

Prolonged Antimicrobial Activity of Unique Sandwich-Structured Silver Nanocomposites

Xiao Song¹, Tao Liu^{2*}, Lihua Dong^{2*}, Zhangwei Guo³, Yaohua Dong², Yuanyuan Shen¹

¹Merchant Marine College, Shanghai Maritime University, Shanghai

²College of Marine Science and Engineering, Shanghai Maritime University, Shanghai

³College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai

Email: [*liutao@shmtu.edu.cn](mailto:liutao@shmtu.edu.cn), [*lhdong@shmtu.edu.cn](mailto:lhdong@shmtu.edu.cn)

Received: Feb. 25th, 2014; revised: Mar. 19th, 2014; accepted: Mar. 27th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

In this study, silver nanocomposites with three different structures were prepared to confirm that structure has a significant influence on the antibacterial properties. Ag nanoparticles were prepared by the following three methods: 1) by deposition of Ag on the surface of silica-polydopamine spheres by reducing Ag cations (SiO₂/PD/Ag); 2) by encapsulation of Ag NPs in mesoporous SiO₂ with a core-shell structure (Ag@MSN); and 3) Ag nanocrystals were both decorated on the surface of SiO₂ and incorporated into its mesoporous structure (Ag@MSN/PD-Ag). The antibacterial activities of these particles were evaluated through bacterial growth curves. The results demonstrated that in the first three days, the effect of SiO₂/PD/Ag was more intense on *V. natriegens* compared with Ag@MSN; however, the next seven days revealed the opposite result. Therefore, Ag@MSN/PD-Ag exhibited the most effective antimicrobial treatments for ten days.

Keywords

Silver, Nanocomposite, Dopamine, Antibacterial Activity, Structure

夹心层结构的纳米银复合粒子的缓释抑菌性

宋笑¹, 刘涛^{2*}, 董丽华^{2*}, 郭章伟³, 董耀华², 申媛媛¹

¹商船学院, 上海海事大学, 上海

²材料科学与工程研究院, 上海海事大学, 上海

*通讯作者。

³水产生命学院, 上海海洋大学, 上海

Email: liutao@shmtu.edu.cn, lhdong@shmtu.edu.cn

收稿日期: 2014年2月25日; 修回日期: 2014年3月19日; 录用日期: 2014年3月27日

摘要

本文为了证明纳米颗粒的结构对抑菌性能具有很大的影响效果, 制备出了三种不同结构的纳米银复合粒子。它们分别是: (1) 通过还原银离子制备纳米银颗粒, 并使其包覆在二氧化硅-聚多巴胺球形颗粒表面形成复合粒子($\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$)。 (2) 将纳米银颗粒负载在球形介孔二氧化硅内, 形成核-壳结构的复合粒子(Ag@MSN)。 (3) 纳米银颗粒既粘附在二氧化硅球形表面又封装在二氧化硅内层而形成的具有独特夹心层结构的复合粒子($\text{Ag@MSN}/\text{PD}-\text{Ag}$)。采用革兰氏阴性菌-需钠弧菌的生长曲线来测试三种粒子的抑菌性能。实验结果表明, 在最初的三天里, $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 较 Ag@MSN 对需钠弧菌抑制效果更好, 但是接下来的七天, Ag@MSN 对需钠弧菌更为敏感, 而 $\text{Ag@MSN}/\text{PD}-\text{Ag}$ 在整个十天的抑菌测试中一直都是对需钠弧菌最为敏感。

关键词

银, 纳米复合粒子, 多巴胺, 抑菌性能, 结构

1. 引言

银纳米复合材料由于其独特的结构和物理化学性质, 吸引了大量的学者对其进行研究, 使其成为最具商业价值的纳米材料之一[1]。这些银纳米复合材料呈现出的独特的结构使它们在生物学和生物化学领域也具有潜在的应用价值[2]。在最近几十年的研究中, 报道了大量的关于含银纳米复合粒子的研究。张亮[3]等人报道出将纳米银粒子包覆在改性的二氧化硅球形颗粒表面来提升该复合材料的抑菌性能。T. Ivanova[4]等人采用溶胶-凝胶法制备出表面吸附有纳米银颗粒的纳米氧化钛膜。其他大量的材料, 如碳纳米管[5][6], 聚合纳米纤维[7][8]和氧化石墨烯[9][10]都被报道出可以作为模板来合成银纳米复合材料。

在这些模板中, 二氧化硅具有不可争议的优势, 因为纳米银粒子不仅可以负载在二氧化硅内层还可以粘附在二氧化硅表面, 或者两者兼具。此外, 二氧化硅还可以运用到电沉积[11], 播种镀[12], 表面官能化[13], 或者层层沉积工艺[14]中。另一方面, 纳米银以高效、广谱杀菌性越来越多的出现在人们的日常生活中。将二氧化硅和纳米银颗粒结合起来制备的二氧化硅-纳米银复合粒子将具有协同效应。然而, 将纳米银内嵌在二氧化硅内或者将纳米银粘附在二氧化硅外, 将得到两种结构截然不同的纳米银复合粒子。前者的好处在于纳米银和银离子都可以对细菌生长起到抑制作用, 但是这种结构的粒子纳米银释放速度比较快。后者虽然可以有效的减缓纳米银释放过快的问题, 但是这种结构的复合粒子的抑菌作用只能通过释放银离子来实现。因此, 我们制备了一种能结合上述两种粒子的优点的复合粒子, 并测试了它的抑菌性能。

本文描述了三种不同结构的纳米银-二氧化硅复合粒子。首先将银离子还原成纳米银粒子, 然后将其包覆在二氧化硅-聚多巴胺球形粒子表面, 形成 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 粒子; 其次将纳米银粒子内嵌在介孔二氧化硅里形成核壳结构的 Ag@MSN 粒子; 最后将纳米银既封装在介孔二氧化硅内又粘附在二氧化硅-聚多巴胺外层形成独特夹心层结构的 $\text{Ag@MSN}/\text{PD}-\text{Ag}$ 粒子。通过细菌的生长曲线来测试它们的抑菌性。令人惊讶的是, 这些粒子的抑菌效果都有一定的延长, 但是抑菌的作用效果却出现在不同的阶段。

2. 实验

2.1. SiO₂/PD/Ag 粒子制备

采用改进的 stober 方法制备粒径分布在 200 nm 的二氧化硅球形颗粒。将 0.06 g 的多巴胺加入 30 mL, pH = 8.5 的三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液中, 然后向混合溶液中加入 0.05 g 的二氧化硅颗粒, 在室温下混合搅拌一晚。去离子水清洗后, 分散于 20 mL 的 1.5 mg/mL 的 AgNO₃ 溶液中, 在氮气保护, 加热到 80°C, 反应 30 分钟, 去离子水清洗后, 50°C 真空干燥箱中干燥, 待用。

2.2. Ag@MSN 粒子制备

将 0.2 g 的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 96 mL 的去离子水和 2.8 mL 的 NH₃ 混合在 150 mL 的三口烧瓶中加热至 80°C 反应 30 分钟, 然后向烧瓶中加入 1.0 mL, 浓度为 0.1 M 的硝酸银和 0.6 mL 浓度为 1.0 M 的甲醛溶液。5 分钟后, 再向混合溶液中逐滴加入 1 mL 的正硅酸乙酯。反应 2 小时后, 用无水乙醇和去离子水清洗, 并用 0.1 M 的盐酸/乙醇溶液来提取表面活性剂, 将得到的粒子在 50°C 的真空干燥箱中干燥, 待用。

2.3. Ag@MSN/PD-Ag 粒子制备

2 mg/mL 的多巴胺盐酸盐溶解于 10 mL 的 Tri-Hcl (pH = 8.5) 中, 0.05 g 的 Ag@MSN 颗粒加入 30 mL 的多巴胺溶液, 在 25°C 下振荡一晚, 去离子水清洗, 分散于 20 mL 的 1.5 mg·mL⁻¹ 的 AgNO₃ 溶液中, 在氮气保护, 加热到 80°C, 反应 30 分钟, 去离子水清洗后, 50°C 真空干燥箱中干燥, 待用。

2.4. 抑菌测试

测量需钠弧菌的最小抑菌浓度(MIC)来衡量这些粒子的抑菌性能。在含有 8 mL 培养基的试管中, 分别加入 0.18, 0.23, 0.28, 0.33, 0.38, 0.43 mg·mL⁻¹ 对应质量的粉体, 超声均匀后, 取 4 mL 测得 OD 值 (600 nm), 然后向试管中各加入 100 ul 的细菌培养液, 培养 24 小时后再测量每个试管的 OD 值(600 nm)。此外, 测量添加和没添加三种粉体的情况下, 需钠弧菌连续 10 天的生长曲线。整个实验过程重复进行 3 次。

3. 结果与讨论

如图 1a 所示, 本实验采用层层自组装法制备 SiO₂/PD/Ag 颗粒。将 200 nm 的二氧化硅颗粒分散在多巴胺溶液里(pH = 8.5), 在碱性环境中, 多巴胺会自发的聚合成为聚多巴胺, 并在球形二氧化硅表面形成一层薄膜, 随后还原硝酸银生成的粒径分布在 35 nm 的纳米银颗粒包覆在聚多巴胺薄膜外面。形成这种特殊结构的关键在于聚多巴胺, 因为它具有极强的粘附性和还原性, 可以作为二次反应的平台。实验中多巴胺聚合为聚多巴胺的机理包括儿茶酚氧化为醌, 分子间的交联反应, 如芳基-芳基欧联和迈克尔加成反应[15] [16]。

如图 1b 所示, Ag@MSN 具有核壳结构, 粒径分布大概 150 nm, 其中纳米银的粒径大约 30 nm(亮点)。在该反应系统中, 甲醛作为还原剂还原硝酸银, CTAB 作为表面活性剂, 正硅酸乙酯作为硅源, 氢氧化钠作为碱性催化剂。最后, 采用盐酸/乙醇溶液回流去除 CTAB。

如图 1c 所示, Ag@MSN/PD-Ag 具有独特的夹心层结构, 其中在二氧化硅内层和表面都存在纳米银颗粒。这里聚多巴胺有两方面的作用, 其一作为反应平台还原生成纳米银并将纳米银粘附在二氧化硅表面。其二, 可以有效的减缓纳米银颗粒的释放速度。

采用测量细菌的生长曲线, 来测试该三种不同结构的粉体对细菌生长的抑制作用。本实验中采用革

兰氏阴性菌 - 需钠弧菌作为实验菌种，是因为该类细菌的细胞膜比较薄，便于粉体渗透到细菌内。在测试细菌的生长曲线之前，我们先测量细菌对粉体的最小抑菌浓度(MIC)。如图 2a 所示，当粉体的浓度较低(0.18 mg mL^{-1} , 0.23 mg mL^{-1})时，OD 值的增幅变化很大，意味着该浓度的粉体对细菌生长的抑制效果很弱。随着粉体的浓度的增加，OD 值的增幅变化越来越小，当粉体的浓度为 0.43 mg mL^{-1} 时，OD 值增

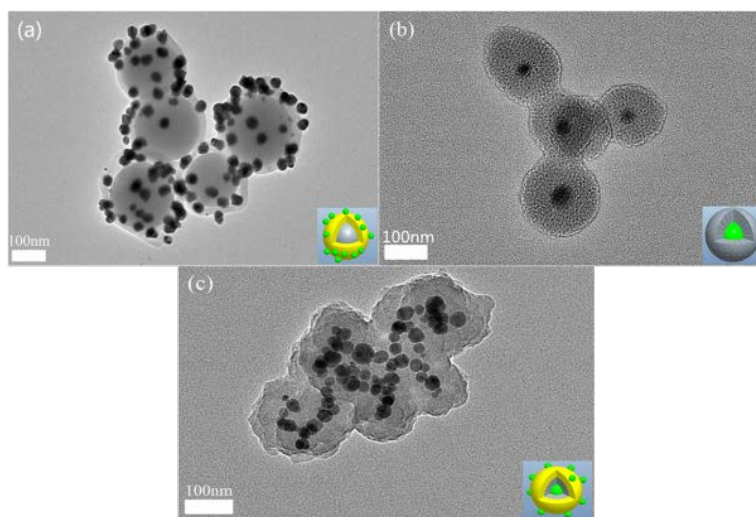


Figure 1. TEM images of (a) $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$, (b) $\text{Ag}@MSN$, and (c) $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ NPs (Corresponding 3-D images are embedded in each figures)

图 1. $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ (a) 粒子、 $\text{Ag}@MSN$ (b) 粒子和 $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ (c) 粒子的透射电镜图片(嵌入各自的 3D 效果图)

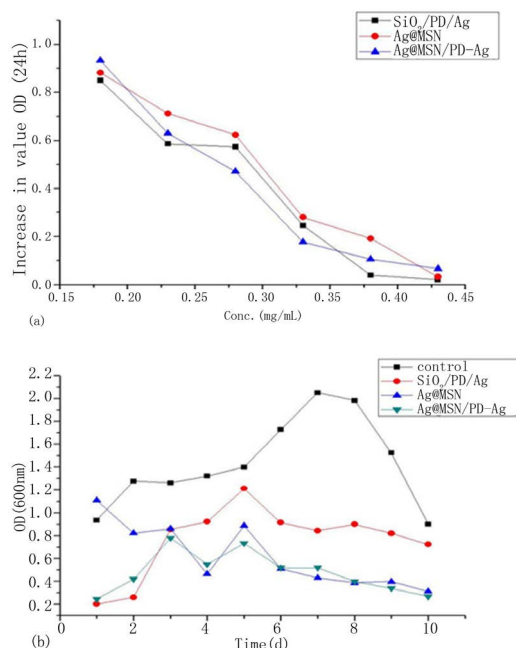


Figure 2. Determination of (a) MIC, (b) Bacterial Growth curves (Optical density) of *V. natriegens* for 10 days

图 2. 测试需钠弧菌的最小抑菌浓度和连续 10 天的生长曲线(OD 值)

长几乎为零,说明这些粉体的 MIC 趋于 $0.43 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

向培养基中添加粉体,并连续 10 天测量细菌 OD 值(600 nm)的变化,对照组不添加粉体。如图 2b 所示,与对照组相比,三种粉体均表现出了一定的抑菌性能。在最初的三天, $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 较 $\text{Ag}@MSN$ 对需钠弧菌生长的抑制作用更为明显,因为 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 通过释放纳米银和银离子来抑制细菌的生长,但是 $\text{Ag}@MSN$ 的介孔结构阻止了内层的纳米银快速地与细菌接触。然而,接下来的七天, $\text{Ag}@MSN$ 对需钠弧菌生长的抑制效果更明显了,这是因为一方面内嵌的纳米银逐渐氧化成为银离子并释放出来,另一方面包覆在二氧化硅表面的纳米银颗粒逐渐流失。这两种粉体的 OD 值的显著不同,是由它们结构的不同导致的。更重要的是,在整个抑菌过程中, $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ 测试出来的 OD 值一直都是最小的。这是因为在与细菌的接触过程中,首先最外层的纳米银和银离子流失,然后聚多巴胺膜被水解破坏,最后内嵌的纳米银氧化为银离子释放出来,整个抑菌过程结合了 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 粒子和 $\text{Ag}@MSN$ 粒子的特性。

为了进一步探讨三种粉体的抑菌性能,我们准备了经过粉体处理和未经过粉体处理的抑菌实验的透射电镜样本。如图 3b 所示,经过 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 处理的细菌,细胞膜完全破碎并在需钠弧菌的细胞质里发现纳米银颗粒,而图 3a 所示的对照组中需钠弧菌保持完整的棒状结构。此外,在图 3c 中只发现 $\text{Ag}@MSN$ 粘附在细菌细胞膜表面却并没有发现明显的细胞膜破坏。这种显著的不同可能是因为介孔二氧化硅层阻止了 $\text{Ag}@MSN$ 中纳米银在最初几天里与细菌的接触,而 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 中包覆的纳米银却比较容易释放。对于 $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$,如图 3d 所示,在细菌内部发现有纳米银,同时还发现有大量粉体粘附在细胞膜上。该实验结果进一步表明, $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ 粒子具有 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 粒子和 $\text{Ag}@MSN$ 粒子的特性。

4. 结论

本文证实了纳米颗粒的结构对抑菌性能确实存在影响效果。其中 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ 和 $\text{Ag}@MSN$ 的抑菌性能都增强了,但是作用的阶段不一样,这是因为两者的结构不同,导致对纳米银的释放速度不同。同时,

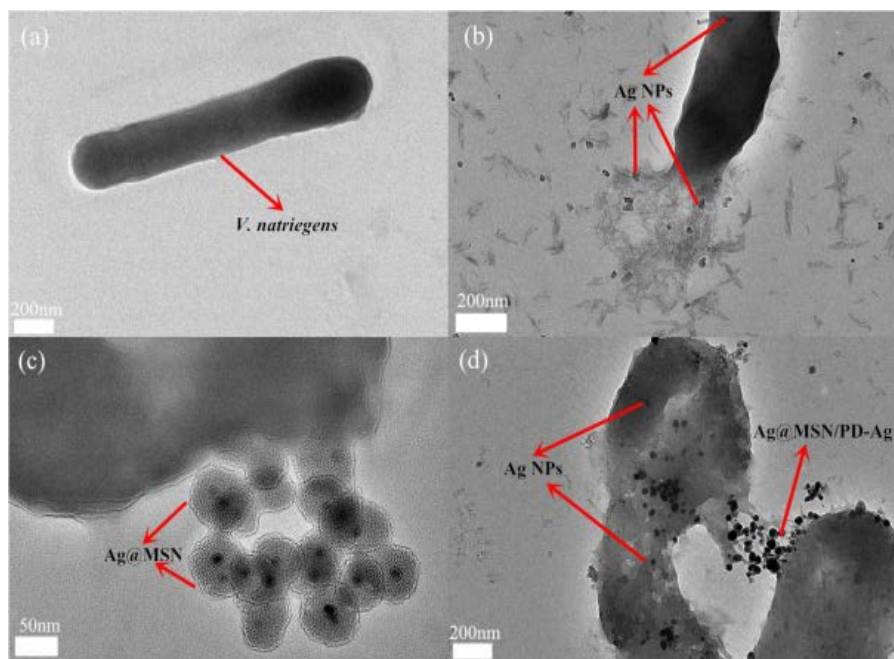


Figure 3. TEM photographs of (a) *V. natriegens* control sample; (b), (c) and (d) *V. natriegens* treated with $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$, $\text{Ag}@MSN$ and $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ NPs, respectively.

图 3. 需钠弧菌对照组样本(a)需钠弧菌分别与 $\text{SiO}_2/\text{PD}/\text{Ag}$ (b), $\text{Ag}@MSN$ (c) 和 $\text{Ag}@MSN/\text{PD}-\text{Ag}$ (d)处理后的透射电镜图片。

Ag@MSN/PD-Ag 表现出 SiO₂/PD/Ag 和 Ag@MSN 的协同效应, 首先外层的纳米银进入细胞质并氧化成银离子, 随后聚多巴胺膜水解, 内嵌的纳米银氧化释放出银离子, 致使细胞膜的完全破坏。因此, 这些纳米银复合粒子都可以作为一种潜在的长效杀菌剂。

致 谢

该项目得到国家自然科学基金(编号: 51003056), 国家重点基础研究发展计划(编号: 2014CB643306), 上海教委科研创新重点项目(编号: 12YZ121), 上海市科技创新项目(编号: 12231204102)等资助, 在此表示感谢!

参考文献 (References)

- [1] Jankiewicz, B.J., Jamiola, D., Choma, J., Jaroniec, M. (2012) Silica-metal core-shell nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, **170**, 28-47.
- [2] Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y.A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., et al. (2012) Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Langmuir*, **28**, 8140-8148.
- [3] Zhang, L., Wu, J.J., Wang, Y.X., Long, Y.H., Zhao, N. and Xu, J. (2012) Combination of bioinspiration: A general route to superhydrophobic particles. *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 9879-9881.
- [4] Ivanova, T., Harizanova, A., Koutzarova, T., Vertruyen, B. (2013) Optical and Structural Characterization of TiO₂ Films Doped with Silver Nanoparticles Obtained by Sol-Gel Method. *Optical Materials*, **36**, 207-213.
- [5] Sahoo, S., Husale, S., karna, S., Nayak, S.K. (2011) Controlled assembly of Ag nanoparticles and carbon nanotube hybrid structures for biosensing. *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 4005-4009.
- [6] Niu, A., Han, Y.J., Wu, J., Yu, N., Xu, Q. (2010) Synthesis of one-dimensional carbon nanomaterials wrapped by silver nanoparticles and their antibacterial behavior. *The Journal of Physical Chemistry C*, **114**, 12728-12735.
- [7] Kong, H. and Jang, J. (2008) Antibacterial properties of novel poly (methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*, **24**, 2051-2056.
- [8] Kong, H. and Jang, J. (2008) Synthesis and antimicrobial properties of novel silver/polyrhodanine nanofibers. *Biomacromolecules*, **9**, 2677-2681.
- [9] Tang, J., Chen, Q., Xu, L., Zhang, S., Feng, L.Z., Xu, H. (2013) Graphene oxide-silver nanocomposite as a highly effective antibacterial agent with species-specific mechanisms. *ACS Applied Materials Interfaces*, **5**, 3867-3874.
- [10] Xu, W.P., Zhang, L.C., Li, J.P., Lu, Y. and Li, H.H. (2011) Facile synthesis of silver@graphene oxide nanocomposites and their enhanced antibacterial properties. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 4593-4597.
- [11] Kobayashi, Y., Salgueirino-Maceira, V. and Liz-Marzan, L.M. (2001) Deposition of silver nanoparticles on silica spheres by pretreatment steps in electroless plating. *Chemistry of Materials*, **13**, 1630-1633.
- [12] Tang, S.C., Tang, Y.F., Zhu, S.P., Lu, H.M. and Meng, X.K. (2007) Synthesis and characterization of silica silver core shell composite particles with uniform thin silver layers. *Journal of Solid State Chemistry*, **180**, 2871-2876.
- [13] Graf, C. and von Blaaderen, A. (2002) Metallodielectric colloidal core-shell particles for photonic applications. *Langmuir*, **18**, 524-534.
- [14] Cassagneau, T. and Caruso, F. (2002) Contiguous silver nanoparticle coatings on dielectric spheres. *Advanced Materials*, **14**, 732-736.
- [15] Lee, H., Dellatore, S.M., Miller, W.M. and Messersmith, P.B. (2007) Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, **318**, 426-430.
- [16] Sagert, J., Sun, C.J. and Waite, J.H. (2006) Chemical subtleties of mussel and polychaete holdfasts. *Biological Adhesives*, 125-143.