

芽孢杆菌 SeRB-2 还原亚硒酸盐的动力学研究

袁永强^{1,2}, 朱建明^{1,*}, 刘丛强^{1,*}, 雷磊^{1,2}

(1. 中国科学院地球化学研究所, 贵阳 550002; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:微生物还原亚硒酸盐的动力学研究具有重要的现实意义, 可以为 Se(IV) 污染场地的微生物修复设计提供理论依据。本文研究了兼性厌氧菌 *Bacillus* sp. SeRB-2 对亚硒酸钠的还原动力学。通过指数方程模型、对数方程模型和米氏方程模型的分析可知, Se(IV) 的细菌还原符合一级反应动力学, 还原反应主要集中在对数期和稳定生长前期, 米氏方程模型能更好的反映细菌对亚硒酸盐的还原过程。通过对不同 Se(IV) 浓度下的米氏常数(K_m)和最大反应速率(V_{max})的分析发现, 当 Se(IV) 浓度较低时, K_m 值较小, V_{max} 值较大, 这表明 Se(IV) 浓度越低, 还原亚硒酸盐的酶与 Se(IV) 的结合能力越强, 此时细菌对亚硒酸盐的还原速率越大、还原效率也越高。在本研究中, 当 Se(IV) 浓度为 1 mmol/L 时, 其还原效率最高可达 90%, 能够有效去除或降低 Se(IV) 污染, 说明该菌在 Se(IV) 污染场地的生物修复上具有应用潜力。

关键词:细菌; 还原; 亚硒酸盐; 动力学; 参数

中图分类号: O643 文献标识码: A 文章编号: 1672-9250(2014)01-0047-08

硒是人体和动物必需的微量元素, 但硒摄入量高时又是有毒的^[1]。环境中含硒岩石的风化、化石燃料燃烧、石油冶炼、工农业排水及矿业开采都会造成局部地区硒浓度的升高, 导致硒污染^[2, 3], 从而影响生态系统的正常运行及危害人体健康。硒的毒性与生物可利用性与硒的价态与浓度有关^[4]。环境中的硒, 一般以 -II、0、+IV、+VI 四种价态存在, 其中 Se(IV) 易溶于水、易于迁移、毒性最强, 对环境与生态的危害较大, 是硒污染重点关注对象之一^[5]。

环境中微生物在硒的地球化学循环和形态转化中发挥着重要作用^[6, 7], 包括细菌在内的多种微生物能将可溶的亚硒酸盐、硒酸盐转化为不可溶的元素硒, 并沉淀下来^[3, 5, 8-10]。细菌还原硒氧离子为元素硒的行为对硒的地球化学循环有重要意义。元素硒不溶于水且毒性低可以作为硒污染地区生物修复的一种有效方法^[9, 11], 国外已经开展了该方法的实际应用, 如美国加利福尼亚州圣华金河谷硒污染水体、土壤的微生物(细菌)修复, 在初始浓度不超过 1 mmol/L 时, 平均约 70% 以上的硒被还原,

实践表明处理效果比较理想^[12, 13]。近年来, 国内也开展了硒氧离子细菌还原的研究^[14, 15], 然而, 目前有关微生物还原的亚硒酸盐动力学研究还比较少。

本文重点研究了兼性厌氧菌 *Bacillus* sp. SeRB-2 对亚硒酸钠的还原动力学。通过动力学模型研究, 确定了细菌还原亚硒酸盐的动力学参数, 得到了动力学方程。从而量化表达了细菌还原亚硒酸盐的过程。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

实验菌株 (*Bacillus* sp. SeRB-2, 简称 SeRB-2); 分离自湖北恩施渔塘坝高硒碳质泥岩, 根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[16], 可知该芽孢杆菌属以好氧或兼性厌氧菌为主, 又该菌在有氧、无氧条件下都能生长, 故该菌为兼性厌氧菌, 酶的最适温度为 37°C。

亚硒酸钠 ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 储备液 (100 mmol/L): 称取 1.7829 g 的, 溶于 100 mL 去离子水中, 使用无菌滤头 (0.22 μm) 过滤、备用。

收稿日期: 2013-03-20; 改回日期: 2013-05-26

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)。

第一作者简介: 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.

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 1000 mL,pH 约为 7.0。所有培养基均在 121℃、高压蒸汽灭菌 30 min。

1.3 细菌还原亚硒酸盐的动力学实验

1.3.1 菌种活化、培养

将保存的细菌 37℃活化,然后用接种环挑取细菌接种到已灭菌含 YEG 培养基的培养瓶中,之后将培养瓶放入恒温振荡培养箱中培养(37℃,200 rpm)约 24 h,以保证菌体进入稳定的对数生长期,以便后续实验中保持菌株稳定的活性。

1.3.2 实验方法

根据碳质泥岩样品中水溶性 Se(IV)的浓度(最高可达 93 mg/kg,未发表数据),设置亚硒酸盐的浓度梯度。向装有 YEG 培养基的培养瓶中加入已灭菌的亚硒酸钠溶液,均匀混合,使其初始浓度分别约为 1 mmol/L、3 mmol/L、5 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L。然后按 10% 的接种量接入对数生长期(约 24 h)的细菌菌液,同时做无菌(含 Se(IV))空白对照实验和细菌纯培养(无 Se(IV))实验,之后将培养瓶置 37℃,200 rpm 培养,3 次重复。

1.4 取样及样品分析方法

对培养液根据细菌生长状况,用无菌注射器取细菌悬液:0~6 h 每隔 3 h 取一次样;6~12 h,每隔 6 h 取一次样;12~24 h,每隔 12 h 取一次样;从 24 h 起每隔 24 h 取一次样。由于细菌悬液的浓度与光密度(OD 值)成正比,因此,以不同取样时间 OD 值(本研究用 722 型分光光度计(上海),波长 $\lambda = 600$ nm)为纵坐标绘制成的生长曲线可以反映细菌生长规律,当细菌悬液的 $OD_{600} > 0.8$ 时,需适当稀释。另约 1 mL 样品用高速离心机(TGL-18C-C)在转速为 11,000 g 下离心 10 min,该转速能将大部分细胞吸附的四价硒分离^[17,18],分别得到上清液和管底沉淀(包括菌粒和还原产物)。一方面,取上清液,用 0.75 mol/L 的稀盐酸稀释 1×10^4 倍,然后用氢化物发生原子荧光仪(HG-AFS)(最低检测限 0.2 $\mu\text{g/L}$)测定不同取样时间培养基中的四价硒^[15]。另一方面,对管中沉淀分别进行固定(2.5%的戊二醛、1%的锇酸)、洗涤(0.1 mol/L 的磷酸缓冲液)、脱水(浓度分别为 50%、70%、80%、90%、100%的乙醇)、渗透(丙酮:Epon812 包埋剂=1:1)、包埋(Epon812 包埋剂)、修块与切片(厚度 80~

10 nm)、染色(2%的醋酸铀和枸橼酸铅);最后用透射电镜(JEM-2000FX II,日本)对负染切片进行形貌观察,以表征产物特征。

1.5 动力学方程模型

首先对方程模型的建立作以下假设:

(1)细胞对 Se(IV)还原是简单的单一反应;该过程细菌处于平衡生长状态;

(2)硒只是细菌所需的一种微量元素,参与细菌生命活动的 Se(IV)只占很少一部分,且细菌 SeRB-2 对亚硒酸盐主要是异化还原,可将培养液中亚硒酸盐的减少视为亚硒酸盐的还原。

因培养液中剩余的 Se(IV)浓度为时间的函数,根据实验结果建立细菌还原亚硒酸盐动力学方程模型如下:

A) 指数方程模型

根据不同时间培养液中剩余的亚硒酸盐浓度,建立细菌还原亚硒酸盐的动力学方程(公式 1),用 origin 软件通过最小二乘法,对曲线进行非线性拟合,即直接用还原时间与培养液中亚硒酸盐浓度建立动力学方程。

$$C_i = A \times e^{-kt} + B_0 \quad (1)$$

式中 A 为特征常数(mmol/L);k 为还原速率常数(h^{-1}); B_0 为还原达到平衡时的浓度(mmol/L)。

B) 对数方程模型

同样将培养液中亚硒酸盐的浓度视为时间的函数,则浓度随时间的变化可通过公式(2)来表示,对其求解可得细菌还原亚硒酸盐动力学过程。

$$\frac{dC}{dt} = -kt \quad (2)$$

对公式(2)两边积分得到公式(3)。

$$\ln C_i = -kt + \ln C_0 \quad (3)$$

式中, C_0 为亚硒酸盐的初始浓度, C_i 为反应 i 时刻培养液中剩余的亚硒酸盐浓度;k 为还原速率常数,可以求出细菌还原亚硒酸盐的半寿期(half life 或 HL),HL 指的是细菌还原亚硒酸盐过程中培养液中残留 Se(IV)浓度为初始浓度 1/2 时所用的时间,即 $t_{1/2} = (\ln 2)/k$ 。

C) 米氏方程模型

细菌对硒氧离子的还原是需要一种诸如含钼的膜结合酶参与的过程^[19,20],描述酶催化反应动力学最经典的模型是米氏方程(Michaelis-Menten equation)^[21]:

$$V = \frac{V_{\max}}{K_m + C_i} \times C_i \quad (4)$$

式中, C_i 为 i 时刻时培养液中亚硒酸钠的浓度, 当 $T=0$ 时, C_0 为培养基中亚硒酸钠的初始浓度; $V = -dC_i/dT$ 为还原速率; V_{\max} 为催化反应的最大速率; K_m 为酶的特征常数, 是酶催化反应速率达到最大速率的一半时的底物(亚硒酸钠)浓度。

该公式又因反应速率 $V = (C_i - C_0)/t = -dC_i/dT$, 将其代入公式(4)两边积分, 用积分法得到公式(5)

$$\ln \frac{C_0}{C_i} = \frac{V_{\max}}{K_m} \times \frac{t}{C_0 - C_i} - \frac{1}{K_m} \quad (5)$$

2 结果与讨论

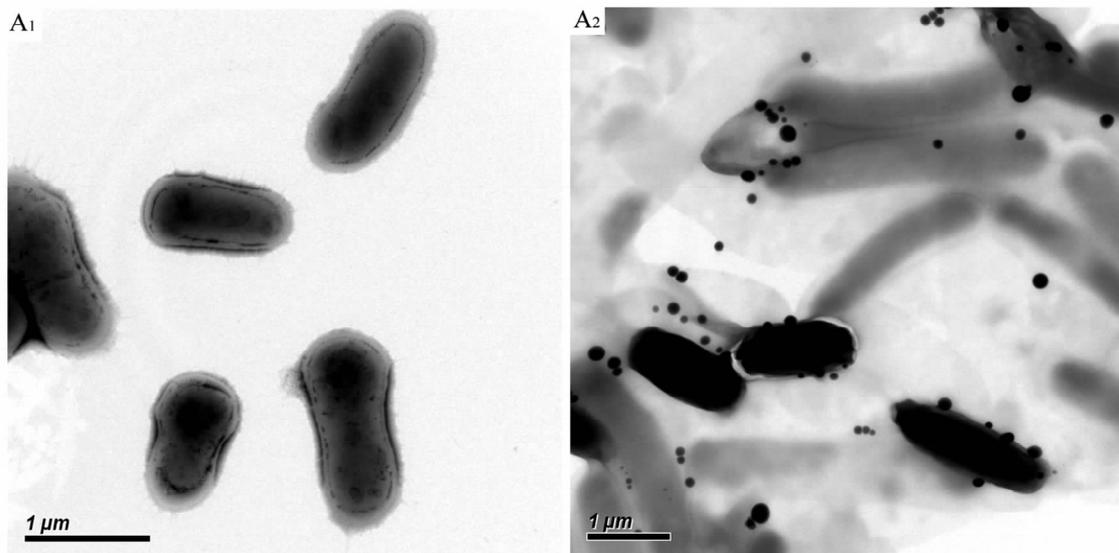
2.1 细菌对亚硒酸盐的还原

在含亚硒酸钠的液体培养基中接种细菌后, 大约 4 h 后逐渐出现红色沉淀, 而无菌空白对照并未出现, 说明发生了四价硒的细菌还原, 还原产物以出现红色元素硒颗粒为特征。透射电镜照片验证了亚硒酸钠还原(生成元素硒)前后芽孢杆菌 SeRB-2 形貌的变化, 以 $Se(IV) = 5 \text{ mmol/L}$ 为例, 接种 24 h 时, 在菌体表面有元素硒颗粒(100~300 nm)(图 1. A₂), 而刚接种时(0 h), 菌体表面则没有(图 1. A₁)。

在菌株生长曲线与培养基中硒含量变化的对照图中(图 2), 可得知菌株需要经过一定延滞期(4~6 h)后才开始繁殖, 说明四价硒会对细菌的生长产生一定的抑制作用。而随着 $Se(IV)$ 浓度升高, 细

菌 SeRB-2 需要经过更长的延滞期, 之后才能进入对数生长期, 这使得四价硒浓度快速降低的时间向后推迟。在整个反应时间内, $Se(IV)$ 的浓度呈持续下降趋势, 说明该菌一直处于比较活跃的还原状态。根据亚硒酸盐的还原速率大小, 细菌 SeRB-2 对亚硒酸盐的还原一般分为 2 个阶段, 阶段 I: 接种起到对数生长前期(0~12 h); 阶段 II: 对数生长后期到取样结束(12~120 h)。而不同的 $Se(IV)$ 浓度, 在这 2 个阶段, 细菌对亚硒酸盐的还原速率也不尽相同, 如当 $Se(IV)$ 浓度 $\leq 5 \text{ mmol/(L} \cdot \text{h)}$, 在 12~24 h 的时间段内, 亚硒酸盐的还原速率高达 $0.02 \sim 0.07 \text{ mmol/(L} \cdot \text{h)}$, 该时段也是细菌增殖最快的阶段。 $Se(IV)$ 浓度为 8 mmol/L 时, 12~36 h 的还原速率最快约 $0.05 \text{ mmol/(L} \cdot \text{h)}$; 而当 $Se(IV)$ 浓度升高至 10 mmol/L 时, 则在前 12 h 还原速率最大, 达到 $0.08 \text{ mmol/(L} \cdot \text{h)}$ 。

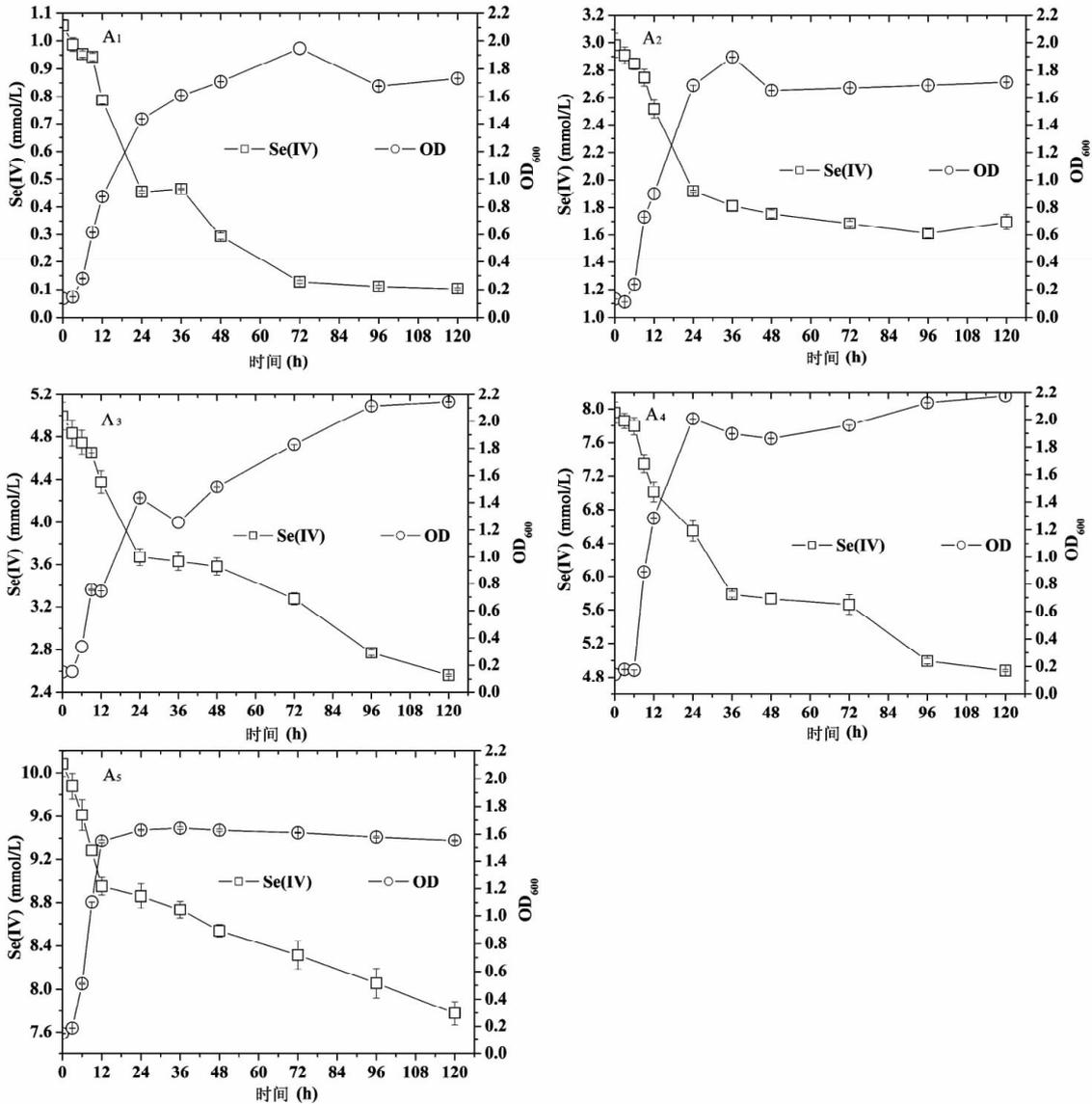
将 $Se(IV)$ 初始浓度与终止浓度的差值与初始浓度的比值作为四价硒的还原去除率(RE), 实验时间段内, RE 也是随着四价硒浓度的递增而降低的, 不同 $Se(IV)$ 浓度下, 细菌 SeRB-2 的 RE 分别约为 90%(1 mmol/L)、50%(3 mmol/L)、44%(5 mmol/L)、35%(8 mmol/L)和 22%(10 mmol/L)。说明四价硒的还原随着 $Se(IV)$ 浓度的增加而递减。与本研究类似, 在细菌 *B. selenitireducens* strain MLS10(简称 MLS10)还原亚硒酸钠实验中(初始浓度约 5 mmol/L), 也只有约 29% 的四价硒被还原^[22], 说明



A₁-接种 0 h; A₂-接种 24 h

图 1 细菌菌体与元素硒的透射电镜(TEM)照片

Fig. 1 TEM graphics of bacteria and element Se



A₁-1 mmol/L; A₂-3 mmol/L; A₃-5 mmol/L; A₄-8 mmol/L; A₅-10 mmol/L

图2 Se(IV)浓度变化与细菌 *Bacillus sp.* SeRB-2 还原亚硒酸盐的生长曲线
Fig. 2 Variation curves of selenite (Se(IV)) concentration and growth profiles during Se(IV) reduction by *Bacillus sp.* SeRB-2.

四价硒浓度较高时,细菌还原亚硒酸盐的效率较低,这是由于高浓度四价硒对细菌生长的抑制作用造成。但是,对于较高浓度四价硒的细菌还原,与细菌 MLS10 相比,本研究中细菌 SeRB-2 有相对较高的还原效率。实验表明,亚硒酸盐的还原与细胞生长相伴而生,主要发生在对数生长期及稳定前期,说明在对数生长阶段细菌体内可能有某种解毒机制,使菌株生长不再受到抑制。需要说明的是,细菌在不同阶段还原速率的差异,是否也表明其存在拮抗四价硒机制的差异,还有待进一步的研究。

2.2 亚硒酸钠还原动力学分析

1) 指数方程模型

由表 1 可知,细菌 SeRB-2 对亚硒酸盐的还原符合一级反应动力学,亚硒酸盐的浓度随时间呈指数衰减趋势,该模型与实验数据拟合的相关性很高。其还原速率常数 k 随着 Se(IV) 浓度的增加,呈现出先升高、后降低、再升高的变化趋势,在 3 mmol/L 时 k 值最大,约为 0.05/h。但该模型不能反映细菌对亚硒酸盐的还原速率和酶的特征常数等动力学参数。

表 1 细菌 SeRB-2 还原亚硒酸盐指数动力学方程

Table 1 Exponential kinetics of selenite reduction by SeRB-2

浓度 (mmol/L)	动力学方程	速率常数 k	相关系数 R
1	$C_i = 1.04 \times e^{-0.0317t} + 0.07$	3.17×10^{-2}	0.98
3	$C_i = 1.46 \times e^{-0.0524t} + 1.67$	5.24×10^{-2}	0.96
5	$C_i = 2.52 \times e^{-0.0201t} + 2.45$	2.01×10^{-2}	0.97
8	$C_i = 3.19 \times e^{-0.0280t} + 4.88$	2.80×10^{-2}	0.98
10	$C_i = 1.98 \times e^{-0.0314t} + 7.95$	3.14×10^{-2}	0.94

2) 对数方程模型

由表 2 可知,该模型也呈现出一级反应的特征。其还原速率常数随培养液中 Se(IV)浓度的增大而逐渐减小,而半寿期则是随 Se(IV)浓度增大而增大。由此可推知,Se(IV)浓度较小时,细菌对亚硒酸盐还原速率较大,半寿期较短;随 Se(IV)浓度的增大,其还原速率变小,半寿期随之增大。k 越大

或 HL 越短,说明该菌对 Se(IV)的还原能力越强,这有利于亚硒酸盐的快速去除。除了 Se(IV)浓度为 1 mmol/L 外,模型计算值与实测值基本一致,说明在反映还原过程中 Se(IV)浓度随时间变化的趋势方面,该模型是比较适用的。与指数方程模型相似,该模型也不能得出反应速率和酶的特征常数等动力学参数。

3) 米氏方程模型

根据公式(5),以 $t/(C_0 - C_i)$ 为横坐标, $\ln(C_0/C_i)/(C_0 - C_i)$ 为纵坐标作图,并进行线性回归,可得一条直线,直线的截距为 $1/K_m$,斜率为 V_{max}/K_m ,据此可计算出相应的动力学参数和动力学方程(表 3)。

由表 3 可知,米氏方程模型下的细菌对亚硒酸盐还原也是符合一级反应的。其对亚硒酸盐的还原分为 2 个阶段。在这 2 个阶段,酶的特征常数相

表 2 细菌 SeRB-2 还原亚硒酸盐的对数动力学方程及参数

Table 2 Logarithmic kinetics of and parameters for selenite reduction by SeRB-2

初始浓度(mmol/L)	动力学拟合方程	半寿期 $t_{1/2}$ (h)	还原速率常数 k	相关系数 R
1	$\ln C_i = 0.14 - 0.0356t$	19.47	3.56×10^{-2}	0.96
3	$\ln C_i = 1.14 - 0.0194t$	35.77	1.94×10^{-2}	0.98
5	$\ln C_i = 1.62 - 0.0129t$	53.61	1.29×10^{-2}	0.99
8	$\ln C_i = 2.08 - 0.0088t$	78.86	0.88×10^{-2}	0.97
10	$\ln C_i = 2.30 - 0.0063t$	110.37	0.63×10^{-2}	0.89

表 3 细菌 SeRB-2 还原亚硒酸盐的米氏动力学方程及参数

Table 3 Michaelis-Menten kinetics of and parameters for selenite reduction by SeRB-2

浓度 (mmol/L)	动力学方程	米氏常数 K_m (mmol/L)	最大反应速率 V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$)	反应时 间段(h)	相关系数 R
1	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.93 + 1.14 \times 10^{-3} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	1.08	1.23	0~12	0.99
	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.64 + 0.02 \times 10^{-3} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	1.57	25.1	12~120	0.90
3	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.40 + 1.26 \times 10^{-3} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	2.52	3.18	0~12	0.95
	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.40 + 6.48 \times 10^{-4} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	2.47	1.60	12~120	0.99
5	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.17 + 1.90 \times 10^{-3} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	5.72	1.09	0~120	0.87
8	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.14 - 6.27 \times 10^{-4} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	7.13	4.47	0~12	0.97
	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.13 + 8.27 \times 10^{-4} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	7.87	6.51	12~120	0.90
10	$\frac{\ln \frac{C_0}{C_i}}{C_0 - C_i} = 0.10 + 2.31 \times 10^{-4} \times \frac{t}{C_0 - C_i}$	9.99	2.31	0~120	0.92

差不多,尤其是 Se(IV)浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 时,其 K_m 值几乎相等,说明还原亚硒酸盐某种酶与培养液中 Se(IV)的亲合能力大小在两阶段是比较均一的。而不同 Se(IV)浓度,其 K_m 值则不同,说明 K_m 是与包括 Se(IV)浓度等反应条件有关的一个特征常数,Se(IV)浓度越低, K_m 值越小,说明还原亚硒酸盐的某种酶与培养液中 Se(IV)的亲合能力更强,亚硒酸盐的还原效率越高。

而细菌对亚硒酸盐的还原速率,则与细菌的生长状况有关,第一阶段细菌刚进入对数生长期,生长速率比较小,因此只有少量的亚硒酸盐被还原,其还原速率也较小;在第二阶段,尤其是 12~24 h,细菌对数生长后期,细菌大量繁殖,还原亚硒酸盐的某种酶的活性也较高,更多的亚硒酸盐被还原,其还原速率也较大,而进入稳定生长期,细菌处于生长与衰亡平衡,其还原速率又变小。与指数方程模型与对数方程模型相比,米氏方程模型很好地反映细菌对亚硒酸盐的还原过程,通过米氏方程,能够得出不同 Se(IV)浓度下最大反应速率 V_{max} 、酶的特征常数 K_m 等动力学常数。

4) 三种公式模型的比较

指数方程模型与对数方程模型,是对培养液中剩余的 Se(IV)浓度随时间变化的直接拟合。这两种模型,虽然能够反映培养液中剩余 Se(IV)浓度随时间递减(指数或对数)趋势,但是二者都不能反映细菌对亚硒酸盐的还原过程及相关的动力学参数。

米氏方程模型,不仅能反映 Se(IV)浓度随时间递减的变化趋势,而且还能反映出细菌还原亚硒酸盐过程或阶段,这与亚硒酸盐的还原过程相符(图 2),根据实验结果,计算出了细菌还原亚硒酸盐的动力学参数 K_m 和 V_{max} 。通过 K_m 可知,细菌对亚硒酸盐的还原与 Se(IV)的浓度等反应条件有关,即 Se(IV)的浓度越小,亚硒酸盐还原酶与底物中 Se(IV)的结合能力越强,亚硒酸盐的还原速率越大,还原效率越高,这与 Se(IV)的浓度为 1 mmol/L 时,其还原效率最大达到 90%的实验结果一致。同时也说明,Se(IV)对细菌具有一定的毒害作用,随着培养液中 Se(IV)浓度升高,其毒性增大,使得微生物需要较长的时间恢复其正常的生理代谢功能,因而对亚硒酸盐的还原速率变小,还原效率降低。

因此,米氏方程模型能更好的反映细菌对亚硒酸盐的还原过程。

2.3 动力学参数分析

表 4 列出了细菌 SeRB-2 与部分文献报道的几种常见还原亚硒酸盐细菌的动力学参数。通过对比发现该菌还原亚硒酸盐的酶的特征常数 K_m 值比细菌 STG-83(简称 STG-83)的低,但要比 *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 的高。除了细菌培养条件和培养基组成不同造成的差异之外,更主要是由细菌体内起还原作用的酶的特性决定。这种差异还体现在同一培养条件、同一种细菌 *E. SLD1a-1*(简称 SLD1a-1)对不同价态硒的还原上,细菌 SLD1a-1 对硒酸盐还原的 K_m 值为 3.1 mmol/L,则其对亚硒酸盐还原 K_m 的 4.3 倍^[23],进一步说明米氏常数是酶的特征性常数,只与酶的种类有关而与酶的浓度无关。 K_m 的大小反映细菌还原亚硒酸盐的酶与底物结合能力的大小。同样二者的最大反应速率也不尽相同,其中细菌 SLD1a-1 六价硒还原 V_{max} 为 0.76 mmol/L,略高于其对四价硒还原的相应 V_{max} 值。对于同一价态硒(Se(IV))还原的不同细菌,最大反应速率 V_{max} ,细菌 STG-83 的要比细菌 SLD1a-1 的大。由于这两种硒还原细菌的最大反应速率 V_{max} (单位为 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 蛋白)计算中涉及到硒氧离子(亚硒酸盐硒和硒酸盐硒)还原酶或蛋白的提取与纯化,鉴于本实验研究条件限制,未做这一步工作。但根据实验数据和模型,本研究也推导出了相应的最大反应速率 V_{max} (单位为 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$),只是在不同的基准(参数单位)下,其 V_{max} 值未与上述两种还原硒的细菌进行直接对比。由于细菌培养条件和培养基组成不同,也会造成数值上的差异, V_{max} 是与反应(还原)速率有关的一个参数,而研究发现,在高硒浓度下,最大反应速率 V_{max} 较大时,反应速率也会较快,如本研究选用细菌 SeRB-2 还原 10 mmol/L 的 Se(IV),在对数生长期其反应速率达 0.114 mmol/h,高于 SLD1a-1 还原硒酸盐的反应速率约为 1.47 $\mu\text{mol}/\text{h}$ (据图 3A 推算)^[24],说明在此条件下细菌 SeRB-2 还原酶对亚硒酸盐的还原活性比较高。

表 4 动力学参数比较

Table 4 Comparison of kinetic parameters

菌种	K_m (mmol/L)	V_{max}	文献
<i>Bacillus</i> sp. SeRB-2	1.1~10	1.1~25 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{h})$,	本研究
<i>Enterobacter cloacae</i> SLD1a-1	0.72	1.3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$	[23]
<i>Bacillus</i> sp. STG-83	10.9	1.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$	[25]

3 结论

1) 细菌 SeRB-2 对亚硒酸盐的还原分为两个阶段。阶段 I: 从接种起到对数生长前期(0~12 h), 该阶段细菌经历适应期开始生长, 亚硒酸盐的还原速率比较小; 阶段 II: 从对数生长后期到取样结束(12~120 h), 在稳定生长的后期, 细菌快速生长、亚硒酸盐的还原速率变大, 进入稳定生长期后, 还原速率又变小。

2) 实验表明细菌还原亚硒酸盐符合一级动力

学特征, 米氏方程能更能反映细菌还原亚硒酸盐的动力学过程。由此得出了不同浓度下的米氏常数 K_m 和 V_{max} , K_m 值是一个与反应条件(包括 Se(IV) 浓度)有关的常数, Se(IV) 浓度越小, K_m 值也越小, 还原亚硒酸盐的酶与 Se(IV) 的亲和能力越强, 细菌还原亚硒酸盐的效率越高;

3) 细菌对亚硒酸盐的还原效率随 Se(IV) 浓度(1~10 mmol/L) 升高而递减, 在 Se(IV) 浓度为 1 mmol/L 时, 其还原效率最高可达 90%; 该菌能有效降低或去除 Se(IV) 污染。

参 考 文 献

- [1] Lenz M, Lens P N L. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences [J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(12): 3620-3633.
- [2] Seiler R L, Skorupa J P, Peltz L A. Areas susceptible to irrigation-induced selenium contamination of water and biota in the western United States[R]. US Geological Survey, 1999.
- [3] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, et al. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium [J]. Chemical Geology, 1996, 132(1-4): 199-204.
- [4] Uden P C, Boakye H T, Kahakachchi C, et al. Selective detection and identification of Se containing compounds-review and recent developments [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1050(1): 85-93.
- [5] Antonioli P, Larnpis S, Chesini I, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a new bacterial strain suitable for bioremediation of selenite-contaminated environmental matrices [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6854-6863.
- [6] Stolz J, Basu P, Oremland R. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium [J]. International Microbiology, 2002, 5(4): 201-207.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] Dungan R. and Frankenberger W. Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments [J]. Bioremediation Journal, 1999, 3(3): 171-188.
- [10] Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, et al. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4734-4740.
- [11] Frankenberger Jr W T and Arshad M. Bioremediation of selenium-contaminated sediments and water [J]. BioFactors, 2001, 14(1-4): 241-254.
- [12] Losi M E. and 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.
- [13] Zhang Y Q and Frankenberger W T. Removal of selenium from river water by a microbial community enhanced with *Enterobacter taylorae* in organic carbon coated sand columns [J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 346(1–3): 280–285.
- [14] 王东亮, 肖敏, 钱卫, 等. 细菌还原氧化态硒产生红色单质硒的研究进展[J]. *微生物学报*, 2007, 47(3): 554–557.
- [15] 朱建明, 雷磊, 肖湘, 等. 地衣芽孢杆菌对亚硒酸盐的还原[J]. *矿物岩石地球化学通报*, 2011, 30(3): 245–250.
- [16] 布坎南 RE, 吉本期 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版) [M]. 北京: 科学出版社, 中国科学院微生物研究所译. 1984: 729–758.
- [17] Garbisu C, Gonzalez S, Yang W H, *et al.* Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis* [J]. *BioFactors*, 1995, 5(1): 29–37.
- [18] Zhang Y Q, Zahir Z A, Frankenberger W T. Factors affecting reduction of selenate to elemental selenium in agricultural drainage water by *Enterobacter taylorae* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51(24): 7073–7078.
- [19] 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.
- [20] Ridley H, Watts C A, Richardson D J, *et al.* Development of a viologen-based microtiter plate assay for the analysis of oxyanion reductase activity: Application to the membrane-bound selenate reductase from *Enterobacter cloacae* SLD1a–1 [J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 358(2): 289–294.
- [21] Cutright T J. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinulata var elegans* [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, 35(4): 397–408.
- [22] Afkar E, Lisak J, Saltikov C, *et al.* The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10 [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2003, 226(1): 107–112.
- [23] Ma J, Kobayashi D Y, and Yee N. Chemical kinetic and molecular genetic study of selenium oxyanion reduction by *Enterobacter cloacae* SLD1a–1 [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(22): 7795–7801.
- [24] 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.
- [25] Etezad 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.

Study on Kinetics of Selenite Reduction by *Bacillus* sp. SeRB-2

YUAN Yong-qiang^{1,2}, ZHU Jian-ming^{1,*}, LIU Cong-qiang^{1,*}, LEI Lei^{1,2}

(1. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: It is significant to study the bioreduction kinetics of selenite, which may provide a theoretical basis for bioremediation design in the contaminated sites. The kinetics of Se(IV) reduction by facultative anaerobic strain *Bacillus* sp. SeRB-2 was studied using the index equation model, logarithm equation model and Michaelis-Menten equation model. It is shown that Se(IV) bioreduction fits a first-order reaction, and reacts mainly in the logarithmic phase and early stationary phase. The Michaelis-Menten equation model better reflects the reduction process compared with both index and logarithm equation models. The kinetic parameters K_m and V_{max} acquired were relevant to Se(IV) concentrations, i.e., the lower the Se(IV) concentrations, the smaller the K_m value and the higher V_{max} will be. It is indicated that the binding ability between Se(IV)-reducing enzyme and selenite is stronger, the reducing rate is larger and the reducing efficiency is higher, in a lower Se(IV) medium. In addition, the reduction efficiency is up to 90%, when Se(IV) concentrations are about 1mmol/L, which illustrates that Se(IV) contamination can be effectively reduced or removed by strain SeRB-2. This strain may be suitable for bioremediation in the Se(IV) contaminated sites.

Key words: bacterium; reduction; selenite; kinetic; parameter