



Cr(VI)还原菌的筛选、鉴定及其还原物质分析

韩剑宏 宋玉艳 张铁军* 姜庆宏 张连科 王维大

内蒙古科技大学能源与环境学院 内蒙古 包头 014010

摘要:【背景】铬污染土壤是我国土壤污染修复的重点治理对象,在众多修复技术中,微生物法因具有简单、经济、无二次污染等特性已成为研究热点,而微生物法中筛选出既能适应污染场地环境又能高效还原 Cr(VI)的菌株尤为重要。【目的】筛选适应西北寒旱区高效还原 Cr(VI)的菌株,丰富铬还原菌资源库,为铬污染土壤修复奠定基础。【方法】采用富集驯化、分离纯化法进行筛菌;通过形态学和分子生物学相结合的方法对目的菌株进行鉴定;采用傅里叶变换红外光谱法对还原机理进行研究。【结果】菌株 G-13 有较强的 Cr(VI)还原能力, pH 9.0、温度为 30 °C 条件下, 60 h 对 Cr(VI) (100 mg/L)的还原率达到 82.8%。经形态学和分子生物学鉴定,菌株 G-13 为 *Micrococcus luteus*。反应中 Cr(VI)的降低伴随着 Cr(III)的增加,说明以还原反应为主,并且还原能力与细菌生长呈依赖型关系。对细胞各组分及变性研究表明,胞外酶在还原反应中占主要作用。除 Pd²⁺、Cd²⁺外,其余金属离子对酶活性无明显抑制作用。通过傅里叶变换红外光谱分析,发现 G-13 与 Cr(VI)结合位点主要为羟基、羰基、羧基、-CH、酰胺基等。【结论】菌株 G-13 有较强的 Cr(VI)还原能力,能为西北寒旱区铬污染土壤修复丰富菌种资源。

关键词: 铬还原菌, 藤黄微球菌, 还原特性, 傅里叶变换红外光谱

Screening and identification of Cr(VI) reducing bacteria

HAN Jian-Hong SONG Yu-Yan ZHANG Tie-Jun* JIANG Qing-Hong
ZHANG Lian-Ke WANG Wei-Da

School of Energy and Environment, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou,
Inner Mongolia 014010, China

Abstract: [Background] Chromium-contaminated soil is a key target for soil pollution remediation in China. In many remediation technologies, microbial method has become a research hotspot because of its simple, economical, and no secondary pollution. It is particularly important to screen strains that can adapt to the polluted site environment and efficiently reduce Cr(VI) in the microbial method. [Objective] Screening strains adapted to the efficient reduction of Cr(VI) in cold and arid regions of Northwest China, enrich the resource pool of chromium reducing bacteria, and lay the foundation for remediation of chromium-contaminated soil. [Methods] Screening bacteria by enrichment, domestication, isolation and purification; the target strain was identified by a combination of morphology and molecular biology; and the reduction mechanism was studied by fourier transform infrared spectroscopy. [Results] G-13 has

Foundation item: Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2018MS02015)

*Corresponding author: E-mail: 15540250116@163.com

Received: 22-11-2019; Accepted: 20-02-2020; Published online: 04-06-2020

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2018MS02015)

*通信作者: E-mail: 15540250116@163.com

收稿日期: 2019-11-22; 接受日期: 2020-02-20; 网络首发日期: 2020-06-04

strong Cr(VI) reducing ability. At pH 9.0 and temperature 30 °C, the reduction rate reached 82.8% in a 100 mg/L Cr(VI) solution within 60 hours. Morphological and molecular biological identification showed that the strain G-13 was *Micrococcus luteus*. The decrease of Cr(VI) in the reaction was accompanied by the increase of Cr(III), which indicated that the reduction reaction was the main factor, and the reducing ability was dependent on the growth of bacteria. Studies on cell components and denaturation showed that extracellular enzymes play a major role in the reduction reaction. Except for Pd²⁺ and Cd²⁺, the other metal ions had no significant inhibitory effect on enzyme activity. Through fourier transform infrared spectroscopy analysis, it was found that the binding sites of G-13 and Cr(VI) were mainly -OH, C=O, -COOH, -CH, -CONH₂ and so on. **[Conclusion]** G-13 has strong Cr(VI) reducing ability, and can be used to rich bacterial resources for repairing chromium-contaminated soil in northwestern cold and arid regions.

Keywords: Chromium reduction strains, *Micrococcus luteus*, Reduction characteristics, Fourier transform infrared spectroscopy

铬及其化合物的应用随着工业化的发展越来越多,如铬酸盐电镀、皮革制革、纺织染色、金属清洗等,在这些行业的生产和使用过程中铬随之被排放到环境中,导致水体、土壤遭到不同程度的污染^[1]。环境中铬的价态通常在 II-VI 之间,而三价和六价两种价态相对稳定,其中 Cr(VI)的毒性比 Cr(III)高约 10-100 倍,具有致突变性、致癌性及致畸性,被归为“A”类人类致癌物;Cr(VI)长期暴露可能会导致呕吐、腹泻、皮肤病变、癌症和过早死亡等问题^[2-4]。因此,能够对铬污染进行有效治理具有一定的研究意义。

铬污染土壤修复的常用方法包括化学氧化/还原、电化学、客土/换土等,然而这些方法都存在一些问题^[5]。近年来,微生物修复作为一种“绿色”方法,在降低 Cr(VI)毒性方面得到应用。微生物来源生态,成本低,而且无毒^[6-7]。目前,真菌、酵母菌、细菌已被应用于生物吸附、铬酸盐还原、生物积累等方面^[8]。其中细菌主要是通过铬还原酶在好氧或厌氧的条件下将 Cr(VI)还原为 Cr(III),已经报道的铬还原酶包括醛氧化酶、细胞色素 P450、DT-硫辛酰胺脱氢酶^[9]。还有一些具有不同代谢功能的还原酶如硝基还原酶^[10]、铁还原酶^[11]和依靠 NADH/NADPH 的还原酶^[12]。然而不同的微生物具有不同的还原特性,许多铬还原菌的还原机制以及还原酶性质尚不清楚。

本研究拟对从包头市韩庆坝原铬渣堆场土壤中筛选出的菌株进行 Cr(VI)还原能力测试,对还原能力较强的菌株进行形态学和分子生物学鉴定,并对菌株还原机理以及还原酶性质进行研究,旨在丰富修复铬污染土壤微生物菌种资源,揭示微生物在还原 Cr(VI)过程中的生物学过程,为利用微生物修复铬污染土壤提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

土壤样品采集于包头市韩庆坝原铬渣场 0-10 cm 的表层土壤, Cr(VI)为 300 mg/kg,装于无菌袋中带回实验室用于菌株的分离和筛选。

1.1.2 主要试剂和仪器

铬标准贮备液的配制:称取于 110 °C 干燥 2 h 的重铬酸钾(K₂Cr₂O₇) 0.282 9 g,用去离子水溶解后,移至 1 L 的容量瓶中,稀释至标线,摇匀。此时, Cr(VI)溶液浓度为 100 mg/L。

实验所用试剂均为国产分析纯。紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;傅里叶红外光谱仪, Bruker 科技有限公司;火焰原子分光光度计,赛默飞世尔有限公司;扫描电子显微镜,卡尔·蔡司股份公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母浸粉 5.0,

氯化钠 10.0, 琼脂 15 (固体培养基)。调节 pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 冷却后备用。

含铬培养基: 取一定体积的 Cr(VI)标准贮备液, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 冷却后, 在无菌条件下根据所需浓度的含铬培养基添加相应梯级的 Cr(VI)标准贮备液。

1.2 方法

1.2.1 Cr(VI)还原菌的筛选

取 10 g 土样加入到装有 90 mL 无菌水的锥形瓶中, 在磁力搅拌器上搅拌 20 min, 静置 20 min。以 10 倍比梯级稀释, 分别涂布在 LB 固体培养基上, 倒置于恒温培养箱中, 35 °C 培养 48 h, 挑取不同形态单菌落进行纯化。

将分离纯化的菌株划线接种于 Cr(VI)浓度为 50、100、150、200、250、300、350 mg/L 的 LB 固体培养基上, 35 °C 培养 2-3 d, 观察菌株生长情况, 确定最低抑菌浓度。

将筛选出对 Cr(VI)有耐受性的菌株接种于含 Cr(VI)的 LB 液体培养基中, Cr(VI)的初始浓度为 100 mg/L, 35 °C、150 r/min 振荡培养 3 d, 5 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液测定剩余 Cr(VI)的浓度, 即可筛选出 Cr(VI)还原菌株。

1.2.2 菌株鉴定

菌株的形态特征及生理生化特性参照《微生物学实验教程》第 2 版^[13]进行操作分析。

采用 CTAB 法提取菌株基因组 DNA, PCR 扩增其 16S rRNA 基因序列, 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(20 μ L): $10 \times ExTaq$ Buffer 2.0 μ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 1.6 μ L, Primer 1 和 Primer 2 各 5 pmol, 模板 DNA 0.5 μ L, $ExTaq$ (5 U/ μ L) 0.2 μ L, ddH₂O 14.1 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s, 24 个循环; 72 °C 10 min, 10 °C 保存。16S rRNA 基因序列的测定由上海美吉生物医药科技有限公司完成, 将测定的序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析, 采用 MEGA-X 构建系统

发育树。

1.3 还原实验

在 Cr(VI)浓度为 100 mg/L 的培养基中进行还原实验, 分别调节 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 调节温度为 20、30、35、40、45、50 °C, 对 pH 和温度进行优化。

在最佳 pH 和温度条件下, 调节 Cr(VI)初始浓度为 50、100、150、200 mg/L, 研究不同初始 Cr(VI)浓度对还原反应的影响。

在最佳 pH 和温度条件下, 将菌株同时接入不含铬和含铬(100 mg/L)的培养基中, 150 r/min 振荡培养, 每隔 6 h 测定细菌的生长量和剩余 Cr(VI)浓度, 研究二者关系。

在最佳 pH 和温度条件下, 研究 Cr(VI)、Cr(III)、总铬之间的关系。实验均设置 3 个平行。

1.4 细菌各组对 Cr(VI)的还原效果

收集培养 30 h 的对数期菌液, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次后, 用同样的缓冲溶液悬浮, 在冰浴中超声 20 min (200 W, 工作 5 s, 间歇 15 s)破碎细菌, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 即为细胞内分泌物。收集培养 30 h 的对数期菌液, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液即为细胞外分泌物; 将细胞沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次后, 用同样的缓冲溶液悬浮, 即为静息细胞样品, 再加入 1 mL 的 1%甲苯和 0.2% Triton X-100 旋涡振荡, 即为渗透性细胞样品。将上述细胞组分加入至初始 Cr(VI)浓度为 50 mg/L 的缓冲溶液中, 150 r/min 振荡培养 24 h, 取上清液测定剩余 Cr(VI)含量。

1.5 还原物质的初步鉴定

制取胞内分泌物、胞外分泌物和细胞碎片, 进行 121 °C 和 10% SDS 变性处理^[14], 将处理后的组分加入至初始 Cr(VI)浓度为 50 mg/L 的缓冲溶液中, 150 r/min 振荡培养 24 h, 取上清液测定剩余 Cr(VI)含量。

1.6 金属离子对胞外分泌物活性的影响

铬还原酶活性单位的定义为: 在特定的条件下, 30 min 能转化 1 μmol 底物 Cr(VI)的酶量, 即 1 U=1 $\mu\text{mol}/30 \text{ min}$ 。酶活性的检测通过酶-缓冲液反应体系进行。该体系总体积为 2 mL, 包括 50 mg/L 的 Cr(VI)、0.4 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液和 1 mL 的胞外分泌物。反应从加入胞外分泌物开始, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 终止反应。向体系中加入 1.0 mmol/L 的 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pd^{2+} 、 Cd^{2+} , 反应结束通过测定 Cr(VI)的剩余含量反映酶的活性。

1.7 傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析

为了进一步了解菌体表面官能团与 Cr(VI)的作用, 分别取在 Cr(VI)浓度为 50 mg/L 的液体培养基中生长 48 h 的菌体细胞和空白对照样品进行 FT-IR 检测, 对菌体表面官能团的种类及变化进行分析。

1.8 Cr(VI)及总铬的测定

取一定量的含铬培养液, 5 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 采用二苯碳酰二肼分光光度法^[15]在 540 nm 波长处测定上清液中剩余 Cr(VI)浓度。总铬由火焰原子分光光度计测定。Cr(VI)还原率按照公式(1)计算。

$$\text{Cr(VI)还原率}(\%) = (C_0 - C_e) / C_0 \times 100 \quad (1)$$

式中, C_0 为未接种菌体的空白对照样品的 Cr(VI)质量浓度(mg/L); C_e 为培养液上清液中残留的 Cr(VI)质量浓度(mg/L)。

2 结果与分析

2.1 菌株分离

从包头市韩庆坝铬渣堆场土壤中分离筛选出 10 株细菌, 并在 100 mg/L Cr(VI)培养基中进行还原实验, 最终筛选出一株高效还原菌(编号为 G-13), 最低抑菌浓度为 300 mg/L。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态学鉴定

通过对细菌菌落形态(图 1A)、革兰氏染色(图 1B)以及扫描电子显微镜(scanning electronic microscopy, SEM)(图 1C)观察发现, 菌落表面光滑, 呈黄色, 革兰氏染色呈阳性, 细胞呈球形, 成对, 四联或立方堆出现。

2.2.2 生理生化鉴定

菌株 G-13 的生理生化反应特性如表 1 所示, 该菌株葡萄糖反应、接触酶反应、淀粉水解反应、硝酸盐还原反应、明胶水解反应、过氧化氢酶反应均为阳性, 甲基红反应、吲哚反应均为阴性。

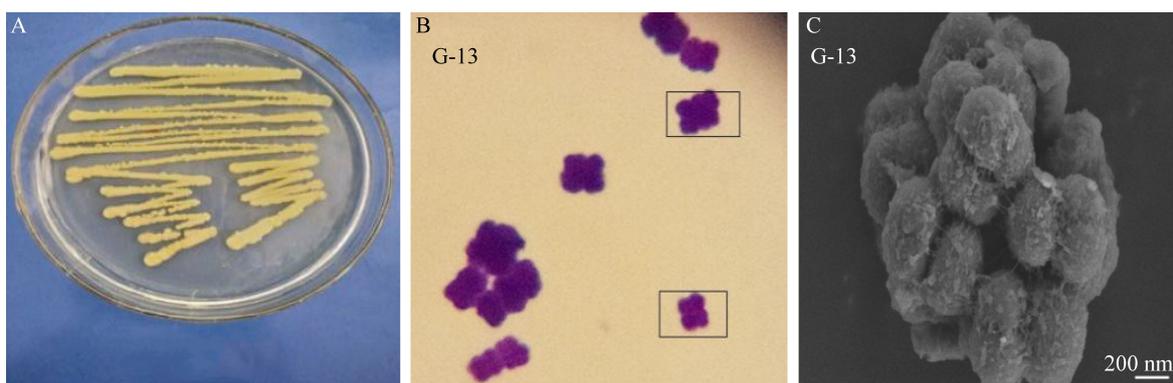


图 1 细菌菌落和微观形态

Figure 1 Bacterial colonies and microscopic morphology

注: A: G-13 菌落; B: 显微镜下菌株的形态; C: SEM 下菌株的形态。

Note: A: Colony of strain G-13; B: Strain morphology under microscope; C: Strain morphology under SEM; Scale bar: 200 nm.

表 1 菌株 G-13 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain G-13

| 实验项目 | 结果 |
|---------------------------------|--------|
| Experiment item | Result |
| Catalase | + |
| Methy Red | - |
| Amylohydrolysis | + |
| Reduction of nitrate to nitrate | + |
| Indole production | - |
| Gelatin hydrolysis | + |
| CAT | + |
| D-glucose fermentation | + |

Note: +: Positive; -: Negative.

2.2.3 分子生物学鉴定

将菌株 G-13 的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 数据库中,用 BLAST 程序进行对比分析,利用 MEGA-X 软件及邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树,如图 2 所示,并结合形态鉴定(图 1)和生理生化鉴定(表 1)结果,表明该菌株与微球菌属的相似度达到了 100%,为 *Micrococcus luteus*。

2.3 还原实验

2.3.1 pH 对 Cr(VI)还原效果的影响

由图 3 可以看出, pH 对还原效果具有显著的影响, pH 为 5.0 时菌株 G-13 还原率仅有 42.6%,但随着 pH 的升高,还原率逐渐升高, pH 为 9.0 时

还原率达到最高,为 82.1%。这可能是因为过低的 pH 抑制了细菌的生长代谢,细菌生物量较低;也可能是过低的 pH 使还原酶活性降低,导致还原能力下降。pH 为 6.0、7.0、8.0、10.0 时,还原率均在 60%以上,说明该菌株能够适应的 pH 范围较广,但在碱性条件下更有利于菌株 G-13 的还原作用。

2.3.2 温度对 Cr(VI)还原效果的影响

由图 4 可以看出,随着温度的升高,菌株 G-13 的还原能力也随之增加,在温度为 30–40 °C 范围内还原率均较高,30 °C 时还原率达到最大,为 82.5%;而在 45、50 °C 时还原率低于 20 °C,这可能是因为高温导致酶的活性位点失活,造成还原能力降低。因此,菌株 G-13 的最适还原温度为 30 °C。

2.3.3 细菌生长与 Cr(VI)还原效果的关系

由图 5 可以看出,菌株 G-13 在 12–36 h 内生长进入对数期, OD_{600} 在不含铬的培养基中从 0.01 增加到 1.8,在含铬[100 mg/L Cr(VI)]培养基中从 0.005 增加到 1.6,还原率也随之增加,在 60 h 时细菌总数趋于稳定,还原率也达到最高,为 82.8%。继续培养没有表现出还原率增加的趋势,此时由于菌株生长进入了衰亡期,营养物质消耗殆尽,死亡速率高于生长速率,还原率不再增加。对菌株生长与还原能力的相关性进行分析发现含铬(100 mg/L

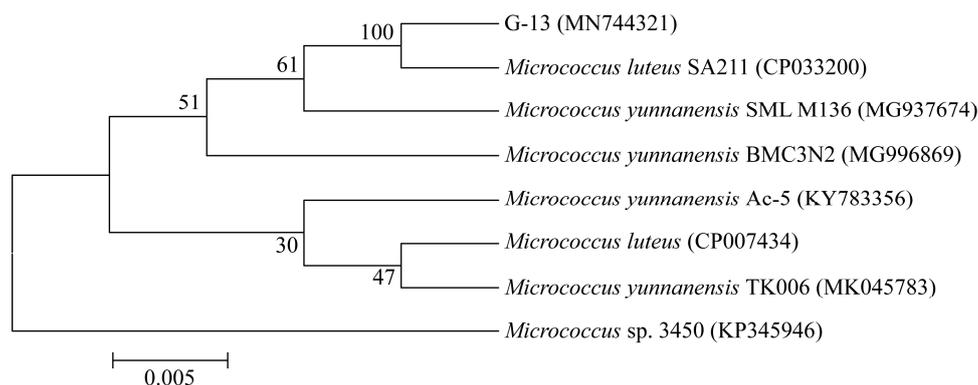


图 2 菌株 G-13 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain G-13 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中为参与对比序列的 GenBank 登录号,分支处标注有自展值,标尺长度为 0.005 核苷酸置换率。

Note: GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.

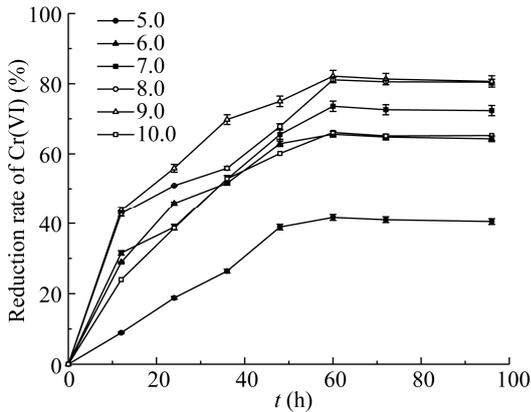


图3 pH对菌株G-13还原效果的影响
Figure 3 Effect of pH on the reduction effect of strain G-13

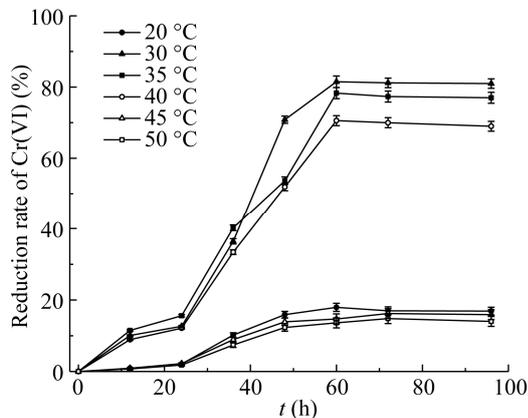


图4 温度对菌株G-13还原效果的影响
Figure 4 Effect of temperature on the reduction effect of strain G-13

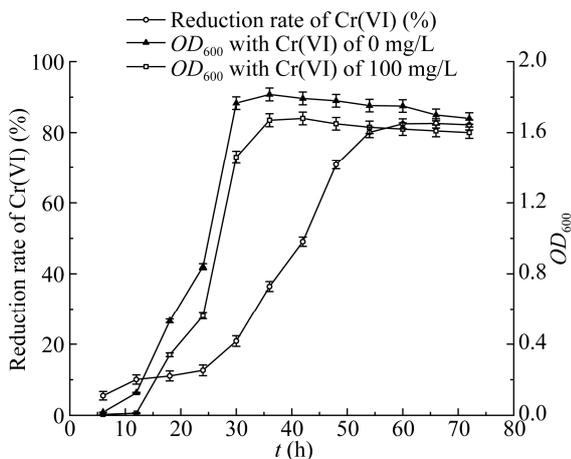


图5 菌株G-13还原能力与生长关系
Figure 5 Relationship between reducing ability and growth of strain G-13

Cr(VI)条件下的 OD_{600} 与还原率呈极显著相关 ($P < 0.01$), 相关系数为 0.809。说明菌株还原能力与菌株生长有关, 呈依赖型的关系。

2.3.4 初始 Cr(VI)浓度对还原效果的影响

初始 Cr(VI)浓度对还原效果的影响如图 6 所示, 当 Cr(VI)的浓度为 50 mg/L 时, 还原率为 99.1%, Cr(VI)几乎能够完全还原。随着 Cr(VI)浓度的增加还原率逐渐下降。当 Cr(VI)浓度为 100 mg/L 时还原率为 82.6%, Cr(VI)浓度为 150 mg/L 时还原率为 69.8%, Cr(VI)浓度为 200 mg/L 时, 还原率仅为 58%。说明随着 Cr(VI)浓度的提高, 对细菌产生了一定毒性, 生长受到抑制, 影响了还原效果。

2.3.5 还原反应中 Cr(VI)、Cr(III)、总铬的关系

由图 7 可知, 随着时间的延长, 60 h 内 Cr(VI)浓度从 100 mg/L 下降到 15.60 mg/L。研究发现, Cr(VI)浓度的下降伴随着 Cr(III)浓度的增加, 60 h 内 Cr(III)逐渐增加到 80.01 mg/L, 总铬有轻微的下落。说明 G-13 主要以还原为主, 将 Cr(VI)还原为 Cr(III)。

2.4 细菌各组分对 Cr(VI)的还原效果

研究了胞外分泌物、胞内分泌物、静息细胞、渗透细胞各组分的还原能力, 结果如图 8 所示, 细胞外分泌物的还原率为 43.1%, 活性最佳。胞内分泌物、静息细胞、渗透细胞的还原率分别为 11.5%、

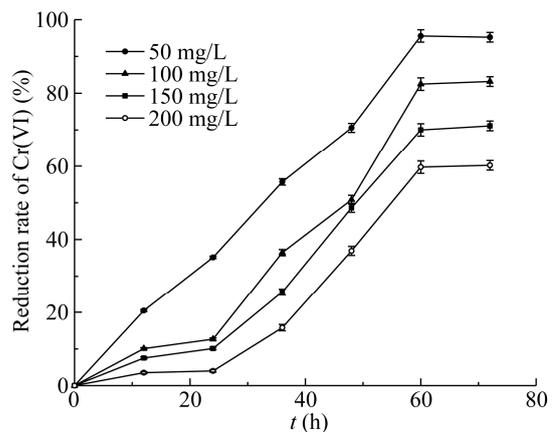


图6 初始Cr(VI)浓度对还原效果的影响
Figure 6 Effect of initial hexavalent chromium concentration on reduction effect

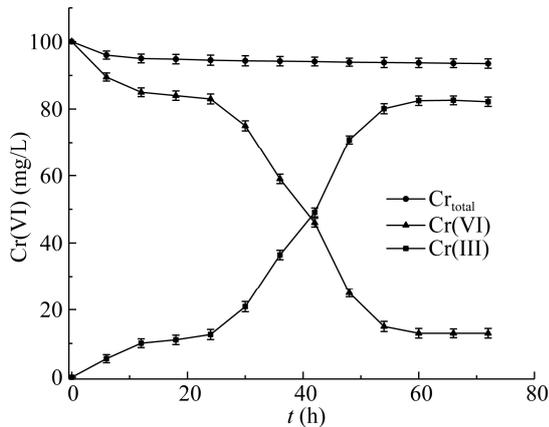


图7 Cr(VI)、Cr(III)、总铬的关系

Figure 7 Relationship between Cr(VI), Cr(III) and total chromium

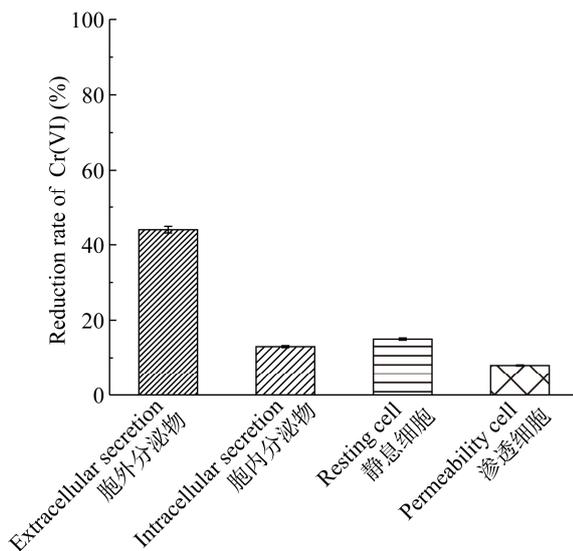


图8 各组分对还原效果的影响

Figure 8 Effect of each component on the reduction reaction

13.8%、6.7%。这表明还原部位主要发生在细胞外，细胞不吸收 Cr(VI)，也排除了生物蓄积降低 Cr(VI) 的可能性。静息细胞的还原能力略高于渗透细胞，说明细胞膜的通透性在还原过程中十分重要，细胞膜经甲苯和 Triton X-100 处理后，通透性发生改变，Cr(VI) 进入细胞内产生毒害，使还原能力受到影响。胞外分泌物是胞外酶与代谢产物的组成体，

也有人认为胞外酶不是还原 Cr(VI) 的主要手段^[16]，所以在此基础上将各组分进行变性实验，初步鉴定还原物质。

2.5 还原物质变性实验

为了确定具有还原能力的物质是否为胞外酶，将胞外分泌物、胞内分泌物、细胞膜进行 121 °C 和 10% SDS 变性处理。10% SDS 的疏水部分和亲水部分能够破坏蛋白质，引起变性，使酶蛋白质失活，从而达到普通代谢物还原效果。如图 9 所示，细胞膜在高温加热后 Cr(VI) 剩余 49.94 mg/L，与对照对比，还原能力几乎为 0，说明高温使细胞膜上的还原酶失效，无法完成电子供体的传递过程，进而不能还原 Cr(VI)；但经 10% SDS 处理后，Cr(VI) 剩余 44.90 mg/L，具有一定还原能力，这可能是因为细胞膜上的还原色素在处理过程中暴露出来；胞外分泌物经过高温加热后还原能力较低，Cr(VI) 剩余 47.43 mg/L，经过 10% SDS 处理后，胞外分泌物的还原能力几乎没有，说明胞外酶在还原 Cr(VI) 中占主要作用；而胞内分泌物在经过高温和 10% SDS 处理后，均无还原能力，说明胞内分泌物中具有还原能力的也是还原酶。

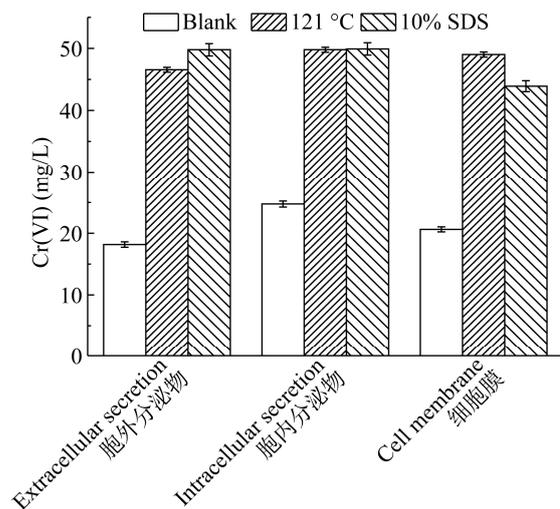


图9 各组分经变性后对还原效果的影响

Figure 9 Effect of various components on the reduction reaction after denaturation

2.6 金属离子对酶活性的影响

金属离子是酶的组成成分,不同的金属离子可能对还原反应产生一定的促进或者抑制作用。由图 10 可以看出, Cu^{2+} 对还原酶具有一定促进作用,可能是因为 Cu^{2+} 能够作为还原酶的辅基; Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 对酶活性的影响不显著,而 Pd^{2+} 、 Cd^{2+} 具有较强的抑制作用。这可能是因为还原酶的不同性质引起的,还需进一步研究。

2.7 傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析

比较菌株 G-13 还原 Cr(VI)前后的 FT-IR 图谱,分析菌株表面官能团与 Cr(VI)的作用。如图 11 所

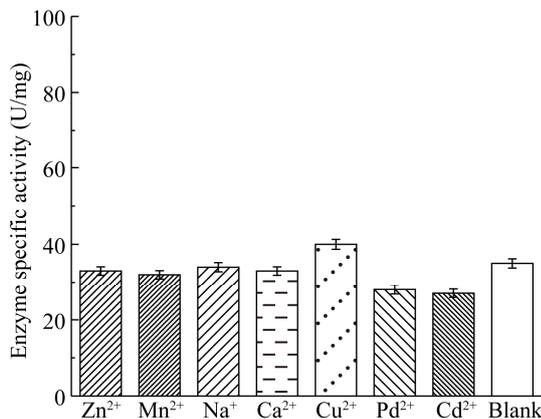


图 10 金属离子对酶活性的影响

Figure 10 Effect of metal ions on enzyme activity

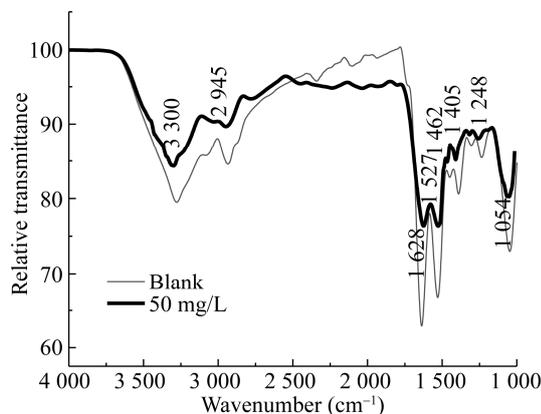


图 11 细菌 G-13 与 Cr(VI)反应前后的 FT-IR 图谱

Figure 11 FT-IR spectrum of bacteria G-13 before and after Cr(VI) reaction

示, G-13 表面成分复杂多样,在 $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是 $-\text{OH}$ 和 $-\text{NH}$ 伸缩振动共同引起, $2\ 945\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰表明存在 $-\text{CH}_2$, $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是由酰胺 I 带的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动引起, $1\ 527\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是酰胺 II 带,而 $1\ 462\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰值是由 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_3-$ 的弯曲振动引起, $1\ 405\ \text{cm}^{-1}$ 处吸收峰由酰胺 III 带的 $\text{N}-\text{H}$ 的弯曲振动和 $\text{C}-\text{N}$ 伸缩振动引起, $1\ 248\ \text{cm}^{-1}$ 处为 $\text{C}-\text{O}$ 和 $\text{O}-\text{H}$ 的叠加吸收峰,也可能是 $\text{C}=\text{S}$ 和 $\text{P}=\text{O}$ 的伸缩振动, $1\ 054\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰值为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 和 $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ 伸缩振动引起。表明菌株与 Cr(VI)反应中,结合位点主要为羟基、羰基、羧基、 $-\text{CH}$ 、酰胺基等。

3 讨论与结论

铬是一种重金属污染物,对水体、土壤等造成污染,甚至通过食物链影响人类健康。微生物修复法是一种有效治理铬污染的解决方法。本研究中从包头市韩庆坝原铬渣场中筛选出一株对 Cr(VI)有较高还原能力的细菌 G-13,经鉴定为 *Micrococcus luteus*。目前已经报道了许多具有还原能力的菌株,如 *Bacillus* sp.、*Microbacterium* sp. MP30、*Pseudomonas synxantha*、*Rhodobacter sphaeroides*、*Achromobacter* sp.等,但关于 *Micrococcus luteus* 还原 Cr(VI)的报道较少。

优化菌株的培养条件能够提高还原 Cr(VI)的能力。Soni 等^[16]和 Poopal 等^[17]报道了 *Streptomyces griseus*、*Bacillus* sp.、*Microbacterium* sp.在 pH 为 7.0 时还原能力最佳。Elangovan 等^[18]、Murugavelh 等^[19]报道了 *Arthobacter rhombi*、*Bacillus cereus* 在温度为 35 、 $37\ ^\circ\text{C}$ 条件下能够最大限度地还原 Cr(VI)。Sau 等^[20]研究发现 *Bacillus firmus* KUCr1 的最佳还原温度为 $70\ ^\circ\text{C}$ 。说明菌株在不同温度、pH 条件下还原能力不同。本研究优化了菌株 G-13 在还原反应中的 pH 和温度,得到最佳 pH 为 9.0,温度为 $30\ ^\circ\text{C}$,说明该菌在偏碱性土壤中还原效果较好。这与 Ma 等^[21]、朱文杰^[22]和李维宏等^[23]的报道相似,可能是因为细菌在碱性土壤中分离所

得,所以在碱性条件下具有最好的还原性能。同时本文研究了菌株 G-13 在最佳 pH 和温度条件下还原能力与生长的关系,表明菌株还原能力依赖于菌株的生长,这与 Desai 等^[24]的报道一致。

菌株的还原能力还受 Cr(VI)初始浓度的影响,随着 Cr(VI)浓度的增加而减小,说明 Cr(VI)的毒性对细胞具有抑制作用,降低了还原能力。但在本研究中发现菌株 G-13 在 200 mg/L Cr(VI)溶液中还原率仍然能够达到 58%,其还原效果优于大多数已报道的菌株,如 Focardi 等^[25]报道的 *Halomonas* sp. 在 Cr(VI)浓度为 54 mg/L 时还原率仅为 33.26%; Murugavelh 等^[19]发现 *Bacillus cereus* 在 70 mg/L 时还原率已经开始下降,为 73.98%。本研究还发现在还原反应中 Cr(VI)的降低伴随着 Cr(III)的增加,总铬有微量的减少,表明菌株 G-13 以还原反应为主,有少量的吸附作用,将进一步地研究其还原机理。

对细胞各组分还原能力的研究发现,胞外分泌物具有较高的还原能力,表明还原部位发生在细胞外,并对细胞组分进行变性研究,发现胞外酶在还原过程中占主导作用,普通代谢物的还原能力不高。Mala 等^[8]对 *Bacillus methylotrophicus* 进行还原酶研究,结果表明胞外酶的还原能力与其他各组相比较,与本研究结果一致。经傅里叶变换红外光谱分析发现,细胞膜表面具有与 Cr(VI)结合的官能团,主要为羟基、羰基、羧基、-CH、酰胺基等。Raman 等^[26]和 Bueno 等^[27]的研究也表明,细胞表面官能团酰胺基、羧基、羰基、羟基等能够与金属离子结合。Kang 等^[28]则认为细胞表面的羰基还能够吸附还原后的 Cr(III),并将其固定在细胞表面。胞外分泌物的还原能力高于胞内分泌物可能是因为细胞膜能够对分泌物进行加工处理,使通过细胞膜的分泌物具有较高的还原能力,而未通过细胞膜的分泌物仅具有较低的还原能力。渗透细胞也是因为破坏了细胞膜的通透性,从而影响了还原能力。说明细胞膜不但具有还原能力,还能够保护细胞免受毒害,并加工合成铬还原酶。这与肖伟等^[29]和邓红艳^[14]研究结果类似。但由于实验条件有限,

本研究未能对胞外酶做进一步鉴定。

金属离子既可以促进酶的活性,也可以破坏酶的稳定性,本研究中 Cu^{2+} 对还原酶具有促进作用,而 Pd^{2+} 、 Cd^{2+} 具有较强的抑制作用,这与 Murugavelh 等^[30]的研究结果一致。这一结果在实际应用中具有重要意义,在受铬污染土壤中,除了 Cr(VI)之外,还有其他重金属离子,因此还原酶活性的增加有利于受污土壤的生物修复。

总之,菌株 G-13 在偏碱性环境中具有较高的 Cr(VI)还原能力,为微生物修复西北偏碱性铬污染土壤提供了候选菌株。

REFERENCES

- [1] Dotaniya ML, Thakur JK, Meena VD, et al. Chromium pollution: a threat to environment—a review[J]. *Agricultural Reviews*, 2014, 35(2): 153-157
- [2] Mao LQ, Gao BY, Deng N, et al. Oxidation behavior of Cr(III) during thermal treatment of chromium hydroxide in the presence of alkali and alkaline earth metal chlorides[J]. *Chemosphere*, 2016, 145(3): 1-9
- [3] Arshad M, Khan AHA, Hussain I, et al. The reduction of chromium (VI) phytotoxicity and phytoavailability to wheat (*Triticum aestivum* L.) using biochar and bacteria[J]. *Applied Soil Ecology*, 2017, 114: 90-98
- [4] Rahman Z, Singh VP. Cr(VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr(VI) reductase[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 91: 97-103
- [5] Zahoor A, Rehman A. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(6): 814-820
- [6] Sandana M, John G, Sujatha D, et al. Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation[J]. *Microbiological Research*, 2015, 170: 235-241
- [7] Shakoori AR, Makhdoom M, Haq RU. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53(3): 348-351
- [8] Mala JGS, Nair BU, Puvanakrishnan R. Bioaccumulation and biosorption of chromium by *Aspergillus niger* MTCC 2594[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52(3): 179-186
- [9] Patra RC, Malik S, Beer M, et al. Molecular characterization of chromium (VI) reducing potential in gram positive bacteria isolated from contaminated sites[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42(10): 1857-1863

- [10] Kwak YH, Lee DS, Kim HB. *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(8): 4390-4395
- [11] Gonzalez CF, Ackerley DF, Lynch SV, et al. ChrR, a soluble quinone reductase of *Pseudomonas putida* that defends against H₂O₂[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(24): 22590-22595
- [12] Puzon GJ, Petersen JN, Roberts AG, et al. A bacterial flavin reductase system reduces chromate to a soluble chromium(III)-NAD⁺ complex[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 294(1): 76-81
- [13] Qian CR, Huang YX. Laboratory Experiments Microbiology[M]. Beijing: Peking University Press, 1999: 113 (in Chinese)
钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1999: 113
- [14] Deng HY. Chromium pollution and research on bioremediation of chromium contaminated soil in a plant[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing University, 2016 (in Chinese)
邓红艳. 某工厂厂区土壤铬污染及其微生物修复研究[D]. 重庆: 重庆大学博士学位论文, 2016
- [15] National Environmental Protection Agency. Determination Methods for Examination of Water and Wastewater[M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002: 346 (in Chinese)
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 346
- [16] Soni SK, Singh R, Awasthi A, et al. *In vitro* Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(3): 1661-1674
- [17] Poopal AC, Laxman RS. Studies on biological reduction of chromate by *Streptomyces griseus*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1/3): 539-545
- [18] Elangovan R, Philip L, Chandraraj K. Hexavalent chromium reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi-RE*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(1): 81-97
- [19] Murugavel S, Mohanty K. Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 230: 1-9
- [20] Sau GB, Chatterjee S, Mukherjee SK. Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1[J]. Polish Journal of Microbiology, 2010, 59(3): 185-190
- [21] Ma ZM, Zhu WJ, Long HZ, et al. Chromate reduction by resting cells of *Achromobacter* sp. Ch-1 under aerobic conditions[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(6): 1028-1032
- [22] Zhu WJ. Mechanism of Cr(VI) reduction with *Leucobacter* sp. CRB1 and its application in detoxification of chromite ore processing residue[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Central South University, 2007 (in Chinese)
朱文杰. *Leucobacter* sp. CRB1 菌还原铬(VI)的机理及其在铬渣解毒中的应用[D]. 长沙: 中南大学博士学位论文, 2007
- [23] Li WH, Yang N, Wei XF, et al. Isolation, identification and Cr(VI)-reducing capacity of a Cr(VI)-reducing strain *Enterobacter hormaechei*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(11): 2133-2139 (in Chinese)
李维宏, 杨宁, 魏晓峰, 等. 一株 Cr(VI)还原菌的筛选鉴定及其还原特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(11): 2133-2139
- [24] Desai C, Jain K, Madamwar D. Evaluation of *in vitro* Cr(VI) reduction potential in cytosolic extracts of three indigenous *Bacillus* sp. isolated from Cr(VI) polluted industrial landfill[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6059-6069
- [25] Focardi S, Pepi M, Landi G, et al. Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. TA-04[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2012, 66(1): 63-70
- [26] Raman NM, Asokan S, Shobana SN, et al. Bioremediation of chromium(VI) by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from tannery effluent[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2017, 15(2): 207-216
- [27] Bueno BYM, Torem ML, Molina F, et al. Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and Kinetic Studies[J]. Minerals Engineering, 2008, 21(1): 65-75
- [28] Kang SY, Lee JU, Kim KW. Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 36(1): 54-58
- [29] Xiao W, Wang L, Li ZK, et al. Mechanisms and enzymatic characters of hexavalent chromium reduction by *Bacillus cereus* S5.4[J]. Environmental Science, 2008, 29(3): 751-755 (in Chinese)
肖伟, 王磊, 李倬锴, 等. 六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4 还原机理及酶学性质研究[J]. 环境科学, 2008, 29(3): 751-755
- [30] Murugavel S, Mohanty K. Bioreduction of hexavalent chromium by free cells and cell free extracts of *Halomonas* sp.[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 203: 415-422