

黄孢原毛平革菌最佳生物转化含碳物质的参数评估

Grace Ofori-Sarpong^{1,2}, Kwadwo Osseo-Asare^{2,3}, Richard Osei^{1,*}, Richard Kwasi Amankwah¹

1 加纳 塔尔夸 矿业技术大学矿物工程系

2 美国 宾夕法尼亚州 宾夕法尼亚州立大学能源与矿产工程系

3 美国 宾夕法尼亚州 宾夕法尼亚州立大学材料科学与工程系

摘要：由于含碳物质（CM）的存在，难浸含碳金矿石在金氰化过程中面临挑战，这些物质会预浸溶解的金，从而导致回收率降低。在一项正在进行的研究中，这种真菌黄孢原毛平革菌已被用于使 CM 失活，并降低其对金氰菊酯的预处理能力。据报道，金孢假单胞菌通过表面氧化对 CM 进行生物转化，这会破坏吸附所需的连续石墨结构，并改变适合吸附金氰化物的孔。目前的研究重点是使用无烟煤作为 CM 的替代品，并建立真菌处理参数，以最大程度地减少无烟煤级 CM 的预抢劫。结果表明，黄孢假单胞菌可以在多种生长介质中存活，并具有在宽时间、纸浆密度、温度、pH 和搅拌水平范围内使无烟煤失活的能力。在 pH4 和 37℃ 下，5-7 天的处理时间是最佳条件。固定培养和摇动培养的最佳纸浆密度分别为 60% 和 25%。

关键词：真菌；生物转化；孵化参数；碳质；氰化金吸附；劫金

Assessing the Parameters for Optimum Biotransformation of Carbonaceous Matter by *Phanerochaete chrysosporium*

Grace Ofori-Sarpong^{1,2}, Kwadwo Osseo-Asare^{2,3}, Richard Osei^{1,*}, Richard Kwasi Amankwah¹

1. Department of Minerals Engineering, University of Mines and Technology, Tarkwa, Ghana

2. Department of Energy and Mineral Engineering, Penn State University, Pennsylvania, USA

3. Department of Materials Science and Engineering, Penn State University, Pennsylvania, USA

Abstract: Refractory carbonaceous gold ores pose challenges during cyanidation of gold due to the presence of carbonaceous matter (CM) which preg-robs dissolved gold, and this results in a decreased recovery. In an on-going study, the fungus, *Phanerochaete chrysosporium* has been used to deactivate CM and decrease its ability to preg-rob aurocyanide. *P. chrysosporium* has been reported to biotransform CM by surface oxidation, which leads to disruption of the continuous graphitic structure necessary for adsorption, and alteration of the pores suitable for aurocyanide adsorption. The present study focused on using anthracite coal as surrogate for CM, and establishing fungal-treatment parameters that bring about maximum decrease in preg-robbing by the anthracite-grade CM. The results indicate that *P. chrysosporium* can survive in several growth media, and possesses the ability to deactivate anthracite in a wide range of time, pulp density, temperature, pH, and level of agitation. A processing time of 5-7 days at pH 4 and 37°C gave the best conditions. The best pulp densities for stationary and shake culturing respectively were 60% and 25%.

Keywords: Fungi; Biotransformation; Incubation parameters; Carbonaceous matter; Aurocyanide adsorption; Preg-Robbing

1. 引言

难处理含碳金矿石是指含碳物质（CM）的矿石，在氰化过程中，这些物质会吸附溶解的金，从而减少金的提取。这种被称为“预抢劫”的效应，在从难熔含碳金矿石中提取金时，提出了一个严重且具有挑战性的问题，已经研究了多种技术来使 CM 失活并防止这种金属损失。这些技术包括焙烧、使用有机试剂的化学处理和微生物

预处理^[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]。

1.1. 含碳物质的微生物预处理

由于相对较低的操作温度以及微生物可以自我恢复以回收反应所需的试剂，微生物预处理工艺由于成本和环境问题而作为潜在的替代方法越来越重要。许多细菌和真菌已被测试过金矿石中不同级别的 CM 的失活情况，有报告称，总体黄金提取量有所增加。

所使用的微生物包括细菌刚毛链霉菌 (*Streptomyces setonii*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.)、无色杆菌属 (*Achromobacter* spp.) 和节杆菌属 (*Arthrobacter* spp.) 以及红球菌属 (*Rhodococcus* spp.)，以及真菌变色菌 (*Trametes versicolor*)、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、黑曲霉 (*Aspergillus bruneio uniseriatus*) 和柠檬青霉菌 (*Pen*)。

在对用作 CM 替代品的褐煤、烟煤和无烟煤的生物降解研究中, Amankwah 和 Yen^[4] 观察到, 当他们使用 *S.setonii* 时, 褐煤和烟煤的生物降解比无烟煤更广泛。在 5mg/L Au 的溶液中, 生物处理使烟煤、褐煤和无烟煤的金吸附量分别从平均约 19% 降至 0.3%、22% 至 9% 和 45% 至 20%。Yen 等人^[14] 和 Afidenyo^[15] 也报道了当他们使用白腐菌 *Trametes versicolor* 时, 烟煤的预抢效果从 40.3% 降低到 8.3%, 无烟煤从 99.5 降低到 27.7。

由于无烟煤级 CM 在难处理金矿石中占 CM 组分的 50% 以上, 因此人们对钝化无烟煤级 CM 越来越感兴趣^[16-22]。此外, 由于无烟煤的成熟度和石墨结构发达, 无烟煤级 CM 吸附金的能力远高于烟煤和褐煤^[4, 11, 12, 15, 23-26]。因此, 鉴定能使无烟煤失活并显著减少其金吸附的微生物将对含碳金矿石的处理大有裨益。

Ofori Sarpong 等人^[11] 研究了不同等级煤与氰化金溶液的相互作用, 并观察到, 在所有煤中, 无烟煤与溶解金的相互作用最强, 约为褐煤和烟煤的 4 倍。然而, 在用真菌黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 对煤进行生物处理后, 无烟煤的吸附量最大。作者随后使用表征技术来阐明生物转化的机制^[12]。

1.2. 金孢子虫对无烟煤级 CM 的生物转化性质

已经对碳质材料的生物粒形成性质进行了几项研究。Ofori Sarpong 等人^[12] 在一篇关于阐明机制以更好地理解黄孢假单胞菌对无烟煤的生物转化性质的论文中, 使用各种技术对无烟煤进行了接收和处理。通过 BET 分析测量表面积、孔体积和尺寸, 通过傅里叶变换红外 (FT-IR) 和 X 射线吸收近边缘结构 (XANES) 光谱测量氧基和脂肪族化合物的存在, 观察了无烟煤表面特性的变化。使用 Micromeritics ASAP 2000 多点 BET 分析仪进行 BET 和孔径分析, 并通过高压氮吸附分析样品的孔径。FT-IR 分析在 Bruker IFS 66/S FT-IR 光谱仪中进行, 而 XANES 分析使用纽约布鲁克黑文国家实验室的国家同步加速器光源进行。^[27, 28] 共聚焦 WITec XY 拉曼光谱仪用于半定量分析金孢假单胞菌真菌处理后碳质样品石墨性质的变化。在对其结果进行详细分析后, Ofori Sarpong 等人^[12] 得出结论, 金孢子虫以三种主要方式对无烟煤进行生物转化。在一种方式中, 由于引入氧基团而导致碳损失和表面氧化, 这会破坏连续的石墨结构, 从而降低吸附所需的活性位点。Liu 等人^[29] 研究了黄孢假单胞菌对活性炭降解和脱孕能力的影响, 证实了这一点。第二种途径是通过真菌菌丝堵塞孔来减少表面积,

从而减少金对吸附位点的可及性。第三, 由于真菌活性对石墨平面的切割, 微孔可能会扩大, 这将减少金的吸附, 这优先发生在碳的微孔中^[30]。

1.3. 当前研究

本文进一步探讨了金孢子虫与无烟煤的相互作用及其对金氰化物吸附的影响, 以确定其对 pH、纸浆密度、温度和搅拌等参数变化的响应。

2. 实验研究

2.1 材料

粒径小于 850 μ m 的无烟煤样品由 EMS 能源研究所的煤炭库提供, 而黄孢假单胞菌 ME446 的真菌孢子则从宾夕法尼亚州立大学生物化学和分子生物学系的 Ming Tien 实验室获得。真菌的生长培养基, 小米和麦麸 (MWB), 从宾夕法尼亚州州立学院的自然食品库获得, 并在制备培养物时使用双蒸馏 (dd) H₂O。高纯度标准提供标准金溶液 (50 μ g/ml, 0.1% 氢氧化钠和 0.05% 氰化钠)。试剂级磷酸钾、琥珀酸和氢氧化钠从加纳矿业大学矿物工程实验室获得。

2.2. 无烟煤的培养基制备和真菌培养

按照 Ofori Sarpong 等人的详细描述, 进行了无烟煤的培养基制备、培养和收获以及金吸附(预吸附)试验^[11]。将无烟煤粉碎并筛分至所有通过 250 μ m, 并在不同条件下(包括加工时间、纸浆密度、温度、pH 值、杀菌程度和搅拌)与黄孢杆菌在小米和麦麸 (MWB) 培养基中孵育。固体样品和培养基在 121 $^{\circ}$ C 的高压釜中灭菌 30 分钟, 然后接种 1 mL 黄孢假单胞菌孢子悬浮液。在具有温度控制的新不伦瑞克 25 系列培养箱摇床上以 150rpm 进行搅拌, 并分别用琥珀酸和磷酸钾将 pH 缓冲在 4 和 6。

2.3. 真菌处理的无烟煤对黄金的掠夺

将生物改性无烟煤、对照无烟煤和收到的无烟煤的三份样品与 250mL 5mg/L 金溶液接触, 并以 150rpm 搅拌 24 小时。在接触时间结束时, 过滤残余溶液并使用 Perkin Elmer Optima 5300 电感耦合等离子体原子发射光谱仪 (ICP-AES) 测定滤液中的金。根据用于吸附的含碳材料的量计算吸附试验前后溶液中金的浓度之间的差异。

2.4. 数据分析

碳 (PEC) 的预抢效应表明了真菌生物转化对碳吸附金的程度^[11], 使用方程 1 计算。IC 和 FC 分别是溶液中金的初始和最终浓度。WC 是吸附试验中使用的碳材料的质量 (g), 250 是使用的金溶液的体积 (mL), 197 是金的摩尔质量。

$$PEC \left(\text{in } \frac{\mu\text{mol of gold}}{\text{g of carbon}} \right) = 250 \text{ mL} \times \left(\frac{(\text{IC} - \text{FC}) \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}}{197 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \right) \left(\frac{1}{\text{WC g}} \right) \quad (1)$$

与接收到的无烟煤 (AAR) 吸附的量 (μ mol/g) 相比, 预吸 (PRP) 的百分比减少如公式 2 所示。所有培养实验分三次进行, 图中报告的数据为 3 个样品的平均值,

误差条表示与平均值的百分比偏差。

$$PRP(\%) = \frac{PEC}{AAR} \times 100\% \quad (2)$$

3. 结果和讨论

本文旨在研究无烟煤真菌处理过程中使用的不同条件是如何降低含碳物质 (CM) 的预吸能力的。在继续改变孵育参数之前, 有必要确定一个事实, 即 CM 抢孕能力的降低主要是由于黄孢原毛平革菌对 CM 的表面生物转化。

真菌处理后 CM 的预吸能力降低如图 1 所示。真菌处理在 37°C 和 pH 6.5 的条件下, 在 60% 固体的条件下进行了 14 天。从初始平均吸附值 4.5 μmol/g (标准偏差 0.26) 开始, 处理 14 天后, 金吸附量降至 0.25 μmol/g, 标准偏差 0.05, 表示减少约 95%。通过对照实验, 研究了小米和麦麸 (MWB) 培养基对金孢子虫对 CM 的生物转化作用的可能贡献。

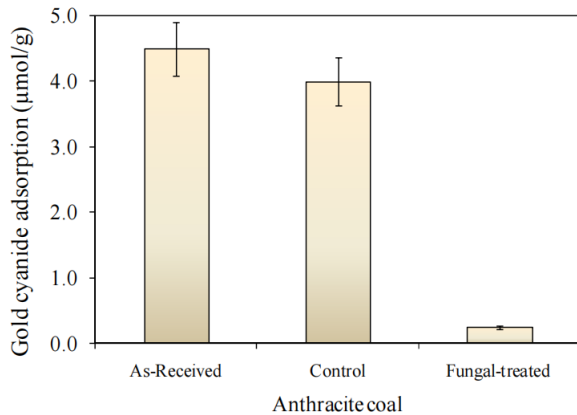


图 1: 在 37°C 和 pH 6.5 条件下, 在 60% 固体条件下进行真菌处理 14 天后, CM 预浸的减少。对于吸附试验, 将 1 g 无烟煤与 250 mL 5 μg/mL 金溶液接触, 并以 150 rpm 搅拌 24 小时。

如图 1 所示, 对照实验导致预浸料抢劫减少约 20%, 平均值为 4.0 μmol/g, 标准偏差为 0.28。在其他参数保持不变的情况下, 设置了更多的对照实验, 以监测温度、pH 和纸浆密度对碳吸附金的影响。对于温度, 将 25°C 和 37°C 的温育进行比较, 而 pH 值为 4 的情况下判断为 6.5。在这两种情况下, 没有发现金吸附的显著差异。25°C 时, 金吸附量减少约 18%, 而 37°C 时为 20%。在 pH 值为 4 时, 与 pH 值为 6.5 时的 20% 相比, 金吸附量减少了约 17%。纸浆密度对金吸附的影响的对照实验得出了类似的结果。

由于介质本身的原因, 孕前吸收率略有下降, 这可能是由于细悬浮颗粒堵塞了碳表面的一些孔隙^[11, 12]。在真菌的存在下, 与单独培养基相比, 金吸附量减少了约 15 倍。这清楚地表明, 金孢假单胞菌有可能降低难处理金矿石中 CM 的预浸性质。

3.1. 生物转化过程中纸浆密度对 CM 掠夺猎物的影

响

纸浆密度对金孢子虫生物转化 CM 的影响如图 2 所示。在纸浆密度为 25% 固体的情况下, 静置培养 14 天后, 浓度为 5 mg/L Au 的溶液中的预浸率降低了 88%。

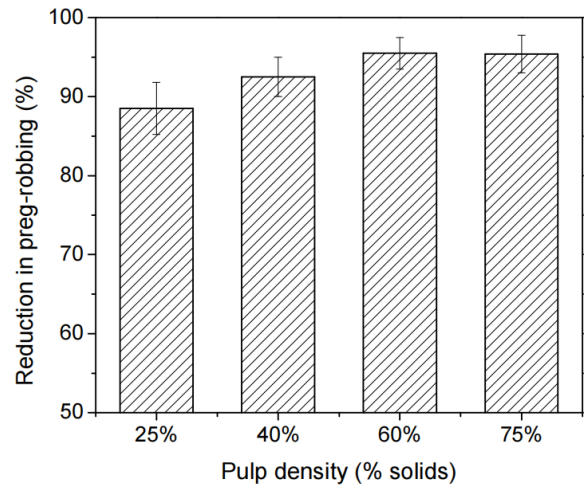


图 2. 生物转化过程中纸浆密度对 CM 预处理的影响。在 37°C、pH 6.5 和 14 天的固定条件下进行生物转化。

通过使用相同的初始真菌剂量以 40%、60% 和 75% 的牙髓密度进行固定培养, 妊娠期抢劫的平均百分比分别为 92.5%、95.5% 和 95%。从图 2 可以看出, 60% 和 75% 的孵育纸浆密度导致了处理过的 CM 的妊娠期抢劫的最高减少。纸浆密度越高, 可用于真菌接触和生长的固体表面越大, 因此在 60% 和 75% 纸浆密度中观察到的生物转化率高于 25% 和 40% 纸浆密度, 后者几乎浸没在水中。在 60% 和 75% 的固体密度下, 润湿培养基和样品, 但不形成浆料。潮湿基质的不连续性允许形成气穴, 提供生长所需的氧气, 这有利于金孢菌的活性, 金孢菌是一种需氧菌^[31]。

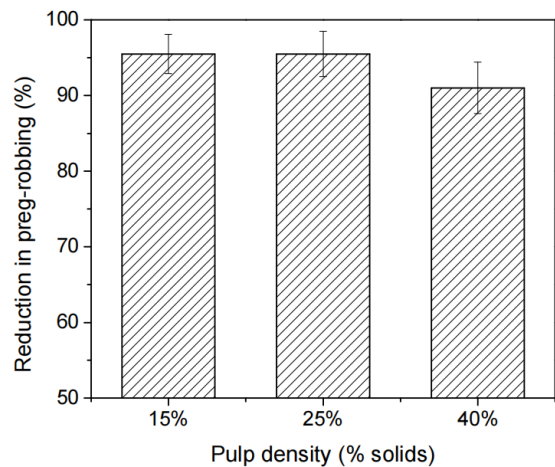


图 3. 生物转化过程中纸浆密度对 CM 预处理的影响。在 37°C、pH 6.5 和 14 天的摇瓶培养中进行生物转化。

对于摇瓶培养, 如图 3 所示, 使用了较低的纸浆密度, 在 15% 和 25% 固体浓度下培养的材料平均金吸附量减少了 95%, 而在 40% 固体浓度下处理的样品的平均

金吸收量减少了 91%。在较低的纸浆密度下, 当搅拌样品时, 氧气向浆料中的扩散得到改善, 从而提供真菌生长和活性所需的溶解氧。此外, 纸浆密度越低, 氧化剂与被处理材料的比率越高。然而, 由于每单位时间可处理的材料质量更高, 25% 的纸浆密度选择在 15% 以上进行进一步研究。

由于在 14 天的真菌处理后, 在 60% 和 75% 的纸浆密度下实现的金吸附量的减少同样良好, 因此进行了进一步的研究, 以监测真菌处理时间 (图 4) 对孕前抢劫减少的影响。培养 1 天后, 在 60% 固体培养的样品的金吸附能力降低了 78%, 在 75% 固体培养的试样的金吸附性能降低了 68%。在第 5 天之后, 两个样本的妊娠期抢劫减少了 90% 以上, 到第 7 天减少了 95% 以上。从图 4 可以推断, 5-7 天的处理时间适合该过程。

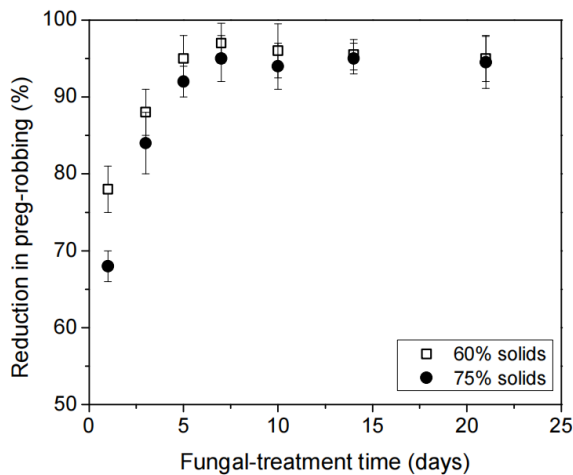


图 4. 真菌处理时间和牙髓密度对 CM 预处理的影响。在 37°C 和 pH 6.5 的固定培养下, 在 60% 和 75% 固体下进行生物转化。

由于 75% 固体物质中水的存在减少, 真菌生长并形成覆盖无烟煤的基质, 使得生物质和样品之间的后处理分离更加困难。因此, 基于在处理材料的培养后收获期间减少的材料损失, 60% 的纸浆密度可能是优选的。

固定培养和摇动培养之间的选择将取决于可用于处理的材料体积与可用于收获处理材料的时间和技术之间的平衡。虽然每单位时间内, 通过固定培养可以处理的材料比摇动培养多得多, 但是从摇动培养中洗涤处理过的材料不那么麻烦, 并且可以在相对较短的时间内完成, 材料损失比在固定培养中少得多。

3.2. 生物转化过程中的温度对 CM 捕食的影响

图 5 显示了 pH 为 6.5 和 60% (作为时间的函数) 的固定培养的培养温度对 CM 预浸的影响。在 37°C 的处理温度下, 金吸附能力在第 1 天后下降了 80%, 在第 7 天后进一步下降了约 96%。在这一天之后, 随着培养时间的增加, 金吸附能力保持不变, 直到第 21 天。在 25°C 下孵育的样品遵循类似的趋势, 但降低速度要慢得多, 因为在孵育 1 天后, 金吸附能力降低了 66%。21 天

后, 吸附率进一步降低至 96% 的最终值。

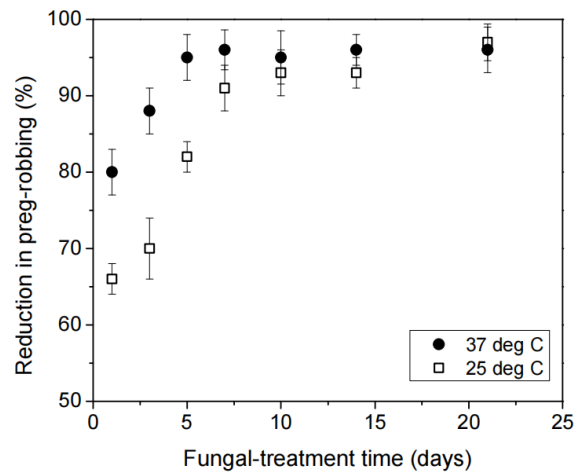


图 5. 真菌处理时间和温度对 CM 抢孕的影响。在 25°C 和 37°C 下, 在 60% 固体和 pH 6.5 的固定培养下进行生物转化。

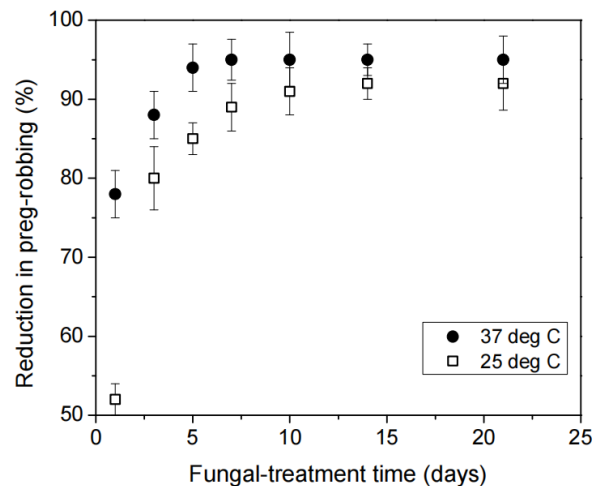


图 6. 真菌处理时间和温度对 CM 预处理的影响。在 25°C 和 37°C 下, 在 25% 固体和 pH 6.5 的摇床培养下进行生物转化。

图 6 说明了在 25% 固体和 pH 6.5 条件下进行摇瓶培养时, 温度对处理时间长达 21 天的影响。在 37°C 条件下, 第 1 天之后, 金吸附量下降了 78%, 第 7 天之后, 黄金吸附量下降 95%。该趋势与固定培养观察到的趋势相似 (图 5)。对于在 25°C 下孵育, 金吸附在第 1 天后减半, 21 天后减少 92%。

从图 5 和图 6 中可以清楚地看出, 在 37°C 下孵育比在 25°C 下固定培养和摇动培养, CM 的预抢能力降低更高。5 至 7 天的处理时间也更有利。尽管黄孢假单胞菌的最佳生长温度为 37°C^[31], 但在 25°C 下的研究对于评估环境温度下的妊娠行为变化至关重要。Kirk 和 Farrel^[32]所做的工作表明, 37°C 为微生物提供了生长和产生氧化酶的合适温度。因此, 这可以解释真菌在 37°C 下的性能优于 25°C。因此, 挑战在于在环境温度下解决较低的预浸料剥离减少与较高预浸料剥离减少的额外加

热成本之间。然而, 金孢假单胞菌的催化作用会产生热量, 使反应维持在环境温度以上。

3.3. 生物转化过程中 pH 值对 CM 捕食的影响

在 pH4 和 6.5 条件下, 研究了 pH 值对黄孢假单胞菌生物转化 CM 的影响。在 25% 固体和 37℃ 条件下, 摇瓶培养 7 天。图 7 显示, 孵育一天后, pH 值为 4 时, 约减少 85%, 而在接近中性的 pH 值下, 约减少 78%。到第 7 天, 出现了近乎平等的现象, 因为在 pH 值 4 和 6.5 时, 吸附量分别减少了 97% 和 95%。

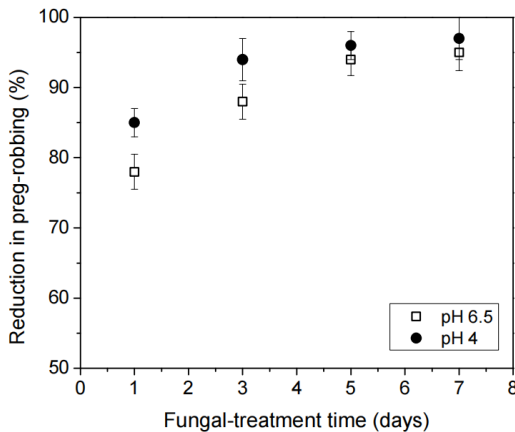


图 7. 真菌处理时间和培养 pH 对 CM 抢孕的影响。在 37℃ 和 25% 固体的摇床培养下, 在 pH 4 和 6.5 下进行生物转化。

Tien 和 Kirk (33) 的研究表明, 真菌的生长和分泌氧化酶的能力在 pH 4 左右达到峰值, 这可能是在该 pH 下与接近中性条件相比, 金吸附量更高的原因。新鲜培养基的自然 pH 值约为 6.5, 对于不控制 pH 值的试验, 观察到 pH 值随时间降低至 4 至 5.5 之间。这是因为黄孢假单胞菌倾向于通过产生有机酸来缓冲自身, 如草酸 ($(\text{COOH})_2$) 丙二酸 ($\text{CH}_2(\text{COOH})_2$) 和酒石酸 ($\text{CH}_3\text{CHO}_2(\text{COO})_2$), 使其能够在接近其最佳 pH 值的条件下发挥作用^[33, 34]。在两个 pH 值下, 发现 5-7 天的培养时间是合适的。

3.4 生物转化过程中灭菌对 CM 捕食的影响

真菌接种前对培养基和基质进行消毒的效果如图 8 所示。培养 3 天后, 与记录 92% 的无菌系统相比, 非无菌样品上的吸附减少了 90%。非不育组第 5 天和第 7 天的吸收减少率为 97%, 而在类似时期, 不育组的平均吸收率为 96%。从平均值来看, 非不育株似乎比不育株稍有优势。

灭菌的主要目的是去除自然存在于待处理介质和 / 或基质中的常驻微生物。因此, 在未灭菌的培养物中, 除了专门用于接种的微生物外, 还会有其他微生物。因此, 看似微小的优势可能是由于培养基和 / 或基质中的天然微生物对金孢假单胞菌的生物转化作用的积极贡献。这也可能是金孢假单胞菌对其他可能的天然微生物的竞争性和拮抗性生存反应过度产生氧化酶的结果^[35]。

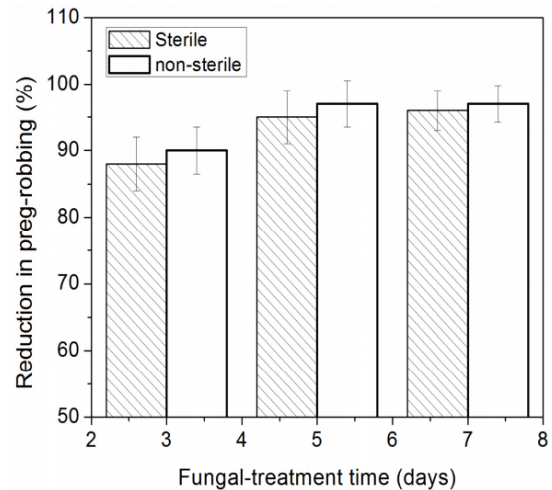


图 8. 真菌处理时间和灭菌对 CM 抢孕的影响。在 37℃ 和 60% 固体的固定培养下, 在 pH 6.5 下进行生物转化。

3.5. 生物转化过程中生长培养基对 CM 捕食的影响

图 9 描述了生长培养基 (MWB) 对金孢假单胞菌生物转化作用的贡献。条形图的下部表示仅由培养基引起的总生物转化的百分比, 而上部显示了当培养基与黄孢假单胞菌一起培养时 CM 的预分解能力的额外降低。在真菌的存在下, 与单独培养基相比, 金吸附量减少了 4-8 倍。由于介质本身的原因, 预浸料剥离率略有下降, 这可能是由于细悬浮颗粒堵塞了碳质材料上的一些孔隙^[11]。

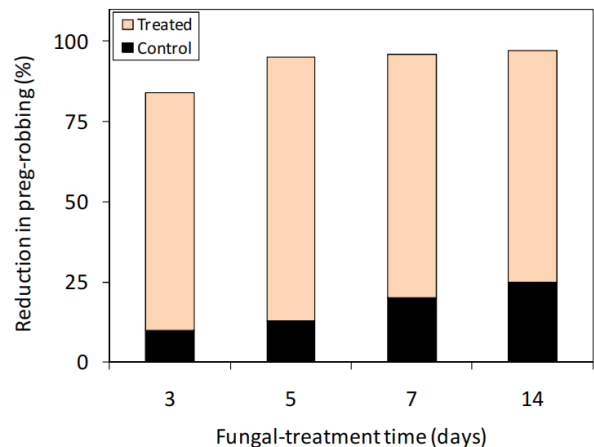


图 9. MWB 和真菌在 CM 生物转化中的联合作用。在 37℃ 和 60% 固体的固定培养下, 在 pH 6.5 下进行生物转化。

4. 结论

白腐担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 被用于减少无烟煤对金的吸附, 无烟煤作为难处理金矿石中含碳物质的替代品。真菌处理导致在小米和麦麸的混合物中 CM 的金吸附能力降低 90% 以上 (MWB)。

发现金孢假单胞菌对真菌的改性在广泛的时间、纸浆密度、温度、pH 值、杀菌程度和搅拌水平范围内进行。与真菌接触后, CM 的金吸附能力下降约 90-97%, 这取

决于培养条件。发现 pH 值为 4 且温度为 37℃可增强生物转化。固定培养允许使用更高的纸浆密度, 固定和摇动培养的最佳纸浆密度分别为 60% 和 25% 固体。总之, 参数的严格选择将取决于需要处理的材料、可用于处理的技术和孵化后收获。其他考虑因素是容量 / 吨位、试剂额外成本和处理时间之间的平衡。当进行成本分析时, 可以做出坚定的决定。

利益冲突

作者声明没有利益冲突。

参考文献

[1] Abotsi, G. M. K., Osseo-Asare, K., (1987), "Surface chemistry of carbonaceous gold ores. II. Effects of organic additives on gold adsorption from cyanide solution", *International Journal of Mineral Processing* 21, 225 - 239.

[2] Adams, M. D. Burger, A. M., (1998), "Characterization and blinding of carbonaceous preg-robbars in gold ores", *Minerals Engineering* 11, 919-927.

[3] Afenya, P. M., (1991), "Treatment of carbonaceous refractory gold ores", *Minerals Engineering* 4, 1043-1055.

[4] Amankwah, R. K., Yen, W. T., (2006), Effect of carbonaceous characteristics on biodegradation and preg-robbing behaviour, in: *Proceedings of the 23rd International Mineral Processing Congress*, Promed Advertising Limited, Istanbul, 1445-1451.

[5] Arriagada, F. J., Osseo-Asare, K., (1984), "Gold extraction from refractory ores: roasting behavior of pyrite and arsenopyrite", in: *Precious Metals: Mining, Extraction and Processing*, The Metallurgical Society of AIME, Warrendale, PA, 367-385.

[6] Brierley, J. A., Kulpa, C. F., (1993), "Biometallurgical treatment of precious metal ores having refractory carbon content", U. S. Patent, 5,244,493.

[7] Hutchins, S. E., Brierley, J. A., Brierley, C. L., (1988), "Microbial pretreatment of refractory sulfide and carbonaceous ores improves the economics of gold recovery", *Mining Engineering* 40, 249-254.

[8] Kohr, W. J., (1994), "Method of recovering gold and other precious metals from carbonaceous ores", US Patent, 5,338,338.

[9] Portier, R. J., (1991), "Biohydrometallurgical processing of ores, and microorganisms therefor, US Patent, 5,021,088.

[10] Rees, K. L., Van Deventer, J. S. J., (2000), "The mechanism of enhanced gold extraction from ores in the presence of activated carbon", *Hydrometallurgy* 58, 151-167.

[11] Ofori-Sarpong, G., Tien, M., Osseo-Asare, K.,

(2010), "Myco-hydrometallurgy:

Coal model for potential reduction of preg-robbing capacity of carbonaceous gold ores using the fungus, *Phanerochaete chrysosporium*", *Hydrometallurgy* 102, 66 - 72.

[12] Ofori-Sarpong, G., Amankwah, R. K. and Osseo-Asare, K. (2013), "Reduction of Preg-robbing by Biomodified Carbonaceous Matter - A Proposed Mechanism", *Minerals Engineering*, Vol. 42, pp. 29 - 35.

[13] Amankwah, R. K., Yen, W. T. Ramsay, J., (2005), "A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores", *Minerals Engineering* 18, 103-108.

[14] Yen, W. T., Amankwah, R. K., Choi, Y., (2008), Microbial pre-treatment of double refractory gold ores, in: *Proceedings of the Sixth International Symposium, Hydrometallurgy 2008*, Phoenix, USA. SME, Littleton, CO, 506-510.

[15] Afidenyo, J. K., (2008), Microbial pre-treatment of double refractory gold ores. MSc Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.

[16] Hausen, D. M., Bucknam, C. H., (1985), Study of preg robbing in the cyanidation of carbonaceous gold ores from Carlin, Nevada, in: *Proceedings of the Second International Congress on Applied Mineralogy, AIME*, Warrendale, PA, 833-856.

[17] Osseo-Asare, K., Afenya, P. M., Abotsi, G. M. K., (1984), Carbonaceous Matter in Gold Ores; Isolation, Characterization and Adsorption Behavior in Aurocyanide Solution, in: *Precious Metals: Mining, Extraction and Processing*, The Metallurgical Society of AIME, Warrendale, PA, 125-144.

[18] Pyke, B. L., Johnston, R. F., Brooks, P., (1999), "The characterisation and behaviour of carbonaceous material in a refractory gold bearing ore", *Minerals Engineering* 12, 851-862.

[19] Schmitz, P. A., Duyvesteyn, S., Johnson, W. P., Enloe, L., McMullen, J., (2001), "Adsorption of aurocyanide complexes onto carbonaceous matter from preg-robbing Goldstrike ore", *Hydrometallurgy* 61, 121 - 135.

[20] Sibrell, P. L., Wan, R. Y., Miller, J. D., (1990), Spectroscopic analysis of passivation reactions for carbonaceous matter from Carlin trend ores, in: *Proceedings of the Gold '90 Symposium*, SME, Inc., Littleton, CO, 355-363.

[21] Stenebraten, J. F., Johnson, W. P., McMullen, J., (2000), "Characterization of Goldstrike Ore Carbonaceous Material Part 2", *Minerals and Metallurgical Processing* 17, 7-15.

- [22] Vaughan, J. P. Kyin, A., (2004), “Refractory gold ores in Archaean greenstones, Western Australia: mineralogy, gold paragenesis, metallurgical characterization and classification” , *Mineralogical Magazine* 68, 255–277.
- [23] Ibrado, A. S., Fuerstenau, D. W., (1992), “Effect of the structure of carbon adsorbents on the adsorption of gold cyanide” , *Hydrometallurgy* 30, 243–256.
- [24] Ibrado, A. S., Fuerstenau, D. W., (1995). *Infrared and X-ray Photoelectron Spectroscopy Studies on the Adsorption of Gold Cyanide on Activated Carbon*. *Minerals Engineering* 8, 441–458.
- [25] Jones, W. G., Klauber, C., Linge, H. G., (1989). *Fundamental aspects of gold cyanide adsorption on activated carbon*, Chapter 32, in: Bhappu, R. B., Handen, R. J. (Eds.), *Gold Forum on Technology and Practices – ‘World Gold ‘89’*, SME, Littleton, Co, 278 – 281.
- [26] Klauber, C., (1991), “X-ray photoelectron spectroscopic study of the adsorption mechanism of aurocyanide onto activated carbon” , *Langmuir* 7, 2153–2159.
- [27] Van Vuuren, C. P. J. Snyman, C. P. Boshoff A. J., (2000), ” *Gold losses from cyanide solutions part II: The influence of the carbonaceous materials present in the shale material*” , *Minerals Engineering* 13, 1177–1181.
- [28] Szulczewski, M., Helmke, P., Bleam, W., (2001), “XANES spectroscopy studies of Cr(VI) reduction by thiols in organosulfur compounds and humic substances” , *Environ. Sci. Technol.* 35, 1134–1141.
- [29] Seiter, J. M., Staats–Borda, K. E., Ginder–Vogel, M. and Sparks D. L., (2008), “XANES Spectroscopic Analysis of Phosphorus Speciation in Alum–Amended Poultry Litter” , *Journal of Environmental Quality* 37, 477–485.
- [30] Liu, Q., Yang, H–y., Tong, L–l. (2014), *Influence of Phanerochaete chrysosporium degradation and pre-robbing capacity of activated carbon*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 24, 1905–1911.
- [31] McDougall, G. J., Hancock, R. D., (1981), “Gold complexes and activated carbon – a literature review” , *Gold Bulletin* 14, 138–153.
- [32] Tien, M., Kirk, T. K., (1988), “Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium” , *Methods in Enzymology* 161, 238–249.
- [33] Kirk, T. K., Farrell, R. L., (1987), “Enzymatic combustion” : *The microbial degradation of lignin*, *Annual Review of Microbiology* 41, 465 – 505.
- [34] Tien, M., Kirk, T. K., (1984), *Lignin–degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂–requiring oxygenase*, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A.*, 81, 2280.
- [35] Fakoussa, R. M., Hofrichter, M., (1999), “*Biotechnology and microbiology of coal degradation*” , *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 25 – 40.
- [36] Madigan, M. T., Martinko, J. M., (2006). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed., Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.