

金属离子对三苯基锡酶促降解的影响

佟瑶^{1,2}, 叶锦韶^{1,2}, 尹华^{1,2*}, 彭辉^{1,2}, 陈烁娜^{1,2}, 秦华明^{1,2}, 何宝燕^{1,2}

(1. 暨南大学环境工程系, 广州 510632; 2. 广东省高校毒性污染物防治与生物修复重点实验室, 广州 510632)

摘要:研究了不同金属离子及其添加形式对肺炎克雷伯氏菌胞内酶和胞外酶降解三苯基锡的影响, 以期阐明有机锡的酶促降解机制提供实验依据。结果表明, 菌体对 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 具有良好的耐受能力, 高浓度的 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 可能对菌体产生一定的毒害作用, 从而影响其生长。适当浓度范围的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 加入均能促进三苯基锡的酶促降解, 其中 30 mg/L Mg^{2+} 的促进作用最明显, 降解率为 77.22%。一定浓度范围内的 Fe^{3+} 对酶促降解具有适当的抑制作用。 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 加入培养基中, 均可以促进其产酶效果, 其中 Mg^{2+} 加入后降解效果最好, 降解率达到 85.66%, 说明部分金属离子在适当的浓度范围内可以作为酶的激活剂促进三苯基锡的酶促降解。此外, 金属离子对菌体生长量的影响和产酶效果没有相关的联系。某些金属离子只能作为胞内酶的激活剂而对胞外酶不能表现出相同作用。

关键词:肺炎克雷伯氏菌; 金属离子; 有机锡; 三苯基锡; 酶促降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2011)03-0779-05

Effect of Heavy Metal Ions on Triphenyltin Enzymatic Degradation

TONG Yao^{1,2}, YE Jin-shao^{1,2}, YIN Hua^{1,2}, PENG Hui^{1,2}, CHEN Shuo-na^{1,2}, QIN Hua-ming^{1,2}, HE Bao-yan^{1,2}

(1. Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Key Laboratory of Water/Soil Toxic Pollutants Control and Bioremediation, Department of Education of Guangdong Province, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The influence of different metal ions and different forms of addition on triphenyltin enzymatic degradation was investigated under conditions using enzyme obtained from *Klebsiella pneumoniae*. The objective of this study is to illuminate the mechanism of enzymatic degradation of triphenyltin (TPhT). The results demonstrated that the strain was able to tolerate K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} and Fe^{3+} at high concentrations. High concentrations of Zn^{2+} and Fe^{2+} had some toxic effects on the strain, thus affecting its growth. The endoenzyme activity was enhanced by metal ions such as K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{2+} at certain concentrations. In the presence of 30 mg/L of Mg^{2+} , the removal percentage of TPhT was up to 77.22%. Fe^{3+} restrained the enzyme activity at certain concentrations. Adding K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} into medium can promote the production of enzyme, among which Mg^{2+} demonstrated up to 85.66% of removal percentage of TPhT, suggesting some metal ions at the appropriate concentration range can be used as enzyme activator for the enzymatic degradation of triphenyltin. Metal ions showed no relevant impact on the cell growth and enzyme production. Certain metal ions can only serve as activators of endoenzyme and exhibited no similar effect towards exoenzyme.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; metal ions; organotin; triphenyltin; enzymatic degradation

有机锡类化合物 (organic tin compounds OTC), 作为聚合物的稳定剂和农业杀菌剂一直大量使用, 同时也作为海洋船舶防污涂料广泛用于工业中。虽然部分 OTC 已被许多国际规范禁止使用, 但是仍然能在水体环境中检测到该类化合物。目前, 生产量、使用量和在环境中的残留量最大的 OTC 是三丁基锡 (TBT) 和三苯基锡 (TPhT)。这类化合物导致的环境污染和职业性接触已使其成为了一个严重的问题^[1]。OTC 对于原核和真核生物具有较高毒性, 并且能够影响人类的免疫和内分泌系统^[2]。目前, 关于 OTC 的研究主要侧重于检测方法^[3,4]、区域分布^[5]及其生物毒理^[6]等方面, 而对 OTC 的微生物降解方面研究较少, 降解该类化合物的微生物种类及其微生物适应机制尚未明确^[7]。许多金属离子是微生物生长的必需元素, 可参与细胞结构的组成, 并有能量转移、细胞渗透调节等功能, 有利于菌株的生

长, 但是当重金属含量超过一定浓度时, 会对微生物产生毒性作用, 影响微生物的生长以及酶的分泌^[8]。因此研究金属离子对 OTC 酶促降解的影响具有重要意义。

本课题组在前期研究工作中, 已经分离筛选出可降解 TPhT 的肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 并对其生物降解特性进行了深入的研究^[9]。研究发现, 在菌体降解 TPhT 的过程中, 起主要作用的是胞内酶, 并得到了酶促反应的最佳条件^[10,11]。本研究在此基础上, 研究了不同金属离子及不同添加形式对 TPhT 的酶促降解的影响作用,

收稿日期: 2010-04-06; 修订日期: 2010-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21007020); 国家自然科学基金委-广东省联合基金项目 (U0933002); 广东省自然科学基金项目 (9151027501000055)

作者简介: 佟瑶 (1986 ~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境化学与应用, E-mail: 2001-tongyao@163.com

* 通讯联系人, E-mail: ohjgc@jnu.edu.cn

以期阐明有机锡污染物的生物降解机制及指导其生物修复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

三苯基氯化锡储备液:用甲醇溶解三苯基氯化锡,配制成 1 g/L 的储备液,4℃ 保存待用;**三苯基氯化锡使用液:**用储备液配制成 3 mg/L 的使用液;实验菌种:三苯基锡降解菌肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) 由本课题组筛选和保藏;牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 调节至 7.2~7.4,121℃ 灭菌 30 min;金属离子:将 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 分别配制成 1 g/L 和 0.1 g/L 的母液,4℃ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 金属离子对菌体生长的影响

将一定浓度的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 离子分别加入培养基中,按 1% 的接种量接种 *K. pneumoniae*,培养 36 h 后,稀释 5 倍测定其生长量 (D)^[12~14]。

1.2.2 酶溶液的制备

K. pneumoniae 于牛肉膏蛋白胨培养液中培养 36 h 后于 8℃ 下 6 000 r/min 离心 10 min,分别得到上清液和菌体细胞。将上清液用 0.22 μm 滤膜抽滤除去残留的菌体细胞即得胞外酶液;菌体用去离子双蒸水充分洗涤 2 次,洗涤后的菌体用超声波破碎(工作 5 s,间隔 10 s,超声 50 次,功率 450 W)后于 8℃ 下 6 000 r/min 离心 10 min,分离得到上清液即为胞内酶液,胞内酶液用 0.22 μm 滤膜抽滤。

1.2.3 TPhT 的酶促降解实验

称取干重为 0.015 g 的湿菌体制成胞内酶液,加入 TPhT 并补充蒸馏水至处理体系总体积为 20 mL,并使 TPhT 的初始浓度为 3 mg/L。在水浴 30、130 r/min 条件下避光处理 4 h,取出样品萃取后分析检测 TPhT 浓度,考察菌体产生的酶对 TPhT 的降解效果。

$$\text{降解率} = \frac{\text{TPhT 初始浓度} - \text{降解后 TPhT 浓度}}{\text{TPhT 初始浓度}} \times 100\%$$

1.2.4 TPhT 的萃取和检测

降解后,在含有 TPhT 的样品中加入 100 mg NaCl 和 2 mL 1 mol/L HCl 溶液,将样品的 pH 调至酸性(pH 约为 2),再加入 10 mL 乙酸乙酯,剧烈振

荡使其充分混合,然后静置 30 min 使其分层,收集乙酸乙酯有机相。重复上述过程,萃取 2 次,合并 2 次所得有机相,并加入一定量的无水 Na_2SO_4 除去有机相中的水分,在 40℃ 恒温水浴下进行旋转蒸发,将有机相蒸干,最后用流动相将样品从瓶中洗出,定容至 10 mL,利用高效液相色谱仪(LC-20AT, Shim-pack, Japan)进行 TPhT 检测。

检测条件:分离柱为 C18 反相柱(150 mm);使用紫外检测器,检测波长 206 nm;流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{0.1\% \text{三氟乙酸溶液}} = 50:45:5$,流速为 1 mL/min;分析时间为 10 min;进样量 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 金属离子对菌体生长的影响

金属离子对微生物具有多方面的影响,其中 K、Na、Mg、Fe 等元素是微生物生长过程中所需要的重要元素,维持微生物的正常生长发育。此外,微生物生长代谢过程中某些重金属起重要作用,如 Cr、Cu、Ni、Zn 等是微生物的必需元素,在微生物生化反应中起催化剂的作用,能稳定蛋白质结构、细胞壁及维持渗透压平衡。此外,它们更是许多酶催化的活性中心的重要成分。这些重金属元素如果在微生物细胞中过量存在,可能造成很多不良影响,对微生物产生毒害作用^[15]。因此,本研究考察了 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 等金属离子对 *K. pneumoniae* 生长的影响。每种金属选择 3 个不同浓度:10、20、30 mg/L。实验结果如图 1 所示,培养基中添加 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 可以促进菌体的生长,其生长量明显高于未添加金属离子的情况; Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 对菌体生长没有明显的促进或者抑制的作用;即使上述 3 种离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 在浓度高达 20、30 mg/L 时,菌体仍然生长良好,说明该菌体对 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 具有良好的耐受能力;随着 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 浓度的升高菌体的生长量略有降低,并表

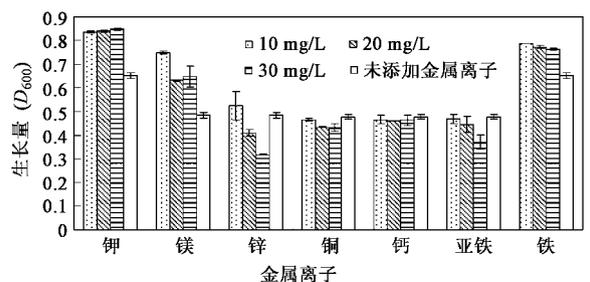


图 1 金属离子对 *K. pneumoniae* 生长的影响

Fig. 1 Effects of various metals on growth of *K. pneumoniae*

现出一定的抑制作用,说明当浓度达 30 mg/L 时, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对菌体产生一定的毒害作用,从而影响其生长。

2.2 金属离子加入降解体系对 TPhT 酶促降解的影响

金属离子是微生物生长的重要辅助因子,是许多胞内酶的构成成分,并协助催化代谢途径中的氧化等反应。除了 K、Na、Ca、Mg 外,微生物在生长代谢过程中,还需要有一些具有特殊生物学功能的微量金属元素。Fe 元素是细胞中过氧化氢酶、细胞色素氧化酶的组成成分,化能自养菌则依赖铁的氧化获得生长代谢所需的能量;Cu 元素是多酚氧化酶的组分并为羧化酶作用所必需;Zn 是乙醇脱氢酶、RNA 和 DNA 聚合酶的组分; Mg^{2+} 是 ATP 酶等多种酶的金属辅基,还可作为变构激活剂,激活数百种酶,参与糖代谢、脂肪酸代谢、蛋白质合成和信号转导^[16];此外,微生物蛋白质合成的启动阶段需要 Mg^{2+} 的参与,在重金属污染的情况下,镁离子与重金属发生交换,使蛋白质合成无法启动,蛋白质合成受阻^[17]。因此本实验选择 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 作为金属离子代表物,分别将 10、20、30 mg/L 和 1、2、3 mg/L 的金属离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 直接加入双蒸水降解体系利用 *K. pneumoniae* 的胞内酶液考察不同金属离子对 TPhT 酶促降解影响。

高浓度金属离子对 TPhT 酶促降解影响实验结果如图 2(a) 所示, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 均对酶促降解有促进作用,其中 K^+ 的最佳浓度为 10mg/L, Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 的最佳浓度均 30 mg/L。在上述最佳浓度下,其降解率分别为 76.66%、77.22%、62.99%、60.12%,相应的无金属离子存在的实验组,降解率分别为 54.51%、41.31%、53.41%、53.53%。即在最佳浓度的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 4 种金属离子存在的情况下,TPhT 的降解率是对照实验的 1.41、1.87、1.18、1.12 倍。 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 则对酶促降解影响不大。 Fe^{3+} 对酶促降解产生了一定的抑制作用,这与本课题组前期研究^[11]的结果一致。说明高浓度的 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 均可作为该菌体的胞内酶激活剂,促进其对 TPhT 的酶促降解; Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 对胞内酶没有明显的激活或抑制作用; Fe^{3+} 由于其浓度较高,对酶产生破坏作用,其较强的氧化能力会催化生物分子中巯基的自氧化并产生自由基从而对降解酶产生负面影响^[11]。

低浓度金属离子对 TPhT 酶促降解影响实验结

果如图 2(b) 所示, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 在较低浓度时可以适当地促进酶促降解作用,其最佳浓度分别为 1 mg/L、3 mg/L、3 mg/L。在最佳浓度下,其降解率分别为 67.80%、66.64%、60.29%。在最佳浓度下的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 这 3 种金属离子存在下,TPhT 的降解率是对照实验的 1.24、1.48、1.21 倍。 Ca^{2+} 随着加入浓度的增加对酶促降解有先抑制后激活的作用。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 对酶促降解有适当的抑制作用。说明低浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 均不能对酶促降解起到促进作用。

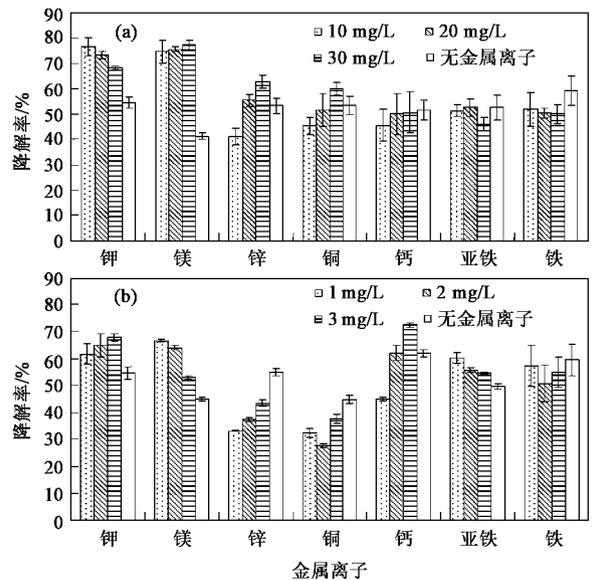


图 2 不同浓度金属离子对 TPhT 酶促降解的影响

Fig. 2 Effects of various metal concentrations on enzymatic degradation of TPhT

上述 2 组实验结果表明,不同金属离子对酶的活性有不同影响,即使是同一种金属离子在不同浓度范围所起的作用也存在差异。只有适当浓度范围的金属离子才能作为胞内酶的激活剂,对酶活性中心产生影响,刺激酶的活性,对酶降解产生促进作用,而超过或者未达到该浓度范围时,激活剂不能发挥作用甚至起到抑制的作用。

2.3 金属离子加入培养基中对产酶效果的影响

细胞的生长和发育是构成生命的基础,金属离子在其生长过程中主要起促进调节作用。例如:钙活化中性蛋白酶 (calcium-activated neutral proteinase, CANP) 中 Ca 在细胞功能的调节中起着关键性的作用,促进细胞生长、分泌^[18]。此外,金属离子是微生物生长过程中的重要辅助因子,是许多胞内酶的重要组成成分,并协助催化代谢途径中的

氧化等反应^[19,20]. 因此,本实验选择加入后使菌体具有良好降解效果的 30 mg/L 金属离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 加入培养基中利用培养后的菌体产生的胞内酶降解 TPhT,考察金属离子对降解酶活性的影响. 结果如图 3 所示, Mg^{2+} 加入后降解效果最好,降解率达到 85.66%,是对照实验的 1.83 倍;其次是 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 K^+ ,降解率分别为 73.01%、70.71%、70.13%,分别为对照实验的 1.56、1.51、1.50 倍. Ca^{2+} 与 Fe^{2+} 加入后对产酶效果的影响基本不明显, Fe^{3+} 加入培养基中对产酶具有一定的抑制作用. 该实验结果与直接将金属离子加入酶促降解体系中的实验结果基本一致. 说明金属离子加入培养基对微生物生长过程中酶的合成具有一定的影响作用,能够不同程度地促进或者抑制酶的合成.

比较图 1 和图 3 的实验结果可以发现,尽管 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 在 30 mg/L 时,菌体生长量较低,但是在加入该浓度 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 至培养基中产生的酶对 TPhT 仍然具有较好的降解效果;而 Fe^{3+} 加入培养基中,该菌体的生长量较高,但其产生的酶对 TPhT 降解具有一定的抑制作用. 说明降解菌的生长量高低与该菌体的产酶效果并不是完全一致.

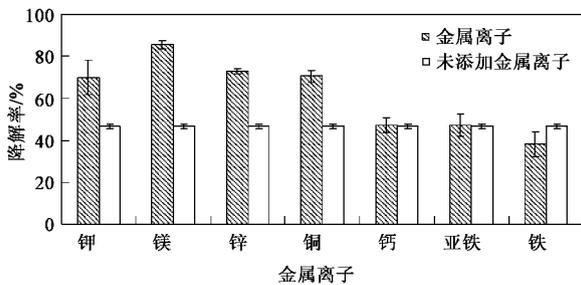


图3 金属离子对产酶效果的影响

Fig. 3 Effects of various metals on production of enzyme

2.4 金属离子加入 TPhT 粗酶液对酶促降解的影响

将 30 mg/L 金属离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 分别加入胞内酶液和胞外酶液中,考察此时金属离子对胞内酶和胞外酶促降解的影响,结果如图 4 所示. 观察图 4(a), Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 加入胞内酶液后,酶促降解率均高于未添加金属离子的,降解率分别为 51.55%、46.99%、41.76%,是未添加金属离子的 1.34、1.22、1.09 倍; K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 加入胞内酶后对酶促降解效果无明显的促进或抑制作用; Fe^{3+} 加入胞内酶后对酶促降

解效果具有一定的抑制作用. 观察图 4(b),无论添加金属离子与否,与胞内酶降解相比,胞外物质对 TPhT 的去除能力均比较差(基本在 10% 左右),说明胞外酶没有明显的 TPhT 降解能力. 胞内物质具有较高的降解能力. 而添加金属离子,对胞外酶降解影响较小,基本表现出一定的抑制作用. 说明某些金属离子只能作为胞内酶的激活剂而对胞外酶不能表现出相同作用. 这一结果同时说明,该菌体之所以具有能够分解 TPhT 的能力,主要是由于其分泌的一种或几种胞内酶表现出 TPhT 降解能力. 胞外物质也含有降解酶,但是该酶对 TPhT 的降解效果不佳^[10,11].

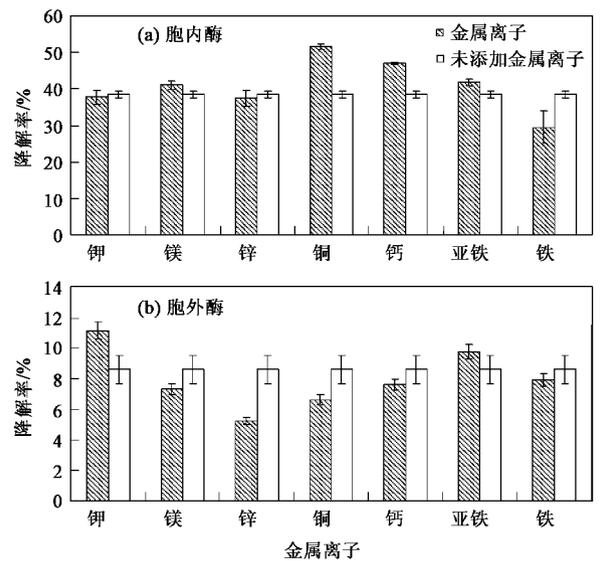


图4 金属离子对酶降解能力的影响

Fig. 4 Effects of various metals on degradation ability of its enzyme

3 结论

(1) 菌体 *K. pneumoniae* 对 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 具有良好的耐受能力,高浓度的 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对菌体产生一定的毒害作用,从而影响其生长. 适当浓度范围内的 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 均对酶促降解有促进作用,其中 Mg^{2+} 的促进作用最明显,其最佳浓度为 30 mg/L. 一定浓度范围内的 Fe^{3+} 对酶促降解具有适当的抑制作用. 不同金属离子对酶的活性有不同影响,同一种金属离子在不同浓度范围所起的作用也存在差异. 只有适当浓度范围的金属离子才能作为胞内酶的激活剂,刺激酶的活性,对酶降解产生促进作用,超过或者未达到该浓度范围时,激活剂不能发挥作用甚至起到抑制的作

用. 金属离子对菌体生长量的影响和产酶效果没有相关的联系.

(2) 金属离子加入培养基中利用菌体产生的胞内酶降解 TPhT, K^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 均能不同程度对微生物生长过程中酶的合成起到一定的促进作用, 从而提高了降解率; Ca^{2+} 与 Fe^{2+} 加入后对产酶效果的影响不明显; Fe^{3+} 加入培养基中对产酶具有一定的抑制作用. 该菌体之所以具有能够分解 TPhT 的能力, 主要是由于其分泌的胞内酶表现出 TPhT 降解能力. 某些金属离子只能作为胞内酶的激活剂而对胞外酶不能表现出相同作用.

参考文献:

- [1] Zachariadis G A, Rosenbergb E. Determination of butyl- and phenyltin compounds in human urine by HS-SPME after derivatization with tetraethylborate and subsequent determination by capillary GC with microwave-induced plasma atomic emission and mass spectrometric detection [J]. *Talanta*, 2009, **78** (2) : 570-576.
- [2] Cruz A, Caetano T, Suzuki S, *et al.* *Aeromonas veronii*, a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment, Ria de Aveiro in Portugal [J]. *Marine Environmental Research*, 2007, **64** (5) : 639-650.
- [3] Chou C C, Lee M R. Determination of organotin compounds in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography - mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1064** (1) : 1-8.
- [4] Colombini V, Bancon-Montigny C, Lu Y *et al.* Headspace single-drop microextraction for the detection of organotin compounds [J]. *Talanta*, 2004, **63** (3) : 555-560.
- [5] 袁东星, 钟树明, 杨东宁. 厦门西港和闽江口表层沉积物中有机锡含量分布 [J]. *台湾海峡*, 2001, **20** (1) : 91-95.
- [6] Paton G I, Cheewasedtham W, Marr I L, *et al.* Degradation and toxicity of phenyltin compounds in soil [J]. *Environmental Pollution*, 2006, **144** (3) : 746-751.
- [7] Bernat P, Dlugonski J. Tributyltin chloride interactions with fatty acids composition and degradation ability of the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007, **60** (3) : 133-136.
- [8] 陈素华, 孙铁珩, 周启星, 等. 微生物与重金属间的相互作用及其应用研究 [J]. *应用生态学报*, 2002, **13** (2) : 239-242.
- [9] 叶锦韶, 史一枝, 尹华, 等. 三苯基锡吸附降解菌的分离及特性研究 [J]. *环境科学*, 2009, **30** (8) : 2452-2457.
- [10] 史一枝. 水体三苯基锡的生物吸附与降解研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2009.
- [11] 叶锦韶, 史一枝, 尹华, 等. 克雷伯氏菌对三苯基锡的酶促降解特性 [J]. *环境科学*, 2010, **31** (2) : 459-464.
- [12] 金华, 赵建新, 陈卫, 等. 不同金属离子对丁酸梭状芽孢杆菌 Z-10 菌体及芽孢的影响 [J]. *食品工业科技*, 2009, **30** (6) : 177-180.
- [13] 鞠喜, 堵国成, 陈坚. 金属离子和醇类对混合菌产聚乙烯醇降解酶的影响 [J]. *工业微生物*, 2008, **38** (2) : 15-19.
- [14] Wani P A, Khan M S, Zaidi A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants [J]. *Chemosphere*, 2007, **70** (1) : 36-45.
- [15] 杨生玉, 王刚, 沈永红. 微生物生理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007. 274-275.
- [16] Pauza N L, Cotti M J P, Godar L, *et al.* Disturbances on Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) enzyme activity by Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ , K^+ and Li^+ : analysis based on coordination geometry and acid - base Lewis capacity [J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99** (2) : 409-414.
- [17] Bruins M R, Kapil S, Oehme F W. Microbial resistance to metals in the environment [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, **45** (3) : 198-207.
- [18] 周崇松, 兰昌云, 范必威, 等. 金属离子在生命过程中的作用机制 [J]. *广州化学*, 2005, **30** (1) : 58-64.
- [19] Maguire M E, Cowan J A. Magnesium chemistry and biochemistry [J]. *BioMetals*, 2002, **15** (3) : 203-210.
- [20] Garfinkel L, Garfinkel D. Magnesium regulation of the glycolytic pathway and the enzymes involved [J]. *Magnesium*, 1985, **4** (2-3) : 60-72.