

土壤富硒细菌的筛选、鉴定^①

廖青, 刘永贤, 邢颖, 梁潘霞, 潘丽萍, 陈锦平, 江泽普*

(广西农业科学院农业资源与环境研究所/广西富硒农业研究中心, 南宁 530007)

摘要: 从广西不同富硒区土壤中分离出 32 株耐硒细菌, 通过优化加硒时间、培养时间及加硒浓度进行富硒试验, 筛选获得 4 株富硒能力较强的细菌, 进一步通过对 4 株细菌 16S rDNA 序列分析及系统发育树分析明确了各菌株的种属关系。经鉴定, YLB1-6 为 *Bacillus cereus*, TXB1-10 为 *Sinomonas sp.*, TXB2-5 为 *Bacillus thuringiensis*, GPB1-5 为 *Achromobacter denitrificans*。在最适加硒时间、培养时间及适宜加硒浓度条件下, 各菌株的硒转化率分别为: YLB1-6 74.22%, TXB1-10 66.05%, TXB2-5 55.31%, GPB1-5 63.30%。各菌株处理能显著提高土壤可交换态硒含量, 对土壤硒起到较强活化作用。土壤富硒细菌为硒转化提供更多的高效微生物载体, 并为富硒产品开发研究提供技术支持。

关键词: 富硒细菌; 硒转化率; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A

硒是人体必需的一种微量营养元素, 对人体有预防疾病、增强体质及延缓衰老等功效^[1]。广西富硒土壤面积达 212 万 hm^2 ^[2], 土壤硒含量最高可达 2.29 mg/kg ^[3], 为发展富硒农产品提供了有利的基础条件。然而, 广西富硒土壤多呈酸性, 土壤中的硒易与铁形成难溶的复合亚硒酸铁, 从而导致其有效性较低^[4], 直接影响了广西富硒土壤资源的有效利用。研究表明, 土壤硒的生物有效性受到环境微生物的显著影响^[5], 微生物通过自身代谢作用可以实现硒形态、价态的转化, 从而提高土壤硒的生物有效利用率。因此, 筛选高效、稳定的具有硒代谢转化能力的富硒微生物, 是开发利用土壤硒资源的有效途径。

对土壤微生物硒耐受性进行研究, 发现硒的耐受性: 细菌 > 真菌 > 放线菌^[6], 土壤细菌能在高硒环境下将无机硒转化且生长良好, 说明土壤细菌对硒具有较好的代谢能力。因此, 本研究主要侧重于富硒土壤中细菌的分离, 采用含硒培养基筛选耐硒细菌, 进一步通过富硒试验获得硒转化能力强的菌株, 并对其进行鉴定, 以期获得硒高效转化微生物载体, 为土壤硒资源利用、富硒农产品生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 培养基及试剂

液体培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, 氯化钠 5 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.3±0.2; 固体培养基: 营养琼脂, 购自广东环凯微生物科技有限公司。所有培养基均在 121 °C 灭菌 20 min 后使用。

亚硒酸钠(Na_2SeO_3 , AR 98%) 购自山东西亚化学工业有限公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 购自上海生工生物工程技术有限公司; 其他化学药品均为国内生产的分析纯产品。

硒液制备: 称取 22.35 g Na_2SeO_3 , 溶于去离子水中并定容至 100 ml, 此溶液硒浓度为 100 mg/ml , 使用无菌滤头(0.22 μm) 过滤后备用, 存于避光处。使用时取上述硒液用灭菌去离子水稀释至 20 mg/ml 。

1.2 菌株的分离和纯化

从广西多个富硒区采集土壤样品, 称取 10 g 土样加入到预先装有 10 颗玻璃珠的 90 ml 的无菌 PBS 中, 30 °C、200 r/min 振荡 30 min, 静置 5 min, 收集土壤悬液, 于 5 000 r/min 离心 15 min, 沉淀用 10 ml PBS 悬浮, 4 °C 保存备用。取 2 ml 制备好的样品加

基金项目: 国家自然科学基金项目(41761052)、广西创新驱动重大专项项目(桂科 AA17202019-1、桂科 AA17202019-4、桂科 AA17202026)、广西重点研发计划项目(桂科 AB16380207)、广西农业重点科技计划项目(201604)、广西青年基金项目(2016GXNSFBA380131)、广西富硒特色作物试验站项目(桂 TS2016011)、广西农业科学院基本科研业务专项项目(2015YT33、桂农科 2017YZ03)和广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2017JM01, 桂农科 2017JM03, 桂农科 2018JZ21)资助。

* 通讯作者(lzjeep@163.com)

作者简介: 廖青(1981—), 女, 广西梧州人, 硕士, 副研究员, 主要从事土壤生态和高值农业研究。E-mail: liaoqing81@163.com

入到 100 ml 含硒浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 震荡培养 2 d 进行筛选, 然后用梯度稀释法制备 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 系列稀释液, 取 100 μl 分别涂布到固体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养至菌落长好, 挑取具有不同菌落形态特征的单个菌落, 采用平板划线法进行重复分离纯化, 获得菌株纯培养物。

1.3 菌株生长曲线测定

从固体培养基上挑取菌株接种于含 10 ml 液体培养基的培养瓶中, 活化后按 5% 接种量转接于 100 ml 液体培养基的三角瓶中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 每隔 1 h 取样液, 用分光光度计在 530 nm 波长下测定吸光度值, 绘制菌株的生长曲线。

1.4 适宜硒浓度的测定

按 1 $\mu\text{g/ml}$ 硒浓度梯度递增依次制备含硒量为 1 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ 的液体培养基, 待菌株活化后, 按 5% 接种量依次接种于上述含硒液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养, 根据菌液颜色变化确定适宜硒质量浓度。

1.5 富硒能力测定

菌株活化后按 5% 接种量转接于 100 ml 液体培养基的三角瓶中, 在菌株适宜硒浓度、适宜加硒时间及其合适培养时间条件下进行摇床培养。将培养好的菌悬液 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液经消解反应后用原子荧光光度计测量荧光强度值, 由标准曲线可得样液的硒浓度, 由硒转化率公式获悉菌株的富硒能力^[7]。

硒转化率(%)=(总硒含量-残留无机硒含量)/总硒含量 $\times 100$

1.6 菌株的鉴定

挑选具有较强富硒能力的菌株, 用液体培养基活化, 提取细菌基因组总 DNA 并以其为模板, 采用细菌通用引物(27F/1492R)扩增其 16S rRNA 基因片段, PCR 扩增产物用胶回收试剂盒进行回收纯化后在 ABI3730 测序仪上进行测序。将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行比对, 用 MEGA5.0 软件构建系统进化树, 明确菌株的种属关系。

1.7 菌株对土壤硒的活化

利用浸提剂提取的土壤化学有效性可反映土壤硒的生物有效性^[8]。菌株土壤硒活化试验方法参照龙云川等^[9]的方法进行。富硒土壤中的水溶态硒用超纯水浸提, 可交换态硒用 0.1 mol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 溶液浸提^[10]。样品经相关处理后, 其硒含量用原子荧光光谱仪测定。

1.8 数据处理

采用 DPS 7.05 软件进行统计分析, 并采用

Microsoft Office Excel 2003 软件进行图表制作。

2 结果与讨论

2.1 耐硒细菌的筛选

本试验从广西永福(砂页岩红壤, 全硒 0.567 mg/kg)、玉林(砂页岩赤红壤, 全硒 1.804 mg/kg)、桂平(砂页岩赤红壤, 全硒 1.188 mg/kg)、藤县(砂页岩赤红壤, 全硒 0.580 mg/kg)等多个富硒区采集土壤样品, 采用含硒液体培养基进行耐硒细菌筛选, 并利用梯度稀释涂板法分离获得具有不同菌落特征的细菌 32 株。采用平板划线法将这些菌株进行纯化, 菌株纯化后于试管斜面上 4 $^{\circ}\text{C}$ 保藏。所获耐硒细菌中, 6 株来源于永福, 9 株来源于玉林, 12 株来源于藤县, 5 株来源于桂平, 表明广西不同富硒区中, 砂页岩母质红壤、赤红壤均有耐硒细菌存在。

2.2 菌株的生长曲线

由菌株生长曲线可知菌株的对数生长期及所需培养时间。对各耐硒菌株进行生长曲线测定后发现, 不同耐硒细菌进入对数生长期的时间及其持续时间、到达生长稳定期所需时间均存在差异。从生长周期考虑, 本研究筛选出 4 株培养时间较短的菌株进行下一步研究。4 株耐硒细菌分别命名为 YLB1-6(玉林)、TXB1-10(藤县)、TXB2-5(藤县)和 GPB1-5(桂平), 其生长曲线如图 1 所示, YLB1-6 在 1~4 h 时处于对数生长期, 对数期出现较早且较短, 4~7 h 处在稳定期; 其他 3 株细菌在 2~6 h 处于对数生长期, 6~10 h 处于稳定期。菌株对数生长期细胞生长速率最快, 代谢也最为旺盛, 这个时期加硒有利于硒的转化, 但加硒过早会对菌体代谢活动有抑制作用^[11], 过晚菌体发生自溶也会导致转化率低, 因此在对数生长期的中期加硒转化效果最好。由此确定, YLB1-6 最适加硒时间为第 2.5 h, 培养时间为 7 h; 其他 3 株细菌最适加硒时间为第 4 h, 培养时间为 10 h。

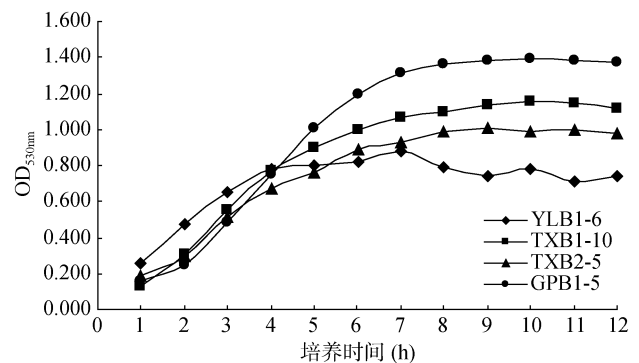


图 1 耐硒细菌生长曲线

Fig. 1 Growth curves of selenium-tolerant bacteria

2.3 菌株适宜硒浓度的确定

不同硒浓度下,各菌株菌液颜色变化如表 1 所示。随着液体培养基中硒浓度的增加,菌液呈不红 红色不明显 红色变化趋势。当菌液出现红色时,说明菌株将

Na₂SeO₃ 转化为红色单质硒^[12],为了避免过多单质硒的产生,提高有机硒的转化率,选择菌液呈红色不明显时的硒浓度作为适宜硒浓度,即 YLB1-6 和 TXB2-5 为 6 μg/ml, TXB1-10 为 4 μg/ml, GPB1-5 为 8 μg/ml。

表 1 不同硒浓度菌液颜色变化
Table 1 Color changes of bacterial liquids under different Se concentrations

菌株	Na ₂ SeO ₃ 浓度(μg/ml)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
YLB1-6	-	-	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TXB1-10	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TXB2-5	-	-	-	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GPB1-5	-	-	-	-	-	-				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“-”表示菌液没变红，“ ”表示菌液红色不明显，“+”表示菌液呈红色。

2.4 菌株的富硒能力

在各菌株适宜硒浓度、适宜加硒时间及其合适培养时间条件下进行菌株富硒试验,由硒转化率公式可知各菌株的富硒能力。经富硒试验后, YLB1-6、TXB1-10、TXB2-5 和 GPB1-5 残留无机硒含量分别为 1.547、1.358、2.681 和 2.936 μg/ml, 菌株硒转化率依次为 74.22%、66.05%、55.31% 和 63.30%, YLB1-6 与 TXB1-10、GPB1-5 和 TXB2-5 菌株之间的硒转化率差异均达极显著水平,4 个耐硒菌富硒能力由大到小排序为: YLB1-6 > TXB1-10 > GPB1-5 > TXB2-5(表 2)。目前国内文献报道的富硒细菌,其硒转化率为 50% ~ 80%^[7,11-14]。本研究所筛 4 株富硒细菌的硒转化率均达 50% 以上,具有较强富硒能力。

表 2 富硒细菌的硒转化率
Table 2 Ratios of Se transformation of Se-enriched bacteria

菌株	硒转化率(%)
YLB1-6	74.22 aA
TXB1-10	66.05 bB
TXB2-5	55.31 cC
GPB1-5	63.30 bB

注:同列数据后大小写字母不同分别表示差异达到 P<0.01 和 P<0.05 显著水平,下表同。

2.5 富硒细菌的鉴定

通过 PCR 扩增,各富硒细菌的 16S rDNA 序列长度均在 1 450 bp 左右。BLAST 分析结果(表 3)表明,这 4 株富硒细菌与其同源菌株相似性均在 99% 以上;进一步采用 Neighbor-Joining 方法构建了富硒细菌的系统发育树(图 2),经鉴定, YLB1-6 为 *Bacillus cereus*, TXB1-10 为 *Sinomonas sp.*, TXB2-5 为 *Bacillus thuringiensis*, GPB1-5 为 *Achromobacter denitrificans*。目前文献报道的富硒细菌有 *Bacillus*、*Stenotrophomonas*、*Enterobacter* 和 *Pseudomonas*^[13,15],而本研究中 *Sinomonas* 和 *Achromobacter* 具有富硒能力为首次报道,丰富了富硒菌株的种类。

表 3 菌株 16S rDNA 序列同源性分析结果
Table 3 Sequence homology analyses of strains based on 16S rDNA sequences

菌株	同源菌株	相似性(%)
YLB1-6	<i>Bacillus cereus</i> strain DS16	99
TXB1-10	<i>Sinomonas sp.</i> bE8	99
TXB2-5	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BAPE1	99
GPB1-5	<i>Achromobacter denitrificans</i> strain BTC3	99

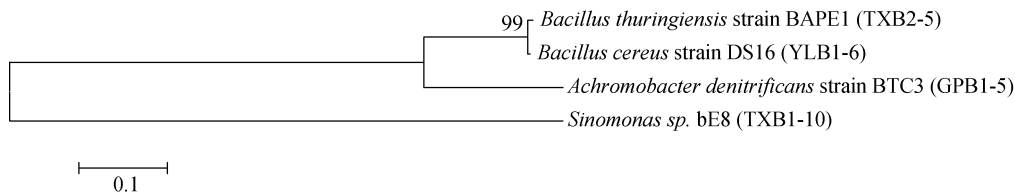


图 2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

2.6 菌株对土壤硒的活化能力

水溶态硒和可交换态硒是土壤有效硒的主要形态。从表 4 可以看出,各处理中可交换态硒为主要的

有效硒形态,而水溶性硒所占有效硒的比例较小;土壤经各菌株制成的菌剂处理后,各处理水溶态硒与 CK 相比无明显差异,而可交换态硒均有不同程度的

提高。CK 可交换态硒含量为 0.053 mg/kg, 各菌剂处理的可交换态硒含量提高至 0.085 ~ 0.112 mg/kg, 其中 YLB1-6 和 TXB1-10 菌剂处理均极显著提高了土壤可交换态硒含量($P < 0.01$), TXB2-5 和 GPB1-5 菌剂处理也显著提高了土壤可交换态硒含量($P < 0.05$)。本研究中, 土壤经菌剂处理后, 可交换态硒含量显著提高, 可能是吸附于氧化物和黏土矿物表面的亚硒酸盐更易与菌株分泌的肽、氨基酸结合从而获得释放, 也可能是菌株分泌胞外磷酸酶溶解土壤中的难溶性磷, 磷元素释放的同时与之伴生的硒元素也被活化释放, 其活化机制有待进一步研究。相关研究表明, 通过土壤微生物代谢转化获得的硒是一种重要的生物有效硒^[16-17], 它在提高土壤硒生物有效性方面具有巨大的潜力。因此, 土壤富硒细菌作为作物硒生物强化的潜在工具, 在富硒作物生产上具有实际应用价值。

表 4 土壤处理后水溶态硒和可交换态硒含量

Table 4 Concentrations of water-soluble Se and exchangeable Se in treated soil

菌株	水溶态硒 (mg/kg)	可交换态硒 (mg/kg)	水溶态硒+可交换态硒 (mg/kg)
CK	0.005 a	0.053 bB	0.058
YLB1-6	0.006 a	0.112 aA	0.118
TXB1-10	0.004 a	0.101 aA	0.105
TXB2-5	0.006 a	0.085 aAB	0.091
GPB1-5	0.008 a	0.088 aAB	0.096

3 结论

从广西多个富硒区分离筛选到 4 株富硒能力较强的菌株: YLB1-6(玉林)、TXB1-10(藤县)、TXB2-5(藤县)和 GPB1-5(桂平), 经 16S rDNA 序列分析及系统发育树分析, YLB1-6 为 *Bacillus cereus*, TXB1-10 为 *Sinomonas sp.*, TXB2-5 为 *Bacillus thuringiensis*, GPB1-5 为 *Achromobacter denitrificans*, 这些富硒细菌对硒的转化率为 55.31% ~ 74.22%, 各菌株处理能显著提高土壤可交换态硒含量, 对土壤硒起到较强活化作用。在土壤微生物硒强化中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 李素媚. 微量元素硒的临床应用新进展[J]. 广东微量元素科学, 2009, 16(7): 8-12
- [2] 邓萍. 广西几多“硒”再摸“富”家底——我区对“长寿元素”硒开展再调查纪事[N]. 广西日报, 2014-01-15
- [3] 刘永贤, 阳继辉, 石玫莉, 等. 广西富硒功能农产品开发前景分析[J]. 农业与技术, 2015, 35(1): 176-178
- [4] Geering H R, Carry E E, Jones L H P. Solubility and redoxcriteria for the possible form of selenium in soils[J]. Soil Science Society of America, Proceedings, 1968, 32: 35-40
- [5] 徐巧林, 吴文良, 赵桂慎, 等. 微生物硒代谢机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 44(1): 207-216
- [6] 廖青, 梁潘霞, 邢颖, 等. 广西富硒区土壤耐硒菌株的分离及鉴定[J]. 西南农业学报, 2017, 10(30): 2303-2307
- [7] 宋照军, 王树宁, 潘润淑, 等. 富硒乳酸菌的分离、筛选、驯化及富硒研究[J]. 中国酿造, 2004(11): 4-6
- [8] 诸旭东, 宗良纲, 马迅, 等. 内源调控与外源补硒对土壤中硒有效性及水稻产量的影响[J]. 土壤通报, 2016, 47(2): 398-404
- [9] 龙云川, 陈轩, 周少奇. 高产铁载体根际菌的筛选鉴定及硒活化特性评价[J]. 生物技术进展, 2017, 7(5): 402-408
- [10] 吴少尉, 池泉, 陈文武, 等. 土壤中硒的形态连续浸提方法的研究[J]. 土壤, 2004, 36(1): 92-95
- [11] 周防震, 谢园园, 赵婷, 等. 富硒微生物的筛选、富硒条件优化及鉴定[J]. 中国酿造, 2013, 32(8): 103-106
- [12] 宋照军, 潘润淑, 王树宁, 等. 富硒乳酸菌筛选及其富硒工艺初探[J]. 食品工业科技, 2004(7): 62-64
- [13] Acuña J J, Jorquera M A, Barra P J, et al. Selenobacteria selected from the rhizosphere as a potential tool for Se biofortification of wheat crops[J]. Biology and Fertility of Soils, 2013, 49: 175-185
- [14] 朱何东, 常峰, 罗俊成, 等. 富硒乳酸菌的筛选及其富硒能力的初步研究[J]. 酿酒科技, 2005(8): 29-31
- [15] 张如, 樊霆, 李森, 等. 一株耐硒壶瓶碎米芥内生菌分离、鉴定及体外硒代谢研究[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 314-321
- [16] Fernández M A, Charlet L. Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view[J]. Reviews in Environmental Science & Biotechnology, 2009, 8(1): 81-110
- [17] 陈锦平, 刘永贤, 曾成城, 等. 植物对土壤硒的吸收转化研究进展[J]. 生物技术进展, 2017, 7(5): 421-427

Screening and Identification of Se-enriched Bacteria from Se-rich Soils in Guangxi

LIAO Qing, LIU Yongxian, XING Ying, LIANG Panxia, PAN Liping, CHEN Jinping, JIANG Zepu^{*}
(Agricultural Resource and Environmental Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Selenium Enriched Agriculture Research Center of Guangxi, Nanning 530007, China)

Abstract: 32 Se-tolerance strains were isolated from Se-rich soils in Guangxi. Se-enriched test were conducted by optimizing the time of adding Na_2SeO_3 , the incubation time and Na_2SeO_3 concentration, and 4 bacterial strains with strong Se-enriched ability were screened out. Furthermore, the species of these 4 bacterial strains were determined based on the sequencing of 16S rDNA and phylogenetic analysis as *Bacillus cereus* (YLB1-6), *Sinomonas sp.* (TXB1-10), *Bacillus thuringiensis* (TXB2-5) and *Achromobacter denitrificans* (GPB1-5), respectively. Under the condition of the optimum time of adding Na_2SeO_3 , the suitable incubation time and optimal Na_2SeO_3 concentration, the ratio of Se transformation of each strain was as follow: YLB1-6 74.22%, TXB1-10 66.05%, TXB2-5 55.31%, GPB1-5 63.30%. Furthermore, all strains treatments could significantly increase the exchangeable Se contents and have strong activating effect on soil Se. Soil Se-enriched bacteria provides more efficient microorganism carrier for Se transformation and provide technical support for Se-enriched products development.

Key words: Se-enriched bacteria; Ratio of Se transformation; Screening; Identification