CSTR: 32114.14.j.cjb.240789
DOI: 10.13345/j.cjb.240789
Feb. 25, 2025, 41(2): 693-705
http://journals.im.ac.cn/cjbcn
©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

阿维链霉菌合成纳米硒的物理化学表征及其对枸杞病原真菌的抑菌活性

张琪[1]，李亚妮[1]，周荣娟[1]，秦佳圆[1]，岳思君[2*]

1 宁夏大学新华学院，宁夏 银川 750021
2 宁夏大学 生命科学学院 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室，宁夏 银川 750021

张琪, 李亚妮, 周荣娟, 秦佳圆, 岳思君. 阿维链霉菌合成纳米硒的物理化学表征及其对枸杞病原真菌的抑菌活性[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 693-705.
ZHANG Qi, LI Yani, ZHOU Rongjuan, QING Jiayuan, YUE Sijun. Selenium nanoparticles synthesized by *Streptomyces avermitilis*: physical and chemical characteristics and inhibitory activity on a pathogen of *Lycium barbarum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 693-705.

摘　要：生物合成的纳米硒(selenium nanoparticles, SeNPs)具有独特的物理、化学和生物学特性，备受研究人员关注。为了开发将硒盐还原为 SeNPs 的菌种，本研究以阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)为研究对象，通过添加一定量的 Na_2SeO_3，利用光学显微镜、扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电镜(transmission electron microscope, TEM)、能量色散 X 射线能谱(energy dispersive spectrometer, EDS)分析、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析、傅里叶红外变换光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)技术对菌体及合成的 SeNPs 进行物理化学表征分析，同时选用枸杞根腐病主要病原真菌-尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*)对其抗菌活性进行研究。结果表明，阿维链霉菌可将 Na_2SeO_3 转化成 SeNPs，能耐受 300 mmol/L 的 Na_2SeO_3，耐受性较高；阿维链霉菌可在细胞质中合成球形 SeNPs，大部分直径在 100 nm 左右，并以菌丝断裂的方式释放；阿维链霉菌合成的 SeNPs 颗粒为非晶态，表面以 C、Se 为主，同时存在 O、N 等元素，−OH、C=O、C−N、C−H 等官能团与 SeNPs 稳定性和生物活性密切相关；阿维链霉菌所产的 SeNPs 对 *F. oxysporium* 有显著抑制活性，25.0 μmol/mL 处理抑菌率可达 77.61%，半数效应浓度(median effective concentration, EC_{50})为 0.556 μmol/mL。总之，阿维链霉菌可耐受高 Na_2SeO_3 胁迫，同时还可介导合成 SeNPs，合成的 SeNPs 颗粒具有良好的稳定性和抗菌活性，在 SeNPs 制备和枸杞根腐病防治方面具有潜在的应用价值。

资助项目：中央引导地方科技发展资金(2023FRD05032)；宁夏回族自治区重点研发计划重点项目(2021BEG02003)；宁夏大学新华学院科学研究基金(23XHKY04)；宁夏大学新华学院大学生创新创业训练项目(2024-81)
This work was supported by the Central Leading Local Science and Technology Development Fund (2023FRD05032), the Key Project of Ningxia Hui Autonomous Region Key R&D Programme (2021BEG02003), the Science Research Project of Xinhua College, Ningxia University (23XHKY04), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students of Xinhua College, Ningxia University (2024-81).
*Corresponding author. E-mail: yue_sj@nxu.edu.cn
Received: 2024-09-29; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-02

关键词：阿维链霉菌；纳米硒；物理化学表征；尖孢镰刀菌；抑菌活性

Selenium nanoparticles synthesized by *Streptomyces avermitilis*: physical and chemical characteristics and inhibitory activity on a pathogen of *Lycium barbarum*

ZHANG Qi[1], LI Yani[1], ZHOU Rongjuan[1], QING Jiayuan[1], YUE Sijun[2*]

1 Xinhua College of Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China
2 Key Lab of Ministry of Education for Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

Abstract: Biosynthesized selenium nanoparticles (SeNPs) have attracted much attention because of their unique physical, chemical, and biological properties. The microbial reduction of selenium salts to SeNPs has great potential, while there is a lack of elite strains. In this study, we explored the reduction of Na_2SeO_3 by *Streptomyces avermitilis* into SeNPs. The colonies and hyphae of the strain and the synthesized SeNPs were characterized by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscope (TEM), energy dispersive spectrometry (EDS), X-ray diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). At the same time, the inhibitory activity of SeNPs on *Fusarium oxysporum*, the main pathogen causing root rot of *Lycium barbarum*, was studied. The results showed that *S. avermitilis* converted Na_2SeO_3 into SeNPs and tolerated 300 mmol/L Na_2SeO_3, demonstrating strong tolerance. *S. avermitilis* synthesized spherical SeNPs in the cytoplasm, and most of SeNPs had a diameter of about 100 nm and were released by hyphal fracture. The SeNPs synthesized by *S. avermitilis* were amorphous, and their surfaces were dominated by C and Se, with the existence of O, N and other elements. SeNPs had functional groups such as –OH, C=O, C–N, and C–H, which were closely related to the stability and biological activity of SeNPs. The SeNPs synthesized by *S. avermitilis* showcased significant inhibitory activity on *F. oxysporum*, and 25.0 μmol/mL SeNPs showcased the inhibition rate of 77.61% and EC_{50} of 0.556 μmol/mL. In conclusion, *S. avermitilis* can tolerate high Na_2SeO_3 stress and mediate the synthesis of SeNPs. The synthesized SeNPs have good stability and strong inhibitory activity, demonstrating the potential application value in the preparation of SeNPs and the control of *L. barbarum* root rot.

Keywords: *Streptomyces avermitilis*; selenium nanoparticles; physical and chemical characterization; *Fusarium oxysporum*; inhibitory activity

硒(Se)是人体不可缺少的微量元素之一，具有重要的生理功能[1-3]。相对于亚硒酸盐(SeO_3^{2-})、硒酸盐(SeO_4^{2-})和有机硒化合物(Se^{2-})，纳米硒(selenium nanoparticles, SeNPs)具有生理活性强、毒性低、生物相容性好、易吸收等优点，在农业、食品、生物医药、材料、环境保护等领域具有广阔的应用前景，是目前最安全的硒制品[4-6]。因此，SeNPs 的制备已成为近年国内外学者研究的热点。

SeNPs 的合成可通过化学、物理和生物的

方法实现[4]。微生物通常是利用酶将高价硒还原生成 SeNPs，同时在表面生成蛋白、多糖、脂质等有机物以稳定其结构，较化学和物理合成方法具有培养条件温和、稳定性好、活性高、更安全环保等优点[7]，是目前公认的最具潜力的 SeNPs 合成方法。

寻找优良的菌种是微生物合成 SeNPs 的核心问题。目前报道的具有合成 SeNPs 能力的微生物大多为细菌和真菌[8-11]，部分放线菌也可合成 SeNPs，如灰色链霉菌(*Streptomyces griseobrunneus*)[12]、Tendae 链霉菌(*Streptomyces tendae*)[13]、Bikini 链霉菌(*Streptomyces bikiniensis*)[14]等。放线菌多来自于土壤中，代谢繁殖旺盛、适应能力强、容易培养，在合成纳米颗粒方面有巨大潜力[15]。阿维链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)主要用于阿维菌素的生产，尚未见对其产 SeNPs 的能力的报道。本课题组前期研究过程中发现，阿维链霉菌在含有 Na_2SeO_3 的培养基上可以生长，能产生红色的 SeNPs 颗粒，实验结果表明具有较强的产 SeNPs 能力。本研究以阿维链霉菌为研究对象，对其产 SeNPs 的物理化学表征、菌丝形态、耐受性进行进一步分析，以期为 SeNPs 的生产提供新的菌株，同时以枸杞(*Lycium barbarum*)根腐病的主要致病菌——尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)验证其抑菌活性，为 SeNPs 的制备以及枸杞病害防治提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

阿维链霉菌(*S. avermitilis*)菌种购自美国菌种保藏中心(ATCC 编号 31271)；尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)由宁夏大学生命科学学院微生物实验室分离自枸杞(*L. barbarum*)根腐病病株。

1.1.2 培养基

阿维链霉菌液体培养基(酵母提取物 4.0 g、葡萄糖 4.0 g、麦芽提取物 10.0 g、pH 7.3，加水定容至 1.0 L)用于阿维链霉菌的活化和 SeNPs 的制备；固体培养基加入 18.0 g/L 的琼脂，用于 Na_2SeO_3 耐受性分析试验。

PDA 培养基(马铃薯煮汁 200.0 g，葡萄糖 20.0 g，琼脂 18.0 g，加水定容至 1.0 L)用于枸杞根腐病原菌的活化及抑菌实验。

灭菌条件：121 ℃，20 min。

1.1.3 主要试剂与仪器

药品与试剂：Na_2SeO_3 (≥99%, ThermoFisher Scientific 公司)，PBS (pH 7.4，武汉赛维尔生物科技有限公司)，戊二醛固定液(2.5%, Phygene 公司)，其他试剂均为分析纯。

1 mol/L Na_2SeO_3 母液配制：准确称取 Na_2SeO_3 8.647 0 g，加去离子水定容至 50 mL，充分混匀后用 0.22 μm 滤膜过滤，4 ℃冷藏备用。

1 mol/L SeNPs 母液配制：准确称取 0.789 6 g 干燥的 SeNPs，置于 10 mL 去离子水中制成 1 mol/L SeNPs 母液，4 ℃冷藏备用。

主要仪器：扫描电镜(Carl Zeiss AG 蔡司)，傅里叶红外变换光谱仪(ThermoFisher Scientific 公司)，X 射线衍射仪(Bruker Corporation 公司)，能谱分析仪(Oxford Instruments)，透射电镜(Hitachi 公司)，光学显微镜(奥林巴斯株式会社)，超临界干燥仪(Tousimis Research Corporation 公司)，高速冷冻离心机(海尔生物医疗)，恒温振荡培养箱(济南欧莱博生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 SeNPs 合成

取活化 3 d 镜检未染菌的阿维链霉菌液，按照 2% (体积比)的接种量接种至 50 mL 液体培养基中，加入 250 μL Na_2SeO_3 母液，使培养液中 Na_2SeO_3 浓度为 5 mmol/L，封口膜封口，

于 28 ℃、90 r/min 振荡培养观察，以接种后加入等体积无菌水处理作为对照。

1.2.2 阿维链霉菌的 Na_2SeO_3 耐受性试验

为了验证阿维链霉菌对 Na_2SeO_3 的耐受性，分别吸取不同体积的 Na_2SeO_3 母液加入到 20 mL 未凝固的培养基中，摇匀，制备 Na_2SeO_3 浓度为 5、10、20、40、100、200、300、400 mmol/L 的固体培养基，然后用无菌棉签蘸取菌液分别划线接种到以上培养基，倒置于 28 ℃培养箱中培养观察，以加入等体积无菌水的固体平板作为对照。

为了检验高浓度 Na_2SeO_3 胁迫下是否有活的阿维链霉菌，将以上处理培养 6 d 后用无菌棉签蘸无菌水擦拭培养基表面，然后划线接种于新的培养基，置于 28 ℃培养箱中培养 6 d，观察是否有阿维链霉菌菌落形成。以上每个处理均设置 3 个重复。

1.2.3 阿维链霉菌菌丝显微观察、透射电镜观察和扫描电镜观察

按照 1.2.2 的方法制备含 0.5 mmol/L Na_2SeO_3 的固体培养基，接种培养 3 d 后涂片、染色，显微观察菌丝形态。

制备 50 mL 培养液，于 28 ℃、90 r/min 振荡培养 3 d 后加入 250 μL Na_2SeO_3 母液，使培养液中 Na_2SeO_3 浓度为 5 mmol/L，继续培养至培养液呈红色时，取 5 mL 菌液 2 份，于 5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，所得沉淀用冷 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤 3 次以去除培养基等残留物，然后分别向含菌丝的沉淀中加入 1 mL 2.5%的戊二醛溶液固定。其中一份于 4 ℃静置 24 h 后脱水、包埋、切片，采用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察纳米硒颗粒的位置；另一份用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，再依次使用 30%、50%、70%、80%、95%乙醇梯度脱水，后用 100%乙醇脱水 2 次，每次 20 min，再以 100%丙酮置换 2 次，每次 20 min，之后冷冻干燥、镀金膜进行扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察。对照样品加入 250 μL 无菌水，其余处理方法与样品相同。

1.2.4 SeNPs 的提取及表征

为了进一步确定产生的红色沉淀物质的成分，将培养 6 d 的培养液置于高速冷冻离心机 10 000 r/min 离心 10 min，收集沉淀，用超纯水洗涤 3 次去除培养基残留，沉淀用 50%、60%、70%蔗糖梯度溶液于 8 000 r/min 离心 10 min 分离菌丝，梯度分离 2 次后收集红色沉淀，用超纯水于 8 000 r/min 离心 10 min 洗涤 3 次去除残留蔗糖，再用超纯水 6 000 r/min 离心 10 min 洗涤两次后收集沉淀，所得沉淀经超临界干燥后进行 SEM 观察、能量色散 X 射线能谱(energy dispersive spectrometer, EDS)分析、傅里叶红外变换光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)和 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析。

采用傅里叶红外光谱仪测定样品结构，将 SeNPs 粉末与溴化钾混合压片，室温下在 400–4 000 cm^{-1} 范围内测量其吸收光谱，扫描速度为 5 kHz。采用 X 射线衍射仪对制得的样品结晶状态进行分析，将 SeNPs 粉末置于载玻片的样品槽中，进行表面压片，随后将其置于 X 射线衍射仪中进行测试，扫描角度为 10°–90°，扫描速度为 5 (°)/min。

1.2.5 SeNPs 对尖孢镰刀菌的抑菌作用

参照文献[16]的方法，将纯化、超临界干燥后的 SeNPs 用无菌水配制成浓度为 1 mol/L 的母液，然后分别吸取 4、10、20、40、100、200、300、400、500 μL 母液，各加入一定量的无菌水涂布在 20 mL 的 PDA 平板上，立即用玻璃涂布器涂布均匀，制备出 SeNPs 浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μmol/mL

浓度梯度的 PDA 平板。对照组加入等体积无菌水涂布，每个处理设置 3 个重复。

用内径 5 mm 的金属环将活化 3 d 的尖孢镰刀菌培养基均匀切割成菌饼，使用接种环将布满菌丝的菌饼转移到含 SeNPs 的培养基中央，长有菌丝的一面紧贴培养基表面，封口膜密封边缘，正面向上置于 28 ℃恒温培养箱中静置培养，待 24 h 后倒置平皿培养。培养过程中每天定时使用“十”字交叉法测量菌落直径，待对照组菌落蔓延接近平皿边缘时停止培养，分析不同处理对尖孢镰刀菌的抑菌效果。抑菌率[R(%)]计算公式：$R=(D_{对照}-D_{处理})/(D_{对照}-5)$，式中 $D_{对照}$是对照组直径，$D_{处理}$是处理组直径，菌饼直径 5 mm。

将菌丝生长抑制率换成抑制几率值作为纵坐标，纳米硒浓度转化为对数值作为横坐标，根据菌丝生长抑制几率值和微摩尔浓度对数的线性回归关系，求解毒力回归方程，计算半数效应浓度(median effective concentration, EC_{50})以及相关系数等[17]。

2 结果与分析

2.1 阿维链霉菌还原 Na_2SeO_3 生成 SeNPs

2.1.1 阿维链霉菌对 Na_2SeO_3 耐受性分析

阿维链霉菌在含有 5 mmol/L Na_2SeO_3 的液体培养基中培养 2 d 后颜色明显变红(图 1)，这初步说明该菌具有将 Na_2SeO_3 转化为红色的 SeNPs[18-19]的能力。

采用固体平板培养方式验证阿维链霉菌对 Na_2SeO_3 的耐受性，以培养基是否变红以及能否从中分离出活菌进行判断。按照 1.2.2 设置的浓度梯度培养 3 d 后，5−300 mmol/LNa_2SeO_3 处理的培养基均变红，并且从相应处理平板上都成功分离到了阿维链霉菌(图 2)，这说明在相应浓度处理下均有 SeNPs 的生成，且都存在活的阿维链霉菌。400 mmol/L Na_2SeO_3 处理的培养基同样变红，但未能分离出阿维链霉菌，说明

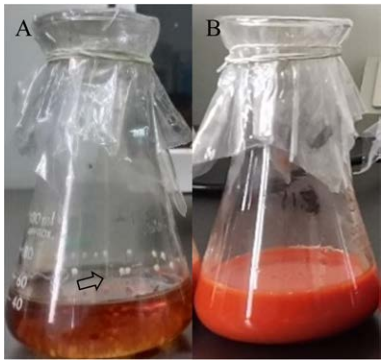


图 1 阿维链霉菌还原 Na_2SeO_3 生成 SeNPs A：阿维链霉菌菌液，箭头所指为菌丝球；B：添加 5 mmol/L Na_2SeO_3 的阿维链霉菌菌液。

Figure 1 Reduction of Na_2SeO_3 by *S. avermitilis* to generate SeNPs. A: *S. avermitilis* culture solution. The arrow points to the mycelial pellet. B: *S. avermitilis* solution with 5 mmol/L Na_2SeO_3.

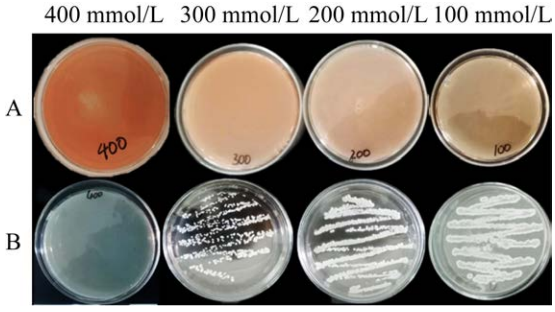


图 2 高浓度 Na_2SeO_3 处理对阿维链霉菌存活的影响 A：分别添加 400、300、200、100 mmol/L Na_2SeO_3 的阿维链霉菌固体平板；B：各处理分离出的阿维链霉菌所形成的菌落。

Figure 2 Effect of high concentration Na_2SeO_3 treatment on the survival of *S. avermitilis*. A: Solid culture of *S. avermitilis* with 400, 300, 200, and 100 mmol/L Na_2SeO_3 added, respectively. B: Colonies formed by *S. avermitilis* isolated at each treatment concentration.

400 mmol/L 浓度胁迫下已没有活菌存在，SeNPs 的产生是由种子液中的还原性小分子物质或酶催化反应的结果[20]。综上所述，阿维链霉菌可耐受 300 mmol/L 的 Na_2SeO_3，具有较高的耐受能力。

2.1.2 Na_2SeO_3 对阿维链霉菌菌落形态的影响

为了验证 Na_2SeO_3 对阿维链霉菌菌落及菌丝形态的影响，添加 0.5 mmol/L Na_2SeO_3 培养 3 d 后观察菌落及菌丝形态的变化。从图 3A 可以看出，阿维链霉菌在不添加 Na_2SeO_3 的培养基上形成白色、表面干燥的菌落，显微观察可以看到菌丝粗壮、形态饱满、相互缠绕；图 3B 为添加 Na_2SeO_3 的菌落及菌丝显微图，从图中可以看到添加 Na_2SeO_3 后阿维链霉菌不能形成正常的菌落，而是形成红色点状的小菌落，显微观察可以看到菌丝纤细，断裂成“杆菌”状。研究发现，断裂的“杆菌”的大小与 Na_2SeO_3 浓度有关，Na_2SeO_3 处理浓度越高，形成的菌落越细小，当浓度高于 10 mmol/L 时，肉眼观察不到菌落，显微观察到的断裂体也更小。上述结果在液体培养过程中也可以得到印证，不添加 Na_2SeO_3 的液体培养基经过一段时间的培养后，瓶壁有明显的菌丝球(图 1 箭头所示)，而添加 Na_2SeO_3 则观察不到。以上结果说明，Na_2SeO_3 对阿维链霉菌菌丝的生长状态会产生较大影响。

2.1.3 阿维链霉菌丝 SEM 分析

从 SEM 结果可以看出，未添加 Na_2SeO_3 的菌丝体舒展、光滑、顶端钝圆，形态完整(图 4A)，而添加 Na_2SeO_3 处理的菌丝体表面褶皱(图

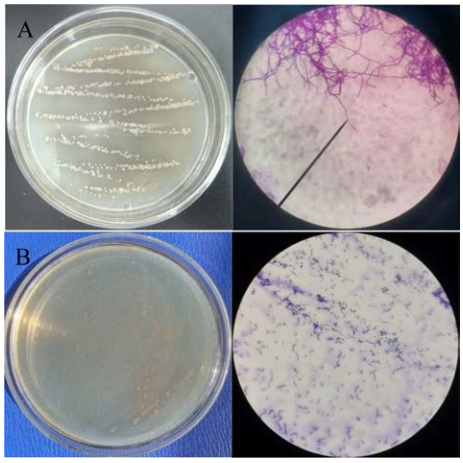


图 3 Na_2SeO_3 对阿维链霉菌菌落及菌丝形态的影响 A：未添加 Na_2SeO_3 的菌落及菌丝；B：添加 0.5 mmol/L Na_2SeO_3 的菌落及菌丝。

Figure 3 Effects of adding Na_2SeO_3 on colony and mycelial morphology of *S. avermitilis*. A: Colonies and microscopic hyphae without Na_2SeO_3; B: Colonies and microscopic hyphae with 0.5 mmol/L Na_2SeO_3 added.

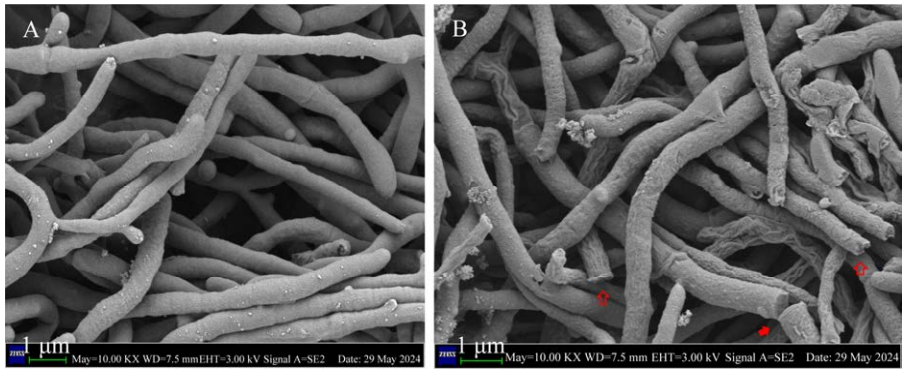


图 4 阿维链霉菌菌丝 SEM 图 A：未添加 Na_2SeO_3。B：添加 Na_2SeO_3。Bar=1 μm。

Figure 4 SEM image of *S. avermitilis* hyphae. A: SEM without Na_2SeO_3. B: SEM with Na_2SeO_3. Bar=1 μm.

4B)，顶端出现较多的断面(空心箭头所示)和断裂体(实心箭头所示)。以上结果与光学显微镜下观察到的结果相一致，说明阿维链霉菌可以通过菌丝断裂的方式将合成的 SeNPs 释放到发酵液中。这与 *Streptomyces* sp.ES2-5 释放 SeNPs 的方式相同[21]，是放线菌区别于细菌和真菌所特有的释放方式[22-24]。

2.1.4 阿维链霉菌 TEM 结果

TEM 结果表明，在添加 Na_2SeO_3 的处理组中，菌丝体内外均观察到了边缘清晰、结构致密的 SeNPs 颗粒(图 5A 箭头所示)，同时可以看出，细胞中出现了较大的空洞；未添加 Na_2SeO_3 的对照组细胞结构较为完整，菌丝体内外均没有 SeNPs 颗粒(图 5B)。以上结果说明，阿维链霉菌可在细胞质中合成 SeNPs 颗粒，然后将其释放到发酵液中，同时 Na_2SeO_3 可以与蛋白质的巯基发生反应，产生的自由基在一定程度上损伤阿维链霉菌的细胞超微结构，表现出明显的“毒性效应”[21]。

2.2 纳米硒的表征

2.2.1 扫描电镜分析

将提取分离的红色粉末使用超临界干燥后进行 SEM 观察。从图 6 可以看出，阿维链霉菌

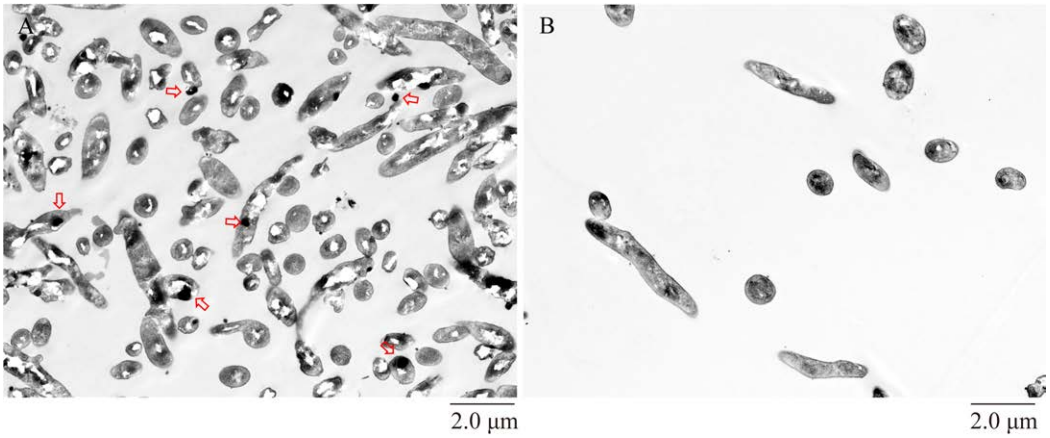


图 5 添加(A)与不添加(B) Na_2SeO_3 的阿维链霉菌菌体 TEM 图 A 图中箭头所示为 SeNPs 颗粒

Figure 5 TEM micrographs of *S. avermitilis* hyphae with (A) and without (B) Na_2SeO_3. The arrow points to the SeNPs.

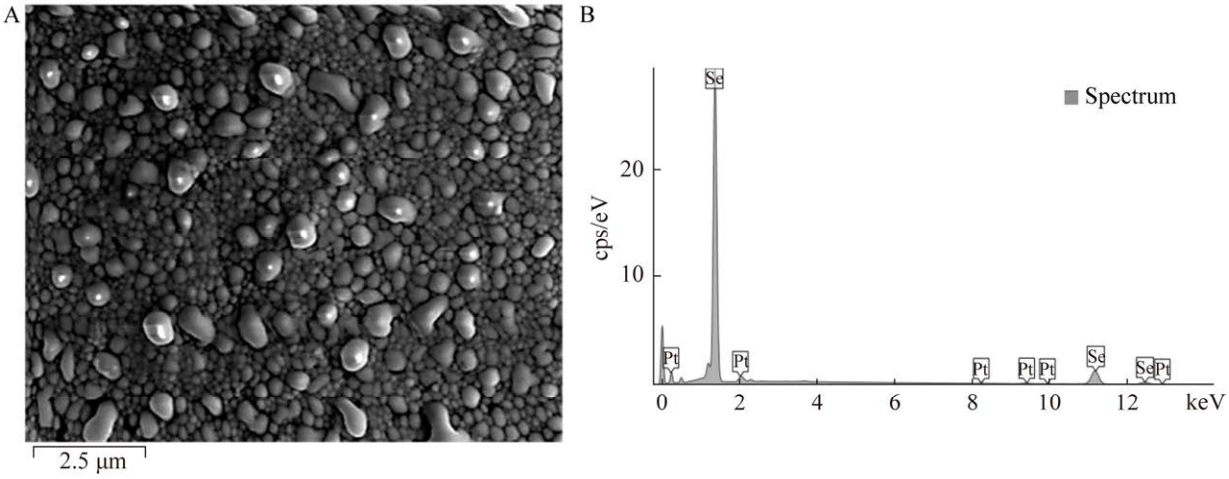


图 6 SeNPs 粉末的 SEM (A)和 EDS (B)分析

Figure 6 SEM (A) and EDS (B) analysis of SeNPs powder.

介导形成的球形 SeNPs 颗粒，大部分直径 100 nm 左右，小部分形成 200 nm 左右的聚集体。EDS 分析显示，硒的特征吸收峰较高，在 1.37 KeV、11.20 KeV 和 12.49 KeV 出现了特定的硒吸收峰值，说明含有大量 Se 元素。

2.2.2 红外光谱分析

为了进一步表征纳米硒，对阿维链霉菌合成的 SeNPs 表面官能团进行分析。FTIR 结果显示(图 7)，3 421.87 cm^{-1} 处的较强吸收峰是由酰胺基团的 N−H 和分子间、分子内的−OH 的伸缩振动引起[25]。2 853.61 cm^{-1} 和 2 921.67 cm^{-1} 处的特征峰是脂肪族基团(如存在于蛋白质侧链和脂质中的$-CH_2$ 和$-CH_3$)的对称和不对称振动拉伸引起。1 635.92 cm^{-1} 处的强吸收峰则由不同无规则卷曲蛋白质中酰胺基的 C=O (酰胺I带)伸缩振动引起[25-26]。1 537.60 cm^{-1} 处的吸收峰则归因于酰胺II带，而 1 400.88 cm^{-1} 处的吸收峰属于脂肪族 C−H 弯曲变形造成的。1 229.16 cm^{-1} 处的吸收峰对应−OH 的弯曲振动，多由多糖类物质引起[27]。1 040.18 cm^{-1} 处的吸收峰可能是由胺中的 C−N 振动引起的。以上 FTIR 光谱结果均说明，阿维链霉菌产生的 SeNPs 存在多糖类、脂类和蛋白质等有机残留，推测这些细胞外聚合物质(extracellular polymeric substances, EPS)参与 SeNPs 的形成过程，对生物源 SeNPs 的稳定具有重要的作用[28]，这与朱燕云等的研究结果相一致[29]。此外，在 517.96 cm^{-1} 有一特征峰可能是对称环伸缩引起的，可能是 Se=O 或 Se−H 结构[30]，这是否说明有部分硒与蛋白或多糖形成了硒蛋白或硒多糖有待进一步证实。

2.2.3 XRD 分析

SeNPs 的 XRD 结果如图 8 所示，在 20°–30° 之间出现了典型的“馒头”衍射峰，未出现晶体特征吸收峰，这说明阿维链霉菌产生的 SeNPs 为非晶态。阿维链霉菌合成非晶态的 SeNPs 可能是由于其表面吸附了更多的蛋白、糖类等物质，这些物质阻碍了晶体的形成。研究发现，生物合成的 SeNPs 多为非晶态，且非晶态 SeNPs 的反应活性优于晶体形态的活性[31-32]。据此可知，相较于化学法合成的晶体态 SeNPs，阿维链霉菌合成的非晶态的 SeNPs 具有潜在的生物活性优势。

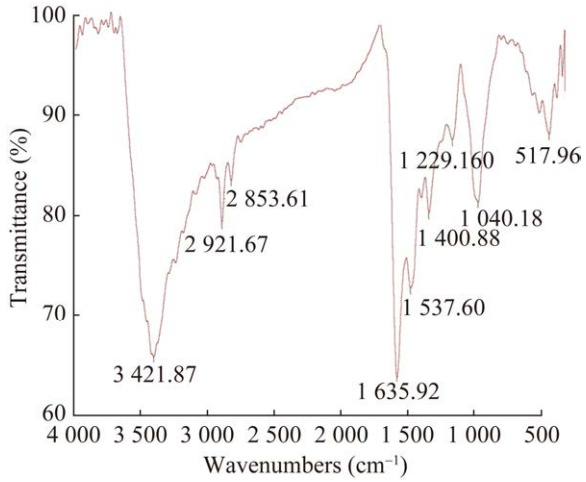


图 7 SeNPs 的傅里叶红外变换光谱分析
Figure 7 FTIR spectrum of SeNPs.

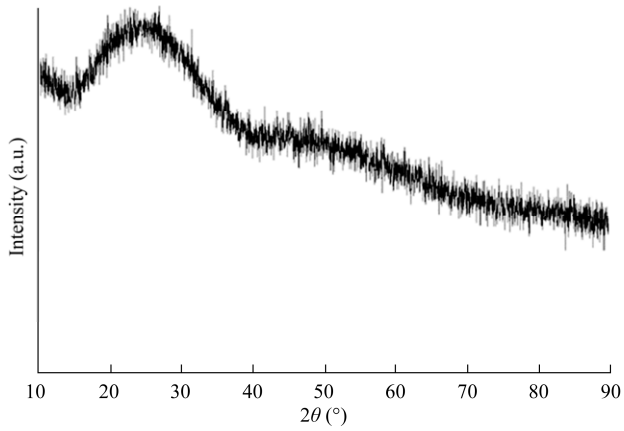


图 8 SeNPs 的 XRD 分析
Figure 8 XRD analysis of SeNPs.

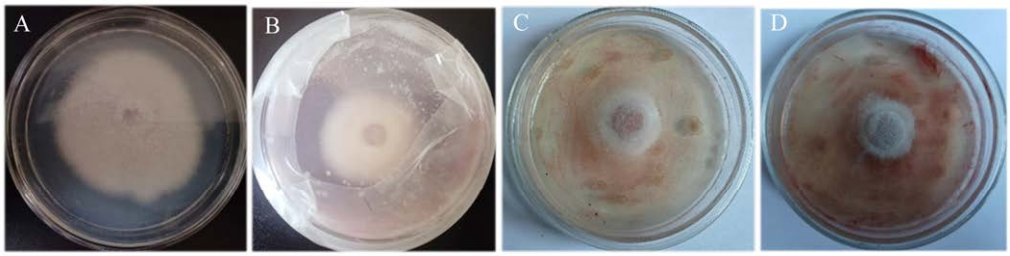
2.3 纳米硒对枸杞根腐病原菌的抑制

尖孢镰刀菌(*F. oxysporium*)是我国宁夏地区枸杞根腐病的主要真菌病原菌之一[33]。为了

探索阿维链霉菌合成的SeNPs在枸杞根腐病方面的应用潜力，本研究采用平板抑制法检验 SeNPs 对主要病原菌-尖孢镰刀菌的抑制效果，由低浓度到高浓度(0.2–25.0 μmol/mL)共设置 9 个处理以及对照组(CK)。图 9 为 CK、低、中、高浓度下尖孢镰刀菌的菌落形态，可以看出，阿维链霉菌产生的 SeNPs 可以有效抑制尖孢镰刀菌的生长，随着 SeNPs 浓度的增加，尖孢镰刀菌的直径相应减少，表现出明显的浓度梯度效应。

培养4 d后不同SeNPs浓度对尖孢镰刀菌的抑制效果如表 1 所示，浓度在 0.2–25.0 μmol/mL 时，尖孢镰刀菌的生长直径为 6.20–2.00 cm，纳米硒对尖孢镰刀菌的抑菌率为 14.93%–77.61%，各处理之间抑菌率差异极显著(P<0.01)。

由表 2 可知，阿维链霉菌产生的 SeNPs 对尖孢镰刀菌的毒力回归方程为 Y=0.919X+4.489，EC_{50} 为 0.556 μmol/mL，抑制几率值(Y)与微摩尔浓度对数(X)呈正相关。



0 μmol/mL　2 μmol/mL　5 μmol/mL　15 μmol/mL

图 9　0 μmol/mL (A)、2 μmol/mL (B)、5 μmol/mL(C)、15 μmol/mL (D) SeNPs 对尖孢镰刀菌菌落大小的影响

Figure 9　The effect of 0 μmol/mL (A), 2 μmol/mL (B), 5 μmol/mL (C) and 15 μmol/mL (D) SeNPs on the colonial morphology of *F. oxysporum*.

表 1　不同 SeNPs 浓度对尖孢镰刀菌的抑制效果

Table 1　Inhibitory activity of different SeNPs concentrations on *F. oxysporum*

Concentration (μmol/mL)	Colony diameter (cm)	Antibacterial rate (%)
0.2	6.20±0.25 bB	14.93±0.35 iI
0.5	6.00±0.26 bB	17.91±0.29 hH
1.0	5.50±0.16 cC	25.37±0.26 gG
2.0	4.30±0.91 dD	43.28±0.91 fF
5.0	3.00±0.60 eE	62.69±1.02 eE
10.0	2.80±0.59 fF	65.67±1.31 dD
15.0	2.50±0.53 gG	70.15±1.40 cC
20.0	2.30±0.49 hH	73.13±1.46 bB
25.0	2.00±0.42 iI	77.61±1.55 aA
CK	7.20±0.20 aA	–

The lowercase letters in the same column represent a significant difference of 5%, and the uppercase letters represent a significant difference of 1%.

表 2　不同 SeNPs 浓度对尖孢镰刀菌的室内毒力

Table 2　Indoor toxicity of different concentrations of SeNPs to *F. oxysporum*

Pathogenic bacteria	Toxicity regression equation	r	EC_{50} (μmol/mL)	95% confidence limits	X^2
F. oxysporium	Y=0.919X+4.489	0.98	0.556	2.727–4.746	3.948

3 讨论

硒盐的耐受性是筛选产纳米硒菌的必要条件。研究表明，亚硒酸盐还原过程中产生的 O_2^- 对细胞具有一定的毒性作用，高浓度的硒盐会加速细胞损伤，因此需要细胞具有解毒或排出机制[34]。大多数微生物最大 Na_2SeO_3 耐受浓度在 100 mmol/L 以内[8-11,29]，已报道最高耐受浓度为 800 mmol/L[35]，但在此浓度下是否能分离出活的菌尚未见报道。阿维链霉菌具有高的 Na_2SeO_3 耐受性归因于其独特的解毒机制，一方面，阿维链霉菌可以通过菌丝断裂的方式释放 SeNPs，这种独特的释放机制能更有效地保护菌体免受毒害；另一方面，阿维链霉菌通过分泌更多的多糖、蛋白等 EPS，这些 EPS 残基中的羰基(C=O)和肽键(−CO−NH−)能够结合 Se，从而形成一层保护层包裹在纳米颗粒产物上，以减小毒性物质对菌株的影响，同时还可使合成的 SeNPs 颗粒更加稳定[36-37]。阿维链霉菌能够将 Na_2SeO_3 还原为红色纳米硒，具有较高的 Na_2SeO_3 耐受能力，有一定的应用潜力。

不同微生物在合成 SeNPs 时，合成部位存在差异，有的在胞内，有的则在胞外，还有一些微生物在胞内和胞外均可合成 SeNPs[38-40]。本研究结果表明，阿维链霉菌可在菌体内合成直径较小的 SeNPs 颗粒，这些颗粒在细胞内聚集到一定程度时，会以杆状体形式断裂，然后在理化因素作用下发生破裂，从而释放出 SeNPs 颗粒。同时，细胞外也有 SeNPs 颗粒出现，这些颗粒的形成过程、代谢转化规律、产 SeNPs 条件及机理等都有待进一步研究。

纳米颗粒具有良好的抗真菌活性，被认为是控制植物病原真菌的良好替代品[41]。SeNPs 可以吸附在菌体表面，并插入细胞壁或细胞膜，将硒因子释放到细胞内部，诱导活性氧的产生，从而使细胞产生由外到内的损伤，发挥抑菌的作用[42]。研究表明，SeNPs 对革兰氏阳性菌(如李斯特菌)和革兰氏阴性菌(如金黄色葡萄球菌、表皮链球菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌等)均有显著且持续的抑菌作用[19,43]。SeNPs 颗粒对蚕豆根腐病病原菌[10]、稻瘟病病原菌[44]、草莓枯萎病病原菌[29]等植物真菌病原菌表现出强烈的抑制作用。本研究发现，SeNPs 对枸杞根腐病原菌同样具有较好的抑制效果。以 SeNPs 颗粒作为枸杞根腐病的生防试剂，既安全有效，又对枸杞的生长有益。以上结果可为生物源 SeNPs 的应用以及枸杞根腐病的防治提供参考。

4 结论

目前已报道能够合成 SeNPs 的放线菌较少。阿维链霉菌在 SeNPs 合成及对 Na_2SeO_3 耐受性方面表现卓越，其具有较强的 SeNPs 合成能力和较高的 Na_2SeO_3 耐受能力，最高耐受浓度可达 300 mmol/L，这一数值远高于已报道的大多数细菌和真菌。阿维链霉菌能够在细胞质内合成球形 SeNPs 颗粒。这些在胞内合成的 SeNPs 会通过菌丝断裂的方式释放到细胞外环境中。阿维链霉菌合成的 SeNPs 颗粒直径约 100 nm，部分颗粒会进一步形成约 200 nm 的聚集体，且呈非晶态结构。颗粒表面元素组成以 C、Se 为主，并含有 O、N 等元素。值得注意的是，SeNPs 表面包裹着丰富的胞外聚合物(EPS)，其中的 −OH、C=O、C−N、C−H 等官能团对维持 SeNPs 的稳定性及其生物活性起着关键作用。在生物活性应用方面，阿维链霉菌所合成的 SeNPs 对尖孢镰刀菌具有显著的抑制活性，且抑菌效果与 SeNPs 的浓度呈正相关。当 SeNPs 浓度为 25 μmol/mL 时，对尖孢镰刀菌的抑菌率可达 77.61%，其 EC50 为 0.556 μmol/mL。

综上所述，阿维链霉菌通过菌丝断裂和产生更多的 EPS 的方式降低 Na_2SeO_3 对细胞的毒

性，这种解毒机制使得阿维链霉菌有更高的 Na_2SeO_3 耐受性，进而形成更稳定的 SeNPs 颗粒。这一过程体现了阿维链霉菌对环境适应性的改变。鉴于上述特性，阿维链霉菌作为一种传统的工业生产菌，其在合成纳米硒方面也极具潜力，对其进行深入研究，不仅可以丰富微生物产 SeNPs 资源，也可为全面认识微生物产 SeNPs 机理及生物源纳米硒的综合利用提供参考。

REFERENCES

[1] ANGAMUTHU A, VENKIDUSAMY K, MUTHUSWAMI RR. Synthesis and characterization of nano-selenium and its antibacterial response on some important human pathogens[J]. Current Science, 2019, 116(2): 285-290.

[2] HARTIKAINEN H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005,18(4): 309-318.

[3] ZHANG L, ZENG HW, CHENG WH. Beneficial and paradoxical roles of selenium at nutritional levels of intake in healthspan and longevity[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 127: 3-13.

[4] ZHANG T, QI M, WU Q, XIANG P, TANG DJ, LI Q. Recent research progress on the synthesis and biological effects of selenium nanoparticles[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1183487.

[5] 苏华华，王艳华. 纳米硒的制备及生物医学应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2020, 31(5): 621-626.
SU HH, WANG YH. Progress in synthesis and biomedical application of selenium nanomaterials[J]. Letters in Biotechnology, 2020, 31(5): 621-626 (in Chinese).

[6] XU MM, ZHU S, LI YR, XU S, SHI GY, DING ZY. Effect of selenium on mushroom growth and metabolism: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 118: 328-340.

[7] NIE XL, YANG XR, HE JY, LIU P, SHI H, WANG T, ZHANG DH. Bioconversion of inorganic selenium to less toxic selenium forms by microbes: a review[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2023, 11: 1167123.

[8] AVENDAÑO R, CHAVES N, FUENTES P, SÁNCHEZ E, JIMÉNEZ JI, CHAVARRÍA M. Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37155.

[9] 李严，杨婧，吴炜泽，龚静熙，戴春晓，曲媛媛. 细菌共培养体系合成纳米硒特性[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28(2): 379-386.
LI Y, YANG J, WU WZ, GONG JX, DAI CX, QU YY. Biosynthesis of selenium nanoparticles by a bacteria co-culture system[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2022, 28(2): 379-386 (in Chinese).

[10] HASHEM AH, ABDELAZIZ AM, ASKAR AA, FOUDA HM, KHALIL AMA, ABD-ELSALAM KA, KHALEIL MM. *Bacillus megaterium*-mediated synthesis of selenium nanoparticles and their antifungal activity against *Rhizoctonia solani* in faba bean plants[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(3): 195.

[11] KHOEI NS, LAMPIS S, ZONARO E, YRJÄLÄ K, BERNARDI P, VALLINI G. Insights into selenite reduction and biogenesis of elemental selenium nanoparticles by two environmental isolates of *Burkholderia fungorum*[J]. New Biotechnology, 2017, 34: 1-11.

[12] AMERI A, SHAKIBAIE M, AMERI A, ALI FARAMARZI M, AMIR-HEIDARI B, FOROOTANFAR H. Photocatalytic decolorization of bromothymol blue using biogenic selenium nanoparticles synthesized by terrestrial actinomycete *Streptomyces griseobrunneus* strain FSHH12[J]. Desalination and Water Treatment, 2016, 57(45): 21552-21563.

[13] 昌青青，张园园，曹圆圆，卢存龙，陆鹏，刘爱民. 富硒链霉菌 wh63 的鉴定及富硒特性研究[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(4): 867-871.
CHANG QQ, ZHANG YY, CAO YY, LU CL, LU P, LIU AM. Identification and Se-enriched characteristics of A strain Se-enriched *Streptomyces wh63*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(4): 867-871 (in Chinese).

[14] AHMAD MS, YASSER MM, SHOLKAMY EN, ALI AM, MEHANNI MM. Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess_amA-1[J]. International Journal of Nanomedicine, 2015, 10: 3389-3401.

[15] GOLINSKA P, WYPIJ M, INGLE AP, GUPTA I, DAHM H, RAI M. Biogenic synthesis of metal nanoparticles from actinomycetes: biomedical applications and cytotoxicity[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(19): 8083-8097.

[16] ZHOU JY, ZHAO XY, DAI CC. Antagonistic mechanisms of endophytic *Pseudomonas fluorescens* against *Athelia rolfsii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2014, 117(4): 1144-1158.

[17] 霍宏丽，席先梅，白全江，妥德宝，宋雪峰，彭敏，邱廷艳，刘丽茹. BGF 生物有机肥对辣椒疫霉和茄病镰孢菌的抑菌效果[J]. 北方农业学报, 2022, 50(1): 101-106.
HUO HL, XI XM, BAI QJ, TUO DB, SONG XF, PENG M, QIU TY, LIU LR. Antimicrobial activity of BGF bio-organic fertilizer against *Phytophthora capsici* and *Fusarium solani*[J]. Journal of Northern Agriculture, 2022, 50(1): 101-106 (in Chinese).

[18] WANG YT, SHU X, ZHOU Q, FAN T, WANG TC, CHEN X, LI MH, MA YH, NI J, HOU JY, ZHAO WW, LI RX, HUANG SW, WU LF. Selenite reduction and the biogenesis of selenium nanoparticles by *Alcaligenesfaecalis* Se03 isolated from the gut of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9): 2799.

[19] 徐孝楠, 马浩迪, 续炎, 李璇, 覃智, 权春善, 张丽影. 耐硒海洋菌株的筛选、鉴定及其产纳米硒的抗菌活性[J]. 食品工业科技, 2023, 44(24): 152-158.
XU XN, MA HD, XU Y, LI X, QIN Z, QUAN CS, ZHANG LY. Screening and identification of selenium-tolerant marine strain and the antibacterial activity of Se nanoparticles it synthesized[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(24): 152-158 (in Chinese).

[20] 朱燕云, 吴文良, 赵桂慎, 郭岩彬. 硒在动植物及微生物体中的转化规律研究进展[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(3): 189-198.
ZHU YY, WU WL, ZHAO GS, GUO YB. Progress of selenium biological transformation in animals, plants, and microorganisms[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2018, 35(3): 189-198 (in Chinese).

[21] TAN YQ, YAO R, WANG R, WANG D, WANG GJ, ZHENG SX. Reduction of selenite to Se(0) nanoparticles by filamentous bacterium *Streptomyces* sp. ES2-5 isolated from a selenium mining soil[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 157.

[22] BUTLER CS, DEBIEUX CM, DRIDGE EJ, SPLATT P, WRIGHT M. Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis*[J]. Biochemical Society Transactions, 2012, 40(6): 1239-1243.

[23] PIACENZA E, PRESENTATO A, BARDELLI M, LAMPIS S, VALLINI G, TURNER RJ. Influence of bacterial physiology on processing of selenite, biogenesis of nanomaterials and their thermodynamic stability[J]. Molecules, 2019, 24(14): 2532.

[24] SCHRÖDER I, RECH S, KRAFFT T, MACY JM. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(38): 23765-23768.

[25] 冯明菊, 熊华, 王晓雅, 孙永. 富硒糙米蛋白理化特性及抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 34-42.
FENG MJ, XIONG H, WANG XY, SUN Y. Physicochemical properties and antioxidant activity of protein in selenium-enriched brown rice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(15): 34-42 (in Chinese).

[26] 谢孟峡, 刘媛. 红外光谱酰胺III带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 226-231.
XIE MX, LIU Y. Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins[J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2003, 24(2): 226-231 (in Chinese).

[27] 李磊, 李忠佩, 刘明, 吴萌, 马晓焉, 唐晓雪. 基于FTIR 分析猪场废水有机物分解过程中组成结构变化[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(11): 3517-3522.
LI L, LI ZP, LIU M, WU M, MA XY, TANG XX. Structural analysis of organic matter composition in piggery wastewater during the process of organic degradation based on FTIR spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2016, 36(11): 3517-3522 (in Chinese).

[28] LAMPIS S, ZONARO E, BERTOLINI C, CECCONI D, MONTI F, MICARONI M, TURNER RJ, BUTLER CS, VALLINI G. Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 3-14.

[29] 朱燕云, 孔祥平, 吴娥娇, 朱宁, 梁栋, 娄梦函, 周朱梦, 靳红梅. 耐高盐枯草芽孢杆菌 XP 合成球形纳米硒及其抑制草莓病原真菌生物活性[J]. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2825-2835.
ZHU YY, KONG XP, WU EJ, ZHU N, LIANG D, LOU MH, ZHOU ZM, JIN HM. Biosynthesis of spherical selenium nanoparticles with halophilic *Bacillus subtilis* subspecies stercoris strain XP for inhibition of strawberry pathogens[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(8): 2825-2835 (in Chinese).

[30] 石宝霞, 车会莲, 赵利霞, 谭军, 潘思轶, 汪兴平, 柳玉. 碎米荠硒多糖的分离纯化及光谱分析[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 298-302.
SHI BX, CHE HL, ZHAO LX, TAN J, PAN SY, WANG XP, LIU Y. Study on purification and spectra analysis of *Cardamine urbaniana* O.E. schlz-selenium polysaccharide[J]. Food Science, 2007, 28(6): 298-302 (in Chinese).

[31] YE XG, CHEN ZZ, ZHANG YY, MU JJ, CHEN LY, LI B, LIN XR. Construction, characterization, and bioactive evaluation of nano-selenium stabilized by green tea nano-aggregates[J]. LWT, 2020, 129: 109475.

[32] 王丽红, 杨辉, 毛建丽, 耿懿璠, 苏文, 贺博. 微生物还原法合成纳米硒益生菌的筛选及其培养条件优化[J]. 陕西科技大学学报, 2019, 37(4): 29-34.
WANG LH, YANG H, MAO JL, GENG YF, SU W, HE B. Screening of probiotics strain for nano-selenium synthesis by microbial reduction and optimization of the culture conditions[J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2019, 37(4): 29-34 (in Chinese).

[33] 王国琴, 杜雪倩, 马聪, 朱滕滕, 郑蕊, 岳思君. 枸杞根腐病病原菌鉴定及其拮抗菌的筛选[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(6): 245-253.
WANG GQ, DU XQ, MA C, ZHU TT, ZHENG R, YUE SJ. Identification of the pathogen causing root rot of *Lycium barbarum* and screening of antagonists[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(6):

245-253 (in Chinese).
[34] LOSI ME, FRANKENBERGER WT. Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: isolation and growth of the bacterium and its expulsion of selenium particles[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3079-3084.
[35] HUANG SW, WANG YT, TANG CG, JIA HL, WU LF. Speeding up selenite bioremediation using the highly selenite-tolerant strain *Providencia rettgeri* HF16-a novel mechanism of selenite reduction based on proteomic analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 406: 124690.
[36] RAJASREE SRR, GAYATHRI S. Extracellular biosynthesis of Selenium nanoparticles using some species of *Lactobacillus*[J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 2015, 44(5): 766-775.
[37] LIU HL, LIAN B. Quantitative evaluation of different fractions of extracellular polymeric substances derived from *Paenibacillus mucilaginosus* against the toxicity of gold ions[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 175: 195-201.
[38] WADHWANI SA, SHEDBALKAR UU, SINGH R, CHOPADE BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(6): 2555-2566.
[39] WANG TT, YANG LB, ZHANG BC, LIU JH. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H_2O_2 biosensor[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 80(1): 94-102.
[40] DOMOKOS-SZABOLCSY E, MARTON L, SZTRIK A, BABKA B, PROKISCH J, FARI M. Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia tabacum*[J]. Plant Growth Regulation, 2012, 68(3): 525-531.
[41] CRUZ-LUNA AR, CRUZ-MARTÍNEZ H, VÁSQUEZ-LÓPEZ A, MEDINA DI. Metal nanoparticles as novel antifungal agents for sustainable agriculture: current advances and future directions[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(12): 1033.
[42] 王丽红. 益生菌转化合成纳米硒及其抑菌机制研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2022.
WANG LH. Synthesis of nano-selenium by probiotics and its antibacterial mechanism[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2022 (in Chinese).
[43] WANG Q, LARESE-CASANOVA P, WEBSTER TJ. Inhibition of various Gram-positive and Gram-negative bacteria growth on selenium nanoparticle coated paper towels[J]. International Journal of Nanomedicine, 2015, 10: 2885-2894.
[44] 周驰. 纳米硒的生物合成及其抑菌活性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
ZHOU C. Study on biosynthesis and antibacterial activity of nano-selenium[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese).