固定化球形红细菌生物合成银纳米材料及其抑菌性能研究

白红娟,贾万利

(中北大学 化工与环境学院,太原 030051)

摘 要:采用固定化球形红细菌生物合成银纳米材料,对所制备的银纳米材料分别用紫外吸收光 谱、X射线衍射、低分辨和高分辨透射电镜等做了详细的表征。结果表明,制备的银纳米材料为 立方闪锌矿结构,呈圆柱状,尺寸大小变化范围为10~50 nm。体外抑菌结果显示,对于大肠杆菌 和金黄色葡萄球菌,其最小抑菌浓度为10 mg/L,最小杀菌浓度为80 mg/L。 关键词:生物合成;球形红细菌;固定化;银;纳米材料;抑菌活性 中图分类号:O614.122 文献标识码:A 文章编号:1004-0676(2013)01-0008-05

Biological Synthesis of Silver Nanomaterials Using Immobilized *Rhodobacter Sphaeroides* and Their Antimicrobial Activities

BAI Hongjuan, JIA Wanli

(Chemical Industry and Ecology Institute, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: Silver nanomaterials were successfully biosynthesized by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*. The silver nanomaterials were characterized by means of UV-Vis optical absorption, X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM), energy dispersive analyses of X-rays (EDX). The silver nanomaterials are cubic zinc blende structure and circular columns-shaped, and the nanoparticles are found to be polydisperse in the size range 10~50 nm. In addition, the silver nanomaterials showed high antimicrobial activities against *E. coli.* and *S. aureus*. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the silver nanoparticles are 10 mg/L and 80 mg/L, respectively.

Key words: biological synthesis; *Rhodobacter sphaeroides*; immobilization; silver; nanomaterials; antibacterial property

银纳米材料由于具有特殊的物理化学性质,在 许多领域都有着广阔的应用前景,如抗菌剂、催化 剂、生物标记等^[1-2]。传统的合成银纳米材料的化学 方法需要有毒化学试剂做还原剂和高温条件,因此, 新兴的生物还原法已经成为合成银纳米材料的绿色 方法^[3]。目前已有文献报道利用细菌、真菌、酵母 菌、霉菌等微生物或其提取液合成银纳米材料^[3-5]。 但是,利用微生物细胞提取物合成银纳米材料是通 过调节环境条件控制粒径大小及形貌,不能利用微 生物细胞生物体控制;利用微生物细胞合成的银纳 米材料大多沉积在细胞内或细胞周质间隙中,需要 利用超声波等技术进行分离^[3]。固定化微生物合成 的纳米材料可以通过微生物活体细胞控制反应,且 易与反应体系分离^[6-7],鉴于此优点,固定化微生物 成为合成纳米材料的一种有效方法。

光合细菌与其它微生物相比,具有以下优点: 第一,该菌是益生菌,生产的产品安全、可靠,特 别适宜于医、药上使用;第二,光合细菌不仅能在

收稿日期: 2012-07-06

基金项目: 山西省科技攻关计划项目(No. 20080311027-1)资助。

第一作者:白红娟,女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:环境生物技术研究。E-mail:bhj44871@163.com

厌氧光照的条件下,利用光能把有机物作为供氢体固定二氧化碳进行光能异养生长,而且能在有氧黑暗条件下,以上述有机物为呼吸基质,进行好气异养生长,即具有随着生存环境而灵活地改变代谢类型的特征;第三,光合细菌生长繁殖快,生产周期短;易于规模化生产,并便于自动化控制。因此,光合细菌是一种极好的微生物材料^[8]。目前,作者已采用光合细菌生物合成了ZnS、PbS、CdS纳米材料^[6-7,9-10]。为此,本研究采用固定化光合细菌制备银纳米材料,以期为银纳米材料的合成提供一种新方法。

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

硝酸银(AgNO₃),聚乙烯醇(平均聚合度 1750±50,北京新化学试剂厂);硼酸(北京新化学试 剂厂);所用试剂均为分析纯;实验用水为双蒸水。

UV-2101PC 紫外-可见分光光度计(日本岛津 公司); Rigaku Dmax-γA型X射线仪(日本理学电机 株式会社); H-600型透射电子显微镜(日立公司); Hitachi H-2010型高分辨透射电镜(日立公司); KEVEX型X射线能谱仪(日本理学电机株式会社)。

1.2 菌种

球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)H菌株 是光合细菌紫色非硫菌群的红细菌属,由山西大学 光合细菌研究室分离鉴定保藏^[8]。

大肠杆菌(E. coli, ATCC 8099)和金黄色葡萄球 菌(S. aureus, ATCC 6358)均为标准株,由山西大学 生命科学学院微生物实验室提供。

培养基:基础培养基用光合细菌液体培养基^[8]; 抑菌试验采用牛肉膏蛋白胨培养基。

1.3 银纳米材料的制备及表征

1.3.1 菌种驯化培养

将 10%原始菌液接入 Ag⁺含量为 0.5 mmol/L 的 光合细菌培养液中,在 pH≈7.0、厌氧光照(2500 Lux)、30℃条件下培养,待适应后,逐步增加 Ag⁺ 含量,经数次驯化培养后,以在含 Ag⁺浓度为 1.0 mmol/L 的光合细菌培养液中能正常生长的 H 菌株 作为试验菌种备用。

1.3.2 固定化球形红细菌的制备

采用聚乙烯醇-硼酸包埋法制备固定化球形红 细菌^[6]。将培养好的球形红细菌在 6000 r/min 下离 心 10 min,用生理盐水洗涤沉淀并离心 2 次。然后 将所得的浓缩菌体(包埋量 30%)与冷却至 35℃的 PVA (质量浓度 10%)溶液混匀,用注射器将此混 合物滴入 pH≈6.5 的饱和硼酸溶液中,形成 3 mm 左右的小球。将形成的小球放置于 4℃冰箱中固化 18 h,使之充分反应,用纯净水洗涤 3 次,然后在 培养基中活化 6 h 制得固定化菌种,备用。

1.3.3 固定化球形红细菌合成纳米银

取上述培养基 1000 mL 置于广口瓶中,调 pH=7.0,121℃灭菌 30 min。加入 1.0 mmol 的 AgNO₃ 和 450 g 固定化菌种,在温度 30℃、pH=7.0、好氧 (DO=5 mg/L)培养 24 h 后,取出固定化小球,进 行常规的离心分离,弃去上清液,留下产物,用去 离子水洗涤 3~5 次。用去离子水冲洗附着在固定化 小球上的产物,最后将得到的产物合并,置于 50℃ 的烘箱真空干燥 3 h,即得到黑色纳米银。

1.4 表征方法

将所取的银溶胶样品稀释适当倍数后注入 1×1 cm 的比色皿中,利用紫外-可见分光光度计 (HP8453)进行扫描,以水为参比。扫描波长范围 为 330~1100 nm, 扫描步长为 1 nm, 检测银纳米颗 粒特征的表面等离子体共振吸收峰。将反应后产物 置于 50℃烘箱中真空干燥得到粉末状样品,用 X 射 线粉末衍射仪测定测得 XRD 图谱,测定条件为 Cu 靶 K_α, λ=1.54178Å, Ni 滤光片, 管电压 40 kV, 管 电流 40 mA, 扫描范围 10~70°, 扫描速度为 0.02 °/s。 TEM 照片分别由 Hitachi-600 型透射电镜(TEM, 100 kV) 和 Hitachi H-2010 型高分辨透射电镜 (HRTEM, 200 kV)获得。同时进行选区电子衍射 (SAED)测试;随 TEM 实验进行 X 射线能散射谱 (EDX)测试。样品的制备是将样品的粉末用无水 乙醇超声分散后,取一滴溶液滴于镀有碳膜的铜网 上,待酒精挥发直接用于观察。用 SigmaScan Pro 软件对所得银纳米颗粒的 TEM 图片进行处理,得 到图片中每个颗粒的粒度,用 Origin 软件进行粒度 分布统计。

1.5 银纳米颗粒的抑菌性能评价

1.5.1 银纳米粒子溶液的配制

称取 150 mg 银纳米粉末,放入锥形瓶中,再 往其中加入 100 mL 无菌水,摇晃均匀,放入超声 振荡仪中对银纳米粉末进行分散,即得浓度为 1.5 g/L 的银纳米粒子溶液。该溶液为原液。用时,可 分别吸取一定量的原液来配制不同浓度的银纳米粒 子溶液。

1.5.2 抑菌圈直径的测定

将斜面活化好的各供试菌种用无菌水分别制成

含菌数约 10⁸ CFU/mL 的菌悬液。采用 K-B 法(新 华 I 号滤纸,打孔器制备纸片直径为 6 mm, MH 固 体培养基,每片点药量为 5 μL),每种浓度重复 3 次,取抑菌圈直径的平均值;另取无菌水滤纸片作 对照。

1.5.3 MIC 和 MBC 的测定

在 35℃下培养 48 h,观察细菌生长情况,测定 最小抑菌浓度、最小杀菌浓度值。培养前后,若在 银纳米粒子的某个最低浓度下,可以观察到有抑菌 效果,则该浓度为最小抑菌浓度;若在银纳米粒子 的某个最低浓度下,观察不到有细菌的生长,则该 浓度为最小杀菌浓度。

2 结果与讨论

2.1 UV-Vis 吸收光谱表征

考察了固定化球形红细菌活细胞将 Ag⁺还原为 单质 Ag 的过程。接种固定化球形红细菌活细胞的 血清瓶中呈现黄棕色,暗示着银纳米粒子的生成, 而对照空白的血清瓶中无颜色变化。紫外-可见吸收 光谱(图1)表明,反应溶液在 420 nm 处出现最大 吸收峰,对应于银纳米粒子的表面等离子共振吸收, 证明溶液中生成了银纳米粒子。从图1中可以看出, 在考察的反应时间范围内,随着反应时间的延长, 生成的银纳米粒子的吸收峰位基本没有变化,而峰 高逐渐增加,说明随着时间的延长,生成的银纳米 粒子数量不断增加,直到反应时间达到 16 h,紫外 -可见吸收光谱图显示峰值达到最大,说明反应过程 基本结束。





Fig.1 UV-Vis absorption spectrum of silver sample

2.2 X射线衍射表征

图2为固定化球形红细菌活细胞与AgNO3溶液 反应合成 Ag 样品的 X 射线衍射图。从该图可以看 出,4个最强峰位置20值分别为38.40°、44.45°、 64.72°和77.60°,与标准Ag(JCPDS,04-0783)在 (111)、(200)、(220)和(311)晶面所对应的38.46°、 44.50°、64.65°和77.60°相比很接近,说明制备的纳 米银具有面心立方结构。根据衍射峰的位置计算得 到的晶格常数*a*₀=4.095Å,与JCPDS卡片中的数值 *a*₀=4.086Å吻合。各衍射峰对应的晶面标于图中, 没有明显的杂质峰出现,说明用本方法制得的Ag 样品的结晶程度很好。Ag纳米粒子的元素组成采用 能量散射X射线能谱(EDX)分析,由图3可以看出, 制备的纳米粒子在≈3 keV处有单质银表面等离子 共振吸收产生的典型光吸收带,而其它Cu、O、C、 和Cl的吸收峰是由于承载样品的玻璃产生^[11]。



图 2 Ag 样品的 X 射线衍射图 Fig.2 XRD patterns of silver sample



图 3 Ag 样品的 EDX 图谱 Fig.3 EDX patterns of silver sample

2.3 高分辨透射电镜表征

固定化球形红细菌活细胞制备的银纳米材料高 分辨透射电镜图像见图 4。

由图 4(a)和 4(b)可知,制备的银纳米粒子呈圆 柱状,尺寸有大有小,尺寸大小变化范围为 10~50 nm,分布呈多分散性。在 Ag 纳米样品的高倍高分 辦电镜照片图 4(c)中,可以看到单独的圆柱状晶粒。 图 4(d)显示出清晰的 Ag 纳米晶(111)晶面条纹,表 明其结晶良好,其晶面间距为 d₁₁₁=0.23 nm。用选 场电子衍射技术观察纳米晶粒的形貌,其方法是在 电子显微镜中,以一束电子射线打在待测物表面, 若为晶体则产生电子衍射环。对 Ag 纳米样品观察 的区域做较大范围的 SAED,得到图 4(d)中电子衍 射谱(SAED)插图,从图中可以看出,Ag纳米粒 子产生了衍射点,表明Ag纳米样品为单晶结构。 由电子衍射谱,根据公式^[12]: *L*λ = *Rd*(其中 *L*λ=2.96 mm·nm,*R*为衍射环半径,*d*为晶面间距), 可计算对应的(220)晶面间距为0.14 nm,衍射环 的计算结果表明,样品为立方闪锌矿结构,与 XRD 得到的Ag纳米粒子结构一致。



图 4 Ag 样品的高分辨透射电镜图像

[(a) 50 nm 标尺; (b) 25 nm 标尺; (c) 10 nm 标尺; (d) c 中选定区(111)晶面条纹(d₁₁₁=0.23 nm),插图为相应的电子衍射谱(SAED)]

Fig.4 HRTEM images of silver sample

[(a) 50 nm scale; (b) 25 nm scale; (c) 10 nm scale; (d) (111) lattice fringes of denoted area in c (d₁₁₁=0.23 nm), the inset shows the corresponding SAED pattern]

2.4 银纳米颗粒的抑菌性能评价

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为典型的革兰氏 阴性菌和阳性菌,是导致伤口感染的主要细菌。因 此,本试验选取它们作为试验菌种,为今后银纳米 粒子在医药方面的开发提供实验依据。从表1可知, 固定化球形红细菌制备的纳米银对这两种细菌有明 显的抑菌作用,随着银纳米粒子浓度的增加,菌体 生长区域直径逐渐减小。当银纳米粒子浓度为10 mg/L时,与对照组相比,可以观察到明显的抑菌效 果。当银纳米粒子浓度为80 mg/L时,在蘸有大肠 杆菌和金黄色葡萄球菌的滤纸片周围已观察不到有 菌体的生长。因此,对于大肠杆菌和金黄色葡萄球 菌,其最小抑菌浓度为10 mg/L,最小杀菌浓度为 80 mg/L。在相同浓度的银纳米粒子作用下,银纳米 粒子对金黄色葡萄球菌的抑菌作用较优于大肠杆 菌。在银纳米粒子浓度为50 mg/L时,金黄色葡萄 球菌的生长区域直径相对于阳性对照,已减少至 90%。大肠杆菌在银纳米粒子浓度为70 mg/L时, 直径减少百分比仅为53%,但在银纳米粒子浓度达 到80 mg/L时,抑菌率迅速达至100%。相反地,金 黄色葡萄球菌未在某一浓度的银纳米粒子、产生急 剧变化的抑菌效果,而是随着银纳米粒子浓度的增 加,保持稳定持续的杀菌能力。这对以后的生产实 践有重要的指导作用。

表1银纳米粒子对不同菌种的抑制活性

Table 1 Antimicrobial activity of silver nanomaterials on

var							
菌种	银纳米粒子	0	10	30	50	70	80
	浓度/(mg/L)						
大肠 杆菌	菌体生长区	4	3.7	3.1	2.3	1.9	0
	域直径/mm						
	直径减少/%	-	7.5	23	43	53	100
金黄	菌体生长区	9.4	5.6	2.7	0.95	0.55	0
色葡	域直径/mm						
萄球	直径减少/%	-	40	71	90	94	100
菌							

3 结论

采用固定化的球形红细菌制备了纳米银,含有银粒子溶液的UV-Vis吸收光谱显示,在420~460 nm 处出现银纳米粒子的吸收峰;XRD和EDX分析表明,制备的纳米银具有面心立方结构。产物的TEM 及HRTEM 图片显示,银纳米粒子呈圆柱状,尺寸有大有小,尺寸大小变化范围为10~50 nm,分布呈多分散性。体外抑菌结果显示,对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,其最小抑菌浓度为10 mg/L,最小杀菌浓度为80 mg/L。

参考文献:

- Christopher P, Xin H L, Linic S. Visible-light-enhanced catalytic oxidation reactions on plasmonic silver nanostructures[J]. Nature Chemistry, 2011, 3(2): 467-472.
- [2] Liong M, France B, Bradley K A, et al. Antimicrobial activity of silver nanocrystals encapsulated in mesoporous silica nanoparticles[J]. Advanced materials, 2009, 21(17): 1684-1689.
- [3] Narayanan K B, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes[J]. Advances in colloid and

interface science, 2010, 156(1): 1-13.

- [4] Saravanan M, Vemu Anil Kumar, Barik Sisir Kumar. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from Bacillus megaterium (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 88(1):325-331.
- [5] Castro-Longoriaa E, Vilchis-Nestorb Alfredo R, Avalos-Borjac M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus Neurospora crassa[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 83(1): 42-48.
- [6] Bai H J, Zhang Z M, Yu Guo, et al. Biological synthesis of size-controlled cadmium sulfide nanoparticles using immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Nanoscale Research Letters, 2009, 4(7): 717-723.
- [7] Bai H J, Zhang Z M. Microbial synthesis of semiconductor lead sulfide nanoparticles using immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Materials Letters, 2009, 63(9): 764-766.
- [8] 姚竹云,张肇铭.几株光合细菌的表型特征及其 DNA-DNA 同源性分析[J].应用与环境生物学报,1996, 2(1): 84-89.
- [9] Bai H J, Zhang Z M, Gong J. Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*[J]. Biotechnol Lett, 2006, 28(14):1135-1139.
- [10] Bai H J, Zhang Z M, Guo Y, et al. Biological synthesis of size-controlled cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodopseudomonas palustris*[J]. Collide Surfaces B, 2009, 70(1): 142-146.
- [11] Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun K S. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms[J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2010, 81(1): 358-362.
- [12] 左演声, 陈文哲, 梁伟. 材料现代分析方法[M]. 北京: 北京工业大学出版社, 2005: 121-123.