

六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4 还原机理及酶学性质研究

肖伟¹, 王磊², 李倬锴¹, 张思维¹, 任大明^{1*}

(1. 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433; 2. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092)

摘要:从宝钢电镀污泥中分离得到 1 株六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4, 在液体 LB 培养基中培养 72 h 完全还原 2 mmol/L Cr^{6+} . 测定该菌株六价铬还原后细胞内外六价铬和总铬浓度, 检测细胞各组分六价铬还原能力, 并结合扫描电镜分析六价铬还原前后细胞形态的变化. 结果表明, 细菌的细胞壁膜能阻止六价铬进入细胞, 是六价铬发生还原的主要场所, 其通透性的改变将影响六价铬还原酶的作用; 该菌株六价铬还原酶为非分泌型, 在细菌细胞内侧发生作用. 测定六价铬还原酶活性和稳定性: 其最适温度范围 25 ~ 37℃, 最适 pH 7, Cu^{2+} 有增强六价铬还原酶活性的作用; 在 37℃, 该菌株六价铬还原酶 K_m 为 125.61 $\mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 为 7.68 nmol/(min·mg).

关键词: *Bacillus cereus*; 六价铬; 还原酶; 酶动力学曲线

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)03-0751-05

Mechanisms and Enzymatic Characters of Hexavalent Chromium Reduction by *Bacillus cereus* S5.4

XIAO Wei¹, WANG Lei², LI Zhuo-kai¹, ZHANG Si-wei¹, REN Da-ming¹

(1. State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: A strain of bacteria identified as *Bacillus cereus* S5.4, which was isolated from the electroplating sludge of Baosteel Corporation, Shanghai, was able to completely reduce 2 mmol/L Cr^{6+} in LB liquid after 72 hours. Experiments on concentrations of hexavalent and total chromium inside and outside bacterial cells after hexavalent chromium reduction, and hexavalent chromium reduction abilities of different cellular components, and SEM analysis of cellular morphology before and after hexavalent chromium reduction, showed that cellular walls and membranes, which were able to prevent hexavalent chromium out from living cells, were the main sites where hexavalent chromium reduction took place, and changes of their permeability would take effect on the function of hexavalent chromium reductase. The reductase was non-secretive and took effect on the inner side of living cells. Determination of the activity and stability of hexavalent chromium reductase showed that the optimal temperature range and pH of the reductase was 25 ~ 37℃ and pH 7, respectively. Cu^{2+} had some effect on the promotion of reductase activity. At the temperature of 37℃, K_m and $V_{\max}$ of the reductase was 125.61 $\mu\text{mol/L}$ and 7.68 nmol/(min·mg), respectively.

Key words: *Bacillus cereus*; hexavalent chromium; reductase; enzymatic kinetic curve

铬被广泛地应用在皮革工业、电解电镀和染料制造等领域, 发挥着巨大的经济价值, 但其生物毒性极大, 是造成环境污染的主要重金属之一. 我国每年的铬盐产量已经超过 16 万 t, 而铬渣的排放量却在 35 ~ 42 万 t, 其含有的六价铬约有 3 500 t^[1]. 六价铬的毒性最大, 因为它很容易被生物体吸收, 并且具有强氧化性, 能引起生物体的突变^[2]. 已经发现许多微生物具有把六价铬还原的能力, 其中包括 *Achromobacter* sp. C-1^[3]、*Arthrobacter aureus*^[4]、*Bacillus* sp.^[5]、*Cellulomonas flavigena*^[6]、*Desulfotomaculum reducens* sp. nov. MI-1^[7]、*Enterobacter cloacae* HO1^[8]、*Exiguobacterium aurantiacum*^[9]、*Microbacterium* sp. MP30^[10]、*Micrococcus* sp. SDCr-4^[11]、*Ochrobactrum* sp.^[12]、*Oscillatoria* sp. BJ2^[13]、*Providencia* sp.^[14]、*Pseudomonas*

synxantha^[9]、*Rhodobacter sphaeroides*^[15]、*Streptomyces griseus*^[16]和 *Synechocystis* sp.^[13]. 在好氧或厌氧的条件下, 六价铬的还原都可以发生^[2], 不同的微生物具有不同的还原能力, 但六价铬还原的作用机理以及相关还原酶的性质还不是很清楚.

为了研究微生物还原六价铬的作用机理及相关还原酶的性质, 本研究对从宝钢电镀污泥中分离得到的 1 株六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4 的六价铬还原酶的性质及还原机理进行了初步的探讨, 旨在揭示微生物还原六价铬的生物学过程, 为工业

收稿日期: 2007-04-04; 修订日期: 2007-06-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(50130030)

作者简介: 肖伟(1981 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物筛

选及遗传改造, E-mail: 042023054@fudan.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: dmren@fudan.edu.cn

上利用微生物治理铬重金属污染提供帮助^[17, 18].

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

菌株 *Bacillus cereus* S5.4 为本实验室从宝钢电镀污泥中分离得到. 菌株培养条件: 含有 2 mmol/L Cr^{6+} , pH 7 的 LB 液体培养基, 10% 接种量, 37℃ 培养. 每隔 24 h 取样, 测定细菌的生长量和上清液中六价铬残留浓度.

1.2 细菌细胞内外六价铬和总铬测定

含有 2 mmol/L Cr^{6+} 的 LB 液体培养基连续培养 96 h, 菌液 4℃ 离心取上清, 细胞沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)洗涤 2 次后, 用同样的缓冲液悬浮, 在冰浴中超声破菌, 再 4℃ 离心取上清, 分别测定 2 次上清的六价铬残留浓度和总铬浓度.

1.3 细菌细胞各组分六价铬还原能力检测

不含 Cr^{6+} 的 LB 液体培养基过夜培养, 菌液 4℃ 离心取上清, 即为上清样品. 细胞沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)洗涤 2 次后, 用同样的缓冲液悬浮, 平均分成 3 份. 一份不作处理, 即为静息细胞样品; 一份加入 1% 甲苯和 0.2% Triton X-100, 漩涡振荡, 即为渗透性细胞样品; 一份在冰浴中超声破菌, 再 4℃ 离心取上清, 即为细胞内提取物样品.

上述各样品与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 37℃ 水浴 6 h 后, 分别测定反应液上清的六价铬残留浓度.

1.4 六价铬对细菌细胞形态的影响

分别在不含有 Cr^{6+} 和含有 0.4 mmol/L Cr^{6+} 的 LB 液体培养基过夜培养, 菌液 4℃ 离心, 细胞沉淀经清洗、固定、脱水、干燥、喷金后于扫描电镜下观察细胞形态^[19, 20].

1.5 六价铬还原酶活性和稳定性测定

按上述制备细胞内提取物样品的方法制备六价铬还原酶.

一定量的六价铬还原酶在 pH 7, 37℃ 条件下与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 以上清液中六价铬残留浓度的减少作为活性测定的标准. 平行实验分别改变 pH 为 5 和 9, 温度为 4、25 和 55℃, 与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 测定上清液中六价铬残留浓度的减少, 与上述标准相比, 计算相对活性. 当改变某一条件时, 其他条件不变.

一定量的六价铬还原酶事先置于 pH 7, 4℃ 环境中, 24 h 后在 pH 7, 37℃ 条件下与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 以上清液中六价铬残留浓度的减少作为稳定性测定的标准. 平行实验分别改变事先置于环境

的 pH 为 5 和 9, 温度为 25、37 和 55℃, 24 h 后在 pH 7, 37℃ 条件下与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 测定上清液中六价铬残留浓度的减少, 与上述标准相比, 计算相对活性, 作为相对稳定性. 当改变某一条件时, 其他条件不变.

1.6 重金属离子对六价铬还原酶活性的影响

一定量的六价铬还原酶在 pH 7, 37℃ 条件下与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 以上清液中六价铬残留浓度的减少作为活性影响测定的对照和标准. 平行实验分别添加 0.1 mmol/L Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ag^{+} , 每次只添加一种重金属离子, 在 pH 7, 37℃ 条件下与 0.2 mmol/L Cr^{6+} 作用 2 h, 测定上清液中六价铬残留浓度的减少, 与上述标准相比, 计算相对活性, 判断各重金属离子的影响.

1.7 六价铬还原酶动力学曲线的绘制

测定一定量的六价铬还原酶在不同六价铬浓度下, pH 7, 37℃ 水浴不同时间后上清液中六价铬残留浓度的减少, 计算反应初速度 V_0 , 绘制 $1/V_0-1/\text{Cr}^{6+}$ 图, 从酶动力学曲线图上计算 K_m 和 $V_{\max}$.

蛋白质定量采用 Bradford Protein Estimation Kit (Sangon).

1.8 分析方法

细菌的生长量测定采用 600 nm 吸光度. 六价铬测定采用 DPC 法^[21]. 总铬测定采用 KMnO_4 -DPC 法^[22].

2 结果与讨论

2.1 菌株生长及六价铬还原情况

本实验条件下, 六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4 的对数生长发生在 12 ~ 24 h, 随着细菌的生长, 培养基中的六价铬被快速还原, 72 h 后 2 mmol/L Cr^{6+} 被完全还原, 见图 1.

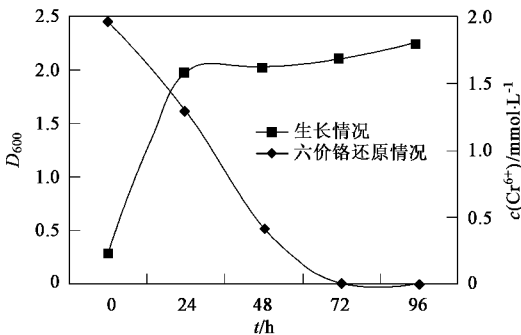


图1 菌株 *Bacillus cereus* S5.4 生长及六价铬还原情况

Fig.1 Bacterial cultivation and hexavalent chromium reduction of bacterial strain *Bacillus cereus* S5.4

2.2 细菌细胞内外六价铬和总铬测定

含有 2 mmol/L Cr⁶⁺ 的 LB 液体培养基连续培养 96 h 后,测定菌株 *Bacillus cereus* S5.4 细胞内外六价铬残留浓度和总铬浓度发现,此时,细胞内外环境中都已不再含有六价铬,铬元素已经从六价态还原成其他价态,见表 1.细菌细胞外总铬浓度与初始六价铬浓度基本相同,确证铬元素总量没有改变,只是从六价态还原成其他价态.

被还原的铬元素,绝大部分分布在细胞外,细胞内只有很小一部分,说明六价铬还原可能不是在细胞内发生的,并且在六价铬还原过程中,铬元素始终都被阻挡在细胞外,进入细胞的很少.因为六价铬对细胞具有很强的毒性,避免六价铬进入细胞,在细胞外发生六价铬还原,可能是该菌株长期进化选择后,获得的消除六价铬毒性的一种机制.

表 1 培养96 h后菌株 *Bacillus cereus* S5.4 细胞内外六价铬残留浓度和总铬浓度/mm^{ol}·L⁻¹

Table 1 Endocellular and extracellular hexavalent and total chromium analysis of bacterial strain <i>Bacillus cereus</i> S5.4 after 96 h incubation/mm ^{ol} ·L ⁻¹		
位置	六价铬 <i>c</i>	总铬 <i>c</i>
胞外	— ¹⁾	1.98 ± 0.06
胞内	—	0.045 ± 0.005

1) —表示检测不到

2.3 细菌细胞各组分六价铬还原能力检测

检测细菌细胞各组分六价铬还原能力发现,细胞各组分还原六价铬的能力很不相同,见表 2.上清样品仅能还原 22.5% 六价铬,而细胞内提取物样品能还原 92.5% 六价铬,说明六价铬还原酶主要在细胞内发挥作用,为非分泌型.

渗透性细胞样品能还原 72.5% 六价铬,而静息细胞样品却能还原 87.5% 六价铬,还原能力更高一

些,说明细胞壁膜的通透性对六价铬还原酶发挥作用十分重要.经甲苯和 Triton X-100 作用后,细胞壁膜的通透性发生改变,六价铬更易进入细胞,可能对细胞产生一定毒害,使其还原六价铬的能力受到一定影响.

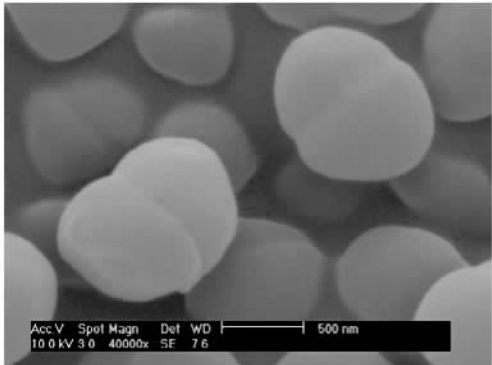
而静息细胞样品和细胞内提取物样品在六价铬还原能力上的差异,主要是六价铬还原酶能否与六价铬充分接触,将电子传递给六价铬,得到还原价态的铬.其中就存在这样一个矛盾,细胞一方面要保护自己,将六价铬阻挡在细胞壁膜之外,又要让主要在细胞内发挥作用的六价铬还原酶尽可能与六价铬接触.因此,六价铬还原酶反应发生的场所是在细胞壁膜上.

表 2 菌株 *Bacillus cereus* S5.4 细胞各组分六价铬还原能力/mm^{ol}·L⁻¹

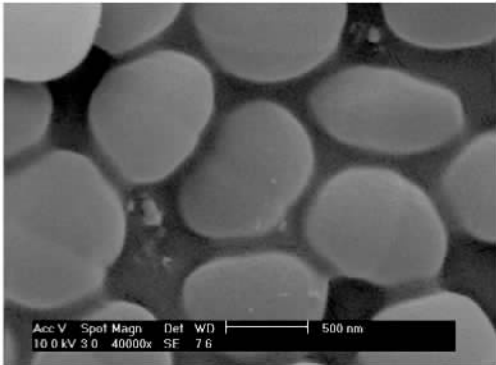
Table 2 Hexavalent chromium reduction capacity of cellular components of bacterial strain <i>Bacillus cereus</i> S5.4/mm ^{ol} ·L ⁻¹		
项目	Cr ⁶⁺ 起始 <i>c</i>	Cr ⁶⁺ 终末 <i>c</i>
上清	0.20	0.155 ± 0.005
渗透性细胞	0.20	0.055 ± 0.025
静息细胞	0.20	0.025 ± 0.010
细胞内提取物	0.20	0.015 ± 0.005

2.4 六价铬对细菌细胞形态的影响

分别在不含有 Cr⁶⁺ 和含有 0.4 mmol/L Cr⁶⁺ 的 LB 液体培养基中过夜培养,电镜观察细菌细胞形态,见图 2.从图 2 中可以看出,不含有六价铬的条件下,菌株生长旺盛,分裂期细胞居多,细胞表面光滑饱满;而在 0.4 mmol/L Cr⁶⁺ 条件下,菌株生长情况依旧良好,细胞正常分裂增殖,细胞表面饱满完整,且细胞壁膜对六价铬无明显吸附,表明六价铬不曾进入细胞内部,未对细胞形态造成破坏,还原后的铬留在胞外培养基中.



(a) 无Cr⁶⁺



(b) 0.4mmol/L Cr⁶⁺

图 2 不同六价铬培养条件下菌株 *Bacillus cereus* S5.4 细胞形态的扫描电镜图

Fig. 2 SEM photograph of bacterial strain *Bacillus cereus* S5.4 under different hexavalent chromium culture conditions

2.5 六价铬还原酶活性和稳定性测定

实验发现,菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶能发挥酶活性的温度范围在 25 ~ 55℃,且不同温度之间没有太大差异,见图 3(a).但预先置于 37 ~ 55℃

这个温度范围24 h可能引起酶的不稳定,影响酶活性的发挥,因此该酶的最适温度范围在 25 ~ 37℃.而该酶在pH 5和pH 9的环境下,酶活性和稳定性都会有较大损失,因此,该酶的最适 pH 为 7,见图 3(b).

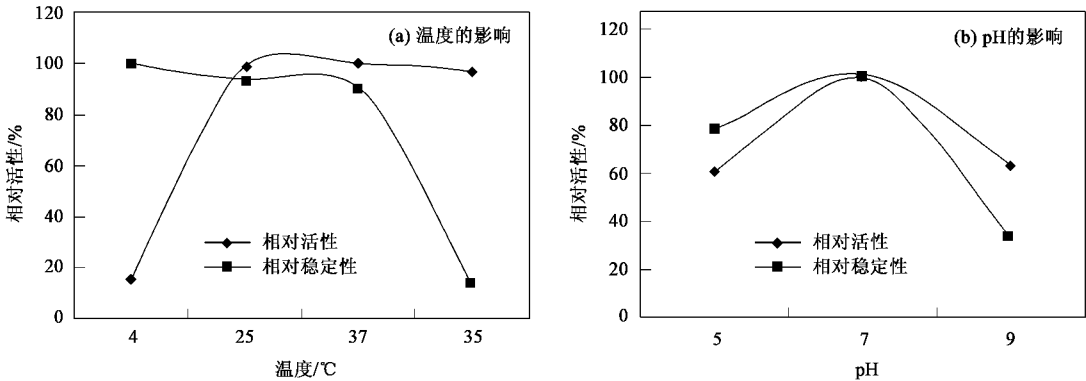


图 3 菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶的相对活性和相对稳定性
Fig.3 Relative enzymatic activity and stability of hexavalent chromium reductase of bacterial strain *Bacillus cereus* S5.4

2.6 重金属离子对六价铬还原酶活性的影响

测定不同重金属离子存在下,菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶活性的改变发现,大部分重金属离子对该酶的活性都有不同程度的抑制作用,只有 Cu^{2+} 有一定的促进作用,见图 4.这与文献 [23, 24]报道的结果一致,但 Cu^{2+} 能对酶活性起促进作用的原因还不是很清楚.

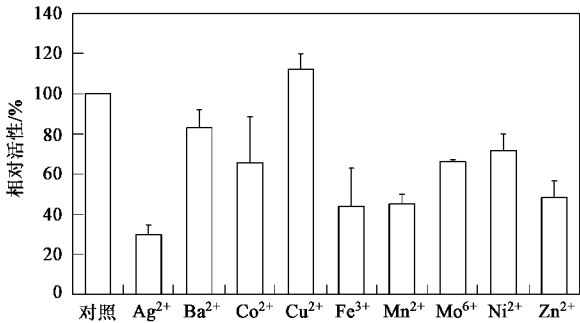


图 4 重金属离子对菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶活性的影响

Fig.4 Effect of heavy metals on relative enzymatic activity of hexavalent chromium reductase of bacterial strain *Bacillus cereus* S5.4

2.7 六价铬还原酶动力学曲线

测定不同六价铬浓度下,菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶反应初速度 V_0 ,见表 3.

依表 3 数据绘制 $1/V_0-1/\text{Cr}^{6+}$ 图,即为 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶的动力学曲线,见图 5.

从曲线拟合得到的解析式 $y = 16.355x + 0.1302$,计算出 K_m 为 $125.61 \mu\text{mol/L}$, $V_{\max}$ 为 7.68

表 3 不同 Cr^{6+} 浓度下菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶的 V_0 、 $1/V_0$ 和 $1/\text{Cr}^{6+}$ 浓度

Bacillus cereus S5.4 and 1/Cr ⁶⁺ under various Cr ⁶⁺ concentration			
Cr ⁶⁺ /mmol·L ⁻¹	V ₀ /nmol·(min·mg) ⁻¹	1/V ₀ /min·mg·nmol ⁻¹	1/Cr ⁶⁺ /L·μmol ⁻¹
0.02	1.05	0.950	0.050
0.04	1.87	0.534	0.025
0.10	3.39	0.295	0.010
0.20	4.68	0.214	0.005

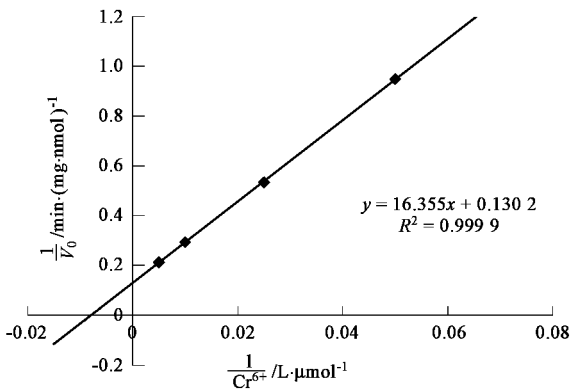


图 5 菌株 *Bacillus cereus* S5.4 六价铬还原酶动力学曲线
Fig.5 Enzymatic kinetic curve of hexavalent chromium reductase of bacterial strain *Bacillus cereus* S5.4

$\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$. 比较来源于不同菌株的六价铬还原酶的 K_m 和 $V_{\max}$,见表 4,可以看出,不同来源的六价铬还原酶的酶反应动力学参数 K_m 和 $V_{\max}$ 很不相同,表明不同六价铬还原酶具有不同的活性.

表 4 不同菌株六价铬还原酶 K_m 和 V_{max} 的比较

Table 4 K_m and V_{max} of hexavalent chromium reductase from different bacterial strains

菌株	K_m / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	V_{max} / $\text{nmol}\cdot(\text{min}\cdot\text{mg})^{-1}$	参考文献
<i>Bacillus cereus</i> S5.4	125.61	7.68	本研究
<i>Bacillus</i> sp. ES 29	7.09	171.00	[23]
<i>Bacillus</i> sp. RE	14.00	3.80	[24]
<i>Bacillus sphaericus</i> AND 303	158.12	1 432.00	[25]

3 结论

从宝钢电镀污泥中分离得到的 1 株六价铬还原细菌 *Bacillus cereus* S5.4, 在液体 LB 培养基中培养 72 h 完全还原 2 mmol/L Cr^{6+} . 对该菌株六价铬还原酶的性质及还原机理进行了研究, 实验发现, 细菌的细胞壁膜能阻止六价铬进入细胞, 是六价铬发生还原的主要场所, 其通透性的改变将影响六价铬还原酶的作用. 该菌株六价铬还原酶为非分泌型, 在细菌细胞内侧发生作用. 其最适温度范围 25 ~ 37℃, 最适 pH 7, Cu^{2+} 有增强六价铬还原酶活性的作用. 在 37℃, 该菌株六价铬还原酶 K_m 为 125.61 $\mu\text{mol/L}$, V_{max} 为 7.68 $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$.

参考文献:

[1] 江澜. 微生物治理铬污染的应用与发展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2006, 23(2): 132-135.

[2] Garbisu C, Alkorta I, Llama M J, *et al.* Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis* [J]. Biodegradation, 1998, 9(2): 133-141.

[3] 柴立元, 龙腾发, 唐宁, 等. 微生物治理碱性含铬废水的试验研究[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2005, 36(5): 816-820.

[4] Horton R N, Apel W A, Thompson V S, *et al.* Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens* [J]. BMC Microbiology, 2006, 6(5): 5-12.

[5] Megharaj M, Avudainayagam S, Naidu R. Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste [J]. Current Microbiology, 2003, 47(1): 51-54.

[6] Xu W H, Liu Y G, Zeng G M, *et al.* Enhancing effect of iron on chromate reduction by *Cellulomonas flavigena* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2005, 126(1): 17-22.

[7] Teo B M, Obratsova A Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptors [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 162(1): 193-198.

[8] Komori K, Rivas A, Toda K, *et al.* Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromates under anaerobic conditions [J]. Biotechnology & Bioengineering,

1990, 35(9): 951-954.

[9] Pattanapitpaisal P, Mabbett A N, Finlay J A, *et al.* Reduction of Cr(VI) and bioaccumulation of chromium by gram positive and gram negative microorganisms not previously exposed to Cr-stress [J]. Environmental Technology, 2002, 23(7): 731-745.

[10] Pattanapitpaisal P, Brown N L, Macaskie L E. Chromium reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2001, 57(2): 257-261.

[11] Sultan S, Hasnain S. Chromate reduction capability of a gram positive bacterium isolated from effluent of dying industry [J]. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 2005, 75(4): 699-706.

[12] Thacker U, Madamwar D. Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DMI [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, 21(7): 891-899.

[13] Faisal M, Hameed A, Hasnain S. Chromium-resistant bacteria and cyanobacteria: impact on Cr(VI) reduction potential and plant growth [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2005, 32(12): 615-621.

[14] Thacker U, Parikh R, Shouche Y, *et al.* Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 4332-4337.

[15] Nepple B B, Kessi J, Bachofen R. Chromium reduction by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000, 25(4): 198-203.

[16] Laxman R S, More S. Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus* [J]. Minerals Engineering, 2002, 15(11): 831-837.

[17] 周立祥, 方迪, 周顺桂, 等. 利用嗜酸性硫杆菌去除制革污泥中铬的研究[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 62-66.

[18] 方迪, 周立祥. 温度对制革污泥的生物淋滤除铬效果的影响[J]. 环境科学, 2006, 27(7): 1455-1458.

[19] 何宝燕, 尹华, 彭辉, 等. 酵母菌吸附重金属铬的生理代谢机理及细胞形貌分析[J]. 环境科学, 2007, 28(1): 194-198.

[20] 尹华, 叶锦韶, 彭辉, 等. 酵母菌-活性污泥法吸附处理含铬电镀废水的性能[J]. 环境科学, 2004, 25(3): 61-64.

[21] GB 7467-87, 水质六价铬的测定——二苯碳酰二肼分光光度法[S].

[22] GB 7466-87, 水质总铬的测定——高锰酸钾氧化-二苯碳酰二肼分光光度法[S].

[23] Camargo F A O, Okeke B C, Bento F M, *et al.* In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu^{2+} [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2003, 62(5): 569-573.

[24] Elangovan R, Abhipsa S, Rohit B, *et al.* Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus* sp. [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(4): 247-252.

[25] Pal A, Dutta S, Paul A K. Reduction of hexavalent chromium by cell-free extract of *Bacillus sphaericus* AND 303 isolated from serpentine soil [J]. Current Microbiology, 2005, 51(5): 327-330.