

研究报告

## 绿色木霉菌合成金纳米颗粒的可能性及影响因素

周家智<sup>1</sup> 石超宏<sup>2</sup> 朱能武<sup>1,3,4\*</sup>

(1. 华南理工大学环境与能源学院 广东 广州 510006)

(2. 广东省农业科学院农业资源与环境研究所 广东 广州 510640)

(3. 工业聚集区污染控制与生态修复教育部重点实验室 广东 广州 510006)

(4. 固体废物处理与资源化广东省环境保护重点实验室 广东 广州 510006)

**摘要:**【背景】金纳米颗粒(AuNPs)凭借其稳定性、抗氧化性能和生物相容性在许多领域有广泛应用。目前关于微生物合成金纳米颗粒的研究较少。【目的】对微生物合成金纳米颗粒的可能性以及影响因素进行探究,有利于揭示具体的合成机制,发现 AuNPs 的特性以及合成位置与菌丝和影响因素的关系。【方法】以绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)菌株(GIM3.141)为菌种资源,通过目视检测法、紫外可见分光光度计、X 射线衍射和透射电镜等手段分析合成 AuNPs 的特征。探讨细胞内生物合成金纳米颗粒(AuNPs)的可能性,研究生物量、初始金离子浓度、溶液 pH 等因素对细胞内合成 AuNPs 的影响。【结果】X 射线衍射分析表明 AuNPs 以金纳米晶体形态存在。透射电镜分析表明 AuNPs 主要位于细胞壁膜间隙,一小部分附着在细胞壁上。紫外可见分光光度计分析表明,金纳米颗粒粒径随着生物量添加量和溶液 pH 的升高而变小,随着初始金离子浓度的升高而变大。【结论】非致病性真菌绿色木霉菌可以在细胞内合成 AuNPs,其中包括伪球形、三角形、四边形和六边形等多种形状,粒径范围从几纳米到三百纳米,为大规模、低成本、无污染地生物合成纳米颗粒工艺提供了菌种资源。

**关键词:** 绿色木霉菌, 金纳米颗粒, 细胞内合成, 影响因素

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (51178191); New Century Excellent Talents in University (NCET-11-0166); Guangdong Science and Technology Project (2017A020216013); Guangzhou Science and Technology Project (201604020055)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-20-39300522; E-mail: nwzhu@scut.edu.cn

**Received:** December 02, 2017; **Accepted:** March 19, 2018; **Published online** (www.cnki.net): May 16, 2018

**基金项目:** 国家自然科学基金(51178191); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-0166); 广东省科技计划项目(2017A020216013); 广州市科技计划项目(201604020055)

**\*通信作者:** Tel: 86-20-39300522; E-mail: nwzhu@scut.edu.cn

**收稿日期:** 2017-12-02; **接受日期:** 2018-03-19; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-05-16

## The possibility and influence factors of biosynthesis gold nanoparticles in *Trichoderma viride*

ZHOU Jia-Zhi<sup>1</sup> SHI Chao-Hong<sup>2</sup> ZHU Neng-Wu<sup>1,3,4\*</sup>

(1. School of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

(2. Institute of Agricultural Resources and Environment, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

(3. Key Laboratory of Pollution Control and Ecosystem Restoration in Industry Clusters, Ministry of Education, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

(4. Guangdong Environmental Protection Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Recycling, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** [Background] Gold nanoparticles (AuNPs) have various applications in optics, electronics, biomedicines and catalysis due to their high stability, oxidation resistance and biocompatibility. The current research on microbial synthesis of gold nanoparticles is less. [Objective] We performed the intracellular biosynthesis of AuNPs with the biomass of *Trichoderma viride*. The effects of the biomass addition, initial gold ions concentration and solution pH were also evaluated. [Methods] We performed the intracellular biosynthesis of AuNPs using biomass of *Trichoderma viride* (GIM3.141). By visual method, ultraviolet visible (UV-vis) spectrophotometer and X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM) and other means to analyze the characteristics of the synthesis of AuNPs. The possibility of biosynthesis of AuNPs was discussed. The effect of reaction conditions on the characterizations of the AuNPs was also evaluated. [Results] The particle size decreased with the increase of biomass addition and solution pH, and increased with the increase of initial gold ions concentration. Reaction conditions such as biomass addition, solution pH and initial gold ions concentrations exhibited great effect on the AuNPs location and size distribution. [Conclusion] On exposing the biomass of *Trichoderma viride* to aqueous solution of  $\text{HAuCl}_4$ , AuNPs with various shapes including pseudo-spherical, triangular, quadrilateral, and hexagonal ranging from several nanometers to more than 300 nm were produced. For large scale, low cost, clean biosynthesis nanoparticles process provides the species resources.

**Keywords:** *Trichoderma viride*, Gold nanoparticles, Intracellular biosynthesis, Influence factors

纳米生物技术是一门涉及多学科的技术<sup>[1]</sup>。金属纳米颗粒具有良好的催化、物理、化学、光学和电子性能<sup>[2]</sup>。金纳米颗粒(AuNPs)凭借其稳定性、抗氧化性和生物相容性在许多方面有广泛应用,比如光学器件、生物标记、药物运输、催化剂等领域<sup>[3-6]</sup>。目前,针对金属纳米颗粒的合成方法已开展诸多研究。传统的合成方法如紫外照射法、气溶胶法、光刻法、激光烧蚀法、化学还原法等普遍存在能耗高和成本高及二次污染严重等问题<sup>[2,7-9]</sup>。因此,亟需寻找一种清洁、经济、环保的金纳米颗粒合成方法<sup>[10-12]</sup>。

近年来,利用微生物合成纳米颗粒的研究成果

令人振奋<sup>[13-14]</sup>。许多金属纳米颗粒已被报道可由微生物合成,比如金<sup>[3,6,11,15-21]</sup>、银<sup>[22-23]</sup>、铂<sup>[24-25]</sup>、钯<sup>[26]</sup>;研究者也利用微生物来合成合金纳米颗粒<sup>[27-29]</sup>。研究表明,菌体耐受  $\text{Au(III)}$  受多种机制调控<sup>[15]</sup>,而  $\text{Au(III)}$  在形成 AuNPs 前均先被还原为  $\text{Au(I)}$ <sup>[17]</sup>。金纳米颗粒可通过控制环境因素,在几纳米到几微米的范围内保持高产率<sup>[18]</sup>。28 kD 的蛋白质对金纳米颗粒起形状导向剂的作用<sup>[19]</sup>。在催化双氯芬酸和三氯乙烯脱氯反应中,使用 Pd-Au 纳米颗粒后的脱氯速率比只使用 Pd 和 Au 颗粒显著提高<sup>[25]</sup>。真菌在合成纳米颗粒上具有许多优势<sup>[30]</sup>,其中绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)存在于土壤、植物中的纤维素

上<sup>[31]</sup>。本文利用绿色木霉菌合成 AuNPs, 通过进一步的研究确定微生物合成纳米颗粒的具体机制, 并探究合成 AuNPs 的尺寸、形状、位置等特性和实验参数的关系。目的是探讨绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)在细胞内合成 AuNPs 的可能性, 并研究生物量添加量、初始金离子浓度和溶液的 pH 对 AuNPs 特性及合成位置的影响。通过目视检测法、紫外可见(Ultraviolet visible, UV-vis)光谱、X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和透射电镜(Transmission electron microscopy, TEM)等手段分析合成 AuNPs 的特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、仪器及培养基

氯金酸(HAuCl<sub>4</sub>), 阿拉丁试剂有限公司。火焰原子吸收分光光度计、紫外可见分光光度计, 岛津公司; X 射线衍射仪、透射电子显微镜, 日立公司。

综合马铃薯葡萄糖琼脂培养基(g/L): 无水葡萄糖 20.0, 磷酸二氢钾 3.0, 七水合硫酸镁 1.5, 维生素 B<sub>1</sub> 0.01–0.05, 待溶解混匀后, 用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液将培养液的 pH 调到 6.0。

### 1.2 真菌菌株和生长条件

绿色木霉菌(GIM3.141)购自广东省微生物菌种保藏中心。菌种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)中培养并保藏在冷藏库中以备后用。在进行实验前, 将菌种接种到马铃薯葡萄糖(PD)液体培养基中, 30 °C 和 150 r/min 条件下培养。经过 3 d 的培养, 10 °C、5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清后获得 *T. viride* 菌体沉淀, 用去离子水清洗 3 次配成菌悬液。

### 1.3 AuNPs 的合成

分别选取 1、2、4、8 g 生物量(湿重)的 *T. viride*, 取 250 mL 锥形瓶作为反应容器, 添加 100 mL HAuCl<sub>4</sub> 溶液(1 mmol/L), 混合溶液在 30 °C、165 r/min 条件下培养 24 h。AuNPs 的形成通过目视检测控制。每间隔 6 h 通过可见紫外分光光度计测量混合物的吸光度。然后 10 °C、15 000 r/min 离心 10 min 分离反应液, 上清液的金离子浓度采用火焰

原子吸收分光光度计测量。

探究初始金离子浓度对 AuNPs 形成及特性的影响: 在 100 mL HAuCl<sub>4</sub> 溶液中添加 8 g 生物量的绿色木霉菌, 分别控制 HAuCl<sub>4</sub> 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 进行合成, 其余条件同上。

探究溶液 pH 的影响: 在 100 mL HAuCl<sub>4</sub> 溶液中添加 8 g 生物量的绿色木霉菌, 通过 0.1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 控制 pH 值为 2.0、4.0、6.0 和 8.0 进行培养, 其余条件同上。

## 1.4 AuNPs 的特性

### 1.4.1 紫外可见分光光度计测定

采用分光光度计(范围为 300–800 nm)测量合成的 AuNPs, 以去离子水为参照在分辨率为 1 nm 下操作。AuNPs 溶液稀释 5 倍以避免溶液的高光密度造成的误差。

### 1.4.2 X 射线衍射分析

采用 X 射线衍射对 AuNPs 进行分析以确定晶体结构。使用装备着 Cu K $\alpha$  射线的 D8 ADVANCE X 射线衍射仪(波长为 0.154 nm)测定, 在 40 kV 电压与 40 mA 电流下操作。AuNPs 装载的生物量通过离心法(10 °C, 15 000 r/min, 10 min)收集, 用超纯水洗涤 3 次, 然后真空冻干并在研钵中研磨成细粉。测量在 2 $\theta$  角位于 20°–90°中, 每隔 0.02°进行一次测定。

### 1.4.3 透射电子显微镜研究

为了检验合成 AuNPs 的形态和尺寸, 用透射电子显微镜观察, 可以确定 AuNPs 在细胞中合成的确切位置。研究的样品根据 Konishi 等推荐的方法做准备<sup>[32]</sup>。AuNPs 在 10 °C、15 000 r/min 离心 10 min, 用超纯水洗涤 3 次后离心收集。取少量菌体悬浮于 5 mL 含有 4%戊二醛的 0.1 mol/L 二甲基胍酸盐缓冲液中, 于 4 °C 下前固定(置于冰箱中) 4 h 后离心收集并用缓冲液清洗 3 次, 悬浮于 2 mL 含有 1%四氧化锇的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 于 4 °C 固定 12 h 后离心收集并用缓冲液清洗 3 次。固定细胞后分别用 30%、50%、70%、80%、90%和 95%的乙醇水溶液在室温下脱水 10 min; 紧接着用纯乙醇脱

水 2 次,各 15 min;再换成丙酮脱水 2 次,各 15 min。然后,样品分别以 1:3、1:1 和 3:1 的树脂丙酮比浸润在环氧树脂中 4 h。紧接着用纯树脂处理 2 次,持续 12 h,植入到纯树脂中并在 60 °C 聚合 24 h,使用超薄切片机切成超薄片,然后放置在包铜炭碳包的 TEM 网格上,用 2% 的乙酸双氧铀和柠檬酸铅着色 10 min,采用透射电镜进行观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿色木霉菌对合成 AuNPs 的影响

通过一定生物量 *T. viride* 与  $\text{HAuCl}_4$  水溶液混合,混合液的颜色渐渐呈现褐色、粉色或紫色,这一过程可说明 AuNPs 的形成。颜色与色深随着生物量添加量、初始金离子浓度和溶液 pH 值的不同而变化。研究表明,合成 AuNPs 的颜色将根据颗粒的形状和粒径从红色到蓝色变化<sup>[33]</sup>。这种现象是由于 AuNPs 的表面等离子体共振产生的<sup>[20]</sup>。通过离心从混合溶液中分离出一定生物量 AuNPs,可以发现菌体沉淀是有色的,但上清液是无色的,这表明 AuNPs 是在细胞内形成。该结果将由紫外可见光谱和透射电镜进一步确定。

如图 1 所示,对金纳米颗粒进行 XRD 是为了确定合成 AuNPs 的确切晶体结构。 $2\theta$  角位于 38.2°、

44.6°、64.9°、77.8°和 81.7°分别对应金纳米面心立方结构的(111)、(200)、(220)、(311)和(222)衍射晶面,表明 AuNPs 纳米颗粒晶体的合成。而且,峰值出现在 38.2°,与其余峰值形成强烈对比。反应条件的变化对 XRD 图谱显示出很小的影响,尽管在衍射峰值位置上有一个轻微的位移,但这是生物合成纳米颗粒的共同特征<sup>[34]</sup>。

### 2.2 生物量添加量对合成 AuNPs 的影响

紫外可见光谱是一种重要的确定金属纳米颗粒合成的方法。图 2 表示在反应发生 24 h 后不同条件下混合溶液的紫外可见吸光度。从图 2 中可以明显看出,随着生物量添加量的增加,吸收带的强度也在增加,表明 AuNPs 生成量在升高。这是因为吸收带的强度与纳米颗粒的数量成正比。同时还可以观察到伴随着生物量添加量的增加,最大吸收波长蓝移的现象。在 1、2、4、8 g 生物量添加量情况下,吸收峰值分别集中在 568、559、546、538 nm。Husseiny 等认为,伴随着颗粒尺寸的增大,最大吸收波长倾向于红移,而颗粒尺寸减小会倾向于蓝移<sup>[35]</sup>。因此,生物量添加量的增加导致颗粒粒径减小,造成了最大吸收波长的蓝移。

生物量添加量对颗粒特性和粒径分布的影响如图 3 所示。AuNPs 合成的位置既可以在壁膜间隙,也可以在细胞壁上。在壁膜间隙中观察到小的

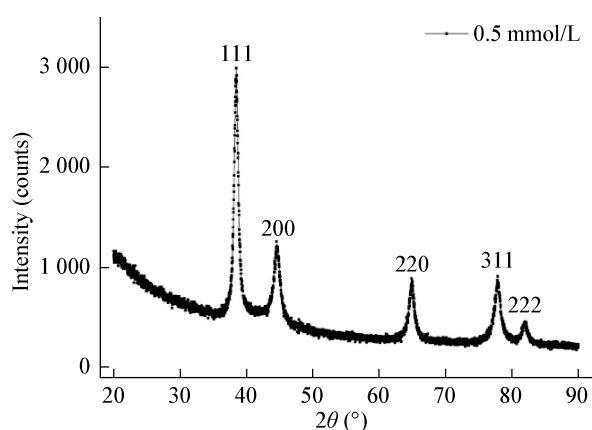


图 1 生物合成 AuNPs 的 XRD 图谱

Figure 1 Representative XRD patterns of biosynthesized AuNPs

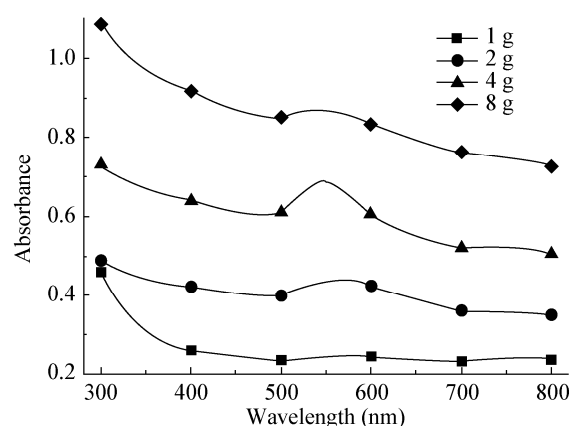


图 2 不同生物量添加量下的混合液紫外全谱图

Figure 2 UV-vis absorbance spectra of the mixture solution under different biomass addition



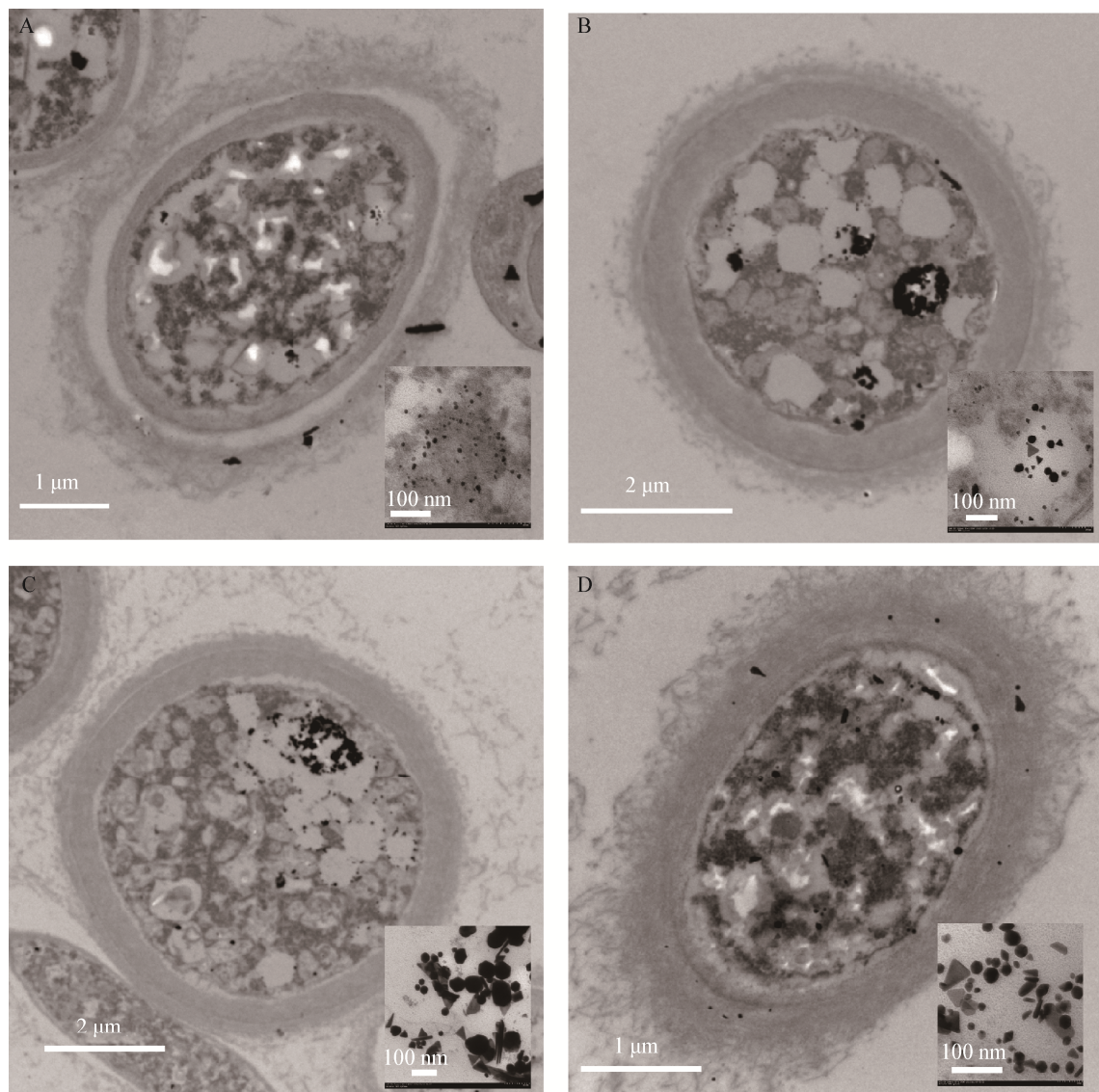


图3 不同生物量添加量合成的 AuNPs 的透射电镜图

**Figure 3** TEM images of AuNPs synthesized with different biomass addition

注: A-D: 1、2、4、8 g 生物量添加量.

Note: A-D: 1, 2, 4, 8 g biomass.

伪球面、三角形、四边形和六边形 AuNPs,而在细胞壁上的 AuNPs 则大部分是较大的三角形状。图4是 AuNPs 的粒径分布图。生物量添加量为 1 g 或 2 g 时, AuNPs 展现出宽泛的粒度分布范围,从几纳米到超过三百纳米都有;在生物量添加量为 4 g 和 8 g 时,生成的 AuNPs 会在一个相对窄的粒度分布范围

内,在 4 g 生物量添加量时,超过 65% 的 AuNPs 粒径范围在 20 nm–60 nm 间,超过 94% 的 AuNPs 小于 100 nm;而在 8 g 生物量添加量情况下,约 83% 的 AuNPs 粒径在 10 nm–30 nm 间,超过 98% 的 AuNPs 小于 50 nm。总而言之,随着生物量添加量的升高,生成 AuNPs 的粒径变得更集中。

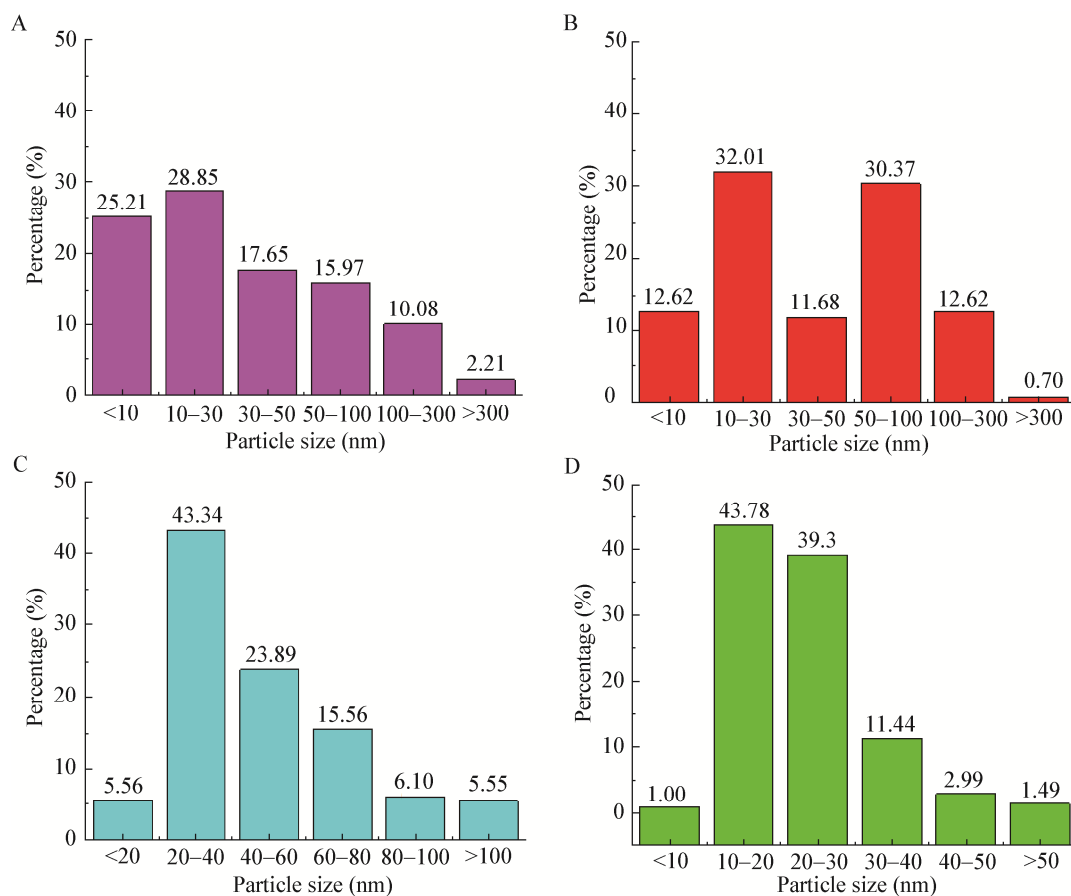


图 4 不同生物量添加量合成的 AuNPs 粒径分布柱状图

Figure 4 Particle size distribution histograms of AuNPs synthesized with different biomass addition

注: A-D: 1、2、4、8 g 生物量添加量。

Note: A-D: 1, 2, 4, 8 g biomass.

### 2.3 初始金离子浓度对合成 AuNPs 的影响

图 5 表示混合液中初始金离子浓度对合成 AuNPs 的影响。在初始金离子浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, 只观察到一个吸收峰值; 当初始金离子浓度升高到 1.5 mmol/L 和 2.0 mmol/L 时, 观察到另一个集中在 750 nm 的低峰值。曾有研究表明, 小球面形的 AuNPs 只展现一个单独的吸收带, 但各向异性的颗粒会展现出 2-3 条吸收带<sup>[18]</sup>。

图 6 表示初始金离子浓度对 AuNPs 特性的影响。当初始金离子浓度为 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, 几乎所有的 AuNPs 在壁膜间隙中合成; 当初始金离子浓度升高到 1.5 mmol/L 或 2.0 mmol/L 时,

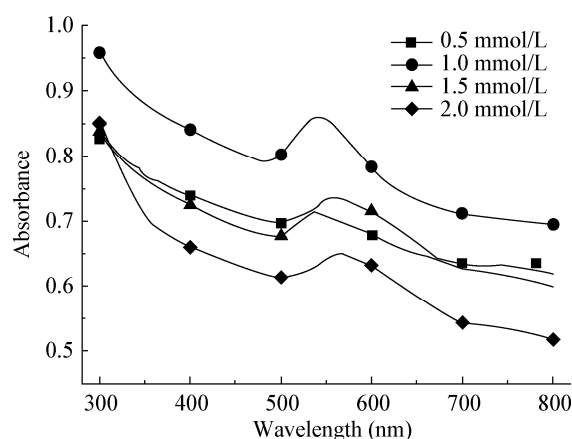


图 5 不同初始金离子浓度下的混合液紫外全谱图

Figure 5 UV-vis absorbance spectra of the mixture solution under different initial gold ions concentration



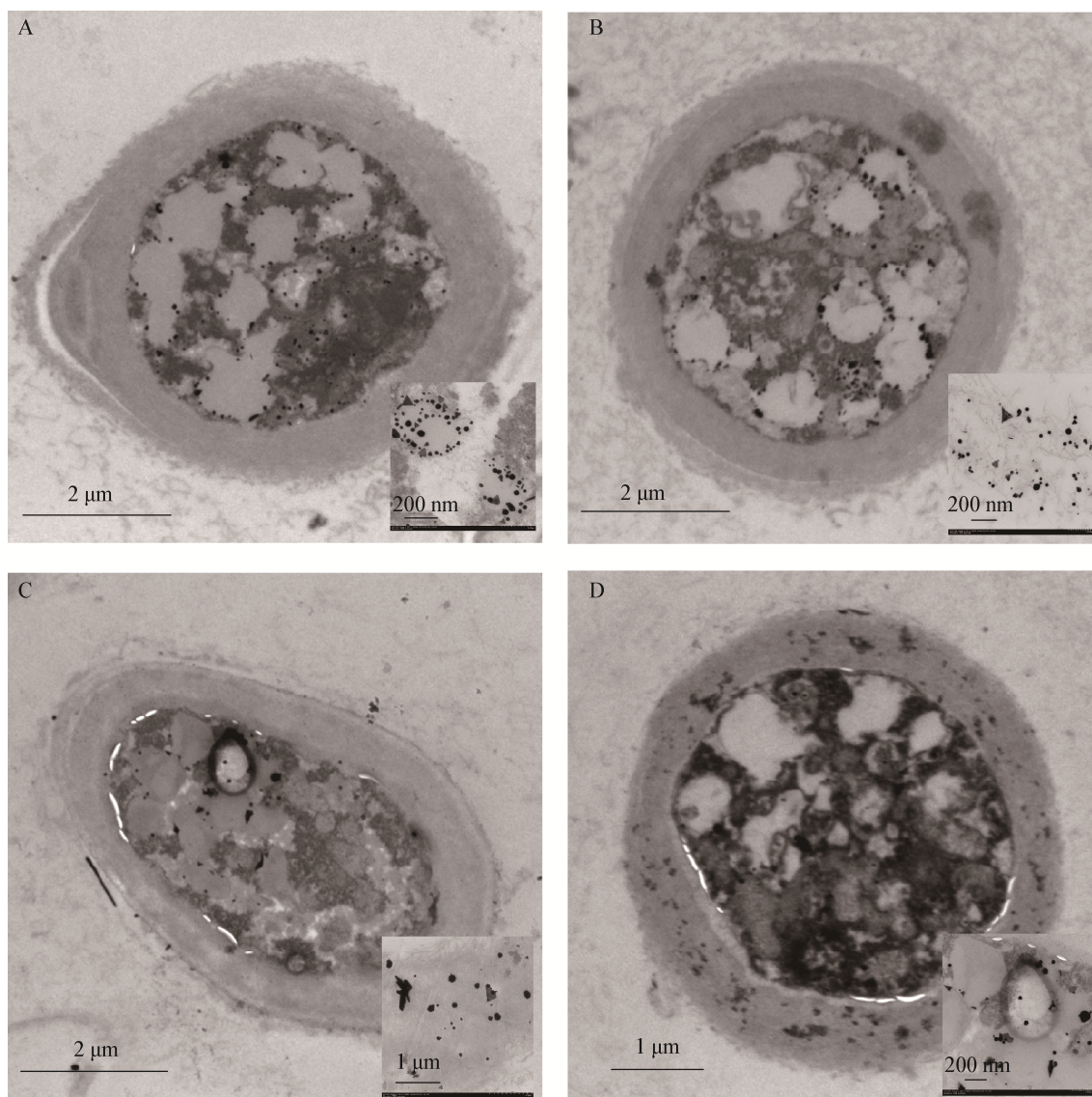


图 6 不同初始金离子浓度合成的 AuNPs 透射电镜图

**Figure 6** TEM images of AuNPs synthesized with different initial gold ions concentration

注: A-D: 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 初始金离子浓度.

Note: A-D: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L initial gold ions concentration.

许多无定形的 AuNPs 开始在细胞壁上出现。图 7 表示初始金离子浓度对 AuNPs 粒径分布的影响,随着初始金离子浓度的升高,平均粒径变大,而且粒径分布范围也在变宽。文献[36]指出,金离子首先变成金原子并产生原子核,随后金原子粘附在原子核上,组合成一个金纳米颗粒;在高金离子浓度下,有更多的机会使金原子和原子核接触,因此会产生

较大的颗粒,这与我们的实验结果相一致。

## 2.4 pH 对合成 AuNPs 的影响

图 8 是溶液 pH 对 AuNPs 的影响。可以看出,溶液 pH 对吸收带峰值的位置影响很小,而对吸收带强度的影响更加显著。强酸或强碱条件下会使吸收峰值的强度更强,但其原因还需要进一步研究。

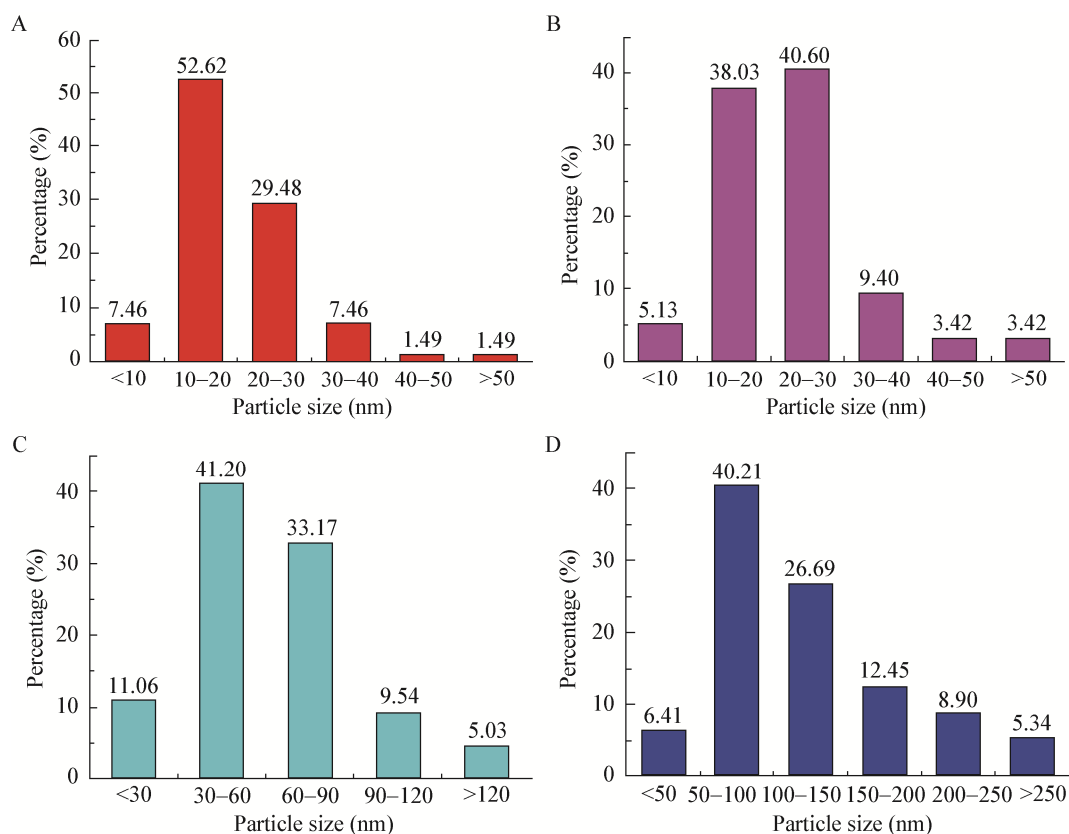


图 7 不同初始金离子浓度的 AuNPs 粒径分布柱状图

Figure 7 Particle size distribution histograms of AuNPs synthesized with different initial gold ions concentration

注: A-D: 0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L 初始金离子浓度。

Note: A-D: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol/L initial gold ions concentration.

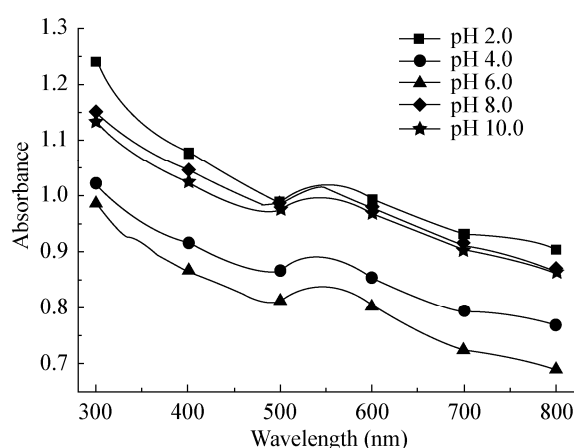


图 8 不同 pH 下的混合液紫外全谱图

Figure 8 UV-vis absorbance spectra of the mixture solution under different solution pH

图 9 和图 10 表示溶液 pH 对 AuNPs 特性和粒径分布的影响。显然, 溶液的 pH 对 AuNPs 合成的位置和粒径有很大的影响。当溶液的初始 pH 调到 2.0 时, AuNPs 大部分在细胞壁上合成, 合成的粒径范围从几纳米到超过三百纳米, 约 70% 的 AuNPs 粒径在 50 nm–200 nm 的范围内; 当溶液 pH 值调到 4.0 或更高时, AuNPs 在壁膜间隙合成, 而且生物合成的 AuNPs 比 pH 为 2.0 时要小。Konishi 等<sup>[32]</sup>的研究表明溶液 pH 对 AuNPs 的合成位置有很大的影响, 当 pH 从 7.0 降到 2.0 时, 会有更大的约为 350 nm 粒径的 AuNPs 生成, 这与我们的实验结果相一致。



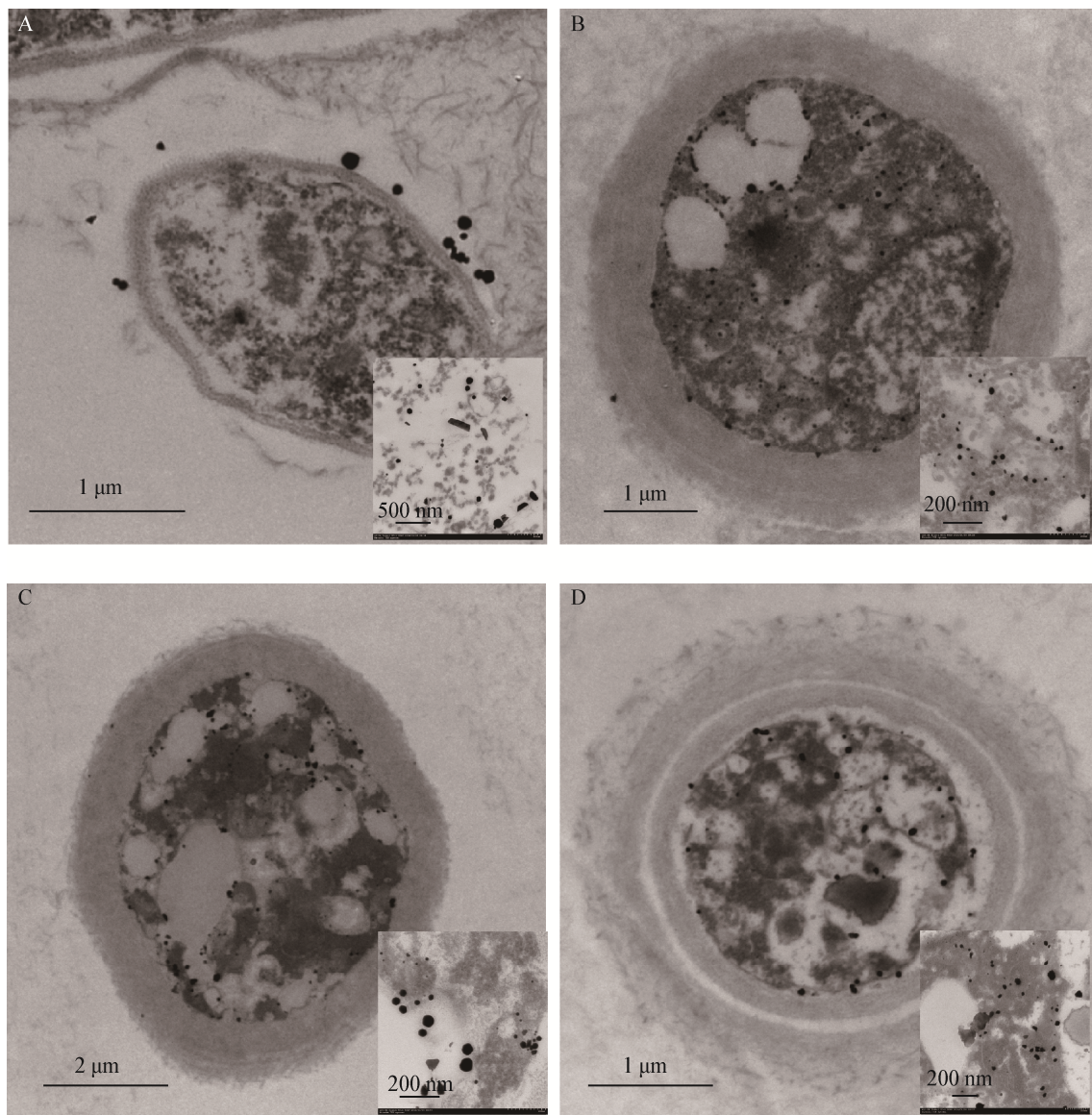


图9 不同溶液 pH 合成的 AuNPs 透射电镜图

Figure 9 TEM images of AuNPs synthesized with different initial solution pH

Note: A: pH 2.0; B: pH 4.0; C: pH 6.0; D: pH 8.0.

### 3 讨论与结论

在本实验中,我们通过非致病性真菌绿色木霉菌合成了 AuNPs,合成的过程简单、清洁、经济。AuNPs 在常温常压下合成,并利用目视检测法、紫外可见分光光度法、X 射线衍射、透射电镜进行表征分析。TEM 图像显示大部分 AuNPs 位于壁膜间隙,小部分 AuNPs 位于细胞壁上。生物量添加量、

初始金离子浓度和溶液 pH 等反应条件对合成 AuNPs 的形貌和尺寸有很大影响,将来的研究需要进一步探究合成过程中作用的官能团和生物还原剂。

与传统物理、化学方法相比,生物合成金纳米颗粒的方法相对简单、可靠和环保。多种微生物被用于合成纳米颗粒,其中真菌合成的前景更加光

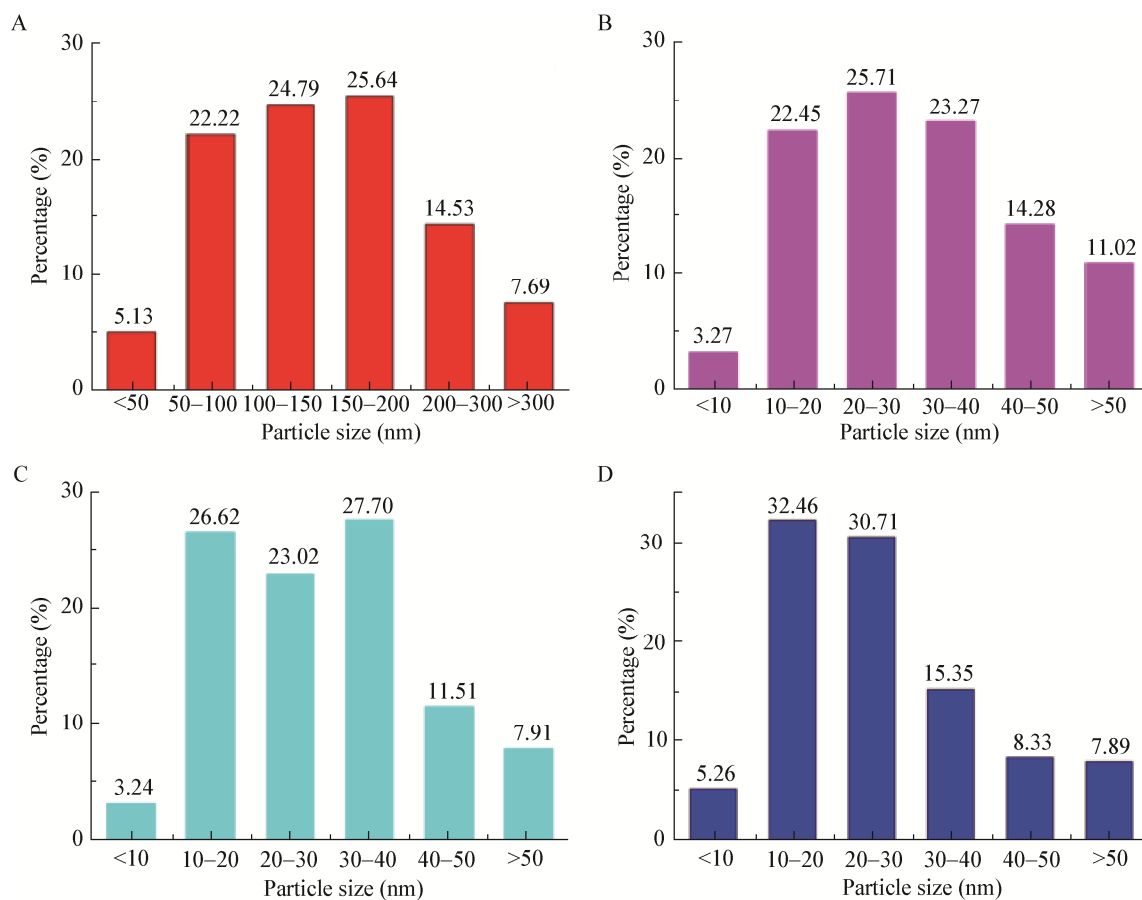


图 10 不同溶液 pH 的 AuNPs 粒径分布柱状图

Figure 10 Particle size distribution histograms of AuNPs synthesized with different initial solution pH

Note: A: pH 2.0; B: pH 4.0; C: pH 6.0; D: pH 8.0.

明, 因为真菌具有更高的耐受性, 可分泌大量蛋白质并具有更多的生物量。因此, 本实验探究了非致病性真菌绿色木霉菌合成 AuNPs 的可能性, 生物量添加量、初始金离子浓度和溶液 pH 等反应条件在生物合成过程中的影响以及合成 AuNPs 的特性。

当 AuNPs 在溶液中呈现多种颜色时, 首先要用目视检测法对颜色变化进行观察, 以确定 AuNPs 的形成。但颜色的亮度和颜色的变换会因实验条件的不同而改变。有研究表明, 采用 *Trichoderma viride* 合成 AuNPs 是由生物吸附过程和相对缓慢的生物还原过程组成的<sup>[37]</sup>。反应体系可通过 UV-vis 进行分析, 多数 AuNPs 在 520–560 nm 出现特征吸收峰是由于表面等离子体共振效应(Surface plasmon

resonance, SPR)引起的<sup>[38]</sup>。这一现象说明合成的 AuNPs 非常稳定, 而且没有聚合现象出现。细胞分泌的蛋白质很可能起到结合并稳定 AuNPs 的作用<sup>[9]</sup>。据报道, 蛋白质可以粘附在金属纳米颗粒上, 通过游离胺基、半胱氨酸残基、羧基或羰基覆盖在金属纳米颗粒表面, 以避免 AuNPs 的凝聚, 使其变得稳定<sup>[5,13,16,20]</sup>。

除了目视检测法与紫外可见光谱分析以外, AuNPs 的合成由X射线衍射和透射电镜分析进一步表明。2 $\theta$ 角位于 38.2°、44.6°、64.9°、77.8°和 81.7°分别对应金纳米面心立方结构的(111)、(200)、(220)、(311)和(222)衍射晶面, 表明 AuNPs 纳米颗粒晶体的合成。TEM 图像清晰地表明反应条件对 AuNPs

的合成位置和粒径分布的调控。简而言之, 生物量添加量和溶液 pH 的增加, 或初始金离子浓度的减少, 对合成小粒径和窄的粒径分布范围 AuNPs 是有利的, 这个结论与许多研究结果一致。Pimprikar 等<sup>[33]</sup>报道细胞数量的增长导致 AuNPs 粒径的缩小, 而平均粒径随着金离子溶液浓度的增大而增大。Das 等<sup>[3]</sup>也报道过, AuNPs 的粒径与金离子浓度和真菌菌株 *Rhizopus oryzae* 中提取出的无细胞蛋白质的比值之间是正相关关系。He 等<sup>[39]</sup>把 pH 看作是调控 AuNPs 粒径和形状的最重要因素: 当溶液 pH 7.0 时, 大部分颗粒呈现球形且粒径范围在 10 nm–20 nm 间; 当溶液 pH 4.0 时大部分纳米颗粒呈现三角形且粒径范围在 50 nm–400 nm 间。

已有研究普遍认为, 金离子首先在细胞壁上被吸附, 这些被吸附的离子, 一部分直接还原成 AuNPs 并粘附在细胞壁上, 另一部分被运输到细胞质中被小分子物质还原, 其 AuNPs 的合成位置在壁膜间隙上<sup>[17]</sup>。在金离子还原和 AuNPs 的形成过程中, 金离子首先被还原成金原子, 作为后续形成 AuNPs 的晶核, 之后获得的金原子会聚集在晶核上, 最终形成不同形貌和粒径的 AuNPs。在金离子浓度不变的情况下, 菌体生物量投加量的提高会使 AuNPs 的合成位点增多, AuNPs 的合成量提高, 颗粒平均粒径变小。据研究, 许多官能团如羧基、羰基、羟基和氨基会参与生物吸附和还原过程<sup>[3,28]</sup>, 微生物可以在胞内外或细胞膜上还原 Au(III) 并形成 AuNPs, 合成位点可能取决于参与还原的酶的亚细胞定位。此外, pH 也是影响还原场所和合成位置的重要因素, 推测其原因是在低 pH 条件下, 溶液有较高浓度质子, 从而使官能团带正电荷, 促进氯金酸阴离子与质子化的有效官能团之间的静电作用, 提高 AuNPs 的合成量。一些研究者甚至在基因层面探究金纳米颗粒的生物合成机制, 发现 Au(III) 和菌体孵育一定时间后, 基因簇中特定功能基因上调表达, 导致金盐的还原沉淀, 最终使得 Au(I)-C 和 AuNPs 合成<sup>[15]</sup>。由于丰富的生物多样性, 有必要做更深层次的研究来探索金属纳米颗粒合成的

具体机制, 以发现可稳定还原和充当封端剂蛋白质的基因工程微生物, 从而达到更好地调控金属纳米颗粒的形状、粒径、分散度的效果, 甚至实现大规模生物合成金属纳米颗粒的目标, 以降低成本和对环境的影响。

## REFERENCES

- [1] Narayanan KB, Sakthivel N. Facile green synthesis of gold nanostructures by NADPH-dependent enzyme from the extract of *Sclerotium rolfsii*[J]. Colloids & Surfaces A: Physicochemical & Engineering Aspects, 2011, 380(1/3): 156-161
- [2] Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes[J]. Advances in Colloid & Interface Science, 2010, 156(1/2): 1-13
- [3] Das SK, Das AR, Guha AK. Microbial synthesis of multishaped gold nanostructures[J]. Small, 2010, 6(9): 1012-1021
- [4] Srivastava SK, Yamada R, Ogino C, et al. Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol[J]. Nanoscale Research Letters, 2013, 8(1): 70
- [5] Sharma N, Pinnaka AK, Raje M, et al. Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 86
- [6] Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, et al. Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(5): 2148-2152
- [7] Sadhasivam S, Shanmugam P, Yun K. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 81(1): 358-362
- [8] Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 83(1): 42-48
- [9] Binupriya AR, Sathishkumar M, Yun SI. Biocrystallization of silver and gold ions by inactive cell filtrate of *Rhizopus stolonifer*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 79(2): 531-534
- [10] Thirumurugan A, Ramachandran S, Tomy NA, et al. Biological synthesis of gold nanoparticles by *Bacillus subtilis* and evaluation of increased antimicrobial activity against clinical isolates[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2012, 29(12): 1761-1765
- [11] Cao YL, Zhu NW, Shi CH, et al. Influence factors and mechanisms of Au<sup>3+</sup> biosorption by *S. halotidis*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(6): 1962-1970 (in Chinese)  
操艳兰, 朱能武, 石超宏, 等. 鲍希瓦氏菌吸附 Au<sup>3+</sup> 的影响因素及机理研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(6): 1962-1970
- [12] Manivasagan P, Venkatesan J, Senthilkumar K, et al. Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardopsis* sp. MBRC-1[J].

- BioMed Research International, 2013, 2013: Article ID 287638
- [13] Gupta S, Devi S, Singh K. Biosynthesis and characterization of Au-nanostructures by metal tolerant fungi[J]. Journal of Basic Microbiology, 2011, 51(6): 601-606
- [14] Wu SM, Su YL, Ma LY, et al. Synthesis of nanoparticles using microorganisms: a review of its mechanism[J]. Microbiology China, 2014, 41(12): 2516-2524 (in Chinese)  
吴盛美, 苏义龙, 马丽雅, 等. 基于微生物生物合成纳米颗粒机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2516-2524
- [15] Reith F, Etschmann B, Grosse C, et al. Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(42): 17757-17762
- [16] Binupriya AR, Sathishkumar M, Vijayaraghavan K, et al. Bioreduction of trivalent aurum to nano-crystalline gold particles by active and inactive cells and cell-free extract of *Aspergillus oryzae* var. *viridis*[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 177(1/3): 539-545
- [17] Das SK, Liang JN, Schmidt M, et al. Biomineralization mechanism of gold by zygomycete fungi *Rhizopus oryzae*[J]. ACS Nano, 2012, 6(7): 6165-6173
- [18] Xie JP, Lee JY, Ting YP. High-yield synthesis of complex gold nanostructures in a fungal system[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(45): 16858-16865
- [19] Xie JP, Lee JY, Wang DIC, et al. Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions[J]. Small, 2007, 3(4): 672-682
- [20] Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SBRK, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 77(2): 257-262
- [21] Liu ZY, Zhou H, Shen E, et al. Recent advances in microbes-mediated biosynthesis of gold nanoparticles[J]. Microbiology China, 2015, 42(8): 1584-1592 (in Chinese)  
刘紫嫣, 周豪, 沈娥, 等. 微生物介导的金纳米颗粒合成[J]. 微生物学通报, 2015, 42(8): 1584-1592
- [22] Balaji DS, Basavaraja S, Deshpande R, et al. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 68(1): 88-92
- [23] Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel MA, et al. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 71(1): 133-137
- [24] Syed A, Ahmad A. Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 97: 27-31
- [25] Shang R, Zhu NW, Kang NX, et al. Bio-inspired recovery of platinum nanoparticle and its mechanism[J]. Environmental Science, 2016, 37(7): 2799-2806 (in Chinese)  
商儒, 朱能武, 康乃馨, 等. 生物法回收贵金属铂纳米颗粒及其机制[J]. 环境科学, 2016, 37(7): 2799-2806
- [26] Bunge M, Søjberg LS, Rotaru AE, et al. Formation of palladium(0) nanoparticles at microbial surfaces[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 107(2): 206-215
- [27] Chen HM, Sun DH, Jiang XD, et al. Fabrication of Au/Pd alloy nanoparticle/*Pichia pastoris* composites: a microorganism-mediated approach[J]. RSC Advances, 2013, 3(35): 15389-15395
- [28] Deplanche K, Merroun ML, Casadesus M, et al. Microbial synthesis of core/shell gold/palladium nanoparticles for applications in green chemistry[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2012, 9(72): 1705-1712
- [29] de Corte S, Hennebel T, Fitts JP, et al. Biosupported bimetallic Pd-Au nanocatalysts for dechlorination of environmental contaminants[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(19): 8506-8513
- [30] Das SK, Dickinson C, Lafir F, et al. Synthesis, characterization and catalytic activity of gold nanoparticles biosynthesized with *Rhizopus oryzae* protein extract[J]. Green Chemistry, 2012, 14(5): 1322-1334
- [31] Wickel SM, Citron CA, Dickschat JS. 2H-Pyran-2-ones from *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum*[J]. European Journal of Organic Chemistry, 2013, 2013(14): 2906-2913
- [32] Konishi Y, Tsukiyama T, Tachimi T, et al. Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*[J]. Electrochimica Acta, 2007, 53(1): 186-192
- [33] Pimprikar PS, Joshi SS, Kumar AR, et al. Influence of biomass and gold salt concentration on nanoparticle synthesis by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 74(1): 309-316
- [34] Mishra A, Tripathy SK, Wahab R, et al. Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(3): 617-630
- [35] Husseiny MI, El-Aziz MA, Badr Y, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2007, 67(3/4): 1003-1006
- [36] Cai F, Li J, Sun JS, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles by biosorption using *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1[J]. Chemical Engineering Journal, 2011, 175: 70-75
- [37] de Corte S, Hennebel T, Verschuere S, et al. Gold nanoparticle formation using *Shewanella oneidensis*: a fast biosorption and slow reduction process[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2011, 86(4): 547-553
- [38] Verma VC, Kharwar RN, Singh SK, et al. Correction: biofabrication of anisotropic gold nanotriangles using extract of endophytic *Aspergillus clavatus* as a dual functional reductant and stabilizer[J]. Nanoscale Research Letters, 2011, 6(1): 261
- [39] He SY, Guo ZR, Zhang Y, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*[J]. Materials Letters, 2007, 61(18): 3984-3987