

【论著】

文章编号:1001-5914(2006)01-0031-02

2 株具有亚硒酸盐还原能力细菌的筛选和鉴定

王明义¹,梁小兵¹,朱建明¹,郑娅萍²,魏中青¹,赵由之¹

摘要:目的 探讨具有还原亚硒酸盐能力的菌株在硒的生物地球化学转化过程中的作用。方法 在湖北省恩施市双河乡渔塘坝采集富硒碳质泥岩样品,通过富基、分离和纯化培养,选择具有还原亚硒酸盐能力的菌株进行细菌鉴定和转硒效率的检测。结果 从富硒碳质泥岩中筛选出 2 株具有还原亚硒酸盐能力的优势细菌,均鉴定为棒状杆菌属,亚硒酸钠转化率分别为 3.9%,96.8%。结论 棒状菌属在渔塘坝环境单质硒富集和硒的生物地球化学转化过程中起着重要的作用。

关键词:亚硒酸钠;环境微生物学;棒状杆菌;渔塘坝**中图分类号:**R117**文献标识码:**A

Isolation and Identification of Two Strains With the Ability to Reduce Selenite WANG Ming-yi, LIANG Xiao-bing, ZHU Jian-ming, et al. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry Chinese Academy of Science, Guizhou, Guiyang 550002, China

Abstract: Objective To screen out and isolate the strains that can reduce selenite in the high-Se environment of Yutangba. **Methods** The strains with the ability to reduce selenite were screened out by enrichment, isolation and purification culture. The strains were identified, the efficiency of transferring Se of the strains was measured. **Results** Two strains with the ability to reduce selenite were screened out from the soil and were preliminarily identified as *Corynebacterium* spp. The efficiency of transferring Se of one strain is 96.8%. **Conclusion** *Corynebacterium* spp. play an important role in the enrichment of Se and the process of Se biogeochemistry transformation in the environment of Yutangba.

Key words: Sodium selenite; Environmental microbiology; *Corynebacterium*; Yutangba

硒是人体和动物不可缺少的微量元素,具有有益和有害的双重生物学功能^[1]。硒在表生环境中分布的不均一性已导致了不同区域的生物、生态效应^[2-4]。硒是一种多变价的元素,可以在自然界中以-2价、0价、+4价、+5价的无机和有机形式(二甲基硒,对二甲基二硒等)存在^[1,4]。不同形态的硒具有不同的地球化学特性,影响着地质环境中硒的迁移、循环、生物可利用性和毒性^[1,4],而地质环境中微生物因素则明显影响着不同形态硒的转化,或将 Se^{6+} 、 Se^{4+} 还原为元素硒或甲基化硒,或与此相反^[4-7]。大量研究表明,富硒环境中微生物对高硒的耐受主要表现在微生物对硒形态的转化,即微生物对硒的氧化-还原、同化-矿化和甲基化^[5-7]。渔塘坝是中国典型的高硒地区之一,富硒碳质岩附近的土壤硒含量通常在数十 mg/kg 以上,有的甚至达到几百 mg/kg^[8]。这样富硒的土壤环境中必然存在特异的微生物区系与群落结构。然而,国内研究人员对富硒土壤中微生物分布状况的调查却鲜有报道。因此,筛选富硒土壤或富硒碳质岩石中的微生物,对硒的生物地球化学循环及硒污染环境的生物修复技术等认识具有重要的理论和现实意义。我们从湖北省恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中分离出 2 株具有亚硒酸盐还原能力

的棒状杆菌,并对其进行了初步的鉴定和亚硒酸盐-硒的转化效率检测,目的在于鉴定该环境中具有无机硒还原能力的微生物的种属,以便进一步分析该环境中的微生物群落结构;研究富硒环境中微生物对无机硒转化,筛选对无机硒具有较强还原能力的菌株,以便进一步开展微生物无机硒还原的生物化学机制研究。

1 材料与方法

1.1 富硒碳质泥岩样品的采集

富硒碳质泥岩样品采自湖北省恩施市双河乡渔塘坝,样品采集后,无菌保鲜袋封装,贮存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,立即带回实验室。

1.2 培养基

3.8 g/L 亚硒酸钠液体高氏 1 号培养基:可溶性淀粉 20 g, KNO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, NaCl 0.5 g, 亚硒酸钠 3.8 g; 牛肉膏蛋白胨:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 固体培养基中加入 2%琼脂;3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 亚硒酸钠 3.8 g, 固体培养基中加入 2%琼脂。

1.3 样品中耐受硒微生物的富集、分离和纯化培养

1 g 富硒碳质泥岩样品接入 3.8 g/L 亚硒酸钠高氏 1 号液体培养基中, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 105 r/min 振荡培养 5 d。取富集培养液于 3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨固体培养基中分离培养, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。取分离培养的单个菌落分别接种于牛肉膏蛋白胨固体和 3.8 g/L 亚硒酸钠

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40103007)**作者单位:**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.贵阳医学院生物化学与分子生物学教研室(贵州 贵阳 550001)**作者简介:**王明义(1973-),男,主管检验师,贵阳医学院与中国科学院地球化学研究所联合培养硕士研究生,从事生物化学与分子生物学研究。

牛肉膏蛋白胨固体培养基,分别于 35℃ 培养 2 和 5 d,进行菌落的拍照和纪录。

1.4 细菌鉴定

取对数生长期的菌株分别进行革兰染色、抗酸染色、鞭毛染色和芽孢染色。根据菌体的形态学特征对菌株进行常规生化鉴定。

1.5 转硒效率的测定

挑取牛肉膏蛋白胨固体培养基上活化的单菌落接种到 20 ml 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,35℃ 105 r/min 摇床过夜培养至对数生长期,按 2% 的比例取活细菌悬液(600 nm 波长下的吸光度值为 0.5)接种于 50 ml 的 3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨液体培养基中,设为转化组;同时按 2% 的比例取灭菌的死细菌悬液(600 nm 波长下的吸光度值为 0.5)接种于 50 ml 的 3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨液体培养基中作为初始浓度组,35℃,105 r/min 振荡培养。根据细菌的生长曲线,取对数期末的转化组和初始浓度组细菌悬液,10 000 r/min 离心 30 min,以原子荧光光度法测定上清液中亚硒酸钠的浓度,按公式(1)计算转硒效率^[9]:

$$\text{转硒效率} = (c_0 - c_1) / c_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: c_0 —初始浓度组上清液亚硒酸钠浓度, mol/L; c_1 —转化组上清液中亚硒酸钠浓度, mol/L。

2 结果

样品中微生物经富集后,液体培养基由无色转为红色。3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨培养基中分离培养,出现 5 种不同形态的红色菌落和 3 种灰白色细小菌落。其中 2 株菌落为红色的优势菌,分别占平板菌落的 44% 和 32%,将其分别编号为 Se-1 和 Se-2,并进一步进行纯化鉴定。其他 3 种形态的红色菌落分别占 4%, 6% 和 6%。Se-1 和 Se-2 经牛肉膏蛋白胨固体培养基转化培养后,Se-1 为淡黄色、半圆形、湿润、边缘整齐的较大菌落,Se-2 为无色、混浊、半圆形、湿润、中央有突起中等大小菌落。3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨培养基中,Se-1 为红色、扁平、湿润、边缘有无色区的小菌落,Se-2 为红色、半圆形、湿润小菌落。Se-1 和 Se-2 经革兰染色后均为阳性棒状杆菌,菌体着色不均匀,可见 X 和 Y 形的菌体交叉。抗酸染色阴性,无鞭毛和芽孢。Se-1 和 Se-2 常规生化反应结果相同(表 1)。根据菌体形态特征和生化反应,Se-1 和 Se-2 均鉴定为棒状杆菌属。Se-1 和 Se-2 的亚硒酸钠转化率分别为 3.9%, 96.8%。

3 讨论

环境中硒酸盐和亚硒酸盐经微生物还原后生成元素硒,并可以在菌体内甲基化后生成毒性很低且具有

表 1 Se-1 和 Se-2 菌株主要生化反应结果

菌株	氧化酶	触酶	动力	硝酸盐	尿素	乳糖	七叶苷	葡萄糖
Se-1	-	+	-	+	+-	+	-	-
Se-2	-	+	-	+	+-	+	-	-

菌株	麦芽糖	蔗糖	木糖	甘露醇	气体	溶血	37℃ 生长
Se-1	-	-	-	-	+	-	+
Se-2	-	-	-	-	+	-	+

挥发性的二甲基硒,该过程在硒元素的迁徙、毒性和生物可利用性中起着重要的作用。

从湖北省恩施市双河乡渔塘坝富硒泥岩样品中分离出具有还原亚硒酸钠能力的 2 株菌,编号为 Se-1 和 Se-2。在分离培养的 3.8 g/L 亚硒酸钠牛肉膏蛋白胨培养基上,Se-1 和 Se-2 分别占平板菌落的 44% 和 32%,为优势菌株。在牛肉膏蛋白胨固体培养基上,Se-1 为淡黄色,Se-2 为无色,但在含有亚硒酸钠的培养基上均形成红色菌落,是由于在亚硒酸盐还原过程中生成红色单体硒(Se_0)。根据形态学和生理学特性,将 2 株菌鉴定为棒状杆菌属。2 株棒状杆菌对亚硒酸钠的转化率差别很大,Se-1 转化率为 3.9%,Se-2 转化率为 96.8%,后者的转化率明显高于前者,提示 Se-2 菌属在渔塘坝硒的生物地球化学转化过程中起着重要的作用,进一步丰富了对渔塘坝环境中单质硒富集的微生物作用机制的研究。Se-2 菌株具有运用于生物工程的潜在价值,可用于生物工程中降低硒含量的生物反应器中;也可通过对其菌株体内硒的生物化学机制研究,选择编码亚硒酸钠还原相关酶的基因转移到植物中,使植物具有转化硒的能力。

参考文献:

- [1] 彭安,王子健,Whanger PD,等. 硒的环境生物无机化学[M]. 北京:中国环境科学出版社,1995:1-204.
- [2] Wang ZJ, Gao YX. Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments[J]. Appl Geochem, 2001, 16:1345-1351.
- [3] Tan JA, Zhu WY, Wang WY, et al. Selenium in soil and endemic diseases in China[J]. Sci Total Environ, 2002, 284:227-235.
- [4] Frankenberger WT, Benson S. Selenium in environment[M]. New York: Marcel Dekker, 1994:1-416.
- [5] Stolz JF, Basu P, Oremland RS. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium[J]. Int Microbiol, 2002, 5:201-207.
- [6] Jayaweera GR, James WB. Role of redox potential in chemical transformations of selenium in soils[J]. Soil Sci Soc Am J, 1996, 60:1056-1063.
- [7] Masscheleyn PH, Ronald DD, William HP Jr. Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH [J]. Environ Sci Technol, 1990, 24: 91-96.
- [8] 朱建明. 渔塘坝黑色富硒岩石中硒的赋存状态及其对局域环境的效应[D]. 贵阳:中科院地球化学研究所,2001.
- [9] 王劲松,俞吉安,张承康. 含硒类球红细菌的研究[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(6):1-4.

(收稿日期:2005-05-08)

(本文编辑:杜宇欣)