



含还原基因 *dsrA* 的耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 的构建及其对铀(VI)的还原富集性能

朱琦琦¹, 唐 艳¹, 罗佳琦², 王五洲³, 马 云³, 彭国文², 李珊珊¹, 何淑雅¹, 肖方竹¹

- (1. 南华大学 公共卫生学院, 衡阳 421001;
2. 南华大学 化学化工学院, 衡阳 421001;
3. 南华大学 衡阳医学院, 衡阳 421001)

摘 要: 本文提取扩增硫酸盐还原菌中关键还原基因 *dsrA*, 将其转入耐辐射奇球菌(DR)中, 构建基因工程菌 *Deino-dsrA*。考察溶液 pH 值、菌剂量、铀初始浓度、富集时间等因素对基因工程菌 *Deino-dsrA* 还原富集性能的影响。采用扫描电镜和电子能谱(SEM-EDS)以及傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)表征该基因工程菌, 分析铀富集前后菌体表面形貌结构、元素和基团的变化, 探明其还原富集铀(VI)的行为。结果表明: 在溶液 pH 值为 5、菌剂所占比例为 33%、铀初始浓度为 30 mg/L、富集时间为 60 min 时, 该基因工程菌还原富集铀(VI)的效果最佳。基因工程菌对铀的富集过程符合准二级反应动力学模型及 Langmuir 等温线模型。基因工程菌 *Deino-dsrA* 富集率(92.45%)相比野生型 DR 富集率(72.02%)显著提升。该基因工程菌以其耐辐射、高还原富集、环境友好等多重优势, 将在含铀废水的治理领域具有可观的应用前景。

关键词: 耐辐射奇球菌; 还原基因 *dsrA*; 铀; 还原富集

文章编号: 1004-0609(2021)-12-3690-10

中图分类号: X753; X172

文献标志码: A

引文格式: 朱琦琦, 唐 艳, 罗佳琦, 等. 含还原基因 *dsrA* 的耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 的构建及其对铀(VI)还原富集性能[J]. 中国有色金属学报, 2021, 31(12): 3690-3699. DOI: 10.11817/j.ysxb.1004.0609.2021-37870

ZHU Qi-qi, TANG Yan, LUO Jia-qi, et al. Construction of radiation-tolerant genetically engineered bacteria *Deino-dsrA* containing reduction gene *dsrA* and its performance on uranium(VI) enrichment[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2021, 31(12): 3690-3699. DOI: 10.11817/j.ysxb.1004.0609.2021-37870

铀是一种天然放射性元素, 广泛分布在岩石和土壤中。近年来, 核工业迅速发展, 铀作为重要的核工业原料, 其需求量日益增加, 与此同时, 铀导致的水体污染越来越受到重视。水体中铀的来源主要包括铀矿开采、冶炼及加工, 核电站异常事故导致的铀泄露, 核武器的生产、试验及贫铀武器的使用等^[1]。铀兼备化学毒性和放射毒性两方面的危害^[2], 可通过呼吸道和消化道进入体内, 易溶性铀化合物还可经无伤的皮肤进入体内, 从而产生内照射和化学毒性, 可对人的肾脏、免疫系统、神经系

统及生育能力产生损害, 并可能导致基因突变和癌症的发生^[3-4]。目前, 含铀废水中铀的净化方法主要包括: 化学沉淀^[5]、吸附^[6-7]、离子交换^[8]、溶剂萃取^[9]、生物处理^[10]等。由于物理化学处理方法的经济性和有效性低, 微生物处理成为优选方法^[11]。

微生物富集法因其廉价、高效、易于培养等特点, 具有治理环境中的重金属离子的潜力^[12-14]。耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, DR)是一种球菌或杆状非孢子菌, 无致病性, 具有极强的抗辐射、抗氧化和 DNA 损伤修复能力, 被认为是地球上最

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11705085); 湖南省自然科学基金资助项目(2020JJ6050, 2018JJ3458, 2018JJ3457)

收稿日期: 2020-11-24; 修订日期: 2021-03-13

通信作者: 何淑雅, 教授, 博士; 电话: 13807348502; E-mail: heshuya8502@163.com

肖方竹, 副教授, 博士; 电话: 18397713358; E-mail: xfzhunh@163.com

耐辐射的微生物^[15]。耐辐射奇球菌对干燥、电离辐射、氧自由基(ROS)和有毒化学物质等都具有很强的抵抗能力^[16]。能够生存在高辐射条件下^[17],对营养物质需求较低^[18],极强的抗性使其在微生物治理中脱颖而出。近年来,已有研究报道耐辐射奇球菌能够有效降低汞(II)为毒性较小的挥发性单质汞^[19],将 Cr(VI)还原为流动性较低、毒性较弱的 Cr(III)^[20],去除放射性核污染废水中的钴、铁等重金属离子^[21-22]。耐辐射奇球菌对铀具有一定的富集作用^[23-25],但野生型菌株的富集效能尚未满足大规模工业化应用需求。

目前,采用转基因方式修饰耐辐射奇球菌以增强其还原富集性能的报道较少。本文拟将已连接还原基因 *dsrA* 的重组载体 pRADK-*dsrA* 转入耐辐射奇球菌 DR 中,构建兼备高还原性和强辐射抗性的基因工程菌 *Deino-dsrA*。并将该基因工程菌应用于低浓度铀溶液中铀(VI)的还原富集实验,系统考察溶液 pH 值、菌剂投加量、铀初始浓度、富集时间等主要因素对其还原富集性能的影响。通过对比该基因工程菌铀富集前后形貌及基团变化,分析其还原富集铀(VI)的行为,将该基因工程菌富集铀的数据拟合动力学模型及等温线模型,阐释其还原富集铀(VI)的机理,该研究可为生物治理含铀废水提供一定的科学依据和技术支撑。

1 实验

1.1 菌剂/试剂与仪器

主要菌剂/试剂:耐辐射奇球菌 *Deinococcus radiodurans* R1(编号:CGMCC1.633),大肠杆菌 DH5 α ,硫酸盐还原菌(SRB),原核表达载体 pRADK 质粒均由南华大学核辐射生物效应重点实验室传代保存; TGY 培养基(0.5% 胰蛋白胍 TRYPTONE、0.3% 酵母提取物 YEAST、0.1% 葡萄糖 D-glucose, pH=6.4 $\pm$ 0.2, 固体培养基另加 1.5% 琼脂 Agar, 以上比例均为质量分数)用于培养耐辐射奇球菌。细菌 DNA 提取试剂盒购于北京天根生物有限公司, PCR 引物由金唯智公司合成, Nde I 酶、BamH I 酶、T4 DNA 连接酶购于碧云天生物有限公司,高纯度质粒小提试剂盒购自北京康为生物公司,其他试剂为国产分析纯。

主要仪器:紫外分光光度计(UV2600 型,日本

岛津公司),傅立叶变换红外光谱仪(FTIR, IRA-1S 型,日本岛津公司),扫描电子显微镜(SEM, 配备电子能谱仪 EDS, mpms squid vsm 型,美国 FEI 公司)。

1.2 耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 的构建及鉴定

提取硫酸盐还原菌中的基因组 DNA,设计并合成 PCR 扩增引物,上游引物 *dsrA*-F 序列为: 5'-CCCTGCAGGTCGAATCGGATCC(BamH I 酶切位点)CCAAGGCAGGCTTCAG-3',下游引物 *dsrA*-R 序列为: 5'-CTCACAGGAGGACCCCATATG(Nde I 酶切位点)CATGTGGAGGTAGGCA-3',以基因组 DNA 为模板,加入设计好的引物进行 PCR 扩增反应,得到目的基因 *dsrA*。用核酸内切酶 Nde I、BamH I 将 pRADK 质粒和 PCR 纯化产物进行双酶切,将双酶切产物进行凝胶电泳并胶回收。之后将回收的酶切后 PCR 产物与载体质粒 pRADK 进行连接反应,得到重组载体 pRADK-*dsrA* 并将其转化入耐辐射奇球菌中,构建耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA*,并进行 PCR 鉴定,之后将基因扩增为阳性的菌株其质粒寄至上海生工公司进行测序鉴定。

1.3 还原富集实验

将耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 于 TGY 固体培养基中培养复苏后,挑取单克隆菌株接种于 TGY 液体培养基中,扩大培养至菌液 OD₆₀₀ 值约为 1。用 0.9% 生理盐水将其制成 OD₆₀₀ 值为 0.5 的菌悬液,在一系列 100 mL 具塞锥形瓶中,分别加入 20 mL 菌悬液,10 mL 一定浓度的铀标准溶液,调节 pH 值。将具塞锥形瓶置于 30 ℃ 恒温空气浴摇床内,以 220 r/min 的转速恒温震荡后,离心取 1 mL 上清液,加入具塞比色管中,再加入 1 mL 偶氮胂 III(质量分数 0.05%),醋酸-醋酸钠缓冲溶液(pH=4)定容至 10 mL,上下颠倒混匀后静置 10 min。在波长 652 nm 处,用紫外可见分光光度计分别测其吸光度,并计算相应的还原富集率 p ^[26]:

$$p = \frac{c_0 - c_t}{c_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$q_t = \frac{(c_0 - c_t) \times V}{m} \quad (2)$$

式中: c_0 为铀初始浓度, mg/L; c_t 为 t 时刻溶液中

铀的剩余浓度, mg/L。 V 为所用铀溶液体积, L; m 为富集剂质量, g。

1.4 样品的制备及其表征

将未富集和已富集铀的基因工程菌菌体用生理盐水清洗干净, 于 55 °C 的烘箱中烘 24 h, 冷却后使用研钵研磨菌体, 称量并收集菌体, 将干菌体保存在干燥器中备用, 用于扫描电镜、能谱和傅立叶红外光谱分析。

2 结果与讨论

2.1 重组载体 pRADK-*dsrA* 测序鉴定

如图 1 所示, 琼脂糖电泳结果表明在第二条泳道所得条带与目的片段长度大小一致。测序分析的部分序列结果如图 1(b)所示, 利用 Blast 程序对所得序列进行对比分析, 结果表明基因插入位置正

确, 没有发生移码突变, 载体构建成功。

2.2 溶液 pH 值对富集 U(VI)的影响

取 10 mL pH 分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 的铀溶液和 20 mL OD₆₀₀ 值为 0.5 的菌悬液加入一系列具塞锥形瓶中, 使溶液中铀的最终质量浓度为 30 mg/L, 于 30 °C 富集反应 60 min, 观察 pH 值对富集铀的影响, 其结果如图 2 所示。从图 2 可看出, pH<5 时, 富集率随 pH 值的增大而上升, 在 pH 值过低的环境中, U(VI)在铀溶液以 UO_2^{2+} 的形式存在, 同时溶液中含有大量的 H^+ , 占据工程菌剂表面的亲核位点, 产生相互竞争, 使 UO_2^{2+} 不能很好地与工程菌剂表面的亲核位点接触, 随着 pH 值的增大, 溶液中 H^+ 减少, 与 UO_2^{2+} 的竞争减弱, 从而富集率上升。pH=5 时, 富集率达到 92.45%, 此时, 活性微生物体内还原酶活性以及其生存活性最佳。pH>5 时, 由于溶液中铀酰离子发生水

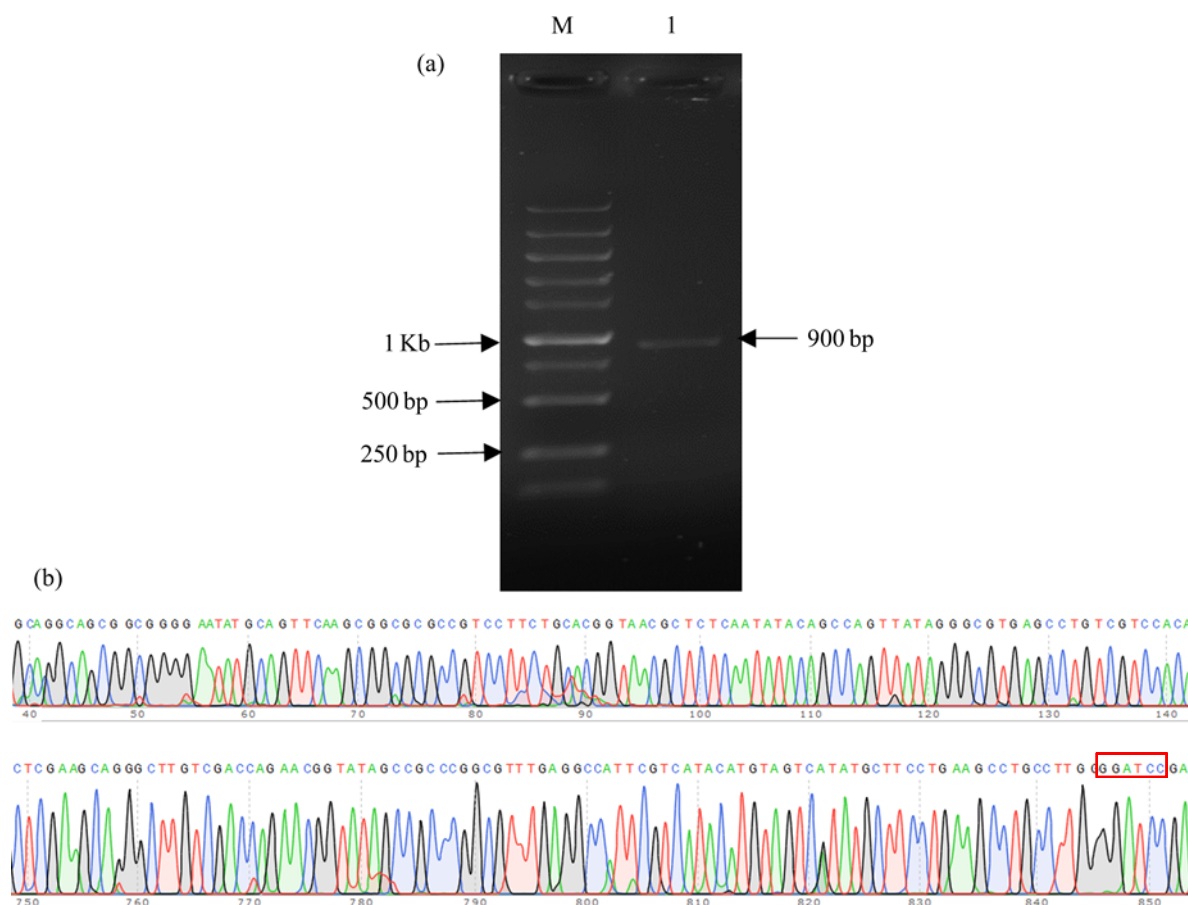


图 1 pRADK-*dsrA* 质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of pRADK-*dsrA* plasmid (Lane M: Maker; Lane1: PCR products; Red box marks sequences of BamH I restriction sites): (a) PCR amplification products of pRADK-*dsrA*; (b) Partial sequencing result of pRADK-*dsrA*

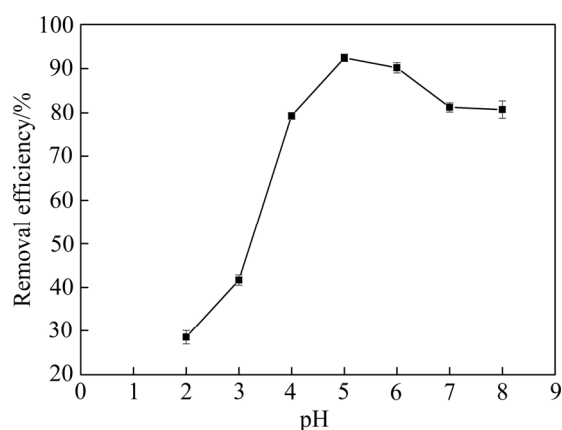


图 2 pH 值对富集效果的影响

Fig. 2 Effect of pH on enrichment

解, 生成了空间结构较大的铀酰水合正离子, 包括 $[\text{UO}_2\text{OH}]^+$ 、 $[(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2]^{2+}$ 、 $[(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5]^+$ 、 $[(\text{UO}_2)_4(\text{OH})_7]^+$ 等^[27-29], 占据细胞壁表面更多的活性位点, 使富集率随 pH 值的增大而下降。因此, 最佳 pH 值条件为 5.0。

2.3 菌剂量对富集 U(VI)的影响

取 2、4、6、8、10、12、14 mL 菌液离心后, 用 20 mL 生理盐水重悬菌体并将其加入到一系列具塞锥形瓶中, 再加入 10 mL 铀标溶液使其终浓度为 30 mg/L, 溶液总体积为 30 mL, 调节 pH=5, 在 30 °C 条件下富集 60 min, 探索菌剂量对富集 U(VI)的影响, 结果如图 3 所示。从图 3 可以看出, 富集率随菌液加入量的增加而升高, 呈正相关性, 这和范黎锋等^[30]的研究结果相似。加入量为 33%后富集率逐

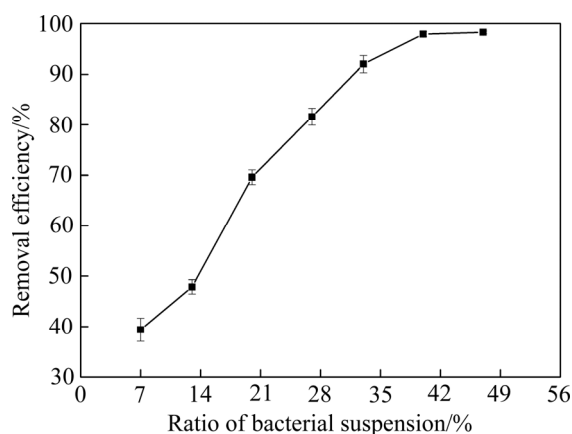


图 3 菌液投加比例对富集 U(VI)效果的影响

Fig. 3 Effect of ratio of bacterial suspension on enrichment of U(VI)

渐趋于稳定, 达到 92%, 菌剂加入量越大, 细胞壁上的富集位点和空穴相应的增多, 使富集率增大。从经济、可行性等方面综合考虑, 最佳菌液投加比例为 33%。

2.4 铀初始浓度对富集 U(VI)的影响

在 pH=5、反应温度 30 °C 的条件下, 加入 10 mL 铀溶液、20 mL OD₆₀₀ 值为 0.5 的菌悬液, 一系列具塞锥形瓶中的铀终浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70 mg/L。60 min 后观察铀初始浓度对富集 U(VI)的影响, 其结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 随着铀初始浓度的增加, 富集率呈现下降的趋势。当菌体投加量一定, 溶液中铀初始浓度较低时, 细胞壁表面活性位点充足, 铀酰离子与菌体充分接触, 从而富集率较高。增加铀初始浓度, 菌体表面富集位点逐渐饱和, 铀酰离子占据有限的活性位点, 使富集达到平衡。之后随着铀初始浓度的增高, 工程菌剂对铀的富集率则降低。综合考虑, 最佳的铀初始浓度为 30 mg/L。

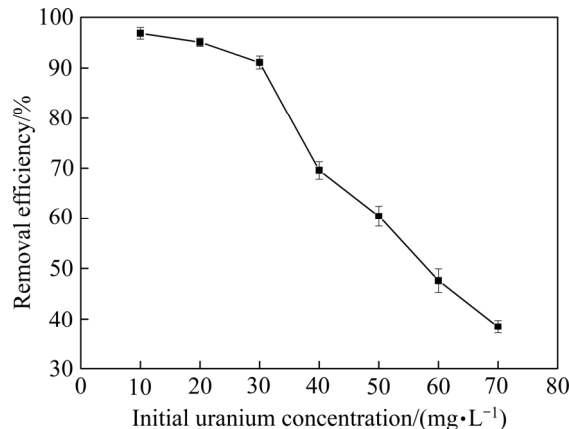


图 4 铀初始浓度对富集 U(VI)效果的影响

Fig. 4 Effect of initial uranium concentration on enrichment of U(VI)

2.5 时间对富集 U(VI)的影响

在一系列具塞锥形瓶中加入 10 mL 铀溶液、20 mL OD₆₀₀ 值为 0.5 的菌悬液, 使得锥形瓶中铀初始浓度为 30 mg/L, 调节 pH 为 5, 在 30 °C 进行富集, 富集时间分别为 15、30、45、60、75、90、105 min。考察时间对富集 U(VI)的影响。在相同的实验条件下, 将野生型耐辐射奇球菌作为对照组, 用于探讨 *dsrA* 还原基因对耐辐射奇球菌富集铀的影响, 结果

如图 5 所示。由图 5 可以看出, 在 15 min 内, 由于菌体表面富集位点数量较多, 与溶液中 U(VI)的结合率大, 富集率迅速增长到 67.91%; 富集时间为 60 min 时, 富集率达到 90.39%, 随着时间的延长, 菌体表面富集位点逐渐饱和, 富集达到平衡。对照组富集时间为 60 min 时, 富集率达到 72.02%, 明显低于实验组。由于实验组 *Deino-dsrA* 中含有 *dsrA* 还原基因, 其表达的还原酶可以将溶液中的 U(VI)还原为 U(IV), 使铀更易沉淀于菌体表面。综上所述可知, 最佳的富集时间为 60 min, 此时 *dsrA* 还原基因能显著增强耐辐射奇球菌对铀的富集性能。

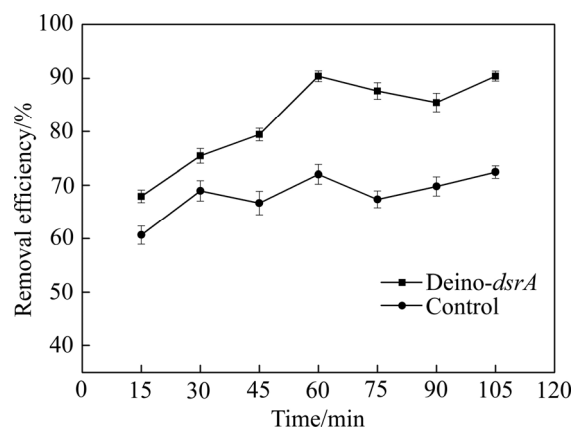


图 5 富集时间对富集 U(VI)效果的影响
Fig. 5 Effect of enrichment time on enrichment of U(VI)

2.6 富集动力学

为了进一步探讨基因工程菌富集 U(VI)的动力学, 在 $c_0=30\text{ mg/L}$ 、 $\text{pH}=5$ 、 $m=16.6\text{ mg}$ 、 $T=30\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下, 采用准一级反应动力学模型和准二级反应动力学模型进行线性拟合分析。

准一级反应动力学拟合方程为

$$\lg(q_e - q_t) = \lg q_e - \frac{k_1 t}{2.303} \tag{3}$$

准二级反应动力学拟合方程为

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \tag{4}$$

表 1 耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 富集铀的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of uranium enrichment by *Deino-dsrA*

Pseudo-first-order kinetic model			Pseudo-second-order kinetic model			Actual equilibrium concentration, $q_e/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
$q_e/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	k_1/min^{-1}	R^2_t	$q_e/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$k_2/(\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$	R^2_t	
24.77	0.04443	0.86442	51.98	0.00294	0.99372	49.01

式中: k_1 为准一级反应富集速率常数, min^{-1} ; k_2 为准二级反应富集速率常数, $\text{g}/(\text{mg}\cdot\text{min})$; q_e 为平衡富集容量, mg/g 。

准一级、准二级反应动力学模型用于富集过程的线性拟合分析, 其结果如图 6 所示, 拟合参数列于表 1。表 1 数据表明, 准一级动力学模型对实验数据拟合的相关性 ($R^2_t=0.86442$) 小于准二级的相关性 ($R^2_t=0.99372$), 且实际平衡富集容量与准二级动力学方程计算得到的理论平衡富集容量更接近。因此, 准二级反应动力学模型更适合描述基因工程菌富集 U(VI)的反应过程, 表明该反应过程以化学富集为主。

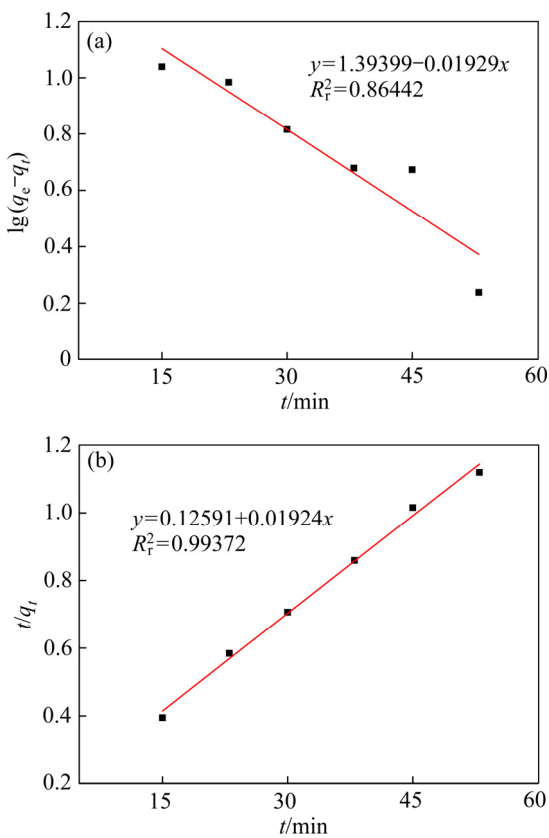


图 6 动力学模型的拟合结果
Fig. 6 Fitting results of tow known kinetic models: (a) Pseudo-first-order model; (b) Pseudo-second-order model

2.7 富集等温线分析

为进一步研究基因工程菌富集 U(VI)的反应过程,采用 Langmuir 和 Freundlich 富集等温线模型拟合基因工程菌对 U(VI)的等温富集过程。

Langmuir 富集等温线模型为

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{\max}} + \frac{1}{q_{\max} \rho_e b} \quad (5)$$

Freundlich 富集等温线模型为

$$\lg q_e = \frac{1}{n} \lg \rho_e + \lg k \quad (6)$$

式中: $q_{\max}$ 为单层饱和富集容量, mg/g; ρ_e 为平衡时溶质的浓度, mg/L; b 为 Langmuir 富集常数, L/mg; k 为 Freundlich 富集常数; $1/n$ 为不均匀因子。

采用 Langmuir 等温线模型和 Freundlich 等温线模型进行线性拟合分析,其结果如图 7 所示,拟合参数列于表 2。从图 7 可看出,Langmuir 方程中拟合实验数据的相关性($R^2=0.9156$)大于 Freundlich 方程中对应的相关性($R^2=0.81577$),Langmuir 等温线模型的 $q_{\max}$ 值与实验值非常接近,由此可得,基因工程菌对 U(VI)的富集特性更符合 Langmuir 等温线模型。菌体表面的活性位点与金属离子形成单分子

富集层,且被富集的离子间无相互作用。

2.8 扫描电镜及电子能谱分析

基因工程菌富集前后的 SEM 像如图 8 所示。由图 8(a)可以看出,菌体富集前的表面形状不规则,为富集铀提供了更大的接触表面积和富集位点。由图 8(b)可看出,磷酸根与铀酰离子反应生成的沉淀附着在菌体表面后,菌体表面出现大量颗粒物,这表明基因工程菌富集了一定量的铀。

图 9 所示为基因工程菌富集前后的 EDS 谱。比较富集前后的谱峰,图 9(b)中结合能为 3~4 keV 处出现了铀的吸收峰,进一步证明菌体表面颗粒为铀的沉积物。说明基因工程菌对铀离子发生了富集作用,菌体表面的活性位点与铀离子形成配合物,表现为表面络合富集机制。以上结果提示基因工程菌对铀离子的富集不仅依赖于细胞表面活性位点的被动富集,同时还要依赖于自身代谢系统的调控及其代谢产物的性能。

2.9 红外光谱分析

基因工程菌在 pH=5、反应温度为 30 °C 条件下

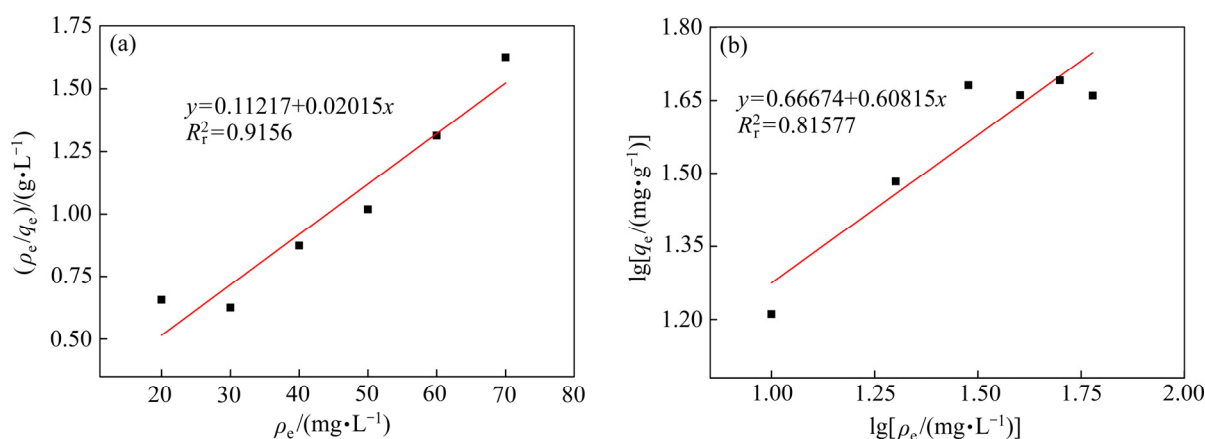


图 7 等温线模型的拟合结果

Fig. 7 Fitting results of tow known isotherm models: (a) Langmuir; (b) Freundlich

表 2 Langmuir 和 Freundlich 模型的参数

Table 2 Parameters of Langmuir and Freundlich models

Langmuir			Freundlich			Actual equilibrium concentration, $q_s/(mg \cdot g^{-1})$
$q_m/(mg \cdot g^{-1})$	$k_l/(L \cdot mg^{-1})$	R^2	n	K_f	R^2	
49.63	0.17964	0.9156	1.64	4.64237	0.8158	47.98

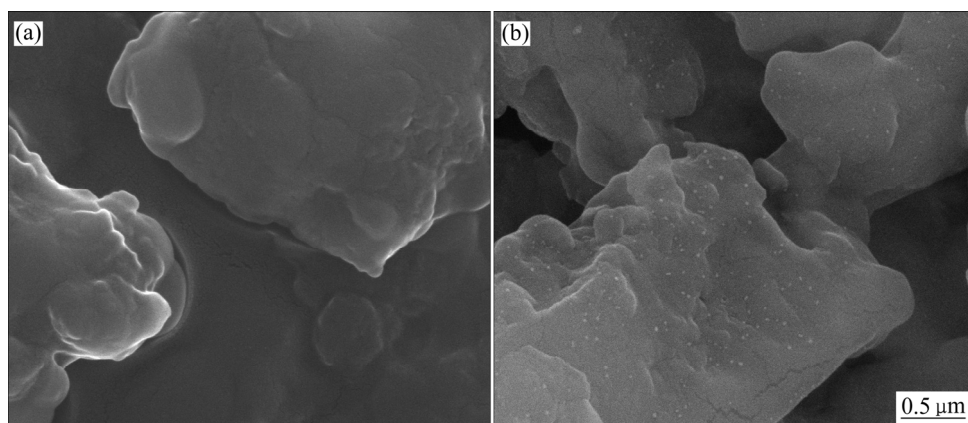


图8 基因工程菌富集前后的 SEM 像

Fig. 8 SEM images of *Deino-dsrA* before(a) and after(b) enrichment

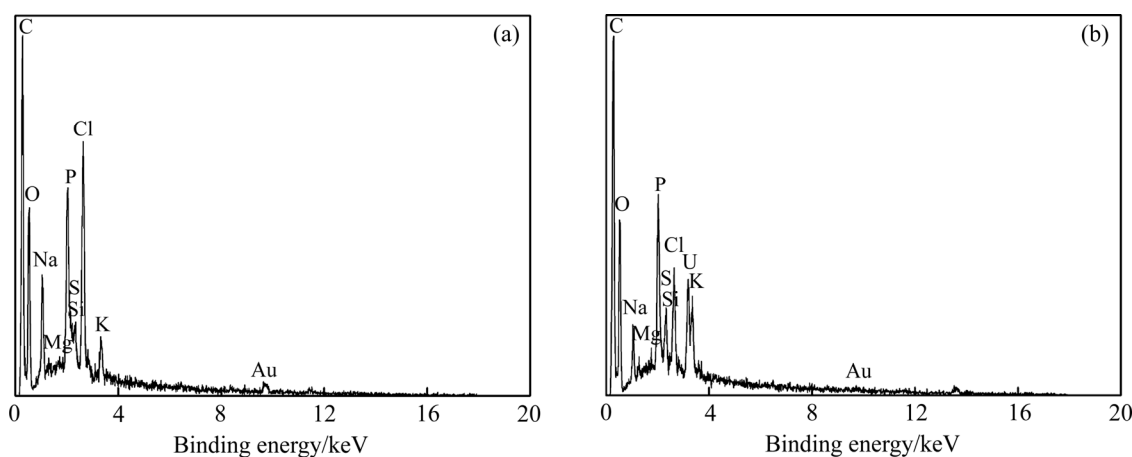


图9 基因工程菌富集前后的 EDS 谱

Fig. 9 EDS patterns of *Deino-dsrA* before(a) and after(b) enrichment

富集初始浓度为 30 mg/L 铀溶液,富集前后的 FT-IR 谱结果如图 10 所示。根据已有研究,耐辐射奇球菌的细胞壁是富集金属离子的主要区域,主要由肽聚糖、蛋白质、磷壁酸、脂类和几丁质等成分构成^[31]。较宽的 3315.28 cm^{-1} 处谱带为蛋白质胺基中 $-\text{NH}_2$ 的不对称伸缩和 $-\text{OH}$ 的伸缩混合振动吸收峰。与 U(VI) 作用后,该处缔合谱带向低波数偏移了 18 cm^{-1} ,表明羟基可能参与了铀的富集过程; 2926.23 cm^{-1} 处为蛋白质和脂类的 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2$ 的对称、反对称伸缩振动吸收峰, 1652.27 cm^{-1} 处吸收峰为蛋白质上酰胺 I 带的 $\text{C}=\text{O}$ 键伸缩振动, 1543.12 cm^{-1} 处吸收峰是由仲酰胺的 $\text{N}-\text{H}$ 键弯曲振动和 $\text{C}-\text{N}$ 键伸缩振动引起的酰胺 II 带。比较富集前后 FT-IR 谱图,整体峰型未发生明显改变,细胞壁表面的功能基团未受到破坏,在 916.38 cm^{-1}

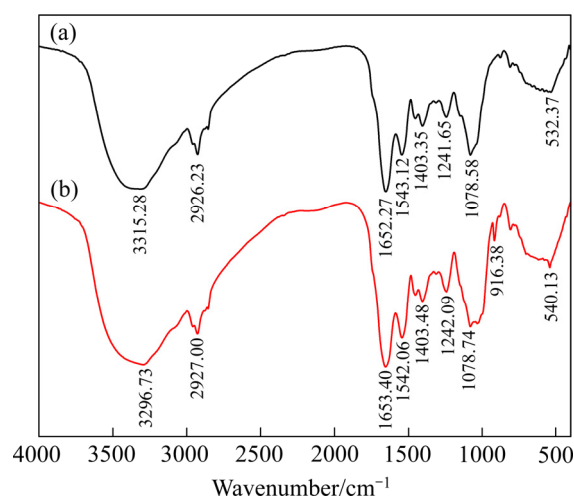


图10 基因工程菌富集前后的 FT-IR 谱

Fig. 10 FT-IR spectra before(a) and after(b) enrichment

处出现的新谱带为 UO_2^{2+} 的伸缩振动吸收峰,表明基因工程菌对铀产生了富集反应。

2.10 生物安全评价

针对新物种基因工程菌 *Deino-dsrA*, 本研究做了生物安全评价。转基因微生物的安全评价主要包括受体微生物安全性评价、基因操作的安全性评价、转基因生物的安全性评价和转基因生物产品的安全性评价^[32]。本研究所用耐辐射奇球菌为非致病菌, 在自然界中对环境和人类无毒无害。基因操作按照分子生物技术中的化学转化法, 安全规范。本研究依托南华大学病原微生物生物安全二级实验室, 以及长期有效的实验室生物安全管理体系, 充分保障实验操作的生物安全。已检测基因工程菌 *Deino-dsrA* 未产生任何有毒有害物质, 生存代谢产物中无抑制其他生物存活物质。该基因工程菌生长繁殖速度可控, 不会危害人类健康, 威胁生态系统。综上所述可知, 基因工程菌 *Deino-dsrA* 无毒无害, 对环境友好, 无生物安全隐患。

3 结论

1) 将硫酸盐还原菌中的 *dsrA* 还原基因转入耐辐射奇球菌, 经 PCR 及测序鉴定, 证实耐辐射基因工程菌 *Deino-dsrA* 构建成功。

2) 在溶液 pH 值为 5、铀初始浓度为 30 mg/L、菌剂投加比例为 33%、富集时间 60 min 时, 基因工程菌还原富集铀(VI)的富集率可达 92.45%; 菌剂浓度增大时, 基因工程菌 *Deino-dsrA* 对铀的富集量随之增加, 菌剂浓度对铀富集量成正向调节。

3) 扫描电镜联合电子能谱(SEM-EDS)分析证实基因工程菌表面存在大量富集的铀, 傅里叶变换红外光谱(FTIR)提示在富集中发挥作用的有效基团。富集过程符合准二级反应动力学模型和 Langmuir 等温线模型, 提示该过程主要以化学富集为主, 推测存在化学键合以及还原等反应。

4) 与野生型耐辐射奇球菌富集率(72.02%)相比, 基因工程菌 *Deino-dsrA* 对铀(VI)的还原富集率(92.45%)显著提升, 该基因工程菌可作为颇具潜力的生物富集剂应用于含铀废水治理领域。

REFERENCES

[1] 高军凯, 顾平, 张光辉, 等. 吸附法处理低浓度含铀废水的研究进展[J]. 中国工程科学, 2014, 16(7): 73-78.

GAO Jun-kai, GU Ping, ZHANG Guang-hui, et al. Research progress of adsorptive technology in processing wastewater with low concentration of uranium[J]. Strategic Study of CAE, 2014, 16(7): 73-78.

[2] SZLACHTA M, NEITOLA R, PERÄNIEMI S, et al. Effective separation of uranium from mine process effluents using chitosan as a recyclable natural adsorbent[J]. Separation and Purification Technology, 2020, 253: 117493.

[3] KURTIO P, AUVINEN A, SALONEN L, et al. Renal effects of uranium in drinking water[J]. Environmental Health Perspectives, 2002, 110(4): 337-342.

[4] YUE Y C, LI M H, WANG H B, et al. The toxicological mechanisms and detoxification of depleted uranium exposure[J]. Environmental Health and Preventive Medicine, 2018, 23(1): 1342-1351.

[5] 杜超超, 周义朋. CO₂+O₂ 地浸采铀矿层渗透性影响因素[J]. 有色金属 (冶炼部分), 2019(7): 48-53.

DU Chao-chao, ZHOU Yi-peng. Influence factors on permeability of ore layer in uranium CO₂+O₂ in situ leaching[J]. Nonferrous Metals (Extractive Metallurgy), 2019(7): 48-53.

[6] WU L, LIN X, ZHOU X, et al. Removal of uranium and fluorine from wastewater by double-functional microsphere adsorbent of SA/CMC loaded with calcium and aluminum[J]. Applied Surface Science, 2016, 384: 466-479.

[7] HUANG S, PANG H, LI L, et al. Unexpected ultrafast and high adsorption of U(VI) and Eu(III) from solution using porous Al₂O₃ microspheres derived from MIL-53[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 353: 157-166.

[8] NEKHUNGUNI P M, TAVENGWA N T, TUTU H. Sorption of uranium(VI) onto hydrous ferric oxide-modified zeolite: Assessment of the effect of pH, contact time, temperature, selected cations and anions on sorbent interactions[J]. Journal of Environmental Management, 2017, 204: 571-582.

[9] 王成, 彭国文, 肖方竹, 等. 新型杯[4]芳烃磷酸酯衍生物的合成及其对 U(VI) 的萃取性能[J]. 中国有色金属学报, 2019, 29(3): 659-664.

WANG Cheng, PENG Guo-wen, XIAO Fang-zhu, et al. Synthesis of novel calix[4]arene phosphate derivative and its extraction performance for uranium(VI)[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2019, 29(3): 659-664.

[10] CHEN C, HU J, WANG J. Biosorption of uranium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Environmental Radioactivity, 2020, 213: 106158.

[11] PAUL D, PANDEY G, PANDEY J, et al. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental

- restoration[J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(3): 135–142.
- [12] SHEN Y, ZHENG X, WANG X, et al. The biomineralization process of uranium(VI) by *Saccharomyces cerevisiae*-transformation from amorphous U(VI) to crystalline chernikovite[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(9): 4217–4229.
- [13] LIANG X, KIERANS M, CECI A, et al. Phosphatase-mediated bioprecipitation of lead by soil fungi[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(1): 219–231.
- [14] ZHANG J, CHEN H, SONG J, et al. Immobilization of uranium at nanoscale by *Bacillus cereus* 12-2 at different U(VI) concentration[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2019, 19(11): 7131–7138.
- [15] 付亮, 何淑雅, 潘宝平, 等. 耐辐射奇球菌基因回补株的构建与鉴定[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2016, 40(2): 115–119.
- FU Liang, HE Shu-ya, PAN Bao-ping, et al. Construction and identification of *pprM*-complemented *Deinococcus radiodurans* strain[J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2016, 40(2): 115–119.
- [16] 郭忠忠, 肖方竹, 阳志, 等. 耐辐射奇球菌对 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 吸附行为研究[J]. 化学研究与应用, 2018, 30(3): 327–332.
- GUO Zhong-zhong, XIAO Fang-zhu, YANG Zhi, et al. Study of Cu^{2+} and Cr^{6+} sorption by *Deinococcus radiodurans*[J]. Chemical Research and Application, 2018, 30(3): 327–332.
- [17] BATTISTA J R. Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*[J]. Annual Review of Microbiology, 1997, 51: 203–224.
- [18] SHUKLA S K, SANKAR G G, PARANEEISWARAN A, et al. Differential radio-tolerance of nutrition-induced morphotypes of *deinococcus radiodurans* R1[J]. Current Microbiology, 2014, 68(2): 247–253.
- [19] BRIM H, MCFARLAN S C, FREDRICKSON J K, et al. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(1): 85–90.
- [20] BRIM H, OSBORNE J P, KOSTANDARITHES H M, et al. *Deinococcus radiodurans* engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction[J]. Microbiology-Sgm, 2006, 152: 2469–2477.
- [21] GOGADA R, SINGH S S, LUNAVAT S K, et al. Engineered *Deinococcus radiodurans* R1 with NiCoT genes for bioremoval of trace cobalt from spent decontamination solutions of nuclear power reactors[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(21): 9203–9213.
- [22] FREDRICKSON J K, KOSTANDARITHES H M, LI S W, et al. Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2006–2011.
- [23] XU R, WU K, HAN H, et al. Co-expression of YieF and PhoN in *Deinococcus radiodurans* R1 improves uranium bioprecipitation by reducing chromium interference[J]. Chemosphere, 2018, 211: 1156–1165.
- [24] 肖方竹, 何淑雅, 彭国文, 等. 功能化磁性载体固定耐辐射奇球菌及其对铀的吸附行为与机理[J]. 中国有色金属学报, 2016, 26(7): 1568–1575.
- XIAO Fang-zhu, HE Shu-ya, PENG Guo-wen, et al. Adsorption behavior and mechanism of uranium (VI) on *Deinococcus radiodurans* immobilized functionalization magnetic carrier[J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2016, 26(7): 1568–1575.
- [25] MANOBALA T, SHUKLA S K, RAO T S, et al. A new uranium bioremediation approach using radio-tolerant *Deinococcus radiodurans* biofilm[J]. Journal of Biosciences, 2019, 44(5): 122–131.
- [26] 许玉历, 张康, 肖方竹, 等. 功能化间羧基苯偶氮基杯[4]芳烃对称硫醚衍生物的制备及其对 U(VI) 的吸附行为研究[J]. 原子能科学技术, 2020, 54(1): 23–30.
- XU Yu-li, ZHANG Kang, XIAO Fang-zhu, et al. Preparation of functionalized m-carboxyphenyl azo calix[4]arenesymmetrical sulfide derivative and its adsorption behavior towards U(VI)[J]. Atomic Energy Science and Technology, 2020, 54(1): 23–30.
- [27] WANG M, QIU J, TAO X, et al. Effect of pH and ionic strength on U(IV) sorption to oxidized multiwalled carbon nanotubes[J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2011, 288(3): 895–901.
- [28] SEN Y, JUN Q, LIANGJU K, et al. Ion-imprinted mesoporous silica for selective removal of uranium from highly acidic and radioactive effluent[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(34): 29337–29344.
- [29] YUBING S, SHUBIN Y, YUE C, et al. Adsorption and desorption of U(VI) on functionalized graphene oxides: A combined experimental and theoretical study[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(7): 4255–4262.
- [30] 范黎锋, 谢水波, 刘迎九, 等. 大肠杆菌配合植酸对铀的吸附[J]. 环境工程学报, 2016, 10(8): 4167–4171.
- FAN Li-feng, XIE Shui-bo, LIU Ying-jiu, et al. Adsorption

- of U(VI) containing wastewater by *E.coli* with phytic acid[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(8): 4167–4171.
- [31] 杨 杰, 董发勤, 代群威, 等. 耐辐射奇球菌对放射性核素铀的吸附行为研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 1010–1014.
- YANG Jie, DONG Fa-qin, DAI Qun-wei, et al. Biosorption of radionuclide uranium by *Deinococcus radiodurans*[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(4): 1010–1014.
- [32] 蒋建东. 多功能农药降解基因工程菌的构建及其环境释放安全评价研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- Jiang Jian-dong. Construction of multifunctional pesticides degrading genetically engineered microorganism and its risk assessment for environmental release[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.

Construction of radiation-tolerant genetically engineered bacteria *Deino-dsrA* containing reduction gene *dsrA* and its performance on uranium(VI) enrichment

ZHU Qi-qi¹, TANG Yan¹, LUO Jia-qi², WANG Wu-zhou³, MA Yun³, PENG Guo-wen²,
LI Shan-shan¹, HE Shu-ya¹, XIAO Fang-zhu¹

(1. School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China;

3. Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang 421001, China.)

Abstract: The key reduction gene *dsrA* was extracted from sulfate reducing bacteria, and it was transferred into *Deinococcus radiodurans* (DR) to construct the genetically engineered bacteria *Deino-dsrA*. The effects of solution pH, ratio of bacterial suspension, initial uranium concentration and enrichment time on the performance of the genetically engineered bacteria were investigated. Scanning electron microscopy, energy dispersive spectrometer (SEM-EDS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to characterize the morphological structure of genetically engineered bacteria before and after uranium enrichment. The changes of elements and groups were analyzed, and the behavior of uranium(VI) enrichment was investigated. The results show that the genetically engineered bacteria has the best effect on the enrichment of uranium(VI) when the solution pH is 5, the ratio of bacterial suspension is 33%, the initial concentration of uranium is 30 mg/L, and the enrichment time is 60 min. The enrichment process of uranium by genetically engineered bacteria conforms to the pseudo-second-order reaction kinetic model and Langmuir isotherm model. The enrichment rate of *Deino-dsrA* (92.45%) is significantly higher than the wild-type *deinococcus radiodurans* (72.02%). The genetically engineered bacteria will have considerable application prospect in the environmental treatment of uranium wastewater due to its multiple advantages of radiation resistance, high reduction capacity and environmental friendliness.

Key words: *deinococcus radiodurans*; reduction gene *dsrA*; uranium; reduction enrichment

Foundation item: Project(11705085) supported by the National Natural Science Foundation of China; Projects (2020JJ6050, 2018JJ3458, 2018JJ3457) supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province, China

Received date: 2020-11-24; **Accepted date:** 2021-03-13

Corresponding authors: HE Shu-ya; Tel: +86-13807348502; E-mail: heshuya8502@163.com
XIAO Fang-zhu; Tel: +86-18397713358; E-mail: xfzhunh@163.com

(编辑 龙怀中)