

## 真菌还原 Cr(VI)的研究

王保军 杨惠芳 李文忠

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 从不同来源的样品中分离筛选出几株抗 Cr(VI)的真菌,他们能在含 300~500mg/L  $K_2Cr_2O_7$  的蔗糖合成培养基中生长,其中 BS-1 菌株抗  $K_2Cr_2O_7$  达 900mg/L。BS-1 等 4 株真菌在含 200mg/L  $K_2Cr_2O_7$  的培养基中生长 4~6d 后,培养液中的 Cr(VI)已全部消失。这些真菌经鉴定为青霉菌 (*Penicillium* sp.) BS-1 和 BS-3, 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) BR-4 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) BX-1。经紫外可见光扫描及化学分析证实,高毒的 Cr(VI)可被真菌还原成为低毒的 Cr(III)。BS-1 菌株细胞还原 Cr(VI)的最适温度为 30℃,最适 pH7.0。葡萄糖 (0.25%) 对细胞还原 Cr(VI)有促进作用,但高浓度的 Cr(VI)则抑制细胞对 Cr(VI)的还原。

**关键词** 真菌, Cr(VI)还原,青霉菌

**分类号** Q939.5

铬 (Cr) 是一种重金属元素,具有 (II)、(III) 和 (VI) 等多种价态,但以 Cr(III) 最为稳定, Cr(VI) 则易与氧结合形成强氧化剂铬酸盐 ( $CrO_4^{2-}$ ) 和重铬酸盐 ( $Cr_2O_7^{2-}$ )。铬化合物在金属合金制造、鞣革、电镀、木材防腐和电子等行业中广泛应用,导致大量含 Cr(VI) 废水排入环境中。由于 Cr(VI) 毒性较高,一般为 Cr(III) 的 100 多倍,而且又有致癌、致畸等潜在危害,因此,有关铬污染的生态学效应及其污染环境的生物净化已愈加受到人们的关注<sup>[1~3]</sup>。

在自然环境,尤其是 Cr(VI) 污染的环境中,不少细菌对 Cr(VI) 具有抗性或使之解毒。将高毒、易溶于水的 Cr(VI) 还原成为低毒、易于沉淀的 Cr(III) 是细菌中具有代表性的一种解毒方式<sup>[4~5]</sup>。这些已在假单胞菌 (*Pseudomonas*)、气单胞菌 (*Aeromonas*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 和丛毛单胞菌 (*Comamonas testosteroni*) 等细菌中证实<sup>[6~12]</sup>。在我国,汪频等<sup>[13]</sup>研究了硫酸盐还原菌脱硫弧菌 SRIV 还原 Cr(VI) 的最适条件,然而,迄今为止有关真菌还原 Cr(VI) 的研究还未见报道。本文描述了几株真菌对 Cr(VI) 的抗性,并对高抗菌株青霉菌 BS-1 在生长和非生长条件下还原 Cr(VI) 的某些特性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株来源

从采集的活性污泥、污水和土壤中分离筛选得到。

### 1.2 培养基成分 (g/L)

蔗糖 20,  $(NH_4)_2SO_4$  2.0, KCl 0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  1.0,  $FeSO_4$

0.01, 酵母浸出物 0.2, 蒸馏水定容, pH6.8.

1.3 真菌生长测定

测菌体干重.

1.4 真菌的鉴定<sup>[14]</sup>

1.5 真菌还原 Cr(VI)的测定

真菌在含一定浓度  $K_2Cr_2O_7$  的蔗糖液体培养基中 30℃ 振荡培养, 不同时间取样, 用 0.45μm 微孔滤膜过滤, 滤液和菌体分别加入二苯碳酰二肼试剂, 在波长 540nm 处测定样品中剩余的 Cr(VI) 浓度<sup>[15]</sup>. 为了验证加入的 Cr(VI) 是否被真菌还原成为 Cr(III), 取上述滤液和菌体各一份, 加入高锰酸钾, 在酸性条件下煮沸, 之后加入  $NaN_3$ , 以去除过量的高锰酸钾, 冷却后, 测定样品中的总铬量, 用总铬量减去已知的 Cr(VI) 量, 即为样品中的 Cr(III) 量<sup>[15]</sup>.

1.6 Cr(VI)还原的紫外-可见光吸收扫描

真菌在含 Cr(VI) 的培养基中生长后, 间隔时间取样, 过滤, 滤液在惠普 8452A 型紫外可见光分光光度计波长 200~500nm 扫描, Cr(VI) 的特征吸收在波长 340~380nm 范围.

1.7 真菌完整细胞的制备及 Cr(VI)还原的检测

真菌培养后过滤, 菌体用 0.066mol / L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 洗涤 2 次, 再悬浮于同样的缓冲液中, 振荡摇匀, 即为完整细胞悬液. 在规定条件下, 细胞与一定浓度的 Cr(VI) 反应, 并依照材料和方法 1.5 所述的有关程序, 分别检测样品中的 Cr(VI) 及 Cr(III) 浓度.

2 实验结果

2.1 筛选菌株对 Cr(VI)的抗性和去除

2.1.1 筛选菌株对 Cr(VI) 的抗性水平: 采用富集培养技术, 从不同来源的样品中分离出真菌 20 株, 然后在含不同浓度的  $K_2Cr_2O_7$  的培养基中培养, 筛选高抗菌株. 所选的 8 株菌抗  $K_2Cr_2O_7$  浓度一般在 300~500mg / L, 但其中一株从活性污泥中分离的 BS-1 抗  $K_2Cr_2O_7$  达 900mg / L. 据文献报道<sup>[6,10]</sup>, 在正常生理条件下, 微生物对 Cr(VI) 的抗性都 < 200mg / L. 由此表明, 上述从环境中分离筛选的 BS-1 等真菌菌株对有毒的 Cr(VI) 具有较强的抗性.

表 1 筛选菌株对 Cr(VI)的去除

Table 1 Removal of Cr(VI)

菌株	培养液中的 $K_2Cr_2O_7$ 浓度 (mg/L)					
	培养时间 Cultivation time (d)					
	0	2	4	6	8	10
BS-1	200	80	-	-	-	-
BS-3	200	155	78	-	-	-
BS-5	200	176	142	105	73	3
BS-6	200	180	150	116	82	4
BR-2	200	185	164	110	80	15
BR-4	200	140	74	-	-	-
BX-1	200	135	60	-	-	-

- 未检出, - Undetectable

**2.1.2 筛选菌株对 Cr(VI) 的去除:** 真菌能否去除生长环境中的重金属, 是判别其是否具有解毒作用的标准之一。表 1 结果显示, 抗 Cr(VI) 水平最高的 BS-1 菌株在含 200mg / L  $K_2Cr_2O_7$  的合成培养基中生长 4d 后, 初始加入的 Cr(VI) 已完全消失, 培养基颜色也由初始时的黄色 [Cr(VI) 的特征颜色] 转变为无色, 此结果与文献报道<sup>[6, 11]</sup> 的细菌还原 Cr(VI) 的结果相同。其他真菌, 如 BS-3、BS-4 和 BX-1 等菌株, 在生长 6d 后, 加入的 Cr(VI) 均未检出。在未接种的对照培养基中, Cr(VI) 浓度及培养基颜色未见明显变化。由此表明, 真菌生长期间对 Cr(VI) 的

去除主要是生物学作用所致。

## 2.2 真菌的鉴定

依照常规真菌鉴定方法<sup>[14]</sup>, 根据筛选菌株的形态特征和生理特性, 4 株对 Cr(VI) 去除能力较高的真菌被鉴定为青霉菌 (*Penicillium* sp.) BS-1 和 BS-3、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) BR-4 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) BX-1。BS-5 和 BS-6 经镜检观察为酵母菌, 但未作其他项目鉴定。

## 2.3 生长细胞对 Cr(VI) 的还原解毒作用

**2.3.1 青霉菌 BS-1 生长过程中对 Cr(VI) 的去除:** 将去除 Cr(VI) 效果较佳的青霉菌 BS-1 接种于含 130mg / L

图 1 青霉菌 BS-1 生长过程中对 Cr(VI) 的去除

Fig.1 Growth of the strain BS-1 and decrease of Cr(VI) in the medium

1. Control of Cr(VI), no inoculum; 2. Growth no Cr(VI);
3. Growth, added Cr(VI); 4. Cr(VI) content in the culture.

$K_2Cr_2O_7$  和未加 Cr(VI) 的液体培养基中, 30℃ 振荡培养。如图 1 所示, 培养 64h 后, 培养液中的 Cr(VI) 已全部消失。BS-1 在含 Cr(VI) 的培养基中初始生长时, 因受毒物 Cr(VI) 的影响, 其生物量低于未加 Cr(VI) 的对照, 但随着 Cr(VI) 浓度的降低, 生长得以恢复并加速进行。等 Cr(VI) 全部消失后, 其生物量与对照接近。由此表明, 真菌对 Cr(VI) 的解毒与其生长具有一定的相关性。本试验结果与文献 [6, 10] 报道的细菌还原 Cr(VI) 的情况相似。

**2.3.2 Cr(VI) 还原的检测:** 由图 2 可见, Cr(VI) 在波长 360nm 左右有一特征性吸收峰。青霉菌 BS-1 在含有 120mg / L  $K_2Cr_2O_7$  的合成培养基中生长时, Cr(VI) 在 360nm 处的吸收峰值随培养时间的延长而逐步降低, 54h 后, 该特定吸收峰已经消失, 表明培养液中的 Cr(VI) 已被真菌全部转化。在细菌中, 通常被还原成为 Cr(III)<sup>[6, 10]</sup>。该检测结果与同时进行的 Cr(VI) 浓度

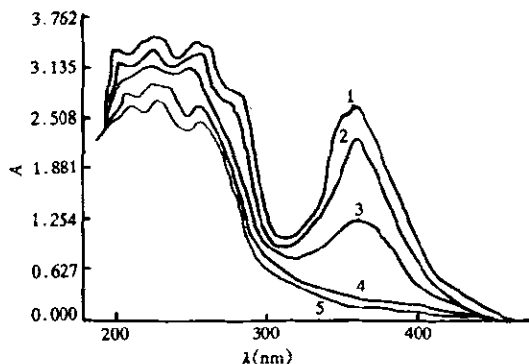


图 2 青霉菌 BS-1 还原 Cr(VI) 的紫外可见光吸收

Fig.2 UV-absorbance of Cr(VI) reduction by stain BS-1

1. 0h, Cr(VI) 120mg / L; 2. 22h, Cr(VI) 102.93mg / L;
3. 32h, Cr(VI), 77.55mg / L; 4. 46h, Cr(VI), 13.54mg / L;
5. 54h, Cr(VI), undetectable.

变化检测结果完全吻合。

**2.3.3 真菌还原 Cr(VI)的化学确证:**由表 2 可见,青霉菌 BS-1 等菌株在含 200mg / L 或 100mg / L  $K_2Cr_2O_7$  的培养基中生长 4d 后,菌体及滤液中已无 Cr(VI)检出,表明培养液中的 Cr(VI)已被真菌全部转化。之后,样品用检测 Cr(III)的方法处理并测定。结果表明,大部分的 Cr(82.4%~87.5%)存在于滤液中,约 4%~9.5% 的 Cr 残留在菌体中。本试验结果为确定真菌对 Cr(VI)的作用是一种还原解毒方式提供了有力的证据。

表 2 真菌还原 Cr(VI)的定量分析

Table 2 Quantitative analysis for reduction of Cr(VI) by the fungal strain

菌 株 Strain	Cr(VI) <sup>*</sup> (mg/L)			Cr(III) (mg/L)		总Cr回收率 Recovery rate (%)
	初始培养 Initial	4d后 After 4d		4d后 After 4d		
		菌体 Cells	滤液 Filtrate	菌体 Cells	滤液 Filtrate	
<i>Penicillium</i> BS-1	200	—	—	8.0	175.0	91.5
<i>Penicillium</i> BS-3	100	—	—	7.0	83.0	90.0
<i>Aspergillus niger</i> BR-4	100	—	—	8.7	84.0	92.7
<i>Aspergillus flavus</i> BX-1	100	—	—	9.5	82.4	91.9

\* as  $K_2Cr_2O_7$ ; — 未测出 — Undetectable

2.4 青霉菌 BS-1完整细胞对 Cr(VI)的还原

**2.4.1 完整细胞还原 Cr(VI)的测定:**图 3 显示,细胞在 30℃, pH7.0 的条件下反应 24h, 加入的 20mg / L  $K_2Cr_2O_7$  全部消失。对照液(未加细胞)中 Cr(VI)浓度无变化。之后,将细胞反应液过滤,细胞和滤液分别用高锰酸钾氧化,以检测有无 Cr(III)存在。结果表明,约 85% 的 Cr 存在于滤液中,约 5% 的 Cr 残留在细胞中,这些 Cr 即为 Cr(III)。由此表明,细胞中存在着还原 Cr(VI)的活性组份,此活性组份在细菌中称之为铬酸盐还原酶<sup>[6, 10, 12]</sup>。

**2.4.2 温度对细胞还原 Cr 的影响:**反应混和液中细胞浓度 60mg(湿重) / ml,  $K_2Cr_2O_7$  30mg / L, pH7.0, 在不同温度条件下反应 24h。图 4 显示,还原 Cr(VI)的最适温度为 30℃。

**2.4.3 pH 对细胞还原 Cr(VI)的影响:**细胞在不同 pH 的磷酸缓冲液(0.066mol / L)中与

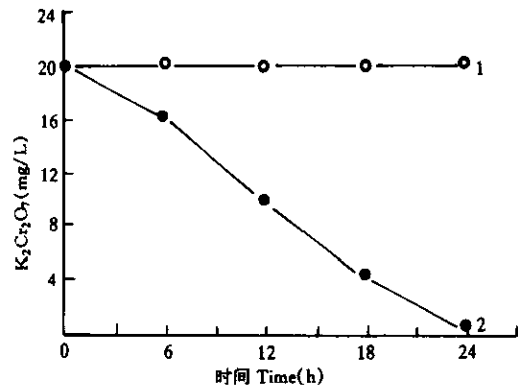


图 3 青霉菌 BS-1完整细胞对 Cr(VI)的还原

Fig.3 Reduction of Cr(VI) by intact cells of *Penicillium* sp. BS-1

1. Control, no cells; 2. Intact cells.

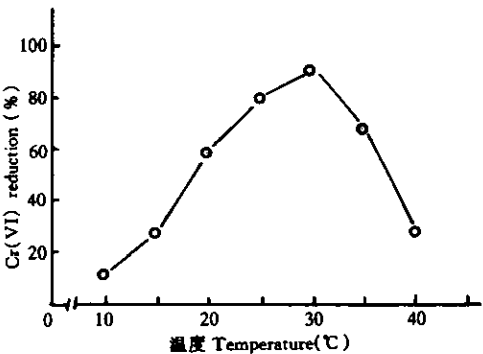


图 4 温度对青霉菌 BS-1完整细胞还原 Cr(VI)的影响

Fig.4 Effect of temperature on reduction by intact cells of *Penicillium* BS-1

40mg / L 的  $K_2Cr_2O_7$  反应 30h, 细胞还原 Cr(VI) 的最适 pH 为 7.0.

**2.4.4 葡萄糖对细胞还原 Cr(VI) 的影响:** 在含 50mg / L  $K_2Cr_2O_7$  的细胞混合液中, 加入不同浓度的葡萄糖, 在规定条件下反应 16h. 表 3 显示, 添加 0.25% 的葡萄糖即可对细胞还

表 3 葡萄糖对 BS-1 细胞还原 Cr(VI) 的影响

Table 3 Effect of glucose on reduction of Cr(VI) by intact cells of *Penicillium* sp. BS-1

葡萄糖 Glucose (%)	Cr(VI) as $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)	Cr(VI) 还原率 Cr(VI) reduction (%)	葡萄糖 Glucose (%)	Cr(VI) as $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)	Cr(VI) 还原率 Cr(VI) reduction (%)
0.00	21.15	58	0.75	15.70	69
0.25	15.15	70	1.00	15.72	69
0.50	16.00	68			

原 Cr(VI) 有促进作用, 此结果与 *Bacillus* QCl-2<sup>[10]</sup> 对 Cr(VI) 的还原结果相同.

**2.4.5 Cr(VI) 浓度对 BS-1 细胞还原 Cr(VI) 的影响:** 如表 4 所示, 反应 22h 后, 低浓度的 Cr(VI) 被全部还原. 随着反应液中 Cr(VI) 的增加, 细胞对 Cr(VI) 的还原率逐步降低, 在

表 4 Cr(VI) 浓度对 BS-1 细胞还原 Cr(VI) 的影响

Table 4 Effect of Cr(VI) concentrations on reduction of Cr(VI) by intact cells of *Penicillium* sp. BS-1

初始 Cr(VI) 浓度* Initial Cr(VI) (mg/L)	反应后 Cr(VI) 浓度* Residual Cr(VI) (mg/L)	Cr(VI) 还原率 Cr(VI) reduction (%)	初始 Cr(VI) 浓度* Initial Cr(VI) (mg/L)	反应后 Cr(VI) 浓度* Residual Cr(VI) (mg/L)	Cr(VI) 还原率 Cr(VI) reduction (%)
5	—	100	40	14.10	65
10	—	100	50	20.00	60
20	—	100	80	35.25	56
30	4.30	86	100	64.86	35

\* Cr(VI), as  $K_2Cr_2O_7$ ; — Undetectable

$K_2Cr_2O_7$  浓度为 100mg / L 时, 还原率降至 35%, 表明高浓度的 Cr(VI) 已对细胞还原活性构成了抑制作用.

### 3 讨论

本文研究结果证明, 由环境样品中分离筛选出的青霉菌 BS-1 不仅对 Cr(VI) 有较强的抗性, 而且在生长和非生长条件下都可将高毒的 Cr(VI) 还原成为低毒的 Cr(III). 其他真菌, 如青霉菌 BS-3, 黑曲霉 BR-4 和黄曲霉 BX-1 等也具有还原解毒 Cr(VI) 的能力. 此外, 未鉴定的酵母菌 BS-5 和 BS-6 等菌株对 Cr(VI) 也有一定的去除能力, 但是否为还原解毒作用尚需研究. 根据上述研究结果, 我们认为, 在自然生境中, Cr(VI) 还原成为 Cr(III) 作为一种重要的解毒方式, 不仅在许多细菌中出现, 而且在一些抗铬的真核微生物中也同样存在. 这些微生物不仅在维持自然生境物质平衡方面起重要作用, 而且在应用于净化铬污染的环境方面也具有一定的潜力. 有关真菌还原解毒 Cr(VI) 的机理尚待深入研究.

**致谢** 肖昌松、徐毅和刘志培等在紫外测定及本文修改过程中给予大力协助, 吕人豪老师在真菌鉴定工作中给予帮助和指导, 特此致谢.

## 参 考 文 献

- [1] Ajmal M M, Nomani A A, Ahmad M. *Water Air Soil Pollut*, 1984, 23: 119~127.
- [2] Babich H, Schiffenbauer M, Storzky G. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1982, 28: 452~459.
- [3] Aislabie J, Loutit M W. *Marine Environ Res*, 1984, 13: 69~79.
- [4] Wang Y T, Shen H. *Indus Microbiol*, 1995, 14: 159~163.
- [5] Cervantes C, Silver S. *Plasmid*, 1992, 27: 65~71.
- [6] Horitsu H, Futo S, Miyazawa S *et al*. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 2417~2420.
- [7] Ishibashi Y, Cervantes C, Silver S. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 2268~2270.
- [8] Kvasnikov E I, Stepanyuk V V, Klyushnikova T M *et al*. *Mikrobiologiya*, 1985, 54: 83~88.
- [9] Shen H, Wang Y T. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 3771~3777.
- [10] Campos J, Maties-Pacheco M, Cervantes C. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 68: 203~208.
- [11] Wang PC, Mori T, Komori M *et al*. *Appl Environ Microbiol*, 1989, 55: 1665~1669.
- [12] Cooke V M, Hughes M N, Poole R K. *J Indus Microbiol*, 1995, 14: 323~328.
- [13] 汪 频, 李福得, 刘大江. 环境科学, 1993, 14(6): 1~5.
- [14] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌. 北京: 科学出版社, 1973. 182~186.
- [15] 日本分析化学会北海道支部编(孙铁珩等译). 水的分析. 北京: 中国建筑工业出版社, 1979. 234~237.

STUDIES ON REDUCTION OF HEXAVALENT  
CHROMIUM BY FUNGI

Wang Baojun Yang Huifang Li Wenzhong

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** Several fungal strain, isolated from activated sludge, sewage and soil, were able to grow in the medium containing 300~500mg / L  $K_2Cr_2O_7$ , and strain BS-1 was capable of resistance to  $K_2Cr_2O_7$  up to 900mg / L. After 4~6d growing of the strain BS-1 and other 3 strains in the liquid medium added 200mg / L  $K_2Cr_2O_7$ , the Cr(VI) content of the medium disappeared completely. These strain were identified as *Penicillium* sp. BS-1, BS-3, *Aspergillus niger* BR-4, *Aspergillus flavus* BX-1 respectively. The results from the dection of the fungal culture by UV-absorbance spectrum and chemical analysis showed that high-toxic Cr(VI) was reduced to lesstoxic Cr(III). Reaction conditions and effectors of Cr(VI) reduction by intact cells of *Penicillium* sp. BS-1 were studied. The optimum temperature was 30℃, the optimum pH was 7.0. Addition of glucose (0.25%) enhanced Cr(VI) reduction, but high concentrations of Cr(VI) inhibited the reduction of Cr(VI) to Cr(III).

**Key words** Fungi, Cr(VI) reduction, *Penicillium* sp.