

博士学位论文

诱变前后混合微生物对铜、锌硫化矿
浸出能力比较及其纯种分离研究

作者姓名：康健

学科专业：矿物加工工程

学院(系、所)：资源加工与生物工程学院

指导教师：邱冠周 教授

中南大学

2007年10月

分类号 VDC_____

密级_____

博士学位论文

诱变前后混合微生物对铜、锌硫化矿
浸出能力比较及其纯种分离研究

**Comparative study on leaching of Cu/Zn sulphide by mixed
microorganisms before and after mutation and their
isolation in pure culture**

作者姓名：康健

学科专业：矿物加工工程

学院(系、所)：资源加工与生物工程学院

指导教师：邱冠周 教授

论文答辩日期 2007-11-30

答辩委员会主席 唐谟堂

中 南 大 学
2007 年 10 月

本课题受如下基金资助

国家重点基础研究发展计划项目（2004CB619201）

国家自然科学基金创新研究群体项目（50321402）

摘 要

微生物浸矿是多种微生物共同作用的复杂生化过程。大部分浸矿微生物是化能自氧型，生长速度慢，浸矿效率低。如何提高它们对金属离子的浸出效率是工业应用的难题。目前，普遍的方法是从浸矿混合微生物中分离纯培养，对其诱变处理。但在工业生产中常常应用混合微生物，其中很大一部分的微生物得不到纯培养，因此单一菌种诱变方法来选育浸矿微生物有明显的局限性。

本研究采用几种理化诱变剂及其组合，对从江西、云南、广东和台湾等不同地点采集的浸矿混合微生物进行单一或复合诱变，以获得生长快和浸矿效率高的混合培养物。同时，对诱变后的混合微生物进行了菌株分离与纯化、16S rDNA 鉴定和微生物群落的生态分析。结果如下：

通过混合微生物诱变和多次浸黄铜矿精矿实验，筛选得到了浸出 Cu^{2+} 能力较强的混合微生物 A、B、C、D 和 E。

①在加入矿浆浓度为 1% 黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d，混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 61.40%、125.57%、1.45%、58.98% 和 149.98%，浸出率分别提高 17.56%、35.90%、0.41%、16.87% 和 42.88%。说明混合培养物诱变可提高微生物浸黄铜矿精矿的活性。

②在加入矿浆浓度为 10% 黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d，混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 49.46%、71.68%、22.82%、44.85% 和 97.57%，浸出率分别提高 3.65%、5.29%、1.69%、3.31% 和 7.20%。说明混合培养物诱变可提高微生物浸黄铜矿精矿的活性。

③在加入矿浆浓度为 20% 的黄铜矿精矿培养基中培养 40 d，在 9K 和 leathen 培养基中，混合微生物 E 浸出 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 87.22% 和 79.24%，浸出率分别提高 3.60% 和 3.59%，表明混合微生物 E 的浸矿性能稳定。

④ Cu^{2+} 耐受实验表明，混合微生物 E 耐受 Cu^{2+} 能力明显提高，提示其具有工业应用的潜力。

⑤混合微生物 A、B、C、D 和 E 在 9K 培养基上生长到稳定期，它们的生长速度比未诱变的混合微生物快 1-2d。混合微生物在含黄铜矿精矿的培养基中保存比在不加矿的培养基中保存，其生长到稳定期快 1-2 d 左右，表明加入选择性压力可以保持浸矿微生物的生长活性。

从不同地点采集的微生物，经过黄铜矿和闪锌矿的长期驯化后，通过混合微生物的复合诱变，得到浸出闪锌矿精矿能力强的混合微生物 B、D 和 E。

①在加入矿浆浓度为 1%闪锌矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d，混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 8.06%、85.97%、-2.39%、77.61%和 117.01%；浸出率分别提高 1.54%、16.43%、-0.46%、14.83%和 22.37%。

②在加入矿浆浓度为 10%闪锌矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d，混合微生物 B、D 和 E 浸出 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 49.14%、44.86%和 54.77%；浸出率分别提高 2.27%、2.07%和 2.53%。

③在加入矿浆浓度为 20%闪锌矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d，混合微生物 B、D 和 E 在 9K 培养基中培养， Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.10%、1.59%和 2.24%；在 leathen 培养基中， Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.03%、1.89%和 2.56%

④B 混合微生物适合在矿浆浓度 4%-16%下生长，E 混合微生物适合在 4%-32%矿浆浓度下生长，说明混合微生物 B、E 耐受高矿浆浓度，有良好的工业应用前景。

比较了诱变前后四个不同样品中微生物群落的多样性。结果表明，四个样品中微生物群落结构可以分为嗜铁钩端螺旋菌组、嗜酸氧化亚铁硫杆菌组和嗜酸氧化硫硫杆菌和喜温硫杆菌三大组。尽管随着培养条件的改变，样品中微生物的群落结构存在一定的变化，但在本实验条件下，微生物浸出体系中最主要的优势菌种仍然是嗜酸氧化亚铁硫杆菌和嗜酸氧化硫硫杆菌。

诱变处理使混合微生物中的嗜酸氧化硫硫杆菌（2[#]菌株）由原来的次要菌株变成主要菌株，在含黄铜矿和闪锌矿培养基中分别占微生物总数的 69%和 57%，可能在微生物浸矿中起主要作用。

诱变前混合微生物中嗜酸氧化亚铁硫杆菌（1[#]菌株）生长量最少，诱变处理显著提高了它在微生物群落中的数量。在含黄铜矿精矿和闪

锌矿精矿培养基中培养时，它分别占微生物总数的 20%和 29%，可能在微生物浸矿中起重要作用。

在混合微生物样品中，进行微生物单菌株分离实验：

①分离出一株最适生长温度40℃，最适生长起始pH值为1.5的螺旋菌，16S rDNA序列分析表明，该菌为*Leptospirillum ferriphilum*。

②分离出一株最适生长温度45℃，最适生长起始pH值为1.8的杆菌，16S rDNA序列分析表明，该菌为*Acidithiobacillus caldus*。

③分离出一株最适生长温度53℃，最适生长起始pH值为2.0的杆菌，16S rDNA序列分析表明，该菌为*Sulfobacillus thermosulfidoxidans*。

④分离出 K1 和 K2 菌株，经初步鉴定分别为嗜酸氧化亚铁硫杆菌和嗜酸氧化硫硫杆菌。

关键词 混合微生物，黄铜矿，闪锌矿，诱变，生物浸出

ABSTRACT

Bioleaching is a complicated biochemical process in which a number of microbial genera are involved. Most of bioleaching microorganisms are chemoautotrophic. They grow slowly and have low efficiency in metal -leaching. How to improve the leaching efficiency is a problem of industrial applications. Up to date, most popular strategy is mutation of single microorganism isolated from mixed microorganisms of bioleaching. However, microorganisms for bioleaching industry are always in mixed form, and mostly, their pure culture may not be obtained. Therefore, there are limitations on mutation breed of single microorganism.

In present study, microbial samples were collected from acid mine drainage and spring of Jiangxi, Yunnan, Guangdong and Taiwan province, mixed and enriched. To obtain higher growth rate and higher leaching efficiency-mixed cultures, the mixed microorganisms were mutated using several physical and chemical mutagens and their combinations. Furthermore, single strain isolation, characterization of 16S rDNA, and ecological analysis were performed for the screened mixed cultures. The results are as follows:

The mixed cultures with higher concentrations of leaching Cu^{2+} , designated A, B, C, D and E, were screened after mutation and leaching tests of chalcopyrite.

① The concentrations of leaching Cu^{2+} for mixed culture A, B, C, D and E were increased by 61.40%, 125.57%, 1.45%, 58.98% and 149.98% and the leaching rates of Cu^{2+} in the cultures were correspondingly 17.56%, 35.90%, 0.41%, 16.87% and 42.88% higher compared with the control, 40 d after leaching in 9K medium containing 1% chalcopyrite pulp. The results indicate that Cu^{2+} leaching activities of mixed organisms can be enhanced by physical and chemical mutations.

② The amount of leaching Cu^{2+} for mixed culture A, B, C, D and E was increased by 49.46%, 71.68%, 22.82%, 44.85% and 97.57%, respectively, with 3.65%, 5.29%, 1.69%, 3.31% and 7.20% higher than the

control in Cu^{2+} leaching rates, 40 d after leaching in 9K medium each containing 10% Chalcopyrite pulp, again indicating that physical and chemical mutations may improve Cu^{2+} leaching activities of mixed organisms.

③ When added with 20% chalcopyrite pulp and inoculated in 9K and Leathen mediums for 40 d, mixed culture E extracted 87.22% and 79.24% more Cu^{2+} from chalcopyrite and had 3.6% and 3.59 higher Cu^{2+} leaching rates than the unmutated control, suggesting the acquired higher characteristics of Cu^{2+} -leaching is stable.

④ Mixed culture E was more resistant to Cu^{2+} than the unmutated control, suggesting that it possesses potentials for industrial applications.

⑤ The growth of mixed culture A, B, C, D and E in 9k medium was 1-2 d higher than that of the unmutated control and the mixed cultures conserved on chalcopyrite grew 1-2 d faster than those not conserved on chalcopyrite. These results indicate that growth activity of leaching microorganisms can be kept by selective stress.

After three rounds of leaching tests on sphalerite, mixed cultures B, D and E with higher efficiency of Zn^{2+} -leaching were obtained from mixed microorganisms A, B, C, D and E mentioned above.

① Compared with the unmutated control, the concentrations of leaching Zn^{2+} in 9K medium added with 1% sphalerite pulp for mixed cultures A, B, C, D and E were increased by 8.06%、85.97%、-2.39%、77.61% and 117.01%, respectively, and the leaching rates of Zn^{2+} in the cultures were correspondingly 1.54%、16.43%、-0.46%、14.83% and 22.37%, indicating that mutation against mixed microorganisms may improve leaching effects.

② Compared with the unmutated control, the concentrations of leaching Zn^{2+} for mixed culture B, D and E inoculated in 9K medium with 10% sphalerite pulp were increased by 49.14%、44.86% and 54.77%, and the leaching rates of Zn^{2+} in the cultures were correspondingly 2.27%、2.07% and 2.53%, respectively.

③ When added with 20% sphalerite pulp and inoculated for 40 d, mixed culture B, D and E had 2.10%、1.59% and 2.24% higher Zn^{2+}

leaching rates in 9K medium and 2.03%、1.89% and 2.56% higher Zn^{2+} leaching rates in Leathen medium than the unmutated control.

④ Mixed culture B could adjust to 4%-16% pulp of sphalerite, and mixed culture E could adjust to 32% pulp of sphalerite. These results indicate that B and E are more tolerant to high concentrations of sphalerite pulp, suggesting that they have brighter prospects on industrial applications than D.

Diversity of microbial clones of CK, CKCu, Bcu and BZn were compared in this section. The results showed that the microbial populations of the four samples were categorized into three groups, i.e., *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*. With the culture conditions varying, some changes may occur in the population structures of the mixed cultures. However, in the present study, the dominant microorganisms of the bioleaching systems were still *Thiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus caldus*.

The growth quantity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* among mixed microorganisms is the smallest before mutation. After mutation, its quantity ratio in the culture of chalcopyrite and sphalerite is 20% and 29% respectively of all microorganisms and it probably plays an important role in bioleaching.

The growth quantity of *Thiobacillus thiooxidans* among mixed microorganisms is small before mutation. After mutation, its quantity ratio in the culture of chalcopyrite and sphalerite is 69% and 57% respectively of all microorganisms and it probably plays an important role in bioleaching.

① A strain of *Leptospirillum ferriphilum* was isolated, and characterized by sequence analysis of 16S rDNA. Its optimum growth temperature was 40°C, and its optimum growth start pH was 1.5.

② A strain of *Acidithiobacillus caldus* was isolated, and characterized by sequence analysis of 16S rDNA. Its optimum growth temperature was 45°C, and its optimum growth start pH was 1.8.

③ A strain of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* was isolated, and characterized by sequence analysis of 16S rDNA. Its optimum growth temperature was 53°C, and its optimum growth start pH was 2.0.

④ No. 1 strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and No. 2 strain of *Thiobacillus thiooxidans* were isolated.

KEY WORDS Mixed microorganisms, Chalcopyrites, Sphalerite, Mutation, Bioleaching

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	IV
第一章 文献综述.....	1
1.1 微生物冶金的历史	2
1.1.1 国内的微生物冶金.....	3
1.1.2 国外的微生物冶金.....	9
1.2 微生物冶金的特点	11
1.3 微生物冶金的具体研究方法	12
1.3.1 浸矿微生物研究.....	12
1.3.2 浸矿环境研究.....	17
1.3.3 微生物和环境共同作用机制研究.....	17
1.4 微生物冶金的前景	18
1.4.1 极端条件的微生物选育.....	18
1.4.2 基因工程菌的构建.....	19
1.4.3 生产工艺研究.....	19
1.5 选题目的	20
1.5.1 选题目的.....	21
1.5.2 创新之处.....	21
第二章 混合微生物收集与富集培养.....	22
2.1 材料与方法	22
2.1.1 样品.....	22
2.1.2 矿石来源.....	24
2.1.3 仪器设备.....	24
2.1.4 微生物培养.....	25
2.2 结果和分析	26
2.2.1 德兴菌种常温培养.....	26
2.2.2 云南高温微生物富集培养.....	28
2.3 本章小结	29
第三章 混合微生物的诱变及其在黄铜矿的浸出.....	30
3.1 材料与方法	30
3.1.1 矿石来源.....	30
3.1.2 混合微生物的制备.....	30

3.1.3 诱变剂的选择及诱变.....	30
3.1.4 微生物筛选驯化实验.....	31
3.1.5 1%矿浆浓度浸矿实验.....	31
3.1.6 10%矿浆浓度浸矿实验.....	32
3.1.7 20%矿浆浓度浸矿实验.....	32
3.1.8 Cu^{2+} 耐受实验.....	32
3.1.9 pH 测定.....	32
3.1.10 细菌染色及其生长量测定.....	32
3.1.11 铜离子浓度测定.....	32
3.1.12 铁离子浓度测定.....	33
3.2 结果与分析.....	33
3.2.1 诱变后混合微生物选育结果.....	33
3.2.2 1%矿浆浓度浸矿实验结果.....	34
3.2.2 10%矿浆浓度浸矿实验结果.....	34
3.2.3 20%矿浆浓度浸矿实验结果.....	35
3.2.5 浸出过程中培养基 pH 的变化.....	36
3.2.6 Cu^{2+} 耐受实验.....	36
3.2.7 保存方法与条件对混合微生物生长的影响.....	38
3.2.8 培养温度对混合微生物生长的影响.....	39
3.3 本章小结.....	41
第四章 混合微生物浸出闪锌矿精矿.....	43
4.1 材料与方法.....	43
4.1.1 实验材料.....	43
4.1.2 微生物培养.....	43
4.1.3 浸矿实验.....	43
4.1.4 细菌浓度测定.....	44
4.1.5 锌离子浓度测定.....	44
4.2 结果和分析.....	44
4.2.1 浸矿实验.....	44
4.2.2 不同闪锌矿精矿矿浆浓度中混合微生物的生长.....	46
4.2.3 显微镜观察.....	50
4.3 本章小结.....	50
第五章 诱变前后微生物的群落结构分析.....	52
5.1 材料与方法.....	52

5.1.1 混合微生物和培养基.....	52
5.1.2 诱变前后混合微生物的 DNA 提取.....	52
5.1.3 诱变前后混合微生物的系统发育分析.....	53
5.1.4 数据统计.....	54
5.2 结果与分析	54
5.2.1 诱变前后混合微生物的 RFLP 分析	54
5.2.2 诱变前后混合微生物的系统发育分析.....	54
5.3 结 论.....	62
5.4 本章小节	63
第六章 <i>Leptospirillum ferriphilum</i> 的分离纯化.....	64
6.1 材料与方法	64
6.1.1 菌种和培养基.....	64
6.1.2 <i>L. ferriphilum</i> 的培养及纯化	65
6.1.3 <i>L. ferriphilum</i> 的生理生化性质	65
6.1.4 DNA 提取.....	65
6.1.5 16S rDNA 的扩增、序列测定和系统发育分析	66
6.2 结果与分析	66
6.2.1 <i>L. ferriphilum</i> 的分离	66
6.2.2 <i>L. ferriphilum</i> 的最适生长温度	67
6.2.3 <i>L. ferriphilum</i> 的最适起始 pH	67
6.2.4 <i>L. ferriphilum</i> 的生长曲线	68
6.2.5 <i>L. ferriphilum</i> 的 16S rDNA 系统发育分析.....	68
6.3 结 论.....	69
第七章 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的分离纯化.....	70
7.1 材料与方法	70
7.1.1 菌种和培养基.....	70
7.1.2 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的培养及纯化.....	70
7.1.3 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的生理生化性质.....	71
7.1.4 DNA 提取.....	71
7.1.5 16S rRNA 基因的扩增、序列测定和系统发育分析.....	71
7.2 结果与分析	72
7.2.1 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的分离.....	72
7.2.2 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的最适生长温度.....	72
7.2.3 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的最适起始生长 pH.....	73

7.2.4 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的生长曲线.....	73
7.2.5 <i>Acidithiobacillus caldus</i> 的 16S rDNA 系统发育分析.....	74
7.3 本章小结	75
第八章 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的分离纯化	76
8.1 材料与方法	76
8.1.1 菌种和培养基.....	76
8.1.2 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的培养及纯化.....	76
8.1.3 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的生理生化性质	77
8.1.4 DNA 提取	77
8.1.5 16SRNA 的扩增、序列测定和系统发育分析	77
8.2 结果与分析	78
8.2.1 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的分离	78
8.2.2 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的最适生长温度	78
8.2.3 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的最适生长 pH	79
8.2.4 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的生长曲线	79
8.2.5 <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> 的 16S rDNA 的系统发育分析.....	80
8.3 本章小结	81
第九章 混合微生物中优势菌株的分离纯化.....	82
9.1 材料与方法	82
9.1.1 菌种和培养基.....	82
9.1.2 混合微生物中优势菌株的培养及纯化.....	82
9.1.3 混合微生物中优势菌株的生理生化性质.....	82
9.1.4 DNA 提取	83
9.1.5 16S rDNA 的扩增、序列测定和系统发育分析	83
9.2 结果与分析	83
9.2.1 混合微生物中优势菌株的分离.....	83
9.2.2 混合微生物中优势菌株的最适生长温度.....	83
9.2.3 混合微生物中优势菌株的最适起始生长 pH.....	85
9.2.5 混合微生物中优势菌株的 16S rDNA 系统发育分析	86
9.3 本章小结	86
第十章 结 论.....	87
参 考 文 献.....	89
致 谢.....	100
攻读博士学位期间发表的论文.....	101

第一章 文献综述

微生物冶金是利用微生物的氧化还原特性,将矿物中有价金属直接氧化成可溶性的离子形式,释放到溶液中。如铜、铀、镍、锰、钴的浸出;有些金属通过微生物的作用并不能直接溶出,如矿石中的金,但通过浸矿微生物作用后,可以除去金矿中大部分难溶的黄铁矿杂质、硫、砷及一些重金属离子,提高金矿石的品位,有利于下一步化学冶金的进行,提高金的提取率。许多微生物可以通过多种途径对矿物作用,将矿物中的有价元素转化为溶液中的离子。利用微生物的这种性质,结合湿法冶金等相关工艺,形成了生物冶金技术^[1~3]。

根据Falmouth Asso Ciates最新完成的一项调查研究表明^[4]:世界上每年有20亿美元以上的金属是用生物技术提取的,其中以铜为主,并且每年以12%-15%的速度增长^[5~7]。通常情况下,生物浸出生产电铜的成本比火法生产电铜的成本低20%-25%。

未来20年,世界主要产铜国智利、美国矿业最重要的革新将是采用湿法冶金工艺取代有色行业传统熔炼工艺^[8]。而生物浸出技术有望在湿法冶金工艺中充当越来越重要的角色^[9],应用微生物浸矿的优势在于:反应温和,环境友好,能耗低,流程短。

目前研究的浸矿微生物主要有以下几个种类^[10~17]:嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、嗜酸氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)、金属球菌(*Metallosphaera*)、氧化亚铁钩端螺菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)、嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)、固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)、极端嗜酸性喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)、嗜酸异养菌(*Acidiphilium*)、亚铁原生质菌(*Ferroplasma*)、嗜热硫化叶菌属(*Sulfolobus acidocaldarius*)、硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus*)、氧化铁杆菌(*Ferrobacillus ferrooxidans*)、高温嗜酸古细菌(*Thermoacidophilic archaeobacteria*)等。在以前有关生物冶金的报道中,*Acidithiobacillus ferrooxidans*为浸矿菌种的论文占绝大多数,现在其他菌的报道也有一些^[18~20],特别是最适生长温度40以上的细菌研究较多,这些菌在微生物浸矿中发挥重要作用^[21,22]。

这些混合菌有些适宜在常温环境下生长、有些则适宜在50-70℃或更高温度下生长。用于浸矿的细菌,按其生长的最佳温度可以分为三大类,即中温菌、中等嗜热菌与高温菌^[23]。但从研究者对浸矿细菌的分离及培养方法来看^[24],应该是多个菌种的富集混合菌在微生物浸矿时起作用^[25,26]。

现在,对微生物的大部分研究都是分离单个菌种,研究其生理生化特性、基因结构和功能、蛋白质结构和功能。越来越多的证据表明,可培养微生物仅占自然环境微生物的极少部分。Amann等^[27]认为,自然环境中尚不可纯培养的微生物高达85%-99.9%,并且即便是得到了纯培养,在不同的培养条件下其形态和生理特征均可能发生很多变化,这成为全面客观认识自然环境中微生物群落的严重障碍。

然而,微生物浸矿是一个多菌种、混合菌浸矿过程,单个优良菌种的简单组合不一定产生最好的浸矿效果。Harrison、Kelly 和Wood 等人研究了其它酸性菌株的特性及各浸矿菌株混合使用效果,认为由于各菌株对铁离子、元素硫及其它金属离子的不同作用,混合菌株具有优势互补作用^[28,29]。

影响微生物冶金快速发展的主要原因是微生物浸矿速度缓慢^[30]。而细菌的生长速度是决定浸矿速度的最主要的因素,其生长速度的快慢直接影响到它的氧化活性(即浸矿能力)。众所周知,每个矿床都有其独特的活性细菌,从目的矿床的矿石或矿坑水中分离选育出适应矿床环境的高活性、高效益浸矿细菌是微生物冶金技术实现工业化的前提条件,而驯化^[31~35]、诱变育种是目前用得最为普遍也是最经济的育种手段^[36]。因此,国内学者在驯化^[37]和诱变育种方面进行着不懈的努力^[38~43]。

为了理论研究和实际生产能够紧密联系,同时高效率选育出适应工业生产的混合微生物组合。该研究立足于混合菌的培养、驯化,试图通过常规诱变法,多种诱变剂复合诱变混合微生物,选育出高性能的浸矿混合微生物。

1.1 微生物冶金的历史

生物浸出(Bioleaching)又称微生物浸出或细菌浸出,它是利用自然界中存在的某些细菌实现从硫化矿石或精矿中提取贵金属和基本金属——实质上是加速硫化物自然转化成氧化物的湿法冶金过程。此法特别适于处理贫矿、废矿及难采、难选、难冶矿的堆浸和就地浸出。20世纪50年代,Comler和Temple等人的研究证明烟煤矿层中的硫化矿石在潮湿环境中,其细菌可将黄铁矿中的铜浸出,开创了微生物冶金的时代^[44]。生物冶金在解决资源综合利用的化学过程调控、选择性和能源、环境方面比高温冶金具有明显优势。因此,在富矿、易处理矿资源日渐减少、环保要求不断提高、现代工业和科技发展对有色金属的需求与日俱增的条件下,生物浸出可能成为现代技术中最有吸引力的技术之一。目前世界各国通过生物浸出法生产的铜约为100万t,其中美国25%的铜产量得自生物浸出法;全世界难处理金矿中有25%左右采用生物浸出法^[45],甚至有人估计,世界上有近1/3

的黄金产量来自难浸矿石^[46~48]。

1.1.1 国内的微生物冶金

中国是世界上最早采用生物冶金技术的国家,早在公元前2世纪,就记载了用铁从硫酸铜溶液中置换铜的化学作用,堆浸在当时就是生产铜的普遍做法。不过是在采铜和铁的过程中不自觉地利用了自发生长的某些自养细菌浸矿。西汉《淮南万毕术》里有“白青(硫酸铜)得铁则化为铜”的描述。在公元11世纪大量应用了这种工艺,北宋时代,又记载有“胆水浸铜”,产铜占当时总产量的15%-25%,仅江西铅山铜采矿场就年产 $19 \times 10^4 \text{kg}$,安徽铜官山采场产量超过铅山^[49]。

1.1.1.1 微生物冶金技术在铜矿石中的应用

随着国民经济的快速发展,铜的用途越来越广泛,用量越来越大(表1-1, 1-2)。我国85%铜矿属于原生硫化矿,都是低品位,常规技术不能利用。同时在开采过程中受当时选矿技术和经济成本的限制产生了大量的表外矿和废石,废石含铜通常为0.05%-0.3%。这些铜资源得不到有效的利用,但是我国每年要进口60%以上的铜矿石^[50,51]。

为了充分利用我国的硫化矿资源,国家投入了大量资金以致力于解决我国硫化矿利用课题。2004年,我校得到国家自然科学基金创新研究群体项目的资助。同年,以中南大学邱冠周教授为首席科学家已正式启动国家973项目:“微生物冶金的基础研究(2004CB619201)”,该项目以教育部为依托、由中南大学为第一承担单位,致力于开发我国的硫化矿资源,解决资源问题。

我国矿产资源紧缺,富矿多数已开发利用。对于有限的矿产资源,传统技术资源利用率很低,经济可采率还不到30%,另有70%的资源如果想得到充分利用,就必须依托新技术来完成,微生物冶金技术将提高矿产资源利用率两倍以上。以铜为例,我国铜的保有储量6917万吨,传统的采选冶金技术资源开发率只有28%左右,而利用微生物冶金技术开发率接近100%。目前,我国在微生物冶金应用方面刚刚起步,由于国内有90%为复杂低品位原生硫化矿,因此这一技术的应用前景十分广阔。

德兴铜矿采用细菌堆浸技术处理含铜0.09%-0.25%的废石,建成了生产能力2000 t/a的湿法铜厂,萃取箱的处理能力达到了 $320 \text{ M}^3/\text{h}$,已接近了国外萃取箱的水平。该厂1997年5月投产,已正常运转了几年,生产的阴极铜质量达到A级^[52]。

广东大宝山建立了我国第一个生物浸铜中试基地^[53]。

福建紫金山铜矿已探明的铜金属储量253万吨,属低品位含砷铜矿,铜的平

表 1-1 我国近十年铜产品和进口量 ($\times 10^4\text{t}$)

类 别	1990 年	1991 年	1992 年	1993 年	1994 年	1995 年	1996 年	1997 年	1998 年	1999 年	2000 年
生产量:											
铜精矿 (含铜)	29.59	30.40	33.43	34.57	39.56	44.52	43.91	49.55	48.68	52.01	59.0
粗铜	35.85	38.50	41.80	44.37	48.24	53.80	61.56	78.90	83.86	83.70	101
电解铜	55.87	56.00	65.90	73.03	73.61	107.97	111.91	117.94	121.13	117.42	137
铜材	45.19	47.45	61.60	72.04	77.82	157.19	135.10	146.33	125.20	128.19	159
进口量 (实物量)											
铜精矿	24.22	30.98	34.01	24.11	24.87	48.28	82.48	93.78	118.29	125.01	181
粗铜	0.19	0.61	11.32	10.26	4.27	7.98	13.30	11.11	9.59	13.00	13
精炼铜	3.76	10.65	26.10	10.20	7.23	10.21	14.97	8.83	16.26	40.49	69
铜合金	0.10	0.14	0.47	0.62	0.64	0.56	0.81	1.13	0.98	1.29	69
废杂铜	2.17	0.10	49.14	56.86	77.39	118.89	71.09	79.68	95.71	70.114	250
铜材	3.78	5.22	15.94	20.82	28.31	35.04	42.33	48.47	54.59	63.14	74

表 1-2 重要铜化合物用途

化合物	农业（杀虫剂， 杀菌剂，除草剂）	分析试 剂	防污 油漆	触 媒	云雨催化剂	抗防 腐剂	电解和 电镀	电子仪器	纺织业	防火剂	燃料油加工添加剂
醋酸亚铜				√							
醋酸铜	√	√		√			√		√	√	
乙酐亚铜				√							
砷酸铜											
溴化亚铜	√			√							
碱式碳酸铜	√		√	√		√			√		
氯化亚铜		√		√				√	√		√
氯化铜	√	√		√		√		√	√	√	√
羟基氯化铜	√			√			√				
铬酸铜	√			√			√			√	
铁酸铜				√					√		
氟硼酸铜				√			√	√	√		
葡萄糖酸铜											
氢氧化铜	√	√					√		√		
碘化亚铜		√		√	√		√	√			
硝酸铜						√	√	√	√		√
氧化亚铜	√	√	√	√	√		√	√			√
氧化铜	√	√	√	√	√	√		√	√	√	√
脂肪酸铜	√	√	√	√							
硫酸铜	√	√				√	√	√	√	√	
醋酸亚铜					√	√		√		√	

续表 1-2

化合物	玻璃陶瓷水泥	医疗食品 药品	冶 金	矿业和金属	尼龙	有机反应	纸张纸 制品	颜料染 料	控制污染 (催化)	印刷 照相	烟火 火箭	木材防 腐
醋酸铜		√			√	√		√		√		
乙酰亚铜						√						
砷酸铜						√						√
溴化亚铜			√		√	√				√		
溴化铜	√		√			√						
碱式碳酸铜						√						
氯化亚铜	√		√	√	√	√				√	√	
氯化铜	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√		
羟基氯化铜	√					√						
铬酸铜						√			√		√	√
铁酸铜										√		
氟硼酸铜												√
葡萄糖酸铜		√								√		
氢氧化铜		√			√	√	√					
碘化亚铜					√	√				√		
硝酸铜	√	√	√	√		√	√			√	√	√
氧化亚铜	√		√	√	√	√			√	√	√	

均品位0.45%，含砷 0.37%。主要铜矿物为蓝辉铜矿、辉铜矿和铜蓝。中国有色金属工业协会组织专家在北京对北京有色金属研究总院和福建紫金矿业集团股份有限公司完成的“紫金山铜矿生物提铜技术与工业应用”成果进行技术鉴定，经认真审查，专家认为，项目在完成试验室小型试验和扩大试验基础上，进行了现场300 t·Cu / a和1000 t·Cu / a级工业试验。入堆铜品位0.42-0.88%，浸出周期180-240天，铜浸出率75.68-80.84%。电铜质量达到国家A级铜标准。技术创新点包括：

①改良与应用了本土微生物，得到驯化菌与诱变菌，提高了耐酸性和浸出效率；

②研究成功了适合于高S / Cu比铜矿特点的生物堆浸工程技术、酸铁平衡技术和除杂技术；

③成功开发了高温多雨地区生物堆浸过程水平衡技术；

针对紫金山含砷低品位铜矿特点，与传统的选矿—火法炼铜工艺相比，该技术较好地解决了砷的污染问题。所开发的技术及其指标居国内领先，达到国际先进水平。应用该技术成果建设的紫金山万吨级生物提铜矿山基本建成，使铜储量达146万吨的紫金山大型低品位硫化铜矿得到大规模开发，预计年经济效益可达1.84亿元。该技术成本低、对环境友好，经济社会效益显著，可推广应用于我国低品位及偏远地区铜资源开发^[54]。

新疆阿舍勒铜矿采用全湿法冶金新工艺成果计划2005年试运行（图1-1）。



图1-1 新疆阿舍勒铜矿

资源储量居中国第一、亚洲第二的西藏昌都玉龙特大型铜矿日前进入实质性开发阶段，工程于2007年正式开工建设，力争3年内建成投产。

玉龙铜矿拥有625万吨储量，潜在储量在1000万吨。初步规划分三期建设，一期建设规模为年产3至5万吨电解铜，总投资15亿元，年内开工建设，并力争通

过二期、三期建设达到年产电解铜15至20万吨的生产规模^[55]。

1.1.1.2 微生物冶金技术在金、银矿石中的应用

金精矿生物预氧化提金在山东莱州已开始工业应用^[56,57]，我国陕西省地矿局1994年进行了2 000吨级黄铁矿类型贫金矿的细菌堆浸现场试验，原矿的含金只有0.54 g / t，经细菌氧化预处理后金的回收率达58%，未经处理的只有22%^[58,59]。

1995年云南镇源金矿难浸金矿细菌氧化预处理项目启动，建起我国第一个微生物浸金工厂。

新疆包古图金矿经细菌氧化预处理后，金浸出率高达92%-97%^[60,61]。

1996年，陕西地勘局建成了全国最大的微生物氧化提金连续半工业试验基地，处理能力为2-3 t/d 精矿，经对广西某金矿14 t 金精矿预氧化处理，金的回收率达到82.16 %^[62]；烟台黄金冶炼厂2000年建成投产生物氧化厂，加工的矿石为难处理含砷金精矿处理量为60 t/d。金精矿中的金采用常规方法浸出回收率仅10%，而生物氧化预处理后，仍采用常规方法浸出，金的回收率高达96 %^[63]，莱州黄金冶炼厂于2001年4月建成并投产，采用CCD 流程提取金，生产能力100t/d^[64]。

1.1.1.3 微生物冶金技术在铀矿石中的应用

抚州铀矿是我国最大铀矿冶企业之一，矿点多，矿石矿性差异性大，化学成分复杂，水冶加工酸耗高。目前采用的以常规搅拌浸出为基础的“淋萃”工艺流程，虽然对矿石适应性强，浸出率高，但工艺流程长，工序多，操作复杂，原材料、动力消耗大，生产成本居高不下^[65,66]。多年来，抚州铀矿一直努力探索适合该矿实际情况的技术改造方案。从上个世纪90年代起，该矿先后与相关科研院所合作，进行了半工业、工业规模的堆浸、细菌堆浸和渗滤浸出研究^[67,68]，并于2004年建成渗滤浸出工业生产线。近2年的渗滤浸出工业化生产情况表明，氧化剂用量为0.289 / t，酸耗(与矿石质量比，下同)为10-11，同“淋萃”流程相比较，节省硫酸20%-30%，动力消耗降低30%-40%。

我国在20世纪70年代初，也曾在湖南711铀矿作了处理量为700吨贫铀矿石的细菌堆浸扩大试验，而在柏坊铜矿则将堆积在地表的含铀0.02%-0.03% 的2万多吨尾砂历经8年用细菌浸出铀浓缩物2吨多。进入20世纪90年代后，新疆某矿山利用细菌地浸浸出铀取得了良好的经济效益。此外，北京化工冶金研究院在细菌浸矿方面做过许多研究工作，他们曾在相山铀矿进行过细菌堆浸半工业试验研究，而赣州铀矿原地爆破浸出试验及在草桃背矿石堆浸试验中也都应用了细菌技术^[69,70]。

镍、锌等硫化矿的生物冶金亦得到不同程度的发展^[71~72]。

总体来说,我国生物冶金工业应用规模较小、应用矿山较少、矿种单一,需加大力度发展。由于国内有90%的原生硫化矿为复杂低品位,因此这一技术应用前景十分广阔。

1.1.2 国外的微生物冶金

1687年,在瑞典中部的Falun矿,人们使用微生物技术已经至少浸出了200万吨铜,但当时人们对其反应机理并不清楚,细菌浸矿技术的发展十分缓慢。直到1947年, Colmer与Hinkel首次从酸性矿坑水中分离出一种可以将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} 的细菌即嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)^[73]。1954年, Bryner和Beck等人开始利用该菌种进行硫化铜矿石的实验室浸出试验研究,并发现该细菌对硫化矿具有明显的氧化作用。1955年10月24日, Zimmerley、Wilson与Prater首次申请了生物堆浸的专利并委托给美国Kennebec铜矿公司,开始了生物湿法冶金的现代工业应用。

1.1.2.1 微生物冶金技术在金、银矿石中的应用

微生物湿法冶金技术在金、银矿中主要应用于氧化预处理阶段^[74,75],近年来已有8个生物氧化预处理厂分别在美国、南非、巴西、澳大利亚和加纳投产,具体厂家见(表1-3)。南非的Fairview金矿厂采用细菌浸出,金的浸出率达95%以上;美国内华达州的Tomkin Sptins金矿于1989年建成生物浸出厂,日处理1 500 t矿石,金的回收率为90% ;澳大利亚于1992年建成Harbour Lights细菌氧化提金厂,处理规模为40 t / d。巴西一家工厂于1991年投产,处理量为150 t / d。

表1-3 处理浮选金精矿的生物氧化厂

浸出厂	规模(t/ d)	生产年份
南非Fairview 氧化厂	35	1986 、1991 - 现在
澳大利亚Harbour Lights	40	1992 - 1994
澳大利亚Wiluna	115	1993 - 现在
巴西Sao Bento	150	1990 - 现在
加纳Ashanti	1000	1994 - 现在
澳大利亚Youanmi	120	1994 - 1998
秘鲁Tamboraque	60	1999 - 现在
澳大利亚Beaconsfield	70	2000 - 现在

1.1.2.2 微生物冶金技术在铜矿石中的应用

生物湿法冶金已经使用了很长的时间^[76~79]。罗马人、腓尼基人以及其他早

期文明就已知道从流经采矿场或矿体的水中回收铜。当初的人们并不知道生物细菌在铜提取过程中起着非常重要的作用。直到20世纪40年代末期。人们才认识到生物细菌在提取铜过程中具有可以大大加强 Fe^{2+} 的氧化作用的能力。进入20世纪八、九十年代。生物浸矿已成为矿冶领域研究的热点并取得了长足进步,国外大规模生物冶铜实例见(表1-4)。

表1-4 国外大规模生物冶铜实例

Region/mine	Operation reserves (t)	Ore processed (t/day)	Cu production (t/year)
Lo Aguirre, Chile 1980–1996	Heap bioleach 12×10^6 at 1.5% Cu	Oxides/chalcocite 16×10^3	$14-15 \times 10^3$
Cerro Colorado, Chile 1993–	Heap bioleach 80×10^6 at 1.4% Cu	Chalcocite, covellite 16×10^3	100×10^3
Ivan Zar, Chile 1994–	Heap bioleach 5×10^6 at 2.5% Cu	Oxides/sulphides 1.5×10^3	12×10^3
Quebrada Blanca, Chile 1994–	Heap/dump bioleach 85×10^6 at 1.4% Cu Cu 45×10^6 at 0.5% Cu	Chalcocite 17.3×10^3	75×10^3
Punta del Cobre, Chile 1994–	Heap (bio)leach 10×10^6 at 1.7% Cu	Oxides/sulphides –	$7-8 \times 10^3$
Andacollo, Chile 1996–	Heap/dump bioleach 32×10^6 at 0.58% Cu	Chalcocite 15×10^3	21×10^3
Dos Amigos, Chile 1996–	Heap bioleach 2.5%	Chalcocite 3×10^3	–
Zaldivar, Chile 1998–	Heap/dump bioleach 120×10^6 at 1.4% Cu Cu 115×10^6 at 0.4% Cu	Chalcocite 20×10^3	150×10^3
Lomas Bayas, Chile 1998–	Heap/dump 41×10^6 at 0.4% Cu	Oxides/sulphides 36×10^3	60×10^3
Cerro Verde, Peru 1977–	Heap bioleach — at 0.7% Cu	Oxide/sulphide 32×10^3	54.2×10^3
Escondida, Chile	Heap bioleach 1.5×10^9 at 0.3–0.7%	Oxides, sulphides	200×10^3
Lince II, Chile, 1991–	Heap leach 1.8% Cu	Oxides, sulphides	27×10^3
Toquepala, Peru	Heap leach	Oxides, sulphides	40×10^3
Morenci, Arizona 2001–	Mine for leach 3450×10^6 0.28% Cu	Chalcocite, pyrite 75×10^3	380×10^3
Equatorial Tonopah, Nevada, 2000–2001	Heap bioleach 0.31% Cu	25×10^3	25×10^3
Gunpowder Mammoth Mine, Australia, 1991–	In situ (bio)leach 1.2×10^6 at ~1.8% Cu	chalcocite and bornite –	33×10^3
Girilambone, Australia 1993–2003	Heap bioleach — at 2.4% Cu	Chalcocite/chalcopyrite 2×10^3	14×10^3
Nifty Copper, Australia, 1998–	Heap bioleach — at 1.2%	Oxides/chalcocite 5×10^3	16×10^3
Whim Creek and Mons Cupri, Australia 2006–	Heap bioleach 900×10^3 at 1.1% Cu Cu 6×10^6 at 0.8% Cu	Oxides/sulphides	17×10^3
Mt Leyshon, Australia 1992–1997	Heap bioleach — 0.15%	Chalcocite 1.3×10^3	750
S&K Copper, Monywa, Myanmar, 1999–	Heap bioleach 126×10^6 at 0.5% Cu	Chalcocite 18×10^3	40×10^3
Phoenix deposit, Cyprus, 1996–	Heap (bio)leach 9.1×10^6 at 0.78% Cu Cu 5.9×10^6 at 0.31% Cu	Oxide/sulphide –	8×10^3
Jinchuan Copper, China 2006–	240×10^6 at 0.63% Cu	Chalcocite, covellite, enargite	10×10^3

1980年,第1个商业化规模的低品位铜矿生物浸出堆浸厂在智利Minera Pudahuel矿山公司建成。该技术的近期应用是使生物堆浸工程化。智利北部的Quebrada Blanca堆浸厂是目前铜生物浸出工业应用的很好的实例。该生物堆浸厂位于海拔4 400 m的Alti Plano地区。该厂的成功运转否定了一些操作者认为细菌浸出在低温和低氧分压的高海拔地区效果不佳的意见。近年来生物浸出已用来处理含铜品位大于1%的次生硫化铜矿,和直接处理高品位的铜精矿^[80]。

最初生物浸出铜主要用于从废石和低品位硫化矿中回收铜,细菌是自然生长的,近年来这种方法已用来处理含铜品位大于1%的次生硫化铜矿,称为生物浸出。现在,美国和智利用SX-EW法生产的铜中约有50%以上是采用生物堆浸技术生产的。如世界上海拔最高4 400 m的湿法炼铜厂位于智利北部的奎布瑞达布兰

卡, 该厂处理的铜矿石含Cu 1.3%, 主要铜矿物为辉铜矿和蓝铜矿, 采用生物堆浸, 铜的浸出率可以达到82%。生产能力为年产7.5万吨阴极铜。

1.1.2.3 微生物冶金技术在铀矿石中的应用

细菌浸铀也已有多年历史^[81~83]。葡萄牙1953年开始试验细菌浸铀, 到1959年时某铀矿用细菌浸铀浸出率达60%-80%。在60年代, 加拿大就开始用细菌浸出ElliotLake铀矿中的铀。在该区的3个铀矿公司都有细菌生产厂。1986年氧化铀年产量达3 600t。1983年成功地以原位浸出的方式从Dension矿中回收了大约250t氧化铀。到目前为止, 美国、前苏联和南非、法国、葡萄牙等国都有工厂在用生物堆浸法回收铀。1966年加拿大研究成功了细菌浸铀的工业应用, 用细菌浸铀生产的铀占加拿大总产量的10%-20%, 而西班牙几乎所有的铀都是通过细菌浸出获得的, 印度、南非、法国、前南斯拉夫、塔吉克斯坦、日本等国也广泛应用细菌法溶浸铀矿。

1.1.2.4 微生物冶金技术在其它金属矿中的应用

据报道, 铋、镉、钴、钼、镍和锌等硫化物的生物浸出试验比较成功^[84~86]。由此可知, 氧化铁硫杆菌和喜温性微生物可从纯硫化物或复杂的多金属硫化物中将上述重金属有效地溶解出来。金属提取速度取决于其溶度积, 因而溶度积最高的金属硫化物具有最高的浸出速度。这些金属硫化物可用细菌直接或间接浸出。除上述金属硫化物外, 铅和锰的硫化物、二价铜的硒化物、稀土元素以及镓和锗也可以用微生物浸出。硅酸铝的生物降解曾被广泛研究, 特别是采用在生长过程中能释放出有机酸的异养微生物的生物降解, 这些酸对岩石和矿物有侵蚀作用。另外, 它还应用在贵金属和稀有金属的生物吸附锰、大洋多金属结核、难选铜-锌混合矿、大型铜-镍硫化矿、含金硫化矿石、稀有金属钼和钽的细菌浸取等众多方面。

1.2 微生物冶金的特点

现有的常规物理、化学选冶方法由于回收率低、资源损耗大、生产成本低和对环境污染严重等问题已不适应社会经济可持续发展要求。在此情况下, 微生物在矿物分离方面的作用逐渐引起人们的重视。

微生物冶金的特点是: ^[87~89]

- ①微生物冶金既可用于矿物的就地浸出, 也可用于工厂矿物、废水废渣处理。
- ②微生物冶金具有生产成本低、投资少、工艺流程短、设备简单、环境友好、

能处理复杂多金属矿物等优点,因此细菌浸矿的广泛应用,将引起传统矿物加工产业的重大变革,为人类、资源与环境的可持续发展开辟广阔的前景。

细菌氧化处理难选冶硫化物金精矿的工艺与另两种氧化(焙烧、加压)法相比,基建投资省(设焙烧法的投资是1.0,则加压法要0.66,而细菌法只需0.35),生产成本低(设焙烧法的生产成本为1.0,则加压法为1.11,细菌法只需0.95),而金的回收率与焙烧法相当或还高一点。

③由于微生物冶金适合储量小、低品位、成分复杂的硫化矿的冶金,而我国的矿大多符合这个条件。所以,微生物冶金在我国有很大的发展前景。

④微生物冶金的主要缺点是过程的反应速度慢。在生物湿法冶金方面的主要任务,是研究开发能提高反应速度的菌种。工程的挑战在于如何用最短的时间,对大量的矿石同时进行固相、液相、气相反应,而且能控制其它的可变因素,特别是把温度控制在最佳水平上加速细菌的作用。即一个非常重要的任务就是通过遗传工程的技术,培育出对高含量的重金属更有耐力,用于提取特定金属的浸出生物。这些生物还应有强大的新陈代谢(提取金属)能力。同时,多学科联合以及矿物工业对生物工艺学的长期经济支持也是至关重要的。也许生物工艺学用于采矿和金属工业所面临的最大挑战是工业本身并不熟悉生物工艺学。冶金学和生物工艺学所使用的技术和语言有很大的区别,为填补这项空白将需要多学科联合。另外,矿物工业必须从经济上长期支持生物工艺学,如同其它科学研究一样,生物工艺学的成功将不会是经济而又迅速的。只有给予这样的保障,生物工艺的潜力才会充分开发出来。

1.3 微生物冶金的具体研究方法

随着埋藏浅、易开采的矿物资源的日趋减少,品位低、成分复杂、难处理硫化矿资源的合理、高效、环保地开发利用已成为全球面临的重大课题。难处理矿石的生物湿法冶金技术(Biohydrometallurgy)研究以南非、加拿大、美国、澳大利亚等最为卓著,且其商业开发利用已占有相当大的份额。近十年来,国内外针对低品位、难处理矿物的生物湿法冶金技术研究十分活跃,尤其是针对难处理含砷、锑、碲等的硫化矿一直是全球研究的热点。归纳起来,微生物冶金的研究主要集中于^[90]以下几个方面:

1.3.1 浸矿微生物研究

1.3.1.1 主要浸矿微生物

在微生物冶金中研究的微生物主要是细菌、古细菌、真菌、霉菌、藻类等，最早分离、研究的细菌是嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*, A.f)，以前命名为氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*, T.f)^[91]。随着分子生物学技术应用到浸矿微生物研究中^[92~97]，浸矿微生物研究得到迅速发展^[98~102]，许多嗜酸微生物及它们的氧化作用被发现^[103~105]。其中能够氧化铁和硫的微生物见（表1-5）。它们的作用机理是：代谢产物通过溶解作用、间接作用，常见的代谢产物包括有机酸、络合物等。应用领域：从硅酸盐、碳酸盐矿物提取金属、浸出金，作矿物浮选剂、絮凝剂、离子交换吸附剂用于净化等。

表1-5 氧化铁和硫的微生物

Organism	Reported growth substrates	Characteristics
<i>Acidianusambivalens</i>	S oxidation and reduction	Hyperthermophiles
<i>Acidianusbrierleyi</i>	Sulphides	pH opt 1.5-2.5
<i>Acidianus infernus</i>	Poor, if any, Fe oxidation	
<i>Acidianustengchongensis</i>		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mixotroph Fe oxidation and reduction Sulphides (poor)	Moderate thermophile pH opt 2
<i>Acidiphilum spp</i>	Obligate heterotrophs	Mesophiles
<i>Acidiphilium SJH</i>	S oxidation Fe(III) reduction	pH opt 2-3
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	Facultative autotroph S oxidation Fe(III) reduction	Mesophile pH opt 2-3
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Autotrophs	Mesophiles
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	S oxidation, sulphides	pH range 2-4
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	(A.f, Fe(II) oxidation; Fe(III) reduction as A facultative anaerobe)	
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Mixotroph 3S oxidation, sulphides	Moderate thermophile pH opt 2-2.5
<i>Acidolobus aceticus</i>	Heterotroph S reduction to H ₂ S	Hyperthermophile pH opt 3.8
<i>Alicyclobacillus spp</i>	S oxidation, sulphides	Mesophiles-moderate thermophiles
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	A.d, facultative autotroph,;	pH 1.5-2.5
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	A.t, mixotroph, Fe(III) reduction)	
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Heterotroph Fe(II) oxidation, sulphides Fe(III) reduction	Mesophile pH opt 1.7-1.8
<i>Ferroglobus placidus</i>	Fe oxidation	Thermophile pH neutral
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Possibly autotroph	Moderate thermophiles
<i>Ferroplasma cypreacervatum</i>	Iron oxidation	pH range < 1-2
<i>Ferroplasma acidophilum</i>	Pyrite oxidation poor	
<i>Ferroplasma MT17</i>		

续上表

<i>Hydrogenobaculum acidophilus</i>	S,H oxidation to produce sulphuric acid	Thermophile
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Fe oxidation	pH opt 3-4 Mesophiles,some thermotolerant strains
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Pyrite	pH range 1.6-1.9
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe oxidation, pyrite	Mesophile pH opt 1.5-1.7
<i>Metallosphaera sedula</i>	S oxidation	Thermophiles
<i>Metallosphaera prunae</i>	Sulphides	pH 1-4
<i>Metallosphaera hakonensis</i>		
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Fe(II)oxidation;Fe(III)reduction,Sulphides	Moderate thermophiles
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Soxidation	pH 1-2.5
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Strict chemolithoautotroph	Hyperthermophiles
<i>Sulfolobus rivotincti</i>	S oxidation, sulphides	Various pH in range 1-4.5
<i>Sulfolobus shibatae</i>		
<i>Sulfolobus tokodaii</i>		
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>		
<i>Sulfolobus JP2andJP3</i>		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Heterotrophs	Hyperthermophiles
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Not S oxidation	pH 2-4.5
<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i>	S and Fe oxidation	Hyperthermophile
<i>Thiobacillus prosperus</i>	S and Fe oxidation sulphides	Mesophile, halophile pH opt 2
<i>Thiomonas cuprina</i>	S oxidation, sulphides	Mesophile pH opt 3-4

硫化矿氧化过程中会产生亚铁离子和元素硫及其相关化合物,浸矿微生物一般为化能自氧菌,它们以氧化亚铁或元素硫及其相关化合物获得能量,吸收空气中的氧及二氧化碳,并吸收溶液中的金属离子及其它所需物质,完成开尔文循环生长^[106,107]。

生物浸出是利用特定微生物细菌对某些金属硫化物的氧化作用,使矿石中的金属离子溶解、富集的湿法冶金过程。目前已被报告可用于浸矿的微生物有20多种,分属自养菌、异养菌和兼性菌。目前常用的主要有嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、嗜酸氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)、氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)。

*Leptospirillum*属类群I的代表菌株是氧化亚铁钩端螺旋菌(*L. ferrooxidans*),该菌在1972年由Markosyan^[108]首次报道;类群II的代表菌株是嗜铁钩端螺旋菌(*L. ferriphilum*),这是2002年Coram和Rawlings^[109]根据16株*L. ferrooxidans*的16S rDNA序列分析、DNA-DNA杂交及16S-23S区间分析结果,从*L. ferrooxidans*中划分出的一个新类群;类群III主要存在于自然界矿山酸性废水中,但在实验室条件下,一直没有分离和培养成功。2005年,Tyson^[110]等通过连续稀释法,用不

加氮源的9K培养液作为液体培养基,从矿山酸性废水中获得属于类群III的纯菌,并定名为固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferro Diazotrophum*)^[3]。

生物浸出细菌生长在普通微生物所不能生存的酸性水体中,摄取空气中的二氧化碳、氧和水中的其它微量元素,用以合成细胞组织。并在促进矿石中硫、铁等成分的氧化作用的同时,获得新陈代谢的能量,自养自生。有嗜酸性且都是 Fe^{2+} 氧化剂。在有电子受体 O_2 和 CO_2 及一定氮源、碳源的情况下,上述细菌就能生长繁殖,将元素S氧化成 SO_4^{2-} ,从中获得能量,并将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 。这些微生物能使氧化反应速度比在无菌条件下的速度加快上千倍。在细菌浸出中,温度与细菌的生长和浸出反应有重要的关系。当细菌在最适宜温度中生长时,矿的浸出量也多。

1.3.1.2 基因工程改造浸矿微生物

遗传工程为开发专门用于采矿和金属工业的微生物提供了广阔的前景。的确,将遗传信息从一种微生物传给另一种微生物基因连接技术已很成熟,但是,目前有研究人员尚不能利用遗传控制方法生产出具有特殊使命的微生物(具有很强的吸附某种金属的能力)。在不远的将来,通过自然适应与微生物的选择很有可能得到具有很强浸出力的微生物,该微生物对恶劣的环境有较强的适应性,同时需要的营养也较低。自然选择的目的也就是经过逐渐的驯化作用使天然有机物具有特定的能力。还需要进一步研究的主要领域是生物浸取和生物吸附的机理。虽然这些工艺的应用过程简单,但其内在的机理却很复杂。弄清这些机理将会使研究人员集中于特殊的领域,这些研究很有可能使生物工艺学成功地用于采矿工业。特别值得指出的领域是确定生物浸取过程中速度限制的步骤,这些步骤的确定会使工艺反应速度加快。

至今,真正用于生产的微生物主要是嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、氧化铁硫杆菌及嗜热嗜酸的硫化裂片菌。尤其是前者,几乎对所有硫化矿物均有氧化分解作用,但分解的程度和速度还有待提高。所以,人们研究嗜酸氧化亚铁硫杆菌的基因最多^[111~118]。

为此,不少学者开展了强化浸出方面的研究:如以硝酸盐形式添加0.5%的银离子,铜浸出率可由16%-61%提高到57%-100%;向溶液中添加少量磷酸盐和抑制铁溶解的药剂,加速尾矿中铜的浸出;电场和磁场可以强化细菌浸矿过程;开展了通过基因工程培育性能优越菌种的研究工作^[119]。

我国微生物浸出的研究和工业化应用有了相当的发展^[120]。在浸矿微生物研究方面,张东晨、张明旭等对质粒在硫杆菌中普遍存在的观点提出了质疑^[121],其研究结果表明,氧化亚铁硫杆菌对 Fe^{2+} 、S等的氧化能力可能只是与拟核染色

体DNA有关,而氧化亚铁硫杆菌的遗传物质就是拟核染色体DNA。徐晓军等报道了经紫外线诱变的浸矿细菌,对黄铜矿的浸出率比原始菌提高了46%以上^[122],到达浸出终点的时间比原始菌缩短了5-10d,浸矿细菌能更好地氧化浸出黄铜矿。赵清等利用DNA体外重组技术^[123],构建了含有强启动子、可在tra基因诱导下转移的组成型表达的抗砷质粒pSDRA4。通过接合转移的方式将其导入专性自养极端嗜酸性喜温硫杆菌*Acidithiobacillus caldus*中,构建了冶金工程菌*Acidithiobacillus caldus*(pSDRA4)。经检测,重组质粒在喜温硫杆菌中具有较好的稳定性,在无选择压力条件下传代50次基本保持稳定(重组质粒保留76%以上),经抗砷性能检测,与野生菌相比,构建的喜温硫杆菌工程菌抗砷能力明显提高,从0 mmol/L 提高到45 mmol/L。

浸矿细菌生长速度慢,只有大肠杆菌(*E. Coli*)的 10^{-4} 倍,且在实际浸矿体系中,表面活性剂、重金属离子、卤素离子等含量超过一定浓度时,将抑制细菌生长,甚至造成菌体死亡。因此,人们希望通过传统的驯化、诱变育种或遗传工程来改良菌种以获得能适用多种矿石、适应能力强、氧化活性高并能大规模应用的高效工程菌。已有文献报道用紫外线、He-Ne 激光、微波等诱变剂对氧化亚铁硫杆菌进行诱变,提高了其对重金属离子的耐受能力。

我国浸矿细菌的遗传学研究起步较晚,迄今,大部分育种工作仍处于实验室阶段,但生物湿法冶金工作者已充分认识到细菌活动在浸矿过程中的重要作用及育种工作的重大意义。1990年,刘振盈、颜望明从氧化亚铁硫杆菌中分离到pTf-52质粒,对此质粒进行了限制性酶切图谱的分析,并进一步与大肠杆菌的质粒pBR325重组,转化到*E. Coli* HB101,构建了一个能够在*E. Coli*中进行复制的嵌合质粒pSDF-1。1993年,他们完成了氧化亚铁硫杆菌Tf-55基因文库的构建。

文库的建立必将促进遗传学的研究,从文库中可分离出特定的基因片段,如CO₂的固定基因1,5-二磷酸核酮糖羧化酶P氧化酶基因、铁氧化酶基因、Fe-氧化蛋白基因等,在体外进行精细的研究。在1997年,他们完成了氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌及多能硫杆菌1,5-二磷酸核酮糖羧化酶P氧化酶(简称Rubis CO)基因的同源性分析,1994年,彭基斌等用pJRD215作为抗砷基因载体,构建了两个抗砷质粒pSDRA1和pS2DRA21,两个质粒都具有来源于RSF 1010复制区(ori)和带动转移功能区(mob),两个抗性标记(Kmr, Smr)和来源于大肠杆菌R19773的抗砷基因(Asr)。1995年,徐海岩利用pUM3和pJRD215构建了抗砷载体pSDX3,并应用于含砷金精矿的脱砷研究。结果表明,含抗砷载体的氧化亚铁硫杆菌的抗砷能力明显提高,在40mmol/L 亚砷酸钠浓度下仍能维持一般生长,而对照菌在15 mmol/L 亚砷酸钠浓度下的生长就很微弱。经过多年的探索,彭基斌等研究设计出了一种新的适用于氧化亚铁硫杆菌遗传操作的固体培养基—2:2培养基,

在该种培养基上卡那霉素(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和链霉素(200-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)可以使用,这就为利用这两种抗生素抗性为遗传标记,选择转移接合子奠定了基础^[124~130]。

1.3.2 浸矿环境研究

①温度:环境因素对微生物浸矿活性的影响很大,特别是温度。微生物对环境温度很敏感,它们只在一定的温度范围内生长良好。中温微生物在30℃左右能够有效浸出金属;高温微生物能够在自己最适温度范围(10℃左右)有效的浸出金属。

野外环境有时候温度很低,需要研究低温微生物;但是矿堆中央由于微生物的生长,释放大量的热量,所以温度很高,需要研究高温微生物。对于利用槽浸和生物反应器的工艺来说,主要是选育高温微生物和筛选合适的培养条件。

②pH值:不同微生物生长时最适pH有所不同,所以工艺上要求使用不同pH的培养基。但是同一个浸矿过程要求同一种pH,这样可以减少工艺环节,节约成本。所以研究最适pH相同的微生物有利于实际浸矿。

一般微生物浸矿时要求的酸度很低,大约pH1-2,不利于环保,所以筛选适应偏中性环境的微生物应用于微生物浸矿有很大的发展前途。

1.3.3 微生物和环境共同作用机制研究

目前微生物冶金技术还存在一系列的问题,其工业推广的瓶颈在于其反应周期长,浸出率低,究其原因主要是研究者还未完全掌握细菌氧化规律,因此不能针对反应控制步骤及时做出有效的强化措施。事实上微生物浸出体系涉及微生物-矿物、矿物-矿物、微生物-溶液-矿物-气相等多相界面,因此找到它们复杂界面作用和电子传递规律,将有助于我们彻底揭示微生物冶金的氧化机理^[131~133]。

① 生物与矿物相互作用

在研究*Leptospirillum*属菌株和矿物相互作用机理的过程中,人们研究较多的是*L. ferrooxidans*,并建立了一些矿物浸出模型,利用它们来分析*L. ferrooxidans*和*A. ferrooxidans*参与浸矿作用的异同点^[134],其中最主要的是直接浸出模型,又称接触浸出模型。该模型认为,在*L. ferrooxidans*和*A. ferrooxidans*的细胞膜与矿物之间存在着胞外多聚物EPS(Extracellular Polymeric Substances),通过EPS的介导,在细胞膜和矿物之间相互作用,造成黄铁矿的溶蚀。透射电镜照片显示出,*L. ferrooxidans*的EPS中包含黄铁矿颗粒,而*A. ferrooxidans*的EPS中包含胶体硫。人们推测,*L. ferrooxidans*通过EPS的作用吸收电子,堆积 Fe^{3+} ,使黄铁矿表面发生电化学氧化;而*A. ferrooxidans*通过硫作为能量中间体,在EPS中形成

胶体硫作为能量传递者。人们推测,通过EPS的介导,细胞外形成了一个独特的囊膜,细胞吸收并利用囊膜中的黄铁矿颗粒,将其氧化成 Fe^{3+} , Fe^{3+} 是一种强氧化剂,具有氧化硫化矿物的能力,可以介导EPS与矿物表面发生电化学相互作用,在细菌与硫化矿物的吸附位点形成蚀刻坑,细菌再生三价铁离子并利用此过程产生的能量生长^[135]。

②培养环境和矿物的相互作用

一般在浸出体系中含有多种硫化矿,矿物与矿物之间的界面作用在浸出中往往起到加速某一硫化矿氧化速度的效果。这是因为多数硫化矿为半导体或导体,而且各种矿物的静电位又不相同,当两种不同硫化矿接触时,就会产生原电池效应,即静电位高的充当阴极,而静电位相对较低的充当阳极。

在微生物冶金过程中,细菌的存在会强化这种原电池效应:第一,细菌氧化使矿物静电位升高,矿物间静电位差加大;第二,细菌的存在加强了阴极氧得电子的能力,另外细菌使得二价铁氧化成三价铁,后者吸附于阴极区,也增强了得电子的能力,强化了原电池作用。

1.4 微生物冶金的前景

生物冶金是近代学科交叉发展生物工程技术 and 传统矿物加工技术相结合的一种新工艺。生物工程应用于矿物加工无疑具有重要意义^[136],目前发展趋势、研究方向和需要解决的问题主要有:

1.4.1 极端条件的微生物选育

高温菌是一类能在45℃以上生长和繁殖的极端环境微生物,包括部分细菌、古生菌和真菌。其中,最适生长温度在45℃-80℃之间的高温菌为中度嗜热菌,最适生长温度大于80℃的微生物为超温菌(hyperthermophiles),包括处于系统进化树底部的部分细菌和古生菌^[137]。

未来的工艺发展必须要有嗜热微生物,它们在矿物生物氧化中将发挥越来越重要的作用。在生物浸出和生物氧化堆浸中,黄铁矿放热氧化使矿堆内部的温度升高到60℃-80℃,因此采用嗜热微生物是必要的。能在60-85℃下生长的嗜热微生物中,*Archaea*、*Sulfolobus*、*Acidianus brierleyi*和*Metallosphaera sedula*等菌种特别适用于生物浸出中难选黄铜矿中的铜^[17]。

1.4.2 基因工程菌的构建

生物技术在湿法冶金领域应用的研究趋势主要表现在 2 个方面:

一方面是新的诱变育种技术。1987 年,中科院开创了航天育种先例,主要是利用气球和卫星搭载手段。截止到目前,我国至少进行了 4 次航天育种。这种方法主要是利用大剂量、高强度的宇宙射线辐射和微重力场的作用使微生物细胞发生变异。

另一种是离子注入微生物诱变育种法,它是通过离子束发生装置,将 H^+ , N^+ , Ar^+ 等离子注入到微生物体内使其发生变异。这方面的研究已取得了相当大的进展。另一方面是基因工程技术。上面谈到的诱变育种方法工作量很大,且得到的新菌种未必是所需的。目前对浸矿细菌的研究已深入到了基因水平^[138],测定主要浸矿细菌的 DNA 序列;利用不同生长温度细菌的 DNA 片段培养基因工程菌;初步揭示浸矿细菌对阴阳抗性的质粒编码机理,并通过对质粒基因重组的尝试,培养一些抗砷工程菌。但这些研究与尝试需要进一步深入与加强。基因工程技术应用到微生物冶金领域后,可揭示浸矿细菌的特性及与基因表达的内在联系,可指导菌种基因改良工作,得到更适合浸矿的综合性能优良的细菌;另外,新的诱变育种技术和基因工程技术将推动在极端环境中能够生存的“极端微生物”的发掘与应用,也就是说,生物技术的进步将会给微生物冶金领域提供更为优良的菌种,进而推动微生物湿法冶金技术的进一步发展。

1.4.3 生产工艺研究

①原位浸矿:此法还可称为原位置浸出或矿床内浸出法,是从低品位残留矿床或未开采的矿床中不用采矿作业回收金属的一种方法。为了提高浸出液的流动性和浸液与矿石的接触面积,根据需要有时把矿体进行破碎。当浸出有危险性存在时,采取设置遮断壁等措施来防止浸出液向浸出对象区域外逸出。多数矿堆是利用地面的自然形状在矿场附近就地堆成的。通常废矿石堆积在陡峭的山坡之间,采矿的废石堆存在山坡上,或者用皮带运输机将废石运至铺有不透水塑料的场地上堆存。堆场应当选择在地面不透水的地方。浸出矿堆的结构通常应使浸出液、细菌培养基和氧气易于达到矿物表面。某些情况下,可在矿堆内铺设管网以保证矿堆的通气。然而,如果矿堆的透气性可满足要求,加上金属硫化物经细菌氧化产生的热,穿过矿堆的自然向上气流一般能保证较好的供养状况。矿堆的尺寸结构的重要特性是控制其表面积与体积之比,以便能够保存细菌氧化硫化物所产生的热量,并使矿堆的作业不因外界温度低而受到显著的影响。应通过适当的试验和半工业试验,取得改进矿堆结构的数据。可用喷淋、浸渍或竖管将浸液引入矿堆,方式的选择取决于气候条件、矿物组成、矿堆高度和表面积以及生产规

模。喷淋法可使浸液在矿堆表面均匀分布,然而却造成很大的蒸发损失,特别是在干燥的地区^[139]。

②堆浸:此法是指把矿石堆积在矿坑外浸出的一种方法。为提高浸出后的浸出液的集水率,堆积场的地表要具有不透水性。把低品位块矿从底部开始以阶梯形式堆积起来,并弄平其上部。从上部喷射浸出液,随着浸出的进行,浸出液的品位逐渐下降,此时在上部重新设置堆积层继续进行浸出。美国等国家实施大规模浸出的矿山中,有的堆积阶梯总高度可达300 m^[140]。

③反应器:设计新型反应器以减轻矿浆剪切力对微生物的抑制作用,优化反应器的各参数以利于生物浸出。由于高温菌的细胞壁薄,部分甚至无典型细胞壁,因此无法耐受高的矿浆浓度和强搅拌剪切力。文献指出:良好的氧传质系数和柔和的搅拌条件是生物氧化浸矿反应器的2个最重要的性能要求^[141]。应主要围绕“传质”和“剪切”2个方面对搅拌式反应器、气升式反应器等做出改进,或者研制出新型的生物反应器,以适应高温菌浸出工艺的要求。

④添加物质:添加各种金属阳离子催化剂、添加表面活性剂、添加复杂矿等手段都被证明可以用来提高微生物浸出硫化矿的效率^[142]。表面活性剂能改变矿物表面性质,使矿物的亲水性增加,对细菌和矿物接触有利,因而对细菌浸出有促进作用。添加适量的表面活性剂可以大大缩短浸出时间,但较高浓度的活性剂反而不利于浸出^[143]。根据浸出矿物的特性,选择适当的催化离子,有助于加速微生物浸矿速度,能提高浸出率^[144]。

⑤建模:为了更好的研究各种条件对微生物浸矿的影响,建立一个数学模型可以指导生物学的研究。现有菌种在浸出硫化矿方面具有一定优势,但时间耗费较长,此外对矿浆浓度也有一定的要求。温度较高时,金属浸出的动力学性能提高,研究开发嗜酸耐高温菌种有利于提高浸出效率。在生物浸出和生物氧化堆浸中,黄铁矿放热氧化使堆内部的温度升高到60-80℃,因此采用嗜热微生物是必要的。能在60-85℃下生长的嗜热菌种特别适用于生物浸出难选黄铜矿中的铜。也适用于难选硫化金矿石和硫化金精矿的处理^[145~147]。细菌生长动力学的理论模型还没有对所有的关键因素进行综合考虑,如元素硫的代谢及其作用,还需不断的发展和完善^[148]。

1.5 选题目的

目前,由于人类社会的快速发展,消耗了大量的矿物资源,而这些有限的资源是不可再生的,致使传统冶金工艺能够利用的高品位矿物越来越少。然而,大量低品位的成分复杂矿、废石和表外矿等又不能够有效的加以利用。生物冶金有

投资少、成本低，能够处理低品位的硫化矿的特点；特别是它能够处理大量的矿物和废渣，所以，它能够有效的利用以前废弃的资源，扩大人类能够利用的资源量，在一定程度上缓解资源危机。

尽管生物冶金的优点很多，但是制约生物冶金在工业上发展的因素很多，最主要的原因是微生物生长速度较慢，导致它在冶金速度上难以和传统的火法冶炼竞争。

1.5.1 选题目的

希望通过该研究，得到一种提高微生物浸矿性能的新方法；同时筛选出高效浸矿菌群。

混合微生物驯化—混合微生物诱变—高效率浸矿混合微生物选育—微生物群落研究—群落中起到重要作用的微生物菌株分离。

1.5.2 创新之处

1. 利用紫外线（UV）、亚硝酸钠（ NaNO_2 ）、硫酸二乙酯（DES）及其不同组合方式进行混合微生物的复合诱变；诱变后在选育浸矿混合微生物过程中用黄铜矿和黄铁矿作为选择压力，得到了浸出黄铜矿精矿能力提高183%和浸出闪锌矿精矿能力提高117%的混合微生物E。

2. 进行混合微生物的群落分析。初步了解在不同环境中，诱变前后各类微生物生态分布的变化；同时分离出了5类不同的微生物菌株 *Leptospirillum ferriphilum*、*Acidithiobacillus caldus*、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*、*Acidithiobacillus thiooxidans* 和 *Acidithiobacillus ferrooxidans*。

第二章 混合微生物收集与富集培养

2.1 材料与方法

2.1.1 样品

第一批浸矿微生物：2004 年 8 月，从江西德兴铜矿采集一批矿坑水样品，用温度计和便携式 Shenci PHB-5[®] pH 计现场测定采样点的温度和 pH 值，带回中南大学资源加工和生物工程学院实验室培养，具体采集地点如表 2-1。

表 2-1 江西德兴细菌来源

序 号	pH	颜色	地点
j1	3.5	淡黄绿色 (++)	1 号堆，萃取液回流口
j2	2.5	淡黄绿色 (+)	1 号堆，萃取液中间
j3	3.0	淡黄绿色 (+)	1 号堆，萃取液回流口 10M 远
j4	2.5	浅绿色	自然堆，左边浸出液
j5	2.5	浅绿色	自然堆，右边浸出液，温度高
j6	4.0	浅绿色	自然堆，池，右边角落
j7	2.5	浅褐色	自然堆，对面，楼梯口
j8	2.5	浅褐色	自然堆，偏右
j9	2.5	浅褐色	萃余液
j10	2.5	浅绿色	工艺流程原液
j11	4.5	深褐色	萃余液上层
j12	2.5	深褐色	北山，小堆浸厂，原液
j13	3.5	深褐色	地表水
j14	2.8	淡黄	杨桃坞
j15	2.8	淡黄	杨桃坞
j16	1.8	黄	大坞头，酸性废水（唐代开始采矿）
j17	1.5	黄	大坞头，酸性废水（唐代开始采矿）
j18	1.5	淡绿	银山矿，左致右 1 号样
j19	1.5	淡绿	银山矿，左致右 2 号样
j20	1.5	淡绿	银山矿，左致右 3 号样
j21	1.5	淡绿	银山矿，左致右 4 号样
j22	1.5	淡绿	银山矿，左致右 5 号样
j23	1.5	淡绿	银山矿，左致右 6 号样

第二批浸矿微生物：2005 年 1-5 月，从云南腾冲温泉取样，记录采样点的温

度和水样 pH 值, 在腾冲县进出口检验检疫局微生物实验室用不同培养基, 在不同温度条件下进行富集培养, 在中南大学资源加工和生物工程学院实验室保存, 样品具体地点见表 2-2。

表 2-2 云南腾冲细菌来源

序 号	温度℃	pH	颜色	地点
t1	93	4.5	无色透明	珍珠泉
t2	96	8.3	无色透明	怀胎井
t3	50	6.2	无色透明	九龙温泉
t4	87	7.5	无色透明	老滚锅 (不同时间 pH 变化大)
t5	80	3.0	无色透明	黄瓜菁 (较远的点)
t6	87	5.0	无色透明	黄瓜菁 (中间的点)
t7	98	5.5	无色透明	黄瓜菁 (较近的点)

第三批浸矿微生物: 2005 年 6 月, 从云南的腾冲、瑞甸、安宁和台湾的阳明山酸性热泉或温泉等地收集, 共 9 份; 从江西的德兴铜矿和广东的大宝山铜矿收集酸性矿山废水水样 5 份。测定采样点的温度和 pH 值, 水样带回实验室后, 各分成两份, 其中一份保存在 45℃, 用于菌种富集, 另一份保存在 4℃, 用于元素分析。样品从收集到使用, 保存时间不超过 4 d。采用原子吸收分光光度法 (atomic absorption spectrometry, AAS) 分析水样化学元素 (表 2-3)。

表 2-3 14 种样品的主要化学元素成分

元素 (mg. L ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hg	0	0	0	0	0	0	0.04	0	0.32	1.4	1.07	0.89	2.51	1.49
As	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.02	0.21	0.08	0.65	2.49	1.95	2.48	5.6	5.3
P	0.01	0.04	0.02	0.02	0.03	0.04	0.13	0.10	2.65	7.19	6.52	4.22	13.28	7.71
Au	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.20	4.09	1.33	0	0
Cr	0	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0.33	0.35	0.47	0.66	0.49
Al	1.57	0.03	0.05	0.02	0.08	0.89	0	0.05	261.59	1588	9.44	1506	429.12	391.4
Ti	0	0	0	0	0	0	0	0	1.41	0.09	0.04	0.15	0.22	0.15
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0.47	2.9	1.81	3.15	8.78	9.71
Zn	0.02	0	0.01	0	0.05	0.11	0	0.03	0.16	7.67	3.18	79.96	119.01	268.99
Pb	0	0	0	0	0	0.06	0.14	0.20	1.38	2.48	1.89	5.19	7.39	4.19

续上表

Co	0	0	0	0	0.01	0.04	0	0	0.09	7.15	4.09	1.3	1.43	2.66
Mg	0.48	2.48	2.65	3.1	2.66	3.02	28.21	17.00	16.27	3085	1102	2974	733	643.98
Ca	12.44	24.8	25.03	25.66	24.31	19.11	19.22	23.12	27.39	317	336.35	284.99	467	511
K	18.54	7.47	6.89	7.25	5.44	8.15	1.95	1.03	4.3	0	0	4.04	3.08	6.08
S	46.72	23.11	25.55	56.32	16.22	22.01	6.11	10.24	1545	4147	4401	3881	9760	10266
Mo	0	0	0	0	0.02	0.01	0	0	0.18	0.85	0.59	0.84	1.26	0.51
Cd	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.05	0.14	0.15	0.58	3.35	0.5
Mn	0.24	0	0	0	0.32	0.21	0	0	0.26	156.66	64.38	129.99	149.99	151
Si	61.83	33.98	30.25	35.44	36.21	29.62	21.66	32.41	170.83	70.5	56.26	41.44	63.79	59.34
Cu	0	0	0	0	0.02	0.03	0	0	0.79	113.2	100.19	69.47	2762	1120
Sn	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0.41	1.41	1.1	1.53	2.6	0.92
Sb	0	0	0	0	0.01	0.01	0	0	0.94	4.65	3.14	4.33	6.03	2.61
Ni	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0.05	6.91	4.02	1.39	2.8	2.78
Fe	0.01	0.07	0.05	0.03	0.08	0.06	0	0	217.33	198.61	981.83	257.12	6338	1325
Na	49.32	10.58	9.66	10.15	41.2	38.28	15.23	12.04	8.9		1.07			
Ag	0	0	0	0	0	0				0.02	1.95	0.31	0.39	0.37

2.1.2 矿石来源

黄铜矿精矿来自云南某铜矿，矿石粉碎至 0.74 mm（占 85%），进行微生物浸矿实验。闪锌矿精矿来自贵州某锌矿。因为微生物浸矿的环境在 pH2.0 左右，而通过浮选的闪锌矿精矿 pH 较高，所以闪锌矿精矿通过两次 pH 2 的硫酸溶液浸泡处理，每次浸泡 1 d。闪锌矿精矿清洗干燥后测量其矿物成分。

用于柱浸的黄铜矿矿石和闪锌矿矿石破碎至粒度约 30 mm。对黄铜矿精矿和闪锌矿精矿试样进行成分分析，结果表明：黄铜矿精矿中铜含量 32.96%；闪锌矿精矿中锌含量 52.27%，

2.1.3 仪器设备

奥林巴斯显微镜（CX31RTSF 型）、电热恒温水浴锅（DK-98-1 型）、新型恒温震荡器（ZHWT-1102C 型）、立式压力蒸汽灭菌器筒（04J2063-6 型）、水银玻璃温度计和便携式 Shenci PHB-5[®] pH 计。

2.1.4 微生物培养

2.1.4.1 液体培养^[150]

① 9K 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g; KCl 0.1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; K_2HPO_4 0.5g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g; pH 2.0; 定容 1000 mL; 121.3 °C, 20 min 灭菌。

② Leathen 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15 g; KCl 0.05g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; K_2HPO_4 0.05g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01g; pH 2.0。定容至 1000 ml; 121.3°C, 20 min 灭菌。

9K 和 Leathen 培养基灭菌后, 视培养条件, 加入过滤除菌的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 g/L), 或间歇灭菌的 S^0 (10 g/L) 或 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 S^0 或高温灭菌的矿石后接种培养。

③ 高温菌培养基:

F 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; K_2HPO_4 0.25 g; KCl 0.1 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g; YE 0.2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2-8 g; 或 S^0 10 g; pH 1.8; 定容至 1000 mL。

ATCC 培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g; K_2HPO_4 0.2 g; KCl 0.1g; yeast extract 0.25 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; pH 2.0; 定容至 1000 mL。

培养基灭菌后, 视培养条件, 加入过滤除菌的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 或间歇灭菌的 S^0 后接种培养。

微生物培养条件: 30°C、120-240 rpm。

高温菌采用液体培养, 培养温度为 45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C、85 °C 和 90 °C, 培养时间 15-45 d。

2.1.4.2 固体培养

9K 培养基或 Leathen 培养基灭菌后, 冷却到 60°C 时加入灭菌的琼脂 (2%) 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 g/L) 或 S^0 (10 g/L) 或 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 g/L) 和 S^0 (10 g/L), 倒平皿, 冷却后备用。

双层培养基: 底层培养基加 S^0 , 上层培养基加 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。接种后, 在 30°C 恒温培养 2-15 d。

2.1.4.3 柱浸驯化培养

层析柱中分别装铜矿石和锌矿石。配制 Leathen 培养基, 采用上述地点收集的菌种和富集培养后的微生物, 混合接种。在室温条件下用混合微生物进行柱浸实验, 主要目的是获得适应铜矿和锌矿环境的混合微生物。

2.2 结果和分析

2.2.1 德兴菌种常温培养

2.2.1.1 液体培养

德兴收集的混合微生物(编号 j1-j23)接种在 9K 液体培养基中, 常温下经过三次连续培养, 生长速度明显加快。

第一次培养时, 生长到稳定期需要 8 d 的混合微生物有 j15、j16、j17、j22、j23 和 j9, 分属于杨桃坞、大坞头和银山矿点, 而这些点已经停产。

在工业生产的混合微生物中, j10 活性最高, 生长周期最短。特别是, 第二次培养时, 达到生长稳定期只需要 1.5 d; 其次是 j4、j6、j7、j8 混合微生物, 达到生长稳定期需要 2 d; 而其他大部分混合微生物达到生长稳定期一般需要 3-4 d, 说明正在使用的混合微生物的延滞期较短, 因而整个生长周期较短, 与微生物生长理论相符合^[118]。

第三次培养时, 所有混合微生物都能在 2 d 内达到生长稳定期, 其中 j10 混合微生物只需要 30 h 就达到生长稳定期(表 2-4), 这说明, 经过了长时间的驯化和筛选的混合微生物较矿点附近收集到的混合微生物生长要快。

表 2-4 江西德兴样品液体培养至稳定期需要的时间

序 号	第一次培养(d)	第二次培养(d)	第三次培养(d)	备 注
j1	6	3	2	
j2	6	3	2	
j3	4	2	2	
j4	4	2	2	生产用的混合微生物
j5	6	3	2	
j6	4	2	2	生产用的混合微生物
j7	4	2	2	生产用的混合微生物
j8	4	2	2	生产用的混合微生物
j9	8	4	2	
j10	5	1.5	30hr	工艺流程入口
j11	5	3	2	
j12	6	3	2	
j13	6	3	2	
j14	6	3	2	
j15	8	4	2	
j16	8	4	2	
j17	8	4	2	
j18	6	3	2	
j19	6	3	2	
j20	6	3	2	
j21	6	3	2	
j22	8	3	2	
j23	8	4	2	

2.2.1.2 固体培养

取德兴的微生物样品进行固体培养分离实验, 经过 10 d 培养, 培养基已经变褐色。除 j1、j2、j5、j7、j8、j9、j11、j13、j15、j16、j17、j19、j21、j22 样品的培养物中未见菌落外, 其他样品在培养基上生长的菌落较多。其菌落特征见表 2-5。

表 2-5 江西德兴样品固体培养 10 d 菌落特征

序 号	菌落形状	菌落颜色	菌落凸起	菌落边缘	菌落种类、数量	备注
j1	-	-	-	-	-	-
j2	-	-	-	-	-	-
j3	圆	灰白	凸起	整齐	小 20	
j4	圆	灰白	凸起	整齐	小 20	
j5	-	-	-	-	-	-
j6	圆	白			小>200	
j7	-	-	-	-	-	-
j8	-	-	-	-	-	-
j9	-	-	-	-	-	-
j10	圆	黄	凸起	整齐	中	光滑
j11	-	-	-	-	-	-
j12	圆	黄	凸起	整齐	中 1	
j13	-	-	-	-	-	-
j14	圆	灰白	凸起	整齐	大 1、中 2	
j15	-	-	-	-	-	-
j16	-	-	-	-	-	-
j17	-	-	-	-	-	-
j18	圆	黄	凸起	整齐	中 2	
j19	-	-	-	-	-	-
j20	圆	兰色	扁平	整齐	中 2	长满霉菌
j21	-	-	-	-	-	-
j22	-	-	-	-	-	-
j23	圆	黄	扁平	整齐	大 4	若干霉菌

- 表示没有微生物菌落。

经过 20 d 培养, 全部固体培养基上均出现菌落, 菌落特征见表 2-6。其中,

j1、j2、j4、j7、j10、j16、j21、j23 可见培养基内部生长了一些菌落（接种在培养基表面），这些样品中的微生物可能具有鞭毛，生长时穿透力强，同时喜欢厌氧环境，所以在固体培养时可向培养基中氧含量低的环境迁移。另外，在 j6、j20、j22 的培养基中霉菌多，同时生长了其它菌落。

表 2-6 江西德兴样品固体培养 20 d 菌落特征

序 号	形状	颜色	凸起	边缘	种类、数量	备注
j1	圆	褐色、灰色	凸起	整齐	1 大, 12 小	培养基里面有 4 个菌落
j2	圆	褐色、灰色	凸起	整齐	30	培养基里面有 2 个菌落
j3	圆	灰色	凸起	整齐	30	
j4	圆	灰白	凸起	整齐	50	培养基里面有 1 个菌落
j5	圆	灰白、褐色	凸起	整齐	18	-
j6	圆	白、褐色	凸起	整齐	小>200	霉菌多
j7	圆	褐色、灰白	凸起	整齐	35	培养基里面有 2 个菌落
j8	圆	灰白、褐色	凸起	整齐	46	褐色不明显
j9	圆	褐色	凸起	整齐	9	-
j10	圆	白色、黄色	凸起	整齐	中	培养基里面有 2 个菌落
j11	圆	褐色	凸起	整齐	41	-
j12	圆	黄	凸起	整齐	100 多个	
j13	圆	白色、红色	凸起	整齐	32	-
j14	圆	灰白	凸起	整齐	大 1、中 2	
j15	圆	褐色	凸起	整齐	23	-
j16	圆	褐色、白色	凸起	整齐	50 多个	培养基里面有 1 个菌落
j17	圆	灰白	凸起	整齐	24	-
j18	圆	黄色	凸起	整齐	5	
j19	圆	黄色	凸起	整齐	36	-
j20	圆	黑色	扁平	整齐	22	长满霉菌
j21	圆	褐色、白色	凸起	整齐	14	培养基里面有 1 个菌落
j22	圆	黑色-	凸起	-		长满霉菌
j23	圆	黑色、黄色	扁平	整齐	34	培养基里面有 20 个菌落

细菌序号同表 2-1。

2.2.2 云南高温微生物富集培养

经第一次富集培养的云南腾冲菌种，分别接种在液体培养基中培养，温度为

45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、70 °C、75 °C、80 °C、85 °C、90 °C。从表 2-7 可知, t₂、t₄、t₇ 可在 90 °C 时生长; t₁、t₂、t₄、t₅、t₆、t₇ 可在 80 °C 时生长; t₄、t₆ 可在 70 °C 时生长; t₃ 可在 45-55 °C 时生长; 而在 60 °C 时, 所有样品都未见微生物生长, 说明采样环境温度高的样品, 在高温条件下生长较好; 采样环境温度较低的样品, 在相对低温条件下生长较好。

表 2-7 云南腾冲高温微生物富集培养结果

序号	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	90 °C
t ₁	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
t ₂	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
t ₃	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
t ₄	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
t ₅	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
t ₆	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
t ₇	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+表示有生长, 浑浊; -表示没有生长, 清亮。

2.3 本章小结

从江西德兴采集的酸性水样, 经过 9K 培养基富集培养, j10 样品中微生物生长最快, 生长 1.5 d 达到稳定期; 其它样品生长 3-4 d 达到稳定期。

从我国江西、云南、广东和台湾等地区采集到温度 30 °C-90 °C、pH 2.0-5.8 的酸性水样, 对这些水样进行富集后, 分离到在 60 °C-90 °C 温度下生长良好的微生物, 不同温度下各样品生长结果是:

在 90 °C 时生长的样品: t₂、t₄、t₇。

在 80 °C 时生长的样品: t₁、t₂、t₄、t₅、t₆、t₇。

在 70 °C 时生长的样品: t₄、t₆。

在 60 °C 时生长的样品: 无。

在 45-55 °C 时生长的样品: t₃。

(t 代表高温培养微生物, 数字代表样品编号)

第三章 混合微生物的诱变及其在黄铜矿的浸出

微生物冶金具有投入少、污染少、可以利用低品位矿石、废矿和尾矿等优点，但是，微生物冶金有一个最大的弱点——浸矿速度较火法冶金慢。为了尝试解决这个问题，本章通过混合微生物的复合诱变，试图得到能够快速生长、能够耐受高浓度铜离子和高效浸出铜离子的混合微生物。

3.1 材料与方法

3.1.1 矿石来源

黄铜矿精矿来自云南某铜矿，矿石粉碎至 0.074 mm（占 85%），进行微生物浸矿实验；用于柱浸的黄铜矿矿石破碎至粒度约 30 mm。对黄铜矿精矿试样进行成分分析，其结果如下（表 3-1）。

表 3-1 黄铜矿精矿的成分分析

元素	Cu	Pb	Zn	Fe	S
含量 (%)	32.96	7.28	1.16	22.33	29.85

3.1.2 混合微生物的制备

从云南、江西、广东和台湾等地收集的水样，经过富集培养和各种矿物的柱浸驯化后，将其混合在 9K 培养基中进行两次连续培养。用离心方法（8000 rpm，30 min）收集菌体，无菌生理盐水洗涤离心 3 次（8000 rpm，30 min），收集的菌体用无菌生理盐水制成浓度 10^8 的菌悬液，备用。

3.1.3 诱变剂的选择及诱变

选择的诱变剂有紫外线（UV）、亚硝酸钠（ NaNO_2 ）、硫酸二乙酯（DES）及其不同组合。

① UV 诱变：开紫外灯预热 20 min。诱变处理时，培养皿与紫外灯相隔 30 cm 左右，用磁力搅拌器搅拌菌悬液，诱变时间为 1 min-130 min。

② DES 诱变：往 10 ml 菌悬液中加入 50% 的 DES 0.2 ml，使 DES 的终浓度达 0.1%，用 25% 的硫代硫酸钠中止反应，诱变时间为 1 min-130 min。

③ NO_2^- 诱变: 细菌置于 pH 4.6 的乙酸缓冲液中, 加入终浓度 1 g/L 的 NaNO_2 , 控制诱变时间, 用 0.07 mol/L pH 8.6 的 Na_2HPO_4 中止反应, 诱变时间为 1 min-130 min。

④ 混合诱变: 诱变剂两两组合或三种诱变剂组合, 诱变及终止反应方法同上。诱变时间及取样见表 3-2。

诱变处理后进行浸矿实验, 10 d 后测定浸矿液中 Cu^{2+} 的含量, 选出浸矿效果好的诱变混合微生物。

表 3-2 诱变剂量和取样培养*

时间 (min)	1	5	10	30	60	100	130
UV	1	2	3	4	5		
DES			1	2	3	4	5
NO_2^-		1	2	3	4	5	
UV+ DES		1	2	3	4	5	
UV+ NO_2^-		1	2	3	4	5	
DES + NO_2^-			1	2	3	4	5
UV+ DES + NO_2^-			1	2	3	4	5

*: 表中的数字 1、2、3、4、5 是培养时的编号, 例如 UV+ DES 5 表示 UV+ DES 混合诱变 100 min 的样品; 空白处表示该诱变剂量没有取样进行培养。

3.1.4 微生物筛选驯化实验

在 100 ml 三角瓶中, 各加入 50 ml 9K 培养基, 于 0.1 Mpa, 121.3°C 温度下, 高压蒸汽灭菌 20 min。实验分两组。第一组加入矿浆浓度为 1% 的黄铁矿精矿; 第二组加入矿浆浓度为 1% 的黄铜矿精矿。

以 2% (V/V) 的接种量, 分别接种不同的诱变混合培养物, 恒温振荡培养 (160 rpm, 30°C), 以未诱变的混合微生物做对照 (CK)。培养 10 d 后测定培养基中混合微生物的浓度; 观察培养基的颜色、浑浊度, 选出生长好的诱变后的混合培养物。

3.1.5 1%矿浆浓度浸矿实验

诱变后混合培养物经过筛选实验, 其中生长较好的混合微生物和未诱变的混合微生物, 分别接入矿浆浓度为 1% 的黄铜矿精矿的 9K 培养基中 (50 ml, 种量 1%), 恒温振荡培养 (30°C, 160 rpm) 40 d, 定时测定浸矿液中的 Cu^{2+} 浓度。

3.1.6 10%矿浆浓度浸矿实验

诱变后混合培养物经过筛选实验,其中生长较好的混合微生物和未诱变的混合微生物,分别接入矿浆浓度为10%的黄铜矿精矿的9K培养基中(50 ml, 种量1%),恒温振荡培养(30℃, 160 rpm) 40 d,定时测定浸矿液中的 Cu^{2+} 、浓度。

3.1.7 20%矿浆浓度浸矿实验

配两组培养基,第一组采用9K培养基,第二组采用 Leathen 培养基。每组培养基中加入矿浆浓度为20%的黄铜矿精矿,接种3.1.5浸矿后的菌悬液(接种量1%),恒温振荡培养40 d (30℃, 200rpm)。定时测定培养基中 Cu^{2+} 浓度。

3.1.8 Cu^{2+} 耐受实验

筛选后的混合培养物在9K液体培养基中培养。培养基分为4组,分别加入 S^0 、 Fe^{2+} 、 $\text{S}^0 + \text{Fe}^{2+}$ 和黄铜矿作为混合培养物的能量来源。

在每组培养基中,分别加入1%、2%、4%、8%、16%和32%的 Cu^{2+} (以硫酸铜的形式加入),振荡培养(30℃, 200 rpm) 15 d后,测定培养液中的微生物细胞数量。

3.1.9 pH测定

使用便携式 Shenci PHB-5[®] pH计测定培养液的pH值。

3.1.10 细菌染色及其生长量测定

微生物生长量测定采用血球计数板计数法和光密度计数法^[151]。

3.1.11 铜离子浓度测定

铜离子浓度测定按照GB437-80进行。

a: 试剂 焦磷酸钠,碘化钾,冰醋酸,硫代硫酸钠,可溶性淀粉。

b: 取1 ml样品,加入49 ml蒸馏水。然后加入1 g焦磷酸钠(磨碎),溶解。加入2-4 g碘化钾,加入10 ml醋酸,混匀后,置阴暗处静置10 min。用0.1 mol/L硫代硫酸钠标准溶液滴定,滴到淡黄色时,加入3 ml淀粉指示剂,滴至蓝色消失。

用99.999%的铜配制成标准溶液,制作铜离子浓度的标准曲线。参照标准曲线,得出样品中铜离子的浓度。

3.1.12 铁离子浓度测定

a: 试剂: 重铬酸钾溶液 1.755 g/L, 二苯胺磺酸钠溶液 0.2% (W/W); 硫磷酸 (浓硫酸: 浓磷酸: 水 = 1.5: 1.5: 7)

b: 滴定: 50 ml 三角瓶中, 加入 1 ml 样品。然后加入 10 ml 硫磷酸、2-3 滴二苯胺磺酸钠溶液。用重铬酸钾溶液滴定。

c: 计算: 每消耗 1 ml 重铬酸钾溶液, 相当于 0.002 g 亚铁离子。

3.2 结果与分析

3.2.1 诱变后混合微生物选育结果

生物浸矿是多种微生物参与的复杂生化过程, 对微生物诱变育种来说, 单一微生物诱变具有明显的局限性。第一, 有些微生物在浸矿时有一定的作用, 但不能够分离出纯培养。第二, 单一微生物诱变只是改变了一种微生物的某种 (些) 性能, 而微生物浸矿是多种细菌协同作用的复杂过程。即使把筛选得到的优良单一微生物组合在一起, 并不一定适应浸矿的环境, 也不一定得到好的浸矿效果。鉴于此, 本研究采用混合微生物诱变的策略, 以获得优良的微生物混合培养物, 用于工业生产。

诱变后的混合培养物分别接种在加入黄铜矿精矿或黄铁矿精矿的 9K 培养基中 (矿浆浓度均为 1%), 经过 10 d 培养后, 不同组别的培养液中微生物的浑浊度不一, 此时选择培养液中浑浊度大 (即生长量大) 的组别。共发现了 5 组在加黄铜矿、黄铁矿的培养基中生长量较高的培养物, 即: 在黄铁矿培养基中的 DES + NO₂⁻ 诱变 60 min、DES 诱变 60 min 的 2 组培养物; 在黄铜矿培养基中的 DES 诱变 10 min、UV 诱变 10 min、UV + DES + NO₂⁻ 诱变 100 min 的 3 组培养物, 依次编号为 A、B、C、D、E (表 3-3)。

表 3-3 诱变后混合微生物编号

诱变剂	DES + NO ₂ ⁻	DES	DES	UV	UV + DES + NO ₂ ⁻
处理时间	60 min	60 min	10 min	10 min	100 min
加入的矿物	黄铁矿	黄铁矿	黄铜矿	黄铜矿	黄铜矿
混合培养物编号	A	B	C	D	E

之所以选择这样的初筛条件, 是基于以下因素:

①培养时间较短, 是为了避免长时间的培养, 造成优势微生物大量生长, 而暂时的劣势微生物 (可能它们浸矿能力较强, 但诱变后暂时生长缓慢) 被淘汰。

一般说来,在诱变后,浸矿微生物生长达到稳定期要 16 d^[35]。

②浸矿培养时加入 1%黄铜矿,是为了给诱变后的混合微生物以选择压力,淘汰在该环境下生长不好的微生物,富集在矿物存在条件下生长良好的微生物,加快选择正突变微生物的速度。

③微生物的某些特性是质粒提供的,加入选择压力,尽可能让微生物不丢失质粒,保留它们的有益特征。

3.2.2 1%矿浆浓度浸矿实验结果

采用矿浆浓度为 1%黄铜矿精矿在 9K 培养基中进行浸矿实验。浸矿 40 d 的结果表明(表 3-4),诱变后的 5 组培养物浸出 Cu^{2+} 的浓度都比 CK 高,其中混合微生物 E 浸出 Cu^{2+} 浓度达到 2356 mg/L,而 CK 仅仅浸出 942 mg/L,提高 Cu^{2+} 浸出浓度 149.98%;同时,混合微生物 E 的 Cu^{2+} 浸出率达到 74.18%,比诱变前的浸出率增加 42.88%;混合微生物 D 增幅最少,仅仅增加浸出率 0.41%。

表 3-4 矿浆浓度 1% 的黄铜矿精矿浸矿 40d Cu^{2+} 的浸出

混合培养物*	A	B	C	D	E	CK
Cu^{2+} (mg/L)	1521	2126	956	1498	2356	942
Cu^{2+} (mg/L)增加%	61.40	125.57	1.45	58.98	149.98	0
浸出率 %	46.16	64.50	29.01	45.47	71.48	28.60
浸出率增加 %	17.56	35.90	0.41	16.87	42.88	0

*: 见表 3-3; CK, 未诱变处理的混合培养物。

3.2.2 10%矿浆浓度浸矿实验结果

采用矿浆浓度为 10%黄铜矿精矿在 9K 培养基中进行浸矿实验。浸矿 40 d 的结果表明(表 3-5),诱变后的 5 组培养物浸出 Cu^{2+} 的浓度都比 CK 高,其中混合微生物 E 浸出率最高,达到 14.58%;浸出率比诱变前增加 7.20 %,混合微生物 C 增幅最少。

表 3-5 矿浆浓度 10% 的黄铜矿精矿浸矿 40d Cu^{2+} 的浸出浓度

混合培养物*	A	B	C	D	E	CK
Cu^{2+} (mg/L)	3635	4176	2987	3523	4805	2432
Cu^{2+} (mg/L)增加%	49.46	71.68	22.82	44.85	97.57	0
浸出率 %	11.03	12.67	9.07	10.69	14.58	7.38
浸出率增加 %	3.65	5.29	1.69	3.31	7.20	0

*: 见表 3-3; CK, 未诱变处理的混合培养物。

熊英^[35] 等对驯化后 *T. f* 菌经过紫外诱变, 氧化活性提高 20.3%; 再经过微波诱变, 氧化活性提高 24.7%; 复合物理诱变处理, 氧化活性累计提高了 45.0%。该实验条件下, 混合微生物 E 浸出 Cu^{2+} 浓度从 2432.45 mg/L 增加到 4805.56 mg/L, 提高浸出 Cu^{2+} 浓度 97%。说明混合微生物诱变比单一微生物诱变的效果明显。

3.2.3 20%矿浆浓度浸矿实验结果

为了考察诱变后 5 组混合微生物的浸矿性能是否稳定以及它们在矿浆浓度 20%的条件下浸矿效果。采用 9K 和 Leathen 培养基, 分别加入矿浆浓度 20%的黄铜矿精矿进行了浸矿实验。40d 浸矿结果表明: 5 组混合菌的 Cu^{2+} 浸出浓度均比没有诱变处理的对照高 (表 3-6)。其中, 混合微生物 E 在 Leathen 培养基中浸出液 Cu^{2+} 浓度最高, 达到 5352 mg/L。

在矿浆浓度 20%的条件下浸黄铜矿精矿时, 40d 浸矿 Cu^{2+} 浸出率 (表 3-7)。其中混合微生物 E 的浸矿效果最佳: 9K 培养基中 Cu^{2+} 浸出率达到 7.73%, 较对照的浸出率 4.13%提高了 3.60%; 在 Leathen 培养基中 Cu^{2+} 浸出率达到 8.12%, 较对照的浸出率 3.77%提高了 4.35%。

表 3-6 矿浆浓度 20% 的黄铜矿精矿浸矿 40d Cu^{2+} 的浸出浓度

组合*/ 时间 (d) / Cu^{2+} (mg/L)	5	10	20	30	40
K-A	404	1280	2373	3202	4304
K-B	505	1344	2501	3926	4752
K-C	480	1254	2177	3074	3512
K-D	436	1626	2563	3278	4317
K-E	470	2419	3672	4758	5096
K-CK	252	1149	2314	2715	2722
L-A	401	1469	2650	3814	4304
L-B	501	1692	2986	4298	4688
L-C	471	1556	2674	3499	3676
L-D	440	1614	2854	4065	4580
L-E	471	1961	3147	4901	5352
L-CK	229	1254	2170	2676	2986

*: K 表示混合微生物在 9K 培养基中培养; L 表示混合微生物在 Leathen 培养基中培养; CK 代表未诱变混合微生物。A、B、C、D 和 E 代表诱变后混合微生物, 与表 3-3 相同。

表 3-7 矿浆浓度 20% 的黄铜矿精矿浸矿 40d Cu^{2+} 的浸出率

培养基		9K 培养基					Leathen 培养基					
微生物*	A	B	C	D	E	CK	A	B	C	D	E	CK
浸出率%	6.53	7.21	5.33	6.55	7.73	4.13	6.53	7.11	5.58	6.95	8.12	4.53
浸出率增加%	2.40	3.08	1.20	2.42	3.60	0	2.00	2.58	1.05	2.42	3.59	0

*与表 3-3 相同。

从浸矿时间与 Cu^{2+} 的浸出量关系看, 诱变组合在 5-30 d 时间范围内浸出 Cu^{2+} 的速度最快, 其后逐渐下降, 到 40 d 时, Cu^{2+} 浸出量达到最高值。而对照中 Cu^{2+} 浓度在浸矿 20 d 后增长缓慢。前 5 d 是微生物生长期, 浸出速度慢; 30 d 后由于 Cu^{2+} 浓度增大, 抑制了铜的浸出速度, 所以 Cu^{2+} 浸出速度降低。其中浸出效果最好的混合微生物 E 在两种培养基中浸出 Cu^{2+} 浓度均在 5 000 mg/L 以上,

结果表明, 不管采用哪种培养基, 诱变后的 5 组混合微生物的浸矿性能是稳定的。相对而言, Leathen 培养基成本较低, 提示它们可能有工业应用的价值和潜力。

3.2.5 浸出过程中培养基 pH 的变化

将培养基的初始 pH 调至 1.0, 测定了培养液 pH 的变化情况, 以了解浸矿过程中微生物培养液 pH 变化的规律。从表 3-8 的结果可看出, 各组混合微生物培养液的 pH 值变化规律类似, 都是一个缓慢上升过程 (LD 除外)。

表 3-8 混合微生物浸矿过程中培养液 pH 的变化

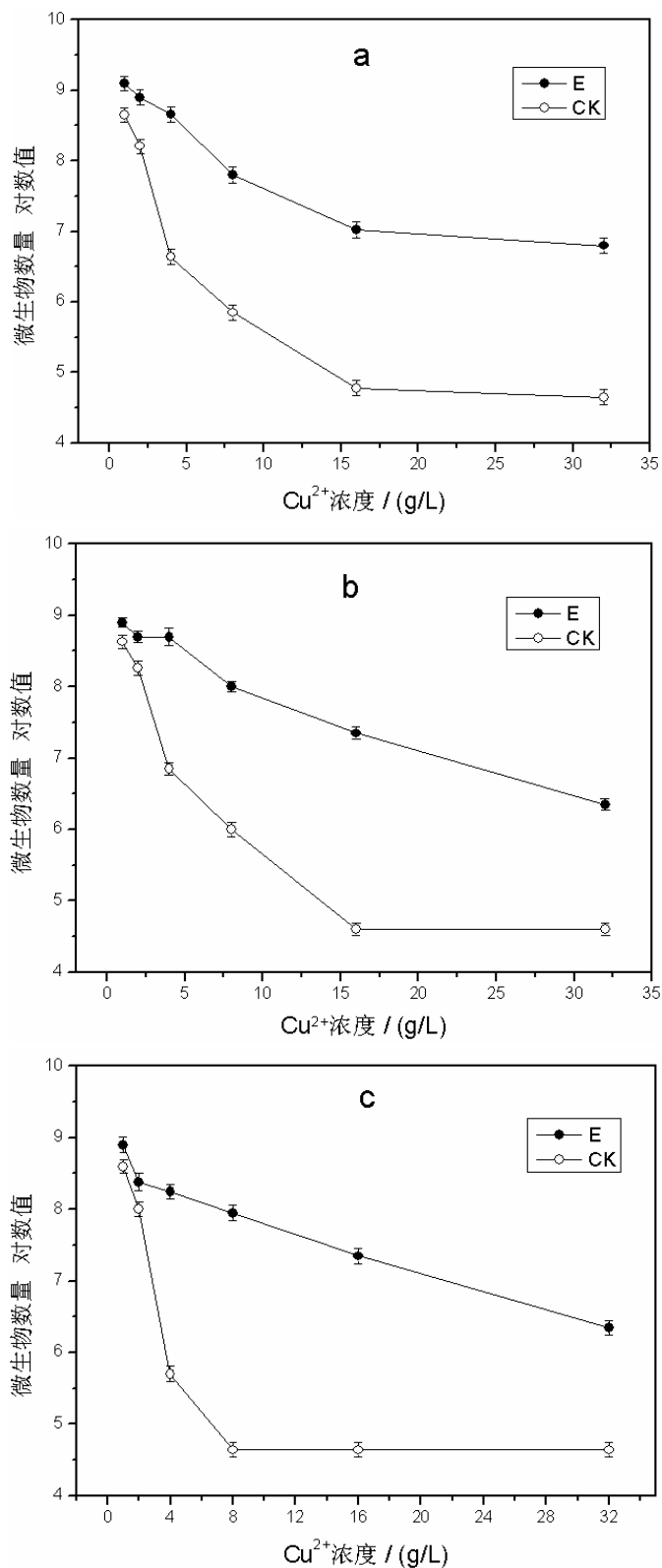
组合 [*] /时间(d)/pH	1	3	6	10	14	18	23	30	35	41	45	48	50
K-A	1.0	1.1	1.5	1.6	1.7	1.8	2.0	2.1	2.2	2.4	2.3	2.4	2.5
K-B	1.0	1.3	1.5	1.7	1.9	2.0	2.3	2.5	2.5	2.6	2.6	2.6	2.6
K-C	1.0	1.4	1.5	1.9	1.8	2.1	2.2	2.2	2.4	2.4	2.5	2.6	2.6
K-D	1.0	1.2	1.6	1.6	1.8	1.8	2.0	2.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.4
K-E	1.0	1.3	1.6	1.6	1.9	1.9	2.0	2.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.4
K-CK	1.0	1.3	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.4
L-A	1.0	1.1	1.3	1.4	1.3	1.6	1.9	2.1	2.2	2.4	2.5	2.6	2.5
L-B	1.0	1.2	1.2	1.4	1.3	1.5	1.8	2.0	2.0	2.3	2.4	2.5	2.6
L-C	1.0	1.0	1.3	1.4	1.3	1.5	1.8	1.9	2.0	2.2	2.3	2.4	2.5
L-D	1.0	1.3	1.4	1.5	1.7	1.8	2.2	2.4	2.5	2.6	2.4	2.2	2.2
L-E	1.0	1.1	1.3	1.4	1.3	1.5	1.7	1.9	1.9	2.2	2.3	2.4	2.5
L-CK	1.0	1.2	1.3	1.4	1.3	1.6	1.8	1.9	2.1	2.2	2.3	2.4	2.4

* 与表 3-6 相同。

3.2.6 Cu^{2+} 耐受实验

在黄铜矿的微生物浸出中, Cu^{2+} 作为终产物之一, 可能对微生物生长产生反馈抑制, 从而影响 Cu^{2+} 的浸出。选用 E 组混合培养物, 在 9K 培养基中分别加入 S^0 、 Fe^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+} + \text{S}^0$ 和黄铜矿进行浸矿实验, 考察其耐受 Cu^{2+} 能力。实验结果 (图

3-1) 表明, E 混合培养物能够耐受 32 g/L 的 Cu^{2+} ; 未诱变处理的对照在相同浓度 Cu^{2+} 的培养条件下, 培养基中添加 S^0 、 Fe^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+} + \text{S}^0$ 或黄铜矿, 微生物生长量明显低于 E 混合培养物, 说明 E 混合培养物耐受 Cu^{2+} 能力比对照明显增强, 有很好的工业生产开发前景。



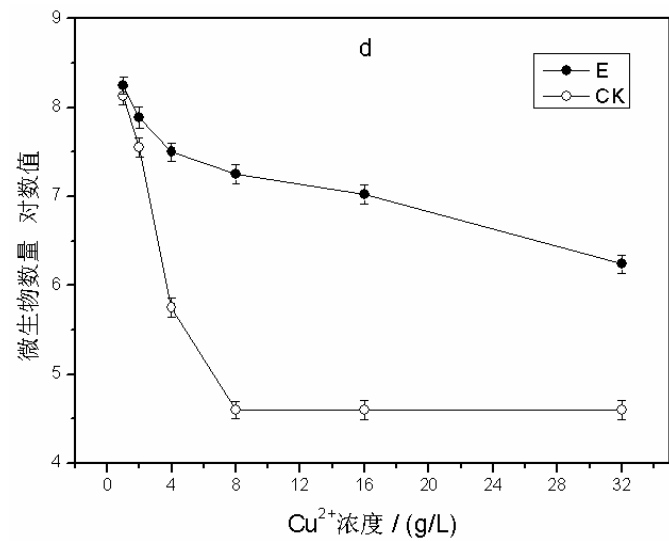


图 3-1 混合微生物 E 对 Cu^{2+} 的耐性

leathen 培养基中添加 S^0 (图 a), Fe^{2+} (图 b), $\text{S}^0+\text{Fe}^{2+}$ (图 c) 和黄铜矿(图 d)。E 表示混合微生物 E; CK, 未诱变处理的混合菌。

3. 2. 7 保存方法与条件对混合微生物生长的影响

混合微生物 A、B、C、D、E 在 9K 培养基中培养后，一部分在 4℃ 条件下保存 1 年；另一部分连续传代。表 3-9 的结果表明，两者的生长速度有明显不同。保存 1 年的混合培养物比连续传代的混合培养物，达到生长稳定期的时间慢 2 d 以上。

表 3-9 连续传代对混合培养物生长的影响 *

混合微生物 / 培养时间 (h)	12	24	36	48	60	72	84	96
A	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
B	-	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
C	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
D	-	+	++	++++	++++	++++	++++	++++
E	+	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
CK	-	+	+++	++++	++++	++++	++++	++++
A-1	-	-	-	+	+	+++	+++	++++
B-1	-	-	-	-	+	+++	+++	++++
C-1	-	-	-	-	++	+++	++++	++++
D-1	-	-	-	-	+	++	+++	++++
E-1	-	-	-	+	++	++++	++++	++++
CK-1	-	-	-	-	+	++	+++	++++

*: - 未见变化; + 淡黄色; ++ 黄色; +++ 红色、三角瓶有沉淀附着; ++++ 深褐色、沉淀多。A、B、C、D、E 同表 3-3; CK, 未诱变处理的混合微生物, 均连续传代。A-1、B-1、C-1、D-1、E-1 和 CK-1 指室温保存 1 年的各组混合培养物。

另外,考察了培养基中加入黄铜矿精矿与否对混合培养物生长的影响。混合培养物 A、B、C、D、E,一部分用 9K 培养基培养,另一部分用加入矿浆浓度 1% 的黄铜矿精矿的 9K 培养基培养,均于 4 °C 保存 2 年。从表 3-10 可看出,培养基中加入矿浆浓度 1% 黄铜矿与否对微生物的生长有明显影响。

同一组混合微生物相比,添加黄铜矿保存的比未添加的生长要快。在黄铜矿中保存的 B 组混合微生物生长达到稳定期较未加黄铜矿保存的快 1 d; 同时,在黄铜矿中保存的 E 组混合微生物生长达到稳定期较未加黄铜矿保存的快 1.5 d。这可能是因为黄铜矿的离子选择压力^[123,124],使得混合微生物的活性较强,增长速度较快。

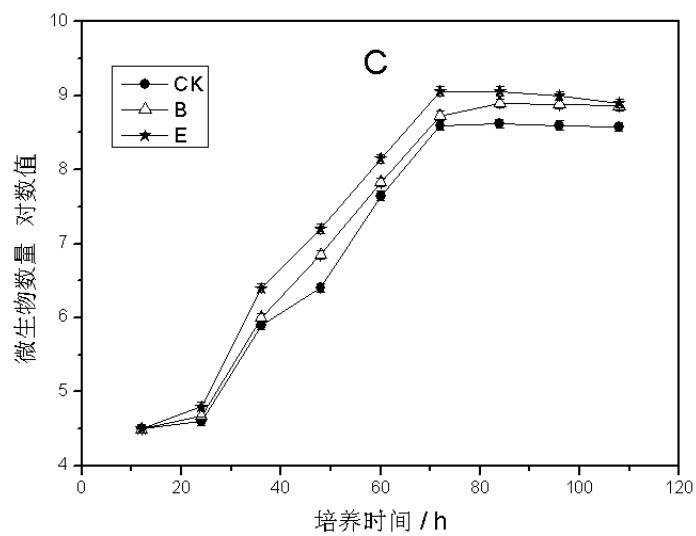
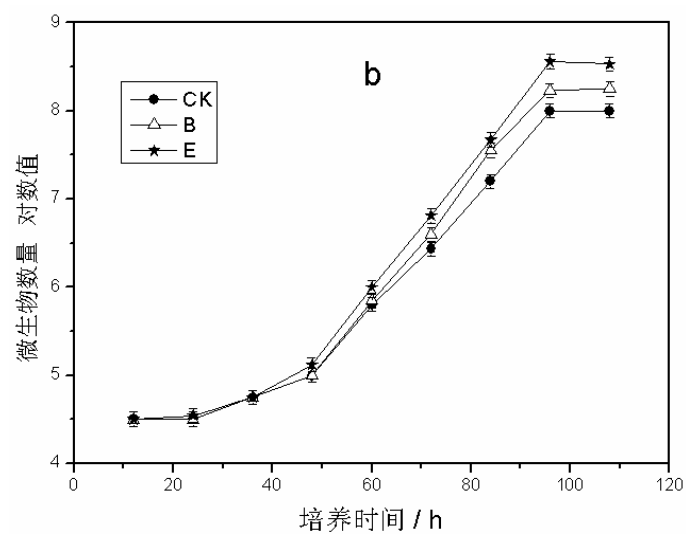
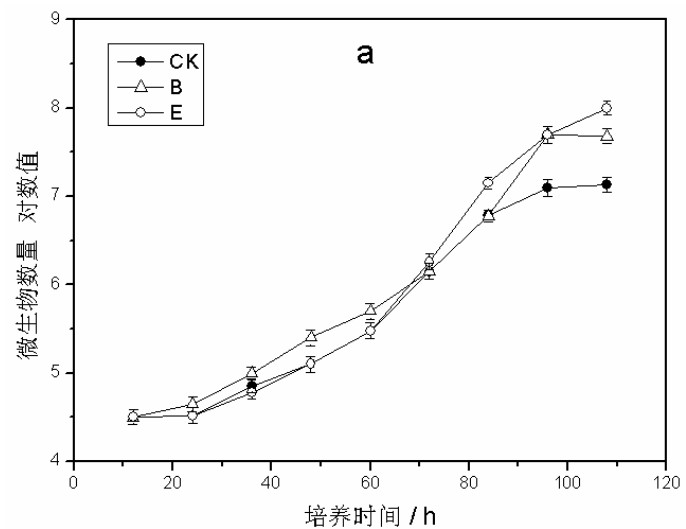
表 3-10 加入黄铜矿保存混合微生物对混合微生物生长的影响 *

混合培养物/ 培养时间 d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	-	-	-	+	+	++	++	+++	++++	++++
B	-	-	-	+	++	+++	+++	++++	++++	++++
C	-	-	-	+	+	++	++	+++	++++	++++
D	-	-	-	-	+	+	++	+++	++++	++++
E	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	++++
CK	-	-	-	-	-	+	+	++	+++	++++
A-K	-	-	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++
B-K	-	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++
C-K	-	-	-	+	+	++	+++	+++	++++	++++
D-K	-	-	+	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
E-K	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++	++++
CK-K	-	-	-	-	+	++	+++	++++	++++	++++

*: - 未见变化; + 淡黄色; ++ 黄色; +++ 红色、三角瓶有沉淀附着; ++++ 深褐色、沉淀多。A、B、C、D 和 E 与表 3-2 相同, CK 为未诱变处理的混合微生物, 培养基都未加黄铜矿。Ak、Bk、Ck、Dk、Ek 和 CKk 指加入黄铜矿保存的各组混合培养物。

3.2.8 培养温度对混合微生物生长的影响

图 3-2 反映了混合微生物 B 和 E 在 9K 培养基中, 不同培养温度条件下 (20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 和 40 °C) 的生长情况。可以看出, 在 9K 培养基中, 诱变后混合微生物在 30 °C 条件下生长最好; 在 20 °C 培养时生长缓慢; 在 40 °C 生长量最少。



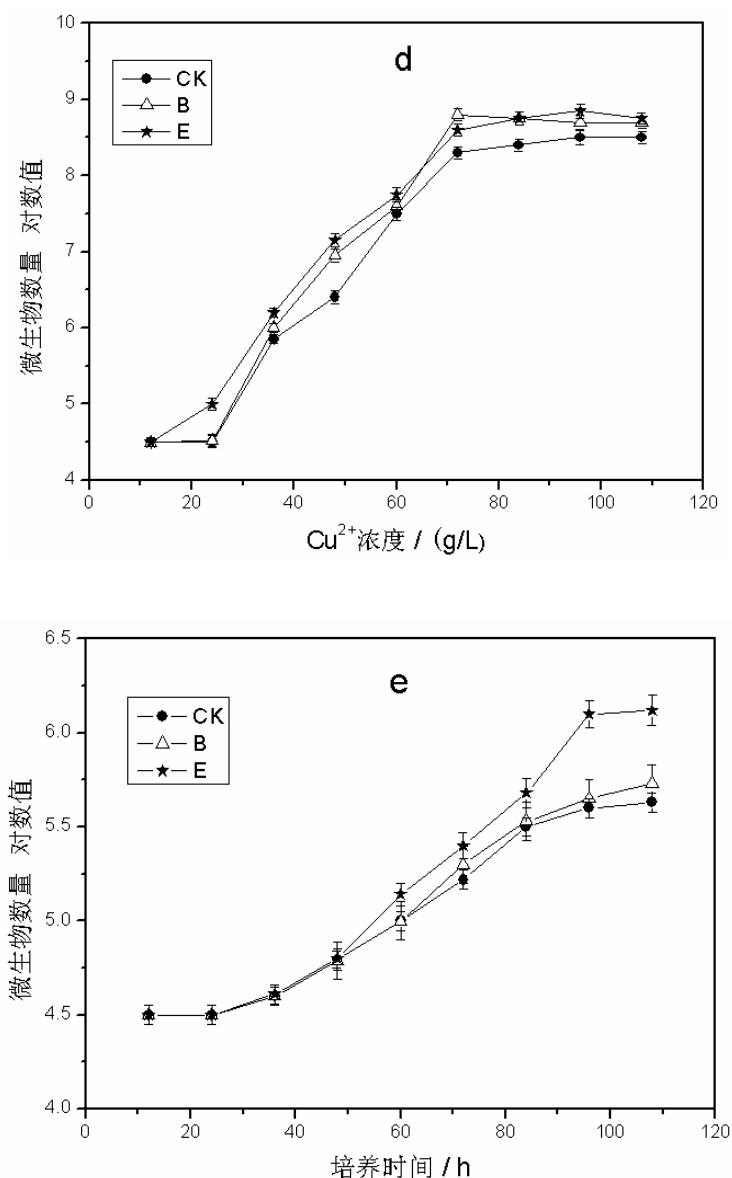


图 3-2 不同培养温度下混合微生物的生长数量

a, 20°C; b, 25°C; c, 30°C; d, 35°C; e, 40°C。B 和 E 与表 3-3 相同。CK, 未诱变处理的混合微生物。

3.3 本章小结

从不同地点采集的微生物, 经过黄铜矿和闪锌矿的长期驯化后, 通过混合微生物的复合诱变与浸矿筛选, 获得了混合微生物 A、B、C、D 和 E。

①在加入矿浆浓度为 1%黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 61.40%、125.57%、1.45%、58.98% 和 149.98%; 浸出率分别提高 17.56%、35.90%、0.41%、16.87%和 42.88%。

②在加入矿浆浓度为 10%黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、

B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 49.46%、71.68%、22.82%、44.85% 和 97.57%；浸出率分别提高 3.65%、5.29%、1.69%、3.31% 和 7.20%。

③在加入矿浆浓度为 20% 的黄铜矿精矿培养基中培养 40 d，在 9K 和 leathen 培养基中，混合微生物 E 浸出 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 87.22% 和 79.24%，浸出率分别提高 3.60% 和 3.59%，表明混合微生物 E 的浸矿性能稳定。

④混合微生物 E 耐受浓度能力比对照强，具有工业应用的潜力。

⑤加入黄铜矿精矿保存的微生物比不加黄铜矿精矿保存的生长到稳定期快 1-2 d 左右，说明加入选择性压力可以提高浸矿微生物的活性。

⑥混合微生物 B 和 E 在 9K 培养基上生长到稳定期比未诱变的混合微生物快 1-2 d。

第四章 混合微生物浸出闪锌矿精矿

本章研究诱变前后混合微生物 A、B、C、D、E 对闪锌矿的浸出效果，以及不同矿浆浓度对混合微生物生长的影响，为混合微生物用于锌的浸出进行前期实验。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验材料

矿石为贵州省某浮选厂的闪锌矿精矿。微生物浸矿的环境在 pH2.0 左右，而通过浮选的闪锌矿 pH 较高，所以闪锌矿通过两次 pH2 的硫酸溶液浸泡处理，每次浸泡 1 d。闪锌矿精矿清洗干燥后测量其矿物成分。

闪锌矿精矿成分分析表明，它的品位较高（表 4-1）。矿石粉碎至 0.074 mm（占 85%），供浸矿实验用。

表 4-1 闪锌矿精矿的成分分析

元素	Zn	Pb	Cu	Fe	S
含量（%）	52.27	7.21	0.01	3.31	32.61

4.1.2 微生物培养

混合微生物 A、B、C、D、E 和未诱变的混合微生物（CK），培养方法同第二章。

4.1.3 浸矿实验

于不同矿浆浓度闪锌矿精矿的 9K 培养基中，接种混合微生物 A、B、C、D、E 和未诱变的混合微生物 CK（100mL 三角瓶，装培养基 50mL，接种量 1%），恒温振荡培养（30 °C，200 rpm）。

闪锌矿精矿矿浆浓度 1%，培养 40 d；

闪锌矿精矿矿浆浓度 10%，培养 40 d；

闪锌矿精矿矿浆浓度 20%，培养 40 d；

4.1.4 细菌浓度测定

细菌浓度测定采用血球计数板计数法和光密度计数法^[151]。

4.1.5 锌离子浓度测定

a 试剂：碘化钾；氟化铵溶液（200 g/L）；硫酸溶液；乙酸-乙酸钠缓冲溶液（pH≈5.5：称取 200 g 乙酸钠，溶于水，加 10 ml 冰醋酸，以水稀释至 1000 ml）；乙二胺四乙酸二钠标准滴定溶液[（EDTA）=0.05 mol/L]；二甲酚橙指示液（2 g/L）。

b：取 1 ml 样品溶液置于 250 mL 锥形瓶中，加入 49 ml 蒸馏水、10 ml 氟化铵溶液（200 g/L）和 0.5 g 碘化钾，混匀后加入 15 ml 乙酸-乙酸钠缓冲溶液（pH≈5.5）和 3 滴二甲酚橙指示液（2 g/L），用乙二胺四乙酸二钠标准滴定溶液[（EDTA）=0.05 mol/L]滴定至溶液由红色变为亮黄色。同时做空白实验。

配置标准锌离子浓度溶液滴定，制作锌离子浓度的标准曲线。计算样品滴定时消耗乙二胺四乙酸二钠标准溶液体积，对照标准曲线，得出样品锌离子浓度。

4.2 结果和分析

4.2.1 浸矿实验

4.2.1.1 闪锌矿精矿矿浆浓度 1%的浸出实验

采用矿浆浓度为 1% 闪锌矿精矿在 9K 培养基中进行浸矿实验。浸矿 40 d 的结果表明（表 4-2），诱变后的 5 组培养物浸出 Zn^{2+} 的浓度都比 CK 高，其中 E 组混合微生物增幅最大，浸出 Zn^{2+} 浓度由诱变前 1005 mg/L 增加到 2181 mg/L，增加 117.01%； Zn^{2+} 浸出率达到 41.49%，比诱变前的浸出率增加 22.37%；C 组混合微生物浸出 Zn^{2+} 浓度比 CK 降低，浸出率减少 0.46%。

在这次浸矿中，混合微生物 B、D 和 E 浸出 Zn^{2+} 效果比较理想，这 3 组菌进行下一阶段浸矿实验。

表 4-2 矿浆浓度 1% 的闪锌矿精矿浸矿 40d Zn^{2+} 的浸出

混合培养物*	A	B	C	D	E	CK
Zn^{2+} (mg/L)	1086	1869	981	1785	2181	1005
Zn^{2+} 浓度(mg/L)增加%	8.06	85.97	-2.39	77.61	117.01	0
浸出率 %	20.66	35.55	18.66	33.95	41.49	19.12
浸出率增加 %	1.54	16.43	-0.46	14.83	22.37	0

*：见表 3-3；CK，未诱变处理的混合培养物。

4.2.1.2 矿浆浓度 10%的闪锌矿精矿浸出实验

为了考察混合微生物 B、D 和 E 在矿浆浓度为 10%闪锌矿精矿中的浸矿性能，在 9K 培养基中进行浸矿实验。浸矿 40 d 的结果表明（表 4-3），诱变后的 3 组培养物浸出 Zn^{2+} 的浓度都比 CK 高，其中 E 组混合微生物增幅最大，浸出 Zn^{2+} 浓度由诱变前 2432 mg/L 增加到 3764 mg/L，增加 54.77%； Zn^{2+} 浸出率达到 7.16%，比诱变前的浸出率增加 2.53%。

表 4-3 矿浆浓度 10% 的闪锌矿精矿浸矿 40d Zn^{2+} 的浸出

混合培养物*	B	D	E	CK
Zn^{2+} (mg/L)	3627	3523	3764	2432
Zn^{2+} 浓度(mg/L)增加%	49.14	44.86	54.77	0
浸出率 %	6.90	6.70	7.16	4.63
浸出率增加 %	2.27	2.07	2.53	0

*：见表 3-3；CK，未诱变处理的混合培养物。

4.2.1.3 矿浆浓度 20%的闪锌矿精矿浸出实验

为了考察混合微生物 B、D 和 E 的浸矿性能是否稳定以及它们在矿浆浓度 20%的条件下浸矿效果。采用 9K 和 Leathen 培养基，分别加入矿浆浓度 20%的闪锌矿精矿进行了浸矿实验。40d 浸矿结果表明：3 组混合菌的 Zn^{2+} 浸出量均比没有诱变处理的对照高（表 4-4）。其中，混合微生物 E 在 Leathen 培养基中浸出液 Zn^{2+} 浓度最高，达到 6110 mg/L。

在矿浆浓度 20%的条件下浸闪锌矿精矿 40d， Cu^{2+} 浸出率（表 3-7）。其中混合微生物 E 的浸矿效果最佳：9K 培养基中 Zn^{2+} 浸出率达到 5.71%，较对照的浸出率 3.47%提高了 3.60%；在 Leathen 培养基中 Zn^{2+} 浸出率也达到 5.81%，较对照的浸出率 3.55%提高了 4.35%。

表 4-4 矿浆浓度 20% 的闪锌矿精矿浸矿 40d Zn^{2+} 的浸出

组合/时间 (d) / Zn^{2+} (mg/L)	5	10	20	30	40
K-B	251	1464	2601	4426	5852
K-D	336	1526	3263	4378	5317
K-E	371	1941	3793	4812	6007
K-CK	221	1249	2274	3085	3652
L-B	266	1392	2863	4598	5868
L-D	342	1614	3454	4365	5680
L-E	394	1882	3921	5230	6110
L-CK	228	1354	2370	3046	3736

*：K-B、K-D 和 K-E 表示混合微生物在 9K 培养基中培养；L-B、L-D 和 L-E 表示混合微生物在 Leathen 培养基中培养；K-CK 和 L-CK 分别表示未诱变微生物在 9K 和 Leathen 培养基中培养；B、D 和 E 与表 3-3 相同。

表 4-5 矿浆浓度 20% 的闪锌矿精矿浸矿 40d Zn^{2+} 的浸出

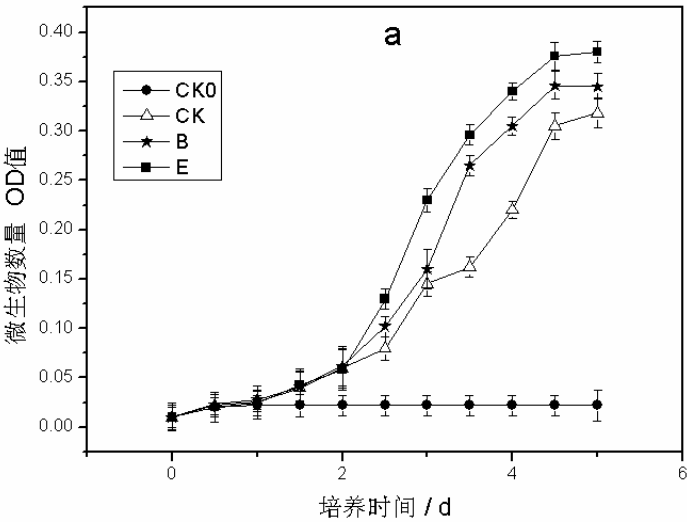
培养基	9K				Leathen			
微生物*	B	D	E	CK	B	D	E	CK
浸出率%	5.57	5.06	5.71	3.47	5.58	5.40	5.81	3.55
浸出率增加%	2.10	1.59	2.24	0	2.03	1.89	2.26	0

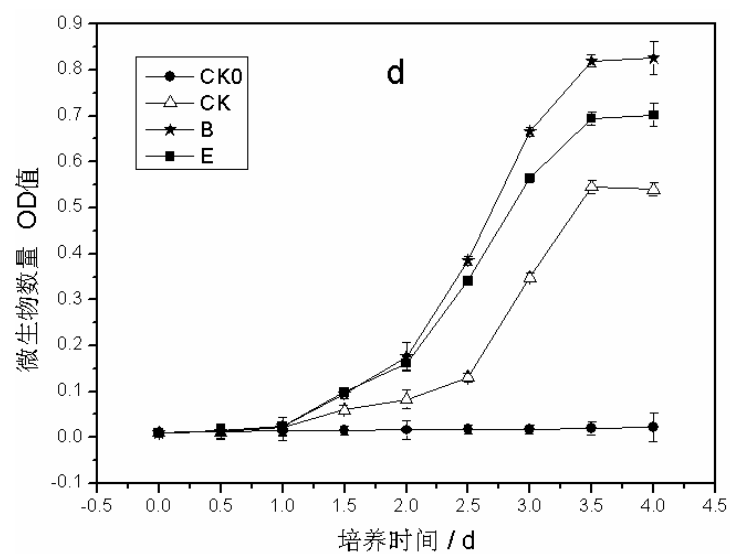
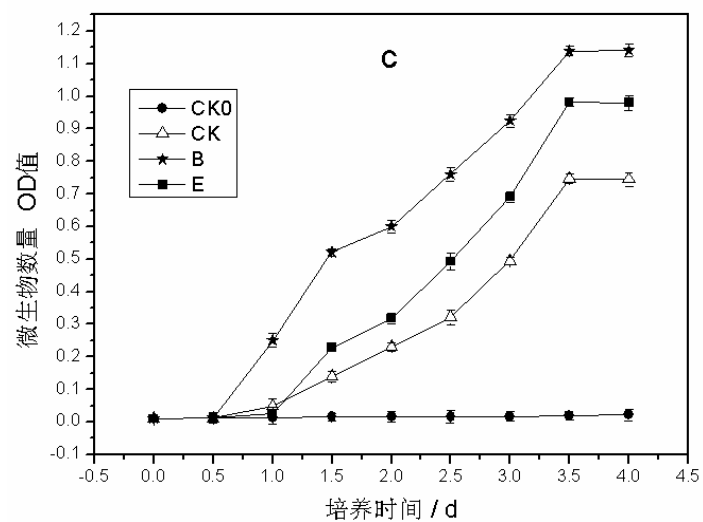
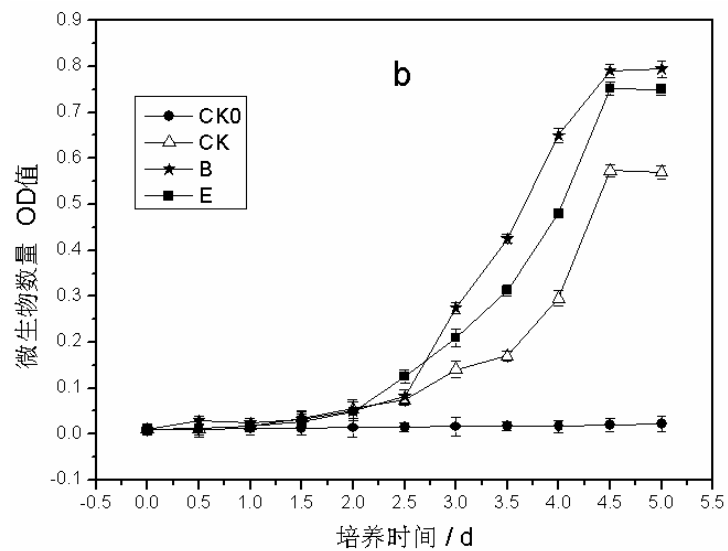
*：见表 3-3；CK，未诱变处理的混合培养物。

4. 2. 2 不同闪锌矿精矿矿浆浓度中混合微生物的生长

在黄铜矿矿浆浓度为 1% 的 9K 培养基中连续生长的混合微生物，在 Leathen 培养基中，经过 3 次活化后，接种在矿浆浓度 2%、4%、8%、16%、32% 的 Leathen 培养基中生长，用蒸馏水为零点对照，测定 OD₆₀₀ 值，实验结果（图 4-1）表明：

- ①在矿浆浓度为 2%-32% 闪锌矿中培养，混合微生物 B 和 E 的生长量均比未诱变的对照大。
- ②在加入矿浆浓度 4%、8%、16% 的闪锌矿培养基中，B 混合微生物的生长量最大，该混合微生物可能适应中低浓度闪锌矿的环境，较稳定，工业生产应用前景看好。
- ③在加入矿浆浓度 32% 的闪锌矿培养基中，E 混合微生物生长最多，该混合微生物适用于高浓度闪锌矿的环境，有较好的工业生产应用前景。





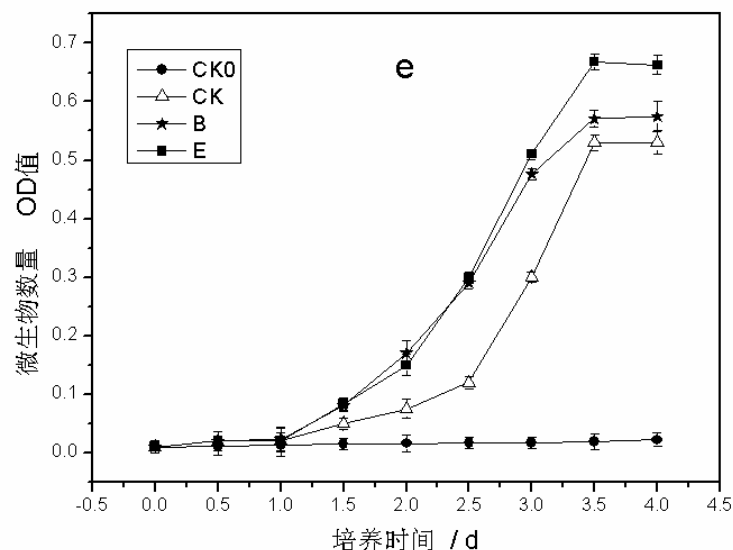
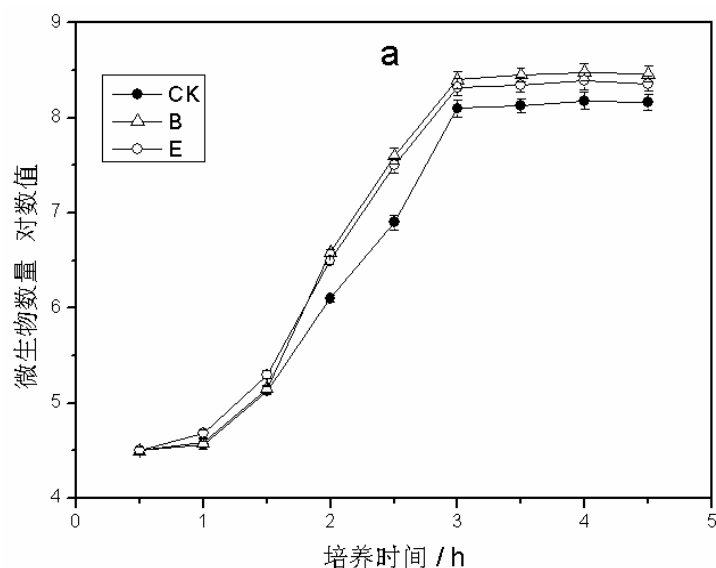
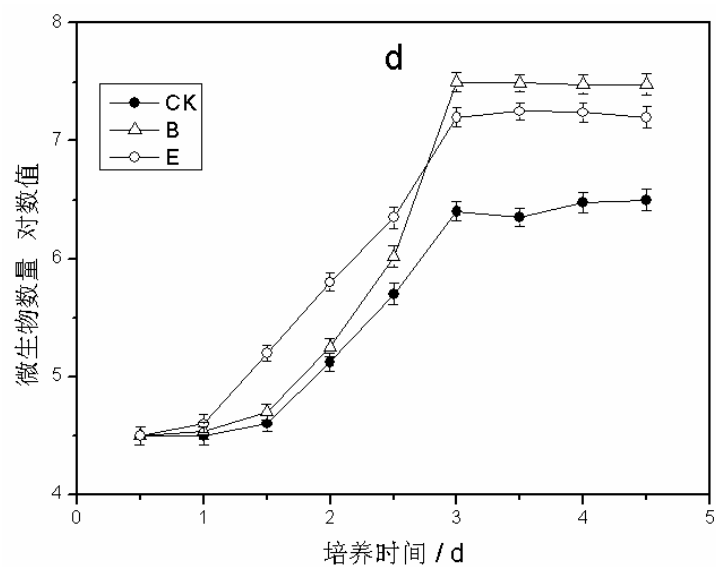
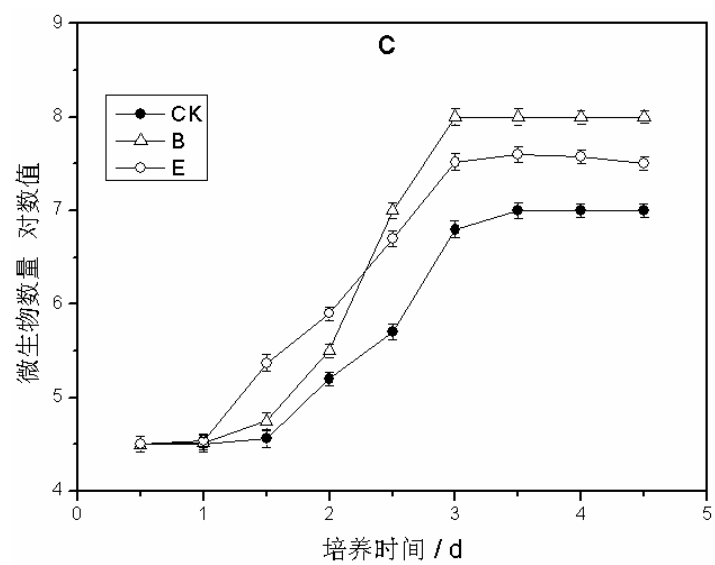
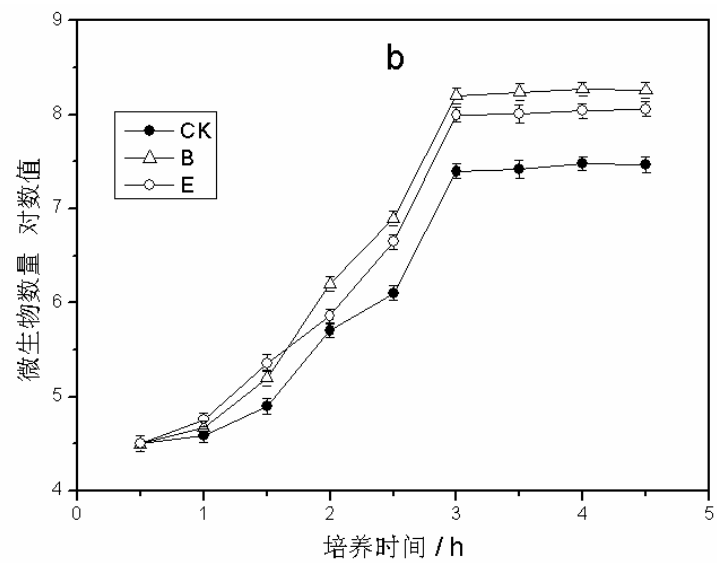


图 4-1 不同闪锌矿矿浆浓度中混合微生物的生长 (OD_{600} 值)

a, 矿浆浓度 2%; b, 矿浆浓度 4%; c, 矿浆浓度 8%; d, 矿浆浓度 16%; e, 矿浆浓度 32%。B 和 E 与表 2-2 相同。CK0, 未接种微生物; CK, 未诱变处理的混合微生物。

培养液 OD 值只能间接反映微生物的生长量,有必要进一步用血球计数板直接测定生长过程中的微生物数量。从图 4-2 可以看出,两种测量方法的结果是类似的,都表明 B 和 E 混合微生物在加入矿浆浓度 4-32% 的闪锌矿培养基中生长良好,特别是 E 适合在闪锌矿浓度 32% 的环境,可能是高浓度闪锌矿提供了大量的营养物质。





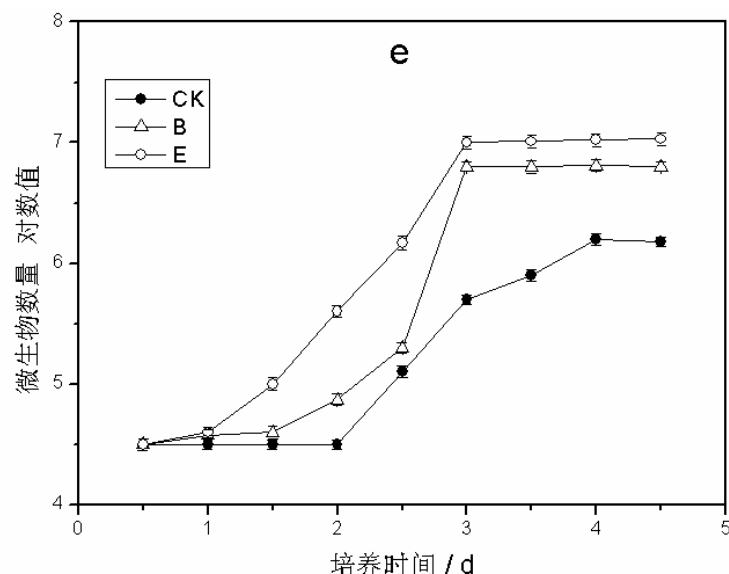


图 4-2 混合微生物在不同闪锌矿浓度培养基中的生长量对数值

a, 矿浆浓度 2%; b, 矿浆浓度 4%; c, 矿浆浓度 8%; d, 矿浆浓度 16%; e, 矿浆浓度 32%。B、D 和 E 与表 3-3 相同。CK, 未诱变处理的混合微生物。

4.2.3 显微镜观察

对 E 混合培养物做涂片检查, 在光学显微镜下观察, 培养物中主要是不同大小的杆菌、少量的螺旋菌和球菌 (图 4-3)。

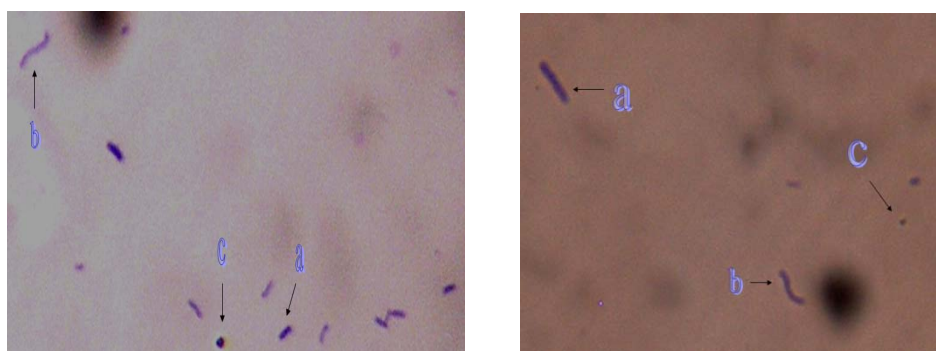


图 4-3 混合培养物 E 在光学显微镜下形态
a: 杆菌, b: 螺旋菌, c: 球菌。(放大倍数 100×10)

4.3 本章小结

从不同地点采集的微生物, 经过黄铜矿和闪锌矿的长期驯化后, 通过混合微生物的复合诱变, 得到浸出闪锌矿能力最强的混合微生物 B、D 和 E。

①在加入矿浆浓度为 1% 闪锌矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 8.06%、85.97%、-2.39%、77.61% 和 117.01%, 说明混合培养物诱变可提高微生物浸闪锌矿精矿的活性; 浸出率分别提高 1.54%、16.43%、-0.46%、14.83% 和 22.37%。

②在加入矿浆浓度为 10%的闪锌矿精矿培养基中培养 40 d, 在 9K 培养基中, 混合微生物 B、D 和 E 浸出 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 49.14%、44.86%和 54.77%, 浸出率分别提高 2.27%、 2.07%和 2.53%。

③在加入矿浆浓度为 20%闪锌矿精矿的 9K 和 leathen 培养基中培养 40 d, 混合微生物 B、D 和 E 在 9K 培养基中培养时, Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.10%、1.59%和 2.24%; 在 leathen 培养基中培养时, Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.03%、1.89%和 2.56%

④混合微生物 B 适合在矿浆浓度为 4%-16%闪锌矿精矿中生长, 混合微生物 E 适合在 4%-32%的矿浆浓度下生长, 说明混合微生物 B、E 耐受高矿浆浓度, 有良好的工业应用前景。

第五章 诱变前后微生物的群落结构分析

长期以来,微生物的深入研究受限于技术手段的落后已是不争的事实,对于微生物的认识,人们通常是通过先分离细菌细胞再在培养基上培养、鉴定菌落的方法,但事实上,只有少数细菌可以通过该方法获得,而大部分细菌极难培养成功,这使得许多微生物包含的大量遗传信息难以被发现。

目前,涌现出许多用于研究微生物多样性和生态学的技术,比如:ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis), SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), RFLP(Restriction fragment length polymorphism), Sequencing, DGG E(Denaturing gradient gel electrophoresis)和T-RFLP(Terminal restriction fragment-length polymorphism)等。这些技术和方法的采用,使得在微生物多样性、微生物种群的结构和功能、微生物的系统发育和分类、微生物与环境的相互作用等领域研究得以突破,发挥了传统方法所不能替代的作用^[152~158]。

为了了解诱变后混合微生物在浸矿过程中微生物的群落结构的变化,本章采用PCR-RFLP方法研究了诱变后混合微生物的生态组成,并对其进行了生态分析。

5.1 材料与方法

5.1.1 混合微生物和培养基

5.1.1.1 混合微生物来源

经过长期高浓度黄铜矿精矿和闪锌矿精矿驯化培养获得的诱变前后混合培养物。

5.1.1.2 培养基

9K 培养基; 9K 培养基+矿浆浓度为 1%的闪锌矿精矿; 9K 培养基+矿浆浓度为 1%的黄铜矿精矿。

5.1.2 诱变前后混合微生物的 DNA 提取

250 ml 三角瓶中,加入 9K 培养基 200 ml。按照前述培养条件再加入闪锌矿精矿 2 g 或黄铜矿精矿 2 g,接种混合微生物(接种量为 1%)后于 30℃、160 rpm 条件下恒温培养 10 d。培养 10 d 后, 10000 rpm 离心 20 min 收集混合微生物沉

淀,收集的沉淀用 pH1.8 的无菌水洗涤三次以去掉高价铁离子沉淀。细胞破壁之前,上述沉淀细胞重新悬浮于 400 μ l pH8.0 的 TE 缓冲液中,并于 70 $^{\circ}$ C 温育 10 min,以破坏可能存在的 DNA 酶的活性。稍冷却后,在上述悬浮液中加入 40 μ l 20% (w/v) 的 SDS 和 5 μ l 20 mg/ml 的蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 温育 5—10 min。然后,加入等体积的氯仿/戊醇 (24/1, V/V) 混匀后, 12000 rpm 10 min, 将上清液小心地吸入到新的 EP 管中, 重复一次; 在上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇, 并置于 -20 $^{\circ}$ C 20 min 或过夜。5000 rpm 离心 2 min 收集 DNA 沉淀, 沉淀用 70% 的乙醇洗涤三次后, 自然干燥并将沉淀溶于适量的 pH8.0 的 TE 缓冲液中。在溶有 DNA 的缓冲液中加入最终浓度为 20 μ g/mL 的 RNase A, 37 $^{\circ}$ C 90 min。最后, 依次用等体积的酚/氯仿/戊醇 (25/24/1, V/V) 和氯仿/戊醇 (24/1, V/V) 各抽提一次, 无水乙醇沉淀, 70% 的乙醇洗涤三次。纯化后的 DNA 分别用适量的 pH8.0 的 TE 缓冲液和去离子水溶解, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

5.1.3 诱变前后混合微生物的系统发育分析

混合微生物的 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用通用引物对: 63f (5'-CAGGCC TAACACATGCAAGTC-3') 和 1387f (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液, 5.0 μ l; Mg^{2+} (25mmol/L), 3.0 μ l; dNTP(各 5mmol/L), 2.0 μ L; 引物(20 μ mol/L)各 1.0 μ l; *Taq* DNA 聚合酶(1 U/ μ l, MBI), 1.0 μ l; 模板 2.0 μ l 约 20 ng; 去离子水 35 μ l。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后, 94 $^{\circ}$ C, 30s; 52 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1.0 min; 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 Omega 公司生产的 E.Z.N.ATM 凝胶回收试剂盒纯化; 纯化的 PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TA 克隆试剂盒克隆, 其载体为 pCR[@]2.1。

随机挑选 120 个克隆子进行 PCR 扩增筛选, 电泳检测后, 对阳性 PCR 产物用 *Hin*P1 和 *Msp*I 酶进行酶切反应, 具体操作均参照说明书进行。酶切产物使用 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳, 电泳后进行 RFLP 分析。

建立在 PCR-RFLP 图谱的基础上, 从 CK (未诱变混合微生物在 9K 培养基中培养)、CKCu (未诱变混合微生物在黄铜矿加 9K 培养基中培养)、BCu (诱变后混合微生物在黄铜矿加 9K 培养基中培养)、BZn (诱变后混合微生物在闪锌矿加 9K 培养基中培养) 分别挑选出 82、67、55、82 个克隆子用于测序分析。序列先采用 NCBI 的 BLASTN 工具进行分类, 然后采用 Neighbor-Joining 法对所有可用的 DNA 序列进行初步的系统发育分析, 基于系统发育分析结果, 适当的挑选适当的序列子集用 CLUSTAL W 程序构建最终的系统发育树。

5.1.4 数据统计

为了分析微生物的多样性,我们定义具有高度相似性带型的图谱为一可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)。计数各种克隆子数量以及每类克隆子在总克隆子中的比例。

5.2 结果与分析

5.2.1 诱变前后混合微生物的 RFLP 分析

我们分别从 CK、CKCu、BCu、BZn 四个样品中分别挑选出了 58、67、55 和 83 个克隆子。RFLP 分析显示,不同样品中其 OTU 数量还是存在一定的差异性,如 CK 样点有 8 个 OTU,而 BZn 样点有 10 个 OTU。

5.2.2 诱变前后混合微生物的系统发育分析

根据 RFLP 分析结果,从 CK、CKCu、BCu、BZn 样品中挑出 32 个序列,它们分别是 1[#], 2[#], 4[#], 5[#], 6[#], 7[#], 9[#], 10[#], 11[#], 12[#], 13[#], 14[#], 15[#], 16[#], 17[#], 18[#], 19[#], 20[#], 21[#], 22[#], 23[#], 24[#], 25[#], 26[#], 27[#], 28[#], 29[#], 31[#], 32[#], 33[#], 35[#], 36[#]。测序后,构建 16S rDNA 的系统发育树(图 5-1),并且把每个样品中各 OTU 数量列表(表 5-1)。

每个 OTU 对应的微生物菌株分别用相同的编号表示。

由图 5-1 可以知道,四个样品中微生物群落结构可以分为 3 组:

第 1 组与嗜铁钩端螺旋菌相似(EF025341 *Leptospirillum ferriphilum* strain BY),它们分别是 29[#], 31[#], 32[#]。

第 2 组与嗜酸氧化亚铁硫杆菌相似(AJ457808 *A. ferrooxidans* strain ATCC19859),它们分别是 2[#], 6[#], 11[#], 12[#], 13[#], 17[#], 20[#], 22[#], 24[#], 25[#], 28[#]。

第 3 组与嗜酸氧化硫硫杆菌和喜温硫杆菌相似(DQ508106 *Acidithiobacillus thiooxidans* strain AA012、Z29975 *T.caldus* DSM 8584),它们分别是 1[#], 4[#], 5[#], 7[#], 9[#], 10[#], 14[#], 15[#], 16[#], 18[#], 19[#], 21[#], 23[#], 26[#], 27[#], 33[#], 35[#], 36[#]。

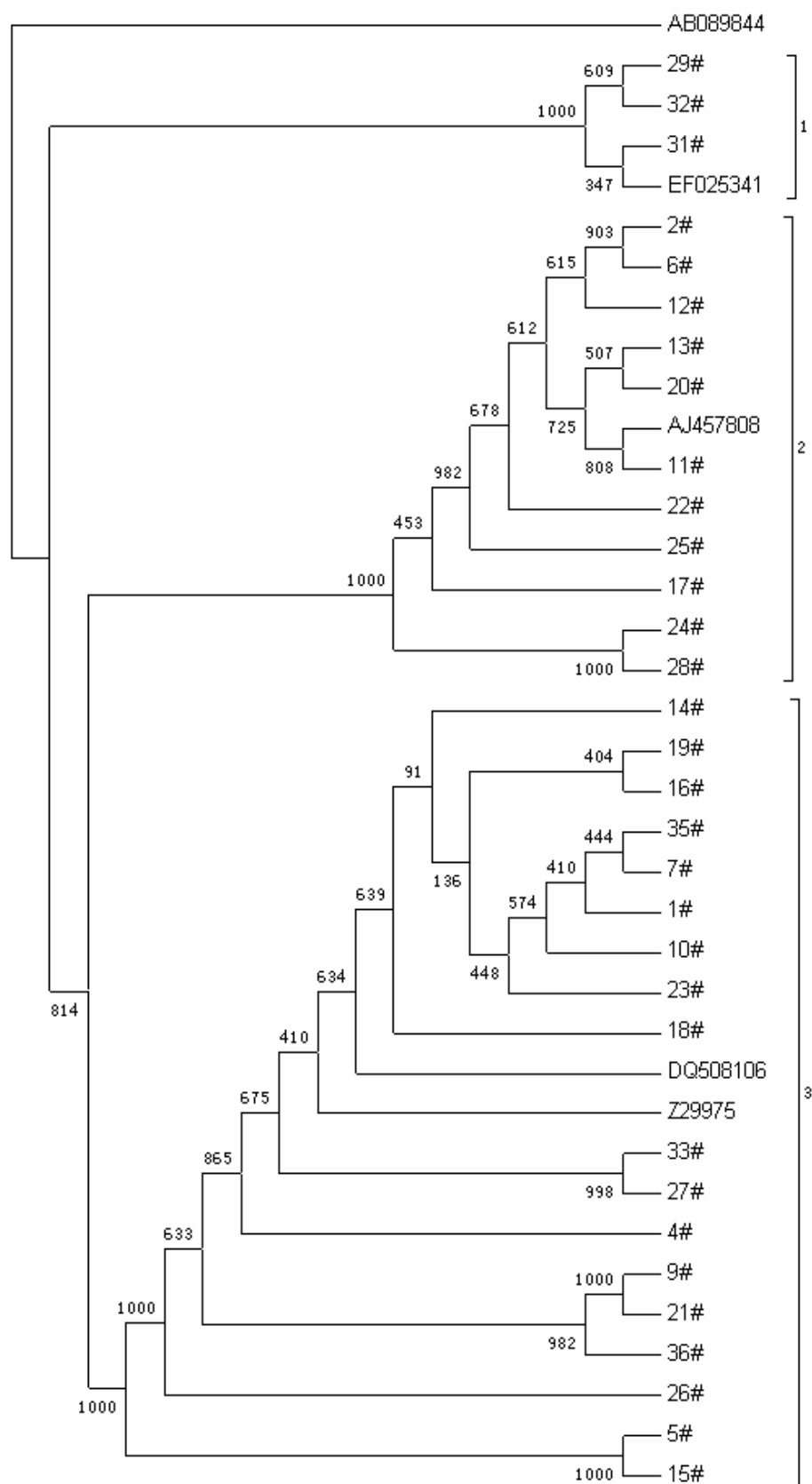


图 5-1 CK、CKCu、BCu、BZn 培养液中混合微生物 16S rDNA 的系统发育树

表 5-1 CK、CKCu、BCu、BZn 样品 OTU 分布

	第 1 组			第 2 组												第 3 组																		总数
编号	29	31	32	2	6	11	12	13	17	20	22	24	25	28	1	4	5	7	9	10	14	15	16	18	19	21	23	26	27	33	35	36	32	
CK 数	1	1	1	1	1	1	1	19	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	76	
%	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	23	1.2	4.9	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	28	2.4	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	100	
CKCu 数	1	3	26											5	4														8	15	2	3	67	
%	1.5	4.5	38											7.5	6.0														12	22	3.0	4.5	100	
BCu 数				11							1	1	1		38										1	1	1						55	
%				20							1.8	1.8	1.8		69										1.8	1.8	1.8						100	
BZn 数				24	2	2	1								47	2	1	1	1	1													82	
%				29	2.4	2.4	1.2								57	2.4	1.2	1.2	1.2	1.2													100	

注：编号是各 OTU 编号，表中数字是各 OTU 数量，%是各类 OTU 在总数中的百分比。

5.2.2.1 诱变前混合微生物的群落分析

从诱变前的混合微生物的 9K 培养物中检测到 32 个 OTU, 各 OTU 丰度见图 5-2; 而从 9K 培养基加黄铜矿精矿培养基的培养物中检测到 9 个 OTU, 各 OTU 丰度见图 5-3。

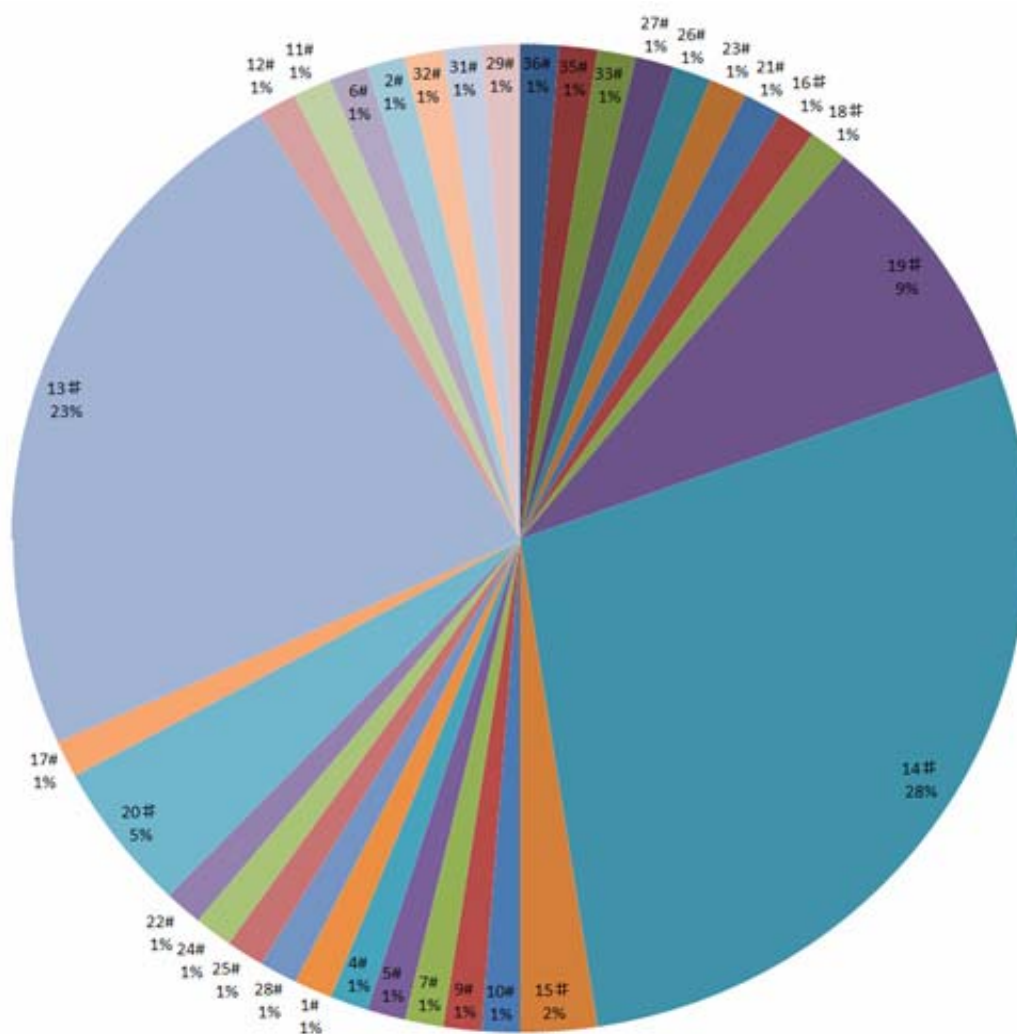


图 5-2 诱变前混合微生物在 9K 培养基中生长菌群分布

结果说明诱变前混合微生物在添加黄铜矿精矿的环境压力下, 经过长时间驯化培养, 群落中生长最多的菌株 32[#] (嗜铁钩端螺旋菌, 占总数 29%)、33[#] (嗜铁钩端螺旋菌, 占总数 22%), 与未经黄铜矿精矿驯化培养时生长最多的 13[#] (嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 占总数 23%)、14[#] (嗜铁钩端螺旋菌, 占总数 28%) 不相同。

诱变前混合微生物经过长期黄铜矿驯化培养后, 丰度最大的微生物种群与一直用 9K 培养基培养的种群完全不同, 这与前人的研究结果一致—驯化培养可以提高微生物浸矿能力^[31~35], 我们从微生物种群结构给予了解释。

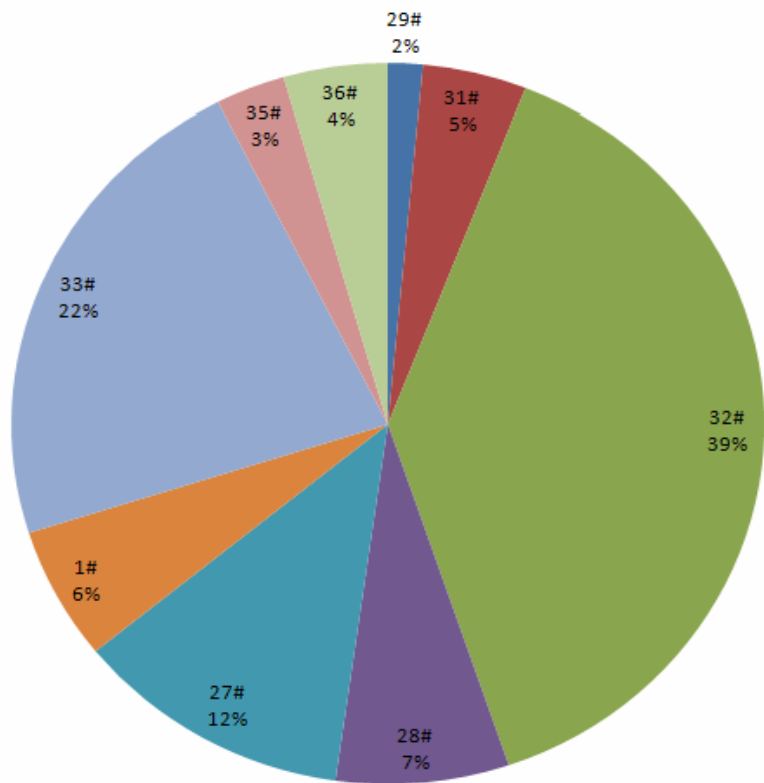


图 5-3 诱变前混合微生物在铜矿培养基中生长菌群分布

诱变前混合微生物，经过不同条件下的长时间培养，其中生长的微生物种类最大的区别是，诱变前混合微生物在 9K 培养基中有 42%的 *A. f* 菌，只有少量的嗜铁钩端螺旋菌（4%），而在黄铜矿的选择压力下，嗜铁钩端螺旋菌占 45%，而 *A. f* 菌仅仅占 7%（图 5-4，图 5-5）。

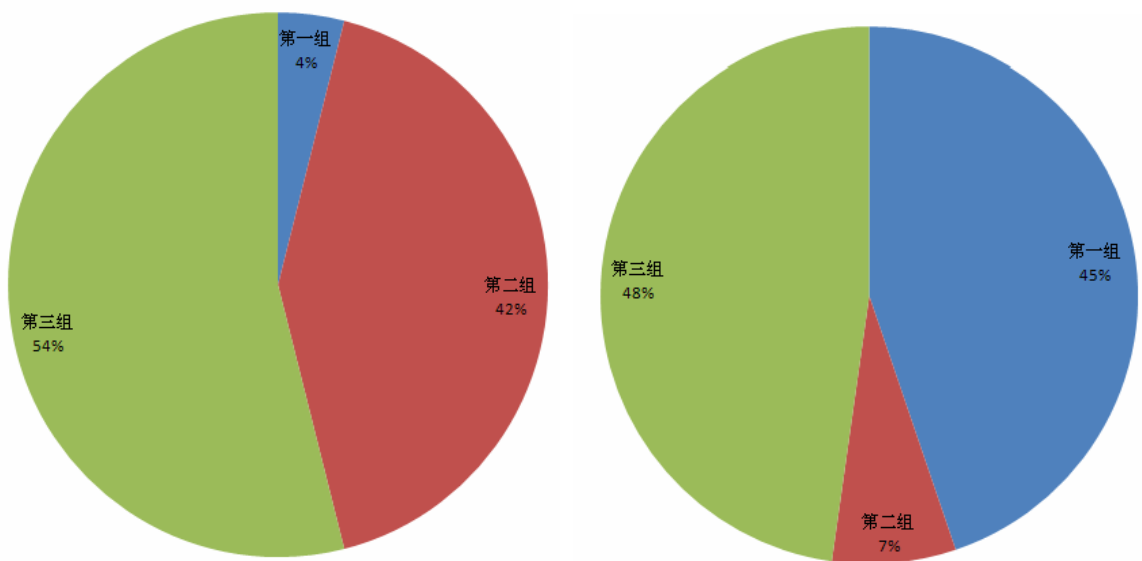


图 5-4 诱变前混合微生物在 9K 培养基中生长菌群分布 5-5 诱变前混合微生物在黄铜矿培养基中生长菌群分布

注：第一组 *Leptospirillum ferriphilum*，第二组 *A. ferrooxidans*，第三组 *Acidithiobacillus thiooxidans*

微生物群落分析结果显示，诱变前混合微生物在 30℃ 人工培养条件下，最适生长温度 40℃ 的嗜铁钩端螺旋菌只有少量生长；但加入黄铜矿时，嗜铁钩端螺旋菌却大量生长。

5. 2. 2. 2 诱变后混合微生物在有黄铜矿的培养条件下的群落分析

在 9K 加黄铜矿的培养基中培养后，诱变后混合微生物的微生物组成图 5- 6，具体菌株群落结构分布图 5-7，从图中可以看出，其中 1[#]和 2[#]菌株各占 69%和 20%，说明该条件下这 2 个菌株起到重要作用。

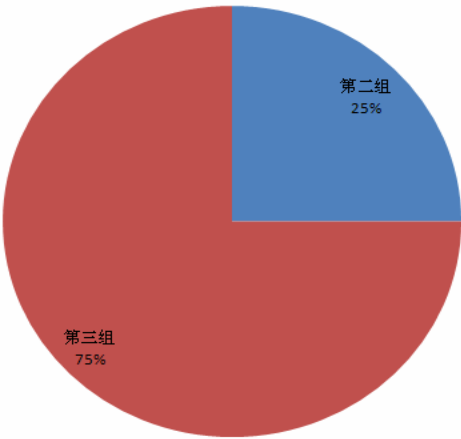


图 5-6 诱变后混合微生物在黄铜矿培养基中的菌群分布
第二组 *A. ferrooxidans*，第三组 *Acidithiobacillus thiooxidans*

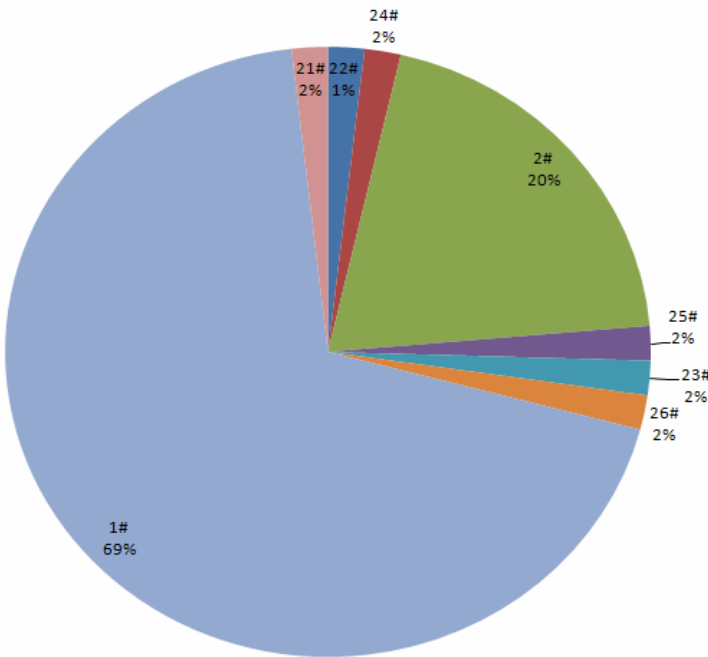


图 5-7 诱变后混合微生物在铜矿培养基中生长菌群分布

由第 3 章实验结果可知,在黄铜矿矿浆浓度 20%条件时,诱变后混合微生物浸出铜离子浓度较对照提高一倍以上。从诱变前后的群落结构可以知道,它们最大的区别是:第 2 组的嗜酸氧化亚铁硫杆菌群落结构变化相对较小,由诱变前的 7%上升到诱变后的 25%,比例上升 18%;但是 OTU 由 28[#]一个变为 4 个:22[#]、24[#]、25[#]、2[#],它们在第 2 组中占有比例见图 5-8。由图可知,诱变后第二组菌主要由 2[#]菌株组成,占第二组菌株的 79%,在微生物浸矿时起到重要的作用。这可能是诱变前后微生物浸矿效果相差显著的主要原因。

2[#]OTU 在诱变前黄铜矿培养基中生长较少,但诱变使它能够在黄铜矿培养基中大量生长。

第 3 组为嗜酸氧化硫硫杆菌和喜温硫杆菌,在微生物群落结构中由诱变前的 48%上升到诱变后的 75%,比例上升 27%,变化较大;OTU 由 5 个(1[#]、27[#]、33[#]、35[#]、36[#])变为 4 个(1[#]、21[#]、23[#]、26[#])。诱变前后混合微生物的黄铜矿精矿培养物中,第 3 组微生物的生态分布见图 5-9, 5-10。

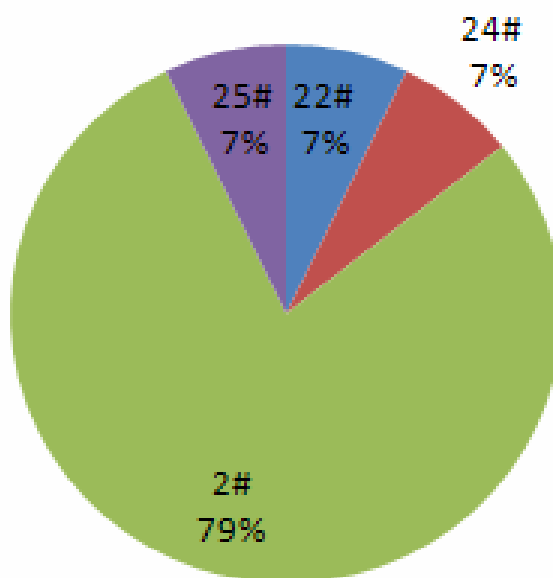


图 5-8 诱变后混合微生物在黄铜矿培养基中生长时第 2 组菌群（嗜酸氧化亚铁硫杆菌）各菌株分布

1[#]OTU 在诱变前的黄铜矿精矿培养物中数量很少,仅仅 4 个(占总数的 6%);而诱变后的培养物中却发现了 38 个 OTU(占总数的 69%)。由图 5-9 和图 5-10 可知,诱变前后 1[#]OTU 在第三组中占有比例由 13%升高到 93%,可能是诱变前后浸矿能力大大提高的主要原因。

第一组嗜铁钩端螺旋菌菌群群落结构由诱变前的 45%降低到 0,变化最大。可能是通过诱变剂的处理和短时间的第一次培养而丢失;或者该菌株生长量太少,这次试验没有检测到该类菌的 OTU。

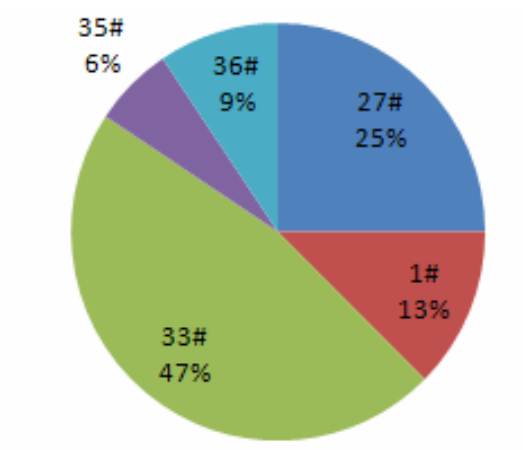


图 5-9 诱变前第 3 组菌生态分布

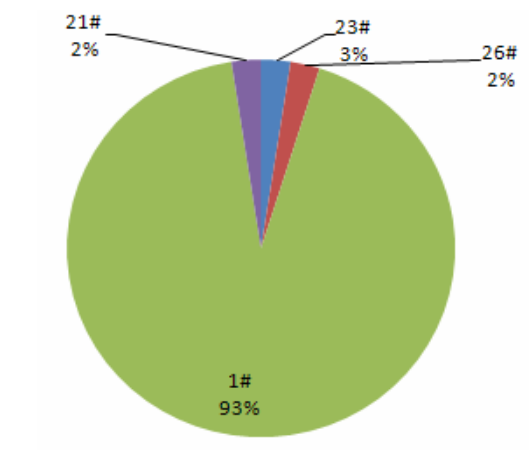


图 5-10 诱变后第 3 组菌生态分布

5.2.2.3 诱变后混合微生物在有闪锌矿的培养条件下的群落分析

诱变后混合微生物在闪锌矿培养基中培养，其中第 2 组和第 3 组微生物分布情况见图 5-11，总 OTU 及其丰度见图 5-12。

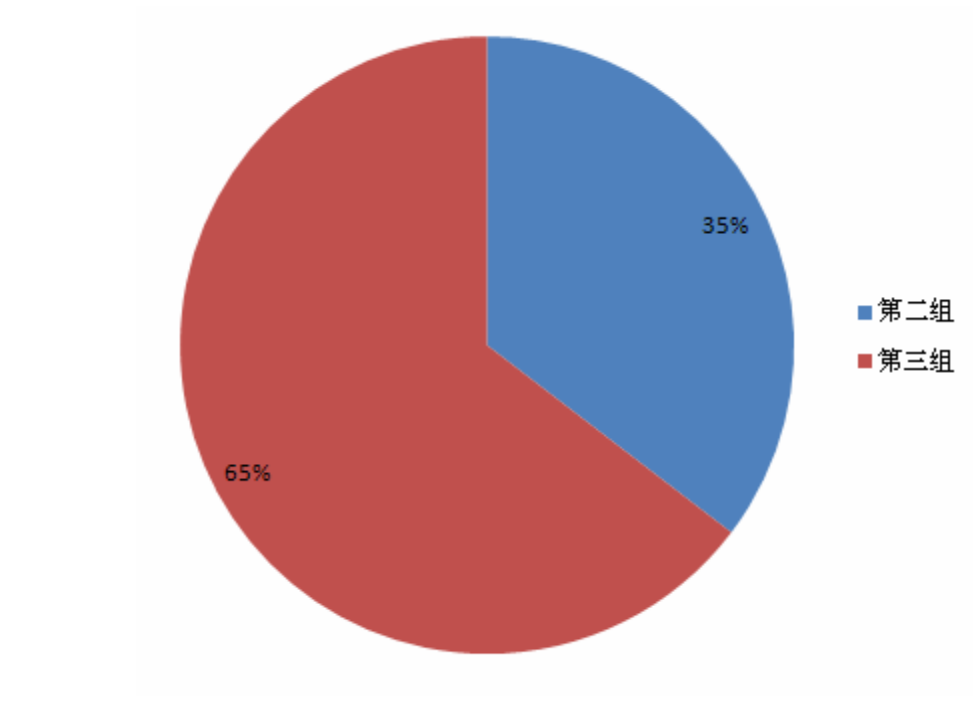


图 5-11 诱变后混合微生物在闪锌矿培养基中生长菌群分组情况
注：第二组 *A. ferrooxidans*，第三组 *Acidithiobacillus thiooxidans*

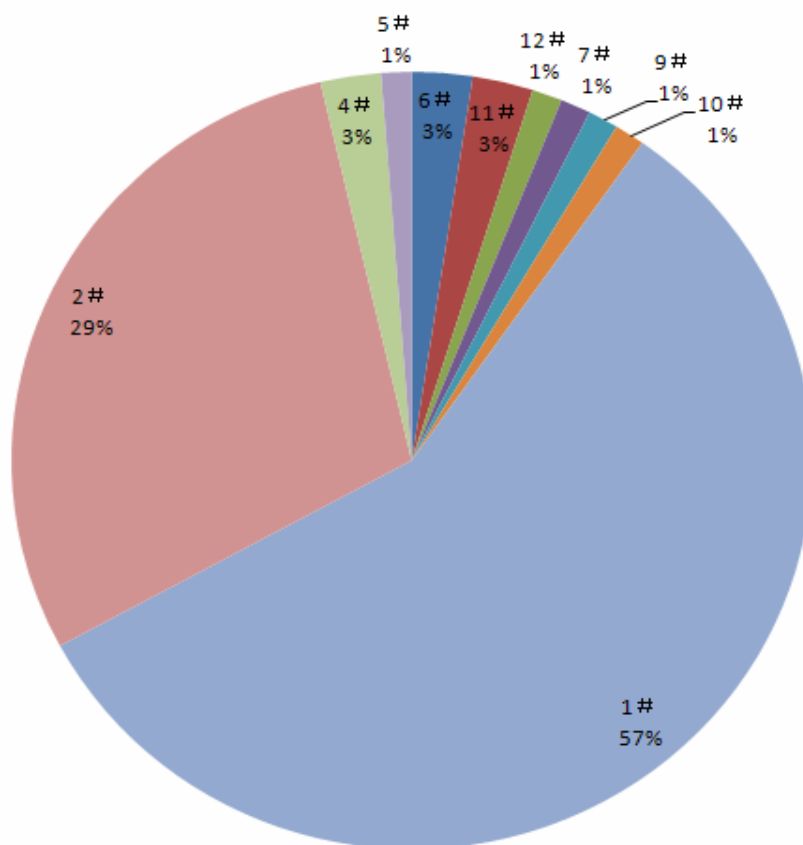


图 5-12 诱变后混合微生物在锌矿培养基中生长菌群分布

通过对比诱变前后混合微生物的组成,发现最大的变化是,在诱变后的培养物中没有第 1 组微生物(嗜铁钩端螺旋菌 *Leptospirillum ferriphilum*)。

上述实验结果提示,诱变实验选育出的混合微生物之所以浸矿性能高,可能是由于诱变后第 2 组的 2[#]菌株、第 3 组中 1[#]菌株大量生长及其组合优势,这与在黄铜矿精矿培养基中的结果一致。

5.3 结 论

比较了 CK、CKCu、BCu、BZn 四个不同样品中微生物菌落的多样性。结果表明,四个样品中微生物群落结构可以分为嗜铁钩端螺旋菌组、嗜酸氧化亚铁硫杆菌组和嗜酸氧化硫硫杆菌和喜温硫杆菌共三大组。

尽管随着培养条件的改变,样品中微生物的群落结构存在一定的变化,但在本实验条件下,微生物浸出体系中最主要的优势菌种仍然是嗜酸氧化亚铁硫杆菌和嗜酸氧化硫硫杆菌。这种结果与前人的报道是一致的^[31~35]。

1[#]和 2[#]菌株在诱变前生长量很少,诱变处理导致微生物群落发生了改变,两

者在黄铜矿精矿的培养物中，分别占整个 OTU 的 69%和 20%，在发酵时起到主要的作用，对浸出铜能力提高贡献最大；在闪锌矿培养基中生长时，分别占整个 OTU 的 59%和 29%，在发酵时起到主要的作用，对浸出锌能力提高贡献最大。

5.4 本章小节

从微生物群落结构分析可知，诱变前后混合微生物在不同环境条件下生长的微生物群落结构不同，1[#] (*Acidithiobacillus thiooxidans*) 和 2[#] (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 菌株是诱变后生长量最大的菌株，它们在微生物浸矿中可能起重要的作用。

第六章 *Leptospirillum ferriphilum* 的分离纯化

在微生物浸矿的不同环境中,已经分离到数十种微生物,分别属于嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、嗜酸氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)、金属球菌(*Metallosphaera*)、氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)、嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)、极端嗜酸性喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)、固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)、嗜酸异养菌(*Acidiphilium*)、亚铁原生质菌(*Ferroplasma*)、嗜热硫化叶菌属(*Sulfolobus acidocaldarius*)、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*、硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus*)、氧化铁杆菌(*Ferrobacillus ferrooxidans*)、高温嗜酸古细菌(*Thermoacidophilic archaeobacteria*)等。最近研究较多的是高温菌和螺旋菌,它们在浸矿中可能具有重要的作用。

在40℃以下培养温度时,*Acidithiobacillus ferrooxidans*起到非常重要的作用。但是,当溶液pH值较低或 Fe^{3+} 浓度增大时,*Leptospirillum ferriphilum*渐渐起到非常重要的作用^[159-162]。在铜矿堆浸时,pH=0.7的极酸条件下,*L. ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*可能是优势菌群^[162]。

混合微生物群落分布结果显示,在混合微生物中有嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)存在。本章的主要任务是采用9K培养基分离该菌株,并对其进行特性研究。

6.1 材料与方法

6.1.1 菌种和培养基

6.1.1.1 菌种来源:

诱变前混合微生物。

6.1.1.2 培养基

9K 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g; KCl 0.1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; K_2HPO_4 0.5g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g; pH 1.5; 定容 1000 ml; 121.3 °C, 20 min 灭菌。加入硫酸亚铁 80 g/L。

6.1.2 *L. ferriphilum* 的培养及纯化

100 ml 三角瓶中, 加入 10 倍浓度的 9K 培养基 5 ml, 定容至 50 ml。

第一次培养时, 接入混合菌种 5 ml (接种量 10%), 定容至 50 ml, 于 40℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养;

第二次培养用第一次培养液 (稀释梯度最高) 进行梯度稀释, 分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 浓度的稀释液 1 ml, 定容至 50 ml, 于 40℃、170 rpm 条件下恒温培养。

第三次培养用第二次的培养液 (稀释梯度最高) 进行梯度稀释, 分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 浓度的稀释液 1ml, 定容 50 ml, 于 40℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养。(取稀释度最高的培养物显微观察, 若菌种纯度不高, 重复第二、第三步骤)

取第三次培养的菌悬液 10 000 rpm 离心 20 min。收集菌体, 用 pH1.8 的硫酸溶液洗涤、离心 3 次。菌株命名为 K40。

6.1.3 *L. ferriphilum* 的生理生化性质

6.1.3.1 最适生长温度的测定

纯化的K40菌株, 用9K培养基液体培养 (接种量1%), 分别置于20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃ 7个温度梯度条件下, 170 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数, 测定K40在不同温度下的生长状况。

6.1.3.2 最适起始pH的测定

分别接种K40菌株 (接种量1%) 到pH 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5的9K培养基中, 40℃、170 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数, 测定K40在不同起始pH条件下的生长状况。

6.1.3.3 生长曲线的测定:

用K40菌株 (接种量1%) 接种到9K液体培养基中, 在pH 1.5、40℃、条件下 170 rpm 恒温摇床培养, 每隔12 h用血球计数板计数, 绘制生长曲线。

6.1.4 DNA 提取

离心收集的菌体细胞用 pH=1.2 的硫酸洗涤几次, 以去掉三价铁离子沉淀。然后, 用基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工) 提取 DNA。具体操作步骤按照 5.1 进行。

6.1.5 16S rDNA 的扩增、序列测定和系统发育分析

K40 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用通用引物:27f (5'-CAGAGTTTGA TCGTGGCTCAG -3') 和 1506f (5'-CGGGTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液, 5.0 μ L; Mg^{2+} (25 mmol/L), 3.0 μ L; dNTP(各 5 mmol/L), 2.0 μ L; 引物(20 μ mol/L)各 1.0 μ L; Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L, MBI), 1.0 μ L; 模板 2.0 μ L 约 20 ng; 去离子水 35 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后, 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 52 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1.0 min; 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 Omega 公司生产的 E.Z.N.ATM 凝胶回收试剂盒纯化; 纯化的 PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TA 克隆试剂盒克隆, 其载体为 pCR[@]2.1。

克隆产物的测序工作交由北京三博生物技术有限公司完成。

6.2 结果与分析

6.2.1 *L. ferriphilum* 的分离

从 40 $^{\circ}$ C 条件下分离了一株嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*), 命名为 K40, 菌体透射电镜照片如图 6-1, 可以清晰地看到荚膜。形态学结果表明, 该菌株属于钩端螺旋菌属的成员。

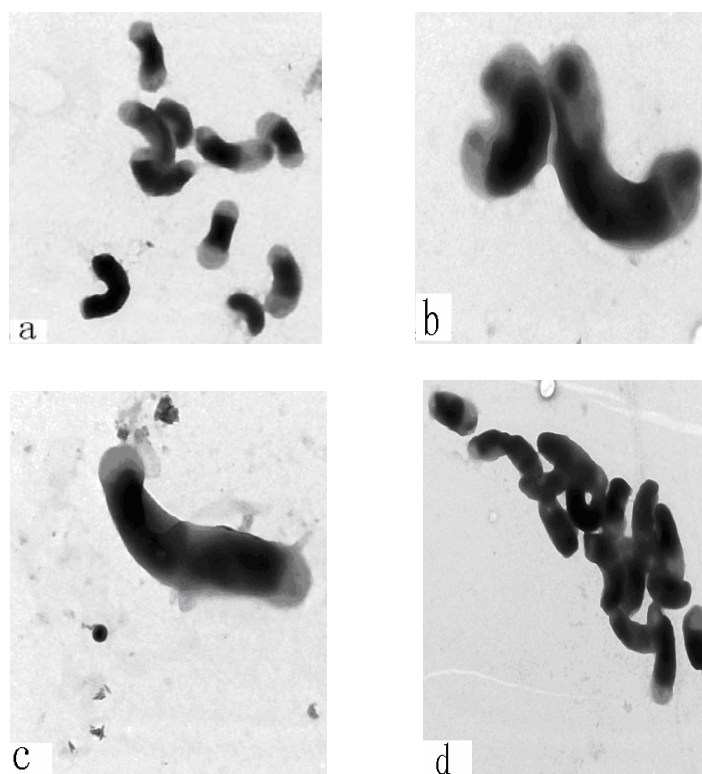


图 6-1 40 $^{\circ}$ C 条件下培养的嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)透射电镜照片

6.2.2 *L. ferriphilum* 的最适生长温度

图 6-2 是 K40 在不同温度 (20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃) 下、9K 培养基中培养的最大生长量变化, 表明 K40 菌株的最适生长温度为 40℃; 在 35℃、45℃ 生长良好; 在 30℃ 生长缓慢; 在 50℃、25℃ 条件下基本不生长。

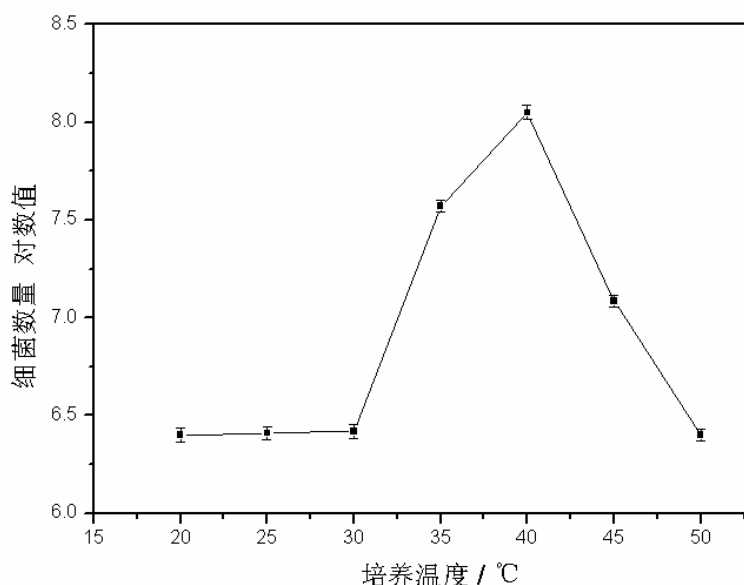


图 6-2 K40 菌在不同温度条件下的最大生长量

6.2.3 *L. ferriphilum* 的最适起始 pH

图 6-3 是 K40 在起始 pH 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 的 9K 培养基中的最大生长量变化, 表明 K40 菌在起始 pH1.5 时生长最好; 起始 pH1.0、2.0 时生长良好; 起始 pH0.5、3.5 时生长最差。

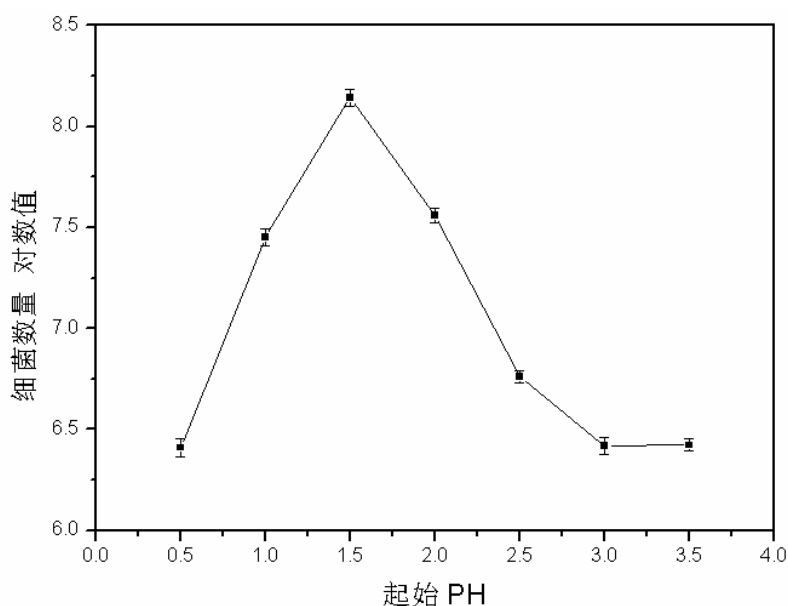


图 6-3 K40 菌在不同起始 pH 条件下的最大生长量

6.2.4 *L. ferriphilum* 的生长曲线

在起始 pH1.5 和 40℃ 条件下, K40 菌在 9K 培养基中的生长曲线如图 6-4。0-60 h 是延迟期、72-108 h 是对数生长期、108-172 h 是稳定期、172 h 以后是衰亡期。

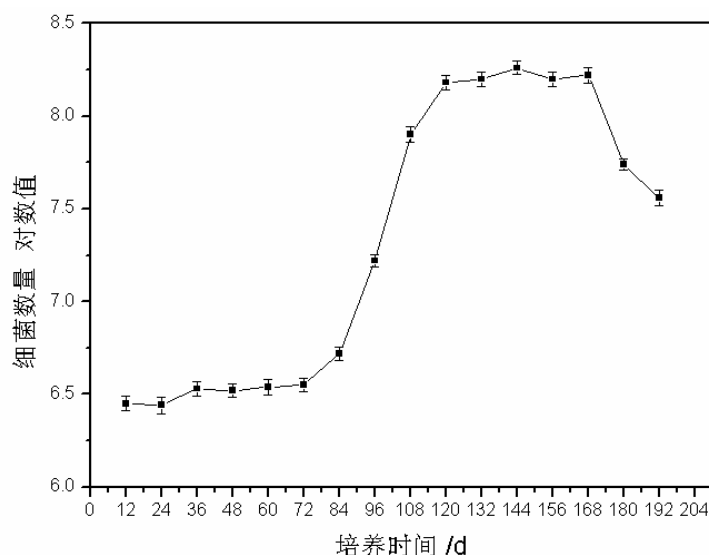


图 6-4 K40 菌在 9K 培养基中的生长曲线

6.2.5 *L. ferriphilum* 的 16S rDNA 系统发育分析

K40 菌株的 16S rDNA 的碱基序列数据, 在 GenBank, EMBL, 和 DDBJ 核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLASTn), 以比较供试菌株与已知钩端螺旋菌属其他成员相应序列的相似程度。为显示供试菌株与已知钩端螺旋菌的亲缘关系及其系统地位, 根据同源序列搜索结果, 下载相关钩端螺旋菌的 16S rDNA 序列, 与供试菌株的序列一起, 用 Clustal X 软件进行匹配排列, 然后用 Neighbor-Joining 分析方法进行分子系统学分析, 用 TreeView 软件显示系统树。在本研究中, 由于钩端螺旋菌属在分类地位上属于硝化螺旋菌纲(Nitrospira), 因而, 将 Nitrospira moscoviensis 当作外类群(进行分支分类研究时, 首先需要确定外类群。所谓外类群是指为了探知内类群一指被研究的对象一的演化关系而借助比较的外部类群, 它与内类群在演化关系上是最为接近的类群, 具有最相近的祖先, 且在进化程度上低于内类群)。系统发育树表明(图 6-5), 该菌株与 *Leptospirillum ferriphilum* 在分类地位上相似, 特别是与 BY 菌株相似度高达 99.5%。这表明该菌株应该是属于 *Leptospirillum* 属的 *Leptospirillum ferriphilum* 种。

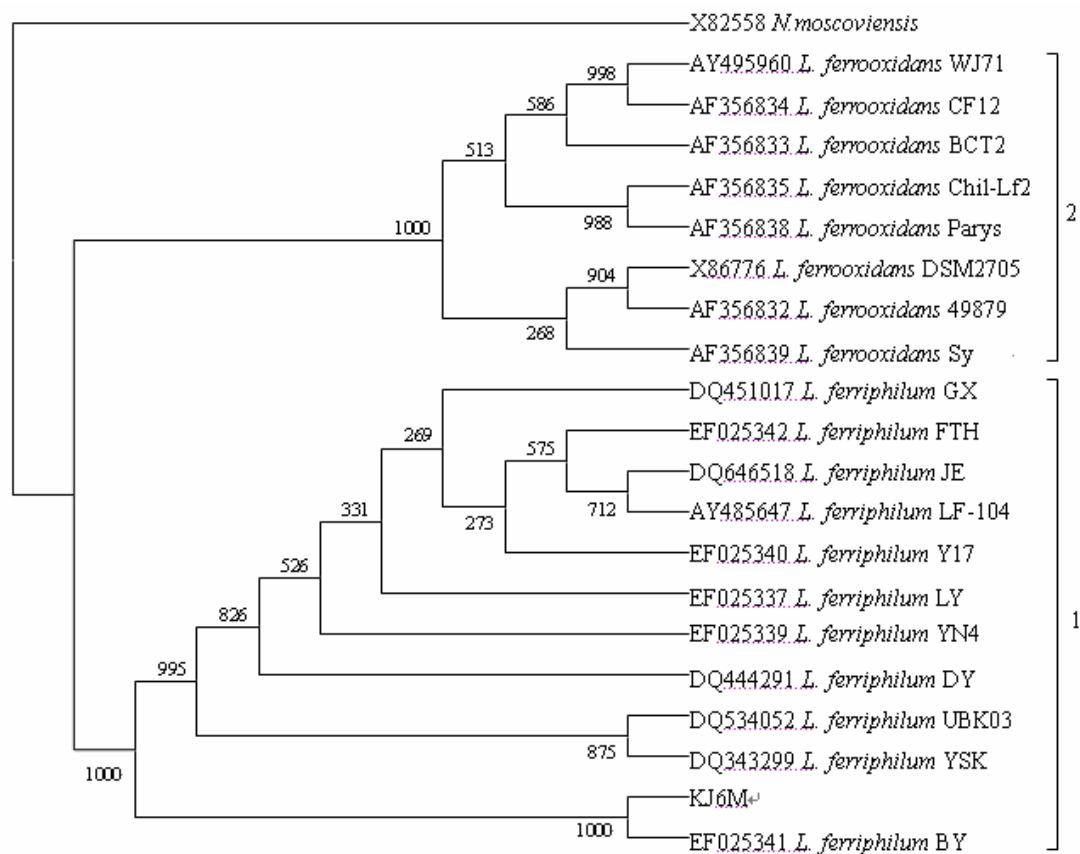


图 6-5 K40 菌株的系统发育树

6.3 结 论

从各地收集的混合微生物中分离出一株钩端螺旋菌属的嗜铁钩端螺旋菌 (*Leptospirillum ferriphilum*), 被命名为 K40。它的最适生长温度是 40℃, 最适生长 pH 为 1.5。

第七章 *Acidithiobacillus caldus* 的分离纯化

微生物冶金过程中,在温度 40-45℃ 条件下,极端嗜酸性喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*) 很可能是占统治地位的菌群^[99,163]。

第五章混合微生物群落分布结果表明,诱变前后混合微生物中均有极端嗜酸性喜温硫杆菌 (*Acidithiobacillus caldus*) 的存在。它们的 16S rDNA 的碱基序列与标准菌株 Z29975 *T.caldus* DSM 8584 的相似。

本章主要尝试分离该菌种,并对其进行初步的鉴定。

7.1 材料与方法

7.1.1 菌种和培养基

7.1.1.1 菌种来源:

诱变前混合微生物。

7.1.1.2 培养基

ATCC 培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4 g; K_2HPO_4 0.2 g; KCl 0.1g; yeast extract 0.25 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg pH 2.0; 定容至 1000 mL。过滤除菌。

7.1.2 *Acidithiobacillus caldus* 的培养及纯化

100 mL 三角瓶中,加入 10 倍浓度的 ATCC 培养基 5 mL,定容至 50 mL。

第一次培养时,接入混合菌种 5 mL (接种量 10%),定容至 50 mL,于 45℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养;

第二次培养用第一次培养液(稀释梯度最高)进行梯度稀释,分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 浓度的稀释液 1 mL,定容至 50 mL,于 45℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养。

第三次培养用第二次培养液(稀释梯度最高)进行梯度稀释,分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 浓度的稀释液 1mL,定容 50 ml,于 45℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养。(取稀释度最高的培养物显微观察,若菌种纯度不高,重复第二、第三步骤)

取第三次培养好的菌悬液(纯种,命名为 K45),10 000 rpm 离心 20 min。

收集菌体，用 pH1.8 的硫酸溶液洗涤、离心 3 次。菌株命名为 K45。

7.1.3 *Acidithiobacillus caldus* 的生理生化性质

7.1.3.1 最适生长温度的测定：

纯化的K45菌株，用ATCC培养基液体培养（接种量1%），分别置于30℃、35℃、40℃、45℃、50℃和55℃ 5个温度梯度条件下，160 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定分离的微生物在不同温度下的生长状况。

7.1.3.2 最适起始pH的测定：

分别接种K45菌株（接种量1%）到pH 0.8、1.3、1.8、2.3、2.8和3.3 的ATCC培养基中，45℃、160 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定微生物在不同起始pH条件下的生长状况。

7.1.3.3 生长曲线的测定

用K45菌株（接种量1%）接种到ATCC液体培养基中，在pH 1.8、45℃、条件下 160 rpm 恒温摇床培养，每隔4 h用血球计数板计数，绘制生长曲线。

7.1.4 DNA 提取

离心收集的菌体细胞用 pH=1.2 的硫酸洗涤几次，以去掉三价铁离子沉淀。然后，用基因组 DNA 抽提试剂盒（上海生工）提取 DNA。具体操作步骤见 5.1。

7.1.5 16S rRNA 基因的扩增、序列测定和系统发育分析

K45 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用通用引物:27f (5'-CAGAGTTTGA TCGTGGCTCAG -3') 和 1506f (5'-CGGGTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液, 5.0 μ L; Mg^{2+} (25 mmol/L), 3.0 μ L; dNTP(各 5 mmol/L), 2.0 μ L; 引物(20 μ mol/L)各 1.0 μ L; Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L, MBI), 1.0 μ L; 模板 2.0 μ L 约 20 ng; 去离子水 35 μ L。扩增程序为: 94℃预变性 3 min, 然后, 94℃, 30 s; 52℃, 30 s; 72℃, 1.0 min; 30 个循环后 72℃ 10 min。PCR 产物用 Omega 公司生产的 E.Z.N.ATM 凝胶回收试剂盒纯化; 纯化的 PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TA 克隆试剂盒克隆, 其载体为 pCR[@]2.1。上述具体操作均参照说明书进行。

克隆产物的测序工作交由北京三博生物技术有限公司完成。

7.2 结果与分析

7.2.1 *Acidithiobacillus caldus* 的分离

透射电镜照片（图 7-1）表明，分离到的菌株形态为杆状，有时成连生状态。形态学表明，该菌株可能属于硫杆菌属的成员。

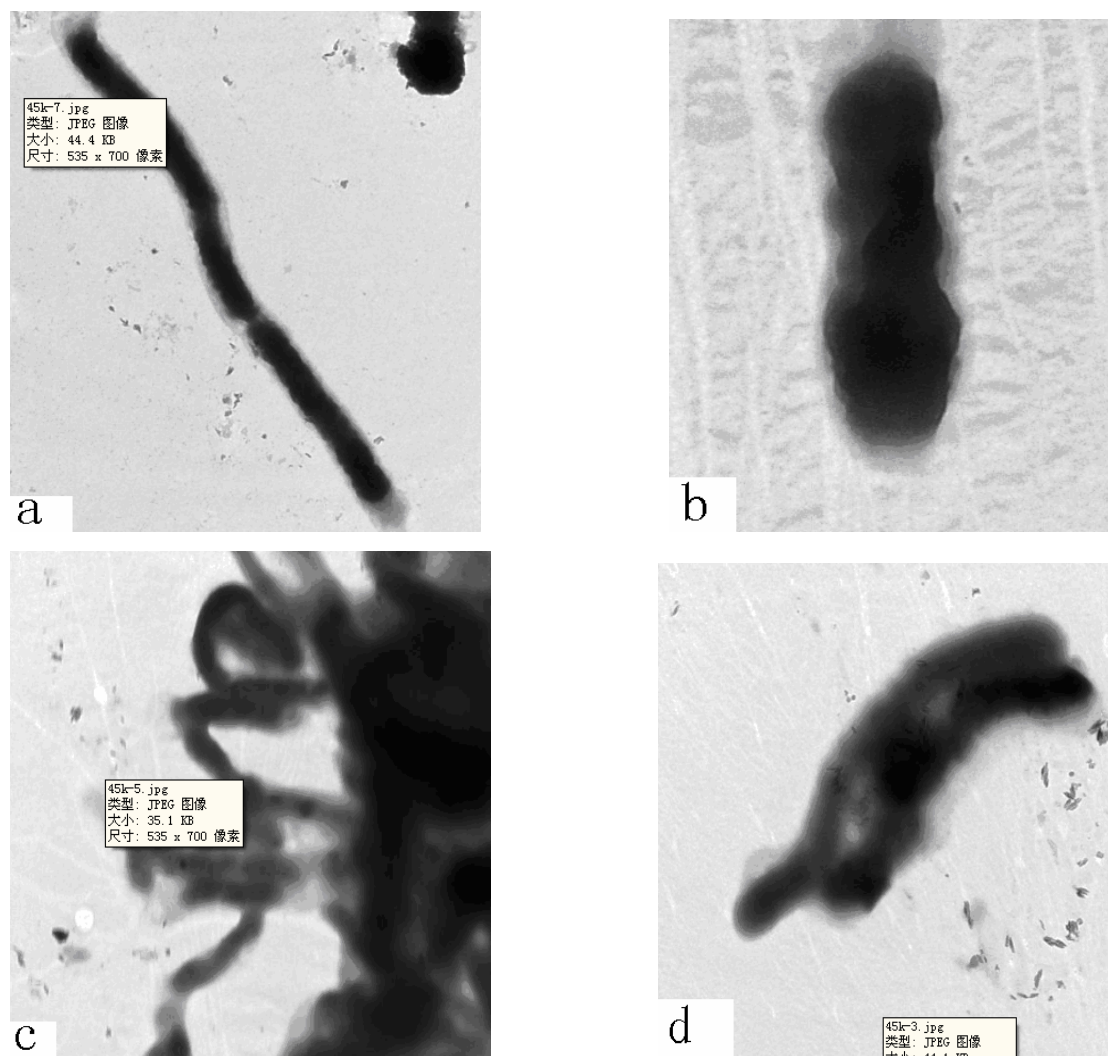


图 7-1 45℃条件下培养的微生物透射电镜照片

7.2.2 *Acidithiobacillus caldus* 的最适生长温度

K45 菌株用 ATCC 培养基分别置于 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃ 5 个温度梯度，160rpm 恒温摇床培养，测定它们的最大生长量，结果表明该菌最适生长温度为 45℃（图 7-2）。

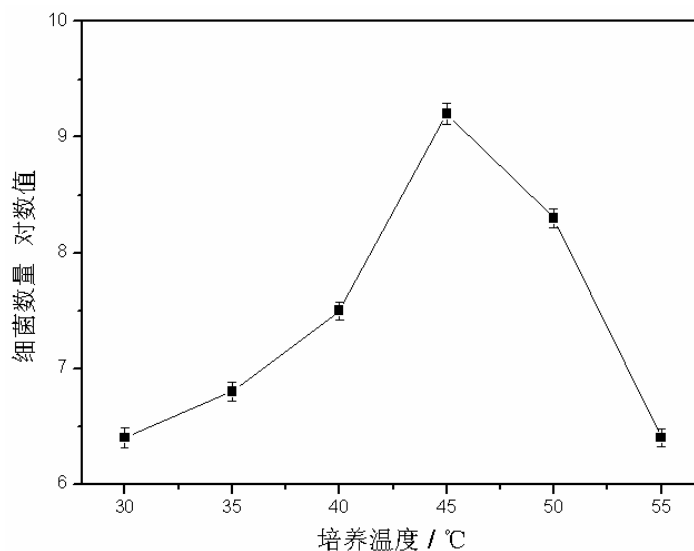


图 7-2 K45 菌在不同温度条件下的最大生长量

7.2.3 *Acidithiobacillus caldus* 的最适起始生长 pH

K45 菌株分别接种到起始 pH 0.8、1.3、1.8、2.3、2.8、3.3 的 ATCC 培养基中，160rpm 恒温摇床培养，测定它们的最大生长量，结果表明该菌最适生长 pH 为 1.8（图 7-3）。。

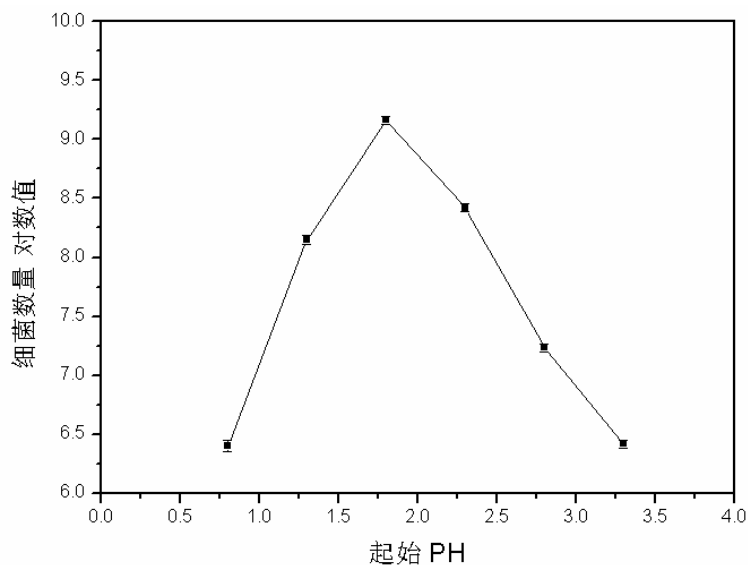


图 7-3 K45 菌在不同起始 pH 条件下的最大生长量

7.2.4 *Acidithiobacillus caldus* 的生长曲线

K45 菌株接种到 ATCC 液体培养基中，45°C 恒温培养，每隔 4 h 用血球计数板计数，绘出其生长曲线（图 7-4）。由图可以看出：K45 菌在 0-60 h 是延迟期、

60-100 h 是对数生长期、100-180 h 是稳定期、180 h 以后是衰亡期。

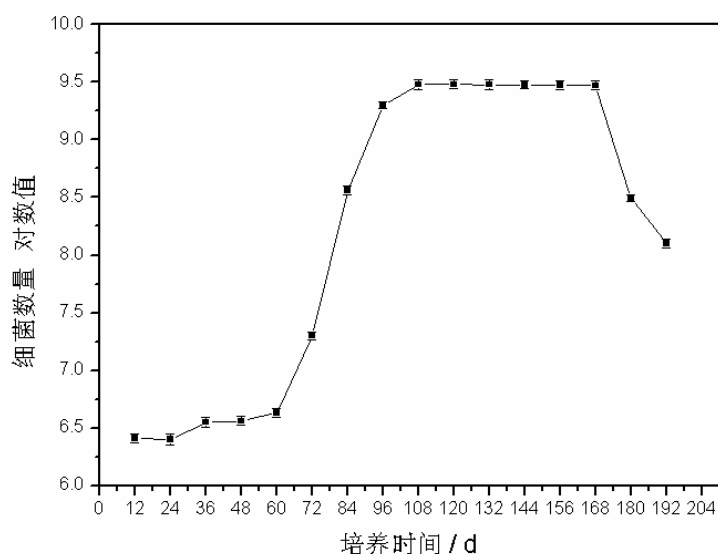


图 7-4 K45 菌的生长曲线

7.2.5 *Acidithiobacillus caldus* 的 16S rDNA 系统发育分析

用 K45 菌株的 16S rDNA 的碱基序列数据, 在 GenBank、EMBL 和 DDBJ 核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLASTn), 以比较供试菌株与已知 *Acidithiobacillus* 属其他成员相应序列的相似程度。为显示供试菌株与已知 *Acidithiobacillus* 属其他成员的亲缘关系及其系统地位, 根据同源序列搜索结果, 下载相关 *Acidithiobacillus* 属其他成员的 16S rDNA 序列, 与供试菌株的序列一起, 用 Clustal X 软件进行匹配排列, 然后用 Neighbor-Joining 分析方法进行分子系统学分析, 用 TreeView 软件显示系统树。在本研究中, K45 菌株的 16S rDNA 的系统发育树表明, 该菌株位于 *Acidithiobacillus caldus* 分支, 与该分支上的 DSM8584 菌株的相似性高达 99% 以上 (图 7-5), 表明它应该属于 *Acidithiobacillus* 属的喜温硫杆菌种。

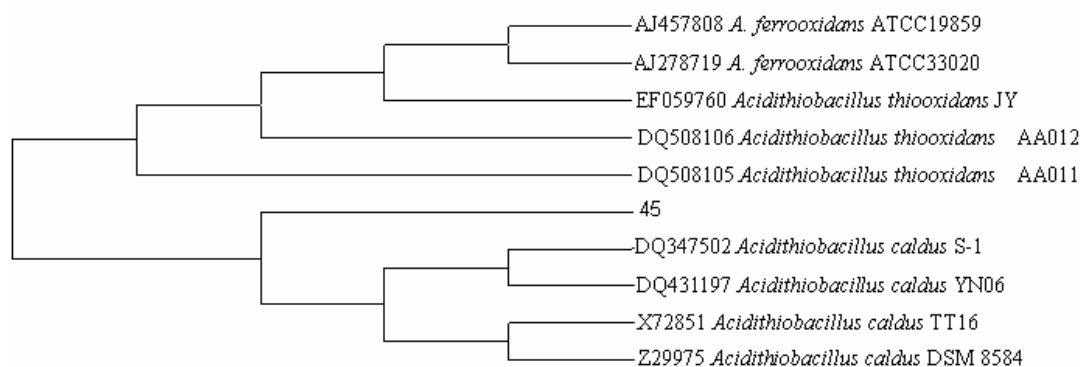


图 7-5 K45 菌株的系统发育树

7.3 本章小结

从各地收集的混合微生物中分离出一株硫杆菌属的菌株 (*Acidithiobacillus caldus*)，命名为 K45。它的最适生长温度为 45℃，最适生长 pH 为 1.8。

第八章 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的分离纯化

在微生物浸矿的不同环境中,已经分离到数十种微生物,它们分别属于氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、氧化亚铁铁杆菌(*Ferrobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)、金属球菌属(*Metallosphaera*)、氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)、嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)、(极端嗜酸性喜温硫杆菌 *Acidithiobacillus caldus*)、固氮氧化亚铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrodiazotrophum*)、嗜酸异养菌(*Acidiphilium*)、亚铁原生质菌(*Ferroplasma*)、嗜热硫化叶菌属(*Sulfolobus acidocaldarius*)、*Sulfobacillus thermosulfidooxidans*、硫化芽孢杆菌(*Sulfobacillus*)、氧化铁杆菌(*Ferrobacillus ferrooxidans*)、高温嗜酸古细菌(*Thermoacidophilic archaeobacteria*)等。最近研究较多的是高温菌和螺旋菌,它们在浸矿中可能具有重要的作用。

混合微生物包括了收集的全部菌株,诱变试验得到较好的浸矿混合微生物。为了研究该混合微生物的细菌组合,采用 F 培养基于 53℃ 培养,试图分离出 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 菌株,实验结果如下:

8.1 材料与方法

8.1.1 菌种和培养基

8.1.1.1 菌种来源

在黄铜矿、闪锌矿中分别生长的诱变混合微生物。

8.1.1.2 培养基

F 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; K_2HPO_4 0.25 g; KCl 0.1 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.01 g; YE 0.2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2-8 g; 或 S^0 10 g; pH 1.8; 定容至 1000 mL。过滤除菌。

8.1.2 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的培养及纯化

100 mL 三角瓶中,加入 10 倍浓度的 F 培养基 5 mL。

第一次培养时,接入混合菌种 5 mL (接种量 10%),定容至 50 mL,于 53℃、185 rpm 条件下恒温摇床培养;

第二次培养用第一次培养液（稀释梯度最高）进行梯度稀释，分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 浓度的稀释液 1 mL，定容至 50 mL，于 53℃、185 rpm 恒温摇床培养。

第三次培养用第二次培养液（稀释梯度最高）进行梯度稀释，分别接种 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 浓度的稀释液 1 mL，定容 50 mL，于 53℃、185 rpm 恒温摇床培养。

（取稀释度最高的培养物，进行显微观察，若菌种纯度不高，重复第二、第三步骤）

第三次培养好的菌悬液，10 000 rpm 离心 20 min。收集菌体，用 pH1.8 的硫酸溶液洗涤、离心 3 次。菌体备用。

8.1.3 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的生理生化性质

8.1.3.1 最适生长温度的测定

K53菌株接种到F培养基中，分别置于43℃、48℃、53℃、58℃和63℃ 5个温度梯度，185 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定分离的微生物在不同温度下生长状况

8.1.3.2 最适起始pH的测定

K53菌株接种到F培养基中，培养基起始pH分别为1.0、1.5、2.0、2.5和3.0，于53℃，185 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定微生物在不同起始pH条件下的生长状况。

8.1.3.3 生长曲线的测定

K53菌株接种到pH 2.5的F液体培养基中，40℃ 185 rpm 恒温培养，每隔2 d用血球计数板计数，绘制K53菌的生长曲线。

8.1.4 DNA 提取

离心收集的菌体细胞用 pH=1.2 的硫酸洗涤几次，以去掉三价铁离子沉淀。然后，用基因组 DNA 抽提试剂盒（上海生工）提取 DNA。具体操作步骤见 5.1。

8.1.5 16SRNA 的扩增、序列测定和系统发育分析

K53 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用通用引物:27f (5'-CAGAGTTTGA TCGTGGCTCAG -3') 和 1506f (5'-CGGGTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 10 $\times$ PCR 缓冲液, 5.0 μ L; Mg^{2+} (25 mmol/L), 3.0 μ L; dNTP(各 5 mmol/L), 2.0 μ L; 引物(20 μ mol/L)各 1.0 μ L; Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L, MBI), 1.0 μ L; 模板 2.0 μ L 约 20 ng; 去离子水 35 μ L。扩增程序为: 94℃预变性 3 min,

然后, 94℃, 30 s; 52℃, 30 s; 72℃, 1.0 min; 30 个循环后 72℃ 10 min。PCR 产物用 Omega 公司生产的 E.Z.N.ATM 凝胶回收试剂盒纯化; 纯化的 PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TA 克隆试剂盒克隆, 其载体为 pCR[@]2.1。上述具体操作均参照说明书进行。

克隆产物的测序工作交由北京三博生物技术有限公司完成。

8.2 结果与分析

8.2.1 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的分离

透射电镜照片 (图 8-1) 表明, 采用本分离方法分离的菌株为杆状, 常连生, 具有荚膜。

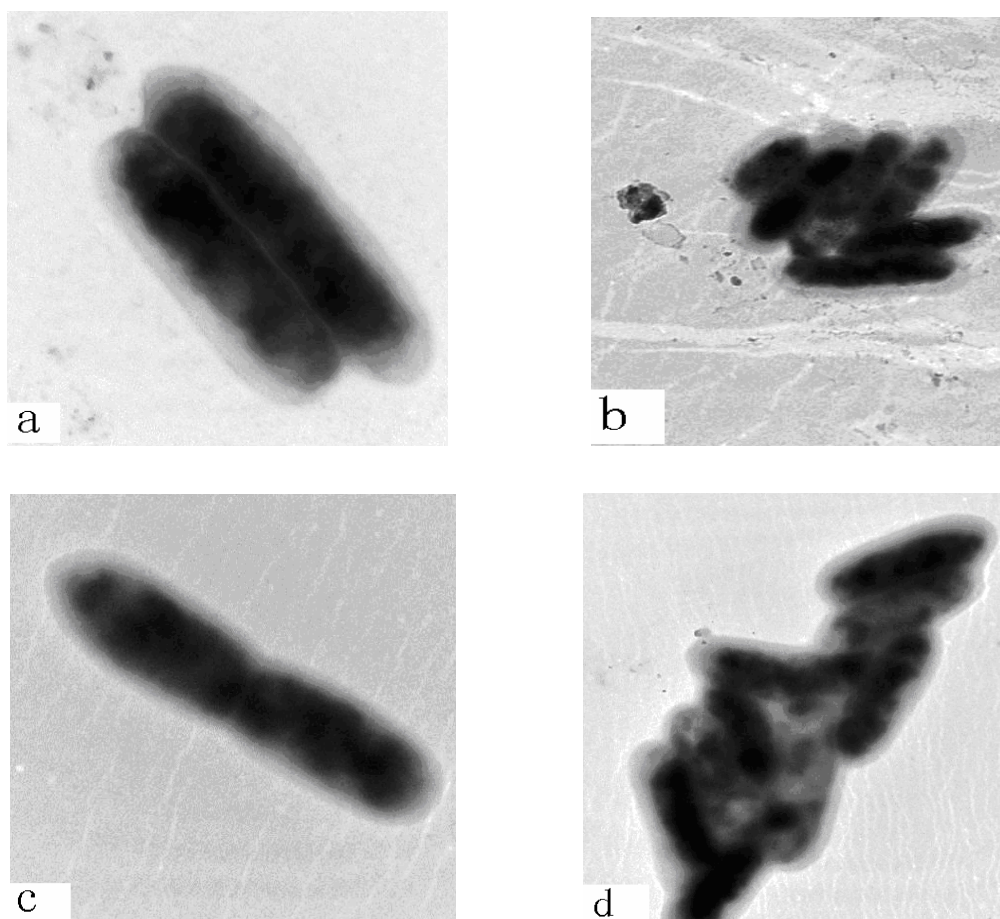


图 8-1 53℃条件下培养的微生物透射电镜照片

8.2.2 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的最适生长温度

K53 菌株用 F 培养基分别置于 38℃、43℃、48℃、53℃、58℃、63℃和 68℃等 7 个温度梯度, 160rpm 恒温摇床培养, 测定它们的最大生长量, 结果表

明该菌最适生长温度是 45℃（图 8-2）。

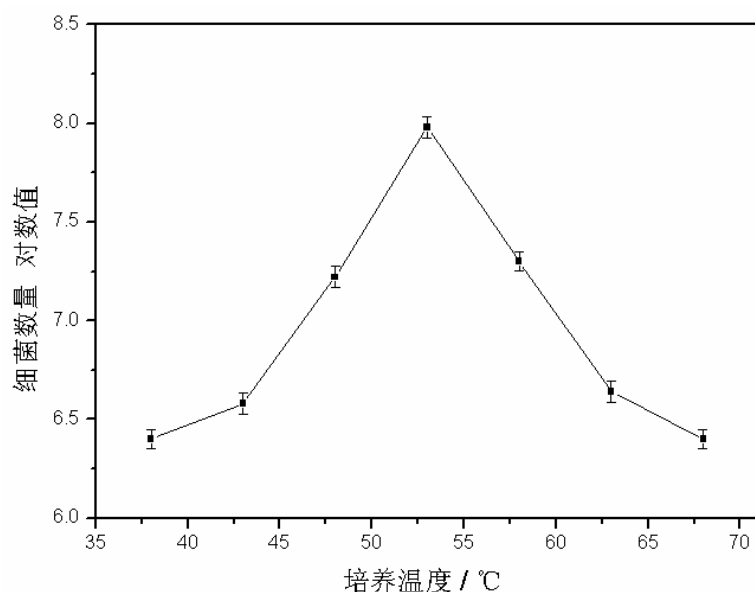


图 8-2 K53 菌在不同温度下的最大生长量

8. 2. 3 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的最适生长 pH

K53 菌株用分别在起始 pH 为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5 的 F 培养基中，于 53℃、160rpm 恒温摇床培养，培养后它们的最大生长量见图 8-3，该菌最适起始 pH 为 2.0℃。

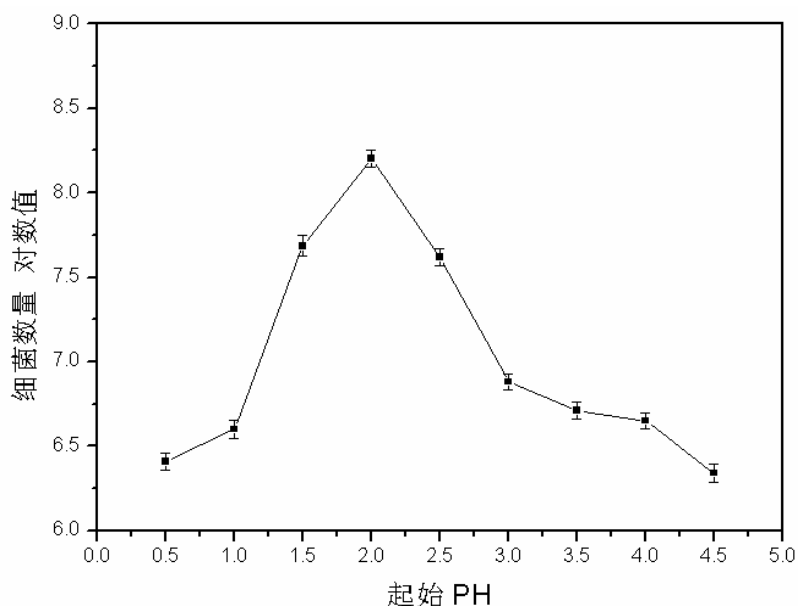


图 8-3 K53 菌在不同初始 pH 条件下的最大生长量

8. 2. 4 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的生长曲线

在起始 pH2.0 温度 53℃ 条件下恒温培养，K53 菌在 F 培养基中的生长曲线。

图 8-4。由图可以看出,K53 菌在 0-48 h 是延迟期、48-108 h 是对数生长奇、108-156 h 是稳定期、156 h 以后是衰亡期。

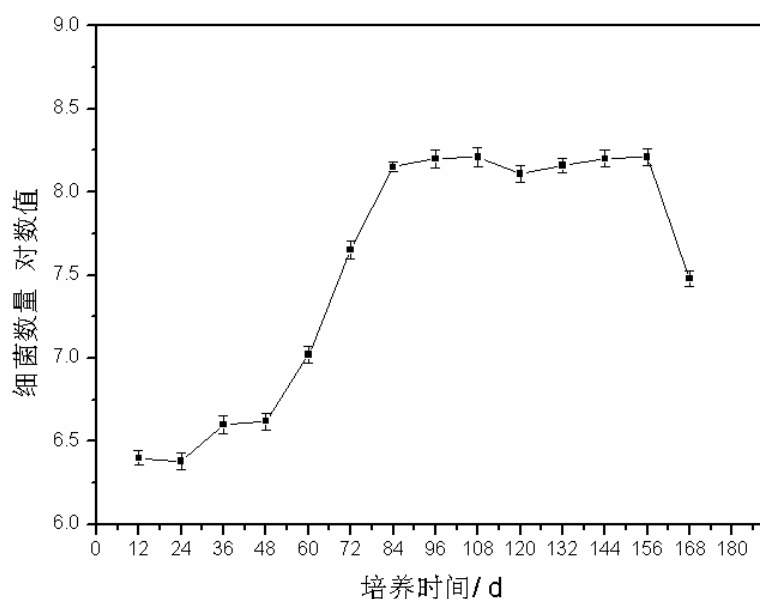


图 8-4 K53 菌的生长曲线

8.2.5 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 的 16S rDNA 的系统发育分析

用 K53 菌株的 16S rDNA 序列数据,在 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLAST search),以比较供试菌株与已知 *Sulfobacillus* 属其他成员相应序列的相似程度。为显示供试菌株与已知 *Sulfobacillus* 属其他成员的亲缘关系及其系统地位,根据同源序列搜索结果,下载相关 *Sulfobacillus* 属其他成员的 16S rDNA 序列,与供试菌株的序列放在一起,用 Clustal X 软件进行匹配排列,然后用 Neighbor-Joining 分析方法进行分子系统学分析,用 TreeView 软件显示系统树。在本研究中, K53 菌株的 16S rDNA 的系统发育树(图 8-5)表明,该菌株与 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 在分类地位上相似,相似性高达 99%以上。这一结果表明 K53 菌株为 *Sulfobacillus* 属的 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*。

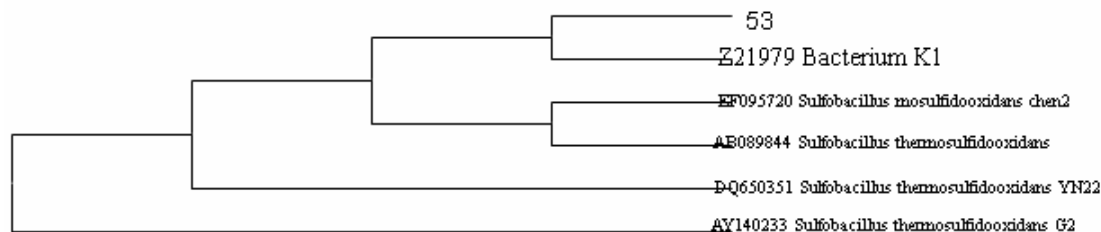


图 8-5 K53 菌株的系统发育树

8.3 本章小结

从各地收集的混合微生物中分离出一株硫杆菌属的菌株 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*，命名为 K53。它的最适生长温度为 53℃，最适生长 pH 为 2.0。

第九章 混合微生物中优势菌株的分离纯化

9.1 材料与方法

9.1.1 菌种和培养基

9.1.1.1 菌种来源

诱变后在铜矿、闪锌矿中分别生长的混合微生物。

9.1.1.2 培养基

9K+Fe²⁺培养基：9K 培养基中加入终浓度 40 g/L 的硫酸亚铁。

9K+S 培养基：9K 培养基中加入终浓度 10 g/L 的升华硫。

固体培养基：液体培养基的基础上加入 2% 的琼脂。（9K 培养基见 1.1。）

9.1.2 混合微生物中优势菌株的培养及纯化

100 mL 三角瓶中，加入 10 倍浓度的 9K 培养基 5 mL，分别加入硫酸亚铁和升华硫，定容至 50 mL。

第一次培养时，接入混合菌种 1 mL（接种量 2%），定容至 50 mL，于 30℃、170 rpm 条件下恒温摇床培养。

固体培养：取 0.1 mL 第一次培养的培养液，分别对应涂布到硫酸亚铁和升华硫的培养基平皿上，30℃ 恒温培养 7 d。

挑选平皿上的单菌落画线分离单菌落，生长的单菌落在相应的试管中画线保藏。在含升华硫培养基中生长的菌株编号 K1，在含硫酸亚铁培养基中生长的菌株编号 K2。

9.1.3 混合微生物中优势菌株的生理生化性质

9.1.3.1 最适生长温度的测定

纯化菌株，用 9K 培养基液体（分别加升华硫和硫酸亚铁）培养，接种量 1%，分别置于 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 和 40℃ 等 5 个温度梯度条件下，170 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定分离的微生物在不同温度下的生长状况。

9.1.3.2 最适起始 pH 的测定

分别接种纯化的菌株（接种量1%）到pH 0.5、1.0、1.5、2.0和2.5的9K培养基中（分别加入升华硫和硫酸亚铁），30℃、170 rpm 恒温摇床培养。用血球计数板计数，测定微生物在不同起始pH条件下的生长状况。

9.1.4 DNA 提取

离心收集的纯化后菌体细胞，分别用 pH=1.8 的无菌水洗涤几次，以去掉三价铁离子沉淀。然后，用基因组 DNA 抽提试剂盒（上海生工）提取 DNA。具体操作步骤见 5.1。

9.1.5 16S rDNA 的扩增、序列测定和系统发育分析

纯化菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增，采用通用引物：27f (5'-CAGAGTTT GATCGTGGCTCAG-3') 和 1506f (5'-CGGGTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L)：10 $\times$ PCR 缓冲液，5.0 μ L；Mg²⁺(25 mmol/L), 3.0 μ L；dNTP(各 5 mmol/L)，2.0 μ L；引物(20 μ mol/L)各 1.0 μ L；Taq DNA 聚合酶(1 U/ μ L, MBI)，1.0 μ L；模板 2.0 μ L 约 20 ng；去离子水 35 μ L。扩增程序为：94℃预变性 3 min，然后，94℃，30 s；52℃，30 s；72℃，1.0 min；30 个循环后 72℃ 10 min。PCR 产物用 Omega 公司生产的 E.Z.N.ATM 凝胶回收试剂盒纯化；纯化的 PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TA 克隆试剂盒克隆，其载体为 pCR[@]2.1。上述具体操作均参照说明书进行。

克隆产物的测序工作交由北京三博生物技术有限公司完成。

9.2 结果与分析

9.2.1 混合微生物中优势菌株的分离

加升华硫的固体培养基中分离的单菌落，通过 3 次画线分离、纯化后，该菌株命名为 K1 菌株。

加硫酸亚铁的固体培养基中分离的单菌落，通过 3 次画线分离、纯化后，该菌株命名为 K2 菌株。

9.2.2 混合微生物中优势菌株的最适生长温度

在 9K 培养基中，通过不同温度（15℃、20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃）培养，它们最大生长量分别见（图 9-1，9-2）。

实验结果说明 K1 和 K2 菌株均在 30℃时生长最好，它们的最适生长温度均

为 30℃；在 25℃生长良好；在 20℃和 35℃生长缓慢；在 15℃、40℃条件下基本不生长。

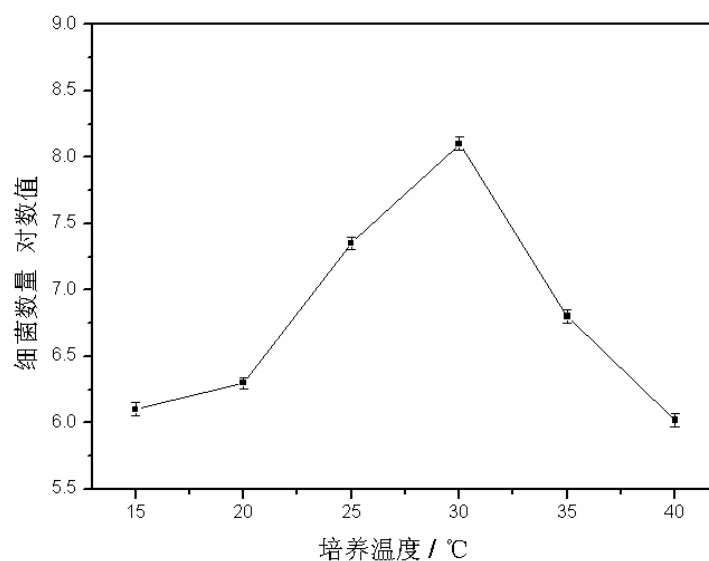


图 9-1 K2 菌株在不同温度条件下的最大生长量

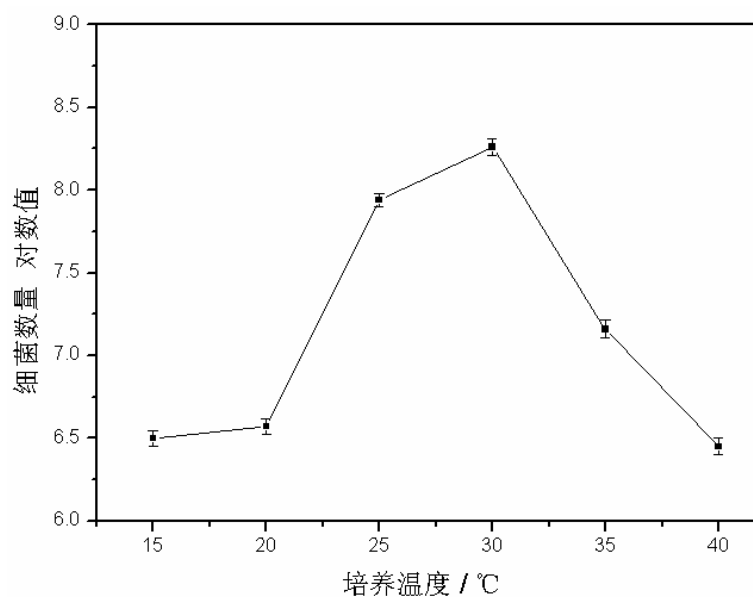


图 9-2 K1 菌株在不同温度条件下的最大生长量

由图 9-1, 9-2 可知：K1 菌株的生长量较 K2 菌株的高。这可能是因为 K1 菌株以硫为能源，氧化硫比 K2 菌株氧化相同摩尔的氧化亚铁的能量多，所以在

以硫为能源的培养基中，细菌的生长数量较多。

9.2.3 混合微生物中优势菌株的最适起始生长 pH

K1 和 K2 菌株在起始 pH 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 的 9K 培养基中摇瓶培养，它们最大生长量（图 9-3、9-4）。

K1 菌在起始 pH2.0 时生长最好；起始 pH1.5、2.5 时生长良好；起始 pH0.5、3.5 时生长最差。

K2 菌株在起始 pH2.0 时生长最好；起始 pH1.5、2.5 时生长良好；起始 pH0.5、3.0 时生长最差。

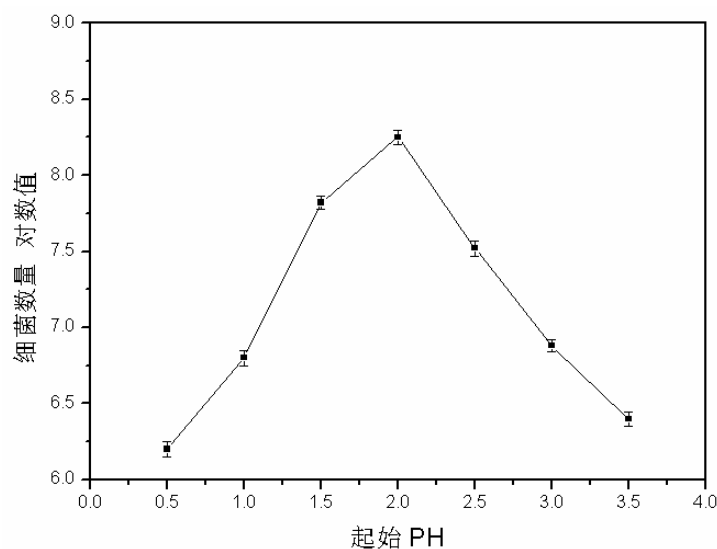


图 9-3 K1 菌株在不同起始 pH 条件下的最大生长量

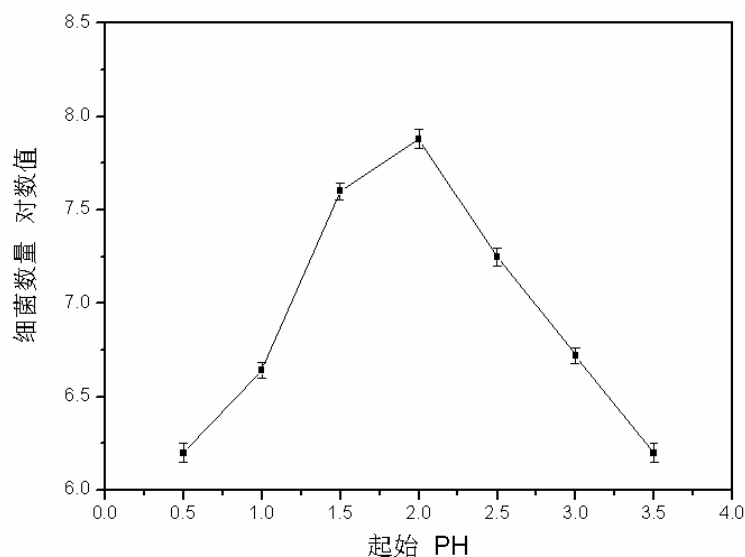


图 9-4 K2 菌株在不同起始 pH 条件下的最大生长量

9.2.5 混合微生物中优势菌株的 16S rDNA 系统发育分析

用 K1 和 K2 菌株的 16S rDNA 序列数据, 在 GenBank、EMBL 和 DDBJ 核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLASTn), 以比较供试菌株与已知其他成员相应序列的相似程度。

K1 菌株 16S rDNA 序列数据与生态分析时 1[#]OTU 序列完全相同, 结果说明分离纯化的 K1 菌株就是在生态分析时生长较多的菌株, 它是嗜酸氧化亚铁硫杆菌。

K2 菌株的 16S rDNA 序列数据与生态分析时 2[#]OTU 序列完全相同, 结果说明分离纯化的 K2 菌株就是在生态分析时生长最多的菌株, 它是嗜酸氧化硫硫杆菌。

9.3 本章小结

①在混合微生物中分离出一株以硫为能源的微生物, 命名 K1。它的最适生长 pH 为 2.0, 最适生长温度 30℃。通过其 16S rDNA 分析, 它与群落分析中的 1[#]OTU 的 16S rDNA 完全相同, 初步认为它是嗜酸氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)。

②在混合微生物中分离出一株以硫酸亚铁为能源的微生物, 命名 K2。它的最适生长 pH 为 2.0, 最适生长温度 30℃。通过其 16S rDNA 分析, 它与群落分析中的 2[#]OTU 的 16S rDNA 完全相同, 初步认为它是嗜酸氧化亚铁硫杆菌 (*A. ferrooxidans*)。

第十章 结 论

(1) 从江西、云南、广东和台湾等地采集酸性矿坑水样品及温泉水样品, 富集培养及用黄铜矿和闪锌矿驯化培养, 再用紫外线(UV)、亚硫酸钠(NaNO_2)和硫酸二乙酯(DES)进行单一或复合诱变, 得到不同条件诱变后的混合微生物 A、B、C、D 和 E。

(2) 在加入矿浆浓度为 1% 黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 61.40%、125.57%、1.45%、58.98% 和 149.98%; 浸出率分别提高 17.56%、35.90%、0.41%、16.87% 和 42.88%。

在加入矿浆浓度为 10% 黄铜矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 49.46%、71.68%、22.82%、44.85% 和 97.57%; 浸出率分别提高 3.65%、5.29%、1.69%、3.31% 和 7.20%。

在加入矿浆浓度为 20% 的黄铜矿精矿培养基中培养 40 d, 在 9K 和 leathen 培养基中, 混合微生物 E 浸出 Cu^{2+} 浓度比对照分别增加 87.22% 和 79.24%, 浸出率分别提高 3.60% 和 3.59%, 表明混合微生物 E 的浸矿性能稳定。

(3) 在加入矿浆浓度为 1% 闪锌矿精矿的 9K 培养基中培养 40 d, 混合微生物 A、B、C、D 和 E 浸出的 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 8.06%、85.97%、-2.39%、77.61% 和 117.01%, 说明混合培养物诱变可提高浸闪锌矿精矿的活性; 浸出率分别提高 1.54%、16.43%、-0.46%、14.83% 和 22.37%。

在加入矿浆浓度为 10% 的闪锌矿精矿培养基中培养 40 d, 在 9K 培养基中, 混合微生物 B、D 和 E 浸出 Zn^{2+} 浓度比对照分别增加 49.14%、44.86% 和 54.77%, 浸出率分别提高 2.27%、2.07% 和 2.53%。

在加入矿浆浓度为 20% 闪锌矿精矿的 9K 和 leathen 培养基中培养 40 d, 混合微生物 B、D 和 E 在 9K 培养基中培养时, Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.10%、1.59% 和 2.24%; 在 leathen 培养基中培养时, Zn^{2+} 浸出率分别提高 2.03%、1.89% 和 2.56%。

另外, 浸矿实验表明, 混合微生物 B 适合在闪锌矿精矿矿浆浓度 4%-16% 的条件下生长, 混合微生物 E 适合在闪锌矿矿浆浓度 4%-32% 的条件下生长, 说明诱变后的混合微生物 B、E 能耐受较高矿浆浓度, 有良好的工业应用前景。

(4) 在菌种保存实验中发现, 加入黄铜矿后保存的微生物比不加黄铜矿保存

的微生物生长快 1-2 d 左右,说明加入选择性压力可以提高浸矿微生物的活性。而且诱变后 5 组混合微生物 A、B、C、D 和 E 在 9K 培养基上生长速度比诱变前的微生物都快 1-2d。

(5) 本研究比较了诱变前、后混合微生物在含有 1%黄铜矿精矿及 1%闪锌矿精矿的 9K 培养基中微生物群落的多样性。结果表明,四个样品中微生物群落结构可以分为嗜铁钩端螺旋菌组、嗜酸氧化亚铁硫杆菌组和嗜酸氧化硫硫杆菌和喜温硫杆菌共三大组。尽管随着培养条件的改变,样品中微生物的群落结构存在一定的变化,但在本实验条件下,微生物浸出体系中最主要的优势菌种仍然是嗜酸氧化亚铁硫杆菌和嗜酸氧化硫硫杆菌,在浸矿时起到最重要的作用,对提高铜浸出能力和锌浸出能力贡献最大。

(6) 本研究对混合微生物中的菌株进行分离纯化,共分离了 5 株菌株并进行了 16SrDNA 鉴定。5 株菌分别为:钩端螺旋菌属的 *Leptospirillum ferriphilum* 命名为 K40,其最适生长温度为 40℃,最适生长 pH 为 1.5;硫杆菌属的 *Acidithiobacillus caldus*,命名为 K45,其最适生长温度为 45℃,最适生长 pH 为 1.8;硫杆菌属的 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*,命名为 K53,其最适生长温度为 53℃,最适生长 pH 为 2.0;硫杆菌属的 *Acidithiobacillus thiooxidans*,命名 K1,其最适生长 pH 为 2.0,最适生长温度 30℃;硫杆菌属的 *Acidithiobacillus ferrooxidans*,命名 K2,其最适生长 pH 为 2.0,最适生长温度 30℃。

参 考 文 献

- [1] 王松森. 细菌冶金[J]. 生物学通报, 1994, 29(4): 2-3
- [2] 杨显万, 邱定蕃. 湿法冶金[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1998
- [3] 刘纓, 林建群, 颜望明. 浸矿细菌—钩端螺旋菌属菌株研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 151-155
- [4] 闰森, 童雄. 强化处理硫化铜矿物微生物浸出过程研究[J]. 国外金属矿选矿, 2000, 11: 13-18
- [5] Arbiter N, Fletcher A W. Copper hydrometallurgy evolution and milestones [J]. Mining Engineering. 1994, (2): 118-123.
- [6] Watling H R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides B review [J]. Hydrometallurgy, 2006, 84(2): 81-108
- [7] Bartos P J. SX-EW copper and the technology cycle. Resources Policy, 2002, 28(3-4): 85-94
- [8] National Research Council. Evolutionary and Revolutionary Technologies for Mining [M]. National Academy Press, Washington DC, 2001
- [9] Watling H R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides A review [J]. Hydrometallurgy, 2006, 84 (1): 81-108
- [10] Harrison J R. Genomic and physiological diversity amongst strains of *T.f* genomic comparison with *T.t* [J]. Arch Microbiol, 1982, 131(1): 68-76
- [11] Izama H M, Suzuki I J. Bacterial leaching of a sulphide ore by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* shake flask studies [J]. Bioeng, 1988, 32:110-116
- [12] Orris P R, Marsh R M, Linstrom E B. Growth of mesophilic and thermophilic acidophilic bacteria on sulfur and tetrathionate [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1986, 8: 318-329
- [13] Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M, *et al.* Distribution of *T. ferrooxidans* and *L. ferrooxidans*: Implications for generation of acid mine drainage [J]. Science, 1998, 279(6): 1519-522
- [14] Tyson G W, Lo I, Baker B J, *et al.* Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an acidophilic microbial community[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 6319-6324
- [15] Awlins D E. Mesophilic, autotrophic bioleaching bacteria: description, physiology and role. In: Rawlings, D.E. (Ed.), Biomining: Theory, Microbes and

- Industrial Processes. Springer Verlag, Berlin, 1997, 229-245
- [16] Orris P R. Thermophiles and bioleaching. In: Rawlings, D.E. (Ed.), *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer Verlag, Berlin, 1997. 247-258
- [17] Hallberg K B, Johnson D B. Biodiversity of acidophilic prokaryotes [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2001, 49: 37-84
- [18] Li Hong-Xu, Wang Dian-Zuo. Review of investigation on microorganism behaviors in ore bioleaching [J]. *Nonferrous metals*, 2003, 55(2): 59-63
- [19] Norris P R, Barr D B. Growth and iron oxidation by moderate thermophiles [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1985, 28: 221-24
- [20] König H, Skorko R J. Glycogen in thermoacidophilic archaebacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus* [J]. *Arch Microbiol*, 1982, 132: 297-303
- [21] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford G S. Reasons why leptospirillum like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores [J]. *Microbiology*, 1999, 145: 5-13
- [22] Dopson M, Lindström E B. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching [J]. *Appl Environ Microbiology*, 1999, 65: 36- 40
- [23] 彭艳平,余水静. 我国生物冶金研究的发展概况[J]. *矿业快报*, 2006, 452 (12): 8-10
- [24] 周吉奎, 钮因健. 硫化矿生物冶金研究进展[J]. *金属矿山*, 2005, 346 (4): 24-30
- [25] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社,1993
- [26] 傅建华. 硫化铜矿浸矿细菌超微结构与吸附机理及SFORESE的纯化[D]. 中南大学博士学位论文, 2004
- [27] Amman R, Ludwig I W , Schleifer K H . Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59: 143-169
- [28] Harrision A P. Characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other ironoxidizing bacteria with emphasis on nucleic acid analysis[J]. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 1986, 8: 249-257
- [29] Wood A P, Kelly D. Growth and sugar metabolism of a thermoacidophilic iron-oxidizing mixotrophic bacterium [J]. *J Gen Microbiol Lett*, 1984, 130:

13-37

- [30] 陈顺方, 桑正林. 生物技术在矿业上的应用[J]. 湿法冶金, 1999, (2): 1-4
- [31] Deng T L, Liao M X, Wang M H, *et al* . Investigations of accelerating parameters for the biooxidation of low grade refractory gold ores[J]. Minerals Engineering, 2000, 13 (14-15): 1543-1553
- [32] Deng T L, Liao M X. Gold recovery from the refractory flotation concentrate combined biooxidation and thiourea leach [J]. Hydrometallurgy, 2002, 63: 249-257
- [33] 汪模辉, 邓天龙, 廖梦霞. 含砷金矿的磁场强化生物预氧化[J]. 应用化学, 2000, 17(4): 362-365
- [34] 廖梦霞, 邓天龙, 汪模辉, 等. 难处理含砷金精矿的生物预氧化工艺研究[J]. 矿产综合利用, 1998, (6): 17-20
- [35] 廖梦霞. 低品难处理原生金矿的生物预氧化-无氰法提金绿色工艺研究[D] . 成都理工大学硕士学位论文, 1999
- [36] 徐晓军, 宫磊, 孟云生, 等. 硫杆菌的化学诱变及对低品位黄铜矿的浸出[J]. 金属矿山, 2004, (8): 42-44
- [37] 邹平, 窦明民, 杜强. 应用氧化亚铁硫杆菌去除湿法炼锌浸出液中铁的研究[J]. 湿法冶金, 2000, 19(1): 21-26
- [38] 龙中儿, 黄运红, 蔡昭铃, 等. 耐低 pH 的氧化亚铁硫杆菌选育及其氧化硫酸亚铁的初步研究[J]. 过程工程学报, 2002, 2(5): 415-420
- [39] 张广积, 方兆珩. 驯化氧化亚铁硫杆菌从镍黄铁矿中浸出镍[J]. 过程工程学报, 2001, 1(3): 285-288
- [40] 徐家振, 金哲男, 焦万丽. 生物法贫化铜熔炼炉渣[J]. 有色矿冶, 2001, 17 (1): 28-30
- [41] 熊英, 胡建平, 林滨兰, 等. 氧化亚铁硫杆菌的驯化与诱变选育[J], 矿产综合利用, 2001, (6): 17-31
- [42] 李宏煦, 刘晓荣, 邱冠周, 等. 驯化氧化亚铁硫杆菌浸出废铜矿中铜的研究[J]. 矿冶工程, 2001, 21(1): 40-42
- [43] 杨洪英, 杨立, 魏绪钧, 等. 耐热耐砷氧化亚铁硫杆菌(SH-1)的驯化和特性研究[J]. 有色金属, 2000, 52(3): 55-57
- [44] Henry L E. Past, present and future of biohydrometallurgy [J]. Hydrometallurgy, 2001, 59: 127-139
- [45] 陈世. 生物浸出及其在有色金属冶金中的应用[J]. 上海有色金属, 2000, 21 (3): 137-146
- [46] 李廷梁. 俄罗斯难浸金矿的生物冶金技术[J]. 贵金属, 1998, 19(1): 54-56

- [47] 李俊萌. 难处理金矿石预处理工艺研究与应用现状[J]. 有色矿山, 2002, 31(5): 21-29
- [48] 杨少华, 杨凤丽, 余新阳. 难处理金矿石的细菌氧化机理及影响因素[J]. 湿法冶金, 2006, 25(2): 57-61
- [49] 王昌汉, 童雄等, 才锡民. 矿业微生物与铀铜金等细菌浸出[M]. 长沙: 中南大学出版社, 2003
- [50] 刘大星, 蒋开喜. 王成彦. 铜湿法冶金技术的现状及发展趋势[J]. 有色冶炼, 2002, 29(4):1-5
- [51] 孙业志, 吴爱祥, 黎建华. 微生物在铜矿溶浸开采中的应用[J]. 金属矿山, 2001, (1): 3-6
- [52] 杨红晓, 周爱东, 徐家振. 生物浸出技术在铜工业中的应用[J]. 有色矿冶, 2003, 19(5): 15-18
- [53] 李宏煦, 邱冠周, 胡岳华, 等. 大宝山废铜矿细菌浸出铜的研究[J]. 矿产综合利用, 2000, (5): 31-33
- [54] 中国有色金属报[N]. 2005-11-8
- [55] 中国化工报[N] 2005-8-17
- [56] 徐家振, 金哲男. 重金属冶金中的微生物技术[J]. 有色矿冶, 2001, (2): 31-34
- [57] 钟宏. 生物药剂在矿物加工和冶金中的应用[J]. 矿产保护与利用, 2002, (3): 28-32
- [58] 童雄. 微生物浸矿的理论与实践[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997
- [59] 王营茹, 钟康年, 魏以和. 难浸金矿细菌氧化预处理工艺流程的优化[J]. 金属矿山, 2003(10): 40-42
- [60] 杨显万, 邱定蕃. 湿法冶金[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997
- [61] 王恩德. 环境资源中的微生物技术[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1997
- [62] 王康林, 汪模辉, 蒋金龙. 难处理金矿石的细菌氧化预处理研究现状[J]. 黄金科学技术, 2001, 9(1): 9-23
- [63] 王玉棉, 李军强. 微生物浸矿的技术现状及展望[J]. 甘肃冶金, 2004, 26 (1): 36-39
- [64] 陶德宁. 生物浸出和生物氧化技术在中国的研究与应用[J]. 湿法冶金, 2003, 22(1): 56-56
- [65] 刘陶安, 周星火, 吕俊文. 某水冶厂技改设计复杂地形的改造与利用[J]. 铀矿冶, 2004, 23(2): 93-96
- [66] 樊保团, 蔡春晖, 刘建, 等. 抚州铀矿石细菌渗滤浸出扩大试验[J], 铀矿冶, 2006, 25(3): 127-132

- [67] 蔡春晖. 抚州矿铈矿石渗滤浸出工业性试验研究[J]. 铈矿冶, 2002, 21(2): 85-88
- [68] 钟平汝, 李铁球, 毛拥军, 等. 渗滤浸出法处理抚州铈矿石[J]. 铈矿冶, 2004, 23(1): 13-17
- [69] 肖芳欢. 三二0铈矿床改用留矿淋浸采矿法可行性初探[J]. 铈矿开采, 1990, (1): 7-11
- [70] 殷志勇, 成海芳, 张文彬. 生物技术在湿法冶金领域的应用现状及研究趋势[J]. 湿法冶金, 2006, 25(3): 113-116
- [71] 王淀佐, 李宏熙, 阮仁满, 等. 硫化矿的生物冶金及其研究进展[J]. 矿冶, 2002, 11(增刊): 8-12
- [72] 刘建, 樊保团, 张传敬. 抚州铈矿细菌堆浸半工业试验研究[J]. 铈矿冶, 2001, 20(1): 15-27
- [73] Colmer A R, Hinke M E. The role of microorganisms in acid mining drainage. A preliminary report[J]. Science, 1947, 106: 253- 256
- [74] Needham J, Gwei-Djen L. Science and civilization in China[A]. In: Chemistry and Chemical Technology: Part II. Spagyric Discovery and Invention: Magisteries of Gold and Immortality vol. 5, Univ. Press, Cambridge (1974) pp. 25, 250
- [75] Pesic B, Biohydrometallurgical Technologies[A]. Volume I, ed, Torma, A E *et al*, A Publication of TMS 1993, 545-560
- [76] 廖辉伟. 铜资源的利用及其发展[J]. 新技术新工艺, 2002, (1): 34- 36
- [77] 李浩然, 冯雅丽. 微生物冶金的新进展[J]. 冶金信息导刊, 1999, (3): 29-33
- [78] 裘荣庆. 微生物在采铜工业中的应用[J]. 应用微生物, 1983, (6): 23-30
- [79] Tiller-Jeffery R E, Watling H R, Browner R E, *et al*. Microbial versus chemical leaching of chalcopyrite concentrator quantitative mineralogical investigation. Proc. Bac-Min Conference (Bendigo). Aus. I.M.M, Melbourne, 2004: 57-62
- [80] 杨红晓, 周爱东, 徐家振. 生物浸出技术在铜工业中的应用[J]. 有色矿冶, 2003, 19(5): 15-18
- [81] Henr Y I, Ehrhch. Past, present and future of biohydrometallurgy [J]. Hydrometallurgy. 2001, 59: 127-134
- [82] 钟慧芳. 浸锰微生物及其浸锰之研究[J]. 应用微生物, 1986, (6): 4-9
- [83] 欧津, 李维卿, 钟慧芳. 贫铈矿石细菌浸出的研究[J]. 微生物学报, 1977, 17(1): 11-20
- [84] Silver M, Torma A E. Oxidation of metal sulfides by *Thiobacillus ferrooxidans* grown on diggerent substrates [J]. Can. J. Microbio, 1974, (20): 141-147

- [85] 袁宗仪. 应用矿业生物工程技术回收利用难选矿产资源[J]. 湿法冶金, 1998, (3): 6-13
- [86] Whittington B, McDonald R, Johnson J, et al. Pressure acid leaching of Bulong nickel laterite ore, PartI: Effect of water quality [J]. Hydrometallurgy, 2003, 70: 31-46
- [87] 龚文琪, 魏鹏, 雷绍民. 微生物技术及21世纪矿产资源开发[J].中国非金属矿工业导刊, 2000, (5): 25-28
- [88] 张晓云. 微生物在矿物与金属工业中的应用[J]. 矿业快报, 2002, (4): 19-21
- [89] 李浩然, 冯雅丽. 微生物冶金的新进展[J]. 冶金信息导刊, 1999, (3): 29-33
- [90] 廖梦霞, 邓天龙. 难处理硫化矿生物湿法冶金研究进展(I)微生物氧化工艺技术研究[J]. 稀有金属, 2004, 28(4): 767-770
- [91] Colmer A R, Temple K L, Hinkle M E. An iron-oxidizing bacterium from the acid mine drainage of some bituminous coal mines [J]. Journal of Bacteriology, 1950, 59: 317-328
- [92] Plumb J J, Gibbs B, Stott M B, et al. Enrichment and characterization of thermophilic acidophiles for the bioleaching of mineral sulphides[J]. Minerals Engineering, 2002, 15, 787-794
- [93] Robertson W J, Kinnunen P H M, Plumb J J, et al. Moderately thermophilic iron oxidising bacteria isolated from a pyritic coal deposit showing spontaneous combustion [J]. Minerals Engineering, 2002, 15: 815- 822.
- [94] Keeling S E, Davies K L, Johnson J A, et al. Isolation and phenotypic characterization of Australian mining microbes from a spent heap [A]. Proc. Bac Min Conference (Bendigo). Aus IMM, Melbourne, 2004, 35-39
- [95] Demergasso C S, Galleguillos P A, Escudero G, et al. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap [J]. Hydrometallurgy, 2005, 80: 241-253
- [96] Hallberg K B, Johnson D B. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters [J]. Hydrometallurgy, 2003, 71: 139- 148
- [97] Dopson M, Baker-Austin C, Hind A. Characterization of ferropasma isolates and *Ferropasma acidarmanus* sp. Nov extreme *Acidophiles* from acid mine drainage and industrial bioleaching environments [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70: 2079-2088
- [98] Gonzalez-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor E O, et al. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 4853-4865

- [99] Okibe N, Gericke M, Hallberg K B, et al. Enumeration and characterization of *Acidophilic* microorganisms isolated from a pilot plant stirred tank bioleaching operation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 1936-1943
- [100] Atkinson T, Cairns S, Cowan D A, et al. A microbiological survey of Montserrat Island hydrothermal biotopes [J]. Extremophiles, 2000, 4: 305-313
- [101] Burton N P, Norris P R. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis [J]. Extremophiles, 2000, 4: 315-320
- [102] Simmons S, Norris P R. *Acidophiles* of saline water at thermal vents of Vulcano, Italy [J]. Extremophiles, 2000, 4: 201-207
- [103] Hallberg K B, Johnson D B. Biodiversity of *Acidophilic* prokaryotes [J]. Advances in Applied Microbiology, 2001, 49: 37-84
- [104] Johnson D B, Bacelar-Nicolau P, Okibe N, et al. Role of pure and mixed cultures of Gram-positive eubacteria in mineral leaching. In: Ciminelli, V.S.T., Garcia, O. (Eds.), Proc. Intl. Biohydrometallurgy Symposium (Ouro Preto). Part A [J]. Elsevier, Amsterdam, 2001, 461-470
- [105] Okibe N, Johnson D B. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH controlled bioreactors: significance of microbial interactions [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 8: 574-583
- [106] 罗祖虞. 微生物冶金历史、现状、展望 [M]. 昆明理工大学真空冶金所学术报告会, 2001
- [107] 魏以和, 王军. 矿物生物技术的微生物学基本方法 [J]. 国外金属矿选矿, 1996, (1): 14-27
- [108] Markosyan G E. A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. sp. [J]. Biol J Armenia, 1972, 25: 26-29
- [109] Coram N J, Rawlings D E. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 838-845
- [110] Gene W. Tyson, Ian L O, Allen E E, et al. Banfield genome directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an *Acidophilic* microbial community [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 6319-6324
- [111] Barreto M, Quatrini R, Bueno S, et al. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome

- sequence[J]. *Hydrometallurgy*, 2003, 71: 97-105
- [112] Holmes D S, Barreto M, Valdes J, *et al.* Whole genome sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*: metabolic reconstruction, heavy metal resistance and other characteristics. In: Ciminelli, V.S.T., Garcia, O. (Eds.), *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development Part A*. Elsevier, Amsterdam, 2001. 237-251
- [113] Leduc L G, Ferroni G D. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 14: 103- 120
- [114] Quatrini R, Veloso F, Jedlicki E, *et al.* A model for iron uptake in *Acidithiobacillus ferrooxidans* based upon genome analysis. In: Tzesos, M., Hatzikioseyan, A., Remoundaki, E. (Eds.), *Biohydrometallurgy: A Sustainable Technology in Evolution* (Athens, 2003)[M]. National Technical University of Athens. Athens, 2004: 989-995
- [115] Rawlings D E. The molecular genetics of mesophilic, *acidophilic*, chemolithotrophic, iron or sulfur-oxidizing microorganisms. In: Amils, R, Ballester, A. (Eds.), *Proc. Intl. Biohydrometallurgy Symposium* (Madrid, Spain), Part B[J]. Elsevier, Amsterdam, 1999. 3-20
- [116] Rawlings D E. The molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other mesophilic, acidophilic, chemolithotrophic, iron- or sulfur-oxidizing bacteria[J]. *Hydrometallurgy*, 2001, 59: 187-201
- [117] Rawlings D E, Kusano T. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Microbiological Reviews*, 1994, 58: 39-55
- [118] Valdes J, Jedlicki e, Holmes D S. Sulfur assimilation in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. In: Tzesos, M., Hatzikioseyan, A, Remoundaki, E. (Eds.), *Biohydrometallurgy: A Sustainable Technology in Evolution* (Athens, 2003)[M]. National Technical University of Athens, Athens, 2004: 1187-1194
- [119] 裘荣庆. 微生物冶金的应用和研究现状[J]. *国外金属矿选矿*, 1994, 31(8): 45-49
- [120] 李学亚, 叶茜. 微生物冶金技术及其应用[J]. *矿业工程*, 2006, 4(2): 49-51
- [121] 张东晨, 张明旭, 陈清如. 脱硫微生物氧化亚铁硫杆菌遗传特性的分子生物学试验[J]. *煤炭学报*, 2006, 31(1): 104-107
- [122] 徐晓军, 孟运生, 宫磊等. 氧化亚铁硫杆菌紫外线诱变及对低品位黄铜矿的浸出[J]. *矿冶工程*, 2005, 25(1): 34-36
- [123] 赵清, 刘相梅, 詹杨, 等. 一株高效抗砷喜温硫杆菌工程菌的构建[J]. *微生*

- 物学报, 2005, 45(5): 675-679
- [124] 刘清, 徐伟昌, 聂春龙. 我国浸矿微生物研究的发展概况[J]. 南华大学学报, 2003, 17(1): 21-24
- [125] Peng J B. Expression of heterogenous arsenic resistance gens in the obigately autotrophic biomining bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(7): 2653-2656
- [126] Peng J B. Solid medium for genetic manipulation of *Thibacillus ferrooxidans* [J]. J Gen Appl Microbiol, 1994, 40(1): 243-253
- [127] 刘振盈, 颜望明, 徐海岩, 等. 氧化亚铁硫杆菌质粒pTf-52 限制图谱和嵌合质粒pSDF-1的构建[J]. 山东大学学报, 1990, 25(3): 389-394
- [128] 刘振盈, 颜望明. 氧化亚铁硫杆菌Tf-55 基因文库的构建[J]. 山东大学学报, 1993, 28(3): 358-364
- [129] 刘振盈, 颜望明. 多能硫杆菌RubisCO基因的同源性分析[J]. 微生物学报, 1997, 37(3): 179-183
- [130] 徐海岩, 刘振盈. 抗砷载体的构建及其在氧化亚铁硫杆菌中的表达[J]. 应用与环境生物学报, 1995, 1(3): 238-243
- [131] 李宏煦, 王淀佐. 生物冶金中的微生物及其作用[J]. 有色金属, 2003, 55(2): 58-63
- [132] 柳建设, 王兆慧, 耿梅梅. 微生物浸出中微生物-矿物多相界面作用的研究进展[J]. 矿冶工程, 2006, 26(1): 40-44
- [133] Franzmann P D, Haddad C M, Hawkes R B, *et al.* Effects of temperature on the rates of iron and sulfur oxidation by selected bioleaching Bacteria and Archaea: application of the Ratkowsky equation[J]. Minerals Engineering, 2005, 18: 1304-1314
- [134] Tributsch H. Direct versus indirect bioleaching[J]. Hydro- metallurgy. 2001, 59: 177-185
- [135] Edel-Hermann V, Dreumont C, Pérez-Piqueres A, *et al.* Terminal restriction fragmentlength polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungalcommunity structure in soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47 (3): 397-404
- [136] 刘维平. 湿法冶金新技术进展[J]. 矿冶工程, 2003, 23(5): 39-471
- [137] 和致中, 彭谦, 陈俊英. 高温菌生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [138] 嗜酸氧化亚铁硫杆菌及其活性的基因芯片检测方法. 省级标准
- [139] 李浩然, 冯雅丽. 微生物冶金的新进展[J]. 冶金信息导刊.1999(3):29-33

- [140] Arpad E, Torma. Challenges in Mineral Processing[M]. Littleton, Colorado. 1989. P: 550-563
- [141] 方兆衍. 生物氧化浸矿反应器的研究进展[J]. 黄金科学技术, 2002, 10(6): 1-7
- [142] 闫森, 童雄. 强化难处理硫化铜化物微生物浸出过程的研究[J]. 矿物工程, 2000, (11): 13-19
- [143] Y. 科西尼, 周廷熙, 李长根. 嗜热嗜酸Ab 酸杆菌浸出硫化锌精矿[J]. 国外金属矿选矿, 2000, 9: 31-35
- [144] 刘晓荣, 李宏煦, 胡岳华, 等. 生物浸矿的电化学催化[J]. 湿法冶金, 2000, (9): 22-27
- [145] 赵由才, 牛冬杰. 湿法冶金污染控制技术[M]. 北京, 冶金工业出版社, 2003
- [146] 方兆珩. 生物氧化浸矿反应器的研究进展[J]. 黄金科学技术, 2002, 10(6): 1-7
- [147] 池秀文, 田金华. 改进层次分析法在采矿方法选择中的应用[J]. 武汉理工大学学报, 2003, 25(5): 28-30
- [148] 汪恂, 龚文琪. 微生物学在浸矿技术中的应用研究[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(3): 56-58
- [149] Sitthipan C, Saipin C, Anwarul H, *et al.* Viability of the Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139 [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2001, 24(3): 331-341
- [150] 周长春, 周志坚, 刘炯天, 等. 微生物在煤炭脱硫中的应用[J]. 选煤技术, 2003, 2: 6-9
- [151] 沈萍. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007
- [152] Horton T R, Bruns T D. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box [J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 1855-1871
- [153] Ogram A. Discussion soil molecular microbial ecology at age 20: Methodological challenges for the future [J]. Soil Biology & Biochemistry. 2000, 32: 1499-1504
- [154] Bridge P, Brian S. Soil fungi: Diversity and detection [J]. Plant and Soil. 2001, 232: 147-154
- [155] Dunbar J, Ticknor L O, Kuske C R I. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis [J]. Appl Environ Microbiol. 2000, 66: 2943-2950
- [156] Tiedje J M, Asuming-Brempong S, Nusslein K, *et al.* Opening the black box of

- soil microbial diversity [J]. *Applied Soil Ecology*. 1999, 13: 1109-1122
- [157] Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community [J]. *Nature*, 1990, 345: 63-65
- [158] 马万里. 土壤微生物多样性研究的新方法[J]. *土壤学报*, 2004, 41(1): 103-107
- [159] Norris P R, Barr, D W, Hinson, D. Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite. In: Norris, P.R., Kelly, D.P. (Eds.), *Biohydrometallurgy: Proc. Intl. Symposium* (Warwick, UK, 1987). *Science and Technology Letters*, Kew. 1988, 43-59
- [160] Hansford G S. Recent developments in modeling the kinetics of bioleaching. In: Rawlings, D.E. (Ed.), *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer Verlag, Berlin, 1997. 153-175
- [161] Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M, et al. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage [J]. *Science*, 1998, 279: 1519-1522
- [162] Vasquez M, Espejo R T. Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric acid concentration [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. 63: 332-334
- [163] Rawlings D E, Tributsch H, Hansford GS. Reasons why *Leptospirillum* like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidising bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores[J]. *Microbiology*, 1999, 145: 5-13

致 谢

首先要感谢我的导师邱冠周教授提供给我一个学习的机会。

本论文是在邱冠周教授的悉心指导下完成的。导师渊博的专业知识,严谨的治学态度,朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。在学术上导师高瞻远瞩,给予我极大的启迪,让我对学术的理解更加透彻;工作上导师细致求实的作风让我受益匪浅,让我从工作中收获到更多的成果;在人生道路上,导师正直的人品给予我最大的鞭策……一日为师,终身为父,在导师的教导下,让我这个从小失去父亲的儿子终于得到了慈父般的教诲。在此,谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢!

感谢王淀佐院士在论文选题及论文研究过程中所给予的有意义的指导,王老师渊博的知识,精辟的见解使我受益匪浅。

感谢刘学端教授、夏金兰教授、刘新星教授在整个学位论文进行过程中所给予的具体而细致的指导和帮助,使我进入生物冶金研究这一交叉领域。

本论文的顺利完成,离不开各位老师、同学和朋友的关心和帮助。在此感谢胡岳华教授、覃文庆教授、徐竞副教授、柳建设教授、余润兰教授、周洪波副教授、杨宇副教授、曾嘉副教授、贺治国副教授、聂珍媛高级工程师等多位老师的指导和帮助。在学习期间,得到了同学和朋友张成桂博士、尹华群博士、高健博士、丁建南博士、吴学玲博士、蒋莹硕士、王海华博士、程海娜博士、朱建裕博士、王军博士、夏乐先博士等的热心帮助和关心,在此表示深深的感谢。同窗之间的友谊永远长存。

感谢中南大学资源加工与生物工程学院全体领导和老师在这几年的时间里对我的支持和帮助。

感谢我的家人,感谢我的夫人和儿子4年多来对我攻读博士学位的全方位的支持;正是由于他们默默无闻的奉献和一贯的支持和鼓励,才使我有信心和毅力完成全部的学业。

感谢国家创新群体科学基金及国家重点基础研究规划发展项目(973项目)的资助。

在论文即将完成之际,我的心情无法平静,从开始进入课题到论文的顺利完成,有多少可敬的老师、同事、同学、朋友及家人给了我无言的帮助,在这里请接受我诚挚的谢意!我要向关心和支持我学习的人们表示真挚的谢意!感谢你们对我的关心、关注和支持!

康 健

2007年11月

攻读博士学位期间发表的论文

1. 康健, 高健, 吴学玲, 丁建南, 邱冠周. 混合菌群诱变及诱变菌群对闪锌矿浸出的影响. 中南大学学报, 2007, 38(3): 439-444.
2. 康健, 丁建南, 高健, 吴学玲, 邱冠周. 诱变后混合菌在锌矿中生长的研究. 现代生物医学进展, 2007, 7(4): 489-493.
3. KANG Jian, QIU Guanzhou, GAO Jian, WANG haihua, DING Jiannan. Improved leaching performance of chalcopyrite by microbial cultures subjected to mutation. Minerals and Metallurgical Processing, 2008 (accepted).
4. KANG Jian(康健), QIU Guanzhou (邱冠周), GAO Jian (高健), WANG haihua(王海华), DING Jiannan (丁建南), WU Xueling (吴学玲). Improved leaching performance of Chalcocite by microbial cultures subjected to mutation 《中南大学学报》(英文版) (已接受.)
5. WU Xueling (吴学玲), QIU Guanzhou (邱冠周), GAO Jian (高健), DING Jiannan (丁建南), KANG Jian(康健), LIU Xinxing (刘新星). Mutagenic breeding of silver-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* and exploration of resistant mechanisms. Transactions of Nonferrous Metals Society of China. 2007, 17(2): 346-351(SCI).
6. DING Jian-nan (丁建南), GAO Jian (高健), KANG Jian (康健), WU Xue-ling (吴学玲), QIU Guan-zhou (邱冠周). Precipitation mediated by strain YN23 of *Metallosphaera sedula*. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7 (4): 481-485.
7. 吴学玲, 蒋莹, 高健, 康健, 丁建南, 邱冠周. 几株嗜酸氧化亚铁硫杆菌的分离及阴离子对其亚铁氧化活性的影响. 中南大学学报, 2007 (已递交).
8. 丁建南, 何环, 尹华群, 康健, 高健, 邱冠周. 嗜热硫氧化硫化杆菌一新菌株的分离与鉴定. 湖南师范大学自然科学学报, 2007, (4) (刊印中).
9. Gao Jian, Xie Jian-ping, Ding Jian-nan, Kang Jian, Chen Hai-na, Qiu Guan-zhou. Extraction and Purification of Magnetic Nanoparticles from a Strain of *Leptospirillum ferriphilum*. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2006, 16 (6): 1417-1420.
10. 高健, 康健, 吴学玲, 徐竞, 邱冠周. Fe^{2+} 对嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)生长活性的影响. 中国有色金属学报, 2008 (已接受).

专利申请:

- (1) 专利申请一: 邱冠周, 高健, 康健, 吴学玲, 丁建南, 夏乐先. 浸矿细菌—嗜铁钩端螺旋菌的选择性分离方法. 申请号: 200610032338. 申请日: 20060928. 公开号: 10101652, 公开日: 2007.08.15.
- (2) 专利申请二: 邱冠周、丁建南、张成桂、吴学玲、康健、高健. 一种分离嗜温硫氧化硫化杆菌的方法. 申请号: 200610032337. 申请日: 20060928. 公开号: CN101012441, 公开日: 2007.08.08.
- (3) 专利申请三: 邱冠周、丁建南、高健、吴学玲、康健、张成桂. 化学胁迫法分离纯化勤奋金属球菌. 申请号: 200610136866. 申请日: 2006.12.14. 公开号: CN197475, 公开日: 2007.06.06.