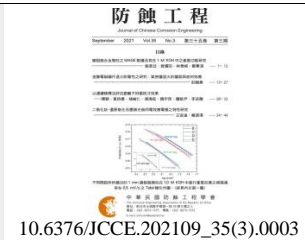




防蝕工程

期刊網址：http://www.anticorr.org.tw



以連續稀釋法評估銀離子抑菌防汙效果 The serial dilution techniques in the fast evaluation of Ag⁺ antifouling performance

陳穎¹、黃詩晏¹、褚喻仁¹、湯偉鈺²、魏宇昆²、羅凱尹³、李岳聯^{*1}
Ying Chen¹, Shih-Yen Huang¹, Yu-Ren Chu¹, Wei-Cheng Tang², Yeu-Kun Wei², Kai-Yin Lo³,
Yueh-Lien Lee^{*1}

中文摘要

從古至今海生物腐蝕的問題一直存在於全球海洋工業中，因此如何尋求因應之道或是找出針對台灣海域所設計的海洋腐蝕抑制材料與檢測技術是非常重要之課題。本研究以銀離子為抗菌物種，搭配選用自左營港採樣所分析出來的代表菌種做為抗菌目標來制定相關流程，以最小抑制濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 及最小殺菌濃度 (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 的概念，分別搭配 96 孔盤稀釋法與瓊脂稀釋塗佈法進行檢測，設計出短時間提供快速且準確的抗菌劑添加量。研究成果指出在使用金屬銀離子作為殺菌劑時，得到其對於希瓦氏海藻菌的最小殺菌濃度為 50 ppm。

關鍵詞：銀離子、殺菌劑、最小抑制濃度、最小殺菌濃度、連續稀釋法。

Abstract

Biofouling is always one of the major problems in the worldwide marine industries. As a result, it is urgent and necessary to develop the non-toxic antifouling marine agents and techniques for the measurement of antifouling performance, especially in Taiwan marine environment. In this study, an Ag⁺ antifouling agent was tested. *Shewanella algae* was chosen as the target bacterial and following the concept of MIC and MBC. The MIC and MBC values of Ag⁺ concentration will be designed and confirmed by 96-well plate microdilution

收到日期：110 年 01 月 22 日 修訂日期：110 年 03 月 23 日 接受日期：110 年 05 月 10 日

¹ 國立台灣大學工程科學及海洋工程系

¹ Department of Engineering Science and Ocean Engineering, National Taiwan University

² 工業技術研究院材料與化工研究所

² Material and Chemical Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute

³ 國立台灣大學農業化學系

³ Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

*聯絡作者：yuehlien@ntu.edu.tw

checkerboard method. It was found that the MBC value of Ag^+ against *Shewanella algae* is 50 ppm. With the serial test methods above, the optimal added-amount would high effectively determine.

Keywords: silver ions; biocide, minimum inhibitory concentration (MIC); minimum bactericidal concentration (MBC); serial dilution technique.

1. 前言

對於長期浸泡在海洋中的結構物及運輸工具而言，生物汙損是一項受重視的課題。生物汙損行程可分三個階段，產生調節膜(Conditioning film)、形成生物膜(Biofilm)、大型生物汙損的生成(Macrofouling)^[1,2]。一旦形成複雜的生物汙損，不僅影響船舶航行速度，增加船體排水量使得耗油量提升，增加營運成本及浪費能源^[3]，大量微生物附著亦可能加速船舶結構的腐蝕影響航行安全。因此研發各種方式來抑制生物汙損是近年全球致力的研究方向。

抑制生物汙損層的方法眾多，大致可分為物理方法、微生物方法及化學方法。其中化學方法較物理方法節省成本，且操作容易，如過去最成功的殺菌劑塗料為添加三丁基錫(Tributyltin, TBT)的防汙塗料，雖能快速有效地抑制海洋中大量微生物的成長，但其含有極高的毒性，經長時間食物鏈的累積有毒害非目標生物的問題，嚴重影響到海洋生態^[4]，因此於 2008 年被全球列為禁止使用的殺菌劑塗料^[5]；爾後，有團隊使用氧化亞銅(Cu_2O)作為替代殺菌劑塗料^[6]，但大量銅溶於水中會對海洋中其他生物造成危害，故近年全球試圖研發新型的環境友善塗料^[7]。希望能藉由使用低汙染甚至無毒的方式抑制微生物生長，進而防止微生物腐蝕發生。

由於目前對於抗微生物汙損濃度之檢測方法的報導較少，只有 ASTM 提出的檢測評估方法，但此方法需要實際放置於海上且長時間的檢測，針對此議題本研究擬制一套於實驗室中能快速檢測殺菌劑抑制濃度的流程，透過使用 96 微量孔盤棋盤稀釋法及瓊脂稀釋塗佈法判定殺菌劑

對該微生物的最小抑制濃度(MIC)及最小殺菌濃度(MBC)，將使用銀離子作為殺菌劑來說明此方法的可用性。並藉由此最佳殺菌劑濃度應用於新塗層開發，在短時間內提供快速且準確的抑菌使用量，有效降低環境的汙染，達到永續之目標。

2. 實驗方法

以希瓦氏海藻菌(*Shewanella algae*)為代表性菌種，其易於物體上形成生物黏膜，故本研究選定此菌種作為實驗的對象。為防止其他非目標菌種的汙染，所有實驗皆於無菌操作台進行。

以銀離子(Ag^+)為殺菌劑，使用微量 96 孔盤棋盤稀釋法測得殺菌劑對希瓦氏海藻菌最小抑制濃度^[8]。每孔添加量為菌液及殺菌劑共 200 μl ，藉由殺菌劑稀釋倍率的不同以改變不同劑量。於孔盤表面黏貼透明密封膜使各孔環境分開培育，避免非目標細菌的汙染。使用 ELISA Reader 分光光度計檢測其吸光值，藉由吸光值的變化判定最小抑制濃度。為避免細菌是因為暫時失去活性造成殺菌劑添加濃度誤判，將進行 7 天持續培育，觀察吸光值變化判定最佳抑制濃度。

使用測得之最小抑制濃度，藉由再培育之瓊脂稀釋塗佈法來判定其最小殺菌濃度，即殺死大於 99.9 % 初始細菌(即為減少 3 個數量級之菌落數)之濃度^[8]。使用 96 微量孔盤培育 24 小時後，將菌液已無菌水連續序列稀釋塗佈於無菌培養基瓊脂中再培育 24 小時，藉瓊脂上菌落的數目與對照組的差異來計算各殺菌劑濃度的殺菌率。

3. 實驗方法

3.1 最小抑制濃度檢測

使用 96 微量孔盤之棋盤稀釋法培育 24 小時能找出金屬銀離子的最小抑制濃度。96 微量孔盤的橫軸為添加不同濃度銀離子，縱軸為相同參數之 8 次重複，由於檢測和培育溫度不同，導致在 96 微量孔盤蓋子上容易凝結霧氣，故加入一組純無菌水，以確定檢測時的基準值。我們定義培育 24 小時後吸光值小於 0.3 時為有效抑制。

在剛添加完溶液時，96 微量孔盤每孔呈淡黃色(培養液原色)，測量其 OD_{A600} 值皆小於 0.2。經過 24 小時 30 °C 恆溫培育，可簡單從 96 微量孔盤中的樣貌判定各濃度之銀離子的抑菌效果。從圖 1 可發現 10 ppm 和 20 ppm 組中的每孔都和控制組(0 ppm) 一樣呈混濁的深棕色，代表添加該濃度之銀離子不能有效抑制希瓦氏海藻菌的生長；將濃度提升至 30 ppm 時，發現約一半的孔呈清澈的淡黃色，而另一半呈混濁之棕色，代表此濃度可能接近該微生物的最小抑制濃度。而到 40 ppm 時，可清楚地發現每孔都呈清澈的淡黃色，故由肉眼初步估計銀離子的最小抑制濃度可能為 40 ppm。

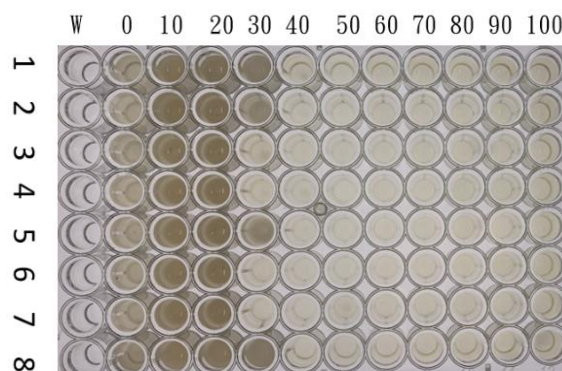


圖 1 培育 24 小時之銀離子 96 微量孔盤圖。
Figure 1 Checkerboard assay of medium with varying concentration of Ag^+ after 24 h. of incubation.

進一步以 ELISA Reader 量測各孔之 OD_{A600} 值確認各孔真實抑制效果。24 小時培育後之平均 OD_{A600} 值結果如表 1 所示，10 ppm 及 20 ppm 的吸光值都約為 1.5 左右；而 30 ppm 平均值為 0.7119，但是標準差高達 0.4604，此濃度抑制效果非常的不穩定，時而具抑制微生物生長效果，時而完全失去抑制效果；在 40 ppm 的平均 OD_{A600} 值為 0.2468，代表 40 ppm 有明顯抑制效果；而更高濃度 50 ppm 到 100 ppm 的平均吸光值皆在 0.2 到 0.3 範圍。由此判定添加銀離子於希瓦氏海藻菌之菌液最小抑制濃度為 40 ppm。

表 1 培育 24 小時之銀離子 OD_{A600} 值。

Table 1 The OD_{A600} value of checkerboard assay after 24 h of incubation.

24 h	Water	0 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
平均值	0.09	1.11	1.52	1.50	0.71	0.25
標準差	0.01	0.06	0.06	0.04	0.46	0.01
24 h	50 ppm	60 ppm	70 ppm	80 ppm	90 ppm	100 ppm
平均值	0.27	0.30	0.30	0.31	0.29	0.29
標準差	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03

3.2 最小殺菌濃度檢測

經 24 小時再培育瓊脂上的菌落數來判定其最小殺菌濃度，其結果如圖 2 所示。從圖 2 (a)縮圖可知在沒有稀釋的情況下瓊脂上將會長滿希瓦

氏海藻菌，而在連續序列稀釋 4 次後的結果能發現其擁有 1039 CFU/50 μ l 之菌落數，藉由計算得知控制組中擁有 2.078×10^9 CFU/ml 之菌落數。而在最小抑制濃度 40 ppm 發現其在未稀釋的情

況下(圖 2 (b)縮圖)和控制組一樣會長滿微生物，而經由連續序列稀釋 4 次後擁有 912 CFU/50 μ l 之菌落數，計算計算得知有 1.824×10^9 CFU/ml 之菌落數，代表 40 ppm 之銀離子雖然能在剛開始培育 24 小時後暫時抑制微生物的生長，但是並不能完全殺死微生物。

圖 2 (c)為添加 50 ppm 的結果，能明顯看出在再培育之培養基瓊脂中完全沒有任何菌落生長，代表該濃度能完全抑制及殺死微生物。於更高濃度之結果圖 2 (d) ~ (f)中，一樣沒有任何菌落生長，因此能說明在添加 50 ppm 以上的每個濃度皆能完全抑制微生物生長，故由此結果能判定添加銀離子於希瓦氏海藻菌之菌液的最小殺菌濃度為 50 ppm。

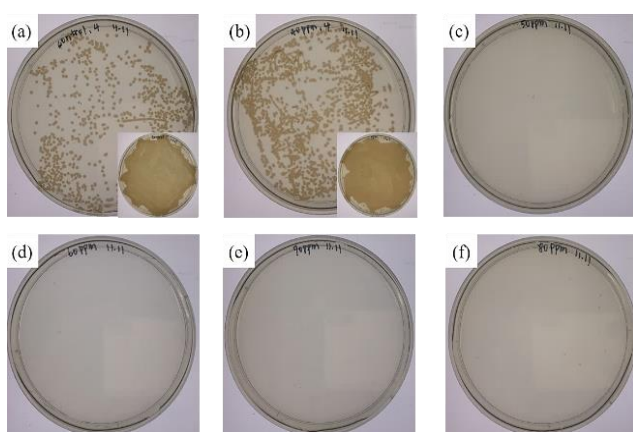


圖 2 添加銀離子作為殺菌劑之瓊脂稀釋塗佈法結果；(a) 0 ppm-控制組 (b) 40 ppm (c) 50 ppm (d) 60 ppm (e) 70 ppm (f) 80 ppm。
Figure 2 Bacterial colony images after agar dilution method; (a) 0 ppm (b) 40 ppm (c) 50 ppm (d) 60 ppm (e) 70 ppm (f) 80 ppm.

表 2 培育 3 天(72 h)之銀離子 OD_{A600} 值。

Table 2 The OD_{A600} value of checkerboard assay after 72 h of incubation.

72 h	Water	0 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
平均值	0.09	0.90	1.08	0.61	0.72	1.59
標準差	0.01	0.18	0.12	0.11	0.07	0.16
72 h	50 ppm	60 ppm	70 ppm	80 ppm	90 ppm	100 ppm
平均值	0.26	0.32	0.29	0.30	0.31	0.31
標準差	0.02	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03

3.3 長時間 96 微量孔盤檢測

由以上實驗得知以銀離子作為殺菌劑於 40 ppm 能在 96 微量孔盤培育 24 小時後抑制微生物的生長，但再經過 24 小時培育後又沒有明顯的抑制效果，故本研究將嘗試把 96 微量孔盤培育的時間延長至 7 天，並且藉由 1 天、3 天、5 天和 7 天的 OD_{A600} 吸光值量測來判定個濃度銀離子的抑制效果。

當延長至 3 天時， OD_{A600} 值檢測結果如表 2 所示。在 40 ppm 時平均 OD_{A600} 值高達 1.5906，此時微生物可能處在指數成長期(Log phase)，擁有最高的活性，而在 24 小時前因為有些許銀離子能抑制部分微生物生長，等到銀離子皆消耗完全後，剩餘低活性的微生物將大量生長。而在 50 ppm 以上濃度的平均值中，其大約都維持在 0.2 至 0.3 之間，表示此濃度能在 96 孔盤培育 3 天時有效抑制微生物的生長。

將 96 微量孔盤培育時間延長至 5 天， OD_{A600} 值如表 3 所示。其數值結果與培育 3 天之間量測結果差異不大，在 50 ppm 以上之濃度的平均皆維持在 0.2 至 0.3 之間，而 0 ppm 至 40 ppm 的平均吸光值則有略微下降的趨勢，表示此時微生物可能入穩定期 (Stationary phase)。由此推測培養基養分已經被消耗殆盡，導致無法提供足夠的養分給微生物生存，因此微生物的活性有略微下降的趨勢，為印證此說法須將 96 微量孔盤培育時間延長至 7 天，以確認各孔之生長情形。

表3 培育 5 天(120 h)之銀離子 ODA600 值。

Table 3 The OD_{A600} value of checkerboard assay after 120 h of incubation.

120 h	Water	0 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
平均值	0.10	0.92	0.77	0.69	0.78	0.86
標準差	0.01	0.15	0.13	0.06	0.06	0.06
120 h	50 ppm	60 ppm	70 ppm	80 ppm	90 ppm	100 ppm
平均值	0.22	0.29	0.29	0.25	0.26	0.28
標準差	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

將 96 微量孔盤培育時間延長至 7 天，OD_{A600} 值量測結果如表 4 所示，發現結果與培育 5 天相似，於 50 ppm 以上濃度的平均吸光值都介於 0.2 至 0.3 之間，說明只要添加 50 ppm 就能完全抑制希瓦式海藻菌生長；而在 0 ppm 至 40 ppm 的結果中發現其吸光值皆維持在 0.7 至 0.9 之間，說明此時菌液處於穩定期，代表在 7 天的

培育中微生物還是能維持一定的活性，由此說明將培育時間延長至 7 天是有參考性的，能更加確認檢測出之最佳濃度在長時間培育下殺菌劑的效果。因此如果要建議添加濃度運用於塗層的製作，可以使用此檢測方法，短時間找出合適的殺菌劑添加量。

表4 培育 7 天(168 h)之銀離子 OD_{A600} 值。

Table 4 The OD_{A600} value of checkerboard assay after 168 h of incubation.

168 h	Water	0 ppm	10 ppm	20 ppm	30 ppm	40 ppm
平均值	0.09	0.92	0.77	0.69	0.78	0.86
標準差	0.01	0.15	0.13	0.06	0.06	0.06
168 h	50 ppm	60 ppm	70 ppm	80 ppm	90 ppm	100 ppm
平均值	0.22	0.29	0.29	0.25	0.26	0.28
標準差	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

4. 結論

1. 使用金屬銀離子作為殺菌劑，得到其對希瓦式海藻菌的最小抑制濃度為 40 ppm，最小殺菌濃度為 50 ppm。
2. 最小抑制濃度僅能短時間抑制細菌活性，透過長時間培育發現最小殺菌濃度(50 ppm)能維持最好效果。

致謝

本研究承蒙工業技術研究院的支持與材料供給，以及工業技術研究院的同仁們在研究過程中

給予的協助，使本研究得以順利進行，特此表達感謝之意。

參考文獻

- [1] “Revised paradigm of aquatic biofilm formation facilitated by microgel transparent exopolymer particles”, E. Bar-Zeev, I. Berman-Frank, O. Girshevitz and T. Berman, Proceedings of the National Academy of Sciences, 109 (2012) pp. 9119-9124.
- [2] “Biofouling of membrane distillation, forward

- osmosis and pressure retarded osmosis: Principles, impacts and future directions”, A. Bogler, S. Lin and E. Bar-Zeev, *Journal of Membrane Science*, 542 (2017) pp. 378-398.
- [3] “Economic impact of biofouling on a naval surface ship”, M. Schultz, J. Bendick, E. Holm and W. Hertel, *Biofouling*, 27 (2011) pp. 87-98.
- [4] “Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards”, A. Kotrikla, *Journal of Environmental Management*, 90 (2009) pp. S77-S85.
- [5] “Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation”, K. A. Dafforn, J. A. Lewis and E. L. Johnston, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) pp. 453-465.
- [6] “Morphology-dependent antibacterial activities of Cu_2O ”, Y. J. Lee, S. Kim, S. H. Park, H. Park and Y. D. Huh, *Materials Letters*, 65 (2011) pp. 818-820.
- [7] “Microbially influenced corrosion—any progress?”, B. Little, D. Blackwood, J. Hinks, F. Lauro, E. Marsili, A. Okamoto, S. Rice, S. Wade and H. C. Flemming, *Corrosion Science*, 170 (2020) p. 108641.
- [8] “Precipitation of silver chloride from homogeneous solution”, M. Insley and G. Parfitt, *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 233 (1969) pp. 930-934.