

湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中的微生物多样性初探

雷磊^{1,2}, 朱建明^{1*}, 王风平^{3*}, 肖湘³, 秦海波^{1,2}, 冯新斌¹

(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, 贵阳 550002; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 本文以湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩为研究对象, 采用构建 16S rRNA 基因克隆文库方法首次对其微生物群落结构进行了初步调查, 结果发现其中细菌主要特征群落为变形菌(*Proteobacteria*)34%、酸杆菌(*Acidobacteria*)43.6%、放线菌(*Actinobacteria*)12.9%和未分类细菌 9.5%。古菌主要优势菌群为泉古菌(*Crenarchaeota*)66.67%, 未分类古菌 32%。表明高硒样品中具有丰富的微生物多样性。该结果有助于进一步理解高硒环境下硒生物地球化学转化过程中微生物的重要作用, 并为硒中毒地区的生物修复和恩施硒资源的安全开发提供参考依据。

关键词: 硒; 富硒碳质泥岩; 微生物多样性

中图分类号: S154.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-9250(2011)04-0517-06

微生物是一切肉眼看不见或者看不清楚的微小生物的总称, 既包括原核的真细菌、放线菌、支原体、立克次氏体、衣原体、蓝细菌和古细菌, 也包括真核的真菌(酵母菌和霉菌)、原生动物和微藻类, 以及非细胞的病毒、类病毒和朊病毒等。微生物在自然界中无处不在, 在很多动、植物活动无法到达的地方, 微生物是唯一的生命体。微生物虽然个体微小, 但具有极大的比表面积, 能够迅速地与周围环境进行物质交换, 并且数量庞大, 代谢类型多样, 代谢强度也高于动、植物, 具有较大的合成和分解能力。地质环境中存在的微生物参与了许多地质-地球化学过程, 使特定的生境具有与之相适应的微生物群落多样性。湖北恩施渔塘坝是中国较为典型的高硒地区之一^[1-3], 也是世界上发生过人群硒中毒爆发性流行的病区^[4]。目前已经发现有很多种微生物^[5-9]可以参与硒的价态转化并在硒的生物地球化学循环中发挥着重要作用。有些微生物可以将高毒性的氧化态亚硒酸盐及硒酸盐异化还原为无毒的元素态硒, 或甲基化为具挥发性的 DMS_e 等; 而有些微生物又可通过元素态硒的氧化而获得能量。因此, 调

查湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中的微生物群落结构, 可以进一步了解高硒环境下微生物在硒的生物地球化学转化过程中的重要作用, 有助于硒中毒地区的环境修复, 并为恩施硒资源的安全开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究中的富硒碳质泥岩于 2007 年, 2008 年 8 月采自湖北省恩施市双河乡渔塘坝北部二叠系茅口组顶部碳质硅质岩层。采用 HG-AFS 法^[10]测定其平均含硒量为 985 mg/kg(n=6)。

1.2 样品预处理和 DNA 提取

样品在无菌条件下分装, 采用改进的液氮研磨 DNA 提取法^[11], 称取约 5 g 样品及 3.5 g 石英砂加入研钵, 迅速加入适量液氮并用力研磨, 反复加入液氮研磨 3 次, 之后加入 13.5 mL (65℃ 预热) DNA 抽提液, 37℃ 225 rpm 摇床温育 30 min, 称取 0.16 g 溶菌酶溶于 1 mL 无菌水中(终浓度 10 mg/mL)加入离心管中混匀 vortex 10 s, 37℃ 225 rpm 摇床

收稿日期: 2010-10-14; 改回日期: 2011-08-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-JC101), 国家自然科学基金创新群体项目(40721002); 国家自然科学基金项目(40973085)。

第一作者简介: 雷磊(1982-), 男, 博士研究生, 微生物地球化学与地质微生物学专业。

* 通讯作者: 朱建明. E-mail: zhujianming@vip.gyig.ac.cn; 王风平. E-mail: fengpingw@yahoo.com

温育 30 min 加入 1.5 mL 20% SDS (65°C 预热) 65°C 水浴 2 h (每 15~30 min 颠倒一次), 4°C 6000 g 离心 10 min, 取上清, 再向离心管中加入 4.5 mL DNA 抽提液 (65°C 预热) 和 0.5 mL 20% SDS (65°C 预热), vortex 10 s, 4°C 6000 g 离心 10 min 加入等体积氯仿 vortex 10 s, 4°C 6000 g 离心 10 min, 取上清加入 0.6 倍体积异丙醇 (-20°C 静置时间大于 1 h), 25°C 16000 g 离心 30 min 弃去上清, 用 70% 乙醇 (4°C 预冷) 重悬 2 次, 静置 30 min, 25°C 16000 g 离心 30 min 弃去上清, 空气干燥加入 100 μ L 无菌水重悬 DNA, 于 -20°C 存放。根据不同用途, 对此 DNA 样品进一步处理纯化。

1.3 PCR 扩增

由上海生工生物工程技术服务有限公司合成了两对扩增细菌及古菌 16S rDNA 部分片段的通用引物: 细菌通用引物 Eubac27F: (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), Eubac1492R: (5'-GGT TAC CTTGTT ACG ACT T-3')。古菌通用引物 Arch21F: (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') Arch958R: (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3') (Y 为 C 或 T; M 为 A 或 C)。PCR 扩增按常规流程进行。扩增体系为 50 μ L, 其中 10 \times PCR 扩增缓冲液 5 μ L, dNTPs 4 μ L (2 mmol/L), 两种引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), Taq 酶 2U, 以及适量模板。PCR 条件为 95°C 变性 1 min, 60°C 复性 40 s, 72°C 延伸 100 s, 共 35 个循环, 最后在 72°C 在延伸 10 min。

1.4 16s rDNA 文库的构建

取 DNA 约 20 ng 为模板, 利用细菌、古菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 每次 PCR 反应设置 3 次重复, 将 PCR 产物混合后以回收试剂盒回收, 分别得到 1.5 kb 和 900 bp 的片段。将 DNA 片段克隆到 pMD18-T 载体上, 经过阳性克隆筛选和电泳检验得到的这些含有相关环境微生物 16S rDNA 片段的阳性克隆子的集合即构建了富硒碳质泥岩样品中细菌和古菌的 16S rDNA 文库。使用 E. Z. N. A Cycle Pure 试剂盒 (Promega) 纯化 PCR 产物, 然后按照 pMD18-T 载体 (MBI) 手册上的方案将回收所得 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上, 并转化到使用高效感受态细胞制备试剂盒 (鹭隆生物有限公司) 制备的 E. coli DH5 α 感受态细胞中, 涂布于 LA 平板 37°C 培养 12 h 左右, 挑取 LA 平板上的单菌落并划线于新的 LA 平板上 37°C 培养 12 h 左

右。使用来源于 pMD18-T 载体克隆位点两边 50 bp 的序列为引物 (UP I: 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'; UP II: 5'-TTG GGT AAC GCC AGG GT-3') 进行菌落 PCR, 之后以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选出所有阳性克隆子。

1.5 16s rDNA 限制性内切酶多态性 (RFLP) 分析

使用阳性克隆子菌落 PCR 的产物为模板, 以 UP I, UP II 为引物进行二次扩增, 所得的产物用 MspI 和或 RsaI 进行完全酶切, 酶切产物用 5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 分析产物酶切后的图谱, 计算每种酶切谱型的出现频率。

1.6 16s rDNA 序列测定与系统进化关系的分析

阳性克隆子中的 16s rDNA 由上海 Invitrogen 生物有限公司进行测序, 所得的序列在 RDP (ribosomal database project) II 中先进行序列有效性验证, 剔除无用序列, 将剩余序列进行 SEQUENCE-MATCH, 找出 RDP II 库中相关序列, 用 ARB 软件进行分析并构建了相应系统进化树; 同时在 NCBI 上利用 Blast 搜索 GeneBank, EMBL, DDBJ 和 PDB 上的所有序列, 找出相关序列, 确定样品中所含细菌, 古菌所属的种类范畴; 结合这两部分搜索结果和 ARB 构建的进化树, 挑选其中的部分序列, 利用 DNAMAN (version 6.0, Lynnon BioSoft) 软件进行分析, 采用邻接法构建系统发育树。

2 结果和讨论

2.1 样品 DNA 提取结果

使用无菌管及一次性灭菌采样器采集富硒碳质泥岩, 立即放入 4°C 保温箱中, 12 h 内 -20°C 冷冻保存。采用液氮研磨法提取 DNA, 1 g 样品可以获得大约 200 ng DNA, 且 DNA 片段大于 21 kb, 而且酶切效果良好, 可以用于微生物 DNA 随机基因文库构建。

2.2 16S rDNA 文库构建及 16S rDNA RFLP 分析

构建 16S rDNA 克隆文库, 采用了 UP I + UP II 引物对阳性克隆子进行菌落 PCR 以验证插入片段的大小, 对 DNA 片段大小在 1.5 kb 的 PCR 产物以 MspI 进行酶切, 之后用 5% 琼脂糖凝胶电泳检测。由于克隆数量大无法在同一次电泳中间测完, 因此对每次电泳中具有不同谱型的酶切产物加以统计, 并与最后同时进行电泳, 以除去可能重复的谱型。结果显示富硒碳质泥岩样品中的细菌至少属于 12 种不同的类型; 而古菌则至少属于 3 种不同的类

型。这说明样品中细菌群落发育较好,有多个种群适应了高硒环境,而古菌仅有少部分种群可在高硒环境中生存。本研究中分别构建了湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩的细菌 16S rDNA 克隆文库和古菌 16S rDNA 克隆文库,从文库中随机挑取 150 个克隆进行 PCR-RFLP 分析,对具有不同谱型的克隆进行测序,获得 120 个长度约为 1.5 kb 的 16S rDNA 序列。通过 DNAMAN(version 5.0)软件进行相互比较,这 120 个序列之间的同源性均小于 97%,为不同的基因型。将这些序列与 EMBL 和 RDP II 数据库中的已知序列进行相似性比较,得到同样的结果,发现这些克隆子可被归入 10 门,24 个种,如图 1 所示,图中分别为古菌和细菌文库中不同微生物类群分别在文库中的百分比。采用 DOTUR^[12] 计算得到细菌和古菌克隆子文库的多样性稀释曲线及克隆文库多样性指数,如图 2,表 1 所示。多样性稀释曲线可以很直观的看出古菌克隆文库曲线已经有接近饱和的趋势,而细菌克隆文库还远没有饱和,说明样品中细菌的多样性远高于古菌。Shannon-Weaver Index 用来表示群落中物种的歧异程度,这个指标会同时受到物种数量(丰富度)和物种的数量分布(均匀度)所影响,一个群落中如果物种越多(丰富度越高),不同物种的数量越均匀一致,Shannon-Weaver Index 就越高;Simpson Index 代表从一个群落中随机取出两个个体,这两个个体同属一个物种的概率,一个群落中如果物种歧异度越高,这个指标值就越低;由表 1 可知细菌文库 16S rDNA 克隆文库中物种的歧异度远高于古菌文库 16S rDNA 克隆文库,能够较好的代表湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩样品中的群落组成。

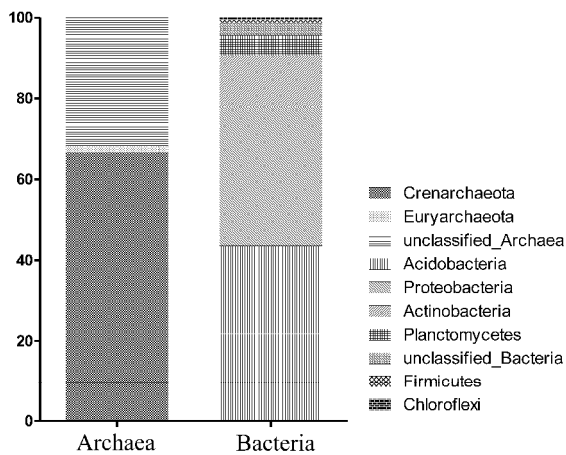


图 1 不同微生物类群在 16S rDNA 克隆文库中的比例
Fig. 1 The proportion of different micorbe groups based on 16S rRNA gene clone libraries

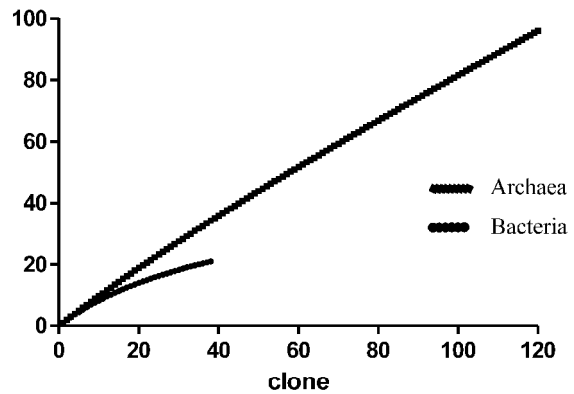


图 2 湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中细菌及古菌多样性稀释曲线

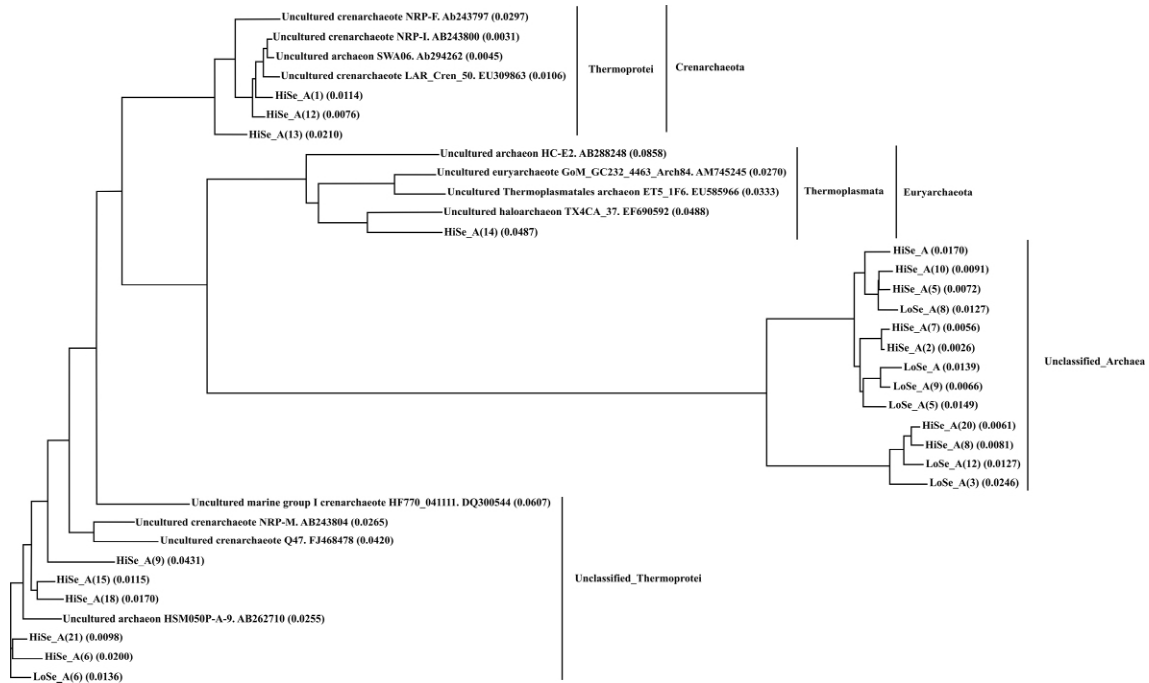
Fig. 2 Rarefaction curve of bacterial and archaeal 16S rRNA sequences from Se-rich carbonaceous mudstone

表 1 16S rDNA 克隆文库多样性指数
Table 1 The index of microbe diversity based on 16S rRNA gene clone libraries

克隆文库	Chao1	ACE	bootstrap	Jackknife	Shannon-Weaver Index	Simpson Index
古菌文库	35.375	38.599	30.0813	38	3.062	0.027
细菌文库	901	745.882	133.687	617.415	4.500	0.0049

2.3 系统进化分析

对测序得到的古菌 16S rDNA 克隆子序列进行系统进化分析,结果见图 3。克隆文库中有 40 个克隆属于泉古菌(*Crenarchaeota*),所占克隆文库比例为 66.67%;此外还有广古菌(*Euryarchaeota*): 1.67%,以及未分类古菌(*unclassified Archaea*): 31.67%。泉古菌(*Crenarchaeota*)是一类极端嗜热嗜酸可代谢硫的古菌类群。其中有 16 个克隆子属于热变形菌纲 *Thermoprotei* 与已知物种相似性均大于 97%,热变形菌纲 *Thermoprotei* 为细长状杆菌,能够弯曲或分支的革兰氏阴性菌,细胞壁由糖蛋白组成,为绝对厌氧生长温度为 70~97℃,pH 介于 2.5~6.5,常存在于富含硫的热水环境中,通过氧化葡萄糖、氨基酸、酒精和有机酸等获取能量,可以以硫为电子受体,也可利用 H₂ 和 S⁰ 进行化学无机自养,以 CO 或 CO₂ 为唯一碳源。广古菌(*Euryarchaeota*)包含了古菌中的大多数种类,如经常在动物肠道中发现的产甲烷菌,在极高盐浓度下生活的盐杆菌,一些超嗜热的好氧菌和厌氧菌,也有海洋类群。现有的一些研究已经发现古菌能够利用硒,并且能够合成硒蛋白。



(系统发育树采用邻接法构建;克隆以 A_(编号)表示;参照菌株来自 RDP II 数据库, 括号内为参照菌株在数据库中的编号;分支的长度表示遗传距离)

图 3 湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩古菌 16S rRNA 基因克隆子系统发育树

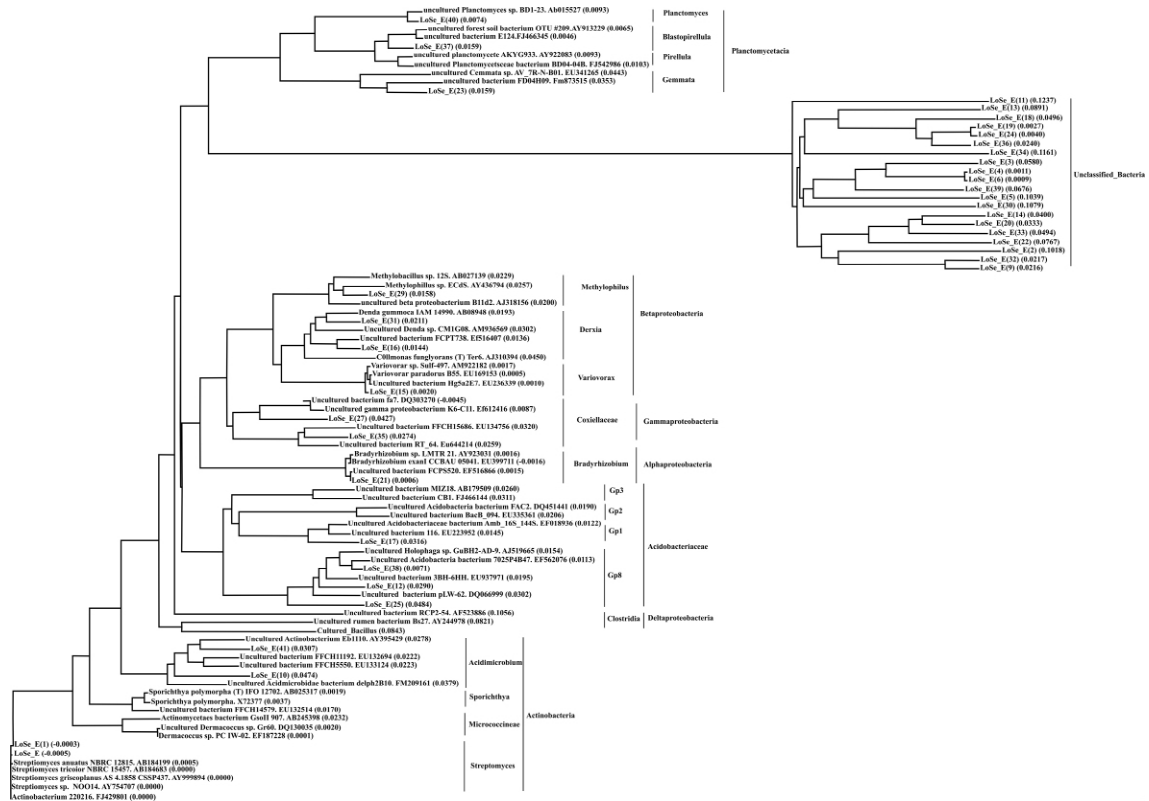
Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of Archaea present in the Se-rich carbonaceous mudstone of Yutangba, Enshi, Hubei Province

对测序得到的细菌 16S rDNA 克隆子序列进行系统进化分析,结果见图 4。克隆文库中有 56 个克隆属于变形细菌门(*Proteobacteria*),所占克隆文库比例为 34%。其中 α -*Proteobacteri*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* 所占比例分别为:3.68%, 25.15%, 3.07%, 1.23%。除变形细菌门(*Proteobacteria*)序列以外还得到包括浮霉菌门(*Planctomycetes*): 49.08%; 壁厚菌门(*Firmicutes*): 0.61%; 放线菌门(*Actinobacteria*): 12.88%; 绿弯菌门(*Chloroflexi*): 0.61%; 酸杆菌门(*Acidobacteria*): 43.56%; 以及未分类细菌(*unclassified Bacteria*): 3.07%, 共 11 个种类。变形细菌门(*Proteobacteria*)是细菌中最大的一门,包括很多病原菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、弧菌、螺杆菌等著名的种类。也有自由生活的种类,包括很多可以进行固氮的细菌。所有的变形菌门细菌为革兰氏阴性菌,其外膜主要由脂多糖组成。很多种类利用鞭毛运动,但有一些非运动性的种类,或者依靠滑行来运动。此外还有一类独特的黏细菌,可以聚集形成多细胞的子实体。变形菌门包含多种代谢种类,大多数细菌能够兼性或者专性厌氧及异养生活,并且很多并非紧密相关的属可以利用光合作用储存

能量,因其多数具有紫红色的色素,被称为紫细菌。变形菌门根据 rRNA 序列被分为五类(通常作为五个纲),用希腊字母 α 、 β 、 γ 、 δ 和 ϵ 命名。

酸杆菌门(*Acidobacteria*)是一个新划分出的菌门,正如它的名字所暗示的,这是一类嗜酸的菌,于 1997 年首次被分离出来,由于酸杆菌最近才被发现因此大多数种类未获得纯培养,这些菌的生态分布及代谢特性尚未被人们了解,但因其土壤中大量存在,这些菌很可能是生态系统的重要组成。Garbisu^[13]等人研究发现当向培养基中添加 1 mmol/L 亚硒酸钠,枯草芽孢杆菌(丙酸杆菌属)在还原亚硒酸钠为元素硒的同时还会产生形态和生化方面的变化。

放线菌门(*Actinobacteria*)是一类革兰氏阳性细菌,曾经由于其形态被认为是介于细菌和霉菌之间的物种。它们具有分支的纤维和孢子,依靠孢子繁殖,表面上和属于真核生物的真菌类似,从前被分类为“放线菌目”(*Actinomycetes*)。但因为放线菌没有核膜,且细胞壁由肽聚糖组成,和其它细菌一样。目前通过分子生物学方法,放线菌的地位被肯定为细菌的一个大分支。放线菌用革兰氏染色可染成紫色(阳性),且 GC 含量较高。放线菌最重要的作用是可以产生、提炼抗菌素,目前世界上已经发现



(系统发育树采用邻接法构建;克隆以 E_(编号)表示;参照菌株来自 RDP II 数据库, 括号内为参照菌株在数据库中的编号;分支的长度表示遗传距离)

图 4 湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩细菌 16S rRNA 基因克隆子系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of bacteria present in the Se-rich carbonaceous mudstone of Yutangba, Enshi, Hubei Province

的 2000 多种抗菌素中,大约有 56%是由放线菌(主要是放线菌属)产生的,如链霉素、土霉素、四环素、庆大霉素等。放线菌门拥有数目众多的纲、目、科、属(常见的有诺卡氏菌属、小单孢菌属、链霉菌属,其与变形菌门、厚壁菌门的细菌构成了硒还原的主要菌门群体^[14]。Wintzingerode^[15]等从厌氧生化反应池中分离出 3 种多食醋弧菌(一种新型放线菌),这些细菌具有在厌氧条件下将硒酸盐还原为单质硒的能力,同时也存在硒的甲基化现象。

3 结论

本研究首次采用分子生物学技术初步研究了湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中细菌和古菌的多样性,结果表明富硒碳质泥岩中细菌的优势种群主要包括变形菌群,酸杆菌群和放线菌群等;古菌的优势

种群主要是泉古菌群。此外泥岩中还存在部分未分类的菌群占到总克隆文库的 9.5%,且与已知微生物类群相似性小于 80%,证明富硒碳质泥岩中有着丰富的微生物多样性,而本研究中构建的 16S rDNA 克隆文库容量有限。因此为全面认识湖北恩施渔塘坝富硒碳质泥岩中的微生物群落,应进行更大规模的文库筛选及测序,并进行定期采样研究,其中微生物群落结构的动态变化等方面尚有待进一步研究。该研究结果有助于恩施硒中毒地区的环境修复,并有可能为恩施硒资源的安全开发提供参考依据。

致谢:本研究实验过程中得到国家海洋局第三海洋研究所肖湘研究员课题小组成员汤熙祥、姜丽晶、盖英宝、谷力老师和叶光斌、李宁、萧芳等学生的无私指导和帮助,谨此致谢。

参 考 文 献

[1] 郑宝山,洪业汤,赵伟,等.鄂西的富硒碳质硅质岩与地方性硒中毒[J].科学通报,1992,37(11):1027-1029.
[2] 朱建明,郑宝山,王中良,等.渔塘坝微地域高硒环境中土壤硒的分布规律及其影响因素[J].环境科学,1998,19(6):33-36.

- [3] 朱建明,郑宝山,毛大均,等. 渔塘坝微地域硒分布的景观地球化学研究[J]. 地球化学,2000,29(1):43-49.
- [4] 扬光圻,王淑真,周瑞华. 湖北恩施地区原因不明脱发脱甲症病因的研究[J]. 中国医学科学院学报. 1981,3(增刊2):1-6.
- [5] Gerrard T L, Telford J N, Williams H H. Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy[J]. *Bacterial*, 1974, 119: 1057-1060.
- [6] Tomei F A, Barton L L, Lemanski C L, *et al.* Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by *Wolinella succinogenes*[J]. *Can J Microbiol*, 1992, 38: 1328-1333.
- [7] Tomei F A, Barton L L, Lemanski C L, *et al.* Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*[J]. *J Ind Microbiol*, 1995, 14: 329-336.
- [8] 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]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3079-3084.
- [9] Dungan R S, Yates S R, Frankenberger W T. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment[J]. *Environ Microbiol*, 2003, 5: 287-295.
- [10] 朱建明,秦海波,李璐,等. 高硒环境样品中硒的形态分析方法[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2007, 26(3): 209-213.
- [11] Brown M V, Bowman J P. A molecular phylogenetic survey of sea-ice microbial communities (SIMCO)[J]. *FEMS Microbial Ecol*, 2001, 35: 267-275.
- [12] Schloss P D, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [13] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, *et al.* Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*[J]. *BioFactors*, 1995, 5(1): 29-37.
- [14] Siddique T, Okeke B C, Zhang Y, *et al.* Bacterial diversity in selenium reduction of agricultural drainage water amended with rice straw[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(1): 217-226.
- [15] von Wintzingerode F, Gobel U B, Siddiqui R A, *et al.* *Salana multivorans* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction International[J]. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1653-1661.

Primarily Investigating the Diversity of Microorganisms in Selenium-rich Carbonaceous Mudstone of Yutangba, Enshi, Hubei

LEI lei^{1,2}, ZHU Jian-ming^{1*}, WANG Feng-ping^{3*}, XIAO Xiang³,
QIN Hia-bo^{1,2}, FENG Xin-bin¹

(1. State Key Lab. of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Lab. Of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: In order to investigate the microbial diversity of the selenium (Se)-rich carbonaceous mudstone of Yutangba, Enshi, Hubei Province, the microbial community structures have been primarily characterized by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) and 16S rRNA gene library analyses based on the DNA extracted from the mudstone. Phylogenetic analysis revealed that most of the bacterial clones were affiliated with members of the Acidobacteria family (43.6%), Proteobacteria family (34%), Actinobacteria family (12.9%) and the members of unclassified bacteria (3%). In the Archaea domain, the dominant Archaea belonged to the members of the Crenarchaeota family (66.7%), others were unclassified (32%). These results showed that there is a rich diversity of microorganisms in Se-rich carbonaceous mudstone, which is helpful to further understand the significant role of microorganisms in the biogeochemical cycle of Se in the Se-high surface environment, and to provide the referred evidence for bio-remediation of Se-polluted areas and safe utilization of mineral resources on Se in Enshi Prefecture, China.

Key words: selenium; Se-rich carbonaceous mudstone; microbial community