

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201704048

引文格式: 韩文, 陈海珊, 袁治豪, 等. 一株李氏禾内生细菌去除 Cr(VI) 的特性 [J]. 广西植物, 2019, 39(6): 729-736.
HAN W, CHEN HS, YUAN ZH, et al. Characteristics of Cr(VI) removal from *Leersia hexandra* by an endophytic bacteria isolated [J].
Guihaia, 2019, 39(6): 729-736.

一株李氏禾内生细菌去除 Cr(VI) 的特性

韩文¹, 陈海珊², 袁治豪¹, 秦舒琴^{1,2}, 陈慧英¹, 李典鹏², 李海云^{1*}

(1. 广西高校食品安全与检测重点实验室 桂林理工大学 化学与生物工程学院, 广西 桂林 541004;
2. 广西壮族自治区 广西植物研究所 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西 桂林 541006)

摘要: 李氏禾 (*Leersia hexandra*) 是中国境内发现的第一种铬超积累植物, 该文对李氏禾内生菌及其除铬性能进行了研究。采用添加 Cr(VI) 的牛肉膏蛋白胨固体平板培养方法, 从李氏禾根部分离筛选获得一株具有较强 Cr(VI) 抗性的内生细菌 G04, 分子生物学鉴定结果表明该菌株属于阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。采用摇瓶培养方法, 以 Cr(VI) 去除率、总 Cr(铬) 的去除率以及菌体生物量为指标, 考察了 pH、温度、底物浓度、装液量、接种量、摇床转速以及反应时间等因素对 Cr(VI) 去除率、总铬去除率和菌株生长的影响。结果表明: 在牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 菌株 *E. cloacae* G04 去除 Cr(VI) 的较优反应条件为初始 pH5.0、温度 37 °C、Cr(VI) 浓度为 100 mg · L⁻¹、装液量 80 mL (250 mL 三角瓶)、接种量 15%、摇床转速为 120 r · min⁻¹、反应时间 48 h。在此条件下, 菌株 *E. cloacae* G04 对 Cr(VI) 和总铬的去除率分别为 84% 和 8%。根据 Cr(VI) 去除率和总铬去除率的结果推测该菌株去除 Cr(VI) 的机制可能是以还原为主、吸附为辅。这表明李氏禾内生细菌 *E. cloacae* G04 菌株具有较好的应用潜力, 既有可能直接用于土壤、水环境铬污染的修复, 也有可能作为促植物修复铬污染的后备菌株, 另外可为深入研究李氏禾的铬积累作用机制提供参考。

关键词: 李氏禾, 内生细菌, 阴沟肠杆菌, Cr(VI), 还原

中图分类号: Q946, X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2019)06-0729-08

Characteristics of Cr(VI) removal from *Leersia hexandra* by an endophytic bacteria isolated

HAN Wen¹, CHEN Haishan², YUAN Zhihao¹, QIN Shuqin^{1,2},
CHEN Huiying¹, LI Dianpeng², LI Haiyun^{1*}

(1. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Food Safety and Detection, College of Chemistry & Bioengineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004, Guangxi, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Function Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

收稿日期: 2018-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(31460409); 广西自然科学基金(2016GXNSFAA380014); 广西科学研究与技术开发计划重大专项项目(桂科重 14122003-5); 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 16009) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31460409); Guangxi Natural Science Foundation(2016GXNSFAA380014); Major Program of Science and Technology of Guangxi (14122003-5); Fundamental Research Fund of Guangxi Institute of Botany (16009)]。

作者简介: 韩文(1991-), 男, 吉林蛟河人, 硕士研究生, 研究方向为生物化工, (E-mail) 1193640008@qq.com。

* 通信作者: 李海云, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为天然产物及生物转化, (E-mail) xglihaiyun@126.com。

Abstract: *Leersia hexandra* is a chromium hyper-accumulative plant which was firstly found in China. The endophytic bacteria of *L. hexandra* and their removal capacity for Cr(VI) were studied. A Cr(VI)-resistant endophytic bacterium G04 was isolated from the roots of *L. hexandra* by solid plate culture method using the media of beef extract peptone containing Cr(VI). Biological identification results showed the strain belonged to *Enterobacter cloacae*. Effects of culture conditions, such as initial pH, temperature, Cr(VI) concentration, liquid volume, inoculation amount, shaking speed and culture time, on the removal rate of Cr(VI), removal rate of total Cr and the growth of the strain were studied in detail by shaking flask culture. The results showed that the optimal conditions for the removal of Cr(VI) by *E. cloacae* G04 were initial pH of 5.0, culture temperature of 37 °C, substrate concentration of 100 mg · L⁻¹, liquid volume of 80 mL in 250 mL conical flask, inoculum size of 15%, shaking speed of 100 r · min⁻¹ and culture time of 48 h. Under these conditions, the removal rate of Cr(VI) and total chromium were about 84% and 8%, respectively. The results of this study indicate that the endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* G04 has better application potential for removing chromium. It may be used directly for remediation of soil and water environment contaminated of chromium, and also may be used as alternative strain for promoting plant remediation of chromium pollution. Furthermore, the result has an important reference value for illuminating the mechanism of chromium hyper-accumulation of *L. hexandra*.

Key words: *Leersia hexandra*, endophytic bacteria, *Enterobacter cloacae*, hexavalent chromium [(Cr(VI))], reduction

随着现代化技术的发展,重金属铬在制药、电镀等多领域中得到了广泛的应用。但与此同时,环境中的铬及其化合物的污染问题也越来越严重。长期接触铬及铬化合物容易对胃肠道系统、免疫系统、肝脏和肾脏产生影响甚至诱发呼吸系统癌症(Costa, 1997)。各种铬形态中,主要以铬酸根和重铬酸根形式存在的 Cr(VI) 被认为是毒性最强的(Shanker et al., 2005; 王新建和刘健, 2010)。国际上对铬污染的水体、土壤都提倡采用生物修复法,即借助微生物或植物的絮凝、吸收累积、富集等作用去除重金属离子(Chibuike & Obiora, 2014; Malik et al., 2010)。从铬重金属污染的环境中分离的白色杆菌属(*Leucobacter* sp.) (Ge et al., 2013)、假单胞菌属(*Pseudomonad*) (Zhang et al., 2016)、链霉菌属(*Streptomyces griseus*) (Chen et al., 2014; Poopal & Laxman, 2008)、芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) (Alsalamah, 2011; Dhal et al., 2010) 和栖热菌属(*Thermusscotoductus*) (Opperman & Van, 2007) 都具有较好的 Cr(VI) 去除能力。

超富集植物具有生物量大、对重金属吸附量是常规植物的 10~500 倍、可在重金属污染土壤中生长良好等优势(石润等, 2015), 在环境污染修复中的应用日益广泛(Brooks et al., 1998)。与此同时,超富集植物内生菌的研究也开始受到研究者

的重视,如 As(砷)超富集植物蜈蚣草(董睿智, 2012)、Zn(锌)超富集植物东南景天(龙新宪等, 2013)、Cd(镉)超累积植物龙葵(曹喆等, 2009)、Mn(锰)超积累植物商陆(卢文显, 2015) 等均有研究报道。李氏禾(*Leersia hexandra*) 是张学洪等(2007)在广西桂林发现的铬超积累植物,也是第一种在中国境内被发现的铬超积累植物,研究表明其对 Cr(III) 和 Cr(VI) 都有较强的富集能力(胡澄, 2008; 陈俊等, 2008; 卢媛媛等, 2013)。但目前利用李氏禾内生细菌对重金属 Cr(VI) 进行还原的研究尚未见报道。本研究对铬超富集植物李氏禾中的内生细菌进行分离、筛选、鉴定及除 Cr(VI) 特性进行研究,为李氏禾内生菌在铬污染修复中的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 原料 Cr(铬)超富集植物李氏禾,采自桂林理工大学环境科学与工程学院实验室。

1.1.2 培养基 固体培养基:牛肉膏 3 g · L⁻¹, 蛋白胨 10 g · L⁻¹, 氯化钠 5 g · L⁻¹, 琼脂 20 g · L⁻¹, 其余为蒸馏水, pH 为 7.0。

液体培养基:牛肉膏 3 g · L⁻¹, 蛋白胨 10 g ·

L⁻¹,氯化钠 5 g · L⁻¹,其余为蒸馏水,pH 为 7.0。

含 Cr(VI)培养基:在牛肉膏蛋白胨固/液体培养基的基础上,加入相应质量的重铬酸钾配制而成。

1.2 Cr(VI)抗性内生细菌的分离、筛选

取健康的李氏禾根根部组织,用水冲洗干净后,无菌条件下用 70% 的酒精浸泡 40 s,然后用 2.5% 次氯酸钠浸泡 2 min,最后用无菌水冲洗 6 次,去除附着在材料表面的消毒剂。无菌条件下用最后一遍冲洗的无菌水涂布于固体平板培养基,培养后无微生物长出,表明表面消毒彻底。无菌条件下取适量经表面消毒的根部组织,加 1 mL 0.9% 的氯化钠溶液充分研磨,取 1 mL 研磨液接种于 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中(500 mL 三角瓶),37 ℃,120 r · min⁻¹条件下振荡培养 2 d,将培养液按 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 进行稀释,分别取 20 μL 用平板涂布器涂布在含 Cr(VI)浓度分别为 100~1 000 mg · L⁻¹ 的牛肉膏蛋白胨平板培养基上,37 ℃ 恒温培养 24~48 h 后,根据菌落的生长情况,挑选长势较好、耐铬性能强的菌落,接入含铬平板中,采用划线法进行多次的分离纯化,获得了 Cr(VI)抗性内生菌纯培养物,并将菌株接种于试管斜面培养基上,37 ℃ 恒温培养 24 h 后,4 ℃ 冰箱保存。

1.3 Cr(VI)抗性细菌的鉴定

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)有限公司)对 Cr(VI)抗性内生细菌 G04 基因组进行提取。

PCR 扩增反应体系:2×Taq DNA 聚合 2 μL,酶 25 μL,模板 2 μL,引物 1492R 和 27F 各 2 μL,ddH₂O 19 μL,混匀后置于 PCR 扩增仪。其程序:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃ 后延伸 5 min,30 个循环。

用 1% 的琼脂糖凝胶、0.5×TBE 为电泳缓冲液、80 V 电压进行 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳。将 G04 菌株 DNA 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,送往生工生物工程(上海)有限公司进行检测。检测的结果登录美国的 NCBI 网(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 DNA 的 Blast 比对,确定菌株归属。

1.4 内生细菌 G04 去除 Cr(VI)实验

试管斜面保存的菌株 G04 经牛肉膏蛋白胨固体培养基平板活化,于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后,挑取 2 环接种于含 100 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的 250 mL 三角瓶中,37 ℃、120 r · min⁻¹ 振荡培养 24 h 后作为种子液。以不接种的牛肉膏蛋白胨液体培养基同法处理,作为后续除 Cr(VI)试验中接种培养的空白对照。

将种子液按 10% 接种量接种于含 Cr(VI)浓度为 100 mg · L⁻¹、pH 为 7(用 2 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠和盐酸溶液调节)的牛肉膏蛋白胨液体培养基(装液量 100 mL/250 mL 三角瓶)中,八层纱布封口,置于 37 ℃ 的恒温水平摇床上 120 r · min⁻¹ 振荡培养。培养适当时间后,无菌条件下取样适量培养液,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去除菌体和其他悬浮杂质。沉淀用蒸馏水溶液混匀,测定 OD₆₀₀ 下吸光度值,上清液用于测定 Cr(VI)的浓度和总 Cr(铬)的浓度。上述步骤中,以不接种微生物的牛肉膏蛋白胨液体培养基代替种子液同法操作,作为空白对照。

1.5 Cr(VI)和总 Cr(铬)的测定

Cr(VI)标准曲线的绘制:分别取 5 mg · L⁻¹ 的 Cr(VI)标准溶液 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL 于 10 mL 刻度比色管中,用蒸馏水至刻度后,分别加入(1+1)的硫酸和磷酸各 0.1 mL 后,加入 0.4 mL 二苯碳酰二肼溶液,摇匀。待充分反应 5~10 min 后,测定样品在 540 nm 波长处的吸光度值。以 Cr(VI)浓度为横坐标,对应 540 nm 处的吸光度值为纵坐标,绘制 Cr(VI)标准曲线。

Cr(VI)的测定:取 1.0 mL 待测含 Cr(VI)试样,加水稀释至 10 mL。取 1 mL 含铬稀释液,加入到 10 mL 比色管中,用蒸馏水稀释至刻度,加入(1+1)硫酸 0.1 mL 和(1+1)磷酸 0.1 mL,摇匀。加入 0.4 mL 二苯碳酰二肼溶液,摇匀。5~10 min 后,于 540 nm 波长处比色测定。在标准曲线上查得 Cr(VI)浓度,求得质量后按式(1)计算 Cr(VI)去除率。

$$\text{Cr(VI)去除率} = \frac{\text{Cr(VI)初始质量} - \text{Cr(VI)残余质量}}{\text{Cr(VI)初始质量}} \times 100\% \quad (1)$$

总 Cr(铬)的测定:取 1.0 mL 待测含 Cr(VI) 试样,加水稀释至 10 mL。取 1 mL 含铬稀释液,和 (1+1)磷酸 0.1 mL,摇匀。加入 4%高锰酸钾溶液滴,如紫红色消退,则继续滴加高锰酸钾溶液至保持紫红色。加热煮沸至溶液约剩 4 mL。冷却后,加入 0.2 mL 20%的尿素溶液,摇匀。用滴管加 2%亚硝酸钠溶液,每加一滴充分摇匀,至紫红色刚好消失。稍停片刻,待溶液内气泡逸尽,转移 10 mL 比色管中,稀释至标线,按 Cr(VI)的测定方法比色测定。按式(2)计算总铬去除率。

$$\text{总铬去除率} = \frac{\text{理论总铬质量} - \text{残余总铬质量}}{\text{理论总铬质量}} \times 100\% \quad (2)$$

Cr(VI)和总铬去除率最终结果均扣除空白对照,以排除培养基成分对反应的影响。

1.6 统计分析

采用 Microsoft Office Excel 2007 软件对结果进行差异显著性分析(t 检验,置信水平 0.05)。

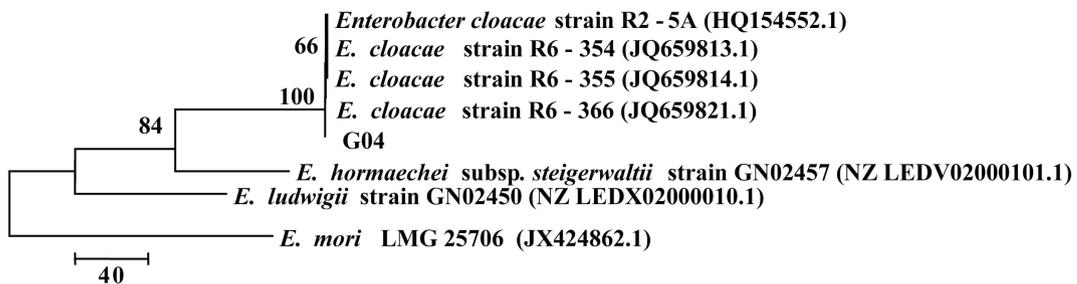


图 1 李氏禾 Cr(VI)抗性内生细菌 G04 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Cr(VI) resistance strain G04 isolated from *Leersia hexandra*

作用也已有报道(Rahman et al., 2016; 张剑, 2011; Wang et al., 1989)。

2.2 Enterobacter cloacae G04 去除 Cr(VI) 的特性

2.2.1 初始 pH 的影响 按 1.4 方法,固定其他条件不变,改变液体培养基的 pH,考察 pH 对 G04 菌株除 Cr(VI)的影响,结果如图 2 所示。

图 2 结果表明,*E. cloacae* G04 具有较宽的 pH 生长和 Cr(VI)还原范围,在 pH 5~8 均能较好地生长和进行 Cr(VI)还原。从菌株生长情况上看,在 pH 为 4 时,细菌生长受到了明显的抑制;当 pH 大于 8.0,细菌生长减缓。统计分析结果表明,pH

2 结果与分析

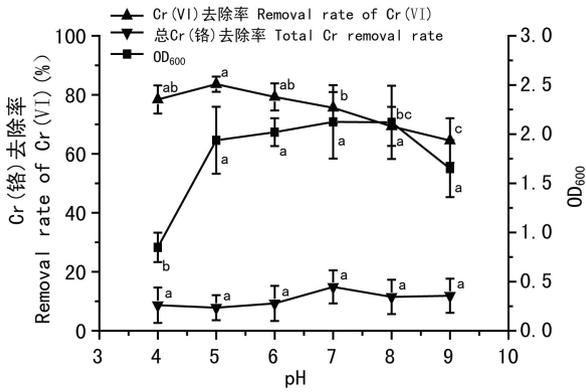
2.1 菌株鉴定结果

按 1.2 方法对李氏禾 Cr(VI)抗性内生细菌进行分离纯化,结果从李氏禾根部获得一株具有较强 Cr(VI)抗性的菌株 G04,按 1.3 方法对该菌株进行 DNA 序列分析,其系统发育树如图 1 所示。结果表明李氏禾 Cr(VI)抗性内生细菌 G04 与阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* strain R2-5A) (HQ154552.1)、(*E. cloacae* strain R6-354) (JQ659813.1) 等菌株的序列同源性达 99%,归属于 *E. cloacae*,将其命名为 *E. cloacae* G04。阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 是一类应用较广泛的微生物,具有植物促生作用(徐幼平等, 2001)、固氮作用(杨海莲等, 2001)、降解柴油(Ramasamy et al., 2017)和农药(林抗美等, 2008)、吸附/固定 Cd^{2+} (Xu et al., 2017)等作用。阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)除 Cr(VI)

对 Cr(VI)去除率和菌株生长的影响显著 ($P < 0.05$),而对总铬去除率不显著。当 pH 为 5 时, Cr(VI)去除率最佳,约为 84%。故选择 pH5 为 *E. cloacae* G04 去除 Cr(VI)最佳反应条件。

2.2.2 温度的影响 按 1.4 方法,固定其他条件不变,考察温度对 G04 菌株除 Cr(VI)的影响,结果如图 3 所示。

E. cloacae G04 在 25 °C 至 40 °C 下均能较好地生长和进行 Cr(VI)还原。统计分析结果表明,温度对 Cr(VI)去除率和菌株生长的影响显著 ($P < 0.05$),而对总铬去除率不显著。当温度高于 40



注：不同字母表示不同水平间的差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Note: Different letters indicate significant differences between different levels ($P < 0.05$). The same below.

图 2 pH 对 Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 2 Effects of pH on removal rate of chromium and strain growth

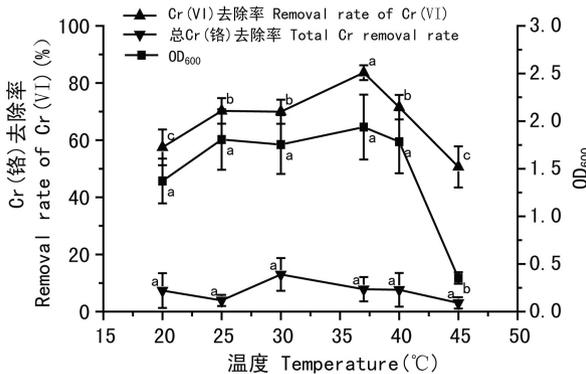


图 3 温度对 Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 3 Effects of temperature on removal rate of chromium and strain growth

℃后, Cr(VI)去除率显著降低,降低的原因可能是细胞内的还原酶随着反应温度的逐渐升高而逐渐受到抑制而失活。在 37 ℃时, *E. cloacae* G04 生长状况良好,且 Cr(VI)去除率最高,因此确定反应最适温度为 37 ℃。

2.2.3 Cr(VI)初始浓度的影响 按 1.4 方法,固定其他条件不变,改变 Cr(VI)底物浓度,考察底物浓度对 G04 菌株除 Cr(VI)的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,随着 Cr(VI)初始浓度的增加,对 Cr(VI)的去除率明显的减少,而且菌株的生物量

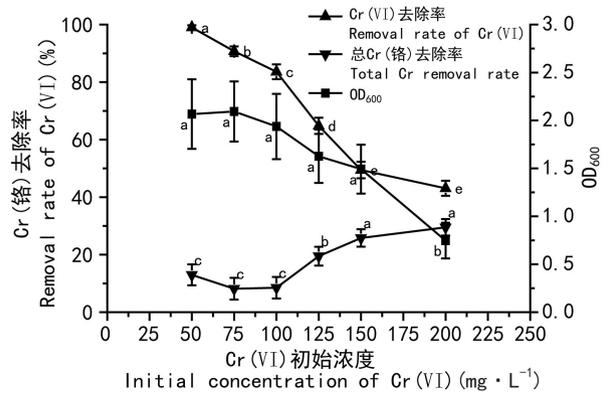


图 4 Cr(VI)初始浓度对 Cr(铬)去除率和菌株生长的影响

Fig. 4 Effects of initial Cr(VI) concentration on removal rate of chromium and strain growth

也有明显的下降趋势,这可能是由于随着 Cr(VI)浓度的增加对菌株的生长产生了毒害作用抑制了其生长。相反,在 Cr(VI)浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,总铬的去除率有上升的趋势,说明菌株 *E. cloacae* G04 对 Cr(VI)吸附性有所增加。统计分析结果表明, Cr(VI)初始浓度对 Cr(VI)去除率、总铬去除率和菌株生长的影响均显著 ($P < 0.05$)。从去除 Cr(VI)的浓度来看, Cr(VI)底物浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时去除浓度最大。综合考虑,选择底物 Cr(VI)的初始浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.4 装液量的影响 按 1.4 方法,固定其他条件不变,考察装液量对 G04 菌株除 Cr(VI)的影响,结果如图 5 所示。

从图 5 结果可以看出,随着装液量的逐渐增加, Cr(VI)去除率略有降低,但变化并不显著,但菌株生长呈减弱趋势,这可能是装液量逐渐增加,瓶内的溶氧量不足以维持细胞的活动,从而导致菌体生长受到抑制。统计分析的结果表明,装液量对 Cr(VI)去除率、总铬去除率和菌株生长的影响不显著 ($P > 0.05$)。当装液量为 80 mL(三角瓶体积 250 mL)时,菌株的生长和 Cr(VI)去除效果均较佳,故确定装液量为 80 mL。

2.2.5 接种量的影响 按 1.4 方法,固定其他条件不变,考察接种量对 G04 菌株除 Cr(VI)的影响,结果如图 6 所示。图 6 结果表明,当接种量小于

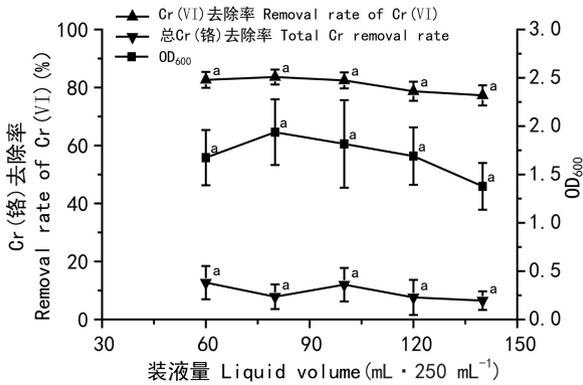


图5 装液量对Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 5 Effects of liquid volume on removal rate of chromium and strain growth

15%时,菌株的生长情况和除Cr(VI)呈正相关性,Cr(VI)的去除率随着接种量的增加而增大,即生长较好的菌液具有更高的Cr(VI)去除能力。统计分析结果表明,接种量对Cr(VI)去除率和菌株生长的影响显著($P < 0.05$),而对总铬去除率不显著。当接种量为15%时,Cr(VI)去除效果最佳,故选择*Enterobacter cloacae* G04接种量为15%。

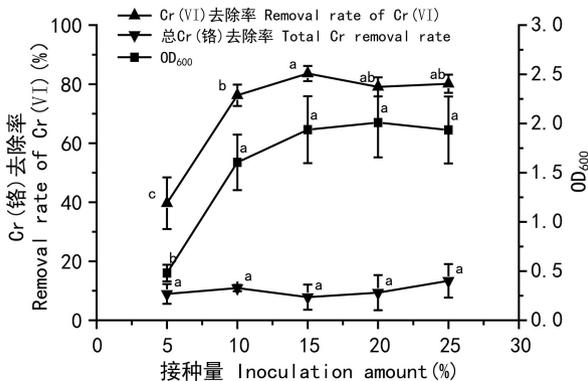


图6 接种量对Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 6 Effects of inoculation amount on removal rate of chromium and strain growth

2.2.6 摇床转速的影响 按1.4方法,固定其他条件不变,考察接种量对G04菌株除Cr(VI)的影响,结果如图7所示。

当摇床转速在80~120 r · min⁻¹时,随着转速的增加,Cr(VI)的去除率和菌体的生长均呈上升的趋

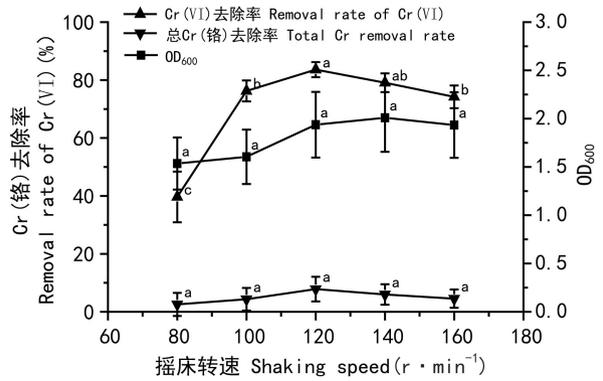


图7 摇床转速对Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 7 Effects of shaking speed on removal rate of chromium and strain growth

势,这可能是因为菌株*E. cloacae* G04是兼性好氧型微生物,随着转速的增加,氧气的溶解量也增加。统计分析结果表明,摇床转速对Cr(VI)去除率的显著($P < 0.05$),而对总铬去除率和菌株的生长不显著。综合考虑,选择摇床转速为120 r · min⁻¹。

2.2.7 反应时间的影响 按1.4方法,固定其他条件不变,考察反应时间对G04菌株除Cr(VI)的影响,结果如图8所示。

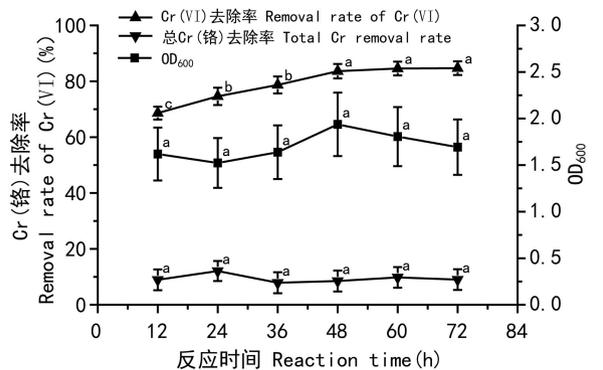


图8 反应时间对Cr(铬)去除率和菌株生长的影响
Fig. 8 Effects of reaction time on removal rate of chromium and strain growth

从*E. cloacae* G04对Cr(VI)的去除效果方面考察,随着培养时间的加长,Cr(VI)去除率逐步递增,至48 h后基本达平衡。从菌株生长状况看,在48 h时细菌生长状况最佳,随后开始进入衰亡期。统计分析结果表明,反应时间对Cr(VI)去除率显

著 ($P < 0.05$), 而对总铬去除率和菌株的生长不显著。综合考虑, 确定反应时间为 48 h。

3 讨论与结论

本研究从铬超积累植物李氏禾根部组织中分离获得一株 Cr(VI) 抗性内生细菌 *E. cloacae* G04, 采用单因素试验研究 pH、温度、底物浓度、装液量、接种量、摇床培养以及反应时间等因素对该菌株去除 Cr(VI) 性能的影响。在牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 较优反应条件是 pH 为 5.0、温度为 37 °C、Cr(VI) 底物浓度为 100 mg · L⁻¹、装液量为 80 mL/250 mL、接种量为 15%、摇床转速为 120 r · min⁻¹、反应时间 48 h。此条件下, 菌株 *E. cloacae* G04 对 Cr(VI) 的去除率约为 84%, 总铬去除率为 8%。该菌株对 Cr(VI) 的去除率远高于总 Cr(铬) 去除率, 表明该菌株主要是通过改变 Cr(VI) 价态的形式实现去除 Cr(VI) 的作用。关于阴沟肠杆菌(*E. cloacae*) 的除 Cr(VI) 作用, Rahman et al. (2016)、张剑(2011)和 Wang et al. (1989) 等的研究表明其作用机制主要为还原 Cr(VI)。本研究的结果与上述报道一致, 推测李氏禾内生细菌 *E. cloacae* G04 对 Cr(VI) 去除机制可能也是以还原为主, 但具体的作用机制还有待更加深入地研究。与已有的除 Cr(VI) 微生物相比较, 如耐酸脱硫弧菌 *Desulfovibrio* SRB7 (马小珍等, 2009)、炭疽芽孢杆菌(徐卫华, 2007) 等, 李氏禾内生细菌 *E. cloacae* G04 在耐 Cr(VI) 浓度、除 Cr(VI) 效率方面具有一定的优势。

本研究结果表明, 从李氏禾中分离的 Cr(VI) 抗性内生细菌 *E. cloacae* G04 菌株具有较强的除 Cr(VI) 性能, 在土壤、水环境铬污染的修复中具有较好的应用潜力, 也有可能作为促进植物修复铬污染的备选菌株, 另外也可为深入研究李氏禾的铬积累作用机制提供一定参考。今后尚需深入研究该菌株的除 Cr(VI) 作用机制、除 Cr(VI) 动力学、实际应用条件等, 以便在今后的应用中发挥最大效益。

参考文献:

ALSALAMAH AA, 2011. Bioreduction of Cr(VI) by potent

novel chromate resistant alkaliphilic *Bacillus* sp. strain KSUCr5 isolated from hypersaline soda lakes [J]. *Afr J Biotechnol*, 10(37):7207-7218.

BROOKS RR, CHAMBERS MF, NICKS LJ, et al., 1998. Phytomining [J]. *Trends Plant Sci*, 3(9): 359-362.

CAO Z, LUO SL, ZENG GM, et al., 2009. Removal of Cd²⁺ by an endophytic bacteria SDE06 obtained from *Solanum nigrum* L. [J]. *Microbiol Chin*, 36(3):328-333. [曹喆, 罗胜联, 曾光明, 等, 2009. 一株龙葵内生细菌 SDE06 去除 Cd²⁺ 的实验 [J]. *微生物学通报*, 36(3):328-333.]

CHEN J, WANG DQ, ZHANG XH, et al., 2008. Study on the potential of *Leersia hexandra* Swartz for remediation of heavy metal(Cr, Cu, Ni) polluted water [J]. *J Agro Environ Sci*, 27(4):1514-1518. [陈俊, 王敦球, 张学洪, 等, 2008. 李氏禾修复重金属(Cr, Cu, Ni) 污染水体的潜力研究 [J]. *农业环境科学*, 27(4):1514-1518.]

CHEN Z, ZOU L, ZHANG H, et al., 2014. Thioredoxin is involved in hexavalent chromium reduction in *Streptomyces violaceoruber* strain LZ-26-1 isolated from the Lanzhou reaches of the Yellow River [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 94:146-151.

CHIBUIKE GU, OBIORA SC, 2014. Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods [J]. *Appl Environ Soil Sci*, 2014:1-12.

COSTA M, 1997. Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans [J]. *Crit Rev Toxicol*, 27(5): 431-442.

DHAL B, THATOI H, DAS N, et al., 2010. Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 85(11):1471 - 1479.

DONG RZ, 2012. Application of endophytes of arsenic hyperaccumulator in the resistance and adsorption of arsenic and lead in the aqueous solution [D]. Nanchang: Nanchang Hangkong University. [董睿智, 2012. 砷超积累植物内生菌对重金属砷、铅抗性及其吸附性能的研究 [D]. 南昌: 南昌航空大学.]

GE S, ZHOU M, DONG X, et al., 2013. Distinct and effective biotransformation of hexavalent chromium by a novel isolate under aerobic growth followed by facultative anaerobic incubation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(5):2131-2137.

HU C, 2008. Study on mechanism of Cr accumulation and detoxification in *Leersia hexandra* Swartz [D]. Guilin: Guilin University of Technology. [胡澄, 2008. 李氏禾对铬的富集解毒机制研究 [D]. 桂林: 桂林工学院.]

LIN KM, GUAN XF, MA LN, et al., 2008. The biological characteristics of organophosphorus pesticide-degrading bacterium, *Enterobacter cloacae* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 24(9):382-386. [林抗美, 官雪芳, 马丽娜, 等, 2008. 有机磷农药降解菌-阴沟肠杆菌的生物学特性 [J]. *中国农学通报*, 24(9):382-386.]

LONG XX, CHEN XM, HUANG HZ, et al., 2013. Feasibility of enhanced phytoextraction of Zn contaminated soil with Zn

- mobilizing and plant growth promoting endophytic bacteria [J]. *Trans Nonferrous Metal Soc Chin*, (8):2389-2396. [龙新究, 陈雪梅, 黄焕忠, 等, 2013. 促植物生长内生细菌强化植物修复锌污染土壤 [J]. *中国有色金属学报*, (8):2389-2396.]
- LU WX, 2015. Identification and characterization of manganese-resistant endophytic bacteria from manganese hyperaccumulator *Phytolacca acinosa* [D]. Quanzhou: Fujian Normal University. [卢文显, 2015. 超富集植物商陆抗锰内生菌的筛选鉴定及其特性的研究 [D]. 泉州: 福建师范大学.]
- LU YY, ZHANG XH, LIU J, et al., 2013. Mechanism of Cr(VI) uptake by hyperaccumulator *Leersia hexandra* Swartz [J]. *J Agro Environ Sci*, 32(11):2140-2144. [卢媛媛, 张学洪, 刘杰, 等, 2013. 超富集植物李氏禾根系对 Cr(VI) 吸收机制的研究 [J]. *农业环境科学学报*, 32(11):2140-2144.]
- MALIK RN, HUSAIN SZ, NAZIR I, 2010. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan [J]. *Pakistan J Bot*, 42(1):291-301.
- MA XZ, FEI BJ, JIN N, et al., 2009. Characteristic of reduce Cr(VI) by *Desulfotribrio* SRB7 [J]. *Microbiol China*, 32(9):1324-1328. [马小珍, 费保进, 金楠, 等, 2009. 脱硫弧菌 SRB7 对重金属铬 Cr(VI) 的还原特性 [J]. *微生物学通报*, 32(9):1324-1328.]
- OPPERMAN DJ, VAN HE, 2007. Aerobic Cr(VI) reduction by *Thermus scotoductus* strain SA-01 [J]. *J Appl Microbiol*, 103(5):1907-1913.
- POOPAL AC, LAXMAN RS, 2008. Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus* [J]. *Biotechnol Lett*, 30(6):1005-1010.
- RAHMAN A, NAHAR N, OLSSON B, et al., 2016. Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* B2-DHA, a chromium-resistant bacterium [J]. *Genome Announc*, 4(3):e00483-516.
- RAMASAMY S, ARUMUGAM A, CHANDRAN P, 2017. Optimization of *Enterobacter cloacae*, (KU923381) for diesel oil degradation using response surface methodology (RSM) [J]. *J Microbiol*, 55(2):104-111.
- SHANKER AK, CERVANTES C, LOZA-TAVERA H, et al., 2005. Chromium toxicity in plants [J]. *Environ Int*, 31(5):739-753.
- SHI R, WU XF, LI Y, et al., 2015. Plant species applied in phytoremediation of heavy metal contaminated soils [J]. *J Centr S Univ For Technol*, (4):139-146. [石润, 吴晓芙, 李芸, 等, 2015. 应用于重金属污染土壤植物修复中的植物种类 [J]. *中南林业科技大学学报*, (4):139-146.]
- WANG PC, MORI T, KOMORI K, et al., 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions [J]. *Appl Environ Microbiol*, 55(7):1665-1669.
- WANG XJ, LIU J, 2012. Study on experimental conditions of determination the total chromium in water by flame atomic absorption spectrophotometry [J]. *J Med Pest Contr*, (4):462-464. [王新建, 刘健, 2012. 原子吸收火焰光度法测定水中总铬实验条件的探讨 [J]. *医学动物防制*, (4):462-464.]
- XU C, HE S, LIU Y, et al., 2017. Bioadsorption and biostabilization of cadmium by *Enterobacter cloacae* TU [J]. *Chemosphere*, 173:622.
- XU YP, ZANG RC, CHEN WL, et al., 2001. Promoting plant growth and IAA of *Enterobacter cloacae* B8 fermentation liquid [J]. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 27(3):282-284. [徐幼平, 臧荣春, 陈卫良, 等, 2001. 阴沟肠杆菌 B8 发酵液对植物的促生作用和 IAA 分析 [J]. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 27(3):282-284.]
- XU WH, 2007. Research on characteristic and mechanisms of microbial Cr(VI) reduction [D]. Changsha: Hunan University. [徐卫华, 2007. 微生物还原 Cr(VI) 的特性与机理研究 [D]. 长沙: 湖南大学.]
- YANG HL, SUN XL, SONG W, et al., 2001. Studies on the rice endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MR12's identification and it's effects of nitrogen fixation and biological control to plant disease [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 31(1):92-93. [杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等, 2001. 水稻内生阴沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用研究 [J]. *植物病理学报*, 31(1):92-93.]
- ZHANG J, 2011. Screening, identification and characteristics of a strain with high Cr(VI) degradation capacity [D]. Xiangtan: Xiangtan University. [张剑, 2011. 高效降 Cr(VI) 菌的筛选、鉴定及其降解特性 [D]. 湘潭: 湘潭大学]
- ZHANG JK, WANG ZH, YE Y, 2016. Heavy metal resistances and chromium removal of a novel Cr(VI)-reducing *pseudomonad* strain isolated from circulating cooling water of iron and steel plant [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 180(7):1328-1344.
- ZHANG XH, LIU J, HUANG HT, et al., 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz [J]. *Chemosphere*, 67(6):1138-1143.