

Study on the Treatment of Lead Pollution in Water by Nano-Fe₃O₄ Immobilized *Shewanella putrefaciens*

Hongzhao Chen¹, Yuwen Zhao², Wenjuan Yuan^{3*}

¹Chengdu Shishi Tianfu High School, Chengdu Sichuan

²Chengdu Shude High School, Chengdu Sichuan

³College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu Sichuan

Email: chenhz829@163.com, 1052371870@qq.com, *yuanwenjuanzr@163.com

Received: Apr. 6th, 2020; accepted: Apr. 21st, 2020; published: Apr. 28th, 2020

Abstract

Aim: To explore the removal of heavy metal Pb²⁺ by immobilized *Shewanella putrefaciens* in nanomaterials, and to explore the mechanism of immobilized ball. **Methods:** The dead cells of *Shewanella putrefaciens* were prepared with sodium alginate (SA) and nano-Fe₃O₄ as immobilization materials and the immobilized beads were prepared for removal experiments. The removal efficiency was measured by atomic spectrophotometer. The changes in surface structure before and after adsorption of immobilized beads were observed with scanned electron microscopy (SEM). **Results:** Regardless of whether the fixed material selected sodium alginate (SA) or sodium alginate + nano-Fe₃O₄ (SA + Fe), the removal efficiency of dead cells was higher than that of living cells. The removal efficiency of Pb²⁺ by the beads of sodium alginate + nano-Fe₃O₄ + *Shewanella putrefaciens* (SA + Fe + Xs) was as high as 92.11%. Scanning electron microscopy showed that the surface of the immobilized spheres became flat and dense after the removal experiment, which may further indicate that Pb²⁺ may adhere to the surface of the immobilized beads by adsorption. **Conclusion:** The dead cells of *Shewanella putrefaciens* have a stronger advantage in removing heavy metal Pb²⁺; nano-Fe₃O₄ has great potential as a microbial immobilization material.

Keywords

Shewanella putrefaciens, Sodium Alginate, Nano-Fe₃O₄, Immobilized, Lead

纳米Fe₃O₄固定化腐败希瓦氏菌处理水体铅污染的研究

陈弘钊¹, 赵聿文², 袁文娟^{3*}

¹成都石室天府中学, 四川 成都

²成都树德中学, 四川 成都

³四川大学生命科学学院, 四川 成都

Email: chenhz829@163.com, 1052371870@qq.com, *yuanwenjuanzr@163.com

收稿日期: 2020年4月6日; 录用日期: 2020年4月21日; 发布日期: 2020年4月28日

摘要

目的: 探索纳米材料固定化腐败希瓦氏菌对 Pb^{2+} 的去除作用, 并对固定化小球去除作用的机理进行了初步探讨。**方法:** 腐败希瓦氏菌的死活细胞以海藻酸钠(SA)和纳米 Fe_3O_4 作为固定化材料, 制备固定化小球进行 Pb^{2+} 去除实验, 通过原子分光光度计检测去除效率的变化并利用扫描电子显微镜(SEM)观察固定化小球吸附前后的表面特征的变化。**结果:** 不管固定材料选择海藻酸钠(SA)还是海藻酸钠 + 纳米 Fe_3O_4 (SA-Fe), 腐败希瓦氏菌死细胞的去除效率均高于活细胞, SA + Fe + 腐败希瓦氏菌死细胞(SA-Fe-Xs)对 Pb^{2+} 的去除效率高达92.11%; 扫描电子显微镜显示去除实验后, 固定化小球表面整体变得平整, 结构致密, 说明 Pb^{2+} 可能是通过吸附作用附着在固定化小球的表面。**结论:** 海藻酸钠和纳米 Fe_3O_4 固定化腐败希瓦氏菌在去除 Pb^{2+} 方面有较强的优势。

关键词

腐败希瓦氏菌, 海藻酸钠, 纳米 Fe_3O_4 , 固定化, 铅

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

由于社会的飞速发展, 人类生活的环境受到了严重的重金属污染。人类使用超过 10 万种不同的化学元素和化合物, 包括铅、汞、镉和持久性有机污染物(POPs)。其中铅就是一种常见的重金属类污染物。铅通过消化道进入人体后, 能引起严重的累积性中毒。铅会对多种器官造成伤害, 对骨髓造血系统以及神经系统更是能造成严重的损害。人在铅中毒后心血管、肾脏、消化系统以及肝脏的活动都会受到影响。儿童铅中毒极大地威胁着低收入和中等收入国家儿童的智商水平, 造成巨大损失[1]。

世界上地表水中, 天然铅平均值大约是 $0.5 \mu\text{g/L}$, 地下水中铅的浓度在 $1\sim 60 \mu\text{g/L}$ 之间。当铅的浓度达到 0.1 mg/L 时, 便可抑制水体的自净作用。铅进入水体中与其他重金属一样, 一部分被水生物浓集于体内, 另一部分则随悬浮物絮凝沉淀于底质中, 由于铅不能被生物代谢所分解, 所以在环境中属于持久性的污染物[2]。之前很长一段时间我国铅生产工艺没有进行技术改造, 导致技术落后, 排污量大, 加之企业管理不善, 这些都是造成我国铅污染的原因[3]。

目前, 对于重金属污染环境的修复方法主要有物理方法、化学方法和生物方法等, 包括电解、离子交换和超滤等[4][5], 这些传统方法各有优势, 但也都有缺陷。因此, 找到有效的、对环境无害且成本低廉的方法具有重要意义。生物方法中引起较大关注的就是微生物去除法, 该方法具有微生物繁殖速度快、绿色环保、高效等特点。但是当处于复杂多变、恶劣的外界环境中, 不仅微生物的生长受到抑制, 影响去除效果, 而且微生物菌体易流失或被其他水体微生物吞噬[6], 此外直接投放菌体可能会造成稳定水体

的二次污染,且不易与水体分离。

固定化微生物技术是一项新兴的生物技术,主要是利用物理或化学方法,将游离的细胞或酶固定在限定的区域中[7]。该技术不仅可以提高限定区域内微生物细胞的浓度,而且能够使微生物保持较高的活性,最重要的是,该技术可以实现细胞或酶的循环使用[8][9]。传统的固定化方法主要有吸附法、包埋法、交联法和共价结合法等。海藻酸钠包埋法以操作简便、包埋后颗粒强度高、对微生物无毒和传质性能好等优点被广泛利用[10][11]。此外,纳米材料作为一种新型材料,基于其比表面积大等优势,在作为固定材料方面拥有巨大潜能。纳米颗粒具有极大的长径比和柔性的结构特点使其容易纠缠团聚,利于菌体在其表面进行富集生长。重要的是,纳米材料本身对重金属也具有良好的吸附性能。

基于前期实验的探索,我们发现了一株具有较高重金属去除效率的微生物菌株——腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)。在此基础之上,本研究将从以下几个方面进行探索:1)检测腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的死活细胞在水作为介质的环境中对 Pb^{2+} 的去除效率;2)探索海藻酸钠(SA)和纳米 Fe_3O_4 固定化腐败希瓦氏菌小球的制备方法;3)检测腐败希瓦氏菌固定化小球对铅的去除效率;4)利用扫描电子显微镜观察固定化小球去除铅前后的表面特征的变化,探索固定化小球去除 Pb^{2+} 的机理。本研究为固定化微生物处理重金属水体提供了理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验仪器

本实验中用到的仪器为本实验室平台提供,各个仪器的型号、生产厂家等参数如表1所示。

Table 1. Laboratory apparatus

表 1. 实验仪器

仪器名称	型号	公司
电子天平	ESJ200-4	沈阳龙腾电子有限公司
分析天平	SL502N	上海民桥精密仪器科技有限公司
艾科浦超纯水系统	AFZ-2000	上海琅环实验设备有限公司
pH 计	PSH-25	上海仪电科学仪器股份有限公司
立式蒸汽压力灭菌锅	LDZX-30KB	上海申安医疗器械厂
小型摇床	TS-1	QILINBEIER
冷冻离心机	SORVALL LEGEND MICRO 21R	Thermo
紫外分光光度计	UV-2450	岛津
原子分光光度计	iCE3000	Thermo
扫描电子显微镜	JSM-7500F	日本电子

2.1.2. 试剂

胰蛋白胨、大豆蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司)、纳米 Fe_3O_4 (北京德科岛金科技有限公司)、海藻酸钠、葡萄糖(成都市科龙试剂有限公司)、硝酸铅、氯化钠、牛肉膏、盐酸、硝酸、氯化钙、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、乙酸异戊酯(成都金山化学试剂有限公司),以上试剂均为化学分析纯。

2.1.3. 微生物菌种

腐败希瓦氏菌 CICC 22940 以冷冻干燥的形式从中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)购买。

2.2. 方法

2.2.1. 腐败希瓦氏菌的死活细胞对 Pb^{2+} 的去实验

1) 腐败希瓦氏菌的培养

培养基的配制: 称取胰蛋白胨 15 g, 大豆蛋白胨 5 g, 氯化钠 6.5 g, 葡萄糖 2 g, 牛肉膏 6 g 加热溶解于 1000 mL 去离子水中, 冷却后使用 pH 计调节酸碱度至 7.5 (HCl/NaOH) [12]。溶化后分装入 100 mL 锥形瓶中; 121℃ 灭菌 20 min, 冷却备用。

腐败希瓦氏菌的活化及扩大培养: 液体培养基具有通气和振荡培养的优点, 有利于细胞生长, 主要用于菌种的扩大培养。将前期保存的甘油冻存菌液以 1% 的接种量接入已经灭菌、冷却的液体培养基中, 放置于恒温摇床中, 温度为 30℃、转速为 150 r/min, 摇床培养至指数增长期。从液体培养基中移取 1 mL 菌液入 100 mL 液体培养基中, 放置于恒温摇床中, 温度为 30℃、转速为 150 r/min, 振荡培养 24 h。

2) Pb^{2+} 标准溶液的配制

称取 1.5985 g 优级纯硝酸铅 $Pb(NO_3)_2$ 于烧杯中, 用 5% HNO_3 (体积分数) 溶解后, 加入至 1000 mL 容量瓶中定容, 摇匀。 Pb^{2+} 浓度为 1000 mg/L, 作为母液置于 4℃ 冰箱中保存备用。

3) 腐败希瓦氏菌死活细胞菌悬液的制备

将振荡培养 24 h 的腐败希瓦氏菌液体培养基的一半进行高压蒸汽灭菌, 121℃ 灭菌 20 min, 冷却备用; 另一半置于 4℃ 冰箱中保存。

将分别含有腐败希瓦氏菌死活细胞的液体培养基分别转移至离心管, 在 10,000 r/min 下进行离心 5 min, 弃去上清液。加入生理盐水冲洗三次, 去除残留的培养基。最后将收集的腐败希瓦氏菌菌体用生理盐水溶解, 制备成 5 g/L 的菌悬液。

4) 腐败希瓦氏菌死活细胞对 Pb^{2+} 的去实验

将制备好的死活细胞悬液加入到含有 30 mL Pb^{2+} 浓度为 20 mg/L 的水溶液中, 封口, 置于温度为 30℃, 150 r/min 的摇床中培养 3 h。将培养物在 8000 rpm 离心 5 min, 收集上清液于干净试管中, 并用 1 M HNO_3 酸化。最后采用火焰原子分光光度计于 283.3 nm 测定上清中残留的 Pb^{2+} 浓度。

Pb^{2+} 的去除效率采用如下公式计算:

$$R = \frac{c_0 - c_e}{c_0} * 100\%$$

其中 c_0 和 c_e 分别是 Pb^{2+} 离子 (mg/L) 的初始浓度和平衡浓度。

2.2.2. 腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 的去实验

固定化微生物技术具有吸附材料价格低廉、机械强度高、固液可分离、材料可解吸再利用等优点, 对于这项技术的多层次研究, 可在处理环境重金属污染方面提供重要技术支撑。为了提高吸附重金属效果, 本研究采用海藻酸钠、纳米 Fe_3O_4 为包埋材料, 以 4% $CaCl_2$ 溶液作为交联剂, 探讨不同固定化小球对 Pb^{2+} 的去实验效率。

本研究设置 6 个实验组进行实验, 分别为海藻酸钠(SA)固定化小球、海藻酸钠(SA) + 纳米 Fe_3O_4 (Fe) 固定化小球、海藻酸钠(SA) + 腐败希瓦氏菌活细胞(Xh)固定化小球、海藻酸钠(SA) + 腐败希瓦氏菌死细胞(Xs)固定化小球、海藻酸钠(SA) + 纳米 Fe_3O_4 (Fe) + 腐败希瓦氏菌活细胞(Xh)固定化小球、海藻酸钠(SA) + 纳米 Fe_3O_4 (Fe) + 腐败希瓦氏菌死细胞(Xs)固定化小球。以上 6 个实验组分别简写表示为: SA、SA-Fe、SA-Xh、SA-Xs、SA-Fe-Xh、SA-Fe-Xs, 后续实验均按此表示。

1) 固定化小球的制备

SA-Fe-Xh、SA-Fe-Xs 组, 制备固定化小球的流程如下:

称取一定量的纳米 Fe_3O_4 (2%)与 2% (wt %)的海藻酸钠溶液混合, 超声 40 min, 使纳米 Fe_3O_4 颗粒均匀分散在溶液中, 121℃灭菌 20 min。

①将制备好的菌悬液接入混合液中, 搅拌混合均匀, 用灭菌 5 mL 注射器将混合液逐滴滴入 4% (wt%) 的氯化钙溶液中。

②将固定化小球置于 4℃冰箱中交联固化 4 h, 得到直径 3~4 mm 的 Fe_3O_4 -SA 联合固定化小球。

③用无菌水洗涤 2~3 次, 除去其表面粘附的 CaCl_2 溶液, 放置 4℃冰箱中保存备用。

其它试验组在此基础上作少许的调整。对于 SA 组, 则在第①、②步中分别不需要加入纳米 Fe_3O_4 和菌悬液, 其他步骤维持不变; SA-Fe 组, 则在第②步中不需要加入菌悬液; SA-Xh、SA-Xs 组, 则在第①步都中不需要加入纳米 Fe_3O_4 , 在第②步中分别加入腐败希瓦氏菌活细胞和死细胞。

2) 腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 的去除实验

将上述制备好的空白小球(SA, SA-Fe)和腐败希瓦氏菌固定化小球加入到含有 30 mL Pb^{2+} 浓度为 20 mg/L 的水溶液中, 封口, 置于温度为 30℃, 150 r/min 的摇床中培养 3 h。去除实验结束后的样品处理以及 Pb^{2+} 测定均与 4)中方法相同。

2.2.3. 腐败希瓦氏菌固定化小球吸附作用的电镜观察

使用扫描电子显微镜观察与 Pb^{2+} (20 mg/L)相互作用前后的固定化小球的表面特征。制备固定化小球 SA-Fe-Xh 进行 Pb^{2+} 的去除实验, 将实验前后的小球用于电子显微镜观察[13]。固定化小球的处理方法按照如下步骤进行[14]:

1) 将上述进行 Pb^{2+} 去除实验的铅负载的固定化小球和未经去除实验的空白小球后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 20 min, 加入 3%戊二醛放入 4℃冰箱固定 24 h。

2) 8000 r/min 离心 3 min 后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 20 min, 再用 30%~50%~60%~70%~80%~90%~95%~100%不同梯度乙醇脱水 20 min。

3) 乙酸异戊醋置换 2 次, 每次 20 min。

4) 将处理好的固定化小球冷冻干燥 1 h。

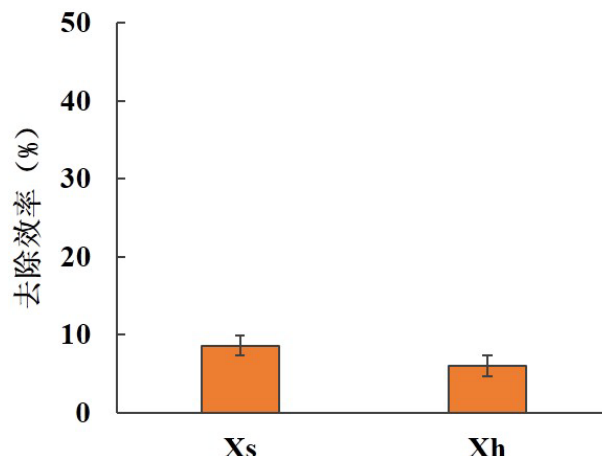
5) 将 6 个样品分别胶贴于电镜载物台上, 喷金后上机观察。

3. 结果与分析

3.1. 腐败希瓦氏菌的死活细胞对 Pb^{2+} 的处理

由图 1 结果显示, 腐败希瓦氏菌的死活细胞在以水为介质的环境中对 Pb^{2+} 的去除效率均较低, 但是腐败希瓦氏菌死细胞的去除效率高于活细胞。腐败希瓦氏菌对 Pb^{2+} 的去除效率较低的原因主要有以下几方面: 1) 外界复杂、恶劣、营养物质匮乏的环境抑制了腐败希瓦氏菌的生长。在发酵培养阶段, 胰蛋白胨、大豆蛋白胨、葡萄糖、牛肉膏等物质为微生物的生长提供了丰富的营养, 微生物可以大量繁殖; 但是外界自然环境中并不能提供如此丰富的物质, 因此微生物的数量是有限的。2) 外界自然环境中其他的有毒物质会对加入的微生物产生毒害作用, 导致微生物基数降低, 延缓繁殖速度; 外界环境温度、酸碱度、氧气浓度、气压等因素导致微生物的死亡或生长衰退。3) 加入的腐败希瓦氏菌死细胞的生物量是有限的, 能提供有限的吸附位点, 进而导致较低的去除率。

腐败希瓦氏菌死细胞的去除效率高于活细胞的原因可能主要是由于腐败希瓦氏菌细胞在灭活死亡之后, 细胞结构遭到破坏, 尤其是细胞壁结构变得松散, 表面疏松, 能够提供更多的吸附位点[15], 因此其去除效率高于活细胞。死生物量具有一些优点, 如毒性有限, 可长期储存, 不需要生长介质和营养物质来维持等, 因此, 对于复杂的外界环境来说, 采用死细胞进行重金属污染环境的修复具有更好的实际意义[16]。



注: Xs 表示腐败希瓦氏菌死细胞; Xh 代表腐败希瓦氏菌活细胞

Figure 1. Removal of heavy metal Pb^{2+} by dead and live cells of *Shewanella putrefaciens*

图 1. 腐败希瓦氏菌死活细胞对 Pb^{2+} 的去除

3.2. 腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 的去除

图 2 显示的是不同的腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 的去除, SA、SA-Xh、SA-Xs、SA-Fe、SA-Fe-Xh、SA-Fe-Xs 等 6 组实验的去除效率分别为 64%、74.29%、78.22%、74.21%、78.07%、92.11%, 均明显高于腐败希瓦氏菌死/活细胞单独的去除效率。不管是 SA 小球实验组, 还是 SA-Fe 小球实验组, 加入腐败希瓦氏菌细胞后, 去除效率均增加, 这可能是由于菌体的加入导致吸附位点的增多, 进而使去除效率也增加。

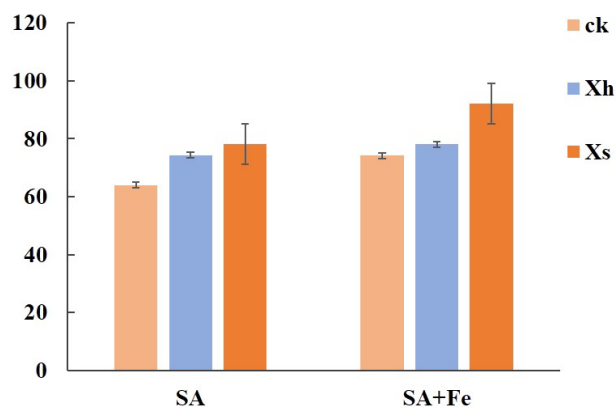


Figure 2. Removal of heavy metal Pb^{2+} by different immobilized beads of *Shewanella putrefaciens*

图 2. 不同的腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 的去除

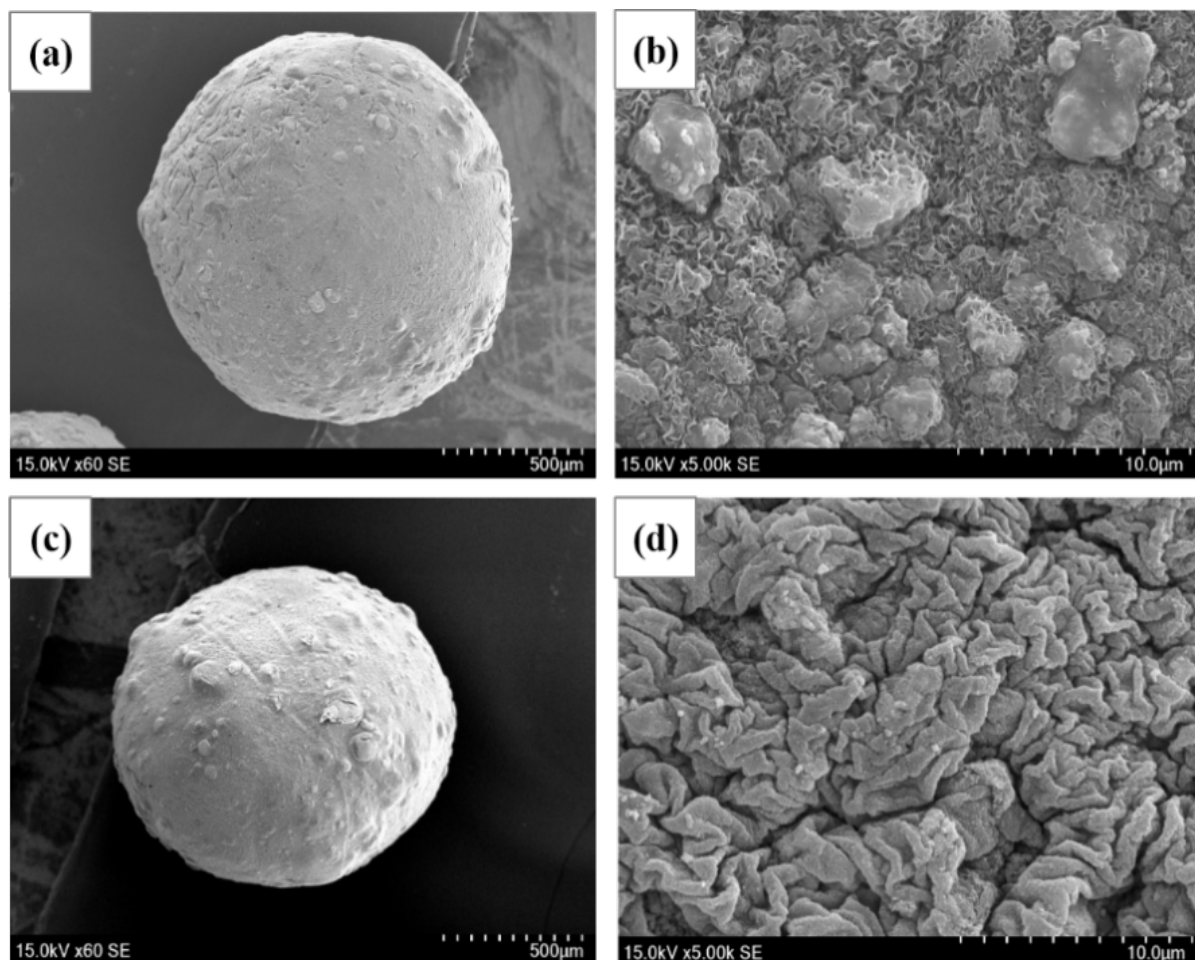
就单独的固定化材料而言, SA 和 SA-Fe 对 Pb^{2+} 的去除效率分别为 64%、74.21%, 也就是说纳米 Fe_3O_4 的加入对 Pb^{2+} 的去除效率具有显著影响。纳米 Fe_3O_4 具有一般纳米材料所具有的比表面积大等优点, 这可以为重金属离子提供更多的吸附位点。

就以海藻酸钠(SA)单独作为固定化材料而言, SA-Xh 和 SA-Xs 对 Pb^{2+} 的去除效率分别为 74.29%、78.22%, 即加入死细胞后的去除效率高于活细胞, 这与 3.1 中的结果相符, 进一步说明死细胞在处理重金属污染水体方面具有巨大潜能。以海藻酸钠 + 纳米 $Fe(SA-Fe)$ 作为复合固定化材料, SA-Fe-Xh 和

SA-Fe-Xs 对 Pb^{2+} 的去除效率分别为 78.07%、92.11%，说明复合材料固定化的效果更优；同样的，菌体的加入可以显著提高固定化小球的去除效率，尤其是腐败希瓦氏菌死细胞的加入，这说明微生物与合适的固定化材料联合去除 Pb^{2+} 方面的确具有良好的效果，尤其是菌体死细胞有更强的优势，这对后续将研究结果应用于实践提供了可喜的理论基础。

3.3. 腐败希瓦氏菌固定化小球对 Pb^{2+} 吸附作用的电镜观察

为了进一步了解 Pb^{2+} 与腐败希瓦氏菌固定化小球相互作用的机制，进行了扫描电子显微镜分析。图 3(a)、图 3(c) 中固定化小球的全貌图显示，在进行 Pb^{2+} 去除试验前后，小球的形态几乎没有区别，只是在两者表面出现了很多凸起，这可能是由于纳米 Fe_3O_4 的加入导致的。图 3(b) 中，固定化小球表面除了大量的孔隙之外，有很多“蜂窝”状的结构，这有利于固定化小球的表面积增加，附着位点同步增加，从而使得 Pb^{2+} 去除效率大大增加。图 3(d) 显示在固定化小球去除 Pb^{2+} 后内表面凹凸不平的结构大大减少，整体表面变得平整，结构致密，这可能是由于可能是由于 Pb^{2+} 附着后，“蜂窝”状结构被填充，小球表面变得相对平坦，进一步说明 Pb^{2+} 可能是通过吸附作用附着在固定化小球的表面。



注：(a)、(b) 分别是腐败希瓦氏菌 - 海藻酸钠 - 纳米 Fe_3O_4 固定化小球去除 Pb^{2+} 前的全貌和部分扫描电镜；(c)、(d) 分别是腐败希瓦氏菌 - 海藻酸钠 - 纳米 Fe_3O_4 固定化小球去除 Pb^{2+} 后的全貌和部分区域扫描电镜。

Figure 3. Electron microscopic observation of the adsorption of heavy metal Pb^{2+} by *Shewanella putrefaciens* -sodium alginate-nano- Fe_3O_4 immobilized beads

图 3. 腐败希瓦氏菌 - 海藻酸钠 - 纳米 Fe_3O_4 固定化小球对 Pb^{2+} 吸附作用的电镜观察

4. 结论

在这项工作中,我们首先探索了腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)的死细胞在水作为介质的环境中对 Pb^{2+} 的去除效率,结果显示单纯的菌体细胞对 Pb^{2+} 的去除效率较低,但是死细胞对 Pb^{2+} 的去除效率高于活细胞的去除效率;考虑到菌体在污染水体中不易分离、成效低等因素,探究了腐败希瓦氏菌的死细胞以海藻酸钠(SA)和纳米 Fe_3O_4 作为固定化材料,制备固定化小球进行去除实验。结果显示腐败希瓦氏菌菌体(活/死)的加入,去除效率均增加;海藻酸钠和纳米 Fe_3O_4 作为固定材料制备的固定化小球,去除效率均高于以海藻酸钠(SA)单独作为固定材料的小球;SA-Fe-Xs 小球实验组的去除效率最高,达 92.11%,说明海藻酸钠和纳米 Fe_3O_4 复合固定腐败希瓦氏菌的死细胞在去除 Pb^{2+} 方面有很强的优势,这对后续将研究投入实际的复杂环境进行应用提供了理论基础。固定化小球具有优良的去除效率、与单纯的微生物菌体相比更高的机械强度,且易于在水体中分离等优点,可用于在实际生产中产生的铅污染水体。

通过扫描电子显微镜观察显示 Pb^{2+} 在小球表面的附着填补了原本凹凸不平的裂缝与孔隙,说明 Pb^{2+} 可能是通过吸附作用附着在固定化小球的表面。此结果为揭示固定化小球去除 Pb^{2+} 的机制提供了依据。此外,扫描电镜表征发现,Pb 吸附在小球表面,而大多数的重金属都是以金属阳离子的状态存在,所以可以用于其他重金属离子的处理,这为重金属污染水体的治理提供了新的思路。

基金项目

我们要感谢四川大学分析测试中心老师在试验过程中对火焰原子分光光度计测量和扫描电子显微镜(SEM)成像的帮助。

参考文献

- [1] 唐永杰. 铅,你了解多少?[J]. 中国生态文明,2017(6): 56-57.
- [2] 马玉琴. 环境监测[M]. 武汉: 武汉工业大学出版,1998: 39.
- [3] 肖承坤. 我国铅污染现状分析[J]. 环境与可持续发展,2017,42(5): 91-92.
- [4] Wang, J. and Chen, C. (2009) Biosorbents for Heavy Metals Removal and Their Future. *Biotechnology Advances*, **27**, 195-226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- [5] Limcharoensuk, T., Sooksawat, N., Sumarnrote, A., Awutpet, T., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., et al. (2015) Bioaccumulation and Biosorption of Cd^{2+} and Zn^{2+} by Bacteria Isolated from a Zinc Mine in Thailand. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **122**, 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.013>
- [6] 姜立春, 阮期平, 王晓丽. PVA 固定化 *Corynebacterium* sp. JY03 降解苯酚的特性研究[J]. 环境工程,2013,31(2): 36-40.
- [7] Guisan, J.M. (2013) Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Louisville, 1-13. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1
- [8] Ma, C., Qin, D., Sun, Q., et al. (2016) Remove of Environment Estrogens by Bacterial Cell Immobilization Technique. *Chemosphere*, **144**, 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.014>
- [9] 王建龙. 生物固定化技术与水污染控制[M]. 北京: 科学出版社,2002: 33-40.
- [10] 李超敏, 韩梅, 张良, 等. 细胞固定化技术-海藻酸钠包埋法的研究进展[J]. 安徽农业科学,2006,34(7): 1281-1284.
- [11] 张长利, 王景晶, 杨宏. 细胞固定化技术研究进展及其在水处理领域的应用[J]. 水处理技术,2013,39(6): 1-4.
- [12] 成娟, 王磊, 陶榆伟, 袁文娟, 赵建, 冯甦. 一株腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)培养基优化[J]. 水污染及处理,2018,6(2): 103-109.
- [13] Li, X.J., et al. (2018) Biosorption and Bioaccumulation Characteristics of Cadmium by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *RSC Advances*, **8**, 30902-30911. <https://doi.org/10.1039/C8RA06270F>
- [14] Zhao, C., Liu, J., Li, X., et al. (2016) Biosorption and Bioaccumulation Behavior of Uranium on *Bacillus* sp. dwc-2: Investigation by Box-Behnenken Design Method. *Journal of Molecular Liquids*, **221**, 156-165. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.05.085>

- [15] Velasquez, L. and Dussan, J. (2009) Biosorption and Bioaccumulation of Heavy Metals on Dead and Living Biomass of *Bacillus Sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials*, **167**, 713-716. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.044>
- [16] Salvadori, M.R., Nascimento, C.A.O. and Correa, B. (2014) Nickel Oxide Nanoparticles Film Produced by Dead Biomass of Filamentous Fungus. *Scientific Reports*, **4**, Article No. 6404. <https://doi.org/10.1038/srep06404>