

研究报告

钩状木霉生物合成纳米银及其杀菌性能

张杰¹ 张映¹ 郭瑞¹ 张琦¹ 杨洪一^{1*} 王滨松^{2*}

(1. 东北林业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150040)

(2. 黑龙江大学化学化工与材料学院 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要:【目的】以钩状木霉为微生物材料合成纳米银粒子, 并对其杀菌性能进行测定。【方法】将钩状木霉与 2 mmol/L 的 AgNO₃ 溶液混合暗培养合成纳米银, 采用 UV-vis、XRD 和 TEM 等方法对纳米银进行表征; 利用原子吸收光谱仪和热重分析仪测定并计算银离子的转化率和纳米银的产率; 以大肠杆菌和枯草芽孢杆菌为受试菌株检测纳米银的杀菌性能。【结果】钩状木霉与硝酸银混合的培养液颜色为红褐色, UV-vis 图谱显示在 420 nm 左右出现了强的吸收峰; XRD 图谱出现了 4 个特征性衍射峰, 分别对应纳米银的 4 个晶面; TEM 照片可以看出纳米银多数为球形, 具有单分散性; 粒度分布仪显示纳米银具有很窄的粒径分布, 在 1–13 nm 之间, 平均粒径为 6.69 nm; 根据原子光谱吸收仪测定的结果得到银的转化率为 84.41%, 根据热重分析结果得到纳米银的产率为 67.12%; 纳米银对大肠杆菌的 MBC 为 10 mg/L, MIC 为 7 mg/L; 对枯草芽孢杆菌的 MBC 为 5 mg/L, MIC 为 4 mg/L。【结论】钩状木霉与 AgNO₃ 溶液混合培养可以合成纳米银。合成的纳米银大小均匀, 粒径小且分布很窄, 具有面心立方结构, 是纯净的, 产率约为 67.12%; 纳米银对枯草芽孢杆菌的致死效果好于对大肠杆菌的致死效果。

关键词: 钩状木霉, 生物合成, 纳米银, 杀菌效果

Biosynthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma hamatum* and antibacterial activity

ZHANG Jie¹ ZHANG Ying¹ GUO Rui¹ ZHANG Qi¹ YANG Hong-Yi^{1*}WANG Bin-Song^{2*}

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

(2. School of Chemistry and Material Sciences, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

Abstract: [Objective] To biosynthesis silver nanoparticles using *Trichoderma hamatum* and detect antibacterial activity of silver nanoparticles. [Methods] Silver nanoparticles were biosynthesized using

Foundation item: National Science Foundation for Fostering Talents in Basic Research of National Natural Science Foundation of China (No. J1210053); National Natural Science Foundation of China (No. 31300573)

*Corresponding author: YANG Hong-Yi: Tel: 86-451-82192073; E-mail: yhyi1@sohu.com

WANG Bin-Song: Tel: 86-451-86608616; E-mail: wangbinsong@hlju.edu.cn

Received: April 18, 2015; **Accepted:** July 31, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 11, 2015

基金项目: 国家自然科学基金国家基础科学人才培养基金项目(No. J1210053); 国家自然科学基金项目(No. 31300573)

*通讯作者: 杨洪一: Tel: 86-451-82192073; E-mail: yhyi1@sohu.com

王滨松: Tel: 86-451-86608616; E-mail: wangbinsong@hlju.edu.cn

收稿日期: 2015-04-18; **接受日期:** 2015-07-31; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-11

Trichoderma hamatum mixed with AgNO_3 and were characterized by UV-vis, XRD and TEM. Thermogravimetric analysis and atomic absorption were used to detected productivity of silver nanoparticle and conversion rate of Ag^+ . Antibacterial activity of silver nanoparticles was detected using *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **[Results]** Culture solution of *Trichoderma hamatum* mixed with AgNO_3 was reddish-brown; UV-vis spectrum showed a significant peak at 420 nm; XRD spectrum showed four peaks, which corresponded to four crystal faces of silver nanoparticles; TEM images suggested that silver nanoparticles were monodisperse with shape in spherical. Size distribution suggested that they had narrow distribution, between 1–13 nm and the average size was 6.69 nm. Atomic absorption showed conversion rate of Ag^+ was 84.41%. Thermogravimetric analysis showed that the productivity of silver nanoparticles was 67.12%. MBC of silver nanoparticle for *E. coli* was 10 mg/L and MIC was 7 mg/L, while for *Bacillus subtilis* was 5 mg/L and 4 mg/L. **[Conclusion]** After mixed with AgNO_3 , *Trichoderma hamatum* can biosynthesis silver nanoparticles. Silver nanoparticles were uniform, cubic and pure. Lethal effect of silver nanoparticles for *Bacillus subtilis* was much greater than that for *E. coli*.

Keywords: *Trichoderma hamatum*, Biosynthesis, Silver nanoparticles, Lethal effect

伴随着环境友好理念的深入人心,生物法合成纳米材料,尤其是纳米银,作为纳米技术和生物技术交叉领域的新兴闪光点,得到了越来越多的关注^[1]。生物合成可以在温和的条件下进行,生物体或者生物质在一定条件下通过氧化还原反应将金属离子还原,整个过程中不仅不需要添加任何化学试剂,还可以充分利用生物资源,具有可持续发展的特征,已成为合成纳米银的一个热点^[2]。目前,用于生物合成的材料主要有细菌、真菌、植物提取物和合成多肽^[3]。细菌是首次被报道可以合成纳米银的微生物体系^[4-6]。但由于银离子和纳米银的广谱抗菌能力,极大地限制了菌源和纳米银的生产效率^[7-8]。真菌不仅具有适应性强的特点,还可以分泌大量的胞外蛋白^[9],使得胞外合成成为可能的同时还可以提高纳米银的产量,更重要的是,实验操作简单、成本低、能耗小,因此利用真菌合成纳米银具有广阔的发展前景。

纳米银具备单分散性、粒径小等纳米材料的特殊性质,抑菌或杀菌效果要比传统的银离子更好,并且纳米银的稳定性也使其在很长的一段时间内都可以保持很强的杀菌性能。目前市场上已经出现抗菌织物,如抗菌纱布,美国生产的纳米银织物(商品名:ACTICOAT)的抗菌性能高于银离子,也优于磺胺嘧啶银^[10];治疗烧伤和烫伤的药膏中也添加

了纳米银,如安柯信(ANSON)纳米银创伤贴。纳米银还可以应用到抗菌内墙涂料中,有效抑制和杀灭环境中的致病菌^[11]。因此研究纳米银的抗菌性能对保护人类健康,改善生活环境具有很重要的意义。

本研究以耐银真菌钩状木霉为实验材料,研究其合成纳米银的能力及纳米银的特征,并考察了所合成纳米银的杀菌能力,以期利用真菌产业化合成纳米银提供有力参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 钩状木霉 NYZJ03, 筛选于东北林业大学帽儿山林场土壤,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC),保藏地址是北京市朝阳区北辰路1号院3号,保藏日期为2014年7月3日,保藏编号为CGMCC9333。

1.1.2 培养基: PDA 配制方法参照文献[12],牛肉膏蛋白胨培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂 20, pH 7.0–7.2。

1.1.3 主要试剂和仪器: 硝酸银, 天津科密欧试剂公司; 实验用水均为灭菌去离子水。

Tu-1901 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器厂; Bruker D8 型 X-射线衍射仪, 德国 Bruker 公司; TECNAIG2 生物透射电子显微镜, 荷兰 FEI 公司; JEM-2010 型高倍透射电子显微镜, 日本

JEOL 公司; NETZSCH TG 209F3 热重分析仪, 德国耐驰公司; GFA-7000 原子吸收分析仪, 日本岛津公司; 马尔文 Nano-zeta sizer 粒度分布仪, 郑州建斌电子科技有限公司; 能量色谱仪, 北京瑞华恒通科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 NYZJ03 的活化: 接种针刮取保存于试管斜面的 NYZJ03, 接种于固体 PDA 培养基上, 28 °C 培养 2–4 d。

1.2.2 纳米银的制备: 刮取活化好的菌丝块, 接种于 200 mL PDA 培养基中, 添加 AgNO₃ 溶液至终浓度为 2 mmol/L, 于 28 °C、120 r/min 暗反应 3–5 d。不添加 AgNO₃ 的菌体培养液作为对照。待实验组溶液颜色发生变化时过滤掉菌丝体, 收集滤液, 于 14 000 r/min 离心 6 min 后收集所得沉淀, 蒸馏水清洗 3 次, 自然风干后研磨备用。

1.2.3 纳米银的表征: 取 4 mL 暗反应结束后的胞外滤液于比色皿中, 采用紫外可见分光光度计对其进行紫外全波长扫描, 不添加 AgNO₃ 的胞外滤液作为空白对照; 将研磨好的粉末置于马弗炉中灼烧 4 h, 然后装载到 XRD 样品载片上进行 XRD 衍射分析, 调整铜 X-射线管的功率为 1.6 kW, 工作电压 40 kV, 扫描速度为 10°/min; 将灼烧后的粉末溶于无水乙醇中, 利用超声清洗器做分散处理, 取少量分散好的溶液滴至透射电镜测试铜网上, 室温密闭干燥, 使得乙醇挥发完全, 然后进行透射电镜和高倍透射电镜分析, 工作电压为 120 V; 利用粒度分布仪对纳米银的粒径进行分析; 采用能量色谱仪对纳米银中的元素进行分析。

(1) 银离子转化率的测定: 原子吸收光谱仪分别测定反应前后银离子的浓度, 具体方法参照文献[13]。银的转化率 η 的计算公式如下:

$$\eta = \frac{C_1 \times n_1 - C_2 \times n_2}{C_1 \times n_1} \times 100\%$$

式中: C_1 : 反应前胞外滤液的银离子浓度; n_1 : 反应前胞外滤液的稀释倍数; C_2 : 反应后胞外滤液的银离子浓度; n_2 : 反应后胞外滤液的稀释倍数。

(2) 纳米银产率的测定: 称量 0.04 g 收集的纳米银沉淀, 于热重分析仪中灼烧, 设置温度为 0–600 °C, 等到沉淀质量不再变化时结束, 根据公式计算纳米银的产率 κ :

$$\kappa = \frac{m_1 \times \chi}{m_0} \times 100\%$$

其中, m_1 是纳米银沉淀的总质量, χ 是纳米银占沉淀总质量的质量分数, m_0 是纳米银的理论产量。

1.2.4 纳米银杀菌性能的测定: (1) 最小杀菌浓度 (MBC) 的确定: 采用滤纸片法。在长满细菌的平皿上放滤纸片, 分别添加 5、10、15、20 mg/L 的纳米银溶液, 添加无菌水作为阴性对照, 置于 37 °C 培养箱中培养 18 h, 通过测量抑菌圈的直径对杀菌效果进行评估, 分别确定大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 MBC。

(2) 最小抑菌浓度 (MIC) 的确定: 分别配制纳米银浓度为 1、3、4、5、7、9、10、11 mg/L 的牛肉膏蛋白胨固体培养基, 取 1 mL 生长到对数期的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌进行涂布, 置于 37 °C 培养过夜, 每个浓度设置 3 组, 观察菌落生长情况, 确定 MIC。

2 结果与分析

2.1 纳米银的合成

未添加 AgNO₃ 的培养液颜色为淡淡的黄色, 添加 2 mmol/L 的 AgNO₃ 溶液暗培养 5 d 后, NYZJ03 菌体培养液的颜色变成了红褐色, 分别如图 1 中插图 B、C 所示。据报道, 土曲霉的二次发酵液^[4]、白腐菌的胞外滤液和二次发酵液^[13]等多种真菌介导纳米银合成时都出现了此种颜色的变化, 该现象的出现是因为纳米银具有 SPR 效应, 该效应决定了其光学特性, 宏观表现就是可以特异性吸收自然光, 所以在生成纳米银时, 溶液会产生棕红色的变化, 这是银纳米粒子产生时的一个典型特征。根据此现象说明 NYZJ03 也合成了纳米银。

图 1 为胞外滤液的紫外全波长扫描图谱。由图

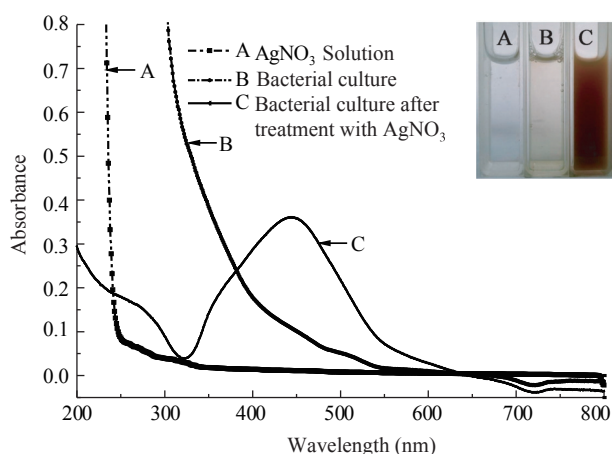


图1 纳米银的 UV-vis 光谱

Figure 1 UV-vis spectrum of silver nanoparticles

1 可见, 添加 AgNO_3 培养后的胞外滤液在 420 nm 左右处出现了强的特征吸收峰, 未添加 AgNO_3 培养的胞外滤液则没有出现吸收峰。吸收峰的出现是因为纳米银的表面存在自由电子运动, 当这种运动与外加电磁波振荡频率相同时就会产生表面等离子共振, 该现象在 UV-vis 全波扫描吸收光谱上就会表现出明显的特征性吸收峰^[15], 进一步证实了纳米银的合成。

2.2 纳米银的表征

2.2.1 XRD 表征: 图 2 为所得纳米银粉末的 XRD 图谱。图中所示在 2θ 角 $20^\circ\sim 80^\circ$ 之间出现了 4 个强的特征衍射峰, 其中, 2θ 值分别对应 38.08° , 44.257° , 64.406° 和 77.452° , 这 4 个衍射峰与卡 (JCPDS File No. 01-1167) 中银的标准图谱十分吻合^[16], 分别对应着 (111)、(200)、(220) 和 (311) 4 个晶面, 表明纳米银结构为典型的面心立方结构。衍射图谱中所出现的衍射峰单一, 没有杂峰, 说明 NYZJ03 合成的纳米银纯净且结晶程度比较好。

2.2.2 TEM 表征: 利用透射电镜和高倍透射电镜对上述获得的粉末进行观察, 电镜照片见图 3。图 3 中 A 为低倍医学透射电镜下纳米银的形貌, 可以看出, 纳米银分散良好, 没有团聚现象, 多数为近球形, 较为均匀, 纳米银周围有许多絮状杂质。B 和 C 为经马弗炉灼烧后的纳米银的透射电镜图, 可

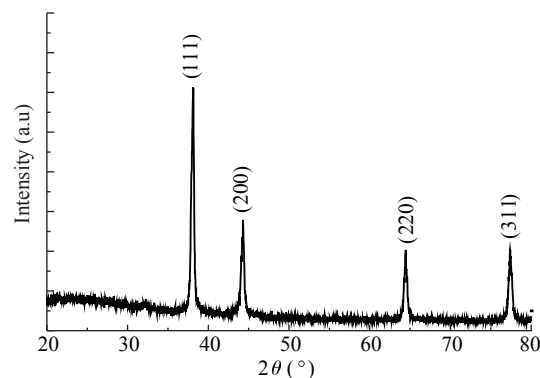


图2 纳米银的 XRD 图谱

Figure 2 XRD spectrum of silver nanoparticles

以看出, 灼烧后纳米银粒径变大, 原因可能是在灼烧的过程中在纳米银表面起作用的保护物质或者稳定物质被燃烧释放, 使得纳米银发生了团聚现象。D 是高倍透射电镜下纳米银的晶格条纹图, Ag 的晶格条纹与 (111) 晶面相吻合, 结合 XRD 图谱可以证实钩状木霉合成的纳米银具有面心立方结构。

2.2.3 纳米银的粒径分布特征: 纳米银的粒径分布直方图见图 4。根据 TEM 照片计数结果得到的直方图如图 4 中 A 所示, 可知纳米银的粒径分布在 1–13 nm 之间, 80% 的粒子粒径小于 9 nm, 平均粒径约为 6.69 nm, 具有非常窄的粒径分布。这与利用 DLS 方法测量得到的分布结果很吻合, 见图 4B。目前利用化学物理方法合成小粒径的纳米银也需要较为严苛的条件, 如添加大量稳定剂和高温搅拌等, Klaus 等^[4]利用施氏假单胞菌合成的纳米银粒径在几纳米到 100 nm 不等, 粒径分布很宽, 而利用钩状木霉的生物合成, 在无需任何化学试剂、温和的条件下就实现了小粒径纳米银的合成, 这是钩状木霉生物合成纳米银很重要的一个优势。

2.2.4 能量色谱分析: 采用能量色谱仪对纳米银粉末中的元素进行分析, 分析结果如图 5 所示。图 5 显示, 在 3 KeV 处出现了特征性吸收峰, 这是银元素的吸收峰, 证实了收集的纳米银粉末中含有大量的银元素。除此之外, 纳米银粉末中还含有 C、O、

Na 等元素, 这是培养基中物质的残留。

2.2.5 银离子的转化率分析: 根据不同浓度银离子的吸光值, 得到的银离子浓度与吸光值的标准曲线如图 6 所示。原子吸收光谱仪测定的反应前菌体胞

外滤液的 OD_{328} 值为 1.486, 根据标准曲线计算得银离子浓度为 $32.9 \mu\text{g/L}$, 反应结束后菌体胞外滤液 OD_{328} 值为 0.239, 得浓度为 $5.13 \mu\text{g/L}$, 根据公式计算得银离子的转化率 η 为 84.41%。

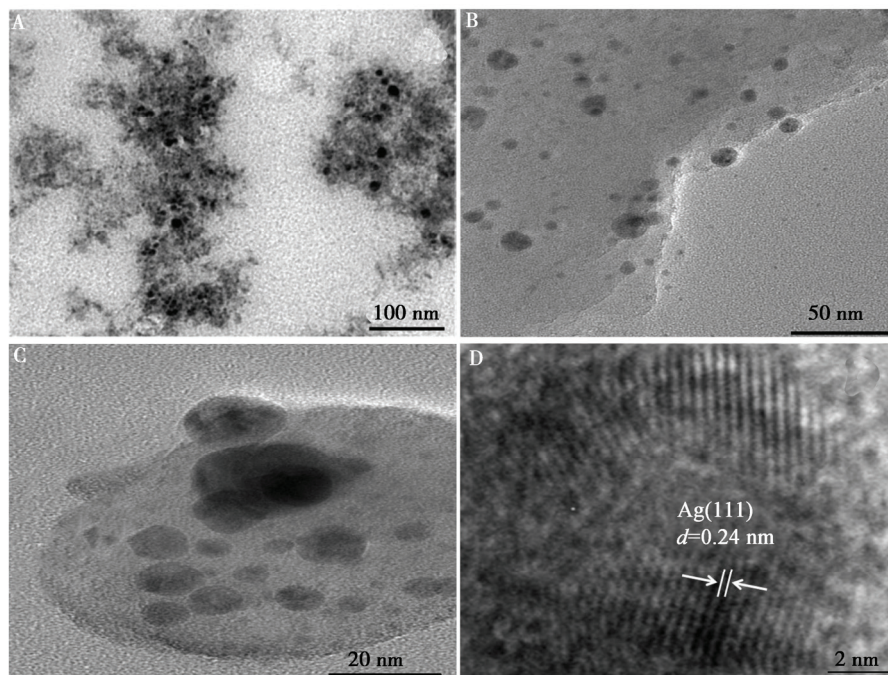


图 3 纳米银的透射电镜及高倍透射电镜照片
Figure 3 TEM and HRTEM images of silver nanoparticles

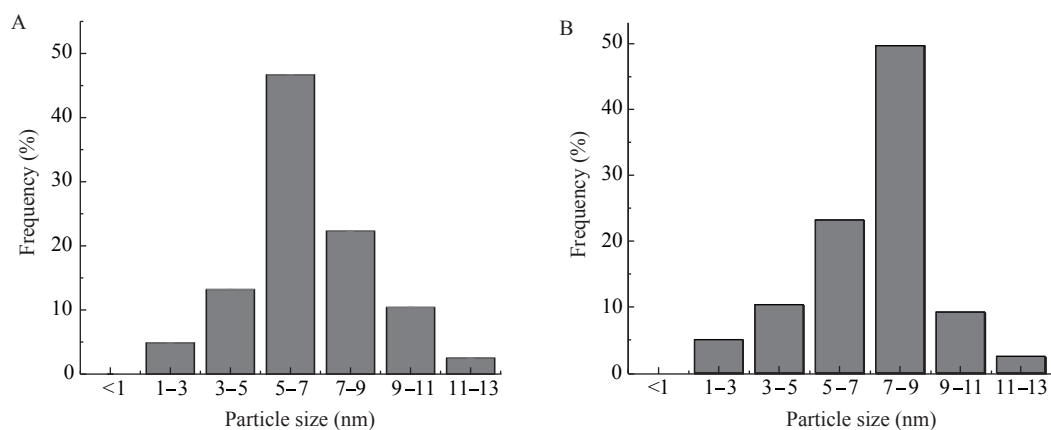


图 4 根据 TEM 照片(A)和粒径分布分析仪(B)得到的纳米银的粒度分布特征
Figure 4 Particle size distribution of silver nanoparticles from TEM images (A) and DLS analysis (B)

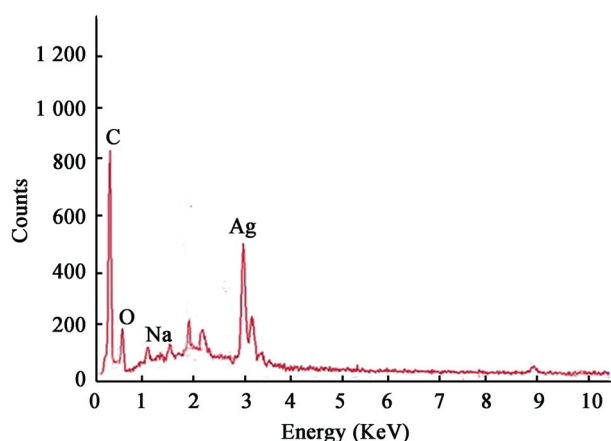
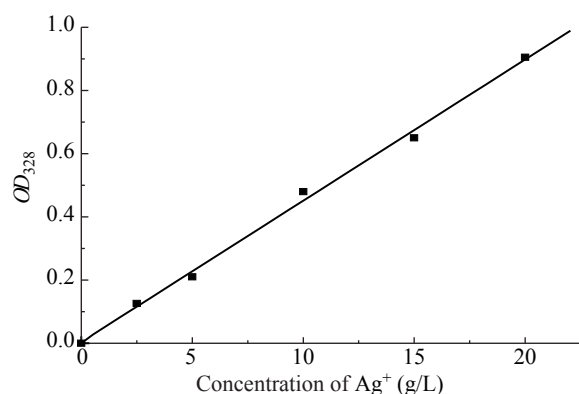


图5 纳米银的 EDS 图谱

Figure 5 EDS spectrum of silver nanoparticles

图6 Ag^+ 浓度与光吸收值的标准曲线Figure 6 Standard curve of Ag^+ concentration and OD_{328} value

2.2.6 纳米银的产率分析: 纳米银的热重分析结果见图7。图7中显示的是质量为0.05 g的纳米银粉末的热重分析曲线,随着温度的升高,粉末的质量逐渐减少,原因可能是因为在加热过程中,粉末中含有的水和有机物等物质燃烧释放了,当温度上升到580 °C时达到热稳定状态,沉淀质量不再损失,此时最终得到的纳米银的质量为离心沉淀质量的58.9%,则纳米银的实际产量为0.029 g,而纳米银的理论产量为 $0.2 \text{ L} \times 2 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 108 \text{ g/mol} = 0.0432 \text{ g}$,根据公式计算纳米银的产率为 $\eta = 67.12\%$ 。离心500 mL菌体外滤液得到0.05 g纳米银粉末,根据纳米银的质量得到纳米银在真菌菌液中的浓度为

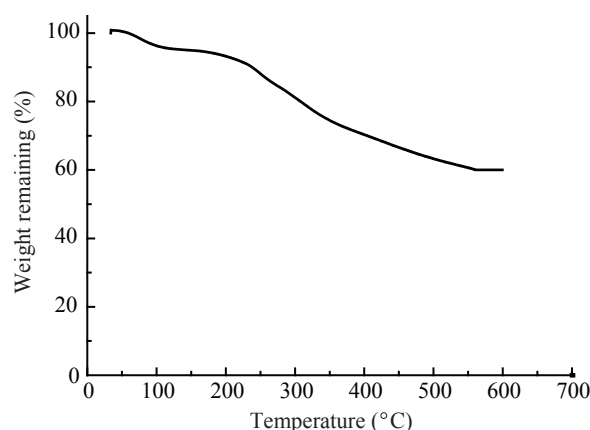


图7 纳米银的热重分析结果

Figure 7 Thermogravimetric analysis of silver nanoparticles

58 mg/L。

2.3 纳米银杀菌性能测定

2.3.1 最小杀菌浓度的测定: 图8显示的是银纳米粒子分别对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌效果图。可以看出,银纳米粒子对这两株菌具有明显的杀菌作用,且随着银纳米粒子浓度的增加,滤纸片周围的透明圈越来越大,即杀菌效果也越来越好。表1为银纳米粒子杀菌透明圈直径。在银纳米粒子浓度为5 mg/L时,大肠杆菌平皿上没有透明圈出现,而枯草芽孢杆菌平皿上开始出现透明圈。在10 mg/L时大肠杆菌刚开始出现透明圈,并且随着银纳米粒子浓度的增大而增大,到20 mg/L时,透明圈直径达到9.1 mm。而枯草芽孢杆菌在5 mg/L时开始出现透明圈,也是随着银纳米粒子浓度的增大而增大,到20 mg/L时达到12 mm。根据单因素方差分析可知, $P = 0.031 < 0.05$,两组数据差异性显著,认为纳米银对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌效果不同,银纳米粒子对枯草芽孢杆菌的毒害作用更强一些。可以认为, NYZJ03 合成的银纳米粒子表现出对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌作用,对大肠杆菌的MBC为10 mg/L,对枯草芽孢杆菌的最小杀菌浓度为5 mg/L。

2.3.2 最小抑菌浓度的确定: 将菌液涂布在含有不同浓度纳米银的LB固体培养基平板上,培养过夜

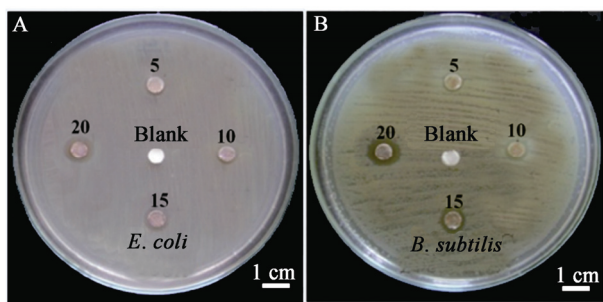


图 8 银纳米粒子对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的杀菌效果图

Figure 8 Antibacterial activity for *E. coli* and *Bacillus subtilis* of silver nanoparticles

表 1 银纳米粒子杀菌透明圈直径
Table 1 Diameter of the inhibition zone (DIZ)

银纳米粒子浓度 Concentration of silver nanoparticles (mg/L)	大肠杆菌透明圈直径 DIZ of <i>E. coli</i> (mm)	枯草芽孢杆菌透明圈直径 DIZ of <i>Bacillus subtilis</i> (mm)
0	5	5
5	5±0.1	6.5±0.2
10	6.1±0.1	7.8±0.1
15	7.9±0.2	9.1±0.2
20	9.1±0.1	12±0.2

Note: $P=0.031<0.05$.

后发现, 大肠杆菌在纳米银浓度 ≥ 7 mg/L 的平板上都没有菌落生长, 在纳米银粒子浓度 ≥ 5 mg/L 的平板上都有菌落出现, 且随着浓度的降低菌落数增多, 确定大肠杆菌的 MIC 为 7 mg/L。同样, 对于枯草芽孢杆菌, 在纳米银浓度 ≥ 4 mg/L 平板上都没有菌落生长, 在纳米银粒子浓度为 3 mg/L 和 1 mg/L 的平板上都有菌落出现, 确定枯草芽孢杆菌的 MIC 为 4 mg/L。

3 讨论

本实验以钩状木霉为实验材料, 与硝酸银混合培养合成了纳米银。纳米银多数为球形或近球形, 大小很均匀, 平均粒径在 6.69 nm 左右, 是面心立方结构, 很纯净没有杂质。尽管需要 3–5 d, 较细菌合成时间长, 但是, 在硝酸银浓度、合成方法、

纳米银的下游纯化及纳米银的粒径等方面都具有一定的优势。钩状木霉 NYZJ03 可以在硝酸银浓度为 2 mmol/L 的 PDA 培养基中生长繁殖并合成纳米银, 表现出比细菌强的抗银性, 硝酸银初始浓度的提高有助于纳米银产率的提高; 合成过程实现了有菌体参与的胞外反应, 与细菌的菌体内部合成相比, 纳米银的收集纯化过程简单; 合成方法操作简单, 无需收集菌体和胞外滤液等前期过程, 并且易于扩大化生产; 更重要的是合成的纳米银具有很窄的粒径分布, 平均 6.69 nm, 具有很重要的应用价值。

本试验中, 银离子的转化率为 84.41%, 而纳米银的产率为 67.12%, 原因可能是一部分银离子被真菌的菌丝体吸附, 一部分银离子会进入到菌体内部, 引起 Ag^+ 浓度的下降, 导致 Ag^+ 转化率增大; 而热重分析只是对胞外滤液中合成的纳米银进行分析, 无法分析菌体吸附和进入到菌体内部的银离子, 导致纳米银产率偏低。虽然纳米银的产率有待于进一步证实, 但是合成纳米银过程操作简单, 易于扩大化生产。此外, 钩状木霉无致病性, 是林场土壤中常见的真菌, 不会对人体造成伤害, 也不会对环境造成任何污染, 是绿色经济的合成方法。

纳米银因其广谱的杀菌能力在生物医药领域具有很重要的应用价值, 因此很有必要对纳米银的杀菌性能进行测定。本试验中, 纳米银对大肠杆菌的 MBC 为 10 mg/L, MIC 为 7 mg/L; 对枯草芽孢杆菌的 MBC 为 5 mg/L, MIC 为 4 mg/L, 该浓度比 Wei 等^[17]报道的银纳米粒子的杀菌浓度小, 表明钩状木霉合成的纳米银杀菌效果更好, 有助于纳米银在生物医药领域的应用。

虽然利用真菌合成纳米银具有一系列优势, 但仍然存在很多问题。(1) 生物合成法还没有实现纳米粒子的大小和形貌控制; (2) 生物法合成及稳定纳米粒子的机理还处于初步研究阶段, 无法实现纳米粒子的大量生产; (3) 生物法合成还是处于实验室研究阶段, 产率问题也没有得到很好的解决, 没有产业化生产, 需要科研工作者进一步研究探索。

参 考 文 献

- [1] Soni N, Prakash S. Microbial synthesis of spherical nanosilver and nanogold for mosquito control[J]. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(3): 1099-1111
- [2] Zheng BY, Huang JL, Sun DH, et al. Research progress on biosynthetic technology of noble metal nanomaterials[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science Edition)*, 2011, 50(2): 378-385 (in Chinese)
郑炳云, 黄加乐, 孙道华, 等. 贵金属纳米材料生物还原制备技术的研究进展[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2011, 50(2): 378-385
- [3] Guo YC, Li HX, Li A, et al. A review for nanosilver bio-preparation and application[J]. *Materials Review*, 2010, 24(12): 76-80 (in Chinese)
郭云驰, 李宏煦, 李安, 等. 纳米银的生物制备及应用进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(12): 76-80
- [4] Klaus T, Joerger R, Olsson E, et al. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(24): 13611-13614
- [5] Vidhu VK, Philip D. Spectroscopic, microscopic and catalytic properties of silver nanoparticles synthesized using *Saraca indica* flower[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 117(1): 102-108
- [6] Tamuly C, Hazarika M, Bordoloi M, et al. Biosynthesis of Ag nanoparticles using pedicellamide and its photocatalytic activity: An eco-friendly approach[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 132(21): 687-691
- [7] Vijayaraghavan K, Nalini SP, Prakash NU, et al. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 94(6): 114-117
- [8] Vijayakumar M, Priya K, Nancy FT, et al. Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 41(2): 235-240
- [9] Santhoshkumar T, Rahuman AA, Rajakumar G, et al. Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors[J]. *Parasitology Research*, 2011, 108(3): 693-702
- [10] Chen MW, Peng XS, Wu LN, et al. Research on antibacteria agents of silver nanoparticles and its application[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2009, 26(4): 424-426 (in Chinese)
陈美婉, 彭新生, 吴琳娜, 等. 纳米银抗菌剂的研究和应用[J]. *中国消毒学杂志*, 2009, 26(4): 424-426
- [11] Nadagouda MN, Iyanna N, Lalley J, et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles using antioxidants from blackberry, blueberry, pomegranate, and turmeric extracts[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, 2(7): 1717-1723
- [12] Saxena A, Tripathi RM, Zafar F, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous solution of *Ficus benghalensis* leaf extract and characterization of their antibacterial activity[J]. *Materials Letters*, 2012, 67(1): 91-94
- [13] Chan YS, Mat Don M. Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(1): 282-288
- [14] Li GQ. Fungus-mediated green synthesis of nano-material using *Aspergillus terreus* and their applications[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jinlin University, 2012 (in Chinese)
李广泉. 土曲霉介导的纳米材料生物还原制备及其应用的研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2012
- [15] Mehmood A, Murtaza G, Bhatti TM, et al. Enviro-friendly synthesis of silver nanoparticles using *Berberis lycium* leaf extract and their antibacterial efficacy[J]. *Acta Metallurgica Sinica-English Letters*, 2014, 27(1): 75-80
- [16] Suvith VS, Philip D. Catalytic degradation of methylene blue using biosynthesized gold and silver nanoparticles[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 118(2): 526-532
- [17] Wei XT, Zhou HC, Xu L, et al. Sunlight-induced biosynthesis of silver nanoparticles by animal and fungus biomass and their characterization[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2014, 89(2): 305-311