

无机抗菌剂及其加工品抗菌效力评价

曾冬冬 孙春宝

(北京科技大学资源工程学院,100083)

丁浩

(北京市建筑材料科学研究院,100041)

摘要 本文主要综述了无机抗菌剂对细菌的作用及近年来国内外常用的抗菌试验方法和抗菌效力判定基准,并且总结了不同加工品的适用检测方工。

关键词 无机抗菌剂,抗菌作用,抗菌试验方法,抗菌效力判定基准

VALUATION OF THE EFFECT OF INORGANIC ANTIBACTERIAL AGENT AND ITS PRODUCT

Zeng Dongdong Sun Chuenbao

(Resource Engineering School, Beijing University of Science and Technology, 100083)

Ding Hao

(Beijing Academy of Building Materials, 100041)

Abstract The inorganic antibacterial agents' action on the bacteria were introduced. The usual antibacterial test and the standard of the capability and the determination methods suitable for different products were also reviewed.

Key words inorganic antibacterial agents, antibacterial action, antibacterial test, capability standard

无机抗菌剂是一种利用无机重金属离子抗菌作用的新型抗菌材料,与有机抗菌剂相比,具有广谱、耐久、安全的特点。随着人们对环境质量要求的提高,无机抗菌剂具有广阔的市场前景。但目前对该类抗菌剂抗菌性能的检验尚无统一标准,对抗菌加工品的抗菌性能测定仅见于行业参考,并且不同抗菌剂抗菌性能间的比较缺乏规范标准,有较大的随机性。本文探讨了无机抗菌剂对细菌的作用,综述了国内外常用的测定方法,旨在为无机抗菌剂及其加工品的性能评价提供合适的检测手段。

1 无机抗菌剂对微生物的抗菌作用及其动力学描述

无机抗菌剂对细菌的作用表现在两个方面:抑菌与杀菌^[1]。抑菌指在细菌的增殖期,无机抗菌剂吸附于细胞壁上,与细胞膜蛋白(如 S-S 键)结合,破坏膜中的酶,防止细胞生长所需能量代谢的电子

传递,抑制细菌个体生长的作用,又称为静菌作用。杀菌是指当细菌处于非增殖期时,无机抗菌剂对细胞膜酶的破坏,导致细菌维持个体生存所需的能量代谢不能正常进行而死亡的作用。

1.1 增殖条件下抗菌剂对细菌的发育阻害^[2]

若细菌在生长初期的菌数为 N_0 ,经 t 时间细胞分裂,其菌数 N 与时间关系如下:

$$\ln(N/N_0) = \mu t \quad (1)$$

式中 μ 称为该菌繁殖的比增殖速度。

若有抗菌药剂存在,由于静菌作用,细菌的比增殖速度降为 μ_i ,可用增殖阻害度 H 来表示抗菌剂的静菌力大小:

$$H = (\mu - \mu_i) / \mu \quad (2)$$

H 与药剂浓度 C 的关系,可用一经验式来表达:

$$H = C^n / (I_{50}^n + C^n) \quad (3)$$

式中 I_{50} 是当细菌 50% 受阻时药剂浓度。

将(2)式代入(3)式得:

$$\mu / \mu_i = 1 + (C / I_{50})^n \quad (4)$$

另外,在诱导期,添加抗菌药剂后细菌生长的诱导时间 τ_i 较无添加时的诱导时间 τ 更长。同样用 H 来表示阻害度:

$$H = (\tau_i - \tau) / \tau \quad (5)$$

$$\text{可得 } \tau_i / \tau = 1 + (C / I_{50})^n \quad (6)$$

由上可知,抗菌剂的静菌力是与 C^n 成比例的,抗菌剂浓度的增加,将导致细菌发育强烈受阻。

1.2 非增殖期的杀菌^[2]

若稳定期的细菌菌数为 N_0 ,加入抗菌剂后菌数减少到 N ,可用式(7)来表示两者间的关系:

$$\ln(N / N_0) = - K_d t \quad (7)$$

K_d 称为杀灭速度常数,它与抗菌剂浓度有关:

$$K_d = K C^n \quad (8)$$

K 随菌种、抗菌剂不同而不同。

由上可知,抗菌剂的 K 越大,其杀菌作用越强;同一抗菌剂的杀菌力随浓度增大而急剧上升。

日本的松山圭一郎研究了不同浓度的醋酸银对金黄色葡萄球菌生长的影响,得到的增殖曲线表明:低浓度的药剂使细菌诱导期变长,但对比增殖速度的影响并不明显;当药剂浓度增大到一定值时,菌数下降,说明高浓度的药剂对细菌直接起杀灭作用。他还考察了稳定期抗菌剂对菌体的影响,得到的死灭曲线是直线,可知抗菌剂对细菌的杀灭是完全的一次反应^[2]。

2 无机抗菌剂抗菌性能检测方法

如前所述,抗菌剂抗菌性能包括抑菌作用(即静菌力)与杀菌作用(即杀菌力)。对于抗菌剂本身抗菌性能的检测,包括静菌力评价与杀菌力评价两方面的内容。

2.1 静菌力的评价

静菌力一般采用电导率法或 MIC 法来评价。

2.1.1 电导率法^[3]

微生物在生长过程中,消耗营养液中的蛋白质而放出有机酸和氨基酸两种电解质。微生物生长越快,电解质浓度就越大,营养液的导电性也越好,电导率也就越大。以不含抗菌剂的菌营养液作参比,以加有抗菌剂的菌营养液为处理液,比较两种条件下电导率的变化趋势,就可推断抗菌剂的静菌力。

2.1.2 MIC 法^[1]

MIC 是指使微生物发育受阻所需的最小抗菌剂

浓度。MIC 值越小,抗菌剂的静菌活性越大。MIC 的测定有两种方法,其一是液体稀释法。以不含无机抗菌剂的菌液作参比,以营养液作稀释液,把抗菌剂液稀释不同倍数后,加入一定浓度的菌液,混合后作处理液。测定参比液与处理液各自的浊度,若抗菌剂浓度为 C_x 的处理液浊度与参比液浊度相等,则此 C_x 即为 MIC 值。其二是固体稀释法(即培养基法)。在培养基中加入不同量的抗菌剂,混凝成平板,培养菌种,1 周后观察菌种生长情况,不生长菌的平板所含抗菌剂浓度即为该抗菌剂的 MIC 值。后法操作较简单,但影响因素多,结果较粗。

2.2 杀菌力的评价

杀菌力可通过测定细菌数量、浊度、MBC 等值来评价,相应的方法分别称为细胞数量测定法,比浊法和 MBC 法。

2.2.1 细胞数量测定法

通过测定比较参比样与抗菌剂处理样细菌数量的增减来评价抗菌性能。细胞数量的测定,多采用菌落计数法(colony count)^[4]。

对于微生物,在理论上可认为高度稀释时每个活的单细胞均能繁殖成一个菌落(colony),因而可以用培养的方法使每个活细胞生长成一个单独的菌落,并通过长出的菌落数去推算菌悬浮液中的活菌数,由此而来的方法即为菌落计数法。以菌液作为参比液,在菌液中加入抗菌剂后,采用平板涂抹法,在 37 °C 培养条件下培养 24h 后测定参比液与处理液的生存菌数,计算增减值差:

增减值差 = - 1g(处理液生存菌数/参比液生存菌数)

若该值大于 2,则认为该抗菌剂具有杀菌作用。

2.2.2 最大或然数法(MPN)^[4]

该法依然根据菌落计数测定原理,但适合于测定在一个微生物群中不占优势却具有特殊生理功能的类群,例如污水、牛奶及其它食品,或其它场合下的特殊微生物。在测定之前,先采用液体稀释培养法,利用待测菌特殊生理功能的选择性来摆脱其它微生物的干扰,逐代优化待测菌,并通过该生理功能的表现来判断该群微生物的存在丰度,以示杀菌力。

2.2.3 比浊法^[4]

在一定浓度范围内,菌悬浮液中的微生物细胞浓度与浊度成正比,因而通过测定浊度,间接比较菌液与处理液菌量,可检测抗菌剂杀菌性能。

2.2.4 MBC(最小杀菌浓度)法^[5]

MBC为抗菌剂杀灭细菌所需最低浓度。该值越小,抗菌剂的杀菌力越大。以无菌水作稀释液,把细菌配成个数浓度(以下简称为浓度) 10^6 个/ml的悬浮液,把抗菌剂悬浮液稀释到不同倍数。取菌液1ml,不同浓度的抗菌剂悬浮液1ml,混合后于30℃水浴中振荡1h,然后加入到2ml的新鲜培养液中,37℃恒温条件下培养24h,以不含细菌的抗菌剂悬浮液作参比,测参比液与处理液各自的浊度。若抗菌剂浓度为 C_x 的处理液浊度与参比液浊度相等,则此 C_x 即为MBC值。

3 无机抗菌加工品抗菌性能评价

由抗菌加工品的静菌力引起的细菌生存菌数 X 的变化,可用下式来表示^[2]:

$$-dX/dt = \mu X - g(X) - f(X) - h(X)$$

式中 $-dX/dt$ 是细菌的总死灭速度, $f(X)$ 是由抗菌剂引起的细菌死灭速度, $g(X)$ 是由稀释液引起的细菌死灭速度, $h(X)$ 是由于菌膜与试料间接触引起的细菌死灭速度。欲判定抗菌加工品的静菌力,可比较抗菌加工品与非加工品生存菌数变化,用菌数增减值差来作为评价指标。

由抗菌加工品杀菌力引起的细菌菌数变化,可用下式来表示:

$$-dX/dt = k_d X + g(X)$$

式中 $K_d X$ 是抗菌剂的杀菌速度, $g(X)$ 是由稀释液引起的细菌死灭速度。由于杀菌是一次反应,可用灭菌率作为指标来评价杀菌力:

灭菌率 = (试验前菌数 - 试验后菌数) / 试验前菌数 $\times 100\%$ ^[2]

若试验材料的灭菌率与参比材料的灭菌率之差大于26%,则认为该试验材料有杀菌作用。

杀菌力的评价指标,有直接计数、灭菌率或增减值差、抑菌圈三种,各指标的测定因检测时抗菌材料形态与检测操作不同,手段也多样。

3.1 直接计数指标^[6]

在显微镜下直接观察菌面积,通过比较处理前后面积变化来评价抗菌性。此法多用于抗真菌试验。

3.2 灭菌率或增减值差指标

3.2.1 薄膜密着法^[5]

将抗菌加工品制成供试片,未加抗菌剂的加工品制成参比片,滴上菌液(磷酸缓冲液, pH = 7.0),

使菌液在试验片上成膜,于菌膜上覆盖PE薄膜,37℃恒温条件下保存18~24h。之后用磷酸缓冲液将菌液淋洗下来,采用菌落计数法测生存菌数。计算供试片与参比片的增减值差,评价加工品的抗菌力。该法用于检测表面光滑的塑料、橡胶、陶瓷、金属成品的抗菌性能。

3.2.2 滴下法^[5]

该法用于具有吸水性的加工品性能检测。菌液用1/500倍数的培养液稀释成浓度为 10^4 个/ml的悬浊液,在试验片(50×50mm)上滴1滴或数滴该悬浊液,使菌液以液滴形式存在。在37℃下恒温保存18~20h,测生存菌数。计算增减值差。

3.2.3 统一试验法^[5]

把材料切成18mm长的试验片,称取0.4g放入300ml广口瓶中。在高压釜中121℃条件下灭菌15min。菌液经培养后,以1/20倍数的培养液稀释,调成浓度为 10^5 个/ml的悬浊液。在试验片上滴菌悬浊液0.2ml,使菌液以菌滴形式存在。恒温35~37℃培养18h后,测定生存菌数,比较灭菌率。该法主要用于疏水制品的检测。

3.2.4 振荡接触法^[7]

对于非溶出型抗菌材料,将它和菌液在25℃下于锥形瓶中强烈振荡1h,以增加菌与测试物的接触。测定生存菌数,计算灭菌率。此法多用于纺织品、纤维等表面粗糙的制品检验。由于强烈振荡,菌液易起泡沫,对抗菌性能评价有一定影响。

3.2.5 浸渍法^[7]

将材料加工成50×50×3mm的试验片,置于聚乙烯容器中,滴上浓度为 $10^3 \sim 10^6$ 个/ml的菌液(磷酸缓冲液, pH = 7.0),使材料周围形成1mm厚的菌层,之后把容器口用60mm宽的透明PP带封住,用40W灯光照射,25℃条件下振荡1h,之后采用平板法测菌数,比较抗菌加工品与未加抗菌剂的加工品的灭菌率。该法适用于表面粗糙的纤维制品、树脂成品以及非溶出型(如磷酸铝载体银离子抗菌剂)材料。

3.2.6 盖玻片法^[8]

该法是检测半导体光催化加工制品抗菌性能的唯一方法。将试样加工成尺寸为40×40mm的薄片,把30×30×0.12mm的盖玻片置于薄片中央,于紫外光下照射一定时间后测定菌数,计算增减值差。

3.3 抑菌圈指标—抑菌环法^[9]

菌用灭菌生理盐水调至浓度为 10^8 个/ml,与营养液混合,固化成试验平板,把材料加工成圆盘,置于平板中央,在此圆盘上会出现菌生长禁止圈(即抑菌圈)。37℃下培养 18h 后,比较抗菌材料与参比材料抑菌圈的面积,评价抗菌材料的性能。该法较适合于纤维制品。

现将抗菌制品对应的检测方法归纳如表 1。

表 1 抗菌制品检测方法

抗菌制品	检测方法	评价指标
普通纤维制品	抑菌圈法	抑菌圈形成
疏水纤维制品	统一试验法	灭菌率
吸水制品	滴下法	增减值差
非溶出型制品	振荡接触法,浸渍法	灭菌率
金属、塑料、陶瓷制品	薄膜密着法	增减值差
合成树脂制品	薄膜密着法	增减值差
家电、家用机器设备	滴下法,薄膜密着法	增减值差

抗菌加工品的抗菌性能检测,应根据材料的亲水性、抗菌剂的溶出性以及抗菌材料的外在形态等,选择和使用相应的测试方法。

4 抗菌效力表示法与效果判定基准^[2]

抗菌加工品的抗菌效力,除了可用上述指标来评价外,还可以量化的 D_a 值作为判定基准。 D_a 值为在某一条件下细菌数减少到起始菌数 10% 所需要的时间。

若起始菌数为 N_0 ,在最佳生长条件下,细菌繁殖到 $2N_0$ 所需要的时间 T ,可根据生长公式 (1) $\ln(N/N_0) = \mu t$ 来计算:

$$T = \ln 2 / \mu_{\max}$$

因为细菌处于最佳生长条件,所以式中取细菌的最大比增殖速度 $\mu_{\max}$ 。

当有抗菌剂存在时,细菌菌数减少到 $1/2 N$ 的时间称为半衰期 D_{50} ,因为抗菌剂对细菌的杀灭是完全的一次反应,所以 D_{50} 与 D_a 满足以下关系式:

$$D_{50} = 0.301 D_a$$

对某一细菌而言,只有当抗菌剂存在时的半衰期 D_{50} 小于 T 时,才会因抗菌剂的抗菌作用而引起发育受阻、个体死亡,

$$\text{即: } D_{50} < T$$

$$\text{整理后得: } 0.301 D_a < \ln 2 / \mu_{\max} = 0.693 / \mu_{\max}$$

$$\text{即: } D_a < 2.303 / \mu_{\max}$$

细菌由于抗菌剂的抗菌作用而引起的菌数减少所需要的最大 D_{50} 、最大 D_a 与细菌的 $\mu_{\max}$ 关系可表示为:

$$(D_{50})_{\max} = 0.693 / \mu_{\max}$$

$$(D_a)_{\max} = 2.303 / \mu_{\max}$$

向细菌液中加入某一抗菌剂,只有该条件下的 $D_{50} < (D_{50})_{\max}$ 、 $D_a < (D_a)_{\max}$ 时,此抗菌剂才有抗菌效力。

不同细菌的最大比增殖速度不同,其所对应的由抗菌剂引起的最大半衰期、最大 D_a 值也不同,如表 2 所示。通过测定某一抗菌剂存在时的半衰期、 D_a 值,与细菌相应的值比较,以判断该抗菌剂的抗菌效力。

表 2 常见菌及其对应的 $\mu_{\max}$ 、 $(D_a)_{\max}$ 和 $(D_{50})_{\max}$ 值

细菌名	$\mu_{\max} (1/h)$	$(D_{50})_{\max} (h)$	和 $(D_a)_{\max} (h)$
大肠杆菌	2.1	0.38	1.1
巨大芽孢杆菌	1.4	0.5	1.7
荧光假单胞菌	1.2	0.58	1.9
嗜酸乳杆菌	0.52	1.3	4.4

抗菌加工品 D_a 值的测定,可采用浸渍法。只有当加工品的 D_a 值 $<$ 细菌的 $(D_a)_{\max}$ 时,该抗菌加工品才具有抗菌性能,且差值越大,抗菌力越大。

5 结束语

合适的无机抗菌剂及其制品抗菌性能的检测方法,必将为无机抗菌剂的研制开发提供评价依据。但仍然存在以下问题。

(1) 目前的检测方法只能对抗菌性能作定性评价,缺乏定量测定方法和定量评价指标。

(2) 抗菌性能检测多是对常规菌类而言,而对特殊环境下生存的细菌的抗菌检测,尚没有较普遍合适的测定方法。

参考文献

- 1 祖若夫,胡宝龙,周德庆.微生物学实验教程.上海:复旦大学出版社,1993
- 2 桧山圭一郎.防菌防霉(日),1998,26(10):587~591
- 3 富冈敏一,富田胜己,冈弘章.日本化学会志(日),1995(10):848~850
- 4 徐孝华.普通微生物学.北京:农业大学出版社,1992
- 5 铃木昌二. Inorganic Materials, Japan. 1999(6):474~484
- 6 李毕忠.抗菌塑料的发展与应用.化工新型材料,2000(6):8~10
- 7 桧山圭一郎.防菌防霉(日),1994,22(3):127~131
- 8 黄占杰.材料导报,1999,(2):35~37
- 9 US,4525410

收稿日期:2000-11-3