科学通报 2012 年 第 57 卷 第 6 期：474 ~ 478
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

金属非晶的抗菌作用

林葆[①], 牧人[②], 杨礼富[②], 边秀房[①*]

① 山东大学材料液固结构演变与加工教育部重点实验室, 济南 250061;
② 中国热带农业科学院橡胶研究所, 儋州 571737
* 联系人, E-mail: xfbian@sdu.edu.cn

2011-09-08 收稿, 2011-10-27 接受
国家重点基础研究发展计划(2007CB613901)、国家自然科学基金(50871062, 50831003)和山东省自然科学基金(Z2008F08)资助

摘要 实验研究了 Fe 基、Ni 基和 Cu 基金属非晶的抑菌效果, 发现 3 种金属非晶都能抑制大肠杆菌的生长, 用比浊法测定光密度值比正常培养时最多下降约 65%, 比加入纯铁时下降约 57%. 金属非晶不同成分对抑菌效果的影响无显著差异(σ= 0.05), Cu 基非晶的抑菌效果与 Fe 基和 Ni 基相近. 该实验结果将会影响对抗菌材料抑菌机理的认识和金属非晶的应用.

关键词
金属玻璃
抗菌
大肠杆菌

传统的抗菌材料分为天然生物型、有机型和无机型. 壳聚糖是最主要的天然生物抗菌剂, 由几丁质经过脱乙酰作用获得, 而几丁质是无脊椎动物甲壳中的主要成分. 除了抑菌, 这种天然抗菌材料被广泛用于改良土壤、止血、促进组织修复等领域, 但其商业化应用受制于其生产工艺水平, 难以推广应用. 许多有机抗菌剂已经在杀菌、防腐、防霉等领域大量应用, 具有高效、广谱、耐久等特点, 但存在生物安全性问题, 具有耐热性差、易水解等缺点[1].

无机抗菌材料大体分为 2 种, 即金属和光催化剂. 大多数金属离子都具有抗菌作用, 综合考虑杀菌性能和人体安全性, Ag, Cu 和 Zn 为最合适的金属抗菌材料. 鉴于这 3 种金属的机械性能, 以往的研究更倾向于将其作为添加剂或者 1 个组分加入传统的结构材料中制造抗菌结构材料[2,3].

许多研究认为, 光催化剂二氧化钛(TiO_2)能够使细菌、霉菌、病毒甚至癌细胞失活[4~8]. 尽管悬浊液颗粒催化剂的后分离是该材料的一个主要缺陷[9,10], 固定的有较高比表面积的光催化剂(如多孔 TiO_2 薄膜)仍是比较好的抗菌材料[2~4,11~14].

新兴的纳米抗菌材料正逐渐成为抗菌材料领域的新宠. 纳米抗菌材料是含有抗菌功能的纳米颗粒或者能够释放纳米级颗粒的材料, 通常具有表面积大和高效的特点[15,16]. 然而, 纳米材料进入人体后, 会对所有细胞进行无差别破坏, 包括对人体有益的细菌和人体自身的细胞. 纳米抗菌材料能够轻易穿透细胞膜甚至“血脑障壁”, 所以其生物安全性还有待证实[17~19].

金属非晶材料在工业上已经获得许多应用, 如变压器电芯及电子零部件[20~22]. 除了电子领域的应用, 金属非晶作为功能材料尤其是抗菌材料的应用鲜见报道. 本研究以 Fe 基、Cu 基和 Ni 基 3 种金属非晶材料对微生物生长的影响为目标, 探索金属非晶在抑菌领域的应用.

1 材料与方法

1.1 菌株与菌悬液

实验所用菌种为大肠杆菌变体(*E. coli* KNabc), 由美国纽约城市大学西奈山医学院生物化学系 Terry A. Krulwich 教授提供. 从琼脂平板上取 1 个独立的菌落, 接种到 5 mL LBK 培养基(1%胰蛋白胨, 0.5%酵母粉, 87 mmol/L 氯化钾)中, 置于摇床上, 置 37℃, 180 r/min 振荡培养 12 h, 至对数期的中期, 制成菌悬液. 在 4℃下保存.

1.2 金属非晶

Fe 基非晶 $Fe_{78}Si_9B_{13}$ 的非晶条带购于安泰科技股

英文版见: Lin B, Mu R, Yang L F, et al. Antibacterial effect of metallic glasses. Chin Sci Bull, 2012, 57, doi: 10.1007/s11434-012-4997-2

份有限公司. 本实验所用的金属非晶全部为通过单辊甩带方式获得的带材, 成分见表 1. 将金属带剪成小段, 每段长度应保证完全浸入培养基, 不能暴露在空气中. 每种材料设 3 次重复, 并保证所有材料样品在每次实验中的质量相同. 实验前, 用紫外光对试样表面灭菌 30 min. 铁钉作为参考样本.

1.3 细菌培养基

大肠杆菌 *E.coli* KNabc 生长于 LBK 培养基. 将 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母粉、6.48 g 氯化钾完全溶解于去离子水, 用 NaOH 调整 pH 7.0~7.2, 加水稀释至 1 L, 用蒸气 121℃灭菌 20 min, 在 4℃下保存.

1.4 抗菌实验

进行实验前, 所有玻璃器皿必须在 127℃下蒸气灭菌 15 min.

(ⅰ) 振荡培养. 培养大肠杆菌, 然后按 5% (*v*/*v*) 的比例将大肠杆菌接种到经灭菌处理的 LBK 液体培养基中, 混匀, 得到菌悬液. 将菌悬液分装于试管, 每管 5 mL, 置 37℃, 180 r/min 振荡培养 8 h. 每一供试材料设 3 次重复, 以不加金属材料的培养液为空白对照(CK). 用比浊法测定培养液的光密度值(A_{600}).

(ⅱ) 抑菌圈. 往 LBK 培养基中添加 20 g/L 琼脂, 密封, 121℃蒸气灭菌 20 min 后, 冷却至 50℃, 倒入 Φ90 的培养皿. 在每盘固体培养基表面, 均匀涂抹 250 μL 菌悬液. 每一供试材料、每个培养皿设 3 次重复. 测量样品的抑菌圈半径大小(mm), 以此值来衡量金属玻璃的抗菌作用.

2 实验结果

振荡培养结果如图 1 所示, 加入铁钉参考样(Iron)的 A_{600} 值为 CK 的 81.2%, 金属非晶样品 A_{600} 值仅为 CK 的 60%. 金属非晶之间, 除 $Ni_{66}Hf_{34}$ (Ni1)外, 其余成分之间无显著差异($\sigma = 0.05$).

表 1 实验材料

编号	材料	形状
Cu1	$Cu_{64}Hf_{36}$	条带
Cu2 a)	$Cu_{64}Hf_{36}$	条带
Cu3	$Cu_{62}Hf_{38}$	条带
Ni1	$Ni_{66}Hf_{34}$	条带
Ni2	$Ni_{64}Hf_{36}$	条带
Fe1	$Fe_{78}Si_9B_{13}$	条带

a) 即造即用

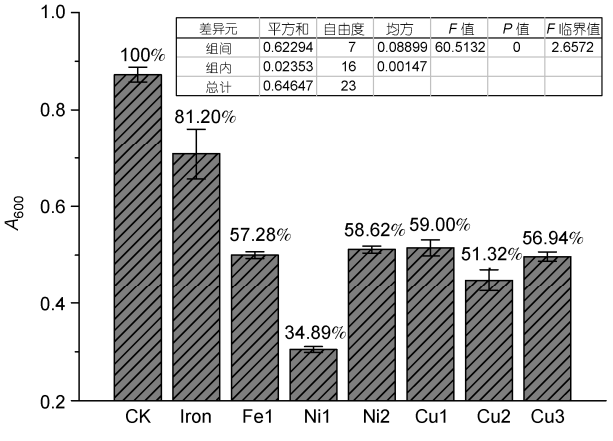

图 1 振荡培养 8 h 后各样品的 A_{600} 值

将 5%稀释后的菌悬液置于 37℃, 180 r/min 继续扩大培养 8 h 后, 再将菌悬液分装至放有不同材料样品的试管中继续培养. 在菌悬液初始浓度升高后, 金属非晶的抗菌效果明显减弱, 甚至失去抑菌作用. 比较图 1 和 2 可以发现, 加入金属非晶片的试管 A_{600} 值明显升高, 甚至超过 CK, 最高达到 CK 的 107.15%. Iron 的结果虽然有所增加, 但是与图 1 所示结果无显著差异($\sigma = 0.01$).

琼脂固体培养基用于测量金属玻璃在水中的扩散. 连续观察不同样品的抑菌圈随时间的变化曲线如图 3 所示. 作为对比的 Iron 试样, 抑菌圈半径超过 24 mm, 并且保持稳定. 相比之下, 金属非晶的抑菌圈几乎可以忽略, 半径最大不超过 4 mm. 随着时间的推移, 金属非晶抑菌圈不断发生变化, 甚至消失.

在所有金属非晶样品中, Fe 基非晶 $Fe_{78}Si_9B_{13}$

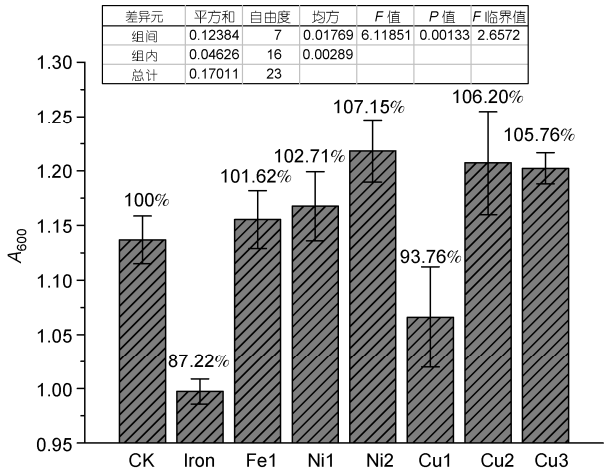

图 2 对实验用菌悬液稀释后继续培养 8 h, 不同样品的 A_{600} 值

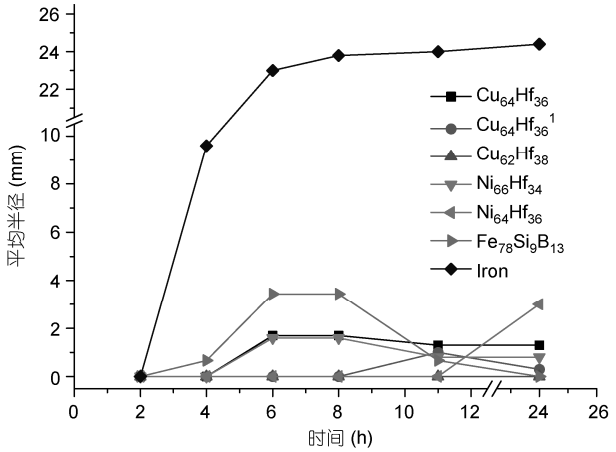

图 3 抑菌圈半径随时间的变化

(Fe1)的抑菌圈半径最大, 其抑菌圈半径先扩大, 然后缩小. Fe1 在整个实验过程中发生的变化如图 4 所示. Fe1 的变化有 2 个方面, 首先是由非晶片心部开始产生 1 个环并逐渐扩大, 24 h 时刻几乎覆盖了视域的非晶片表面. 其次是 Fe1 非晶片的抑菌圈最大, 也消失最快. 在抑菌圈的周围可以发现一个很明显的边界, 边界外围有条白色区域, 该区域内大肠杆菌的菌落数要高于平板的其他区域. 随着时间的推移, 抑菌圈逐渐消失, 白色边界区域也一同消失, 直到 24 h 时刻, 白色区域已经完全消失.

3 讨论

振荡培养时, 菌悬液初始浓度改变后, 金属非晶的表现前后差异巨大. 加入 Ni1 的试管在 5%稀释以后, 菌悬液 A_{600} 值低至正常培养的 34.89%. 但是稀释后继续培养 8 h 再加入 Ni1, 该菌悬液的 A_{600} 值与正常培养相当, 达到 102.71%. 似乎 Ni1 的抗菌能力在菌悬液浓度升高以后消失了, 这个现象与 Tang 等人[17]的 C_{60} 对大肠杆菌的生长抑制实验结果相类似, 他们发现, C_{60} 对大肠杆菌的生长有明显的抑制作用, 但是, 在 C_{60} 浓度较低的时候(20 或 40 mg/L), 大肠杆菌在几小时后又恢复了平常的生长速率. 由图 2 和 4 可见, 大部分金属非晶在金属浓度上升以后, A_{600} 值高于 CK, 细菌自身增殖造成的影响可以排除. 在抑菌圈的实验中, $Fe_{78}Si_9B_{13}$ 非晶的变化证明, 金属非晶在培养基中浸泡确实发生了某种反应. 因为比浊法的结果极易受到待测液体中悬浮颗粒或其他有色物质的影响, 所以, 我们怀疑 Fe1 的反应产物导致 A_{600} 值的额外增加, 造成结果超高的假象.

本实验虽然没有改变金属非晶的加入剂量, 但是通过改变菌悬液的浓度相对改变了金属非晶的单位剂量. 当菌悬液浓度上升以后, 金属非晶的单位剂量减少, 从而使大肠杆菌仅在最初阶段的生长受到了抑制, 但在后来的几小时内很快恢复了原来的水平, 与 C_{60} 的表现相似. 作为对比的纯铁则没有因为大肠杆菌数量的多少而影响其抑菌效果. 由此推断非晶态金属对微生物生长的影响可能仅仅是抑制, 而不是杀灭.

细菌菌落表面生有一层菌膜, 能够起到保护着床的作用. 有研究发现, 天然抗菌材料壳聚糖可以破坏生物被膜, 使细菌不能依附在材料表面着床, 会被流动的液体冲走[14]. 如果金属非晶的抑菌圈内大肠杆菌不能着床, 也就不能顺利生长. 在金属非晶片周围游弋的孢子只有离开了抑菌圈后才能顺利着床, 也就造成了抑菌圈边界附近的高密度菌落—“白色区域”的形成.

以往的研究中, 无机抗菌材料的杀菌方式是依靠原子或者离子的接触式杀菌. 依靠金属离子直接破坏细胞结构的抗菌材料应具有比较稳定的抑菌圈, 因为离子扩散的速率和数量应遵从 Fick 定律, 是相对恒定的. Fick 第一扩散公式如下:

$$J = -D\nabla\phi, \tag{1}$$

式中, J 为扩散通量, D 为扩散系数, $\nabla\phi$ 为浓度梯度.

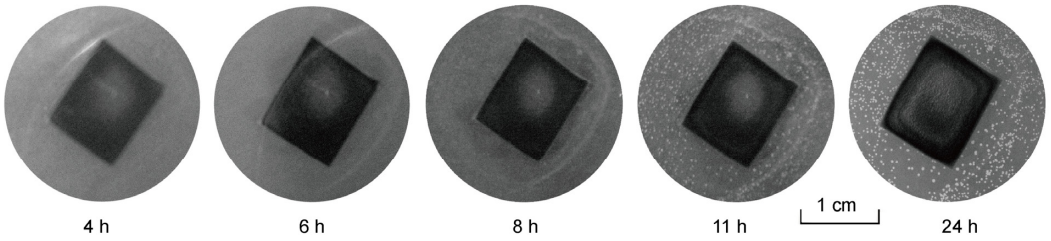

图 4 固体培养基不同时刻的 $Fe_{78}Si_9B_{13}$ 非晶及其抑菌圈

Fe基非晶$Fe_{78}Si_9B_{13}$的离子扩散能力仅受到表面积的影响, 在表面积不变的情况下, 随时间延长, 抑菌圈应逐渐增大, 而金属非晶片的大小并没有发生明显变化, 抑菌圈也没有一直扩大. 而且, 没有证据表明金属离子抗菌会造成边界上高密度的菌落群.

金属离子的抗菌能力为: Hg>Ag>Cd>Cu>Zn>Ni. 但本实验中, Fe基和Ni基的金属非晶表现出与Cu基非晶一样的效果. 除了图1中$Ni_{66}Hf_{34}$ (Ni1)和图2中$Cu_{64}Hf_{36}$ (Cu1)的反常结果外, 金属非晶的整体抑菌能力相近. 换句话说, 成分的改变并没有对抑菌效果产生明显的影响. 造成Ni1与Cu1差异的原因, 不排除人为因素的影响, 因为成分相同的Cu2与Cu1的抑菌表现也存在巨大差异, 我们认为金属离子的作用在非晶态金属中被削弱了. 即使抗菌能力较弱的 Ni基材料也具有相当的抗菌能力, 这意味金属非晶的抗菌能力不是来自于其成分, 而是由于这种特殊的非晶态结构的效果.

4 结论

金属非晶以非接触的方式抑制培养基中大肠杆菌的繁殖, 通过类似于抑制其黏附着床的方式阻止大肠杆菌生长. 这种"温柔的"抗菌方式与天然抗菌剂壳聚糖相似, 在封闭的环境中细菌含量较高时可能失效.

金属非晶的抗菌性能可能来自于其非晶态的结构. 在本实验中, Fe基、Ni基和Cu基非晶表现出相近的抗菌性能. 金属离子的作用被弱化, 其本身的成分差异对抗菌效果没有影响. 通过将金属材料的表面制作成非晶态, 可以使细菌不能依附在金属的表面生长, 使这种金属材料获得抗菌能力.

致谢 感谢中国热带农业科学院橡胶所副所长、农业部橡胶树生物学重点开放实验室主任田维敏教授, 王真辉博士和谭海燕实验师为本实验提供帮助.

参考文献

1 董加胜, 陈四红, 吕曼祺, 等. 抗菌材料发展和现状. 材料导报, 2004, 18: 41–43, 46
2 Akhavan O. Lasting antibacterial activities of Ag-TiO_2/Ag/a-TiO_2 nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation. J Colloid Interface Sci, 2009, 336: 117–124
3 Chen J, Wan G, Leng Y, et al. Antithrombogenic investigation and biological behavior of cultured human umbilical vein endothelial cells on Ti-O film. Sci China Ser E-Technol Sci, 2006, 49: 20–28
4 Liu Y, Wang X, Yang F, et al. Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO_2 and Ag/TiO_2 composite films. Microporous Mesoporous Mater, 2008, 114: 431–439
5 Yu J C, Ho W, Lin J, et al. Photocatalytic activity, antibacterial effect, and photoinduced hydrophilicity of TiO_2 films coated on a stainless steel substrate. Environ Sci Technol, 2003, 37: 2296–2301
6 Nadtochenko V, Denisov N, Sarkisov O, et al. Laser kinetic spectroscopy of the interfacial charge transfer between membrane cell walls of *E. coli* and TiO_2. J Photochem Photobiol A, 2006, 181: 401–407
7 Hur J S, Koh Y. Bactericidal activity and water purification of immobilized TiO_2 photocatalyst in bean sprout cultivation. Biotechnol Lett, 2002, 24: 23–25
8 Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Bactericidal activity of copper-deposited TiO_2 thin film under weak UV light illumination. Environ Sci Technol, 2003, 37: 4785–4789
9 Mills A, Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. J Photochem Photobiol A, 1997, 108: 1–35
10 Bellantone M, Williams H D, Hench L L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag_2O-doped bioactive glass. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 1940–1945
11 Fu G, Vary P S, Lin C T. Anatase TiO_2 nanocomposites for antimicrobial coatings. J Phys Chem B, 2005, 109: 8889–8898
12 Alivisatos A P. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. J Phys Chem, 1996, 100: 13226–13239
13 Henglein A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: "Microelectrode" reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. J Phys Chem, 1993, 97: 5457–5471
14 Murakami Y, Matsumoto T, Takasu Y. Salt catalysts containing basic anions and acidic cations for the sol-gel process of titanium alkoxide: Controlling the kinetics and dimensionality of the resultant titanium oxide. J Phys Chem B, 1999, 103: 1836–1840
15 Sivakumar P M, Balaji S, Prabhawathi V, et al. Effective antibacterial adhesive coating on cotton fabric using ZnO nanorods and chalcone. Carbohydr Polym, 2010, 79: 717–723

16 Simchi A, Tamjid E, Pishbin F, et al. Recent progress in inorganic and composite coatings with bactericidal capability for orthopaedic applications. Nanomed Nanotechnol Biol Med, 2011, 7: 22–39
17 Tang Y J J, Ashcroft J M, Chen D, et al. Charge-associated effects of fullerene derivatives on microbial structural integrity and central metabolism. Nano Lett, 2007, 7: 754–760
18 Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. Science, 2003, 300: 243
19 Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 2006, 311: 622–627
20 Hilzinger H R. Applications of metallic glasses in the electronics industry. IEEE Trans Magn, 1985, MAG-21: 2020–2025
21 Ku W, Ge F, Yan G, et al. Giant magneto-impedance effects in nanocrystalline soft magnetic alloy ribbons. Chin Sci Bull, 1997, 42: 1049–1052
22 Yoshizawa Y, Oguma S, Yamauchi K. New Fe-based soft magnetic alloys composed of ultrafine grain structure. J Appl Phys, 1988, 64: 6044–6046