

微紫青霉菌菌株 GXCR 对低品位黄铜矿中的 Cu 和 Fe 的生物淋滤及其淋滤机制

周媛^{1,2}, 黄晓婷^{1,2}, 黄桂海^{1,2}, 白晓波^{1,2}, 唐咸来^{1,2}, 李有志^{1,2}

1 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005

2 广西大学微生物及植物遗传工程教育部重点实验室, 南宁 530005

摘要: 研究了 *Penicillium janthinellum* 菌株 GXCR 对低品位黄铜矿中的 Cu 和 Fe 的生物淋滤浸出。结果表明摇浸淋滤效率优于静置浸没淋滤效率, 对 Cu 的淋滤浸出效果最佳; 在添加最佳碳源(10%蔗糖, W/V)、氮源(1.5% NaNO₃, W/V)、摇浸淋滤和最佳条件组合(淋滤培养基初始 pH 6.0, 矿石大小 200 目, 矿石浓度 5% (W/V)和初始接种菌量 3.0×10⁵ 分生孢子/mL)时, Cu 的浸出率达到 87.31% (W/W); 摇浸淋滤时影响 Cu 的生物浸出的主要因素是淋滤培养基初始 pH ($F > F_{0.05}$); 对 Cu 和 Fe 淋滤起主要作用的有机酸分别是柠檬酸和草酸; 浸没淋滤效率低是与柠檬酸和草酸产量低有关; GXCR 的生物淋滤机制有 2 种: 柠檬酸和草酸的生化作用和菌体附着生长所产生机械压力对矿石的破碎作用。

关键词: *Penicillium janthinellum*, 生物淋滤, 低品位黄铜矿, 最适条件, 淋滤机制

Cu and Fe Bioleaching in Low-grade Chalcopyrite and Bioleaching Mechanisms Using *Penicillium janthinellum* Strain GXCR

Yuan Zhou^{1,2}, Xiaoting Huang^{1,2}, Guihai Huang^{1,2}, Xiaobo Bai^{1,2}, Xianlai Tang^{1,2}, and Youzhi Li^{1,2}

1 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China

2 Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engineering at Guangxi University, Nanning 530005, China

Abstract: Bioleaching of Cu and Fe in low-grade chalcopyrite using *Penicillium janthinellum* strain GXCR was studied. As a result, shaking bioleaching was more efficient than submerged bioleaching; Cu bioleaching was much better than Fe bioleaching; under conditions of optimum carbon source (10% sucrose, W/V), optimum nitrogen source (1.5% NaNO₃, W/V), shaking bioleaching and the optimum combination of conditions (initial pH 6.0 in leaching media, 5% (W/V) 200-mesh ore and initial inocula of 3.0×10⁵ conidia/mL), Cu bioleaching efficiency reached 87.31% (W/W). One of the most important factors affecting Cu bioleaching in shaking bioleaching was the initial pH in leaching media ($F > F_{0.05}$). The major organic acids for Cu and Fe bioleaching were citric and oxalic acids, respectively. Low bioleaching efficiency by submerged bioleaching was due to low production of citric and oxalic

Received: April 10, 2008; **Accepted:** July 1, 2008

Supported by: Development Program for Guangxi Science and Technology (No. 0443001-20), Director's Fund of Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization (No. 07-04) and Science Foundation of Key Laboratory of Ministry of Education for Microbial and Plant Genetic Engineering (No. J0701).

Corresponding authors: Youzhi Li. Tel: +86-771-3270103; Fax: +86-771-3270130; E-mail: dyzl@gxu.edu.cn

Xianlai Tang. Tel: +86-771-2630965; E-mail: xltang163@163.com

广西科技攻关项目(No. 0443001-20), 亚热带生物资源保护利用重点实验室主任基金(No. 07-04)和微生物与植物遗传工程教育部重点实验室开放基金(No. J0701)资助。

acids. The mechanisms employed by the GXCR in Cu bioleaching included biochemical functions of citric and oxalic acids as well as ore crack caused by mechanical power generated from mycelial growth.

Keywords: *Penicillium janthinellum*, bioleaching, low-grade chalcopyrite, optimum conditions, bioleaching mechanisms

高品位的矿石表面的金属被提取后, 遗留有大量的低金属含量的矿石(也称低品矿)。传统的热冶金在提取低品位矿石中的金属的效费比很低^[1], 生物淋滤由此成为提取低品位矿石中金属的最为经济有效的方法并且再次受到重视^[1, 2]。在工业生物淋滤中, 以化能无机自养的 G⁻细菌的生物淋滤最为广泛^[4-8]。其机制主要是酸性作用^[3, 9-11]。作为异养微生物, 一些真菌也能产生大量的有机酸, 由于真菌的生物淋滤需要有机碳源和特殊的反应器以保证淋滤过程中真菌生长的氧的需要, 因此对其生物淋滤的工业应用性仍有异议^[12]。目前, 有关真菌的生物淋滤仍然集中于少数具有大量产生有机酸能力的真菌, 例如 *Aspergillus niger*^[13, 14] 和 *Penicillium simplicissimum*^[15]。生物淋滤是在重金属含量较高的环境中进行, 因此, 无论细菌或真菌生物淋滤, 高抗重金属盐菌株无疑比弱重金属盐抗性菌株更具优势。本实验室曾报道了 1 株高抗多种重金属盐的 *P. janthinellum* 菌株 GXCR^[16]。本研究目的是探讨该菌株对低品位黄铜矿中生物淋滤的可行性及其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 菌株、培养基、培养条件及接种体

所用菌株为高抗多种重金属盐的 *P. janthinellum* 菌株 GXCR^[16]。正常生长培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[17]。金属淋滤培养基为改良的 Czepek Dox 矿质培养基: 1 号培养基 (1.5 g NaNO₃, 0.50 g K₂HPO₄, 0.25 g MgSO₄, 0.01 g FeSO₄, 0.025 g KCl, 适量的微量元素, 水 1 L)。2 号培养基(0.5 g K₂HPO₄, 0.25 g MgSO₄, 0.01 g FeSO₄, 0.025 g KCl, 100 g 蔗糖, 适量的微量元素, 水 1 L), 3 号培养基 (1.5 g NaNO₃, 0.5 g K₂HPO₄, 0.25 g MgSO₄, 0.01 g FeSO₄, 0.025 g KCl, 100 g 蔗糖, 适量的微量元素, 水 1 L)。所有培养基均经 1 × 10⁵ Pa、30 min 湿热灭菌。真菌培养生长温度 32°C。接种体为取自 PDA 培养基上 32°C 培养 7 d 的分生孢子, 制成 3 × 10⁷ 分生孢子/L 的孢子液备用。

1.2 矿石样品

低品黄铜矿采自广西德宝铜矿区。矿石粉碎后过筛并灭菌。对 200 目的矿石分析表明, 所用矿石含 5.435% (W/W) Cu 和 10.43% (W/W) Fe。

1.3 淋滤辅助添加剂

果糖、蔗糖、葡萄糖、蛋白胨、酵母浸出膏、柠檬酸(Citric acid)和草酸(Oxalic acid)为购买的商业化学试剂, 其中果糖、蔗糖、葡萄糖、柠檬酸和草酸均为分析纯。蔗糖糖蜜采自广西地方糖厂。马铃薯汁和马铃薯皮为实验室自制: 100 g 马铃薯去皮加入 50 mL 水, 煮沸 20 min 过滤后, 滤液为马铃薯汁。剩余的马铃薯皮在 69°C 烘干后研磨成粉备用。所有添加剂均经湿热灭菌。

1.4 金属淋滤分析

生物淋滤采用摇浸和静置淋滤 2 种方法。摇浸淋滤: 将适量分生孢子接种于含 100 mL 淋滤培养基和一定量矿石的体积为 250 mL 的三角瓶, 32°C、120 r/min 摇床培养适当时间后, 4°C、4000 r/min 离心 5 min。测定上清液中的质子(H⁺)、草酸和柠檬酸含量。利用原子吸收法测定上清液和去除矿粒后的菌体中的金属含量, 同时将菌体于 80°C 下烘烤并称重。静置淋滤: 将适量分生孢子接种于含 20 mL 淋滤培养基和一定量矿石的直径 9 cm 培养皿, 32°C 静置培养一定时间后, 按同样方法测定淋滤液和去除矿粒后的菌体中的金属含量和菌体产量。

化学淋滤: 在含 5% (W/V) 200 目矿石并添加了柠檬酸或草酸的 1 号淋滤培养基中按照生物淋滤的条件摇浸淋滤 20 d 后, 4°C、4000 r/min 离心 5 min, 利用原子吸收法测定上清液中 Cu 和 Fe 的含量。对照为不加柠檬酸或草酸条件下平行处理的矿石。

1.5 正交实验设计

用正交实验设计助手软件设计 (<http://www.bioon.com/Soft/Class1/Class19/200410/300.html>)。正交设计为 4 因素 4 水平(L₁₆(4⁴))。4 个因素设计为淋滤培养基、初始 pH、矿石浓度、矿石颗粒大小和初始接种菌量。每因素设计为 4 水平(表 1)。

1.6 H⁺、草酸和柠檬酸含量的测定

H⁺浓度采用酸碱滴定法^[18]; 草酸采用按照比色法^[19], 测定条件为显色体系 pH 值 2.3, 比色波长 510 nm, 比色 20 min。柠檬酸采用褪色光度法^[20], 测定条件为 470 nm, 常温显色 10 min。所用仪器为 722 型冷光分光光度计(上海科学精密有限公司)。所用试剂为分析纯或标样。

1.7 原子吸收分析

金属的原子吸收测定按照标准的方法^[21]在装备有石墨雾化器的 Hitachi Z-8000 原子吸收仪(Hitachi, Tokyo, Japan) 上进行。

1.8 扫描电镜观察(SEM)

在初始 pH 6.0、含 5% (W/V) 400 目矿石和 3×10⁵分生孢子/mL 的 3 号淋滤培养基中静置浸没淋滤 20 d 后, 按照常规的方法处理样品并用 HITACHI EDAX S-3400N 进行电镜进行观察。

2 结果

2.1 碳源对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

酸可以促进金属的微生物生物淋滤, 微生物产酸与碳源密切相关^[2,14]。本研究以质子浓度指示 GXCR 菌体的产酸量。结果表明, 摇浸淋滤的 Cu 的浸出率远高于静置淋滤, 碳源对 GXCR 的产酸量和 Cu 的浸出率有很大影响, 产酸量和 Cu 的淋滤浸出率呈正相关关系(图 1), 最适产酸的碳源是蔗糖(图 1)。在摇浸淋滤并添加蔗糖条件下, GXCR 的产酸量和 Cu 的淋滤浸出率分别达到 5 mmol/L 和 71.1% (W/W), 虽然添加葡萄糖时, GXCR 的产酸量达到 4.3 mmol/L, 但是最大 Cu 的淋滤浸出率仅为 13.46% (图 1)。摇浸淋滤时, 各单一碳源的最佳添加浓度为 10% (W/V)(图 2)。

表 1 正交实验设计中的水平和因素设计
Table 1 Design of levels and factors in the orthogonal experiment

Level	Factor	Initial pH in medium A	Slurry density (% W/V) B		Particle size (mesh) C		Initial inoculum (×10 ⁵ conidia /mL) D
			Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	
1		2	9	10	200	400	3.6
2		4	7	15	400	200	32.4
3		6	5	20	150	150	1.8
4		8	3	25	50	50	

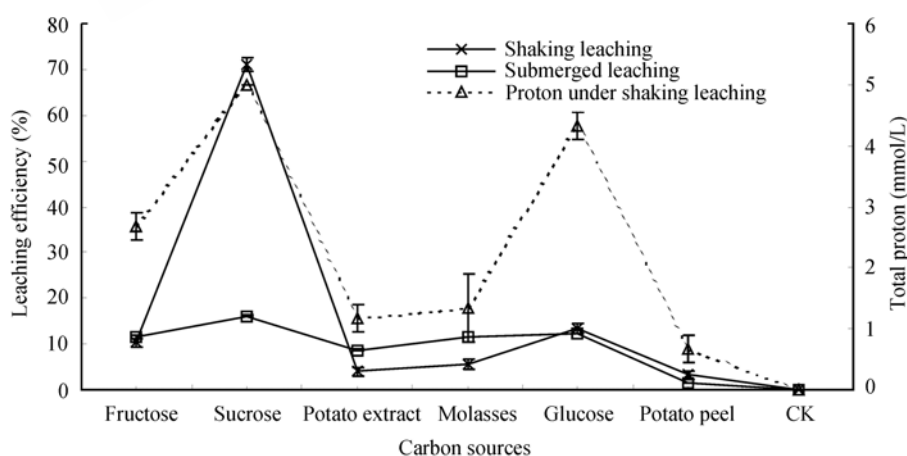


图 1 碳源对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on Cu bioleaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR
Bioleaching was conducted for 20 d in leaching medium no. 1 with an initial pH 6.0, 5% (W/V) of the 200-mesh ore and initial inocula of 3×10⁵ conidia/mL. The error bar indicates the standard deviation (SD) from three independent tests

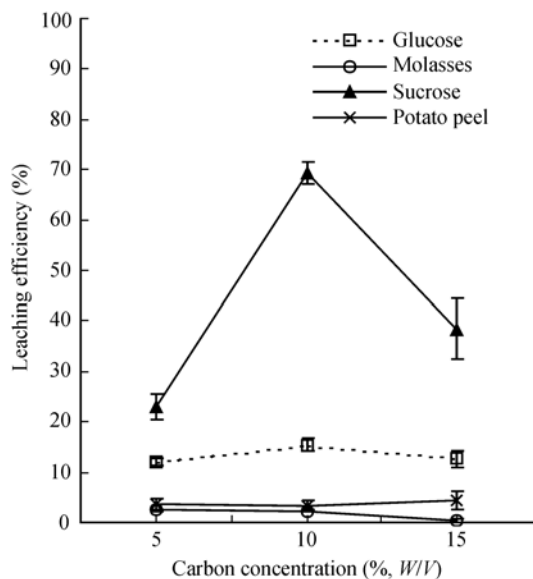


图2 碳源浓度对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 2 Effects of carbon source concentrations on Cu bioleaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR

Bioleaching was conducted in shaking for 20 d in leaching medium no. 1 with appropriate amounts of carbon sources, initial pH 6.0, 5% (W/V) of the 200-mesh ore and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests

2.2 氮源对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

如同碳源, 氮源也对 GXCR 的产酸和 Cu 的淋滤浸出率有显著影响, 与文献报道结论相符^[2, 14]。产酸量和 Cu 的淋滤浸出率基本呈正相关关系(图 3)。在添加最适碳源蔗糖条件下, 产酸和 Cu 淋滤浸出的最适氮源是 NaNO₃。添加 NaNO₃(1.5%, W/V)时, GXCR 的产酸量达到 5.17 mmol/L, Cu 的淋滤浸出率达到 73.65%。例外的是, 摇浸并且添加蛋白胨(Peptone)时, GXCR 的产酸量接近添加 NaNO₃时的水平, 但是, Cu 的淋滤浸出率仅为 20.83%。

2.3 淋滤培养基初始 pH 对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

金属生物淋滤浸出具有高度 pH 依赖性^[22], 但是并不清楚淋滤的初始 pH 的影响。在摇浸并且添加最适碳源的蔗糖和氮源 NaNO₃ 条件下, 淋滤培养基的初始 pH、GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率没有显著的相关性(图 4)。淋滤培养基初始 pH 4 时, GXCR 产酸量最高, 但此时的 Cu 的浸出率并不是最高。最高 Cu 的浸出率出现在淋滤培养基初始 pH 6 条件下。淋滤培养基初始 pH 4 时的 Cu 的浸出率仅为淋滤培养基初始 pH 6 时的 30%。

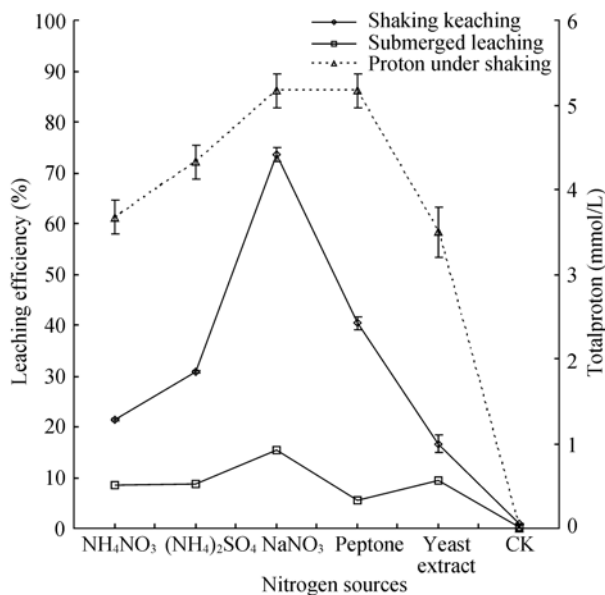


图3 氮源对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen sources on Cu leaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR

Bioleaching was conducted for 20 d in leaching medium no. 2 with initial pH 6.0, 1.5% (W/V) of nitrogen sources, 5% (W/V) of 200-mesh ore and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests

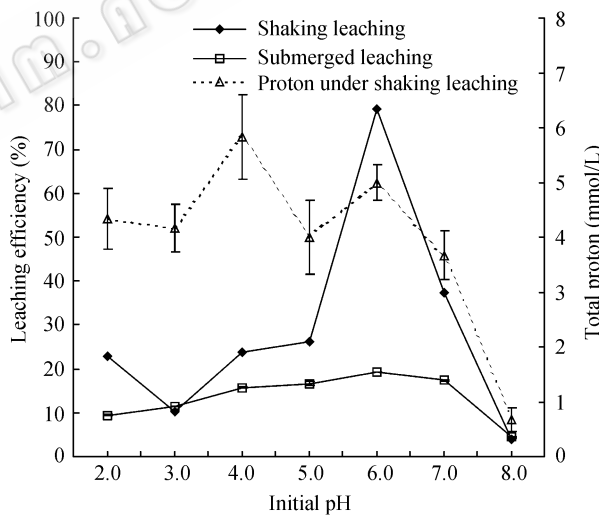


图4 初始 pH 对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 4 Effects of initial pH in the medium on Cu bioleaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR

Bioleaching was conducted for 20 d in leaching medium no. 3 with 5% (W/V) of the 200-mesh ore and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests

2.4 矿石浓度对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

矿石浓度是影响金属生物淋滤的因素之一^[14]。如图 5 所示, 矿石浓度对 GXCR 产酸量和 Cu 的生物

淋滤浸出也有明显影响。Cu 的浸出率随矿石浓度的增加而减少, 摇浸和静置淋滤的最佳的淋滤矿石浓度分别为 5% 和 20%。但是矿石浓度、GXCR 产酸量和 Cu 的生物淋滤浸出率之间无显著的相关性。

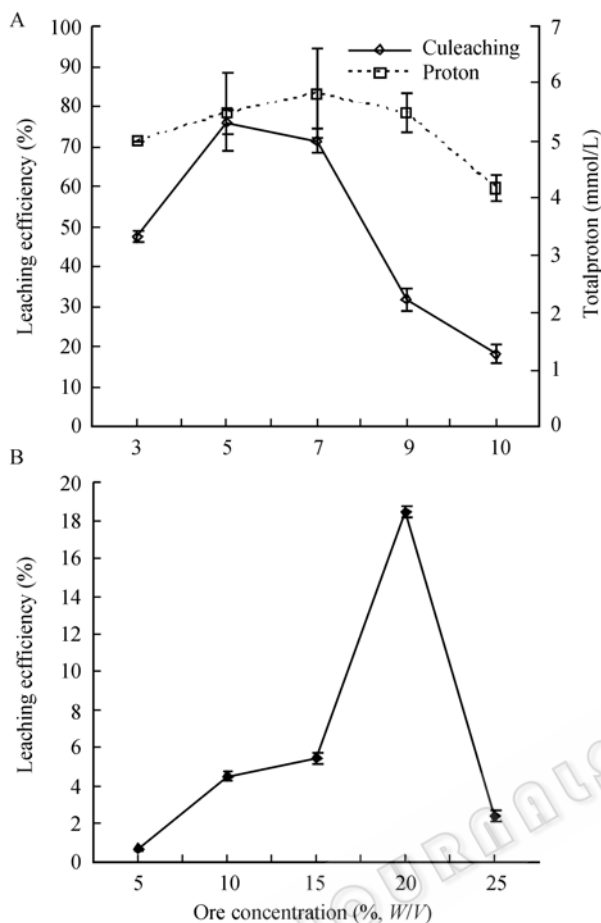


图 5 矿石浓度对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 5 Effects of slurry density on Cu bioleaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR

Bioleaching was conducted in shaking (A) and submerged (B) methods for 20 d in leaching medium no. 3 with the 200-mesh ore, initial pH 6.0 and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests

2.5 矿石颗粒大小对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

研究表明矿石大小是影响金属生物淋滤的因素之一^[14, 23]。在矿石颗粒小于 200 目范围内, 摇浸条件下, GXCR 的产酸量和 Cu 的浸出率随矿石粒度变小而增加, 静置浸没淋滤则相反(图 6), 这可能是因为矿石粒度愈小, 通气不畅供氧不良, 导致菌体生长受限。在矿石颗粒 200 目时, 摇浸时的 GXCR 的产酸量和 Cu 的浸出率最高, 分别为 5.5 mmol/L 和

8.4% (图 6), 当超过 200 目或处于混合目(50、150 和 200 目, 按 1:1:1 混合)时, GXCR 的产酸量和 Cu 的浸出率在摇浸时转而下降, 在静置淋滤时却呈增加趋势(图 6)。这说明在无论摇浸还是静置浸没淋滤, 在适当特别是较高矿石含量情况下, 矿石粒度愈小虽然可以增加菌体淋滤表面积, 有助于提高淋滤效率, 但是矿石粒度太小会导致淋滤过程中的通气状况不良。

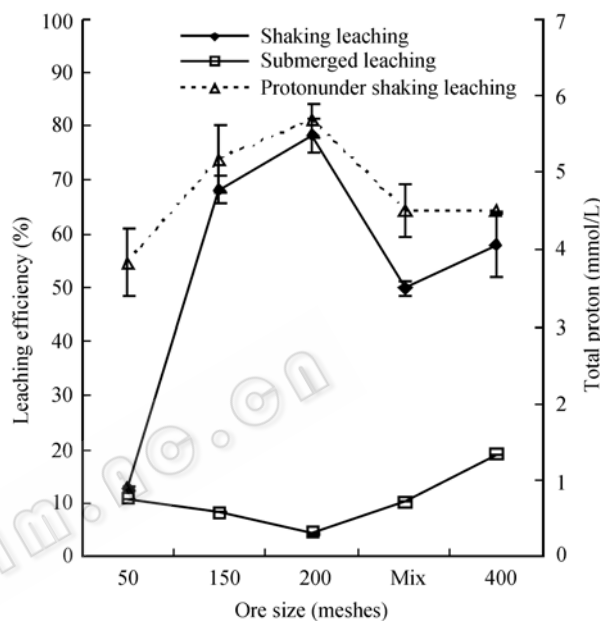


图 6 矿石颗粒大小对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 6 Effects of ore particle size on Cu leaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR

Bioleaching was conducted for 20 d in leaching medium no. 3 with an initial pH 6.0, 5% (W/V) of the ore and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests. Mixed: ore mix with 50-, 150- and 200-mesh ore in the ratio of 1:1:1

2.6 初始接种菌量对 GXCR 的产酸和 Cu 生物淋滤浸出率的影响

在初始接种菌量小于 3×10^5 分生孢子/mL 的范围内, GXCR 的产酸量和 Cu 的淋滤浸出率随着接种菌量的增加而增加, 当接种菌量大于 3×10^5 分生孢子/mL 时, 产酸量和 Cu 的浸出率随接种菌量的增加急剧下降(图 7)。最适初始接种菌量为 3×10^5 分生孢子/mL, 在此条件下, 产酸和 Cu 的浸出分别为 5.33 mmol/L 和 79.98%。

2.7 最佳淋滤条件的优化

在添加了最佳氮源 NaNO_3 (1.5%, W/V) 的 2 号淋滤培养基中淋滤的正交实验表明 (表 2), 摇浸的最

适条件组合是: A3 (淋滤培养基初始 pH 6.0), B3 (矿石浓度, 5%), C1 (矿石大小, 200 目)和 D2(初始接种菌量 3.0×10^5 分生孢子/mL), 在此条件下的 Cu 的生为: 淋滤培养基初始 pH>矿石浓度>初始接种菌量>物浸出率达到 87.31%, 单个因素的重要性依次为: 淋滤培养基初始 pH>矿石浓度>初始接种菌量>矿石颗粒大小, 对淋滤影响最大的关键的因素是淋滤培养基初始 pH ($F>0.05$)(表 3)。静置淋滤的最佳条件组合与摇浸的基本相似, Cu 淋滤浸出率仅为 27.76%, 虽然单个因素的重要性可排序为: 淋滤培养基初始 pH>矿石浓度>矿石颗粒大小>初始接种菌量, 但是单一因素的重要性间没有显著差异($F<0.05$)(表 3)。

2.8 摇浸和静置淋滤下的菌体产量

按照最佳淋滤条件组合测定比较了摇浸淋滤和静置淋滤的菌体的生物量。结果表明, 在同样初始接种菌量条件下, 摇浸淋滤时产生的菌体的生物量远高于静置淋滤条件下的菌体的生物量, 大约为 2~4

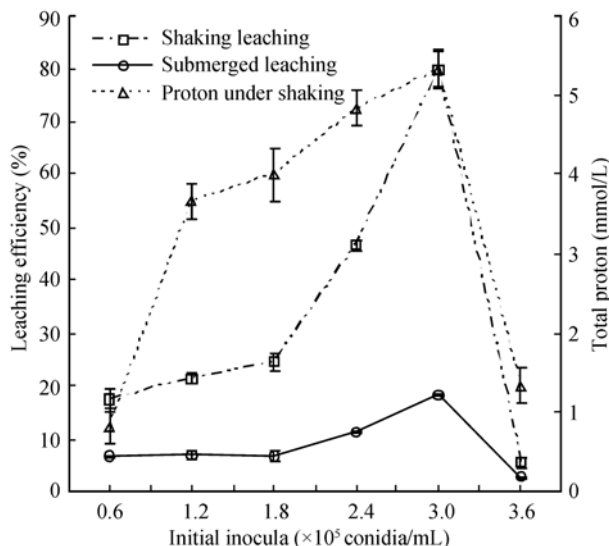


图 7 接种菌量对真菌菌株 GXCR 的 Cu 的生物淋滤效率和总酸产量的影响

Fig. 7 Effects of the amount of inocula on Cu leaching efficiency and yield of total protons of the fungal strain GXCR. Bioleaching was conducted for 20 d in leaching medium no. 3 with an initial pH 6.0 and 5% (W/V) of the 200-mesh ore. The error bar indicates the SD from three independent tests

表 2 正交实验中的 GXCR 菌株的生物淋滤效率(20 d)
Table 2 Biorecovery efficiency of the strain GXCR in orthogonal experiments (20 d)

Factors No.	A		B		C		D		e ^a		Leaching efficiency (%) ^b	
	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10.87±0.67	9.41±0.42
2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	7.21±3.49	5.36±0.33
3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	9.72±0.85	8.16±0.27
4	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	14.63±3.55	10.74±0.20
5	2	2	1	1	2	2	3	3	4	4	15.74±3.47	12.82±0.09
6	2	2	2	2	1	1	4	4	3	3	15.90±1.96	13.08±0.16
7	2	2	3	3	4	4	1	1	2	2	36.53±2.37	10.71±0.04
8	2	2	4	4	3	3	2	2	1	1	30.90±2.87	10.32±0.82
9	3	3	1	1	3	3	4	4	2	2	19.56±6.34	14.08±0.96
10	3	3	2	2	4	4	3	3	1	1	48.17±5.29	20.63±0.03
11	3	3	3	3	1	1	2	2	4	4	87.31±2.58	27.76±0.03
12	3	3	4	4	2	2	1	1	3	3	64.84±1.44	16.36±0.04
13	4	4	1	1	4	4	2	2	3	3	2.56±1.15	4.95±0.10
14	4	4	2	2	3	3	1	1	4	4	10.99±2.48	8.78±0.66
15	4	4	3	3	2	2	4	4	1	1	16.73±5.48	8.20±0.03
16	4	4	4	4	1	1	3	3	2	2	5.44±1.31	3.57±0.67
Average 1	10.607	8.418	12.183	10.315	29.835	13.455	30.812	11.315	26.668	12.140		
Average 2	24.767	11.732	20.567	11.963	26.135	10.685	31.950	12.098	17.185	8.430		
Average 3	54.930	19.707	37.527	13.707	17.792	10.335	19.767	11.295	23.260	10.638		
Average 4	8.930	6.375	28.957	10.248	25.473	11.758	16.705	11.525	32.123	15.025		
Range	46.000	13.332	25.344	3.459	12.043	3.120	15.245	0.803	14.938	6.595		

Biorecovery was conducted for 20 d in the leaching medium no.3; ^a error; ^b values are the means ± SD from three experiments

表 3 正交实验中的各因素的差异性分析
Table 3 Significant analysis of individual factors in orthogonal experiments

Source of variation	SS		df		F		$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching	Shaking leaching	Submerged leaching		
A	5444.406	412.684	3	3	11.587*	4.488	9.280	29.500
B	1425.556	32.186	3	3	3.034	0.350	9.280	29.500
C	306.762	23.585	3	3	0.653	0.256	9.280	29.500
D	712.510	1.681	3	3	1.516	0.0018	9.280	29.500
e	469.86	91.96	3	3				

* $F > 0.05$

倍(图 8)。在初始接种菌量小于 3.0×10^5 分生孢子/mL 范围内, 最终菌体生物量随着初始接种菌量增加而增加。在 3.0×10^5 分生孢子/mL 条件下, 菌体生物量最大。接种菌量超过 3.0×10^5 分生孢子/mL 时, 菌体生物量下降。这一结果支持了正交实验中所发现的最佳接种菌量, 同时也说明静置浸没淋滤效率低下是因为菌体生长量较低缘故。

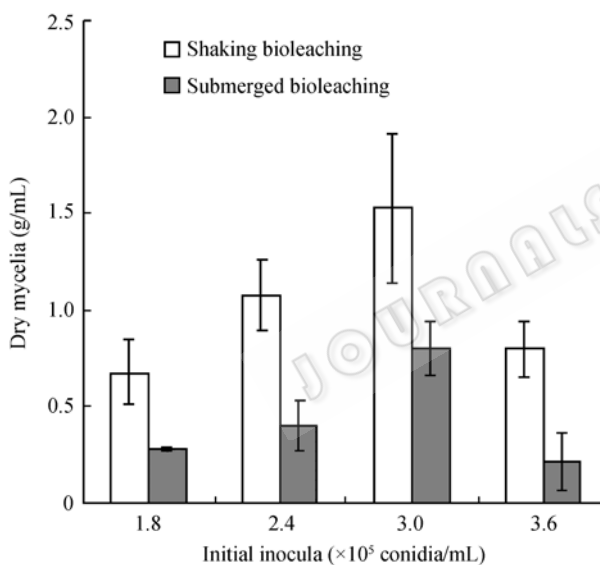


图 8 摇浸淋滤和静置淋滤条件下的菌体的生物量
Fig. 8 Biomass change of the fungal strain GXCR in shaking bioleaching

Mycelial biomass is presented by weight of dry mycelia cultured with initial inocula of 3×10^5 conidia/mL in leaching medium no. 2 with an initial pH 6.0, 5% (W/V) of 200-mesh ore and 1.5% (W/V) NaNO_3 . The error bar indicates the SD from three independent tests

2.9 淋滤时间对 GXCR 的酸产量、Cu 和 Fe 的生物淋滤浸出率的影响

由于淋滤黄铜矿中 Fe 含量较高, 进一步测试了最佳条件组合下的摇浸淋滤时间对酸产量、Cu 和 Fe 的浸出率的影响。结果表明 GXCR 的酸产量(总酸、

柠檬酸和草酸)、Cu 和 Fe 的浸出率随淋滤时间增加而增加, 三者之间有显著的相关性(图 9)。在测试的时间范围内, 淋滤 20 d 后, Cu 淋滤浸出率是 Fe 的浸出率的 32.38 倍, 柠檬酸和草酸的总量占总酸的 70.17%, 其中柠檬酸产量是草酸产量的 2.1 倍。说明这 2 种有机酸可能在该菌的生物淋滤中起主要作用。

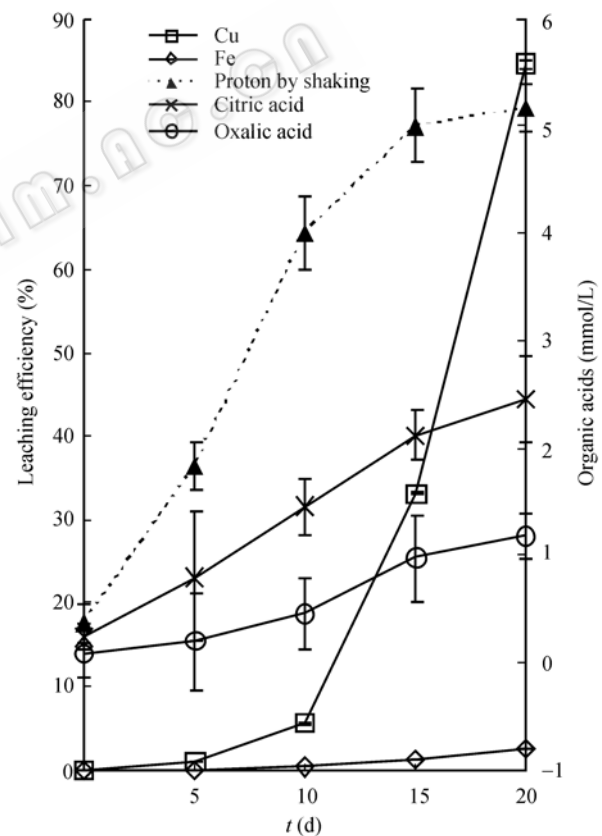


图 9 摇浸淋滤条件下真菌菌株 GXCR 的 Cu 和 Fe 的生物淋滤效率和酸产量的变化

Fig. 9 Changes of Cu and Fe bioleaching efficiencies as well as acid yield of the fungal strain GXCR over leaching time in shaking bioleaching

Bioleaching was conducted for 20 d under the combination of optimum conditions in leaching medium no. 2 with initial pH 6.0, 5% (W/V) of 200-mesh ore and initial inocula of 3×10^5 conidia/mL. The error bar indicates the SD from three independent tests

2.10 Cu 和 Fe 的化学淋滤

为验证柠檬酸和草酸在该菌的生物淋滤中的淋滤作用(图 8), 在未添加菌体而分别添加柠檬酸和草酸按照摇浸条件分析了这两种有机酸对该矿石中的 Cu 和 Fe 的浸出效果(图 10)。结果表明随有机酸用量的增加, Cu 和 Fe 的浸出率增加。在测试酸浓度为 0.5%(W/V)时, 柠檬酸对 Cu 和 Fe 的浸出率为 52.48% 和 16.41%, 草酸对 Cu 和 Fe 的浸出率为 13.52% 和 54.05%, 而对照中的 Cu 和 Fe 的含量几乎为零。说明 Cu 和 Fe 的浸出明显的呈有机酸特异性, Cu 浸出的最适有机酸是柠檬酸, Fe 浸出的最适有机酸是草酸。也证实了柠檬酸和草酸在 GXCR 的生物淋滤中起重要作用。

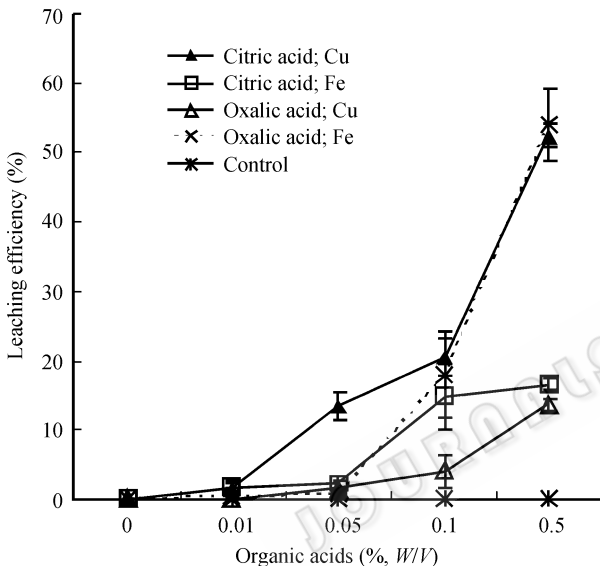


图 10 Cu 和 Fe 的化学淋滤

Fig. 10 Chemical leaching of Cu and Fe

The error bar indicates the SD from four independent tests

2.11 静置淋滤下的菌体和矿石形态

电镜观察表明, 静置淋滤下的菌体紧密附着生长于矿石颗粒表面, 大约有 90% 的附着有菌体的矿石产生有长形的裂隙(图 11), 而未淋滤处理的矿石颗粒中没有这种长形裂隙存在。说明 GXCR 生长过程中产生的机械力对矿石的破碎作用也是金属淋滤浸出的重要机制之一。

3 讨论

真菌 *Aspergillus* 和 *Penicillium* 生物淋滤研究表明^[24], 真菌的生物淋滤的机制是多样的^[25], 但是

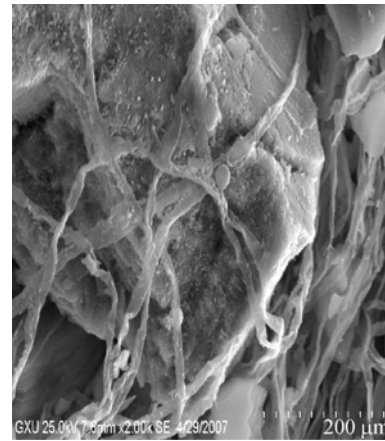


图 11 菌体和矿石颗粒形态的电镜观察

Fig. 11 Observation of mycelia and ore particles in submerged leaching by scanning electron microscopy

柠檬酸和草酸的作用最为关键^[26]。这两种有机酸的生物合成与三羧酸循环(TAC)途径有关^[25]。因此, 碳、氮源的供给对于真菌的生物淋滤十分重要^[27, 28]。葡萄糖和果糖的同时增加更有利于增加糖酵解途径的通量^[29], 提高 TAC 循环效率和有机酸的产率, 因此, 蔗糖是 GXCR 在 Cu 生物淋滤的最佳碳源(图 1)。本研究测试氮源包括了氨态氮 $[\text{NH}_4\text{NO}_3]$ 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、硝态氮 (NaNO_3) 以及复杂的有机氮源(蛋白胨 peptone 和酵母浸出膏 yeast extract)。在测试浓度水平, 氨态氮不利于 GXCR 菌株对 Cu 和 Fe 的生物淋滤浸出(图 2), 这是因为该类氮源降低了真菌的生长比速率, 减缓了柠檬酸生物合成过程^[28]。

为了降低实际生产中的真菌生物淋滤成本, 国内外曾经尝试过多种低成本的替代性营养源^[14, 26]。甘蔗糖蜜是广西本地的一大宗制糖副产品, 糖蜜的主要成份是修饰后的蔗糖 ($\alpha\text{-D-glucopyranosyl-}\beta\text{-D-fructofuranoside}$)。生物对糖蜜的利用主要取决于蔗糖酶^[29]。但是该类糖蜜并不是 GXCR 在生物淋滤浸出 Cu 时的良好碳源, 可能的原因是该菌株缺乏蔗糖酶或蔗糖酶活性较低。

虽然许多研究也进行了生物淋滤的条件优化, 而且主要针对于某一单一因子^[9-15, 24, 25], 但是各因子在生物淋滤的重要程度并不清楚。本研究表明, 淋滤培养基初始 pH 是摇浸的最重要的因素, GXCR 生物淋滤浸出 Cu 时的最佳淋滤培养基初始 pH 6 (表 2)。这可能与真菌的 $\text{H}^+\text{-ATPase}$ 酶在 pH 6.0 最强, pH

7.5 时酶活反而下降的特性有关^[30]。H⁺-ATPase 酶是促进柠檬酸分泌出真菌细胞的一种重要酶类^[31]。此外, 糖酵解中的与葡萄糖和果糖磷酸化的关键的己糖激酶的活性在 pH 6.5 最强^[32]。

本研究中, Cu 的生物淋滤浸出率从淋滤第 5 天后开始明显增加(图 9)。类似的变化也曾发生在 *A. niger* 的生物淋滤过程中。这与该时期的真菌产酸量明显增加有关^[14, 24]。这些结果表明, 真菌生物淋滤的第 5 天是控制并提高金属生物浸出率的重要时间点。

一般而言, 增加初始接种菌量, 有助于提高有机酸产量^[33]。当初始接种菌量超过 3×10^5 分生孢子/mL, GXCR 的对金属的生物淋滤浸出率和产酸量下降(图 7)。这是因为高接种菌量不仅降低了溶解氧水平而且降低了氨离子吸收^[34], 同时在营养有限情况下, 过量的菌体会导致营养过早、过度消耗, 从而影响有机酸的产生。

细菌淋滤机制之一是通过细菌细胞的直接接触^[35]。直接淋滤的证据来自嗜热细菌 *Sulfolobus rivotincti* 对黄铜矿的生物淋滤, 一些矿石的表面形成与细菌细胞大小相似的“坑”, 特别是在细菌细胞附着的矿石表面附近发现了明显的裂缝^[36]。类似的裂隙现象也发现在 GXCR 生物淋滤中(图 11), 这种裂隙很可能与真菌生长中的产生的机械压力有关, 很显然, 这种裂隙有助于酸类物质淋滤矿石内部的金属。

虽然静置淋滤在生产中具有低能耗的优势, 但是生物淋滤效率很低, 主要原因是通气较差, 氧供应不足^[36, 37], 导致菌体的生物量低。低的菌体生物量导致低产酸量, 最终产生了低的生物淋滤效率。部分原因也是可能与菌体不能充分与矿石颗粒表面完全接触有关。

REFERENCES

- [1] Rawlings DE, Dew D, du Plessis C. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**(1): 38–44.
- [2] Lee EY, Noh S, Cho K, et al. Leaching of Mn, Co, and Ni from manganese nodules using an anaerobic bioleaching method. *J Biosci Bioeng*, 2001, **92**(4): 354–359.
- [3] Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, **20**(3-4):

591–604.

- [4] Coram NJ, Rawlings DE. 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. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(2): 838–845.
- [5] Goebel BM, Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(5): 1614–1621.
- [6] Hallberg KB, Johnson DB. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv Appl Microbiol*, 2001, **49**: 37–84.
- [7] Hallberg KB, Lindstrom EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology*, 1994, **140**(Pt 12): 3451–3456.
- [8] Kelly DP, Wood AP. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *hermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(Pt 2): 511–516.
- [9] Rawlings DE, Tributsch H, Hansford GS. 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. *Microbiology*, 1999, **145**(Pt 1): 5–13.
- [10] Rawlings DE, Johnson DB. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 2007, **153**(Pt 2): 315–324.
- [11] Valenzuela L, Chi A, Beard S, et al. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol Adv*, 2006, **24**(2): 197–211.
- [12] Kobayshi T, Van Dedem G, Moo-Young M. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Bio Bioeng*, 1973, **15**(1): 27–45.
- [13] Mulligan CN, Kamali M. Bioleaching of copper and other metals from low-grade oxidized mining ores by *Aspergillus niger*. *J Chem Technol & Biotechnol*, 2003, **78**(5): 497–503.
- [14] Mulligan CN, Kamali M, Gibbs BF. Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. *J Hazard Mater*, 2004, **110**(1-3): 77–84.
- [15] Franz A, Burgstaller W, Schinner F. Leaching with *Penicillium simplicissimum*: Influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(3): 769–774.
- [16] Wei MK, Tang HY, Liang L, et al. Characteristics of high resistance to heavy metal salts and uptake of Cu²⁺ and Zn²⁺ ions of *Penicillium janthinellum*. *Mycosystem*, 2006, **25**(4): 616–623.
韦明肯, 唐华英, 梁铃, 等. 青霉菌 *Penicillium janthinellum* 菌株 GXCR 的高抗重金属盐及其对 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 离子吸收的特性. 菌物学报, 2006, **25**(4): 616–623.
- [17] Shepherd MG, Sullivan PA. The production and growth characteristics of yeast and mycelial forms of *Candida*

- albicans* in continuous culture. *J Gen Microbiol*, 1976, **93** (2): 361–370.
- [18] Wuhan University. Experiment of Analytical Chemistry, fourth edition. Peking: High Education Press. 2001: 202–206.
武汉大学. 分析化学实验, 第 4 版. 北京: 高等教育出版社. 2001, 202–206.
- [19] Duan LZ, Wang JF, Zhao JR. Study on the determining conditions of oxalate content in spinach with coloration method., *J Anhui Agri Sci*. 2007, **35**(3): 632–633.
段立珍, 汪建飞, 赵建荣. 比色法测定菠菜中草酸含量的条件研究. *安徽农业科学*, 2007, **35**(3): 632–633, 643.
- [20] Zhang LP, Xiao CM. Determination of citric acid with discoloration spectrophotometry. *J Sichuan Univ Sci & Eng (Natural Science Edition)*. 2005, **18**(1): 6–8.
张丽萍, 肖春梅. 褪色光度法测定柠檬酸含量. *四川理工学院学报(自然科学版)*, 2005, **18**(1): 6–8.
- [21] Perkin-Elmer Corp. Perkin-Elmer manual. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry, 1982.
- [22] Chen SY, Lin JG. Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. *Chemosphere*, 2001, **44**(5): 1093–1102.
- [23] Hossain SM, Das M, Begum KMMS, et al. Bioleaching of zinc sulphide (ZnS) ore using *Thiobacillus ferrooxidans*. *IE (I) Journal-CH*, 2004, 85: 7–11.
- [24] Aung KM, Ting YP. Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. *J Biotechnol*, 2005, **116**(2): 159–170.
- [25] Gadd GM. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. *Adv Microb Physiol*, 1999, **41**: 47–92.
- [26] Strasser H, Burgstaller W, Schinner F. High-yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett*, 1994, **119**(3): 365–370.
- [27] Karaffa L, Sandor E, Fekete E, et al. The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiol Immuno Hung*, 2001, **48**(3-4): 429–440.
- [28] Haq IU, Ali S, Qadeer MA, et al. Optimization of nitrogen for enhanced citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *Aspergillus niger* NGd-280. *Bioresour Technol*, 2005, **96**(5): 645–648.
- [29] Magnuson JK, Lasure LL. Organic Acid Production by Filamentous Fungi, In: Jan, Lene Lange.(Eds.), *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004, 307–340.
- [30] Burgstaller W, Müller B, Schinner F. The *in vivo* effect of glucose and extracellular pH on the plasma membrane H⁺-ATPase of *Penicillium simplicissimum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, **147**: 109–114.
- [31] Gallmetzer M, Burgstaller W. Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process, adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways. *Microbiology*, 2002, **148**(Pt 4): 1143–1149.
- [32] Panneman H, Ruijter GJ, van den Broeck HC, et al. Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase--the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *Eur J Biochem*, 1998, **258**(1): 223–232.
- [33] Papagianni M. Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures. *Microb Cell Fact*, 2006, **5**(1): 5.
- [34] Papagianni M, Mattey M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microb Cell Fact*, 2006, **5**: 3.
- [35] Suzuki I. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**(2): 119–132.
- [36] Gómez E, Blázquez ML, Iñesta A, et al. Study by SEM and EDS of chalcopyrite bioleaching using a new thermophilic. *Miner Eng*, 1996, **9**(9): 985–999.
- [37] Leahy MJ, Schwarz MP, Davidson MR. An air sparging CFD model for heap bioleaching of chalcocite. *Appl Mathemat Mod*, 2006, **30**(11): 1428–1444.