

Ag/Diatomite 复合材料及其对禽流感病毒的杀灭研究

张若愚¹, 夏雪山^{1,2}, 胡亮¹, 董亦斌¹, 王素平¹, 宋建领²,
赵文华², 张润虎¹, 高毅颖¹, 林连兵¹, 熊向峰¹, 罗明河¹

(1. 昆明理工大学生物与化学工程学院, 云南 昆明 650224;

2. 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224)

Study of Ag/Diatomite Composite and AIV Disinfection Activity

ZHANG Ruoyu¹, XIA Xueshan^{1,2}, HU Liang¹, DONG Yibin¹, WANG Shuping¹, SONG Jianling²
ZHAO Wenhua², ZHANG Runhu¹, GAO Yiyang¹, LIN Lianbing¹, XIONG Xiangfeng¹, LUO Minghe¹

(1. College of Chemistry and biology, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650224, China;

2. The Key Laboratory of Tropical and Subtropic Animal Disease in Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: Based on the high antibacterial performance of silver, the disinfection effect of AIV virus by Ag and Ag/diatomite was studied. The diatomite carrying silver was examined by TEM and XRD. The results showed that the diatomite carried nanometer silver particles and there was no chemical reaction between them. One gram of the composite can adsorb and disinfect virus in 6mL solution effectively and the figure of congealing blood was zero. The above clear liquid was inoculated to chicken embryos. The statistical figure of half death number of chicken embryo indicated that the dose of 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ag/diatomite could obviously disinfect the AIV virus. This composite is worth further studying as an additive to forage for prevention and control of chicken flu virus. It might be a new way to use the composite for protection of people from cross infection of flu viruses.

Keywords: Composite; Silver; Diatomite; AIV flu virus; Adsorption; Disinfection

摘 要: 依据 Ag 具有强烈杀毒抗菌的特性, 开展对禽流感病毒的杀灭实验。通过 TEM、XRD 对载银硅藻土测定, 反映了 Ag 以纳米状态负载于硅藻土的表面, 没有产生化学反应。1g 载银硅藻土能强烈吸附杀灭 6mL 溶液中的病毒液, 血凝效价为零。洗脱上清液接种鸡胚的半致死数统计说明, 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量对病毒有明显的杀灭作用, 可进一步作饲料添加剂用于禽流感防治。对人体流感病毒交叉感染的防护隔离也是一个新的途径。

关键词: 复合材料; 银; 硅藻土; 禽流感病毒; 吸附; 杀灭

中图分类号: TG146.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0676(2004)02-0028-05

Ag 自古代以来就被用作消毒器皿, 它在地壳中的克拉克值为 $1 \times 10^{-5} \%$, 在贵金属中最易获得, 用途很广。2000 年 1 月国家正式放开对白银流通的管制, 加速了 Ag 在电镀、印刷、电子、试剂上的推广应用^[1]。随着超微粒子加工技术的完善, Ag、Ag₂O 在催化剂、医药、灭菌杀毒领域也引起

收稿日期: 2004-01-15

基金项目: 云南省自然科学基金项目(2002B0015M)

作者简介: 张若愚, 男, 副研究员, 长期从事硅藻土开发研究。

了广泛关注。目前, Ag、Ag₂O 粒子的制备方法较多, 可成功获得半径为 5~88nm 的颗粒, 但后期的保护比较困难, 多次聚集的结果使粒径增大, 影响了应用效果^[2~3]。Ag 的杀菌灭毒剂量非常小, 0.001mg/L 的浓度可在 30min 内把水中的大肠杆菌完全杀灭, 而且微量的 Ag 对人体无害, 服用量过多会产生皮肤沉积(银斑), 但此种银斑对机体并无害处。按一般饮水量, 如以每日摄入含 0.04mg/L Ag 的水计算, 40 年后的积累总量才达到产生银斑剂量的 0.9g, 所以 Ag 对人体的毒性极小^[4], 是安全的灭菌杀毒材料。关键使用时必须保持超微粒子状态, 提高应用价值, 降低经济成本。硅藻土是国内外广泛使用的非金属矿, 在化工领域是传统的催化剂载体。钒催化剂、固体磷酸催化剂是最成功的应用^[5]。由于硅藻土无毒, 具有较大的比表面积, 一直应用于食品、饮料、酒类工业中。单纯的硅藻土只能吸附过滤 0.1~1 μ m 的细菌杂质^[5]。但是硅藻土具有丰富的微米级和纳米级微孔的生物结构, 导致了表面能增高, 对水中污染物有强烈絮凝吸附作用^[6]。这种结构改性后是 Ag 的良好载体, 制成 Ag/Diatomite 复合材料, 它的表面特性产生了质的变化^[7], 研究其对病菌和病毒灭活是人类健康与文明的需求, 作者首次报道其在制备和对禽流感病毒灭活方面的研究进展。

作者采用了禽流感病毒(AIV)为研究对象。禽流感病毒属正粘病毒科, 流感病毒属, 是一种严重危害禽类的病毒性传染病, 2003 年 12 月韩国爆发的禽流感导致大批鸡、鸭的宰杀及焚烧是典型事件。由于禽流感可能对哺乳动物和人类有传染性, 所以它的预防受到国际卫生组织的高度重视。SARS 爆发以来, 从催化角度研究杀毒的较多, 倾向较明显^[8]。作者进行的这一研究工作是多学科交叉的联合, 昆明理工大学化学工程系提出研究方向, 承担了粗 Ag、Ag/Diatomite 的制备工作; 生物工程系制定了病毒吸附、杀灭方案; 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室提供了禽流感病毒并完成病毒的杀灭实验, 本文是 2003 年 5 月以来 7 个月工作的进展报道。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

AgNO₃ 为 AR 或 GR 级, NaOH、氨水、葡萄糖、抗坏血酸和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)为 AR 级; 禽流感病毒(AIV), 鸡胚(9~11 日龄)。真空干燥仪(ZK-82A, 室温~200 $^{\circ}$ C, 上海实验仪器厂), 高速搅拌仪(300~23000r/min, FLUKO 上海分公司), 透射电镜(荷兰非力浦 EM420), X 射线衍射仪(D/MAX-RC)。

1.2 制备实验

1.2.1 硅藻土(Diatomite, 简称为 Dia, 下同)精制见文献[9]。

1.2.2 普通银粉及纳米银粉的制备: 用 AgNO₃ 与氨水制成[Ag(NH₃)₂]⁺溶液, 采用抗坏血酸(VC)还原, 经分离, 无水乙醇洗涤, 80 $^{\circ}$ C 真空干燥制得普通银粉, 作参照物对比用。

纳米 Ag 粉采用化学液相法制备, 先制成葡萄糖-PVP-NaOH 水溶液, 然后滴加 AgNO₃ 溶液, 控制 pH 值, 在高速搅拌下完成还原反应, 得黑色的悬浮液产物。

1.2.3 Ag/Dia 制备: 当 AgNO₃ 滴加完毕, 立即加入 Dia, 提高搅拌速度到 12~16 $\times 10^3$ r/min, 充分让纳米级 Ag 颗粒嵌入硅藻土的生物微孔中, 反复离心分离、水洗、醇洗、真空干燥制得灰色 Ag/Dia 复合粉体。

1.3 禽流感病毒(AIV)杀灭实验

取 Ag/Dia 与粗 Ag 粉各 1g 于无菌瓶中, 加病毒液 1.0mL(稀释倍率 1:10), 混和后分别在 A(37 $^{\circ}$ C 摇床振荡 30min) 和 B(室温人工间隔摇 30min) 2 种条件下进行杀灭实验, 然后离心分离(2000r/min, 5min), 取上清液倍比系列稀释进行血凝试验及鸡胚接种实验。

1.4 鸡胚接种实验

禽流感病毒能在 9~11 日龄鸡胚尿囊腔内繁殖, 对鸡胚有高度致死作用, 取 Ag/Dia 杀灭病毒后的上清液 10 倍系列稀释后, 接种 10 日龄鸡胚尿囊腔, 同时用禽流感病毒液与之平行接种鸡胚作阳

性对照, 统计并测定 2 系列各种稀释条件对鸡胚半数致死的变化。

2 结果与讨论

2.1 Ag/Dia 的 TEM 和 XRD 分析

Ag/Dia 的制备达到了使 Ag 高度分散, 减少用量, 增强杀毒功能的目的。图 1 是精制 Dia 的 TEM 图象, 孔径 76~500nm, 选自云南腾冲, 属羽纹目卵形藻^[10], 该硅藻具有对蛋白、胺的吸附能力^[11], 它提供表面积使 Ag 粒充分负载。图 2 是粗 Ag 粉的图象, 粒径 27~108nm, 有明显的团聚; 图 3 是纳米 Ag 的图象, 粒径 8~45nm, 为分散状态。图 4~6 是 Ag/Dia 的照片, 8200 倍时可看出硅藻上负载 Ag 的全貌; 3 万倍时看出 Ag 是膜状负载, 右边 2 颗粒尺寸为 36 及 66nm; 10.5 万倍看出除



图 1 精制 Dia 的 TEM 图象(10500×)
Fig. 1 TEM image of prepared Diatomite

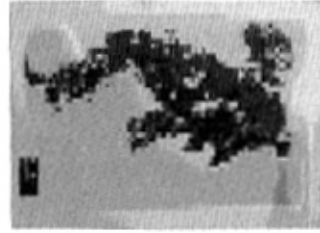


图 2 粗银粉的 TEM 图象(36000×)
Fig. 2 TEM image of rough Ag powders

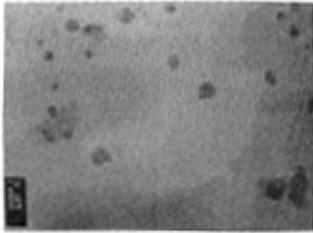


图 3 纳米银的 TEM 图象(230000×)
Fig. 3 TEM image of nano-Ag

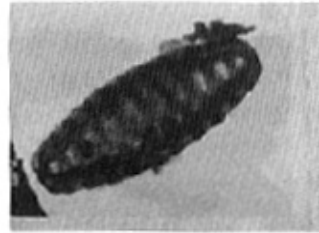


图 4 Ag/Dia 的 TEM 图象(8200×)
Fig. 4 TEM image of Ag/Dia

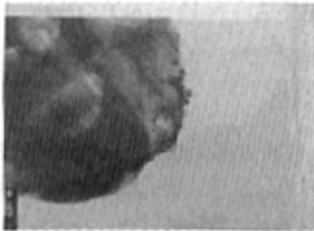


图 5 Ag/Dia 的 TEM 图象(30000×)
Fig. 5 TEM image of Ag/Dia



图 6 Ag/Dia 的 TEM 图象(105000×)
Fig. 6 TEM of image Ag/Dia

Ag 膜外, 仍然有 Ag 纳米颗粒存在, 上部 2 颗粒更清晰。图 7 是精制 Dia 的 XRD 谱图, 反映了 Dia 非晶态 SiO₂ 的特征谱线。图 8 是 Ag/Dia 粉体的 XRD 图谱, a 为 80°C 真空干燥物, b 为 200°C 真空干燥物, 仍反映了 Dia 的特征谱线, 而在 38°、44°、65° 和 77° 四处都出现了 Ag 的衍射峰, 说明 Ag 与 Dia 并没有生成新物质。

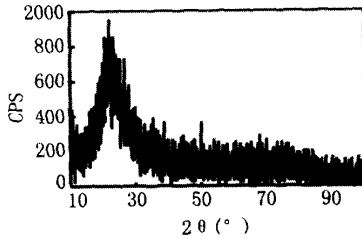


图 7 精制 Dia 的 XRD 谱图

Fig. 7 XRD pattern of prepared Diatomite

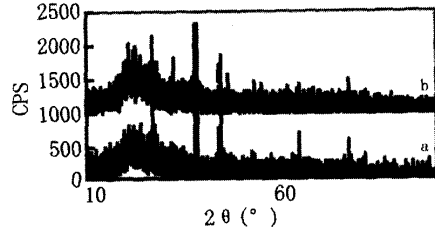


图 8 Ag/Dia 粉体的 XRD 谱图

Fig. 8 XRD pattern of Ag/Dia Powders

2.2 普通 Ag 与 Ag/Dia 对病毒作用的比较

原病毒液经 A₁、B₁ 2 系列处理后的血凝效价均为 2⁴; 而用 Ag 粉的对照相比 A₂ 与 B₂ 都可降低病毒的血凝效价(从 2⁴ 降至 2² 或 2¹), 说明 Ag 粉对病毒有杀灭作用, 但因大颗粒团聚的影响, 不能使病毒完全吸附或杀灭。Ag/Dia 的作用则完全不同, 在病毒液增大 3 倍条件下, B₃ 的血凝效价 2⁰, 吸附或杀灭病毒效果明显, 可使处理后的病毒液不能再凝集红细胞(“O”), 已完全吸附杀灭掉血凝方法可检测到的病毒, A₃ 的血凝效价 2¹, 似乎摇床的条件对吸附病毒不如人工摇充分。从 Ag 的剂量上分析, Ag/Dia 的含 Ag 量小于 5%, 说明 Dia 的亲水性对病毒有强烈吸附作用, 只有吸附固定了病毒, 才能使病毒快速杀灭, 而纯 Ag 无亲水性, 降低了杀灭病毒的接触面积。

表 1 AIV 病毒液在无菌瓶中 A、B(见 1.3)2 系列杀灭对照
Tab. 1 Comparison of AIV virus disinfection in bacteria-free bottle of A and B

序号	A	B
	(37°C 摇床振荡 30min)	(室温人工间隔摇 30min)
血凝效价		
1. 1mL AIV	2 ⁴ (A ₁)	2 ⁴ (B ₁)
2. 1g Ag + 1 mL AIV	2 ² (A ₂)	2 ¹ (B ₂)
3. 1g Ag/Dia + 3 mL AIV	2 ¹ (A ₃)	2 ⁰ (B ₃)

表 2 3 mL 上清液对鸡胚的致死情况

Tab. 2 Status of chicken embryo death by 3mL above clear liquid

	上清液	10 ¹ 稀释(下同)	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
接种鸡胚数	5	5	5	5	5	5
24h 死亡数	2(0)		1(0)			
36h 死亡数		1(0)				
48h 死亡数						
60h 死亡数	1(0)					
72h 死亡数					1(0)	
84h 死亡数						
90h 死亡数						1(0)

*(0)表示死亡鸡胚尿囊液血凝效价为阴性, 可知死亡鸡胚系因机械震动等自然原因所致, 非病毒引起。

2.3 Ag/Dia 处理病毒液对鸡胚的情况分析

分别用 1:10 禽流感病毒稀释液 3.5.6 和 7mL 按 2.2 方法与 1g Ag/Dia 作杀毒处理, 收集上清液分别检测其血凝效价, 均为阴性。然后系列稀释上清液至 10⁵, 分别接种到 10 日龄鸡胚尿囊腔(每枚 0.2mL), 继续孵化观察, 死亡鸡胚情况见表 2、3。

表3 5、6、7mL上清液对鸡胚的致死情况

Tab. 3 Status of chicken embryo death by 5mL, 6mL and 7mL above clear liquid

	5mL 上清液	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	6mL 上清液	7mL 上清液
接种鸡胚数	5	5	5	5	5	5	5	5
24h 死亡数	2(0)				1(0)		1(0)	1(0)
36h 死亡数		1(0)						1(0,7)
48h 死亡数				1(0)				
60h 死亡数							1(0)	1(7)
72h 死亡数	1(0)		1(0)					
84h 死亡数								
96h 死亡数								

*(0)为血凝效价为阴性, (0,7)为一枚阴性, 另一枚血凝效价为2⁷。可知5~6mL杀灭病毒液接种后仍检测不到病毒, 而7mL 1:10的病毒液经杀灭后在鸡胚尿囊液中已能检测到病毒(但血凝试验检测不到血凝效价)。

用未经杀灭处理的1:10病毒液的同期鸡胚接种对照实验表明, 从原液至10⁴倍稀释的各系列鸡胚均100%呈阳性死亡, 10⁵倍稀释系列有3枚阴性死亡, 10⁶倍稀释有一枚呈阳性死亡, 一枚阴性死亡, 用Reed-Muench法计算, 该病毒的半数致死量为10^{-5.5}/0.2mL。通过上述实验可知1g Ag/Dia可将每0.2mL含有对鸡胚半数致死量为10^{-5.5}的禽流感病毒液最大吸附杀灭6mL, 到7mL时已不能完全吸附。可进一步计算出Ag/Dia的有效杀毒剂量为: $1 \times 10^{-5.5} / 6 = 0.33 \times 10^{-6} \text{g}$, 即0.35μg/mL Ag/Dia对鸡胚接种病毒有明显的吸附杀灭作用。由于Dia本身是饲料添加剂, 所以Ag/Dia可以用于饲料添加等途径防治禽流感的临床研究, 同时可提供与人体不直接接触的各种特殊情况下的病毒防治, 开辟一个更深的研究领域。

参考文献

- [1] 周全法, 王琪, 谈永祥等. 贵金属深加工及其应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 5, 66-70.
- [2] 曹茂盛. 超微颗粒制备科学与技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 1998. 141-147.
- [3] 洪广言. 无机固体化学[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 29-50.
- [4] 陈仪本. 工业杀菌剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 148-150.
- [5] 黄成彦, 姚以俭, 张若愚等. 中国硅藻土及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 180-218, 123-135.
- [6] Markovic N.M, Ross Jr P.N. Surface Science Reports. 2002. 286. 1.
- [7] 张若愚, 张秀敏, 李顺芬等. 磁化粒子法净化杞麓湖水的研究[J]. 水处理技术, 2003, (4): 242.
- [8] 刘中民, 张卓然, 许国旺等. 催化材料对病毒的吸附和灭活作用及对哺乳动物细胞的毒性[J]. 催化学报, 2003, (5): 323.
- [9] 张若愚, 董亦斌, 王素萍等. 超声波精选硅藻土研究[J]. 非金属矿, 2003, (6): 33-34.
- [10] 黄成彦, 刘师成, 程兆第等. 中国湖相化石硅藻图集[M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 23, 105.
- [11] 杨宇翔, 王鹏, 吴界达等. 用微电泳法研究改性硅藻土的表面性质[J]. 无机化学学报, 1998, 3(1): 47-52.