

# 地衣芽孢杆菌对亚硒酸盐的还原

朱建明<sup>1</sup>, 雷磊<sup>1,2</sup>, 肖湘<sup>3</sup>, 袁永强<sup>1,2</sup>, 秦海波<sup>1,2</sup>, 苏惠<sup>4</sup>

1. 中国科学院地球化学研究所, 环境地球化学国家重点实验室, 贵阳 550002; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005; 4. 湖北省恩施自治州疾病预防控制中心, 湖北恩施 445000

**摘要:**利用高硒碳质泥岩中筛选出的地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 研究了该菌对亚硒酸盐硒的耐受与还原行为。结果表明, 液体培养基(YEG)中, 它能耐受 320 mM 亚硒酸盐硒的浓度, 耐受硒酸盐硒的浓度可高达 1000 mM。然而, 高浓度的亚硒酸盐硒对它的生长有明显的抑制作用。在有氧和厌氧的环境中, 地衣芽孢杆菌均能还原亚硒酸盐中的硒: 将四价硒还原为纳米球状的元素硒颗粒, 使其分布在菌体的周边和细胞内。在含 5 mM 亚硒酸钠的液体培养基中, 还原亚硒酸钠硒成为元素硒的平均效率约为 42%。地衣芽孢杆菌在生存环境无严格要求的条件下, 其还原亚硒酸盐硒形成纳米元素硒颗粒的现象, 是研究生物合成低毒的纳米活性元素硒和生物修复硒污染技术的基础, 也为硒的微生物矿化过程提供了契机。

**关键词:**地衣芽孢杆菌; 亚硒酸盐硒的还原; 元素硒

**中图分类号:**P593 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-2802(2011)03-0245-06

## The Reduction of Selenite by *Bacillus licheniformis*

ZHU Jian-ming<sup>1</sup>, LEI Lei<sup>1,2</sup>, XIAO Xiang<sup>3</sup>, YUAN Yong-qiang<sup>1,2</sup>, QIN Hai-bo<sup>1,2</sup>, SU Hui<sup>4</sup>

1. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences,

Guiyang 550002, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 4. Center for Disease Control and Prevention of Enshi Prefecture, Enshi, Hubei 445000, China

**Abstract:** *Bacillus Licheniformis*, which can reduce the toxic selenite anion to red elemental selenium ( $\text{Se}^0$ ), was isolated from a carbonaceous mudstone with high content of Se. The results showed that this strain can stand in 320 mM  $\text{SeO}_3^{2-}$  and in more than 1000 mM  $\text{SeO}_4^{2-}$ . However, the high concentration of  $\text{SeO}_3^{2-}$  can inhibit the growth of the strain in liquid medium (YEG). No matter in aerobic culture or anaerobic culture that the strain was inoculated, it can reduce selenite anion to nanospheric elemental selenium granules, distributed around or within the cells. In the liquid YEG medium contains 5mM of selenite, the transformed efficiency of  $\text{Se}^{4+}$  to  $\text{Se}^0$  by *Bacillus licheniformis* was 42% approximately. Since no rigorous requirement for *Bacillus licheniformis* to live, it is suitable to be selected in microbial remediation techniques as the strains that cope with selenium pollutions, and to produce the nano-Se granules with bioavailability. At the same time, the phenomena of selenite anions reduced to elemental Se by the bacterial provides a chance to further understand the microbial mineralization of selenium in the environment.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*; reduction of selenite; elemental selenium

硒是人体和动物必需的一种微量元素。硒在自然界中主要以 4 种价态存在, 即  $\text{Se}^{2-}$ 、 $\text{Se}^0$ 、 $\text{Se}^{4+}$  (本

文中以亚硒酸钠代表亚硒酸盐硒)和  $\text{Se}^{6+}$  (以硒酸钠代表硒酸盐硒)<sup>[1,2]</sup>。其中, 硒酸盐容易发生迁

收稿日期: 2011-01-10 收到, 04-12 改回

资助项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-JC101); 国家自然科学基金创新群体项目(40721002, 40973085); 矿床地球化学国家重点实验室开放项目资助项目(200912)

第一作者简介: 朱建明(1969—), 男, 研究员, 从事环境、微生物与非传统同位素的地球化学研究。E-mail: zhujianming@vip.gyig.ac.cn.

移,易被生物利用;亚硒酸盐较其他价态硒有更强的毒性<sup>[1~6]</sup>。微生物在硒的生物地球化学循环及其形态转化中发挥了重要作用<sup>[3~6]</sup>。微生物可将毒性较高的亚硒酸盐、硒酸盐还原为毒性较低的元素态硒,或同化还原合成硒蛋白、含硒蛋白,甲基化为具高挥发性的二甲基硒(DMSe)等<sup>[3~6]</sup>。一些细菌也能在还原硒酸盐、亚硒酸盐的过程中获取能量,同时把氧化态的高价硒转化为低价态的 $Se^0$ 和 $Se^{2-}$ ,降低硒的毒性,以便能在高硒环境中生长<sup>[3~6]</sup>。

以往的研究发现,可以进行硒异化还原作用的微生物遍及整个微生物界,而不仅仅是原核生物中的特定类群<sup>[3,4]</sup>。代表的微生物有嗜热细菌(*thermophilic bacteria*)、高和低G+C(low and high G+C)含量细菌、革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria)、变形菌(*Proteobacteria*)以及光合型的微生物—紫细菌(*purple bacteria*)等<sup>[3,4]</sup>。这些微生物在生理学特性上具有较大差异,呈现多样性。目前已从土壤中分离出119种放线菌和60种细菌能与硒酸根或亚硒酸根作用形成元素硒<sup>[3,4,7]</sup>。比较典型有大肠杆菌(*Escherichia coli*)<sup>[8]</sup>、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)<sup>[9]</sup>、罗斯通氏菌CH34(*Ralstonia metallidurans* CH34)<sup>[10]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等<sup>[11]</sup>。鉴于以往的研究多是从富硒的环境中筛选与分离细菌<sup>[3~7,12]</sup>,且特异的环境中必生长有特定的微生物群落,在我们前期调查湖北恩施渔塘坝特高硒碳质泥岩(硒含量大于500 mg/kg)中微生物多样性的基础上,选定兼性厌氧细菌——地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)为研究对象,调查其对硒酸盐、亚硒酸盐耐受性的同时,也研究其产物中元素硒的特征。该研究对硒的微生物地球化学过程及其矿化认识有一定的指导意义,同时为纳米活性元素硒颗粒的制备和硒污染的生物修复技术提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集

本研究中的高硒碳质泥岩于2007年和2008年8月采自湖北省恩施市双河乡渔塘坝北部二叠系茅口组顶部的碳质硅质岩层,有关该研究区的地理与地质特征可参阅文献<sup>[13,14]</sup>。采样时使用一次性无菌采样器,刮去表层泥岩,垂直采取泥岩芯体,并在同一位点重复取样。采集的样品低温保存并在24 h内运回实验室置于超低温冰箱内冷冻保存。

### 1.2 地衣芽孢杆菌的筛选、分离与鉴定

泥岩样品在无菌条件下分装,取约1 g样品于

100 mL 无菌 MilliQ(MQ)水中分散,在培养箱中震荡混合均匀后分取1 mL混合清液均匀涂抹在几个含10~100 mg/kg四价硒(本文中以亚硒酸钠硒代表可溶的亚硒酸盐硒)的平板固体(主成份是酵母膏+葡萄糖,本文中简称 YEG 培养基)培养基上,在超净台静置3 d,观察到出现周边红色或发红的菌落,使用灭菌牙签挑取后转移置含不同4价硒浓度的平板固体培养基上,反复纯化确保单一的菌落后转移置含4价硒(100 mg/kg)的液体 YEG 培养基中,在生长3 h后开始在不同时间段取样,并在显微镜和透射电镜下观察细菌的形貌特征。

除观察细菌的显微形貌外,采用分子生物学的方法进行鉴定。基本流程是:先进行菌体DNA的提取和纯化,使用上海生工生物工程技术有限公司合成的两对16S rDNA部分片段 Eubac27F:(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')、Eubac1492R:(5'-GGT TAC CTTGTT ACG ACT T-3')作为通用引物,进行PCR扩增。PCR条件为95℃变性1 min,60℃复性40 s,72℃延伸100 s,共35个循环,最后在72℃再延伸10 min。PCR扩增产物纯化后克隆到pMD-18T质粒中,然后导入*E. coli* DH5 $\alpha$ ,由上海英骏生物技术有限公司完成测序。将所测的16S rDNA序列提交EMBL和GenBank数据库(登录号EF656455),采用FASTA和Blast程序,进行序列相似性对比分析(相似性大于99%),确定该菌株是地衣芽孢杆菌。

### 1.3 地衣芽孢杆菌的计数与电镜观察

细菌的计数主要使用细胞计数板测量培养液中的菌体数量,同时进行吸光度的测定。透射电镜观察时先进行培养液中菌体的离心分离,使用无菌MQ水洗涤和不同浓度(75%、50%、25%、10%)的戊二醇脱水后进行样品的包埋、固化和切片,测试时样品载在400目铜网。同时对脱水后的样品在无水酒精中分散,用铜网捞取后在灯下烘干。透射电镜为国家海洋局第三海洋研究所的JEM-100CXII和中国科学院地球化学研究所的JEM-2000FXII(EDX:元素B~U)。

### 1.4 硒浓度的测定

所有样品中硒的测定使用氢化物-原子荧光法(HG-AFS)。岩石样品研磨至160目以上的0.1 g干燥粉末样,放入特富龙密闭消解罐中,加入3.2 mL HNO<sub>3</sub>+HF的混合消解液,拧紧后放入150~155℃烘箱恒温加热16 h。冷却后谨慎打开消解罐,补加1~2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,在90℃下盖盖加热45 min后取下冷却,转移至15 mL PFA杯中,于70℃

的电热板上蒸至近干补加 0.5 mL HNO<sub>3</sub> 二次驱氟并蒸至近干后用 6 mol/L HCL 定容至 3 mL, 然后转移到 25 mL 的比色管中于 95 °C 下水浴 45 min, 稀释至 25 mL 待测<sup>[2]</sup>。本研究中筛选细菌的泥岩样品中硒含量均为 200~10000 mg/kg。

取含菌体的培养液快速离心后的上清液 0.1 mL, 加入 0.1 mL 硝酸混合液并静置一段时间, 使用 MQ 水逐级稀释(1:100)稀释, 待合适浓度直接使用 0.72 M (6%) 的 HCL 稀释后上机待测。YEG 培养基中加入亚硒酸钠硒的初始量为 5、10、25 mM。细菌耐硒实验中加入亚硒酸钠和硒酸钠硒的量均是 100~1000 mM。

## 2 结果与讨论

### 2.1 地衣芽孢杆菌对硒的耐受性实验

将该菌划线于含有亚硒酸盐、硒酸盐不同浓度梯度的 YEG 平板固体培养基上, 恒温培养后观察地衣芽孢杆菌生长的菌落形态, 并统计平板上菌落的大小。菌落特征一般是表面湿润, 光滑, 边缘有不规则状开裂; 含硒平板均有红色物质析出, 与无硒平板对照, 证实红色物质应是菌株的代谢产物, 扫描电镜能谱可鉴定为元素硒颗粒(图 1)。菌落直径随四价硒浓度的升高逐渐变小, 菌落数量也减少, 当硒浓度超过 320 mM 时进入显著降低阶段, 硒浓度在 600 mM 时细菌停止了生长。奇怪的是, 当六价硒浓度由 0 mM 逐渐升高到 25 mM 时菌落直径随之逐渐增大, 但当六价硒浓度高于 25 mM 时菌落直径随之逐渐减小, 硒浓度直至 1000 mM 时仍有菌落的生长, 但菌落大小和数量明显减少。这一结果表明, 低浓度的硒酸盐硒对该菌株的生长有促进作用, 并且当浓度为 25 mM 时菌落直径达到最大, 高浓度的硒酸盐硒也会抑制菌株的生长。这说明地衣芽孢杆菌菌株对亚硒酸盐硒和硒酸盐硒耐受程度是存在差异的。目前已发现的菌株能够耐受亚硒酸盐硒的浓度多在 100 mM 以下, 100~200 mM 的只有少量报道<sup>[12]</sup>, 如国内王东亮等发现的一种固氮红细菌(*Rhodobacter azotiformans*), 其耐受亚硒酸盐硒的最高浓度 125 mM<sup>[15]</sup>。在我们研究中发现的地衣芽孢杆菌, 其在平板培养基中最高耐受亚硒酸盐硒的浓度约为 600 mM, 但在含 320 mM 亚硒酸盐硒的液体培养基中也能生长, 这足以证明其抵抗亚硒酸盐硒的毒性是非常强的。

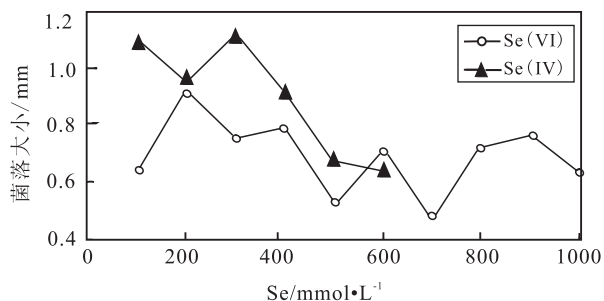
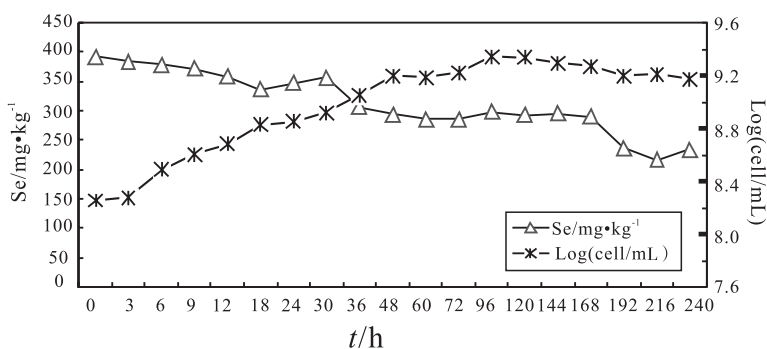


图 1 地衣芽孢杆菌对亚硒酸盐与硒酸盐硒的耐受性  
Fig. 1 The Effects of selenite (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and selenate (SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) on the growth of *Bacillus Licheniformis*

地衣芽孢杆菌是一类能产生内生孢子(芽孢)的细菌, 常见于土壤中; 它也是一种嗜热的革兰氏阳性菌, 其适生温度大约为 50 °C, 酶分泌的最适温度为 37 °C, 可以以芽孢形式存在抵抗恶劣环境, 在适宜环境下生长。目前主要通过培养地衣芽孢杆菌获取能用于洗衣粉添加剂的蛋白酶, 或者作为动物饲料添加剂或肠道微生物制剂等。从人身安全和硒污染的生物修复角度上, 我们在高硒碳质泥岩中筛选的地衣芽孢杆菌有可能成为硒污染生物修复技术中的首选菌株之一。

### 2.2 地衣芽孢杆菌对亚硒酸盐硒的还原

在暴露光和氧的条件下, 地衣芽孢杆菌能在含硒酸钠的平板固体培养基代谢形成红色的元素硒颗粒, 但在兼性厌氧的液体培养基中并不出现硒酸钠中硒的还原。反之, 该菌无论在含亚硒酸钠(代表亚硒酸盐硒)的平板固体, 还是液体培养基中生长时, 均有四价硒的还原, 并以出现红色的元素硒颗粒为特征。图 2 显示了该菌株接入含 5 mM 亚硒酸钠的液体培养基中, 于 37 °C 150 rpm 摇床培养并定时取样得到的菌株生长曲线。从生长曲线可以看出, 含



初始浓度为 5 mM 硒  
The initial concentration is 5 mM selenite  
图 2 亚硒酸钠的还原与细菌细胞数的变化  
Fig. 2 The reduction of selenite (SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and the variation of bacterial cell count

亚硒酸钠培养基中菌株的生长状况比不含硒的培养基中菌株生长状况稍微有些滞后(该数据未在图中显示),前者在生长前的 6 h 内对菌株生长有明显的抑制作用,而菌株的生长在 6 h 之后开始加快。培养基中的硒浓度也开始逐渐降低,在菌株生长 24 h 后硒浓度显著降低。这表明该菌株对硒的还原主要发生在生长的稳定期,其体内有可能形成了某种解毒的机制,使菌株生长不再受到抑制。按 5 mM 亚硒酸钠培养基中硒浓度的变化,可以估算出地衣芽孢杆菌对亚硒酸钠中四价硒的平均还原效率约为 42%。

利用下面公式可分别计算得到该菌株的倍增时间(DT)、生长速率(GR)和生长抑制指数(% ,GI)。

$$DT(h) = \frac{\log 2}{GR},$$

$$GR(H^{-1}) = \frac{d\{\log(OD)\}}{dT},$$

$$GI(\%) = \frac{\Delta \log(OD_{600(\text{control})}) - \Delta \log(OD_{600(\text{test})})}{\Delta \log(OD_{600(\text{control})})} \times 100\%.$$

以添加 20 mM 的亚硒酸钠、硒酸钠为例。在不添加亚硒酸钠的培养基中该菌生长较快,倍增时间短,为 1.72 h,生长速率是  $0.18 \text{ h}^{-1}$ ;而在添加了亚硒酸钠和硒酸钠的培养基中,倍增时间分别为 2.70 h 和 1.86 h;生长速率为  $0.16 \text{ h}^{-1}$  和  $0.11 \text{ h}^{-1}$ ;生长抑制指数为 92.8% 和 80.0%。这表明在添加高浓度硒的培养基中,细菌生长受到了不同程度的抑制,且在添加亚硒酸钠培养基中的生长明显慢于添加硒酸钠培养基内的生长,也证实了亚硒酸盐硒对该菌的毒性强于硒酸盐硒。

菌株在含有亚硒酸钠的液体培养基中出现了较长的延滞期,而在含硒酸钠液体培养基中生长的菌株并没有这一现象,仅相对于不添加硒的培养基中菌株生长速率较慢。这说明菌株对亚硒酸钠、硒酸钠中四价硒、六价硒的反应机制或代谢途径是不同的。细菌对高价态硒的耐受机制通常表现为同化还原作用合成硒蛋白或含硒蛋白,异化还原(呼吸作用)作用( $\text{Se}^{6+}/\text{Se}^{4+} \rightarrow \text{Se}^0$ )过程中获取生长的能量或者使硒甲基化降低周围环境中的硒;这些生化反应过程的完成与细菌基因表达的不同酶系统息息相关<sup>[3,4,6]</sup>。该菌在未加入含亚硒酸钠的液体培养基之前,对亚硒酸钠的还原能力较低,很可能菌株在生长在不含亚硒酸钠的培养基中时,不表达亚硒酸盐还原酶或表达量较低,因此菌株的亚硒酸盐还原酶为诱导表达型酶类;而菌株在生长在不含硒酸盐的

培养基中时,也表达了对硒酸盐有还原能力的酶类,硒酸盐对于这种酶原本的底物有竞争性抑制作用。基于现有实验室的条件,这部分工作将在后续的工作中进一步完成。

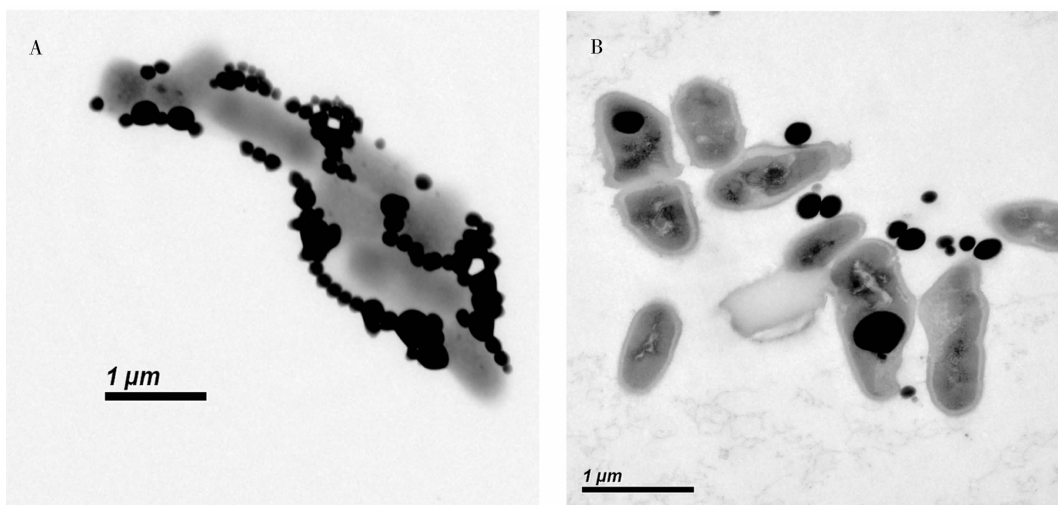
本研究中获取的菌株能够在高浓度的亚硒酸盐培养基中生长(大于或等于 320 mM),仅经过较短时间(24 h)延滞期后就能高效的还原亚硒酸盐。因此这一发现对于高硒污染的土壤及水体都可以起到生物修复的作用,高效的将具有毒性和高生物可利用性的硒氧化物还原为无毒不可溶于水的红色单质硒纳米颗粒,从而降低生物毒害。

### 2.3 元素硒在地衣芽孢杆菌中的分布

在含 5~25 mM 亚硒酸盐硒的 YEG 液体培养基中,该菌生长 3 h 以后培养基颜色转红,硒浓度越高红色越深,表明有元素硒的形成。图 3A 和图 3B 显示了元素硒在菌液中的分布。图 4 是以能谱证明培养基中沉降的颗粒物为元素硒。该菌还原亚硒酸盐硒形成的元素硒初始时主要在分布在菌体的周边,包裹着菌体,尔后随菌体的分解进入培养基中。细菌体内也有元素硒的形成,但明显不同于其他细菌周质空间的元素硒<sup>[16,17]</sup>,而是分布在菌体内部;这表明 4 价硒在细菌的胞内可被还原。该菌形成元素硒的颗粒一般为无定型、球状,大小 20~100 nm,部分颗粒因发生团聚作用而形成不规则的团聚体,在低倍显微镜下即可观察。

细菌形成的元素硒颗粒均可附着积累于细胞质、周质空间和细菌表面。硒的这一异化还原作用可能有多个途径,但对于细胞外的元素硒是通过细胞裂解而逸出,还是通过细胞膜上整合的还原酶及膜上的转运通道将其泵出细胞外尚无定论。不过,从微生物成矿机制和元素硒在地衣芽孢杆菌中的分布特征来看,该菌形成的元素硒颗粒大小相对均一,球状特征明显,应该属于菌体内部形成后泵出胞外的,可能为细菌诱导型的产物<sup>[18]</sup>,这也是除个别畸变菌体外,在正常生长的细菌体内元素硒颗粒在透射电镜下较难发现的一个原因。

Oremland 等<sup>[18]</sup>利用三种系统发育和生理学上不同的细菌合成了胞外元素硒。这些元素硒在胞外形成稳定、均一的具单斜晶系结构的纳米硒颗粒。收集清洗后获得的纯化胞外纳米颗粒在光学性质上有很大的不同,具独特的硒原子排列结构,不能通过目前化学合成的方法得到的。我们采集到的元素硒颗粒在形貌上与 Oremland<sup>[18]</sup>使用细菌合成的硒颗粒非常相似,但在 TEM 下没有观察到选区衍射的花样,说明合成的元素硒颗粒不具晶体结构,但在光



透射电镜照片

TEM photos

图3 元素硒颗粒在细菌中的分布

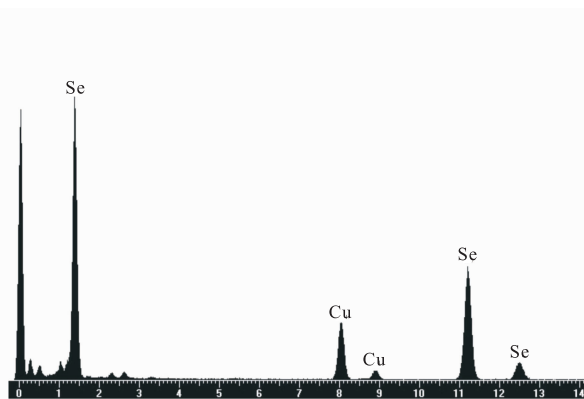
Fig. 3 The distribution of elemental selenium particles formed by *Bacillus Licheniformis* strains

图4 元素硒颗粒的能谱图(keV)

Fig. 4 EDX analysis of elemental selenium particles formed by *Bacillus Licheniformis* strains(keV)

照下能产生移动,明显有别于细菌的运动,并在37℃下能缓慢转化为灰色的元素硒,表明其物理性质有一定的不稳定性。

生物方法制备的纳米元素硒颗粒大小一般为5~200 nm<sup>[15,18]</sup>,具与亚硒酸盐硒的类似生物活性,但毒性远小于亚硒酸盐中的四价硒离子。具生物活性的纳米硒颗粒已在实验中用于畜禽的饲料添加剂,而地衣芽孢杆菌本身被广泛用于畜禽饲料的添加剂。因此,地衣芽孢杆菌在富硒食品和医药的开发应用方面极具潜在价值,同时对微生物的矿化机制认识方面也有一定的启迪。

### 3 结 论

微生物在硒的生物地球化学循环和形态转化中发挥着重要作用,现今发现的许多微生物均能还原四价硒、六价硒,它们对其他有毒金属元素也有显著的抵抗力,地衣芽孢杆菌也不例外。本研究中使用从高硒碳质泥岩中筛选出的地衣芽孢杆菌,重点探讨了它对亚硒酸盐硒的还原能力。研究发现,地衣芽孢杆菌能在高浓度的亚硒酸盐环境中生长,对液体培养基中亚硒酸钠的耐受至少为320 mM,对硒酸盐钠的耐受则可达1000 mM。该菌具有较强的环境适应性,无论在有氧和厌氧的环境下,都会将亚硒酸钠中的四价硒还原为10~100 nm球状的元素硒颗粒,并分布在菌体的周围或细胞内。同时,高浓度的亚硒酸钠对细菌的生长也有明显的抑制作用。在含5 mM亚硒酸钠的兼性厌氧液体培养基中,该菌把亚硒酸钠中四价硒还原为元素硒的平均效率约为42%,类似于其他能还原亚硒酸盐硒为元素硒的效率。由于地衣芽孢杆菌是一种有益的细菌,且具有较强的环境适应性,还可以作为畜禽饲料的添加剂,这对利用该菌开发低毒性活性元素硒的医药或饲料添加剂有一定的潜在价值。同时,在硒污染的生物修复技术方面也可以回收细菌合成的元素硒,以做到资源的综合利用。此外,该菌株把四价硒转化为元素硒的过程,从地质微生物学的角度理解,本身就是硒的生物矿化过程,对深入理解硒的微生物地球化学过程及其矿化机制有着极其重要的意义。

**致 谢:**感谢在实验过程中得到国家海洋局第三海洋研究所王凤平研究员及其课题组成员、谷力助理研究员在透射电镜实验中的指导;文章撰稿和修改过程中得到中国科学院地球化学研究所连宾研究员的帮助,谨此致谢。

### 参考文献 (References):

- [1] Frankenberger W T J, Benson S. Selenium in environment [M]. New York: Marcel Dekker, 1994: 1—416.
- [2] 朱建明, 秦海波, 李璐, 魏中青, 雷磊, 苏宏灿. 高硒环境样品中硒的形态分析方法[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2007, 26(3): 209—213.  
Zhu Jianming, Qin Haibo, Li Lu, Wei Zhongqing, Lei Lei, Su Hongcan. The method for analyzing state of selenium in Se-rich environmental samples [J]. Bulletin of Mineralogy, Petrology and Geochemistry, 2007, 26(3): 209—213. (in Chinese with English abstract)
- [3] Stolz J F, Oremland R S. Bacterial respiration of arsenic and selenium [J]. FEMS Microbiology Review, 1999, 23: 615—627.
- [4] Stolz J F, Basu P, Santin J M, Oremland R S. Arsenic and selenium in microbial metabolism [J]. Anu. Rev. Microbiol., 2006, 60: 107—130.
- [5] 雷磊, 朱建明, 秦海波, 苏惠, 冯新斌. 硒的微生物地球化学研究进展[J]. 地球与环境, 2011, 待刊.  
Lei Lei, Zhu Jianming, Qin Haibo, Su Hui, Feng Xinbin. Progress in microbial geochemistry of selenium in the environment [J]. Earth and Environment, 2011. (in press). (in Chinese with English abstract)
- [6] Dungan R S, Frankenberger W T J. Microbial transformation of selenium and the bioremediation of seleniferous environments[J]. Bioremediation J., 1999, 3(3): 171—188.
- [7] Doran J W. Microorganisms and the biological cycling of selenium[J]. Advanced in Microbial Ecology, 1982, 6: 1—31.
- [8] Turner R J, Weiner J H, Taylor D E. Selenium metabolism in *Escherichia coli*[J]. Biometals, 1998, 11: 223—227.
- [9] 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*[J]. Microbiology, 2006, 152: 731—743.
- [10] Roux M, Sarret G, Pignot-Paintrand I, Fontecave M, Coves J. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34[J]. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67: 769—773.
- [11] Garbisu C, Carlson D, Adamkiewicz M, Yee B C, Wong J H, Resto E, Leighton T, Buchanan B B. Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress[J]. Biofactor, 1999, 10: 311—319.
- [12] Hunter W J, Kuykendall L D. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Rhizobium* sp. strain B1[J]. Curr. Microbiol., 2007, 55: 344—349.
- [13] 朱建明, 李社红, 左维, Sykorova I, 苏宏灿, 郑宝山, Pesek J. 恩施渔塘坝富硒碳质岩中硒的赋存状态[J]. 地球化学, 2004, 33(6): 634—640.  
Zhu Jianming, Li Shehong, Zuo Wei, Sykorova I, Su Hongcan, Zheng Baoshan, Pesek J. The modes of occurrence of selenium in Se-rich carbonaceous rocks of Yutangba [J]. Geochemica, 2004, 33(6): 634—640. (in Chinese with English abstract)
- [14] Zhu J M, Wang N, Li S H, Li L, Su H C. Distribution and transport of selenium in Yutangba China: Impact of human activities [J]. Sci. Total. Environ. 2008, 392: 252—261.
- [15] 王东亮, 肖敏, 钱卫, 韩波. 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[J]. 微生物学报, 47(1): 44—47.  
Wang Dongliang, Xiao Min, Qian Wei, Han Bo. Screening and identification of a photosynthetic bacterium reducing selenite to red elemental selenium [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(1): 44—47. (in Chinese with English abstract)
- [16] Van Fleet-Stalder, Chasteen T G, Pickering I J, George G N, Prince R C. Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2000, 66: 4849—4853.
- [17] Garbisu C, Ishii T, Leighton T, Buchanan B B. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium [J]. Chem. Geol., 1996, 132: 199—204.
- [18] Oremland R S, Herbel M J. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(1): 52—60.