

## 外源刺激剂强化芽孢杆菌高效修复Cr(VI)污染水体

张亚珍, 向媛羚, 张庆明, 康茜琳, 张恒星, 张伟, 韩颖

### 引用本文:

张亚珍, 向媛羚, 张庆明, 康茜琳, 张恒星, 张伟, 韩颖. 外源刺激剂强化芽孢杆菌高效修复Cr(VI)污染水体[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(5): 1100-1113.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0992>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 生物炭基硫酸盐还原菌(SRB)对Cr(VI)的吸附效应及作用机制

朱晓丽, 李雪, 寇志健, 王军强, 尚小清, 陈超

农业环境科学学报. 2021, 40(4): 866-875 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1156>

#### 生物炭固定化微生物对U、Cd污染土壤的原位钝化修复

戚鑫, 陈晓明, 肖诗琦, 张祥辉, 田甲, 勾佳磊, 卓驰夫, 罗学刚

农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1683-1689 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0233>

#### DDTs污染农田土壤的强化微生物修复研究

王晓旭, 孙丽娜, 郑学昊, 吴昊, 王辉, 刘春跃

农业环境科学学报. 2018, 37(1): 72-78 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0882>

#### 微生物固定化生物炭对水体铵态氮去除效果的研究

吴梦莉, 李洁, 智燕彩, 李刚, 赖欣, 居学海, 张贵龙

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1071-1078 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1368>

#### 极端嗜热功能菌筛选及其促进堆肥腐熟效果研究

王玉, 张晶, 曹云, 吴华山, 黄红英, 刘爱民

农业环境科学学报. 2020, 39(7): 1633-1642 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0007>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张亚珍, 向媛玲, 张庆明, 等. 外源刺激剂强化芽孢杆菌高效修复 Cr(VI) 污染水体[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(5): 1100–1113.

ZHANG Y Z, XIANG Y L, ZHANG Q M, et al. Exogenous stimulants enhance the efficacy of remediation of Cr(VI)-contaminated water by *Bacillus* sp.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2024, 43(5): 1100–1113.



开放科学 OSID

# 外源刺激剂强化芽孢杆菌高效修复 Cr(VI) 污染水体

张亚珍<sup>1</sup>, 向媛玲<sup>1</sup>, 张庆明<sup>2</sup>, 康茜琳<sup>1</sup>, 张恒星<sup>1</sup>, 张伟<sup>3</sup>, 韩颖<sup>1\*</sup>

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 2. 西南科技大学应用技术学院, 四川 绵阳 621010; 3. 西南科技大学分析测试中心, 四川 绵阳 621010)

**摘要:** 目前, 利用微生物修复六价铬[Cr(VI)]污染的土壤和水体已经在实验室及场地大量应用, 但由于土著微生物的竞争及场地的寡营养条件, 导致外源铬(Cr)高效还原微生物定殖困难。鉴于此, 本研究从成本低廉且无二次污染的氮源型/碳源型/矿物型/离子型的微生物刺激剂筛选出发, 探讨了不同刺激剂添加方式(非包埋型和包埋型)对抗铬芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)高效还原Cr(VI)的影响, 并采用扫描电子显微镜-能谱(SEM-EDS)对芽孢杆菌表面进行表征。结果表明, 甘蔗粉(碳源型)、豆粕粉(氮源型)、钙离子[Ca(II), 离子型]、蒙脱石(矿物型)这四种刺激剂的添加显著增加了芽孢杆菌对Cr(VI)的还原效率, 进一步利用单因素多水平试验确定了它们的最佳投加量分别为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 在第8天时与裸菌相比, 分别添加这4种刺激剂的芽孢杆菌对Cr(VI)的还原率分别提高了17.48、15.56、11.70、18.84个百分点。在单因素试验的基础上, 挑选2个效果最佳的刺激剂甘蔗粉和蒙脱石, 利用响应曲面法建立了混合型刺激剂(甘蔗粉+蒙脱石)与菌的最佳投加量, 结果显示甘蔗粉投加量为 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蒙脱石投加量为 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、菌剂投加量为0.3%(V/V)时, 培养8 d后, 与裸菌相比, 添加混合刺激剂的芽孢杆菌对Cr(VI)还原率增加了32.53个百分点, 显著高于单一非混合刺激组。考虑到刺激剂直接加入环境亦会被土著微生物利用, 导致对外源铬还原微生物刺激作用的长效性差, 本研究还探究了包埋型缓释刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)的长效刺激作用, 结果发现, 在包埋型刺激剂的辅助下, 芽孢杆菌对Cr(VI)的还原能力随着时间延长而不断增加, 其Cr(VI)还原率分别从86.08%(第2天)增加到97.09%(第28天), 添加了非包埋型混合刺激剂的菌从86.92%(第2天)下降到75.93%(第28天)。SEM观察修复28 d的菌, 发现未加任何刺激剂的裸菌出现严重皱缩, 部分断裂, 形态结构不完整; 添加非包埋混合刺激剂的菌出现轻微皱缩, 点状断裂, 形态结构较为完整; 而添加包埋型刺激剂的菌光滑, 形态结构完整, 表面有绒毛状产物, EDS显示绒毛状产物O和Cr含量相对于其他元素较多, 包埋型刺激剂提升了菌细胞表面参与的铬固定, 降低了铬对细菌细胞的毒性。研究表明, 混合刺激剂还原效果优于单一非混合刺激组, 确定最佳投加量分别为甘蔗粉( $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、蒙脱石( $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和菌剂(0.3%)。利用非包埋型刺激剂有利于短期内快速提升菌对Cr(VI)还原, 而包埋型刺激剂使菌还原Cr(VI)具有长效性并有效地降低了Cr(VI)毒性。

**关键词:** Cr(VI)污染; 非包埋型刺激剂; 包埋型刺激剂; 芽孢杆菌; Cr(VI)还原效率

中图分类号: X52; X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2024)05-1100-14 doi:10.11654/jaes.2023-0992

## Exogenous stimulants enhance the efficacy of remediation of Cr(VI)-contaminated water by *Bacillus* sp.

ZHANG Yazhen<sup>1</sup>, XIANG Yuanling<sup>1</sup>, ZHANG Qingming<sup>2</sup>, KANG Qianlin<sup>1</sup>, ZHANG Hengxing<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, HAN Ying<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 2. School of Applied Technology, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 3. Analysis and Test Center of Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

**Abstract:** Microbial remediation of hexavalent chromium Cr(VI) contamination in soil and water has been extensively studied to date in

收稿日期: 2023-11-23 录用日期: 2024-01-18

作者简介: 张亚珍(1999—), 女, 甘肃临夏人, 硕士研究生, 主要研究方向为水体重金属污染生态修复。E-mail: 2845828761@qq.com

\*通信作者: 韩颖 E-mail: 595749991@qq.com

基金项目: 国家科技重大专项(2019YFC1805900); 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1223)

**Project supported:** National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China (2019YFC1805900); Natural Science Foundation of Sichuan Province, China(2022NSFSC1223)

both laboratory and field settings. Challenges arise due to competition among indigenous microorganisms and the nutrient-deficient conditions of the sites, adversely affecting the colonization of exogenous chromium (Cr)-reducing microbes. To address this issue, this study embarked on screening low-cost and non-secondary pollution nitrogen / carbon / mineral / ion-based microbial stimulants. We investigated the impact of various stimulant application methods (non-embedded and embedded) on the efficacy of reduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. and we characterized the *Bacillus* sp. surface using scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). The results indicate that separate addition of sugarcane powder (carbon source), soybean meal (nitrogen source), calcium ion Ca(II) (ion type), and montmorillonite (mineral type) significantly increased the efficiency of *Bacillus* sp. to reduce Cr(VI). Further single-factor multi-level experiments determined their optimal dosages as  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. On the 8<sup>th</sup> day, compared to the bare bacteria, the addition of these four stimulants increased the reduction of Cr(VI) by 17.48, 15.56, 11.70, and 18.84 percent points, respectively. Building on the single-factor experiments, sugarcane powder and montmorillonite, the two most effective stimulants, were chosen for a response surface methodology to establish the optimal dosage of a combined stimulant (sugarcane powder + montmorillonite) with the bacteria. The results revealed an optimal dosage of  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  for sugarcane powder,  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  for montmorillonite, and 0.3% (V/V) for the bacterial agent. After 8 days of cultivation, compared to the bare bacteria, the addition of the combined stimulant increased the reduction of Cr(VI) by 32.53 percent points, which was significantly more than the reduction by the single stimulant groups. Considering that direct addition of stimulants into the environment can be utilized by indigenous microorganisms, resulting in poor long-term effectiveness for stimulating exogenous microbial chromium reduction, this study further explored the long-term stimulatory effect of embedded slow-release stimulants on the reduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. We found that with the assistance of embedded stimulants, the ability of *Bacillus* sp. to reduce Cr(VI) increased continuously over time, with Cr(VI) reduction levels rising from 86.08% (two days) to 97.09% (28 days). In contrast, for bacteria treated with non-embedded combined stimulants, the reduction levels decreased from 86.92% (two days) to 75.93% (28 days). SEM observations of bacteria after 28 days of remediation showed significant shrinkage, partial rupture, and incomplete morphological structure in bare bacteria without any stimulant. Bacteria treated with non-embedded combined stimulants exhibited slight shrinkage, punctate ruptures, and relatively complete morphological structures. In contrast, bacteria treated with embedded stimulants appeared smooth, with intact morphological structures and a fuzzy surface. EDS analysis revealed a higher content of O and Cr in the fuzzy structures compared with other elements, indicating that the embedded stimulants enhanced the fixation of Cr on bacterial cell surfaces, thus reducing the toxicity of Cr toward bacterial cells. In summary, this study shows that the reduction effect of mixed stimulant is better than that of single unmixed stimulant groups, and the optimal dosages are  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  for sugarcane powder,  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  for montmorillonite, and 0.3% for bactericide. The use of non-embedded stimulants is conducive to rapid improvement of the reduction of Cr(VI) by bacteria in the short term, while embedded stimulants provide bacteria with a more long-term capacity to reduce Cr(VI) and thus effectively reduce the toxicity of Cr(VI).

**Keywords:** Cr(VI) pollution; non-embedded stimulant; embedded stimulant; *Bacillus* sp.; Cr(VI) reduction efficiency

铬(Cr)在电镀、冶金、制革等行业中的广泛应用使其在环境中大量累积<sup>[1]</sup>,这些行业产生的废水、废渣中的铬主要以Cr(VI)和Cr(III)这两种较稳定的形式存在,据报道,含铬工业废水中通常含有 $50\sim 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Cr(VI),尽管处理和稀释可以降低其浓度,但仍然对环境和人类健康造成危害<sup>[2]</sup>。研究者们已经探索了多种将Cr(VI)转化为Cr(III)的方法,以最大程度地减少Cr(VI)污染,其中化学还原和离子交换法应用最多<sup>[3]</sup>,但这两种方法普遍存在成本高和二次污染问题<sup>[4]</sup>。以微生物为主的生物修复法因其环境友好及运行成本低而成为研究和应用的热点<sup>[5]</sup>,然而,当功能微生物单独在场地施用时,容易受到土著微生物的竞争和外界不利环境的影响,导致其存活率低、定殖效率差,从而降低其对污染物的处理效果<sup>[6]</sup>。因此,如何利用廉价的外源刺激剂增强微生物活性,

促使Cr(VI)得以高效还原,是亟待解决的技术问题。

生物刺激剂通过提供微生物生长所需的营养元素或改善其生长环境来强化微生物活性<sup>[7]</sup>,常见的生物刺激剂包括表面活性剂、营养底物和电子供体等<sup>[8]</sup>。它们通过激活和增强现有微生物群落的代谢活性和降解能力,加速有害物质的降解。许仲轩<sup>[9]</sup>研究发现表面活性剂通过提供离子和电子等方式,促进微生物的生长、新陈代谢进而增强对环境中重金属等有害物质的去除效率。营养底物是微生物机体生长、繁殖和完成各种生理活动所需的物质,外源添加氮源和碳源可以刺激微生物的生长和代谢<sup>[10]</sup>。其中氮源是构成菌体细胞物质和维持胞内氮化合物的主要物质,同时可以提供大量无机盐及生长因子,传统的氮源有氨基酸和硝酸盐等<sup>[11]</sup>。碳源是构成细胞的物质,为微生物提供生长发育所需能量,传统的碳源有蔗糖



和葡萄糖等。但传统碳源和氮源等生物刺激剂成本高,难以大规模应用。研究人员开发了一些低成本的碳源和氮源,包括农业废物<sup>[12]</sup>、天然纤维素<sup>[13]</sup>、生物降解的聚合物<sup>[14]</sup>。其中甘蔗粉是一种安全性高、成本低的可代替传统碳源的新型碳源<sup>[15]</sup>,它既能提供廉价的碳源又可以作为电子供体和穿梭体,加速微生物生长<sup>[16]</sup>。此外,矿物材料由于其表面积大和化学性质稳定等特点被广泛应用于重金属污染的防治,蒙脱石是常用的矿物材料,具有离子交换微观结构,能够在其表面形成生物膜,为重金属还原微生物提供保护场所<sup>[17]</sup>。尽管这些生物刺激剂能够有效促进微生物生长,但通常存在稳定性差、存活期短和持久性差等问题,这些因素限制了它们的广泛应用。

包埋法是将微生物菌体包埋在半透性的聚合物凝胶或膜内,小分子的底物和产物可以自由出入,而微生物却不会漏出的方法。包埋物通常由维持微生物生命周期的氮源、碳源、无机盐以及生长因子等与黏合剂结合形成的固定化材料组成<sup>[18]</sup>,这使得微生物具有更高的结构稳定性和更好的抗性,从而减少外部环境的影响。海藻酸钠通常用作包埋材料的壁材,因为其是由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸M和 $\alpha$ -L-古洛糖醛酸G嵌段组成的亲水多糖,这些糖链段的排列和比例为海藻酸钠提供了独特的化学物理性能,通过交联和表面接枝,对重金属具有较大的吸收和去除能力<sup>[19-20]</sup>。例如孙爽<sup>[21]</sup>使用海藻酸钠作为载体,以甘蔗粉生物炭为添加剂制备凝胶球,并成功用于Cr(VI)的还原,扫描电镜观察到凝胶球内部存在三维纤维网状结构,且对Cr(VI)的最大还原量达到了 $388.92 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,此试验以单一刺激剂包埋,其局限性较大,难以满足实际处理过程中复杂环境条件的需求。因此,以多种有机或无机载体组成的复合载体成为研究热点,实现各种载体材料的相互补充<sup>[22]</sup>,从而得到更有效的修复手段。

本研究以前期实验室从青海铬渣遗留场地分离的芽孢杆菌铬还原菌为研究对象,实验室前期研究发现该菌具有生长快、表面积大、对环境要求低等优势,且在铬胁迫下可以产生丰富的胞外分泌物,为Cr(III)的络合和沉淀提供大量阴离子基团,从而降低铬的毒性,但该菌属于异养微生物,在恶劣的环境条件下很难形成菌群,因此需要外源刺激剂的引入,以提供额外的营养物质,满足其生长和代谢需求<sup>[23]</sup>。鉴于此,本实验通过室内模拟Cr(VI)污染水环境,研究了成本低廉且无二次污染的氮源型/碳源型/矿物型/离子型微生物刺激剂,在非包埋与包埋条件下对芽孢杆菌

还原Cr(VI)的影响,为外源刺激剂增强微生物修复Cr(VI)污染水体的应用提供理论支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

供试菌剂:研究选取的抗铬芽孢杆菌(*Bacillus* sp.,保藏号:CCTCCAB2022416)是本实验室前期从青海省海西海北化工厂( $36^{\circ}55'42''\text{N}$ , $101^{\circ}18'18''\text{E}$ ,海拔2900 m)含铬废渣的土壤中筛选而来,现保存于武汉大学的中国典型培养物保藏中心。

供试刺激剂:本试验所用到的乳酸钠(纯度99%)、尿素(纯度100%)、豆粕粉、硫酸铜(纯度99%)、碳酸钙(纯度99%)、钙基蒙脱石(纯度95%)和海泡石(纯度99%)均购于绵阳益鑫商贸有限公司,甘蔗残渣购于四川省绵阳市农贸市场。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 试验设计

本研究比较了单一型刺激剂、非包埋型混合刺激剂以及包埋型混合刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响,以添加 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI)的LB培养基(酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )为纯对照,以只添加刺激剂的 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI) LB培养基为材料对照,以只添加芽孢杆菌的 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI) LB培养基为生物对照组。其中,单一型刺激剂的最佳添加量筛选试验采用了单因素多水平实验设计,采用单因素多水平试验和响应曲面法研究非包埋型混合刺激剂的最佳浓度配比,包埋型混合刺激剂采用凝胶包埋方法对最佳的非包埋型混合刺激剂进行了包埋处理,分别考察了不同类型刺激剂对芽孢杆菌Cr(VI)还原率影响的时间变化规律。

#### 1.2.2 菌悬浮液的制备

配制500 mL的LB培养基(酵母提取物2.5 g、胰蛋白胨5 g和氯化钠5 g),加入蒸馏水充分溶解后定容至500 mL,放入温度 $121^{\circ}\text{C}$ 的高压灭菌锅灭菌20 min,灭菌后分装至锥形瓶中,待温度降至室温后接入0.3%(V/V)的处于对数生长期的菌液,培养至OD值为1.2,菌液在 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心30 min使其分离沉淀,弃上清,加入等量超纯水制备成菌悬液( $8.0 \times 10^8$  个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ),放入恒温振荡器(温度: $28^{\circ}\text{C}$ ,恒温振荡器转数: $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )中培养24 h后成为菌剂(F),取出放在 $4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱冷藏备用。

#### 1.2.3 刺激剂制备方法

碳源型:甘蔗粉和乳酸钠作为外加碳源型,将购

买的甘蔗渣用去离子水反复清洗干净后,放在70℃烘箱烘干水分,使用高速多功能粉碎机打碎后过100目筛,装入密封袋中备用。将乳酸钠透明糖浆状液体,放置于5℃冰箱备用。

**氮源型:**尿素和豆粕粉作为外加氮源型,将豆粕粉和尿素过100目筛,装入密封袋中备用。

**离子型:**硫酸铜和碳酸钙作为外加离子型,称取硫酸铜7.981 g溶于100 mL的蒸馏水中定容为500 mmol·L<sup>-1</sup>Cu(II)母液;称取碳酸钙5.004 g溶于100 mL的水中定容为500 mmol·L<sup>-1</sup>Ca(II)母液。分别放置于5℃冰箱备用。

**矿物型:**钙基蒙脱石(以下简称蒙脱石)和海泡石作为矿物型,将蒙脱石和海泡石过100目筛,装入密封袋中备用。

#### 1.2.4 单因素多水平试验筛选不同类型刺激剂及最佳投加量

本试验的刺激剂均使用紫外灭菌法灭菌15 min。投加刺激剂和接种0.3%(V/V)菌液到600 mg·L<sup>-1</sup>Cr(VI)培养基中,设置3个重复,在28℃,160 r·min<sup>-1</sup>的气浴恒温振荡器中培养,每隔2 d取样2 mL测定溶液中的Cr(VI)含量,到第16天为止(表1)。

#### 1.2.5 非包埋型混合刺激剂还原Cr(VI)的响应曲面试验设计

由单因素多水平试验可知,蒙脱石与甘蔗粉对芽

孢杆菌还原Cr(VI)的影响最大,所以将甘蔗粉与蒙脱石作为混合型刺激剂的材料。采用单因素多水平试验优化混合型刺激剂和菌剂投加量的最佳配比。

##### (1)最佳配比单因素多水平试验

**不同投加量的甘蔗粉+蒙脱石+菌:**以优化得到混合刺激剂开展单因素试验,分别以0、4、6、8 g·L<sup>-1</sup>和10 g·L<sup>-1</sup>的投加量将甘蔗粉投放于含有600 mg·L<sup>-1</sup>Cr(VI)培养基中,蒙脱石投加量为6 g·L<sup>-1</sup>,菌剂投加量在0.3%(V/V)。在28℃,160 r·min<sup>-1</sup>的气浴恒温振荡器中培养,每隔2 d取样2 mL并测定溶液中的Cr(VI)含量,共测到第14天,设置3组重复。

**不同投加量的蒙脱石+甘蔗粉+菌:**以优化得到混合刺激剂开展单因素试验,分别以0、4、6、8 g·L<sup>-1</sup>和10 g·L<sup>-1</sup>的投加量将蒙脱石投放于含有600 mg·L<sup>-1</sup>Cr(VI)的培养基中,甘蔗粉投加量在8 g·L<sup>-1</sup>,菌剂投加量在0.3%(V/V),其余步骤同上。

**不同菌剂投加量+混合刺激剂:**以优化得到混合刺激剂开展单因素试验,分别以0、0.1%、0.3%和0.5%(V/V)的投加量将菌剂投放于含有600 mg·L<sup>-1</sup>Cr(VI)的培养基中,甘蔗粉投加量为8 g·L<sup>-1</sup>,蒙脱石投加量为6 g·L<sup>-1</sup>,其余步骤同上。

##### (2)响应面法优化非包埋型混合刺激剂协同菌剂(HF)的最佳投加量

基于单因素筛选的甘蔗粉含量(A)、蒙脱石含量

表1 不同类型刺激剂及投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的筛选

Table 1 Screening of Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. with different types of stimulants and dosage

刺激剂类型 Type of stimulants	刺激剂 Stimulate	是否投加芽孢杆菌 Whether or not to add F	投加量 Dosage	简称 Abbreviation
碳源型	甘蔗粉(G)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	G <sub>F1</sub> 、G <sub>F2</sub> 、G <sub>F3</sub> 、G <sub>F4</sub>
	乳酸钠(SL)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	SL <sub>F1</sub> 、SL <sub>F2</sub> 、SL <sub>F3</sub> 、SL <sub>F4</sub>
氮源型	豆粕粉(D)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	D <sub>F1</sub> 、D <sub>F2</sub> 、D <sub>F3</sub> 、D <sub>F4</sub>
	尿素(U)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	U <sub>F1</sub> 、U <sub>F2</sub> 、U <sub>F3</sub> 、U <sub>F4</sub>
离子型	Cu(II)	是	4、6、8、10 mmol·L <sup>-1</sup>	Cu(II) <sub>F1</sub> 、Cu(II) <sub>F2</sub> 、Cu(II) <sub>F3</sub> 、Cu(II) <sub>F4</sub>
	Ca(II)	是	4、6、8、10 mmol·L <sup>-1</sup>	Ca(II) <sub>F1</sub> 、Ca(II) <sub>F2</sub> 、Ca(II) <sub>F3</sub> 、Ca(II) <sub>F4</sub>
矿物型	蒙脱石(M)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	M <sub>F1</sub> 、M <sub>F2</sub> 、M <sub>F3</sub> 、M <sub>F4</sub>
	海泡石(P)	是	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	P <sub>F1</sub> 、P <sub>F2</sub> 、P <sub>F3</sub> 、P <sub>F4</sub>
碳源型	甘蔗粉(G)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	G <sub>1</sub> 、G <sub>2</sub> 、G <sub>3</sub> 、G <sub>4</sub>
	乳酸钠(SL)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	SL <sub>1</sub> 、SL <sub>2</sub> 、SL <sub>3</sub> 、SL <sub>4</sub>
氮源型	豆粕粉(D)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	D <sub>1</sub> 、D <sub>2</sub> 、D <sub>3</sub> 、D <sub>4</sub>
	尿素(U)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	U <sub>1</sub> 、U <sub>2</sub> 、U <sub>3</sub> 、U <sub>4</sub>
离子型	Cu(II)	否	4、6、8、10 mmol·L <sup>-1</sup>	Cu(II) <sub>1</sub> 、Cu(II) <sub>2</sub> 、Cu(II) <sub>3</sub> 、Cu(II) <sub>4</sub>
	Ca(II)	否	4、6、8、10 mmol·L <sup>-1</sup>	Ca(II) <sub>1</sub> 、Ca(II) <sub>2</sub> 、Ca(II) <sub>3</sub> 、Ca(II) <sub>4</sub>
矿物型	蒙脱石(M)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	M <sub>1</sub> 、M <sub>2</sub> 、M <sub>3</sub> 、M <sub>4</sub>
	海泡石(P)	否	4、6、8、10 g·L <sup>-1</sup>	P <sub>1</sub> 、P <sub>2</sub> 、P <sub>3</sub> 、P <sub>4</sub>

(B)、菌剂投加量(C)实验结果,本文利用回归方程优化试验条件(甘蔗粉、蒙脱石、菌剂),确定芽孢杆菌对Cr(VI)还原率最高时的条件组合(表2)。本试验将其放入初始含量为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI)培养基中,在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温培养箱中培养,于第8天测定Cr(VI)含量。

表2 芽孢杆菌还原Cr(VI)条件的响应曲面试验

Table 2 Response surface experiments on F reducing Cr(VI)

自变量 Argument	编码 Encode	水平Level		
		-1	0	1
甘蔗粉/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	A	6	8	10
蒙脱石/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	B	4	6	8
菌剂投加量(V/V)/%	C	0.1	0.3	0.5

### 1.2.6 包埋型刺激剂协同菌剂的制备方法

称取质量分数为4%(m/V)的海藻酸钠放入200 mL超纯水中 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 下加热充分溶解海藻酸钠,再称取1.202 g蒙脱石和1.601 g甘蔗粉(等量缩小最优配比),放入含有海藻酸钠的溶液中搅拌均匀,在 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min,冷却至室温得到混合液,用10 mL注射器分别缓慢滴入已经灭菌的4%(m/V)CaCl<sub>2</sub>溶液中交联24 h,形成固定化小球,用0.3%(m/V)的生理盐水冲洗,再用无菌水冲洗3次得到海藻酸钠+混合刺激剂(SH)。同SH制备方法相同,先制混合液,后将培养24 h的菌在 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min得到菌剂,按照菌液比3:7放入灭菌好的混合液中用涡旋仪振荡,用10 mL注射器将混合液缓慢滴入4%(m/V)CaCl<sub>2</sub>溶液中交联24 h,用灭菌的0.3%(m/V)的生理盐水冲洗再用无菌水清洗3次最后得到海藻酸钠+混合刺激剂+菌(SHF)。

### 1.2.7 包埋型刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)的试验

将 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI)溶液用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH和HCl调节pH至中性(pH7.0), $120 \text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌20 min,冷却至室温。在100 mL锥形瓶中装入60 mL含量为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI)溶液,称取6.001 g包埋型刺激剂放入锥形瓶中用封口膜密封,在 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温振荡器中培养,试验设置3组重复,每隔2 d取样2 mL测定溶液中的Cr(VI)含量,共测28 d,见表3。

### 1.2.8 表征方法

参考许银等<sup>[24]</sup>的制样方法,将暴露于 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cr(VI)条件下第28天的F、HF和SHF,用 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(PBS, pH7.0)洗涤3次,每次 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min,弃上清液后收集到F、HF和SHF样

品,分别加入2.5%(m/V)戊二醛溶液在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱固定12 h,然后用 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS洗涤3次,每次10 min,最后用无水乙醇(25%、55%、75%、95%和100%)进行梯度脱水,放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻8 h,取出后用冷冻干燥机干燥8 h;将处理好的样品置于SEM-EDS(SU1510,日本日立集团)中观察微观结构。

### 1.3 分析方法

非包埋型和包埋型刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)的含量采用国家标准方法《水质 六价铬的测定 二苯碳酰二肼分光光度法》(GB 7467—1987)进行测定,在波长为540 nm测定吸光度,由标准曲线( $y=0.5409x+0.0021$ , $R^2=1$ )查得样品Cr(VI)含量,再计算出Cr(VI)的还原率( $\eta$ )为:

$$\eta = \left[ \frac{C-C_1}{C} \right] \times 100\%$$

式中: $C$ 为初始Cr(VI)含量, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_1$ 为处理后溶液中Cr(VI)含量, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.4 数据处理

利用Excel 2021和SPSS 21.0对数据进行统计分析。在数据分析之前,对数据进行方差同质性检验(Levene检验, $P<0.05$ )。使用Origin Pro 2018c(Origin Lab.,美国)绘图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同刺激剂及其投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响

不同菌株对营养成分和最佳投加条件需求各不相同,因此需要对其刺激剂和最佳条件进行筛选<sup>[25]</sup>。研究发现除CK外,随着时间的延长,不同类型刺激剂单施对Cr(VI)的还原率表现出不同的影响;当添加刺激剂+菌剂后,在2~4 d对Cr(VI)还原率呈缓慢增长趋势,6~8 d对Cr(VI)的还原率显著提高,10 d之后对Cr(VI)的还原率显著下降,并且不同投加量所表现出来的还原效果具有差异性(图1~图4)。

投加了碳源型刺激剂培养到8 d后(图1),与菌剂相比, $G_3$ 、 $G_4$ 对Cr(VI)的还原率分别显著提高了6.11、7.33个百分点, $SL_3$ 、 $SL_4$ 对Cr(VI)的还原率分别显著提高了2.21、2.31个百分点( $P<0.05$ ),刺激剂+菌剂组 $G_{F3}$ 、 $G_{F4}$ 对Cr(VI)的还原率分别显著提高了15.92、17.48个百分点, $G_{F4}$ 最高还原率为87.34%, $SL_{F3}$ 、 $SL_{F4}$ 对Cr(VI)的还原率分别显著提高了11.31、14.87个百分点( $P<0.05$ ), $SL_{F4}$ 最高还原率为83.34%,培养10 d后,发现只添加了碳源型刺激剂对Cr(VI)



的还原率保持稳态下降,而添加了刺激剂+菌剂的还原率持续下降,且还原率依旧比单施刺激剂的还原率高,有研究表明,由碳源氧化产生的电子原本用于生物合成,但当有Cr(VI)存在时,电子会被用于还原Cr(VI),从而减慢了生长速度<sup>[26]</sup>,杜兆林等<sup>[27]</sup>研究发现,微生物会借助细胞表面及刺激剂带负电荷的官能团,通过静电吸引和络合配位等作用来对铬吸附,被吸附的铬会穿过细胞膜进入细胞内,在微生物体内富集或被胞内酶(如还原酶等)将铬还原成低毒状态,因此刺激剂+菌剂的还原效率高于刺激剂单施加。SL<sub>F</sub>和G<sub>F</sub>含量越高对Cr(VI)的还原速率越快,可能是含有较多的小分子有机物,如有机酸、单糖、脂类和蛋白等,提供容易利用的溶解性有机碳源,能够快速释放出微生物可利用的碳源和营养物质,促使微生物还原Cr(VI)速率提高<sup>[28]</sup>。从“变废为宝”和还原Cr(VI)效果的角度考虑,选择甘蔗粉作为碳源型刺激剂。

投加了氮源型刺激剂培养8 d后(图2),与菌剂相比,U<sub>3</sub>、U<sub>4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了7.12、9.42个百分点,D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了4.01、9.42个百分点( $P<0.05$ ),刺激剂+菌剂组

U<sub>F3</sub>、U<sub>F4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了13.07、14.01个百分点,U<sub>F4</sub>最高还原率为82.36%,D<sub>F3</sub>、D<sub>F4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了15.12、15.56个百分点( $P<0.05$ ),D<sub>F4</sub>最高还原率为84.23%;培养10 d后发现U<sub>F4</sub>和D<sub>F4</sub>对Cr(VI)的还原率下降缓慢,其他投加量下降较迅速,由此可知Cr(VI)还原率是随着U<sub>F</sub>和D<sub>F</sub>含量的增加而增加,可能是含量越高<sup>[29]</sup>,释放出的可利用氮源的数量就越多,使芽孢杆菌对Cr(VI)产生了抗性。但是与豆粕粉相比芽孢杆菌对尿素的利用率较低,尿素是一种含有两个氨基(NH<sub>2</sub>)的有机化合物,它的结构相对简单,微生物可能更倾向于利用更复杂的氮源,如蛋白质或氨基酸,因为这些化合物中的氮更容易被微生物利用。豆粕粉本身作为有机氮源能给微生物提供丰富的氮源、蛋白质、矿物质等,使菌体生长量大,更有利于对Cr(VI)的还原<sup>[30]</sup>,所以选择豆粕粉为氮源型刺激剂。

与其他处理(4、6、8 mmol·L<sup>-1</sup>)相比,投加了10 mmol·L<sup>-1</sup>离子型刺激剂后Cr(VI)的还原率呈先慢后快的增长趋势(图3)。在反应前2 d时对Cr(VI)的还原率的增长较为缓慢,可能是芽孢杆菌在添加到含

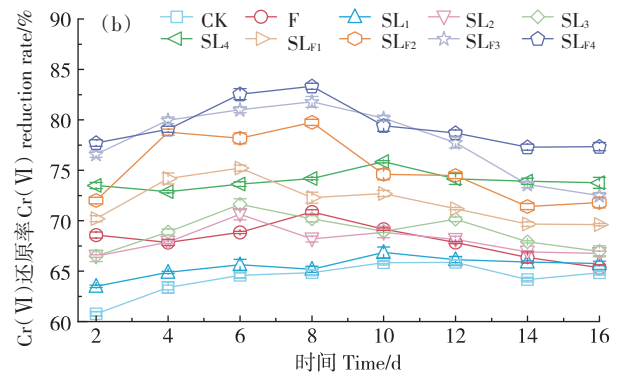
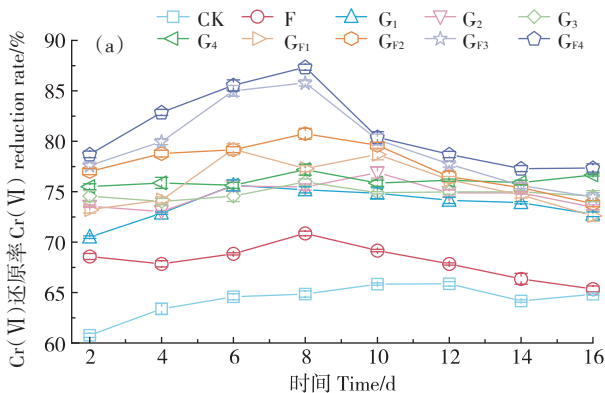


图1 不同碳源型刺激剂和投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响

Figure 1 Effects of different carbon source stimulants and dosage on reduction of Cr(VI) by F.

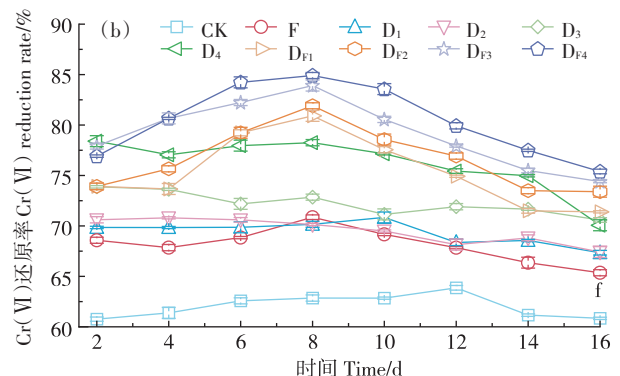
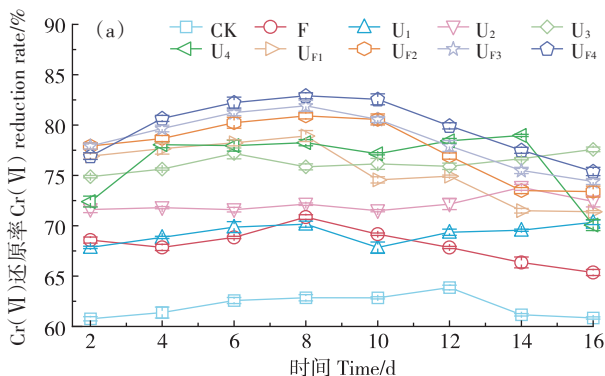


图2 不同氮源型刺激剂和投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响

Figure 2 Effects of different nitrogen source stimulants and dosage on reduction of Cr(VI) by F.

Cr(VI)的水体中同时受到了高浓度的离子影响,使芽孢杆菌不能产生足够的还原酶来还原Cr(VI),对芽孢杆菌的生长产生了抑制作用,在第4天后对Cr(VI)的还原开始缓慢增长。培养至6 d后,与菌剂相比,可知Ca(II)<sub>3</sub>、Ca(II)<sub>4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了6.79、6.85个百分点,Cu(II)<sub>3</sub>、Cu(II)<sub>4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了6.73、7.37个百分点,刺激剂+菌剂组合Ca(II)<sub>F3</sub>、Ca(II)<sub>F4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了10.16、11.70个百分点( $P < 0.05$ ),Ca(II)<sub>F4</sub>最高还原率为79.78%,Cu(II)<sub>F3</sub>、Cu(II)<sub>F4</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了11.02、9.72个百分点( $P < 0.05$ ),Cu(II)<sub>F4</sub>最高还原率为78.68%;培养到8~10 d后发现刺激剂+菌剂对Cr(VI)的还原率持续下降,Cr(VI)降低菌株的活性和破坏菌株蛋白质的结构,并且存在离子间竞争吸附的可能<sup>[31]</sup>,而单施刺激剂的处理中刺激剂含量高的处理对Cr(VI)的还原率保持恒定。Cr(VI)还原受到共存金属离子的影响,与菌剂相比在添加刺激剂后,对Cr(VI)还原效果得到提升,其中Ca(II)可以提高细胞活性,促进Cr(VI)生物还原,

Cu(II)含量超标会严重影响细胞发育。这与王广顺等<sup>[32]</sup>研究变化趋势一致,0.2~0.4 mmol·L<sup>-1</sup> Cu(II)含量对菌株Thp2-23还原Cr(VI)有明显促进作用,随着Cu(II)含量的增加到0.4 mmol·L<sup>-1</sup>以上促进作用呈现先增强后减弱的现象,高含量Cu(II)抑制Thp2-23还原Cr(VI)。因此,选择Ca(II)<sub>3</sub>作为协同微生物还原Cr(VI)的离子型刺激剂<sup>[33]</sup>。

投加矿物型刺激剂(图4),培养到8 d后,与菌剂相比,得知M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>对Cr(VI)的还原率分别提高了1.67、8.33个百分点,P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了3.23、4.21个百分点( $P < 0.05$ ),添加刺激剂+菌剂组M<sub>F2</sub>、M<sub>F3</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了16.52、18.84个百分点,M<sub>F3</sub>最高还原率为87.88%,P<sub>F2</sub>、P<sub>F3</sub>对Cr(VI)的还原率分别显著提高了10.07、14.94个百分点( $P < 0.05$ ),P<sub>F3</sub>最高还原率为83.78%。由此可知在第8天后,MF比PF对Cr(VI)的还原率高,海泡石是由Si—O—Si键断裂形成的Si—OH、Si—O四面体中的氧原子及与Mg<sup>2+</sup>配位结合的水分子,而蒙脱石是由Si—O四面体和Al—(O,OH)八面体组成,具有

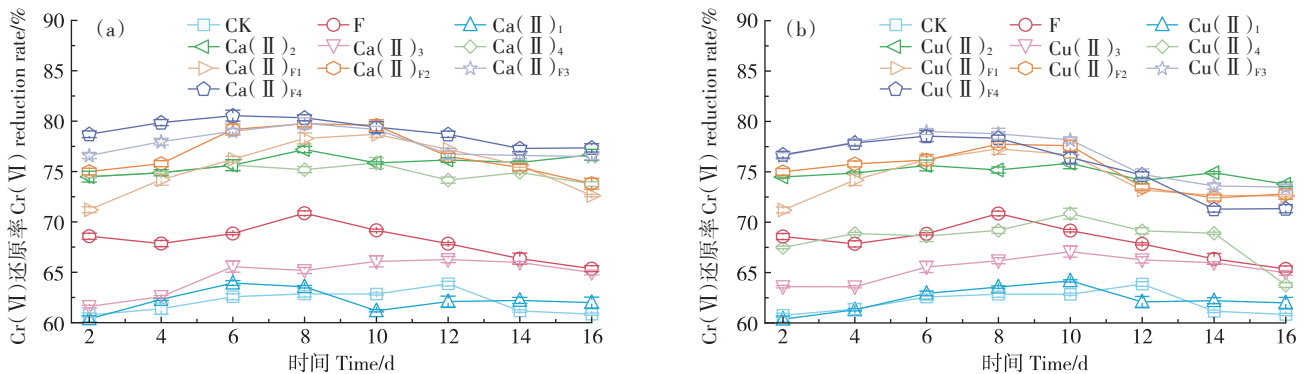


图3 不同离子型刺激剂和投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响  
Figure 3 Effects of different ionic stimulants and dosage on reduction of Cr(VI) by F.

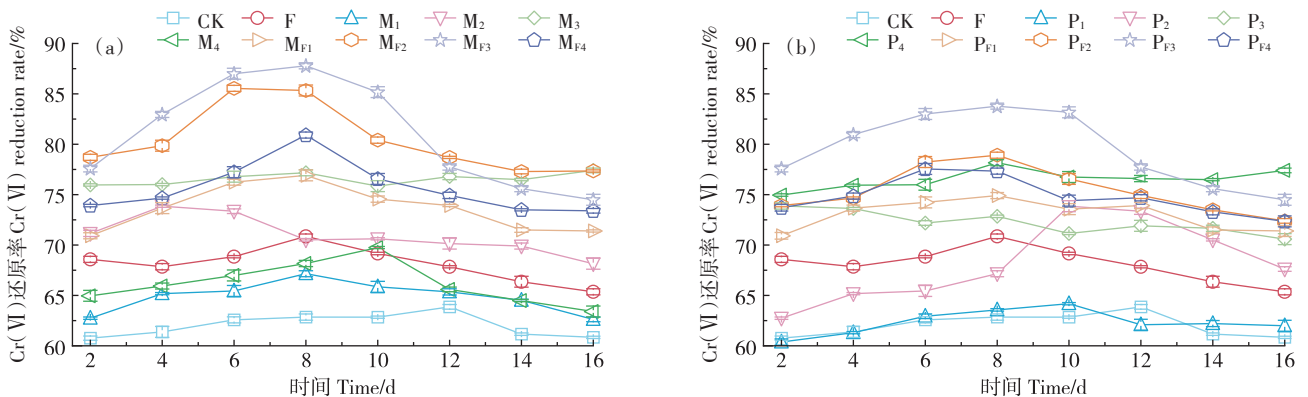


图4 不同矿物型刺激剂和投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响  
Figure 4 Effects of different mineral stimulants and dosage on reduction of Cr(VI) by F.



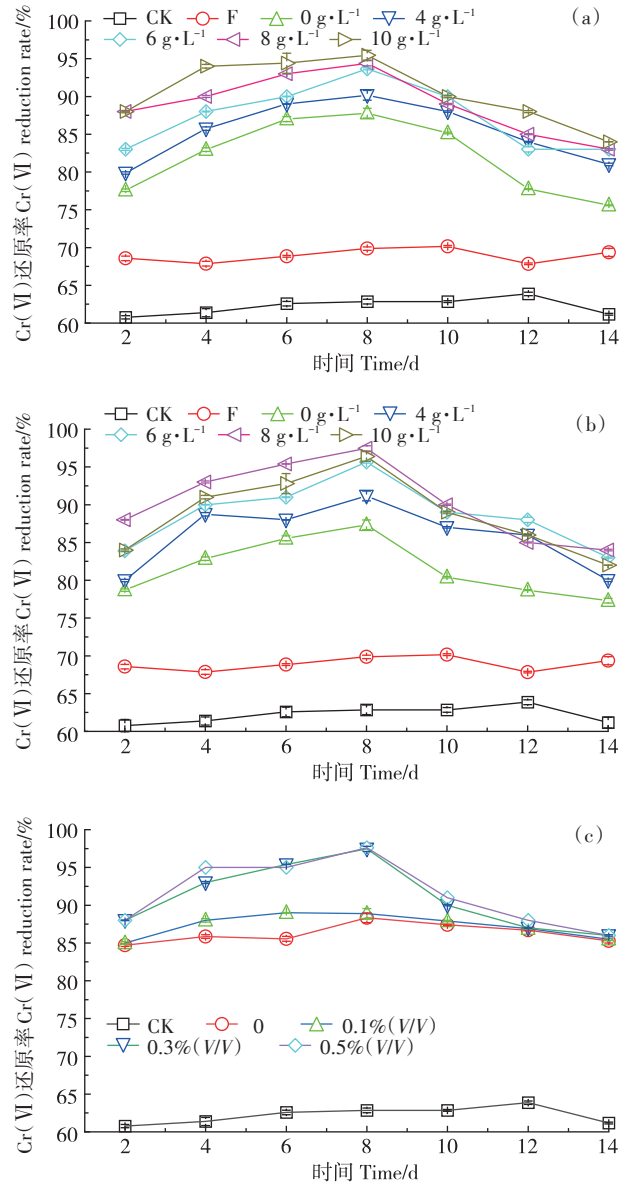
更强的亲水性,能够进行离子交换,吸附Cr(VI)中有害的阴离子基团( $\text{CrO}_4^{2-}$ 、 $\text{CrO}_7^{2-}$ )<sup>[34-35]</sup>,它既能为Cr(VI)提供电子也能作为微生物的附着材料,供其生长<sup>[36]</sup>,减少Cr(VI)对芽孢杆菌的胁迫,所以选择蒙脱石作为协同微生物还原Cr(VI)的矿物型刺激剂。

综上可知,碳源型的甘蔗粉、氮源型的豆粕粉、离子型的Ca(II)、矿物型的蒙脱石对芽孢杆菌还原Cr(VI)的效率较高于其他刺激剂,它们的最佳投加量分别为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。尤其是甘蔗粉和蒙脱石对芽孢杆菌还原Cr(VI)的刺激效果最佳,还原率分别达到了87.34%和87.88%。

## 2.2 非包埋型混合刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响

随着时间的延长,不同的投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响显著增加,在培养2 d后对芽孢杆菌还原Cr(VI)不显著,可能是芽孢杆菌对新环境适应的过程,培养8 d后对芽孢杆菌还原Cr(VI)显著,10 d之后还原率持续性降低(图5)。甘蔗粉的不同投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响见图5a,培养2 d后,不同投加量的甘蔗粉对芽孢杆菌还原Cr(VI)不显著;培养到8 d后,甘蔗粉的投加量为6、8、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对芽孢杆菌还原Cr(VI)增强,分别为94.13%、94.39%、95.46%,与菌剂比较,分别显著提高了23.79、24.53个和25.61个百分点,与单施蒙脱石比较,分别显著提高了14.36、17.78个和18.76个百分点( $P<0.05$ ),因此当甘蔗粉投加量在 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,芽孢杆菌对Cr(VI)还原情况最佳。蒙脱石的不同投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)的影响见图5b,培养2 d后,蒙脱石投加量为 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对Cr(VI)还原率高于其他投加量,分别显著提高了15.27、7.59、1.16个和6.03个百分点,培养到4~8 d之后,与菌剂相比,显著提高了22.65个百分点,与单施甘蔗粉相比,显著提高了10.13个百分点( $P<0.05$ ),因此当蒙脱石投加量在 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,芽孢杆菌对Cr(VI)还原情况最好,高瑞丽等<sup>[17]</sup>研究发现单独添加蒙脱石对重金属的钝化效果好,且质量比为5%时,钝化效果最显著。不同投加量的菌剂还原Cr(VI)的影响见图5c,培养2~8 d后,在菌剂投加量为0.3%时对Cr(VI)还原最显著( $P<0.05$ )。由此可知,混合型刺激剂不仅给菌提供了底物营养还提供了具有吸附性能的黏土矿物<sup>[37]</sup>,使芽孢杆菌对Cr(VI)的还原效率显著高于单施刺激剂。

由单因素试验结果可以得到不同投加量的蒙脱石、甘蔗粉、菌剂投加量对芽孢杆菌还原Cr(VI)有影



CK[ $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cr(VI)的培养基],F(芽孢杆菌),(a)甘蔗粉的不同投加量(0、4、6、8、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蒙脱石对F还原Cr(VI)的影响,(b)蒙脱石的不同投加量(0、4、6、8、 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘蔗粉对F还原Cr(VI)的影响,(c)菌剂的不同投加量对F还原Cr(VI)的影响。  
CK[ $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cr(VI) medium],F(*Bacillus* sp.), (a) Effects of different dosages of sugarcane powder(0,4,6,8 and  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  montmorillonite on the reduction of Cr(VI) by F, (b) Effects of different dosages of montmorillonite(0,4,6,8 and  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) +  $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sugarcane powder on the reduction of Cr(VI) by F, and (c) Effects of different dosages of bactericide on the reduction of Cr(VI) by F.

图5 非包埋型混合刺激剂最佳投加量

Figure 5 Optimal dosage of non-embedding stimulant of mixture

响。本试验采用三因素三水平16个试验点响应面优化进行试验,最终得到优化还原Cr(VI)的回归模型(表3)。通过Design Expert建立二次曲面模型<sup>[38]</sup>,拟合响应面回归方程:

表3 Cr(VI)还原率二次回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of quadratic regression equation for Cr(VI) reduction rate

参数 Parameter	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F值 F-value	P值 P-value	显著性 Significant
模型	571.81	9	63.53	148.79	<0.000 1	***
A-甘蔗粉	6.20	1	6.20	14.52	0.006 6	**
B-蒙脱石	0.26	1	0.26	0.60	0.463 9	*
C-菌剂投加量	338.08	1	338.08	791.75	<0.000 1	***
AB	0.082	1	0.08	0.19	0.674 4	
AC	13.75	1	13.75	32.20	0.000 8	***
BC	5.45	1	5.45	12.76	0.009 1	**
A <sup>2</sup>	0.01	1	0.01	0.02	0.879 8	
B <sup>2</sup>	6.24	1	6.24	14.60	0.006 5	**
C <sup>2</sup>	196.83	1	196.83	460.96	<0.000 1	***
残差	2.99	7	0.43			
失拟项	2.99	3	1.00		0.264 2	
纯误差	0.00	4	0.00			
合计	574.80	16				

注:\*\*\*,  $P < 0.001$ , 极显著; \*\*,  $P < 0.01$ , 高显著; \*,  $P < 0.05$ , 显著。

Note: \*\*\*,  $P < 0.001$ , very significant; \*\*,  $P < 0.01$ , highly significant; \*,  $P < 0.05$ , significant.

$$Y = 9.87 - 0.0478A - 0.0103B - 0.3434C + 0.0073AB - 0.1004AC - 0.062BC + 0.0036A^2 - 0.0629B^2 - 0.3606C^2 \quad (R^2 = 0.9943)$$

式中:  $Y$ : Cr(VI)还原率(%);  $A, B, C$ : 自变量的因素;  $BC$ : 参数  $B$  和  $C$  之间的交互作用。

对方程用回归方差分析,  $F$  值和  $P$ -value 值代表相关系数的显著性, 由表3可知,  $F$  值为 148.79, 为极显著 ( $P < 0.0001$ ), 失拟项 ( $P = 0.2645$ ) 不显著, 决定系数  $R^2$  为 0.9943,  $R^2$  值越大, 说明模型拟合度越高, 精确度越高。比较三种独立变量的  $F$  值可知对 Cr(VI) 还原率的影响顺序为菌剂投加量 > 甘蔗粉 > 蒙脱石, 而且  $AC$  (甘蔗粉与菌剂投加量) 与  $BC$  (蒙脱石与菌剂投加量) 交互项显著。

为了描述各因子之间的交互作用对 Cr(VI) 还原的三维响应曲面见图6。交互作用的强弱主要通过响应面曲线图的形状来体现, 曲线的坡度越陡, 说明两个变量之间的交互作用越显著; 反之, 表示交互作用不显著。在固定菌剂投加量为 3%、甘蔗粉投加量为  $6 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蒙脱石投加量为  $4 \sim 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下, Cr(VI) 还原的响应曲面坡度变化较小, 表明蒙脱石和甘蔗粉的交互作用不显著 (图6a)。然而, 当蒙脱石含量为  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 甘蔗粉在  $6 \sim 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 菌剂投加量在 0.1%~0.5% 范围内, Cr(VI) 还原的响应曲面呈现出陡

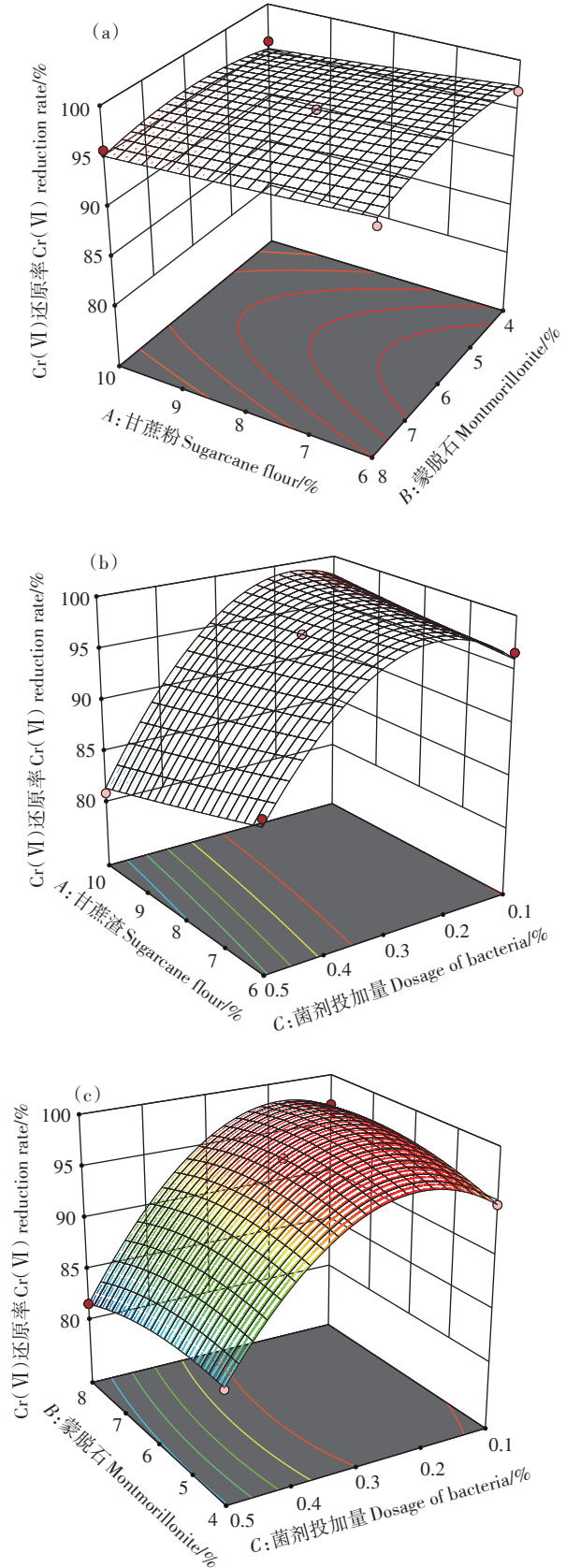


图6 混合刺激剂与菌剂投加量交互作用对 Cr(VI) 还原率的影响  
Figure 6 Effects of interaction between stimulant of mixture and bacterial agent dosage on Cr(VI) reduction rate

峭的坡度,表明它们之间的交互作用非常显著(图6b)。Cr(VI)还原率随着菌剂投加量的增加呈先增后减的趋势;随着甘蔗粉含量的增加,Cr(VI)还原率缓慢降低,这可能是因为芽孢杆菌生长量超过锥形瓶容量,导致生长停止。同时,甘蔗粉作为芽孢杆菌的碳源提供丰富的营养,但在营养过剩的情况下,微生物吸收变得困难<sup>[39]</sup>。当甘蔗粉含量为 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,蒙脱石在 $4\sim 8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,菌剂投加量在 $0.1\%\sim 0.5\%$ 范围内时,Cr(VI)还原的响应曲面坡度较陡,表明它们之间的交互作用显著(图6c)。因此,得出结论:Cr(VI)还原率随着菌剂投加量的增加先增加后减小,而随着蒙脱石含量的增加,Cr(VI)还原率降低。采用响应面分析法可以有效地确定混合刺激剂的最佳投加量,并在减少工作量的同时实现条件优化,这种统计学方法已广泛应用于各种筛选试验的优化,并建立三维立体曲面图,可以更直观地分析不同混合投加量还原Cr(VI)的影响趋势<sup>[40]</sup>。本研究通过响应曲面分析法验证甘蔗粉、蒙脱石和菌剂投加量三个因素对还原Cr(VI)的影响,优化混合刺激剂最优组合为甘蔗粉投加量 $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蒙脱石投加量 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、菌剂投加量 $0.3\%$ 。反应8 d后,与菌剂相比增加了32.53个百分点。

### 2.3 包埋型混合刺激剂对芽孢杆菌Cr(VI)还原率的影响

在Cr(VI)胁迫下,随着时间的延长,发现SHF还原Cr(VI)的持久性显著高于HF(图7)。HF在第2~6天内Cr(VI)的还原率高于包埋型刺激剂,还原率最高达到95.95%,其在第8天之后还原率开始显著下降,28 d后下降到74.93%,说明非包埋型刺激剂对芽孢杆菌还原Cr(VI)在短期内能够达到很好的效果,但后期由于HF不能提供良好的保护环境,造成芽孢杆菌死亡且前期已经还原的Cr(III)被氧化成有毒的

Cr(VI),因此缺乏持久性。相比而言,SH在第2天对Cr(VI)影响未表现出差异性,在第6天SH对Cr(VI)还原有较显著变化,还原率分别为78.56%;从第6天开始SH在平缓增长,说明包埋型刺激剂中的材料在一定程度上影响Cr(VI)还原。而SHF在第2天时还原率为85.97%,与菌剂相比,还原率显著提高了19.74个百分点,第6天时还原率显著增加23.35个百分点( $P<0.05$ ),Cr(VI)还原率随着时间的增加而增加。2~6 d SHF还原率高,说明材料保护菌免受Cr(VI)毒害,且未加菌剂的SH对Cr(VI)有还原作用,因此材料本身对Cr(VI)有一定的还原作用。SHF可以提供一种保护性的环境,降低外界环境对芽孢杆菌的不利影响,并释放出的材料作为电子供体增强微生物的还原酶活性,加速还原Cr(VI)<sup>[41-42]</sup>。第8天时,与未加菌的包埋型刺激剂相比,SHF还原率显著提高了18.76个百分点,与HF相比,SHF还原率显著增加了15.43个百分点;第28天时,与未加菌的包埋型刺激剂相比,SHF对Cr(VI)还原率显著提高了11.15个百分点,与HF相比,SHF还原率显著提高了21.16个百分点( $P<0.05$ )。由此可知在Cr(VI)暴露下,SHF依然能够长效地保护微生物免受铬离子毒害,包埋型刺激剂控制甘蔗粉和蒙脱石的释放速率,使其在一段时间内逐渐释放,这种时效性释放有助于维持刺激剂对芽孢杆菌的影响,并延长其在环境中的作用时间,Song等<sup>[43]</sup>发现将芽孢杆菌KSB7固定在花生生物炭上与皮肤联用,可以显著提高微生物的丰度,铬的可提取量降低了53.42%。

### 2.4 芽孢杆菌表面结构的表征

为了直观地显示在Cr(VI)胁迫下芽孢杆菌的变化,使用SEM观察试验28 d后的材料,发现未加Cr(VI)的芽孢杆菌呈直杆状,表面光滑,菌株形态较

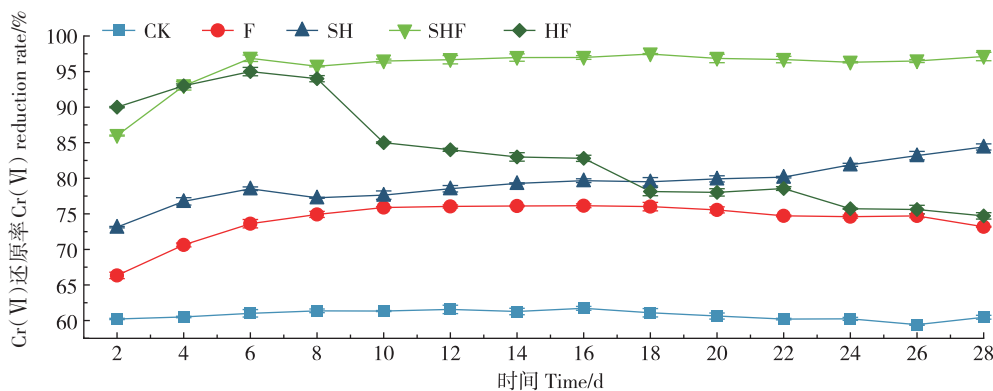


图7 包埋型刺激剂协同菌剂对Cr(VI)的还原率

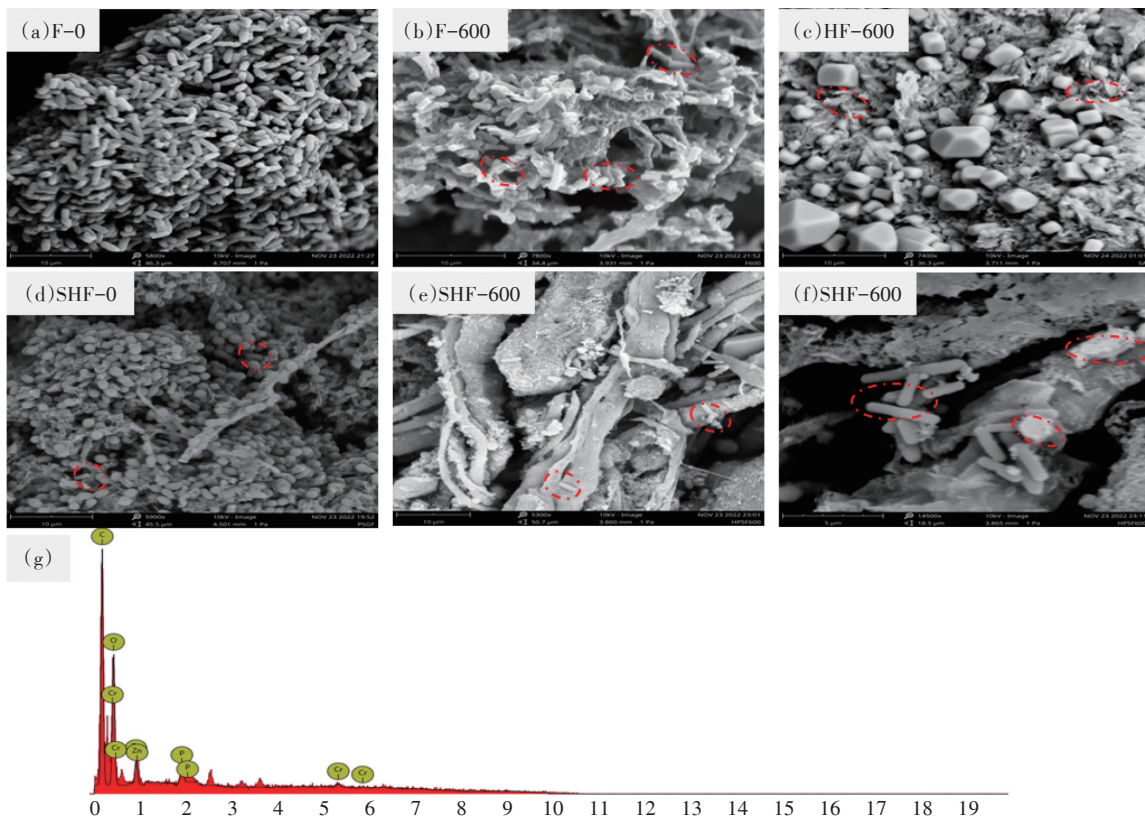
Figure 7 Reduction rate of Cr(VI) by embedding stimulant and bactericide



完整,未出现变形(图8a);而在Cr(VI)胁迫下未添加包埋型混合刺激剂的芽孢杆菌细胞出现皱缩甚至破裂的现象,形态结构不完整(图8b),表明微生物在没有营养物质条件下,生长代谢缓慢,Cr(VI)使菌株细胞表面活性成分受到破坏<sup>[44]</sup>;添加非包埋混合刺激剂的菌出现轻微皱缩,点状断裂,形态结构较为完整,表明混合型刺激剂不能长时间对芽孢杆菌提供能量和生存空间(图8c);而SHF表现出较为完整的形态结构,未出现皱缩的情况,推测包埋型混合刺激剂可以作为芽孢杆菌的保护机制(图8e),包埋型混合刺激剂具有多孔结构,有利于细菌表面附着,孔状结构即可以为菌株提供生存空间,也能为营养物质和污染物提供流通的通道<sup>[45-46]</sup>。在Cr(VI)胁迫下,包埋型混合刺激剂中观察到芽孢杆菌末端出现绒毛状产物(图8f),该物质在未经Cr(VI)处理的芽孢杆菌中未曾出现,因此猜测该物质可能是芽孢杆菌产生的胞外分泌物(如胞外蛋白等)通过络合配位等作用来固定Cr(III),或使Cr(III)以氢氧化物等形式沉淀<sup>[23]</sup>。为验

证猜想,对其出现绒毛状产物表面进行EDS分析(图8g),发现除了O元素外Cr元素含量较多,猜测芽孢杆菌细胞表面存在铬还原产物<sup>[47]</sup>。Chatterjee等<sup>[48]</sup>从SEM中观察铜绿假单胞菌吸附Cr(VI)前后产物的变化可知,未经处理的铜绿假单胞菌表面光滑、不曾出现不定形物质,而经Cr(VI)处理后发现Cr(III)沉淀物以不定形物质聚集在细胞表面。陈旭等<sup>[49]</sup>对奇异变形杆菌还原Cr(VI)的研究中,用EDS分析检测结果与以上结果一致。Das等<sup>[50]</sup>也进行类似的观察,发现淀粉样芽孢杆菌还原Cr(VI)也有相似的特征。

结果表明,外源刺激剂在不同添加方式(非包埋型和包埋型)中显著提高了芽孢杆菌对Cr(VI)的还原,特别是,非包埋型刺激剂在短期内迅速提升了芽孢杆菌对Cr(VI)的高效还原,而包埋型刺激剂使得芽孢杆菌对Cr(VI)的还原表现出长效性,并显著降低了Cr(VI)的毒性。在一定范围内,增加刺激剂的含量有助于提高微生物对Cr(VI)的高效还原效率,需要注意的是,过量的营养条件可能产生负面效



(g)添加包埋型混合刺激剂条件下,F细胞表面物质EDS元素分析图。(a-e)为10 μm下观察,(f)为5 μm下观察,红色虚线圆圈表示F。  
(g) EDS elemental analysis of F cell surface material under the addition of embedding mixed stimulant. (a-e) is 10 μm for observation, (f) is 5 μm for downward observation, and the red dotted circle indicates F.

图8 包埋型混合刺激剂协同菌的形态结构以及扫描电镜图

Figure 8 Morphological structure and scanning electron microscopy of the synergistic effect of embedding mixed stimulators on F

应<sup>[39]</sup>。因此,在本研究中甘蔗粉在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对芽孢杆菌还原Cr(VI)最佳,而蒙脱石在 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对芽孢杆菌还原Cr(VI)最佳。本研究只关注了芽孢杆菌对 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cr(VI)的还原,未深入探讨低浓度及不同温度条件下刺激剂对芽孢杆菌的影响,仅使用SEM-EDS对芽孢杆菌的表面形态变化和元素确定进行了观察,而并未深入研究在刺激剂的作用下芽孢杆菌是否通过胞外聚合物参与还原过程,或者是否涉及细胞内部的特异性功能等问题。因此,要准确揭示芽孢杆菌还原Cr(VI)的机制,还需要进一步研究和深入探讨。

通过以上研究结果,建议在实际的微生物修复Cr(VI)的治理工程中,应急治理项目优先使用非包埋型混合刺激剂,该类型刺激剂可以在短时间内提升工程菌的Cr(VI)还原能力,非应急项目建议优先使用包埋型混合刺激剂,其能显著提升工程菌的Cr(VI)长效还原能力。混合型刺激剂中碳源型、氮源型、矿物型和离子型刺激剂的添加种类和比例应根据场地的实际情况进行灵活调整。

### 3 结论

(1)筛选得到Ca(II)、蒙脱石、豆粕粉、甘蔗粉这四种刺激剂为廉价无二次污染的刺激剂,其对芽孢杆菌还原Cr(VI)效率的提升能力排序为甘蔗粉>蒙脱石>豆粕粉>Ca(II)。

(2)由还原效果最佳的蒙脱石和甘蔗粉构建混合刺激剂,以响应曲面得出对Cr(VI)还原率的影响顺序为菌剂投加量>甘蔗粉>蒙脱石,且甘蔗粉+菌剂和蒙脱石+菌剂对Cr(VI)还原影响显著。

(3)与非包埋型刺激剂相比,包埋型刺激剂显著提升了芽孢杆菌对Cr(VI)还原的长效性,随着处理时间的延长,Cr(VI)去除率不断增强,在第28天时对Cr(VI)还原率增加到97.09%。

(4)SEM-EDS观察可知包埋型刺激剂有效地保护了芽孢杆菌,减小了Cr(VI)对其细胞的毒害作用,细胞结构完整,未出现皱缩和断裂。

#### 参考文献:

- [1] KANAKALAKSHMI A, JANAKI V, SHANTHI K, et al. Biosynthesis of Cr(III) nanoparticles from electroplating wastewater using chromium-resistant *Bacillus subtilis* and its cytotoxicity and antibacterial activity[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2017, 45(7):1304-1309.
- [2] PUSHKAR B, SEVAK P, PARAB S, et al. Chromium pollution and its

- bioremediation mechanisms in bacteria: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 287:112279.
- [3] LIU J, SUN S, ZHANG H, et al. Remediation materials for the immobilization of hexavalent chromium in contaminated soil: preparation, applications, and mechanisms[J]. *Environmental Research*, 2023, 237:116918.
- [4] WANG D, LI G, QIN S, et al. Remediation of Cr(VI)-contaminated soil using combined chemical leaching and reduction techniques based on hexavalent chromium speciation[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208:111734.
- [5] MORE T T, YADAV J S S, YAN S, et al. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications[J]. *Journal of Environmental Management*, 2014, 144:1-25.
- [6] 彭蕾, 姜岩, 夏如馨. 微生物修复Cr(VI)污染作用机制及研究进展[J]. *化工学报*, 2021, 72(9):4458-4468. PENG L, JIANG Y, XIA R X. The mechanism and research progress of bioremediation of Cr(VI) pollution[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2021, 72(9):4458-4468.
- [7] 肖亚兵, 张雪纯, 季斌, 等. 微藻生物强化对藻-菌颗粒污泥的形成影响及污染物去除研究[J]. *环境科学研究*, 2022, 35(3):761-767. XIAO Y B, ZHANG X C, JI B, et al. Effect of microalgae bio-augmentation on formation of microalgal-bacterial granular sludge and the pollutants removal[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2022, 35(3):761-767.
- [8] SUN P, WANG Z, AN S, et al. Biochar-supported nZVI for the removal of Cr(VI) from soil and water: advances in experimental research and engineering applications[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 316:115211.
- [9] 许仲轩. 蜡状芽孢杆菌12-2在金属阳离子协同下的铬矿化探索及研究[D]. 广州:华南理工大学, 2021. XU Z X. Exploration and study on chromium mineralization of *Bacillus cereus* 12-2 in coordination with metal cation[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [10] 陈珊, 丁咸庆, 祝贞科, 等. 秸秆还田对外源氮在土壤中转化及其微生物响应的影响[J]. *环境科学*, 2017, 38(4):1613-1621. CHEN S, DING X Q, ZHU Z K, et al. Effect of straw application on the dynamics of exogenous nitrogen and microbial activity in paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(4):1613-1621.
- [11] YANG K, BU H, ZHANG Y, et al. Efficacy of simultaneous hexavalent chromium biosorption and nitrogen removal by the aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri* YC-34 from chromium-rich wastewater[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13:961815.
- [12] LI J, FENG Y, QIU Y, et al. Recovery of electron and carbon source from agricultural waste corncob by microbial electrochemical system to enhance wastewater denitrification[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 20:878:162926.
- [13] 奚道国, 张瑞斌, 陈凡. 缓释碳源强化人工湿地脱氮效果研究[J]. *中国环保产业*, 2022(1):32-34. XI D G, ZHANG R B, CHEN F. Research on nitrogen removal efficiency of constructed wetland enhanced by sustained-release carbon source[J]. *China Environmental Protection Industry*, 2022(1):32-34.

- [14] ZHU X, LIU X, WANG B, et al. Sodium hydroxide or tetramethylammonium hydroxide modified corncob combined with biodegradable polymers to prepare slow-release carbon source for wastewater denitrification[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 384: 129304.
- [15] 付芳语. 生物法改性甘蔗渣制备Cr(VI)吸附材料的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020. FU F Y. Preparation of Cr(VI) adsorption materials from bagasse modified by biological method and its effect analysis[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.
- [16] ZAFAR H, REHMAN I, EJAZ U, et al. Production of multienzyme by *Bacillus aestuarii* UE25 using ionic liquid pretreated sugarcane bagasse[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(11): 1016–1028.
- [17] 高瑞丽, 唐茂, 付庆灵, 等. 生物炭、蒙脱石及其混合添加对复合污染土壤中重金属形态的影响[J]. 环境科学, 2017, 38(1): 361–367. GAO R L, TANG M, FU Q L, et al. Fractions transformation of heavy metals in compound contaminated soil treated with biochar, montmorillonite and mixed addition[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(1): 361–367.
- [18] JIANG Y, YANG F, DAI M, et al. Application of microbial immobilization technology for remediation of Cr(VI) contamination: a review[J]. *Chemosphere*, 2022, 286(2): 131721.
- [19] BEMILLER J N. Structure–property correlations of non-starch food polysaccharides[J]. *Macromolecular Symposia*, 1999, 140(1): 1–15.
- [20] GAO X, GUO C, HAO J, et al. Adsorption of heavy metal ions by sodium alginate based adsorbent—a review and new perspectives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 4423–4434.
- [21] 孙爽. 生物质基海藻酸钠改性微球对铬和磷的去除性能研究[D]. 济南: 山东大学, 2021. SUN S. Study on the removal performance of biomass-based sodium alginate modified microspheres on chromium and phosphorus[D]. Jinan: Shandong University, 2021.
- [22] BOUABIDI Z B, EL-NAAS M H, ZHANG Z. Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2019, 17(1): 241–257.
- [23] 赵长青, 陈武勇, 杨秦欢. 固定化蜡质芽孢杆菌处理制革废水中Cr(VI)的条件优化[J]. 四川理工学院学报(自然科学版), 2011, 24(4): 436–439. ZHANG C Q, CHEN W Y, YANG Q H. Optimization of Cr(VI) removal in tannery wastewater by immobilized *Bacillus cereus*[J]. *Journal of Sichuan University of Science & Engineering(Natural Science Edition)*, 2011, 24(4): 436–439.
- [24] 许银, 熊哲, 倪红. 海藻酸钙包埋恶臭假单胞菌吸附Cd<sup>2+</sup>的效果及机理研究[J]. 绿色科技, 2020(20): 71–74. XU Y, XIONG Z, NI H, et al. Study on the effect and mechanism of Cd<sup>2+</sup> adsorption by *Pseudomonas putidis* embedded with calcium alginate[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2020(20): 71–74, 81.
- [25] 陶虎春, 谢勇, 张丽娟, 等. 一株氢氧化细菌的生长条件及其对不同氮源利用的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2021, 57(4): 756–764. TAO H C, XIE Y, ZHANG L J, et al. Growth conditions of a hydrogen-oxidizing bacterium and its utilization of different nitrogen sources[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2021, 57(4): 756–764.
- [26] 姜毅, 汤鼎, 周宇诚, 等. *Bacillus* sp. T124对六价铬的生物还原[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(5): 967–975. JIANG Y, TANG D, ZHOU Y C, et al. Bioreduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. T124[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(5): 967–975.
- [27] 杜兆林, 陈洪安, 姚彦坡, 等. 生物炭固定化微生物修复污染土壤研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2584–2592. DU Z L, CHEN H A, YAO Y P, et al. Research progress of biochar immobilized microorganism in soil pollution remediation[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2584–2592.
- [28] 孟雅静, 王晓雨, 温海莲, 等. 玉米秸秆与甘蔗渣生物炭的制备及其对Cr<sup>6+</sup>离子的吸附性能研究[J]. 农产品加工, 2018(5): 1–3. MENG Y J, WANG X Y, WEN H L, et al. Preparation of biochar from corn stalk and bagasse and its adsorption of Cr<sup>6+</sup>[J]. *Farm Products Processing*, 2018(5): 1–3.
- [29] 董艳山, 高丽, 何加亨, 等. 以豆粕粉为氮源的枯草芽孢杆菌液态发酵生产纳豆激酶[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(2): 109–114. DONG Y S, GAO L, HE J H, et al. *Bacillus subtilis* liquid fermentation using soybean meal meal as nitrogen source[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(2): 109–114.
- [30] 魏斐, 杨丽荣, 薛保国, 等. 还原六价铬细菌及其还原酶的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(4): 53–59. WEI F, YANG L R, XUE B G, et al. Study on the restore hexavalent chromium bacteria and its reductase[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(4): 53–59.
- [31] LI M K, ZHOU Y T, HU Y T, et al. Exploration on the bioreduction mechanism of Cr(VI) by a gram-positive bacterium: *Pseudochrobactrum saccharolyticum* W1[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109636.
- [32] 王广顺, 张皓璠, 唐晨, 等. 石油烃降解菌还原六价铬的特性及条件优化研究[J]. 现代化工, 2023, 43(11): 99–103, 110. WANG G S, ZHANG H F, TANG C, et al. Characteristics and conditions optimization of hexavalent chromium reduction by a petroleum hydrocarbon degradation strain[J]. *Modern Chemical Industry*, 2023, 43(11): 99–103, 110.
- [33] 葛军, 申星梅, 吴成志, 等. K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>共存离子对活性炭吸附Cr(VI)的影响[J]. 环境污染与防治, 2019, 41(1): 6–9. GE J, SHEN X M, WU C Z, et al. Effects of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> coexisting ions on the adsorption of Cr(VI) by activated carbon[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2019, 41(1): 6–9.
- [34] ZHANG T, TANG B, FU F. Influence of montmorillonite incorporation on ferrihydrite transformation and Cr(VI) behaviors during ferrihydrite–Cr(VI) coprecipitates aging[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 873: 162257.
- [35] YANG S, CHENG Y, ZOU H, et al. Synergistic roles of montmorillonite and organic matter in reducing bioavailable state of chromium in tannery sludge[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(58): 87298–87309.
- [36] 代群威, 王维富, 赵玉连, 等. 蒙脱石-碳酸盐矿化菌对Sr<sup>2+</sup>的联合去除作用研究[J]. 原子能科学技术, 2023, 57(3): 485–492. DAI Q W, WANG W F, ZHAO Y L, et al. Combined removal of Sr<sup>2+</sup> by montmorillonite carbonate mineralizing bacteria[J]. *Atomic Energy Science and Technology*, 2023, 57(3): 485–492.



- [37] 叶玲, 张敬阳, 肖子敬. 蒙脱石对铬螯合物的吸附行为分析[J]. 矿物学报, 2015, 35(2): 122-126. YE L, ZHANG J Y, XIAO Z J. A study on Cr(II) chelate adsorption on montmorillonite[J]. *Acta Mineralogica Sinica*, 2015, 35(2): 122-126.
- [38] 高婧琪, 张杰, 蹇庭昆, 等. 纤维微菌 C6 对水中 Cr(VI) 去除条件优化及机理研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2021, 58(4): 172-180. GAO J Q, ZHANG J, JIAN T K, et al. The conditions optimization for removing Cr(VI) from water by *Cellulosimicrobium* sp. strain C6 and study on its removal mechanism[J]. *Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)*, 2021, 58(4): 172-180.
- [39] LIU X, LIU Q, SHENG Y. Nutrients in overlying water affect the environmental behavior of heavy metals in coastal sediments[J]. *Environmental Research*, 2023, 238: 117135.
- [40] 孙小杰, 张迎, 王雪寒, 等. 微嗜酸寡养单胞菌 4-1 对 Cr(VI) 污染土壤的修复研究[J]. 环境保护前沿, 2022, 12(2): 158-168. SUN X J, ZHANG Y, WANG X H, et al. Remediation of Cr(VI)-contaminated soil by *Stenotrophomonas acidaminiphila* 4-1[J]. *Advances in Environmental Protection*, 2022, 12(2): 158-168.
- [41] MCLEOD H C, ROY J W, SMITH J E. Anaerobic biodegradation of dissolved ethanol in a pilot-scale sand aquifer: gas phase dynamics [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2018, 215: 62-72.
- [42] WU M, WANG Q, WANG C, et al. Strategy for enhancing Cr(VI)-contaminated soil remediation and safe utilization by microbial-humic acid-vermiculite-alginate immobilized biocomposite[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 243: 113956.
- [43] SONG L, NIU X, ZHOU B, et al. Application of biochar-immobilized *Bacillus* sp. KSB7 to enhance the phytoremediation of PAHs and heavy metals in a coking plant[J]. *Chemosphere*, 2022, 307(4): 136084.
- [44] HUANG F, GUO C L, LU G N, et al. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism [J]. *Chemosphere*, 2014, 109: 134-142.
- [45] XU W H, LIU Y G, ZENG G M, et al. Characterization of Cr(VI) resistance and reduction by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2009, 19(5): 1336-1341.
- [46] CHENG Y, LIN H, CHEN Z, et al. Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* C09V immobilized on PVA-sodium alginate-kaolin gel beads[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 83: 108-114.
- [47] CHEN Z, HUANG Z, CHENG Y, et al. Cr(VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*[J]. *Chemosphere*, 2012, 87(3): 211-216.
- [48] CHATTERJEE S, GHOSH I, MUKHERJEE K K. Uptake and removal of toxic Cr(VI) by *Pseudomonas aeruginosa*: physico-chemical and biological evaluation[J]. *Current Science*, 2011, 101(5): 645-652.
- [49] 陈旭. 固定化奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* A57 去除重金属 Cr 及其机理研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021. CHEN X. Removal of heavy metal Cr by immobilized *Proteus mirabilis*A57 and its mechanism[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.
- [50] DAS S, MISHRA J, DAS S K, et al. Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil[J]. *Chemosphere*, 2014, 96: 112-121.

(责任编辑:叶飞)