

极端环境胁迫下金精矿生物氧化过程研究进展

李 敏, 闻建平

天津大学, 天津

Email: jpwen@tju.edu.cn

收稿日期: 2021年7月1日; 录用日期: 2021年7月30日; 发布日期: 2021年8月5日

摘 要

生物氧化已经商业化地应用于从金精矿中提取金, 尤其在难处理金精矿方面具有显著优势, 从而扩大黄金的储量。可以采用系统生物学手段阐述极端环境下单菌株和多菌株体系的适应性机制, 这将有助于为生物氧化建立更具抵抗力的微生物群落, 并发挥最大的作用。同时, 在生物反应器中进行金精矿的生物氧化是一种高效的冶金方法。由于生物反应器内存在复杂的三相生物氧化过程, 有必要建立计算流体动力学(CFD)模型来模拟金精矿的生物氧化过程, 通过该模型得到的最佳操作条件可以进一步提高实际生产过程中的各项指标。本文综述了系统生物学应用于浸出微生物适应性机制及对金精矿生物氧化过程建模的研究现状和发展趋势。

关键词

金精矿, 生物氧化, 浸出微生物, 系统生物学, 生物反应器, CFD模型

Research Progress on Biological Oxidation Process of Gold Concentrate under Extreme Environmental Stress

Min Li, Jianping Wen

Tianjin University, Tianjin

Email: jpwen@tju.edu.cn

Received: Jul. 1st, 2021; accepted: Jul. 30th, 2021; published: Aug. 5th, 2021

Abstract

Bio-oxidation has been commercially applied to extract gold from gold concentrate, and has sig-

nificant advantages especially when handling refractory gold concentrate, thereby expanding the recoverable gold reserves. The adaptive mechanisms of single- and multi-strain systems under extreme environments can be explained by means of systems biology, which will help to build a more stress-resistant microbial community for bio-oxidation with maximal effectiveness. At the same time, the bio-oxidation of gold concentrate in bioreactors is an efficient metallurgical method. Due to the complex bio-oxidation processes inside bioreactors, it is necessary to establish a computational fluid dynamics (CFD) model to simulate the dissolution process of gold concentrate, and the optimal operating conditions obtained from such models can further improve the indicators in the actual production processes. This article reviews the research status and development trend of systems biology applied to the adaptive mechanisms of leaching microorganisms and the modeling of the gold concentrate dissolution process in bioreactors.

Keywords

Gold Concentrate, Bio-Oxidation, Leaching Microorganisms, Systems Biology, Bioreactors, CFD Model

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

生物氧化作为一种基于矿物、冶金、化工和生物学跨学科研究的湿法冶金新技术, 主要依靠微生物氧化将非目标矿物溶解在液相中, 然后将目标矿物暴露在氧化物渣中, 主要用于从黄铁矿, 毒砂和其他硫化矿中提取金和银[1]。金精矿的商业生物氧化已在南非(例如, 始于 1986 年的 Fairview)、中国、澳大利亚、巴西、加纳、秘鲁、俄罗斯、哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦和美国实行[2]。相应的基于连续搅拌釜反应器的已商业化的技术为 BIOX[®], BioCOP[®], BioNIC[®], BioZINC[®], HIOX[®], BRISA, BACOX, CCGRI[®] 和 BacTech/Mintek 反应器等[3] [4]。为进一步提高生物氧化提金技术水平, 冶金微生物单菌株和菌群、气-液-固三相流复杂反应器等基础研究、创新及应用已成为热点。

随着基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学和表型筛选等系统生物学技术的发展, 结合生物信息学, 研究微生物的完整生物学最近变得可行[5], 这些方法可用于全面了解生物采矿微生物[6]。例如, 不同细菌、古细菌和真核生物的多样性及其在酸性矿山废水生境上的代谢活性状态已经得到了很好的描述[7]。因此, 在金精矿的单菌株筛选和自适应培养过程中, 可以采用这些组学方法对冶金单菌株的基因序列、转录谱、酶结构等功能信息进行科学研究。

冶金微生物菌群有一系列优势, 通过菌种之间的分工来分配代谢负担, 使它们能够有效地转化复杂的底物[8]。运用宏基因组及宏转录组等方法可以揭示多菌株之间竞争、相互促进和抑制等过程直接或间接地相互联系而导致的微生物群落复杂性变化[9]。对优良冶金微生物研究的根本目的在于进行工业化应用, 其中在生物反应器中优化生产是重要研究内容。

生物反应器可以精确控制曝气, 温度和 pH 等参数, 从而实现更高的浸出效率和金属回收率[10]。而且, 连续流动操作允许自发选择对催化硫化物矿物溶解有效的微生物群落[11]。由此产生的物种丰富度导致了微生物群落之间的协同效应[12], 从而提高总氧化率。生物反应器具有许多矿物溶解的优势, 因此其浸出周期通常比堆浸更短[1]。金精矿在气-液-固三相反应器中存在复杂的生物氧化过程, 其中涉及许多影响金提取率的因素。因此, 可以在计算流体力学(CFD)模型中动态调控各项参数以使金提取率达到最

佳, 从而减少实际实验材料的高消耗。

随着冶金生物技术、系统生物学、冶金反应器技术、建模等多种技术的发展, 可以对生物反应器中金精矿生物氧化过程进行理性优化, 以获得更高的金回收率和氧化能力。本文综述了近年来生物反应器内生物氧化处理金精矿的研究现状和发展趋势。

2. 浸出微生物对金精矿生物氧化环境的适应性机制

目前, 在金精矿生物氧化过程中使用的最常见的、成功的微生物, 主要有氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)、嗜铁钩端螺旋菌(*Leptospirillum ferrooxidans*)、嗜酸性喜温硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)、硫杆菌属(*Sulphobacillus* sp.)和铁原体属(*Ferroplasma* sp.)等[13]。这些浸出微生物生存在金精矿生物氧化导致的极端环境中, 但它们对高盐、强酸和其他恶劣环境条件的适应机制仍不完全清楚, 缺乏揭示潜在功能细胞成分的系统分析[14]。因此, 有必要运用高通量测序、生物信息学分析、系统生物学方法等手段, 在基因、RNA 和蛋白质等尺度上进一步研究抗性机制中潜在功能成分, 以探索极端微生物的全部代谢潜能并构建具有更强抗逆性的高效工程菌株。

2.1. 极端环境下单菌株的适应性机制

2.1.1. 极端酸性环境下单菌株的适应性机制

金精矿进行生物氧化的极端酸性环境($\text{pH} < 3.0$)是适应酸性和有毒金属的微生物的独特生态位[15]。在这一环境中, 浸出微生物的集体适应是通过形成生物膜来实现的。生物膜为嵌入其自身生成的细胞外聚合物(EPS)基质中的微生物聚集体[16], 这些彼此粘附或粘附于矿物表面的微生物群体具有高度结构化, 因此其耐酸性有了显著提高。浸出微生物单个细胞内部的适应防御策略为机械防御[17]、膜电位逆转[18]、质子外排系统[19]、细胞内缓冲[20]、生物大分子的保护或修复系统[14]等。这些适应通过恢复 pH 稳态和相关的能量代谢来维持正常的生理活动。浸出微生物主要通过外排蛋白将金属离子从细胞质中泵出并将其转化为毒性较小的形式来适用高浓度金属离子的胁迫[21]。微生物适应极端酸性环境的这些策略可通过组学研究来揭示特定基因、RNA、蛋白质的表达与调控。

采用基因组学方法, 为氮碳循环、硫铁吸收和体内平衡、胞外多糖生物合成、重金属抗性和能量代谢等关键过程中涉及的基因和途径建立初步模型有利于理解对微生物应对极端环境的复杂响应过程[22]。通过对极端嗜酸菌 *A. caldus* 和 *A. thiooxidans* 的系统基因组学分析均发现插入序列和基因组岛等多种可移动的遗传元素, 这表明它们存在频繁的遗传流动(如侧向基因转移、基因重复、基因突变和基因组重排等)[23][24]。通常, 在极酸性环境中, 铁离子的浓度远高于中性环境[25]。在铁负载异常高的生物氧化过程中, 基因组分析揭示了 *A. ferrooxidans* 用于铁吸收, 感测, 存储和调节铁稳态的以操纵子结构存在的候选基因, 且这些基因可以编码至少 11 个铁离子系统以吸收 Fe^{3+} [26]。对 44 株生活在高铁浓度下的嗜酸细菌和古细菌的基因组序列分析表明, 这些细菌缺乏编码 Fenton 反应调节因子的基因, 表达的酶不足以解毒活性氧(ROS) [27]。因此, 可以通过补充 ROS 去除的替代系统及保留 DNA 损伤的修复系统来缓解 ROS 对细胞的损害。

采用转录组学方法, 对极端环境下的浸出微生物进行分析, 如 *A. thiooxidans*、*A. caldus* 等。分析可得菌株在抵抗极端环境时差异表达的基因与能量代谢、双组分系统、氨基酸代谢和信号转导等代谢途径有关[28]。微观特征表明, 浸出微生物在金属胁迫下显示出较高的细胞聚集及 EPS 分泌, 且 EPS 分泌的物质可以与金属离子形成沉淀来缓解氧化压力[29]。采用 KEGG 和 GO 对 *A. thiooxidans* 的差异表达基因进行注释和分类可用于分析得到其涉及的代谢途径[30]。例如, 硫代谢途径相关基因(*sor* 和 *soxABXYZ*)的上调可以为细菌提供能量, 而 H^+ -ATPase 活性的增强促进多余质子的流出。相反, 参与碳代谢和鞭毛

组装的基因下调可能会减少不必要的能量消耗[30]。同时, 天冬氨酸、谷氨酸等氨基酸通过消耗质子增加碱度以抵抗酸胁迫, 而不饱和脂肪酸(特别是 C19-cyc)增加细胞膜密度以防止质子入侵[30]。 *A. caldus* 抵御极端酸性环境的机制与 *A. thiooxidans* 基本相同。因此, 其参与谷胱甘肽合成的氨基酸水平、抗氧化酶活性、细胞膜流动性和 ATP 合成相关酶的活性也都有所增加[28]。

蛋白质组学方法分析表明 *L. ferriphilum* 对砷胁迫的反应涉及砷抗性系统、磷酸盐调节和谷胱甘肽合成[31]。通过分析耐温氧化硫化杆菌(*Sulfobacillus thermotolerans*)对抗高砷含金硫化物浓缩物的差异表达蛋白, 可以得到 MBL 折叠金属水解酶, 醌氧化还原酶和 GroEL 伴侣蛋白等抗应激蛋白在抵抗砷和硫化物中发挥重要作用[32]。

2.1.2. 高盐环境下单菌株的适应性机制

在高盐环境下, 高浓度的氯离子会对浸出微生物的亚铁氧化酶系统的活性、pH 稳态、生长动力学产生较大的不利影响[33]。例如, 氯化物可穿过嗜酸性铁氧化剂的细胞质膜来降低细胞质的 pH 值, 从而抑制细胞甚至致其死亡[34]。此外, 浸出微生物产生的黄钾铁矾沉淀会妨碍金精矿的生物氧化[35]。因此, 研究浸出微生物在高盐环境下对这些损伤的抵御机制有利于驯化得到极端耐盐微生物。在高盐胁迫下, 浸出微生物可以通过合成海藻糖、四氢嘧啶、甘氨酸甜菜碱等相容性溶质来缓解内外部渗透压不均衡对细胞的胁迫[36] [37]。例如, *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 使用脯氨酸和甜菜碱作为渗透保护剂来防止细胞干燥及蛋白质变性[38]。

比较基因组学可揭示渗透耐受性的分子决定因素。嗜酸性铁氧化微生物除含有渗透胁迫反应的典型基因外, 还含有 K^+ 转运蛋白 Kdp 和 Ygg 完整或部分组成的基因, 这可能使微生物能够吸收钾响应高水平的外部可溶性阴离子[39]。生物信息学预测结果表明嗜酸菌对氯化物的耐受型取决于代谢类型, 如混合营养细菌 *Sb. thermosulfidooxidans* 和 *Fm. acidiphilum* 比严格的化能自养菌 *A. ferrooxidans* 和 *L. ferriphilum* 具有更高的耐受性[39]。此外, *L. ferriphilum* 对氯化物的耐受性高于 *A. ferrooxidans* [39]。

比较蛋白质组学在不同氯化物水平下对 *Acidihalobacter prosperus* DSM 14174 的分析揭示了该菌株对高酸度和高氯离子环境的响应[40]。该菌株的适应变化包括四氢嘧啶、谷胱甘肽、氨基酸、与 DNA 修复和膜生物合成相关蛋白质的合成均增加, 而核糖体蛋白质产生减少, 以及碳通量变化[40]。同时, 铁氧化和硫氧化产生的能量减少可能通过存储的糖原代谢产生能量来补偿, 从而使菌株能够在高盐和低 pH 的刺激下保持正常的生命活动[40]。

采用系统生物学的方法, 详细分析了在强酸性和盐溶液等极端环境下, 单菌株在物质流动方面的适应机制。从能量流出发, 与极端环境下 ATP 浓度和 NADH、NADPH、FADH₂ 等辅因子相关的文献报道很少。如何实现物质流、能量流和辅助因子的高效耦合平衡, 从而提高微生物对金精矿的降解能力, 将是今后研究的热点之一。从信息流出发, 进一步的研究可以通过调节菌株内部的信息流来增强其定向合成蛋白质的能力。因此, 研究极端环境下单菌株内部物质、能量和信息流动的差异性、系统性、完整性和方向性能力, 将成为今后金精矿生物氧化过程研究的重点。

2.2. 极端环境下多菌株的适应性机制

在极端环境下单菌株研究成果基础上, 将耐受能力强的多种单菌株混合在一起培养使它们形成高效协同群落。因此, 形成的群落在能量物质利用率、环境适应性、氧化效率等方面的表现大幅度提升, 进而取得更高的经济效益。

硫氧化微生物与铁氧化微生物的混合培养物对金精矿的氧化效果更好已被证明[41]。硫氧化微生物(如 *A. thiooxidans*、*A. caldus* 等)能氧化硫和还原态硫化物, 但不能氧化 Fe^{2+} [42]; 铁氧化微生物(如 *L. ferriphilum*、*Ferroplasma acidiphilum* 等)则与之相反[43]。因此, 铁氧化微生物在金精矿上产生的硫膜会

阻碍硫化物基体的浸出, 而硫氧化微生物可以氧化这层硫膜, 从而使硫化物基质更好地被铁氧化微生物氧化释放金。采用 *A. ferrooxidans* 和 *A. thiooxidans* 处理难处理金精矿时, 两菌的混合培养物对金精矿中 As 的去除率高于纯培养物[13]。

自养微生物与异养微生物和/或混合营养微生物的混合培养物也被证明可以强化金精矿生物氧化过程。在含砷金矿的生物氧化系统中, 自养微生物产生的有机物可为异养和兼性异养微生物(如 *Acidibacillus*、*Thermoplasma* 和 *Sulfobacillus*)提供能量和碳。这些物种表现出协同效应, 如有机碳和无机碳的转移, 或铁和硫的转化[44]。详细研究了异养菌 *Rhizobium phaseoli* 与自养菌 *A. ferrooxidans* 在矿物溶解中的协同机制[45]。*R. phaseoli* 代谢多糖产生的有机酸能螯合或沉淀有害重金属, 减少对 *A. ferrooxidans* 的伤害, 同时破坏矿物的晶格。

采用 Illumina 宏基因组测序技术对极端酸性环境中的驯化后菌群进行测序后, 对其结果进行物种组成及物种丰度分析可表征群落的生物多样性组成, 这有助于重新构建驯化后的微生物群落[46]。对群落中优势菌株(*A. ferrooxidans*)的测序数据进行后续数据库注释、基因丰度统计、功能基因差异分析发现, 与重金属运输和压力管理相关的功能基因得到了富集, 这很大可能与浸出微生物在逆境中适应和生存有关[46]。因此, 宏基因组学可用于研究金精矿的生物氧化过程中的生物多样性、种群结构进化关系、功能活性相互协作关系以及群落与环境之间的关系, 从而为改善群落并提高协同效率提供依据[46]。

极端环境中多菌株群落的宏转录组数据、生化参数和微生物演替之间的相关性表明共培养群落中的微生物通过其内在的功能特性, 早期适应生物浸出环境, 后期抵抗有毒环境[47]。早期, 微生物通过促进细胞增殖来维持生命活动, 表现为: 参与细胞部分的基因、*S. thermosulfidooxidans* 中涉及结合作用的基因和 *A. caldus* 中涉及催化活性的基因表达上调[47]。后期, 微生物主要抵抗由金属离子、毒素和代谢物积累引起的严重环境胁迫, 表现为: *L. ferriphilum* 中与信号转导和应激反应相关的基因、*A. caldus* 中与建立定位相关的基因和 *S. thermosulfidooxidans* 中的转运蛋白基因被高度表达[47]。因此, 共培养系统加深了我们对菌株之间沟通与协调的理解, 这将有助于我们利用分解代谢途径的多样性促进协同作用在生物氧化过程中的有效应用[48]。

关于极端环境下金精矿生物氧化过程中多菌落协同效应的科学问题, 国际研究者在宏基因组、宏转录组和生理学分析已经取得了一些可喜的成果。但是缺少开展新的多酶体系和代谢途径构建的研究, 也缺少开展新的酶结构和代谢物鉴定研究。因此, 利用新获得的蛋白质组和代谢组的相关信息来提高发酵水平将是国际研究的热点和发展趋势。

综上, 探究浸出微生物在极端环境下的响应机制可获得多菌株群落及其优势菌株如何运作以及如何将这些相互作用转化为更高的金精矿生物氧化率的信息。因此, 收集到的调控信息可用于添加特定物质和优化生物浸出发酵罐的操作条件, 从而使菌株在极端环境中实现高效的转化平衡和合成代谢产物的能力。同时, 将计算流体力学(CFD)模型的最新研究成果应用于大型生物反应器中进行高浓度金精矿浆的生物氧化也有助于工业生产。

3. 生物反应器内部复杂冶金反应过程的 CFD 建模

生物反应器中生物氧化过程的实际实验研究存在着耗时、劳动强度大、成本高等缺点。相比之下, 在模拟中更改模型设置和参数相对容易, 以获得新的更相关的结果。因此, 建立关于这个复杂过程的模型以预测系统的行为能够避免走许多弯路。CFD 模型可以提供更多的三相生物反应器内的物料流动细节, 可以更好地描述颗粒(固体颗粒、液滴或气泡)、颗粒群的分布和非均相流体力学行为[49]。作为模拟流体力学、传热传质的有力工具[50], CFD 模型建立能够在工程的许多方面发挥重要作用, 如操作条件优化、辅助反应器设计及过程强化等[51]。当 CFD 模型应用于模拟金精矿生物氧化过程时, 其流程可如图 1 所示。

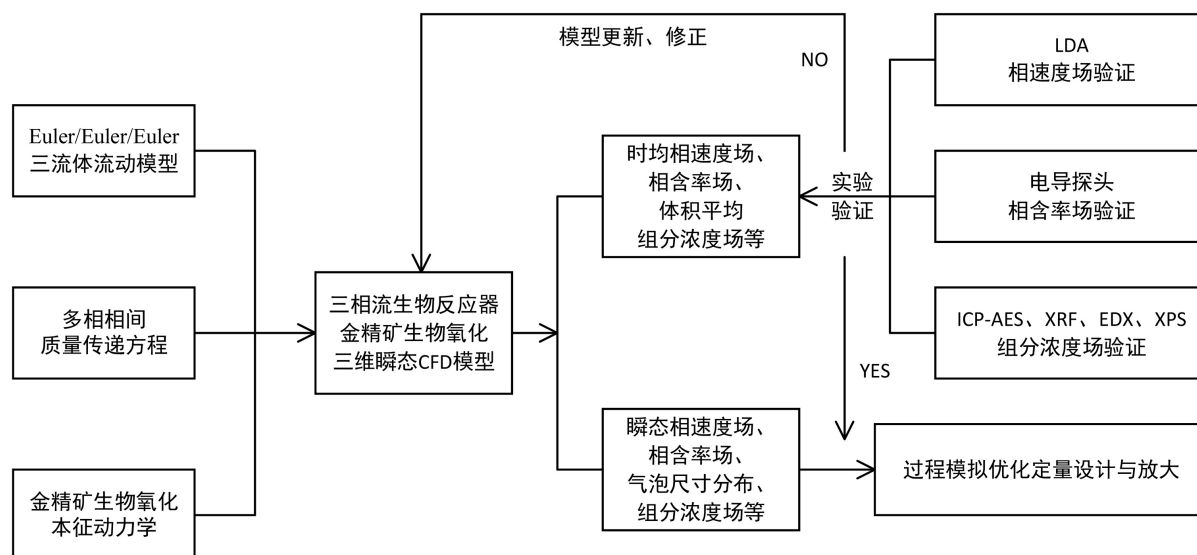


Figure 1. CFD simulation of bio-oxidation process of gold concentrate

图 1. 金精矿生物氧化过程的 CFD 模拟流程

针对单个颗粒周围的气-液双流体传质现象和复杂的流场,采用三维几何VOF(流体体积法)方法和CFD模型可模拟得到气-液两相系统的离子浓度分布图和流体速度场[52]。模拟结果表明了颗粒表面与液体本体之间离子浓度的显著梯度,这可以解释金属硫化物在含有溶解铁的液体介质中的化学和生物氧化速率之间的差异[52]。这些数据可以指导选择合适的进气速度以改善矿物颗粒溶解。

针对搅拌槽生物浸出发酵罐流体力学(功率、混合效率和颗粒应力),建立了基于粒径不变的两级Euler-Euler固-液CFD模型来表征叶轮设计[53]。通过对叶轮功率数 N_p 的计算,对50多种工况下六种径向和轴向叶轮的进行了量化,且结果表明叶轮设计的选择对保证槽内最佳固体分散、低功耗和限制剪切应力对颗粒的影响至关重要[53]。

针对金精矿生物氧化过程中气-液-固三相固体粒径、细菌的剪切应力、气含率、气泡尺寸和湍流能量耗散率,建立了基于粒径不变的三流体瞬态模型[54]。数值模拟结果显示,叶轮叶尖速度在一定范围内的增加会导致细菌氧化活性(生存力)和剪切应力的增加,当剪切应力达到一定值时细菌就会死亡[54]。同时,叶轮和分布器区域的气含率、气泡尺寸、能耗和细菌剪切应力发生显著变化,且由此模型得到的最佳操作条件可用于开发更清洁、更环保的生物氧化技术[54]。

但是这些气-液-固三相CFD模型构建过程中均假设颗粒直径大小不变。因此,建立一个基于金精矿生物氧化过程中粒径减小的三维瞬态CFD模型是今后研究的方向之一。然后,通过反复的实验验证,可以很好地反映三流体瞬态流体力学特性以及金精矿生物氧化速率随表观液速、表观气速、金精矿矿浆浓度等操作条件的变化过程。

4. 结论

在单菌株纯培养体系中,采用系统生物学方法,总结了高酸和高盐条件下浸出微生物对金精矿氧化过程的响应机制。在多菌株混合培养体系中,应用宏基因组学及宏转录组学研究了具有协同作用的微生物群落的基因序列变化、生存能力和生物氧化效应。未来可继续采用系统生物学手段量化研究单菌株和多菌株群落在极端环境下(如,强酸、高盐、高温和寒冷等)的性质,如基因转换、新途径、酶的新结构、新代谢物质及其新功能等。然后,基于这些新发现来提高单菌株的抗逆性,进一步通过高效协同作用获得在高浓度矿浆中生长和代谢能力更强的微生物群落。基于生物反应器内部气、液、固三相体系的复杂

性、封闭性及不确定性,介绍了基于各种假设条件的金精矿生物氧化的 CFD 模型。但有限的研究尚未取得比较满意的成果,CFD 模型在模拟金精矿生物氧化过程方面还有很大的进步空间,如粒径不断变小的方面。今后的研究应继续从单菌株、多菌株群落、生物反应器等多个方面进行高效优化,进而实现生物反应器内金精矿氧化效率的大幅度提高。

致谢

特别感谢国家重点研发计划(2018YFA09022)和教育部前沿科学中心天津大学的资助。

基金项目

国家重点研发计划(2018YFA09022)。

参考文献

- [1] Rawlings, D.E., Dew, D. and du Plessis, C. (2003) Biomineralization of Metal-Containing Ores and Concentrates. *Trends in Biotechnology*, **21**, 38-44. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00004-5)
- [2] Kaksonen, A.H., Mudunuru, B.M. and Hackl, R. (2014) The Role of Microorganisms in Gold Processing and Recovery—A Review. *Hydrometallurgy*, **142**, 70-83. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.11.008>
- [3] Kaksonen, A.H., Boxall, N.J., Gumulya, Y., Khaleque, H.N., Morris, C., Bohu, T., Cheng, K.Y., Usher, K.M. and Lankaniemi, A.-M. (2018) Recent Progress in Biohydrometallurgy and Microbial Characterisation. *Hydrometallurgy*, **180**, 7-25. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.06.018>
- [4] 郝福来. 生物冶金技术的发展及其在黄金行业中的应用现状[J]. *黄金*, 2019, 40(5): 55-60.
- [5] De Sousa, C.S., Hassan, S.S., Pinto, A.C., Silva, W.M., De Almeida, S.S., De Castro Soares, S., Azevedo, M.S.P., Rocha, C.S., Barh, D. and Azevedo, V. (2018) Chapter 1—Microbial Omics: Applications in Biotechnology. In: Barh, D. and Azevedo, V., Eds., *Omics Technologies and Bio-Engineering*, Academic Press, Cambridge, 3-20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00001-2>
- [6] Jerez, C.A. (2008) The Use of Genomics, Proteomics and Other OMICS Technologies for the Global Understanding of Biomining Microorganisms. *Hydrometallurgy*, **94**, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.032>
- [7] Watling, H. (2016) Microbiological Advances in Biohydrometallurgy. *Minerals*, **6**, 49. <https://doi.org/10.3390/min6020049>
- [8] Shahab, R.L., Brethauer, S., Davey, M.P., Smith, A.G., Vignolini, S., Luterbacher, J.S. and Studer, M.H. (2020) A Heterogeneous Microbial Consortium Producing Short-Chain Fatty Acids from Lignocellulose. *Science*, **369**, Article ID: 1073. <https://doi.org/10.1126/science.abb1214>
- [9] Liu, W., Jacquiod, S., Brejnrod, A., Russel, J., Burmølle, M. and Sørensen, S.J. (2019) Deciphering Links between Bacterial Interactions and Spatial Organization in Multispecies Biofilms. *The ISME Journal*, **13**, 3054-3066. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0494-9>
- [10] Natarajan, K.A. (2018) Chapter 6—Bioleaching of Copper and Uranium. In: Natarajan, K.A., Ed., *Biotechnology of Metals*, Elsevier, Amsterdam, 107-150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804022-5.00006-2>
- [11] Mahmoud, A., Cézac, P., Hoadley, A.F.A., Contamine, F. and D'Hugues, P. (2017) A Review of Sulfide Minerals Microbially Assisted Leaching in Stirred Tank Reactors. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **119**, 118-146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.015>
- [12] Zhu, J.Y., Zhang, J.X., Li, Q., Han, T., Hu, Y.H., Liu, X.D., Qin, W.Q., Chai, L.Y. and Qiu, G.Z. (2014) Bioleaching of Heavy Metals from Contaminated Alkaline Sediment by Auto- and Heterotrophic Bacteria in Stirred Tank Reactor. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, **24**, 2969-2975. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(14\)63433-6](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(14)63433-6)
- [13] Hong, J., Silva, R.A., Park, J., Lee, E., Park, J. and Kim, H. (2016) Adaptation of a Mixed Culture of Acidophiles for a Tank Biooxidation of Refractory Gold Concentrates Containing a High Concentration of Arsenic. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121**, 536-542. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.09.009>
- [14] Hu, W.B., Feng, S.S., Tong, Y.J., Zhang, H.L. and Yang, H.L. (2020) Adaptive Defensive Mechanism of Bioleaching Microorganisms under Extremely Environmental Acid Stress: Advances and Perspectives. *Biotechnology Advances*, **42**, Article ID: 107580. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107580>
- [15] González-Toril, E. and Aguilera, Á. (2019) Chapter 14 - Microbial Ecology in Extreme Acidic Environments: Use of Molecular Tools. In: Das, S. and Dash, H.R., Eds., *Microbial Diversity in the Genomic Era*, Academic Press, Cam-

- bridge, 227-238. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00014-9>
- [16] Li, Q. and Sand, W. (2017) Mechanical and Chemical Studies on EPS from *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: From Planktonic to Biofilm Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **153**, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.009>
- [17] Feng, S., Yang, H. and Wang, W. (2015) System-Level Understanding of the Potential Acid-Tolerance Components of *Acidithiobacillus thiooxidans* ZJJN-3 Under extreme Acid Stress. *Extremophiles*, **19**, 1029-1039. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0780-z>
- [18] Zhang, X., Liu, X.D., Liang, Y.L., Guo, X., Xiao, Y.H., Ma, L.Y., Miao, B., Liu, H.W., Peng, D.L., Huang, W.K., et al. (2017) Adaptive Evolution of Extreme Acidophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Potentially Driven by Horizontal Gene Transfer and Gene Loss. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**, 18. <https://doi.org/10.1128/AEM.03098-16>
- [19] Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., El Hajjami, M., Buetti-Dinh, A., Pivkin, I.V., Sand, W., Wilmes, P., Poetsch, A. and Dopson, M. (2018) Multi-omics Reveals the Lifestyle of the Acidophilic, Mineral-Oxidizing Model Species *Leptospirillum ferriphilum* (T). *Applied and Environmental Microbiology*, **84**, 17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02091-17>
- [20] Baker-Austin, C. and Dopson, M. (2007) Life in Acid: pH Homeostasis in Acidophiles. *Trends in Microbiology*, **15**, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>
- [21] Dopson, M. and Holmes, D.S. (2014) Metal Resistance in Acidophilic Microorganisms and Its Significance for Biotechnologies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 8133-8144. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5982-2>
- [22] Valdés, J., Cárdenas, J.P., Quatrini, R., Esparza, M., Osorio, H., Duarte, F., Lefimil, C., Sepulveda, R., Jedlicki, E. and Holmes, D.S. (2010) Comparative Genomics Begins to Unravel the Ecophysiology of Bioleaching. *Hydrometallurgy*, **104**, 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.03.028>
- [23] Zhang, X., Liu, X., He, Q., Dong, W., Zhang, X., Fan, F., Peng, D., Huang, W. and Yin, H. (2016) Gene Turnover Contributes to the Evolutionary Adaptation of *Acidithiobacillus caldus*: Insights from Comparative Genomics. *Frontiers in Microbiology*, **7**, Article ID: 1960. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01960>
- [24] Zhang, X., Feng, X., Tao, J.M., Ma, L.Y., Xiao, Y.H., Liang, Y.L., Liu, X.D. and Yin, H.Q. (2016) Comparative Genomics of the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus thiooxidans* Reveals Intraspecific Divergence and Niche Adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**, Article ID: 1355. <https://doi.org/10.3390/ijms17081355>
- [25] Osorio, H., Martinez, V., Nieto, P.A., Holmes, D.S. and Quatrini, R. (2008) Microbial Iron Management Mechanisms in Extremely Acidic Environments: Comparative Genomics Evidence for Diversity and Versatility. *BMC Microbiology*, **8**, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-203>
- [26] Quatrini, R., Jedlicki, E. and Holmes, D.S. (2005) Genomic Insights into the Iron Uptake Mechanisms of the Biomining Microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**, 606-614. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0233-2>
- [27] Pablo Cardenas, J., Moya, F., Covarrubias, P., Shmaryahu, A., Levican, G., Holmes, D.S. and Quatrini, R. (2012) Comparative Genomics of the Oxidative Stress Response in Bioleaching Microorganisms. *Hydrometallurgy*, **127**, 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.07.014>
- [28] Feng, S., Hou, S., Cui, Y., Tong, Y. and Yang, H. (2020) Metabolic Transcriptional Analysis on Copper Tolerance in Moderate Thermophilic Bioleaching Microorganism *Acidithiobacillus caldus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **47**, 21-33. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02247-6>
- [29] Gupta, P. and Diwan, B. (2017) Bacterial Exopolysaccharide Mediated Heavy Metal Removal: A Review on Biosynthesis, Mechanism and Remediation Strategies. *Biotechnology Reports*, **13**, 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- [30] Yin, Z., Feng, S., Tong, Y. and Yang, H. (2019) Adaptive Mechanism of *Acidithiobacillus thiooxidans* CCTCC M 2012104 under Stress during Bioleaching of Low-Grade Chalcopyrite Based on Physiological and Comparative Transcriptomic Analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **46**, 1643-1656. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02224-z>
- [31] Li, B., Lin, J., Mi, S. and Lin, J. (2010) Arsenic Resistance Operon Structure in *Leptospirillum ferriphilum* and Proteomic Response to Arsenic Stress. *Bioresource Technology*, **101**, 9811-9814. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.043>
- [32] Panyushkina, A., Matyushkina, D. and Pobeguts, O. (2020) Understanding Stress Response to High-Arsenic Gold-Bearing Sulfide Concentrate in Extremely Metal-Resistant Acidophile *Sulfobacillus thermotolerans*. *Microorganisms*, **8**, Article ID: 1076. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071076>
- [33] Sadeghieh, S.M., Ahmadi, A. and Hosseini, M.R. (2020) Effect of Water Salinity on the Bioleaching of Copper, Nickel and Cobalt from the Sulphidic Tailing of Golgohar Iron Mine, Iran. *Hydrometallurgy*, **198**, Article ID: 105503.

- <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105503>
- [34] Zammit, C.M., Mangold, S., Jonna, V.R., Mutch, L.A., Watling, H.R., Dopson, M. and Watkin, E.L.J. (2012) Bioleaching in Brackish Waters-Effect of Chloride Ions on the Acidophile Population and Proteomes of Model Species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**, 319-329. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3731-3>
- [35] Ye, M., Yan, P., Sun, S., Han, D., Xiao, X., Zheng, L., Huang, S., Chen, Y. and Zhuang, S. (2017) Bioleaching Combined Brine Leaching of Heavy Metals from Lead-Zinc Mine Tailings: Transformations during the Leaching Process. *Chemosphere*, **168**, 1115-1125. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.095>
- [36] 郝闯, 唐兵, 唐晓峰. 嗜盐微生物的工业应用研究及进展[J]. 生物资源, 2019, 41(4): 281-288.
- [37] 毛振华, 孙见行, 周文博, 王玉光, 周洪波, 程海娜. 生物冶金中耐盐浸矿微生物的研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 321-328.
- [38] Rea, S.M., McSweeney, N.J., Degens, B.P., Morris, C., Siebert, H.M. and Kaksonen, A.H. (2015) Salt-Tolerant Microorganisms Potentially Useful for Bioleaching Operations Where Fresh Water Is Scarce. *Minerals Engineering*, **75**, 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.09.011>
- [39] Rivera-Araya, J., Huynh, N.D., Kaszuba, M., Chavez, R., Schlomann, M. and Levican, G. (2020) Mechanisms of NaCl-Tolerance in Acidophilic Iron-Oxidizing Bacteria and Archaea: Comparative Genomic Predictions and Insights. *Hydrometallurgy*, **194**, Article ID: 105334. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105334>
- [40] Khaleque, H.N., Shafique, R., Kaksonen, A.H., Boxall, N.J. and Watkin, E.L.J. (2018) Quantitative Proteomics Using SWATH-MS Identifies Mechanisms of Chloride Tolerance in the Halophilic Acidophile Acidihalobacter Prosperus DSM 14174. *Research in Microbiology*, **169**, 638-648. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.07.002>
- [41] Xu, Y., Yin, H.Q., Jiang, H.D., Liang, Y.L., Guo, X., Ma, L.Y., Xiao, H.H. and Liu, X.D. (2013) Comparative Study of Nickel Resistance of Pure Culture and Co-Culture of *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum*. *Archives of Microbiology*, **195**, 637-646. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0900-z>
- [42] Akinci, G. and Guven, D.E. (2011) Bioleaching of Heavy Metals Contaminated Sediment by Pure and Mixed Cultures of *Acidithiobacillus* spp. *Desalination*, **268**, 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.10.032>
- [43] Nurmi, P., Özkaya, B., Kaksonen, A.H., Tuovinen, O.H. and Puhakka, J.A. (2009) Inhibition Kinetics of Iron Oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* in the Presence of Ferric, Nickel and Zinc Ions. *Hydrometallurgy*, **97**, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.02.003>
- [44] Li, J., Tong, L., Xia, Y., Yang, H., Sand, W., Xie, H., Lan, B., Zhong, S. and Auwalu, A. (2020) Microbial Synergy and Stoichiometry in Heap Biooxidation of Low-Grade Porphyry Arsenic-Bearing Gold Ore. *Extremophiles*, **24**, 355-364. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01160-6>
- [45] Zheng, X.C. and Li, D.W. (2016) Synergy between *Rhizobium phaseoli* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the Bioleaching Process of Copper. *Biomed Research International*, **2016**, Article ID: 9384767. <https://doi.org/10.1155/2016/9384767>
- [46] Ulloa, R., Moya-Beltran, A., Rojas-Villalobos, C., Nunez, H., Chiacchiarini, P., Donati, E., Giaveno, A. and Quatrini, R. (2019) Domestication of Local Microbial Consortia for Efficient Recovery of Gold Through Top-Down Selection in Airlift Bioreactors. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00060>
- [47] Ma, L., Wang, H., Wu, J., Wang, Y., Zhang, D. and Liu, X. (2019) Metatranscriptomics Reveals Microbial Adaptation and Resistance to Extreme Environment Coupling with Bioleaching Performance. *Bioresource Technology*, **280**, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.117>
- [48] Jiang, H.D., Liang, Y.L., Yin, H.Q., Xiao, Y.H., Guo, X., Xu, Y., Hu, Q., Liu, H.W. and Liu, X.D. (2015) Effects of Arsenite Resistance on the Growth and Functional Gene Expression of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in Pure Culture and Coculture. *Biomed Research International*, **2015**, Article ID: 203197. <https://doi.org/10.1155/2015/203197>
- [49] Li, X., Wang, H., Feng, X., Chen, J., Mao, Z., Li, G. and Yang, C. (2019) Progresses in Measurement Technologies of Heterogeneous Characteristics in Multiphase Reactors. *Chemical Industry and Engineering Progress*, **38**, 45-71.
- [50] Bitog, J.P., Lee, I.B., Lee, C.G., Kim, K.S., Hwang, H.S., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K.S. and Mostafa, E. (2011) Application of Computational Fluid Dynamics for Modeling and Designing Photobioreactors for Microalgae Production: A Review. *Computers and Electronics in Agriculture*, **76**, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.01.015>
- [51] Duan, X., Feng, X., Peng, C., Yang, C. and Mao, Z. (2020) Numerical Simulation of Micro-Mixing in Gas-Liquid and Solid-Liquid Stirred Tanks with the Coupled CFD-E-Model. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **28**, 2235-2247. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.06.016>
- [52] Mousavi, S.M., Jafari, A., Chegini, S. and Turunen, I. (2009) CFD Simulation of Mass Transfer and Flow Behaviour around a Single Particle in Bioleaching Process. *Process Biochemistry*, **44**, 696-703. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.016>

- [53] Cheron, J., Loubiere, C., Delaunay, S., Guezennec, A.-G. and Olmos, E. (2020) CFD Numerical Simulation of Particle Suspension and Hydromechanical Stress in Various Designs of Multi-Stage Bioleaching Reactors. *Hydrometallurgy*, **197**, Article ID: 105490. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105490>
- [54] Zheng, C., Huang, Y., Guo, J., Cai, R., Zheng, H., Lin, C. and Chen, Q. (2018) Investigation of Cleaner Sulfide Mineral Oxidation Technology: Simulation and Evaluation of Stirred Bioreactors for Gold-Bioleaching Process. *Journal of Cleaner Production*, **192**, 364-375. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.04.172>