

希瓦氏菌合成并协同纳米钯还原氯硝基苯的研究

孔宛芹, 产丹丹, 韩锐善, 武超*

(安徽大学资源与环境工程学院, 合肥 230601)

摘要: 研究了异化金属还原细菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 合成金属钯纳米颗粒, 用于还原 2-氯硝基苯的还原机制、过程和动力学。结果表明, *S. oneidensis* MR-1 可将氯钯酸钠还原成零价钯纳米颗粒 (BioPd)。*S. oneidensis* MR-1 和 BioPd 协同能催化 2-氯硝基苯的还原, 且 *S. oneidensis* MR-1 的醌脱氢酶 CymA 在还原中发挥重要作用。2-氯硝基苯的还原产物包括 2-氯苯胺、硝基苯和苯胺, 而苯胺是还原最终产物, 说明该体系可同时实现脱氯和硝基还原。动力学分析显示, BioPd-*Shewanella* 协同催化体系还原 2-氯硝基苯的过程符合二级反应动力学过程。

关键词: 希瓦氏菌; 钯; 纳米颗粒; 氯硝基苯

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)05-0806-05

Biological synthesis of Pd nanoparticles by *Shewanella oneidensis* MR-1 used for the reduction of chloronitrobenzene

KONG Wanqin, CHAN Dandan, HAN Ruishan, WU Chao

(School of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601)

Abstract: The biological synthesis of palladium nanoparticle (BioPd) by *S. oneidensis* MR-1 and its ability to reduce 2-chloronitrobenzene (2-CNB) were investigated. The results showed that BioPd reduced 2-CNB through cooperation with *S. oneidensis* MR-1, and heavily depended on the quinone dehydrogenase CymA in *S. oneidensis* MR-1. The reduction products included in nitrobenzene, chloroaniline and aniline, and aniline was the final product, indicating that the synergistically catalytic system could achieve dechlorination and nitro-reduction simultaneously. The reduction of 2-CNB could be described as the second-order kinetics.

Key words: *Shewanella*; palladium; nanoparticle; nitrobenzene

某些细菌可通过呼吸作用, 将可溶的 Pd^{2+} 离子还原至固态的零价 Pd 纳米颗粒, 又称为生物纳米钯 (BioPd)。由于纳米尺寸的 Pd 颗粒具有加氢、脱卤和还原金属等多种催化活性, 故 BioPd 是潜在的优良催化剂。利用希瓦氏菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 合成 Fe_3O_4 负载的 BioPd、BioAu 和 BioPd/Au, 为可回收纳米催化剂^[1]; 同时发现 *S. oneidensis* MR-1 合成的 BioPd, 经简单处理后, 其催化活性明显优于纯化学合成的钯纳米颗粒^[2]。针对 pH 值、盐浓度等指标苛刻的废水, 可加入已经合成 BioPd 的菌体, 还原废水中的金、铂和铬等金属^[3]。氯代化合物是工业废水、城市生活污水和沉积物中常见污染物,

生物降解性普遍比较差。可利用微生物合成 BioPd 后, 原位催化脱氯反应, 促进这些含氯污染物的最终矿化^[4-5]。从重金属污染地区分离的 *Pseudomonas species* 在以甲酸为电子供体条件下, 合成 BioPd 能原位催化二噁英类化合物还原脱氯^[6]。*Geobacter sulfurreducens* 与其合成的 BioPd 协同, 具有更高的 Cr^{6+} 还原效率^[7]。厌氧颗粒污泥合成 BioPd 后, 两者协同明显提升了污泥降解偶氮染料的能力^[8]。

在目前能够合成 BioPd 的微生物中, 异化金属还原细菌 *S. oneidensis* MR-1 是研究最多的细菌之一, 具有还原快、易培养、金属抗性强和纳米颗粒合成能力稳定等优势^[9-10]。*S. oneidensis* MR-1 是兼性

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31670126), 安徽省自然科学基金青年项目 (1508085QB47) 和安徽大学青年骨干教师培养项目 (J01005132) 共同资助。

作者简介: 孔宛芹, 硕士研究生。E-mail: kwq516@163.com

* 通信作者: 武超, 博士, 副教授。E-mail: wuchao@ahu.edu.cn

厌氧菌, 以还原铁氧化物而闻名^[11]。 *S. oneidensis* MR-1 具有独特的细胞外电子传递能力: 即将呼吸作用产生的电子, 通过由细胞色素 C 组成的电子传递链, 经醌池传递至细胞表面。其中 CymA-MtrC-OmcA/MtrC 是主要的细胞外电子传递链, 在 *S. oneidensis* MR-1 还原多种污染物的过程中发挥重要作用^[12]。

氯硝基苯类化合物, 如氯硝基苯, 是一类在农药、染料和其他制造业中广泛使用的有机化合物。它们是具有致癌、致畸和致突变特性的持久性有机污染物^[13]。近年来, 中国的土壤、地下水和地表水等, 均发现不同程度受到氯硝基苯类化合物及其衍生物的污染^[14]。因此, 含该类化合物的废水处理和污染水体的修复成为亟待解决的问题。传统的化学和物理处理方法不仅成本高, 而且容易引起二次污染, 故有必要发展新的处理方法。

在本研究中, 探索了 *S. oneidensis* MR-1 合成的 BioPd 还原氯硝基苯类化合物的能力。以邻氯硝基苯 (2-chloronitrobenzene, 2-CNB) 为模型, 解析了 2-CNB 的还原过程和动力学, 为应用于实际废水处理提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 *S. oneidensis* MR-1(ATCC 700550)及其突变菌株 $\Delta cymA$ 、 $\Delta omcA\Delta mtrC$ 均由南加利福尼亚大学的 K.H. Neelson 教授提供。

1.1.2 培养基 Luria-Bertani (LB) 培养基配方为: 1 L 超纯水中含 10 g NaCl, 10 g 蛋白胨, 10 g 酵母粉。厌氧矿物盐培养基 (pH 7.0): 1 L 超纯水中含 0.46 g NaCl, 0.255 g (NH₄)₂SO₄, 4.766 g HEPES, 0.024 g MgSO₄·7H₂O, 微量元素储备液 5 mL, 20 mmol·L⁻¹ 甲酸作电子供体。分装入血清瓶后, 通氮气 20 min; 密封, 高温高压灭菌备用。

1.2 菌体培养和还原方法

1.2.1 *S. oneidensis* MR-1 合成 BioPd MR-1 菌株 接入 LB 培养基后, 120 r·min⁻¹, 30℃ 避光培养 16 h。离心收集细菌, 用矿物盐培养基洗涤 3 次后, 接入含有矿物盐培养基的血清瓶中, 控制菌液的 OD₆₀₀ 至 0.5。往血清瓶中加入 Na₂PdCl₄ 至 100 μmol·L⁻¹。在 30℃, 120 r·min⁻¹ 避光培养, 以合成 BioPd。

1.2.2 2-CNB 还原产物分析 在厌氧培养合成 BioPd 后, 向血清瓶中加入 2-CNB 至 0.64 mmol·L⁻¹, 继续培养。分别在 0、6、12、24、36、48 和 72 h 取样, 经 12 000 g 离心 10 min 后, 上清液用于测定

样品中 2-CNB 及其还原产物。

1.2.3 2-CNB 还原动力学分析 厌氧培养合成 BioPd 后, 向血清瓶中加入 0.64 mmol·L⁻¹ 2-CNB, 继续在 30℃, 120 r·min⁻¹ 避光培养。分别在 0、0.5、1、1.5、2、2.5、6、9 和 12 h 取样, 经 12 000 g 离心 10 min 后, 上清液用于测定 2-CNB 浓度。对 2-CNB 还原速率进行动力学方程拟合, 反应动力学模型方程为: $-(dC)/(dt)=kC_t^n$, t 为反应时间, k 是速率常数, 单位取决于反应级数, C_0 是 0 时反应物浓度, C_t 是 t 时反应物浓度, n 是反应级数, 将方程变形转换使用 Origin8.0 进行线性拟合, 一级、二级动力学方程如下:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C_t}\right)=k_1t \quad (n=1)$$

$$\frac{1}{C_t}=\frac{1}{C_0}+k_2t \quad (n=2)$$

1.2.4 2-CNB 浓度对还原的影响 厌氧培养合成 BioPd 后, 向血清瓶中分别加入 2-CNB 至终浓度 0.25、0.64、1.50 和 2.50 mmol·L⁻¹, 定时取样测定终产物苯胺的浓度。

1.2.5 电子传递途径分析 野生型的 *S. oneidensis* MR-1 及其突变菌株 $\Delta cymA$ 、 $\Delta omcA\Delta mtrC$ 接入 LB, 过夜培养后。经洗涤, 接入厌氧培养基中, 方法同上。加入 Na₂PdCl₄ 至 100 μmol·L⁻¹。培养 24 h 后, 加入 2-CNB 至 0.64 mmol·L⁻¹。继续培养, 定时取样测定 2-CNB 浓度。

1.3 化学分析

1.3.1 TEM 观察 BioPd 还原 Na₂PdCl₄ 24 h 后, 取样。12 000 r·min⁻¹, 10 min, 4℃ 离心收集菌体。2.5%的戊二醛溶液中过夜固定细胞后, 经包埋、染色和超薄切片。样品采用透射电子显微镜 TEM (JEM-2010) 观察 BioPd 的形貌、大小和位置。

1.3.2 GC-MS 分析 2-CNB 还原产物 用正己烷对还原后的样品进行萃取, 利用气象色谱-质谱 (GC-MS, Agilent 7890-5975) 定性分析还原产物。程序升温条件为: 80℃ 保持 3 min, 以 6℃·min⁻¹ 的速率升温至 110℃, 以 10℃·min⁻¹ 的速率升温至 280℃, 保持 8 min。为无分流模式, 进样口温度为 250℃, 载气为高纯度的氦气 (99.999%), 进样体积为 1 μL, 柱流速为 1.0 mL·min⁻¹。

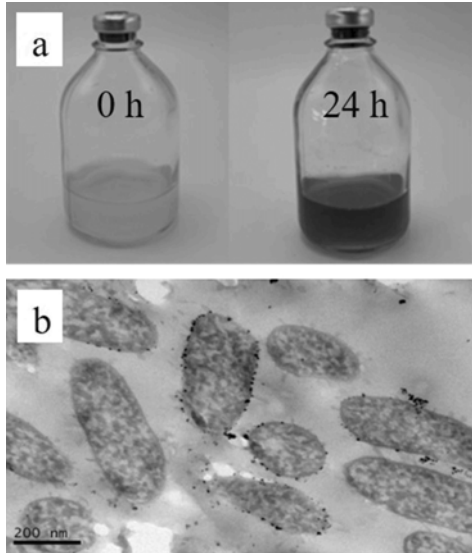
1.3.3 HPLC 定量分析 2-CNB 还原 利用高效液相色谱 (HPLC, Waters 2695) 对 2-CNB 及其还原产物分析。液相条件为: SepaxHP-C18 柱 (4.5 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 30℃; 流量 1.0 mL·min⁻¹; 流动相为甲醇:水=70:30; 进样量为 20 μL; 波长在 280 nm

处。

2 结果与分析

2.1 *S. oneidensis* MR-1 合成 BioPd

在厌氧条件下, 矿物盐培养基中, 以甲酸作为电子受体, 添加 Na_2PdCl_4 至终浓度 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。接种 *S. oneidensis* MR-1 并培养 24 h 后, 血清瓶中的培养物, 由乳白色浑浊变成黑色浑浊 (图 1a), 说明有零价的钯产生。为了分析零价钯的尺寸, 从血清瓶取样, 经超薄切片后用透射电子显微镜观察。可发现在细胞周围和细胞之间沉积了大量 $5\sim 10 \text{ nm}$ 高电子密度的颗粒, 说明合成的是 BioPd (图 1b)。此外, 未在细胞质内发现纳米颗粒, 暗示纳米颗粒的合成过程发生在周质空间或细胞外表面。由于 *S. oneidensis* MR-1 可分泌黄素类物质, 作为电子穿梭体, 促进细胞外还原反应的发生^[15]。因此, 在细胞之间的 BioPd 可能由电子穿梭体还原生成。



a. 合成 BioPd 前后对照; b. BioPd 的透射电子显微镜图

a. Composed before and after BioPd in serum bottles; b. Transmission electron microscopy about BioPd

图 1 *S. oneidensis* MR-1 还原合成生物钯纳米颗粒

Figure 1 BioPd synthesized by *S. oneidensis* MR-1

2.2 BioPd-*Shewanella* 协同催化 2-CNB 还原

以 2-CNB 为模型污染物, 首先分析 *S. oneidensis* MR-1 合成 BioPd 还原 2-CNB 的能力。样品组加入了 Na_2PdCl_4 , 并始终保持 *S. oneidensis* MR-1 为活菌状态。对照 1 组, 未加入 *S. oneidensis* MR-1 细菌; 对照 2 组, 未加 Na_2PdCl_4 , 因此没有合成 BioPd; 对照 3 组, 在加入 Na_2PdCl_4 和 *S. oneidensis* MR-1, 反应 24 h 后, 加热灭活细菌, 使体系中仅有 BioPd。24 h 后, 向 4 组样品中加入 $0.64 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-CNB,

继续反应 48 h 后, 分析 2-CNB 的含量。结果显示, 样品组已检测不到 2-CNB, 而 3 个对照组 2-CNB 的含量并未发生变化 (图 2a)。这一结果说明, 2-CNB 的还原是 BioPd 和 *S. oneidensis* MR-1 协同催化的过程。推测反应机制为 *S. oneidensis* MR-1 为纳米钯提供电子, 而 BioPd 作为催化剂, 催化 2-CNB 的还原。

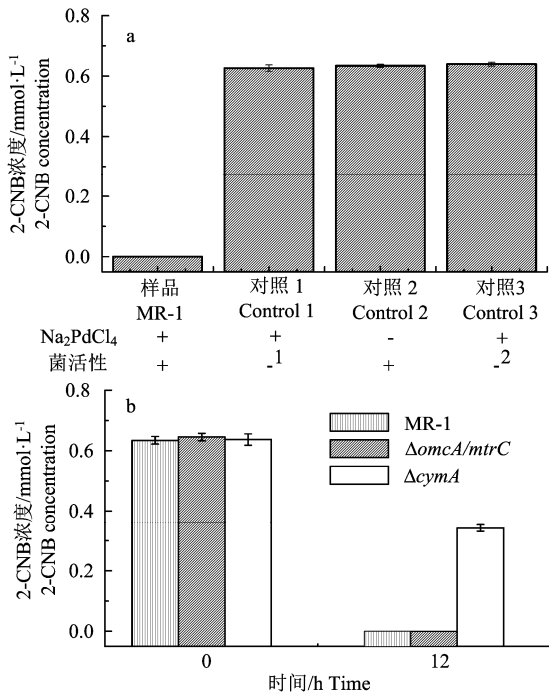
为了验证这一推断, 分析了 *S. oneidensis* MR-1 在 2-CNB 降解过程中的作用。在透射电子显微镜观察中发现, BioPd 主要定位于细胞表面。因此, 如果 *S. oneidensis* MR-1 向 BioPd 提供电子, 那很可能通过细胞表面的相关蛋白发生作用。OmcA/MtrC 定位于细胞表面的细胞色素 C 蛋白复合物, 是 *S. oneidensis* MR-1 细胞外电子传递过程必须的蛋白。因此, 分析了 *omcA* 和 *mtrC* 基因在 2-CNB 还原中可能的作用。结果表明, 缺失细胞色素 C 蛋白复合物 OmcA/MtrC 的基因突变株 $\Delta\text{omcA}\Delta\text{mtrC}$ 还原 2-CNB 的能力与野生型的 MR-1 菌株相当 (图 2b), 说明 OmcA/MtrC 不参与复合催化体系还原 2-CNB 的过程中。OmcA/MtrC 在 *S. oneidensis* MR-1 还原铁氧化物, 微生物燃料电池的产电, 和多种污染物还原过程中发挥重要作用^[16]。但 2-CNB 的还原不依赖该复合物, 暗示 BioPd-*Shewanella* 复合催化体系可供处理 2-CNB 和其他污染物, 而不会因竞争电子传递蛋白, 导致处理效率降低。在 *S. oneidensis* MR-1 将呼吸产生的电子从细胞内输出至细胞表面的电子传递链中, CymA 是位于内膜的中枢蛋白, 从醌池获得电子^[17]。因此, 检测了 CymA 在 2-CNB 还原过程中的作用。结果显示, *cymA* 基因突变菌株 ΔomcA 还原 2-CNB 的能力大大下降 (图 2b)。对活细菌和 CymA 的依赖充分说明, 2-CNB 还原是 BioPd 和 *S. oneidensis* MR-1 协同催化的结果。

2.3 2-CNB 还原途径分析

为了进一步研究该复合催化体系中 2-CNB 的降解途径, 首先分析了降解产物。气相色谱-质谱偶联分析显示, 共有 3 种降解产物产生, 分别是保留时间在 7.716 min 的硝基苯 (nitrobenzene, NB)、保留时间在 8.311 min 的 2-氯苯胺 (2-chloroaniline, 2-CAN) 和保留时间在 5.964 min 的苯胺 (aniline, AN) (图 3)。由此可知, 该复合体系催化的是 2-CNB 的还原转化过程。

利用高效液相色谱法, 分析了 2-CNB 还原和产物产生的动力学过程。初始加入的 2-CNB 的浓度为 $0.64 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应 12 h 后, 2-CNB 已完全降解, 而 NB、2-CAN 和 AN 的浓度分别为 0.01 、 0.036 和 $0.59 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 反应 24 h 后, NB 和 2-CAN 已无

法检出, 而 AN 的浓度达到 $0.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与初始加入的 2-CNB 的摩尔浓度相当 (图 4)。结果说明, AN 是 2-CNB 的还原终产物, 而 NB 和 2-CAN 是反应的中间产物。



a. 还原 48 h 的 2-CNB 浓度, “-1”表示未加细菌, “-2”表示加入灭活细菌; b. MR-1 与突变株还原 2-CNB 对照图
 a. The 2-CNB concentration was reduced in 48 h, “-1” was no bacteria, “-2” was inactivated bacteria; b. Control chart for degradation of 2-CNB using MR-1 and mutant strains
图 2 BioPd 和 *S. oneidensis* MR-1 协同催化 2-CNB 还原
 Figure 2 Reduction of 2-CNB depends on bioPd and *S. oneidensis* MR-1 simultaneously

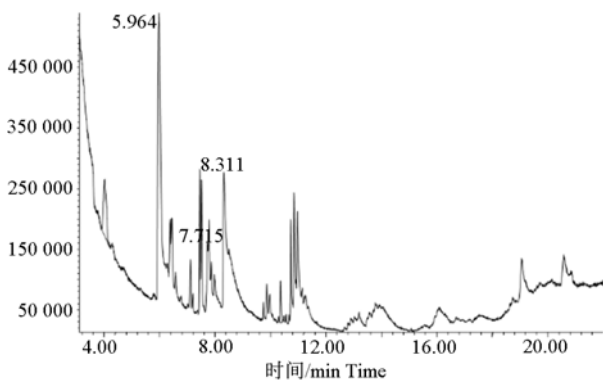


图 3 GC-MS 分析 2-CNB 的还原产物
 Figure 3 Reduction products analyzed by GC-MS

2.4 2-CNB 还原的动力学分析

为了探究 BioPd-*Shewanella* 系统催化体系的还原潜力, 分析了该体系还原不同浓度 2-CNB 的动力学过程。初始加入的 2-CNB 浓度分别为 0.25、0.64、

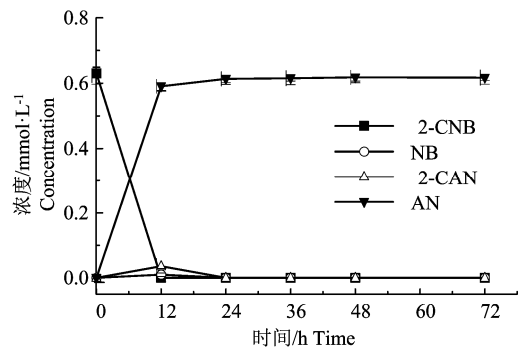


图 4 2-CNB 还原和产物生成的过程
 Figure 4 The process of 2-CNB reduction and produce of reduction products

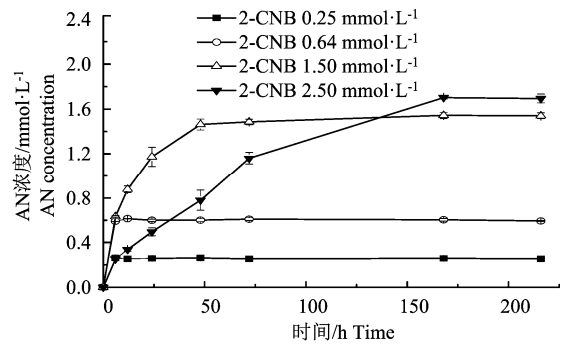
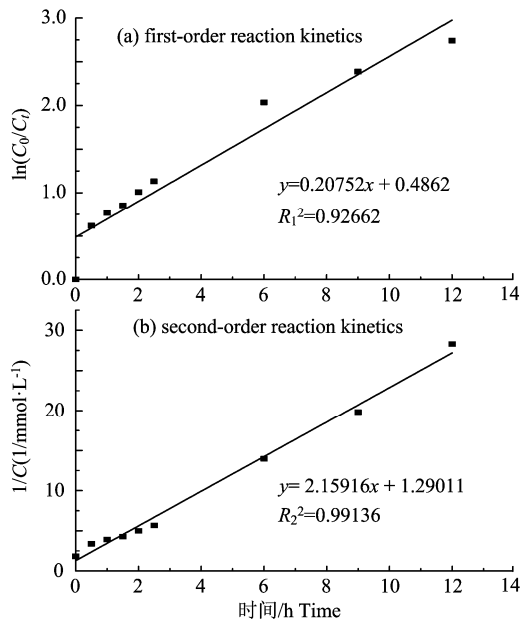


图 5 不同浓度的 2-CNB 对还原的影响
 Figure 5 Effect of 2-CNB concentration on its reduction



a. 一级动力学拟合; b. 二级动力学拟合
 a. first-order reaction kinetics; b. second-order reaction kinetics

图 6 2-CNB 还原的动力学分析
 Figure 6 Dynamic analysis of 2-CNB reduction

1.50 和 $2.50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因 AN 为还原终产物, 因此检测 AN 的生成。结果显示, 12 h 后, 0.25 和 0.64

mmol·L⁻¹的 2-CNB 已被完全还原成 AN; 1.50 mmol·L⁻¹的 2-CNB 约 60%还原为 AN, AN 浓度为 0.87 mmol·L⁻¹; 而 2.50 mmol·L⁻¹的 2-CNB 仅有 14%还原为 AN, AN 浓度为 0.34 mmol·L⁻¹ (图 5)。1.5 mmol·L⁻¹的 2-CNB 在 72 h 时, 完全还原为 AN, 而 2.50 mmol·L⁻¹的 2-CNB 在 72 h 后仅有 46%还原为 AN, 在所检测的时间段内没有完全还原(图 5)。结果暗示, 当 2-CNB 浓度至 2.50 mmol·L⁻¹时, 可能对 *S. oneidensis* MR-1 细胞有潜在的毒性, 导致体系的还原速度和还原能力明显下降。因此, 这一结果对指导该复合催化体系用于实际处理污染物过程有指导意义。可以考虑以稀释的方式降低污染物浓度, 多次进样, 以确保污染物的完全降解。

进一步分析了 BioPd-*Shewanella* 复合催化体系还原 2-CNB 的动力学。初始加入的 2-CNB 的浓度为 0.64 mmol·L⁻¹。计算 0、0.5、1、1.5、2、2.5、6、9 和 12 h 时, 2-CNB 的还原速率, 然后进行动力学方程拟合。结果显示, 按照一级动力学拟合的回归系数 R_1^2 为 0.92662, 而按照二级动力学拟合的回归系数 R_2^2 为 0.99136。因此, 该催化体系对 2-CNB 的还原过程符合二级动力学过程(图 6)。动力学分析结果, 可为将该催化 2-CNB 还原反应用于实际 2-CNB 污染处理过程, 提供可优化的参数。

3 结论

本研究表明, *S. oneidensis* MR-1 在还原 Na₂PdCl₄ 合成 BioPd 后, 与 BioPd 协同, 快速地将 2-CNB 还原成苯胺, 同时实现脱氯和硝基还原。该协同催化体系对其他的氯代硝基苯类化合物可能具有同样的脱氯和硝基还原的能力。由于氯原子和硝基官能团是此类化合物毒性的重要原因, 因此, BioPd-*Shewanella* 协同催化体系在其他含氯或含硝基化合物的生物处理和脱毒中有潜在的应用价值。因为该体系依赖 *S. oneidensis* MR-1 作为电子的直接供体, 所以对于该细菌呼吸活性的优化, 可能是进一步提高催化性能的切入点。

参考文献:

- [1] TUO Y, LIU G, DONG B, et al. Microbial synthesis of Pd/Fe₃O₄, Au/Fe₃O₄ and PdAu/Fe₃O₄ nanocomposites for catalytic reduction of nitroaromatic compounds[J]. Sci Rep-UK, 2015, 5(10): 1-12.
- [2] XIONG L, CHEN J, HUANG Y, et al. An oxygen reduction catalyst derived from a robust Pd-reducing bacterium[J]. Nano Energy, 2015, 12(1): 33-42.
- [3] WATTS M P, COKER V S, PARRY S A, et al. Effective treatment of alkaline Cr (VI) contaminated leachate using a novel Pd-bionanocatalyst: impact of electron donor and aqueous geochemistry[J]. Appl Catal B-Environ, 2015, 170(3): 162-172.
- [4] HENNEBEL T, DE CORTE S, VERSTRAETE W, et al. Microbial production and environmental applications of Pd nanoparticles for treatment of halogenated compounds[J]. Curr Opin Biotech, 2012, 23(4): 555-561.
- [5] CHAPLIN B P, REINHARD M, SCHNEIDER W F, et al. Critical review of Pd-based catalytic treatment of priority contaminants in water[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(7): 3655-3670.
- [6] SCHLÜTER M, HENTZEL T, SUAREZ C, et al. Synthesis of novel palladium (0) nanocatalysts by microorganisms from heavy-metal-influenced high-alpine sites for dehalogenation of polychlorinated dioxins[J]. Chemosphere, 2014, 117(1): 462-470.
- [7] TUO Y, LIU G, ZHOU J, et al. Microbial formation of palladium nanoparticles by *Geobacter sulfurreducens* for chromate reduction[J]. Bioresource Technol, 2013, 133(2): 606-611.
- [8] QUAN X, ZHANG X, XU H. In-situ formation and immobilization of biogenic nanopalladium into anaerobic granular sludge enhances azo dyes degradation[J]. Water Res, 2015, 78: 74-83.
- [9] PEREIRA L, MEHBOOB F, STAMS A J M, et al. Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation[J]. Crit Rev Biotechnol, 2015, 35(1): 114-128.
- [10] 马晓波, 雷育斌, 王明娜, 等. 希瓦氏菌介导纳米材料生物合成及其环境应用[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(12): 253-257.
- [11] 陈洁, 储茵, 司友斌. 奥奈达希瓦氏菌 MR-1 的 Fe (III) 还原特性及其影响因素[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(4): 554-558.
- [12] FONSECA B M, PAQUETE C M, NETO S E, et al. Mind the gap: cytochrome interactions reveal electron pathways across the periplasm of *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Biochem J, 2013, 449(1): 101-108.
- [13] ISAYEV O, RASULEV B, GORB L, et al. Structure-toxicity relationships of nitroaromatic compounds[J]. Mol Divers, 2006, 10(2): 233-245.
- [14] 李杏茹, 何孟常, 孙艳, 等. 硝基苯类化合物在黄河小浪底至高村河段水体中的分布特征[J]. 环境科学, 2006, 27(3): 513-518.
- [15] OKAMOTO A, HASHIMOTO K, NEALSON K H, et al. Rate enhancement of bacterial extracellular electron transport involves bound flavin semiquinones[J]. P Natl Acad Sci Usa, 2013, 110(19): 7856-7861.
- [16] YAN F F, HE Y R, WU C, et al. Carbon nanotubes alter the electron flow route and enhance nitrobenzene reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1[J]. Environ Sci Tech Lett, 2013, 1(1): 128-132.
- [17] MCMILLAN D G G, MARRITT S J, BUTT J N, et al. Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA[J]. J Biol Chem, 2012, 287(17): 14215-14225.