

抗菌金属材料抗菌性能检测方法研究

叶德萍, 周李华, 王 智, 马丽侠, 谭和平

(中国测试技术研究院, 四川 成都 610021)

摘 要: 为建立检测抗菌金属材料的抗菌性能的方法。分别用 ASTM E2149-13a 法和 ISO 22196—2011 法对抗菌金属的抗菌性能和适用性进行比对研究, 得出这两种方法都不太适合抗菌金属材料的抗菌性能检测。提出适宜于抗菌金属及其制品的抗菌性能检测方法: 采用贴膜法, 抗菌金属材料与菌液的作用时间为 2 h。经实验证明: 该方法重复性好、再现性佳, 3 种不同抗菌剂处理的金属材料抗菌率, 其重复性分别为 5.5%、5.6% 和 2.5%, 同种抗菌剂处理的金属材料抗菌率的再现性为 5.5%, 说明该方法能应用于抗菌金属及相关材料抗菌性能检测。

关键词: 抗菌性能; 金属; 检测方法; 抗菌材料

文献标志码: A **文章编号:** 1674-5124(2016)05-0066-04

Study on detection method of antibacterial properties of antibacterial metallic materials

YE Deping, ZHOU Lihua, WANG Zhi, MA Lixia, TAN Heping

(National Institute of Measurement and Testing Technology, Chengdu 610021, China)

Abstract: The purpose of this paper is to design a detection method for antibacterial properties of antibacterial metallic materials. The antibacterial properties were detected and the applicability thereof was comparatively studied with both the ASTM E2149-13a and ISO 22196—2011 methods. The outcome suggests that the two methods were unsuitable for testing the antibacterial properties of antibacterial metallic materials. Then, a scientific and reasonable detection method was put forward. First, the antibacterial metallic materials and bacterial liquid were mixed with the sticking membrane method to react for 2 hours. It is proved from the test results that this method is stable and highly reproductive. The repeatability of the antibacterial rates of metallic materials treated by three different kinds of antibacterial agents is 5.5%, 5.6% and 2.5% respectively. The reproducibility of the same kind of antibacterial agent is 5.5%. It suggests that the proposed method can be used to detect the antibacterial properties of antibacterial metal and related materials.

Keywords: antibacterial property; metal; detection method; antibacterial materials

收稿日期: 2016-02-03; 收到修改稿日期: 2016-03-13

基金项目: 2015 国家科技支撑计划项目

(2015BAK45B00, 2015BAK45B01)

作者简介: 叶德萍 (1983-), 女, 四川盐源县人, 助理研究员, 主要从事微生物研究。

通讯作者: 谭和平 (1957-), 男, 重庆市人, 研究员, 享受国务院政府津贴专家, 主要从事生物化学研究。

0 引 言

随着社会生活资料的不断丰富, 人居环境的安全性及材料的抗菌功能日益受到重视; 因此, 新一代兼有抗菌性能的产品应运而生, 在日常家具、厨具及卫生用品方面展示出广阔的市场前景^[1]。抗菌材料是指那些具有抑菌和杀菌性能的功能材料, 与普通材料相比, 抗菌产品具有卫生自洁功能, 可免去许多清洁工

作,能有效避免细菌传播,减少交叉感染,对改善人们生活质量,保护健康具有重要意义^[2]。

当前对于“抗菌材料”概念的过度炒作让产品真假难辨,产品是否使用抗菌材料无从判断,技术指标无法统一,技术质量监督和管理很困难,消费者的合法权益难以得到保障,对抗菌制品存在信任危机。所谓的抗菌材料是否真正具有抗菌效果,抗菌性能究竟如何?建立一种抗菌材料的抗菌性能检测方法尤为重要。一方面可以规范市场,提升产品品质,另一方面则防止消费者掉入宣传的套路中^[3]。

我国虽有 SN/T 2399—2010《抗菌金属材料评价方法》^[4],但该标准内容完全参照 JIS Z 2801—2000《抗菌测试标准》^[5]进行,JIS Z 2801—2000 只有纺织品和塑料的抗菌性能检测方法。

本研究选择可用于抗菌金属抗菌性能检测的标准 ASTM E2149-13a^[6]和 ISO 22196—2011^[7]进行复现,在此基础上研究建立实验室方法,并对该方法进行方法学考察,得出适合抗菌金属材料的抗菌性能检测方法。

1 材料及方法

1.1 试剂、材料和菌株

营养肉汤、平板计数琼脂培养基(购自北京陆桥技术有限公司);缓冲液(0.3 mmol/L KH_2PO_4 ,自制);覆盖膜(聚乙烯薄膜,标准尺寸为 $(40\pm 2)\text{mm}\times(40\pm 2)\text{mm}$ 、厚度为0.05~0.10 mm,用 70%乙醇溶液浸泡 1 min,再用无菌水冲洗,自然干燥);菌种(大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*, ATCC 25922)。

1.2 仪器和设备

培养箱(上海智诚 ZSD-1270);高压蒸汽灭菌器(日本 Tomy ES-315);紫外分光光度计(日本岛津 UV-1700);漩涡振荡仪(厦门 XW-80A);水浴锅(上海精宏 DK-8B)。

1.3 菌种活化与菌悬液制备

将 *E.coli* 保藏菌转接到营养琼脂培养基平板上,在 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 24 h,后每天转接 1 次,不超过 2 周。试验时应采用连续转接 2 次后的新鲜细菌培养物(24 h 内转接的)。

用接种环从营养琼脂培养基平板上取少量(刮 1~2 环)新鲜细菌,加入营养肉汤中培养 18 h,菌液用磷酸盐缓冲液稀释,直至菌液在 475 nm 的吸光度为 0.28 ± 0.02 ;菌液再用磷酸盐缓冲液稀释 1 000 倍,作为工作菌悬液。

1.4 样 品

金属片:分别采用表面经过抗菌处理(抗菌样

品)和未经抗菌处理(对照样)的直径 5 cm 圆形金属片。

1.5 抗菌性能检测

1.5.1 ASTM E2149-13a

分别将抗菌表面积约为 25.8 cm^2 的抗菌金属样品和对照金属样品,切割成表面积 0.5 cm^2 的小片,放入 250 mL 灭菌三角烧瓶中,每个烧瓶加入 $(50\pm 0.5)\text{mL}$ 工作菌悬液。并在另一个空三角烧瓶中加入 $(50\pm 0.5)\text{mL}$ 菌悬液作为菌液空白对照,立即对空白对照的菌液作梯度稀释并利用平板计数法对菌的含量计数,稀释过程不能超过 5 min。

将 3 个三角烧瓶放入恒温振荡器,用最大的震荡速度震荡 $(60\pm 5)\text{min}$,立即对每瓶菌液梯度稀释至 1 000 倍,并用平板计数法对每个梯度做菌落计数,每个梯度做 3 个平行, $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h。选择 30~300 菌落数的平板进行计数,3 个平行菌落数的平均数乘以稀释倍数即为每毫升菌液的菌数。

1.5.2 ISO 22196—2011

用平板计数法对工作菌悬液计数并作为菌液空白,同时分别取菌悬液 0.2 mL 滴加在对照金属片和抗菌金属片上,对照金属片做 6 个平行,每种抗菌金属片样品做 3 个平行,用灭菌镊子夹起灭菌覆盖膜分别覆盖在对照金属片和抗菌金属片上,确保铺平,使菌均匀接触样品,且菌液不要超过覆盖膜边缘。立即回收 3 个对照金属片上的菌,用 20 mL 磷酸缓冲液反复冲洗(最好用镊子夹起薄膜冲洗)并收集液体,将收集液充分摇匀后,作梯度稀释,取适宜稀释的液体倾注平板计数琼脂,在 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养 24 h 后菌落计数,作为对照样 0 h 的菌落数。将剩余的 3 片对照金属片和抗菌金属片小心置于灭菌平皿中,在 $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度大于 90%条件下培养,培养 24 h。培养完成后取出培养样品,采用相同方法冲洗金属片及覆盖膜并对收集液做菌落计数。

1.5.3 本文改进方法

同 1.5.2,对照金属片做 9 个平行,0,1,2 h 的各培养 3 个并作菌落计数;每种抗菌金属片样品做 6 个平行,3 个培养 1 h,3 个培养 2 h 并作菌落计数。

2 试验结果及分析

ASTM E2149-13a 方法的抗菌性能检测结果见表 1,将抗菌金属片做了各种抗菌处理,但是几乎没有抗菌效果,虽然该方法提出可用于表面有抗菌剂的固体(如金属片,塑料,玻璃,芯片,或类似坚硬表面的材质),但从本研究看来该方法不适合抗菌金属片的检测。

ISO 22196—2011 法的抗菌性能检测结果见

表 1 ASTM E2149-13a 法的抗菌性能检测结果¹⁾

试验次数	样品	菌落数/(CFU·mL ⁻¹)		抗菌率	备注
		0 h 接触时间	1 h 接触时间		
1	菌液空白	97 000	97 000	—	
	对照样	97 000	136 000	—	抗菌处理 1 法
	抗菌样	97 000	126 000	0	
2	菌液空白	135 000	145 000	—	抗菌处理 2 法
	对照样	135 000	141 000	—	
	抗菌样	135 000	150 000	0	
3	菌液空白	350 000	280 000	—	
	对照样	350 000	320 000	—	
	抗菌样 1	350 000	350 000	0	抗菌处理 3 法
	抗菌样 2	350 000	380 000	0	抗菌处理 4 法
4	菌液空白	182 000	161 000	—	
	对照样	182 000	175 000	—	
	抗菌样 1	182 000	177 000	0	抗菌处理 5 法
	抗菌样 2	182 000	190 000	0	抗菌处理 6 法
	抗菌样 3	182 000	167 000	0	抗菌处理 7 法

注:1)抗菌率=(对照样菌落数-抗菌样菌落数)/抗菌样菌落数。

表 2,样品在培养了 24 h 后,菌液基本干了,因此洗脱液培养后都无菌落生长,只有对照样-3 有 9CFU,乘以稀释倍数 20,计算出该金属片上的菌为 180CFU,而其他金属片则是<20 CFU。基于此在金属片下垫一个无菌的材料作支撑,再在培养皿上滴 5 mL 灭菌水,以保持平皿内的湿度,培养 24 h,此时金属片与覆盖膜之间的菌液未干,洗脱后作菌落计数,结果见表 3,培养 24 h 后从金属片和覆盖膜上洗脱下来的菌太多,有些甚至无法计数,说明平皿内湿度太高,又造成了菌的迅速增殖。

表 2 ISO 22196——2011 法的抗菌性能检测结果¹⁾

样品	菌落数/(CFU/每片样品)		抗菌率	备注
	0 h 接触时间	24 h 接触时间		
菌液空白	210 000	—	—	
对照样-1	161 000	<20	—	
对照样-2	158 000	<20	—	
对照样-3	191 000	180	—	
抗菌样 1-1	—	<20	—	
抗菌样 1-2	—	<20	—	抗菌处理 3 法
抗菌样 1-3	—	<20	—	
抗菌样 2-1	—	<20	—	
抗菌样 2-2	—	<20	—	抗菌处理 4 法
抗菌样 2-3	—	<20	—	

注:1)抗菌率计算同表 1。

表 3 ISO 22196——2011 法的抗菌性能检测结果
(装金属片的平皿内滴加灭菌水)¹⁾

样品	菌落数/(CFU/每片样品)		抗菌率	备注
	0 h 接触时间	24 h 接触时间		
菌液空白	170 000	—	—	
对照理样-1	161 000	多不可计	—	
对照理样-2	158 000	多不可计	—	
对照理样-3	191 000	多不可计	—	
抗菌样 1-1	—	15 430 000	—	
抗菌样 1-2	—	多不可计	—	抗菌处理 3 法
抗菌样 1-3	—	966 000	—	
抗菌样 2-1	—	552 500	—	
抗菌样 2-2	—	627 000	—	抗菌处理 4 法
抗菌样 2-3	—	<20	—	

注:1) 抗菌率=(24 h 对照样菌落数平均数-抗菌样菌落数)/对照样菌落平均数。

表 4 本文改进方法的抗菌性能检测结果¹⁾

试验次数	样品	菌落数/(CFU/每片样品)			抗菌率/%		备注
		0 h 接触时间	1 h 接触时间	2 h 接触时间	1 h 接触时间	2 h 接触时间	
1	菌液空白	18 900	—	—	—	—	—
	对照样	14 700	15 000	3 000	—	—	—
	抗菌样	—	10 500	1 670	30	44	抗菌处理 1 法
2	菌液空白	40 600	—	—	—	—	—
	对照样	38 700	21 600	7 800	—	—	—
	抗菌样 1	—	18 300	4 280	15	45	抗菌处理 3 法
	抗菌样 2	—	11 500	2 250	47	71	抗菌处理 4 法
3	菌液空白	155 000	—	—	—	—	—
	对照样	119 000	156 000	31 000	—	—	—
	抗菌样	—	106 000	12 000	32	61	抗菌处理 4 法
4	菌液空白	199 000	—	—	—	—	—
	对照样	148 000	117 000	81 000	—	—	—
	抗菌样	—	69 200	33 000	41	59	抗菌处理 4 法

注:1)抗菌率=(1 h 或 2 h 对照样菌落数-抗菌样菌落数)/对照样菌落平均数。

由于 ISO 22196——2011 法培养需要 24 h, 要保证洗脱的回收率(对照样 0 h 的菌落数与菌液空白菌落数的百分比不能低于 75%, 对照样品接触 24 h 后的菌落计数应不低于 0 h 菌落计数的 1/100)和菌液培养 24 h 不干, 试验的难度很大。基于此, 将培养时间从 24 h 缩短到了 1 h 和 2 h, 考察短时作用下抗菌金属片的抗菌效果; 若短时作用下, 抗菌金属片仍能达到很好的抗菌效果, 则说明该金属片的抗菌性能很好, 而且也减少了试验的难度, 增加了试验的准确性。由表 4 可以看出, 处理样随着处理时间改为 1~2 h, 抗菌效果有提高。对照样在 1 h 时, 菌落数下降不明显, 有些还有略微上升, 这是因为菌有一定程度的增殖现象, 而在 2 h 时菌落数下降很明显, 可能是随着时间的增长, 水分蒸发, 细菌的死亡速度超过了增殖速度。

微生物在相同的条件其生长情况都有可能不同, 为满足试验的重复性和再现性, 每个样品至少要做 3 个以上平行, 每个数据的相对偏差不能大于 15%。本研究中每个样品(对照和抗菌样)都做了 3 个平行, 包括每种接触时间都分别做了 3 个平行, 但 ISO 22196——2011 法的重复性都不好, 只有本文改进的方法满足要求, 1 h 的抗菌率相对偏差为 7.4%、5.5% 和 6.0%; 2 h 抗菌率相对偏差为 5.5%、5.6% 和 2.5%; 因此对抗菌效果最好的一种处理方法的抗菌材料做了再现性试验。3 次独立的试验, 1 h 的抗菌率分别为 47%、32% 和 41%, 相对偏差 7.55%, 未超过 15%; 2 h 的抗菌率分别为 71%、61% 和 59%, 相对偏差 5.48% 也未超过 15%, 说明同种抗菌剂处理的金属材料抗菌率的再现性为 5.5%。

由上可知, 培养 2 h 比 1 h 的抗菌率高, 基本能达到 70%, 而且 2 h 时菌液也未干, 因此将 2 h 作为抗菌金属抗菌性能检测之反应时间(即作用时间), 既能达到客观评价抗菌制品的抗菌功能的目的, 又能节省大量时间。解学魁^[8]的研究也证明很多抗菌制

品在与菌作用 2 h 后抑菌率不再随着作用时间的延长而明显增加, 如果延长作用时间, 抑菌率虽可能有一定的提高, 但却大大增加了实验时间, 同时也为实验的质量控制提高了难度。

3 结束语

ASTM E2149-13a 将抗菌金属片做了各种抗菌处理, 但是几乎没有抗菌效果, 虽然该标准提出可用于表面有抗菌剂的固体(如金属片, 塑料, 玻璃, 芯片, 或类似有坚硬表面的材质)检测, 但从本研究看来该方法不适合抗菌金属片, 而本文改进方法相比 ISO 22196——2011 法时间缩短至 2 h, 但抗菌率达到 60%~70%。说明本文改进方法更适合用于抗菌金属片的抗菌性能检测。

参考文献

- [1] 季君晖, 史维明. 抗菌材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 46-60.
- [2] 刘秀英, 吕斌, 郭红莲, 等. 我国抗菌产品性能检测标准体系现状[J]. 中国人造板, 2009(8): 27-30.
- [3] 张晓, 鲁建国, 刘皓男. 家电产品抗菌、除菌检测方法综述[C]//2012 年中国家用电器技术大会集, 2012: 621-623.
- [4] 抗菌金属材料评价方法: SN/T 2399—2010[S]. 北京: 中国质检出版社, 2010.
- [5] Antimicrobial Products—Test for Antimicrobial Activity and Efficacy: JIS Z 2801—2000[S]. 2000.
- [6] Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions: ASTM E2149-13a[S]. West Conshohocken: ASTM International, 2010.
- [7] Plastics—Measurement of antibacterial activity on plastics surfaces: ISO 22196—2011(E)[S]. 2011.
- [8] 抗菌制品的抑菌效果检测方法研究[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(7): 634-635.

(编辑: 莫婕)