

蛋壳粉纳米银抗菌材料的制备及抑菌性研究

Preparation of eggshell-powder nanosilver and its antibacterial properties

陈巧玲¹ 陈碧桑² 吴秀婷¹ 游雨婷¹

CHEN Qiao-ling¹ CHEN Bi-sang² WU Xiu-ting¹ YOU Yu-ting¹

(1. 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建 漳州 363000; 2. 闽南师范大学化学与环境学院, 福建 漳州 363000)
(1. College of Biological Science And Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;
2. College of Chemistry And Environment, Minnan Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

摘要:以蛋壳粉为原料通过超声波还原法与 AgNO_3 、 NaBH_4 作用, 制备蛋壳粉纳米银。通过扫描电镜观察蛋壳粉纳米银的形貌及被其处理过的菌的形貌变化, 并通过微生物方法对其抑菌性进行研究。结果表明, 蛋壳粉纳米银对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌 4 种菌均有较好的抑菌效果, 最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 1.5、3.0、3.0、6.0 mg/L, 最低杀菌浓度 (MBC) 值分别为 6、12、12、24 mg/L。

关键词: 蛋壳粉; 纳米银; 超声波; 还原法; 抑菌

Abstract: Eggshell-powder as reactant react with AgNO_3 and NaBH_4 through ultrasonic reduction method to prepare the eggshell-powder nanosilver. The eggshell-powder nanosilver morphology and morphology changes of treated bacteria were characterized by using Scanning Electron Microscope (SEM). And its antibacterial properties were characterized by the microorganism methods. The results showed that silver nanoparticles of eggshell powder had strong bactericidal effect on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* etc. And the minimum inhibitory concentration (MIC) of this four bacterias were 1.5, 3.0, 3.0, 6.0 mg/L and minimum bactericidal concentration (MBC) were 6, 12, 12, 24 mg/L.

Keywords: eggshell-powder; nanosilver; ultrasonic; reduction method; bacteriostasis

纳米银具有量子效应高、比表面积极大、小尺寸效应、安全性高、功效持久、不易耐药等物理、化学和生物特性^[1], 已被广泛应用于化工催化、食品保鲜、包装材料、光学、电子工业、生物医药等方面^[2-4]。但由于纳米银易聚合^[1], 因此制备纳米银复合材料常常需要添加稳定剂防止团聚。

蛋壳为多孔质结构, 生物安全性高, 主要是由碳酸钙与蛋白质组成的高度有序的生物矿物质^[5]。蛋壳常被加工成蛋壳粉, 广泛应用于食品行业^[6-7]、畜牧业^[8]、医药^[9-10]、日化^[11]等方面。蛋壳总重量的 3.5% 为有机物, 其中, 蛋白质占 70%, 多糖占 13%^[5]。蛋白质、多糖中含有一定数量的氨基及羧基可以充当纳米银的稳定剂。

近年来, 利用银的无毒、无过敏、不具耐药性等优点, 进行纳米银复合材料的制备及其性能的研究备受关注。壳聚糖纳米银^[12]、纳米银凝胶^[13]等具有良好杀菌性能的纳米银材料得到广泛研究。但利用蛋壳粉这一生物安全性极高, 并具有一定营养价值的材料, 制备纳米银复合物的方法尚未见报道。本试验通过化学还原法, 利用 NaBH_4 的强还原性将银还原至蛋壳粉空隙中, 制成新型的抗菌材料, 并通过抑菌试验研究蛋壳粉纳米银的抑菌性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

白色念珠菌 (GIM 2.194 *Candida albicans*)、大肠杆菌 (GIM 1.559 *Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (GIM 1.977 *Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (GIM 1.221 *Staphylococcus aureus*): 广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.2 主要试剂

95% 酒精、 AgNO_3 、戊二醛、叔丁醇、 NaBH_4 : AR 级, 西陇化工股份有限公司;

营养琼脂: 琼脂 15~20 g、牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、蒸馏水 1 000 mL、调 pH 至 7.3±0.1, 在 121 °C 下灭菌 15 min;

LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、调 pH 至 7.0, 在 121 °C 下灭菌 15 min;

普通肉汤: 蛋白胨 20 g、氯化钠 5 g、牛肉粉 5 g、调 pH 至 7.5±0.1, 在 121 °C 下灭菌 15 min;

基金项目: 福建省教育厅 A 类项目 (编号: JAT160289)
作者简介: 陈巧玲 (1986—), 女, 闽南师范大学实验师, 硕士。
E-mail: chenqiaoling.com.1@163.com

收稿日期: 2018-03-26

10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤:丙酮酸钠 10 g、胰蛋白胨 17 g、氯化钠 100 g、大豆蛋白胨 3 g、葡萄糖 2.5 g、磷酸氢二钾 2.5 g、调 pH 至 7.3±0.2,在 121 ℃ 下灭菌 15 min;

马铃薯培养基:马铃薯粉 6.0 g、琼脂 20.0 g、葡萄糖 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL、调 pH 至 5.6±0.2,在 121 ℃ 下灭菌 15 min;

MH 肉汤:牛肉粉 2.0 g、酸水解酪蛋白 17.5 g、可溶性淀粉 1.5 g、蒸馏水 1 000 mL、调 pH 至 7.4±0.2,在 121 ℃ 下灭菌 15 min。

1.1.3 主要仪器设备

扫描电子显微镜:JSM-6010LA 型,日本电子株式会社;
星形球磨机:KQM-X4B 型,咸阳金宏通用机械有限公司;

旋转蒸发仪:RE-52AA 型,上海亚荣生化仪器厂;
旋转摇床:ZWY-240 型,上海智城分析仪器制造有限公司;

生化培养箱:LRH-250 型,上海博迅有限公司;
灭菌锅:YXQ-LS-75G 型,上海博讯有限公司;
冻干机:ALPHA1-2 LD-PLUS 型,德国 MarinChrist 公司;

恒温水浴锅:HH-6 型,金坛市鸿科仪器厂;
电子分析天平:E240 型,梅特勒—托利多国际贸易(上海)有限公司;

超净工作台:SW-CJ-1FD 型,苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 2 种含纳米银蛋壳粉的制备及电镜观察

- (1) 鸡蛋壳洗净烘干,球磨机研磨成粉末备用。
- (2) A 法蛋壳粉纳米银(Ag⁺先吸附后还原):称取 0.5 g 鸡蛋壳粉于 10 mL 的 12 mg/L AgNO₃ 溶液中,超声 10 min,加入 15 mL 的 0.2 mmol/L NaBH₄,继续超声 10 min 后,备用^[12,14]。
- (3) B 法蛋壳粉纳米银(Ag⁺先还原后吸附):称取 0.5 g 的鸡蛋壳粉加入 10 mL 的 12 mg/L AgNO₃ 溶液中,并加入 15 mL 已配好的 NaBH₄,超声 20 min 后,备用^[12,14]。

(4) 电镜观察:取 2 种方法制备的各浓度梯度的纳米银蛋壳粉溶液烘干,制备相应的硅片样本进行扫描电镜观察以及能量色散光谱仪(EDS)进行能谱点扫表征。

1.2.2 对比 2 种方法制得的蛋壳粉纳米银的抑菌效果

(1) 菌液制备方法:将超低温冰箱冻存的菌种取出解冻后接种至 100 mL 各菌种所对应的液体培养基中,在 37 ℃、200 r/min、24 h 的条件下摇床培养,采用血球计数板进行计数,确定各菌液的浓度。

其中,大肠杆菌用普通肉汤液体培养基活化培养,LB 固体培养基进行抑菌试验;金黄葡萄球菌用 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤液体培养基活化菌种,营养琼脂固体培养基进行抑菌试验;白色念珠菌用改良马丁液体培养基进行菌种活化,改良马丁固体培养基进行抑菌性试验;枯草芽孢杆菌用普通肉汤液体培养基进行菌种活化,营养琼脂固体培养基进行抑菌

试验。

(2) 预加菌液法制作平板:分别将冻存的约 1 mL 的菌液接种至灭菌的 50 ℃ 左右的培养基中,制得浓度均为 1×10⁶ CFU/mL 的各种菌液,倒平板,凝固后备用。

(3) 抑菌材料试验浓度:将制备好的 2 种纳米银蛋壳粉对倍稀释成 12.00,6.00,3.00,1.50,0.75,0.38,0.19,0.09,0.05 mg/L 的溶液进行抑菌试验。

(4) 抑菌圈试验:采用打孔法。用已灭菌的 6 mm 左右的打孔器在平板上打孔,挑去圆孔培养基做成直径 6 mm 左右的圆孔,分别往圆孔中倒入 80 μL 各种浓度的蛋壳粉纳米银悬浊液,在 4 ℃ 冰箱中预扩散 2 h,培养箱中于 37 ℃ 倒置培养 24 h,取出测量抑菌圈直径。

(5) 抑菌圈直径测量:用游标卡尺进行十字交叉测量。
1.2.3 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定

取 2 种蛋壳粉纳米银中抑菌效果较好的一组进行抑菌试验。

(1) 最低抑菌浓度(MIC):在无菌环境下制备 MIC 孔板,将已倍比稀释后的不同浓度梯度的蛋壳粉纳米银悬浊液按顺序加到 96 孔聚苯乙烯无菌板中,从第 1 孔至第 11 孔进行加药,10 μL/孔,第 12 孔为生长阳性对照不加药,第 13 孔为阴性对照(无菌悬液、无蛋壳粉纳米银)。制备浓度为 0.5 麦氏比浊度的标准菌悬液,用 MH 肉汤进行 1:1 000 稀释后向每孔中注入 100 μL,密封并置于 35 ℃ 培养箱中孵育 16~20 h。使用血球计数板计数的方法,用电子显微镜观察每个孔中菌的数量,以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。当阳性对照孔(即不含测试药物)内细菌明显生长试验才有意义。当在微量肉汤稀释法出现单一的跳孔时,应记录抑制细菌生长的最高药物浓度。如出现多处跳孔,则不应报告结果,需重复试验。

(2) 最低杀菌浓度(MBC):取 MIC 试验结果中,无菌生长的各培养管中的培养液 0.1 mL,移种到新鲜的琼脂培养基上,37 ℃ 培养 24 h,以无菌落生长的最低浓度为药液的 MBC。同时取有菌生长的培养管中培养液 0.1 mL 进行平皿培养作为阳性对照,仅含新鲜琼脂培养基的平皿为阴性对照。

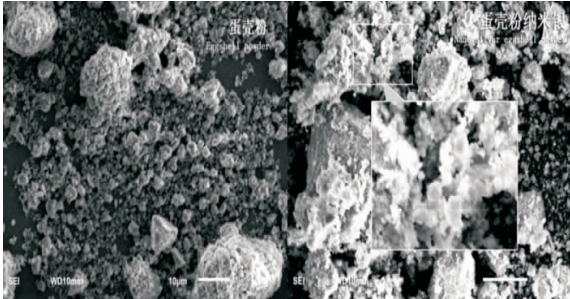
1.2.4 扫描电镜下观察菌体形貌变化 纳米银蛋壳粉处理后的菌悬液置于冷冻离心机中以 5 000 r/min 离心 15 min。取样加入预冷的 4%戊二醛,4 ℃ 固定 2 h 后,用 0.1 mol pH 7.4 磷酸缓冲液漂洗 2 次,每次 10 min,用 1%锇酸固定液固定 1 h,再用 0.1 mol pH 7.4 磷酸缓冲液反复漂洗 3 次每次 10 min。在 4 ℃ 冰箱内进行梯度脱水,30%乙醇—50%乙醇—70%乙醇后 90%乙醇—95%乙醇—100%乙醇,各脱水 15 min。然后,从乙醇逐步过渡到多次纯叔丁醇后置于冰箱内过夜结晶。电镜观察前冷冻干燥,后将样品进行喷金处理。样品喷金后即可进行电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 蛋壳粉纳米银的形貌观察、EDS 表征及银负载量测定
灭菌后的蛋壳粉以及负载银的蛋壳粉形貌见图 1。球磨

后蛋壳粉呈白色粉状,粉末孔径疏松,呈蜂窝状。此结构有利于银附着,也有利于后续使用过程中银的释放。负载银后的蛋壳粉表面更为紧实。蛋壳粉的主要成分是碳酸钙,从显微结构来看,化学方法获得的碳酸钙为坚实的片状,而蛋壳这种多孔结构,可能是蛋壳粉比普通碳酸钙更易被吸收的主要原因^[1]。至于纳米银与蛋壳粉之间是否存在某种键合仍需要进一步研究。

对所制备的蛋壳粉纳米银进行 EDS 能谱扫描,结果如图 2、表 1 所示,样品中负载有银。每个浓度梯度的蛋壳粉纳



(a) 蛋壳粉 (b) 蛋壳粉纳米银

图 1 蛋壳粉载银前后形貌对比

Figure 1 Morphology before and after silver treat with eggshell powder

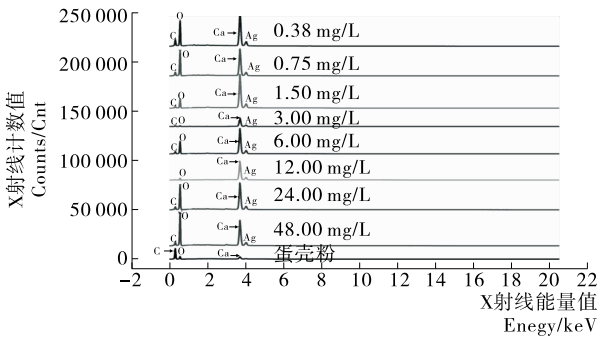


图 2 蛋壳粉以及蛋壳粉纳米银材料的元素分布(EDS)

Figure 2 Elemental distribution of eggshell powder and the nano-silver eggshell powder

米银中银元素所占的质量分数以及原子数比可以通过表 1 查得。而低于 0.38 mg/L 的蛋壳粉纳米银无法检出银。

2.2 抑菌试验

如表 2 所示,A 法及 B 法蛋壳粉纳米银对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌等均有抑菌效果。由抑菌圈大小可见这 2 种方法所得的蛋壳粉纳米银对大肠杆菌的抑菌效果最好,对白色念珠菌的抑菌效果最弱。可能是革兰氏阴性菌细胞壁的肽聚糖层是由脂质和多糖共价而成的网状结构,整体强度和硬度较弱^[15],且细胞壁较薄(约

表 1 样品中各元素的质量比和原子数比

Table 1 The elements mass ratio and atom ratio of different samples

样品	C		O		Ca		Ag	
	质量比	原子数比	质量比	原子数比	质量比	原子数比	质量比	原子数比
蛋壳粉	61.71	70.26	32.46	27.75	5.83	1.99	0.00	0.00
48.00 mg/L 蛋壳粉纳米银	8.56	12.95	62.08	70.51	17.68	8.02	1.12	0.19
24.00 mg/L 蛋壳粉纳米银	0.78	0.13	59.74	69.34	21.39	9.91	0.78	0.13
12.00 mg/L 蛋壳粉纳米银	3.41	6.85	36.75	55.50	55.31	33.35	0.56	0.12
6.00 mg/L 蛋壳粉纳米银	9.43	15.01	55.36	66.17	28.99	13.83	0.28	0.05
3.00 mg/L 蛋壳粉纳米银	15.57	27.67	34.21	45.65	49.99	26.63	0.23	0.05
1.50 mg/L 蛋壳粉纳米银	6.87	11.75	50.19	64.43	37.86	19.40	0.16	0.03
0.75 mg/L 蛋壳粉纳米银	10.35	15.65	59.85	67.97	21.14	9.58	0.07	0.01
0.38 mg/L 蛋壳粉纳米银	14.33	21.49	54.79	61.70	22.04	9.91	0.05	0.01

表 2 A、B 法蛋壳粉纳米银的抑菌效果

Table 2 A, B The effect of eggshell-powder nanosilver on bacteriostasis

蛋壳粉纳米银浓度/ (mg · L ⁻¹)	大肠杆菌/mm		金黄色葡萄球菌/mm		枯草芽孢杆菌/mm		白色念珠菌/mm	
	A 法	B 法	A 法	B 法	A 法	B 法	A 法	B 法
12.00	28	26	22	20	25	23	20	19
6.00	20	17	13	11	19	17	12	12
3.00	17	15	9	8	10	10	9	8
1.50	13	12	7	7	8	8	8	7
0.75	10	9	0	0	7	7	0	0
0.38	7	8	0	0	0	0	0	0
0.19	0	0	0	0	0	0	0	0
0.09	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	0	0	0	0	0	0	0

7~8 nm),纳米银较易吸附和穿透。而革兰氏阳性菌结构中无细胞膜、脂多糖和周质间隙等,组成细胞壁的糖链通过肽键交联形成较高强度的细胞壁结构,纳米银不容易吸附和穿透,破坏杀灭效果就较差。因此,纳米银对革兰氏阴性细菌的抑制作用更加明显。也有报道^[16]指出,原核生物由于没有细胞器和核膜,纳米银对其所起的作用大于真核生物。如白色念珠菌为真核生物,从抑菌圈大小可见纳米银蛋壳粉对白色念珠菌的抑制效果弱于其他3种细菌(原核生物)。而由表2的结果可知,A法制得的蛋壳粉纳米银对这几种菌的抑制效果优于B法的。因此,选择A法获得的蛋壳粉纳米银进行这几种菌的MIC以及MBC值测定。

2.3 MIC、MBC 值

如表3、4所示,蛋壳粉纳米银溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的MIC分别为1.5,3.0,3.0,6.0 mg/L,MBC分别为6,12,12,24 mg/L。可见,

表3 A法蛋壳粉纳米银对各种菌的MIC测定结果[†]
Table 3 A The results of MIC determination of eggshell-powder nanosilver on various bacteria

蛋壳粉纳米银 浓度/(mg·L ⁻¹)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌
48.00	—	—	—	—
24.00	—	—	—	—
12.00	—	—	—	—
6.00	—	—	—	—
3.00	—	—	—	+
1.50	—	+	+	+
0.75	+	+	+	+
0.38	+	+	+	+
0.19	+	+	+	+
阳性对照	+	+	+	+
阴性对照	—	—	—	—

† “+”菌落不可计数;“—”无菌落生长;阳性对照:添加菌液的MH肉汤;阴性对照:MH肉汤。

表4 A法蛋壳粉纳米银对各种菌的MBC测定结果[†]
Table 4 A The results of MBC determination of eggshell-powder nanosilver on various bacteria

蛋壳粉纳米银 浓度/(mg·L ⁻¹)	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌
48	—	—	—	—
24	—	—	—	—
12	—	—	—	+
6	—	+	+	+
3	+	+	+	+
阳性对照	+	+	+	+
阴性对照	—	—	—	—

† “+”菌落不可计数;“—”无菌落生长;阳性对照:取有菌生长的MIC培养液至琼脂培养基中培养;阴性对照:新鲜琼脂培养基。

其对真菌的杀菌效果较弱。李飞飞等^[17]制作的纳米银抑菌喷射剂对多种菌均有杀菌效果,其中测得大肠杆菌和金黄色葡萄球菌MIC值均为3.13 mg/L,白色念珠菌的MIC值均为1.56 mg/L;MBC值分别为25.0,25.0,12.5 mg/L,与本研究结果略有出入,可能与纳米银的形态和粒径大小有关。

2.4 蛋壳粉纳米银处理对菌体形貌的影响

2.4.1 大肠杆菌经蛋壳粉纳米银处理后的形貌变化 由图3可见,纳米银粒子致使细胞壁上产生裂缝和孔洞,通过这些间隙到达周质空间后细胞膜被破坏。纳米银即可进入细胞内,导致DNA呈紧张状态,最后胞内物质流失,细胞呈皱缩状,这与谢小保等^[18]研究结果相似。Sondi等^[19]的研究也发现在扫描电镜下观察经纳米银处理过的大肠杆菌,细胞壁上出现很多孔洞,细胞被破坏严重,还发现纳米银粒子与死亡的细胞发生聚集形成聚集体。

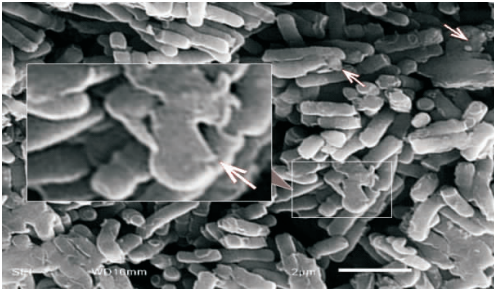


图3 蛋壳粉纳米银处理后的大肠杆菌电镜形貌
Figure 3 The morphology of *Escherichia coli* after treated by eggshell-powder nanosilver

2.4.2 金黄色葡萄球菌经蛋壳粉纳米银处理后的形貌变化

如图4所示,蛋壳粉纳米银处理后的金黄色葡萄球菌细胞壁破裂痕明显,破裂的细胞细胞质外流,细胞内部空虚,导致细胞死亡。段晓杰等^[20]的研究也表明,纳米银对金黄色葡萄球菌有抗菌作用可导致细胞壁破裂从而胞内物质外流,纳米银可能进入胞内致其死亡,与本研究所得的结果基本一致。

2.4.3 枯草芽孢杆菌经蛋壳粉纳米银处理后的形貌变化

如图5所示,枯草芽孢杆菌经蛋壳粉纳米银处理后,细胞膜表面出现皱缩和破裂,部分个体断裂,细胞质外流使菌体表面被覆盖,样品在扫描电镜下出现模糊。纳米银通过破

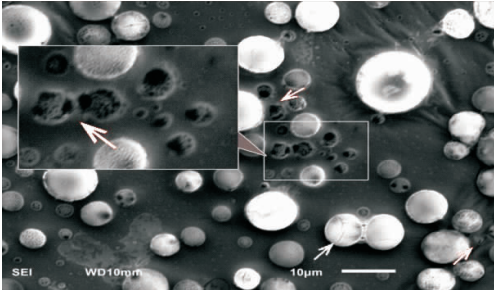


图4 蛋壳粉纳米银处理后的金黄色葡萄球菌电镜形貌
Figure 4 The morphology of *Staphylococcus aureus* after treated by eggshell-powder nanosilver

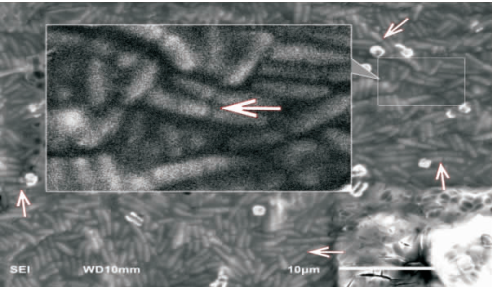


图 5 蛋壳粉纳米银处理后的枯草芽孢杆菌电镜形貌
Figure 5 The morphology of *Bacillus subtilis* after treated by eggshell-powder nanosilver

坏的细胞壁进入细胞内部,致使细胞凋亡。Li 等^[21]研究表明,经纳米银作用后菌膜的通透性发生改变,细胞内大量还原糖、蛋白质泄漏到细胞外。

2.4.4 白色念珠菌经蛋壳粉纳米银处理后的形貌变化 如图 6 所示,经蛋壳粉纳米银作用后的白色念珠菌,在扫描电镜下观察菌体呈现不规则形态,表面有明显的凹陷,裂痕。部分白色念珠菌的细胞壁、细胞膜出现断裂,细胞核心溶解,菌体干瘪似空壳。可见纳米银蛋壳粉中的纳米银能够有效的杀灭白色念珠菌,抗菌性能较好。李飞飞等^[17]的研究结果也表明纳米银对白色念珠菌这样的真菌杀灭效果较好,与本研究结果基本一致。

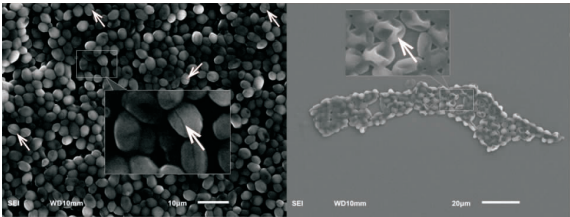


图 6 蛋壳粉纳米银处理后的白色念珠菌电镜形貌
Figure 6 The morphology of *Candida albicans* after treated by eggshell-powder nanosilver

3 结论

蛋壳粉特有的空间结构为纳米银的附着与后期缓慢释放提供了可能。将银离子先吸附到蛋壳粉上,后将其还原,这种方法获得的蛋壳粉纳米银的抑菌、杀菌效果较好。这可能是液体渗入蛋壳粉的结构内部,使银离子可以均匀地分散在蛋壳粉中,形成较为稳定的状态,还原后可以稳定地附着在蛋壳粉表面。蛋壳粉纳米银的抗菌性能较强,能够使大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌等菌体表面出现裂痕,胞内物质析出,菌体死亡。而所制备的蛋壳粉纳米银对于各种菌的抑制效果是否具有持续性,是否能够在长期的作用过程中缓释抑制菌的生长,还需要进一步的验证。研究蛋壳粉纳米银在食品保鲜、化妆品,包装材料以及一些医疗药物及器械中的运用是接下来研究的重点。综上,以蛋壳粉为基体负载纳米银,拓宽了蛋壳粉的应用领域和应用前景,同时为纳米银的研究提供了新的方向。

参考文献

[1] 曾琦斐,李绍国,谭荣喜,等. 纳米银的制备及其应用研究进展[J]. 应用化工, 2014, 43(5): 919-922.

[2] 杨龙平,章建浩,黄明明,等. 纳米材料在食品包装中的应用及安全性评价[J]. 包装工程, 2015, 36(1): 19-23, 56.

[3] 陈丽琼,李荣先. 纳米银溶胶在抗菌内墙涂料中的应用研究[J]. 新型建筑材料, 2007, 34(10): 34.

[4] 胡晓骅. 纳米银抗菌医用敷料银离子吸收和临床应用[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(24): 2 178.

[5] 刘亚平,马美湖. 蛋壳特异性基质蛋白结构与功能特性研究进展[J]. 中国家禽, 2015, 37(13): 50-56.

[6] 宾冬梅. 蛋壳粉补钙面条加工技术研究[J]. 现代食品科技, 2008 (10): 1 002-1 005, 1 067.

[7] 吴江. 蛋壳粉在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 1998 (1): 67-68.

[8] 夏宁,迟玉杰,孙波,等. 蛋壳粉的功能与利用[J]. 中国家禽, 2007(4): 51-53.

[9] 李桂英,张尚桓. 鸡蛋壳的综合利用[J]. 化学世界, 1992(11): 522-524.

[10] 胡荣,郭守立,马宇熙,等. 鸡蛋壳超微粉体性质及其对谷氨酸螯合钙制备的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(10): 251-257.

[11] 李鑫,赵燕,李建科,等. 蛋壳膜中美容活性物质的提取与应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 427-430.

[12] 张雨菲,李友良,姚远,等. 壳聚糖纳米银溶液的稳定性及在织物抗菌整理上的应用[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(8): 1 860-1 865.

[13] 杨立群,林凯城,沈荣春,等. 含纳米银的抗菌水凝胶研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(6): 58-61.

[14] 代小英,许欣,陈昭斌,等. 纳米银制备方法概述[J]. 中国消毒学杂志, 2007(6): 561-563.

[15] UMADEVI M, RANI T, BALAKRISHNAN T, et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticles prepared under an ultrasonic field[J]. Environ. Sci. Technol., 2011, 5(4): 1 941-1 946.

[16] ARAKAWA H, NEAULT J F, TAJMIR-RIABI H A. Silver (I) complexes with DNA and RNA studied by fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis[J]. Biochemistry, 2005, 87(44): 1 580-1 587.

[17] 李飞飞,吴国丽,布紫云,等. 一种纳米银抑菌喷剂的杀菌效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(11): 1 074-1 076.

[18] 谢小保,李文茹,曾海燕,等. 纳米银对大肠杆菌的抗菌作用及其机制[J]. 材料工程, 2008(10): 106-109.

[19] SONDI I, SALOPEKA SONDI B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent; a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2004, 275: 177-182.

[20] 段晓杰,杜晓丹,张蓓蓓. 纳米银对金黄色葡萄球菌的抗菌作用及其机制研究[J]. 生物医学工程与临床, 2015, 19(3): 237-240.

[21] LI Wen-ru, XIE Xiao-bao, SHI Qing-shan, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85 (4): 1 115-1 122.