

还原六价铬细菌及其还原酶的研究*

魏斐^{1,2} 杨丽荣² 薛保国^{1**} 吴坤^{2**}

(1 河南省农科院植物保护研究所 河南省农作物病虫害防治重点实验室 郑州 450002)

(2 河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘要 从活性污泥中筛选出的 C-2 苏云金芽孢杆菌,能耐受 250mg/L 的六价铬,并具有较好的还原能力。研究表明木糖、果糖、玉米饼粉、苹果酸、琥珀酸、柠檬酸及 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 离子对 C-2 菌的还原有积极作用,菌体的接种量影响还原的速率。C-2 菌还原的最适温度为 37℃,最适 pH 为 9.0;六价铬还原酶的最适 pH 为 7.0、温度为 37℃, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、DTT、NADH 对酶的还原有积极影响。

关键词 C-2 菌 六价铬 还原酶

中图分类号 Q819

铬污染不仅已经成为危害环境,影响人类健康的元凶之一,同时也严重损伤农作物机体。铬污染的来源主要来自金属加工、制革业以及电镀行业,国家环保部的资料显示,目前,我国受铬等重金属污染的耕地面积近 2000 万公顷,约占耕地总面积的 1/5。全国每年因重金属污染而减产粮食一千多万吨。铬虽然是人和动物所必需的微量元素,但是过量的铬有致癌作用,尤其是六价铬是一种危害极大的致癌物质^[1],如今铬渣已成为铬污染的重要环境问题,2011 年的云南省曲靖铬污染事件轰动全国,由于铬渣随意堆放在水边、湖边,造成了水体的严重污染,在其周边竟然形成了一个“癌症村”,村中的很多村民都被癌症所困扰,由此看出铬污染对人健康的严重危害,治理铬污染迫在眉睫。

处理铬污染的方法通常有物理法、化学法以及生物法^[2]。中国作为世界上铬盐生产最多的国家,处理铬渣的方法主要有有水泥矿化剂、炼铁烧结、转窑干法解毒、立窑干法解毒、硫酸法湿法解毒、旋风炉发电等 6 种,由于各类方法都存在缺陷,至今还未找到有效的综合利用方式。由于生物法具有二次污染小、价格低廉、经济有效等优点,已成为一种修复铬污染的主要方法。如今生物学者已经筛选出了不同的菌株具有还原六价

铬的作用,比如 *Escherichia coli* (大肠杆菌)^[3]、*Brucella* sp. (布鲁氏杆菌)^[4]、*Providencia* sp.^[5] 等等。本研究将筛选出的 C-2 还原菌为研究对象,研究其对六价铬的还原情况。

1 材料与方法

1.1 菌种

本研究所选用的 C-2 菌株是本实验室从活性污泥经过不断筛选而来的。通过生理生化试验和 16srDNA 分子生物学鉴定,确定所筛选的 C-2 菌株为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* C-2)。

1.2 Cr^{6+} 浓度对 C-2 细菌生长的影响

将 LB 液体培养基(pH7.2)分装 100ml 到 250ml 的 LB 中,将无菌的重铬酸钾母液加入 LB 中,在 37℃、150r/min 培养条件下,测定 C-2 菌在不同浓度的 Cr^{6+} 下的生长量。

1.3 不同因素下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原

1.3.1 不同碳源对 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的影响 以葡萄糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、果糖为外加碳源,在培养基初始 pH 为 7.2,外加碳源为 1% (w/v) 的条件下,测定 C-2 菌对六价铬的还原。

1.3.2 不同氨基酸代谢中间产物对 C-2 菌还原的影响 将琥珀酸、柠檬酸、苹果酸分别加入 LB 培养基,浓度为 1% (w/v),在培养基初始 pH 为 7.2 下,测定 C-2 菌

收稿日期:2011-12-12 修回日期:2012-02-13

* 河南省超级产粮大省奖励资金资助项目(2001-196-31)

**通讯作者,电子信箱:wukun63@126.com

对 Cr^{6+} 的还原。

1.3.3 不同氮源对 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的影响 分别选用氯化铵、尿素、玉米饼粉等无机和有机氮源作为外加氮源,在培养基初始 pH 为 7.2,外加氮源为 0.5% (w/v) 条件下,测定 C-2 菌对六价铬的还原。

1.3.4 不同初始 pH 条件下 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 将 LB 培养基的初始 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 等 7 个梯度,在此范围内测定 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原,得出最适初始 pH。

1.3.5 Cr^{6+} 初始浓度的影响 在初始 pH 为 9.0 的条件下, Cr^{6+} 浓度分别为 20、40、60、80、120、160、200mg/L 时,研究 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原情况。

1.3.6 不同温度下,C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 在初始 pH 9.0 条件下,分别在 28℃、37℃、45℃ 条件下测定 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原。

1.3.7 不同接种量下,C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 在初始 pH 为 9.0 时,菌液接种量分别为 1%、2%、4%、6% 时,测定 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原。

1.3.8 不同金属离子下,C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 将 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 分别加入 LB 培养基中,终浓度为 1mmol/L,在初始 pH 为 9.0 条件下,测定 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原情况。

1.4 Cr^{6+} 的还原与 C-2 菌生长的关系及总铬的变化

在初始 pH 为 9.0,培养基中 Cr^{6+} 初始浓度为 160mg/L 时,测定 C-2 菌在 37℃、150r/min 的条件下,菌体的生长与 Cr^{6+} 还原的关系;同时测定溶液中总铬浓度的变化。

1.5 六价铬还原酶的活性与稳定性

1.5.1 六价铬还原酶的提取 将 C-2 菌过夜培养,菌液 4℃ 离心去上清,用 Tris-HCl (pH=7.2) 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。将菌液倒入玻璃容器中,在冰浴条件下,用超声波破碎仪处理,超 5s,停 5s,共 10min。将破碎液以 4℃、12000r/min 离心 20min,将上清液转到新的离心管中,即为六价铬还原酶。

1.5.2 还原酶的活性测定 参考文献[6]的方法,条件略有修改。在 pH7.0、37℃ 条件下,将六价铬还原酶与 40mg/L Cr^{6+} 反应 3h,以六价铬减少作为相对活性的测定标准。

(1) 温度对六价铬还原酶活性的影响

在 pH 为 7.0 不变,改变反应的温度,分别在 4℃、16℃、25℃、50℃、65℃ 条件下,将还原酶与 40mg/L Cr^{6+}

反应 3h,测定六价铬浓度的减少量,与上述相对活性测定标准比较。

(2) pH 对六价铬还原酶活性的影响

在酶活性最高的 37℃ 下,改变 pH,分别为 4、5、6、8、9、10 条件下,将粗酶液与 40mg/L 的 Cr^{6+} 反应 3h,测定六价铬浓度的减少量,与上述相对活性测定标准比较。

1.5.3 还原酶的稳定性测定 先将六价铬还原酶放于 pH7.0、4℃ 中 24h,后在 pH7.0、37℃ 条件下,与 40mg/L Cr^{6+} 反应 3h,以六价铬减少作为相对稳定性的测定标准。

(1) 温度对六价铬还原酶稳定性的影响

在 pH 为 7.0 不变条件下,将六价铬还原酶分别置于 16℃、25℃、37℃、50℃、65℃ 中 24h,后在 37℃ 条件下,与 40mg/L Cr^{6+} 反应 3h,测定六价铬浓度的减少量,与上述相对稳定性测定标准比较。

(2) pH 对六价铬还原酶稳定性的影响

将六价铬还原酶的 pH 分别改为 4、5、6、8、9、10,后放置于 4℃、24h 后将六价铬还原酶与 40mg/L Cr^{6+} 在 37℃ 反应 3h,测定六价铬浓度的减少量,与上述相对稳定性测定标准比较。

1.6 六价铬还原酶对 Cr^{6+} 的还原

按 1.5.1 节制取六价铬还原酶,分为两等份,一份加入 NADH,终浓度为 2mmol/L;另一份不作处理。与 40mg/L 的 Cr^{6+} 离子反应,每隔一定时间测量 Cr^{6+} 的浓度。

1.7 金属离子对六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的影响

分别加入 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mn^{7+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等不同金属离子于酶液中,终浓度为 0.2mmol/L,以不含金属离子的酶液为对照,在 pH7.0、37℃ 条件下与 40mg/L 的 Cr^{6+} 反应 3h,比较各种金属离子的影响。

1.8 小分子物质对六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的影响

分别加入 1% 吐温 80、吐温 20、triton100;1mmol/L 的 SDS、EDTA、EGTA、DTT、PMSF 等小分子物质于酶液中,以不处理的粗酶液为对照,在 pH7.0、37℃ 条件下与 40mg/L Cr^{6+} 反应 3h,测量六价铬浓度的减少,对比各种小分子对还原酶的影响。

1.9 测定方法

(1) 六价铬的测定方法:采用二苯碳酰二肼分光光度法^[7]。

(2) 总铬的测定方法:采用高锰酸钾-二苯碳酰二

分光光度法^[7]。

(3) 细菌生长量:在 600nm 处测量菌体吸光度。

2 结果与讨论

2.1 Cr^{6+} 浓度对 C-2 细菌生长的影响

本试验在初始 pH 为 7.2, Cr^{6+} 浓度分别为 0、40、70、100、130mg/L 的情况下, C-2 菌的生长曲线见图 1。

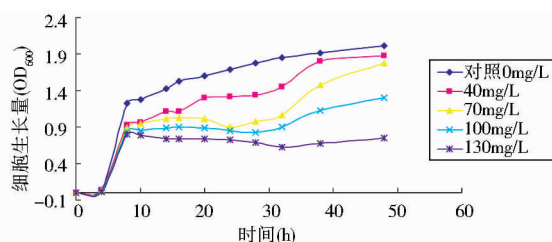


图 1 C-2 菌在不同浓度的 Cr^{6+} 中的生长情况

Fig. 1 The cultivation of C-2 strain under different concentration of Cr^{6+}

由图 1 可以看出, C-2 菌在 8h 前生长的速度都很快, 但最后都低于对照; 具体情况如下: Cr^{6+} 浓度为 130mg/L 时, 菌体起初快速增长, 在 10~32h 之间成缓慢下降趋势, 最后趋于平稳; Cr^{6+} 浓度为 40mg/L 和 70mg/L 时, 虽然菌体生长过程中各个时间段的浓度有一定区别, 但在 48h 后差异变小; Cr^{6+} 浓度 100mg/L 时, 32h 之前生长较慢并有少量下降, 但随后菌体快速增长, 这于菌体对环境的适应及 Cr^{6+} 浓度的减少有关。

2.2 不同因素下对 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的影响

2.2.1 不同碳源对 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的影响 由图 2 结果显示, C-2 菌以木糖为碳源时, 48h 之内全部还原 100mg/L Cr^{6+} , 这可能是菌体在利用木糖生长后, C-2 菌产生了促进还原的酶或代谢产物。以果糖为碳源

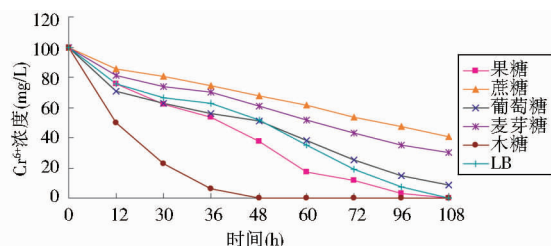


图 2 不同碳源下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原

Fig. 2 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different carbon source

时, 其还原 Cr^{6+} 的速率也同样快于对照 LB。而以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖为碳源时, 最终还原速率都低于对照,

这可能与 C-2 菌对碳源的选择性或产生的某些物质有关。

2.2.2 不同氨基酸代谢中间产物对 C-2 菌还原的影响

如图 3 所示, 苹果酸还原速率最快, 只需 36h 就可完全还原 Cr^{6+} ; 柠檬酸的还原时间虽然短于琥珀酸, 但是在 40h 前却慢于琥珀酸; 而对照 LB 还原 Cr^{6+} 最慢。说明以上 3 种不同氨基酸代谢中间产物, 虽然都促进了六价铬的还原, 但影响效果却不相同, 这也许与电子供体有关。

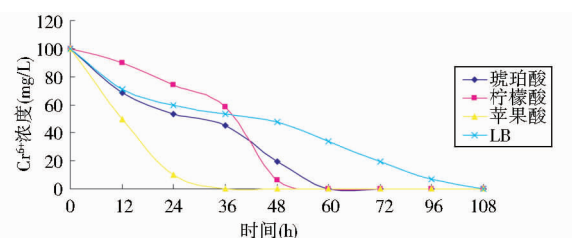


图 3 不同氨基酸下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原

Fig. 3 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different amino acids

2.2.3 不同氮源对 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的影响 在培养基中添加玉米饼粉时, C-2 菌还原 Cr^{6+} 的速率最快, 在 60h 内可完全还原 100mg/L Cr^{6+} ; 而在以 NH_4Cl 、尿素为外加氮源时, 还原速率均慢于对照 LB, 其中在尿素中还原得最慢(图 4)。綜上看出, 有机氮源下的还原速率大于无机氮源, 说明 C-2 菌利用有机氮源的效果优于无机氮源。

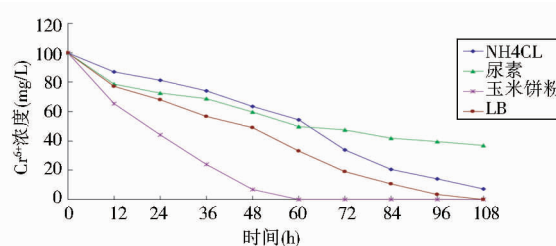


图 4 不同氮源下, C-2 菌还对 Cr^{6+} 的还原

Fig. 4 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different nitrogen source

2.2.4 不同初始 pH 条件下 C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原

由图 5 中看出, C-2 菌在 pH5.0、pH6.0 条件下, 还原 Cr^{6+} 的速度最慢; 而在 pH4.0 酸性更强的情况下, 菌体还原速率反而变大, 并与 pH7.0 时的还原情况大致相同; 在 pH10.0 下, 还原速率稍快; 而在 pH8.0、pH9.0 时 48h 内就可以将 Cr^{6+} 还原完全, 还原速率最快。

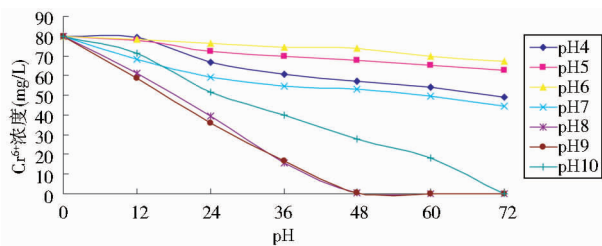


图5 培养基的不同初始 pH 下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原

Fig. 5 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different initial pH of Medium

2.2.5 Cr^{6+} 初始浓度的影响 由图6看出 Cr^{6+} 浓度越低, 还原所需时间越短。在 Cr^{6+} 为 200mg/L 的情况下, 72h 就还原了 98.71%; 在 Cr^{6+} 浓度为 20mg/L 时, C-2 菌在 12h 内就全部还原了六价铬; 在 Cr^{6+} 浓度在 40 ~ 120mg/L 时, Cr^{6+} 在 48h 内都可被还原; 而在 60h 内, C-2 菌可 100% 还原 160mg/L 的 Cr^{6+} 。

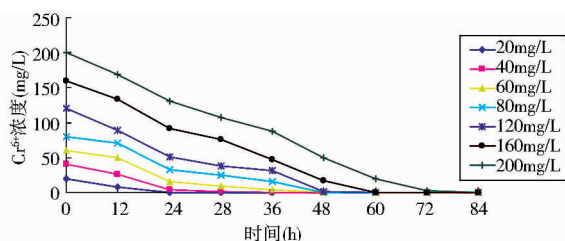


图6 Cr^{6+} 初始浓度对 C-2 菌还原的影响

Fig. 6 The reduction of C-2 strain under different initial concentration of Cr^{6+}

2.2.6 不同温度下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 从试验结果得出, 在 37℃ 时 C-2 菌的还原速率最快, 60h 内可将 Cr^{6+} 全部还原, 而在 28℃ 时则需 72h, 45℃ 还原速率最低。由此得出 C-2 菌还原 Cr^{6+} 的最适温度为 37℃, 而 *Pseudomonas* strain CRB5^[8] 的最适还原温度则为 30℃, *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 菌^[9] 的最适还原温度则为 35℃, 结果见图7。

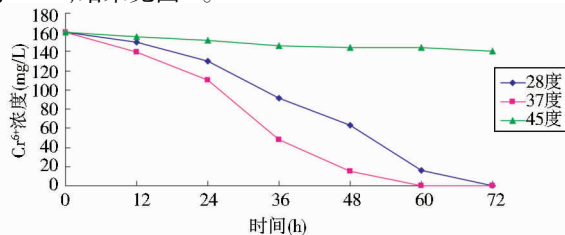


图7 不同温度对 C-2 菌还原的影响

Fig. 7 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different temperature

2.2.7 不同接种量下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 从图8发现, 在接种量不同的情况下, 接种量越大, 还原的速率越快, 但是相近的两种接种量还原差异不是特别的大, 在 48h 内 1%、2%、4%、6% 的还原率分别为 88.34%、92.99%、96.64%、99.45%, 60h 内均可将 160mg/L 的 Cr^{6+} 全部还原。

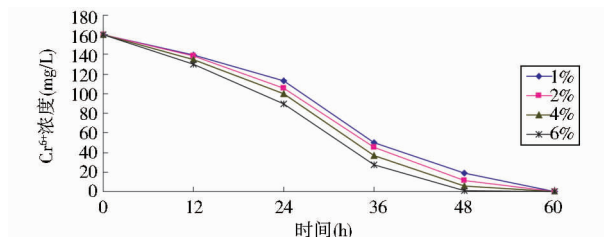


图8 不同接种量对 C-2 菌还原的影响

Fig. 8 C-2 strain reduce Cr^{6+} under different cells inoculum amount

2.2.8 不同金属离子下, C-2 菌对 Cr^{6+} 的还原 由图9得, 在存在 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 下, 还原的速率明显高于其它金属离子, 48h 内可完全还原 160mg/L 的 Cr^{6+} ; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 条件下与对照差异不大; 而 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 则有明显的抑制作用。

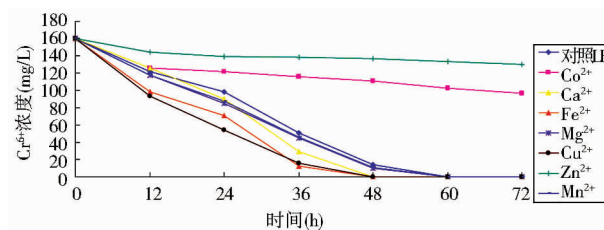


图9 不同金属离子对 C-2 菌还原的影响

Fig. 9 The effect of different metal ions on Cr^{6+} reduction

2.3 Cr^{6+} 的还原与 C-2 菌生长的关系

在试验中发现, 细菌在 24h 内快速生长, 随着细菌增长 Cr^{6+} 离子也被逐渐还原(图10); 总铬在整个过程中有少量的减少(图11), 这与菌体自身的吸附有关。

2.4 六价铬还原酶的活性与稳定性

本试验测定不同温度、pH 下对六价铬还原酶活性的影响, 试验结果见图12、图13。

由图12、图13可知, 六价铬还原酶在 25℃ 与 37℃ 之间能保持良好活性, 若将酶预先放入 37℃ ~ 65℃ 之间 24h, 则酶的活性将大量损失。该还原酶最适 pH 为 7.0, 若将酶预先放入不同 pH 下 24h, 除了在 pH8.0 下

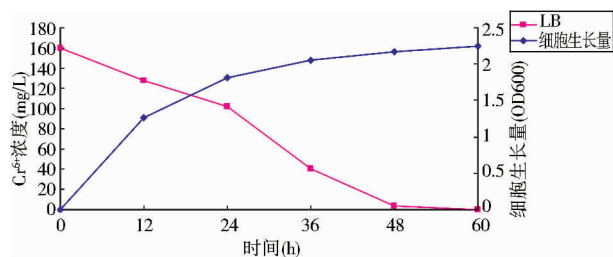
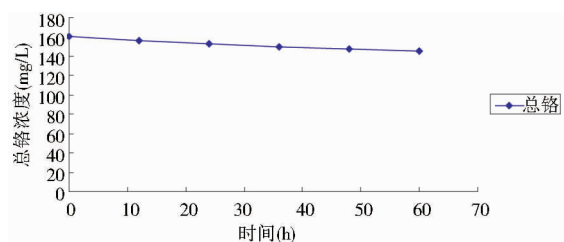
图 10 Cr^{6+} 的还原与 C-2 菌生长的关系Fig. 10 The relation between Cr^{6+} reduction and cultivation of C-2 strain

图 11 试验中总铬的变化

Fig. 11 The changes of total chromium

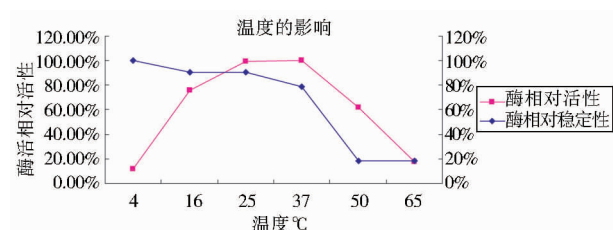


图 12 不同温度对六价铬还原酶的影响

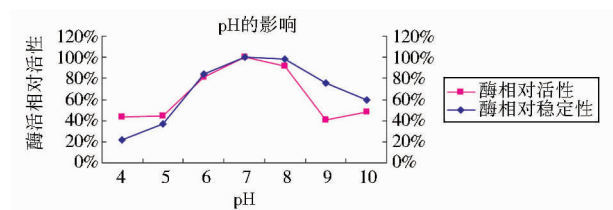
Fig. 12 The affection of Cr^{6+} reductase under different temperature

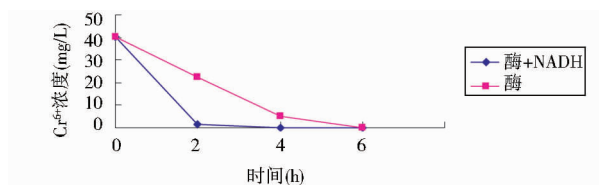
图 13 pH 对六价铬还原酶的影响

Fig. 13 The affection of Cr^{6+} reductase under different pH

稳定外,其余都会影响酶的稳定性。

2.5 六价铬还原酶对 Cr^{6+} 的还原

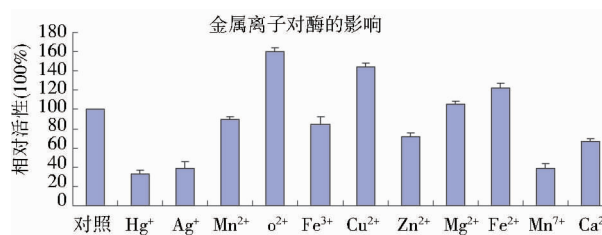
由图 14 可知,NADH 可以明显地促进六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的速率,这与 Camargo 等^[10]的研究结果一

图 14 不同情况六价铬还原酶对 Cr^{6+} 的还原Fig. 14 The reduction of Cr^{6+} reductase under different circumstances

样。在本试验中,含有 NADH 的酶在 2h 内就可以还原 95.88% 的 Cr^{6+} 离子,而此时不含有 NADH 的酶只还原了 44.89% 的 Cr^{6+} 离子,可见 NADH 对提高还原酶的活性有重要作用。

2.6 金属离子对六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的影响

由图 15 可知, Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 可以有效地增加六价铬还原酶的催化效率,其中 Co^{2+} 效果最明显,而 Mg^{2+} 对酶几乎没有什么影响,其余的金属离子均能不同程度地抑制酶的活性。从 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 、 Mn^{7+} 两组看出,价位越高,对酶的抑制越明显,从而可以看出,在相同金属离子下,不同的电荷对酶的活性有不同的影响,电荷越高,越抑制酶的活性。

图 15 不同金属离子对六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的影响Fig. 15 The reduction of Cr^{6+} reductase under different metal ions

2.7 小分子物质对六价铬还原酶还原 Cr^{6+} 的影响

由结果可知, Triton X-100、EGTA 对酶的催化效率没有明显的影响,在其余的小分子物质中,除了 DTT 能显著地增加酶的活性提高催化效率,剩余的均对酶有不同程度的抑制作用(图 16)。

3 讨论

本研究中发现琥珀酸、苹果酸、柠檬酸这三种三羧酸循环中间产物的氨基酸对 C-2 菌还原六价铬有明显促进作用,与参考文献[11]与[12]中报道苹果酸能有效促进还原六价铬作用结果相同,原因初步认为这与

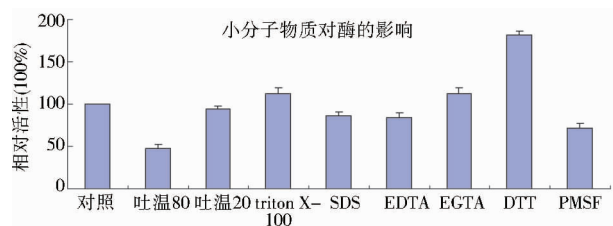


图 16 不同的小分子物质对六价铬
还原酶还原 Cr^{6+} 的影响

Fig. 16 The reduction of Cr^{6+} reductase
under different small molecules

它们在反应中产生的电子供体 $\text{NADH}/\text{FADH}_2$ 有关,研究称 NADH 在还原酶还原六价铬过程中可以直接提供电子,将六价铬直接还原为三价铬,加快反应速率,比如 Chr 蛋白^[13]。秦利玲^[14]研究称葡萄糖能明显促进六价铬还原,而这与本研究结果不同,本研究发现葡萄糖对 C-2 菌还原具有一定抑制作用。试验发现 C-2 菌最适 pH 也为 9.0,这与 Shakoori 等^[15]的研究显现出一致性:对于革兰氏阳性菌,还原六价铬最适 pH 为 9.0。而对于其他菌种,比如 *Pseudomonas aeruginosa* 菌^[11],其最适还原 pH 却为 7.0。很多研究发现 Cu^{2+} 离子可以有效地提高还原六价铬的速率,本研究结果同样如此,这可能是由于 Cu^{2+} 是很多还原酶的辅基,它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,可以在蛋白质亚基之间起穿梭电子的作用^[16]。研究发现细菌还原六价铬过程中均与酶有关,比如 Lawrence 等^[17]发现在 *Pseudomonas fluorescens* strain LB300 菌的细胞膜上具有还原六价铬作用酶,而其他研究发现在细胞质内同样含有还原酶,如 YeiF 蛋白^[18]。而对于这些还原酶来说,不同的来源其性质差别很大,比如 Elangovan 等^[19]研究的 *Bacillus* sp. 菌的还原酶最适 pH 为 6.0,最适温度为 30℃,在 pH 为 4.5 时酶的稳定性最高,而 *Escherichia coli* ATCC 33456 菌^[20]中的还原酶最适 pH、温度分别为 6.5 和 37℃,而在 pH 为 7.0 稳定性最好,与本研究结果不尽相同。

通过本研究对苏云金芽孢杆菌及其还原酶的初步探究,对其相关还原机制和还原基因奠定了基础,具有一定应用和理论意义。

4 结 论

(1)本研究筛选出的苏云金芽孢杆菌 C-2 菌株不仅能耐受较高浓度的六价铬还能有效地对其还原,研

究表明其还原最适温度为 37℃,最适 pH 为 9.0,并且木糖、果糖、玉米饼粉、苹果酸、琥珀酸、柠檬酸均能有效地提高 C-2 菌的还原效率,而且随着接种量的不断提高,还原速率也会随之变快,另外 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 离子均对还原有一定的促进作用。

(2)在六价铬还原酶方面,其最适 pH 为 7.0,最适温度为 37℃;在不同温度和 pH 下对酶的稳定性都有影响。 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 金属离子和 DTT、 NADH 可以有效地增加六价铬还原酶的催化效率。

参考文献

- [1] Rachel Codd, Carolyn T Dillon, Aviva Levina, et al. Studies on the genotoxicity of chromium; from the test tube to the cell. *Coord Chem Rev*, 2001, 216:537-582.
- [2] Göntül Dönmez, Nur Koçberber. Bioaccumulation of hexavalent chromium by enriched microbial cultures obtained from molasses and NaCl containing media. *Process Biochem*, 2005, 40:2493-2498.
- [3] Shen H, Wang Y T. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59:3771-3777.
- [4] Thacker U, Parikh R, Shouche Y, et al. Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr (VI) contaminated sites. *Bioresource Technology*, 2007, 98 (8) : 1541- 1547.
- [5] Thacker U, Parikh R, Shouche Y, et al. Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry*. 2006, 41(6) : 4332-4337.
- [6] 肖伟,王磊,李倬锴. 六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4 还原剂机理及酶学性质研究. *环境科学*, 2008(29) : 3, 751-755.
Xiao W, Wang L, Li Z K. Mechanisms and enzymatic characters of hexavalent chromium reduction by *Bacillus cereus* S5.4. *Environmental Science*, 2008(29) : 751-755.
- [7] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002:12.
State Environmental Protection Administration. Determination methods for examination of water and wastewater. Fourth Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. 12.
- [8] McLean J, Beveridge T J, Phipps D. Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate contaminated site, *Environ. Microbiol*, 2000(2) : 611-619.
- [9] Zhiguo He, Fengling Gao, Tao Sha, et al. Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction *Ochrobactrum* sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. *Journal of Hazardous Materials*.

- 2009,163:869-873.
- [10] Camargo F A O, Okeke B C, Bento F M, et al. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu^{2+} . *Applied Microbiology Biotechnology*. 2003,62:569-573.
- [11] Liu Y G, Xu W H, Zeng G M, et al. Experimental study on reduction Cr(VI) by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci*, 2004,16(5):797-801.
- [12] Ligy Philip, Leela Iyengar, Venkobachar C. Cr(VI) reduction by *Bacillus coagulans* isolated from contaminated soils. *J Environ Eng*,1998,124(12):1165-1170.
- [13] Dhanpat Rai, Bruce M Sass, Dean A. Moore. Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide. *Inorganic Chemistry*, 1987,26(3):345-349.
- [14] 秦利玲,王天贵. 用细菌解毒水溶液中六价铬的实验研究. *化学工程师*, 2010,24(10):37-41.
- Qin L L, Wang T G. Detoxification of chromium(VI) from aqueous solution by bacteria. *Chemical Engineer*, 2010,24(10):37-41.
- [15] Shakoori A R, Makhdoom M, Haq R U. Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2000,53:348-351.
- [16] Fumiyoshi Abe, Takeshi Miura, Takahiko Nagahama, 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+} . *Biotechnology Letters*, 2001,23:2027-2034.
- [17] Lawrence H Bopp, Henry L Ehrlich. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Archives of Microbiology*, 1988,150(4):422-430.
- [18] Ackerley D F, Gonzalez C F, Park C H, et al. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004,70(2):873-882.
- [19] Elangovan R, Abhipsa S, Rohit B, et al. Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 2006,28:247-252.
- [20] Woo-Chul Bae, Han-Ki Lee, Young-Chool Choe, et al. Purification and characterization of NADPH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *The Journal of Microbiology*, 2005,2(43):21-27.

Study on the Restore Hexavalent Chromium Bacteria and Its Reductase

WEI Fei^{1,2} YANG Li-rong¹ XUE Bao-guo¹ WU Kun²

(1 Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Crop Pest and Disease Control in Henan Province Key Laboratory, Zhengzhou 450002, China)

(2 College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract The *Bacillus thuringiensis* C-2 strain was isolated from activated sludge and it can tolerant 250mg/L Cr^{6+} and have better reducing capacity. The results showed that xylose, fructose, corn cake powder, malic acid, succinic acid, citric acid and ions Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} had an active role for reduction and the inoculum size had influence for reduction. The conditions of 37°C and pH9.0 were good for C-2 strain to reduce the Cr^{6+} . The optimum pH and temperature of chromium reductase was pH7.0 and 37°C. The Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , DTT, NADH effectively promoted the reduction.

Key words C-2 strain Hexavalent chromium Reductase