

隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* XTS 的 Cr(VI)还原特性及相关基因的差异表达

杨宇^{1,2*} 黄露¹ 杨罗¹ 谢丹¹ 王涛¹

(1. 中南大学 资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083)

(2. 中南大学 生物冶金教育部重点实验室 湖南 长沙 410083)

摘要:【目的】考察 pH 值、初始 Cr(VI)浓度、Fe(III)的加入及氧气含量对隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响及其六价铬还原相关基因在不同培养条件下的差异表达。【方法】采用正交试验法 $L_9(3^4)$ 优选 Cr(VI)还原最适条件; 根据模式菌 *A. cryptum* JF-5 同源功能基因序列设计引物, 对菌株 XTS 中的六价铬还原相关基因 *Acry_2099* 在不同培养条件下的基因差异表达进行分析。【结果】pH 为 2.9, 初始 Cr(VI)浓度为 80 mg/L, Fe(III)浓度为 100 mg/L 的条件是该菌株还原 Cr(VI)的最优化配合比, 在该条件下处理 24 h, Cr(VI)的还原率达到 67.48%; 从菌株 XTS 中成功克隆了 *Acry_2099* 基因, 其序列与模式菌 *A. cryptum* JF-5 的同源功能基因序列一致性达到了 99.7%; 在不同 pH 值、初始 Cr(VI)浓度及氧气含量下 *Acry_2099* 基因表达上调情况与 Cr(VI)还原速率呈一致趋势, 证明 *Acry_2099* 很可能参与还原 Cr(VI)的代谢途径。虽然加入 Fe(III)能促进 Cr(VI)的还原, 但是铁的加入对 *Acry_2099* 基因表达水平没有显著的影响。【结论】*A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原与 pH 值、初始 Cr(VI)浓度、Fe(III)的存在等因素有关, 较低的 pH 和较高的初始 Cr(VI)浓度对该菌还原 Cr(VI)具有促进作用。

关键词: 隐藏嗜酸菌, 六价铬还原, 正交试验法, Real time-qPCR

Reduction characteristics and differential expression of *Acidiphilium cryptum* XTS Cr(VI)-reduced related gene

YANG Yu^{1,2*} HUANG Lu¹ YANG Luo¹ XIE Dan¹ WANG Tao¹

(1. School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

(2. Key Laboratory of Biometallurgy, Ministry of Education, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China)

Abstract: [Objective] Investigate the effect of pH, initial Cr(VI) concentration, the existence of Fe(III) and oxygen concentration on Cr(VI) reduction conducted by *A. cryptum* XTS, and monitor differential expression of the functional gene involved in Cr(VI) reduction process. [Methods] The orthogonal experiment $L_9(3^4)$ has been utilized to find the optimal condition for Cr(VI) reduction; The sequence of gene *Acry_2099*, which is thought to be involved in Cr(VI) reduction pathway of *A. cryptum* XTS has been cloned and analyzed. [Results] It has been shown that the optimal condition of Cr(VI) reduction

*通讯作者: ✉: csuyangyu@csu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-14; 接受日期: 2014-03-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-15

by *A. cryptum* XTS is at pH 2.9 under the help of 100 mg/L ferric ion with initial 80 mg/L Cr(VI). In this condition, 67.48% Cr(VI) has been reduced in 24 hours. In addition, *Acry_2099* has been cloned and its sequence shares 99.7% similarity with its homolog in *A. cryptum* JF-5, the model *A. cryptum* species. The alternation of *Acry_2099* expression level correlates with the ability of Cr(VI) reduction in different condition including different pH, initial Cr(VI) concentration as well as oxygen concentration, which suggests *Acry_2099* may be involved in Cr(VI) reduction pathway. Even though the addition of ferric iron can enhance the Cr(VI) reduction by *A. cryptum* XTS, ferric iron addition have no obvious influence on *Acry_2099* gene expression. **[Conclusion]** The environmental factors including pH, initial Cr(VI) concentration, the existence of Fe(III) and oxygen concentration greatly affect the ability of reducing Cr(VI) by *A. cryptum* XTS. To be specific, low pH and high initial Cr(VI) concentration promotes *A. cryptum* XTS ability to reduce Cr(VI).

Keywords: *Acidiphilium cryptum*, Hexavalent chromium reduction, Orthogonal experimental design, Real time-qPCR

工业的迅猛发展,尤其是制革、印染、电镀等行业的发展,导致了大量含 Cr(VI)工业废水的产生。近年来发现 Cr(VI)具有潜在的致癌性和基因诱变性,使得环境 Cr(VI)污染问题变得倍受关注。Cr(VI)污染的处理方式是通过物理化学方法或生物方法将水体中高毒游离的 Cr(VI)还原为低毒稳定的 Cr(III)^[1-2]。物理化学治理方法价格较贵,且容易因反应不完全而造成二次污染。因此, Cr(VI)污染的生物治理方法由于环保高效、成本低廉等特点而备受关注^[3]。目前国内外在含Cr(VI)废水微生物处理方面的研究主要利用的都是在碱性环境生长良好的菌株,而在酸性环境下微生物直接还原 Cr(VI)的研究鲜见报道。电镀厂废水、矿区废水等 Cr(VI)污染多为酸性环境,若用碱性菌株进行处理,则需将 pH 值调成碱性,提高了处理成本。因此,开发酸性条件下新型 Cr(VI)还原菌种资源迫在眉睫。隐藏嗜酸菌 *A. cryptum* 是一种革兰氏阴性、兼性异养的嗜酸异化铁还原菌,属于 α -变形菌纲嗜酸菌属。最适宜的生长温度为 30–35 °C,耐受的 pH 值范围为 1.9–5.9,因其在酸性环境下还原高价金属离子的能力,而成为酸性 Cr(VI)还原菌株的最佳候选之一^[4]。该菌对 Cr(VI)的还原与一种 I 型细胞色素 c (ApcA)的作用有关,其基因编号为 *Acry_2099*^[5]。本研究考察了该菌还原 Cr(VI)的特性和最佳工艺,并通过 RT-qPCR 探究 *Acry_2099* 的差异表达与 Cr(VI)还原速率的相关性,为 Cr(VI)污染环境的修复提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Acidiphilium cryptum* XTS 为本实验室从酸性矿坑水中分离得到,已由本实验室保存。

1.1.2 培养基: 9K 基础培养基(g/L)^[6]: (NH₄)₂SO₄ 3.00, KCl 0.10, K₂HPO₄ 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.50, Ca(NO₃)₂ 0.01。菌株的富集、活化及扩大培养时采用向上述 9 K 基础培养基中加入质量体积比为 1% 的葡萄糖作为外源能源物质,用硫酸调 pH 至 3.5。各组充分溶解后于 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.2 Cr(VI)的测定: 采用二苯碳酰二肼分光光度法(GB/T 15555.5-1995)测定 Cr(VI)的浓度^[7]。

1.3 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原

将实验所需菌株 *A. cryptum* XTS 传代活化,培养至生长活性最高的对数期,再以5%接种量转接到新鲜的 50 mL 含有重铬酸钾的液体培养基,于最适生长温度 30 °C 恒温 170 r/min 振荡培养。取样时,吸取 500 μ L 菌液,12 000 r/min 离心取上清液,取 200 μ L 上清液至 50 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度线,混匀,加入 3 mL 含混合酸的 DPCI 溶液,摇匀,静置 5 min,用 30 mm 比色皿,在 540 nm 的波长下用紫外可见分光光度仪测吸光度。

1.4 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原条件研究

1.4.1 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原能力: 分别设置加菌组与不加菌组,每隔一定时间取样,测定

Cr(VI)还原率情况。设立 3 组平行实验同时测定。

1.4.2 不同 pH 对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响: 分别设置 pH 1.9、2.9、3.9、4.9、5.9 的梯度,每隔一定时间取样,测定 Cr(VI)还原率情况。设立 3 组平行实验同时测定。

1.4.3 不同初始 Cr(VI)浓度对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响: 分别设置初始 Cr(VI)浓度为 20、40、60、80 和 100 mg/L 5 个梯度,每隔一定时间取样,测定 Cr(VI)还原率情况。设立 3 组平行实验同时测定。

1.4.4 Fe(III)的加入对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响: 在初始 Cr(VI)浓度均为 50 mg/L 的前提下设置不含 Fe(III)和 Fe(III)浓度为 50 mg/L 两个梯度,每隔一定时间取样,测定 Cr(VI)还原率情况。设立 3 组平行实验同时测定。

1.4.5 氧气含量对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响: 在初始 Cr(VI)浓度均为 50 mg/L 的前提下设置好氧与厌氧两种培养条件,厌氧组平行处理 12 份,塞紧橡胶塞,充氮气 5 min 除氧后密封,分别

于培养的 4、18、23、27、41、48、65、75、89、113、137 和 151 h 取出一瓶进行取样,测定 Cr(VI)还原率情况。设立 3 组平行实验同时测定。

1.4.6 正交试验表的设计^[8]: 由上述实验结果可知,初始 Cr(VI)浓度、pH 值和 Fe(III)加入浓度这 3 个因素对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)具有显著影响,而氧气的含量则对 *A. cryptum* XTS 还原相同起始浓度的 Cr(VI)的影响不大,因此选取初始 Cr(VI)浓度、pH 值和 Fe(III)加入浓度 3 个因素,每个因素 3 个水平,设立 3 组平行实验同时测定。选用 $L_9(3^4)$ 作为该考察试验指标的正交表,因素水平试验分配方案见表 1。

1.5 Real time-qPCR

1.5.1 Real time-qPCR 的引物设计: 引物 16S-F、16S-R、2099-F、2099-R 以 National Center for Biotechnology Information Institute (NCBI)网站上的 *A. cryptum* JF-5 全基因组序列为模板,由 Primer Premiers 6.0 软件设计^[9-10],上海生工生物工程有限公司合成,引物情况见表 2。

表 1 因素水平正交试验分配方案
Table 1 Allocation plan of factor levels

编号 Number	初始 Cr(VI)浓度 Initial Cr(VI) concentration (mg/L)	pH	Fe(III)加入浓度 Fe(III) concentration (mg/L)
1	40	1.9	0
2	60	2.9	50
3	80	3.9	100

表 2 引物描述
Table 2 Primer description

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	扩增长度 Amplicon length (bp)
16S rRNA	16S-F	CCTTACCAGGATTTGACA	148
	16S-R	CAACTAAAGGCGAGGG	
<i>Acry_2099</i>	2099-F	AGCCTGCCATAGCGTGAGC	105
	2099-R	GCCGGGGAGAACTGGAATC	

1.5.2 总 DNA 的提取及目的基因的 PCR 扩增: 使用北京天根公司的细菌基因组提取试剂盒提取 XTS 菌株的基因组 DNA, 使用美国 Bio-Rad 公司的基因扩增仪进行扩增。PCR 反应体系(50 μ L)为: 模板 DNA 2.0 μ L、2 \times Pfu PCR Master Mix 25.0 μ L、表 2 引物 F 和引物 R (5 pmol/L)各 2.0 μ L、ddH₂O 19.0 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下切胶回收, 使用北京天根公司的普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化目的片段。

1.5.3 目的基因的克隆及序列比对: PCR 产物经凝胶纯化后连接到 pGM-T 载体上, 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜。连接体系为: 10 \times T4 连接 Buffer 1.0 μ L, pGM-T 载体 1.0 μ L, PCR 产物 7.0 μ L, T4 DNA 连接酶 1.0 μ L。连接产物转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 在 LB 固体培养基上进行蓝白筛选。将得到的白色菌落接种至含有终浓度为 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养过夜后提取质粒, 用通用引物 T7 (5'-TAATACGACTCACTATA GGG-3'), 反向引物 SP6 (5'-TACGATTTAGGTGAC ACTATAG-3')进行 PCR 扩增。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送由上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果用 BLAST 进行序列比对。

1.5.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成: 使用 RNAprep Pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)进行总 RNA 的提取及纯化。cDNA 的合成使用反转录试剂盒 FastQuant RT Kit (with gDNase)(北京天根公司)。分别用 NanoDrop[®]微量分光光度计测定其纯度和浓度。

1.5.5 RT-PCR 检测: 利用 iCycler iQ 的 Real-Time PCR 仪进行 RT-PCR 检测。使用 SuperReal PreMix (SYBR Green)试剂盒(北京天根公司)进行实时定量 PCR 检测。RT-PCR 反应体系(50 μ L)为: cDNA 模板 2.0 μ L、2 \times SuperReal PreMix 25.0 μ L、表 2 引物 F 和引物 R (5 pmol/L)各 2.0 μ L、ddH₂O 19.0 μ L。RT-PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C

30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 1 min; 55 $^{\circ}$ C 1 min; 55 $^{\circ}$ C 10 s, 共 80 个循环, 每个循环时按 0.5 $^{\circ}$ C 递增, 直到 95 $^{\circ}$ C 循环结束。

1.5.6 数据处理: 使用 Pfaffl 法^[11]来计算基因的相对表达量, 相对表达量由未知样本和内参基因的 E 值和 C_t 值推导出, 公式为:

$$\text{Ratio} = \frac{E^{\Delta C_{t\text{target}}(\text{control-sample})}}{E^{\Delta C_{t\text{refere}}(\text{control-sample})}}$$

E_{target} 为目的基因的扩增效率, E_{refere} 为内参基因 16S rDNA 的扩增效率, $\Delta C_{t\text{target}}$ 为参照体系中目的基因的 C_t 减去待测样品中目的基因的 C_t , $\Delta C_{t\text{ref}}$ 为参照体系中内参基因的 C_t 减去待测样本中内参基因的 C_t 。计算结果表示, 目的基因在实验组的表达量为对照组中表达量的倍数。

2 结果与分析

2.1 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原条件研究

2.1.1 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI)的还原能力: 其他培养条件相同的情况下, 加入细菌与不加细菌组对 Cr(VI)的还原情况如图 1 所示。可以看到, 初始 Cr(VI)浓度同样为 50 mg/L 的条件下, 加菌组对 Cr(VI)的还原速率很快, 151 h 内, 98.60%的 Cr(VI)被还原; 而不加菌组对 Cr(VI)浓度的影响则很小。可见 Cr(VI)浓度降低的原因主要来自细菌对其的还原能力, 与培养基中所含的其他物质无关。

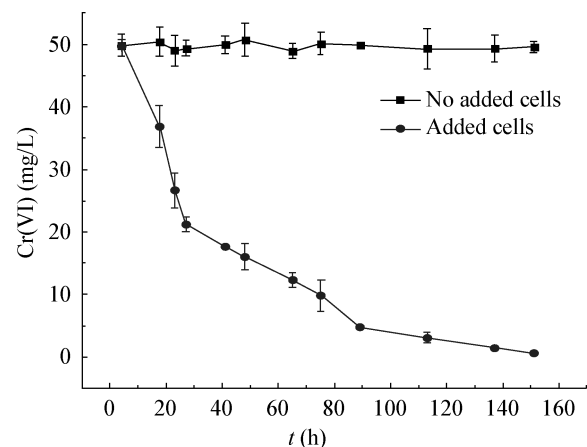


图 1 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的能力

Figure 1 Cr(VI) reducing capacity of *A. cryptum* XTS

2.1.2 不同 pH 对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的影响: 本实验组前期研究发现^[4,12], 隐藏嗜酸菌 *A. cryptum* 的生长适宜 pH 值为 1.9–5.9, 最适 pH 为 3.0–3.5。其他培养条件相同, 初始 Cr(VI) 浓度为 50 mg/L 的条件下, *A. cryptum* XTS 在 pH 为 1.9、2.9、3.9、4.9 和 5.9 条件下对 Cr(VI) 的还原情况如图 2 所示。可以看到, 在开始的 5 h 内, 细菌对 Cr(VI) 的平均还原率为 39.22%, 在 pH 为 1.9 时还原率最高, 达到了 73.41%。pH 为 1.9 时, *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI) 的还原速率最快, 在 41 h 内还原率达到了 100%; 而相同时间内, pH 为 5.9 的条件下, Cr(VI) 仅被还原了 39%。可见, pH 对 Cr(VI) 的还原具有重要的影响, 该菌在其生长适宜的 pH 范围内都能有效地还原 Cr(VI), 但最适 Cr(VI) 还原的 pH 却和该菌的最适生长 pH 不同^[13]。

2.1.3 不同初始 Cr(VI) 浓度对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的影响: 其他培养条件相同, 初始 pH 为 2 的条件下, Cr(VI) 浓度分别为 0、20、40、60、80 和 100 mg/L 时, *A. cryptum* XTS 菌株在 151 h 内对 Cr(VI) 的还原率如图 3 所示。在开始的 27 h 内, 细菌对 Cr(VI) 的还原速率很快, 还原率平均为 48.19%, 其中 20 mg/L 浓度的还原率最高, 达到了 68.52%。在 137 h 时, 20 mg/L 的 Cr(VI) 被还原完全; 在 151 h 时, 40 mg/L 的 Cr(VI) 被还原完全, 而 60、80 和 100 mg/L 的 Cr(VI) 还原率分别为 93.37%、92.17% 和 83.38%。可见 *A. cryptum* XTS 虽然能够直接还原 Cr(VI), 但其还原速率和还原率有限, 且 Cr(VI) 浓度越高, 该菌还原能力呈现递减趋势。其原因是否是具有毒性的 Cr(VI) 部分抑制了微生物活性, 阻碍了其生物代谢过程所致, 还有待进一步研究。

2.1.4 Fe(III) 的加入对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的影响: Li 等^[14]在文献中提到, Fe(III) 的加入可以促进垃圾渗滤液中的 Cr(VI) 还原成 Cr(III)。它可能是通过一种称为“Electron shuttle (电子穿梭)”的机制促使细菌首先还原 Fe(III), Cr(VI) 接受 Fe(III) 还原成 Fe(II) 所提供的电子, 从而使自身还原为 Cr(III)。

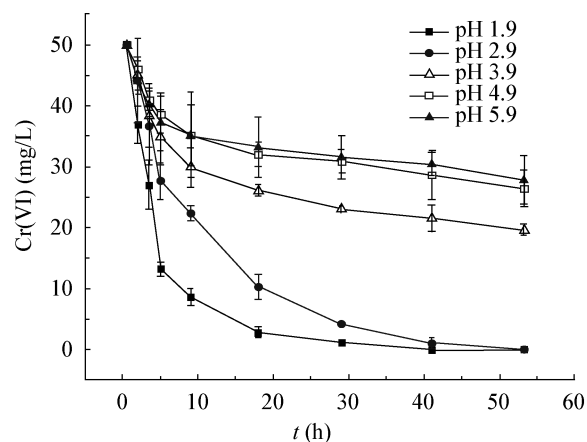


图 2 不同 pH 对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的影响(初始 Cr(VI) 为 50 mg/L)

Figure 2 Effects of different pH on Cr(VI) reducing capacity of *A. cryptum* XTS

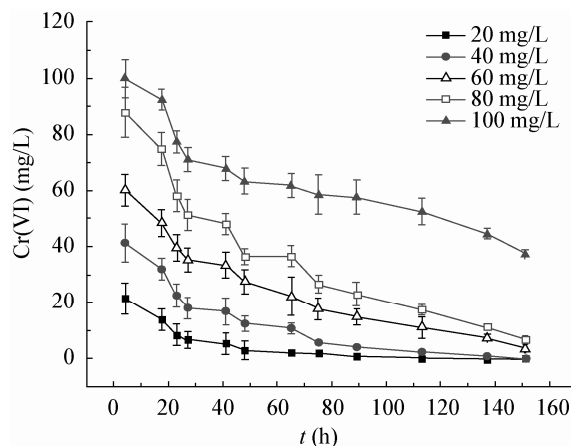
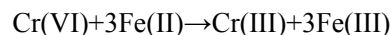


图 3 不同初始 Cr(VI) 浓度对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的影响(初始 pH 为 2)

Figure 3 Effects of different initial Cr(VI) concentration on Cr(VI) reducing capacity of *A. cryptum* XTS



从图 4 中可以看出, 其他培养条件相同, 初始 pH 为 2.0 的条件下, 加 Fe(III) 组的 Cr(VI) 还原率与还原速率均高于不加 Fe(III) 组, 还原率达到 74.09%, 比不加 Fe(III) 组高出 30.68%。这证明, Fe(III) 的存在确实能促进 *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI) 的还原, 而该过程究竟是采取电子穿梭机制还是 Fe(III) 的加入能影响 *Acry_2099* 基因表达水平, 还有待后续实验进一步研究。

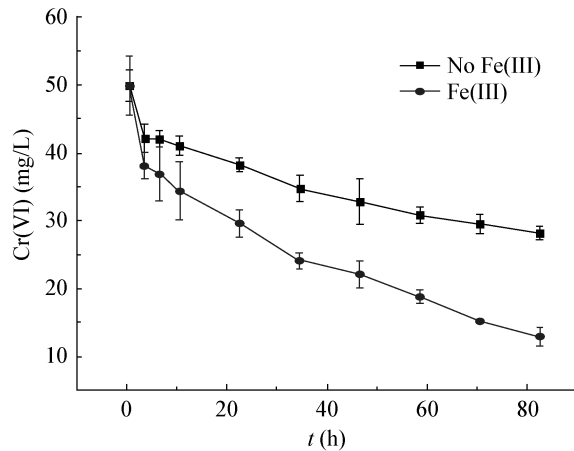


图 4 Fe(III)的加入对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响

Figure 4 Effects of the existence of Fe(III) on Cr(VI) reducing capacity of *A. cryptum* XTS

2.1.5 氧气含量对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响: 比较菌株 *A. cryptum* XTS 分别在好氧以及微厌氧条件下培养 82 h 后的 Cr(VI)还原效果, 结果如图 5 所示。其他培养条件相同的情况下, 氧气含量对 *A. cryptum* XTS 还原相同起始浓度的 Cr(VI)的影响不大, 这表明 Cr(VI)的还原不是一个依赖氧气的过程, 氧气不是必需的电子受体。Timothy 等^[5,15]提出, *A. cryptum* 还原 Cr(VI)的机制可能是 I 型细胞色素 c(ApcA)充当一种在呼吸复合物和电子受体金属之间的中间电子运输体, 通过其 ¹H、¹³C 和 ¹⁵N 骨架、侧链和血红素的化学位移形成氧化和还原两种状态, 从还原醌类接受电子, 而将 Cr(VI)还原为 Cr(III)(图 6)。氧气在整个电子循环过程中并未起到关键作用。

2.1.6 动力学分析: ApcA 催化方程反应机理符合 Michaelies-Menten 方程, 则可根据 M-M 方程:

$$r_s = \frac{k_{+2}c_{E0}c_S}{K_S + c_S} = \frac{r_{\max}c_S}{K_S + c_S}$$

进行积分, 得到:

$$r_{\max}t = (c_{S0} - c_S) + K_m \ln \frac{c_{S0}}{c_S}$$

对该式进行整理, 分别得到下式:

$$\frac{\ln \frac{c_{S0}}{c_S}}{c_{S0} - c_S} = \frac{r_{\max}}{K_m} \frac{t}{c_{S0} - c_S} - \frac{1}{K_m}$$

$$\frac{1}{t} \ln \frac{c_{S0}}{c_S} = \frac{r_{\max}}{K_m} - \frac{1}{K_m} \frac{c_{S0} - c_S}{t}$$

由图 2-5 实验, 测出 c_S-t 系列数据, 并代入上

述各式, 分别以 $\frac{\ln(c_{S0}/c_S)}{c_{S0}-c_S}$ 与 $\frac{t}{c_{S0}-c_S}$ 为纵、横坐标对应作图, 结果使用 Origin 8.0 可拟合为一直线, 这表明该反应符合 M-M 方程, 得到动力学回归方程及 K_m 值如表 3 所示。

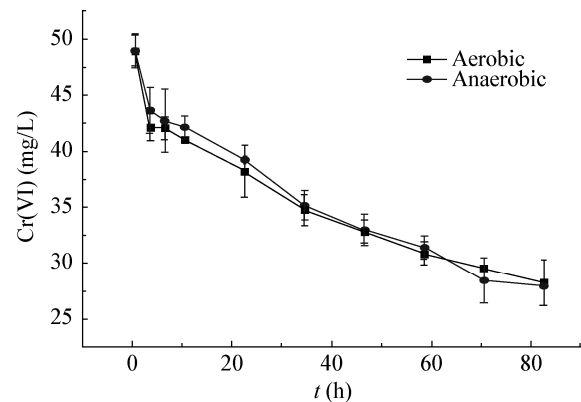


图 5 不同氧气含量对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI)的影响

Figure 5 Effects of different oxygen concentration on Cr(VI) reducing capacity of *A. cryptum* XTS

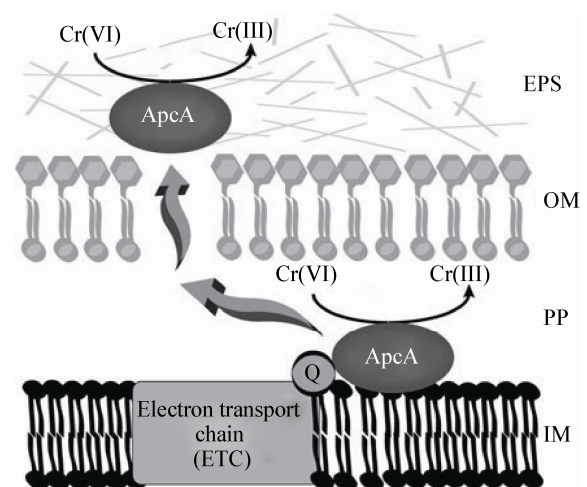


图 6 *A. cryptum* JF-5 六价铬还原电子传递假想模型

Figure 6 Hypothetical electron transport model for *A. cryptum* JF-5 chromate reduction

表 3 动力学分析 Table 3 Kinetic analysis		
条件 Conditions	回归方程 Regression equation	K_m (mol/L)
pH (30 °C, $C_{Cr(VI)}$ =50 mg/L)		
1.9	$y=0.107x-0.765$	1.307×10^{-3}
2.9	$y=0.096x-0.165$	6.061×10^{-3}
3.9	$y=0.002x-1.158$	8.636×10^{-4}
4.9	$y=0.003x-1.099$	9.099×10^{-4}
5.9	$y=0.006x-1.122$	8.913×10^{-4}
$C_{Cr(VI)}$ (mg/L) (30 °C, pH 1.9)		
20	$y=0.032x-0.401$	2.494×10^{-3}
40	$y=0.033x-1.076$	9.294×10^{-4}
60	$y=0.017x-0.191$	5.236×10^{-3}
80	$y=0.014x-0.02$	5.000×10^{-2}
100	$y=0.002x-0.496$	2.016×10^{-3}
$C_{Fe(III)}$ (mg/L) (30 °C, pH 1.9, $C_{Cr(VI)}$ =50 mg/L)		
0	$y=0.002x-1.071$	9.337×10^{-4}
50	$y=0.007x-1.014$	9.862×10^{-4}
C_{oxygen} (30 °C, pH 1.9, $C_{Cr(VI)}$ =50 mg/L)		
Aerobic	$y=0.002x-1.071$	9.337×10^{-4}
Anaerobic	$y=0.002x-1.034$	9.671×10^{-4}

K_m 是酶的特征常数,反映了酶同底物亲和力的大小。当 K_m 值较大时,酶与底物的结合力弱,易解离,表示酶对底物的亲和力小;当 K_m 值较小时,酶与底物的结合力强,不易解离,表示酶对底物的亲和力大。由表 3 可知,Fe(III)的加入和氧气的存在与否对 ApcA 酶动力学参数 K_m 的影响不明显,而 *A. cryptum* XTS 在不同 pH 下还原 Cr(VI)的 K_m 值则有显著性差异。在 pH 为 2.9 时,有最大 K_m ; pH 为 3.9 时, K_m 最小,表明 pH 3.9 有明显激活 ApcA 活性的作用。对 *A. cryptum* XTS 在不同初始 Cr(VI)浓度下还原 Cr(VI)的 K_m 值进行比较,也可以看到,Cr(VI)浓度为 80 mg/L 时有最大 K_m ;当初始 Cr(VI)浓度为 40 mg/L 时, K_m 最小,表明初始 Cr(VI)浓度对 ApcA 的催化反应有显著影响,Cr(VI)浓度为 40 mg/L 能明显激活 ApcA 活性。

2.2 正交试验结果

2.2.1 正交试验数据处理及结果: 使用 24 h 内被还

原的 Cr(VI)浓度作为衡量指标,每组设置 3 次平行,按照表 4 进行数据处理。

2.2.2 极差分析: 从极差(R)的大小可见该指标下各影响因素的主次,极差分析见表 5。

试验结果经过极差分析,得到的结果为 $T_1>T_2>T_3$ 。即: 在变化的水平范围内,因素 1 (即初始 Cr(VI)浓度)对结果造成的影响最大,其次为因素 2 (pH 值),因素 3 (Fe(III)浓度)对结果造成的影响最小。反之, T 越小,与之对应的那一系列的因素试验的结果影响越小。

试验结果为: $D_{31}>D_{21}>D_{11}$, $D_{22}>D_{32}>D_{12}$, $D_{33}>D_{23}>D_{13}$, D 值为 Cr(VI)还原量,一般希望 Cr(VI)还原量越大越好,因此根据 D 值的大小很快可以确定对应因素水平组合,即配合比为 $A_3B_2C_3$ 的试验结果是最优化配合比,即初始 Cr(VI)浓度为 80 mg/L, pH 为 2.9,Fe(III)浓度为 100 mg/L 是最优化配合比。在该条件下处理 24 h,Cr(VI)的还原率达到 67.48%。

表 4 因素水平正交试验数据处理				
Table 4 Orthogonal experimental data processing				
编号 Number	初始 Cr(VI)浓度 Initial Cr(VI) concentration (mg/L)	pH	Fe(III)加入浓度 Fe(III) concentration (mg/L)	被还原的 Cr(VI) Reduced Cr(VI) (mg/L)
1	40	1.9	0	$y_1=19.78$
2	40	2.9	50	$y_2=28.75$
3	40	3.9	100	$y_3=34.54$
4	60	1.9	50	$y_4=33.98$
5	60	2.9	100	$y_5=51.74$
6	60	3.9	0	$y_6=33.33$
7	80	1.9	100	$y_7=41.74$
8	80	2.9	0	$y_8=53.98$
9	80	3.9	50	$y_9=44.54$
I_1	$y_1+y_2+y_3=83.07$	$y_1+y_4+y_7=95.50$	$y_1+y_6+y_8=107.09$	$Y=1/9(Ey_j)=38.04$ 其中, $j=1,2,3\dots 9$
I_2	$y_4+y_5+y_6=119.05$	$y_2+y_5+y_8=134.47$	$y_2+y_4+y_9=107.27$	
I_3	$y_7+y_8+y_9=140.26$	$y_3+y_6+y_9=112.41$	$y_3+y_5+y_7=128.02$	
I_1	$I_{11}=(y_1+y_2+y_3)/3=27.69$	$I_{12}=(y_1+y_4+y_7)/3=31.83$	$I_{13}=(y_1+y_6+y_8)/3=35.70$	
I_2	$I_{21}=(y_4+y_5+y_6)/3=39.68$	$I_{22}=(y_2+y_5+y_8)/3=44.82$	$I_{23}=(y_2+y_4+y_9)/3=35.76$	
I_3	$I_{31}=(y_7+y_8+y_9)/3=46.75$	$I_{32}=(y_3+y_6+y_9)/3=37.47$	$I_{33}=(y_3+y_5+y_7)/3=42.67$	

表 5 极差分析					
Table 5 Range analysis					
编号 Number	D_1	D_2	D_3	R	T
1	$D_{11}=I_{11}-Y=-10.35$	$D_{21}=I_{21}-Y=1.64$	$D_{31}=I_{31}-Y=8.71$	$R_{01}=\max(D_{11}, D_{21}, D_{31})=8.71$ $R_{11}=\min(D_{11}, D_{21}, D_{31})=-10.35$	$T_1=R_{01}-R_{11}=19.06$
2	$D_{12}=I_{12}-Y=-6.21$	$D_{22}=I_{22}-Y=6.78$	$D_{32}=I_{32}-Y=-0.57$	$R_{02}=\max(D_{12}, D_{22}, D_{32})=6.78$ $R_{12}=\min(D_{12}, D_{22}, D_{32})=-6.21$	$T_2=R_{02}-R_{12}=12.99$
3	$D_{13}=I_{13}-Y=-2.34$	$D_{23}=I_{23}-Y=-2.28$	$D_{33}=I_{33}-Y=4.63$	$R_{03}=\max(D_{13}, D_{23}, D_{33})=4.63$ $R_{13}=\min(D_{13}, D_{23}, D_{33})=-2.34$	$T_3=R_{03}-R_{13}=6.97$

2.3 RT-qPCR

2.3.1 目的基因的序列比对及相关引物质量评估: 以 XTS 基因组 DNA 为模板 PCR 结果如图 7, 内参基因引物对 16S-F 和 16S-R 的扩增产物片段在 150 bp 左右, 目的基因引物对 2099-F 和 2099-R 的扩增产物片段在 100 bp 左右, 与预期引物扩增产物长度 148 bp 和 105 bp 相符。相关基因阳性质粒菌体 PCR 产物经由 BLAST 比对结果证实, 其序列与模式菌 *A. cryptum* JF-5 的同源功能基因序列一致性达到了 99.7%, 可用于后续实验研究。

2.3.2 总 RNA 和 cDNA 质量分析: 总 RNA 经 NanoDrop®微量分光光度计检测分析如图所示, 紫

外吸收光谱曲线平滑, 260 nm 处有最大吸收值, 为典型的 RNA 紫外吸收峰, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.90–2.15 之间, 另一纯度指标 OD_{260}/OD_{230} 比值在 2.00–2.30 间, 以上数据表明总 RNA 样品的纯度高。反转录所得的 cDNA 经 NanoDrop®微量分光光度计检测, 吸光光谱曲线平滑, 260 nm 处有最大吸收峰, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.75–1.85 之间, OD_{260}/OD_{230} 比值约为 1.90–2.10, 以上数据表明, 反转录得到的 cDNA 样品纯度高, 可用于后续实验。(提取 RNA 所用的 RNAprep Pure Cell/ Bacteria Kit 购自天根生化科技(北京)有限公司, 反转录所用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司)。

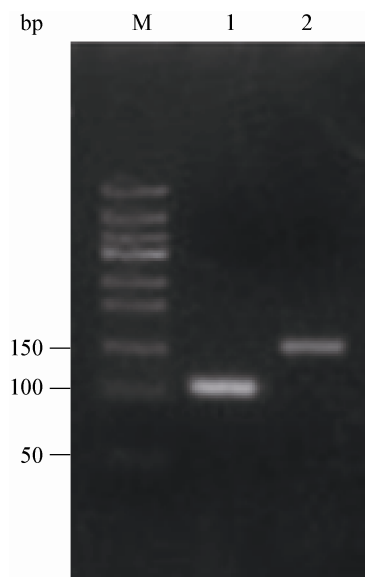


图 7 PCR 产物电泳结果

Figure 7 Electrophoresis analysis of PCR products

Note: 1: 16S rRNA; 2: *Acry_2099*; M: Marker.

2.3.3 RT-qPCR 结果与分析: 从图 8 可以看出, *Acry_2099* 基因的表达差异与 *A. cryptum* XTS Cr(VI) 还原速率成正相关, pH 值越低, *Acry_2099* 基因的表达量上调倍数越多。这是由于, ApcA 还原 Cr(VI) 是一个依赖于 pH 的反应, 较低的 pH 有利于完成蛋白的再氧化。同时, 低 pH 也能促进 ApcA 传递电子给 Cr(VI), 从而完成 Cr(VI) 的催化还原。由图 9 可以看出, 在 Cr(VI) 浓度为 80 mg/L 时, *Acry_2099* 基因的表达量上调倍数最多, 表明该浓度的 Cr(VI) 能够最大程度地促进细菌对 Cr(VI) 还原作用。*Acry_2099* 基因的表达量与其接受的电子数量成正比, 而由图 10 可以看出, Fe(III) 的加入与否对 *Acry_2099* 基因的表达量上调倍数影响不大, 这表明, 在 Fe(III) 存在下, 一种间接的机制主导着 Cr(VI) 的还原。Fe(III) 被酶促还原为 Fe(II), 快速将得到的电子传递给 Cr(VI), 将其还原为 Cr(III)。动力学上可知, 细菌还原 Fe(III) 比直接还原 Cr(VI) 来得快, 而由 Fe(II) 还原 Cr(VI) 的化学反应也会比一般的酶促反应快得多。由图 11 可以看出, 在氧气充足和缺乏氧气的环境中, *Acry_2099* 基因的表达量上调倍数差别不大, 这表明氧气的存在与否并不是影响细菌还原 Cr(VI) 的关键因素。

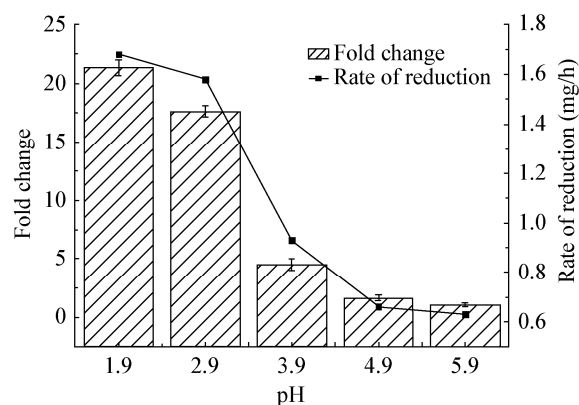


图 8 不同 pH 值下, *Acry_2099* 基因的表达差异与 *A. cryptum* XTS 铬还原速率的相关性

Figure 8 Correlation of differential expression of *Acry_2099* and rate of Cr(VI) reduction under different pH

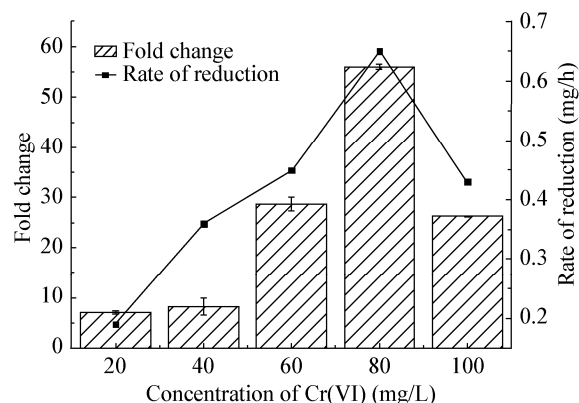


图 9 不同初始 Cr(VI) 浓度下, *Acry_2099* 基因的表达差异与 *A. cryptum* XTS 铬还原速率的相关性

Figure 9 Correlation of differential expression of *Acry_2099* and rate of Cr(VI) reduction under different initial Cr(VI) concentration

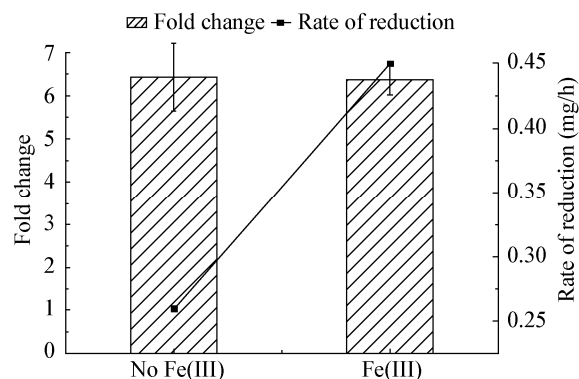


图 10 Fe(III) 的存在下, *Acry_2099* 基因的表达差异与 *A. cryptum* XTS 铬还原速率的相关性

Figure 10 Correlation of differential expression of *Acry_2099* and rate of Cr(VI) reduction under the existence of Fe(III)

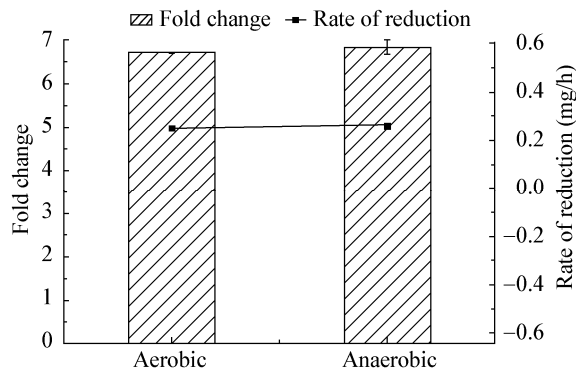


图 11 不同氧气含量下, *Acry_2099* 基因的表达差异与 *A. cryptum* XTS 铬还原速率的相关性

Figure 11 Correlation of differential expression of *Acry_2099* and rate of Cr(VI) reduction under different oxygen concentration

3 结论

(1) pH 对 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 具有重要影响作用, 该菌还原 Cr(VI) 的最适 pH 与其最适生长 pH 并不相同, 较低 pH 能够促进 ApcA 传递电子给 Cr(VI), 有助于细菌六价铬的还原;

(2) 随着初始 Cr(VI) 浓度的增高, *A. cryptum* XTS 对 Cr(VI) 的还原能力呈现递减趋势; 这可能是由于具有毒性的 Cr(VI) 部分抑制了微生物活性, 阻碍了其生物代谢过程所致;

(3) Fe(III) 的存在下, *A. cryptum* XTS 能够通过“电子穿梭”机制加速细菌对六价铬的还原, 但 Fe(III) 的加入对 *Acry_2099* 基因表达水平没有显著的影响;

(4) 好氧与微厌氧条件对细菌还原 Cr(VI) 的影响相差不大, 这说明细菌还原 Cr(VI), 是 ApcA 充当中间电子运输体, 通过其化学位移形成氧化和还原两种状态而还原 Cr(VI), 氧气并不是充当主要的最终电子受体, 其存在与否并不是还原 Cr(VI) 的关键因素;

(5) 正交试验结果显示, 初始 Cr(VI) 浓度为 80 mg/L, pH 为 2.9, Fe(III) 浓度为 100 mg/L 是 *A. cryptum* XTS 还原 Cr(VI) 的最优化配合比。

参考文献

[1] Zheng YJ, Zhang J, Yi BLY. The application of microorganism in the treatment for heavy metal waste water[J]. Foreign Medical Sciences (Section of Medgeography), 2006, 27(1): 39-42 (in Chinese)
郑玉健, 张杰, 依不拉音. 微生物在水体重金属污染治理中

的应用[J]. 国外医学医学地理分册, 2006, 27(1): 39-42
[2] Kim DS. The removal by crab shell of mixed heavy metal ions in aqueous solution[J]. Bioresource Technology, 2003(87): 355-357
[3] Williams CJ, Aderhold D, Edyvean RGJ. Comparison between biosorbent for the removal of metal ions from aqueous solution[J]. Water Research, 1998, 32(1): 216-224
[4] Yang Y, Wang X, Huang L, et al. Progresses on *Acidiphilium cryptum*[J]. Life Science Research, 2013, 17 (2): 179-184 (in Chinese)
杨宇, 王项, 黄露, 等. 隐藏嗜酸菌 *Acidiphilium cryptum* 的研究进展[J]. 生命科学研究, 2013, 17(2): 179-184
[5] Timothy SM, Michael WS, Andrzej JP, et al. Proteogenomic and functional analysis of chromate reduction in *Acidiphilium cryptum* JF-5, an Fe(III)-respiring acidophile[J]. Biometals, 2010, 23(6): 1129-1138
[6] Purushothaman M, Anderson RKL, Narayana S. Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA)-biodegradable plastics[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2001, 24(3): 131-136
[7] Chen YX. Chemical engineering & equipment diphenyl carbonyl 2 hydrazine spectrophotometric method of determination of hexavalent chromium in electroplating waste water improvement research[J]. 2008(6): 109-111 (in Chinese)
陈育翔. 二苯碳酰二肼分光光度法测定电镀废水中六价铬的改进研究[J]. 化学工程与设备, 2008(6): 109-111
[8] Dong RH, Xiao BF, Fang YS. Theoretical analysis of orthogonal test design method and application[J]. Journal of Anhui Institute of Architecture (Natural Science Edition), 2004, 12(6): 103-106 (in Chinese)
董如何, 肖必华, 方永水. 正交试验设计的理论分析方法及应用[J]. 安徽建筑工业学院学报: 自然科学版, 2004, 12(6): 103-106
[9] Xu AL, Xia JL, Liu KK, et al. Real-time PCR analysis of metabolic pathway of PHB in *Acidiphilium cryptum* DX1-1[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 71-77
[10] Liu KK, Nie ZY, Xu AL, et al. Cloning and differential expression of *Acidiphilium cryptum* DX1-1 CO fixed-related gene[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 18(5): 3408-3412 (in Chinese)
刘可可, 聂珍媛, 徐爱玲, 等. *Acidiphilium cryptum* DX1-1 CO₂ 固定相关基因的克隆及在不同营养方式下的差异表达研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 18(5): 3408-3412
[11] Michael WP. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): 2002-2007
[12] Zou LH, Qian L, Zhang YF, et al. Isolation and identification of *Acidiphilium* strain DY from complex sulfide mines and its bioleaching characterization[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2008, 18(2): 336-341 (in Chinese)
邹俐宏, 钱林, 张燕飞, 等. 源自硫化矿区 *Acidiphilium* 属菌的分离及其浸矿性能[J]. 中国有色金属学报, 2008, 18(2): 336-341
[13] David EC, Scott F, Nathan S, et al. Reduction of Cr(VI) under acidic conditions by the facultative Fe(III)-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(1): 146-152
[14] Li Y, Low GK, Scott JA, et al. The role of iron in hexavalent chromium reduction by municipal landfill leachate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 161: 657-662
[15] Cort JR, Swenson MW, Magnuson TS, et al. 1H, 13C, and 15N backbone, side-chain, and heme chemical shift assignments for oxidized and reduced forms of the monoheme c-type cytochrome ApcA isolated from the acidophilic metal-reducing bacterium *Acidiphilium cryptum*[J]. Biomolecular NMR Assignments, 2011, 5(1): 89-92