

土壤中嗜酸性氧化亚铁硫杆菌的分离鉴定及其性能研究

任婉侠^{1,2}, 李培军¹, 何娜^{1,2}, 范淑秀^{1,2}, E.V. Verkhovzina³

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 俄罗斯科学院西伯利亚分院地质研究所, 伊尔库茨克 664033)

摘要:采用改进型 Leathen 培养基直接从辽宁省抚顺市红透山铜矿附近的土壤中分离到了一株高度嗜酸的氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 菌株 (暂命名为 R2)。鉴定表明, 该菌株为革兰氏阴性细菌, 在扫描电镜下观察该菌株为短杆状, 菌体大小为 $(0.4 \pm 0.2) \mu\text{m} \times (1.6 \pm 0.4) \mu\text{m}$ 。最适 pH 值 2.0, 化能自养型, 能利用亚铁、单质硫和硫代硫酸钠生长, 不能利用葡萄糖、蛋白胨生长。并且以 16S rDNA 序列同源性为基础构建了 17 株已报道菌种在内的系统发育树, 将 16S rDNA 测序结果输入 Genbank 以 Blast 软件进行序列同源性比较, 结果显示与氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 的多株细菌具有较高的同源性 (>99%), 其中与 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain TGS 的相似性达到 100%, 与标准株 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain ATCC33020 相似性为 99.3%, 结合其生理生化特性可以确定该菌为氧化亚铁硫杆菌种。序批式试验法研究表明, 接种该株菌可有效溶出土壤中重金属, 经过 5 d 的生物淋滤, Cu、Cr、Zn、Cd 的最高去除率分别达到 30.6%、16.3%、58.4% 和 72%。

关键词: 土壤; 重金属; 嗜酸性氧化亚铁硫杆菌; 生物淋滤; 系统发育树; 16S rDNA

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0602-06

Isolation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and Its Application on Heavy Metals Bioleaching from Soil

REN Wan-xia^{1,2}, LI Pei-jun¹, HE Na^{1,2}, FAN Shu-xiu^{1,2}, E.V. Verkhovzina³

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Geochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033)

Abstract: An *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain R2 was isolated from the soil around Hongtoushan copper mine, Liaoning province in China through incubation in the modified Leathen-selected liquor medium followed by inoculation in solid plate. The cell of R2 strain was Gram negative and rod-shaped in $(0.4 \pm 0.2) \mu\text{m} \times (1.6 \pm 0.4) \mu\text{m}$ observed under SEM. The optimum growth pH was 2.0. The R2 strain can grow chemoautotrophically by using Fe^{2+} , sulfur and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ as sole energy sources, but cannot grow with glucose and peptone. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the relative bacteria species. In the phylogenetic tree, the R2 strain was the closest relative to *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain TGS and *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain ATCC33020 with 100% and 99.3% sequence similarity. These results revealed that the R2 strain was a strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. A batch experiment further demonstrated that as high as 30.6%, 16.3%, 58.4% and 72% of the removal efficiency of Cu, Cr, Zn and Cd could be obtained, respectively, in the period of 5 days bioleaching by using the isolated strain R2.

Keywords: soil; heavy metals; *Acidithiobacillus ferrooxidans*; bioleaching; phylogenetic tree; 16S rDNA

目前, 国内外土壤重金属污染相当普遍, 发展一种运行成本较低且能够有效去除土壤中重金属的技

术势在必行。使用不同氧化剂、还原剂或螯合剂的化学浸提法已经在去除矿石、矿物残渣、污泥、土壤和沉积物中的重金属方面得到应用。虽然该法对重金属的去除率较高, 但由于在淋洗剂和设备方面投入过高, 限制了其在实际修复中的应用。近年来, 利用嗜酸性微生物特别是硫杆菌溶解去除污染介质中的重金属即生物淋滤 (Bioleaching) 修复技术是一项非常有前

收稿日期: 2007-05-17

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(20337010); 国家基础研究发展计划(2004CB418506)

作者简介: 任婉侠(1977—), 女, 博士研究生, 主要研究方向为重金属污染土壤的生物修复。E-mail: ren_laura@163.com

通讯联系人: 李培军 E-mail: lipeijun@iae.ac.cn

景的金属浸提技术^[1-3],该技术已经在含有毒金属的固体废弃物如污泥、土壤、沉积物等脱毒方面得到应用^[4]。

生物淋滤(Bioleaching)技术是利用自然界中一些微生物的直接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^[2]。它的主要原理是利用化能自养型的嗜酸性硫杆菌,如氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)的生物产酸作用,将难溶性的重金属从固相溶出而进入液相成为可溶性的金属离子,再采用适宜方法从液相中加以回收。与化学浸提法相比,它具有反应温和、耗酸少、运行成本较低等优点,因此当从污染介质中回收重金属时,会更多的选择生物淋滤修复技术^[5-7]。该技术已经在污水污泥脱毒^[8-13]、沉积物中金属回收^[14-17]以及城市垃圾焚烧飞灰中金属回收^[1,18]等方面得到研究,但是该技术在去除土壤中重金属方面的研究很少^[19,20],因此,生物淋滤技术在污染土壤中的应用研究具有较强的可操作性。

生物淋滤技术的关键之一是高效微生物菌株的分离筛选与驯化。用于生物淋滤的菌种很多,其中氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*,简称 A.f 菌)被认为是最重要的嗜酸性微生物^[20,21]。嗜酸性氧化亚铁硫杆菌,是一种化能自养,专性好氧,嗜酸革兰氏阴性菌,以自身细胞分裂的形式进行繁殖,可以固定空气中的 CO₂,以氧化 Fe²⁺、S⁰ 及 S²⁻的化合物等来获得生长过程所需的能量^[22,23]。自从 1947 年由 Colmer 和 Hinkle 首先分离纯化并命名以来,一直是生物浸出及其他如煤脱硫方面最主要的细菌之一,受到国内外研究者的重视和研究^[22-28]。本文的目的是试图直接从土壤环境中分离出可用于生物淋滤的高效的氧化亚铁硫杆菌菌株,并了解其基本性质以及系统发育分析。

本实验从辽宁省抚顺市红透山铜矿尾矿坝附近取回土壤,从中筛选了一株嗜酸性硫杆菌,并将其命名为 R2,通过对其生理生化性质以及 16S rDNA 序列同源性分析,发现这株菌为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌,利用该菌株对沈阳冶炼厂重金属污染的土壤进行淋滤,取得了较好的浸出效果。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

实验中使用的嗜酸性氧化亚铁硫杆菌分离自辽宁省抚顺市红透山铜矿尾矿坝附近的土壤,其基本性

质见表 1。

表 1 菌种来源土壤的基本特性

Table 1 The primary properties of the selected soil

pH	有机质/%	含水率/%	Cu/mg·kg ⁻¹	Zn/mg·kg ⁻¹	Pb/mg·kg ⁻¹	Fe/mg·kg ⁻¹
2.89	2.9	2.14	531.2	3 097	218.35	116 170

1.2 供试土壤

采自沈阳冶炼厂重金属污染的土壤,其中重金属的含量如表 2。

表 2 供试土壤重金属含量

Table 2 Contents of some heavy metals in the study soil

Cu/mg·kg ⁻¹	Zn/mg·kg ⁻¹	Cd/mg·kg ⁻¹	Cr/mg·kg ⁻¹	Pb/mg·kg ⁻¹
1 100.4	7 760.1	105.2	58.1	21 138.4

1.3 培养基

(1)改进型 Leathen 液体培养基(g·L⁻¹):(NH₄)₂SO₄ 0.45, KCl 0.05, K₂HPO₄ 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.5, Ca(NO₃)₂ 0.01, FeSO₄·7H₂O 20, pH 2.0, H₂SO₄ 调节。

(2)分离培养基(g·L⁻¹):A 基本盐成分:(NH₄)₂SO₄ 3.0, KCl 0.1, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, Ca(NO₃)₂ 0.01, dH₂O 750 mL, 5 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 调节 pH=3; B 成份:琼脂粉 15 g, dH₂O 250 mL; C 成份:无菌的硫酸亚铁晶体 22.2 g。硫酸亚铁为经微孔滤膜(Φ0.22 μm)真空抽滤除菌后,再经冷冻干燥后保存的晶体。

由于在强酸性环境中,琼脂在高温灭菌时水解液化,室温时不能凝固,操作时采用琼脂和对应酸性培养基分开灭菌,冷去至 80℃左右,合并两者即可。

1.4 菌种分离及形态分析

取辽宁省抚顺市红透山铜矿尾矿坝附近的土壤 5 g 加入到 100 mL 改进型 Leathen 液体培养基中, 28℃摇床培养,当溶液颜色由澄清变为红棕色时,再进行 10~12 次加富培养,随后取 1 mL 培养液到装有 9 mL 不加 FeSO₄·7H₂O 的种子培养基中,如此继续倍比稀释到 10⁻⁶。取 10⁻²~10⁻⁶ 稀释度的稀释液涂平板(每个稀释度 3 个重复),恒温培养 9~10 d 后在平板上出现针尖大小的棕色圆点状小菌落。挑取外观均匀的菌株接种至 10 mL 液体培养基的小锥形瓶中, 28℃, 150 r·min⁻¹ 条件下培养,直至锥形瓶中的溶液颜色变成红棕色。如此重复在液体培养基中扩大培养和在平板上反复涂布分离,最终选出菌株 R2。将分离的单菌株转到液体培养基中扩大培养后取细菌,在光学显微镜下观察细菌形态和运动情况,革兰氏染色观察其染色情况,并且用扫描电镜观察该细菌的显微结构。

1.5 氧化曲线测定

取生长 30 h 的氧化亚铁硫杆菌菌液,以 10% (m/m) 的接种量接种到含 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形摇瓶中,每隔一段时间取一定量菌液,采用 1,10-邻啡罗啉比色法测定溶液中 Fe^{2+} 的浓度。

1.6 初始 pH 对细菌生长的影响

取生长 30 h 的氧化亚铁硫杆菌菌液,以 10% (m/m) 的接种量接种到含 100 mL 液体培养基的 250 mL 锥形摇瓶中,用 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{H}_2\text{SO}_4$ 调节液体培养基的 pH 分别为 1.0、1.3、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0,在 28 °C 条件下培养 30 h 后采用血球计数板计数法测量细菌的生长情况。

1.7 能源利用情况的测定

在不含亚铁的基本液体培养基中(100 mL)分别加入蛋白胨 0.1%,葡萄糖 0.1%,硫磺 5%,硫代硫酸钠 1%,七水合硫酸亚铁 14.7%,七水合硫酸亚铁 14.7%+蛋白胨 0.1%,七水合硫酸亚铁 14.7%+葡萄糖 0.1%。其中葡萄糖、硫代硫酸钠、 $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 均采用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 超滤膜过滤除菌后再加入培养基,硫磺隔水常压下连续 3 d,每 d 30 min 灭菌后加入培养基,28 °C 条件下培养 3 d 后采用血球计数板计数法测定细菌的生长情况。

1.8 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列测定及系统发育树分析

1.8.1 染色体 DNA 的提取

采用液体培养基培养细菌 30 h 后,先用普通滤纸过滤尽量除去培养基中的铁矾,滤液先 $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 最大限度除去培养液中沉淀,再用 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 富集细菌,然后用 pH2.0 硫酸清洗菌泥 3 次后转至 1.5 mL EP 管中,用 500 μL TE(pH8.0)重新悬浮细菌平衡 pH 后,按照基因组提取试剂盒内说明操作提取细菌的基因组 DNA。

1.8.2 16S rDNA 的 PCR 扩增、序列测定

通过对菌株 16S rDNA 序列分析进行。用于 16S rDNA PCR 扩增的引物:正向 F27:5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3';反向 R1492:5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3'。PCR 反应体系(25 μL)为 10 $\times$ buffer 2.5 μL ,dNTP 2.0 μL ,引物 F27 和 1492R 各 1.0 μL ,模板 DNA 1.0 μL ,Taq 酶 0.2 μL ,双蒸水 173 μL 。PCR 反应条件为 94 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物的纯化使用北京博大泰克公司的试剂盒,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.8.3 16S rDNA 序列分析及系统发育树构建

将 16S rDNA 的测序结果输入 Genebank 中进行序列比对,将比对结果中同源性最高的序列和测得序列一起输入 clustalx1.8 生成比对格式文件,再将生成的文件输入 Phylip3.65 软件包,采用邻接法构建系统发育树。

1.9 分离的菌株对土壤生物淋滤效果的影响

在本研究中整个生物淋滤过程采用无菌操作。试验设接种菌液和不接种菌液(对照),每个处理 3 次重复。取 90 mL pH 自然的改进型 Leathen 液体培养基于 250 mL 三角瓶中,依次加入 10 mL 菌液和 5 g 粒径 2 mm 的沈阳冶炼厂土壤,对照处理不添加菌液,以等体积的无菌蒸馏水补充。三角瓶用 8 层纱布封口,并置于 28 °C,转速 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的往复式摇床中振荡培养 5 d,培养期间采用称量法补充蒸发的水分。

每天取 10 mL 淋滤上清液,测定其 pH、ORP(氧化还原电位,mV)。然后在 $10\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 膜过滤,用 ICP 法测定上清液中 Cd、Cr、Cu、Zn 浓度。根据试验前后样品中重金属含量的差值,计算土壤中重金属的去除率。

2 结果与讨论

2.1 目的菌株形态

在含 $FeSO_4\cdot 7H_2O$ 的 Leathen 液体培养基(pH=2)培养过程中,随着菌体的生长,培养液颜色很快由清亮的浅绿色依次变成浅黄色、褐色和棕红色,最终有淡黄色的黄钾铁矾沉淀生成,而不接种菌体的液体颜色几乎没有变化。细菌在固体平板上培养一星期后开始出现白色凸起菌落,菌落直径约为 0.2~1 mm,表面光滑,边缘完整,培养到 10 d 左右,部分白色菌落开始变黄,菌落周围培养基也逐渐呈现黄色,培养到 14 d 左右,平板上菌落全部变成黄色,表面粗糙,菌落周围变得不规则,菌落中心呈现黄褐色。分离纯化后通过显微镜观测该细菌为短杆状,能运动,革兰氏染色显阴性,扫描电镜分析表明细菌的大小为 $(0.4\pm 0.2)\text{ }\mu\text{m}\times (1.6\pm 0.4)\text{ }\mu\text{m}$,单生或对生,以自身细胞分裂的形式进行繁殖(见图 1)。

2.2 氧化曲线

培养基中亚铁离子的氧化曲线(见如图 2)。从图中可以看出,24 h 左右溶液中 Fe^{2+} 基本上被完全氧化。

2.3 初始 pH 值对细菌生长影响

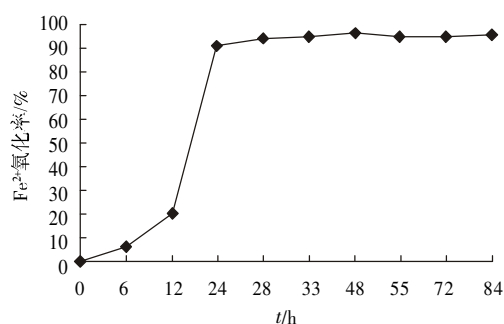
图 1 扫描电镜下 R2 菌株的形态($\times 20\,000$)Figure 1 Configuration of R2 under SEM($\times 20\,000$)图 2 生长过程中 Fe²⁺氧化曲线

Figure 2 Ferrous iron oxidation during the growth of R2

由图 3 可以看出,初始 pH 值对细菌的生长有较大影响,细菌生长的最适 pH 为 2.0,在 pH 值低于 2.0 或者高于 3.0 时,细菌的生长受到明显的抑制。

2.4 能源利用情况

细菌对能源的利用情况见表 3。从表中可以看出,氧化亚铁硫杆菌 R2 可以利用亚铁、单质硫和硫代硫酸钠生长,且在亚铁与葡萄糖混合培养基、亚铁蛋白胨混合培养基中也能生长;不能利用蛋白胨和葡萄糖生长。

2.5 菌株的 16S rDNA 序列分析和系统发育树的构建

将 16S rDNA 测序结果输入 Genebank 以 Blast 软件进行序列同源性比较,结果显示与氧化亚铁硫杆菌属 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) 的多株细菌具有较高的同源性(>99%),其中与 *Acidithiobacillus ferroxi-*

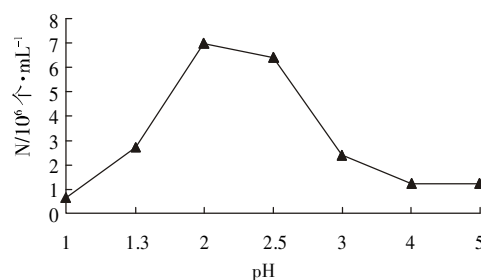


图 3 初始 pH 对 R2 菌株生长的影响

Figure 3 Effect of initial pH on the growth of strain R2

dans strain TGS 的相似性达到 100%,与标准株 *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain ATCC33020 相似性为 99.3%,结合其生理生化特性可以确定该菌为氧化亚铁硫杆菌属,系统发育地位如图 4。

2.6 利用分离的菌株淋滤重金属污染土壤中重金属

2.6.1 pH 和 ORP 的变化

图 5 显示,与对照处理相比,接种氧化亚铁硫杆菌在 5 d 内就能明显降低土壤的 pH,由起始时的 3.52 下降到 2.28,并基本稳定保持到试验结束。而对照处理,仅因 Fe²⁺的水解作用使 pH 有微弱的变化。在 pH 下降的过程中,氧化还原电位(ORP)在上升(见图 5)。

pH 下降和 ORP 上升可以作为氧化亚铁硫杆菌大量增殖的标志。在淋滤的过程中,接种处理的 ORP 迅速上升,而对照处理的 ORP 基本上没有明显的变化,接种处理的 ORP 值为 616,比对照处理 ORP 值 291 高很多,很显然氧化亚铁硫杆菌在其中起到了极其重要的作用。

2.6.2 土壤中重金属生物淋滤效果

接种氧化亚铁硫杆菌能够提高土壤中重金属 Cu、Cr、Zn、Cd 的去除率,但不同重金属的去除率有所不同(见图 7)。

前 3 d 在接种的条件下,Zn 的去除率随淋滤时间的延长而呈直线增加,到第 3 d 时达到 58.4%,3d 后去除率开始下降,到第 5 d 时去除率只有 34.2%。在接种的前 3 d,Cu 的去除率逐渐增加,第 3 d 时达到 30.6%,但在第 4 d 迅速下降到了 13.5%,第 5 d 稳定在 13%左右。但重金属 Cd 的去除率变化很明显,随着淋滤时间的推迟,淋滤去除率逐渐降低。在淋滤的

表 3 氧化亚铁硫杆菌 HT 对能源的利用情况

Table 3 The usage of substrates of the strain R2

硫磺5%	硫代硫酸钠1%	FeSO ₄ ·7H ₂ O 14.7%	FeSO ₄ ·7H ₂ O 14.7%+蛋白胨0.1%	FeSO ₄ ·7H ₂ O 14.7%+葡萄糖0.1%	蛋白胨0.1%	葡萄糖0.1%
+	+	+	+	+	-	-

注:“+”表示可生长,“-”表示不能生长。

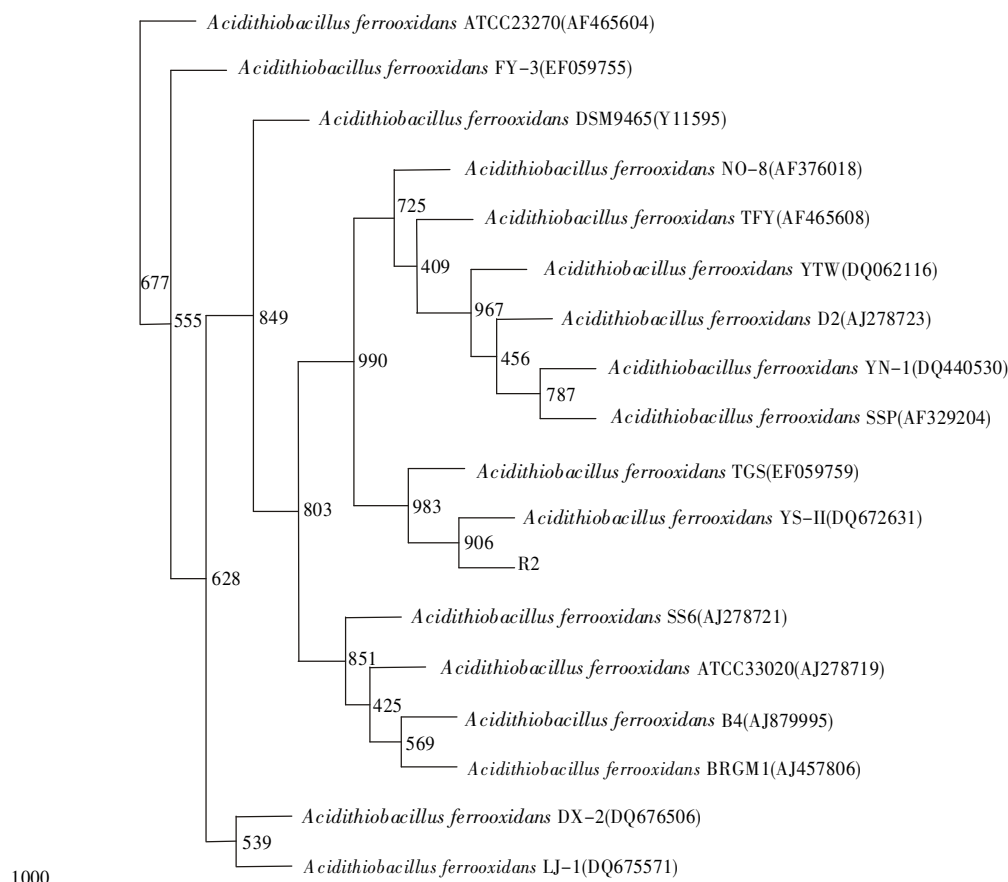


图4 基于16S rDNA 序列的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of R2 and the sequences of relating species

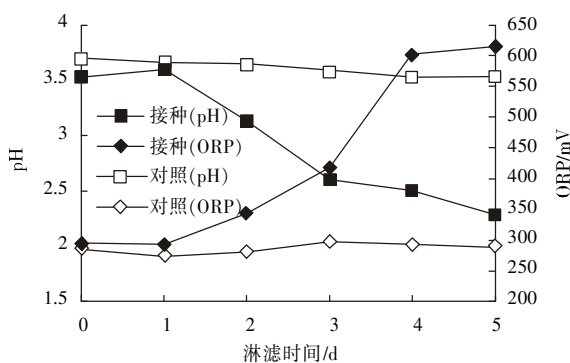


图5 生物淋滤过程中 pH 和 ORP 的变化动态

Figure 5 Dynamics of pH and ORP in soil solution during bioleaching

第1 d,其去除率就达到了72%,随后随着时间的延长,Cd 的去除率不断下降,第5 d 时仅有30%,下降了42%。可以看出,Cd 比其他3 种金属更容易被溶出,这可能与土壤中Cd 金属形态有关。Cu、Zn、Cd 在淋滤后期去除率下降可能是由于溶解出的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 被淋滤过程中生成的二次沉淀物如黄铁矾或无

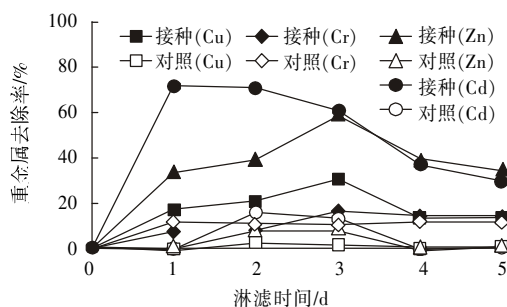


图6 土壤中重金属生物淋滤效果

Figure 6 Bioleaching efficiencies of heavy metals in soil

定形羟基硫酸铁重新吸附或与之发生共沉淀所致。在选择淋滤去除的重金属中,Cr 的去除效率最低,最高去除率仅为16.3%(第3 d)。在对照处理中,尽管在投加能源物质(FeSO_4)后由于其水解会导致pH 下降至3.52,但Cu、Cr、Zn 去除率并没有明显的升高,Cu 的去除率始终低于3%,Cr 低于12%,Zn 低于8%。这说明土壤中Cu、Cr、Zn 的生物淋滤去除主要依赖于生物氧化作用以及由此产生的更低的pH 环境。而Cd

则不同,其去除率由最初的 0.3% 迅速上升至 16.2%, 之后又有缓慢的下降,可以认为 Cd 的溶出所需要的酸性 pH 环境可能比 Cu、Cr、Zn 的宽松。

3 结 论

(1) 以 Fe^{2+} 为底物,采用改进型 Leathen 液体培养基继以固体培养基平板接种法,直接从辽宁省抚顺市红透山铜矿土壤中分离纯化得到细菌 R2, 通过细胞形态、生理生化及分子生物学鉴定,该细菌为嗜酸性氧化亚铁硫杆菌。

(2) 生理生化性质研究发现在 24 h 左右培养基中的 Fe^{2+} 基本上被完全氧化,且最适生长 pH 为 2.0。该细菌能利用亚铁、单质硫、硫代硫酸钠作为能源物质,不能利用葡萄糖、蛋白胨这些有机能源为能源物质。

(3) 接种氧化亚铁硫杆菌后,经过 5 d 的生物淋滤,Cu、Cr、Zn、Cd 的最高去除率分别为 30.6%、16.3%、58.4% 和 72%。对照处理几乎观测不到 Cu 的去除。接种后对重金属 Cd 的处理效果比其他金属好,可以考虑应用此法于受重金属 Cd 污染土壤的生物修复。

参考文献:

- [1] Brombacher C, Bachofen R, Brandl H. Development of laboratory-scale leaching plant for metal extraction from fly ash by *Thiobacillus* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998,64:1237-1241.
- [2] 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.
- [3] Xu T J, Ting Y P. Optimisation on bioleaching of incinerator fly ash by *Aspergillus niger*: use of central composite design[J]. *Enzyme Microbial Technol*, 2004,35:444-454.
- [4] Bosecker K. Microbial leaching in environmental clean-up programmes[J]. *Hydrometallurgy*, 2001,59:245-248.
- [5] Bosecker K. Bioleaching: metal solubilisation by microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1987,20:591-604.
- [6] Chartier M, Mercier G, Blais J F. Partitioning of trace metals before and after biological removal of metals from sediments [J]. *Water Research*, 2001,35 (6):1435-1444.
- [7] Mercier G, Chartier M, Couillard D, et al. Decontamination of fly ash and used lime from municipal waste incinerator using *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Environmental Management*, 1999, 24 (4):517-528.
- [8] Couillard D, Chartier M, Mercier G. Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge [J]. *Biores Technol*, 1991,36:293-302.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Solisio C, Lodi A, Veglio F. Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Waste Management*, 2002 ,22:667-675.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Chen S Y, Lin J G. Effect of substrate concentration on bioleaching of metal-contaminated sediment[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2001, 82:77-89.
- [17] Seidel H, Görsch K, Schümichen A. Effect of oxygen limitation on solid-bed bioleaching of heavy metals from contaminated sediments[J]. *Chemosphere*, 2006,65:102-109.
- [18] 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.
- [19] Gomez C, Bosecker K. Leaching heavy metals from contaminated soil by using *Thiobacillus ferrooxidans* or *Thiobacillus thiooxidans* [J]. *Gemicrobiology Journal*, 1999,16 (3): 233-244.
- [20] Liu H L, Teng C H, Cheng Y C. A semiempirical model for bacterial growth and bioleaching of *Acidithiobacillus* spp.[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2004, 99 (1): 77- 87.
- [21] Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M, et al. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage[J]. *Science*, 1998,279:1519-1522.
- [22] Kelly D P, Wood A P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000,50:489-500.
- [23] Temple K L, Colmer A R. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1951,61: 605-611.
- [24] Acharya C, Kar R N, Sukla L B. Bacterial removal of sulphur from three different coals [J]. *Fuel*, 2001,80:2207-2216.
- [25] Brierley J A, Brierley C L. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy[J]. *Hydrometallurgy*, 2001,59:233-239.
- [26] Nestor D, Valdivia U, Chaves A P. Mechanisms of bioleaching of a refractory mineral of gold with *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. *International Journal of Mineral Processing*, 2001,62:187-198.
- [27] Rawlings D E. Heavy metal mining using microbes [J]. *Annual Review Microbiology*, 2002,56:65-91.
- [28] Shi S Y, Fang Z H. Bioleaching of marmatite flotation concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. *Hydrometallurgy*, 2004,75:1-10.