

## 研究报告

一株耐镉细菌 *Exiguobacterium acetylicum* TC13 的分离鉴定及全基因组分析李萍<sup>1</sup>, 黄文丽<sup>2</sup>, 熊川<sup>2</sup>, 彭梅芳<sup>2</sup>, 金鑫<sup>2</sup>, 李强<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106<sup>2</sup> 四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 四川 成都 610066

李萍, 黄文丽, 熊川, 彭梅芳, 金鑫, 李强. 一株耐镉细菌 *Exiguobacterium acetylicum* TC13 的分离鉴定及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1583-1599.

LI Ping, HUANG Wenli, XIONG Chuan, PENG Meifang, JIN Xin, LI Qiang. Isolation, identification, and whole-genome analysis of a cadmium-tolerant bacterium *Exiguobacterium acetylicum* TC13[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1583-1599.

**摘要:** 【背景】一些具有金属抗性的微生物被发现能降低土壤中金属的有效性, 减少金属在植物中的转运和积累, 同时具有促进植物生长的作用, 表现出较低的成本效益和环境生态友好性, 在农业、工业和环境领域具有广阔的应用前景。【目的】分离筛选并获得耐 Cd(II) 优质菌株, 并对其生物学鉴定, 分析菌株形貌及耐镉的生物学特性, 进一步从基因组层面剖析菌株的分子遗传特征, 初步探究其潜在功能及耐重金属 Cd(II) 相关基因, 并探究 Cd(II) 胁迫下菌株对小麦籽粒萌发特性的影响。【方法】收集四川省德阳市磷矿、煤矿产区 10 余份土样, 利用筛选培养基分离获得耐 Cd(II) 菌株, 采用扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)、透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)观察其形貌特征; 测定培养液  $OD_{600}$  验证菌株耐 Cd(II) 特性。基于 Illumina NovaSeq 和 Oxford Nanopore ONT 测序平台, 采用全基因组测序技术进行菌株鉴定及全基因组功能分析。利用生物信息学软件对原始数据组装、功能注释, 挖掘耐 Cd(II) 适应机制相关基因。观察不同处理下的发芽生根率及芽根长势, 研究 Cd(II) 胁迫下菌株对小麦籽粒的萌发特性。【结果】分离获得一株优质耐 Cd(II) 菌株, 经 16S rRNA 基因测序和全基因组测序鉴定为 *Exiguobacterium acetylicum*, 命名为 TC13。菌株 TC13 全基因组序列组装得到 1 个染色体和 1 个环状质粒, 大小分别为 3 192 165 bp 和 167 401 bp; G+C 含量分别为 46.62% 和 44.63%; 分别包含 3 231 个和 154 个 DNA 编码序列, 染色体同时包含 54 个 ncRNA。功能基因数据库比对结果发现菌种中多个基因涉及重金属转运、外排及应激响应等生物学过程, 这可能与耐 Cd(II) 特性有关。菌株对镉胁迫下小麦籽粒萌发率及长势特性具有显著提升作用。【结论】本研究通过全基因组测序探究了 *E. acetylicum* TC13 的基因结构, 丰富了同属种菌株遗传学信息, 解析了 Cd(II) 耐受的相关基因, 证实了菌株 TC13 对 Cd(II) 胁迫下

资助项目: 四川省农业科学院自主创新项目(2022ZZCX028)

This work was supported by the Independent Innovation Project of Sichuan Academy of Agricultural Sciences (2022ZZCX028).

\*Corresponding author. E-mail: liqiang02@cdu.edu.cn

Received: 2023-09-11; Accepted: 2023-11-29; Published online: 2024-01-09

小麦籽粒生长的促进作用, 这表明菌株 TC13 在土壤修复及促生中具有潜在的应用前景。

关键词: 微小杆菌; 扫描电镜; 透射电镜; 全基因组; 重金属功能基因

## Isolation, identification, and whole-genome analysis of a cadmium-tolerant bacterium *Exiguobacterium acetylicum* TC13

LI Ping<sup>1</sup>, HUANG Wenli<sup>2</sup>, XIONG Chuan<sup>2</sup>, PENG Meifang<sup>2</sup>, JIN Xin<sup>2</sup>, LI Qiang<sup>\*1</sup>

1 College of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, Sichuan, China

2 Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, Sichuan, China

**Abstract: [Background]** Some metal-tolerant microorganisms have been found to reduce the availability of metals in soil, reduce the transportation and accumulation of metals in plants, and promote plant growth. With low cost-effectiveness and environmental friendliness, these microorganisms demonstrate promising prospects for applications in agriculture, industry, and the environment. **[Objective]** To isolate and identify high-quality strains tolerant to Cd(II), examine the morphological characteristics and Cd(II) tolerance of the strains, analyze the molecular genetic characteristics of the strains at the genomic level, mine their potential functions and Cd(II) tolerance-related genes, and observe the effects of the strains on wheat seed germination under cadmium stress. **[Methods]** Over ten soil samples were collected from phosphate and coal mining areas in Deyang City, Sichuan Province. A Cd(II)-tolerant strain was isolated in selective culture media, and its morphological characteristics were observed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The Cd(II) tolerance of the strain was examined based on the *OD*<sub>600</sub>. Whole-genome sequencing was performed using Illumina NovaSeq and Oxford Nanopore ONT platforms for identification and genetic function analysis of the strain. Bioinformatics tools were used for genetic assembly, functional annotation, and mining of genes related to Cd(II) adaptation. The wheat seed germination rate, the bud and root growth of wheat seedlings under different treatments were determined to reveal the germination characteristics of wheat seeds under Cd(II) stress. **[Results]** One Cd(II)-tolerant strain was isolated, identified as *Exiguobacterium acetylicum* and named TC13. The whole-genome sequence assembly of TC13 resulted in one chromosome and one circular plasmid with the lengths of 3 192 165 bp and 167 401 bp and the G+C content of 46.62% and 44.63%, respectively. The chromosome and circular plasmid carried 3 231 and 154 DNA coding sequences, and the chromosome contained 54 ncRNAs. Functional gene database alignment results revealed that multiple genes were involved in biological processes such as heavy metal transport, efflux, and stress response in the strain, which may be associated with its cadmium tolerance. In addition, the strain increased the germination rate of wheat seeds and improved the growth of wheat seedlings under Cd(II) stress. **[Conclusion]** This study explored the genome structure of *E. acetylicum* TC13 by whole-genome sequencing, enriching the

genetic information of strains of the same species, revealing the Cd(II) tolerance-related genes and confirmed the strain TC13 could promote the growth of wheat grain under Cd(II) stress. The strain TC13 has potential application prospects in soil remediation and plant growth promotion.

**Keywords:** *Exiguobacterium* sp.; scanning electron microscope; transmission electron microscope; whole genome; functional genes associated with heavy metals

工业废水、来自污水处理厂的污泥、过度使用农药化肥以及来自城市人口和工业未经处理的污水造成了严重的环境污染。其中重金属污染是一个普遍存在的环境问题,大多数重金属化合物因在水中可溶解,导致在低浓度下也具有极强的毒性<sup>[1]</sup>;同时重金属是不可生物降解的,可通过食物链在人和动物体内转移积累,直接影响或通过污染水、空气间接威胁人类健康<sup>[2-3]</sup>。在所有非必需重金属中,镉(cadmium, Cd)是土壤中流动性最强的元素之一,在土壤-植物系统中很容易被植物吸收并释放到水系统中,当灌溉水 Cd 含量超过 0.04 mg/L 时,土壤和种植的作物均被视为受污染<sup>[4-5]</sup>。因此,重金属污染治理刻不容缓,开发具有成本效益和环境友好的修复技术极为重要。微生物能在广泛的温度和 pH 范围内适应,同时表现出较低的成本效益和友好的环境生态性,使其成为开发农业、工业和环境相关产品的合适候选者。

据报道,抗金属细菌能改变土壤中金属存在形式并降低植物中金属积累量,同时促进植物生长<sup>[6-7]</sup>。芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)研究较多,如巨芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) H3 和新根瘤菌(*Neorhizobium huautlense*) T1-17 能够显著降低水稻根系和籽粒的 Cd 含量以及土壤的有效 Cd 含量<sup>[8]</sup>。此外,假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)和窄食单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)也被研究用于刺激植物 Cd 的积累<sup>[9]</sup>。另外,节杆菌(*Arthrobacter* sp.)和微杆菌(*Exiguobacterium* sp.)已被用于促进镍(nickel, Ni)和铬(chromium, Cr)积累剂,但对于

镉积累的研究较少<sup>[10]</sup>。例如, Wang 等<sup>[11]</sup>研究发现橙色微小杆菌(*Exiguobacterium aurantiacum*) Q3-11 显著降低小麦植株在根际土壤中 Cd 和砷(arsenic, As)的吸收和土壤中金属的可溶有效含量并促进植株生长; Siripan 等<sup>[12]</sup>研究发现微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.) RB51 能产生可溶解磷酸盐和少量的吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),从而促进植物生长并刺激植物对镉的积累。乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*)因其嗜极性、产酶能力、产代谢产物(如类胡萝卜素)等而得到研究,具有抑菌、增强免疫及促进植物生长的潜力,在耐重金属方面发现对 Cr(VI)具有耐受性并能去除废水中的 Cr(VI),但对 Cd(II)的耐受及去除率少见报道<sup>[13-14]</sup>。目前,微生物耐镉机制被广泛研究,包括胞外吸附、细胞外排、胞内沉淀、抗应激反应及蛋白质/DNA 修复等<sup>[15-16]</sup>。金属转运蛋白特异性控制运输、金属外排系统、次生代谢产物结合是微生物耐镉适应机制中直接有效的主要途径,而热应激、氧化应激、蛋白质/DNA 修复等应激基因过表达和非应激基因下调是间接缓解细胞损伤的适应机制<sup>[15-17]</sup>。

目前,已有 53 株 *Exiguobacterium* sp. 基因组序列被测序,发表文章涉及促生、降解石油、降解塑料、修复环境等方面<sup>[18-19]</sup>。在重金属治理上,对铬、砷的研究相对较多,对镉的研究较少<sup>[18]</sup>。因此,本实验期望从四川省德阳市矿产区土样中分离纯化获得优质耐 Cd(II)菌株,通过扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察其形貌,通过 16S rRNA 基因和全基

因组测序比对完成基因学鉴定,同时进行功能分析注释,从基因层面全面了解菌株信息,挖掘耐重金属相关的功能基因,并通过菌株对 Cd(II)胁迫下小麦籽粒生长试验验证菌株 Cd(II)耐受能力,以期对环境修复提供良好的候选菌种。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

2022年1月11日于四川省德阳市清平镇吴华磷矿产区(海拔 960 m, E104°4'66", N31°31'22")、吴华磷矿产区河道滩涂(海拔 940 m, E104°6'6", N31°31'28")和天池乡煤矿产区河道滩涂(海拔 810 m, E104°8'13", N31°29'29")共收集 8 个土样,分别命名为 QP1-1、QP1-2、QP1-3、QP1-4、QPS2-1、QPS2-2、TC1 和 TC2。收集后于-80℃超低温冰箱保存,待用。

小麦籽粒由四川省农业科学院生物技术核技术研究所提供,编号为 CF22。

### 1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母膏 5.0, NaCl 10.0。配制固体时加 15.0 琼脂粉。

耐 Cd(II)筛选 LB 液体培养基:上述 LB 培养基添加 40 mg/L Cd(II)。

### 1.3 主要试剂和仪器

CdCl<sub>2</sub>·5/2H<sub>2</sub>O, 上海麦克林生化科技股份有限公司;植物 DNA 提取试剂盒,北京擎科生物科技股份有限公司。SEM 和 TEM,日立公司;酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;立式恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.4 耐镉菌株的分离与纯化

将采集的 10 g 新鲜土壤放于 90 mL 无菌水中,摇匀 30 min,以 10 的倍数梯度稀释悬浮液,采用稀释涂布法分别取 100 μL 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 悬浮液涂布于细菌耐 Cd(II)筛选 LB 平板上,32.8℃培养 48 h 后挑取不同形态的菌落进行编号,采

用划线法在无 Cd(II) LB 平板纯化 3 次以上,每次纯化保证分离出 10 个以上的单个菌落,挑取最后一次纯化的单菌落用 60%灭菌甘油-80℃保存,待用。

### 1.5 优势耐镉细菌的筛选

选用含 40 mg/L Cd(II) (处理组)和添加等体积无菌水(CK 组)的 LB 培养基各 100 mL, pH 7.35±0.10, 32.8℃、150 r/min 分别培养 1.4 纯化菌株 24 h,酶标仪测定 OD<sub>600</sub>,得到菌株处理组和 CK 组相应的生长活力值,记为 Y<sub>e</sub>和 Y<sub>0</sub>,计算得到耐 Cd(II)能力值 Y(%),设置重复 3 个。耐 Cd(II)能力测定公式:

$$Y(\%) = Y_e / Y_0 \times 100$$

式中:Y 为耐 Cd(II)能力;Y<sub>0</sub> 为 CK 组 OD<sub>600</sub>;

Y<sub>e</sub> 为处理组 OD<sub>600</sub>。

### 1.6 观察形态特征

将分离得到的优势菌株划线接种于无 Cd(II) LB 平板,32.8℃恒温培养 72 h,观察菌落形状、大小、颜色、边缘、透明等形态特征。无 Cd(II) LB 液体培养基中 32.8℃、150 r/min 培养 48 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,冷冻干燥,观察菌株颜色变化情况。

### 1.7 扫描电镜观察

32.8℃、150 r/min 培养 24 h 后 OD<sub>600</sub> 为 0.8–1.0 的无 Cd(II)菌株培养液取 20 mL,常温 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清;用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液洗涤菌体 2 次,常温 8 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 4℃预冷的 2.5%戊二醛固定液,4℃冰箱固定过夜,4℃、8 000 r/min 离心 5 min,弃上清;再用 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次,每次 15 min;加入 1%锇酸溶液固定 2 h,弃锇酸废液,重复上一步漂洗操作;用不同浓度梯度(30%–95%)乙醇溶液脱水处理 1 次,100%乙醇处理 2 次,15 min/次。然后用乙醇稀释 1 倍的醋酸异戊酯及不稀释的

纯醋酸异戊酯溶液分别处理样品 0.5 h 和 1 h。临界点干燥后将样品均匀撒在电导胶带上, 喷金处理后采用 SEM 观察菌体形态。

### 1.8 透射电镜观察

菌体前处理同 1.7 一致, 脱水处理后, 纯丙酮处理 20 min, 再依次采用丙酮将包埋剂稀释 1、0.25 和 0 倍, 分别渗透处理 1 h、3 h、过夜; 常规包埋并维持 70 °C 过夜。将样品进行常规切片, 经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀 50% 乙醇饱和溶液各染色 10 min, 晾干后观察形态。

### 1.9 不同 Cd(II) 浓度培养时菌株生长曲线的测定

将处于生长对数期( $OD_{600}$  为 0.8–1.0)的细菌生长悬浮母液按 1% 接种量接种于 100 mL、pH 7.35±0.10 且含有不同 Cd(II) 浓度(0、10、20、40、50、60 和 70 mg/L)的 LB 液体培养基, 32.8 °C、150 r/min 恒温摇床中孵育, 96 h 内每间隔 3 h 用酶标仪测定  $OD_{600}$ 。设置 3 个重复。

### 1.10 菌株 16S rRNA 基因鉴定

使用植物 DNA 提取试剂盒(通用型)提取菌株 DNA, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTAC CTTGTTACGA-3') 扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 菌株 DNA 1.0  $\mu$ L, 10×Buffer (含 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ) 5.0  $\mu$ L, Taq 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 1.0  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 39.0  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 次循环; 72 °C 7 min。得到 1 500 bp 左右的 16S rRNA 基因片段, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物由北京擎科生物科技有限公司成都分公司一代测序(测序引物为 27F/1492R), 用 ContigExpress 拼接测序结果并保留准确部分, 利用 NCBI 数据库(blast.ncbi.nlm.nih.gov)进行序列比对。

### 1.11 细菌全基因组测序

细菌全基因组测序由上海派森诺生物科技股份有限公司采用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略, 利用二代/三代单分子测序技术, 基于 Illumina NovaSeq/Oxford Nanopore ONT 测序平台对构建文库进行测序。过滤接头污染、低质量、短片段 reads (长度<50 bp) 和模糊碱基 N, 使用 UniCycler、Flye 软件对三代数据进行组装。将二代高质量数据使用 pilon 软件对三代 contig 结果进行校正, 获得完整序列。采用 GeneMarkS 软件进行基因预测并用 Rfam 数据库比对获得非编码 RNA 预测, 采用 CGView 绘制基因组完成图。全基因组序列由 NCBI 和 IMG/M (Integrated Microbial Genomes & Microbiomes, <https://img.jgi.doe.gov/>) 分别进行注释和功能预测。

### 1.12 菌株对小麦籽粒生长的影响

将目标菌株的单一菌落接种于 100 mL LB 培养基中, 32.8 °C、150 r/min 培养 72 h, 常温 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 无菌水重悬菌体清洗 2 次, 相同条件离心弃上清, 再用无菌水重悬菌体至  $OD_{600}=1.0$ , 获得种子菌悬液。选择均一饱满、无病虫害种子籽粒进行培养皿生长实验, 设置 4 个处理组, 每个处理组放置 35 粒种子, 分别为 CK 组(去离子水摇瓶 2 h 后, 去离子水培养)、Cd 组(20 mg/L Cd(II) 溶液摇瓶 2 h 后, 20 mg/L Cd(II) 溶液培养)、CdB 组(种子菌悬液摇瓶 2 h 后, 20 mg/L Cd(II) 培养)、B 组(种子菌悬液摇瓶 2 h 后, 去离子水培养), 重复 3 次, 培养 6 d, 观察发芽生根率、芽和根长势情况。发芽生根率(%) = 发芽生根粒数/籽粒总数×100。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐 Cd(II) 细菌的分离筛选及验证

分离获得 10 个纯化菌株, 分别命名为 QP1-3-10、QP1-4-9、QP1-4-13、QP1-4-16、

24912-120、24912、QPS1-2-1、QPS1-2-4、TC1-2和TC13。菌株进行LB液体培养[CK和Cd(II) 40 mg/L] 48 h, 获得10株菌株的生长活力和耐镉能力信息(表1), 筛选出一株耐Cd(II)优势菌株(TC13), 其生长活力、耐Cd(II)能力显著高于其他菌株, 对其进行后续研究与分析。

## 2.2 不同Cd(II)浓度对菌株TC13生长的影响

初始Cd(II)浓度分别为0、10、20、40、50、60和70 mg/L时, 培养96 h, 间隔3 h测定 $OD_{600}$ , 得到菌株TC13的生长曲线(图1)。从图1中发现, 添加Cd(II)使菌株TC13生长受到抑制, 生物量显著降低。在0–50 mg/L Cd(II)浓度下, 菌株TC13生长曲线变化趋势一致,  $OD_{600}$ 呈现先增

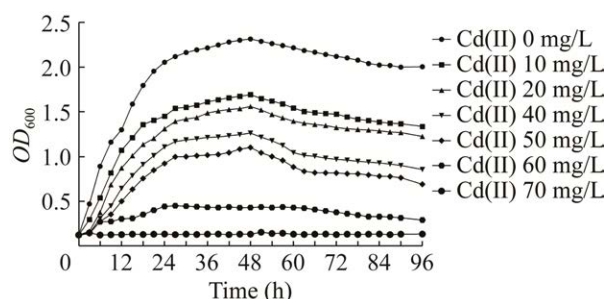


图1 不同Cd(II)浓度下菌株TC13的生长曲线  
Figure 1 Growth curve of strain TC13 at different Cd(II) concentrations.

长后趋于平稳再下降; 24–48 h生物量平稳增长, 48 h生物量达到最大值; 在60 mg/L Cd(II)浓度下, 菌株长势微弱, 70 mg/L Cd(II)完全抑制菌株生长, 最高耐Cd(II)浓度范围为60–70 mg/L, 菌株最适耐Cd(II)浓度在0–40 mg/L; 随着Cd(II)浓度升高, 菌株对数期生长速度显著下降, 衰亡期衰退速率显著上升, 表现为不同Cd(II)浓度曲线斜率的不同。

## 2.3 菌株TC13的菌落形态

菌株TC13菌落颜色随着生长时间的延长出现褪色现象, 依次呈现出乳白色、橙色、淡黄色(图2A–2C); 菌落呈圆形, 不透明, 表面光滑无褶皱, 边缘清晰, 形状规则。真空冷冻干燥后菌株呈橙色(图2D)。

## 2.4 菌株TC13的SEM观察结果

扫描电镜可以清晰观察到菌株TC13菌体呈短圆柱状, 个体均匀饱满, 大小约(5–8)  $\mu\text{m} \times (9–20) \mu\text{m}$ , 表面被微小绒毛感颗粒包裹, 菌体轮廓清晰圆润, 细胞之间独立生长, 未发生粘连, 细胞表面无明显颗粒状聚合物, 未见明显鞭毛(图3)。

## 2.5 菌株TC13的TEM观察结果

扫描电镜显示菌体以胞质层为分界线, 形成细胞壁、胞质层及细胞质三部分: 细胞壁厚约为500–800 nm, 胞质层清晰明显, 细胞质分布均匀(图4)。

表1 不同菌株耐Cd(II)表现情况

Table 1 Performance of cadmium resistance in different strains

菌株编号 Strain No.	处理 Manage	生长活力 Growth vitality ( $OD_{600}$ )	耐镉能力 Cd(II) resistance capability (%)
QP1-3-10	CK	0.95±0.13	/
	Cd(II)	0.27±0.032C	28.40±0.60c
QP1-4-9	CK	1.14±0.03	/
	Cd(II)	0.29±0.048C	25.07±3.66c
QP1-4-13	CK	0.92±0.11	/
	Cd(II)	0.28±0.031C	28.09±4.30c
QP1-4-16	CK	0.89±0.13	/
	Cd(II)	0.27±0.044C	30.31±2.13c
24912-120	CK	1.35±0.09	/
	Cd(II)	0.11±0.005D	7.93±0.15d
24912	CK	1.06±0.12	/
	Cd(II)	0.12±0.002D	11.52±1.51d
QPS1-2-1	CK	1.38±0.14	/
	Cd(II)	0.16±0.009D	11.81±0.59d
QPS1-2-4	CK	0.86±0.11	/
	Cd(II)	0.24±0.013C	26.37±2.85c
TC1-2	CK	0.81±0.10	/
	Cd(II)	0.43±0.064B	52.51±1.80a
TC13	CK	1.76±0.30	/
	Cd(II)	0.85±0.016A	48.30±1.12ab

不同大小写字母代表显著性差异( $P<0.05$ )

The different capital letters and lowercase letters represent significant differences ( $P<0.05$ ); “/” represent undetermined.



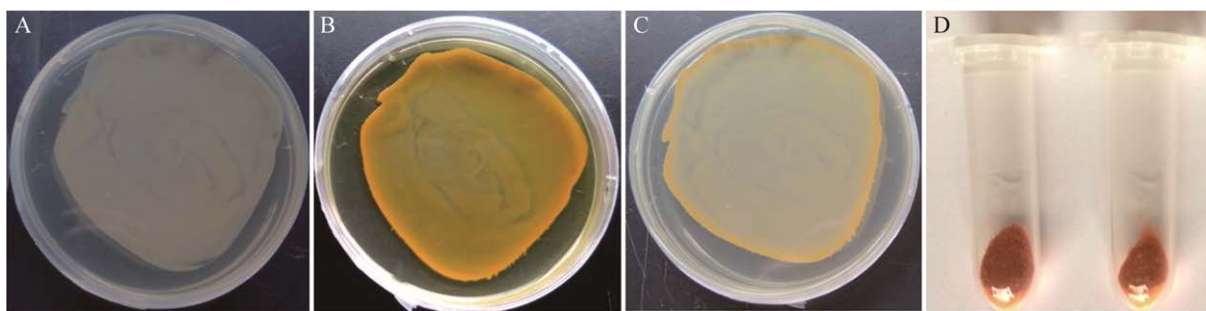


图 2 菌株 TC13 菌落形态 A: 培养 24 h. B: 培养 72 h. C: 培养 7 d. D: 真空冷冻干燥后形态

Figure 2 Colony morphology of the strain TC13. A: Culture for 24 h. B: Culture for 72 h. C: Culture for 7 d. D: Morphology after vacuum freeze-drying.

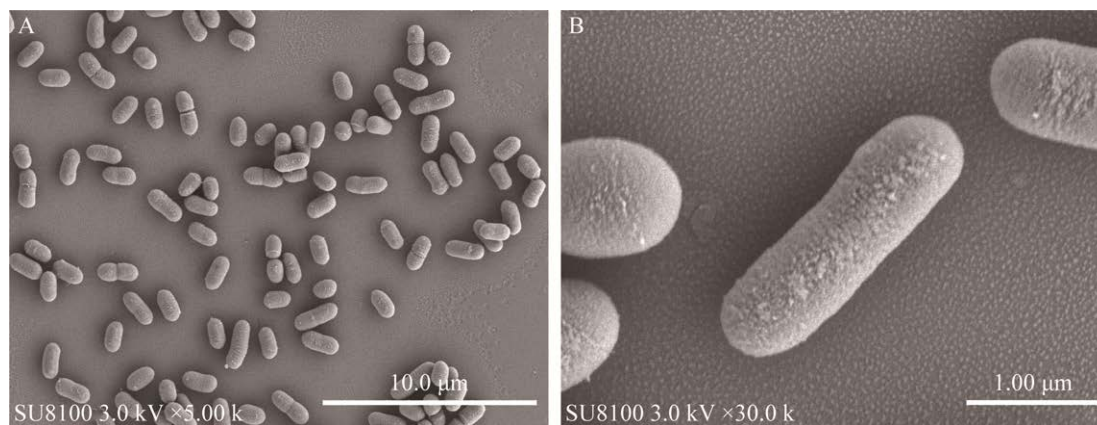


图 3 菌株 TC13 的扫描电镜结果 A: 放大倍数为 5 000×. B: 放大倍数为 30 000×

Figure 3 The scanning electron microscopic results of the strain TC13. A: Magnification of 5 000×. B: Magnification of 30 000×.

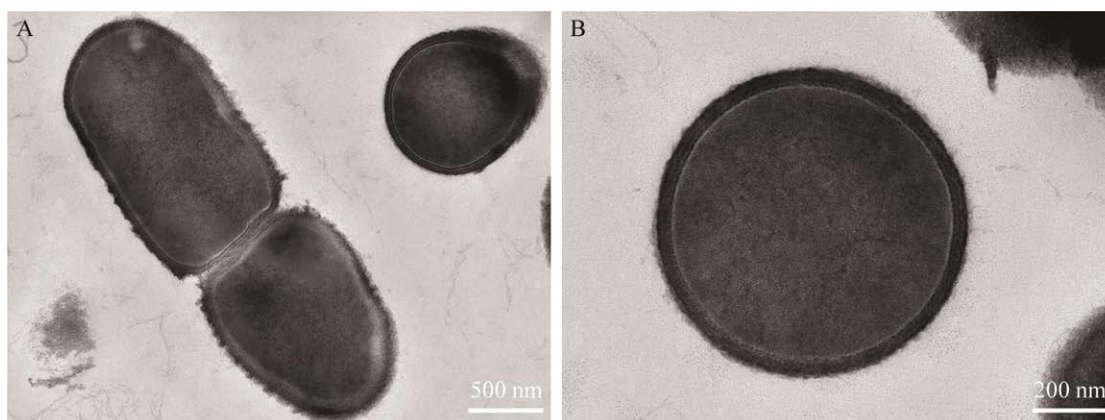


图 4 菌株 TC13 的透射电镜观察结果 A: 放大倍数为 12 000×. B: 放大倍数为 25 000×

Figure 4 The transmission electron microscope results of the strain TC13. A: Magnification of 12 000×. B: Magnification of 25 000×.

## 2.6 菌株 TC13 的 16S rRNA 基因鉴定结果

将拼接得到的菌株 TC13 的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 数据库中进行比对,发现与微小杆菌属中乙酰微小杆菌相似度为 99.66%,表明菌株 TC13 与乙酰微小杆菌(*E. acetylicum*) 16S rRNA 基因序列亲缘关系亲近,初步判断菌株 TC13 为微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.)。

## 2.7 菌株 TC13 全基因组基本信息

为进一步鉴定菌株并从基因水平揭示其功能,对菌株 TC13 进行全基因组测序。菌株全基因组三代下机数据显示,菌株 TC13 高质量过滤后长度为 1 362 218 927 bp, G+C 含量 46.5%。序列拼接后包含 1 条染色体和 1 个质粒,染色体和质粒大小分别为 3 192 165 bp 和 167 401 bp, G+C 含量分别为 46.62%和 44.63%。全基因组序列与核酸序列数据库比对结果显示,菌株 TC13 染色体和质粒均为 *E. acetylicum*, 序列相似度均大于 98.7%,因此该菌株被命名为 *E. acetylicum* TC13。基因组中包含 3 385 个 coding sequences (CDSs)和 150 个非编码 RNA,编码 3 341 个预测蛋白。CDSs 被分配到一个或多个功能类,非编码 RNA 包含 27 个 rRNA、69 个 tRNA 和 54 个 ncRNA (表 2)。基因组圈图显示,染色体和质粒均为环状基因组,每一个 CDS 所属的同源蛋白簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)、CDS、tRNA 及 rRNA 在基因组上均具有相应的位置(图 5)。

## 2.8 菌株 TC13 基因组功能注释

### 2.8.1 COG 数据库注释

COG 按照功能一共可以分为 25 类。将基因编码蛋白序列与 COG 数据库中蛋白序列进行比对,将其注释到某一 COG 分类中,可推测该序列的功能<sup>[11]</sup>。菌株 TC13 的染色体和质粒在 COG 数据库中分别得到 2 734 个和 77 个功能基因注释,分别占 CDS 的 84.62%和 50.00%。

表 2 菌株 TC13 全基因组的一般特征

Table 2 General characterization of the whole genome of strain TC13

Features	Chromosome	Plasmid 1
Size (bp)	3 192 165	167 401
G+C content (%)	46.62	44.63
tRNA	69	0
rRNA	27	0
ncRNA	54	0
Total number of CDSs	3 231	154
CDSs with NR number assignments	3 198	143
CDSs with COG number assignments	2 734	77
CDSs with GO assignments	2 271	64
CDSs with KEGG pathway	1 656	40
CDSs with TCDB assignments	637	24

注释结果显示(图 6):有 785 个未知功能基因,转录相关基因得到了最多注释量,达到 207 个;其次在氨基酸的转运和代谢、碳水化合物的运输和代谢、无机离子的运输和代谢、细胞壁/膜/被膜的生物合成、信号转导机制等过程具有较高的基因注释量,分别获得 187、178、173、163 和 139 个,辅证菌株 TC13 在转运和生物膜形成中可能具有较强表达,同时防御机制注释量为 70 个,表明菌株 TC13 对抵抗外界环境胁迫可能具有一定潜力。

### 2.8.2 KEGG 数据库注释

蛋白编码基因 KEGG ortholog (KO)及 Pathway 注释主要采用 KEGG 的 KAAS 自动化注释系统完成。菌株 TC13 的染色体和质粒分别有 1 656 和 40 个基因在 KEGG 数据库中被注释到各个代谢通路(图 7)。菌株染色体和质粒的功能注释表现出明显差异。整体代谢通路主要分布于蛋白质家族参与过程,包括遗传信息处理、信号传导和细胞代谢过程,其次集中在碳水化合物代谢、氨基酸代谢及膜输送转运过程。



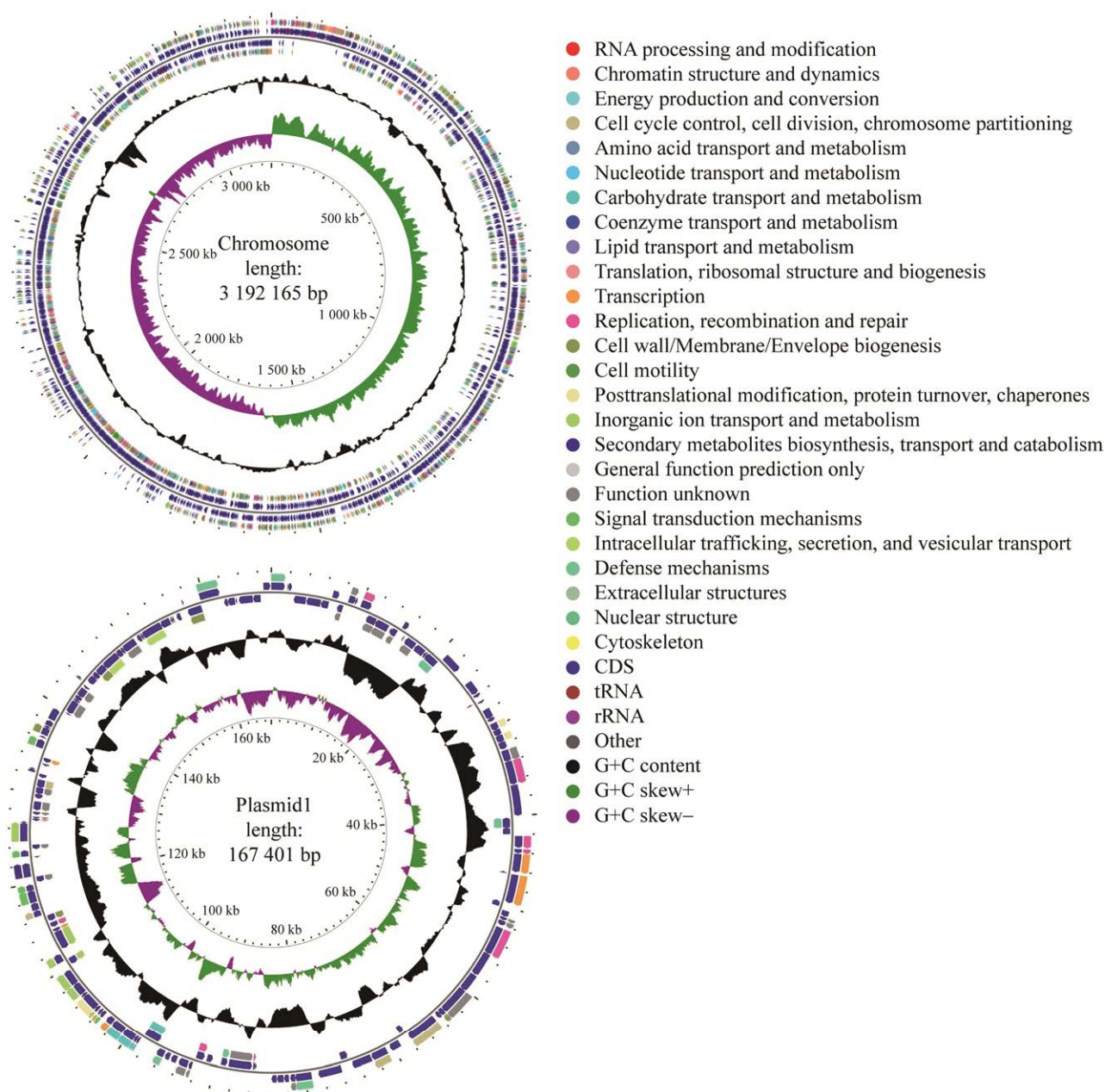


图5 TC13 菌株基因组圈图 从内到外, 圈1: 刻度, 圈2: G+C skew, 圈3: G+C 含量, 圈4和圈7: 每一个 CDS 所属的 COG, 圈5和圈6: CDS、tRNA 及 rRNA 在基因组上的位置

Figure 5 Circular genome map of strain TC13. From the inside to the outside, circle 1: The scale, circle 2: G+C skew, circle 3: Represents the G+C content, circle 4 and circle 7: The COG where each CDS belongs, circle 5 and circle 6: The position of CDS, tRNA and rRNA on the genome.

同时得到 242 个整体环境信息处理功能注释, 体现在膜输送转运和信号转导。膜输送转运主要集中于 ABC 转运体、磷酸转移酶系统、细菌

分泌系统, 信号转导主要集中于双组分系统和 HIF-1 信号通路。另外, 在人类疾病方面得到注释的基因较少, 主要是抗菌药物抗性。

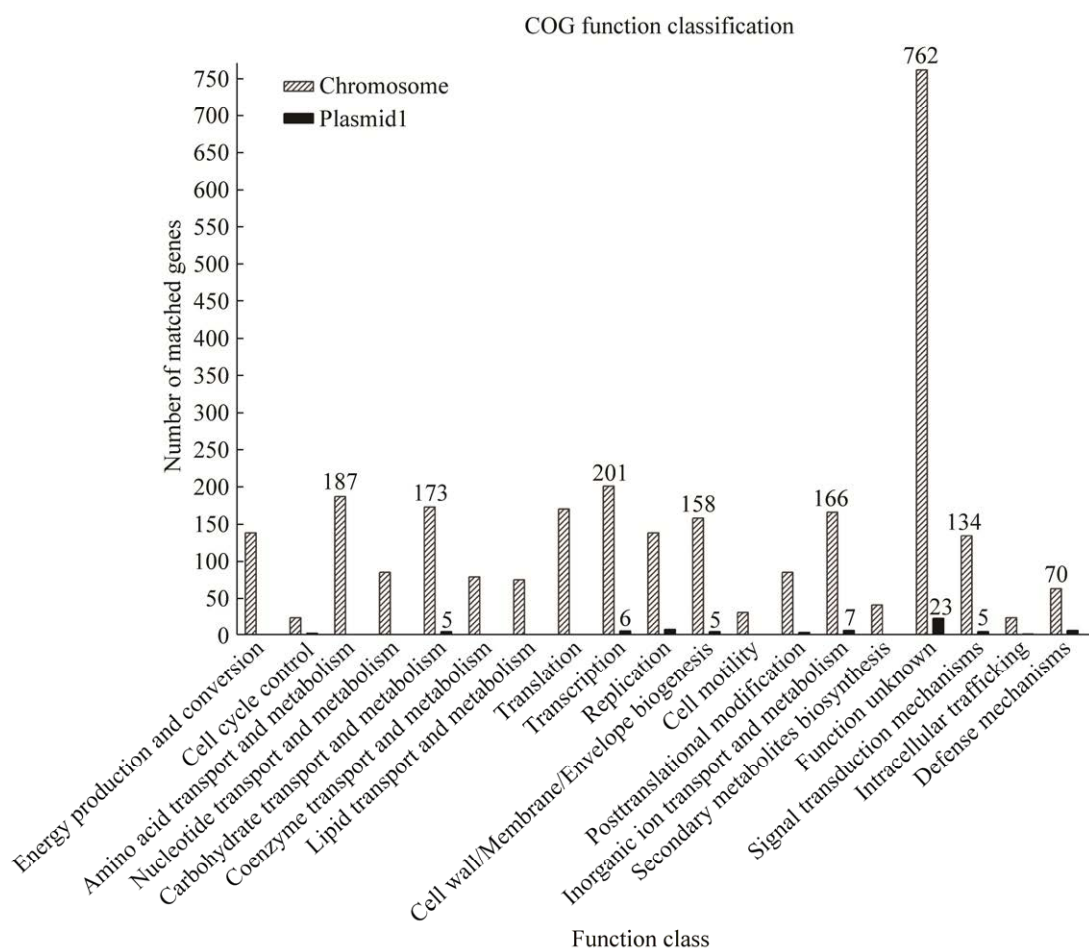


图 6 菌株 TC13 COG 分类统计

Figure 6 Classification statistics of strain TC13 of the COG.

### 2.8.3 菌株 TC13 耐 Cd(II)相关基因注释

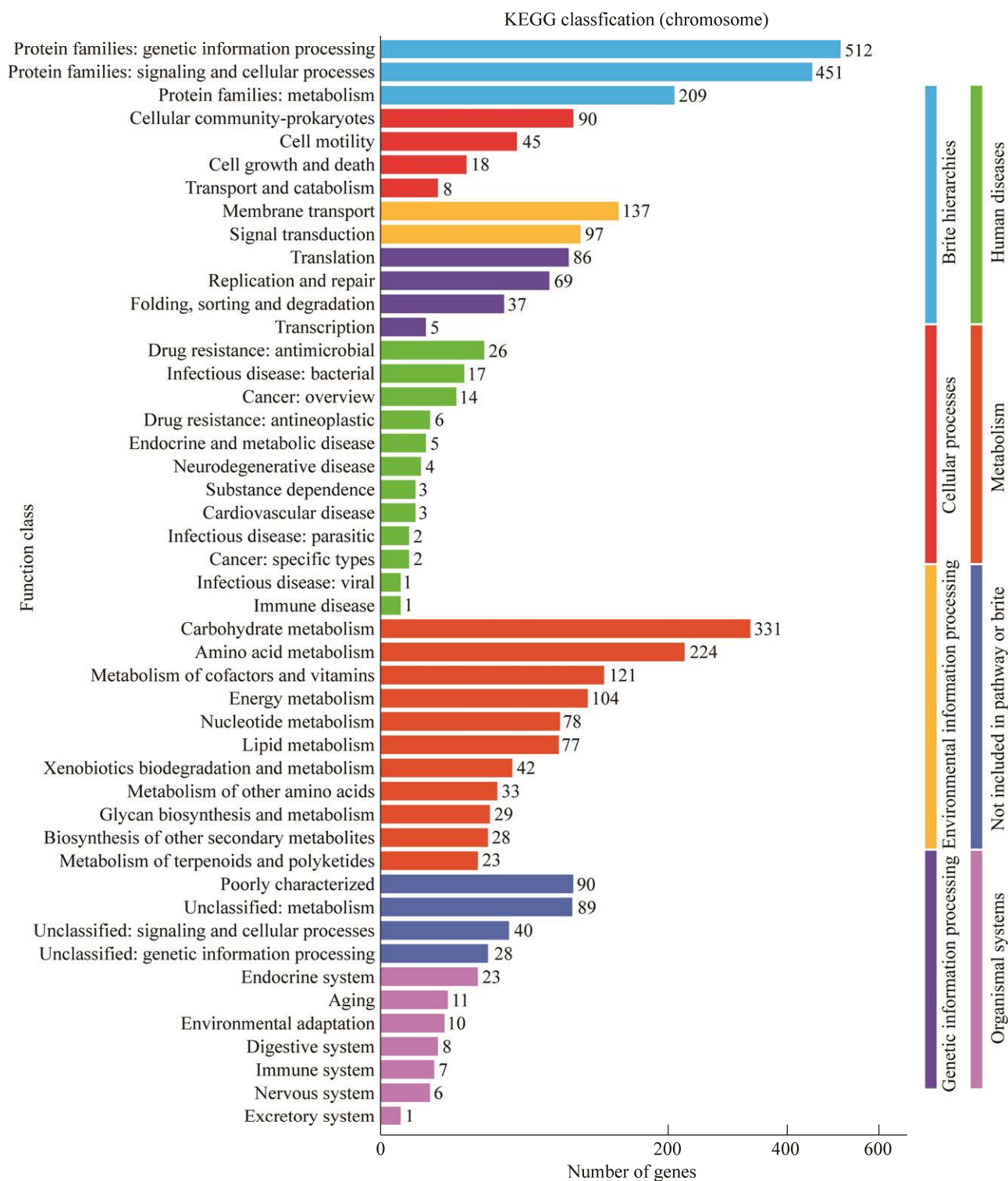
菌株 TC13 在 Cd(II)吸收、外排和结合等相关蛋白基因中得到注释。包括钴锌镉转运蛋白编码基因(*czcd*)、Mn(II)转运体编码基因(*zupr*)、Zn(II)转运体编码基因(*mntabc* 和 *mnth*)；耐药结瘤分裂(the resistance-nodulation-division)超家族、ATP 结合(the ATP-binding cassette)家族、多药和毒素外排(multidrug and toxin extrusion)家族、小多药耐药(small multidrug resistance)家族和主要促进超家族(major facilitator superfamily)有关基因被注释。同时，在染色体和质粒上均存在 Cd 系统中的外排蛋白编码基因

(*cada*、*cadc*)，可与 Cd(II)结合吸附的胞外多糖、谷胱甘肽相关编码基因也被发现(表 3)。

### 2.9 菌株 TC13 对小麦籽粒萌发长势的影响

实验表明，小麦籽粒萌发率及生长长势存在差异(图 8A)。不同处理下，籽粒萌发率为 72.3%–86.7% (图 8B)，Cd 处理组显著低于其他处理组，B 处理组、CdB 处理组显著高于对照处理组；籽粒芽和根长势在各处理组之间存在显著差异(图 8C)，不同处理下籽粒芽长和根长势变化趋势一致，表现为 CK 组和 B 处理组组间长势无显著差异但显著高于 CdB 处理组和 Cd 处理组，同时 CdB 处理组长势显著高于 Cd 处理组。

A



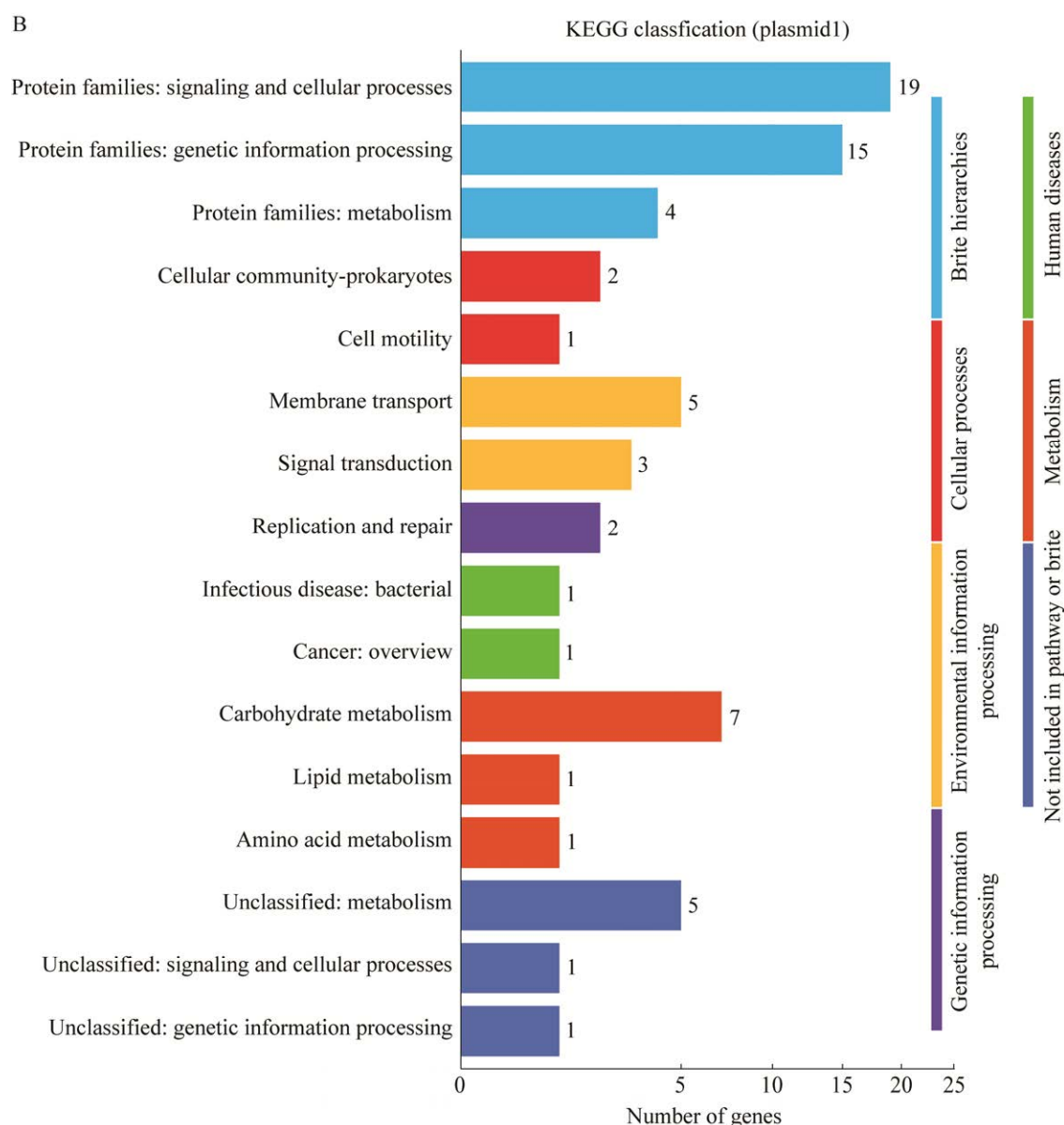


图 7 菌株 TC13 KEGG 功能注释图

Figure 7 Annotated diagram of the KEGG function of the strain TC13.

### 3 讨论

*Exiguobacterium* sp. 是一个高度多样化的群体, 可以从各种工业废弃物、重金属矿产等污染堆积区被分离出来<sup>[18]</sup>。本研究的 *E. acetylicum* TC13 也在相似的环境中被发现。其经过二代、三代测序拼接组装, 得到 1 个染色体和 1 个环状

质粒基因组, 基因组大小为 3.35 Mb, G+C 含量为 46.62%, 包含 3 385 个基因, 编码 3 341 个预测蛋白。NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/33986/>) 查询发现 53 株微小杆菌上传 262 条基因组信息, 包括 complete genome、scaffold 和 contig, 其中 *E. acetylicum* 基因组 7 条, 基因组大小为 3.1–3.4 Mb, G+C 含量为



表 3 菌株 TC13 耐 Cd(II)相关基因注释

Table 3 Annotation of genes associated with Cd(II) resistance of strain TC13

基因 Gene	蛋白家族 Protein family	功能 Function
<i>czcd</i>	P-type ATPase	Cd(II) uptake proteins, cadmium, cobalt and zinc/H(+)-K(+) antiporter
<i>mnta</i>	ABC family	Cd(II) uptake protein, metal ABC transporter substrate-binding protein
<i>mntb</i>	ABC family	
<i>mntc</i>	ABC family	
<i>mntb</i>	ABC family	
<i>zupt</i>	ZIP family	Cd(II) uptake protein
<i>glutathione</i>		Cd(II) binding proteins
<i>zura</i>	ABC family	Cd(II) binding proteins, metal ABC transporter ATP-binding protein
<i>cada</i>	P-type ATPase	Cd(II) efflux proteins, probable cadmium-transporting ATPase
<i>cadc</i>	ArsR/SmtB family	Cd(II) efflux proteins, metalloregulator ArsR/SmtB family transcription factor
<i>czcr</i>		Response regulator transcription factor of CzcD
<i>znua</i>	ABC family	Zinc uptake system ATP-binding protein
<i>yiso</i>	MATE efflux family	Uncharacterized transporter
<i>dinf</i>	MATE efflux family	DNA damage-inducible protein
<i>mepa</i>	MATE efflux family	Multidrug export protein
<i>yfmo</i>	MFS family	Multidrug efflux protein
<i>blt</i>	MFS family	Multidrug resistance protein
<i>bmr</i>	MFS family	Multidrug resistance protein
<i>swrc</i>	RND efflux family	Acriflavin resistance protein
<i>gdnc</i>	SMR efflux family	Multidrug resistance protein
<i>gdnd</i>	SMR efflux family	Multidrug resistance protein

46.5%–47.0%，包含 3 215–3 553 个基因，编码 3 147–3 433 个预测蛋白。菌株 TC13 与 *E. acetylicum* 在基因组大小、G+C 含量、基因和蛋白质编码基因数量上都是相似的。在基因层面佐证菌株 TC13 与 *E. acetylicum* 具有亲缘关系。

本研究发现菌株在 2.3 中描述的形态表征与 Selvakumar 等对 *E. acetylicum* 1P 的描述相似，同时菌株 1P 具有多种促生特性，包括磷酸溶解、IAA、铁载体和氰化氢(氢氰酸)的产生<sup>[19]</sup>，意味着菌株 TC13 或许存在相似的功能。在菌株 TC13 基因注释中发现 2 条萜烯簇，表明菌株 TC13 可能合成包括不止一种类别的萜烯。其中一条萜烯簇与嗜盐芽孢杆菌 DSM 2266 代谢产物类胡萝卜素的合成基因簇相似性为 78%<sup>[20]</sup>，该簇包括编码番茄红素合成所需的番茄红素去

饱和酶家族蛋白编码基因(*crtN*、*crtNC* 和 *crtNB*)、番茄红素合酶家族蛋白编码基因(*psy*)、糖基转移酶II家族蛋白编码基因(*crtQ*)及 I 类 SAM 依赖性甲基转移酶编码基因(*nods*)基因，由此推测菌株 TC13 能合成番茄红素；另一条萜烯簇与海云台副球菌代谢产物(2R,3S,3'S)-2 虾青素的合成基因簇相似性为 53%<sup>[21]</sup>，表明存在其合成的部分基因，由此推测菌株 TC13 可能合成虾青素。番茄红素和虾青素均为红色类胡萝卜素，菌株 TC13 随着培养时间的增长，合成色素相关的代谢产物使得菌株具备颜色变化特征，由乳白色渐变为橙色；但类胡萝卜素稳定性差，对光、热、氧敏感，随着光、热对培养菌株的刺激，菌株发生传代退化，色素分解，出现褪色现象。同时发现菌株 TC13 与 *Exiguobacterium sibiricum*

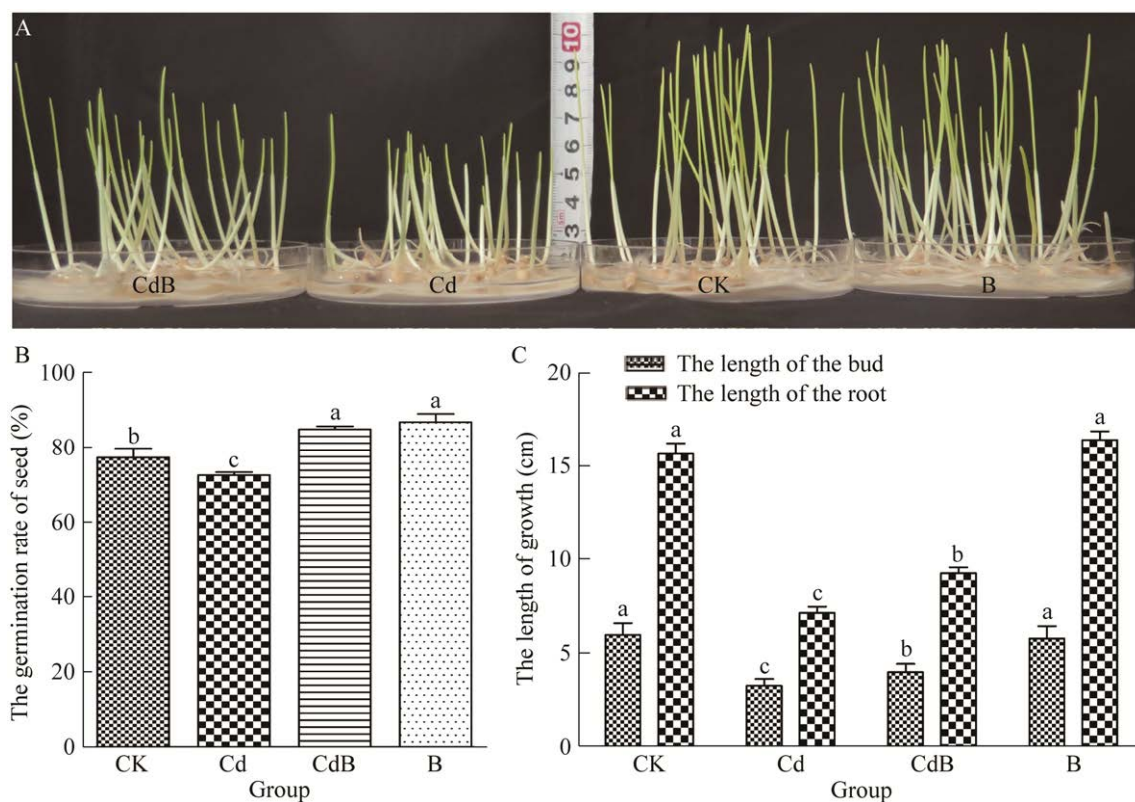


图8 菌株 TC13 对 Cd(II)胁迫下小麦籽粒萌发及长势的影响 A: 不同处理下籽粒生长长势. B: 不同处理下籽粒萌发率. C: 不同处理下籽粒芽长和根长. 不同小写字母代表显著性差异( $P<0.05$ )

Figure 8 Effect of strain TC13 on germination and growth of wheat grains under cadmium stress. A: Growth of grains under different treatments. B: The germination rate of seed under different treatments. C: The length of bud and root under different treatments. The different lowercase letters represent significant differences ( $P<0.05$ ).

一样存在产孢反应调节因子关键基因 *spo0a*, 该基因可在芽孢杆菌中调控 100 多个基因, 并且与芽孢杆菌属 Bmar 蛋白的相似性为 72.46%<sup>[22]</sup>。另外, 编码产孢蛋白的基因 *spo0m*、*spovs*, 以及激活 *spo0a* 的磷酸化串联基因 *kinb* 和反应调节因子基因 *Spo0f* 也存在, 但未发现枯草芽孢杆菌产孢的经典操纵子基因(*spoIIa* 和 *spoIIg*), 但存在产孢操纵子编码基因(*spoIIIe*), 由此推测菌株 TC13 具备产孢特性。

SEM 和 TEM 观察发现, 菌株 TC13 与 *E. acetylicum* strain S01 表观相似, 均表现为短杆状, 未观察到鞭毛<sup>[23]</sup>。但菌株 TC13 相较于菌株

S01 能观察到细胞表面颗粒绒毛, 而菌株 S01 表面光滑, 这或许是由于观察条件的不一致。基因注释发现, 菌株 TC13 存在鞭毛合成及运动有关的完整基因(*flg*、*flgC*、*flgB*、*flgI*、*flgK*、*flr*、*fliQ*、*fliP*、*fliZ*、*fliY*、*fliM*、*fliL*、*fliI*、*fliG*、*fliF*、*fliE*、*fliS*、*fliD* 和 *fliW*), 表明菌株 TC13 是一株具有鞭毛可以自由运动的菌株, 而在 SEM 下未观察到鞭毛, 这不是个例, 微小外杆菌(*Exiguobacterium chiriqhucha*) RW2 同样通过基因组注释并预测到一个完整的鞭毛生物合成途径(包括 *fih*、*fli* 和 *fig* 基因操纵子), 但未观测到鞭毛<sup>[24]</sup>, 这或许是由于菌株传代过程发生无义突变所致。



菌株 TC13 对 60 mg/L 浓度以下的 Cd(II)有一定的耐受性,目前文献报道耐镉细菌对镉的耐受范围差异较大,大多数为 50–300 mg/L (CdCl<sub>2</sub>),克雷伯氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)最高耐受浓度高达 2 000 mg/L,这可能与其环境适应能力以及属间的差异有关<sup>[8,11,17]</sup>。耐镉细菌的基因组通常包含一系列抵抗或耐受镉离子毒性的基因,与其他耐镉细菌相比,在 *E. acetylicum* 基因组中同样发现了编码许多同源蛋白的基因,并且可能与重金属的抗性有关。基因注释发现存在 Cd(II)吸收相关转运体表达基因,包括钴锌镉转运蛋白(*czcd*)、Zn(II)转运体(*zupt*)和 Mn(II)转运体(*mntabc*, *mntb*)的表达基因,这些转运体被证实可以识别与 Mn(II)、Zn(II)具有相似化学性质的 Cd(II),取代低特异性的 Mn(II)和 Zn(II)进入细胞<sup>[25]</sup>。同时高特异性 Zn(II)易位器表达基因 *znua* 和转录阻遏因子 *czcr* 也存在,而高特异性 Zn(II)易位器 ZnuABC 可增加 Zn(II)的摄取以减少 Cd(II)的吸收<sup>[26]</sup>,且 *czcr* 可以传递胞外 Cd(II)信号,发生转录阻遏减少 Cd(II)的吸收<sup>[27]</sup>。注释未发现谷胱甘肽(GSH)合成关键基因,但发现了谷胱甘肽还原酶、过氧化酶和谷胱甘肽转运系统渗透酶基因,推测菌株 TC13 能产生 GSH,并利用谷胱甘肽提供硫源与 Cd(II)结合,产生 Cd-(SG)<sub>2</sub> 复合物以减少 Cd(II)的细胞毒性<sup>[28]</sup>。膜蛋白家族被确定为 Cd(II)的外排蛋白已被大量报道,与李斯特氏菌属(*Listeria*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)类似,*E. acetylicum* 染色体和质粒上均发现完整的 *cad* 外排系统,由基因 *cada* 和 *cadc* 组成,*cada* 和 *cadc* 分别为 P-type ATPase 和 ArsR/SmtB 家族的负调控转录调控因子,ArsR/SmtB 家族金属感应蛋白在金属外排、转运蛋白、还原酶和金属隔离蛋白的表达中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。菌株 TC13 中与 RND、MATE、SMR 和 MFS 家族有关的膜蛋白多耐药外排蛋

白基因被注释,推测菌株 TC13 以相似的方式减少对 Cd(II)的摄取,以应对 Cd(II)毒性。

另外,菌株 TC13 基因注释发现在调控基因 *hrca*、*ctsr* 下存在 2 条完整的热激伴侣机制:*hrca* 编码的调控因子调控下的 GrpE-DnaK-DnaJ-GroEL 机制,DnaK 通过与 DnaJ 和 GrpE 结合来实现其伴侣功能;*ctsr* 编码的调控因子调控下的 CtsR-McsA-B-ClpC-RadR-YacY 机制,这与大多数的细菌和真核生物相同<sup>[30]</sup>。同时,编码小家族热激伴侣蛋白基因 *hsp33*、其他热激伴侣蛋白基因 *htpg* 及 3 个冷激蛋白基因 *cspa*、*cspd* 和 *cspla* 也存在。菌株 TC13 受 Cd(II)刺激时,细胞内调控因子关键基因 *hrca*、*ctsr* 上调操纵子相关基因表达并参与蛋白质折叠、易位和组装,防止蛋白质变性,同时消除已失去作用的可能危及细胞活力的蛋白质,间接保护细胞<sup>[31–32]</sup>。注释也发现菌株 TC13 存在编码超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)的相关基因,包括超氧化物歧化酶基因(*soda*)、调控过氧化物酶关键基因(*perr*、*spx*),以及分别受 *perr* 调控的烷基过氧化氢还原酶亚基(*ahpc* 和 *ahpf*)。SOD 在抗氧化应激扮演先锋角色,同 CAT、POD 一起清除有毒的自由基,保护细胞抵抗氧化压力。综上所述,推测菌株 TC13 耐 Cd(II)机制主要是利用金属外排系统减少 Cd(II)吸收,与次生代谢产物结合,同时伴随产生应激反应,增加对 Cd(II)的耐受性。

实验及基因组信息表明菌株 TC13 对 Cd(II)具有耐受性,在此基础上开展小麦籽粒萌发实验,结果表明菌株 TC13 对 Cd(II)抑制下籽粒萌发、胚芽和根胚长势具有促进作用,这与 Selvakumar 等<sup>[19]</sup>对 *E. acetylicum* 1P 因溶磷、载铁特性促进小麦生长的描述一致,表明菌株 TC13 具备耐 Cd(II)特性,同时具备促生作用。

## 4 结论

本研究从四川省德阳市天池乡受污染矿产区分离获得一株耐镉菌株 *E. acetylicum* TC13, 通过 SEM、TEM 观察, 发现菌株 TC13 是一株橙色革兰氏阳性细菌, 但因外在培养条件会发生褪色现象。经过二代、三代测序拼接组装, 得到 1 个染色体和 1 个环状质粒基因组, 基因组大小为 3.35 Mb, G+C 含量为 46.62%, 包含 3 385 个基因, 编码 3 341 个预测蛋白。同时菌株 TC13 在 50 mg/L Cd(II) 浓度下, 仍然具有较高耐受性。菌株 TC13 全基因组分析获得 Cd(II) 吸收、外排、结合、应激反应等过程有关的基因注释, 推测菌株 TC13 通过减少 Cd(II) 吸收、利用金属外排系统作用、与次生代谢产物结合, 同时伴随产生应激反应, 增加对 Cd(II) 的耐受性。同时发现菌株对 Cd(II) 胁迫下的小麦籽粒萌发及长势具有促生作用。因此, 菌株 TC13 全基因组测序丰富了 *E. acetylicum* 基因组数据库, 其具有耐 Cd(II) 特性的同时对小麦籽粒的生长长势具备促生效应, 能够为环境重金属修复或提升污染土壤作物品质提供可靠的候选菌种。

## REFERENCES

- [1] AHMAD JU, GONI MA. Heavy metal contamination in water, soil, and vegetables of the industrial areas in Dhaka, Bangladesh[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2010, 166(1): 347-357.
- [2] XUE C, QI PS, LI MS, LIU YZ. Characterization and sorptivity of the *Plesiomonas shigelloides* strain and its potential use to remove Cd<sup>2+</sup> from wastewater[J]. Water, 2016, 8(6): 241.
- [3] ANETOR JI. Rising environmental cadmium levels in developing countries: threat to genome stability and health[J]. Journal of Environmental & Analytical Toxicology, 2012, 2(4):1000140.
- [4] YU H, WANG JL, FANG W, YUAN JG, YANG ZG. Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe cultivars of rice[J]. Science of the Total Environment, 2006, 370(2/3): 302-309.
- [5] THAKARE M, SARMA H, DATAR S, ROY A, PRASAD R. Understanding the holistic approach to plant-microbe remediation technologies for removing heavy metals and radionuclides from soil[J]. Current Research in Biotechnology, 2021, 3: 84-98.
- [6] CHEN L, HE LY, WANG Q, SHENG X. Synergistic effects of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and immobilizers on the growth and heavy metal accumulation of edible tissues of hot pepper[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 312: 123-131.
- [7] MALLICK I, BHATTACHARYYA C, MUKHERJI S, DEY D, SARKAR SC, MUKHOPADHYAY UK, GHOSH A. Effective rhizoinoculation and biofilm formation by arsenic immobilizing halophilic plant growth promoting bacteria (PGPB) isolated from mangrove rhizosphere: a step towards arsenic rhizoremediation[J]. Science of the Total Environment, 2018, 610/611: 1239-1250.
- [8] LI Y, PANG HD, HE LY, WANG Q, SHENG XF. Cd immobilization and reduced tissue Cd accumulation of rice (*Oryza sativa* wuyun-23) in the presence of heavy metal-resistant bacteria[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 138: 56-63.
- [9] ZAETS I, KRAMAREV S, KOZYROVSKA N. Inoculation with a bacterial consortium alleviates the effect of cadmium overdose in soybean plants[J]. Central European Journal of Biology, 2010, 5(4): 481-490.
- [10] VISIOLI G, VAMERALI T, MATTAROZZI M, DRAMIS L, SANANGELANTONI AM. Combined endophytic inoculants enhance nickel phytoextraction from serpentine soil in the hyperaccumulator *Noccaea caerulea*[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 638.
- [11] WANG XH, LUO WW, WANG Q, HE LY, SHENG XF. Metal(loid)-resistant bacteria reduce wheat Cd and As uptake in metal (loid)-contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2018, 241: 529-539.
- [12] SIRIPAN O, THAMCHAIPENET A, SURAT W. Enhancement of the efficiency of Cd phytoextraction using bacterial endophytes isolated from *Chromolaena odorata*, a Cd hyperaccumulator[J]. International Journal of Phytoremediation, 2018, 20(11): 1096-1105.
- [13] JINENDIRAN S, DAHMS HU, KUMAR BSD, PONNUSAMY VK, SIVAKUMAR N. Diapolycopenedioic-acid-diglucosyl ester and keto-myxocoxanthin glucoside ester: novel carotenoids derived from *Exiguobacterium acetylicum* S01 and evaluation of their anticancer and anti-inflammatory activities[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 103: 104149.

- [14] OKEKE BC. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(12): 1571-1579.
- [15] ABBAS SZ, RAFATULLAH M, HOSSAIN K, ISMAIL N, TAJARUDIN HA, KHALIL HPSA. A review on mechanism and future perspectives of cadmium-resistant bacteria[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2018, 15(1): 243-262.
- [16] XIA X, WU S, ZHOU Z, WANG G. Microbial Cd(II) and Cr(VI) resistance mechanisms and application in bioremediation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 401: 123685.
- [17] RIAZ M, KAMRAN M, RIZWAN M, ALI S, PARVEEN A, MALIK Z, WANG XR. Cadmium uptake and translocation: selenium and silicon roles in Cd detoxification for the production of low Cd crops: a critical review[J]. Chemosphere, 2021, 273: 129690.
- [18] KASANA RC, PANDEY CB. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(1): 141-156.
- [19] SELVAKUMAR G, KUNDU S, JOSHI P, NAZIM S, GUPTA AD, GUPTA HS. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(1): 50-56.
- [20] KÖCHER S, BREITENBACH J, MÜLLER V, SANDMANN G. Structure, function and biosynthesis of carotenoids in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*[J]. Archives of Microbiology, 2009, 191(2): 95-104.
- [21] LEE JH, KIM YT. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*[J]. Gene, 2006, 370: 86-95.
- [22] RODRIGUES DF, IVANOVA N, HE ZL, HUEBNER M, ZHOU JZ, TIEDJE JM. Architecture of thermal adaptation in an *Exiguobacterium sibiricum* strain isolated from 3 million years old permafrost: a genome and transcriptome approach[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 547.
- [23] JINENDIRAN S, BOOPATHI S, SIVAKUMAR N, SELVAKUMAR G. Functional characterization of probiotic potential of novel pigmented bacterial strains for aquaculture applications[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 11(1): 186-197.
- [24] WHITE RA 3rd, SOLES SA, GAVELIS G, GOSSELIN E, SLATER GF, LIM DSS, LEANDER B, SUTTLE CA. The complete genome and physiological analysis of the eurythermal firmicute *Exiguobacterium chiriqhucha* strain RW2 isolated from a freshwater microbialite, widely adaptable to broad thermal, pH, and salinity ranges[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3189.
- [25] AMMENDOLA S, CERASI M, BATTISTONI A. Deregulation of transition metals homeostasis is a key feature of cadmium toxicity in *Salmonella*[J]. BioMetals, 2014, 27(4): 703-714.
- [26] MIKHAYLINA A, KSIBE AZ, SCANLAN DJ, BLINDAUER CA. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons[J]. Biochemical Society Transactions, 2018, 46(4): 983-1001.
- [27] MERGEAY M, NIES D, SCHLEGEL HG, GERITS J, CHARLES P, GIJSEGM FV. *Alcaligenes eutrophus* CH<sub>34</sub> is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 162(1): 328-334.
- [28] GALLARDO-BENAVENTE C, CARRIÓN O, TODD JD, PIERETTI JC, SEABRA AB, DURÁN N, RUBILAR O, PÉREZ-DONOSO JM, QUIROZ A. Biosynthesis of CdS quantum dots mediated by volatile sulfur compounds released by antarctic *Pseudomonas fragi*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1866.
- [29] 王杏, 王革娇, 史凯祥. 微生物镉解毒机制及微生物-植物互作修复研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1666-1680.
- WANG X, WANG GJ, SHI KX. Research progress in microbial detoxification of cadmium and bioremediation based on microorganism-plant interaction[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1666-1680 (in Chinese).
- [30] PETITJEAN C, MOREIRA D, LÓPEZ-GARCÍA P, BROCHIER-ARMANET C. Horizontal gene transfer of a chloroplast DnaJ-Fer protein to Thaumarchaeota and the evolutionary history of the DnaK chaperone system in Archaea[J]. BMC Evolutionary Biology, 2012, 12: 226.
- [31] MICHAŁ AZ, MACARIO AJL, BARBARA L. Functional similarities and differences of an archaeal Hsp70 (DnaK) stress protein compared with its homologue from the bacterium *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 336(2): 539-549.
- [32] MATARREDONA L, CAMACHO M, ZAFRILLA B, BONETE MJ, ESCLAPEZ J. The role of stress proteins in haloarchaea and their adaptive response to environmental shifts[J]. Biomolecules, 2020, 10(10): 1390.