

• 环境生物技术 •

贪铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成纳米硒

杨颖, 厉舒祯, 范书伶, 杨婧, 李政, 张珩琳, 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

杨颖, 厉舒祯, 范书伶, 等. 贪铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成纳米硒特性考. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1162–1169.

Yang Y, Li SZ, Fan SL, et al. Characteristics of selenium nanoparticles synthesized by cell-free supernatant *Cupriavidus* sp. SHE. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1162–1169.

摘要: 近年来, 纳米硒凭借其良好的导电、光热以及抗癌等特性, 在纳米技术、生物医学以及环境修复等诸多领域得到广泛应用。实验选择前期筛选得到的贪铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE, 文中探究了该菌株的细胞上清液、全细胞以及胞内提取物合成纳米硒的能力, 并对细胞上清液合成的纳米硒进行形貌表征与官能团分析, 最后选取革兰氏阳性菌假单胞菌 *Pseudomonas* sp. P11 和革兰氏阴性菌大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 进行抗菌实验。结果表明, 菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液、全细胞以及胞内提取物均具有合成纳米硒的能力。对于菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液而言, 在该实验中, 研究范围内其合成纳米硒的最佳条件是 SeO_2 浓度为 5 mmol/L, pH 为 7。透射电子显微镜结果表明合成的纳米硒颗粒主要为球形, 平均直径为 196 nm。X 射线衍射结果表明合成的纳米硒晶体类型为六方形结构。傅立叶转换红外光谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明纳米硒表面有小分子蛋白结合, 可能参与了纳米硒的合成和稳定过程。此外, 抗菌实验表明菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成的纳米硒颗粒对菌株 *E.coli* BL21 和 *Pseudomonas* sp. P11 均无明显的抗菌活性。综上, 该研究表明菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 在细胞上清液中产生的蛋白类物质在其合成纳米硒的过程中发挥了重要作用, 合成的生物纳米硒颗粒无毒且生物相容性良好, 未来在生物医学等领域具有较好的应用潜力。

关键词: 贪铜杆菌, 纳米硒, 抗菌活性, 绿色合成

Characteristics of selenium nanoparticles synthesized by cell-free supernatant *Cupriavidus* sp. SHE

Ying Yang, Shuzhen Li, Shuling Fan, Jing Yang, Zheng Li, Henglin Zhang, and Yuanyuan Qu

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

Abstract: In recent years, selenium nanoparticles (SeNPs) have been widely used in many fields such as nanotechnology, biomedicine and environmental remediation due to their good electrical conductivity, photothermal properties and anticancer

Received: September 19, 2019; **Accepted:** January 13, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31970107), the Open Project of State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology (No. QAK201943).

Corresponding author: Yuanyuan Qu. E-mail: qyy@dlut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 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 (No. QAK201943) 资助。

properties. In this study, the cell-free supernatant, whole cell and the cell-free extracts of the strain *Cupriavidus* sp. SHE were used to synthesize SeNPs, and several methods were applied to analyze the crystal structure and surface functional groups of the nanoparticles. Finally, *Pseudomonas* sp. PI1 (G^+) and *Escherichia coli* BL21 (G^-) were selected to investigate the antibacterial properties of SeNPs. Cell-free supernatant, whole cell and cell-free extracts of the strain could synthesize SeNPs. As for the cell-free supernatant, selenite concentration of 5 mmol/L and pH=7 were favorable for the synthesis of SeNPs. TEM images show that the average size of nanospheres synthesized by the supernatant was 196 nm. XRD analysis indicates the hexagonal crystals structure of SeNPs. FTIR and SDS-PAGE confirmed the proteins bound to the surfaces of SeNPs. SeNPs synthesized by cell-free supernatant showed no antimicrobial activities against *Pseudomonas* sp. PI1 and *Escherichia coli* BL21 (DE3). These results suggest that proteins played an important role in biotransformation of SeNPs in an eco-friendly process, and SeNPs synthesized in this study were non-toxic and biologically compatible, which might be applied in other fields in the future.

Keywords: *Cupriavidus* sp. SHE, selenium nanoparticles, antibacterial properties, green synthesis

目前,关于纳米硒在抗癌、抗氧化、抗菌等医学方面的相关应用已有不少报道。对于纳米硒的合成而言,生物法因成本低廉、无毒、环保等特点,引起了人们的广泛关注^[1]。在合成纳米硒的众多生物资源中,细菌是一种高效的绿色纳米合成工厂,大量文献报道不同种类的细菌能够合成尺寸与形态各异的纳米硒颗粒。例如,生枝动胶菌 *Zooglea ramigera* 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 均可在体外合成尺寸均一、分散性良好的球形纳米硒颗粒^[2-3]。贪铜杆菌 *Cupriavidus metallidurans* CH34 可在细胞内将亚硒酸盐还原为单质纳米硒,且其胞内含有大量重金属抗性基因^[4]。然而,目前关于菌株胞外合成纳米硒的研究仍未见报道。与胞内合成纳米硒相比,胞外合成反应步骤简单、不需要繁琐的后续操作,如细胞破碎以及溶剂萃取分离产物等,具有更广泛的应用前景^[5]。

此外,关于纳米硒在生物医学等方面的应用也有很多。Khiralla 等研究发现用菌株嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02 合成的纳米硒颗粒对大肠杆菌具有良好的抗菌活性,也有文献表明该菌株无法合成具有良好抗菌活性的纳米硒颗粒,但其合成的纳米硒颗粒生物相容性较好^[6-7]。通常纳米硒颗粒的形貌不同对其性质会产生一定的影响。Urarika 等通过分子设计和合成的方式成功合成出尺寸为 300 nm 的立方体结构的单质纳米硒颗粒,且通过实验证明该种形貌的纳米硒相较于球形颗粒而言对乳腺癌

细胞具有更强的抗癌能力^[8]。而迄今为止,如何利用生物法定向合成特定形貌或尺寸的纳米硒颗粒仍是目前的研究难点,有待于进一步的研究发现。

本研究选择前期筛选的贪铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE,分别探究其细胞上清液、胞内提取物以及全细胞合成纳米硒的能力,并对细胞上清液合成的生物纳米硒颗粒进行形貌及尺寸表征分析。通过考察生物转化合成纳米硒过程中的关键蛋白,对生物纳米硒的合成机理进行初步探索。最后利用大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 和假单胞菌 *Pseudomonas* sp. PI1 考察合成的纳米硒颗粒的抗菌特性。

1 材料与方法

1.1 菌株

贪铜杆菌 *Cupriavidus* sp. SHE 分离自大连理工大学牛角山泥土样品,现已鉴定并保存于中国普通微生物菌种保藏中心,保藏号为 CGMCC No. 9266 菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的 16S rRNA 基因序列储存于 GenBank 数据库,保存号为 KJ875863。菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 采用 LB 培养基,培养基的成分为:NaCl 10 g/L,蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L^[9]。

1.2 主要试剂

二氧化硒 (SeO_2),购自天津市化学试剂研究所;氯化钠 (NaCl),购自天津市富宇精细化工有

限公司；蛋白胨和酵母浸粉，购自北京奥博星生物技术有限责任公司；菌株 *Escherichia coli* BL21 为实验室购买的工程菌，菌株 *Pseudomonas* sp. PI1 为实验室前期分离筛选得到。本实验所用试剂均为分析纯及以上。

1.3 利用菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液、全细胞和胞内提取物合成纳米硒

从土壤中分离的菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 于 LB 培养基中培养，培养条件为 150 r/min、30 °C、24 h。菌株达到对数生长期后，菌液在 10 000 r/min 下离心 10 min (Avanti-30 型，美国 E Beckman 公司)^[8]，用注射器将离心后的上清液透过 0.45 μm 的滤膜进行过滤，得到细胞上清液。离心后的菌细胞用超纯水冲洗 3 次，再利用超纯水将其 *OD*₆₀₀ 调整为 1.0 得到菌株的全细胞溶液。将离心后得到的菌细胞用超纯水清洗 3 次后用一定量的超纯水重悬，然后利用超声破碎仪（超声波处理器 CPX 750、美国）破碎 30 min，将破碎后的体系在 10 000 r/min 条件下离心 10 min，离心后得到的上清液用 0.45 μm 滤膜进行过滤，得到菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的胞内提取液。最后将上述 3 种反应体系分别与 5 mmol/L SeO₂ 在 30 °C、150 r/min 条件下反应，合成纳米硒颗粒。

1.4 纳米硒的表征

首先通过溶液颜色变化直接观察纳米硒的生成，然后在 400–800 nm 波长范围内用紫外分光光度计 (UV-vis, Metash UV-9000, 中国) 对反应体系进行测量，考察其纳米硒的合成情况。用透射电子显微镜 (TEM, FEI Tecnai G2 Spirit, 荷兰) 对菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液合成的纳米硒颗粒的大小及形貌进行表征分析，用 X 射线衍射 (XRD, Rigaku, 日本) 对菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液合成的纳米硒晶体结构进行表征分析，用傅立叶转换红外光谱 (FTIR, IRPrestige-21, Japan) 在 400–4 000 cm⁻¹ 范围内对反应体系中可能参与纳米硒生物合成的物质的官

能团进行表征分析。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析生物合成的纳米硒

为了研究可能参与纳米硒还原和稳定的蛋白，采用 SDS-PAGE 进行分析^[10]。将菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 在 10 000 r/min 下离心 30 min，收集合成的含有结合蛋白的纳米硒，然后用超纯水洗涤 3 次，再悬浮于超纯水中，最后利用 SDS-PAGE 对纳米硒表面附着的蛋白进行分析。

1.6 纳米硒的抗菌活性

本实验采用纸片扩散法对纳米硒的抗菌活性进行初步的考察，实验选取革兰氏阳性菌 *Pseudomonas* sp. PI1 和革兰氏阴性菌 *E. coli* BL21 进行抗菌实验。首先在琼脂平板 (MHA) 上分别接种上述两种菌液 200 μL (1.5×10⁸ CFU/mL)，用无菌棒涂匀。将滤纸剪成直径为 10 mm 的圆盘状，取 25 μL 纳米硒滴在剪好的滤纸上，然后用无菌钳把滤纸放在琼脂板上，以灭菌超纯水为对照。37 °C 培养 24 h 后，通过观察在纸片周围是否存在抑菌圈以及抑菌圈直径的大小来判断纳米硒颗粒对两株常见致病菌的抗菌性能。

2 结果与分析

2.1 菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 合成纳米硒的能力

本实验利用菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液、胞内提取物和全细胞 3 个反应体系分别与 SeO₂ 作用，合成纳米硒颗粒。反应数天后，3 个反应体系中均可观察到体系颜色从无色逐渐变为橙红色，细胞上清液和胞内提取物体系在 7 d 内达到稳定，全细胞体系在 10 d 内达到稳定。使用 UV-vis 分析表明，如图 1 所示，3 个反应体系在 600 nm 处出现了明显的特征吸收峰，证明反应体系中有纳米硒的生成^[11]。用 Bradford 试剂盒测试蛋白质浓度显示，细胞上清液中的蛋白浓度 (25 mg/L) 远低于胞内提取物 (150 mg/L)，但实验现象却表明细胞上清液具有更强的纳米硒合成

能力^[12]。因此,推测菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 能分泌某些生物活性分子,例如谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 等,能在胞外作为还原剂还原 Se (IV) 为单质纳米硒颗粒^[10]。有研究表明, α 、 β 和 γ 变形菌

门的菌株能够在胞外分泌较高浓度的谷胱甘肽参与亚硒酸的还原和纳米硒的生成^[13]。在本实验中,菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 属于 β 变形菌门,在细胞上清液中可能存在大量的谷胱甘肽类物质,因此我们可以在未来实验中进行进一步的考察研究。

随后考察不同 SeO_2 浓度及不同溶液 pH 对菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成纳米硒的影响。 SeO_2 浓度对生物合成纳米硒的影响如图 2A 所示。当 SeO_2 浓度在 1–5 mmol/L 时,随着 SeO_2 浓度的增大,其在 UV-vis 图中的特征吸收峰峰值逐渐增加,但当 SeO_2 浓度进一步增大至 7 mmol/L 及以上时,其特征吸收峰峰值明显下降。相关文献表明反应体系中纳米硒的浓度与其在 UV-vis 中的特征吸收峰峰值呈正相关关系^[12],因此菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液合成纳米硒的最佳 SeO_2 浓度为 5 mmol/L。由于反应体系 pH 值的不同会影响到细胞提取物中酶的活性,进而会对纳米硒的合成造成一定的影响,因此本实验设置了 6 个不同的 pH 梯度,分别考察了细胞上清液在酸性、中性以及碱性条件下合成纳米硒的情况。其 UV-vis 结果如图 2B 所示。结果表明,当反应体系 pH 值为 5 和 10 时,UV-vis 图中没有出现明显的特征吸收峰,表明此时反应体系中没有纳米硒的产生,当反应体系 pH 为 7 时,其特征吸收峰峰值达到最大,因此, pH 为 7 是菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 上清液合成纳米硒的最佳条件。

2.2 生物合成纳米硒的表征

我们采用 TEM 观察菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 上清液合成的纳米硒颗粒的形貌和尺寸分布,如图 3 所示。生物合成的纳米硒颗粒主要为球形,少数为棒状,且具有良好的分散性。进一步利用粒径分析软件 Nano Measurer 1.2 对合成的纳米硒颗粒粒径进行分析。结果发现合成的纳米硒尺寸粒径分布在 83–480 nm 范围内,平均粒径为 196 nm。有研究表明菌株嗜碱假单胞菌 *Pseudomonas alcaliphila* 和菌株 *Zooglea ramigera* 合成的纳米硒

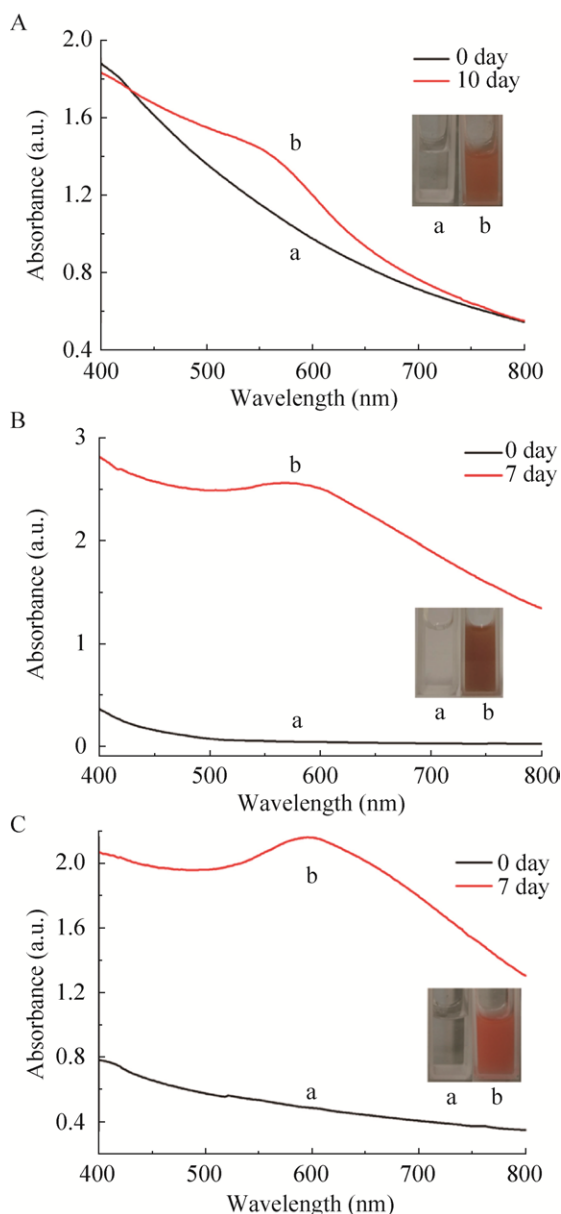


图 1 不同反应体系下菌株 *Cupriavidus* sp. SHE (A) 全细胞、(B) 胞内提取物以及 (C) 细胞上清液合成纳米硒的 UV-vis 光谱图

Fig. 1 UV-vis spectra of SeNPs synthesized by (A) the cells, (B) cell extracts and (C) cell-free supernatant of strain SHE. The insets show the color of SeNPs before and after reaction. Reaction condition: pH 7, 5 mmol/L SeO_2 .

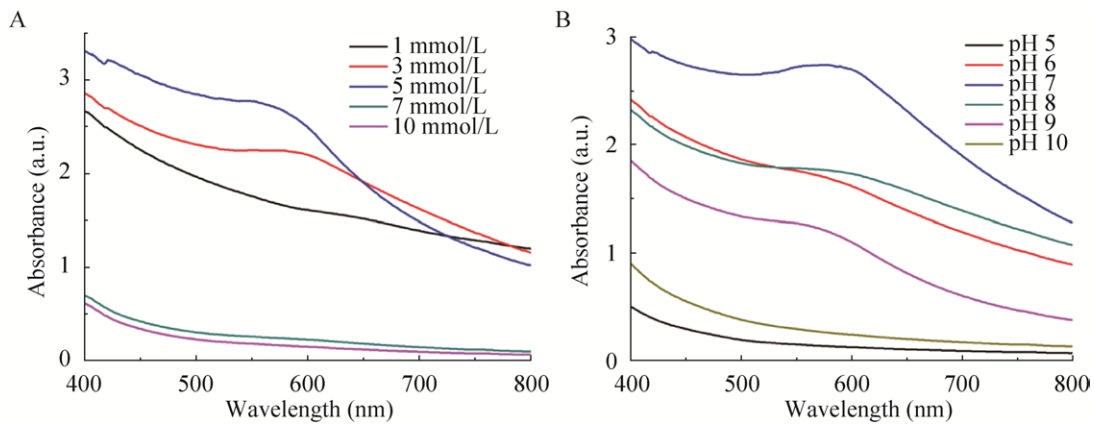


图2 不同 SeO_2 浓度 (A) 以及 pH (B) 条件下菌株 *Cupriavidus sp. SHE* 细胞上清液合成纳米硒的 UV-vis 图
Fig. 2 Uv-vis diagram of SeNPs synthesized by *Cupriavidus sp. SHE* with cell supernatant under different SeO_2 concentration (A) and pH (B) conditions.

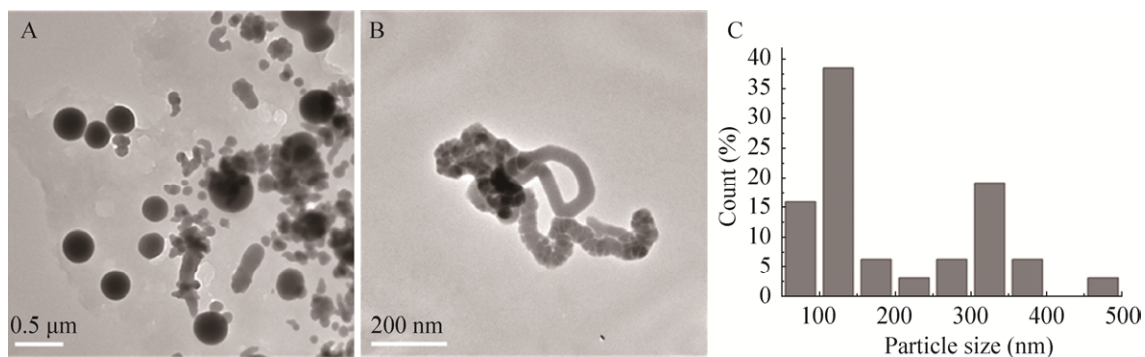


图3 菌株 *Cupriavidus sp. SHE* 细胞上清液合成纳米硒的 TEM 图
Fig. 3 TEM images of SeNPs synthesized by *Cupriavidus sp. SHE* with cell supernatant. (A) Spherical SeNPs. (B) Rod-like SeNPs. (C) Size distribution diagram.

颗粒的形貌在一定环境因素作用下会发生改变, 转化为棒状颗粒^[2]。推测可能是因为大尺寸球形纳米硒颗粒的自由能远高于三角形或棒状纳米硒颗粒而导致自身结构不稳定, 所以球形纳米硒颗粒在反应体系中能自发溶解形成小尺寸的硒原子, 而较小尺寸的硒原子可再次组装形成一定尺寸的棒状纳米硒颗粒, 降低了自身的自由能提高稳定性^[2]。

对合成的纳米硒颗粒进行 XRD 表征分析, 结果如图 4 所示。与纳米硒颗粒的六方型标准卡 (JCPDS No. 06-0362) 对比可知, 2θ 在 23.74° 、 30.50° 、 42.16° 、 44.32° 、 46.81° 、 52.84° 以及 62.30°

处出现 7 个明显的衍射峰, 分别与六方晶型结构的 (100)、(101)、(110)、(102)、(111)、(201)、(202) 晶面对应^[9], 并且 (101) 面的衍射峰强度明显高于其他峰, 由此可说明合成的纳米硒晶体颗粒以 (101) 面为主导。

为了对生物合成纳米硒的机制进行初步的探索, 我们对合成的纳米硒颗粒进行 FTIR 表征分析, 结果如图 5 所示。其中, 3430 、 1454 和 1050 cm^{-1} 处的特征吸收峰分别对应 -N-H、-COO 和 C-N 的拉伸振动峰, 1652 、 1542 和 1245 cm^{-1} 处的特征吸收峰对应氨基 I、II 和 III 的特征吸收峰^[14-15], 表明一些蛋白质可能参与了纳米硒的合成或稳定

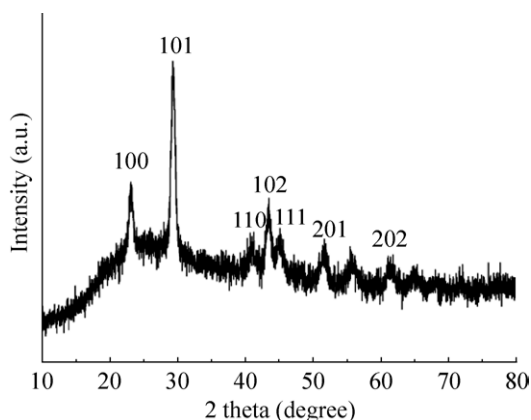


图4 菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成纳米硒的 XRD 图

Fig. 4 XRD image of SeNPs synthesized by *Cupriavidus* sp. SHE.

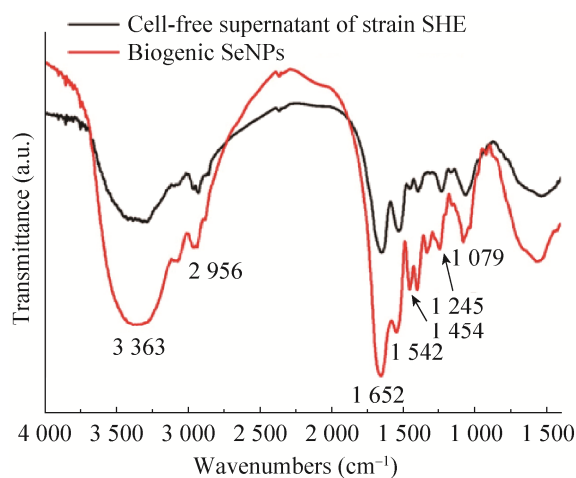


图5 菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液及其合成的纳米硒的 FTIR 图

Fig. 5 FTIR image of the cell-free supernatant of strain SHE and the biogenic SeNPs.

过程。例如,有研究表明陶厄式菌 *Thauera selenatis* 能在胞外分泌一种蛋白 Sefa, 该蛋白是一种良好的封端剂, 能有效防止合成的纳米硒颗粒相互聚集^[16]。同样地, 用生枝动胶菌 *Z. ramigera* 和大肠杆菌 *E. coli* 合成的纳米硒颗粒表面也可能存在着一些蛋白类物质, 对纳米硒的合成和稳定过程起着重要的作用^[2,17]。综上, 我们推测在生物合成的纳米硒表面通常会覆盖一层蛋白类物质, 它们的存在能促进纳米硒的还原也防止了小尺寸纳米

硒颗粒的聚集, 从而使合成的纳米硒颗粒尺寸更为均一, 分散性更为良好。

SDS-PAGE 分析表明 (图 6), 在凝胶上出现多条不同大小分子量的条带, 且随着样品体积量的增加, 条带的颜色加深, 由此可说明在合成的纳米硒颗粒的表面附着了一层蛋白质物质。Malhotra 等发现某些小分子蛋白可以较为容易地通过质膜排到培养基上清液中, 与金属离子反应生成纳米颗粒^[18]。因此, 我们推测在 SDS-PAGE 中分离的蛋白质物质也在纳米硒的合成和稳定过程中起到了重要的作用。

2.3 纳米硒的抗菌活性

最后, 我们利用菌株 *Pseudomonas* sp. P11 和 *E. coli* BL21 对本实验中合成的纳米硒颗粒的抗菌性进行考察, 如图 7 所示, 当纳米硒浓度为 0.5–50 mg/mL 时, 平板中的小纸片周围均未发现明显的抑菌圈, 由此可说明用菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成的纳米硒颗粒生物相容性较好。已有研究证实, 用嗜麦芽窄食单胞菌

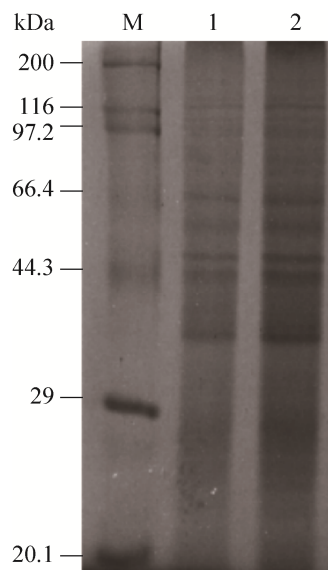


图6 SeNPs 表面蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of proteins bound to biosynthesized SeNPs. Lane M: standard protein molecular weight marker; lane 1: 5 μ L bound proteins; lane 2: 10 μ L bound proteins.

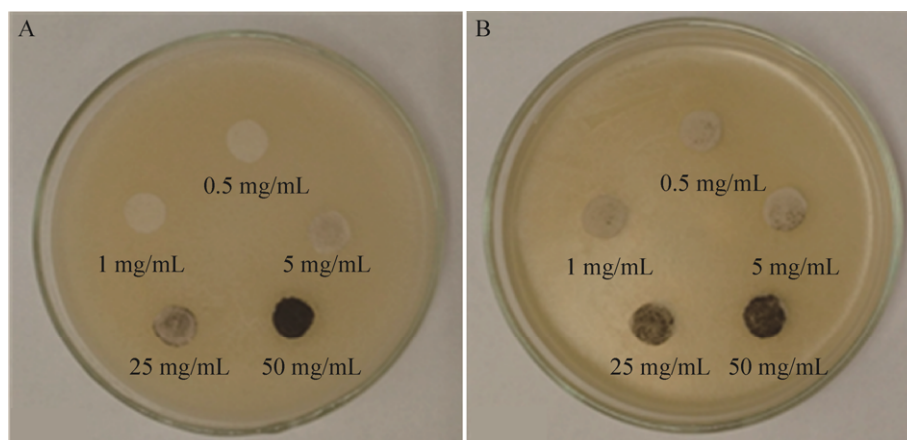


图7 生物合成的纳米硒对 *E. coli* BL21 (A) 和 *Pseudomonas* sp. PI1 (B) 的抗菌活性

Fig. 7 The antimicrobial activities of biosynthesized SeNPs against *E. coli* BL21 (A) and *Pseudomonas* sp. PI1 (B).

S. maltophilia SeITE02 和地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 的无细胞上清合成的纳米硒颗粒对菌株 *E. coli* 具有较为明显的抗菌活性^[6,19]。然而,在考察菌株荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 和枝孢菌 *Cladosporium* sp. JAPSK3 合成的纳米硒颗粒的抗菌性时,得到的结果却截然不同^[7]。利用酸奶中的益生菌产生的纳米硒已被证实是一种无毒、安全的食品添加剂^[20]。目前有研究人员提出纳米硒的抗菌性大小可能与纳米硒的浓度以及颗粒大小有关,此外,纳米硒颗粒的形貌以及其元素组成也会对其诸多物理化学性质产生影响^[6,19]。综上,本研究利用菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液获得的纳米硒无毒且生物相容性较好,因此该纳米硒颗粒在生物医学或食品工业领域具有潜在的应用前景。

3 结论

本实验探究了菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液、胞内提取物以及全细胞合成纳米硒的能力,对其合成纳米硒颗粒的形貌进行表征,并通过分析纳米硒表面关键蛋白初探合成机理,最后对生物合成纳米硒的抗菌特性进行考察,实验结论如下:(1)在利用菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 的细胞上清液、胞内提取物以及全细胞进行纳米硒合成

过程中,通过 UV-vis 均发现在 600 nm 处出现明显的特征吸收峰,表明 3 个反应体系均具有生物合成纳米硒的能力。(2)菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液合成的纳米硒的形貌主要为球形,少数为棒状,且颗粒分散性良好,平均粒径为 196 nm;XRD 分析表明合成的纳米硒颗粒的晶体结构为六方形结构,并且以 (101) 面为主导。(3)本实验利用 FTIR 和 SDS-PAGE 表征对纳米硒生物合成的机理进行了初步分析,结果表明覆盖在纳米硒颗粒表面的某些小分子蛋白可能参与了纳米硒的合成及稳定过程,在后续实验中将引进基因组、转录组或蛋白组等组学技术对该过程中具体的分子机制或其中起关键作用的蛋白进行进一步的揭示。(4)本实验表明菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 细胞上清液胞外合成的纳米硒颗粒对 *E. coli* BL21 和 *Pseudomonas* sp. PI1 均无抗菌活性,说明菌株 *Cupriavidus* sp. SHE 合成的纳米硒颗粒无毒且生物相容性好。

REFERENCES

- [1] Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, et al. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(6): 2555–2566.
- [2] Srivastava N, Mukhopadhyay M. Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powd Technol*, 2013,

- 244: 26–29.
- [3] Wang TT, Yang LB, Zhang BC, et al. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2010, 80(1): 94–102.
- [4] Roux M, Sarret G, Pignot-Paintrand I, et al. Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 769–773.
- [5] Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interf Sci*, 2010, 156(1/2): 1–13.
- [6] Khiralla GM, El-Deeb BA. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Sci Technol*, 2015, 63(2): 1001–1007.
- [7] Singh N, Saha P, Rajkumar K, et al. Biogenic strain of silver and selenium nanoparticles by *Pseudomonas fluorescens* and *Cladosporium* sp. JAPSK3 isolated from coal mine samples and their antimicrobial activity. *Int J Nanosci*, 2015, 14(5/6): 1550017.
- [8] Luesakul U, Komenek S, Puthong S, et al. Shape-controlled synthesis of cubic-like selenium nanoparticles via the self-assembly method. *Carbohydr Polym*, 2016, 153: 435–444.
- [9] Qu YY, Shen E, Ma Q, et al. Biodegradation of indole by a newly isolated *Cupriavidus* sp. SHE. *J Environ Sci*, 2015, 34: 126–132.
- [10] Lian SY, Diko CS, Yan YQ, et al. Characterization of biogenic selenium nanoparticles derived from cell-free extracts of a novel yeast *Magnusiomyces ingens*. *3 Biotech*, 2019, 9(6): 221.
- [11] Dhanjal S, Cameotra SS. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb Cell Factor*, 2010, 9: 52.
- [12] Li SZ, Shen WL, Den Y, et al. Advances in understanding the mechanisms underlying microbial reduction of Se (VI) and Se (IV) to SeNPs. *Chin J Appl Environ Biol*, 2017, 23(3): 579–585 (in Chinese).
- 厉舒祯, 沈文丽, 邓晔, 等. 微生物还原 Se(VI)和 Se(IV)合成 SeNPs 机理研究新进展. *应用与环境微生物学报*, 2017, 23(3): 579–585.
- [13] Kessi J, Hanselmann KW. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *Biol Chem*, 2004, 279(49): 50662–50669.
- [14] Prasad KS, Patel H, Patel T, et al. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2013, 103: 261–266.
- [15] Sanghi R, Verma P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresour Technol*, 2009, 100(1): 501–504.
- [16] Debieux CM, Dridge EJ, Mueller CM, et al. A bacterial process for selenium nanosphere assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(33): 13480–13485.
- [17] Dobias J, Suvorova EI, Bernier-Latmani R. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology*, 2011, 22(19): 195605.
- [18] Malhotra A, Dolma K, Kaur N, et al. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using a novel marine strain of *Stenotrophomonas*. *Bioresour Technol*, 2013, 142: 727–731.
- [19] Zonaro E, Lampis S, Turner R J, et al. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. *Front Microbiol*, 2015, 6: 584.
- [20] Eszenyi P, Sztrik A, Babka B, et al. Elemental, nano-sized(100–500 nm) selenium production by probiotic lactic acid bacteria. *Int J Mol Sci*, 2011, 1(2): 148–152.

(本文责编 郝丽芳)