

· 论 著 ·

掺镧氧化钛的制备及其对金黄色葡萄球菌的消毒效能观察

黄 勋¹, 范学工¹, 尹荔松², 吴晓英³

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 中南大学功能材料研究所, 湖南 长沙 410006; 3 中南大学湘雅医学院, 湖南 长沙 410007)

[摘 要] **目的** 配制掺镧氧化钛无机制剂, 观察其对金黄色葡萄球菌的消毒效能。**方法** 采用溶胶-凝胶法制备出不同温度下掺镧氧化钛 6 种复合样品, 并采用能谱仪进行样品杂质分析。以三角烧瓶振荡试验法测定 6 种样品中最佳抗菌活性的样品; 用试管法测定避光条件下具有最佳抗菌活性的材料对上述细菌的最低抑菌浓度(MIC)与最低杀菌浓度(MBC)值。同时采用电子显微镜观察金黄色葡萄球菌与最佳作用浓度的掺镧氧化钛接触前后超微结构变化。**结果** 通过溶胶-凝胶法获得的 6 种样品不含任何杂质, 其中 FH1 号样品抗菌活性最强, 其对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的 MIC 与 MBC 值分别为 12.5 mg/mL、25 mg/mL。电子显微镜观察结果提示该材料作用 30 min, 细菌细胞数量明显减少, 菌体出现肿胀、固缩或坏死, 菌体表面电子密度增高。**结论** 配制的掺镧氧化钛对金黄色葡萄球菌具有良好的杀灭效果。

[关 键 词] 无机抗菌材料; 掺镧氧化钛; 金黄色葡萄球菌; 消毒; 超微结构

[中图分类号] R378.1⁺1 TQ133.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)05-0301-05

Preparation and observation of disinfection efficacy of inorganic lanthanum-doped titanium compounds on *Staphylococcus aureus*

HUANG Xun¹, FAN Xue-gong¹, YIN Li-song², WU Xiao-ying³ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 School of Physics Science and Technology, Central South University, Changsha 410006, China; 3 Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective** To prepare inorganic lanthanum-doped titanium (La-TiO₂) compounds, and observe the antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). **Methods** The six level samples of TiO₂ were prepared by sol-gel method. The energy spectrometer technology was used to characterize these products. Antibacterial activity of 6 samples on *Staphylococcus aureus* were evaluated. Flask Shaking test was used to evaluate the best antibacterial activity among 6 samples; tube test method was used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of sample (code designation was FH1) with the best antibacterial activity in dark condition. Change in bacterial ultrastructure was observed by electron microscope before and after the action of FH1 for 30 minutes. **Results** The serials compounds without any foreign materials could be gotten with sol-gel technique, sample 1(FH1) had the best antibacterial activity. The MIC and MBC of FH1 for *Staphylococcus aureus* was 12.5mg/mL and 25mg/mL respectively. The ultrastructure of *Staphylococcus aureus* changed after exposed to FH1. **Conclusion** La-TiO₂ compounds has good disinfection efficacy on *Staphylococcus aureus*.

[Key words] inorganic antibacterial material; lanthanum-doped titanium dioxide; *Staphylococcus aureus*; disinfection; ultrastructure

[Chin Infect Control, 2009, 8(5): 301-305]

目前无机抗菌材料的研究已经取得了不少进展, 但仍然存在一些问题需要研究解决, 其中一个最

突出的问题就是对其抗菌机制的研究^[1]。为了解制备的无机复合材料掺镧氧化钛的抗菌活性和抗菌机

[收稿日期] 2009-06-20

[作者简介] 黄勋(1972-), 女(土家族), 湖南省长沙市人, 副主任医师, 主要从事感染性疾病预防与控制研究。

[通讯作者] 范学工 E-mail: xgfan57@126.com

制,我们筛选了具有最佳抗菌活性的材料,并对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 在该材料作用前后超微电镜结构的变化进行了观察,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验样品的制备 本研究中配制掺钨氧化钛溶胶各组成成分的摩尔比为钛酸四丁酯:无水乙醇:乙酰丙酮:盐酸:氨水:蒸馏水:硝酸钨 = 1:10:0.5:0.2:1:1:0.5。掺钨氧化钛制备参见文献[2],将 10 mL 钛酸丁酯缓慢滴入 200 mL 无水乙醇中,同时搅拌溶液,随后加入 3 mL 冰醋酸及 2 mL 乙酰丙酮,室温搅拌 30 min 获取溶液 A。溶液 B 的配制:将 1 mL 蒸馏水加入到 100 mL 无水乙醇中,同时按照换算的摩尔比在 B 溶液中加入相应剂量的硝酸钨,搅拌 30 min。将溶液 B 缓慢倒入溶液 A 中,用盐酸调节 pH 值,搅拌 30 min 后陈化,所得稳定、均匀、清澈透明溶液即为所需掺钨氧化钛(Titanium Oxide, TiO_2)。将透明溶液转移至烧杯中,在 35℃ 水浴温度下超声振荡 15 min,置冰箱 -6℃ 冷冻 0.5 h,使凝胶结冰,再在真空冷冻干燥机干燥 2 h。取出松软的干凝胶粉用玛瑙研钵研磨,在空气环境下置于电阻炉温控器中,以 2℃/min 升温,然后在相应的煅烧温度下保温 2 h,制得不同温度下掺杂金属钨的 TiO_2 粉体,并将该系列产品分别命名为 FH1~FH6。使用前称取一定量的样品进行高压灭菌(121℃, 20 min),之后进行干燥处理,用无水乙醇进行原液稀释,然后用无菌磷酸盐缓冲液稀释成 100 mg/mL 的原液浓度,超声下进行充分混匀 30 min,备用。

1.2 样品成分分析 配制样品在工作电压 300 kV,加速电压 0.2~30 kV 下使用荷兰 FEI 公司生产的高分辨场发射扫描电镜(Sirion200)配套能谱仪进行相应成分的测定:取适量试样粉体放入无水乙醇的小烧杯中,然后在室温下进行 30 min 左右的超声分散,用喷碳的铜网在分散液中捞取粉体,然后放置在滤纸上吸湿后自然干燥,在 LDM50D 上喷金镀膜后行相应的成分分析。

1.3 菌株选择 选择金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 作为细菌繁殖体中化脓性球菌的代表,菌株由湖南省疾病预防控制中心消毒科提供。细菌悬液制备程序参照文献[1],用磷酸盐缓冲液洗下菌苔并稀释配制成实验浓度菌悬液,实验菌浓度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL,进行菌落计数确定。菌液经显微镜观察

确定无其他杂菌污染。

1.4 抗菌性能初步测定 采用三角烧瓶振荡试验法,具体步骤如下:(1)在三角烧瓶中加入 10 mL 胰蛋白胍生理盐水溶液;(2)加入待测复合材料及细菌菌液,设定的复合材料浓度为 100 mg/mL;(3)对照样不加复合材料,其他步骤与待测样相同;(4)将上述三角烧瓶固定于振荡摇床上,以 150 r/min 的速度 37℃ 恒温振荡 2 h 后,取 0.1 mL 三角烧瓶内的试样先进行 10 倍稀释,后加入直径为 9 cm 的无菌培养皿中,再加入 19.9 mL 融化后冷却至 45℃ 的琼脂培养基,迅速轻轻摇动混匀,平放于台上;(5)待琼脂培养基凝固后,翻转培养皿,使底向上,置 37℃ 恒温箱内培养 48 h,观察菌落数(即剩余的活菌数量),比较 6 种复合材料的抗菌性能;(6)按照上述方法,每个待测样品及对照样品都各做一式 3 份实验,取 3 次实验的平均值,计算出细菌菌落数,采用公式:存活率 = (样本组平均菌落数/对照组平均菌落数) × 100%。

1.5 试管法抗菌性能测定 对通过 1.4 方法获取的具有初步抗菌活性的材料,采用温箱(避光条件下)试管法进行抗菌性能测定。具体步骤如下:(1)在试管中加入 1 mL 细菌稀释液;(2)于上述试管中加入待测复合材料及细菌菌液,设定的复合材料浓度为 25 mg/mL;(3)对照样不加复合材料,其他步骤与待测样相同;(4)将上述试管置于避光 37℃ 恒温培养箱中分别培养 2 h、4 h、24 h,后续步骤同 1.4。

1.6 试管法测定最佳抗菌复合材料的最低抑菌浓度(MIC)与最低杀菌浓度(MBC) 对 1.5 实验获取的最佳抗菌活性材料进一步测定 MIC 与 MBC 值,实验方法仍然采用试管法。(1)取 3 支试管,每支试管中各加入 100 mg/mL 样品 2 mL,再加入 2 mL 的 PBS,在超声作用 30 min 下制成悬浊液,即获得 50 mg/mL 的材料浓度,依次以倍比稀释的方法分别获取 6 个浓度:50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL、6.25 mg/mL、3.125 mg/mL、1.56 mg/mL;(2)每支试管中接种上述菌悬液 0.1 mL,35℃ 培养 18~24 h 后取出进行平板菌落计数,未出现细菌抗菌材料的最低浓度即为 MIC,每份样品做 3 组平行测试,取平均值;(3)上述试液在 35℃ 下再培养 24 h 后取出进行平板菌落计数,未出现细菌的抗菌材料的最低浓度即为 MBC,每份样品做 3 组平行测试,取平均值。

1.7 电镜用实验材料 2.5%戊二醛,购自中国国

药集团化学试剂有限公司;1%~2% 磷钨酸染液 (pH6.6~6.8),购自美国 SIGMA 公司;覆盖聚乙烯醇缩甲醛膜的铜网,由中南大学湘雅医学院电镜中心提供;光学显微镜 CX21FS1,购自日本 OLYMPUS 公司;Hitachi H-7500 型透射电子显微镜,购自日本 HITACHI 公司。

1.8 电子显微镜下细菌超微结构观察 电镜标本制备采用负染色技术,实验步骤参照文献[3],稍作改动,具体如下:(1)将菌悬液与含 MIC 浓度的最佳抗菌活性样品混匀,分别在受试物与细菌接触后 30 min 取相应培养液 1 mL 放入离心管中;(2)高速台式离心机 12 000 r/min 离心 10 min;(3)弃上清液,取沉淀物加入 2.5%戊二醛 500 μ L 中,之后将沉淀物充分打散,室温放置 2 h,正常对照组为同时期生长的细菌;(4)均匀分散细菌后,用覆盖聚乙烯醇缩甲醛膜的铜网蘸取菌液,静置 5~10 min;(5)用小片滤纸吸干多余液体,干燥 10 min;(6)用 1%磷钨酸染色 2 min;(7)再次用小片滤纸吸干多余液体,干燥 10 min 后置电镜下观察并照相。

2 结果

2.1 能谱仪分析 见图 1。结果显示,制备的样品含有 Ti、O₂、La 3 个主要波峰。证实制备的掺镧纳米氧化钛样品只含有钛、氧与镧成分,不含其他杂质。

2.2 三角烧瓶振荡试验法 通过三角烧瓶振荡试验法我们发现,在 100 mg/mL 的材料浓度普通光照条件下,6 种样品(FH1~FH6)在作用 2 h 后对金黄色葡萄球菌的灭菌率存在差异,细菌存活率分别为 3.64%、3.41%、5.00%、27.95%、41.36% 和 111.82%。具有明显抗菌活性的材料为 FH1、FH2 和 FH3,无抗菌活性的材料为 FH6。

2.3 5 种样品对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的抗菌活性 见表 1。实验结果表明,FH1、FH2 号样品在 25 mg/mL 浓度下相对其他 3 种样品在避光条件下,对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 作用 2 h、4 h 以及 24 h 时间段的细菌菌落计数值低,抗菌活性强。我们选择 FH1 进行进一步超微结构观察。

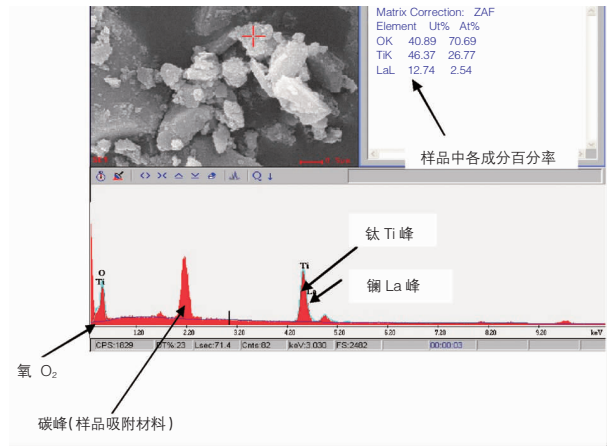


图 1 掺镧氧化钛样品能谱分析图
Figure 1 Analysis of TiO₂ sample by energy spectrometer technology

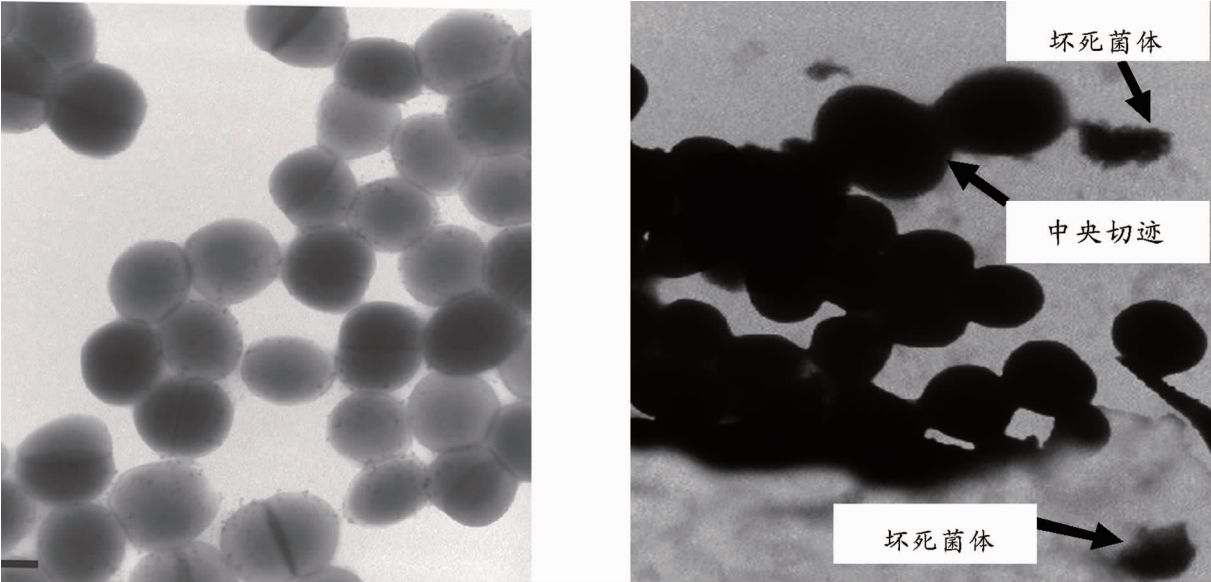
表 1 试管法测定的 5 种样品避光条件下对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的影响($\times 20$ CFU/mL)
Table 1 The effect of 5 samples on *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 by tube test method in dark condition ($\times 20$ CFU/mL)

样品	温箱孵育时间		
	2 h	4 h	24 h
FH1	320	280	80
FH2	300	180	160
FH3	440	280	640
FH4	2 460	1 060	640
FH5	3 640	1 700	80

加入的菌液浓度为 4.4×10^4 CFU/mL

2.4 试管法测定 FH1 的 MIC 与 MBC 采用试管法避光条件下进行 MIC 与 MBC 测定结果显示,该材料对金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 的 MIC 与 MBC 值分别为 12.5 mg/mL 与 25 mg/mL。

2.5 金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 超微结构改变 见图 2。电镜下观察发现,正常金黄色葡萄球菌胞壁光滑,许多菌体聚积成葡萄状,有分裂相(图 2-A);而经样品作用 30 min 后的细菌含量明显减少,可见坏死菌体,细菌菌体呈凹陷性肿胀,中央切迹明显,菌体表面电子密度增高,分裂相减少(图 2-B)。



A 正常 ATCC 6538

B 样品作用 30 min 后 ATCC 6538

图 2 FH1 作用前后金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 电镜图示(×30 000)

Figure 2 The change in *Staphylococcus aureus* ATCC6538 before and after the action of FH1 by electronmicroscope(×30 000)

3 讨论

近年来,随着抗菌药物和化学药物的大量使用,以细菌和病毒为代表的一系列新、老病原体对人类袭击日趋猛烈,也提高了人们对环境微生物的研究和认识,减轻和减少由此引发的各类感染性疾病已经成为社会的共识,而最直接有效的预防方法之一就是使用各种具有抗微生物性能的材料。抗微生物材料包括有机、天然和无机材料 3 大类型。有机材料具有见效快、杀菌能力强的特点,但同时存在易产生微生物耐(抗)药性、作用期短、耐热性差以及分解物产生二次污染等缺点;天然抗微生物材料效果不如有机材料,并存在药效短、安全性和耐久性差、来源有限等不足;而无机抗微生物材料通过将无机材料固有的稳定性和抗微生物成分的高效性、广谱性相结合,克服了上述 2 种材料的局限性,并具有优异的持久性、耐热性、高度安全性等诸多优点,具有“绿色化学”产品的概念,是目前抗微生物材料的研究热点和主流,也是最具有前景的控制环境微生物的方法与措施之一。

在无机抗微生物材料中,TiO₂ 是当前最具应用潜力的一种宽禁带 n 型半导体材料,其化学性质稳定,耐腐蚀,耐酸碱,无毒,来源丰富,价格便宜,具有较强的光催化氧化能力,在治理环境污染和纺织品、卫生用品杀菌处理方面备受关注^[4]。目前,TiO₂ 粉

体的制备工艺已较为成熟,并进入产业化批量生产阶段,但由于其需紫外光照射才能发挥作用,催化效率低,且在一些无光环境如暗室中,不能有效杀灭细菌,影响到其杀菌效果。近年来,各种复合技术和改进负载技术^[5]等方法用于提高光催化效率,其中的掺杂技术是控制材料能级和物理性质的有效手段,将其激发波段扩展到可见光波段,提高了太阳光的利用率,但 TiO₂ 复合材料在医学领域的研究尚少。

人们早已发现稀土金属具有良好的广谱抗菌性能,其在不同浓度条件下,对白假丝酵母菌、大肠埃希菌及葡萄球菌属具有抑菌能力,且随着硝酸稀土溶液浓度的增加,相应抑菌环直径增大,抑菌能力增强。梁兆玲^[6]等研究也发现,镧配合物、钆配合物和钼配合物具有一定的对抗人免疫缺陷病毒的活性。但是到目前为止,少见将稀土离子负载到无机载体上,利用稀土离子作为活性组分来达到抑制微生物效果的无机材料的研制开发。已有的少量对 TiO₂ 负载稀土离子的抗菌机制研究多为理论推断,且缺乏系统的实验研究资料。如果将稀土金属的抗微生物效果和稀土金属的激活作用与 TiO₂ 的光催化性能相结合,就可以充分发挥稀土金属离子抗微生物和纳米 TiO₂ 光催化两者的优点,既可以达到解决目前光催化型无机材料研究中普遍存在的问题,又能真正实现广谱抗微生物、高效缓释持续功能的目的。如研制成功,可以作为抗菌材料广泛使用。

本文中采取的溶胶—凝胶技术^[7]是一种由金属有机化合物、金属无机化合物或上述两者的混合物经过溶液、溶胶、凝胶而固化,再经过热处理(或在一定气氛条件下处理)而获得氧化物或其他化合物的新工艺。相对于传统的固相烧结法,溶胶—凝胶技术在制备金属氧化物或其他化合物方面具有许多优势,它可以在低温下制备高纯度、粒径分布均匀、化学活性大的单组分或多组分分子级催化剂;同时具有工艺简单,步骤、产物组成及粒度可控等优点,是制备超细粒子的重要方法之一^[8]。我们的实验证实,配制的掺镧氧化钛不含其他杂质。实验中选用的掺镧氧化钛中镧的含量所占摩尔比是根据文献所确定。据晏太红等报道^[9],镧的掺杂含量在 0.5% 时,光催化活性可以达到最强;而 Li 等报道^[10]掺杂镧量为 1.2% (质量分数) 时催化活性最高,但随着含量的继续增加,覆盖在 TiO₂ 表面的多余镧反而不利于电子—空穴对的分离。故我们选择镧的掺杂含量为 0.5%。

关于无机抗菌材料的抗菌性能检测,目前国内尚无统一标准。本实验采用三角烧瓶振荡法进行复合材料的抗菌活性初筛,参考日本抗菌材料的代表性评价法^[11],借鉴我国卫生部《消毒技术规范》^[1]中方法进行。

负染技术是进行细胞亚单位分子结构研究的一种方法^[12]。通过我们的实验,可以确定在 FH1 作用后,细菌细胞数量明显减少,菌体出现肿胀、固缩或坏死,菌体表面电子密度增高。推断其作用过程是胞外膜首先部分分解,接着细胞质膜发生紊乱,最终导致细胞死亡。Madrid 等^[13]利用透射电镜观察了紫外光下 TiO₂ 杀灭铜绿假单胞菌的过程,发现经过 40 min 照射,细菌细胞呈现拉伸状态并被分裂;延长照射时间,胞外膜出现波纹状结构,并有少许细胞内含物被挤压出来而形成水泡状隆起物。今后实验中,可以尝试将 FH1 作用其他细菌前后的超微结构变化进行比较。

同时,我们的实验结果也提示,除 FH6 外,其余各样品对金黄色葡萄球菌存在不同程度的抗菌活性。在今后的研究中,也可以尝试进行对其他细菌抗菌活性方面的研究,同时对其他有抗菌活性的样品进一步实验。由于我们的实验仅仅是改变了掺杂材料后不同煅烧温度下的材料的抗菌活性,而没有对不同掺杂材料含量进行比较,故在今后的实验过程与研发过程中,还需进一步观察不同掺杂量(即摩尔比不同)材料掺杂对抗菌活性的影响,掺杂不同稀

土金属镧以外的材料抗菌活性是否存在差异。从真正意义上讲,将具备各种不同性能的材料在微观尺度上形成自组装体系,使其成为一个复杂的具协同作用的整体,以确保各项功能的实现^[14-15],从而达到多功能、高性能和低成本的优点。

[参 考 文 献]

- [1] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 北京, 2002.
- [2] 尹嘉松, 周岐发, 唐新桂, 等. 溶胶-凝胶法制备 TiO₂ 的胶凝过程机理研究[J]. 功能材料, 1999, 30(4): 407-409.
- [3] Yang J, Bremer P J, Lamont I L, *et al.* Infrared spectroscopic studies of siderophore-related hydroxamic acid ligands adsorbed on titanium dioxide[J]. Langmuir, 2006, 22(24): 10109-10117.
- [4] 王帆, 宋晓秋, 柳翱, 等. 材料的性能及其在化学和医学方面的应用[J]. 长春工业大学学报, 2003, 24(1): 7-9.
- [5] Fujishima A, Rao T N, Tryk D A. Titanium dioxide photocatalysis[J]. J. of photochemistry and photobiology C: Photochemistry Reviews, 2000, 1(1): 1-21.
- [6] 梁兆玲, 曾涛, 汪旭, 等. 八种稀土金属配合物和铂配合物抗 HIV 活性的研究[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2005, 25(1): 40-43.
- [7] 郭旭侠, 宋明凯, 丑修建, 等. TiO₂ 光催化材料的研究现状及展望[J]. 沈阳航空工业学院学报, 2004, 21(1): 43-46.
- [8] Racheva T M, Critchlow G W. SnO₂ thin films prepared by sol-gel process[J]. Thin Solid Films, 1997, 292(1-2): 299-302.
- [9] 晏太红, 崔海霞, 林志东, 等. 稀土掺杂 TiO₂ 薄膜的制备及光催化特性[J]. 复旦学报(自然科学版), 2003, 42(6): 999-1002.
- [10] Li F B, Li X Z, Hou M F. Photocatalytic degradation of 2-mercap-Tobenzothiazole in aqueous La³⁺ - TiO₂ suspension for odor control[J]. Appl Catal B: Environ, 2004, 48(3): 185-194.
- [11] 铃木昌二. 抗菌剂及び抗菌加工制品の抗菌效力评析法[J]. セラミックス, 1996, 31(7): 590-593.
- [12] 凌治萍, 俞 彩. 细胞超微结构与电镜技术——分子细胞生物学基础[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 97.
- [13] Madrid P A, Nevárez G V M, Orrantía E B, *et al.* Photoinduced bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* by TiO₂ based thin films[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(2): 183-188.
- [14] Yi Y, Wang Y T, Liu H. Preparation of new crosslinked chitosan with crown ether and their adsorption for silver ion for antibacterial activities[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53(4): 425-430.
- [15] Hosono H, Abe Y. Silver ion selective porous lithium titanium phosphate glass-ceramics cation exchanger and its application to bacteriostatic materials Mater[J]. Res Bull, 1994, 29(11): 1157-1162.