

乌鲁木齐市道路林带土壤抗重金属细菌的筛选及重金属去除能力

黄永杰^{1,2}, 柏晓玉¹, 朱艳蕾^{*1,2}

1 新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054

2 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室 干旱区植物逆境生物学实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054

黄永杰, 柏晓玉, 朱艳蕾. 乌鲁木齐市道路林带土壤抗重金属细菌的筛选及重金属去除能力[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 969-982.

HUANG Yongjie, BAI Xiaoyu, ZHU Yanlei. Screening of heavy metal-resistant bacteria from the soil of road forest belt in Urumqi of China and testing of the heavy metal-removing ability[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 969-982.

摘要:【背景】道路重金属污染问题日益严峻, 寻找高效的微生物资源用于环境修复已迫在眉睫。

【目的】从乌鲁木齐市道路林带土壤中筛选抗重金属菌株, 并对其重金属去除能力进行探究。

【方法】使用含5种重金属离子(铅、镉、锌、铜、镍)的4种培养基进行抗性菌株筛选, 通过形态学特征和16S rRNA基因序列进行鉴定, 采用电感耦合等离子体发射光谱仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES)检测分离株对重金属离子的去除情况。

【结果】4种分离培养基中, TSA是抗重金属菌株筛选的最适培养基, 共筛选出16株抗重金属菌, 其中4株抗Pb菌、4株抗Cd菌、4株抗Zn菌、3株抗Cu菌和1株抗Ni菌, 其抗性分别高达3000、800、600、300和400 mg/L, 16株菌中以芽孢杆菌属(*Bacillus*)数量最多。在初始浓度为700 mg/L Pb²⁺下, 菌株Pb6的去除率高达92.48%, 菌株Pb11、Pb3和Pb9的去除率分别为27.70%、40.37%和58.88%;

在200 mg/L Cd²⁺下, 菌株Cd4的去除率最高, 为63.84%, 其余抗Cd菌株去除率在30%–40%;

在200 mg/L Zn²⁺下, 菌株Zn1和Zn4的去除率较高, 分别为65.34%和60.87%, 而菌株Zn5和Zn6的去除率为15.78%和12.60%;

在300 mg/L Cu²⁺下, 3株抗Cu菌的去除率均较低, 未超过3%;

在200 mg/L Ni²⁺下, 菌株Ni2的去除率为4.31%。对菌株Pb6、Cd4、Zn1紫外照射30 s并连续传代培养后得到3株去除率较稳定菌株, 去除率分别为91.11%、65.10%和66.48%。

【结论】获得3株对重金属有较高耐受性和去除率的优势菌株, 分别为*Bacillus* sp. Pb6、*Pseudomonas* sp. Cd4和*Bacillus* sp. Zn1, 这将为重金属污染土壤或水体修复和治理提供优良菌种资源。

关键词: 河滩快速路; 土壤细菌; 抗重金属菌株; 去除能力; 电感耦合等离子体发射光谱仪

资助项目: 国家自然科学基金(32160309); 新疆师范大学重点实验室招标课题(XJDX1414-2021-02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160309) and the Key Laboratory of Xinjiang Normal University Under the Bidding Project (XJDX1414-2021-02).

*Corresponding author. E-mail: zhuyanlei1226@163.com

Received: 2022-06-04; Accepted: 2022-09-23; Published online: 2022-12-06

Screening of heavy metal-resistant bacteria from the soil of road forest belt in Urumqi of China and testing of the heavy metal-removing ability

HUANG Yongjie^{1,2}, BAI Xiaoyu¹, ZHU Yanlei^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

2 Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Key Laboratory of Plant Stress Biology in Arid Land, Urumqi 830054, Xinjiang, China

Abstract: **[Background]** Heavy metal pollution of roads becomes more and more serious, and it is urgent to find efficient microbial resources for environmental remediation. **[Objective]** To screen heavy metal-resistant strains from the soil of road forest belt in Urumqi of China and test the heavy metal-removing ability. **[Methods]** Four media containing five heavy metal ions (Pb, Cd, Zn, Cu, and Ni) were used to screen the resistance strains which were then identified based on morphological characteristics and 16S rRNA gene. The removal of heavy metal ions by the strains was tested by inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES). **[Results]** Among the four media, TSA was the optimal one for the screening of strains. A total of 16 resistance strains were screened out: 4 Pb-resistant strains (tolerant concentration: 3 000 mg/L), 4 Cd-resistant strains (tolerant concentration: 800 mg/L), 4 Zn-resistant strains (tolerant concentration: 600 mg/L), 3 Cu-resistant strains (tolerant concentration: 300 mg/L), and 1 Ni-resistant strain (tolerant concentration: 400 mg/L). Among the 16 strains, the majority were *Bacillus*. The removal rate of 700 mg/L Pb²⁺ by strain Pb6 stood at 92.48%, and the removal rates by strains Pb11, 3 and 9 hit 27.70%, 40.37%, and 58.88%, separately. The removal rate of 200 mg/L Cd²⁺ by strain Cd4 was the highest (63.84%), and the removal rates by other Cd-resistant strains were about 30%–40%. The removal rates of 200 mg/L Zn²⁺ by strains Zn1 and Zn4 were 65.34% and 60.87%, respectively, while those by strains Zn5 and Zn6 registered 15.78% and 12.60%, separately. The removal rates of 300 mg/L Cu²⁺ by the three Cu-resistant strains were low (<3%). The removal rate of 200 mg/L Ni²⁺ by strain Ni2 was 4.31%. The strains (except for Cu1 and Cu3) mainly removed the heavy metals by adsorption, supplemented by absorption. After UV irradiation of strains Pb6, Cd4, and Zn1 for 30 s and continuous subculture, the removal rates of the corresponding heavy metals by three stable strains were 91.11%, 65.10%, and 66.48%, respectively. **[Conclusion]** Three strains with high tolerance to and removal rate of heavy metals were screened out: *Bacillus* sp. Pb6, *Pseudomonas* sp. Cd4, *Bacillus* sp. Zn1, which can be used as candidate strains for the remediation and treatment of soil or water polluted by heavy metals.

Keywords: Hetan expressway; soil bacteria; heavy metal-resistant strains; removal ability; inductively coupled plasma optical emission spectrometer

随着我国交通运输业的快速发展, 车辆尾气排放、机械摩擦和车体腐蚀等加速了道路土壤重金属元素积累, 造成了严重的环境污染问题, 并进一步威胁着人们的身体健康^[1]。乌鲁木齐市位于天山山脉之北, 深居内陆, 远离海洋, 是连接我国至中亚地区和欧洲陆路的交通枢纽。近年来经济和城市的快速发展导致机动车量快速增加, 使得城市交通量增大, 加之植被覆盖率低、城市生活垃圾大量填埋, 工业“三废”进入土壤, 造成土壤重金属含量增高, 严重危害城市生态环境质量^[2-4]。据报道, 乌鲁木齐市土壤镉(Cd)、铅(Pb)、锌(Zn)、铜(Cu)和镍(Ni)的平均含量分别是背景值的 4.5、3.6、2.3、1.9 和 1.0 倍, 并且在交通密集区活性态重金属含量很高^[5]; 李吉玫等^[6]研究表明乌鲁木齐市道路林带土壤重金属质量分数普遍超过背景值, 且主要污染重金属为 Pb、Zn 等。综上可知, 道路林带土壤受重金属污染日益严重, 是乌鲁木齐市亟须解决的重大环境问题之一。

目前, 利用生物修复土壤重金属污染是最为理想的可持续发展途径。据报道芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)和微球菌属(*Micrococcus*)等细菌^[7-11], 因具有很高的重金属吸附和吸收等能力用于重金属污染场地的修复。其中, 巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[12]用于去除 Pb 和 Cd; 丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)^[13]用于 Cu 修复; 一种固定化脱硫弧菌剂用于去除 Cr、Cu 和 Ni^[14]; 基于细菌及其代谢产物的纳米材料也被用于重金属修复^[15]。由此可见, 微生物的多样性为污染土壤的修复创造了机会, 筛选具有耐受性的土著菌株用于修复当地重金属污染的研究十分必要。

乌鲁木齐河滩快速路是贯通城市南北区的主干道, 承载着全市 47% 的交通量, 每天有

30 万辆各类车辆通行, 是该市车流量最大的交通路段, 汽车尾气排放严重导致其林带土壤重金属大量积累^[16]。但有关河滩快速路林带土壤重金属污染的防治和修复方面的研究鲜见报道。因此, 本试验以乌鲁木齐市河滩快速路林带土壤为研究材料, 采用 4 种培养基(TSA、R2A、高氏一号、牛肉膏蛋白胨培养基)在 5 种重金属(Pb、Cd、Zn、Cu、Ni)离子胁迫下进行抗性菌株筛选及其重金属去除能力的研究, 以期为重金属污染水体或土壤修复提供菌种资源^[17], 也为生态环境的修复提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

于 2020 年 4 月选择乌鲁木齐市河滩快速路重要路段进行土壤样品采集, 采样点距离道路边缘 2.0 m, 剔除土壤表面覆盖的枯枝落叶、石块及动植物残体, 采用五点法采集表层 0-20 cm 土样, 将各点土样等量混匀后, 用四分法选取一定量土样作为代表样品, 用无菌袋装好密闭, 带回实验室, 4 °C 保存, 用于土壤细菌的分离。

1.1.2 培养基

TSA 培养基参照文献[18]配制; R2A 培养基参照文献[19]配制; 牛肉膏蛋白胨(nutrient agar, NA)培养基参照文献[20]配制; 高氏一号(Gauze's No.1 agar, GA)培养基参照文献[21]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

化学试剂均为国产分析纯; PbCl₂、CdCl₂·2H₂O、NiCl₂·6H₂O、CuSO₄·5H₂O 和 ZnSO₄·H₂O, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司, 制成溶液后经 0.22 μm 无菌滤膜过滤备用; DNA 提取试剂和 PCR 试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海天呈仪器制造有限公司;

电泳仪,北京六一生物科技有限公司;PCR仪,应用生物系统公司;电感耦合等离子发射光谱仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometer, ICP-OES),南京佰壹科生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 土壤抗重金属菌株的分离与纯化

称取新鲜土样 10 g,加入装有 90 mL 无菌水的锥形瓶中,摇匀后静置 3 min,取上清用无菌水进行 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 系列稀释。配制 300 mg/L Pb^{2+} 、20 mg/L Cd^{2+} 、200 mg/L Zn^{2+} 、200 mg/L Cu^{2+} 、200 mg/L Ni^{2+} 共 5 种溶液,并将这 5 种溶液分别添加到 4 种固体培养基中,所以含重金属离子的培养基共形成 20 种,以未添加重金属的 4 种培养基作为对照,共 24 种培养基,吸取 10^{-2} 稀释度菌悬液 100 μ L 分别涂布到上述培养基中,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3–7 d。观察记录菌落数,以每克土壤的 CFU 表示。根据菌落形态特征进行划线至获得纯培养物。

1.2.2 分离株对重金属的耐受性

吸取 2 μ L 菌液(OD_{600} 为 1.0)分别在 TSA 固体培养基中接入 600、900、1 500、3 000、6 000 mg/L Pb^{2+} ; 200、400、600、800、1 000 mg/L Cd^{2+} ; 250、300、350、400、450 mg/L Cu^{2+} ; 300、400、500、600、700 mg/L Zn^{2+} ; 250、300、350、400、450 mg/L Ni^{2+} , 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3–5 d 观察生长状况以表征菌株对重金属的耐受性。

1.2.3 分离株鉴定

将筛选获得的耐重金属菌株划线于 TSA 固体培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养了 3–5 d 形成单个菌落,观察菌落大小、颜色、形状、表面及边缘情况等,并对其进行革兰氏染色,记录菌体形态及染色结果。将分离株接种至液体培养基,于 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养过夜,采用 CTAB-冻融法^[22]提取菌液 DNA,采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R

(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对已提取的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:10 \times buffer (含 2.5 mg Mg^{2+}) 2.5 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, dNTPs (5 mmol/L) 0.5 μ L, DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L,加 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 55.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次;72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rRNA 基因测序。

1.2.4 分离株对重金属的去除试验

挑取已平板活化的抗重金属分离株单菌落于 TSA 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 17 h 后,按 1%接种量接种于含 700 mg/L Pb^{2+} 、200 mg/L Cd^{2+} 、200 mg/L Zn^{2+} 、300 mg/L Cu^{2+} 、200 mg/L Ni^{2+} 的 TSA 液体培养基中,以未接种的作为对照,每处理重复 3 次,28 $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养 72 h 后 6 000 r/min 离心 15 min,按文献[23]方法分别收集上清液(10 mL)、洗涤液(10 mL)及菌体沉淀。菌体沉淀中加入 1 mL 浓硝酸经 2 h 沸水浴至完全消解,定容至 10 mL,此为消解液。采用 ICP-OES 分别测定上清液、洗涤液及消解液中的重金属含量,并按公式(1)–(3)分别计算菌株对重金属离子的去除率、吸附率和吸收率。

$$\text{去除率(\%)} = \frac{\text{初始离子浓度(mg/L)} - \text{上清液离子浓度(mg/L)}}{\text{初始离子浓度(mg/L)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{吸附率(\%)} = \frac{\text{洗涤液离子浓度(mg/L)} \times \text{洗涤液体积(mL)}}{\text{初始离子浓度(mg/L)} \times \text{初始溶液体积(mL)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{吸收率(\%)} = \frac{\text{消解液离子浓度(mg/L)} \times \text{消解液体积(mL)}}{\text{初始离子浓度(mg/L)} \times \text{初始溶液体积(mL)}} \times 100 \quad (3)$$

1.2.5 分离株的紫外照射试验

将–20 $^{\circ}$ C 甘油管保存的菌株进行活化,吸

取 5 mL 对数期菌液(OD_{600} 为 1.0)于灭菌的培养皿中, 均匀混合后使用紫外灯进行紫外照射试验, 调节紫外灯功率为 30 W, 使其距离菌液 30 cm, 控制照射时间为 30、60、90 s。在黑暗条件下, 吸取 200 μ L 紫外辐射后的菌液涂布于含重金属离子的 TSA 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3 d, 连续传代培养 3 次。培养完成后挑取平板生长良好的菌落至 TSA 液体培养基中进行活化, 活化菌液按 1% 接种量转接于新的液体培养基(含重金属离子)中, 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 振荡培养 72 h 后 6 000 r/min 离心 15 min, 测定菌株对重金属的去除情况, 以未辐射菌为对照。

1.3 数据处理与分析

以上实验处理均重复 3 次, 结果以平均值 \pm SD 表示, 采用 SPSS 20.0 软件对数据进行显著性分析; 分离株 16S rRNA 基因通过 NCBI 中 BLAST 方法进行比对, 选取相似性最高的菌株序列作为参考序列, 用 MEGA 5.0 软件的相邻法构建系统发育树, 同时将其 16S rRNA 基因递交至 NCBI 申请 GenBank 登录号。

2 结果与分析

2.1 土壤不同重金属抗性分离株数量分布情况

对 4 种培养基之间的菌落数量进行显著性

分析, 结果见表 1, 4 种对照组(CK)中 R2A 培养基菌落数最高(1.62×10^7 CFU/g), 与其他 3 种有显著性差异; GA 和 NA 培养基菌次之; TSA 培养基菌落数量最低(7.67×10^6 CFU/g)。

当 4 种培养基中添加重金属离子后, 菌落数量与对照相比均显著减少。添加 Cd、Zn、Cu、Ni 离子后, TSA 培养基中菌落数量显著高于其他 3 种培养基, 而添加 Pb 离子后 GA 培养基菌落数量(7.33×10^6 CFU/g)最高。另外, 在含 Pb、Zn、Cu 的 NA 培养基、含 Zn、Cu、Ni 的 GA 培养基和 R2A 上无菌落生长。因此, TSA 培养基可作为重金属离子胁迫下抗性细菌筛选的培养基类型。

2.2 土壤抗重金属分离株的耐受性

从 TSA 培养基中筛选出 16 株具有较高耐受性的菌株(表 2)。其中, 菌株 Pb6、Pb9、Pb11 对 Pb^{2+} 的抗性达 1 500 mg/L, 而菌株 Pb3 对 Pb^{2+} 耐受性最高, 其抗性达 3 000 mg/L; 菌株 Cd4、Cd6 和 Cd8 对 Cd^{2+} 的抗性均为 400 mg/L, 而 Cd5 的抗性高达 800 mg/L; 菌株 Zn1、Zn4、Zn5 和 Zn6 对 Zn^{2+} 具有较好的耐受性, 其抗性均达 600 mg/L; 菌株 Cu1、Cu3 和 Cu13 对 Cu^{2+} 的抗性达 300 mg/L; 菌株 Ni2 对 Ni^{2+} 的抗性达 400 mg/L。

2.3 土壤抗重金属菌株鉴定

抗重金属菌株菌落大小不一, 以圆形为主,

表 1 土壤抗重金属细菌数量分布统计

Table 1 Statistics of quantity distribution of the heavy metal-resistant bacteria from soil ($\times 10^5$ CFU/g)

Type of medium	CK	Pb	Cd	Zn	Cu	Ni
TSA	76.67 \pm 7.36Ca	38.00 \pm 13.06Bb	3.06 \pm 0.05Ac	9.60 \pm 0.91Ac	1.51 \pm 0.18Ac	5.40 \pm 1.42Ac
GA	116.00 \pm 7.79Ba	73.33 \pm 17.15Ab	0.11 \pm 0.04Cc	0.00 \pm 0.00Bc	0.00 \pm 0.00Bc	0.00 \pm 0.00Bc
NA	119.67 \pm 16.36Ba	0.00 \pm 0.00Bb	1.22 \pm 0.20Bb	0.00 \pm 0.00Bb	0.00 \pm 0.00Bb	0.9 \pm 0.14Bb
R2A	162.00 \pm 9.20Aa	13.67 \pm 5.73Bb	0.11 \pm 0.01Cb	0.00 \pm 0.00Bb	0.00 \pm 0.00Bb	0.00 \pm 0.00Bb

不同大写字母表示 4 种培养基间 CFU 差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示未添加(CK)或添加 5 种重金属离子后同一培养基间 CFU 差异显著($P < 0.05$)

Different capital letters indicates significant differences in the number of CFUs among the 4 mediums ($P < 0.05$); Different lowercase letters indicates significant differences in CFUs between the same medium without (CK) or with the addition of 5 heavy metal ions ($P < 0.05$).

表 2 土壤分离株对重金属的耐受情况

Table 2 Tolerance of the soil isolates against heavy metal

Strains No.	Tolerant concentration (mg/L)
Pb3	3 000
Pb6	1 500
Pb9	1 500
Pb11	1 500
Cd4	400
Cd5	800
Cd6	400
Cd8	400
Zn1	600
Zn4	600
Zn5	600
Zn6	600
Cu1	300
Cu3	300
Cu13	300
Ni2	400

颜色以黄色和白色居多, 边缘多数整齐, 表面光滑、质地湿润者主要集中在抗 Pb、Cd 菌株, 抗 Zn、Cu、Ni 菌株菌落表面大多数粗糙、质地较干燥; 除 Zn5 外菌株菌体形态均为杆状且以短杆居多, 革兰氏染色结果表明只有菌株

Cd4 和 Cd6 为阴性菌, 其余均为阳性菌(表 3)。

将分离菌株的 16S rRNA 基因(登录号见表 4)与 GenBank 中序列进行同源性分析(表 4), 并结合菌株系统发育树(图 1)发现分离筛选的 16 株菌中 10 株为芽孢杆菌属, 其中 4 株与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)菌株相近, 相似性为 99%–100%; 其余 6 株分别与惠州芽孢杆菌(*Bacillus huizhouensis*)、简单芽孢杆菌(*Bacillus simplex*)、运动芽孢杆菌(*Bacillus mobilis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌和阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai*)相近, 相似性均为 99%; 该属菌株为抗 Pb、Cd、Zn 和 Cu 细菌。2 株属于假单胞菌属, 分别与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和 *Pseudomonas seleniipraecipitans* 相近, 相似性均为 99%, 该属菌株为抗 Cd 细菌。其余 4 株分别属于节杆菌属、土地芽孢杆菌属(*Terribacillus*)、红球菌属(*Rhodococcus*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*), 与相近菌株的相似性为 98%–99%, 这 4 株分别为 2 株抗 Pb 菌、1 株抗 Zn 菌和 1 株抗 Ni 菌。

表 3 土壤抗重金属菌株的形态学特征

Table 3 Morphological characteristics of the heavy metal-resistant isolates from soil

Strains No.	Colony characteristics	Bacterial shape	Staining results
Pb3	Larger, round, dark yellow, smooth and moist, neat	Short rod	G ⁺
Pb6	Large, round, dark white, raised, smooth and moist, neat	Long rod	G ⁺
Pb9	Small, round, white, smooth and moist, neat	Short rod	G ⁺
Pb11	Small dots, round, translucent, smooth and moist, neat	Long rod	G ⁺
Cd4	Small, round, yellow, raised, smooth and moist, neat	Short rod	G ⁻
Cd5	Larger, irregularly textured, white, rough and drier, wavy	Short rod	G ⁺
Cd6	Medium, round, gray translucent, raised, smooth and wetter, neat	Short rod	G ⁻
Cd8	Medium, round textured, milky white, rough and drier, wavy	Long rod	G ⁺
Zn1	Medium, round, gray, rough and drier, irregular	Short rod	G ⁺
Zn4	Medium, flat, light yellow, rough and drier, wavy	Short rod	G ⁺
Zn5	Small dots, round, yellowish, raised, smooth and moist, neat	Globular	G ⁺
Zn6	Medium, round, off-white, rough and drier, wavy	Short rod	G ⁺
Cu1	Small, round, off-white, raised, rough and drier, irregular	Short rod	G ⁺
Cu3	Large, round, white, raised, rough and drier, neat	Short rod	G ⁺
Cu13	Small, round, white, rough and drier, neat	Short rod	G ⁺
Ni2	Smaller, round, dark brown, rough and dry, neat, firmly bonded	Long rod	G ⁺

表 4 土壤抗重金属菌株 16S rRNA 基因序列同源性分析

Table 4 Sequence homology analysis of 16S rRNA gene of the heavy metal-resistant isolates from soil

Strains No.	Most similar strains (accession No.)	Alignment length	Similarity (%)	Accession number
Pb3	<i>Bacillus huizhouensis</i> WJB41 (KU877639)	1 446/1 447	99	OM341399
Pb6	<i>Bacillus simplex</i> EGI89 (MN704415)	1 444/1 446	99	OM341400
Pb9	<i>Arthrobacter scleromae</i> KNUC9004 (JF505938)	1 409/1 433	98	OM341401
Pb11	<i>Terribacillus goriensis</i> km2 (JF411250)	1 454/1 457	99	OM341618
Cd4	<i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i> PA100 (KT710798)	1 432/1 439	99	OM341620
Cd5	<i>Bacillus pumilus</i> CTSP16 (EU855197)	1 476/1 483	99	OM341621
Cd6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LBUM770 (MG461480)	1 433/1 436	99	OM341622
Cd8	<i>Bacillus pumilus</i> ZLynn800-22 (KY316438)	1 464/1 464	100	OM341623
Zn1	<i>Bacillus mobilis</i> YBG10 (MW405816)	1 431/1 438	99	OM421645
Zn4	<i>Bacillus cereus</i> LXJ76 (MN746191)	1 444/1 446	99	OM346710
Zn5	<i>Rhodococcus agglutinans</i> CFH S0262 (NR136860)	1 428/1 448	98	OM346708
Zn6	<i>Bacillus pumilus</i> SR67 (KY203657)	1 478/1 483	99	OM346704
Cu1	<i>Bacillus subtilis</i> H184 (JX515570)	1 445/1 446	99	OM346693
Cu3	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 (MK182805)	1 443/1 446	99	OM346694
Cu13	<i>Bacillus pumilus</i> EE106-P1 (MN581175)	1 479/1 483	99	OM346695
Ni2	<i>Lactobacillus paracasei</i> 8779 (MT464404)	1 471/1 474	99	OM346696

从分离株的系统发育树得知, 16 株分离株大致处于 3 个进化分支, 可分为 3 大类群, 第 1 类群为厚壁菌门(*Firmicutes*), 包括芽孢杆菌属、土地芽孢杆菌属和乳杆菌属, 共 12 株, 占总分离株的 75%; 第 2 类群为放线菌门(*Actinobacteria*), 包括节杆菌属和红球菌属, 共 2 株; 第 3 类群为变形菌门(*Proteobacteria*), 仅假单胞杆菌属, 共 2 株(图 1)。由此可见, 抗重金属细菌类群覆盖细菌域的 3 个门, 但种类不是很多, 主要集中在厚壁菌门中的芽孢杆菌属, 说明该属细菌在道路林带土壤抗重金属微生物中占有一定优势。

2.4 土壤抗重金属菌株对重金属的去除能力

使用 ICP-OES 测定了分离株对液体培养基中特定浓度重金属离子的去除情况。如表 5 所示, 抗 Pb、Cd、Zn 菌株对重金属有 60% 以上的去除效率, 其中 *Bacillus* sp. Pb6 对 700 mg/L Pb²⁺ 的去除率高达 92.48%, 与其他抗 Pb 菌株 Pb3、Pb9、Pb11 (40.37%、58.88%、27.70%) 相比有显著差异; *Pseudomonas* sp. Cd4 对 200 mg/L

Cd²⁺ 的去除率为 63.84%, 显著高于菌株 Cd5、Cd6、Cd8 的去除率(40.78%、36.03%、33.28%); *Bacillus* sp. Zn1 和 *Bacillus* sp. Zn4 对 200 mg/L Zn²⁺ 的去除率分别为 65.34% 和 60.87%, 显著高于菌株 Zn5 (15.78%) 和 Zn6 (12.60%)。抗 Cu 和抗 Ni 菌株的去除效果不明显, 菌株 Cu1、Cu3、Cu13 对 300 mg/L Cu²⁺ 的去除率均在 3% 以下(1.62%、2.19%、0.56%); 菌株 Ni2 对 200 mg/L Ni²⁺ 的去除率为 4.31%。供试菌株中, 抗 Pb、Cd、Zn 菌株(Zn5、Zn6 除外) 有较高的吸附率和吸收率, 说明这些菌株对重金属具有较强的耐受能力和去除能力。另外, 从菌株对重金属的吸附和吸收情况看, 大多数菌株(Cu1、Cu3 除外) 对重金属的吸附率明显高于吸收率。

2.5 紫外照射下抗重金属菌株对重金属的去除能力

对已获得的 4 株具有较高去除率的抗 Pb、Cd、Zn 菌株进行紫外照射试验, 发现在照射时间为 30 s 时各培养基中菌落生长良好, 在该时间下菌株 Pb6、Cd4 和 Zn1 对 700 mg/L Pb²⁺、

200 mg/L Cd²⁺ 和 200 mg/L Zn²⁺ 的去除率(91.11%、65.10%、66.48%)、吸附率(76.99%、60.01%、65.48%)和吸收率(18.62%、5.09%、1.00%)与对照相比无显著差异(图 2A–2C)菌株

Zn4 对 200 mg/L Zn²⁺ 的去除率(15.27%)和吸附率(15.10%)与对照相比极显著降低(图 2D), 说明菌株 Pb6、Cd4、Zn1 在去除重金属离子方面具有较高的稳定性。

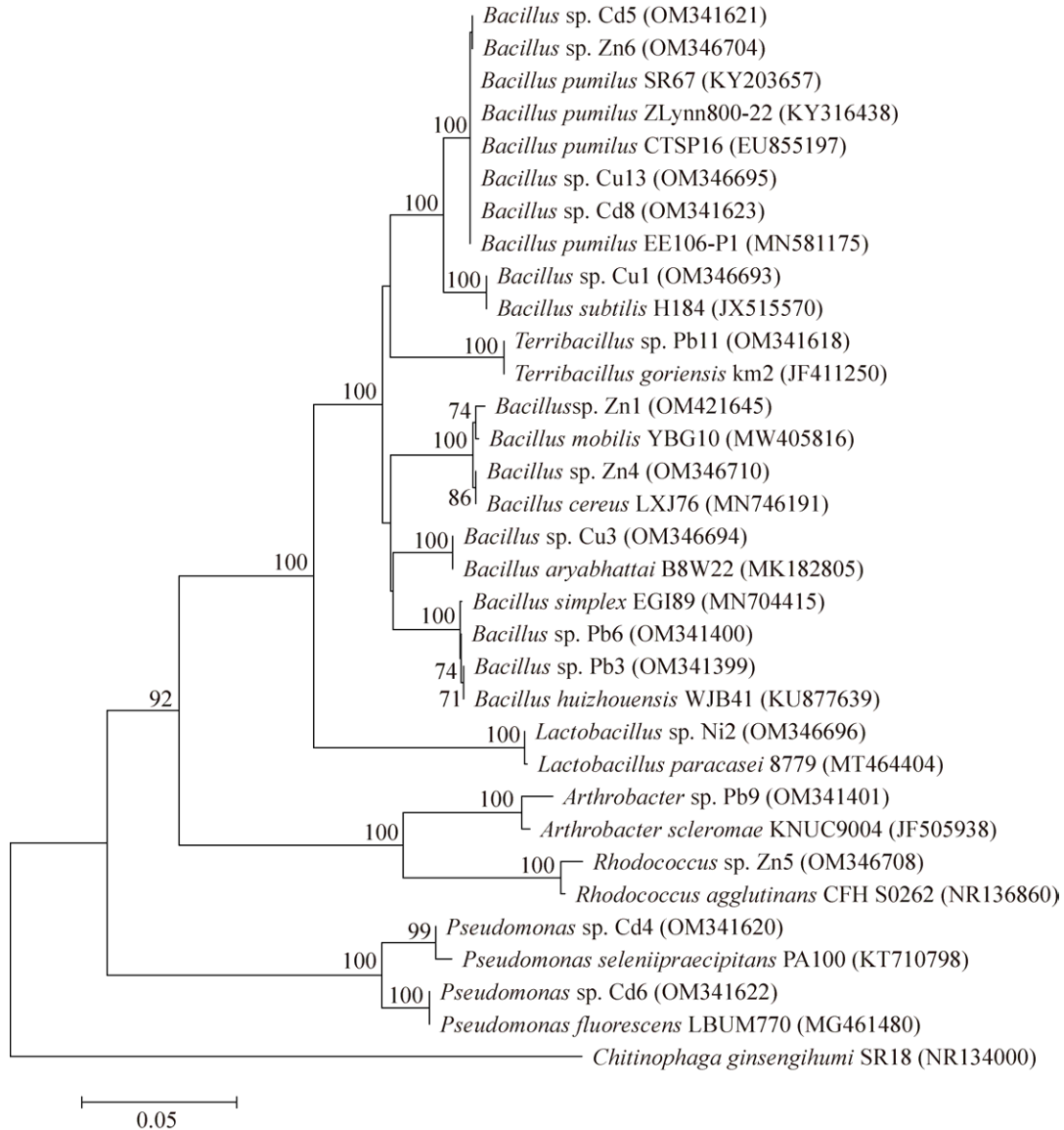


图1 土壤抗重金属菌株的系统发育分析 使用邻接法构建的系统发育树 bootstrap 检验次数设置为1 000次; 分支点上的数字代表自举值(显示>70%的数值); 进化标尺表示 0.05 次核苷酸替换; 括号中的序号表示对应菌 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号

Figure 1 Phylogenetic analysis of the heavy metal-resistant isolates from soil. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method; The number of bootstrap tests was set to 1 000, and bootstrap values are shown in branching points (display values>70%); Bar, 0.05 nucleotide substitution; GenBank accession number of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses.

表 5 土壤分离株对不同重金属的去除能力

Table 5 Removal ability of different heavy metals by the isolates from soil

Strains	Removal rate (%)	Adsorption rate (%)	Absorptivity (%)	Strains	Removal rate (%)	Adsorption rate (%)	Absorptivity (%)
Pb3	40.37±1.13Ac	40.26±1.34Ab	0.11±0.01Bb	Zn1	65.34±0.63Aa	64.02±0.79Aa	1.32±0.16Ba
Pb6	92.48±0.50Aa	65.41±9.90Ba	27.07±10.40Ca	Zn4	60.87±5.17Aa	59.63±4.75Aa	1.24±0.45Ba
Pb9	58.88±4.06Ab	56.46±3.18Aa	2.42±0.87Bb	Zn5	15.78±4.76Ab	15.53±4.73Ab	0.25±0.07Bb
Pb11	27.70±0.05Ad	27.47±4.92Ab	0.23±0.10Bb	Zn6	12.60±1.67Ab	12.12±1.71Ab	0.48±0.04Bb
Cd4	63.84±4.93Aa	58.22±5.06Aa	5.62±2.25Ba	Cu1	1.62±2.06Aa	1.61±2.05Aa	0.01±0.00Aa
Cd5	40.78±2.95Ab	36.53±1.96Aa	4.25±3.10Ba	Cu3	2.19±1.56Aa	2.17±1.55Aa	0.02±0.00Aa
Cd6	36.03±3.89Ab	34.17±3.73Aa	1.86±0.40Ba	Cu13	0.56±0.05Aa	0.56±0.00Aa	0.00±0.00Ba
Cd8	33.28±3.63Ab	31.27±4.60Ab	2.01±1.16Ca	Ni2	4.31±1.43A	4.30±1.43A	0.01±0.00B

不同大写字母表示每株菌去除率、吸附率和吸收率间差异显著 ($P<0.05$); 不同小写字母表示相同重金属下不同菌株间去除率(吸附率或吸收率)差异显著 ($P<0.05$)

Different capital letters indicate significant difference between the removal rate, adsorption rate and absorptivity of each strain ($P<0.05$); Different lowercase letters indicates significant difference in removal rate (adsorption rate or absorptivity) among different strains under the same heavy metal ($P<0.05$).

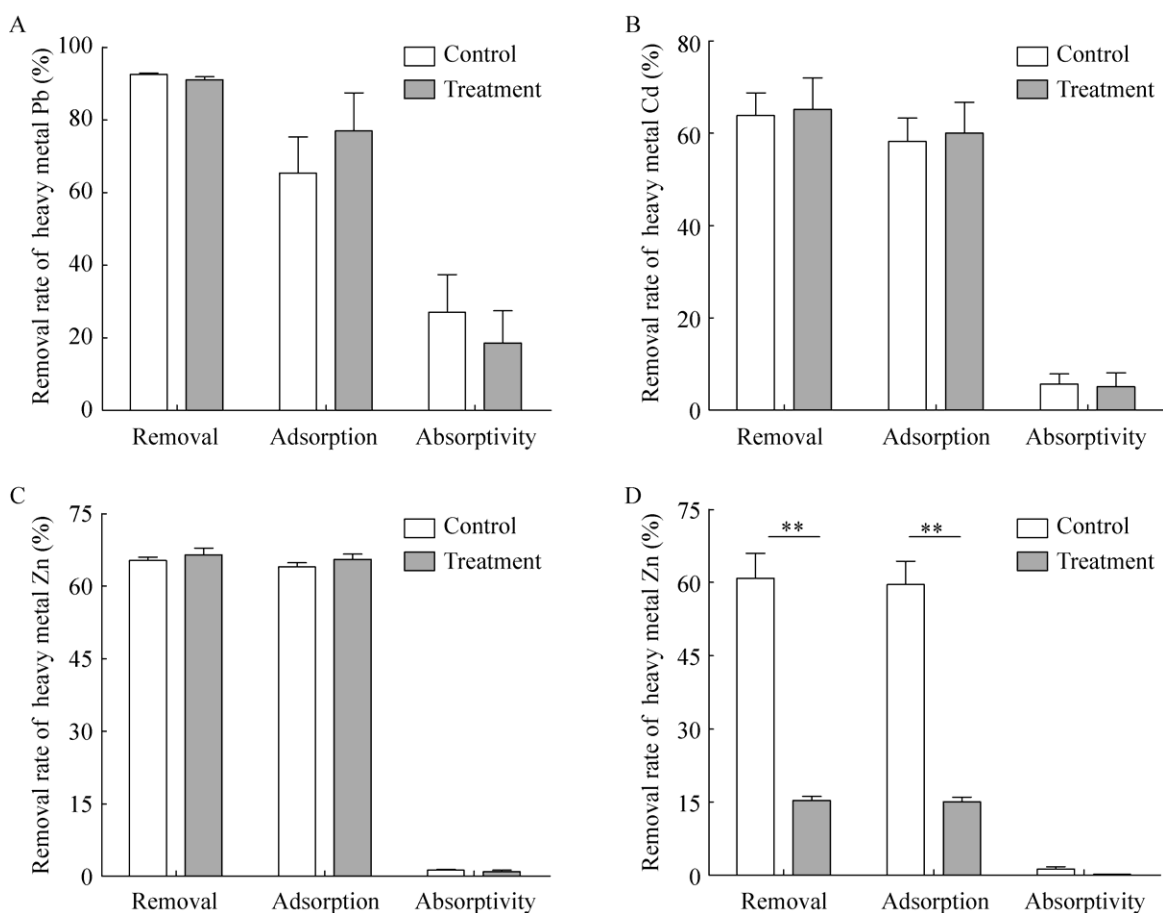


图 2 紫外照射下分离株对重金属的去除能力

Figure 2 Removal ability of heavy metals by isolates under ultraviolet irradiation. A: Strain Pb3. B: Strain Cd4. C: Strain Zn1. D: Strain Zn4. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

3 讨论

微生物修复技术中对抗重金属细菌的筛选及去除能力研究一直是热点问题。其中使用较多的筛选培养基是 NA、LB^[24]和 R2A 培养基,也有较少的土豆葡萄糖^[25]、低磷蔗糖^[26]、有氮^[27]和乳酸细菌^[28]等培养基。本研究采用 4 种培养基进行抗重金属菌株筛选,发现 R2A、NA、GA 培养基在加入重金属离子(Cd、Zn、Cu、Ni)后菌落数量相对较少,而以 TSA 为基础培养基进行抗重金属菌株筛选时生长的菌落数量和种类较多。这可能与 TSA 中胰酪蛋白胨和蛋白胨有关,这些成分有利于对营养条件较为苛刻细菌的培养^[29],因此 TSA 培养基可作为重金属胁迫下筛选抗性菌株的优良培养基。

目前,对抗重金属细菌的研究中以芽孢杆菌属数量最多,它们对多种重金属具有较高耐受性^[30-31]。本研究分离出 16 株耐受性菌以芽孢杆菌属数量最多,且对 Pb、Cd、Zn、Cu 最高耐受性分别达 3 000、800、600 和 300 mg/L 的菌株主要集中在芽孢杆菌属,包括 *Bacillus* sp. Pb3、*Bacillus* sp. Cd5、*Bacillus* sp. Zn1 和 *Bacillus* sp. Cu1 等,高于已报道的其他菌属的最大耐受性,如节杆菌属^[32]、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)^[33]、拉恩氏菌属(*Rahnella*)^[34]和气单胞菌属(*Aeromonas*)^[35]。该属菌株也在某些荒漠极端环境中作为优势属被大量分离到^[36],具有耐高温、耐酸、耐盐碱等能力,其芽孢的产生可帮助自身抵御各种环境胁迫,包括重金属胁迫和恶劣的自然环境^[37],对其同时耐受多种重金属方面也有相关报道^[38],所以本文筛选的具有较高耐受性的芽孢杆菌可作为极端环境下重金属污染修复的供试菌种资源。

除芽孢杆菌具有较高耐受性外,假单胞菌属菌株对重金属 Cd 抗性方面的研究报道较多,

本研究筛选出 2 株较高耐受性的抗 Cd 菌株分别为 *Pseudomonas* sp. Cd4 和 *Pseudomonas* sp. Cd6,可耐受 400 mg/L Cd²⁺,与林晓燕等^[39]筛选出的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) LCd1 和侯进慧等^[40]分离出的 *Pseudomonas* sp. XZC1 耐受性相同。据报道假单胞菌在 Cd²⁺胁迫土壤中占很大比例且耐 Cd 能力与其耐 Cd 基因有关,并证明该基因位于质粒上^[41],因此筛选出的 2 株假单胞菌可为重金属 Cd 污染修复和耐 Cd 机制研究提供资源。此外,本文还发现一株乳杆菌属菌株,对重金属 Ni 的耐受性可达 400 mg/L,而文献报道乳杆菌属主要耐受汞(Hg)、Cd、砷(As)等重金属^[42],因此本文获得的 *Lactobacillus* sp. Ni2 有望为重金属 Ni 修复提供新的菌种资源。

在重金属污染修复方面,除了对分菌株的耐受性有较高要求外,还需探究菌株对重金属的去除能力。本研究筛选出一株对 Pb²⁺有高去除率的菌株为 *Bacillus* sp. Pb6,对 700 mg/L Pb²⁺去除率高达 92.48%。研究报道从尾矿土壤中分离出的 *Bacillus* sp. G-1 对 200 mg/L Pb²⁺的去除率达 91.32%^[33];固定化的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对 100 mg/L Pb²⁺的去除率达 96.49%^[43]。相较而言,菌株 Pb6 在高浓度 Pb²⁺(700 mg/L)下具有很高的去除率,这可能与其生长速度快、表面积大和抗逆性强等特点有关^[44]。除抗 Pb 菌株外,本文获得的抗 Cd 菌株 *Pseudomonas* sp. Cd4 对 200 mg/L Cd²⁺有较高的去除率(63.84%)。罗洁^[45]分离出的类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)对 100 mg/L Cd²⁺的去除率为 37.4%,张旭辉等^[23]分离出的 *Pseudomonas aeruginosa* ZXH23 对 50 mg/L Cd²⁺的去除率为 33.7%。菌株 Cd4 在较高 Cd²⁺浓度下具有相对较高的去除率,分泌胞外多糖、类色氨酸等物质可能是其对 Cd²⁺具有

较好去除能力的主要原因。此外, *Bacillus* sp. Zn1 和 *Bacillus* sp. Zn4 对 200 mg/L Zn^{2+} 的去除率(65.34%、60.87%)相对较高。在以上研究结果的基础上, 本文进一步通过紫外照射试验筛选出 3 株稳定性较好的菌株, 分别为 *Bacillus* sp. Pb6、*Pseudomonas* sp. Cd4 和 *Bacillus* sp. Zn1, 它们在经过紫外处理并连续传代后仍可保持较高的重金属去除率(91.11%、65.10%、66.48%), 可以作为重金属污染土壤和水体修复的优势菌株。

综上所述, 本研究利用 TSA 培养基对道路林带土壤进行重金属抗性菌株的筛选, 并结合重金属去除能力测定和紫外照射实验, 获得一株对 Pb 有高去除率的稳定性菌株 *Bacillus* sp. Pb6, 以及 2 株对 Cd 和 Zn 有较高去除率的稳定性菌株, 分别为 *Pseudomonas* sp. Cd4 和 *Bacillus* sp. Zn1。这将为重金属污染土壤或水体的生物修复与治理提供优良菌株资源。为了更好地将高效优势微生物资源应用于环境污染治理中, 本文提出了土壤和水体污染修复思路。对重金属污染水体修复而言, 以 Pb 污染为例, 利用生物强化技术^[46]将筛选出的一株高效抗 Pb 菌株 *Bacillus* sp. Pb6 投加至序批式生物反应器 (sequencing batch reactor) 中^[47], 按照时间顺序通过进水、曝气、沉淀、排水等步骤强化反应器中活性污泥(含微生物群体及其代谢物)的去除效果, 进而通过污泥中微生物与重金属 Pb 的分批次反应使 Pb^{2+} 沉淀, 最后利用过滤和化学消毒的方式去除废水中的细菌和重金属; 对重金属污染土壤而言, 以 Zn 污染为例, 将抗 Zn 菌株 *Bacillus* sp. Zn1 与其能够形成联合关系且能富集 Zn 的绿化植物, 如山楂、大叶白蜡和丁香等^[21], 构建联合修复体系, 通过菌株对植物的抗逆促生和解毒作用, 促使植物生长及其对重金属的富集, 再进一步通过移除植物而达到

重金属去除目的。与物理化学法修复相比, 利用微生物技术修复重金属污染水体或土壤具有运行成本低、处理效果好、无二次污染等优点, 但也存在如去除时间长、去除效率受环境影响较大等不足^[48], 针对这些问题, 采用生物法与其他方法联合处理将是今后的发展方向。

REFERENCES

- [1] 王荣芬, 邱尔发, 唐丽清. 道路林带对重金属的监测及防护作用研究现状[J]. 世界林业研究, 2013, 26(3): 46-51.
WANG RF, QIU EF, TANG LQ. A review of roles of road tree belts in heavy metal monitoring and pollution prevention[J]. World Forestry Research, 2013, 26(3): 46-51 (in Chinese).
- [2] 周怡, 胡文友, 黄标, 纪荣平, 刘本乐, 刘鹏, 王信凯. 我国高速公路周边土壤重金属污染现状及研究进展[J]. 中国环境监测, 2020, 36(5): 112-120.
ZHOU Y, HU WY, HUANG B, JI RP, LIU BL, LIU P, WANG XK. Current status and research progress of heavy metal pollution in soils surrounding highways of China[J]. Environmental Monitoring in China, 2020, 36(5): 112-120 (in Chinese).
- [3] PAN LB, WANG Y, MA J, HU Y, SU BY, FANG GL, WANG L, XIANG B. A review of heavy metal pollution levels and health risk assessment of urban soils in Chinese cities[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(2): 1055-1069.
- [4] 姑力巴努·艾尼. 乌鲁木齐市地表灰尘微量元素污染及潜在风险评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2020.
HINI G. Assessment of contamination and its potential risk of trace elements in street dust in Urumqi city[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2020 (in Chinese).
- [5] 王亚宇. 乌鲁木齐市土壤重金属空间分布及行道树对重金属的富集特征[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2008.
WANG YY. Space distribution and accumulations in roadside trees of heavy metal in urban soil of Urumqi city[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [6] 李吉玫, 张毓涛. 乌鲁木齐不同功能区林带土壤重金属污染特征分析[J]. 生态环境学报, 2019, 28(9): 1859-1866.
LI JM, ZHANG YT. Characteristics of heavy-metal

- pollution in forest belt soil of different functional zones in Urumqi, Xinjiang[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2019, 28(9): 1859-1866 (in Chinese).
- [7] 华景秋. 利用芽孢杆菌在高盐浓度下生产微生物絮凝剂的机理及应用研究[D]. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2021.
HUA JQ. Mechanism and application of bioflocculant produced under high-salt condition by using strain *Bacillus* sp.[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [8] AL-GARNI S, GHANEM K, IBRAHIM A. Biosorption of mercury by capsulated and slime layer-forming gram-ve bacilli from an aqueous solution[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9: 6413-6421.
- [9] 李娟, UWAREMWE C, 冷艳, 张晓华, 李师翁, 陈熙明. 节杆菌属细菌处理有机物和重金属污染物的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(10): 89-97.
LI J, UWAREMWE C, LENG Y, ZHANG XH, LI SW, CHEN XM. Progress on the study of biodegradation of organic pollutants and adsorption of heavy metals with *Arthrobacter* strains[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 40(10): 89-97 (in Chinese).
- [10] BHATTACHARYA A, NAIK SN, KHARE SK. Harnessing the bio-mineralization ability of urease producing *Serratia marcescens* and *Enterobacter cloacae* EMB19 for remediation of heavy metal cadmium (II)[J]. Journal of Environmental Management, 2018, 215: 143-152.
- [11] SHER S, HUSSAIN SZ, REHMAN A. Phenotypic and genomic analysis of multiple heavy metal-resistant *Micrococcus luteus* strain AS2 isolated from industrial waste water and its potential use in arsenic bioremediation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(5): 2243-2254.
- [12] SHARMA S, ADHOLEYA A. Hexavalent chromium reduction in tannery effluent by bacterial species isolated from tannery effluent contaminated soil[J]. Journal of Environmental Science and Technology, 2012, 5(3): 142-154.
- [13] 欧晓彬, 燕晓娟, 张文杰, 王东. 基于丁香假单胞杆菌的植物重金属富集促进剂制作方法: CN107931326A[P]. 2018-04-20.
OU XB, YAN XJ, ZHANG WJ, WANG D. Manufacturing method for plant heavy metal enrichment accelerant based on *Pseudomonas syringae*: CN107931326A[P]. 2018-04-20 (in Chinese).
- [14] ZHANG ZH, SI R, LV JT, JI YY, CHEN WS, GUAN WY, CUI YX, ZHANG T. Effects of extracellular polymeric substances on the formation and methylation of mercury sulfide nanoparticles[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(13): 8061-8071.
- [15] 杨文卿. 绿色合成纳米铁对猪粪堆肥过程中重金属的钝化机制研究[D]. 福州: 福建师范大学博士学位论文, 2019.
YANG WQ. Research on the passivation mechanism of heavy metals during pig manure composting by adding green synthesis of iron nanoparticles[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Normal University, 2019 (in Chinese).
- [16] 美合日阿依·希尔亚孜旦. 乌鲁木齐市城市道路绿化带不同配置模式植物重金属富集效能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2019.
XIRYAZDAN M. Study on heavy metal enrichment efficiency of plants in different configuration patterns of urban road green belt in Urumqi[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2019 (in Chinese).
- [17] 皮永蕊, 吕永红, 柳莹, 唐永政, 高丽, 包木太. 微藻-细菌共生体系在废水处理中的应用[J]. 微生物学报, 2019, 59(6): 1188-1196.
PI YR, LÜ YH, LIU Y, TANG YZ, GAO L, BAO MT. Application of microalgae-bacteria symbiosis system in wastewater treatment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(6): 1188-1196 (in Chinese).
- [18] RATTANAPOLSAN L, NAKBANPOTE W, SANGDEE A. Zinc- and cadmium-tolerant endophytic bacteria from *Murdannia spectabilis* (Kurz) Faden. studied for plant growth-promoting properties, in vitro inoculation, and antagonism[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203: 1131-1148.
- [19] 卜旭莹, 任敏, 万传星, 张利莉. 帕米尔高原可培养需氧冷适应细菌及古菌多样性[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2568-2581.
BU XY, REN M, WAN CX, ZHANG LL. Diversity of aerobic cold-adapted bacteria and archaea isolated from the Pamir Plateau[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2568-2581 (in Chinese).
- [20] 柯野, 卢星燕, 曾松荣, 陈韵. 粤北大宝山矿区土壤中抗铅菌株的筛选鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2016, 43(3): 489-493.
KE Y, LU XY, ZENG SR, CHEN Y. Screening and identification of Pb-resistance strain from Dabaoshan mining area in Northern Guangdong Province[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2016, 43(3): 489-493 (in Chinese).
- [21] 王小琴, 龚斌, 朱薇玲, 缪礼鸿. 放线菌 327[#]的发酵培养基筛选及培养条件优化[J]. 中国酿造, 2010, (10): 47-50.
WANG XQ, GONG B, ZHU WL, MIAO LH. Optimization of culture medium and fermentation

- conditions for the production of antagonistic substances by actinomycetes 327[#][J]. China Brewing, 2010, (10): 47-50 (in Chinese).
- [22] 胡娴, 彭涛, 王逗, 侯海军, 秦红灵, 陈香碧, 陈春兰. 一种改良的旱地土壤微生物 DNA 提取方法[J]. 河南农业科学, 2020, 49(5): 75-80.
HU X, PENG T, WANG D, HOU HJ, QIN HL, CHEN XB, CHEN XL. An improved extraction method of microbial DNA from dryland soil[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(5): 75-80 (in Chinese).
- [23] 张旭辉, 孙斌, 魏志敏, 赵晨雨, 徐源洲, 张力浩, 徐莉. 2 株耐镉微生物的筛选及其对镉的吸附钝化差异机制[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(5): 869-876.
ZHANG XH, SUN B, WEI ZM, ZHAO CY, XU YZ, ZHANG LH, XU L. Screening of two cadmium tolerant microorganisms and their differences in adsorption and immobilization of cadmium[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(5): 869-876 (in Chinese).
- [24] 付少委, 楚超群, 黎妮, 宋崇洋, 梁爽, 张超, 王伟平, 杨志伟. 镉污染水稻种子内生细菌的分离及其耐镉性和植物促生性研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(4): 1536-1548.
FU SW, CHU CQ, LI N, SONG CY, LIANG S, ZHANG C, WANG WP, YANG ZW. Isolation of endophytic bacteria from cadmium-contaminated rice seeds and their cadmium tolerance and plant growth-promoting traits[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1536-1548 (in Chinese).
- [25] 张敏, 郜春花, 李建华, 卢晋晶, 靳东升, 郜雅静. 一株耐铅土著微生物的吸附特性及机制研究[J]. 山西农业科学, 2018, 46(8): 1321-1328.
ZHANG M, GAO CH, LI JH, LU JJ, JIN DS, GAO YJ. Study on the adsorption characteristics and mechanism of a lead resistant aboriginal microorganism[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 1321-1328 (in Chinese).
- [26] 唐志远. 具有溶镉能力的微生物筛选及其促生特性研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2018.
TANG ZY. Study on screening of cadmium-dissolving microorganisms and its growth-promotion properties[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [27] 王旭梅, 盛楠, 王红旗. 铅抗性细菌的筛选及其对铅活化的研究[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(6): 64-67.
WANG XM, SHENG N, WANG HQ. Screening of lead-resistant strains of microorganisms and study on the activation of lead[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(6): 64-67 (in Chinese).
- [28] 蒲俊华, 刘茵茵, 陈大伟, 高玉时, 陆俊贤, 张小燕, 唐梦君, 周倩, 孔令武. 鸡源耐镉乳酸菌株的分离与鉴定[J]. 动物营养学报, 2022, 34(2): 1305-1312.
PU JH, LIU YY, CHEN DW, GAO YS, LU JX, ZHANG XY, TANG MJ, ZHOU Q, KONG LW. Isolation and identification of cadmium-tolerant *Lactobacillus* strains from chicken[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(2): 1305-1312 (in Chinese).
- [29] 徐春燕, 王涛, 徐婷, 苏建宇. 一株耐旱细菌的分离、筛选与鉴定[J]. 干旱区资源与环境, 2019, 33(4): 117-123.
XU CY, WANG T, XU T, SU JY. Isolation, screening and identification of a strain of drought resistant bacteria[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2019, 33(4): 117-123 (in Chinese).
- [30] 李艳楠, 袁存霞, 张肖冲, 杨瑞, 何艳婷, 程欣怡, 刘建利, 刘秉儒, 李靖宇. 耐多种重金属细菌的筛选、鉴定和酶活测定[J]. 环境科学与技术, 2021, 44(10): 44-52.
LI YN, YUAN CX, ZHANG XC, YANG R, HE YT, CHENG XY, LIU JL, LIU BR, LI JY. Isolation, identification and enzyme activity determination of heavy metal tolerant bacteria[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 44(10): 44-52 (in Chinese).
- [31] BAI J, YANG XH, DU RY, CHEN YM, WANG SZ, QIU RL. Biosorption mechanisms involved in immobilization of soil Pb by *Bacillus subtilis* DBM in a multi-metal-contaminated soil[J]. Journal of Environmental Sciences, 2014, 26(10): 2056-2064.
- [32] 陈志, 邹情雅, 潘晓鸿, 林璋, 关雄. 铅锌矿尾矿坝分离节杆菌 12-1 对 Pb²⁺ 的耐受和吸附性能研究[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(11): 1394-1401.
CHEN Z, ZOU QY, PAN XH, LIN Z, GUAN X. Pb²⁺ tolerance and adsorption of *Arthrobacter* sp. 12-1 isolated from lead-zinc mine tailing dam[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(11): 1394-1401 (in Chinese).
- [33] 张璐, 薛林贵, 武雯雯, 李明聪, 王韶梅, 刘映彤, 何圆圆. 两株耐铅镉菌株的分离筛选及铅镉去除性能研究[J]. 兰州交通大学学报, 2021, 40(1): 104-111.
ZHANG L, XUE LG, WU WW, LI MC, WANG SM, LIU YT, HE YY. Isolation, screening and performance study on lead and cadmium removal of two Pb-Cd tolerant strains[J]. Journal of Lanzhou Jiaotong University, 2021, 40(1): 104-111 (in Chinese).
- [34] 周野, 金香一, 张秀芳, 吴迪, 冷粟, 李明堂. 拉恩氏菌 LRP3 诱导形成碱式磷酸锌沉淀及其在 Zn 污染土壤修复中的作用[J]. 吉林大学学报(理学版), 2019, 57(3): 722-727.
ZHOU Y, JIN XY, ZHANG XF, WU D, LENG S, LI MT. *Rahnella* sp. LRP3 induces basic zinc phosphate

- precipitation and its role in zinc contaminated soil remediation[J]. Journal of Jilin University: Science Edition, 2019, 57(3): 722-727 (in Chinese).
- [35] 何环宇. 重金属铜吸附优势菌株的筛选及其特性研究[D]. 成都: 西南交通大学硕士学位论文, 2017.
HE HY. Screening of adsorption dominant bacteria for copper and research on its features[D]. Chengdu: Master's Thesis of Southwest Jiaotong University, 2017 (in Chinese).
- [36] PIUBELI F, de LOURDES MORENO M, KISHI LT, HENRIQUE-SILVA F, GARCÍA MT, MELLADO E. Phylogenetic profiling and diversity of bacterial communities in the death valley, an extreme habitat in the Atacama desert[J]. Indian Journal of Microbiology, 2015, 55(4): 392-399.
- [37] 余岳, 王春维, 祝爱侠, 李涛. 一株凝结芽孢杆菌芽孢抗逆性研究及其产孢条件优化[J]. 饲料工业, 2013, 34(7): 43-47.
YU Y, WANG CW, ZHU AX, LI T. Stress resistance and optimization on spore-forming conditions of *Bacillus coagulans*[J]. Feed Industry, 2013, 34(7): 43-47 (in Chinese).
- [38] 阚洪媛, 杨世鑫, 孙梁伦, 杨月伟, 唐美珍, 高燕, 刘振路, 贾婧兰. 一株耐铅、锌、铬菌株的分离鉴定及其吸附能力[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 3974-3986.
KAN HY, YANG SX, SUN LL, YANG YW, TANG MZ, GAO Y, LIU ZL, JIA RL. Isolation, identification and adsorption capacity of a strain resistant to lead, zinc and chromium[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 3974-3986 (in Chinese).
- [39] 林晓燕, 牟仁祥, 曹赵云, 朱智伟, 陈铭学. 耐镉细菌菌株的分离及其吸附镉机理研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(9): 1700-1706.
LIN XY, MOU RX, CAO ZY, ZHU ZW, CHEN MX. Isolation and cadmium adsorption mechanisms of cadmium-resistant bacteria strains[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(9): 1700-1706 (in Chinese).
- [40] 侯进慧, 陈集双, 丁爱军, 胡燕花. 一株大质粒决定的耐镉假单胞菌的鉴定与耐受性分析[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 225-228.
HOU JH, CHEN JS, DING AJ, HU YH. Identification and tolerance analysis of a large plasmid determined cadmium resistance *Pseudomonas* sp.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(14): 225-228 (in Chinese).
- [41] 周丽英. 水稻根际土壤耐镉细菌的筛选及其耐镉机理研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2012.
ZHOU LY. Screening of cadmium-tolerant bacteria from rice rhizosphere soil and its cadmium-tolerance mechanism[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2012 (in Chinese).
- [42] 白英, 孙悦, 王纯玮. 乳酸菌对重金属离子吸附能力的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(1): 39-45.
BAI Y, SUN Y, WANG CW. Research progress on the adsorption capacity of lactic acid bacteria to heavy metal ions[J]. China Dairy Industry, 2021, 49(1): 39-45 (in Chinese).
- [43] 张金帆, 杜春艳, 文晓凤, 谭诗杨, 余关龙, 陈宏, 范庆元, 杨毓鑫. 固定化地衣芽孢杆菌对 Pb^{2+} 的吸附特性研究[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(11): 87-92.
ZHANG JF, DU CY, WEN XF, TAN SY, YU GL, CHEN H, FAN QY, YANG YX. A novel biosorbent prepared by fixed *Bacillus licheniformis* for Pb^{2+} removal from wastewater[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(11): 87-92 (in Chinese).
- [44] 杨文玲, 杜志敏, 孙召华, 周伏忠, 安明理, 雷高, 魏传军, 巩涛. 芽孢杆菌在重金属污染土壤修复中的研究进展[J]. 环境污染与防治, 2021, 43(6): 759-763.
YANG WL, DU ZM, SUN ZH, ZHOU FZ, AN ML, LEI G, WEI CJ, GONG T. Research progress of *Bacillus* in remediation of heavy metal contaminated soil[J]. Environmental Pollution & Control, 2021, 43(6): 759-763 (in Chinese).
- [45] 罗洁. 类产碱假单胞菌对PVA的降解及镉吸附特性研究[D]. 株洲: 湖南工业大学硕士学位论文, 2014.
LUO J. Research on PVA biodegradation and cadmiums biosorption of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*[D]. Zhuzhou: Master's Thesis of Hunan University of Technology, 2014 (in Chinese).
- [46] 王哲, 魏利, 马放, 赵光, 张斯. 苯胺废水SBR工艺生物强化处理效能[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2010, 42(6): 949-953.
WANG Z, WEI L, MA F, ZHAO G, ZHANG S. Treatment effectiveness of bioaugmentation on aniline wastewater with SBR[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2010, 42(6): 949-953 (in Chinese).
- [47] ZHANG YY, KURODA M, ARAI S, KATO F, INOUE D, IKE M. Biological treatment of selenate-containing saline wastewater by activated sludge under oxygen-limiting conditions[J]. Water Research, 2019, 154: 327-335.
- [48] 王泓博, 苟文贤, 吴玉清, 李伟. 重金属污染土壤修复研究进展: 原理与技术[J]. 生态学杂志, 2021, 40(8): 2277-2288.
WANG HB, GOU WX, WU YQ, LI W. Progress in remediation technologies of heavy metals contaminated soil: principles and technologies[J]. Chinese Journal of Ecology, 2021, 40(8): 2277-2288 (in Chinese).