

海洋生物活素消毒液杀菌作用 与安全性的检测

王淑琳^{1*}, 权力敏², 曲 奕³

- (1. 青岛市肿瘤医院, 山东 青岛 266042;
2. 青岛市疾病预防控制中心, 山东 青岛 266033;
3. 青岛大学, 山东 青岛 266001)

慈华牌海洋生物活素消毒液是选择天然抗菌活性物质海洋生物复合酶、海藻酸聚多糖、海洋甲壳胺活素为主要抗菌成分, 经特殊工艺制备而成的。将合成液稀释成 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的使用液 (pH8.06)。在实验室条件下, 对该使用液的理化性能、杀灭微生物效果、毒性进行了实验。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 慈华牌海洋生物活素消毒液 由青岛慈华高分子生物技术研究所研制生产, 所含有效成分海洋生物复合酶、海藻酸聚多糖、海洋甲壳胺活素为主要抗菌成分, 其含量分别为 $600, 800, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 合成液浓度为 25%, 将合成液用重蒸溜水稀释成 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为使用液^[6]。

1.2 菌片的制备 试验菌为金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、

大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC 10231)。用磷酸盐缓冲液(PBS)将其 24 h 新鲜培养物洗下, 制成菌悬液, 染于脱脂的无菌布片上, 干燥, 制成含菌量为 $5 \times 10^5 \sim 10^6 \text{ cfu/片}$ 的菌片^[6]。

1.3 中和剂鉴定试验 试验指示菌为金黄色葡萄球菌、白色念珠菌。试验设平行 8 组。结果判定, 以第 1 组不长菌或有少量菌生长且少于第 2 组, 第 2 组菌数 $> 50 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$; 第 3 4 5 组间菌数相差不超过 15% 且在规定范围; 第 6 7 8 组不长菌; 试验重复 3 次结果一致, 表明所选中中和剂及浓度适宜^[6]。

1.4 载体浸泡定量杀菌试验 按每片 5.0 mL 的量, 吸取相应浓度的生物活素注入无菌平皿中。置 $(20 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴箱内 5 min 后, 分别放入预先制备的菌片 3 片。作用至预定时间, 取出菌片, 分别移入到盛有 5.0 mL 中和剂溶液的试管中振荡混匀试管 80 次, 取 1.0 mL 接种无菌平皿, 倾注普通营养琼脂培养基(白色念珠菌用沙堡葡萄糖琼脂), 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温箱培养 48 h 计数平板菌落数, 试验重复 3 次(包括对照); 计算平均杀灭率。判定结果以平均杀灭率大于 99.9% 为消毒合格^[6]。

1.5 毒性试验 按卫生部《消毒技术规范》2002 年版 消毒产品毒性试验检验技术规范进行

1.5.1 急性经口毒性试验 选体重为 $(20 \sim 22) \text{ g}$ 的昆明种一级小鼠 20 只, 体重 $20 \sim 22 \text{ g}$, 雌、雄各半, 剂量设计为 $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$, 给药前禁食过夜, 按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$ 一次经口灌胃试验剂量给药液后观察 14 d, 记录小鼠各种反应症状、体重和死亡情况^[6]。

1.5.2 蓄积毒性试验 取体重为 $(180 \sim 200) \text{ g}$ 的昆明种一级大鼠 20 只, 雌、雄各半。按体重计算染毒剂量, 按不超过 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重为最大剂量, 用经口灌胃方式给药, 在 24 h 内分成 2~3 次给药, 其总剂量作为一日剂量计算, 以后每 24 h 递增 1.5 倍剂量, 直至 28 d, 染毒后观察动物的中毒表现和死亡

[收稿日期] 2007-02-27

[通讯作者] * 王淑琳, Tel: (0532) 84962565; E-mail: wblin@163.com

数及死亡时间, 根据给受试物后 28 d 内的各剂量组动物死亡率计算 LD₅₀。

1.5.3 急性眼刺激试验 用健康白色家兔 4 只, 体重(2.5~3.0) kg, 将该剂原液 0.1 mL 滴入家兔左眼结膜囊内, 被动闭合 4 s 后用生理盐水冲洗, 右眼为对照。于滴眼后 6, 24, 48, 72 h 和 4, 7 d 观察并记录眼局部刺激反应^[6]。

1.5.4 急性皮肤刺激试验 取 4 只健康白色家兔, 体重(2.5~3.0) kg, 将背部脊柱两侧毛分别(3.0×3.0) cm, 不损伤表皮。将 0.2 mL 该剂原液均匀涂抹往左侧皮肤上, 用二层纱布和玻璃纸覆盖后固定。右侧皮肤作为空白对照。于除去受试物后 1, 24, 48 h 分别观察皮肤反应^[6]。

1.5.5 小鼠骨髓细胞微核试验 选用 50 只健康小鼠, 随机分为 5 组, 每组雌、雄各 5 只, 共设 3 个剂量组, 分别为 500, 2 000, 5 000 mg·kg⁻¹ 体重, 另设阴性对照及阳性对照, 阳性组给予环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹ BW。受试物及阳性物均经口灌胃, 采用 30 h 给药法, 即两次给药间隔 24 h, 于末次给药后 6 h, 常规取股骨骨髓制片、固定、染色, 于油镜下对每只动物观察 1 000 个嗜多染红细胞, 计算微核率, 进行统计学分析^[6]。

1.5.6 小鼠精子畸形试验 选用 25 只雄性健康小鼠, 随机分为 5 组, 每组各 5 只, 共设 3 个剂量组, 分别为 500, 2 000, 5 000 mg·kg⁻¹, 另设阴性对照及阳性对照, 阳性组给予环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹ BW。阴性对照为蒸馏水。受试物、阴性对照物及阳性物均经口灌胃, 连续 5 d, 于首次给药后的第 35 d 处死动物, 取副睾制片、固定、染色, 于油镜下对每只动物计数 2 000 条精子, 计算精子畸形发生率, 进行统计学分析^[6]。

2 结果

2.1 中和剂试验结果 试验表明, 用金黄色葡萄球菌、白色念珠菌试验, 慈华牌海洋生物活素 300 mg·L⁻¹ 稀释液用含 40 g·L⁻¹ 吐温(-80+20) g·L⁻¹, 卵磷脂+10 g·L⁻¹ 甘氨酸⁻ PBS 缓冲液, 可有效中和试验浓度的海洋生物活素消毒液残余作用, 结果符合规定要求。

2.2 杀菌效果 结果表明, 在(19~21) °C 条件下, 以含体积分数 300 mg·L⁻¹ 海洋生物活素溶液作用 2 min, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌平均杀灭率为 99.99%; 作用 5 min, 对白色念珠菌作用杀灭率均达 99.99%, 见表 1。

2.3 毒性 在急性经口毒性试验中, 小鼠染毒后未见异常反应, 未出现死亡, 表明该剂原液对雌、雄小鼠急性经口 LD₅₀ > 5 000 mg·kg⁻¹。按化学物质急性毒性分级标准属实际无毒性。蓄积毒性试验给药 20 d, 雌、雄大鼠均无死亡情况发生, 大鼠蓄积系数 K > 5, 按蓄积毒性分级标准为弱蓄积毒性。家兔皮肤刺激试验, 该剂原液对皮肤刺激反应积分均值为 0。按“皮肤刺激强度分级”标准属无刺激性。家兔急性眼刺激试验, 该剂原液滴眼 4 s 后冲洗, 对动物急性眼刺激积分指数为 3, 按“眼刺激强度评价标准”对眼无刺激性。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验为阴性, 无致突变性。精子畸形试验结果为阴性。

表 1 慈华牌海洋生物活素对不同微生物的杀灭作用

微生物	消毒液稀释度 (mg·L ⁻¹)	作用不同时间的 平均杀灭率(%)			
		2(min)	5(min)	10(min)	20(min)
金黄色葡萄球菌 S. aureus(6538)	300	99.99	99.99	100	100
	200	99.98	99.94	99.99	100
	100	99.76	99.91	99.98	99.99
大肠杆菌 E. coli(8099)	300	99.99	99.99	100	100
	200	99.86	99.98	99.99	100
	100	99.21	99.81	99.98	99.99
白色念珠菌 C. albicans(10231)	300	99.99	99.99	100	100
	200	99.87	99.98	99.99	100
	100	99.48	99.84	99.96	99.99

注: 试验温度为 22 °C。阳性对照组平均菌数, 金黄色葡萄球菌为(6.55×10⁵) cfu/片, 大肠杆菌为(9.46×10⁵) cfu/片, 白色念珠菌为(5.36×10⁵) cfu/片。结果为 3 次试验平均值。

3 讨论

慈华牌海洋生物活素消毒液是选择天然抗菌活性物为主要原料, 经特殊工艺研制成的。对其杀灭微生物效果、毒性进行了检测观察, 结果表明, 慈华牌海洋生物活素 300 mg·L⁻¹ 稀释液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌作用 2 min, 对布片上白色念珠菌作用 5 min, 杀灭率均达 99.99%; 毒性试验表明, 该剂属实际无毒性。对皮肤、眼无刺激, 对骨髓嗜多染红细胞无致突变作用, 对生殖细胞无遗传毒性。评价、验证、应用该产品的实用剂量与杀菌能力及特性并与常规消毒液相比较, 该生物液杀菌效果好、稳定性强、无毒、无味、无刺激性、使用浓度低。是一种高效、低毒生物实用型的消毒液。

[参考文献]

- [1] Rotl L., Khan A., Lillibridge SR. *et al.* Public health assessment of potential biological terrorisms agents[J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 2: 1.
- [2] Victoria Sutton. Law and science drive technology in a war against bioterrorism[J]. *Technology in society*, 2004, 26: 287.
- [3] 魏秋华, 张文福, 王长德, 等. 一种皮肤消毒纳米乳液性能的试验研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2004; 21(1): 1.
- [4] 李敬云, 鲍作义, 庄道明, 等. 一种复方消毒乳液对新型冠状病毒的杀灭效果[J]. *中国消毒学杂志*, 2003, 20(2): 116.
- [5] 王嘉军, 刘敏霞, 王全立. 壳聚糖-蜂胶复合纳米乳剂的研制及抑菌活性的检测[J]. *中国消毒学杂志*, 2005; 22(3): 241.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 第二部分 消毒产品检验技术规范. 2002.