

明胶/纳米 SiO₂ 复合膜的体外抑菌试验

代 敏^{1,2} 郭文字¹ 王雄清^{1*} 彭 成² 陈希文¹ 杨丽红¹ 杨 蕾¹

(1. 绵阳师范学院动物应用技术研究 分子生物学与生物制药重点实验室 绵阳 621000)

(2. 成都中医药大学药学院 成都 610075)

摘 要: 本实验测定了明胶、纳米 SiO₂、明胶/纳米 SiO₂ 复合膜对 6 种供试菌的抑菌效果, 结果表明, 明胶不具有抑菌作用; 纳米 SiO₂ 对供试菌具有较好的抑菌效果; 20 种明胶/纳米 SiO₂ 复合膜材料中, 有 11 种复合膜对供试菌具有较强的抑菌效果。用琼脂平板稀释法测定了具有较强抑菌作用复合膜的最低抑菌浓度(MIC), 结果表明, 最低抑菌浓度因膜的配比和菌种类的不同而有所差异, 为 16.0 mg/mL~256.0 mg/mL。复合膜对蜡样芽孢杆菌的最低抑菌浓度(MIC)最大(256.0 mg/mL), 而对其他供试菌相对较低, 为 64.0 mg/mL~128.0 mg/mL。

关键词: 抑菌试验, 纳米 SiO₂, 明胶, 复合膜

Bacteriostatic Test *in vitro* of the Gelatin/Nano-SiO₂ Composite Membrane

DAI Min^{1,2} GUO Wen-Yu¹ WANG Xiong-Qing^{1*} PENG Cheng²
CHEN Xi-Wen¹ YANG Li-Hong¹ YANG Lei¹

(1. Institute of Applied Animal Technology, Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceuticals, Mianyang Normal University, Mianyang 621000)

(2. College of Pharmaceuticals, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

Abstract: The paper studied antibacterial effects *in vitro* of gelatin, nano-SiO₂ and gelatin/nano-SiO₂ composite membranes on 6 kinds of bacteria. The results indicated that gelatin had no antibacterial effect; nano-SiO₂ had antibacterial effect; 11 out of 20 kinds of gelatin/nano-SiO₂ composite membranes had strong antibacterial effects. Their minimal inhibitory concentrations (MICs) were also tested using the method of plate dilution, and the results indicated that they had different MICs because of different membranous formula and different bacteria. There were differences of MICs for different bacteria. For *Bacillus cereu*, MIC was 256.0 mg/mL; but for other bacteria, MICs were mainly 64.0 mg/mL~128.0 mg/mL.

Keywords: Bacteriostatic test, Nano-SiO₂, Gelatin, Composite membrane

明胶是动物结缔组织中的胶原蛋白经部分水解和热变性而制得的生物大分子蛋白质, 由 18 种氨基酸组成, 其降解产物-水解明胶具有多种生物学活

性^[1,2], 此外, 它还具有良好的生物相容性、可降解性以及溶胶—凝胶的可逆转换性、极好的成膜性以及入口即化等特性, 现已广泛应用于食品、保健品、

医药、感光、化妆品等领域^[3-5]。纳米 SiO₂ 为无定型白色粉末, 是一种无毒、无味、无污染的非金属材料, 该材料具有耐高温、耐腐蚀、耐磨、易降解、韧性好、防水等特性, 作为 21 世纪的热点材料, 现已广泛运用于食品、电子、能源、生物、医药、农业等领域^[6,7]。由于纳米 SiO₂ 具有易降解、耐高温等特性, 以及明胶较好的生物相容性、可降解性和极好的成膜性, 能否将两者进行有机结合, 制作复合膜, 用于研发食品抗菌保鲜的包装及生物医学等材料, 目前国内尚未见有报道。为此, 本研究拟对由明胶和纳米 SiO₂ 组成的复合膜的抗菌性能等进行初步研究, 为其作为活性包装材料及生物医学材料等的开发和应用等深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

明胶(购自绵阳荣盛化试公司), 纳米 SiO₂(四川

大学赠送)。

1.2 材料(保存于绵阳师范学院动物应用技术研究 所)

1.2.1 材料 1: 膜的制作工艺 : 明胶+水 搅拌 30 min 制成明胶溶液; 纳米 SiO₂+水 高速搅拌 30 min 滴加明胶溶液 搅拌 30 min→倒膜 65℃ 恒温箱烘 5 h~7 h。膜的编号及配比见表 1。

1.2.2 材料 2: 膜的制作工艺 : 明胶+水 搅拌均匀 +甘油 搅拌 30 min 制成明胶溶液; 纳米 SiO₂+水 高速搅拌 30 min 滴加明胶溶液 搅拌 30 min 倒膜 65℃ 恒温箱烘 5 h~7 h。膜的编号及配比见表 2 和表 3。

1.3 实验菌株

供试菌株 : 链球菌、葡萄球菌、变形杆菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、棒状杆菌共 6 种(分离于绵阳市奶牛场并经生化等试验鉴定, 现保存于绵阳师范学院“ 动物应用技术研究 所”)。

表 1 明胶/纳米 SiO ₂ 复合膜的配比 Table 1 Composition of gelatin/Nano-SiO ₂ composite membrane					
组成 Composition 编号 No.	明胶 Gelatin		纳米 SiO ₂ Nano-SiO ₂		水(mL) Water
	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	
A	16.0	8.0	4.0	2.0	180.0
B	16.0	8.0	2.0	1.0	182.0
C	16.0	8.0	1.6	0.8	182.4
D	16.0	8.0	1.2	0.6	182.8
E	16.0	8.0	0.8	0.4	183.2
F	16.0	8.0	0.4	0.2	183.6
G	16.0	8.0	0.2	0.1	183.8
H	16.0	8.0	0.1	0.05	183.9

表 2 明胶/纳米 SiO ₂ 复合膜的配比 Table 2 Composition of gelatin/Nano-SiO ₂ composite membrane							
组成 Composition 编号 No.	明胶 Gelatin		纳米 SiO ₂ Nano-SiO ₂		甘油 Glycerol		水(mL) Water
	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	
a	16.0	8.0	1.6	0.8	10.0	5.0	172.4
b	16.0	8.0	1.6	0.8	8.0	4.0	174.4
c	16.0	8.0	1.6	0.8	6.0	3.0	176.4
d	16.0	8.0	1.6	0.8	4.0	2.0	178.4
e	16.0	8.0	1.6	0.8	2.0	1.0	180.4
f	16.0	8.0	1.6	0.8	1.0	0.5	181.4

表 3 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜的配比
Table 3 Composition of gelatin/Nano-SiO₂ composite membrane

组成 Composition 编号 No.	明胶 Gelatin		纳米 SiO ₂ Nano-SiO ₂		甘油 Glycerol		水(mL) Water
	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	质量(g) Weight	浓度(%) Concentration	
a ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	10.0	5.0	173.6
b ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	8.0	4.0	175.6
c ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	6.0	3.0	177.6
d ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	4.0	2.0	179.6
e ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	2.0	1.0	181.6
f ₁	16.0	8.0	0.4	0.2	1.0	0.5	182.6

药敏质控菌株：大肠杆菌标准株和金黄色葡萄球菌标准株(购自中国科学院微生物研究所)。菌株种类及其编号见表 4。

表 4 供试菌株的种类及编号
Table 4 Kind and number of bacteria

编号 No.	菌种 Species of bacteria
1	大肠杆菌标准株 Standard <i>Escherichia coli</i>
2	金黄色葡萄球菌标准株 Standard <i>Staphylococcus aureus</i>
3	链球菌 <i>Streptococcus</i>
4	葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>
5	变形杆菌 <i>Proteus</i>
6	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>
7	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>
8	棒状杆菌 <i>Corynebacterium</i>

1.4 实验方法

1.4.1 菌种的活化及菌液的制备：将实验菌株活化后于 4℃ 冰箱保存备用。实验时挑取单个菌落接种到 LB 液体培养基中，37℃ 恒温摇床振荡培养 18 h~24 h，用无菌生理盐水稀释，将菌液配成 10⁵ CFU/mL~10⁶ CFU/mL 备用^[8,9]。

1.4.2 明胶的体外抑菌试验：平板的制备：将明胶溶于 LB 培养基中，使其浓度为 512.0 mg/mL，1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min，趁热铺板，制成含明胶 512.0 mg/mL 的平板，37℃ 恒温培养箱烘干备用；以不含明胶的 LB 平板作阳性对照。

体外抑菌试验：将上述制备好平板分成 9 个区并作好标记。用微量移液枪在 1~8 区加入 5 μL 相应编号的供试菌及标准菌株的菌液，9 区加无菌生理盐水做阴性对照。37℃ 恒温培养 18 h~24 h，观察细菌的生长情况^[10]。

1.4.3 纳米 SiO₂ 的体外抑菌试验：平板的制备：称取 5.12 g 纳米 SiO₂ 溶于 20 mL LB 液体培养基中，使其浓度为 256.0 mg/mL，1 × 10⁵ Pa 灭菌 20 min，趁热铺板，制成含纳米 SiO₂ 256.0 mg/mL 的平板，37℃ 恒温培养箱烘干备用；以不含纳米 SiO₂ 的 LB 平板作阳性对照。体外抑菌试验同明胶。

1.4.4 复合膜敏感性试验：平板的制备：将明胶/纳米 SiO₂ 复合膜加入无菌蒸馏水加热融化后配制成 5120.0 mg/mL 的膜母液，灭菌后于 4℃ 冰箱保存备用。在已灭菌的培养皿中分别加入膜母液 2 mL 和培养基 18 mL 灭菌的 LB 固体培养基，充分混匀，趁热铺板，制成含膜 512.0 mg/mL 的平板，37℃ 恒温培养箱烘干备用；以 2 mL 无菌生理盐水代替膜母液作阳性对照平板。

膜敏感性试验：与明胶体外抑菌试验相同。

1.4.5 最低抑菌浓度(MIC)的测定：采用改良的琼脂平板稀释法对具有较好抑菌效果复合膜的最低抑菌浓度进行测定。

平板的制备：分别称取 10.24 g、5.12 g、2.56 g、1.28 g、0.64 g、0.32 g、0.16 g、0.08 g 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜于 50 mL 离心管中，再加入 20 mL LB 固体培养基后密封灭菌，混匀后趁热铺板，37℃ 恒温培养箱烘干备用；以不含膜的 LB 平板为阳性对照平板。

MIC 值的测定：将制备好的平板分成 9 个区，在 1~8 区分别加入相应编号的供试菌株及标准菌株的菌液 5 μL，第 9 区加入无菌生理盐水作阴性对照。37℃ 恒温培养 18 h~24 h，观察菌株的生长情况，以细菌刚好不生长的浓度为该材料对该菌种的最低抑菌浓度。试验重复 3 次，取其平均值作为明胶/纳米 SiO₂ 复合膜的 MIC 值。

2 结果与分析

2.1 明胶对供试菌的敏感性

明胶体外抑菌试验结果表明, 明胶对供试菌株无抑菌作用, 结果见表 5。

2.2 纳米 SiO₂ 对供试菌的敏感性

纳米 SiO₂ 体外抑菌试验结果表明, 纳米 SiO₂ 对供试菌株有较强的抑菌活性, 结果见表 5。

2.3 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜对供试菌的敏感性
测定了 20 种明胶/纳米 SiO₂ 复合膜对 6 种供试菌的敏感性, 结果见表 6。

由上表可知, 除材料 G、H 对 6 种供试菌无明显抑菌作用; 材料 F、a₁、b₁、c₁、d₁、e₁、f₁ 对仅大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌和棒状杆菌无明显抑菌作用; 材料 D 对蜡样芽孢杆菌无明显抑菌作用; 材料 E 对蜡样芽孢杆菌和棒状杆菌无明显抑菌作用外, 其他

表 5 明胶和纳米 SiO₂ 对供试菌的敏感性
Table 5 Sensitivity of gelatin and nano-SiO₂ to experimental bacteria

试剂 Reagents	菌株编号 No. of bacteria								阴性对照 Negative comparison
	1	2	3	4	5	6	7	8	
明胶 Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
纳米 SiO ₂ Nano-SiO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	-
阳性对照 Positive comparison	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注: +: 阳性, 即有抑菌作用; -: 阴性, 即无明显抑菌作用
Note: +: Positive, i. e. it is sensitive to the bacteria; -: Negative, i. e. it is not significantly sensitive to the bacteria

表 6 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜对供试菌的敏感性
Table 6 Sensitivity of gelatin/nano-SiO₂ composite membrane to experimental bacteria

膜编号 No. of membrane	菌株编号 No. of bacteria								阴性对照 Negative comparison
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D	+	+	+	+	+	-	+	+	-
E	+	+	+	+	+	-	+	-	-
F	-	+	+	+	+	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a	+	+	+	+	+	+	+	+	-
b	+	+	+	+	+	+	+	+	-
c	+	+	+	+	+	+	+	+	-
d	+	+	+	+	+	+	+	+	-
e	+	+	+	+	+	+	+	+	-
f	+	+	+	+	+	+	+	+	-
a ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
b ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
c ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
d ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
e ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
f ₁	-	+	+	+	+	-	-	-	-
阳性对照 Positive comparison	+	+	+	+	+	+	+	+	-

注: +: 阳性, 即有抑菌作用; -: 阴性, 即无明显抑菌作用
Note: +: Positive, i. e. it is sensitive to the bacteria; -: Negative, i. e. it is not significantly sensitive to the bacteria

实验材料对 6 种供试菌均有较好抑菌作用。

2.4 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜对供试菌的最低抑菌浓度(MIC)

采用改良的琼脂平板稀释法对除 G、H、F、a₁、b₁、c₁、d₁、e₁、f₁ 以外具有较好抑菌作用的 11 种材料的最低抑菌浓度(MIC)进行了测定, 结果见表 7。

由表 7 可知, 不同材料对同一菌株的最低抑菌

浓度有所不同, 如材料 A 对链球菌的 MIC 值为 16.0 mg/mL, 而材料 B、C、D 和 E 对链球菌的 MIC 值分别为 32.0 mg/mL、64.0 mg/mL、128.0 mg/mL 和 256.0 mg/mL; 同一材料对不同菌株的最低抑菌浓度也有所差异, 如材料 A 对链球菌和葡萄球菌的 MIC 值为 16.0 mg/mL, 而对蜡样芽孢杆菌的 MIC 值为 64.0 mg/mL, 对变形杆菌、大肠杆菌和棒状杆菌的 MIC 值为 32.0 mg/mL。

表 7 11 种明胶/纳米 SiO ₂ 复合膜对供试菌的最低抑菌浓度(MIC)						
Table 7 MIC of Kinds of gelatin/nano-SiO ₂ composite membrane to experimental bacteria 单位(Unit): mg/mL						
编号 No.	链球菌 <i>Streptococcus</i>	葡萄球菌 <i>Staphylococcus</i>	变形杆菌 <i>Proteus</i>	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	棒状杆菌 <i>Corynebacterium</i>
A	16.0	16.0	32.0	64.0	32.0	32.0
B	32.0	32.0	64.0	128.0	64.0	64.0
C	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
D	128.0	128.0	128.0	—	256.0	256.0
E	256.0	256.0	256.0	—	256.0	—
a	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
b	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
c	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
d	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
e	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0
f	64.0	64.0	64.0	256.0	128.0	128.0

注: —: 无明显抑菌作用
Note: —: It is not sensitive to the bacteria

3 讨论

纳米材料具有高强度/硬度、高扩散性、高塑性/韧性、低密度、低弹性模量、高电阻、高比热、高热膨胀系数、低热导率及强软磁性能, 现已广泛应用于陶瓷、纺织、光电、电磁、化工、医学等领域^[11]。关于明胶和纳米 SiO₂ 各自的研究报道非常多, 如将明胶与壳聚糖木薯淀粉制作可食抗菌保鲜复合膜^[12], 但关于明胶/纳米 SiO₂ 复合膜的抗菌性能研究在国内外都尚未见有报道。本研究选择了价格便宜、无毒无害、易降解的明胶和纳米 SiO₂, 制备其复合膜, 研究其对几种常见的细菌(葡萄球菌、链球菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、棒状杆菌、变形杆菌)的抑菌效果。结果表明, 55%(11/20)的制备材料具有较好的抑菌效果。此外, 该复合膜制备工艺简单, 原料来源充足, 生产成本低, 开发其在食品、生物医药等领域的运用将具有巨大的潜力。

本试验首先对明胶和纳米 SiO₂ 各自对实验菌株的敏感性进行测定, 结果表明, 明胶不具有抑菌作用, 这与明胶的主要成分是蛋白质和氨基酸有关; 而纳米 SiO₂ 对供试菌具有较强的抑菌作用。在测定复合膜的最低抑菌浓度时发现, 传统的二倍稀释法不适合于明胶/纳米 SiO₂ 复合膜的梯度稀释, 这主要是因明胶/纳米 SiO₂ 复合膜粘稠易凝固。为此, 针对材料本身耐高温的特性, 本研究对其方法进行了改进, 将明胶/纳米 SiO₂ 复合膜与培养基一起密封灭菌, 力保材料尤其是纳米 SiO₂ 在培养基中的均匀分布, 以确保实验结果的准确性。该方法简单易行, 不失为筛选粘稠易凝固且耐高温的抗菌材料的一种好方法。此外, 本试验曾试图采用制作含膜的滤纸片以及直接制作膜片利用抑菌圈法测定其抑菌直径, 探讨其对细菌的敏感性, 结果发现材料的有效成分难以在滤纸片中扩散以及复合膜片遇水易卷曲、膨胀、溶解等不足, 导致两种方法的实验结果都不理想,

也说明简单快捷的抑菌圈法不适合本材料的抑菌试验研究。

对比分析不同材料及其组分变化对实验菌株敏感性的影响, 结果发现膜中纳米 SiO₂ 的含量是影响膜抑菌效果的主要因素, 随着纳米 SiO₂ 浓度的提高, 明胶/纳米 SiO₂ 复合膜抑菌效果增强, MIC 值也相应降低, 这与明胶不具有抑菌作用, 而纳米 SiO₂ 具有抑菌作用的结论一致。当纳米 SiO₂ 的含量降低到 0.6% 时, 如材料 D 对蜡样芽孢杆菌无明显抑菌效果, 随着浓度的进一步降低, 抑菌效果越来越差, 如材料 G(0.1% 纳米 SiO₂)、H(0.05% 纳米 SiO₂) 对所有供试菌都无抑菌效果。生产中如果要考虑将其作为抗菌材料, 我们不仅要考虑膜本身的性能特点, 同时还要考虑其抑菌效果, 当纳米 SiO₂ 配比含量低于 0.6% 时, 材料对个别菌株如蜡样芽孢杆菌和棒状杆菌的抑菌效果差, 建议纳米 SiO₂ 在抗菌材料中的含量大于 0.6%。此外, 在实验中还发现明胶/纳米 SiO₂ 复合膜中纳米 SiO₂ 是否均匀分布, 是影响抑菌试验结果的又一重要因素, 若纳米 SiO₂ 分布不均匀, 将直接导致实际浓度与理论浓度存在一定的偏差和结果的准确性, 也是出现实验重现性不好的重要原因, 而纳米 SiO₂ 在膜中是否分布均匀又直接与膜的制作工艺有关。此外, 材料 2 较材料 1 的组分多了一种增塑剂甘油, 它可以改善膜的流动性和柔韧性等加工性能, 而对抑菌效果却无影响。

最低抑菌浓度试验结果表明, 11 种复合材料的最低抑菌浓度在 16.0 mg/mL~512.0 mg/mL 之间, 但对蜡样芽孢杆菌的 MIC 值最高(64.0 mg/mL~256.0 mg/mL), 这可能与蜡样芽孢杆菌本身的抵抗力较强有关; 其次为大肠杆菌和棒状杆菌(32.0 mg/mL~128.0 mg/mL); 最低为葡萄球菌、链球菌和变形杆菌。在对同一菌株的 MIC 值进行比较分析时发现, 仅材料 A、B、C、D、E 的 MIC 值不一样, 而其他材料都一致, 这主要与各个材料中 SiO₂ 的含量有关, 其中材料 A、B、C、D、E 中 SiO₂ 各自所含的比例不同, 而其他材料所含 SiO₂ 的比例都一致, 也说明

了材料中的抗菌物质是纳米 SiO₂, 当然要达到一定的抗菌效果, 必须加入足够的量(0.6%), 这与当纳米二氧化硅的添加量超过 0.5% 时, 改性丝光涂料试样就表现出明显的抗菌效果报道基本一致^[13]。

参 考 文 献

- [1] 帅兴华, 王少强, 宋增峰, 等. 明胶应用性能的研究. 皮革化工, 2007, 24(3): 20-23.
- [2] Nakajima K, Sato M, Hattori M, *et al.* Soft textural and emulsifiable gelatin formed by conjugating with fatty-acylated saccharide. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(2): 295-302.
- [3] 曹 娜, 符玉华, 贺军辉. 明胶膜作为可食性包装膜、覆盖膜及医学材料的应用. 明胶科学与技术, 2006, 26(4): 195-202.
- [4] 吴道澄, 吴明习, 吴 红. 离子化修饰明胶纳米凝胶的制备及其超声触发释药性质. 药科学报, 2006, 41(4): 313-317.
- [5] 关林波, 但卫华, 曾 睿, 等. 明胶及其在生物材料中的应用. 材料导报, 2006, S2: 380-383.
- [6] 刘俊波, 臧玉春, 吴景贵, 等. 纳米二氧化硅的开发与应用. 长春工业大学学报, 2003, 24(4): 9-12.
- [7] 康睿宇, 徐国想, 曹静雅. 纳米 SiO₂ 的制备、改性和应用. 化工时刊, 2006, 20(10): 7-11.
- [8] 陈林娜, 周立勤, 王汉敏, 等. 中药对临床耐药菌株的体外抑菌试验观察. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(1): 118-120.
- [9] 严赞开, 邱 虎. 淫羊藿甙的抑菌试验. 中国食品添加剂, 2005, 4: 65-67, 80.
- [10] 宋学宏, 蔡春芳. 九种中草药有效成分的提取及抑菌实验. 水利渔业, 2001, 21(6): 38-40.
- [11] 赵丽娜, 王 平. 纳米材料和纳米技术的应用研究. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2006, 4: 39-40, 43.
- [12] 钟秋平, 夏文水. 壳聚糖水薯淀粉明胶复合可食抗菌保鲜膜性能的研究. 食品科学, 2006, 27(6): 59-64.
- [13] <http://www.clickstone.biz/GB/info.aspx?>