

doi: 10.13745/j.esf.2014.02.025

## 高硒碳质泥岩中的 3 株高还原耐受亚硒酸盐菌

袁永强<sup>1,2</sup>, 朱建明<sup>1,\*</sup>, 刘丛强<sup>1,\*</sup>, 雷磊<sup>1,2</sup>

1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002
2. 中国科学院大学, 北京 100049

YUAN Yongqiang<sup>1,2</sup>, ZHU Jianming<sup>1,\*</sup>, LIU Congqiang<sup>1,\*</sup>, LEI Lei<sup>1,2</sup>

1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

YUAN Yongqiang, ZHU Jianming, LIU Congqiang, et al. Three high-reducing selenite-tolerance bacteria from high-Se carbonaceous mudstone. *Earth Science Frontiers*, 2014, 21(2): 331-341

**Abstract:** This study examined the tolerance of selenite for 3 strains of *Bacillus licheniformis* SeRB-1, *Bacillus* sp. SeRB-2 and *Arthrobacter* sp. SeRB-3 from high-Se carbonaceous mudstone. The results demonstrate that cell growth can be stimulated by Se(IV) in lower concentration (less than 25 mM), but inhibited in higher concentration (over 100 mM). With the increasing of Se(IV) concentration, the doubling time got longer, rate turned smaller, and percentages of growth inhibition became larger. But, the tolerance of Se(IV) for strains was typically enhanced, through continued domestication and cultivation under an increasing Se(IV) culture. Experiments also show that the concentration of Se(IV)-resistant was as high as 800 mM, while the medium effective concentration of bacterial growth inhibition was also high up to 102.48-150.24 mM. Therefore, the strains could be considered as high Se(IV)-resistant bacteria. The TEM studies of bacteria morphology show that large numbers of elemental Se were detected at the cell envelopes (near cell wall and membrane) under the Se(IV) stress. Such changes in Se might be one of the detoxification mechanisms of the bacteria. On the other hand, suspected methylation gas was observed during the experiment, which might be recognized as another mechanism for the removal of Se(IV) toxin or detoxification. This research is of great significance for microbial remediation of high-Se polluted areas.

**Key words:** high-Se carbonaceous mudstone; selenite reduction; bacteria; Se(IV)-tolerance; high tolerance mechanism

**摘要:**文中研究了高硒碳质泥岩中的 3 株细菌 *Bacillus licheniformis* SeRB-1、*Bacillus* sp. SeRB-2 和 *Arthrobacter* sp. SeRB-3 耐受亚硒酸盐的能力。研究表明,低浓度的 Se(IV) (<25 mM) 对细菌生长有促进作用,高浓度的 Se(IV) (>100 mM) 起抑制作用。随着 Se(IV) 浓度的增加,细菌生长的倍增时间延长、增长速率变小、抑制率增大。但细菌耐受 Se(IV) 的能力可通过不断驯化来有限度的提高。实验得出了其还原耐受亚硒酸盐的浓度高达 800 mM,抑制细菌生长的半数有效浓度 EC<sub>50</sub> 也达到了 102.48~150.24 mM,可以认为细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 为高耐受亚硒酸盐菌。通过透射电镜对细菌的形貌观测发现,在 Se(IV) 胁迫下,在靠近细菌壁、膜附近位置生成大量的元素硒,这些元素硒的生成可能是细菌为减少 Se(IV) 毒害而产生的解毒机制;实验中还发现疑似甲基化气体生成,视为其解毒或脱毒的另一机制。因此,本研究成果对于高硒污染区域的微生物修复具有重要的指导意义。

**关键词:**高硒碳质泥岩;亚硒酸盐还原;细菌;四价硒耐受性;高耐受性机理

中图分类号:P154.381;X144 文献标志码:A 文章编号:1005-2321(2014)02-0331-11

收稿日期:2013-04-15;修回日期:2013-06-25

基金项目:国家自然科学基金创新群体项目(41021062);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-EW-102);国家自然科学基金项目(41173030)

作者简介:袁永强(1982—),男,博士研究生,研究方向为环境地球化学。E-mail:huayang1202@sohu.com

\* 通讯作者:朱建明,E-mail:zhujianming@vip.gyig.ac.cn;刘丛强,E-mail:liucongqiang@vip.gyig.ac.cn

<http://www.earthsciencefrontiers.net.cn> 地学前缘,2014,21(2)

硒是一种广泛分布于地表环境的微量元素,其在表生环境中分布的不均一性形成了局域或区域上的低硒与高硒地区<sup>[1-5]</sup>。湖北恩施渔塘坝是中国典型的高硒地区之一<sup>[6-7]</sup>,曾发生过人畜摄入过量硒而引起的中毒事件<sup>[8]</sup>。近年的研究依然表明渔塘坝土壤含有较高的硒<sup>[9-10]</sup>,该地仍然存在硒中毒发生的潜在风险。硒中毒的发生与硒的形态和生物可利用性紧密相关。大量研究表明,微生物在硒的生物地球化学循环和形态转化中发挥着重要作用<sup>[11-12]</sup>,可以通过异化还原作用将硒氧离子转化为不溶的元素硒,和/或通过甲基化作用将其转化为挥发性的气体等<sup>[13-15]</sup>。因此,可以利用微生物对硒的上述转化作用开展硒污染场地的生物修复。目前已从高硒或硒污染环境(2.25~3.50 mM)发现了耐受 Se(IV) 的浓度高达 50~600 mM 细菌<sup>[16-20]</sup>,在高硒污染场地修复中取得了比较好的治理效果,但对于恩施这一高硒环境中高硒耐受性细菌的报道还比较少见。

本研究团队在恩施渔塘坝的高硒碳质泥岩中分离出了几种具有还原亚硒酸盐能力的细菌,包括地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis* SeRB-1)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp. SeRB-2)和节杆菌(*Arthrobacter* sp. SeRB-3)等。高硒碳质泥岩呈酸性且富含有机质,水溶 Se(IV) 浓度很高(最高可达 92.9 mg/L),高浓度的 Se(IV) 必然会对微生物产生毒害作用,影响细菌的活性,进而导致细菌还原亚硒酸盐效率的降低,甚至死亡。细菌对硒耐受和解毒能力的大小,是研究微生物修复硒污染土壤、水体效率的重要指标<sup>[21]</sup>。因此,了解特高硒环境下细菌对 Se(IV) 的还原耐受性,对于处理高浓度的硒污染具有极大的应用价值。本文开展了 3 种细菌对不同 Se(IV) 浓度胁迫下的生长研究,通过倍增时间、生长速率、细胞生长抑制率和半数有效浓度等耐受性指标判断其耐受 Se(IV) 的能力,结合实验现象及电镜观察对可能存在的耐受性原因作出解释。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与试剂

实验菌株从湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中分离、纯化、选育出来:(1)用稀释( $10^{-6}$  倍)接种法从碳质泥岩样品中分离出菌株;(2)用添加与不添加 Se(IV) 的平板对照法(1% yeast extract + 1% glucose + 1.5% 琼脂)筛选出 3 株具有还原亚硒酸盐的能力的

细菌(有红色菌团出现);(3)用重新接种法对筛选出的菌株进一步富集纯化;(4)通过细菌 DNA 提取和 PCR 扩增、E. Z. N. A Cycle Pure 试剂盒(Promega)纯化获得 16S rRNA 序列;(5)然后将 16S rRNA 序列提交 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>)和 DDBJ([http://www.ddbj.nig.ac.jp/submission\\_general-e.html](http://www.ddbj.nig.ac.jp/submission_general-e.html))数据库进行比对,通过比对可知这 3 种细菌分别为在地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* SeRB-1(登录号 JX512417)、芽孢杆菌 *Bacillus* sp. SeRB-2(登录号 JX512418)和节杆菌 *Arthrobacter* sp. SeRB-3(登录号 AB746200)。

实验试剂主要包括亚硒酸钠( $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、NaOH、HCl、戊二醛、钼酸、葡萄糖和酵母提取物等。

亚硒酸钠储备液制备是称取 17.829 g 的  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,溶于 100 mL 去离子水中,配制成浓度为 1 M 的储备液,逐级稀释成 100 mM 和 10 mM 的储备液,使用无菌滤头(0.22  $\mu\text{m}$ )过滤后备用。

### 1.2 培养基和培养条件

酵母膏葡萄糖培养基(简称 YEG 培养基)(10 g/L):酵母提取物 10 g、葡萄糖 10 g,去离子水 1 000 mL,pH 约为 7.0。所有培养基均在 121  $^{\circ}\text{C}$  高压蒸汽灭菌 30 min。菌株在恒温(37  $^{\circ}\text{C}$ )振荡(200 r/min)培养箱中培养。

### 1.3 菌株对亚硒酸盐的耐受性实验

#### 1.3.1 菌株扩大培养

在超净台内用已灭菌的接种环分别挑取冷藏的斜面菌体 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3,将其接种到已灭菌的含 30 mL YEG 液体培养基的血清瓶中,然后将血清瓶放置在恒温振荡培养箱中活化约 24 h,以保证菌体进入稳定的对数生长期<sup>[22]</sup>,以便后续实验中保持菌株稳定的活性。分别提取菌液,用于耐受性实验。

#### 1.3.2 细菌对亚硒酸盐耐受性梯度试验

细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 是从富硒碳质泥岩的特高硒环境中筛选出来的,生物对环境具有先天适应的本能,细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 也应当能耐受很高浓度的 Se(IV),据此,尝试将对数生长期的纯培养菌体直接在不同 Se(IV) 浓度梯度下培养。根据野外碳质泥岩样品中水溶性 Se(IV) 浓度,并考虑到其他结合态中 Se(IV) 的缓慢释放,以及突发性硒污染造成 Se(IV) 浓度瞬时升高等因素,设置了耐受性试验中 Se(IV) 的浓度梯度。即向装

有 YEG 培养基的血清瓶中按逐浓度递增的方法加入已灭菌的亚硒酸钠储备液,均匀混合,设置成 Se(IV)浓度分别为 5~25 mM(以 5 mM 浓度递增)、100~500 mM(以 200 mM 浓度递增)、800 mM、900 mM、1 M 的基础培养液,然后按 10% 的接种量接入对数生长期的细菌菌液,同时做无菌对照实验。之后将已接种细菌的血清瓶放置在恒温振荡培养箱中培养。每组实验做 3 个平行样。如果纯培养菌体不能直接耐受高浓度的 Se(IV),再用逐浓度尝试法,从低到高 Se(IV)浓度递增的培养中提取菌体,不断接种、驯化,即从含 Se(IV)浓度为 5 mM 的培养中提取菌体,扩大培养至对数生长期,接种至含 Se(IV)浓度为 10 mM 的培养基中;再从含 Se(IV) 10 mM 的培养基中提取菌体,扩大培养接种至含 Se(IV)浓度为 25 mM 的培养基,以此类推。直至细菌不再明显生长或受到抑制。

#### 1.4 分析方法

##### 1.4.1 生长曲线

由于细菌悬液的浓度与光密度(Optical Density 或 OD)成正比,可利用分光光度计(721型,上海)测定细菌悬液的 OD(波长  $\lambda=600$  nm)值来推知菌液的浓度,然后,以时间为横坐标,不同取样时间的 OD<sub>600</sub> 值为纵坐标绘制出细菌生长曲线,用此法来(比浊法)描述细菌生长曲线是比较快捷、简便的。当培养液原液的 OD 值大于 0.80 时,需适当稀释。

##### 1.4.2 耐受性指标

细菌生长速率(Growth Rate 或 GR)、倍增时间(Doubling Time 或 DT)和生长抑制率(Percentage of Growth Inhibition 或 GI)和抑制细菌生长的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)来表征细菌生长耐受性。其公式表达如下<sup>[23-25]</sup>:

$$GR = \frac{d[\lg(OD)]}{dT} \quad (1)$$

$$DT = \frac{\lg 2}{GR} \quad (2)$$

$$GI = \frac{\Delta \lg(OD_{\text{control}}) - \Delta \lg(OD_{\text{test}})}{\Delta \lg(OD_{\text{control}})} \times 100\% \quad (3)$$

其中 DT 单位为 h;GR 单位为 h<sup>-1</sup>;EC<sub>50</sub> 值是 GI=50% 时的 Se(IV)浓度(mM),通过概率分析计算得到(SPSS 16.0)<sup>[26]</sup>。

##### 1.4.3 透射电镜观察

按下面步骤进行制样:(1)使用高速离心机对不同时间采集的培养液离心 10 min(转速 10 000 r/min),收

集管底沉淀(菌粒和产物),向管中沉淀加 2.5% 的戊二醛前固定约 24 h;(2)吸去戊二醛,用 0.1 M 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 15 min;吸去 PBS,再用 1% 的锇酸后固定;(3)吸出锇酸至废液瓶,用 PBS 洗涤样品洗涤 3 次,每次 15 min;(4)吸去 PBS,依次加入浓度分别为 50%、70%、80%、90%、95% 的乙醇脱水 10~15 min,最后用 100% 的乙醇脱水 10 min;(5)吸去乙醇,向样品中加入渗透液(丙酮:Epon812 包埋剂=1:1)过夜(37 °C),吸去渗透液再添加 Epon812 包埋剂,渗透 1~2 d(37 °C);(6)渗透之后用 Epon812 包埋剂包埋,置于 60 °C 烘箱中烘 48 h;(7)对包埋块进行修块(梯形)、超薄切片机上切片(厚度 80~10 nm),载(铜、镍)网捞片;(8)将捞片的载网先后放入 2% 的醋酸铀和枸橼酸铅中染色 15 min,晾干。对未染色的超薄切片用能谱仪(Oxford Link ISIS)进行 X 射线能谱分析(EDS),染色的超薄切片用透射电镜(TEM)(JEM-2000FX II,日本)观察形貌,以表征产物特征。

## 2 结果

### 2.1 细菌在不同浓度亚硒酸盐胁迫下的耐受性生长曲线

图 1 表示不同 Se(IV)浓度下细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 的生长曲线。在 Se(IV) < 25 mM 的低浓度培养中,3 种细菌均呈现出了良好的生长曲线,并且能保持较长时间的稳定期(图 1A<sub>1</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>5</sub>)。在该浓度以下,细菌不需经过反复驯化尝试,可以直接接种到含 Se(IV)的培养基中,并且硒的存在,对细菌的生长是起到促进作用的,而且硒浓度越高,促生长作用越明显。可能与这 3 种细菌长期生长在高硒环境、自身产生某种适应机制有关。

在此浓度以下,细菌 SeRB-1 的延滞期(适应期)相对较短(大约只有 3 h),细胞增殖得比较快。在前 12 h,含 Se(IV)实验组的生长曲线与对照组的无明显差别(相平行),而进入对数生长后期,随着 Se(IV)浓度的升高,15 mM 和 25 mM(Se(IV))组的 OD<sub>600</sub> 值要明显高于对照组和 5 mM 组。一方面,这可能与细菌将 Se(IV)还原为红色的元素硒有关,元素硒不溶于培养液,呈悬浮状态存在于振荡的培养液中,增大了 OD 值;另一方面可能与硒对细胞生长的促进作用有关,根据细胞荧光显微计数,在稳定期,25 mM 组的细胞浓度(1.54 × 10<sup>9</sup> 个/mL)要

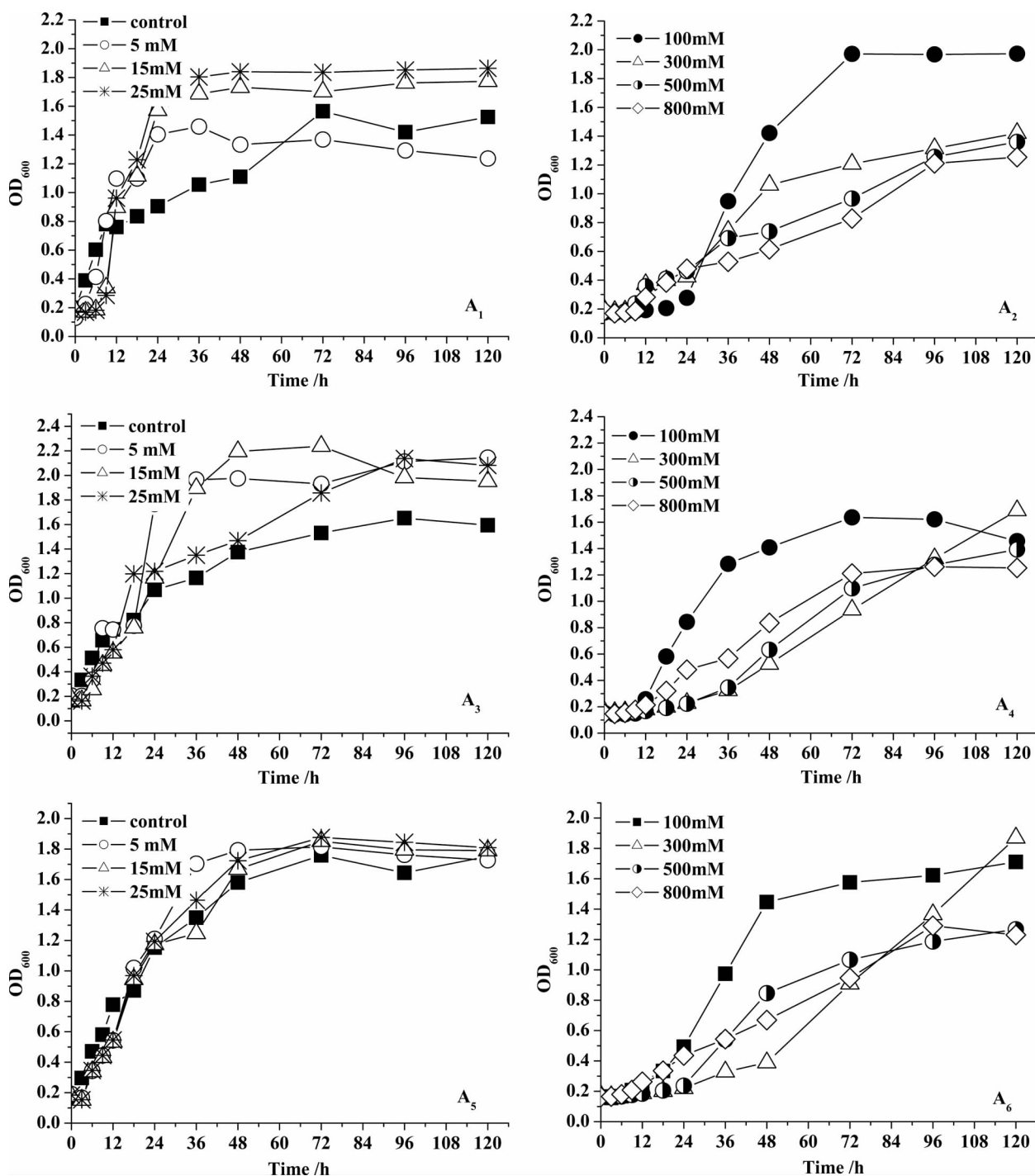


图 1 细菌在不同 Se(IV) 浓度梯度下的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of bacteria growing in YEG medium with different Se(IV) concentration

其中 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 为 SeRB-1; A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub> 为 SeRB-2; A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub> 为 SeRB-3。

高于对照组的 ( $1.13 \times 10^9$  个/mL), 说明该菌具有良好的适应性。细菌 SeRB-2 的细胞生长状况与 SeRB-1 类似, 可能是 SeRB-2 与 SeRB-1 同属芽孢杆菌有关。只是, SeRB-2 的适应期比 SeRB-1 稍长些 (约 4~5 h), 并且当 Se(IV) 浓度为 25 mM 时,

细胞增长的没有 10 mM 和 15 mM 实验组的快。而细菌 SeRB-3 细胞增长表现出与 SeRB-2 类似的特征, 但其实验组与对照组的生长曲线更一致, 25 mM 的实验组的细胞增长速率比同浓度下的 SeRB-2 的要快。

在 Se(IV) 为 100 mM~1 M 高浓度的培养中, 只有当 Se(IV) 浓度为 100 mM 时, 细菌生长曲线才与对照组的相似, 在测试时间内, 呈现出完整的生长曲线。实验中也同样发现, 无需反复驯化尝试, 3 种细菌可以直接在此浓度下正常生长, 但是其生长延滞期相应变长(6~9 h)。而从 300 mM 开始, 细菌生长变得越来越缓慢、延滞期越来越长。而且, 不经驯化、直接接种, 在与低浓度 Se(IV) 相同的培养周期内, 培养液中没有明显出现红色(沉淀), 细胞荧光显微计数显示, 细胞没有出现明显增长, 但也没有大量的或完全死亡。

从含 Se(IV) 为 100 mM 的培养液中挑取菌体, 在耐受性实验中逐步提高 Se(IV) 浓度, 经过一段时期驯化(1~2 月), 再次将这 3 种细菌分别接种到含 Se(IV) 300~800 mM 的培养中, 细胞生长出现了如图 1A<sub>2</sub>、A<sub>4</sub>、A<sub>6</sub> 的状态。在该浓度范围, 细菌生长的延滞期增加到 18~24 h, 此后的对数生长期, 细胞生长速率比低浓度下要小。在耐受 Se(IV) 800 mM 的基础上, 同时做了细菌对 900 mM、1 M 的 Se(IV)

的耐受性能, 其中在 1 M 的培养中, 细菌 SeRB-1 几乎不再增长、甚至出现大量细胞死亡, 而细菌 SeRB-2 和 SeRB-3 则在 900 mM 下就已经出现生长抑制。此时, 将抑制细菌出现明显增长的最低 Se(IV) 浓度定为最小抑制浓度 MIC (minimum inhibitory concentration), 则细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 的 MIC 分别为 1 M、900 mM、900 mM, 而细菌能够生长的最高耐受 Se(IV) 浓度为 800 mM。800 mM 是目前 Se(IV) 还原菌中耐受性最高浓度之一。细菌的这种高耐受性的获得, 需要不断添加 Se(IV) 的反复驯化, 才逐渐适应在高浓度 Se(IV) 的胁迫下生长。而且随着耐受性适应不断加强, 其耐受浓度在一定范围内会不断增大。

## 2.2 倍增时间、生长速率、生长抑制指数和半数有效浓度

由图 2 可知, 随着 Se(IV) 浓度的升高, 细菌生长的 DT 变长、GR 变小、GI 变大。当 Se(IV) 浓度在 25 mM 以下时, DT 比较小, 一般在 15 h 之内, 其中细菌 SeRB-1 的最短, 约为 4.5~8.0 h (Se(IV)

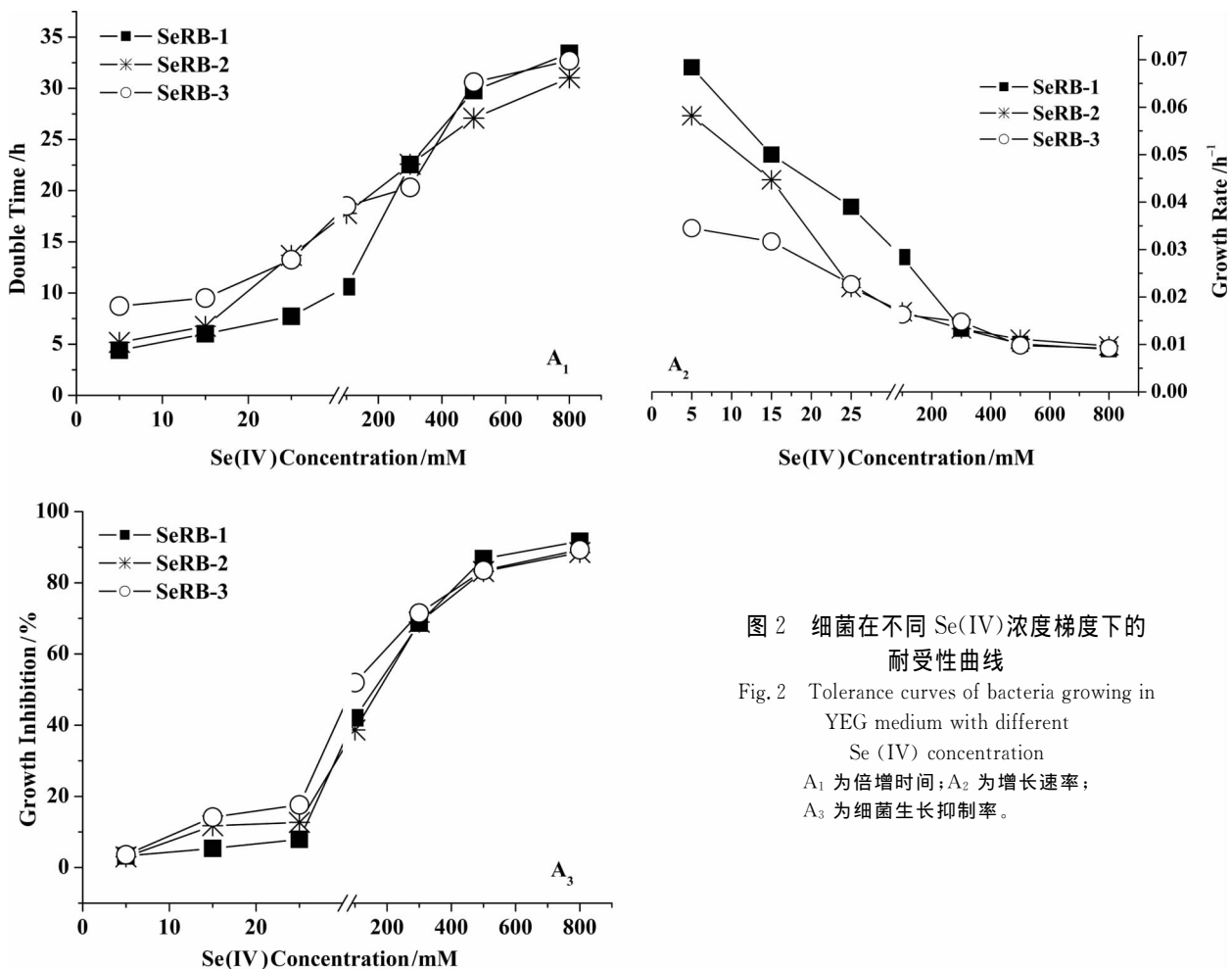


图 2 细菌在不同 Se(IV) 浓度梯度下的耐受性曲线

Fig. 2 Tolerance curves of bacteria growing in YEG medium with different Se (IV) concentration  
A<sub>1</sub> 为倍增时间; A<sub>2</sub> 为增长速率;  
A<sub>3</sub> 为细菌生长抑制率。

5~25 mM);细菌 SeRB-3 的 DT 最长,约为 8.5~13.5 h(Se(IV) 5~25 mM);细菌 SeRB-2 的 DT 介于 SeRB-1 与 SeRB-3 的 DT 值之间,但当 Se(IV) 从 15 mM 升高至 25 mM 时,DT 会有急剧变化,从不到 7.0 h 增至约 14.0 h。

当 Se(IV) 浓度在 100~800 mM 之间时,DT 会更长,其值一般是低浓度 DT 的 2.0~5.0 倍。其中细菌 SeRB-1 的 DT 值变化幅度最大,尤其是 Se(IV) 浓度由 100 mM 升至 300 mM 时,其 DT 值由约 10.6 h 突增至 22.6 h;而在 300~800 mM 浓度递增中,其 DT 值的生长则比较小,在约 22.5~33.4 h 之间波动。当 Se(IV) 浓度增至 500 mM 以上时,DT 增长更小,这与细胞生长曲线数据一致。在此浓度范围,细菌 SeRB-2 与 SeRB-3 的 DT 与 SeRB-1 的相似,但变化幅度没有 SeRB-1 大。GR 是 DT 倒数的倍数,总体上,这 3 种细菌的 GR 值随着 Se(IV) 浓度递增而变小,但在 Se(IV) 浓度低时,其 GR 值随着四价硒浓度升高递减比较快;而随着 Se(IV) 浓度进一步升高,GR 值递减趋于缓和。GR 值变化情形与 DT 值呈相反的规律,但反映问题的实质是一样的,即高浓度 Se(IV) 对细菌生长有一定的抑制作用。

根据公式(3)计算出了细菌生长抑制率(GI)(图 2A<sub>3</sub>),在低浓度 Se(IV) 胁迫下,细菌 GI 值比较低(<20%),随着 Se(IV) 浓度的升高,GI 值逐渐增

大,且 Se(IV) 浓度越高,GI 值也越大,但当 Se(IV) 达到一定浓度(如>500 mM)以后,GI 值就趋于平稳(约 90%),这表现出了细菌耐受 Se(IV) 浓度极限。根据细菌生长抑制率,通过概率分析(SPSS 16.0)得到了抑制细菌耐受亚硒酸盐生长的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)(表 1)。这 3 种细菌的 EC<sub>50</sub> 分布范围为 102.48~150.24 mM(Se(IV))(如表 1),其中细菌 SeRB-1 的 EC<sub>50</sub> 最高,SeRB-2 次之,SeRB-3 最低。细菌 SeRB-1 与 SeRB-2 的 EC<sub>50</sub> 比较接近,可能与其属于同一属、性质相近有关。

表 1 根据概率分析得到的抑制细菌生长的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)

Table 1 Median effective concentration(EC<sub>50</sub>) calculated for bacterial strains by probit analysis

细菌	EC <sub>50</sub> (Se(IV) mM)	置信区间
<i>Bacillus licheniformis</i> SeRB-1	150.24	95%
<i>Bacillus</i> sp. SeRB-2	145.67	95%
<i>Arthrobacter</i> sp. SeRB-3	102.48	95%

### 2.3 透射电镜分析

在添加 Se(IV) 的培养中,观察到有红色的沉淀产生,通过对收集到的红色产物进行 X-射线能谱分析(EDS),EDS 显示其主要成分为元素硒(图 3),即细菌通过硒的形态转化,将可溶的、有毒的 Se(IV) 转化成了不溶的毒性低的元素硒。

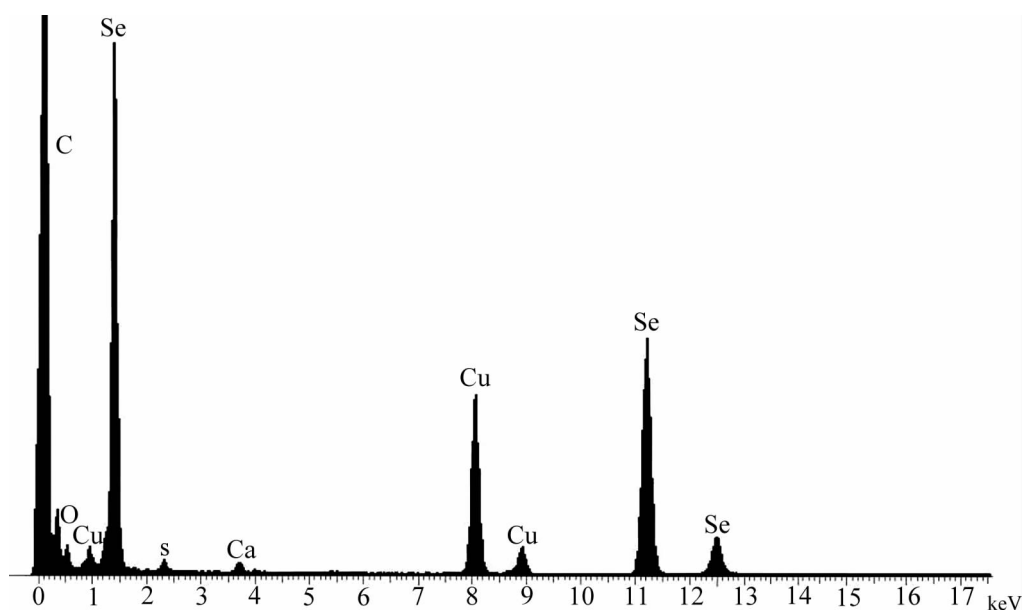


图 3 实验组细菌 SeRB-1 还原 Se(IV) 产生的颗粒物的 EDS 分析

Fig. 3 EDS analysis of particles formed by SeRB-1 grown cultures amended with 5 mM selenite

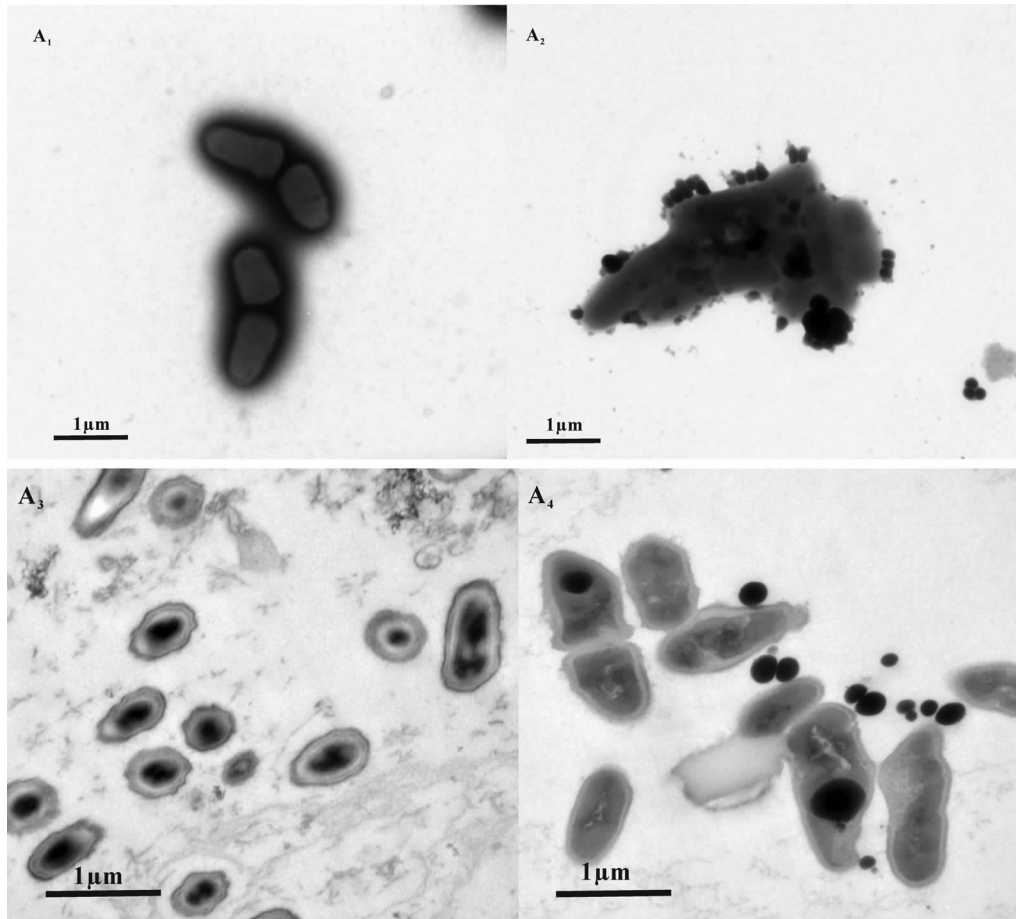


图4 纯培养(A<sub>1</sub>、A<sub>3</sub>)与添加 Se(IV)培养(A<sub>2</sub>、A<sub>4</sub>)的细菌 SeRB-1 菌体与元素硒的透射电镜(TEM)照片

Fig. 4 TEM of cells growing in culture with and without Se(IV)

A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 为负染照片; A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub> 为超薄切片照片。

TEM 观察也发现,在添加 Se(IV)前后,细菌形貌发生了变化。以细菌 SeRB-1 为例,添加硒的实验组细菌(负染)靠近表面的部位出现了大量的元素硒(图 4A<sub>2</sub>),而对照组细菌(负染)则无此现象(图 4A<sub>1</sub>)。同时,超薄切片也显示在部分细胞内部及胞外有少量的元素硒颗粒存在(图 4A<sub>4</sub>),这些颗粒粒径约为 20~100 nm。其他 2 种细菌表面也有类似纳米元素硒颗粒。

### 3 讨论

#### 3.1 高耐受亚硒酸盐还原菌

本研究首次从富硒碳质泥岩这一特高硒环境筛选、驯化出了高耐受性亚硒酸盐还原菌 *Bacillus licheniformis* SeRB-1, *Bacillus* sp. SeRB-2 和 *Arthrobacter* sp. SeRB-3。这 3 种细菌还原耐受亚硒酸盐的浓度高达 800 mM,之前报道的还原耐受

亚硒酸盐的最高浓度为 200~600 mM<sup>[17-19,27]</sup>,说明 800 mM 是目前细菌耐受四价硒的最高浓度之一。

已知的最高耐受 600 mM 亚硒酸盐的有假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、戴尔福特菌 (*Delftia tsuruhatensis*)和球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*),它们分别属于变形菌纲(Proteobacteria)和芽孢杆菌纲(Bacill)<sup>[18]</sup>。变形菌纲(Proteobacteria)和芽孢杆菌纲(Bacill)的许多细菌有耐受重金属或类金属的能力<sup>[28-29]</sup>,本研究发现的高耐受亚硒酸盐菌除了属于芽孢杆菌纲(Bacill)的 *Bacillus licheniformis* SeRB-1, *Bacillus* sp. SeRB-2,还发现了一种新的高耐受亚硒酸盐的节杆菌 *Arthrobacter* sp. SeRB-3,而之前研究发现节杆菌 *Arthrobacter* sp. VW8 最高只能耐受亚硒酸盐的浓度为 50 mM<sup>[17]</sup>。上述几种细菌大多是从受到硒污染的土壤(水体)分离出来的,说明高硒环境是高耐受性硒的微生物种群的潜在来源,而除了常见的高耐受硒氧离子的芽孢杆菌

(Bacill)外,还有其他种属的高耐受硒微生物存在,如本研究中发现的节杆菌 *Arthrobacter* sp. SeRB-3,说明耐受性微生物是普遍存在的,高耐受性也不仅仅局限于某一特定微生物。与前人研究相比,细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 耐受 Se(IV)浓度更高,更具有在高硒污染地区生物修复应用的优势。

细菌 SeRB-1、SeRB-2 和 SeRB-3 具有耐受浓度比较高的亚硒酸盐的能力,但要在较短的时间内获得更高的耐受浓度,还需要不断驯化。通过逐浓度梯度尝试法可以对其高耐受性不断驯化,但是这种试错法得到的耐受浓度是有一定限度的,因为随着 Se(IV)浓度的增大,细菌生长的倍增时间延长、生长速率变缓、抑制率增大,即细菌耐受亚硒酸盐不会一直升高,达到某一浓度,细菌生长就会受到限制。本研究发现在 Se(IV)浓度达到 500 mM 始,细菌生长的抑制率就已达到约 85%,在 Se(IV)浓度为 800 mM 时,抑制率曲线已接近水平(约 90%),基本上达到耐受极限,此时仍存在亚硒酸盐被细菌还原为元素硒的现象,可以说 800 mM 是这 3 种细菌还原耐受亚硒酸盐的最高浓度。而在 Se(IV)浓度达到 900~1 000 mM,细菌生长就会受到更大的抑制,甚至出现大量的死亡,此时得到的是细胞生长最小抑制浓度 MIC。其中细菌 SeRB-1 的 MIC 值要高于 SeRB-2 和 SeRB-3 的。抑制这 3 种细菌耐受亚硒酸盐生长的半数有效浓度为 102.48~150.24 mM(Se(IV))(表 1),约是已报道的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* K27)的  $EC_{50}$  (3.70 mM)值的 28~40 倍,而后者已能耐受高浓度的亚硒酸盐 (50 mM)<sup>[25]</sup>,因此本研究中的 3 种细菌 SeRB-1、SeRB-2、SeRB-3 属于高耐受亚硒酸盐还原菌。耐受金属(类金属)的细菌在生物修复过程中的应用,如生物监测(通过生物传感器)、废水处理和污染土壤的回收利用等更具吸引力<sup>[28,30]</sup>。

### 3.2 耐受性机理

本研究中的 3 种细菌能够在 Se(IV)浓度不断升高的环境中存活。这一特性对于这些细菌克服原生境高浓度的硒至关重要。经过长期进化,土生土长的微生物种群已经适应了污染环境生长,微生物体内已形成某种抵抗污染物的能力或机制<sup>[31]</sup>。微生物对硒耐受性机理主要有营养元素、脱毒机制和硒氧离子作为电子受体<sup>[32]</sup>。硒是一种原核生物和真核生物必需的微量元素,但是高浓度的硒会对生物产生毒害作用。微生物通过同化作用将 Se

(IV)还原为元素硒而降低毒害。在添加 Se(IV)的培养中,细菌通过硒的形态转化,将可溶的、有毒的 Se(IV)转化成了不溶的毒性低的元素硒。其转化(还原)效率(RE)为:当 Se(IV)浓度为 5 mM 时,约 50%的  $SeO_3^{2-}$  被还原为  $Se^0$ ;当 Se(IV)浓度升高到 10 mM 时,约 30%的  $SeO_3^{2-}$  被还原为  $Se^0$ ;当 Se(IV)浓度升高到 25 mM 时,约 20%的  $SeO_3^{2-}$  被还原为  $Se^0$ ;而当 Se(IV)浓度升高到 500~800 mM 时,仅约 3%的  $SeO_3^{2-}$  被还原为  $Se^0$ 。由此可知,由于 Se(IV)的毒性作用,细菌对亚硒酸盐的 RE 随着 Se(IV)浓度的升高而降低,这与耐受性指标测得的结果类似。但当 Se(IV)浓度为 1 mM( $\approx$ 水溶性 Se(IV)浓度)时,其转化效率平均可达 75%,其中细菌 SeRB-2 的 RE 最高达 90%,这说明 3 种细菌能有效地降低 Se(IV)污染。

这些元素硒是怎样形成的呢?TEM 观察已揭示在细菌表面、内部有大量的元素硒生成。说明在 Se(IV)胁迫下,细菌产生了应激反应,在细胞壁膜位置将有毒的四价硒转化为了元素硒<sup>[14,33-34]</sup>;而胞内的元素硒有可能是进入细胞内部的部分四价硒在细胞质发生了还原<sup>[35-36]</sup>,胞外的元素硒可能是细胞分泌出或细胞表面脱落的结果。不管通过何种途径,高浓度有害的 Se(IV)被细菌转化为了毒性低的元素硒,元素硒的生成可能是细菌耐受高浓度 Se(IV)胁迫的原因之一。

在稳定生长期的后期,会有蒜臭气体产生,可能是细菌在还原亚硒酸盐的过程中,发生了甲基化作用,通过收集液的测定,发现吸收液中有少量的硒存在(约 4 mg/L),这可能是细菌耐受高浓度硒或解脱硒毒性的又一机制。细菌在转化硒氧离子过程中可生成二甲基硒( $CH_3SeCH_3$  或  $DMS_{Se}$ )、二甲基二硒( $CH_3SeSeCH_3$  或  $DMDSe$ )、二甲基三硒( $CH_3SeSeSeCH_3$  或  $DMTSe$ )、二硫化硒酰( $CH_3SeSCH_3$  或  $DMS_{SeS}$ )、二甲基硒酰二硫( $CH_3SeSSCH_3$  或  $DMS_{SeDS}$ )等多种气体<sup>[37-39]</sup>,鉴于本实验条件的限制,未对这些气体进行定性分析。

不管通过哪种形式(还原、是甲基化),细菌耐受污染物一般离不开某一种或多种酶或基因的参与。如在产碱杆菌 (*Alcaligenes Eutrophus*) 的质粒 pMOL30 的 *czc* 基因簇决定了其对  $Cd^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  的耐受能力<sup>[40]</sup>;真养雷氏菌 (*Ralstonia eutropha* CH34) 大的质粒 (pMOL28 和 pMOL30) 携带的耐重金属的基因使其能抵御多种重金属的毒害<sup>[41]</sup>;在



大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中砷酸盐抗性编码质粒也印证了其耐受砷的能力<sup>[17]</sup>。虽然目前对微生物还原四价砷和六价砷的机理尚未搞清楚,可以肯定的是细菌对亚砷酸盐和砷酸盐的还原是由相关的酶系完成的,而编码这些酶系合成的是功能基因。

目前已从 *Thauera selenatis* 菌株中得到砷酸盐的还原酶,也是迄今为止唯一一种分离出的砷还原酶<sup>[42-43]</sup>,还有研究发现,砷酸盐的还原需要一种膜结合酶的参与<sup>[44-45]</sup>,目前 Yee 等人<sup>[46]</sup>从阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* SDL1a-1) 菌株中分离出 *tat* 基因簇,成功地实现了野生菌与突变菌(插入 *tat* 基因簇的工程大肠杆菌)对砷酸盐的还原实验。这一开创性成果使微生物调控下的砷地球化学过程研究迈入了基因水平。雷磊<sup>[47]</sup>对 SeRB-1 菌体全蛋白组进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析(图5)。根据 SDS-PAGE 结果可知,对于同一种细菌的不同培养其菌体全蛋白组有明显的差别,实验组菌体蛋白出现了多条特异表达的条带(图中 IV 对应条带),而且表达量明显超过空白对照组的条带(图中 0 对应条带),即在实验组中明显存在特异表

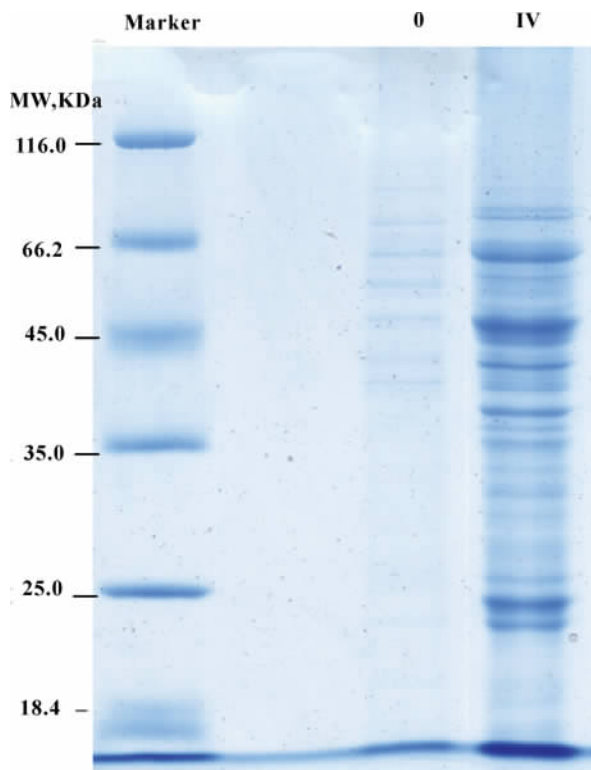


图5 SeRB-1 全蛋白组 SDS-PAGE<sup>[47]</sup>

Fig. 5 SeRB-1 entire protein group SDS-PAGE<sup>[47]</sup>  
左列为 Protien Marker;中间 0 列为空白对照菌体;右列 IV 为实验组培养菌体。

达的蛋白质类型,说明菌株为适应高砷生存环境表达了特异的酶类。这种酶可能是诱导型的,因此泳道上出现了特异表达的条带,但这种具有还原亚砷酸盐的酶的位置和种类,以及其在细菌还原亚砷酸盐为元素砷中发挥的作用都需要进一步研究,这有助于解开细菌 SeRB-1 还原耐受高浓度的亚砷酸盐之谜,同样细菌 SeRB-2 和 SeRB-3 也应当具有与之相匹配的还原亚砷酸盐的酶类,与细菌 SeRB-1 有着某种类似的还原耐受高浓度亚砷酸盐的机理。

## 4 结论

高砷碳质泥岩中的 3 株细菌 *Bacillus licheniformis* SeRB-1、*Bacillus* sp. SeRB-2 和 *Arthrobacter* sp. SeRB-3 具有在高浓度 Se(IV) 胁迫下生长的能力,其对 Se(IV) 的还原耐受生长浓度高达 800 mM,这是目前细菌耐受四价砷的最高浓度之一。说明细菌在长期的进化中已经适应这种高砷环境,该环境具有发现特异微生物的潜力,这种高 Se(IV) 耐受性可以通过逐浓度梯度尝试法不断驯化获得。低浓度 ( $\leq 25$  mM) 的四价砷对细菌的生长起到促进作用,但随着 Se(IV) 浓度的升高,细菌生长的倍增时间延长、生长速率变小,说明 Se(IV) 在高浓度下对细菌的正常生长产生抑制作用,浓度越高,抑制作用越明显,当 Se(IV) 升高至一定浓度时,细菌生长就完全受到抑制。由此得出细菌 *Bacillus licheniformis* SeRB-1、*Bacillus* sp. SeRB-2 和 *Arthrobacter* sp. SeRB-3 最小抑制浓度分别为 1 M、900 mM、900 mM。但是细菌进化出了将溶解的、有毒的四价砷转化(还原)为不溶的、低毒的元素砷沉淀下来、或(和)通过甲基化作用将四价砷转化为气态的砷化物挥发出去的能力,从而降低了四价砷的毒性或对其危害,正是这种解毒或脱毒机制的存在,是这 3 种细菌耐受高浓度四价砷的原因。细菌对四价砷的还原是有特异性的酶类参与的,如何找到、分离出这一特异性酶对于解决细菌还原亚砷酸盐的机制是至关重要的,这一步还需进一步探索。这种高耐受性能菌发现,有助于在恩施渔塘坝这类高砷地区开展 Se(IV) 污染的生物修复。

## 参考文献

- [1] WHO. Environmental Health Criteria 58: Selenium [R]. International Program on Chemical Safety, Geneva. 1987: 190.

- [2] Levander O A. A global view of human selenium nutrition [J]. Annual Review of Nutrition, 1987, 7: 227-250.
- [3] Tan J A, Zhu W Y, Wang W Y, et al. Selenium in soil and endemic diseases in China [J]. Science of the Total Environment, 2002, 284(1/2/3): 227-235.
- [4] Haygarth P M. Global importance and global cycling of selenium[M]//Frankenberger W T Jr, Benson S. Selenium in the Environment. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994: 1-28.
- [5] Fordyce F. Selenium deficiency and toxicity in the environment[M]//Selinus O, et al. Essentials of Medical Geology. Amsterdam: Elsevier 2005: 373-415.
- [6] Fordyce F M, Zhang G D, Green K, et al. Soil, grain and water chemistry in relation to human selenium-responsive diseases in Enshi District, China[J]. Applied Geochemistry, 2000, 15(1): 117-132.
- [7] Zheng B, Hong Y, Zhao W, et al. The Se-rich carbonaceous siliceous rock and endemic Se poisoning in southwest Hubei China[J]. Chinese Science Bulletin, 1992, 37: 1027-1029.
- [8] Yang G Q, Wang S Z, Zhou R H, et al. Endemic selenium intoxication of humans in China[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1983, 37(5): 872-881.
- [9] Zhu J M, Wang N, Li S, et al. Distribution and transport of selenium in Yutangba, China: Impact of human activities[J]. Science of the Total Environment, 2008, 392(2/3): 252-261.
- [10] 朱建明, 凌宏文, 王明仕, 等. 湖北渔塘坝高硒环境中硒的分布、迁移和生物可利用性[J]. 土壤学报, 2005, 42(5): 835-843.
- [11] Stolz J, Basu P, Oremland R. Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium[J]. International Microbiology, 2002, 5(4): 201-207.
- [12] Stolz J E, Basu P, Santini J M, et al. Arsenic and selenium in microbial metabolism[J]. Annual Review of Microbiology, 2006, 60: 107-130.
- [13] Dungan R, Frankenberger W. Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments [J]. Bioremediation Journal, 1999, 3(3): 171-188.
- [14] Losi M E, Frankenberger W T. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3079-3084.
- [15] Oremland R S, Hollibaugh J T, Maest A S, et al. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: Biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(9): 2333-2343.
- [16] Di Gregorio S, Lampis S, Vallini G. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: A biotechnological perspective[J]. Environment International, 2005, 31(2): 233-241.
- [17] Burton G A, Giddings T H, Debrine P, et al. High-incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(1): 185-188.
- [18] Ghosh A, Mohod A M, Paknikar K M, et al. Isolation and characterization of selenite - and selenate-tolerant microorganisms from selenium-contaminated sites[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(8): 1607-1611.
- [19] Kinkle B K, Sadowsky M J, Johnstone K, et al. Tellurium and selenium resistance in rhizobia and its potential use for direct isolation of *Rhizobium-Meliloti* from soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(5): 1674-1677.
- [20] Mishra R R, Prajapati S, Das J, et al. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product [J]. Chemosphere, 2011, 84(9): 1231-1237.
- [21] Roane T M. Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils[J]. Microbial Ecology, 1999, 37(3): 218-224.
- [22] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, et al. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium[J]. Chemical Geology, 1996, 132: 199-204.
- [23] Dewever H, Demoor K, Verachtert H. Toxicity of 2-Mercaptobenzothiazole towards bacterial-growth and respiration [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994, 42(4): 631-635.
- [24] Strotmann U J, Eglsaer H, Pagga U. Development and evaluation of a growth-inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical-compounds [J]. Chemosphere, 1994, 28(4): 755-766.
- [25] Yu R. Toxicity Comparison of Selenium Oxyanions With a Proposed Biomethylation Intermediate Dimethyl Selenone in a Minimal Medium Accompanied by Selenium Distribution Analysis [D]. Huntsville, Texas: Sam Houston State University, 1996.
- [26] Takeuchi M, Kawahata H, Gupta L P, et al. Arsenic resistance and removal by marine and non-marine bacteria [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 127(3): 434-442.
- [27] Ikram M, Faisal M. Comparative assessment of selenite (SeIV) detoxification to elemental selenium (Se0) by *Bacillus* sp. [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(9): 1255-1259.
- [28] Diels L, Mergeay M. DNA probe-mediated detection of

- resistant-bacteria from soils highly polluted by heavy-metals [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56(5): 1485-1491.
- [29] Goris J, De Vos P, Coenye T, et al. Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov and *Ralstonia basilensis* Steinle et al. 1998 emend. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 1773-1782.
- [30] Collard J M, Corbisier P, Diels L, et al. Plasmids for heavy-metal resistance in *Alcaligenes-Eutrophus* CH34: Mechanisms and applications[J]. Fems Microbiology Reviews, 1994, 14 (4): 405-414.
- [31] Tripathi M, Munot H P, Shouche Y, et al. Isolation and functional characterization of Siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9 [J]. Current Microbiology, 2005, 50(5): 233-237.
- [32] Stolz J F, Oremland R S. Bacterial respiration of arsenic and selenium [J]. Fems Microbiology Reviews, 1999, 23 (5): 615-627.
- [33] Oremland R S, Herbel M J, Blum J S, et al. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 52-60.
- [34] Yamada A, Miyashita M, Inoue K, et al. Extracellular reduction of selenite by a novel marine photosynthetic bacterium [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1997, 48(3): 367-372.
- [35] Silverberg B A, Wong P T S, Chau Y K. Localization of selenium in bacterial-cells using tem and energy dispersive-X-ray analysis [J]. Archives of Microbiology, 1976, 107(1): 1-6.
- [36] Tomei F A, Barton L L, Lemanski C L, et al. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by *Wolinella-Succinogenes* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1328-1333.
- [37] Amouroux D, Tessier E, Pecheyran C, et al. Sampling and probing volatile metal(loid) species in natural waters by in-situ purge and cryogenic trapping followed by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (P-CT-GC-ICP/MS) [J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 377(2/3): 241-254.
- [38] Burra R, Pradenas G A, Montes R A, et al. Production of dimethyl triselenide and dimethyl diselenenyl sulfide in the headspace of metalloid-resistant *Bacillus* species grown in the presence of selenium oxyanions [J]. Analytical Biochemistry, 2010, 396(2): 217-222.
- [39] Chasteen T G, Silver G M, Birks J W, et al. Fluorine-induced chemiluminescence detection of biologically methylated tellurium, selenium, and sulfur-compounds [J]. Chromatographia, 1990, 30(3/4): 181-185.
- [40] Nies D H, Nies A, Chu L, et al. Expression and nucleotide-sequence of a plasmid-determined divalent-cation efflux system from *Alcaligenes-Eutrophus* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(19): 7351-7355.
- [41] Mergeay M, Monchy S, Vallaeyts T, et al. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals; Towards a catalogue of metal-responsive genes [J]. Fems Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 385-410.
- [42] Eteazad S M, Khajeh K, Soudi M, et al. Evidence on the presence of two distinct enzymes responsible for the reduction of selenate and tellurite in *Bacillus* sp. STG-83 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009, 45(1): 1-6.
- [43] Schroder I, Rech S, Krafft T, et al. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(38): 23765-23768.
- [44] Watts C A, Ridley H, Condie K L, et al. Selenate reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 is catalysed by a molybdenum-dependent membrane-bound enzyme that is distinct from the membrane-bound nitrate reductase [J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 228(2): 273-279.
- [45] Ridley H, Watts C A, Richardson D J, et al. Resolution of distinct membrane-bound enzymes from *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 that are responsible for selective reduction of nitrate and selenate oxyanions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5173-5180.
- [46] Yee N, Ma J, Dalia A, et al. Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(6): 1914-1920.
- [47] 雷磊. 湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中硒的微生物地球化学研究 [D]. 贵阳: 中国科学院地球化学研究所, 2010.