

纳米银对多重耐药菌的抑菌效果研究

邓中华,熊艺灿,谭超超,陈杰,王璐,曹友德

湖南省人民医院/湖南师范大学附属第一医院,湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 探讨纳米银对多重耐药菌的抑菌效果。 **方法** 制备金黄色葡萄球菌的标准菌株和耐甲氧西林菌株,大肠埃希菌的标准菌株和产 ESBLs 菌株悬液并与终浓度 80、100、120、140 mg/L 四个浓度纳米银溶液混合处理,分别于处理前和处理后 10、20、30、40 min 取混合菌液培养,计数菌悬液菌落数,分析纳米银不同浓度,不同处理时间对四种菌株的抑菌率。比较纳米银溶液对不同种细菌之间,同种耐药菌株和标准菌株之间的抑菌率差别,分析纳米银的抑菌效果。 **结果** 纳米银溶液浓度 120 mg/L 时,作用 30 min 就能完全抑制 0.5 麦氏浊度的所有大肠埃希菌标准菌株和产 ESBLs 菌株,而完全抑制 0.5 麦氏浊度的金黄色葡萄球菌标准菌株和耐甲氧西林菌株需要纳米银溶液浓度 120 mg/L 作用 40 min 或 140 mg/L 作用 30 min。120 mg/L 浓度纳米银处理 20 min 对大肠埃希菌标准株的抑菌率为 $(72.42 \pm 5.50)\%$,高于对金黄色葡萄球菌标准株的抑菌率 $(55.67 \pm 7.62)\%$,差异有统计学意义($t=5.64, P=0.000$)。纳米银对产 ESBLs 大肠埃希菌菌株的抑菌率为 $(71.51 \pm 5.56)\%$,高于对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株的抑菌率 $(53.78 \pm 5.90)\%$,差异有统计学意义($t=6.91, P=0.000$)。纳米银抑菌率在大肠埃希菌标准菌株和产 ESBLs 菌株之间,金黄色葡萄球菌标准菌株和耐甲氧西林菌株之间差异无统计学意义($P>0.05$)。 **结论** 纳米银对革兰氏阴性杆菌的抑菌能力高于革兰氏阳性球菌,而对同种菌的耐药和敏感菌株的抑菌能力无明显性差异。

关键词: 纳米银;多重耐药菌;抑菌效果

中图分类号:R187 **文献标识码:**B **文章编号:**1006-3110(2020)07-0881-04 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2020.07.033

近年来,随着抗生素越来越广泛且不规范使用,多重耐药菌乃至泛耐药菌越来越多。为减少细菌耐药性的出现,寻找新的抗菌物质已成为抗感染研究的热点。纳米银是一类新型抗菌剂,具有强大的抑菌作用和广谱的抗菌效果,是传统抗菌剂无法比拟的,因此它是有发展前景的新一代抗菌物质。纳米银是粒径在 1~100 nm 之间的纳米级别银单质,具有显著表面效应、量子隧道效应和量子尺寸效应^[1],有文献报道^[2]纳米银抗菌的有效浓度在纳摩尔水平,其抑菌效果是普通银离子的数千倍。纳米银研究至今,已在临床上多方面使用,如纳米银抗菌凝胶、纳米银敷料、纳米银心血管支架、纳米银骨水泥等,纳米银材料还广泛应用于外科、妇产科等临床各个领域^[3],但有关于纳米银详细抑菌效果参数目前国内外鲜有文献报道。本研究从纳米银溶液的稀释效应、抑菌浓度、抑菌效果时间,对不同细菌抑菌效率等多方面探讨纳米银的抑菌效果,现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

基金项目:湖南省人民医院仁术基金项目

作者简介:邓中华(1986-),男,湖南郴州人,在读博士,主管技师,主要从事病毒感染研究工作。

通信作者:曹友德,E-mail:youde120@aliyun.com。

1.1 材料与试剂 金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC29213)、大肠埃希菌标准菌株(ATCC25922);耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株、产 ESBLs 大肠埃希菌菌株由湖南省人民医院检验科提供。纳米银胶体溶液由上海宇瑞化学有限公司提供;革兰氏阴性杆菌鉴定卡,革兰氏阴性杆菌药敏卡,革兰氏阳性球菌鉴定卡,革兰氏阳性球菌药敏卡购于法国生物梅里埃公司;哥伦比亚血琼脂培养基由贝瑞特生物技术有限公司提供。

1.2 仪器与设备 GH-5009C 隔水式恒温培养箱为北京市永光明医疗仪器有限公司生产;VITEK2 compact全自动微生物分析系统由法国生物梅里埃公司提供;7DR-Z200 细菌浊度仪由湖南省长沙天地人生物有限公司提供;Shimadzu UV-1601 spectrophotometer 为日本津岛有限公司生产;722N 可见分光光度计由上海仪电科学仪器股份有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 纳米银表征的测定

1.3.1.1 纳米银透射电镜观察 取一滴纳米银胶体溶液滴于超薄碳膜上自然干燥后透射电镜观察。

1.3.1.2 纳米银紫外吸收光谱测定 取纳米银溶液原液 300 μ l 加入 96 孔反应板中的三孔中,置于 Shimadzu UV-1601 spectrophotometer 仪器载架,设置从 300~600 nm 每 10 个波长检测程序进行测定。

1.3.1.3 纳米银溶液稀释线性检测 取纳米银溶液原液若干,将其进行一系列的对倍稀释,浓度梯度为百万分之 2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 八个梯度。根据前期得到的紫外吸收光谱,选取在最大吸收峰处的波长,用可见分光光度计读取吸光度,根据测量值作线性回归曲线,观察纳米银溶液稀释是否呈线性。

1.3.2 菌株复苏以及鉴定 四种菌株解冻后接种于血琼脂平板,36℃培养 24 h。灭菌水配制细菌悬液浓度(0.5±0.05)麦氏浊度,按照 Vitek2 compact 仪器革兰阳性菌鉴定以及药敏和革兰阴性菌鉴定及药敏要求标准步骤进行细菌鉴定和药敏分析。

1.3.3 纳米银抑菌的最佳浓度的确定 取四种试验菌 36℃、24 h 血琼脂平板培养基新鲜培养物,用灭菌水配置 0.5 麦氏浊度菌液 4 ml,菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数。纳米银溶液用灭菌水分别按照 400、500、600、700 mg/L 梯度浓度稀释。取各菌株悬液 4 ml 分别与上述五个浓度的 1 ml 纳米银胶体溶液混合,混合后纳米银胶体溶液抑菌终浓度为分别为 80、100、120、140 mg/L,放置摇床上室温暗处理 30 min。菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数。计算抑菌率,计算公式如下:抑菌率=(抑菌前活菌数-1.25×抑菌终止后活菌数)/抑菌前活菌数×100%。

1.3.4 纳米银抑菌的最佳时间的确定 取四种试验菌 36℃、24 h 血琼脂平板培养基新鲜培养物,用灭菌水配置 0.5 麦氏浊度菌液 4 ml,菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数。取各菌株悬液 4 ml 与 600 mg/L 浓度的纳米银溶液 1 ml 混匀后置摇床上室温暗处理,分别于处理 10、20、30、40 min 四个时间点各取菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数和抑菌率。

1.3.5 纳米银对不同细菌抑菌效率比较 取四种实验菌株新鲜培养物,灭菌水配制 0.5 麦氏浊度菌液 4 ml,菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数。取各菌株悬液 4 ml 与 600 mg/L 浓度的纳米银溶液 1 ml 混匀后置摇床上室温暗处理 20 min 后菌液稀释 106 倍后取 1 μl 接种于血琼脂培养平板上,36℃培养 24 h,计数菌落数和抑菌率。每个菌株重复 10 次。分别比较金黄色葡萄球菌标准菌株与大肠埃希菌标准菌株之间的抑菌率,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株与产 ESBLs 大肠

埃希菌菌株之间的抑菌率,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株与金黄色葡萄球菌标准菌株之间抑菌率,产 ESBLs 大肠埃希菌菌株与大肠埃希菌标准菌株之间抑菌率的差异。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件包数据处理,各菌株纳米银直接抑菌率采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,各菌株之间纳米银直接抑菌率的比较采用独立样本的 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米银表征 由图 1 可见本实验所用的纳米银形状为球形,其粒径约在 15~20 nm 之间,各粒子之间无聚集,分散良好。由图 2 可见本实验所用的纳米银纯度高,吸收峰在 400 nm 附近,其吸收峰与文献报道的纳米银在 400 nm 附近存在的特征吸收峰相吻合^[4];由图 3 可知,线性回归系数接近于 1,纳米银溶液倍比稀释后呈线性分布,表明本实验所需浓度的纳米银溶液可以采用原液用灭菌水直接进行稀释。

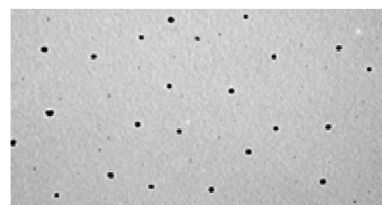


图 1 纳米银透射电镜图(×10 000)

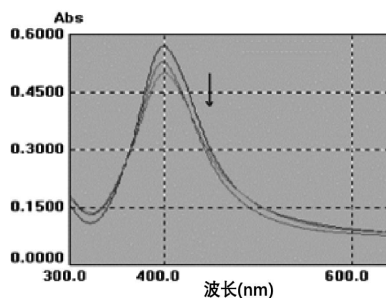


图 2 纳米银紫外吸收光谱图

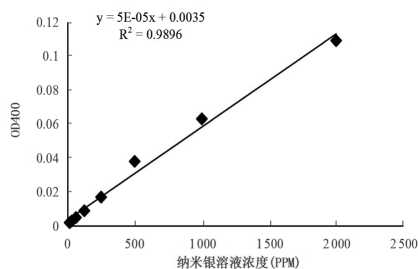


图 3 纳米银溶液倍比稀释线性分析

2.2 耐药菌株鉴定与药敏验证 Vitek2 compact 全自动微生物分析系统对实验菌株进行菌种及药敏鉴定结果显示,本实验所用菌株分别为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株和产 ESBLs 大肠埃希菌菌株。

2.3 不同浓度纳米银溶液抑菌效果分析 作用 30 min 的情况下,随着纳米银浓度的增加,四种菌株的抑菌率逐渐增高,纳米银溶液 120 mg/L 就能完全抑制 0.5 麦氏浊度的所有大肠埃希菌标准菌株和产 ESBLs

菌株;而 140 mg/L 的纳米银溶液才能在 30 min 抑制 0.5 麦氏浊度的所有金黄色葡萄球菌的标准菌株和耐甲氧西林菌株,见表 1。

表 1 不同浓度纳米银胶体溶液作用下抑菌率($n, \%$)

菌种	0 mg/L	80 mg/L	100 mg/L	120 mg/L	140 mg/L
大肠埃希菌标准菌株	0.00(0/114)	29.82(34/114)	71.93(82/114)	100.00(114/114)	100.00(114/114)
产 ESBLs 大肠埃希菌菌株	0.00(0/115)	26.96(31/115)	73.91(85/115)	100.00(115/115)	100.00(115/115)
金黄色葡萄球菌标准菌株	0.00(0/112)	16.96(19/112)	58.03(65/112)	94.64(106/112)	100.00(112/112)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株	0.00(0/116)	12.93(15/116)	58.62(68/116)	87.07(101/116)	100.00(116/116)

2.4 纳米银溶液不同抑菌时间分析 纳米银溶液浓度为 120 mg/L 时,随着作用时间的增加,纳米银的抑菌率逐渐增加。纳米银作用 30 min 可以抑制 0.5 麦氏浊度的大肠埃希菌标准菌株和产 ESBLs 菌株的所

有细菌;纳米银作用 40 min 才能抑制 0.5 麦氏浊度的金黄色葡萄球菌标准菌株和耐甲氧西林菌株的所有细菌,见表 2。

表 2 纳米银溶液作用不同时间下抑菌率($n, \%$)

菌种	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
大肠埃希菌标准菌株	0.00(0/114)	52.63(60/114)	71.93(82/114)	100.00(114/114)	100.00(114/114)
产 ESBLs 大肠埃希菌菌株	0.00(0/115)	48.70(56/115)	73.91(85/115)	100.00(115/115)	100.00(115/115)
金黄色葡萄球菌标准菌株	0.00(0/112)	21.43(24/112)	58.04(65/112)	94.64(106/112)	100.00(112/112)
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株	0.00(0/116)	18.97(22/116)	58.62(68/116)	87.07(101/116)	100.00(116/116)

2.5 纳米银对不同细菌抑菌效果比较 纳米银浓度为 120 mg/L,处理时间为 20 min 时,纳米银对大肠埃希菌标准株的抑菌率高于对金黄色葡萄球菌标准株的抑菌率,差异有统计学意义($t=5.64, P=0.000$)。纳米银对产 ESBLs 大肠埃希菌菌株的抑菌率高于对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株的抑菌率,差异有统计学意义($t=6.91, P=0.000$)。说明同等情况下,纳米银对大肠埃希菌的抑菌效能高于对金黄色葡萄球菌的抑菌效能。纳米银对大肠埃希菌标准株抑菌率和产 ESBLs 大肠埃希菌菌株的抑菌率比较差异无统计学意义($t=0.37, P=0.715$)。纳米银对金黄色葡萄球菌标准菌株抑菌率和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株的抑菌率比较差异无统计学意义($t=0.618, P=0.545$),说明同等情况下,纳米银对耐药菌和非耐药菌的抑菌效能无显著差异,见表 3。

表 3 纳米银对不同细菌抑菌率($\%, \bar{x} \pm s$)

菌株	实验次数(n)	抑菌率($\%, \bar{x} \pm s$)
大肠埃希菌标准株	10	72.42 \pm 5.50
产 ESBLs 大肠杆菌菌株	10	71.51 \pm 5.56
金黄色葡萄球菌标准菌株	10	55.67 \pm 7.62
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株	10	53.78 \pm 5.90

多重耐药菌的出现导致临床细菌感染的治疗变得越来越困难,很多感染多重耐药菌的患者面临无药可用的状况,传统的抗菌药物已经不能满足临床耐药菌感染治疗的需要,新型抗菌机制的探索 and 新型抗菌药物及材料的研发已经刻不容缓^[5-6]。纳米银是一类新型抗菌剂,具有传统抗菌剂无法比拟的强大的抑菌作用和广谱的抗菌效果,是很有发展前景的新一代抗菌物质。纳米银抑菌能力极高,极低剂量的纳米银就可产生强大的抑菌能力。本研究中,140 mg/L 浓度的纳米银就能在 30 min 内完全抑制 0.5 麦氏浊度的细菌。纳米银的抑菌速度也非常的快,本研究结果亦是如此,120 mg/L 的纳米银溶液仅需 40 min 的时间就能完全抑制 0.5 麦氏浊度的细菌。纳米银的强大抑菌能力与其粒径微小从而导致表面积大密切相关。纳米银通过与微生物细胞膜中带负电荷的磷酸基团结合,摧毁细胞膜,并绑定到病原体带负电荷的巯基、羧基,使一些基团的酶失去效果,从而达到抑制细菌的作用。纳米银还可以引起局部表面等离子的共振,达到吸附和破坏病原体细胞膜小颗粒蛋白及核酸等物质的作用导致细胞死亡的功能,其抑菌效率高于银离子千倍^[2]。纳米银的抑菌作用在不同细菌各有不同,本研究结果显示纳米银对革兰氏阴性菌的抑菌能力要远大于革兰氏阳性细菌,但纳米银对于同一菌种的标准菌株和耐