

柱式反应器处理黄铜矿过程中嗜热微生物群落变化

王玉光¹ 赵伟^{1,2*} 苏丽君³ 刘飞飞¹ 邬长斌¹ 周洪波^{1,2}

(1. 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 中南大学生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

(3. 长沙医学院医学检验系 湖南 长沙 410219)

摘要: 从中国的多个铜矿取样, 在45 °C 条件下富集获得了一种高效的中等嗜热浸矿富集物, 探讨了该富集物在柱式反应器中浸出低品位黄铜矿的 pH 变化以及与 Cu^{2+} 浸出的关系, 并采用限制性片段长度多态性(RFLP)技术分析了微生物的群落结构和种群动态变化规律。结果表明在整个浸出过程中 pH 变化较为明显, 且一直在1.8以上, 60 d 内回收了13.6%的铜。RFLP 结果表明: 在初期, 嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferriphilum*)在浸出前期占有很高比例(81%), 随后逐渐降低, 至后期只有13%, 而耐温氧化硫化杆菌(*Sulfobacillus thermotolerans*)和喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)的比例逐渐升高, 在中期分别达到32%和23%; 至末期, 耐温氧化硫化杆菌达到了79%, 成为优势种群。研究加深了对中等嗜热微生物浸矿特性的了解, 也为中等嗜热菌处理低品位黄铜矿的工业应用提供了可供借鉴的数据。

关键词: 生物冶金, 中等嗜热富集物, 低品位黄铜矿, RFLP

Community structure and dynamics of moderately thermophilic microorganisms during bioleaching of low-grade chalcopyrite by column reactor

WANG Yu-Guang¹ ZHAO Wei^{1,2*} SU Li-Jun³ LIU Fei-Fei¹ WU Chang-Bin¹
ZHOU Hong-Bo^{1,2}

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(2. Key Laboratory of Biomaterials, Ministry of Education, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(3. Department of Clinic Laboratory, Changsha Medical University, Changsha, Hunan 410219, China)

Abstract: In this study, a mixed culture of moderately thermophilic microorganisms was enriched from

基金项目: 国际海底区域研究开发“十一五”项目(No. DYXM-115-02-2-07); 海洋公益性行业科研专项经费项目(No. 200805032)

* 通讯作者: Tel: 86-731-88877216; ✉ wei.zhao.csu@gmail.com

收稿日期: 2010-07-27; 接受日期: 2010-12-16

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

several acid mine drainage samples collected from copper mines in China at 45 °C. The pH and copper concentration in the leachate were monitored during bioleaching low-grade chalcopyrite by column reactor, and community structure and dynamics were investigated by restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results show that variation of pH was more obvious, and pH value was always higher than 1.8 in the bioleaching process. And 13.6% of copper was recovered within 60 days. RFLP results show that microbial community was dominated by *L. ferriphilum* in the initial stage, which occupied 81% of total prokaryotes. With the bioleaching process continues, the proportion of *L. ferriphilum* decreased slowly, which only had a proportion of 13% in the final stage. The proportion of *S. thermotolerans* and *A. caldus* were increase gradually, and the proportion was 32% and 23% respectively in the middle stage. *S. thermotolerans* was the dominant microorganism in the final stage, and the proportion was up to 79%. The research results could promote to understand bioleaching characteristics and behavior of moderately thermophilic microorganisms and provide referential experience for industrial application.

Keywords: Bioleaching, Moderately thermophilic enrichment, Low-grade chalcopyrite, RFLP

生物冶金技术发展已有相当长的历史, 是 21 世纪矿物提取前沿科学技术。具有流程短、成本低、能耗少、范围广、环境友好和低污染等优点, 对处理低品位、复杂、难处理的矿产资源过程具有极大的优势, 因此越来越受到各国科学家的重视^[1]。目前生物冶金在工业应用中采用堆浸技术处理低品位矿石、废矿和尾矿应用最为成熟, 也最广泛^[2]。堆浸工艺可以处理极低品位的铜矿石, 使可开采的边界品位从 0.8% 降到 0.1% 以下^[3-4], 极大提高了资源利用率和储备量。对于我国来说, 铜矿产资源特点是低品位(平均品位 0.87%), 复杂且多为难处理的原生硫化矿, 开发利用的瓶颈问题非常突出, 常规选冶方法存在成本高和污染环境严重等问题, 使其应用受到极大的限制, 因此生物冶金技术是解决我国铜矿产资源所面临困境的关键技术之一^[5-6]。

运用生物冶金技术处理黄铜矿过程中的动力学缓慢^[7-8], 还没有完全达到工业应用的水平。生物冶金技术关键的影响因素是微生物, 但是目前对于浸矿体系中的微生物生态学研究还不够, 还不是很清楚微生物群落结构变化规律以及微生物之间的相互作用关系。Brierley^[3,9-10]认为, 明确生物浸出中的微生物学过程, 尤其是微生物生态规律, 是提高工艺水平的关键。因此对黄铜矿浸出过程中微生物群落结构演替规律的研究就显得尤为重要。

本文采用 PCR-RFLP 技术研究了柱式反应器浸

出黄铜矿过程中的生物群落多样性, 有助于揭示微生物群落中各种微生物在浸矿过程中的功能以及不同微生物之间的相互作用; 同时有助于了解不同阶段浸矿体系的物理化学变化与群落组成结构的相互关系, 为优化工业应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种和培养条件

将采自中国云南、江西、湖南、广东、甘肃等省矿场或温泉, 含有多种微生物的泥、酸性浸矿水样品相互混合, 在 45 °C 下富集培养。培养基组成(g/L): (NH₄)₂SO₄ 3, KCl 0.1, K₂HPO₄ 0.05, Na₂SO₄ 2.1, MgSO₄·7H₂O 0.5, Ca(NO₃)₂ 0.01, FeSO₄·7H₂O 30, S 10, 黄铜矿 10。初始 pH 1.8, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.2 矿物来源及成分分析

实验所用的黄铜矿矿石由生物冶金教育部重点实验室提供。所用矿石过筛备用, 粒径<1.5 cm, 主要化学元素组成如下(W/W): Fe 4.46%, Cu 4.62%, S 3.19%, K 2.09%, Al 4.00%, Ca 2.32%。

1.3 浸矿反应器

实验所用浸矿反应装置主要包括双层玻璃浸矿柱、双层石英储液罐、恒温水浴锅、恒流泵和空气泵 5 个部分。浸矿柱中均匀填充矿石颗粒, 从浸矿柱顶端进行喷淋, 用储液罐收集回流的浸矿溶液,

通过恒流泵重新泵入浸矿柱。通过柱体和罐体的夹套水浴控制浸矿体系温度为 45 °C。

1.4 实验方法

柱浸装置总装矿量 0.66 kg, 浸矿溶液总体积 750 mL。首先采用稀硫酸溶液预浸 15 d, 每天用 2 mol/L H₂SO₄ 调节 pH, 趋于稳定后接种。预浸结束后, 测定溶液中 Cu²⁺ 浓度, 并更换培养基, 体积 400 mL, 加入 FeSO₄ 和 S 各 1 g, 以提供微生物初期生长所需能源。接种浓度 1×10⁸ 个/mL, 通气量 2 L/min。

分别在接种后第 20 天、40 天和 60 天取样提取基因组, 进行 PCR-RFLP 分析(分别用 BS-D、BS-E、BS-F 表示)。同时测定浸矿溶液的 pH, Cu²⁺ 浓度。

1.5 微生物群落多样性分析

1.5.1 总 DNA 的提取和纯化: DNA 的提取采用魏曼等人抽提环境 DNA 的方法^[11]。

1.5.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增和切胶纯化: 用细菌通用引物 27F 和 1492R 进行 16S rRNA 基因扩增。50 μL 反应体系中包含 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.2 pmol/L 引物, 1×PCR Buffer 和 1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 40 s, 72 °C 90 s, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 EZNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。

1.5.3 克隆和 RFLP 分析: PCR 回收产物克隆到 pGEM T-载体上, 转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 采用蓝白斑筛选法挑取阳性克隆子, 建立克隆文库, 通过 Amp^r 平板保藏。随机挑取菌落进行 RFLP 分析, 用引物 SP6(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和 T7(5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3')重新扩增插入的 16S rRNA 基因片段, 扩增的 DNA 片段用限制性内切酶 *Msp* I 和 *Hin*6 I 酶切 6 h, 经 2.5% 凝胶电泳获得 RFLP 酶切图谱。

1.5.4 测序与系统发育分析: 分析 RFLP 酶切图谱, 挑选不同带型的克隆子送去测序(上海生工)。所得序列由软件 ContigExpress 拼接后, 通过 BLAST 搜索引擎(www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)进行相似性序列搜索, 采用 ClustalX 1.8 对比分析, 再用 MEGA 3.1 邻近法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,

Bootstrap 值设定为 1 000。

2 结果与讨论

2.1 pH 变化与 Cu²⁺ 的浸出

反应器运行过程中的 pH 值变化如图 1 所示, pH 值在初期呈上升趋势, 最高接近 2.6; 第 5 天后开始下降, 最终稳定在 pH 1.9 左右。Cu²⁺ 浓度逐渐升高, 浸矿 5 d 后, Cu²⁺ 浓度开始出现较明显的升高, 最终浓度达到 10.35 g/L, 浸出率 13.6%。

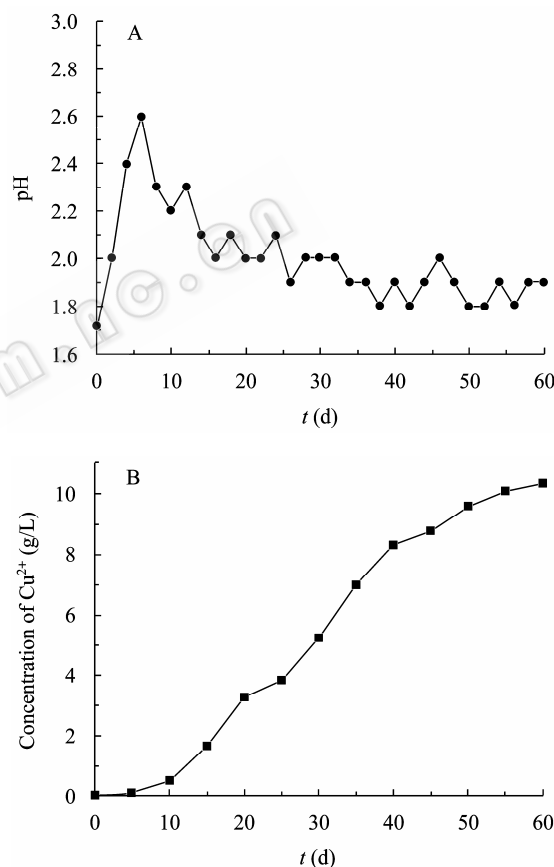


图 1 中等嗜热微生物浸出低品位黄铜矿过程中 pH 值变化(A)和 Cu²⁺ 的变化(B)情况

Fig. 1 The variation of pH (A) and copper concentration (B) in the leachate during bioleaching low-grade chalcopyrite with moderately thermophilic microorganisms

2.2 克隆文库构建和 RFLP 分析

2.2.1 DNA 提取和 PCR 扩增: 提取的基因组大小在 23 kb 左右, 用通用引物 27F 和 1492R 扩增后, 获得 1.5 kb 大小左右的片段。

2.2.2 RFLP 分析: 将纯化后的细菌 16S rRNA 基因 PCR 产物连接到 pGEM T-载体上, 然后转入 *E. coli* DH5 α 中。经过蓝白筛选后, 3 个样品(BS-D, BS-E, BS-F)分别各挑取白色克隆子 90 个。BS-D 阳性克隆子率 97.8%, BS-E 阳性克隆子率 93.3%, BS-F 阳性克隆子率 95.6%。限制性内切酶双酶切后共获得 23 种不同的酶切带型, 其中 BS-D 6 种特征带型(分别以 BS-D1、BS-D2、BS-D3、BS-D4、BS-D5、BS-D6 表示), BS-E 中 9 种特征带型(分别以 BS-E1、BS-E2、BS-E3、BS-E4、BS-E5、BS-E6、BS-E7、BS-E8、BS-E9 表示), BS-F 中 8 种特征带型(分别以 BS-F1、BS-F2、BS-F3、BS-F4、BS-F5、BS-F6、BS-F7、BS-F8 表示), 如图 2 所示。每个酶切类型挑取 1 个代表克隆子进行测序。

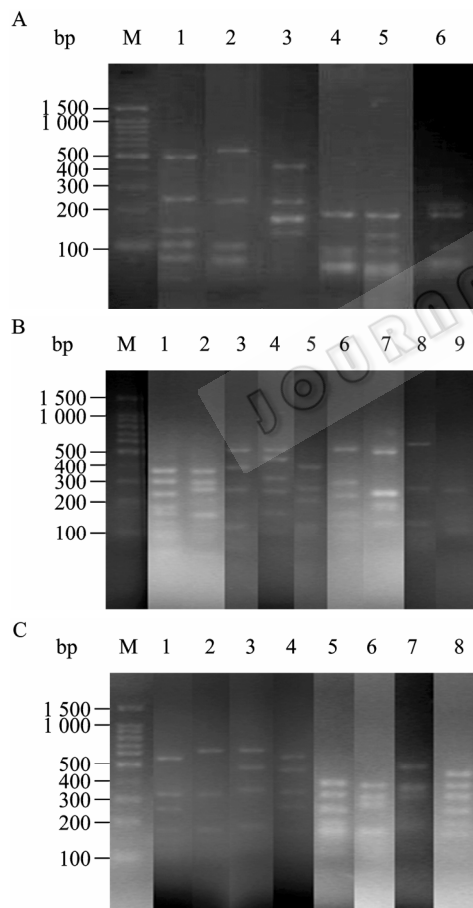


图2 BS-D, BS-E, BS-F 3 个样品 16S rRNA 基因的 RFLP 酶切结果

Fig. 2 Restriction fragment length profiles of 16S rRNA genes of all three samples

Note: A: BS-D; B: BS-E; C: BS-F.

2.2.3 系统发育分析: 将 RFLP 分析得到的特异性克隆子进行测序分析, 然后将得到的序列提交到 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 根据比对结果所构建系统发育树如图 3、4、5 所示。所有样品检测到的序列集中于 3 个种, 分别为嗜铁钩端螺旋菌、耐温氧化硫化杆菌和喜温硫杆菌, 与已有的研究报道结果相符^[12-13]。

通过统计具有相同 RFLP 图谱的克隆子数目, 间接反映不同培养体系中的种群丰度。在 60 d 浸矿的前、中、后 3 个阶段, 存在相类似的菌种类型, 主要包括: 嗜铁钩端螺旋菌, 耐温氧化硫化杆菌以及喜温硫杆菌。在反应器运行初期(20 d), 嗜铁钩端螺旋菌在黄铜矿浸出体系中占有很高比例(81%), 随着浸矿的进行, 嗜铁钩端螺旋菌比例逐渐降低, 在浸矿 40 d 时, 降低至 45%, 同时耐温氧化硫化杆菌和喜温硫杆菌的比例逐渐升高, 分别达到 32%和 23%; 浸矿末期(60 d), 耐温氧化硫化杆菌在总的微生物群落中所占比例显著上升, 达到 79%, 嗜铁钩端螺旋菌所占比例降低到 13%, 而喜温硫杆菌的比例仍然维持在一个相对较低的水平(8.1%)。图 6 为浸矿前、中、后期反应器中主要菌种的组成比例。

2.3 分析与讨论

在接种细菌初期, 由于停止调节 pH 值, 黄铜矿为酸溶性矿如方程式(1)所示, 矿物的溶蚀消耗了溶液当中的 H^+ , 所以会导致溶液的 pH 值升高, 超过了浸矿微生物的最适生长值(图 1A)。此时微生物的作用比较弱, Cu^{2+} 的浸出速度缓慢(图 1B)。随着细菌适应环境, 喜温硫杆菌硫酸化活性增强, 产酸速度大于耗酸速度, pH 值逐渐下降如方程式(2)所示。此时酸浸产生的 Fe^{2+} 为铁氧化菌嗜铁钩端螺旋菌提供了能源, 将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} 见方程式(3), 因而生成的 Fe^{3+} 又会作用于黄铜矿使铜溶浸出来如方程式(4)所示。由于 Fe^{3+} 是主要的氧化剂, 因此 Cu^{2+} 浓度开始明显的升高(图 1B)。第 20 天后 Cu^{2+} 浸出速度减缓, 可能的原因 pH 值大于 1.8, 结果形成大量黄钾铁矾如方程式(5)所示, 产生的黄钾铁矾和元素硫的钝化膜堆积在矿物表面, 阻碍了主要的氧化剂 Fe^{3+} 与矿物的作用, 且黄钾铁矾的生成致使 Fe^{3+} 浓度下降, 从而使浸出效率下降。与已

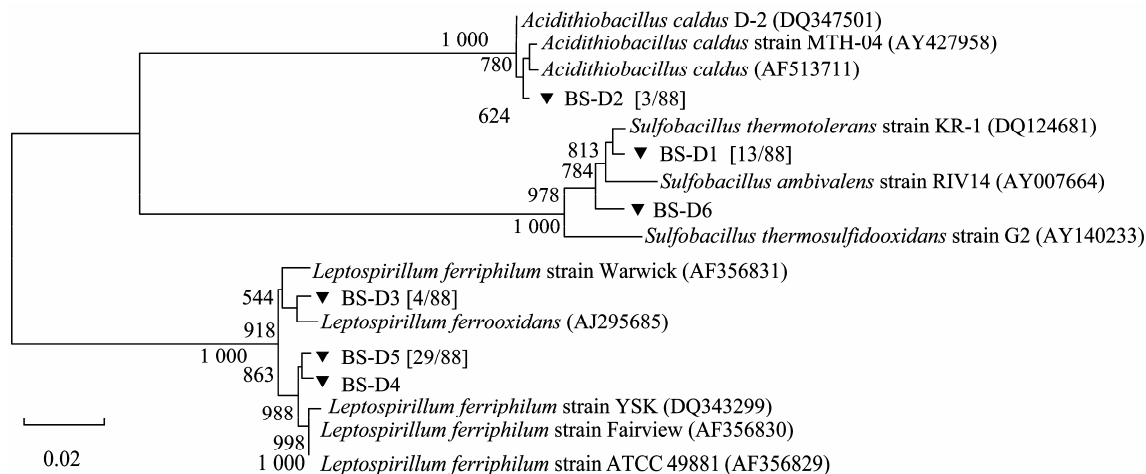


图3 样品BS-D中细菌的16S rRNA基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on fragment of 16S rRNA genes sequences of sample BS-D

Note: Scale bar represents the number of changes per base position; Numbers at tree nodes represent the number of times the topology to the right of the node was recovered in 1 000 bootstrap resamplings; Content of brackets are the proportion of the clones in all the positive clones. The same below.

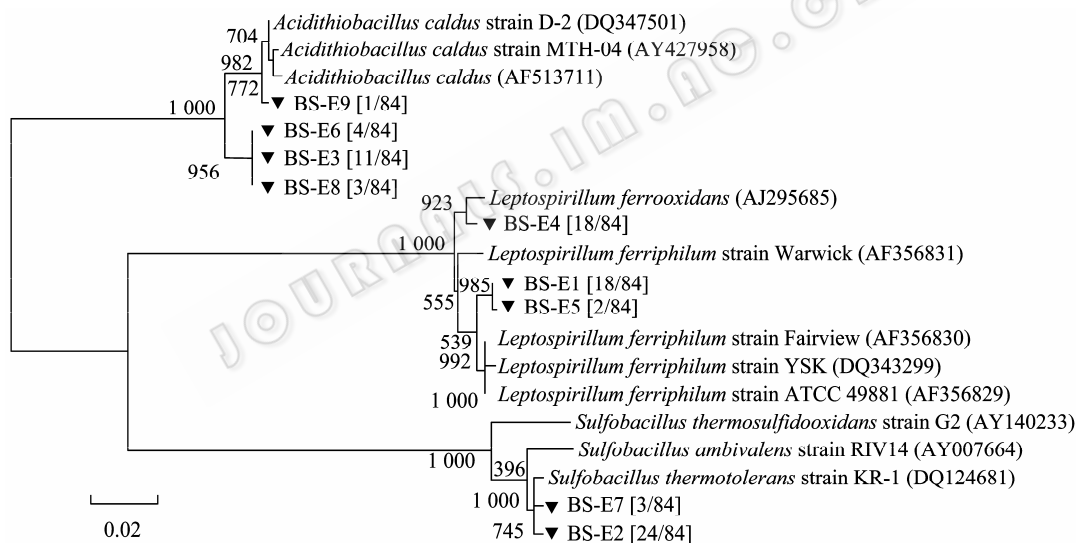
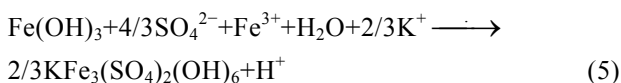
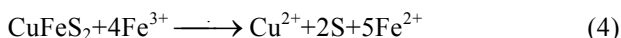
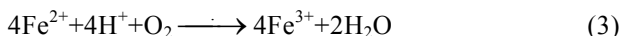
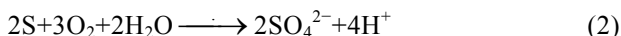
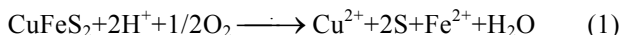


图4 样品BS-E中细菌16S rRNA基因的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on fragment of 16S rRNA genes sequences of sample BS-E

有文献报道当pH值高于1.6时极易形成黄钾铁矾相符^[14-15]。实验所用矿石颗粒未经浮选和磨碎,且品位较低(4.62%),氧化剂 Fe^{3+} 不能直接与矿物作用,导致 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 的循环受到影响,微生物不能获得能源。矿石颗粒在浸矿柱中堆积密度过高,传氧传质效果差,微生物浓度始终维持在较低水平,造成酸的生成量较低,从而使脉石难以溶解,加剧了浸出的难度^[16]。上述所有的因素导致了最终的浸出率

只有13.6%。



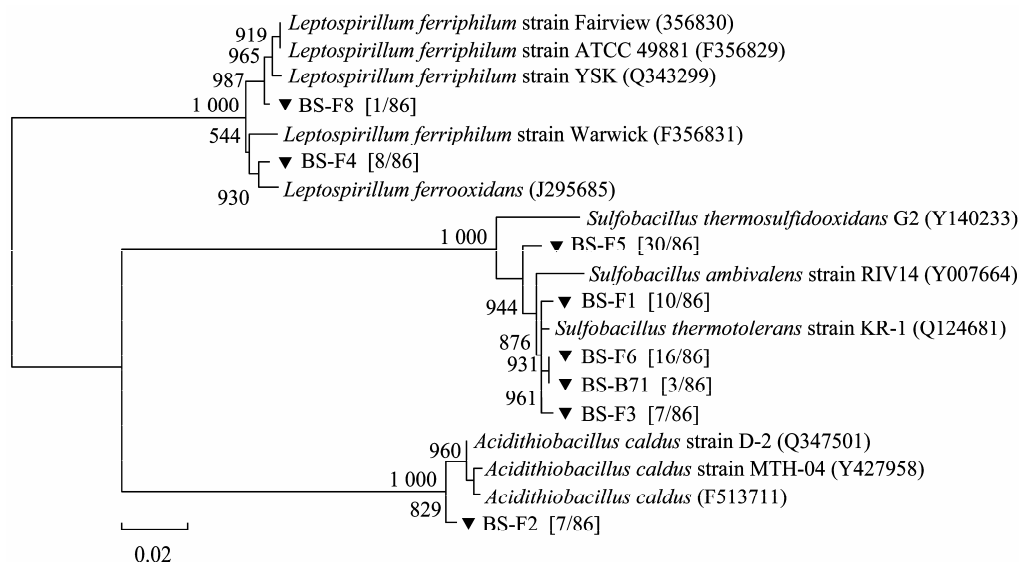


图5 样品 BS-F 中细菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on fragment of 16S rRNA genes sequences of sample BS-F

RFLP 分析结果表明生物多样性不丰富,发现嗜铁钩端螺旋菌、耐温氧化硫化杆菌以及喜温硫杆菌(图 3-5) 3 种细菌构成了浸矿反应柱中的微生物群落,这与浸矿环境的极低 pH 和寡营养环境相关^[15,17-18]。

浸矿初期嗜铁钩端螺旋菌在黄铜矿浸出体系中所占比例最高(81%),随着浸矿的进行比例逐渐降低,而耐温氧化硫化杆菌和喜温硫杆菌所占比例呈逐渐升高趋势,至浸矿末期,耐温氧化硫化杆菌所占比例显著上升。出现这样的变化原因可能为在前期 Fe^{2+} 被释放出来,然后迅速被嗜铁钩端螺旋菌氧化成为 Fe^{3+} 获得能源,因此所占比例较高,随着浸出过程的延长,其作为严格自养的微生物对有机化合物是比较敏感的,容易受到高浓度有机化合物的抑制。因此在后期代谢产生的有机化合物和微生物自身的溶解而导致的有机物浓度升高抑制了嗜铁钩端螺旋菌的生长,致使所占比例开始降低。由于耐温氧化硫化杆菌和喜温硫杆菌代谢类型为兼性营养型,一定浓度的有机物会促进其生长,所以比例会呈现上升趋势。同时耐温氧化硫化杆菌既可以氧化 Fe^{2+} 获得能量,也可以氧化硫获得能量。由于 Fe^{2+} 较容易被氧化,而还原态硫较难被氧化,所以至后期耐温氧化硫化杆菌占有绝大比例。

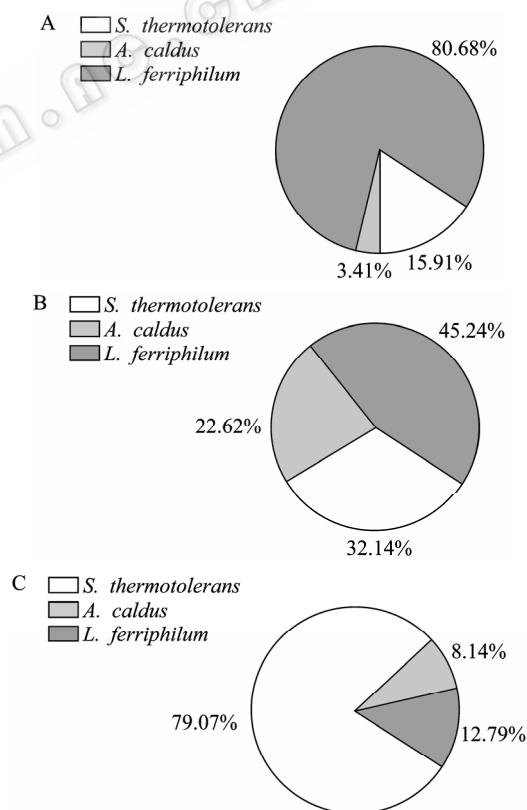


图6 中等嗜热微生物浸出低品位黄铜矿过程中前、中、后期种群结构变化情况

Fig. 6 The variation of community structure and dynamics of different stages during bioleaching low-grade chalcopyrite with moderately thermophilic microorganisms

Note: A: Initial stage; B: Middle stage; C: Final stage.

3 结论

本文模拟目前生物冶金工艺中, 技术最为成熟, 应用也最广泛堆浸技术条件, 采用中等嗜热富集物浸出低品位的黄铜矿, 60 d 内回收了 13.6% 的铜。另外通过 RFLP 分析表明在前期嗜铁钩端螺旋菌为优势种群, 在后期耐温氧化硫化杆菌为优势种群, 为黄铜矿的工业应用及工艺优化提供了一定的理论指导。由于在整个浸出过程 pH 值一直大于 1.8, 此 pH 高于 Fe^{2+} 能力最强的嗜铁钩端螺旋菌最适生长 pH 值, 因此如何调节浸出体系和过程, 使其达到微生物生长的最适条件还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Ehrlich HL. Past, present and future of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2/3): 127-134.
- [2] Brierley JA, Brierley CL. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59 (2/3): 233-239.
- [3] Pradhan N, Nathsarma KC, Srinivasa RK, et al. Heap bioleaching of chalcopyrite: a review[J]. Minerals Engineering, 2008, 21(5): 355-365.
- [4] 杨显万, 沈庆峰, 郭玉霞. 微生物湿法冶金[M]. 北京: 冶金工业出版社, 2003: 5-100.
- [5] 杨洪英, 杨立. 细菌冶金学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 10-20.
- [6] Zhou HB, Zeng WM, Yang ZF, et al. Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(2): 515-520.
- [7] Sasaki K, Nakamuta Y, Hirajima T, et al. Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. Hydrometallurgy, 2009, 95(1/2): 153-158.
- [8] Zeng WM, Qiu GZ, Zhou HB, et al. Community structure and dynamics of the free and attached microorganisms during moderately thermophilic bioleaching of chalcopyrite concentrate[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 7068-7075.
- [9] Brierley CL. Bacterial succession in bioheap leaching[J]. Hydrometallurgy, 2001, 59(2/3): 249-255.
- [10] Johnson DB. Biodiversity and interactions of acidophiles: key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates[J]. Trans Nonferrous Met Soc China, 2008, 18(6): 1367-1373.
- [11] 魏曼曼, 王玉光, 郑甲, 等. 劳盆地深海热液喷口沉积物中细菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(4): 538-543.
- [12] Plumb JJ, Gibbs B, Stott MB, et al. Enrichment and characterisation of thermophilic acidophiles for the bioleaching of mineral sulphides[J]. Minerals Engineering, 2002, 15(11): 787-794.
- [13] Demergasso CS, Galleguillos PPA, Escudero GLV, et al. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap[J]. Hydrometallurgy, 2005, 80(4): 241-253.
- [14] Pogliani C, Donati E. Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans*: importance of jarosite precipitation[J]. Process Biochemistry, 2000, 35(9): 997-1004.
- [15] 周洪波, 邱冠周, 郭长斌, 等. 嗜酸微生物生态学与矿物生物浸出技术[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(6): 784-788.
- [16] 王长秋, 马生凤, 鲁安怀, 等. 黄钾铁矾的形成条件研究及其环境意义[J]. 岩石矿物学杂志, 2005, 24(6): 607-611.
- [17] 刘新星, 霍强, 刘学端, 等. 古矿井区域酸性矿坑水微生物群落的多样性[J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2007, 38(3): 414-420.
- [18] Zhang RB, Wei MM, Zhou HG, et al. Application of real-time PCR to monitor population dynamics of defined mixed culture of moderate thermophiles involved in bioleaching of chalcopyrite[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(6): 1161-1168.