

微生物还原五价钒的电子传递过程及其钒还原对藻类生长的影响

王丽丽, 周睿, 周雅琪, 司友斌

引用本文:

王丽丽, 周睿, 周雅琪, 司友斌. 微生物还原五价钒的电子传递过程及其钒还原对藻类生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(3): 516–526.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0544>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

钒胁迫对紫花苜蓿生长及钒积累与转移的影响

武振中, 杨金燕, 张有贤

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1198–1207 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1165>

Shewanella oneidensis MR-1 异化铁还原诱导次生矿物固定镉

童昆, 徐成, 吴峥, 司友斌

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2114–2123 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0496>

AQDS和腐植酸对微生物介导铁还原过程的影响

牛丹妮, 弓晓峰, 李远航, 孙玉恒, 舒瑶, 曾慧卿

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2733–2741 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0502>

球磨法合成钒基催化剂及其催化生物质制备甲酸

覃潇雅, 李佳璐, 丁永祯, 申锋

农业环境科学学报. 2021, 40(1): 211–218 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0863>

铁还原条件下铁负载生物质炭固定三价砷的能力及其稳定性

朱晓东, 杨敏, 吴松, 施维林, 周东美

农业环境科学学报. 2020, 39(12): 2735–2742 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0548>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王丽丽, 周睿, 周雅琪, 等. 微生物还原五价钒的电子传递过程及其钒还原对藻类生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(3): 516–526.

WANG L L, ZHOU R, ZHOU Y Q, et al. Electron transfer of microbial V(V) reduction and its effects on algae growth[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(3): 516–526.



开放科学 OSID

微生物还原五价钒的电子传递过程及其钒还原对藻类生长的影响

王丽丽, 周睿, 周雅琪, 司友斌*

(农田生态保育与污染防控安徽省重点实验室, 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘要:为探究微生物还原五价钒[V(V)]的机理,从钒污染土壤中筛选出一株V(V)还原菌,经鉴定为神户肠杆菌(*Enterobacter kobei* NC1-2),研究不同电子传递抑制剂和电子穿梭体对菌株NC1-2还原V(V)的电子传递过程的影响,以及V(V)微生物还原前后的毒性变化及其对藻类生长的影响。结果表明,当V(V)初始浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,培养3 d时菌株NC1-2对V(V)的还原率为90.3%。扫描电镜(SEM)结果显示菌株表面附着无定形物质,结合能量散射X射线谱(EDS)分析证实无定形物质中含有钒元素;X射线光电子能谱(XPS)分析表明菌株NC1-2将V(V)还原为V(IV)。电子传递抑制剂辣椒素、奎那克林和氯化铜能抑制菌株NC1-2对V(V)的还原;核黄素作为电子穿梭体可缩短电子传递距离,促进胞外电子传递,有利于V(V)的还原,进而加快菌株NC1-2对V(V)的还原。V(V)还原成V(IV)后毒性降低,减少了对小球藻*Chlorella pyrenoidosa*和斜生栅藻*Scenedesmus obliquus*的生长胁迫,两种藻生长96 h时的藻密度显著增加,且叶绿素a含量均有所提高,分别为 $17.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究表明,强化微生物还原V(V),能降低其对水生生物的毒性。

关键词:五价钒;钒还原菌;电子传递;小球藻;斜生栅藻

中图分类号:X172;X52 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2024)03-0516-11 doi:10.11654/jaes.2023-0544

Electron transfer of microbial V(V) reduction and its effects on algae growth

WANG Lili, ZHOU Rui, ZHOU Yaqi, SI Youbin*

(Anhui Province Key Laboratory of Farmland Ecological Conservation and Pollution Prevention, School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: To explore the mechanism of microbial V(V) reduction, a strain of *Enterobacter kobei* NC1-2 was isolated from vanadium-contaminated soil to investigate the effects of different electron transfer inhibitors and electron shuttles on the electron transfer process of V(V) reduction, as well as the changes in toxicity before and after microbial V(V) reduction and its effects on algal growth. The results showed that the reduction rate of V(V) by strain NC1-2 was 90.26% after 3 d of incubation at an initial V(V) concentration of $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Scanning electron microscopy showed that amorphous materials were attached to the surface of the strain, which was confirmed to contain vanadium by energy-scattering X-ray spectroscopy. Additionally, X-ray photoelectron spectroscopy analysis indicated that strain NC1-2 reduced V(V) to V(IV). Furthermore, the reduction of V(V) by strain NC1-2 was inhibited by the electron inhibitors capsaicin, quinacrine, and copper chloride. Conversely, riboflavin, acting as an electron shuttle, shortened the electron transfer distance and promoted extracellular electron transfer, thus facilitating the reduction of V(V) by strain NC1-2. The toxicity of V(V) decreased after its reduction

收稿日期:2023-07-10 录用日期:2023-11-25

作者简介:王丽丽(1997—),女,安徽六安人,博士研究生,从事环境生物技术研究。E-mail:2436834338@qq.com

*通信作者:司友斌 E-mail:youbinsi@ahau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(42077123)

Project supported: National Natural Science Foundation of China(42077123)

to V(IV), resulting in reduced growth stress to *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. Both algal species exhibited a significant increase in algal density after 96 h of growth and in chlorophyll a content at 17.4 and 15.8 mg·L⁻¹, respectively. This study demonstrates that enhanced microbial reduction of V(V) reduces its toxicity to aquatic organisms.

Keywords: pentavalent vanadium; vanadium-reducing bacteria; electron transfer; *Chlorella pyrenoidosa*; *Scenedesmus obliquus*

钒(V)是普遍存在于地壳中的过渡金属元素,具有良好的延展性、抗腐蚀性以及导电性被广泛应用于钢铁生产、航天航空、材料等领域^[1-3]。长期以来含钒合金钢的生产、钒矿的开采以及化石燃料的燃烧等人为活动造成环境中的钒污染严重^[4]。钒的毒性与其价态相关,化合价越高毒性越强,V(V)毒性最大且迁移性强。研究表明,人体暴露于高剂量钒后可能会损害人体肾脏及中枢神经系统^[5],导致生殖和发育异常^[6],长期累积会促使蛋白质变性以及干扰酶的运输,进而会诱发癌症的产生^[7]。相比物理法和化学法修复钒污染,微生物法因具有效率高、选择性强以及成本低等优点而受到研究者的广泛关注^[8-9]。

电子传递是微生物重要的代谢方式,其可以将胞内氧化有机物过程中产生的电子输出到胞外受体,实现了电子在胞内和胞外物质之间的高效传递并产生能量以维持微生物自身生长^[10-11]。电子传递主要有直接电子传递和间接电子传递两种方式,直接电子传递是通过胞外膜上的细胞色素c或纳米导线将电子传递至胞外受体,间接电子传递是由电子穿梭体如核黄素、吩嗪类等介导电子传递至电子受体^[12-13]。研究表明,V(V)还原与电子传递过程密切相关,并且V(V)和V(IV)能分别通过磷酸盐转运蛋白和阳离子通道进入细胞质^[14]。Myers等^[15]首次证明V(V)还原是由一个完整的电子传递链介导,该过程由细胞质膜成分(甲醌和细胞色素CymA)和外膜细胞色素OmcB、OmcA组成,并通过电子自旋共振谱证实溶液中的V(V)被还原为V(IV)。Carpentier等^[16]以钒酸盐为*Shewanella oneidensis* MR-1唯一电子受体,以乳酸为电子供体驱动厌氧钒呼吸。通过氧化脉冲实验发现钒酸盐还原过程中发生了质子跨细胞膜易位,并证实膜结合的甲醌和细胞色素c参与钒还原。在*Shewanella loihica* PV-4处理V(V)和Cr(VI)的复合污染中发现,含有细胞色素c的膜组分、可溶性蛋白质以及NADH的细胞质组分可能参与V(V)和Cr(VI)的还原,并且发现大多数Cr(VI)在细胞外被还原,而V(V)则倾向于通过细胞内过程被还原^[17]。

重金属对生物体的毒性评价一直是环境毒理领域的研究重点。藻类作为初级生产者,其易培养、繁

殖快、对重金属敏感,在较短时间内可得到重金属对藻类的毒性系数,是检测毒性效应的重要途径^[18]。在钒对藻类的毒性评价研究中,Shu等^[19]发现高浓度的钒抑制了小球藻*Chlorella vulgaris*的生长,Meisch等^[20]研究表明钒对小球藻*Chlorella pyrenoidosa*的细胞分裂具有毒性影响。Tambat等^[21]发现受钒胁迫的山梨小球藻*Chlorella sorokiniana* SU1和冈绿小藻*Picochlorum oklahomensis*会导致活性氧积累,抑制叶绿素的合成,还会产生膜脂过氧化等现象。

尽管一些具有V(V)还原功能的细菌被鉴定并分离出来,但钒还原菌如何在代谢过程中传递电子还原V(V)仍是值得探讨的问题。此外,关于微生物还原V(V)后产物的毒性研究较少。基于此,本研究采用筛选菌株*Enterobacter kobei* NC1-2,研究不同的电子传递抑制剂阻断电子传递链,以探讨菌株还原V(V)过程中的电子传递途径,并以核黄素为电子穿梭体探究其对菌株还原V(V)的影响,最后利用两种绿藻对菌株还原V(V)后的产物进行毒性评价,为利用微生物修复钒污染提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

药品:钒标准液,浓度1 000 mg·L⁻¹,购于国家标准物质检测中心;偏钒酸钠(NaVO₃),纯度≥99.5%;环乙二胺四乙酸(CyDTA),纯度99.5%;4-(2-吡啶)偶氮间苯二酚(PAR),纯度98%;核黄素(Riboflavin),纯度98%;奎那克林(Quinacrine Dihydrochloride),纯度98%;无水氯化铜(CuCl₂),纯度99.99%;N-乙酰-L-蛋氨酸(AcMet),纯度98.5%;辣椒素(N-Vanillylnonanamide),纯度97%;鱼藤酮(Rotentone),纯度98%;抗霉素A(Antimycin A),纯度98%。以上试剂均购于上海阿拉丁试剂有限公司。

试验菌种:供试菌株为本实验室从钒污染矿区土壤中分离筛选出的对钒具有较高抗性的*Enterobacter kobei* NC1-2^[22]。菌株NC1-2为一株革兰氏阴性菌,单菌落呈淡黄色,表面光滑湿润,边缘整齐。菌体呈现短棒状,周身有鞭毛。吡啶、甲基红、柠檬酸盐、鸟氨酸脱羧酶反应以及山梨醇、蔗糖、蜜二糖、过氧化氢酶

反应均为阳性,VP试验、淀粉水解为阴性。

菌悬液制备:将菌株 NC1-2 接种至固体培养基(胰蛋白胨 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母浸粉 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 置 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 完全厌氧条件下培养 24 h 。挑取单菌落接至营养肉汤培养基中(胰蛋白胨 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 牛肉浸粉 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 氯化钠 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 培养 24 h 后 $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集菌体, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS, $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH=7.0)冲洗3次再将其重悬于无菌 PBS 溶液中, 得到菌体浓度为 $10^8\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的单一菌悬液。

绿藻的来源和培养:蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)均购于中国科学院淡水藻种库, 编号分别为 FACHB-5 和 FACHB-13, 采用高温高压灭菌后的 BG11 培养基进行培养。

藻种培养条件:照度 $2\ 000\text{ lx}$, 明暗比 $12\text{ h}:12\text{ h}$, 温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。将小球藻和斜生栅藻分别培养至藻密度在 683 nm 和 690 nm 波长下光密度值为 $0.4\sim0.5$, 备用。

1.2 试验方法

初始 V(V) 浓度对菌株还原 V(V) 的影响:向灭菌后的 NB 培养基中加入不同剂量的 NaVO_3 储备液, 使溶液中 V(V) 浓度分别为 0 、 20 、 40 、 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 体系中初始接菌量为 $1\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, 于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 恒温振荡培养。使用无菌注射器在 0 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 d 和 7 d 内定期取样, 测定 OD_{600} 以及 V(V) 浓度。

电子传递抑制剂对 V(V) 还原的影响试验:选择辣椒素、奎那克林(浓度设置均为 5 、 10 、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), CuCl_2 、N-乙酰-L-蛋氨酸(浓度设置均为 25 、 50 、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 鱼藤酮(浓度设置为 0.1 、 0.5 、 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 抗霉素 A(浓度设置为 0 、 25 、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), V(V) 初始浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 细菌接种量 $1\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中避光培养。每个处理 3 次重复。

核黄素对 V(V) 还原的影响试验:以核黄素作为电子穿梭体, 设置核黄素浓度为 0 、 2.5 、 5 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 初始 V(V) 浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0, 细菌接种量 $1\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, 充氮气保证体系处于厌氧环境下, 在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温摇床中避光培养 48 h 测定 V(V) 的浓度。同时测定样品 OD_{600} 值以表征核黄素对菌株受钒胁迫下生长状况的影响。采用电化学循环伏安法表征核黄素对微生物还原 V(V) 的电子得失能力。

V(V) 还原对两种绿藻生长的影响试验:设置

V(V) 浓度为 $160\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 微生物接种量为 $1\times10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, 还原试验在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱中进行, 在第 0 天和第 7 天取样测定 V(V) 含量。菌株还原 V(V) 后对绿藻的毒性试验在 96 微孔板中进行, 在空白组和对照组中各加入培养至对数生长期的藻液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 对照组中依次加入 V(V) 还原产物溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 空白组中加入纯培养菌液离心过滤所得上清液 $100\text{ }\mu\text{L}$, 使孔内溶液总体积为 $200\text{ }\mu\text{L}$ 。将微孔板置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、照度 $2\ 000\text{ lx}$ 、明暗比为 $12\text{ h}:12\text{ h}$ 的人工气候箱中培养, 分别在 24 、 48 、 72 h 和 96 h 时取样, 用酶标仪测定 OD 值以表征绿藻生长情况。同时, 测定暴露 96 h 后藻体叶绿素 a 含量的变化。

1.3 分析测定方法

V(V) 测定:采用 4-(2-吡啶)偶氮间苯二酚分光光度法^[23]。绿藻叶绿素 a 含量测定:采取乙醇提取法, 取 10 mL 摇匀后的藻液置于离心管中, 在 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min , 弃上清液, 加入 5 mL 95% 的乙醇溶液, 超声破碎 20 min , 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。提取液于 24 h 后取出, 将其在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min , 取上清液测定其在 649 nm 及 665 nm 处的吸光度, 以 95% 乙醇做空白参比, 并计算绿藻叶绿素 a 含量。

V(V) 还原后溶液的循环伏安法分析:将待测样品用氮气曝气 20 min 后密封, 快速移至电化学三电极体系中测定(CHI-660E 型电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司)。工作电极:玻碳电极;对电极:铂丝电极;参比电极:饱和甘汞电极。扫描范围为 $-0.8\sim0.8\text{ V}$, 扫描速率为 $0.005\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

扫描电镜-能量散射 X 射线谱(SEM-EDS): $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 收集反应后的菌体沉淀, 于 5% 戊二醛溶液中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 用 PBS 缓冲溶液洗涤菌体 3 次, 通过 30%、50%、70% 和 90% 的乙醇溶液依次梯度脱水, 用丙酮溶液置换两次, 将样品置于 CO_2 临界点干燥仪中干燥, 最后使用 Hitachi S-4800 冷场发射扫描电镜(日立, 日本)观察菌株及还原 V(V) 后的细胞形貌, X-Max N150 X 射线能谱仪(牛津仪器, 上海)点扫描分析沉淀物成分。

X 射线光电子能谱(XPS):样品溶液 $8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 10 min 离心得到沉淀, 并用去离子水清洗 2~3 遍, 放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥, 24 h 后取出样品并将其研磨过 $200\text{ }\mu\text{m}$ 筛, 采用高性能 X 射线光电子能谱进行观察。

1.4 数据处理

V(V) 还原率计算方法:

$$V(V) \text{ 还原率}(\%) = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_0 为初始 $V(V)$ 浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C_t 为 t 时刻 $V(V)$ 的浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

绿藻生长抑制率的计算方法:

$$I = (\text{OD}_0 - \text{OD}_t) / \text{OD}_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中: I 为生长抑制率, %; OD_0 为空白组绿藻的吸光度, OD_t 为试验组绿藻的吸光度。

叶绿素含量计算方法:

$$P = 13.95 \times \text{OD}_{665} - 6.88 \times \text{OD}_{649} \quad (3)$$

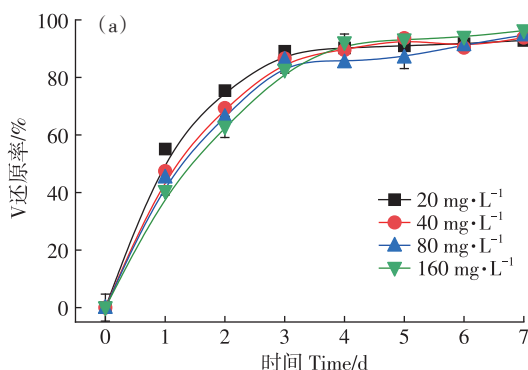
式中: P 表示叶绿素 a 浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

除产物表征外,摇瓶试验均重复3次,处理结果均以平均值 $\pm$ 标准差表示,相关数据使用Excel和Origin 2021软件分析处理。XPS数据使用XPSPEAK软件分析。

2 结果与分析

2.1 *Enterobacter kobei* NC1-2 对 $V(V)$ 的还原及其产物分析

Enterobacter kobei NC1-2 对 $V(V)$ 的还原动力学



如图1所示。当 $V(V)$ 初始浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,连续培养3 d时 $V(V)$ 的还原率为90.3%,连续培养7 d时 $V(V)$ 的还原率为91.2%。当 $V(V)$ 浓度为 $160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养3 d时 $V(V)$ 的还原率为82.6%,培养7 d时 $V(V)$ 的还原率为96.3%。研究结果表明,菌株NC1-2在较大 $V(V)$ 浓度范围内具有良好的 $V(V)$ 还原能力,且初始 $V(V)$ 浓度越高,其还原速率越快。图1b显示,菌株NC1-2生长活性随 $V(V)$ 浓度的升高呈现先上升后降低的趋势,当 $V(V)$ 浓度低于 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对NC1-2生长有一定的刺激作用,随着 $V(V)$ 浓度增加,菌株生长受到抑制。低浓度 $V(V)$ 促进菌株的生长,但高浓度 $V(V)$ 在一定程度上抑制菌株生长。

通过扫描电镜观察菌体还原 $V(V)$ 前后形貌的变化,从图2中可以观察到添加 $V(V)$ 的菌体呈现凹陷、破损且不规则的形态,可能是还原过程中菌体受到氧化损伤所致。此外,还观察到细胞表面有无定形物质附着,其可能是 $V(V)$ 生物还原过程中的还原产物。进一步对该无定形物质进行能谱分析,结果表明

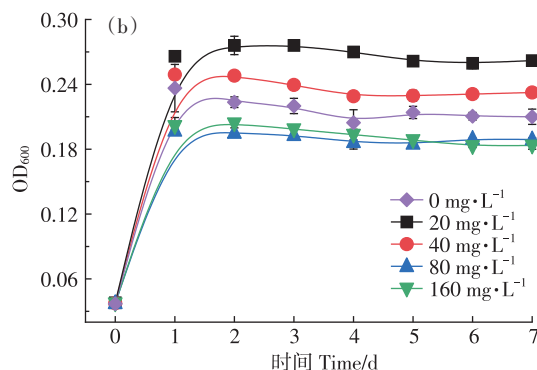


图1 不同初始浓度下 $V(V)$ 的微生物还原(a)及其对菌株生长(b)的影响

Figure 1 Effects of different $V(V)$ concentration on microbial $V(V)$ reduction(a) and the strain growth(b)

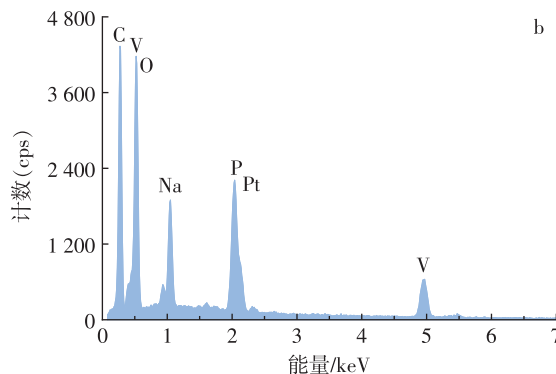


图2 菌株还原 $V(V)$ 的SEM(a)和EDS图谱(b)

Figure 2 SEM(a) and EDS(b) images of the strains under $V(V)$ reduction

无定形物质中含有V。SEM-EDS证实菌株表面有含V化合物的存在。

为了验证V(IV)的存在,采用X射线光电子能谱仪对微生物还原V(V)试验中固相产物进行表征分析,如图3所示。在250~550 eV之间监测到4个明显的特征峰,分别代表C1s、N1s、V2p和O1s。通过V2p轨道峰后可以看出3个不同的特征峰,2p_{1/2}轨道中524.1 eV和2p_{3/2}轨道中517.7 eV处出现的特征峰对应V(V),2p_{3/2}轨道中515.9 eV处出现的特征峰对应V(IV)^[24]。以上结果证实NC1-2能将V(V)还原为V(IV),从而有效地降低了V(V)毒性。

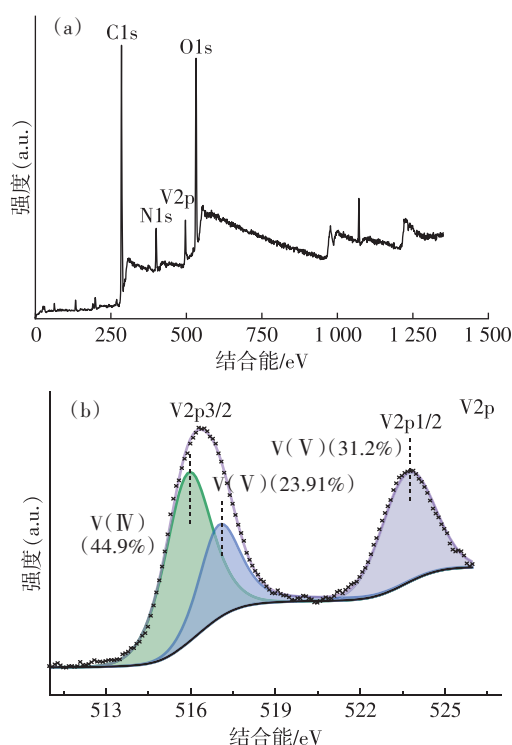


图3 菌株还原V(V)的XPS全谱图(a)及V2p轨道峰(b)
Figure 3 Full spectrum of XPS(a) and V2p orbital peak(b) of the strains under V(V) reduction

2.2 电子传递抑制剂对 *E. kobei* NC1-2 还原 V(V) 的影响

呼吸链抑制剂能阻断特定的电子传递途径,菌株在还原V(V)过程中的电子转移过程如图4所示。当添加50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的辣椒素和奎那克林,培养24 h时菌株对V(V)的还原率分别为40.0%和74.3%,培养48 h菌株对V(V)的还原率分别为68.3%和92.8%;随着两种抑制剂浓度升高,菌株对V(V)的抑制作用增强。研究发现,辣椒素可作用于NADH脱氢酶抑制电子传递途径,奎那克林可用作FAD脱氢酶

的抑制剂阻碍电子传递过程^[25-26]。研究结果表明NADH脱氢酶和FAD脱氢酶可能催化菌株对V(V)还原过程的电子传递过程,且NADH在电子传递过程中起主导作用。

CuCl₂可以通过抑制NADH-CoQ从而抑制电子传递途径^[27],当分别添加100、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuCl₂时,培养24 h时V(V)的还原率分别为54.1%、33.9%,培养48 h时V(V)的还原率分别为73.7%、65.4%。但当CuCl₂浓度为25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养后期对菌株还原V(V)有轻微的促进作用。Cu²⁺作为重金属离子对菌株有毒害作用,可能在生长过程中产生氧化损伤,随着CuCl₂浓度升高,V(V)的还原被明显的抑制。

抗霉素A可以阻碍Cyt b_L-Cyt b_H的胞外电子传递途径,鱼藤酮常用于细胞膜内电子传递系统^[28],包括泛醌氧化还原活性酶、醌类、细胞周质的细胞色素载体等,N-乙酰-L-蛋氨酸多用于细胞膜上细胞色素c功能障碍的研究。当添加不同浓度的上述三种抑制剂时发现,菌株对V(V)的还原并未被抑制,并且当添加鱼藤酮时,V(V)的还原反而被促进。以上结果表明,菌株对V(V)的还原可能仍主要在胞内进行,当使用抑制细胞膜上细胞色素等相关电子传递抑制剂时,并未对菌株还原V(V)的过程产生明显抑制作用。这验证了菌株对V(V)的还原主要在胞内进行,而菌株生长代谢产生的对V(V)具有氧化还原活性的物质主要在胞内产生。

2.3 电子穿梭体核黄素对 *E. kobei* NC1-2 还原 V(V) 的影响

微生物自身分泌或外源的黄素类物质、吩嗪、醌类等有机分子被认为能作为电子穿梭体参与微生物的胞外电子传递。为探究核黄素能否促进菌株还原V(V)的过程,不同核黄素浓度下菌株对V(V)的还原结果如图5所示。当核黄素浓度分别为0、2.5、5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养12 h时,V(V)的还原率分别为51.3%、53.8%、58.9%、67.7%;培养24 h时,V(V)的还原率分别为84.2%、91.6%、92.4%、91.4%。随着核黄素浓度升高,菌株生长也受到不同程度的促进作用,如图5b所示,培养24 h时,菌株生长随核黄素浓度增大而明显增强。以上结果表明核黄素有利于菌株对V(V)的还原,同时促进菌株生长代谢。

为探究核黄素在还原过程中的作用机理,分别测定了不含核黄素以及添加10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 核黄素的菌株还原V(V)时溶液氧化还原电位变化及CV曲线,如图6所示。培养12 h时,不添加核黄素和添加10 $\mu\text{mol} \cdot$

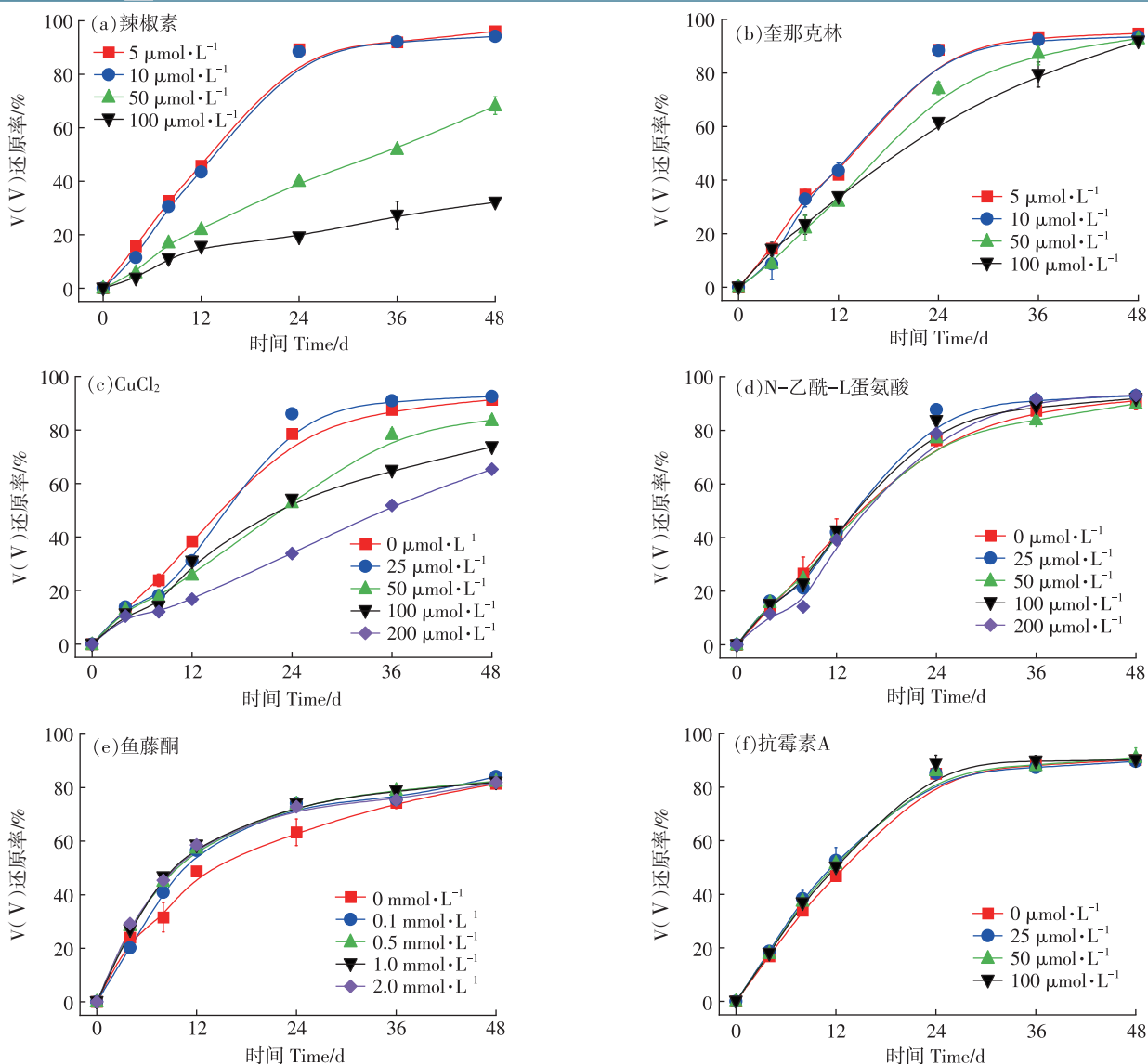


图4 电子传递抑制剂辣椒素(a)、奎那克林(b)、CuCl₂(c)、N-乙酰-L蛋氨酸(d)、鱼藤酮(e)、抗霉素A(f)对 *E. kobei* NC1-2还原V(V)的影响

Figure 4 Effects of electron transfer inhibitor capsaicin(a), quinacrine(b), copper chloride(c), AcMet(d), rotenone(e), and antimycin A(f) on V(V) bioreduction

L⁻¹核黄素溶液体系的氧化还原电位分别为-79、-102 mV;随着培养时间延长,氧化还原电位差异逐渐增大,培养48 h时,不添加核黄素和添加10 μmol·L⁻¹核黄素溶液体系的氧化还原电位分别为-304、-382 mV,如图6a所示。这可能是由于核黄素加速菌株生长代谢,使得氧化还原电位降低并加速V(V)的还原,也可能核黄素促进菌株还原V(V)时,产生较多的还原酶等物质,使得氧化还原电位降低。

从图6b可以看出,不添加V(V)时,菌液的CV曲线在-0.236 V处出现特征峰,表明菌株在生长代谢过程中可能产生了氧化还原活性物质。CV曲线的封

闭区域可用于表征体系中的电子转移能力。对比不添加V(V)、添加40 mg·L⁻¹ V(V)时CV曲线面积和峰值电流明显增大,溶液分别在-0.119 V和0.094 V附近出现氧化还原峰,表明溶液中的氧化还原反应增强。添加核黄素后对电化学活性有明显增强的效果,可能的原因是核黄素促进了菌株还原V(V)的电子传递过程。

2.4 *E. kobei* NC1-2还原V(V)过程中的电子传递强化机制

为了验证核黄素对菌株还原V(V)的促进机理及V(V)还原过程中的电子传递链,向含有电子传递

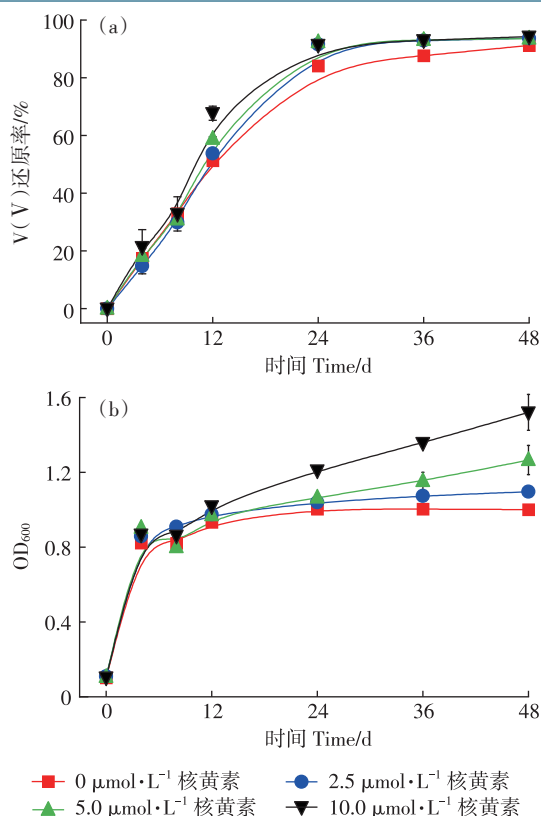


图5 不同浓度核黄素对菌株还原V(V)(a)及菌株生长(b)的影响

Figure 5 Effects of riboflavin concentration on V(V) bioreduction(a) and strain growth(b)

抑制剂的溶液中加入核黄素,研究体系中V(V)的微生物还原效率,结果如图7所示。根据V(V)与3种电子传递抑制剂的直接化学反应表明,抑制剂并不会直接还原V(V),当向菌株还原V(V)溶液中加入抑制剂后,V(V)还原率降低,这表明抑制剂能有效阻断V(V)还原的电子传递过程。

如图7a所示,当向含100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒素的V(V)微生物还原体系中加入10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素,培养24 h时V(V)的还原率为55.6%,培养48 h时V(V)还原率增加至88.0%。如图7b所示,当向含100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 奎那克林的V(V)微生物还原体系中加入10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素,培养48 h时V(V)的还原率为91.1%,略高于只含抑制剂的组分。如图7c所示,当向含100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuCl₂的V(V)微生物还原体系中加入10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素,培养48 h时V(V)的还原率为93.6%,高于微生物体系中加入CuCl₂,其V(V)的还原率为73.4%。以上结果表明,连续培养48 h后,添加核黄素的处理中电子传递抑制剂的作用明显减弱,这表明核黄素降低了抑制剂在V(V)还原的电子传

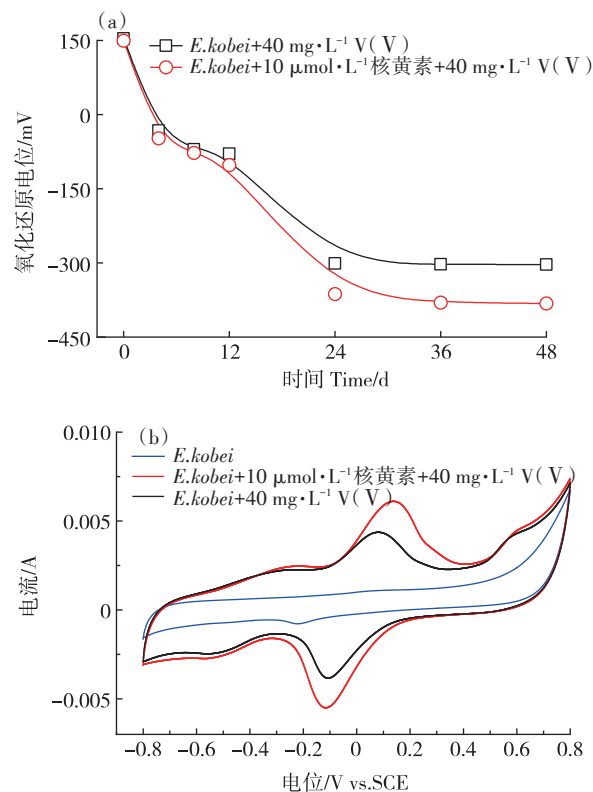


图6 核黄素对V(V)还原过程中氧化还原电位(a)及CV曲线(b)的影响

Figure 6 Effects of riboflavin on Eh(a) and CV curve(b) during V(V) bioreduction

递过程中的影响,NADH脱氢酶及FAD脱氢酶可能是菌株还原V(V)电子传递链中的重要一环。核黄素作为黄素辅酶FAD和FMN的前体物质可能参与菌株生长^[29],促进微生物代谢过程,另一方面核黄素可能参与微生物还原V(V)的电子传递过程中,并强化被特定阻断的电子传递过程,从而促进菌株对V(V)的还原。

2.5 V(V)微生物还原对蛋白核小球藻和斜生栅藻生长的影响

V(V)微生物还原前后对蛋白核小球藻及斜生栅藻生长的影响,如图8所示。V(V)对两种绿藻的生长在不同暴露时间内呈现不同的作用效果,根据统计分析发现随着时间的延长,小球藻和斜生栅藻的藻密度增加,且V(V)还原前后对藻密度具有显著的影响($P<0.05$)。图8a为V(V)微生物还原前后蛋白核小球藻藻密度的变化,与对照处理相比,V(V)还原前在48 h后,藻密度显著降低,说明V(V)对小球藻生长有抑制,这可能与小球藻对V(V)的耐受性有关。V(V)还原后,藻密度明显增加,OD₆₈₃值为1.5,

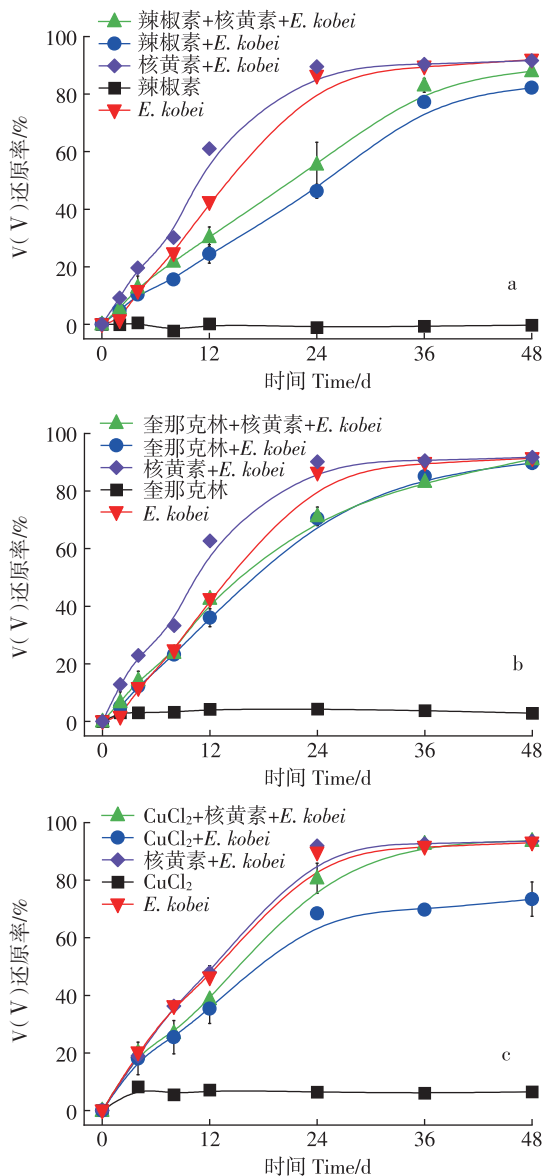
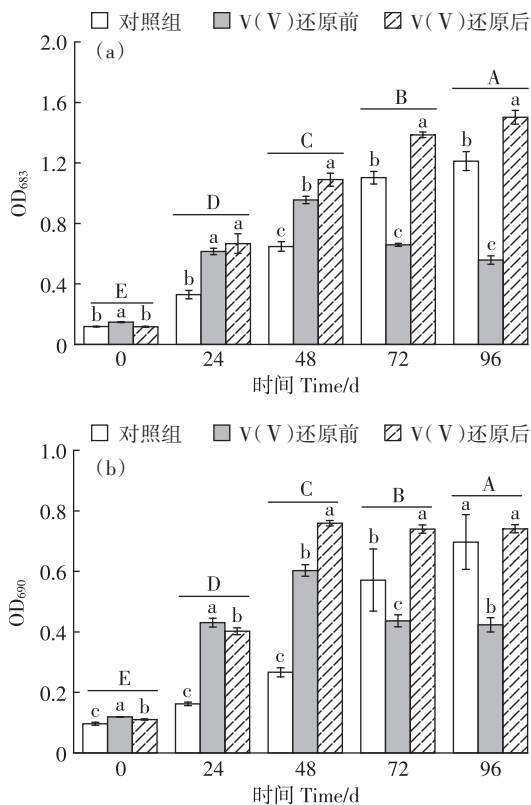


图7 核黄素在电子传递链上促进V(V)生物还原

Figure 7 V(V) bioreduction enhanced by riboflavin on the electron transport chain

且高于对照组OD₆₈₃值(1.2),说明V(V)还原为V(IV)后对小球藻毒性会降低。图8b为V(V)生物还原前后对斜生栅藻生长的影响,V(V)还原后的产物同样在48 h后显著促进了斜生栅藻的生长,以上结果表明菌株对V(V)的还原降低了钒对藻类的胁迫作用。这可能是因为*E. kobei*将V(V)还原为V(IV),毒性降低,同时钒能参与固氮酶作用,对藻类生长具有一定程度的促进效果。

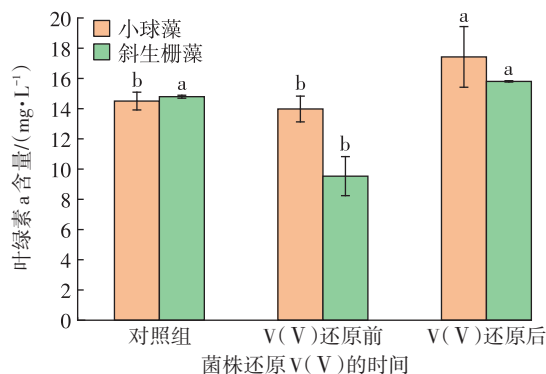
图9为菌株还原V(V)前后两种绿藻中叶绿素a含量。叶绿素含量的高低与藻类的生长密切相关,叶绿素含量降低表明环境对其生长有阻碍作用,反之则



不同大写字母表示时间尺度上在 $P<0.05$ 水平上差异显著,不同小写字母表示不同处理组在 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Different uppercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level on time scale, and different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level among different treatment groups.

图8 V(V)微生物还原对蛋白核小球藻(a)和斜生栅藻(b)藻密度的影响

Figure 8 Effects of microbial reduction on algal density in *Chlorella proteinacea*(a) and *Chlorella obliqua*(b)



同色不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Different lowercase letters of the same color indicate significant difference at $P<0.05$ level.

图9 V(V)微生物还原对蛋白核小球藻和斜生栅藻叶绿素a含量的影响

Figure 9 Effects of microbial reduction on algal density in *Chlorella proteinacea* and *Chlorella obliqua*

有促进作用。与对照处理相比,V(V)还原前,在暴露96 h后小球藻和斜生栅藻的叶绿素a含量分别为13.9、9.5 mg·L⁻¹,与V(V)还原前的处理相比,V(V)还原后在暴露96 h后小球藻和斜生栅藻的叶绿素a含量分别显著增加3.5、6.3 mg·L⁻¹($P<0.05$)。结果表明随着V(V)被还原沉淀,暴露在还原产物中生长的小球藻和斜生栅藻中的叶绿素a含量均有所提高。菌株对V(V)的还原降低了钒绿藻可能产生的胁迫作用,且低浓度钒绿藻的生长有促进效果。

3 讨论

3.1 微生物对V(V)的还原及其影响因素

微生物通过其自身的代谢过程将V(V)转化为毒性较小的V(IV),已成为环境中钒污染治理的研究热点。Zhang等^[30]发现在纯培养条件下两种产甲烷菌*Methanosarcina mazei*和*Methanothermobacter thermautotrophicus*均对V(V)具有还原能力,且后者作为嗜热菌,能在65℃环境下表现出较优的钒还原能力。Carpentier等^[31]发现*Shewanella oneidensis*通过乳酸盐、甲酸盐和丙酮酸的厌氧氧化反应还原V(V),并形成固体沉淀。*Shewanella putrefaciens*能将V(V)作为唯一电子受体还原,当初始V(V)浓度为5 mg·L⁻¹时,在2 d内对V(V)的去除率达到77%^[32]。Ortiz-Bernad等^[33]发现*Geobacter metallireducens*以醋酸盐作为电子供体,能有效去除地下水中V(V),电子显微探针分析V(V)还原沉淀物可能是[CaV₂(PO₄)₂(OH)₄·3H₂O]。van Marwijk等^[34]分离出一株肠杆菌*Enterobacter cloacae*能还原V₂O₅并形成沉淀,但未对较高浓度下钒还原及机理进行探究。近年来通过高通量测序和宏基因组等技术发现肠杆菌(*Enterobacter*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、沉淀杆菌(*Sedimentibacter*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、陶氏菌(*Thauera*)等^[35-39]能作为优势菌属参与到V(V)还原过程中,但目前有关神户肠杆菌还原V(V)的报道较少。

本研究表明随着V(V)初始浓度增大,会加快菌株NC1-2对V(V)的还原。郝丽婷^[40]通过屎肠球菌*Enterococcus faecium*对不同初始浓度的V(V)还原研究与我们的研究结论一致。Zhang等^[30]研究结果也表明随着V(V)初始浓度的增大,*Lactococcus raffinolactis*对V(V)的还原率升高。菌株的生长受到初始V(V)浓度的影响,低浓度V(V)可能会促进微生物生长,高浓度V(V)对菌株可能产生毒害作用,进而抑制菌株的生长。钒酸盐和磷酸盐化学结构相似,

相较于其他重金属元素的毒性较小^[41]。

本研究通过SEM发现菌株在还原V(V)后,细胞表面有不定形物质附着,且出现凹陷、破损现象,因此V(V)还原过程中可能会对菌体产生氧化损伤,导致部分菌体细胞膜破损使得胞内V(IV)溶出,最终附着在细胞表面。通过对V(V)还原后的固相产物进行XPS分析,结果显示存在V(V)和V(IV),表明菌株NC1-2吸附还原V(V)时,其表面除V(IV)外还存在部分V(V),证明菌株NC1-2吸附还原V(V)过程同时包含吸附作用和还原作用。

3.2 微生物还原V(V)过程中的电子传递

在研究菌株的电子传递过程中,利用电子传递抑制剂特异性阻断了菌株可能存在的电子传递链,结果发现,与细胞色素c等膜上电子传递机制相关的抑制剂效果不显著,表明*E. kobei* NC1-2对V(V)的还原可能与膜结合物质的直接关联较小。CV曲线结果表明纯培养的菌液中存在氧化还原活性物质,但相比文献报道中的产电菌能力较差。研究表明核黄素作为内源性电子穿梭体具备增强电子传递的能力,地衣芽孢杆菌*Bacillus licheniformis*可以利用希瓦氏菌分泌的核黄素加速不锈钢的腐蚀^[42],嗜甲基菌*Methylophilus methylotrophs*能通过核黄素和细胞色素c将电子传递至细胞外的水铁矿^[43]。通过向菌株还原V(V)溶液中添加核黄素,发现促进了菌株生长和V(V)还原,并使得氧化还原电位降低,因此核黄素在参与菌株代谢过程中可能直接充当电子穿梭体的作用。Masuda等^[44]发现*Lactococcus lactis*以黄素单核苷酸作为电子穿梭体能促进电子转移。当向抑制菌株NADH脱氢酶、FAD脱氢酶的溶液中加入核黄素后发现,菌株对V(V)的还原被明显促进,表明这些物质可能在*E. kobei* NC1-2还原V(V)过程中起到重要的催化作用,核黄素在*E. kobei* NC1-2代谢过程中扮演重要角色,也表明菌株在还原V(V)过程中存在多条电子传递途径,核黄素可能作为FAD的前体物质参与菌株对V(V)的胞内还原。

3.3 V(V)微生物还原的毒性评价

从V(V)微生物还原前后对藻类生长的影响可以看到,*E. kobei* NC1-2对V(V)的还原产物减少了其对小球藻和斜生栅藻生长过程中的抑制作用,提高了藻类生物量和叶绿素a含量。菌株还原过程中产生的代谢产物可能在一定程度上会刺激藻类的生长。Shu等^[45]发现钒抑制了*Chlorella vulgaris*的生长,在初始浓度为400 mg·L⁻¹,50 mg藻类生物量下40℃培养

24 h后,最大吸附容量达到 $94.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,但过程中并未发生氧化还原而是化学吸附的作用。Tambat 等^[21]利用小球藻在处理2周后的钒去除量为 $25.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,研究表明小球藻细胞对钒的吸附及转化主要是通过糖类及蛋白质上的 COO^- 基团发挥着作用。目前关于微生物菌株对 V(V) 还原后的产物进行毒性评价的相关研究较少,尽管试验表明 V(V) 还原产物的毒性降低,但利用微生物方法还原 V(V) ,其过程中产生的代谢产物在藻类生长过程中是否产生积极或消极影响仍是一个值得探讨的问题。

4 结论

(1)筛选获得的菌株 *E. kobei* NC1-2 能有效还原 V(V) ,初始浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、培养第3天时 V(V) 的还原率达到 90.3%。

(2)SEM-EDS 和 XPS 结果显示,菌株 *E. kobei* NC1-2 将 V(V) 还原为 V(IV) ,并形成不溶性的无定型物质附着在菌体表面。

(3)当电子传递抑制剂辣椒素、奎那克林浓度分别为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 CuCl_2 浓度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,均对 *E. kobei* NC1-2 还原 V(V) 产生明显的抑制作用,而鱼藤酮、N-乙酰-L-蛋氨酸和抗霉素 A 的抑制效果不显著。添加电子穿梭体核黄素能加快菌株的生长,促进了 V(V) 微生物还原。

(4)将小球藻和斜生栅藻培养在 V(V) 微生物还原后的溶液中,96 h 后两种绿藻的藻密度均提高,同时叶绿素 a 含量均显著升高,菌株 *E. kobei* NC1-2 对 V(V) 的还原降低了 V(V) 对小球藻和斜生栅藻生长的抑制作用。

参考文献:

[1] IMTIAZ M, RIZWAN M S, XIONG S, et al. Vanadium, recent advancements and research prospects: a review[J]. *Environment International*, 2015, 80:79–88.

[2] TULCAN R X S, OUYANG W, LIN C, et al. Vanadium pollution and health risks in marine ecosystems: anthropogenic sources over natural contributions[J]. *Water Research*, 2021, 207:117838.

[3] AN Y, MA B, LI X, et al. A review on the roasting-assisted leaching and recovery of V from vanadium slag[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2023, 173:263–276.

[4] TANG Q X, GAN C D, YANG J Y. Photo-induced reduction of vanadium in vanadium-containing iron/manganese oxide agglomerates by oxalic acid[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 316:120590.

[5] AIHEMAITI A, GAO Y, MENG Y, et al. Review of plant-vanadium physiological interactions, bioaccumulation, and bioremediation of va-

nadium-contaminated sites[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 712:135637.

[6] GHOSH S K, SAHA R, SAHA B. Toxicity of inorganic vanadium compounds[J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2015, 41(7):4873–4897.

[7] 李青仁, 王月梅, 李晓波. 钒的生物学功能及与疾病的关系[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 98(2):65–66. LI Q R, WANG Y M, LI X B. Vanadium biology function and disease relations[J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 2007, 98(2):65–66.

[8] 林海, 李真, 董颖博, 等. 修复钒铜复合污染水体的菌株分离及性能[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2021, 52(5):1418–1426. LIN H, LI Z, DONG Y B, et al. Isolation and characterization of bacteria for vanadium and cadmium polluted water remediation[J]. *Journal of Central South University(Science and Technology)*, 2021, 52(5):1418–1426.

[9] YIN K, WANG Q, LV M, et al. Microorganism remediation strategies towards heavy metals[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 360:1553–1563.

[10] 赵昕宇, 何小松, 檀文炳, 等. 典型胞外呼吸细菌的胞内电子转移机制研究进展[J]. 生态学报, 2017, 37(8):2540–2550. ZHAO X Y, HE X S, TAN W B, et al. Intracellular electron transfer mechanism of typical extracellular respiratory bacteria[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(8):2540–2550.

[11] 唐朱睿, 黄彩红, 高如泰, 等. 胞外呼吸菌在污染物迁移与转化过程中的应用进展[J]. 农业资源与环境学报, 2017, 34(4):299–308. TANG Z R, HUANG C H, GAO R T, et al. Review on extracellular respiratory bacteria and its application in migration and transformation of pollutants[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2017, 34(4):299–308.

[12] XIONG Y, SHI L, CHEN B, et al. High-affinity binding and direct electron transfer to solid metals by the *Shewanella oneidensis* MR-1 outer membrane c-type cytochrome *OmcA*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(43):13978–13979.

[13] REGUERA G, MCCARTHY K D, MEHTA T, et al. Extracellular electron transfer via microbial nanowires[J]. *Nature*, 2005, 435(7045):1098–1101.

[14] II M, IVI M, SPASOJEVI I, et al. The interactions of vanadium with *Phycomyces blakesleeanus* mycelium: enzymatic reduction, transport and metabolic effects[J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(1):61–69.

[15] MYERS J M, ANTHOLINE W E, MYERS C R. Vanadium(V) reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires menaquinone and cytochromes from the cytoplasmic and outer membranes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3):1405–1412.

[16] CARPENTIER W, DE SMET L, VAN BEEUMEN J, et al. Respiration and growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 using vanadate as the sole electron acceptor[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(10):3293.

[17] WANG G, ZHANG B, LI S, et al. Simultaneous microbial reduction of vanadium(V) and chromium(VI) by *Shewanella loihica* PV-4[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 227:353–358.

[18] 尹文珂, 程金凤, 肖婉露, 等. 四尾栅藻对重金属镉胁迫的响应[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(4):633–638. YIN W K, CHENG J

- F, XIAO W L, et al. Effect of cadmium on *Scenedesmus quadricauda* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(4):633-638.
- [19] SHU X, YU Y Q, LIU Q M, et al. Adsorptive-desorptive performance of *Chlorella vulgaris* for the removal of vanadium from aqueous solutions[J]. *Chemistry and Ecology*, 2023, 39(1):24-43.
- [20] MEISCH H U, BENZSCHAWEL H. The role of vanadium in green plants[J]. *Archives of Microbiology*, 1978, 116(1):91-95.
- [21] TAMBAT V S, PATEL A K, CHEN C W, et al. A sustainable vanadium bioremediation strategy from aqueous media by two potential green microalgae[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 323:121247.
- [22] 周睿, 周雅琪, 王丽丽, 等. 一株钒还原菌的分离鉴定及V(V)还原机理研究[J]. *中国环境科学*, 2023, 43(6):2926-2937. ZHOU R, ZHOU Y Q, WANG L L, et al. Isolation and identification of a vanadium reducing bacterium and the mechanism of V(V) bioreduction[J]. *China Environmental Science*, 2023, 43(6):2926-2937.
- [23] FILIK H, BERKER K I, BALKIS N, et al. Simultaneous preconcentration of vanadium (V/IV) species with palmitoyl quinolin-8-ol bonded to amberlite XAD 2 and their separate spectrophotometric determination with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol using CDTA as masking agent[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 518(1):173-179.
- [24] ZHAO K, HAN W, TANG Z, et al. Investigation of coating technology and catalytic performance over monolithic $V_2O_5-WO_3/TiO_2$ catalyst for selective catalytic reduction of NOx with NH_3 [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 503:53-60.
- [25] WANG S H, GUO J B, LIAN J, et al. Rapid start-up of the anammox process by denitrifying granular sludge and the mechanism of the anammox electron transport chain[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 115:101-107.
- [26] ZHAO R, GUO J, SONG Y, et al. Mediated electron transfer efficiencies of Se(IV) bioreduction facilitated by meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrin[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2020, 147:104838.
- [27] RAHMAN Z, SINGH V P. Cr(VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr(VI) reductase[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 91:97-103.
- [28] WOŹNICA A, DZIRBA J, MAŃKA D, et al. Effects of electron transport inhibitors on iron reduction in *Aeromonas hydrophila* strain KB1[J]. *Anaerobe*, 2003, 9(3):125-130.
- [29] HUANG B, GAO S, XU Z, et al. The functional mechanisms and application of electron shuttles in extracellular electron transfer[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(1):99-106.
- [30] ZHANG J, DONG H, ZHAO L, et al. Microbial reduction and precipitation of vanadium by mesophilic and thermophilic methanogens[J]. *Chemical Geology*, 2014, 370:29-39.
- [31] CARPENTIER W, SANDRA K, DE SMET I, et al. Microbial reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 69(6):3636-3639.
- [32] 李劲, 杨玉蓉, 朱广森, 等. *Shewanella oneidensis* MR-1 和 *Shewanella putrefaciens* 对 V(V) 的还原及其影响因素[J]. *中国环境科学*, 2020, 40(1):414-421. LI J, YANG Y R, ZHU G S, et al. The reduction of V(V) by *Shewanella oneidensis* MR-1 and *Shewanella putrefaciens* and influencing factors[J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(1):414-421.
- [33] ORTIZ-BERNAD I, ANDERSON R T, VRIONIS H A, et al. Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: novel strategy for *in situ* removal of vanadium from groundwater[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(5):3091-3095.
- [34] VAN MARWIJK J, OPPERMAN D J, PIATER L A, et al. Reduction of vanadium(V) by *Enterobacter cloacae* EV-SA01 isolated from a South African deep gold mine[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(6):845-849.
- [35] SHI J, LI Z, ZHANG B, et al. Synergy between pyridine anaerobic mineralization and vanadium(V) oxyanion bio-reduction for aquifer remediation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 418:126339.
- [36] QIU R, ZHANG B, LI J, et al. Enhanced vanadium(V) reduction and bioelectricity generation in microbial fuel cells with biocathode[J]. *Journal of Power Sources*, 2017, 359:379-383.
- [37] WANG S, ZHANG B, DIAO M, et al. Enhancement of synchronous bio-reductions of vanadium(V) and chromium(VI) by mixed anaerobic culture[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 242:249-256.
- [38] LAI C Y, DONG Q Y, CHEN J X, et al. Role of extracellular polymeric substances in a methane based membrane biofilm reactor reducing vanadate[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(18):10680-10688.
- [39] WANG S, ZHANG B, LI T, et al. Soil vanadium(V)-reducing related bacteria drive community response to vanadium pollution from a smelting plant over multiple gradients[J]. *Environment International*, 2020, 138:105630.
- [40] 郝丽婷. 钒污染地下水的微生物修复与机理研究[D]. 北京: 中国地质大学, 2019. HAO L T. Microbial remediation and mechanism study of vanadium contaminated groundwater[D]. Beijing: China University of Geosciences, 2019.
- [41] WU Z Z, ZHANG Y X, YANG J Y, et al. Effect of vanadium on *Lactuca sativa* L. growth and associated health risk for human due to consumption of the vegetable[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(7):9766-9779.
- [42] JIN Y, LI Z, ZHOU E, et al. Sharing riboflavin as an electron shuttle enhances the corrosivity of a mixed consortium of *Shewanella oneidensis* and *Bacillus licheniformis* against 316L stainless steel[J]. *Electrochimica Acta*, 2019, 316:93-104.
- [43] YANG Y, WANG H, ZHENG Y, et al. Extracellular electron transfer of *Methylophilus methylotrophs*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 94:313-318.
- [44] MASUDA M, FREGUIA S, WANG Y F, et al. Flavins contained in yeast extract are exploited for anodic electron transfer by *Lactococcus lactis*[J]. *Bioelectrochemistry*, 2010, 78(2):173-175.
- [45] SHU X, YU Y Q, LIU Q M, et al. Adsorptive-desorptive performance of *Chlorella vulgaris* for the removal of vanadium from aqueous solutions[J]. *Chemistry and Ecology*, 2023, 39(1):24-43.

(责任编辑:叶飞)