

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.09.014

氧化镁纳米材料抗菌机理的研究进展*

张小乐^{1,2**} 朱雨荷¹ 李轻彩¹ 车 晶¹ 江 巍¹ 蔡亚岐²

(1. 河北联合大学轻工学院, 唐山, 063000; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

摘 要 氧化镁基纳米材料作为一类新型的抗菌材料,具有持久和广谱的抗菌活性,而且安全无毒、热稳定性好、无需光照诱导,因此成为抗菌消毒领域的研究热点,但是其抗菌机理一直存有争议.文章介绍了几种近年来被广泛接受的抗菌机理,以及利用先进的研究方法在氧化镁基纳米材料的抗菌机理研究方面所取得的最新进展,指出了其对新型无机纳米抗菌材料合成的指导意义.

关键词 氧化镁基纳米材料, 抗菌机理, 研究进展.

Research progress of the antibacterial mechanism of magnesium oxide nano-materials

ZHANG Xiaole^{1,2**} ZHU Yuhe¹ LI Qingcai¹ CHE Jing¹ JIANG Wei¹ CAI Yaqi²

(1. Qinggong College, Hebei United University, Tangshan, 063000, China;

2. Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Science, Beijing, 100085, China)

Abstract: Magnesium oxide nano-materials, a group of novel antibacterial materials with low toxicity, high thermal stability, and permanent and broad-spectrum antibacterial activity even under dark condition, have been a research focus in the field of disinfectants. But there are still disputes in terms of their antibacterial mechanism. In this article, several commonly accepted antibacterial mechanisms of magnesium oxide nano-materials, as well as some most recent research progress in this aspect achieved by using some advanced methodology, are introduced. The significance of these research results in guiding the synthesis of novel inorganic antibacterial nano-materials is also discussed.

Keywords: magnesium oxide based nano-materials, antibacterial mechanisms, research progress.

与常用的紫外辐射消毒和臭氧、氯气等化学试剂消毒法相比,无机纳米抗菌材料由于具有低毒性、强耐热性、持久及广谱抗菌活性、不易产生抗性菌株等优点,而且在消毒过程中不易生成毒性更强的消毒副产物,因此成为抗菌消毒领域的研究热点^[1-3].无机纳米抗菌材料中研究较多的是纳米银和 TiO₂ 基纳米材料,这两类材料均具有良好的抗菌活性,其有效抗菌浓度分别可达 10—100 mg·L⁻¹^[3-6] 和 25—100 mg·L⁻¹^[1-3, 5].与之相比,纳米氧化镁(MgO)虽然有效抗菌浓度一般在 500—1000 mg·L⁻¹^[7-12],但是因其环境友好、不易变色,无需光照诱导,而且能够灭活芽孢等具有较强抗性的病原体^[11-22],目前作为抗菌材料被广泛添加于纺织品^[23]、纸张^[24]、陶瓷^[17, 25]及内墙涂料^[26]中.而且,基于对纳米氧化镁抗菌机理的研究,目前已经开发出了 Mg(OH)₂^[10, 27-28]、MgO 纳米线^[29-31]、MgO 纳米盘^[9, 29, 32-33]、MgO-ZnO^[7]、MgO-CaO^[34]、MgO-GeO₂^[35]、MgO-CaCO₃^[36]、MgO-X₂^[37-39]等一系列 MgO 基的无机纳米抗菌材料.为了进

2014 年 3 月 3 日收稿.

* 国家自然科学基金项目(21377034, 21277152);河北省科学技术研究与发展计划项目(11215183);环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金项目(KF2011-28);中国博士后科学基金资助项目(2012M510573)资助.

** 通讯联系人, Tel: 13785562015; E-mail: smilxin@126.com

一步提升 MgO 基纳米材料的抗菌活性,有必要对其抗菌机理进行更加深入的探讨。

本文介绍了 MgO 基纳米材料的不同抗菌机理的研究进展,并指出在研究过程中先进研究手段的重要性,以及研究 MgO 纳米颗粒的抗菌机理对新型无机纳米抗菌材料合成的指导意义。

1 氧化镁基纳米材料的抗菌机理

1.1 活性氧自由基的氧化损伤

较早对纳米 MgO 的抗菌活性开展研究的是日本科学家 Sawai.他首先采用电导法研究了 26 种陶瓷粉末的抗菌性能,发现纳米 MgO 对于革兰氏阳性(G^+)的 *S. aureus* 和 *B. subtilis* 以及革兰氏阴性(G^-)的 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 均具有良好的杀菌能力^[40].随后,Sawai 又利用氧电极法和化学发光法对 MgO、CaO 和 ZnO 等纳米颗粒的抗菌机制进行了研究,结果证实由于有过氧负离子(O_2^-)的生成,3 种氧化物的悬浮液均有化学发光响应,且响应强度依 CaO、MgO、ZnO 递减,恰好与 3 种纳米颗粒的抗菌活性顺序相符合,并由此提出了 MgO 纳米颗粒的活性氧自由基(ROS)的氧化损伤学说^[25].而后他又利用 Ames 试验考察了 MgO 纳米颗粒对 *S. typhimurium* TA 102 菌株的抗突变作用,发现该颗粒可以减弱甲基乙二醛对受试菌株的致突变作用,他认为其原因可能是 MgO 纳米颗粒表面生成的 O_2^- 导致了突变体的灭活^[41].

为了证实上述的 ROS 的氧化损伤抗菌机制,Sawai 利用抑菌圈法以 *E. coli* 和 *S. aureus* 为受试菌株对 MgO 纳米颗粒的抗菌机制进行了深入的研究,结果发现,受试菌株被纳米 MgO 处理之后对抗生素的敏感性明显增强,与 ROS 处理之后的结果相一致,由于前面的化学发光分析已经证实在纳米 MgO 表面有 O_2^- 等自由基的生成,其抗菌机制^[13]:MgO 晶体表面的氧空位可以催化水中的溶解氧通过单电子还原反应产生活性 O_2^- , O_2^- 有强氧化性,可以破坏细菌的细胞成分,从而迅速杀死细菌.此外,MgO 在水溶液中极易水合,并在表面生成 $Mg(OH)_2$,使 MgO 的表面包覆一层 OH^- 而呈碱性.纳米级的 MgO 粉体比表面积较大,其表面生成的 $Mg(OH)_2$ 较多,而 O_2^- 在碱性环境中具有较高的化学稳定性,因此水溶液中产生的 O_2^- 容易在其表面富集,使其表面的 O_2^- 浓度远高于水溶液,从而具备较强的杀菌能力,MgO 颗粒的粒径越小,比表面积越大,其表面的 OH^- 离子越多,表面吸附的 O_2^- 浓度也越大,表现出 MgO 的杀菌能力随粒径减小而增大的趋势.此后,关于 MgO 基纳米抗菌材料的研究大部分都是基于这种机理^[14-15, 34, 42-43].

为了探讨 ROS 的攻击方式,进一步完善上述抗菌机理,Makhluf 利用扫描电子显微镜-X-射线能谱(SEM-EDX)和透射电子显微镜(TEM)等手段对纳米 MgO 的抗菌机制进行了系统的研究(图 1).经过纳米 MgO 处理之后的细胞中 Mg 元素的含量明显升高,而磷元素和硫元素则显著下降,说明 MgO 纳米颗粒侵入了细胞,造成了细胞中蛋白质成分的外泄.他认为,纳米 MgO 可以通过两种方式攻击细胞:(1)在细胞外产生 ROS 攻击细胞膜,使细胞破裂;(2)侵入细胞,通过与细胞膜接触并在其附近产生 ROS,攻击细胞膜,之所以 *S. aureus* 比 *E. coli* 对纳米 MgO 具有更强的抵抗能力,可能与前者能够合成更多的超氧化物歧化酶(SOD)或过氧化氢酶以分解 ROS 有关^[12].随后,Huang 等人也利用红外光谱(FTIR)分析了 MgO 纳米颗粒处理前后细菌的细胞组分变化,但是得到的结论却与 Makhluf 有所不同.该研究发现,细胞化学组分的变化主要体现在细胞壁上的蛋白质成分,并据此认为是纳米 MgO 表面生成的 O_2^- 攻击肽链中羰基上的 C^{8+} ,导致蛋白质的降解,而对于 *B. subtilis* ATCC 9372 芽孢的灭活则是由于 O_2^- 攻击芽孢壁中蛋白质的仲酰胺链所致(图 2)^[44].Al-Hazmi 也利用 SEM 证实了 MgO 纳米线通过攻击细胞壁(或芽孢壁)上的肽键对细菌细胞和芽孢产生的灭活作用^[30].

Krishnamoorthy 利用微孔板试验,以刃天青为细胞生长指示器,进一步研究了纳米 MgO 的抗菌机制,并指出是纳米 MgO 表面的晶格缺陷和氧空位导致了 O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ 等 ROS 的产生,继而引发细胞膜脂的过氧化和细胞结构的破坏.紫外光谱和光致发光光谱证实了 MgO 表面晶格缺陷和氧空位的存在,脂质球的超声诱导脂质过氧化试验也验证了纳米 MgO 表面 ROS 的生成,并且检出了各种脂质过氧化产物.以此为依据,作者提出了 ROS 产生的依次氧化-还原机理:MgO 在水溶液中与水结合形成一层 $Mg(OH)_2$,使其表面生成电子-空穴对,进而分解成表面捕获电子和原位空穴,然后再与溶解氧反应生成各种 ROS^[11].此外,Krishnamoorthy 还利用 SEM、Western Blot 分析、以及流式细胞分析等先进手段研究

了纳米 MgO 对肿瘤细胞的毒性效应,及其作为纳米冷冻或加热材料在肿瘤治疗中的应用,结果发现,纳米 MgO 对 HeLa、AGS、和 SNU-16 等肿瘤细胞具有优秀的杀伤能力,暴露于纳米 MgO 下的肿瘤细胞由于受到来自于 MgO 表面产生的 ROS 的攻击,导致细胞膜脂的过氧化和肿瘤细胞的凋亡^[45].

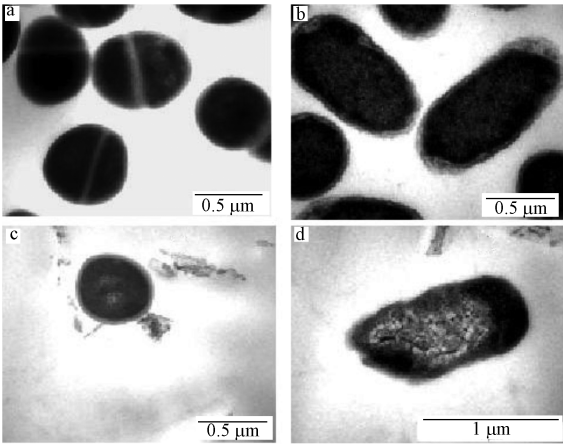


图 1 *S. aureus* (a.未处理;b.纳米 MgO 处理)和 *E. coli* (c.未处理的细胞;d. 纳米 MgO 处理)的透射电镜图^[12]
Fig.1 TEM of *S. aureus* (untreated cells (a) and nano MgO treated cells (b)) and *E. coli* (untreated cells (c) and treated cells (d))^[12]

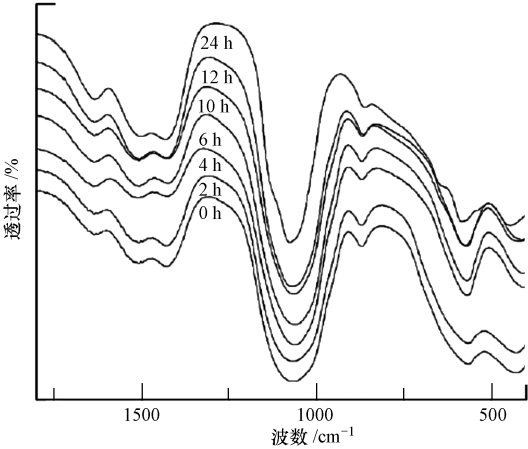


图 2 MgO 与 *B. subtilis* 混合不同时间后的红外光谱图^[44]
Fig.2 FTIR spectra of mixtures of MgO and *B. subtilis* after different contact times^[44]

这种纳米 MgO 的 ROS 氧化损伤抗菌机制获得了大多数研究者的认可,对于新型 MgO 基纳米抗菌材料的开发也集中于对其进行掺杂处理,使之产生更多的、活性更强的 ROS 上.Ohira 就合成了一系列不同 ZnO 含量的 ZnO-MgO 复合纳米颗粒,XRD 表征结果显示,随着 ZnO 比例的提高,纳米颗粒逐渐由立方结构的 MgO 向六边形结构的 ZnO 过渡,当 MgO/ZnO 摩尔比为 0.44—1.22 之间时为混晶结构.立方结构晶体表面生成的 O₂⁻ 比六边形结构晶体表面生成的 H₂O₂ 氧化性更强,因此随着 ZnO 比例的提高,纳米颗粒的抗菌活性有所减弱^[46].但是当 MgO/ZnO 摩尔比大于 1.86 时,即晶体均为立方结构时,Zn 含量的增加却使其抗菌活性有所提高,他认为这可能与纳米材料的光吸收增强导致自由基生成量的增加有关^[47].但是,在探讨 MgO 抗菌机制时采用的化学发光法和脂质球的超声诱导脂质过氧化实验均只能作为 ROS 产生的辅助证明,FTIR 结果也只能反映作用前后细胞组分中化学键的变化,而无法确定具体的氧化产物.因此,这个机理还需要更多的实验证据作为支撑.

1.2 吸附作用引发的机械损伤

纳米 MgO 的 ROS 氧化损伤抗菌机制虽然被广泛接受,但是仍然无法解释某些实验现象.例如, Sawai 在研究不同类型的细菌对 MgO 纳米颗粒的敏感性时发现,菌体对 MgO 颗粒的敏感性与细胞形状有关,杆形的 *E. coli* 和 *B. subtilis* 比球形的 *S. aureus* 更为敏感,而与其细胞壁结构组成等其他特性关系不大^[48].此外,Hewitt 利用多参数流式细胞分析和荧光染色研究还发现,即使在适宜的培养基中,*E. coli* 经纳米 MgO 处理之后仍然有大量细胞的细胞膜发生了去极化和渗漏现象^[49].考虑到纳米 MgO 具有很高的比表面积^[38, 50],而且 MgO 表面存在大量 Mg²⁺ Lewis 酸、O₂⁻ Lewis 碱、晶格局限羟基、游离羟基以及阳离子和阴离子空穴等多种活性位点^[38],这些都是吸附和表面反应的中心,Yamanoto 提出,除了 ROS 的氧化损伤之外,纳米 MgO 的抗菌能力还与纳米颗粒对微生物的吸附作用造成细胞膜的机械损伤有关,而且纳米 MgO 颗粒越细小,这种抑菌和杀菌性能就越突出^[34].此外,杆形细胞对 MgO 纳米颗粒的高敏感性可能与其细胞表面具有更多的吸附位点有关.但是,直到 2011 年 Jin 利用 SEM 观察了纳米 MgO 对 *E. coli* 和 *Salmonella Stanley* 造成的细胞损伤,才证实了纳米 MgO 对受试菌株的吸附作用及其导致的细胞膜的变形和损伤,进而引起细胞内含物的泄露和菌体的死亡(图 3)^[16].

利用纳米 MgO 较高的比表面积和强吸附能力,还可以制备纳米 MgO 和卤素的加成物(MgO-X₂).美国堪萨斯州立大学的 Klabunde 研究小组合成了 MgO-Cl₂和 MgO-Br₂等纳米颗粒,研究了这些 MgO-X₂纳

米颗粒的杀菌效果,结果发现纳米 MgO 对卤素单质具有强大的吸附能力,可吸附自身重量 20%的氯气,并使其稳定性大大提高,有利于实际应用;原子力显微镜(AFM)、激光共聚焦显微镜(CLSM)和 TEM 的观察结果显示,这些纳米颗粒可通过吸附作用和活性卤原子的进攻使细胞壁和细胞膜破损,进而有效杀死 *E. coli*、*Bacillus cereus* 以及 *Bacillus globigii* 等多种 G^+ 和 G^- 细菌及其芽孢(图 4) [37, 39] .

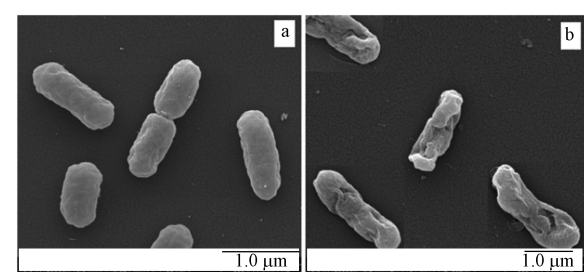


图 3 *E. coli* O157:H7 菌株经 MgO+乳酸链球菌素暴露后的形态变化
(a.对照, b. $8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MgO 纳米颗粒) [16]
Fig.3 SEM of *E.coli* O157:H7 following treatments with MgO NP and nisin (a.control, b. $8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MgO NP) [16]

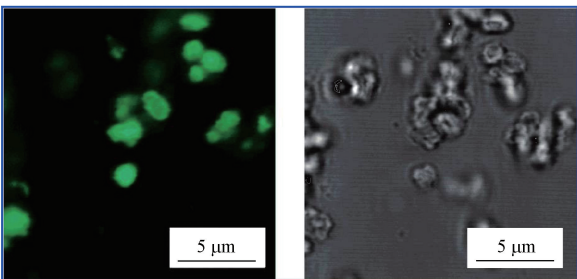


图 4 *B. subtilis* 芽孢与负载卤素气溶胶的 MgO 颗粒混合后的激光共聚焦(左)及透射电镜显微(右)图 [39]
Fig.4 Confocal fluorescence microscope (left) and transmission electron microscope (right) im-ages of *B. subtilis* spores mixed with AP-MgO/fluorescein [39]

此外,由于 MgO 极易与水反应生成 $\text{Mg}(\text{OH})_2$,因此 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 作为一种新型的氧化镁基纳米抗菌材料也逐渐引起人们的关注,关于其抗菌机理的研究近年来也逐渐开展.大连理工大学的 Dong 利用菌落形成单位(CFU)计数法和顶空气相色谱法(HS-GC)考察了 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米材料在液体培养基内和纸张上对于 *E. coli* 和 *Burkholderia phytofirmans* 的抗菌活性.CFU 计数的结果表明,干燥纸张上的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 可杀死绝大多数的受试菌,说明 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 可通过与菌体细胞的直接接触发挥其杀菌作用,而无需溶解于水中生成 Mg^{2+} 和 OH^- .由于没有水分参与,因此显然不能用 ROS 的氧化损伤来解释其杀菌作用.Dong 给出的解释是: $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米颗粒直接穿透细胞壁,进入细胞内部,破坏蛋白质结构,引起细胞的膜结构破损和细胞的死亡 [27].该作者还研究了 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片对 *E. coli* 的抗菌活性,SEM 的结果表明, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片通过与菌体细胞的直接接触导致细胞的膜结构破损和细胞的死亡,而封装在膜管中的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片却几乎完全没有杀菌能力,只能延缓受试菌的生长 [24].最近,Pan 采用了几种不同的方法合成了一系列 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片,并研究了这些材料对 *E. coli* 的抗菌能力和抗菌机制.SEM、TEM、CLSM 和 Zeta 电位的结果表明, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片并没有进入细胞,而是通过静电作用吸附于细胞表面,破坏细胞壁和细胞膜的完整性,最终造成细胞的死亡(图 5) [51].

MgO 基纳米抗菌材料对受试菌的吸附作用引发的机械损伤可以作为 ROS 的氧化损伤机制的重要补充,它不仅很好地解释了 MgO 纳米颗粒的抗菌活性随粒径减小而逐渐增强、直接接触对抗菌活性的必要性、以及杆形细菌比球形细菌更为敏感等一系列实验现象.另外,通过合成更小粒径的纳米颗粒或利用纳米 MgO 的强吸附能力和水合能力进一步提高其抗菌活性,为新型 MgO 基纳米抗菌材料的开发提供了另一种思路.

1.3 OH^- 释放造成的 pH 改变

如前所述,纳米 MgO 容易与水化合,并在其表面形成 $\text{Mg}(\text{OH})_2$,而 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 是一种微溶于水的中等强度碱,在水中可电离出 OH^- 而使溶液 pH 值上升至 10.5 左右.这种 pH 的变化对于纳米 MgO 抗菌活性的影响,在早期研究 MgO 基纳米材料的抗菌作用时,普遍的观点是 O_2^- 在碱性环境中更为稳定,纳米 MgO 表面生成碱性的 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 可使水中的 O_2^- 更容易在其表面富集,从而起到杀菌作用.此外, $\text{pH} = 10.5$ 的 NaOH 溶液对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的杀菌效果远不如纳米 MgO 的事实也说明单纯的 pH 变化并不具有明显的抗菌作用,但是溶液 pH 的升高确实对纳米 MgO 的抗菌活性有所贡献 [13].基于这个观点,Yamanoto 制备了 CaO-MgO 和 ZnO-MgO 等掺杂的纳米 MgO 材料,并利用 CFU 计数法研究了他们的抗菌活

性.结果表明,随着 ZnO 掺杂量的提高,ZnO-MgO 纳米材料的抗菌能力有所下降,而随着 CaO 掺杂量的提高,CaO-MgO 纳米材料的抗菌能力却有所提高,作者认为这种抗菌活性的变化与掺杂后纳米 MgO 的碱性增强或减弱有关,但是根本原因还是 ROS 在碱性环境下的高稳定性及其在纳米颗粒表面的富集^[34, 42].

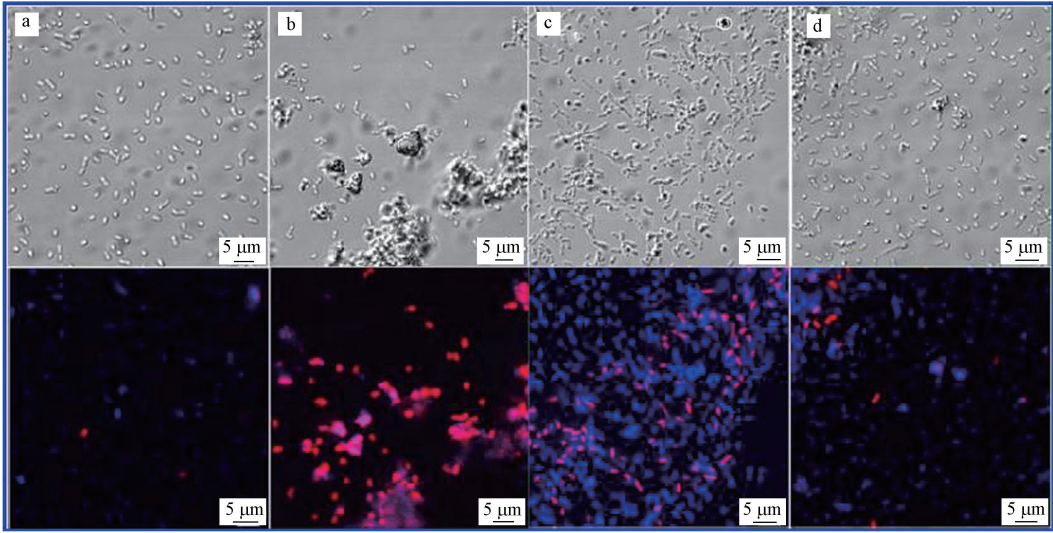


图 5 三种 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米片处理后 *E. coli* 细胞凋亡和坏死的荧光显微电镜图(a. 对照)^[51]

Fig.5 Fluorescence microscopy investigation of apoptotic and necrotic *E.coli* cell morphology after exposure to 3 types of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (a. control)^[51]

以上观点直到 Sawai 在研究 CaO-MgO 纳米材料对 *Candida albicans*、*Saccharomyces cerevisiae* 以及 *Aspergillus niger* 等真菌的抗菌能力时才有所改变.由于真菌的细胞壁结构组成与细菌差别较大,而且更喜欢偏酸性的培养环境,因此对于碱性溶液更为敏感, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 电离生成的 OH^- 的直接杀菌作用也更为显著^[15].此外,在前面提到的负载 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米颗粒的抗菌纸张的研究中,作者指出,干燥条件下 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 的抗菌活性也可能与 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 纳米颗粒吸收毛细管水后电离,在其表面形成高浓度的 OH^- 有关^[27].另一方面,对于掺杂型 MgO 基纳米抗菌材料的深入研究也发现,掺杂元素的种类对于纳米材料抗菌活性的影响并不仅限于 pH 的改变.华中科技大学的 Rao 利用溶胶-凝胶法分别合成了 Li、Zn、Ti 掺杂的 MgO 纳米颗粒,并考察了这些材料的抗菌能力.肉汤稀释法和平板培养法的结果表明, $\text{Li}_2\text{O-MgO}$ 对 *E. coli* 的杀灭能力最强,而 ZnO-MgO 和 $\text{TiO}_2\text{-MgO}$ 均低于纯 MgO, Li^+ 的掺杂不仅可以使颗粒的碱性提高,而且可以增加晶体表面的氧空位,提高材料的催化能力,生成更多的 ROS,从而获得较高的抗菌活性^[8].

除了偏爱酸性环境的真菌容易受到材料表面碱性上升的直接作用外, OH^- 释放对 MgO 基纳米材料抗菌活性的影响主要还是体现在对 ROS 的富集和稳定上.而通过对 MgO 纳米颗粒进行适当的掺杂处理以提高材料表面的 OH^- 浓度也是提高材料抗菌活性的有效手段,但在选择掺杂元素及其含量时还要充分考虑到合成的成本,以及是否能够同时增加材料表面的活性位点,产生更多的 ROS,后者对于提高抗菌活性的作用更为显著.

1.4 非自由基介导的细胞膜损伤

以上的报道主要是采用 SEM 或 TEM 等微观手段结合化学发光、FTIR、元素分析以及平板培养抗菌试验来研究 MgO 基纳米材料的抗菌机理.但是这些研究大多是根据损伤造成的结果来分析和推测可能的抗菌机制,而且根据化学发光等相对原始的研究方法所获得的结论也有待进一步验证,因此有必要利用更为先进的研究手段从更深层次上探讨纳米 MgO 的抗菌机理.最近,香港大学的 Leung 以 *E. coli* 为受试菌,采用电子自旋共振(ESR)、液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)和蛋白质组学等手段,结合常规的 TEM、FTIR 和平板培养等方法,对 3 种 MgO 纳米材料的抗菌活性进行了深入研究^[10].首先,平板培养和溶液培养的结果表明,3 种不同来源的纳米 MgO 在紫外辐射、自然光辐射及完全黑暗的条件下对 *E. coli* 均显示良好的杀菌效果,SEM 和 TEM 的结果也显示受试菌经纳米 MgO 处理后发生了细胞膜破损的现象,细胞表面的孔洞清晰可见,但是细胞内却没有发现纳米 MgO 的侵入,EDX 谱图中也没有发现 Mg 的

过量存在,由此确定纳米 MgO 的杀菌作用是通过造成细胞膜损伤实现的.随后,作者利用 ESR 测定了 3 种样品产生的 ROS,结果只有 1 种样品可以检测出少量的 O_2^- 和 $\text{OH}^\cdot$,另外两种样品则检测不到任何的 ROS(图 6).同时,对于后两种样品的硫代巴比妥酸的脂质过氧化试验也没有检测到细胞壁和细胞膜组分的过氧化产物,衰减全反射模式的 FTIR 谱图也显示,经纳米 MgO 处理后细胞壁中的脂多糖(LPS)和磷脂酰乙醇胺(PE)没有发生明显的变化.这与前面利用化学发光法和脂质球的超声诱导脂质过氧化试验得出的结论并不相符.以上结果均说明纳米 MgO 对细胞膜结构的破坏并不一定是因为 ROS 的产生和它与细胞膜成分的脂质过氧化反应,一定还存在其他的抗菌机制.

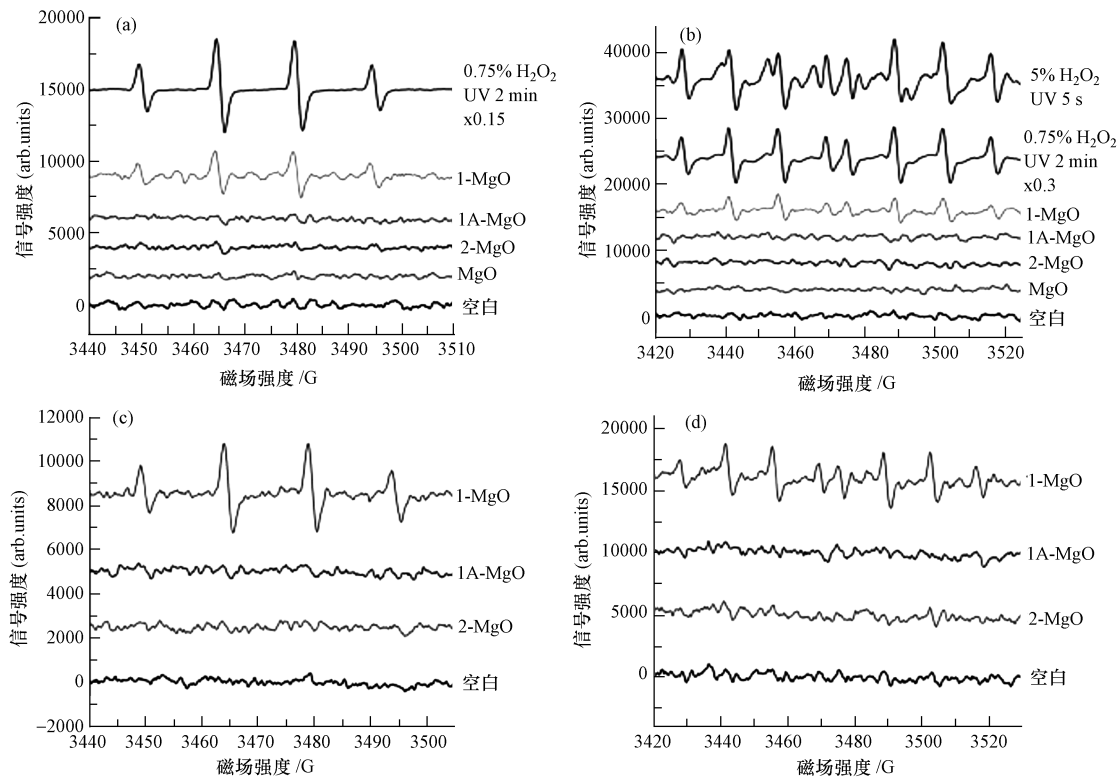


图 6 不同 MgO 颗粒在存在 *E. coli* 与否时经 DMPO (a,c) 和 DEPMPO (b,d) 电子捕获的 ESR 谱图^[10]
Fig.6 ESR spectra of different nanoparticles. DMPO and DEPMPO spin trap without (a,b) and with *E. coli*; (c,d)^[10]

为了探讨在没有 ROS 生成的情况下纳米 MgO 抗菌作用的分子机制,作者利用 LC-MS 技术进行了作用前后细胞的蛋白质组学研究,结果发现,经纳米 MgO 处理之后的细胞中 ROS 相关蛋白的表达并没有得到上调(与 ESR 研究结果相一致),而离子通道蛋白等外膜蛋白以及与脂类合成代谢相关的蛋白质却明显下调.结合 Zeta 电位分析和 XRD 分析,作者提出了纳米 MgO 的非自由基介导的细胞膜损伤抗菌机制:纳米 MgO 在水溶液中发生水合作用,生成 $\text{Mg}(\text{OH})_2$,电离出 OH^- 后带上正电荷,然后通过静电作用、范德华力、疏水作用或受体-配基作用与细胞表面带负电荷的 LPS 等分子结合^[52],进而导致外膜蛋白及细胞膜中脂类的合成代谢相关的蛋白质表达下调,造成细胞膜的不稳定和细胞的裂解.当然, OH^- 释放导致的 pH 变化、 Mg^{2+} 的存在及其与磷酸基团的相互作用在纳米 MgO 的抗菌过程中也发挥了一定的作用.

上述理论与吸附作用引发的机械损伤机制基本类似,区别在于,它认为纳米 MgO 造成的细胞膜的损伤并不是简单的机械作用,而是通过蛋白质组学研究在分子层面上解释了细胞膜的不稳定性与细胞组分的合成代谢有关,实验证据更为充分,结论也更具有说服力.但是,该理论的提出仅基于对 *E. coli* 的结果.由于微生物种类繁多,菌体结构和组成较为复杂,遗传特性和代谢方式多样,要想证实这种非自由基介导的细胞膜损伤机理的普适性,还需要选取不同类型的具有代表性的菌种,深入研究纳米 MgO 对各种类型菌种合成代谢的影响.

2 结论与展望

通过以上介绍可以看出,先进的研究手段对于纳米材料的抗菌机理研究具有巨大的推动作用.早期的实验手段相对落后,只能通过简单的抗菌试验了解材料的抗菌活性,利用化学发光等间接方法初步探讨其抗菌机理,并提出一些假说;SEM、TEM、CLSM、FTIR、EDX 和流式细胞仪等先进设备的使用,可以为这些假说提供更多的实验证据,但是只有 LC-MS、HS-GC 和 ESR 等更为先进的分析手段才能分析在杀菌过程中的中间反应产物,在分子水平上深入揭示其抗菌机制;而蛋白质组学的研究方法能够从微生物的遗传和代谢的角度上为各种抗菌机制提供生物学方面的信息.只有将各种研究方法合理地结合起来,充分利用先进研究手段的优势,获得更为完整的证据链,才能为纳米材料的抗菌机理提供更加合理的解释,使其得以不断完善和向前发展.

根据以上氧化镁基纳米材料抗菌性能及机理研究状况的评述,我们认为该领域今后的研究工作可在以下几方面推进.(1) 合成不同形貌和尺寸的 MgO 纳米材料,并采用过渡金属离子对 MgO 进行不同比例的掺杂,然后选取不同类型的菌种,利用抗菌实验考察纳米材料的形貌、尺寸以及掺杂处理对不同菌种抗菌活性的影响;(2) 利用 ESR 直接检测各种类型的 MgO 基纳米材料产生的 ROS,结合抗菌实验和 XRD 的结果,分析形貌、尺寸以及掺杂处理对 MgO 基纳米材料的晶型结构、表面生成 ROS 的种类和数量以及抗菌活性的影响;(3) 在抗菌实验中加入自由基清除剂,考察其对各种类型 MgO 基纳米材料抗菌性能的影响,明确各种 ROS 在抗菌过程中的贡献,并利用 LC-MS 或 HS-GC 等手段分析加入自由基清除剂后反应液中自由基氧化产物的变化,获得自由基氧化损伤的直接证据;(4) 选取不同类型的 MgO 基纳米材料和菌种作为研究对象,利用蛋白质组学研究各种纳米材料对不同类型菌种的遗传特性和合成代谢的影响,尤其是掺杂离子对非自由基损伤的贡献,结合抗菌实验、ESR 和电镜观察结果,指导纳米抗菌材料的合成.

参 考 文 献

- [1] Li Q, Mahendra S, Lyon D Y, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications[J]. Water research, 2008, 42: 4591-4602
- [2] Tiwari D K, Behari J, Sen P. Application of nanoparticles in waste water treatment[J]. World Applied Sciences Journal, 2008, 3 (3): 417-433
- [3] Hajipour M J, Fromm K M, Ashkarran A A, et al. Antibacterial properties of nanoparticles[J]. Trends in biotechnology, 2012, 30: 499-511
- [4] Matthews L, Kanwar R K, Zhou S F, et al. Applications of nanomedicine in antibacterial medical therapeutics and diagnostics[J]. The Open Tropical Medicine Journal, 2010, 3: 1-9
- [5] Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on antimicrobial properties[J]. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 2010, 79: 5-18
- [6] Azeredo H M C. Antimicrobial nanostructures in food packaging[J]. Trends in Food Science & Technology, 2013, 30: 56-69
- [7] Vidic J, Stankic S, Haque F, et al. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2013, 15(5): 1595
- [8] Rao Y, Wang W, Tan F, et al. Influence of different ions doping on the antibacterial properties of MgO nanopowders[J]. Applied Surface Science, 2013, 284: 726-731.
- [9] Luo F, Wang W, Tan F, et al. Preparation and antibacterial activity of magnesium oxide nanoplates via sol-gel process[J]. Micro & Nano Letters, 2013, 8(9): 479-482
- [10] Leung Y H, Ng A M, Xu X, et al. Mechanisms of Antibacterial Activity of MgO: Non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*[J]. Small, 2014, 10(6): 1171-1183
- [11] Krishnamoorthy K, Manivannan G, Kim S J, et al. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14(9): 1063-1072
- [12] Makhluaf S, Dror R, Nitzan Y, et al. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide[J]. Advanced Functional Materials, 2005, 15(10): 1708-1715
- [13] Sawai J, Kojima H, Igarashi H, et al. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, 16(2): 187-194
- [14] Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003(2), 54: 177-182
- [15] Sawai J, Yoshikawa T J. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(4): 803-809
- [16] Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2011, 13(12): 6877-6885
- [17] Mestres G, Ginebra M P. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties[J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(4): 1853-1861
- [18] Lin Y J, Li D Q, Wang G, et al. Preparation and bactericidal property of MgO nanoparticles on gamma-Al₂O₃[J]. Journal of Materials

- Science-Materials in Medicine, 2005, 16(1): 53-56
- [19] Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, et al. Calcium oxide and magnesium oxide inhibit plasma coagulation by *Staphylococcus aureus* cells at the lower concentration than zinc oxide[J]. Journal of Dermatological Science, 1999, 22(1): 62-65
- [20] 郭如新. 氧化镁及氢氧化镁的应用研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2010, 18(12): 22-26
- [21] 崔红梅, 武晓峰, 陈运法, 等. 纳米氧化镁-卤素加合物新型抗菌材料研究与应用[J]. 硅酸盐通报, 2012, 3(16): 1472-1477
- [22] 方晶晶, 许林军. 纳米氧化镁灭菌效果与抑菌能力研究[J]. 海军医学杂志, 2005, 26(1): 12-14
- [23] Perelshtein I, Applerot G, Perkas N, et al. Ultrasound radiation as a "throwing stones" technique for the production of antibacterial nanocomposite textiles[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2010, 2(7): 1999-2004
- [24] Dong C, Song D, Cairney J, et al. Antibacterial study of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ nanoplatelets[J]. Materials Research Bulletin, 2011, 46(4): 576-582
- [25] Sawai J, Kawada E, Kanou F, et al. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1996, 29(4): 627-633
- [26] 郑典模, 张浦, 肖文清, 等. 纳米 MgO 改性涂料的制备及其抗菌性能研究[J]. 南昌大学学报工科版, 2007, 29(4): 315-322
- [27] Dong C, Cairney J, Sun Q, et al. Investigation of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ nanoparticles as an antibacterial agent[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2009, 12(6): 2101-2109
- [28] Vatsha B, Tetyana P, Shumbula P M, et al. Effects of precipitation temperature on nanoparticle surface area and antibacterial behaviour of $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and MgO nanoparticles[J]. Journal of Biomaterials Nanobiotechnology, 2013, 4(4): 365-373
- [29] Wang F, Ta N, Shen W J. MgO nanosheets, nanodisks, and nanofibers for the Meerwein-Ponndorf-Verley reaction[J]. Applied Catalysis A: General, 2014, 475: 76-81
- [30] Al-Hazmi F, Alnowaiser F, Al-Ghamdi A A, et al. A new large-scale synthesis of magnesium oxide nanowires: Structural and antibacterial properties[J]. Superlattices and Microstructures, 2012, 52(2): 200-209
- [31] Li H J, Li M L, Guo W L, et al. The effect of microstructure and crystal defect on electrochemical performances of MgO nanobelts[J]. Electrochimica Acta, 2014, 123: 103-110
- [32] Zhang Y, Ma M, Zhang X, et al. Synthesis, characterization, and catalytic property of nanosized MgO flakes with different shapes[J]. Journal of Alloys and Compounds, 2014, 590: 373-379
- [33] Cui H, Wu X, Chen Y, et al. Synthesis and characterization of mesoporous MgO by template-free hydrothermal method[J]. Materials Research Bulletin, 2014, 50: 307-311
- [34] Yamamoto O, Sawai J, Kojima H, et al. Effect of mixing ratio on bactericidal action of MgO - CaO powders[J]. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2002, 13(8): 789-792
- [35] Avanzato C P, Follieri J M, Banerjee I A, et al. Biomimetic synthesis and antibacterial characteristics of magnesium oxide-germanium dioxide nanocomposite powders[J]. Journal of Composite Materials, 2009, 43(8): 897-910
- [36] Yamamoto O, Ohira T, Alvarez K, et al. Antibacterial characteristics of CaCO_3 - MgO composites[J]. Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology, 2010, 173(1/3): 208-212
- [37] Koper O B, Klabunde J S, Marchin G L, et al. Nanoscale powders and formulations with biocidal activity toward spores and vegetative cells of bacillus species, viruses, and toxins[J]. Current Microbiology, 2002, 44(1): 49-55
- [38] Jeevanandam P, Klabunde K J. A study on adsorption of surfactant molecules on magnesium oxide nanocrystals prepared by an aerogel route[J]. Langmuir, 2002, 18(13): 5309-5313
- [39] Stojmenov P K, Klinger R L, Marchin G L, et al. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents[J]. Langmuir, 2002, 18(17): 6679-6686
- [40] Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, et al. Evaluation of growth-inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1995, 28(3): 288-293
- [41] Sawai J, Kojima H, Kano F, et al. Ames assay with *Salmonella typhimurium* TA102 for mutagenicity and antimutagenicity of metallic oxide powders having antibacterial activities[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1998, 14(5): 773-775
- [42] Yamamoto O, Sawai J, Sasamoto T. Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO - ZnO solid solution[J]. International Journal of Inorganic Materials, 2000, 2(5): 451-454
- [43] Yamamoto O, Fukuda T, Kimata M, et al. Antibacterial characteristics of MgO -mounted spherical carbons prepared by carbonization of ion-exchanged resin[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 2001, 109: 363-365
- [44] Huang L, Li D Q, Lin Y J, et al. Controllable preparation of Nano- MgO and investigation of its bactericidal properties[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2005, 99(5): 986-993
- [45] Krishnamoorthy K, Moon J Y, Hyun H B, et al. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells[J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(47): 24610-24617
- [46] Ohira T, Kawamura M, Iida Y, et al. Influence of the mixing ratio on antibacterial characteristics of MgO - ZnO solid solution in two phase coexistence region[J]. Journal of the Ceramic Society of Japan, 2008, 116(1359): 1234-1237
- [47] Ohira T, Kawamura M, Fukuda M, et al. Extension of the optical absorption range in Zn -doped MgO powders and its effect on antibacterial activity[J]. Journal of Materials Engineering and Performance, 2009, 19(3): 374-379
- [48] Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, et al. Effect of particle size and heating temperature of ceramic powders on antibacterial activity of their slurries[J]. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1996, 29(2): 251-256
- [49] Hewitt C J, Bellara S R, Andreani A, et al. An evaluation of the anti-bacterial action of ceramic powder slurries using multi-parameter flow cytometry[J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(9): 667-675
- [50] Gulkova D, Solcova O, Zdrzil M. Preparation of MgO catalytic support in shaped mesoporous high surface area form [J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2004, 76(1/3): 137-149
- [51] Pan X, Wang Y, Chen Z, et al. Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013, 5(3): 1137-1142
- [52] Jiang W, Mashayekhi H, Xing B S. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles [J]. Environmental Pollution, 2009, 157(5): 1619-1625