· 实验研究 ·

蜡样芽孢杆菌还原六价铬效果分析*

焦仕林, 朱培蕾, 姜朴, 曾欣, 罗启芳, 王琳

摘 要: 目的 探索蜡样芽孢杆菌 Cr4-1 对六价铬[Cr(VI)]的还原特性。**方法** 采用正交试验研究温度、pH、初始 Cr(VI)浓度、摇床转速对细菌生长和 Cr(VI)还原的影响; 使用 9 种常见碳源进行细菌生长和 Cr(VI)还原试验, 筛选最佳碳源和电子供体; 采用透射电子显微镜观察不同浓度 Cr(VI)还原细菌, 细菌前后形态的变化。**结果** 影响该细菌生长的主要因素是摇床转速和 pH 值, 影响 Cr(VI)还原细菌的主要因素是初始 Cr(VI)浓度和温度。细菌生长和 Cr(VI)还原的较优条件是温度 35 ℃、pH = 9、初始 Cr(VI)浓度为 30 mg/L、转速 150 r/min。乳酸钠是细菌生长和 Cr(VI)还原的较好碳源, 其次是丙酮酸钠。透射电镜观察发现, 初始 Cr(VI)浓度为 30 mg/L 和 60 mg/L 时, 还原过程中 Cr(VI)对细菌具有毒性作用, 浓度越高, 细菌损伤越严重。**结论** 蜡样芽孢杆菌Cr4-1 对 Cr(VI)的还原效果明显, 具有较好的应用前景。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 六价铬还原; 环境因素; 碳源

中图分类号: R 994.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0580(2016)10-1326-04 DOI: 10.11847/zgggws2016-32-10-08

Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus cereus* Cr4-1

JIAO Shi-lin, ZHU Pei-lei, JIANG Pu, et al (*Institute of Environmental Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province* 430030, China)

Abstract: Objective To study the reduction of hexavalent chromium (Cr[VI]) by *Bacillus cereus* (*B. cereus*) Cr4-1. **Methods** Effects of temperature, pH, initial Cr(VI) concentration and shaker speed on hexavalent chromium reduction and the growth of *B. cereus* were explored with orthogonal tests. Nine common carbon sources were used in the bacteria culture and Cr(VI) reduction test in order to screen the optimum carbon source and electron donor. Transmission electron microscopy was employed to observe morphological changes of bacteria Cr4-1 before and after Cr(VI) reduction. **Results** The main factors influencing the growth of the bacteria were shaking speed and pH value. The main factors influencing the Cr(VI) reduction were initial Cr(VI) concentration and temperature. The better conditions for the bacterial growth and Cr(VI) reduction were the temperature of 35 ℃, pH value of 9, initial Cr(VI) concentration of 30 mg/L, and the shaking speed of 150 r/min. Sodium lactate was the best carbon source for bacterial growth and Cr(VI) reduction, followed by sodium pyruvate. Toxic effect of Cr(VI) on *B. cereus* Cr4-1 strain during Cr(VI) reduction process at the initial Cr(VI) concentration of 30 and 60 mg/L was observed with transmission electron microscope and the effect was positively correlated with the initial Cr(VI) concentration. **Conclusion** *Bacillus cereus* Cr4-1 presents good efficiency in bioreduction of hexavalent chromium and could be used in practical application.

Key words: *Bacillus cereus*; hexavalent chromium reduction; environmental factor; carbon source

铬(chromium, Cr)在生产和应用过程中可对环境带来严重污染, 其中六价铬[Cr(VI)]可通过消化道、呼吸道、皮肤及粘膜侵入人体, 损伤肝肾等器官, 同时具有较强的遗传毒性、生殖毒性和致癌作用, 严重危害人体健康[1-2]。因此, 将 Cr(VI)还原为低毒的 Cr(III)具有重要的实际意义。Cr(VI)还原目前已知的方法主要有化学还原和离子交换法。前者会产生大量污泥, 后者在其他重金属离子存在时缺乏特异性[3]。近年来, 随着生物修复技术的发展, 用细菌还原六价铬的方法引起了重视[4]。本研究于 2014 年 3 月从湖北省某铬盐厂污水处理站含 Cr(VI)的活性污泥中, 通过驯化培养, 筛选获得 1 株还原 Cr(VI)的蜡样芽孢杆菌 Cr4-1。现将环境因素、碳源和电子供体对细菌生长和 Cr(VI)还原效果的影响报告如下。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 LB 培养液: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取 5 g/L, 氯化钠 10 g/L; 无机盐培养液: 1.013 g/L 氯化铵, 0.62 g/L 磷酸二氢钠, 2.5 g/L 磷酸氢二钾, 0.010 3 g/L 硫酸镁, 0.004 25 g/L 氯化钙, 氯化铁 0.000 85 g/L[5-6]。本研究中所用试剂纯度均为分析纯。722N 分光光度计(上海菁华科技有限公司); 150 - A 数显生化培养箱(常州国

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81273022)
作者单位: 华中科技大学同济医学院公共卫生学院环境医学研究所 教育部环境与健康重点实验室, 湖北 武汉 430030
作者简介: 焦仕林(1990 -), 男, 湖北人, 硕士在读, 研究方向: 环境生物修复技术。
通讯作者: 王琳, E-mail: lwangtj@126.com
数字出版日期: 2016 - 6 - 21 14:12
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160621.1412.028.html

华电器有限公司);TH2 - 103B 恒温培养摇床(上海一恒科技有限公司);Neofuge 23R 台式高速冷冻离心机(香港力康发展有限公司);HFsafe 1200/C 生物安全柜(深圳力康发展有限公司)、Tecnai $G^2$12 透射电子显微镜(荷兰 FEI 公司)。

1.2　Cr(VI)还原菌株　于 2014 年 3 月采集湖北省某铬盐厂污水处理站活性污泥进行驯化、分离和纯化,获得 1 株高效 Cr(VI)还原的蜡样芽孢杆菌株,命名为 Cr4-1。该菌即为后续 Cr(VI)还原特性研究的菌种[7]。

1.3　Cr4-1 生长和还原较优条件筛选(表 1)　采用 4 因素 3 水平的正交试验设计(表 1)[8]筛选 Cr4-1 生长和还原 Cr(VI)的较优条件。以细菌生长百分比和还原率作为评价指标。其中细菌生长百分比是指还原试验进行 12 h 之后的细菌密度和初始细菌密度的比值;还原率是还原实验进行 12 h 之后,被还原的 Cr(VI)浓度和初始 Cr(VI)浓度的比值。

表 1　正交设计因素

变量	水平		
	1	2	3
温度(℃)	25	30	35
pH 值	7	8	9
初始 Cr(VI)浓度(mg/L)	30	60	90
摇床转速(r/min)	0	75	150

1.4　不同碳源和电子供体对 Cr4-1 生长和还原的影响　取 0.1 mL Cr4-1 菌液接种到装有 50 mL LB 培养液的锥形瓶中过夜富集培养,将细菌在 6 000 r/min条件下离心 5 min,用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline,PBS)溶液清洗 2 次,接种至装有 70 mL 无机盐培养液的锥形瓶中,在 30 ℃、150 r/min 条件下培养。培养液初始 Cr(VI)浓度 30 mg/L,分别加入不同碳源,检测细菌 600 nm 处吸光度值和剩余 Cr(VI)浓度。所选择的碳源包括乳酸钠、葡萄糖、乙醇、甘油、丙酮酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、醋酸钠和甲酸钠等。采用不加碳源但接种细菌的无机盐培养液作为对照。每个样品进行 3 个平行试验。

1.5　Cr(VI)对菌株 Cr4-1 的损伤　将 Cr4-1 接种在初始 Cr(VI)浓度为 30 mg/L 和 60 mg/L 的培养液中,培养 24 h。取 0.5 mL 的 Cr4-1 菌液,6 000 r/min离心 5 min,弃去上清液,用 2.5% 戊二醛固定细菌 2 h,然后用 0.1 mol/L 的 PBS 清洗 2 次,每次 20 min,用 1% 的锇酸固定 30 ~ 120 min,再次用 0.1 mol/L 的 PBS 清洗,按 50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇丙酮、90% 丙酮、100% 丙酮(2 次)各 5 min 梯度脱水,丙酮和环氧树脂 1∶1,混合浸透 2 h,纯环氧树脂包埋剂浸透 2 h,开始包埋,在 80 ℃恒温箱内聚合 10 h,修块,用德国 LEICA ULTRACUT UCT 超薄切片机切片,醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色各 10 min,最后在透射电子显微镜下观察并拍照记。对照为不加 Cr(VI),接种相同浓度和体积的 Cr4-1 菌液。

1.6　分析方法　Cr(VI)测定采用二苯基碳酰二肼分光光度法[9]。细菌浓度的测定采用 600 nm 处吸光度值。

1.7　统计分析　正交实验中,采用极差分析法,计算 K 值和 R 值。K 值为不同因素不同水平的均值,R 值为极差,即各因素中最大 K 值和最小 K 值的差值。因此,K 值用来确定不同因素的最佳水平。R 值反映不同因素对于实验结果的影响程度。采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。

2　结　果

2.1　细菌生长和还原较优条件(表 2)　比较细菌生长百分比(%)和 Cr(VI)还原率(%)各因素的 R 值大小可知,细菌生长的影响程度依次为:转速 > pH 值 > 初始 Cr(VI)浓度 > 温度;各因素对 Cr(VI)还原的影响依次为:Cr(VI)浓度 > 温度 > pH 值 > 转速。比较各因素的 K 值大小可知,细菌生长的最佳条件为 25 ℃、pH 为 8、初始 Cr(VI)浓度 30 mg/L、摇床转速 150 r/min;Cr(VI)还原的最佳条件为:35 ℃、pH 为 9、初始 Cr(VI)浓度 30 mg/L、摇床转速 75 r/min。由此可见,影响细菌生长最主要的因素是摇床转速和 pH 值,影响 Cr(VI)还原最主要的因素是初始 Cr(VI)浓度和温度。当温度为 35 ℃、pH 值为 9、初始 C 浓度 30 mg/L、转速 150 r/min 时,细菌生长百分比最高达到 123.1%,还原率达到 100%。

2.2　碳源和电子供体筛选结果(图 1、2)　乳酸钠是细菌生长代谢过程中的一种常见碳源和电子供体,为获得适于 Cr4-1 生长的碳含量和碳氮比,首先选用不同浓度乳酸钠进行细菌生长和 Cr(VI)还原试验。从图 1A 可以看出,当乳酸钠浓度较低时,由于碳源浓度无法满足细菌生长的需求,细菌光密度(optical density,OD)值呈下降趋势,随着乳酸钠浓度的增加,细菌浓度逐渐增大,当乳酸钠浓度达到 12 g/L 时,细菌浓度达到最大。乳酸钠浓度为 48 g/L时,可能由于碳源和氮源比例的影响,细菌生长被抑制。图 1B 显示,当乳酸钠浓度为 12 g/L 时,细菌 Cr4-1 对 Cr(VI)还原效果最好,可以在 48 h 内将 30 mg/L 的 Cr(VI)还原至 5 mg/L,还原率达到 83.33%。乳酸钠浓度过高或过低,还原均会受到抑制。因此,细菌生长和还原所需的最佳乳酸钠浓度为 12 g/L,此时碳含量为 3.84 g/L,培养液碳氮比

为 14∶1。为便于比较,本研究选择的 9 种碳源,其碳含量均为 3.84 g/L,碳氮比为 14∶1,实验结果如图 2 所示。从图 2A 可以看出,与未加碳源对照相比,甘油、醋酸钠、琥珀酸钠、柠檬酸钠可维持细菌的生长,而乳酸钠和丙酮酸钠则可促进细菌的生长。细菌 Cr4-1 的较好碳源依次为乳酸钠 > 丙酮酸钠 > 葡萄糖≈甘油 > 琥珀酸钠 > 柠檬酸钠。不同碳源对 Cr(VI)还原的影响如图 2B 所示。有利于 Cr(VI)还原的碳源依次为:乳酸钠 > 丙酮酸钠 > 葡萄糖 > 甘油 > 琥珀酸钠。可见,乳酸钠是细菌生长和 Cr(VI)还原的较好碳源,其次是丙酮酸钠。葡萄糖、甘油、琥珀酸钠虽然可促进细菌生长,但对 Cr(VI)还原的效果较差。

表 2　菌株 Cr4-1 生长和还原的正交试验结果

因素	温度(℃)	pH 值	初始 Cr(VI)浓度(mg/L)	摇床转速(r/min)	生长百分比(%)	还原率(%)	因素	温度(℃)	pH 值	初始 Cr(VI)浓度(mg/L)	摇床转速(r/min)
实验编号							生长百分比(%)				
1	25	7	30	0	91.9	49.3	K_1	106.2	99.6	107.5	90.0
2	30	8	30	75	107.4	88.9	K_2	100.5	109.8	105.6	120.4
3	35	9	30	150	123.1	100.0	K_3	104.6	101.9	98.2	120.4
4	30	9	60	0	86.7	53.9	R	5.7	10.2	9.3	30.4
5	35	7	60	75	99.4	53.2	还原率(%)				
6	25	8	60	150	130.8	30.8	K_1	30.4	39.8	79.4	47.1
7	35	8	90	0	91.3	38.1	K_2	53.2	52.6	46.0	51.0
8	25	9	90	75	95.9	10.9	K_3	63.8	54.9	22.0	49.2
9	30	7	90	150	107.3	16.9	R	33.4	15.2	57.8	3.9

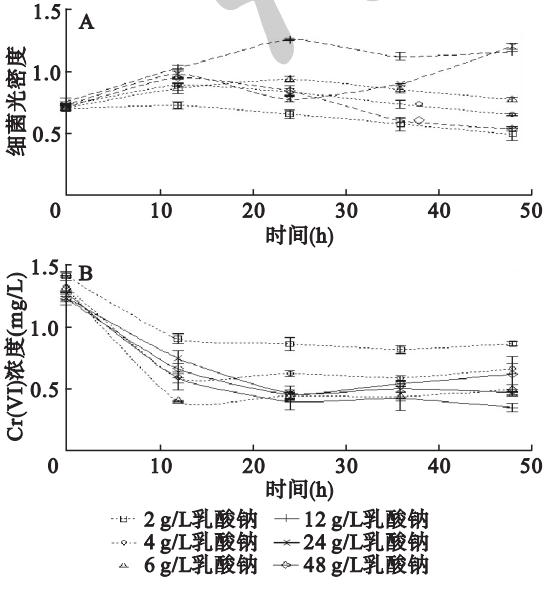

图 1　不同乳酸钠浓度对菌株 Cr4-1 生长和 Cr(VI)还原的影响

2.3　Cr(VI)对细菌损伤(图 3 ~ 5)　采用透射电子显微镜对 Cr(VI)还原前后的细菌形态变化进行了观察。图 3 是正常细菌生长 24 h 后的镜下形态。从图 3a 上可以清楚的观察到细菌的细胞壁、细胞膜和细胞内部的微细结构。图 3b 和图 3c 是正常细菌不同切面的形态,细胞结构完整、形态正常,没有观察到损伤破坏。细菌在含有 Cr(VI) 30 mg/L 和 60 mg/L的 LB 培养液中生长 24 h 后,采用透射电镜观察,结果如图 4 和图 5 所示。可以看出,由于 Cr(VI)的影响,细菌形态明显改变,出现萎缩变形,甚至溶解坏死。有些细胞破碎之后,镜下仅存留完整的细胞壁结构,部分细胞的细胞壁也被破坏。且 Cr(VI)浓度为 60 mg/L 时,细胞溶解坏死比 Cr(VI)浓度为 30 mg/L 时严重。以上结果表明,细菌在还原 Cr(VI)的同时,Cr(VI)对细菌产生一定的毒性,且浓度越高,毒性越大。

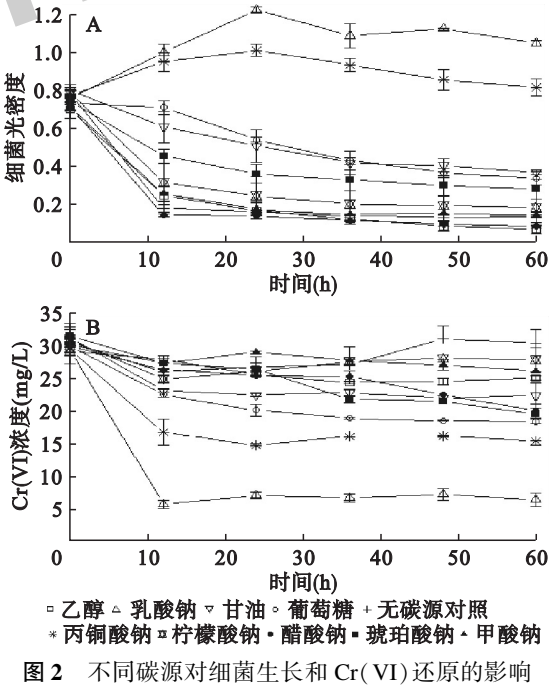

图 2　不同碳源对细菌生长和 Cr(VI)还原的影响

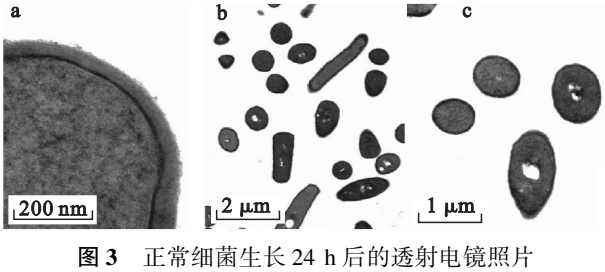

图 3　正常细菌生长 24 h 后的透射电镜照片

中国公共卫生 CPH

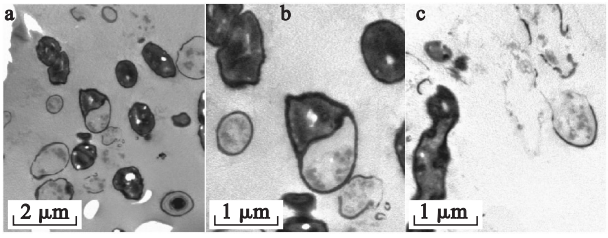

图 4　还原初始 Cr(VI)浓度 30 mg/L 24 h 后的细菌透射电镜照片

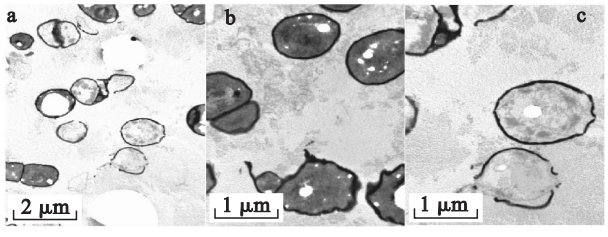

图 5　还原初始 Cr(VI)浓度 60 mg/L 24 h 后的细菌透射电镜照片

3　讨　论

正交试验的优点是试验次数少、效果好、方法简单、使用方便、效率高。本研究通过 4 因素 3 水平 9 次试验的正交试验设计，探讨蜡样芽孢杆菌 Cr4-1 生长和还原 Cr(VI)的影响因素，得出菌株 Cr4-1 生长和对 Cr(VI)还原的较优条件为：35 ℃、pH 值为 9、初始铬浓度 30 mg/L、转速 150 r/min。目前，筛选 Cr(VI)还原菌及其还原 Cr(VI)影响因素的研究中，由于筛选的方法不同、得到的菌种不同、环境因素的差异，得到的结果存在差异[10-12]。本研究发现乳酸钠和丙酮酸钠是细菌生长和 Cr(VI)还原的较好碳源，同时发现葡萄糖、甘油、琥珀酸钠对菌株 Cr4-1 的生长与还原也有较好的促进效果，这与魏斐等[13]研究结果相似，加之所选择的碳源价格便宜，容易获得，在废水中比较常见，比如葡萄糖常见于食品加工废水[14]，故它们作为菌株 Cr4-1 的碳源和电子供体可行且经济实用。

细菌还原六价铬的机制一般认为有直接还原和间接还原 2 种。直接还原是利用细菌分泌的铬还原酶催化还原 Cr(VI)，这种酶可能位于胞外、胞内或者胞膜上，是细菌的一种主动防御机制[15]。间接还原是细菌在代谢过程中产生一些还原性物质，如硫化氢等，可直接与 Cr(VI)反应，达到解毒目的，间接还原的细菌一般为自养型细菌。蜡样芽孢杆菌 Cr4-1为异养型细菌，而且在还原试验的过程中，并未发现硫化氢等还原性物质的产生。因此，可以初步推测，细菌 Cr4-1 对 Cr(VI)的还原为酶介导反应。有文献表明，细菌溶解在六价铬还原过程中起到重要的作用，细菌溶解所释放的构酶可以在胞内或者胞外催化 Cr(VI)[16-17]。蜡样芽孢杆菌Cr4-1也可能具有类似的还原机制。由于 Cr(VI)的毒性作用，细菌发生溶解坏死，释放出 Cr(VI)还原酶还原 Cr(VI)。但 Cr(VI)如何介导细菌的溶解尚有待进一步研究。

参考文献

[1] 周宜开. 环境流行病学基础与实践[M]. 北京：人民卫生出版社，2013：249－252.
[2] 周梦芝，王华锋，郑月慧，等. 常见重金属污染与男(雄)性不育[J]. 中国公共卫生，2013，29(5)：769－772.
[3] Kanmani P, Aravind J, Preston D. Remediation of chromium contaminants using bacteria[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2012, 9(1): 183－193.
[4] Dhal B, Thatoi HN, Das NN, et al. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review[J]. J Hazard Mater, 2013, 250:(2)272－291.
[5] Chirwa EN, Wang YT. Simultaneous chromium(VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria[J]. Water Research, 2000, 34(8): 2376－2384.
[6] Molokwanne PE, Chirwa EMN. Biological Cr(VI) reduction in indigenous sludge cultures from Gauteng, South africa. [J]. Water Science and Technology A Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2006, 54(10): 177－184.
[7] 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.
[8] 明星，范允舟，叶晓艳，等. 水中大肠埃希菌 f2 噬菌体反冲超滤装置浓缩效果评价[J]. 中国公共卫生，2013，29(9)：1387－1388.
[9] Gilcreas FW. Standard methods for the examination of water and wastewater[J]. American Journal of Public Health and the Nations Health, 2012, 56(3): 113.
[10] Wani R, Kodam K, Gawai K, et al. Chromate reduction by *Burkholderia cepacia* MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater lake[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(3): 627－632.
[11] Opperman D, Van HE. Aerobic Cr(VI) reduction by *Thermus scotoductus* strain SA-01[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1907－1913.
[12] Cheung KH, Gu JD. Chromate reduction by *Bacillus megaterium* TKW3 isolated from marine sediments[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(3): 213－219.
[13] 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.
[14] 邱俊. 异 VC 钠生产废水处理研究与应用[D]. 南昌：南昌大学硕士学位论文，2009.
[15] Mclean J, Beveridge TJ. Chromate reduction by a pseudomonad isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1076－1084.
[16] Priester JH, Olson SG, Webb SM, et al. Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 1988－1996.
[17] Dogan NM, Kantar C, Gulcan S, et al. Chromium(VI) bioremoval by pseudomonas bacteria: role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination[J]. Environmental Science and Technology, 2011, 45(6): 2278－2285.

收稿日期： 2016－04－07　　（吴少慧编辑　郭薇校对）

中国公共卫生 CPH