

张进,熊和琴,姚桃花,等.分子印迹电化学传感器检测环境中特丁津研究[J].环境科学与技术,2014,37(5):31-35. Zhang Jin, Xiong Heqin, Yao Taohua, et al. A molecularly imprinted polymers electrochemical sensor for determination of terbuthylazine in environmental samples[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 37(5): 31-35.

# 分子印迹电化学传感器检测环境中特丁津研究

张进<sup>1,2</sup>, 熊和琴<sup>2</sup>, 姚桃花<sup>2</sup>, 罗荣琴<sup>1</sup>, 李世杰<sup>1</sup>

(1.中国科学院地球化学研究所环境地球化学国家重点实验室,贵州 贵阳 550002;

2.贵州师范学院化学与生命科学学院,贵州 贵阳 550018)

**摘要** 除草剂在水体、土壤、大气等环境介质中的残留广受关注。在弱酸条件下,于铂电极表面电化学聚合邻氨基苯酚(oAP)制备了除草剂特丁津(TB)分子印迹电化学传感器(MIECS)。以  $K_3Fe(CN)_6$  为电化学探针,利用循环伏安法和交流阻抗技术研究了 MIECS 的识别性能。结果表明  $K_3Fe(CN)_6$  的峰电流值与 TB 浓度在 2~160  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现较好的线性关系( $R^2=0.9915$ )。检出限为 0.66  $\mu\text{mol/L}$ 。MIECS 达到稳定电流响应时间约为 8 min,对 TB 具有较好的选择性和稳定性。将该印迹膜传感器用于农田环境水样的检测分析,回收率在 97.6%~102.2%。

**关键词** 分子印迹技术; 电化学传感器; 电聚合膜; 除草剂特丁津

中图分类号 X132 文献标志码 A doi:10.3969/j.issn.1003-6504.2014.05.007 文章编号:1003-6504(2014)05-0031-05

## A Molecularly Imprinted Polymers Electrochemical Sensor for Determination of Terbuthylazine in Environmental Samples

ZHANG Jin<sup>1,2</sup>, XIONG Heqin<sup>2</sup>, YAO Taohua<sup>2</sup>, LUO Rongqin<sup>1</sup>, LI Shijie<sup>1</sup>

(1.State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. School of Chemistry and Life Science, Guizhou Normal College, Guiyang 550018, China)

**Abstract**: Pollution of herbicide residues in water, soil and atmosphere has drawn common concern. This paper described an electrochemical sensor of molecularly imprinted polymers membrane (MIECS) for detecting herbicide terbuthylazine (TB), which was prepared by the method of electropolymerization with o-aminophenol (oAP) onto a platinum electrode. For performance recognition of the MIECS, the investigation was conducted by a  $K_3Fe(CN)_6$  probe which was based on the techniques of cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The results showed that the peak current of  $K_3Fe(CN)_6$  decreased linearly in a range from 2 to 160  $\mu\text{mol/L}$  ( $R^2=0.9915$ ) of TB concentration with a detection limit of 0.66  $\mu\text{mol/L}$ ; and the response time was approximately 8 min. In addition, the MIECS showed high selectivity and long-term stability, e.g. a successful application of MIECS to measuring TB concentrations of water samples from farmland showed that the recoveries were within the range from 97.6% to 102.2%.

**Key words**: molecular imprinting technique; electrochemical sensor; electro-polymerization film; herbicide terbuthylazine

特丁津(terbuthylazine, TB),化学名称 2-氯-4-特丁氨基-6-乙氨基-1,3,5-三嗪,是一种广泛使用的芽前和芽后除草剂,主要用于去除农田阔叶杂草和一年生杂草<sup>[1]</sup>。TB 难以被生物降解,在水体、土壤、大气等环境中的残留对人类、动物和后茬作物等均有毒害作用<sup>[2]</sup>。研究表明,TB 对哺乳动物<sup>[3]</sup>、土壤微生物<sup>[4]</sup>、水生生

物<sup>[5-9]</sup>等具有较强的毒性。目前,对 TB 含量的分析方法尚无国家标准或行业标准,文献报道的检测方法涉及荧光免疫分析法<sup>[7]</sup>、气相色谱法<sup>[8]</sup>、液相色谱法<sup>[9]</sup>和色谱-质谱联用技术<sup>[10]</sup>等。这些方法尚存在操作繁杂、分析时间长、试剂消耗量大、选择性低<sup>[11]</sup>等不足。尤其是在除草剂复杂基体环境中,难以实现对 TB 单一组分含量

《环境科学与技术》编辑部(网址)http://fjks.chinajournal.net.cn(电话)027-87643502(电子信箱)hjkxyjs@126.com

收稿日期 2013-07-15,修回 2013-10-09

基金项目:贵州省科学技术基金项目资助(J20102120),贵州省特色重点学科建设项目(2012442),贵州省自然科学基金项目(2012052)

作者简介:张进(1980-),男,副教授,博士研究生,主要从事环境污染分离与分析新方法、新技术研究,(电话)0851-5816647(电子信箱)zhang@gznc.edu.cn。

分析。因此,有必要发展具有特异性识别能力的分析方法,以提高农残分析的准确性和速度<sup>[12]</sup>。分子印迹电化学传感器(MIECS)因具有预定性好,选择性高,稳定性好,可批量生产等优势,在环境监测、药物分析和农药残留检测等领域展现了良好的应用前景<sup>[13-14]</sup>。在 MIECS 敏感膜的制备方法中,电聚合成膜方式由于形成的膜具有厚度及多孔性易于控制,在电极表面附着性好等优势,被认为是制备 MIECS 敏感膜最有潜力的方法之一。本文以 TB 为印迹分子,  $\rho$ AP 为功能单体,通过电化学聚合法制备了对 TB 具有特异性识别能力的 MIECS。利用循环伏安法(CV)和交流阻抗法(EIS)对 TB 在 MIECS 上的电化学响应进行了研究,建立了一种简便、快速、灵敏的 TB 分析方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

CHI660D 电化学工作站(上海辰华仪器有限公司), SG8200APT 超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司), DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器(上海梅香仪器有限公司);三电极体系:以裸铂电极或分子印迹膜修饰的铂电极为工作电极,铂丝为对电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。

特丁津(TB, 98.8%)、吡啶磺隆(PSE, 98.8%)、苄嘧磺隆(BSM, 97.1%) (上海市农药研究所);邻氨基苯酚(oAP, 98%),  $K_3Fe(CN)_6$  ( $\geq 99\%$ )(上海 aladdin 公司), N-N 二甲基甲酰胺(DMF), 乙腈(成都金山化学试剂有限公司)。不同 pH 值 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(PBS)用 0.2 mol/L  $KH_2PO_4$  和  $Na_2HPO_4$ , 加 0.1 mol/L KCl 电解质配制。其它试剂均为分析纯。实验用水为超纯水,由 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

### 1.2 溶液的配制

配制 0.1 mol/L HAc-NaAc 缓冲液(ABS, pH 5.0)和 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  溶液(含 0.1 mol/L KCl)。称取 0.005 7 g TB 标准品溶于 10 mL DMF,加水配成  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的 TB 储备液,摇匀,低温保存。其它浓度标准溶液均由此储备液逐级稀释配制。

### 1.3 分子印迹膜传感器的制备

铂电极( $\Phi=2$  mm)依次经 1.0、0.3、0.05  $\mu m$  的  $Al_2O_3$  悬浊液在麂皮上抛光,然后分别用无水乙醇、去离子水超声清洗 10 min,氮气吹干备用。

将 0.05 mmol TB 和 0.1 mmol oAP 加入 5 mL ABS (pH 5.0)和 5 mL DMF 混合液中,超声分散 10 min,通氮气除氧 10 min。在 -0.2~0.8 V 电位范围内以 50 mV/s 扫描速率 CV 扫描聚合 15 圈,即得到嵌有 TB 模板的

印迹膜电极。将印迹膜电极悬浮于 DMF/水(2:1, V/V)溶液中,搅拌洗脱 100 min 以除去模板 TB。非印迹膜电极的制备除不加模板分子外,其余步骤与印迹膜电极相同。

### 1.4 检测方法

将洗脱模板后的印迹膜电极置于一定浓度的 TB 溶液中吸附 8 min,再于 -0.2~+0.8 V 电位范围内,以 50 mV/s 的扫描速率进行 CV 表征。检测底液为 5 mL 含 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  和 0.1 mol/L KCl 的 PBS(pH 8.0)。每次使用后,将电极浸于 DMF/水(2:1, V/V)溶液中搅拌洗脱 100 min,洗去聚合物基质中的 TB 模板,以便重复使用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 印迹膜的形成

TB 印迹膜电聚合过程的循环伏安曲线见图 1。由图可知,扫描第一圈时 oAP 在 0.522 9 V 左右产生了明显的阳极峰电流( $i_p \approx 60.22 \mu A$ )。随着扫描圈数的增加,电流响应逐渐变弱并趋于稳定。原因是电位扫描过程中产生自由基负离子,引发 oAP 聚合反应,电极表面被生成的分子印迹膜覆盖,电子传输能力减弱,电流下降。由曲线的形状可以看出,  $\rho$ AP 的电化学聚合是一个不可逆过程,生成的 oAP 膜为低导电性聚合物膜。当扫描至 15 圈左右时,电流值不再降低,说明电极表面形成了致密的分子印迹膜,电流趋于稳定<sup>[15]</sup>。

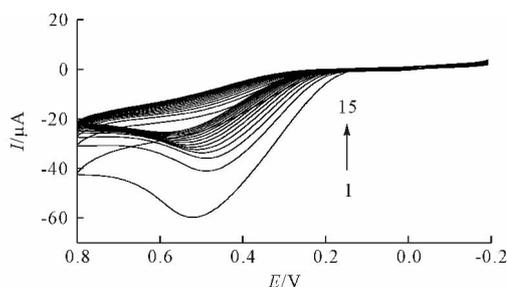


图1 TB印迹膜电聚合过程的循环伏安曲线  
Fig.1 CVs of the electropolymerization of imprinted film

### 2.2 印迹膜的表面

#### 2.2.1 循环伏安表征

以  $K_3Fe(CN)_6$  溶液为电化学分子探针,根据  $K_3Fe(CN)_6$  的氧化还原电流信号变化情况判断膜的印迹效应。不同修饰电极制备过程的循环伏安图如图 2 所示。

实线标示的曲线是裸铂电极表面  $K_3Fe(CN)_6$  的特征氧化还原电流曲线。在电聚合形成的印迹膜电极表面几乎观察不到氧化还原峰,说明电聚合形成的 oAP 聚合膜具有致密的膜结构,阻碍了  $K_3Fe(CN)_6$  探针在底液和电极表面间的氧化还原反应。而当洗脱模板 TB 后,在聚合膜内形成了 TB 的特有识别孔穴,  $K_3Fe(CN)_6$

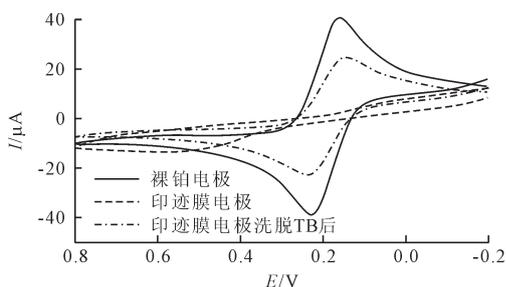


图2  $K_3Fe(CN)_6$ 在不同修饰电极上的循环伏安曲线  
Fig.2 CVs of  $K_3Fe(CN)_6$  on different modified electrodes

可通过印迹孔穴扩散至铂电极表面, 所以其峰电流增加。当印迹膜电极再次吸附 TB 后, 识别孔穴被重新占据, 传质通道被封闭, 氧化还原电流强度逐渐减弱, 峰电流降低, 降低程度受吸附时间和模板分子浓度的影响<sup>[16]</sup>。由此建立起根据  $K_3Fe(CN)_6$  峰电流变化间接检测 TB 的定量方法。

### 2.2.2 交流阻抗表征

交流阻抗是探测修饰电极表面状况的有效工具<sup>[17]</sup>。实验进一步通过交流阻抗技术对聚合膜的印迹效应进行证实。在 25 °C、 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.0 \times 10^6$  Hz 频率范围和 220 mV 激励电压的条件下于  $K_3Fe(CN)_6$  溶液中测试了不同修饰电极的交流阻抗行为 (图 3)。在阻抗曲线的高频部分出现规则的膜本体阻抗半圆, 低频部分可观察到 Warburg 阻抗。裸铂电极的阻抗接近直线, 说明其阻抗值很小。随着电极表面印迹膜的形成, 电极阻抗值剧烈增加, 说明电聚合形成的印迹膜能够稳定地修饰在电极表面。当洗脱 TB 后, 电极的阻抗值明显减小。说明模板分子可通过该途径洗脱, 印迹膜电极可实现再生利用。而再次吸附 TB 后, 识别孔穴被重新占据, 因此阻抗值增加。

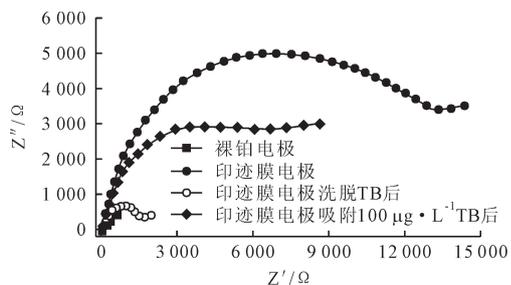


图3 不同修饰电极的交流阻抗图  
Fig.3 EIS of the different modified electrodes

## 2.3 实验条件优化

### 2.3.1 洗脱体系的确定

分别考察了 50%乙醇溶液、乙醇/乙酸(2:1, V/V)、DMF/水(1:2, V/V)和 DMF/水(2:1, V/V)4 种溶液对模板的去除效果。结果发现 DMF/水(2:1, V/V)溶液去除模板的效果最好, 50%乙醇溶液难以洗脱模板, 乙醇/乙酸(2:1, V/V)溶液洗脱模板相对较难, DMF/水(1:2, V/V)

溶液洗脱时间较长(>3 h)。因此, 实验最终选择 DMF/水(2:1, V/V)溶液为 TB 的洗脱剂。

### 2.3.2 洗脱时间的选择

洗脱时间对传感器的再生重复使用和洗脱效果有较大影响, 实验通过交流阻抗技术对洗脱时间进行优化, 结果如图 4 所示。随着洗脱时间的增加, 印迹膜的交流阻抗值逐渐减小。这是由于膜电极中 TB 不断溶出, 留下的印迹孔穴逐渐增多, 膜的阻抗逐渐减小。当洗脱时间超过 100 min 后, 印迹膜的阻抗值趋于稳定, 表明印迹膜中的 TB 去除完全。因此, 后续实验选择模板的洗脱时间为 100 min。

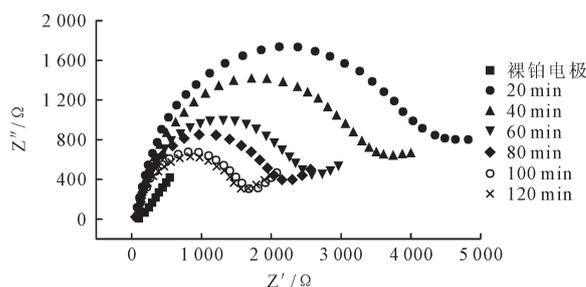


图4 印迹膜电极洗脱不同时间后的EIS图  
Fig.4 Influence of the elution time on the EIS response of the imprinted electrode

### 2.3.3 溶液酸度的影响

固定 TB 浓度为 150 μmol/L, 通过 PBS 调节测试背景溶液的 pH 值在 5.0~10.0 范围内改变, 用 CV 法测试印迹膜电极的响应曲线。由图 5 可以看出, 随着 pH 的增加,  $K_3Fe(CN)_6$  的峰电位逐步降低, 峰电流先降低后增加。当 pH 值为 8.0 时,  $K_3Fe(CN)_6$  峰电流值达到最小值, 说明此条件下有更多的识别位点被占据, 识别效果最好。因此, 选择 pH 8.0 PBS 作为基体溶液对 TB 进行测定。

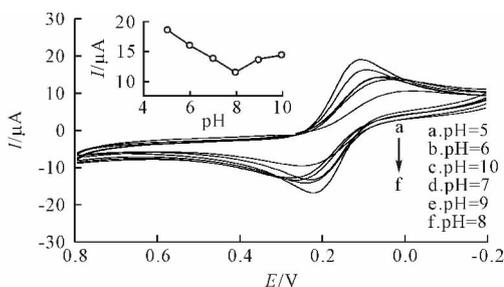


图5 印迹膜电极在不同pH值下的循环伏安曲线  
Fig.5 Influence of pH on the CV response of the imprinted electrode

### 2.3.4 吸附时间的选择

实验考察了 TB 在印迹膜电极上的吸附时间对  $K_3Fe(CN)_6$  峰电流的影响情况。将洗脱后的印迹膜电极放入含 150 μmol/L TB 和 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  的 PBS(pH 8.0)溶液中, 每隔 1 min 用循环伏安法测定一次。由图 6 可以看出, 随着吸附时间增加, 峰电流值迅

速降低,曲线的斜率不断减小,即吸附越来越慢。超过 4 min 后峰电流变化随吸附时间的增加明显变缓。8 min 后趋于平缓,说明印迹膜中的 TB 结合位点吸附趋于饱和。实验同时发现, TB 浓度对吸附时间的影响较小,所以实验中选择开路吸附时间为 8 min。

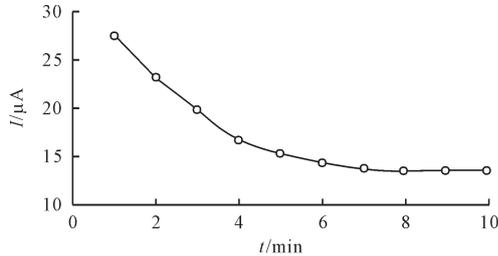


图6 吸附时间对印迹膜电极响应的影响  
Fig.6 Influence of the adsorption time on the response of the imprinted electrode

#### 2.4 印迹膜电极的响应性能

在优化的实验条件下,将洗脱后的印迹膜电极浸入含不同浓度的 TB 系列标准溶液中吸附 8 min。然后于 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  的 PBS(pH 8.0)测试溶液中 CV 扫描,结果如图 7 所示。 $K_3Fe(CN)_6$  峰电流随着 TB 浓度的增加而逐渐降低。其峰电流值与 TB 浓度在 2~160  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈良好的线性关系( $R^2=0.9915$ )。线性回归方程为  $i_p(\mu\text{A})=-0.0922C(\mu\text{mol/L})+27.962$ 。从斜率可求得在信噪比为 3 时,其检出限为 0.66  $\mu\text{mol/L}$ 。

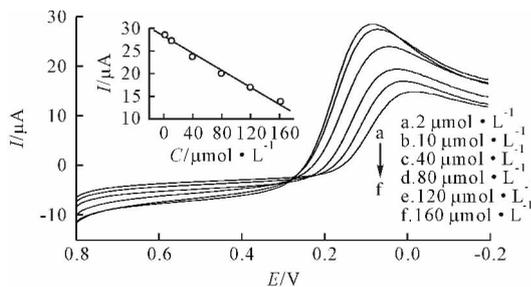


图7 印迹膜电极在 TB 溶液中的 CV 图  
Fig.7 CVs of the imprinted electrode in 5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  solution at TB concentration

实验以 TB 的结构类似物和常见共存物除草剂 PSE、BSM 作为竞争结合底物考察印迹膜电极的选择性识别能力。将印迹膜电极置于同浓度的 BSM、PSE、TB 混合溶液中吸附后检测  $K_3Fe(CN)_6$  氧化峰电流变化情况,结果发现电流值为未加干扰物时的 97.5%,说明 PSE、BSM 对印迹膜电极的干扰很小。

#### 2.5 实际样品初步分析

以当地农田水样考察印迹膜电极的实际应用可行性<sup>[3]</sup>。分别采集不同区域的农田水样 3 份(每份 5.0 mL),用 PBS 调节其 pH 为 8.0。放入洗脱后的印迹膜电极吸附 8 min 后于测试背景溶液中进行检测。然后采用标准加入法向其中加入一定量的 TB 标准溶液后

再进行检测。每个样品平行测定 5 次,取其平均值。由表 1 可知,其回收率范围为 97.6%~102.2%,相对标准偏差为 2.65%~4.51%,表明传感器具有较好的实际样品分析应用潜力。

表 1 印迹膜电极对农田水样中 TB 的分析结果( $n=5$ )  
Table 1 Results for the determination of TB in farmland water samples

样品	检出量 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	加入量 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	检出量 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	RSD /%
1	未检出	5	4.88	97.6	2.65
2	3.11	20	23.63	102.2	4.51
3	4.26	100	102.93	98.7	4.04

### 3 结论

通过在模板分子 TB 存在下,于铂电极表面电聚合 oAP,制备了对 TB 具有较好特异识别性能的 MIECS,构建了一种以  $K_3Fe(CN)_6$  为电化学探针间接测定除草剂 TB 的检测新方法。结果表明,  $K_3Fe(CN)_6$  的峰电流值与 TB 浓度在 2~160  $\mu\text{mol/L}$  范围内呈现较好的线性关系,检出限为 0.66  $\mu\text{mol/L}$ 。MIECS 能在同浓度的结构类似竞争底物 PSE、BSM 存在下较好地选择性识别 TB。将 MIECS 应用于农田环境水样的检测分析,回收率在 97.6%~102.2%间。

#### [参考文献]

- [1] Sahid I B, Teoh S S. Persistence of terbutylazine in soils[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1994, 52(2): 226-230.
- [2] Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, et al. Effects of the herbicide Roundup<sup>TM</sup> on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Marine Environmental Research, 2000, 50(1): 263-266.
- [3] Lang D H, Rettie A E, Böcker R H. Identification of enzymes involved in the metabolism of atrazine, terbutylazine, ametryne and terbutryne in human liver microsomes [J]. Chemical Research in Toxicology, 1997, 10(9): 1037-1044.
- [4] Salminen J, Eriksson I, Haimi J. Effects of terbutylazine on soil fauna and decomposition processes [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 34(2): 184-189.
- [5] Marchini S, Passerini L, Cesareo D, et al. Herbicidal triazines: acute toxicity on daphnia, fish, and plants and analysis of its relationships with structural factors [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1988, 16(2): 148-157.
- [6] Steinberg C E W, Mayr C, Lorenz R, et al. Dissolved humic material amplifies irritant effects of terbutylazine (triazine herbicide) on fish [J]. Naturwissenschaften, 1994, 81(5): 225-227.
- [7] Ulrich P, Weil L, Niessner R. Rapid fluorescence immunoassay (FIA) for the determination of terbutylazine [J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1992, 343(1):

- 50-51.
- [8] Navarro S, Oliva J, Barba A, et al. Determination of simazine, terbutylazine and their dealkylated chlorotriazine metabolites in soil using sonication microextraction and gas chromatography[J]. *Journal of AOAC International*, 2000, 83(5):1239-1243.
- [9] Papadopoulos N, Gikas E, Zalidis G, et al. Simultaneous determination of terbutylazine and its major hydroxy and dealkylated metabolites in wetland water samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(18):7270-7277.
- [10] Ferrer C, Gómez MJ, García-Reyes JF, et al. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1069(2):183-194.
- [11] Schachterle S, Feigel C. Pesticide residue analysis in fresh produce by gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 754(1):411-422.
- [12] 胡玉玲, 朱飞, 李家威, 等. 特丁津分子印迹整体萃取棒的研制及其萃取性能[J]. *分析化学*, 2009, 37(3):466-470.  
Hu Yuling, Zhu Fei, Li Jiawei, et al. Preparation of terbutylazine molecularly imprinted monolithic bar and its extraction property[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(3):466-470.(in Chinese)
- [13] Piletsky S A, Piletskaya E V, Panasyuk T L, et al. Imprinted membranes for sensor technology: opposite behavior of covalently and noncovalently imprinted membranes[J]. *Macromolecules*, 1998, 31(7):2137-2140.
- [14] 赵硕, 崔莉凤, 申晴. 谷氨酸分子印迹电化学传感器的研究[J]. *环境科学与技术*, 2012, 35(11):70-74.
- Zhao Shuo, Cui Lifeng, Shen Qing. Glutamate electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 35(11):70-74.(in Chinese)
- [15] 李建平, 李玉平, 魏小平. 基于三聚氰胺膜电催化与酶催化放大的分子印迹电化学传感器测定绿麦隆[J]. *化学学报*, 2012, 70:1853-1857.  
Li Jianping, Li Yuping, Wei Xiaoping. Molecularly imprinted electrochemical sensors based on the double-amplification from the electro-catalysis of poly-melamine and the enzymatic catalysis of HRP for chlortoluron determination[J]. *Acta Chim Sinica*, 2012, 70:1853-1857.(in Chinese)
- [16] 韦寿莲, 潘文捷, 汪洪武, 等. 基于分子印迹电聚合膜的褪黑素传感器的研究[J]. *分析化学*, 2012, 40(8):1219-1224.  
Wei Shoulian, Pan Wenjie, Wang Hongwu, et al. Study of melatonin sensor based on molecular imprinting technique and electropolymerization membrane[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(8):1219-1224.(in Chinese)
- [17] Alfonta L, Katz E, Willner I. Sensing of acetylcholine by a tricomponent-enzyme layered electrode using faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltammetry and micro-gravimetric quartz crystal microbalance transduction methods[J]. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(5):927-935.
- [18] 张进, 雷建平, 鞠焯先, 等. 毒莠定印迹邻氨基苯磺酚/金纳米粒子复合膜安培传感器[J]. *中国科学 化学*, 2013, 43(5):585-591.  
Zhang Jin, Lei Jianping, Ju Huangxian, et al. An amperometric sensor for picloram based on its imprinting in composite membrane of o-aminothiophenol and Au nanoparticles[J]. *Scientia Sinica Chimica*, 2013, 43(5):585-591.(in Chinese)

(上接第30页)

- Tan Li. Isolation and Application Research of Acidophilic Heterotrophic Bacteria Isolated from Stone Coal Drainage[D]. Xiangtan: Xiangtan University, 2012.(in Chinese)
- [21] Tiper D R, Dave S R. Bioleaching process for Cu-Pb-Zn bulk concentrate at high pulp density[J]. *Hydrometallurgy*, 2004, 75:37-43.
- [22] 胡宏伟, 束文圣, 蓝崇钰, 等. 乐昌铅锌尾矿的酸化及重金属溶出的淋溶实验研究[J]. *环境科学与技术*, 1999(3):1-3.  
Hu Hongwei, Shu Wensheng, Lan Chongyu, et al. Studies on acid forming and heavy metal mobility of leaching Pb/Zn mine tailings in lysimeters[J]. *Environmental Science & Technology*, 1999(3):1-3.(in Chinese)
- [23] 李媛媛. 尾矿重金属淋溶污染及其抑制技术研究——以广东大宝山尾矿为例[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.  
Li Yuanyuan. Study of Heavy Metal Pollution Produced by Leaching Tailings and Suppression Control a Case Study of Dabaoshan Tailings[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.(in Chinese)