

纳米银对大肠杆菌的抗菌作用及其机制

Study of Antimicrobial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli*

谢小保^{1,2}, 李文茹^{1,2}, 曾海燕^{1,2}, 欧阳友生^{1,2}, 陈仪本^{1,2}

(1 广东省微生物研究所, 广州 510070; 2 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广州 510070)

XIE Xiao-bao^{1,2}, LI Wen-ru^{1,2},

ZENG Hai-yan^{1,2}, OUYANG You-sheng^{1,2}, CHEN Yi-ben^{1,2}

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China; 2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China)

摘要: 以大肠杆菌为研究对象, 对纳米银的抗菌效果进行了研究, 并对其抗菌机制做了初步探讨。纳米银对大肠杆菌的抑制生长曲线的结果表明, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米银能够完全抑制 10^6 cfu/mL 的大肠杆菌细胞生长, 纳米银使大肠杆菌的延滞期加长, 并且纳米银浓度越高, 延滞期越长。采用透射电镜观察了经纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞形态变化过程, 结果显示纳米银粒子先在细胞壁上产生小的孔洞, 通过这些孔洞进入周质空间, 导致细胞膜成分渗漏和破坏细胞膜, 进而进入细胞内部。进入细胞内部的纳米银粒子使 DNA 浓缩呈紧张态, 并与破损细菌的细胞质结合积累, 最后引起胞内物质流失。另外, 纳米银对大肠杆菌总 DNA 影响的分析表明, 随着纳米银浓度的增高, 大肠杆菌总 DNA 样品降解的程度增大。

关键词: 纳米银; 大肠杆菌; 抗菌作用

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4381(2008)10-0106-04

Abstract: The antimicrobial effect of the nanosilver on *Escherichia coli* and the antimicrobial mechanism was studied elementarily. Experimental results indicated that the silver nanoparticles of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ could inhibit completely the growth of 10^6 cfu/mL cells in liquid LB medium. The growth curves showed that silver nanoparticles prolonged the lag phase of *E. coli*, and the higher of the concentration of silver nanoparticles, the longer of the lag phase of *E. coli*. Transmission electron microscopy (TEM) was used to evaluate the cell morphology of both the normal and the treated *E. coli*. The observation with TEM suggested that silver nanoparticles lead to the formation of "pits" in cell wall of the bacteria, and silver nanoparticles could enter into periplasm through the pits and destroyed the cell membrane. Then the silver nanoparticles could enter into the bacterial cell, which not only condensed DNA, but also combined and coagulated with the cytoplasm of damaged bacteria. Finally, silver nanoparticles resulted in the leakage of cytoplasmic component. Moreover, the analysis of agar gel electrophoresis demonstrated that silver nanoparticles could increase the decomposability of genome DNA.

Key words: nanosilver; *Escherichia coli*; antimicrobial activity

随着抗生素、消毒剂 and 杀菌剂等化学药物的大量使用, 由耐药性引起的微生物变异种群越来越多, 由此引发的全球性微生物灾害事件频频发生。为了防止微生物灾害事件的发生, 研发和应用新型抗菌材料是一种行之有效的方法。无机抗菌材料具有安全性高, 耐热性和持久性良好, 且不易产生抗药性等优点, 自 20 世纪 80 年代以来获得了陆续的开发与应用^[1,2]。其中, 载银无机抗菌材料因其毒性低、抗菌活性高、抗菌谱广, 已成为目前应用最广泛的无机抗菌材料^[3,4]。

纳米银作为无机抗菌材料, 由于其原子排列表现为介于固体和分子之间的“介态”, 表现出量子效应、小尺寸效应和极大的比表面积, 具有其他载银无机抗菌材料无法比拟的抗菌活性, 可以有效地杀灭细菌、真菌、支原体等致病微生物^[5,6]。但是, 在纳米银抗菌材料得以发展和应用的同时, 相关基础研究明显滞后, 纳米银对细菌的作用机理尚未认识清楚, 这将影响纳米银抗菌材料的进一步发展和更为广泛的应用。

本工作以大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为模式菌,

研究了纳米银对大肠杆菌的抗菌作用,并对其抗菌机制做了初步的探讨,为纳米银抗菌材料的广泛应用奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

纳米银溶液,浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,纳米银粒径 $\leq 15\text{nm}$,上海沪正纳米科技有限公司提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC8739 购自美国菌种保藏中心,由本实验室保存;MH (MuellerHinton) 肉汤和琼脂培养基由本实验室配制。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米银的抗菌琼脂培养实验

配制纳米银浓度分别为 0, 2.5, 5, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MH 琼脂,每个浓度各倒 3 个平皿,待琼脂凝固,用多点接种器吸取 2 μL 制备好的 10^7 cfu/mL 大肠杆菌稀释液接种到琼脂表面,每点菌数约为 10^4 cfu/mL,置于(37 ± 2) $^\circ\text{C}$ 恒温培养 48 h,观察结果。

1.2.2 纳米银的抗菌肉汤培养实验

将 6 个 50 mL 三角瓶中分别加入 20 mL 灭菌的

LB 肉汤培养基、纳米银溶液和大肠杆菌,使纳米银浓度分别为 0, 2.5, 5, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,大肠杆菌浓度为 10^6 cfu/mL,放入(37 ± 2) $^\circ\text{C}$ 培养箱中恒温振荡培养。每隔一段时间取样,用分光光度计(DU640, BECKMAN 公司)测定 OD_{600} ,以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标,绘制生长曲线。

1.2.3 纳米银对细菌细胞形态和结构的影响

将 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米银处理的大肠杆菌和未经处理的对照组大肠杆菌培养 12 h 进行切片,用透射电镜(日本日立 H-600)观察处理组的细菌形态变化。

1.2.4 纳米银对细菌总 DNA 的影响

经 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米银处理和未经处理的大肠杆菌在(37 ± 1) $^\circ\text{C}$ 培养箱中恒温振荡培养 12 h 后取样,提取总 DNA^[7],然后进行琼脂糖 DNA 凝胶电泳。

2 结果

2.1 纳米银对大肠杆菌的抑菌效果

纳米银抗菌琼脂培养实验结果如表 1 所示,从表 1 可以看出纳米银对大肠杆菌的最低抑菌浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 纳米银最低抑制浓度实验

Table 1 Minimum inhibitory concentration of nanosilver

Concentration of nanosilver/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0	2.5	5	10	15	20
Growth of <i>E. coli</i>	Growth	Growth	Growth	No growth	No growth	No growth

由纳米银抗菌肉汤培养实验结果绘制了纳米银对大肠杆菌的抑制生长曲线,如图 1 所示。从图 1 可以看出,对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)以及 2.5, 5, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纳米银处理组的大肠杆菌样品的生长都呈现典型的生长曲线,包括生长延滞期、指数期、稳定期和衰亡期几个典型阶段。将处理组与对照组相比较,可以看出纳米银能够延长大肠杆菌的延滞期,纳米银浓度越高延滞期越长。由于 OD_{600} 测得的是活菌和死菌的总数,所以衰亡期不明显。当纳米银浓度达到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时完全抑制大肠杆菌的生长,液体培养至 48 h 后取样进行平皿培养 48 h,没有长出菌落。

2.2 抗菌作用机制

采用透射电镜观察了经纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞的形态变化过程,结果如图 2 所示。2a, b 是培养 12 h 的对照组大肠杆菌细胞,2c, d, e 和 2f 是经纳米银处理 12 h 的大肠杆菌细胞的内部结构。从 2a, b 可以看出,对照组大肠杆菌细胞的电子密度一致,是没有受到任何环境因素干扰的大肠杆菌细胞的典型形

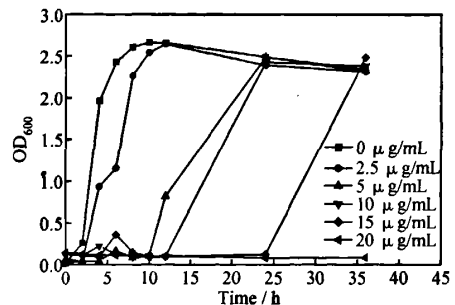


图 1 纳米银对大肠杆菌的抑制生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *E. coli* in different concentrations of nanosilver

态特征。细胞中的电子明亮物质是 DNA 分子,它们随机分布在大肠杆菌细胞的核区。而处理组大肠杆菌细胞的内部构造出现很大的变化,如图 2c, d 所示,细胞的中心有一个很明显的电子明亮区域,区域的中心有浓缩很紧密的物质,呈线性状态,明亮区域的周围也有很多电子致密的颗粒。这可能是纳米银使大肠杆菌

的细胞壁与细胞膜脱离,使 DNA 分子浓缩呈紧张态。大肠杆菌电子明亮区域周围的电子致密颗粒可能是纳米银粒子;而在电子明亮区域内部却没有电子致密颗粒,显然是电子明亮区域阻止了纳米银粒子的进入。

图 2f 是图 2e 中的大肠杆菌细胞的局部放大电镜照片,这个细胞非常特殊,细胞内布满了电子致密的颗粒,而没有电子明亮的区域,这是经纳米银处理的大肠杆菌细胞晚期的典型形态特征,此时细胞没有了

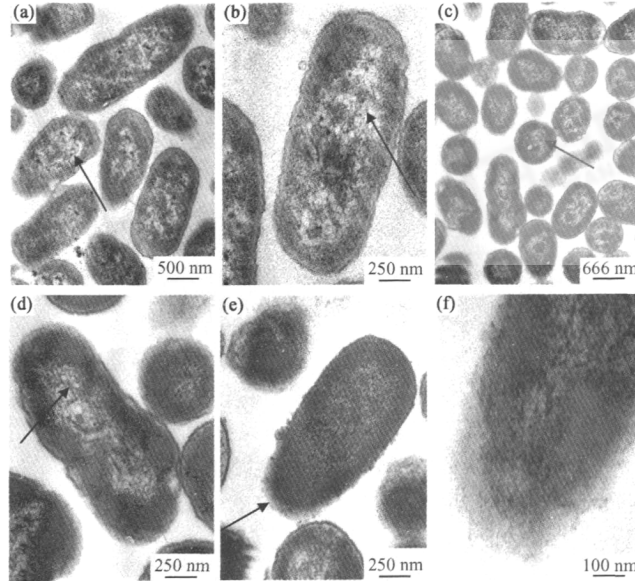


图 2 透射电镜下大肠杆菌形态结构

- (a) 未经纳米银处理的大肠杆菌放大 20000 倍,箭头所指为随机分布在细胞内的电子明亮物质;
 (b) 未经纳米银处理的大肠杆菌放大 40000 倍,箭头所指为随机分布在细胞内的电子明亮物质;
 (c) 经纳米银处理的大肠杆菌放大 15000 倍,箭头所指为电子明亮区域;(d) 经纳米银处理的大肠杆菌放大 40000 倍,箭头所指为在电子明亮区域浓缩呈线性的 DNA;(e) 经纳米银处理的大肠杆菌晚期细胞放大 40000 倍,箭头所指为破损的细胞壁;(f) 经纳米银处理的大肠杆菌晚期细胞放大 100000 倍,是细胞壁破损的细胞

Fig. 2 Morphology and structure of *E. coli* cells under transmission electron microscope

- (a) normal *E. coli* cells, the electron light materials(arrow) distributed randomly in cells(20000); (b) normal *E. coli* cells, the electron light materials(arrow) distributed randomly in cells(40000); (c) *E. coli* cells treated by nanosilver, the electron light region(arrow) in the center of cells(15000); (d) *E. coli* cells treated by nanosilver, condensed form of DNA(arrow) in the electron light region(40000); (e) the terminal *E. coli* cells treated by nanosilver, damaged cell wall(arrow) (40000); (f) the terminal *E. coli* cells treated by nanosilver, the cell wall was damaged(100000)

明显的核区,细胞壁已经破损。

图 3 为纳米银对大肠杆菌总 DNA 的影响。可以看出,对照组与两个处理组(经过浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米银处理)的大肠杆菌培养 12 h 后的总 DNA 呈现相同的条带,但处理组的 DNA 量减少。条带下方的明亮区域是降解的 DNA。与对照组相比,处理组的 DNA 样品有更大程度的降解,且随着纳米银浓度的增高,大肠杆菌总 DNA 样品降解的程度增大。

3 讨论

目前,关于纳米银的抗菌机制还没有系统的认识。

虽然文献报道认为^[9,10]是带负电荷的细菌细胞和带正电荷的纳米银粒子之间的静电相互作用引起的。但是,纳米银与细菌接触后对细菌细胞的损害过程、以及对细菌总 DNA 的影响等方面,系统的研究报道较少。

从本工作对经纳米银处理过的大肠杆菌细胞形态影响的电镜结果可以看出,经纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞形态变化过程是循序渐进的,纳米银粒子先在细胞壁上产生小的孔洞,通过这些孔洞进入周质空间,导致细胞膜成分渗漏和破坏细胞膜,进而进入细胞内部。进入细胞内部的纳米银粒子使 DNA 浓缩呈紧张态,并与破损细菌的细胞质结合积聚,最后引起胞内物质流失。Sondi 等^[8]通过扫描电镜也观察到纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞出现了较大的损伤,细

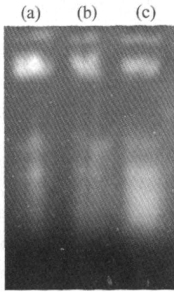


图3 纳米银对大肠杆菌总DNA的影响

(a) 对照组的大肠杆菌总DNA; (b) 10 µg/mL的纳米银处理的大肠杆菌总DNA; (c) 20 µg/mL的纳米银处理的大肠杆菌总DNA

Fig. 3 Effect of nanosilver on genome DNA of *E. coli*

(a) genome DNA of normal *E. coli* cells; (b) genome DNA of *E. coli* cells treated with 10 µg/mL nanosilver; (c) genome DNA of *E. coli* treated with 20 µg/mL nanosilver

胞壁上有很多的孔洞,并观察到纳米银粒子和死亡的细胞形成了聚集体;X射线能谱(EDAX)分析也表明,大肠杆菌细胞膜中有很多纳米银粒子^[8]。Amro等^[12]在研究大肠杆菌细胞渗透性的结构基础时,也发现细胞膜上出现孔洞是由于细胞膜成分的流失,主要是脂多糖和膜蛋白。

此外,本工作采用透射电镜观察的纳米银对大肠杆菌细胞形态影响的实验结果和采用琼脂糖凝胶电泳观察的纳米银对大肠杆菌总DNA的影响实验结果都表明,纳米银也可能通过作用于细胞DNA而抑制大肠杆菌的生长。DNA是细胞中最重要的基因信息,DNA的任何损伤都会引起生物体的变异或死亡。DNA分子在松弛状态下才能有效地进行复制,呈紧张状态的DNA分子失去复制的能力。因此,纳米银粒子也可能通过浓缩DNA使之失去复制能力和引起DNA降解来抑制细菌的生长繁殖。本工作通过电镜观察到经纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞,DNA不再随机分布在细胞的核区,而是在核区浓缩呈紧张态的现象,还有研究工作者有同样的发现。Feng等^[11]在研究硝酸银对大肠杆菌的抑菌作用时,发现经硝酸银处理过的大肠杆菌细胞与本工作用纳米银处理过的大肠杆菌细胞具有同样的特征:细胞中心有一个电子明亮的区域,其中心是浓缩的DNA分子。

4 结论

(1) 纳米银使大肠杆菌的生长延滞期加长,并且纳米银浓度越高,生长延滞期越长。

(2) 经纳米银粒子处理过的大肠杆菌细胞形态变化过程是循序渐进的,纳米银粒子先在细胞壁上产生

小的孔洞,通过这些孔洞进入周质空间,导致细胞膜成分渗漏和破坏细胞膜,进而进入细胞内部。进入细胞内部的纳米银粒子使DNA浓缩呈紧张态,并与破损细菌的细胞质结合积聚,最后引起胞内物质流失。

(3) 纳米银使大肠杆菌DNA不再随机分布在细胞的核区,而是在核区浓缩呈紧张态,且能够增加大肠杆菌总DNA样品的降解程度,故纳米银通过浓缩DNA使之失去复制能力和引起DNA降解可能是其抑制细菌生长繁殖的作用机制之一。

参考文献

- [1] 夏金兰,王春,刘新星. 抗菌剂及其抗菌机理[J]. 中南大学学报, 2004,35(1):31-38.
- [2] 刘康时,江显异,赵英. 银系无机抗菌剂作用机理的研究进展[J]. 佛山陶瓷,2001,11(56):1-5.
- [3] BERGER TJ, SPADARO JA, CHAPIN SE, et al. Electrically generated silver ions; quantitative effects on bacterial and mammalian cells[J]. *Anti Microb Agents*, 1976, 9(2):357-358.
- [4] ZHAO GJ, STEVENS SE. Multiple parameters for comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion[J]. *Bio Metals*, 1998, 11:27-32.
- [5] 林爱红,秦彦琛,饶健,等. 纳米抗菌剂抑菌杀菌性能研究[J]. 实用预防医学,2003,10(2):168-170.
- [6] 杨玉旺,刘敬利. 纳米银研究和应用新进展[J]. 工业催化,2003, 11(12):7-12.
- [7] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANISTIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3rd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] SONDI I, SALOPEKAI-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.
- [9] HAMOUDA T, BAKER JR. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric gram-negative bacilli[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89:397-403.
- [10] STOIMENOV PK, KLINGER RL, MARCHIN GL, et al. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents[J]. *Langmuir*, 2002, 18:6679-6686.
- [11] FENG QL, WU J, CHEN GQ, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 52:662-668.
- [12] AMRO NA, KOTRA LP, WADU-MESTHRIGE K, et al. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability [J]. *Langmuir*, 2000, 16:2789-2796.

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(A06104481)

收稿日期:2008-06-11;修订日期:2008-08-24

作者简介:谢小保(1966—),男,硕士,副研究员,主要从事抗菌材料的抗菌作用机理及微生物耐药机理研究,联系地址:广州市先烈中路100号大院广东省微生物研究所(510070)。E-mail:xxiaobao@tom.com