

芽孢杆菌 HBS4 还原亚硒酸钠为单质硒的实验研究

李瑞萍, 鲁安怀, 郝瑞霞, 马黠静, 吕 明, 鲁志强

(北京大学 地球与空间科学学院, 北京 100871)

摘 要: 利用从油藏中分离的芽孢杆菌 HBS4 在兼性厌氧情况下作用于剧毒物质亚硒酸钠, 36 h 后 1~ 11 mM 的样品中均出现了大量红色颗粒沉淀物。生物显微镜观察发现, 在很多细菌内部出现一颗到多颗红色的圆形颗粒, 排列方式有单链、双链、弧线和无规则排列, 并且在细胞周围释放出有游离态的红色颗粒。XPS 测试红色沉淀物发现四价硒全部还原为零价硒。实验还发现添加葡萄糖对单质硒的产量有很大的促进作用。

关键词: 微生物; 芽孢杆菌 HBS4; 亚硒酸钠; 单质硒; 生物缓毒

中图分类号: Q939. 1; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000- 6524 (2005) 06- 0598- 05

Sodium selenite reduction to elemental selenium by *Bacillus* HBS4

LI Rui_ping, LU An_huai, HAO Rui_xia, MA Xia_jing, LU Ming and LU Zhi_qiang

(School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The experiments in this paper employed the strains of *Bacillus* HBS4 isolated from oil reservoir. By growing in the facultative aerobic condition the cells acted on selenite. After 36 hours, all the samples with sodium selenite radical from 1mM up to 11mM produced many red deposits. Under biomicroscope the authors found one or more red round intracellular deposits in the cell with free floating deposits outside the cell. Intracellular organization of deposits includes one or two regular chains, curve or irregular in form. The XPS patterns of the deposits show that the sodium selenite has been exclusively reduced to elemental selenium. Furthermore, glucose in the culture media can impact greatly the quantity of the deposits of the reduced elemental selenium.

Key words: microorganism; *Bacillus* HBS4; sodium selenite; elemental selenium; biot detoxification

硒(selenium, Se)元素,于1817年由瑞典科学家 Berzelium 首先发现,1957年美国科学家 Schuar 首次证实了硒是动物体内必需的微量元素(赵凤泽等,2001)。硒是体内重要的过氧化物酶-谷胱甘肽过氧化酶的组成部分,它在抗氧化防御体系、免疫细胞功能、甲状腺激素功能等方面都有一定的作用(刘进国等,2003)。但是硒在体内的安全阈值很窄,如果食物中含硒量低于 0.05 mg/kg,就会缺硒;大于 5 mg/kg,就可能出现中毒;0.1~ 1 mg/kg 属于正常范围(利锋等,2004)。

硒污染在中国具有局部性和职业性,大部分地区都处于贫硒的地带,因此对于硒缺乏与人体健康的危害研究颇多(刘晓亮等,1994;杨志伟等,1994;侯少范等,1994;蒋守群,2000)。通过生物进行硒的转化为获取有机硒提供一条简便经济的途径,有利于实际生产中大量应用(李家奎等,2002)。人们已应用多种植物或微生物作为硒的生物有机载体进行

含硒活性物质的研究和开发,已报道的有富硒的酵母、大蒜、菇类、麦芽、茶、螺旋藻等(黄峙等,2003)。

利用细菌可以形成纳米尺度的红色单质元素硒,与有机硒和无机硒相比,纳米硒有较强的高效高安全优势。在急性毒性(LD50)标准方面,无机硒为 15 mg/kg,有机硒为 30~ 40 mg/kg,纳米硒则为 113 mg/kg。在亚慢性毒性方面,饲料中无机硒或有机硒的含量在 4~ 5 mg/kg 时,即可导致大鼠体重下降和肝硬化。而纳米硒含量在 6 mg/kg 时,也不发生上述现象。在生物功效方面,纳米硒体外清除羟基自由基效率为无机硒的 5 倍,为有机硒的 2.5 倍(天天硒网网站)。

我国大多学者集中于研究利用植物和藻类进行有机硒的转化,而利用细菌进行硒的转化研究很少,对作用细胞的形态学研究更未见报道。

收稿日期: 2005-05-25; 修订日期: 2005-08-29

基金项目: 国家重大基础研究前期研究专项资助项目(2001CCA02400)

作者简介: 李瑞萍(1980-),女,硕士研究生,材料及环境矿物学研究方向;联系作者:鲁安怀, E-mail: ahlh@pku.edu.cn。

1 实验材料与方法

1.1 培养基

实验用培养基基本采用细菌的富集培养基(EM 培养基),实验室配制后灭菌。培养基具体成分如下:EM 液体培养基(NaNO_3 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, NaCl 5.0 g, NH_4Cl 0.1 g, K_2HPO_4 2.7 g, 蛋白胨 3.0 g, 牛肉浸膏 1.0 g, 酵母浸膏 0.5 g, 葡萄糖 3.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, $\text{pH}=7.2$) (郝瑞霞等, 2002), EM 固体培养基(培养基在液体基础上每 1 000 mL 添加 15 g 琼脂), EM2($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.010 g, K_2HPO_4 2.7 g, 牛肉浸膏 1.0 g, 蛋白胨 3.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, $\text{pH}=7.2$)。

1.2 实验培养、灭菌条件

细菌 HBS4 生长最适温度为 32~48℃, 本文实验采用 35℃。细菌的平板和斜面在 35℃ 生化培养箱中培养。液体样品在气浴振荡箱中 35℃、120 r/min 振荡培养。

实验采用高压蒸汽灭菌锅 0.1 MPa、121℃ 灭菌, 器皿灭菌 30 min, 培养基灭菌 20 min。亚硒酸钠置于超净工作台内紫外灭菌 30 min 以上。

1.3 细菌形态、生理生化特征

本文实验所采用的菌株 HBS4 为油藏中分离出的芽孢杆菌, 此菌株为运动的革兰氏阳性杆菌, 细胞中产生终生到亚端生的椭圆状芽孢, 鞭毛均为侧生。菌落呈乳白色, 粘稠。最适生长温度为 32~48℃, 最高生长温度为 58℃。在 pH 值为 5.5~8.5 时生长良好, 在 7% NaCl 的溶液中也生长 (郝瑞霞等, 2002)。

1.4 生长特征分析

实验采用 S₁ 和 S₂ 两个样品, 在装有 100 mL EM 液体培养基的三角瓶中分别加入灭菌的亚硒酸钠 0.017 3 g (1 mM)、0.069 g (4 mM), 之后接入连续两次划平板培养 24 h 的细菌 HBS4, 在气浴振荡培养箱 35℃、120 r/min 振荡培养 72 h。每 3 h 取一次样测其 OD、 pH 以及 Eh 值。采用紫外-可见光分光光度计 (HP Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy) 在 420 nm 测定菌液的 OD 值, 并利用 PHSJ-4A 酸度计测定细菌生长过程中菌液的 pH 值和 Eh 值的变化。

1.5 产物的测定

利用高速台式离心机在 25℃、10 000 r/min 的情况下对反应后产生沉淀的菌液进行离心, 干燥器里自然风干后, 利用 XPS 对其进行成分测定。

1.6 形态特征观察

利用 Nikon Elipse E600 生物光学显微镜对未染色的活体进行观察, 并用 Nikon Coolpix 990 数码相机 3.34MEGA PIXELS, 利用最大放大倍数 4 倍进行拍照。照片总放大倍数: 10 (目镜) \times 100 (油镜) \times 4 (相机) = 4 000 倍。剪切图经调整处理再进行 1~2 倍的放大。

1.7 细菌对亚硒酸盐的还原实验方法

为保证细菌充分活化, 缩短生长延迟时间, 把细菌划在

EM 固体培养基平板上, 在 35℃ 恒温培养箱中培养 24 h。之后再一次划平板置于 35℃ 在恒温培养箱中培养 24 h。这样培养基能够提供充足的能量和必需的生长因子, 可避免细菌老化, 使其具有较高的活性。为了考查细菌 HBS4 对亚硒酸盐的作用, 实验针对 1~11 mM 不同浓度的亚硒酸盐在兼性厌氧情况下进行了对比实验。主要采用 EM 液体培养基, 第 1 组在 7 个 100 mL 的三角瓶中添加 100 mL EM 液体培养基, 高压蒸汽灭菌后加入紫外灭菌过的亚硒酸钠, 前 6 个三角瓶分别加入 0 g (无硒空白)、0.017 3 g (1 mM)、0.034 6 g (2 mM)、0.051 9 g (3 mM)、0.069 2 g (4 mM)、0.086 5 g (5 mM) 亚硒酸钠, 最后一个加入 0.051 9 g (3 mM) 亚硒酸钠。在前 6 个三角瓶中接入细菌, 最后一个不接入细菌 (无菌空白)。全部样品用棉塞塞好瓶口, 然后用牛皮纸包裹, 以减少试验过程中的氧气量。最后把三角瓶置于振荡培养箱 35℃、120 r/min 振荡培养。第 2 组 7 个样品, 前 6 个三角瓶中分别加入亚硒酸钠 0.103 8 g (6 mM)、0.121 1 g (7 mM)、0.138 4 g (8 mM)、0.155 7 g (9 mM)、0.173 0 g (10 mM) 和 0.190 3 g (11 mM), 最后 1 个加入亚硒酸钠 0.138 4 g (8 mM) 做无菌空白, 方法过程如第 1 组。第 3 组样品 7 个, 100 mL 三角瓶中加入 EM2 液体培养基。灭菌后 1 个不加亚硒酸钠接入细菌做无硒空白, 其他 6 个样品分 2 组分别加入灭菌的亚硒酸钠 0.017 3 g (1 mM)、0.069 2 g (4 mM)、0.138 4 g (8 mM), 1 组接入细菌, 另外 1 组做无菌空白, 其他条件同第 1 组。

2 结果与讨论

2.1 还原实验及葡萄糖影响作用

实验发现, 第 1 组和第 2 组含亚硒酸钠的样品培养 24 h 后溶液开始变红, 伴随少量红色沉淀, 进行到 36 h 样品中产生了大量红色沉淀, 沉淀物颜色随硒的浓度增加而加深。无硒空白样品液体密度大呈混浊状, EM 中有白色絮状菌膜沉淀, 而无菌空白样品呈透明状没有发生明显变化。同样条件下, 第 3 组采用 EM2 培养基 (无葡萄糖) 实验的样品, 也产生了红色单质硒的沉淀, 但沉淀量明显少于加入碳源的样品, 同样无硒空白样液体密度大但混浊程度轻, 也有少量白色菌膜沉淀, 无葡萄糖的无菌空白样也没有明显变化。无硒空白样品说明细菌在两种培养基中生长旺盛; 而有硒样品溶液相对较透明一些, 细菌生长稍差, 说明亚硒酸钠对细菌生长有一定的抑制作用。有无葡萄糖 (碳源) 的对比实验说明缺乏碳源的细菌生长状况不如含有碳源的样品, 造成沉淀物量比较少。

一些微生物对无机硒有耐受性, 原因是将无机硒转换成对这些微生物无毒性的胶体状态的红色元素硒 (高学云等, 2000)。细菌在亚硒酸钠浓度为 0.6~5 mM 之间时, 芽孢杆菌能将亚硒酸钠还原为单质硒 (Garbisu *et al.*, 1995)。此次实验表明, 在添加或不添加碳源葡萄糖的情况下细菌均能还原亚硒酸钠, 加入碳源能使反应效果更好。第 2 组实验表明, 细菌 HBS4 相对于其他细菌对亚硒酸钠有更高的耐受性, 在

高浓度的亚硒酸钠溶液中仍然能保持活性还原亚硒酸钠。

2.2 XPS 测试结果

对在 EM 液体培养基中培养的含 1 mM 和 4 mM 亚硒酸钠反应后的样品进行了 XPS 光谱测试分析,结果如图 1。根

据两个样品中 Se 的 3d 值(3d 峰是 Se 的峰值中最高的峰) 55.2 mV 和 55.3 mV(图 1B) 断定为零价单质硒,并且两个样品中均未发现其他价态硒的存在。由此表明细菌 HBS4 已经把亚硒酸钠还原为红色的单质硒沉淀,并且还原效果很好。

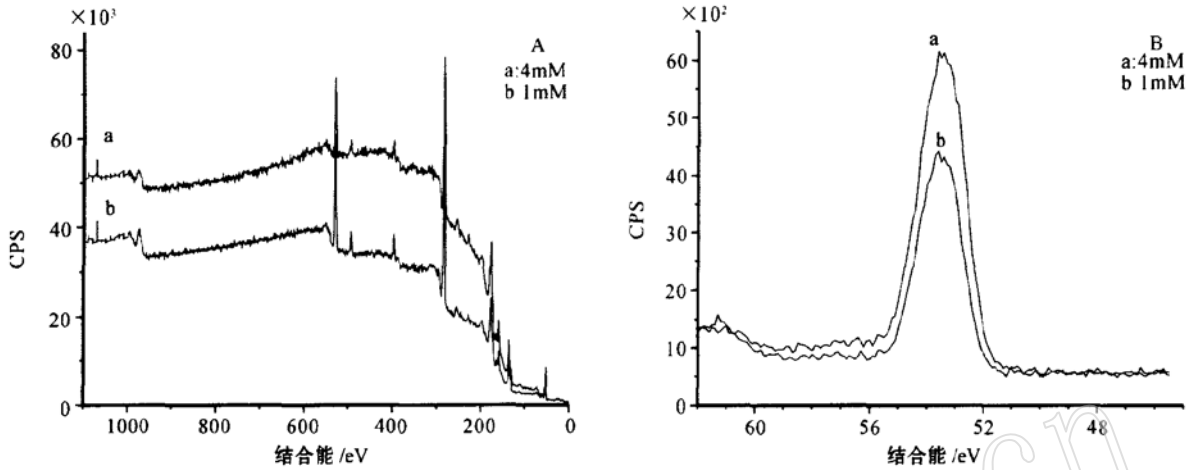


图 1 沉淀物的 XPS 图谱
Fig. 1 XPS patterns of the deposits

2.3 生长曲线

从图 2 可以看出,芽孢杆菌 HBS4 在与亚硒酸钠作用过程中,开始一段时间样品 S_2 的 OD 值变化非常缓慢,经过 24 h 迟缓期之后才进入对数生长期,42 h 达到稳定期。而样品 S_1 没有生物迟缓期,直接进入对数生长期,并且在 42 h 进入二次生长期。由此可见,随着硒浓度的增大,硒对细菌生长的抑制增强,细菌对溶液的适应时间也有所增加,迟缓期就比较长。但最终 1 mM 亚硒酸钠样品的 OD 值低于 4 mM 的样品可能反应生成的单质硒颗粒的影响,4 mM 样品产生的颗粒沉淀多,吸收度影响就更大。

致,在硒浓度高的 S_2 样品中,开始变化非常缓慢,在细菌进入对数生长期时,pH 和 Eh 发生了大的变化。

实验过程中细菌的形态上发生了巨大变化,但与资料显示的又有很大不同。Garbisu 等(1999)的实验资料指出,在芽孢杆菌还原 1 mM 亚硒酸钠过程中,6 h 细胞表面产生黑色颗粒沉积,7 h 通常在端部形成一个类似原生质结构的黑色圆体突起,10 h 圆体与细胞分离,20 h 左右在圆体表面发现类似晶体的单质硒,随后圆体溶解。但从图 3 中可以看出,大部分细菌仍为正常的棒杆状,进行正常的分裂繁殖。部分细菌细胞内部出现了圆形红色颗粒并不局限于两端,且不以突起的形态存在。有的细胞在分裂繁殖的时候颗粒会分到两个新的细胞中,还有一部分细菌已经开始破裂溶解,伴随着红色

由图 2 还可以看到 pH 值随时间增加而降低,Eh 值与之相反,随时间增加而升高。并且 pH、Eh 与 OD 值相对应一

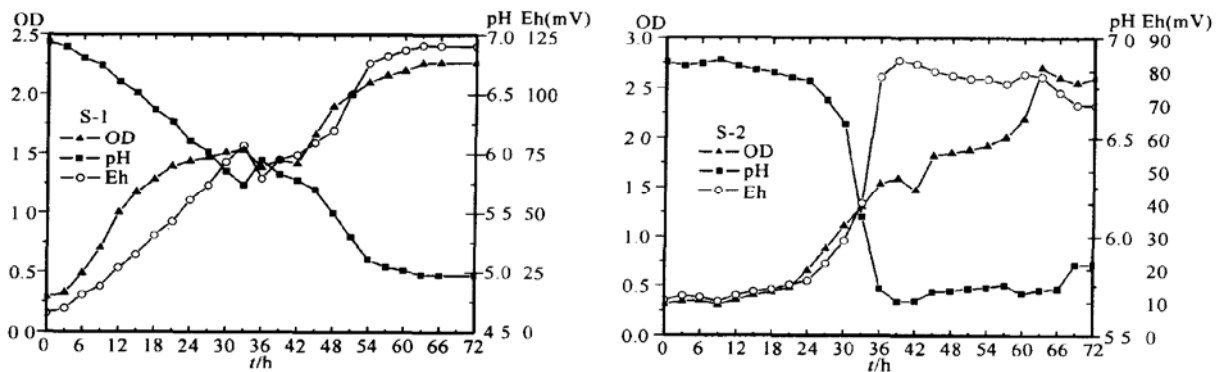


图 2 亚硒酸钠还原过程中 OD 值与 pH 值和 Eh 值的变化
Fig. 2 Growth curve and pH and Eh value changes of strain HBS4 in the growth process

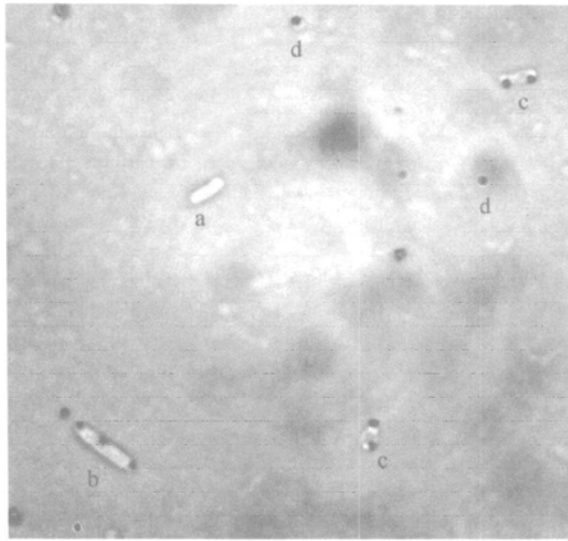


图3 在 1 mM 的亚硒酸钠培养基中生长的细菌 HBS4 光学显微镜照片(放大 4 000 倍)

Fig. 3 Light photomicrographs of HBS4 cells growing in EM media containing 1mM sodium selenite ($\times 4\ 000$)

- a—正常的细胞; b—内部包含红色颗粒的细胞; c—正在破裂溶解的细胞; d—脱离细胞游离态的红色颗粒
a—normal rod shaped cells; b—rod body with round deposits; c—lysing body; d—free floating round deposits

颗粒的释放。由此推测,芽孢杆菌还原亚硒酸钠为单质硒的过程可能是多种的,随细菌种属、实验条件不同而不同。由图 4 中可以看出细胞内部的颗粒排列方式多种多样。大部分颗粒在细胞内呈线状排列,一颗或多颗,一列或两列;也有的呈曲线状,或者是杂乱无章。但总体上细胞内部的颗粒形状都

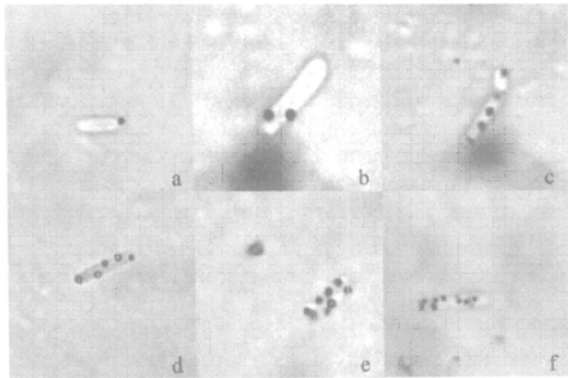


图4 显微镜下细胞内部包含颗粒的 HBS4 细菌
Fig. 4 Light photomicrographs of HBS4 cells with intracellular deposits

颗粒在细胞内部呈多种形式存在,有一颗(a)或二颗(b)或多颗(c, d, e, f),有一列(d)或两列(e)规则排列,也有呈曲线(d)或杂乱排列(f)(放大 4 000~ 8 000 倍)

Intracellular organization of deposits includes one (a), two (b) or multiple (c, d, e, f) grains; There are regular chains of one (c) or two (e), or curved (d) or irregular (f) arrangements

为圆形,镜下呈红色。随着硒浓度的增加,硒对细菌生长的抑制作用和毒性增强,活动性减弱,细菌形状有所变异,大部分细菌变为一头粗一头细(图 4f),还有很多呈弧状。

2.4 反应中电子的转移

硒是生命体的营养微量元素,可以组成含硒的谷胱甘肽过氧化酶、硒蛋白中的含硒半胱氨酸、硒酶,甚至在 tRNAs 中也有硒的存在(Heider *et al.*, 1994)。但被生物体吸收利用的只是很小一部分,大部分通过生物转化作用转化成其他形式。硒的生物转化主要包括了硒的生物甲基化(BMSe)和生物异化还原作用(DSeR),它们分别可将无机硒转化成挥发硒和元素硒(金强等, 1996),其中零价元素硒生产量较大(韩润平等, 1999)。本次实验也主要研究硒的生物异化还原作用。

当环境中存在适当的电子给体,并且有一定的浓度时,硒酸盐可以作为重要的电子受体,硒酸盐中 Se(VI) 可还原为 Se(IV), Se(IV) 还原为 Se(0) (Ronald *et al.*, 1989; Stolz *et al.*, 1999)。可以作为硒还原电子给体的有 H₂、乳酸盐等(Stolz *et al.*, 1999),发生的化学反应如下: $1/4 \text{SeO}_5^{2-} + 2\text{H}^+ + 1/2 \text{H}_2 \rightarrow 1/4 \text{Se}^0 + 3/4 \text{H}_2\text{O}$ (Stolz *et al.*, 1999); $\text{Lactate}^- + \text{SeO}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Se}^0 + \text{acetate}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$ (Oremland *et al.*, 1994; Blum *et al.*, 1999)。

细菌在代谢过程中, pH 和 Eh 会因代谢产物的影响发生一定的变化。为了分析细菌 HBS4 代谢的影响,对细菌 HBS4 在不添加亚硒酸钠的情况下,利用 EM 液体培养基进行培养测试。前 9 h, pH 稍微下降, Eh 稍微升高,之后却发生了相反的变化。在 40 h 后测菌液 pH 值达到 8.986, Eh 值达到了 -110.6 mV。而在含硒的样品中, Se 得到了还原,而溶液的 pH 值不断下降至 4.95, Eh 不断上升至 121 mV。在硒还原形成不溶的单质硒过程中,溶液 pH 降低近 4。因此推测在还原中亚硒酸钠中的硒作为电子受体,通过细菌作用得到电子还原为零价硒。零价硒的生成说明整个过程中硒主要发生了生物异化还原作用, pH 值的降低表明在硒还原作用过程中由于细菌的作用产生了大量的 H⁺。同时在实验过程中,添加不添加葡萄糖对实验结果影响很大,因为细菌发酵过程中,葡萄糖发酵为微生物提供能量但不需外界提供电子,发酵最终得到 ATP、NADH 和丙酮酸、乙醇、乳酸等;而厌氧和兼性厌氧微生物在无氧呼吸过程中不仅可以提供大量 ATP,还可以为外源受体提供电子(沈萍等, 2002)。由于实验利用兼性厌氧的细菌,实验中的 Eh 值处于其进行发酵和无氧呼吸的界限上。而 Garbisu 等(1996)在研究中发现虽然细菌不仅利用葡萄糖,也可以利用其他碳源,但在还原亚硒酸钠实验中,葡萄糖成为惟一的碳源,因此实验中部分葡萄糖可能为细菌无氧呼吸时亚硒酸钠还原为单质硒的电子供体。

3 结论

(1) 细菌 HBS4 对亚硒酸钠有较高的生物耐受性,在亚硒酸钠浓度高达 11 mM 仍能生长,但随着硒浓度的增高,对

细菌生长抑制作用增强。葡萄糖对细菌生长和沉淀物的生成有较强的促进作用。

(2) 细菌 HBS4 能够还原亚硒酸钠为不溶于水的红色单质硒, 还原率高。

(3) 细菌 HBS4 在还原亚硒酸钠的同时, 在细胞内部形成红色硒颗粒, 颗粒数目不等, 排列方式有单链、双链、弧线和无规则。

(4) 亚硒酸钠在还原过程中主要作为电子受体, 得到电子还原为 Se(0)。

References

- Blum J S, Bindi A B, Buzzelli J, *et al.* 1999. *Bacillus arsenicoselenatis* sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California, which respire oxyanions of selenium and arsenic[J]. *Arch. Microbiol.* 171: 19~ 30.
- Garbisu C, Carlson D, Adamkiewicz M, *et al.* 1999. Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress[J]. *BioFactors*, 10: 311~ 319.
- Garbisu C, Gonzalez S, Yang W H, *et al.* 1995. Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis*[J]. *Biofactors*, 5: 29~ 31.
- Garbisu C, Takahisa Ishii, Leighton T, *et al.* 1996. Bacterial reduction of selenite to elemental selenium[J]. *Chemical Geology*, 132: 199~ 204.
- Gao Xueyun, Zhang Jinsong, Zhang Lide, *et al.* 2000. Acute toxicity and bioavailability of nano red elemental selenium[J]. *Journal of Hygiene Research*, 29(1): 57~ 58 (in Chinese).
- Han Runping, Li Jianjun and Jin Qiang. 1999. Study of selenite bio-transformation in nature water by hydride generation- atomic fluorescence[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 19(2): 196~ 197 (in Chinese).
- Hao Ruixia, Lu Anhuai and Wang Guanyu. 2002. Metabolism of *Bacillus Subtilis* on crude oils[J]. *Acta Petrolei Sinica(Petroleum Processing Section)*, 18(5): 14~ 20 (in Chinese).
- Heider J and Bock A. 1994. Selenium metabolism in micro-organisms[J]. *Adv. Microbiol. Physiol.* 35: 71~ 109.
- Hou Shaofan, Wang Wuyi, Li Ribang, *et al.* 1994. The environmental factors related with the incidence decrease of Kaschin-Beck disease[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 14(2): 198~ 205 (in Chinese).
- Huang Zhi, Zheng Wenjie, Li Lenong, *et al.* 2003. Research progress on biosynthesis and bioactivity of nano red elemental selenium[J]. *China Biotechnology*, 23(7): 20~ 22 (in Chinese).
- Jiang Shouqun. 2000. The study of the nutrition of organic selenium and the application[J]. *Guangdong Feed*, 9(4): 32~ 33. (in Chinese).
- Jin Qiang, Xu Boxing, Wang Yufang. 1996. Study on the microbial transformation of selenite[J]. *Shanghai Environmental Sciences*, 15(6): 22~ 24 (in Chinese).
- Li Feng and Liang Qifeng. 2004. Bioremediation Technology of Polluted Soil by Selenium. *Guangdong[J]. Trace Elements Science*, 11(3): 17~ 20 (in Chinese).
- Li Jiakui and Wang Xiaolong. 2002. Development of the study of selenium transformation by microorganism[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 38(3): 35~ 37 (in Chinese).
- Liu Jinguo and Yu Jianing. 2003. Advances in the study of nano selenium and the prospect of its application[J]. *Guangdong Feed*, 12(4): 20~ 22 (in Chinese).
- Liu Xiaoliang, Xu Liyan, Zhang Xiuyun, *et al.* 1994. Damage to renal and hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase in rats fed with grains from a KD endemic area and the preventive effects of selenium and vitamin E. *J. N[J]. Bethune Univ. Med. SCI.*, 20(3): 217~ 220 (in Chinese).
- Stolz J F and Oremland R S. 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 615~ 627.
- Oremland R S, Blum J S, Culbertson C W, *et al.* 1994. Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES_3[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3011~ 3019.
- Shen Ping. 2000. *Microbiology[M]*. Beijing: Higher Education Press. 75~ 155 (in Chinese).
- Yang Zhiwei, Yang Fajun and Xin Wenjuan. 1994. The influence of hydroxyl radical (OH•) on cardiac mitochondria membrane and the antagonistic effect of Se compounds[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 10(2): 305~ 310 (in Chinese).
- Zhao Fengze, Shen Gangzhe and Nan Jixing. 2001. Survey of Selenium Analysis[J]. *Guangdong Trace Elements Science*, 8(11): 1~ 16 (in Chinese).

附中文参考文献

- 高学云, 张劲松, 张立德. 2000. 纳米红色元素硒的急性毒性和生物利用性[J]. *卫生研究*, 29(1): 57~ 58.
- 韩润平, 李建军, 金强. 1999. 氢化物发生-原子荧光法研究天然水体中亚硒酸盐的微生物转化[J]. *光谱学与光谱分析*, 19(2): 196~ 197.
- 郝瑞霞, 鲁安怀, 王关玉. 2002. 芽孢杆菌对原油作用的初探[J]. *石油学报*, 18(5): 14~ 20.
- 候少范, 王五一, 李日邦, 等. 1994. 大骨节病病情下降与环境因素的定位研究[J]. *环境科学学报*, 14(2): 198~ 205.
- 黄峙, 郑文杰, 李乐农, 等. 2003. 纳米元素硒的生物合成及生物活性[J]. *中国生物工程杂志*, 23(7): 20~ 22.
- 蒋守群. 2000. 有机硒的营养研究与应用[J]. *广东饲料*, 9(4): 32~ 33.
- 金强, 徐伯兴, 王毓芳. 1996. 亚硒酸根的微生物转化[J]. *上海环境科学*, 15(6): 22~ 24.
- 利锋, 梁奇峰. 2004. 土壤硒污染的生物修复技术[J]. *广东微量元素科学*, 11(3): 17~ 20.
- 李家奎, 王小龙. 2002. 硒的生物转化研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 38(3): 35~ 37.
- 刘进国, 于建宁. 2003. 纳米硒的研究进展及其应用前景[J]. *广东饲料*, 12(4): 20~ 22.
- 刘晓亮, 许丽艳, 张秀云, 等. 1994. 克山病区粮喂大鼠肾、肝 T45-脱单碘酶的损伤及硒和维生素 E 的保护作用[J]. *白求恩医科大学学报*, 20(3): 217~ 220.
- 沈萍. 2000. *微生物学[M]*. 北京: 高等教育出版社, 75~ 155.
- 杨志伟, 杨法军, 忻文娟. 1994. 羟自由基对心肌线粒体膜的影响及硒的效应[J]. *生物物理学报*, 10(2): 305~ 310.
- 赵凤泽, 沈刚哲, 南极星. 2001. 硒的分析概况[J]. *广东微量元素科学*, 8(11): 1~ 16.