

无机载银抗菌材料抗菌机理及细菌对其抗性机制

李文茹, 谢小保, 欧阳友生, 陈仪本

(广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

摘要 无机载银抗菌材料具有广谱高效的抗菌性能,并得到了广泛应用,对其抗菌机理及细菌对其抗性机制进行了综述。银离子从无机物载体中缓慢释放,当微量 Ag^+ 到达微生物细胞膜时,主要通过破坏微生物膜上与呼吸产能相关的电子传输系统、物质传送系统或其他与细胞代谢活动相关的蛋白或酶的活性,致使菌体细胞死亡或被抑制。同时,在长期的环境适应条件下,很多细菌产生了对 Ag^+ 的抗性,这种抗性与细菌对银的有效外排,周质空间对银的吸收和外膜缺失孔道等机制有关。对无机载银抗菌材料的抗菌机制以及细菌的抗银机制进行了泛深入的研究,将为开发更加广谱高效的抗菌材料提供理论基础。

关键词 无机载银抗菌材料 抗菌机理 抗性机制

Advance in Antimicrobial Mechanism of Silver-Carrying Inorganic Antimicrobial Materials and Silver-Resistance Mechanism of Microbe

LI Wenru, XIE Xiaobao, OUYANG Yousheng, CHEN Yiben

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, 510070)

Abstract Silver-carrying inorganic antimicrobial materials are used extensively in many industries, which have promising development prospect. Silver ions are released slowly from silver-carrying inorganic antimicrobial materials. When micro-silver ions penetrate the cell membrane, they may inhibit or kill microorganisms mainly by destroying electron transfer chain, materials transfer system and the activities of proteins or enzymes correlative with cell metabolism located in cell membrane. Furthermore, for conforming to environment many bacterium develop a resistance mechanism to silver-carrying inorganic antimicrobial materials. The resistance mechanism is associated with silver expelling from cell, silver absorbed by periplasm and cell losing channel to silvers. The extensive and in-depth studies about the antimicrobial mechanism of silver-carrying inorganic antimicrobial materials and the silver resistance mechanism of bacteria will provide academic foundation for developing broad and efficient antimicrobial materials.

Key words silver-carrying inorganic antimicrobial materials, antimicrobial mechanism, resistance mechanism

早在远古时代,金属银就被人们认识到具有抑菌和杀菌作用,并有广谱的抗菌活性^[1]。与其它金属相比,金属银对哺乳动物毒性低,而对微生物毒性较大^[2]。这些特点使其成为非常具有吸引力和开发应用前景的无机抗菌材料^[3]。人们对金属银的抗菌作用已经有 60 多年的研究历史,对其抗菌作用机理已有一定的认识^[4]。特别是无机载银抗菌材料的开发和应用,更引发了人们对金属银及无机载银抗菌材料抗菌机理研究的兴趣,使金属银及无机载银抗菌材料抗菌机理的研究有了一些新进展。

1 无机载银抗菌材料的种类

1.1 载银离子型无机抗菌材料

载银离子型无机抗菌材料即是指通过物理吸附或离子交换吸附作用等方法将银离子负载于沸石、硅胶、羟基磷灰石、蒙脱石等硅酸盐或磷酸盐类多孔无机物的载体中,制成抗菌剂,然后将其加入到制品中,通过缓释银离子以发挥抗菌作用而得到的一类无机抗菌材料。此类抗菌材料一般具有安全性高、耐热性好、有效期长、持续性好以及抗菌谱广等特点,因而可有效应用于建筑材料、陶瓷、涂料、家用电器和纤维制品等人们日常接触的物品中^[5]。根据抗菌剂载体的

不同,目前市场上开发和应用的载银离子型无机抗菌材料主要包括以下几种类型:载银沸石抗菌剂、载银磷酸钙抗菌剂、载银羟基磷灰石抗菌剂、载银磷酸复盐抗菌剂、载银可溶性玻璃抗菌剂、载银膨润土抗菌剂、载银硅胶抗菌剂等。

1.2 载银光催化型无机抗菌材料

TiO_2 是一种活性高、稳定性好且对人体无害的光催化抗菌材料。载银 TiO_2 抗菌剂兼具 TiO_2 光催化抗菌剂和载银抗菌剂的优点,表现出了显著的优越性。通过合理方法制得的载银 TiO_2 ,使 Ag^+ 嵌入 TiO_2 晶体和晶体空穴中,既可在长时间内缓慢地释放出 Ag^+ ,保持有效的 Ag^+ 浓度,又可以防止电子空穴对的复合,促进电子空穴对的有效分离,从而具有抗菌性能稳定、杀菌作用时间长、不受光线影响、使用方便等优点^[6]。

1.3 纳米银无机抗菌材料

纳米技术是 21 世纪最具前途的高新技术,是研究结构尺寸在 0.1~100nm(有些资料为 1~100nm)范围内材料的性质和应用。纳米材料由于其独特的微观结构而具有各种优异的性能。金属纳米粒子,具有特异的高表面积和高表面原子分布,科研工作者已经对它们独特的理化特性进行了广泛的研

*广东省自然科学基金项目(A06104481);广东省微生物研究所所长基金资助

李文茹:女,硕士,主要从事微生物方向研究 Tel:020-37656335 Email:liwenru0708@yahoo.com.cn

究,如催化活性、光学特性、电子特性、抗菌活性和磁性。纳米银特异的高表面积和高表面原子分布,将导致比金属银更高的抗菌活性^[1]。纳米银的抗菌活性与其粒径大小有关,相同质量的银含量条件下,纳米银的粒径越小抗菌活性越高。但有报道认为,纳米银在高电解液的培养基中会形成沉积,引起抗菌活性的损失^[7]。

2 无机载银抗菌材料抗菌机理

无机载银抗菌材料的抗菌活性主要是由其释放银离子的能力决定的,因此其抗菌机理通常以 Ag^+ 作为实验材料进行研究^[7,8]。随着纳米技术的兴起和日趋成熟,现在很多无机载银抗菌材料是以纳米银作为主体,因此纳米银抗菌机理的研究也越来越多。

2.1 破坏细菌呼吸产能系统

细菌细胞最易受抗菌剂攻击的位点是质膜,许多蛋白位于质膜上,包括呼吸链的酶类和关键的运输通道^[9]。Slawson 等^[10]曾报道银离子通过作用于呼吸链的细胞色素 b 和细胞色素 d 两个位点之间的区域而抑制细胞呼吸,在底物进入呼吸链的位点和 NADH 到琥珀酸脱氢酶区域的黄素蛋白之间。Holt 等^[9]在研究 Ag^+ 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)呼吸链的影响时发现,当加入 $10\ \mu\text{m}$ 的 Ag^+ 时,由于细菌呼吸停止且大气中的氧气溶解到溶液中,使溶液中氧浓度迅速升高。用 $10\ \mu\text{m}$ 的 AgNO_3 处理的大肠杆菌在通气的培养基中培养过夜,细胞并不生长,这与细胞受到的呼吸抑制是一致的。

1982 年 Schreurs 等提出 Ag^+ 能破坏细胞膜上的质子动力^[11]。Yoon 等发现,纳米银能与细菌细胞膜相作用,引起膜结构的改变,使膜的质子动力(pH)消失,最终引起细胞死亡^[12]。但 Holt 等^[9]在研究 Ag^+ 的抑菌作用时却发现,当加入 $1\ \mu\text{m}$ 的 Ag^+ 时,氧消耗率出现了迅速增加的趋势,表明细菌呼吸加快。推测 $1\ \mu\text{m}$ 的 Ag^+ 增强了细胞质膜对质子的通透性,从而消除了膜内外的质子浓度梯度,为补偿质子浓度梯度的损失,细胞加速呼吸,以维持细胞的正常生长。Dibrov 等^[11]在研究 Ag^+ 对霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)抗菌活性机制时发现,在霍乱弧菌的膜泡溶液中加入低浓度(μm)的 Ag^+ ,无论有无 Na^+ 存在,都能引起膜泡 pH 和 (膜电势)的彻底摧毁。至此,也阐明了低浓度的 Ag^+ 的杀菌机制问题: Ag^+ 能与其它膜蛋白相互作用(或 Ag^+ 能直接与脂双层相互作用),引起 H^+ 渗漏,造成质子浓度梯度的破坏。跨膜质子梯度在微生物代谢产能中具有重要作用, Ag^+ 作用不可避免地会导致细胞死亡。用荧光技术检测了纳米银和 AgNO_3 处理对大肠杆菌细胞质膜势能的影响,发现纳米银和 AgNO_3 在各自的最低抑菌浓度($1\ \text{nm}$, $1\ \mu\text{m}$)都能引起质膜势能的消失。大肠杆菌的膜势能主要靠细胞内高 K^+ 浓度维持,进一步检测纳米银对细胞 K^+ 浓度的影响,发现培养 $5\ \text{min}$ 后,纳米银和 AgNO_3 在各自最低抑菌浓度条件下,几乎引起细胞内 K^+ 的完全损失。进一步检测了银处理的大肠杆菌细胞的 ATP 水平,发现纳米银和 AgNO_3 在各自最低抑菌浓度条件下, $5\ \text{min}$ 内都能引起细胞 ATP 的耗尽^[13]。

2.2 破坏细胞膜上与物质运输相关蛋白

银离子能与细胞壁和细胞外膜结合,改变细胞膜的功能

^[14]。Semykina 等^[15,16]发现耐碱耐卤的一种芽胞杆菌(*Bacillus FTU*)具有两条呼吸链,分别是由 H^+ 和 Na^+ 驱动。 Ag^+ 对它们的影响尤为典型。 Ag^+ 强烈抑制 Na^+ 向高浓度一侧运输,而 H^+ 的运输不受 Ag^+ 影响。该研究组^[16]在研究微摩尔级的 Ag^+ 对 *Bacillus FTU* 膜泡 Na^+ 梯度的影响时发现,这两条呼吸链对抑制剂的敏感性区别很大,微摩尔级的 Ag^+ 能增加 *Bacillus FTU* 细胞膜对 Na^+ 的通透性,从而抑制膜内外 Na^+ 梯度的形成。当加入 Na^+ -驱动的 NADH-辅酶 Q 还原酶的特异抑制剂时,这一现象被消除。因此, Ag^+ 可能通过与 Na^+ -驱动的 NADH-辅酶 Q 还原酶结合而增加了细胞膜对 Na^+ 的通透性。Schreurs 等^[17]在研究 Ag^+ 对大肠杆菌的磷酸根运输时发现, Ag^+ 抑制大肠杆菌对磷酸根的吸收和细胞内外磷酸根的交流,并能引起细胞内积累的磷酸根的流出和甘露醇、琥珀酸、谷氨酸和脯氨酸的外泄。因此可以推测, Ag^+ 通过与菌体膜上与物质运输相关蛋白的作用,破坏菌体的物质内外运输系统,达到杀死细菌的效果。

2.3 改变外膜蛋白前体的加工与运输

Lok 等^[13]在研究纳米银对细菌蛋白质组的影响时发现,纳米银处理能导致大肠杆菌外膜蛋白 OmpA 前体的累积。在正常的细胞中,外膜蛋白前体的细胞寿命很短,通常检测不到。由此看出,纳银使得外膜蛋白 OmpA 前体加工过程受到了抑制。外膜蛋白前体的加工和运输过程需要细胞提供能量,因此推测纳米银处理的大肠杆菌细胞中积累外膜蛋白前体,可能是由于纳米银破坏了细胞的能量产生系统,间接地影响了细胞蛋白质的加工和运输过程。

2.4 其它作用机制

Ag^+ 能与 RNA 和 DNA 形成不溶复合物而抑制细菌的繁殖,也能与一些具有重要生物功能的阴离子形成沉淀,且是真菌 DNA 酶的潜在抑制剂^[10,18,19]。 Ag^+ 与蛋白质结合很紧密,尤其是与含有硫、氧、氮的电子供体基团(巯基、羧基、磷酸、羟基、胺、咪唑、吡啶)形成复合物而使得微生物的酶失活^[10,18,19,20]。而且, Ag^+ 也可能取代作为酶的天然辅基的金属离子(如 Ca^{2+} 或 Zn^{2+}),从而使酶丧失活性发挥抗菌作用^[18,20]。 Ag^+ 能抑制大肠杆菌中果糖、甘油、延胡索酸和琥珀酸的氧化,从而抑制细胞的正常生长代谢过程^[10]。

Ag^+ 与其它抗菌剂结合具有协同抗菌作用,如与过氧化氢、铜等混合使用其抗菌效率更高^[21]。此外,1973 年 Rahn 等研究发现,在 UV254(UV-C)照射下, Ag^+ 能使一种 DNA 病毒副猪嗜血杆菌(*Haemophilus Influenzae*)的噬菌体 HPlcl 形成 DNA 光二聚体的作用增强,从而加速该病毒的失活,因而推测 Ag^+ 能与 UV254 协同作用,通过增强 DNA 形成光二聚体而发挥抗菌功能^[21]。但 2007 年 Jim 等^[21]研究发现, Ag^+ 也能在 UV-A(300 ~ 400nm)和可见光照射下,促进大肠杆菌和噬菌体 MS-2 的失活。而 UV-A 和可见光本身几乎不被 DNA 吸收,也不具有抗菌作用,因而不可能通过增强细菌形成 DNA 光二聚体而发挥抗菌作用。Jim 等通过进一步研究发现, Ag^+ 是通过与半胱氨酸的巯基($-\text{SH}$)作用,取代巯基中的氢形成 $-\text{S}-\text{Ag}$,使酶失活从而发挥抗菌作用。

另外,有人研究在光或其他能量因素的作用下, Ag^+ 能

起到催化活性中心的作用,类似光催化陶瓷半导体化反应, Ag^+ 激活空气或水中的氧,产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)及活性氧离子($\text{O}^2\cdot$),具有很强的氧化还原作用,能在短时间内破坏细菌体细胞的增殖能力,致使细胞死亡,从而达到抑制或杀灭细菌的目的^[22-24]。

综上所述,无机载银抗菌材料中的 Ag^+ 由于其活泼的化学性质,容易从无机物载体中缓慢释放、游离至基体材料的表面。当与细菌接触时,抗菌剂缓慢释放出 Ag^+ ,当微量 Ag^+ 到达微生物细胞膜时,因后者带负电荷,依靠库仑引力,使二者牢固吸附, Ag^+ 穿透细胞壁进入胞内,主要通过破坏微生物膜上与呼吸产能相关的电子传输系统、物质传送系统或其它与细胞代谢活动相关的蛋白或酶的活性,致使菌体细胞死亡或生长受到抑制。

3 细菌对银的抗性机制

在银对细菌毒性作用的长期研究中分离了很多银的抗性菌株。科研人员曾经从被银污染的环境中分离到抗银的细菌,也有人通过逐渐增加 AgNO_3 的浓度筛选出了抗性菌株肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)^[18]。某些抗银微生物能在体内积累银达到很高的水平,但还不能确切地知道这个积累过程是涉及到 Ag^+ 的表面结合还是细胞内的吸收。能够沥滤金属的微生物氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)和氧化硫硫杆菌(*Thiobacillus thiooxidans*)还生长在含银的硫矿中,以硫化物的形式在细胞表面结合银^[18]。

细菌对银抗性的分子基础研究始于最近几年,这种抗性与细菌对银的有效外排、周质空间对银的吸收、 Ag^+ 还原成胶态和外膜缺失孔道等有关^[7]。Ghandour等^[18]发现,自银矿分离的施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和大肠杆菌中都发现了编码有抗银基因的质粒。而且还发现,大肠杆菌对银的抗性与卤化物的浓度有关。当培养环境中没有卤化物存在时,含有抗性质粒和不含有抗性质粒的细胞对银的抗性几乎没有区别,两种类型的细胞表面与 Ag^+ 的结合都很紧密。当培养环境中存在卤化物时,两类细胞对 Ag^+ 的敏感性出现了差异^[18]。Frank等^[4]研究发现,在革兰氏阳性细菌抗性菌株中,对 Ag^+ 的抗性是由于一种P-类型的ATP酶催化的 Ag^+ 排出的结果。在革兰氏阴性菌中,一种质粒编码的银抗性因子调解 Ag^+ 的排出,这表明大肠杆菌中有编码银排出系统的基因信息。Frank等^[4]在研究大肠杆菌对银抗性的分子基础时还发现,ybdE基因产物与抗银的机制有关。从大肠杆菌抗银野生型菌株K38的基因组中敲除ybdE基因,得到大肠杆菌突变株EC756比野生型K38对 Ag^+ 更加敏感。在无NaCl的LB琼脂固体培养基上,野生型菌株K38能在25 μm 的 Ag^+ 浓度条件下生长,但敲除ybdE基因的EC756菌株不能生长。两种菌株在固体培养基上对 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^+ 的抗性没有显著差异。在液体培养基培养条件下,EC756 ybdE菌株比其野生型菌株K38对 Ag^+ 更敏感。Solioz等^[25]在研究海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)膜泡中的CopB-ATP酶对铜和银的运输时发现,海氏肠球菌中的CopB是一种ATP泵,能从细胞质中将 Cu^+ 和 Ag^+ 排出体外。 Ag^+ 不是细胞生长所需,而且对海氏肠球菌有极大的毒性,因此CopB催化的银运输

可能是偶然的,不是生理所需。

4 展望

目前,有关无机载银抗菌材料抗菌机理的研究虽已取得了一些进展,但还没有形成系统的完整的理论。对于这一领域的未来研究应注重以下几点: 加强细胞水平、亚细胞水平和分子水平的综合探究,更深入系统地阐明无机载银抗菌材料的抗菌机理; 继续探索细菌对无机载银抗菌材料的抗性机理; 在理论研究的基础上进一步优化无机载银抗菌材料的构成,以获得更加高效和耐用的抗菌材料。

参考文献

- 1 Cho K H, Park J E, Osaka T, et al. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta*, 2005, 51: 956
- 2 Zhao G, Stevens SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *BioMetals*, 1998, 11:27
- 3 陈仪本, 欧阳友生, 黄小荣等. 工业杀菌剂. 北京:化学工业出版社. 2001
- 4 Franke S, Grass G, Nies D H. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology*, 2001, 147: 965
- 5 赵娣芳, 周杰, 刘宁. 含银无机抗菌材料的开发及应用. *矿产保护与利用*, 2005, 3:12
- 6 于延芬, 郑粟, 柴立元, 等. 二氧化钛载银抗菌剂的研究进展. *环境污染治理技术与设备*, 2004, 5(12):16
- 7 Lok C N, Ho C M, Chen R et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*, 2007, DOI 10.1007/soo775-007-0208-z
- 8 Radheshkumar C, Münstedt H. Morphology and mechanical properties of antimicrobial polyamide/silver composites. *Mater Letters*, 2005, 59, 1949
- 9 Holt K B, Bard A J. Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+ . *Biochemistry*, 2005, 44:13214
- 10 Ahearn D G, May L L, Gabriel M M. Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *J Industrial Microbiology*, 1995, 15: 372
- 11 Dibrov P, Dzioba J, Gosink K K, et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag^+ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46:2668
- 12 Yoon K Y, Byeon J H, Park J H, et al. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Env*, 2007, 373:572
- 13 Lok C N, Ho C M, Chen R, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Prote Res*, 2006, 5:916
- 14 Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydrate Polymers*,

- 2007, doi:10.1016/j.carbpol. 2007.07.025
- 15 Semeykina A L, Skulachev V P, Verkhovskaya M L , et al. The Na⁺-motive terminal oxidase activity in an alkalo- and halo- tolerant bacillus. *Eur J Biochem*, 1989,183:671
 - 16 Semeykina A L, Skulachev V P. Submicromolar Ag⁺ increases passive Na⁺ permeability and inhibits the respiration-supported formation of Na⁺ gradient in Bacillus FTU vesicles. *Federation of European Biochemical Societies*, 1990,269(1): 69
 - 17 Schreurs W J A, Rosenberg H. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia coli. *J Bacteriology*, 1982,152:7
 - 18 Ghandour W, Hubbard J A, Deistung J et al. The uptake of silver ions by escherichia coli. K12: Toxic effects and interaction with copper ion. *Appl Microbiol Biotechnol* , 1988, 28: 559
 - 19 Thomas V, Yallapu M M, Sreedhar B , et al. A versatile strategy to fabricate hydrogel – silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity. *J Colloid Interf Sci* , 2007,315: 389
 - 20 Kim S, Kim H J. Anti-bacterial performance of colloidal silver-treated laminate wood flooring. *Intern Biodeterioration and Biodegradation*. 2006, 57:155
 - 21 Kim J Y, Lee C, Cho M, Yoon J. Enhanced inactivation of E. coli and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. *Water Res* , 2007, doi:10.1016/j.watres. 2007 , 7 ; 24
 - 22 季君晖,史维明. 抗菌材料. 北京: 化学工业出版社 , 2003.9
 - 23 Inoue Y, Hoshino M, Takahashi H et al. Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by