

[文章编号] 1671-587X(2019)05-1003-06

DOI:10.13481/j.1671-587x.20190505

金属离子和小分子物质对耐铬 (VI) 菌株 M52 还原能力的影响

郭东北¹, 唐 晨², 张 敏², 范 春¹, 岳紫钰², 李佳瑶², 陈 群², 赵 苒¹

(1. 厦门大学 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102; 2. 厦门大学公共卫生学院 预防医学系, 福建 厦门 361102)

[摘 要] 目的: 研究从厦门近岸海域沉积物样品中分离筛选出的芽孢八叠球菌属菌株 *Sporosarcina saromensis* M52 在含不同浓度六价铬 [Cr (VI)] 培养基中的生长情况, 定位 Cr (VI) 还原酶, 探讨金属离子和小分子物质对耐 Cr (VI) 菌株 M52 还原能力的影响。方法: 将 M52 菌株的种子液接种于含不同浓度 (0~600 mg·L⁻¹) Cr (VI) LB 培养基中, 培养 0~48 h 后用紫外分光光度法测量 600 nm 处 M52 菌液的吸光度 (A) 值, 观察 M52 菌株在含 0、50、100、200、400 和 600 mg·L⁻¹ Cr (VI) 的 LB 培养基中的生长情况。将 M52 菌液超声破碎前、破碎后离心所得胞内和胞外活性物质与对照组 M52 菌液在 37℃、pH 7.5 条件下培养 0、12、24 和 48 h, 用二苯碳酰二肼分光光度法分别测定溶液中 Cr (VI) 的浓度, 计算各时间点胞内和胞外活性物质中 Cr (VI) 的还原率。在 LB 培养基中分别加入 0.2 mmol·L⁻¹ 的 Mn²⁺、Fe²⁺ 和 Cu²⁺, 1 mmol·L⁻¹ SDS、1% Triton X-100 和吐温 80 作为处理组, 以未作处理的 LB 液体培养基为对照组, 将种子液以 4% 浓度接种于处理组和对照组, 计算 M52 菌株在 0、6、12、24、36 和 48 h 对 Cr (VI) 的还原率, 分析金属离子和小分子物质处理组中 M52 菌株对 Cr (VI) 还原率的变化。结果: 当 Cr (VI) 浓度低于 100 mg·L⁻¹ 时, 随浓度增加菌株生长加快; 当 100 mg·L⁻¹ ≤ Cr (VI) 浓度 < 600 mg·L⁻¹ 时, 随浓度增加菌株生长受到抑制; 当 Cr (VI) 浓度高于 600 mg·L⁻¹ 时, M52 菌株几乎不生长。与对照组比较, M52 菌株对 Cr (VI) 的还原率在胞内外均升高 (P < 0.05), 胞内 Cr (VI) 的还原率最高。与对照组比较, Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 存在情况下 M52 菌株对 Cr (VI) 的还原率升高 (P < 0.05), 且 Cu²⁺ > Fe²⁺, Mn²⁺ 存在情况下 M52 菌株对 Cr (VI) 的还原率降低 (P < 0.05); 与对照组比较, 小分子物质 SDS、Triton X-100 和吐温 80 存在时, M52 菌株对 Cr (VI) 的还原率降低 (P < 0.05), 且 SDS > Triton X-100 > 吐温 80。结论: 低浓度 Cr (VI) 可以促进 M52 菌株生长, 高浓度 Cr (VI) 则会抑制菌株生长, M52 菌株对 Cr (VI) 的还原主要发生在胞内, Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 可促进 M52 菌株还原 Cr (VI), 吐温 80、Triton X-100 和 SDS 可抑制 M52 菌株还原 Cr (VI)。

[关键词] 芽孢八叠球菌 M52; 六价铬; 还原酶; 小分子物质; 金属离子

[中图分类号] R117 [文献标志码] A

Effects of metal ions and small molecules on reduction of Cr (VI) resistant strain M52

GUO Dongbei¹, TANG Chen², ZHANG Min², FAN Chun¹, YUE Ziyu², LI Jiayao², CHEN Qun², ZHAO Ran¹
(1. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the growth of *Sporosarcina saromensis* M52 obtained from the sediment samples in Xiamen, to locate the Cr (VI) reductase, and to study the effects of metal ions and small molecules on the reducing ability of Cr (VI) resistant strain M52. Methods: The seed solution of M52 strain was inoculated

[收稿日期] 2019-03-20

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目资助课题 (81673129); 福建省教育厅中青年骨干教师教育科研项目资助课题 (JAT160001); 厦门大学大学生创新创业训练计划项目资助课题 (2016Y0070)

[作者简介] 郭东北 (1986-), 男, 安徽省宿州市人, 工程师, 医学硕士, 主要从事环境微生物工程方面的研究。

[通信作者] 赵 苒, 副教授, 硕士研究生导师 (Tel: 0592-2880637, E-mail: zhaoran@xmu.edu.cn)

into the LB medium containing different concentrations ($0-600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) of Cr (VI). After cultivating for 0-48 h, the absorbance (A) value of M52 strain liquid at 600 nm was measured by UV spectrophotometry. The growth of M52 strain in LB medium containing 0, 50, 100, 200, 400, and 600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr (VI) was observed. The intracellular and extracellular active substances obtained by centrifugation of M52 bacteria solution before and after sonication and the M52 in control group were cultured at 37°C and pH 7.5, respectively. Using diphenylcarbazide spectrophotometry, the concentrations of Cr (VI) in the solution at 0, 12, 24, and 48 h were measured, and the reduction rates of Cr (VI) in intracellular and extracellular active substances at each time point were calculated. 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} , 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS and 1% Triton X-100, Tween 80 were added to the LB medium as treatment groups, and the untreated LB liquid medium was used as control group. The seed solution was inoculated in treatment groups and control group at 4% concentration. The reduction rates of Cr (VI) by M52 at 0, 6, 12, 24, 36, and 48 h were calculated. The changes of the reduction rates of Cr (VI) by M52 in metal ion and small molecule treatment groups were investigated. **Results:** When the concentration of Cr (VI) was lower than $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the growth of strain was promoted with the increase of concentration; when the concentration of Cr (VI) was higher than $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the growth of the strain was inhibited with the increase of concentration; when the concentration of Cr (VI) was higher than $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the M52 strain hardly grew. Compared with control group, the reduction rates of Cr (VI) by M52 occurred both inside and outside the cells were increased ($P < 0.05$), and the intracellular Cr (VI) had the highest reduction rate. Compared with control group, the reduction rates of Cr (VI) by M52 were increased in the presence of Cu^{2+} and Fe^{2+} ($P < 0.05$), and $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$; the reduction rate was reduced in the presence of Mn^{2+} ($P < 0.05$). Compared with control group, the reduction rates of Cr (VI) by M52 were reduced in the presence of small molecules SDS, Triton X-100, and Tween 80, and $\text{SDS} > \text{Triton X-100} > \text{Tween 80}$. **Conclusion:** Low concentration of Cr (VI) can promote the growth of the M52 strain, and high concentration of Cr (VI) can inhibit the growth of the strain. The reduction of Cr (VI) by M52 mainly occurs in the cells. Cu^{2+} and Fe^{2+} can promote the reduction of Cr (VI) by M52. Tween 80, Triton X-100, and SDS can inhibit the reduction of Cr (VI) by M52.

KEYWORDS Sporosarcina saromensis M52; hexavalent chromium; reductase; small molecules; metal ions

重金属铬(chromium, Cr)在电镀、木材保藏、染料生产、合金生产和制革等多行业中的广泛应用造成含Cr废水大量排放。由于Cr在环境中长期存在、不易还原,且具有通过食物链的生物聚集和放大作用,因此人为活动产生未经处理的Cr不仅对环境造成严重的污染^[1],还可能威胁公众健康^[2-3]。Cr在环境中通常以三价铬[trivalent chromium, Cr(III)]和六价铬[hexavalent chromium, Cr(VI)]的形式存在。Cr(III)较稳定,是对人体有益的微量元素,毒性低;Cr(VI)具有强烈的生物毒性和极强的水相迁移性^[4],毒性约为Cr(III)的100倍,Cr(VI)的强氧化性使其具有潜在的致癌、致畸和致突变性^[5],致突变性约为Cr(III)的1000倍^[6],是国际公认的3种致癌金属物之一,并被美国环境保护局列为A类污染物。如何安全有效地去除环境中的Cr污染,成为亟待解决的问题。将高毒性的Cr(VI)还原为毒性较低的Cr(III)是在工业废水或自然水体中开展Cr(VI)无害化处理的思路之一^[7]。其中,离子交换、膜分离和化学沉淀等传统的物理化学修

复方法^[8]因工艺程序复杂、治理成本高、易引发二次污染等弊端,在实际应用中备受限制^[9]。生物修复作为一种新兴的环境友好型Cr(VI)污染处理技术,是通过特定生物(主要是藻类、细菌和真菌等微生物)将水或土壤中的污染物还原为低毒或无毒化合物的过程,其具有修复效率高、过程安全和无二次污染等优点^[10],正成为修复环境Cr(VI)污染的新趋势。

本课题组^[11]前期从厦门近岸海域沉积物样品中分离筛选出一株经验证具有高效Cr(VI)还原能力的芽孢八叠球菌属菌株 *Sporosarcina saromensis* M52,该菌株在pH值 ≥ 7.5 、温度 $\geq 30^\circ\text{C}$ 时,24 h可完全还原 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI),对 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI)的还原率达80%以上。为阐明影响M52还原Cr(VI)的因素,本实验通过研究不同浓度Cr(VI)条件下M52的生长情况,菌株胞内、胞外活性物质对Cr(VI)的还原效果,以及金属离子和小分子物质对M52还原Cr(VI)的影响,为M52还原Cr(VI)的条件优化提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器 选用的 M52 菌株是本实验室从厦门马銮湾近海沉积物经不断富集、筛选而来, 经生理生化实验和 16S rDNA 分子生物学鉴定, 确定所筛选的菌种为芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina sp.*), 将其命名为 *Sporosarcina saromensis* M52, 简称 M52。LB 肉汤培养基购自青岛海博生物技术有限公司, 重铬酸钾、吐温 80、Triton X-100、乙二醇四乙酸二钠、SDS 和丙酮等化学试剂均为国产分析纯。VCX130PB 型超声波破碎仪 (美国 Sonics 公司), Epoch2 型全波长酶标仪 [美国伯腾 (BioTek) 仪器有限公司], FE20 型 pH 计和 EL204 型电子天平 [瑞士梅特勒-托利多 (METTLER TOLEDO) 公司], GI54TW 型全自动灭菌锅 [致微 (厦门) 仪器有限公司], SW-CJ-2F 型超净工作台 (上海智诚分析仪器制造有限公司), U410-86 型超低温冰箱 (美国 NBS 公司)。

1.2 种子液配制 取保存于 -80°C 的 M52 菌液 $30 \sim 50 \mu\text{L}$, 置于 100 mL 的 LB 培养基中, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 $12 \sim 14 \text{ h}$, 检测吸光度 [A (600)] 值达到 $0.6 \sim 0.7$ 时停止培养, 即得种子液。

1.3 M52 菌株在不同浓度 Cr (VI) 中的生长情况 分别配制初始含 Cr (VI) 浓度为 $0, 50, 100, 200, 400$ 和 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LB 培养液, 按照 4% 的接种量接种 M52 种子液, 在 $\text{pH} 7.5, 37^{\circ}\text{C}, 150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养, 分别在初始时刻 (0 h), $12, 24$ 和 48 h 检测 A (600) 值, 以 A 值反映 M52 菌株生长情况。

1.4 Cr (VI) 还原酶的提取和定位 将 M52 菌液离心 ($4^{\circ}\text{C}, 12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min), 收集上清液即为胞外活性物质; 菌液离心去上清, 用 Tris-HCl ($\text{pH} 7.5$) 洗涤菌体, 再离心去上清, 加入原培养基的 $1/20$ 体积的 Tris-HCl, 漩涡振荡。将菌液倒入无菌玻璃容器中, 在冰浴条件下超声波破碎, $4^{\circ}\text{C}, 12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min , 将上清液转到新的离心管中, 即得胞内活性物质 [Cr (VI) 还原酶]^[12]。将上述胞外和胞内活性物质分别加入含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 重铬酸钾溶液中, 于培养 $0, 12, 24$ 和 48 h ($37^{\circ}\text{C}, \text{pH} 7.5$, 摇床培养条件下) 以二苯碳酰二肼分光光度法分别测定溶液中的 Cr (VI) 浓度, 计算 $0, 12, 24$ 和 48 h 时

Cr (VI) 的还原率。菌株对 Cr (VI) 还原率计算: 实验初始测得 Cr (VI) 浓度记为 ρ_0 , 待测时刻测得 Cr (VI) 浓度记为 ρ_1 , 代入下列公式计算待测时刻菌株的还原率 X: $X = (\rho_0 - \rho_1) / \rho_0 \times 100\%$ 。依据各时间点胞外和胞内活性物质中 Cr (VI) 的还原率高低判断菌株对 Cr (VI) 的还原情况。

1.5 二苯碳酰二肼分光光度法测定不同金属离子组中 Cr (VI) 的还原率 分别配制浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{Mn}^{2+}, \text{Fe}^{2+}$ 和 Cu^{2+} 溶液, 以不含金属离子的 LB 液体培养基为对照, 在 $\text{pH} 7.5, 37^{\circ}\text{C}, 150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下与 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr (VI) 反应 $0, 6, 12, 24, 36$ 和 48 h , 用二苯碳酰二肼分光光度法分别测定溶液中的 Cr (VI) 浓度, 计算不同时间点 Cr (VI) 的还原率。依据不同金属离子组中 Cr (VI) 的还原率高低判断金属离子是否抑制或促进 M52 还原 Cr (VI)。

1.6 二苯碳酰二肼分光光度法测定不同小分子物质组中 Cr (VI) 的还原率 配制浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SDS 和 1% 的 Triton X-100、吐温 80, 以未作处理的 LB 液体培养基为对照, 在 $\text{pH} 7.5, 37^{\circ}\text{C}, 150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下与 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr (VI) 反应 $0, 6, 12, 24, 36$ 和 48 h , 用二苯碳酰二肼分光光度法分别测定溶液中的 Cr (VI) 浓度, 计算不同时点 Cr (VI) 的还原率。依据不同小分子物质组中 Cr (VI) 的还原率高低判断小分子物质是否抑制或促进 M52 还原 Cr (VI)。

1.7 二苯碳酰二肼分光光度法测定溶液中 Cr (VI) 及总 Cr 浓度 参考生活饮用水标准检验方法-金属指标-水质 Cr (VI) 的测定——二苯碳酰二肼分光光度法 (GB/T 5750.6-2006) 检测溶液中的 Cr (VI) 浓度; 参考水质总 Cr 的测定法——二苯碳酰二肼分光光度法 (GB 7466-1987) 测定溶液中总 Cr (VI) 浓度。

1.8 统计学分析 采用 Excel 2016 软件制作图表, 应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。胞内和胞外活性物质对 Cr (VI) 的还原率以及金属离子和小分子物质对 Cr (VI) 的还原率均服从正态分布与方差齐性, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 运用方差分析前还原率数据经平方根反正弦变换处理。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M52 在不同浓度 Cr (VI) 中的生长情况 测

得各剂量组初始 A (600) 值为 0.068~0.074, 表明菌株初始接种量是一致的, M52 在各时间点的生长情况见表 1。当 Cr (VI) 浓度低于 100 mg · L⁻¹ 时, 随浓度增加可促进菌株生长; 当 100 mg · L⁻¹ ≤ Cr (VI) 浓度 < 600 mg · L⁻¹ 时, 随浓度增加, 菌株生长受到抑制。与 0 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组比较, 50 和 100 mg · L⁻¹ Cr (VI) 浓度时 A (600) 值升高 (P < 0.05), 且浓度越高, 菌量越低。100 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组 A (600) 值高于 0、200、400 和 600 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组 (P < 0.05), 表明 Cr (VI) 浓度为 100 mg · L⁻¹ 时菌量最高; 50 和 100 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组中, 菌量起初增长速度较快, 12 h 后菌量增长速度变缓。200 和 400 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组中, 前 12 h 菌株增长较缓慢, 但 12 h 后菌量增长速度较快。600 mg · L⁻¹ Cr (VI) 组中菌株菌量几乎不增长。见表 1。

表 2 M52 菌株胞内和胞外活性物质作用不同时间后 Cr(VI) 的还原率

Tab 2 Reduction rates of Cr(VI) after treated with intracellular and extracellular active substances of M52 strain for different time (n=9, $\bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Reduction rate of Cr (VI)			
	(t/h)	12	24	48
Control		37.99 ± 3.30	84.98 ± 2.30	88.98 ± 0.50
Intracellular active substance		49.42 ± 5.80	88.78 ± 0.50	96.98 ± 6.20
Extracellular active substance		7.19 ± 6.40 ^{*△}	47.98 ± 9.30 ^{*△}	49.04 ± 6.20 ^{*△}

* P < 0.05 compared with control group; [△] P < 0.05 compared with intracellular active substance group.

2.3 二苯碳酰二肼分光光度法测定不同金属离子组作用不同时间 Cr (VI) 的还原率 在 12 和 24 h, Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 金属离子处理组 Cr (VI) 还原率较对照组升高 (P < 0.05), Cu²⁺ 和 Fe²⁺ 不同程

表 1 M52 菌株在不同时间点不同浓度 Cr (VI) 中的生长情况

Tab 1 Growth of M52 strain in different concentrations of Cr (VI) at different time points (n=18, $\bar{x} \pm s$)

Cr(VI) (mg · L ⁻¹)	A value		
	(t/h) 12	24	48
0	0.36 ± 0.01 [△]	0.56 ± 0.12	0.76 ± 0.10 [△]
50	0.53 ± 0.03 [*]	0.54 ± 0.03	0.83 ± 0.04
100	0.49 ± 0.05 [*]	0.65 ± 0.11	1.01 ± 0.14
200	0.20 ± 0.04 ^{*△}	0.40 ± 0.10 ^{*△}	0.72 ± 0.18 [△]
400	0.06 ± 0.01 ^{*△}	0.37 ± 0.05 ^{*△}	0.74 ± 0.10 [△]
600	0.00 ± 0.00 ^{*△}	0.31 ± 0.04 ^{*△}	0.26 ± 0.01 ^{*△}

* P < 0.05 compared with 0 mg · L⁻¹ Cr(VI) group; [△] P < 0.05 compared with 100 mg · L⁻¹ Cr(VI) group.

2.2 Cr (VI) 还原酶 (活性物质) 的定位 胞外活性物质组对 Cr (VI) 的还原率明显低于对照组和胞内活性物质组 (P < 0.05)。见表 2。

度地促进 M52 对 Cr (VI) 的还原, 且促进作用为 Cu²⁺ > Fe²⁺; Mn²⁺ 处理组与对照组比较 Cr (VI) 还原率降低 (P < 0.05), 表明 Mn²⁺ 抑制 M52 对 Cr (VI) 的还原。见表 3。

表 3 不同金属离子作用不同时间后 Cr(VI) 的还原率

Tab 3 Reduction rates of Cr(VI) after treated with different metal ions for different time

(n=20, $\bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Reduction rate of Cr (VI)				
	(t/h) 6	12	24	36	48
Control	21.92 ± 5.02	32.36 ± 1.72	57.11 ± 1.20	66.46 ± 2.47	94.78 ± 5.77
Mn ²⁺	12.39 ± 2.48 [*]	24.21 ± 2.64 [*]	48.31 ± 3.38 [*]	64.62 ± 2.08	94.50 ± 5.05
Cu ²⁺	27.05 ± 4.35	42.63 ± 2.40 [*]	83.78 ± 2.79 [*]	100.09 ± 0.42 [*]	100.46 ± 0.57 [*]
Fe ²⁺	22.28 ± 7.13	37.68 ± 1.11 [*]	64.72 ± 1.61 [*]	84.69 ± 1.79 [*]	99.36 ± 0.32

* P < 0.05 compared with control group.

2.4 不同小分子物质组作用不同时间 Cr (VI) 的还原率 SDS、Triton X-100 和吐温 80 的小分子物质处理组在各时间点与对照组比较 Cr (VI) 还

原率均降低 (P < 0.05), SDS、Triton X-100 和吐温 80 均表现为不同程度地抑制 M52 对 Cr (VI) 的还原。见表 4。

表 4 不同小分子物质作用不同时间后 Cr(VI) 的还原率

Tab 4 Reduction rates of Cr(VI) after treated with different small molecules for different time ($n=20, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Reduction rate of Cr(VI)					
	(t/h)	6	12	24	36	48
Control		21.92±5.02	32.36±1.72	57.11±1.20	66.46±2.47	94.78±5.77
SDS		6.15±0.57*	3.68±4.30*	9.73±2.71*	4.69±2.64*	20.82±2.62*
Triton X-100		8.90±2.48*	6.25±3.57*	12.02±1.80*	11.10±1.59*	21.64±2.20*
Tween 80		7.71±2.91*	22.37±3.54*	54.54±1.11	56.93±1.51*	83.60±0.32*

* $P < 0.05$ compared with control group.

3 讨论

M52 在不同浓度 Cr(VI) 中的生长情况显示: Cr(VI) 浓度低于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, M52 增长速度较快, 特别是在 12 h 内, 而当 $\text{Cr(VI)} \geq 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌株几乎不生长, 提示适宜浓度的 Cr(VI) 可促进 M52 的生长。部分从 Cr 污染环境分离出的耐 Cr 菌株已被证明具有还原铬酸盐的能力^[12-13]。在高浓度 Cr(VI) 水平下观察到的菌株生长速率较慢, 会使与金属结合的吸附表面减少, 还原效率降低。暴露在适量浓度的重金属环境下会引发适应性反应, 如诱导金属硫蛋白, 从而使细胞对重金属引起的毒性具有抗性^[14]。GONZALEZ 等^[15]认为: Cr(VI) 进入菌体后才被还原为 Cr(III)。PRIESTER 等^[16]发现: *Pseudomonas putida* 菌体溶解后释放还原酶催化 Cr(VI) 在胞外被还原为 Cr(III)。胞浆 Cr 还原酶^[12]或膜相关 Cr 还原酶^[17]都可能参与 Cr(VI) 的还原。上述研究提示细胞内外均有可能是活性物质(Cr 还原酶)还原 Cr(VI) 的场所。本研究对 Cr(VI) 还原活性物质的定位结果显示: M52 对 Cr(VI) 的还原在细胞内外均有发生, 但以胞内为主, 在适宜条件下, 菌株 M52 胞内活性物质对 Cr(VI) 的最高还原率为 96.98%, 高于 M52 对照组的 88.98%。

Cu^{2+} 离子可以有效提高 Cr(VI) 的还原率。肖伟等^[18]研究表明: Cu^{2+} 有增强 Cr(VI) 还原酶活性的作用, 这可能是由于 Cu^{2+} 是很多还原酶的辅基, 其可以运输电子或者作为电子的氧化还原中心, 并在某些情况下, 以在蛋白质亚基之间起穿梭电子的作用^[19]; 魏斐等^[20]的研究也证实 Cu^{2+} 对苏云金芽孢杆菌有明显的促进 Cr(VI) 还原作用。本研究同样观察到: Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 可促进 M52 对 Cr(VI) 的还原, 而 Mn^{2+} 则表现为抑制 M52 对 Cr(VI) 的还原; SDS、Triton X-100 和吐温 80 不

同程度抑制 M52 对 Cr(VI) 的还原。本研究结果与魏斐等^[20]的研究结果部分一致, 其研究显示 Triton X-100 对 Cr(VI) 的还原无明显的影响, 而 SDS 和吐温 80 则可抑制 Cr(VI) 的还原。不同金属离子和小分子物质对 M52 还原 Cr(VI) 能力的不同作用方式提示, 在将 M52 用于修复环境 Cr 污染的实践中应注意其他因素对还原效率的影响, 并可通过添加 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 等离子提升修复效果。

Cr(VI) 还原菌在天然水体、土壤和沉积物中大量存在, 但迄今从天然环境中发现并筛选出的具有 Cr(VI) 还原能力的土著微生物还非常有限, 更多的菌株是分离自污染环境^[12,17,20-22]。源于 Cr(VI) 污染地带的微生物因在高 Cr(VI) 环境下生存, 可能进化出特有的还原机制^[15]。本研究所选用 *Sporosarcina saromensis* M52 菌株分离自厦门马銮湾近岸海域沉积物样品, 是一株首次被报道于近岸海域发现的新型 Cr(VI) 还原菌土著细菌, 自然水体和土壤的适应性和实用性好, 更适用于科学研究和实际应用。本研究通过对 M52 中 Cr(VI) 还原酶定位及其影响因素初步探讨, 为阐明还原酶介导 M52 还原 Cr(VI) 的分子生物学机制、构建高选择性的 Cr(VI) 抗性基因工程菌奠定实验基础, 具有一定的应用和理论意义。

[参考文献]

- [1] KARTHIK C, OVES M, SATHYA K, et al. Isolation and characterization of multi-potential Rhizobium strain ND2 and its plant growth-promoting activities under Cr(VI) stress [J]. Arch Agronomy Soil Sci, 2017, 63 (8): 1058-1069.
- [2] 胡颖, 操家顺. 植物废料吸附含铬污水的研究进展 [J]. 安全与环境工程, 2016, 23 (1): 51-58.
- [3] 王晓波, 李建国, 刘冬英, 等. 广州市市售大米中铬污染水平及健康风险评价 [J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27 (1): 75-78.
- [4] MA Y, ZHONG H, HE Z G. Cr(VI) reductase activity

- locates in the cytoplasm of *Aeribacillus pallidus* BK1, a novel Cr(VI)-reducing thermophile isolated from Tengchong geothermal region, China [J]. *Chem Eng J*, 2019, 371: 524-534.
- [5] WANI R, KODAM K M, GAWAI K R, et al. Chromate reduction by *Burkholderia cepacia* MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater Lake [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75 (3): 627-632.
- [6] ZHANG W F, ZHANG P X, LIU F, et al. Simultaneous oxidation of Cr(III) and extraction of Cr(VI) from chromite ore processing residue by silicate-assisted hydrothermal treatment [J]. *Chem Eng J*, 2019, 371: 565-574.
- [7] KABIR M M, FAKHRUDDIN A N M, CHOWDHURY M A Z, et al. Isolation and characterization of chromium(VI)-reducing bacteria from tannery effluents and solid wastes [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34 (9): 126.
- [8] 刘仕业, 岳昌盛, 彭 犇, 等. 铬污染毒性土壤清洁修复研究进展与综合评价 [J]. *工程科学学报*, 2018, 40 (11): 1275-1287.
- [9] NUÑEZ-DELGADO A, FERNÁNDEZ-SANJURJO M, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ E, et al. Cr(VI) Sorption/desorption on pine paw dust and oak wood ash [J]. *Int J Env Res Pub He*, 2015, 12 (8): 8849-8860.
- [10] GARG S K, TRIPATHI M, SRINATH T. Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent [J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2012, 217: 75-140.
- [11] ZHAO R, WANG B, CAI Q T, et al. Bioremediation of hexavalent chromium pollution by *Sporosarcina saromensis* M52 isolated from offshore sediments in Xiamen, China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2016, 29 (2): 127-136.
- [12] PAL A, PAUL A K. Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil [J]. *Microbiol Res*, 2004, 159 (4): 347-354.
- [13] LONG D Y, HASHMI M Z, SU X M, et al. Cr(VI) reduction by an extracellular polymeric substance (EPS) produced from a strain of *Pseudochrobactrum saccharolyticum* [J]. *Biotech*, 2019, 9 (3): 111.
- [14] CHEN L P, MA L, BAI Q, et al. Heavy metal-induced metallothionein expression is regulated by specific protein phosphatase 2A complexes [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289 (32): 22413-22426.
- [15] GONZLEZ P S, AMBROSIO L F, PAISIO C E, et al. Chromium(VI) remediation by a native strain: effect of environmental conditions and removal mechanisms involved [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 21 (23): 13551-13559.
- [16] PRIESTER J H, OLSON S G, WEBB S M, et al. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72 (3): 1988-1996.
- [17] IBRAHIM A S S, EL-TAYEB M A, ELBADAWI Y B, et al. Isolation and characterization of novel potent Cr(VI) reducing alkaliphilic *Amphibacillus* sp. KSUCr3 from hypersaline soda lakes [J]. *Electron J Biotechnol*, 2011, 14 (4): 7117-7121.
- [18] 肖 伟, 王 磊, 李悼错. 六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5. 4 还原剂机理及酶学性质研究 [J]. *环境科学*, 2008, 29 (3): 751-755.
- [19] ABE F, MIURA T, NAGAHAMA T, et al. Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan trench and the induction of superoxide dismutase activity by Cu^{2+} [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23 (24): 2027-2034.
- [20] 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.
- [21] 谭小庆, 邓 鹏, 吴 颖, 等. 铬还原酶 T 体外合成及活性鉴定 [J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39 (7): 973-977.
- [22] 朱培蕾, 焦仕林, 姜 朴, 等. 六价铬还原菌 Cr4-1 的鉴定和还原影响因素的优化 [J]. *卫生研究*, 2015, 44 (2): 201-205, 210.