

土壤重金属生物淋滤修复过程中廉价碳源的筛选研究

任婉侠, 李培军, 耿涌, 巩宗强

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:在室内模拟实验条件下,重点研究了一步和二步生物淋滤过程中黑曲霉利用各种廉价碳源替代蔗糖产酸修复重金属污染土壤的效果。结果发现,杨树叶、桃树叶、土豆皮去除重金属效果较好。其中杨树叶对冶炼厂土壤中重金属去除率分别为 Cu 63.5%、Cd 100%、Pb 16.8%和 Zn 27%;桃树叶去除效果分别为 Cu 61.8%、Cd 100%、Pb 14.6%和 Zn 28.5%;土豆皮去除效果分别为 Cu 61%、Cd 100%、Pb 10.6%和 Zn 34%。廉价碳源的使用可降低污染土壤生物淋滤修复成本。

关键词:黑曲霉;生物淋滤修复;土壤;廉价碳源;重金属

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)09-1837-07

Selection of Cheap Carbon Sources During Bioleaching of Heavy Metal Contaminated Soil

REN Wan-xia, LI Pei-jun, GENG Yong, GONG Zong-qiang

(Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: Soil washing is a valid and relatively inexpensive alternative in remediation of soils contaminated with heavy metals. It has been proved that organic acids produced by *Aspergillus niger* (*A. niger*) fed with sucrose had the ability to mobilize and remove heavy metal contaminants from soils. However it is still somewhat expensive to feed *A. niger* with sucrose. The cost for soil remediation will be significantly reduced if other cheaper alternatives can be employed. Thus, the objectives of this study were to test the feasibility of using some alternative cheaper materials as carbon sources, to evaluate the effects of these cheaper materials on heavy metal removal from a contaminated soil. Some inexpensive tree leaves or food by products, namely poplar leave, peach leave, potato peels were used as carbon sources for *A. niger*, respectively. The resulting mixture of *A. niger* solution, produced organic acids, and carbon sources were applied to the contaminated soil for heavy metal removal using one-step and two-step bioleaching processes. Results show that these materials had a good capability in helping the *A. niger* to remove heavy metals from the soil. Percentages of the heavy metal removals were 63.5% for Cu, 100% for Cd, 16.8% for Pb, and Zn for 27%, respectively, when the poplar leaves were used as carbon source; were 61.8% for Cu, 100% for Cd, 14.6% for Pb, and 28.5% for Zn, respectively, when the peach leaves were used; and were 61% for Cu, 100% for Cd, 10.6% for Pb, and 34% for Zn, respectively, when the potato peels were used. Based on this, it is concluded that the application of suitable cheaper carbon sources reduced the cost of contaminated soil remediation by means of bioleaching.

Keywords: *Aspergillus niger*; bioleaching; soil; cheap carbon source; heavy metal

随着我国社会经济的飞速发展,由于人为因素导致的土壤重金属污染越来越严重。据统计目前我国约有 2 000 万 hm^2 耕地受镉、砷、铅等重金属的污染,约占耕地总面积的 1/5^[1-2],其中工业“三废”污染

耕地 1 000 万 hm^2 。土壤重金属(特别是有毒重金属)的污染和防治一直是国际上研究的难点和课题研究的重点。国外专家曾采用非毒性改良剂、深耕法、排土法和客土法以及化学冲洗的方法来解决土壤重金属污染问题,但是由于上述方法自身的局限性,都未能成为理想的土壤重金属污染治理方法。近年来,国外专家提出用起源于微生物湿法冶金技术的生物淋滤修复(Bioleaching)方法来解决重金属污染土壤的问题。生物淋滤技术是利用自然界中一些微生物的直接

收稿日期:2009-02-16

基金项目:中国科学院“百人计划 08YBR111SS”

作者简介:任婉侠(1977—)女,山东临沂人,博士,助理研究员。主要从事
事循环经济、产业生态学及污染土壤修复研究。

E-mail:renwanxia@iae.ac.cn

通讯作者:耿涌 E-mail:gengyong@iae.ac.cn

作用或其代谢产物的间接作用,产生氧化、还原、络合、吸附或溶解作用,将固相中某些不溶性成分(如重金属、硫及其他金属)分离浸提出来的一种技术^[3]。与利用无机酸 H_2SO_4 、 HNO_3 、 HCl 等或者有机络合剂 EDTA 等的化学浸提法相比,生物淋滤法因其耗酸少、运行成本低、重金属去除率高、实用性强等优点而越来越受到关注^[4-5]。该技术已经在污水污泥脱毒^[6-11]、沉积物中金属回收^[12-15]以及城市垃圾焚烧飞灰中金属回收^[16]等方面得到研究,但在重金属污染土壤中的研究较少^[17-18]。

化能自养微生物氧化亚铁硫杆菌、氧化硫硫杆菌是生物淋滤技术中最重要的微生物,而异养微生物在淋滤技术中的应用也很广泛。研究发现,“异养淋滤”利用异养微生物产生的柠檬酸、乙酸、草酸、葡萄糖酸等有机酸淋滤重金属污染土壤是另一项有潜力的淋滤修复技术。它们不仅提供 H^+ ,而且有机酸根离子能够络合金属阳离子,促进矿物溶解,在清除污染土壤中重金属的淋滤过程中,柠檬酸、葡萄糖酸等扮演了酸液和螯合剂的角色^[19]。国内外大量吸附解吸实验结果表明,柠檬酸和酒石酸等有机酸能将重金属离子从土壤中解吸出来^[20-23]。众所周知,一些真菌可以利用廉价有机物质发酵产酸^[24],实际上全世界对柠檬酸的需求都是通过真菌发酵生产满足的^[25]。真菌可以生产积累大量有机酸如柠檬酸、草酸等^[26]。其中黑曲霉是最具优势的一类真菌^[24]。黑曲霉能产生大量有机酸如柠檬酸、葡萄糖酸、草酸和酒石酸^[27-28]。虽然利用黑曲霉发酵蔗糖产酸淋滤修复重金属污染土壤具有良好效果,但是从目前看,技术上可行的工艺,在经济上不一定具有吸引力。因此,寻找价格低廉、来源丰富的碳源(蔗糖)替代品,如木材加工行业、食品行业和饮料工业等产生的有机废弃物作为黑曲霉生长所需的能源,既可解决有机废弃物对环境的污染,又可解决黑曲霉淋滤过程中所需的能源问题,从而降低淋滤成本,增强黑曲霉生物淋滤修复技术的实际应用性。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

本研究所用土壤样品采自沈阳市冶炼厂废料堆

积地,采样深度均为 0~20 cm,土样经风干后,过 2 mm 塑料筛。部分土样进一步用玛瑙研钵研磨,过 0.125 mm 塑料筛,供元素全量分析。土壤颗粒组成用比重计法测定;土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定;土壤 pH 采用酸度法(土壤:水=1:2.5)测定;土壤阳离子交换量测定采用醋酸铵淋洗法,具体方法参见土壤理化性质分析^[29]。重金属元素全量分析采用 $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4+\text{HF}$ 三酸消化,用原子吸收光谱仪(AAS)(Spectr AA 240, Varian, USA)测定。土壤样品基本理化性质见表 1。

1.2 黑曲霉孢子悬浮液的制备

本研究使用黑曲霉为实验室存储菌种。其孢子悬浮液的制备步骤:在无菌室中,将 50 mL 无菌水加入到在 30 ℃恒温培养箱中培养 5 d 的 PDA 斜面培养基,用灭菌的接种环在培养基表面轻轻刮动,制成孢子悬液,混匀后用血球计数板计孢子数,调整孢子悬液的孢子数约为 3.5×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 碳源材料

研究中所采用的廉价碳源材料均从东北地区获得,玉米芯、稻糠购自中科院沈阳生态站,玉米芯粒径 2~4 mm。杨树叶和桃树叶收集自沈阳应用生态研究所花园内,自然风干,用手揉碎。白糖购自当地农贸市场,土豆皮来自本地农贸市场购买的土豆,用刀削下皮收集起来自然风干,用手揉碎。玉米皮也购买于本地市场,自然风干揉碎。

1.4 培养基与配制方法

营养盐溶液: $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。发酵培养基:在 250 mL 锥形瓶中加入 4 g 碳源和 100 mL 营养盐溶液,拌匀,调节 pH 值至 6.0, 121 ℃高压灭菌 30 min,冷却后按每瓶培养基 3 mL 孢子悬液接种,搅拌均匀。而其中以玉米芯为碳源的培养基必须在加营养盐之前先置于 $10.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中浸泡 24 h,再加入无机盐,调节 pH 值至 6.0,高压灭菌。详细情况见表 2。

1.5 实验步骤

一步淋滤实验:在上述配制发酵溶液中加入灭菌土壤 5 g,置于摇床中 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 ℃培养 15 d,然后取样测定 pH、有机酸和重金属浓度。

表 1 污染土壤理化性质

Table 1 Physical and chemical property of the polluted soil

pH	有机质/ %	阳离子交换量/ $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$	钾/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	钙/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	镁/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	粘粒/ %	粉粒/ %	沙砾/ %	Cu/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cd/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Pb/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Zn/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
7.8	3.42	16.8	14 150	26 610	1 360	15.2	34.4	51.6	1 100	105	21 138	7 760

表 2 实验用不同碳源组成

Table 2 Composition of various media used in the experiments

序列号	碳源	预处理
1	100 g·L ⁻¹ 蔗糖	高压灭菌
2	40 g·L ⁻¹ 蔗糖	高压灭菌
3	40 g·L ⁻¹ 杨树叶+10 g·L ⁻¹ 白糖	高压灭菌
4	40 g·L ⁻¹ 桃树叶+10 g·L ⁻¹ 白糖	高压灭菌
5	40 g·L ⁻¹ 土豆皮+10 g·L ⁻¹ 白糖	Ca(OH) ₂ +高压灭菌
6	40 g·L ⁻¹ 土豆皮不加白糖	高压灭菌
7	40 g·L ⁻¹ 玉米芯+10 g·L ⁻¹ 白糖	Ca(OH) ₂ +高压灭菌
8	40 g·L ⁻¹ 玉米芯不加白糖	Ca(OH) ₂ +高压灭菌
9	40 g·L ⁻¹ 玉米皮+10 g·L ⁻¹ 白糖	高压灭菌
10	20 g·L ⁻¹ 玉米皮 +20 g·L ⁻¹ 玉米芯 +10 g·L ⁻¹ 白糖	Ca(OH) ₂ +高压灭菌
11	40 g·L ⁻¹ 稻糠+10 g·L ⁻¹ 白糖	高压灭菌
12	20 g·L ⁻¹ 稻糠+20 g·L ⁻¹ 玉米芯 +10 g·L ⁻¹ 白糖	Ca(OH) ₂ +高压灭菌

二步淋滤实验:将上述配制发酵溶液先置于摇床中连续培养 15 d, 然后淋滤过程除去菌体和固体残渣, 测定溶液 pH 值和有机酸浓度, 然后加入 5 g 土壤, 振荡处理 48 h, 淋滤过滤去除土壤残渣, 测定溶液中重金属离子浓度。

1.6 分析方法

定期取样 5 mL, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 0.45 μm 滤膜过滤, 测定 pH (PHS-3B, REX, 上海)、有机酸类型和浓度 (HPLC, Agilent 1100 Series), 原子吸收法 (Varian AAS, Spectr AA 240) 测定滤液中 Cu、Cd、Pb 和 Zn 浓度。

高效液相色谱条件^[30-31]: 柱 Zobax C18, 250 mm × 4.6 mm; 流动相 5 g·L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄-H₃PO₄ (pH 2.5, 色谱纯), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 进样量 10 μL, 检测器 DAD, 波长 215 nm。有机酸标样均为分析纯。

2 结果与讨论

2.1 一步生物淋滤过程

2.1.1 重金属去除率变化

一步淋滤修复中, 黑曲霉发酵不同碳源时, 土壤中 Cu、Cd、Pb 和 Zn 去除率见图 1。当培养到第 15 d 时, 100 g·L⁻¹ 蔗糖培养基中 Cu 去除率最高达到 62.3%, 除对照处理外, 玉米芯碳源中 Cu 去除率最高 (41%), 然后依次为桃树叶、土豆皮、土豆皮不加白糖、玉米皮+玉米芯、稻糠和稻糠+玉米芯, 去除率在 20% 左右。杨树叶中 Cu 去除率最低 (4.3%)。对 Cd 来

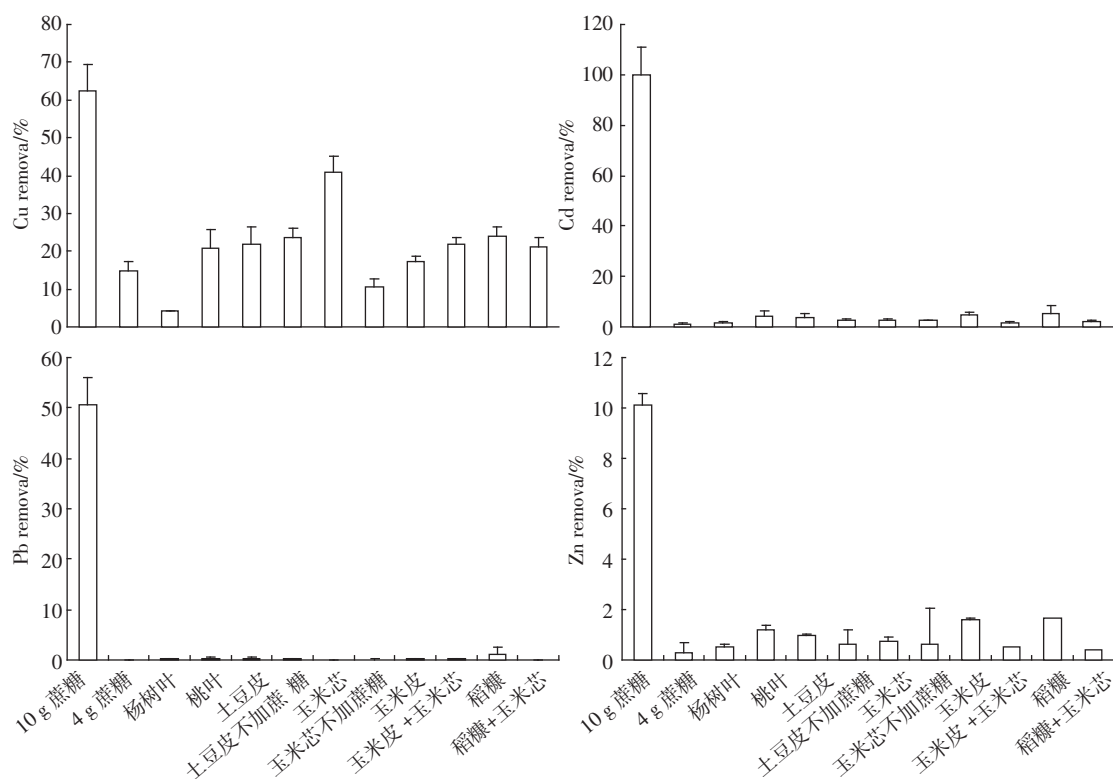


图 1 不同碳源利用过程中重金属去除率 (第 15 d)

Figure 1 Metal removals using different carbon substrates during one-step bioleaching on Day 15

说,培养 15 d 时,100 g·L⁻¹ 蔗糖培养基去除率最高,其他替代碳源中金属去除率均较低。对 Pb 来说,除对照处理外,其他碳源培养基中 Pb 去除率几乎为 0。对 Zn 而言,所有发酵碳源中其去除率都不高,可能与土壤性质、重金属形态和初始浓度有关。

2.1.2 pH 值和有机酸变化

培养 15 d 后,溶液 pH 值变化见图 2。土壤泥浆 pH 值在淋滤开始和结束时 pH 值一般会升高,可能是由两种机理引起的:一是随着培养时间延长,可能

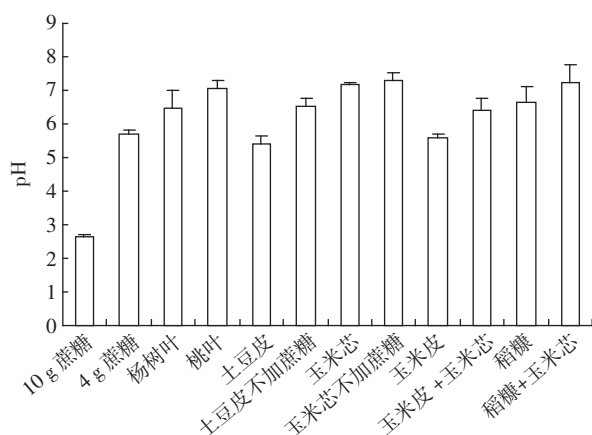


图 2 培养 15 d 后溶液 pH 值

Figure 2 pH values after 15 days of one-step bioleaching

限制了一些可以缓冲土壤 pH 物质的释放;二是土壤中的细菌降解了发酵液中的有机酸,导致溶液 pH 值有所上升^[32]。

一步淋滤过程中黑曲霉发酵不同碳源产有机酸的类型和浓度见图 3。100 g·L⁻¹ 蔗糖所产草酸浓度很低,而土豆皮中草酸浓度最高(100 mg·L⁻¹);40 g·L⁻¹ 蔗糖、玉米皮、土豆皮不加白糖和玉米芯中葡萄糖酸浓度较高,依次为 2 422、2 255、2 234 和 1 080 mg·L⁻¹;玉米芯和玉米芯+玉米皮中苹果酸浓度较高,分别为 203 和 142 mg·L⁻¹;玉米芯和杨树叶中柠檬酸浓度较高,分别为 209 和 114 mg·L⁻¹。故经过 15 d 培养黑曲霉发酵不同碳源所产总酸浓度顺序依次为 100 g·L⁻¹ 蔗糖>40 g·L⁻¹ 蔗糖>土豆皮不加白糖>玉米皮>玉米芯>玉米芯不加白糖>土豆皮>(玉米皮+玉米芯)、杨树叶>(稻糠+玉米芯)>桃树叶>稻糠。

2.2 二步淋滤过程

2.2.1 重金属去除率变化

二步淋滤过程中,黑曲霉发酵不同碳源产酸淋滤去除污染土壤中 Cu、Cd、Pb 和 Zn 的效果见图 4。经过第一步 15 d 发酵培养和第二步 48 h 淋洗过程,冶炼厂土壤中重金属去除效果较好,特别是 Cd 去除率高达 100%。对 Cu 而言,杨树叶、桃树叶、土豆皮不加白

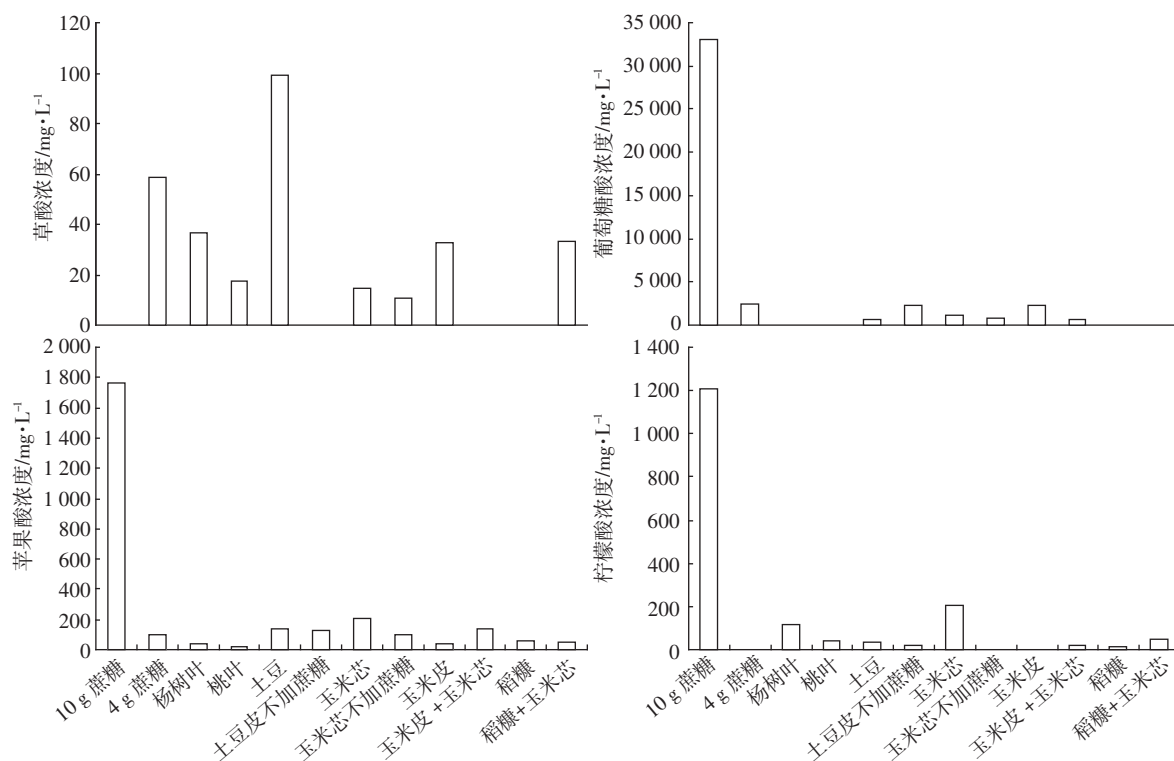


图 3 培养 15 d 后溶液中有有机酸浓度

Figure 3 Organic acid concentrations during one-step bioleaching process after 15 days

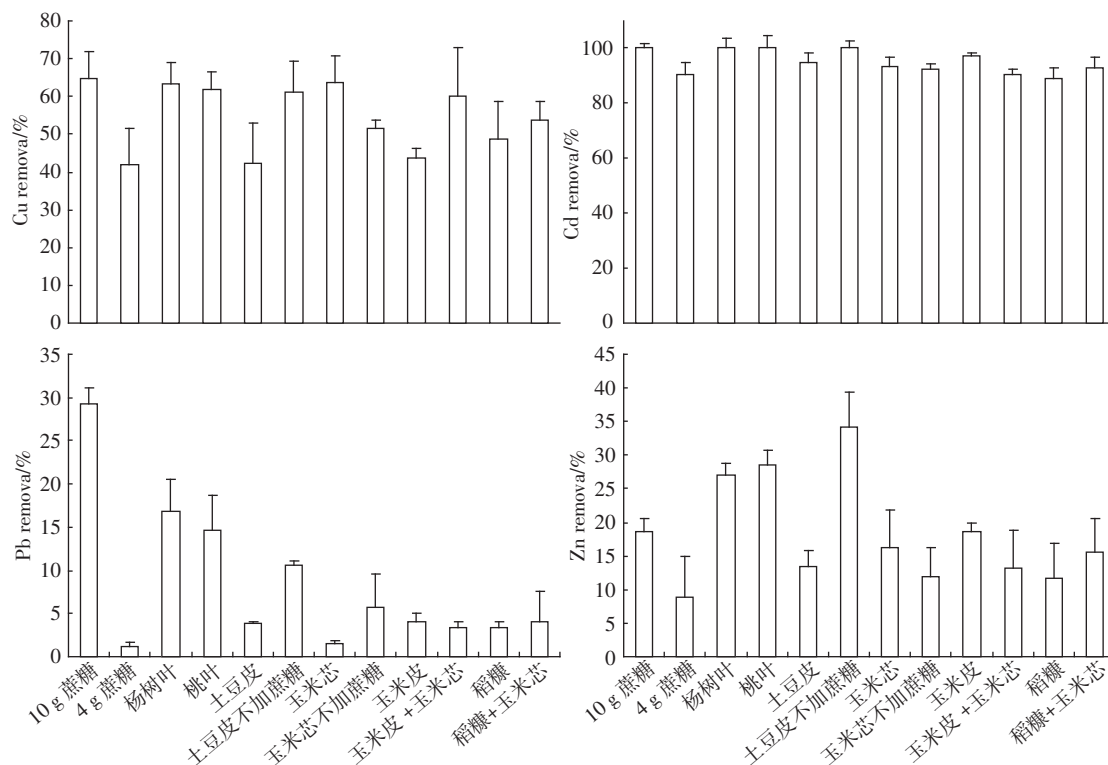


图 4 二步淋滤过程中重金属去除率

Figure 4 Metal removals during two-step bioleaching process

糖、玉米芯和玉米皮+玉米芯对 Cu 去除效果与 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖接近,均在 60%左右;玉米芯不加白糖、稻糠和稻糠+玉米芯去除率在 50%左右, $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、土豆皮和玉米皮去除率在 40%左右;同时发现不加白糖的土豆皮发酵处理要好于加白糖的土豆皮处理,而加白糖的玉米芯处理要好于不加白糖的玉米芯处理,故淋滤过程中白糖的添加视具体情况而定。对 Pb 来说,对照处理效果最好(29.4%),其次为杨树叶、桃树叶和土豆皮不加白糖,去除率依次为 16.8%、14.6%和 10.6%。而对 Zn 来说,土豆皮不加白糖、桃树叶和杨树叶中修复效果最好,去除率分别为 34%、28.5%和 27%。故二步淋滤过程中杨树叶、桃树叶、土豆皮不加白糖和玉米芯不加白糖中金属去除效果相对较好。

2.2.2 pH 和有机酸变化

二步淋滤过程中,发酵液 pH 值见图 5。经过 15 d 发酵培养,对照处理 pH 值最低仅为 2.06;其他碳源发酵溶液 pH 值在 4.8~6.0 之间变化。

发酵液中有有机酸类型和浓度结果见图 6。发酵不同碳源组合均产草酸,其中桃树叶、 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和土豆皮不加白糖中草酸浓度相对较高,分别为 2921 、 2912 和 $2809 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;除对照处理外,其他碳源中均

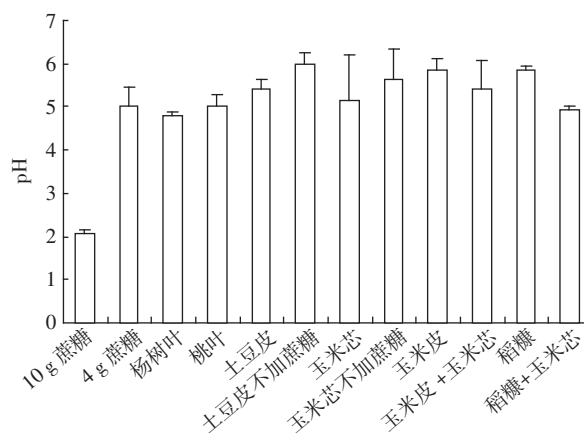


图 5 15 d 后溶液 pH 值

Figure 5 pH values after 15 days of two-step bioleaching

不存在产葡萄糖酸;除 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖和玉米皮外,其他碳源中均存在苹果酸,其中稻糠+玉米芯中苹果酸浓度最高,达到 $2162 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;而柠檬酸与苹果酸类似,大部分碳源中均存在柠檬酸,其中土豆皮中柠檬酸浓度最高($3920 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。综上所述,黑曲霉发酵不同碳源所产有机酸浓度总和顺序分别为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖>土豆皮>桃树叶>(稻糠+玉米芯)>玉米芯>土豆皮不加白糖>杨树叶>玉米芯不加白糖>稻糠>(玉米皮+玉米芯)> $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖>玉米皮。

100 g·L⁻¹ 蔗糖所产酸大部分来自葡萄糖酸,贡献率高达 68%;土豆皮所产酸中柠檬酸浓度最高,贡献率高达 64%,其次为草酸占 21%;桃树叶所产酸中草酸贡献率达到 66%,其次为苹果酸占 25%;稻糠+玉米芯所产酸中主要以苹果酸为主,贡献率为 55%,其次为草酸占 35%;玉米芯所产有机酸中草酸贡献率为 58%,其次为苹果酸占 31%;土豆皮不加白糖所产酸中草酸贡献率高达 88%,其次为苹果酸占 12%;杨树叶所产酸中草酸占 71.6%,其次为苹果酸占 23.3%;玉米芯不加白糖所产酸中草酸占 61%,苹果酸占 20.4%;稻糠所产酸中绝大部分为草酸占 94.2%;玉米皮+玉米芯所产酸中草酸占 55%,其次为柠檬酸占 28%;40 g·L⁻¹ 蔗糖所产酸中只有草酸;玉米皮所产酸中草酸占 87.5%。

从结果可见,黑曲霉发酵不同碳源所产生的不同类型和浓度的有机酸中绝大部分以草酸为主,按照黑曲霉发酵产草酸浓度大小为依据进行排序其顺序为桃树叶>100 g·L⁻¹ 蔗糖>土豆皮不加白糖>杨树叶>稻糠>玉米芯>40 g·L⁻¹ 蔗糖>玉米芯不加白糖>(稻糠+玉米芯)>土豆皮>(玉米皮+玉米芯)>玉米皮。

Mulligan 和 Galvez-Cloutier^[33]运用蔗糖、糖蜜、

玉米芯和酿酒厂废料作为黑曲霉发酵碳源修复矿山尾矿的研究中,经过 21 d 连续培养,蔗糖中 Cu 去除效果最好(~60%),其次为糖蜜、玉米芯和酿酒厂废料。Mulligan 等^[31]利用蔗糖、糖蜜、土豆皮、木屑等作为碳源研究了黑曲霉生物淋滤去除低品味矿石中金属效果,结果表明:蔗糖效果最好,Cu、Zn 去除率分别达到 60%、28%;糖蜜中 Cu、Zn 去除率分别为 48%、20%;土豆皮中 Cu、Zn 分别为 35%;木屑中 Cu 去除率仅为 8%。

3 结论

本实验中黑曲霉利用不同廉价碳源(树叶、土豆皮、玉米芯、玉米皮和稻糠)替代蔗糖进行发酵淋滤实验,结果表明:二步淋滤实验优于一步淋滤实验,其中杨树叶、桃树叶和土豆皮不加白糖处理效果较好;杨树叶中 Cu、Cd、Pb 和 Zn 去除率分别为 63.5%、100%、16.8%和 27%;桃树叶中去除率分别为 Cu 61.8%、Cd 100%、Pb 14.6%和 Zn 28.5%;土豆皮不加白糖中去除率分别为 Cu 61%、Cd 100%、Pb 10.6%和 Zn 34%;黑曲霉利用不添加白糖的土豆皮作廉价碳源即可满足生长发酵需求,且去除效果更佳。

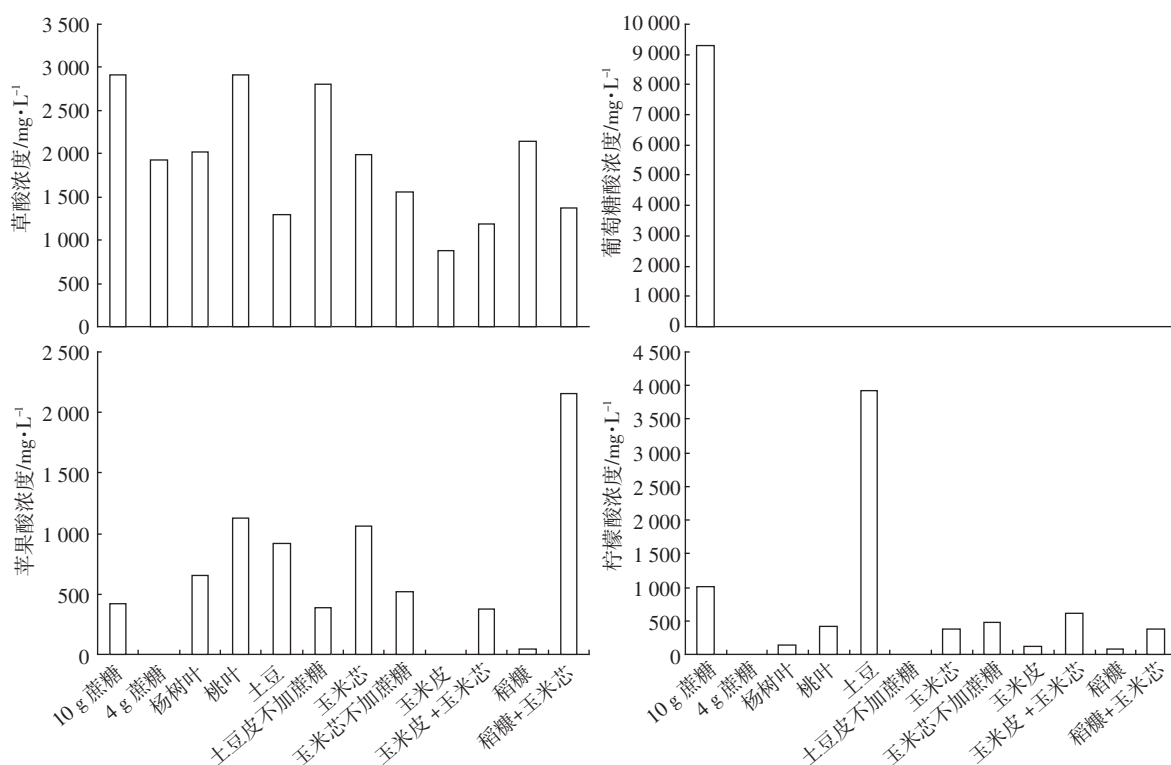


图 6 培养 15 d 后溶液中有有机酸浓度

Figure 6 Concentrations of organic acids after 15 days of two-step bioleaching

参考文献:

- [1] 韦朝阳, 陈同斌. 重金属超富集植物及植物修复技术研究进展[J]. 生态学报, 2001, 21(7): 1196–1203.
WEI Chao-yang, CHEN Tong-bin. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: a review of studies in China and abroad[J]. *ACTA Ecologica Sinica*, 2001, 21(7): 1196–1203.
- [2] 朱荫渭, 周启星. 土壤污染与我国农业环境保护的现状、理论和展望[J]. 土壤通报, 1999, 30(3): 132–135.
ZHU Yin-mei, ZHOU Qi-xing. Soil pollution and the current situation, theories and outlooks for agriculture environmental protection in China[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1999, 30(3): 132–135.
- [3] Krebs W, Brombacher C, Bosshard P P, et al. Microbial recovery of metals from solids[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 20(3–4): 605–617.
- [4] Bosecker K. Bioleaching: metal solubilisation by microorganisms[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1987, 20: 591–604.
- [5] Chartier M, Mercier G, Blais J F. Partitioning of trace metals before and after biological removal of metals from sediments[J]. *Water Res*, 2001, 35(6): 1435–1444.
- [6] Couillard D, Chartier M, Mercier G. Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge[J]. *Biores Technol*, 1991, 36: 293–302.
- [7] Kim I S, Lee J U, Jang A. Bioleaching of heavy metals from dewatered sludge by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80: 1339–1348.
- [8] 王世梅, 周立祥, 黄峰源. 酵母菌与两种硫杆菌复合对污泥中三价铬的去除[J]. 中国环境科学, 2006, 26(2): 197–200.
WANG Shi-mei, ZHOU Li-xiang, HUANG Feng-yuan. Optimum condition in Cr^{3+} bioleaching of tannery sludge with *Thiobacillus ferrooxidans* LX5, *Thiobacillus thiooxidans* TS6 and *Rhodotorula* sp. R30[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(2): 197–200.
- [9] Solisio C, Lodi A, Veglio F. Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Waste Manage*, 2002, 22: 667–675.
- [10] Wong J W C, Xiang L, Gu X Y, et al. Bioleaching of heavy metals from anaerobically digested sewage sludge using FeS_2 as an energy source[J]. *Chemosphere*, 2004, 55: 101–107.
- [11] 周立祥, 方迪, 周顺桂, 等. 利用嗜酸性硫杆菌去除制革污泥中铬的研究[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 62–65.
ZHOU Li-xiang, FANG Di, ZHOU Shun-gui, et al. Removal of Cr from tannery sludge by acidophilic *Thiobacilli*[J]. *Environmental Science*, 2004, 25(1): 62–65.
- [12] Chartier M, Couillard D. Biological processes: the effects of initial pH, percentage inoculum and nutrient enrichment on the solubilization of sediment bound metals[J]. *Water Air Soil Pollut*, 1997, 96: 249–267.
- [13] Chen S Y, Lin J G. Influence of solid content on bioleaching of heavy metals from contaminated sediment by *Thiobacillus spp.*[J]. *Chem Technol Biotechnol*, 2000, 75: 649–656.
- [14] Chen S Y, Lin J G. Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment[J]. *J Hazard Mater*, 2001, 82: 77–89.
- [15] Seidel H, Görsch K, Schümmichen A. Effect of oxygen limitation on solid-bed bioleaching of heavy metals from contaminated sediments[J]. *Chemosphere*, 2006, 65: 102–109.
- [16] Wu H Y, Ting Y P. Metal extraction from municipal solid waste (MSW) incinerator fly ash—chemical leaching and fungal bioleaching[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 38: 839–847.
- [17] Gomez C, Bosecker K. Leaching heavy metals from contaminated soil by using *Thiobacillus ferrooxidans* or *Thiobacillus thiooxidans*[J]. *Gemicrobiol J*, 1999, 16(3): 233–244.
- [18] Liu H L, Teng C H, Cheng Y C. A semiempirical model for bacterial growth and bioleaching of *Acidithiobacillus spp.*[J]. *Chem Eng J*, 2004, 99(1): 77–87.
- [19] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. Removal of heavy metals from contaminated soil and sediments using the biosurfactant surfacting[J]. *J Soil Contam*, 1999c, 8: 231–254.
- [20] Wasay S A, Barrington S F, Tokunaga S. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents[J]. *Environ Technol*, 1998, 19(4): 369–379.
- [21] Wasay S A, Barrington S F, Tokunaga S. Using *Aspergillus niger* to bioremediate soils contaminated by heavy metals[J]. *Biorem J*, 1998, 2(3): 183–190.
- [22] Wasay S A, Barrington S F, Tokunaga S. Organic acids for the in situ remediation of soils polluted by heavy metals: soil flushing in columns[J]. *Water Air Soil Pollu*, 2001, 127: 301–314.
- [23] Wu H Y, Ting Y P. Metal extraction from municipal solid waste (MSW) incinerator fly ash—chemical leaching and fungal bioleaching[J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 2006, 38: 839–847.
- [24] Burgstaller W, Schinner F J. Mini review: leaching of metals with fungi[J]. *J Biotechnol*, 1993, 27(2): 91–116.
- [25] Ikram-ul-Haq, Sikander A, Qadeer M A, et al. Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium[J]. *Electron J Biotechnol*, 2002, 5(2): 125–132.
- [26] Rehm H J, Reed G. Biomass, microorganisms for special applications, microbial products I. energy from renewable resources[J]. *Weinheim*, 1983, 3: 388–407.
- [27] Gupta S, Sharma C B. Biochemical studies of citric acid production and accumulation by *Aspergillus niger* mutants[J]. *W J Microbiol Biotechnol*, 2002, 18: 379–383.
- [28] Lesniak W, Pietkiewicz J, Podgorski W. Citric acid fermentation from starch and dextrose syrups by a trace metal resistant mutant of *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnol Lett*, 2002, 24: 1065–1067.
- [29] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
LU Ru-kun. Soil agriculture chemistry analysis method[M]. Beijing: Agriculture Science Press of China, 1999.
- [30] Van Hees P A W, Dahlén J, Lundström U S, et al. Determination of low molecular weight organic acids in soil solution by HPLC[J]. *Talanta*, 1999, 48: 173–179.
- [31] Mulligan C N, Kamali M, Gibbs B F. Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*[J]. *J Hazard Mater*, 2004, 110: 77–84.
- [32] 可欣. 有机酸淋洗修复重金属污染土壤的研究[D]. 沈阳: 中国科学院沈阳应用生态研究所, 2006.
KE Xin. Leaching heavy metal contaminated soils with organic acids[D]. Shenyang: Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [33] Mulligan C, Galvez-Cloutier R. Bioremediation of metal contamination[J]. *Environ Monitor Assess*, 2003, 84: 45–60.