

刘玉玲, 铁柏清, 李园星露, 等. 耐镉细菌的分离及其对土壤中镉的形态影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(2): 250–258.

LIU Yu-ling, TIE Bai-qing, LI Yuan-xing-lu, et al. Isolation of a Cd-resistant bacterium and its effect on the speciation of Cd in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(2): 250–258.

## 耐镉细菌的分离及其对土壤中镉的形态影响

刘玉玲<sup>1,2</sup>, 铁柏清<sup>1,2\*</sup>, 李园星露<sup>1,2</sup>, 魏祥东<sup>1,2</sup>, 彭 鸥<sup>1,2</sup>, 叶长城<sup>1,2</sup>, 刘孝利<sup>1,2</sup>, 孙 健<sup>3</sup>

(1.湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128; 2.湖南省重金属污染耕地安全高效利用工程研究中心, 长沙 410013; 3.广东工业大学环境科学与工程学院, 广州 510006)

**摘 要:**通过传统的分离方法和室内培养实验,从Cd污染土壤中筛选和分离出一株对Cd<sup>2+</sup>吸附率高的菌株B9,并分析B9对土壤Cd形态的影响,探究其在Cd污染土壤修复中应用的可行性。16S rRNA序列分析结果表明,B9与食酸代尔福特菌(*Delftia acidovorans*, 登录号NC010002)的16S rRNA序列具有99%的同源性,结合形态和生理生化指标,将其鉴定为代尔福特菌。研究结果表明,B9在pH=8、温度为35℃、培养时间为48h时,对Cd<sup>2+</sup>的吸附效果最好,且Cd<sup>2+</sup>浓度低于10 mg·L<sup>-1</sup>时,吸附率均在60%以上。接种B9可促进污染土壤中的Cd从弱酸可溶态向可还原态和残渣态转化。添加3 mL(接种量为1.44×10<sup>11</sup> cfus)和10 mL(接种量为4.8×10<sup>11</sup> cfus)B9菌悬液处理能使弱酸可溶态Cd含量分别减少22.17%和25.06%,可还原态Cd含量分别增加9.66%和12.17%,对可氧化态Cd含量无明显影响,残渣态Cd<sup>2+</sup>含量分别增加13.55%和13.61%。研究结果可为Cd污染土壤微生物修复方法及菌株B9的实际应用提供数据参考与理论支持。

**关键词:**食酸代尔福特菌;镉;吸附率;形态

中图分类号:S154 文献标志码:A 文章编号:1672–2043(2018)02–0250–09 doi:10.11654/jaes.2017–0966

### Isolation of a Cd-resistant bacterium and its effect on the speciation of Cd in soil

LIU Yu-ling<sup>1,2</sup>, TIE Bai-qing<sup>1,2\*</sup>, LI Yuan-xing-lu<sup>1,2</sup>, WEI Xiang-dong<sup>1,2</sup>, PENG Ou<sup>1,2</sup>, YE Chang-cheng<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-li<sup>1,2</sup>, SUN Jian<sup>3</sup>

(1.College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Engineering Research Center of Efficient Utilization of Heavy Metal Polluted Crop-land, Hunan Province, Changsha 410013, China; 3.School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Contamination of heavy metals has been increasing in recent years due to industrial activity. Consequently, microbial remediation of heavy metal-polluted soils has received increasing interest. A bacterial strain, B9, with high cadmium adsorption capacity was isolated from cadmium-polluted soils through a conventional method of bacterial isolation and cultivation, and the effects of the strain on soil Cd speciation were investigated by a pot experiment to evaluate the feasibility of using B9 in Cd bioremediation. The results of 16S rRNA gene sequence analysis showed that B9 was 99% homologous to *Delftia acidovorans*, and was identified as *Delftia* sp. by morphological and biochemical analysis. It was found that the highest adsorption efficiency for Cd<sup>2+</sup> was achieved at pH 8, 35 °C, and 48 h of incubation time. In these conditions, more than 60% of the Cd<sup>2+</sup> could be adsorbed from a concentration below 10 mg·L<sup>-1</sup>. B9 could facilitate Cd transformation from weak acid-soluble to reducible and residual phases in soil. The addition of 3 mL and 10 mL bacterial suspensions into the soil resulted in 22.17% and 25.06% decreases in the content of weak acid-soluble Cd, 9.66% and 12.17% increases in the content of reduced Cd, and 13.55% and 13.61% increases in the content of residual Cd, respectively, whereas the content of oxidized Cd did not significantly change. The results provide convincing evidence for the potential application of the B9 strain for bioremediation of Cd-contaminated soil.

**Keywords:** *Delftia acidovorans*; Cd; adsorption rate; speciation

收稿日期:2017-07-10 录用日期:2017-11-06

作者简介:刘玉玲(1992—),女,山东泰安人,硕士研究生,从事环境重金属污染治理与修复。E-mail:2227283058@qq.com

\*通信作者:铁柏清 E-mail:tiebq@qq.com

基金项目:国家科技支撑计划课题(2015BAD05B02-07);国家自然科学基金项目(41201511)

**Project supported:** The National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China(2015BAD05B02-07); The National Natural Science Foundation of China(41201511)

重金属镉(Cd)因移动性大、毒性高、污染面积较广被称为“五毒之首”<sup>[1]</sup>。21世纪以来,随着工业飞速发展,矿产累年采冶,导致农田Cd污染日趋严重<sup>[2]</sup>。我国受Cd污染地区已涉及11个省(市)的25个地区<sup>[3]</sup>。目前对受重金属污染的土壤修复,主要采用的技术方法有化学修复、物理修复、生物修复和微生物修复<sup>[4]</sup>。微生物作为土壤中的活性胶体,具有比表面积大、带电荷、代谢活动旺盛、种类繁多、数量大等特点,有的土壤微生物不仅参与土壤中污染物的循环过程,还可作为环境载体吸附重金属污染物<sup>[5]</sup>。由于微生物对重金属具有积累、吸附和解毒作用,土壤重金属污染微生物处理技术的发展及应用受到广泛关注。Francesca等<sup>[6]</sup>研究发现硫酸盐还原菌对Cd的生物吸附去除率达到77%。晋银佳等<sup>[7]</sup>证实荧光假单胞菌菌株代谢能够产生铁载体,铁载体能够与Cd<sup>2+</sup>络合,使得油麦菜对Cd的吸收减少,其中采用砂基方式培养的油麦菜Cd含量降幅最高达50.74%。

*Delftia* 菌属是1999年由Wen等<sup>[8]</sup>发现的一个新菌属,目前对该类菌的研究主要集中于对有机污染物的去除能力上,如Zhang等<sup>[9]</sup>、梁泉峰<sup>[10]</sup>、Xiao等<sup>[11]</sup>研究发现*Delftia*能够高效降解苯胺并分析了其降解的相关基因和降解途径。González等<sup>[12]</sup>发现*Delftia* sp.能降解2,4-D,在2,4-D初始浓度为100 mg·L<sup>-1</sup>时,降解率达到99.9%。叶杰旭等<sup>[13]</sup>发现*Delftia*能以氯苯为唯一碳源和能源,并且能够降解氯苯。对于*Delftia*修复重金属污染土壤的研究较少,Prakash等<sup>[14]</sup>报道了*D.tsuruhatensis* AR-7可以通过胞内积累或细胞膜吸附将Se<sup>4+</sup>转化为Se<sup>0</sup>,Caravaglia等<sup>[15]</sup>、Morel等<sup>[16]</sup>和Ubalde等<sup>[17]</sup>报道了Cr(VI)抗性菌*D. acidovorans* AR和*Delftia* sp. JD2对Cr(VI)的生物转化,其可将Cr(VI)还原成毒性较低的Cr(III)。目前还没有*Delftia*对于Cd污染土壤修复方面的报道。

土壤中重金属以各种不同的形态存在,重金属的不同形态具有不同的化学活性和生物有效性,重金属形态分布在一定程度上可以反映重金属的生物有效性和毒性变化,重金属的形态及其转化对研究重金属的环境效益及重金属污染治理修复具有重要意义<sup>[18-19]</sup>。

目前,关于微生物-土壤重金属形态的研究较少,本研究通过从矿区镉污染土壤中筛选分离的耐Cd细菌,探究目标菌株对土壤中Cd形态分布的影响,以期为重金属污染土壤微生物修复提供理论依据和数据支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试土壤

供试土壤采自湖南省株洲市霞湾地区某冶炼厂周边受重金属污染的0~20 cm土层土壤,为偏中性紫砂土。由表1可知,重金属含量普遍较高,与国家土壤环境质量三级标准(为保障农林生产和植物正常生长的土壤临界值)相比,Pb、Zn、Cu、Cd的含量分别为国家土壤环境质量三级标准的2.71、10.06、15.61、174.87倍,其中Cd超标最为严重。

### 1.2 耐Cd菌株的筛选

培养基:牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、氯化钠5 g、琼脂15~20 g、蒸馏水1 L,pH 7.2~7.4。121℃高压灭菌锅灭菌30 min。液体培养基不加琼脂。

称取5 g土样,加入到45 mL已灭菌并装有玻璃珠的液体培养基(Cd<sup>2+</sup>含量50 mg·L<sup>-1</sup>)中,30℃、150 r·min<sup>-1</sup>振荡培养,4 d为一个周期,一个周期结束后以10%(V/V)的接种量转接入新鲜的液体培养基(Cd<sup>2+</sup>含量100 mg·L<sup>-1</sup>)中,150 r·min<sup>-1</sup>继续振荡培养一个周期,再转接4次,至液体培养基中的Cd<sup>2+</sup>浓度增加到300 mg·L<sup>-1</sup>。取最后一次富集培养液0.2 mL,以10倍比稀释法稀释后涂布于分离纯化培养基平板上,并在30℃的恒温培养箱中倒置培养48~96 h。肉眼观察菌落生长情况,并分别挑选不同形态的典型单菌落,在新的分离纯化培养基平板上继续划线分离,直到培养出菌落特征一致的纯菌种。然后将纯菌种接种到含Cd<sup>2+</sup>的液体培养基中振荡培养,观察菌株生长情况,选择生长较好的菌株保存并进行吸附试验。取1 mL菌液接入50 mL已灭菌的液体培养基中,培养基含Cd<sup>2+</sup>浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>和100 mg·L<sup>-1</sup>,在30℃下振荡培养24 h后,取25 mL培养液于13 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液测定Cd<sup>2+</sup>浓度,并筛选Cd<sup>2+</sup>吸附率最

表1 土壤理化性质

Table 1 Soil physical and chemical properties

土壤类型	pH 值	Pb/mg·kg <sup>-1</sup>	Zn/mg·kg <sup>-1</sup>	Cu/mg·kg <sup>-1</sup>	Cd/mg·kg <sup>-1</sup>
霞湾土壤	7.9±0.04	1356±13.48	5030±12.27	624.5±3.88	174.87±1.04
土壤环境质量标准(三级)	>6.5	≤500	≤500	≤40	≤1

注:测定结果为平均值±标准差。

高的菌株,即为目标菌株进行后续研究。

### 1.3 目标菌株鉴定

菌株的形态及生理生化鉴定:观察菌株的形态特征并根据菌株的形态特征,按照《常见细菌系统鉴定手册》对分离纯化的细菌进行鉴定。

菌株 16S rRNA 的扩增和鉴定:将 1.2 中筛选出的目标菌株培养至对数期,取适量的菌体到 30  $\mu\text{L}$  无菌水中,98  $^{\circ}\text{C}$  热解 20 min 后,4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min。取 1  $\mu\text{L}$  上清液作为模板 DNA,用于 PCR 扩增。用细菌 16S rRNA 通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3' 和 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTAC-GACTT-3')来进行 PCR 扩增。扩增产物由湖南擎科生物技术有限公司进行测序。

### 1.4 目标菌株的生长曲线

将目标菌株接种在液体培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 24 h,以 2% 的接种量接入新的  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 0(CK)、10、100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  培养基中,在 0~54 h 周期里,以 3 h 为时间间隔取样,于 600 nm 下测定不同浓度下的生长曲线。

### 1.5 不同培养条件对菌株去除 $\text{Cd}^{2+}$ 效果的影响

#### 1.5.1 菌体的制备

将目标菌株接种在液体培养基中 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  培养 24 h,用无菌水洗涤两次后制成  $\text{OD}_{600}=1.6$  ( $7.6\times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的菌悬液。

#### 1.5.2 pH 对目标菌株吸附 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

将 50 mL 含 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  的培养液 pH 分别调至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,每个 pH 值设置 3 个重复,灭菌后对培养液的 pH 进行测定,并做相应校正。按 2% 接种量分别接入菌悬液,30  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 48 h,13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,采用 ICP-OES 测定上清液  $\text{Cd}^{2+}$  的浓度,计算目标菌株对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率。

#### 1.5.3 培养温度对目标菌株吸附 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

将 50 mL 含 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  的培养液 pH 调为 7.0,灭菌后按 2% 的接种量接入菌悬液,分别于 10、20、30、35、40  $^{\circ}\text{C}$  下 120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 48 h,测定方法同 1.5.2。

#### 1.5.4 培养时间对目标菌株吸附 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

将 50 mL 含 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  的培养液 pH 调为 7.0,灭菌后按 2% 的接种量接入菌悬液,于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  分别振荡培养 18、24、36、48、72 h,测定方法同 1.5.2。

#### 1.5.5 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度对目标菌株吸附 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

分别配制  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为 1、5、10、50、100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的

培养液,pH 调为 7.0,灭菌后按 2% 的接种量接入菌悬液,于 30  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 48 h,测定方法同 1.5.2。

### 1.6 菌株对土壤 Cd 形态的影响

试验用土先经过阳光曝晒后过 2 mm 筛,试验用塑料小盆钵的上缘直径 10 cm,底面直径 9 cm,高 14 cm。每盆装土 150 g(以风干土计)。将菌株培养 48 h 后接种 3 mL( $T_1$ ,接种量为  $1.44\times 10^{11}$  cfus)和 10 mL( $T_2$ ,接种量为  $4.8\times 10^{11}$  cfus)到土壤中,加蒸馏水使土壤含水量保持田间持水量的 60%。以不加菌的为对照(CK),分别于接种后 0、5、10、20、30 d 取鲜土样 10 g 测定土壤 Cd 的形态。

### 1.7 分析方法

Cd 的形态分析采用 BCR 法<sup>[20]</sup>,用 ICP-OES(美国 PE8300)测定其 Cd 的浓度。BCR 提取法:(1)用 40 mL 0.11  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的醋酸(HOAc)在室温( $22\pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  下提取弱酸可溶态 Cd;(2)用 40 mL 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸羟胺(pH=2.0)在室温( $22\pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  下提取可还原态 Cd;(3)加入 10 mL 8.8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (pH=2~3)溶液,先在室温( $22\pm 5$ )  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 h,间歇振荡,然后在( $85\pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 1 h,取下盖子继续水浴加热使其体积至 3 mL;再向其中加入 10 mL 8.8  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (pH=2~3)溶液,85 $\pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  水浴反应 1 h,继续水浴加热使其体积小于 1 mL。冷却后加入 50 mL 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OAc}$  提取可氧化态 Cd;(4)残渣态 Cd 提取采用全消解处理,消解步骤同土壤全量消解。

### 1.8 数据处理

图表处理运用 Microsoft Excel 软件;多重差异显著性分析运用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件。计算公式:吸附率=(初始浓度-终浓度)/初始浓度 $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐 Cd 菌株的分离与鉴定

供试土壤样品经梯度富集培养后,分离纯化得到生长良好的耐 Cd 菌株 12 株,其中细菌 9 株,真菌 3 株,分别命名为 B1~B9 和 F1~F3(表 2)。从表 2 可以看出,当液体培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度为 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,B9 的吸附率最高,为 65.64%,其次为 B2,吸附率为 47.14%,其他菌株的吸附率在 7.78%~30.27%之间。当液体培养基中  $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度为 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,各菌株  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附率均低于初始浓度 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其中 B9 的  $\text{Cd}^{2+}$  吸附率最高,为 44.30%,其次为 B2(26.02%),其他菌株的  $\text{Cd}^{2+}$  吸附率均较低,在 5%左右。根据本实验

表2 耐 Cd 菌株处理后液体培养基中 Cd 浓度的变化

Table 2 Variation of cadmium concentration in medium after treatment with cadmium-resistant bacteria

菌株	培养基初始 Cd <sup>2+</sup> 浓度 10 mg·L <sup>-1</sup>			培养基初始 Cd <sup>2+</sup> 浓度 100 mg·L <sup>-1</sup>		
	培养后 Cd <sup>2+</sup> 浓度/mg·L <sup>-1</sup>	吸附量/mg·L <sup>-1</sup>	吸附率/%	培养后 Cd <sup>2+</sup> 浓度/mg·L <sup>-1</sup>	吸附量/mg·L <sup>-1</sup>	吸附率/%
CK	9.78	—	—	95.46	—	—
B1	8.24	1.54e	15.74	91.09	4.37d	4.58
B2	5.17	4.61b	47.14	70.62	24.84b	26.02
B3	8.25	1.53e	15.64	91.52	3.94de	4.13
B4	9.02	0.76g	7.78	96.15	—	—
B5	8.17	1.61e	16.46	91.39	4.07de	4.26
B6	7.40	2.38d	24.34	90.72	4.74d	4.96
B7	8.62	1.16f	11.86	92.53	2.93e	3.07
B8	6.85	2.93c	29.96	89.39	6.07c	6.36
B9	3.36	6.42a	65.64	53.17	42.29a	44.30
F1	6.82	2.96c	30.27	89.55	5.91c	6.19
F2	7.33	2.45d	25.05	91.39	4.07de	4.26
F3	8.59	1.19f	12.17	96.53	—	—

注: 同列不同字母表示 5% 差异水平; CK 为不添加菌株的处理。

的目的, 选取 Cd<sup>2+</sup> 吸附率最高的 B9 菌株进行深入研究。

菌株 B9 菌落为黄色, 呈圆形, 有凸起, 边缘平整, 光滑湿润 (图 1a), 扫描电镜下菌体呈杆状 (图 1b)。葡萄糖发酵试验、柠檬酸盐试验为阳性, 淀粉水

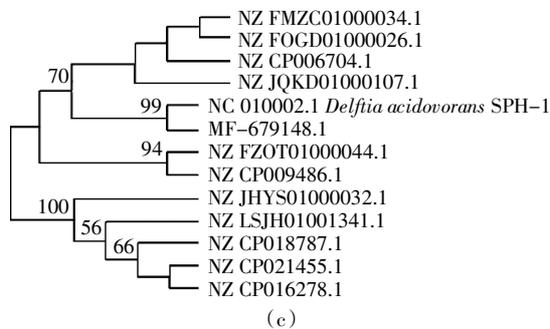
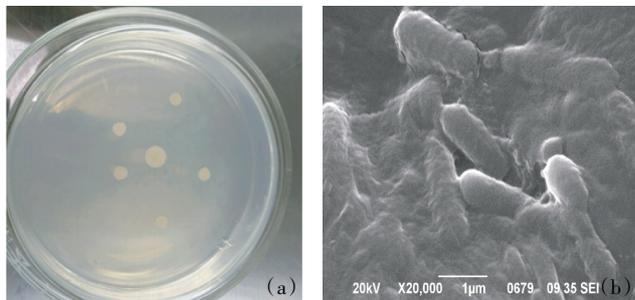


图1 菌株 B9 的形态学特征(a)、扫描电镜图(b)及其 16S rRNA 基因序列的系统进化树分析(c)

Figure 1 Morphological characteristic(a), scanning electron microscopy image(b) and the phylogenetic tree of 16S rRNA(c) of strain B9

解试验、明胶水解试验、吲哚试验、V-P 试验为阴性, 革兰氏染色阴性, 全部与 *D. acidovorans* 生理生化特征一致。16S rRNA 序列比对结果表明, B9 与 *D. acidovorans* 的序列具有 99% 的同源性 (图 1c), 结合菌株形态观察、生理生化试验, 可以确定目标菌株为 *Delftia* sp., 基因登录号为 MF679148。

## 2.2 不同 Cd<sup>2+</sup> 浓度下的生长曲线

图 2 是 Cd<sup>2+</sup> 浓度分别为 0、10、100 mg·L<sup>-1</sup> 下, 培养 54 h 后菌株 B9 的生长曲线。由图 2 可见, Cd<sup>2+</sup> 浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup> 时 B9 对数期后的生长量降低, 与 CK 都是在培养的 36 h 进入稳定期。Cd<sup>2+</sup> 浓度为 100 mg·L<sup>-1</sup> 时延长了 B9 生长的延滞期, B9 延迟 12 h 后进入对数期, 且进入对数期后生长量降低, 进入稳定期后 OD<sub>600</sub> 在 2.5 左右, 表明 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 有较强的耐受性。

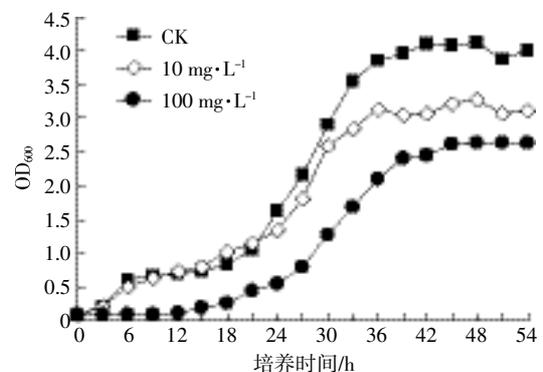


图2 菌株 B9 生长曲线

Figure 2 Growth curve of strain B9

### 2.3 不同培养条件对目标菌株 B9 去除 $\text{Cd}^{2+}$ 效果的影响

由图 3a 可见,在培养温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时,当 pH 值从 5 增加到 8, B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率均显著增加;当 pH=8 时,  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率达到最大值  $6.73\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $69.85\%$ ; 当 pH 值继续增加时, B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率均明显降低。当 pH=9 时, B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附率为  $42.39\%$ , 比 pH=8 低  $2.64\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可见, pH 是影响 B9 吸附  $\text{Cd}^{2+}$  的一个因素。根据实验结果可知, B9 在 pH=8 的环境中对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附效果最好。

由图 3b 可见,在培养温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH=7、 $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 0~48 h 时, B9 随着培养时间的增加对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率显著增加, 到 48 h 时  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率达到最大值  $8.13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $84.37\%$ ; 培养时间达到 72 h 时, 吸附量比 48 h 时有所减少, 但差异不显著。

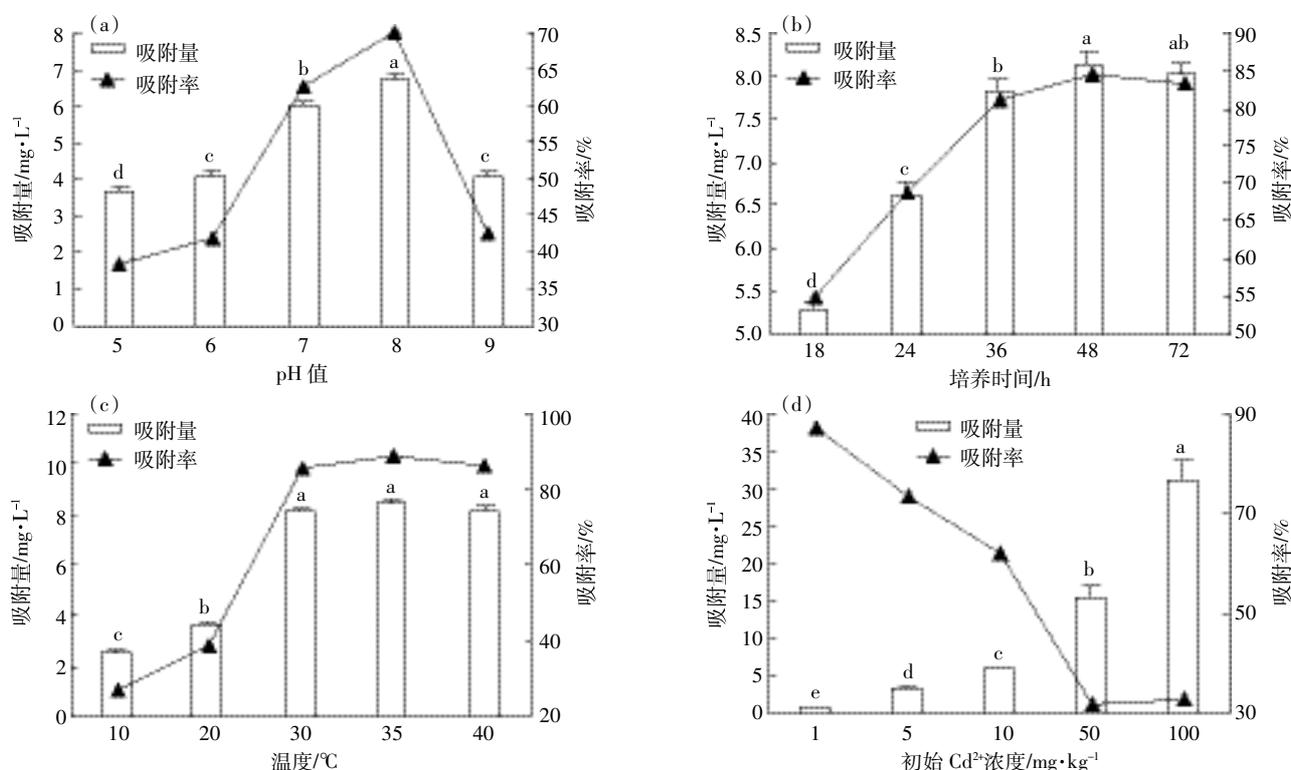
由图 3c 可见,在 pH=7、 $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度为  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 当温度从  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  增加到  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量和吸附率均显著增加; 当温度从  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  增加到  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 两者吸附量和吸附率均没有显著差异, 均保持在

较高的水平, 吸附量在  $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上, 吸附率在  $85\%$  以上。

由图 3d 可见,在培养温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH=7、 $\text{Cd}^{2+}$  初始浓度在  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以下时, 吸附率都在  $60\%$  以上, 浓度越低吸附率越高, 初始  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为  $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 吸附率达到  $87.07\%$ ; 初始  $\text{Cd}^{2+}$  浓度为  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 吸附率下降到  $31.8\%$ 。而 B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量随着  $\text{Cd}^{2+}$  浓度的增加而不断增加, B9 对  $\text{Cd}^{2+}$  吸附量从  $0.85\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  增加到  $31.28\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.4 菌株 B9 对土壤 Cd 形态的影响

添加菌株 B9 后土壤弱酸可溶态 Cd 的含量随着培养时间的增加呈现出先减少后趋于平缓的趋势。土壤培养至第 10 d 时,  $T_1$  (添加  $3\text{ mL}$  菌悬液) 和  $T_2$  (添加  $10\text{ mL}$  菌悬液) 处理土壤样品中弱酸可溶态 Cd 的含量均显著减少, 分别减少  $44.40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $45.33\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (表 3); 在培养的第 10 d 到第 30 d,  $T_1$ 、 $T_2$  土壤样品的弱酸可溶态 Cd 的含量随着时间的推移有所变化, 但没有出现显著差异。  $T_1$ 、 $T_2$  处理与 CK 相比, 在培养的 30 d 内弱酸可溶态 Cd 的含量均具有显著性差异,  $T_1$  与  $T_2$  两个处理之间除了第 30 d, 其他时间



不同小写字母表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Different lowercase letters indicate significant differences among treatments

图 3 不同培养条件对菌株 B9 吸附  $\text{Cd}^{2+}$  效果的影响

Figure 3 Influence of different culture conditions on the adsorption rate of Cd from strain B9

无显著差异,因此添加菌株 B9 对土壤中弱酸可溶态 Cd 含量影响较大,B9 两种不同添加量影响较小。

添加菌株 B9 后,CK 处理中可还原态 Cd 含量随着培养时间的增加呈现出先减少后增加的趋势(表 3),培养至第 10 d 可还原态 Cd 含量减少  $2.89 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;第 10 d 到第 30 d 内可还原态 Cd 含量增加  $14.72 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,这可能与培养时保持加水有关。 $T_1$  和  $T_2$  处理中可还原态 Cd 含量随培养时间的增加呈现出先增加后趋于稳定的趋势, $T_1$ 、 $T_2$  处理培养到第 10 d 时,可还原态 Cd 含量均显著增加,比开始土壤样品的可还原态 Cd 含量分别增加  $13.71$ 、 $17.60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; $T_1$  在培养的第 10 d 到第 30 d 土壤中可还原态 Cd 含量虽有所变化,但没有显著性差异,培养至第 30 d 时,比开始增加了  $15.17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 $T_2$  在培养的第 10 d 到第 20 d 土壤中可还原态 Cd 含量虽有所变化,但与第 10 d 相比,没有显著差异;培养到第 30 d 时,可还原态 Cd 含量上升到  $38.06 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,比开始增加了  $20.69 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 $T_1$ 、 $T_2$  和 CK 三个处理之间在培养的 30 d 内可还原态 Cd 的含量均具有显著性差异,因此,添加菌株 B9 及其添加量对土壤中可还原态 Cd 含量影响均较大。

添加菌株 B9 后,CK、 $T_1$  和  $T_2$  三个处理可氧化态 Cd 含量随着培养时间的增加均呈现出减少的趋势(表 3)。CK 处理的可氧化态 Cd 在培养的前 5 d 内显著减少,之后含量虽然有变化,但差异不显著,培养至第 30 d 时,比开始减少了  $1.81 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 $T_1$  处理在培

养前 10 d 内可氧化态 Cd 含量显著减少,减少量为  $2.44 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;培养的第 10 d 到第 30 d 差异不显著。 $T_2$  处理在培养的第 30 d 比开始时可氧化态 Cd 含量显著减少,减少量为  $1.08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 $T_1$ 、 $T_2$  和 CK 三个处理之间在培养的 30 d 内可氧化态 Cd 的含量均无显著性差异,因此,添加菌株 B9 及其添加量对土壤中可氧化态 Cd 含量没有显著影响。

土壤样品中镉的残渣态含量变化如表 3 所示,CK 处理中残渣态 Cd 含量随着时间的变化没有显著差异, $T_1$ 、 $T_2$  处理残渣态 Cd 含量随着培养时间的增加呈现出显著增加的趋势。 $T_1$  处理培养至第 20 d 时,残渣态 Cd 含量达到最大值  $34.20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,比开始增加了  $18.67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,之后含量减少; $T_2$  处理土壤样品中 Cd 的残渣态含量持续增加,培养至第 30 d 时,残渣态 Cd 含量达到最大值  $33.13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,比开始增加了  $17.20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 $T_1$ 、 $T_2$  和 CK 三个处理之间在培养的 30 d 内残渣态 Cd 的含量均具有显著性差异,因此,添加菌株 B9 及其添加量对土壤中可还原态 Cd 含量影响均较大。

图 4 为经过 30 d 培养 Cd 形态百分比的变化情况,可见随着培养时间的延长,添加 B9 菌悬液的处理能显著降低土壤中弱酸可溶态 Cd 含量,增加可还原态和残渣态 Cd 含量,可氧化态 Cd 含量变化不明显。CK 处理中弱酸可溶态 Cd 含量在培养 30 d 后降至最小值,减少了 4.64%。 $T_1$  处理中弱酸可溶态 Cd 含量在培养 10 d 后降至最小值,减少了 22.17%。 $T_2$  处

表 3 菌株 B9 对土壤 Cd 形态的影响( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

Table 3 Effect of strain B9 on the speciation of Cd in the soil( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )

时间/d	弱酸可溶态 Cd			可还原态 Cd		
	CK	$T_1$ (3 mL)	$T_2$ (10 mL)	CK	$T_1$ (3 mL)	$T_2$ (10 mL)
0	131.05±0.91aB	133.39±0.81aA	133.70±0.37aA	19.30±2.01cA	17.16±3.79cA	17.37±1.74dA
5	128.93±0.81aA	125.35±2.00bB	123.15±0.43bB	20.43±0.60cC	22.71±0.52bB	25.20±0.49cA
10	125.47±1.88bA	88.99±5.88cB	88.37±0.58cB	16.41±0.19dC	30.87±0.58aB	34.97±0.88bA
20	125.37±0.88bA	89.33±4.45cB	88.09±0.17cB	25.60±0.84bC	30.42±0.11aB	35.02±0.21bA
30	125.35±2.00bA	91.93±1.43cB	88.51±0.39cC	31.13±0.31aC	32.87±0.58aB	38.06±1.26aA
时间/d	可氧化态 Cd			残渣态 Cd		
	CK	$T_1$ (3 mL)	$T_2$ (10 mL)	CK	$T_1$ (3 mL)	$T_2$ (10 mL)
0	8.66±0.36aA	8.54±0.10aA	7.58±0.98aA	15.93±0.12aA	15.53±0.25eB	15.93±0.12dA
5	6.51±0.60bA	7.13±0.53bA	6.86±0.42abA	15.27±0.06bC	17.20±0.20dB	18.50±1.06cA
10	6.23±0.48bAB	6.10±0.40cB	6.98±0.38abA	15.67±0.25abC	29.23±0.35cB	32.00±0.17bA
20	6.54±0.06bA	6.09±0.52cA	6.63±0.13abA	15.93±0.31aC	34.20±1.14aA	32.03±0.50bB
30	6.85±0.41bA	6.18±0.65cA	6.50±0.18bA	16.00±0.35aC	31.87±0.57bB	33.13±0.49aA

注:不同小写字母表示同一列数据之间的差异显著,不同大写字母表示同一行数据之间的差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase and uppercase letters indicate significant differences in a row and in a line, respectively ( $P<0.05$ ).

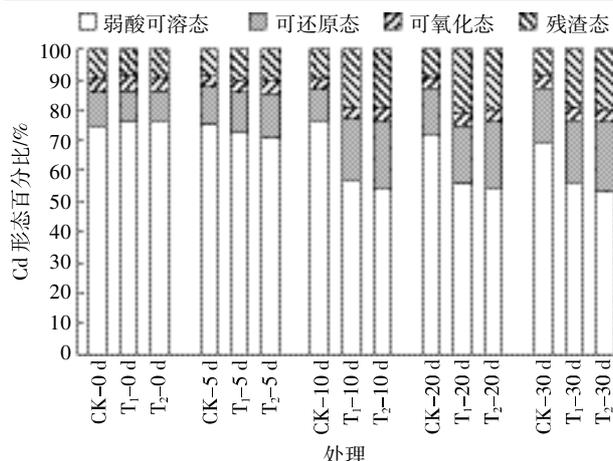


图4 添加菌株 B9 后各形态 Cd 百分比动态变化

Figure 4 Dynamic changes of percentage of Cd under exogenous addition strain B9

理中的酸可溶态 Cd 含量在培养 20 d 后降至最小值, 减少了 25.06%。在整个培养过程中, T<sub>2</sub> 土壤中弱酸可溶态 Cd 的减少量一直大于 T<sub>1</sub>。CK 处理的可还原态 Cd 含量在培养的第 10 d 降至 10.02%, 培养至第 30 d 上升到 17.45%。T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 处理中可还原态 Cd 含量增加明显, 培养至第 30 d 时分别达到 19.47% 和 22.10%, 比开始增加了 9.66% 和 12.17%。CK、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 处理中可氧化态 Cd 含量由 4.95%、4.88%、4.33% 分别降至 3.84%、3.66%、3.77%, 但 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 与 CK 相比, 减少量都没有明显差异。T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub> 处理中残渣态 Cd 含量明显增加, 由 8.88%、9.11% 分别升至 22.43%、22.72%, 增加了 13.55%、13.61%。CK 中残渣态 Cd 含量变化不明显。

### 3 讨论

微生物对重金属离子的吸附, 不仅因微生物种类的不同而异, 还受微生物生长和吸附条件的限制, 如 pH、温度、吸附时间、初始重金属浓度等。为了达到 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 的最佳吸附效果, 研究了 B9 吸附培养液中 Cd<sup>2+</sup> 的环境条件。培养液的 pH 值是影响菌株 B9 吸附 Cd<sup>2+</sup> 的一个重要因素(图 3a), 较低的 pH 值不利于重金属 Cd<sup>2+</sup> 的吸附, 这可能是由于在较低的 pH 值下, 液体培养基中的 H<sup>+</sup> 与 Cd<sup>2+</sup> 竞争表面吸附位点。而 pH 较高时 B9 对 Cd 的吸附率也减少, 可能是 Cd<sup>2+</sup> 主要以氢氧化物沉淀的形式存在, 氢氧化物沉积于菌体细胞表面, 影响了 Cd<sup>2+</sup> 与吸附位点的结合, 使得吸附率下降<sup>[21]</sup>。培养时间也会影响 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附效果(图 3b), 72 h 时的吸附率略低于 48 h 时的吸附率, 这可能是由于菌株生长消耗营养物质, 使菌株生长速率降低或生物量不再增加, 随着时间的延长出现了解吸现

象; 或者菌株在生长代谢过程中产生有生物毒性的产物, 这些产物随着时间积累, 对菌株的生长繁殖造成影响, 从而导致 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附量减少<sup>[22]</sup>。温度对 B9 吸附 Cd<sup>2+</sup> 的影响(图 3c) 主要表现在菌体的吸附活性上, 温度过高或过低都会降低 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 吸附过程所需的活化能, 进而对吸附能力造成影响。很多研究<sup>[23-24]</sup> 显示 *Delfia.sp* 生长的适宜温度在 37 °C 左右, 与本研究结果相近。Cd<sup>2+</sup> 浓度变化过程中(图 3d), 吸附量比吸附率更能体现出 B9 对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附作用, 研究表明, 微生物对重金属离子的吸附能力与细胞表面的吸附位点的饱和度有关, Cd<sup>2+</sup> 初始浓度较低时, B9 表面带负电荷的活性吸附位点多, 能与培养液中 Cd<sup>2+</sup> 充分结合, 使吸附量增加。Cd<sup>2+</sup> 初始浓度的增加导致吸附位点逐渐被占用, 从而导致吸附率减少<sup>[25]</sup>, 同时, Cd<sup>2+</sup> 浓度高时, 会对菌体生长量产生影响(图 2), 使菌体 OD<sub>600</sub> 值下降, 这也会减少其对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附量。

虽然土壤中重金属元素的总量可以作为评价该土壤污染水平的关键因素, 但不能真正反映其潜在的生态危害性, 重金属元素的不同存在形态的环境行为和生态效应不同, 所以分析土壤中重金属的不同形态很有必要<sup>[26]</sup>。本试验研究显示, B9 接种到土壤后能够使 Cd 的形态发生变化, 且各种形态在培养的第 10 d 几乎达到平衡, 即弱酸可溶态 Cd 含量减少, 可还原态和残渣态 Cd 含量显著增加, 而可氧化态 Cd 含量变化不显著, 这与曹霞<sup>[27]</sup> 和范文宏等<sup>[18]</sup> 得出的结论类似。添加菌株 B9 前, 土壤中 Cd 形态百分比表现为弱酸可溶态 > 可还原态 > 残渣态 > 可氧化态, 处理后土壤中 Cd 形态百分比表现为弱酸可溶态 > 可还原态 ≈ 残渣态 > 可氧化态。土壤中 Cd 的弱酸可溶态虽然一直占比最高, 但添加 B9 后 Cd 的形态还是由有效态向难溶态转化, 这能有效降低 Cd 在土壤中的毒性。添加 B9 能使 Cd 的形态发生变化可能是由于 B9 的生命活动的分泌物或代谢产物使重金属形态发生了转化, 如曹裕松等<sup>[28]</sup> 发现细菌能将 Cd<sup>2+</sup> 还原成难溶的 CdS。B9 使 Cd 形态发生变化也可能是由于 B9 对重金属 Cd 的吸附富集作用, 微生物可通过带电荷的细胞表面吸附重金属离子, 或通过摄取必要的营养元素主动吸收重金属离子, 将重金属离子富集在细胞表面或内部, 一些微生物能产生胞外聚合物(如多糖、糖蛋白、脂多糖等), 其带有大量的阴离子基团, 能与金属离子结合; 某些微生物产生的代谢产物(如柠檬酸)也是一种很好的金属螯合剂。有关 B9 对土壤中 Cd 形态变化的影响机理还需进一步研究。

## 4 结论

(1)从重金属污染的土壤中分离得到对  $\text{Cd}^{2+}$  具有较高吸附率的菌株为 B9, 经鉴定该菌种为 *Delftia* sp.。

(2)通过对不同培养条件下菌株吸附  $\text{Cd}^{2+}$  效果的试验,发现 B9 在 pH=8、温度为 35 °C、培养时间为 48 h 条件下,对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附效果最好,并且  $\text{Cd}^{2+}$  浓度在  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  及以下时,吸附率在 60% 以上。

(3)目标菌株 B9 能影响土壤中 Cd 的形态,Cd 从弱酸可溶态向可还原态和残渣态转化。不同添加量处理下,弱酸可溶态 Cd 含量减少 44.40、45.33  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,可还原态 Cd 含量增加 15.71、20.69  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,可氧化态 Cd 含量无明显变化,残渣态 Cd 含量增加 18.67、17.2  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

## 参考文献:

- [1] 王京文,李丹,柳俊,等.耐镉菌株对土壤镉形态及土壤微生物群落结构的影响[J].农业环境科学学报,2015,34(9):1693-1699.  
WANG Jing-wen, LI Dan, LIU Jun, et al. Effects of cadmium tolerant bacteria on soil cadmium forms and microbial community structure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(9):1693-1699.
- [2] 王维.水稻镉吸收的区域模型及其调控研究[D].南京:南京林业大学,2012.  
WANG Wei. Rice cadmium uptake by regional model and its regulation [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2012.
- [3] 安红敏,郑伟,高扬.镉的健康危害及干预治疗研究进展[J].环境与健康杂志,2007,24(9):739-742.  
AN Hong-min, ZHENG Wei, GAO Yang. Research progress in cadmium toxicity[J]. *J Environ Health*, 2007, 24(9):739-742.
- [4] 凌辉,谢水波,唐振平,等.重金属污染土壤的修复方法及其在几类典型土壤修复中的应用[J].四川环境,2012,31(1):118-122.  
LING Hui, XIE Shui-bo, TANG Zhen-ping, et al. Remediation of heavy metal polluted soil and application for typical soils[J]. *Sichuan Environment*, 2012, 31(1):118-122.
- [5] 余天红,黎华寿.砷污染土壤微生物修复机制及其研究进展[J].环境污染与防治,2014,36(12):77-82.  
YU Tian-hong, LI Hua-shou. Mechanism of bioremediation in arsenic contaminated soil and its research progress[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2014, 36(12):77-82.
- [6] Paquanelli F, Cruz V C, Toro L. Isolation and quantification of cadmium removal mechanisms in batch reactors inoculated by sulphate reducing bacteria: Biosorption versus bioprecipitation[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9):2981-2987.
- [7] 晋银佳,刘文,朱跃,等.荧光假单胞菌产铁载体对油菜吸收砂基和水基中 Cd 的影响[J].环境工程学报,2016,10(1):415-420.  
JIN Yin-jia, LIU Wen, ZHU Yue, et al. Effects of siderophore produced by pseudomonas fluorescence on cadmium uptake from sand-base and water-base systems by lettuces[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(1):415-420.
- [8] Wen A, Fegan M, Hayward C, et al. Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov.[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(2):567-576.
- [9] Zhang T, Zhang J L, Liu S J, et al. A novel and complete gene cluster involved in the degradation of aniline by *Delftia* sp. AN3[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(6):717-724.
- [10] 梁泉峰.生物降解菌株 *Delftia tsuruhatensis* AD9 中染色体编码的苯胺代谢基因簇的克隆和功能研究[D].北京:中国农业科学院,2005.  
LIANG Quan-feng. Cloning and functional analysis of chromosome-encoded gene cluster for aniline metabolic pathway in *Delftia tsuruhatensis* AD9[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2005.
- [11] Xiao C B, Ning J, Yan H, et al. Biodegradation of aniline by a newly isolated *Delftia* sp. XYJ6[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2009, 17(3):500-505.
- [12] González A J, Gallego A, Gemini V L, et al. Degradation and detoxification of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid(2, 4-D) by an indigenous *Delftia* sp. strain in batch and continuous systems[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 66(1):8-13.
- [13] 叶杰旭,林彤晖,骆煜昊,等.1 株氯苯高效降解菌的分离鉴定及降解特性[J].环境科学,2017,38(2):802-808.  
YE Jie-xu, LIN Tong-hui, LUO Yu-hao, et al. Isolation and identification of a chlorobenzene-degrading bacterium and its degradation characteristics[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(2):802-808.
- [14] Prakash D, Pandey J, Tiwary B N, et al. Physiological adaptations and tolerance towards higher concentration of selenite( $\text{Se}^{4+}$ ) in *Enterobacter* sp. AR-4, *Bacillus* sp. AR-6 and *Delftia tsuruhatensis*, AR-7[J]. *Extremophiles*, 2010, 14(3):261-272.
- [15] Garavaglia L, Cerdeira S B, Vullo D L. Chromium(VI) biotransformation by  $\beta$ - and  $\gamma$ -proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1/2/3):104-110.
- [16] Morel M A, Ubalde M C, Braña V, et al. *Delftia* sp. JD2: A potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity[J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(1):63-68.
- [17] Ubalde M C, Braña V, Sueiro F, et al. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies[J]. *Current Microbiology*, 2012, 64(6):597-603.
- [18] 范文宏,姜维,王宁.硫酸盐还原菌修复污染土壤过程中镉的地球化学形态分布变化[J].环境科学学报,2008,28(11):2291-2298.  
FAN Wen-hong, JIANG Wei, WANG Ning. Changes of cadmium geochemical speciation in the process of soil bioremediation by sulfate-reducing bacteria[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(11):2291-2298.
- [19] 韩春梅,王林山,巩宗强,等.土壤中重金属形态分析及其环境学意义[J].生态学杂志,2005,24(12):1499-1502.  
HAN Chun-mei, WANG Lin-shan, GONG Zong-qiang, et al. Chemical

- forms of soil heavy metals and their environmental significance[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(12): 1499-1502.
- [20] Rauret G, López-sánchez J F, Sahuquillo A, et al. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials[J]. *J Environ Monit*, 1999, 1(1): 57-61.
- [21] 吴涓, 李清彪, 邓旭, 等. 重金属生物吸附的研究进展[J]. 离子交换与吸附, 1998, 14(2): 180-187.  
WU Juan, LI Qing-biao, DENG Xu, et al. Research advances in biosorption of heavy metals[J]. *Ion Exchange and Adsorption*, 1998, 14(2): 180-187.
- [22] 郑晓丹. 变形假单胞菌吸附镉的机制及其吸附条件的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2010.  
ZHENG Xiao-dan. Research on the mechanism and the conditions of cadmium adsorbed by *Pseudomonas Plecoglossicida*[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2010.
- [23] 吕晶华, 段云霞, 许丹宇, 等. 高效苯胺降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 城市环境与城市生态, 2016, 29(1): 32-34.  
LÜ Jing-hua, DUAN Yun-xia, XU Dan-yu, et al. Isolation and identification of bacteria degrading aniline[J]. *Urban Environment & Urban Ecology*, 2016, 29(1): 32-34.
- [24] 侯颖, 王飞, 李静泉, 等. *Delftia* sp. T3-6 菌株及其粗酶液对 2', 6'-甲基乙基-2-氯乙酰苯胺的降解[J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1396-1402.  
HONG Ying, WANG Fei, LI Jing-quan, et al. Degradation characteristics of 2', 6'-methylethyl-2-chloroacetanilide by strain *Delftia* sp. T3-6 and its crude enzyme[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(6): 1396-1402.
- [25] Vecchio A, Finoli C, Simine D D, et al. Heavy metal biosorption by bacterial cells[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1998, 361(4): 338-342.
- [26] 郭朝晖, 朱永官. 典型矿冶周边地区土壤重金属污染及有效性含量[J]. 生态环境学报, 2004, 13(4): 553-555.  
GUO Zhao-hui, ZHU Yong-guan. Contamination and available contents of heavy metals in soils in the typical mining and smelting circumjacent districts[J]. *Ecology and Environment*, 2004, 13(4): 553-555.
- [27] 曹霞. 耐铅镉微生物的筛选及其对污染土壤铅镉化学形态的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.  
CAO Xia. Screening of lead and cadmium-resistant microorganism and their effect on chemical form of Pb and Cd in contaminated soil[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.
- [28] 曹裕松, 李志安, 邹碧. 根际环境的调节与重金属污染土壤的修复[J]. 生态环境, 2003, 12(4): 493-497.  
CAO Yu-song, LI Zhi-an, ZOU Bi. Regulation of rhizosphere and remediation of polluted soil by heavy metal[J]. *Ecology and Environment*, 2003, 12(4): 493-497.