



Bacillus cereus CC-1 的亚碲酸盐还原特性及产物表征

陈光玮 张雷 杨重 周豪*

大连理工大学海洋科学与技术学院 辽宁 盘锦 124221

摘要:【背景】含 Te(IV) 的工业废水对于生物体具有潜在的毒性作用, 可将 Te(IV) 还原为 Te⁰ 的微生物过程具有重要的研究价值。【目的】探索亚碲酸盐还原菌 *Bacillus cereus* CC-1 对 Te(IV) 的还原能力、还原酶位点以及还原产物的特性。【方法】利用前期筛选的亚碲酸盐还原菌 *Bacillus cereus* CC-1 还原 Te(IV), 根据 48 h 内还原率大小确定最适 Te(IV) 浓度及 pH; 考察不同阴阳离子对 Te(IV) 还原率的影响与 Te(IV) 还原酶位点; 利用表征分析确定还原产物的组成、结晶性与形貌。【结果】菌株 CC-1 能够将 Te(IV) 还原, Te(IV) 初始浓度为 0.5 mmol/L, 体系 pH 为 7.0 时还原率最高。体系中外加阴阳离子对 Te(IV) 的还原有一定影响, 其中磷酸根、硫酸根、醋酸根、钼酸盐对 Te(IV) 的去除无明显影响; 低浓度的硝酸根抑制 Te(IV) 的去除, 随着硝酸根浓度增加, 其对 Te(IV) 的去除的抑制作用减弱; 铅离子和铋离子对 Te(IV) 的还原有抑制作用; 铜离子能够提高 Te(IV) 的去除率。在胞外、细胞膜组分以及细胞内均检测到 Te(IV) 还原酶的活性, 且细胞外的酶活高于细胞内和细胞膜上。菌株 CC-1 可将 Te(IV) 部分还原为碲单质, 还原产物包裹在细胞内部; 胞内酶对 Te(IV) 的还原产物为成簇的碲纳米片。【结论】菌株 CC-1 具有一定的 Te(IV) 耐受能力和还原能力, 并体现了一定的 pH 依赖性。菌株 CC-1 对 Te(IV) 的还原涉及到多种转运过程, 硝酸盐还原酶在 Te(IV) 还原的过程中可能起到重要作用。菌株 CC-1 的胞内碲还原酶对 Te(IV) 的还原产物为胶体 Te⁰, 回收和利用较为方便。

关键词: 亚碲酸盐, 芽孢杆菌, 碲还原, 微生物

Tellurite reduction characteristics of *Bacillus cereus* CC-1 and product characterization

CHEN Guang-Wei ZHANG Lei YANG Zhong ZHOU Hao*

School of Ocean Science and Technology, Dalian University of Technology, Panjin, Liaoning 124221, China

Abstract: [Background] The industrial wastewater containing Te(IV) has potential toxic effects on organisms. The microbial mediated Te(IV) reduction to Te⁰ is of great importance. [Objective] Exploring the reducing ability, reductase site and reducing product characteristics of Te(IV) by *Bacillus cereus* CC-1. [Methods] Te(IV) was reduced by a selenite reducing bacterium *Bacillus cereus* CC-1. The optimum Te(IV) concentration and pH were confirmed according to the reduction rate within 48 h. The Te(IV) reductase site and the reduction ratio of Te(IV) with the existence of different anions and cations were

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41977197); Fundamental Research Funds of Dalian University of Technology (DUT17RC(4)36)

*Corresponding author: Tel: 86-427-2631786; E-mail: zhouhao@dlut.edu.cn

Received: 25-11-2019; Accepted: 26-12-2019; Published online: 06-01-2020

基金项目: 国家自然科学基金(41977197); 大连理工大学基本科研业务费(DUT17RC(4)36)

*通信作者: Tel: 0427-2631786; E-mail: zhouhao@dlut.edu.cn

收稿日期: 2019-11-25; 接受日期: 2019-12-26; 网络首发日期: 2020-01-06

determined. The composition, crystallinity and morphology of the reduced product of Te(IV) were characterized. **[Results]** *Bacillus cereus* CC-1 has the Te(IV) reducing ability. The reduction rate was the highest when the initial concentration of Te(IV) was 0.5 mmol/L and at pH 7.0. The addition of anions and cations in the system has a certain effect on the reduction of Te(IV). Phosphate, sulfate, acetate and molybdate have no obvious effect on the removal rate. Low concentration of nitrate inhibits the remove of Te(IV). Lead and bismuth inhibit the reduction of Te(IV) and copper can increase the removal rate of Te(IV). Te(IV) reductase is active both inside and outside of the cell and on the cell membrane, and the extracellular enzyme activity is higher than the other two sites. The strain CC-1 can partially reduce Te(IV) to tellurium, and the reduction product is encapsulated inside the cell. The reduction product of the intracellular enzyme to Te(IV) is a cluster of flaky structure. **[Conclusion]** The strain CC-1 has Te(IV) tolerance and reducing ability, and shows a certain pH dependence. There may be multiple transport processes for the reduction of Te(IV) by strain CC-1, and nitrate reductase may play an important role in the process of Te(IV) reduction. Te(IV) reductase is not only present on both inside and outside of the strain CC-1 cells but on the cell membrane as well. The reduction of Te(IV) by intracellular enzyme makes recycling and re-using of Te^0 possible.

Keywords: Tellurite, *Bacillus*, Tellurite reduction, Microorganism

碲是一种金属元素，其化合物多被用于颜料、玻璃、催化剂、冶金和太阳能电池中^[1]。尽管碲不是生物必需元素，其在地壳中的含量也相对较低(1–5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，但在特定工业废水排放点附近的土壤和水中也有着较高浓度的碲元素检出，对生物体具有潜在的环境风险^[2]。碲元素在环境中常以–2、0、+4、+6 价的形式存在，其中碲酸盐 $[\text{TeO}_4^{2-}$ 、Te(VI)]和亚碲酸盐 $[\text{TeO}_3^{2-}$ 、Te(IV)]是好氧条件下常见的含 Te 物种，具有较高的水溶性，且毒性较大。Te(IV)是对真核生物和原核生物毒性最大的 Te 的存在形式，浓度低至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时即可对生物体造成显著的损害^[3]。其主要毒性机制在于 Te(IV)被机体吸收后，会与血浆蛋白中的巯基结合，取代组织蛋白中的硫，干扰含巯基酶的系统，最终导致肝、肾、脑等器官以及神经系统的损害，严重时可产生致癌致突变效应^[4]。因此，对于含 Te(IV)废水的有效处理迫在眉睫。

在自然界中存在着大量的 Te(IV)耐受微生物，主要的 Te(IV)脱毒机制在于利用多种非特异性的还原酶，将 Te(IV)还原为不溶于水的单质 Te (Te^0)。Te⁰相较于 Te(IV)，不仅具有更小的生物毒性，同时自身具有独特的非线性光学响应、光电导率和热电特性，可以作为一种半导体材料

应用于电子和光学器件中^[5–7]。因此，利用 Te(IV)还原微生物处理含 Te(IV)废水是一种环境友好、能耗较低的方法。国内外的研究已经证实有多种微生物能够将 Te(IV)还原为 Te^0 ，例如 *Pseudoalteromonas* sp. EPR3^[8]、*Rhodococcus aetherivorans* BCPI^[9]、*Rhodobacter capsulatus* B100^[10]、*Bacillus* sp. STG-83^[11]和 *Shinella* sp. WSJ-2^[12]。但是在已有的研究中，研究者通常关注菌株在仅存在 Te(IV)的条件下对 Te(IV)的耐受浓度、还原效率以及还原机制，而对同时共存其他阴阳离子时的 Te(IV)还原性能以及产物的具体形态涉及较少。

本实验室前期筛选得到了一株可进行亚碲酸盐 $[\text{Se(IV)}]$ 还原的菌株 *Bacillus cereus* CC-1。因 Se(IV)和 Te(IV)的微生物代谢具有一定的相似性，在本研究中探索其是否也具有还原 Te(IV)的能力。首先，研究了亚碲酸盐的初始浓度、pH、外加阴阳离子对 Te(IV)去除率的影响。随后，对微生物胞内、胞外和细胞膜上的酶活进行了测定，确定 Te(IV)还原酶主要的存在位置。最后，对 Te(IV)的还原产物进行了表征，确定了菌株 CC-1能够将 Te(IV)还原为 Te^0 ，产物呈簇状分布，且被生物物质包裹。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源

本实验所用菌株为蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* CC-1 (菌株保藏号为 CICC24251), 由本实验室前期从辽宁省盘锦市辽东湾近海底泥中利用亚硝酸盐筛选获得, 其全基因组数据 GenBank 登录号为 CP023179-CP023183^[13]。

1.1.2 培养基

胰酪大豆胨液体培养基(TSB, g/L): 胰酪胨 17.0, 磷酸二氢钾 2.5, 氯化钠 5.0, 葡萄糖 2.5, 大豆木瓜蛋白酶水解物 3.0。液体培养基需要在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

亚硝酸钠、三羟甲基氨基甲烷, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 五水合硝酸铋, 中国医药集团有限公司; 钼酸钠, 广东光华科技股份有限公司; 二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDTC), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氢氧化钠, 天津大茂化学试剂厂; 以上药品与试剂纯度等级均为 99%; 浓硝酸, 天津大茂化学试剂厂, 优级纯; 牛血清蛋白标准溶液(BSA, 0.5mg/mL), 生工生物工程(上海)股份有限公司。

pH 计, 奥豪斯仪器有限公司; 紫外-可见分光光度计, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司。X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD), 岛津公司; 场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、场发射透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM), X-射线光电子能谱仪(X-ray photoelectron spectrometer, XPS), FEI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Te(IV)浓度对 Te(IV)还原率的影响

向灭菌后的 TSB 培养基中分别加入 0.45 μm 滤膜过滤除菌的 Te(IV)储备液(0.5 mol/L), 使培养基内 Te(IV)浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mmol/L,

再向培养基中分别接入 1%预先活化的菌液[无 Te(IV)], 每种浓度设置 2 组平行实验。将培养基放入恒温培养振荡器内培养, 设置温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 转速为 150 r/min。分别在 0 h 与 48 h 时取样, 在 10 000 r/min 的条件下离心 10 min, 取上清液并用孔径为 0.45 μm 的水系滤膜过滤。用 1.3.1 中 Te(IV)浓度的测定方法, 在 340 nm 波长下测量吸光度值^[14]。

1.2.2 pH 对 Te(IV)还原率的影响实验

用 1 mmol/L NaOH 和 HCl 将培养基 pH 分别调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 并设置一组不调 pH 的培养基。每种条件设置 2 组平行实验。分别向灭菌后的培养基中接入 1%的菌液和亚硝酸钠, 使 Te(IV)最终浓度为 0.5 mmol/L。分别在 0 h 与 48 h 时取样, 样品处理与测试方法同 1.2.1。

1.2.3 不同离子对 Te(IV)还原率的影响实验

向灭菌后的 TSB 培养基中分别加入亚硝酸钠母液, 使培养基内 Te(IV)浓度为 0.5 mmol/L, 再分别接入 1%的 CC-1 菌液。分别加入 NaNO_3 、 Na_3PO_4 、 Na_2SO_4 、 CH_3COONa , 使每种阴离子终浓度分别为 0、0.1、0.5、5 mmol/L, 每种情况设置 2 组平行, 分别在 0 h 与 48 h 时取样, 测量样品中 Te(IV)的浓度; 分别加入 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 、 Na_2MoO_4 , 使每种金属离子浓度分别为 0、0.1、0.5、5 mmol/L, 每种情况设置 2 组平行, 分别在 0 h 与 48 h 时取样, 测量样品中 Te(IV)的浓度, 样品处理与测试方法同 1.2.1。其中金属离子对本实验采用的 Te(IV)检测方法有影响, 采用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)检测 Te(IV)浓度^[15]。

1.3 测定方法

1.3.1 亚硝酸盐的测定

利用 DDTC 法测定培养基中 Te(IV)的浓度^[12]。将样品以 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液通过孔径为 0.45 μm 的水系滤膜过滤后, 取 500 μL 加入 5 mL 离心管中, 继续在离心管中加入 1.5 mL 0.5 mol/L Tris-HCl (pH 7.0), 加入 500 μL 10 mmol/L DDTC。用紫外-可见分光光度计在 340 nm 处测样品吸光度^[14]。

1.3.2 蛋白质浓度的测定

用完全融化后的蛋白标准品(5 mg/mL BSA)配制浓度梯度为 0、0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.5 mg/mL 的蛋白溶液,用 0.5 mol/L Tris-HCL (pH 7.0)缓冲溶液稀释,每次稀释需要充分摇匀。取 5 μ L 样品和不同浓度蛋白标准液分别加到 96 孔板中,各孔加入 250 μ L G250 染色液并混合均匀,样品和标准品均做 3 组平行实验。2 h 内用酶标仪测定 595 nm 下的吸光度,根据标准曲线和实际的样品体积计算出样品中的蛋白浓度。

1.3.3 菌株 CC-1 酶活测定方法

向灭菌后的培养基中接入 1% CC-1 菌液,在恒温培养振荡器 150 r/min、30 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后,以 22 000 r/min 离心 10 min,上清液即为细胞外物质;将离心后沉淀加入 10 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)洗涤 3 次,第 4 次加入 Tris-HCl 进行 200 W 20 min 细胞破碎,将破碎后的混合物以 22 000 r/min 的速率离心 10 min,得到的上清液为细胞内物质;沉淀加入 Tris-HCl 洗涤 3 次,第 4 次加入 Tris-HCl 得到膜组分。向 96 孔板的样品孔中加入 690 μ L 10 mmol/L Tris-HCl, 100 μ L 0.1 mol/L NADH, 10 μ L 1 mol/L Na_2TeO_3 , 1 μ L 0.1 mol/L 巯基乙醇,再分别加入 200 μ L 得到的细胞外、膜上、胞内组分^[16]。在 1 h 内实时检测 500 nm 下 Te^0 的吸光度,根据碲单质的摩尔吸光系数 $\epsilon=237\ 000\ \text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 计算碲单质浓度^[17]。根据蛋白质浓度标准曲线计算得到胞内、胞外、膜上蛋白质浓度,从而计算出各部位比酶活。

1.3.4 生物碲纳米颗粒的表征

在灭菌后的 TSB 培养基中加入 5% 菌液和 0.5 mmol/L Te(IV) ,培养 48 h 后 10 000 r/min 离心 10 min,将得到的沉淀冷冻干燥 10 h,研磨成粉末用于表征。利用 XRD 判断所得产物的结晶性和晶型;利用 SEM 测试样品表面形貌;利用 SEM 的附件能谱仪(energy dispersive sepetrometer, EDS),分析样品微区的化学成分;利用 TEM 观察胞内酶还原产物形貌(胞内酶提取与 1.3.2 胞内操作相同);利用 XPS 测试固体表面碲元素的价态。

2 结果与分析

2.1 Te(IV) 浓度对 Te(IV) 还原率的影响实验

本实验首先研究了 Te(IV) 初始浓度由 0.1 mmol/L 增加到 2 mmol/L 时,微生物对 Te(IV) 的还原情况(图 1)。随着初始 Te(IV) 浓度的增加,微生物对碲的还原率先增加后减少,在初始浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1 和 2 mmol/L 时 Te(IV) 的移除率是 34.1%、71.1%、86.6%、53.7% 和 37.8%,移除率在 0.5 mmol/L 达到峰值,随后逐渐降低,当初始浓度进一步增加为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时菌株已经完全没有 Te(IV) 去除能力。因此后续实验的初始 Te(IV) 浓度选用 0.5 mmol/L。

2.2 pH 对 Te(IV) 还原率的影响实验

如图 2 所示, Te(IV) 的移除率随 pH 增加总体先增加后减少,在 pH 由 3.0 增加至 7.0 时, Te(IV)

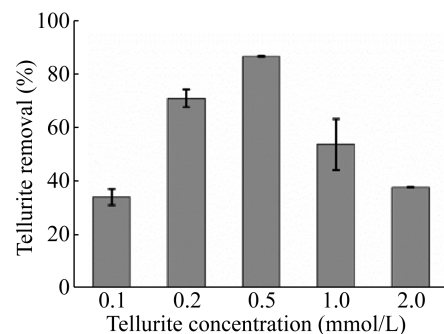


图 1 不同初始 Te(IV) 浓度下菌株对 Te(IV) 的还原率
Figure 1 Te(IV) removal proportion by strain CC-1 at different initial concentration of Te(IV)

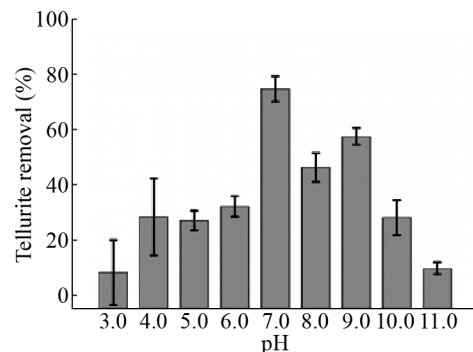


图 2 不同 pH 值下菌株 CC-1 对 Te(IV) 的还原率
Figure 2 Te(IV) removal proportion by strain CC-1 at different pH values

的移除率增加至 74.6%，随着 pH 的进一步增加，Te(IV)去除率反而降低。由于本实验所用培养基的 pH 为 6.8，接近于 7.0，后续试验不再调整 pH。

2.3 不同阴离子对 Te(IV)还原率的影响实验

如图 3A 所示，在有外加 NO_3^- 的 3 个浓度中，随 NO_3^- 浓度增加，Te(IV)的移除率不断增加， NO_3^- 浓度为 5 mmol/L 时为 72.4%，空白组对 Te(IV)的移除率几乎和 5 mmol/L 时相等，为 72.2%。这表明硝酸根在低浓度时会降低菌株 CC-1 对 Te(IV)的还原， NO_3^- 浓度越高抑制能力越小，在 5 mmol/L 时几乎没有抑制。如图 3B 所示，在实验设定的浓度范围内，随磷酸根浓度不断增加，Te(IV)移除率分别为 73.8%、71.6%、73.5%、76.0%，可见磷酸根浓度的变化对 Te(IV)的移除率影响不大。如图 3C、3D 所示，和磷酸根类似，硫酸根和醋酸根

2.4 不同金属离子对 Te(IV)还原率的影响实验

如图 4A 所示，随着铅离子浓度的增加，Te(IV)的移除率呈现先增加后减少的趋势，在 0.1 mmol/L Pb^{2+} 存在条件下，Te(IV)的移除率为 14.2%，0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 时移除率增加，分别为 67.2%和 58.8%。钼酸根对 Te(IV)移除率的影响如图 4B 所示，随着钼酸根浓度不断增加，Te(IV)的移除率基本不变，分别为 67.6%、66.7%、68.0%、68.8%。如图 4C 所示，在实验设置的铋离子浓度范围内，随着铋离子浓度的增加，Te(IV)的去除率减小，分别为 63.8%、61.8%、50.8%、34.2%，可知高浓度的铋离子抑制 Te(IV)的还原。如图 4D 所示，空白组移除率为 63.1%，实验组中，铜离子浓度为 0.1、0.5、1 mmol/L 的体系，对应的移除率分别为 76.6%、77.0%、77.0%，均高于实验组，而铜离子浓度的增加并未使 Te(IV)的去除率显著增长。

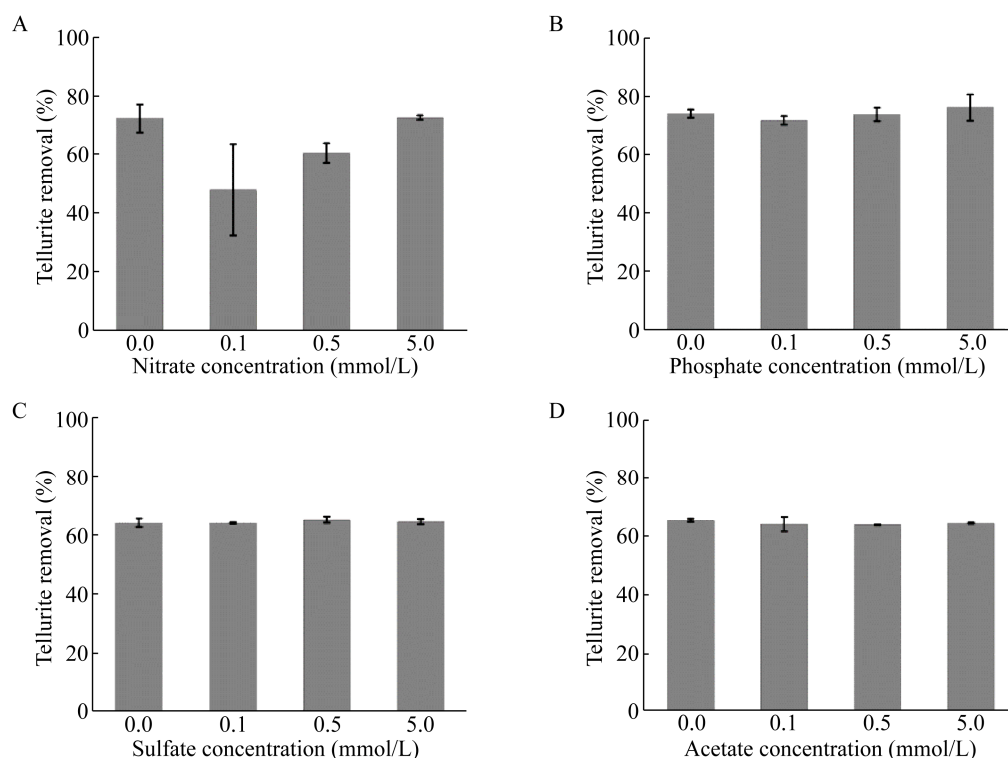


图 3 不同浓度阴离子对菌株 CC-1 的 Te(IV)还原率的影响

Figure 3 Effects of various anions on Te(IV) reduction capacity of strain CC-1

注：A：硝酸盐；B：磷酸盐；C：硫酸盐；D：乙酸盐。

Note: A: Nitrate; B: Phosphate; C: Sulfate; D: Acetate.

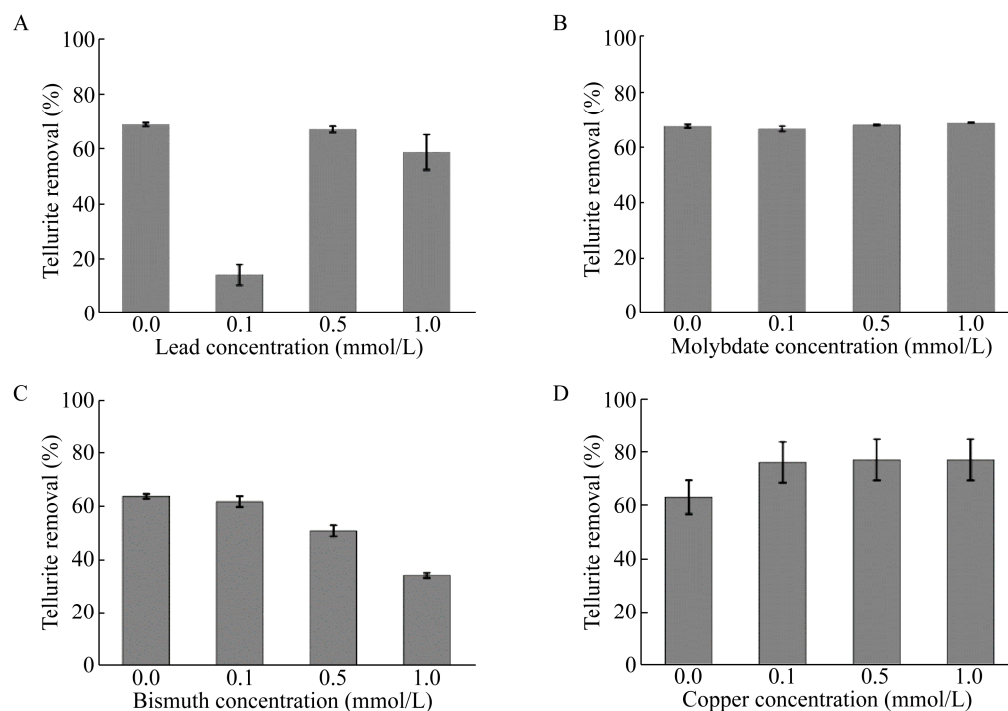


图 4 不同浓度金属离子对菌株 CC-1 的 Te(IV)还原率的影响

Figure 4 Effects of various metal ions on Te(IV) reduction capacity of strain CC-1

注: A: 铅离子; B: 钼酸盐; C: 铋离子; D: 铜离子.

Note: A: Lead; B: Molybdate; C: Bismuth; D: Copper.

2.5 菌株 CC-1 的 Te(IV)还原酶活性

测定了菌株 CC-1 细胞内外以及细胞膜上的蛋白浓度,胞外、胞内、膜上的蛋白浓度分别为 0.139、2.411、0.329 mg/mL。如图 5 所示,菌株 CC-1 的胞内外及细胞膜上均体现出 Te(IV)还原酶活性,其中胞外、胞内、细胞膜上的比酶活分别为 5.05×10^{-5} 、 4.64×10^{-6} 、 4.59×10^{-6} $\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

2.6 生物碲纳米材料表征

为确定菌株 CC-1 对 Te(IV)的还原产物,利用 XRD 对冻干研磨后的产物进行表征。如图 6A 所示,样品的 XRD 谱图在 $2\theta=23.0^\circ$ 、 27.6° 、 38.3° 、 40.4° 、 43.3° 、 45.9° 、 49.6° 、 51.2° 、 56.9° 、 62.8° 处有衍射峰,分别对应于六方晶系单质碲的(100)、(101)、(102)、(110)、(111)、(003)、(201)、(112)、(202)、(113)晶面(PDF#36-1452),说明 Te(IV)的还原产物确实为碲单质。由图 6B 所示样品的 SEM 图像可以看出,Te(IV)的还原产物包裹在生物质内

部,不能确定碲单质的具体形貌。图 6B 的 EDS 能谱图可证明产物样品中存在碲元素。为了更准确地评价碲纳米材料自身的特性,将胞内酶组分提取出来用来还原 Te(IV),产物的 TEM 图像如图 6C、6D 所示,可见产物结晶性良好,为簇状片层结构。图 6E 显示了产物样品 Te 3d 的 XPS 光谱。结合能为

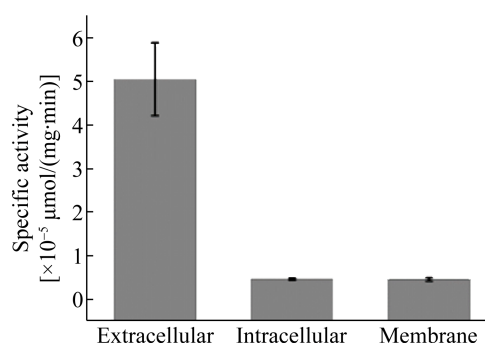


图 5 CC-1 细胞中不同组分的 Te(IV)还原酶活性

Figure 5 Te(IV) reductase activities of different fractions in CC-1 cells

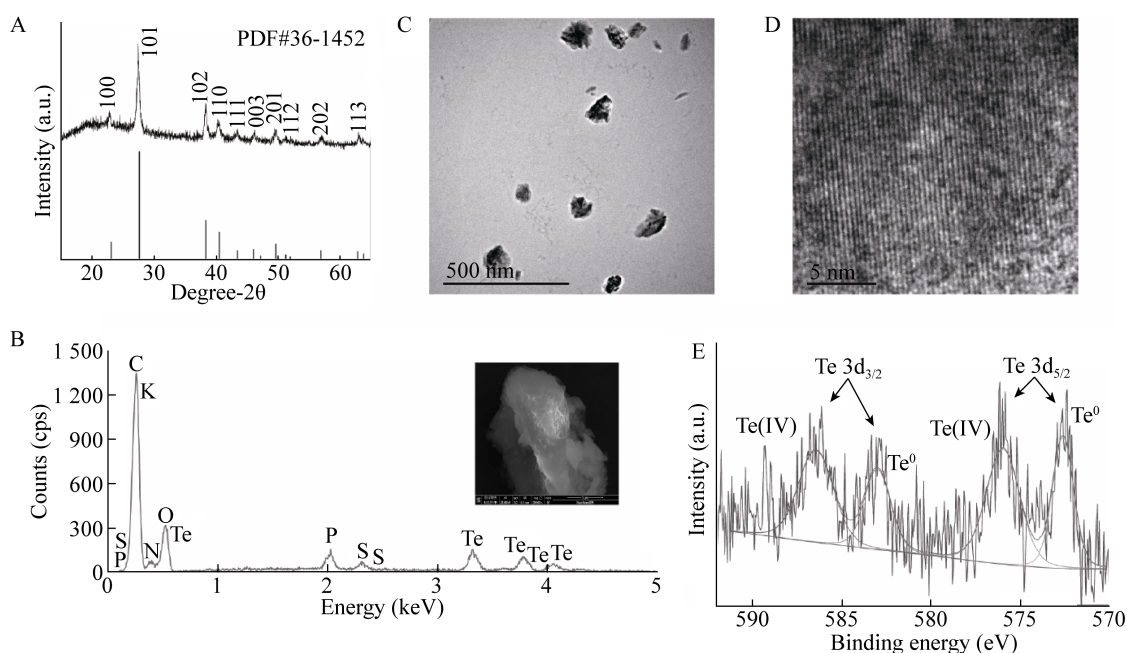


图 6 生物碲纳米材料的表征

Figure 6 Characterization of biogenic Te^0

注: A: XRD; B: EDS; C: TEM; D: HRTEM; E: Te 3d 的 XPS 谱图。

Note: A: XRD; B: EDS; C: TEM; D: HRTEM; E: XPS Te 3d.

586.2 eV 和 576.2 eV 处的 2 个峰分别对应 $\text{Te } 3d_{3/2}$ 和 $\text{Te } 3d_{5/2}$ 的特征峰,说明样品中存在着尚未完全被还原的 Te(IV) ; 而 584.9 eV 和 584.9 eV 处的 2 个特征峰 $\text{Te } 3d_{3/2}$ 和 $\text{Te } 3d_{5/2}$ 证明样品表面 Te^0 的存在。

3 讨论

Te(IV) 耐受和还原微生物在自然界分布较为广泛,但是相关的纯培养研究尚不多见。目前已经报道的可还原 Te(IV) 的芽孢杆菌属微生物较少,主要包括 *Bacillus subtilis*、*Bacillus stearothermophilus* 和 *Bacillus thermoamylovorans*, 而 *Bacillus cereus* 对 Te(IV) 的还原能力未见报道^[18-20]。而关于前述 3 种的芽孢杆菌细菌的 Te(IV) 还原报道,主要集中在相关的还原酶位点以及还原酶本身的特性方面,关于菌株水平的 Te(IV) 还原特性较少涉及。考虑到微生物对 Cr(VI) 、 Se(IV) 和 Te(IV) 的还原过程通常由非特异性还原酶介导,而本实验室前期分离得到的 *Bacillus cereus* CC-1 具有较强的 Se(IV) 还原能

力,本研究尝试探究菌株 CC-1 是否也具有 Te(IV) 的还原能力,并从特性、还原酶定位以及反应产物特性对 Te(IV) 还原的过程进行分析,以期更加全面地了解芽孢杆菌属细菌对 Te(IV) 的响应。

从 Te(IV) 还原的基本特性而言,菌株 CC-1 体现出了一定的 Te(IV) 耐受和还原能力。其可以耐受至少 2 mmol/L 的 Te(IV) ,这一结果与 *Bacillus thermoamylovorans* SKC1 相当,同时比众多革兰氏阴性菌,如 *E. coli* 以及 *Pseudomonas sp.* 具有更强的 Te(IV) 耐受能力,这一现象可能是由不同菌属对 Te(IV) 的耐受机制不同而导致^[21]。另一方面,菌株 CC-1 的 Te(IV) 还原体现出了非常明显的 pH 依赖性,其在 pH 为 7.0 时达到较高的还原率,偏酸或者偏碱都会显著的降低 Te(IV) 的还原率。这一现象与 CC-1 还原 Se(IV) 的过程类似,但是 Te(IV) 的还原率下降的幅度更加明显^[13]。在 Te(IV) 还原的过程中,主要涉及到 Te(IV) 转运和 Te(IV) 还原的 2 个过程,而 Te(IV) 转运到细胞内的过程对于胞内还原至关重要。在以往的研究中,有报道过的 Te(IV)

转运蛋白包括磷酸盐转运蛋白 PitA 和乙酸盐转运蛋白 ActP, 而与 Te(IV)结构类似的 Te(VI)可以通过 SulT 型硫酸盐转运蛋白进行跨膜运输^[21]。因此本研究中考察了外加磷酸盐、乙酸盐和硫酸盐对菌株 CC-1 的 Te(IV)还原的影响。从结果来看, 即使磷酸盐、乙酸盐和硫酸盐的浓度增加到 Te(IV)浓度的 10 倍时, Te(IV)还原率仍然未受到明显的抑制。本实验室之前筛选出的另一株 Te(IV)还原菌 *Lysinibacillus* sp. ZYM-1 的 Te(IV)还原过程会显著地受到磷酸盐和乙酸盐的抑制, 这也表明了 Te(IV)转运系统在不同类型的细菌中可能存在较大的差异^[15]。不同阴离子对 CC-1 的这一结果表明多种 Te(IV)转运过程可能同时存在, 或者在 CC-1 菌体细胞外以及细胞膜上存在着 Te(IV)还原酶, 无需跨膜转运 Te(IV)再进行还原。这一推测也可以通过菌株 CC-1 的不同部分酶活性的测定得到进一步的支持。菌株 CC-1 的胞外组分具有最高的 Te(IV)还原比酶活, 即使 Te(IV)进入细胞膜内的过程受到一定的抑制, CC-1 仍然可以有效地通过胞外作用对 Te(IV)进行还原。与上述三者不同的是, 硝酸盐还原酶可以直接还原 Te(IV), 因此, 推测在菌株 CC-1 中, 硝酸盐和 Te(IV)的还原可能存在着直接的竞争还原作用^[22]。从结果来看, 加入 0.1 mmol/L 的硝酸盐抑制了 Te(IV)的还原, 而随着硝酸盐浓度的进一步升高, Te(IV)的还原率逐步回升, 直至接近不加硝酸盐的对照体系。这一结果表明硝酸盐可能同时扮演着硝酸盐还原酶的底物和诱导物的角色。当硝酸盐浓度较低时, 其与 Te(IV)竞争硝酸盐还原酶的活性位点; 而当硝酸盐浓度较高时, 可能激活原先未表达的硝酸盐还原酶, 从而为 Te(IV)还原提供足够的活性位点。根据本课题组前期对菌株 CC-1 对 Cr(VI)脱毒特性的研究^[23], CC-1 细胞内、细胞膜上及细胞外均可检测到 Cr(VI)的还原; 而在菌株 CC-1 对 Se(IV)的还原特性研究中, 在 CC-1 细胞内和细胞外均发现球状的硒纳米颗粒产生^[13]。说明菌株 CC-1 对 Cr(VI)、Se(IV)和 Te(IV)

的还原均由多种酶共同催化。其中硝酸盐还原酶可能是 Cr(VI)、Se(IV)和 Te(IV)还原过程的共同重要参与者。

另一方面, 金属离子对 Te(IV)还原的影响主要集中于金属离子对菌株生长和代谢的潜在毒性。从 CC-1 的结果来看, 铅离子在 0.1 mmol/L 时即可显著地抑制 Te(IV)还原能力, 这一过程可能和谷胱甘肽介导的 Te(IV)还原过程相关(两者竞争谷胱甘肽的结合位点)^[24]。进一步增加铅离子浓度导致的表观 Te(IV)还原量回升, 主要的原因可能是两者之间形成了 PbTe 沉淀, 从而使得 Te(IV)被去除。钼酸盐的添加主要考虑的是其可以作为多种非特异性 Te(IV)还原酶的辅因子, 从而可能对 Te(IV)的过程起加速的作用。但是, 从实验结果来看, 钼酸盐的添加并未使得 CC-1 对 Te(IV)的还原量增加, 这一结果表明在培养基组分中存在的微量钼(如酵母粉和蛋白胨)已经足够供给含钼酶的钼需求。铋和铜离子的添加, 对 Te(IV)还原量具有截然相反的影响, 推测原因可能是铋离子对微生物具有一定的毒性, 而铜离子和铅离子类似, 可以形成 CuTe 从而从溶液中共去除。

最后, 从 Te(IV)的还原产物来看, 其可能的去向包括甲基碲物种、 H_2Te 以及 Te^0 等物质, 而转化为 Te^0 对于实现 Te(IV)的资源化回收具有重要的意义^[25]。与 *Pseudomonas* sp. MBR 对 Te(IV)的还原产物主要集中在细胞质内部^[26]类似, 在本研究中, 利用完整细胞合成的碲纳米材料被包裹在生物质中, 其形貌无法观察。同时回收涉及到与大量生物质的分离, 因此, 在实际利用的过程中具有较大的困难。利用胞内上清液制备的 Te^0 为成簇的片层结构, 同时具有良好的结晶性。后期可以考虑将其收集用于纳米酶催化、热电材料以及光热材料, 具有一定的回收价值。在利用生物法进行 Te(IV)还原的工作中, 已经有研究者开始关注是否可以利用培养条件的差异对反应生成的 Te^0 材料进行形貌的调控。Soda 等发现 *Shewanella putrefaciens* 9a 在微好

氧条件下和好氧条件下合成的 Te^0 分别为球状颗粒和棒状^[27]; 而 Liang 等发现真菌可以形成纺锤状的 Te^0 ^[28]。在本实验室前期的研究中, 通过改变 Te(IV) 的浓度, 即可实现菌株 *Lysinibacillus* sp. ZYM-1 合成的 Te^0 形貌从棒状到片状的调控。同时, 单纯的利用菌株的细胞膜组分和 Te(IV) 作用时, 可以发现纳米花、纳米棒和纳米六边形形貌的共存。 Te^0 的多形貌共存特性应与不同 Te(IV) 还原酶的模板效应有关^[15]。因此, 本研究后续的工作将集中于探索不同形貌的生物 Te^0 在应用过程中的性能差异。

4 结论

本次实验探索了 *Bacillus cereus* CC-1 还原 Te(IV) 的特性, 并对生成的产物进行表征。

在胰酪大豆胨液体培养基中, Te(IV) 的初始浓度为 0.5 mmol/L, pH 7.0 时, 菌株 CC-1 对 Te(IV) 的去除率最高。

外加阴阳离子对 Te(IV) 去除率影响的实验表明, 磷酸根、硫酸根、醋酸根、钼酸盐对 Te(IV) 的去除无明显影响; 低浓度的硝酸根对 Te(IV) 的去除有抑制作用, 硝酸根浓度增加, Te(IV) 的去除率也有所提高; 铅离子和铋离子能够抑制 Te(IV) 的还原; 铜离子能够提高 Te(IV) 的去除率。

菌株 CC-1 细胞内外和细胞膜上均存在亚碲酸盐还原酶, 细胞外的比酶活明显高于细胞内和细胞膜上的比酶活。

Te(IV) 能被菌株 CC-1 部分还原为 Te^0 , 包裹在微生物细胞内部; 用细胞内亚碲酸盐还原酶还原 Te(IV) , 产物为结晶性良好的片状碲单质。

REFERENCES

- [1] Wang SJ. Tellurium, its resourcefulness and recovery[J]. JOM, 2011, 63(8): 90-93
- [2] Turner RJ, Borghese R, Zannoni D. Microbial processing of tellurium as a tool in biotechnology[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 954-963
- [3] Taylor DE. Bacterial tellurite resistance[J]. Trends in Microbiology, 1999, 7(3): 111-115
- [4] Hu LP, Lv J, Peng KL, et al. Advances in research on toxicity of tellurium and its compounds[J]. Journal of Toxicology, 2002, 16(2): 120-123 (in Chinese)
- [5] 胡莉萍, 吕京, 彭开良, 等. 碲及其化合物的毒性研究进展[J]. 卫生毒理学杂志, 2002, 16(2): 120-123
- [6] Liu ZP, Hu ZK, Liang JB, et al. Size-controlled synthesis and growth mechanism of monodisperse tellurium nanorods by a surfactant-assisted method[J]. Langmuir, 2004, 20(1): 214-218
- [7] Mayers B, Xia YN. One-dimensional nanostructures of trigonal tellurium with various morphologies can be synthesized using a solution-phase approach[J]. Journal of Materials Chemistry, 2002, 12(6): 1875-1881
- [8] Zhu HT, Zhang H, Liang JK, et al. Controlled synthesis of tellurium nanostructures from nanotubes to nanorods and nanowires and their template applications[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2011, 115(14): 6375-6380
- [9] Bonificio WD, Clarke DR. Bacterial recovery and recycling of tellurium from tellurium-containing compounds by *Pseudoalteromonas* sp. EPR3[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(5): 1293-1304
- [10] Presentato A, Piacenza E, Anikovskiy M, et al. *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 as cell factory for the production of intracellular tellurium nanorods under aerobic conditions[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 204
- [11] Borghese R, Brucale M, Fortunato G, et al. Extracellular production of tellurium nanoparticles by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 309: 202-209
- [12] Soudi MR, Ghazvini PTM, Khajeh K, et al. Bioprocessing of seleno-oxyanions and tellurite in a novel *Bacillus* sp. strain STG-83: a solution to removal of toxic oxyanions in presence of nitrate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 165(1/3): 71-77
- [13] Tucker FL, Walper JF, Appleman MD, et al. Complete reduction of tellurite to pure tellurium metal by microorganisms[J]. Journal of Bacteriology, 1962, 83: 1313-1314
- [14] Che L, Xu WP, Zhan JJ, et al. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* CC-1, a novel marine selenate/selenite reducing bacterium producing metallic selenides nanomaterials[J]. Current Microbiology, 2019, 76(1): 78-85
- [15] Mal J, Nanchariaiah YV, Maheshwari N, et al. Continuous removal and recovery of tellurium in an upflow anaerobic granular sludge bed reactor[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 327: 79-88
- [16] Wang ZW, Bu YB, Zhao YH, et al. Morphology-tunable tellurium nanomaterials produced by the tellurite-reducing bacterium *Lysinibacillus* sp. ZYM-1[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(21): 20756-20768
- [17] Castro ME, Molina R, Diaz W, et al. The dihydroliipoamide dehydrogenase of *Aeromonas caviae* ST exhibits NADH-dependent tellurite reductase activity[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 453(1): 105-109

- 2008, 375(1): 91-94
- [17] Elsoud MMA, Al-Hagar OEA, Abdelkhalek ES, et al. Synthesis and investigations on tellurium myconanoparticles[J]. *Biotechnology Reports*, 2018, 18: e00247
- [18] Slobodkina GB, Bonch-Osmolovskaya EA, Slobodkin AI. Reduction of chromate, selenite, tellurite, and iron (III) by the moderately thermophilic bacterium *Bacillus thermoamylovorans* SKC1[J]. *Microbiology*, 2007, 76(5): 530-534
- [19] van Iterson W, Leene W. A cytochemical localization of reductive sites in a gram-positive bacterium: tellurite reduction in *Bacillus subtilis*[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1964, 20(3): 361-375
- [20] Moscoso H, Saavedra C, Loyola C, et al. Biochemical characterization of tellurite-reducing activities of *Bacillus stearothermophilus* V[J]. *Research in Microbiology*, 1998, 149(6): 389-397
- [21] Filella M. Foreword to the research front on 'tellurium in biological and environmental systems: after Fukushima'[J]. *Environmental Chemistry*, 2019, 16(4): 213-214
- [22] Shi LD, Du JJ, Wang LB, et al. Formation of nanoscale Te^0 and its effect on TeO_3^{2-} reduction in CH_4 -based membrane biofilm reactor[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 655: 1232-1239
- [23] Yang Z, Xu TY, Liu YH, et al. Cr(VI) detoxification characteristics and mechanism analysis of salt-tolerant bacteria *Staphylococcus* sp. YZ-1 and *Bacillus cereus* CC-1[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(1): 66-75 (in Chinese)
杨重, 徐天怡, 刘奕含, 等. 耐盐菌 *Staphylococcus* sp. YZ-1 和 *Bacillus cereus* CC-1 的 Cr(VI) 脱毒特性与机理[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(1): 66-75
- [24] Hsu-Kim H. Stability of metal-glutathione complexes during oxidation by hydrogen peroxide and Cu(II)-catalysis[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(7): 2338-2342
- [25] Belzile N, Chen YW. Tellurium in the environment: a critical review focused on natural waters, soils, sediments and airborne particles[J]. *Applied Geochemistry*, 2015, 63: 83-92
- [26] Zhang L, He XH, Zhang LX, et al. Characterization of aerobic reduction of tellurite by *Pseudomonas* sp. MBR[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(1): 126-129 (in Chinese)
张亮, 何晓红, 张礼霞, 等. 一株假单胞菌 MBR 对亚碲酸盐的好氧还原特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2011, 17(1): 126-129
- [27] Soda S, Ma WB, Kuroda M, et al. Characterization of moderately halotolerant selenate- and tellurite-reducing bacteria isolated from brackish areas in Osaka[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(1): 173-181
- [28] Liang XJ, Perez MAMJ, Nwoko KC, et al. Fungal formation of selenium and tellurium nanoparticles[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(17): 7241-7259