

郝孔利, 张子辉, 王珊珊, 等. 季也蒙毕赤酵母菌还原 Cr(VI) 的特性研究[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 63-70.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.009.

## 季也蒙毕赤酵母菌还原 Cr(VI) 的特性研究

郝孔利, 张子辉, 王珊珊, 张杰

燕北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室/东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

**摘要** 从喂食聚乙烯塑料印度谷螟(*Plodia interpunctella* (Hübener))幼虫的肠道液中分离筛选出1株能还原 Cr(VI) 的酵母菌 ZJH-1, 通过形态特征和分子生物学鉴定该菌株为季也蒙毕赤酵母菌(*Pichia guilliermondii*)。该菌株对 Cr(VI) 的最小抑菌浓度(MIC)为 17 mmol/L, 在含有 50 mg/L Cr(VI) 的条件下, 对其他重金属的 MIC 分别为 Cu(II) 13 mmol/L、Pb(II) 6 mmol/L、Ag(I) 4 mmol/L、Mn(II) 16 mmol/L、Ni(II) 3 mmol/L、Co(II) 3 mmol/L、Cd(II) 0.9 mmol/L 和 Hg(II) 0.2 mmol/L。以 Cr(VI) 还原率为指标, 考察了温度、pH、接种量、供电子体以及不同重金属离子对 Cr(VI) 还原率的影响, 结果表明: 在酵母浸出粉胨葡萄糖液体培养基(YPD)中, 菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的较优 pH 和温度分别为 9.0 和 40 °C; 在最适条件下, 接种量为 8% 时, Cr(VI) 的还原效果最佳; 当葡萄糖作为供电子体时, 48 h 内 Cr(VI) 的还原率为 100%; 菌株在含有不同重金属离子的培养液中, 除 Cu(II)、Pb(II) 和 Co(II) 外, 菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的能力和生长能力均受到抑制, 抑制顺序为 Mn(II) > Hg(II) > Ag(I) > Ni(II) > Cd(II)。对菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 能力的初步研究结果表明, 菌株 ZJH-1 在 Cr(VI) 污染修复中具有良好的应用潜力。

**关键词** 季也蒙毕赤酵母菌(*Pichia guilliermondii*); Cr(VI); 重金属; 污染修复; 最小抑菌浓度; 铬还原菌

**中图分类号** X 172 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0063-08

铬是最常用和有毒的重金属之一, 广泛用于纺织染料、抗防腐剂、镀铬、燃料和颜料等行业, 因此, 每年都有大量的铬废物排放到环境中, 导致严重的环境污染, 特别是对土壤和水的污染<sup>[1]</sup>。

在铬的 9 个价态(从 -2 到 +6)中, Cr(VI) 和 Cr(III) 在自然界中最为稳定。Cr(III) 被认为是对生物体正常运作至关重要的微量营养素, 低浓度的 Cr(III) 参与胰岛素调节和葡萄糖代谢, 而 Cr(VI) 化合物是一种致癌和致突变剂<sup>[2]</sup>, 其毒性主要来自 Cr(VI) 还原为 Cr(V) 或 Cr(IV), 然后 Cr(V) 或 Cr(IV) 进一步还原为 Cr(III) 的过程, 在这个过程中产生自由基和活性氧(ROS)<sup>[3]</sup>。此外, Cr(VI) 不可生物降解的特性和在水环境中的高溶解度有助于持久的稳定性, 这就增加了该重金属的毒性和污染能力<sup>[4]</sup>。因此, 消除环境中高浓度六价铬的方法, 可集中在将 Cr(VI) 还原至 Cr(III)。

去除 Cr(VI) 的方法主要为物理、化学和生物

法。物理和化学方法主要包括电化学处理、吸附、反渗透和沉降等。然而, 上述方法易造成二次污染以及需要高成本和高能量的输入<sup>[5]</sup>。相对物理和化学方法, 利用生物法将 Cr(VI) 还原为 Cr(II) 更为高效环保, 是一种经济上可行的技术。

微生物对有毒重金属的响应依赖于重金属离子的浓度及其可接近性。酵母细胞由于其固有机制, 如转化、结晶、络合、细胞外沉淀、流出系统、细胞内区化、细胞壁吸附和色素, 使得酵母细胞能够很容易地适应被重金属污染的环境<sup>[6-7]</sup>。例如, *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[7]</sup>、*Pichia jadinii*、*Pichia anomala*<sup>[8]</sup>、*Cryptococcus*<sup>[9]</sup>、*Cyberlindnera fabianii*、*Wickerhamomyces anomalus*<sup>[10]</sup>、*Candida* sp. PS33<sup>[11]</sup>、*Yarrowia lipolytica* 3589 和 3590<sup>[12]</sup> 等均对 Cr(VI) 具有抗性。Ksheminska 等<sup>[13]</sup> 研究了 *Pichia guilliermondii* L2、*Hansenula polymorpha* 356、*Saccharomyces cerevisiae*、*Rhodotorula pilimanae* D-76 和 *Yarrowia lipo-*

收稿日期: 2019-08-13

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2019C005); 哈尔滨市科技创新人才项目(2017RALXJ010)

郝孔利, 硕士研究生. 研究方向: 环境微生物. E-mail: 1971656918@qq.com

通信作者: 张杰, 博士, 副教授. 研究方向: 环境微生物. E-mail: zhangjie1972@nefu.edu.cn

*lytica* VKM Y-917 对 Cr(VI) 的还原性研究, 其中, *Pichia guilliermondii* L2 是还原活性最高的菌株。

*Pichia guilliermondii* 属于黄原性酵母群, 它们能够根据铁缺乏合成大量的核黄素。而培养基中过量的外源核黄素存在则降低了 Cr(III) 和 Cr(VI) 的毒性<sup>[14]</sup>。酵母细胞的抗性机制对于重金属的清除是必不可少的。目前还没有关于蜡螟肠道液酵母对金属耐受性的报道。

本研究从长期喂食聚乙烯塑料的印度谷螟幼虫肠道液中分离筛选出 1 株能还原 Cr(VI) 的菌株 *Pichia guilliermondii* ZJH-1, 并进一步研究其还原 Cr(VI) 的特性, 旨在为酵母菌在铬污染修复中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1) 肠道液。挑取 4~5 龄印度谷螟幼虫 50 只 (印度谷螟幼虫购于天津惠裕德生物科技有限公司), 空腹 2 d, 每 24 h 清理 1 次粪便, 之后放入一次性的聚乙烯(PE)塑料膜条(PE 塑料购于江苏省海门市扬子医疗器械有限公司), 喂食 7 d 后, 在超净工作台中解剖获得肠道内容物, 之后将其悬浮于无菌生理盐水中, 将肠道组织去除后余下的液体转移到含有 PE 片的无碳液体培养基(LCFBM)中, 在 30 ℃ 的恒温培养箱中培养 60 d 后, 取培养液筛选还原 Cr(VI) 的菌株。

2) 培养基。无碳液体培养基:  $K_2HPO_4$  0.7 g/L,  $KH_2PO_4$  0.7 g/L,  $MgSO_4$  0.7 g/L,  $NH_4NO_3$  1 g/L,  $NaCl$  0.005 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.001 g/L, 120 ℃ 灭菌 15 min。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDA): 称量去皮马铃薯 200 g, 切块煮沸 30 min, 过滤, 添加葡萄糖 20 g (固体 PDA 培养基需加入琼脂 15~20 g, 融化), 补蒸馏水至 1 000 mL, 115 ℃ 灭菌 20 min。酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(YPD): 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L, (固体 YPD 培养基加入琼脂 15~20 g), 115 ℃ 灭菌 20 min。

3) Cr(VI) 标准液(10 g/L) 的配制。准确称取烘干的(120 ℃, 2 h)重铬酸钾( $K_2Cr_2O_7$ ) 2.829 g 放于 100 mL 的容量瓶中, 加去离子水至标线, 摇匀, 之后转入棕色瓶中避光保存。

### 1.2 菌株的富集、分离、纯化

取上述肠道液 2 mL 加入到 100 mL 含有 100

mg/L Cr(VI) 的 PDA 液体培养基中, 30 ℃、125 r/min 过夜培养, 然后以 10 倍的梯度稀释, 吸取 0.1 mL 涂布在 PDA 固体培养基上, 30 ℃ 恒温培养 24 h。之后选取不同形态特征的单菌落进行纯化, 纯化后的单菌落即为具有 Cr(VI) 抗性的纯菌株, 并将该菌株接种于试管斜面培养基上, 30 ℃ 培养 24 h 后, 于 4 ℃ 冰箱保存, 以备后续使用。

### 1.3 菌株的鉴定

在平板上观察上述分离纯化的菌株形态, 在显微镜下进行染色观察, 并使用扫描电镜(JSM-7500F)(SEM-EDS)分析 ZJH-1 经 50 mg/L Cr(VI) 处理 12 h 后, 菌株的形态变化以及能谱(EDS)的变化。

使用 OMAGE Fungal DNA Kit 试剂盒提取真菌总 DNA, 采用真菌通用引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3'、ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC -3' 和 26S NL1 5'-GCATATCAATA-AGCGGAGGAAAAG -3'、NL4 5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3' 进行 PCR 扩增。26S 序列 PCR 扩增条件为: 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s 72 ℃ 1 min, 32 个循环后 72 ℃ 2 min; ITS 序列退火温度为 55 ℃, 其余条件等同 26S。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。将 PCR 扩增产物由上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 将测序结果通过 BLAST 与 NCBI 数据库序列进行比对, 采用 MEGA7.5 构建系统发育树。

### 1.4 菌株对 Cr(VI) 的耐受性及还原性研究

根据 Cr(VI) 对真菌的最小抑制浓度(MIC)来确定该菌株对 Cr(VI) 的耐受性<sup>[15]</sup>。取对数期的细胞 0.2 mL 涂布于 2~30 mmol/L Cr(VI) 的 YPD 固体培养基中, 30 ℃ 恒温静置培养, 直至该菌无法在不同浓度 Cr(VI) 的琼脂板上产生菌落; 取对数期细胞 0.2 mL 加入到含有 2~50 mmol/L Cr(VI) 的 YPD 液体培养基中, 30 ℃、125 r/min 恒温振荡培养 5 d, 然后吸取 0.2 mL 培养液涂布于 YPD 固体培养基, 观察是否有菌落产生。

### 1.5 菌株对不同重金属离子的耐受性

取对数期细胞 0.2 mL 加入到含有 50 mg/L Cr(VI) 和 100~800 mg/L 的 Pb(II)( $Pb(NO_3)_2$ )、Cu(II)( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ )、Mn(II)( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )、Ni(II)( $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ )、Co(II)( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )、Ag(I)( $AgNO_3$ )、Cd(II)( $CdCl_2 \cdot 2^{1/2}H_2O$ ) 和 Hg(II)( $HgCl_2$ ) 的 YPD 固体培养基中, 恒温培养箱中静置培养, 观察菌株是否生长。

## 1.6 不同温度、pH 及接种量对菌株还原 Cr(VI) 的影响

以 2% 接种量将菌株接种于含有 50 mg/L Cr(VI) 的 YPD 液体培养基中, 在温度分别为 25、30、35、40 和 45 °C, 转速为 125 r/min 的培养箱中培养 48 h, 然后检测培养液在 560 nm 处的吸光值及 Cr(VI) 的浓度。利用原子吸收分光光度计测定总铬浓度, 二苯碳酸二肼分光光度法测定 Cr(VI) 浓度<sup>[16]</sup>。

以 2% 接种量将菌株接种于含有 100 mg/L Cr(VI) 的 YPD 液体培养基中, pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0, 转速为 125 r/min, 于 40 °C 培养 48 h, 然后检测  $D_{560}$  及 Cr(VI) 的浓度。

以 2%、4%、6%、8% 和 10% 的接种量将菌株接种于含有 100 mg/L Cr(VI) 的 YPD 液体培养基中, pH 为 9.0, 于 40 °C、125 r/min 培养 48 h, 检测  $D_{560}$  及 Cr(VI) 的浓度。

以上实验每个处理重复 3 次。

## 1.7 不同碳源供电子体对菌株还原 Cr(VI) 的影响

以 2% 接种量接种于含有 20 g/L 葡萄糖、甲酸钠、乙酸钠、甘油、乳酸钠、柠檬酸钠、草酸钠和酒石酸钠的 YPD 液体培养基中, Cr(VI) 质量浓度为 50 mg/L, 恒温箱震荡培养 48 h 后, 检测  $D_{560}$  和 Cr(VI) 的浓度, 每个实验重复 3 次。

## 1.8 不同重金属离子对菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的影响

将对数期菌株 G12 以 2% 的接种量分别接种到

含 50 mg/L 的 Pb(II)、Cu(II)、Mn(II)、Co(II)、Ag(I)、Cd(II) 和 Hg(II) 的 YPD 培养基中(含 50 mg/L Cr(VI)), 置于恒温培养箱 48 h 后, 于 560 nm 和 540 nm 处检测菌体密度和 Cr(VI) 浓度。

# 2 结果与分析

## 2.1 菌株 ZJH-1 形态鉴定及 Cr(VI) 对细胞形态的影响

从长期喂食聚乙烯塑料印度谷螟(*Plodia interpunctella* (Hübener)) 幼虫的肠道液中分离筛选出 1 株能还原 Cr(VI) 的酵母菌 ZJH-1, 图 1 为该菌株在培养基以及在光学显微镜下的形态。该菌株菌落呈乳白色, 表面湿润、粘稠, 易被挑起(图 1A)。在光学显微镜下, 菌株呈卵圆形, 以出芽方式繁殖(图 1B)。

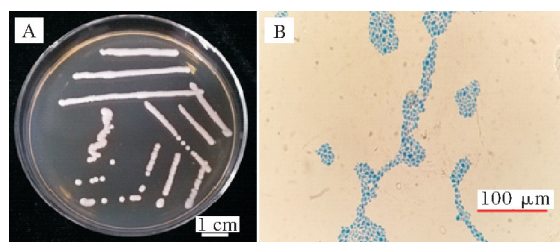
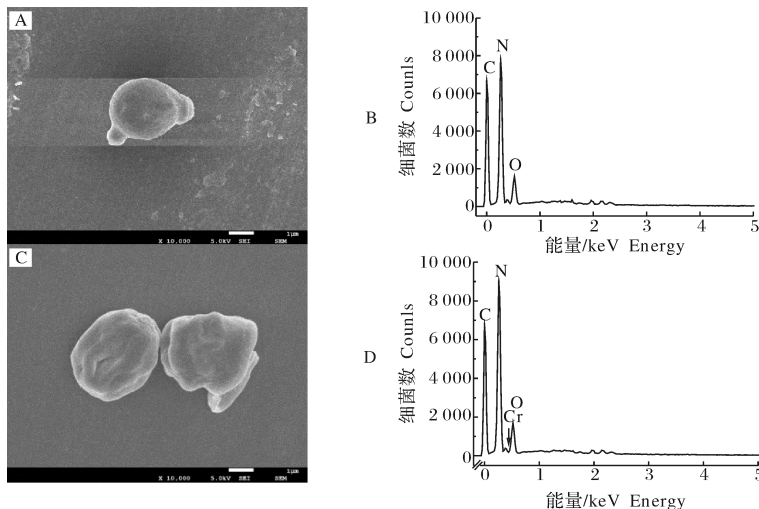


图 1 ZJH-1 的菌落形态和美兰染色结果

Fig.1 Colony morphology and Meilan staining results of ZJH-1

图 2 为该菌株经 50 mg/L Cr(VI) 处理前和处理后的 SEM 图和 EDS 能谱图。从图 2A 中可以看



A: 处理前 ZJH-1 的扫描电镜图; B: 处理前 ZJH-1 的能谱图; C: 处理后 ZJH-1 的扫描电镜图; D: 处理后 ZJH-1 的能谱图。A: Scanning electron micrograph of ZJH-1 before processing; B: Energy spectrum of ZJH-1 before treatment; C: Scanning electron micrograph of ZJH-1 after treatment; D: Energy spectrum of ZJH-1 after treatment.

图 2 50 mg/L Cr(VI) 处理前后菌株的扫描电镜图和能谱图

Fig.2 Scanning electron micrograph and energy spectrum of the strain before and after 50 mg/L Cr(VI) treatment

出,在不含有  $\text{Cr(VI)}$  的条件下,ZJH-1 细胞表面光滑饱满;而在 50 mg/L  $\text{Cr(VI)}$  的条件下,ZJH-1 细胞能够正常分裂生殖,细胞表面皱缩(图 2C),且由图 2D 可以看出,细胞壁膜对  $\text{Cr(VI)}$  无明显的吸附,表明  $\text{Cr(VI)}$  不曾进入细胞内部,还原后的铬留在细胞外的培养基中。

## 2.2 菌株分子生物学鉴定及系统发育分析

对菌株 ZJH-1 进行基于 ITS rDNA 和 26S rDNA 基因序列的分子生物学鉴定,将所得序列通过 NCBI 基

因库中的序列进行同源性分析并通过软件 MEGA 7.5 使用邻接法 (neighbor-joining method) 构建系统发育树,结果如图 3 所示,表明菌株 ZJH-1 属于 *Pichia guilliermondii*。

## 2.3 菌株对不同浓度 $\text{Cr(VI)}$ 的耐受性以及其他金属离子的耐受性

在酵母菌的生长过程中, $\text{Cr(VI)}$  的浓度会影响菌体的生长及其还原  $\text{Cr(VI)}$  的效率。该菌株对  $\text{Cr(VI)}$  的耐受浓度分别为固体培养基 17 mmol/L

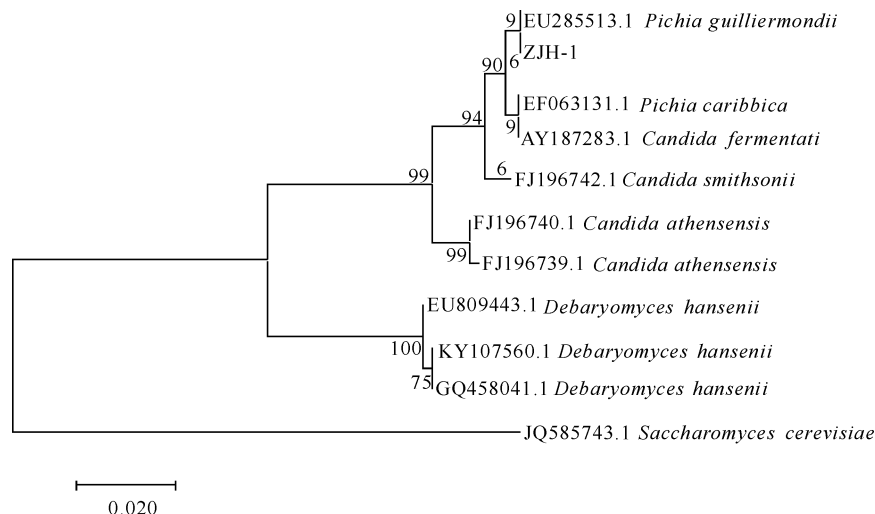


图 3 ZJH-1 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of ZJH-1

和液体培养基 33 mmol/L。此外,该菌株还可以耐受 6 mmol/L  $\text{Pb(II)}$ 、4 mmol/L  $\text{Ag(I)}$ 、16 mmol/L  $\text{Mn(II)}$ 、13 mmol/L  $\text{Cu(II)}$ 、0.2 mmol/L  $\text{Hg(II)}$ 、3 mmol/L  $\text{Ni(II)}$ 、3 mmol/L  $\text{Co(II)}$  和 0.9 mmol/L  $\text{Cd(II)}$ ,耐受性顺序为  $\text{Mn(II)} > \text{Cu(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Ag(I)} > \text{Co(II)} = \text{Ni(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Hg(II)}$ 。由图 4 可以看出,在不同重金属离子存在的条件下,该菌株的形态及颜色均发生改变。图 4A 显示该菌株在  $\text{Pb(II)}$  的存在下,菌株颜色由最初的乳白色变为褐色;图 4B 是该菌株对  $\text{Ag(I)}$  的耐受性,可以看出该菌株可以还原  $\text{Ag(I)}$  离子,培养基表面发生银镜反应。图 4C 和图 4H 是该菌株对  $\text{Mn(II)}$  和  $\text{Co(II)}$  的耐受性,可以看出个别菌株颜色发生变化,是因为重金属对该菌株的基因组产生了影响,从而使其菌落颜色发生了改变<sup>[3]</sup>。除了颜色的变化以外,菌株的形态(图 4D、图 4E 和图 4I),透明度(图 4F 和图 4G)均发生了变化。

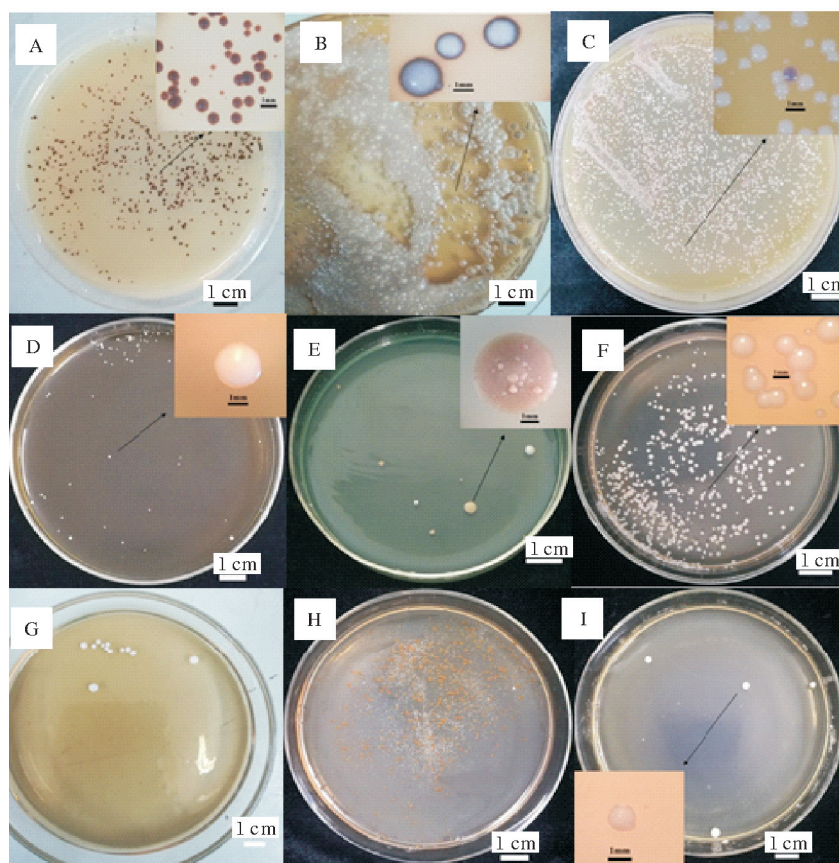
## 2.4 温度、pH 及接种量对菌株还原 $\text{Cr(VI)}$ 的影响

由图 5 可知,菌株 ZJH-1 在 25~45 °C 均能较好

地生长,其中在 40 °C 生长最好;从  $\text{Cr(VI)}$  还原情况上看,该菌株在 25~45 °C 时,还原率均在 82% 以上,在 40 °C 时,还原率达到 99%,结合该菌株的生长和还原率,确定该菌株还原  $\text{Cr(VI)}$  的最适温度为 40 °C。

由图 6 可知,该菌株生长具有较宽的 pH 和还原  $\text{Cr(VI)}$  的范围,该菌株在 pH 3.0~11.0、时间 48 h 内,还原率达 82% 以上。pH 为 9.0 时,菌株生长状况以及还原  $\text{Cr(VI)}$  效率均最高。因此,pH 9.0 为 ZJH-1 还原  $\text{Cr(VI)}$  的最佳反应条件。

接种量对  $\text{Cr(VI)}$  还原率和菌株生长的影响结果(图 7)表明:当接种量 < 8% 时,接种量与还原  $\text{Cr(VI)}$  之间存在正相关性, $\text{Cr(VI)}$  的还原率随接种量的增加而增加,当接种量为 10% 时,其  $\text{Cr(VI)}$  的还原率与接种量为 2% 的  $\text{Cr(VI)}$  的还原率相同。此外,接种量与菌株生长呈正相关。综合以上结果,8% 的接种量为还原  $\text{Cr(VI)}$  的最佳反应条件。



A:  $\text{Pb(II)}$  (6 mmol/L); B:  $\text{Ag(I)}$  (4 mmol/L); C:  $\text{Mn(II)}$  (16 mmol/L); D:  $\text{Cr(VI)}$  (17 mmol/L); E:  $\text{Cu(II)}$  (13 mmol/L); F:  $\text{Hg(II)}$  (0.2 mmol/L); G:  $\text{Ni(II)}$  (3 mmol/L); H:  $\text{Co(II)}$  (3 mmol/L); I:  $\text{Cd(II)}$  (0.9 mmol/L).

图 4 ZJH-1 在 30 °C 并含有不同浓度重金属离子 YPD 固体培养基上的生长情况

Fig.4 ZJH-1 growth at 30 °C with different concentrations of heavy metal ions on YPD solid medium

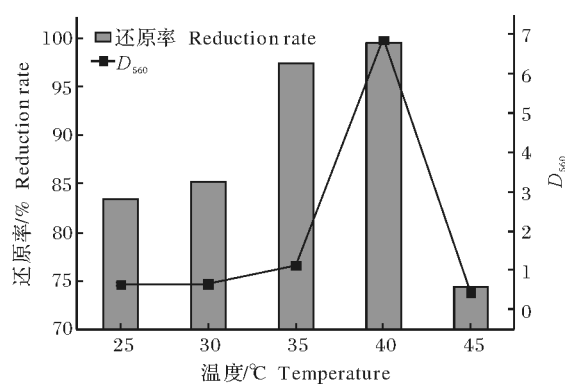


图 5 温度对  $\text{Cr(VI)}$  还原率和菌株生长的影响

Fig.5 Effect of temperature on  $\text{Cr(VI)}$  reduction rate and strain growth

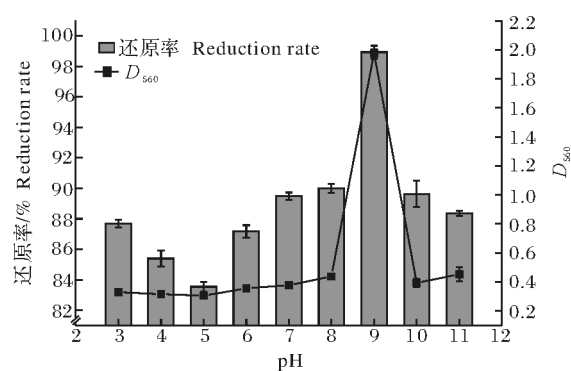


图 6 pH 对  $\text{Cr(VI)}$  还原率和菌株生长的影响

Fig.6 Effect of pH on  $\text{Cr(VI)}$  reduction rate and strain growth

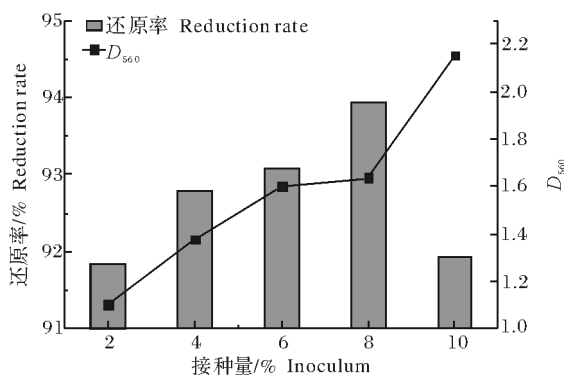
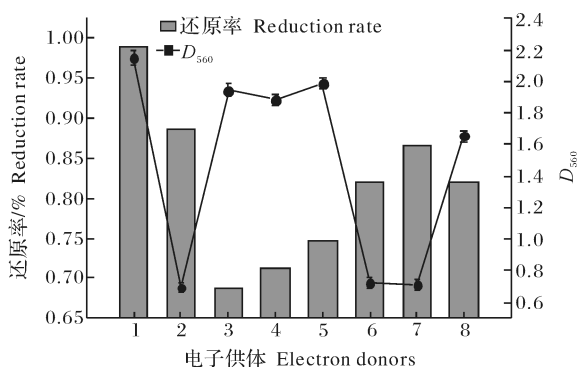


图 7 接种量对 Cr(VI) 还原率和菌株生长的影响

Fig.7 Effect of inoculum size on Cr(VI) reduction rate and strain growth

## 2.5 以不同碳源为电子供体对菌株还原 Cr(VI) 的影响

以葡萄糖、甲酸钠、乙酸钠、甘油、乳酸钠、柠檬酸钠、草酸钠和酒石酸钠作为唯一电子供体,对菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的效率和生长的影响结果(图 8)显示:在 48 h 内,菌株在不同供电子体的培养液中还原率和生长均受到影响。菌株对 Cr(VI) 的还原率表现为:葡萄糖>甲酸钠>草酸钠>柠檬酸钠=酒石酸钠>乳酸钠>甘油>乙酸钠。菌株在以葡萄糖为电子供体时,还原 Cr(VI) 的效果显著,以其他脂类和有机酸盐为电子供体时,还原效果一般。说明以葡萄糖作为电子供体时,可显著促进菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI)。此外,菌株的生长速度表现为葡萄糖>乳酸钠>乙酸钠>甘油>酒石酸钠>柠檬酸钠>草酸钠>甲酸钠。说明菌株能较好利用部分有



1.葡萄糖 Glucose;2.甲酸钠 Sodium metformate; 3.乙酸钠 Sodium acetate; 4.甘油 Glycerin; 5.乳酸钠 Sodium lactic acid; 6.柠檬酸钠 Sodium citrate; 7.草酸钠 Sodium oxalate; 8.酒石酸钠 Sodium tartrate.

图 8 不同电子供体对 Cr(VI) 还原率和菌株生长的影响

Fig.8 Effect of different electron donors on Cr(VI) reduction rate and strain growth

机酸盐和脂类,对甲酸钠、柠檬酸钠和草酸钠的利用效果不佳。因此,菌株 ZJH-1 以葡萄糖作为电子供体时,可显著促进菌株的生长,从而增强了菌株还原 Cr(VI) 的能力。

## 2.6 不同重金属离子对菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的影响

由图 9A 可知,Cu(II)、Pb(II) 和 Co(II) 能促进菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI),其他重金属均起抑制作用,抑制顺序为 Mn(II)>Hg(II)>Ag(I)>Ni(II)>Cd(II),但在 48 h 时,还原率均为 80% 以上。在含有 50 mg/L Cr(VI) 的条件下,添加 50 mg/L 不同重金属离子对菌株 ZJH-1 生长的影响结果(图 9B)显示,除了 Cu(II) 的添加对菌株生长起促进作用,其余重金属离子均对菌株的生长起抑制作用。与只加 Cr(VI) 相比,Cu(II) 在 36 h 进入对数期,而只添加 Cr(VI) 时,菌株在 40 h 进入对数期,其他金属离子在 4~48 h 之间,均处于迟缓期。此外,在不添加任何重金属的条件下,菌株在 24 h 进入稳定期。可见,金属离子的加入会对菌株 ZJH-1 产生毒性,进而抑制其还原 Cr(VI) 的能力。

## 3 讨论

本研究从喂食聚乙烯的蜡螟肠道液中筛选出 1 株适宜于偏碱性、中温环境生长且能够还原 Cr(VI) 的酵母菌株 *Pichia guilliermondii* ZJH-1,结果发现季也蒙毕赤酵母菌 ZJH-1 以 YPD 为培养基,能够耐受 17 mmol/L Cr(VI),并且还能耐受其他重金属离子。Bankar 等<sup>[12]</sup>的研究表明 *Y. lipolytica* NCIM 3589 和 NCIM 3590 也对不同重金属离子具有耐受性。本研究结果表明,在液体 YPD 培养基中,菌株 ZJH-1 还原 Cr(VI) 的最佳反应条件为:pH 9.0、温度 40 °C、接种量 8% (100 mL)、摇床转速 125 r/min、最佳电子供体为 20 g/L 葡萄糖、反应时间 48 h、Cr(VI) 质量浓度 50 mg/L。此条件下,菌株 ZJH-1 对 Cr(VI) 的还原率为 100%。此外 Cu(II) 的加入显著提高了 Cr(VI) 的还原率。关于 *Pichia guilliermondii* 去除 Cr(VI) 的作用, Martorell 等<sup>[8]</sup>、Shi 等<sup>[19]</sup> 和 Ksheminska 等<sup>[20]</sup> 的研究表明其作用机制为铬酸盐还原酶还原 Cr(VI)。本研究结果与上述报道一致,推测 ZJH-1 对 Cr(VI) 的去除机制可能以还原为主,但还原 Cr(VI) 的具体机制还有待更加深入的研究。与已有的还原 Cr(VI) 的微生物 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>[7]</sup>、*Pichia guilliermondii* L2<sup>[13]</sup>、*P. guilliermondii* H、*P. guilliermondii* ATCC 9058、*P. guilliermondii* T2、*P. guilliermondii*

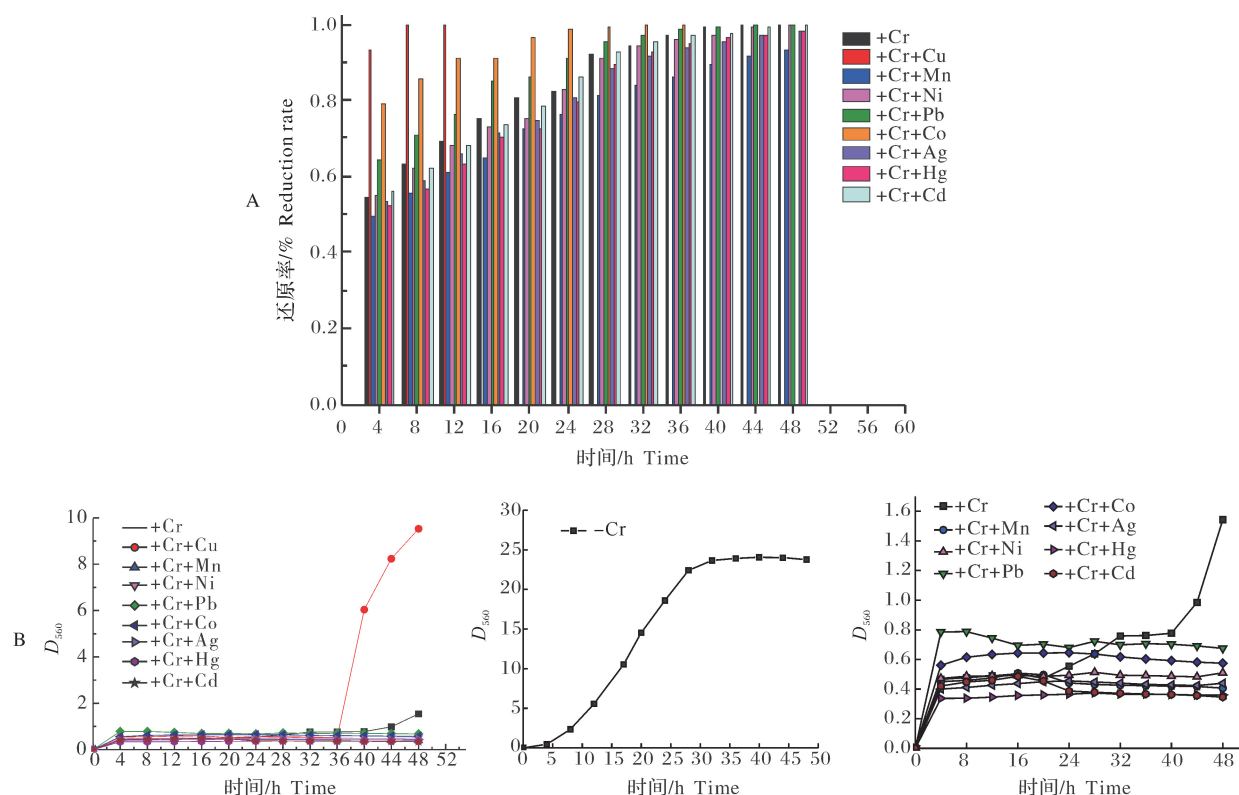


图9 不同重金属离子对Cr(VI)还原率(A)和菌株生长(B)的影响

Fig.9 Effect of different heavy metal ions on Cr(VI) reduction rate (A) and strain growth (B)

VKM Y-1352 和 *P. guilliermondii* VKM Y-1353 等<sup>[20]</sup>相比,*P. guilliermondii* ZJH-1 对 Cr(VI) 的耐受性以及还原 Cr(VI) 的效率方面具有一定的优势,并且在多种重金属污染的水环境中具有良好的应用潜力。

酵母菌在耐铬性和铬富集方面是一个非常异质的群体,似乎进化出多种重金属吸收和代谢机制。因此,关于菌株 ZJH-1 对 Cr(VI) 的耐受性及最佳还原条件的研究对于酵母菌吸附六价铬的机制探究具有很高的科学价值。在实验室模拟和环境污染控制的实践中,酵母生物修复过程的复杂性仍然是一个具有挑战性的课题。

## 参考文献 References

- [1] MALAVIYA P, SINGH A. Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters[J]. Critical reviews in microbiology, 2016, 42(4): 607-633.
- [2] BARRERA C E. A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction[J]. Journal of hazardous materials, 2012, 223/224(2): 1-12.
- [3] SHAHID M, SHAMSHAD S, RAFIQ M, et al. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: a review[J]. Chemosphere, 2017, 178: 513-533.
- [4] ABOLGHASEM H, SILVIA C M, GITI E, et al. Bioremedi-

ation of chromium contaminated water by diatoms with concomitant lipid accumulation for biofuel production[J]. Journal of environmental management, 2018, 227: 313-320.

- [5] GUPTA P, KUMAR V, USMANI Z, et al. Phosphate solubilization and chromium (VI) remediation potential of *Klebsiella* sp. strain CPSB4 isolated from the chromium contaminated agricultural soil[J]. Chemosphere, 2018, 192: 318-327.
- [6] ADAMO G M, BROCCA S, PASSOLUNGHU S, et al. Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains[J/OL]. Microbial cell factories, 2012, 11, 1[2019-09-21]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-1>.
- [7] HOSINER D, GERBER S, LICHTENBERG-FRATE H, et al. Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1)[2019-09-21]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083330>.
- [8] MARTORELL M M, FERNÁNDEZ P M, FARINA J I, et al. Cr(VI) reduction by cell-free extracts of *Pichia jadinii* and *Pichia anomala* isolated from textile-dye factory effluents[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2012, 71: 80-85.
- [9] SINGH P, RAGHUKUMAR C, PARVATKAR R R, et al. Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the central Indian Basin [J]. Yeast, 2013, 30(3): 93-101.
- [10] FERNÁNDEZ P M, VINARTA S C, BERNAL A R, et al. Bioremediation strategies for chromium removal: current research, scale-up approach and future perspectives[J]. Chemo-

- sphere, 2018, 208; 139-148.
- [11] ILYAS S, REHMAN A, ILYAS Q. Heavy metals induced oxidative stress in multi-metal tolerant yeast, *Candida* sp. PS33 and its capability to uptake heavy metals from wastewater[J]. Pakistan journal of zoology, 2017, 49(3): 769-775.
- [12] BANKAR A, ZINJARDE S, SHINDE M, et al. Heavy metal tolerance in marine strains of *Yarrowia lipolytica* [J]. Extremophiles, 2018, 22(4): 617-628.
- [13] KSHEMINSKA H P, HONCHAR T M, GAYDA G Z, et al. Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures [J]. Central European journal of biology, 2006, 1(1): 137-149.
- [14] KSHEMINSKA H, JAGLARZ A, FEDOROVYCH D, et al. Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*; toxicity and accumulation of Cr (Ⅲ) and Cr (Ⅵ) and the influence of riboflavin on Cr tolerance[J]. Microbiological research, 2003, 158(1): 59-67.
- [15] BIBO L, BINHUI Y, QINGLIN L, et al. Characterization of *Penicillium oxalicum* SL2 isolated from indoor air and its application to the removal of hexavalent chromium[J/OL]. PLoS One, 2018, 13(1) [2019-8-13]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0191484>.
- [16] 国家环保局本书编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2015. National Environmental Protection Agency book editorial board. Water and wastewater monitoring and analysis methods[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2015(in Chinese).
- [17] BARRIA C, MALECKI M, ARRAIANO C M. Bacterial adaptation to cold[J]. Microbiology, 2013, 159(12): 2437-2443.
- [18] ARIVALAGAN P, SINGARAJ D, HARIDASS V, et al. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*[J]. Ecological engineering, 2014, 71: 728-735.
- [19] SHI Y, CHAI L, YANG Z, et al. Identification and hexavalent chromium reduction characteristics of *Pannonibacter phragmitetus*[J]. Bioprocess and biosystems engineering, 2012, 35(5): 843-850.
- [20] KSHEMINSKA H, FEDOROVYCHET D, BABYAK L, et al. Chromium (Ⅲ) and (Ⅵ) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera [J]. Process biochemistry, 2004, 40(5): 1565-1572.

## Reduction characteristics of Cr(Ⅵ) by *Pichia guilliermondii*

HAO Kongli, ZHANG Zihui, WANG Shanshan, ZHANG Jie

Key Laboratory of Saline-Alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education /  
College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract** A strain of yeast ZJH-1 capable of reducing Cr(Ⅵ) was isolated and screened from the intestinal juice of *Plodia interpunctella* (Hübener) larvae polyethylene plastic. The results of morphological characteristics and molecular biological identification indicated that the strain is *Pichia guilliermondii*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Cr(Ⅵ) was 17 mmol/L. Under the condition of 50 mg/L Cr(Ⅵ), the MIC of other heavy metals was Cu(Ⅱ) 13 mmol/L, Pb(Ⅱ) 6 mmol/L, Ag(Ⅰ) 4 mmol/L, Mn(Ⅱ) 16 mmol/L, Ni(Ⅱ) 3 mmol/L, Co(Ⅱ) 3 mmol/L, Cd(Ⅱ) 0.9 mmol/L and Hg(Ⅱ) 0.2 mmol/L. The effects of temperature, pH, inoculum size, electron donor and different heavy metal ions on Cr(Ⅵ) reduction rate was investigated by Cr(Ⅵ) reduction rate. The results showed that the optimal pH and temperature of strain ZJH-1 for reducing Cr(Ⅵ) were 9.0 and 40 °C in yeast leachate glucose liquid medium (YPD). Under optimal conditions, the inoculum was 8%. When Cr(Ⅵ) is the best, the reduction rate of Cr(Ⅵ) is 100% within 48 h when glucose is used as the electron donor. The strain contains Cu(Ⅱ) in the culture solution containing different heavy metal ions. Except for Pb(Ⅱ) and Co(Ⅱ), both the growth ability and ability of strain ZJH-1 to reduce Cr(Ⅵ) were inhibited. The order of inhibition was Mn(Ⅱ) > Hg(Ⅱ) > Ag(Ⅰ) > Ni(Ⅱ) > Cd(Ⅱ). The result of a preliminary study on the ability of strain ZJH-1 to reduce Cr(Ⅵ) showed that strain ZJH-1 has good application potential in the remediation of Cr(Ⅵ) pollution.

**Keywords** *Pichia guilliermondii*; Cr(Ⅵ); heavy metal; pollution remediation; minimum inhibitory concentration; chromium-reducing bacteria

(责任编辑: 张志钰)