

# 细菌还原氧化态硒产生红色单质硒的研究进展

王东亮, 肖 敏\*, 钱 卫, 张秀格

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

**摘 要** 硒是一种生命必需的微量元素,但高浓度时毒性较强且会造成环境污染。许多细菌可以将亚硒酸盐( $\text{SeO}_3^{2-}$ )或硒酸盐( $\text{SeO}_4^{2-}$ )等毒性较高的氧化态硒还原为毒性较小的红色单质硒( $\text{Se}^0$ ),形成硒-蛋白复合物,它们对于获得最佳补硒方式和治理硒环境污染具有应用潜力。近年来,关于这一生物还原过程,人们进行了大量的研究,包括碳源、氧气、元素硫、谷胱甘肽以及一些氧化还原酶和膜转运蛋白等在内的多种物质都被发现可能影响或参与了细菌对硒的代谢。综述了细菌进行生物还原氧化态硒的影响因素及不同细菌产生红色单质硒机理的研究进展。

**关键词** : 硒酸盐, 亚硒酸盐, 红色单质硒, 细菌还原

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)03-0554-04

硒是一种生命必需的微量元素,但高浓度的硒毒性较强容易造成环境污染。氧化态的硒包括亚硒酸盐( $\text{SeO}_3^{2-}$  (+4))和硒酸盐( $\text{SeO}_4^{2-}$  (+6)),是环境中硒污染的主要物质。许多细菌都能将氧化态的硒还原为零价的红色单质硒( $\text{Se}^0$  (0)),生成的红色硒颗粒不溶于水,毒性较小<sup>[1]</sup>。并且,近年来的研究发现,当粒径小于 200nm 时,这些红色单质硒可能具有重要的生物学意义<sup>[2]</sup>。因此,关于细菌还原氧化态硒产生红色单质硒的研究逐渐成为人们的研究热点。

## 1 细菌产生红色单质硒的发现

自然界中,单质硒主要存在于火山岩、沉积岩和一些化石燃料中,包括几种同素异形体:红色单质硒、灰色单质硒、黑色单质硒以及无定形单质硒,其中,常温下最稳定的形式是黑色单质硒。通常,水溶液中溶解的氧化态硒被还原时,就会以红色单质硒的形式沉淀出来,当温度高于 30℃ 时,红色单质硒会逐渐转变成黑色,并最终变为稳定的黑色单质硒<sup>[3-5]</sup>。

1981 年, Sarathchandra 等在研究巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) 硒生物转化时报道了一种红色物质的生成现象<sup>[6]</sup>。其后,大肠杆菌(*Escherichia coli*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酒色着色菌(*Chromatium vinosum*)、脱硫杆菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)、深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)等多种细菌也被报道具有将硒酸盐或亚硒酸盐转化为这种红色物质的能力<sup>[7-12]</sup>。另外,在进行酵母、真菌、藻类及植物对硒的生物富集转化研究中同样发现了这种红色物质的生成现象。

这些红色物质生成后,通常附着于细菌细胞的表面或存

在于细胞质、周质空间内,光学显微镜下即可看到一些附着于细胞表面的微小颗粒。透射电子显微镜观察,其为一些高电子密度的颗粒,分布于细胞表面、周质空间及细胞质中,大小从十几到几百纳米不等。X 射线检测分析( Electron-Dispersive X-ray, EDX )及蛋白含量测定显示,这些颗粒的主要成分为元素硒及少量蛋白质<sup>[7]</sup>,可能是一种以蛋白质为核、红色单质硒为膜的硒-蛋白复合物<sup>[2]</sup>,人们称之为红色单质硒或红色元素硒( Red elemental selenium )。研究表明,生物方式获得的这种红色单质硒毒性小,对热稳定,通常不转化为灰色或黑色单质硒,被认为是硒生物解毒的方式,在生物活性方面也可能具有较高的研究应用价值。

## 2 细菌产生红色单质硒的影响因素

### 2.1 碳源对硒生物还原的影响

1996 年 Carlos 等在研究荧光假单胞菌和枯草芽孢杆菌还原亚硒酸盐为红色单质硒时,分别以柠檬酸盐、谷氨酸盐、果糖和葡萄糖作为唯一碳源,发现硒的还原生成效果因碳源不同而各异,其中,以葡萄糖为唯一碳源时,两株细菌对亚硒酸盐的还原效果最为明显<sup>[13]</sup>。金强等在亚硒酸盐的生物转化研究中也报道,添加葡萄糖可以促进亚硒酸盐的转化<sup>[14]</sup>。另外, Zhang 等利用酵母膏为泰勒肠杆菌(*Enterobacter taylorae*)提供碳源,发现随着酵母膏加量的升高,亚硒酸盐的还原量和还原效率也会相应升高<sup>[15]</sup>。

### 2.2 氧气对硒生物还原的影响

亚硒酸盐和硒酸盐的细菌还原是一个氧化还原的过程,因此,环境中氧气的含量对红色单质硒的生物还原具有一定的影响。据报道,好氧菌对亚硒酸根的转化效率要高于厌氧菌<sup>[14]</sup>,而对于厌氧或兼性厌氧的光合细菌如深红螺菌和球

\* 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 2006-11-20 接受日期 2006-12-18 修回日期 2007-02-11

形红细菌 ,其在厌氧条件下的亚硒酸盐转化率要高于好氧条件。如球形红细菌在 0.5mmol/L  $\text{SeO}_3^{2-}$  存在的情况下 ,其在好氧条件下对亚硒酸盐的生物转化率为 25% ,而在厌氧条件下亚硒酸盐几乎全部被转化。研究发现 ,在好氧条件下 ,球形红细菌中 SOD 酶、硫氧还蛋白和含巯基蛋白的量会因为硒酸盐或亚硒酸盐的存在而迅速增加 ,但是在厌氧条件下这些酶或蛋白的含量会维持在较低的水平。据此推断 ,球形红细菌在厌氧条件下可能存在着与好氧条件不同的红色单质硒的生物产生机理<sup>[13,16]</sup>。

3 细菌产生红色单质硒机理的研究进展

关于细菌还原氧化态硒产生红色单质硒的机理 ,存在多种假说。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 ,可能存在不同的硒还原机理。

3.1 硒的转运

细菌产生红色单质硒大都是在菌体细胞内进行的 ,因此 ,细胞膜对硒酸盐和亚硒酸盐的通透性直接影响细胞中红色单质硒的产生。

在大肠杆菌中 ,硒酸盐同亚硒酸盐都可以通过硫酸盐通透酶系统( *cysT* , *cysW* , *cysA* )进入细胞<sup>[8]</sup> ,而亚硒酸盐还存在另外一条进入细胞的途径<sup>[5]</sup>。2000 年 ,Guzzo 和 Dubow 等发现 ,在大肠杆菌中 ,亚硒酸盐可能是通过一种分子量为 43kDa 的多肽转运进入细胞的 ,二级结构分析表明 ,此多肽包括 12 个可预测的跨膜区和一个糖转运蛋白的目的标签<sup>[8]</sup>。另外 ,Bebien 等通过对球形红细菌的 *smoK* 基因进行突变研究 ,推测在球形红细菌中 ,亚硒酸盐可能先通过细胞膜上的一种 *smoK* 基因编码的 ATP 转运酶导入进入菌体细胞内 ,然后进一步生成红色单质硒<sup>[16]</sup>。

3.2 硫参与的硒-硫颗粒(  $\text{Se}^0-\text{S}^0$  )的产生

自然界中 ,许多细菌都能将氧化态或还原态的硫转化为单质硫。最初 ,人们认为氧化态硒的生物还原机理可能与硫的生物还原机理一致 ,但是 ,在所有编码与硫酸盐还原相关的基因中 ,只有在编码 O-乙酰丝氨酸( 巯基 )裂解酶的 *cysK* 基因突变时 ,菌株才表现出对硒酸盐和亚硒酸盐的抗性。在大肠杆菌中 ,*cysI* 和 *cysJ* 编码的硫酸盐还原酶并没有亚硒酸盐或硒酸盐还原酶的活性<sup>[5]</sup>。因此 ,否定了亚硒酸盐和硒酸盐通过硫还原机制进行生物还原的观点。然而 ,近年来的研究发现 ,许多与硫氧化还原相关的细菌都可以产生零价硒。

酒色着色菌是一类硫蓄积细菌 ,在光照厌氧的条件下 ,能将还原形式的硫(  $\text{S}^{2-}$  )氧化为零价的单质硫 ,以硫颗粒的形式储存在胞内。研究表明 ,当  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{Se}$  同时存在时 ,该菌可以产生一种同时含有单质硫和单质硒的硒-硫颗粒。

根据无机硒和硫在不同氧化还原电位( *Eh* )和 pH 条件下稳定性的比较<sup>[11]</sup> ,环境中硒与硫之间存在下列氧化还原反应：



通过一系列体外试验 ,Neleson 等提出 ,酒色着色菌中 ,硒-硫颗粒的形成可能存在如下反应机制( 图 1-A ) 酒色着色菌首先将环境中的  $\text{S}^{2-}$  氧化 ,产生的零价硫颗粒存在于周质空

间中 ,通过细胞膜与外界溶液隔开 ,同时通过质膜与细胞质分开。外界溶液中的小分子物质如  $\text{H}_2\text{Se}$  等可以通过简单扩散作用进入细胞膜 ,其中的  $\text{Se}^{2-}$  便可与零价的硫颗粒发生氧化还原反应( 反应 1 ) ,生成单质硒储存于周质空间 ,与单质硫形成硒-硫颗粒(  $\text{Se}^0-\text{S}^0$  ) ,而  $\text{S}^{2-}$  则以  $\text{H}_2\text{S}$  的形式扩散出胞外或继续氧化为硫颗粒<sup>[11]</sup>。

细菌硫酸盐还原细菌如脱硫微生物 *Desulfomicrobium norvegicum* 是另一类与硫相关的细菌 ,属专性厌氧菌 ,在无氧的条件下 ,可以硫酸盐作为电子的末端受体 ,使特定的有机物或分子态氢氧化 ,以获得能量 ,硫酸盐最终被还原为  $\text{H}_2\text{S}$  ,而硫化氢可以继续与氧化态的硫反应生成单质硫<sup>[17]</sup>。

研究发现 ,若亚硫酸盐和亚硒酸盐同时存在 ,此菌同样可以产生硒-硫颗粒 ,但当加入过量的  $\text{Fe}^{2+}$  与  $\text{S}^{2-}$  形成  $\text{FeS}$  沉淀 ,此时形成的颗粒中则不含有零价硒。根据反应 3 ,Hockin 和 Gadd 提出 ,在此菌中 ,硒-硫颗粒的形成可能存在如下机制( 图 1-B ) 脱硫微生物 *Desulfomicrobium norvegicum* 通过硫酸盐还原途径首先将硫酸盐还原为负二价的硫化物(  $\text{S}^{2-}$  ) ,并释放到胞外 ,当环境中存在有亚硒酸根离子(  $\text{SeO}_3^{2-}$  )存在时 , $\text{S}^{2-}$  便与  $\text{SeO}_3^{2-}$  反应 ,生成同时含零价硒(  $\text{Se}^0$  )和零价硫(  $\text{S}^0$  )的硒-硫颗粒 ,黏附于细胞表面<sup>[17]</sup>。

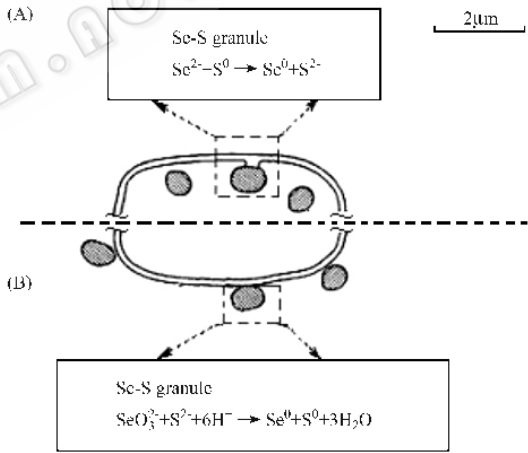
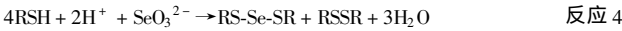


图 1 硒-硫颗粒产生机理的假说

Fig.3 Hypothesis of the selenium-sulfur granule formation mechanism. (A) In *Chromatium vinosum* , the sulfur globules are separated from the bulk solution and cytoplasm by the outer membrane and the cytoplasmic membrane .  $\text{H}_2\text{Se}$  diffusing through the outer membrane gains access to the  $\text{S}^0$  globule to form Se-S globule ; ( B ) In *Desulfomicrobium orvegicum* , sulfate was first reduced to sulfide by sulfate-reducing pathway , and then sulfide reacted with selenite in bulk solution to form Se-S globule .

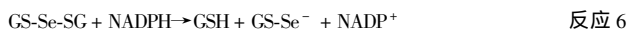
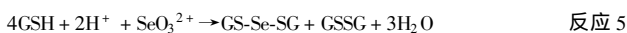
3.3 谷胱甘肽( GSH )参与的红色单质硒的产生

1941 年 ,Painter 发现 ,谷胱甘肽中的巯基同亚硒酸盐有很高的反应活性 ,能够形成 selenotrisulfides (  $\text{RS-Se-SR}$  ) ,如反应 4<sup>[18]</sup>。



细菌中 ,大部分还原性的巯基以谷胱甘肽的形式存在<sup>[5]</sup>。1971 年 ,Ganther 发现谷胱甘肽与亚硒酸盐反应后 ,同样可以生成  $\text{RS-Se-SR}$  ,命名为 selenodiglutathione(  $\text{GS-Se-GS}$  )。作为底物 ,包括谷胱甘肽还原酶、硫氧还蛋白还原

酶、硝酸盐还原酶及硫酸盐还原酶等多种氧化还原酶都可能催化其发生氧化还原反应<sup>[19]</sup>,生成的GS-Se<sup>-</sup>不稳定,会继续与氢离子反应产生较稳定的红色单质硒<sup>[7]</sup>。反应式如下:



其后,在对深红螺菌、球形红细菌和大肠杆菌等细菌转硒的研究中发现,当谷胱甘肽含量降低时,亚硒酸盐的还原速度也会降低,而亚硒酸盐与谷胱甘肽的反应能同时促进谷胱甘肽还原酶的产生,从而进一步证明谷胱甘肽和谷胱甘肽还原酶参与了亚硒酸盐的还原。另外,Kessi等又对谷胱甘肽与亚硒酸盐的体外反应进行了进一步的研究,发现在谷胱甘肽还原亚硒酸盐为单质硒的过程中,会产生超氧根离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>),这也解释了亚硒酸盐生物毒性的成因,如反应8:



综合上述发现,Kessi等对Ganther等提出的谷胱甘肽参与的氧化态硒还原的假设进行了改进:还原型谷胱甘肽(GSH)作为电子供体首先与亚硒酸根(SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)反应(反应8),反应的第一个中间产物GS-Se-SG可以作为谷胱甘肽还原酶或硫氧还蛋白还原酶的底物被还原(反应6),得到GS-Se<sup>-</sup>,再通过歧化反应(反应7),生成GSH和单质硒(Se<sup>0</sup>)。反应中产生的O<sub>2</sub><sup>-</sup>可以被细菌自身的氧化酶降解。NADPH为GSH的再生提供电子<sup>[12]</sup>。

## 4 展望

1985年,Nuttall首次提出胶体状态红色单质硒在特定环境下可能具有生物活性的假设<sup>[20]</sup>。近年来实验证实,生物还原得到的直径小于200nm的红色单质硒在免疫调节<sup>[21]</sup>、抗氧化<sup>[21]</sup>、延缓衰老及抑制肿瘤<sup>[22]</sup>方面都有很好的生物活性,且毒性只有亚硒酸钠的1/7<sup>[21]</sup>,被认为是一种很好的补硒方式。另一方面,生物还原后的红色单质硒通常存在于细胞内或附着在细胞表面<sup>[7]</sup>,易于回收处理,对硒环境污染的治理也有较好的应用前景。此外,细菌的亚硒酸盐和硒酸盐的生物还原代谢途径,在自然界硒的地球生物化学物质循环中应该具有重要的作用。随着新的硒还原细菌的发现和细菌还原产生红色单质硒机理的详细研究,细菌还原产生红色单质硒的应用将会越来越广泛。

## 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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, **31**(29): 57–58.
- [3] Gattow G, Heinrich G. Thermochemistry of selenium. II. Conversions of crystalline selenium modifications. III. Conversion of amorphous selenium modifications. *Z Anorg Allg Chem*, 1964, **331**: 256–288.
- [4] Geering HR, Cary EE, Jones LHP, et al. Solubility and redox criteria for the possible forms of selenium in soils. *Soil Sci Soc Am Proc*, 1968, **32**: 35–40.
- [5] Margaret PR. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 2000, **356**(9225): 233–241.
- [6] Sarathchandra SU, Watkinson JH. Oxidation of elemental selenium to selenite by *Bacillus megaterium*. *Science*, 1981, **211**(4482): 600–601.
- [7] 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.
- [8] Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *BioMetals*, 1998, **11**: 223–227.
- [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] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, et al. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology*, 1996, **132**: 199–204.
- [11] Neleson DC, Casey WH, Sison JD, et al. Selenium uptake by sulfur-accumulating bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1996, **60**(18): 3531–3539.
- [12] Kessi J, Kurt WH. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(49): 50662–50669.
- [13] Ganther HE. Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry*, 1968, **8**: 2898–2905.
- [14] 金强, 徐伯兴, 王毓芳, 等. 亚硒酸根的细菌转化研究. 上海环境科学, 1996, **15**(6): 22–24.
- [15] Zhang Y, Zahir ZA, Frankenberger WT. Factors affecting reduction of selenate to elemental selenium in agricultural drainage water by *Enterobacter taylorae*. *J Agric Food Chem*, 2003, **51**: 7073–7078.
- [16] Bebie M, Chauvin JP, Adriano JM, et al. Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(10): 4440–4447.
- [17] Simon LH, Geoffrey MG. Linked redox precipitation of sulfur and selenium under anaerobic conditions by Sulfate-reducing bacterium biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12): 7063–7072.
- [18] Painter EP. The chemistry and toxicity of selenium compounds with special reference to the selenium problem. *Chemistry*, 1941, **28**: 179–213.
- [19] 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.
- [20] Nuttall KL. Elemental selenium and glutathione reductase. *Med Hypotheses*, 1985, **16**(2): 155–158.
- [21] 张劲松, 高学云, 张立德, 等. 纳米红色元素硒的护肝、抑瘤和免疫调节作用. 营养学报, 2001, **23**(1): 32–35.
- [22] 郑青山, 张劲松, 桂常青, 等. 纳米红色元素硒与葡萄糖醛酸内酯联用对大鼠肝纤维化形成过程的干预及其定量分析. 中国药理学通报, 2002, **18**(1): 99–102.

## Progress in research of the product of the red elemental selenium reduced from selenium oxyanions by bacteria

WANG Dong-liang, XIAO Min<sup>\*</sup>, QIAN Wei, ZHANG Xiu-ge

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, china)

**Abstract** Selenium(Se) is a naturally occurring trace element. It is essential for humans and animals but is very toxic at higher concentrations and will make the selenium pollution. In four inorganic states of selenate[ $\text{SeO}_4^{2-}$ (VI)], selenite[ $\text{SeO}_3^{2-}$ (IV)], elemental selenium[ $\text{Se}^0$ (0)] and selenide[ $\text{Se}^{2-}$ (-II)], selenium oxyanions including selenite and selenate are well known to be more bioavailable but higher toxic than other forms. Many bacteria have the capacity to reduce selenium oxyanions to red elemental ground granule, called red elemental selenium, which is likely to be Se-protein compound. It has lower toxicity comparing with selenite, but when the size is at 5 ~ 200 nm, its bioavailability to selenite was similar in terms of inducing seleno-enzymes in cultured cells and in Se-deficient rats. This provides the potential to gain the best manner to supply selenium for organisms and solve the pollution of selenium. So far, series of researches have been made to study this bacterial reduced process. Many substances such as carbon source, oxygen, elemental sulfur, glutathione, some oxidoreductases and transfer protein in membrane were found to affect or participate this biological dissimilatory reduction. This review presents the discovery of the biomorphic red elemental selenium, factors affecting the bacterial reduction of the selenium oxyanions, and the possible pathways to form red elemental selenium in bacteria.

**Keywords** : Selenate ; Selenite ; Red elemental selenium ; Bacterial reduction

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel 86-531-88365128 ; Fax 86-531-88565610 ; E-mail minxiao@sdu.edu.cn