



研究报告

一株耐铅、锌、铬菌株的分离鉴定及其吸附能力

阚洪媛¹ 杨世鑫¹ 孙梁伦¹ 杨月伟¹ 唐美珍^{*1} 高燕² 刘振路¹ 贾婧兰¹

1 曲阜师范大学 南四湖湿地生态与环境保护重点实验室 山东 曲阜 273165

2 山东鲁南地质工程勘察院山东省地勘局第二地质大队 山东 济宁 272100

摘要:【背景】采矿带来的土壤重金属污染问题对生态环境和人类健康产生了极大的危害,因此矿区重金属污染问题亟待解决。生物修复法成本低、资源广、没有二次污染,是修复土壤重金属污染的有效途径。【目的】以山东省曲阜市某煤矸石山周围土壤为材料,采用平板划线法分离筛选一株同时对铅、锌、铬有高耐性且吸附能力强的菌株。【方法】通过形态学特征、生理生化鉴定、分子生物学方法鉴定菌种;采用原子吸收分光光度计测量各重金属的浓度。【结果】鉴定菌株为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),命名为 *Bacillus cereus* MZ-11。菌株 MZ-11 在 pH 为 5.5–8.5、温度为 15–45 °C、NaCl 质量分数为 2%–8% 时可正常生长。菌株 MZ-11 最高耐铅、锌、铬浓度高达 1 000、1 200、1 600 mg/L。在培养基中铅、锌、铬 3 种重金属浓度分别为初始浓度(含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 浓度分别为 50、60、80 mg/L)、初始浓度的 5 倍、10 倍、20 倍的情况下, MZ-11 对 Cr^{6+} 和 Zn^{2+} 的吸附比例则随浓度的提高逐渐增大,吸附百分比均在 98%–99% 以上。对 Pb^{2+} 的吸附比例有一个最高值,并且 Pb^{2+} 的浓度为初始浓度的 5 倍时, MZ-11 对 Pb^{2+} 的吸附比例达最大值 97.01%。【结论】菌株 MZ-11 对铅、锌、铬有高耐性和较好的吸附能力,为生物法修复矿区复合重金属污染和矿区生态环境提供了有力的理论支持。

关键词: 耐铅锌铬菌株, 菌株鉴定, 蜡状芽孢杆菌, 吸附能力

Isolation, identification and adsorption capacity of a strain resistant to lead, zinc and chromium

KAN Hong-Yuan¹ YANG Shi-Xin¹ SUN Liang-Lun¹ YANG Yue-Wei¹TANG Mei-Zhen^{*1} GAO Yan² LIU Zhen-Lu¹ JIA Ruo-Lan¹

1 Key Laboratory of Nansihu Lake Wetland Ecosystem and Environment Protection, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China

2 Southern Shandong Geological Engineering Investigation Institute, Second Geological Brigade of Shandong Geological Survey Bureau, Jining, Shandong 272100, China

Abstract: [Background] The problem of heavy metal pollution caused by mining has caused great harm

Foundation items: Southern Shandong Geological Engineering Investigation Institute (Second Shandong Geological Brigade of Shandong Geological Survey Bureau) Open Topic (LNY2020-Y09); National Natural Science Foundation of China (31700433, 31672314)

***Corresponding author:** E-mail: qsd_tmzh@qfnu.edu.cn

Received: 01-06-2020; **Accepted:** 30-09-2020; **Published online:** 12-10-2020

基金项目: 山东省鲁南地质工程勘察院(山东省地勘局第二地质大队)开放课题(LNY2020-Y09); 国家自然科学基金(31700433, 31672314)

***通信作者:** E-mail: qsd_tmzh@qfnu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-01; **接受日期:** 2020-09-30; **网络首发日期:** 2020-10-12

to the ecological environment and human health. Therefore, the problem of heavy metal pollution in mining areas needs to be solved urgently. Biological remediation method has low cost, wide resources and no secondary pollution. It is an effective way to remediate soil heavy metal pollution. **[Objective]** Using the soil around a coal gangue mountain in Qufu city, Shandong province as a material, a strain with high tolerance to lead, zinc, and chromium and strong adsorption capacity was separated and selected by the flat line method. **[Methods]** Morphological characteristics, physiological and biochemical identification, and molecular biology methods were used to identify the strain. The concentration of each heavy metal was measured by an atomic absorption photometer. **[Results]** The identified strain was *Bacillus cereus*, named *Bacillus cereus* MZ-11. The strain MZ-11 can grow normally when the pH was 5.5–8.5, the temperature was 15–45 °C, and the NaCl mass fraction was 2%–8%. The strain MZ-11 had the highest resistance to lead, zinc and chromium up to 1 000, 1 200 and 1 600 mg/L. The three heavy metal concentrations of lead, zinc, and chromium in the medium were the initial concentration (containing Pb^{2+} , Zn^{2+} , and Cr^{6+} at 50, 60, and 80 mg/L, respectively), and the initial concentration was 5 times, 10 times, and 20 times. As the concentration increased, the adsorption ratio of strain MZ-11 to Cr^{6+} and Zn^{2+} gradually increased, and the adsorption percentages were all above 98%–99%. Under the condition that the Pb^{2+} concentration was 5 times the initial concentration, the adsorption ratio of MZ-11 to Pb^{2+} reached the maximum 97.01%. **[Conclusion]** Strain MZ-11 has high tolerance to lead, zinc and chromium and good adsorption capacity, which provides strong theoretical support for bioremediation of heavy metal pollution in the mining area and ecological environment of the mining area.

Keywords: Lead zinc chromium resistant strains, Strain identification, *Bacillus cereus*, Adsorption capacity

采矿为地区和国家经济发展提供重要的能源资源, 为人类带来了巨大的经济效益, 但矿业开发所造成的土壤重金属污染问题日益凸显^[1], 常年露天堆放的煤矸石已成为矿区重要的重金属污染源之一^[2]。矿山土壤重金属含量过高, 易通过风蚀雨淋扩散, 加之重金属的富集和生物放大作用, 对周围的生态环境和人类生产活动产生严重威胁; 因此, 如何合理修复废弃矿山土壤已成为当前亟待解决的问题^[3]。

目前重金属污染土壤的修复包括物理修复、化学修复和生物修复。物理修复方法主要包括深耕换土、客土、翻土、电动力修复法、热解吸技术、热处理法等; 化学修复方法主要包括溶剂萃取法、化学淋洗、氧化法、还原法、钝化技术、施加改良剂以及电动力学修复等^[4]; 生物修复技术是利用生物(包括动物、植物和微生物)的代谢功能对污染物进行吸收、降解、转化或者清除, 实现环境净化和生态恢复^[5]。生物修复与物理、化学修复方法不同, 相对于其他两种方法来说, 生物修复技术更适合推

广, 原因在于其成本低廉、资源广泛、不存在二次污染等特点^[6]。生物修复中微生物修复是修复重金属污染土壤的一项有前景的技术^[7]。从重金属污染区分离筛选本土微生物能有效提高生物修复的效率^[8]。已有一些研究报道了微生物对重金属的修复及耐性机理。如: 陈兰洲等^[9]从重金属污染土壤中筛选出一株在酸性条件下对 Pb^{2+} 有良好去除效果的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) Z-y3, 该菌株主要通过表面静电吸附、离子交换、产碱沉淀等方式, 利用胞外蛋白多聚物、多糖的羟基和氨基结合重金属 Pb^{2+} , 并形成难溶晶体, 从而达到吸附重金属 Pb^{2+} 的效果; 李如意^[10]从湖南省株洲市某冶炼厂周围重金属污染土壤中分离出一株新的耐受 Mn^{2+} 的普罗威登斯菌属(*Providencia* sp.) 细菌菌株, 该菌株主要通过细胞外氧化、细胞外吸附和细胞内积累对 Mn^{2+} 进行生物吸附。微生物的耐受机理主要有微生物表面吸附, 通过细胞表面带负电的化学基团与重金属离子进行快速吸附^[11]、微生物与重金属形成络合物, 降低移动能力等。目前的研究大多局限于对某一单一

金属的去除,但是面对现实的重金属污染,单一有抗性的菌株对重金属污染的治理存在较大的局限性。因为菌株对于重金属具有交叉抗性^[12],所以筛选出对复合金属有高耐性的菌株是微生物法修复煤矸石山复合重金属污染的关键。

本研究从曲阜市某煤矸石山重金属污染的土壤中分离筛选得到一株同时对重金属铅、锌、铬具有吸附富集作用的高耐性菌株,利用形态学和分子生物学方法对菌株进行鉴定,并研究菌株的生长特性、重金属耐受性、吸附能力,以期为将来应用于矿区土地复垦和生态修复提供重要的理论依据和菌种资源^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集

土样采集于山东省曲阜市某煤矸石山周围的土壤。以煤矸石山为中心分别在距矸石山 20、50、100 m 的圆周上采样。每个圆周均设 5 个采样点,采样深度为土壤表层 0–20 cm。将采集的土样放入灭菌的样品袋中,并对样品袋进行编号。取部分样品用于实验,其余放入冰箱(4 °C)储存备用。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨固体培养基(g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0,NaCl 5.0,琼脂 15–20,调节 pH 7.0–7.5。LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,NaCl 10.0,酵母提取物 5.0,调节 pH 7.0–7.2。筛选培养基:向 LB 培养基加入一定量的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液、 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 溶液和 ZnCl_2 溶液,使其达到具体实验所要求的离子浓度。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 试剂,天根生化科技(北京)有限公司。原子吸收分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;紫外可见分光光度计,岛津公司;扫描电子显微镜,Carl Zeiss 股份有限公司;温控摇床,上海一恒科学仪器有限公司;精密 pH 测量器,Mettler Toledo (上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 耐铅、铬、锌菌株分离与纯化

将土壤样品放入 28 °C 恒温培养箱中培养驯化 2 d,取驯化后的土样 1 g 溶于含 99 mL 无菌蒸馏水并带有玻璃珠的三角瓶中,于 28 °C、150 r/min 振荡培养 24 h,让微生物大量生长,从而达到富集的目的。静置后取上清液进行梯度稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释度的样液 0.1 mL,涂布于含 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 质量浓度为 10、16、12 mg/L 的牛肉膏蛋白胨培养基平板上,每个梯度设 3 个平行,37 °C 下恒温培养 24 h,获得单菌落。挑选长势好、菌落饱满的菌株依次反复划线纯化培养。然后逐次提高重金属的浓度,直至牛肉膏蛋白胨培养基中重金属 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 浓度增加为 50、60、80 mg/L,依次接种到重金属浓度更高的固体平板上培养,挑选耐重金属能力最强的单菌落在平板上划线转接 3 次以上进行菌种纯化^[14],并挑选长势好、菌落饱满的单菌落接种到试管斜面培养基上,编号 MZ-1–MZ-12。

1.2.2 菌株初筛与复筛

将分离出的 12 个单菌落经扩大培养后同时接种到筛选培养基中,筛选培养基中含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度分别为 50、60、80 mg/L。观察菌株的生长状况,每种菌株设置 3 个重复,不添加重金属离子的 LB 培养基为空白培养基,即对照。

最终选定生长旺盛的 6 株菌株进行复筛,在筛选培养基(Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度分别为 50、60、80 mg/L)中 37 °C 下恒温培养 24 h 后,4 °C、1 250 r/min 离心 10 min 取上清,原子吸收分光光度计测其吸光度(Abs),每个菌株设置 3 个重复。计算出各金属离子的吸附率,筛选出对 3 种金属离子均有较高吸附率的菌株 MZ-11 进行下一步的研究实验。

1.2.3 MZ-11 的鉴定

(1) 形态学观察

在牛肉膏蛋白胨平板上观察细菌的菌落形态,利用革兰氏染色法在油镜下观察菌体形态,将芽孢染色后观察芽孢。将纯化好的菌株 MZ-11 转接至

LB 固体培养基, 在 30 °C 无菌条件下培养 24 h 左右。挑取菌株 MZ-11, 以无菌水洗涤多次。菌体先用 3% 的戊二醛固定、漂洗, 再用 1% 的锇酸固定, 最后用乙醇脱水。临界点干燥、粘台、喷金, 在扫描电子显微镜下观察^[15]。

(2) 生理生化特征测定

对筛选出的细菌进行葡萄糖氧化发酵试验、氧化酶试验、蔗糖水解试验、乙酰甲基甲醇试验、甲基红(M.R.)试验、H₂O₂ 酶试验、产 H₂S 试验、吲哚产生试验、硝酸盐还原试验等生理生化反应, 具体方法及步骤参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)^[16], 并使用一株蜡状芽孢标准菌株作为参考菌。

(3) 16S rRNA 基因检测

用细菌基因组试剂盒提取 DNA, 细菌 16S rRNA 基因通用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTAC GA-3')。PCR 反应体系(50 μL): 27F (10 μmol/L) 1 μL, 1 492R (10 μmol/L) 1 μL, DNA 模板 2 μL, 2×PCR Mix 25 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 34 个循环; 72 °C 15 min; 16 °C 10 min^[17]。PCR 反应结束后, 将获得的产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行鉴定测序。将测序完成的 16S rRNA 基因通过 BLAST 检索 GenBank 中的核酸序列进行同源性比对, 下载 BLAST 比对序列相似性较高的菌株序列, 利用 ClustalW 进行比对, 用 Phylip 软件构建系统发育进化树。

1.2.4 MZ-11 的生长特性研究

(1) 生长曲线测定

将菌株活化 24 h 后按照 3% 的接种量接种到牛肉膏蛋白胨培养基中, 设置 3 个平行, 37 °C 下培养, 每隔 2 h 测定使用紫外分光光度计在 600 nm 处测定 OD₆₀₀ 值。根据测定结果的平均值绘制菌株 MZ-11 的生长曲线图。

(2) pH、温度、盐离子浓度对菌株 MZ-11 生长的影响

将菌株 MZ-11 进行活化 24 h 后, 以 3% 的接种

量接种至盛有 100 mL LB 液体的 150 mL 锥形瓶中, 不同 pH、温度和盐度条件下对其进行振荡 (150 r/min) 培养^[18], 培养 24 h 后测定 OD₆₀₀ 并绘制 pH、温度、盐度与 OD₆₀₀ 的关系图。其中实验温度划分为 5、15、25、37、45、55 °C 共 6 个梯度; 设置 pH 值为 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5 共 6 个梯度; 设置 NaCl 质量分数 2%、3.5%、5%、6.5%、8%、9.5% 共 6 个梯度。以未接种的牛肉膏蛋白胨液体培养基作为空白对照, 每个处理设置 3 个平行。

1.2.5 MZ-11 对铅、锌、铬的耐受性分析

将获得的高耐性菌株 MZ-11 经过牛肉膏蛋白胨固体培养基(不含铅、锌、铬)传代 10 次培养后, 再转入相应铅、锌、铬浓度的牛肉膏蛋白胨固体培养基上传代培养 10 次, 观察培养基上菌株 MZ-11 的生长状况。培养温度均为 37 °C。

1.2.6 MZ-11 对 Pb²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺ 的吸附能力研究

将菌株 MZ-11 转接到 LB 培养基中, 37 °C、150 r/min 条件下培养 24 h 制备种子液。将 1 mL 种子液加入到 9 mL 含重金属初始浓度(Pb²⁺: 50 mg/L; Zn²⁺: 60 mg/L; Cr⁶⁺: 80 mg/L)的 1、5、10、20 倍的液体培养基中, 在同样条件下振荡培养 12 h 后, 于 4 °C、13 000 r/min 条件下离心 10 min, 用原子吸收分光光度计测量离心所得的上清液中各重金属的浓度。挑取 MZ-11 单菌落转到 LB 培养基中, 37 °C、150 r/min 恒温培养 24 h, 13 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用去离子水清洗 3 次, 冷冻干燥后研磨过筛, 置于干燥器中保存备用, 以灭活菌体组为对照组, 每个浓度设置 3 个平行。根据结果计算吸附率, 根据吸附率得出菌株 MZ-11 对铅、锌、铬的吸附能力结论。计算公式如下所示:

$$P = \frac{(C_0 - C_e) \times 100}{C_0}$$

式中, C₀ 为 Pb²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺ 的初始浓度(mg/L), C_e 为吸附平衡后 Pb²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺ 的浓度(mg/L)。

将吸附 500 mg/L Pb²⁺、600 mg/L Zn²⁺、800 mg/L Cr⁶⁺ 后的菌体进行前处理后, 利用 SEM-EDS 组合对样品进行面扫描, 观察吸附后菌体表面的微观特

征和元素分布情况,电子束在试样表面扫描时,元素在试样表面的分布能在屏幕上以亮度(彩色)分布显示出来(定性分析),亮度越亮,说明元素含量越高。

2 结果与分析

2.1 耐铅、锌、铬菌株的筛选

通过菌种多次划线纯化,24 h 后在平板上挑取分离长势良好、生长丰满的 12 个细菌单菌落,在筛选培养基中 MZ-1、MZ-3、MZ-4、MZ-7、MZ-8、MZ-12 正常生长, MZ-2、MZ-5、MZ-6、MZ-9、MZ-10、MZ-11 生长旺盛,因此选择 MZ-2、MZ-5、MZ-6、MZ-9、MZ-10、MZ-11 进行复筛。

菌株 MZ-2、MZ-5、MZ-6、MZ-9、MZ-10、MZ-11 对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的吸附率如图 1 所示。由菌株的复筛结果明显可以看到 6 株菌对 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 均有非常高的吸附率,而 MZ-2、MZ-5、MZ-6、MZ-9、MZ-10 对 Cr^{6+} 的吸附效果较差,吸附率均只在 40% 左右,只有 MZ-11 对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 这 3 种重金属离子的吸附率均达到了 90% 以上。综合以上结果,选定菌株 MZ-11 作为进一步研究的对象。

2.2 MZ-11 的鉴定

2.2.1 形态学和生理生化鉴定

对分离筛选得到的菌株 MZ-11 进行形态学观察和生理生化实验,在 37 °C 下培养,菌株 MZ-11 表现为边缘整齐,圆形凸起,不透明的米白色菌落,革兰氏染色呈阳性,光学显微镜(图 2)和扫描电镜(图 3)

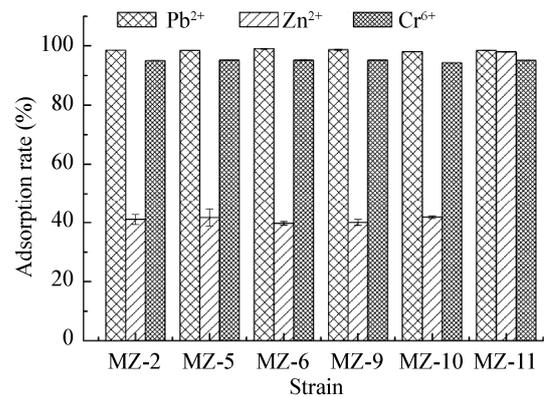


图 1 菌株对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的吸附情况
Figure 1 Adsorption of Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} by strains



图 2 光镜下菌株 MZ-11 的形态(1 000×)
Figure 2 Morphology of strain MZ-11 under light microscope (1 000×)

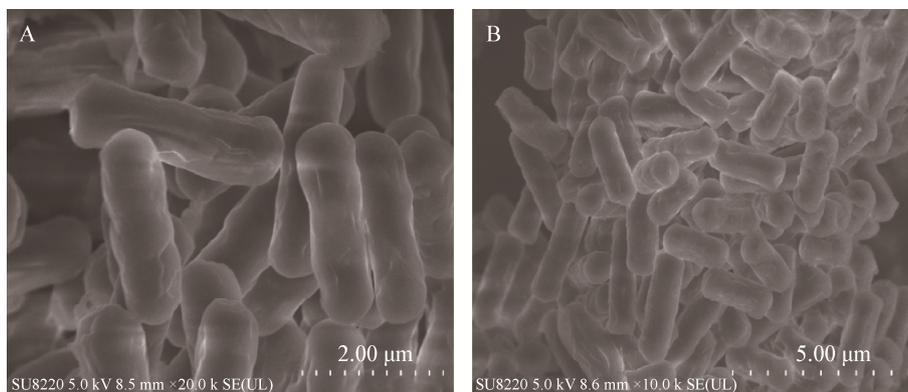


图 3 菌株 MZ-11 的扫描电镜图
Figure 3 Scanning electron micrograph of strain MZ-11

下观察为长杆状, 芽孢中生或者端生, 大小为 (0.5–0.8) μm×(1.6–1.8) μm。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)对菌株 MZ-11 进行的生理生化试验结果如表 1 所示, 与参考菌株蜡状芽孢杆菌 HJJ2-5^[19](一株由吉林农业大学水产实验室保存的蜡状芽孢杆菌)的生理生化实验结果基本一致。

2.2.2 MZ-11 的 16S rRNA 基因序列分析

菌株 MZ-11 的 16S rRNA 基因特异序列为 1 477 bp (GenBank 登录号为 MT512571), 通过 BLAST 检索 GenBank 中的核酸序列进行比对, 结果表明该菌株与 *Bacillus cereus* (MT323229)的相似性达到 99.57%。结合菌株的形态特征和生理生化指标测定结果, 鉴定菌株 MZ-11 为蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 并命名为 *Bacillus cereus* MZ-11 (MT512571)。基于 16S rRNA 基因序列构建的该菌株的系统发育树如图 4 所示。

表 1 菌株 MZ-11 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain MZ-11

项目 Items	MZ-11	<i>Bacillus cereus</i> HJJ2-5
Gram stain	+	+
V-P	+	+
M.R.	+	+
Sucrose	+	+
Nitrate (reduction)	+	+
Hydrogen sulfide	-	-
H ₂ O ₂ enzyme	+	+
Indole production	-	-
Glucose oxidative fermentation	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
Inositol	-	-
Spore staining	+	

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

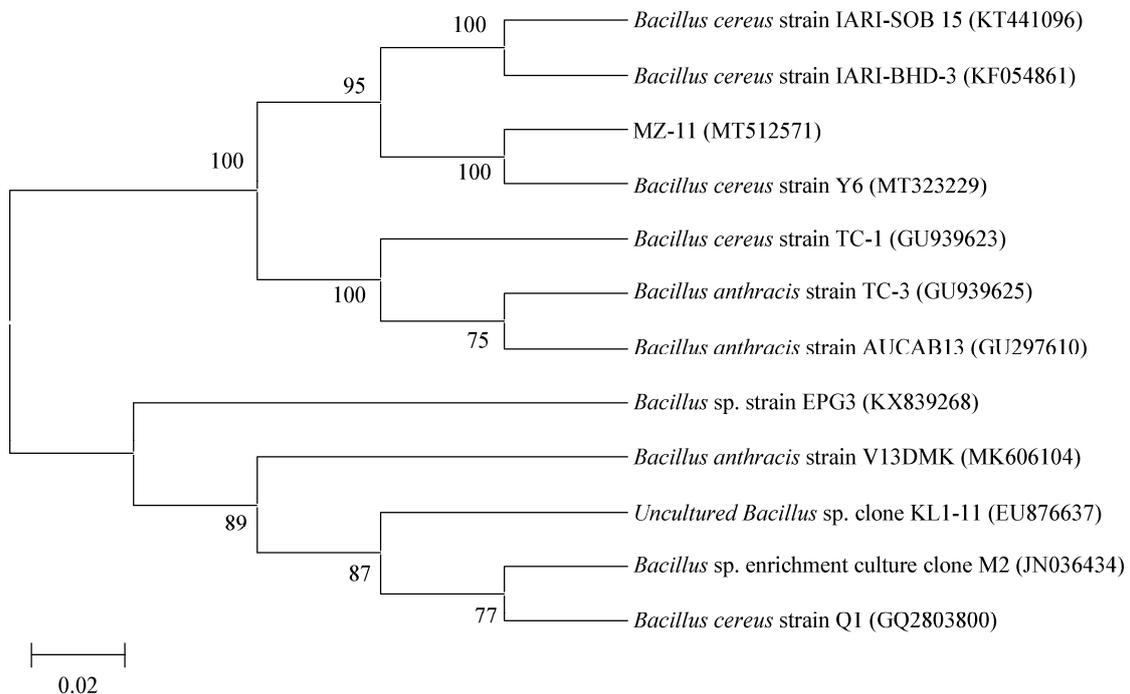


图 4 菌株 MZ-11 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain MZ-11

注: 括号中序号: 菌株登录号; 分支点上的数字: Bootstrap 支持率; 标尺刻度 0.02: 序列差异的分支长度。

Note: Numbers in parentheses: The sequence accession number; Numbers in each branch points: The percentages supported by bootstrap; Bar=0.020: Nucleotide divergence.

2.3 MZ-11 的生长特性

2.3.1 MZ-11 的生长曲线

菌株 MZ-11 的生长曲线如图 5 所示。从图 5 中可以看出,在最初的 12 h 内 $OD_{600} < 0.1$, 菌株生长非常缓慢,处于停滞期,是对环境的适应阶段;随着培养时间的延长,菌株生长速度明显加快,在 12 h 后进入对数期,菌株进行大量的生长和繁殖,并于 24 h 时达到最大值, OD_{600} 为 0.84; 24 h 后逐渐进入稳定期,24–44 h 内菌株稳定生长;菌株大致在 44 h 时 OD_{600} 开始下降,进入衰亡期。根据菌株 MZ-11 的生长曲线,结合前面筛选试验中 MZ-11 对重金属离子的吸附效果,可以大致确定在后面的吸附实验中,所需菌株的培养时间大约为 24 h,因为此时菌株的生长速率最大、生物活性最高,对重金属的吸附去除效果相对最好。

2.3.2 环境因子对 MZ-11 生长的影响

对菌株培养 pH、温度、盐离子浓度进行试验的结果如图 6 所示。

pH 值的变化会影响菌株的生长速度,并且改变菌株的代谢途径及细胞结构^[20]。由图 6A 可知,菌株 MZ-11 对 pH 的适应范围比较宽,菌株 MZ-11 在 pH 值为 5.5–8.5 内正常生长,随着 pH 逐步升高,菌株生长量逐渐增加,在 pH 值为 7.5 时 OD_{600} 达到最大 0.985,最适生长范围为 6.5–8.5,由此可知,

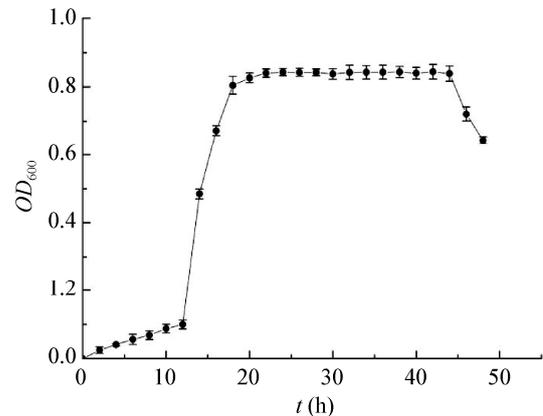


图 5 菌株 MZ-11 的生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain MZ-11

菌株 MZ-11 对环境 pH 变动有较强的适应能力。许有燊等^[21]筛选得到的芽孢杆菌(*Bacillus* sp. strain YS-1)最适 pH 范围为 6.5–8.5,这与本实验的研究结果相似。

温度是影响微生物生存生长和繁殖的重要环境因子之一。由图 6B 可知,菌株 MZ-11 在温度 15–45 °C 内生长良好,随着温度的升高,菌株生长量逐渐升高,在 25 °C 时达到最大值 0.986,温度低于 5 °C 和高于 55 °C 时菌株 MZ-11 生长受到限制,温度过高或过低条件下,菌株 MZ-11 生长的差异性主要是由于过高的温度导致蛋白质或核酸变性失活,而过低的温度会使酶活力受到抑制,导致细胞

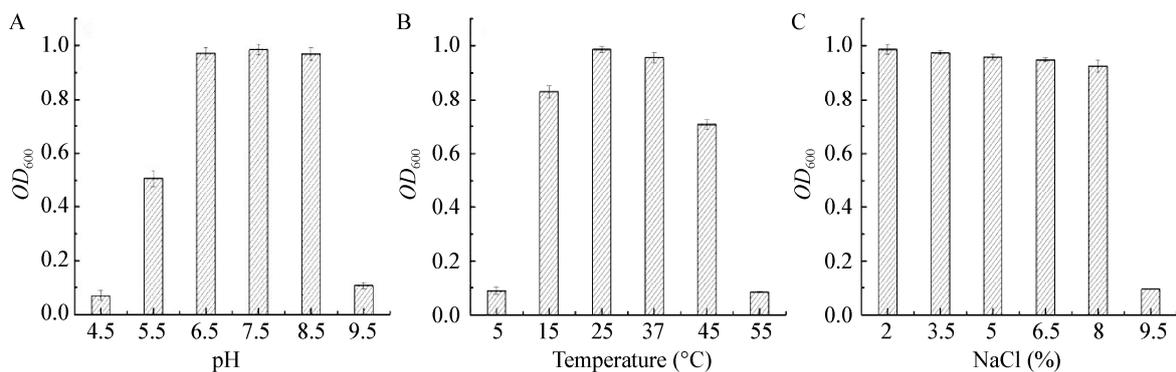


图 6 不同环境因子对菌株 MZ-11 生长的影响

Figure 6 The effect of different environmental factors on the growth of strain MZ-11

注: A: pH 对菌株 MZ-11 生长的影响; B: 温度对菌株 MZ-11 生长的影响; C: 盐离子浓度对菌株 MZ-11 生长的影响。

Note: A: Effect of pH on the growth of strain MZ-11; B: The influence of temperature on the growth of strain MZ-11; C: Effect of salt ion concentration on the growth of strain MZ-11.

新陈代谢活动减弱^[22]。宋莉莎等^[23]筛选到的甲基营养型芽孢杆菌在 10–45 °C 时正常生长, 与本实验的结果相似。

盐离子浓度会影响菌株的新陈代谢。由图 6C 可知, NaCl 质量分数为 2%–8% 时均可正常生长, 这与倪鑫鑫等^[24]的研究结果相同, NaCl 质量分数为 2% 时菌株生长最好, OD_{600} 达到了 0.987, NaCl 质量分数 $\geq 9.5\%$ 时菌株不能正常生长。盐离子作为菌株生长的必需元素, 过低或过高都会对正常的新陈代谢产生不利的影响, 过低对菌株生长产生抑制作用, 过高会使菌株大量失水而发生死亡, 菌株的生长同样会受到抑制。

2.4 MZ-11 对铅、锌、铬的耐受性分析结果

在 37 °C 的培养条件下, 各浓度下菌株 MZ-11 的生长状况如表 2 所示。在牛肉膏蛋白胨培养基培养的 10 代和转入相应重金属浓度的牛肉膏蛋白胨培养基上传代培养的 10 代均正常生长。菌株 MZ-11 在 1–20 倍初始浓度(含 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 浓度分别

表 2 菌株 MZ-11 在不同重金属离子浓度下的生长状况
Table 2 Growth status of strain MZ-11 under different heavy metal ion concentrations

重金属离子	重金属离子浓度	生长状况
Heavy metal ion	Heavy metal ion concentration (mg/L)	Growth status
Pb^{2+}	50	+
	250	+
	500	+
	750	+
	1 000	+
	1 050	-
	Zn^{2+}	60
300		+
600		+
900		+
1 200		+
1 260		-
Cr^{6+}	80	+
	400	+
	800	+
	1 200	+
	1 600	+
	1 680	-

注: +: 正常生长; -: 不生长。

Note: +: Normal growth; -: No growth.

为 50、60、80 mg/L) 培养的条件下, 与没有任何重金属离子条件下培养的菌株生长状况基本没有差异。菌株 MZ-11 最高耐铅、锌、铬浓度达到了 1 000、1 200、1 600 mg/L。

2.5 MZ-11 对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 吸附能力研究结果

菌株 MZ-11 (活) 的吸附能力研究结果如图 7 所示, 菌株 MZ-11 对 Cr^{6+} 和 Zn^{2+} 的吸附率随浓度的提高逐渐增大, 吸附率均在 98%–99% 以上, 表现出较好的吸附能力; 对 Pb^{2+} 的吸附率在初始浓度的 5 倍 (Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度为 250、300、400 mg/L) 时有最大值 97.25%, 在 20 倍时明显降低, 几乎不吸附 Pb^{2+} , 但是对 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 仍表现出较高的吸附能力, 这可能是由于 Pb^{2+} 吸附活性位点被覆盖, 菌体与重金属离子不能充分结合利用, 导致菌体吸附量降低^[25]; 菌株 MZ-11 在初始浓度的 10 倍 (Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度为 500、600、800 mg/L) 时对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 均表现出较强的吸附能力, 去除率达到了 97.01%、98.79%、98.90%。对照组的吸附效率如图 8 所示, 灭活菌株对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 仍具有一定的吸附能力, 但吸附效率在不同浓度梯度下均明显低于有活性的菌株 MZ-11, 所以有活性的菌株 MZ-11 为生物吸附研究的重点。利用 SEM-EDS 组合, 通过面扫描可以看到扫描区域内元素的分布特

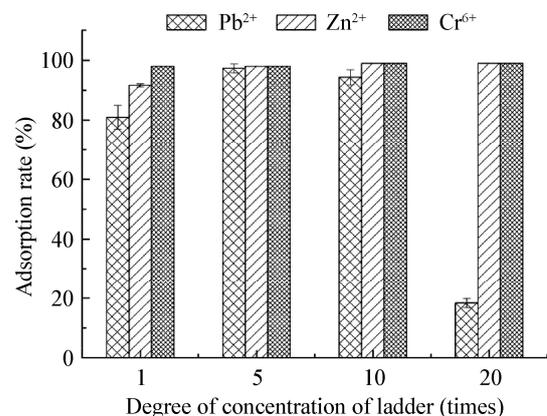


图 7 菌株 MZ-11(活)对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的吸附率
Figure 7 Adsorption rate of strain MZ-11 (live) to Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+}

征,包括各种元素的位置和相对多少,不同颜色代表不同的元素,颜色分布即代表元素分布,分布密集代表元素含量高,分布稀疏代表元素含量低。吸附重金属后菌体表面元素分布如图9所示,粉色、青绿色、蓝色分别代表铅、锌、铬,明显看出在菌株的表面有大量的铅、锌、铬元素的分布,说明菌株MZ-11对3种金属均有很强的胞外吸附作用。

3 讨论与结论

本研究从曲阜市某煤矸石山周围的土壤中分离纯化得到一株对铅、锌、铬有高耐性的细菌,通过形态学特征、生理生化反应和分子生物学方法鉴

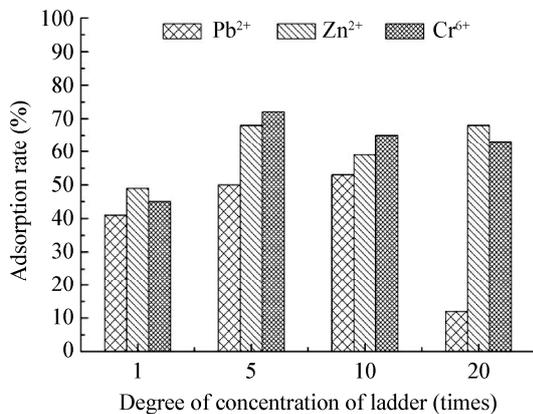


图8 菌株MZ-11(死)对Pb²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺的吸附率
Figure 8 Adsorption rate of strain MZ-11 (dead) to Pb²⁺, Zn²⁺, Cr⁶⁺

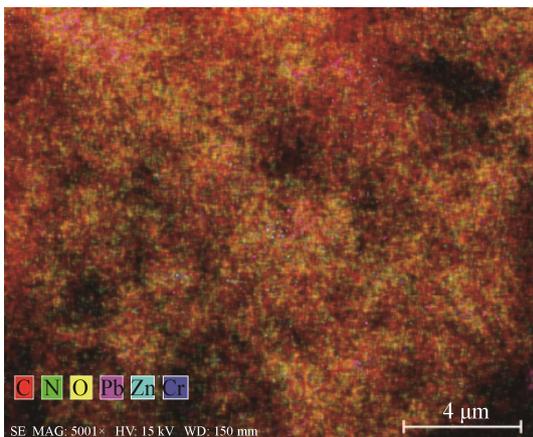


图9 MZ-11吸附重金属后扫描电镜图
Figure 9 Scanning electron micrograph of heavy metal adsorbed by MZ-11

定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),命名为 *Bacillus cereus* MZ-11。对菌株的生长特性进行了研究,菌株在 pH 为 5.5–8.5、温度为 15–45 °C、NaCl 质量分数为 2%–8%时均可正常生长。菌株 MZ-11 的生理特性可以使其很好地适应重金属污染的环境,对修复复合重金属污染的矿区有良好的应用前景,也为未来进一步研究微生物-植物联合修复提供了珍贵的物质资源基础。

关于微生物修复重金属污染土壤,国内外已有较多研究,但对于“复合耐性”微生物的研究和应用比较少见,包红旭等^[26]曾分离出一株吸附复合重金属离子的胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus* Krassilnikov) BHX-71,其对初始浓度分别为 15、10、15 mg/L 的 Pb²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺的吸附率分别可达到 97.3%、85.5%、64.7%,当溶液中 Pb²⁺、Zn²⁺浓度分别大于 30 mg/L、20 mg/L 时其吸附效果随之变差。菌株 MZ-11 在 Pb²⁺、Zn²⁺、Cr⁶⁺的浓度为 500、600、800 mg/L 时去除率达到了 97.01%、98.79%、98.90%,菌株 MZ-11 对复合重金属的吸附效果远远强于胶质芽孢杆菌 BHX-71。目前报道的多为耐单一重金属的菌株的筛选。张晓倩等^[27]分离得到的一株红假单胞菌 gh32 对 Cu²⁺的耐性为 3 mmol/L (192 mg/L);姜蒙等^[28]筛选得到的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、沙福芽孢杆菌(*Bacillus sonorensis*)对 Cr⁶⁺的耐性为 2 mmol/L (约 104 mg/L);Jeong 等^[29]从尾矿土中分离到一株新型产孢霉甲杆菌 EM2,抗 Pb²⁺的浓度为 800 mg/L。目前对复合重金属有高耐性的微生物的报道较为罕见,其中对铅、锌、铬均有很高耐受性的菌株更为罕见。本研究分离筛选得到的菌株 MZ-11 对铅、锌、铬的耐受浓度高达 1 000、1 200、1 600 mg/L。近几年的研究也表明,生活在采矿场等重金属污染环境中的细菌具有抵抗这些环境中通常遇到的高浓度重金属的机制^[30-31]。由此可以看出,菌株 MZ-11 对复合重金属的耐受性普遍高于其他菌株,因此可以认定 MZ-11 是一株复合重金属的高耐受性菌株。

菌株 MZ-11 在 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度为 500、600、800 mg/L 时去除率达到了 97.01%、98.79%、98.90%，这说明菌株 MZ-11 对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 有很强的吸附能力。杨卓^[32]从污染土壤样品中富集培养微生物菌株，得到 4 株锌吸附能力较高的菌株，其中，在 50 mL 浓度为 500 mg/L 的 Zn^{2+} 溶液中，Zn H-2 菌株对锌的吸附率最高，达到 48.30%；其次是 Zn L-2，吸附率为 42.95%。李同灵等^[33]筛选得到一株能够耐 Pb^{2+} 浓度在 1 200 mg/L 的菌株，该菌株在 Pb^{2+} 浓度为 200 mg/L 时去除 Pb^{2+} 的能力最强，达到 80%。通过以上明显看出菌株 MZ-11 的高吸附能力，可以肯定菌株 MZ-11 具有高效的复合金属吸附能力。

通过生物吸附、生物积累等作用，可以使微生物对重金属离子产生耐受性^[34]；重金属与菌体分泌的大分子物质在菌体表面形成螯合物，降低它们在环境中的流动性^[35]等。本研究筛选得到的 MZ-11 同时对铅、锌、铬具有很强的耐受性，在 MZ-11 吸附重金属后通过扫描电镜观察到菌体表面有 3 种重金属元素的大量存在，表明菌株 MZ-11 的高耐受性与胞外吸附有很大关系，同时还可能涉及到重金属的胞内积累。赵晓峰^[36]从包头市包钢矿区和包头市白云鄂博铁矿区附近的土壤中筛选分离得到两株对铅吸附效果相对较好的菌株 *E. hirae* Qaa 和 *P. pentosaceus* Fe3，两种菌株吸附 Pb^{2+} 的主要耐性机制有表面静电作用、络合反应、离子交换和胞内积累等；樊霆等^[37]从某锌尾砂坝土壤中筛选分离、纯化得到一株对锌具有较强耐性的菌株 CTB430-1，CTB430-1 富集 Zn^{2+} 主要耐性机制由表面吸附和胞内富集两部分组成。菌体胞外吸附能力强是菌体耐重金属毒性的一种自我保护机制，胞外吸附还与生物表面的大分子物质有关，菌株 MZ-11 的高耐受性可能与生物表面分泌的多糖、核酸等大分子物质与重金属作用大大降低其对菌株的毒性有关。史广宇等^[38]发现铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 吸附铜和铅，这是由于重金属能与菌体分泌到细胞外的生物大分子发生螯合后形成复合物，这些生物

大分子的主要成分是多糖和蛋白质，具有很好的粘性，可以促进重金属吸附于菌体细胞表面，是金属离子与微生物吸附剂间的桥梁；此外，这些分泌物与重金属发生螯合后可以有效降低重金属的毒性，从而使吸附后的菌体仍保持饱满的细胞结构。菌株 MZ-11 对铬的耐受性也有可能和 Cr^{6+} 的还原有关，菌株 MZ-11 可能存在一种胞外还原酶，能将有毒的 Cr^{6+} 还原为无毒的 Cr^{3+} ，因此减少了对菌株的毒性以及对菌株结构的破坏。韩剑宏等^[39]的研究表明菌株 *Micrococcus luteus* G-13 对 Cr^{6+} 有较强的还原能力，反应中 Cr^{6+} 的降低伴随着 Cr^{3+} 的增加，胞外酶在还原反应中占主要作用。韩剑宏等^[39]还发现 G-13 与 Cr^{6+} 结合位点主要为羟基、羰基、羧基、-CH、酰胺基等。所以有可能随着 Cr^{6+} 的减少，剩余的吸附位点会增加，菌株 MZ-11 对铅和锌的吸附增强，但是在本研究中 Pb^{2+} 的吸附效率随着铅、锌、铬浓度提高到初始浓度的 20 倍时，吸附效率明显下降，可能与 Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 对吸附位点的竞争有关，微生物耐受重金属机制比较复杂，通常是多种机制协同作用，微生物可以通过固定、络合或解毒作用改变重金属的迁移能力和生物有效性^[40]。菌株 MZ-11 有如此高的复合耐性和吸附能力，可以猜测其必定拥有特有的重金属耐受机制，深入研究阐明其机理^[41]，可以更好地发挥菌株 MZ-11 在复合重金属污染土壤修复研究及应用中的巨大潜力。

REFERENCES

- [1] Zhao YF, Zhang T, Tian ZJ, et al. Research progress on phytoremediation technology of heavy metal contaminated soil around mining area[J]. Urban Geology, 2020, 15(1): 22-33 (in Chinese)
赵云峰, 张涛, 田志君, 等. 矿区周边重金属污染土壤植物修复技术研究进展[J]. 城市地质, 2020, 15(1): 22-33
- [2] Esmaeili A, Moore F, Keshavarzi B, et al. A geochemical survey of heavy metals in agricultural and background soils of the Isfahan industrial zone, Iran[J]. CATENA, 2014, 121: 88-98
- [3] Pan ZQ, Zhang SQ, Ren DJ, et al. Effects of direct application of sewage sludge on soil remediation in abandoned mining area[J]. Environmental Engineering,

- 2019, 37(11): 189-193,183 (in Chinese)
潘志强, 张淑琴, 任大军, 等. 城市污泥的直接施用对矿区土壤修复的影响[J]. 环境工程, 2019, 37(11): 189-193,183
- [4] Wu ZN, Xie MM, Wang YY. Remediation of soils with combined pollution in China: a review[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(12): 2250-2259 (in Chinese)
吴志能, 谢苗苗, 王莹莹. 我国复合污染土壤修复研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(12): 2250-2259
- [5] Liu ZP, Liu SJ. Development of bioremediation in China—a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(6): 901-916 (in Chinese)
刘志培, 刘双江. 我国污染土壤生物修复技术的发展及现状[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 901-916
- [6] Ding ZL. Screening of resistance to cadmium, chromium strains and study effects of the rice rhizosphere micro-ecology[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
丁自立. 抗耐镉、铬重金属菌株筛选及水稻根际土壤微生物生态效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2016
- [7] Shan SP, Guo ZH, Lei P, et al. Increased biomass and reduced tissue cadmium accumulation in rice via indigenous *Citrobacter* sp. XT1-2-2 and its mechanisms[J]. Science of the Total Environment, 2020, 708: 135224
- [8] Dong FY. Study on screening and characteristics of heavy metal-tolerant strains and their application[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2016 (in Chinese)
董凤英. 抗重金属微生物的筛选、特性及应用研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2016
- [9] Chen LZ, Zhao RX, Wu YF, et al. Characteristics and mechanism of Pb(II) adsorption in a *Bacillus* sp. strain Z-y3[J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 2018, 37(1): 30-34 (in Chinese)
陈兰洲, 赵瑞雪, 武艳芳, 等. 芽孢杆菌 Z-y3 对 Pb(II) 吸附特性及机理[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2018, 37(1): 30-34
- [10] Li RY. Heavy metal adsorption behavior and transcriptome sequencing analysis of *Providencia* bacteria[D]. Zhuzhou: Master's Thesis of Hunan University of Technology, 2019 (in Chinese)
李如意. 普罗威登斯属细菌的重金属吸附行为及转录组测序分析[D]. 株洲: 湖南工业大学硕士学位论文, 2019
- [11] Wang JC, Liu XH, Wang HZ, et al. Isolation, identification and heavy metals biosorption of a lead and cadmium-tolerant strain[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(8): 1600-1609 (in Chinese)
王建才, 刘兴华, 王怀中, 等. 耐铅镉菌株的分离鉴定及其吸附能力[J]. 生物工程学报, 2020, 36(8): 1600-1609
- [12] Chen SY, Wang LN, Yang HQ, et al. Phylogenetic diversity of heavy metal-resistant bacteria in Baiyangdian Lake and its relationship with ecological factors[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2008, 38(6): 664-672 (in Chinese)
陈思雨, 王丽娜, 杨惠琪, 等. 白洋淀抗重金属细菌多样性及其与生态因子相关性[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2008, 38(6): 664-672
- [13] Zhang XD, Li YS, Chen J, et al. Screening and identification of bacteria resistant to heavy metals such as iron, manganese, copper and chromium in soil of Baorixile mining area[J]. Journal of China Coal Society, 2019, 44(12): 3790-3796 (in Chinese)
张晓东, 李雅舒, 陈金, 等. 宝日希勒矿区土壤耐重金属铁、锰、铜、铬细菌的筛选与鉴定[J]. 煤炭学报, 2019, 44(12): 3790-3796
- [14] Huang C, Wu ZJ, He YH, et al. Isolation, screening and identification of Cu, Zn and Pb resistant plant growth-promoting bacteria from Le'an River-Poyang Lake Wetland[J]. Microbiology China, 2008, 45(6): 1283-1294 (in Chinese)
黄程, 吴子君, 何颖慧, 等. 鄱阳湖-乐安河段湿地耐 Cu、Zn、Pb 植物促生菌的分离、筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 45(6): 1283-1294
- [15] Zhou YP, Tang MZ, Cao YX, et al. Isolation and denitrification characteristics of a psychrotrophic and heterotrophic nitrification bacterium[J]. Journal of Lake Sciences, 2019, 31(3): 746-754 (in Chinese)
周英萍, 唐美珍, 曹彦雪, 等. 一株耐冷异养硝化菌的分离鉴定及脱氮特性[J]. 湖泊科学, 2019, 31(3): 746-754
- [16] Buchanan RE, Gibbs NE. Berger's Bacterial Identification Manual[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 660-728 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 660-728
- [17] Zhang XJ, Liu YC, Qian XY, et al. Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Bipolaris papendorfii*[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2417-2424 (in Chinese)
张新杰, 刘彦策, 钱欣雨, 等. 弯曲平脐蠕孢拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8):

2417-2424

- [18] Jiang B. Growth characteristics of two *Bacillus* strain and its probiotic effects on sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Hebei Fisheries, 2017(2): 1-5 (in Chinese)
姜冰. 两株芽孢杆菌的生长特性及其对仿刺参的益生作用[J]. 河北渔业, 2017(2): 1-5
- [19] Wu ZC, Chen YK, Gao YS, et al. A golden carp source waxy bacillus strains screening, identification and patience research[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020. DOI:10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-331 (in Chinese)
吴振超, 陈玉珂, 高永生, 等. 一株黄金鲫鱼源蜡状芽孢杆菌的筛选、鉴定及耐性研究[J]. 大连海洋大学学报, 2020. DOI:10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-331
- [20] Lin FY, Wang RP, Yi ZW, et al. Biosorption of heavy metals cadmium, chromium, copper by marine bacterium *Lysinibacillus xylanilyticus* strain JZ008[J]. Journal of Applied Oceanography, 2008, 37(3): 387-394 (in Chinese)
林梵宇, 王润萍, 易志伟, 等. 海洋解木糖赖氨酸芽孢杆菌 JZ008 对重金属 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 和 Cu^{2+} 的吸附作用[J]. 应用海洋学学报, 2018, 37(3): 387-394
- [21] Xu YS, Chen Z, Li X, et al. Screening and optimization of culture conditions of *Bacillus* sp. strains[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(5): 41-47 (in Chinese)
许有燊, 陈钊, 李霞, 等. 水产养殖环境中芽孢杆菌的筛选及生长特性研究[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(5): 41-47
- [22] Tang MZ, Li TT, Wang YN, et al. Identification and characterization of an efficient psychrotrophic bacterial strain isolated from artificial wetlands[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(3): 708-714 (in Chinese)
唐美珍, 李婷婷, 王艳娜, 等. 人工湿地中一株高效低温菌的分离鉴定与去除特性研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(3): 708-714
- [23] Song LS, Si SF, Long YH, et al. Isolation, identification and growth conditions analysis of antagonistic *Bacillus* against tobacco brown spot[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(1): 84-89 (in Chinese)
宋莉莎, 司世飞, 龙友华, 等. 烟草赤星病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及其生长条件研究[J]. 河南农业科学, 2019, 48(1): 84-89
- [24] Ni XX, Gong HY, Ma DH, et al. Analysis of physiological and biochemical characteristics about *Bacillus*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2015, 21(7): 47-48,58 (in Chinese)
倪鑫鑫, 龚海燕, 马顶虹, 等. 芽孢杆菌生理生化特性分析[J]. 安徽农学通报, 2015, 21(7): 47-48,58
- [25] Zhang XQ, Du J, Cao JR, et al. Isolation, identification and biosorption characteristics of a lead resistant strain NY-3[J]. Letters in Biotechnology, 2018, 29(6): 783-788 (in Chinese)
张晓青, 杜瑾, 曹军瑞, 等. 一株耐铅菌株 NY-3 的分离鉴定及其吸附特性研究[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(6): 783-788
- [26] Bao HX, Sun TH, Sun LN, et al. Characteristics and mechanism analysis of Pb^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} in industrial wastewater adsorbed by *Bacillus gelata* BHX-71[A]// Proceedings of 2011 International Conference on Energy and Environment (ICEE 2011 V7)[C]. Dalian: Intelligent Information Technology Application Society, 2011: 417-420 (in Chinese)
包红旭, 孙铁珩, 孙丽娜, 等. 胶质芽孢杆菌 BHX-71 吸附工业废水中 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 红外光谱分析与机理研究[A]//智能信息技术应用学会会议论文集[C]. 大连: 智能信息技术应用学会, 2011: 417-420
- [27] Zhang XQ, Yang K, Wang N, et al. Isolation and identification of a copper-removal *Rhodospseudomonas* strain[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2392-2398 (in Chinese)
张晓倩, 杨阔, 王宁, 等. 一株红假单胞菌的分离及对 Cu^{2+} 的去除[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2392-2398
- [28] Jiang M, Wang W. Screening of heavy metal Cr^{6+} resistant strains[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(2): 324-329 (in Chinese)
姜蒙, 王伟. 重金属 Cr^{6+} 耐受细菌的筛选研究[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(2): 324-329
- [29] Jeong SW, Kim HK, Yang JE, et al. Removal of Pb(II) by pellicle-like biofilm-producing *Methylobacterium hispanicum* EM2 strain from aqueous media[J]. Water, 2019, 11(10): 2081
- [30] Colin VL, Villegas LB, Abate CM. Indigenous microorganisms as potential bioremediators for environments contaminated with heavy metals[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 69: 28-37
- [31] Dadrasnia A, Wei KSC, Shahsavari N, et al. Biosorption potential of *Bacillus salmalaya* strain 139SI for removal of Cr(VI) from aqueous solution[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2015, 12(12): 15321-15338
- [32] Yang Z. A study on screening of adsorption of heavy metal zinc strains in pollution soil[J]. Journal of EMCC, 2017, 27(3): 87-89 (in Chinese)
杨卓. 污染土壤中重金属锌吸附菌株的筛选研究[J]. 中国环境管理干部学院学报, 2017, 27(3): 87-89
- [33] Li TL, Huang HJ, Peng Y, et al. Lead resistance of microbial screening and preliminary determination of its

- adsorption[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2008, 45(4): 696-702 (in Chinese)
- 李同灵, 黄寒娟, 彭漪, 等. 耐铅微生物的筛选及其吸附性[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(4): 696-702
- [34] Ke Y, Lu XY, Zeng SR, et al. 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)
- 柯野, 卢星燕, 曾松荣, 等. 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
- [35] Fashola MO, Ngole-Jeme VM, Babalola OO. Heavy metal immobilization potential of indigenous bacteria isolated from gold mine tailings[J]. International Journal of Environmental Research, 2020, 14(1): 71-86
- [36] Zhao XF. Study on isolation, identification, adsorption characteristics and mechanism of lead-resistant lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Doctoral dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- 赵晓峰. 耐铅乳酸菌分离鉴定、吸附特性及机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2019
- [37] Fan T, Zhang YH, Li DX, et al. Isolation of zinc-resistant fungus CTB430-1 and its bioaccumulation characteristics[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2013, 22(5): 453-458 (in Chinese)
- 樊霆, 张颖慧, 李定心, 等. 一株耐锌真菌 CTB430-1 分离鉴定及其富集特性[J]. 激光生物学报, 2013, 22(5): 453-458
- [38] Shi GY, Cheng YY, Shi Q, et al. Study of the biosorption of copper and lead by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(6): 2107-2113 (in Chinese)
- 史广宇, 程媛媛, 史琦, 等. 铜绿假单胞菌对铜和铅的吸附[J]. 环境科学学报, 2017, 37(6): 2107-2113
- [39] Han JH, Song YY, Zhang TJ, et al. Cr(VI) the screening and identification of sulfate-reducing bacteria and reducing substances analysis[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3206-3215 (in Chinese)
- 韩剑宏, 宋玉艳, 张铁军, 等. Cr(VI)还原菌的筛选、鉴定及其还原物质分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3206-3215
- [40] Gadd GM. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation[J]. Geoderma, 2004, 122(2/4): 109-119
- [41] Xu SH, Jiang DH, Shi DD, et al. Screening and identification of lead and cadmium resistant microorganisms from combined heavy metal pollution soil[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2019, 25(3): 532-538 (in Chinese)
- 徐少慧, 蒋代华, 史鼎鼎, 等. 重金属复合污染土壤中耐铅镉微生物的筛选及鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(3): 532-538