

银离子和含银不锈钢的抗菌性研究

段继周¹, 丹治 保典², 侯保荣³, 西方 篤⁴, 水流 徹⁴

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266003; 2 东京工业大学 大学院生命理工学研究科, 横滨 226-8501; 3. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 4 东京工业大学 大学院理工学研究科, 东京 152-8552)

摘要: 基于银因其具有良好的广谱抗菌活性和低毒性而在医学方面有着较为广泛的应用, 对银离子(硝酸银)和含银不锈钢的抗菌活性进行了初步研究。实验结果表明, 在 10^6 CFU/mL的初始接种浓度下, 银离子对枯草杆菌、大肠杆菌和假单胞菌的最小抑菌质量浓度和最小杀菌质量浓度分别为 2, 6, 8 mg/L 和 2, 8, 10 mg/L。大肠杆菌经 8 mg/L 的银离子处理 2 h 后, 有 99.9 % 以上的细菌被破坏。含银不锈钢也表现了较强的抗菌性能。在普通的、银合金和银涂层的 SUS304 不锈钢表面附着的单层生物膜浸泡在 PBS 溶液中 3 d 后, 经 CFDA-DAPI 双染色和荧光显微镜观察计数获得的假单胞菌的平均存活率为 98.0%, 38.5% 和 15.1%。

关键词: 抗菌活性; 银离子; 含银不锈钢

中图分类号: TB31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 3096 (2005) 07 - 0069 - 04

环境微生物诸如细菌、真菌和病毒能够导致人们感染多种疾病; 同时, 环境微生物还能在各种材料包括金属表面形成生物膜, 导致材料的腐蚀破坏。因此, 寻找和开发各种有效的抗菌剂和抗菌材料, 以减轻微生物的附着和可能的感染, 在公共环境、健康和安全的今天, 具有重要意义。银, 因其对微生物具有很高的毒性同时对哺乳动物细胞具有低毒性, 在医学上特别是用于烧伤等外科的防感染治疗上具有很长的应用历史。现在, 各种含银添加材料诸如纤维、陶瓷和金属已获得研究和应用^[1-3]。银对细菌的杀菌和细菌的耐药性机理也得到了深入研究^[4, 5]。作者对银离子和含银不锈钢的抗菌性做了初步研究。

和假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1)。实验中用到的培养基为 B1 (枯草杆菌) 和 LB 培养基 (大肠杆菌和假单胞菌), 培养基的组成列于表 1。

表 1 LB 和 B1 培养基的组成

Tab.1 Compositions of Luria-Bertani (LB) and B1 mediums

培养基	化学式 (g/L)			
	NaCl	多价胺	酵母粉	牛肉膏
LB	10.0	10.0	5.0	/
B1	3.0	5.0	/	3.0

1 实验

1.1 细菌菌株及其培养条件

本研究中使用的细菌菌株为枯草杆菌 (*Bacillus subtilis* IAM 1069)、大肠杆菌 (*Escherichia coli* K12)

收稿日期: 2005 - 03 - 21; 修回日期: 2005 - 05 - 18

作者简介: 段继周 (1972 -), 男, 山东临清人, 博士后, 主要研究方向为海洋微生物腐蚀与生物材料, 电话: 0532 - 2898731, E - mail: duanjz2002@yahoo.com.cn

1.2 硝酸银溶液及含银不锈钢实验材料

首先用 Milli-Q 超纯水配制 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 Ag^+ (以 AgNO_3 配置) 溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 低温闭光保存。实验时, 按照逐级稀释方法将其稀释到期望的浓度, 加入到各培养基中。

使用普通的(无银添加的)、银合金和含银涂层的 SUS304 不锈钢试片 (20 mm \times 20 mm \times 2 mm) (分别以 PS, SA 和 SC 表示) 开展含银不锈钢的抗菌性实验。试验前, 试片用 75% 的酒精消毒灭菌; 试验后, 用 99% 的乙醇溶液超声清洗 5 min。

1.3 银离子及含银不锈钢抗菌性的测定

最小抑菌浓度 (MIC) 测定: 细菌经 12~15 h 过夜培养, 经离心后重新悬浮在 LB 或 B1 溶液中, 经逐级稀释后使最后菌体浓度为 10^6 CFU/mL, 然后将 AgNO_3 溶液作为杀菌剂加入到培养基中, 使最后的表观 Ag^+ 质量浓度为 1, 2, 4, 6... mg/L。然后将培养管置于 37 $^\circ\text{C}$ 的摇床中培养 24 h。定时观察和测量培养基的混浊程度, 明显可见的混浊是细菌快速生长的特征。24 h 后, 没有使培养基混浊的最小浓度, 被认为是该条件下的最小抑菌浓度。

最小杀菌浓度 (MBC) 测定: 最小杀菌浓度指在 48 h 内, 能使最初菌体浓度降低 99.9% 以上的最小杀菌剂浓度。在最小抑菌浓度实验基础上, 对于 24 h 后没有出现混浊的试管, 取 0.5 mL 样品将其涂布在 LB 琼脂固体培养基上, 使用常规菌落形成单位(CFU) 方法计算 24 h 后的活菌数, 确定 MBC。

杀菌时间曲线和存活率的测定: 确定最小杀菌浓度后, 进一步研究 Ag^+ 对大肠杆菌的杀菌活性。在接种有 10^6 CFU/mL 大肠杆菌的 LB 培养基中, 加入定量的 AgNO_3 (MBC 质量浓度), 每隔 30min 取样一次, 使用常规 CFU 法对活菌进行计数, 计算活菌浓度和细菌存活率。

含银不锈钢对单层生物膜的抗菌性测定: 先将 PS, SA 和 SC 试片置于含 10^7 CFU/mL 假单胞菌的磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 1L 水溶液中含有 NaCl 8.0 g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.44 g) 中, 在 120 r/min 条件下浸泡 1 h, 经 PBS 冲洗后, 将试片浸入静止的灭菌 PBS 盐溶液中, 于 28 $^\circ\text{C}$ 下保持不同的时间取出, 经 CFDA-DAPI 双染色^[6]后, 通过荧光显微镜观察活菌和总菌的数量, 计算附着在不同试片表面的

细菌存活率。

2 结果与讨论

2.1 银离子的杀菌活性特征

表 2 列出了 3 种细菌暴露于不同质量浓度 Ag^+ (以 AgNO_3 形式) 中 24 h 后的浊度变化情况。由表看出, Ag^+ 对枯草杆菌、大肠杆菌和假单胞菌三种细菌的 MIC 分别为 2, 6 和 8 mg/L。可以看到, 大肠杆菌和假单胞菌的 MIC 明显高于枯草杆菌。一个合理的解释是前两者作为革兰氏阴性菌, 具有相对较厚的外层细胞膜, 能够在一定程度上阻止银离子的渗透, 因而呈现较高的 MIC 值。

表 3 列出了经不同质量浓度的 Ag^+ 处理 24 h 后, 3 种细菌在 LB 琼脂固体培养基上形成的菌落数。

表 2 3 种细菌暴露在不同表观 Ag^+ 浓度 24 h 后的浊度变化

Tab.2 The turbidity of three kinds of bacteria exposed to different concentration of silver ion for 24 h (10^6 CFU/mL initial inoculum size) ($\mu\text{g/mL}$)

Ag ⁺ 质量浓度(mg/L)	混浊度		
	枯草杆菌	大肠杆菌	假单胞菌
1	+	/	/
2	-	+	+
4	-	+	+
6	-	-	+
8	-	-	-

注: - : 不混浊; + : 混浊

表 3 3 种细菌经不同 Ag^+ 浓度处理 24 h 后并在 LB 琼脂固体培养基上培养 48h 后的形成菌落数

Tab.3 The number of colonies of three kinds of bacteria incubation in LB agar for 48h after exposed to different silver ion concentration for 24h

Ag ⁺ 质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	菌落数		
	枯草杆菌	大肠杆菌	假单胞菌
2	2	/	/
4	0	/	/
6	0	许多	/
8	/	16	许多
10	/	0	78
12	/	0	10

注: - : 不混浊; + : 混浊

图 1 是大肠杆菌在不同浓度 Ag^+ 作用后形成的菌落照片。当表观 Ag^+ 质量浓度达到 8 mg/L 时, 99.9% 以上的细菌不能形成菌落。因此, Ag^+ 对枯草杆菌、

大肠杆菌和假单胞菌三种细菌的 MBC 分别为 2, 8

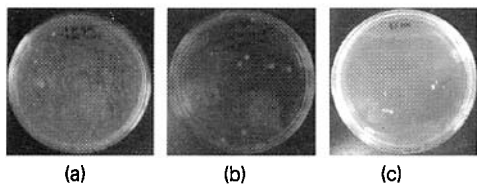


图1 大肠杆菌经不同 Ag^+ 质量浓度作用 24 h 并在含相同 Ag^+ 浓度 LB 琼脂固体培养基上培养 48 h 后形成的菌落照片 (0.5 mL 接种体积)

Fig.1 Photo of Colonies of *E. coli* K12 on LB agar incubated for 48h after exposed to different concentration of silver ion for 24 h (0.5 mL inoculum volume)

(a): 6 $\mu\text{g/mL}$ (b) :8 $\mu\text{g/mL}$ (c):10 $\mu\text{g/mL}$

和 10 mg/L。

图 2 是大肠杆菌在暴露于其 MBC 质量浓度 (8 mg/L) 时, 大肠杆菌的存活数和存活率随时间的变化。由该杀菌曲线看出, 银离子对大肠杆菌能够产生迅速的杀灭作用, 能够导致细菌存活率的迅速降低。在初始的 2 h 内, 大肠杆菌的存活率下降 99.9% 以上, 这说明银离子能够与细菌快速作用, 导致细菌的受伤和死亡。最近的研究表明, Ag^+ 能够穿过细菌细胞膜, 与含巯基的蛋白质发生络合, 导致蛋白失活^[4]。

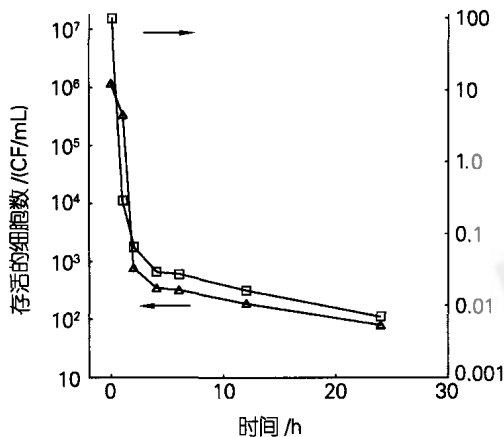


图 2 大肠杆菌接种在 Ag^+ 质量浓度为 8 mg/L (最小杀菌浓度) 的 LB 培养基中时其存活数和存活率随时间的变化 (初始接种浓度为 10^6 CFU/mL)

Fig. 2 The time course of viable cells and the viability of *E. coli* K12 after exposed to LB with 8 $\mu\text{g/mL}$ silver ion (MBC) (10^6 CFU/mL initial inoculum size)

2.2 含银不锈钢的抗菌活性特征

在含 10^7 CFU/mL 假单胞菌的 PBS 盐溶液中浸

泡 1 h 后, 假单胞菌在不锈钢表面形成单层生物膜。在 3 种不锈钢表面的附着密度约为 10^6 cells/cm², 含银不锈钢对细菌的初始附着没有显著影响。

图 3 是附着在 3 种不锈钢表面上的假单胞菌其存活率随时间的变化。存活率通过计算活菌数 (CFDA 染色, 蓝光激发下, 细菌发出绿光) 和总菌数 (DAPI 染色, 紫外激发下, 细菌发出蓝光) 之比获得。

图 3 看出, 在接种 3 d 后, 在细菌附着密度平均为 10^6 个/cm² 时, 附着在 PS, SA 和 SC 上的假单胞菌的平均存活率约为 97.0%, 38.5% 和 15.1%。在 SC 试片的局部区域, 能够发现只有 1.5% 的细菌是活菌 (图 4)。

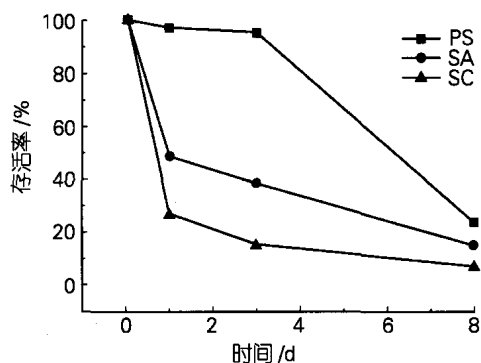


图 3 附着在 3 种不锈钢表面上的假单胞菌其存活率随时间的变化

Fig.3 The viability of *P. aeruginosa* PAO1 adhering to three kinds of stainless steels with time course

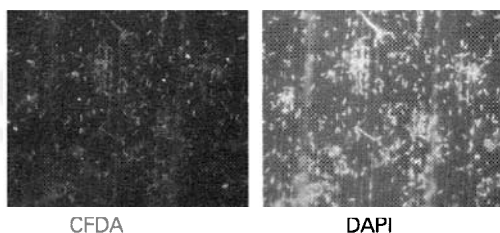


图 4 在 PBS 盐溶液中浸泡 3 d 并经 CFDA-DAPI 联合染色后附着在 SC 不锈钢上的假单胞菌的活菌和总菌的荧光显微镜照片

Fig. 4 Epifluorescence photos of *P. aeruginosa* PAO1 adhered to SC stainless steel stained by CFDA-DAPI after exposed to PBS for 3 d (Bars=10 μm)

因此, 含银不锈钢对附着其上的细菌具有较强的杀菌作用。这种杀菌作用也主要是通过释放 Ag^+ 而起作用的, 但实验证实 (未给出) 银离子的释出并不是一个快速的过程。含银不锈钢对细菌生物膜的杀菌模

式和机理尚需进一步的实验研究。

3 结论

通过对银离子和含银不锈钢的抗菌性的初步研究, 得出结论如下:

银离子具有很强的快速杀菌性, 银离子对枯草杆菌、大肠杆菌和假单胞菌的最小抑制浓度和最小杀菌浓度分别为 2, 6, 8 mg/L 和 2, 8, 10 mg/L。含银不锈钢对单层细菌生物膜也表现出较强的杀菌性。其作用机理需要做进一步研究。CFDA-DAPI 双染色荧光直接计数方法能够有效分辨活菌和死菌, 是一种有推广使用价值的方法。

参考文献:

[1] Mackeen P C, Person S, Warner S C, *et al.* Silver-coated nylon fiber as an antibacterial agent [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31: 93-99.

[2] Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, *et al.* Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method [J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 393-398.

[3] Kikuchi Y. Antibacterial stainless steels [J]. *Thermal treatment (in Japanese)*, 2003, 43: 79-86.

[4] Liao S Y, Read D C, Pugh W J, *et al.* Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups — relationship to the antibacterial action of silver ions [J]. *Lett Appl Microbio*, 1997, 25: 279-283.

[5] Gupta A, Matsui K, LO J.F, *et al.* Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella* [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 183-188.

[6] Morono Y, Takano S, Miyayama K, *et al.* Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26: 379-383.

Antibacterial property of silver ions and silver-containing stainless steels

DUAN Ji-zhou¹, Yasunori Tanji², HOU Bao-rong³, Atsushi Nishikata⁴, Tooru Tsuru⁴

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Department of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8501, Japan; 3. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. Department of Metallurgy and Ceramics Science, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152-8552, Japan)

Received: Mar., 21, 2005

Key words: antibacterial property; silver ion; silver-containing stainless steels

Abstract: It is well known that silver has good antiseptic properties and has been used widely in medical treatment. In the research, antibacterial property of silver ion and silver-containing stainless steel were studied to develop silver-additive antibacterial stainless steels application. The results showed at inoculum size of 10^6 CFU/mL, the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of silver ion were 2, 6, 8 and 2, 8, 10 μ g/mL to *Bacillus subtilis* IAM 1069, *Escherichia coli* K12 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, respectively. Viable bacteria of *Escherichia coli* K12 was lower than 0.01 % after exposed to 8 μ g/mL silver ion concentration for 2 h. The survival of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on the surfaces of regular stells, silver-alloyed and silver-coated stainless steels were in average level of 98.0%, 38.5% and 15.1% after being exposed to PBS for 3 days, respectively, revealed by direct epifluorescence enumeration method and double stained technology of CFDA and DAPI.

(本文编辑: 刘珊珊)