

Al₂O₃ 负载 Ag 催化剂的杀菌作用

闫丽珠¹, 陈梅雪², 贺泓¹, 曲久辉²

(1 中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085 ;

2 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京 100085)

摘要 : 考察了空气中 Al₂O₃ 负载的 Ag 催化剂 (Ag/Al₂O₃ 和 AgCl/Al₂O₃) 对大肠杆菌 (*E. coli*) 的杀灭作用。结果表明, 负载 Ag 的催化剂的杀菌效果明显好于 Al₂O₃。在空气中, 催化剂上溶出的 Ag⁺ 对细菌的重金属毒性可以忽略。Ag/Al₂O₃, AgCl/Al₂O₃ 和 Al₂O₃ 在有氧和无氧条件下的杀菌效果表明, Ag 促进了催化剂表面分子态氧向活性氧转化, 活性氧通过氧化作用破坏 *E. coli* 的细胞膜, 从而提高了催化剂的杀菌能力。扫描电镜结果证实在催化剂表面 *E. coli* 细胞的破坏是从细胞膜开始的。

关键词 : 氧化铝, 银, 活性氧, 杀菌作用, 大肠杆菌

中图分类号 : O643/R91 文献标识码 : A

Bactericidal Effect of Al₂O₃-Supported Ag Catalyst

YAN Lizhu¹, CHEN Meixue², HE Hong^{1*}, QU Jiuhui²

(1 State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2 State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract : The bactericidal effect of the Al₂O₃-supported Ag catalyst (Ag/Al₂O₃ and AgCl/Al₂O₃) against *E. coli* in air was investigated. The results indicated that the colony-forming ability of *E. coli* was completely lost on the catalyst. The toxicity of Ag⁺ eluted from the catalyst could be ignored under the experimental conditions. The results with and without the presence of oxygen showed that Ag promoted the transformation of oxygen molecules to reactive oxygen species (ROS), and ROS destroyed the cell membrane of *E. coli* through oxidation. Thus the existence of oxygen was a fatal factor to the bactericidal effect of Ag/Al₂O₃ and AgCl/Al₂O₃. Scanning electron microscopy confirmed that the primary breakage of cells was on the membrane.

Key words : alumina, silver, reactive oxygen, bactericidal effect, *Escherichia coli*

自从 2003 年非典型性肺炎 (SARS) 疫情暴发以来, 杀菌剂的研究与开发受到了广泛的重视。传统的氯、过氧乙酸和过氧化氢等杀菌剂的耐热性低, 杀菌能力不能长效保持, 而且对人类健康和生态环境有危害。尽管 TiO₂ 光催化杀菌技术弥补了上述缺陷, 但该过程必须有紫外光照射, 设备复杂, 并且具有一定危险性。我们最近的研究结果表明^[1], 在空气中和无需光照的条件下, Ag/Al₂O₃ 催化剂对 SARS 冠状病毒、大肠杆菌 (*E. coli*) 和多形德巴利

酵母菌 (*D. polymorphus*) 具有很好的杀灭作用。另外, 作为一种稳定的固体无机物, Ag/Al₂O₃ 可以负载在其他材料上, 有望制成具有长效杀菌作用的滤料、涂料和织物等功能材料, 具有广阔的应用前景。

文献[2~5]报道, 含 Ag 材料在水中逐渐溶出 Ag⁺, Ag⁺ 可以通过库仑力与带有负电的细菌结合, 进而穿过细胞膜使蛋白质凝聚并使其丧失功能和活性, 起到杀菌作用。研究表明^[1,3,4,6,7], Ag 元素能够激活 O₂, 使之成为氧化作用极强的活性氧,

活性氧对细菌有很强的杀伤力,从而实现含 Ag 材料的催化杀菌. 从刘中民等^[8]的研究结果看,许多催化材料对吸附在表面的微生物具有明显的破坏作用,说明催化微生物灭活作用是普遍存在的现象.

本文考察了空气中 Al_2O_3 负载 Ag 催化剂($\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$)对 *E. coli* 的杀灭能力,利用扫描电镜(SEM)对催化剂表面菌体的破坏情况进行了分析,探讨了催化剂上溶出的 Ag^+ 在杀菌过程中的作用,并结合水溶液中有氧和无氧条件下 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 杀菌能力的变化,提出了 Al_2O_3 负载 Ag 催化剂的杀菌机理.

1 实验部分

1.1 催化剂的制备

按文献[9]制备 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 催化剂,并以 Al_2O_3 粉末作为参比样品. 筛取 0.3~0.6 mm 的样品压成片状,并于 600 °C 焙烧 3 h,备用.

1.2 菌液的配制

采用中国普通微生物菌种保藏管理中心提供的 *E. coli* K-12 菌种(ATCC23716). 将活化的 *E. coli* K-12 接种到 50 ml 的 LB 液体培养基(购自瑞士 Fluka 公司)中,37 °C 培养 24 h,吸取其中 20 μl 接种到 50 ml 新鲜液体培养基中,相同条件下培养 4 h,以保证细菌处于活性较强的对数生长期.

培养过程完成后,采用离心的方法将 *E. coli* K-12 从液体培养基中分离出来,并用无菌水稀释,配成一定浓度的初始菌液. 用平板计数法确定该菌液的浓度,初始菌液的浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFU/ml(CFU 为菌落形成单位).

1.3 催化剂杀菌活性的测定

向新鲜催化剂样品片表面滴加 20 μl 初始菌液,经过一定时间(0.5, 2, 5, 10 和 20 min)后,用无菌生理盐水洗脱,并记录洗脱水体积,用平板计数法得到上述生理盐水中细菌的浓度,从而换算出样品片上残留活菌的浓度.

为考察杀菌后催化剂表面的恢复情况,用已经接触过初始菌液的样品片重复上述杀菌实验. 样品片恢复时间(即两次滴加菌液的间隔时间)分别为 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 恢复 2 和 10 min, $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 恢复 2 和 10 min, Al_2O_3 恢复 1 和 24 h.

1.4 Ag^+ 对杀菌效果的影响

配制一系列浓度的 AgNO_3 溶液,各取 4 ml 与 20 μl 初始菌液混合,接触一定时间(5, 20, 1 440

min)后立即取出 0.5 ml 溶液并向其中注入 4.5 ml 生理盐水,用平板计数法计算出与该浓度的 AgNO_3 溶液接触后残余的细菌浓度. 将 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 样品片在 5 ml 蒸馏水中浸泡 20 min,利用 Optima 2000 型等离子体发射光谱仪测定样品溶出的 Ag^+ 浓度,然后根据上述标准曲线确定溶出 Ag^+ 对催化剂杀菌能力的贡献.

1.5 O_2 对杀菌效果的影响

将 40 ml 无菌水与 0.5 g 催化剂(>40 目)粉末均匀混合,分别通入 0.8 ml/min 的 O_2 和 N_2 . 曝气 40 min 后,加入 10 ml 菌液,继续曝气,定时采样 0.5 ml,立即注入 4.5 ml 生理盐水以消除 Ag^+ 的作用,并计算残留细菌的数量.

1.6 SEM 观察实验

在催化剂样品片上滴加 20 μl 初始菌液,经过一定时间后用戊二醛-锇酸双固定,然后在 FEI Quanta 200 型扫描电子显微镜上观察不同样品表面细菌的形貌变化.

2 结果与讨论

2.1 催化剂杀菌活性测定结果

空气中不同催化剂的杀菌作用示于图 1. 可以看出, $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 的杀菌作用非常快速有效,仅与细菌接触 0.5 min 就能将其全部杀灭. Al_2O_3 上的细菌随接触时间的延长而减少,但是接触 10 min 后,其表面残留的活菌浓度仍达 1×10^3 CFU/ml.

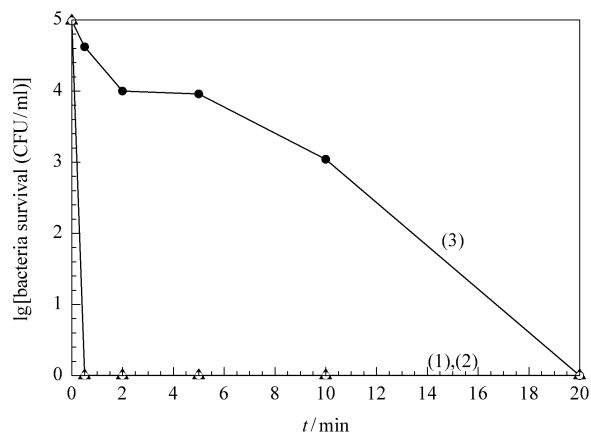


图 1 不同催化剂对大肠杆菌的杀菌作用

Fig 1 Bactericidal effect of different catalysts against *E. coli* K-12
(1) $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$, (2) $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$, (3) Al_2O_3
(*E. coli* K-12 represents *E. coli* K-12 (ATCC23716), the experiment was carried out in air, the same below unless stated otherwise. CFU — Colony-forming units)

不同催化剂表面杀菌能力的恢复实验结果示于图 2. $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 在 2 min 内就能恢复杀菌能力, $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 样品表面染菌 10 min 后便能恢复杀菌能

力, 而 Al_2O_3 在 24 h 后还未恢复杀菌能力. 由上述实验可以看出, Al_2O_3 负载的 Ag 催化剂具有非常强的杀菌能力和表面恢复能力.

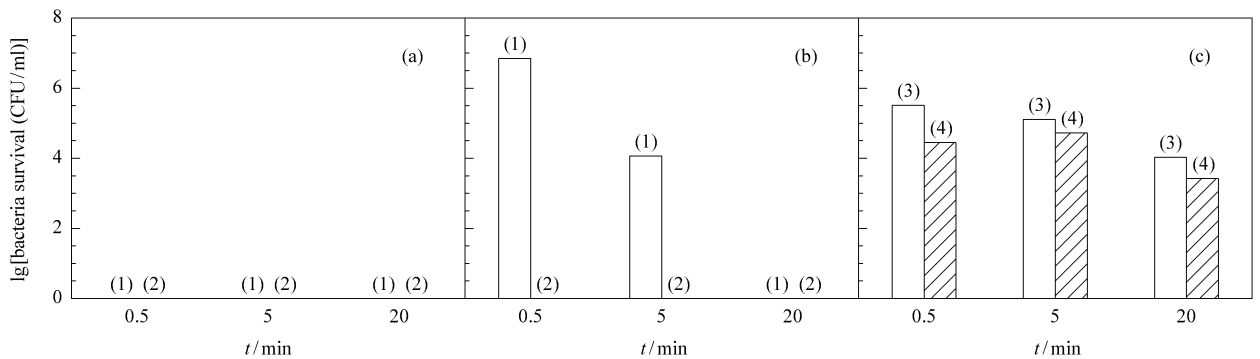


图 2 不同恢复时间后催化剂对大肠杆菌的杀菌作用

Fig 2 Bactericidal effect of different catalysts after contact with *E. coli* K-12 and being recovered for various time (a) $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$, (b) $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$, (c) Al_2O_3 ; (1) 2 min, (2) 10 min, (3) 1 h, (4) 24 h

2.2 SEM 观察实验结果

采用 SEM 观察了菌种在不同催化剂表面的形

貌, 结果如图 3 所示. 可以看出, 在 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 样品片上, 细胞内容物在短时间内大量喷出, 催化剂表面

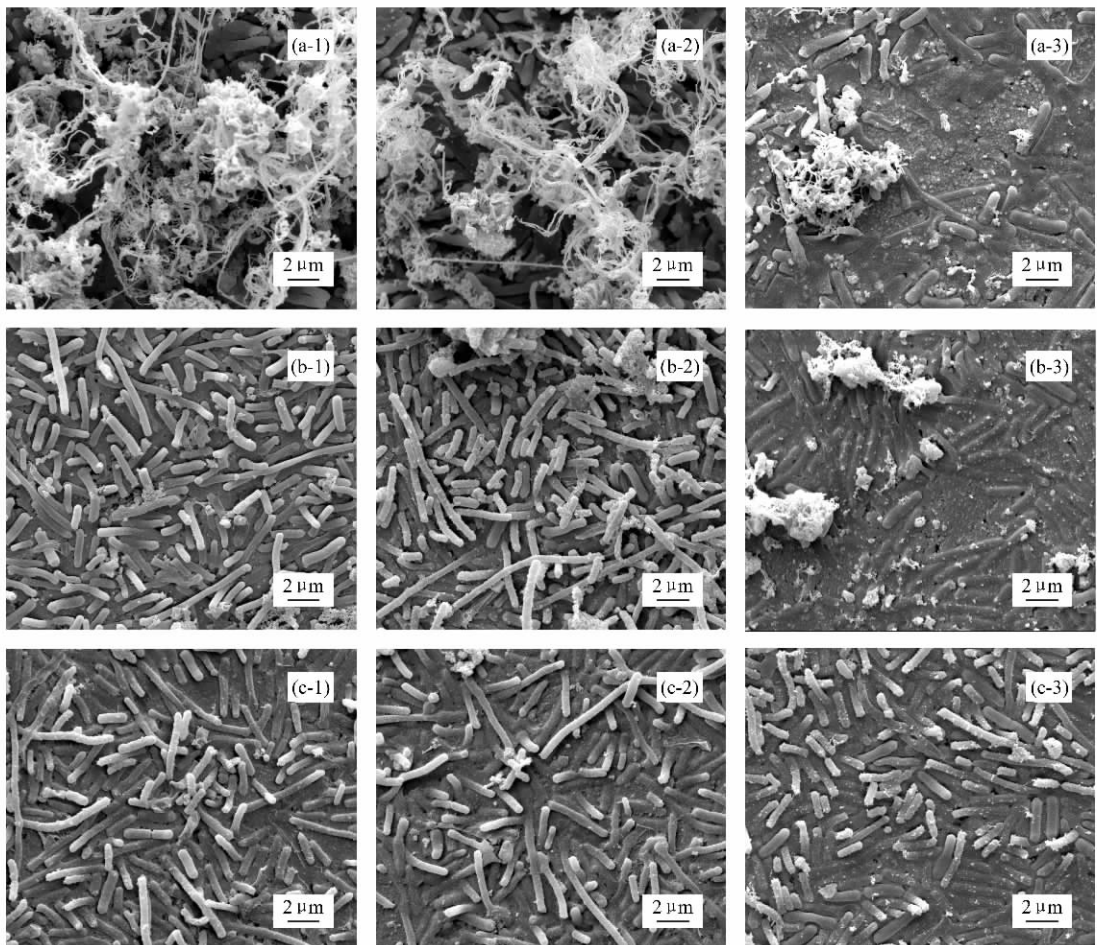


图 3 杀菌过程中与不同催化剂接触的大肠杆菌的 SEM 照片

Fig 3 SEM photographs of *E. coli* K-12 after contact with $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (a), $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ (b) and Al_2O_3 (c) for 30 s (1), 0.5 h (2) and 24 h (3)

几乎观察不到完整的细菌. 随着杀菌时间的延长, 菌体物质逐渐消失, 露出的催化剂表面增大. 这表明催化剂杀灭并分解细菌首先通过破坏细胞膜, 杀死细菌, 然后逐步分解细胞遗骸, 最后重新露出催化剂表面.

与 Ag/Al₂O₃ 相比, AgCl/Al₂O₃ 的杀菌作用较为温和, 30 s 后即可观察到菌体从端部某点破裂, 内容物泄漏, 0.5 h 后该现象更加明显. 细胞逐渐萎缩, 分解, 重新露出催化剂表面. 尽管 0.5 h 内 Ag/Al₂O₃ 与 AgCl/Al₂O₃ 表面细菌形貌差异很大, 但 24 h 后两种催化剂表面情况差异不大.

在参比样品 Al₂O₃ 上, 大部分细菌在 0.5 h 内光滑饱满, 1 h (未给出 SEM 照片) 后才可以观察到细胞膜破坏的现象, 然而菌体仍然比较饱满, 即使接触 24 h 后, 也没有出现大量萎缩的细胞.

2.3 Ag⁺ 对杀菌效果的影响

文献 [4] 报道, Ag⁺ 接触细菌, 与其蛋白质上的巯基发生氢取代反应, 造成细菌死亡或产生功能障碍. 图 4 给出了 Ag⁺ 对杀菌效果的影响. 可以看出, 当 Ag⁺ 浓度很低时, 其重金属毒性对细菌的杀灭作用要经过较长时间才能体现出来. 在本实验条件下, Ag/Al₂O₃ 溶出的 Ag⁺ 浓度为 3.43 × 10⁻⁵ mol/L. AgCl/Al₂O₃ 溶出的 Ag⁺ 浓度为 1.45 × 10⁻⁶ mol/L. 由图 4 可见, 浓度为 1.45 × 10⁻⁶ mol/L 的 Ag⁺ 在 20 min 内不能杀死细菌, 因此前述空气中的杀菌实验可以忽略 AgCl/Al₂O₃ 溶出的 Ag⁺ 对细菌的杀灭作用. 浓度为 3.43 × 10⁻⁵ mol/L 的 Ag⁺ 接触细菌 20 min 后杀菌效果比较明显, 所以细菌与 Ag/Al₂O₃ 接触较长时间(如 10 和 20 min)后, 催化

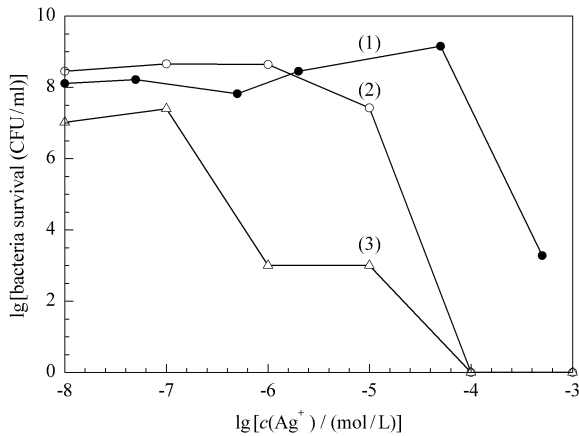


图 4 Ag⁺ 对杀菌作用的影响

Fig 4 Influence of Ag⁺ on bactericidal effect against *E. coli* K-12 at 5 min (1), 20 min (2) and 24 h (3)

剂溶出的 Ag⁺ 对杀菌效果的影响很难排除. 但该浓度的 Ag⁺ 在 5 min 内的杀菌效果不明显, 而 Ag/Al₂O₃ 上的大肠杆菌在 5 min 内已被完全杀灭, 因而可以判定 Ag/Al₂O₃ 催化剂起杀菌作用的不仅是溶出的 Ag⁺, 还有其他原因导致催化剂具有较强的杀菌作用.

2.4 O₂ 对杀菌效果的影响

图 5 示出了 O₂ 对杀菌效果的影响. 可见, Ag/Al₂O₃ 在 O₂ 曝气条件下能够完全杀灭细菌, 而在 N₂ 曝气条件下仅可部分杀灭细菌. 尽管 AgCl/Al₂O₃ 在水溶液中的杀菌能力比 Ag/Al₂O₃ 差很多, 但它在 O₂ 曝气时的杀菌效果优于 N₂ 曝气时的杀菌效果. Al₂O₃ 在有氧和无氧条件下的杀菌效果都不明显. 上述实验结果表明, 负载银元素大大提高了催化剂的杀菌能力, 氧的存在进一步改善了 Al₂O₃ 负载 Ag 催化剂的杀菌效果, 即 Ag/Al₂O₃ 和 AgCl/Al₂O₃ 杀菌能力可能源于银与氧的协同作用.

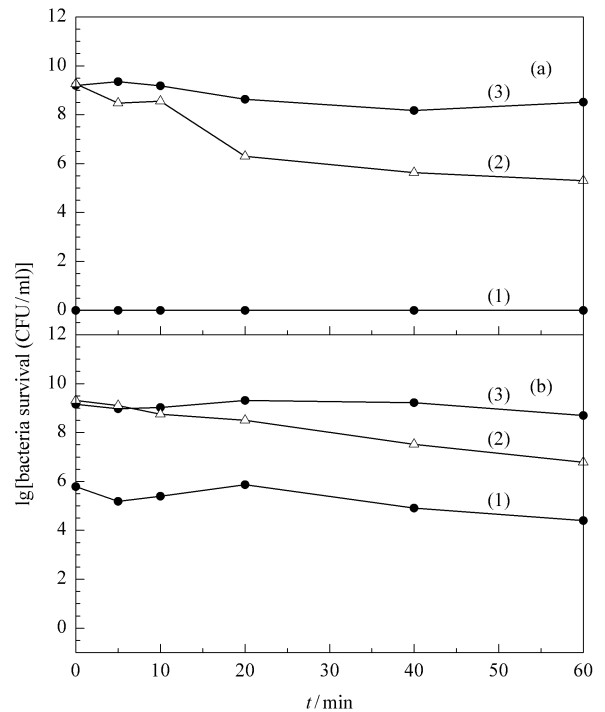


图 5 O₂ 对不同催化剂杀菌作用的影响

Fig 5 Influence of O₂ on bactericidal effect of different catalysts against *E. coli* K-12

(a) Aeration with O₂, (b) Aeration with N₂

(1) Ag/Al₂O₃, (2) AgCl/Al₂O₃, (3) Al₂O₃

(The experiment was carried out in the suspension formed by dispersing 0.5 g catalyst in 40 ml water.)

Cordi 等^[10]报道, Ag 有利于分子态氧(O₂)向活性氧的转化. 而活性氧在杀菌过程中可能起着关

键作用. 在无氧条件下, $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 表面难以形成活性氧, 细菌浓度的减小可能是由于溶出 Ag^+ 的重金属毒性造成的; 在有氧条件下, $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 促进了分子态氧向活性氧的转化, 催化体系的杀菌能力大大增强. 在水中 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 的杀菌效果可以认为是表面活性氧的氧化作用与 Ag^+ 重金属毒性共同作用的结果. 在 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 催化剂上也可以观察到类似的现象, 但由于 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 溶出 Ag^+ 的浓度低, 其杀菌作用较温和.

3 结论

无论在空气中还是在水中, Al_2O_3 负载的 Ag 催化剂都比 Al_2O_3 的杀菌效果显著得多, 这表明催化剂表面的 Ag 在杀菌过程中起着关键作用. 在空气中, 催化剂上溶出的 Ag^+ 在短时间内的杀菌作用很小. 但在水中, Ag^+ 的作用不容忽视, 从 N_2 和 O_2 曝气的实验结果可以看到, 银在杀菌过程中的作用部分体现为溶出 Ag^+ 对细胞的重金属毒性. Al_2O_3 负载 Ag 催化剂的杀菌能力与氧的存在密切相关, 而分子态氧不具有杀菌能力, 因而银更重要的作用可能是促进了催化剂表面活性氧的形成, 活性氧可通过氧化作用破坏细菌细胞膜, 从而使细菌迅速失活. 因此, Al_2O_3 负载 Ag 催化剂的杀菌过程可看作一个以催化氧化为主的过程. SEM 实验证实了 $\text{Ag}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 和 $\text{AgCl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ 上菌体的破坏是从细胞膜开始的.

致谢 本工作得到北京农学院万善霞副教授和中国科

学院生态环境研究中心余运波博士的大力支持, 特此表示感谢.

参 考 文 献

- 1 He H, Dong X P, Yang M, Yang Q X, Duan Sh M, Yu Y B, Han J, Zhang Ch B, Chen L, Yang X. *Catal Commun*, 2004, **5**(3):170
- 2 Dowling D P, Betts A J, Pope C, McConnell M L, Eloy R, Arnaud M N. *Surf Coat Technol*, 2003, **163-164**:637
- 3 季君晖, 史维明. 抗菌材料. 北京: 化学工业出版社(Ji J H, Shi W M. *Antibacterial Materials*. Beijing: Chem Ind Press), 2003. 45
- 4 汪山, 程继健, 陈奇. 中国陶瓷(Wang Sh, Cheng J J, Chen Q. *China Ceramics*), 2000, **36**(2):7
- 5 Inoue Y, Hoshino M, Takahashi H, Noguchi T, Murata T, Kanzaki Y, Hamashima H, Sasatsu M. *J Inorg Biochem*, 2002, **92**(1):37
- 6 Kehrler J P. *Toxicology*, 2000, **149**(1):43
- 7 Pape H L, Solano-Serena F, Contini P, Devillers C, Maf-tah A, Leprat P. *J Inorg Biochem*, 2004, **98**(6):1054
- 8 刘中民, 张卓然, 许国旺, 杨凌, 马磊, 孙承林, 许磊, 齐越, 赵春霞, 明平文等. 催化学报(Liu Zh M, Zhang Zh R, Xu G W, Yang L, Ma L, Sun Ch L, Xu L, Qi Y, Zhao Ch X, Ming P W *et al.* *Chin J Catal*), 2003, **24**(5):323
- 9 张长斌, 贺泓, 余运波, 张润铎. 高等学校化学学报(Zhang Ch B, He H, Yu Y B, Zhang R D. *Chem J Chin Univ*), 2004, **25**(1):135
- 10 Cordi E M, Falconer J L. *Appl Catal A*, 1997, **15**(1):179

(Ed YHM)