

# 深海抗铬( )细菌的分离、鉴定及其 铬( )还原能力的研究

裴耀文<sup>1,2</sup>, 骆祝华<sup>1,2</sup>, 黄翔玲<sup>1,2</sup>, 王琳<sup>1,2</sup>, 叶德赞<sup>1,2\*</sup>

(1 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2 国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

关键词: 铬; 抗铬( )细菌; 16S rRNA; 深海沉积物; 太平洋

中图分类号: P578.8 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2004)02-0140-09

## 1 引言

随着采矿业的发展和重金属在工农业等诸多领域的应用, 排放到环境中的含重金属离子的废水大大增加. 重金属进入环境后不能被生物降解而只能发生各种形态间的相互转化和迁移, 当被低等生物富集后, 通过食物链进入人体, 破坏生物体正常的生理代谢活动, 危害人体健康. 业已发现, 许多微生物能在较高浓度的金属离子环境中生存, 并解除重金属对自身的毒害<sup>[1]</sup>, 这一点可被应用于金属污染环境的生物修复和贵重金属的生物沥滤等方面.

铬是一种毒性较高的重金属, 自然环境中通常以六价和三价两种价形态存在. 六价铬主要是与氧结合成铬酸盐或重铬酸盐, 这种高氧化态和可溶性导致高的迁移能力和毒性, 其毒性可通过食物链传递<sup>[2]</sup>, 对人体有突变和致癌作用. 三价铬易于形成氧化物或氢氧化物沉淀而使其毒性减弱<sup>[3]</sup>. 通常认为六价铬的毒性比三价铬的毒性高 100 倍<sup>[4]</sup>. 已经发现很多的微生物对金属铬尤其对六价铬有抗性, 它们当中有些可以把铬从高毒的六价还原成低毒的三价, 具有巨大的应用潜力.

对于大肠杆菌, 铬酸根离子( $\text{CrO}_4^{2-}$ )的最小抑制浓度<sup>[5]</sup>(minimal inhibitory concentration)为  $0.2 \text{ mol}$ , 相当于铬( )  $10.4 \text{ mg/dm}^3$ , 一般抗铬水平高于此浓度的微生物才被称为抗性微生物<sup>[5]</sup>. 许多研究者指出微生物对六价铬的抗性和还原是两个互不相关的过程, 两者有着不同的机理<sup>[6]</sup>. 研究发现抗铬( )能力较高的抗性菌不一定能还原高浓度的铬( ), 铬( )还

收稿日期: 2002-08-20; 修订日期: 2002-10-24.

基金项目: 973 国家重点基础研究专项经费资助项目(G2000078504); 中国大洋矿产研究开发协会资助项目(DY105-02-03)

作者简介: 裴耀文(1980), 男, 山东省泰安市人, 硕士研究生, 从事海洋微生物学研究.

\* 通讯作者, E-mail: yedezan@public.xm.fj.cn

原菌又往往不能抵抗较高浓度的铬( )。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) LB300 菌株是第1个被发现对六价铬有还原作用的菌株<sup>[7]</sup>,它可将  $28.6 \text{ mg/dm}^3$  的铬( )较彻底还原<sup>[8]</sup>。之后更广泛的还原菌被发现,如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)<sup>[9]</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 33456<sup>[10]</sup>等,但均是在铬( )的较低浓度水平上。抗铬细菌如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAOI 可在含  $208 \text{ mg/dm}^2$  铬( )的肉汁培养基上生长<sup>[11]</sup>,但没有在此浓度下还原铬( )。

从海洋中筛选到7株抗铬细菌进行研究,并对其中1株分离自太平洋深海的Y1菌株进行了抗铬水平、生长状况、生理生化特征和对六价铬的还原能力的初步考察,利用16S rRNA序列分析法对其进行了鉴定。

## 2 材料和方法

### 2.1 样品采集

自太平洋、白令海、楚科奇海各站点采集海洋样品

### 2.2 抗铬菌株的分离和筛选

#### 2.2.1 底质用无菌生理盐水按1:10的比例稀释制成悬液,海水样品直接使用

以1:10比例加入到含铬( )( $20 \text{ mg/dm}^3$ )的液体选择培养基中富集,之后经适当稀释,固体平板涂布法分离<sup>[4]</sup>。温度条件为  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

PYG海水培养基:蛋白胨为  $10.0 \text{ g}$ ,酵母提取物为  $5.0 \text{ g}$ ,葡萄糖为  $1.0 \text{ g}$ ,盐度为34的海水  $1.0 \text{ dm}^3$ ,重铬酸钾(灭菌后根据所需浓度加入),琼脂为  $15.0 \text{ g}$ ,pH 6.8~7.0。

#### 2.2.2 以上分离得到的抗铬菌对递增铬(六价)浓度的抗性作初步比较

以液体静置培养的方式在不同的六价铬浓度( $20, 40, 60, 80 \text{ mg/dm}^3$ )下,对各菌株的抗铬能力进行测定,以生长能力比值为标准:(加铬)选择培养基中菌体达到的最高浓度除以(无铬)对照培养基中菌体达到的最高浓度乘以100%。

菌体浓度用比浊法测定<sup>[4]</sup>。

### 2.3 抗铬菌株抗性水平及其还原铬( )能力的试验

从上一步中筛选出抗铬能力最高的菌株,继续在六价铬的更高浓度( $200, 400, 600 \text{ mg/dm}^3$ 等)条件下测试其抗性水平,并动态测定对六价铬还原的情况(培养液经  $8000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ 后取上清液)。

#### 2.3.1 微生物生长的测定

用平板菌落计数法<sup>[12]</sup>。

#### 2.3.2 六价铬及总铬浓度的测定

用二苯碳酰二肼分光光度法、高锰酸钾氧化-二苯碳酰二肼分光光度法<sup>[13]</sup>。

### 2.4 抗铬菌株的生理生化特征

在Biolog 96孔平板上,除对照孔外的95孔中,每孔都含有 tetrazolium violet 缓冲营养培养基和不同碳源,用待测菌株的海水细胞悬液注入微孔中,培养24 h后利用  $595 \text{ nm}$  波长的光测定其对不同碳源底物的利用情况。

## 2.5 抗铬菌株的分子鉴定

### 2.5.1 细菌染色体 DNA 制备

将菌株转接至 2216E 培养基中,在 4 培养.待长出单菌落后,用灭菌牙签点取少量菌体至无菌重蒸水中,99 加热,裂解菌体,释放细菌染色体 DNA,作为 16S rRNA 基因的 PCR 扩增模板.

### 2.5.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和产物纯化

根据大肠杆菌的基因组序列设计出了多对用于 16S rRNA 序列扩增的引物,选用了其中的 27f(5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3',对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 8~27 位)和 1542r(5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3',对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 1525~1542 位)进行扩增,该对引物几乎能够扩增出全长的 16S rRNA 序列,长度约为 1500 bp.

在 50 mm<sup>3</sup> PCR 反应液中含有: 10 PCR 缓冲液 5 mm<sup>3</sup>, 2 mmol dNTP 5 mm<sup>3</sup>, Taq DNA 聚合酶 8 unit, 25 mmol MgCl<sub>2</sub> 2.5 mm<sup>3</sup>, 引物各 2 mm<sup>3</sup>, 模板 20 mm<sup>3</sup>, 重蒸水 9.5 mm<sup>3</sup>. 反应条件为: 94 1 min, 55 1 min, 68 1.5 min, 循环 40 次, 68 延伸 10 min. PCR 产物经低熔点琼脂糖电泳检测,用玻璃粉纯化法从胶上回收纯化.

### 2.5.3 PCR 产物克隆<sup>[14]</sup>

pBluescript 质粒经 *EcoR* 完全酶切后去磷酸化,与经末端磷酸化后的 PCR 产物混合,加入 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16 连接过夜(约 12 h). 连接产物转化到 *E. coli* 感受态细胞中,通过蓝白斑筛选,挑选阳性转化菌.

### 2.5.4 阳性转化菌的鉴定

用灭菌牙签挑取筛选平皿上的白色菌落,在 10 mm<sup>3</sup> 无菌水中打匀,99 加热 15 min,裂解液直接作为模板,采用 pBluescript 质粒上的 T7 和 T3 引物进行菌落 PCR. PCR 反应条件为: 94 1 min, 53 1 min, 72 1.5 min, 循环 30 次, 72 延伸 10 min, PCR 产物用琼脂糖电泳检测.

提取经 PCR 扩增验证后的转化菌的质粒,通过 *EcoR* 和 *Hind* 完全双酶切进行进一步验证,两步验证中均能产生 1500 bp 左右片段的为阳性转化菌. 将插入了 16S rRNA 基因的质粒送至上海基康生物技术有限公司进行测序.

### 2.5.5 序列分析

通过互联网,将序列提交 EMBL(欧洲分子生物学实验室)数据库,应用 FASTA3 程序与数据库中已有的细菌 16S rRNA 序列进行相似性比较分析. 序列的比较及系统发育分析采用 DNAMAN(Version 5.1)软件进行.

## 3 结果和分析

### 3.1 抗铬菌株的分离与筛选

经液体富集培养后,分别从太平洋、白令海、楚科奇海分离到能在铬( )浓度为 20 mg/dm<sup>3</sup> 条件下良好生长的菌株共 7 株,分别编号为 Y1 到 Y7,菌株来源见表 1.

## 3 2 各抗铬菌对递增铬( )浓度的抗性结果(表 1)

表 1 抗铬菌株抗性水平初步比较

菌株号	菌株来源	经度	纬度	水深/m	铬( )浓度/mg dm <sup>-3</sup>			
					20	40	60	80
Y1	太平洋	145 21 2 W	8 20 5 N	5 291	+++	+++	+++	+++
Y2	太平洋	145 21 2 W	8 20 5 N	5 291	++	+	+	
Y3	太平洋	145 21 2 W	8 20 5 N	5 291	+	+		
Y4	太平洋	154 05 W	10 50 N	5 194	+++	+++	++	+
Y5	白令海	178 55 6 E	57 59 0 N	3 800	++	++		
Y6	白令海	179 25 8 W	60 15 2 N	840	+++	++	+	
Y7	楚科奇海	169 52 9 W	66 30 2 N	51	++	++	+	

注: +++ 代表生长能力比值不小于 90%, ++ 代表不小于 50%, + 代表不小于 10%, - 代表不大于 10%.

## 3 3 Y1 菌株抗性水平及其还原铬( )能力的试验

在以上实验基础上,选择 Y1 菌株从较高的菌体浓度( $10^9$  个/cm<sup>3</sup>)出发,继续在铬( )更高浓度下测定其抗性水平及还原铬( )能力,结果如图 1. 在铬( )更高浓度为 200 mg/dm<sup>3</sup> 时,菌体浓度可以继续升高至  $6.7 \times 10^9$  个/cm<sup>3</sup>,之后铬( )可以被其较为彻底的还原(97%). 当 400 mg/dm<sup>3</sup> 时,菌体浓度首先下降,然后缓慢升高至  $2.3 \times 10^9$  个/cm<sup>3</sup>,铬( )不能被还原. 600 mg/dm<sup>3</sup> 时,菌体浓度持续下降,最终在固体平板上不能检测到活菌的存在,铬( )不能被还原.

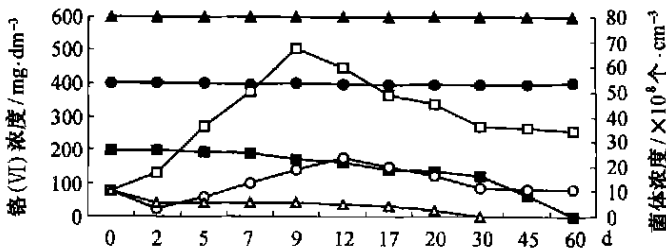


图 1 不同铬( )浓度下菌株 Y1 的抗性及其还原能力

, 200 mg/dm<sup>3</sup> 铬( ); , 400 mg/dm<sup>3</sup> 铬( ); , 600 mg/dm<sup>3</sup> 铬( )  
空心代表菌体浓度变化, 实心为铬( )的变化

对 200 mg/dm<sup>3</sup> 铬( )培养液中接种 Y1 菌株前后的六价铬和总铬含量进行测定, 结果如表 3

表 2 200 mg/dm<sup>3</sup> 铬( )培养液中六价铬和总铬含量变化情况

	六价铬(%)	总铬(%)
接种前培养液	100	100
接种 1 d 后未离心培养液	100	100
接种 1 d 后离心后上清液	100	100
接种 60 d 后未离心培养液	4	100
接种 60 d 后离心后上清液	1	25

### 3.4 培养条件对 Y1 菌株生长及铬(VI)还原的影响研究

#### 3.4.1 振荡培养的影响

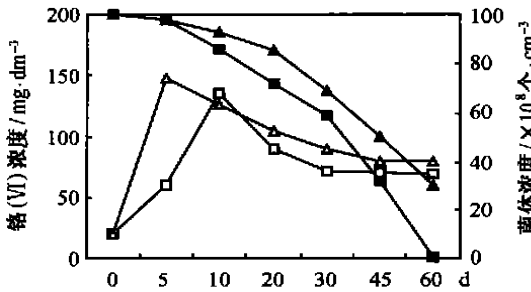


图2 振荡培养对菌株 Y1 生长和还原的影响  
□, 静止培养; △, 振荡培养  
空心代表菌体生长, 实心为铬(VI)的变化

在 4 ℃ 下以摇床振荡培养(150 r/min)与静止培养相对照, 结果如图 2. 从图中可以看出, 振荡培养加速了菌体的生长速度, 但却抑制了铬(VI)还原.

#### 3.4.2 温度的影响

Y1 菌株的自然生长环境温度为 1~5 ℃. 在不同温度条件下(4, 10, 20, 37, 40 ℃)进行静止培养, 结果表明, 能够生长的温度范围较宽, 在 4~37 ℃ 范围内均能良好生长, 在 40 ℃ 不能生长. 20 ℃ 左右时菌体生长速率最高, 在 10 和 37 ℃ 次之, 在 4 ℃ 较低; 菌体能够达到的最大

生长量除在 37 ℃ 较低外在 4, 10, 20 ℃ 相差不多; 对数生长期后温度对铬(VI)还原影响不大.

#### 3.4.3 培养基起始 pH 值的影响

在 4 ℃ 下以不同的 PYG 培养基初始 pH(4, 7, 10)对 Y1 菌株进行静止培养, 3 组中菌体生长能够达到的最高生长量为 100%, 以生长量(%)和铬(VI)的最终还原率(%)为标准进行检测, 结果如图 4. pH 值为 4 时, 菌体不能生长, 但铬(VI)的最终还原率为 50%. pH 值为 10 时, 菌体最高生长量为中性时的 25%, 铬(VI)没有被还原.

#### 3.4.4 培养基盐度的影响

在 4 ℃ 下以不同的 PYG 培养基盐度(0, 27, 34)对 Y1 菌株进行静止培养, 3 组中菌体生长能够达到的最高生长量为 100%, 以生长量和铬(VI)的最终还原率为标准进行检测, 结果如图 5. 盐度 34 时的培养基中菌体生长量最高, 盐度 0 时, 菌体不能生长. 盐度 27 时, 菌体最高生长量是盐度 34 时的 88%, 铬(VI)的最终还原率为 85%.

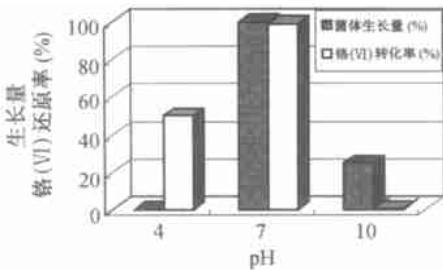


图4 初始 pH 值的影响

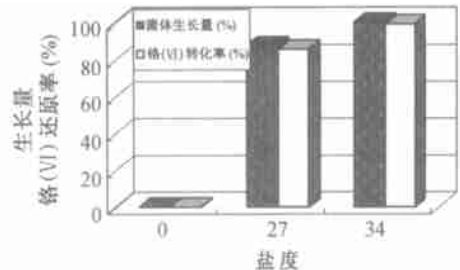


图5 盐度的影响

### 3.5 Y1 菌株的特征和生理生化特征

Y1 菌株在 PYG 培养基上为灰白色的圆形光滑菌落, 表面湿润, 稍黏. 革兰氏染色为阴性, 氧化酶阳性, 油镜下为短杆状. 表 3 显示了 Y1 菌株对 Biolog 板上 95 种碳源底物的利用能力. 在 Biolog 自动鉴定系统中没有发现与该菌株生理生化特征相类似的菌株.

表3 Y1菌株对Biolog板上95种碳源底物的利用能力

底物	利用状况	底物	利用状况	底物	利用状况	底物	利用状况
海水	-	D- 蜜二糖	-	P- 羟基苯基丙氨酸	-	L- 组氨酸	+
- 环式糊精	-	- 甲基- D- 葡糖苷	+	衣康酸	-	羟基- L- 脯氨酸	-
糊精	-	D- 阿洛酮糖	-	- 丁酮酸	-	L- 亮氨酸	-
糖原	-	D- 蜜三糖	+	- 酮戊二酸	+	L- 鸟氨酸	-
吐温 40	+	L- 鼠李糖	+	D, L- 酮戊酸	+	L- 苯丙氨酸	-
吐温 80	+	D- 山梨糖醇	+	乳酸	+	L- 脯氨酸	+
N- 乙酰- D- 半乳糖胺	-	蔗糖	-	丙二酸	-	L- 焦谷氨酸	-
N- 乙酰- D- 葡糖胺	-	D- 海藻糖	-	丙酸	-	D- 丝氨酸	-
核糖醇	-	松二糖	-	奎尼酸	-	L- 丝氨酸	+
L- 阿拉伯糖	-	木糖醇	-	D- 葡糖二酸	-	L- 苏氨酸	+
D- 阿拉伯糖醇	-	丙酮酸甲酯	-	癸二酸	-	D, L- 肉毒碱	-
纤维二糖	-	琥珀酸甲酯	+	琥珀酸	-	- 氨基- 丁酸	+
i- 赤藓糖醇	-	乙酸	-	溴琥珀酸	-	尿刊酸	-
D- 果糖	-	顺乌头酸	-	琥珀酰胺酸	+	肌苷	-
L- 岩藻糖	+	柠檬酸	-	葡糖醛酰胺	+	尿苷	-
D- 半乳糖	+	甲酸	-	丙氨酰胺	-	胸腺嘧啶	-
龙胆二糖	-	D- 半乳糖酸内酯	-	D- 丙胺酸	+	苯基乙胺	-
- D- 葡萄糖	+	D- 半乳糖醛酸	-	L- 丙胺酸	+	丁二胺	-
m- 肌醇	-	D- 葡糖酸	-	L- 丙氨酰甘氨酸	+	2- 乙烯醇	-
- D- 乳糖	-	D- 氨基葡糖酸	-	L- 天冬酰胺	+	2, 3- 丁二醇	-
半乳糖苷果糖	-	D- 葡糖醛酸	+	L- 天冬氨酸	+	甘油	-
麦芽糖	-	- 羟基丁酸	+	L- 谷氨酸	+	D, L- - 磷酸甘油	-
D- 甘露糖醇	-	- 羟基丁酸	+	甘氨酸- L- 天冬氨酸	-	葡萄糖- 1- 磷酸	-
D- 甘露糖	+	- 羟基丁酸	-	甘氨酸- L- 谷氨酸	-	葡萄糖- 6- 磷酸	-

注: + 表示可利用, - 表示不能利用, 表示可微弱利用。

### 3.6 序列分析结果

将所测得的序列通过互联网输入 EMBL 数据库, 以 FASTA3 程序进行比较分析, 根据序列同源性比较所得的结果表明: 该菌株与 *Psychrobacter pacificensis* 种的 NIBH P2K17 菌株的 16S rRNA 序列同源性最高, 达 98.935%, 与另外 3 株 *Psychrobacter pacificensis* 种菌株同源性也在 98% 以上。

## 4 讨论

(1) 微生物对环境中重金属的去除有生物吸附、螯合作用及酶促的氧化还原反应等多种机制, 对于可溶性较高的铬( ), 其方式则主要是后者。因铬( )和铬( )是铬在自然界的主要存在形式, 结合文中表 2, 可以认为:

菌体对铬( )的吸附作用不显著(接种 1 d 后培养液中铬( )和总铬含量均未有明显变化); Y1 菌株培养过程中对铬( )发生了还原作用[培养 60 d 后未离心的培养液中铬( )含量减少了 96%, 但其中总铬含量并未降低], 产生的铬( )大部分成为沉淀形式, 小部分还在培

养液中[离心后上清液中铬( )含量减少了 99%, 其中的总铬也变为离心前的 25% ]。

Y1 菌株对六价铬的去除作用主要发生在该菌株的稳定生长期, 当初总铬( )浓度小于  $200 \text{ mg/dm}^3$  时, 稳定期的菌体浓度维持在  $3.0 \times 10^9 \text{ 个/cm}^3$  以上, 与 Wang<sup>[15]</sup> 指出的所有六价铬还原系统都需要较高的细胞浓度相一致, 这也说明铬( )的去除发生在一定的代谢阶段, 与细胞的物质和能量代谢有关。Y1 菌株还原铬( )的具体机理还有待进一步研究。

(2) Malakul 等<sup>[16]</sup> 研究了恶臭假单胞菌在不同镉浓度的液体矿物培养基上的生长状况, 并指出镉对它的毒性可分为 3 个阶段: 1) 无抑制作用; 2) 部分抑制; 3) 完全抑制。本试验筛选到的 Y1 菌株也较清晰的显示出了这 3 个阶段。

(3) 文中提到抗铬( )能力较高的抗性菌不一定能还原高浓度的铬( ), 铬( )还原菌又往往不能抵抗较高浓度的铬( ), Y1 菌株的价值在于在抗高浓度铬( )的基础上还能够将其较彻底的还原。Y1 菌株分离自太平洋 5 291 m 水深的浅褐色硅藻泥, 显示出海洋这个巨大的微生物资源库的开发应用潜力, 海洋金属转化菌的发现对于评价海洋生态环境, 了解微生物在海洋的生物地球化学循环中的作用, 揭示海洋环境的成因都有着重要的意义。抗重金属菌株在微生物治理重金属污染中有巨大的应用潜力, Y1 菌株的分离鉴定将为进一步克隆与还原六价铬有关的基因和构建治理多种重金属污水的环保工程菌株奠定了基础。

(4) 培养条件对 Y1 菌株生长及铬( )还原的影响试验表明:

1) Y1 菌株原始生长环境的温度为  $1 \sim 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 但其可生长的温度范围很宽, 从  $4$  到  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  均能生长, 最适生长温度为  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  左右。尽管人们研究低温微生物已经有 100 多年, 但关于低温微生物还没有一个统一明确的概念。有些研究者根据微生物的最适生长温度以及生长的上下限温度来进行定义, 如 Morita 将那些最适生长温度等于或低于  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ , 上限温度等于或低于  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 下限生长温度等于或低于  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  的微生物称为嗜冷菌(psychrophile)。Eddy 将那些能在低于或等于  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  的温度条件下生长(无论其最适及上限生长温度是多少)的微生物称为营养型嗜冷菌(psychrotroph)。李广武等<sup>[17]</sup> 将 Morita 定义的嗜冷菌称为专性嗜冷菌, 将除专性嗜冷菌之外的其他营养型嗜冷菌称为兼性嗜冷菌。由此, 可断定该菌为一株兼性嗜冷菌。

2) pH 值影响重金属与微生物间相互作用可能通过 3 种途径影响细胞的生理状态, 改变金属存在的状态, 影响培养基有机成分与金属的络合<sup>[18]</sup>。Y1 菌株可在中性至稍碱的条件生长, 而酸性条件下铬( )的还原是由于其氧化还原性所致, 即酸性溶液中铬酸盐和重铬酸盐很容易被还原到铬( )<sup>[3]</sup>。

3) 海洋生态环境与陆地生态环境存在很大差异, NaCl 浓度即盐度是一个重要特征, 盐度影响的试验结果与 Y1 菌株的来源密切相关, 该菌株分离自太平洋深海沉积物, 它只能在海水环境中生存, 不能在不含 NaCl 的淡水环境中生存, 且更适宜在盐度较高(34)的深海环境中生长。鉴于此, 可以确定此菌株是原生的深海微生物而不是由陆生菌流入海洋, 也排除了试验过程中染菌的可能。3 种环境条件对铬( )还原的影响则主要是通过对菌体生长的影响间接地起作用。

4) 铬( )还原的最佳条件并不完全与细菌的最佳生长条件相符, 从振荡培养对两者影响的结果可以发现, 振荡培养加速菌体的生长, 而对于铬( )还原则是一个抑制因素, 振荡培养加大了氧气通量, 氧气加速了嗜养菌的生长, 而对于铬( )还原的抑制作用可能是升高了氧化还原电势或是氧气直接与铬( )争夺电子所致, 这一结果与 Wang<sup>[15]</sup> 指示的相符。

(5) 16S rRNA 序列分析法是近 10 a 发展起来的一种分子指纹技术, 广泛应用于分子系统发育分类学研究。rRNA 结构既具有保守性, 又具有高变性。保守性能够反映生物物种的亲缘关系, 为系统发育重建提供线索; 高变性则能揭示出生物物种的特征核苷酸序列, 是属种鉴定的分子基础。国际上已建立了多个微生物 16S rRNA 序列数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统。通过待鉴定菌与基因库中已知种属的 16S rRNA 序列作同源性比较, 可以鉴定到种的水平<sup>[19]</sup>。Y1 菌株的 16S rRNA 序列分析结果表明, 它与 *Psychrobacter pacificensis* 种的 NIBH P2K17 菌株的 16S rRNA 序列同源性达 98.935%。

Biolog 自动鉴定系统能够同时提供被测菌对 Biolog 板上 95 种碳源底物的利用能力数据, 并根据这些代谢指纹与其数据库中的 1500 多种细菌鉴定信息进行比较来鉴定细菌, 但其数据库中已知菌种还有待扩充。由于被测菌种来源和发表较晚等原因, 研究中利用 Biolog 技术没有找到代谢指纹相似性较高的菌种, 但可以将这些数据运用于其他鉴定方法的结果验证中。如 Y1 菌株与 *Psychrobacter pacificensis* 都能利用组氨酸、乳酸、3-羟基丁酸, 而不能利用柠檬酸、葡糖酸等。

*Psychrobacter pacificensis* 是 Maruyama 等<sup>[20]</sup>在 2000 年通过系统发育分析方法发现的一个嗜冷菌新种, 它来自日本海沟 5 000~6 000 m 处的深海区, 6 株原始菌株的 16S rRNA 序列同源性小于 98% (小于 Y1 菌株与 P2K17 菌株的 98.935% 同源性)。Y1 菌株的特征与 Maruyama 的描述相一致, 最适宜 NaCl 浓度在 3% 左右而受限于淡水环境。由此可以初步认为 Y1 菌株属于 *Psychrobacter pacificensis* 种。

## 参考文献:

- [1] 林稚兰, 田哲贤. 微生物对重金属的抗性及其解毒机理[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 36-39.
- [2] 匡世焕, 张福绥. 铬<sup>6+</sup>对海湾扇贝早期发育的影响[J]. 海洋学报, 1996, 18(1): 84-90.
- [3] 王. 生命科学中的微量元素(下)[M]. 北京: 中国计量出版社, 1992: 354-356.
- [4] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 157.
- [5] NIES DH. Microbial heavy-metal resistance[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(6): 730-750.
- [6] OHTAKE H, CERVANTES C, SILVER S. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid[J]. J Bacteriol, 1987, 169: 3853-3856.
- [7] BOPP L H, EHRLICH H L. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300[J]. Arch Microbiol, 1988, 155: 4426-4431.
- [8] DELEO P C, EHRLICH H L. Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB300 in batch and continuous cultures[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 40: 756-759.
- [9] ISHIBASHI Y, CERVANTES C, SILVER S. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*[J]. Appl Environ Microbiol, 1990, 56: 2268-2270.
- [10] SHEN H, WANG Y. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 3771-3777.
- [11] CERVANTES C, OHTAKE H, CHU L, et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505[J]. J Bacteriol, 1990, 172: 287-291.
- [12] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 65-67.
- [13] 国家海洋局. 海洋监测规范[S]. 北京: 海洋出版社, 1991: 347-349.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1998: 672-691.



- [15] WANG Y T, SHEN H. Bacterial reduction of hexavalent chromium[J]. J Ind Microbiol, 1995, 14: 159-164.
- [16] MALAKUL P, SRINIVASAN KR, WANG HY. Metal toxicity reduction in naphthalene biodegradation by use of metal chelating adsorbents[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11): 4610-4613.
- [17] 李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 112-114.
- [18] 李永祺, 丁美丽. 海洋污染生物学[M]. 北京: 海洋出版社, 1991. 343-349.
- [19] VANDAMME P, POT B, et al. Polyphasic taxonomy: a consensus approach to bacteria systematics[J]. Microbiol Reviews, 1996, 60: 407-438.
- [20] MARUYAMA, et al. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. Int[J]. J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 835-846.

## Isolation and identification of chromate-tolerant deep-sea bacteria and their chromate reduction capability

PEI Yaowen<sup>1,2</sup>, LUO Zhuohua<sup>1,2</sup>, HUANG Xiangling<sup>1,2</sup>,  
WANG Lin<sup>1,2</sup>, YE Dezan<sup>1,2</sup>

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources of State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Key words:** chromium; Cr(VI)-tolerant bacteria; 16S rRNA; deep-sea sediments; Pacific Ocean

勘误:

26 卷 1 期 40 页摘要的第 3 行 夏季平均含量为  $0.004 \text{ mol/dm}^3$ , 应为 夏季平均含量为  $0.04 \text{ mol/dm}^3$ .