



## 研究报告

## 基于铁氧化/还原菌改善黄铁矿-水草酸解液体系下低品位辉铜矿生物浸出过程

洪娴静<sup>1</sup> 冯守帅<sup>\*1</sup> 仝艳军<sup>2</sup> 杨海麟<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 江南大学生物工程学院 教育部工业微生物技术重点实验室 江苏 无锡 214122<sup>2</sup> 江南大学食品科学与技术学院 国家功能食品工程研究中心 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】高效的生物浸出与微生物介导活跃的铁硫代谢紧密关联,低品位辉铜矿( $\text{Cu}_2\text{S}$ )铁代谢匮乏严重制约其效能。【目的】强化铁硫代谢及“接触”机制改善低品位辉铜矿生物浸出。【方法】基于自主筛选的嗜酸杆菌属(*Acidiphilium* sp.)及双层平板筛选的嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*),与硫氧化菌喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)协作,加以 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -黄铁矿-纤维质废弃物酸解液(废-废资源利用)干预,系统分析浸出生化参数差异性。【结果】扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM)结果表明矿渣表面大量微孔及坑壑,表明活跃的菌体作用;傅立叶变换红外光谱仪(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)揭示N-H、C=O、O-H等键与胞外聚合物(Extracellular Polymer Substance, EPS)紧密相关,S=O、C-O-S等吸收峰波动表明更剧烈的硫代谢;激光共聚焦扫描显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)结果表明优化体系呈现更多附着细胞及EPS,为“接触”机制奠定基础,浸出40 d游离/附着细胞量分别提高2.51倍及5.73倍,最大比生长速率( $\mu_{\max}$ )出现时间提前1.5–5.3 d,最高浸出率达67.6%。【结论】铁氧化/还原菌及外源含铁物质干预强化浸出体系铁硫代谢加速矿物溶解,酸解液促进铁元素循环及菌体生长,附着细胞及EPS分泌增多强化“接触”机制从而有效改善浸出微环境和效能。

**关键词:** 低品位辉铜矿, 生物浸出过程, 改善, 废物处理

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (21878128, 21776113)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-510-85326829

E-mail: FENG Shoushuai: fengss@jiangnan.edu.cn; YANG Hailin: bioprocessor@126.com

**Received:** 19-02-2021; **Accepted:** 31-03-2021; **Published online:** 27-04-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(21878128, 21776113)

**\*通信作者:** Tel: 0510-85326829

E-mail: 冯守帅: fengss@jiangnan.edu.cn; 杨海麟: bioprocessor@126.com

**收稿日期:** 2021-02-19; **接受日期:** 2021-03-31; **网络首发日期:** 2021-04-27

## Improvement of low-grade chalcocite bioleaching process under the pyrite-aquatic weed acid hydrolysate system based on iron-oxidizing and iron-reducing bacteria

HONG Xianjing<sup>1</sup> FENG Shoushuai<sup>\*1</sup> TONG Yanjun<sup>2</sup> YANG Hailin<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

<sup>2</sup> National Engineering Research Center for Functional Food, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] Efficient bioleaching is closely related to the active iron and sulfur metabolism mediated by microorganisms. Thus, the lack of iron metabolism will restrict low-grade chalcocite bioleaching. [Objective] To improve the bioleaching of low-grade chalcocite by enhancing iron and sulfur metabolism and the “contact”. [Methods] The iron-oxidizing *Leptospirillum ferriphilum* (screened with the double-plate method), iron-reducing *Acidiphilium* sp., sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus caldus*, and the Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>-pyrite-fibrous waste acid hydrolysate system (waste utilization) were combined to improve low-grade chalcocite bioleaching. [Results] A large number of micropores and pits were observed on the slag surface under the scanning electron microscope (SEM), suggesting the active action of the bacteria. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy revealed that bonds such as N–H, C=O, and O–H were closely related to extracellular polymer substance (EPS), and significantly enhanced absorption peaks of S=O and C–O–S testified more intense sulfur metabolism. Confocal laser scanning microscope (CLSM) manifested that more attached cells and EPS existed in the optimized system, laying the foundation for the “contact” mechanism. After 40 days of leaching, the concentration of planktonic and attached cells increased by 2.51 and 5.73 times, respectively. The maximum specific growth rate ( $\mu_{\max}$ ) appeared 1.5–5.3 days earlier, and the highest cupric ion leaching rate reached 67.6%. [Conclusion] The intervention of iron-oxidizing bacteria, iron-reducing bacteria, and exogenous iron-containing substances strengthens the iron and sulfur metabolism of the leaching system and accelerates the dissolution of minerals. The acid hydrolysate promotes iron circulation and the growth of bacteria. The increase in the number of attached cells and secreted EPS enhances the “contact”, thus effectively improving the bioleaching microenvironment and efficiency.

**Keywords:** low-grade chalcocite, bioleaching process, improvement, waste treatment

相较传统采选冶工艺,生物浸出技术在处理低品位矿物中显示出巨大的应用潜力及优势,能够缩短和简化工艺流程从而降低生产成本,同时减少废水废气等污染物的排放,具有良好的经济和环保效益<sup>[1-2]</sup>。辉铜矿(Cu<sub>2</sub>S)是铜矿储备资源中常见矿物之一,Cu和S为其主要组成元素,少量Fe来源于其伴生矿物黄铁矿。典型生物浸出过程涉及复杂的铁硫代谢反应,矿物中的Fe<sup>2+</sup>在微生物作用下氧化为Fe<sup>3+</sup>,后者作为强氧化剂与矿物反应使其溶解,释放的硫元素经由硫氧化菌介导的系列酶促反应最终转化为SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>,可见Fe<sup>3+</sup>是快速启

动并维持矿物持续溶解,以及同时多方面影响硫代谢的关键因素<sup>[3]</sup>。

嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)和喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)作为典型浸矿微生物普遍存在于各浸出体系并占领主导地位,能够耐受低酸度及重金属离子胁迫,显示更强的铁/硫氧化活性,此2类微生物组合被广泛应用并呈现良好的浸出性能<sup>[4-5]</sup>。多项研究表明,浸出后期积累的Fe<sup>3+</sup>水解生成黄钾铁矾钝化层覆盖于矿物表面,制约矿物进一步溶解<sup>[3]</sup>,而具有铁还原能力的菌种能够控制浸出体系的Fe<sup>3+</sup>水平减缓或消

除钝化膜生成。作为分布广泛的嗜酸异养菌,嗜酸杆菌属(*Acidiphilium* sp.)除能利用多种有机物外,部分菌种还呈现铁还原特性,可将高铁沉淀还原溶解为 $\text{Fe}^{2+}$ 。浸出体系中的 *Acidiphilium* sp.吸收利用有机物进行异养生长(如矿物溶解过程释放的有机物质、自养菌生长过程释放的代谢分泌物及菌体裂解物等),不仅有机物的抑制和毒害作用得到缓解,同时生成的二氧化碳还能促进菌体生长, *Acidiphilium* sp.的铁还原作用协同氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)的亚铁氧化能力促进浸出体系中铁元素循环,有利于矿物持续溶解<sup>[6-7]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup>发现浸出前期接种更多 *L. ferriphilum* 显著缩短延滞期,通过强化铁元素循环加速矿物溶解,释放能源物质促进各类微生物生长。另有研究表明 *Ferroplasma thermophilum* 的引入可缓解浸出体系内有机物对自养菌的抑制作用<sup>[8]</sup>。由此可见,功能各异的浸矿微生物在浸出过程的种间协同效应呈现更好的浸出性能。

为提高矿物浸出效率,除利用高效菌种外,各类添加剂如银离子、氯化钠、Triton X-100 等也被广泛研究并在一定程度促进金属离子浸出<sup>[9-11]</sup>,但均面临价格较高或高浓度下不利于菌体积累的缺陷。纤维质废弃物成本低廉、来源广泛, Sajjad 等<sup>[12]</sup>发现酸解处理的竹屑显著促进低品位矿石中铜/锌元素溶出, Panda 等<sup>[13]</sup>通过加入废报纸浓酸水解物提高低品位黄铜矿的浸出效率,推测这些酸解物的主要功能是作为催化剂协助菌体完成铁离子还原。基于酸性矿坑废水 (Acid Mine Drainage, AMD) 酸度低、 $\text{Fe}^{3+}$  含量高的特点,考虑将其应用于树叶及水草的酸解处理,其中的纤维素经酸解作用转化为还原糖,后者还原性使废水中的  $\text{Fe}^{3+}$  转化为可供铁氧化菌生长的  $\text{Fe}^{2+}$ ,同时释放大量子维持良好的浸出环境,后续生成的二氧化碳作为能源和碳源支持菌体的营养与呼吸,这种废物结合的策略能够同步实现纤维质废弃物的资源化利用及提高金属浸出效率,具有一定的科学研究意义和应用前景。

基于此,本研究提出综合硫氧化菌、铁氧化/还原菌的生长特性并利用自养菌与异养菌间协同效应,借助自主选育的铁氧化/还原菌强化铁硫代谢,采用废物利用策略借助农林废弃物改善低品位辉铜矿生物浸出,以期该类矿产资源的回收利用提供理论和技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 矿样、培养基及纤维质废弃物酸解液

实验所用低品位辉铜矿(Cu 1.1%, Fe 11.9%, S 7.4%)取自福建紫金山,黄铁矿精矿(Fe 45.0%, S 53.7%)购自湖北黄石,经研磨粉碎过筛得矿石颗粒( $\leq 48.0 \mu\text{m}$ )。X 射线衍射仪(X-Ray Diffractometer, XRD)分析表明含铜矿物为辉铜矿( $\text{Cu}_2\text{S}$ )、少量铜蓝( $\text{CuS}$ )及黄铜矿( $\text{CuFeS}_2$ ),含铁矿物为黄铁矿( $\text{FeS}_2$ )及磁铁矿( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ),脉石矿物为石英( $\text{SiO}_2$ )、明矾石 $[\text{KAl}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6]$ 、地开石 $[\text{Al}_4(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_8]$ 及方解石( $\text{CaCO}_3$ )。所用 *A. caldus* JNFS 6 为实验室保藏菌种(CCTCC M 2018054)<sup>[14]</sup>, *L. ferriphilum* 及 *Acidiphilium* sp.筛选自矿区废水。

9K 培养基(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0, KCl 0.1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01,  $\text{H}_2\text{O}$  700.0 mL; 能源底物  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  44.3 (异养菌能源底物 Glu 5.0),  $\text{H}_2\text{O}$  300.0 mL。改进的 Starkey 培养基(g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5, KCl 0.1,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0.01; 能源底物升华硫 5.0。

树叶(主要成分为香樟和木樨叶)和水草(主要成分为水鳖及水葫芦)烘干粉碎处理后,分别取 2.0 g 粉末与 10.0 mL 50%浓硫酸混合,于  $50^\circ\text{C}$ 、150 r/min 振荡 1 h 以实现完全水解,水解产物用于后续浸出试验。

### 1.2 主要试剂和仪器

七水合硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、葡萄糖( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )、升华硫(S)、三氯乙酸( $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ ),分析纯,国药集团化学试剂有限公司; SYTO<sup>TM</sup> 9 Green Fluorescent、Alexa Fluor<sup>TM</sup> 594 Conjugate,

Invitrogen 公司。

pH 计, 瑞士梅特勒托利多公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器责任有限公司; 原子吸收分光光度计 (Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS), VARIAN 公司; 扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM), FEI 公司; 傅立叶变换红外光谱仪 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR), Thermo Nicolet Corporation 公司; 激光共聚焦扫描显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM), Leica 公司。

### 1.3 铁氧化/还原菌种筛选鉴定

利用 9K 培养基对矿区采集样液中的微生物进行富集培养和筛选, 通过菌株菌落形态观察、16S rRNA 基因序列分析和同源性比对等对所获菌株进行鉴定。

#### 1.3.1 *Acidiphilium* sp. 的筛选

将包括 AMD、萃余液、硫化工艺原水等在内的 6 种矿区原液以 5% 接种量加入 100.0 mL 新鲜无铁 9K 培养基 (pH 3.0, Glu 5.0 g/L) 进行富集培养, 培养至  $OD_{600}$  约为 1.0 的菌液经  $10^{-1}$ – $10^{-9}$  系列梯度稀释后均匀涂布于固体培养基表面, 置于 37 °C 培养箱中约 2 d 即形成菌落, 取单菌落多次划线进行分离纯化, 最终获得的菌落形态一致可初步认定为纯培养物, 命名为 DX-LIX2。

#### 1.3.2 *L. ferriphilum* 的筛选

各类矿区原液以 10% 的接种量加入 100.0 mL 无菌 9K 培养基 (pH 2.5,  $Fe^{2+}$  25.0 g/L), 于 30 °C、200 r/min 振荡培养, 待培养基变成红色时取样镜检, 观察到螺旋状菌体后取 2 mL 富集液转接至新鲜培养基 (pH 2.5,  $Fe^{2+}$  50.0 g/L), 按上述方法进行培养, 再次对变红色的培养基取样镜检, 随后依次调整培养条件进行富集液转接<sup>[15]</sup>, 第 4 代富集培养液在同样的条件下连续传代培养 3 次达到稳定生长状态, 将菌液进行  $10^{-1}$ – $10^{-9}$  系列梯度稀释并接种至 9K 培养基 (pH 1.6,  $Fe^{2+}$  50.0 g/L), 于 37 °C、200 r/min 振荡培养, 最高稀释度下获得的培养物为所需菌种, 命名为 ZJ-AU1。菌落获取采用双层

平板分离技术<sup>[16]</sup>, 取 2.0 mL 培养至对数生长期的 *Acidiphilium* sp. 菌液接入无铁 9K 培养基 (pH 3.5, Glu 5.0 g/L), 与高温溶解并降至 37 °C 的琼脂溶液混合后倒入无菌培养皿, 冷凝后作为底层培养物, 再倒入常规方法制备的 9K 固体培养基 (pH 3.0,  $Fe^{2+}$  22.0 g/L), 待其冷凝后取 100.0  $\mu$ L 经  $10^{-1}$ – $10^{-3}$  梯度稀释的 ZJ-AU1 培养液均匀涂布于培养基表层。

3 种纯培养物分别用 9K 培养基 (44.3 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  或 5.0 g/L Glu) 及改进的 Starkey 培养基 (5.0 g/L  $S^0$ ) 连续传代培养, 生长至 ( $OD_{600}$  约为 1.0) 时经过滤、3 000 r/min 离心 2 min 处理并用稀硫酸溶液 (pH 2.0) 洗涤以除去铁沉淀或其他复合物, 最终收集的菌体重悬于无铁 9K 基础培养基中作为接种物用于浸出试验。

### 1.4 低品位辉铜矿生物浸出试验

向 250 mL 锥形瓶中接入 100.0 mL 无铁 9K 培养基 (pH 1.8) 和 2.0 g 铜矿石颗粒, G5–G7 组额外添加 2.0 g 黄铁矿颗粒, 除 G3 组添加 2.0 g/L  $Fe^{3+}$  外, 其余各组加入 2.0 g/L  $Fe^{2+}$  作为能源物质, G6、G7 组额外补充 3.0 g/L 树叶/水草酸解液, *L. ferriphilum* 及 *A. caldus* 等比混合接种至 G2、G3 组, *L. ferriphilum*、*A. caldus* 及 *Acidiphilium* sp. 等比混合接种至 G4–G7 组, 总菌体数量均维持  $3.0 \times 10^8$  cells/mL, 另设置非生物对照组 G1, 具体试验条件见表 1。浸出周期 40 d, 于 37 °C、180 r/min 振荡培养, 每 3 d 取样进行理化参数及细胞浓度分析, 每天补加 2.0 mL 灭菌蒸馏水用于平衡蒸发损失。

### 1.5 基本理化参数分析

pH 测定: 使用 pH 计测定。

$Fe^{2+}/Fe^{3+}$  浓度测定: 采用邻菲罗啉分光光度法<sup>[17]</sup>,  $Fe^{2+}$  与邻菲罗啉生成稳定橙红色络合物 (pH 2.0–9.0), 于 508 nm 处测定其吸光度。盐酸羟胺使  $Fe^{3+}$  还原为  $Fe^{2+}$ , 计算总铁含量,  $Fe^{3+}$  浓度即为总铁与  $Fe^{2+}$  含量的差值。



表 1 生物浸出试验条件  
Table 1 Conditions of bioleaching experiments

| 组别<br>Groups | Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup><br>(2.0 g/L) | 接种物<br>Inoculum  | 铜矿石<br>Mineral (g) | 黄铁矿<br>Pyrite (g) | 酸解液<br>Acid hydrolysate (g/L) |
|--------------|---|--|--------------------|-------------------|-------------------------------|
| G1           | —   | —  | 2.0                | —                 | —                             |
| G2           | Fe <sup>2+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i>                           | 2.0                | —                 | —                             |
| G3           | Fe <sup>3+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i>                           | 2.0                | —                 | —                             |
| G4           | Fe <sup>2+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i> + <i>Acidiphilium</i> sp. | 2.0                | —                 | —                             |
| G5           | Fe <sup>2+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i> + <i>Acidiphilium</i> sp. | 2.0                | 2.0               | —                             |
| G6           | Fe <sup>2+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i> + <i>Acidiphilium</i> sp. | 2.0                | 2.0               | 3.0 <sup>a</sup>              |
| G7           | Fe <sup>2+</sup>                                | <i>L. ferriphilum</i> + <i>A. caldus</i> + <i>Acidiphilium</i> sp. | 2.0                | 2.0               | 3.0 <sup>b</sup>              |

注: a: 3.0 g/L 树叶酸解液; <sup>b</sup>: 3.0 g/L 水草酸解液; —: 不添加  
Note: a: 3.0 g/L acid hydrolysate of leaves; <sup>b</sup>: 3.0 g/L acid hydrolysate of aquatic weeds; —: No addition

SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 含量测定: 采用铬酸钡分光光度法<sup>[17]</sup>, 铬酸钡与硫酸盐反应释放铬酸根离子, 碱性条件下呈黄色, 测定其吸光度可换算得硫酸盐含量。

Cu<sup>2+</sup>浓度测定: 将铜标准溶液(1 000 μg/mL)进行梯度稀释, 浓度依次为 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mg/L, 用 AAS 测定各浓度条件对应的吸光度并建立标准曲线, 各浸出体系溶液经 3 000 r/min 离心 2 min 去除矿渣, 上清液稀释 100 倍后测定吸光度, 带入标准曲线获得 Cu<sup>2+</sup>浓度。

附着及游离细胞浓度测定: 采用核酸法<sup>[18]</sup>, 混合均匀的浸出液 3 000 r/min 离心 2 min 使矿物沉降, 上清液经适度稀释与 5%三氯乙酸等体积混合, 依次经水浴、冰浴处理后测定 260 nm 处的吸光度; 矿渣以无菌水重悬并漩涡振荡后再次离心得附着细胞, 经适度稀释后与三氯乙酸等体积混合进行水浴及冰浴处理, 测定相应的吸光度, 根据显微镜技术与吸光度建立的标准曲线计算实际细胞浓度。

1.6 矿物理化特征分析

矿渣表面形貌分析: 矿渣干燥后取适量平铺并固定于铝制样品台, 利用 SEM 观察矿渣表面形貌, 扫描速度为 300–30 ns。

矿渣表面官能团分析: 矿渣与 KBr 以 1:100 的比例混合加入研钵反复研磨, 油压制样后用 FTIR 测量 400–4 000 cm<sup>-1</sup> 波长范围内的红外吸收光谱。

附着细胞及胞外聚合物(Extracellular Polymer Substances, EPS)分布: 在浸出中/后期分别从各体系取含矿浸出液, 3 000 r/min 离心 2 min 收集矿渣后用无菌水洗涤样品 2 次除去游离菌体, 先后加入二甲基亚砷(DMSO)和 SYTO<sup>TM</sup> 9 染料, 37 °C、200 r/min 避光孵育 20 min 后 3 000 r/min 离心 2 min 收集矿样, 加入 PBS 溶液洗涤后再次离心收集矿渣, 依次加入 NaHCO<sub>3</sub> (0.1 mol/L)和 Alexa Fluor<sup>TM</sup> 594 染料, 37 °C、200 r/min 避光孵育 20 min 后离心收集矿样, PBS溶液洗涤离心后再以少量去离子水重悬, 利用 CLSM 观察矿物表面菌体附着及 EPS 分布情况。

2 结果与讨论

2.1 铁氧化/还原菌 *L. ferriphilum*/*Acidiphilium* sp.筛选鉴定

从紫金山铜矿和德兴铜矿工业堆浸现场采集的萃余液、硫化工业原水和酸性矿坑废水等 10 余份样本呈现强酸、高金属离子的极端特点(pH 1.02–2.35; 总 Fe 3.2–33.3 g/L; Cu<sup>2+</sup> 0.6–1.2 g/L)。以葡萄糖为碳源经 9K 培养基富集培养筛得异养型嗜酸铁还原菌 DX-LIX2, 菌落呈圆形乳白色、凸面光滑, TEM 观察细胞呈杆状或球状[0.6 μm×(0.8–1.0) μm], 对数生长期细胞呈成对或链状生长。经 16S rRNA 基因鉴定(MW418095.1)与 *Acidiphilium organovorum*、*Acidiphilium multivorum*、*Acidiphilium cryptum* 及 *Acidiphilium*

*symbioticum* 序列相似度达 99%，与属内其他菌种相似度为 94%–95%，结合其生长特性及菌落形态可知该菌株属于嗜酸杆菌属(*Acidiphilium*)，命名为 *Acidiphilium* sp. DX-LIX2。*Acidiphilium* sp.在极端酸性环境中广泛存在，相较其他异养菌能耐受更低酸度，通常与化能自养菌形成密切关系<sup>[19]</sup>。

鉴于酸性条件易使琼脂水解成有机糖类抑制自养菌菌落形成，导致该菌种筛选困难，本研究采用双层培养方式，以异养型 *Acidiphilium* sp. DX-LIX2 为底层培养物，嗜铁钩端螺旋菌富集液涂布于上层，借助异养菌吸收利用凝固剂水解生成的有机物及代谢物，以尽可能减少后者对化能自养菌的抑制作用。上层平板培养约 5 d 形成乳白

色光滑圆形菌落，该菌( $G^-$ )氧化亚铁并在平板表面形成黄褐色沉淀(高铁复合物)。TEM结果显示菌体细胞呈曲杆状或螺旋状(长度 0.7–2.5  $\mu\text{m}$ ，直径 0.3–0.5  $\mu\text{m}$ )。经 16S rRNA 基因测序分析菌株 ZJ-AU1 (MW021515.1)与 *Leptospirillum ferriphilum* ATCC 49881 相似度接近 100%，结合生理生化特征命名为 *Leptospirillum ferriphilum* ZJ-AU1。将 2 菌种与亲缘关系较近菌种序列进行同源比对，MEGA 5.1 构建系统发育树如图 1B 所示。

## 2.2 基于铁氧化/还原菌干预下低品位辉铜矿生物浸出

### 2.2.1 生物浸出过程铁代谢

如图 2A 所示，浸出前期  $\text{Fe}^{2+}$  浓度变化显著，表明存在活跃的铁代谢反应。G1 及 G3 组分别由  $\text{H}^+$

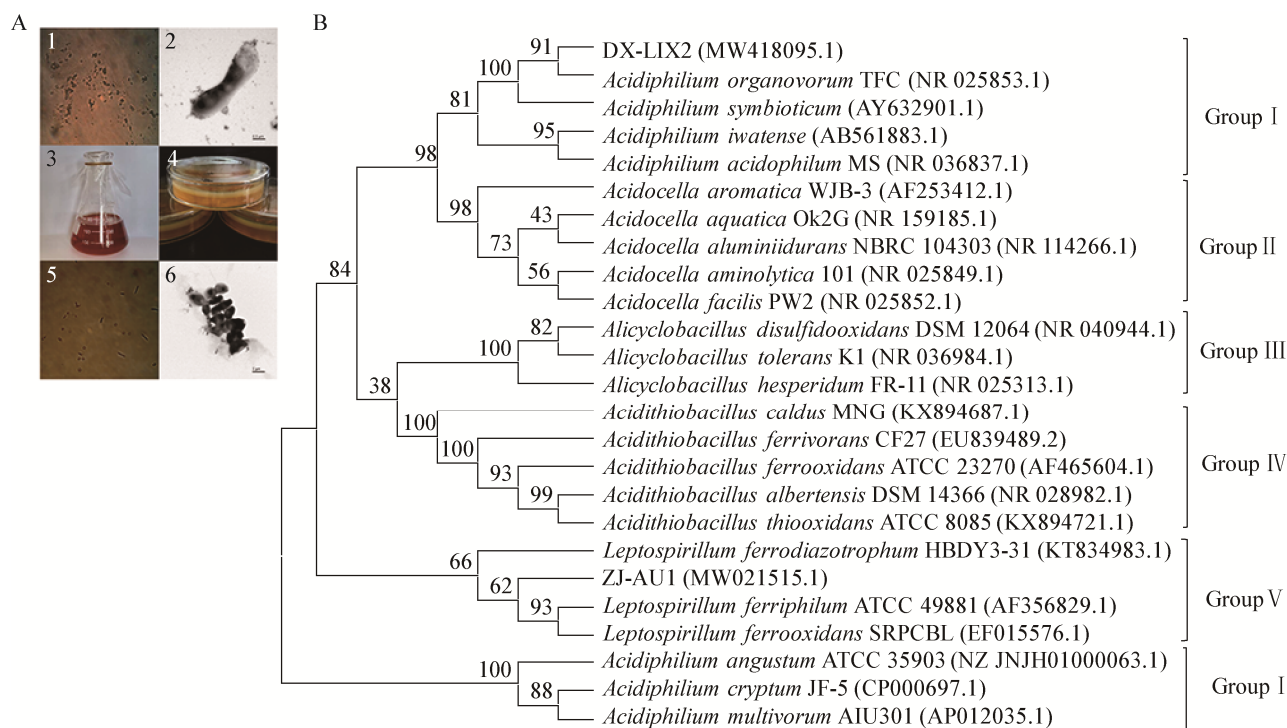


图 1 系统发育树、菌体及培养基形态

Figure 1 Phylogenetic tree, morphology of cell and culture medium

注：A：菌体及培养基形态。1 和 2：ZJ-AU1 显微镜及 TEM 图像；3：ZJ-AU1 液体培养基；4：双层固体培养基；5 和 6：DX-LIX2 显微镜及 TEM 图像。B：系统发育树。括号中的序列号代表菌株的 GenBank 登录号，分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类至同一分支概率

Note: A: Morphology of cell and culture medium. 1, 2: Microscope and TEM images of ZJ-AU1; 3: Liquid medium of ZJ-AU1; 4: Double-layered solid medium; 5, 6: Microscope and TEM images of DX-LIX2. B: Phylogenetic tree. Number in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank; The number at each branch point in the percentage supported by bootstrap

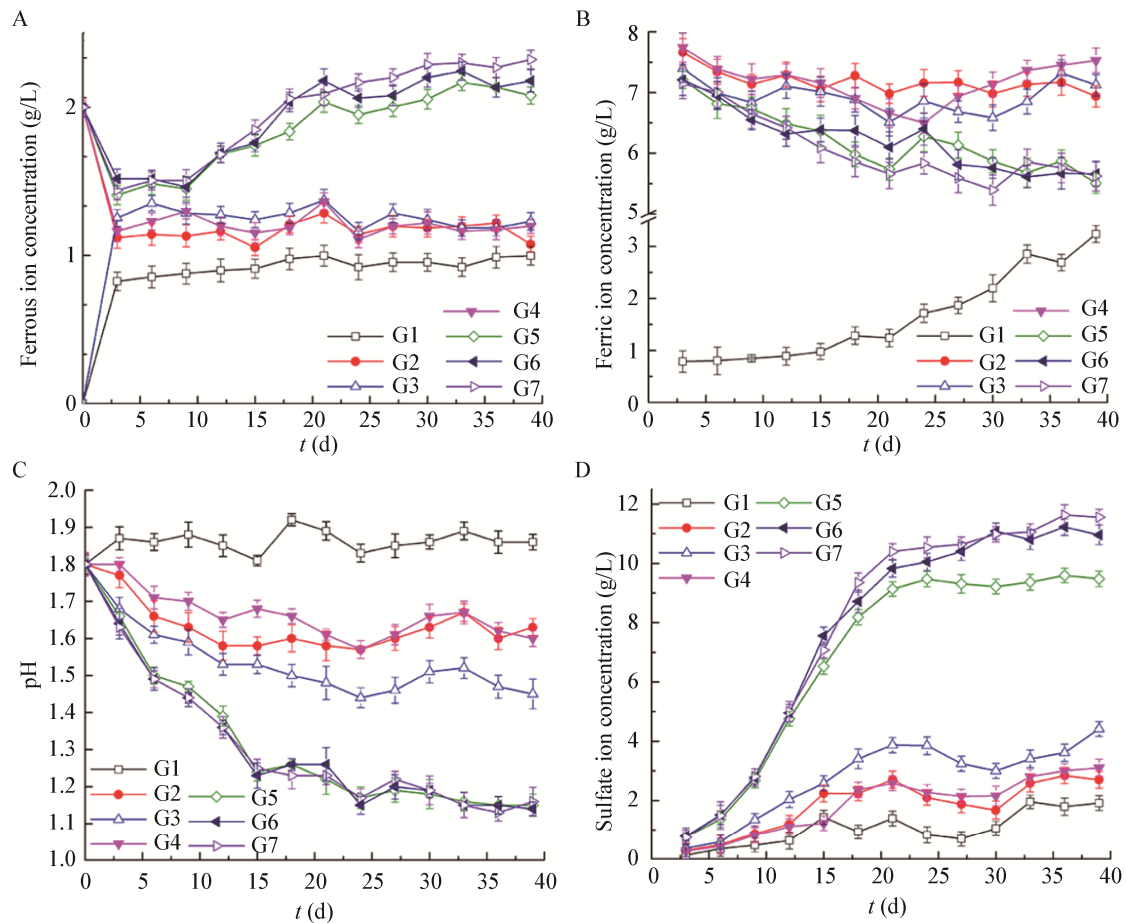


图2 不同浸出体系主要生化参数变化

Figure 2 Changes of main biochemical parameters in different leaching systems

注: A: 亚铁离子浓度; B: 铁离子浓度; C: pH; D: 硫酸根离子浓度

Note: A: Ferrous ion concentration; B: Ferric ion concentration; C: pH; D: Sulfate ion concentration

和  $\text{Fe}^{3+}$  介导矿物溶解导致  $\text{Fe}^{2+}$  水平迅速提高, 其余各组中 *L. ferriphilum* 有效氧化  $\text{Fe}^{2+}$  使其浓度下降。G5-G7 组外源添加黄铁矿为浸出体系补充更多铁元素, 矿物溶解生成  $\text{Fe}^{2+}$  速率高于菌体  $\text{Fe}^{2+}$  氧化速率, 表现为  $\text{Fe}^{2+}$  浓度降至约 1.4 g/L 后持续升高, G6 及 G7 组更高的  $\text{Fe}^{2+}$  水平归因于酸解液的还原作用, 协同 *L. ferriphilum* 氧化活性促进体系铁元素循环; 其余各组  $\text{Fe}^{2+}$  氧化与生成速率相近, 浓度由 2.0 g/L 降至 1.1-1.3 g/L 后保持相对稳定并在小范围内波动。图 2B 中各组  $\text{Fe}^{3+}$  浓度呈不同程度下降趋势,  $\text{Fe}^{3+}$  过高可与附着细胞分泌的 EPS 结合<sup>[20]</sup>, 或与浸出液中黏性物质络合后随矿物沉降, 以及发生水解作用生成黄钾铁矾。其中 G5-G7 组  $\text{Fe}^{3+}$  浓度下降

幅度明显, 推测与其中更高菌体数量相关。有研究表明隐性嗜酸杆菌(*Acidiphilium cryptum*)在低酸度条件下还原溶解黄钾铁矾, 某些由微生物合成或有机物降解生成的物质可作为氧化还原介质促进此过程进行<sup>[21-22]</sup>。G4 组后期  $\text{Fe}^{3+}$  浓度由 6.5 g/L 上升至 7.5 g/L, 推测其中 *Acidiphilium sp.* 分解还原黄钾铁矾钝化层产生  $\text{Fe}^{2+}$ , 后者被 *L. ferriphilum* 迅速氧化。对比 G1 与其余各组可知, 菌体及其氧化作用加剧矿物溶解导致更多金属离子溶出<sup>[23]</sup>。

### 2.2.2 生物浸出过程硫代谢

浸出前期侵蚀矿石及中和脉石矿物消耗质子, 导致浸出体系 pH 升高, 方解石( $\text{CaCO}_3$ )是本研究所采用低品位辉铜矿中的主要耗酸成分为

主, 含量较低, 表现为非生物对照 G1 组 pH 仅小幅度提高, 整个浸出过程中在 pH 1.8–1.9 范围内波动(图 2C)。其余组 pH 均呈不同幅度下降趋势, 归因于 *A. caldus* 介导的硫代谢反应, 随着可利用能源物质耗尽及菌体活性减弱, 后期各体系 pH 下降趋势显著减缓。相较 G2 和 G4 组, G3 组  $\text{Fe}^{3+}$  作为强氧化剂与矿物直接反应, 溶解过程释放还原型无机硫化物(RISCs)供菌体利用产生更多质子。浸出前期 G4 组 pH 高于 G2, 24 d 后 2 组无显著差异, 表明 *Acidiphilium* sp. 在前期由于种间竞争抑制硫氧化菌种活性。浸出前 15 天, G5–G7 组 pH 由 1.8 持续降低至 1.3, 其中的黄铁矿溶解为菌体提供更多能源物质促进硫氧化菌生长。

浸出体系的  $\text{SO}_4^{2-}$  主要来源于矿物溶解及单质

硫氧化, 外源添加黄铁矿强化浸出体系铁硫代谢, 导致 G5–G7 组  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度持续提升, 最高可达 9.6–11.6 g/L, 如图 2D 所示, G6 及 G7 组略高的  $\text{SO}_4^{2-}$  表明酸解液的加入进一步促进矿物溶解或菌体的硫氧化作用。相较  $\text{Fe}^{2+}$ , 添加  $\text{Fe}^{3+}$  直接与矿物反应生成  $\text{SO}_4^{2-}$ , 此外溶出的 RISCs 也被菌体氧化, 因此 G3 组  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度相对较高(最大值约 4.4 g/L)。G4 组中 *Acidiphilium* sp. 对 *A. caldus* 的抑制作用在浸出后期有所缓解, 因此  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度略高出 G2。非生物对照组由于质子侵蚀作用导致矿物部分溶解,  $\text{SO}_4^{2-}$  水平小幅度升高至 1.9 g/L。

### 2.2.3 游离/附着细胞演替规律

由图 3A–D 可知, G5–G7 组菌体量均显著高于其

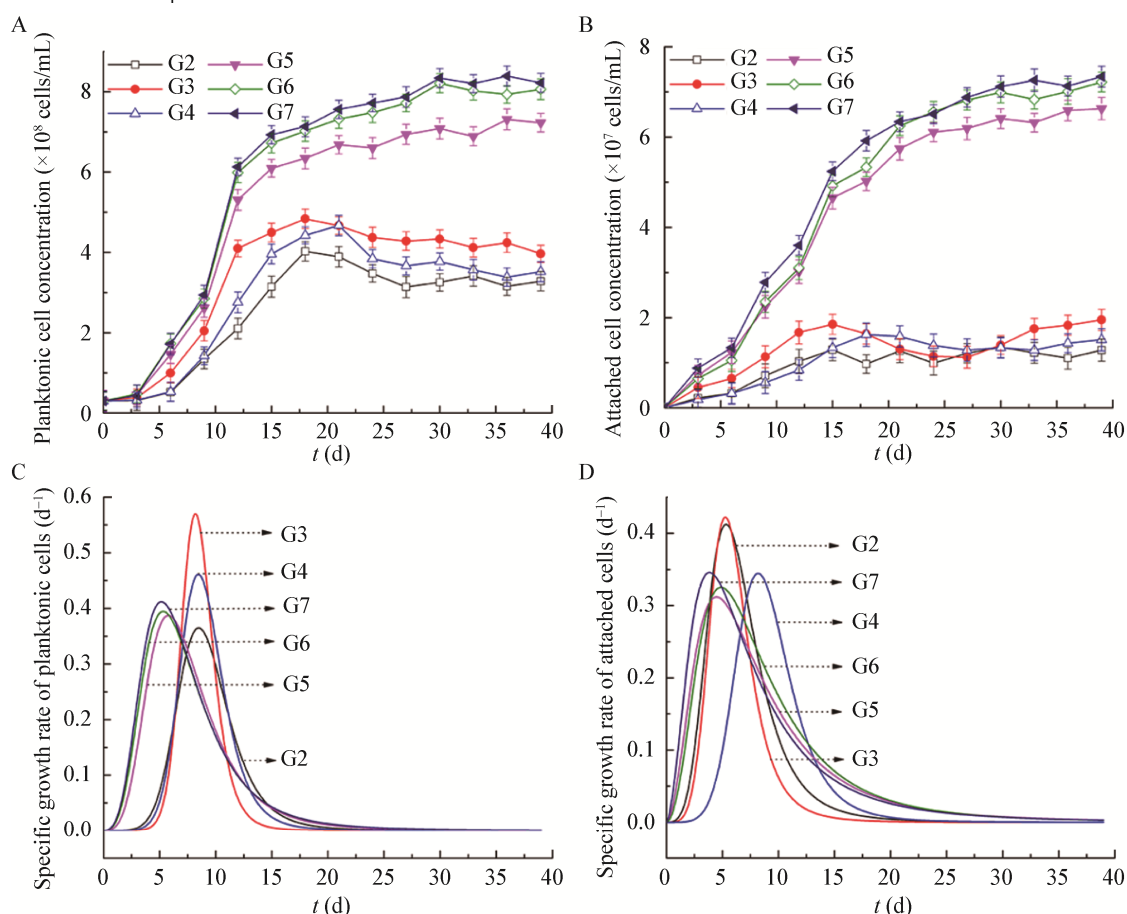


图 3 不同浸出体系主要生化参数变化

Figure 3 Changes of main biochemical parameters in different leaching systems

注: A: 游离细胞浓度; B: 附着细胞浓度; C: 游离细胞比生长速率; D: 附着细胞比生长速率

Note: A: Planktonic cell concentration; B: Attached cell concentration; C: Specific growth rate of planktonic cells; D: Specific growth rate of attached cells



余各组, 游离细胞数量最高可达  $8.4 \times 10^8$  cells/mL, 附着细胞达  $7.3 \times 10^7$  cells/mL, 相较 G2 组分别提高 2.5 倍及 5.7 倍。各组菌体最大比生长速率  $\mu_{\max}$  出现时间也存在显著差异, 游离细胞  $\mu_{\max}$  出现时间由 8.2–8.5 d 提前至 5.2–5.3 d, G7 组附着细胞  $\mu_{\max}$  出现时间最早为 3.8 d, 相较 G4 组提前 4.4 d。黄铁矿溶解释放的  $\text{Fe}^{2+}$  及 RISCs 供菌体利用生长, 显著缩短菌体生长延滞期, 酸解液引入在浸出前/中期促进更多菌体附着, 后期在游离菌的生长中发挥积极作用。强氧化剂  $\text{Fe}^{3+}$  通过直接与矿物反应释放各种能源物质, 对游离菌的促进作用更为显著。G4 组略低的细胞数量验证了 *Acidiphilium* sp. 引入对 *L. ferriphilum* 及 *A. caldus* 生长不利的推测, 由于自养菌本身具有较强抗逆性, 而且浸出过程不断有能源物质溶出, 浸出 15–25 d 时 G4 组细胞数量小幅度提升, 随后由于能源消耗及生长环境恶化细胞数量逐渐减少。

### 2.3 基于铁氧化/还原菌强化铁硫代谢和“接触”机制解析

#### 2.3.1 SEM 观察矿渣表面形貌差异性

图 4 展示不同条件由于菌体黏附导致的矿渣表面形貌差异。G1 组只存在有限的质子侵蚀作用, 矿物表面相对光滑; G2 与 G4 组由于菌体作用使矿

物溶解, 在此过程中矿物表面出现大量衍生物, G4 组出现类似硫颗粒的物质, 推测该体系硫氧化菌活性较弱, 未能及时利用矿物溶解过程生成的单质硫, 与该组呈现相对较高 pH 水平相一致; G3 组中  $\text{Fe}^{3+}$  与矿物间剧烈的化学反应促使矿物溶解, 在为菌体补充能源物质的同时提供大量附着位点, 矿渣表面呈现明显腐蚀痕迹。G5–G7 组外源添加黄铁矿及酸解液加速铁硫代谢反应同时促进微生物生长, 在  $\text{Fe}^{3+}$  介导的化学氧化及菌体介导的生物氧化双重作用下矿物大量溶解, 其表面产生的微孔及裂缝等成为潜在吸附位点, 有利于菌体的附着及充分氧化<sup>[24]</sup>, 最终形成的矿渣表面粗糙多孔, 腐蚀痕迹明显。

#### 2.3.2 矿渣表面关键官能团解析

图 5 为浸出矿渣表面关键官能团的变化情况, 吸收峰主要出现在 3 600、3 400、1 720、1 080、1 000 及 800  $\text{cm}^{-1}$  处, 其中 3 600  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能代表与  $\text{Cu}^{2+}$  相关独立羟基 O–H 键的伸展<sup>[25]</sup>; 3 400  $\text{cm}^{-1}$  和 800  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰分别由 N–H 的伸缩振动和变形振动引起, 1 720  $\text{cm}^{-1}$  和 1 080  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰分别由羧基中的 C=O 键和 O–H 键的伸缩振动引起, 这些吸收峰仅存在于各实验组中, 而非生物对照组中未出现。–NH 和 –COOH 等活性

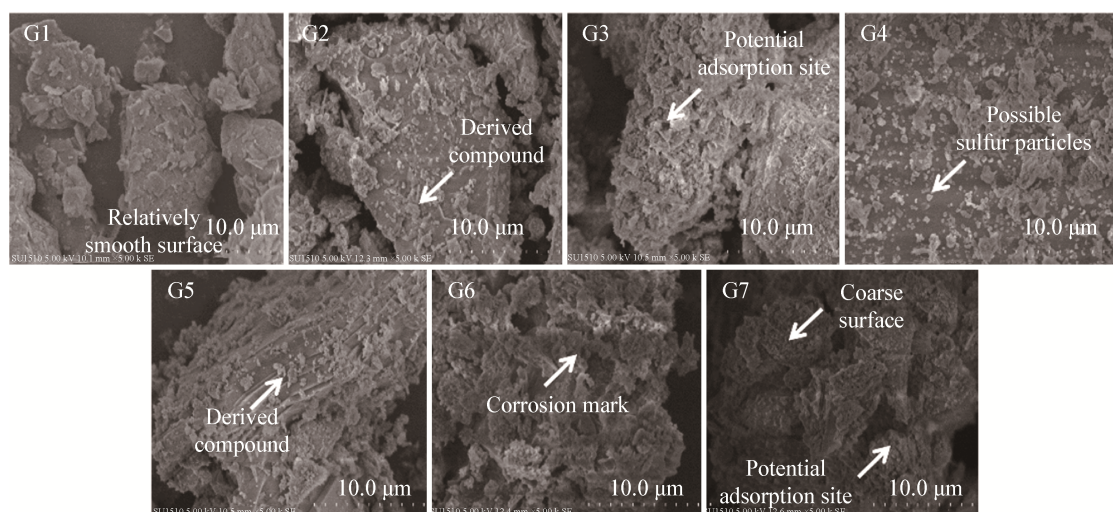


图 4 不同浸出体系矿渣 SEM 图像

Figure 4 SEM images of mineral residues in different leaching systems

基团与菌体胞外蛋白分泌密切相关,表明菌体在矿物表面吸附及 EPS 生成<sup>[26]</sup>, G4-G7 组相应的吸收峰尤为明显,与各浸出体系显著更高的附着生物量相符。1 000  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰与  $\text{SO}_4^{2-}$  相关, 800  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰与 C-O-S 相关,相较于对照组,实验组中相关吸收峰显著增强,表明矿物表面活跃的硫代谢反应。研究表明,1 420  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰与铵钾铁矾相关,998-1 005  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能与黄钾铁矾系列衍生物振动有关,相关吸收峰的出现表明活跃的代谢反应导致铁矾钝化层生成。但相较其他组而言,添加酸解液的实验组尤其是 G7 组在这 2 处的吸收峰强度减弱, Panda 等<sup>[13]</sup>将酸解处理的废报纸引入黄铜矿生物浸出过程,也发现矿物表面钝化物相关吸收峰减少,表明纤维质废弃物酸解液能够一定程度缓解钝化效应。此外各实验组呈现更多新吸收峰,900-950  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能由羧基 O-H 键的面外变形振动引起,1 160-1 120  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可能与 S=O 的对称伸缩振动相关,1 400-1 440  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰与 O-H 的变形振动相关,3 620  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰源于游离 O-H 的伸缩振动,表明菌体干预下矿石表面存在活跃的生化反应,由此形成更为复杂的衍生物。

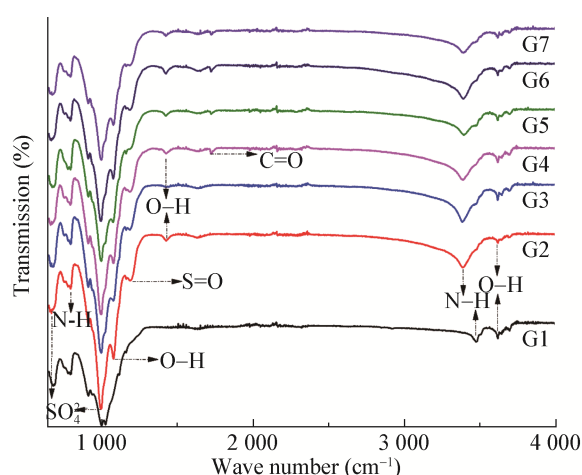


图 5 不同浸出体系矿渣 FTIR 图谱

Figure 5 FTIR images of mineral residues in different leaching systems

### 2.3.3 矿物表面附着细胞/EPS 分布及演化规律

结合荧光染色及 CLSM 观察浸出中/后期附着细胞及其分泌 EPS 在矿物表面的分布情况。如图 6 所示,非生物对照组不显示任何荧光,浸出中期各实验组矿物表面缺陷位点呈现荧光,随着浸出进程推进,红色及绿色荧光强度增强,分布范围变广,表明越来越多菌体附着于矿物表面,在此过程中分泌脂多糖、胞外蛋白等 EPS 组分,增强吸附作用的同时促进生物膜形成<sup>[27]</sup>,通过附着菌体不断繁殖及运动,矿物表面为广泛分布的菌体及 EPS 所覆盖<sup>[24]</sup>,这与 SEM 中剧烈的腐蚀作用及 FTIR 中显著增强的菌体和 EPS 相关吸收峰相一致。相较 G2-G4 组, G5-G7 组矿物表面荧光强度更强,荧光覆盖面积更为广泛,表明 G5-G7 组具有更高的菌体数量及 EPS 分泌量,一方面是由于黄铁矿为菌体提供能源物质,有利于菌体生长和胞内能量储存,进一步促进细胞吸附于矿石表面并分泌 EPS;另一方面,额外添加黄铁矿强化了铁硫代谢, pH 持续下降且重金属离子不断累积,附着细胞增强 EPS 分泌形成生物膜以抵御多重环境压力<sup>[19]</sup>。不同状态菌体协同参与金属硫化矿生物浸出,通常附着菌体及其分泌 EPS 所介导的间接“接触”机制在整体浸出效率中的作用更为显著。EPS 组分糖醛酸能够螯合浸出体系内的  $\text{Fe}^{3+}$  (摩尔比约为 2:1),在矿物表面形成特殊的反应空间,扩大  $\text{Fe}^{3+}$  可对金属硫化物进行化学攻击的范围以加速矿物溶解<sup>[2]</sup>。Vera 等报道 EPS 是介导菌体在矿物表面初始附着的关键,糖醛酸-三价铁复合物形成使菌体表面携带正电荷,与酸性条件下呈负电性的矿物表面间产生静电吸引,促进菌体附着于矿物表面,而与矿物间的接触进一步刺激菌体分泌 EPS<sup>[28]</sup>。

### 2.4 浸出效果及浸出机制

图 7A、7B 为各组铜离子浓度及浸出率,相较于对照组 G1,其余各组浸出率呈不同程度提升(2.3%-12.2%), G7 组铜离子浓度最高为 148.7 mg/L,浸出率达 67.6%,其次为 G6 及 G5 组,浸出率分别为

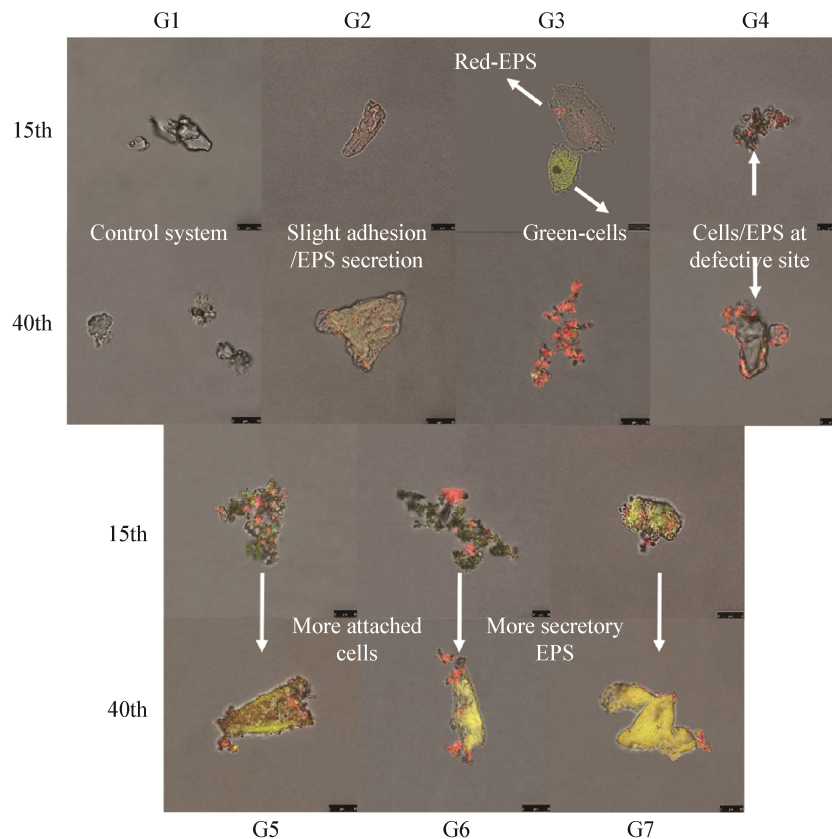


图6 各浸出体系不同浸出阶段矿渣 CLSM 图像

Figure 6 CLSM images of mineral residues at different stages in each leaching system

65.9%及 63.4%。G3 组中  $\text{Fe}^{3+}$  与矿物直接反应促进其更快溶解, 释放含硫物质供 *A. caldus* 利用, 因此该组 pH 相对更低而  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度、菌体数量相对 G2 和 G4 组更高。G3 组菌体数量远低于 G5–G7 组但浸出率较高, 得益于相对缓和的钝化效应, 同时较多的  $\text{Fe}^{3+}$  与矿物反应促进  $\text{Cu}^{2+}$  持续溶出。G4 组浸出前/中期 pH 和  $\text{Fe}^{2+}$  含量相对更高而菌体数量低于 G2 组, 推测外源接种 *Acidiphilium* sp. 加剧浸出体系内空间资源的争夺而不利自养菌生长, 浸出 24 d 后, G4 组各参数呈小幅度上升而菌体数量无显著变化, 推测 *Acidiphilium* sp. 吸收浸出体系积累的有机物还原溶解黄钾铁矾。G4 组浸出率 (58.3%) 与 G2 (57.7%) 相近, 表明初期引入 *Acidiphilium* sp. 对浸出没有明显促进作用, 与 pH 下降趋势结果吻合。

通常作为伴生矿物存在的黄铁矿因其较高的静电位被用于协同浸出多种硫化矿。Zhao 等<sup>[29]</sup>在黄铜矿硫酸浸出过程中添加黄铁矿, 结合矿物成分和电化学分析发现黄铁矿主要通过控制氧化还原电位抑制多硫化物钝化层生成从而促进黄铜矿溶解。Wang 等<sup>[30]</sup>探究黄铁矿在 *L. ferriphilum* 生物浸出斑铜矿中的作用, 认为黄铁矿引起的低 pH、高 ORP、氧化剂  $\text{Fe}^{3+}$  生成及静电效应是实现 2 种矿物协同浸出的重要因素。在本研究中, 黄铁矿添加对浸矿微生物生长呈现显著的促进作用, 结合理化参数及矿物分析可知, G5–G7 组中, 黄铁矿溶解产生质子维持良好的浸出环境, 同时生成含硫物质和  $\text{Fe}^{2+}$  作为能源物质被 *A. caldus* 和 *L. ferriphilum* 利用, 产生更多  $\text{H}^+$  和强氧化剂  $\text{Fe}^{3+}$ , 各优化浸出体系铁硫代谢活跃, 菌体数量也显著



更多, 快速增殖及充足的能量储备促进游离态细胞向矿物表面迁移, “接触”浸出机制得到强化, 此外, 黄铁矿与原矿石中各类硫化矿物间可能存在的静电效应也有利于矿物溶解<sup>[30]</sup>。

Sajjad 等<sup>[12]</sup>采用硫酸预处理策略并添加酸解毛

竹屑生物浸出铜锌矿物, 取得了较好的结果。Panda 等<sup>[13]</sup>详细分析矿渣成分, 探究报纸酸解液促进矿物浸出的作用机制, 但未涉及微生物影响的分析。本研究以低品位辉铜矿为研究对象, 探究树叶及水草酸解液对低品位辉铜矿浸出的影响。

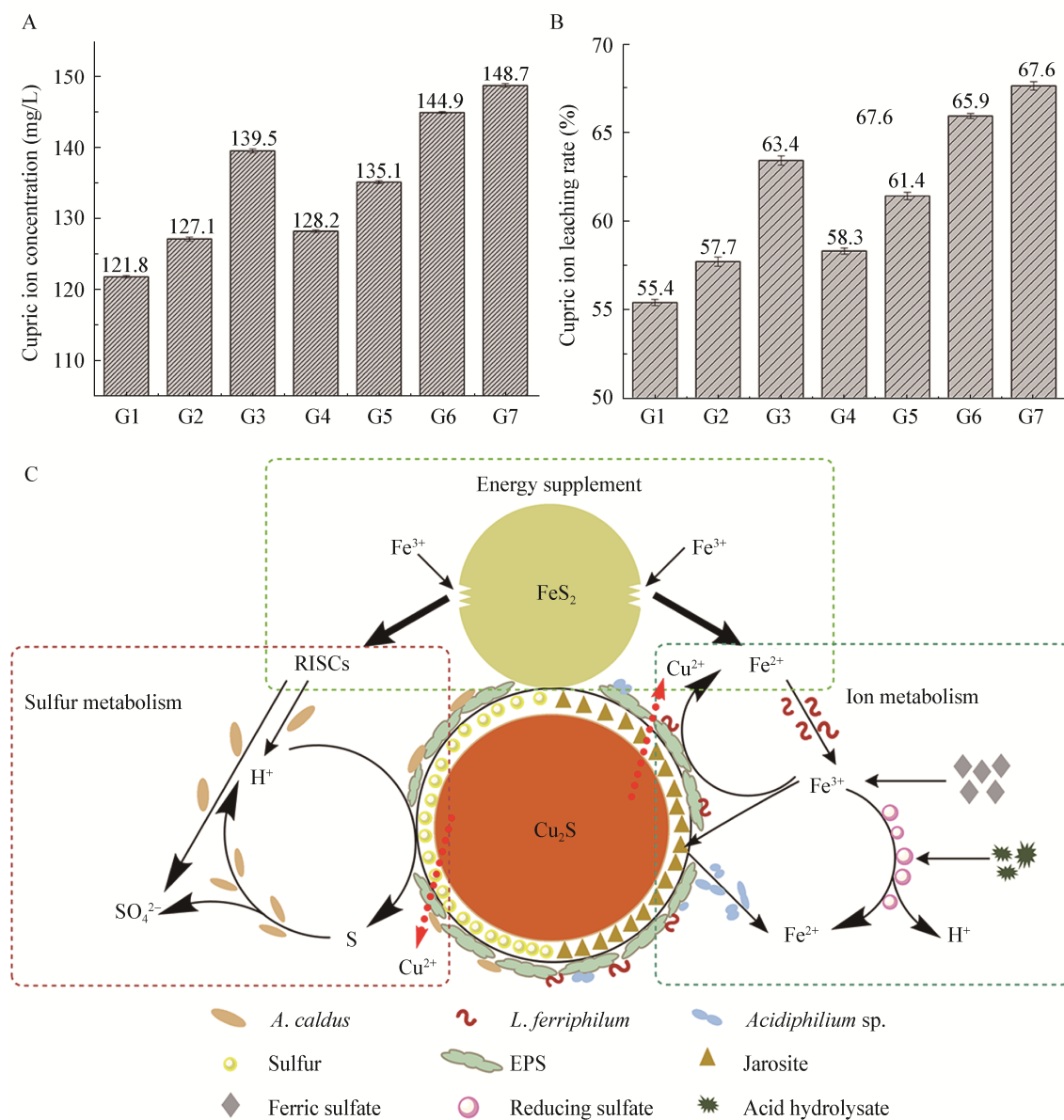


图 7 不同浸出体系浸出效率及黄铁矿-纤维质废弃物酸解液体系低品位辉铜矿生物浸出模型

Figure 7 Leaching efficiency of different leaching systems and bioleaching model of low-grade chalcocite under the pyrite-cellulosic waste acid hydrolysate system

注: A: 铜离子浓度; B: 铜离子浸出率; C: 黄铁矿-纤维质废弃物酸解液体系低品位辉铜矿生物浸出模型

Note: A: Cupric ion concentration; B: Cupric ion leaching rate; C: Bioleaching model of low-grade chalcocite under the pyrite-cellulosic waste acid hydrolysate system



铁硫代谢相关参数变化表明浸出体系中存在活跃的生化反应, 游离及附着菌体量均有所增加, 推测酸解液中的还原糖发挥作用, 同时释放  $\text{CO}_2$  促进菌体尤其是附着菌生长, 矿物溶解伴随菌体铁氧化、酸解液还原  $\text{Fe}^{3+}$  过程, 加速体系内铁元素循环代谢, 在质子酸解及菌体氧化的双重作用下, 矿物中的铜离子持续溶出, 浸出率相应提高, 与此前的研究结果相吻合。基于此, 初步构建黄铁矿-纤维质废弃物酸解液体系低品位辉铜矿生物浸出模型(图 7C)。

### 3 结论

基于筛选的铁氧化/还原菌 *L. ferriphilum*、*Acidiphilium* sp. 与硫氧化菌 *A. caldus* 协作, 添加强氧化剂  $\text{Fe}^{3+}$  与矿物直接反应或补加黄铁矿都为菌体生长提供更多能源物质, SEM 中矿渣表面粗糙多孔, FTIR 中与 EPS、衍生物、含硫物质相关吸收峰显著增强, 表明活跃的菌体氧化作用及铁硫代谢反应, CLSM 呈现大量菌体附着及 EPS 分泌现象。外源含铁物质干预强化辉铜矿浸出体系铁硫代谢, 酸解液有利于铁元素循环同时促进菌体附着, 黄铁矿及酸解液添加引起附着细胞数量及 EPS 分泌量显著提高, 通过强化“接触”浸出机制加速矿物溶解促进铜离子浸出。

### REFERENCES

- [1] Feng SS, Yang HL, Wang W. Insights to the effects of free cells on community structure of attached cells and chalcopyrite bioleaching during different stages[J]. Bioresource Technology, 2016, 200: 186-193
- [2] Wang LM, Yin SH, Wu AX, Chen W. Synergetic bioleaching of copper sulfides using mixed microorganisms and its community structure succession[J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 245: 118689
- [3] Yang Y, Liu WH, Chen M. XANES and XRD study of the effect of ferrous and ferric ions on chalcopyrite bioleaching at 30 °C and 48 °C[J]. Minerals Engineering, 2015, 70: 99-108
- [4] Zeng WM, Qiu GZ, Zhou HB, Peng JH, Chen M, Tan SN, Chao WL, Liu XD, Zhang YS. Community structure and dynamics of the free and attached microorganisms during moderately thermophilic bioleaching of chalcopyrite concentrate[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7079-7086
- [5] Zhang LJ, Mao F, Li K, Wang YG, Chen XH, Zhou HB. Enhancement in copper extraction from chalcopyrite by re-inoculation of different acidophilic, moderately thermophilic microorganisms[J]. Hydrometallurgy, 2015, 156: 142-151
- [6] Liu HW, Yin HQ, Dai YX, Dai ZM, Liu Y, Li Q, Jiang HD, Liu XD. The co-culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidiphilium acidophilum* enhances the growth, iron oxidation, and  $\text{CO}_2$  fixation[J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(12): 857-866
- [7] Yang Y, Diao MX, Liu K, Qian L, Nguyen AV, Qiu GZ. Column bioleaching of low-grade copper ore by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in pure and mixed cultures with a heterotrophic acidophile *Acidiphilium* sp.[J]. Hydrometallurgy, 2013, 131/132: 93-98
- [8] Zhang LJ, Zhou WB, Li K, Mao F, Wan LL, Chen XH, Zhou HB, Qiu GZ. Synergetic effects of *Ferroplasma thermophilum* in enhancement of copper concentrate bioleaching by *Acidithiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferriphilum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2015, 93: 142-150
- [9] Xia JL, Song JJ, Liu HC, Nie ZY, Shen L, Yuan P, Ma CY, Zheng L, Zhao YD. Study on catalytic mechanism of silver ions in bioleaching of chalcopyrite by SR-XRD and XANES[J]. Hydrometallurgy, 2018, 180: 26-35
- [10] Bevilacqua D, Lahti H, Suegama PH, Garcia O, Benedetti AV, Puhakka JA, Tuovinen OH. Effect of Na-chloride on the bioleaching of a chalcopyrite concentrate in shake flasks and stirred tank bioreactors[J]. Hydrometallurgy, 2013, 138: 1-13
- [11] Zhang RY, Sun CB, Kou J, Zhao HY, Wei DZ, Xing Y. Enhancing the leaching of chalcopyrite using *Acidithiobacillus ferrooxidans* under the induction of surfactant Triton X-100[J]. Minerals, 2018, 9(1): 11
- [12] Sajjad W, Zheng GD, Ma XX, Xu W, Ali B, Rafiq M, Zada S, Irfan M, Zeman J. Dissolution of Cu and Zn-bearing ore by indigenous iron-oxidizing bacterial consortia supplemented with dried bamboo sawdust and variations in bacterial structural dynamics: a new concept in bioleaching[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 709: 136136
- [13] Panda S, Biswal A, Mishra S, Panda PK, Pradhan N, Mohapatra U, Sukla LB, Mishra BK, Akcil A. Reductive dissolution by waste newspaper for enhanced meso-acidophilic bioleaching of copper from low grade chalcopyrite: a new concept of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2015, 153: 98-105
- [14] Huang ZZ, Feng SS, Tong YJ, Yang HL. Enhanced “contact mechanism” for interaction of extracellular polymeric substances with low-grade copper-bearing sulfide ore in bioleaching by moderately thermophilic *Acidithiobacillus caldus*[J]. Journal of Environmental Management, 2019,

- 242: 11-21
- [15] Gao J, Ding JN, Kang J, Wu XL, Qiu GZ. Identification and heavy metal toxicity assessment upon Fe~(2+)-oxidizing ability of *Leptospirillum*-like bacterium isolated from acid mine drainage[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2011(1): 220-226 (in Chinese)  
高健, 丁建南, 康健, 吴学玲, 邱冠周. 分离于酸性矿坑水的疑似钩端螺旋菌的鉴定及重金属对其铁氧化能力影响的评估[J]. 中国有色金属学报, 2011(1): 220-226
- [16] Liu Y, Liu XM, Tian KL, Qi FJ, Yan WM. Growth and morphology of *Leptospirillum ferrooxidans* on solid medium[J]. Microbiology China, 2003, 30(6): 70-72 (in Chinese)  
刘纓, 刘相梅, 田克立, 齐放军, 颜望明. 氧化亚铁钩端螺旋菌在固体平板上的培养及形态观察[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6): 70-72
- [17] Feng SS, Yang HL, Wang W. Insights into the enhancement mechanism coupled with adapted adsorption behavior from mineralogical aspects in bioleaching of copper-bearing sulfide ore by *Acidithiobacillus* sp.[J]. RSC Advances, 2015, 5(119): 98057-98066
- [18] Wei PL, Cen PL, Sheng CQ. Comparison of three biomass estimation methods in solid state fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2006(1): 60-64,69 (in Chinese)  
魏培莲, 岑沛霖, 盛春琦. 3 种固态发酵生物量测定方法的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2006(1): 60-64,69
- [19] Diao M, Taran E, Mahler S, Nguyen AV. A concise review of nanoscopic aspects of bioleaching bacteria-mineral interactions[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2014, 212: 45-63
- [20] Sand W, Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(1): 49-56
- [21] González E, Muñoz JÁ, Blázquez ML, González F, Ballester A. Reductive dissolution of jarosite by *Acidiphilium cryptum* in presence of chelating agents and dissolved iron[J]. Geomicrobiology Journal, 2016, 34(4): 355-361
- [22] González E, Hernández L, Muñoz JÁ, Blázquez ML, Ballester A, González F. Electron shuttles stimulate the reductive dissolution of jarosite by *Acidiphilium cryptum*[J]. Hydrometallurgy, 2020, 194: 105351
- [23] Ding DX, Liu YL, Li GY, Hu N, Wang YD, Wang YT. Leaching mechanism of pitchblende by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering: China, 2009, 60(11): 2903-2910 (in Chinese)  
丁德馨, 刘玉龙, 李广悦, 胡南, 王永东, 王有团. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌在沥青铀矿石浸出中的作用[J]. 化工学报, 2009, 60(11): 2903-2910
- [24] Zhang RY, Bellenberg S, Castro L, Neu TR, Sand W, Vera M. Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum*[J]. Hydrometallurgy, 2014, 150: 245-252
- [25] Grift CJG, Geus JW, Kappers MJ, Maas JH. Characterization of copper-silica catalysts by means of *in situ* diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy[J]. Catalysis Letters, 1989, 3(2): 159-168
- [26] Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN, Rao GR. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4051-4055
- [27] Bellenberg S, Leon-Morales CF, Sand W, Vera M. Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Hydrometallurgy, 2012, 129-130: 82-89
- [28] Vera M, Krok B, Bellenberg S, Sand W, Poetsch A. Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite[J]. Proteomics, 2013, 13(7): 1133-1144
- [29] Zhao HB, Wang J, Gan XW, Hu MH, Tao L, Qin WQ, Qiu GZ. Role of pyrite in sulfuric acid leaching of chalcopyrite: an elimination of polysulfide by controlling redox potential[J]. Hydrometallurgy, 2016, 164: 159-165
- [30] Wang XX, Liao R, Zhao HB, Hong MX, Huang XT, Peng H, Wen W, Qin WQ, Qiu GZ, Huang CM, et al. Synergetic effect of pyrite on strengthening bornite bioleaching by *Leptospirillum ferriphilum*[J]. Hydrometallurgy, 2017, 176: 9-16