どう知库 Eco-Environmental Knowledge Web		<mark>环境工程学报</mark> ^{Chinese Journal of Environmental Engineering}	第 17 卷 第 12 期 2023 年 12 月 Vol. 17, No.12 Dec. 2023
(*****	http://www.cjee.ac.cn	E-mail: cjee@rcees.ac.cn	7110 (010) 62941074
里 文章	栏目:环境生物技术		. 7.

游胜雄, 王义安, 林华, 等. 一株新型 *Kerstersia gyiorum* 菌株 CY-2 对 Cr(VI) 的还原性能[J]. 环境工程学报, 2023, 17(12): 4096-4106. [YOU Shengxiong, WANG Yian, LIN Hua, et al. Reduction properties of Cr(VI) by a novel *Kerstersia gyiorum* strain CY-2[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(12): 4096-4106.]

中图分类号 X703

文献标识码

Α

一株新型 Kerstersia gyiorum 菌株 CY-2 对 Cr(VI) 的还原性能

游胜雄1,王义安1,3,林华1,2,∞,李唐铭1,柏家欢1,赖才星1

DOI 10.12030/j.cjee.202307038

1. 桂林理工大学环境科学与工程学院, 桂林 541000; 2. 桂林理工大学, 广西岩溶地区水污染控制与用水安全保 障协同创新中心, 桂林 541000; 3. 井冈山大学生命科学学院, 吉安 343000

摘 要 为探究李氏禾人工湿地-微生物燃料电池中铬还原菌与 Cr(VI)的相互作用关系,从中筛选一株具有 Cr(VI)还原 能力的菌株 CY-2,并对该菌还原 Cr(VI)的特性和机制进行了探究。通过 16S rRNA 基因序列鉴定,该菌 CY-2为 *Kerstersia gyiorum* (OQ773627),其对 Cr(VI)的最低抑制浓度为 300 mg·L⁻¹;在较宽的 pH(4.0~9.0)、温度 (27~52 ℃)和 接种量 (1%~20%)内还原 Cr(VI);并在 pH=6.0、37 ℃和 10% 接种量下,该菌在 36 h内对 50 mg·L⁻¹ Cr(VI)的还原率 为 100%,对 100、150、200和 250 mg·L⁻¹的 Cr(VI)在 120 h内的还原率分别为 62%、42%、25%和 16%。此外,菌株 CY-2 对 Mg²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ni²⁺和 Zn²⁺具有高耐受性,对呋喃唑酮、利福平和甲硝唑抗生素表现出耐药性,而对其他抗生素表现出敏感性。SEM-EDX 和 FTIR 表征结果表明,菌株 CY-2 不对铬进行生物吸附;铬的存在导致了细菌细胞表面官能团的变化,并使含硫酸盐分子减少,从而该菌可能通过还原、生物累积和外排等机制有效还原铬。以上结果表明所筛选出的菌株 CY-2 在铬污染场地的有效生物修复中具有潜在的应用价值。 关键词 镕还原; Kerstersia gyiorum; 生物修复;还原机制

铬是一种常见的剧毒重金属,广泛应用于金属电镀、合金制造、皮革鞣制、木材保存和陶瓷制造等工业制造业中^[1-2];其中,Cr(VI)和 Cr(III)是最常见的2种形态^[3]。与Cr(III)相比,Cr(VI)具有更高的溶解度和流动性,使其对细胞毒性和诱变的危害性高出100倍^[4-5]。质量浓度≥0.2 mg·mL⁻¹的Cr(VI)和质量浓度≥ 1.0 mg·mL⁻¹的Cr(III)会损害细胞遗传物质^[6]。鉴于Cr(VI)对环境和人体的危害,美国环境保护局将其列为A级人类致癌物^[7]。传统的铬处理方法(如吸附/积累、离子交换和化学沉淀等)存在成本高、产生有毒污泥及衍生污染物等缺点^[8-9]。相比之下,生物修复技术具有成本低、便于大规模执行、高效率、特异性和环境兼容性强等优点^[10-12]。近年来,从铬污染场地分离出的微生物已成为解毒/还原Cr(VI)的研究热点,为实现铬污染环境的生物修复提供了一种安全和生态友好的选择^[13-14]。

近年来、本课题组围绕人工湿地-微生物燃料电池 (constructed wetland-microbial fuel cell, CW-MFC) 中湿地植物李氏禾^[15]、不同构型^[16]和不同基质碳源^[17]下的电化学性能、污染物净化效果和电子传递机制^[18]等方面进行了一系列研究。为了探究 CW-MFC 中特异性耐铬菌或具有铬还原能力菌种,还需进一步探究特异性微生物对 Cr(VI)的作用机制。研究人员已分离出多种具有铬生物修复能力的细菌,并对它们与铬的相互作用进行了深入研究^[19-20]。据报道,细菌通过多种机制对抗 Cr(VI)的毒性,包括络合、离子交换、配位、吸

收稿日期: 2023-07-10; 录用日期: 2023-09-26

基金项目:国家自然科学面上基金资助项目(52070051,52170154);广西科技计划项目(2020GXNSFAA297256);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划资助(桂财教函[2018]319);广西八桂学者和特聘专家项目;井冈山大学(自然科学)博士科研启动项目(JZB2307)

第一作者: 游胜雄 (1996—),男,硕士研究生,1875074098@qq.com; **⊠通信作者:** 林华 (1984—),男,博士,教授, linhua5894@163.com 附、螯合和微沉淀、还原和外排等^[21-22]。例如,LIAO等^[23]研究证明了超氧化物歧化酶和 Na⁺/H⁺反转运蛋白 是 phagmitetus BB 中解毒 Cr(VI)的关键抗氧化系统。GANG 等^[24]研究表明,在希瓦氏菌 MR-1(Shewanella oneidensis MR-1)中,与鞭毛组装、核糖体、运输、硫代谢和能量代谢相关的蛋白质参与了长期对铬的适 应。此外,嗜酸窄养单胞菌 (Microbacterium paraoxydans)和纤维素微生物 (Cellulosimicrobium sp.)利用铬 还原酶成功修复 Cr(VI)^[25-26]。细菌还原 Cr(VI) 具有复杂的反应机制,尽管 Cr(VI) 解毒的一般机制已被广泛 研究,但对于 CW-MFC 系统中特异性功能微生物对铬的解毒机制所具有的复杂网络仍需进一步探究。

本研究拟对从李氏禾 CW-MFC 反应器中筛选出的铬还原菌进行形态学和分子生物学鉴定,并拟研究其 对 Cr(VI) 还原特性及机制;旨在丰富修复铬污染的微生物菌种资源,同时揭示在李氏禾 CW-MFC 中微生物 还原 Cr(VI) 过程中的生物学过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的菌株 CY-2 来源于李氏禾 CW-MFC 反应器^[18] 的阳极区域,经鉴定为圆形、灰白色、革兰氏 阴性杆菌。Cr(VI) 母液 (1 000 mg·L⁻¹):首先将 2.829 g 重铬酸钾盐干燥 2 h,再溶于 1 L 超纯水中并过滤灭 菌。通过在培养基中稀释母液以得到所需浓度。LB 培养基中含有 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、 10 g NaCl、超纯水 1 L。将 pH 调节至 7.0~7.2,然后在 121 ℃ 下高压蒸汽灭菌 15 min。固体培养基中琼脂的投 加量为 1.5%~2.0%。

1.2 耐铬细菌的分离与筛选

1) 通过富集培养法分离出耐铬菌株^[27]。将富集后的菌液进行梯度稀释,然后涂布在含有 50 mg·L⁻¹ Cr(VI) 的 LB 固体培养基上^[28],再倒置于恒温培养箱中,在 37 ℃ 下培养 48 h。最后从中挑选 5 个形态各异 的菌落,分别标记为 CY-1、CY-2、CY-3、CY-4 和 CY-5,以用于进一步研究。

2) 将 5 个菌株的指数期菌液接种到 Cr(VI) 质量浓度为 50、100、150、200、250、300、350 和 400 mg·L⁻¹ 的 LB 培养基中,并在 37 ℃, 200 r min⁻¹ 的摇床上培养 24 h。观察菌株的生长情况,并确定最低抑 菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。每个实验进行 3 次重复。

3) 根据 MIC 结果,选择 MIC 最高的菌株,将其接种到 Cr(VI) 质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 的 LB 培养基中,在 37 ℃,200 r·min⁻¹ 的摇床上振荡培养 120 h。以不加菌的培养基作对照,其他处理相同。每个实验进行 3 次重复。每间隔 12 h 取样,监测细菌生长情况,并检测上清液中 Cr(VI) 的残余量和总铬变化,以确定细菌的还原潜力。

1.3 菌株的鉴定

采用广东环凯微生物科技有限公司购入的试剂盒对 MIC 最高的菌株进行形态和生化特性的初步鉴定。 为了确定 MIC 最高的菌株的属种,采用 16S rRNA 序列检测方法。使用 DNA 提取试剂盒 (广州艾基生物) 提取细菌 DNA。然后使用 16S 引物组 27F/1492R(27F: 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 和 1492R: 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) 进行 PCR 扩增^[29],得到约 1 400 bp 的 PCR 产物。将获得的 PCR 产物纯 化后委托广州艾基生物技术有限公司完成测序。然后通过 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库进行比对分析^[30]。最后利用 MEGA7.0 软件构建系统发育树,并进行同源性分析。

1.4 还原 Cr(VI) 的影响因素

在 50 mg·L⁻¹ Cr(VI) 的 LB 培养基中进行还原实验,将培养液中的 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0、在 37 ℃、10% 接种量、200 r·min⁻¹ 条件下,每间隔 12 h 取样,检测 pH 对 MIC 最高的菌株生 长和还原 Cr(VI) 的影响。菌株最适生长温度的实验设计同 pH 影响实验,初始 pH 控制在 7.0,温度依次设 定为 27、32、37、42、47 和 52 ℃,检测温度对 MIC 最高的菌株生长和还原 Cr(VI) 的影响。接种量实验中 分别设置接种量为 1%、5%、10%、15% 和 20%,检测接种量对 MIC 最高的菌株生长和还原 Cr(VI) 的影响。接种量实验中 分别设置接种量为 1%、5%、10%、15%和 20%,检测接种量对 MIC 最高的菌株生长和还原 Cr(VI) 的影响。在最佳 pH、温度和接种量条件下,调节 Cr(VI) 的初始质量浓度为 50、100、150、200 和 250 mg·L⁻¹,研究 Cr(VI) 初始浓度对 MIC 最高的菌株还原反应的影响。调节 Cr(VI) 初始质量浓度为 100 mg·L⁻¹,将金属 离子 Mg²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Co²⁺、Ni²⁺和 Zn²⁺以 50 mg·L⁻¹ 的质量浓度加入到培养基中,分析金属离子 对 MIC 最高的菌株还原 Cr(VI) 的影响。每隔 12 h 取样,监测细菌生长情况,并检测上清液中的 Cr(VI) 的

残余量。每组实验设置3个重复。

1.5 对抗生素的耐药实验

将 MIC 最高的菌株的菌悬液 (2×10° CFU·mL⁻¹) 涂布在不含铬的 LB 固体培养基上,然后添加不同抗生素 (克拉霉素、阿莫西林、甲硝锉、四环素、利福平、左氧氟沙星、庆大霉素和呋喃唑酮)。在 37 ℃ 下培养 72 h 后,根据抑菌圈直径大小评估对抗生素的敏感性^[21]。

1.6 Cr(VI) 还原的物理表征

在 Cr(VI) 质量浓度为 100 mg·L⁻¹ 和不含铬的 LB 培养基中培养 MIC 最高的菌株,48 h 后收集细胞样品。采用扫描电子镜显微镜 (SEM,捷克 TESCAN MIRA LMS) 对细菌表面形貌进行观察,并利用能量色散 X 射线谱仪 (EDX) 来确定元素含量。采用傅立叶红外光谱仪 (FTIR,美国 Frontier) 在 400~4 000 cm⁻¹ 内测 定细胞内官能团变化。

1.7 细菌生长和 Cr(VI) 还原的检测方法

取 2 mL 的菌液于紫外分光光度计 (上海仪电分析仪器有限公司)600 nm 处检测其吸光度 (OD),即为菌体的浊度 (或浓度)。使用电感-等离子体发射光谱 (ICP-OES,美国 Qpetima7000DV) 测定培养基中的总铬。 采用二苯碳酰二肼分光光度法 (DPC),在 540 nm 处检测培养基中剩余的 Cr(VI) 浓度 ^[31]。

2 结果和讨论

2.1 耐铬菌株的筛选

如图 1 所示,菌株 CY-2 对 Cr(VI)的耐受性 最高,MIC 为 300 mg·L⁻¹。有研究表明,分离的 细菌对铬的耐受性差异很大,从受污染场地分离出 的大宝山芽孢杆菌 (*Bacillus dabaoshanensis* sp.) 能耐受高达 600 mg·L⁻¹ 的 Cr(VI)^[32],而克雷白氏 菌(*Klebsiella pneumoniae*)和*Mangrovibacter yixingensis*分别对 80 mg·L⁻¹和 100 mg·L⁻¹的 Cr(VI) 表现出抗性^[33]。细菌的耐受水平可能与其周围环境 中铬的浓度呈正相关,且细菌固有的铬抵抗能力和 适应性决定了它们修复铬的能力^[34]。因此,后续实 验选择菌株 CY-2 进行生物修复潜力的研究。

2.2 菌株 CY-2 的生物修复潜力实验

在 50 mg·L⁻¹ Cr(VI) 处理下, 菌株 CY-2 的 生长曲线和对铬的去除效果如图 2(a) 和图 2(b) 所



图 1 分离的 5 株细菌对 Cr(VI) 的最低抑制浓度

Fig. 1 The minimum inhibitory concentration of Cr(VI) for the five isolated bacterial strains



图 2 在 50 mg·L⁻¹ Cr(VI) 下菌株 CY-2 的生长曲线和铬还原曲线

Fig. 2 Growth curve and chromium reduction curve of strain CY-2 at 50 mg L^{-1} Cr(VI)

示。可以看出,菌株 CY-2 生长良好,在 60 h 内对 Cr(VI) 还原率高达 90%,而对总铬的去除率较低。表明 CY-2 主要通过还原作用,将 Cr(VI) 还原为 Cr(III)。同时,发现菌株 CY-2 在 48 h 后对 Cr(VI) 的还原保持 稳定,这一现象可归因于在较高铬浓度下,生物积累的 Cr(VI) 流出细胞以减少细胞内损伤^[10,35]。需要注意的 是,还原实验中只定量分析了 Cr(VI),而在总铬去除的研究同时考虑了 Cr(VI)和 Cr(III)的总含量^[12,24]。因 此,菌株 CY-2 可能生物积累 Cr(VI),同时将 Cr(VI) 还原为 Cr(III),进而使铬离子主动从细胞中释放出来。

2.3 菌株 CY-2 的鉴定

菌株 CY-2 的菌落形态见图 3。可以看出, CY-2 在平板上形成灰白色的圆形菌落 (图 3(a)), 并且该菌为革兰氏阴性杆菌 (图 3(b))。生化测试结 果表明, CY-2 的接触酶反应、氧化酶反应、 H₂S 反应、甲基红反应、硝酸盐 (还原)反应、明 胶液化反应、葡萄糖均为阳性, 而 V-P 实验、蔗 糖反应、西蒙氏柠檬酸盐反应均为阴性。此外, 通 过 16S rRNA 测序并上传 NCBI 进行序列同源性 分析。发现 CY-2 与 Kerstersia gyiorum 的相似性 最高, 同源性达到 99.64%。根据 CY-2 的生理生 化特征,进一步确认其为 Kerstersia 属。K. gyiorum 属于 Alcaligenaceae 科, 与 Alcaligenes、Bordatella、





Achromobacter 和 Pigmentiphaga 属 关 系 密 切^[36]。TEKERLEKOPOULOU 等^[37] 发 现 Kerstersia 属 与 Cr(VI) 在悬浮反应器和附着反应器中的降解密切相关,因此,菌株 CY-2 可能在铬污染环境中具有生存适应 能力,并且有潜力成为一种有效的生物修复工具。该菌株的 16S rRNA 序列已在 NCBI 上提交,登录号为 OQ773627 并使用 Mega7.0 程序构建菌株 CY-2 的系统发育树 (图 4)。





2.4 菌株 CY-2 还原 Cr(VI) 的影响因素

1) pH 对菌株 CY-2 生长和还原 Cr(VI) 的影响。由图 5(a) 可知, CY-2 在培养基 pH 为 6.0~9.0 之间呈现出良好的生长状态, 而在 pH 为 4.0 和 5.0 时生长受到了明显抑制。由图 5(b) 可以看出, CY-2 可以在较



图 5 不同 pH 条件下菌株 CY-2 的生长曲线和铬还原曲线 Fig. 5 Growth curves and chromium reduction curves of strain CY-2 at different pHs

宽的 pH 范围 (4.0~9.0) 下还原 Cr(VI), 且还原 Cr(VI) 的最佳 pH 为 6.0, 36 h 内对 Cr(VI) 的还原率可达 100%。培养基的 pH 过高或过低均会影响细菌生长,从而导致该菌的铬还原能力减弱^[38]。FOCARDI 等^[39] 研 究表明,中度嗜卤菌株 TA-04(*Halomonas* sp. TA-04) 在 pH 为 6.0~7.0 时对 Cr(VI) 的还原酶活性最大。 MURUGAVELH 等^[40] 研究表明,嗜盐单胞菌 (*Halomonas* sp.) 还原 Cr(VI) 的最佳 pH 在 6.0~7.0,这与本研 究结果一致。

2) 温度对菌株 CY-2 生长和还原 Cr(VI) 的影响。由图 6(a) 可知,菌株 CY-2 在 27~47 ℃ 时正常生长, 但超过 52 ℃ 生长受到抑制。而图 6(b) 可见, CY-2 可以在较宽的温度范围 (27~52 ℃) 下还原 Cr(VI),最适 温度为 37 ℃,对 Cr(VI) 的还原率可达 92%。在不同温度条件下,不同的细菌对 Cr(VI) 的还原效果也不 同。有研究^[31]表明,菌株 IFR-2 和 IFR-3 生长和还原 Cr(VI) 的最佳生长温度为 35~40 ℃,而 *Bacillus dabaoshanensis* sp.细菌的最佳生长温度为 30~37 ℃^[32]。





3) 接种量对菌株 CY-2 生长和还原 Cr(VI) 的影响。如图 7 所示,菌株 CY-2 在 1%~20% 的初始接种量 下能够良好地生长,并且随着初始接种量从 1% 增加到 10%,该菌对 Cr(VI) 的还原率逐渐提高。然而,当 初始接种量超过 10% 时,Cr(VI) 还原率反而下降,所以 CY-2 还原 Cr(VI) 的最佳接种量为 10%,还原率为 93%。这表明增加细菌的初始接种量可以在一定程度上提高 Cr(VI) 的还原率,并减少生长延迟时间^[41];但这 也可能导致细菌在生长过程中对营养物质发生竞争作用,从而导致 Cr(VI) 还原率下降^[42]。

4) Cr(VI) 初始质量浓度对菌株 CY-2 生长的影响。如图 8(a) 所示,在 0 mg·L⁻¹和 50 mg·L⁻¹的 Cr(VI) 质量浓度下,细菌的生长状态在 24~120 h 内仅略微下降,然而当 Cr(VI) 质量浓度超过 100 mg·L⁻¹





Fig. 7 Growth curves and chromium reduction curves of strain CY-2 at different inoculum levels



Fig. 8 Growth curves and chromium reduction curves of strain CY-2 at different Cr(VI) concentrations

时,该菌的生长状态下降更为明显。对照实验结果表明,在无铬条件下,该菌的生长曲线呈现出一个短暂的 平稳期和下降期。但在 Cr(VI)的存在下,由于其对细菌生长具有毒性和抑制作用,导致 CY-2 生物量减少, 并延长适应高胁迫条件的滞后期^[43]。LIU 等^[44]评估了 5~100 mg·L⁻¹ Cr(VI)对芽孢杆菌 XW-4(*Bacillus* sp. XW-4)的生长影响,结果表明,当 Cr(VI)质量浓度为 100 mg·L⁻¹时,细菌生长受到显著影响;而在 Cr(VI) 质量浓度为 5~20 mg·L⁻¹时,对细菌的生长影响相对较小。SHEKHAR 等^[45]也研究了假单胞菌 V3(*Pseudomonas* sp. V3)在逐渐增加 Cr(VI)质量浓度 (20~200 mg·L⁻¹)下的细菌生长动力学,结果表明,在 初始较低的 20 mg·L⁻¹质量浓度下,细菌细胞生长达到最大值;而在较高的 Cr(VI)质量浓度 (200 mg·L⁻¹)下,细菌生长显著降低。

Cr(VI) 初始质量浓度对菌株 CY-2 还原 Cr(VI 的影响。结果如图 8(b) 所示,可以看出不同的初始 Cr(VI) 浓度显著影响 CY-2 还原 Cr(VI) 的效率。在 36 h 内,细菌完全还原 50 mg·L⁻¹ 的 Cr(VI),而对质量 浓度为 100、150、200 和 250 mg·L⁻¹ 的 Cr(VI),在 120 h 内的还原率分别为 62%、42%、25% 和 16%,其 还原效果优于大多数已分离出的菌株,如 BANERJEE 等^[46] 报道的 *Rhodococcous erythropolis* 在 Cr(VI) 浓 度为 50 mg·L⁻¹ 时还原率为 89.54%,而 FOCARDI 等^[39] 报道的 *Halomonas* sp.在 Cr(VI) 浓度为 54 mg·L⁻¹ 时还原率仅为 33.26%。CY-2 通过在其生长过程中发生的 Cr(VI) 还原来降低 Cr(VI) 的毒性,并且这一还原 反应可能发生在细胞包膜和细胞质内^[47]。同时,随着 Cr(VI) 质量浓度增加,100~250 mg·L⁻¹ 质量浓度下的 铬还原百分比降低,而在 50 mg·L⁻¹ 下未观察到这种现象。这可能是由于生物蓄积的 Cr(VI) 会从细胞中释放 出来,以最大程度地减少对细胞的损伤^[10];在较低的铬浓度下,细菌可能不会排出 Cr(VI),因此, 其生长几乎不受铬的影响。

5) 金属离子对菌株 CY-2 还原 Cr(VI) 的影 响。如图 9 所示,结果表明在 72 h内,Cu²⁺和 Co²⁺可以促进 CY-2 完全还原 100 mg·L⁻¹的 Cr(VI)。 这与 MALA 等^[48]的研究结果吻合,主要原因是 Cu²⁺可以诱导铬还原酶的活性,从而促进铬的修 复。其他研究表明 Ni²⁺、Zn²⁺和 Cd²⁺会抑制铬还原 酶的活性^[49],但在本研究中,Cd²⁺和 Ni²⁺对 CY-2 对 Cr(VI)的还原作用影响不大。与对照组相 比,Mn²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺分别抑制了 10%、8% 和 10% 的 Cr(VI)还原。而 XU 等^[50] 报道 Mg²⁺对铬 还原酶活性没有任何显着影响。这说明菌株 CY-2 在处理含有其他有毒重金属的 Cr(VI) 复合污染 场地时具有较强的耐受性,这对生物修复具有积极 意义。

2.5 菌株 CY-2 对抗生素的耐药特性

菌株 CY-2 对抗生素的耐药性如表 1 和图 10 所示,菌株 CY-2 对克拉霉素、阿莫西林、四环 素、左氧氟沙星和庆大霉素敏感,但对呋喃唑酮、 利福平和甲硝唑表现出耐药性。微生物对抗生素和 金属的抗性可能与质粒相关。这些特性的出现也可 能是由于暴露在抗生素或金属污染的环境中,进而 选择抗生素和金属离子的抗性因子来表达^[51-52]。

2.6 SEM-EDX 分析

菌株 CY-2 与铬反应前后的 SEM-EDX 结果 如图 11 所示。可见,在 Cr(VI)存在的情况下,细



图 9 金属离子对菌株 CY-2 还原 Cr(VI) 效果的影响 Fig. 9 Effect of metal ions on the reduction of Cr(VI) by strain CY-2

表1 菌株 CY-2 的耐药性分析

Table 1 Drug resistance analysis of strain CY-2

抗生素	药片含量/ug	抑菌环直径/mm	结果
克拉霉素(CLR)	10	22.48	S
阿莫西林(AML)	15	35.60	S
甲硝锉(MTZ)	5	0.00	R
四环素(TE)	30	22.02	S
利福平(RD)	5	7.80	R
左氧氟沙星(LEV)	5	24.12	S
庆大霉素(CN)	10	21.36	S
呋喃唑酮(FR)	100	13.26	R

注: "R"表示耐药, "S"表示敏感。



密約照组
(0) 抗生素实验组
(C) 图 10 菌株 CY-2 在不同抗生素下的生长状况 Fig. 10 Growth conditions of strain CY-2 under different antibiotics

胞呈现出明显的形态学变化,表面呈不规则结构,细胞聚集成块并严重变形。这种形态学变化与之前 CHEN 等^[53] 报道的蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*)的研究结果一致,表明这可能是细菌对外部有毒污染物的一种 自我保护机制。此外,与铬反应前后的 EDX 图中均未观察到 Cr 元素的存在,这与 HE 等^[54]在研究 Cr(VI) 处理下 *fususiformis Lysinibacillus* ZC1 的 EDX 分析结果相一致,也未观察到 Cr 元素的存在。表明菌



图 11 菌株 CY-2 与铬反应前后的 SEM-EDX 图

Fig. 11 SEM-EDX plot of strain CY-2 before and after reaction with chromium

株 CY-2 对铬的解毒作用不是通过生物吸附过程, 而 是 通 过 先 还 原 Cr(VI) 为 Cr(III), 然 后 将 Cr(III) 释放到周围介质中, 这与铬去除研究的研究 结果一致。

2.7 FTIR 分析

菌株 CY-2 与 Cr(VI) 反应前后的红外光谱图 如图 12 所示。可见,在反应前的图谱中观察到蛋 白质的——OH 官能团的伸缩振动峰 (3 312 cm⁻¹), CH₃ 伸缩振动峰 (2 940 cm⁻¹),蛋白质肽键的酰胺 I(1 655 cm⁻¹)、酰胺 II(1 540 cm⁻¹) 和酰胺 III(1 399 cm⁻¹) 振动峰,以及蛋白质成分的 C—N 伸展振动峰 (1 065 cm⁻¹)^[22,28,55]。在反应后的图谱中,这些 官能团的峰强度显著减小,说明在铬处理下,菌 株 CY-2 中这些功能基团的相对丰度减少。在





400~800 cm⁻¹内,主要变化发生在 500~650 cm⁻¹区域,对应于硝基 (—NO₂)和硫化物官能团^[56-57]。具体来 说,400~550 cm⁻¹和 550~700 cm⁻¹处分别对应二硫化物和硫化物基团。硫酸盐通常存在于细菌细胞表面分 子中,如蛋白质、脂类和糖脂等。但在与 Cr(VI)反应后的 FTIR 图谱中,观察不到对应于硫酸盐的吸收峰,表明细胞膜组成发生了变化,特别是含硫酸盐的大分子在 Cr(VI)处理后有所减少。有研究^[58]表明,铬诱导 细胞中的硫酸盐减少,主要是因为铬与硫竞争 ABC 转运蛋白进入细胞,并由于铬诱导的氧化应激而降低细 胞中硫的可用性。因此,细胞膜中含硫酸盐大分子的减少可能是由于铬诱导的硫酸盐不足所致。

3 结论

1) 分离得到的一株对铬具有较高耐性的菌株 CY-2,可以完全还原 50 mg·L⁻¹ Cr(VI)。经 PCR 扩增, 16S rRNA 基因检测,鉴定菌株 CY-2 为 *Kerstersia* 属菌,命名为 *Kerstersia* sp. CY-2。

2) 菌株 CY-2 在 pH 为 6.0、接种量为 10%、温度为 37 ℃ 的条件下具有最佳的 Cr(VI) 还原能力。在供 试的金属离子中, Cu²⁺和 Co²⁺能促进菌株 CY-2 将 100 mg·L⁻¹ 的 Cr(VI) 完全还原, 而 Mn²⁺、Mg²⁺和 Zn²⁺分 别抑制 10%、8% 和 10% 的 Cr(VI) 还原。

3) 菌株 CY-2 能够将 Cr(VI) 积累并转化为 Cr(III), 然后释放到周围介质中。未在与铬反应前后的 SEM-EDX 图谱中观察到铬峰,表明该菌株表面未发生生物吸附;而在 FTIR 图谱结果中发现 Cr(VI) 改变了 细菌细胞表面的功能基团,并通过竞争性抑制硫酸盐进入细胞内从而导致含硫酸盐的分子减少。

参考文献

- ELAHI A, AJAZ M, REHMAN A, et al. Isolation, characterization, and multiple heavy metal-resistant and hexavalent chromium-reducing *Microbacterium testaceum* B-HS2 from tannery effluent[J]. Journal of King Saud University-Science, 2019, 31(4): 1437-1444.
- [2] PRADHAN D, SUKLA L B, MISHRA B B, et al. Biosorption for removal of hexavalent chromium using microalgae Scenedesmus sp. [J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 209: 617-629.
- [3] LIANG J, HUANG X, YAN J, et al. A review of the formation of Cr (VI) via Cr (III) oxidation in soils and groundwater[J]. Science of the Total Environment, 2021, 774: 145762.
- [4] JAISHANKAR M, TSETEN T, ANBALAGAN N, et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2014, 7(2): 60-72.
- [5] LACALLE R G, APARICIO J D, ARTETXE U, et al. Gentle remediation options for soil with mixed chromium (VI) and lindane pollution: biostimulation, bioaugmentation, phytoremediation and vermiremediation [J]. Heliyon, 2020, 6(8): e04550.
- [6] NOVOTNIK B, ŠČANČAR J, MILAČIČ R, et al. Cytotoxic and genotoxic potential of Cr (VI), Cr (III) -nitrate and Cr (III) -EDTA complex in human hepatoma (HepG2) cells[J]. Chemosphere, 2016, 154, 124-131.
- [7] MAO L, GAO B, 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: 1-9.
- [8] HE X, QIU X, CHEN J. Preparation of Fe (II) Al layered double hydroxides: Application to the adsorption/reduction of chromium [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 516: 362-374.
- [9] STOLLER M, SACCO O, VILARDI G, et al. Technical-economic evaluation on chromium recovery from tannery wastewater streams by means of membrane processes[J]. Desalination and Water Treatment, 2018, 127: 57-63.
- [10] BANERJEE S, MISRA A, CHAUDHURY S, et al. A *Bacillus* strain TCL isolated from Jharia coalmine with remarkable stress responses, chromium reduction capability and bioremediation potential[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 367: 215-223.
- [11] ELAHI A, REHMAN A. Comparative behavior of two gram positive Cr⁶⁺ resistant bacterial strains *Bacillus aerius* S1 and *Brevibacterium iodinum* S2 under hexavalent chromium stress[J]. Biotechnology Reports, 2019, 21: e00307.
- [12] HUANG X N, MIN D, LIU D F, et al. Formation mechanism of organo-chromium (III) complexes from bioreduction of chromium (VI) by Aeromonas hydrophila[J]. Environment International, 2019, 129: 86-94.
- [13] ZENG Q, HU Y, YANG Y, et al. Cell envelop is the key site for Cr (VI) reduction by Oceanobacillus oncorhynchi W4, a newly isolated Cr (VI) reducing bacterium [J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 368: 149-155.
- [14] PAL A, DUTTA S, PAUL A K. Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil[J]. Current Microbiology, 2005, 51(5): 327-330.
- [15] ZHANG X H, LIU J, HUANG H T, et al. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz[J]. Chemosphere, 2007, 67(6): 1138-1143.
- [16] 杨佩汶,林毅,林华,等.不同构型人工湿地-微生物燃料电池对废水中对氯苯酚的净化效果及产电性能的影响[J].环境工程学报,2023,17(2):507-516.
- [17] 王义安, 张学洪, 郑君健, 等. 不同基质碳源下人工湿地微生物燃料电池的电化学性能及微生物群落结构[J]. 环境工程学报, 2021, 15(11): 3696-3706.
- [18] WANG Y, ZHANG X, LIN Y, et al. The electron transport mechanism of downflow *Leersia hexandra* Swartz constructed wetland-microbial fuel cell when used to treat Cr (VI) and p-chlorophenol[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, 30(13): 37929-37945.
- [19] SATHVIKA T, MANASI, RAJESH V, et al. Adsorption of chromium supported with various column modelling studies through the synergistic influence of

Aspergillus and cellulose[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2016, 4(3): 3193-3204.

- [20] KARTHIK C, RAMKUMAR V S, PUGAZHENDHI A, et al. Biosorption and biotransformation of Cr (VI) by novel *Cellulosimicrobium funkei* strain AR6[J]. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2017, 70: 282-290.
- [21] BHARAGAVA R N, MISHRA S. Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 102-109.
- [22] KARTHIK, C, BARATHI, S, PUGAZHENDHI, A, et al. Evaluation of Cr (VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium funkei* strain AR8, a novel *haloalkaliphilic* bacterium [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 333: 42-53.
- [23] LIAO Q, TANG J, WANG H, et al. Dynamic proteome responses to sequential reduction of Cr (VI) and adsorption of Pb (II) by *Pannonibacter phragmitetus* BB[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 386: 121988.
- [24] GANG H, XIAO C, XIAO Y, et al. Proteomic analysis of the reduction and resistance mechanisms of Shewanella oneidensis MR-1 under long-term hexavalent chromium stress [J]. Environment International, 2019, 127: 94-102.
- [25] LI L, SHANG X, SUN X, et al. Bioremediation potential of hexavalent chromium by a novel bacterium *Stenotrophomonas acidaminiphila* 4-1[J]. Environmental Technology & Innovation, 2021, 22: 101409.
- [26] MISHRA S, CHEN S, SARATALE G D, et al. Reduction of hexavalent chromium by *Microbacterium paraoxydans* isolated from tannery wastewater and characterization of its reduced products[J]. Journal of Water Process Engineering, 2021, 39: 101748.
- [27] VERMA T, MAURYA A. Isolation of potential bacteria from tannery effluent capable to simultaneously tolerate hexavalent chromium and pentachlorophenol and its possible use in effluent bioremediation [J]. The International Journal of Engineering and Science, 2003, 2-9: 64-69.
- [28] YAN X, LIU X, ZHANG M, et al. Lab-scale evaluation of the microbial bioremediation of Cr (VI) : contributions of biosorption, bioreduction, and biomineralization[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(18): 22359-22371.
- [29] NARDE G K, KAPLEY A, PUROHIT H J. Isolation and Characterization of *Citrobacter* Strain HPC255 for Broad-Range Substrate Specificity for Chlorophenols[J]. Current Microbiology, 2004, 48(6): 419-423.
- [30] MUÑOZ A J, RUIZ E, ABRIOUEL H, et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption[J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 210: 325-332.
- [31] ILIAS M, RAFIQULLAH I M, DEBNATH B C, et al. Isolation and Characterization of Chromium (VI) -Reducing Bacteria from Tannery Effluents[J]. Indian Journal of Microbiology, 2011, 51(1): 76-81.
- [32] CUI X, WANG Y, LIU J, et al. Bacillus dabaoshanensis sp. nov., a Cr (VI) -folerant bacterium isolated from heavy-metal-contaminated soil[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197 (4): 513-520.
- [33] SANJAY M S, SUDARSANAM D, RAJ G A, et al. Isolation and identification of chromium reducing bacteria from tannery effluent[J]. Journal of King Saud University-Science, 2020, 32(1): 265-271.
- [34] NANDA M, KUMAR V, SHARMA D K. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water[J]. Aquatic Toxicology, 2019, 212: 1-10.
- [35] CHAI L, DING C, LI J, et al. Multi-omics response of *Pannonibacter phragmitetus* BB to hexavalent chromium [J]. Environmental Pollution, 2019, 249: 63-73.
- [36] BARAN I, DÜZGÜN A P, MUMCUOĞLU İ, et al. Chronic lower extremity wound infection due to Kerstersia gyiorum in a patient with Buerger's disease: a case report[J]. BMC Infectious Diseases, 2017, 17(1): 608.
- [37] TEKERLEKOPOULOU A G, TSIFLIKIOTOU M, AKRITIDOU L, et al. Modelling of biological Cr (VI) removal in draw-fill reactors using microorganisms in suspended and attached growth systems[J]. Water Research, 2013, 47(2): 623-636.
- [38] MURUGAVELH 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.
- [39] 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.
- [40] MURUGAVELH 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.
- [41] ISHII S, SUZUKI S, YAMANAKA Y, et al. Population dynamics of electrogenic microbial communities in microbial fuel cells started with three different inoculum sources[J]. Bioelectrochemistry, 2017, 117: 74-82.
- [42] WANG X, ZHANG Y, SUN X, et al. Efficient removal of hexavalent chromium from water by *Bacillus* sp. Y2-7 with production of extracellular polymeric substances[J]. Environmental Technology, 2023. DOI: 10.1080/09593330.2023.2185817.
- [43] SURESH G, RAVICHANDRAN N, RAMESH B, et al. Isolation and characterization of chromium-tolerant bacteria from chromium-containing waste water[J]. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability, 2011, 5(1): 22-27.
- [44] LIU Y G, XU W H, ZENG G M, et al. Cr (VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(9): 1981-1986.
- [45] SHEKHAR S, SUNDARAMANICKAM A, VIJAYANSIVA G. Detoxification hexavalent chromium by potential chromate reducing bacteria isolated from turnery effluent [J]. American Journal of Research Communication, 2014, 2(2): 205-216.
- [46] BANERJEE S, JOSHI S R, MANDAL T, HALDER G N. Insight into Cr⁶⁺ reduction efficiency of *Rhodococcus erythropolis* isolated from coalmine waste water[J]. Chemosphere, 2017, 67: 269-281.
- [47] LI M, HE Z, HU Y, et al. Both cell envelope and cytoplasm were the locations for chromium (VI) reduction by *Bacillus* sp. M6[J]. Bioresource Technology, 2019, 273: 130-135.
- [48] SANDANA MALA J G, SUJATHA D, ROSE C. Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation [J]. Microbiological Research, 2015, 170: 235-241.
- [49] HORA A, SHETTY V K. Partial purification and characterization of chromate reductase of a novel Ochrobactrum sp. strain Cr-B4[J]. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2015, 45(8): 769-784.

[50] XU L, LUO M, JIANG C, et al. In vitro reduction of hexavalent chromium by cytoplasmic fractions of *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 under aerobic and anaerobic conditions[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(4): 933-941.

- [51] JAIN P K, RAMACHANDRAN S, SHUKLA V, et al. Characterization of metal and antibiotic resistance in a bacterial population isolated from a copper mining industry [J]. International Journal of Integrative Biology, 2009, 6: 57-61.
- [52] VERMA T, GARG S K, RAMTEKE P W. Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(5): 1425-1432.
- [53] CHEN Z, HUANG Z, CHENG Y, et al. Cr (VI) uptake mechanism of Bacillus cereus [J]. Chemosphere, 2012, 87(3): 211-216.
- [54] HE M, LI X, LIU H, et al. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 185(2/3): 682-688.
- [55] WANG X S, LI Y, HUANG L P, et al. Adsorption of Cr (VI) from aqueous solutions by *Staphylococcus aureus* biomass[J]. Clean-Soil, Air, Water, 2010, 38(5/6): 500-505.
- [56] SINGH R, KUMAR A, KIRROLIA A, et al. Removal of sulphate, COD and Cr (VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 677-682.
- [57] MAJUMDER R, SHEIKH L, NASKAR A, et al. Depletion of Cr (VI) from aqueous solution by heat dried biomass of a newly isolated *fungus Arthrinium malaysianum*: A mechanistic approach[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11254.
- [58] BROWN S D, THOMPSON M R, VERBERKMOES N C, et al. Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2006, 5(6): 1054-1071.

(责任编辑:曲娜)

Reduction properties of Cr(VI) by a novel Kerstersia gyiorum strain CY-2

YOU Shengxiong¹, WANG Yian^{1,3}, LIN Hua^{1,2,*}, LI Tangming¹, BAI Jiahuan¹, LAI Caixing¹

1. College of Environmental Science and Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541000, China; 2. Guangxi Collaborative Innovation Center for Water Pollution Control and Water Safety in Karst Areas, Guilin University of Technology, Guilin 541000, China; 3. School of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an 343000, China *Corresponding author, E-mail: linhua5894@163.com

Abstract To investigate the interaction of chromium-reducing bacteria and Cr(VI) in the Leersia hexandra Swartz constructed wetlands-microbial fuel cells, we screened a strain, CY-2, with Cr(VI)-reducing ability and explored its characteristics and mechanism of Cr(VI) reduction. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, we identified strain CY-2 as Kerstersia gyiorum (OQ773627), which had a minimum Cr(VI) inhibitory concentration of 300 mg·L⁻¹. The strain CY-2 was capable of reducing Cr(VI) over a broad range of pH(4.0~9.0), temperature $(27 - 52 \,^{\circ}\text{C})$, and inoculum size (1% - 20%). Under the conditions of pH=6.0, 37 $^{\circ}\text{C}$, and 10% inoculum, the strain exhibited a complete reduction rate of 100% toward 50 mg L^{-1} Cr(VI) within 36 h, and the reduction rates of 62%, 42%, 25%, and 16% toward 100, 150, 200, and 250 mg \cdot L⁻¹ of Cr(VI), respectively, within 120 h. Additionally, strain CY-2 had a high tolerance to Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Zn²⁺, and displayed the resistance to the antibiotics furazolidone, rifampicin, and metronidazole, while was sensitive to other antibiotics. The SEM-EDX and FTIR characterization results indicated that the strain CY-2 did not perform bioremoval of chromium. However, the presence of chromium led to changes in the functional groups on the bacterial cell surface and reduced the amount of sulfate molecules. It is possible that the strain may effectively reduce chromium through mechanisms such as reduction, bioaccumulation, and efflux. These results suggest that the screened strain CY-2 has a potential application value in the effective bioremediation of chromium-polluted sites.

Keywords chromium-reducing; Kerstersia gyiorum; bioremediation; reduction mechanisms