

柠檬酸钠-施氏假单胞菌还原制备纳米银及抑菌活性研究

郭文阳, 周留柱, 岳丹丹, 潘梦诗, 张宗源, 王雪妍, 亓兰达, 张英涛*
(河南省科学院生物研究所有限责任公司, 郑州 450008)

摘要: 以硝酸银为原料, 利用柠檬酸钠联合施氏假单胞菌还原法制备纳米银, 并对纳米银的紫外吸收特性、微观形貌、物相组成, 以及其稳定性和抑菌性进行了分析。结果表明, 与单独柠檬酸钠制备的纳米银相比, 联合还原法制备的纳米银有明显的紫外吸收峰, 其粒径的整体大小减小了约 10 倍, 稳定性同步增强, 制备效率提高了 26.7%; 抑菌实验表明, 联合法制备的纳米银对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌性分别提高了 62.5% 和 77.5%。

关键词: 纳米银; 制备; 施氏假单胞菌; 柠檬酸钠; 抑菌性

中图分类号: O614.122; TB383.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0676(2023)02-0050-07

Preparation of nano-silver by sodium citrate - *Pseudomonas stutzeri* reduction and its antibacterial activity

GUO Wenyang, ZHOU Liuzhu, YUE Dandan, PAN Mengshi,
ZHANG Zongyuan, WANG Xueyan, QI Landa, ZHANG Yingtao*
(Henan Academy of Science Institute of Biology Co. Ltd., Zhengzhou 450008, China)

Abstract: Nano-silver was prepared by sodium citrate combined with *Pseudomonas stutzeri* reduction method using silver nitrate as the starting material. The ultraviolet absorption characteristics, microscopic morphology, phase composition, stability and antibacterial properties of nano-silver were analyzed. The results showed that compared with the nano-silver prepared by sodium citrate alone, the nano-silver prepared by the combined reduction method exhibited an obvious ultraviolet absorption peak and the overall size of the particle size was reduced by about 10 times and the stability was also enhanced. In addition, the preparation efficiency was improved. More importantly, its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* increased by 62.5% and 77.5%, respectively.

Key words: nano-silver; preparation; *pseudomonas stutzeri*; sodium citrate; antibacterial activity

纳米银独特的物理和化学性质, 在抑菌、催化、生物医药等领域均有应用^[1-3]。制备纳米银的方法主要分为物理法、化学法和生物法, 其中物理法成本较高, 工业中一般采用化学法制备纳米银。化学法中常用的还原剂包括硼氢化钠、柠檬酸钠、多元醇、抗坏血酸、还原糖等^[4-6], 综合考虑环保、成本、可行性等方面的因素, 选择柠檬酸钠作为还原剂制备纳米银具有明显的比较优势。

近年来, 生物法制备纳米银因其条件温和、绿色环保、成本低廉等优势, 逐渐成为研究热点^[7-9], 其中利用微生物制备纳米银的方式是生物法中的重要方向, 在相关研究中, 细菌是最早报道用于合成纳米银的微生物物种, 随之研究发现的具有合成纳米银能力的细菌种类也较多, 比如施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)^[10]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[11]、芽孢杆菌 (*Bacillus Subtilis*)^[12]、乳酸杆菌

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 河南省科学院科研开发专项(200605087, 220605087)

第一作者: 郭文阳, 男, 助理研究员; 研究方向: 生物学功能材料; E-mail: 1684860557@qq.com

*通信作者: 张英涛, 男, 高级工程师; 研究方向: 功能材料开发应用; E-mail: 2251316831@qq.com

(*Lactobacillus*)^[13]、台湾假单胞菌(*Pseudomonas taiwanensis*)^[14]、革兰氏阴性菌(*S. oneidensis* MR-1)等^[15]。对比发现,施氏假单胞菌可以耐受 Ag^+ 浓度较高,可达到 50 mmol/L,在生长过程中分泌在细胞周质空间中的蛋白可作为稳定剂,与溶液中生成的纳米银粒子结合,起到稳定纳米银的作用^[10],是一种比较有潜力的制备纳米银的细菌。

细菌易于培养、繁殖速度快、培养成本低,是合成纳米银的主要载体,其合成方法分为胞内法和胞外法,两者主要是合成纳米银的过程在菌体内和体外的差别。微生物介导制备纳米银的过程被认为是菌体抵抗银离子杀伤的结果,以微生物的酶体系为基础,通过氧化还原作用将银离子解毒并产生相应的纳米银^[10,15],因而胞内法需要考虑银离子对菌株的杀灭作用。一般情况下,菌株对银离子浓度的承受能力较小,这就限制了纳米银的制备和规模化。胞外法不依赖菌株的活性,主要依靠其培养液中释放的蛋白、还原多糖和分泌酶之类的物质以获得稳定的纳米银,是一种比较高效的生物合成纳米银的方法^[16-17],其机理可能是细菌分泌的蛋白对还原 Ag^+ 起到了关键作用,并且这些物质可以覆盖在纳米银粒子表面,增加其稳定性^[18-19]。

综上,本研究尝试利用柠檬酸钠结合施氏假单胞菌胞外产物的方法制备纳米银并分析相关特性,旨在优化纳米银的绿色生产工艺,降低生产成本,为未来纳米银的大规模制备奠定理论基础。

1 实验

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

硝酸银、柠檬酸钠、氯化钠均购买于郑州派尼化学试剂厂;蛋白胨、酵母粉、琼脂均购买于北京奥博星生物技术有限责任公司。施氏假单胞菌购买自中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC);大肠杆菌和金黄色葡萄球菌由河南省科学院生物研究所有限责任公司提供。

GLB 培养液:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,不含柠檬酸钠。NM 培养液:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,柠檬酸钠 10 g/L。NMS 溶液:利用 NM 培养液培养施氏假单胞菌之后的上清液。LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母浸粉 5 g/L,氯化钠 10 g/L,琼脂 15 g/L(固体培养基)。以上培养液和培养基的 pH 均为 7.0 ± 0.5 ,在 121 °C 条件下高温高压

蒸汽灭菌 20 min 后使用。

1.1.2 仪器

ZQZ8-C8 型恒温振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;SX-700 蒸汽灭菌锅,日本 Takara Tomy 公司;KQ-500DE 型台式数控超声清洗器,东莞市科桥超声波设备有限公司;Eppendorf 5810R 型高速冷冻离心机,德国艾本德股份公司。

Nano Drop 2000 型超微量紫外分光光度计(UV-Vis),美国赛默飞世尔科技公司;JEM-1200EX 型透射电子显微镜(TEM),日本 JEOL 公司;Nano ZS90 型激光粒径仪,英国马尔文公司;电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS),美国安捷伦公司;Varioskan Flash 酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司;BRUKER D8 型 X 射线粉末衍射仪(XRD),德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 系列纳米银的制备

参照文献研究^[20]和前期探索,底物 AgNO_3 浓度在 2.0 mmol/L,静置光照的条件下制备纳米银效果较好,故本实验体系设定体积为 100 mL,以 AgNO_3 溶液为原料,设定初始浓度为 1.0、2.0、5.0 mmol/L,添加柠檬酸钠为主要还原剂或施氏假单胞菌上清液。具体实验设计如表 1 所示。将实验组全部放入 30 °C 恒温培养箱中,在光照条件下静置反应 24 h,之后对各实验组合成纳米银的情况进行表征分析。

表 1 各实验组的组成

Tab.1 Composition of each experimental group

实验组	AgNO_3 /(mmol/L)	溶液
A	1.0, 2.0, 5.0	水
B	1.0, 2.0, 5.0	GLB
C	1.0, 2.0, 5.0	NM
D	1.0, 2.0, 5.0	NMS

1.2.2 纳米银的表征分析

UV-Vis 测定:纳米银溶液样品超声处理 5 min,吸取 2.0 μL ,滴在紫外光度计的检测台上,设定 300~800 nm 全波长检测范围测定。TEM 形貌测定:封口膜铺在玻璃片上,铜网固定在封口膜上,用移液器吸取 10 μL 超声后的样品滴在铜网上,10~15 min 之后用滤纸吸走多余液体,待铜网自然晾干后放在样品台上观察。粒度测定:吸取超声后样品约 2.0 mg,加入 1.0 mL 纯水使样品分散均匀,放入激光粒度仪进行测量。XRD 测定:利用冷冻干燥机将纳米银样品冻干成粉末,保持均匀干燥无明显颗粒

状,平铺在制样框的窗口中,摊匀堆好后用抹刀压紧样品,清除多余凸出粉末,得到十分平整的样品粉末平面,放在衍射仪的方形载物台上测定。FTIR测定:取 1.0 mg 冷冻干燥后的粉末样品,和 100 mg 的干燥 KBr 一同放入研钵中充分研磨均匀,用压片机压成透明的薄片后测量。

1.2.3 纳米银抑菌性研究

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在液体 LB 中培养成菌液,之后均匀的涂布到不含氯化钠的 LB 固体培养基平板,放置灭过菌的牛津杯于平板上,分别取 100 μ L 制备得到的纳米银溶液加入牛津杯中,在 30 $^{\circ}$ C 条件下恒温培养。通过观察抑菌透明圈的大小对比纳米银的抑菌性。同时,各取 1.0 mL 纳米银溶液,加入到 100 mL GLB 培养液中,分别接种大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,观察此两种常规致病菌的生长情况,分析纳米银的抑菌性。

2 结果和讨论

2.1 纳米银的形貌和结构分析

2.1.1 紫外可见吸光度分析

为使制备纳米银的效果对比更加直观,仅对 AgNO_3 浓度为 1.0 和 5.0 mmol/L 的各实验组制备纳米银溶液进行了 UV-Vis 分析,结果如图 1~2 所示。

从图 1 可知,在 300 nm~700 nm 的紫外波段范围内, AgNO_3 浓度为 1.0 mmol/L 时,A、B、C 实验组均没有出现紫外吸收峰,而 D 组溶液出现紫外吸收峰,意味着溶液中有纳米银生成^[21-22]。由图 2 可知, AgNO_3 浓度为 5.0 mmol/L 的 A 和 B 组,也未出现明显的特征吸收峰,表明在光照条件下,单一 AgNO_3 溶液和添加 AgNO_3 的 GLB 培养液均不会生成纳米银,因此由实验 A、B 组的结果可排除胰蛋白胨、酵母浸粉和硝酸银对实验结果的影响。众所周知,柠檬酸钠可作为一种还原剂和分散剂能将 Ag^+ 还原成 Ag 单质,C 和 D 组溶液中应当能生成纳米银,然而图 1 中仅 D 组出现了明显的紫外吸收峰,推测可能是因为是在实验进行的 24 h 内,施氏假单胞菌上清液中存在相关的酶及还原性物质有助于将溶液中的银离子还原成纳米银,此与文献^[23]的研究结果相一致。

由图 2 可以看出,添加 AgNO_3 浓度为 5.0 mmol/L 的 C 组和 D 组出现了很强烈的紫外吸收峰,且 D 组的吸收峰强度高于 C 组,经计算,D 组中纳米银的浓度相比于 C 组提高 26.7%。另外,C 组的

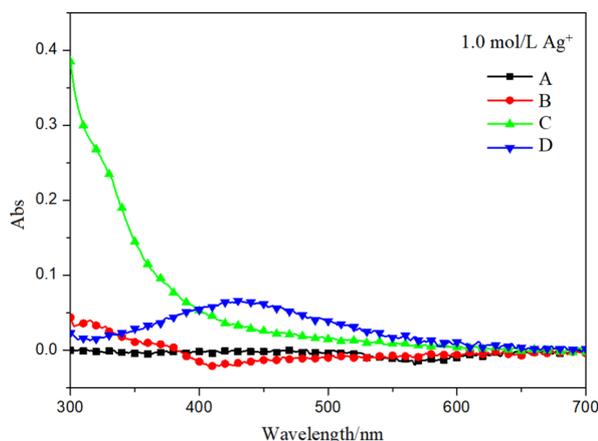


图 1 添加 1.0 mmol/L 银离子制备纳米银的 UV-Vis 光谱图

Fig.1 UV-Vis spectra of nano silver prepared by adding 1.0 mmol/L silver ion

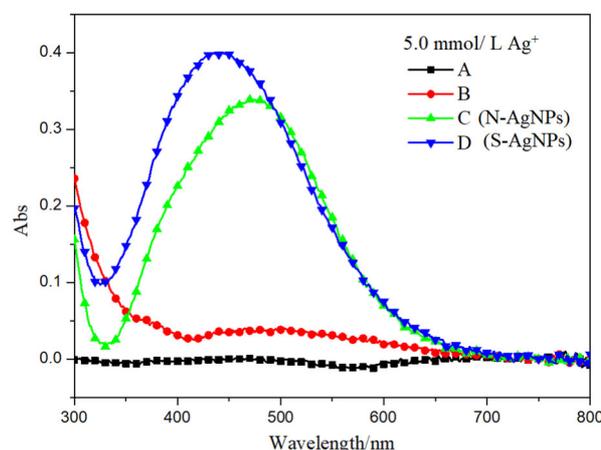


图 2 添加 5.0 mmol/L 银离子制备纳米银的 UV-Vis 光谱图

Fig.2 UV-Vis spectra of nano silver prepared by adding 5.0 mmol/L silver ion

最大紫外吸收峰处于 465~485 nm 的波长范围内,D 组的处于波长 430~450 nm 之间,C 组溶液发生了红移现象。由于表面等离子体共振吸收峰对应的波长越小,其粒子直径越小,说明 C 组溶液中银颗粒大于 D 组^[24]。将 C 组柠檬酸钠培养液制备的纳米银记为 N-AgNPs,将 D 组含有施氏假单胞菌胞外产物的柠檬酸钠培养液制备的纳米银记为 S-AgNPs。由以上 UV-Vis 光谱图可知,在同等银离子浓度下,施氏假单胞菌胞外产物可促进纳米银的生成,并有助于形成小颗粒纳米银,提高其溶液的稳定性。实验选用添加 5.0 mmol/L AgNO_3 实验组制备的 N-AgNPs 和 S-AgNPs,进行后续表征和特性分析。

2.1.2 X 射线衍射分析(XRD)

采用 XRD 对制备的纳米银进行分析(图 3)。

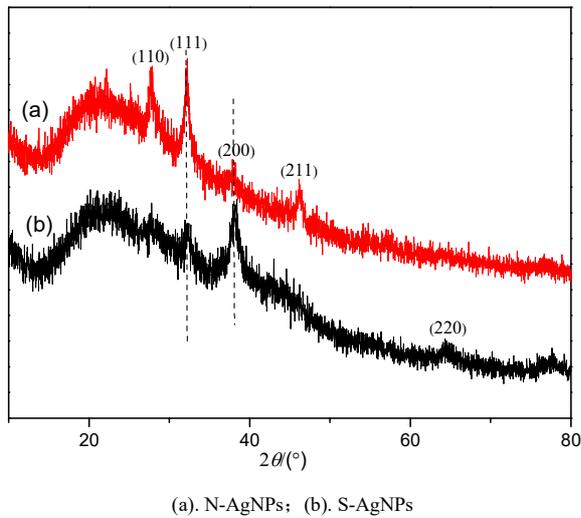


图 3 纳米银的 XRD 图谱

Fig.3 XRD pattern of nano silver

图 3 中谱线(a)显示 2θ 在 27.2° 、 32.6° 、 38.3° 、 46.5° 处出现 X 射线衍射峰，与标准氧化银卡片(JCPDS No.41-1104)中(110)、(111)、(200)、(211)的峰位置相对应，并且其中三个吸收峰与面心立方(FCC)结构的标准氯化银卡片(JCPDS NO.31-1238)中(111)、(200)、(220)的峰位置相对应，表明 N-AgNPs 中纳米银的主要存在形式为化合物 Ag_2O 和 $AgCl$ 。图 3 中 S-AgNPs 谱线(b)显示 2θ 在 32.3° 、 38.2° 、 64.2° 处出现 X 射线衍射峰，与标准晶态银卡片(JCPDS No.04-0783)中(111)、(200)、(220)的晶面相对应，表明 S-AgNPs 溶液中的主要合成产物为纳米银晶体，呈面心立方结构^[25]。

对比发现，S-AgNPs 的纳米银未被氧化，也并没有 $AgCl$ 生成。根据已有的研究，在生物法制备纳米银的过程中，溶液中的蛋白会包裹在纳米银表面形成包裹层，增加纳米银稳定性^[11]，因此推测施氏假单胞菌胞外产物中很可能存在特定还原性酶或蛋白，在 Ag^+ 被还原成银单质的同时，及时在纳米银表面形成包裹层，隔绝溶液中少量 Cl^- 与其接触生成 $AgCl$ 或者防止制备的纳米银被氧化成 Ag_2O 。

2.1.3 透射电镜分析(TEM)

利用 TEM 对合成的纳米银尺寸和形貌进行表征，结果如图 4 所示。由图 4 可见，N-AgNPs 的纳米银出现明显聚集，银颗粒的粒径较大，推测是反应体系中生成的 Ag_2O 较多，稳定性不足；而 S-AgNPs 中纳米银颗粒的粒径相对均一，大多集中在 30 nm 左右，且比较分散。结合 UV-Vis 和 XRD 图的结果，S-AgNPs 的纳米银纯度高，粒径小，粒径

分布较窄且分散性良好。推测原因可能是施氏假单胞菌上清液中存在某些生物分子可以覆盖在纳米银粒子表面，防止粒子团聚，增强其稳定性。

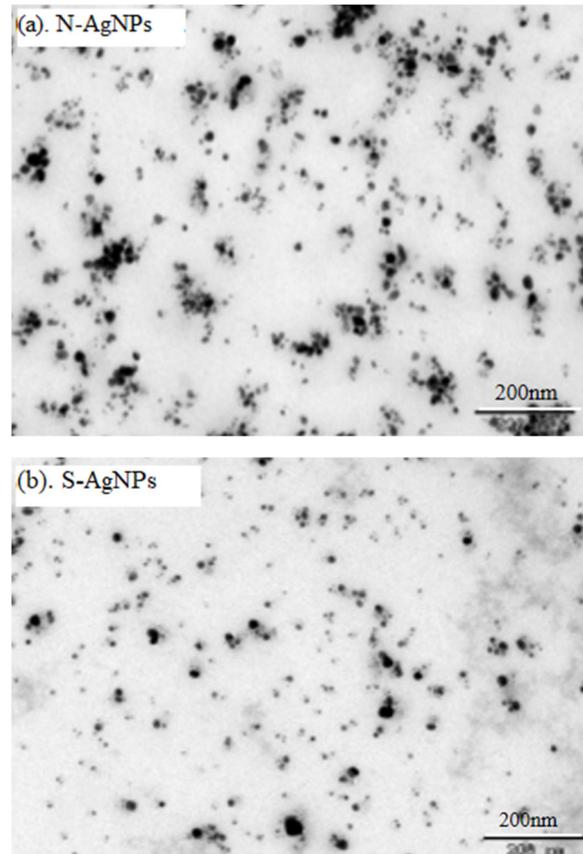


图 4 纳米银的 TEM 图像

Fig.4 TEM images of silver nanoparticles

2.1.4 动态光散射粒径(DLS)分析

用马尔文粒径分析仪测定 N-AgNPs 和 S-AgNPs 溶液中纳米银粒子的 DLS 粒径，如图 5 所示。

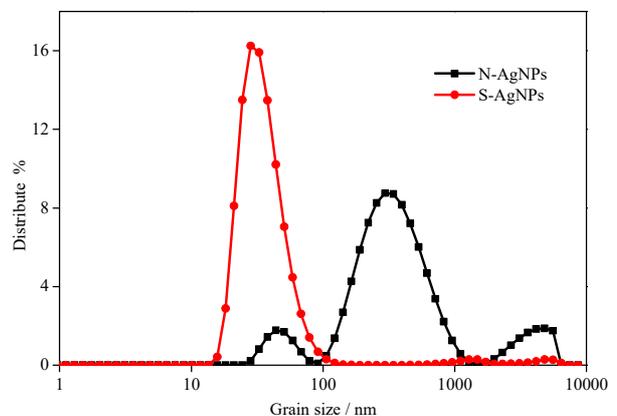


图 5 纳米银的 DLS 粒径分布图

Fig.5 DLS particle size distribution of silver nanoparticles

由图 5 可知, N-AgNPs 的 DLS 粒径分布为: 粒径<100 nm 占比 8.2%、100~1000 nm 之间占比 80.5%、粒径>1000 nm 占比 11.3%; S-AgNPs 的 DLS 粒径则主要集中在 15~50 nm 之间, 占比 87.83%, 并且粒径在 100 nm 以下的占比达到 97.0%。综合对比, S-AgNPs 的粒径分布较窄, 且粒径多集中在 50 nm 以下, 优于 N-AgNPs。这与 UV-Vis、TEM 的结果相对应, 可以断定施氏假单胞菌无菌上清液中胞外产物的确有利于反应体系生成小粒径纳米银, 且使得粒径分布变窄。

2.1.5 红外光谱分析

为进一步分析施氏假单胞菌的胞外产物提高制备纳米银的机制, 对合成的纳米银溶液进行 FTIR 表征分析, 结果如图 6 所示。

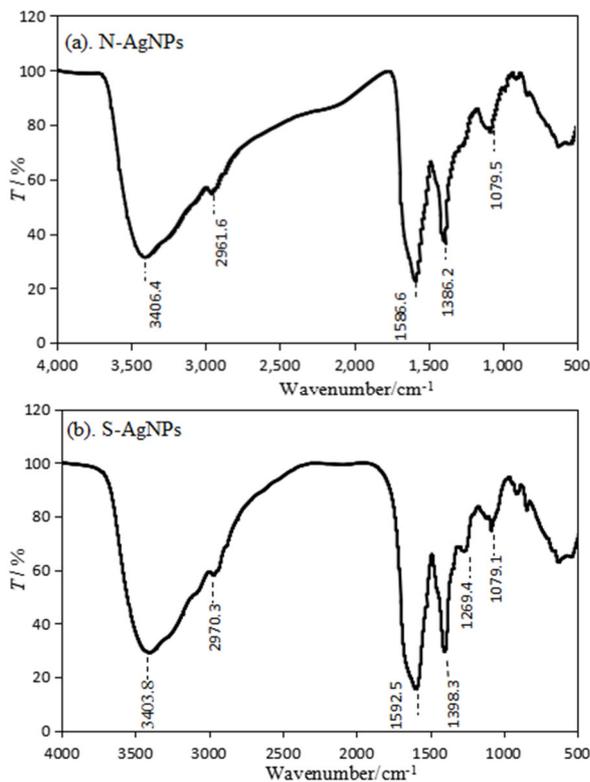


图 6 纳米银的 FTIR 图谱

Fig.6 FTIR spectra of silver nanoparticles

图 6(a)显示 N-AgNPs 红外光谱在 3406.4 cm^{-1} 、 2961.6 cm^{-1} 、 1586.6 cm^{-1} 、 1386.2 cm^{-1} 、 1079.5 cm^{-1} 波长处出现特征吸收峰; 图 6(b)显示 S-AgNPs 在 3403.8 cm^{-1} 、 2970.3 cm^{-1} 、 1592.5 cm^{-1} 、 1398.3 cm^{-1} 、 1269.4 cm^{-1} 、 1079.1 cm^{-1} 处出现了特征吸收峰, 分别对应着 N-H ($3500\sim 3100\text{ cm}^{-1}$), C-H ($3000\sim 2900\text{ cm}^{-1}$), C-N($1420\sim 1390\text{ cm}^{-1}$)和 C-OH($1320\sim 1210\text{ cm}^{-1}$), 这几种吸收峰基本上是培养液中添加的胰蛋白胨里

氨基酸成分, 柠檬酸钠成分中-COOH、-NH₂、-OH 等官能团所产生的特征吸收峰。对比图谱 6(a)(b)发现, S-AgNPs 溶液在 $1300\sim 200\text{ cm}^{-1}$ 的波长区间也出现了吸收峰, 意味着施氏假单胞菌的胞外产物蛋白的结构中存在酚-OH 或醇-OH 类物质, 前者具有还原性, 有助于将 Ag⁺还原成 Ag, 可在一定程度上促进纳米银的生成; 后者在水溶液中呈弱碱性, 有利于纳米银颗粒稳定在小粒径的状态, 这与文献一致^[26], 即在酸性条件下, 纳米银粒子倾向于聚集, 而碱性条件下更有助于生成小粒径的纳米银。

2.2 抑菌活性分析

对于 N-AgNPs 和 S-AgNPs 溶液, 利用生长曲线法研究其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑菌效果, 结果如图 7、8 所示。

从图 7、8 可知, 在实验的 12 h 内, 相比于不添加 N-AgNPs 和 S-AgNPs 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌实验组(CK 组), 添加 N-AgNPs 和 S-AgNPs 之后, 两种细菌基本均处于停滞生长状态, 此意味着纳米银有良好的抑菌效果。由图 7、8 生长曲线的内插放大图可知, 两种纳米银对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长的抑制程度有些许差异, 小粒径的

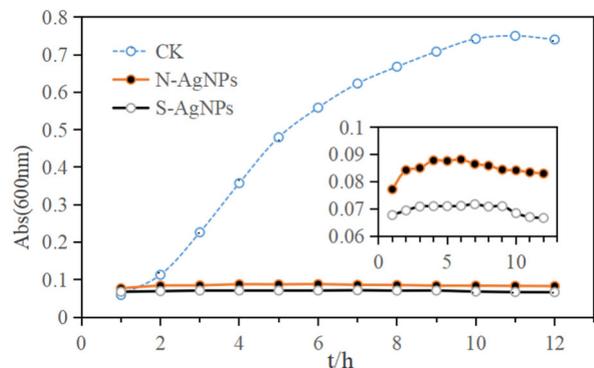


图 7 大肠杆菌的抑制生长曲线

Fig.7 Inhibitory growth curve against *Escherichia coli*

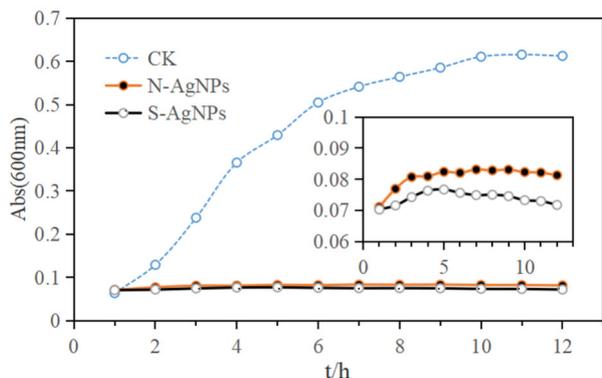


图 8 金黄色葡萄球菌的抑制生长曲线

Fig.8 Inhibitory growth curve against *Staphylococcus aureus*

S-AgNPs 抑菌性优于 N-AgNPs。对于同一种细菌, 具有较大比表面积的小颗粒纳米银往往会表现出更高的抑菌活性, 与前人的研究相一致^[27-28]。

通过牛津杯平板实验法, 分析了 N-AgNPs 和 S-AgNPs 的抑菌效果, 其中每个平板上的两个牛津杯均为同一个平行处理。对于金黄色葡萄球菌的培养平板, 添加 S-AgNPs 的抑菌圈明显大于 N-AgNPs 的, 大肠杆菌实验组也是类似的结果。之后分别测量了各实验组抑菌圈的直径, 计算平均值并作误差分析, 得到 N-AgNPs 和 S-AgNPs 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈平均分别为 16.8 ± 1.4 mm 和 27.3 ± 1.8 mm, 对大肠杆菌的抑菌圈平均分别为 8.0 ± 0.6 mm 和 14.2 ± 1.4 mm, 纳米银对这两种致病菌均有不同程度的抑制效果。在同等条件下, S-ANPs 相对于 N-AgNPs, 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果提高 62.5%, 对大肠杆菌的抑菌效果提高 77.5%。研究表明, 生物合成的纳米银通过释放银离子作用于细菌的细胞膜、呼吸链然后形成自由基等方式起到抗菌作用, 其抗菌性与粒径大小、浓度和形貌等因素有关^[29-31]。因此, 推测 N-AgNPs 和 S-AgNPs 产生以上抑菌效果差异的原因可能是由于 S-AgNPs 的粒径较小, 比表面积大, 且比较分散所导致, 使得其可以充分接触大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 同时因电荷作用吸附在菌体表面为下一步进入细胞内部, 破坏细胞蛋白结构使菌体失活提供更多便利性。

3 结论

1) 利用施氏假单胞菌联合柠檬酸钠还原制备纳米银, 施氏假单胞菌胞外产物可作为还原剂和分散剂, 有助于纳米银的产生, 提高制备效率, 并且随着银离子浓度的增加, 促进效果更加明显。

2) 相比于单纯的柠檬酸钠实验组, 含有施氏假单胞菌胞外产物的实验组生成 100 nm 以下粒径范围的纳米银含量提高了 10 倍, 在同等条件下制备纳米银的产量提高 26.7%。

3) 同等条件下, 制备的纳米银对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性比柠檬酸钠组分别提高了 62.5% 和 77.5%。

参考文献:

[1] PING C, WEI L, XIAO X C, et al. Multifunctional silver film with superhydrophobic and antibacterial properties[J]. Nano Research, 2016, 9(2): 442-450.
[2] 薛文强, 于世平. 纳米银的抗菌机制及临床应用研究

[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(1): 117-120.
XUE W Q, YU S P. Antibacterial mechanism and clinical application of silver nanoparticles[J]. Chinese Journal of Microecology, 2022, 34(1): 117-120.
[3] 张弘弛, 赵翊婷, 廉佳佩, 等. 合成纳米银活性黄芪内生真菌筛选及其抑菌作用研究[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1665-1670.
ZHANG H C, ZHAO Y T, LIAN J P, et al. Screening and antibacterial effect of synthetic nano-silver active astragalus endophytes[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2022, 44(5): 1665-1670.
[4] SAMARI F, DOROSTKAR S. Synthesis of highly stable silver nanoparticles using imidazolium-based ionic liquid[J]. Journal of the Iranian Chemical Society, 2016, 13(4): 689-693.
[5] 刘顺彭, 梁真飞, 王欢, 等. 树叶状纳米银的电化学制备及表面拉曼增强效应[J]. 人工晶体学报, 2014, 43(7): 1751-1755.
LIU S P, LIANG Z F, WANG H, et al. Electrochemical preparation of leaf-shaped silver nanoparticles and surface enhanced Raman scattering[J]. Journal of Synthetic Crystals, 2014, 43(7): 1751-1755.
[6] SINGHA D, BARMAN N, SAHU K. A facile synthesis of high optical quality silver nanoparticles by ascorbic acid reduction in reverse micelles at room temperature[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2014, 413: 37-42.
[7] ELEMIKE E E, ONWUDIWE D C, EKENNIA A C, et al. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial effect of silver nanoparticles obtained using Lavandula x intermedia[J]. Research on Chemical Intermediates, 2017, 43(3): 1383-1394.
[8] AISIDA S O, UGWU K, AKPA P A, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using bitter leave (Veronica amygdalina) for antibacterial activities[J]. Surfaces and Interfaces, 2019, 17: 100359.
[9] SUN Q, QIU S, GU H, et al. Biosynthesis, characterization and biological activities of silver nanoparticles from pogostemon cablin benth. methanolic leaf extract[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2019, 19(7): 4109-4115.
[10] KLAUS T, JOERGER R, GRANQVIST O. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(24): 13611-13614.
[11] SATHIYANARAYANAN G, KIRAN G S, SELVIN J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine Bacillus subtilis MSBN17 [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 102: 13-20.

- [12] 王家浩, 李永磊, 党健, 等. 具有纳米银合成能力菌株的筛选及其抑菌效果[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(9): 40. WANG J H, LI Y L, DANG J, et al. Screening of strain with nano-silver synthesis ability and its bacteriostasis effect[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(9): 40.
- [13] RAJESH S, DHARANISHANTHI V, VINOTH K A, et al. Antibacterial mechanism of biogenic silver nanoparticles of *Lactobacillus acidophilus*[J]. Journal of Experimental Nanoscience, 2015, 10(15): 1143-1152.
- [14] BEELER E, CHOY N, FRANKS J, et al. Extracellular synthesis and characterization of silver nanoparticles from alkaliphilic *Pseudomonas* sp.[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2020, 20(3): 1567-1577.
- [15] 谈碧玉, 石先阳. Ag₂S/rGO 纳米复合材料的细菌还原制备及光电性能研究[J]. 贵金属, 2021, 42(3): 1-9. TAN B Y, SHI X Y. Study on bacterial reduction preparation and photoelectric properties of Ag₂S/rGO nanocomposites [J]. Precious Metals, 2021, 42(3): 1-9.
- [16] 张曼莹, 刘姿钺, 邬艳君. 纳米银的生物合成及应用进展[J]. 科技创新导报, 2017, 14(23): 122-124. ZHANG M Y, LIU Z Y, WU Y J. Progress in biosynthesis and application of silver nanoparticles[J]. Science and Technology Innovation Herald, 2017, 14(23): 122-124.
- [17] AJAH H A, KHALAF K J, HASSAN A S, et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Haemophilus influenzae* and their antimicrobial activity[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2018, 10(1): 175.
- [18] KUMAR C G, MAMIDYALA S K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Colloids & Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 84(2): 462-466.
- [19] KATRIN Q, MIGUEL A, ERNESTINA C L. Controllable biosynthesis of small silver nanoparticles using fungal extract[J]. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2016, 7(2): 118-125.
- [20] 姚薇, 曲明星, 崔晓慧, 等. 木霉菌合成银纳米粒子条件的优化及其对甜瓜尖孢镰刀菌抑制作用[J]. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1859-1868. YAO W, QU M X, CUI X H, et al. Optimization of synthesizing silver nanoparticles from *Trichoderma* strains for inhibition of *Fusarium oxysporum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(9): 1859-1868.
- [21] HE H, HE Z, SHEN Q. Eco-friendly synthesis and characterizations of single-wall carbonnanotubes/Ag nanoparticle hybrids for environmental decontamination[J]. Materials Research Express, 2018, 6(3): 035002.
- [22] ASHOKKUMAR S, RAVI S, KATHIRAVAN V, et al. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using *Leucas martinicensis* leaf extract for catalytic and antibacterial activity[J]. Environmental Science & Pollution Research International, 2014, 21(19): 11439.
- [23] 范月圆, 唐晨, 季逸, 等. 多粘类芽孢杆菌绿色制备纳米银及其抑菌活性[J]. 微生物前沿, 2020, 9(3): 114-124. FAN Y Y, TANG C, JI Y, et al. Green preparation of silver nanoparticles by *paenibacillus polymyxa* 381 and its antibacterial activity[J]. Advances in Microbiology, 2020, 9(3): 114-124.
- [24] RECIO S G, CASTILLA C L, BENITO G N, et al. Leaf extract from the endemic plant *Peumus boldus* as an effective bioproduct for the green synthesis of silver nanoparticles[J]. Materials Letters, 2016, 183(15): 255-260.
- [25] 杨婧, 林宇星, 刘莘轶, 等. 利用 *Mariannaea* sp. HJ 菌株胞内提取物合成纳米银及其抑菌特性研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 749-758. YANG J, LIN Y X, LIU X Y, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the cell-free extracts of *Mariannaea* sp. HJ and their antimicrobial characteristics research[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 749-758.
- [26] BIANCA M., VLADISLAV S, MARIA P S, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *ligustrum ovalifolium* fruits and their cytotoxic effects[J]. Nanomaterials, 2018, 8(8): 627-639.
- [27] BAKER C, PRADHAN A, PAKSTIS L, et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2019, 5(2): 244-249.
- [28] IVASK A, EIBADAWY A, KAWETEERAWAT C, et al. Toxicity mechanisms in *Escherichia coli* vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver[J]. ACS Nano, 2014, 8(1): 374-386.
- [29] 陈学情, 蒋家璇, 任志鸿, 等. 纳米银的抗菌特性及对多重耐药菌株的抗菌作用[J]. 微生物学报, 2017, 57(4): 539-549. CHEN X Q, JIANG J X, REN Z H, et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles against multiple drug resistant strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(4): 539-549.
- [30] AGRAWAL S, BHATT M, RAI S K, et al. Silver nanoparticles and its potential applications: A review[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2018, 7(2): 930-937.
- [31] RAHIMI G, ALIZADEH F, KHODAVANDI A. Mycosynthesis of silver nanoparticles from *Candida albicans* and its antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2016, 15(2): 371-375.