

研究报告

马利亚霉菌(*Mariannaea* sp.) HJ 合成金属硒化物及机理研究

李政 张珩琳 于彬 廉昇阳 范书伶 曲媛媛*

大连理工大学环境学院 工业生态与环境工程教育部重点实验室 辽宁 大连 116024

摘要:【背景】金属硒化物因其优异的光电和催化特性,近年来在半导体、电化学及抗癌等领域成为了研究热点。相较于传统的化学还原法,生物合成金属硒化物具有环境友好、耗能较低等优势。然而,目前有关生物合成金属硒化物的微生物资源较少且相关合成机理尚不明晰。【目的】利用马利亚霉菌(*Mariannaea* sp.) HJ 合成了 3 种金属硒化物并对其合成机理进行了初步探索。【方法】利用 X 射线衍射(X-Ray Diffraction, XRD)和傅里叶转换红外线光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)对菌株 HJ 合成的金属硒化物进行了初步的表征,考察了纳米材料合成过程中总巯基含量、总抗氧化性能及自由基含量变化,并且验证了转运蛋白 DMT1 在金属硒化物合成中所起的关键性作用。【结果】XRD 结果表明菌株 HJ 能够在 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 与 SeO_3^{2-} 作用下分别合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒,其合成的最优 pH 条件分别为 6.0、7.0、8.0。FTIR 结果表明,合成的金属硒化物表面含有氨基、羧基、羟基等官能团。3 种金属硒化物的合成反应体系与空白对照组相比,总巯基含量明显下降,而总抗氧化性能却有所提高,这表明巯基等酶促体系或氨基酸金属蛋白类的非酶促体系可能参与了 SeO_3^{2-} 的还原过程。苯基异硫脲盐酸盐屏蔽实验表明,转运蛋白 DMT1 在 SeO_3^{2-} 转运和金属硒化物分泌过程中起到关键作用。此外, Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Co^{2+} 的加入使得菌株 HJ 产生氧化应激反应,在胞外分泌了大量的过氧化氢、羟基自由基和超氧自由基,而上述自由基可通过诱导热激效应的方式增强金属离子或纳米颗粒的转运过程。【结论】利用马利亚霉菌(*Mariannaea* sp.) HJ 合成了 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒,为研究金属硒化物的生物合成及机理提供了一定的理论参考。

关键词: 金属硒化物, 马利亚霉菌

Characterization and mechanism of metal selenides synthesized by *Mariannaea* sp. HJ

LI Zheng ZHANG Henglin YU Bin LIAN Shengyang FAN Shuling QU Yuanyuan*

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, Ministry of Education; School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China

Abstract: [Background] Metal selenides have attracted increasing attention in semiconductor,

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31970107); Open Project of State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment in Harbin Institute of Technology (QAK201943); National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602306)

***Corresponding author:** E-mail: qyy@dlut.edu.cn**Received:** 26-01-2021; **Accepted:** 05-03-2021; **Published online:** 01-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31970107); 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题(QAK201943); 国家重点研发计划(2018YFC1602306)

***通信作者:** E-mail: qyy@dlut.edu.cn**收稿日期:** 2021-01-26; **接受日期:** 2021-03-05; **网络首发日期:** 2021-04-01

electrochemistry and anticancer fields due to its excellent photoelectric and catalytic properties. Compared with the traditional chemical methods, biosynthesis of metal selenides is environmentally friendly and lower energy. However, few studies on the biosynthesis of metal selenides were reported, and its relevant mechanisms were still unclear. **[Objective]** We chose *Mariannaea* sp. HJ to synthesize three kinds of metal selenides and proposed the possible mechanisms. **[Methods]** X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to initially characterize the metal selenides synthesized by strain HJ. The changes in total sulfhydryl content, total antioxidant capacity and free radical content were investigated during the synthesis process. Besides, the function of transporter DMT1 was also verified in the synthesis of metal selenides. **[Results]** XRD results showed that Bi_4Se_3 , PbSe and CoSe_2 nanoparticles could be separately biosynthesized by strain HJ under the action of Bi^{3+} , Pb^{2+} , Co^{2+} and SeO_3^{2-} , and the optimal pH conditions for their synthesis were 6.0, 7.0, and 8.0, respectively. FTIR analysis illustrated that these nanoparticles were covered with certain functional groups such as amino, carboxyl and hydroxyl groups. Compared to the control group, it was also found that the total sulfhydryl concentration was significantly reduced during the synthesis process, while the total antioxidant performance was increased. It was indicated that the sulfhydryl system or the non-enzymatic system of amino acid metalloproteins could be involved in the reduction of SeO_3^{2-} . The benzylisothiourreas shielding experiment showed that metal transporter DMT1 played a key role in SeO_3^{2-} transportation and metal selenides secretion. Besides, oxidative stress was produced after the addition of Bi^{3+} , Pb^{2+} and Co^{2+} , which caused strain HJ to secrete more hydrogen peroxide, hydroxyl free radicals and superoxide free radicals outside the cells. The transportation process of metal ions or nanoparticles could be enhanced by above free radicals through inducing heat shock effects. **[Conclusion]** *Mariannaea* sp. HJ could greenly synthesize Bi_4Se_3 , PbSe and CoSe_2 nanoparticles. This study would provide useful information for biosynthesis and mechanism of metal selenides.

Keywords: metal selenide, *Mariannaea* sp.

硒与金属之间存在着典型的拮抗作用,不同价态的硒可以与金属离子结合形成金属硒化物。金属硒化物因其优异的光电特性和催化特性近年来备受关注,在太阳能电池、污染物降解、光催化等领域具有潜在的应用价值^[1]。其中,硒化铅因其具有较大的激子玻尔半径和较高的光学灵敏度而被视作一种新型的半导体材料。硒化镉是一种典型的荧光量子点,广泛应用于光敏化太阳能电池的制备和生物医学成像领域。硒化铋因其较高的光热转换效率和在人体内的低毒性,被用于抗癌药物的载体^[2]。

传统的金属硒化物的合成方法一般为化学法。化学法一般是在真空中通过金属和硒的直接反应获取金属硒化物^[3]。然而,该方法存在着耗能较高及使用的还原剂具有毒性等环境问题,因此利用生物法合成金属硒化物是目前研究的热点^[4]。细菌 *Pseudomonas stutzeri*、*Bacillus licheniformis* 和真菌 *Aspergillus terreus* 等已经被证明具有合成不同金属

硒化物的能力^[5-7]。但目前有关金属硒化物合成的机理研究较为模糊。Wang 等将谷胱甘肽还原酶基因屏蔽后发现菌株合成 CdSe 的能力明显下降,这表明谷胱甘肽对微生物合成金属硒化物有重要作用^[8]。Jacob 等在 PdSe 的生物合成机理研究中通过傅里叶转换红外线光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)分析表明,含有巯基的硫醇基团存在于纳米颗粒的表面,并且在合成过程中检测到植物螯合素产量的增加;植物螯合素是以谷胱甘肽为底物催化合成的金属硫醇盐多肽,在真菌和植物体内起着抵抗重金属毒性的作用,这表明金属硒化物的合成伴随着金属离子的氧化应激效应^[7]。因此本研究将在前期研究基础上对金属硒化物合成机理进行初步探索。

本实验室前期从活性污泥中筛选得到一株马利亚霉菌(*Mariannaea* sp.) HJ,首先,通过 X 射线衍射(X-Ray Diffraction, XRD)和 FTIR 对菌株 HJ

合成的 Bi_4Se_3 、 CoSe_2 和 PbSe 纳米颗粒进行了初步的定性分析, 并考察了 pH 对 3 种金属硒化物生物合成的影响; 其次, 在上述实验的基础上测定了菌株 HJ 在 3 种金属硒化物合成过程中总巯基含量、总抗氧化性物质含量、胞外聚合物含量及胞外上清液中自由基含量变化情况; 最后, 通过胞内金属离子的浓度变化及转运蛋白屏蔽实验对金属离子及 SeO_3^{2-} 的转运过程进行了初步探讨。本研究为探索生物合成 Bi_4Se_3 、 CoSe_2 和 PbSe 纳米颗粒及其机理研究提供了一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养

本实验前期在反应器活性污泥中筛选得到一株马利亚霉菌(*Mariannaea* sp.) HJ。现已鉴定并保存于中国普通微生物菌种保藏中心, 菌种保藏编号为 CGMCC No.10030。菌株 HJ 的 26S rRNA 基因序列储存在 GenBank 数据库, 登录号为 KP3302049^[9]。采用改良马丁培养基对菌株 HJ 进行培养, 改良马丁培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, KH_2PO_4 1.0, 葡萄糖 1.0, MgSO_4 0.5, pH 7.0。培养基在 0.7×10^5 Pa 高压蒸汽中灭菌 15 min 后使用, 接种 2% (体积分数) 的 HJ 菌液, 在 30 °C、150 r/min 条件下振荡培养 2 d。

1.1.2 主要试剂和仪器

亚硒酸钠(Na_2SeO_3)、硝酸铅 $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$ 、硝酸钴 $[\text{Co}(\text{NO}_3)_2]$ 和硝酸铋 $[\text{Bi}(\text{NO}_3)_3]$, 分析纯, 天津大茂化学试剂厂; 苊基异硫脲盐酸盐硝基、四氮唑蓝(Nitrotetrazolium Blure Chloride, NBT)、硫代巴比妥酸(Thiobarbituric Acid, TBA)、2-脱氧-D-核糖、N,N-二乙基对苯二胺(N,N-Diethyl-P-Phenylenediamine, DPD)、辣根过氧化物酶(Peroxidase, POD), 分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 巯基检测试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为分析纯及以上纯度。

超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电感耦合等离子体发射光谱仪, 珀金埃尔默股份有限公司; 高速低温冷冻离心机、紫外可见分

光光度计, 贝克曼库尔特股份有限公司; 傅立叶变换红外线光谱, 上海高致精密仪器有限公司; 全自动 X 射线衍射仪, Panalytical 分析仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 金属硒化物的生物合成及表征

菌株 HJ 培养 24 h 后, 取适量菌液利用定性滤纸过滤收集菌丝, 用去离子水清洗 2 次后, 取湿重为 1.0 g 的菌丝重悬于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中。向不同反应体系中分别添加 1 mmol/L 的 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 和 1 mmol/L Na_2SeO_3 , 使二者摩尔比为 1:1。将该反应体系置于 30 °C、150 r/min 条件下避光培养 72 h 获得 3 种不同的金属硒化物。合成稳定后, 利用超声波细胞破碎仪在 4 °C、30 W 条件下破碎 40 min (工作 1 s, 间隔 1 s), 再在 2 000 r/min 条件下离心 5 min 去除细胞碎片, 得到纯净的 3 种金属硒化物溶液。

XRD 表征: 取适量上述合成的 3 种金属硒化物分别在 90 °C 的条件下真空干燥 12 h, 干燥后的样品用研钵充分研磨, 使固体粉末粒径减小到 45 μm 以下。使用全自动 X 射线衍射仪对样品进行表征, Cu 靶 Ka 辐射, 波长 $\lambda=0.154\ 056\ \text{nm}$, 工作功率 12 kW, 精度 0.01, 2θ 扫描区间 20°–80°, 扫描速度 5(°)/min。

FTIR 表征: 取适量培养 12 h 后的 HJ 菌丝, 利用定性滤纸过滤收集菌丝, 超纯水冲洗 3 次。分别将上述合成的 3 种金属硒化物及 HJ 菌丝于 90 °C 条件下烘干 12 h, 将得到的样品分别与溴化钾粉末混合后于研钵中充分混合研磨, 并将研磨后的碎片压片, 使用 FTIR 在 400–4 000 cm^{-1} 范围内测量其吸收光谱, 扫描速度 5 kHz, 扫描间隔 2 nm。

1.2.2 菌株 HJ 合成金属硒化物的条件优化

将反应液的 pH 调为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 并按照 1.2.1 方法合成金属硒化物。将合成结束的反应体系于定性滤纸过滤, 取上清液于 10 000 r/min、10 min 的条件下离心 2 次去除沉淀得到胞外上清液。最后利用抗坏血酸还原法测定胞外上清液中残留的 SeO_3^{2-} 含量^[10], 具体为: 取 1 mL 胞外上清液加入 500 μL 浓度为 4 mol/L 的盐酸和 1 mL 浓度为 1 mol/L 的抗坏血酸, 反应 10 min 后于紫外可见分

光光度计 500 nm 处测量吸光值, 并通过标准曲线换算其 SeO_3^{2-} 残留浓度。

1.2.3 还原性物质测定

在 3 种金属硒化物合成过程中, 分别于 0、8、16、24、32、40、48、60 和 72 h 取一定量的菌液, 用滤纸过滤并使用去离子水清洗 2 次, 利用超声波细胞破碎仪在 4 °C 条件下破碎 40 min, 再在 10 000 r/min 条件下离心 10 min 去除细胞碎片及金属硒化物, 得到上清液。取 200 μL 上清液利用巯基检测试剂盒对金属硒化物合成过程中总巯基含量进行测定; 另取 120 μL 上清液, 利用总抗氧化能力检测试剂盒对金属硒化物合成过程中总抗氧化物质含量进行测定。

1.2.4 胞内金属离子含量变化

选取 3 种硒化物中较为典型的 Bi_4Se_3 作为研究对象。取 9 个 10 mL 的离心管于 121 °C 灭菌 20 min 后按 1.2.1 所示方法合成 Bi_4Se_3 。在合成过程中于 0、8、16、24、32、40、48、60 和 72 h 取一定量样品, 用滤纸过滤并使用去离子水清洗 2 次, 利用超声波细胞破碎仪在 4 °C 条件下破碎 40 min, 再在 10 000 r/min 条件下离心 10 min 去除细胞碎片及金属硒化物, 得到菌株 HJ 胞内上清液。利用电感耦合等离子体发射光谱仪对其胞内上清液中 Bi^{3+} 含量进行测定。

1.2.5 金属转运蛋白抑制

在 3 种金属硒化物合成过程中分别向各反应体系中加入 10 mmol/L 的苄基异硫脲盐酸盐, 用于抑制金属转运蛋白 DMT1 的活性^[11]。72 h 反应结束后分别将各菌液过滤, 取上清液于 10 000 r/min、10 min 的条件下离心 2 次, 制得胞外上清液, 利用抗坏血酸还原法对胞外上清液中残留的 SeO_3^{2-} 含量进行测定。实验以不添加苄基异硫脲盐酸盐的反应体系作为空白对照。

1.2.6 胞外聚合物含量测定

首先利用 1.2.1 中方法合成金属硒化物。将合成得到的金属硒化物和菌株 HJ 分别过滤得到上清液, 于 10 000 r/min 条件下离心 10 min 去除沉淀, 利用 0.45 μm 的滤膜过滤上清液。在上清液中按体积比 1:4 添加冰无水乙醇, 并在 4 °C 条件下放置 24 h。

再以 12 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀用适量去离子水溶解即为胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)。最后采用考马斯亮蓝法测定胞外 EPS 中蛋白质含量^[12], 使用苯酚-硫酸法测定其中多糖含量^[13]。

1.2.7 自由基含量测定

胞外过氧化氢含量的测定: 使用 DPD/POD 法测定胞外过氧化氢含量^[14]。按 1.2.1 方法合成金属硒化物后, 将 3 种金属硒化物和菌株 HJ 通过定性滤纸过滤获得胞外上清液。取 27 mL 上清液, 向其中加入 3 mL 浓度为 0.5 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 并分别加入 50 μL 浓度为 0.05 mol/L 的 DPD 和 1 g/L 的 POD。使用紫外分光光度计于 551 nm 处测量吸光度。

胞外超氧自由基的测定: 向上述金属硒化物和菌株 HJ 的胞外提取液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 NBT, 用紫外可见分光光度计在 560 nm 处测量吸光值^[15]。

胞外羟基自由基的测定: 取 2 mL 上述金属硒化物和菌株 HJ 的胞外提取液, 向其中加入 30 mmol/L 的 2-脱氧-D-核糖于 35 °C 反应 15 min。向 0.05 mol/L NaOH 中加入质量分数为 1% 的 TBA, 取 1 mL NaOH 与 1 mL 混合液混合并加入 1 mL 无水乙酸, 将该反应体系置于沸水水浴 20 min, 室温冷却后, 测定 532 nm 处的吸光值^[16]。

2 结果与讨论

2.1 金属硒化物生物合成及条件优化

从图 1 中可知, 加入 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Co^{2+} 后, 马利亚霉菌 HJ 全细胞和胞外上清液在 72 h 后均变为黑色。利用 XRD 对合成的纳米颗粒进行了定性分析。在 Bi^{3+} 组中(图 1A), 与硒化铋标准卡(ICSD No. 72-2065)进行比对可知, 2θ 在 19.96°、25.66°、28.73°、39.83°、42.29°、47.18°、51.94° 和 59.50° 处出现 8 个衍射峰, 分别与 Bi_4Se_3 六方晶型结构的(009)、(104)、(107)、(0014)、(110)、(119)、(0120) 和 (2014) 的晶面对应^[17]。在 Pb^{2+} 组中(图 1B), 2θ

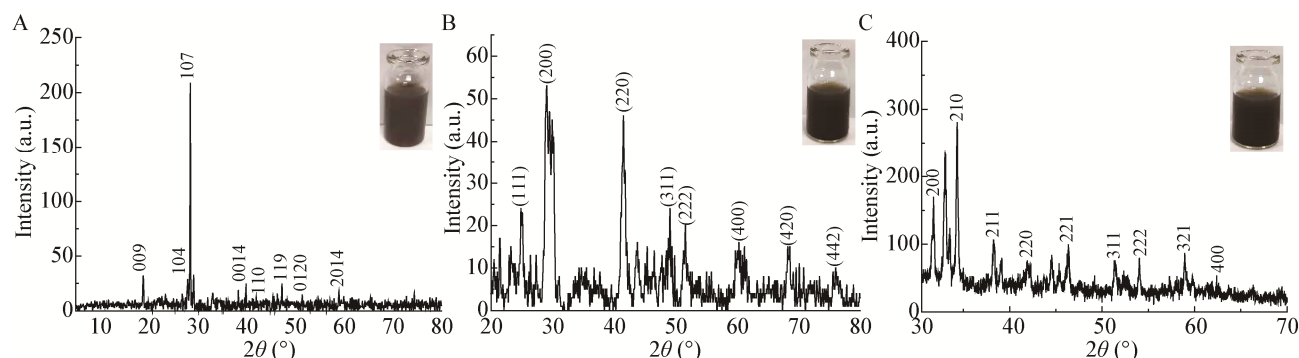


图1 菌株 HJ 合成 Bi_4Se_3 (A)、 PbSe (B)和 CoSe_2 (C)纳米颗粒的 XRD 表征

Figure 1 XRD analysis of Bi_4Se_3 (A), PbSe (B) and CoSe_2 (C) nanoparticles synthesized by fungus HJ

在 24.83° 、 28.97° 、 41.53° 、 49.10° 、 51.56° 、 60.20° 、 68.33° 和 76.04° 处出现 8 个衍射峰, 分别与 PbSe 标准立方晶型结构(ICSD No. 77-0245)的(111)、(200)、(220)、(311)、(222)、(400)、(420)和(442)的晶面相对应^[18]。如图 1C 所示, Co^{2+} 中合成的黑色物质的 2θ 分别在 31.81° 、 34.39° 、 38.27° 、 41.76° 、 46.40° 、 51.42° 、 53.95° 、 58.83° 及 62.37° 处出现 9 个衍射峰, 与 CoSe_2 六方晶型结构(ICSD No. 09-0234)的(200)、(210)、(211)、(220)、(221)、(311)、(222)、(321)和(400)的晶面对应^[19]。综上, 菌株 HJ 可以分别在 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 与 SeO_3^{2-} 作用下合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒。

为了表征生物合成的金属硒化物纳米颗粒表面存在的官能团, 利用 FTIR 对合成的 3 种金属硒化物和菌株 HJ 胞内提取物表面的官能团进行了分析(图 2)。如图 2 所示, 金属硒化合物及菌株 HJ 胞内提取物均在 ~ 3446 、 ~ 2930 、 ~ 2839 、 ~ 1648 、 ~ 1537 、 ~ 1347 、 ~ 1237 、 ~ 1083 、 $\sim 1036\text{ cm}^{-1}$ 处出现特征吸收峰。其中, $\sim 3446\text{ cm}^{-1}$ 是 O-H 伸缩振动峰^[20], $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ 和 $\sim 2839\text{ cm}^{-1}$ 是 C-H 的伸缩振动峰^[21], $\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ 和 $\sim 1537\text{ cm}^{-1}$ 是氨基 I 和氨基 II 的特征峰^[22], $\sim 1347\text{ cm}^{-1}$ 是 C-H 的变形振动峰^[23], $\sim 1237\text{ cm}^{-1}$ 是 C-C 的伸缩振动峰^[20], $\sim 1083\text{ cm}^{-1}$ 是 C-O-C 的伸缩振动峰^[21], $\sim 1036\text{ cm}^{-1}$ 是 C-N 的伸缩振动峰^[24]。Chandramohan 等在使用 *B. subtilis*

合成纳米硒时发现细胞提取物中的氨基、羧基、羰基等一些官能团参与了硒的生物还原过程^[24]。Jacob 等在研究 PdSe 的生物合成过程中利用 FTIR 发现一些蛋白质和酸性基团修饰在纳米颗粒表面。综上可得, 氨基、羧基、羟基等官能团可能修饰在纳米颗粒的表面用于其稳定和生长^[7]。

微生物在合成纳米材料如纳米金、银时会受到环境因素的影响, 其中 pH 对生物还原过程的影响最为显著, 因此, 在探究生物合成金属硒化物机理之前需对其最优 pH 进行调控。如图 3A 所示, 在 Bi_4Se_3 纳米材料合成过程中, 菌株 HJ 胞外上清液中 SeO_3^{2-} 还原率在 pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的条件下分别为 82.0%、89.2%、60.1%、60.9%和

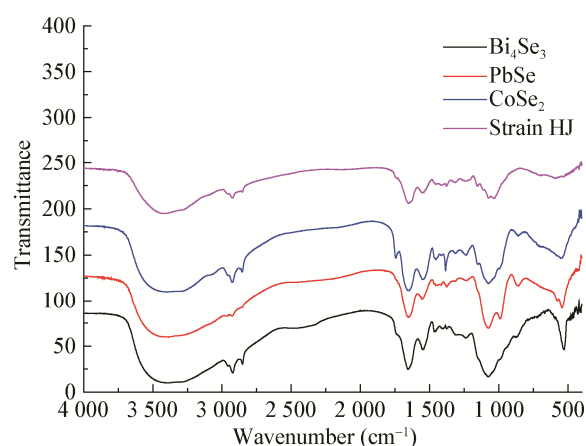


图2 菌株 HJ 及金属硒化物的 FTIR 表征

Figure 2 FTIR spectrum of strain HJ and three metal selenides

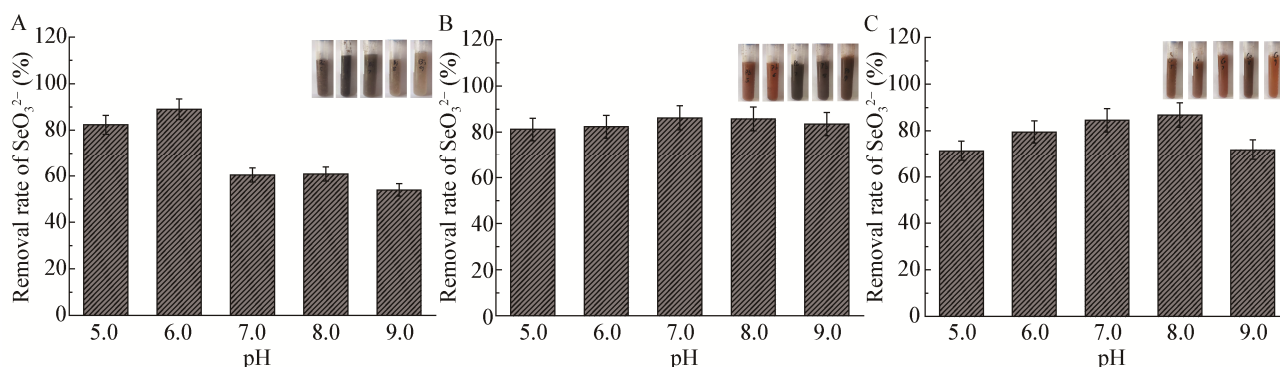


图3 不同 pH 对菌株 HJ 合成 Bi_4Se_3 (A)、 PbSe (B)和 CoSe_2 (C)纳米颗粒的影响

Figure 3 Biosynthesis of Bi_4Se_3 (A), PbSe (B) and CoSe_2 (C) nanoparticles by strain HJ at different pH

53.8%，由此可知 pH 6.0 为 Bi_4Se_3 合成的最优 pH 条件。对于合成 PbSe 纳米材料而言，pH 对其胞外 SeO_3^{2-} 还原的影响不大，其中在 pH 7.0 时还原率达到了 85%，表明 pH 7.0 为菌株 HJ 合成 PbSe 的最优 pH 条件(图 3B)。此外，在 Co^{2+} 诱导下，仅有在 pH 8.0 条件下反应体系呈现棕色且胞外 SeO_3^{2-} 还原率最大，表明 pH 8.0 为 CoSe_2 合成的最优 pH 条件(图 3C)。Diko 等利用真菌 WL-Go 合成 PbSe 时发现不同 pH 对合成效果影响较大，当 pH 为 7.0、8.0 时可以合成黑色的 PbSe 纳米颗粒，而在其他条件下几乎无法合成^[25]。综上，对于菌株 HJ 而言，其全细胞体系合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒的最优 pH 条件分别为 6.0、7.0、8.0。

2.2 还原性物质检测

大量研究表明谷胱甘肽(Glutathione, GSH)和某些金属硫蛋白是生物体内重要的 SeO_3^{2-} 还原性物质，其中起关键性作用的官能团是巯基($-\text{SH}$)^[26]。为了探究菌株 HJ 合成金属硒化物过程中的还原性物质含量变化，本实验检测了不同时间反应体系内总巯基含量，结果如图 4A 所示。结果表明金属硒化物的合成伴随着巯基的消耗。在 72 h 内，菌株 HJ 总巯基含量先增加后降低，稳定时含量约为 0.5 mg/L，与初始含量相比没有明显变化。然而合成 3 种金属硒化物的过程中，体系内总巯基含量在前 12 h 升高后持续下降，在反应 72 h 后 3 者均降至 0.1 mg/L 左右，与初始含量相比明显降低。在最

初 12 h 内，细胞为抵御重金属和亚硒酸钠的毒性分泌大量巯基。在合成金属硒化物时，菌株 HJ 消耗大量的巯基还原 SeO_3^{2-} 为 Se^{2-} ， Se^{2-} 进一步与金属离子反应形成金属-硒复合体。Wang 等利用 *Pseudomonas stutzeri* TS44 成功合成了纳米硒及 CdSe 纳米颗粒，而在合成这 2 种材料的过程中均检测到了 GSH 的增加，表明 GSH 是菌株 TS44 合成 CdSe 荧光量子点的重要还原物质^[8]。

除巯基外，微生物在金属离子作用下也可产生一系列的抗氧化物质(Antioxidant Compound, AOC)，如维生素 C、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等^[27-28]。这类抗氧化物质用于保护细胞 DNA、蛋白质等免受氧化损伤，在金属离子解毒和蛋白质修饰过程中起重要作用。菌株 HJ 合成 3 种金属硒化物过程中反应体系内总抗氧化物(T-AOC)含量变化如图 4B 所示。与菌株 HJ 相比，金属硒化物合成过程中总抗氧化物质含量均增加。在合成 Bi_4Se_3 的过程中，T-AOC 含量在 0–30 h 内逐渐增加，并于 30 h 达到最大为 0.006 3 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}$ 。在合成 PbSe 过程中，反应体系也于 30 h 达到最大为 0.002 7 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}$ 。 CoSe_2 的合成过程中于 38 h 达到最大，为 0.000 881 1 $\mu\text{mol}/\text{mg-protein}$ 。这可能是因为菌株 HJ 为了抵御重金属产生的氧化应激而产生了大量的抗氧化物质，导致前期 T-AOC 含量的急速上升。然而在合成金属硒化物后因为毒性效应的解除从而停止合成抗氧化物，同时，部分抗氧化物质如谷胱甘肽

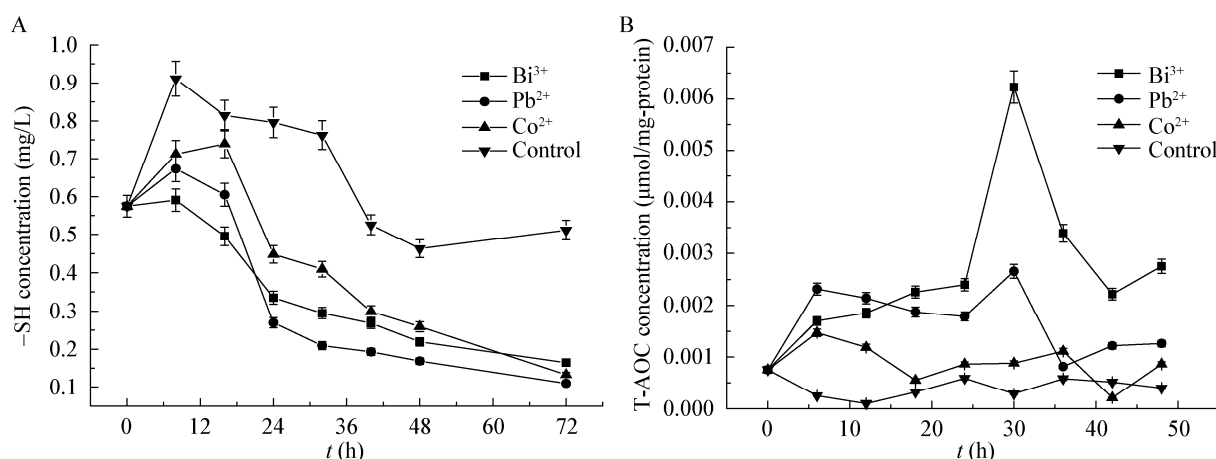


图4 金属硒化物合成过程中还原性物质浓度的变化

Figure 4 The concentration of reductive substance in the synthesis process of three metal selenides

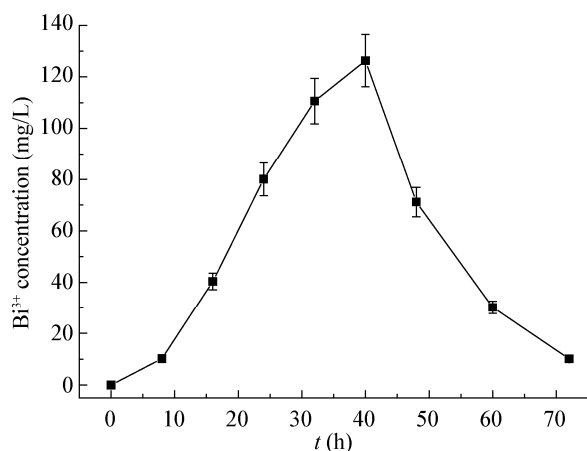
注: A: 总巯基浓度; B: 总抗氧化物质浓度

Note: A: The concentration of -SH; B: The concentration of T-AOC

等酶促体系或氨基酸金属蛋白类的非酶促体系, 还可能参与了金属硒化物的合成过程, 导致 T-AOC 含量下降。由此推测抗氧化物在金属硒化物的合成中参与了抵抗氧化应激及金属硒化物的合成。

2.3 金属离子及 SeO_3^{2-} 的转运

前期实验已证明菌株 HJ 可在胞内或胞外合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒, 其中胞内合成占主导。为了探究在金属硒化物合成过程中金属离子的转运, 本实验选择了一种合成产物较为稳定的 Bi_4Se_3 纳米颗粒, 测定了菌株在合成过程中胞内 Bi^{3+} 浓度的变化, 结果如图 5 所示。在 0–40 h, 胞内

图5 菌株 HJ 合成 Bi_4Se_3 的过程中胞内 Bi^{3+} 浓度变化Figure 5 The intracellular concentration of Bi^{3+} in the Bi_4Se_3 synthesis process by strain HJ

Bi^{3+} 浓度逐渐上升, 并于 40 h 达到最大值 126.3 mg/L, 而后逐渐下降并于 72 h 达到 10.1 mg/L。在最初 8 h 内胞内的 Bi^{3+} 浓度较低, 在 8–40 h 内转运明显加快, 这表明 Bi^{3+} 最初经过 EPS 的缓冲吸附在细胞表面, 并逐渐转运到细胞内与硒反应生成金属硒化物。然而在反应过程中因为胞外金属离子浓度的下降和金属硒化物的生成导致金属和硒的毒性效应得以减弱, 从而导致金属离子转运进细胞和转出速度的变快^[29]。

微生物在合成纳米材料过程中必然会存在离子和颗粒的转运过程, 金属离子和 SeO_3^{2-} 的转运通常是借助细胞膜表面的转运蛋白来实现的, 例如 DMT1 转运蛋白等^[30]。因此为了探究金属离子和 SeO_3^{2-} 在金属硒化物合成中的转运过程, 本实验利用苊基异硫脲盐酸盐作为 DMT1 转运蛋白的屏蔽剂^[11], 考察抑制剂的加入是否会对金属硒化物合成产生明显干扰。如图 6 所示, 本实验通过测定溶液中残留的 SeO_3^{2-} 浓度以判断 SeO_3^{2-} 的转运以及金属硒化物的合成情况。添加苊基异硫脲盐酸盐 72 h 后, 反应体系颜色明显变浅, 表明 3 种金属硒化物合成均受到明显抑制。然而其胞外 SeO_3^{2-} 浓度在 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Co^{2+} 的体系中分别为 185.0、128.1 和 223.9 mg/L, 与空白组相比显著增加, 表明在苊基异硫脲盐酸盐

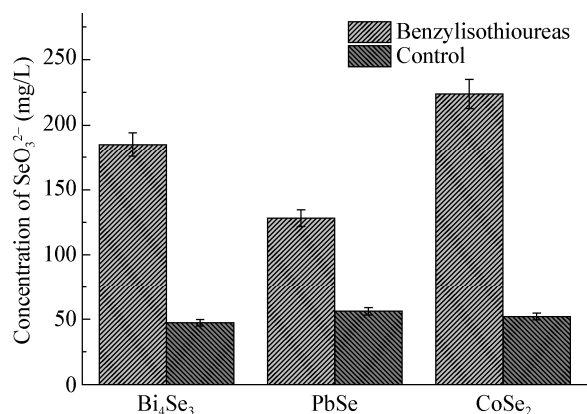


图 6 金属硒化物合成过程中 DMT1 转运蛋白抑制剂对胞外 SeO_3^{2-} 含量变化的影响

Figure 6 Extracellular SeO_3^{2-} concentration of three metal selenides induced by DMT1 transporter inhibitor

的作用下 DMT1 转运蛋白被屏蔽, 这导致细胞转运 SeO_3^{2-} 进入胞内的能力受到抑制, 因此无法合成金属硒化物。

2.4 毒性效应

胞外聚合物 (Extracellular Polymeric Substances, EPS) 在降低重金属毒性中起着重要的作用。首先, EPS 可以络合或通过吸附作用阻止重金属和微生物的直接接触; 其次, 菌株可以通过向胞外分泌特殊的生物活性物质或产生特殊的代谢物质以达到解毒的目的^[31]。为了更直观地了解在金属硒化物合成过程中胞外 EPS 所起的关键作用, 本实验比较了不同金属硒化物合成后胞外 EPS 中的蛋白质和多糖含量变化, 结果如图 7 所示。

与对照组相比, 金属硒化物合成后其胞外 EPS 含量大幅下降。其中蛋白质含量显著增加, 对照组的蛋白质含量为 3.9 mg/L, Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒合成后为 19.0、32.6 和 34.7 mg/L。多糖含量却明显下降, 分别为 1.9、9.0 和 26.8 mg/L。在上述 3 种金属离子作用下菌株 HJ 胞外多糖被大量消耗, 以减少其带来的严重的毒性效应^[32]。研究表明, 胞外的生物活性物质(巯基)可将金属离子修饰后转运入胞内, 某些蛋白质能直接还原 SeO_3^{2-} 为 Se^0 或 Se^{2-} ^[32]。杨颖等通过凝胶电泳实验证实 *Cupriavidus* sp. SHE 胞外蛋白质在 SeNPs 合成过程中起着重要的作用^[33]。由上述推测菌株 HJ 在金属

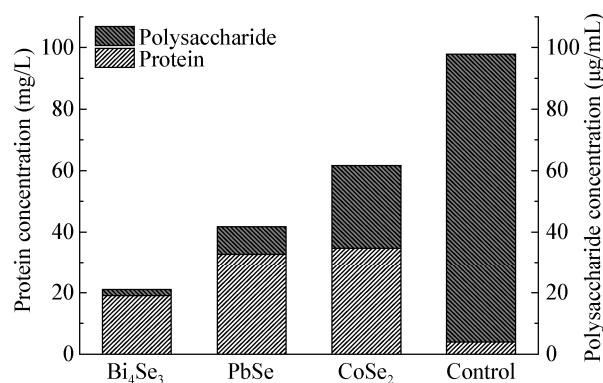


图 7 金属硒化物合成后菌株 HJ 胞外聚合物含量变化
Figure 7 The EPS concentration of three metal selenides

硒化物合成过程中通过向胞外分泌某些特定蛋白质的方式参与纳米颗粒的还原或金属离子的修饰作用。

通常金属离子作用于细胞后, 由于毒性作用会产生氧化应激, 促使细胞产生一系列的活性氧自由基, 例如超氧自由基、羟基自由基, 而细胞所产生的自由基会对细胞脂质、酶等产生明显的氧化损伤^[34]。此外, 金属离子产生的氧化应激也会引发细胞的热激效应, 导致细胞膜渗透性的增加从而增加胞内物质的转运^[34]。本实验分别测定了 3 种金属硒化物合成后胞外上清液中的过氧化氢、超氧自由基和羟基自由基含量的变化。如图 8 所示, 菌株 HJ 在合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 后胞外上清液中过氧化氢的含量与空白的 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 相比上升到 9.9、5.9 和 11.1 $\mu\text{mol/L}$ 。经 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 和 Co^{2+} 诱导后胞外上清液中超氧自由基强度比空白增加了 30.7%、251.4% 和 262.8%, 羟基自由基含量增加了 138.3%、59.5% 和 58.3%。Sousa 等发现 Pb^{2+} 的加入会导致真菌 *Saccharomyces cerevisia* 分泌更多的超氧阴离子和过氧化氢含量, 表明 Pb^{2+} 会引发严重的氧化应激损伤并进一步影响细胞的电子传递^[35]。此外, Tarze 等发现 SeO_3^{2-} 会对 *Saccharomyces cerevisiae* 产生明显的氧化损伤, 在硒暴露后检测到活性氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)含量的明显增加, 而这一过程可能是 SeO_3^{2-} 还原过程大量消耗胞内 GSH 所致^[36]。

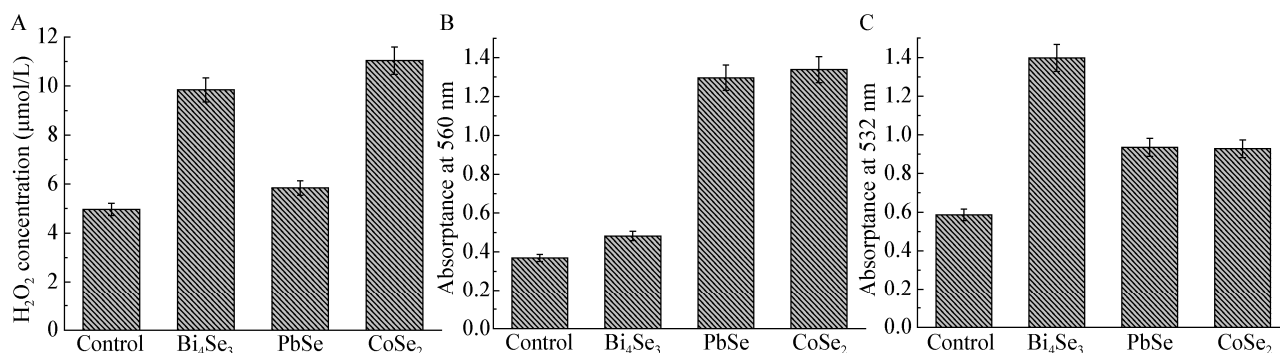


图8 金属硒化物合成后 ROS 含量变化

Figure 8 The concentration of ROS in the synthesis process of three metal selenides

注: A: 过氧化氢; B: 超氧自由基; C: 羟基自由基

Note: A: Hydrogen peroxide; B: Superoxide free radical; C: Hydroxyl free radical

综上可得金属离子与 SeO_3^{2-} 会对细胞产生一定的氧化损伤作用, 而氧化应激的产生可能通过改变细胞的还原性物质或电子传递链等方法对金属硒化物的合成过程产生影响。

2.5 金属硒化物合成机理

根据以上实验结果并结合文献, 提出了菌株 HJ 合成金属硒化物的机理图, 如图 9 所示。金属离子与 SeO_3^{2-} 的加入首先会引发菌株产生氧化应激反应, 大量分泌超氧自由基、羟基自由基和过氧化氢等物质, 同时向胞外分泌还原性蛋白, 将 SeO_3^{2-} 还原为 Se^0 。 Se^0 在胞外或者进入胞内被进一步还原为

Se^{2-} , 这一还原过程可能是由谷胱甘肽等酶促体系或氨基酸金属蛋白类的非酶促体系驱动的^[27]。金属离子一部分被胞外多糖络合以达到解毒的目的, 另一部分在金属转运蛋白的作用下进入细胞。在胞内, 金属离子可能被一些金属硫蛋白或是由谷胱甘肽转化而来的植物螯合素修饰并被进一步转运入液泡中, 这一过程使得金属离子表面可能带有一些具有生物活性的官能团, 例如氨基、羧基、羟基、醚键等。在液泡中, Se^{2-} 与被蛋白修饰的金属离子结合形成金属-硒-蛋白质的复合物^[7]。金属离子和 SeO_3^{2-} 造成的氧化应激也会产生热激

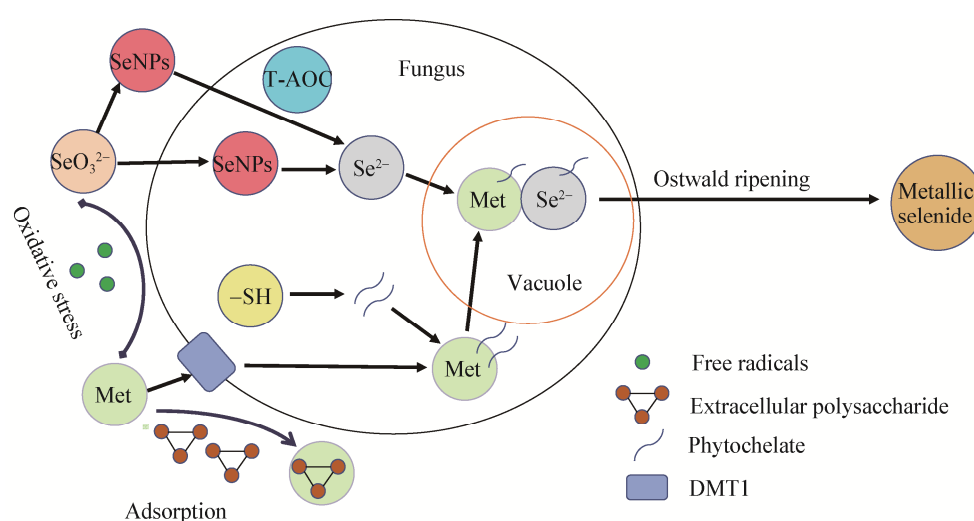


图9 菌株 HJ 生物合成金属硒化物机理

Figure 9 The possible mechanism for the biosynthesis of metal selenide by strain HJ

效应, 导致细胞膜的通透性改变, 使得胞内的金属-硒-蛋白复合物被排出胞外并在奥斯瓦尔德熟化机制作用下生成金属硒化物纳米颗粒^[37]。

3 结论

本研究考察了马利亚霉菌 HJ 合成金属硒化物的能力, 并对其合成条件进行了初步优化。同时, 分别对金属硒化物合成过程中的还原性物质含量及胞内金属离子浓度变化进行了测定。检测了转运蛋白抑制剂对菌株 HJ 合成金属硒化物的影响, 从毒性效应角度考察了合成过程中胞外聚合物含量的变化及氧化损伤情况。得到的实验结论如下:

(1) 菌株 HJ 能够在 Bi^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 与 SeO_3^{2-} 作用下分别合成 Bi_4Se_3 、 PbSe 和 CoSe_2 纳米颗粒, 而且其合成的最优 pH 条件分别为 6.0、7.0、8.0。FTIR 分析表明金属硒化物纳米颗粒表面存在着氨基、羧基、羟基等官能团。

(2) 菌株 HJ 合成金属硒化物过程中总巯基含量显著降低, 表明以巯基为活性中心的 GSH 或金属硫蛋白可能在金属硒化物的生物合成中起重要作用。然而合成过程中 T-AOC 含量先增加后减少, 表明谷胱甘肽等酶促体系或氨基酸金属蛋白类的非酶促体系可能参与了金属硒化物的合成。此外, 苜蓿基异硫脲盐酸盐屏蔽实验表明 DMT1 转运蛋白在 SeO_3^{2-} 转运过程中起到了关键作用。

(3) 金属离子对菌株 HJ 的毒性效应造成胞外蛋白的含量上升、多糖的含量显著降低。金属离子刺激菌株 HJ 产生氧化应激效应, 导致胞外超氧自由基、羟基自由基和过氧化氢的含量明显上升。

REFERENCES

- [1] Anantharaj S, Ede SR, Sakthikumar K, Karthick K, Mishra S, Kundu S. Recent trends and perspectives in electrochemical water splitting with an emphasis on sulfide, selenide, and phosphide catalysts of Fe, Co, and Ni: a review[J]. ACS Catalysis, 2016, 6(12): 8069-8097
- [2] Lu T, Dong SM, Zhang CJ, Zhang LX, Cui GL. Fabrication of transition metal selenides and their applications in energy storage[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2017, 332: 75-99
- [3] Cirillo M, Aubert T, Gomes R, Van Deun R, Emplit P, Biermann A, Lange H, Thomsen C, Brainis E, Hens Z. "Flash" synthesis of CdSe/CdS core-shell quantum dots[J]. Chemistry of Materials, 2014, 26(2): 1154-1160
- [4] Zhang HL, Zhou H, Bai JD, Li Y, Yang J, Ma Q, Qu YY. Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2019, 571: 9-16
- [5] Kuroda M, Suda S, Sato M, Ayano H, Ohishi Y, Nishikawa H, Soda S, Ike M. Biosynthesis of bismuth selenide nanoparticles using chalcogen-metabolizing bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21/22): 8853-8861
- [6] Yan ZY, Qian J, Gu YQ, Su YL, Ai XX, Wu SM. Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells[J]. Materials Research Express, 2014, 1(1): 015401
- [7] Jacob JM, Sharma S, Balakrishnan RM. Exploring the fungal protein cadre in the biosynthesis of PbSe quantum dots[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 54-61
- [8] Wang D, Xia X, Wu SJ, Zheng SX, Wang GJ. The essentialness of glutathione reductase GorA for biosynthesis of Se(0)-nanoparticles and GSH for CdSe quantum dot formation in *Pseudomonas stutzeri* TS44[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 366: 301-310
- [9] Pei XF, Qu YY, Shen WL, Li HJ, Zhang XW, Li SZ, Zhang ZJ, Li XY. Green synthesis of gold nanoparticles using fungus *Mariannaea* sp. HJ and their catalysis in reduction of 4-nitrophenol[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(27): 21649-21659
- [10] El-Enany FF, Mahmoud K, Varma MM. Microdetermination of selenium with ascorbic acid[J]. Analytical Chemistry, 1980, 52(9): 1540-1541
- [11] Montalbetti N, Simonin A, Simonin C, Awale M, Reymond JL, Hediger MA. Discovery and characterization of a novel non-competitive inhibitor of the divalent metal transporter DMT1/SLC11A2[J]. Biochemical Pharmacology, 2015, 96(3): 216-224
- [12] De St Groth SF, Webster RG, Dwyer A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1963, 71: 377-391
- [13] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356
- [14] Voelker BM, Sulzberger B. Effects of fulvic acid on Fe(II) oxidation by hydrogen peroxide[J]. Environmental Science & Technology, 1996, 30(4): 1106-1114
- [15] Stenuit B, Lamblin G, Cornelis P, Agathos SN. Aerobic denitration of 2,4,6-trinitrotoluene in the presence of phenazine compounds and reduced pyridine nucleotides[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(19): 10605-10613
- [16] Greenwald RA, Rush SW, Moak SA, Weitz Z. Conversion

- of superoxide generated by polymorphonuclear leukocytes to hydroxyl radical: a direct spectrophotometric detection system based on degradation of deoxyribose[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1989, 6(4): 385-392
- [17] Stasova MM, Karpinskii OG. Layer structures of bismuth tellurides and selenides and antimony tellurides[J]. *Journal of Structural Chemistry*, 1967, 8(1): 69-72
- [18] Kim D, Kim HS. Solution-processed fabrication of perfectly (200)-oriented lead selenide thin films[J]. *Materials Letters*, 2018, 215: 191-194
- [19] Zhu L, Teo M, Wong PC, Wong KC, Narita I, Ernst F, Mitchell KAR, Campbell SA. Synthesis, characterization of a CoSe₂ catalyst for the oxygen reduction reaction[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2010, 386(1/2): 157-165
- [20] Mishra P, Ray S, Sinha S, Das B, Khan MI, Behera SK, Yun SI, Tripathy SK, Mishra A. Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of *Hibiscus sabdariffa* and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 105: 264-272
- [21] Shi CH, Zhu NW, Cao YL, Wu PX. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2015, 10(1): 1-8
- [22] Zhang XW, Qu YY, Shen WL, Wang JW, Li HJ, Zhang ZJ, Li SZ, Zhou JT. Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016, 497: 280-285
- [23] Pei XF, Shen WL, You SN, Li SZ, Zhang ZJ, Wang JW, Zhang XW, Qu YY. Biosynthesis of gold nanoparticles by the cell-free extracts of *Trichosporon montevidense* WIN for catalytic reduction of nitroaromatics[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, 23(3): 409-414 (in Chinese)
- 裴晓芳, 沈文丽, 由胜男, 厉舒祯, 张照婧, 王经纬, 张旭旺, 曲媛媛. *Trichosporon montevidense* WIN 提取物合成纳米金及其对硝基芳烃的催化特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(3): 409-414
- [24] Chandramohan S, Sundar K, Muthukumaran A. Monodispersed spherical shaped selenium nanoparticles (SeNPs) synthesized by *Bacillus subtilis* and its toxicity evaluation in zebrafish embryos[J]. *Materials Research Express*, 2018, 5(2): 025020
- [25] Diko CS, Qu YY, Zhang HL, Li Z, Ahmed Nahyoon N, Fan SL. Biosynthesis and characterization of lead selenide semiconductor nanoparticles (PbSe NPs) and its antioxidant and photocatalytic activity[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13(11): 8411-8423
- [26] Kuršvietienė L, Mongirdienė A, Bernatoniene J, Šulinskiene J, Staneviciene I. Selenium anticancer properties and impact on cellular redox status[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(1): 80
- [27] Larson RA. The antioxidants of higher plants[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(4): 969-978
- [28] Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1989, 250(3): 1132-1140
- [29] Hulkoti NI, Taranath TC. Biosynthesis of nanoparticles using microbes: a review[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 121: 474-483
- [30] Gupta S, Bector S. Biosynthesis of extracellular and intracellular gold nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5): 1113-1123
- [31] Zhang HO, Zhou WZ, Ma YH, Zhao HX, Zhang YZ. FTIR spectrum and detoxication of extracellular polymeric substances secreted by microorganism[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2013, 33(11): 3041-3043 (in Chinese)
- 张海欧, 周维芝, 马玉洪, 赵海霞, 张玉忠. 微生物胞外聚合物对重金属镉的解毒作用及红外光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2013, 33(11): 3041-3043
- [32] Maalej H, Hmidet N, Boisset C, Buon L, Heyraud A, Nasri M. Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS22 and examination of its metal-binding abilities[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(2): 356-367
- [33] Yang Y, Li SZ, Fan SL, Yang J, Li Z, Zhang HL, Qu YY. Characteristics of selenium nanoparticles synthesized by cell-free supernatant *Cupriavidus* sp. SHE[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1162-1169 (in Chinese)
- 杨颖, 厉舒祯, 范书伶, 杨婧, 李政, 张珩琳, 曲媛媛. 贫铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成纳米硒[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1162-1169
- [34] Tan YQ, Wang YT, Wang Y, Xu D, Huang YT, Wang D, Wang GJ, Rensing C, Zheng SX. Novel mechanisms of selenate and selenite reduction in the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 129-138
- [35] Sousa CA, Soares EV. Mitochondria are the main source and one of the targets of Pb (lead)-induced oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 5153-5160
- [36] Tarze A, Dauplais M, Grigoros I, Lazard M, Ha-Duong NT, Barbier F, Blanquet S, Plateau P. Extracellular production of hydrogen selenide accounts for thiol-assisted toxicity of selenite against *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(12): 8759-8767
- [37] Ghosh A, Ghosh Dastidar M, Sreekrishnan TR. Recent advances in bioremediation of heavy metals and metal complex dyes: review[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2016, 142(9): 5001-5013