

研究报告

一株耐硒壶瓶碎米荠内生菌分离、鉴定及其体外硒代谢研究

张如^{1,3} 樊霆¹ 李淼² 袁林喜^{3*}

(1. 安徽农业大学资源与环境学院 安徽 合肥 230036)

(2. 安徽农业大学植保学院 安徽 合肥 230036)

(3. 中国科学技术大学地球和空间科学学院 安徽 合肥 230026)

摘要:【背景】壶瓶碎米荠对硒具有超积累能力，并主要以硒代胱氨酸的形式存在，与已有的硒超积累植物显著不同，其硒超积累机制不明。【目的】从硒超积累植物壶瓶碎米荠(*Cardamine hupingshanensis*)体内分离耐硒内生菌，并对其鉴定和体外硒代谢特征研究，为壶瓶碎米荠超积累硒的机制研究提供参考。【方法】从壶瓶碎米荠新鲜叶片中分离纯化耐硒内生菌株，对其进行生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析鉴定，并对其进行亚硒酸钠培养代谢。【结果】获得一株耐硒内生菌 CSN-1，被鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)，培养液中硒含量低(Se 1.5 mg/L)时其吸光度值较对照组高，硒含量高(Se 10 mg/L)时其吸光度值较对照组低；代谢后的上清液中硒主要以 Se⁴⁺存在，而菌体中硒主要是硒代胱氨酸(SeCys₂)。【结论】硒超积累植物壶瓶碎米荠叶片体内存在甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) CSN-1，具有将亚硒酸钠转化为硒代胱氨酸的能力，低浓度的硒对该内生菌的生长具有一定的促进作用，而高浓度的硒则会抑制该内生菌的生长。

关键词: 壶瓶碎米荠，耐硒，16S rRNA 基因，甲基营养型芽孢杆菌，硒代胱氨酸(SeCys₂)

Isolation, identification and selenite metabolism of a selenium-tolerant endophyte from *Cardamine hupingshanensis*

ZHANG Ru^{1,3} FAN Ting¹ LI Miao² YUAN Lin-Xi^{3*}

(1. School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(2. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China)

(3. School of Earth and Space Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China)

Abstract: [Background] *Cardamine hupingshanensis* is a novel selenium (Se)-hyperaccumulating plant in China with the predominate Se species as selenocystine (SeCys₂), which is different with other Se-hyperaccumulating plants in USA, eg. *Astragalus bisulcatus*, *Stanleya pinnata*. [Objective]

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31400091)

*Corresponding author: Tel: 86-512-65962842; E-mail: yuanli@ustc.edu.cn

Received: March 13, 2017; Accepted: May 16, 2017; Published online (www.cnki.net): May 31, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31400091)

*通信作者: Tel: 86-512-65962842; E-mail: yuanli@ustc.edu.cn

收稿日期: 2017-03-13; 接受日期: 2017-05-16; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-05-31

To explore the role of microorganism during Se-hyperaccumulation in *Cardamine hupingshanensis*, isolation, identification and Se metabolism *in vitro* of a Se-tolerant endophyte from *C. hupingshanensis* were conducted. [Methods] A Se-tolerant endophyte was isolated and purified from fresh leaves of *C. hupingshanensis* as CSN-1. The physiological and biochemical analysis and 16S rRNA gene sequence analysis were carried out. Moreover, the endophyte CSN-1 was cultured in selenite medium to study its Se metabolism. [Results] The Se-tolerant endophyte CSN-1 was identified as *Bacillus methylotrophicus*. The selenite culture revealed that the medium absorbance was higher than that in controls under 1.5 mg Se/L medium, but lower under 10 mg Se/L medium. The metabolized Se speciation was Se^{4+} in supernatants, but SeCys_2 in bacteria deposits. [Conclusion] The Se-tolerant endophyte *Bacillus methylotrophicus* CSN-1 presented in Se-hyperaccumulating plant, *Cardamine hupingshanensis*, and could transform selenite into SeCys_2 . The low concentration of Se could promote the growth of *Bacillus methylotrophicus* CSN-1, but negative effects could be observed at high Se levels.

Keywords: *Cardamine hupingshanensis*, Selenium-tolerance, 16S rRNA gene, *Bacillus methylotrophicus*, Selenocystine/ SeCys_2

植物内生菌是指定殖在健康植物细胞内或细胞间隙, 且对植物生长没有危害及不会引起植物表型特征改变的细菌、真菌或放线菌^[1-2]。目前已从藻类、蕨类到木本、藤本的维管束植物, 几乎所有种类的植物体内都有内生菌^[3-4]。一方面植物能为内生菌提供必需的营养和能量^[5]; 另一方面某些内生菌对宿主植物有生物学促生作用, 如: Zn超积累植物 *Thlaspi caerulescens*、龙葵(*Solanum nigrum* L.)、多环芳烃污染土壤中生长的小麦(Wheat)和玉米(Maize)、铅锌尾矿中生长的鸭跖草(*Commelina communis*)等植物的内生菌可分泌吲哚乙酸(IAA)、玉米素(ZR4)等, 直接促进植物生长^[6-8]; 而且也有一些内生菌产生的抗生素能抑制植物病原体的危害、增强植物抗病性能等, 间接地促进植物生长^[9], 如: 研究显示感染内生菌的高羊茅(Tall fescue)、滨麦(*Leymus mollis*)的抗旱性、抗高温、耐盐性等抗性均显著高于非感染植株, 甚至在非适宜地区也可以存活^[10-11]。

壶瓶碎米芥(*Cardamine hupingshanensis*)是2年生或多年生十字花科植物, 一般生于海拔800–1400 m^[12]。Yuan等^[13]对湖北恩施硒矿区的壶瓶碎米芥(*C. hupingshanensis*)的研究发现其根中可累积硒高达8000 mg/kg DW, 茎中可累积硒高达2000 mg/kg DW, 叶中也可累积硒高达

2300 mg/kg DW, 可与在美国加利福尼亚富硒区发现的硒超积累植物双钩黄芪(*Astragalus bisulcatus*)^[14]和沙漠王羽(*Stanleya pinnata*)^[15]媲美。壶瓶碎米芥中所积累的硒中85%以上为硒代胱氨酸(SeCys_2)^[13], 这与双钩黄芪和沙漠王羽中积累的硒甲基硒代半胱氨酸(SeMeCys)显著不同^[15], 硒甲基转移酶(SMT)过表达是双钩黄芪和沙漠王羽超积累硒的机制^[15], 但显然SMT机制不能解释壶瓶碎米芥对硒代胱氨酸的超积累现象。

微生物在硒的地球化学循环和形态转化中扮演着重要的角色^[16-17]。不同微生物对硒的耐受程度不同, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)、黑根霉菌(*Rhizopus nigricans*)和枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)分别在亚硒酸钠浓度高于1.6、5.0、1.0和5.0 mg/L时生长异常^[18-19]。固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*)对亚硒酸钠的耐受浓度最高可达10.0 g/L; 当亚硒酸钠浓度高于10.0 g/L时, 固氮红细菌(*Rhodobacter azotoformans*)基本不能生长, 对亚硒酸钠的转化也将停止^[20]。因此, 含硒溶液或材料也可以用来作为抗菌剂或保鲜剂^[21-22]。部分微生物如 *Sulfurospirillum barnesii*、*Bacillus selenitireducens*、*Selenihalanaerobacter shriftii* 可在更高硒浓度条件下存活, 通过将无机硒转化为微生物纳米硒的方式进行解毒^[23]; Ghosh等^[24]从高

硒污染地区分离出的耐硒菌,包括 β 变形菌中的木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*),以及细菌中的纺锤芽孢杆菌(*Bacillus fusiformis*)、球状芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)及假单胞杆菌属(*Pseudomonas* sp.)、肠杆菌属的 *Enterobacter cowanii*,均对亚硒酸钠耐受浓度高达 51–102 g/L,并可以将无机硒转化成有机硒。

本研究对湖北恩施硒矿区的壶瓶碎米荠叶片中的内生菌进行分离、鉴定,筛选对硒有耐性的内生菌,并研究其对硒的体外代谢过程,以期对壶瓶碎米荠超积累硒的机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

2015年11月,将从湖北恩施硒矿区采集的壶瓶碎米荠幼苗15株(3叶期,苗长5–10 cm)均匀种植在5个花盆中,于室温下培养5个月。每2天补水1次,并随着天气和植物生长阶段进行适当的调整。于2016年4月10日采集抽薹期的壶瓶碎米荠新鲜叶片进行内生菌分析。

1.2 培养基

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA-YE)^[25]和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)^[25]。

1.3 主要试剂和仪器

DNA提取试剂盒,北京润泽康生物科技有限公司;PCR扩增引物,南京金斯瑞生物科技有限公司合成;蛋白酶K、胰蛋白酶XIV,美国Sigma-Aldrich-Fluka-Supelco公司;乙醇、NaClO₃、Tween-20、亚硒酸钠、硝酸、高氯酸、盐酸等,国药集团化学试剂有限责任公司。

无菌操作台、摇床及高压灭菌锅,上海博讯实业有限公司;离心机及恒温培养箱,上海恒一科学仪器有限公司;PCR扩增仪,Bio-Rad公司;生长曲线OD值检测所用的分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司;原子荧光光谱仪,北京北分瑞利分析仪器公司;原子荧光-形态预处理装置-液相色谱

联用仪器(LC-UV-AFS),北京海光仪器有限公司。

1.4 内生菌的分离、纯化与保藏

将采集的壶瓶碎米荠新鲜叶片的表面清洗干净,在无菌操作台上用70%乙醇浸5 min,无菌水洗3次,用2% NaClO₃和0.5 mL/L Tween-20摇动浸泡15 min,然后用无菌水冲洗3次,每次2 min,用无菌吸水纸吸干表面的水分,进行表面灭菌,最后冲洗的无菌水100 μ L涂布于TSA-YE培养基平板上,培养48 h观察培养基上无细菌生长则为表面灭菌成功,如有细菌则表面灭菌不成功,需要重新灭菌^[26]。将表面灭菌的叶片放入无菌研钵中充分研磨,将研磨液逐级进行10倍系列(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})稀释,分别取100 μ L涂布于含200 μ g/L亚硒酸钠的TSA-YE平板上,于恒温培养箱28 $^{\circ}$ C培养,48 h后观察平板上各菌落的形态特征,用无菌接种环对菌落形态特征不同的菌株进行筛选,在含有200 mg/L亚硒酸钠的TSA-YE平板上四区划线法纯化菌株,用50%无菌甘油制成甘油菌,–80 $^{\circ}$ C冷冻保藏。

1.5 分子生物学鉴定

对1.4中分离出的一株耐硒内生菌DNA提取采用试剂盒提取方法。菌株16S rRNA基因片段采用16S rRNA基因通用引物27F (5'-GAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACGGTTACCTT GTTACGACTT-3')进行PCR扩增,扩增片段大小约为1 448 bp。PCR反应体系(50 μ L):引物27F和引物1492R (20 μ mol/L)各1.0 μ L,模板DNA 2.0 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 5.0 μ L, Taq酶(5.0 U/ μ L) 0.5 μ L,加灭菌二次去离子水至50 μ L。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。菌株的PCR扩增产物由南京金斯瑞生物科技有限公司完成测序,将所得的测序结果与EzBioCloud网站中序列进行BLAST对比分析,找出与耐硒菌株源性最为接近的种属,使用MEGA 6.0进行序列分析,并构建该菌株的系统发育树。

1.6 生理生化鉴定

对筛选的内生菌株进行硝酸盐还原、革兰氏染色、尿素产生、明胶水解、葡萄糖发酵、吲哚产生、柠檬酸盐利用、V-P 测试和 H₂S 产生检测, 测定方法及初步鉴定方法参考《常见细菌系统鉴定手册》^[27]。

1.7 硒的体外代谢研究

1.7.1 耐硒菌株生长曲线的测定

设置 CK 组不加硒, 低硒组为 Se 1.5 mg/L, 高硒组为 Se 10 mg/L, 室温条件下培养 120 h, 于不同培养时间点取样, 在 $\lambda=600$ nm 下测定菌株培养液的吸光值。

1.7.2 总硒的测定

按照 GB 5009.93-2010 的氢化物原子荧光光谱法测定样品的总硒含量, 测定仪器为原子荧光光谱仪。

1.7.3 硒形态的测定

用原子荧光-形态预处理装置-液相色谱联用仪器(LC-UV-AFS)测量硒形态。称取 0.1 g 离心的菌体干样或离心的培养液上清 1 mL 于 10 mL 离心管中, 加入 5 mL Tris-HCl 充分混匀, 于超声波清洗仪中超声 30 min, 加入 1 000 mg/kg 的蛋白酶 K 0.4 mL, 置于 250 r/min 的气浴恒温振荡器中, 50 °C 培养 24 h 后, 加入 1 000 mg/kg 的蛋白酶 XIV 0.4 mL, 37 °C 培养 18 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min。上清液过 0.22 μ m 水系膜, 滤液待测, 标样为硒代蛋氨酸(SeMet)、硒代胱氨酸(SeCys₂)、硒甲基硒半胱氨酸(SeMeCys)以及四价硒(Se⁴⁺)的混合标准溶液。

1.8 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准误差表示。数据处理用 Origin 7.0 进行双 *t* 检验分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离、筛选

在含 200 μ g/L 亚硒酸钠的 TSA-YE 培养基上培养 48 h 后, 10⁻⁶ 稀释度下共筛选出对硒有耐性的内生菌 3 株, 并将 3 株内生菌在含有 200 mg/L 亚硒酸钠的 TSA-YE 平板上进行纯化培养, 选取

生长较好的耐硒菌株进行鉴定, 并作为进一步研究对象, 命名为 CSN-1。观察该菌株细胞呈杆状, 芽孢位于菌体的中央, 呈现椭圆形。菌落圆形, 白色, 边缘整齐光滑, 菌落表面干燥且有褶皱。

2.2 菌株鉴定

2.2.1 生理生化学特征

菌株 CSN-1 能够还原硝酸盐, 产生尿素, 水解明胶, 其 V-P、柠檬酸盐、葡萄糖发酵反应均为阳性, 不能产生吲哚和 H₂S (表 1)。对照《常见细菌系统鉴定手册》, CSN-1 菌株的这些特征和甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)的记载相吻合。

2.2.2 分子生物学特征

对菌株 CSN-1 的 16S rRNA 基因的测序序列与 EZBioCloud 中的序列进行 BLAST 对比分析表明, 该序列与 *Bacillus methylotrophicus* KACC13105 基因序列相似性高达 99.1%。CSN-1 菌株和相关菌株的系统发育树如图 1 所示, 可以发现 CSN-1 与 *Bacillus methylotrophicus* KACC13105 亲缘关系最近, 综合生理生化特征, 可确定该菌株属于芽孢杆菌属中的甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。CSN-1 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增后, 将得到的基因序列提交到 GenBank 数据库, 获得登录号为 KY777720。

表 1 CSN-1 菌株鉴定的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of CSN-1

测试指标 Characteristics	测试结果 Results
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
革兰氏染色 Gram staining	+
尿素产生 Urea production	+
明胶水解 Hydrolysis of gelatin	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+
吲哚测试 Indole test	-
利用柠檬酸盐 Citrate utilization	+
V-P 测定 V-P test	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。

Note: +: Positive; -: Negative.

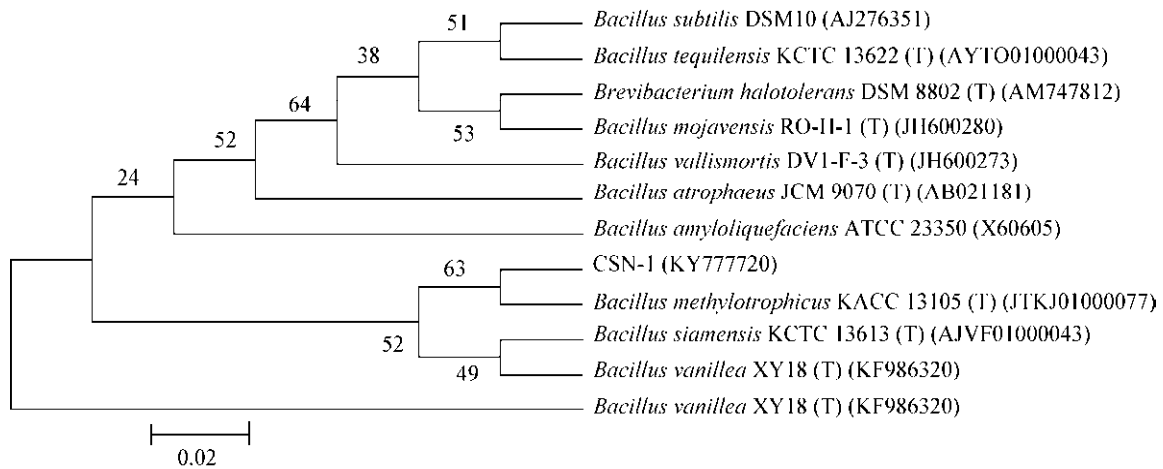


图1 菌株 CSN-1 的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain CSN-1

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号；分支上数据结点处数字为 Bootstrap 值；标尺的数据为进化距离。
Note: Numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of the strain; Numbers at the branch points indicated the bootstrap values; The number on the branch is bootstrap; Bar (0.02) represents sequence divergence.

2.3 体外硒代谢特征

不同硒浓度下对 CSN-1 菌株的生长影响如图 2 所示。耐硒菌生长曲线的变化趋势一致，在培养 8 h 后进入对数期，在 18 h 后基本进入稳定期，36 h 后进入衰退期，72 h 后可能进入下一个生长周期。但是，8 h 前加硒组和 CK 组中菌株的 OD_{600} 值没有显著地差异，8 h 后低硒组 OD_{600} 值均高于 CK 组和高硒组，CK 组 OD_{600} 值高于高硒组，这表明较低浓度的硒对耐硒菌的生长有一定的促进作用，而高浓度的硒对细菌具有一定的抑制作用。

图 3 显示的是结合菌体重量和菌体硒含量计算得出的菌体硒总量，以及结合上清液体积和上清液硒含量计算得到的上清液硒总量的变化情况。结果表明：在培养的前 4 h 菌体中硒总量无明显变化，几乎为零；培养 8 h 后菌体富集的硒总量显著增长，到 32 h 达到顶峰的 0.147 mg；36 h 之后菌体中硒总量开始出现降低的趋势，这可能是由于培养液中部分菌株进入衰落期，菌株死亡自溶导致菌体内的硒被重新释放进入培养液；48 h 后菌体硒总量开始增长，到 96 h 时达到 0.096 mg，这可能是由于细菌进入下一周期的生长导致培养液

中的硒被菌体吸收利用。

上清液中硒总量变化与菌体中硒总量变化呈现相反的变化过程(图 3)。在培养的前期，上清液中硒总量由 2 h 的 0.170 mg 逐渐降低为 10 h 的 0.124 mg；随着培养时间的增长上清液中硒总量不断的减少，在培养 36 h 时上清液中硒总量降低到低谷为 0.027 mg；36 h 之后硒总量有小幅度的增加，缓慢增加到 96 h 的 0.080 mg，这可能是由于耐硒菌的衰落死亡导致菌株体内的硒被释放到上清液中。

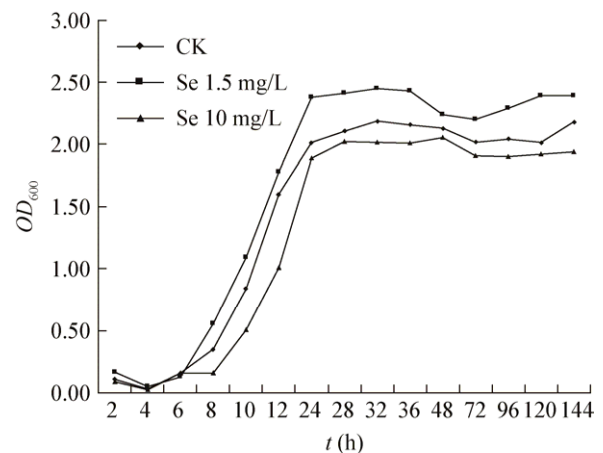


图2 不同硒浓度下 CSN-1 菌株的生长曲线

Figure 2 The growth curve of CSN-1 in different Se media

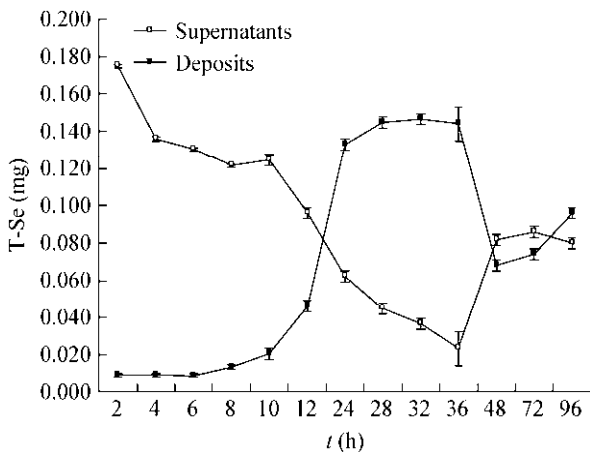


图3 CSN-1 菌株菌体及上清液中硒总量的变化
Figure 3 Total Se weights in deposits and supernatants

表2显示CSN-1菌株在Se 1.5 mg/L的培养液中上清液硒形态的变化过程,结果表明上清液中的硒均以 Se^{4+} 存在,且在培养8 h之前所测的硒形态总量和上清液中总硒含量基本一致,提取率为90%以上;培养8 h之后其提取率随着培养时间的延长逐渐降低,到36 h后低于10%,这表明培养8 h后,特别是12 h后上清液中存在大量不能被检出的硒形态存在,很可能是由于耐硒菌的快速代谢或衰落死亡而重新释放到上清液中的菌体代谢产物。

表3显示CSN-1菌株在Se 1.5 mg/L的培养液中菌体硒形态的变化过程,结果表明:菌体中可以被检测的硒形态主要是硒代胱氨酸(SeCys_2),培养48 h后菌体内存在少量的硒甲基硒代半胱氨酸(SeMeCys)、 Se^{4+} 以及硒代蛋氨酸(SeMet)。在开始培养的8 h内,提取率约为35.46%,但提取率随着培养时间的延长而显著下降,这表明菌体中有未能被检测的硒形态存在。培养96 h时培养液上清液中 Se^{4+} 浓度仅为0.05 mg/L,这表明培养液中亚硒酸钠被完全还原。

3 讨论

研究发现,一些具有硒还原能力的微生物可以在厌氧条件下通过硒氧化物(硒酸盐或亚硒酸盐)还原产生能量,例如嗜泉古菌界 *Crenarchaeota*、嗜热细菌 *Thermophilic bacteria* 及光养性的紫细菌

Purple bacteria 等^[28-29],可以在亚硝酸异化还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶和某些特异性硒酸盐还原酶参与下^[30]在细胞内或细胞外将硒氧化物还原成无毒单质硒^[23]。一些氧化态的硒化合物会在微生物的作用下通过甲基化作用转化成挥发态的硒,这也是微生物在高硒环境下可以存在的原因^[31]。深红

表2 上清液中各硒形态的含量及提取率
Table 2 The contents of Se species and the Se extraction ratios in culture supernatants

Time (h)	SeCys_2	SeMeCys	Se^{4+}	SeMet	提取率 Extraction (%)
1	—	—	1.65	—	96.78
2	—	—	1.14	—	100.56
4	—	—	1.13	—	99.84
6	—	—	1.12	—	90.47
8	—	—	1.12	—	91.07
10	—	—	1.10	—	80.00
12	—	—	0.44	—	21.00
24	—	—	0.13	—	14.77
28	—	—	0.14	—	19.52
32	—	—	0.13	—	18.50
36	—	—	0.07	—	6.52
48	—	—	0.07	—	5.22
72	—	—	0.06	—	5.27
96	—	—	0.05	—	3.95

注:—:未检测出。

Note: Not detected.

表3 CSN-1 菌株菌体中各形态硒的含量及提取率
Table 3 The contents of Se species and the Se extraction ratios in CSN-1 deposits

Time (h)	SeCys_2	SeMeCys	Se^{4+}	SeMet	提取率 Extraction (%)
4	7.09	—	—	—	27.27
6	11.13	—	—	—	44.71
8	13.28	—	—	—	35.46
10	17.22	—	—	—	30.25
12	28.53	—	—	—	22.99
24	49.26	—	—	—	16.72
28	67.70	—	—	—	16.45
32	68.98	—	—	—	16.55
36	43.64	—	—	—	16.93
48	17.79	—	2.30	—	14.67
72	16.27	—	—	5.25	10.30
96	26.21	0.90	—	5.66	12.82

注:—:未检测出。

Note: Not detected.

红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)^[32]及耐金属罗尔斯通菌属(*Ralstonia metallidurans*)^[33]具有只能还原硒的特殊性。

本研究中耐硒菌甲基营养型芽孢杆菌对硒具有吸收和转化能力,在含硒 1.5 mg/L 的培养液中可将亚硒酸钠完全还原成有机硒代胱氨酸(SeCys_2)。van Fleet-Stalder 等^[34]对 *Rhodobacter sphaeroides* 硒代谢研究发现,其在 0.86 mg/L 亚硒酸钠培养液中对硒的吸收率仅为 62.9%,而在 104 mg/L 亚硒酸钠培养液中对硒的吸收率高达 94.3%,同时将亚硒酸钠还原成硒代蛋氨酸(SeMet)和单质硒。研究表明,诸多耐硒菌可将较高浓度的亚硒酸盐还原成单质硒,形成硒蛋白复合物^[35],如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、酒色着色菌(*Chromatium vinosum*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、脱硫杆菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)等。

对于硒超积累植物内生菌的研究始于 2015 年,Staicu 等^[36]从硒超积累植物沙漠王羽(*Stanleya pinnata*)中分离出一株硒耐受性内生菌株 *Pseudomonas moraviensis*,可在 48 h 内将 790 mg/L 的 Se^{4+} 还原为纳米态 Se^0 到检出限以下,体现了该内生微生物菌株对硒的超强代谢能力。Sura-de Jong 等^[26]对美国加利福尼亚州富硒区的硒超积累植物-沙漠王羽(*Stanleya pinnata*)和双钩黄芪(*Astragalus bisulcatus*)的根、茎和叶中分离出多种超耐硒性内生菌,其可以将 15.8 g/L 的硒酸盐和亚硒酸盐还原成单质硒,这些内生菌在含硒 10 mg/L 的高硒培养基中仍能生长,而来自于同样研究区域的硒非积累植物的根际真菌在 10 mg/L 的高硒培养基中根本无法生长。

本研究中的耐硒菌株不仅可以在含硒 10 mg/L 的高硒培养基生长,而且可以将亚硒酸钠主要转化为 SeCys_2 ,体现了一定的特异性。此外,已有研究显示耐受重金属细菌可提高对 Zn、Cd、Ni 等的吸收,增加了对重金属的转运系数和耐性指数,提高了植物对重金属的吸收和积累^[37-39]。因此,壶瓶碎米芽耐硒内生菌在提高壶瓶碎米芽对硒的吸收、

增加其对硒的转运系数和耐性系数上可能发挥重要作用,有待进一步研究。

4 结论

(1) 从壶瓶碎米芽叶片组织内分离纯化的耐硒菌株 CSN-1,通过其生理生化和 16S rRNA 基因序列特征鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

(2) 壶瓶碎米芽耐硒内生菌 CSN-1 对硒有吸收和转化能力,可以将亚硒酸盐转化为硒代胱氨酸(SeCys_2),而且低浓度的硒会促进其生长,而高浓度的硒则会抑制其生长。

REFERENCES

- [1] Chanway CP. Endophytes: they're not just fungi[J]. Canadian Journal of Botany, 1996, 74(3): 321-322
- [2] Feng YJ, Song W. Endophytic bacteria[J]. Ziran Zazhi, 2001, 23(5): 249-252 (in Chinese)
冯永君,宋未.植物内生细菌[J].自然杂志,2001,23(5): 249-252
- [3] Hilszczańska D. Endophytes-characteristics and possibilities of application in forest management[J]. Forest Research Papers, 2016, 77(3): 276-282
- [4] Wang ZW, Ji YL, Chen YG. Studies and biological significances of plant endophytes[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 349-363 (in Chinese)
王志伟,纪燕玲,陈永敢.植物内生菌研究及其科学意义[J].微生物学通报,2015,42(2): 349-363
- [5] Mercado-Blanco J, Prieto P. Bacterial endophytes and root hairs[J]. Plant and Soil, 2012, 361(1/2): 301-306
- [6] Lodewyckx C, Mergeay M, Vangronsveld J, et al. Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*[J]. International Journal of Phytoremediation, 2002, 4(2): 101-115
- [7] Li HY, Wei DQ, Shen M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1): 11-18
- [8] Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1994, 40(12): 1019-1025
- [9] Glick BR, Cheng ZY, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria[J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 119(3): 329-339
- [10] Du YJ, Wang Q, Han LB. The effect of *Neotyphodium typhinum* infected on photosynthetic characteristics of tall fescue[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(2): 590-594 (in Chinese)
杜永吉,王祺,韩烈保.内生真菌 *Neotyphodium typhinum* 感染对高羊茅光合特性的影响[J].生态环境学报,2009,18(2): 590-594
- [11] Rodriguez RJ, Henson J, van Volkenburgh E, et al. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis[J]. The ISME

- Journal, 2008, 2(4): 404-416
- [12] Bai HF, Chen LB, Liu KM, et al. A new species of *Cardamine* (Brassicaceae) from Hunan, China[J]. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 2008, 18(2): 135-137
- [13] Yuan LX, Zhu YY, Lin ZQ, et al. A novel selenocystine-accumulating plant in selenium-mine drainage area in Enshi, China[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65615
- [14] Pickering IJ, Wright C, Bubner B, et al. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(3): 1460-1467
- [15] Freeman JL, Tamaoki M, Stushnoff C, et al. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1630-1652
- [16] Stolz JF, Basu P, Oremland RS. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium[J]. *International Microbiology*, 2002, 5(4): 201-207
- [17] Stolz JF, Basu P, Santini JM, et al. Arsenic and selenium in microbial metabolism[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2006, 60(1): 107-130
- [18] Turner RJ, Weiner JH, Taylor DE. Selenium metabolism in *Escherichia coli*[J]. *BioMetals*, 1998, 11(3): 223-227
- [19] Liu Y, Yan CN, Song ZH, et al. Thermochemical studies of selenium—IV. Microcalorimetric study of the inhibiting action of Na_2SeO_3 on growth metabolism of microbes[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 1998, 15(1): 29-32 (in Chinese)
刘义, 颜承农, 宋昭华, 等. 硒的热化学研究—IV. 微量热法研究 Na_2SeO_3 对微生物生长代谢的抑制[J]. *应用化学*, 1998, 15(1): 29-32
- [20] Wang DL. Study on selenium transformation of photosynthetic bacteria[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2007 (in Chinese)
王东亮. 光合细菌硒转化的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2007
- [21] Liu XY. The research on the effect of selenium-enrich antistaling agent on Navel Orange[J]. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)*, 2011, 34(4): 565-568 (in Chinese)
刘兴艳. 富硒功能保鲜剂在脐橙上的富硒效果研究[J]. *四川师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(4): 565-568
- [22] Li X, Liu Y, Peng YS, et al. Microcalorimetric study of the antibacterial action of four kinds of α -amino dialkyl phosphonate ester containing selenomorpholine[J]. *Journal of Wuhan University of Technology*, 2001, 23(11): 4-7 (in Chinese)
李曦, 刘义, 彭云山, 等. 含硒的膦酸酯化合物抑菌作用的微量热研究[J]. *武汉理工大学学报*, 2001, 23(11): 4-7
- [23] Oremland RS, Herbel MJ, Blum JS, et al. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 52-60
- [24] Ghosh A, Mohod AM, Paknikar KM, et al. Isolation and characterization of selenite- and selenate-tolerant microorganisms from selenium-contaminated sites[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(8): 1607-1611
- [25] Li ZG, Luo YM, Teng Y. The Research Method of Soil and Environmental Microorganism[M]. Beijing: Science Press, 2008: 52-61 (in Chinese)
李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 52-61
- [26] Sura-de Jong M, Reynolds RJ, Richterova K, et al. Selenium hyperaccumulators harbor a diverse endophytic bacterial community characterized by high selenium resistance and plant growth promoting properties[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 113
- [27] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification System Hand[M]. Beijing: Science Press, 2001: 267-295 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 267-295
- [28] Losi ME, Frankenberger WT. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 3079-3084
- [29] Dungan RS, Yates SR, Frankenberger Jr WT. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(4): 287-295
- [30] Kessi J, Hanselmann KW. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49): 50662-50669
- [31] Oremland RS, Hollibaugh JT, Maest AS, et al. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(9): 2333-2343
- [32] Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, et al. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(11): 4734-4740
- [33] Roux M, Sarret G, Pignot-Paintrand I, et al. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2): 769-773
- [34] van Fleet-Stalder V, Chasteen TG, Pickering IJ, et al. Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4849-4853
- [35] Wang DL, Xiao M, Qian W, et al. Progress in research of the product of the red elemental selenium reduced from selenium oxyanions by bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 554-557 (in Chinese)
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
- [36] Staicu LC, Ackerson CJ, Cornelis P, et al. *Pseudomonas moraviensis* subsp. *stanleyae*, a bacterial endophyte of hyperaccumulator *Stanleya pinnata*, is capable of efficient selenite reduction to elemental selenium under aerobic conditions[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 119(2): 400-410
- [37] Li WC, Ye ZH, Wong MH. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-Hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(15/16): 4173-4182
- [38] Abou-Shanab RAI, van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(2): 360-367
- [39] Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.)[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(2): 241-250