

甲壳素纤维织品体外抗细菌和癣菌活性的研究

钟晓芝¹, 夏肖萍², 严杰² (1. 温州医学院绣山校区病原生物学和免疫学教研室, 浙江 温州 325003; 2. 浙江大学医学院病原生物学教研室, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 观察甲壳素含量不同的针织布体外抑制或杀灭细菌或癣菌的作用。方法 采用不同细菌或癣菌接种量($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ / mL), 用体外抑菌试验和杀菌试验检测 100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素针织布和 10%甲壳素针织布对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌的抗菌作用, 实验中以普通全棉布作为对照。结果 作为对照的普通全棉布对上述细菌或癣菌无任何抑制作用。与普通全棉布比较, 100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素针织布和 10%甲壳素针织布对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌的抑制率[抑制率 = (每毫升 CFU 值 - 每毫升接种量) / 每毫升 CFU 值 \times %] 分别高于普通全棉布的 99.8% ~ 99.9%、85.2% ~ 89.6% 和 74.2% ~ 85.8%, 表明随甲壳素纤维含量逐渐增高, 抑菌作用逐渐增强($\chi^2 \geq 18.25$, $P < 0.01$)。所有甲壳素纤维织品均未发现有体外杀菌活性。结论 受试的甲壳素纤维织品无体外杀菌活性, 但均有一定的体外抑制细菌或癣菌作用, 以 100%甲壳素纤维无纺布抑制作用最强, 20%甲壳素针织布次之, 10%甲壳素针织布较弱。

关键词: 甲壳素/纤维; 抑菌试验; 杀菌试验

中图分类号: R282.74 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)01-0016-04

作者简介: 本实验在浙江大学医学院病原生物学教研室完成

Studies of activity against bacteria and dermatophytes of textiles containing different concentrations of chitin *in vitro*

ZHONG Xiaozhi¹, XIA Xiaoping², YAN Jie² (1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Xiushan Campus, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325003, China; 2. Department of Pathogen Biology, College of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To observe the effects of textiles with different concentrations of chitin to inhibit or kill bacteria and dermatophytes *in vitro*. **METHOD** The assays for inhibiting or killing bacteria and dermatophytes under the different bacterial inoculation dosages in media ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ /mL) *in vitro* were applied to determine the effects against *S. aureus*, *E. coli*, *T. rubrum*, *T. violaceum* and *T. mentagrophyte* of the textiles containing 100%, 20% and 10% of chitin respectively. Common whole-cotton textile was used as a negative control in this study. **RESULTS** The common whole-cotton textile did not show any the activities against the tested bacteria and dermatophytes. In comparison with common whole-cotton textile, the inhibition percentages (inhibition percentage = CFU value per milliliter inoculation dosage per milliliter/CFU value per milliliter \times %) against *S. aureus*, *E. coli*, *T. rubrum*, *T. violaceum* and *T. mentagrophyte* of textiles containing 100%, 20% and 10% of chitin were 99.8% ~ 99.9%, 85.2% ~ 89.6% and 74.2% ~ 85.8%, respectively. This result indicated that the effects of inhibiting bacteria or dermatophytes of the chitin-contented textiles were increased corresponding to the chitin concentrations ($\chi^2 \geq 18.25$, $P < 0.01$). No killing bacterium or dermatophyte activities of the tested textiles could be found. **CONCLUSION** All the tested chitin-contented textiles have no the activities of killing bacteria and dermatophytes *in vitro*. According to the results of the assays inhibiting bacteria and dermatophytes *in vitro*, the textile with the strongest inhibiting activity was that containing 100% of chitin, and then the textile containing 20% of chitin, and the textile containing 10% of chitin was the lowest.

KEY WORDS: chitin/fiber; bacterium inhibiting assay; bacterium killing assay

甲壳素(chitin)为1,4糖苷键连接的聚2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖,是一种广泛存在于昆虫、甲壳纲动物(虾、蟹等)外壳及真菌细胞壁中的天然高分子聚合物。甲壳素具有广泛的生物学活性,如抗肿瘤、促进伤口愈合和伤口渗出物吸收等^[1,2]。近年有文献报告甲壳素还有一定的抗菌作用^[3,4]。甲壳素不能直接溶于水^[5],故一些厂商将甲壳素加工成纤维,并按一定比例与棉花纤维混纺成布料。甲壳素纤维及含甲壳素纤维的布料有无抗菌活性目前尚无确切的文献报道。本实验采用体外抑菌试验和杀菌试验测定了甲壳素纤维及含甲壳素纤维布料的抗菌活性。

1 材料与方法

1.1 含甲壳素纤维织品

100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素和10%甲壳素纤维针织布由浙江省舟山市定海海山生物制品有限公司提供,市售普通全棉布作为对照。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌 ATCC25923 株(不产 β -内酰胺酶)、大肠杆菌 ATCC25922 株、红色毛癣菌 6186 株、紫色毛癣菌 5963 株、石膏状毛癣菌 6061 株均由浙江大学医学院病原生物学教研室提供。

1.3 菌株培养

采用牛肉汤培养基培养金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,接种后 37℃培养 24h。采用沙保培养基培养红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌,接种后 26℃培养 7d。

1.4 含甲壳素纤维织品的预处理

将上述各种布料剪碎,蒸馏水煮洗三次,121℃高压蒸气灭菌 15 min,烘干后备用^[6]。

1.5 体外抗菌试验

1.5.1 不同细菌接种量时各种织品的抑菌试验 采用麦氏比浊法将上述各种细菌和癣菌新鲜培养物用灭菌生理盐水分别制备成 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 和 1×10^3 /mL 的悬液。将灭菌的牛肉汤培养基和沙保培养基分别分装试管,每支试管 2 mL。无菌条件下每支试管中加入已灭菌 80 mg (约等于 20%甲壳素纤维织品 1 cm²) 的 100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素纤维针织布、10%甲壳素纤维针织布或普通全棉布料,再分别加入上述细菌或癣菌悬液 0.2 mL,使试管中细菌或癣菌的终浓度分别为 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 和 1×10^2 /mL。细菌 37℃培养 24 h,癣菌 26℃培养 7 d。实验中设置仅分别接种等体积各浓度上述细菌或癣菌悬液的正常对照。以培养基澄清透明、肉眼观察无细菌或癣菌生长的最高细菌或癣菌浓度为该种织品的最高抑菌活性;有细菌或癣菌生长的试管表现为培养基的浑浊或有细小生长团块。本实验重复三次。

1.5.2 不同重量各种织品的抑菌试验 采用麦氏比浊法将上述各种细菌和癣菌新鲜培养物用灭菌生理盐水分别制备成 1×10^7 /mL 和 1×10^4 /mL 的悬液。将灭菌的牛肉汤培养基和沙保培养基分别装入试管,每支试管 2 mL。无菌条件下每支试管中分别加入已灭菌 160, 80, 40, 20, 10, 5 和 2.5 mg 的 100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素纤维针织布、10%甲壳素纤维针织布或普通全棉布料,再分别加入上述细菌或癣

菌悬液 0.2 mL,使试管中细菌或癣菌的终浓度分别为 1×10^6 /mL 和 1×10^3 /mL。培养条件、对照设置、结果判断标准同上。

1.5.3 杀菌试验 分别取接种量均为 1×10^6 /mL 细菌或癣菌试管中的培养物用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,各取 0.05 mL 涂布于普通琼脂平板或沙保琼脂平板上,细菌 37℃ 培养 24h,癣菌 26℃ 培养 7d 后计数菌落。

2 结果

2.1 不同细菌接种量时各种织品的抑菌效果

各正常对照均有明显的细菌或癣菌生长。100%甲壳素无纺布(80mg)能抑制各接种量的所有受试细菌和癣菌;20%甲壳素针织布(80mg)能抑制 $\leq 1 \times 10^5$ /mL 的金黄色葡萄球菌、 1×10^2 /mL 的大肠杆菌或紫色毛癣菌,对红色毛癣菌和石膏状毛癣菌无抑制作用;10%甲壳素针织布(80mg)能抑制 $\leq 1 \times 10^3$ /mL 的金黄色葡萄球菌,但不能抑制大肠杆菌及所有受试的癣菌;普通全棉布对所有受试细菌和癣菌均无抑制作用。三次重复实验的结果均相同。

表 1 各种含甲壳素纤维织品或普通全棉布的体外杀菌效果

Tab 1 The effects of textiles with different concentrations of chitin or common whole-cotton textile to kill bacteria and dermatophytes *in vitro*

织品	菌种	接种菌量 ($\times 10^6$ /mL)	菌落计数 ($\times 10^6$ CFU/mL)
100%甲壳素无纺布	金黄色葡萄球菌	1	4
20%甲壳素针织布		1	1198
10%甲壳素针织布		1	1452
普通全棉布		1	10240
100%甲壳素无纺布	大肠杆菌	1	13
20%甲壳素针织布		1	1728
10%甲壳素针织布		1	1984
普通全棉布		1	12544
100%甲壳素无纺布	红色毛癣菌	1	2
20%甲壳素针织布		1	228
10%甲壳素针织布		1	362
普通全棉布		1	1860
100%甲壳素无纺布	紫色毛癣菌	1	3
20%甲壳素针织布		1	284
10%甲壳素针织布		1	708
普通全棉布		1	2742
100%甲壳素无纺布	石膏状毛癣菌	1	4
20%甲壳素针织布		1	460
10%甲壳素针织布		1	586
普通全棉布		1	3106

2.2 不同重量各种织品的抑菌试验效果

各正常对照均有明显的细菌或癣菌生长。细菌或癣菌的接种量分别为 1×10^6 /mL 和 1×10^3 /mL 时,100%甲壳素无纺布抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌的最低重量分别为 10 和 5,40 和 40,80 和 80,80 和 40,80 和 40 mg;20%甲壳素针织布抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最低重量分别为 40 和 40,160 和 160 mg,但对受试癣菌无抑制作用;10%甲壳素针织布抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的最低重量分别为 80 和 40,160 和

160 mg,但不能抑制受试癣菌的生长;普通全棉布对所有受试的细菌或癣菌均无抑制作用。

2.3 体外杀菌试验

接种 1×10^6 /mL 细菌或癣菌的各种含甲壳素纤维织品或普通全棉布的体外杀菌试验结果见表 1。

3 讨论

本实验中,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别为革兰阳性菌和革兰阴性菌,前者常引起疖、痈和毛囊炎等皮肤感染,后者是最为常见的泌尿道感染病原菌;引起人癣病前三位的病原菌分别为红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌^[4];故选择上述细菌和癣菌作为受试菌具有较好的代表性。

体外抑菌试验结果表明,在细菌或癣菌接种量分别为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ /mL 时,100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素针织布和 10%甲壳素针织布能分别抑制 1×10^6 、 1×10^5 和 1×10^3 /mL 的金黄色葡萄球菌以及 1×10^6 、 1×10^2 和 1×10^2 /mL 大肠杆菌,作为对照的普通全棉布对上述细菌无任何抑制作用。100%甲壳素纤维无纺布抑制红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌的活性均为 1×10^6 /mL,20%甲壳素针织布仅能抑制 1×10^2 /mL 的紫色毛癣菌,但对其余两种癣菌无抑制作用;10%甲壳素针织布及作为对照的普通全棉布对所有受试的癣菌无抑制作用。因此,100%甲壳素纤维无纺布抑制细菌或癣菌作用最强,20%甲壳素针织布次之,10%甲壳素针织布较弱,提示此类织品的抗菌活性随其甲壳素含量升高而增强。

不同重量各种织品的抑菌试验结果表明,80 mg 的 100%甲壳素无纺布能抑制所有受试细菌或癣菌的生长,其中抑制金黄色葡萄球菌的最低重量仅为 5 mg;160 mg 的 20%甲壳素针织布或 10%甲壳素针织布抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长,但对受试癣菌无明显抑制作用;160 mg 的普通全棉布对所有受试的细菌或癣菌均无抑制作用;此结果也提示抗菌活性与甲壳素量呈正比。

从表 1 可见,细菌或癣菌的接种量为 1×10^6 /mL 时,100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素针织布和 10%甲壳素针织布不能杀灭所有受试的细菌或癣菌,表现为 CFU/mL 值均大于原接种量。由于抑菌试验中肉眼未见细菌生长的试管经培养后均出现菌落,表明纯甲壳素纤维无纺布及所有含甲壳素纤维织品无杀菌作用,但能明显抑制细菌生长,表现为抑菌试验中的 CFU/mL 值均明显低于普通全棉布。本实验中,100%甲壳素纤维无纺布、20%甲壳素针织布和 10%甲壳素针织布对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、红色毛癣菌、紫色毛癣菌和石膏状毛癣菌的抑制率[抑制率 = (每毫升 CFU 值-每毫升接种量)/每毫升 CFU 值 \times %]分别高于普通全棉布的 99.8%~99.9%、85.2%~89.6% 和 74.2%~85.8%,表明随甲壳素纤维含量逐渐增高,抑菌作用逐渐增强($\chi^2 \geq 18.25$, $P < 0.01$)。

我们在实验中发现,无菌生长的 100%甲壳素纤维无纺布试管中培养基 pH 值从 7.2~7.4 升至 8.0~8.5,如此高的 pH 值不利于细菌或癣菌的生长,这可能与其抑菌机制有

关。此外,无菌生长的 20 %甲壳素针织布试管中培养基 pH 则为 7.0 ~ 7.5,提示甲壳素尚存在其它体外抑菌机制,如游离氨基的作用等^[4]。

参考文献

- [1] Klokkevold PR, Fukayama H, Sung EC, *et al*. The effect of chitosan (poly- N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 57(1) : 49 .
- [2] Cho YW, Cho Yn, Chung SH, *et al*. Water-soluble chitin as a

wound healing accelerator[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(22) : 2139 .

- [3] 蒋玉燕,毕忆群,汪子伟,等. 聚氨基葡萄糖的体外抗菌活性 [J]. *中国抗生素杂志*, 1996, 21(1) :54 .
- [4] Tsai GJ, Su WH. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Eschichia coli*[J]. *J food Prot*, 1999, 62(3) :239 .
- [5] 王爱勤,阎志宏,贾宝全,等. 羧甲基壳聚糖的制备与质量分析 [J]. *中国生化药物杂志*, 1996, 17(4) :147 .
- [6] 魏凌珍,孙美芳,王取南,等. 甲壳素医用敷料的毒理学研究 [J]. *中国公共卫生杂志*, 1999, 15(6) :469 .

收稿日期:2002-02-07