

C12A7-O⁻材料抗菌性能及机理研究

官 璐, 沈 静, 李全新

(中国科学技术大学 化学物理系, 合肥 230026)

摘 要: 使用气固反应方法制备了 $[\text{Ca}_{24}\text{Al}_{28}\text{O}_{64}]^{4+}\cdot 4\text{O}^{-}$ (C12A7-O⁻)粉末材料, 运用 X 射线衍射(XRD)和电子自旋共振(ESR)对抗菌实验前后 C12A7-O⁻材料结构特性的变化进行了表征, 研究了 C12A7-O⁻材料在溶液中对大肠杆菌 *E. Coli* 的抗菌性能. 实验结果表明, C12A7-O⁻材料中含有的 O⁻浓度约为 $2\times 10^{20}/\text{cm}^3$. 1 mg/mL 的 C12A7-O⁻水溶液中, O⁻浓度约为 $4\times 10^{16}/\text{cm}^3$. 当菌液浓度为 10^5 cfu/mL 时, 1 mg/mL 的 C12A7-O⁻水溶液可在 1 h 内将大肠杆菌浓度降低 99.98%. 通过对比实验和分析发现, C12A7-O⁻粉末释放的 O⁻离子是 C12A7-O⁻溶液具有抗菌作用的重要因素之一.

关 键 词: C12A7; 抗菌性能; 抗菌机理

中图分类号: TQ455

文献标识码: A

Investigation on the Antibacterial Activity and Mechanism of C12A7-O⁻ Particles

GONG Lu, SHEN Jing, LI Quan-Xin

(Department of Chemical Physics, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The $[\text{Ca}_{24}\text{Al}_{28}\text{O}_{64}]^{4+}\cdot 4\text{O}^{-}$ (C12A7-O⁻) particle was firstly investigated its antibacterial activity against bacteria *E. Coli* in aqueous solution and phosphate buffered saline (PBS). The C12A7-O⁻ particles were synthesized by gas-solid reaction method with CaCO_3 and $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ in a molar ratio of 12:7. The structure change of the C12A7-O⁻ particles was measured by X-ray diffraction (XRD) and electron spin resonance (ESR) after antibacterial test. The results show that the structure of the C12A7-O⁻ particles is completely changed into the structure of $(\text{CaO})_3\text{Al}_2\text{O}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Al}(\text{OH})_3$. In the C12A7-O⁻ solution (1 mg/mL), the concentration of atomic oxygen anion (O⁻) in the solution is $4\times 10^{16}\text{ cm}^{-3}$. In the antibacterial test with the particle concentration of 3 mg/mL in aqueous solution, the bacteria concentration in decreased by 99.98% in 1 h from the original concentration of 10^5 cfu/mL. When the particle concentration is 1 mg/mL in PBS, the pH is 7.4 and the pH effect of the solution could be neglected, but the bacteria concentration still deduces to 3.7×10^3 cfu/mL from the original concentration in 24 h. In briefly, O⁻ is the main factor in the antibacterial test in the C12A7-O⁻ PBS solution with the neutral pH environment.

Key words: C12A7; antibacterial activity; antibacterial mechanism

随着生活水平的提高, 人们对生活环境和健康的认识不断增强, 能够防止有害细菌传播的抗菌材料物质倍受青睐, 其中无机抗菌材料不但克服了有机抗菌材料易产生耐药性、易二次污染、不适于高温加工的缺点, 而且还具有稳定性、持久性、安全性的特点, 正在逐步取代有机抗菌材料.

现在广泛研究的无机抗菌材料主要分为金属离子型和氧化物催化型两类. 金属离子型是指以银、铜、锌等金属离子负载于无机非金属材料. 氧化物催化型是指 TiO_2 等光催化型金属氧化物催化剂用作抗菌材料. 但是, 金属离子型抗菌剂经常使用的 Ag^+ 、 Cu^{2+} ^[1-4]等离子属于贵金属, 价格昂贵. 传统的

收稿日期: 2010-01-11; 收到修改稿日期: 2010-02-24

基金项目: 国家“863”项目(2009AA05Z435); 国家“973”项目(2007CB210206); 国家自然科学基金(50772107)

863 Program (2009AA05Z435); 973 Program(2007CB210206); National Nature Science Foundation of China(50772107)

作者简介: 官 璐(1983-), 男, 博士研究生. E-mail: gongmclu@mail.ustc.edu.cn

通讯联系人: 李全新, 教授. E-mail: liqx@ustc.edu.cn

氧化物催化型抗菌剂缺点在于使用时需要借助外界光源发挥作用,装置复杂,光催化效率低^[5]。

近年来,随着纳米技术,特别是制备高质量纳米颗粒技术的发展,纳米无机金属氧化物开始被应用于抗菌领域的研究^[6]。Ca₁₂Al₁₄O₃₃ (C12A7)是一种结构独特的无机复合钙铝氧化物,具有纳米级笼状晶体结构,一个钙铝石晶胞含两个 C12A7 分子,由一个[Ca₂₄Al₂₈O₆₄]⁴⁺点阵框架和两个 O²⁻离子组成,带正电的点阵框架形成十二个直径约为 0.4 nm 的笼子。研究表明,游离 C12A7 笼中的自由氧离子(O²⁻)可以被其它阴离子(如 O⁻, H⁻, OH⁻, F⁻, Cl⁻阴离子或电子 e⁻)部分取代,进而合成各种具有不同性质的 C12A7 衍生物,结构式记为 [Ca₂₄Al₂₈O₆₄]⁴⁺·4(X⁻),简称为 C12A7-X⁻(X = O⁻, OH⁻, H⁻, F⁻, Cl⁻)。C12A7 衍生物具有广泛的应用前景,如 C12A7-O⁻可用于制作高纯 O⁻阴离子源^[7],该材料可用于研究 O⁻阴离子诱导的微生物失活^[8]以及聚合物材料表面改性^[9]; C12A7-H⁻可用于制作光学半导体材料^[10]; C12A7-e⁻可用于制作室温氧化物电极以及冷电子场发射器件^[11]; C12A7-F⁻可用于半导体蚀刻和制作高纯 F⁻阴离子源^[12]。

本工作使用气固反应方法制备 C12A7-O⁻材料,运用 X 射线衍射(XRD)和电子自旋共振(ESR)方法研究抗菌实验前后 C12A7-O⁻材料结构特性的变化,研究了 C12A7-O⁻材料在溶液中对大肠杆菌的抗菌性能,并探讨了抗菌机理。

1 实验部分

1.1 原料

使用气固反应方法制备 C12A7-O⁻材料^[7],具体步骤如下:将 CaCO₃ 和 γ-Al₂O₃ 粉末按照 n(Ca):n(Al)=6:7 的比例混合压片后放置在管式炉中,在连续通入高纯氧气(纯度:99.999%)的条件下,以 10℃/min 的速率程序升温至 1350℃,恒温 10 h,而后自然冷却至室温。将样品取出后磨细,使用 74 μm 标准筛过筛后备用。C12A7-Cl⁻、C12A7-F⁻、CaAl₂O₄ (CA)材料采用文献[12-14]中的方法制备。

大肠杆菌(*E. coli*, DH5α)由中国科学技术大学生命科学院杨永广教授惠赠。实验前,细菌接种于 LB 培养基中 37℃培养。

1.2 样品的表征分析

对制备的 C12A7-O⁻材料使用 Philips χ³pert Pro 衍射仪测定样品的晶体结构,分析条件为:CuKα,扫描范围 10°~80°,速度 2°/min。在抗菌实验结束后,

弃去上层清液,将沉淀置于干燥箱蒸干水分后进行 XRD 分析。对 C12A7-O⁻粉末使用 JES-FA200 电子自旋共振波谱仪测定含有的自由基,分析条件为 ~9.1 GHz (X-band), 120 K。

1.3 抗菌实验

细菌在有氧情况下接种于 LB 培养基中 37℃培养 24 h 左右。培养液离心分离洗涤两次(4000 r/min, 10 min)后制成悬液,细菌含量约为 10⁷ cfu/mL,稀释至 10⁵ cfu/mL 备用。一组在 10 mL 蒸馏水中加入 0.1 mL 菌悬液,其余组在 10 mL 0.02 mol pH 7.2 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中加入 0.1 mL 菌悬液,然后加入一定量的 C12A7-O⁻粉末,振荡、混合均匀,37℃培养 1、12、24 h 后,各取出 0.1 mL 悬液采用营养琼脂稀释培养法 37℃培养 24 h 后进行存活细菌计数。

1.4 抗菌机理试验

在 10 mL 0.02 mol pH 7.2 的 PBS 中,加入 0.1 mL 菌悬液,然后加入 C12A7-O⁻或其他 C12A7 衍生物及 CA,振荡、混合均匀,37℃培养 24 h 后,取 0.1 mL 悬液采用营养琼脂稀释培养法 37℃培养 24 h 后进行存活细菌计数。

2 结果

2.1 材料的表征结果

2.1.1 X 射线衍射分析

图 1 中(a)和(b)曲线分别为新制备的 C12A7-O⁻材料和经过抗菌实验后再干燥样品的 XRD 图谱。图 1(a)显示,经过 1350℃、恒温 10h 的焙烧,对照标准图谱卡片(International Centre for Diffraction Data(ICDD), 2002)可以看出 C12A7 晶型结构已经完全形成。计算得到 C12A7-O⁻材料的晶格常数为 1.199 nm,用 Scherrer 公式计算得出平均晶粒尺寸为 170 nm。图 1(b)显示,图谱中主要的强峰归属于 (CaO)₃Al₂O₃·6H₂O,另外还掺杂有少量的 Al(OH)₃。结果表明,C12A7-O⁻材料经过抗菌实验后,C12A7 的结构发生了明显的变化,其笼状结构已被破坏。

2.1.2 电子顺磁共振分析

图 2(a)和(b)分别为新鲜制备的 C12A7-O⁻材料的 ESR 图谱和 C12A7-O⁻材料水溶液上清的 ESR 图谱。以 CuSO₄·5H₂O 为标准参照测量样品中 O⁻的含量。经过拟合计算后得出 C12A7-O⁻材料中含有的 O⁻浓度约为 2×10²⁰/cm³。将 C12A7-O⁻粉末加入蒸馏水中,30 min 后吸取 100 μL 上层清液中,使用 ESR 检测到溶液中微量 O⁻的存在,经过拟合计算后得出在 1 mg/mL

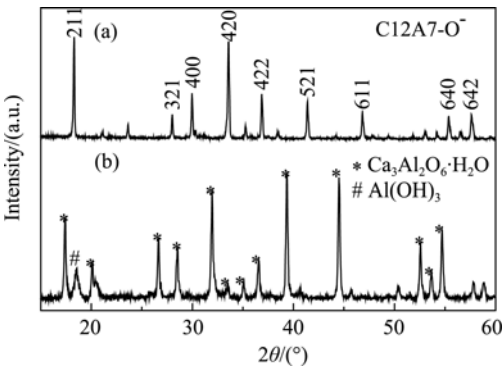


图 1 (a)抗菌实验前和(b)抗菌后 C12A7-O⁻样品的 XRD 图谱
Fig. 1 XRD patterns of the C12A7-O⁻ samples (a) before and (b) after antibacterial test

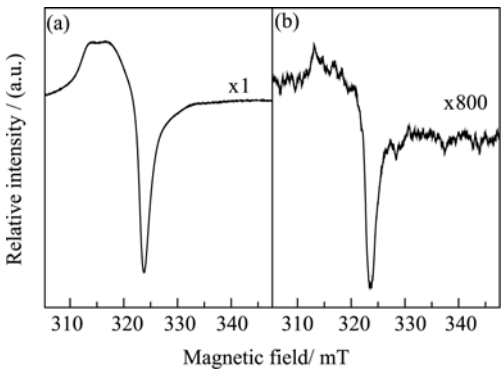


图 2 (a)C12A7-O⁻粉末和(b)加入 C12A7-O⁻粉末后上层清液的 ESR 图谱
Fig. 2 ESR patterns of (a) C12A7-O⁻ sample and (b) the supernatant of C12A7-O⁻ solution

的 C12A7-O⁻水溶液中含有的 O⁻浓度约为 $4\times 10^{16}/\text{cm}^3$. 另外, 对 C12A7-O⁻材料加入到 PBS 中产生的 O⁻浓度做了检测. 结果显示, 在 PBS 中的 O⁻浓度和在蒸馏水中没有区别. 3 mg/mL 的 C12A7-O⁻在 PBS 溶液中含有的 O⁻浓度约为 $6\times 10^{16}/\text{cm}^3$.

2.2 抗菌实验结果

以大肠杆菌为模型, 对不同浓度的 C12A7-O⁻溶液的抗菌性能进行了研究. 表 1 列出了不同浓度的 C12A7-O⁻溶液对大肠杆菌抗菌实验的结果(三个平行样品的平均值). 在不含 PBS 的蒸馏水环境中, 1 mg/mL 的处于适宜 C12A7-O⁻溶液可以在 1 h 内使大肠杆菌的浓度降低 99.98%, 1 h 后 pH 值为 10.5. 在中性 PBS 的环境中, 与 pH=7.4 PBS 的阳性对照组相比较结果表明, 浓度为 1 mg/mL 的 C12A7-O⁻ PBS 溶液在 12 h 后能有效地抑制细菌的增长, 使细菌浓度维持在 2.3×10^3 cfu/mL; 3 mg/mL 的 C12A7-O⁻ PBS 溶液在 12 h 内使细菌浓度降低了大约 94.6%, 24 h 内使细菌浓度降低了约 99.9%. 结果还显示了抗菌实验结束时溶液的 pH 值随着 C12A7-O⁻材料浓度的增加而升高. 1mg/mL 的 C12A7-O⁻ pH 值 24 h

表 1 C12A7-O⁻溶液对大肠杆菌的抗菌性能
Table 1 Antibacterial activity of C12A7-O⁻ particles against *E. coli*.

Sample	Time/h	Solution	pH	Survival number/(cfu·mL ⁻¹)
C12A7-O ⁻ (1mg/mL)	0	Distilled Water	7.0	1.4×10^5
	1		10.5	3.2×10^1
	Blank		7.2	1.0×10^3
	1			1.4×10^3
C12A7-O ⁻ (1mg/mL)	12	PBS		2.5×10^3
	24		7.4	3.7×10^3
	0			1.0×10^3
	1			1.3×10^3
C12A7-O ⁻ (3mg/mL)	12	PBS		2.3×10^3
	24		7.6	2.3×10^3
	0			1.0×10^3
	1			7.6×10^2
C12A7-O ⁻ (3mg/mL)	12	PBS		1.4×10^2
	24		8.9	1.3

后仍然维持在 7.6, 但是当浓度增加到 3mg/mL 时, 溶液的 pH 值却增加到 8.9.

2.3 抗菌实验

2.3.1 阳离子作用和接触作用的影响

无机氧化物在水中与细菌产生的接触作用和其溶解于水后释放的阳离子作用是无机氧化物具有抗菌性能的重要因素. 因此进行了不同的 C12A7 衍生物抗菌性能的实验. 抗菌机理实验中, C12A7 衍生物和 CA 的浓度都是 1mg/mL. 此时, 溶液的 pH 值小于 8.0, 细菌生长的条件下, 尽可能降低了溶液 pH 对实验的影响. 图 3 所示的结果表明, 只有 C12A7-O⁻组的存活率与相应的阳性对照相比降低了 36.2%, 具有明显的抗菌效果; 而 C12A7-F⁻、CA 的存活率与相应的阳性对照相比基本一致, 没有对细菌生长产生明显的抑制效果, 而 C12A7-Cl⁻作用后, 细菌的浓度与阳性对照比反而增加了 46.6%.

2.3.2 pH 值的影响

溶液的 pH 值也是影响无机氧化物抗菌性能的一个重要因素. 因此考察了不同 pH 值的 PBS 对 *E. coli* 生长的影响. 对照不同浓度 C12A7-O⁻材料加入到 0.02mol PBS 后溶液的 pH 值(1mg/mL 和 3mg/mL 时分别为 pH 7.6 和 8.9), 配制相应 pH 值 0.02mol 的 PBS, pH 值分别为 8.0 和 9.0. 图 4 所示的结果表明, 培养 24h 时, 当 PBS 的 pH 值为 8.0 时的细菌浓度与 pH 值为 7.4 时相比增加 17.4%. 有研究表明 pH 值 7~8 是 *E. coli* 的生长适宜条件, 不会对细菌的生长产生抑制作用, 即不会对抗菌实验产生显著的影

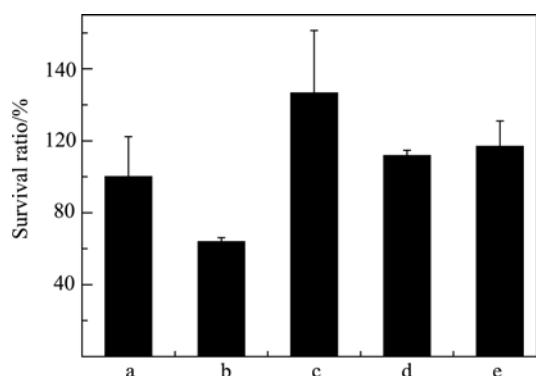


图3 大肠杆菌在各种C12A7衍生物的PBS溶液中存活率
Fig. 3 Survival ratio of *E. coli* in the PBS solution of C12A7 derivatives

(a: PBS solution; b: 1 mg/mL C12A7-O⁻ solution; c: 1 mg/mL C12A7-Cl⁻ solution; d: 1 mg/mL C12A7-F⁻ solution; e: 1 mg/mL CA solution)

Condition: pH=7.2, T=37°C, t=24 h

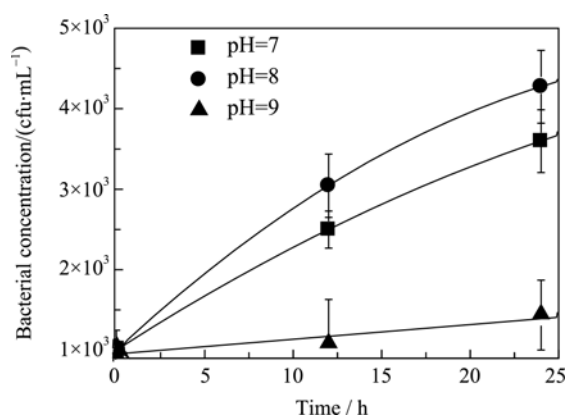


图4 大肠杆菌在不同pH值的PBS中的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *E. coli* in PBS solutions with different pH values

响^[15]. 但是当溶液pH增加到9.0时,pH效应显著增强,24h时细菌浓度只有pH值为7.4时的39.4%,几乎抑制了细菌的生长.

3 讨论

无机氧化物抗菌作用机理主要有以下四个方面:

(1)无机氧化物释放的阳离子;(2)无机氧化物产生的活性氧;(3)无机氧化物与水作用产生的pH效应;(4)无机氧化物与细菌的接触作用破坏细胞膜^[16]. 过去的研究显示:无机氧化物溶解在水中释放的离子(Cu²⁺, Zn²⁺等)与细菌接触,使细胞内的蛋白质、核酸或酶发生变性,促使细胞死亡^[1]. Sawai等^[17]的研究表明,ZnO溶于水后能产生H₂O₂,破坏细胞内的重要组分,使细菌死亡.高pH值(pH>10)具有有效杀死细菌的能力.在高pH的作用下,细胞膜内的蛋白质被溶解、脂质被皂化,最终使细胞膜破裂,导致

细胞死亡^[18].例如,CaO溶于水后虽然也能释放大量的具有抗菌性能的活性氧,如O₂⁻,但是杀菌作用的主要影响因素是pH的效应,1mg/mL CaO溶解后造成pH>10^[19]. Stoimenov等^[20]所做的工作表明,无机氧化物与细菌接触作用时,带正电荷的离子型抗菌材料易吸附带负电荷的细菌,使其细胞膜中的蛋白质发生变性,最终死亡.

实验中,在不含PBS的蒸馏水环境中,1 mg/mL的C12A7-O⁻溶液可以在1 h内使大肠杆菌的浓度降低99.98%,pH值为10.5.3 mg/mL的C12A7-O⁻PBS溶液的pH值为8.9.此时,pH效应起到了主要的杀菌作用.抗菌机理实验在不影响细菌生长的0.02mol pH7.2 PBS环境中进行.经过37°C培育24h,结合表1和图3的结果可以看出,1mg/mL的C12A7-O⁻相对于阳性组,具有36.2%的抑菌效果.而与C12A7-F⁻、C12A7-Cl⁻等其他C12A7衍生物比较的结果可以看出,1mg/mL的C12A7-O⁻粉末分散在0.02mol pH 7.2 PBS中,不引起溶液pH值的剧烈变化,不产生显著的pH效应.加入C12A7-O⁻粉末和CA等钙铝复合物后也没有明显的接触作用效应.图2显示了C12A7-O⁻材料加入到PBS之后,有O⁻离子释放到溶液中.综合上述结果,可以认为在本实验中是C12A7-O⁻加入到水中后释放的O⁻离子起到了抑菌作用.

常见的活性氧簇(ROS)包括·O₂⁻、·OH和H₂O₂.对其产生的机理也研究较多.·O₂⁻既可以作为还原剂供给电子,又可作为氧化剂接受电子.McCord^[21]的研究表明,·O₂⁻可使大肠杆菌中的脱水酶、过氧化氢酶失活.虽然生物体内存在超氧歧化酶(SOD)可以清除·O₂⁻,但当·O₂⁻浓度超过生物体的生理限度时就会损伤生物大分子.·OH化学性质最活泼,但寿命极短.通过Fenton产生的·OH,可与DNA和RNA中嘌呤或嘧啶反应产生加成化合物.H₂O₂是非自由基的活性氧,在化学领域常作为弱氧化剂.H₂O₂可透过细胞膜,在一定条件下产生·OH.O⁻离子也是ROS的一种.O⁻是一种活性很强的物种.有研究表明,在很低的温度下(130K)吸附在MgO表面的O⁻就可以同CH₄发生反应并将其氧化^[22].O⁻虽然在化学合成^[23-26]、表面刻蚀^[27]等领域已有广泛的研究,但其应用在抗菌材料领域的研究尚不多见.本实验室前期工作表明,经过特殊方法制备的O⁻水可以在1h内使细菌浓度降低3个对数量级^[8].推测其杀菌机理可能是,在大肠杆菌的失活过程中,O⁻水能够引起大肠杆菌细胞发生脂质过氧化反应,破坏细胞膜和细胞壁,导致细胞内部核酸的泄漏,引起

细菌死亡.

4 结论

本实验研究了 C12A7-O⁻材料在溶液中的抗菌作用. C12A7-O⁻材料使用气固反应方法制备, 材料中含有的 O⁻浓度约为 $2 \times 10^{20}/\text{cm}^3$, 1 mg/mL 的 C12A7-O⁻水溶液中的 O⁻浓度约为 $4 \times 10^{16}/\text{cm}^3$. 当菌液浓度为 10^5 cfu/mL 时, 1 mg/mL 的 C12A7-O⁻溶液可在 1 h 内将大肠杆菌浓度降低 99.98%. 对比实验表明, 在中性 PBS 环境中, 1mg/mL 的 C12A7-O⁻材料加入后不会产生明显的 pH 效应和接触效应, 结合 XRD 和 ESR 结果分析, C12A7-O⁻材料在中性 PBS 溶液中主要是 O⁻离子起到抗菌作用.

参考文献:

- [1] 李吉东, 李玉宝, 王学江, 等(LI Ji-Dong, *et al.*). 载铜锌纳米经基磷灰石的抗菌性能及机理研究. 无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2006, **21**(1): 162–168.
- [2] 陈君华, 王 飞, 程年寿, 等(CHEN Jun-Hua, *et al.*). 铜原位改性 HMS 材料的表征及抗菌性能. 无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2009, **24**(4): 695–701.
- [3] Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, *et al.* Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem. Mater.*, 2005, **17**(21): 5255–5262.
- [4] 戴晋明, 侯文生, 魏丽乔, 等(DAI Jin-Ming, *et al.*). 载银锌 4A 沸石抗菌剂抗变色性能的研究. 无机材料学报(Journal of Inorganic Materials), 2008, **23**(5): 1011–1015.
- [5] Lu Z X, Zhou L, Zhang Z L, *et al.* Cell damage induced by photocatalysis of TiO₂ thin films. *Langmuir*, 2003, **19**(21): 8765–8768.
- [6] Jones N, Ray B, Ranjit K T, *et al.* Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, **279**(1): 71–76.
- [7] Li Q X, Nishioka M, Kashiwagi H, *et al.* High-intensity atomic oxygen radical anion emission mechanism from 12CaO·7Al₂O₃ crystal surface. *Surf. Sci.*, 2003, **527**(1/2/3): 100–112.
- [8] Wang L, Gong L, Zhao E, *et al.* Inactivation of *Escherichia coli* by O⁻ water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007, **45**(2): 200–205.
- [9] Wang L, Yan L F, Zhao P T, *et al.* Surface modification of polystyrene with atomic oxygen radical anions-dissolved solution. *Appl. Surf. Sci.*, 2008, **254**(13): 4191–4200.
- [10] Hayashi K, Matsuishi S, Kamiya T, *et al.* Light-induced conversion of an insulating refractory oxide into a persistent electronic conductor. *Nature*, 2002, **419**(6906): 462–465.
- [11] Miyakawa M, Kim S W, Hirano M, *et al.* Superconductivity in an inorganic electride 12CaO·7Al₂O₃:e⁻. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**(23): 7270–7271.
- [12] Song C F, Sun J Q, Qiu S B, *et al.* Atomic fluorine anion storage emission material C12A7-F⁻ and etching of Si and SiO₂ by atomic fluorine anions. *Chem. Mater.*, 2008, **20**(10): 3473–3479.
- [13] Sun J Q, Song C F, Ning S, *et al.* Preparation and characterization of storage and emission functional material of chlorine anion: [Ca₂₄Al₂₈O₆₄]⁴⁺·(Cl⁻)_{3.80}(O²⁻)_{0.10}. *Chin. J. Chem. Phys.*, 2009, **22**(4): 417–422.
- [14] Singh V K, Ali M M, Mandal U K. Formation kinetics of calcium aluminates. *J. Am. Ceram. Soc.*, 1990, **73**(4): 872–876.
- [15] 朱英莲, 李远钊, 张培正, 等. 温度生长预测模型在大肠杆菌 O157: H7 控制中的应用. 食品科学, 2007, **28**(3): 183–187.
- [16] Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int. J. Inorg. Mater.*, 2001, **3**(7): 643–646.
- [17] Sawai J, Shoji S, Igarashi H, *et al.* Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *J. Ferment. Bioeng.*, 1998, **86**(5): 521–522.
- [18] Mendonca A F, Amoroso T L, Knabel S J. Destruction of gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**(11): 4009–4014.
- [19] Sawai J, Kojima H, Igarashi H, *et al.* *Escherichia coli* damage by ceramic powder slurries. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 1997, **30**(6): 1034–1039.
- [20] Stoimenov P K, Klinger R L, Marchin G L, *et al.* Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 2002, **18**(17): 6679–6686.
- [21] McCord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 2000, **108**(8): 652–659.
- [22] Henchman M, Hierl P M, Paulson J F. Nucleophilic displacement vs proton transfer: the system OH⁻·(H₂O)_{0,1,2}+CH₃Cl in the relative energy range 0.03–5eV. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**(9): 2812–2814.
- [23] Gao A M, Zhu X F, Wang H J, *et al.* Reduction features of NO over a potassium-doped C12A7-O⁻ catalyst. *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**(24): 11854–11862.
- [24] Lee J, Grabowski J J. Reactions of the atomic oxygen radical-anion and the synthesis of organic reactive Intermediates. *Chemical Reviews*, 1992, **92**(7): 1611–1647.
- [25] Dong T, Li J, Huang F, *et al.* One-step synthesis of phenol by O⁻ and OH⁻ emission material. *Chem. Commun.*, 2005(21): 2724–2726.
- [26] Wang Z X, Pan Y, Dong T, *et al.* Production of hydrogen from catalytic steam reforming of bio-oil using C12A7-O⁻-based catalysts. *Appl. Catal. A-Gen.*, 2007, **320**: 24–34.
- [27] Zhao E, Wang L, Yan L F, *et al.* Surface modification of medical poly(vinyl chloride) with O⁻ water. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **110**(1): 39–48.