

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (8):1074 – 1078; 4 August 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140506

## 希瓦氏菌 *Shewallena oneidensis* MR-1 合成硒纳米棒

邓欢<sup>1</sup>, 郑志勇<sup>2</sup>, 赵峰<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>江苏省物质循环与污染控制重点实验室, 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210023

<sup>2</sup>中国科学院城市污染物转化重点实验室, 中国科学院城市环境研究所, 福建 厦门 361021

**摘要:** 【目的】探索采用希瓦氏菌合成硒(Se)纳米棒, 并阐明合成底物 Se(IV) 的浓度与细菌培养时间对生物合成的影响。【方法】将希瓦氏菌 *Shewallena oneidensis* MR-1 接种至 Luria-Bertani (LB) 液体培养基, 分别以 Se(IV) 浓度 0.1、1、10 和 100 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  作为电子受体, 厌氧培养并绘制生长曲线。再将希瓦氏菌接种到含最适 Se(IV) 浓度的 LB 培养基中, 在厌氧培养后第 24 和 72 h 离心获取沉淀。采用扫描电镜、X 射线能谱和 X 射线衍射对沉淀进行分析。【结果】在 Se(IV) 浓度 1 mmol/L 的培养基中培养 24 h 形成的纳米棒沉淀截面直径约 80 nm, 长度 2 – 3  $\mu\text{m}$ 。而培养 72 h 形成的沉淀较大, 超出纳米物质范畴。采用 X 射线能谱和 X 射线衍射确定纳米棒组成为单质 Se。【结论】本研究为生物合成 Se 纳米棒提供了一种可行的方法。希瓦氏菌最适宜在 1 mmol/L Se(IV) 浓度下以及在对数生长期大量合成 Se 纳米棒, 具有潜在应用价值。

**关键词:** 希瓦氏菌, 厌氧培养, 扫描电镜, 硒纳米棒, X 射线衍射

**中图分类号:** Q938      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1074-05

生物合成纳米材料由于具有能耗低、污染小以及生物相容性良好等特点, 因而备受关注<sup>[1-4]</sup>。微生物可以合成多种纳米物质。耐银的酵母菌可在胞外生成 2 – 5 nm 的 Ag 粒子<sup>[5]</sup>; Lee 等利用 *Shewanella oneidensis* HN-41 在厌氧条件下还原 As(V) 和  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , 合成 As-S 纳米管<sup>[6]</sup>; Jiang 等发现利用 *S. oneidensis* MR-1 能促进 U(VI) 形成纳米线和纳米颗粒<sup>[7]</sup>; Bao 等用酵母细胞获得 CdTe 量子点并用于修饰电极<sup>[8]</sup>。探索并优化微生物合成纳米物质的条件, 是微生物合成技术实现应用的前提。

硒(Se)是重要的半导体, 并具有良好的光电性能, 同时还是工业催化剂。因此硒具有广泛的用途。

包括用于太阳能、电子、化工等行业。动物实验发现, 纳米 Se 能够提高血中谷胱甘肽酶的活性, 并且在免疫调节和抑制肿瘤方面有效果<sup>[9]</sup>。多种微生物能够将硒酸盐和亚硒酸盐还原为球状的单质 Se。Eszenyi 等采用微生物 (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* 和 *Lactobacillus casei*) 呼吸 Se(IV) 获得纳米级别的球状单质 Se, 但所得纳米球的粒径较大, 达到 100 – 500 nm<sup>[10]</sup>。另外, 对于影响微生物大量合成纳米 Se 的因素鲜有报道。

本研究采用希瓦氏菌 *Shewallena oneidensis* MR-1 在厌氧条件下, 以亚硒酸盐为电子受体, 合成 Se 纳米棒。本研究探索适合希瓦氏菌生长的 Se(IV)

**基金项目:** 福建省杰出青年科学基金(2014J06007); 中国博士后科学基金项目(2011M510400、2012T50142); 南京师范大学高层次人才科研启动基金项目(2013105XGQ0057)

\* 通信作者。Tel: +86-592-6190766; E-mail: fzhao@iue.ac.cn

**作者简介:** 邓欢(1982 – )男, 江苏南京人, 博士, 讲师, 主要从事土壤微生物产电方面的研究。E-mail: hdeng@njnu.edu.cn

**收稿日期:** 2014-10-21; **修回日期:** 2014-12-19

浓度,以及细菌培养时间对 Se 纳米棒的影响。通过扫描电镜观察纳米棒外观,并采用 X 射线能谱分析和 X 射线衍射了解纳米棒的化学组成和晶体结构。本研究为生物合成 Se 纳米棒提供一种可行的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌培养

配制 Luria-Bertani (LB) 细菌液体培养基,配方:酵母提取物 5 g;蛋白胨 10 g;NaCl 10 g;水 1 L, pH7.2。121 °C 灭菌 20 min。取部分 LB 培养基接种 *Shewanella oneidensis* MR-1, 30 °C 恒温培养 24 h。剩余的 LB 液体培养基用于配制含硒的培养基。用注射器吸取不同浓度  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  溶液,通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤灭菌,再以无菌操作方式分别注射到培养基中,配制成 Se (IV) 浓度 0.1、1.0、10.0 和 100.0 mmol/L 的 LB 液体培养基。每个 Se (IV) 浓度的 LB 培养基分装到 3 根指形管中作为 3 个重复。以无菌操作方式吸取 1 mL 上述培养后的 *Shewanella oneidensis* MR-1 菌液,注入到 100 mL 含 Se (IV) 的 LB 液体培养基中 ( $OD_{600} = 0.1$ ),置于厌氧培养箱中 30 °C 厌氧培养。在培养开始后第 6、12、24、36、48、60、72 和 84 h 以无菌操作方式获取 2 mL 菌液,采用可见光分光光度计检测  $OD_{600}$  消光度,观察 *Shewanella oneidensis* MR-1 的生长情况,确定 *Shewanella oneidensis* MR-1 生长的最适 Se (IV) 浓度。

### 1.2 Se 纳米棒制备

按照上述方法重新配制 LB 液体培养基,其中含最适于 *Shewanella oneidensis* MR-1 生长的 Se (IV) 浓度。将培养基分装到指形管中,每管分装 100 mL,置于厌氧培养箱中 30 °C 厌氧培养。在培养后第 6、12、24、36、48、60、72 和 84 h,分别取一管,小心从液面下方移出 60 mL 菌液并弃去,避免扰动管底剩余的 40 mL 菌液。将管底 40 mL 菌液转移至 50 mL 离心管中 2000  $\times g$  离心,获取沉淀用于扫描电镜观察、X 射线能谱分析和 X 射线衍射。

### 1.3 扫描电镜观察和 X 射线能谱分析

用蒸馏水洗涤离心沉淀 3 次,加入含 2.5% 戊二醛的磷酸缓冲液固定细胞。再次离心并弃掉上清,依次加入 40%、50%、70%、90%、100% 乙醇,让样品逐步脱水,避免快速脱水造成细胞变形。沉淀脱水之后进行超临界干燥。部分干燥后的样品进行

喷金处理,在 5 kV 下进行扫描电镜观察,并对单根棒状物进行 X 射线能谱分析 (S-4800 型,日立公司,日本)。观察样品时,先采用 1300 倍率对样品进行全面观察,再放大到 3.5 万倍观察 Se 纳米棒。

### 1.4 X 射线衍射

剩余部分干燥后的样品进行研磨粉碎,取少量置于 X 射线衍射分析用的玻璃样品槽中,用毛玻璃板将样品刮平压实后,放入 X 射线衍射仪 (X'Pert Pro, 帕纳科,荷兰) 样品台中。分析参数:采用金属 Cu 靶  $K\alpha$  辐射 ( $\lambda = 1.5412 \text{ \AA}$ ), Ni 片滤波。衍射仪工作电压为 40 kV, X 光管工作电流为 40 mA。使用闪烁探测器,连续扫描方式进行测试,扫速为  $7^\circ \text{ min}^{-1}$ , 衍射角度  $2\theta$  范围  $10^\circ$  至  $80^\circ$ , 扫描步长为  $0.0131^\circ$ 。

### 1.5 统计分析

不同 Se (IV) 浓度、不同培养时间, LB 培养基中 *Shewanella oneidensis* MR-1 菌液吸光值 ( $OD_{600}$ ) 的显著性差异采用最小显著差法 (LSD), 显著水平  $P < 0.05$ 。统计采用 SPSS14.0 软件。

## 2 结果和讨论

### 2.1 生长曲线

不同浓度 Se (IV) 条件下, *Shewanella oneidensis* MR-1 的生长曲线显示 (图 1), Se (IV) 浓度为 1 和 10 mmol/L 时最有利于细菌生长,其中 10 mmol/L 处理 24 h 进入对数生长期,36 h 完成对数生长进入稳定期,但在 72 h 吸光度 ( $OD_{600}$ ) 出现了显著降低。Se (IV) 浓度 1 mmol/L 处理的吸光度值 ( $OD_{600}$ ) 在 24–60 h 显著升高,之后趋于平稳,培养 84 h 的吸光度显著高于 10 mmol/L 处理。Se (IV) 浓度为 0.1 和 100.0 mmol/L 的条件下,细菌生长受到明显抑制。从图 2 可以看出培养 84 h 之后,1 mmol/L Se (IV) 的处理生成的红色单质 Se 最多。表明该浓度条件下, *Shewanella oneidensis* MR-1 生长代谢最活跃。由于 *Shewanella oneidensis* MR-1 在厌氧条件下生长, Se (IV) 作为唯一的电子受体,因而低浓度 Se (IV) 导致细菌代谢缓慢,生长受抑制。而高浓度 Se (IV) 则对细菌产生毒性,抑制细菌生长<sup>[11]</sup>。

### 2.2 Se 纳米棒的电镜观察

将 *Shewanella oneidensis* MR-1 加入到 Se (IV) 浓度 1 mmol/L 的 LB 培养基中厌氧培养 24 h 后,纳米棒大量形成。其截面直径约 80 nm, 长度 2–3  $\mu\text{m}$  (图

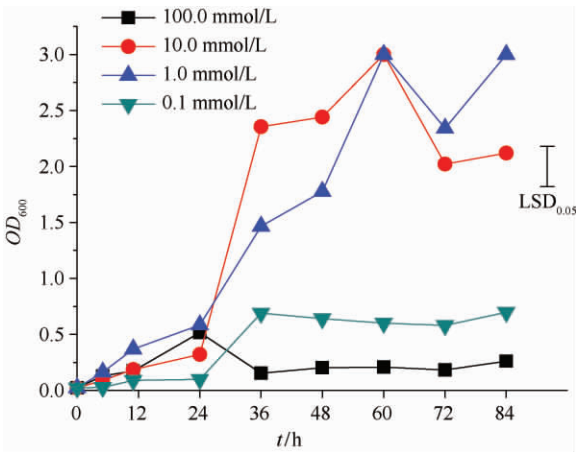


图 1. 不同 Se(IV) 浓度条件下 *Shewanella oneidensis* MR-1 的生长曲线

Figure 1. The growth curve of *Shewanella oneidensis* MR-1 incubated with a series of selenium concentrations. The length of error bar represents  $LSD_{0.05}$  value, differences between any two data points reach the significant level.

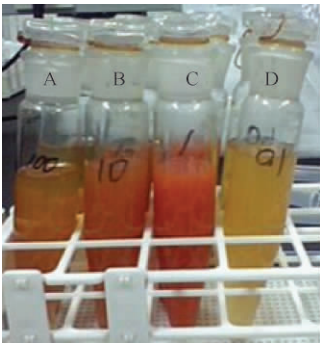


图 2. 培养 84 h 后的 LB 培养基

Figure 2. LB liquid inoculums after 84 hours incubation of *Shewanella oneidensis* MR-1. Lable A, B, C and D denotes inoculums with 100.0, 10.0, 1.0 and 0.1 mmol/L Se (IV), respectively.

3-A)。X 射线能谱分析结果显示, 纳米棒的化学组成为单质 Se (图 4)。培养 72 h 后, 原先的纳米棒明显变粗, 不仅单根直径达到约 200 nm, 且 Se 棒之间形成胶联 (图 3-B)。24 - 36 h 处于对数生长期阶段, 此时大量产生 Se 纳米棒。进入稳定期之后, *Shewanella oneidensis* MR-1 产生的单质 Se 继续生长, 超出纳米物质的规格; 另外, *Shewanella oneidensis* 能够产生大量的胞外多糖<sup>[12]</sup>, 稳定期之后多糖积累、浓度增加, 从而将若干 Se 棒胶联在一起。因此本研究表明, 对数生长期是 *Shewanella oneidensis* MR-1 合成 Se 纳米棒的最佳时期。

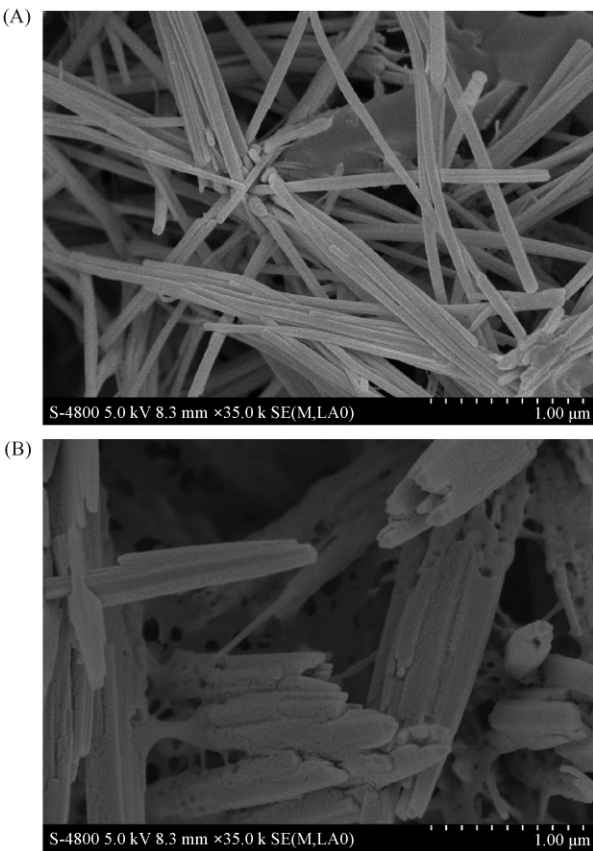


图 3. 培养 24 h (A) 和 72 h (B) 形成沉淀的扫描电镜图 (35000 ×)

Figure 3. The scanning electron microscopy (35000 ×) of deposits after 24 h (A) and 72 h (B) incubation.

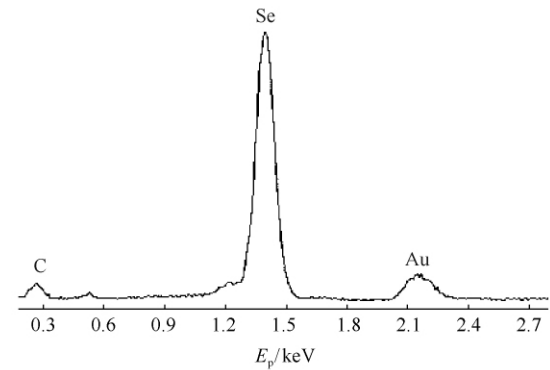


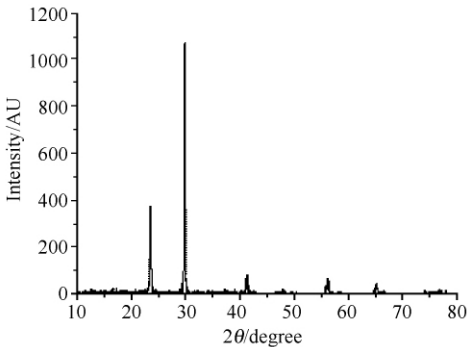
图 4. 纳米棒的 X 射线能谱

Figure 4. The energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy of nanobars.

2.3 X-射线衍射 (XRD)

我们对培养 24 h 产生的 Se 纳米棒进行 X-射线衍射分析。XRD 谱图 (图 5) 与 PDF No. 01-073-0465 匹配较好, 其峰所对应的层面间距  $d$  值与 PDF

No.01-073-0465 的  $d$  值完全相同(表 1),可确定为单质 Se,不含其他副产物,且单质 Se 的结晶度较好。



*Bioscience, Biochemistry & Bioinformatics*, 2011, 1 (2) : 148-152.

- [11] Mézes M, Balogh K. Prooxidant mechanisms of selenium toxicity – a review. *Acta Biologica Szegediensis*, 2009, 53 (S1) : 15-18.
- [12] Cao B, Ahmed B, Kennedy DW, Wang ZM, Shi L,

Marshall MJ, Fredrickson JK, Isern NG, Majors PD, Beyenal H. Contribution of extracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms to U ( VI ) immobilization. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45 (13) :5483-5490.

# Biosynthesis of selenium nanobars by *Shewallena oneidensis* MR-1

Huan Deng<sup>1</sup>, Zhiyong Zheng<sup>2</sup>, Feng Zhao<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Jiangsu Provincial Key Laboratory of Materials Cycling and Pollution Control, School of Geography Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Urban Pollutant Conversion, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] We used *Shewallena oneidensis* MR-1 to produce selenium (Se) nanobars and studied the influence of Se (IV) concentrations and incubation time on nanobars production. [Methods] We incubated *Shewallena oneidensis* MR-1 under anaerobic condition with Luria-Bertani (LB) liquid medium containing 0.1, 1.0, 10.0 or 100.0 mmol/L Se (IV) in Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, to determine the optimal Se (IV) concentration for bacterial growth. Then, we incubated *Shewallena oneidensis* MR-1 with the optimal Se (IV) concentration and collected deposits 24 and 72 h after anaerobic incubation. We used scanning electron microscopy, energy-dispersive X-ray and X-ray diffraction to analyse the deposits. [Results] The cross sectional diameter and length of deposits that were produced by *Shewallena oneidensis* MR-1 after 24 h incubation with 1 mmol/L Se (IV) was around 80 nm and 2-3 μm, respectively. However, the deposits after 72 h incubation exceeded the size limit of nano material. Furthermore, the energy-dispersive X-ray and the X-ray diffraction spectroscopy confirmed that the deposits were elemental Se. [Conclusion] This study provides a viable method for the biosynthesis of Se nanobar. *Shewallena oneidensis* MR-1 can produce a large number of Se nanobars at exponential phase under 0.1 mmol/L Se (IV).

**Keywords:** *Shewallena*, anaerobic incubation, scanning electron microscopy, selenium nanobars, X-ray diffraction

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Fujian Provincial Science Fund for Distinguished Young Scholars (2014J06007), by the China Postdoctoral Science Foundation (2011M510400, 2012T50142) and by the Foundation for High-level Talents of Nanjing Normal University (2013105XGQ0057)

\* Corresponding author. Tel: +86-592-6190766; E-mail: fzxhao@iue.ac.cn

Received: 21 October 2014/Revised: 19 December 2014