

不同类型铜合金板的杀菌特性

杨砚 邹正中 田维嘉 王革娇*

(华中农业大学 生命科学技术学院 农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 【目的】微生物对可接触表面的污染给公共卫生带来了极大的威胁。利用具有杀菌特性的铜及铜合金代替不锈钢等制品,可以降低消毒剂的使用和细菌的传播。【方法】通过分析3株金黄色葡萄球菌和2株大肠杆菌在铜及铜合金平板上的存活时间,对不同类型铜合金的杀菌特性进行了探索。【结果】铜合金平板的杀菌能力与其铜含量成正比;铜合金对同属细菌的杀菌能力相近,对不同属细菌则有一定差异;铜合金的杀菌效率与细菌对 Cu^{2+} 抗性没有直接联系;铜合金杀菌的效率与细菌的细胞壁结构可能有很大关联。【结论】铜及铜合金是较好的杀菌材料。

关键词: 铜, 铜合金, 杀菌, 金黄色葡萄球菌, 大肠杆菌

Bactericidal properties of different copper alloys

YANG Yan ZOU Zheng-Zhong TIAN Wei-Jia WANG Ge-Jiao*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: [Objective] Contamination of micro-organisms attached on surface materials is one of the greatest threats for public health. Using copper alloys to replace stainless steel can reduce the use of disinfectants and the spread of bacteria. [Methods] In this study, the bactericidal abilities of different copper alloys through the survival of 3 *Staphylococcus aureus* and two *Escherichia coli* strains five different bacterial strains were investigated. [Results] The results revealed that the bactericidal abilities of the copper alloys are positively related to the copper content; the survival of the bacteria belonging to the same genus are similar; there was not direct relation between the bactericidal efficiency of the copper alloys and copper-resistances; the bactericidal efficiency of the copper alloys appeared to correlate with the

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170106)

*通讯作者: Tel: 86-27-87281261; 信箱: gejiao@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-21; 接受日期: 2012-03-19

bacterial cell wall structures. **[Conclusion]** The copper alloys are good materials with bactericidal abilities.

Keywords: Copper, Copper alloy, Bactericidal, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

微生物从有益性和有害性两方面影响着人类生存环境。对公共场所可接触表面进行灭菌,是防止疾病的第一道防线。使用消毒剂消毒是常用的方法,但其作用有很大的局限性,而且容易造成二次污染,因此寻找具有杀菌特性的表面材料是一种理想的方法。从20世纪80年代以来,以日本为代表的发达国家就在家用电器、化学、建材、电信通讯、食品包装、日常生活、洗浴设备、玩具等产品方面开始应用抗菌材料^[1]。铜及铜合金具有良好的抗腐蚀性、机械加工性、抗生物淤积能力、杀菌能力,是最合适的材料之一^[2]。

早在古罗马帝国时代,人们就利用铜器皿、炊具、容器来防止疾病流行。之后,科学家发现少量的铜即可控制大量的真菌、藻类和有害微生物,可用作广谱的消毒剂。少量的铜对人体毒害不大,但是微生物对铜却很敏感。从目前的研究结果来看,铜的杀菌机理非常复杂^[3]。

最近几年由国际铜业协会(ICA)和铜质材发展协会(CDA)资助开展了一系列铜及铜合金杀致病微生物的研究。结果表明,金属铜及其合金可以在几个小时内迅速杀死一些致病微生物,包括 *Escherichia coli* O157:H7^[4]、*Listeria monocytogenes*^[5]、*Staphylococcus aureus* (MRSA)^[6]、*Influenza A Virus*、*Clostridium difficile*、*Salmonella enteric*^[7]、*Aspergillus niger* 和 *Mycobacterium tuberculosis*^[8]等。

铜及铜合金具有广泛的杀菌活性,但对不同菌株的杀灭效果不尽相同。有研究者分别比较了含铜与不含铜的纤维、橡胶、聚酯对微生物的致死效果,发现添加铜后对 MRSA、*E. coli*、*Candida albicans*、HIV-1 等具有明显的致死效果,从而提

出了将铜整合于棉花、橡胶、聚酯中制造医疗器械的可行性^[9]。Santo 等研究了不同条件下铜合金对 *E. coli* 的致死率的差别,发现干燥度、铜离子毒性、铜螯合剂、渗透压、自由羟基能不同程度地影响杀菌效果,但厌氧与好氧环境杀菌率差别则不大^[10]。食品处理过程中存在于铜合金表面的牛肉残留物也会影响其存活时间^[11]。有研究者利用原子力显微镜观察了 *E. coli* 细胞膜在含铜奥氏体钢和不含铜奥氏体钢表面处理不同时间后的形态变化,发现在含铜奥氏体钢表面的细胞变得不完整^[12]。本课题在已有相关材料研究的基础上,通过微生物学研究方法,分析铜合金对典型革兰氏阳性和阴性细菌的杀灭特性,获得较有价值的结果。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基及铜板

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)等一直是医院感染的主要病原体,本研究选取 5 株菌作为实验菌株(表 1),其中 HN3 菌是本实验分离鉴定的, *E. coli* K12 由华中农业大学李林教授赠送,其他菌株买自相应的保藏中心实验。所用培养基为 LB 培养基(1 L: NaCl 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸粉 5 g)。菌株活化于 LB 固体平板上,再接种单克隆于 LB 液体培养基中,37 °C、160 r/min 摇瓶培养 12 h。所有菌株按 1%接种量接种于 LB 液体培养基中,在 37 °C 摇床上培养 16–24 h,至对数中期备用。

实验所用铜合金板和不锈钢板均由美国亚利桑那大学 Christopher Rensing 教授赠送。其详细信息如表 2 所示。每块铜板和不锈钢板的大小为 3 cm×3 cm,厚 0.2 cm。

表 1 实验所用菌株
Table 1 Strains used in the experiments

菌株名称 Strain	革兰氏类型 Gram type	菌株信息 Information
ATCC 6538	G ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
CMCC 26001	G ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i> CMCC 26001
HN3	G ⁺	<i>Staphylococcus aureus</i> (分离自湖南锰矿土)
K12	G ⁻	<i>Escherichia coli</i> K12
C118	G ⁻	<i>Escherichia coli</i> C118

表 2 实验所用铜合金、不锈钢及其组分
Table 2 Copper alloys and stainless steel used in the experiments and their components

金属类型 Metal Type	UNS*编号 UNS number	百分比含量 Component (%)						
		Cu	Zn	Sn	Ni	Fe	Cr	P
紫铜 Red copper	C11000	100						
青铜 Bronze	C51000	94.8		5				0.2
黄铜 Brass	C26000	70.0	30.0					
不锈钢 Stainless steel	S30400	0			8	74	18	

注：*: UNS 是美国金属及合金统一编号体系(UNIFIED NUMBERING SYSTEM)的缩写.

Note: *: UNS, UNIFIED NUMBERING SYSTEM.

1.2 菌株在 LB 培养基中 Cu²⁺抗性检测

配制 Cu²⁺浓度为 5 mol/L 的 CuSO₄母液, 使用灭菌滤膜过滤灭菌。再使用 CuSO₄ 母液配制 Cu²⁺浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mmol/L 的 LB 固体培养基。将实验所用菌株接种到不同 Cu²⁺浓度的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h 后, 观察菌株生长情况。

1.3 菌株在不同铜板和不锈钢板上存活时间的测定

菌体在不同铜板和不锈钢板上的存活时间测定方法参见文献[10], 并有一定的改动。用镊子将铜板从装有无水乙醇的塑料瓶中取出, 在酒精灯上灼烧至表面无酒精后, 放入底部垫有 20 层纱布的培养皿中。待铜板冷却, 加入无菌水至纱布

完全浸润, 以保持铜板培养时的湿度。取约 25 μL 生长到对数期并具有相近 OD₆₀₀ 值的菌液, 均匀涂于铜板上, 另加一个不接菌的铜板作为空白对照, 在室温下盖好培养皿培养一定时间后, 将铜板转移到 50 mL 的离心管中(含 10 mL 灭菌 PBS 溶液, 10–20 个灭菌的 2 mm 玻璃珠), 振荡 30–60 s, 用 PBS 进行系列稀释, 从 3 个稀释度取 100 μL 分别涂 LB 平板, 37 °C 培养 24 h, 计数。每个结果重复 3 次, 取平均值。

1.4 铜板和不锈钢板的处理

铜板和不锈钢板杀菌试验完成后, 用镊子夹住铜板, 浸泡于 62 °C、5% NaOH 中 30–120 s, 其间不断来回搅动, 使铜板表面与氢氧化钠溶液充分接触。浸泡后用双蒸水清洗铜板, 此时铜板表

面会形成一层褐色的膜。然后铜板加入 5%硫酸中 5–30 s, 其间不断来回搅动, 使铜板表面与硫酸溶液充分接触, 以清除铜板表面的褐色膜。最后将铜板放入双蒸水清洗干净, 用吸水纸擦干, 放入装有无水乙醇的塑料瓶中保存。这样处理后的铜板和不锈钢板可以重复利用至少 5 次。

2 结果

2.1 菌株在 LB 培养基中 Cu^{2+} 抗性检测

在 1 mmol/L 和 2 mmol/L CuSO_4 浓度的 LB 固体平板上的 5 种菌株, 均长出了正常的菌落; 3 mmol/L Cu^{2+} 浓度条件下, 只有 CMCC 26001 在平板上长出了菌落; 而 4 mmol/L Cu^{2+} 浓度的 LB 培养基接种到平板上后, 所有的菌株都不能正常长出菌落。由上表可以清楚地看到, ATCC 6538、HN3、K12、C118 能够生长的最高 Cu^{2+} 浓度为 2 mmol/L, CMCC 26001 的铜抗性略高, 能够生长在 Cu^{2+} 浓度为 3 mmol/L 的条件下。可以认为这 5 株菌对铜的抗性基本相似。

2.2 金黄色葡萄球菌在不同铜板和不锈钢板上的存活时间测定

S. aureus ATCC 6538 的起始数量为 7.516×10^7 CFU/mL。60 min 后, C11000 上 ATCC 6538 的数量降低到 5.794×10^4 CFU/mL。在 C51000 板

上该菌的数量降低到 9.705×10^5 CFU/mL。C26000 上 ATCC 6538 的数量降低到 4.436×10^5 CFU/mL。在 C11000 板上的菌体在 4 h 内全部死亡, C51000 和 C26000 板上的也在 6 h 内全部死亡, 而不锈钢上的菌体数量为 3.412×10^7 CFU/mL, 无明显变化(图 1A)。

S. aureus CMCC 26001 菌的起始浓度为 7.328×10^7 CFU/mL, C11000 上的菌体在 3 h 内全部死亡, C51000 上的在 4 h 内全部死亡, C26000 在 6 h 内全部死亡, 而 6 h 时不锈钢上的菌体数量为 2.296×10^7 CFU/mL, 无明显变化(图 1B)。

S. aureus HN3 菌的起始浓度为 9.705×10^7 CFU/mL, C11000 上的菌体在 3 h 内全部死亡, C51000 和 C26000 上的菌在 9 h 内全部死亡, 而 9 h 时不锈钢上的菌体数量为 1.222×10^7 CFU/mL (图 1C)。不接菌的铜板或不锈钢板上没有菌体生长。

2.3 大肠杆菌在不同铜板和不锈钢板上的存活时间测定

E. coli K12 的起始浓度为 1.072×10^8 CFU/mL, C11000 板上的菌体在 1 h 内全部死亡, C51000 板上的菌体在 3 h 内全部死亡, C26000 板上的菌体在 6 h 内全部死亡, 而 6 h 时不锈钢上的菌体数量为 5.230×10^7 CFU/mL, 无明显变化(图 2A)。

表 3 实验用菌株的 Cu^{2+} 抗性
Table 3 Cu^{2+} resistance of strains

菌种名称 Strains	在不同 Cu^{2+} 的浓度(mmol/L) LB 培养基中生长情况 Growth in LB medium with different concentrations of Cu^{2+} (mmol/L)			
	1	2	3	4
ATCC 6538	+	+	—	—
CMCC 26001	+	+	+	—
HN3	+	+	—	—
K12	+	+	—	—
C118	+	+	—	—

注: +: 阳性反应; —: 阴性反应。

Note: +: Positive reaction; —: Negative reaction.

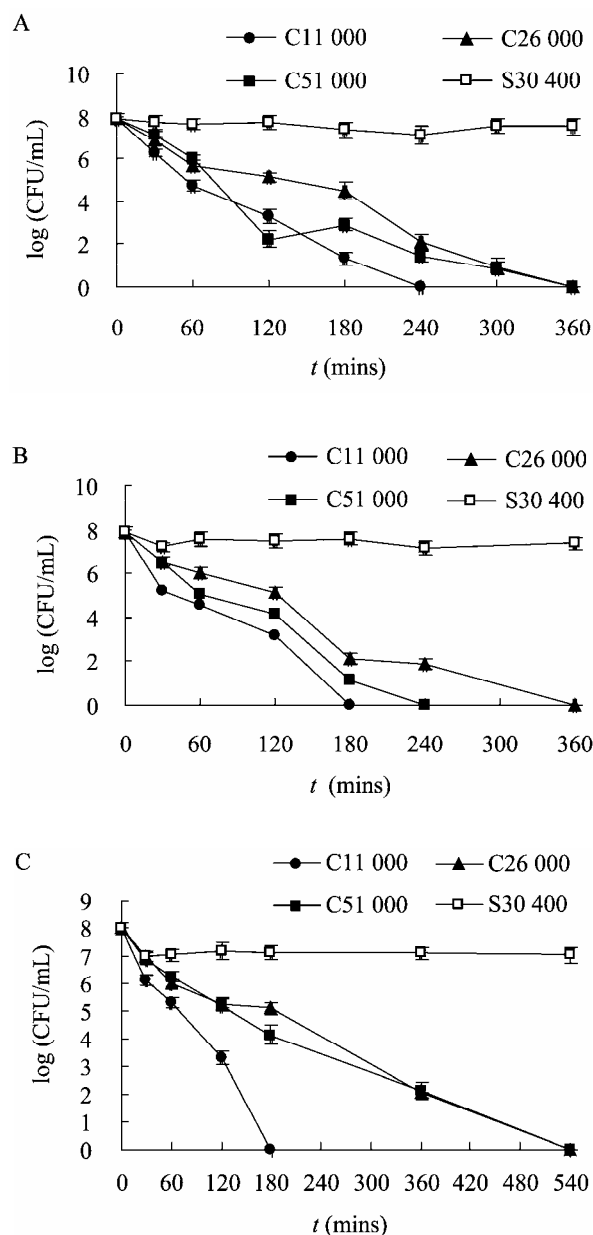


图1 金黄色葡萄球菌在不同铜板上的存活时间曲线
Fig. 1 The survival curves of different *S. aureus* on different copper alloy plates

Note: A: *S. aureus* ATCC 6538; B: *S. aureus* CMCC 26001; C: *S. aureus* HN3.

E. coli C118的起始浓度为 8.426×10^7 CFU/mL, C11000和C51000板上的菌体在90 min内全部死亡, C26000板上的菌体在3 h内全部死亡, 而3 h时不锈钢上的菌体数量为 6.230×10^7 CFU/mL, 无

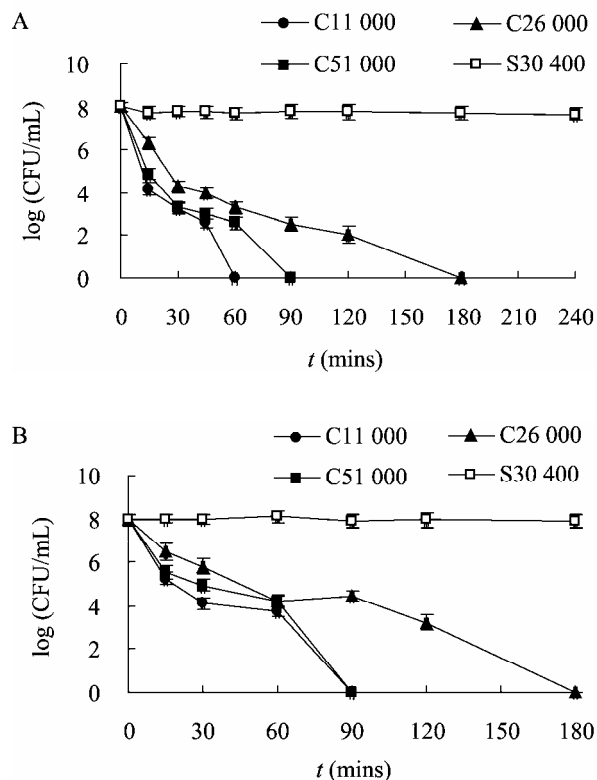


图2 大肠杆菌在不同铜板上的存活时间曲线

Fig. 2 The survival curves of different *E. coli* on different copper alloy plates

Note: A: *E. coli* K12; B: *E. coli* C118.

明显变化(图 2B)。不接菌的铜板或不锈钢板上没有菌体生长。

5 株菌在不同铜板上的最长存活时间如表 4 所示。其中紫铜(100% Cu, C11000)对 5 株菌的杀菌能力均为最强。

表4 菌株在不同铜板上的最长存活时间
Table 4 The longest survival time of bacteria on the copper alloys

菌株名称 Strain	最长存活时间 Longest survival time (min)		
	C11000	C51000	C26000
ATCC 6538	240	360	360
CMCC 26001	180	240	360
HN3	180	540	540
K12	60	90	180
C118	90	180	180

3 讨论

从图 1、2 可以看出, 不锈钢板的曲线几乎全部都保持平直。也就是说, 在培养不同的时间后, 不锈钢板上的菌体数没有发生太大的变化。如图 1A 所示, ATCC 6538 菌的起始数量为 7.516×10^7 CFU/mL, 在 20 °C 条件下, 6 h 后, 不锈钢板上 ATCC 6538 存活的数量为 7.654×10^7 CFU/mL, 表明了不锈钢对细菌的活性没有明显的影响。

在表 4 中可以清楚地看到 C11000 板使 ATCC 6538 菌完全失活的时间, 远远小于另外两种铜板。其他几株菌的情况也相似, 在 60 min 内, C11000 均能使菌体的数量降低 2–3 个数量级。菌株的失活时间与 C11000 (100% Cu)、C51000 (94.8% Cu)、C26000 (70% Cu) 的铜含量呈现出明显的反比关系。所以可以得出结论: 铜合金对细菌的杀灭效果, 与铜合金中铜的含量成正比。

从表 4 还可以看出, 菌在 C11000 板上完全失活的时间, ATCC 6538 (240 min)、CMCC 26001 (180 min) 和 HN3 (180 min) 比较接近, 而 K12 (60 min) 则与 C118 (90 min) 比较接近。由此可见, 铜板对于同属细菌的杀菌能力是相近的, 不同属的细菌则有一定差异。

另外, 比较 CMCC 26001 和 ATCC 6538, 它们均属于金黄色葡萄球菌, 而且 CMCC 26001 的铜抗性高于 ATCC 6538, 但 CMCC 26001 菌在 C11000 和 C51000 板上的存活时间均短于 ATCC 6538, 在 C26000 板上的存活时间与 ATCC 6538 相同。所以实验结果显示铜合金对细菌的杀菌效率, 与这两株菌的铜抗性没有直接的关系。

从图 1–2 的结果来看, 3 株金黄色葡萄球菌在不同铜板上的存活时间都比大肠杆菌要长。而从抗性实验的结果来看测试的 5 株菌的 Cu^{2+} 抗性相似。可见, 对于 Cu^{2+} 抗性相似的菌, 在铜板上的存活时间可以差别很大, 说明铜板表面溶出的

Cu^{2+} 并不是铜板杀菌的唯一原因。

比较图 1、2 的结果可以发现, 金黄色葡萄球菌的存活时间远远比大肠杆菌的存活时间长。我们知道金黄色葡萄球菌是革兰氏阳性菌, 而大肠杆菌是革兰氏阴性菌。革兰氏阳性菌和阴性菌最大的区别就在于其细胞壁。细菌细胞壁是细菌细胞最外面的一层坚韧并富有弹性的外被, 它赋予细菌细胞以强度和形状, 起着保护细胞形态的作用。 G^+ 细菌的细胞壁较厚 (20 nm–80 nm), 具有厚而致密的肽聚糖层, 多达 20 层, 化学组成比较简单, 只含有 90% 的肽聚糖和 10% 的磷壁酸; G^- 细菌的细胞壁较薄 (10 nm–15 nm), 却有多层构造 (肽聚糖和脂多糖层等), 其化学成分中除含有肽聚糖以外, 还含有一定量的类脂质和蛋白质等成分^[13]。此外, 两者在表面结构上也有显著不同, 可见细胞壁是金黄色葡萄球菌和大肠杆菌之间非常重要的差别。因此, 可以初步预测铜板的杀菌效果与细菌的细胞壁结构有关。

本研究结果表明: 铜合金对细菌具有杀菌能力, 而不锈钢基本没有杀菌能力。铜合金平板的杀菌能力与其铜含量成正比; 铜合金对同属细菌的杀菌能力相近, 对不同属细菌则有一定差异; 铜合金的杀菌效率与细菌对 Cu^{2+} 抗性没有直接联系, 而与细菌的细胞壁结构可能有很大关联。该研究对于不同铜板的杀菌机制和应用都具有重要价值。当然, 这些初步的结论还需要进一步大量的实验来证明。

参 考 文 献

- [1] 李梅, 王庆瑞. 抗菌材料的发展及其应用[J]. 化工新型材料, 1998, 26(5): 8–11.
- [2] 陈四红, 吕曼祺, 张敬党, 等. 含 Cu 抗菌不锈钢的微观组织及其抗菌性能[J]. 金属学报, 2004, 40(3): 314–318.
- [3] Borkow G, Gabbay J. Copper as a biocidal tool[J].

- Current Medicinal Chemistry, 2005, 12(18): 2163–2175.
- [4] Michels HT, Wilks SA, Noyce JO, et al. Copper Alloys for Human Infectious Disease Control[M]. Pittsburgh, PA: Science and Technology Conference, 2005.
- [5] Wilks SA, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: implications for cross-contamination[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 111(2): 93–98.
- [6] Noyce JO, Michels HT, Keevil CW. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment[J]. Journal of Hospital Infection, 2006, 63(3): 289–297.
- [7] Faúndez G, Troncoso M, Navarrete P, et al. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*[J]. BMC Microbiology, 2004, 4: 19.
- [8] Mehtar S, Wiid I, Todorov SD. The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an *in-vitro* study[J]. Journal of Hospital Infection, 2008, 68(1): 45–51.
- [9] Borkow G, Gabbay J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities[J]. The FASEB Journal, 2004, 18(14): 1728–1730.
- [10] Santo CE, Taudte N, Nies DH, et al. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(4): 977–986.
- [11] Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 4239–4244.
- [12] Nan L, Liu YQ, Lü M Q, et al. Study on antibacterial mechanism of copper-bearing austenitic antibacterial stainless steel by atomic force microscopy[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008, 19(9): 3057–3062.
- [13] 沈萍, 陈向东, 卫扬保. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009: 25–27.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: *t* (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。