

· 研究论文 ·

纳米 TiO_2 悬浮液对烟草青枯菌杀菌活性的研究

蒲 丽, 蒋家珍, 李效禹, 康占海, 吴学民*

(中国农业大学 理学院, 北京 100094)

摘 要: 纳米 TiO_2 是一种半导体光催化剂, 在近紫外光的激发下, 可以产生强的杀菌活性。以烟草青枯菌 *Pseudomonas solanacearum* 为试验对象, 采用平板稀释法对自制的纳米 TiO_2 悬浮液进行杀菌活性测定。结果表明: 在阳光或汞灯下照射 4 h 后, TiO_2 对烟草青枯菌的杀菌率可达 90% 以上。说明用纳米 TiO_2 防治烟草青枯病具有一定的可行性。

关键词: 纳米 TiO_2 ; 光催化氧化; 杀菌; 烟草青枯菌

中图分类号: TB 383; TQ 134.1

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)04-0339-04

The Fatal Activity of Titanium Dioxide on *Pseudomonas solanacearum*

PU Li, JIANG Jia-zhen, LI Xiao-yu, KANG Zhan-hai, WU Xue-min*

(The College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

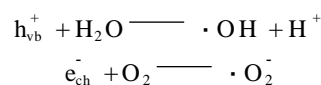
Abstract: As a photocatalyst, titanium dioxide (TiO_2) exhibits strong sterilization effect when it is irradiated with near-UV light. The fatal activity of TiO_2 photocatalyst on *Pseudomonas solanacearum* was tested. The result indicated that the TiO_2 fatal activity could reach to more than 90% when it was irradiated by high-voltage mercury lamp or solar light for 4 h.

Key words: titanium dioxide; photocatalytic oxidation; fatal activity; *Pseudomonas solanacearum*

1985年 Mataunaga^[1]首次报道了纳米 TiO_2 经紫外光激发后可以杀死水中的微生物, 其后纳米 TiO_2 的杀菌活性一直是研究的热点^[2,3]。纳米 TiO_2 是一种 n 型半导体, 禁带宽度为 3.2 eV。当用能量大于 3.2 eV 的光 (即波长小于 385 nm) 照射时, 可以将价带上的电子激发到导带上, 形成光生电子 (e_{ch}^-), 价带上形成带正电荷的空穴 (h_{vb}^+)。即



光生电子和光生空穴可以与水、氧气分别发生以下反应:



反应产生的强氧化性的活性超氧离子自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 能穿透细菌的细胞壁, 破坏细胞膜的不饱和磷酸酯^[4] 和内毒素^[5], 阻断其呼吸系统和电子传输系统, 从而杀死细菌。 TiO_2 对高等动物安全, 长时间给动物喂养或皮下注射 TiO_2 颗粒, 未发现中毒反应^[6]。目前纳米 TiO_2 作为杀菌剂的应用仅限于卫生杀菌^[7,8], 主要杀菌对象是大肠杆菌、酵母菌、金色葡萄球菌等,

收稿日期: 2005-03-31; 修回日期: 2005-07-19

作者简介: 蒲丽 (1981-), 女, 四川成都人, 硕士; *通讯作者: 吴学民 (1968-), 男, 重庆人, 副教授, 主要从事农用杀菌剂的研制开发和农药剂型加工研究。联系电话: 010-62732961; E-mail: wuxuemin@cau.edu.cn

在农业上应用的报道还很少。李敏等将 TiO_2 纳米晶用叶绿素进行敏化后用于防治白菜软腐病 *Erwinia carotovora*, 结果证明在阳光下照射 50 min 后 TiO_2 纳米晶的杀菌活性几乎达到 100%^[9]。

烟草青枯菌 *Pseudomonas solanacearum* 是一种危害严重的植物病原细菌, 由它引起的烟草青枯病俗称“烟瘟”、“半边疯”, 每年造成的经济损失高达千万元, 到目前为止并无特效的化学药剂防治此病^[10]。作者将纳米 TiO_2 作为农用杀菌剂用于杀灭烟草青枯菌, 提出了一条防治烟草青枯病的新途径。

1 材料与方 法

1.1 化学试剂及仪器

TiCl_4 、 HCl 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、聚乙二醇均为分析纯。TU-1901型双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); 微型高速万能试样粉碎机(河北省黄骅市齐家振兴电器厂); 主波长 365 nm 的高压汞灯(北京辉煌电光源有限公司); 手提式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 供试菌种

烟草青枯菌 *P. solanacearum* (由中国农业大学理学院生测实验室提供)。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨液体培养基: 牛肉膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 加热溶解后用稀 NaOH 溶液调至中性。

固体培养基: 上述液体培养基中加琼脂 20 g。

1.4 实验方法

1.4.1 纳米 TiO_2 的制备及紫外-可见光谱的测定

参照文献[11]的方法制备。配制 $\text{pH}=0.5$ 的盐酸溶液 100 mL, 向其中加入 0.1 g 聚乙二醇作分散剂, 于冰水浴下冷却, 在剧烈搅拌下滴加 TiCl_4 5.0 mL, 60 °C 水解 3 h, 室温陈化 12 h。过滤后水

洗、乙醇洗, 得白色粉体。

将所制得的白色粉体在微型高速万能试样粉碎机中粉碎 10 min 后备用。将 TiO_2 重新分散于水中配制成 1.0 mg/mL 的悬浮液, 测定其紫外-可见吸收光谱, 测定纳米粒径。另外, 制得的 TiO_2 不避光放置 6 个月(陈化), 再配制成 1.0 mg/mL 悬浮液, 测定其紫外-可见吸收光谱。

1.4.2 生测实验

1.4.2.1 细菌悬浮液的制备 将牛肉膏蛋白胨液体培养基在手提式压力蒸汽灭菌锅中 121 °C 灭菌 30 min 后取出, 接种烟草青枯菌, 于 37 °C 下培养 3 d。将制得的细菌悬浮液用无菌水倍比稀释, 采用平板菌落计数法测得细菌浓度为 1.2×10^7 CFU/mL。

1.4.2.2 不同浓度 TiO_2 细菌悬浮液的配制 在 100 mL 无菌容量瓶里加入 1.0 mL 液体培养基, 分别加入一定量的 TiO_2 , 用无菌水定容, 分别配制成含 TiO_2 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL、细菌浓度为 1.2×10^5 CFU/mL 的 TiO_2 细菌悬浮液。

1.4.2.3 TiO_2 悬浮液在不同光照条件下对烟草青枯菌的杀菌活性 将 1.4.2.2 中制备好的 TiO_2 细菌悬浮液倒入培养皿中, 揭开玻璃盖, 盖上塑料布(紫外光透过率为 70%~80%), 用 25 W 高压汞灯于 50 cm 高处垂直照射 4 h, 同时分别以无光和阳光照射为对照。每隔 10~15 min 振荡一次, 以保证 TiO_2 与细菌混合均匀。

采用平板稀释法测定杀菌活性。取培养皿中悬浮液 1 mL 稀释 100 倍, 用移液枪取其 0.1 mL 放入含固体培养基的培养皿中, 用曲玻棒涂抹均匀, 于 37 °C 培养箱中培养 24 h 后观察结果, 用血小 板计数器计数, 由(1)式计算杀菌率。每个处理重复 3 次, 取其平均值。

$$\text{杀菌率}(\%) = (\text{空白样菌落数} - \text{处理后菌落数}) / \text{空白样菌落数} \times 100 \quad (1)$$

1.4.2.4 陈化前后 TiO_2 杀菌活性的测定 将 1.4.1 制得的 TiO_2 不避光放置 6 个月, 采用 1.4.2.2 的方法配制成 TiO_2 细菌悬浮液, 汞灯下照射 4 h 后, 测定陈化后的 TiO_2 细菌悬浮液的杀菌活性, 与新制备的 TiO_2 细菌悬浮液的杀菌活性进行对比。

2 结果及分析

2.1 陈化前后 TiO_2 悬浮液的紫外-可见吸收光谱

据文献[11]报道, 1.4.1 制得的白色粉体是金红石相 TiO_2 纳米晶。由图 1A 可以看出, 新制备的 TiO_2 悬浮液的紫外-可见吸收光谱在 360 nm

处有一个突跃,此突跃为吸收边界,与金红石相 TiO₂ 晶体相的吸收边界 410 nm 相比,明显向短波方向移动。根据 Brus 公式^[12]的定量描述,由 (2) 式计算 TiO₂ 的晶粒直径。

$$E \left[\frac{h^2 \cdot 2}{2R^2} \cdot \frac{1}{\mu} - \frac{1.8}{\mu} \right] \quad (2)$$

其中 $E = E_g - E_{g_0}$, E_g 是制备所得材料的禁带宽度,且 $E_g = hc/\lambda$, 经测 $\lambda = 360$ nm, 计算得 $E_g = 3.35$ eV; E_{g_0} 是相体材料的能隙宽度,经文献 [12] 查阅, E_{g_0} 为 3.2 eV; μ 为有效折合质量 ($1/\mu = 1/m_e + 1/m_h$, 其中 m_e 和 m_h 分别为 TiO₂ 的有效电子质量和有效空穴质量), m_e 为 5~13 m_e , m_h 为 2 m_e , 则 μ 为 1.43~1.73 m_e (m_e 为电子质量), ϵ 为材料的介电常数, $\epsilon = 184$ 。

由 (2) 式计算得到悬浮液中 TiO₂ 的晶粒直径 R 约为 2.3~4.2 nm。

由图 1B 可以看出,陈化后的 TiO₂ 悬浮液没有吸收边界出现,这可能是由于其出现了团聚现象。

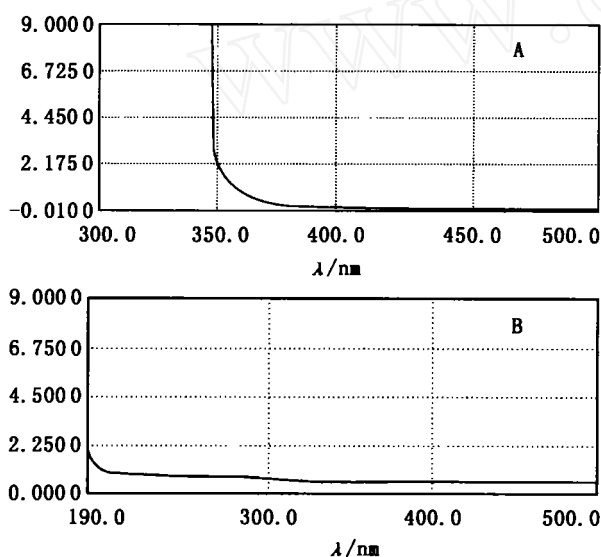


Fig 1 The UV-Vis absorption spectra of 1.0 mg/mL TiO₂ suspension

Note: A, newly prepared; B, exposed to the light for six months

2.2 新制备 TiO₂ 悬浮液对烟草青枯菌的杀菌活性

为测定 TiO₂ 被光激发后的杀菌活性,选取了 3 个不同的处理条件。高压汞灯主波长为 365 nm, 属于近紫外光,本身对细菌无明显的杀菌作用。同时考察了太阳光的作用,波长小于 385 nm 的光约占太阳光的 3%,若采用太阳光为光源,更有利于实际应用。由图 2 可以看出,当 TiO₂ 浓度从

0.5 mg/mL 增加至 1.5 mg/mL 时,杀菌率随浓度的增加而显著增加。在无光照条件下 TiO₂ 也有一定的灭菌活性。当 TiO₂ 浓度在 2.5 mg/mL 时,高压汞灯照射 4 h 后,杀菌率可达 99.1%。TiO₂ 在太阳光照射下的杀菌活性不及在高压汞灯下的原因是本实验是在冬天进行,阳光中 385 nm 以下的紫光较少, TiO₂ 并未完全被光激发。

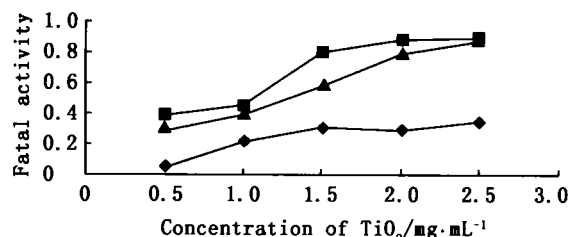


Fig 2 The fatal activity of TiO₂ (newly prepared) suspension on *Pseudomonas solanacearum*

2.3 陈化前后纳米 TiO₂ 对烟草青枯菌的杀菌活性

在不避光情况下陈化 6 个月后的 TiO₂ 粉末悬浮液外观上没有新制备的 TiO₂ 在水中的分散性好,浊度也相对较低。从图 3 可以看出,在高压汞灯照射下,陈化后的 TiO₂ 悬浮液比新制备的悬浮液杀菌活性有所降低。陈化后的 TiO₂ 光活性有所下降,在光照下没有完全发生光催化氧化反应,因此最好使用新制备的 TiO₂。

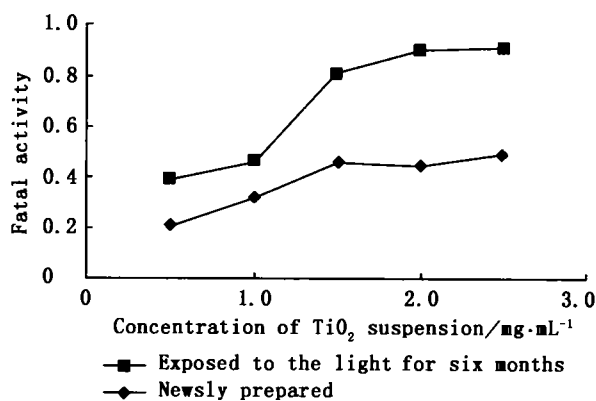


Fig 3 The fatal activity to *P. solanacearum* of TiO₂ suspension under the high-voltage mercury lamp for 4 h

3 讨论

陈化后的 TiO₂ 悬浮液出现了团聚,可能是制

备时未完全除净氯离子。这些无机离子会严重影响 TiO_2 的聚集程度,降低光催化氧化的活性,导致生成的强氧化性的自由基减少^[13],杀菌活性降低。故要使其具有高的杀菌活性,应使用分散性好的 TiO_2 悬浮液。

一般认为 TiO_2 在溶液中会引起光的散射,在某一浓度下杀菌率有一个最高值。如 Salih^[14] 证明太阳光照射 40 min 后, TiO_2 悬浮液的浓度在 0.25 ~ 3.0 mg/mL 范围内杀菌活性最高时的浓度为 1.0 mg/mL。但从图 2 可以看出,当 TiO_2 浓度在 0.5 ~ 2.5 mg/mL 之间时,对烟草青枯菌的杀菌率没有出现一个最佳浓度点。这是因为光照射时间较长,并且不断振荡, TiO_2 不断被激发产生强氧化性的自由基,所以具有较好的杀菌活性。所以适当延长光照时间可以增强其杀菌活性。

TiO_2 作为一种化学性质稳定、安全无毒的杀菌剂具有广阔的应用前景。本实验采用平板稀释法测定了自制的 TiO_2 粉末对烟草青枯菌的杀菌活性,取得了较好的结果,为将其作为农用杀菌剂使用提供了理论依据。此制备方法利用廉价的 TiCl_4 为原料,操作简单,易于工业化大生产。但 TiO_2 在植物活体上的应用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] M ataunaga T, Tomoda R, Nakajima T, et al Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders [J]. FEMS Microbiology Letters, 1985, 29: 211-214.
- [2] M ataunaga T, Tomoda R, Nakajima T, et al Continuous-sterilization system that uses photosemiconductor powders [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 1330-1333.
- [3] Huang Z, Maness P C, Blake D M, et al Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2000, 130: 163-170.
- [4] Maness P C, Smolinski S, Blake D, et al Bactericidal activity of photocatalytic TiO_2 reaction: toward an understanding of its killing mechanism [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (9): 4094-9098.
- [5] Sunada K, Kikuchi K, Hashimoto K, et al Bactericidal and detoxification effects of TiO_2 thin film photocatalysts [J]. Environ Sci Technol, 1998, 32: 726-728.
- [6] Cai R X, Kubota Y, Shuin T, et al. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO_2 particles [J]. Cancer Res, 1992, 52: 2346-2348.
- [7] Mills A, Dabis R H, Worsely D, et al Water purification by semiconductor photocatalysis [J]. Chem Soc Review, 1993, 23 (2): 417-425.
- [8] Gaswami D Y, Triwedi D M, Block S S. Photocatalytic disinfection of indoor air [J]. Sol Energy, 1997, 119: 92-96.
- [9] LIM in (李敏), WANG Zhen-ling (王振岭), SHI Heng-zhen (石恒真), et al 敏化的 TiO_2 纳米晶表面形貌、晶相、光谱及光催化灭菌研究 [J]. J Inorg Materials (无机材料学报), 2003, 18(6): 1261-1266.
- [10] LAI Chuan-ya (赖传雅). Agricultural Phytopathology [农业植物病理学 (华南本)] [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2003. 161-164.
- [11] ZHANG Qing-hong (张青红), GAO Lian (高濂), SUN Jing (孙静), et al 室温下制备金红石相二氧化钛纳米晶的方法 [P]. China patent: 99113693. 4, 1999.
- [12] Kom an C, Bahnen ann D W, Hoffmann M R. Preparation and characterization of quantum-size titanium dioxide [J]. J Phys Chem, 1988, 92: 5196-5201.
- [13] ZHANG Tian-yong (张天永), CUI Xin-an (崔新安), ZHANG You-lan (张友兰), et al 无机盐对纳米二氧化钛聚集的影响 [J]. Chemical Industry and Engineering (化学工业与工程), 2004, 21(3): 169-173.
- [14] Salih F M, Enhancement of solar inactivation of Escherichia coli by titanium dioxide photocatalytic oxidation [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92: 920-926.

(Ed JIN S H)