

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(10):1347–1352; 4 October 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 一株假单胞菌 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 好氧还原亚硒酸钠为红色单质硒

蒋华东<sup>1,2</sup>, 何晓红<sup>2</sup>, 张礼霞<sup>2</sup>, 陶勇<sup>2</sup>, 王晓梅<sup>2</sup>, 高平<sup>1</sup>, 李大平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 四川大学生命科学院, 成都 610064)

(<sup>2</sup> 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

**摘要:**【目的】本实验室保藏的一株异化硝酸盐还原菌 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR), 其能够在好氧环境下以有机碳源为电子供体, 把易溶解、高毒性亚硒酸钠还原成为红色单质硒, 本文对该菌株还原亚硒酸盐的特征进行了研究。【结果】结果表明该菌株可以在 pH 为 6-11 环境中生长, 对亚硒酸钠有较强抗性, 其 MIC (minimal inhibitory concentration) 可高达 50 mmol/L。在 5 天时间内, 菌体以柠檬酸钠为电子供体, 把 2 mmol/L 亚硒酸钠完全还原为红色单质硒并主要积累于胞外。硝酸盐和还原型谷胱甘肽对菌体还原亚硒酸钠具有促进作用, 初步确定菌体对亚硒酸钠的还原是细胞膜或细胞质中的某些物质催化的结果。【结论】本项研究为应用 *Pseudomonas alcaliphila* MBR 于生物反应器提供了重要基础。

**关键词:** *Pseudomonas alcaliphila* MBR ; 亚硒酸钠还原 ; 单质硒 ; 谷胱甘肽

**中图分类号:** Q935      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1347-06

硒元素是瑞典化学家 Bezeliu 在 1817 年发现并命名<sup>[1]</sup>。1973 年, 世界卫生组织 (WHO) 向全世界宣布: 硒是人类和动物生命中必须的微量元素, 补硒可以有效预防多种疾病。硒主要以硒半胱氨酸的形式存在人体中, 能有效增加谷胱甘肽过氧化物酶、硫氧还蛋白还原酶、脱碘酶等含硒酶的活性, 可以增加机体防病、抗病能力, 预防癌症, 抵抗有害金属, 抗辐射等方面的作用。硒对治疗肝炎, 关节炎, 白内障, 出血热有显著作用, 并且硒对肿瘤患者的放化疗也有显著的辅助治疗作用。

硒的一个显著特征就是其营养剂量和毒性剂量之间范围很窄。近些年来, 探索高生物活性和高安全性的硒源成为研究焦点。硒主要以 3 种形式存在: (1) 无机硒: 代表性物质为硒酸钠, 亚硒酸钠和硒化氢。 (2) 有机硒: 代表性物质为硒蛋白, 还有一些利用有机化合物与无机硒作用, 生成有机态硒化

物, 如硒氨酸。 (3) 单质硒。对于补硒来说, 有机硒相比于无机硒, 硒的吸收利用价值高, 急性毒性更小, 被认为是较好的硒制品, 但是近年的研究表明, 利用微生物还原亚硒酸钠而产生的纳米红色单质硒, 比传统无机硒和有机硒更具有高效高安全性<sup>[2]</sup>。从生物功效来看, 纳米硒在体外清除羟基自由基的效率为无机硒的 5 倍, 为有机硒的 2.5 倍, 在急性毒性 (LD500) 标准方面, 无机硒为 15  $\mu\text{g/g}$ , 有机硒为 30–40  $\mu\text{g/g}$ , 而纳米硒则高达 113  $\mu\text{g/g}$ <sup>[3]</sup>。国外在利用微生物进行硒的还原方面研究的较多, 已经从最初的菌株的筛选发展到现在对还原机理的探究, 而我国在这方面研究较少, 目前只报道了利用芽孢杆菌 (*Bacillus* HBS4)<sup>[3]</sup>, 固氮红细菌 (*Rhodoacter azotoformans*)<sup>[4]</sup>, 棒状菌属 (*Corynebacterium spp*)<sup>[5]</sup> 来还原亚硒酸钠生成单质纳米硒, 但是这些菌株的还原率并不高, 为此寻找新

**基金项目:** 科学院知识创新重要方向项目课题 (KSCX2-YW-G-075-12)

\* 通信作者。 Tel/Fax: +86-28-85235149; E-mail: lidp@cib.ac.cn

**作者简介:** 蒋华东 (1984–), 男, 浙江宁波人, 硕士研究生, 主要从事资源微生物的研究。 E-mail: jhdscu@163.com

**收稿日期:** 2010-04-14; **修回日期:** 2010-05-23

的适合工业用的高还原率的菌株显得尤为重要。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**假单胞菌 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR), 由实验室分离、鉴定并保藏<sup>[6]</sup>, 该菌株已于 2008 年 1 月 2 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物保藏中心。保藏号为 CGMCC No. 2318。

**1.1.2 培养基:**(1) 基础培养基:  $\text{KNO}_3$  1.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.05 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5.13 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 mL。(2) 亚硒酸钠培养基: 在 1 L 基础培养基里加入 1 mmol 的亚硒酸钠。(3) 固体培养基: 在基础培养基和亚硒酸钠培养基加入琼脂粉 15.0 g/L。150 mL 培养基加入到 250 mL 的三角瓶中, 棉塞封口,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min 后备用。

**1.1.3 培养条件:**将斜面保存菌株接种于经灭菌的 150 mL 基础培养基中, 置于 28℃, 110 r/min 摇床振荡培养 24 h 进行菌种的活化, 然后按 10% 接种量转接到新鲜基础培养基中培养 48 h, 重复 2 次备用。亚硒酸钠的还原培养是在 150 mL 亚硒酸盐培养基中接种 200  $\mu\text{L}$  活化菌种菌液, 然后置于 28℃, 110 r/min 摇床振荡培养 5 d。

### 1.2 主要仪器和试剂

X-射线光电子能谱仪 XSAM 800 (XPS) (英国 KRATOS 公司); 日立 S-4800 型扫描电子显微镜 (日本日立公司); 冷冻干燥冻干机 (美国 Thermo 公司); PHS—25 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂); HQZ-C 空气摇床 (哈尔滨市东联电子有限公司); Sigma 3K30 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司)。还原型谷胱甘肽 (G-SH) 和谷胱甘肽抑制剂 [L-Buthionine-sulfoximine (BSO)] 为分析纯, 购于 Sigma 公司, 亚硒酸钠, 硝酸钾, 磷酸二氢钾等为分析纯。

### 1.3 扫描电镜 (Scanning Electron Microscope) 和 X 射线光电子能谱 (XPS) 分析样品制备

取亚硒酸钠培养基里的指数期细胞悬液于 EP 管中, 10000  $\times$  g 离心, 无菌水漂洗 3 次以除去杂质, 利用戊二醛固定液 (浓度 3%) 固定, 然后依次用 40%, 70%, 90%, 100% 乙醇分别脱水 15 min, 置于空气中干燥, 然后在扫描电镜下观察。取培养 5 d 的亚硒酸钠培养基, 10000  $\times$  g 离心, 无菌水漂洗 3 次以除去杂质, 取沉淀物经冷冻干燥后进行 XPS 检测。

### 1.4 菌落数量和直径的测量及 MIC 的测定

(1) 取活化的菌种菌液 1 mL, 通过浓度梯度稀释法稀释  $10^7$ 。取 100  $\mu\text{L}$  稀释后的菌液分别涂布于亚硒酸钠浓度为 0, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L, 4 mmol/L 的固体培养基平板 (9 cm) 上, 每个浓度重复 3 次。在 28℃ 恒温培养箱里培养 7 天后, 进行菌落数和菌落直径的测定。(2) MIC 的定义为 30℃ 下抑制该菌在平板上生长的最低浓度。灭菌后, 基础培养基冷却至 50℃, 然后加入适量的无菌亚硒酸钠溶液, 配制成一系列的浓度梯度。培养至指数期的细菌, 稀释  $10^4$  倍后, 滴加 50  $\mu\text{L}$  于平板, 培养 10 d, 没有红色圆斑则定为不生长, 每个浓度至少做 3 个重复。

### 1.5 亚硒酸钠还原动力学研究

配制碳源 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 浓度为 10 g/L, 培养基其他成份不变的亚硒酸钠培养基进行菌株转硒的动力学研究。培养基灭菌后接种 200  $\mu\text{L}$  活化的菌种菌液, 置于 28℃, 110 r/min 摇床振荡培养。分别在 0、12、24、36、48、60、72、84、96 和 108 h 取出培养基。10000  $\times$  g 离心收集细胞, 并用蒸馏水洗涤两次, 所得到的菌体在 100℃ 烘箱烘至恒重, 然后在马弗炉中 550℃ 灰化, 前后之间的减少量即为菌体的生物量。

### 1.6 pH 对菌株生长与亚硒酸钠还原的影响

配制亚硒酸钠培养基, 然后取 150 mL 分装到 250 mL 的三角瓶中, 调节培养基的 pH 值为 5、6、7、8、9、10、11 和 12, 每个浓度重复 3 次。最后在培养基中接种 200  $\mu\text{L}$  活化菌种菌液, 然后置于 28℃, 110 r/min 摇床振荡培养 5 d。

### 1.7 还原型谷胱甘肽 (G-SH) 及胱甘肽抑制剂 [L-Buthionine-sulfoximine (BSO)] 对菌株还原亚硒酸钠的影响

在亚硒酸钠培养基里分别加入 2 mmol/L 的还原型谷胱甘肽及谷胱甘肽抑制剂 (L-Buthionine-sulfoximine), 每个浓度重复 3 次。在 150 mL 的培养基中接种 200  $\mu\text{L}$  活化菌种菌液, 然后置于 28℃, 110 r/min 摇床振荡培养 5 d。

### 1.8 细胞的破碎和提取

1 L 活化的菌液经 10000  $\times$  g 离心 10 min 后收集菌体, 先将菌体悬浮到 100 mL 浓度为 25% 的蔗糖 Hris-HCl 缓冲液 (pH 为 7.5, 50 mmol/L) 中, 再在悬浮液中加入 0.1% (w/v) 溶菌酶, 37℃ 水浴 30 min, 然后加入 0.5 mmol 的 EDTA-2Na, 水浴 20 min, 之后加入 0.13 mmol 的  $\text{MgCl}_2$ , 继续水浴

20 min,最后把悬浮液在 20000 × g 离心 30 min。离心得到的上清中含有细胞周质部分的物质,将沉淀用去离子水洗涤 2-3 次后再离心,最后得到的沉淀即为原生质体。把收集到的原生质体进行超声波破碎,然后 4000 × g 离心 30 min,离心得到的上清中含有细胞膜和胞质的物质。

1.9 化学分析

亚硒酸钠含量测定采用的是 2,3-二氨基萘分光光度法<sup>[7]</sup>,硝酸钠的含量测定采用的是国标紫外分光光度法<sup>[8]</sup>。

2 结果和讨论

2.1 菌体还原亚硒酸钠产生红色单质硒的表征

通过图 1-A 的扫描电镜图发现,样品中菌体表面和外部存在高电子密度颗粒,对这些颗粒进行 EDS 分析(图 1-B),在 0-4 keV 出现了钙.镁.钾,钠等元素的特征吸收峰,这些都是培养基的成份。在 11.22 keV 出现了硒的特征吸收峰,表明颗粒的成分中含有硒元素,与文献报道一致<sup>[9]</sup>。对样品进行 X 射线光电子能谱(XPS)分析,出现了单质硒的特征吸收峰。亚硒酸钠液体培养基经过培养后,培养基变为红色;在亚硒酸钠固体培养基中出现红色的菌落,而未接菌的对照则没有红色菌落的产生,为此可以确定菌体将亚硒酸钠还原为红色单质硒,红色单质硒主要分布在菌体表面。

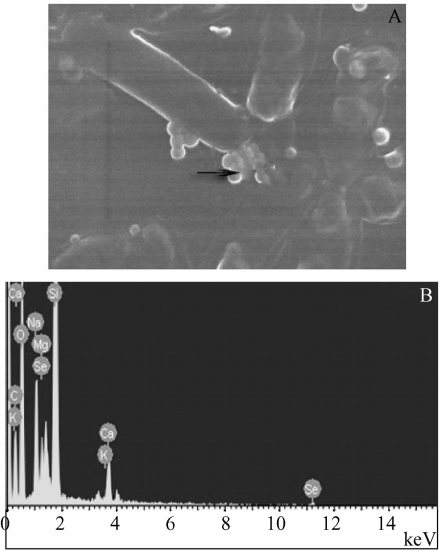


图 1 *Pseudomonas alcaliphila* MBR 的 SEM/EDS 图谱

Fig. 1 SEM (A) and EDX (B) of *Pseudomonas alcaliphila* sp MBR cell grown in the presence of selenite (30000X).

2.2 不同浓度亚硒酸钠对菌体生长的影响

图 2 所示,亚硒酸钠浓度对平板上菌落数和大小有直接的影响。随着亚硒酸钠浓度由 0 增加到 4 mmol/L,平板中的菌落数从最初的大约 360 个减少到 11 个,菌落直径从最初的 5.4 mm 降到了 1.2 mm,从中看出亚硒酸钠对菌体的生长有明显的毒害作用。经测定,当亚硒酸钠浓度高达 50 mmol/L 时,将完全抑制菌体的生长,其 MIC 为 50 mmol/L。在自然界中,有多种微生物能够将亚硒酸钠还原成为红色单质硒,如:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 罗尔斯通氏菌 CH34 (*Ralstonia metallidurans* CH34) 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等等,但它们中大多数对亚硒酸钠的抗性都很小,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 MIC 为 1 mmol/L<sup>[10]</sup>,大肠杆菌 (*E. coli* W1485) 的 MIC 为 5.8 mmol/L<sup>[11]</sup>,慢生大豆根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 的 MIC 为 6-12 mmol/L<sup>[12]</sup>,球形红细菌 (*Rhodobacter spheroids*) 的 MIC 为 2.9-4.6 mmol/L<sup>[13]</sup>。本研究中的假单胞菌 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 的 MIC 达 50 mmol/L,远高于其他菌株。

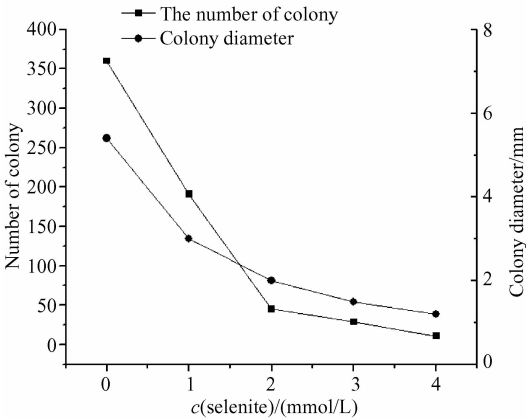


图 2 亚硒酸钠对菌体 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 生长的影响

Fig.2 Effect of selenite on the growth of *Pseudomonas alcaliphila* MBR.

2.3 亚硒酸钠还原动力学

对菌株还原亚硒酸钠进行了动力学研究,结果如图 3,经过 24 h 的停滞期后,菌株进入 24-72 h 的指数期,72 h 后达到稳定期。在 24-48 h 内,菌体首先进行硝酸盐 ( $\text{NO}_3^-$ ) 还原,该段时间内,95% 的硝酸盐被还原。48 h 以后菌体开始对亚硒酸盐 ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) 进行还原,但还原速率比较低,到了稳定期,菌体对亚硒酸盐还原速率显著加快,96 h 后,

99%的亚硒酸盐被还原。在菌体生长过程中,硝酸盐和亚硒酸盐都要从菌体获得电子后才能进行还原,它们存在着电子竞争的关系。结果表明,硝酸盐从菌体得到电子要先于亚硒酸盐,而且还原的速率更快,效率也更高。只有当硝酸盐被还原以后,亚硒酸盐才会从菌体中得到电子还原。为了减少硝酸盐对亚硒酸盐的电子竞争,选用硝酸钾浓度为5.0 g/L,培养基其他成份不变的亚硒酸钠培养基,结果菌体对亚硒酸钠的还原率反而降低,变为64.8%。这一结果显示,虽然硝酸盐在被还原时和要亚硒酸盐进行电子竞争,但是硝酸盐对菌体还原还是具有促进作用。分析其原因,可能是硝酸盐还原酶或者亚硝酸盐还原酶参与了亚硒酸盐的还原<sup>[14]</sup>。

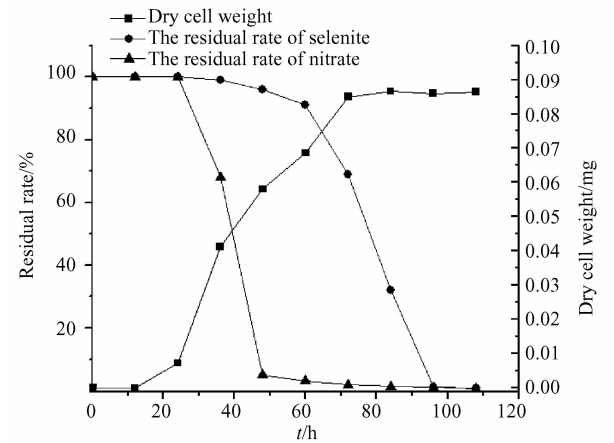


图3 菌体 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 的生长和还原亚硒酸盐、硝酸盐的动力曲线

Fig.3 The grown of *Pseudomonas alcaliphila* MBR and the kinetics of Selenite, Nitrate reduction.

2.4 不同 pH 对菌体还原亚硒酸钠的影响

研究发现,当 pH 在 6 - 11 之间时,菌体均能进行生长和对亚硒酸钠的还原,而 pH 值低于 5 和高于 12 时,菌体无法生长同时也失去对亚硒酸钠的还原能力。菌体在不同 pH 下的还原率由图 4 所示,当在碱性环境下时,菌株对亚硒酸钠的还原率在 67.5% - 69.1% 之间;而在中性和弱酸性环境下还原率在 56.9% - 64.5% 之间。该结果说明菌株适合在碱性环境下对亚硒酸钠进行还原,这与该菌自身嗜碱的生理特性相一致。

2.5 还原型谷胱甘肽 (G-SH) 及谷胱甘肽抑制剂 {L-Buthionine-sulfoximine (BSO)} 对菌体还原亚硒酸钠的影响

如图 5 所示,当在亚硒酸钠培养基中加入 BSO 后,还原率比对照降低了 11.9%;当加入 G-SH 后,

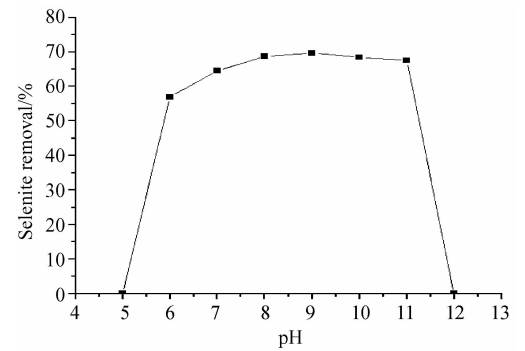


图4 pH 对菌体 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 还原亚硒酸钠的影响

Fig.4 Effect of ph on the reduction of selenite by *Pseudomonas alcaliphila* MBR.

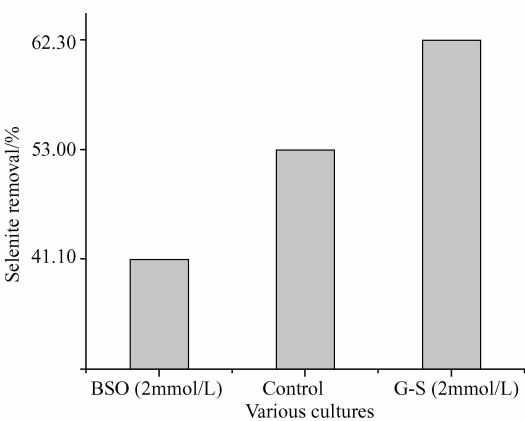


图5 BSO 和 G-SH 对菌体 (*Pseudomonas alcaliphila* MBR) 还原的影响

Fig.5 Effects of BSO and G-SH on the removal of selenite in *Pseudomonas alcaliphila* MBR.

还原率相比于对照增加了 9.3%。结果表明还原型谷胱甘肽 (G-SH) 有提高还原率的作用,而谷胱甘肽抑制剂 {L-Buthionine-sulfoximine (BSO)} 则有降低还原率的作用。目前,已经证实在一些微生物中,如大肠杆菌 (*E. coli*),深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 等,谷胱甘肽与谷胱甘肽还原酶参与了菌体对亚硒酸钠的还原,当谷胱甘肽含量减少时,还原率就会随之降低。谷胱甘肽和亚硒酸钠反应生成单质硒的具体过程是:还原型谷胱甘肽 (G-SH) 首先作为电子供体与亚硒酸根 ( $SeO_3^{2-}$ ) 进行反应生成 GS-Se-SG,然后 GS-Se-SG 被谷胱甘肽还原酶或硫氧还蛋白还原酶还原得到 GS-Se<sup>-</sup>,最后 GS-Se<sup>-</sup> 通过歧化反应,生成 G-SH 和单质 Se<sup>[15]</sup>,在本实验中,由于加入了谷胱甘肽抑制剂 {L-Buthionine-sulfoximine (BSO)},从而抑制了谷胱甘肽的生成,导致了菌体内部谷胱甘肽含量降低,从而使还原率的降低;当在

培养基中加入谷胱甘肽后,导致了菌体内部谷胱甘肽含量增加,从而使还原率的升高。说明在假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila* MBR)细胞中,谷胱甘肽与谷胱甘肽还原酶参与了菌体对亚硒酸钠的还原。但是从图5中可以看出还原率并没有降低为0,分析其原因主要有两个:BSO并不能完全抑制谷胱甘肽产生,菌体可以通过其他途径产生谷胱甘肽<sup>[15]</sup>;菌体内部存在其他机制对亚硒酸钠进行还原。

## 2.6 菌株还原位点分析

取50 mL活化的菌液经10000 × g离心后收集发酵上清液40 mL,加入0.04 mmol的亚硒酸钠和0.08 mmol NADH。在40 mL含有细胞周质的上清液和含有细菌细胞膜和胞质的上清液中分别加入0.04 mmol的亚硒酸钠和0.08 mmol NADH。把上述3份溶液在30℃恒温箱中保持24 h后,结果显示,含有细胞膜和胞质的溶液变成了红色,表明有部分亚硒酸钠已经被还原成红色硒;而含有周质的溶液和发酵上清液中并没有颜色的变化,表明亚硒酸钠并没有被还原。说明菌体对亚硒酸钠的还原是发生在细胞膜及其胞质内。虽然近几年对微生物还原亚硒酸钠才生单质硒的研究越来越热,但是对于细胞还原产生红色单质硒的机理并没有搞清楚,不同的细菌,由于所含酶类及参与氧化还原反应物质的不同,可能存在不同的还原机理,目前存在着几种假设:(1)亚硒酸钠和细胞内的硫醇类化合物(还原型谷胱甘肽)进行反应生成红色的单质硒<sup>[16]</sup>。(2)亚硒酸钠和细胞产生的无机物质(硫化物)进行反应生成红色的单质硒<sup>[17]</sup>。(3)亚硒酸钠和亚硒酸还原酶.亚硝酸还原酶进行酶学反应生成红色的单质硒<sup>[18]</sup>。通过以上实验,本研究中的假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila* MBR)对亚硒酸的还原大致是通过以下过程进行:首先亚硒酸钠通过特殊的通道进入菌体内部<sup>[19]</sup>,然后菌体内部的亚硒酸钠通过两种不同的途径被还原,一是与细胞质中的谷胱甘肽进行反应生成单质的硒;二是经细胞膜及其胞质内的硝酸盐还原酶或者亚硝酸盐还原酶催化后生成单质的硒,最后生成的单质硒通过特殊的通路被菌体转运到胞外。

## 3 结论

本研究中的假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila* MBR)能在好氧情况下利用有机碳源,把培养基所含有的亚硒酸钠还原成红色的单质硒,当柠檬酸钠

浓度为10 g/L时,在5 d时间内能把2 mmol/L的亚硒酸钠全部还原成单质硒。虽然亚硒酸钠对所有微生物都具有毒性作用,该菌株也不例外,但是该菌株的MIC居然高达50 mmol/L,远远高于其他的一些菌株。该菌株耐碱性比较强,适合在碱性条件下生长与亚硒酸钠的还原,其中当pH为9时,菌株对亚硒酸钠的还原率为最高。菌体对亚硒酸盐的还原是发生在细胞的内部,硝酸盐和还原型谷胱甘肽(G-SH)都对还原有明显的促进作用。该假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila* MBR)对亚硒酸钠的高耐受性,高还原率,宽pH范围,非常适合被当作生产菌株用于还原亚硒酸钠生产红色单质硒,应用于医药等各类行业。

## 参考文献

- [1] Watts CA, Ridley H, Condie KL, Leaver JT, Richardson DJ, Butler CS. 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. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 228: 273-279.
- [2] 高学云,张劲松,张立德. 纳米红色元素硒的急性毒性和生物利用度. 卫生研究 (*Journal of Hygiene Research*), 2000, 1(29): 57-58.
- [3] 李瑞萍,鲁安怀,郝瑞霞,马黠静,吕明,鲁志强. 芽孢杆菌HBS4还原亚硒酸钠为单质硒的实验研究. 岩石矿物学杂志 (*Acta Petrologica Et Mineralogica*), 2005, 24(7): 598-601.
- [4] 王东亮,肖敏,钱卫,韩波. 还原亚硒酸盐产生红色单质硒光合细菌菌株的筛选与鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(1): 44-47.
- [5] 王明义,梁小兵,朱建明,郑娅萍,魏中青,赵由之. 2株具有亚硒酸盐还原能力细菌的筛选和鉴定. 环境与健康杂志 (*Journal of Environment and Health*), 2006, 23(1): 31-32.
- [6] 刘佳,李大平,刘强,陶勇,何晓红,王晓梅,高平. 一株好氧DNRA细菌的分离鉴定及其诱导的生物矿化. 四川大学学报 (*Journal of Sichuan University*), 2008, 45(1): 651-654.
- [7] 朱参胜,马长安,刘惠兰,孙巧珍,邓建霞. 二氨基萘分光光度法测定盐硒. 中国地方病学杂志 (*Chinese Journal of Endemiology*), 1999, 18(6): 480-483.
- [8] 国家环保局制《水和废水检测分析方法》委员会. 水和废水检测分析方法. 第三版. 北京:中国环境科学出版社,1998.
- [9] Simona DG, Silvia Lampis, Giovanni Vallini. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root System of *Astragalus bisulcatus* biotechnological perspective. *Environment International*,

- 2005,31:233-241.
- [10] Garbisu C, Carlson D, Adamkiewicz M, Yee BC, Wong JH, Resto E, Leighton T, Buchanan BB. Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress. *Biofactor*, 1999, 10:311-319.
- [11] Schmidt MG, Konetzka WA. Glutathione overproduction by selenite-resistant *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1986, 32:825-827.
- [12] Kinkle BK, Sadowsky MJ, Johnstone K, Koskinen WC. Tellurium and selenium resistance in rhizobia and its potential use for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60:1674-1677.
- [13] William JH, LD Kuykendall. An *Azospira oryzae* (syn *Dechlorosoma suillum*) Strain That Reduces Selenate and Selenite to Elemental Red Selenium. *Current Microbiology*, 2007, 54:376-381.
- [14] Paolo Antonioli, Silvia Lampis, Irene Chesini, Giovanni Vallini, Sara Rinalducci, Lello Zolla. *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02, a New Bacterial Strain Suitable for Bioremediation of Selenite-Contaminated Environmental Matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 6854-6863.
- [15] Kessi J. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in The purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter eapsulatus*. *Microbiolog*, 2006, 152:731-743.
- [16] William JH, Daniel KM. Reduction of Selenite to Elemental Red Selenium by *Pseudomonas sp.* Strain CA5. *Current Microbiology*, 2009 58:493-498.
- [17] Douglas CN, William HC, Jennette DS, EE Mack, Azeem Ahmad. Selenium uptake by sulfur - accumulating bacteria. *Geo chimica et Cosmochimica Acta*, 1996, 60 (18):3531-3539.
- [18] Janine Kessi, Kurt WH. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli* Biol. *The Journal of Biological Chamistry*, 2004, 279: 50662-50669.
- [19] Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *BioMetals*, 1998, 11:223-227.

## Reduction of selenite to elemental red selenium under aerobic condition by *Pseudomonas alcaliphila* MBR

Huadong Jiang<sup>1,2</sup>, Xiaohong He<sup>2</sup>, Lixia Zhang<sup>2</sup>, Yong Tao<sup>2</sup>, Xiaomei Wang<sup>2</sup>, Ping Gao<sup>1</sup>, Daping Li<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(<sup>2</sup>Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We studied the reduction of soluble and highly toxic selenite to elemental red selenium, under aerobic condition by *Pseudomonas alcaliphila* MBR, with organic carbon as electron donor. [ **Results** ] The strain could grow under pH 6-11 and resist to high concentration of selenite with the minimal inhibitory concentration of 50 mmol/L. After 5 days, the strain used sodium citrate as electron donor, and reduced 2.0 mmol/L selenite to elemental red selenium from the culture fluid, the elemental red selenium was stored outside the cells. The glutathione and nitrate could increase the number of reduction rate. [ **Conclusion** ] This study implies the application of *Pseudomonas alcaliphila* MBR to convert selenite to elemental red selenium.

**Keywords:** *Pseudomonas alcaliphila* MBR; selenite reduction; elemental selenium; glutathione

( 本文责编: 张晓丽 )