

应用单针注射等温微量量热滴定法检测尿素水解菌对 Hg^{2+} 的耐受性

魏永洋^{1,3} 宋文娟¹ 李文锋¹ 张道勇^{1,2} 潘响亮^{1,2*}

(1. 中国科学院新疆生态与地理研究所 新疆 乌鲁木齐 830011)

(2. 浙江工业大学环境学院 浙江 杭州 310014)

(3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要:【目的】利用单针注射等温微量量热滴定法(SIITC)检测尿素水解菌对 Hg^{2+} 的耐受性。【方法】与传统的细胞生长曲线法和基于尿素水解的 pH 变化曲线相对比,应用 SIITC 研究耐盐尿素水解菌 *Staphylococcus succinus* 对不同浓度 Hg^{2+} 的耐受性,通过相关性分析验证 SIITC 检测细菌对重金属胁迫耐受性的可行性。【结果】*S. succinus* 菌吸附水解尿素的最高热量交换速率和累积热量值随 Hg^{2+} 浓度升高而降低。最高热量交换速率由不含 Hg^{2+} 的 $-45 \mu\text{J/s}$ 降至 $10 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的 $-20 \mu\text{J/s}$, 吸收热量由 $-1 291.90 \mu\text{J}$ 下降到 $-535.75 \mu\text{J}$; 不同浓度 Hg^{2+} 胁迫下 *S. succinus* 菌吸附水解尿素的反应热量值与溶液 pH 以及 OD_{600} 的相关系数 r 分别达到 0.928 和 0.955。【结论】SIITC 可用来检测 Hg^{2+} 对尿素水解菌 *S. succinus* 的毒性。

关键词: 尿素水解菌, 重金属, 生物修复, 毒性检测, 单针注射等温微量量热滴定法

Resistance of urea hydrolytic bacteria to Hg^{2+} probed by single injection isothermal titration calorimetry

WEI Yong-Yang^{1,3} SONG Wen-Juan¹ LI Wen-Feng¹ ZHANG Dao-Yong^{1,2}
PAN Xiang-Liang^{1,2*}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Environmental Pollution and Bioremediation, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

(2. College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

(3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: [Objective] To determine the resistance of urea hydrolytic bacteria to Hg^{2+} using single injection isothermal titration calorimetry (SIITC). [Methods] The tolerance of urea hydrolytic bacterium *Staphylococcus succinus* to Hg^{2+} toxicity was assessed by SIITC in comparison with the traditional cell growth curves and pH change curves. The correlation between SIITC and the

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. U1503281, U1403181)

*Corresponding author: E-mail: panxl@zjut.edu.cn

Received: February 21, 2017; Accepted: May 26, 2017; Published online (www.cnki.net): June 28, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. U1503281, U1403181)

*通讯作者: E-mail: panxl@zjut.edu.cn

收稿日期: 2017-02-21; 接受日期: 2017-05-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-28

traditional methods was examined. **[Results]** The maximum heat flux rate and the accumulated heat of adsorption and hydrolysis of urea by *S. succinus* decreased with increasing Hg^{2+} concentration up to 10 $\mu\text{mol/L}$. The maximum heat flux rate decreased from $-45 \mu\text{J/s}$ for the control to $-20 \mu\text{J/s}$ for 10 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} treated cells and the accumulated heat decreased from $-1 291.90 \mu\text{J}$ for the control to $-535.75 \mu\text{J}$ for 10 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} treated cells. The decreases of heat flux rate and accumulated heat well correlated with the change of solution pH ($r=0.928$) and cell growth rate OD_{600} ($r=0.955$). **[Conclusion]** SIITC is a potential method to detect tolerance of bacteria to Hg^{2+} .

Keywords: Urea hydrolytic bacteria, Heavy metals, Bioremediation, Toxicity test, Single injection isothermal titration calorimetry

尿素水解菌是一类重要的重金属污染修复微生物, 在自然环境中普遍存在^[1], 它们能够合成脲酶, 在细胞内外特异性地催化尿素水解^[2-3], 生成 CO_3^{2-} 和 NH_4^+ ^[4], 在细胞周围形成微米尺度的碱性环境^[5], 导致 Ca^{2+} 与 CO_3^{2-} 的过饱和, 诱导生成碳酸钙沉淀^[6]. 重金属离子则在碳酸钙沉淀的同时形成共沉淀, 从而将重金属离子钝化^[7-9], 达到修复目的. 近年来由于该技术存在高效、对氧化还原电位不敏感、对土壤环境没有二次污染等优点, 应用尿素水解菌诱导碳酸钙沉淀钝化土壤重金属已经发展成为一种绿色原位土壤修复新技术. 各种尿素水解菌被应用于地下水和土壤重金属污染的修复, 其中 *Sporosarcina ginsengisoli*^[10]、*Halomonas* sp.^[8]、*Bacillus* sp.^[11]、*Exiguobacterium undae*^[12] 等多种尿素水解菌被成功应用于重金属污染环境的原位修复.

筛选能够修复重金属污染的尿素水解菌的首要条件是它们需要对重金属毒性具有良好的耐受性. 传统的筛选方法通常是测定系列浓度重金属胁迫下细菌的生长曲线^[13], 但这种方法耗时长(通常需要 96 h 左右), 需要的样品量也大. 本研究根据尿素水解菌吸附水解尿素时会产生热量交换的原理, 应用微量等温滴定量热仪来检测 Hg^{2+} 对尿素水解菌水解尿素的微量热量交换, 从而测定尿素水解菌对 Hg^{2+} 毒性的耐受性. 与常规的 pH 和 OD_{600} 两个指标进行了对比分析, 以确定 SIITC 的可行性. 研究结果为今后研究微生物对重金属的耐受性提供了新的思路.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DreamTaq TM DNA Polymerase, MBI 公司; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、dNTPs、SanPrep 柱式 DNAJ 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式 DNAJ 胶回收试剂盒、DNA ladder mix marker、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 琼脂糖, BBI 公司; pMD[®] 18-T Vector 连接试剂盒, TaKaRa 公司.

DNA 电泳槽、稳压电泳仪, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, 上海复日科技仪器有限公司; PCR 仪、测序仪, Applied Biosystems 公司; Surf 系列精密单道可调移液器, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 微量等温滴定量热仪, 美国 TA 仪器.

1.2 尿素分解菌的分离

为适应具有较高盐度的地下水和土壤的重金属污染的修复, 实验用的尿素水解菌从咸菜中分离获得. 咸菜购买于新疆乌鲁木齐市某大型超市. 富集和分离培养基分别为营养肉汤培养基(NB)(蛋白胨 10 g/L, 牛肉粉 3 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 7.2)和 LB 基础培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH 7.4). 将咸菜固体样品接种到装有 100 mL 营养肉汤培养基的 250 mL 锥形瓶中, 28 °C、130 r/min 富集培养 24 h. 吸取 2 mL 富集培养液的悬液, 加入到 100 mL 含 2% 尿素和 3% NaCl 的营养肉汤选择培养基中, 培养 24 h 后吸取 1 mL 耐盐菌液, 采用十倍稀释法分离菌种, 得到的单个细菌菌落采用平板划线法进行纯化获得纯培养.

为了能够更方便直接地反映出分离菌株是否具有产生脲酶活性的能力,以测定 pH 值的变化来表示菌体的尿素分解能力。

纯化培养的尿素水解菌培养过夜后,按 SK8255 (细菌)试剂盒操作说明提取基因组 DNA。PCR 扩增 16S rRNA 基因的通用引物为:正向引物(27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系:Template (基因组 DNA 20–50 ng/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1.0 μ L, 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 正反向引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 加双蒸 H_2O 至 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}C$ 4 min; 94 $^{\circ}C$ 45 s, 55 $^{\circ}C$ 45 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 10 min; 4 $^{\circ}C$ 终止反应。序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 Hg^{2+} 胁迫下尿素分解菌生长曲线和尿素分解能力

取 140 mL 去离子水加入到 250 mL 锥形瓶中,加入 2.7 g NB 培养基,溶解后置于灭菌锅,1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min,灭菌后置于无菌操作台冷却。称量 3.0 g 尿素溶解于 10 mL 去离子水中,过 0.22 μ m 滤膜将 10 mL 尿素溶液添加到 NB 培养基中(尿素质量分数为 2%)。加入不同体积的高浓度的 Hg^{2+} 溶液,使溶液的最终 Hg^{2+} 浓度分别为:0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L。接种 1 mL 菌液,28 $^{\circ}C$ 、130 r/min 振荡培养,间隔一段时间取样测 pH 和 OD_{600} 值,以 pH 和 OD_{600} 值作为检测指标研究尿素分解菌对 Hg^{2+} 的耐受性。

1.4 Hg^{2+} 胁迫下尿素水解菌分解尿素的 SIITC 实验

取 80 mL 去离子水加入到 250 mL 锥形瓶中,加入 1.6 g NB 培养基和 1 g NaCl,溶解后置于灭菌锅,1 $\times 10^5$ Pa 灭菌 20 min,灭菌后置于无菌操作台冷却。称量 1.8 g 尿素,溶解于 10 mL 去离子水中,过 0.22 μ m 滤膜将 10 mL 尿素溶液添加到 NB 培养基中(尿素质量分数为 2%)。加入不同体积的高浓度

的 Hg^{2+} 溶液,使溶液的最终 Hg^{2+} 浓度分别为:0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L。接种 1 mL 菌液,28 $^{\circ}C$ 、130 r/min 振荡培养 6 h,然后利用微量等温滴定量热仪进行 SIITC 实验:将 20 μ L 培养 6 h 后的菌液一次性注入含有 1.2 mL 去离子水的反应器中,平衡 300 s 基线后测定热量交换速率。试验温度为 25 $^{\circ}C$ 。

1.5 统计分析

实验设置 3 次重复,所得数据利用 Excel 2003 求算术平均值、标准方差等,用 Origin 9.0 绘制图表,图中误差线代表标准方差。

2 结果与讨论

2.1 具有尿素分解能力菌株的筛选与鉴定

尿素水解菌从咸菜中分离获得。通过富集培养和十倍稀释法分离菌种得到的单个细菌菌落,采用平板划线法进行纯化获得 3 株纯培养细菌。通过测定不同时间点细菌悬浮液 pH 值的方式反映菌株脲酶活性的高低。实验结果发现菌株 J3 在 2% 尿素培养基中培养 96 h 后菌液的 pH 值达到 9.4。Chen 等利用从尾矿土壤中分离的 *Bacillus* sp. 研究其对 80 g/L 尿素的分解能力,结果发现培养 120 h 后菌液 pH 值达到 9.2^[14]。Chen 等使用的细菌菌液的 pH 值(9.2)略低于本实验的 pH 值(9.4),说明本实验菌株 J3 能够有效地分解尿素并且具有较强的脲酶活性。

利用菌株 J3 的 16S rRNA 基因序列,从 GenBank 数据库中进行 BLAST 序列对比得到相近的细菌 16S rRNA 基因序列,然后利用软件 ClustalX version 1.8 进行多序列匹配排序,最后通过软件 MEGA 5.0 程序中 Neighbor-Joining 法,采用 Kimura 双参数计算模型来构建尿素分解菌的系统发育树,见图 1。从系统发育树可以确定所筛选出的尿素分解菌 J3 属于葡萄球菌属,并且与菌株 *Staphylococcus succinus* 的 16S rRNA 基因全序列的相似性达到了 100%,因此可以确定从实验样品中筛选出的尿素分解菌 J3 为 *S. succinus*。

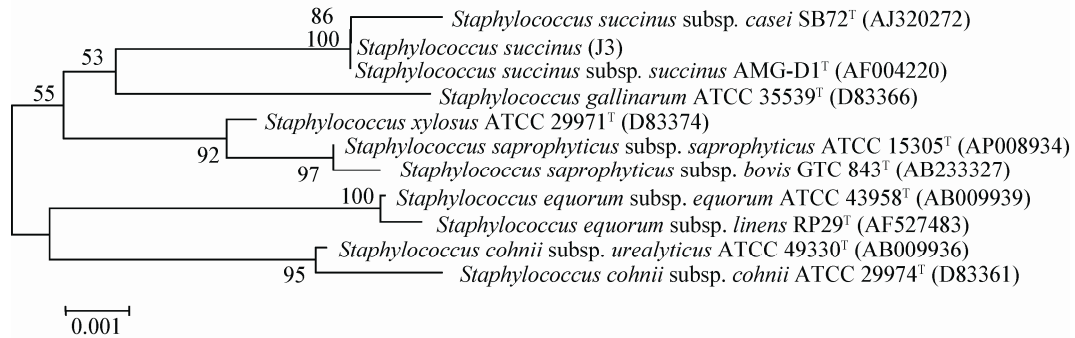


图1 菌株 J3 基于 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences of the representative strains

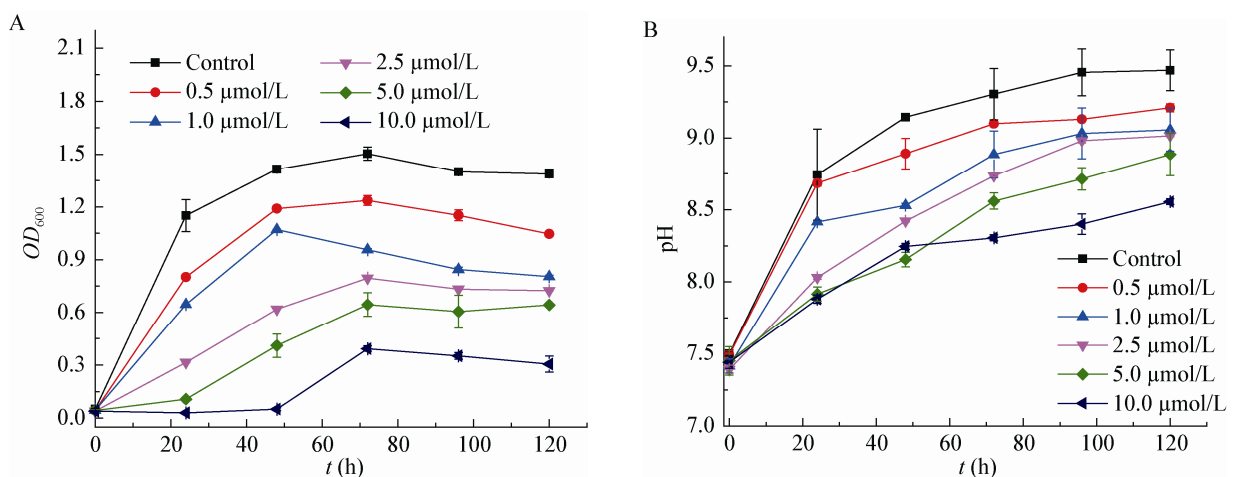
注: 每一个分支上的数字代表样本在 1 000 次重复自举检验下的自展值(自聚值)。

Note: Numbers in the branches represent the bootstrapping percentage that supports the branch with 1 000 bootstrap replications.

2.2 尿素分解菌对 Hg^{2+} 的耐受性

利用细菌的吸光度来测量细菌培养液的浓度, 从而估计细菌的生长情况, OD_{600} 值大小与菌体细胞密度呈正比关系。从图 2A 的 OD_{600} 值变化规律可以看出, 在相同培养时间内随着 Hg^{2+} 浓度的增加, OD_{600} 的数值是逐渐降低的, 说明 *S. succinus* 的数量是减少的。由此可知, Hg^{2+} 浓度越高, *S. succinus* 生长繁殖受到的抑制程度越高。培养细菌 72 h 后, 不含 Hg^{2+} 溶液的 OD_{600} 值达到 1.5, 远高于 1 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 时的 OD_{600} 值(0.9); Hg^{2+} 浓度升高至 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时的 OD_{600} 值

仅有 0.6 和 0.4, 说明在较高 Hg^{2+} 浓度下 *S. succinus* 可以存活, 它对 Hg^{2+} 具有一定的耐受能力。Ruiz-Diez 等研究发现 *Ensifer medicae* 在含 12.5 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 的条件下 OD_{600} 值达到 0.5^[15], 对 Hg^{2+} 的耐受强度略高于本实验所用菌株。De 等从沿海海水和沉积物中分离出来的 5 株汞耐受菌 *Proteus*、*Xanthomonas*、*Alteromonas*、*Aeromonas* 和 *Enterobacteriaceae*, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 浓度下仍能存活, 说明它们具有很强的耐 Hg^{2+} 能力^[16]。除此之外还有很多关于细菌对 Hg^{2+} 具有较强耐受性的报道^[17-19]。

图2 不同 Hg^{2+} 浓度下 *S. succinus* 菌液 OD_{600} (A) 和 pH (B) 随时间变化曲线Figure 2 The curves of OD_{600} (A) and pH (B) for the *S. succinus* cell suspensions treated with various concentrations of Hg^{2+}

细菌分解尿素产生 NH_4^+ 和 CO_3^{2-} , 在细胞周围形成微米尺度的碱性环境, 使得培养液的 pH 值升高。从图 2B 的 pH 变化曲线可知, Hg^{2+} 浓度的增加导致溶液 pH 值的降低, 反映出 *S. succinus* 菌分解尿素的量减少, 尿素代谢产物的量减少。在无 Hg^{2+} 条件下菌液 pH 快速升高, 96 h 后达到 9.5, 高于 $1 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 时的 9.0。在 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 浓度时, pH 降低至 8.7 和 8.4。说明 *S. succinus* 菌对尿素具有分解能力, 但 Hg^{2+} 浓度增加抑制了尿素分解速率。Chen 等研究了从尾矿土壤中分离的 *Bacillus* sp. 对 80 g/L 尿素的分解能力, 结果发现培养 120 h 后 pH 值达到 $9.2^{[14]}$, 略低于本实验的 pH 值(9.4)。

不同 Hg^{2+} 浓度胁迫下细菌生长的 OD_{600} 和 pH 值表现为相同的下降规律, 表明随着 Hg^{2+} 浓度升高, *S. succinus* 受抑制程度增强, 菌数量随之降低, 使得该菌分解尿素量减少的同时尿素代谢产物也是减少的, 最终溶液的 pH 降低。但在较高 Hg^{2+} 浓度下 *S. succinus* 依旧能够存活, *S. succinus* 对 Hg^{2+} 毒性具有一定的耐受性, 是一种有望用于 Hg^{2+} 污染环境修复的微生物。

2.3 SIITC 检测尿素分解菌对 Hg^{2+} 的耐受性

等温滴定量热法 (Isothermal titration calorimetry, ITC) 是近年发展起来的一种研究热动力学的重要方法, 它通过高灵敏度、高自动化的微量热仪连续、准确地监测和记录一个变化过程的量热曲线^[20]。图 3 为不同浓度 Hg^{2+} 胁迫 6 h 后 *S. succinus* 吸附分解尿素时热量速率变化曲线。从图 3 中可以看出, 在各浓度 Hg^{2+} 胁迫处理下, 热量交换速率总体为负值, 这表明 *S. succinus* 吸附分解尿素是一个吸热反应。反应 100 多 s 后, 热量变化速率几乎为零, 表明此时没有热量变化, 反应完全结束。随着 Hg^{2+} 浓度增加, 最大热量速率是逐渐降低的, 由不含 Hg^{2+} 的 $-45 \mu\text{J/s}$ 的交换速率降至 $10.0 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的 $-20 \mu\text{J/s}$; 浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.5 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的交换速率分别为 $-35 \mu\text{J/s}$ 和 $-30 \mu\text{J/s}$ 。

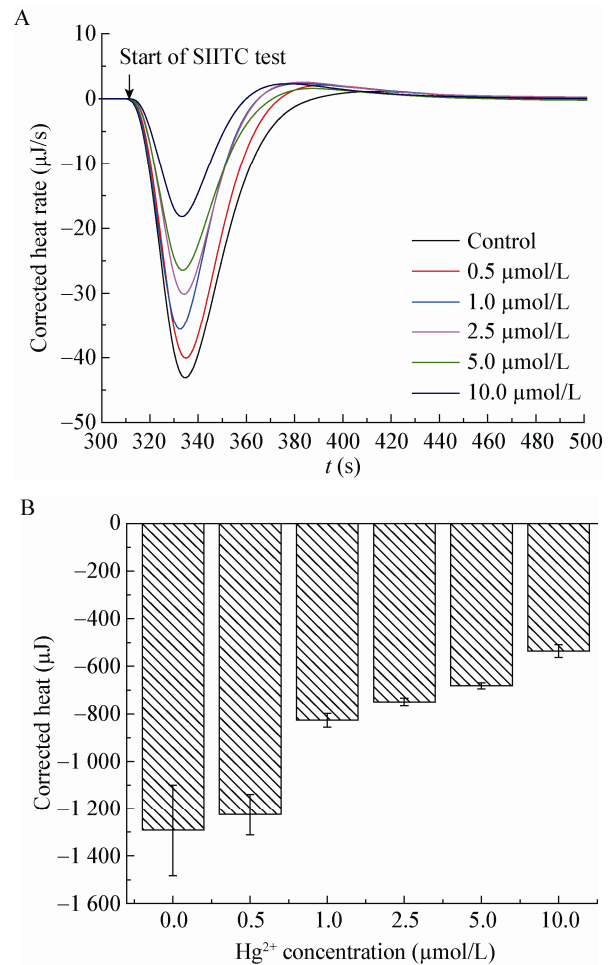


图 3 不同 Hg^{2+} 浓度下 *S. succinus* 菌株分解尿素释放热量速率变化(A)和菌株分解尿素释放热量(B)

Figure 3 The corrected heat flux rate (A) and the accumulated heat (B) for adsorption and hydrolysis of urea by *S. succinus* treated with various concentrations of Hg^{2+}

对尿素分解交换速率进行积分处理得到体系反应热量。如图 3B 所示, 随着 Hg^{2+} 浓度的升高, 反应体系吸收的热量是逐渐降低的。在不含 Hg^{2+} 的对照组吸收热量最大为 $-1291.90 \mu\text{J}$; 当 Hg^{2+} 从 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 增加到 $10.0 \mu\text{mol/L}$, 热量值从 $-1225.57 \mu\text{J}$ 下降到 $-535.75 \mu\text{J}$; 但 $0.5 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的热量值也是远大于 $1.0 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的热量值 $-826.61 \mu\text{J}$, 反映出 $1.0 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 对菌株的抑制性显著增加。

随着胁迫 Hg^{2+} 浓度的升高, *S. succinus* 吸附水解尿素的最大热量速率和反应体系吸收的热量是逐渐降低的。由此可以推断, 随着 Hg^{2+} 浓度的升高,

S. succinus 受抑制程度显著增强, 分解尿素的速率和细菌吸附水解尿素时产生的热量交换量随之降低。

2.4 SIITC 检测结果与常规方法的比较

利用传统的检测 OD_{600} 值的方法和 SIITC 新方法研究尿素分解菌 *S. succinus* 对 Hg^{2+} 的耐受性, 两者都得出相同的结论: 随着胁迫 Hg^{2+} 浓度的升高, *S. succinus* 的受抑制性增强。pH、 OD_{600} 及 *S. succinus* 吸附水解尿素的反应热量值变化规律较为明显, 有相同的降低趋势。从图 4 可以看出, 不同浓度 Hg^{2+} 胁迫下 *S. succinus* 吸附水解尿素的反应热量值与溶液 pH 以及 OD_{600} 均有良好的相关性, 相关系数 r 分别达到 0.928 和 0.955。

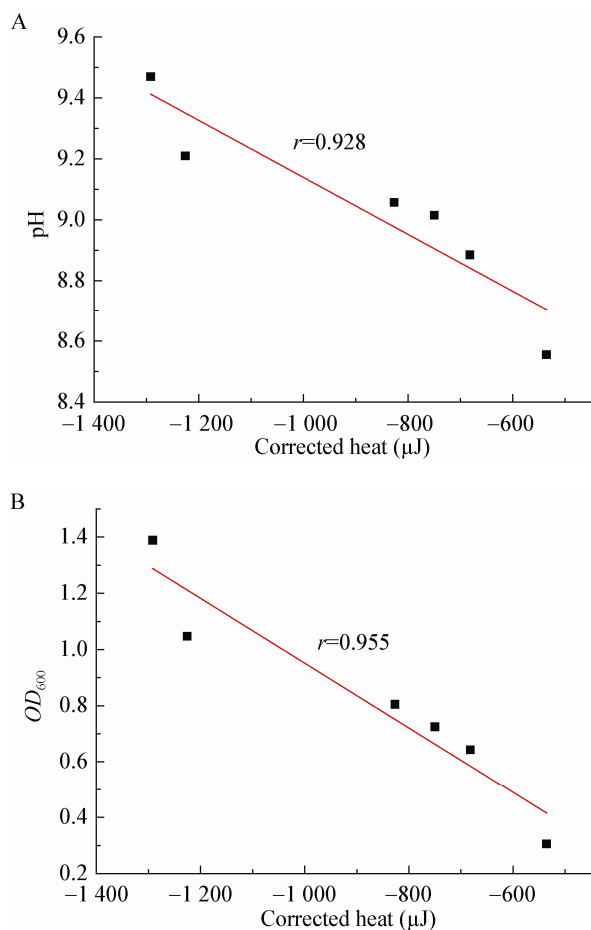


图 4 不同浓度 Hg^{2+} 胁迫下 *S. succinus* 菌吸附水解尿素的反应热量值与溶液 pH (A) 及 OD_{600} (B) 相关性

Figure 4 The correlations between the accumulated heat and OD_{600} (B) and the solution pH (A) for adsorption and hydrolysis of urea by *S. succinus* treated with various concentrations of Hg^{2+}

SIITC 已经被用于酶动力学研究^[21-23]和分子生物学研究^[24], 但本研究是第一次用 SIITC 法测试了细菌对重金属的耐受性, 以期筛选修复微生物。本研究以重金属 Hg^{2+} 为例, 结合 *S. succinus* 吸附水解尿素时会产生热量交换的原理, 应用微量等温滴定量热仪来检测 Hg^{2+} 对 *S. succinus* 的毒性。研究发现最大热量交换速率和累积交换的热量都随 Hg^{2+} 浓度升高而逐渐降低(图 3A、B), 反映了随 Hg^{2+} 浓度的增加该菌代谢活性受到了越来越重的抑制。不同浓度 Hg^{2+} 胁迫下 *S. succinus* 吸附水解尿素的反应热量值与溶液 pH 以及 OD_{600} 值均有良好的相关性(图 4A、B), 这表明 SIITC 与传统的生长曲线法、pH 变化曲线法一样, 可以可靠地检测 *S. succinus* 对 Hg^{2+} 胁迫的耐受性。

3 结论

对比研究了 SIITC、生长曲线法和基于尿素水解的 pH 变化曲线法 3 种方法检测耐盐尿素水解菌 *S. succinus* 对 Hg^{2+} 毒性的耐受性。结果表明 *S. succinus* 吸附水解尿素的反应热量交换速率和累积热量值随 Hg^{2+} 浓度升高而降低, 而且热量交换速率和累积热量值的变化与相应的溶液 pH 变化和 OD_{600} 变化均有良好的相关性, 证明 SIITC 可用来检测 Hg^{2+} 对尿素水解菌的毒性。SIITC 能否可靠地用来检测其它重金属对各种尿素水解菌的毒性还需要进一步深入研究和验证。耐盐尿素水解菌 *S. succinus* 在高浓度 Hg^{2+} 胁迫下依然具有较好的生长速率和尿素代谢能力, 说明 *S. succinus* 对 Hg^{2+} 毒性具有一定的耐受能力, 是一种有望用于 Hg^{2+} 污染环境修复的微生物。

参考文献

- [1] Fujita Y, Ferris FG, Lawson RD, et al. Subscribed content calcium carbonate precipitation by ureolytic subsurface bacteria[J]. Geomicrobiology Journal, 2000, 17(4): 305-318
- [2] Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, et al. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*[J]. Science, 1995, 268(5213): 998-1004
- [3] Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, et al. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea

- hydrolysis costs two nickels[J]. *Structure*, 1999, 7(2): 205-216
- [4] Zhao SG, Wang JQ, Liu KL, et al. Analysis for the diversity of ureolytic bacterium from dairy rumen based on metagenomics[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2010, 15(1): 55-61 (in Chinese)
赵圣国, 王加启, 刘开朗, 等. 宏基因组学方法分析奶牛瘤胃尿素分解菌的多样性[J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(1): 55-61
- [5] van Paassen LA, Ghose R, van der Linden TJM, et al. Quantifying biomediated ground improvement by ureolysis: large-scale biogROUT experiment[J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2010, 136(12): 1721-1728
- [6] Zhao Q. Experimental study on soil improvement using microbial induced calcite precipitation (MICP)[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China University of Geosciences (Beijing), 2014 (in Chinese)
赵茜. 微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)固化土壤实验研究[D]. 北京: 中国地质大学(北京)博士学位论文, 2014
- [7] Achal V, Pan XL, Zhang DY. Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation[J]. *Ecological Engineering*, 2011, 37(10): 1601-1605
- [8] Achal V, Pan XL, Zhang DY. Bioremediation of strontium (Sr) contaminated aquifer quartz sand based on carbonate precipitation induced by Sr resistant *Halomonas* sp.[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(6): 764-768
- [9] Wang XH, Zhao CX, Pan XL. Bioremediation of Pb-pollution based on microbially induced calcite precipitation[J]. *Earth and Environment*, 2015, 43(1): 80-85 (in Chinese)
王新花, 赵晨曦, 潘响亮. 基于微生物诱导碳酸钙沉淀(MICP)的铅污染生物修复[J]. *地球与环境*, 2015, 43(1): 80-85
- [10] Achal V, Pan XL, Fu QL, et al. Biomineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 201-202: 178-184
- [11] Achal V, Pan XL, Lee DJ, et al. Remediation of Cr(VI) from chromium slag by biocementation[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(7): 1352-1358
- [12] Kumari D, Pan XL, Lee DJ, et al. Immobilization of cadmium in soil by microbially induced carbonate precipitation with *Exiguobacterium undae* at low temperature[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 98-102
- [13] Li SY, Su YL, Zhou YQ, et al. Effects of heavy metal stress on the growth curves of two kinds of bacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(1): 443-446 (in Chinese)
李淑英, 苏亚丽, 周元清, 等. 重金属胁迫培养对 2 种细菌生长曲线的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(1): 443-446
- [14] Chen F, Deng CN, Song WJ, et al. Biostabilization of desert sands using bacterially induced calcite precipitation[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2016, 33(3/4): 243-249
- [15] Ruiz-Díez B, Quiñones MA, Fajardo S, et al. Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(2): 543-554
- [16] De J, Ramaiah N, Mesquita A, et al. Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury[J]. *Marine Biotechnology*, 2003, 5(2): 185-193
- [17] Müller AK, Rasmussen LD, Sørensen SJ. Adaptation of the bacterial community to mercury contamination[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 204(1): 49-53
- [18] De J, Ramaiah N. Characterization of marine bacteria highly resistant to mercury exhibiting multiple resistances to toxic chemicals[J]. *Ecological Indicators*, 2007, 7(3): 511-520
- [19] Rehman A, Ali A, Muneer B, et al. Resistance and biosorption of mercury by bacteria isolated from industrial effluents[J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2007, 39(3): 137-146
- [20] Li RG, Chen LJ, Jiang TM, et al. Studies on the interactions between proteins and drug small molecules by equilibrium dialysis[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(6): 80-84 (in Chinese)
李瑞光, 陈历俊, 姜铁民, 等. 应用平衡透析法分析药物小分子与蛋白质相互作用[J]. *生物技术通报*, 2010(6): 80-84
- [21] Todd MJ, Gomez J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?[J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 296(2): 179-187
- [22] Olsen SN. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions[J]. *Thermochimica Acta*, 2006, 448(1): 12-18
- [23] Transtrum MK, Hansen LD, Quinn C. Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry[J]. *Methods*, 2015, 76: 194-200
- [24] Taje SG, Tolbert BS, Basavappa R, et al. Direct determination of thiol pK_a by isothermal titration microcalorimetry[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(34): 10508-10509