

王 健,袁志辉,聂 旭,等. 1 株亚硒酸钠还原菌的分离及初步研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):370-372.

1 株亚硒酸钠还原菌的分离及初步研究

王 健¹,袁志辉^{1,2},聂 旭¹,杨 帆¹,杨 勇¹,杨文蛟¹,吴永尧¹

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院,湖南长沙 410128; 2. 湖南科技学院生命科学与化学工程系,湖南永州 425100)

摘要:从湖北恩施渔塘坝高硒土壤中分离筛选出 1 株能够还原 Na_2SeO_3 的细菌 EGS12,16S rDNA 测序鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌。开展 Na_2SeO_3 对细菌菌株生长影响的试验研究,结果表明,该菌株在 2 mmol/L Na_2SeO_3 的 LB 培养基中 37 ℃ 摇床培养 87 h,对 Na_2SeO_3 的还原率为 97.31%。

关键词:亚硒酸钠;亚硒酸盐;还原;寡养单胞菌

中图分类号: Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0370-03

硒是一种生命必需微量元素,但高浓度的硒毒性较强,容易造成环境污染。湖北恩施渔塘坝是中国典型高硒地区之一,也是世界上发生过人群硒中毒的暴发性流行病区。在硒 4 种价态中(分别为 -2、0、+4、+6),亚硒酸盐的毒性最大,是污染环境的主要物质之一^[1-2]。亚硒酸盐还原菌可以将亚硒酸盐还原为红色的单质硒,可用于某些硒环境污染的生物治理,其产物单质硒在生物补硒方面也有应用价值。另外,单质纳米硒有很活跃的光学电子特性,是未来“纳米技术”的良好研究材料^[3]。嗜麦芽寡养单胞菌是一种在自然界广泛分布的非发酵型革兰氏阴性杆菌,是人类一种重要条件致病菌^[4],学者们大多集中在医学如耐药性、致病机制等方面开展研究,尚未有寡养单胞菌具有还原 Na_2SeO_3 能力的研究报道。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器和试剂

16S rDNA 细菌通用引物 27-F:5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG -3',1392-R:5'-ACG GGC GGT GTG TRC -3',由北京六合华大基因股份有限公司合成;单质硒粉,纯度

为 99.9%;亚硒酸钠(Na_2SeO_3)及其他化学试剂,均为分析纯;TU-1810 紫外可见分光光度计,由北京普析通用有限公司生产。

1.2 土样采集及处理

1.2.1 样品采集 土样 2013 年 9 月采自湖北省恩施市新塘乡渔塘坝,以东经 109°46'19"~109°47'24"、北纬 30°10'24"~30°11'02"的硒矿洞为起点,向北每间隔 500 m 采集 1 个土样,深度为 5~25 cm。记录上层植被情况,多点采样混合。

1.2.2 样品处理及保存 压碎,去除石块、植物、根茎、落叶等,混匀,装入聚乙烯自封袋中,于冰盒中运输及保存。

1.3 培养条件及分离方法

1.3.1 筛选分离培养基 富集和生长培养基(g/L): NH_4Cl 0.03、 NaCl 0.01、 MgSO_4 0.01、酵母提取物 0.15、胰蛋白胨 0.5、琼脂 15,pH 值为 7.5,高压灭菌后加入过滤除菌的 Na_2SeO_3 0.2 mmol/L;矿物盐培养基(g/L): MgCl_2 0.5、 KH_2PO_4 0.45、 K_2HPO_4 0.9、 NH_4Cl 0.3、 KCl 0.3、琼脂 15、0.1%酵母提取物,高压灭菌后加入过滤除菌的 Na_2SeO_3 0.2 mmol/L。25 ℃恒温培养箱中培养 5~15 d。

1.3.2 纯化及后续研究培养基 LB 肉汤培养基,37 ℃恒温培养。

1.3.3 分离纯化方法 称取处理好的土样 10 g,加入 90 mL 灭菌去离子水,常温振荡 15 min;静置 15 min,取上层悬浮液 1 mL,加入 9 mL 无菌去离子水稀释至 10^{-2} ,依次稀释至 10^{-6} ;取 200 μL 稀释的悬浮液,加入制备好的分离平板中涂

收稿日期:2013-12-19

作者简介:王 健(1989—),男,湖南衡阳人,硕士,从事生物资源综合利用研究。E-mail:260598984@qq.com。

通信作者:吴永尧,教授。E-mail:yywu357@sohu.com。

策略上,可采取播前深耕晒土,覆膜高温闷土等方法。由于土壤环境的复杂性,运用单一措施去消除连作障碍很难达到防治效果,因此须要采用多种防治手段,这将是下一步研究重点。

参考文献:

- [1] 张树生,杨兴明,茆泽圣,等. 连作土灭菌对黄瓜(*Cucumis sativus*)生长和土壤微生物区系的影响[J]. 生态学报,2007,27(5):1809-1817.
- [2] 张雪松,侯顺利,高微微,等. 土壤处理对连作西洋参生长及根病发生的影响[J]. 中国农学通报,2008,24(11):406-409.
- [3] 杨桂丽,童 娟,张 丽,等. 熏蒸灭菌对连作马铃薯生长发育及土壤微生物的影响[J]. 农业科学研究,2012,33(1):36-40,56.

- [4] 侯永侠,周宝利,吴晓玲,等. 土壤灭菌对辣椒抗连作障碍效果[J]. 生态学杂志,2006,25(3):340-342.
- [5] 梁 智,周 勃,邹耀湘,等. 土壤湿热灭菌对连作棉花生长发育的影响[J]. 西北农业学报,2007,16(2):87-89.
- [6] 易芬远,沈方科,首安发,等. 不同灭菌措施消除烟-薯-烟连作土壤障碍的效应[J]. 广西农学报,2013,28(2):19-22.
- [7] 郭修武,李 坤,谢洪刚,等. 连作土灭菌对葡萄生长及根系分泌特性的影响[J]. 果树学报,2010,27(1):29-33.
- [8] 李卓棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:178-181.
- [9] Marschner P, Rumberger A. Rapid changes in the rhizosphere bacterial community structure during re-colonization of sterilized soil[J]. Biology and Fertility of Soils,2004,40(1):1-6.

布均匀,待水分干后,置于 25 ℃ 培养箱中倒置培养。以划线法挑选红色且形态不同的单菌落进行纯化培养。

1.3.4 Na_2SeO_3 还原菌的确定及耐硒能力测定 将纯化好的红色单菌落分别接种于含与不含 Na_2SeO_3 的 LB 肉汤培养基中,如在含 Na_2SeO_3 的培养基中呈红色而不含 Na_2SeO_3 的培养基中不呈红色,则初步判断其为 Na_2SeO_3 还原菌。将筛选到的菌株点接于 Na_2SeO_3 浓度梯度平板上测定其耐硒能力。

1.4 硒标准曲线的制作及还原产生单质硒的测定

1.4.1 硒标准曲线制作 单质硒粉溶解于硫化钠溶液中呈现红棕色,含量越高颜色越深,可在 500 nm 波长处定量测定^[5]。依次称取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g 硒粉,置于含 40 mL 0.5 mol/L Na_2S 溶液棕色容量瓶中,振荡摇匀,静置 20 min;用 0.5 mol/L Na_2S 定容至 250 mL,摇匀,用 1 cm 比色皿以 Na_2S 溶液作空白,在 500 nm 处测定其吸光度。以硒含量为横坐标(x)、吸光度值为纵坐标(y),绘制标准工作曲线。

1.4.2 Na_2SeO_3 还原率的测定 将初步判断具有 Na_2SeO_3 还原能力的菌株接种于加有 2 mmol/L Na_2SeO_3 的 LB 培养液中,37 ℃、100 r/min 分别培养 12、24、36、48、60、87 h;培养液 5 000 r/min 离心 20 min,去上清,1 mol/L NaCl 溶液洗涤 2 次;5 000 r/min 离心 20 min,去上清;30 mL 0.5 mol/L Na_2S 溶解沉淀,混匀,反应 1 h,其间摇匀数次;0.5 mol/L Na_2S 定容 50 mL,5 000 r/min 离心 20 min,取上清于 500 nm 波长处测定吸光值,根据硒标准曲线计算还原产生单质硒的量,并换算还原率。

1.5 菌株分子生物学鉴定

1.5.1 菌株 16S rDNA 序列测定 挑取单菌落于 1 mL 无菌水中,100 ℃ 沸水浴 5 ~ 10 min,5 000 r/min 离心,取上清液 2 μL 为 PCR 扩增模板。PCR 反应条件:94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环。扩增产物交由华大基因股份有限公司进行测序。

1.5.2 序列分析 获得序列提交 GenBank 进行 Blast 比对,提取相似度最高的前 5 条序列用 MEGA 5.05 软件进行聚类分析。

1.6 Na_2SeO_3 对菌体生长的影响

1.6.1 Na_2SeO_3 浓度对菌体菌落数量和菌落直径的影响

在 100 mL LB 培养基灭菌后,接种具 Na_2SeO_3 还原能力的菌株 EGS12,37 ℃ 摇床过夜,稀释至 10^{-7} 浓度菌液;取 100 μL 稀释菌液涂布于含 0、1、2、3、4 mmol/L Na_2SeO_3 浓度梯度的培养基平板,3 次重复;室温下放至平板表面无水流动,37 ℃ 倒置培养 24 ~ 48 h,数出每个平板上菌落数量,每个平板选 9 个菌落测量直径,计算平均值,绘制曲线。

1.6.2 Na_2SeO_3 对代时的影响 将 100 μL 菌悬液分别接种到不含硒与含 2 mmol/L Na_2SeO_3 的液体培养基中,37 ℃ 培养 0 ~ 48 h;其间,每隔 1 h 移取 5 mL 菌液,以培养基为空白对照,测定 600 nm 处吸光度 $D_{600\text{ nm}}$,重复 3 次,绘制曲线,计算代时。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

由于 Na_2SeO_3 还原菌能将 Na_2SeO_3 还原成红色单质硒,从而使菌落呈红色。试验将分离出的红色菌落挑选出来并进行纯化,共得到 10 株菌株,编号分别为 EGS4、EGS12、KWS1、KWS2、KWS3、KWS4、KWS5K、KWS6、EGS13、EG71。

2.2 耐硒测定

将纯化得到的 10 株菌株,以点样接种方式接种到浓度分别为 0、1、5、10、20、30、40、50、70、100 mmol/L Na_2SeO_3 平板中培养,编号为 a ~ j,观察生长情况,结果发现,在 a 号平板上,10 株菌株均能生长且未有颜色变化;b 号平板上有 8 株菌株能够生长,不能生长的菌株为 EG71,它只能在约 25 ℃、含 0.2 mmol/L Na_2SeO_3 的平板上生长;在 j 号平板上能生长的菌株有 5 个,菌株 KWS3 在液体培养基中不能还原 Na_2SeO_3 产生红色颗粒,其他 4 个菌株在菌落形态上高度相似。在划线及液体培养时,菌株 EGS12 仅在 60 mmol/L Na_2SeO_3 浓度的平板上生长,因此,认为 Na_2SeO_3 对菌株 EGS12 的最低抑制浓度(MIC)为 60 mmol/L。

2.3 测序鉴定

将菌株 EGS12 的 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳并送交华大公司测序,测得 EGS12 的 16S rDNA 序列长度为 1.2 kbp。用 MEGA5.05 软件对菌株 EGS12、EG71 进行聚类分析,由图 1 可见,菌株 EGS12、EG71 与嗜麦芽寡养单胞菌及另 3 个未培养的细菌相似度为 100%。嗜麦芽寡养单胞菌是

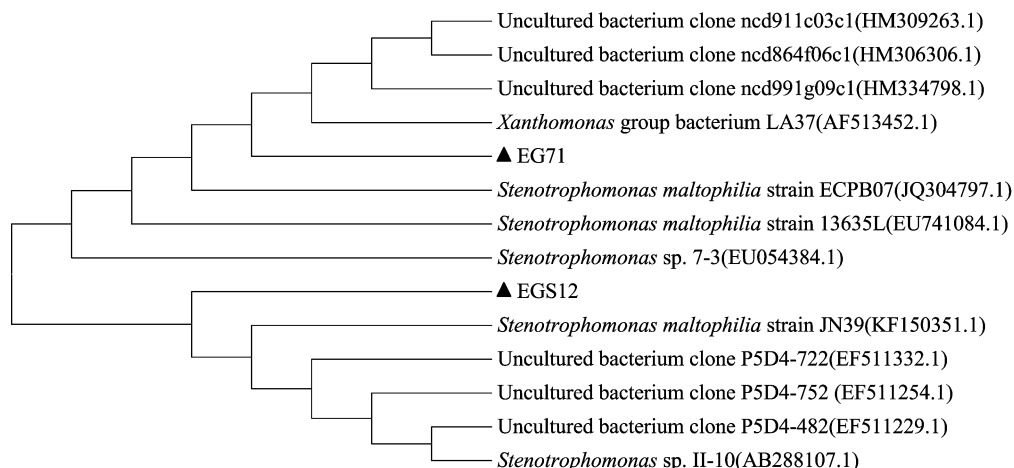


图1 菌株EGS12和EG71聚类分析结果

一种严格的非发酵型需氧、极生多鞭毛革兰氏阴性杆菌,在营养琼脂上显示灰黄色素或无色素,菌落呈针状,在氧化发酵试验中产酸缓慢或不显产酸,但分解麦芽糖产酸明显^[6]。

2.4 Na_2SeO_3 对菌体生长的影响

由图 2 可见,随着 Na_2SeO_3 浓度的提高,菌株 EGS12 的菌落数量和直径均呈下降趋势,这是由 Na_2SeO_3 对细菌的毒性所致。

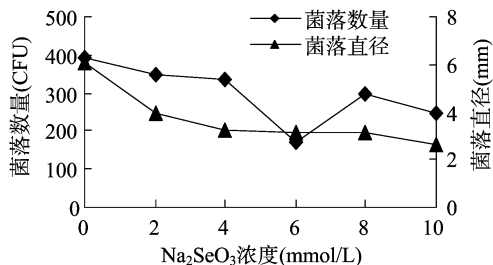


图2 Na_2SeO_3 对 EGS12 菌落数量和直径的影响

由图 3 可见,在不添加硒与含浓度 2 mmol/L Na_2SeO_3 培养基中,不添加硒的菌体经过短暂的延滞期后迅速进入对数生长期,22 h 左右进入稳定期;含 2 mmol/L Na_2SeO_3 的培养基中,菌体的生长没有一个明显的对数生长期,进入稳定期的时间也大大延后,最终其吸光值要高于对照组,这是由还原所产生的红色单质硒干扰所致。根据公式 $G = (t_2 - t_1) / [(\lg w_2 - \lg w_1) / \lg 2]$ 计算得出,0 mmol/L Na_2SeO_3 培养条件下,菌株 EGS12 的代时为 55 min;2 mmol/L Na_2SeO_3 培养条件下,EGS12 菌株的代时为 177 min。

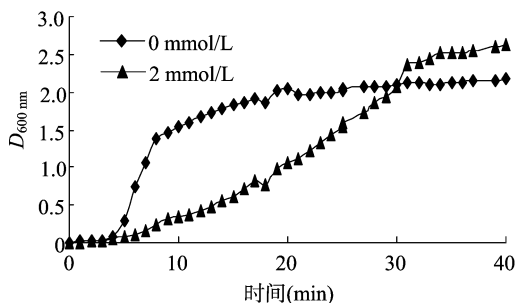


图3 菌株 EGS12 在不含硒和含 2 mmol/L Na_2SeO_3 LB 培养基中的生长曲线

2.5 菌株还原能力初探

由图 4 可见,在 12 ~ 48 h 内,菌株 EGS12 对 Na_2SeO_3 的还原率提升并不明显,48 h 后还原率大大提升。菌株 EGS12 对 Na_2SeO_3 的还原是从生长就开始了,到了稳定期后进行大量还原,这说明菌株对 Na_2SeO_3 的还原和菌体生长呈正相关性。

3 结论与讨论

硒是一种营养剂量和毒性剂量范围很窄的微量元素^[7]。

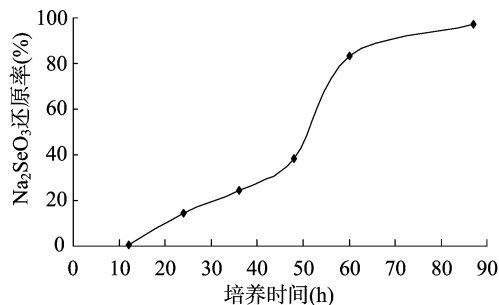


图4 菌株 EGS12 对 Na_2SeO_3 的还原曲线

利用微生物还原 Na_2SeO_3 而产生纳米红色单质硒,比传统无机硒和有机硒更高效、更具有高安全性。本研究从高硒区土壤分离筛选到高耐硒和高还原率的嗜麦芽寡养单胞菌,能在耗氧情况下利用有机碳源,把培养基所含的 Na_2SeO_3 还原成红色单质硒。当 LB 培养基中添加 2 mmol/L Na_2SeO_3 时,仅用 4 d 不到的时间就几乎把 Na_2SeO_3 全部还原完。虽然 Na_2SeO_3 对微生物都有毒性作用,但菌株 EGS12 竟然能生长在 60 mmol/L 筛选分离平板中,其耐硒能力远高于其他还原硒菌种,如枯草芽孢杆菌 MIC 为 1 mmol/L、大肠杆菌 MIC 为 5.8 mmol/L、慢生大豆根瘤菌 MIC 为 6 ~ 12 mmol/L、球型红细菌 MIC 为 2.9 ~ 4.6 mmol/L 等^[8]。经鉴定,筛选出的菌株为嗜麦芽寡养单胞菌,其还原 Na_2SeO_3 的能力国内尚未见报道,对 Na_2SeO_3 的还原位点及还原机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 王东亮,肖敏,钱卫,等. 细菌还原氧化态硒产生红色单质硒的研究进展[J]. 微生物学报,2007,47(3):554-557.
- [2] Zhang J S, Wang H L, Bao Y P, et al. Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of seleno-enzymes in both cultured cells and mice[J]. Life Sciences,2004,75(2):237-244.
- [3] 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性[J]. 卫生研究,2000,29(1):57-58.
- [4] Denton M, Kerr K G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Clinical Microbiology Reviews,1998,11(1):57-80.
- [5] Biswas K C, Barton L L, Tsui W L, et al. A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial reduction of selenite[J]. Journal of Microbiological Methods,2011,86(2):140-144.
- [6] 耿毅,汪开毓,陈德芳,等. 嗜麦芽寡养单胞菌研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(5):28-31.
- [7] 郑世学,栗静,王瑞,等. 硒是双刃剑?——谈微生物中的硒代谢[J]. 华中农业大学学报,2013,32(5):1-8.
- [8] 蒋华东,何晓红,张礼霞,等. 一株假单胞菌好氧还原亚硒酸钠为红色单质硒[J]. 微生物学报,2010,50(10):1347-1352.