

<https://doi.org/10.3799/dqkx.2022.287>



# 湖南冷水江锡矿山尾矿库细菌富集群落与辉锑矿的相互作用及其群落演替

王宇鑫<sup>1</sup>, 邬梦晓俊<sup>1</sup>, 王伟琦<sup>1</sup>, 李旻<sup>1</sup>, 雷静文<sup>1</sup>, 王红梅<sup>1,2\*</sup>

1. 中国地质大学环境学院, 湖北武汉 430078

2. 中国地质大学生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北武汉 430078

**摘要:** 为了从群落水平上探讨细菌对辉锑矿的溶解释放作用, 从湖南锡矿山尾矿库尾矿渣中富集了细菌群落, 开展了其与辉锑矿相互作用的实验研究. 通过湿化学方法检测实验过程中 pH 和锑含量的变化、用 16S rRNA 高通量测序检测实验过程中细菌群落的变化, 用 X 射线粉晶衍射仪 (XRD) 检测微生物与矿物相互作用后矿物相的变化, 进而揭示群落水平上微生物与辉锑矿相互作用的机制及相互作用过程中细菌群落的演替. 结果表明在好氧条件下细菌群落可以以乳酸钠为碳源进行异养生长, 造成溶液 pH 的升高, 进而导致辉锑矿的溶解. 实验初期辉锑矿溶解释放的三价锑迅速被氧化成五价锑, 但第 9 d 之后三价锑开始在溶液中积累, 在实验结束时浓度比五价锑略高. 溶液中五价锑的浓度在第 12 d 之前持续上升, 之后下降, 直至实验结束. 溶液中锑含量的升高, 对细菌群落进行了强烈的筛选作用. 实验过程中细菌群落均以对 As/Sb 等多种重金属具有抗性的草螺菌属 (*Herbaspirillum*) 占绝对优势, 但其相对丰度在第 11 d 之后有所下降. 具有锑氧化能力的细菌类群如副球菌属 (*Paracoccus*)、博斯氏菌属 (*Bosea*) 等在群落中的相对丰度较低, 导致辉锑矿溶解释放出来的三价锑不能被完全氧化. XRD 结果显示辉锑矿与细菌群落作用后生成了含有五价锑的锑酸钠, 这与溶液中五价锑浓度的下降相吻合. 该结果为进一步理解锡矿山自然环境中细菌群落对含锑矿物的溶解、锑的氧化、迁移和转化的影响提供了新的认识.

**关键词:** 锡矿山锑矿; 尾矿坝; 微生物与矿物相互作用; 辉锑矿; 锑氧化; 细菌群落演替; 生物地质; 地球化学; 环境地质.

中图分类号: P593

文章编号: 1000-2383(2023)11-4311-10

收稿日期: 2022-04-10

## Interaction between Stibnite and Microbial Communities Enriched from Tailings at Xikuangshan Coupling with Bacterial Community Succession

Wang Yuxin<sup>1</sup>, Wu Mengxiaojun<sup>1</sup>, Wang Weiqi<sup>1</sup>, Li Min<sup>1</sup>, Lei Jingwen<sup>1</sup>, Wang Hongmei<sup>1,2\*</sup>

1. School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

2. State Key Laboratory of Geobiology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430078, China

**Abstract:** To better understand microbial dissolution and oxidation of stibnite at the community level, microbial communities were enriched from the tailings in the Xikuangshan tailings pond, Hunan Province, which were further used to study microbial interaction with stibnite. pH, total Sb, Sb(V), Sb(III) and  $\text{SO}_4^{2-}$  were measured periodically. 16S rRNA high-throughput sequencing and X-ray powder diffractometer (XRD) were exploited to detect compositions of microbial communities and mineral

基金项目: 国家自然科学基金项目 (Nos. 41877320, 42007306, 42077220).

作者简介: 王宇鑫 (2001-), 男, 中南大学在读研究生, 环境工程专业. E-mail: 862975699@qq.com

\* 通讯作者: 王红梅, E-mail: wanghmei04@163.com

引用格式: 王宇鑫, 邬梦晓俊, 王伟琦, 李旻, 雷静文, 王红梅, 2023. 湖南冷水江锡矿山尾矿库细菌富集群落与辉锑矿的相互作用及其群落演替. 地球科学, 48(11): 4311-4320.

Citation: Wang Yuxin, Wu Mengxiaojun, Wang Weiqi, Li Min, Lei Jingwen, Wang Hongmei, 2023. Interaction between Stibnite and Microbial Communities Enriched from Tailings at Xikuangshan Coupling with Bacterial Community Succession. *Earth Science*, 48(11): 4311-4320.

phases, respectively. The results show that microbial communities can grow with sodium lactate and increase the pH of the solution under aerobic condition, which facilitated the dissolution of stibnite. The concentration of Sb(V) accumulated in the solution due to the oxidation of the released Sb(III), with an increase after the 12<sup>th</sup> day. The Sb(III) concentration in the solution increased after the 9<sup>th</sup> day and was a little bit higher than that of Sb(V) at the end of the experiments. The incomplete oxidation of Sb(III) may result from the low relative abundances of antimony-oxidizing bacteria such as *Paracoccus* and *Bosea* in the enriched culture. The variation of solution chemistry, particularly the Sb concentration, exerted strong selection on microbial communities. Microbial communities were dominated by *Herbaspirillum* sp., with strong resistance to metals, such as and Sb. However their relative abundances decreased after 11 days' interaction potentially due to the accumulation of Sb in the system. Secondary Sb(V)-bearing mineral, sodium antimonite, was detected at the end of the experiments in the biotic systems, which matched well with the decrease of the concentration of Sb(V) in the solution. Our results further confirm the mechanism of microbial dissolution of stibnite followed by oxidation and transformation of minerals at the community level, which provides new insights of understanding the impact of microbial communities on the dissolution of Sb-bearing secondary minerals, oxidation, migration and formation of antimony in natural environments.

**Key words:** Xikuangshan antimony deposit; tailing dam; interaction between microbe and mineral; stibnite; antimony oxidation; microbial community succession; biogeology; geochemistry; environmental geology.

## 0 引言

锑 (Sb) 是一种与砷相似的类金属, 原子序数为 51, 是目前世界上开采量排名第九的元素, 主要用于生产阻燃剂、合金、催化剂、电池、半导体及小型弹药等。自 20 世纪末, 我国已成为世界上最大的锑生产国, 而被誉为“世界锑都”的湖南省冷水江市锡矿山是我国主要的锑产出地和产地 (He *et al.*, 2012)。锡矿山开采历史长, 产生的冶炼废渣以及尾矿渣多, 加上对这些固体废弃物的处置技术不同, 导致矿区内水体和土壤的锑污染严重超标 (Fu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2019), 极大地危害了当地百姓的健康。

湖南锡矿山锑矿的主要矿石矿物为辉锑矿 ( $Sb_2S_3$ ), 该矿物的溶解和释放与 pH 密切相关, 碱性条件有利于辉锑矿中锑的释放 (江南等, 2020)。酸性条件下, 三价阳离子如  $Fe^{3+}$ 、 $Al^{3+}$  等以及碱性条件下二价阳离子如  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等能促进辉锑矿的溶解, 进而导致三价锑的释放 (Biver and Shotyky, 2012)。释放出的三价锑会被氧化, 且氧化程度会随着 pH 的升高而升高 (江南等, 2020)。但如果体系中存在锑氧化微生物, 释放出来的三价锑则会被氧化成五价锑 (Xiang *et al.*, 2022)。目前已经有不少锑氧化细菌被分离出来, 如 *Stibiobacter senarmontii* (Lialikova, 1974), *Thiobacillus ferrooxidans* (Torma and Ganra, 1977), *Sinorhizobium* sp. IK-A2 (Hamamura *et al.*, 2013), *Comamonas* sp. S44 (Li *et al.*, 2013), *Pseudomonas* sp. DF3 (Shi *et al.*, 2013), *Sphingopy-*

*xis* sp. DS8 (Shi *et al.*, 2013), *Agrobacterium tumefaciens* 5A (Li *et al.*, 2015), *Rhizobium* sp. NT-26 (Terry *et al.*, 2015), *Hydrogenophaga* sp. IDSBO-1, *Variovorax* sp. IDSBO-4 (Terry *et al.*, 2015), *Bosea* sp. AS-1 (Lu *et al.*, 2018), *Parococcus* sp. XT0.6 和 *Pseudomonas* sp. SbOxS1 (Hamamura *et al.*, 2020) 等。这些微生物大多属于  $\alpha$ -变形菌纲、 $\beta$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲, 具有氧化溶解态三价锑的能力。除此之外, 它们之中的一些菌株如 *Parococcus* sp. XT0.6 和 *Bosea* sp. AS-1 还被证明能通过新陈代谢, 改变溶液的 pH 值, 从而促进辉锑矿的溶解, 进而再把溶液中的三价锑完全氧化成五价锑 (Xiang *et al.*, 2022)。不同的实验体系中, 微生物导致辉锑矿中锑的释放效率各不相同, 溶液中五价锑在固液相中的分配也不相同, 有的体系中可以形成含有五价锑的次生矿物, 从而降低锑在环境中的毒性。因此, 微生物在辉锑矿的溶解、释放、锑氧化以及锑的再沉淀中均起着重要的作用。

尽管菌株水平的研究可以帮助人们更好地认识微生物与辉锑矿相互作用的机理, 但在自然环境中, 微生物均是以群落的形式存在, 开展群落水平上微生物与辉锑矿的相互作用则更能反映自然条件下微生物与辉锑矿相互作用的过程, 也更有利于人们评价微生物与辉锑矿相互作用的环境效应。已有研究表明, 锑污染区存在着丰富的细菌群落, 并且它们也能响应环境因子的变化。如锑矿区尾矿中的微生物群落以变形菌门 (Proteobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 占主导, 属水平上硫杆菌属

(*Thiobacillus*) 和嗜氢菌属 (*Hydrogenophaga*) 等占优势,且微生物群落结构受 pH、总有机碳含量 (TOC, total organic carbon)、硫酸盐与硫化物的比值等因素的强烈影响 (Xiao *et al.*, 2016)。而锑污染区土壤微生物群落则很大程度上受硫酸盐、亚硝酸盐、Eh 和 pH 值的影响,其优势种群通常为变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、氯弯菌门 (Chloroflexi)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和放线菌门 (Actinobacteria) (Wang *et al.*, 2018)。但这些微生物群落与含锑矿物的相互作用以及对锑的生物地球化学行为的影响,目前还知之甚少。因此,开展群落水平的微生物与辉锑矿的相互作用对评价矿区微生物在锑的环境地球化学中的作用具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 锑氧化细菌群落的富集和筛选

锡矿山 (111°25'47"~111°31'22"E, 27°49'28"~27°43'05"N) 位于湖南省中部冷水江市东北部约 13 km 处,是世界上最大的锑矿床,被誉为“世界锑都”。矿区分为南矿和北矿两个矿区,总面积约为 26 km<sup>2</sup>。为了探讨尾矿坝锑氧化细菌群落与含锑矿物(矿区主要为辉锑矿)之间的相互作用,本研究用 50 mL 无菌离心管对矿区尾矿坝不同深度的尾矿样品进行了系统采样,每个深度 (0.4 m, 0.8 m, 1.2 m, 1.6 m 以及 2.0 m) 采集 3 个生物学重复样品。样品用干冰运回实验室后,少量样品保存于 4 °C 冰箱用于后续的微生物培养,其余样品保存于 -80 °C 用于分子生物学分析。

将不同深度的尾矿样品在无菌条件下研磨成粉末,过 200 目筛。以 1% 的质量体积比将 5 组尾矿粉末样品 (XT0.4、XT0.8、XT1.2、XT1.6 与 XT2.0) 分别加入含有 50 mmol/L 三价锑的矿物盐培养基 (MSM, mineral salts medium) 中,每组 3 个平行,MSM 培养基在 1 L 无菌水中含有 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.9 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.3 g, 维生素溶液, 10 mL (Rhine *et al.*, 2006), 微量元素溶液 5 mL (SL-10, DSMZ GmbH, 2010)。于 30 °C、150 r/min 培养至 OD<sub>600</sub>=1, 将 1 mL 培养液过 0.22 μm 的滤膜,之后向过滤液中添加 0.66 mL 50 mmol/L 的高锰酸钾溶液 (KMnO<sub>4</sub>), 观察其颜色变化。本文分别向 1 mL 50 mmol/L 五价锑溶液 (对照 A) 和 1 mL

50 mmol/L 三价锑溶液 (对照 B) 中滴入 0.66 mL 50 mmol/L 的 KMnO<sub>4</sub> 溶液。若培养液 1 min 内保持与对照 A 相近的颜色,则认为其中富集的微生物菌群具有一定的锑氧化能力。挑选颜色最接近对照 A 的一组作为潜在锑氧化菌群进行后续实验。

### 1.2 锑氧化细菌群落与辉锑矿的相互作用实验

配制定化学成分培养基 (CDM, chemical defined medium, MgSO<sub>4</sub> 0.957 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1.00 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.994 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.014 g/L, CaCl 0.010 g/L, 乳酸钠 7.00 g/L), 按 1 g/L 的浓度向培养基中加入过 200 目筛的辉锑矿 (98%, A801039-100 g, 上海麦克林生化科技有限公司) 粉末。培养基灭菌后将菌群富集培养物分别按 1% (v/v) 接种至含有 750 mL CDM 液体培养基的 1 L 锥形瓶中,于 30 °C 150 rpm 连续培养 15 d 以上。设置 3 个生物学重复及 3 个不添加富集菌群的化学对照。实验期间按照一定的时间间隔进行取样,用于后续理化参数的分析。实验结束后分别离心回收实验组和对照组中的矿物粉末,经冷冻干燥仪 (ALPHA 1-2 LD, Christ, 德国) 冻干后,利用 X-射线粉晶衍射仪 (XRD, Bruker AXS D8-Focus, 德国) 进行物相分析,并利用 Jade (Version 6.5, <https://materialsdata.com/projtd.html>) 软件对 XRD 结果进行半定量分析。

### 1.3 理化参数测定

使用高效液相色谱-原子荧光光谱仪 (HPLC-AFS, HPLC: LC-20AT, 岛津, 日本; AFS: AFS-8510, 海光, 中国) 测定实验过程中总锑、三价锑和五价锑的浓度,用多参数水质分析仪 (HQ30D, HACH, Loveland, USA) 测定溶液 pH 的变化,硫酸根浓度使用离子色谱检测 (ICS-600, Thermo Fisher Scientific, 美国)。

### 1.4 细菌群落的高通量测序

在第 4 d、8 d、11 d 和 14 d 对培养液进行取样,将 10 mL 培养液过 0.22 μm 的无菌滤膜,用于后续细菌群落 DNA 的提取。DNA 提取采用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA 试剂盒 (MOBIO Laboratories, Inc. USA) 进行。用微量核酸蛋白检测仪 (Nanodrop 2000; Thermo Fisher, USA) 检测 DNA 的浓度及质量。利用细菌通用引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-TAA-3') 与 806R (3'-GGACTACHVGGGTWTC-TAAT-5') 对细菌 16S rRNA 的 V4 区进行 PCR 扩增,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,将 PCR 产物送往北京诺禾致源科技股份有限公司,利用 II-

lumina HiSeq 2500 平台进行测序。

### 1.5 细菌群落高通量数据处理

根据 Barcode 序列对下机序列进行拆分和识别,截去 Barcode 和引物序列后使用 FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Magoč and Salzberg, 2011)对每个样品的 reads 进行拼接,得到拼接后的原始 Tags 数据;原始 Tags 参照 QIIME (Qiime, V1.9.1, [http://qiime.org/scripts/split\\_libraries\\_fastq.html](http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html)) (Caporaso *et al.*, 2010)中的质量控制流程进行质控得到高质量的 Tags 数据,再经过嵌合体序列的去除 ([http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera\\_formation.html](http://www.drive5.com/usearch/manual/chimera_formation.html)),从而得到最终的有效数据。使用 Uparse 软件 (Uparse v7.0.1001, <http://drive5.com/uparse/>) (Edgar *et al.*, 2011; Edgar, 2013)以 97% 相似性为标准对有效数据进行聚类,将序列聚类成 OTUs (Operational Taxonomic Units),同时依据其算法原则,筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。使用 Mothur 方法和 SILVA (<http://www.arb-silva.de/>) (Wang *et al.*, 2007) SSUrRNA 数据库 (Quast *et al.*, 2012)对 OTUs 代表序列进行物种注释(设定阈值为 0.8~1)。

使用 MUSCLE (Version 3.8.31, <http://www.drive5.com/muscle/>)软件进行快速多序列比对,得到所有 OTUs 代表序列的系统发生关系后对各样品的数据进行均一化处理,以避免测序深度的差异而引起的分析误差,至此得到的 OTU 表用于下游的统计分析可视化。其中细菌群落在纲、属水平的组成、pH、锑浓度及硫酸根浓度变化等图件使用 Excel (Version 2019)、R 软件 (Version 4.0.1) (<https://www.r-project.org>)绘制细菌群落的  $\alpha$ -多样性图及不同培养时间的群落 NMDS 图,环境因子

和细菌群落的冗余分析 (RDA)由 Canoco (Version 5.0, <http://www.microcomputerpower.com/>)完成。

论文细菌群落的高通量测序数据已上传至组学数据百科全书大数据平台 NODE (<https://www.biosino.org/node>),数据具体编号为:OER259752。

## 2 实验结果

### 2.1 细菌群落与辉锑矿互作过程中 pH、锑浓度及 $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度的变化

细菌群落与辉锑矿相互作用过程中,实验组溶液 pH 值在第 8 d 从实验开始时的 7.0 升高至 9.2,之后保持稳定 (图 1a),而无菌对照组则呈现相反的变化,随着时间推移 pH 值持续下降,实验结束时 pH 降至 5.3。实验组总锑含量 (TSb)先上升,至第 12 d 达到 88.76 mg/L,然后逐渐下降 (图 1b)。Sb(V)含量在前 12 d 缓慢增加至 44.11 mg/L,之后迅速下降至 35.89 mg/L。Sb(III)含量的变化则与 TSb 的变化趋势相似,在第 13 d 达到最高值 (48.09 mg/L),之后快速下降至 43.98 mg/L (图 1b),而无菌对照组 TSb 在实验过程中维持在 9.73~10.94 mg/L。实验组中  $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度在第 4 d 就迅速升高到 1 209.6  $\mu\text{g/L}$ ,之后出现小幅波动 (图 1c),而对照组中的  $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度缓慢小幅上升,最终浓度为 816.0  $\mu\text{g/L}$ ,低于实验组中  $\text{SO}_4^{2-}$ 的最低值 1 027.2  $\mu\text{g/L}$  (图 1c)。

### 2.2 与辉锑矿互作用过程中微生物的群落演替

初始接种的富集群落以  $\gamma$ -变形菌纲占主导,其次为  $\alpha$ -变形菌纲。但随着与辉锑矿相互作用时间的推移,细菌菌群发生了演替。在纲水平上, $\gamma$ -变形菌纲在第 4 d 增加至 99.98%,之后逐渐减少。实验结束时  $\alpha$ -变形菌纲的相对丰度显著升高,占比为 11.35%,但  $\gamma$ -变形菌纲依然占据群落的主导地位

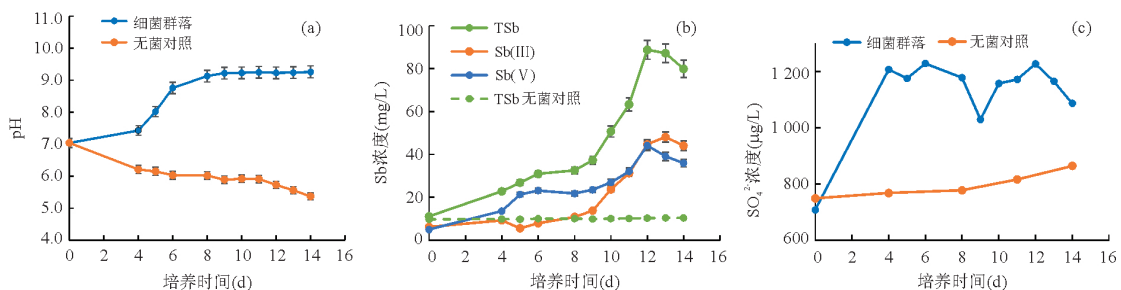


图 1 微生物群落与辉锑矿相互作用过程中溶液理化参数随时间的变化

Fig. 1 Variation of physicochemical parameters in the solution versus time during the interaction between microbial communities and stibnite

a. pH 变化; b. 总锑、三价锑和五价锑浓度变化; c.  $\text{SO}_4^{2-}$ 浓度变化

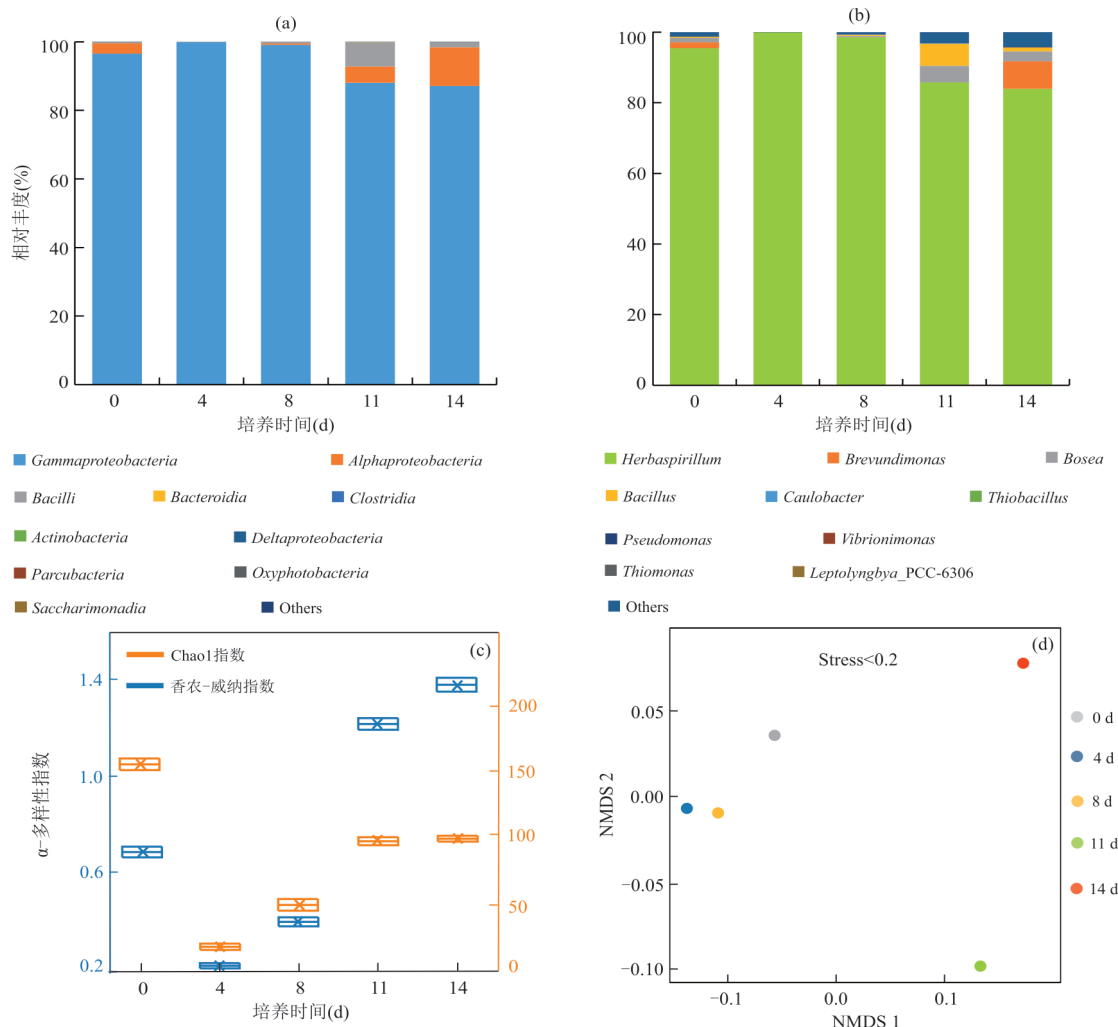


图 2 与辉锑矿相互作用过程中细菌群落的组成及多样性的变化

Fig. 2 Variations of microbial composition and diversity indexes during the interaction between microbial communities and stibnite 细菌群落在纲水平(a)和属水平(b)上相对丰度随培养时间的变化;c. 微生物菌群  $\alpha$ -多样性指数变化,其中橙色表示 Chao1 指数,蓝色表示 香农-威纳指数;d. 与辉锑矿作用过程中微生物菌群群落的非度量多维尺度分析

(87.07%) (图 2a). 属水平上,草螺菌属随着  $\gamma$ -变形菌纲相对丰度的上升而上升,第 8 d 相对丰度高达 98.55%,之后下降,实验结束时相对丰度为 83.97%; *Bosea* 和芽孢杆菌属在第 11 d 相对丰度最高,分别为 4.70% 和 6.24%,但在第 14 d 芽孢杆菌属相对丰度下降,而 *Brevundimonas* 的相对丰度上升,占比为 7.81% (图 2b).

$\alpha$ -多样性指数变化显示菌群的香农-威纳指数均随着培养时间的增加而增加(图 2c). 在整个实验过程中,菌群的香农-威纳指数均小于 1.5, Chao 1 指数均小于 200,在实验开始后的前 4 d, Chao 1 指数急剧下降,之后缓慢升高,11 d 之后趋于平缓. 香农-威纳指数在第 4 d 最低,随后随培养时间迅速升高,实验结束时,多样性最高(图 2c). 细菌群落的  $\beta$ -多样

性分析显示,随着培养时间的推移菌群发生明显的演替变化,细菌群落在 0~8 d 以内聚类距离比较相近,但是在第 8 d 之后菌群的群落演替发生明显的不同,并在 NMDS 的聚类上相互远离(图 2d).

RDA 分析表明,pH 以及溶液中锑的含量是影响细菌群落演替的重要因子,pH、Sb(III) 和 TSb 对微生物类群具有重要影响,解释度分别为 29.1%, 29.8% 和 27.0% (图 3),但 *P* 值均大于 0.05. 其中 *Bosea*、*Vibriomonas*、*Bacillus* 和 *Caulobacter* 与 Sb(III)、TSb 和 pH 正相关.

### 2.3 细菌群落与辉锑矿相互作用后矿物相的变化

XRD 分析结果表明,与原始辉锑矿样品相比(图 4a),经过菌群的作用,生成了次生矿物锑酸钠

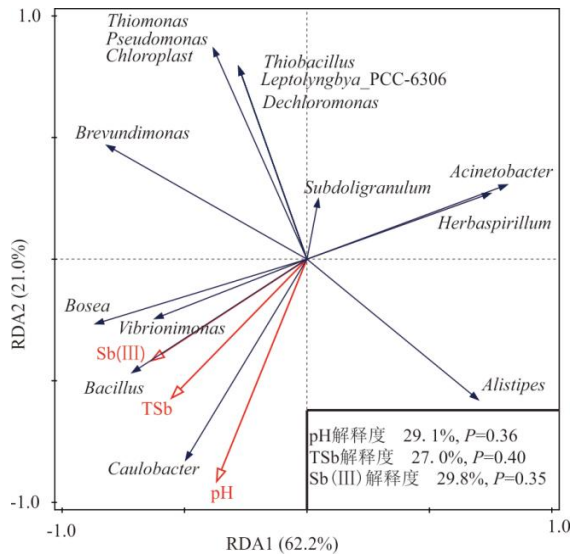
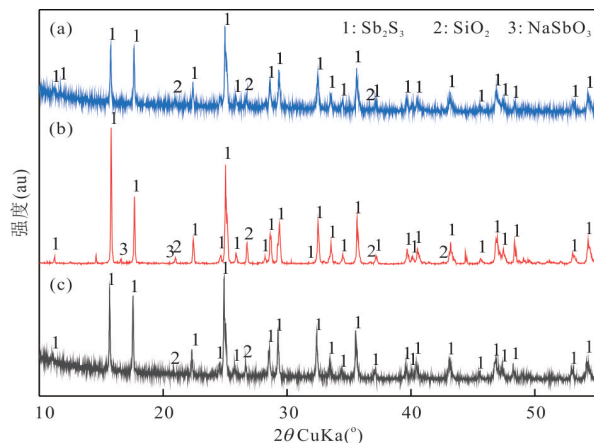


图3 环境因子与细菌群落之间的冗余分析

Fig. 3 Redundancy analysis of microbial communities and environmental variables

图4 细菌群落与辉锑矿相互作用前后矿物相的XRD图谱  
Fig. 4 XRD spectrum of mineral phases before and after the interaction with microbial communities

a. 未处理的辉锑矿粉末; b. 实验组; c. 对照组

表1 微生物菌群与辉锑矿相互作用前后固体样品中矿物组成的XRD半定量结果

Table 1 Semi-quantification of mineral composition in the solution before and after the interaction with microbial communities

|         | Sb <sub>2</sub> S <sub>3</sub> | SiO <sub>2</sub> | NaSbO <sub>3</sub> |
|---------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| 原始辉锑矿粉末 | 97.2%                          | 2.8%             | -                  |
| 实验组     | 83.8%                          | 15.1%            | 1.1%               |
| 对照组     | 96.1%                          | 3.9%             | -                  |

(NaSbO<sub>3</sub>) (图4b). 矿物含量的半定量分析结果显示, 实验组与无菌对照组在液体培养基中均伴随着

Sb<sub>2</sub>S<sub>3</sub>含量的降低, 与无菌对照组相比, 实验组辉锑矿粉末中Sb<sub>2</sub>S<sub>3</sub>含量下降更明显(表1).

### 3 讨论

#### 3.1 与辉锑矿相互作用过程中细菌群落的演替

整个细菌群落中, *Herbaspirillum* 属占据绝对优势, 该属是植物根、根际土壤以及寡营养环境中常见的固氮菌, 对多种重金属如As(550 mg/L)、Cu(350 mg/L)、Zn(300 mg/L)和Pb(200 mg/L)都具有抗性, 可以用于铜污染土壤的治理(Govarthanan *et al.*, 2014). *Herbaspirillum* sp. 还可以刺激植物产生生长激素, 从而促进植物的生长. *Herbaspirillum* sp. GW103菌株可以通过提高植物蛋白质的含量、降低金属对植物的毒性, 从而显著提高 *Zea mays* L. 对Pb和Zn的植物修复潜力(Praburaman *et al.*, 2017). *Herbaspirillum* sp. p5-19联合客土技术还被用于提高岩兰草对含铜尾矿的植物修复效果(Fang *et al.*, 2021). 此外, *Herbaspirillum* 也是受砷锑复合污染矿区(如石门雄黄矿和锡矿山锑矿)土壤中固氮细菌群落中的关键类群, 其丰度与砷和锑浓度显著正相关, 也表明该属对砷和锑具有抗性(Li *et al.*, 2022). 因此 *Herbaspirillum* 在锡矿山尾矿样品中的主导地位一方面说明该属对锑具有较好的抗性, 另一方面也暗示了它们对尾矿生态系统的恢复以及氮素的补充具有重要作用. 该属的相对丰度在第8 d达到最高, 此时实验体系中总锑的浓度为32.47 mg/L, Sb(III)的浓度为10.75 mg/L, 之后随着体系中锑浓度的升高, *Herbaspirillum* 相对丰度有所下降, 可能暗示着它们对锑的耐受阈值, 但这还需要通过实验来进一步验证. 此外, *Herbaspirillum* 为异养固氮菌, 实验体系中添加了较为丰富的有机碳源, 这也可能是导致该属在细菌群落中占优势的原因之一.

实验结束时, 细菌群落的多样性升高, 出现了更多对重金属具有抗性的微生物属种. 如短波单胞菌属(*Brevundimonas*)的相对丰度在实验结束时上升至7.81%, 该属包含25个种, 在自然界中广泛存在, 比如土壤、海洋沉积物、淤泥和纯水中均有发现. *B. diminuta* 被用于缓解有害元素(如As和Hg)的毒性(Singh *et al.*, 2016, 2021; Sforza *et al.*, 2018); 从铜厂排水中分离出来的 *B. diminuta* 可以提高Cu污染的生物修复效果(Rathi and Yogalakshmi, 2021). 而分离于奉贤矿山污染土壤中的 *B. diminuta*

ta, 则对镉和锌都表现出很高的抗性, 可以通过沉淀碳酸钙来对镉和锌进行去除 (Ali *et al.*, 2022). *Brevundimonas* 相对丰度在本研究实验结束时显著升高, 也可能说明其对锑具有较高的抗性.

辉锑矿中三价锑的释放、锑价态的改变, 以及溶液中总锑浓度的升高等因素对细菌群落产生了较强的筛选作用. 在属水平上, 细菌群落中出现了更多的与锑氧化有关或者对锑具有抗性的微生物类群. 如博斯氏菌属 (*Bosea*)、苍白杆菌 (*Ochrobactrum*)、红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、不动杆菌 (*Acinetobacter*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*) 以及副球菌属 (*Paracoccus*) 等. 前期对锡矿山锑氧化微生物的分离中, 本课题组从尾矿样品中分离到一株副球菌属的菌株, 经过全基因组的系统发育树比对, 命名为 *Paracoccus* sp. XT0.6. 该菌株能够在厌氧和好氧条件下对溶液中的三价锑进行快速氧化, 并且在好氧条件下也能与辉锑矿及锡矿山的矿石 (主要成分为辉锑矿) 发生相互作用, 将辉锑矿中的三价锑释放出来, 并快速将三价锑全部氧化成五价锑. 本实验对尾矿坝的锑氧化细菌群落的富集培养物中也发现了副球菌属, 进一步证实了该属在锑氧化中发挥的重要作用, 但总体来讲, 该属在所富集的细菌群落中所占的相对丰度较低. 其他几个微生物属也经常在被报道, 例如在锡矿山矿区土壤中分离到的 *Bosea* sp. AS-1 被证实具有砷和锑的氧化能力 (Lu *et al.*, 2018), 且能在自养和异养条件下对辉锑矿进行溶解, 并将释放出来的三价锑氧化成五价锑 (Xiang *et al.*, 2022). 不动杆菌等也被发现有锑氧化功能 (Li *et al.*, 2013).

综上所述, 由于细菌群落的生长, 改变了体系的 pH, 进而引起辉锑矿的溶解, 导致矿物中三价锑的释放. 部分三价锑又会被微生物氧化成五价锑, 胞内的五价锑通过磷酸盐转运通道转运到胞外 (Li *et al.*, 2015), 从而降低其对微生物的毒性. 但体系中三价锑的持续升高以及总锑的累积也对细菌群落起到了抑制和筛选作用, 使细菌群落逐步发生演替.

### 3.2 细菌群落对辉锑矿释放、氧化及次生矿物生成的作用

菌群作用下, 培养体系的 pH 变化与无菌对照组相比发生了显著区别. 基于宏基因组的证据表明, 尾矿环境中 *Burkholderiaceae* 的细菌同时编码锑

抗性或锑氧化与硫氧化基因 (Sun *et al.*, 2020). 尽管硫氧化的过程中会降低溶液环境的 pH, 但是这些硫氧化细菌通常具有碳氮固定等自养代谢的特征, 因而在添加乳酸钠的培养基中异养细菌会快速代谢产生较多的碳酸根离子, 使得实验组整体的 pH 随着培养时间而明显上升 (Zhang *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020). 由于碱性条件有利于辉锑矿的溶解, 进而造成辉锑矿的溶解和锑的释放, 释放的三价锑部分被细菌群落氧化成五价锑. 至培养的第 12 d 后, 由于 pH 增加、钠离子浓度以及较高的五价锑浓度等, 引起溶液对锑酸钠 ( $\text{NaSbO}_3$ ) 的过饱和, 从而形成了含五价锑的次生矿物, 使部分 Sb(V) 脱离了溶液体系, 导致溶液中五价锑的浓度下降. 但至实验结束, 溶液中 Sb(III) 的浓度为 31.59 mg/L, 这与锑氧化微生物在群落中的相对丰度较低有关. 与纯菌株 *Paracoccus* sp. XT0.6 和辉锑矿的相互作用相比, XT0.6 可以将从辉锑矿和矿石中释放出来的三价锑完全氧化为五价锑. 与课题组前期分离得到的 *Bosea* AS-1 对辉锑矿的释放实验相比, XT0.6 作用下辉锑矿中锑的释放率最高 (12.5%), 菌群与之接近 (10.7%), AS-1 的释放率较低 (5.8%) (表 2). 此外, XT0.6 和菌群作用下虽然均有次生矿物形成, 但次生矿物并不相同, 在 XT0.6 与辉锑矿相互作用后形成了次生矿物水钠锑矿  $\text{NaSb}(\text{OH})_6$ , 而菌群作用下生成的次生矿物则为锑酸钠 ( $\text{NaSbO}_3$ ). 而 AS-1 与辉锑矿相互作用后, 没有次生矿物的形成 (表 2). 与水钠锑矿相比, 在碱性条件下 (pH 8.5) 锑酸钠的溶解度更低, 在溶液体系中更容易沉淀 (Skeaff *et al.*, 2013). 尽管不同菌株以及菌群与辉锑矿相互作用的效率、锑的最终价态以及产生次生矿物的情况有所不同, 但微生物通过生长代谢提高 pH 从而促进锑释放是一个较为普遍的过程, 并且微生物在三价锑的氧化中起着关键作用, 这对降低环境中锑的毒性具有重要意义. 已有研究表明, 矿物中锑的释放率与锑矿物在固体废弃物的含量呈负相关 (Murtani *et al.*, 2016). 因此矿区更应重视对锑矿物含量较低的废石、尾矿、冶炼渣等固体物料的处置和管理. 含锑矿物中的 Sb(III) 在微生物/细菌群落的参与下逐渐被释放、氧化、再转移到含 Sb(V) 的次生矿物中, 这不仅降低了 Sb(III) 对微生物的毒性, 也降低了溶液中 Sb(V) 的累积, 从而以矿物的形式清除部分溶解态的 Sb(V) (图 5), 这揭示了微生物/细菌群落参与矿区锑的活化、迁

表 2 *Bosea* sp. AS-1、*Paracoccus* sp. XT0.6 和菌群与辉锑矿相互作用有关参数的对比Table 2 Parameter comparison of the interactions between stibnite with *Bosea* sp. AS-1, *Paracoccus* sp. XT0.6 and microbial communities

| 菌株名称或菌群 | 体系结束时的pH | 是否产生次生矿物 | 次生矿物名称及分子式                         | 锑的释放率(%) | 释放后锑的氧化率(%) |
|---------|----------|----------|------------------------------------|----------|-------------|
| XT0.6   | 9.3      | 是        | 水钠锑矿( $\text{NaSb}(\text{OH})_6$ ) | 12.5     | 100         |
| AS-1    | 6.8      | 否        | /                                  | 5.8      | 100         |
| 富集菌群    | 9.1      | 是        | 锑酸钠( $\text{NaSbO}_3$ )            | 10.7     | 50.1        |

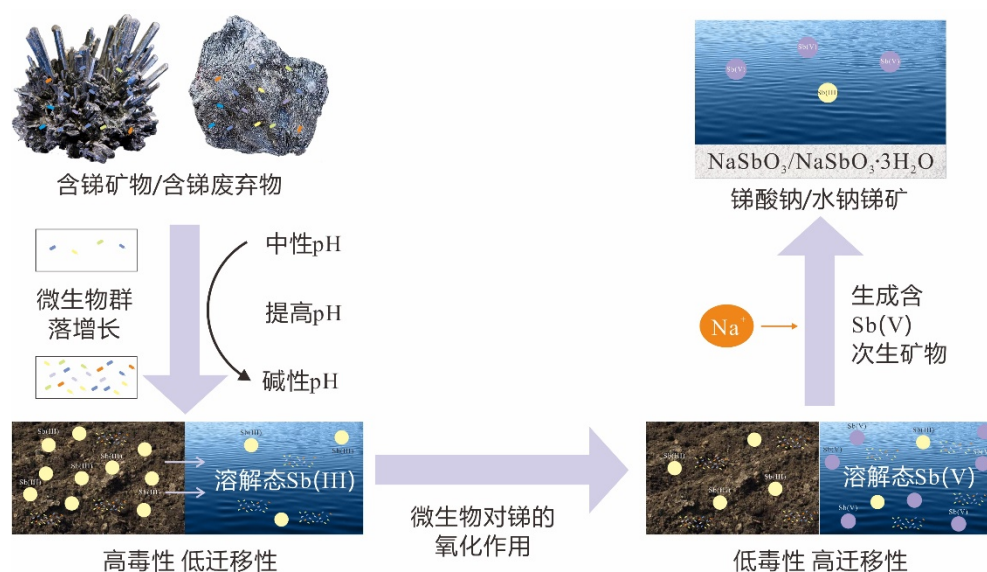


图 5 微生物/细菌群落对含锑矿物/固体废弃物的释放、氧化及次生矿物生成的作用机制

Fig.5 Mechanism of the release, oxidation and re-deposition of antimony from Sb-bearing minerals and solid waste mediated by microorganisms/microbial communities

移、氧化到再沉淀的完整链条,大大提升了人们对细菌群落参与锑的地球化学循环的认识.

## 4 结论

本研究从群落的水平,探讨了湖南冷水江锡矿山尾矿细菌群落与辉锑矿之间的相互作用.研究结果证实细菌群落的参与,可以促进含锑矿物中锑的释放,并将释放出来的三价锑部分氧化成五价锑,而生成五价锑可以再次以次生矿物的形式沉淀下来,从而影响锑的地球化学循环.而细菌群落与辉锑矿相互作用过程中,释放出来的锑也会对细菌群落进行筛选,导致细菌群落的逐步演替.最后的微生物属种对锑均具有良好的耐受性,且不少属种对三价锑具有氧化功能,如 *Parococcus*, *Bosea* 和 *Bacillus* 等.细菌群落中 *Herbaspirillum* 的主导地位可能与其较好的重金属抗性以及培养基中含有较为丰富的有机底物有关.未来开展微生物之

间的相互作用及其对锑的迁移、转化的影响将为深刻揭示细菌群落演替的驱动因素、细菌群落与锑相互作用的分子机制提供实验证据.

## References

- Ali, A., Li, M., Su, J., et al., 2022. *Brevundimonas diminuta* Isolated from Mines Polluted Soil Immobilized Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and Zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) through Calcium Carbonate Precipitation: Microscopic and Spectroscopic Investigations. *Science of Total Environment*, 813: 152668. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152668>
- Biver, M., Shotyk, W., 2012. Stibnite ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ) Oxidative Dissolution Kinetics from pH 1 to 11. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 79: 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.11.033>
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., et al., 2010. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Gut Microbes*, 7(5): 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>

- Edgar, R. C., 2013. UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads. *Frontiers in Plant Science*, 10(10): 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., et al., 2011. UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>
- Fang, Q., Huang, T., Wang, N., et al., 2021. Effects of *Herbaspirillum* sp. P5-19 Assisted with Alien Soil Improvement on the Phytoremediation of Copper Tailings by *Vetiveria zizanioides* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(45): 64757–64768.
- Fu, Z., Wu, F., Mo, C., et al., 2016. Comparison of Arsenic and Antimony Biogeochemical Behavior in Water, Soil and Tailings from Xikuangshan, China. *Science of the Total Environment*, 539: 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.146>
- Govarthanan, M., Lee, G. W., Park, J. H., et al., 2014. Bioleaching Characteristics, Influencing Factors of Cu Solubilization and Survival of *Herbaspirillum* sp. GW103 in Cu Contaminated Mine Soil. *Chemosphere*, 109: 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.054>
- Hamamura, N., Fukushima, K., Itai, T., 2013. Identification of Antimony- and Arsenic-Oxidizing Bacteria Associated with Antimony Mine Tailing. *Microbes and Environments*, 28(2): 257–263. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me12217>
- Hamamura, N., Nakajima, N., Yamamura, S., 2020. Draft Genome Sequence of the Antimony-Oxidizing *Pseudomonas* sp. Strain SbOxS1, Isolated from Stibnite Mine Tailing Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 9(49): e01218–20. <https://doi.org/10.1128/MRA.01218-20>
- He, M., Wang, X., Wu, F., et al., 2012. Antimony Pollution in China. *Science of Total Environment*, 421/422: 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.009>
- Jiang, N., Li, X.Q., Zhou, A.G., et al., 2020. Effect of pH Value and Fe(III) on the Oxidative Dissolution of Stibnite. *Bulletin of Geological Science and Technology*, 39(4): 76–84 (in Chinese with English abstract).
- Li, J., Wang, Q., Li, M., et al., 2015. Proteomics and Genetics for Identification of a Bacterial Antimonite Oxidase in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental Science & Technology*, 49(10): 5980–5989. <https://doi.org/10.1021/es506318b>
- Li, J., Wang, Q., Zhang, S. Z., et al., 2013. Phylogenetic and Genome Analyses of Antimony-Oxidizing Bacteria Isolated from Antimony Mined Soil. *International Biodegradation & Biodegradation*, 76: 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.009>
- Li, Y. B., Lin, H. Z., Gao, P., et al., 2022. Synergistic Impacts of Arsenic and Antimony Co-Contamination on Diazotrophic Communities. *Microbial Ecology*, 84(1): 44–58. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01824-6>
- Lialikova, N. N., 1974. *Stibiobacter senarmonitii*: A New Microorganism Oxidizing Antimony. *Iranian Journal of Public Health*, 43(6): 941–948.
- Lu, X., Zhang, Y., Liu, C., et al., 2018. Characterization of the Antimonite- and Arsenite-Oxidizing Bacterium *Bosea* sp. AS-1 and Its Potential Application in Arsenic Removal. *Journal of Hazardous Materials*, 359: 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.112>
- Magoč, T., Salzberg, S. L., 2011. FLASH: Fast Length Adjustment of Short Reads to Improve Genome Assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Multani, R. S., Feldmann, T., Demopoulos, G. P., 2016. Antimony in the Metallurgical Industry: A Review of Its Chemistry and Environmental Stabilization Options. *Hydrometallurgy*, 164: 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.06.014>
- Praburaman, L., Park, S. H., Cho, M., et al., 2017. Significance of Diazotrophic Plant Growth - Promoting *Herbaspirillum* sp. GW103 on Phytoextraction of Pb and Zn by Zea Mays L. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3): 3172–3180.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al., 2012. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rathi, M., Yogalakshmi, K. N., 2021. *Brevundimonas diminuta* MYS6 Associated *Helianthus annuus* L. for Enhanced Copper Phytoremediation. *Chemosphere*, 263: 128195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128195>
- Rhine, E. D., Phelps, C. D., Young, L. Y., 2006. Anaerobic Arsenite Oxidation by Novel Denitrifying Isolates. *Environmental Microbiology*, 8(5): 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00977.x>
- Sforza, E., Pastore, M., Sanchez, S. S., et al., 2018. Bioaugmentation as a Strategy to Enhance Nutrient Removal: Symbiosis between *Chlorella protothecoides* and *Brevundimonas diminuta*. *Bioresource Technology Reports*, 4: 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.10.007>
- Shi, Z., Cao, Z., Qin, D., et al., 2013. Correlation Models between Environmental Factors and Bacterial Resistance

- to Antimony and Copper. *PLoS One*, 8(10): e78533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078533>
- Singh, N., Marwa, N., Mishra, S. K., et al., 2016. *Brevundimonas Diminuta* Mediated Alleviation of Arsenic Toxicity and Plant Growth Promotion in *Oryza Sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125: 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.020>
- Singh, S., Kumar, V., Gupta, P., et al., 2021. The Synergy of Mercury Biosorption through *Brevundimonas* sp. IITISM22: Kinetics, Isotherm, and Thermodynamic Modeling. *Journal of Hazardous Materials*, 415: 125653. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125653>
- Skeaff, J. M., Beaudoin, R., Wang, R., et al., 2013. Transformation/Dissolution Examination of Antimony and Antimony Compounds with Speciation of the Transformation/Dissolution Solutions. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 9(1): 98–113. <https://doi.org/10.1002/ieam.1339>
- Sun, X. X., Kong, T. L., Häggblom, M. M., et al., 2020. Chemolithoautotrophic Diazotrophy Dominates the Nitrogen Fixation Process in Mine Tailings. *Environmental Science & Technology*, 54(10): 6082–6093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07835>
- Sun, X. X., Li, B. Q., Han, F., et al., 2019. Impacts of Arsenic and Antimony Co-Contamination on Sedimentary Microbial Communities in Rivers with Different Pollution Gradients. *Microbial Ecology*, 78(3): 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01327-5>
- Terry, L. R., Kulp, T. R., Wiatrowski, H., et al., 2015. Microbiological Oxidation of Antimony (III) with Oxygen or Nitrate by Bacteria Isolated from Contaminated Mine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(24): 8478–8488. <https://doi.org/10.1128/AEM.01970-15>
- Torma, A. E., Gabra, G. G., 1977. Oxidation of Stibnite by *Thiobacillus Ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(1): 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02316204>
- Wang, N. N., Zhang, S. H., He, M. C., 2018. Bacterial Community Profile of Contaminated Soils in a Typical Antimony Mining Site. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1): 141–152. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8159-y>
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., et al., 2007. Native Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Mucosal Immunology*, 73(16): 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/aem.00062-07>
- Xiang, L., Liu, C., Liu, D., et al., 2022. Antimony Transformation and Mobilization from Stibnite by an Antimonite Oxidizing Bacterium *Bosea* sp. AS-1. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 111: 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.03.042>
- Xiao, E. Z., Krumins, V., Dong, Y. R., et al., 2016. Microbial Diversity and Community Structure in an Antimony-Rich Tailings Dump. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17): 7751–7763. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7598-1>
- Zhang, G. P., Ouyang, X. X., Li, H. X., et al., 2016. Bio-removal of Antimony from Contaminated Waters by a Mixed Batch Culture of Sulfate-Reducing Bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 115: 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.007>

#### 附中文参考文献

- 江南, 李小倩, 周爱国, 等, 2020. pH值和氧化剂对硫化锑氧化溶解的影响机制. *地质科技通报*, 39(4): 76–84.