程中主要依靠可溶性的中间代谢产物多硫化物进行持续性硫单质还原过程<sup>[20]</sup>,残余的硫粉可以进行再利用.同时,在硫还原过程中,第 6 d 时,体系中硫单质还原菌产生的硫离子的利用率为 50%,9 d 之后大部分的重金属离子已被去除,体系中过量、未利用的硫化物,可通过气体循环装置进行重复利用.一些研究者近期尝试采用  $N_2$  吹脱硫单质还原菌产生的硫化物至废水来去除重金属,这种细菌和废水不直接接触的间接处理方式,一方面可以避免废水过低的 pH 对硫单质还原菌生长的抑制,另一方面还能根据不同重金属的  $K_{sp}$  不同,有针对性的选择回收废水中有价贵金属<sup>[21-22]</sup>,实现了在处理酸性重金属废水的同时,有价金属资源的回收.

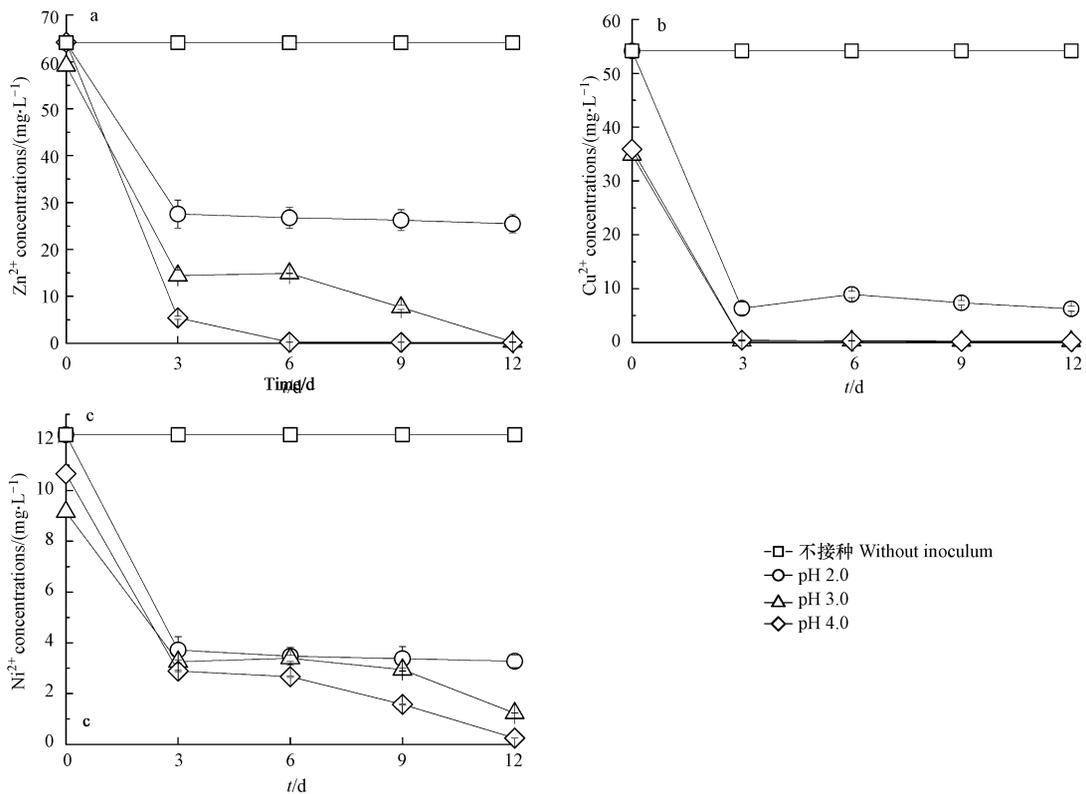


图5 硫单质生物还原过程中污泥生物沥浸酸液中重金属(a.  $Zn^{2+}$ 、b.  $Cu^{2+}$ 、c.  $Ni^{2+}$ )浓度的变化

Fig.5 Variations of metal concentrations (a.  $Zn^{2+}$ , b.  $Cu^{2+}$ , c.  $Ni^{2+}$ ) during the process of biological sulfur reduction in heavy metal-loaded acidic wastewater

### 3 结论 (Conclusion)

本研究从酸性重金属废水中分离到一株嗜酸性的硫单质还原菌株 NAU-16. 经从形态学和 16S rRNA 序列分析鉴定为脱硫菌属中的硫磺细菌种 *Desulfurella amilsii*. *Desulfurella amilsii* NAU-16 能在 pH 3.0—7.0 较宽的 pH 范围生长, 最适温度 35—45 °C, 能利用乙酸、葡萄糖作为电子供体和碳源.

在乙酸添加量  $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 温度 30 °C 的条件下, *Desulfurella amilsii* NAU-16 的生物硫单质还原反应可有效处理含  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  的酸性重金属废水. 对于初始 pH 3.0—4.0 的废水, 12d,  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  的去除率达 99% 以上,  $Ni^{2+}$  的去除率 90%—99%.

#### 参考文献 (Reference)

- [ 1 ] SÁNCHEZ A I, STAMS A J M, WEIJMA J, et al. A case in support of implementing innovative bio-processes in the metal mining industry [J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(11): 1-4.
- [ 2 ] 吴惠明, 李晓, 李锦文等. 模拟风化过程硫铁矿尾矿的产酸性及污染物的释放行为[J]. 环境化学, 2014, 33(3): 447-451.  
WU H M, LI X, LI J W, et al. Acid generation behavior of pyrite tailing and characteristic of pollutant release during simulated weathering process[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(3): 447-451 (in Chinese).
- [ 3 ] ROJO A, HANSEN H K. Electrodialytic remediation of copper mine tailings with sinusoidal electric field [J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2010, 40(6): 1095-1100.
- [ 4 ] CASTILLO J, PÉREZLÓPEZ R, CARABALLO M A, et al. Biologically-induced precipitation of sphalerite/wurtzite nanoparticles by sulfate-reducing bacteria; implications for acid mine drainage treatment [J]. Science of the Total Environment, 2012, 423(15): 176-184.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] KEFENI K K, MSAGATI T A M, MAMBA B B. Acid mine drainage: Prevention, treatment options, and resource recovery; A review [J].

- Journal of Cleaner Production, 2017, 151: 475-493.
- [ 7 ] SÁNCHEZ A I, SANZ J L, MARTIJN F M, et al. Sulfate reduction at low pH to remediate acid mine drainage[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 269: 98-109.
- [ 8 ] ZHANG M, WANG H. 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.
- [ 9 ] MILETTO M. Sulfate-reducing Prokaryotes in River Floodplains[D]. Utrecht: Utrecht University, 2007.
- [10] ZHANG M, WANG H. Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage[J]. Minerals Engineering, 2014, 69: 81-90.
- [11] FLORENTINO A P, BRIENZA C, ALFONS J M, et al. *Desulfurella amilsii* sp. nov., a novel acidotolerant sulfur-respiring bacterium isolated from acidic river sediments[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1249-1253.
- [12] SOROKIN D Y, MUYZER G. *Desulfurispira natronophila* gen. nov. sp. nov.: An obligately anaerobic dissimilatory sulfur-reducing bacterium from soda lakes[J]. Extremophiles, 2010, 14(4): 349-355.
- [13] 张鹏飞. 硫生物还原的影响因素及其在酸性重金属废水处理中的作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.  
ZHANG P F. Influence factors of biological sulfur reduction and its application in treatment of acidic wastewater[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese).
- [14] FLORENTINO A P, WEIJMA J, ALFONS J M, et al. Sulfur Reduction in Acid Rock Drainage Environments[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(19): 11746-11755.
- [15] RAINEY F, HOLLEN B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- [16] PFENNIG N, BIEBL H. *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate oxidizing bacterium [J]. Archives of Microbiology, 1976, 110: 3-12.
- [17] HEDDERICH R, KLIMMEK O, KRÖGER Ac, et al. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides [R]. FEMS Microbiology Reviews, 1998, 22(5): 353-381.
- [18] 李 陞, 吴文芳, 李金华, 等. 温度和电子传递体 AQDS 对铁还原细菌 *Shewanella putrefaciens* CN32 矿化产物的影响[J]. 地球物理学报, 2011, 54(10): 2631-2638.  
LI B, WU F W, LI J H, et al. Effects of temperature on biomineralization of iron reducing bacteria *Shewanella putrefaciens* CN32 [J]. Chinese Journal of Geophysics, 2011, 54(10): 2631-2638 (in Chinese).
- [19] FAUQUE G D, BARTON L L. Chapter 1-hemoproteins in dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes[J]. Advances in Microbial Physiology, 2012, 60: 1-90.
- [20] FLORENTINO A P, WEIJMA J, ALFONS J M, et al. Biotechnology of Extremophiles[M]. Berlin: Springer, 2016: 141-175.
- [21] FANG D, ZHANG R C, ZHOU L X, et al. A combination of bioleaching and bioprecipitation for deep removal of contaminating metals from dredged sediment[J]. Journal of Hazardous Materials 2011, 192(1): 226-233.
- [22] SUN R R, ZHANG L, ZHANG Z F, et al. Realizing high-rate sulfur reduction under sulfate-rich conditions in a biological sulfide production system to treat metal-laden wastewater deficient in organic matter[J]. Water Research, 2018, 131: 239-245.