

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

王东亮, 肖 敏*, 钱 卫, 韩 波

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

摘 要: 从实验室保藏的光合细菌中筛选出一株对亚硒酸钠还原效率较高的菌株 S3, 其亚硒酸钠还原产物通过透射电子显微镜及 EDX(Electron-Dispersive X-ray)分析确定为红色单质硒。菌株 S3 的形态学特征、生理生化特征及光合色素扫描结果与固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*)的特征基本一致; 16S rDNA 序列(GenBank 登录号为 DQ402051)在系统发育树中与固氮红细菌同属一个类群, 序列同源性为 99%。根据上述结果将菌株 S3 鉴定为固氮红细菌。初步研究了该菌株还原亚硒酸盐的特性, 首次报道固氮红细菌具有还原亚硒酸盐产生红色单质硒的能力, 为今后利用微生物方法治理环境中硒污染、利用微生物方法获得活性红色单质硒以及对微生物还原亚硒酸盐产生红色单质硒的机理研究奠定了良好的基础。

关键词: 光合细菌; 红色单质硒; 16S rDNA; 系统发育树; 固氮红细菌

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2007)01-0044-04

硒位于第六主族, 是一种生命必需的微量元素, 但高浓度的硒毒性较强且会造成环境污染。自然界中的硒主要以 4 种价态存在: 还原态的硒化物[$\text{Se}^{2-}(-2)$]、零价的单质硒[$\text{Se}^0(0)$]和氧化态的亚硒酸盐[$\text{SeO}_3^{2-}(+4)$]及硒酸盐[$\text{SeO}_4^{2-}(+6)$]。其中, 亚硒酸盐易溶于水, 较其它形式具有更强的毒性。某些微生物如光合细菌对亚硒酸盐具有极强的耐受性, 能将溶液中的亚硒酸盐还原^[1,2], 产生的红色单质硒溶解度较小且毒性降低, 可用于某些硒环境污染的生物治理。近年来的研究发现, 当粒径在 5 ~ 200nm 时, 这种红色单质硒在生物补硒方面可能有很高的应用价值。此外, 微生物还原亚硒酸盐产生红色单质硒的机制也是近年来研究的热点问题。

本研究从实验室保藏光合细菌中筛选出了 1 株对亚硒酸钠有较强耐受性和还原能力的菌株, 证实具有产生红色单质硒的能力。通过形态学和生理生化特征、光合色素种类及 16S rDNA 的系统发育分析进行了菌种鉴定, 并对其还原亚硒酸盐的情况进行了初步研究, 为今后光合细菌还原亚硒酸钠产生红色单质硒的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(Biospin)、DNA Marker 和 PCR 扩增试剂盒

(TaKaRa); 16S rDNA 细菌通用引物(上海生工生物工程股份有限公司合成); WFXUV-2000 型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); Helios 紫外可见分光光度计(美国); TECNAI 型透射电子显微镜(荷兰)。

1.1.2 培养基: RCVBN 培养基按文献[3]配制, 加入 0.8% 琼脂即为 RCVBN 半固体培养基。

1.2 培养液中菌体数量的测定

利用血球计数板计数测培养液中的菌体数量。

1.3 亚硒酸钠含量的测定

参照文献[4]方法测定培养液亚硒酸钠含量。

1.4 透射电子显微镜及 EDX(Electron-Dispersive X-ray)分析样品制备

光合细菌菌株 S3, 以 10% ~ 20% 的接种量接入一定亚硒酸钠浓度的 RCVBN 培养基, 30℃ 光照培养 5 ~ 10d, 发酵液 10000r/min 离心 10min 收集菌体, 所得菌体再用无菌生理盐水洗涤两次, 用毛细管吸取菌悬液滴在铜网上, 室温干燥后进行透射电子显微镜观察, 并对其中的红色单质硒颗粒进行 EDX 分析, 检测其组成成分。

1.5 菌种鉴定

1.5.1 菌体形态和生理生化特征研究: 参照文献[5,6]中相应属、种鉴定的有关内容选择生理生化实验性状。主要进行了粘液产生、3% NaCl 中生长、硫酸盐同化、硝酸盐同化及唯一碳源实验。

1.5.2 细胞吸光光谱测定^[7] 培养菌液经离心洗涤

* 通讯作者。Tel : 86-531-88365128 ; Fax : 86-531-88565610 ; E-mail : minxiao@sdu.edu.cn

作者简介: 王东亮(1982 -) 男, 山东济南人, 硕士研究生, 主要从事微生物转硒的研究。E-mail : wangdongliang@mail.sdu.edu.cn

收稿日期: 2006-05-22; 接受日期: 2006-06-14; 修回日期: 2006-07-06

后,悬浮于60%的蔗糖溶液中,在190~900nm波长连续扫描,记录特征吸收峰处波长。

1.5.3 菌株 16S rDNA 序列测定:菌体 DNA 的提取按 Biospin 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明进行;以 16S rDNA 通用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAS-3') 和 1525r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') PCR 扩增获得菌株 16S rDNA。PCR 反应条件:95℃ 5min;94℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 3min,30 个循环,72℃ 10min。扩增产物纯化后由上海英骏生物技术有限公司完成测序。

1.5.4 系统发育分析:将 S3 菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行 Blast 比对,选出相似性大于 96% 的部分序列和一株荚膜红假单胞菌 (*Rhodobacter capsulatus*) 的序列共 17 个 16S rDNA 序列,首先用 ClustalX 进行多序列联配,再利用 Philix (3.65) 构建系统发育树,产生的数据套数选 1000。

2 结果

2.1 亚硒酸钠还原菌株的筛选

活化的光合细菌,以 10%~20% 的接种量接入不同亚硒酸钠浓度的 RCVBN 培养基中,30℃ 光照培养 5~10d,通过对不同光合细菌菌体浓度及还原亚硒酸钠效率的比较(结果未显示),从 20 株光合细菌中筛选出 1 株对亚硒酸钠还原量较高的菌株,编号 S3。研究表明,其在 12.5mmol/L 亚硒酸钠浓度下,细菌数仍能达到 2.2×10^8 个细胞/mL,此时亚硒酸钠的还原量为 6.86mmol/L,还原效率 54.9%。

2.2 菌体产生红色单质硒的确定

透射电子显微镜观察,菌体表面及周质空间中存在高电子密度的颗粒(图 1),粒径 5~200nm,EDX 分析显示,这些颗粒只在 1.37keV (peak SeL α)

11.22keV (peak SeK α) 和 12.49keV (peak SeK β) 出现元素硒的特异吸收峰(图 2),表明颗粒的主要成分为元素硒,与文献报道一致^[8],确定其为红色单质硒。

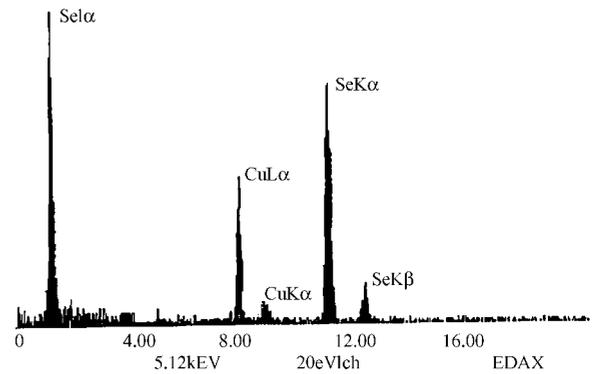


图 2 菌株 S3 形成的高电子密度颗粒的 EDX 分析

Fig. 2 EDX analysis of electron-dense particles formed by strain S3. Energy levels (in kiloelectron volts) are indicated on the x axis. The emission lines for selenium are at 1.37 keV (peak SeL α), 11.22 keV (peak SeK α), and 12.49 keV (peak SeK β).

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌株形态观察和生理生化特性:菌株 S3 革兰氏染色阴性,细胞杆状,菌体大小 0.6 μ m~1.0 μ m \times 1.0 μ m~3.0 μ m。在光照厌氧和黑暗好氧条件下均可生长,光照下培养物为红色。适宜生长温度为 25℃~32℃,pH 为 6.5~7.5。生理生化特征实验结果如表 1 所示。

表 1 菌株 S3 的生理生化特征

Table 1 Physiological features of strain S3

Characteristic	Results	Characteristic	Results
Slime formation	+	Nitrate assimilated	+
NaCl requirement	+	Utilization of:	
Sulfate assimilated	+	Tartrate	-
Final oxidation Product of sulfide	S ^o	Mannitol	+
Growth factors	b, n, t	Dulcitol	+

b: Biotin; n: Nicotinamide; t: Thiamin.

2.3.2 活细胞吸收光谱测定:菌株活细胞的特征吸收峰为 375nm, 487nm, 512nm, 590nm, 802nm, 861nm, 884nm, 叶绿素 a 在 375nm, 590nm, 802nm, 861nm, 884nm 处有特征吸收峰,类胡萝卜素在 450~530nm 处有特征吸收峰,因此菌株 S3 含有叶绿素 a 和类胡萝卜素。

2.3.3 16S rDNA 序列分析:菌株 S3 的 16S rDNA 序列长度为 1459bp,与红细菌属已知菌株 16S rDNA 片段大小相符。在 GenBank 中的登录号为 DQ402051,在系统发育树上与序列号为 D70846、D70847 的固氮红细菌菌株 16S rDNA 序列为一簇,同源性 99%;与序列号为 AF46882 和 D16424 的 AB196354 和 AB196355 的

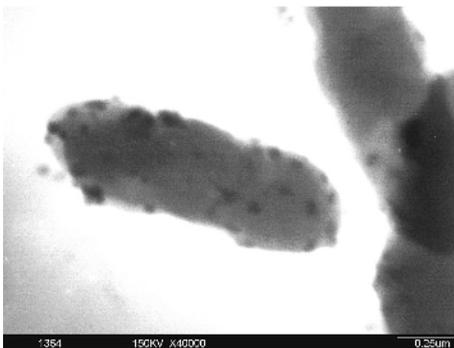


图 1 加硒培养后 S3 菌体的透射电镜照片 (40000 \times)

Fig.1 Transmission electron micrograph of strain S3 cell grown in the presence of selenite showing the electron-dense particles formed by strain S3 (40000 \times).

D16425 球形红细菌菌株 16S rDNA 序列的同源性为 98% (图 3)。

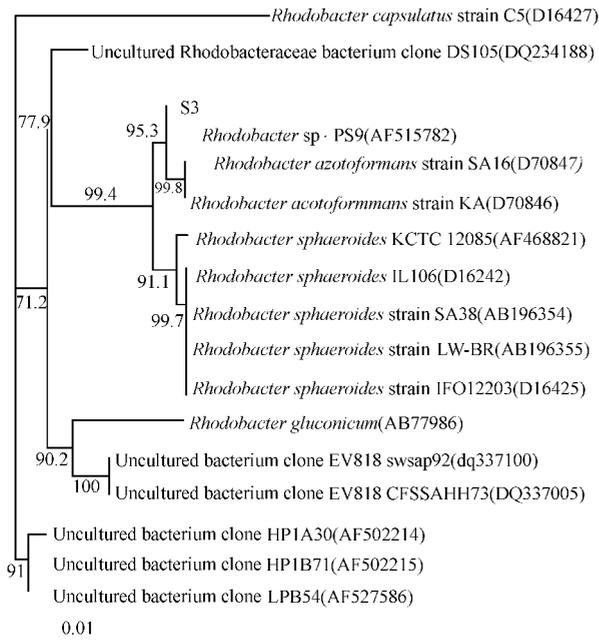


图 3 以 16S rDNA 同源性为基础的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 1459bp-fragment of 16S rDNA sequences of strain S3. The numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap, and in parentheses after each bacterial name 16S rDNA accession number in GenBank are showed. Bar, 1% sequence divergence.

2.4 菌株 S3 对亚硒酸钠还原特性的初步研究

2.4.1 亚硒酸钠还原与 S3 生长状况的关系

活化的 S3 菌株培养液按 10% 的接种量接种于含亚硒酸钠 (1.25mmol/L) 的 RCVBN 培养基中, 在 30℃ 光照条件下培养, 定时取样测定菌体的生长情况和培养基中亚硒酸钠的浓度。图 4 表明, 菌株 S3 细胞的生长和对亚硒酸钠的还原是同步的。此浓度的亚硒酸钠

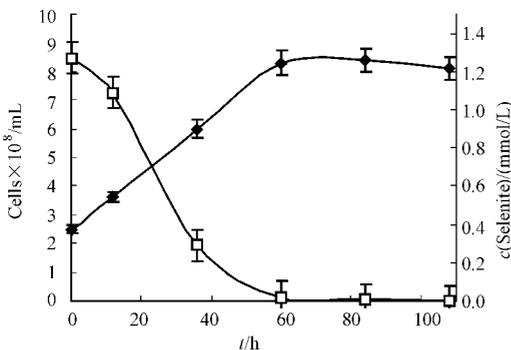


图 4 菌株 S3 对亚硒酸钠的还原情况

Fig. 4 The course of growth and selenite reduction by strain S3. Symbols: ◆, cell concentration; □, selenite concentration. Cells grown in the presence of 1.25mmol/L selenite, selenite was added at zero time. Each curve shows means based on the results of two or three experiments.

对菌株 S3 生长并无明显的延滞作用, 到 60h 基本达到最大生长量, 此时亚硒酸钠的还原达 99% 以上。

2.4.2 耐受亚硒酸盐浓度试验

菌株 S3 在普通培养基中培养至对数后期, 以 10% 的接种量接种至 RCVBN 培养基中, 分别添加不同浓度亚硒酸钠为硒源, 30℃ 光照培养 96h 取样测定菌株生长和对亚硒酸钠的还原情况。结果表明, 当亚硒酸钠浓度低于 1.5mmol/L 时, 菌株 S3 能完全还原亚硒酸钠, 而随着亚硒酸钠浓度的提高, 细胞的生长和亚硒酸钠还原效率均呈下降趋势。菌株对亚硒酸钠的耐受浓度最高达 125mmol/L, 而当亚硒酸钠浓度高于 125mmol/L 时, S3 基本不能生长, 对亚硒酸钠的还原也停止。

3 讨论

本研究筛选出了一株对亚硒酸钠具有高耐受性且能将亚硒酸钠还原为红色单质硒的光合细菌 S3。菌种鉴定表明, 菌株 S3 具有固氮红细菌所特有的表型特征。又据 16S rDNA 序列同源分析可见菌株 S3 与 GenBank 登录号为 D70846、D70847 的固氮红细菌菌株为一族, 最终将菌株 S3 鉴定为固氮红细菌。

亚硒酸钠是环境特别是水环境中硒污染的主要形式, 近年来发现, 许多微生物都能将亚硒酸钠还原为红色单质硒。目前已报道的亚硒酸盐还原菌主要有大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[9]、罗尔斯通氏菌 CH34 (*Ralstonia metallidurans* CH34)^[10]、深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)^[2]、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)^[2]、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)^[11]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[11] 等。但是国内外尚无固氮红细菌还原亚硒酸钠产生红色单质硒的报道。另外, 目前已报道的亚硒酸盐还原菌对亚硒酸钠的耐受浓度不高, 如罗尔斯通氏菌 CH34 可耐受亚硒酸钠的浓度为 6mmol/L^[9], 大肠杆菌耐受亚硒酸钠的浓度最高为 20mmol/L^[10]。而本研究得到的菌株 S3 对亚硒酸钠的耐受浓度最高可达 125mmol/L, 当亚硒酸钠初始浓度 < 12.5mmol/L 时, S3 的最大生长量可达到 > 10⁸ 个细胞/mL, 远远高于其它已报道的菌种, 为今后环境中亚硒酸盐污染的治理提供了良好的菌株材料。

亚硒酸钠是一种生物活性高的廉价硒源添加剂, 但是其营养需求量和中毒量之间差距很小, 很容易引起中毒现象。实验证实, 生物方法获得的粒径在 5~200nm 的红色单质硒与亚硒酸钠具有相同的生物活性^[12,13], 而毒性仅为亚硒酸盐的 1/7^[14,15], 被称之为活性红色单质硒。透射电子显微镜观察显示

本研究中菌株 S3 产生的红色单质硒粒径大小在 5~200nm 的范围内,可能具有很好的生物活性。众所周知,光合细菌本身具有较高的营养价值,不仅能为水产、畜禽和农作物提供营养,而且能增强植物的抗病能力,因此,如果利用光合细菌获得光合细菌活性红色单质硒作为硒源添加剂生产富硒食物,可以结合光合细菌和活性红色单质硒两方面的优势,对富硒食物的生产具有极高的应用潜力和价值。

关于微生物还原亚硒酸盐产生红色单质硒的机制,目前存在多种假说。光合细菌中,深红螺菌^[1,2]和荚膜红细菌^[2]还原亚硒酸盐产生红色单质硒的机制都已被研究。亚硒酸钠存在的条件下,深红螺菌对亚硒酸盐的还原是在生长进入稳定期后进行的^[1,2],而菌株 S3 同荚膜红细菌^[2]对亚硒酸钠的还原是与生长是同步进行的,两者可能存在不同的亚硒酸盐还原途径。研究 S3 还原亚硒酸盐产生红色单质硒的机制,对微生物还原亚硒酸盐产生红色单质硒机制的研究具有重要的意义。

参 考 文 献

[1] Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, et al. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(11): 4734 - 4740.

[2] Kessi J. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*, 2006, **152**: 731 - 743.

[3] 焦瑞声,周德庆. 微生物生理代谢实验技术. 北京:科学出版社,1990,77.

[4] 贺立东. 分光光度法测定富硒酵母中有机硒的含量. *食品工业科技*, 2000, (21): 67 - 68.

[5] Hot GJ, Krieg RN, Sneath HAP, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

[6] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.

[7] 方立超,黄雪峰,杜珍辉,等. 产生辅酶 Q₁₀ 的光合细菌菌株的分离及鉴定. *微生物学报*, 2005, (45): 772 - 775.

[8] Gregorio SD, Lampis S, Vallini G, et al. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus* a biotechnological perspective. *Environ Int*, 2005, **31**: 233 - 241.

[9] Roux M, Sarret G, Pignot-Paintrand I, et al. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(2): 769 - 773.

[10] Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *BioMetals*, 1998, **11**: 223 - 227.

[11] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, et al. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chem Geol*, 1996, **132**: 199 - 204.

[12] 黄 峙,郑文杰,李乐农,等. 纳米元素硒的生物合成及生物活性. *中国生物工程杂志*, 2003, (23): 76 - 79.

[13] Zhang JS, Wang HL, Bao YP, et al. Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of seleno-enzymes in both cultured cells and mice. *Life Sci*, 2004, **75**: 237 - 244.

[14] 高学云,张劲松,张立德,等. 纳米红色元素硒的急性毒性和生物利用度. *卫生研究*, 2000, (29): 57 - 58.

[15] Zhang JS, Wang HL, Yan XX, et al. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sci*, 2005, **76**: 1099 - 1109.

Screening and identification of a photosynthetic bacterium reducing selenite to red elemental selenium

WANG Dong-liang, XIAO Min*, QIAN Wei, HAN Bo
(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract Selenium is essential element for humans and animals but is very toxic at higher concentrations. In four inorganic states of selenate [SeO_4^{2-} (VI)], selenite [SeO_3^{2-} (IV)], elemental selenium [Se^0 (0)] and selenide [Se^{2-} (- II)], selenite is well known to be more soluble and higher toxic than other three forms. Many microorganisms have the capacity to reduce selenite to red elemental selenium, which provide the potential to cope with the detoxification of pollution and to use the biological availability of red elemental selenium. Strain S3 that was more resistant to sodium selenite was selected from 20 photosynthetic bacteria preserved in laboratory. The red granule produced by S3 was identified as elemental selenium (Se^0) by transmission electron microscopy and Electron-Dispersive X-ray (EDX) analysis. The granule diameter of the red elemental selenium was 5nm ~ 200nm, similar as the Nano-Se that has bioavailability. Morphology, physiology and photosynthetic pigments analysis results showed that strain S3 was essentially consistent with *Rhodobacter azotoformans*. The 16S rDNA sequence analysis (GenBank accession number DQ402051) suggested that strain S3 was clustered together with *R. azotoformans* in phylogenetic tree, with the sequence identity of 99%. Based on all the results of taxonomy, strain S3 was identified as *R. azotoformans* S3. The effects of selenite on growth kinetics and the ability to resistant selenite of strain S3 were investigated. In contrast to *Rhodospirillum rubrum* which was reported not to reduce selenite until the end of exponential growth, strain S3 transformed selenite (1.25mmol/L) at the beginning of the growth, suggesting that strain S3 and *Rs. rubrum* may employ different strategies to reduce selenite. Strain S3 can grow in the presence of up to 125mmol/L sodium selenite, which is much higher than those which could be resisted to by other bacteria such as *Escherichia coli* (< 20mmol/L) and *Ralstonia metallidurans* CH34 (< 6mmol/L). It is firstly reported that *R. azotoformans* has the capacity to reduce selenite to red elemental selenium.

Keywords: Phototrophic microorganisms; Red elemental selenium; 16S rDNA; Phylogenetic tree; *Rhodobacter azotoformans*

* Corresponding author. Tel 86-531-88365128; Fax 86-531-88565610; E-mail minxiao@sdu.edu.cn

Received: 22 May 2006/ Accepted: 14 June 2006/ Revised 6 July 2006