

微波和磁场强化细菌 浸出低品位黄铜矿的研究

作者简介：祝丽丽，性别女，1981年7月生，师从成都理工大学汪模辉教授，2008年6月毕业于成都理工大学应用化学专业，获得工学硕士学位。

摘要

本文扼要评述了为提高黄铜矿的浸出率，可以施加的许多微生物强化浸出方法如：添加银离子、表面活性剂、加入赤铁矿、外加电压、应用磁场、超声波预处理等。重点论述了微波技术在矿物处理和冶金过程中应用的现状及其在提升冶金效率方面的巨大潜力。最后，论述了微生物湿法冶金的发展方向。

考察了在pH值为2.0的条件下，不同的接种量、矿浆浓度和铁含量的培养基下黄铜矿中铜的生物浸出率。通过3因素3水平的正交实验表明对极差的影响：矿浆浓度影响最大，培养基、接种量的影响相对较小且基本接近。方差分析的结果表明矿浆浓度的影响是高度显著的。同时结合单因素试验，确定了浸矿的最佳条件：矿浆浓度5%、无铁的9K培养基、接种量为10%。

采用微波或磁场强化后的水配制培养基，发现在强化后培养基中细菌的活性均有所提高。其中微波的作用较明显，效果较磁场好。对于微波相对而言，微波炉中间档位长时间和较高档位短时间处理的水对细菌活性的提高效果较好。另外微波加热与体积有关，表现为对渗透深度的影响。所以处理水时所用容器对实验结果有影响。经磁化半小时处理后的水配制的培养基能够提高T.f菌的活性。磁化一小时的浸矿效率却不如半小时的好。

在最佳的浸出条件下研究了黄铜矿的生物强化浸出，采用微波和磁场强化后的水配制培养基，发现在强化后培养基中细菌对黄铜矿的浸出率比普通培养基中的高，最后比较了微波和磁场联合的情况下二次强化后与普通条件下的细菌浸矿效果。大体上与细菌强化的强弱顺序一致。联合作用机理还有待于进一步探讨。

由于本试验所用的强化方法只是针对培养基用水的处理，不影响其它化学强化的施用，且对其它矿物的细菌浸矿也具有参考价值。此种微生物强化浸出方法具有对环境危害小、投资少、能耗低等优点。

关键词：低品位黄铜矿 微波 磁场 氧化亚铁硫杆菌 (T.f)

Study of microwave and magnetic field comprehensive bioleaching for low grade-Chalcopyrite

Introduction of the author: Zhulili, female, was born in July, 1981 whose tutor was Professor Wang Mohui . She graduated from Chengdu University of Technology in applied chemistry major and was granted the Master Degree in June, 2008.

Abstract

In this paper, different methods to increase the leaching rate of chalcopyrite are briefly reviewed. These methods include the addition of silver ion, surfactants, and hematite into the leaching solution, respectively; and the application of electric voltage, magnetic field, and ultrasonic, etc. to the leaching system. It is discussed emphatically that the microwave techniques can be applied to mineral processing and metallurgy and that there are great potentialities with the application of microwave techniques to increase the metallurgical efficiency. Finally, the future work which would be done is suggested.

Under the condition of pH of 2.0, the different inoculum amount, slurry densities and culture medium with different amount of iron concentrations, bioleaching rate of copper in chalcopyrite was investigated. “3 factors and 3 levels” orthogonal design have shown that the effect in order: slurry density was preferential. The culture medium and inoculum amount were less preferential and closed to each other. Variance analysis showed that the effect of slurry densities is highly significant. At the same time with single-factor tests the optimal conditions for bioleaching have been determined: the slurry density is 5%, 9 K medium without iron ion, the inoculum amount is 10%

The medium was prepared with water which treated by microwave or magnetic fields to strengthen, and founded that the activity of bacteria in the medium was increased. The function of microwave is more obvious and effective than magnetic field. As far as the effect of improving the activity of bacteria is concerned, the water which treated in microwave oven the middle grade power of the long time and higher grade of short time is better. In addition, microwave heating is concerned to volume, presented as the impact of penetration depth. Therefore, when dealing with water the containers have an impact on the experimental results. The medium prepared with water magnetized after half an hour can increase the activity of T.f. However, the effect of magnetized one hour is no good than half an hour.

Under the optimal conditions, comprehensive bioleaching of chalcopyrite was

studied. The culture medium was prepared with water treated by microwave and magnetic field, respectively. It was found out that the bioleaching rate of thiobacillus ferrooxidans (T. f) in the treated culture medium was higher than that in the untreated one. Finally the leaching effects of T.f in the culture medium treated by both microwave and magnetic field were compared with the general treatment under the conditions, respectively. And the order is almost coincident with bacterial comprehensiveness, in general. The comprehensive mechanism has to be further investigated.

As the method used in this experiment is only concerned to the treatment of water for medium. So it does not affect the application of other chemical comprehensive bioleaching, and is valuable for bioleaching of other minerals. This method of comprehensive bioleaching has advantage of less harm to environment, less investment and lower energy consumption.

Keywords: Low grade-chalcopyrite Microwave Magnetic Field Thiobacillus
Ferrooxidans(T.f)

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的
研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其
他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得成都理工大学或其他教
育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何
贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：祝研研

08年 5月 31日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解成都理工大学有关保留、使用学位论文的规定，
有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和
借阅。本人授权成都理工大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数
据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：祝研研

学位论文作者导师签名：江植辉

08年 5月 31日

第1章 引言

1.1 研究意义

微生物冶金技术应用历史悠久,我国北宋时期的《文献通考》上就有“胆水浸铜”的记载:“信之铜山与之处铜廊,皆是胆水,春夏如汤,以铁投之,铜色立变。”当时的人们已经知道,把铁放入“胆水”之中就会产生铜。但由于当时科学技术的限制,并不知道“胆水”的成分是什么,它又是如何产生的。直到19世纪40年代,科学家发现从矿石流出的酸性矿坑水中含有大量的微生物,并且发现它们能将矿石中的金属浸出。生物学家从中分离出这些微生物进行实验研究,结果表明正是这些默默无闻的微生物在炼铜时担任着重要的角色——将铜从矿石中浸出。这个秘密揭开之后,用微生物浸矿来冶炼金属逐渐成为现代工业广泛运用的技术。

铜是重要的有色金属,而我国的铜矿的平均含铜品位为0.71%,矿石品位超过1%的仅占铜矿总量的20%。含铜品位在0.7%以下占总贮量的56%,全国未开采利用的铜资源中有一半以上是属于低品位^[1]。黄铜矿是低品位硫化铜矿中的主要铜矿物,又是硫化铜中最难浸出的铜矿物之一。

1.2 研究现状

1.2.1 湿法炼铜的现状

随着铜矿石品位的降低以及火法冶金中 SO_2 所造成的环境污染,湿法炼铜日益受到人们的关注。湿法炼铜包括堆浸、生物堆浸、搅拌浸出、加压浸出、地下溶浸等浸出手段。微生物浸出又以投资省,成本低,对环境友好等特点倍受关注。相关资料表明,单一铜矿物国外采用生物冶金技术处理,边界品位可达0.01%。目前,采用细菌堆浸或地下浸出工艺生产的铜大约占全世界铜年产量的25%^[2]。

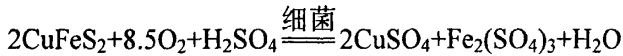
1.2.2 微生物冶金现状

铜的提炼:微生物对铜的提炼是其冶金领域中最早发现的一项,也是微生物在矿冶工业中应用最成功的一个领域。墨西哥的卡纳内阿矿,曾经堆积了约4000吨废矿渣,含铜量只有0.2%,运用一般的冶金方法提取是得不偿失的。人们利用细菌浸矿,能从1千克矿水中提取3克铜,一个月内就得到了650吨铜。据称,目前利用微生物冶金方法提取的铜占美国年产铜量的11%以上^[3]。

用于浸出铜的细菌有：氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌和氧化亚铁钩端螺旋菌等，而浸出黄铜矿常用的是前两种。细菌的初期培养由试验室完成，菌种主要采集于酸性矿坑水或温泉水。也可以用矿区的碎石、泥土经灭菌水洗后过滤得到的水，经培养、富集、分离、纯化获得。

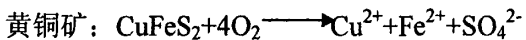
细菌用空气中的二氧化碳作为碳源，从无机物的氧化中得到能量。氧化低价硫产生硫酸，在此过程中获得其生长繁殖的能量，并且从培养基中获得 N、K、P 及微量元素，以补充硫化矿物氧化所消耗的能量。

黄铜矿的细菌浸出过程可简略表示为以下反应：



利用微生物将金属从矿石中浸出有直接和间接两种方法。直接方法是利用细菌对含硫矿物的酶化学反应，形成可溶性硫酸盐；间接方法是利用细菌将矿物中的二价铁转化为三价铁，三价铁是很强的氧化剂，能将矿物中的金属硫化物转变为酸性的可溶性硫酸盐化合物。

细菌的直接作用是指浸矿细菌(主要是 T.f 菌)附着于矿石表面与矿石中的硫化矿发生作用，使该矿物氧化而溶解。实际上，矿石中的还原态硫和铁化合物被氧化亚铁硫杆菌直接氧化是一个极复杂的多极过程。首先，必须使硫化物或硫的晶格受到破裂，接着氧化剂渗入晶格内，然后在各种酶系统的影响下进行氧化过程。这些酶系统参与了由基质传递电子给氧的过程，同时，这些无机化能自氧型细菌，也正是靠氧化亚铁离子、硫化矿物、硫和可溶性的硫化合物来获得生命过程所需的能量。细菌通过这种方式将矿物中有价金属以离子形式释放出来。用电子显微镜对被细菌腐蚀的纯黄铁矿表面观察^[4]发现有细菌浸蚀的通道。在有氧及水存在下，由于细菌的直接作用，金属硫化物、黄铁矿、黄铜矿及元素硫会发生氧化溶解反应如：



保加利亚 S.Gaidarjiev 等试验表明^[5]，将氧化亚铁硫杆菌的某些菌株，先通过一定的方法使它丧失氧化亚铁的能力，但仍保持氧化硫的能力，再用这种细菌去浸出铜矿物，由于它不能将亚铁氧化三价铁，排除了硫酸铁氧化溶解铜矿物的作用，结果表明，用这种菌株浸出时，铜的浸出率要比无菌浸出时高得多。

细菌的间接作用：在多金属的硫化矿床中，通常含有黄铁矿，黄铁矿在自然条件下被缓慢氧化生成硫酸亚铁和硫酸，在有细菌的条件下，细菌将亚铁氧化为三价铁，硫氧化为硫酸，其中的三价铁是一种很有效的矿物氧化剂和浸出剂，多种硫化矿物都可被硫酸铁浸出，氧化反应被三价铁催化快速进行。这就是细菌浸出间接作用机制的观点，凡是利用三价铁为氧化剂的金属矿物的浸出都是间接浸出。Fe³⁺与矿物反应之后生成的 Fe²⁺继续被细菌氧化。细菌的作用就是不断将亚

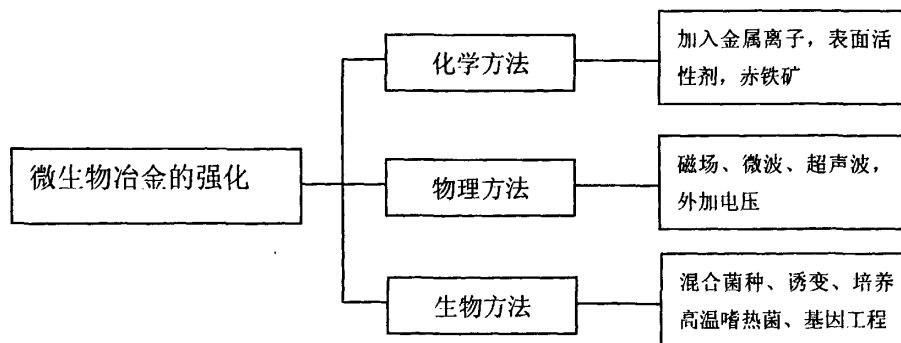
铁氧化为三价铁离子，产生了氧化剂，并提供了适宜的酸性环境。因此，矿石中的硫化矿物在氧化剂和酸性环境下就可发生化学溶解，细菌起一个催化作用。

细菌的复合作用：在细菌浸出过程中，既有细菌直接作用，又有通过 Fe^{3+} 氧化的细菌间接作用。实际上，大多数矿石总会多少存在一些铁的硫化矿，所以三价铁的作用不可排除。只不过有时直接作用占优势，有时间接作用占优势，两种作用都不可排除，这是金属硫化矿物细菌浸出所遵循的一般规律。

1.2.3 微生物冶金强化的现状

由于自然界中大部分矿石都是与其他金属伴生的，因此常规冶金必须投入大量的资金用于精选矿石，并且整个过程都需要高温、高压，能源消耗非常严重并且污染环境。而微生物在周围环境的温度和压力下生长只需较低的能量，并且能从很深的、传统采矿设备不能到达的地下某一点渗出金属，因此用微生物冶金只需要相当低的资金和操作费用，并且效率高、污染少。当然，微生物冶金也有缺点，就是速度比相应的化学冶金慢，对矿石有选择，回收率不稳定，并受一定温度和湿度的控制，人们正在设法克服这些难题，以便提高它们的效率。

低品位硫化铜矿中的主要铜矿物是黄铜矿，而黄铜矿是硫化铜中最难浸出的铜矿物，为了提高黄铜矿的微生物浸出率，可采用的一些强化方法是加入银离子^[6]、表面活性^[7]、赤铁矿^[8]、外加电压^[9]、磁场^[10]或是超声波^[11]。



1.2.3.1 金属阳离子的催化作用

Ag^+ 催化黄铜矿的化学浸出是金属阳离子催化作用的典型例子。现在流行的看法是认为 Ag^+ 与 Cu^{2+} 空间结构相似而取代，浸出过程中加入的微量 Ag^+ 与黄铜矿反应生成 Ag_2S ，并能均匀夹杂在产物硫层中，改善了元素硫层的导电性能，是加快反应速度的主要原因^[12]。但是离子的用量必须在细菌可承受的范围内，过量将对浸矿细菌产生毒性，影响铜的浸出率。

1.2.3.2 表面活性剂强化微生物浸出研究

表面活性剂可以增加矿物的亲水性，改变矿物表面性质。而吸附是细菌直接浸矿的第一步，加入表面活性剂后通过增强细菌对铜矿石的吸附，而有利于细菌

与矿物接触，加快了浸铜速度。童雄和唐云等人^[13,14]在黄铜矿细菌浸出体系中添加吐温 20，发现浓度为 0.003%对浸矿有促进作用，虽没有提高最终浸出率但缩短了“滞后期”。

1.2.3.3 混合矿浸出

有关研究表明^[15]，在有黄铁矿、辉铜矿、辉铋矿等矿物存在时，黄铜矿的电化学溶解速率要比其单独存在时快。因为在黄铜矿中混入一定比例的黄铁矿，两种硫化矿混合接触后形成化学电对，发生电化学反应，有利于铜的溶解。并且细菌的存在能催化这种反应，可促进铜的浸出。

1.2.3.4 外加电压强化微生物浸出研究

细菌浸矿速度与浸矿细菌的生长速度、细胞极限浓度密切相关。研究人员一直在探索如何增强细菌活性和加速细菌生长繁殖，从而促进矿物细菌浸出技术的发展。对浸出体系外加一合适的直流电压，可使细菌体内酶的活性提高，细菌浓度增加，从而提高浸矿速度，并进行多金属硫化矿物的选择性浸出^[16-18]。

1.2.3.5 硫化铜矿超声波预处理提高细菌浸矿的浸出率

超声空化产生的微射流对固体表面的剥离凹蚀作用创造了新的活性表面增大了固体颗粒的传质和吸附表面积，大大缩短了浸取时间。在细菌浸矿实验中将不同粒度的矿样培养液加入锥形瓶，将超声波发生器探头伸入锥形瓶进行超声波处理，再将接种菌液加入锥形瓶置于空气浴振荡培养器。结果发现超声波处理对矿样铜浸出率的提高有一定作用，同时增加超声波处理时间对粒度较大的矿样作用显著^[19,20]。

1.3 微波及其在微生物强化浸出中的应用

微波加热是指频率在 300MHz 至 300000MHz 之内的电磁波对物体进行加热。它不同于一般的加热方式，是由表及里，由外到内的瞬时加热过程，通过微波在物料内部的能量耗散来直接加热物料。微波加热在冶金中的应用具有以下用传统加热方式无法比拟的优点：可以选择性加热物料，升温速率快，受热均匀；能够同时促进吸热反应和放热反应，对化学反应具有催化作用；微波加热可以使高温化学反应在十分低的温度下进行，降低了化学反应温度；很容易使极性液体例如水、酸等加热，因而微波加热可以用来促进矿物在溶剂中的溶解，提高湿法冶金过程的浸出速率和降低能耗；微波加热物质没有因热源或发热材料而给被加热物质带入任何污染，本身不产生任何气体，利于环境保护、便于控制。

1.3.1 氧化亚铁硫杆菌的驯化与微波诱变

生物浸矿速度缓慢是其在矿冶工程中的应用并不普遍的主要原因^[21,22]。而细菌的生长繁殖速度的快慢影响到它的氧化活性也即浸矿能力。选育高效浸矿菌种是生物浸矿技术实现工业化的前提条件。除了从自然界中筛选高品质的浸矿微生物外,更主要的是应用包括传统的驯化、诱变育种、杂交育种和现代的原生质体融合技术以及基因工程育种等育种手段获得优良菌种。可以考虑在原有驯化菌种研究的基础上^[23]再进一步开展诱变研究,特别是将微波作为一种新的物理诱变剂^[24]应用于氧化亚铁硫杆菌的诱变,从诱变剂量的选择到菌种的初筛、复筛探索一简便易行的诱变育种方法,为优势浸矿菌种的获得提供一条有效的育种途径。

(1) 微生物驯化改良机理

微生物的生长是与其与外界环境相互作用的结果,微生物在逐渐适应环境的变化过程中基因会发生突变,在适合生长发育的新环境下成为优势种。

(2) 微生物诱变育种机理

由于自发突变的频率非常低,因此人们常常通过外界物理、化学因素的改变诱发基因突变,诱变处理后,微生物的遗传物质 DNA 和 RNA 的化学结构发生改变,从而引起微生物的遗传变异,变异的程度决定了自然环境下的氧化速度^[25]。

(3) 微波诱变

微波诱变机理可能缘于以下几个方面:微波是一种电磁波,能引起水、蛋白质、核苷酸、脂肪以及碳水化合物等极性分子转动,引起分子间强烈的摩擦,最终引起 DNA 分子结构发生变化,导致遗传变异;微波引起的强烈热运动所产生的瞬时强烈热效应,容易引起酶失活,引起生理生化的变异^[24-26]。

将经紫外诱变选育出来的菌种采用稀释法纯化后,作为微波诱变出发菌。取一定量该菌液,按不同的处理时间进行诱变。微波作用后迅速接入矿物培养基中,置于振荡培养箱中培养,并监测 T.f 菌在几代繁殖过程中的生长速度变化(细菌的生长速度对比以同样的接种浓度及细菌繁殖至对数期所需要的时间为对比参数,时间越短,生长速度越快)。因为 T.f 菌与其他微生物相比在固体培养基中生长缓慢,为了节省时间,同时也考虑到 T.f 菌和生长环境是大多数微生物都不能生长的强酸性环境,其他杂菌不会竞争繁殖,对优势菌不会造成影响。

熊英等^[27]以在高含硫化物金精矿中长期驯化过的氧化亚铁硫杆菌作为出发菌,用紫外灯进行辐照诱变,结果细菌氧化 Fe^{2+} 的活性提高了 21 倍。又将经紫外线诱变选育出来的菌株采用稀释法纯化后,再经微波诱变处理,表明存活下来的少量细菌培养较慢,但经过若干次的转移后,培养时间逐渐缩短且具有高氧化活性,细菌对 Fe^{2+} 的氧化活性从 $1.54\text{g/L}\cdot\text{h}$ 提高到 $3.181\text{g/L}\cdot\text{h}$ 。试验结果证明用逐级传代培养的方法可以将 T.f 的优势菌选育出来。徐晓军,宫磊等^[28]在进行浸出黄铜矿的试验研究中发现:接入耐铜离子经微波诱变后所筛选的活性较好的菌

种, 虽然对菌种的繁殖增加并不很大, 但诱变菌与原始菌相比浸出率提高 24% 以上, 浸出速率加快, 到达浸出终点的时间提前了 5~10d。可以认为该菌种经微波处理, 性能有所改良, 更适合黄铜矿的浸出。

1.3.2 微波辐射对水的影响

水分子在自由状态下, 呈杂乱排列, 正负极性抵消。但在交变电场中时, 这些偶极子的水分子就会随电场做极化运动, 水分子随着磁场方向的变化而转动, 在转动的过程中产生摩擦热, 这就是微波加热水的原理。

1.3.2.1 过热现象:

传统加热是由外到内的加热, 外部靠近热源的容器壁最先热起来, 而那里是最容易形成气化核, 当其饱和蒸汽压等于液体上方气体压强时, 溶剂就沸腾了, 而微波加热因为是一种分子高速震荡的选择性内加热, 加热在水的表面和内部同时进行。在内部温度较高的地方缺乏汽化核, 致使液体内部因缺乏汽化核而加热到传统沸点时仍不能沸腾。另外, 玻璃反应器器壁表面几乎没有可作为晶核的物质, 较难为其提供汽化中心。

1.3.2.2 微波撤消后的效果:

水分子的 O-H 核间距离为 97pm(0.097nm), 2 个 O-H 键间的夹角为 $104^{\circ}40'$, 则单个水分子的最大边长(H.....H 间)为 0.1536nm。而所谓纳米物质的尺寸指在 0.1~100 纳米的范围里, 所以该尺寸在纳米物质的下限。水分子间氢键 O.....H 的核间距离为 179pm(0.179nm), 两个水分子的最大边长 0.373nm^[29]。当水被传统方式加热(如电炉加热)后, 缔合度有一定程度降低, 冷却后缔合度又恢复, 电导率基本不变, 水经微波处理后, 缔合度降低, 单分子水增多, 电导率增大, 并且这种特性在微波场撤消和温度降低后一段时间内仍然能够得以保持, 成为离子型纳米水状态。如果将其作为水分子溶剂, 其扩散和渗透能力增强^[30]。

1.3.2.3 电导率的变化:

根据离子氛学说^[31]当在中心离子和离子氛上加一个电场, 带正电荷的中心离子将沿电场方向移动, 此时, 离子氛的对称性遭到破坏, 中心离子前面的电荷密度低, 后面的高, 这种不对称的离子氛对中心离子移动产生一种反向的阻力——松弛力。

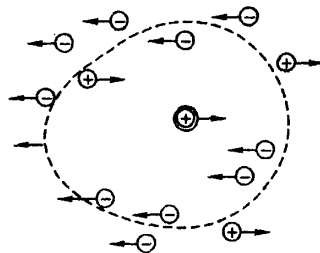


图 1-1 不对称离子氛图

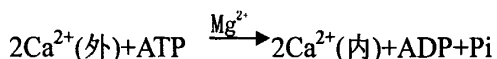
由于构成离子氛的阴离子,一般具有较大的变形性,若同时再对体系施以一交变电场(微波场),那么,构成离子氛的离子将发生诱导偶极极化,就有可能使不对称的离子氛恢复对称性,从而使松弛力降低,溶液的电导就要比无微波场作用时增大^[32]。

1.3.2.4 非热效应及其对微生物的影响:

实际上,弱电磁场与波的“非热效应”在生物电磁学中早有研究。黄卡玛等曾提出用电磁波对生物体新陈代谢(或生化反应)的影响来解释非热效应^[33]。在生物系统中开展的研究主要包括:微生物(主要包括弱电磁辐射下的各种细菌存活率的研究),生物大分子(包括弱微波辐射对蛋白质和各种酶的结构和活化作用影响的研究)和各种人体代谢中关键作用的离子(包括在弱微波辐射下离子通道中 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 等离子的通透性影响的研究)。

电磁场对新陈代谢过程的影响与非热效应之间的联系:

非热效应机理研究必然要涉及到物质和能量变化的来源问题,这实质上就是涉及到新陈代谢过程的变化问题。以细胞内 Ca^{2+} 离子的浓度变化为例,它实际上是这样一种生化过程:



在电磁波作用下,细胞内 Ca^{2+} 离子浓度会发生变化,这意味着上述反应的速率发生了变化。上述非热效应的能量不是来自于电磁场,而是由 ATP 水解提供的,电磁场起到了加快 ATP 水解的作用。

由于生物体固有的个体差异导致很多实验不能重复,“非热效应”被观测的概率随生物系统复杂程度的增加而减小^[34],弱电磁波的“非热效应”至今仍然未被广泛接受。相对于生命如此复杂的非平衡系统,化学反应相对简单,弱电磁场与波的“非热效应”实验的重复性问题将有望得到解决。

与弱电磁场对生物体的“非热效应”研究不同,微波加快化学反应中的微波功率较高,系统往往伴随有显著的温度升高。要区别效应是由温升引起的还是别的什么因素引起的是非常困难的,这就要求在实验系统和方法上进行特殊的设计。

由于生命系统是如此复杂,几乎每一种效应都要涉及到许多生化过程。因此还必须研究电磁场对非平衡系统之间关系的影响。这涉及到非线性和系统科学,在这方面目前人们的研究还刚刚起步,有待长期的努力^[35]。

1.3.3 微波辐射水在生物冶金中的应用

微波加热是全面的加热,是材料在微波交变电场介质中由介质损耗而引起的体加热,是靠点介质的偶极子转向极化和界面转化来实现的。水是极性分子具有永久性偶极矩,在交变电场中能发生偶极迟豫,在体系内部直接引起微波能的损

耗,水分子互相碰撞,导致分子化学键的破坏或改变水分子的原结构形式,引起水分子结构变化^[36],如水由缔合的大分子变为较小的分子,致使不能形成水合物,在有 Fe^{3+} 的浸出体系中,游离的三价铁数目会更多,有利于浸出。

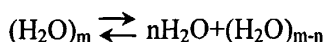
另外,作为电磁辐射的微波也具有相应的磁场,引起溶液界面压力差,促进氧气在水中的溶解,从而促进了细菌的生长。

1.4 磁化水及其在微生物强化浸出中的应用

事实上,因为水为抗磁性物质,不存在所谓“被磁化”问题。水通过磁场处理以后,没有被磁化,仅是引起一系列理化性能的变化而已,叫做“磁处理水”才比较妥当。以下为方便简称“磁化水”。

关于磁场对水作用的机理问题的关键及争论的焦点是磁处理中水的氢键是否被破坏和如何破坏的问题。有的学者认为磁化处理会破坏水原来的结构。使较大的缔合水分子集团变成较小的缔合水分子集团,甚至是单个的水分子。持否定态度的主要原因是磁场对水做的功比氢键键能小得多。磁处理过程中水分子间的氢键不容易被破坏。但是水经磁化处理后部分物理性质会发生变化如:磁化水的 pH 值增大、难溶盐的溶解度增加、磁化水的密度变小等^[37]。

可能原因^[38]:水分子是极性分子,在水中存在着大量通过氢键结合的水分子团,因为氢键是一种分子间的力,不象化学键那样牢固。在液态水中,它处于一种不停地断开、结合的动态平衡中:



在一定条件下这种动态平衡所需要的能量是由水分子的热运动所提供。

首先,磁场对水分子提供的能量虽然很小,但总还是给水分子的热运动提供了能量,有利于平衡向右移动,导致部分氢键被破坏。由于水分子受到磁场的作用,水分子之间的氢键可能断裂这必然使较大的缔合水分子集团变成小的缔合水分子集团,甚至单个的水分子。

其次,水分子是极性分子,存在正负电荷,在磁场作用下正负电荷将受洛仑兹力的作用趋于定向排列,阴阳离子按磁场方向被推向相反的方向,这样就使偶极的取向发生变化,氢键将发生畸变。

此外存在于水中的水合离子也受到磁场的影响,当水合离子受洛仑兹力作用时,将作螺旋式的圆周运动,且正、负离子旋转方向相反。

1.4.1 磁化对水的影响

1.4.1.1 磁化水中的溶解氧:

蒸馏水经静磁场磁化处理和流经一定强度的磁场处理后,水中的溶解氧都有明显增加。这可能因为氧是顺磁性分子,在磁场作用下能聚集于磁场中所致。

1.4.1.2 磁化水的滞后效应:

将磁化后的水从磁场中取出静置,每隔一段时间后检测其电导率,取消磁场后水的电导率还会继续变化,似乎有滞后效应。如前所述液态水处于一种不停地断开、结合的动态平衡中,因取消磁场时等于搅动了溶液,破坏了原有动态平衡,要建立新的动态平衡需要一定时间。

1.4.1.3 磁化对水挥发性的影响:

氢键被破坏后,水分子团变小,使水分子容易从液体中逸出,特别是在温度较高时,由于分子运动加剧,在磁场作用下更易逸出。较大水分子团变成较小的水分子团,甚至是单个的水分子,则水分子之间相互作用力减小,活动加剧,因此磁化引起水的物理性质发生了许多改变,如粘度减小、密度降低、挥发性加快和表面张力变小等,从而也促进蒸馏水的蒸发^[38]。

关于磁场对水的影响还有一些现象得不到解释,如电导率变化方向与磁场强度的关系。这可能是磁场影响电导率的因素很多,如施加磁场的方向、搅动或振动、温度和杂质等有关,目前对这些影响因素还未完全弄清,有待深入研究^[37]。

1.4.2 磁场对微生物的影响

文献中^[39]报道了一些研究者在实验中观测到饮水通过磁场处理后,水的渗透压提高,水中离子形态发生了明显改变,并认为磁化水的这些变化与其生物效应有关。由于磁场改变了水的表面张力系数、离子溶解度、渗透压等理化性质,因而对生物体的细胞和组织产生影响。一般而言,表面张力系数增大,有利于组织对水的吸收、利用;渗透压提高,有利于物质通过生物半透膜,促进对物质的吸收、代谢。磁化水能改变酶的活性,提高机体吸收酶解产物的能力。

实验表明^[40]磁化水配制 9K 培养基能促进细菌的生长,提高细菌的活性,对细菌浸矿有明显的促进作用,缩短细菌预氧化周期。

磁化水能促进细菌生长,其可能原因为:改变了水的结构,在与空气的界面上产生压力差,促进了氧气在水中的溶解^[10]。而氧化亚铁硫杆菌又是好氧菌,细菌的活性增大;提高了细菌生物膜的渗透性,改善了细菌对培养物质的吸收;影响了水中离子水合作用,提高了矿石成分的溶解性。同时磁化又促进了细菌对营养物质的吸收,细菌的生长加快,需要消耗矿石中更多的低价硫和铁以维持新陈代谢的进行,氧化产生的 Fe^{3+} 又是一种良好的矿物浸出剂,矿石溶解加快。此法是无需引入化学试剂的生物强化浸矿过程。

磁化水的生物效应机理问题至今尚未很好解决,因而磁化水的研究和应用中难免存在一定的盲目性,一些研究只停留于宏观。由于生物体具有自建立、自调

节和反馈放大等特殊功能,因而磁化水的生物效应是非常复杂的,涉及的因素很多,对磁化水生物效应不能单纯地考虑作用能量大小的问题,有关磁化水对生物体液中带电粒子的传递、生物膜的渗透、酶和蛋白质的活性等影响的实验和机理研究,目前做得很少。因此,今后工作除继续研究磁化水的各种宏观效应外,还应更重视其微观机制的研究^[39]。

1.5 发展方向

将细菌应用于溶浸采矿方面已得到了相当的发展,但仍存在着一些工艺与技术问题需要解决,浸出机理的研究尚需进一步深入。

1.5.1 工艺技术方面

目前的研究工作主要是对生物浸出反应器的研究,而对后续工艺的研究则较少。另外细菌是需要氧气的,并且细胞的生长需要从空气中获得少量的二氧化碳,所以目前堆浸方面的革新包括堆内鼓风,以改善矿石动力学过程和提高总回收率。研究者^[41]发现常温菌难以获得较高的浸出速率的另一个原因是矿物表面发生钝化现象产生以黄钾铁矾为主的沉淀物致使最终铜浸出率不高,因此对于减少此沉淀的产生很重要^[42]。

1.5.2 高性能菌种的选育

为提高浸矿速度及回收率,除了对细菌进行驯化使之适应浸矿环境外,用快速、高效、新的育种方法对现有菌株进行改良,以期获得具有繁殖速率快,氧化能力强,适应性强的菌种是十分必要的。

1.5.2.1 培养能在相对高温下存活的细菌

众所周知,随着温度的升高,硫化矿物的浸出率增加,目前应用最多的氧化亚铁硫杆菌属嗜中温菌,超过 45℃就不能生长;且生长周期长,因而大大限制了它在工业上的应用。

而嗜热的高温菌要比中等嗜热和中温的细菌对黄铜矿的分解速度快很多。研究表明^[43]:由于嗜酸嗜热菌具有对硫化矿物进行氧化,对铁离子及硫的氧化和高温下对硫化矿物的浸出较快的优点,因而在微生物浸出的工业化单元操作中具有很大的潜力。国外曾有人用人工培育的耐 60~80℃高温的细菌进行微生物冶金,但这种细菌的细胞壁很脆弱,经不起矿浆系统的搅拌摩擦,在对矿石进行氧化时,一般矿浆浓度不能超过 5%^[44]。据报道^[45],在云南热温泉水中采集到了一种高温菌,在 65℃温度下浸出黄铜矿,其速率为氧化亚铁硫杆菌的 6 倍。

1.5.2.2 生物技术和基因工程的应用

目前,我国对于氧化亚铁硫杆菌的应用研究,大部分处于实验室和半工业试验水平。可以利用混合细菌的协同效应,将不同地点采集的或不同种类的细菌混合,考察其浸矿效果。虽然传统诱变技术由于其非定向突变因素使得育种工作周期长,困难大,但经诱变育种的菌株适应性及氧化能力发生了质的飞跃,表现出显著的应用效果。对于利用基因重组技术培养高效工程菌、固定化细胞技术、固定酶技术等微生物冶金中的应用,也有待于进一步的探讨和研究。

总之,应用传统微生物技术、现代分子生物学技术、遗传工程技术,选育符合矿冶工艺需求的各类菌种,是重要的研究方向。

1.5.3 多种强化手段的综合运用

由于各种强化手段都有其局限性,比如银离子较贵且过量会对细菌产生毒性,所以可以考虑将多种强化手段的综合运用,并且随着科学技术的进步如微波技术的应用,黄铜矿的冶金研究会有更大的进展。

1.5.4 细菌浸出过程的动力学模型的建立和完善

已经有学者 M.Wang^[46]等研究了银离子强化微生物浸出黄铜矿的动力学模型,Ding^[47]研究了微波辐射作用下硫化铜精矿三氯化铁浸出反应过程表明:在传统加热下,浸出反应开始时,总体反应速率由扩散控制,当反应温度较高时,总体浸出反应由界面化学反应控制。微波辐照加热下,浸出反应速率之所以显著提高,是由于反应机理发生了变化,总体浸出反应速率仅由扩散控制。

国外学者^[48]研究了微波加热对黄铜矿浸出动力学的影响,表明微波辅助浸取可以提高金属浸出率,缩短反应时间。来自微波和标准化浸出试验的数据计算得出微波浸出的活化能(76.5千焦/摩尔)数据略低于标准浸出的数据(79.5千焦/摩尔),符合核收缩模型,表面反应控制反应速率。

探索研究各种强化手段的动力学模型,可选择最佳浸出条件,优化浸出过程。有力的推动强化浸出的发展。

1.6 本课题来源

导师承担的高校博士学科点专项科研基金资助:项目编号(20050616009)

1.7 本论文的研究内容及成果的新意

从酸性矿坑水中提取出的氧化亚铁硫杆菌,在最佳的浸矿条件下研究其在经

过微波和磁场强化后的水配制培养基中浸出低品位黄铜矿的效果。

1. 对正交实验结果采用极差分析和方差分析, 结合单因素实验确定最佳浸矿条件。

2. 两种物理方法强化方法叠加即利用微波和磁场处理水配制培养基, 强化氧化亚铁硫杆菌浸出低品位黄铜矿中的铜。

3. 对微波和磁场单独处理和叠加处理强化氧化亚铁硫杆菌浸出低品位黄铜矿的机理进行探讨。

第2章 实验部分

2.1 实验材料

2.1.1 仪器

表 2-1 实验仪器型号及生产厂家

仪器名称	型号	生产厂家
原子吸收分光光度计	(GGX-6A)	北京地质仪器厂
原子吸收分光光度计	(GGX-9)	北京海光仪器厂
水浴恒温振荡器	(SHZ-82)	江苏金坛市金城国胜实验仪器厂
回旋式水浴恒温振荡器	(SHZ-82)	江苏金坛市正基仪器有限公司
微波炉	(WP700T)	佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司
可控温式空气摇床	(QYC-211)	上海福玛实验设备有限公司
电光分析天平	(精度 0.0001)	Swiss Mettler H54AR

2.1.2 药品试剂

表 2-2 实验中所用药品试剂如下:

类别	纯度	产地
Na ₂ SO ₃	分析纯	成都市医药公司化学试剂批发部
FeSO ₄ ·7H ₂ O	化学纯	重庆北碚化学试剂厂
HNO ₃	分析纯	四川德阳化学试剂厂
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	化学纯	成都化学试剂厂
K ₂ CrO ₇	化学纯	成都化学试剂厂
AgNO ₃	分析纯	成都化学试剂厂
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	分析纯	成都化学试剂厂
(NH ₄) ₂ SO ₄	分析纯	成都化学试剂厂
H ₂ SO ₄	化学纯	成都化学试剂厂
KCl	分析纯	成都化学试剂厂
MgSO ₄ ·7H ₂ O	分析纯	成都化学试剂厂
H ₃ PO ₄	化学纯	四川德阳化学试剂厂
HCl	化学纯	成都化学试剂厂
琼脂	优级纯	进口
二苯胺磺酸钠	化学纯	江苏昆山化工试剂厂

试剂及配制方法

二苯胺磺酸钠 (5g/L): 称取 0.5 克二苯胺磺酸钠于 50mL 烧杯中, 加适量的蒸馏水待溶解后定容到 100mL 容量瓶中, 摇匀。

酒石酸(10%):称取 25 克酒石酸于 250mL 烧杯中,用水溶解后定容到 250mL 容量瓶中,摇匀。

重铬酸钾 (4mg/mL 铁):准确称取 3.5119 克已烘好的重铬酸钾于 50mL 烧杯中,加蒸馏水待溶解后定容到 1000mL 容量瓶中摇匀。

硫磷混酸:在 1000mL 烧杯中加入 700mL 蒸馏水,然后加入 150mL 浓硫酸,待冷却后加入 150mL 浓磷酸混匀。

浓硫酸,浓盐酸,浓硝酸(优级纯),浓磷酸。

2.1.3 实验所用培养基

微生物的生长需要许多种微量元素。例如,钾离子影响细胞的原生质胶态和渗透性;钙离子在控制细胞渗透性的同时,还起着调节细胞内酸碱度的作用;镁和铁是细胞色素和氧化酶辅基的组成部分。因此,在微生物体内必须含有适量的金属离子^[49]。然而任何事情都有一定的限度。就微生物而言,如果金属或金属离子的含量过高,将会对它们产生不同程度的毒害作用。从而影响微生物浸矿过程的正常进行。

表 2-3 9K 培养基的组成:

组成	9K (g/L)	高浓度的储备液
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0g	60g/L
KCl	0.1g	10g/L
K ₂ HPO ₄	0.5g	50g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g	10g/L
Ca(NO ₃) ₂	0.01g	2g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	44.78g	

9K 培养基(液体):按先后顺序依次吸取上述高浓度的储备液 50mL、10mL、10mL、50mL、5mL 加入二次蒸馏水至 700mL, pH 用 1:H₂SO₄ 调为 2.0, 在 121 °C 灭菌 15 分钟;取 FeSO₄·7H₂O 44.78g 溶于 300mL 二次蒸馏水,用同样的方法将 pH 调为 2.0, 过滤除菌,然后将两者混合。

2.2 实验所用菌的培养方法

(1)富集培养:在 250mL 锥形瓶中加入一定量 9K 培养基,将土样、水样以一定的比例接入,用 1:1 的硫酸调节 pH 为 2.0。放入恒温摇床(30°C,120r/min)培养。将菌液按一定比例转移培养多次,尽量除去异养细菌等杂菌。

(2)选菌:由于样品采自于不同的地点,不能确定哪个地方采的菌氧化亚铁的速度快,所以就要测试它们氧化的速率,测定的方法是用重铬酸钾滴定法。

(3)纯化：氧化亚铁硫杆菌是专性自养型细菌，较难在固体培养基上生长主要问题是没能找到一种理想的凝固剂。常规琼脂等有机凝固剂对自养的氧化亚铁硫杆菌有抑制作用，因而很多菌株不能被筛选。Paolo Visca 的研究表明^[50]，纯化的琼脂糖效果较好，不纯的琼脂中含有的杂质抑制细菌的生长。目前一致认为，不纯琼脂里含有足够的磷酸二氢钾，额外加入的磷酸盐抑制了细菌的生长。9K 固体培养基中，磷酸盐和硫酸亚铁的加入量分别不能超过以定值 0.05g/L、22g/L^[50]。也有些研究者^[51]通过往培养基中加入表面活性剂来改变氧化亚铁硫杆菌的培养特性，取得了一定的效果。

由于氧化亚铁硫杆菌很难在琼脂固体培养基上生长，且形成的菌落又极小，误筛的可能性较大^[52]；同时还由于在酸性环境其它杂菌很难生存，所以可考虑先不进行氧化亚铁硫杆菌的菌落分离纯化，而是直接采用在 9K 培养基中反复接种培养的方式进行分离纯化。

(4)保存：短期保藏菌种的方法是：将 T.f 接种到含有 Fe^{2+} 或硫化矿的 9K 培养基中，充分生长后，停止培养，并向其中加入少许 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，移入 4℃ 的冰箱中保存，每月尚需转种一次。

2.3 实验方法

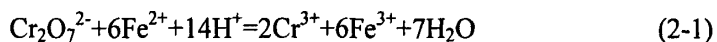
2.3.1 分析方法

细菌的活性采用重铬酸钾滴定二价铁的氧化速率确定；细菌计数采用血球计数法和比浊法；铜离子的浓度采用原子吸收测定。

亚铁滴定测定法

细菌活性的测定方法通常有亚铁离子氧化速率法、细菌耗氧法速率法、 CO_2 的固定速率法以及目的矿物的氧化速率法等。氧化 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 是嗜酸氧化亚铁硫杆菌的重要特征。 Fe^{2+} 氧化速度快，表明细菌代谢旺盛，活性高。本实验采用细菌氧化亚铁的能力来表示细菌活性的强弱。菌液中 Fe^{2+} 含量采用重铬酸钾滴定法进行测定^[53]。

重铬酸钾是常用的一种强氧化剂。在酸性溶液中可氧化许多还原性物质：如 Fe^{2+} ，反应式：



这就是 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 测定亚铁化合物中 Fe^{2+} 含量时发生的反应。反应时加入了硫磷混酸。其中加入硫酸是为了调节溶液的酸度。加入磷酸的目的有两个：一是由于 H_3PO_4 ；与 Fe^{3+} 生成配合物 $\text{Fe}(\text{HPO}_4)^{2-}$ ，降低 $\rho\theta(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})$ ，增大了突跃范围，提高了反应完全程度；二是由于生成 $\text{Fe}(\text{HPO}_4)^{2-}$ 是无色的，消除了 Fe^{3+} 在溶液中

的黄色,有利于观察终点时颜色变化。反应后生成的 Cr^{3+} 本身虽显绿色,但不能用来指示终点,须用二苯胺磺酸钠作指示剂。滴定终点时,溶液呈紫蓝色。

具体步骤为:样品用量 2mL,移入 20mL 的硫磷混酸(3mL 浓硫酸+3mL 浓磷酸+14mL 蒸馏水)中,混合均匀。加 2~3 滴 0.2%二苯胺磺酸钠指示剂,摇匀,然后用 1.755g/L 的重铬酸钾溶液进行滴定,滴定 1mL 重铬酸钾溶液即相当于样品中含有亚铁 0.002g。当变为紫色时即为终点,记录每次滴定所用的重铬酸钾溶液体积。计算方法如下:

$$\text{菌液中 Fe}^{2+}\text{含量为: } [\text{Fe}^{2+}] = \frac{V \times 0.0002}{2}$$

式中: $[\text{Fe}^{2+}]$ — Fe^{2+} 浓度, g/mL;

V—滴定所用的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液体积, mL

$$\text{因此在嗜酸氧化亚铁硫杆菌菌液中, Fe}^{2+}\text{氧化率} = \frac{[\text{Fe}^{2+}]^0 - [\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{2+}]^0} \times 100\%$$

菌株的革兰氏染色

革兰氏染色法是细菌学中很重要的一种鉴别染色法。它可将细菌区别为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌两大类。

挑取固体培养基长势良好的单个菌落少许分别做涂片,经风干、火焰固定后;滴加结晶紫初染约 1~2 分钟,水洗;再加碘液冲去残水,并用碘液覆盖约 1 分钟,水洗;用滤纸吸去玻片上的残水,将玻片倾斜,在白色背景下,用滴管流加 95% 酒精脱色,直至流出的乙醇无紫色时,立即水洗;最后用番红复染约 2 分钟,水洗。干燥后观察,深紫色为革兰氏染色阳性细菌,红色为革兰氏染色阴性细菌。

细菌计数方法

在测定细菌浓度时,细菌的计数方法较多,有显微镜直接测定法、平板菌落计数法、光电比浊法、生物量测定法及 DNA 含量测定法等。较常用的是血球板计数法和浊度法。

(1)血球计数法:

该法是根据测定对象选用特制的载玻片(即计数板),其上刻有已知面积的大小方格(即计数格),当盖上盖玻片后,盖玻片与计数格间的高度为已知,因此计数格的容积为一定。根据在显微镜下测得的该计数格中的微生物个数,可换算出单位体积待测液中所含微生物数。

该方法操作和步骤如下^[54-59]:

备片:取清洁干燥的计数板与盖玻片(必要时,可微微烘干,以除去其上附着的水分),盖上盖玻片。注意盖玻片要盖在计数室两侧。

镜检计数室:在加样前,先对计数板的计数室进行镜检。若有污物,则需清洗后才能进行计数。

加样：用无菌吸管吸取充分摇匀并打散开的待测菌液，小心滴一小滴于盖玻片边缘，菌液自行渗入并布满计数室，注意避免产生气泡。

显微计数：加样后静置 3-5 分钟，镜检。根据受检微生物个体的大小选用适宜的物镜头，先用低倍物镜找好计数室位置，然后换用高倍物镜进行计数。计数前如发现菌液过浓，可做一定倍数稀释后再制片镜检计数，一般以每个小方格内有 5-10 个菌体为宜。一个计数室选 5 个中格(可选 4 个角和中央的中格)中的菌体进行计数。位于格线上的菌体一般只数上方和右边线上的。计数时注意转动细调节器，使液层上下菌数都可测到。每份菌液样品至少计数两次，取其均值。

清洗血球计数板：使用完毕后，将血球计数板在水龙头上用水柱冲洗，切勿用硬物洗刷，洗完后自行晾干或用吹风机吹干。镜检，观察每小格内是否有残留菌体或其他沉淀物。若不干净，则必须重复洗涤至干净为止。

结果计算：一个计数室就是一个大方格，分为 25 个中方格，而每个中方格又分成 16 个小方格，所以每个计数室中的小方格数都是 $16 \times 25 = 400$ 个。每一个大方格边长为 1mm，则每一个计数室的面积为 1mm^2 ，盖上盖玻片后，载玻片与盖玻片之间的高度为 0.1mm，所以计数室的容积为 0.1mm^3 。在计数时，通常数 5 个中方格的总菌数，然后求得每个中方格的平均值，再乘上 25，就得出一个计数室中的总菌数，然后再换算成 1mL 菌液中的总菌数。

设五个中方格中总菌数为 A，菌液稀释倍数为 B，那么，一个计数室中的总菌数(即 0.1mm^3 中的总菌数)为 $\frac{A}{5} \times 25 \times B$ ：因 $1\text{mL} = 1\text{cm}^3 = 1000\text{mm}^3$ ，故 1mL 菌液中的总菌数 = $\frac{A}{5} \times 25 \times B \times 10 \times 1000 = 50000A \cdot B$ (个)

本实验在菌种性质的研究中，细菌计数采用显微镜直接计数法，适合于测液体培养基中的细胞总数，其缺点是一些小细胞在显微镜下很难看到，而且操作繁琐很难获得精确计算且比较费时。

(2)比浊法

用 pH 值为 2 的硫酸为稀释参比液，菌液适当稀释的条件下用比色皿吸光度值。进而反映其生长情况和菌液活性。该法测定氧化亚铁杆菌生长是快速、有效、方便可行的方法。

2.3.2 浸矿方法

称取一定量矿粉，加入液体培养基，用硫酸调节 pH 为 2，接种一定数量的细菌，称重。在 30°C ，振荡速度为 120r/min 下摇瓶浸出。用 1:1 硫酸调节 pH 值恒为 2，定期取样测定溶液中的铜的离子浓度。实验过程中取样减少的量用培养基盐溶液补充，蒸发的水份用蒸馏水补充。

第 3 章 细菌的采集与培养

3.1 样品来源

本实验所用的浸矿细菌采自于四川省成都市彭州某一铜矿酸性矿坑水 (pH3~4) 及废弃矿堆地表土壤(pH5~6)24h 内富集培养。

3.2 细菌的富集培养

将不同采样点的水及土样分别以一定比例, 加入到装有 9K 液体培养基的 250mL 锥形瓶中, 进行富集培养, 30℃摇床培养(120r/min)当观察到有菌生长时, 培养基颜色发生明显变化, 即浅绿色—淡黄色—黄色—红棕色, 并出现沉淀, 这个过程的时间大约十天。在反复多次的接种培养过程中, 其颜色由浅绿色变成红棕色的时间越来越短。

表 3-1 细菌逐代转移培养时间的变化

代数	1	2	3	4	5	6	7
完全氧化所需时间	9天	9天	9天	9天	7天	7天	4天

3.3 选择菌液

由于菌液采自于不同的地点, 不能确定哪个地方采集的 T.f 菌氧化二价铁的速度快, 所以就要测试菌的氧化速率, 测定的方法是用重铬酸钾滴定法。具体操作为分别取采集自不同地方活化后的菌 10mL 于 250mL 锥形瓶中, 加入 90mL9K 培养基, 调节 pH 为 2.0 塞上塞子用牛皮纸包扎好后放到恒温摇床(30℃,120r/min)里, 隔段时间从不同的锥形瓶中吸取 5mL 的菌液于 250mL 锥形瓶中, 加入 15mL 的硫磷混酸, 2 滴二苯胺磺酸钠指示剂, 用重铬酸钾滴定, 记录测得的数值。重铬酸钾滴定的体积越少证明菌液中剩下的二价铁就越少, 则菌氧化亚铁的速度越快。不同的 T.f 菌氧化二价铁的部分数据如下:

表 3-2 不同采样点的 T.f 菌氧化亚铁时重铬酸钾滴定的体积 (mL)

菌样 时间	1	2	3	4	5	6
2 天	7.04	9.31	9.32	5.63	7.51	8.85
3 天	5.41	6.33	8.95	3.91	5.97	7.86
4 天	0.61	3.00	5.91	0.05	3.35	4.02

鉴于上表所列出的重铬酸钾所消耗的体积,很明显 1 号和 4 号菌的氧化能力很强。

最后选取颜色变得最快、最深以及沉淀最少的 1 号和 4 号菌作为出发菌进行液体与固体培养的多次交替,以获得生长稳定的纯菌株,用于开展为后续的实验研究。实验结果:革兰氏染色的结果为红色,为革兰氏染色阴性细菌。显微镜下观察形态为棒状。

3.4 细菌生长过程的研究

装入 90mL 9K 培养基,吸取 10mL 菌液接种:在 30℃ 恒温水浴中振荡培养;用 1:1 的硫酸调节 pH 为 2.0。

细菌的数量用浊度法:

采用 UV-2000 型紫外可见分光光度计在 420nm 波长下,以 pH 值为 2 的硫酸作为参比液。不同时间下取菌液 1mL 用 pH 值为 2 的硫酸稀释 10 倍,保证吸光度在适宜的范围内;用 1cm 比色皿测定吸光度值,然后绘制生长曲线。同时用重铬酸钾法测定溶液中二价铁的含量。

菌液吸光度 (OD)

表 3-3 不同的时间二价铁的含量 (g/L) 和菌液吸光度的数值

时间 (h)	5	20	25	35	45
二价铁的含量 (g/L)	7.86	7.48	7.44	7.23	6.81
菌液吸光度	0.012	0.013	0.014	0.022	0.024

50	60	70	75	80	85	95	100
6.41	6.10	4.52	4.20	3.42	2.52	0.21	0
0.028	0.035	0.063	0.069	0.090	0.141	0.217	0.211

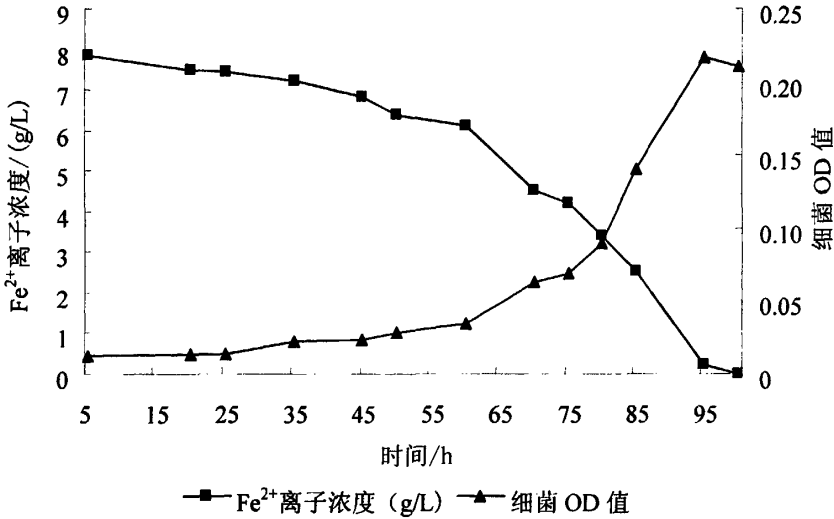


图 3-1 溶液中 Fe²⁺离子浓度和细菌浊度随时间的变化图

由于在 9K 培养基中细菌的接种量较小为 10%，所以细菌的生长非常缓慢，在前 25h，由于细菌被转移到新的环境后有一个适应过程，细菌数量基本没有变化，生长繁殖处于诱导期。此后细菌逐渐适应环境，开始经过诱导期，进入缓慢生长期。在 45h 后，细菌的生长由缓慢期进入对数生长期，95h 后细菌数量的增长基本停止，进入稳定期。

在细菌生长的整个过程中，随时间的变化，Fe²⁺离子浓度与细菌数量的变化基本呈现一种涨落的对应关系。在细菌生长的前 25h 为诱导期，Fe²⁺离子浓度也基本没有变化，25~45h 之间细菌的缓慢生长期内 Fe²⁺离子浓度变化很小；而从 45~95h 之间对应于细菌的对数生长期，Fe²⁺离子浓度由 6.81g/L 很快降低到 0.20g/L，95 小时之后 Fe²⁺离子已经基本被消耗，对应于细菌的稳定期。

通过 Fe²⁺离子浓度的变化与细菌量的对比，验证了细菌作为化能自养细菌以氧化 Fe²⁺为能量来源为生命的生长和繁殖提供需要的能量。

在细菌培养过程中，对溶液的 pH 值也进行了测定。结果发现溶液的 pH 值经历了一个先变大后变小的过程。在前 20h 细菌的诱导期 pH 值没有变化，随着细菌的生长，pH 值出现了增大的过程：由 2 增加到 2.5 左右。这是因为 Fe²⁺离子不断被氧化，消耗了溶液中的 H⁺：



增加到 2.5 左右后 pH 值开始下降。实验中发现，在细菌培养过程的后期，锥形瓶内壁和瓶底逐渐生成一层黄色的沉淀物。有学者^[60]研究成果证明这种沉淀物质的主要成分是黄钾铁矾(KFe₃(SO₄)₂(OH)₆)反应式为：



因此，反应(2)中黄钾铁矾的生成消耗了反应(1)的产物 Fe^{3+} ，并提供了反应物 H^+ ，是溶液 pH 值下降的原因。因此反应(2)和反应(1)是一个相互促进的过程。同时耗酸与产酸的过程也保证了溶液的 pH 值维持在 2~2.5 之间，有利于细菌的生长。

最后将试样所用菌放入 4℃ 冰箱保存。使用时对其活化（250mL 锥形瓶中加入菌液 10mL，9K 培养基 90mL，放入恒温摇床（30℃,120）在此期间保持酸度不变）。使菌种恢复活性。最后细菌的将培养基中的 Fe^{2+} 完全氧化的天数为 3 天左右。

本章小结：

从四川省成都市彭州某一废弃铜矿的酸性矿坑水中分离、纯化了得到了氧化亚铁硫杆菌菌株。用浊度法和 Fe^{2+} 的氧化表征了它的主要生长特性。对其生长规律进行了简单的探索。发现氧化亚铁硫杆菌在 9K 培养基中的生长与 Fe^{2+} 的氧化密切相关，在生长繁殖过程中，溶液中 Fe^{2+} 的浓度与细菌数量的变化呈现反相关，间接证明了 Fe^{2+} 是细菌的能量来源；同时随着 Fe^{3+} 浓度不断升高并由于有部分参与了黄钾铁矾的形成而减少，也会促进 Fe^{2+} 的氧化过程，有利于细菌的生长。而在这个过程中，溶液的 pH 值也经历了一个先变大后变小的过程，维持在一定的范围之内，保持了细菌生长环境的稳定。其中采用浊度法反映氧化亚铁杆菌的生长情况，具有快速、有效、方便的特点。

第 4 章 浸矿条件试验

4.1 实验所用矿样

矿样：实验所用铜矿石采自四川省拉拉铜矿，矿样中主要铜矿物为黄铜矿，铜的品位为 0.39%，磨成 200 目。

矿石有关成分含量：

表 4-1 矿石有关成分含量：

成分	含量 (%)	成分	含量 (%)
SiO ₂	41.44	Fe	17.12
TiO ₂	0.92	CaO	4.32
MgO	1.31	Al ₂ O ₃	9.59
Cu	0.32	S	0.85

表 4-2 铜的化学物相分析：

成分	含量 (质量百分含量%)	在矿样中所占含量 (%)
原生硫化铜	2.55×10^{-1}	79.63
次生硫化铜	5.88×10^{-2}	18.38
自由氧化铜	5.20×10^{-3}	1.63
结合氧化铜	1.20×10^{-3}	0.36
矿样总铜含量	3.19×10^{-1}	100.00

4.2 黄铜矿中总铜的含量

用电子天平称取矿样 (200 目) 0.1-0.5 克于 50mL 烧杯中，用少量水将矿样表面润湿，加入 15mL 浓盐酸，盖上表面皿。在电热板上加热熔解，待硫化氢气体逸出完后 (溶液此时由褐色变成橙黄色)，加入 5mL 浓硝酸，继续加热，待矿样完全溶解后，冲洗表面皿，蒸发至干，取下冷却，加入 2mL 浓盐酸，用水冲洗杯壁，加热至可溶性的盐类溶解，冷却后过滤，将滤液转移到 100mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀^[61]。本次试验中称取的矿样质量为 0.3626 克。吸取以上配制好的总铜溶液 5mL 于 100mL 容量瓶中，加入 10mL 10% 的酒石酸，然后用 3% 的硝酸定容摇匀^[62]。用原子吸收分光光度法测定试液中铜的含量。

4.3 细菌的驯化

为使细菌具有最大活性，必须通过驯化使细菌适应与其工作条件相似的基质。这种驯化往往采用逐步提高培养基或浸出悬浮液中金属离子浓度的办法使菌株对高浓度金属离子适应^[45]。其方法是：首先在三角瓶中加入一定体积的培养基。配入一定量的某种金属离子（保持低浓度），然后接种入需要驯化的细菌进行恒温培养。待细菌适应并能正常生长后再将它接种入新的一份培养基中，其金属离子浓度比上一次高，继续培养，依次进行多次，每一次的培养基中金属离子浓度都比前一次高。实验中用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 配置成 Cu^{2+} 浓度为 1g/L 的标准，进行驯化：

表 4-3 细菌的驯化实验：

氧化完全 时间(d) 转移次数	0 (mg/l)	10 (mg/l)	20 (mg/l)	30 (mg/l)	40 (mg/l)	50 (mg/l)	60 (mg/l)
0	4	4	6				
1				4			
2					5		
3						4	
4							2

4.4 最佳浸矿条件确定（正交设计）

浸矿实验：在 250mL 锥形瓶中称取 10 克的铜矿试样，加入 10mL 浓度约为 $(6 \times 10^8 / \text{mL})$ 的细菌，加入 90mL 培养基，调节 pH 值为 2.0，放在水浴恒温振荡器里，调节温度为 30°C ，隔几天将振荡器中的矿样取出静置，待澄清后，取样用火焰原子吸收分光光度法测定矿液中铜的含量，从而得出铜的浸出率。

摇瓶试验所用矿样通常磨到很细^[63]，一般为 $-40\mu\text{m}$ (-300 目)。从反应动力学角度来看，矿石粒度愈细的反应速度愈快，矿石粒度减小可增加矿粒的比表面积，增加微生物与欲溶矿物的接触机会。我们知道溶解度与矿粒的表面积成正比。但

当粒度降低到某一临界值，与金属矿物共生的脉石矿物的表面积太大，其副作用显著增加。同时矿样磨的过细还增加了能耗费用。综合考虑实验所用矿石为 200 目。

同时 pH 的选择上综合考虑为 2.0 较为合适^[64]，这样既有利于细菌的生长繁殖，又可以减少铁的沉淀。

在细菌浸矿的过程中，其浸出率的大小与诸多因素有着密切的关系且有相互影响的趋势，在实验中经过反复的衡量与比较，最终确定了矿浆浓度、培养基、接种量这三项影响因素进行正交实验。

表 4-4 正交表头设计:

因素 水平	矿浆浓度/(%)	培养基	接种量/(%)
	A	B	C
1	5%	0K	5%
2	10%	2/9K	10%
3	15%	9K	15%

注：根据 1L 培养基中二价铁的质量（克）数分别为：0K、2/9K、9K。

极差分析：利用数理统计方法计算出正交表中每列的极差 R 值，来判断影响因素的主次关系，寻找较优的水平组合。

对浸出 8 天的矿样进行取样，测定。结果见表 4-5，根据结果，采用极差分析法对三个因素与浸出率的影响进行极差分析，其结果见表 4-6。

表 4-5 正交实验结果与数据分析:

序号	A	B	C	浸出率/%
1	1	1	1	9.53
2	1	2	3	9.14
3	1	3	2	9.05
4	2	1	3	8.42
5	2	2	2	8.84
6	2	3	1	8.60
7	3	1	2	7.80
8	3	2	1	6.81
9	3	3	3	5.65
K ₁	27.72	25.75	24.94	
K ₂	25.86	24.79	23.21	73.84
K ₃	20.26	23.30	25.69	

k_1	9.24	8.583	8.313	$Y=T/9=8.204$
k_2	8.62	8.263	7.737	
k_3	6.753	7.767	8.563	
R_i	$R_1=2.487$	$R_2=0.817$	$R_3=0.827$	
最佳条件	1	1	3	

讨论:

极差 R 的大小是衡量实验中相应因素作用的大小。极差大的因素意味着它对细菌浸矿的影响较大, 通常是重要因素, 而极差小的因素往往是不重要因素。由正交分析表中极差的大小可以看出, 各因素对浸出率的影响程度如下:

$A \gg B \approx C$ 即: 矿浆浓度 $>$ 培养基 \approx 接种量

极差分析通过少量的计算综合比较便可得出最优条件, 但是极差分析不能估计试验过程以及试验结果测定中必然存在的误差大小, 也就是说, 不能区分某因素各水平所对应的试验结果间的差异究竟真正是由因素水平不同所引起的, 还是由试验误差所引起的, 因此不能知道分析的精度, 为了弥补极差分析方法的这个缺点, 采用方差分析。方差分析正是将因素水平的变化所引起的试验结果间的差异与误差的波动所引起的试验结果间的差异区分开来的一种数学方法。

表 4-6 方差分析表:

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F 值	$F_{0.01}$	$F_{0.05}$	显著性
A	10.05	2	5.026	22.81	8.65	4.46	***
B	1.016	2	0.508	2.306	8.65	4.46	
C	1.078	2	0.539	2.447	8.65	4.46	
误差	0.441	2	0.220				
总合	12.59	8					

通常, 若 $F > F_{0.01}(f_{因}, f_{E})$, 就称该因素的影响是高度显著的, 用两个*号表示。若 $F < F_{0.01}(f_{因}, f_{E})$, 但 $F > F_{0.05}(f_{因}, f_{E})$, 则称该因素的影响是显著的, 用一个*号^[65]表示。若 $F < F_{0.05}(f_{因}, f_{E})$, 则称该因素的影响是不显著的, 不用*号。

矿浆浓度过低, 单位体积的矿样含量太低; 而当矿浆浓度较大时, 矿样易于沉积且降低了空气中的 O_2 和 CO_2 在矿浆中的溶解率, 在细菌搅拌浸出中, 矿粒之间的摩擦增多, 使矿粒上的细菌易于脱落, 并且增大了细菌细胞的磨擦, 使活性细菌减少, 同时破碎细胞的有机物将抑制自养菌的生长^[66]。因此选定矿浆浓度为 5% 为合适的加入量。

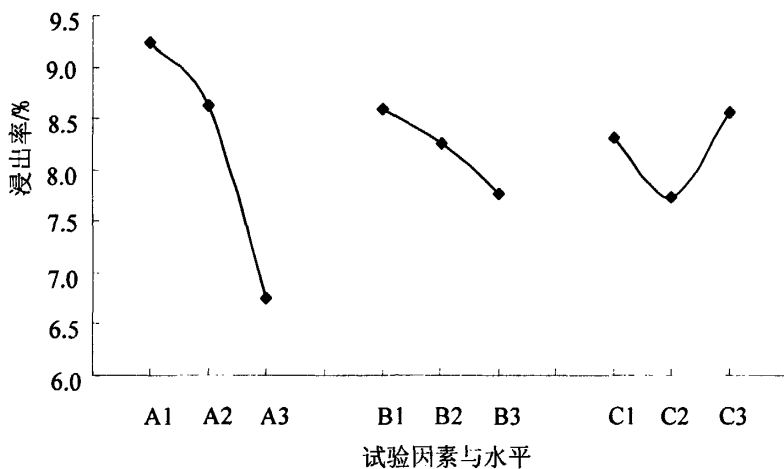


图 4-1 各因素与浸出率的趋势图

4.5 单因素条件试验

4.5.1 培养基中有铁和无铁对铜浸出率的影响

按以上方法操作，一个采用不含铁的 9K 培养基，而另一个采用条件实验中的所用的 9K 培养基，其它条件相同。比较它们对铜浸出率的影响，其数据见表 4-7:

表 4-7 有铁和无铁培养基对铜浸出率 (%) 的影响

培养基 \ 浸矿时间(d)	4	8	12	16	20	24
	无铁培养基	9.60	11.48	13.98	14.15	15.92
9K	9.86	11.33	13.72	13.51	14.24	14.92

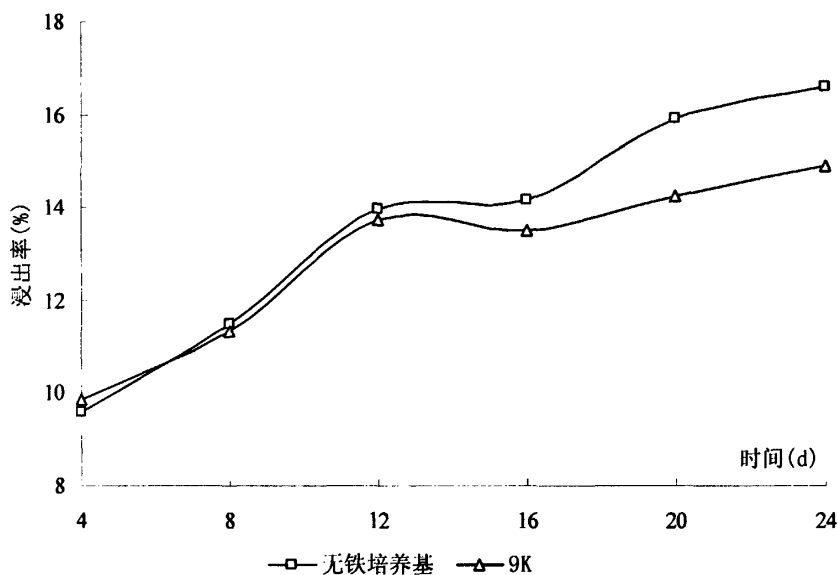


图 4-2 有铁和无铁培养基对铜浸出率的影响

从图 4-2 中可以看出, 含铁的培养基中的菌开始的浸出率比不含铁培养基中的菌浸出率要高, 但是到大约 7 天之后, 含铁培养基中的铜浸出率却不如不含铁的浸出率高, 因此本实验浸矿采用无铁培养基。含铁的培养基中开始的浸出率比不含铁培养基中的要高, 主要原因是初期细菌利用培养基中的二价铁生长很快, 伴随着浸矿过程产生的铁也可以促进细菌的生长。但是含量过高的铁会产生沉淀覆盖在矿的表面阻碍浸出, 后期含铁培养基中的铜浸出率却不如不含铁的浸出率高。浸出剂中需要铁离子, 但过量的铁离子对浸出反而不利。所以用无铁 9K 浸出黄铜矿效果更好。

4.5.2 不同的接种量下铜的浸出率

按细菌氧化矿石的方法, 其它条件相同时改变细菌的接种量, 其接种量分别为 5%、10%、15%, 细菌接种量对铜浸出率的影响见表 4-8 和图 4-3:

表 4-8 接种量不同对铜浸出率 (%) 的影响

浸矿时间(d) \ 接种量	4	8	12
5%	7.74	10.01	12.01
10%	9.13	11.30	13.91
15%	9.60	11.48	13.98

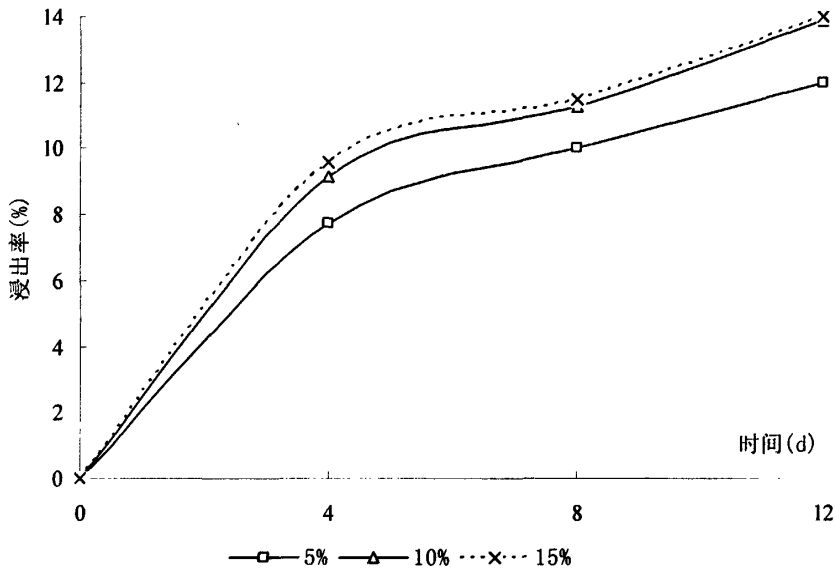


图 4-3 不同接种量下铜浸出率的比较图

从图 4-3 中可以看出接种量为 10% 时铜的浸出率效果好, 当接种量小于 10% 时, 单位体积矿浆的细菌个数较少, 铜的浸出率较低。当接种量大于 10% 时, 矿样中的铜并不随细菌接种量的增大而增大, 主要原因是矿粒表面吸附的细菌趋于饱和, 再增加细菌量, 铜的浸出率增加也不明显。

综上所述, 细菌浸矿的最佳试验条件如下表所示:

由此可得最优化条件, 如下表:

表 4-9 优化条件列表

A	B	C
矿浆浓度	培养基	接种量
5%	OK	10%

本章小结:

1. 正交实验与单因素条件实验结合确定了浸矿的最佳条件。

2. 通过观察图 4-2 中无铁培养基中的浸出速率曲线可以发现: 浸出过程经历很快→较快→缓慢→较快→缓慢→慢的过程。

在浸出的前 4 天, 溶液中 Cu^{2+} 的浓度增加很快; 浸出 4 天以后, Cu^{2+} 浓度增加较为缓慢。这是因为在浸矿初期, 9K 培养基中接种 T.f 菌并加以培养, 细菌数量增多, 活性增强, 加之矿物表面没有沉淀等覆盖相对较为清洁, 细菌、 Fe^{3+} 与

矿物表面直接接触，故 Cu^{2+} 浸出速率很快。随着氧化过程的进行， Cu^{2+} 增加导致 T.f 菌活性降低，加之浸出过程中一些物质(如铁盐、单质硫等)附着在矿物表面，阻碍细菌和 Fe^{3+} 与矿物的接触，使氧化作用不易发生。浸出过程中溶液 pH 值上升，而全铁含量先升后降，说明有铁的沉淀物生成。与此同时，氧化过程的中间产物单质硫，容易附着在矿物表面，对 Cu^{2+} 的浸出也产生一定的影响。在浸出的中后期，铜的浸出速率经历较慢→较快→慢的过程，这正是细菌对 Cu^{2+} 适应过程的表现。

3. 虽然在最佳浸矿条件下，我们发现细菌的浸出率仍然不高，所以采取措施提高黄铜矿的浸出率还是很必要的。

第 5 章 强化条件下浸矿

5.1 微波处理水对细菌生长的影响

分别用微波的中低火、中火和中高火烧水三分钟、五分钟和十分钟每次均处理水约 1000mL，测定温度，数据记录见表 5-1：

表 5-1 不同微波档处理 1000mL 水的温度 (°C)

处理水时间 微波档位	三分钟	五分钟	十分钟
中低火	34	42	60
中火	35	44	68
中高火	41	56	83

实验方法：微波后的水配置不同的培养基。

吸取菌液 10mL 于 250mL 锥形瓶中，分别加不同的培养基 90mL，调节 pH 值为 2.0，塞上塞子用牛皮纸包扎好后放入恒温摇床(30°C，120r/min)里，每隔一段时间取样。通过重铬酸钾滴定的数据可以算出菌氧化亚铁的速率。

通过测得的数据，我们发现大部分并不是所有的微波档位处理后的水配制的培养基的浸出效果都对比好，相对而言，中低档长时间与高档短时间效果较好。

先将几组较好的微波处理后的水配制培养基中的菌液氧化亚铁的速率数据作比较，数据见表 5-2：

表 5-2 不同的微波处理条件下 T.f 菌氧化二价铁的速率 (%)

细菌生长时间 (h) 微波档位与时间	20	36	40	48	62
中低 5	16.44	44.00	65.33	73.33	93.78
中低 10	25.33	56.44	73.33	80.44	95.56
中 3	24.44	55.56	69.78	79.56	92.00
中 5	22.67	53.78	76.00	83.11	97.33
中高 3	20.00	49.33	83.11	86.67	96.44
对比(普通培养基的细菌)	21.78	34.22	50.22	59.11	86.67

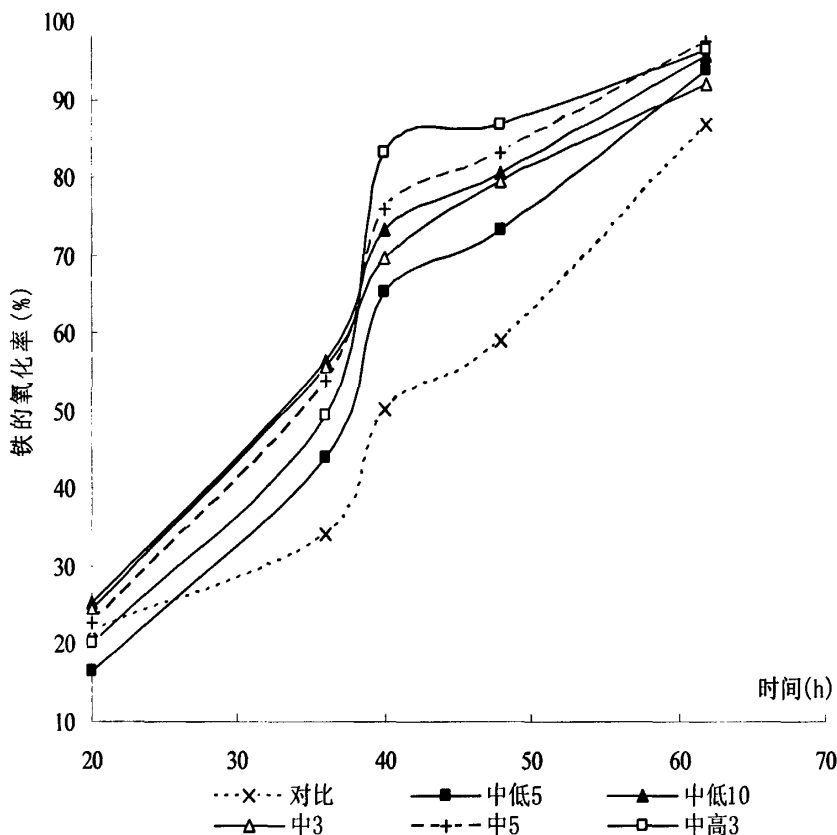


图 5-1 不同的微波处理条件下 T.f 菌氧化二价铁的效果比较图

当微波加热水的时间太短或者强度不大时,在这样的水配制的培养基中的菌就没有明显的强化效果,因此它们氧化二价铁的速率还不及没有强化处理的快。微波能在加热水时,随着温度的升高,水中溶解的氧气就变得越来越少,用这种含氧气很少的水配制的培养基不利于菌的生长,氧化二价铁的速率也慢。

从图 5-1 中可以看出微波处理水配制的培养基中细菌的活性由强到弱顺序是:中高火 3、中火 5、中低火 10、中火 3 和中低火 5 分钟。其中中低 5 的温度是 42℃,中 5 和中高 3 分别是 44、41℃。可能是较适宜温度,而中 3 和中低 10 的温度是 35、60℃,前者处理时间短且微波的强度不大,后者温度较高因蒸发可能有氧气的损失。

5.2 磁场处理水对细菌生长的影响

磁体安装在瓶体两侧, N、S 极相对。南北极磁场结构相同,水在其中很快恢复自然磁场变成离子活性水,磁化率增加。细胞内物质也是按自然磁场排列,变成离子活性水的磁化水能增加细胞磁性和磁序,促进细胞生长和繁殖。而且磁

化水的渗透压增大，提高了生物膜的通透性。改善了细胞对营养物质的转化和吸收，以利细胞个体的生长和繁殖。

实验步骤：将 500 mL 的蒸馏水，置于磁场强度为 0.145 oe 的圆形永磁铁中磁化 30 分钟。取该磁化水配制成培养基，其余做法同上。磁化半小时后的培养基中 T.f 菌氧化亚铁的效率见表 5-3：

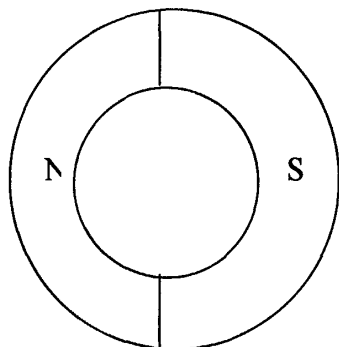


表 5-3 磁场处理半小时条件下 T.f 菌氧化二价铁的效率 (%)

细菌生长时间 (h)	20	36	40	48	62
项目					
对比 (普通培养基的细菌)	21.78	34.22	50.22	59.11	86.67
磁化半小时	22.67	52.89	70.67	78.67	92.00

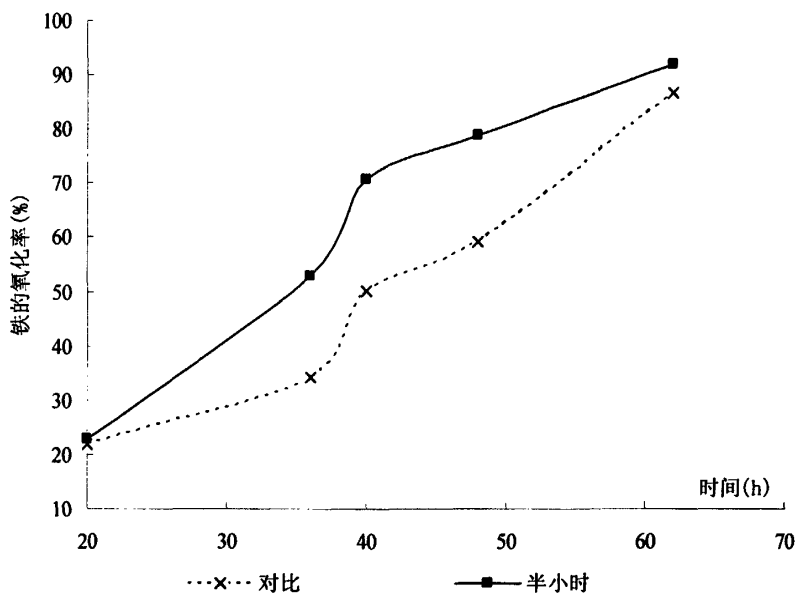


图 5-2 磁场处理半小时条件下 T.f 菌氧化二价铁的效果比较图

从图 5-2 中可以看出尽管用的磁铁磁场很小,但磁化半小时的水配制的培养基中的细菌氧化二价铁的速率还是较对比快。所以细菌的活性较对比是有所提高的。

为了确定磁场处理水配制培养基对细菌的最佳强化效果,进行了磁化时间的对比,考察磁化半小时和一小时对细菌氧化二价铁的速率的影响:

表 5-4 磁化时间对细菌氧化二价铁的效率 (%)

细菌生长时间(h) 磁化时间	20	36	55	60	72
半小时	24.44	28.89	53.78	61.78	90.22
一小时	21.78	29.78	53.78	60.89	85.78

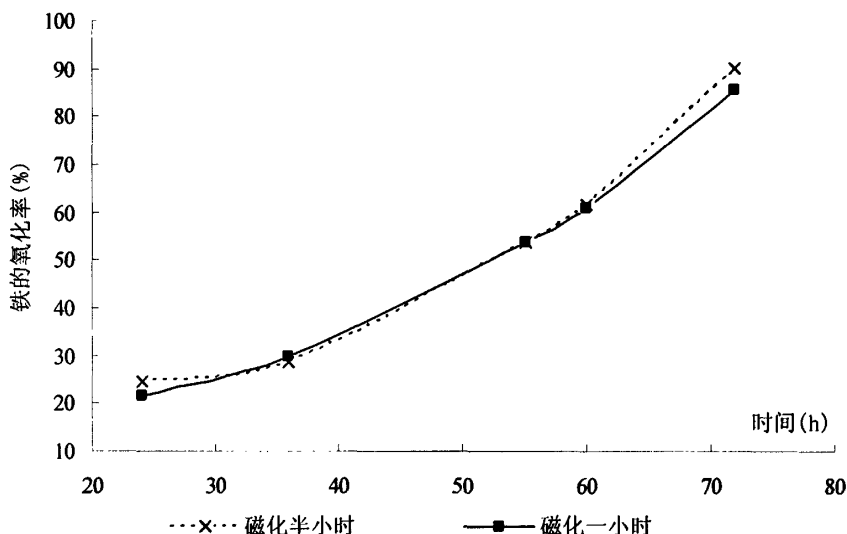


图 5-3 磁化时间对细菌活性的影响比较图

从图 5-3 可以发现:磁化单独作用,半小时的效果要好于一小时的。

可能原因是磁化对水结垢的影响:

前苏联科学家 B.U 莫罗佐夫的实验证明了水经过磁化处理以后,促进了氧在水中的溶解,而 Fe^{2+} 遇 O_2 会生成 Fe^{3+} , 进一步产生 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 胶体。 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 吸附沉降,也促进了垢的形成。从而导致了有磁场的情况下单位面积结垢量增加的幅度大一些。所以,应用磁化处理时,水中 Fe^{2+} 浓度有一限值^[67]。

5.3 驯化菌的浸矿效果

对 Cu^{2+} 驯化过的细菌进行了浸矿效果的比较：

表 5-5 驯化细菌的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20	24
对比 (未驯化菌)	9.60	11.48	13.99	14.15	15.93	16.61
驯化菌	10.54	13.90	15.79	15.96	17.44	17.78

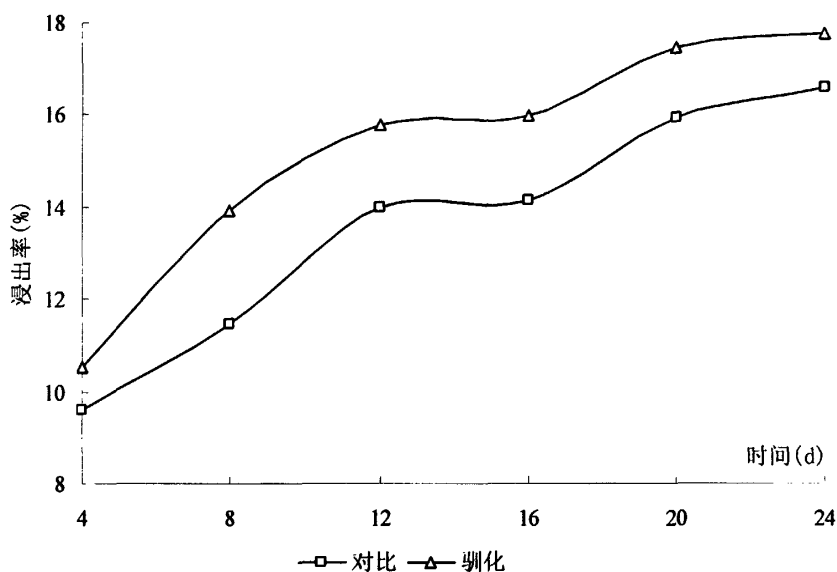


图 5-4 驯化细菌的浸矿效果比较图

试验发现驯化过的细菌由于更适应含铜离子的环境，浸出率较对比增加。

5.4 微波和磁场联合强化细菌浸矿的效果

细菌的处理：对 Cu^{2+} 驯化过的细菌进行微波诱变。

微波和磁场的联合强化：将微波每次处理水 1000mL，再加磁场半小时强化，考察细菌活性较好的微波档位的联合强化浸矿效果。

表 5-6 中低档 5 分钟条件下微波及联合强化的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20
中低 5	10.93	14.20	15.76	17.88	19.85
中低 5 半	10.66	14.25	16.55	18.02	19.67
驯化诱变菌	10.87	14.09	15.58	18.38	20.39

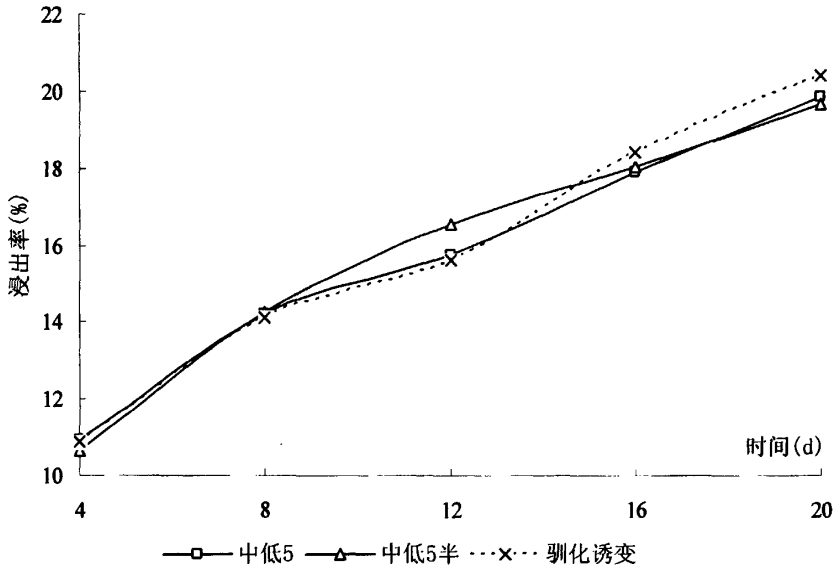


图 5-5 中低档 5 分钟条件下微波及联合浸出比较图

表 5-7 中低档 10 分钟条件下微波及联合强化的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20
中低 10	10.91	15.74	15.83	18.27	20.28
中低 10 半	11.10	12.67	13.32	15.08	16.58
驯化诱变菌	10.87	14.09	15.58	18.38	20.39

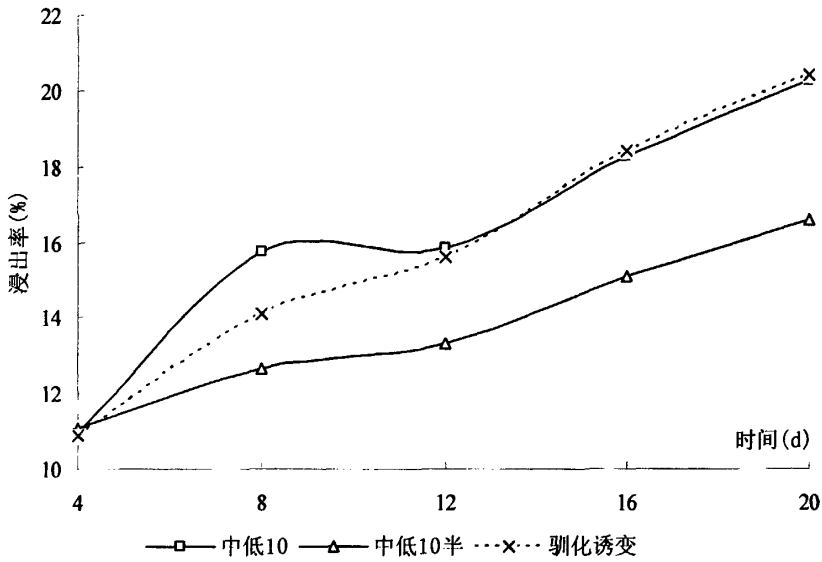


图 5-6 中低档 10 分钟条件下微波及联合浸出比较图

表 5-8 中档 3 分钟条件下微波及联合强化的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20
中 3	10.78	15.65	16.48	18.96	20.43
中 3 半	10.65	12.85	13.24	15.33	17.77
驯化诱变菌	10.87	14.09	15.58	18.38	20.39

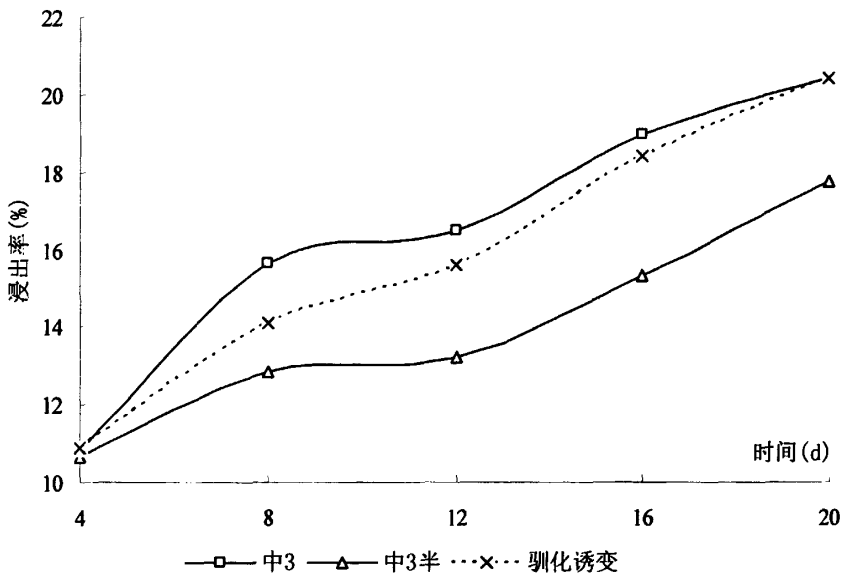


图 5-7 中档 3 分钟条件下微波及联合浸出比较图

表 5-9 中档 5 分钟条件下微波及联合强化的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20
中 5	10.40	15.10	15.76	18.24	18.27
中 5 半	11.22	15.49	16.23	19.24	20.75
驯化诱变菌	10.87	14.09	15.58	18.38	20.39

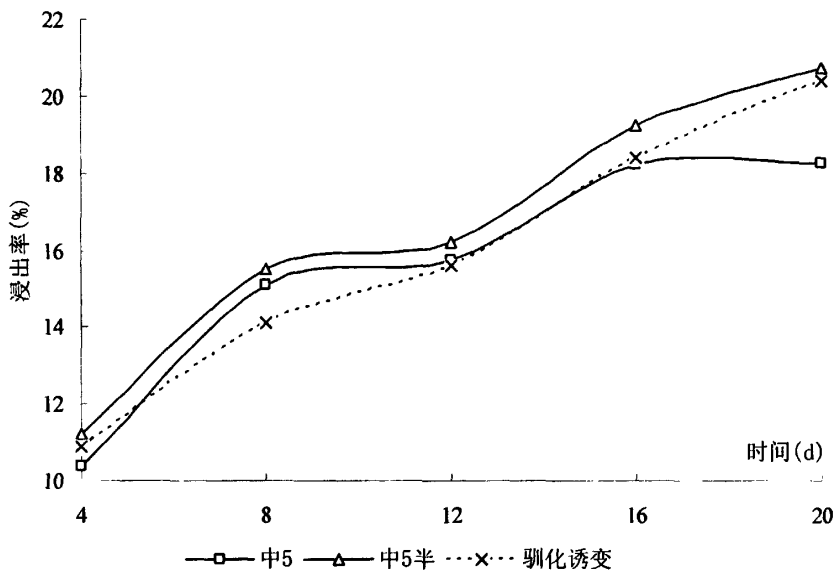


图 5-8 中档 5 分钟条件下微波及联合浸出比较图

表 5-10 中高档 3 分钟条件下微波及联合强化的浸出率 (%)

项目 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20
中高 3	10.95	15.46	15.72	18.63	19.35
中高 3 半	10.41	15.25	16.65	19.21	20.75
驯化诱变菌	10.87	14.09	15.58	18.38	20.39

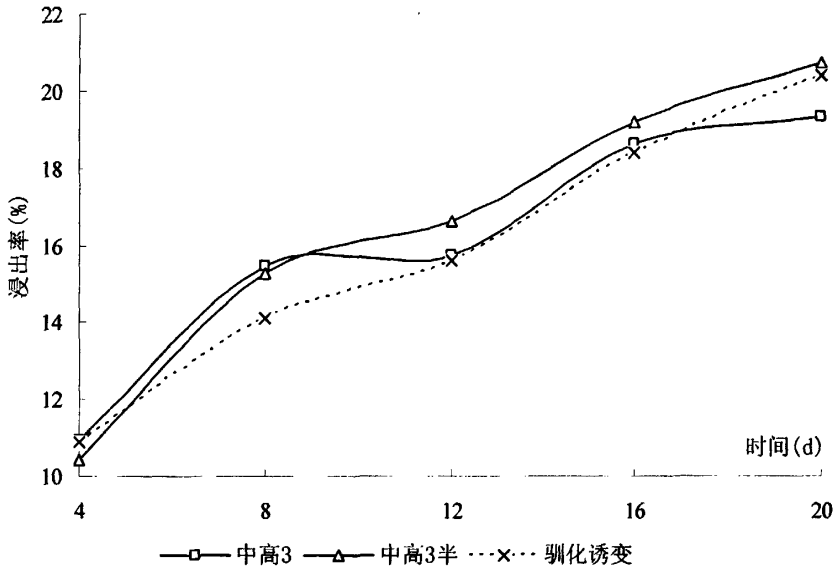


图 5-9 中高档 3 分钟条件下微波及联合浸出比较图

从图 5-5 到图 5-9 可以得到：并不是所有的联合强化效果都好于微波强化。其中中低 5 的温度是 42℃，而中 3 和中低 10 的温度分别是 35、60℃，前者达不到效果后者蒸发损失的氧很严重。而磁场对水的蒸发的影响随温度的升高而增加^[68]，进一步导致了中低 10 的效果变差。中 5 和中高 3 的温度分别是 44、41℃与 42℃较接近，可能是温度较适宜，联合作用浸出率提高。

5.5 联合强化中磁化时间对细菌活性的影响

实验方法：选择磁化后效果较微波单独作用减弱的（中低档 10 分钟）与加强的（中高档 3 分钟）两个档位研究磁化时间对细菌活性的影响：

表 5-11 中低档 10 分钟的磁化处理对细菌活性的影响

时间/h \ 氧化率/%	24	36	55	60	72
中低 10 半小时	20.89	28.89	50.22	60.00	86.67
中低 10 一小时	15.56	28.00	53.78	56.44	70.67

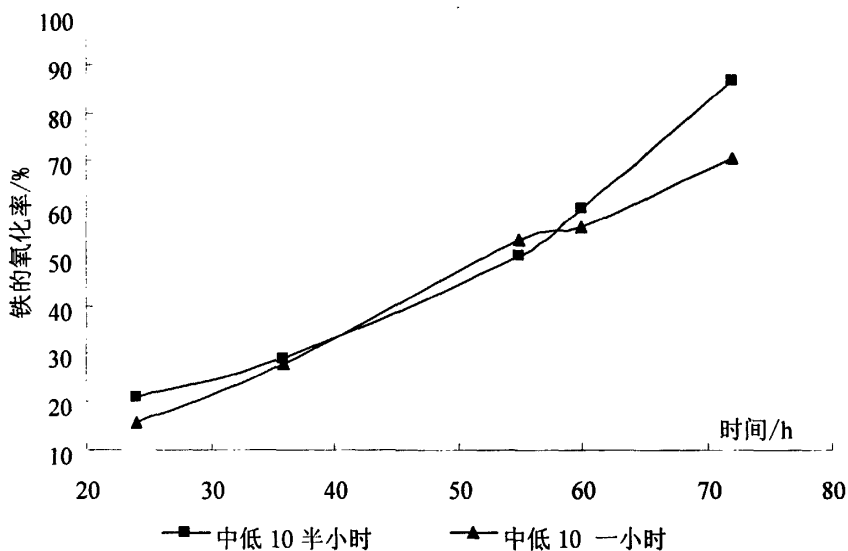


图 5-10 中低档 10 分钟的磁化处理对细菌活性的影响

表 5-12 中高档 3 分钟的磁化处理对细菌活性的影响

时间/h \ 氧化率/%	24	36	55	60	72
中高 3 半小时	20.00	28.89	52.00	60.00	86.67
中高 3 一小时	21.78	30.67	58.22	67.11	91.11

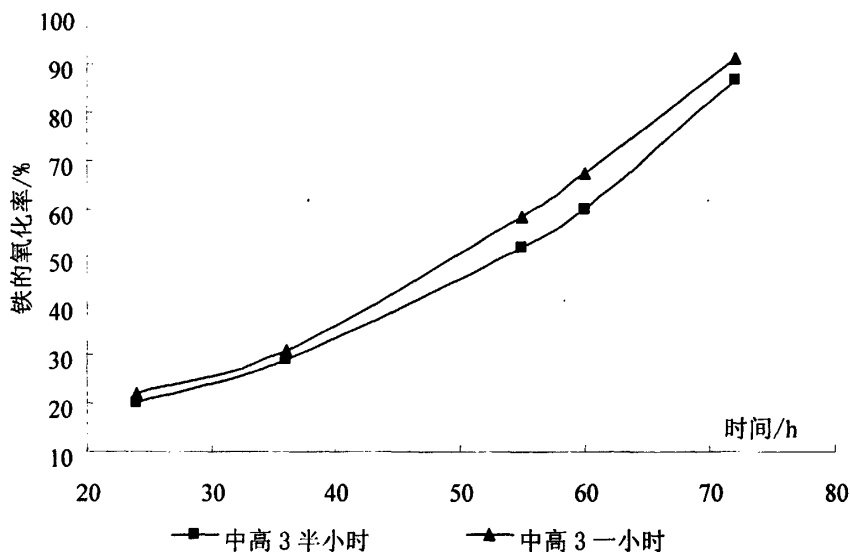


图 5-11 中高档 3 分钟的磁化处理对细菌活性的影响图

从图 5-10 和 5-11 的实验结果发现：中低档 10 分钟处理的水，随着磁化时间的增加，细菌活性减弱；中高档 3 分钟处理的水，随着磁化时间的增加，细菌活性增强。这个结果与细菌联合浸矿的结果一致。

5.6 微波处理水的浸矿过程研究

5.6.1 微波处理水的体积对浸矿结果的影响

分别用微波的中低火、中火和中高火三分钟、五分钟和十分钟每次均处理水 500mL，比较氧化亚铁硫杆菌在微波水配制的培养基中和普通水配制的培养基中的浸矿效果。

表 5-13 不同微波水的浸出率 (%)

微波挡位与时间 \ 浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20	24
中低 5	9.95	11.23	13.88	14.19	15.35	17.01
中低 10	10.47	12.31	15.23	15.74	17.01	18.92
中档 3	10.46	11.94	14.47	14.75	17.66	19.06
中档 5	11.24	13.44	16.28	16.38	18.68	19.71
中高 3	11.43	13.49	16.57	16.35	18.63	19.76
对比 (普通条件细菌浸矿)	9.60	11.48	13.99	14.15	15.93	16.61

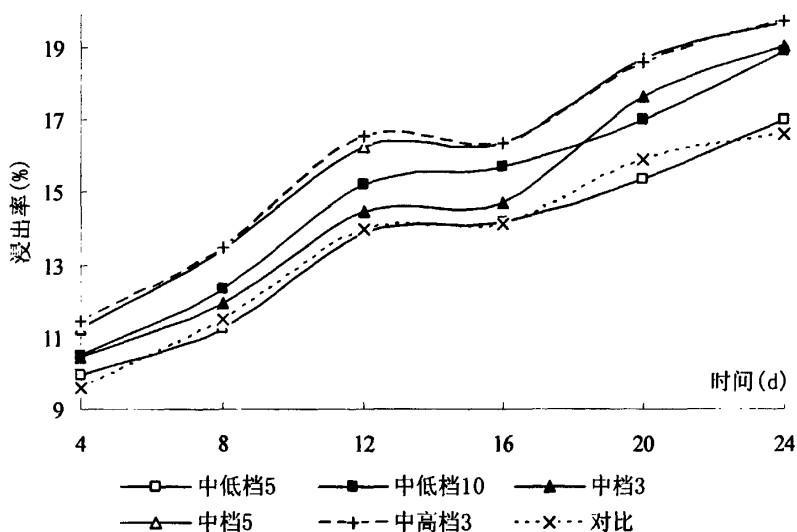


图 5-12 不同微波水的浸矿效果比较图

实验结果发现微波处理水样 500mL 较 1000mL 的浸矿效果提高明显。

5.6.2 微波对矿的前处理对细菌浸矿效果的影响

实验中以微波的中低档位处理时间为 5 分钟的 500mL 水配制培养基强化细菌浸矿为例，图中的 A 曲线代表用中低档位处理 5 分钟的水配制培养基浸矿过程的浸出率曲线；B 曲线代表用中低档位处理 5 分钟的水配制培养基在接种细菌前先进行（矿+培养基）的微波处理的浸矿效果：

表 5-14 微波对矿的前处理对细菌浸出率 (%) 的影响

浸矿时间 (d)	4	8	12	16	20	24
项目 A	9.95	11.23	13.88	14.19	15.35	17.01
项目 B	10.42	13.07	15.96	14.98	16.88	18.28

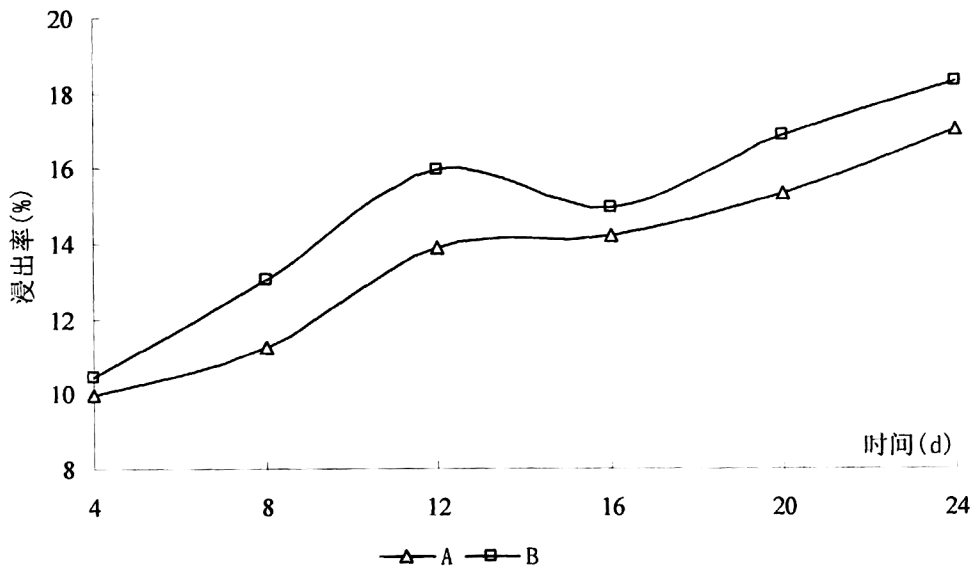


图 5-13 微波对矿的前处理对细菌浸出率的影响

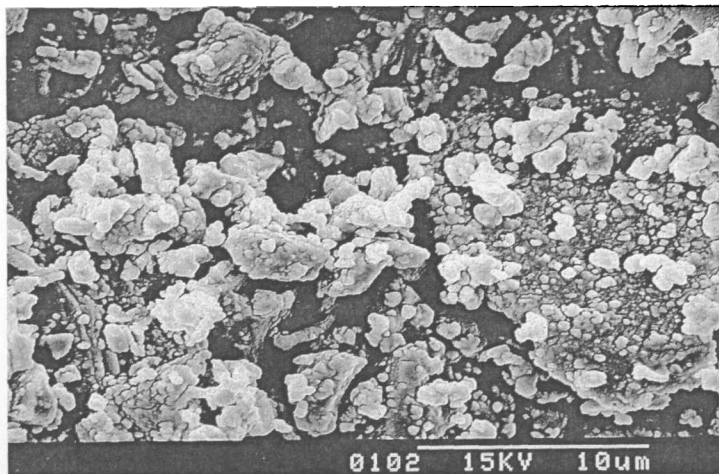


图 5-14 原矿的扫描电镜图

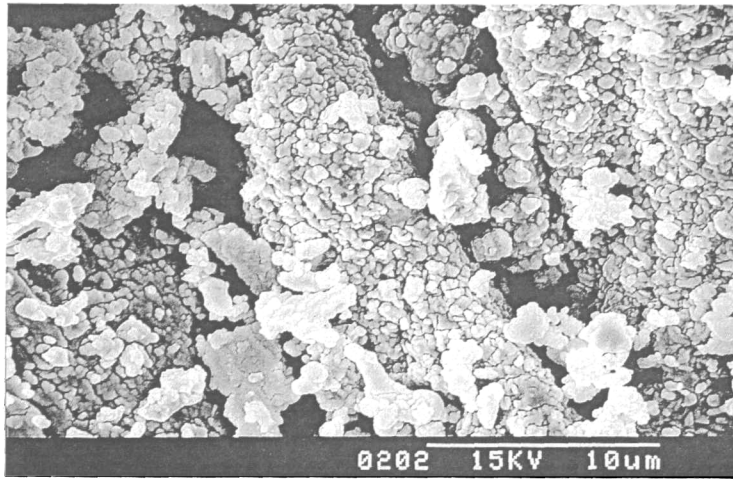


图 5-15 A 瓶浸出 24 天后的矿石扫描电镜图

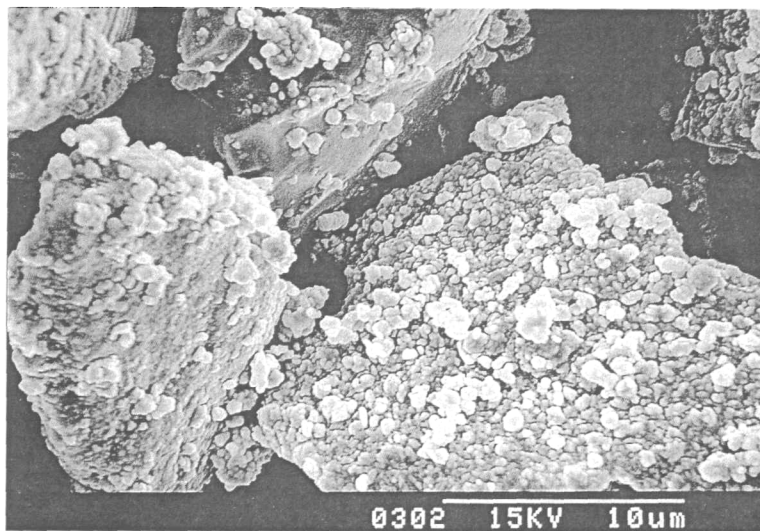


图 5-16 B 瓶浸出 24 天后的矿石扫描电镜图

从图 5-13 到图 5-16 的比较中可以看出在接种细菌前进行微波(矿+培养基)的前处理,细菌浸出效果较好。这是因为微波的选择性加热辐照矿物使矿物相界面间热应力发生变化,从图中可见矿的表面与细菌强化比较除腐蚀外,金属颗粒与脉石之间产生裂纹。暴露出新鲜的表面,有利于液固反应的进行。所以可考虑强化浸出中在接种细菌前对先进行微波处理。

5.7 微波强化浸出的简单方程研究

参考文献^[69]通过产物层传质控制的颗粒大小不变但未反应的核收缩模型:

$$y = (1 - 3(1-x)^{2/3} + 2(1-x)) = kt$$

x 黄铜矿在反应时间 t 内的反应分数, 令 $Y = y \times 10^3$

以下是对微波处理水 500mL 条件下各档位不同时间下的细菌强化浸出率数据表 5-13 处理所得 Y 与时间关系:

表 5-15 各档位不同时间下的 Y 与时间关系:

Y \ 时间/d	4	8	12	16	20	24
中低 5	3.46	4.43	6.85	7.17	8.44	10.46
中低 10	3.84	5.35	8.31	8.90	10.46	13.06
中档 3	3.83	5.02	7.47	7.77	11.31	13.27
中档 5	4.44	6.41	9.54	9.66	12.72	14.23
中高 3	4.59	6.46	9.63	9.90	12.65	14.31

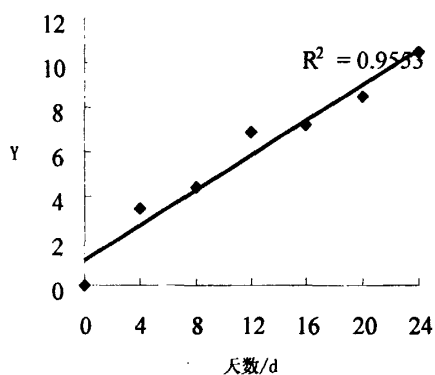


图 5-17 中低档 5 分钟条件下 Y 与时间关系

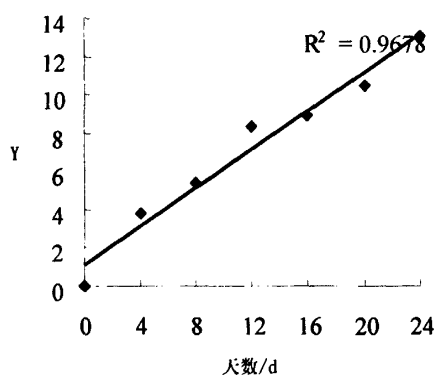


图 5-18 中低档 10 分钟条件下 Y 与时间关系

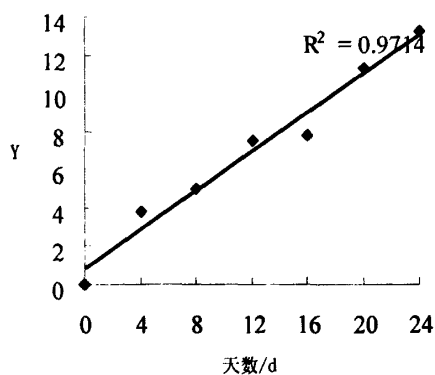


图 5-19 中档 3 分钟条件下 Y 与时间关系

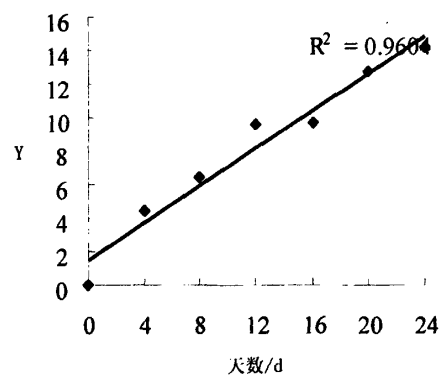


图 5-20 中档 5 分钟条件下 Y 与时间关系

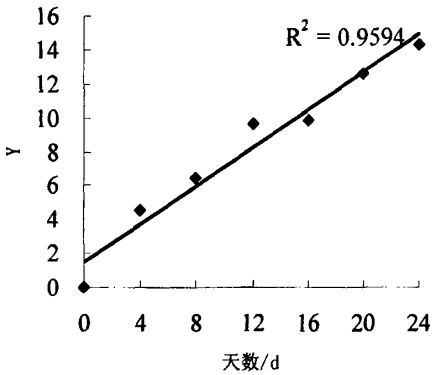


图 5-21 中高档 3 分钟条件下 Y 与时间关系

发现 Y 与时间基本成线性关系，可能由于浸出过程中生成了铁的沉淀等覆盖在矿物表面，同时矿石中含有大量的不纯物质使浸出速率由扩散控制。

本章小结：

1. 磁场可以促进水中氧气的溶解，而对细菌生长的起作用：半小时的效果好于一小时。

2. 微波处理水相对而言，中间的档位长时间和较高档位短时间的效果较好。这是因为^[30]微波功率愈大，水分子所吸收的能量亦愈多，解离的水分子数就愈多，水分子极化作用也愈显著。撤消微波电磁场后，主要受体系的极化弛豫作用影响。虽然高功率微波作用下的体系独立水分子数较多。但由于其温度也较高，分子热运动碰撞剧烈，使弛豫作用减弱；适中的微波功率可以产生较多的解离分子，体系温度不高，极化弛豫作用继续存在并进一步强化，因此随着时间延长，效果较好；低功率作用解离分子不多，体系温度也不高。作用结果表现为效果较对比好。

3. 实验结果发现微波处理水样 500mL 较 1000mL 的浸矿效果提高明显。这是因为微波对水的穿透深度随水的温度升高而增大，水由室温 25℃ 加热至 95℃，其穿透深度由 30mm 增大至约 120mm^[70]。处理水的体积对实验结果有很大影响。

4. 联合浸矿的效果：磁化促进氧气的溶解对于浸矿的效果有两个方面的影响：促进细菌的生长，另一方面，也促进了沉淀的形成，覆盖在矿物表面对浸出又具有抑制作用。

5. 浸出速率由扩散控制，所以尽量减少沉淀的生成，先利用微波辐照处理矿物，再进行细菌的强化对提高浸出率都是有利的。

结 论

本论文通过对低品位黄铜矿的微波和磁场强化细菌浸出黄铜矿的一系列实验研究，可以得出以下的结论：

1.通过正交实验与单因素实验结合确定了本试验的最佳浸矿条件：无铁的9K培养、矿浆浓度5%、接种量为10%。

2.微波与磁场单独处理水配置培养基对细菌活性的提高均有影响。其中微波的作用较明显，效果较磁场好。

3.微波处理水相对而言，中间的档位长时间和较高档位短时间对于细菌活性的提高效果较好进而促进浸矿。另外微波加热时体积加热，表现为对渗透深度的影响。所以处理水时所用容器对实验结果有影响。

4.经磁化半小时处理后的水配制的培养基能够提高T.f菌的活性。磁化一小时的浸矿效率却不如半小时的好。

5.考察了微波和磁场联合处理后与普通条件下的细菌浸矿效果，大体上与细菌强化的强弱顺序一致。联合作用机理还有待于进一步探讨。

6.由于本试验所用的强化方法只是针对培养基用水的处理，不影响其它化学强化的施用，且对其它矿物的细菌浸矿也具有参考价值。

氧化亚铁硫杆菌经强化后可以提高黄铜矿中铜的浸出率，但是由于黄铜矿是硫化铜矿中最难浸出的矿物之一，且本次实验所用铜矿品位较低，强化浸出效果仍有待进一步提高。该课题的后续研究，有望进一步提高强化后的浸出率，从而推进我国低品位硫化铜矿资源生物湿法冶金产业的发展。

致 谢

本毕业设计能够定期圆满的完成，得益于学院各位领导、老师、同学的大力支持和热情帮助，感谢他们在毕业设计期间给我提供的浓厚的学术氛围和良好的实验条件。感谢我的指导老师汪模辉教授在毕业设计期间对我们综述、开题报告、研究工作和论文上的细心指导和帮助。

导师、邓天龙老师、廖梦霞老师及前面的师兄、师姐在微生物冶金方面多年的研究和工作经验积累，都为本课题的研究提供了雄厚的技术支持。

还要感谢王以明老师、陈文老师、朱霞萍老师和龙晓玲老师为实验工作提供的仪器和指导。对实验室工作人员一并表示感谢。感谢我的研究生同学陈雪、王沛东、刘丽梅等在毕业论文撰写过程中热心的帮助，同导师以及本科生同学在试验过程中给予的合作。

另外还要感谢我的父母、亲人、朋友给予的理解和支持。

最后向参与我论文评阅和答辩的各位专家和老师表示衷心的感谢，你们辛苦了！

参考文献

- [1] 刘大星, 路殿坤, 蒋开喜, 王春. 低品位次生硫化铜矿的细菌浸出研究[J]. 有色金属(冶炼部分), 2005, (5): 2-5.
- [2] 闫森. 强化易门硫化铜矿物细菌浸出过程的研究[D]. 昆明理工大学硕士毕业论文, 2001, 9.
- [3] 曾中平. 高新科技知识教程[M]. 2003年09月第1版: 28
- [4] Comustin et. al. , *Biotechnology and Bioengineering* 1992, 39: 1121-1127.
- [5] Gaidarjiev S. et al. , In: 11 th Inter. Min. proc. Cong. , 1975.
- [6] HU Yue-hua, QIU Guan-zhou, WANG Jun, et al. The effect of silver-bearing catalystson bioleaching of chalcopyrite[J]. *Hydrometallurgy*, 2002, 64:81-88.
- [7] Jenkins J G. Copper heap leaching at San Manuel[J]. *Mining Engineering*, 1994, 46(9): 1094-1098.
- [8] Sanchez E C, Umetsu Y, Saito F. Effects of grinding and hematite addition on acid leaching of chalcopyrite concentrate [J]. *J Min Mater Process Inst Jpn*, 1997, 113: 631-633.
- [9] 张卫民, 王焰新. 低品位硫化铜矿微生物强化浸出的研究进展[J]. *中国有色冶金*, 2006, (1), 25-29.
- [10] B. H. 克拉辛著(Auth). 毛钜凡(MAO Ju-Fan), 刘曼琼(LIU Man-Qiong), 王恒(WANG Heng)译(Trans). 磁化水(Magnetized Water). 北京(Beijing): 计量出版社(Measure Press), 1982.
- [11] 张通, 张志全, 张冬艳等. 硫化铜矿超声波预处理提高细菌浸铜浸出率[J]. *过程工程学报*, 2001(3): 315-317.
- [12] 范兴祥, 彭金辉等. 浸出黄铜矿的新工艺研究[J]. *矿冶工程*, 2005, 25(3): 58-62.
- [13] 童雄, 孙永贵. 微生物浸出难浸黄铜矿的研究[J]. *矿产综合利用*, 1999, (4): 6-9.
- [14] 唐云, 杜斌旺, 刘全军. 细菌浸出的试验研究[J]. *有色矿冶*, 2000, 16(6): 23-28.
- [15] 彭琴秀. 德兴铜矿含铜废石细菌浸出试验研究[J]. *湿法冶金*, 2002, 21(2): 83-87.
- [16] Natarajan K A. Bioleaching of sulphides under applied potentials[J]. *Hydrometallurgy*, 1992, 29(1-3): 161-172.
- [17] Natarajan K A. Effect of applied potentials on the activity and growth of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Biotech Bioeng*, 1992, 39(9): 907-913.
- [18] Tshilombo A. F. , Petersen J. , Dixon D. G. . The influence of applied potentials and temperature on the electrochemical response of chalcopyrite during bacterial leaching[J]. *Minerals Engineering*, 2002, 15: 809-813.
- [19] 秦炜, 原永辉, 戴猷元. 超声场对化工分离过程的强化[J]. *化工进展*, 1995, (1): 1-5.
- [20] 张通, 张志全, 张冬艳等. 硫化铜矿超声波预处理提高细菌浸铜浸出率[J]. *过程工程学报*, 2001(3): 315-317.
- [21] 邱冠周, 等. 浸矿细菌的育种及工业应用[J]. *国外金属矿选矿*, 1998(6): 29-33.
- [22] 罗廉明, 等. 提高细菌浸矿速度的方法研究[J]. *矿产保护与利用*, 1999(4): 40-43.
- [23] 熊英, 等. 氧化亚铁硫杆菌在高砷硫化物金矿的驯化研究, 中国黄金学会信息网黄金选冶新技术新设备交流会论文集[C]. 1999-10-13.
- [24] 李永泉, 等. 微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌[J]. *微生物学报*, 1999, 39(2): 181-184.
- [25] 俞俊堂, 唐孝宣. *生物工艺学(上册)*[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1991, 80-84.

- [26] 黄卡玛, 等. 微波学报[J]. 1996, 12(2): 126-132.
- [27] 熊英, 胡建平, 林滨兰等. 氧化亚铁硫杆菌的驯化与诱变育种[J]. 矿产综合利用, 2001, (6): 27-31.
- [28] 徐晓军, 宫磊等. 氧化铁硫杆菌的微波诱变及对低品位黄铜矿的生物浸出[J]. 有色金属, 2005(2): 93-97.
- [29] 华南工学院无机化学教研组. 无机化学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979.
- [30] 汤建伟. 微波电磁场对磷酸解液固反应影响的研究[D]. 成都: 四川大学化工学院 2003, 1.
- [31] 黄子卿. 电解质溶液理论导论[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 100
- [32] 谷晋川. 微波强化硅藻土矿提纯机理研究[D]. 成都: 四川大学化工学院, 2003, 9.
- [33] 黄卡玛, 李颖, 杨春等. 弱电磁波与生命系统相互作用的动力学基础-生物代谢动态过程中的电磁干扰[J]. 中国医学物理学杂志, 1997, 4(14): 205-211.
- [34] 黄卡玛, 赵翔, 李颖等. 试论非热电磁生物效应实验的重复性[J]. 四川大学学报, 1997, 34(3): 315-318.
- [35] 杨晓庆. 微波与化学反应体系相互作用过程中的特殊效应研究[D]. 成都: 四川大学电子信息学院, 2006, 3.
- [36] 金钦汉, 戴树珊, 黄卡玛. 微波化学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [37] 朱元保, 颜流水, 曹社祥等. 磁化水的物理化学性能[J]. 湖南大学学报(自然科学版) 1999, 26(1): 21-25.
- [38] 吴松海, 孙永利, 贾绍义. 磁场对蒸馏水蒸发过程的影响[J]. 石油化工高等学校学报, 2006, 19(1): 10-12.
- [39] 徐生辉. 磁化水生物效应及机理研究进展[J]. 中国医学物理学杂志 1997, 14 (2): 129-132.
- [40] 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, 2004, 17(4): 362-365.
- [41] 舒荣波, 阮仁满, 温建康. 黄铜矿生物浸出中钝化现象研究进展[J]. 稀有金属, 2006, 30 (3): 395-399.
- [42] 王长秋, 马生凤, 鲁安怀, 周建工. 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): 607-612.
- [43] J. J. Plumb, B. Gibbs, M. B. Stott, W. J. Robertson, J. A. E. Gibson, P. D. Nichols, H. R. Watling, P. D. Franzmann. Enrichment and characterisation of thermophilic acidophiles for the bioleaching of mineral sulphides[J]. Minerals Engineering, 2002, 15: 787-794.
- [44] Douglas E. Biomining: Theory, Microbes and Industrial Process[M]. Georgetown tex: Landes bioscience, 1997.
- [45] 杨显万等. 微生物湿法冶金[M]. 2003: 23
- [46] M. Wang, Y. Zhang, T. Deng, K. Wang. Kinetic modeling for the bacterial leaching of chalcopyrite catalyzed by silver ions[J]. Minerals Engineering, 2004, 17: 943-947.
- [47] Ding Weian. Leaching Behavior of Complex Copper Sulphide Concentrate with Ferric Chloride by Microwave Irradiation[J]. RARE METALS, 1997, 16(2): 152-155.
- [48] M. Al-Harashsheh, S. Kingman, N. Hankins, C. Somerfield, S. Bradshaw, W. Louw. The influence of microwaves on the leaching kinetics of chalcopyrite[J]. Minerals Engineering, 2005, 18: 1259-1268.
- [49] 魏德州. 资源微生物技术[M]. 冶金工业出版社, 1996: 425.
- [50] Visca P , Bianchi E , Polidoro M. A New Solid Medium for Isolation and Enumeration of

- Thiobacillus Ferrooxidans. *J Gen Appl Microbiol*, 1989, 35: 71-81.
- [51] Garcia O, Mukai J K, Andrade C B. Growth of Thiobacillus Ferrooxidans on Solid Medium: Effects of Some Surface- Active Agents on Colony Formation. *J Gen Appl Microbiol*, 1992, 38: 279-282.
- [52] 张在海, 王淀佐, 邱冠周, 等. 氧化亚铁硫杆菌亚铁氧化活性诱变育种理论探讨[J]. 铜业工程, 2001, (1): 12-15.
- [53] 张子间. 生物滴滤池烟气脱硫工艺与机理的研究[T]. 广东工业大学硕士学位论文, 2004: 18-19.
- [54] 周群英, 高延耀. 环境工程微生物学(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 292-293.
- [55] 周顺桂, 王世梅, 余素萍, 等. 污泥中氧化亚铁硫杆菌的分离及其应用效果[J]. 环境科学, 2003, 3: 56-60.
- [56] 刘晶, 张灼, 韩秀芳. 硫杆菌(Thiobacillus)的分离培养及其生长特性的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 1996, 18(2): 118-121.
- [57] 张冬艳. 氧化亚铁硫杆菌 C-1#菌株的分离及特性研究[J]. 内蒙古工业大学学报, 1995, 14(1): 27-30.
- [58] 傅建华, 邱冠周, 胡岳华, 等. 浸矿细菌的超微结构及其特性[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2004, 35(4): 562-567.
- [59] 张冬艳. 氧化亚铁硫杆菌的菌数测定法[J]. 内蒙古工业大学学报, 1996, 15(1): 62-65.
- [60] 周顺桂, 周立祥, 黄焕忠. 黄钾铁矾的生物合成与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(9): 1140-1143.
- [61] 岩石矿物分析编写组. 岩石矿物分析[M]. 1959年第1版: 421.
- [62] 穆家鹏. 原子吸收分析方法手册[M]. 1989年12月第1版: 155.
- [63] 方兆珩. 浸出[M]冶金工业出版社, 2007: 354
- [64] 张德诚, 罗学刚. 细菌浸出黄铜矿的工艺影响因素研究[J]. 化工矿物与加工, 2007, (10): 9-15.
- [65] 陈魁. 应用概率统计[M]清华大学出版社, 2000, 3: 286.
- [66] 廖梦霞, 邓天龙. 难处理硫化矿生物湿法冶金研究进展(I) [J]. 稀有金属. 2004. 28 (4): 677-770.
- [67] 储召华, 汤国勇, 郝桂霞. 磁化水中 Fe^{2+} 对抑垢影响规律的探索[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版) 1998, (2): 74.
- [68] 吴松海, 孙永利, 贾绍义. 磁场对蒸馏水蒸发过程的影响[J]. 石油化工高等学校学报, 2006, 19(1): 10-12.
- [69] David Dreisinger , Nedom Abed.A fundamental study of the reductive leaching of chalcopyrite using metallic iron part I : kinetic analysis hydrometallurgy 2002 (66) 37-57
- [70] 焦士龙. 微波提取中药有效成分实验研究[D]. 天津大学机械工程学院, 2006, 5.

发表学术论文目录

- 1.祝丽丽,汪模辉,陈雪.微波和磁场强化细菌浸出黄铜矿研究.矿业快报,2008.5.
- 2.祝丽丽,汪模辉,陈雪.微生物强化浸出及微波技术在黄铜矿冶金中的应用.冶金丛刊,2007.3.
- 3.陈雪,郎春燕,祝丽丽.硒的形态分析进展.广东微量元素科学,第14卷第3期.