

一株黑曲霉的分离鉴定及其对土壤重金属的生物浸出效果*

崔雨琪 方迪 毕文龙 崔春红 周立祥**

南京农业大学资源与环境科学学院 南京 210095

摘要 某些真菌可产生小分子有机酸, 既具有酸化环境介质的功能, 又具有络合重金属能力, 因此可有效浸出环境介质(如土壤、底泥等)中的重金属。本研究从土壤中分离得到一株产酸能力较高的真菌, 经形态学及ITS rDNA基因序列分析鉴定为黑曲霉, 命名为*Aspergillus niger* Y9。测定了其生长特性, 并采用摇瓶培养法探究其同步、分步培养法去除污染土壤中重金属的效果。结果显示, 该菌适宜生长pH范围较广(3.0-8.0), 对Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺的80%抑制浓度分别为250、130、2 700 mg/L。培养20 d后pH降至2.1, 柠檬酸、葡萄糖酸、草酸和苹果酸的产量分别为54.8、20.1、15.9、6.3 mmol/L。分步培养法污染土壤中重金属的浸出率最高为Zn 75%, Cd 100%, Pb 43%, 略优于同步培养法(Zn 64%, Cd 86%, Pb 19%)。上述结果表明, *Aspergillus niger* Y9具有较强的重金属耐受性, 能有效浸出土壤中的Zn、Cd、Pb, 为后期采用该菌处理重金属污染土壤提供了技术参考。图6 表1 参25

关键词 黑曲霉; 重金属污染土壤; 有机酸; 微生物沥浸

CLC X172 : X53

Isolation and identification of *Aspergillus niger* Y9 and its role in bioleaching of metal contaminants from soils*

CUI Yuqi, FANG Di, BI Wenlong, CUI Chunhong & ZHOU Lixiang**

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Fungus is reported to have the capability of producing organic acids that can serve as leaching agents for removing heavy metals from the environment. In this study, an acid-producing heterotrophic fungus named Y9 was isolated from soil and identified as *Aspergillus niger* through morphological and molecular identification. Furthermore, its growth and acid production characteristics, as well as its application in leaching heavy metals from contaminated soil by the one-step and two-step bioleaching processes were investigated and evaluated in shake flask culture. The results showed that *A. niger* Y9 had not only a wide range of optimal pH value from 3.0 to 8.0, but also a strong tolerance to Zn²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ and the 80% inhibitory concentration was 250 mg/L, 130 mg/L, 2 700 mg/L, respectively. After incubating for 20 days, this fungus excreted 54.8 mmol/L citric acid, 20.1 mmol/L gluconic acid, 15.9 mmol/L oxalic acid and 6.3 mmol/L malic acid. As a result, pH value of the pure culture system declined to 2.1. Besides, in the bioleaching experiment, the two-step process exhibited a relatively higher leaching efficiency of heavy metals with a maximum solubilization of 75% Zn, 100% Cd and 43% Pb, as compared to the one-step bioleaching process with removal efficiencies of 64% Zn, 86% Cd, and 19% Pb. It implied that *Aspergillus niger* Y9 has a good resistance of heavy metals and could be used to remove heavy metals from contaminated soils.

Keywords *Aspergillus niger*; soils; heavy metals; organic acids; bioleaching

随着工农业的发展及城市化进程的推进, 土壤重金属污染问题日趋严重。据统计, 我国约有2 000万hm²的耕地遭受不同程度的重金属污染, 约占耕地总面积的1/5, 而每年被污染的粮食多达1 200万t^[1-2]。去除污染土壤中重金属, 提高土壤健康质量, 对于保障农产品品质、维护人群健康意义重大。

自上世纪90年代起, 利用极端嗜酸性微生物的催化氧化(氧化还原电位Eh ≈ 500 mV)、产酸作用(pH ≈ 3.0), 即微生物沥浸技术(Bioleaching), 进行重金属污染介质(污水厂污泥、河道底泥、土壤等)的治理引起了国内外微生物学家、环境学家的广泛关注。研究表明, 该技术具有工艺简便、重金属去除彻底等优势, 应用空间较大。以往的诸多研究中采用的微生物沥浸菌种普遍为化能自养型的氧化亚铁硫杆菌(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)、氧化硫硫杆菌(*Acidithiobacillus thiooxidans*)、钩端螺旋菌(*Leptospirillum* spp.)等^[3-7]。当采用这些自养型的菌种处理重金属污染土壤

收稿日期 Received: 2013-11-11 接受日期 Accepted: 2014-01-13

*国家自然科学基金项目(21377057, 21277071)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (21377057, 21277071)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: lxzhou@njau.edu.cn)

时,通常会出现:(1)土壤溶解性有机质含量高,抑制自养菌的生长,进而导致土壤重金属微生物浸出难以启动或虽能启动但浸出周期长达40 d^[8]; (2)大多数的硫杆菌最适宜的生长pH为2.0-5.0,将其接种至土壤泥浆(pH 7.0左右)需要较长的pH适应期,进一步降低了土壤重金属的浸出效率^[9]。

近些年,有研究者指出,利用自然界中某些产酸真菌(如黑曲霉、产黄青霉、简青霉等)亦可去除污染介质中重金属,且其处理的效果、稳定性比自养型的微生物浸出菌种更好。因为这些真菌可以大量产生柠檬酸、草酸等低分子量有机酸,促使Zn、Cd、Cu等重金属活化、解析。此外,多数的真菌适宜生长pH范围较广,相比极端嗜酸性的硫杆菌更适于处理pH > 6.0的中、碱性污染介质。目前,利用产酸真菌处理低品位磷矿、垃圾焚烧飞灰、废弃工业催化剂的研究较多^[9-14],而关于黑曲霉浸出土壤重金属的报道还比较有限^[15-16]。为此,本研究从土壤中分离出一株产柠檬酸的黑曲霉,对其进行鉴定,分析该菌株适宜的生长条件(温度、pH、对重金属的耐受性等),并比较了黑曲霉与土壤泥浆同步培养和分步培养不同处理条件下土壤重金属的浸出动态,旨在为黑曲霉处理重金属污染土壤技术的建立提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

样品采自湖南株洲石峰区污染土壤,风干磨细后过20目筛待用。土壤基本性质见表1。供试土样采用HNO₃ + HClO₄ + HF法消解^[15],利用ICP-OES测定土壤重金属含量。参照土壤环境质量标准(GB15618-1995),本研究主要选取Zn、Cd、Pb为研究对象。

1.2 黑曲霉的分离、鉴定

采集5-10 cm的重金属污染土壤,称取1.5 g倒入装有灭菌水的三角瓶中,制成1%土壤菌悬液,30 ℃、120 r/min摇瓶富集培养1 d后,吸取三角瓶中的菌液作梯度稀释,再分别涂布查氏固体培养基(蔗糖 30, NaNO₃ 3, K₂HPO₄ 1, MgSO₄·7H₂O 0.5, KCl 0.5, FeSO₄ 0.01, 琼脂 20, 单位g/L),培养3-4 d观察菌落形态,挑取黑曲霉疑似菌划线于含3%溴甲酚绿的查氏筛选平板上,根据溴甲酚绿的变色范围(pH < 3.8显黄色, pH > 5.4显蓝绿色),观测并选取周边黄色透明圈较大的菌落连续划线纯化。将纯化所得菌株的孢子液稀释至相同浓度,分别接入灭菌的蔗糖发酵培养基^[11](蔗糖100, 酵母浸膏1.6, NaNO₃ 1.5, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.025, KCl 0.025, 单位g/L),30 ℃、120 r/min摇瓶培养12 d后采用NaOH滴定法测定发酵液总酸度^[17],由此筛选得到一株产酸量最大的菌株进行进一步的鉴定。

表1 供试土壤的基本理化性质

Table1 Basic physicochemical properties of the tested soils

pH	含水率 Moisture (w/w%)	有机质 Organic matters (w/g kg ⁻¹)	砂粒 Sand (w/w%)	粘粒 Clay (w/w%)	粉粒 Silt (w/w%)	锌Zn (w/g kg ⁻¹)	铅Pb (w/g kg ⁻¹)	镉Cd (w/g kg ⁻¹)	铜Cu (w/g kg ⁻¹)	锰Mn (w/g kg ⁻¹)	铬Cr (w/g kg ⁻¹)
6.3	2.5	33.9	37.4	26.7	35.9	1276.3	525.9	15.8	119.1	1237.8	62.1

pH按照水土比2.5:1 (V/V) 测定。

pH was tested at water/soils (V/V) of 2.5/1.

形态学鉴定:对分离到的菌株采用PDA平板、显微镜(乳酸石炭酸棉兰染色)及扫描电镜对菌落、菌丝、孢子等结构进行观察,并参照《真菌鉴定手册》^[18]和《中国真菌志》^[19]进行鉴定。

分子生物学鉴定:采用OMG公司生产的真菌DNA试剂盒快速提取该菌的DNA,并进行PCR扩增 18S rDNA-ITS序列,引物采用真菌ITS序列扩增通用引物ITS1-Forward (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4-Reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR反应体系为:10 × Taq Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μL, 引物 (20 μmol/L) 各0.5 μL, Taq 酶 (2U/μL) 1.3 μL, DNA模板1 μL, 加无菌水补至25 μL。PCR反应条件:94 ℃预变性5 min, 94 ℃变性45 s, 54 ℃退火45 s, 72 ℃延伸75 s, 共35个循环, 72 ℃延伸10 min。PCR产物委托上海美吉有限公司进行双向测序。将18S rDNA测序结果提交到NCBI数据库并进行BLAST比对,找到典型的菌株系列用Clustal X2.0软件进行同源性比较,并采用Meta 4.0软件构建系统发育树。

1.3 分离菌株的生长特性研究

1.3.1 最适生长温度 取恒温培养箱中生长了6 d的黑曲霉PDA斜面,用无菌水洗下孢子制成黑曲霉孢子悬浮液。吸取1%孢子液于50 mL无菌蔗糖培养基中,设置不同的培养温度(20、25、30、35、40 ℃),每个样品做3个平行试验,120 r/min摇床振荡培养48 h,过滤得到的菌丝球用无菌水冲洗数次以去除残留的培养基,于80 ℃烘箱中烘24 h至恒重,称量菌体干重。

1.3.2 最适生长pH 将蔗糖发酵培养基调节为1.0-8.0的8个不同pH,分别向50 mL不同pH的培养基中加入1%的孢子悬浮液(孢子数约为3.0 × 10⁶个/mL),每个样品3个平行试验,30 ℃、120 r/min摇床振荡培养48 h,称量菌体干重。

1.3.3 产酸特性 采用高效液相色谱(HPLC)法测定供试菌株不同生长阶段的小分子有机酸含量,参数设定如下:Waters液相色谱,UV检测器,色谱柱为Zorbax-Aq C18 250 × 4.6 mm,流动相为(NH₄)₂HPO₄-H₃PO₄ (pH 1.1),流速0.5 mL/min,进样量10 μL,波长215 nm,柱温35 ℃。

1.3.4 重金属的耐受度 分别用ZnSO₄·7H₂O、CdSO₄·8H₂O和Pb(NO₃)₂配制一定浓度的重金属母液、过滤除菌,吸取一定量的母液与灭菌PDA培养基混合均匀后倒平板,设置Zn²⁺浓度为0、50、100、200、300、400 mg/L, Cd²⁺浓度为0、20、50、100、200、300 mg/L, Pb²⁺浓度为0、600、800、1000、2000、5000 mg/L,每个处理重复3次。黑曲霉经PDA平板活化3 d后在菌落边缘用直径5 mm打孔器打孔,再接种于重金属平板中央,置于30 ℃恒温箱中培养。待对照平板(无重金属的PDA培养基)上的黑曲霉长满培养基时(约5 d),采用十字交

叉法^[20-21]测量各重金属平板上黑曲霉的直径,并用抑制率衡量该菌对重金属的耐受性:抑制率=(空白平板直径-重金属平板直径)/(空白平板直径-5 mm)。

1.4 黑曲霉浸出土壤重金属的实验研究

将供试土壤样品制备成含固率为5%的土壤泥浆.黑曲霉浸出土壤重金属试验在250 mL的三角瓶中完成.实验设置2个处理,3个重复:(1)同步培养处理:在初始阶段,接种1%黑曲霉孢子悬浮液(孢子数约为 3.0×10^6 个/mL)至5%的无菌土壤泥浆中(含蔗糖培养基组分)。(2)分步培养处理:在初始阶段,接种1%孢子悬浮液(孢子数约为 3.0×10^6 个/mL)至蔗糖培养基,纯培养2 d后,加入一定质量的土壤样品(形成的土壤泥浆的浓度亦为5%)。两组处理均在30 ℃、120 r/min摇床中振荡培养,培养期间分别于第2天(d 2)、d 4、d 6、d 9、d 12、d 15、d 20取样,于8 000 r/min离心10 min过滤,取上清测pH和重金属浓度。

2 结果与讨论

2.1 菌株鉴定

菌株Y9在PDA培养基上30 ℃培养72 h,直径40-50 mmol/L,

菌落呈椭圆形,表面突起为毛绒状,边缘粗糙;生长初期菌丝为黄白色,生长孢子后呈黑褐色;分生孢子穗球形,分生孢子梗末端有足细胞(图1)。参照《真菌鉴定手册》^[18]及《中国真菌志》(第五卷 曲霉及相关有性型)^[19]对黑曲霉的形态描述,初步确定所筛菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

将所筛菌株的18S rDNA-ITS 序列登录GenBank,与GenBank中的ITS rDNA基因序列进行同源比较,发现其与*Aspergillus niger*同源性达99%。该菌的登录序列号为KC496025.1。采用Clustal X2.0和Meta 4.0软件构建该菌的系统发育进化树(图2)。结合该菌的形态特征与培养特性,鉴定分离菌株为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。

2.2 菌株Y9的生长特性

2.2.1 温度、pH对菌株Y9生长的影响 菌种Y9在不同培养温度和不同初始pH条件下的生长状况如图3。结果表明,该菌在25-35 ℃下生长良好,低于20 ℃或高于40 ℃菌体生长受到明显的抑制,最适生长温度为30 ℃。适宜生长pH值范围(3.0-8.0)较广,低于2.0时菌体生长受到一定抑制。

2.2.2 菌株Y9在纯培养过程中的产酸特性 菌株Y9在蔗糖培养基中pH逐渐下降,并产生大量的有机酸,主要包括柠檬酸、葡萄糖酸、草酸和苹果酸,如图4所示。培养2 d, pH迅速

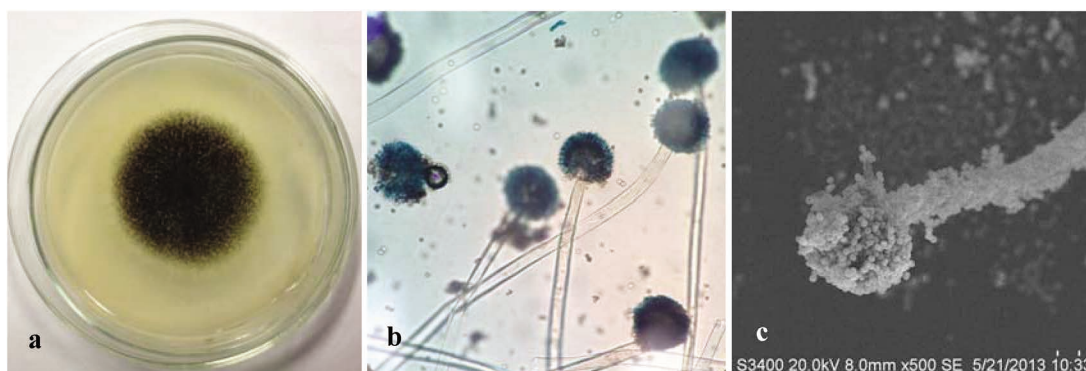


图1 菌株Y9在PDA平板(a)、显微镜(b)及扫描电镜(c)下的形态特征。

Fig. 1 Morphological photographs of strain Y9 on PDA medium (a), microscope (b) and SEM (c).

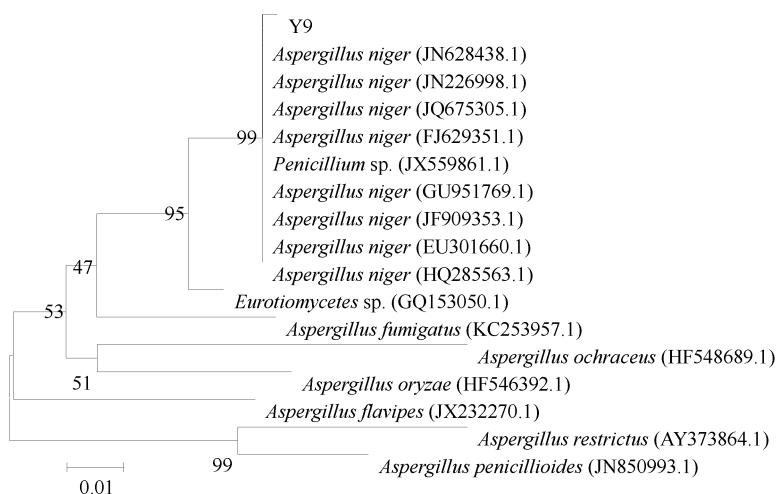


图2 菌株Y9的ITS系统发育树。

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain Y9 and related trees based on ITS sequence.

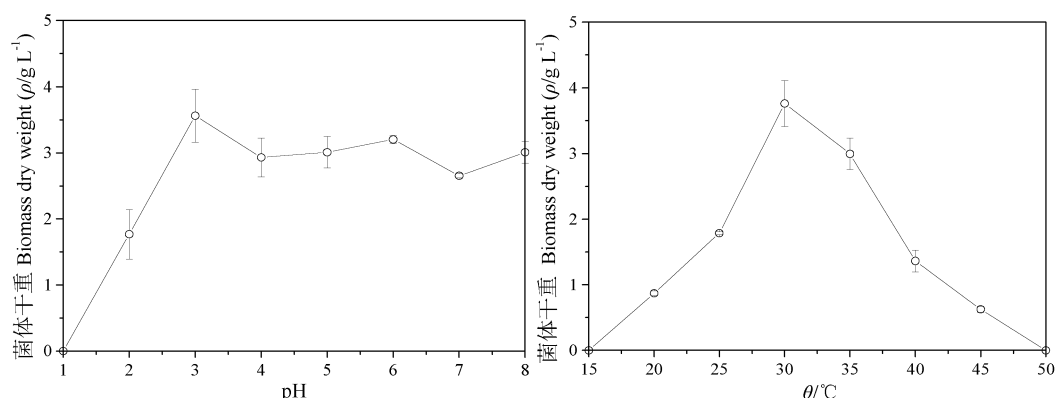


图3 温度和pH对菌株Y9生长的影响。

Fig. 3 Influence of temperature and pH on the growth of strain Y9.

降至3.0, 此时葡萄糖酸产量达到最高 (29.6 mmol/L), 后期基本趋稳, 略有下降。有研究指出, 反应体系的pH对葡萄糖酸产量的影响较大。葡萄糖氧化酶的最适pH为4.5-6.5, 而在pH < 3.0时活性大大降低^[9], 故该结果的产生可能是由于低pH条件下葡萄糖氧化酶受到抑制, 从而导致葡萄糖酸的产量降低。培养4 d, 草酸和苹果酸产量迅速增加, pH迅速下降至2.0。研究发现, 相同浓度的葡萄糖酸、草酸、柠檬酸其pH值高低依次为葡萄糖酸 > 苹果酸 > 柠檬酸 > 草酸, 因此草酸的大量产生使pH迅速下降, 在d 6达到最大产量 (26.1 mmol/L) 时, 体系降至最低pH (1.9)。而在d 6时苹果酸的含量急剧下降, 可能是由于pH的急剧下降不利于苹果酸的积累, 使其被相关酶分解。后期草酸的浓度也呈缓慢下降趋势, 而柠檬酸的浓度却不断升高, 并在20 d后基本稳定在55 mmol/L左右, 可能是草酸在柠檬酸代谢循环中, 作为中间产物被酶解, 并转化成柠檬酸。总体上看, 发酵d 20时柠檬酸产量较高 (54.8 mmol/L), 而葡萄糖酸 (20.1 mmol/L)、草酸 (15.9 mmol/L) 和苹果酸 (6.3 mmol/L) 处在较稳定水平, pH接近2.1, 这一酸性条件为土壤重金属浸出提供了极为有利的条件。

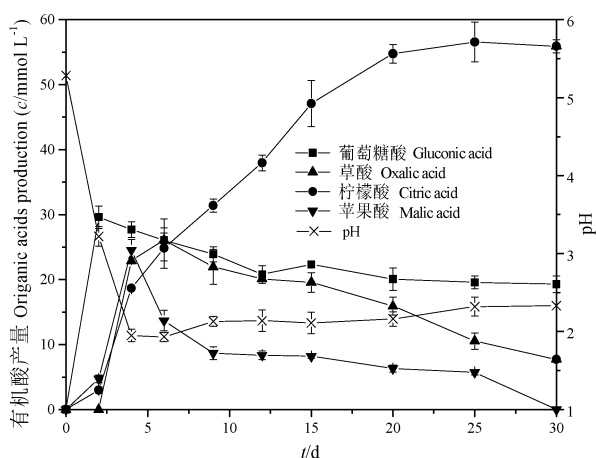
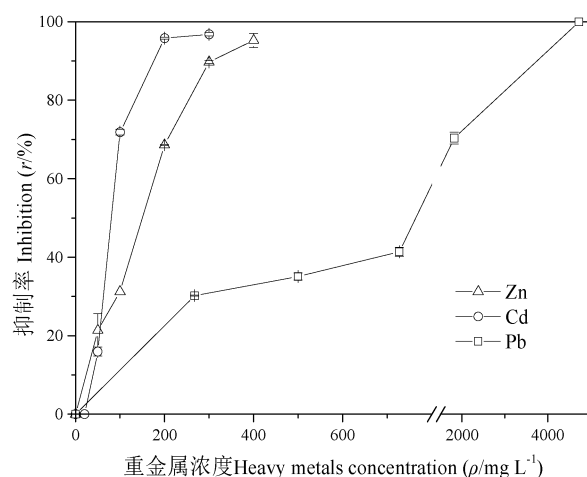


图4 菌株Y9纯培养过程中pH及有机酸的变化。

Fig. 4 Variation of pH and organic acid concentration in pure culture of strain Y9.

2.2.3 菌株Y9对重金属Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺的耐受性 重金属耐受性实验结果 (图5) 显示, 当Cd²⁺浓度低于50 mg/L、Zn²⁺浓度低于100 mg/L时, 抑制率仅为20%-30%, 说明该菌可耐受较低浓度的Cd²⁺和Zn²⁺; 当Cd²⁺浓度升至130 mg/L、Zn²⁺浓度升至250 mg/L时, 抑制率达到80%左右, 强烈抑制了菌体的生长; 而当Cd²⁺浓度高于200 mg/L、Zn²⁺浓度高于400 mg/L时, 抑制率超过95%, 菌株生长受到完全抑制。另外, 该菌对Pb²⁺的耐受度较大, 80%抑制浓度接近2 700 mg/L, 这可能是由于该菌生长过程产生了较多的草酸, 形成了草酸铅沉淀, 从而降低了游离态的Pb²⁺对该菌的毒害作用。冯宏等研究了Cd²⁺、Zn²⁺、Pb²⁺、Cu²⁺等重金属离子对溶磷型黑曲霉生长的影响, 发现黑曲霉对Cd²⁺的最大耐受浓度为100 mg/L, Zn²⁺为200 mg/L时抑制率约为80%, Pb²⁺为200 mg/L时抑制率约为20%^[22], 与本研究结果类似。

图5 重金属Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺对菌株Y9生长的影响。Fig. 5 Impacts of heavy metals Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ on the growth of strain Y9.

2.3 菌株Y9产低分子量有机酸浸出土壤重金属的效果

前述研究表明, 菌株Y9具备较强的产小分子有机酸能力及较强的重金属耐受性, 将其接种到5%的土壤泥浆中, 土壤泥浆pH、重金属的浸出变化动态如图6所示。同步培养时,

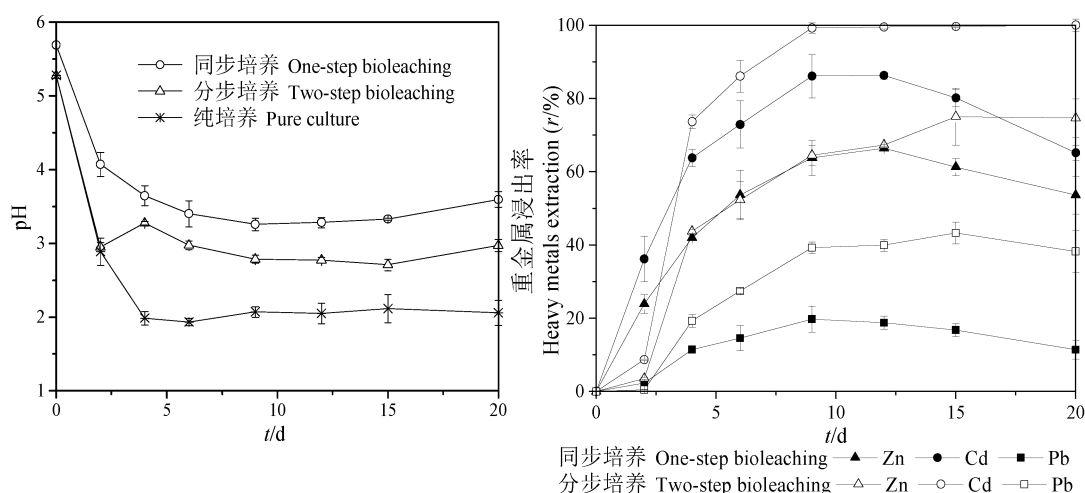


图6 菌株Y9处理重金属污染土壤过程中pH变化及重金属的浸出动态。

Fig. 6 Variation of pH and heavy metal extraction in different leaching process.

培养2 d pH迅速从5.7降至4.1, 随后缓慢下降, 6 d以后pH基本稳定在3.4左右. 分步培养时, 培养2 d后pH迅速从5.3降至2.9, 而随着5% (m/V) 土壤的加入, 由于其缓冲性使pH在d 4升至3.3, d 6 pH再度下降至3.0, 此后整个体系的pH基本维持稳定. 而不加土壤的纯培养体系, pH在前2 d迅速下降随后又有缓慢下降, 并从d 6起基本稳定在2.1左右. 综上所述, 培养20 d, 纯培养体系的终点pH最低 (pH 2.1), 分步培养次之 (pH 3.0), 同步培养的最高 (pH 3.4), 这说明重金属污染土壤的介入对菌株Y9的孢子萌发过程毒害较大, 影响了菌体的生长和后期的产酸速率.

由图6b可知, 菌株Y9的同步和分步培养对Zn的浸出率相差甚微, 只在后期分步培养略高于同步, 而对于Cd和Pb, 分步培养的重金属浸出效果始终优于同步培养. 此外, 随着培养时间的延长, 同步培养时重金属的浸出率呈现先增加后维持稳定再略有减少的变化趋势, 培养9-12 d浸出率达到最高 (Zn 66%, Cd 86%, Pb 19%). 相比之下, 分步培养时重金属的浸出率呈现先迅速增加而后维持稳定或略有上升的变化趋势, 培养9 d后各重金属的浸出率基本稳定, 最高可达Zn 75%、Cd 100%、Pb 43%. 总体上看, Cd的浸出率较高, 而Pb的浸出率较低. 我们推测: 一方面, 这可能与土壤重金属的赋存形态有关, 通过Tessier分步提取法^[23-24]对本研究所用土壤中重金属的化学形态进行分级, 结果发现, Zn在土壤中的重金属形态分布为可交换态13%、碳酸盐结合态13%、铁锰氧化物结合态53%、有机结合态3%、残余态18%; Cd在土壤中仅以前3种形态存在, 分别占68%、12%、20%; Pb的上述形态分别占2%、16%、62%、3%、17%. 分析可知, Cd在供试土壤中主要以可交换态形式存在, 故在土壤中的迁移性强、生物可利用性最高, Zn的可交换态和碳酸盐结合态所占比重也达到25%, 而Pb主要是以较稳定的铁锰结合态、有机结合态和残余态为主, 因此其较难从土壤中淋洗出来. 另一方面, 这也可能与黑曲霉的产酸类型有关. 由于该菌生长过程中产生大量的草酸, 而草酸铅为难溶解的沉淀物, 因此Pb的浸出率较低. 李洁等也曾报道, 重金属土壤的加入会较大影响黑曲霉的产

酸类型、产酸量^[25]. 此外, 任婉侠等利用黑曲霉处理沈阳某灌区重金属污染土壤, 泥浆浓度为5%时, 分步培养9 d后浸出率为Zn 18%、Cd 86%、Pb 8%^[16], 说明菌株Y9具有较好的重金属浸出效果.

3 结论

本研究自重金属污染土壤中分离出一株产柠檬酸、葡萄糖酸、草酸等小分子有机酸的真菌Y9, 经形态学及ITS rDNA序列分析鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*). 该菌最适生长温度30 ℃, 生长pH 3.0-8.0, 对Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺的80%抑制浓度分别为250 mg/L、130 mg/L、2 700 mg/L, 纯培养20 d可产生柠檬酸 (54.8 mmol/L)、葡萄糖酸 (20.1 mmol/L)、草酸 (15.9 mmol/L) 和苹果酸 (6.3 mmol/L). 利用该菌株可有效浸出土壤重金属, 接入1%的孢子悬浮液、纯培养2 d后加入灭菌土壤使泥浆浓度为5%的分步处理条件下, d 15 Zn、Cd、Pb的最高浸出率分别为75%、100%、43%. 将等浓度的1%孢子液接入含固率为5%的灭菌土壤泥浆的同步培养条件下, Zn、Cd、Pb的最高浸出率出现在d 12, 分别为64%、86%、19%, 不及分步培养的浸出效果好.

参考文献 [References]

- 1 骆永明. 中国主要土壤环境问题及对策[M]. 南京: 河海大学出版社, 2008 [Luo YM. Soil Environmental Problems and Countermeasures in China [M]. Nanjing: Hohai University Press, 2008]
- 2 康彩霞. GIS与地统计学支持下的哈尔滨市土壤重金属污染评价与空间分布特征研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009 [Kang CX. Study evaluation and spatial distribution characteristics of heavy metal pollution in soil of Harbin base on GIS and Geo-statistics [D]. Changchun: Jilin University, 2009]
- 3 徐磊辉, 黄巧云, 陈雯莉. 环境重金属污染的细菌修复与检测[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10 (2): 256-162 [Xu LH, Huang QY, Chen WL. Bacterial bioremediation and bio-detection of heavy metal-

- contaminated environments [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10** (2): 256-262]
- 4 NareshKumar R, Nagendran R. Changes in nutrient profile of soil subjected to bioleaching for removal of heavy metals using *Acidithiobacillus thiooxidans* [J]. *J Hazard Mater*, 2008, **156** (1-3): 102-107
- 5 Akinci G, Guven DE. Bioleaching of heavy metals contaminated sediment by pure and mixed cultures of *Acidithiobacillus* spp. [J]. *Desalination*, 2011, **268** (1-3): 221-226
- 6 刘纓, 林建群, 颜望明. 浸矿细菌-钩端螺旋菌属菌株研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, **33** (2): 151-155 [Liu Y, Lin JQ, Yan WM. Bioming microbes-recent research progress of bacteria belonging to the genus *Leptospirillum* [J]. *Microbiol China*, 2006, **33** (2): 151-155]
- 7 顾幅华, 孙小俊, 李建华, 苏丽君, 刘玉林, 赵开乐. 嗜铁钩端螺旋菌对黄铁矿浸出的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2010, **4** (1): 1223-1228 [Gu GH, Sun XJ, Li JH, Su LJ, Liu YL, Zhao KL. Bioleaching of pyrite by *L. ferriphilum* [J]. *J Central South Univ (Sci Technol)*, 2010, **4** (1): 1223-1228]
- 8 王世梅. 耐酸性酵母菌R30加速污泥生物沥浸进程机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007 [Wang SM. Mechanism of accelerating bioleaching process of sludge with *Rhodotorula* sp. R30 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007]
- 9 Wu HY, Ting YP. Metal extraction from municipal solid waste (MSW) incinerator fly ash—chemical leaching and fungal bioleaching [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **38** (6): 839-847
- 10 Mohapatra S, Bohidar S, Pradhan L, Kar RN, Sukla LB. Microbial extraction of nickel from Sukinda chromite overburden by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Aspergillus* strains [J]. *Hydrometallurgy*, 2007, **85** (1): 1-8
- 11 Bosshard PP, Bachofen R, Brandl H. Metal Leaching of fly ash from municipal waste incineration by *Aspergillus niger* [J]. *Environ Sci Technol*, 1996, **30** (10): 3066-3070
- 12 Yang J, Wang Q, Wang Q, Wu T. Heavy metals extraction from municipal solid waste incineration fly ash using adapted metal tolerant *Aspergillus niger* [J]. *Bioresource Technol*, 2009, **100** (1): 254-260
- 13 Aung KMM, Ting YP. Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger* [J]. *J Biotechnol*, 2005, **116** (2): 159-170
- 14 Swamy KM, Sukla LB, Narayana KL, Kar RN, Panchanadikar VV. Use of ultrasound in microbial leaching of nickel from laterites [J]. *Ultrason Sonochem*, 1995, **2** (1): S5-S9
- 15 Ren WX, Li PJ, Geng Y, Li XJ. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger* [J]. *J Hazard Mater*, 2009, **167**: 164-169
- 16 任婉侠, 李培军, 李晓军. 黑曲霉产酸淋滤去除污染土壤中的重金属[J]. 中国环境科学, 2008, **28** (8): 736-741 [Ren WX, Li PJ, Li XJ. Removal of heavy metals from contaminated soils using organic acids produced by *Aspergillus niger* [J]. *China Environ Sci*, 2008, **28** (8): 736-741]
- 17 李常健, 潘宏. 产柠檬酸黑曲霉高产菌株的筛选[J]. 湖南科技学院学报, 2009, **30** (12): 26-29 [Li CJ, Pan H. Screening of the high-yield *Aspergillus niger* strain producing citric acid [J]. *J Hunan Univ Sci Eng*, 2009, **30** (12): 26-29]
- 18 魏景超 主编. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979 [Wei JC ed in chief. Manual Identification of Fungi [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1979]
- 19 齐祖同 主编. 中国真菌志(第五卷 曲霉属及其相关有性型) [M]. 北京: 科学出版社, 1997 [Qi ZT ed in chief. Flora Fungorum Sinicorum (volume 5): *Aspergillus* et Teleomorphi Cognati [M]. Beijing: Science Press, 1997]
- 20 Anahid S, Yaghmaei S, Ghobadinejad Z. Heavy metal tolerance of fungi [J]. *Sci Iran*, 2011, **18** (3): 502-508
- 21 柴兆祥, 李金花, 楼兵干, 李唯, 甘辉林, 郭成, 赵玲, 董迪. 玉米根围土壤中腐霉菌的分离鉴定及核糖体DNA-ITS 序列分析[J]. 草业学报, 2009, **18** (3): 126-135 [Chai ZX, Li JH, Lou BG, Li W, Gan HL, Guo C, Zhao L, Dong D. Isolation, identification, and sequence analysis of rDNA-ITS of *Pythium* species sampled from rhizosphere soil of corn [J]. *Acta Pratacult Turae Sin*, 2009, **18** (3): 126-135]
- 22 冯宏, 王艳霞, 李永涛, 张志红, 郭彦彪. 重金属对溶磷黑曲霉生长的影响[J]. 广东农业科学, 2010, **6**: 200-202 [Feng H, Wang YY, Li YT, Zhang ZH, Guo YB. Effect of heavy metals on the phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2010, **6**: 200-202.]
- 23 Tessier A, Campbell PGC, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. *Anal Chem*, 1979, **51** (7): 844-851
- 24 Dacera DDM, Babel S. Removal of heavy metals from contaminated sewage sludge using *Aspergillus niger* fermented raw liquid from pineapple wastes [J]. *Bioresource Technol*, 2008, **99** (6): 1682-1689
- 25 李洁. 黑曲霉(*Aspergillus niger*)的分离鉴定及其在重金属污染土壤异养生物淋滤处理中的作用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012 [Li J. Isolation of *Aspergillus niger* and its role in heterotrophic bioleaching of heavy metals-laden soil [D]. Qingdao: Ocean University, 2012]