

纳米 TiO_2 光半导体溶胶对植物病原微生物的抗菌性能

李玲玲, 崔海信*, 张 萍

(中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 北京 100081)

摘 要: 鉴于纳米二氧化钛半导体材料在医学、环保领域对细菌、病毒等微生物长效、安全、无残留的成功抑制, 本试验探讨纳米二氧化钛半导体材料在植物领域对植物病原微生物的杀灭与抑制作用。通过溶胶凝胶法合成纳米 TiO_2 半导体溶胶材料, 无菌瓷板涂布成膜, 黑光照射, 统计病原菌存活数、相对抗菌率, 鉴定 TiO_2 溶胶的抗菌效果。结果表明, 该溶胶的平均粒径为 30.6 nm, 为锐钛矿型, 分散度、稳定度良好, 成膜与附着力良好。抗菌鉴定表明, 3 次均匀涂布成膜的抗菌瓷板效果最好, 涂布高于 3 次, 膜易脱落; 对在 3 次成膜瓷板的相对菌落存活数统计表明, 与对照相比, TiO_2 溶胶对植物细菌性病原菌具有显著的抗灭与抑制效果, 延长照射时间, 抗菌能力增强; 相对抗菌率表明, 延长光照为 24 h, 相对抗菌率为 100%, 对各菌种的抗菌率无差异。因此, TiO_2 半导体溶胶材料是一种强效的、广谱的新型绿色环保抗菌剂。

关键词: 纳米; 二氧化钛; 植物病原菌; 溶胶材料; 抗菌性能; 抗菌剂

中图分类号: TB383; S432

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-8-0223-04

李玲玲, 崔海信, 张 萍. 纳米 TiO_2 光半导体溶胶对植物病原微生物的抗菌性能研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 223—226.

Li Lingling, Cui Haixin, Zhang Ping. Antibacterial effect of nano- TiO_2 semiconductor sol on plant bacterial diseases[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(8): 223—226.(in Chinese with English abstract)

0 引 言

TiO_2 光催化剂具有高活性、无污染、对人体安全无害等优点, 是潜在应用价值最为广泛的光半导体纳米材料之一, 已成为材料学及催化科学竞相研究的热点^[1]。1985 年, 日本学者 Matsunaga 等^[2,3]首先发现了 TiO_2 在紫外光照射下具有杀菌作用, 其后许多科学家对其杀菌作用进行了大量的研究。 TiO_2 光催化剂作为抗菌剂的优势在于, 其光催化性能^[4]通过分解和破坏微生物细胞的结构物质, 直接杀灭或削弱环境中的细菌、病毒等微生物, 且能降解细菌、病毒释放出来的毒素, 对环境无污染, 无残留。林爱虹等报道 TiO_2 光催化剂抑制了葡萄球菌^[5], 叶盛英等研究了 TiO_2 光催化剂抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等细菌的生长^[6], 张萍等初步研究了 TiO_2 光半导体材料对黄瓜霜霉病害的防治作用^[7]。但对植物病原细菌的抑制作用还鲜见报道, 本研究以假单胞菌属、黄单胞菌属、芽孢杆菌属三个菌属中常见的植物致病菌为研究对象, 通过统计黄瓜细菌性角斑病菌、番茄疮痂病菌、禾谷巨大芽孢杆菌、茄假单胞菌、水稻白叶枯菌 5 种植物病原菌的相对抗菌率, 探讨 TiO_2 光催化剂凝胶对植物病原微生物的抑制作用, 为研究纳米 TiO_2 半导体溶胶材料在田间植物病害实际防治中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 TiO_2 光半导体溶胶的制备

纳米 TiO_2 光半导体溶胶, 参考 Itinose^[8,9]的方法制备。将硫酸钛溶液水解于等当量的氨水中, 固液分离, 制备成钛酸粉末, 过氧化氢为络合剂溶解制备成过氧钛 (peroxo-titanic acid, PTA) 溶胶。以 PTA 溶胶为前驱物, 在特定的引物和聚合反应条件下合成, 制备得到一种中性、透明、淡黄色的纳米 TiO_2 半导体溶胶, 其主要性能指标见表 1。

表 1 TiO_2 半导体溶胶的主要性能指标
Table 1 Main indexes of nano- TiO_2 semiconductor sol

TiO_2 含量/%	水分含量/%	平均粒径/nm	pH 值	色泽
1.4	98.6	30.6	7.0	黄色、透明

1.2 TiO_2 光半导体溶胶的物性分析

用 X'Pert PRO MPD X-射线衍射仪 (PANalytical 公司, 荷兰) 分析溶胶中 TiO_2 的晶型结构; 用 Zeta PALS—亚微米粒度及电位分析仪 (Brookhaven 公司, 美国) 分析溶胶中 TiO_2 结晶的粒径分布。用 JSM-7401F 超高分辨场发射扫描电镜 (日本电子公司) 分析 TiO_2 的表面形貌。

1.3 TiO_2 抗菌薄膜的制备

将规格为 100 mm×100 mm 的瓷砖, 蒸馏水洗净, 烘干。将 TiO_2 凝胶溶液用精细喷枪均匀涂覆在瓷砖釉面上, 厚度规格通过凝胶溶液的量来控制。试验所用 TiO_2 凝胶溶液浓度 $C_{(\text{T})}$ 为 1.5 g/L, 每次涂层所用溶胶用量为 0.5 mL。室温条件干燥成膜, 烘箱中 165℃ 干热灭菌 2 h, 制成 TiO_2 涂膜瓷砖。制成的 TiO_2 涂膜瓷砖可反复使用。

1.4 涂膜层数对 TiO_2 薄膜抗菌性能的影响

供试菌种为黄瓜细菌性角斑病菌, 预先调制成浓度

收稿日期: 2007-01-22 修订日期: 2008-05-06

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2006AA10A203); 国家“973”计划资助项目 (2004CB719704)

作者简介: 李玲玲 (1981—) 女, 河北唐山人, 主要从事纳米生物技术研究。北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 100081。Email: lililingling821@sohu.com

*通讯作者: 崔海信 (1963—), 男, 研究员, 主要研究领域为生物环境控制工程以及纳米生物技术研究。北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所, 100081。Email: haixin_cui@hotmail.com

为 10^8 CFU.mL⁻¹ 的菌悬液, 在4℃条件下保存备用。

试验根据瓷砖涂层的次数(0、1、2、3、4次)共设置5个处理, 每个处理3次重复。以中未涂膜瓷砖为空白对照。在预先灭菌的瓷砖上滴加0.25 mL菌悬液后覆盖无菌保鲜膜, 移至40 W黑光灯下20 cm处照射12 h, 照射处理后, 用5 mL无菌水反复冲洗。取0.1 mL冲洗菌液涂布在牛肉汁培养基上, 27℃培养48 h, 统计菌落数。相对抗菌率:

$$\text{相对抗菌率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 TiO₂ 薄膜的抗菌性能检测

供试菌种黄瓜细菌性角斑病菌、番茄疮痂病菌, 由中国农业科学院植物保护研究所提供。禾谷巨大芽胞杆菌、茄假单胞菌、水稻白叶枯菌由中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所环境修复实验室提供。菌种预先调制成浓度为 10^8 CFU/mL的菌悬液, 4℃条件下保存备用。

抗菌试验设置TiO₂ 涂膜瓷砖和空白瓷砖(CK)两个处理, 每个处理3次重复。在预先消毒的瓷砖上滴加0.25 mL菌悬液后覆盖无菌保鲜膜, 移至40 W黑光灯20 cm处, 照射时间梯度为: 4、8、12、24 h, 照射处理后, 用5 mL无菌水反复冲洗瓷砖釉面。取0.1 mL冲洗菌液涂布在牛肉汁培养基, 27℃培养48 h, 统计菌落数。按公式(1)统计相对抗菌率。

2 结果与分析

2.1 TiO₂光半导体溶胶特性的表征

2.1.1 X射线衍射分析

光催化的TiO₂主要有两种晶型: 锐钛矿型和金红石型, 锐钛矿型的催化活性较高^[10-12]。孙奉玉报道^[13], 锐钛矿型TiO₂粒子的带隙能为3.2 eV, 金红石型TiO₂粒子的带隙能为3.0 eV, 两者价带位置相同而导带位置不同, 由于锐钛型TiO₂粒子具有较大的带隙, 对O₂的吸附能力较好, 因此光催化活性高于金红石型TiO₂粒子, 光生电子和空穴的分离几率大。图1中表明, 自制样品中纳米TiO₂结晶型为锐钛型(anatase), 其中衍射角2θ为25.42°、37.77°和48.00°, 分别属于锐钛矿相的(101), (004), (200)晶面的衍射峰。因此, 自制TiO₂光半导体具有良好的光催化活性。

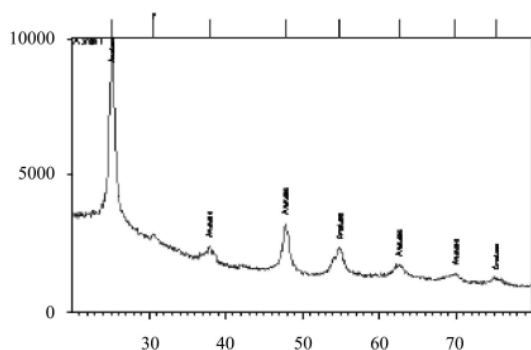


图1 二氧化钛的XRD图
Fig.1 XRD diagram of TiO₂

2.1.2 扫描电镜(SEM)及粒度分析

光催化活性发挥取决于纳米TiO₂在溶液中的分散程度^[14]。图2为TiO₂样品的扫描电子显微镜照片, 其中: 图2a为放大3万倍的晶体颗粒分布情况; 图2b为放大10万倍的颗粒形状; 从图2中可以看出自行制备的纳米TiO₂光半导体溶胶具有很好的分散度。经粒度仪分析, 其中TiO₂颗粒的粒径分布范围为3.9~97.9 nm, 平均有效粒径(effective diameter)为30.6 nm, 溶胶分散度(polydispersity)为0.219。上述结果表明, 自行制备的纳米TiO₂光半导体溶胶中的每一个TiO₂微晶是一个纳米级单晶, 具有良好的分散度和稳定性。

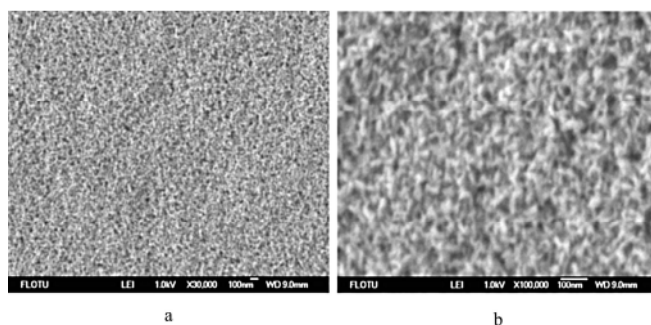


图2 二氧化钛的扫描电镜图片
Fig.2 SEM photos of TiO₂

2.2 涂膜次数对TiO₂抗菌薄膜性能的影响

纳米TiO₂光半导体溶胶凝胶具有成膜性和附着性, 可在瓷砖表面形成连续、透明、稳定的抗菌薄膜。涂布层次的不同, 薄膜的抗菌率有差异。如图3所示, TiO₂涂层的抗菌性能随着涂膜次数增加而提高, 涂膜次数为3层, 照射时间12 h时, 对黄瓜细菌性角斑病原菌的抗菌率可达99.1%。涂层达到4层时照射12 h的抗菌率达到100%。试验中观察发现, 随着涂膜次数的增多, TiO₂涂层厚度增大, 但当涂膜次数超过4层以上时, 涂层薄膜变得容易脱落。涂覆次数在3次以下时, 瓷砖TiO₂抗菌薄膜可以达到铅笔硬度5H以上, 能够反复使用数次而抗菌膜不脱落, 发挥长效抗菌效果。

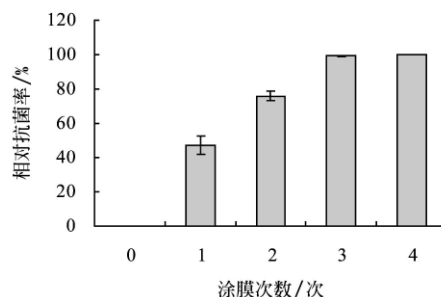


图3 涂膜次数对纳米TiO₂薄膜抗菌效果的影响
Fig.3 Antibacterial rate of nano-TiO₂ film with different dip-coatings

2.3 TiO₂抗菌薄膜的植物病原菌抑制效应

对CK、TiO₂涂膜瓷砖, 4个时间梯度的菌落数进行LSD分析, 结果如表2, 对照在4个时间梯度下的病原菌存活数差异性不显著; 经TiO₂抗菌薄膜处理的各病

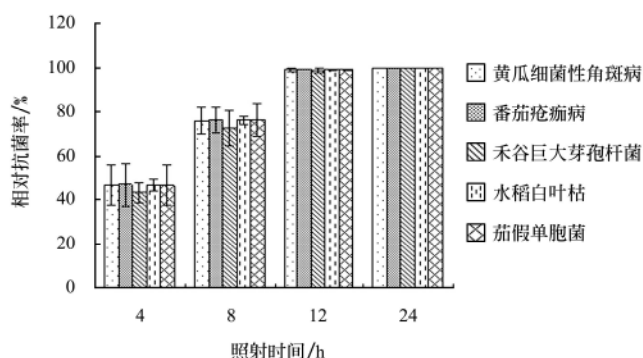
原菌在 4 个时间梯度存活数均与对照存在显著差异。说明经 TiO₂ 抗菌薄膜处理的瓷砖, 抗菌效果优于对照。而且随着照射时间的延长, TiO₂ 抗菌薄膜抗菌能力增强。在 4 个时间梯度下, 对 5 种病原菌的相对抗菌率的 LSD 分析得出 (图 4), 4 个不同时间段各个病原菌相对抗菌能力均存在极显著差异 ($P < 0.01$), 处理 4 h 后的相对平均抗菌率由 45.9% 提高到 8h 的 75.4%; 当 TiO₂ 抗菌薄膜延长照射至 12h 以后, 5 病原菌的相对抗菌率差异性减小, 平均相对抗菌率为 99% 以上。在前期 4 h、8 h 时段, TiO₂ 抗菌薄膜对 5 种病原菌间的抵抗能力有一定差异, 但未达显著水平。表现为对番茄疮痂病的抵抗力略高, 对禾谷巨大芽孢杆菌抗病率略低。表明纳米 TiO₂ 半导体溶胶材料短时间 (< 8 h) 照射, 对各个菌种的抗菌能力存在差异性, 抗菌能力较高; 随着照射时间延长至 24 h, 抗菌能力提高到 100%。说明, 在一定照射时间纳米 TiO₂ 半导体溶胶材料, 是一种强效、广谱的抗菌剂。

表2 不同处理与不同照射时间病原菌的存活数

Table 2 Number of living bacteria with different irradiation time periods

照射时间		4 h	8 h	12 h	24 h
菌种		菌落数 (CFU)	菌落数 (CFU)	菌落数 (CFU)	菌落数 (CFU)
黄瓜细菌性角斑病菌	CK	854aA	849aA	847aA	842aA
	TiO ₂	460aA	210bB	7cC	0cC
番茄疮痂病菌	CK	1170aA	1166aA	1162aA	1157aA
	TiO ₂	628aA	276bA	9cC	0dC
禾谷巨大芽孢杆菌	CK	1229aA	1224aA	1218aA	1213aA
	TiO ₂	698aA	334bB	17cC	0dD
水稻白叶枯菌	CK	1302aA	1297aA	1293aA	1288aA
	TiO ₂	695aA	308bB	12cC	0dD
茄假单胞菌	CK	1108aA	1105aA	1096aA	1086aA
	TiO ₂	593aA	265bB	11cC	0dD

注: 相同菌种不同处理相关性检验 ($p=0.05$ $p=0.01$); 不同字母为差异性显著

图4 TiO₂ 抗菌薄膜对不同病原细菌的抗菌效果Fig.4 Relative antibacterial rates of nano-TiO₂ film

此外试验中发现, 前期的短时照射, 同种病原菌在相同的培养中, 经TiO₂抗菌薄膜处理的菌落, 除菌落较对照少外, 菌落的相对面积较对照也小。说明TiO₂抗菌薄膜除直接杀灭病原菌, 钝化和抑制了一部分病原菌的活力,

延迟了病原菌的生长与繁殖过程。

3 讨论

纳米TiO₂光半导体材料具有长效性、安全、无公害等特点。在植物病害防治领域, 有可能发展成为一种新型绿色抗菌农药。本试验初步证明纳米TiO₂光半导体材料对植物病原微生物具有显著的杀灭和抑制作用。此外, 一些研究表明, 纳米TiO₂光半导体材料还具有提高光合效率^[15-18]、促进植物生长发育^[19,20]等功能, 喷施到作物叶片表面后, 可能会发挥病害防治和促进植物生长等多重效果。详细、深入地研究纳米TiO₂光半导体材料的综合生物学效果, 可以为以纳米TiO₂光半导体材料为有效成分的新型高效植物保护剂与植物生长促进剂的开发提供科学依据。本试验研究所取得的其他相关研究成果, 如 PTA系纳米TiO₂光半导体溶胶对田间植物病害防治和光合作用效果的影响等研究将另文发表。

4 结论

1) 基于过氧钛PTA溶胶制备的纳米TiO₂光半导体溶胶附着力和成膜性能良好, 1.5 mL用量, 3次涂布, 可在自然干燥条件下形成高抗菌性、稳定的薄膜。

2) 光照时间24 h以上, TiO₂抗菌性薄膜对常见菌属的植物病原菌具有显著抑制和杀灭作用, 是一种强效、光谱的抗菌剂。

3) 植物病原菌培养试验结果表明, PTA系纳米TiO₂光半导体溶胶作为一种叶片表面喷涂液, 对病原菌所引起的植物病害具有一定的防治效果。

[参 考 文 献]

- [1] Zhou H, Gan X, Wang J, et al. Hemoglobin-based hydrogen peroxide biosensor tuned by the photovoltaic effect of nano titanium dioxide[J]. Anal Chem, 2005, 77(18): 6102—6104.
- [2] Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, et al. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders[J]. FEMS Microbiol Lett, 1985, 29(4): 211—214.
- [3] Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, et al. Continuous-sterilization system that uses photosensitive semiconductor powders [J]. Appl Environ Microbiol, 1988, 54(6): 1330—1333.
- [4] Andrew M, Stephen L H. An overview of semiconductor photocatalysis[J]. J Photochem Photobiol A Chem, 1997, 108(1): 1—35.
- [5] 林爱红, 秦彦民, 饶健, 等. 纳米抗菌剂抑菌杀菌性能研究[J]. 实用预防医学, 2003, 4(10): 168—170.
- [6] 叶盛英, 刘诗乐, 贺明书. 纳米二氧化钛闪照强光光催化杀菌与保鲜技术初探[J]. 农业工程学报, 2003, 7(19): 180—182.
- [7] 张萍, 崔海信, 宋娜, 等. 纳米TiO₂光半导体材料防治植物病害初步研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(12): 13—16.
- [8] Ichinose H, Katsu Ki H. Photocatalytic activities of coating films prepared from peroxotitanic acid solution-derived anatase sols[J]. J Ceram Soc Jpn, 1998, 106(3): 344—347.
- [9] Ichinose H, Kawahara A, Katsuki H. Properties of anatase films for photocatalytic from peroxotitanic acid solution and

- peroxo-modified anatase sol[J]. J Ceram Soc Jpn, 1996, 104(10): 914—917.
- [10] Linsebigler A L, Lu G Q, Yates J T. Photocatalysis on TiO₂ surface: principles, mechanisms and selected results[J]. Chem Rev, 1995, 95(3): 735—758.
- [11] 沈伟韧, 赵文宽, 贺 飞, 等. TiO₂光催化反应及其在废水处理中的应用[J]. 化学进展, 1998, 10(4): 349—361.
- [12] Sclafani A, Hermann J M. Comparison of the photoelectronic and photocatalytic activities of various anatase and rutile forms of Titania in pure liquid organic phases and in aqueous solutions[J]. J Phys Chem, 1996, 100: 13655—13661.
- [13] 孙奉玉, 吴 鸣, 李文钊, 等. 二氧化钛的尺寸与光催化活性的关系[J]. 催化学报, 1998, 19(3): 229—233.
- [14] 徐瑞芬, 许秀艳, 付国柱, 等. 纳米TiO₂在涂层中的抗菌性能研究[J]. 北京化工大学学报, 2002, 29(5): 45—48.
- [15] Hong F S, Yang P, Gao F Q, et al. Effect of nano-anatase TiO₂ on spectral characterization of photosystem II particles from spinach[J]. Chem Res Chin Univ, 2005, 21(2): 196—200.
- [16] Hong F S, Yang F C, et al. Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast ageing of spinach under light[J]. Biol Trace Element Res, 2005, 104(3): 249—260.
- [17] Hong F S, Zhou J, Liu C, et al. Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach[J]. Biol Trace Element Res, 2005, 105, 269—280.
- [18] Yang F, Hong F S, You W J, et al. Influences of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach[J]. Biol Trace Element Res, 2006, 110: 79—189.
- [19] Zhong L, Hong F S, Lu S P, et al. Effect of nano-TiO₂ strength of naturally aged seeds and growth of spinach[J]. Biol Trace Element Res, 2005, 104(1): 82—93.
- [20] 陆长梅, 张超英, 温俊强, 等. 纳米材料促进大豆萌芽、生长的影响及其机理研究[J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 168—171.

Antibacterial effect of nano-TiO₂ semiconductor sol on plant bacterial diseases

Li Lingling, Cui Haixin^{*}, Zhang Ping

(Institute of Environment and Sustainable Development in Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Nanometer TiO₂ photosemiconductor, as a safe antibacterial chemical with a long-effect, has been widely applied to medicine and environmental protection. The authors studied the effects of TiO₂ sol on plant pathogens. Nano-TiO₂ semiconductor sol was prepared referring to the method developed by Itinose, by which a successive and transparent antibacterial membrane was formed on aseptic tiles, Wood's lamp radiation, statistics antibacterial ratios, to detect antibacterial effectiveness. The results show that the nano-TiO₂ was anatase, and mean diameter was 30.6 nm, dispersity, stability and adhesive power were good. The antibacterial experiments show that the effect of the three antibacterial membranes is the best; when the antibacterial membrane is above three, it is easy exfoliated; compared with the blank, nano-TiO₂ semiconductor sol has excellent antibacterial effect on plant pathogens, and as the time lasts, the antibacterial rate increases. The results of relative antibacterial rate show that when the illumination lasts for 24 h, the relative antibacterial rate reaches 100%, and there is no discrepancy for different strains. So nano-TiO₂ semiconductors sol is a potent and broad spectrum antibacterial.

Key words: Nanometer; TiO₂; plant bacterial disease; semiconductor sol; antibacterial activity