

生化与药用试剂

纳米 Ag@ Kanamycin 复合材料的制备及抑菌性能研究

陈惠惠¹, 吴迎花¹, 汪艳¹, 胡瑞玲¹, 吴苗¹, 王嘉伟¹, 郭少波^{*1,2}, 季晓晖^{*1,2}

(1. 陕西理工大学 化学与环境科学学院, 陕西 汉中 723000;

2. 陕西省催化基础与应用重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘要:近年来, 由于抗生素滥用导致耐药菌的出现, 致使人类健康受到严重威胁。因此, 迫切需要研发出一种新型、高效的抑菌剂。以三氟醋酸银(CF_3COOAg)为原材料, 通过单液相化学还原法制备纳米银颗粒(Ag NPs), 利用“浸渍法”结合市售抗生素硫酸卡那霉素(Kanamycin)合成了 Ag@ Kanamycin 复合材料。通过 TEM、XRD、UV-Vis、FT-IR、表面静电势(ESP)等对样品的形貌、晶体结构和键合方式等进行系统化表征。以大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和真菌白色念珠菌(*C. albicans*)为测试菌, 通过最小抑菌浓度(MIC)、滤纸片扩散法、菌落计数法探究复合材料的协同抑菌性能和抑菌机制。抑菌活性显示, 复合材料对 3 种测试菌的 MIC 分别为 40、20 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 。抑菌机制表明, 复合材料能够有效改变菌体细胞膜通透性并破坏细胞壁, 导致细菌凋亡。

关键词: Ag NPs; Kanamycin; 协同抑菌; 抑菌性能; 抑菌机制

中图分类号: TB333 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)12-0039-09

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0292

Preparation and Bacteriostatic Properties of Ag @ Kanamycin Nanocomposites CHEN Hui-hui¹, WU Ying-hua¹, WANG Yan¹, HU Rui-ling¹, WU Miao¹, WANG Jia-wei¹, GUO Shao-bo^{*1,2}, JI Xiao-hui^{*1,2} (1. School of Chemistry and Environmental Science, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Shaanxi Province Key Laboratory of Catalytic Foundation and Application, Hanzhong 723000, China)

Abstract: In recent years, the overuse of antibiotics has led to the emergence of drug-resistant bacteria that pose a serious threat to human health. As a result, there is an urgent need to develop a new and effective bacteriostatic agent. Silver nanoparticles (Ag NPs) were prepared from silver trifluoroacetate (CF_3COOAg) by single-liquid-phase chemical reduction. The synthesis of Ag@ Kanamycin composites was achieved using the "impregnation method" in combination with the commercially available antibiotic, kanamycin sulphate (Kanamycin). The samples were systematically characterized by TEM, XRD, UV-Vis, FT-IR and surface electrostatic potential (ESP) in terms of their morphology, crystal structure, and bonding mode. The filter paper diffusion method, colony counting method, and minimum inhibitory concentration (MIC) were employed to investigate the synergistic inhibitory properties and inhibitory mechanism of Ag @ Kanamycin against Gram-negative Escherichia coli (*E. coli*), Gram-positive Staphylococcus aureus (*S. aureus*), and fungus Candida albicans (*C. albicans*). The inhibitory activity demonstrated that the MIC of the composites against the three tested bacteria was 40, 20 and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The mechanism of bacterial inhibition showed that the composites were effective in altering the permeability of the bacterial cell membrane and disrupting the cell wall, leading to bacterial apoptosis.

Key words: Ag NPs; Kanamycin; synergistic inhibition; bacteriostatic properties; antibacterial mechanism

在过去的几十年里, 细菌感染是人类面临的严重健康挑战之一^[1]。自抗生素问世被投入医疗使用以来一直被用作对抗细菌感染的有力手段, 且在控制细菌感染传播方面发挥了至关重要

收稿日期: 2024-05-10; 网络首发日期: 2024-09-30

基金项目: 秦巴生物资源与生态环境国家重点实验室科研基金项目(SXS-2105); 陕西省自然科学基金项目(2023-JC-QN-0162)。

作者简介: 陈惠惠(2000-), 女, 陕西宝鸡人, 硕士生, 主要研究方向为金属抑菌材料。

通讯作者: 郭少波, 545366954@qq.com; 季晓晖, E-mail: jixiaohui@snut.edu.cn。

引用本文: 陈惠惠, 吴迎花, 汪艳, 等. 纳米 Ag@ Kanamycin 复合材料的制备及抑菌性能研究[J]. 化学试剂, 2024, 46(12): 39-47。

的作用。有机抗生素可以被划分为多种类别,如氨基糖苷类、喹诺酮类、 β -内酰胺类、大环内脂类等抗生素^[2]。其中,氨基糖苷类抗生素因适用范围广、价格相对低廉被普遍使用,此类抗生素可通过干扰细菌核糖核蛋白体 30S 亚单位与信息核糖核酸结合抑制肽链延长,阻断蛋白质合成,从而抑制细菌生长。硫酸卡那霉素是氨基糖苷类抗生素,对多种如大肠埃希菌、克雷伯菌、变形杆菌等肠杆菌科细菌都具有强有力的抑制作用。然而,单独使用抗生素会触发细菌耐药机制导致抗生素外排或改变其作用靶点^[3]并产生钝化酶,使其抑菌活性降低。

近年来,无机抑菌剂银纳米(Ag NPs)材料在生物医学领域的应用前景广阔^[4,5],与抗生素相比,因其高效广泛的抗菌性能和极低的耐药性而受到研究者的关注^[6]。但在单独使用 Ag NPs 时,其粒径越小的同时也越容易团聚,降低抑菌性能。为此,研究者们将无机金属抑菌剂 Ag NPs 与有机抗生素结合的方法来增强抑菌效率并研究两种抑菌剂的协同抑菌性能。Vazquez-muñoz 等^[7]在探究 Ag NPs 和抗生素的联合治疗过程中发现,Ag NPs-Cm(氯霉素)组合对大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的生长抑制作用约为 50%。Deng 等^[8]通过实验探究出 Ag NPs 与几种抗生素(如新霉素、阿莫西林和四环素)联合使用时,Ag NPs 复合物与沙门氏菌细胞的相互作用更强。协同作用导致更多的 Ag^+ 释放,从而在细菌细胞壁附近产生更高浓度的 Ag^+ ,导致其生长抑制,抗菌活性(协同作用)有所提高^[9]。Ji 等^[10]将无机抑菌剂 Cu_2O 、Ag NPs 与四环素结合起来,解决了 Ag NPs 易团聚的问题,复合材料具有高效的抑制细菌生长且协同作用优于单一抑菌剂。以上研究均表明,Ag NPs 有着优越的协同抑菌性能但对于深层次抑菌性能及研究机制研究相对不足。

基于此,本文以三氟醋酸银(CF_3COOAg)为原材料,通过单液相化学还原法来制备纳米银颗粒,最后利用“浸渍法”^[11]结合市售抗生素合成 Ag@Kanamycin 复合材料。通过滤纸片扩散法、菌落计数法、最小抑菌浓度(MIC)来探究 Ag@Kanamycin 的协同抑菌性能,并利用 Zeta 电位法、PI 染色法、细胞质泄露法和离子泄露法来探究复合材料的潜在抑菌机制。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

FEITecnaig2F20 型透射电子显微镜(荷兰 FEI 公司);D8 ADVAN-CE 型 X 射线衍射仪、VERTEX 70 型傅里叶转换红外光谱仪(德国 Bruker 公司);Cary-50 型紫外-可见分光光度计(美国瓦里安(中国)有限公司)。

三氟醋酸银(CF_3COOAg , 99%, 上海毕得医药科技股份有限公司);一缩二乙二醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$, 99%)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 99%)、硫氢化钠(NaHS , 99%)、硫酸卡那霉素(Kanamycin)(上海捷世凯生物科技有限公司);大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌,均由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 材料的制备

1.2.1 Ag NPs 的制备

通过单液相还原法得到单质银溶胶^[12],冰水浴至冷却,10 000 r/min 离心分离,用乙醇洗涤 3 次,蒸馏水、柠檬酸钠各洗涤一次,置于烘箱烘干备用。

1.2.2 Ag@Kanamycin 复合材料的制备

准确称取 30 mg Kanamycin 溶于 30 mL 水中,超声均匀后加入 30 mg Ag NPs,超声分散 10 min 后室温静置 3 h,离心机离心(10 000 r/min, 15 min),置于真空干燥箱烘干备用。

1.3 表征

采用 TEM、XRD、UV-Vis、FT-IR 对 Ag NPs 的形貌、官能团等进行表征。

1.4 理论计算

在 Gaussian09 程序中计算了 Kanamycin 和 Ag 的电子结构,使用 Mutiwn3.8 软件分析了 Kanamycin 的表面静电势(ESP),探讨了 Kanamycin 与 Ag 的最佳结合位点^[13]。

1.5 Ag@Kanamycin 复合材料的抑菌活性测定

1.5.1 菌种活化

在无菌条件下,用移液枪移取 5 mL 液体培养基加入试管中,随后加入 15 μL 细菌原菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床震荡培养 12 h^[14]。

1.5.2 滤纸片扩散实验

通过滤纸片扩散法,在 1、10、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,分别测试了去离子水、Kanamycin、Ag NPs 以及 Ag@Kanamycin 复合材料对 *E.coli*、*S.aureus* 和 *C.albicans* 的抑菌效果(平行 3 组)。首先,取

1 000 μL 的菌液均匀涂布在 LB 固体培养基上,然后将直径为 6 mm 的滤纸片贴在培养基表面上,将 8 μL 的实验材料滴加至对应的滤纸片上,将培养皿置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱中培养 12 h,最后观察抑菌圈的大小。

1.5.3 菌落计数实验

配制浓度为 1.5×10^8 CFU (colony-forming units)/mL 的 3 种菌悬液,将复合材料与菌液分别混合不同时间后,在固体培养基中滴加 10 μL 上清液用接种环涂抹均匀。在 1.5.2 中相同培养条件下培养 18 h,记录不同时间的菌落数(平行 3 组)。运用公式(1)计算抑菌率。

$$X(\%) = [(Y - Z)/Y] \times 100\% \quad (1)$$

式中, X 为抑菌率, Y 为对照组菌落数, Z 为不同时间抑菌结果菌落数。

1.5.4 最小抑菌浓度(MIC)实验

最小抑制浓度(MIC)被认为是确定生物体对抗菌药物敏感性的“金标准”^[15],采用试管二倍稀释法测定 Ag@ Kanamycin 的最小抑菌浓度。在无菌环境下取 8 支已高温灭菌的试管,分别向每支试管中加入 5 mL 液体培养基和 10 μL (2.1×10^8) CFU/mL 的菌悬液。将试管中溶液用 Ag@ Kanamycin 复合材料配制为不同浓度梯度,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡培养 12 h 后观察实验结果。

1.6 Ag@ Kanamycin 复合材料的抑菌机制研究

1.6.1 Zeta 电位分析法

采用 Zeta 电位分析仪测定 Ag@ Kanamycin 复合材料对 3 种测试菌细胞膜表面电位值随时间发生的变化。将活化好的测试菌稀释至浓度为 9×10^8 CFU/mL,测定 Zeta 电位值作为对照组。将 3 种测试菌与复合材料混合(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别混合不同时间后用离心机(10 000 r/min, 10 min)将复合材料与菌液分离^[13],取上清液进行测试(平行 3 组)。

1.6.2 PI(碘化丙啶)染色法

将 1.5.3 菌悬液加入 PI 染色剂中进行染色,随后使用离心机(15 000 r/min, 5 min)离心,并用磷酸缓冲液(0.2 mol/L PBS, pH 6)洗涤 3 次,以纯菌液作为对照组,加入 Ag@ Kanamycin 复合材料的菌悬液作为实验组,荧光倒置显微镜观察复合材料对细菌的破坏程度^[14]。

1.6.3 细胞质泄露实验

取 4 mL 1.5.3 菌液装入离心管作为对照组,

4 mL 菌液加入 Ag@ Kanamycin 复合材料(浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组。将配制好的菌液与材料混合液在 25 $^{\circ}\text{C}$ 常温下摇床 48 h。随后离心(15 000 r/min, 10 min),于紫外-可见分光光度计在 260 nm 下测定菌液的 UV-Vis 吸收光谱,分析细菌细胞质中大分子泄露情况(平行 3 组)。

1.6.4 离子泄露实验

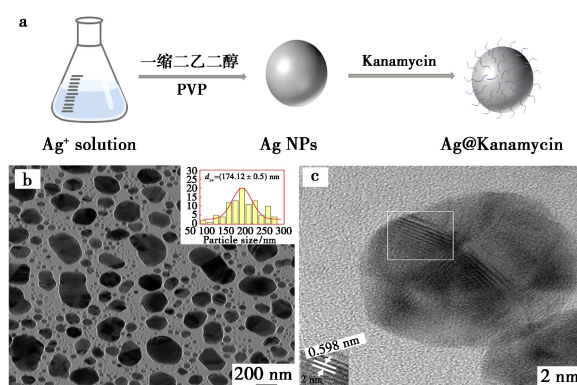
运用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)检测细菌中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 离子的泄露来探究其抑菌机制^[16]。在无菌操作台中,按照 1.6.1 中浓度稀释 3 种测试菌,3 mL 菌液中加入纳米 Ag@ Kanamycin 复合材料(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组,3 种测试菌为对照组。将实验组菌液恒温摇床 12 h,随后离心机(15 000 r/min, 10 min)离心,底部沉淀菌落用王水溶解,进行消解、赶酸处理,待冷却后利用仪器测试离子泄露情况(平行测, 3 组)。

2 结果与讨论

2.1 Ag NPs 与 Ag@ Kanamycin 复合材料的表征

2.1.1 Ag NPs TEM 结果分析

图 1a 为合成 Ag@ Kanamycin 复合材料的流程图。本研究以三氟醋酸银为原材料,一缩二乙二醇为还原剂,聚乙烯吡咯烷酮为分散剂,通过单液相化学还原法来制备 Ag NPs,然后与市售抗生素 Kanamycin 配位结合得到 Ag@ Kanamycin 复合材料。图 1b 为 Ag NPs 的 TEM 图及其粒径正态分布图,可看出 Ag NPs 为一种分散性良好



a. Ag@ Kanamycin 复合材料的合成示意图;

b. Ag NPs 的 TEM 图及其粒径分布图;c. Ag NPs 的 HRTEM 图

图 1 Ag@ Kanamycin 复合材料制备流程及 Ag NPs 形貌图

Fig.1 Preparation process of Ag@ Kanamycin composites and morphology of Ag NPs

的球形结构,平均粒径为 (174.12 ± 0.5) nm。图 1c 为 Ag NPs HRTEM 图像,其表面晶格间距为 0.598 nm。

2.1.2 Ag NPs 和 Ag@ Kanamycin 复合材料的 XRD 结果分析

图 2a 为 Ag NPs 和 Ag@ Kanamycin 的 XRD 谱图。Ag NPs 的谱图中可以看出,在 2θ 为 38.11° 、 44.20° 、 64.50° 和 77.36° 处检测出 4 个较强的衍射峰,对应面心立方结构 Ag 的(111)、(200)、(220)和(311)晶面,与 Ag 的标准谱库的位面(JCPDS 05-0667)基本一致^[16,17],Ag@ Kanamycin 复合材料的谱图中特征峰中也包含与 Ag NPs 对应的所有衍射峰且无杂峰,但是衍射峰强度低于 Ag NPs,这可能是因为 Kanamycin 负载于 Ag NPs 表面遮盖了其衍射峰强度。

2.1.3 Ag@ Kanamycin 复合材料的 FT-IR 结果分析

图 2b 为 Ag@ Kanamycin 复合材料、Kanamycin 和 Ag NPs 的红外光谱图。Kanamycin 光谱显示,在 $3\ 340 \sim 3\ 305\text{ cm}^{-1}$ 范围内,吸收峰对应 N—H 和 O—H 伸缩振动, $1\ 650 \sim 1\ 520\text{ cm}^{-1}$ 处为 N—H 弯曲振动峰,为 C—O 伸缩振动吸收峰位于 $1\ 263 \sim 1\ 067\text{ cm}^{-1}$, $1\ 400 \sim 1\ 320\text{ cm}^{-1}$ 处代表 S=O 伸缩振动峰, $1\ 148 \sim 1\ 030\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰归属于 S—O 的伸缩振动吸收峰^[18,19]。与 Ag NPs 的 FT-IR 光谱相比,复合材料在 $1\ 634\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰发生了偏移,此外,在 $1\ 057\text{ cm}^{-1}$ 处出现了新的吸收峰,这进一步支持了 Kanamycin 中的 N—H 和 S—O 基团与 Ag NPs 之间存在配位作用的可能性。

2.1.4 Ag@ Kanamycin 复合材料的 UV-Vis 结果分析

图 2c 为 Ag NPs、Kanamycin 及 Ag@ Kanamycin 复合材料的紫外吸收光谱,289 nm 处存在 Kanamycin 的特征吸收峰^[20]。403 nm 处有 Ag NPs 特征吸收峰,这是由于 Ag 溶胶体系中纳

米粒子表面存在等离子体共振吸收现象^[16],并且峰较窄且高度对称,也可证明合成的 Ag NPs 粒径分布均匀,也进一步证明了所合成的 Ag NPs 具有粒径分布均匀的特性,这与 TEM 结果相吻合。

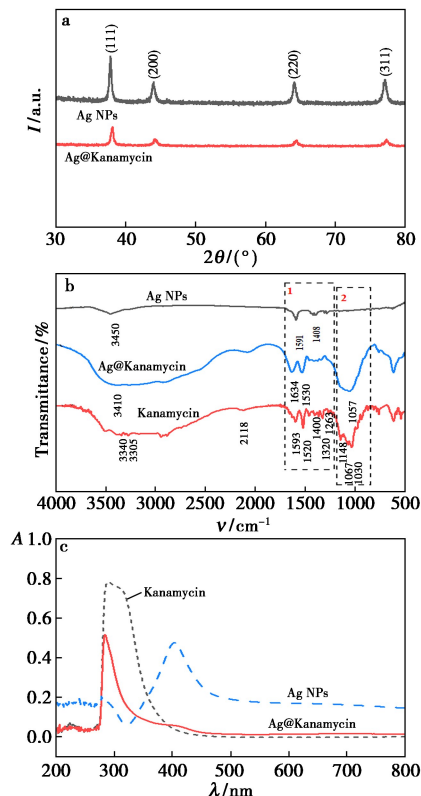


图 2 系列样品的 X 射线衍射(a)、红外(b)、紫外-可见吸收谱图(c)

Fig.2 XRD(a), FT-IR(b) and UV-visible absorption spectra(c) of a series of samples

2.2 理论计算

图 3 为 Kanamycin 表面静电势分析,OH 基团周围表面静电势相对较高为 51.8 kcal/mol,说明在 OH 上氢原子酸性较强属于缺电子区域,更容易脱去氢产生氧负离子。与此相反,在 NH_2 基团附近具有较低的表面静电势,为 -50.4 kcal/mol,说明 NH_2 具有孤对电子,属于富电子区域^[14],此位置是与 Ag NPs 的最佳结合位点。

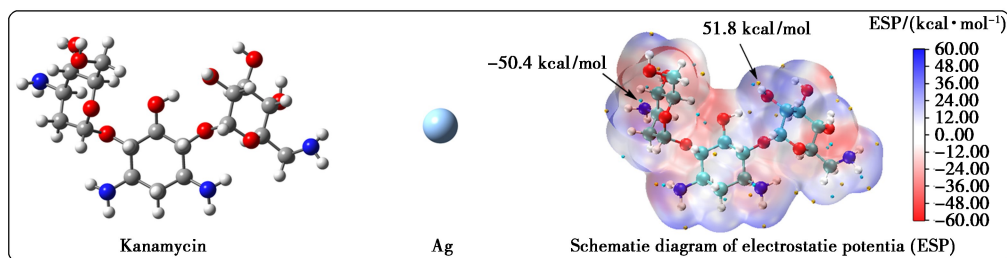


图 3 Ag NPs 与 Kanamycin 结合理论计算分析图

Fig.3 Analytical diagram of theoretical calculations of the binding of Ag NPs to Kanamycin

2.3 Ag@ Kanamycin 复合材料的抑菌性能分析

2.3.1 滤纸片扩散结果分析

以无菌水 (I) 作为对照组, Kanamycin (II)、Ag NPs (III)、Ag@ Kanamycin 复合材料 (IV) 作为实验组进行抑菌性能研究。从图 4a~4c 可以看出, 在浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Kanamycin、Ag NPs 和 Ag@ Kanamycin 复合材料均没有出现抑菌圈。当浓度达到 10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Ag@ Kanamycin 显示出比同浓度的 Ag NPs 和 Kanamycin 更大的抑菌圈。通过滤纸片扩散结果可知, 随浓度的升高,

Ag@ Kanamycin 复合材料的抑菌效果也呈上升趋势, 表明材料抑菌活性与其浓度成正比, 从图 4d~4f 可以看出, Ag@ Kanamycin 复合材料的最佳抑菌浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 3 种菌的抑制效率最佳。复合材料对测试菌均有很好的抑菌效果, 与 Ag NPs 相比, 复合材料对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的抑菌率分别提高了 2.08、1.63 和 2.25 倍, 与单独使用 Kanamycin 相比, 分别提高了 3.00、2.37 和 4.50 倍。其中, 对 *C. albicans* 的抑菌性能强于 *E. coli* 和 *S. aureus*。

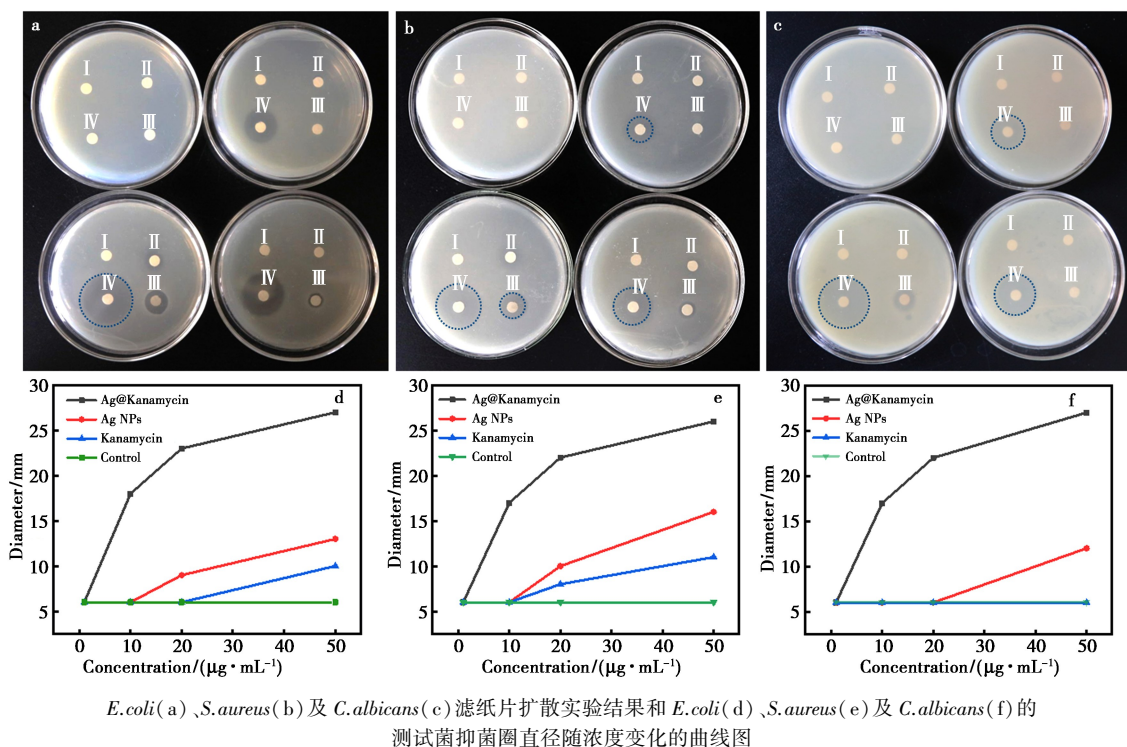


图 4 3 种测试菌滤纸片扩散结果及抑菌圈直径随浓度变化的曲线
 Fig.4 Diffusion results of three kinds of test bacteria filter paper tablets and the curve of the diameter of the inhibition circle with the change of concentration

2.3.2 菌落计数实验结果分析

菌落计数法进行定量研究复合材料抑菌活性^[21]。考察了在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下 Ag@ Kanamycin 的抑菌性能。测定浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Ag@ Kanamycin 复合材料分别和 *E. coli* (图 5a)、*S. aureus* (图 5b) 和 *C. albicans* (图 5c) 混合 0、5、10、20、40 和 80 min (编号对应 I、II、III、IV、V、VI, I 为不加复合材料的空白对照组) 后的抑菌效果。图 5d 为 Ag@ Kanamycin 复合材料对 3 种测试菌的抑菌率, 其中 *C. albicans* 在 5 min 时抑菌率已达到 90% 以上, 而 *E. coli* 和 *S. aureus* 在 40 min 后抑菌率达到 99% (图 5e)。

2.3.3 最小抑菌浓度 (MIC) 实验结果分析

采用试管二倍稀释法研究 Ag@ Kanamycin 最

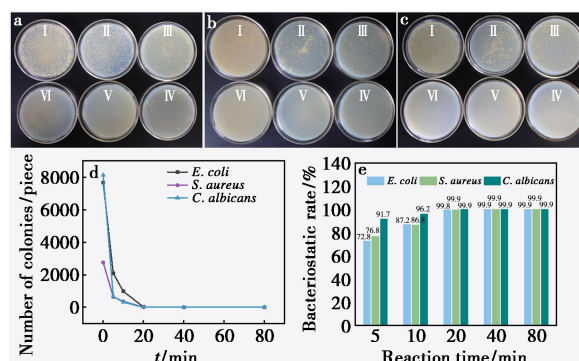


图 5 Ag@ Kanamycin 复合材料对 3 种测试菌的菌落计数结果
 Fig.5 Colony counting results of Ag@ Kanamycin composites for three test bacteria

小抑菌浓度,实验结果如表 1 所列从表中数据可知复合材料对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的最小抑菌浓度分别为 40、20 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 。其中 *C. albicans* 的最小抑菌浓度小于 *E. coli* 和 *S. aureus*,说明 Ag@ Kanamycin 复合材料对 *C. albicans* 表现出更为有效的抑制效果。

表 1 Ag@ Kanamycin 复合材料对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的 MIC 值

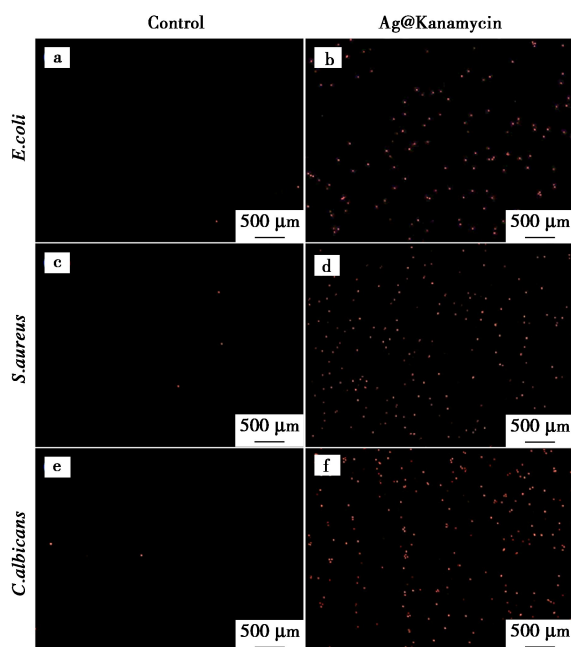
Tab.1 MIC values of Ag@ Kanamycin composites for *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans*

Bacteria	$c(\mu\text{g/mL})/\text{BD}(1 \times 10^6 \text{ CFU/mL})$							
	0	5	10	20	40	80	160	320
<i>E. coli</i>	7.34	4.27	3.46	1.29	0.34	0.27	0.21	0.16
<i>S. aureus</i>	8.76	5.45	2.01	0.44	0.28	0.25	0.18	0.14
<i>C. albicans</i>	5.41	1.87	0.46	0.31	0.28	0.23	0.15	0.13

2.4 抑菌机制探究

2.4.1 PI 染色实验结果分析

PI 可对死亡细胞 DNA 染色,能使受损细胞的细胞核在荧光显微镜下呈现出红色斑点^[22]。从图 6a~6c 中可以看到,当加入 Ag@ Kanamycin 复合材料与测试菌作用 12 h 后,3 种测试菌均显示出比对照组更多的红色荧光点(图 6d~6f),表明该复合材料对测试菌均有较强的膜损伤,Ag@



E. coli (a)、*S. aureus* (b) 及 *C. albicans* (c) 为对照组和

E. coli (d)、*S. aureus* (e) 及 *C. albicans* (f) 为实验组

图 6 Ag@ Kanamycin 复合材料对 3 种测试菌的 PI 荧光染色图片

Fig.6 Pictures of PI fluorescence staining of Ag@ Kanamycin composites on three test bacteria

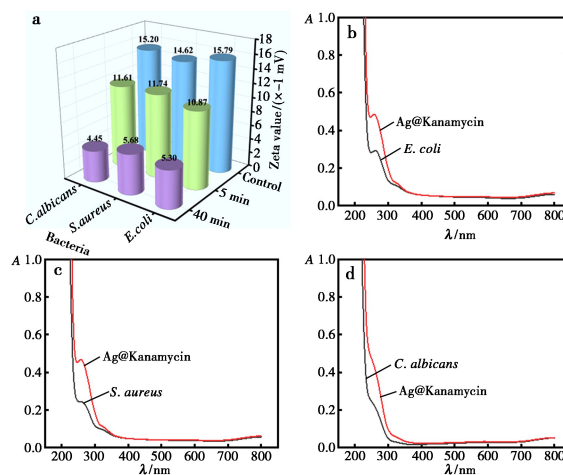
Kanamycin 复合材料可以更有效地破坏细菌细胞。

2.4.2 Zeta 电位实验结果分析

如图 7a 所示,*E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的表面电位值分别为 (-15.79 ± 0.05) 、 -14.62 、 -15.20 mV ,当 Ag@ Kanamycin 复合材料与细菌作用 5 min 后,测试得到细菌表面电位值分别为 -10.87 、 -11.74 、 -11.61 mV ;作用 40 min 后分别为 -5.30 、 -5.68 、 -4.4 mV 。细菌中的 Zeta 电位值的改变证明 Ag@ Kanamycin 复合材料与细菌作用后所释放 Ag^+ 与细菌表面带负电的活性基团作用,使细菌细胞壁负电荷密度降低^[16]。

2.4.3 细胞质泄露实验结果分析

通过 DNA 泄露法探究复合材料对细菌细胞膜的损伤程度。利用紫外-可见分光光度计在 260 nm 处可检测到细菌内容物释放量^[23]。测定结果如图 7b~7d 所示,与对照组相比,*E. coli* (图 7b)、*S. aureus* (图 7c) 和 *C. albicans* (图 7d) 与 Ag@ Kanamycin 纳米复合材料作用后在 260 nm 处的吸光度均有明显上升,表明复合材料对 3 种测试菌的细胞膜均有较强的损伤,使大量细胞内容物泄露于菌液中。



Zeta 电位 (a) 和 *E. coli* (b)、*S. aureus* (c) 和 *C. albicans* (d) 的细胞质泄露实验

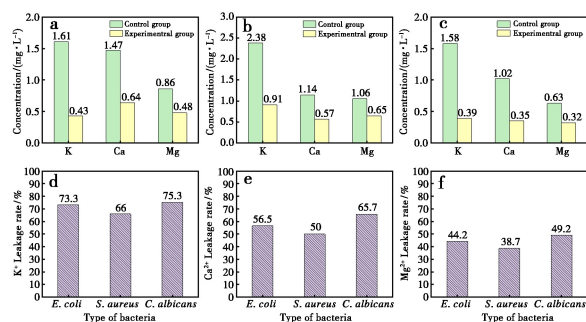
图 7 3 种测试菌及 Ag@ Kanamycin 复合材料的 Zeta 电位与细胞质泄露实验结果

Fig.7 Zeta potential and cytoplasmic leakage experimental results of three test bacteria and Ag@ Kanamycin composites

2.4.4 离子泄露结果分析

细菌细胞膜受损会导致胞内离子泄露,从而发生代谢紊乱^[24]。本实验通过测定菌体中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的泄露情况来进一步评价 Ag@

Kanamycin 纳米复合材料对 3 种测试菌 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 细胞膜通透性的变化程度。图 8a~8c 为复合材料对 3 种测试菌胞内 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 泄露的影响结果图,其中对照组中 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 胞内 K^+ 的浓度分别为 1.61、2.38 和 1.58 mg/L, Ca^{2+} 的浓度分别为 1.47、1.14 和 1.02 mg/L, Mg^{2+} 的浓度分别为 0.86、1.06 和 0.63 mg/L,说明菌体细胞维持着自身的离子通道,经复合材料作用一段时间后,*E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 胞内 K^+ 的浓度分别为 0.43、0.91 和 0.39 mg/L, Ca^{2+} 的浓度分别为 0.64、0.57 和 0.35 mg/L, Mg^{2+} 的浓度分别为 0.48、0.65 和 0.32 mg/L,其浓度均显著低于对照组。如图 8d~8f 所示,*C. albicans* 中 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的泄露率均高于 *E. coli* 和 *S. aureus*,说明该纳米复合材料对 *C. albicans* 细胞质膜造成的损伤更加严重,致使胞内离子发生泄露。实验结果表明,复合材料可以通过破坏菌体细胞膜上的离子通道,使 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 发生大量的泄露,而 K^+ 和 Ca^{2+} 是维持细菌内液渗透压和膜电位的关键性离子^[25], K^+ 和 Ca^{2+} 的泄露会致使细胞膜内外渗透压失衡,从而导致细菌死亡。



E. coli (a)、*S. aureus* (b) 和 *C. albicans* (c) 的离子泄露实验结果和细菌内 K^+ (d)、 Ca^{2+} (e)、 Mg^{2+} (f) 的泄漏率

图 8 Ag@ Kanamycin 复合材料对离子泄露结果和细菌内 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的泄漏率

Fig.8 Results of ion leakage of Ag@ Kanamycin composites and the leakage rates of intracellular K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+}

2.5 Ag@ Kanamycin 复合材料的抑菌机制

根据前文 Zeta 电位、PI 染色法、细胞质泄露法其可能抑菌机制如图 9 所示。细菌表面带电是由于细胞壁主要成分中含有一 NH_2 、 OH 、 $CONH_2$ 等阴离子活性基团^[26], Ag@ Kanamycin 纳米复合材料作为抑菌剂分散在介质中后,可分解出 Ag NPs, Ag NPs 会释放 Ag^+ , 因此,细菌表面电荷的

中和改变了细胞膜的通透性,破坏了细胞壁和细胞膜随后导致菌体凋亡,这与 Zeta 电位结果一致。Ag NPs 还可以锚定并穿透细菌胞膜,随后引发细胞膜的破坏和内容物的泄漏^[27],这与细胞质泄露、离子泄露实验结果一致。此外, Ag NPs 可以影响关键的细胞内活性,如攻击呼吸链和抑制细胞分裂。从而达到抑菌的作用^[28]。

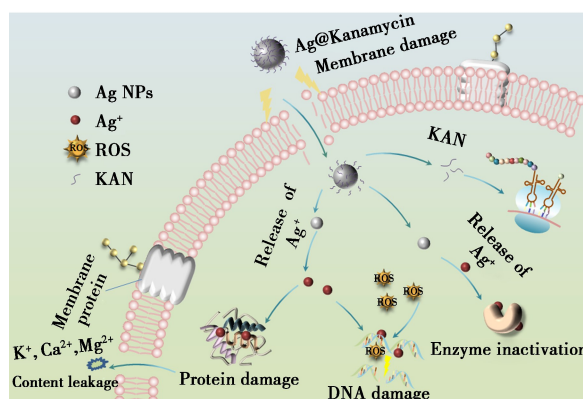


图 9 Ag@ Kanamycin 复合材料抑菌机制图

Fig.9 Bacterial inhibition mechanism diagram of Ag@ Kanamycin composites

Kanamycin 属于氨基糖苷类抗生素,氨基糖苷具有广谱抗菌活性,它们能够通过干扰信息核糖核酸与核糖核蛋白体 30S 核糖体亚基之一结合来抑制细菌中的蛋白质合成^[29],并且对需氧革兰氏阴性杆菌和某些革兰氏阳性细菌有效。在单独使用无机抗菌剂 Ag NPs 时, Ag NPs 可能会存在因不稳定和易团聚等弊端大幅降低抑菌性能;而单独使用抗生素会触发细菌耐药机制导致抗生素外排^[13,30]而失去药用价值,使其抑菌活性明显降低, Ag@ Kanamycin 纳米复合材料体现了无机与有机抑菌材料的协同作用。

3 结论

3.1 本文通过单液相化学还原法来制备 Ag NPs,并利用浸渍法结合市售抗生素合成一种将无机抑菌剂和有机抑菌剂结合且具有高效抑菌的 Ag@ Kanamycin 复合材料。

3.2 通过抑菌实验可知,复合材料对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的最小抑菌浓度分别为 40、20 和 10 $\mu g/mL$ 。与 Ag NPs 相比, Ag@ Kanamycin 复合材料对 3 种测试菌的抑菌效率分别提高了 2.08、1.63 和 2.25 倍,与单独使用 Kanamycin 相比,复合材料对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *C. albicans* 的抑菌效率分别提高了 3.00、2.37 和 4.50 倍。150

$\mu\text{g/mL}$ 的 Ag@ Kanamycin 复合材料在 40 min 后对 3 种测试菌的抑菌率均达到 99.99%。复合材料的抑菌效率优于单独抑菌剂的抑菌性能,其中该复合材料对 *C. albicans* 抑菌活性最高,且复合材料对 3 种测试菌的 MIC 分别为 40、20 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3 经抑菌机制表明,Ag@ Kanamycin 复合材料释放出的 Ag NPs 和 Ag^+ ,可改变细胞膜的完整性和潜力,从而增加细胞通透性,促进抗生素进入细胞内,提高具有细胞内靶点的抗生素的效率。 Ag^+ 吸附在菌体细胞膜表面使细菌细胞膜通透性增加,导致膜破裂,最终致使细胞凋亡。

参考文献:

- [1] LAHEIJ A, KISTLER J O, BELIBASAKIS G N, et al. Healthcare-associated viral and bacterial infections in dentistry[J]. *J. Oral. Microbio.*, 2012, **4**(1): 17-659.
- [2] 宋焕杰, 谢卫民, 王俊, 等. SPE-UPLC-MS/MS 同时测定水环境中 4 大类 15 种抗生素[J]. *分析试验室*, 2022, **41**(1): 50-54.
- [3] GASPARRINI A J, MARKLEY J L, KUMAR H, et al. Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance[J]. *Commun. Biol.*, 2020, **3**(1): 241.
- [4] LIANG S, DENG X, MA P, et al. Recent advances in nanomaterial-assisted combinational sonodynamic cancer therapy[J]. *Adv. Mater.*, 2020, **32**(47): 2 003 214.
- [5] 张慧慧, 乔增杰, 王东新, 等. 牛血清白蛋白-银纳米簇荧光淬灭法检测 H_2O_2 [J]. *分析试验室*, 2022, **41**(7): 745-749.
- [6] VANCE M E, KUIKEN T, VEJERANO E P, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory[J]. *Beilstein. J. Nanotech.*, 2015, **6**(1): 1 769-1 780.
- [7] VAZQUEZ-MUNOZ R, MEZA-VILLEZCAS A, FOURNIER P G J, et al. Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane[J]. *PLoS One*, 2019, **14**(11): e0 224 904.
- [8] DENG H, MCSHAN D, ZHANG Y, et al. Mechanistic study of the synergistic antibacterial activity of combined silver nanoparticles and common antibiotics[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**(16): 8 840-8 848.
- [9] SHAHVERDI A R, FAKHIMI A, SHAHVERDI H R, et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [J]. *Nanomed-Nanotechnol.*, 2007, **3**(2): 168-171.
- [10] JI X H, WU Y H, HAN Y Y, et al. Synergistic antibacterial study of nano- $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ @ Ag-tetracycline composites[J]. *Mater. Chem. Phys.*, 2023, **306**: 127 904.
- [11] 李永强, 胡雳, 邹婉莹, 等. 纳米银的制备研究进展[J]. *当代化工研究*, 2022, **19**: 7-12.
- [12] 郭少波, 梁艳莉, 刘智峰, 等. 四环素-Ag 复合材料的协同抑菌性能[J]. *应用化学*, 2021, **38**(11): 1 462-1 468.
- [13] 吴迎花, 陈惠惠, 房迅, 等. $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ -四环素复合材料的协同抑菌性能[J]. *复合材料学报*, 2023, **40**(12): 6 789-6 799.
- [14] 梁犇, 吴娟娟, 郑锦丽, 等. 4-羟基香豆素-Ag 复合材料的协同抑菌性能[J]. *复合材料学报*, 2023, **40**(8): 4 779-4 791.
- [15] LU T, CHEN F W. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer[J]. *J. Comput. Chem.*, 2012, **33**(5): 580-592.
- [16] 史娟, 梁犇, 宋凤敏, 等. ZnFe_2O_4 @ 聚多巴胺@ Ag 纳米复合材料的制备及其抑菌性[J]. *复合材料学报*, 2023, **40**(12): 6 774-6 788.
- [17] 张建花, 章志翔, 李蓄涵, 等. 基于银纳米颗粒免疫比色法检测甲胎蛋白[J]. *化学试剂*, 2023, **45**(10): 40-45.
- [18] KHURANA C, SHARMA P, PANDEY O P, et al. Synergistic effect of metal nanoparticles on the antimicrobial activities of antibiotics against biorecycling microbes[J]. *J. Mater. Sci. Technol.*, 2016, **32**(6): 524-532.
- [19] VAZQUEZ-MUNOZ R, LOPEZ F D, LOPEZ-RIBOT J L. Bismuth nanoantibiotics display anticandidal activity and disrupt the biofilm and cell morphology of the emergent pathogenic yeast *Candida auris* [J]. *J. Antibiot.*, 2020, **9**(8): 461.
- [20] PAUL P, VERMA S K, KUMAR P P, et al. Molecular insight to influential role of Hha-TomB toxin-antitoxin system for antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles[J]. *Artif. Cell Nanomed. B*, 2018, **46**(s3): 572-584.
- [21] NAIK M M, PRABHU M S, SAMANT S N, et al. Synergistic action of silver nanoparticles synthesized from silver resistant estuarine *Pseudomonas aeruginosa* strain Sn5 with antibiotics against antibiotic resistant bacterial human pathogens[J]. *Thalassas*, 2017, **33**(1): 73-80.
- [22] YADAV A K, SIROHI P, SARASWAT S, et al. Inhibitory mechanism on combination of phytic acid with methanol-

- ic seed extract of syzygium cumini and sodium chloride over bacillus subtilis[J].*Curr.Microbiol.*,2018,**75**:849-856.
- [23] YANG H Y, CHANG C M, CHEN Y W, et al. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide[J].*J.Sci.Food Agr.*,2006,**86**(6):937-943.
- [24] HAKTANIR I, MASOURA M, MANTZOURIDOU F T, et al. Mechanism of antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera*) venom on Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp [J].*AMB Express*, 2021,**11**(1):1-11.
- [25] 蒋思雨,郝刚,唐善虎,等.月桂酰精氨酸乙酯的抑菌活性[J].*现代食品科技*,2022,**38**(10):109-116.
- [26] WANG X L, LI Y, HUANG J, et al. Efficiency and mechanism of adsorption of low concentration uranium in water by extracellular polymeric substances[J].*J Environ. Radioactiv.*,2019,**197**:81-89.
- [27] QING Y, CHENG L, LI R, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies[J].*Int.J.Nanomed.*,2018,**12**:3 311-3 327.
- [28] WANG L, XU H, GU L, et al. Bioinspired synthesis, characterization and antibacterial activity of plant-mediated silver nanoparticles using purple sweet potato root extract[J].*Mater.Technol.*,2016;**31**:437-442.
- [29] PETERSON L R. Currently available antimicrobial agents and their potential for use as monotherapy[J].*Clin.Microbiol.Infect.*,2008,**14**:30-45.
- [30] GASPARRINI A J, MARKLEY J L, KUMAR H, et al. Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance [J].*Commun. Biol.*, 2020,**3**(1):1-12.