

**Получение наночастиц серебра методами
«зеленой химии»
и исследование их
противогрибковой активности и
антибактериальных свойств**

Елизавета Никитина

Лицей 1586, Москва

Научные руководители: Б.П. Макаров (учитель химии, лицей 1586),
Т.А. Лейнсоо (учитель биологии, лицей 1586)

Научные консультанты: А.А. Семенова (аспирант факультета наук
о материалах МГУ)

**Москва
2011**

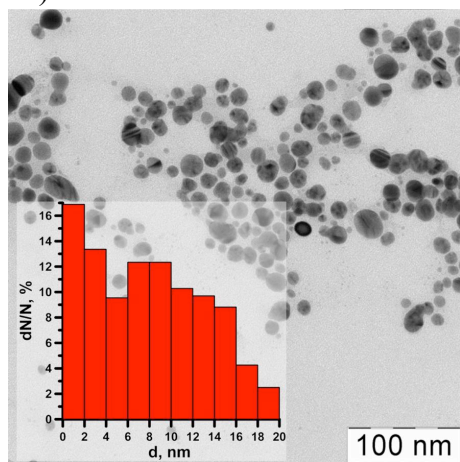
Аннотация

В настоящее время большое распространение получают материалы с наночастицами (НЧ) серебра. Включение в состав материала НЧ Ag придает ему фунгицидные и антимикробные свойства. Большой интерес также вызывает получение наноматериалов методами «зеленой химии», особенно для биомедицинских применений.

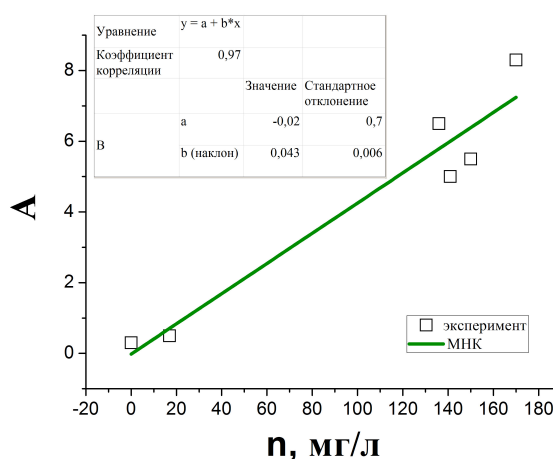
Цель работы заключалась в изучении процессов получения стабильных гидрозолей металлического серебра методами «зеленой» химии, а также исследование возможности создания на их основе антибактериальных и противогрибковых покрытий.

В настоящей работе получены гидрозоли НЧ серебра с применением методик «зеленой химии» – в качестве восстановителей ионов серебра использовались экстракты листьев березы, крапивы, цветов ромашки и плодов шиповника. Установлено, что самыми устойчивыми являются гидрозоли металлического серебра на основе экстракта листьев крапивы, которые не выпадают в осадок в течение всего времени наблюдения – более 4 месяцев.

Методами спектроскопии оптического поглощения в видимой и УФ областях и проникающей электронной микроскопии установлено, что НЧ серебра имеют преимущественно сферическую форму и распределены по размерам в диапазоне 2-20 нм (Рис. 1а).



а)



б)

Рис. 1. а) Изображение НЧ серебра, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Исходная концентрация нитрата серебра $8,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, экстракта листьев крапивы 17 %. Спустя 1 месяц после синтеза. На вставке показано распределение наночастиц серебра по размерам;

б) Противогрибковая активность коллоидных растворов серебра, полученных восстановлением ионов металла экстрактом листьев крапивы против *Penicillium sp.*: □ – экспериментальные данные, — график зависимости противогрибковой активности коллоидных растворов серебра (метод наименьших квадратов).

Показано, что гидрозоли серебра, полученные восстановлением ионов металла экстрактами растений, практически не влияют на рост дрожжевых грибов.

В тоже время, гидрозоли серебра подавляют рост грибковых культур *Penicillium sp.* Причем, противогрибковая активность коллоидных растворов возрастает с увеличением концентрации серебра в гидрозоле и близка к линейной (Рис. 1б). Необходимо отметить также, что максимальная способность подавлять рост *Penicillium sp.* наблюдалась у гидрозолей серебра, которые были получены на основе экстракта листьев крапивы.

Исследование антибактериальных свойств коллоидных растворов серебра показало, что они полностью подавляют рост бактерий *E.coli* и *Staphylococcus sp.*

Введение. В настоящее время большое распространение получают материалы с наночастицами (НЧ) серебра. Такой интерес обусловлен тем, что включение в состав материала наночастиц Ag придает ему фунгицидные и антимикробные свойства [1-4]. Известно, что коллоидные растворы серебра эффективны против более 650 видов микроорганизмов, в то время как антибиотики обычно активны против 5-10 видов. Необходимо отметить также, что привыкания к НЧ серебра не вырабатывается, как это наблюдается при использовании обычных антибиотиков. Это объясняется тем, что одноклеточные организмы не могут мутировать в формы, устойчивые к действию НЧ серебра.

Коллоидные растворы и покрытия с наночастицами серебра могут применяться в таких областях как

- медицина и здравоохранение:
 - более быстрое заживление ран,
 - предотвращение грибковых поражений,
 - медицинская диагностика.
- продукты гигиены,
- защитные ткани,
- производство спортивной одежды.

Применение препаратов и материалов на основе НЧ серебра в медицине возможно, если при их производстве не использовались токсичные для человека восстановители (растворы аммиака, щелочи и т.п.). Таким образом, особые требованиями к наноматериалам, которые используются для биомедицинских применений стимулируют интерес к получению НЧ серебра методами «зеленой химии». С другой стороны, такие методы обычно сочетают в себе невысокую стоимость исходных материалов, биосовместимость, наличие природного реагента-восстановителя, поверхностно активных веществ (ПАВ), которые играют роль стабилизаторов и комплексообразователей – все это способствует получению «в одном флаконе» стабильных гидрозолей НЧ серебра.

Последние исследования в данной области посвящены получению коллоидных растворов серебра с использованием экстрактов растений [1-3]. Можно предположить, что уникальное соотношение между восстановителями и ПАВ для различных экстрактов растений приводит к тому, что форма и размеры НЧ в коллоидных растворах отличаются в зависимости от используемого экстракта. В таблице 1 собраны данные из различных источников, которые отражают зависимость формы и размера НЧ серебра от используемого экстракта растений. Однако оказалось, как видно из таблицы, что при использовании экстрактов растений в процессе синтеза коллоидных растворов серебра, высока вероятность получить сферические НЧ, размер которых в среднем порядка 30 нм. Известно, что с уменьшением размера НЧ серебра возрастает их противогрибковая и антибактериальная активность [4]: при одинаковом содержании металла в гидрозоле НЧ Ag со средним диаметром 9.8 нм проявляли в 10 раз большую активность, чем частицы со средним размером 62 нм. Таким образом, используя экстракты растений в процессе приготовления коллоидных растворов серебра можно получить НЧ серебра, способные подавлять рост бактерий и грибковых культур.

Цель работы заключалась в изучении процессов получения стабильных гидрозолей металлического серебра методами «зеленой» химии, а также исследование возможности создания на их основе антибактериальных и противогрибковых покрытий.

Табл. 1. Зависимость формы и размера НЧ серебра от используемого экстракта растений.

РАСТЕНИЕ	РАЗМЕР, нм	ФОРМА	ИСТОЧНИК
Эвкалипт лимонный (<i>Eucalyptus citriodora</i>) экстракт листьев	20	сферическая	[1]
Смоковница бенгальская (<i>Ficus bengalensis</i>) экстракт листьев	21	неправильной формы	[1]
Пижма обыкновенная (<i>Tanacetum vulgare</i>)	16	сферическая, треугольная	[5]
Мята перечная (<i>Mentha piperita</i>) экстракт листьев	5–30	сферическая	[5]
Ятрофа куркас (<i>Jatropha curcas</i>) латекс	10–20	кубическая	[5]
Ятрофа куркас (<i>Jatropha curcas</i>) экстракт семян	15–50	сферическая	[5]
Лавсония(хна) (<i>Lawsonia inermis</i>) экстракт листьев	39	квази-сферическая	[5]
Шлемник бородатый (<i>Scutellaria barbata</i>) экстракт листьев	5–30	сферическая, треугольная	[5]
Гваюла (<i>Parthenium argentatum</i>)	50	неправильной формы	[5]
Азадирахта индийская (<i>Azadirachta indica</i>) экстракт листьев	50–100	сферическая	[5]
Пеларгония ароматная (<i>Pelargonium graveolens</i>) экстракт листьев	16–40	сферическая	[5]
Чай (<i>Camellia sinensis</i>)	20	сферическая, призмы	[2]
Чай (<i>Camellia sinensis</i>)	25	сферическая	[6]
Чай (<i>Camellia sinensis</i>)	20-60	сферическая	[3]
Кофе (<i>Coffea arabica</i>)	5-15	сферическая	[3]
Акалифа индийская(<i>Acalypha indica</i>)	20–30	сферическая	[5]
Гибискус китайский (<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>)	14	сферическая, призмы	[5]
Мед	4	сферическая	[5]
Лебеда (марь белая) (<i>Chenopodium album</i>) экстракт листьев	10–30	сферическая	[5]
Алоэ настоящее (<i>Aloe vera</i>)	15	сферическая	[7]
Рапс (<i>Brassica napus</i>) экстракт листьев	13	сферическая	[8]
Китайская капуста (<i>Brassica chinesis var parachinensis</i>) экстракт листьев	11	сферическая	[8]
Перец овощной (<i>Capsicum annuum</i>)	10–40	сферическая	[9]
Молочай шерстистый (<i>Euphorbia hirta</i>) экстракт листьев экстракт листьев	40-50	квази-сферическая	[10]
Паслен (<i>Solanum torvum</i>)	14	сферическая	[11]
Десмодиум трехцветковый (<i>Desmodium triflorum</i>) экстракт листьев	5-20	сферическая	[12]
Триантема (<i>Trianthema decandra</i>) экстракт корня	10-50	кубическая, шестиугольная	[13]
Эвкалипт (<i>Eucalyptus hybrida</i>) экстракт листьев	50–150	кубическая	[14]

Экспериментальная часть

Методы

Для проведения работы использованы методики восстановления солей серебра фитозэкстрактами, методы оптической спектроскопии в видимой и УФ области, методы электронной микроскопии, а также методики выращивания в лабораторных условиях дрожжей, культур плесневых грибов *Penicillium sp.*, бактерий *E.coli* и *Staphylococcus sp.*

Приготовление коллоидных растворов

Экстракты готовились из листьев березы, крапивы, цветов ромашки и плодов шиповника. Для приготовления коллоидных растворов серебра использовалась методика восстановления солей серебра фитозэкстрактами: приготовленные экстракты смешивали с раствором нитрата серебра концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л в пропорциях, приведенных в табл.2.

Табл.2. Приготовления коллоидных растворов серебра

№	AgNO ₃ , мл (1.0 мМ)	Экстракт, мл	H ₂ O, мл	Концентрация,		Концентрация экстракта в растворе, %
				ммоль/л	мг/л	
1	8	2	0	0.80	136	20
2	5	1	0	0.83	141	17
3	7	1	0	0.88	150	12.5
4	2	4	0	0.33	56	70
5	1	2	7	0.10	17	20
6	1	1	8	0.10	17	10

Изменение цвета, показывающее образование наночастиц серебра, наблюдали примерно через час при комнатной температуре.

Гидрозоли исследовали методами оптической спектроскопии в видимой и УФ области (спектрофотометр Lambda 35), а также электронной микроскопии (просвечивающий электронный микроскоп JEM-2000FXII) в Центре коллективного пользования МГУ имени М.В.Ломоносова.

Эксперименты по выявлению антибактериальных и фунгицидных свойств коллоидных растворов серебра

Все реактивы, использованные в работе, были химически чистые. Для приготовления культурных сред использовалась дистиллированная вода, в остальных случаях деионизированная.

Бактерии *E.coli* штамма DH5 α были предоставлены профессором В.П.Алмазовым (ИМБП РАН).

Культивирование бактерий проводилось при T=37°C на L-среде (10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л среды). L-агар с суспензией бактерий (0.8%) помещался на плотный L-агар (2.0%).

Плесневые грибы *Penicillium sp.* культивировали на агаре Чапека (сахароза – 30 г, NaNO_3 – 3.0 г, KCl – 0,5 г, KH_2PO_4 – 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 г, агар 15 г на 1 л среды) при $T = 26^\circ\text{C}$.

Дрожжи культивировались при $T = 26^\circ\text{C}$ в среде, состоящей из дрожжевого экстракта – 10 г/л, пептона – 20 г/л, глюкозы – 20 г/л, агара – 15 г/л.

Образцы для исследований по выявлению фунгицидных свойств у коллоидных растворов серебра готовились следующим образом: смешивали 0.1 г агарозы и 5 мл коллоидного раствора. При приготовлении контрольных образцов коллоидный раствор заменялся тем же объемом дистиллированной воды. Все эксперименты были выполнены в 3 повторностях. Результаты фиксировались на четвертый день. Визуализация проводилась с помощью фотоаппарата Casio Exilim EX-FH20.

Эксперименты по подавлению роста плесневых грибов проводились на образцах хлеба (ТУ 9110-001-00346891-07). Исследуемые образцы хлеба обрабатывались 0.15 мл коллоидного раствора, а контрольные – 0.15 мл дистиллированной воды.

Результаты и обсуждение

Спектры оптического поглощения полученных коллоидных растворов приведены на рисунках 1, 4, 5. Видно, что спектры оптического поглощения показывают наличие пика плазмонного резонанса в области 420-430 нм, характерного для наночастиц серебра сферической формы диаметром до 50 нм [4].

Данные просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 2) показывают, что размер полученных частиц изменяется от 2 нм до 20 нм, при этом преобладающая часть массы серебра заключена в частицах размером от 5 нм до 10 нм. Необходимо также отметить, что единственным спектральным изменением за это время является рост поглощения в максимуме видимой полосы (Рис. 3). Мы предполагаем, что это свидетельствует о структурном совершенствовании наночастиц серебра при старении в маточном растворе.

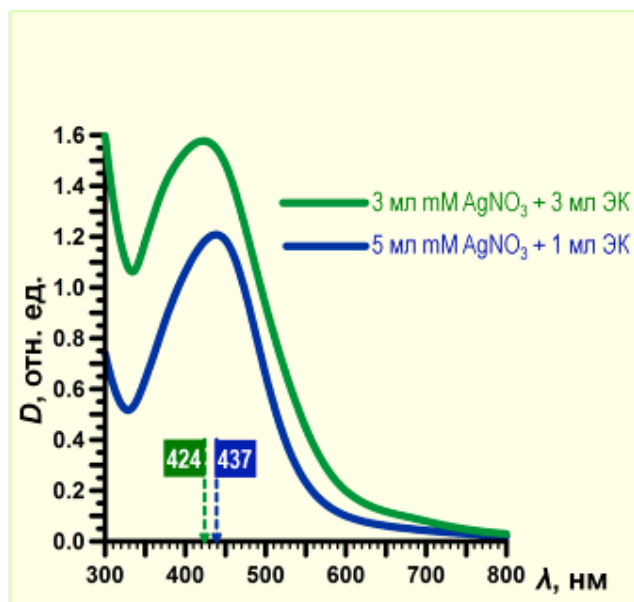


Рис. 1. Спектры поглощения коллоидного раствора серебра на основе экстракта листьев крапивы.

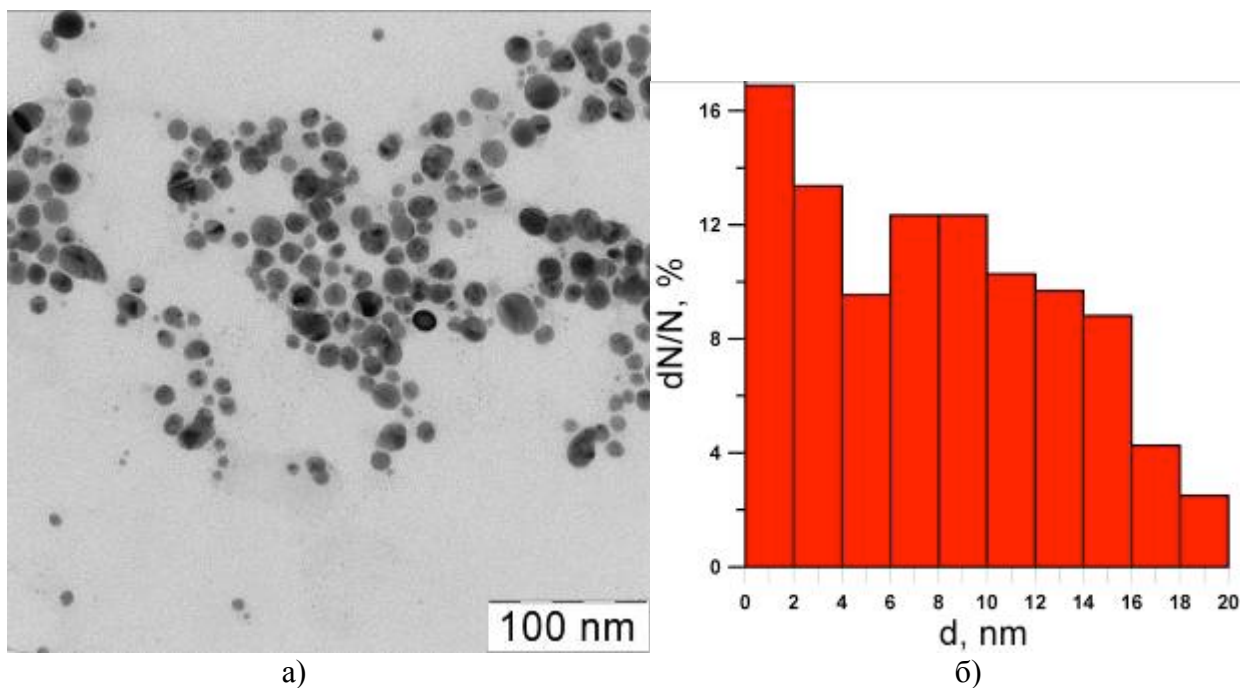


Рис. 2. а) изображение наночастиц серебра, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии. Исходная концентрация нитрата серебра $8.3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, экстракта листьев крапивы 17%. Спустя 1 месяц после синтеза; б) распределение наночастиц серебра по размерам.

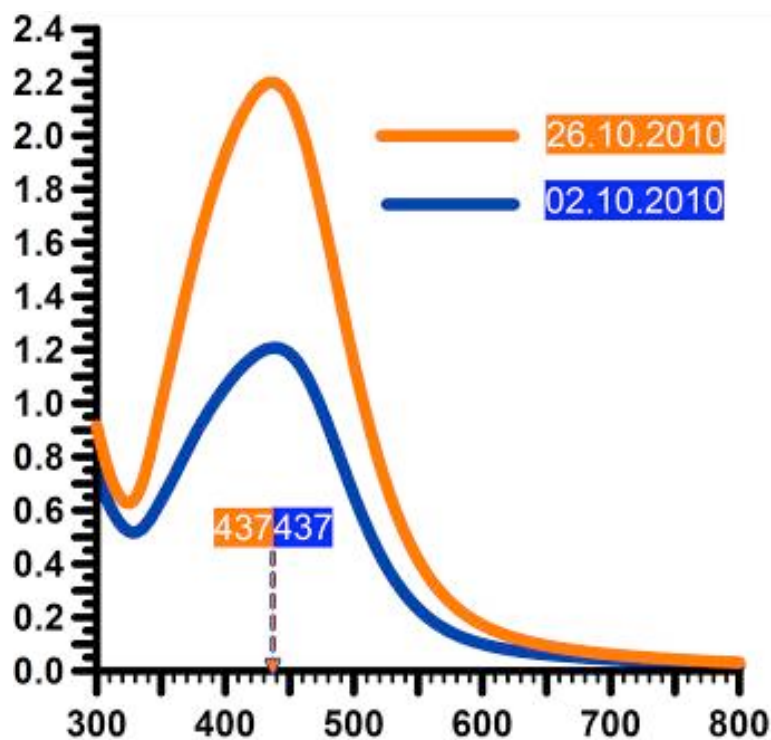


Рис. 3. Рост интенсивности поглощения наночастиц серебра спустя 1 месяц после получения коллоидных растворов на основе экстракта из листьев крапивы при комнатной температуре.

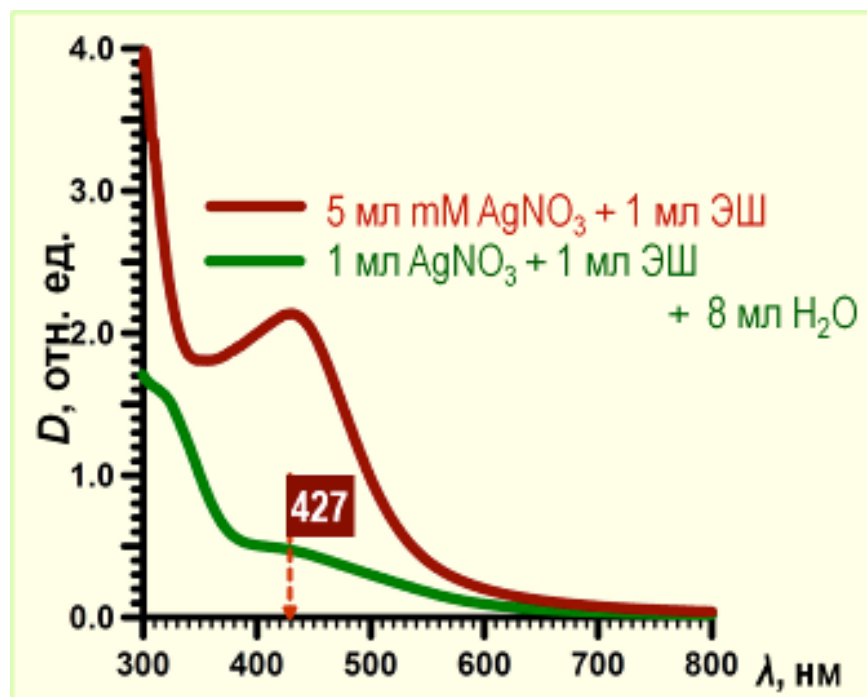


Рис.4. Спектры поглощения коллоидного раствора серебра на основе экстракта плодов шиповника.

Для коллоидного раствора серебра на основе экстракта плодов шиповника (рис.4), характерны размеры частиц порядка 40 нм [4].

Кроме того, данные рис. 1 и 4 показывают, что для больших исходных концентраций нитрата величина максимума поглощения заметно больше, чем для малых. Это означает, что для коллоидных растворов серебра на основе экстрактов из листьев крапивы и плодов шиповника во всех экспериментах восстановитель присутствует в избытке по отношению к ионам серебра. Этим наши результаты отличаются от данных работы [1], в которой интенсивность максимума поглощения коллоидного серебра в видимой области практически не зависит от концентрации нитрата серебра.

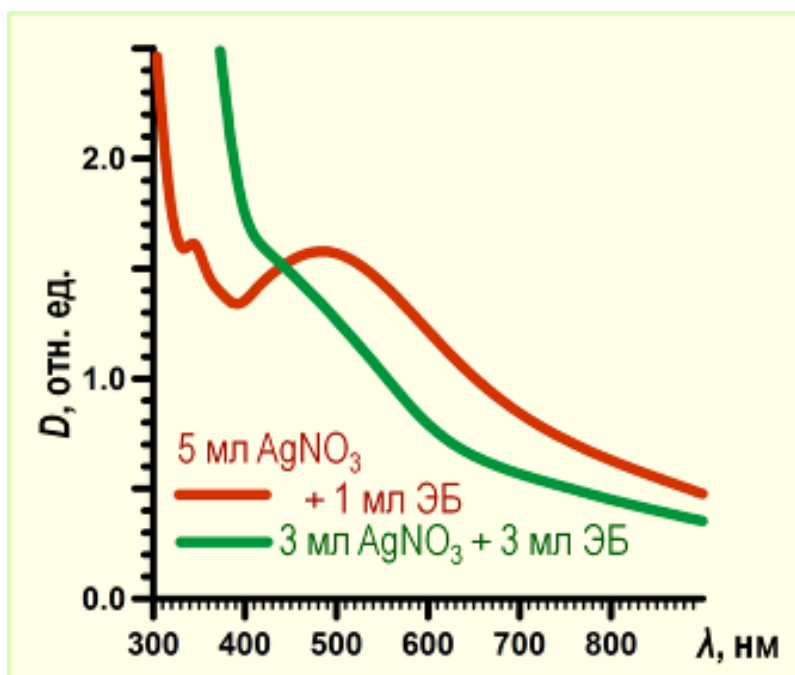


Рис. 5. Спектры поглощения коллоидного раствора серебра на основе экстракта из листьев берёзы.

Спектр поглощения для коллоидного раствора серебра на основе экстракта из листьев берёзы, который отмечен на рис. 5 красным цветом, по-видимому, соответствует более крупным частицам – порядка 50-60 нм. Распределение по размерам слабо зависит от исходных концентраций реагентов, что свидетельствует о моментальном образовании зародышей при контакте реагентов.

По-видимому, коллоидные растворы серебра образуются в результате восстановления ионов серебра согласно схеме: $Ag^+ + e^- \rightarrow Ag$. Восстановителями могут служить многие компоненты растительных экстрактов. Учитывая, что, по нашим кинетическим данным, восстановитель присутствует в избытке в реакционной смеси, ими могут быть такие компоненты, содержание которых, к примеру, в листьях крапивы наибольшее по сравнению с другими составляющими экстракта.

Типичный состав экстракта крапивы: 25 % белка, 20,7 % углеводов, 2,8 % жиров, 34,1 % клетчатки, от 0,15 до 0,37% витамина С. Крапива также содержит муравьиную кислоту.

Для установления природы доноров электронов индивидуальные растворы некоторых веществ проверены на способность восстанавливать серебро в растворе его нитрата при экспериментальных значениях рН. Оказалось, что кинетика восстановления муравьиной кислотой медленнее, чем в случае экстракта крапивы. В то же время, гидролизат образца химически выделенной и очищенной целлюлозы восстанавливает ионы серебра со скоростью, близкой к скорости восстановления экстрактом листьев крапивы, но в значительно меньшей концентрации. Эти результаты не приводят к строгим выводам, однако позволяют заключить, что клетчатка, преобладающая в массе всех исследованных растительных продуктов, при гидролизе в ходе приготовления экстрактов способна образовать достаточные количества восстанавливающих олигосахаридов или даже моноз. Их альдегидные функции предположительно и могут вести процесс восстановления ионов серебра аналогично реакции «серебряного зеркала» с участием глюкозы и реактивом Толленса:



Исследования фунгицидных свойств коллоидных растворов серебра, полученных восстановлением ионов серебра из экстрактов растений.

Исследование зависимости фунгицидных свойств коллоидных растворов серебра от концентрации Ag

Активность коллоидного раствора (А) оценивалась в баллах от 0 до 10: А=0 – соответствовало чистому образцу без колоний, т.е. при 100% подавлении их роста, а А=10, если образец полностью был покрыт колониями грибка *Penicillium sp.* (Рис.6). Полученные экспериментальные данные приведены в Табл. 3.

Табл. 3. Зависимость фунгицидных свойств коллоидных растворов серебра от концентрации Ag в гидрозоле.

Концентрация серебра, мг/л	17	136	141	150	170
Противогрибковая активность, баллы	0.5	6.5	5.0	5.5	8.3

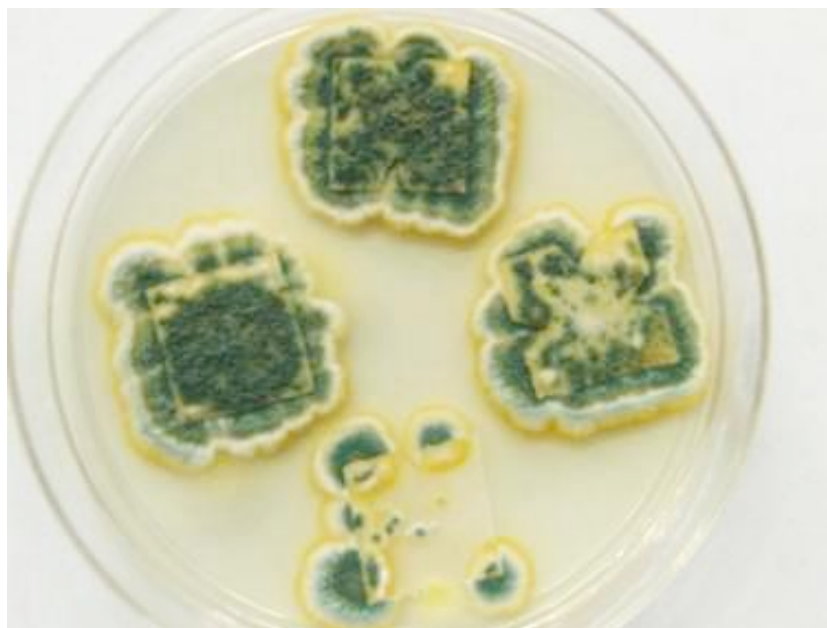


Рис. 6. Влияние концентрации Ag на противогрибковую активность зольей серебра против *Penicillium sp.*: образец без вырезов – контрольный; далее по часовой стрелке – концентрация серебра в растворе: 17 мг/л, 150 мг/л, 170 мг/л.

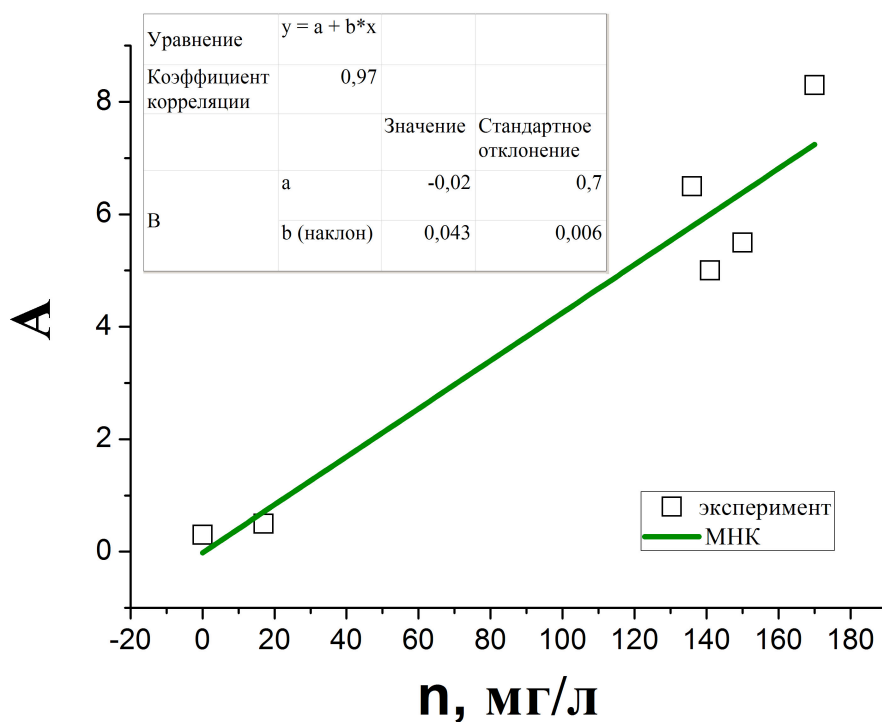


Рис. 7. Подавление роста колоний *Penicillium sp.* коллоидными растворами серебра: \square – экспериментальные данные, — график зависимости противогрибковой активности коллоидных растворов серебра (метод наименьших квадратов).

На Рис.7 представлен график зависимости противогрибковой активности коллоидных растворов серебра на основе экстракта из листьев крапивы. Методом наименьших квадратов (МНК) определены коэффициенты угловой зависимости и свободный член линейной регрессионной зависимости (представлены на вставке Рис.7).

Видно, что противогрибковая активность коллоидных растворов возрастает с увеличением концентрации серебра в гидрозоле и близка к линейной.

Рост плесневых грибов на образцах хлеба, обработанном коллоидными растворами серебра

На рисунках 8, 9 и 10 представлены фотографии, которые были сделаны через 5 дней после заражения образцов спорами *Penicillium sp.* Видно, что все коллоидные растворы серебра, полученные методом "зеленой химии" обладают фунгицидными свойствами. Причем, гидрозолы на основе экстракта из листьев крапивы обладают максимальной способностью подавлять рост плесневых грибов, а растворы на основе экстракта из листьев березы – минимальной (Рис. 8, 9, 10).

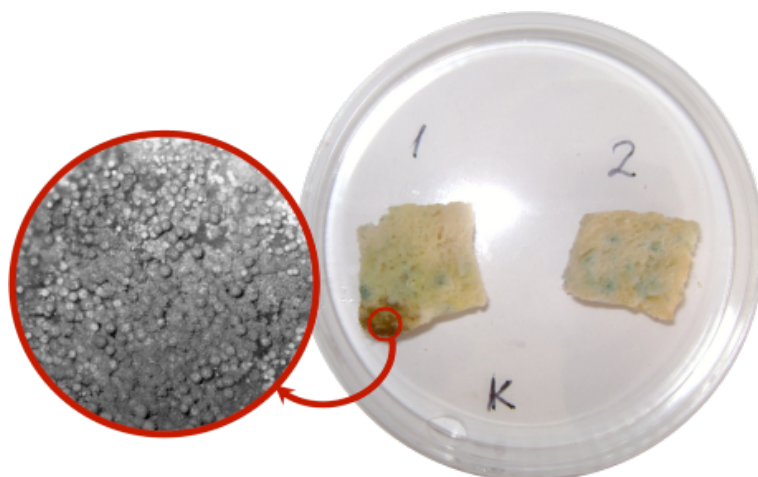


Рис. 8. Подавление роста культур плесневых грибов раствором наночастиц серебра на основе экстракта листьев крапивы: 1 – контрольный образец; 2 – образец с раствором наночастиц серебра. На вставке - увеличенный участок поверхности контрольного образца.

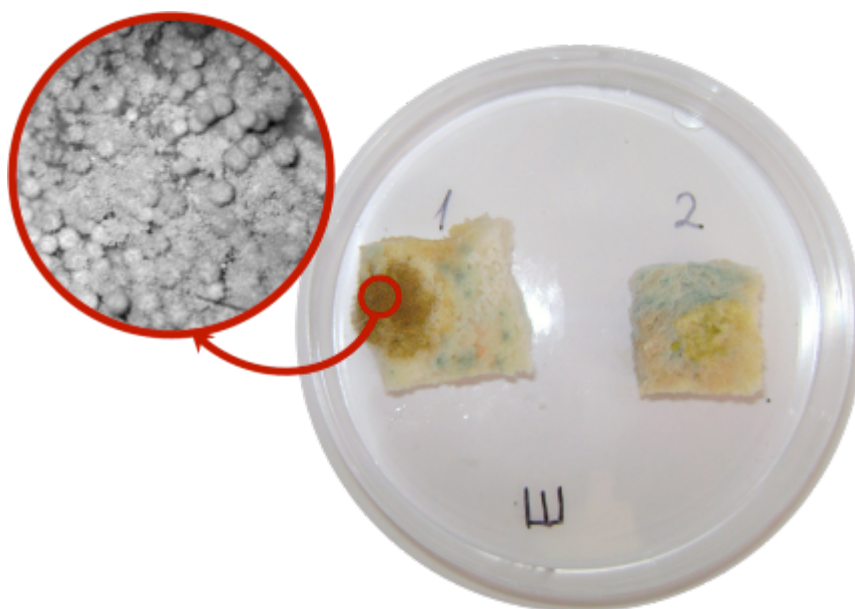


Рис. 9. Подавление роста культур плесневых грибов раствором наночастиц серебра на основе экстракта плодов шиповника: 1 – контрольный образец; 2 – образец с раствором наночастиц серебра. На вставке увеличенный – участок поверхности контрольного образца.

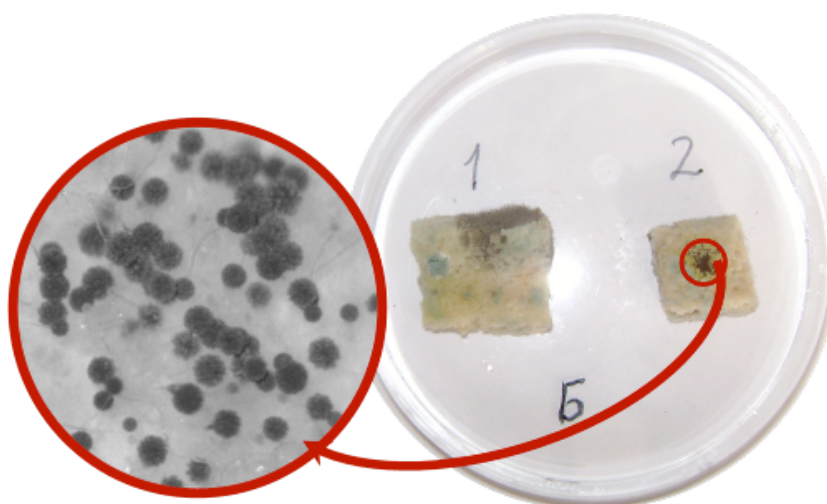


Рис. 10. Подавление роста культур плесневых грибов раствором наночастиц серебра на основе экстракта листьев берёзы: 1 – контрольный образец; 2 – образец с раствором наночастиц серебра. На вставке – увеличенный участок поверхности образца с раствором наночастиц серебра.

Исследования антибактериальных свойств
коллоидных растворов серебра, полученных восстановлением ионов серебра
из экстрактов растений.

На рисунке 11 представлены фотографии, которые были сделаны через 20 часов дней после заражения образцов *E.coli*.

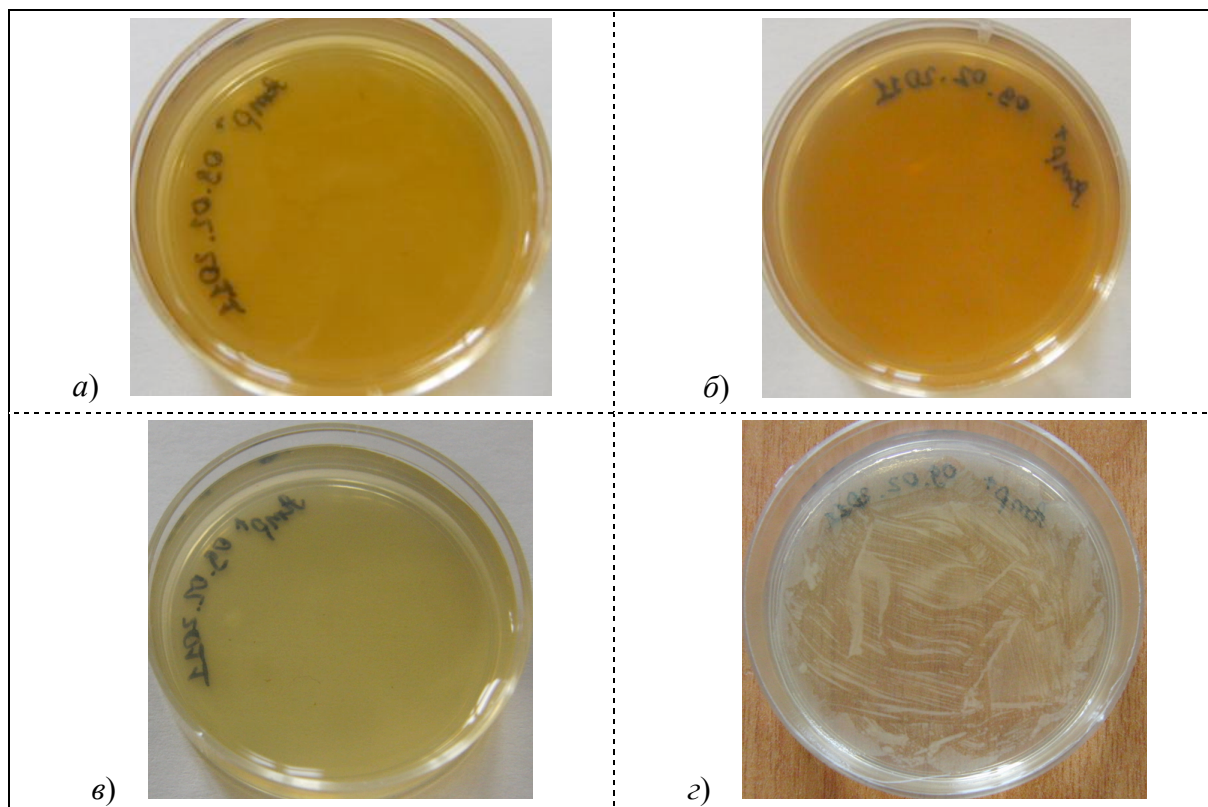


Рис. 11. Антибактериальная активность коллоидных растворов серебра против *E.coli*: в образцы а), б) и в) добавлено по 0.1 мл гидрозолей с концентрациями серебра 141 мг/л, 136мг/л и 17 мг/л, соответственно. Образец г) – контрольный.

Видно, что все коллоидные растворы серебра, полученные методом "зеленой химии" обладают антибактериальными свойствами по отношению к *E.coli*.

Фотографии, которые были сделаны через 20 часов дней после заражения образцов *Staphylococcus sp.*, представлены на рисунке 12.

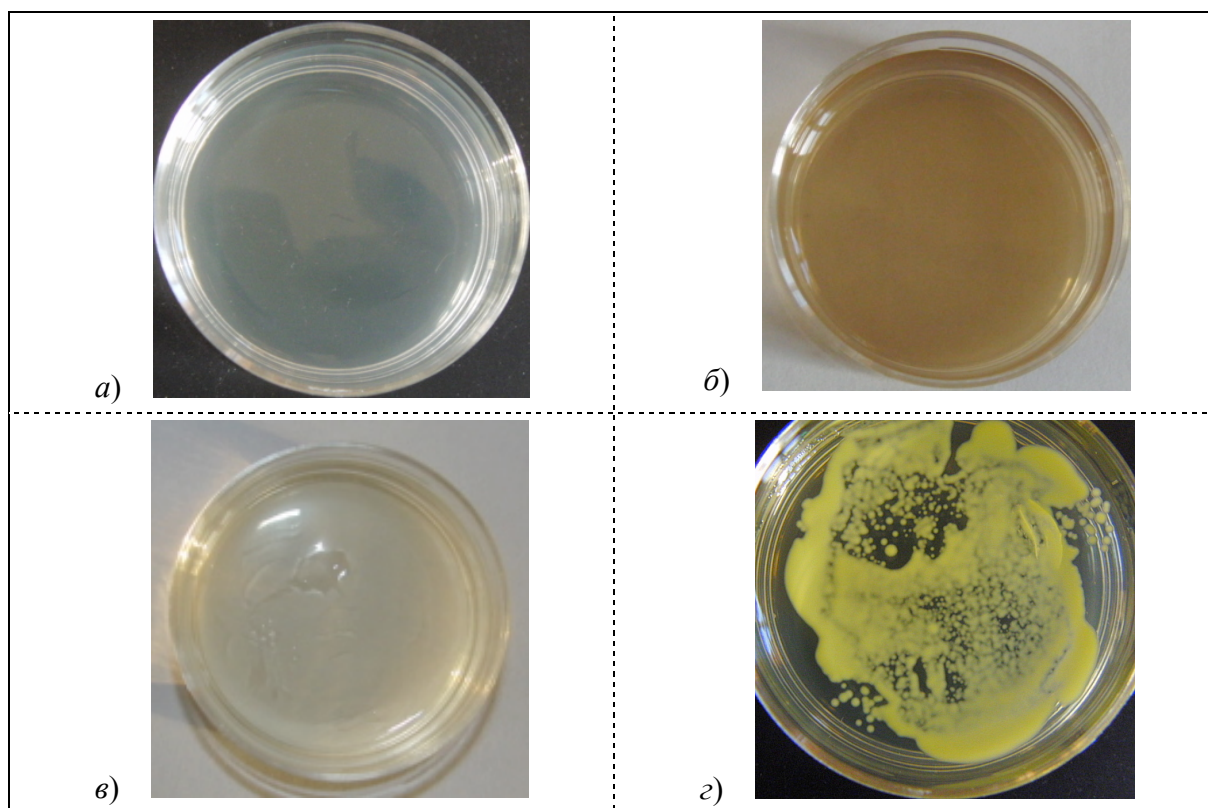


Рис. 12. Антибактериальная активность коллоидных растворов серебра против *Staphylococcus sp.*: в образцы б) и в) добавлено по 0.1 мл гидрозолей с концентрациями серебра 150 мг/л и 17 мг/л, соответственно; в образец а) – 0.1 мл 1ммоль/л водного раствора $AgNO_3$. Образец г) – контрольный.

Видно, что все коллоидные растворы серебра, полученные восстановлением ионов металла экстрактом крапивы, обладают антибактериальными свойствами по отношению к *Staphylococcus sp.*

Выводы

Коллоидные растворы серебра можно синтезировать восстановлением ионов серебра экстрактами из листьев крапивы, плодов шиповника, листьев березы.

Самыми устойчивыми являются гидрозоли металлического серебра на основе экстракта листьев крапивы, которые не выпадают в осадок в течение всего времени наблюдения – более 4 месяцев.

НЧ серебра имеют преимущественно сферическую форму и распределены по размерам в диапазоне $2 \div 20$ нм

Гидрозоли серебра, полученные восстановлением ионов металла экстрактами растений, практически не влияют на рост дрожжевых грибков.

Коллоидные растворы серебра подавляют рост грибковых культур *Penicillium sp.*

Противогрибковая активность коллоидных растворов возрастает с увеличением концентрации серебра в гидрозоле и близка к линейной.

Максимальная способность подавлять рост *Penicillium sp.* наблюдается у коллоидных растворов серебра, которые были получены с использованием экстракта из листьев крапивы.

Коллоидные растворы серебра полностью подавляют рост бактерий *E.coli* и *Staphylococcus sp.*

Перспективы

В настоящее время продолжают эксперименты по выявлению антибактериальных свойств коллоидных растворов серебра, полученных методом «зеленой химии».

В ближайшем будущем планируется провести эксперименты, в которых использовать в качестве восстановителя индивидуальные компоненты экстрактов, для того чтобы выяснить механизмы протекания реакций. Планируется проведение экспериментов по нанесению наночастиц серебра на ткани с использованием экстрактов крапивы и шиповника и исследование полученных тканей на наличие у них антибактериальных и фунгицидных свойств.

Благодарности

Работа частично выполнялась с использованием оборудования Факультета Наук о Материалах и Биологического Факультета МГУ.

Хотелось бы выразить особую благодарность аспирантке ФНМ МГУ *Анне Александровне Семеновой* и студенту 5-го курса Биологического Факультета МГУ *Арво Тоомасовичу Лейнсоо* за постоянное внимание, консультации и предоставленные чистые культуры, а также за участие в обсуждении полученных результатов.

Литература

1. Ravindra S., Murali Mohan Y., Narayana Reddy N., Mohana Raju K. *Fabrication of antibacterial cotton fibres loaded with silver nanoparticles via "Green Approach" // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2010. V.367. P.31-40.
2. Begum N.A., Mondal S., Basu S., Laskara R.A., Mandal D. *Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2009. V.71. P.113-118.
3. Nadagouda M.N., Varma R.S. *Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract // Green Chem.* 2008. V.10. P.859-862.
4. Ю. А. Крутяков, А. А. Кудринский, А. Ю. Оленин, Г. В. Лисичкин *Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // Успехи химии.* 2008. Т. 77. С. 242 — 269.
5. A.D. Dwivedi, K. Gopal *Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extract.// Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2010. V.369. P.27-33.
6. Sarika Srinivas Kalyan Kamal, Prasanta Kumar Sahoo, Johnson Vimala, Manda Premkumar, Shanker Ram, Loganathan Durai *A Novel Green Chemical Route for Synthesis of Silver Nanoparticles Using Camellia Sinensis // Acta Chim. Slov.* 2010. V.57. P.808–812.

7. Chandran S. P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A. and Sastry M. *Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract.*// Biotechnology Progress. V.22. P.577–583.
8. Tan S.Y., Ong B.L. and Loh C.S. *Tissue Culture and Biosynthesis of Silver Nanoparticles in Brassica.*// 15th National Undergraduate Research Opportunities Programme Congress
(http://www.nus.edu.sg/nurop/2010/Proceedings/FoS/Biological%20Sciences/Tan%20Siu%20Yueh_U062390L.pdf)
9. Shikuo Li, Yuhua Shen, Anjian Xie, Xuerong Yu, Lingguang Qiu, Li Zhang and Qingfeng Zhang *Green synthesis of silver nanoparticles using Capsicum annum L. extract* // Green Chem. 2007. V. 9. P.852-858.
10. EK. Elumalai, T.N.V.K.V.Prasad, Venkata Kambala, P.C.Nagajyothi, E David *Green synthesis of silver nanoparticle using Euphorbia hirta L and their antifungal activities.* // Arch. Appl. Sci. Res. 2010. V.2. P.76-81.
11. K. Govindaraju, S.Tamilselvan, V. Kiruthiga and G. Singaravelu *Biogenic silver nanoparticles by Solanum torvum and their promising antimicrobial activity* // Journal of Biopesticides. 2010. V.3(1 Special Issue). P.394 – 399.
12. Naheed Ahmad, Seema Sharma, V. N. Singh, S. F. Shamsi, AnjumFatma, and B. R.Mehta *Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Desmodium triflorum: A Novel Approach Towards Weed Utilization* // Biotechnology Research International. 2011. V.2011. Article ID 454090. 8 pages.
13. R.Geethalakshmi and D.V.L. Sarada *Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using Trianthema decandra extract and evaluation of their anti microbial activities.* // International Journal of Engineering Science and Technology. 2010. V. 2(5). P.970-975.
14. M.Dubey, S.Bhadauria, B.S.Kushwah *Green synthesis of nanosilver particles from extract of Eucalyptus hybrida (safeda) leaf.* // Digest J. Nanomater. Biostruct. 2009. V.4. P.537–543.