

# 一株还原制备纳米银的细菌菌株 zxw01 的分离鉴定

张杰<sup>1</sup>, 熊文<sup>1</sup>, 张映<sup>1</sup>, 王娇<sup>1</sup>, 杨洪一<sup>1\*</sup>, 王滨松<sup>2\*</sup>

(1.东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2.黑龙江大学化学化工与材料学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:**在不同浓度硝酸银条件下的富集和驯化,从东北林业大学林场土壤中驯化和分离出1株能还原制备纳米银的细菌菌株zxw01。菌体形态、生理生化反应特性等分析结果,该菌与解淀粉芽孢杆菌属是一个族群,同源性达99%以上,为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。X射线衍射仪、透射电镜和热重分析表明,用含硝酸银的菌株zxw01的培养液成功制备了纳米银,具有较好的分散性,呈球形或近球形,粒径为2~18 nm,镉纳米银产率为80.6%。

**关键词:** 纳米银; 解淀粉芽孢杆菌; 生物合成

中图分类号: S154.34 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)04-0423-05

## Isolation and identification of zxw01, a bacteria strain with the ability to prepare silver nanoparticles via reduction

Zhang Jie<sup>1</sup>, Xiong Wen<sup>1</sup>, Zhang Ying<sup>1</sup>, Wang Jiao<sup>1</sup>, Yang Hongyi<sup>1\*</sup>, Wang Binsong<sup>2\*</sup>

(1.College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2.School of Chemistry and Material Sciences, Heilongjiang University, Harbin 150080, China)

**Abstract:** This research was on the acclimation and isolation of a bacteria strain ZXW01 with the ability to synthesize silver nanoparticles via reducing silver ion in its gradient of nitrate concentration. Based on morphologic observation, physiology and biochemistry tests and 16S rDNA analysis, the results proved that the bacteria was close related to *Bacillus amyloliquefaciens* with 99% similarity in its 16S rDNA sequence from the point of phylogenetics. Silver nanoparticles biosynthesized by the bacteria were spherical and equally distributed with the size between 2 nm to 18 nm from the analysis of X-ray diffraction, transmission electron microscopy (TEM) and thermogravimetric, and the productivity of silver nanoparticles was 80.6%.

**Keywords:** silver nanoparticles; *Bacillus amyloliquefaciens*; biological synthesis

纳米银具有催化、抗菌、非线性光学及导热、导电等特性,在无机催化材料、抗菌剂、导电浆料等领域有着广阔的应用前景<sup>[1-4]</sup>。目前,纳米银制备多采用物理和化学方法,寻找简单环保的适合大规模制备的均一性好、稳定性好的纳米银制备方法,仍然是广大纳米材料研究者面临的富有挑战性的课题。相对于化学方法,生物方法合成具有条件

温和、操作简单、环境友好等特点。藻类<sup>[5]</sup>、细菌<sup>[6-8]</sup>、真菌<sup>[9-11]</sup>等许多微生物与硝酸银作用都能制备纳米银粒子。细菌生长繁殖快,生长周期短,可大规模制备纳米银,是一种极具潜力的微生物材料。目前,关于制备纳米银优良菌株筛选的报道较少。笔者拟筛选出纳米银高产率化制备的优良菌株,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤样品来源

于东北林业大学林场取土壤样品,共设6个样点,于距地面深20 cm处取样。将样品混合后组成代表样,装入无菌封口塑料袋内,于4℃冰箱保存,备用。

### 1.2 培养基

Luria-Bertani(LB)培养基的制备:将胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g混合,加蒸馏水定容至1 000 mL,pH调至7.4。

改良 Luria-Bertani(LB)培养基(不加 NaCl,防止生成氯化银沉淀)的制备:将胰蛋白胨10 g和酵母提取物5 g混合,加蒸馏水定容至1 000 mL,调pH至7.4。

### 1.3 主要仪器与试剂

主要仪器:HZQ-F160A型高低温恒温振荡培养箱(上海一恒科技有限公司);GeneAmp9700型PCR扩增仪(美国应用生物系统中国公司);himacCF16RX型高速冷冻离心机(日本HITACHI公司);TECNAI G2型透射电子显微镜(荷兰Philips-FEI公司);Bruker D8型X-射线衍射仪(德国Bruker公司);热重分析仪(TGA/DSC2)。

主要试剂:DNA提取试剂盒和凝胶回收试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);*E.coli* JM109感受态细胞(BioDev公司);pMD18-T Vector、PCR反应的试剂(大连TaKaRa公司);Tryptone、Yeast Extract和NaCl(Oxoid公司);细菌微量生化反应管(杭州天和微生物试剂有限公司);氨苄青霉素(哈尔滨制药总厂);其他常规试剂均为分析纯。

### 1.4 菌种的筛选

称取土壤样品5 g,加入到装有5 mL蒸馏水的三角瓶中,制成土壤悬浮液。取1 mL悬浮液接种于改良的LB液体培养基中,150 r/min振荡,富集培养18 h后,向富集培养液中加入硝酸银溶液,使硝酸银终浓度为0.1 mmol/L,避光驯化48 h,分别逐级提高硝酸银的浓度至0.2、0.3、0.5、0.7、1.0 mmol/L。进行多次富集与驯化后,取1.0 mmol/L的菌液,在LB固体培养基上进行浓度梯度稀释划

线分离,得到能在含1 mmol/L硝酸银的改良LB培养基上存活的菌株,于4℃冰箱中保存,备用。

### 1.5 菌株的鉴定

#### 1.5.1 常规鉴定

用透射电子显微镜观察所获得菌株的形态和大小,进行革兰氏染色、芽孢染色和鞭毛染色<sup>[12]</sup>。采用细菌微量生化反应管对细菌的伏普(V-P)反应、硝酸盐培养基生长、糖发酵产酸、淀粉水解、明胶液化、柠檬酸盐利用、硝酸盐还原和酪素分解<sup>[13-18]</sup>等生理生化试验进行鉴定。

#### 1.5.2 16SrDNA序列分析

菌株基因组采用细菌DNA提取试剂盒提取,以细菌总DNA为模板,利用细菌通用引物(27 F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492 R(5'-GGTTACCTGTTACGT-3'))进行PCR扩增。

PCR反应体系:将10×PCR Buffer 5 μL、10 mmol/L的dNTPs 1 μL、2.5 μmol/L的上游和下游引物各4 μL、5 U/μL *Taq* 酶0.5 μL,DNA 1 μL模板混合,加去离子水至总体积50 μL。

PCR反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸2 min,30个循环;72℃保温10 min。4℃保存。

用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小和特异性。PCR产物纯化后,用胶回收试剂盒回收目的片段,并与PMD18-T连接,转化*E.coli* JM109,然后在含有氨苄霉素(AMP)的培养基中挑取白色单菌落(阳性转化子)进行PCR扩增。将阳性克隆子送至上海生物工程公司进行测序,测序所获序列信息提交GenBank核酸数据库,用BLAST程序进行比对,搜索同源性较高的相关序列,采用MEGA5.2软件进行系统发育分析,并构建系统进化树。进化树分支稳定性用Bootstrap分析,重复1 000次。

### 1.6 纳米银的合成及表征方法

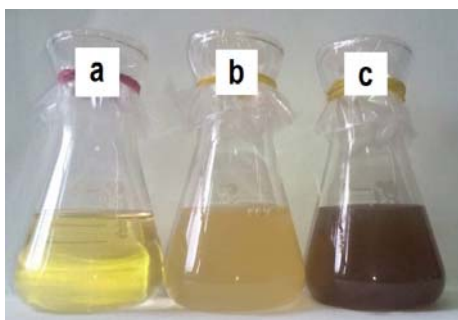
刮取固体平板菌种一环,接入LB液体培养基中,于37℃恒温摇床上150 r/min培养18 h,进行菌种活化。取5 mL活化好的菌株接入300 mL改良的LB液体培养基中,于37℃恒温摇床150 r/min振荡培养24 h。取198 mL细菌培养液,加入2 mL 0.1 mol/L的AgNO<sub>3</sub>溶液,使其Ag<sup>+</sup>终浓度为1 mmol/L,避光培养3 d。将培养液于14 000 r/min离心10 min,

用蒸馏水洗沉淀 3 次,自然风干,得到纳米银颗粒。纳米银颗粒用 X-射线衍射仪(XRD)进行表征,工作电压 40 kV,扫描速度为 10 °/min;利用透射电子显微镜(TEM)在 80 kV 电压下观察纳米银的形貌及纳米银的大小;采用热重分析仪(TGA)对离心得到的纳米银颗粒沉淀物进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选结果

通过逐级提高硝酸银的浓度,富集和驯化,筛选出了 1 株能在含 1 mmol/L 硝酸银改良液体 LB 培养基中存活的菌株,将其命名为 zxcw01。加入 AgNO<sub>3</sub> 避光培养后,图 1-c 中菌株的颜色由土黄色变为红棕色,而图 1-a 和图 1-b 中菌株的颜色无变化。这种明显的颜色变化与金属粒子的表面等离子体共振效应(SPR 效应)有关,据此,可初步判定菌株 zxcw01 有合成纳米银的能力。



a 只加硝酸银的改良 LB 培养基; b 不加硝酸银的细菌培养液; c 加硝酸银的细菌培养液。

图 1 添加硝酸银前后菌株 zxcw01 的颜色变化

Fig.1 Color change of the zxcw01 bacteria before and after AgNO<sub>3</sub> added

### 2.2 菌株鉴定结果

#### 2.2.1 菌落的形态及其生理、生化特征

由图 2 可以看出,菌体呈杆状,大小为(1.23 ~ 1.78) μm × (0.36 ~ 0.85) μm。

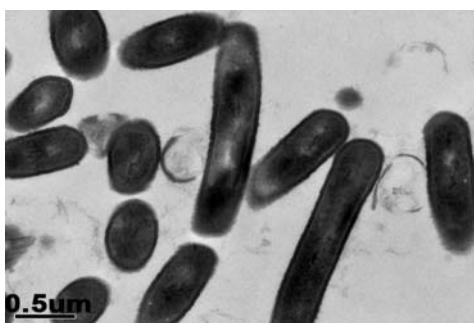


图 2 菌株 zxcw01 的电镜照片

Fig.2 TEM image of zxcw01

菌株 zxcw01 在 LB 固体培养基上生长的菌落为圆形,表面光滑,边缘整齐,呈黄色,细菌革兰氏染色为阳性,芽孢染色可见卵圆形芽孢,孢囊膨大,中生或近中生,鞭毛染色可观察到菌株的鞭毛,光学显微镜暗视野中可观察到该细菌能运动。

从表 1 可知,该菌株不能利用 D-木糖、乳糖、L-阿拉伯糖、蜜二糖、山醇、甘糖、肌醇、甘露醇、鼠李糖、山梨醇和乳糖,可以利用柠檬酸、葡萄糖、果糖、尿素、马尿酸、麦芽糖和蔗糖,明胶液化、淀粉水解、过氧化氢酶、伏普(V-P)和硝酸盐还原试验结果均呈阳性,苯丙氨酸脱氨酶试验结果呈阴性。参照《伯杰细菌手册》和《常见细菌系统鉴定手册》,可初步鉴定该菌为解淀粉芽孢杆菌。

表 1 菌株 zxcw01 的生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain zxcw01

试验名称	试验结果	试验名称	试验结果
酪素水解	+	L-阿拉伯糖	-
过氧化氢酶	+	蔗糖	+
硝酸盐还原	+	蜜二糖	-
伏普(V-P)	+	麦芽糖	+
柠檬酸盐	+	山醇	-
淀粉水解	+	甘糖	-
明胶液化	+	肌醇	-
尿素	+	甘露醇	-
苯丙氨酸	-	乳糖	-
葡萄糖	+	山梨醇	-
D-木糖	-	鼠李糖	-
马尿酸	+	果糖	+

“+”示阳性;“-”示阴性。

#### 2.2.2 zxcw01 的分子生物学鉴定结果

以菌株基因组 DNA 为模板,以细菌 16 SrDNA 的通用引物进行 RCR 扩增,对菌株的 16 SrDNA 进行测序,得到 1 514 bp 序列。将测序结果提交到 GenBank,登录号为 KF 700242。用 BLAST 程序将获得的 16 SrDNA 序列与 GenBank 中的所有序列进行核苷酸同源性对比,采用 MEGA5.2 软件构建系统发育树,用自展法(Bootstrap)检验系统发育树的可靠性,自展 1 000 次得到菌株 zxcw01 的系统进化树(图 3)。由图 3 可见,菌株 zxcw01 与解淀粉芽孢杆菌属形成一个族群,且同源性达 99%以上。结合形态学、生理生化特征以及 16 SrDNA 分析,最终将 zxcw01 鉴定为芽孢杆菌属的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

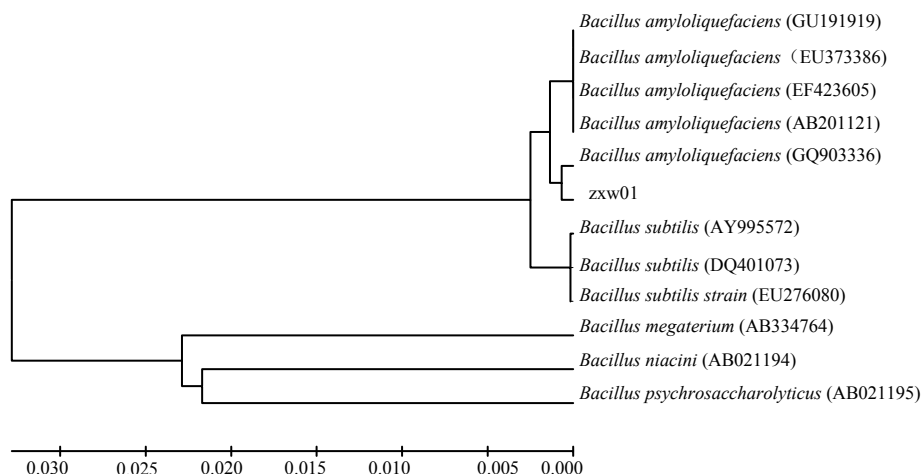


图 3 基于 16SrDNA 序列同源性构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the bacteria strain based on 16 SrDNA sequences homology

### 2.3 纳米银的 XRD 分析结果

由图 4 可以看出,在  $2\theta$  斜角为  $38.23^\circ$ 、 $44.56^\circ$ 、 $64.87^\circ$ 和  $77.48^\circ$ 处出现了明显的特征性衍射峰,与 JCPDS 卡 04-0783 上的数据( $2\theta$  为  $38.096^\circ$ 、 $44.257^\circ$ 、 $64.406^\circ$ 和  $77.452^\circ$ )吻合,分别对应于立方晶系银的(111)、(200)、(220)和(311),说明该细菌在添加硝酸银后合成了面心立方结构的纳米银颗粒,并且纳米银是无杂质的。

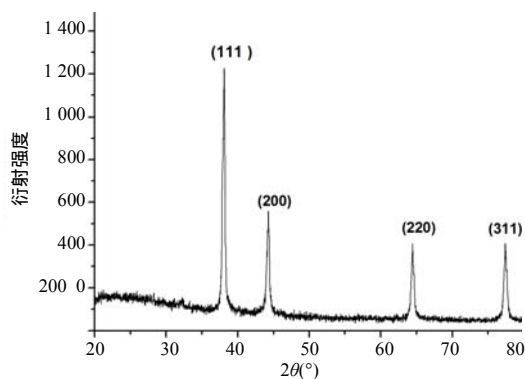


图 4 利用 zwx01 培养液合成的纳米银 XRD 衍射图谱

Fig.4 XRD pattern of AgNPs synthesized by the bacteria strain of zwx01

### 2.4 纳米银的 TEM 分析结果

由图 5 可清楚地观察到银纳米粒子的形态和粒径大小,大部分为球形或近球形,粒径大小为  $2 \sim 18$  nm,平均粒径为 12.6 nm,粒径分布窄且较均匀,具有较好的分散性,几乎没有团聚现象。

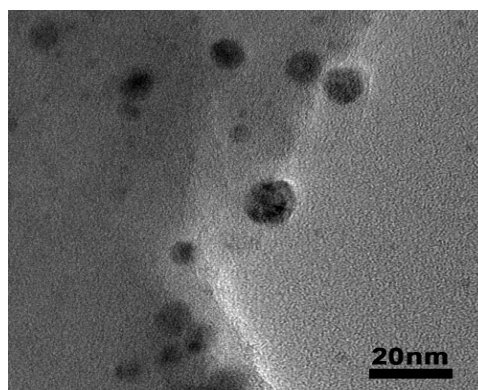


图 5 zwx01 培养液合成纳米银的 TEM 图谱

Fig.5 TEM image of AgNPs synthesized by the bacteria strain of zwx01

### 2.5 纳米银颗粒的热重分析结果

$\text{Ag}^+$ 终浓度为  $1 \text{ mmol/L}$  的培养液  $200 \text{ mL}$  制备纳米银,最终离心后可获得  $0.03 \text{ g}$  的纳米银颗粒沉淀物。对沉淀物进行热重分析的结果(图 6)表明,随着加热温度的升高,纳米银颗粒的质量逐渐减少,当温度上升到  $580^\circ\text{C}$ 时达到热稳定状态,不再有质量损失。其原因在于离心后得到的纳米银颗粒沉淀物中含有的水和有机物,这些水和有机物在加热过程中不断释放,最后达到稳定。热稳定状态时得到的纳米银质量为纳米银颗粒沉淀物质量的  $58\%$ ,由此可知,纳米银的实际产量为  $0.0174 \text{ g}$  ( $0.03 \times 58\%$ ),又知纳米银的理论产量为  $0.0216 \text{ g}$  ( $0.2 \text{ (L)} \times 1 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)} \times 10^8 \text{ (g/mol)}$ ),因此,纳米银产率为  $80.6\%$  (实际产量/理论产量)。

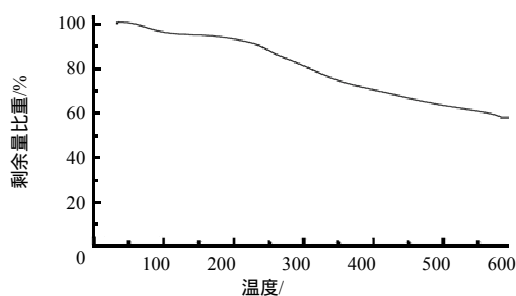


图 6 纳米银的热重分析

Fig.6 Thermogravimetric analysis of silver nanoparticles

### 3 结论与讨论

逐渐加大硝酸银浓度进行富集与驯化,筛选得到 1 株能还原制备纳米银的菌株 zxcw01。该菌株能在含 1 mmol/L 硝酸银的改良 LB 液体培养基中存活,并且能使得添加硝酸银的菌株培养液由土黄色变为棕红色,合成的纳米银是分散的,呈球形或近球形,粒径为 2~18 nm,纳米银产率为 80.6%。经个体形态特征鉴定、生理生化特征鉴定和 16 SrDNA 序列分析,将该菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amylqueiciens*)。

目前,在同类研究中,用细菌制备纳米银比用真菌更具优势。细菌繁殖快,生长周期短,且关于细菌的发酵和遗传改造经验比关于真菌的更为丰富,这有利于基因工程操作,可以利用基因工程技术,使特定的具有还原作用的酶以及起稳定作用的蛋白大量表达,从而实现纳米粒子的大规模制备,所以,细菌在纳米银合成领域具有发展潜力,有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Lu Juan, Gu Wenliang, Sun Jianbo, et al. Isolation identification of *Bacillus amyloliquefaciens* LX1 strain againsts *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and cloning of its antifungal protein gene[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(1): 117-124.
- [2] Mohammad Oves, Mohammad Saghri Khan, Almas Zaidi, et al. Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Plos One, 2013, 8(3): 1-14.
- [3] Abilash Gangula, Ramakrishna Podila, Ramakrishna M, et al. Catalytic reduction of 4-Nitrophenol using biogenic gold and silver nanoparticles derived from breynia rhamnoides[J]. Langmuir, 2011, 27(24): 15268-15274.
- [4] Castro-Longoria E, Alfredo R, Vilchis-Nestor M, et al. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 83 (1): 42-48.
- [5] Indu Barwal, Peeyush Ranjan, Suneel Kateriya, et al. Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2011, 9: 56-68.
- [6] Nalenthiran P, Sambandam A, Govindarajan K, et al. Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. [J]. Nanopart Res, 2009, 11(7): 1811-1815.
- [7] Sahar Zaki, El Kady M F, Desouky Abd-El-Haleem, et al. Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates[J]. Materials Research Bulletin, 2011, 46(10): 1571-1576.
- [8] Seenivasan B, Selvaraj G, Thangavelu B, et al. Characterization and antimicrobial properties of silver and silver oxide nanoparticles synthesized by cell-free extract of a mangrove associated *Pseudomonas aeruginosa* M6 using two different thermal treatments [J]. Ind Eng Chem Res, 2012, 51(17): 5976-5985.
- [9] Navin Jain, Arpit Bhargava, Sonali Majumdar, et al. Extracellular biosynthesis and charact Erization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective[J]. Nanoscale, 2011, 3(2): 635-641.
- [10] 李广泉, 王丽. 土曲霉介导的纳米材料生物还原制备及其应用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [11] 杨素玲, 孟佑婷, 刘桂君, 等. 利用产黄青霉培养液的上清液生物合成纳米银影响因素的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 503-504, 506.
- [12] 汪春蕾. 具细菌漆酶活性的芽孢外壁蛋白 *CotA* 基因克隆及异源表达研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [13] 朱小宁, 余兴龙, 李润成, 等. 副猪嗜血杆菌的分离与鉴定及其 16S rRNA 生物信息学分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 36(5): 517-520.
- [14] 布坎南 R E, 吉布斯 E N. 伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[K]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 498-501.
- [15] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏细菌鉴定手册 [K]. 北京: 科学出版社, 1984: 482-484.
- [16] 李新新, 高新新, 陈星, 等. 一株高效解钾菌的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 381-388.
- [17] 王一光, 林羽, 陈方永, 等. 杨梅枝条枯萎病原菌分离鉴定及防治药剂的室内筛选[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2014, 40(1): 53-55.
- [18] 王同, 孔令雅, 焦加国, 等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷机制[J]. 土壤学报, 2014(2): 373-380.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库