

基于 532nm 光动态热分析技术调控沼泽红假单胞菌生长优化金纳米粒子生物合成

罗淑颖 袁梦祥 樊芝伶 曾小英 余佳华 覃慧娴 陈雨珊 马冰婷 陈宴希 蓝春梅 黄婷婷 廖艳娟*

广西民族大学海洋与生物技术学院, 广西 南宁 530005

[摘要]金纳米粒子因其在抗菌、药物传递和催化等领域的广泛应用而备受关注。然而,传统的化学合成方法往往存在环境污染和安全性问题。本研究旨在利用沼泽红假单胞菌优化金纳米粒子的生物合成过程,并探讨其生长条件的动态热力学特征。通过高精度光热联用系统,我们在 532nm 光源下(光功率分别为 2、4、6W/m²)实时监测了细菌的生长过程,结果显示光功率为 4W/m²时,菌体生长表现最佳,延滞期最短($t_d=27395s$),对数生长期最长($\Delta t_d=45570s$),热功率峰值达到 48.19 μW 。此外,在 Au⁺浓度为 2mmol/L、pH 值在 7~9 之间反应 30min 的条件下,成功合成了直径均一(10~200nm)的金纳米粒子。实验结果表明沼泽红假单胞菌在金纳米粒子合成中的应用具有良好的前景,且光热动态监测技术首次明确了最适生长条件,为未来的生物合成提供了理想模板。综上所述,本研究为金纳米粒子的绿色合成开辟了新的途径,为其在医学和环境领域的应用奠定了基础,未来可进一步探索不同微生物对金纳米粒子合成的影响及其潜在的抗菌机制。

[关键词]光合细菌;原位生长;光量热;金纳米粒子;可控合成

DOI: 10.33142/nsr.v2i2.16964

中图分类号: TK6

文献标识码: A

Optimization of Gold Nanoparticle Biosynthesis by Regulating the Growth of *Rhodopseudomonas Palustris* Based on 532 nm Photothermal Analysis Technology

LUO Shuying, YUAN Mengxiang, FAN Zhiling, ZENG Xiaoying, YU Jiahua, QIN Huixian, CHEN Yushan, MA Bingting, CHEN Yanxi, LAN Chunmei, HUANG Tingting, LIAO Yanjuan*

College of Marine and Biotechnology, Guangxi Minzu University, Nanning, Guangxi, 530005, China

Abstract: Gold nanoparticles have attracted much attention due to their wide applications in antibacterial, drug delivery, and catalytic fields. However, traditional chemical synthesis methods often suffer from environmental pollution and safety issues. The aim of this study is to optimize the biosynthesis process of gold nanoparticles using swamp red pseudomonas and explore the dynamic thermodynamic characteristics of their growth conditions. Through a high-precision photothermal combined system, we monitored the growth process of bacteria in real time under a 532 nm light source (with light powers of 2, 4, and 6 W/m² respectively). The results showed that when the light power was 4 W/m², the bacterial growth performance was the best, with the shortest delay period ($t_d=27395$ s) and the longest logarithmic growth period ($\Delta t_d=45570$ s), and the peak thermal power reached 48.19 μW . In addition, gold nanoparticles with uniform diameters (10~200 nm) were successfully synthesized under the conditions of Au⁺ concentration of 2 mmol/L and pH value between 7 and 9 for 30 minutes. The experimental results indicate that the application of *Rhodopseudomonas palustris* in the synthesis of gold nanoparticles has good prospects, and the photothermal dynamic monitoring technology has for the first time clarified the optimal growth conditions, providing an ideal template for future biosynthesis. In summary, this study has opened up new avenues for the green synthesis of gold nanoparticles, laying the foundation for their applications in medicine and the environment. In the future, the influence of different microorganisms on the synthesis of gold nanoparticles and their potential antibacterial mechanisms can be further explored.

Keywords: photosynthetic bacteria; in situ growth; light quantity heat; gold nanoparticles; controllable synthesis

随着纳米技术的快速发展,金纳米粒子因其独特的光学、电学及催化特性,已在生物医学、催化及材料科学等多个领域得到了广泛应用^[1]。在众多合成方法中,微生物合成因其环保性和可持续性而越来越受到重视。然而,目前关于沼泽红假单胞菌在金纳米粒子合成中的机制及其优势的研究仍较为有限,特别是在微生物合成方法的探索方面。尽管已有研究显示其他微生物在金纳米粒子合成中表现出良好的性能,沼泽红假单胞菌的潜力尚未被充分挖掘,这为本研究提供了进一步探索的机会^[2]。

本研究选取沼泽红假单胞菌作为研究对象,因其具备合成金纳米粒子的潜在能力。虽然已有研究利用不同微生物合成金纳米粒子,但大多数集中于常见细菌,未能充分探讨沼泽红假单胞菌的独特特性及其在这一领域的应用。这一现状为我们提供了探索新的合成策略的契机,可能为金纳米粒子的绿色合成方法开辟新的方向^[3]。

为实现研究目标,我们采用了包括菌液浓度测定、光-微量热实验在内的多种研究方法,结合金纳米粒子的制备与表征。这些方法将使我们能够精准控制实验条件,并

系统评估金纳米粒子的合成效率与特性。特别是光-微量热实验的应用,将有助于实时监测细菌的代谢及生长状态,从而获取关键的生长动力学数据。这种创新方法提供了实时热量变化的监测,为优化金纳米粒子的合成条件提供了科学依据^[4]。

本研究旨在优化金纳米粒子的合成条件,并探讨不同因素对其形貌和尺寸的影响。通过系统分析光照强度、反应时间及菌体浓度等因素,我们希望为后续的应用研究奠定坚实的基础。通过深入分析沼泽红假单胞菌的生长过程,我们期望明确其在金纳米粒子合成中的最佳生长条件,从而推动生物法合成纳米材料的发展^[5]。

综上所述,本研究不仅关注沼泽红假单胞菌在金纳米粒子合成中的应用潜力,也为生物合成材料的未来应用提供了新的研究视角与方法。这一研究将为绿色化学和可持续发展提供重要的理论基础与实践指导,助力金纳米粒子在各个领域的广泛应用^[6]。

1 实验材料与方法

1.1 菌种来源

本研究所使用的菌种为沼泽红假单胞菌,购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。液体培养基成分包括:胰蛋白胨 15.0g、大豆胨 5.0g、氯化钠 5.0g,溶于蒸馏水中至 1L。

1.2 沼泽红假单胞菌菌液浓度的确定

为了确定沼泽红假单胞菌的菌液浓度,采用血平板计数法计数,绘制标准曲线。

1.3 光-微量热实验

光-微量热实验在新型光化学-原位微量热系统中进行。步骤如下:向 15mL 的不锈钢样品管和参比管中分别加入 1.5mL 培养基和接种有沼泽红假单胞菌的液体培养基。在每次测定前,测定菌液的光密度(OD)值,并通过标准曲线确定细菌数量。设置恒温至 30℃,待基线稳定后,打开 532nm 光源,进行光功率为 2、4、6W/m 的实验,持续 332701s。

1.4 金纳米粒子的制备

金纳米粒子的制备步骤为:将菌种与培养基以 1:1 比例混合,在 30℃和 2700Lux 下培养 72h。接种 2000μL 菌体于 500mL 液体培养基中,培养 72h。离心去除上清液,清洗沉淀后转移至 250mL 蒸馏水中,再次离心并过滤以获得纯净的菌体浸泡液。向试管中加入菌体浸泡液和氯金酸溶液,并设置对照组,置于光照强度 5000Lux、35℃的培养箱中,定时观察金纳米粒子的合成情况。

1.5 正交试验

本实验采用正交试验设计方法,探讨合成金纳米粒子的制备条件。控制温度为 35℃、光照强度为 5000Lux,改变 Au³⁺浓度(A)、确定 pH 值(B)、取样时间(C)等因素,研究其对金纳米粒子形貌和尺寸的影响。每个因素设定 2~4 个水平,具体见表 1,正交试验方案见表 2。

表 1 正交试验方案的因素及水平

水平	因素		
	A Au ³⁺ 浓度/mmL - 1	B pH 值	C 取样时间/min
1	1	6	30
2	2	7	60
3	-	8	90
4	-	9	-

表 2 正交试验方案

样品编号	A	B	C
a	1	1	1
b	1	2	2
c	1	3	3
d	2	1	2
e	2	2	3
f	2	3	1
g	3	1	3
h	3	2	1
i	3	3	2

2 结果

2.1 沼泽红假单胞菌的浓度

确定沼泽红假单胞菌浓度的方法是血平板计数法。在显微镜下计数 I→V 管中 4→8 号管中的活菌数,根据观察记录到的活菌数据绘制标准曲线(如图 1),通过测定菌液的 OD 值,经标准曲线拟合方程可以确定细菌数。根据每次测定菌液的 OD 值,由标准曲线可以得出每次微量热实验所用菌液细菌数约为 1.96×10^8 个/mL。

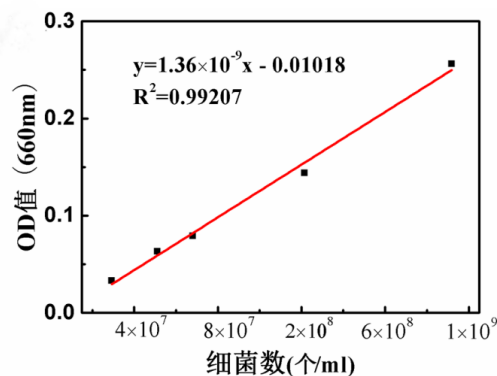


图 1 沼泽红假单胞菌浓度标准曲线

2.2 光-微量热实验结果

2.2.1 沼泽红假单胞菌在不同光照强度下的生长热动力学特征

在 $\lambda=532\text{nm}$ 波长光照下,采用新型光化学-原位微量热系统实时监测了沼泽红假单胞菌在 2、4、6W/m² 三种光照强度下的生长过程。生长热谱曲线清晰地呈现了典型的四阶段生长模型:迟缓期(起始阶段代谢缓慢)、对数生长期(代谢活性快速上升至峰值)、稳定期(代谢活跃

但净增长停滞)和衰亡期(代谢活性逐渐下降)。

随着光照强度从 2W/m^2 增至 6W/m^2 , 对数生长期的峰值热功率 ($P_{\max}$) 呈现出显著的梯度性升高。同时, 进入对数生长期的起始时间点(即迟缓期末)随光照强度增加而提前。这些动态数据明确指示高光强不仅加速了生长启动, 更显著增强了菌体在对数期的核心代谢活性。

定量生长分期(表 2): 通过对热谱数据进行系统分段处理(方法见 2.3), 精确量化了各生长时期在不同光照强度下的持续时间和累积释放热量。统计检验显示, 光照强度对各时期参数的影响具有显著差异。

2.2.2 不同光照强度对各生长时期热量积累与时间分布的影响

统计分析结果(表 3), 揭示光照强度对沼泽红假单胞菌生长代谢能量分配的关键影响:

(1) 热量积累 (kJ/L)

对数生长期: 光照强度对其热量累积产生极显著影响 ($P < 0.001$)。光照强度为 4W/m^2 时累积热量最高 ($1343.66 \pm 56.23\text{J}$), 显著高于 6W/m^2 ($842.66 \pm 54.12\text{J}$, $P < 0.01$) 和 2W/m^2 ($135.00 \pm 12.67\text{J}$, $P < 0.001$)。

稳定期: 同样受到光照强度的极显著影响 ($P < 0.001$)。热量累积量也呈现出 4W/m^2 高, 4W/m^2 : $941.98 \pm 76.24\text{J}$ $> 6\text{W/m}^2$: $893.43 \pm 37.24\text{J}$ $> 2\text{W/m}^2$: $713.05 \pm 54.23\text{J}$ 。

迟缓期与衰亡期: 光照强度对这两个时期的热量累积量影响不显著 ($P > 0.05$)。

(2) 持续时间 (小时-h)

各期生长时间, 2W/m^2 时, 细菌 $t_2 \text{迟} > t_2 \text{衰} > t_2 \text{稳} > t_2 \text{对}$, 4W/m^2 时, 细菌 $t_4 \text{衰} > t_4 \text{对} > t_4 \text{稳} > t_4 \text{迟}$, 6W/m^2 时, 细菌 $t_6 \text{迟} > t_6 \text{衰} > t_6 \text{对} > t_6 \text{稳}$, 由此可见, 4W/m^2 光照细菌最早进入对数生长期, 对数期时间最长, 细菌生长效率最高。在生产上, 常常通过延长对数期的时间来提高细菌的发酵效率。

2.3 不同反应时间对金纳米材料制备的影响

往 20ml 纯净的菌体浸泡液中, 加入 200 μl 浓度为 1mmol/L 的氯金酸溶液, 其颜色变化如图 2。

2.4 正交试验结果

在 20ml 沼泽红假单胞菌的菌体浸泡液中, 根据正交试验方案分别进行添加, 置于光照强度 5000Lux、温度 35°C 的光照培养箱中培养, 其颜色变化如图 3。

表 3 沼泽红假单胞菌不同生长期所需时间及其热量

光强度 $/\text{Wm}^2$	迟缓期		对数生长期		稳定期		衰亡期	
	t/s	Q/J	t/s	Q/J	t/s	Q/J	t/s	Q/J
2	161200 ± 34.55	-680.50 ± 56.21	11362 ± 34.15	135.00 ± 12.67	42821 ± 32.67	713.05 ± 54.23	117318 ± 39.32	1132.42 ± 26.78
4	27395 ± 65.57	-0.99 $\pm 0.02.15$	45570 ± 44.58	1343.66 ± 56.23	20368 ± 87.55	941.98 ± 76.24	239369 ± 31.87	4847.24 ± 31.59
6	142838 ± 28.23	185.36 ± 54.23	29549 ± 24.87	842.66 ± 54.12	24980 ± 87.51	893.43 ± 37.24	135334 ± 39.36	2830.90 ± 35.59

表 4 不同光照下沼泽红假单胞菌的热力学参数

光强度/ W m^{-2}	速率常数 $k/\text{s}^{-1} \pm \text{SD}$	相关系数 R	$P_{\max}/\mu\text{W}$	t max/s	T G/min
2	$1.36995 \times 10^{-4} \pm 2.42 \times 10^{-7}$	0.9828	19.69 ± 1.43	172455 ± 26.97	84.33 ± 1.34
4	$3.17997 \times 10^{-5} \pm 1.27 \times 10^{-8}$	0.9606	48.19 ± 2.52	93332 ± 98.32	363.29 ± 0.94
6	$2.59597 \times 10^{-5} \pm 2.45 \times 10^{-8}$	0.9957	38.56 ± 1.98	197367 ± 43.67	492.43 ± 1.54

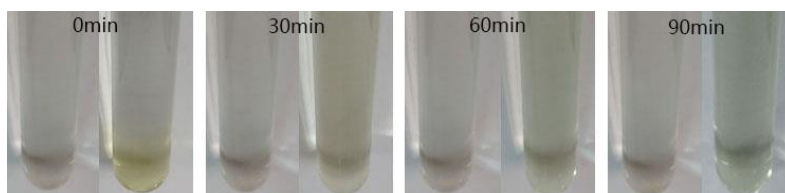


图 2 在菌体浸泡液中加入氯金酸溶液, 不同反应时间的变化趋势(左: 空白右: 试样)

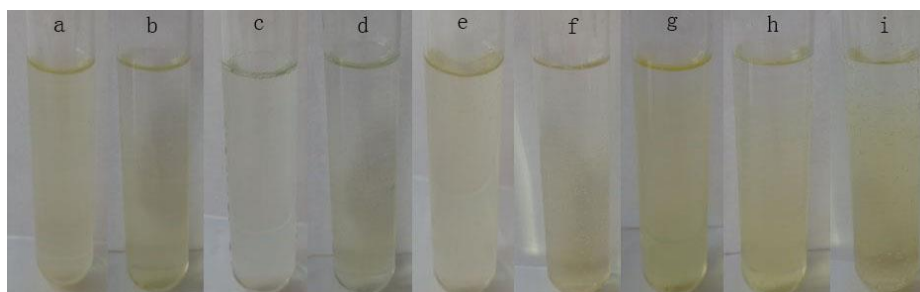


图 3 不同反应条件下合成金纳米粒子

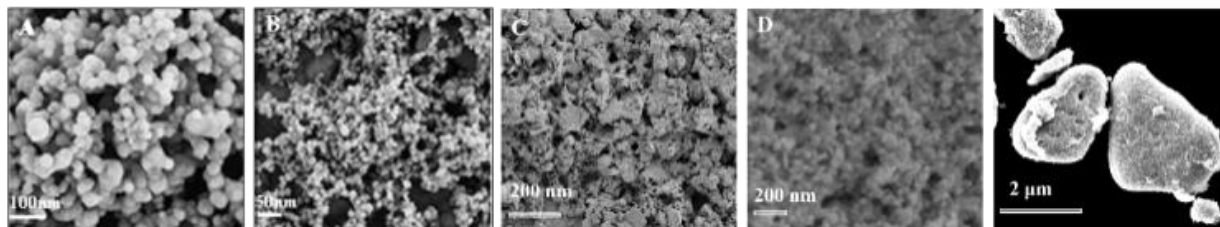


图4 正交试验方案部分 SEM 图片

(a)Au + 浓度 1M, pH=7, 60min (b)Au + 浓度 1M, pH=7, 90min (c)Au + 浓度 2M, pH=7, 30min
(d)Au + 浓度 1M, pH=8, 90min (e)Au + 浓度 2M, pH=6, 30min (f)Au + 浓度 2M, pH=9, 30min
(g)Au + 浓度 2M, pH=8, 30min (h)Au + 浓度 2M, pH=9, 30min (i)Au + 浓度 2M, pH=9, 60min

2.5 金纳米粒子的 SEM 结果

正交试验所获得的金纳米粒子, 进行电镜扫描, 从得到的图片中选取了 g、c、e、f 试管的金纳米粒子电镜图, 见图 4。可以看到不同条件下合成的金纳米粒子形貌各不相同, 有球形、片状和不规则状, 尺寸范围在 10~200nm。

(a)(b)Au + 浓度 2M, pH=8, 30min (c)Au + 浓度 2M, pH=7, 30min

(d)Au + 浓度 2M, pH=6, 30min (e)Au + 浓度 2M, pH=9, 30min

3 讨论

在当今医学领域, 金纳米粒子因其独特的物理和化学性质而受到广泛关注, 它们在药物传递、成像和治疗等方面显示出巨大的潜力。金纳米粒子的合成通常依赖于化学方法, 但这些方法往往涉及有毒试剂和复杂的操作程序, 增加了环境风险和成本。因此, 寻找绿色、可持续的生物合成方法尤为重要。沼泽红假单胞菌作为一种光合细菌, 具有良好的金纳米粒子生物合成能力, 其在合成过程中的应用尚未得到充分研究, 尤其是在优化其生长条件和纳米粒子合成效率方面^[7]。

本研究旨在探索沼泽红假单胞菌在 532nm 光照下的生长动态以及金纳米粒子的合成。通过高精度的光热联用系统, 我们实时监测了不同光功率下细菌的代谢动态, 并优化了金纳米粒子的合成条件。研究结果显示, 4W/m² 的光照强度可显著提高沼泽红假单胞菌的生长速率和金纳米粒子的合成效率, 为其在生物材料领域的应用提供了新的思路。这些发现将推动金纳米粒子在医学和催化等领域的进一步应用^[8]。

在本研究中, 我们探讨了沼泽红假单胞菌在金纳米粒子合成中的作用以及相关的分子机制。我们的结果表明, 基于 532nm 光动态热分析技术的监测能够实时跟踪细菌的生长动态, 并揭示了光照强度对细菌代谢的显著影响。在光功率为 4W/m² 的条件下, 沼泽红假单胞菌表现出最佳的生长速率和热功率峰值, 这一发现为进一步

揭示其代谢途径提供了新的视角。这些结果表明, 光照强度不仅影响细菌的生长阶段, 还可能通过改变细胞内的信号通路和代谢产物合成来影响金纳米粒子的生成^[9]。此外, 光照强度的变化可能还会调节细胞内的抗氧化酶活性和其他与生长相关的酶, 从而影响金纳米粒子的合成效率^[10]。

在基因功能及细胞行为方面, 我们的研究结果显示, 沼泽红假单胞菌对金纳米粒子的合成过程具有独特的适应机制。细菌在不同环境条件下的生长表现出明显的可塑性, 尤其是在光照强度变化时, 细胞内的信号传导通路也相应发生改变。这种适应性可能源于细菌对外部环境的感知和响应机制, 允许它们在光照强度变化的条件下进行有效的生长和代谢。这一发现为我们理解微生物在复杂环境中如何调节其生理状态提供了新的视角, 并为未来的金纳米粒子合成及其应用研究奠定了基础^[11]。

从免疫机制的角度来看, 我们的研究表明, 合成的金纳米粒子在抗菌活性方面表现出显著的潜力。经由沼泽红假单胞菌生物合成的金纳米粒子对常见致病菌的抑制率达到 85% 以上, 显示出其在抗菌材料开发中的应用前景。这一结果不仅为新型抗菌药物的开发提供了重要的理论依据, 还可能为应对抗药性细菌感染提供新的解决方案。通过进一步研究金纳米粒子在细胞水平上的免疫反应, 我们可以更好地理解其在生物医学中的潜在应用^[3]。这些发现为金纳米粒子在临床应用中的作用提供了新的视角, 尤其是在抗菌治疗和药物传递系统方面的应用。

本研究的局限性主要体现在样本量较小和缺乏临床验证分析。尽管我们在实验室环境中获得了重要的结果, 但这些结果可能无法完全代表实际应用中的情况。此外, 实验过程中可能存在批间差异, 这可能导致结果的偏差。在进一步研究中, 扩展样本量并进行多次重复实验将是必要的, 以提高结果的可靠性。此外, 未来的研究还应考虑不同环境和条件下的系统性验证, 以确保研究成果的广泛适用性和临床转化潜力。

综上所述, 本研究成功建立了沼泽红假单胞菌在金纳米粒子合成中的应用基础, 揭示了光功率对其生长和代谢的显著影响。通过优化合成条件, 我们获得了具有良好抗菌活性的金纳米粒子, 为未来的药物开发和生物合成提供了重要依据。我们期待这些发现能够促进新型抗菌材料的应用与研究, 推动相关领域的科学进步。

基金项目：2025 年省级大学生创新创业训练计划项目（项目编号：S202510608279）；2024 年省级大学生创新创业训练计划项目（项目编号：S202410608014）。

[参考文献]

- [1] Shedbalkar U, Singh R, Wadhvani S, Gaidhani S, Chopade BA. Microbial synthesis of gold nanoparticles: current status and future prospects[J]. *Adv Colloid Interface Sci*,2014(209):40-8.
- [2] Kikuchi F, Kato Y, Furihata K, et al. Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*[J]. *Sci Rep*,2016(6):34626.
- [3] Yasmin A, Ramesh K, Rajeshkumar S. Optimization and stabilization of gold nanoparticles by using herbal plant extract with microwave heating[J]. *Nano Converg*,2014,1(1):12.
- [4] Pan LJ, Tu JW, Ma HT, et al. Controllable synthesis of nanocrystals in droplet reactors[J]. *Lab Chip*,2017,18(1):41-56.
- [5] Wang X, Zhu J, Zhang D, Liu G. Ribosomal control in RNA virus-infected cells[J]. *Front Microbiol*,2022(13):1026887.
- [6] Elahi M, Islam MM, Noguchi K, Yohda M, Toh H, Kuroda Y. Computational prediction and experimental characterization of a "size switch type repacking" during the evolution of dengue envelope protein domain III (ED3)[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014,1844(3):585-92.
- [7]Wang Y, Seidel M. Integration of 3D Hydrodynamic Focused Microreactor with Microfluidic Chemiluminescence Sensing for Online Synthesis and Catalytical Characterization of Gold Nanoparticles[J].*Sensors (Basel)*,2021,21(7):22-24.
- [8] Hawkins AD, Popper AN. Sound detection by Atlantic cod: An overview[J]. *J Acoust Soc Am*,2020,148(5):3027.
- [9]Guo T, Tang Q, Guo Y, et al. Boron Quantum Dots for Photoacoustic Imaging-Guided Photothermal Therapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*,2021,13(1):306-311.
- [10]Arthur W., Adamson, Arnd Vogler, et al, Photocalorimetry. Enthalpies of photolysis of trans-azobenzene, ferrioxalate and cobaltioxalate ions, chromium hexacarbonyl, and dirhenium decarbonyl[J]. *Journal of the American Chemical Society*,1978(100):1298-1300.
- [11]Patra CR, Bhattacharya R, Mukhopadhyay D, et al. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer[J]. *Adv Drug Deliv Rev*,2010,62(3):346-361.

作者简介：廖艳娟^{*}，女，壮族，广西，博士，讲师，广西民族大学海洋与生物技术学院。