



## 研究报告

## 一株产嗜铁素耐镉菌的分离及其对黑麦草种子萌发的作用

武雯雯 薛林贵\* 张璐 王韶梅 常思静 李明聪 刘映彤 何园园

兰州交通大学化学与生物工程学院 甘肃 兰州 730070

**摘要:**【背景】产嗜铁素细菌(Siderophore-Producing Bacteria, SPB)是一类耐重金属性能较好的促生微生物,将其应用于土壤重金属污染修复方面的研究已成为该领域的研究热点。【目标】为重金属镉污染土壤修复提供种质资源,并探究产嗜铁素细菌对  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下黑麦草种子萌发的影响。【方法】采用微生物分离纯化技术,从甘肃省临泽县宏鑫矿业尾矿区采集土壤样品,分离筛选出一株能够产嗜铁素且耐镉胁迫的菌株,采用 16S rRNA 基因序列鉴定该菌株,并测定其嗜铁素螯合基因结构类型及生长和产嗜铁素曲线,对菌株嗜铁素分离纯化后测定其荧光强度并进行紫外光谱扫描,最后探究嗜铁素及其产生菌对  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下黑麦草种子萌发的影响。【结果】经鉴定该菌为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp. W-STS-8),能产生一种黄绿色嗜铁素——脓菌素(Pyoverdine),该嗜铁素同时具有异羟肟酸型和儿茶酚型 2 种螯合结构;其嗜铁素产量在菌株生长稳定期的后期达到最大值(68%),而且嗜铁素产量与菌株生物量呈正相关。嗜铁素经分离纯化后,在紫外灯(254 nm)下可见荧光,在 400 nm 处具有紫外光谱特征吸收峰。该菌及其嗜铁素对  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下黑麦草种子萌发实验结果表明,与对照相比,经 W-STS-8 菌悬液和嗜铁素处理后黑麦草种子发芽率显著上升,分别提高了 73.14% 和 150.92%。【结论】对该菌株的深入研究,可为重金属镉污染土壤的微生物-植物联合修复的生态修复工程提供种质资源和科学基础。

**关键词:** 荧光嗜铁素,耐镉菌株,分离,黑麦草,种子发芽率

## Isolation of a siderophore-producing and cadmium-resistant bacteria and its effect on seed germination of ryegrass

WU Wenwen XUE Lingui\* ZHANG Lu WANG Shaomei CHANG Sijing  
LI Mingcong LIU Yingtong HE Yuanyuan

School of Chemical and Biological Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China

**Abstract:** [Background] Siderophore-producing bacteria (SPB) is a kind of growth-promoting microorganism with high heavy metal resistance, and its application in soil remediation of heavy metal

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31860163); Key Research and Development Program of Gansu Province (20YF3NA018); Foundation of Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering of Gansu Province (EEMRE201603)

\*Corresponding author: E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

Received: 10-09-2020; Accepted: 21-10-2020; Published online: 26-11-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31860163); 甘肃省重点研发计划(20YF3NA018); 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室开发基金(EEMRE201603)

\*通信作者: E-mail: xuelg@mail.lzjtu.cn

收稿日期: 2020-09-10; 接受日期: 2020-10-21; 网络首发日期: 2020-11-26

contaminated soil has attracted increasingly attentions. **[Objective]** To provide organism resources for remediation of heavy metal cadmium contaminated soil; To investigate the effect of SPB on seed germination of ryegrass under cadmium stress. **[Methods]** The soil that isolated the bacteria was collected from Hongxin Mining Area, Linze county, Gansu province, a bacteria is capable of both producing siderophore and cadmium-resistant was obtained by isolating and purificating of microorganisms technology, and the identifying of this strain was used 16S rRNA gene sequence, and the structure type of chelating groups of siderophore, the growth curve and siderophore production curve of the strain were measured, the fluorescence intensity and ultraviolet spectrum of the siderophore were determined after separating and purificating from the culture of this bacterium. Finally, the effects of siderophore and its producing bacteria on the germination of ryegrass under cadmium stress were investigated. **[Results]** The bacteria was identified as *Pseudomonas* sp. W-STS-8 and it could secrete a yellow-green siderophore—pyoverdine, which has two types chelating groups structures, hydroxamates type and catecholates type. The yield of siderophore reached its maximum value (68%) at the late of the stationary phase, and the yield of siderophore was positively correlated with the biomass of the strain. After separating and purificating of siderophore, the fluorescence could be observed under UV light (254 nm), and the characteristic absorption peak of ultraviolet spectrum was at 400 nm. By studying the effects of siderophore and its producing bacteria on the germination of ryegrass under cadmium stress, the result showed that compared with the control group, the strain culture and its siderophore showed remarkable effect, the seed germination rate of ryegrass increased by 73.14% and 150.92%, respectively. **[Conclusion]** This strain is expected to provide microbes resources and scientific basis for ecological remediation project by further study, which related to microbial-plant combined remediation of soil contaminated by cadmium.

**Keywords:** fluorescent siderophore, cadmium-resistant bacteria, isolation, ryegrass, seed germination rate

重金属污染伴随着农业和工业生产的发展日益严重<sup>[1-2]</sup>, 其中, 镉的污染也列在五大有毒重金属污染中, 因其半衰期较长, 不仅影响植物和动物生长繁殖, 而且通过食物链对人类健康产生不可逆转的危害<sup>[3]</sup>。

微生物-植物联合修复是一种益于环境、经济有效的原位修复技术, 对于重金属污染环境的治理具有重要的应用前景<sup>[4]</sup>。由于重金属的毒害, 用于污染土壤修复的植物在重金属污染环境中生长缓慢、生物量低, 而且对于生物有效性低的重金属不易吸收, 极大地影响了修复效率<sup>[5]</sup>。有一些微生物具有能吸附和转化某些重金属的能力<sup>[6]</sup>, 其代谢产生的次级代谢物能使重金属的生物有效性增加, 从而促进植物对重金属的富集积累<sup>[7]</sup>。研究表明, 产嗜铁素细菌(Siderophore-Producing Bacteria, SPB)不仅对重金属胁迫下的植物生长有促进作用, 缓解重金属对植物的毒害, 为植物提供营养

物质, 促进植物生长并提高其对重金属耐受性<sup>[8]</sup>, 并且还能促进重金属的活化, 促进植物对其的吸收<sup>[9-12]</sup>。

SPB分泌的次级代谢物——嗜铁素是一种低分子量的有机物<sup>[13]</sup>, 其主要功能是结合土壤环境中的铁元素( $\text{Fe}^{3+}$ ), 提高了土壤难溶铁的溶解性, 从而提高铁元素的有效性, 微生物和植物可以直接吸收利用, 促进其生物量增加。此外, 研究表明, 嗜铁素能与重金属离子结合形成可溶性的络合物<sup>[12,14-19]</sup>, 基于此络合机制, 将产嗜铁素微生物用于重金属污染生物修复领域的研究得到学者高度重视<sup>[20]</sup>, 其原因在于: 一方面重金属结合游离的嗜铁素阻止了铁离子的螯合, 导致铁元素缺乏, 从而刺激更多嗜铁素合成<sup>[21]</sup>, 在一定程度上能够保护微生物免受重金属毒害<sup>[22-25]</sup>, 提高该微生物本身对重金属的耐性, 促进细菌生长。例如: *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1 在  $\text{Cd}^{2+}$  作用下

能合成更多的嗜铁素——脓菌素(Pyoverdine), 以提高菌株对该元素的耐受性<sup>[26]</sup>。另外, 在添加  $\text{Cd}^{2+}$  时, *Streptomyces tendae* F4 在合成嗜铁素的同时, 也伴随着细胞中  $\text{Cd}^{2+}$  积累量的减少<sup>[22]</sup>。另一方面, 由于嗜铁素对重金属离子强烈的亲和性<sup>[27]</sup>, 重金属与嗜铁素的螯合物不仅减轻了重金属离子的毒性, 而且还提高了植物根际环境中重金属的活性, 增加植物对重金属的吸收和积累<sup>[17]</sup>, 提高植物修复效率<sup>[12,28]</sup>。有文献报道, 嗜铁素产生菌 *Streptomyces acidiscabies* E13 在 Al、Cu、Mn、Ni 和 U 胁迫下, 能增强豇豆对金属离子的吸收能力<sup>[21]</sup>。

甘肃省临泽县某矿区因长期采矿活动及产生的尾矿导致周围土壤产生严重的重金属污染, 包括铁、铅、锰、镉等, 对矿区重金属污染土壤的治理和修复迫在眉睫。黑麦草作为一种多年生禾本科植物, 因其具有生物量大、生长速度快、在镉胁迫下受损较小、对重金属有较强的耐受性和修复能力, 以及能将吸收的各类重金属转移到地上部分等多种优良特性<sup>[29-30]</sup>, 所以本研究选用黑麦草作为实验植物进行重金属污染修复实验。此外, 目前有关嗜铁素产生菌应用于镉污染修复方面的研究较少, 本研究以矿区尾矿镉污染土壤修复为研究目标, 希望解决菌种资源瓶颈问题, 并通过初步实验研究, 为产嗜铁素细菌与高富集植物黑麦草共生、提高植物对重金属的积累效率提供更多参考, 以期为后续镉污染土壤的微生物-植物联合修复技术提供种质资源和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

土壤样品采自甘肃省临泽县宏鑫矿业尾矿区, 采用五点取样法进行采样, 采样深度为 0–20 cm。采样尾矿区中心地理位置为东经  $100^{\circ}14'49''$  和北纬  $39^{\circ}29'15''$ , 该地区属大陆性荒漠草原气候, 年均降水量 118.4 mm, 常年以西北风和东风为主; 采集的土壤样品去除异物, 磨碎、混匀、过筛(4 mm)后备用。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

铬天青(CAS)和十六烷基三甲基溴化胺(CTAB), Coolaber 公司; DNA 提取试剂盒和 PCR 扩增试剂, 兰州生物技术开发有限公司; 黑麦草种子, 江苏尚东种业公司; 其他所有生化试剂均为分析纯级别。

紫外-可见光分光光度仪, Unico 公司; PCR 扩增仪和 DNA 电泳仪, 广州市深华生物技术有限公司; 真空旋转蒸发仪, 亚荣生化仪器厂; 紫外可见光谱仪, 日立公司。

LB 培养基参照参考文献[31]配制。

VF 缺铁培养基(g/L)<sup>[32]</sup>: 蔗糖 20.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.5, L-天冬氨酸 1.5, L-甲硫氨酸 0.02, L-组氨酸 0.01,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4$  0.5, NaCl 0.5。

CAS 蓝色检测液<sup>[32]</sup>: 铬天青 1.0 mmol/L,  $\text{FeCl}_3$  0.1 mmol/L, 十六烷基三甲基溴化胺 4.0 mmol/L, 磷酸盐缓冲液 0.1 mol/L, pH 6.8。

CAS 蓝色检测平板: 每 100 mL VF 培养基加入 5 mL CAS 检测液, 另外加入琼脂 1.8%, 在  $1.0 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 后室温放置到约 60 °C 左右缓慢加入 CAS 检测液, 即得检测培养基。

### 1.3 产嗜铁素耐 Cd 菌的分离筛选

初筛时先用 LB 培养基对采样土壤进行富集培养, 然后用 CAS 蓝色检测平板进行分离筛选, 通过在其表面产生的橘黄色晕圈筛选出产嗜铁素的菌株<sup>[32]</sup>。

#### 1.3.1 菌株富集培养、初筛及纯化

称取已经除杂处理的土壤 1 g, 装入已加有 100 mL LB 培养基的三角瓶中, 在 30 °C、140 r/min 条件下培养 2 d 后, 吸取上层悬浊液 1 mL, 依次按浓度梯度稀释到  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ , 然后各取 100  $\mu\text{L}$  涂布于 CAS 蓝色平板, 在 30 °C 恒温培养箱中培养 3 d, 根据是否产生橘黄色晕圈及产圈大小, 初步判定能产嗜铁素的菌株。挑选具有生长优势的单个菌落重复划线 2–3 次, 同时镜检其纯度, 直至获得纯培养菌株,  $-80$  °C 保存。

### 1.3.2 耐重金属 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度检测

将 1.3.1 筛选的产嗜铁素能力较好的菌株分别接种到含有重金属  $\text{Cd}^{2+}$  的液体 VF 培养基中, 通过设置一系列浓度(30、60、90、120、150 mg/L  $\text{Cd}^{2+}$ ), 以不加  $\text{Cd}^{2+}$  的处理组作空白对照。采用 CAS 液体检测方法对该菌株产生的嗜铁素进行定量, 并在分光光度计上测定其生长量( $OD_{600}$ ), 选择性能最优的菌株进行后续实验。

### 1.3.3 嗜铁素定量测定

通过采用 CAS 检测方法, 在可见光分光光度计上可以对嗜铁素定量。培养在液体 VF 培养基中的菌液 5 000 r/min 离心 10 min, 将上清液与 CAS 检测液按 1:1 的体积比混匀, 静置 1 h 后, 将混合物用分光光度计测定吸光值  $OD_{630}$ , 可以根据以下公式计算出嗜铁素相对含量(Siderophore Units, SU)<sup>[33]</sup>:  $\text{SU}(\%) = (A_r - A_s) / A_r \times 100$

其中,  $A_r$  是未接种的空白培养基与 CAS 检测液混合物的吸光值;  $A_s$  是接种菌株的培养上清液与 CAS 检测液混合物的吸光值。

### 1.4 菌株的 16S rRNA 基因序列鉴定

以筛选菌株的基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系<sup>[34]</sup>: DNA 样品 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$ ) 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 引物 27F 和 1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 次循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。将 PCR 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 然后紫外凝胶成像系统检测是否扩增成功。PCR 扩增产物的测序在西安擎科泽西生物科技有限公司完成。将测序结果提交至 NCBI 数据库 BLAST 比对后, 选择相似性较高的相关菌株, 使用 MEGA 7.0 软件的邻接法(Neighbor-Joining Method)构建系统发育树, 以确定该菌株

分类地位<sup>[35]</sup>。

### 1.5 菌株的生长曲线和产嗜铁素曲线绘制

将菌株接种于 50 mL 液体 VF 培养基中, 设置 3 个平行, 置于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 条件下培养, 分别于 0、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72、84、96 和 120 h 取样, 测定生物量( $OD_{600}$ )和嗜铁素产量 SU (%), 并在 Origin 8.0 软件中绘制曲线。

### 1.6 嗜铁素特性鉴定

#### 1.6.1 嗜铁素的类型测定

嗜铁素按照其螯合基团的结构不同可以分为 4 类<sup>[36]</sup>: 异羟肟酸型、儿茶酚型、羟基羧酸盐型和混合型(即包括 2 种以上螯合基团)。通过  $\text{FeCl}_3$  实验<sup>[37]</sup>、Arnow's 实验<sup>[38]</sup>及 Shenker's 实验<sup>[39]</sup>, 确定菌株所产嗜铁素的螯合基团结构类型。

**$\text{FeCl}_3$  实验:** 在 1 mL 上清液中加入 1–5 mL 2% 的  $\text{FeCl}_3$  溶液, 若变红或变紫色则有嗜铁素存在, 1 mL 上清液中加入 1 mL  $\text{FeCl}_3$  溶液立即变红则为异羟肟酸型; 1 mL 上清液加入超过 1 mL  $\text{FeCl}_3$  溶液才变红或变紫则为儿茶酚型。

**Arnow's 实验:** 在 1 mL 上清液中加入 1 mL 0.5 mol/L HCl 和 1 mL 10% 钼酸钠-亚硝酸钠溶液, 若溶液中存在邻苯二酚结构则亚硝酸分解, 生成黄色配体, 溶液变黄; 继续加入 1 mL 1 mol/L NaOH 溶液, 若含有儿茶酚嗜铁素则溶液变红, 至少 1 h 不变色, 在  $OD_{510}$  处有特征吸收峰。

**Shenker's 实验:** 在 1 mL 上清液中加入 1 mL 750  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  溶液和 2 mL pH 4.0 的醋酸盐缓冲液。在紫外分光光度计中扫描在 190–280 nm 范围内的波长, 观察是否有相应的吸收峰。

#### 1.6.2 嗜铁素的特征吸收峰检测

将 10 mL 培养至指数期( $OD_{600}$  为 1.0)的菌液接种到 500 mL 液体 VF 培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 培养 5 d, 将培养物 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去菌体沉淀, 收集上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 然后加入

一定量的大孔树脂(XAD-2),于140 r/min摇床振荡12 h,使所有小分子物质充分吸附进大孔树脂中;再进行抽滤,将液相与固相分离,收集所有固相大孔树脂于三角瓶中,加无水甲醇至刚刚没过所收集的固相树脂,在摇床中振荡12 h,吸附于大孔树脂中的小分子物质充分溶于甲醇中,收集液相,反复溶出若干次,直至大孔树脂中的物质全部溶解出来;将收集的所有甲醇溶液,于真空旋转蒸发仪上蒸发,直至得到固体物质,将其收集4℃冷藏备用<sup>[13]</sup>。

将上述固体物质用无菌水溶解至 $OD_{400}$ 为1.2,一部分在254 nm紫外灯下观察,通过其荧光强度来检验嗜铁素纯化效果;一部分在紫外可见光谱仪中测定嗜铁素的特征吸收峰。

## 1.7 $Cd^{2+}$ 胁迫下黑麦草种子萌发实验

### 1.7.1 不同浓度重金属 $Cd^{2+}$ 对黑麦草发芽率的影响

挑选饱满健康的黑麦草种子,使用10%次氯酸钠消毒5 min,无菌水反复冲洗5遍备用。使用灭菌的VF培养液设置一系列不同的 $Cd^{2+}$ 浓度(30、60、90、120、150和180 mg/L),以不添加 $Cd^{2+}$ 的VF培养液作为空白对照。每个培养皿(直径12 cm)中加入20 mL含不同浓度 $Cd^{2+}$ 的培养液,放置两层无菌滤纸,其上均匀放置50颗黑麦草种子,于25℃室温自然光下培养,期间每隔12 h喷施无菌水,使其湿润度保持在75%。每组3个重复,5 d后计算其发芽率。发芽率(%)的计算公式:

发芽率(%)=萌发种子数/供试种子数×100。

### 1.7.2 菌株对镉胁迫下黑麦草发芽率的影响

通过计算上述不同浓度重金属 $Cd^{2+}$ 胁迫下黑麦草的发芽率情况,选取发芽率较低的 $Cd^{2+}$ 浓度,通过加入不同浓度菌液和嗜铁素,以仅添加90 mg/L  $Cd^{2+}$ 的处理组为空白对照,计算添加菌液后对 $Cd^{2+}$ 胁迫下黑麦草发芽率的影响。

取5 mL指数期菌液接种于250 mL液体VF培养基中,30℃、150 r/min培养24 h,菌液5 000 r/min离心10 min,然后每皿取20 mL VF培养液(其中 $Cd^{2+}$ 浓度均为90 mg/L)制备成一系列不

同的菌液浓度( $OD_{600}$ 为0.0、0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6和1.8)。每组3个重复,培养5 d后计算发芽率。

### 1.7.3 嗜铁素对镉胁迫下黑麦草发芽率的影响

将提取的固体粉末嗜铁素溶于VF培养液中,制备成一系列不同的嗜铁素浓度( $OD_{400}$ 为0.0、0.2、0.4、0.6、1.0、1.3、1.7和2.0),每皿20 mL(其中 $Cd^{2+}$ 浓度均为90 mg/L)。每组3个重复,培养5 d后计算发芽率。

## 1.8 数据分析与处理

菌株鉴定后获得基因序列,使用NCBI进行BLAST比对分析,通过MEGA 7.0软件绘制系统发育树。所有数据均采用Microsoft Excel 2019生成。数据分析和图形绘制均使用SPSS 21和Origin 8.0软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 产嗜铁素耐镉菌的分离筛选

通过富集培养后,在CAS蓝色平板上通过菌落周围产生的橘黄色晕圈,可以分离出若干产嗜铁素细菌,然后将其反复纯化至纯菌株,并根据橘黄色晕圈的大小筛选出产嗜铁素性能较好的5种菌株,如图1所示,分别命名为W-STs-1、W-STs-5、W-STs-6、W-STs-7和W-STs-8。

在耐重金属 $Cd^{2+}$ 检测中,5种菌株在不同 $Cd^{2+}$ 浓度的VF培养基中,其生长量和产嗜铁素量如图2A和2B所示,5株菌在 $Cd^{2+}$ 浓度为30 mg/L和60 mg/L时生长量较高,而在90 mg/L浓度之后,4株菌(W-STs-1、W-STs-5、W-STs-6、W-STs-7)生长速率降低,生物量急剧减少,部分菌株死亡。然而W-STs-8菌株在 $Cd^{2+}$ 浓度为30–150 mg/L时生物量一直保持在较高水平,而且其生长量与产嗜铁素量显著正相关,如图2C所示,在 $Cd^{2+}$ 浓度为60 mg/L时嗜铁素的产量最高(约为68.38%),与空白对照(不添加 $Cd^{2+}$ )处理组相比,嗜铁素产量提高了17.65%,因此选定W-STs-8菌株作为后续研究菌株。

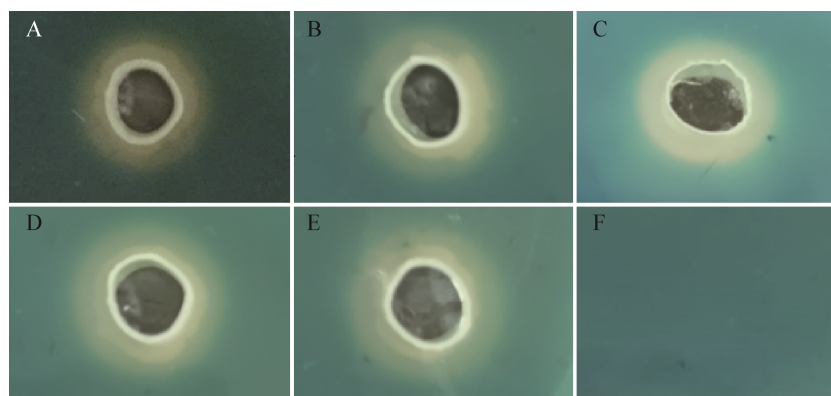
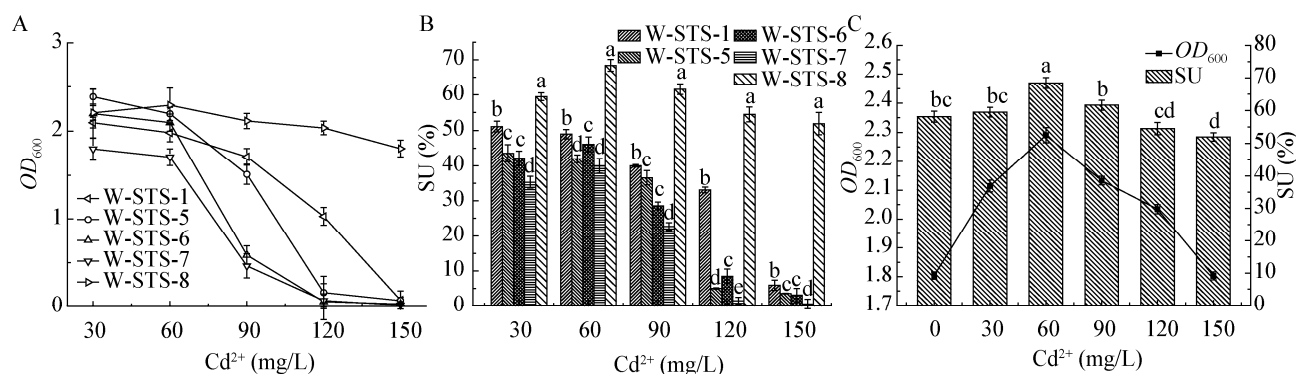


图1 CAS蓝色平板检测结果

Figure 1 Test results of siderophore production in the CAS blue plates

注: A: W-ST-1; B: W-ST-5; C: W-ST-6; D: W-ST-7; E: W-ST-8; F: 空白对照

Note: A: W-ST-1; B: W-ST-5; C: W-ST-6; D: W-ST-7; E: W-ST-8; F: Blank control

图2 菌株重金属  $\text{Cd}^{2+}$  耐受性实验结果Figure 2 Testing results of the domestication of  $\text{Cd}^{2+}$  tolerance in strains

注: A: 5 株菌在不同  $\text{Cd}^{2+}$  浓度胁迫下的生长量; B: 5 株菌在不同  $\text{Cd}^{2+}$  浓度胁迫下的嗜铁素产量, 相同  $\text{Cd}^{2+}$  浓度下不同小写字母表示不同菌株的嗜铁素产量差异显著 ( $P < 0.05$ ); C: W-ST-8 菌株在不同  $\text{Cd}^{2+}$  浓度胁迫下的生长量和嗜铁素产量, 不同浓度  $\text{Cd}^{2+}$  下不同小写字母表示菌株 W-ST-8 嗜铁素产量差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: A: The growth of 5 strains under different  $\text{Cd}^{2+}$  concentration stress; B: The yield of siderophore of 5 strains under different  $\text{Cd}^{2+}$  concentration stress (different lowercase letters indicate significant differences between the SU (%) of different strains for the same  $\text{Cd}^{2+}$  concentration stress at the 0.05 level); C: The growth and siderophore production of W-ST-8 strain under different  $\text{Cd}^{2+}$  concentration stress (different lowercase letters indicate significant differences between the SU (%) of W-ST-8 strain for the different  $\text{Cd}^{2+}$  concentration stress at the 0.05 level)

## 2.2 菌株的 16S rRNA 基因序列分析鉴定

利用 PCR 扩增 16S rRNA 基因, 对扩增后的序列进行拼接, 基因序列在 NCBI 中进行比对后, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 结果见图 3。菌株 W-ST-8 基因序列长度为 1 397 bp, 将其发布在 GenBank 数据库中, 获得的序列登录号为 MT967291。从图 3 中可以看出, 菌株 W-ST-8 与

荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* strain B8)相似度最高(约为 99.93%), 因此, 菌株 W-ST-8 被鉴定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

## 2.3 W-ST-8 菌株的生长曲线与产嗜铁素曲线

将 W-ST-8 菌株培养在 VF 液体培养基中, 得到如图 4 所示生长曲线和产嗜铁素曲线。如图 4 所示, 该菌株的生长在 24 h 后达到稳定期, 108 h 后

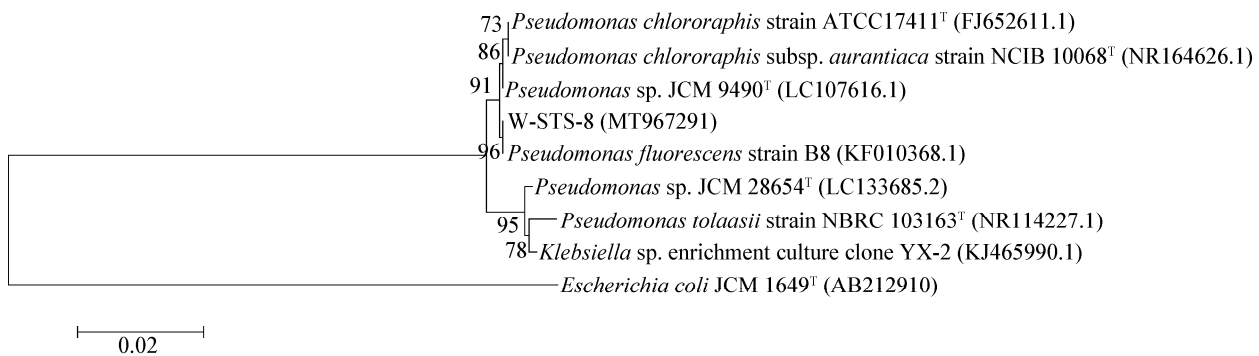


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的菌株系统发育树  
Figure 3 Phylogenetic trees of identified bacterial strains based on 16S rRNA gene sequence

注：分支上的数字表示构建系统发育树时 1 000 次计算形成该节点的百分比；分支的长度代表进化距离，系数为 0.02；括号内的序号为菌株的 GenBank 登录号  
Note: A: Numbers at the branch nodes are bootstrap values, expressed as percentages of 1 000 replicates; The length of branch represents the evolutionary distance and the coefficient is 0.02; The number in parentheses is the GenBank accession number of a strain

进入衰亡期;而其嗜铁素产量在菌株处于指数期时开始显著上升,72 h 时嗜铁素产量达到最大值。研究表明,对该菌株嗜铁素的定量检测可以在菌株生长的稳定期的后期进行检测。

2.4 嗜铁素特性鉴定

2.4.1 嗜铁素的类型检测

菌株 W-STs-8 产生的嗜铁素螯合基团的结构类型检测见表 1。FeCl<sub>3</sub> 实验结果呈阳性,Arnow’s 实验结果呈阳性,而 Shenker’s 实验结果呈阴性,显色结果如图 5A 和 5B 所示。结果表明菌株 W-STs-8

表 1 嗜铁素螯合基团结构类型检测结果  
Table 1 Testing results of structure types of siderophore chelating groups

序号 No.	嗜铁素类型 Type of siderophore	结果 Result
1	羟肟酸型 Hydroxamate type	+
2	儿茶酚型 Catecholate type	+
3	羧酸型 Hydroxycarboxylate type	-

注：+：阳性；-：阴性  
Note: +: Positive; -: Negative

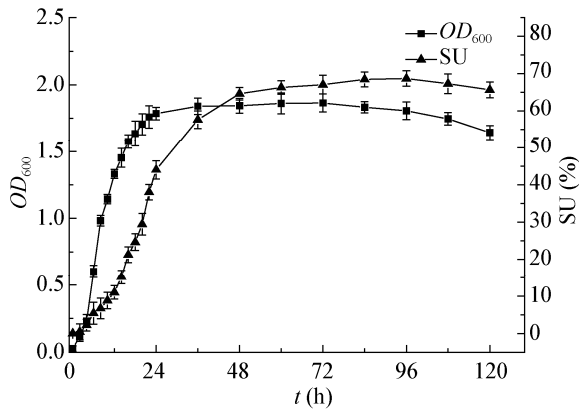


图 4 菌株 W-STs-8 的生长曲线和产嗜铁素曲线  
Figure 4 The growth curve and siderophore production curve of W-STs-8 strain

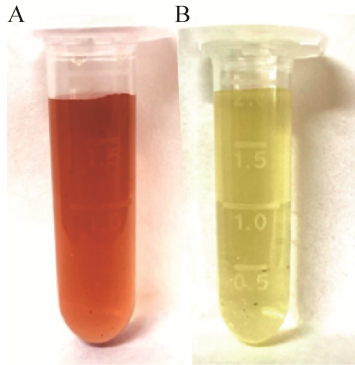


图 5 嗜铁素螯合基团结构类型检测结果显色图  
Figure 5 The color testing results of structure types of siderophore chelating groups

注：A：羟肟酸型；B：儿茶酚型  
Note: A: Hydroxamate type; B: Catecholate type



产生的嗜铁素其螯合基团具有异羟肟酸型和儿茶酚型 2 种结构类型, 因此, 该嗜铁素是混合型嗜铁素。

#### 2.4.2 嗜铁素的特征吸收峰检测

如图 6A 所示, 正常光照下菌液呈现黄绿色, 即菌株 W-STS-8 能分泌产生一种黄绿色产物。将经过分离纯化的嗜铁素溶于无菌水后, 在紫外灯下观察, 结果如图 6B 和 6C 所示, 在紫外光下嗜铁素提取液的荧光强度比菌体培养液显著提高, 因而可以证明所提取的嗜铁素纯度较好, 可用于后续实验研究。将提取的嗜铁素通过紫外可见光全波段扫描 (300–800 nm), 结果在 400 nm 处产生一特征吸收峰 (图 7)。

### 2.5 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草种子萌发实验

#### 2.5.1 不同浓度重金属 $\text{Cd}^{2+}$ 对黑麦草发芽率的影响

不同浓度重金属  $\text{Cd}^{2+}$  对黑麦草发芽率的影响

结果如图 8A 所示, 随着  $\text{Cd}^{2+}$  浓度增加, 黑麦草种子发芽率明显降低, 这说明重金属  $\text{Cd}^{2+}$  对生物有显著的毒害作用, 影响生物体的代谢作用, 进而影响其生长发育<sup>[5]</sup>。由图 8A 可知, 在  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 90 mg/L 时, 种子发芽率降至 36%, 因此选择这一抑制浓度作为后续实验浓度。

#### 2.5.2 菌株对 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草发芽率的影响

由图 8B 可知, 当添加不同浓度 W-STS-8 菌液时, 培养 5 d 后黑麦草种子的发芽率均有所提高, 其中添加菌液浓度  $OD_{600}$  为 1.4 时, 与对照相比, 黑麦草种子发芽率提高了 73.14%。实验结果表明, 添加适宜浓度的菌液有利于缓解和减轻重金属  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫引起的毒害作用, 因而提高了黑麦草种子的发芽率。

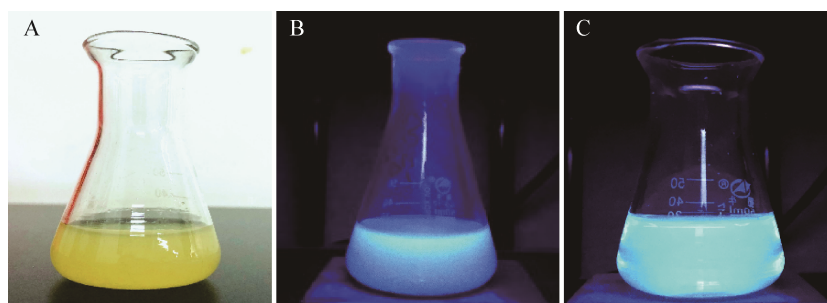


图 6 菌株 W-STS-8 嗜铁素荧光观察结果

Figure 6 The observed results of fluorescence of siderophore produced by W-STS-8 strain

注: A: VF 培养菌液(日光下); B: VF 培养菌液(紫外下); C: 嗜铁素提取液(紫外下)

Note: A: VF culture (in sunlight); B: VF culture (in UV light); C: Siderophore extracts (in UV light)

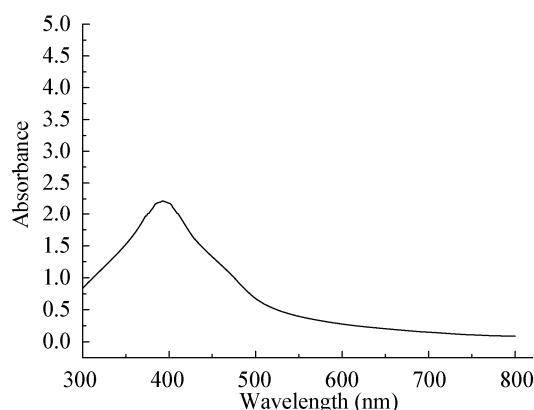


图 7 嗜铁素的紫外可见光全波段扫描图谱

Figure 7 The UV-Vis spectra of siderophore

#### 2.5.3 嗜铁素对 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草发芽率的影响

如图 8C 所示, 添加不同浓度嗜铁素时黑麦草种子发芽率显著上升, 尤其当嗜铁素浓度  $OD_{400}$  为 1.3 时, 与对照相比, 种子发芽率提高了 150.92%, 种子发芽情况如图 9 所示。实验结果表明, 直接添加适宜浓度的嗜铁素, 镉胁迫下黑麦草种子的发芽率显著提高, 这进一步表明嗜铁素与重金属  $\text{Cd}^{2+}$  具有高度亲和性, 二者的结合降低了外界环境中游离  $\text{Cd}^{2+}$  的毒害作用, 因而缓解和减轻了  $\text{Cd}^{2+}$  的胁迫作用, 促进种子在胁迫环境中快速萌发和生长。



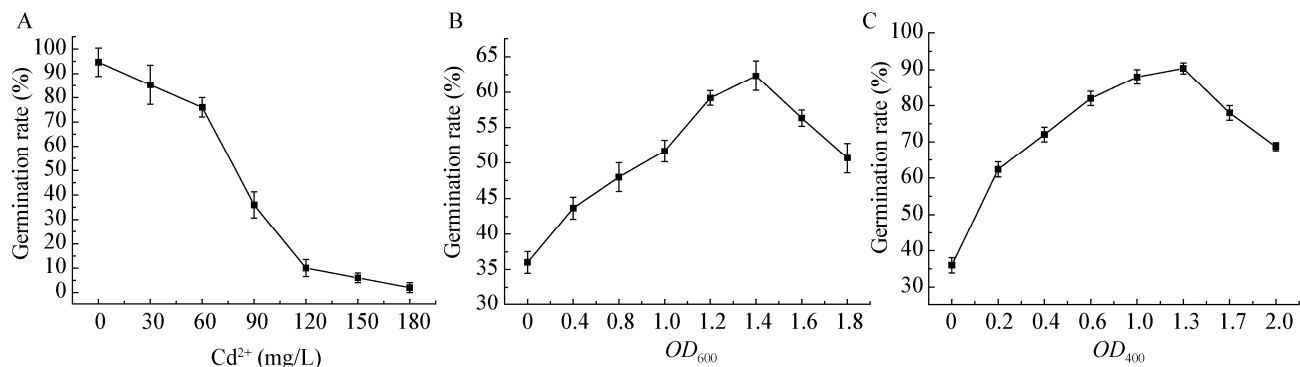


图 8 嗜铁素及其产生菌对  $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草发芽率

Figure 8 Effects of siderophore and its producing strain on the germination rate of ryegrass under  $\text{Cd}^{2+}$  stress

注: A: 不同  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度对黑麦草发芽率的影响; B: 菌株 W-STC-8 对黑麦草发芽率的影响; C: 嗜铁素对黑麦草发芽率的影响

Note: A: Effects of  $\text{Cd}^{2+}$  concentration on the germination rate of ryegrass; B: Effects of W-STC-8 strain on the germination rate of ryegrass under  $\text{Cd}^{2+}$  stress; C: Effects of siderophore extracts on the germination rate of ryegrass under  $\text{Cd}^{2+}$  stress

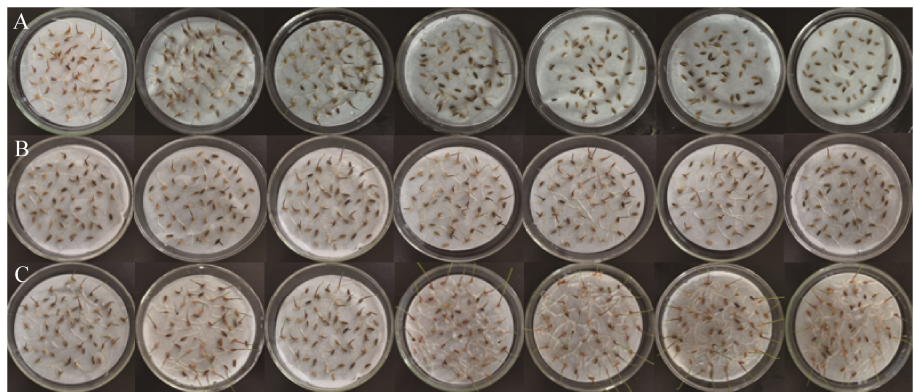


图 9 黑麦草种子发芽情况图片

Figure 9 Pictures of seed germination of ryegrass

注: A: 不同  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度(0、30、60、90、120、150、180 mg/L)对黑麦草种子发芽的影响; B: 菌株 W-STC-8 ( $OD_{600}$ =0.0、0.4、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8)处理对黑麦草种子发芽的影响; C: 嗜铁素( $OD_{400}$ =0.0、0.2、0.4、0.6、1.0、1.3、1.7、2.0)处理对黑麦草种子发芽的影响

Note: A: Effects of  $\text{Cd}^{2+}$  concentration on the germination rate of ryegrass (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 mg/L); B: Effects of W-STC-8 strain on the germination rate of ryegrass under  $\text{Cd}^{2+}$  stress ( $OD_{600}$ =0.0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8); C: Effects of siderophore extracts on the germination rate of ryegrass under  $\text{Cd}^{2+}$  stress ( $OD_{400}$ =0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0)

### 3 讨论

本研究从硫铁矿尾矿中分离筛选出一株产嗜铁素耐镉的菌株(*Pseudomonas* sp. W-STC-8), 在  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度为 60–150 mg/L 时, 该菌生长量和嗜铁素产量一直保持较高水平, 与空白对照相比, 嗜铁素产量提高了 17.65%。Sinha 等研究表明对  $\text{Cd}^{2+}$ 有耐受性的 *Pseudomonas aeruginosa* KUCd1 在添加  $\text{Cd}^{2+}$ 后, 其嗜铁素的合成会增加<sup>[26]</sup>。Dimkpa 等利

用产嗜铁素耐镉微生物 *Streptomyces tendae* F4, 研究发现添加  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度为 100  $\mu\text{mol/L}$  时能刺激其产生更多的嗜铁素<sup>[22]</sup>。我们的研究结果也进一步证实了这一结论, 即菌株 W-STC-8 能够在高浓度  $\text{Cd}^{2+}$ 存在的环境中刺激细菌合成并分泌更多的嗜铁素。

截至目前国内外已发现了 500 多种嗜铁素<sup>[40]</sup>, 其中对假单胞菌属产生的嗜铁素研究较多, 结果

发现多数假单胞菌产生一种复合缩氨酸嗜铁素<sup>[41-42]</sup>, 其具有荧光特性, 同时具有异羟肟酸型及儿茶酚型螯合基团特征<sup>[43]</sup>。近年有研究通过高效液相色谱技术分析还发现, 某些恶臭假单胞菌(*P. putida*)能产生同时具有异羟肟酸型、儿茶酚型及  $\alpha$ -羟基羧酸 3 种基团的嗜铁素<sup>[44]</sup>, 有些细菌还能产生一种新型的嗜铁素 Pyridine-2,6-Bis (Thiocarboxylic Acid)<sup>[45]</sup>。本研究分离鉴定的假单胞菌 W-STS-8 培养液呈现黄绿色, 且其嗜铁素提取液在紫外灯照射下同样能够观察到荧光, 测定结果说明该菌能产生具有异羟肟酸型、儿茶酚型 2 种螯合基团类型的混合型嗜铁素, 该嗜铁素的提取液在 400 nm 处产生的紫外波长吸收峰, 与 Albrecht-Gary 等<sup>[46]</sup>的研究结果一致, 即荧光假单胞菌产生一种黄绿色嗜铁素——脓菌素, 能够在紫外灯下发出荧光, 而且在 400 nm 附近有一特征吸收峰。

赵树民等从黑麦草根际土壤分离得到一株产嗜铁素耐镉巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* LY02), 该菌对重金属  $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草种子的萌发也有较好的促进作用, 但是随着  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度增加至 15 mg/L, 该菌的作用效果明显减弱<sup>[47]</sup>。本研究分离筛选的菌株 W-STS-8 及其产生的嗜铁素, 在  $\text{Cd}^{2+}$ 浓度高达 90 mg/L 时, 对  $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫下黑麦草的种子萌发均有显著的促进效果, 相较于赵树民等的研究结果促进效果更好。在实际应用中, 虽然使用嗜铁素处理重金属镉污染土壤效果更佳, 但考虑到污染土壤修复的规模及经济成本等, 以产嗜铁素耐镉菌悬液进行实际修复应用更有价值, 本研究对于如何解决当前土壤中重金属污染问题提供了新思路。

## 4 结论

(1) 本文从甘肃省临泽县硫铁矿尾矿分离筛选出一株产嗜铁素耐  $\text{Cd}^{2+}$ 菌株(*Pseudomonas* sp. W-STS-8), 经过 16S rRNA 基因序列鉴定其为假单胞菌属, 能产生同时具有异羟肟酸型和儿茶酚型 2 种螯合基团的混合型嗜铁素, 该菌产生的嗜铁素

从对数期开始累积, 稳定期的后期时菌液中嗜铁素产量达到稳定, 其产量与生物量显著正相关。

(2) 通过将菌株 W-STS-8 产生的嗜铁素分离纯化, 在紫外灯下观察荧光强度较好, 表明得到纯度较好的嗜铁素, 紫外可见光光谱扫描显示嗜铁素在 400 nm 处出现特征吸收峰, 因此可利用其特殊的紫外可见光吸收特征对嗜铁素进行定量分析。

(3) 镉胁迫下黑麦草种子发芽实验结果表明, 产嗜铁素细菌的菌悬液和嗜铁素均能显著减缓重金属镉对黑麦草种子萌发造成的毒害作用, 表明菌株 W-STS-8 产生的嗜铁素通过与重金属  $\text{Cd}^{2+}$ 络合, 减轻了镉对黑麦草种子的毒害作用, 提高了黑麦草的种子发芽率。

这些研究结果可为后期产嗜铁素耐镉菌株 W-STS-8 联合黑麦草修复镉污染土壤提供良好的技术支撑, 也为重金属污染土壤的生态修复工程提供了科学方法和思路。

## REFERENCES

- [1] Hu YX, Su H, Zhang B, Zhang BB, Zhang Y, Ouyang J. Soil heavy metal pollution and its evaluation methods: a review[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(17): 33-39 (in Chinese)  
胡永兴, 宿虎, 张斌, 张兵兵, 张元, 欧扬剑. 土壤重金属污染及其评价方法概述[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 33-39
- [2] Zheng H, Wang M, Chen SB, Li SS, Lei XQ. Sulfur application modifies cadmium availability and transfer in the soil-rice system under unstable pe+pH conditions[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 184: 109641
- [3] Sterckeman T, Thomine S. Mechanisms of cadmium accumulation in plants[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2020, 39(4): 322-359
- [4] Duan GL, Cui HL, Yang YP, Yi XY, Zhu D, Zhu YG. Interactions among soil biota and their applications in synergistic bioremediation of heavy-metal contaminated soils[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(3): 455-470 (in Chinese)  
段桂兰, 崔慧灵, 杨雨萍, 袁幸运, 朱冬, 朱永官. 重金属污染土壤中生物间相互作用及其协同修复应用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(3): 455-470
- [5] Chen S, Sun TH, Sun LN, Chao L, Yang CL. Sorption-desorption behavior of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  in

- rhizosphere and bulk soil[J]. Environmental Science, 2007, 28(4): 843-851 (in Chinese)
- 陈苏, 孙铁珩, 孙丽娜, 晁雷, 杨春璐.  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 在根际和非根际土壤中的吸附-解吸行为[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 843-851
- [6] Pratush A, Kumar A, Hu Z. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review[J]. International Microbiology, 2018, 21(3): 97-106
- [7] Abou-Shanab RA, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, Van Berkum P, Moawad H, Ghanem K, Ghazlan HA. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*[J]. New Phytologist, 2003, 158(1): 219-224
- [8] Wang M, Chen SB, Chen L, Wang D, Zhao CM. The responses of a soil bacterial community under saline stress are associated with Cd availability in long-term wastewater-irrigated field soil[J]. Chemosphere, 2019, 236: 124372
- [9] Guerinot ML. Microbial iron transport[J]. Annual Review of Microbiology, 1994, 48(1): 743-772
- [10] Burd GI, Dixon DG, Glick BR. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3663-3668
- [11] Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows[J]. Plant and Soil, 2008, 304(1/2): 35-44
- [12] Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(3): 142-149
- [13] Khan A, Gupta A, Singh P, Mishra AK, Ranjan RK, Srivastava A. Siderophore-assisted cadmium hyperaccumulation in *Bacillus subtilis*[J]. International Microbiology, 2020, 23(2): 277-286
- [14] Kiss T, Farkas E. Metal-binding ability of desferrioxamine B[J]. Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 1998, 32(2/3): 385-403
- [15] Braud A, Geoffroy V, Hoegy F, Mislin GLA, Schalk IJ. Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(3): 419-425
- [16] Wichard T, Bellenger JP, Morel FMM, Kraepiel AML. Role of the siderophore azotobactin in the bacterial acquisition of nitrogenase metal cofactors[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(19): 7218-7224
- [17] Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria[J]. Chemosphere, 2009, 74(2): 280-286
- [18] Kumari S, Khan A, Singh P, Dwivedi SK, Ojha KK, Srivastava A. Mitigation of As toxicity in wheat by exogenous application of hydroxamate siderophore of *Aspergillus oryzae*[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2019, 41(7): 107
- [19] Zloch M, Thiem D, Gadzała-Kopciuch R, Hryniewicz K. Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to  $\text{Cd}^{2+}$ [J]. Chemosphere, 2016, 156: 312-325
- [20] Ahmed E, Holmström SJM. The effect of soil horizon and mineral type on the distribution of siderophores in soil[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2014, 131: 184-195
- [21] Dimkpa CO, Svatoš A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W, Kothe E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp.[J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 19-25
- [22] Dimkpa CO, Merten D, Svatoš A, Büchel G, Kothe E. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1687-1696
- [23] Dimkpa C, Svatoš A, Merten D, Büchel G, Kothe E. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2008, 54(3): 163-172
- [24] Cortese MS, Paszczyński A, Lewis TA, Sebat JL, Borek V, Crawford RL. Metal chelating properties of pyridine-2, 6-bis (thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas* spp. and the biological activities of the formed complexes[J]. Biometals, 2002, 15(2): 103-120
- [25] Fekete FA, Barton LL. Effects of iron(III) analogs on growth and pseudobactin synthesis in a chromium tolerant *Pseudomonas* isolate[J]. Biology of Metals, 1991, 4(4): 211-216
- [26] Sinha S, Mukherjee SK. Cadmium-induced siderophore production by a high Cd-resistant bacterial strain relieved Cd toxicity in plants through root colonization[J]. Current Microbiology, 2008, 56(1): 55-60
- [27] Hesse E, O'Brien S, Thomas N, Bayer F, Luján AM, Van Veen EM, Hodgson DJ, Buckling A. Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination[J]. Ecology Letters, 2018, 21(1): 117-127
- [28] Glick BR. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment[J]. Biotechnology Advances, 2003, 21(5): 383-393
- [29] Dong QL, Bai Z, Li MH, Xie PJ. Response of germination characteristics of Ryegrass to heavy metal stress[A]//Proceedings of 2019 Annual Meeting of Science and Technology of Chinese Society for Environmental

- Sciences[C]. Xi'an: Chinese Society for Environmental Sciences, 2019: 714-719 (in Chinese)
- 董馨岚, 白哲, 李铭红, 谢佩君. 黑麦草萌发特性对重金属胁迫的响应[A]//2019 中国环境科学学会科学技术年会论文集[C]. 西安: 中国环境科学学会, 2019: 714-719
- [30] Chen D, Li BQ, Yang YP, He ZR, Li X. Cadmium accumulation characteristics of four herbs[J]. Environmental Science, 2021, 42(2): 960-966 (in Chinese)
- 陈迪, 李伯群, 杨永平, 和兆荣, 李雄. 4 种草本植物对镉的富集特征[J]. 环境科学, 2021, 42(2): 960-966
- [31] Long XX, Chen XM, Chen YG, Woon-chung WJ, Wei ZB, Wu QT. Isolation and characterization endophytic bacteria from hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance and their potential to promote phytoextraction of zinc polluted soil[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1197-1207
- [32] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [33] Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores[J]. Methods in Enzymology, 1994, 235: 329-344
- [34] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[A]//Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M]. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1991: 115-175
- [35] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [36] Khan A, Singh P, Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: a review[J]. Microbiological Research, 2018, 212/213: 103-111
- [37] Lee J, Postmaster A, Soon HP, Keast D, Carson KC. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia[J]. BioMetals, 2012, 25(2): 285-296
- [38] Arnow LE. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxy-phenylalanine-tyrosine mixtures[J]. Journal of Biological Chemistry, 1937, 118(2): 531-537
- [39] Shenker M, Oliver I, Helmann M, Hadar Y, Chen Y. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*[J]. Journal of Plant Nutrition, 1992, 15(10): 2173-2182
- [40] Boukhalfa H, Crumbliss AL. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport[J]. Biometals, 2002, 15(4): 325-339
- [41] Baune M, Qi YL, Scholz K, Volmer DA, Hayen H. Structural characterization of pyoverdines produced by *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas taiwanensis* VLB120[J]. BioMetals, 2017, 30(4): 589-597
- [42] Maenaka R, Tani SJ, Hikichi Y, Kai KJ. Actinomycins inhibit the production of the siderophore pyoverdines in the plant pathogen *Pseudomonas cichorii* SPC9018[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2020, 84(10): 1975-1985
- [43] Cornelis P, Matthijs S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(12): 787-798
- [44] Boukhalfa H, Reilly SD, Michalczyk R, Iyer S, Neu MP. Iron(III) coordination properties of a pyoverdine siderophore produced by *Pseudomonas putida* ATCC 33015[J]. Inorganic Chemistry, 2006, 45(14): 5607-5616
- [45] Leach LH, Morris JC, Lewis TA. The role of the siderophore pyridine-2,6-bis (thiocarboxylic acid) (PDTC) in zinc utilization by *Pseudomonas putida* DSM 3601[J]. BioMetals, 2007, 20(5): 717-726
- [46] Albrecht-Gary AM, Blanc S, Rochel N, Ocaktan AZ, Abdallah MA. Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Inorganic Chemistry, 1994, 33(26): 6391-6402
- [47] Zhao SM, Yu FB, Ye ZQ, Fang XB, Lin HP. Isolation and identification of a cadmium-resistant and siderophores-producing strain[J]. Environmental Pollution and Control, 2017, 39(9): 999-1002 (in Chinese)
- 赵树民, 虞方伯, 叶正钱, 方晓波, 林海萍. 耐镉产铁载体菌株的分离及鉴定[J]. 环境污染与防治, 2017, 39(9): 999-1002