

纳米银材料抗菌效果研究及其安全性初步评价

钟金栋, 夏雪山, 张若愚, 高毅颖

(昆明理工大学 生物与化学工程学院, 云南 昆明 650224)

摘要: 为了确定纳米银材料的抗菌效果及其使用安全性, 进行了纳米银材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌杀灭实验效果的观察, 并通过小鼠急性毒性实验和家兔皮肤刺激性实验以评价其使用安全性. 结果表明, 在 37°C , 大于 $5.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的表面涂布纳米银材料或大于 $100\text{mg}/\text{L}$ 的纳米银载体浸泡悬液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用 1h 抑制率均大于 95%; 纳米级银材料对小鼠经口灌喂 $5000\text{mg}/\text{kg}$ 时, 小鼠安全, 对兔皮肤刺激性积分为 0, 属于实际无毒级. 纳米银材料具有高效抗菌活性并且使用安全.

关键词: 银; 纳米; 抗菌材料; 生物安全性

中图分类号: Q93 - 334 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007 - 855X(2005)05 - 0091 - 03

Study on Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles and Its Biological Safety Evaluation

ZHONG Jin-dong, XIA Xue-shan, ZHANG Ruo-yu, GAO Yu-ying

(Faculty of Biological and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: To determine the anti-bacterial efficacy of silver nanoparticles, the inhibition effect of the silver nanoparticles on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* are researched. The tests of oral toxicity on mice and skin stimulation on rabbit are conducted to evaluate the safety of silver nanoparticles. The results show that more than 95% bacteria are inactivated when *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* are incubated at 37°C for one hour in the culture dish coated with $5.7\mu\text{g}/\text{cm}^2$ silver nanoparticles material, or in the solution containing $100\text{mg}/\text{L}$ silver nanoparticles material. When the oral dose of this material for mice is $5000\text{mg}/\text{kg}$, and its stimulating score on the rabbit skin is zero, which suggests its safety. The silver nanoparticles has high antibacterial efficacy and biological safety as a new type of material.

Key words: silver; nanoparticles; antibacterial material; biological safety

0 引言

随着对微生物的研究和认识水平的不断提高,人们在利用微生物有益性的同时,也十分警惕其作为病原菌的危害性.在已发现的 3 万多种细菌中,有相当大部分为病原性细菌.民用产品的消毒抗菌化,生活环境的洁净化是人类健康的基本保障.银作为一种最常用的无机抗菌剂,具有高效、安全、抗菌谱广等优点,而被广泛应用于抗菌和防霉制品中^[1].用纳米技术所制得的纳米无机抗菌剂,由于量子效应、小尺寸效应和极大的比表面积,具有常规抗菌剂无法比拟的抗菌效果,同时安全性高,效力持久^[2,3].纳米银的抗菌性能远远大于传统的银系杀菌剂^[4].我们用化学液相还原法制得的纳米银,并进行了纳米银和载银硅藻土对禽流感病毒(弱毒株)的灭活作用实验,经材料处理前后病毒悬液血凝效价和对鸡胚致死力的测定结果比较,发现此纳米银对禽流感病毒有较强的灭活作用^[5,6].研究进行了纳米银材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀灭作用实验以确定其抗菌活性,并通过小鼠口服急性毒性实验和白兔皮肤刺激性实验评价其使用安全性.

收稿日期: 2004 - 11 - 05. 基金项目: 昆明理工大学博士科研启动基金 (项目编号: 14051059).

第一作者简介: 钟金栋 (1982. 1 ~), 男, 在读硕士研究生. 主要研究方向: 微生物工程. E - mail: jindongzhong@shou.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

纳米银材料,由昆明理工大学生物与化学工程学院化工实验室制备,经透射电镜(TEM)和X射线衍射(XRD)鉴定,其粒径为5~88 nm.

大肠杆菌(*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),标准菌株,由云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室提供.

清洁级昆明小鼠体重 20 ± 2 g,26只,雌雄各半;普通级新西兰白兔4只,体重 2 ± 0.2 kg,雌雄各半.由昆明医学院实验动物中心提供.

1.2 实验方法

1.2.1 材料固体表面涂布杀菌实验

不同质量的纳米银材料涂布于60 mm培养皿的表面,并作相应处理使其牢固结合,在其上加入0.5 mL密度为 5×10^7 CFU/mL的菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)悬液,使菌悬液覆盖材料涂布表面,并设未用材料涂布的阴性对照.37 °C恒温箱静置处理1 h后,移出菌液,采用梯度稀释平板菌落计数法,计算活菌数.根据处理与否活菌数差异,计算出材料的杀菌率.

1.2.2 材料液体浸泡杀菌实验

取不同质量的纳米银材料,用PBS将其制备成悬液,加入灭菌三角锥形瓶,再加入菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)悬液使终密度为 5×10^7 CFU/mL,同时设不加材料的阴性对照.在37 °C,150 rpm的摇床处理1 h后,采用梯度稀释平板菌落计数法计算菌悬液中活菌数.根据处理与否菌悬液活菌数的差异,计算出材料的杀菌率.

1.2.3 口服急性毒性实验

26只健康昆明小鼠,体重 20 ± 2 g在动物房环境中适应3天,实验前禁食(不限制饮水)16 h用PBS制成0.5 g/mL,0.2 g/mL的纳米银悬液,按0.1 mL/10 g(体重)计算灌喂剂量,采用一次经口灌胃后,继续禁食3 h,再恢复正常供水、供食.两种材料剂量灌喂小鼠的数量均为10只,雌雄各半;同时设仅灌喂无材料PBS的空白对照组6只,于两周内观察动物的中毒症状和死亡情况.

1.2.4 急性皮肤刺激实验

将约2 kg重的新西兰大耳白兔背部脊柱两侧被毛剪掉,不损伤表皮,去毛范围约3 cm \times 6 cm.用PBS将纳米级银材料分别制成1 000 mg/mL和100 mg/mL的悬液,取0.1 mL纳米银材料悬液滴在2.5 cm \times 2.5 cm大小的4层纱布上,马上敷贴在白兔一侧的去毛皮肤上,再用无刺激性胶布加以固定.另一侧敷

表1 皮肤刺激强度积分

Tab 1 Skin stimulation score

红斑形成	积分	水肿形成	积分
无红斑	0	无水肿	0
勉强可见	1	勉强可见	1
明显红斑	2	皮肤隆起轮廓清楚	2
中等~严重红斑	3	水肿隆起约1 mm	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4	水肿隆起超过1 mm,范围扩大	4

用PBS作为对照.敷用24 h后用温水除去残留物,于实验后1 h,24 h和48 h观察涂抹部位皮肤反应,按表1进行皮肤刺激反应积分,积分低于0.4为无刺激性.同一质量浓度的纳米银悬液处理实验设一重复.

2 实验结果

2.1 材料固体表面涂布杀菌实验

纳米银材料表面涂布杀菌实验结果如表2所示,该材料在较低的表面涂布量的情况下表现出较好的杀菌效果.大于0.16 mg的纳米银材料涂布于直径为60 mm培养皿上,37 °C恒温箱作用1 h,其抑菌率均大于95%,即 $5.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的纳米银材料1 h对 5×10^7 CFU的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制率均大于95%.

2.2 材料液体浸泡杀菌实验

将纳米银材料制备成悬液,在大于 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液中,材料在1 h内可以很好地将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(5×10^7 CFU/mL)杀灭,其杀菌率均大于95%.随着材料悬液浓度的降低,其杀菌率也逐渐降低, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的纳米银材料处理大肠杆菌1 h,杀菌率为41.66%,该浓度对金黄色葡萄球菌的杀菌率为80.33%.

2.3 口服急性毒性实验

根据一次性灌胃最大安全剂量的原则, 本实验一次性灌胃纳米银材料剂量 5 000 mg/kg, 并且用 2 000 mg/kg 剂量为一验证。一次性经口灌喂小鼠 10 只, 7 d 内无一只死亡或中毒, 饲料消耗量及体重不断增加, 外观、行为、精神状态、大、小便及其颜色、背毛、肤色、呼吸均正常, 鼻、眼、口腔无异样分泌物。经 t 检验和卡方检验, 此二剂量组与对照组 6 只间的体重等各项指标比较无显著差异 $P > 0.05$, 证明该纳米银材料口服无毒。

2.4 急性皮肤刺激实验

白兔去毛皮肤分别用 0.1 mL 浓度为 1 000 mg/mL 和 100 mg/mL 的纳米银悬液, 处理 24 h 后, 在不同时间观察, 未发现处理部位有红斑和水肿反应, 与对照部位皮肤比较无异常。纳米银材料对兔皮肤一次性刺激积分为 0, 即该材料对皮肤无刺激性。

3 讨论

在以前的研究中, 已证明用化学液相还原法所制得的纳米银材料, 对禽流感病毒有较好的杀灭作用^[5-6]。为了进一步确定此材料的抗菌效果, 选用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为受试菌, 材料固体表面涂布杀菌实验和液体浸泡杀菌实验结果均表明, 此材料在很低的浓度下即表现出较好的杀菌效果。大肠杆菌为革兰氏阴性 (G^-) 细菌, 而金黄色葡萄球菌为 G^+ 细菌。研究证明此具有杀病毒活性的纳米银材料对 G^- 和 G^+ 细菌均有较高的杀菌活性, 提示此材料可能具有广谱杀菌活性。

纳米银材料作为抗菌剂有很多的优点, 由于其粒径小, 表面积大, 容易跟病原微生物发生密切接触, 从而发挥其更大的生物效应, 因而一般比同类常规无机抗菌材料有更强的抗菌活性^[7], 但纳米银材料在不加保护剂的常规条件下, 容易发生颗粒聚集而失去纳米特性, 或被氧化为棕色的氧化银, 这些都会影响该材料的抗菌效果。我们的研究也发现, 新鲜制备的纳米银材料比经过放置的该种材料抗菌活性要高的多。因而, 此无机抗菌剂的生物稳定性研究, 以及以多孔材料为基质的载银复合材料制备工艺研究尤为重要^[11]。

由于长期使用的结果, 一般被认为使用银是安全的。欧美国家研究认为银也有确定的安全用量, 超过这个用量就会发生中毒^[8]。另外, 纳米银材料与普通银材料相比, 其物理、化学性质均发生了很大变化, 所以对其使用安全性更需进行重新评价。通过小鼠急性毒性实验和家兔皮肤刺激性实验证实了该材料的使用安全性, 为此种同时具有杀毒、抗菌作用的无机材料的进一步开发奠定了基础。

4 结论

通过纳米银材料的抗菌实验和安全性实验表明:

- 1) 通过材料固体表面涂布实验表明, 在 37℃, 大于 5.7 μg/cm² 的纳米银材料作用 1 h 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制率均大于 95%。通过载体浸泡实验, 在大于 100 mg/L 的溶液中, 纳米银材料 1 h 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑制率均大于 95%。
- 2) 通过安全性实验表明, 纳米级银材料对小鼠经口灌喂剂量 2 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 时, 小鼠安全, 对兔皮肤刺激性积分为 0, 属于实际无毒级。
- 3) 纳米银材料具有高效抗菌活性, 同时使用安全。

致谢 研究得到昆明理工大学陈朝银教授, 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室张念祖研究员、赵文华、宋建领等同志的帮助, 在此表示衷心感谢。

(下转第 98 页)

表 2 不同表面涂布浓度纳米银材料的抗菌效果 (抑制率 /%)
Tab 2 Antibacterial Efficacy of silver nanoparticles coated on culture dish (inhibition rate /%)

	纳米银材料表面涂布浓度 /mg · (28.26 cm ²) ⁻¹					
	200	20	4	0.8	0.16	0.032
大肠杆菌	100	99.66	99.79	98.77	96.76	89.36
金黄色葡萄球菌	100	96.69	97.50	95.00	95.87	79.17

注: 实验温度为 37℃, 作用时间为 1 h, 以上质量的纳米银材料固定在直径为 60 mm 的培养皿上。

表 3 纳米银材料液体浸泡抗菌效果 (抑制率 /%)
Tab 3 Antibacterial efficacy of silver nanoparticles in solution (inhibition rate /%)

	液体中材料浓度 /μg · mL ⁻¹			
	170	100	10	1
大肠杆菌	100	98.71	63.64	41.66
金黄色葡萄球菌	100	96.65	83.94	80.30

注: 实验温度为 37℃, 作用时间为 1 h, 菌体浓度为 5 × 10⁷ CFU/mL。

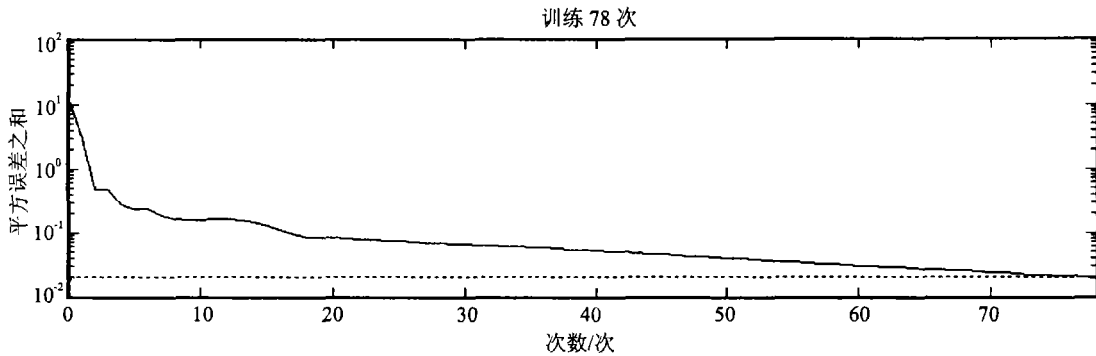


图5 受伤人数网络误差及训练次数

Fig.5 Injury number network error and training number

从结果可以看出,将改进的快速BP网络用于交通事故预测是可行的,且预测精度较高。

4 结论

将道路交通事故的发生作为一时间序列事件,撇开了城市道路事故形成的复杂原因,具有宏观指导性;将道路交通事故作为递推式预测,适用于近期预测,如果用于长期预测,由于累计误差的原因,预测结果将不理想。因此如果学习实例越多,或增加新的学习实例更新网络记忆的知识,时间预测模型获得的知识将会越可靠,预测精度将会越高。

表1 网络预测与实际相对误差

Tab 1 Network forecast and actual relative error

月份	数据值	交通事故数	死亡人数	受伤人数
2002年 10月	预测值	546	29	167
	实际值	551	30	163
2002年 11月	预测值	613	45	198
	实际值	607	43	194
2002年 12月	预测值	465	27	169
	实际值	472	25	174
平均误差 / %		1.13	3.9	2.46

参考文献:

- [1] 中国公路学会编委会. 交通工程手册 [M]. 北京: 人民交通出版社, 1998
- [2] 周维新. 交通事故灰色预测模型的研究 [J]. 西安公路交通大学学报, 2000, 20(2): 73~74
- [3] 尹朝庆, 尹皓. 人工智能与专家系统 [M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2002 296~328
- [4] 吴晓莉, 林哲辉. MATLAB辅助模糊系统设计 [M]. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2002 125~170
- [5] 袁曾任. 人工神经网络及其应用 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1999. 66~78
- [6] 阎平凡, 张长水. 人工神经网络与模拟进化计算 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2000. 23~26
- [7] 闻新, 等. MATLAB神经网络应用设计 [M]. 北京: 科学出版社, 2002 207~232
- [8] 郑黎黎, 丁同强, 成卫. 高速公路交通事件管理智能决策支持系统 [J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2004, 29(6): 118~121.

(上接第93页)

参考文献:

- [1] 余国文, 张高科, 胡波. 金属系无机抗菌材料研究进展 [J]. 工业安全与环境, 2004, 30(4): 34~36
- [2] Volker Alt, Thorsten Bechert, Peter Steinucke, et al. An in vitro Assessment of the Antibacterial Properties and Cytotoxicity of Nanoparticulate Silver Bone Cement [J]. Biomaterials, 2004, 25: 4383~4391.
- [3] Hyung - Jun Jeon, Sung - Chul Yi, Seong - Geun Oh, et al. Preparation and Antibacterial Effects of Ag - SiO₂ Thin Films by Sol - gel Method [J]. Biomaterials, 2003, 24: 4921~4928
- [4] 张文钰, 王广文. 纳米银抗菌材料研发现状 [J]. 化工新型材料, 2003, 31(2): 42~44
- [5] 张若愚, 夏雪山, 胡亮, 等. Ag/Diatomite复合材料及其对禽流感病毒的杀灭研究 [J]. 贵金属, 2004, 25(2): 28~32
- [6] ZHANG Ruo-yu, XIA Xue-shan, HU Liang, et al. The Study on the Character of Diatomite Carrying Argent and Its Inactivation of AIV [C]. The 18th Iupac International Conference on Chemical Thermodynamics and the 12th National Conference on Chemical Thermodynamics and Thermal Analysis, 2004. 17~21.
- [7] 夏金兰, 王春, 刘新星. 抗菌剂及抗菌机理 [J]. 中南大学学报, 2004, 35(1): 31~38
- [8] 王小建, 乔学亮, 陈建国, 等. 无机抗菌材料的研究现状及发展趋势 [J]. 陶瓷学报, 2003, 24(4): 239~244.