耐硒菌株 *Cytobacillus firmus* N4 的筛选及其对 α-葡萄糖苷酶抑制活性的影响

王一丹[1]，余雍和[1]，杨 锐[1]，段玉桦[1]，周 欣[1]，王璋倩[*1,2]
（1. 武汉轻工大学 生命与科学技术学院，湖北 武汉 430023；2. 武汉轻工大学 硒科学与工程现代产业学院，湖北 武汉 430040）

摘要：微生物制备纳米硒具有低毒、温和等优点，具有广阔的应用前景。从武汉施加硒肥的土壤中分离纯化得到一株能将亚硒酸钠还原成纳米硒的菌株，对其进行菌种鉴定，测定其耐硒能力和生长动力学曲线，利用扫描电镜对制备的纳米硒颗粒进行表征，并将转化得到的纳米硒及菌株次生代谢产物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性进行初步探究。结果表明，在分离纯化的 16 株菌株中，坚强芽孢杆菌 N4（*Cytobacillus firmus* N4）对亚硒酸钠的最大耐受性为 36 mg/mL，产生的纳米硒粒径为 150~220 nm。纳米硒质量浓度为 0.625 mg/mL 时对 α-葡萄糖苷酶的抑制率为 25.42%±0.69%；次生代谢产物质量浓度为 2.500 mg/mL 时，抑制率达到 73.83%±4.63%。*Cytobacillus firmus* N4 具有高耐硒性质，可为纳米硒的生物转化提供基础，且其次生代谢产物有一定的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，值得进一步深入研究。

关键词：耐硒菌株；纳米硒；坚强芽孢杆菌；α-葡萄糖苷酶抑制活性
中图分类号：TQ 92　**文章编号：**1673-1689(2023)02-0045-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.007

Screening of Selenium Tolerant Strain *Cytobacillus firmus* N4 and Preliminary Effect of Its Inhibitory Activity against α-Glucosidase

WANG Yidan[1]，*YU Yonghe*[1]，*YANG Rui*[1]，*DUAN Yuhua*[1]，*ZHOU Xin*[1]，*WANG Zhangqian*[*1,2]
（1. College of Life Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. School of Modern Industry for Selenium Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430040, China）

Abstract: The preparation of selenium nanoparticles from microorganism had low toxicity, mild synthesis and other advantages, showing broad application prospects. A strain which could reduce sodium selenite to selenium nanoparticles was isolated and purified from the soil with supplemental selenium fertilizer in Wuhan. The strain was identified, and its selenium tolerance and growth kinetics curve were determined. The selenium nanoparticles were characterized by scanning electron microscope, and the inhibitory activity of selenium nanoparticles and the secondary metabolites on α-glucosidase were preliminarily explored. The results showed that among the 16 strains isolated and purified, the maximum tolerance concentration of *Cytobacillus firmus* N4 to sodium selenite was 36

收稿日期：2021-04-20
基金项目：国家自然科学基金项目（31900011）；湖北省科技创新重大专项项目（2019ABA113）；武汉轻工大学科研项目（2019y05）；武汉轻工大学大学生科研项目（xsky2020028）；湖北省“楚天学者计划”人才项目。
* **通信作者：**王璋倩（1984—），女，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事微生物与生化药学方面的研究。E-mail：wzqsnu@whpu.edu.cn

mg/mL with the selenium nanoparticle size of 150~220 nm. When the concentration of selenium nanoparticles was 0.625 mg/mL, the inhibition rate of α-glucosidase was 25.42%±0.69%, and the inhibition rate reached to 73.83%±4.63% when the concentration of secondary metabolites was 2.500 mg/mL. *Cytobacillus firmus* N4 has high selenite-tolerance, providing the basis for the biotransformation of selenium nanoparticles, and its secondary metabolites show certain α-glucosidase inhibitory activity, which is worthy of further study.

Keywords: selenium tolerance, selenium nanoparticles, *Cytobacillus firmus*, α-glucosidase inhibitory activity

硒是人体生长发育所必需的微量元素，具有抗衰老、抗氧化、抗癌等生物学功能[1-3]。硒在地壳中的分布极其不均匀，很多国家和地区都处于缺硒状态。世界卫生组织规定的平均每天硒摄入量参考值为 40~200 μg，推荐摄入量为 60 μg，而我国大部分人群平均每天硒摄入量为 26~32 μg，明显低于该标准，而长期硒摄入不足会对人体健康造成危害[4]。

与无机硒、有机硒相比，纳米硒具有无毒、高活性的特点。常用制备纳米硒的物化法存在费用高、对环境危害大等缺点[5-6]，而利用微生物制备纳米硒成本低、效率高、亲环境，因此更具优势[7]。已报道的利用微生物还原纳米硒的菌株对亚硒酸钠的耐受性一般在 0.5~20 mg/mL[8-10]，所以筛选更耐硒菌株对硒形态的转化研究极为重要。

糖尿病在全世界范围内的发病率逐年上升，抑制餐后血糖浓度的增加有利于避免糖尿病的发生。人体内葡萄糖含量过多会导致血糖浓度的升高，而α-葡萄糖苷酶是碳水化合物分解为葡萄糖过程中的关键酶[11]，因此寻找低毒高效的 α-葡萄糖苷酶抑制剂尤为重要。现阶段采用微生物发酵法制备 α-葡萄糖苷酶抑制剂已成为研究热点，朱运平等人从芽孢杆菌、链霉菌的微生物代谢产物可分离得到类似 1-脱氧野尻霉素的强效 α-葡萄糖苷酶抑制剂。硒具有降血糖作用，补充硒、硒蛋白及纳米硒能有效预防和治疗 2 型糖尿病[12-14]。作者通过筛选得到高耐硒菌株，并通过评价其纳米硒及次生代谢产物对 α-葡萄糖苷酶的抑制效果，探索降糖机理，以期为菌株的实际开发应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 湖北武汉东西湖区长期施加硒肥基地地表 10 cm 以下根系土壤采集土样，封装于无菌密封袋供后续实验。

1.1.2 试剂 酵母粉：购于 OXOID；琼脂：购于 Biosharp；4-硝基酚 α-*D*-吡喃葡萄糖苷(PNPG)、阿卡波糖、α-葡萄糖苷酶：均购于上海源叶生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 将土壤样品均匀分散到 LB 平板上，37 ℃培养 24 h 得到 16 种不同形态的菌落，将其接种到含 36 mg/mL 亚硒酸钠的 LB 固体培养基上，通过观察这些菌株的生长情况和颜色，挑选出长势较好且颜色较红的菌株进行后续试验。

将筛选的菌株分别接种至含亚硒酸钠质量浓度为 9、18、27、36、45、54 mg/mL 的 LB 液体培养基中，37 ℃恒温振荡培养 48~60 h，观察底部菌体沉淀量及颜色变化，对比筛选出富硒能力较强的菌株。

1.2.2 菌株的鉴定

1）菌株的形态学鉴定 将菌株 N4 接种到 LB 平板上，观察菌落形态；用结晶紫试剂染色，于×100 显微观察菌体形态。

2）PCR 扩增 16S rDNA 提取菌株 N4 的 DNA 作为模板，27F 和 1492R 为引物，将 PCR 产物送至生工生物工程有限公司测序。

3）菌株系统发育进化树的构建 将测序得到的 16S rDNA 序列在 EzBioCloud 数据库中与已知序列进行同源性比较分析，利用MEGA 10.1 构建系统发育进化树。

1.2.3 菌株 N4 生长曲线的测定 将菌株 N4 分别接种于含 4.5、9.0、18.0 mg/mL 亚硒酸钠的 LB 培养基中，在 37 ℃摇床中培养。每隔 2 h 取样，测定 $OD_{600\,nm}$ 值，绘制生长曲线。

1.2.4 生理生化实验 对菌株 N4 进行生理生化鉴定，参考《常用细菌系统鉴定手册》和《伯杰式手册》进行实验[15]。

1.2.5 *Cytobacillus firmus* N4 合成生物纳米硒的分离纯化

1）纳米硒的制备与收集　将菌株 N4 接种至含 9 mg/mL 亚硒酸钠的 LB 培养基中，37 ℃恒温振荡 48 h，得到含有纳米硒的菌液；将菌液于 10 000 r/min 离心 30 min，收集沉淀；用无菌水清洗沉淀 2~3 次。

2）纳米硒的分离纯化　将沉淀加入液氮研磨；加入无菌水悬浮，超声 10 min 后将纳米硒悬液分别过 20、10、5、3、1.2、1.8 μm 的滤膜，再将纳米硒悬液移至分液漏斗中，加入 1/5 体积的正己烷[16]，收集下层；将初产物于 10 000 r/min 离心 30 min，收集沉淀，用无菌水清洗 2~3 次，取沉淀进行真空冷冻干燥，即得纳米硒[17]。

3）纳米硒表征　将菌液接种至含 9 mg/mL 亚硒酸钠的 LB 培养基中，37 ℃培养 24 h。取适量菌液于 8 000 r/min 离心 30 min，收集沉淀。依次用生理盐水、双蒸水洗涤 3 次，10 000 r/min 离心 30 min，收集沉淀，添加固定液，利用扫描电镜(SEM)进行镜检。

1.2.6 *Cytobacillus firmus* N4 次生代谢产物的提取　发酵菌液于 8 000 r/min 离心 10 min，取上清液，用体积比 1:1 的乙酸乙酯萃取，干燥称质量。

1.2.7 *Cytobacillus firmus* N4 纳米硒及次生代谢产物 α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定

1）反应液的制备　配制 0.1 mol/L PBS 磷酸缓冲液（pH 值 6.8）、0.5 mmol/L 的 PNPG 溶液、0.3 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶溶液、0.1 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液、梯度为 10、5、2.5、1、0.1 mg/mL 的纳米硒样品溶液和菌液次生代谢产物样品溶液。

2）α-葡萄糖苷酶抑制活性的测定　参照文献[18-19]方法。25 μL 的 PNPG 与样品等体积混匀，于 37 ℃孵育 10 min，再加入 50 μL α-葡萄糖苷酶溶液，于 37 ℃孵育 30 min。随后将 100 μL 的 Na_2CO_3 溶液加入，用于终止反应，测定 $OD_{405\ nm}$ 值。阳性对照为阿卡波糖。

α-葡萄糖苷酶抑制率计算公式为：

$$E_{抑制率}=(1-\frac{A-B}{C-D})\times 100\%$$

式中：A 为样品吸光度；B 为样品空白对照吸光度（α-葡萄糖苷酶溶液用 PBS 替代）；C 为阴性对照吸光度（样品用 PBS 替代）；D 为阴性空白对照吸光度（样品及 α-葡萄糖苷酶溶液用 PBS 替代）；E 为抑制率。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选

2.1.1 富硒菌株的初筛　分离纯化得到 16 株形态各异的菌株。在含 36 mg/mL 亚硒酸钠的 LB 培养基上，观察菌株的生长情况，选出 6 株长势较好且颜色较红的菌株，分别将其命名为 N4、XFW8、XFW3、XFD8、XFD9、XFD11，做液体培养试验。

2.1.2 富硒菌株的复筛　复筛结果见表 1~2。对比筛选出一株耐硒能力较强的菌株 N4，其对亚硒酸钠的耐受性最高达到 36 mg/mL。Zhang 等人筛选出 2 株菌株，其对亚硒酸钠的耐受性分别为 20.75 mg/mL 和 38.04 mg/mL[20]。菌株 N4 与现已报道的耐硒菌株相比，对亚硒酸钠有较高的耐受性，有利于纳米硒的生物制备。

表 1　不同菌株在富硒培养液中的菌体沉淀量

Table 1　Cell precipitation of different strains in selenium enriched medium

菌株编号	亚硒酸钠质量浓度/(mg/mL)					
	9	18	27	36	45	54
N4	++++	+++	+++	+++	++	+
XFW8	+++	++	++	+	−	−
XFW3	+++	+	+	+	−	−
XFD8	+++	++	++	+	−	−
XFD9	+++	+	+	+	−	−
XFD11	+++	++	+	+	−	−

注：“−”澄清；“+”微量；“++”少量；“+++”正常；“++++”较多。

表 2　不同菌株在富硒培养液中的颜色比较

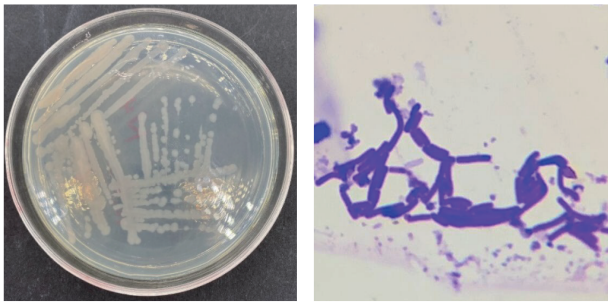
Table 2　Colour comparison of different strains in selenium enriched medium

菌株编号	亚硒酸钠质量浓度/(mg/mL)					
	9	18	27	36	45	54
N4	++++	++++	++++	++++	+++	++
XFW8	+++	+++	++	++	+	−
XFW3	++	++	++	+++	++	+
XFD8	+++	++	++	++	+	−
XFD9	+++	++	++	++	+	−
XFD11	++	++	++	++	−	−

注:“−”正常;“+”微红;“++”粉红;“+++”红;“++++”深红。

2.2　菌株的鉴定

2.2.1　菌株 N4 的形态观察　菌株 N4 在 LB 平板的菌落形态结果见图 1(a)。菌落形态不透明、呈灰白色、圆形,表面有褶皱、边缘完整、较黏稠;镜检结果见图 1(b),细胞呈杆状,有芽孢。



(a) 菌落形态　　(b) 革兰氏染色

图 1　菌株 N4 的形态观察

Fig. 1　Morphological observation of strain N4

2.2.2　菌株 N4 的分子生物学鉴定结果　提取菌株 N4 的 DNA,27F 和 1492R 为引物扩增其 16S rDNA,产物在质量分数 1%的琼脂糖凝胶电泳中得到约 1 500 bp 的片段,清晰无杂带。将得到的测序结果输入 EzBioCloud 数据库与已知序列进行同源性比较分析,结果显示菌株 N4 与坚强芽孢杆菌 *Cytobacillus firmus* 的同源性高达 98.90%。菌株 N4 系统发育进化树(N-J 法构建)结果见图 2,图中红色标记为本研究分离菌株,鉴定其为 *Cytobacillus firmus* N4。

2.2.3　菌株 N4 生理生化鉴定结果　菌株 N4 的生理生化特征见表 3,其与《伯杰氏手册》中坚强芽孢杆菌对比结果一致,结合其形态鉴定可判断菌株 N4 属于坚强芽孢杆菌属。

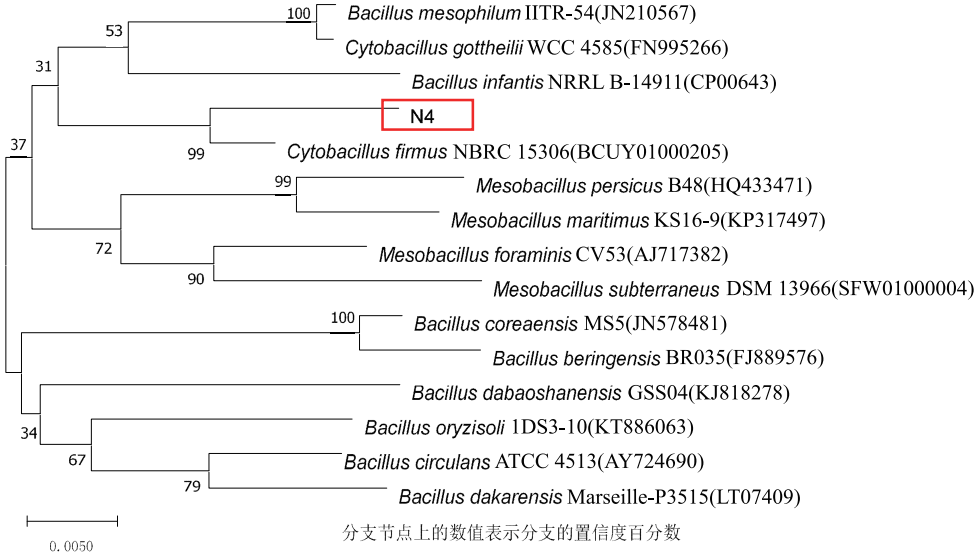


图 2　菌株 N4 系统发育进化树的构建

Fig. 2　Construction of phylogenetic tree of N4 strain

表 3　菌株 N4 与坚强芽孢杆菌生理生化特性比较

Table 3　Differential characteristics of strain N4 and *Cytobacillus firmus*

生理生化特征	菌株 N4	坚强芽孢杆菌（*Cytobacillus firmus*）
葡萄糖	+	+
乳糖	−	−
甘露糖	+	+
阿拉伯糖	−	−
木糖	−	−
明胶水解	+	+
吲哚水解	−	−
氧化酶	+	+
V-P	−	−
接触酶	+	+

2.3　菌株 N4 生长曲线的测定

菌株 N4 在不同亚硒酸钠质量浓度下的生长曲线见图 3。无亚硒酸钠添加时菌株在 9 h 进入对数生长期，约 24 h 进入稳定生长期。通过比较可知，随着亚硒酸钠质量浓度的增大，菌株的生长被抑制，停滞期变长，且质量浓度越高，抑制效果越明显。

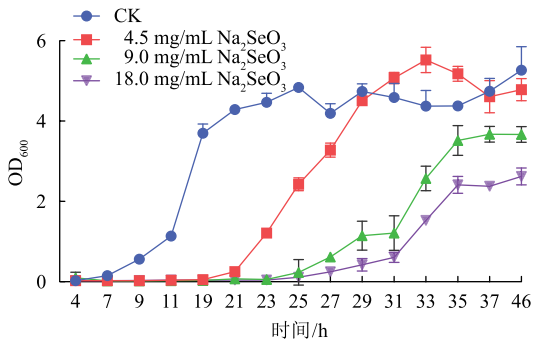


图 3　菌株 N4 在不同质量浓度亚硒酸钠培养基中的生长曲线

Fig. 3　Growth curve of strain N4 in culture medium with different concentrations of sodium selenite

2.4　纳米硒扫描电镜表征

扫描电镜结果见图 4，可观察到菌株 N4 制备的纳米硒在细菌细胞表面为球状分子，粒度均一、分散均匀，粒径在 150~220 nm。

2.5　菌株 N4 纳米硒及次生代谢产物的 α-葡萄糖苷酶抑制活性

菌株 N4 纳米硒及次生代谢产物溶液对 α-葡萄糖苷酶的抑制率见图 5。菌株 N4 的次生代谢产物和纳米硒对 α-葡萄糖苷酶的抑制率均低于阳性对照阿卡波糖，但都表现出一定的抑制活性。α-葡萄糖苷酶的抑制率与菌株 N4 的次生代谢产物溶液的质量浓度成正比，在测定质量浓度范围内最大抑制率为 73.83%±4.63%。说明菌株 N4 不仅具有能将亚硒酸钠还原纳米硒的能力，其次生代谢产物还具有一定的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，可作为潜在的辅助降血糖的菌株。

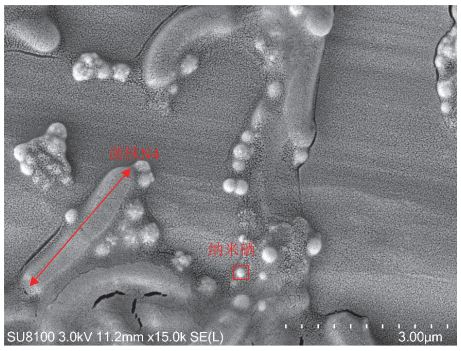


图 4　菌株 N4 添加 9 mg/mL 的 Se(IV)扫描电镜(SEM)图

Fig. 4　Scanning electron microscope (SEM): strain N4 with 9 mg/mL Se (IV)

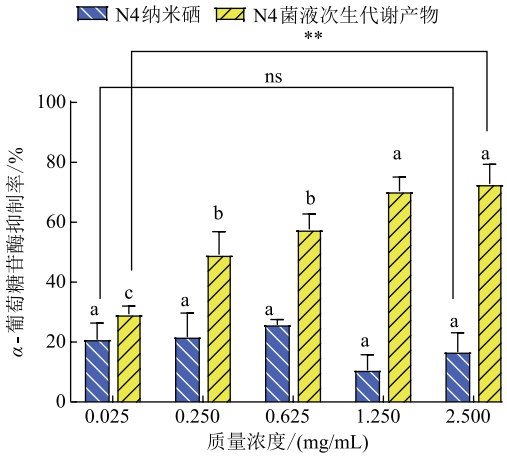


图 5　菌株 N4 纳米硒及次生代谢产物对 α-葡萄糖苷酶的抑制率

Fig. 5　Inhibition rate for α-glucosidase of selenium nanoparticles and secondary metabolites

许芹永等人研究发现，在一定质量浓度范围内，肉桂 5 个部位提取物的 α-葡萄糖苷酶抑制活性与其质量浓度均呈剂量依赖关系，当抑制率增大到一定水平时，不再随着提取物质量浓度的升高而明显提高，这一结果与菌株 N4 次生代谢产物溶液对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性趋势保持一致[21]。

赵胜男等人研究发现，减小纳米硒的粒径有助于增强对糖尿病小鼠的降血糖效果。菌株 N4 转化得到的纳米硒对 α-葡萄糖苷酶的抑制率不与其浓

度呈明显线性关系,抑制活性较弱,可能是其纳米硒粒径较大[22]。

3 结 语

作者从武汉长期施加硒肥基地的土壤中分离纯化出一株能将亚硒酸钠还原成纳米硒的菌株,初步鉴定其为坚强芽孢杆菌 *Cytobacillus firmus* N4。该菌对亚硒酸钠的最大耐受性为 36 mg/mL,可为纳米硒的生物转化提供基础,制备得到的纳米硒粒径为 150~220 nm。再对菌株 N4 纳米硒及次生代谢产物对 α-葡萄糖苷酶的抑制活性进行初步探究,得知其纳米硒对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用不明显。次生代谢产物溶液在测定质量浓度范围内最大抑制率为 73.83%±4.63%,对 α-葡萄糖苷酶抑制作用较强。菌株 N4 作为微生物生产纳米硒的菌株具有一定的市场前景,可作为潜在的辅助降血糖的菌株;且该菌株具有遗传改造的潜力,期待通过基因工程改造进行后续的纳米硒转化还原调控研究。

参考文献:

[1] CHEN Y C,PRABHU K S, MASTRO A M. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis[J]. **Nutrients**,2013,5(4):1149-1168.
[2] BECK M A,LEVANDER O A,HANDY J. Selenium deficiency and viral infection[J]. **The Journal of Nutrition**,2003,133(5 Suppl 1):1463S-1467S.
[3] RANJITHA V R,MUDDEGOWDA U,RAVISHANKAR R V. Potent activity of bioconjug-ated peptide and selenium nanoparticles against colorectal adenocarcinoma cells[J]. **Drug Development and Industrial Pharmacy**,2019,45(9):1496-1505.
[4] 王立平,唐德剑,沈亚美,等. 硒的营养缺乏现状及补充方式[J]. 食品工业,2020,41(1):339-343.
[5] WANG H,ZHANG J,YU H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes:Comparison with selenomethionine in mice[J]. **Free Radical Biology & Medicine**,2007,42(2):1524-1533.
[6] GAO X Y,GAO T,ZHANG L. Solution-solid growth of α-monoclinic selenium nanowires at room temperature[J]. **Journal of Materials Chemistry**,2003,13(1):6-8.
[7] 厉舒祯,沈文丽,邓晔,等. 微生物还原 Se(Ⅵ)和 Se(Ⅳ)合成机理研究新进展[J]. 应用与环境生物学报,2017,23(3):579-585.
[8] OREMLAND R S,HERBEL M J,BLUM J S,et al. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2004,70(1):52-60.
[9] 杨新. 开阳地区桑葚果园富硒酵母菌的筛选及其特性研究[D]. 贵州:贵州大学,2020.
[10] 曾仪维,张小萱,程思俊,等. 一株亚硒酸钠还原菌的分离及纳米硒表征[J]. 食品与发酵工业,2020,46(22):79-83
[11] GLUCOTROL X. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus[J]. **American Family Physician**,2001,63(9):1747-1756.
[12] 喻保军,陈龙菊. 硒蛋白 S 与 2 型糖尿病[J]. 生命科学,2020,32(6):606-613.
[13] ABDEL M H,ABOU ZOAR,ELHARRIF M G,et al. Seleniumcleome droserifolia nanoparticles (Se-CNPs) and it's ameliorative effects in experimentally induced diabetes mellitus[J]. **Clinical Nutrition ESPEN**,2020,40:383-391
[14] 朱运平,李秀婷,李里特. *Bacillus subtilis* B2 产 1-脱氧野尻霉素(DNJ)发酵条件优化[J]. 食品科学,2010,31(17):290-293.
[15] GARRITY G. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology[M]. Berlin: Springer Science & Business Media, 2007.
[16] ZHU Y,REN B,LI H, et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles and effects of selenite,selenate,and selenomethionine on cell growth and morphology in *Rahnellaaquatilis* HX2[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2018,102:6191-205.
[17] WANG Y T,SHU X,HOU J Y,et al. Selenium nanoparticle synthesized by *Proteus mirabilis* YC801:an efficacious pathway for selenite biotransformation and detoxification[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2018,19(12):3809-3809.
[18] UKWATTA,LAWRENCE,WIJAYARATHNA. The study of antimicrobial,anti-cancer,anti- inflammatory and α-glucosidase inhibitory activities of Nigronapthaphenyl isolated from an extract of Nigrosporasphaerica[J]. **Mycology**,2019,10(4):222-228.
[19] OKECHUKWU P, SHARMA M, TAN W H,et al. In-vitro anti-diabetic activity and in-silico studies of binding energies of palmatine with alpha-amylase,alpha-glucosidase and DPP-IV enzymes[J]. **Pharmacia**,2020,67(4): 363-371.
[20] ZHANG J,WANG Y,SHAO Z Y,et al. Two selenium tolerant *Lysinibacillus* sp. strains are capable of reducing selenite to elemental Se efficiently under aerobic conditions[J]. **Journal of Environmental Sciences**,2019,77(3):238-249.
[21] 许芹永,宋青楠,朱靖博,等. 肉桂提取物对 α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 大连工业大学学报,2013,32(2):101-103.
[22] 赵胜男. 不同尺寸纳米硒的制备及其生物活性研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学,2019.