

摘 要

本课题以五种细菌和两种酵母菌为受试菌株,测试了两种纳米材料的抑菌、抗菌性能,利用环境扫描电镜观察纳米材料对受试菌株的杀灭过程,在微观层次上认识杀菌机理。

利用抑菌圈法定性测定了纳米银和纳米 TiO_2 的抗菌效果,证明了两种材料均具有广谱抗菌效果;测定了纳米银和纳米 TiO_2 的最小抑菌浓度(MIC)和最大杀菌浓度(MBC),两者基本相同。它们对细菌的最小抑菌浓度是 $200\mu\text{g/L}$,对啤酒酵母的最小抑菌浓度是 $400\mu\text{g/L}$;在最大杀菌浓度(MBC)方面,对细菌的为 10^7 cfu/mL ,对酵母菌为 10^5 cfu/mL 。

纳米银和纳米 TiO_2 对 G^+ 菌的抑制作用最强,对芽孢杆菌作用次之,对 G^- 菌的作用稍弱,对酵母菌的作用相对最弱。究其原因,这可能与有无芽孢以及各种类型的菌体的细胞壁和细胞膜的不同结构有关系。

两种纳米材料的抗菌效果与其浓度和作用时间成正比,浓度越高,作用时间越长,作用效果越好。在细菌的最小抑菌浓度 $200\mu\text{g/L}$ 下,在18个小时之内就能将细菌全部杀灭;对酵母菌来说达到相同的效果所需的浓度为 $400\mu\text{g/L}$ 。

另外,纳米银颗粒越小,作用效果越好。未经还原的 Ag^+ 的杀菌效果与相同浓度下的纳米银相比差距很大,由此可以判断出 Ag^+ 与纳米银的作用机理应该是有较大区别的。纳米 TiO_2 具有良好的热稳定性,经高温处理后仍然有良好的抑菌效果。

利用环境扫描电镜(ESEM)观察了纳米银和纳米 TiO_2 对受试菌的杀灭过程。在纳米材料作用的初期,首先是从细菌细胞壁开始,其产生的自由基能破坏细胞壁结构,使细胞壁断裂、破损,质膜解体,然后进入胞体内部破坏内膜和细胞组分,使细胞质凝聚,导致细胞内容物溢出,可出现菌体空化现象。

关键词: 纳米银; TiO_2 ; 抑菌; 机理; 最小抑菌浓度

ABSTRACT

Taking five bacteriums and two yeast as target strains, inhibition and antibacterial effect of two nano-materials were tested, and the killing procedure of target strains were observed by ESEM, and sterilizing mechanism were known in this paper.

The antibacterial effect of nano-Ag and nano-TiO₂ were qualitatively test by inhibition zone, that proofed two materials have the broad-spectrum antibacterial effect. The MIC and MBC of nano-Ag and nano-TiO₂ have been tested. Both of them are roughly same. The MIC on bacterium and yeast is 200μg/L and 400μg/L, respectively. The MBC on bacteriums and yeast is 10⁷ cfu/mL and 10⁵cfu/mL, respectively.

Inhibitory action of nano-Ag and nano-TiO₂ on G⁺ bacterium is the best, followed by the effect on bacillus and G⁺ bacterium, and its effect on yeasts is the weakest relatively. I think it has relations with its different structure of cell wall and membrane.

The antibacterial effect of two nano-materials is direct proportion with concentration and time, the more the concentration and time is high, the more the rate of bacteriostasis is high. When the concentration is 200μg/L, the bacteriums would be to kill in 18 hours, but the concentration is 400μg/L if you want to kill the yeasts in the same conditions.

In addition, the smaller the particle of nano-Ag is, the better the rate of bacteriostasis is. There is very conspicuous disparity between Ag⁺ ion and nano-Ag, so the sterilizing mechanism of two nano-materials should not be the same. The nano-TiO₂ has good stability under heat treatment.

The killing procedure of target strain was observed by ESEM. The process of nano-materials photocatalysisinactivation of bacterium begins with destroying the structure of cell wall by the free radical TiO₂ produced. These free radical make the cell wall disruptive and disrepairabl, the plasmalemma disassemble, and then it chisel in the cell, destroy the reticulum and the inner structure which make the cytoplasm coacervateand cause the extravasation of entocyte to form cavitate cells.

Key Words: nano-Ag, TiO₂, bacteriostasis, mechanism, MIC

学位论文独创性声明

本人声明，所呈交的学位论文系在导师指导下本人独立完成的研究成果。文中引用他人的成果，均已做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果，与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

论文作者签名：孔彬彬

日期：2009年6月6日

学位论文知识产权权属声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属山东轻工业学院。山东轻工业学院享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为山东轻工业学院。

论文作者签名：孔彬彬

日期：2009年6月6日

导师签名：于同立

日期：2009年6月7日

第 1 章 绪论

广袤的自然界无处不体现着纳米科学的内涵。人类或动物的牙齿和骨骼表面具有纳米结构，因而其韧性和强度较之具有相同化学组成的宏观团块大得多；贝类的珍珠层仅含 1% 的纳米级聚合物，但其组成比本身组分硬 2 倍，韧性则提高 1000 倍；具有大量纳米结构的树木，维系着地球的生态；而自然界中的生命，更是由最基本生命物质蛋白质、RNA 等“纳米机器”组装成的组合体。

1959 年，著名物理学家、诺贝尔奖获得者 Richard Feynman 首次提出了按人类意愿任意地操纵单个原子与分子的设想，预言了纳米科技的出现。自此，人们逐渐对这一类处于纳米尺度范围、具有明显异于一般宏观材料的物理、化学性能的一类物质发生了兴趣，从而开拓了对这一陌生领域的认知和探索。到 21 世纪的今天，纳米科技对传统产业的实质性影响和对未来工业的潜在革新似已毋庸置疑，因此人们普遍认为，纳米技术将和信息技术一道，成为现代高科技和新兴学科发展的基础^[1,2,3]。

纳米技术是 20 世纪 80 年代末诞生并崛起的高科技，它的基本涵义是指在纳米尺寸范围内研究物质的组成，通过直接操纵和安排原子、分子而创造新物质。纳米技术的出现标志着人类的认知领域已拓展至原子、分子水平，标志着人类科学技术的新时代——纳米科技时代的来临。

1.1 纳米与纳米材料

1.1.1 纳米

如果将人类所研究的物质对象用长度单位加以描述，我们可以得到人类智力所延伸到的物质世界的范围。目前人类能够加以研究的物质世界的最大尺度是 10^{23}m （约 10 亿光年），这是我们已经观测到的宇宙大致范围。人类所研究的物质世界的最小尺度为 10^{-19} （0.1am）。

纳米（nm）是长度单位，为 10^{-9} 米，十亿分之一米，相当于 10 个氢原子一个挨一个排起来的长度。原子的直径在 0.1~0.3 个 nm 之间。人类的遗传物质 DNA 直径小于 3nm。1 纳米大约是头发直径的 1/20000~1/50000，约 1 个分子或 DNA 大小，米与纳米尺寸之比较约等于地球与乒乓球之差距，我们身上的红血球约等于 1000 纳米（nm）。

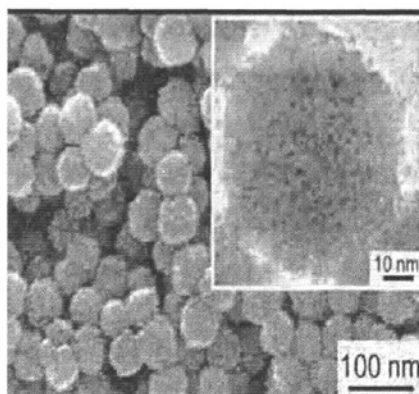


图 1.1 纳米尺寸示意图

1.1.2 纳米材料

纳米材料是纳米科学发展的重要基础，也是纳米科技最为重要的研究对象。自 1861 年以来，随着胶体化学的建立，人们开始了对直径 $1\text{nm}\sim 100\text{nm}$ 的粒子系统即所谓胶体的研究，但真正有意识地把纳米粒子作为研究对象始于 20 世纪 60 年代。广义上，纳米材料是指在三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围或由它们作为基本单元构成的材料，即纳米材料是物质以纳米结构按一定方式组装成的体系，或纳米结构排列于一定基体中分散形成的体系，包括纳米超微粒子、纳米块体材料和纳米复合材料等。组成纳米材料的基本单元在维数上可分为三类：①零维。指在空间三维尺寸均在纳米尺度内。如纳米尺度颗粒、原子簇等；②一维。指在空间有两维处于纳米尺度，如纳米丝、纳米棒、纳米管等；③二维。是指在三维空间中有一维处于纳米尺度，如超薄膜、多层膜、超晶格等。构成纳米材料的物质的类别可以有多种，分为金属纳米材料、半导体纳米材料、纳米陶瓷材料、有机-无机纳米复合材料及纳米介孔固体与介孔复合体材料等。

1.1.3 纳米材料的发展阶段

自 70 年代纳米颗粒材料问世以来，80 年代中期在实验室合成了纳米块体材料，至今已有 20 多年的历史，但真正成为材料科学和凝聚态物理研究的前沿热点是在 80 年代中期以后。从研究的内涵和特点大致可划分为三个阶段：第一阶段（1990 年以前）主要是在实验室探索用各种手段制备各种材料的纳米颗粒粉体，合成块体（包括薄膜），研究评价表征的方法，探索纳米材料不同于常规材料的特殊性能。对纳米颗粒和纳米块体材料结构的研究在 80 年代末期一度形成热潮。研究的对象局限在单一材料和单相材料，国际上通常把这类纳米材料称纳米晶或纳米相（nanocrystalline or nanophase）材料。第二阶段（1994 年前）人们关注的热点是如何利用纳米材料已挖掘出来的奇特物理、化学和力学性能，设计纳米复合材料，通常采用纳米微粒与纳米微粒复合（0-0 复合），纳米微粒与常规块体复合

(0-3 复合) 及发展复合纳米薄膜 (0-2 复合), 国际上通常把这类材料称为纳米复合材料。这一阶段纳米复合材料的合成及物性的探索一度成为纳米材料研究的主导方向。第三阶段 (从 1994 年到现在) 纳米组装体系、人工组装合成的纳米结构的材料体系越来越受到人们的关注, 正在成为纳米材料研究的新的热点。国际上, 把这类材料称作纳米组装材料体系 (nanostructured assembling system) 或者称为纳米尺度的图案材料 (patterning materials on the nanometer scale)。它的基本内涵是以纳米颗粒、纳米丝和管为基本单元在一维、二维和三维空间组装排列成具有纳米结构的体系, 其中包括纳米阵列体系、介孔组装体系、薄膜嵌镶体系。纳米颗粒、丝、管可以是有序或无序地排列。如果说第一阶段和第二阶段的研究在某种程度上带有一定的随机性, 那么这一阶段研究的特点更强调按人们的意愿设计、组装、创造新的体系, 更有目的地使该体系具有人们所希望的特性。可见, 纳米结构的组装体系很可能成为纳米材料研究的前沿主导方向^[4]。

1.1.4 纳米材料的特性

当物质细化到纳米等级时, 其原子间距变大、密度变低、原子排列随机、结构开放, 因此其物性常有极大的变化、优化, 甚至相反。纳米材料具有独特的结构, 在力学、热学和光学上表现出一些奇异的特性。处于纳米尺度下的物质, 其电子的波性以及原子之间的相互作用将受到尺度大小的影响, 诸如熔点、磁学性能、电学性能、光学性能、力学性能和化学活性会出现与传统材料迥然不同的性质, 表现出的独特性能无法用传统的理论体系解释^[5]。以下总结了导致纳米材料表现独特性能的 4 种基本效应。

1、表面效应

当微粒的直径降低到纳米尺度时, 其表面粒子数、表面积和表面能均会大幅增加。由于表面粒子的空位效应, 周围缺少相邻的粒子, 出现表面粒子配位不足; 同时高的表面能也使得表面原子具有很高的活性, 极不稳定, 易于通过与外界原子结合而获得稳定, 如金属纳米颗粒在空气中会燃烧, 无机的纳米颗粒暴露在空气中会吸附气体并与气体发生反应, 皆由表面效应所致。

2、小尺寸效应

随着颗粒尺寸变小所引起的宏观物理性质的变化称为小尺寸效应。纳米颗粒尺寸小, 比表面积大, 在熔点、磁学性能、电学性能和光学性能等都较大尺寸颗粒发生了变化, 产生出一系列奇异的性质。如金属纳米颗粒对光的吸收效果显著增加, 而直径为 2nm 的金和银的纳米颗粒, 其熔点分别降为 330℃ 和 100℃。

3、量子尺寸效应

处于纳米尺度的材料, 其能带将裂分为分立的能级, 即能级的量子化, 而金

属大块材料的能带，可以看成是连续的。纳米材料能级之间的间距随着颗粒的尺寸的减小而增大。当能级间距大于热能、光子能量、静电能以及磁能等的平均能级间距时，就会出现一系列与块体材料截然不同的反常特性，这种效应称之为量子尺寸效应。量子尺寸效应将导致纳米微粒在磁、光、电、声、热以及超导电性等特性与块体材料的显著不同，例如，纳米颗粒具有高的光学非线性及特异的催化性能。

4、宏观量子隧道效应

微观粒子具有穿越势垒的能力称之为隧道效应。近年来，人们发现一些宏观的物理量，如微小颗粒的磁化强度、量子相干器件中的磁通量以及电荷等也具有隧道效应，它们可以穿越宏观系统的势垒而产生变化。这种效应和量子尺寸效应一起，将会是未来微电子器件的基础，它们确定了微电子器件进一步微型化的极限。

1.2 纳米抗菌材料简介

纳米抗菌材料是在纳米技术出现后，将抗菌剂通过一定的方法和技术制备成纳米级抗菌剂，再与抗菌载体通过一定的方法和技术制备而成的具有抗菌功能的材料。随着近几年对纳米抗菌剂、载体及制备方法的广泛研究，纳米抗菌材料的种类愈来愈丰富多彩，制备方法趋于成熟，应用领域也愈来愈广。

1.2.1 纳米抗菌材料的分类

传统的抗菌剂可分为无机系抗菌剂、有机系抗菌剂和天然生物系抗菌剂^[6]。各类抗菌剂有各自的优缺点。有机系抗菌剂的抗菌效果好，成本低廉，但其耐热性差，甚至毒性强，一般只能用来进行一次性消毒或灭菌。天然生物材料作为抗菌剂，毒性和对环境污染小，但受到安全性和加工条件的制约，目前还不能实现大规模市场化，不易做成纳米级抗菌剂。随着人们生活水平的不断提高，希望与人接触的各种生活用具在受到病菌感染后能自动消毒除菌，要求生活用具的材料本身能长期地释放出抗菌剂或起到抗菌剂的作用。大量研究表明，无机系抗菌剂抗菌谱宽，毒性低，耐热性强，适合于人类各种生活条件下的抗菌消毒，且特别宜于做成纳米级抗菌剂，再将其与抗菌载体合成纳米抗菌材料。目前，纳米抗菌材料按照抗菌机制的不同主要分为纳米载银系无机抗菌材料和纳米 TiO_2 光触媒系抗菌材料。纳米载银系无机抗菌材料的抗菌剂有 Ag^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等许多重金属离子，载体主要有沸石、膨润土和硅胶。其中抗菌效果好且对人体毒性最小的是 Ag^+ 。纳米 TiO_2 光触媒系抗菌材料的抗菌剂主要就是纳米 TiO_2 粉体、薄膜等。另外 ZnO 、 Fe_2O_3 、 CdS 、 WO_3 等半导体材料也有一定的抗菌或抑菌作用，也

属于光触媒系抗菌材料。

1.2.2 实验室常用的纳米抗菌材料的制备方法

纳米微粒的制备方法，可以按制备原料状态分为 3 大类：气相法、液相法和固相法；按反应物状态分为干法和湿法；另外按反应的过程分为物理法和综合法^[7]。其中大部分方法都具有粒径均匀，粒度可控，操作简单等优点；但是有的也存在可生产材料范围较窄，反应条件较高，如高温高压等缺点。

实验室常用的纳米材料的制备方法一般为液相法，液相法制备纳米微粒是将均相溶液通过各种途径使溶质和溶剂分离，溶质形成一定形状和大小的颗粒，得到所需粉末的前驱体，热解后得到纳米微粒^[8]。液相法包括化学还原法、沉淀法，水解法，喷雾法，乳液法，溶胶-凝胶法，其中应用最广的是化学还原法、溶胶-凝胶法、沉淀法。

1.2.2.1 化学还原法

银离子极易被还原，常用的还原方法有化学还原、电化学还原和光化学还原。化学还原法是利用化学反应中的氧化还原方法，将银盐中的银阳离子还原成原子银，从而制备出纳米银粒子。光还原法的机理一般认为是在有机物存在下，金属阳离子在光照的条件下，由有机物产生的自由基使金属阳离子还原。顾大明等^[9]以次磷酸钠为还原剂、六偏磷酸钠为分散剂、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）为保护剂，在 pH=12、温度 40~42℃ 条件下与硝酸银溶液反应，得到紫红色银胶。经离心分离 6000 r/min、钝化剂溶液洗涤和真空干燥（1 kPa，50℃）3 h，得到粉末状产物。透射电镜（TEM）和 X 射线衍射仪（XRD）分析表明，产品系粒径为 10~30 nm 的纯相纳米银粉。该方法的制备周期约为 5 h，产率可达 70%~80%。纳米银粒子的 XRD 谱见图 1.2。图 1 中的 5 个衍射峰说明产品是纯相的纳米银。

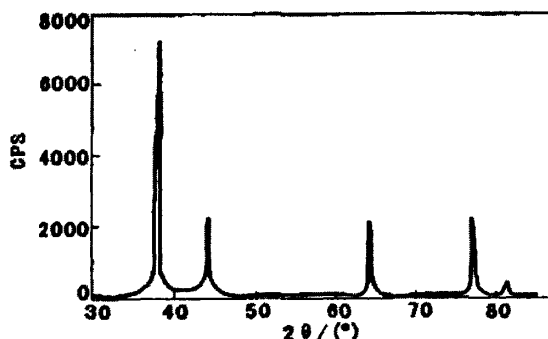


图 1.2 纳米银粒子的 XRD 谱

在有蔗糖存在的条件下，Han Minghan 等^[10]利用不同浓度 Ag^+ 在 TiO_2 上进行

光还原反应,制备了纳米银载量不同的 Ag/TiO₂ 样品。样品呈褐色,通过 XRA 和 TEM 分析表明在 TiO₂ 表面存在金属纳米银粒子,见图 1.3。沉积的 Ag 大小并不一致,估计粒子直径在 10 nm 以内。



图 1.3 纳米银粒子的 TEM 图

姚素薇等^[11]通过光还原方法,利用高分子聚合物壳聚糖制备无机相纳米银粒子。实验中发现,随着光照时间的增长,银离子不断地被还原成新的银原子或纳米银粒子。

1.2.2.2 沉淀法

沉淀法是指包括一种或多种离子的可溶性盐溶液,当加入沉淀剂(如 OH⁻, C₂O₄²⁻等)于一定温度下使溶液发生水解,形成不溶性的氢氧化物、水合氧化物或盐类从溶液中析出,将溶剂和溶液中原有的阳离子洗去,经热解或热脱即得到所需的氧化物粉料。沉淀法包括共沉淀法、直接沉淀法、均相沉淀法等。直接沉淀法的优点是容易制取高纯度的氧化物纳米微粒。

徐甲强等^[12]在室温下,在浓度为 1mol·L⁻¹ Zn(NO₃)₂ 的溶液中,加入浓度 6mol·L⁻¹ 的 NH₃H₂O,不断搅拌控制溶液的 pH 值为 8.0~8.8,得到 Zn(OH)₂ 沉淀,在室温下陈化 36h,过滤并用蒸馏水洗涤干净,于 80℃干燥后,研磨后于 600℃下燃烧 2h,即得平均晶粒度为 50nm 的 ZnO 微粉。P. Nemec 等^[13]使用化学沉积法制备出粒径为 3.8~20nm CdSe 纳米晶体,试验过程中通过选择合适的光密度调整纳米晶体的半径,粒径大小也与沉积时间和温度有关,据此可以根据需要改变产品的纳米尺寸维数。瞿华峰等^[14]将原料 ZrOCl₂·8H₂O(化学纯),Y(NO₃)₃·3.6H₂O(化学纯),Ti(SiO₄)₂(化学纯)按一定配比制成 0.5mol·L⁻¹ 的混合溶液,用化学共沉淀法制得一系列组分不同的 t-ZrO₂-TiO₂-Y₂O₃ 固溶体的纳米粉体,不同组分的固溶体粉体的粒径均在 15~25nm 范围。沃恒洲等^[15]在一定温度和酸度条件下,以硫代乙酰胺水解的硫化氢与钼酸钠反应得到非晶态三硫化钼粉末,再将非晶态三硫化钼粉经过高温加氢脱硫制得纳米级二硫化钼粉末。其粒径为

70~100nm。杨晓娟^[16]等采用化学共沉淀法合成了 4 种尖晶石型复合氧化物 MFe_2O_3 ($M=Cu^{2+}$ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+}) 称取所需量(0.01mol)的金属硝酸盐 $M(NO_3)_2$ 或 $CdSO_4$ ，加 20mL 水溶解，再加入 $0.5mol\cdot L^{-1}$ 的 $Fe(NO_3)_3$ 溶液 40mL(0.02mol)，搅拌均匀，在 70℃ 和不断搅拌下加入 $NaOH(6mol\cdot L^{-1})$ 沉淀剂，保持体系的 pH 值约为 9，完全沉淀后，陈化 1h，抽滤，洗涤，于 110℃ 烘干，再于马弗炉中 400℃ 下灼烧 1h，即得复合氧化物粉末，平均为 32~47nm。郑典模和苏学军等^[17]在水玻璃浓度为 $0.3mol\cdot L^{-1}$ ， H_2SO_4 浓度为 $0.4mol\cdot L^{-1}$ ，添加剂浓度为 $0.9mol\cdot L^{-1}$ ，添加适量表面活性剂，沉淀溶液 pH 值为 8 时获得 SiO_2 粉末，粒度分布均匀，为无定性状，粒径较小，平均粒径为 76nm。

1.2.2.3 乳液法

乳液法是利用两种互不相溶的溶剂在表面活性剂的作用下形成一个均匀的乳液，从乳液中析出固相，这样可使成核、生长、聚结、团聚等过程局限在一个微小的球形液滴内，从而可形成球形颗粒，又避免了颗粒之间进一步团聚。微乳液法具有实验装置简单，能耗低，操作容易；所得纳米粒子粒径分布窄，且单分散性、界面性和稳定性好；与其它方法相比具有粒径易于控制，适应面广等优点。徐甲强等^[12]取 25mL 浓度 $0.1mol\cdot L^{-1}$ 的 $Zn(NO_3)_2$ 溶液，加入环己烷 10mL，正丁醇 15mL， $0.02mol\cdot L^{-1}$ 的 ABS 5mL，搅拌后得透明液，然后加入双氧水 2mL，控制温度为 60℃，用 $6mol\cdot L^{-1}$ 的 $NH_3\cdot H_2O$ 做沉淀剂，控制 pH=8.0~8.8 得到 $Zn(OH)_2$ 溶胶，经过一系列试验步骤得到平均晶粒度为 20nm 的 ZnO 粉末。潘庆谊和徐甲强等^[18]还用微乳液法制备了粒径大小为 5~11nm 纳米 SnO_2 材料。江贵长等^[19]用原位种子乳液复合法合成了苯乙烯/甲基烯酸-二氧化钛复合纳米微球，其平均粒径为 50nm。Wu 等^[20]用乳液膜法制备了平均粒径为 4.5nm 的 CdS 微粒，其中最佳制备条件： Na_2S 的浓度低于 0.3mol/L， Na_2S 与 $CdCl_2$ 的摩尔浓度比高于 1.1，油相和内部前驱物相的体积比为 2.0，乳化液和水(包含了反应物)的体积比为 1.5，pH 值为 3.4~9.6，反应时间为 8min 以上。

1.2.2.4 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法是指前驱物质(水溶性盐或油溶性醇盐)溶于水或有机溶剂中形成均质溶液，溶质发生水解反应生成纳米级的粒子并形成溶胶，溶胶经蒸发干燥转变为凝胶。其优势在于从过程的初始阶段就可在纳米尺度上控制材料结构^[21]。该法具有在低温下制备纯度高，粒径分布均匀，能制得化学活性大，单组分或多组分分级混合物的优点^[22]。该法过程机制有三种类型：传统胶体型、无机聚合物型和络合物型^[8]。

刘静波等^[23]用溶胶-凝胶法以部分醇盐为原料及非醇溶剂，醋酸作催化剂，以不同镧源为掺杂物，在不同工艺条件下合成了一系列镧掺杂钛酸钡基纳米晶。李

蓉萍等^[24]以钛酸丁酯作为原料,无水乙醇作为有机溶剂,盐酸作为催化剂,用溶胶-凝胶成功的制备了纳米 TiO_2 粉末,不同温度热处理后 TiO_2 平均晶粒尺寸有较大差异,大致在 $6.1\sim 93.2\text{nm}$ ($250\sim 750^\circ\text{C}$) 范围内。N.Sanz 等^[25]用溶胶凝胶法制备了粒径为 $20\sim 80\text{nm}$ 的有机纳米微粒, sol-gel 法的低温过程满足有机相的热稳定性的要求,通过控制有机相成核过程、颗粒的增长、醇盐母体的溶胶化过程可以得到粒径均匀的纳米颗粒。Yang 等^[26]在室温常压下用液相法制得粒径为 $10\sim 20\text{nm}$ 的金红石形态的二氧化钛颗粒,随着胶溶和陈化温度的降低,晶体尺寸减小,试验表明液相中晶核越多,产品的粒径越小;胶溶温度是晶体结构的主要影响因素。薛天峰,胡季帆^[27]等在 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 溶液中,加入适量柠檬酸和少许聚乙二醇, 65°C 下搅拌,形成溶胶,直至脱水,形成原粉,前驱体 450°C 热处理,制备得掺杂 Al^{3+} 的纳米 ZnO ,其平均晶粒分别为 40nm 和 35nm 。Lif-shitz^[28]等利用该法在 SiO_2 基体上合成了平均粒径为 $4\sim 20\text{nm}$ 的立方晶型的 CdSe 纳米粒子。Ken-ichi Hashizume 等^[29]用凝胶法制备出粒径为 $2.5\sim 4.7\text{nm}$ 的 CdSe 纳米晶体,通过改变喷射时间和温度以及加入到 TOPO 溶剂中的 $(\text{Me})_2\text{Cd}/\text{TOP}$ 和 TOP-Se 混合物的质量,可以控制晶体的尺寸。

1.2.2.5 溶剂热法

溶剂热法是高温高压下在溶剂(水、苯等)中进行有关化学反应的总称。常见的方法有水热法和有机溶液法。Bai 等^[30]用 InCl_3 和 Li_3N 在 250°C 环境压力下反应,用二甲苯作溶剂,通过溶剂热法制备出粒径为 $27\sim 30\text{nm}$ 的 InN 纳米晶体。张元广和陈友存等^[31]在内衬聚四氟乙烯容器的高压釜中加入适量的油酸(CP),再加入一定量研磨混匀的无水 $\text{Na}_2\text{CO}_3(\text{AR})$ 和无水 $\text{CaCl}_2(\text{AR})$,在 120°C 热处理 6h ,然后自然冷却到室温。将反应后的混合物离心,抽滤,得到白色沉淀,依次用蒸馏水,无水乙醇洗涤 3 次,再以丙酮为提取剂对白色沉淀进行提纯,得到细小的白色粉末,产物在温度为 80°C 时真空干燥 4h ,得到粒径为 5nm 的 CaCO_3 微晶。Qian 等^[32]将适量的分析纯 Na_2S 和 $\text{Zn}(\text{Ac})_2$ 溶液在高压釜中混合, 150°C 下保温 10h 。冷却后经过滤、洗涤及真空干燥,得到粒径为 6nm 的闪锌矿型的 $\beta\text{-ZnS}$ 。

1.2.2.6 超临界法

超临界法^[33]是指以有机溶剂等代替水作溶剂,在水热反应器中,在超临界条件下制备纳米微粉的一种方法。在反应过程中,液相消失,这就更有利于体系中微粒的均匀成长与晶化,比水热法更为优越。姚志强等人^[34]用超临界法制备了 $10\sim 20\text{nm}$ 的 MnZn 铁氧体纳米晶,并与水热法和共沉淀法制备的试样进行了比较,发现超临界法所制备的微粉在晶形、粒子大小、粒度分布、磁性能方面都比水热法和共沉淀法所制备的铁氧体微粉要好。这一结果表明超临界法所制备的纳米晶大小均匀、比表面能较小,不易团聚,晶化相当完全。

1.2.3 纳米材料抗菌机理假说

1、纳米金属材料的抗菌机理

金属(或其离子)能作为抗菌剂已为人们所共识。但汞、镉、铅等对人体有显著的危害,而铜、镍、钴又因为有颜色而影响工业制品的外观,而锌的抗菌强度仅为银的1/1000左右,所以银系无机抗菌剂的应用最为广泛。目前关于银的抗菌机理并没有明确的结论,主要有以下两种假说^[35]:

接触反应假说:银离子接触反应造成微生物共有成分破坏或产生功能障碍。当微量银离子 Ag^+ 到微生物细胞膜时,因后者带负电荷依靠库仑引力使二者牢固吸附, Ag^+ 穿透细胞壁进入胞内,并与——SH基反应,使蛋白质凝固,破坏细胞合成酶的活性,使细胞丧失分裂能力而死亡。 Ag^+ 也能破坏微生物的电子传输系统、呼吸系统,物质传送系统。

催化假说^[36]认为,物质表面的微量银能起到催化活性中心的作用。 Ag^+ 激活空气或水中的氧,产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)及活性氧离子(O_2^-),它们能破坏微生物细胞的增殖能力,抑制或灭杀细菌。

2、光催化型抗菌剂的抗菌机理^[37-40]

用于光催化的纳米粒子有 TiO_2 、 ZnO 、 Fe_2O_3 、 CdS 、 WO_3 等,其中纳米 TiO_2 具有价廉无毒、催化活性高、氧化能力强、稳定性好、易制备成透明薄膜等特点,是最具有代表性的光催化型抗菌剂材料。

光催化型抗菌剂一般采用锐钛型。 TiO_2 的禁带宽度为3.2eV,当 TiO_2 吸收波长小于等于387.5nm的光子后,价带中的电子就会被激发到导带,形成带负电的高活性电子 e_{cb}^- ,同时在价带上产生带正电的空穴 h_{vb}^+ 。在体系内电场的作用下,电子与空穴发生分离,迁移到粒子表面的不同位置。根据热力学理论表明分布在表面的 h_{vb}^+ 可以将吸附在表面的 OH^- 和 H_2O 分子氧化成羟基自由基 $\cdot\text{OH}$,而吸附或溶解在 TiO_2 表面的 O_2 则易俘获 e_{cb}^- 形成 O_2^- 。在光作用下在表面可以产生大量的羟基自由基和氧自由基,而这两种自由基都具有很强的化学活性,能使各种微生物发生有机物质氧化反应。当这些自由基接触到微生物时,也能和微生物内的有机物反应,从而在较短的时间内就能杀灭微生物。因为自由基和微生物内有机物反应没有特异性,所以光催化型抗菌剂具有广谱的抗菌谱。

事实上,由于细菌属于单体有机物大分子,光催化杀菌效应是细菌和 TiO_2 。间广泛相互作用的结果,而不只是一般有机物那样的简单表面反应。由于活性羟基的寿命很短,且不能通过细胞膜,由其直接攻击细胞并破坏细胞结构会比较困难,所以 TiO_2 光催化杀菌效应是活性羟基($\cdot\text{OH}$)与其它活性氧类物质(O_2^- , H_2O_2 等)协同作用的结果。由于 H_2O_2 存在的时间较长,不仅能穿过细菌的细胞膜,分解细菌死亡后释放出的内毒素等毒害性物质,而且能在细菌内部通过反应产生强氧化性活性羟基来杀灭细菌。

1.2.4 抗菌材料抗菌性能测试及评价标准

在医学、微生物学方面,抑制微生物生长主要采用物理和化学方法,按照抑制的不同程度,可分为消毒、灭菌、抗菌等,其涵义有所不同。

消毒:杀死病原菌的方法或作用叫作消毒。具有消毒作用的药物称为消毒剂。一般消毒剂在常用的浓度下只对细菌的繁殖体有效,对于芽胞则无杀害作用。

灭菌:杀灭物体中所有微生物(包括病原菌和非病原菌)的繁殖体和芽胞的方法或作用。

抗菌:防止或抑制微生物生长的方法或作用叫作抑菌或防腐。用于抑菌的药物,称为抑菌剂或防腐剂。许多药品在低浓度时只有抑菌作用,浓度增大或作用时间长时,可起杀菌作用,杀菌作用和抑菌作用总称为抗菌作用^[41]。

1.2.4.1 抗菌性能测试

抗菌性是衡量抗菌制品性能的重要指标,因此科学的测试评价方法是客观反映抗菌性测定结果的关键。大量研究结果表明,应根据抗菌材料的亲(疏)水性、所用抗菌剂的溶出性、以及抗菌材料的外在形态等,研究和使用相应的测试方法^[42]。抗菌试验一般采用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为试验菌,根据样品情况采用各种方法测定抗菌性能。

(1)最小抑制浓度(MIC)法

适用于粉末抗菌剂抗菌性能的测定。将 160~180℃灭菌 2h 的抗菌粉末以 0.1g/L 为中心,按 1/2 和 2 倍的比例配制成各种浓度的悬浊液,置于预先消毒的三角锥形瓶或 L 形试管中,将适量浓度为 $(1.0\sim5.0)\times 10^6\text{cfu/ml}$ 的菌液置于其中,于 35~37℃振荡培养 24h,观察各容器浑浊度判定细菌是否增殖,未增殖的最小浓度即为抗菌粉末的 MIC。

(2)最大杀菌浓度(MBC)法

适用于测定粉末抗菌剂的抗菌性能。将抗菌剂用无菌蒸馏水充分地分散,用蒸馏水以 2 倍的比例稀释,配制成不同浓度的若干悬浊液,将 0.5ml 菌浓为 $2.0\times 10^6\text{cfu/ml}$ 的菌液接种到 0.5ml 各种浓度试验悬浊液中,30±1℃以下于恒温振荡培养 24h。振荡培养后,将各试验液接种到 NB 培养基上。放入恒温培养箱中,于 37±1℃下培养 24h 后。用肉眼观察,没有细菌增殖现象的最大浓度即抗菌剂的 MBC。

(3)抑菌圈法

适用于编织物、不织物和粉末抗菌性能的定性评价。编织物和不织物,采用边长为 25~30mm 大小的正方形试样,将试样制成直径为 20mm 左右的圆片。将普通琼脂培养基 15ml 置于培养皿中并固化,使其充分吸收前培养调制得到的菌液(菌浓为 $1.0\times 10^6\text{cfu/ml}$)。将剩余的菌液用移液管吸干,再将试验片放于培养基

上, 与其紧密相贴。放入恒温器于 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 24h, 根据试验片周围产生的抑菌圈的大小评价抗菌材料及其制品的抗菌性能。

(4) 振荡法

适用于织物和不织物等抗菌制品的抗菌性能。计算抗菌制品的比表面积, 将抗菌处理的待测样品置于专用的塑料袋中。对应于 10cm^2 的抗菌剂表面积, 加入 2ml 接种菌液, 在袋中引入和接种菌液量相当的空气, 将袋热封, 而后在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下振荡 24h, 用稀释平板培养法测定存活菌数。

(5) 薄膜密贴法

适用于块状样品、织物和不织物。将边长约为 50mm 的正方形样品用酒精消毒 3 次, 滴上 0.5ml 接种菌液接种, 在其上贴上 4.5cm 见方的正方形专用消毒薄膜, 在培养箱中于 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养 24h。将培养后薄膜上所附着的细菌用 9.5ml SCDLP 培养液充分淋洗, 采用 SA 培养基, 利用琼脂培养法测定淋洗液中的细菌浓度, 评价制品的抗菌性能^[43]。

1.2.4.2 抗菌性能评价

目前对抗菌性能的评价, 国内外尚无统一的标准, 国际标准有 ISO846, 日本标准有 JISZ2911-1992, 美国标准有 ASTM G21-1990 等。主要包括抗菌效果、抗菌范围、安全性等项指标。

(1) 抗菌效果

抗菌效果主要是通过最小抑制浓度(MIC)值——即阻止细菌繁殖的抗菌剂的最小浓度, 最大杀菌浓度(MBC)值——抗菌剂完全杀灭细菌的最大浓度体现出来: MIC 值越低和 MBC 值越高, 材料的抗菌、杀菌效果越好。

(2) 抗菌范围

通常情况下, 不同的抗菌材料只对特定的一些菌种有抗菌性, 所以在选择抗菌剂的时候希望其抗菌范围越广越好, 即有广谱性。

(3) 持续性

抗菌材料应考虑光分解以及重复洗涤等因素, 要求在该制品使用时间内有持续的抗菌性。缓释型抗菌材料由于在长时间内缓慢地释放出抗菌剂, 能长期有效地保持抗菌剂浓度, 使其抗菌性能稳定, 杀菌时间长, 使用方便。

(4) 细菌耐药性

有些细菌易获得耐药性, 在使用抗菌材料的过程中要求其抗药性越小越好。以绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等菌种为实验菌种, 反复测定 MIC 值 10 次, 如果 MIC 值无明显提高, 则表明该抗菌剂无细菌抗药性。

(5) 耐光、耐热性

不同抗菌材料的加工和使用条件要求抗菌剂具有相应的耐热性, 不应挥发和

降解。在使用抗菌材料的过程中不能出现随时间而变色、物理性能降低等问题^[44]。

1.3 微生物危害

1.3.1 微生物及其危害

微生物是存在于自然界的一群体形细小、构造简单、肉眼无法直接看到。必须借助显微镜等设备才能观察到的微小生物。微生物虽然个体微小，但仍具有一定的形态结构、生理功能，并能在适宜的条件下迅速繁殖生长。微生物种类繁多，按其结构、组成等差异可分成三大类^[45]：

(1) 非细胞型微生物。体积极其微小，只能在活细胞内生长繁殖，如病毒；

(2) 原核细胞型微生物。仅有原始核，无核仁和核膜，缺乏完整的细胞器，如细菌等。

(3) 真核细胞型微生物。细胞核分化程度较高，有核仁、核膜、核染色体，有完整的细胞器，如真菌等。

细菌是微生物中最重要的种群之一。细菌可以根据其外形的基本形态分为球菌、杆菌和螺形菌三类。对于细菌的生存和繁殖，水分、合适的环境酸碱性、氧气和二氧化碳的合适浓度、矿物质、营养及适当的生长因子都是十分必要的，另外还需合适的温度和压力。通常将能引起人类等宿主致病的细菌叫病原菌。病原菌致病一般通过两种途径：一是由细菌毒素直接引起，另一是宿主对细菌产生的产物过敏，然后通过免疫反应间接地造成损伤。微生物带给人类的隐患和威胁却不容忽视。

1.3.2 微生物在材料表面的生长

由于微生物的分布极其广泛，在空气、土壤和水体中都有多种微生物分布，所以在各种场合使用的材料不可避免地接触到微生物。微生物一旦接触到材料表面就可能沉积在材料表面，通过微生物和材料表面的相互作用逐渐粘附定植在材料表面，然后进一步在材料表面生长。人们经常可以发现在很多固体表面尤其是在潮湿表面由一层勃滑的物质，这就是微生物在材料表面生长的结果。一般微生物在材料表面生长可以分成以下几个步骤^[46]。

1、沉积；

2、粘附沉积在材料表面的微生物由可逆的沉积到不可逆沉积的转化过程；

3、生长完成粘附的微生物很快恢复生长，微生物开始分泌细胞外基质 ECM，尤其是勃性基质，并逐渐开始繁殖；

4、形成菌膜随着微菌落中微生物进一步生长繁殖和分泌的 ECM 量进一步提高，材料表面的微菌落逐渐相互凝集，相互融合，形成一个完整的复合菌落网，当聚集在材料表面的微生物数量达到一定阈值后，复合菌落的性质将会发生巨大

的变化，菌落内微生物密度明显降低，但相互作用更加密切，即材料表面形成了菌膜。

1.3.3 常见的微生物抑制方法

最常见的方法有高温湿热灭菌(医院、实验室等)、巴斯德消毒法(食品消毒)、环氧乙烷消毒法(一次性卫生用品)和 γ -射线消毒法等^[47]。目前使用的杀灭或抑制方法列举于图 1.4 中。

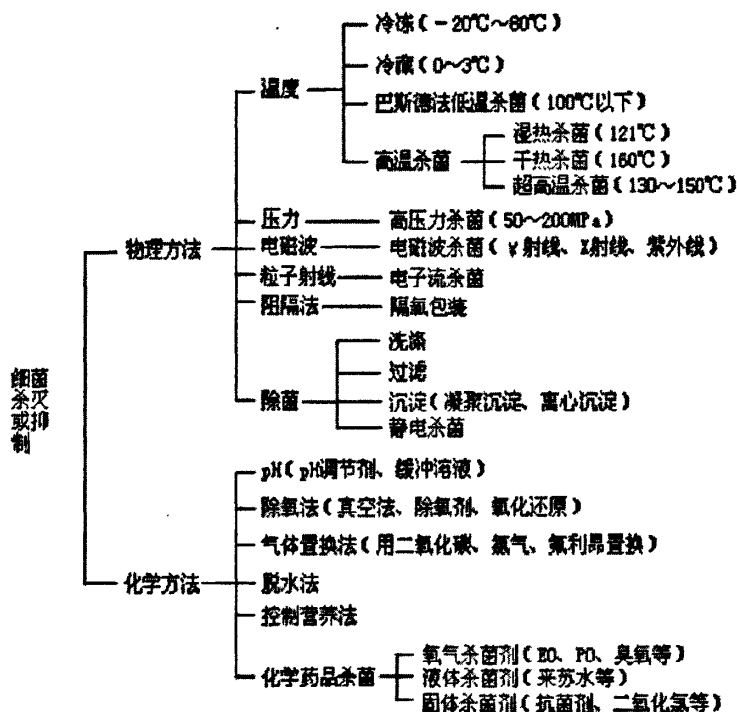


图 1.4 常见细菌杀灭或抑制方法

1.4 立题依据及研究内容

1.4.1 立题依据

纳米材料具有广泛的抑菌杀菌功能，但是纳米材料的杀灭过程及杀菌机理至今没能研究清楚。本研究提出利用材料学、微生物学、生物化学和分子生物学几种手段相结合的办法对金属离子的杀菌机理和杀灭过程进行研究，以便从本质上理解杀菌机理，降低纳米颗粒对人体的毒副作用。

国内纳米抗菌材料的研究主要集中在抗菌性能方面。奚正英^[48]选用TiO₂纳米悬浮液作为抗菌剂，以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和枯草芽孢杆菌作为受试菌株，研究了该材料在不同抗菌剂浓度下的抗菌效果，得出该抗菌剂的最低抑菌浓度

(MIC)为1000ppm; 在另一个实验中, 他们对最高抗菌浓度的研究表明 TiO_2 与 ZnO 这两种抗菌剂的都高达 $10^7 \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当受试菌株的浓度为 $10^7 \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 抑菌率都高达99.99%; 当菌液浓度提高时, 抑菌率有所下降。

另外, 熊德鑫、梁明等^[49]在对新型纳米抗菌塑料的抑菌试验中证实, 新型纳米抗菌塑料对大肠杆菌等十几种受试菌株的MIC都在100~500ppm之间, 对受试菌株的最高抗菌浓度都不超过 $10^8 \text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。林爱红等^[50]在水溶性纳米抗菌膜实验中, 将此膜溶于5ml灭菌水中作用10min可杀灭95.39%的金黄色葡萄球菌和93.28%的白色念珠菌。隆泉等^[51]研究了4种不同的纳米抗菌材料对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抗菌作用以及和纳米材料抗菌效果的对比, 结果发现不管是对金黄色葡萄球菌还是对白色念珠菌, 纳米抗菌材料的抗菌效果要远远优于微米抗菌材料, 在所选纳米抗菌材料中, TiO_2 对两种菌的抑杀作用是最强的。

以上研究证明, 纳米抗菌材料对常见的致病菌和污染菌都具有较好的抗菌效果, 其中对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌性能尤其令人满意, 只是没有较为系统的进一步的研究。本课题采用革兰氏阳性细菌(G^+)、革兰氏阴性细菌(G^-)以及真菌中的啤酒酵母菌作为受试菌株, 利用生物化学手段在宏观上和微观上测试纳米材料对不同类型的抑制和杀灭作用, 并以此认识纳米材料的杀菌机理和杀灭过程。

1.4.2 研究内容

(1) 制备纳米材料——纳米银抗菌材料和纳米 TiO_2 抗菌材料, 选择本科题的受试菌株, 并将其分离并且活化;

(2) 根据现有的条件, 测定纳米材料抗菌性能的各种指标, 实际考察杀菌纳米材料的宏观杀菌效果;

(3) 利用生物化学手段研究有害菌的杀灭过程;

(4) 利用环境扫描电子显微镜观察纳米材料对受试菌的抑制和杀灭过程, 在微观层次上认识杀菌机理和杀菌过程。

第2章 纳米银的制备及受试菌株的选择和分离

2.1 纳米材料的制备

2.1.1 实验材料

聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), AgNO_3 , 乙二醇

2.1.2 实验仪器

JT202N型电子天平

上海精天电子仪器有限公司

芬兰可调式移液器

上海雷勃分析仪器有限公司

84-1A磁力搅拌器

上海司乐仪器厂

2.1.3 实验方法

1、分别准确称量0.034g的 AgNO_3 和0.066g的PVP, 并将其分别溶解到两份20mL的乙二醇溶液中, 充分混匀;

2、将PVP的乙二醇溶液逐滴地加入到 AgNO_3 乙二醇溶液中, 同时加磁力搅拌约10min, 这时Ag纳米颗粒渐渐形成;

3、将形成的纳米溶胶液转移到细口瓶中, 将其妥善保存, 使其充分熟化。

2.2 受试菌株的选择和分离

2.2.1 菌株及其选择

根据绪论中微生物的危害所涉及的内容, 选择受试菌种既要有代表性, 又要考虑到各个菌种细胞壁和细胞膜结构的差异, 还必须充分利用本实验室已有的实验菌种。细菌和真菌、革兰氏阳性细菌(G^+)、革兰氏阴性细菌(G^-)以及有无芽孢的不同菌种之间的胞壁、胞膜和胞内结构是有所不同的。根据以上原则我们选择了五种细菌和两种啤酒酵母菌(真菌)作为受试菌株, 分别是:

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、乳酸杆菌 (*Bacillus acidilactici*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、啤酒酵母 362K、啤酒酵母 206 (*Saccaromyces cerevisiae*)。

金黄色葡萄球菌、乳酸杆菌属于革兰氏阳性细菌; 大肠杆菌、沙门氏菌属于革兰氏阴性细菌; 枯草芽孢杆菌具有芽孢的特殊结构; 啤酒酵母 362K 是上面酵母、啤酒酵母 206 是下面酵母, 均有较强的存活力。另外, 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌等是致病菌或食品生产中常出现的污染菌, 故选用这七种菌作抗菌性能测试具有比较好的代表性。

以上菌株中,金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、啤酒酵母 362K 和啤酒酵母 206 为本实验室保藏,乳酸杆菌和沙门氏菌是为了本课题所分离所得,其分离方法和过程将在下面的实验中介绍。

2.2.2 培养基及试剂^[52,53]

(1) 改良 TJA 培养基:

番茄汁	50mL	酵母抽提液	5g
牛肉膏	10g	葡萄糖	2g
乳糖	20g	碳酸钙	10g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	2g	吐温-80	1g
乙酸钠	5g	琼脂	15g

蒸馏水加至 1000mL。

番茄汁的制作:将新鲜番茄洗净,切碎(切勿捣碎),放入锥形瓶,置 4℃ 冰箱 8h-12h,取出后用纱布过滤。如一次使用不完,可将其置入 4℃ 冰箱,可保存四个月使用时让其在常温下自然溶解。

制法:将所有成分加入蒸馏水中,加热溶解,校正 pH6.8±0.2。分装,0.1MPa 高压灭菌 15min~20 min。临用时加热熔化琼脂,冷至 50℃ 时使用。

(2) 蛋白胨水、靛基质试剂:

蛋白胨	20g	氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL	pH	7.4

按上述成分配制,分装小试管,0.1MPa 高压灭菌 15min。

将 1g 对二甲基苯甲醛溶于 95mL 的 95%酒精内,然后缓慢加入浓盐酸 20mL 即可,此为欧-波试剂。

挑取少量培养物接种,在 (36±1)℃ 培养 1~2 天,必要时可培养 4~5 天。加入欧-波试剂约 0.5mL,沿管壁留下,覆盖于培养液表面,阳性者与液面接触处呈玫瑰红色。

(3) 缓冲蛋白胨水 (BP)

蛋白胨	10g	磷酸二氢钾	1.5g
蒸馏水	1000mL	磷酸氢二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	9g
氯化钠	5g	pH	7.2

按上述成分配好后以大烧瓶装,0.1MPa 高压灭菌 15min。临用时无菌分装每瓶 225mL 本培养基供沙门氏菌前增菌用。

(4) 氯化镁孔雀绿 (MM) 增菌液

取氯化镁孔雀绿基础 3.0g,加 100mL 蒸馏水后,0.1MPa 高压灭菌 15min 备用。

(5) 亚硒酸盐胱氨酸 (SC) 增菌液

蛋白胨	5g	磷酸二氢钾	4.5g
-----	----	-------	------

磷酸氢二钠	9g	蒸馏水	1000mL
亚硒酸氢钠	4g	乳糖	4g
L-胱氨酸	0.01g		

称取 L-胱氨酸 0.1g, 加入 1mol/L 的氢氧化钠 1.5mL, 使溶解, 再加入蒸馏水 8.5mL, 制成 1% 的 L-胱氨酸-氢氧化钠溶液。将除亚硒酸氢钠和 L-胱氨酸以外的各成分溶于 900mL 的蒸馏水中, 加热煮沸, 待冷备用。另将亚硒酸氢钠溶解于 100mL 蒸馏水中, 加热煮沸, 待冷, 以无菌操作与上液混合。再加入 1% 的 L-胱氨酸-氢氧化钠溶液 1mL。分装于灭菌瓶中, 每瓶 100mL, pH 为 7.0 ± 0.1 。

(6) 亚硫酸铋琼脂 (BS)

称取本品 4.96 克, 加入 100ml 蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 冷却至 55°C , 摇匀, 倾注灭菌平板备用。勿需高压灭菌。

(7) DHL 琼脂

称取 DHL 琼脂基础 65.2g, 加入蒸馏水 1000mL, 煮沸至全部溶解, 冷却至 $50 \sim 55^{\circ}\text{C}$, 倾注平板。

(8) 三糖铁琼脂 (TSI)

称取三糖铁琼脂 64.5g, 加入蒸馏水 1000mL, 煮沸至全部溶解, 分装于 $16\text{mm} \times 150\text{mm}$ 试管中, 0.1MPa 高压灭菌 15min, 制成斜面长 $4 \sim 5\text{cm}$, 底部长 $2 \sim 3\text{cm}$ 。

(9) 尿素琼脂 (DHTZ)

取尿素琼脂基础 2.1g, 加入蒸馏水 100mL, 煮沸至全部溶解, 0.1MPa 高压灭菌 15min, 冷却至 60°C , 以无菌技术加入无菌 40% 的尿素水溶液 5mL, 混匀后分装制成高层斜面备用。

(10) 赖氨酸脱羧酶试验培养基

蛋白胨	5g	酵母浸膏	5g
葡萄糖	5g	蒸馏水	1000mL
1.6% 溴甲酚紫-乙醇溶液	1mL	L-氨基酸	0.5g/100mL
pH	6.8		

除氨基酸以外的成分加热溶解后, 分装每瓶 100mL, 加入赖氨酸。再行校正 pH 至 6.8。对照不加赖氨酸。分装于灭菌的小试管内, 每管 0.5mL, 上面滴加一层液体石蜡, 115°C 灭菌 10min。

从琼脂斜面上挑去培养物接种, 于 $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 $18 \sim 24\text{h}$, 观察结果。赖氨酸脱羧酶阳性者由于产碱, 培养基应呈紫色; 阴性者无碱性产物, 但因葡萄糖产酸而是培养基变为黄色。对照管应为黄色。

(11) 产硫化氢试验培养基

蛋白胨	20g	氯化钠	5g
柠檬酸铁铵	0.5g	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0.5g

琼脂	15~20g	蒸馏水	1000mL
PH	7.2		

先将琼脂、蛋白胨溶化，冷却到 60℃ 加入其它成分。分装试管，0.1MPa 高压灭菌 15min 备用。

取用硫化氢实验培养基两支，分别用穿刺法接种各可以菌株，试管上注明序号，置于 37℃ 培养 24h；培养后取出观察，看有无黑色沉淀产生。

(12) 明胶培养基

蛋白胨	5g	明胶	120g
牛肉膏	3g	蒸馏水	1000mL

以无菌操作，穿刺接种可疑菌株于明胶培养基中，置于 37℃ 培养 48h，置冰箱中速冷后，观测其液化明胶的情况。

(13) 硝酸盐培养基：

硝酸钾	0.2g	蛋白胨	5g
蒸馏水	1000mL	pH	7.4

甲液：将对甲基苯磺酸 0.8g 溶于 5mol/L 乙酸溶液 100mL 中。

乙液：将甲萘胺 0.5g 溶于 5mol/L 乙酸溶液 100mL 中。

①分别接种可疑菌株于硝酸盐液体培养基中，每菌株做两个重复，另外一贯不接种作为对照，标明序号，置于 37℃ 培养 48~96h；

②取两支干净的空试管或在比色瓷盘小窝中倒入少许上述培养液，再滴一滴格里斯氏试剂甲、乙液。在对照管中同样加入甲、乙液各一滴；

③当培养液中滴入甲、乙液后，溶液如果变为粉红色、玫瑰红色、橙色、棕色等表示有亚硝酸盐存在，为硝酸盐还原阳性。如无红色出现，则可加入 1、2 滴二苯胺试剂，此时如是蓝色反应，则为阴性反应。如不呈蓝色反应，则仍为阳性反应。

(14) 过氧化氢酶试验

3%过氧化氢溶液，临用时配制。

挑取固体培养基上菌落一接种环，置于洁净试管内，滴加 3% 过氧化氢溶液 2mL，观察结果。于 0.5min 内发生气泡者为阳性，不发生者为阴性。

(15) 氧化酶试验

①1%盐酸二甲苯对苯二胺溶液，少量新鲜配制，于冰箱内避光保存。

②1%α-萘酚-乙醇溶液

取白色洁净滤纸粘取菌落，加盐酸二甲苯对苯二胺溶液一滴，阳性者呈粉红色，并逐渐加深；再加 α-萘酚-乙醇溶液一滴，阳性者于 0.5min 内呈现鲜蓝色。阴性者于 2min 内不变色。

(16) 革兰氏染色液

(17) 芽孢染色液

(18) 生理盐水稀释液

制备0.85%氯化钠溶液，0.1MPa高压灭菌15min，备用。

2.2.3 实验仪器

电热培养箱	江苏省东台县电器厂
SW-CT-2FD 型超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
干燥器厌氧培养装置	

2.2.3 乳酸杆菌的分离鉴定

1、分离路线

乳酸杆菌分离程序见图2.1。

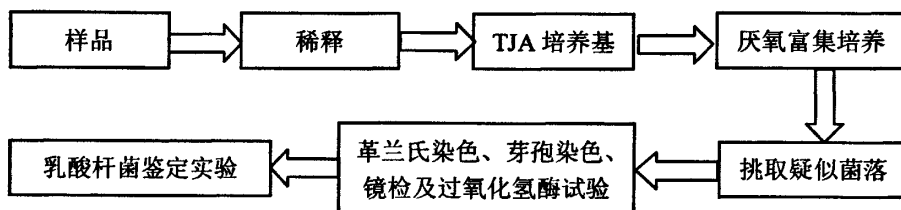


图 2.1 乳酸杆菌分离路线图

2、乳酸杆菌的分离^[52]

(1) 以无菌操作将经过充分摇匀的发酵酸奶25ml(g)放入含有225mL灭菌生理盐水的灭菌广口瓶内作成1: 10的均匀稀释液。

(2) 采用逐级稀释的办法将1: 10的稀释液稀释至 10^{-5} ，选择2个~3个以上适宜稀释度，分别在作10倍递增稀释的同时，移取1mL稀释液于灭菌平皿内，每个稀释度作两个平皿。

(3) 稀释液移入平皿后，应及时将冷至50℃的改良TJA培养基注入平皿约15mL，并转动平皿使混合均匀。同时将改良TJA培养基倾入加有1mL灭菌生理盐水的灭菌平皿内作空白对照，以上整个操作自培养物加入培养皿开始至接种结果须在20 min内完成。

(4) 待琼脂凝固后，翻转平板，置 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 温箱内厌氧培养 $72 \pm 3\text{h}$ ，观察乳酸菌菌落特征。乳酸菌在不同培养基上的菌落特征见附表1.1。随机挑取五个疑似菌落数进行革兰氏染色，芽孢染色、显微镜检查并做过氧化氢酶试验。革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，无芽孢的球菌或杆菌可定为乳酸菌。

3、乳酸杆菌的鉴定

将第一步得到的疑似菌落进行乳酸杆菌鉴定试验：分别将可疑菌株做硝酸盐还原试验、明胶液化试验和靛基质和硫化氢试验；乳酸杆菌菌株结果极少见还原硝酸盐，不液化明胶，不产生靛基质和硫化氢。

2.2.4 沙门氏菌的分离鉴定^[53]

1、沙门氏菌分离路线

沙门氏菌分离程序见图2.1。

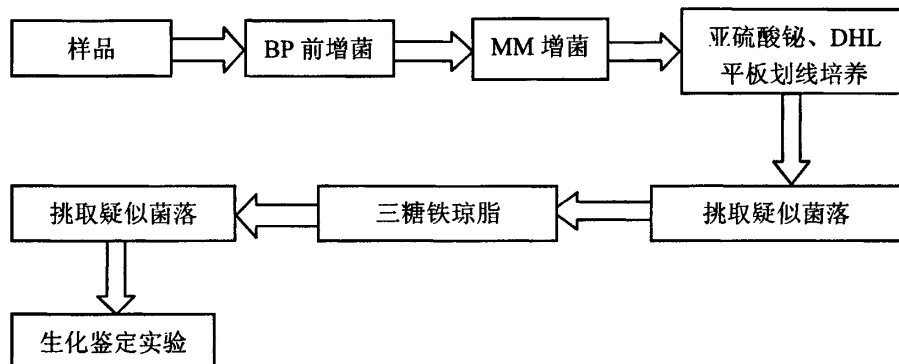


图 2.2 沙门氏菌分离路线图

2、沙门氏菌的分离

(1) 前增菌和增菌

称取冻肉25克，将其切碎，加在装有225mL缓冲蛋白胨水的500mL广口瓶内，于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养4h，移取10mL，转种于100mL氯化镁孔雀绿增菌液内，于 42°C 培养18~24h。

(2) 分离

取增菌液1环，划线接种于亚硫酸铋琼脂（BS）平板一个和DHL琼脂平板一个。两种增菌液可同时划线接种在同一个平板上。于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养18~24h（DHL）或40~48h（BS）。观察各平板上生长的菌落，沙门菌属亚属 I、II、IV、V 和亚属III在各个平板上的菌落见附表1.2。

3、生化鉴定试验

①挑取选择性平板上的疑似菌落，接种三糖铁琼脂。一般应该多挑几个，以防遗漏。在三糖铁琼脂内，各个均属的主要反映结果见附表1.3。

附表1.3说明在三糖铁琼脂内只有斜面产酸并同时硫化氢（ H_2S ）阴性的菌株可以排除。其它的反应结果均有沙门菌的可能，同时也均有不是沙门菌的可能，因此都需要做几项最低限度的生化试验。必要时作抹片染色镜检应为革兰氏阴性短杆菌，做氧化酶试验应为阴性。

②在接种三糖铁琼脂的同时，再接种蛋白胨水（供作靛基质试验）、尿素琼脂（pH7.2）氰化钾（KCN）培养基和赖氨酸脱羧酶试验培养基及对照培养基各一管，于 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养18~24h，必要时可延长至48h，按附表1.4判定结果。

2.3 实验结果及讨论

2.3.1 纳米银的制备及条件的讨论

通过多次试验，得到了生长情况较好的纳米银溶胶。需要注意的是，在制备过程中，为了使分散均匀，应当逐滴地加入PVP的乙二醇溶液，同时需要加磁力搅拌。原则上是搅拌时间长一点较好，但如果时间较长，纳米银的颗粒已经形成了，PVP起不到应有的保护作用，所以建议搅拌时间定为10min。在搅拌过程中如果发现溶液颜色发生变化，则说明Ag纳米颗粒已经形成，此时只有几个纳米左右。将纳米溶胶转移到密封的细口瓶中保存，在这个过程中，由于发生奥斯德丽尔熟化，颗粒逐渐长大，将其低温保存。以初始AgNO₃的浓度为标准计算纳米银的浓度，得到了浓度为0.85g/L的纳米银溶胶液。

2.3.2 乳酸菌的分离鉴定结果

1、乳酸杆菌的分离结果

根据附表1.1中所给出的乳酸杆菌的菌落特征，观察平板中的各菌落的菌落特征，随机挑取8个疑似菌落进行革兰氏染色，显微镜检查并做过氧化氢酶试验，结果如表2.1所示。

表 2.1 八株疑似菌落数的鉴别结果

编号	革兰氏染色	芽孢染色	镜检	过氧化氢酶试验
1	+	无芽孢	杆菌	-
2	+	无芽孢	球菌	+
3	-	无芽孢	杆菌	-
4	+	无芽孢	杆菌	-
5	-	无芽孢	杆菌	-
6	+	无芽孢	杆菌	-
7	+	无芽孢	杆菌	-
8	+	无芽孢	球菌	-

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

根据根据表2.1所示，革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，无芽孢的球菌或杆菌可定为乳酸菌；因此可以将2、3、5号疑似菌落排除，所以，剩余的1、4、6、7、8号菌落为乳

酸菌疑似菌落。同时，乳酸杆菌在显微镜下应为短杆菌，因此可以将显微镜检查为球菌的8号可疑菌株排除。最后得到了4株乳酸杆菌疑似菌落，将它们重新编号为1~4。

2、乳酸杆菌的鉴定结果

将符合条件的菌株进行乳酸杆菌鉴定试验，结果如表2.2所示。

表 2.2 乳酸杆菌鉴定试验结果

编号	硝酸盐	明胶	胨基质	硫化氢
1	+	-	-	+
2	-	+	-	+
3	-	-	-	-
4	+	-	-	-

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

乳酸杆菌菌株结果极少见还原硝酸盐，不液化明胶，不产生胨基质和硫化氢。根据表2.2所示，1号菌株硝酸盐还原试验和硫化氢试验为阳性，即有硝酸盐被还原，并产生硫化氢；2号菌株明胶液化试验为阳性，即可以使明胶液化；4号菌株硝酸盐还原试验为阳性；故1、2、4三株菌株可以排除是乳酸杆菌的可能，得到3号菌株为乳酸杆菌，并在低温下妥善保存。

2.3.3 沙门氏菌的分离鉴定结果

1、选择性培养基及三糖铁琼脂内的反应结果

根据附表1.2中所给出的沙门菌属在各种选择性琼脂平板上的菌落特征，观察平板中的各菌落的菌落特征，随机挑取与之相符的10个疑似菌落，然后接种在三糖铁琼脂上，观察各个菌落的菌落特征。

表 2.3 各疑似菌落在三糖铁琼脂内的反应结果

菌落序号	斜面	底层	产气	硫化氢
1	-	-	+	+
2	+	+	+	-
3	-	+	-	+
4	+	+	+	+
5	-	-	-	-
6	-	+	+	+
7	+	+	-	-
8	-	-	+	-
9	-	+	-	+
10	+	+	+	+

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

附表1.2说明在三糖铁琼脂内只有斜面产酸并同时硫化氢（H₂S）阴性的菌株可以排除。根据表2.3所示结果，并与附表1.3所示结果进行对比，可以发现只有2号和7号疑似菌落是斜面产酸并同时硫化氢（H₂S）阴性的菌株，因此可以排除2号和7号疑似菌落是沙门菌的可能。但其它的反应结果均不能完全确定为沙门氏菌，因此需要做几项最低限度的生化试验。

3、疑似菌落的生化试验结果

根据附表1.4，只有反应结果属于A₁、A₂和B₁时，可疑菌株才有可能属于沙门菌属，而且只有当反应结果属于A₁时，才完全可以确定可疑菌株属于沙门菌属。但是如果当硫化氢试验为阴性时，根据本实验室现有的实验设备和实验条件，将不可能完全确定疑似菌落属于沙门菌属，所以在做沙门菌属的生化鉴定试验时，可以不必做硫化氢试验为阴性的菌落，而只做硫化氢试验为阳性的菌落，根据反应结果来确定疑似菌落是否属于沙门菌属。将六株硫化氢试验为阳性的菌落重新编号为1~6，进行沙门菌属生化鉴定试验，结果如表2.4所示。

表 2.4 六株 H₂S 阳性疑似菌落的生化试验结果

菌落序号	H ₂ S	靛基质	pH7.2 尿素	赖氨酸脱羧酶
1	+	-	+	+
2	+	+	-	-
3	+	-	-	+
4	+	-	+	+
5	+	+	+	-
6	+	+	-	+

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

如表2.4所示，与附表1.4中各项指标的鉴定结果逐一比较，可以发现在六株H₂S阳性疑似菌落中，3号疑似菌落的生化试验结果与附表1.4中A₁的情况相同，6号结果与A₂情况相同，但这种情况也不能完全确定为沙门氏菌，因为它们同样也有可能属于爱德华菌属；另外，1号、2号、4号和5号都可以排除属于沙门菌属的可能，只有3号疑似菌落可以确定为属于沙门菌属。继续将3号疑似菌落做革兰氏染色、镜检和氧化酶试验，发现其为革兰氏阴性短杆菌，做氧化酶试验为阴性，进一步确认了3号疑似菌落是属于沙门菌属的。

2.4 小结

本章实验的目的是为课题以后的实验提供实验材料和受试菌株。

首先，选择了本实验的受试菌株。选择受试菌株首先必需要有代表性，要考虑到各个菌种细胞壁和细胞膜结构的差异；另外要尽量利用本实验室现有的菌种。我们选择了五种细菌和两种啤酒酵母菌（真菌）作为受试菌株。金黄色葡萄球菌、乳酸杆菌属于革兰氏阳性细菌；大肠杆菌、沙门氏菌属于革兰氏阴性细菌；枯草芽孢杆菌属于细胞胚胎；啤酒酵母 362K 是上面酵母、啤酒酵母 206 是下面酵母，均有较强的存活力，故选用这七种菌作抗菌性能测试具有比较好的代表性。其中五株为本实验室已有菌种，另外两种通过分离也比较容易得到。

其次，利用实验室常用的方法，经过反复试验，得到生长情况较好的纳米银溶胶，其浓度为 0.85g/L。制备过程中需要注意的是，为了使分散均匀，应当逐滴地加入 PVP 的乙二醇溶液，同时需要加磁力搅拌。原则上是搅拌时间长一点较好，但如果时间较长，纳米银颗粒已经形成了，PVP 起步到应有的保护作用，所以建议搅拌时间定为 10min。将纳米银溶胶转移到密封的细口瓶中保存，在这个过程中，由于发生奥斯德丽尔熟化，

纳米颗粒的尺寸逐渐长大。

最后，分别从发酵的酸奶和冻肉中分别分离出了乳酸杆菌和沙门氏菌，并进行了相关的生化鉴定试验，证明它们的确属于乳杆菌属和沙门菌属。

第3章 纳米银抑菌作用及机理的研究

3.1 实验材料

3.1.1 受试菌株和纳米抗菌材料

(1) 受试菌株

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、乳酸杆菌 (*Bacillus acidilactici*)；大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)；啤酒酵母362K (上面酵母)、啤酒酵母206 (下面酵母) (*Saccaromyces cerevisiae*)。

(2) 纳米抗菌材料

0.85g/L纳米银溶胶。

3.1.2 培养基及溶液的配制

(1) 营养肉汤培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL

按上述成分混合，溶解后校正pH7.4，分装烧瓶，每瓶225mL，0.1MPa高压灭菌15min。

(2) 营养琼脂培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
琼脂	15~20g
蒸馏水	1000mL

将除琼脂以外的各成分溶解与蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2mL，校正pH至7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，0.1MPa高压灭菌15min。

(3) YEPD培养基

葡萄糖	20g
蛋白胨	20g
酵母粉	10g
琼脂	20g
蒸馏水	1000mL

将除琼脂以外的各成分溶解与蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2mL，校正pH至

6.0。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，0.1MPa高压灭菌15min。液体培养基不加琼脂。

(4) MRS培养基

蛋白胨	10g	牛肉膏	10g
酵母粉	5g	K ₂ HPO ₄	2g
柠檬酸二铵	2g	乙酸钠	5g
葡萄糖	20g	吐温80	1mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.58g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25g
琼脂	15~20g	蒸馏水	1000mL

将以上成分加入到蒸馏水中，加热使完全溶解，调pH至6.2~6.4，分装于三角瓶中，0.1MPa高压灭菌15min。液体培养基不加琼脂。

(5) 生理盐水稀释液

制备0.85%氯化钠溶液，0.1MPa高压灭菌15min，备用。

(6) 玻璃器皿的灭菌

将培养皿、三角刮刀、试管洗净烘干，用牛皮纸包扎(将烘干的试管用脱脂棉塞封口)，在180℃干热空气中灭菌2h。备用。

3.1.3 仪器

电热培养箱	江苏省东台县电器厂
SW-CT-2FD型超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
自动立式压力蒸汽灭菌器	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
101-3型电热鼓风干燥箱	上海阳光实验仪器有限公司
JT202N型电子天平	上海精天电子仪器有限公司
HZQ-Q全文振荡器	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
pH S-25数显pH计	上海精密科学仪器有限公司
芬兰可调式移液器	上海雷勃分析仪器有限公司
Quanta200环境扫描电镜	FEI co-Holland
游标卡尺	

3.2 实验准备

3.2.1 受试菌液制备^[54,55]

将在低温下保藏的五种细菌和两种酵母菌取出，以无菌操作分别挑取一环接种于相应的液体培养基中（大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌为营养肉汤培养基，乳酸杆菌为MRS培养基，酵母菌为YEPD培养基），置于37℃恒温培养箱中培养18~24h；取0.1mL菌悬液涂布到相应的琼脂平板上，置于37℃恒温培养箱中培养48~

72h; 挑取琼脂平板上单独且菌落较大的菌株接种于盛有相应的液体培养基的试管中, 置于37℃恒温培养箱中培养18~24小时为第一代, 连续传代至第三代作为试验菌种, 如发现有杂菌者不得使用。

另取第三代试验菌株 1mL, 用 0.85% 的无菌生理盐水将其稀释至 10^{-7} , 然后分别取 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 的稀释液 0.1mL 将其涂布在相应的琼脂平板上, 每个稀释度平行做三个平板, 以平板上存在 30~300 个菌落数的平板为准, 统计各平板上的菌落数, 计算其平均数, 并计算出初始菌悬液的浓度。然后用相应的液体培养基进行一系列稀释, 使 1mL 菌液含 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 个细菌, 置 2~8℃ 保存备用。

以上所有操作都是在无菌操作台上进行。

3.2.2 抗菌剂溶液和悬浮液的制备和稀释

将第 2 章制备的纳米银溶胶配制成 10000 μ g/L, 将其分别稀释至浓度为 4000 μ g/L、2000 μ g/L、1000 μ g/L、500 μ g/L、200 μ g/L、100 μ g/L 的, 低温保存, 备用。

3.2.3 培养基准备

将灭菌后的各种固体培养基倒入培养皿(已灭菌)中, 置 37℃ 恒温箱中培养 24h 小时, 无杂菌者方可使用。

3.2.4 菌液活化

将受试菌液(浓度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ cfu/mL)分别置于 37℃ 和 28℃ 恒温培养箱中, 活化 2h。

3.2.5 菌液稀释

在无菌操作台上, 将活化好的菌液进行 10 倍系列稀释 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 不同浓度菌液。

3.2.6 “0” 接触时间菌落数

取上述 10^{-6} 稀释度(即 1000 cfu/mL)菌液 0.1mL 直接接种于相应的琼脂平皿中, 用三角刮刀涂布均匀, 于 37℃ 培养 24h, 共做 3 个平皿, 求其平均菌落数为 “0” 接触时间菌落数。

3.2.7 菌落数计算

(1) 平皿菌落数的选择

选取菌落数在 30~300 之间的平皿作为菌落数总数测定标准。每个稀释度使用 3 个平皿, 采用 3 个平皿菌落数平均值。

(2) 菌落计数方法

做平皿菌落数一般可用肉眼观察, 必要时可用放大镜检查, 以防遗漏。然后记录每个稀释度每个平皿的菌落数(cfu), 求出 3 个平皿平均菌落数(cfu)。

(3) 结果计算

$$\text{抑菌率 (\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100 \quad (3.1)$$

根据下公式计算样品的抑菌率：

式中 A——与抗菌剂接触一定时间后的混合液的菌落数；

B——“0”接触时间的菌落数(作阳性对照用)。

3.3 实验方法

3.3.1 抑菌圈实验

采用琼脂糖孔穴扩散法。在超净工作台内，将灭菌后的营养琼脂培养基倒入已灭菌的培养皿中，制成平板，用可调式移液器移取 1mL 浓度为 10^8 cfu/L 的大肠杆菌于无菌的琼脂平板上，用三角刮刀均匀涂布。5min 后，用灭过菌的直径为 5mm 的不锈钢打孔器打孔，每孔加入 5 μ L 纳米银溶胶，置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24h。在菌体生长的同时，样品试液均匀扩散到琼脂平板上，抑制其周围的微生物生长，从而产生不长菌的透明抑菌圈。按互成 60° 的 3 个直径方向测量透明抑菌圈直径，计算平均值，从而测量出大肠杆菌纳米银作用下的抑菌圈大小。

在相应培养基上以相同的方法测量其它六种菌株的抑菌圈的大小。与细菌不同的是应该将 10^7 cfu/L 酵母菌涂布在 YEPD 固体培养基上，放置在 28℃ 恒温培养箱中培养 48h。

以抑菌圈直径的平均值作为评价材料抗菌性能的依据，此试验可以定性地表征材料的抗菌性能。

3.3.2 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定

1、将 6 支灭菌的试管分别编号 1~6#，将已经配制好的不同浓度的 6 种纳米银溶液各取 1.8mL 至编号为 1~6# 的灭菌试管中；

2、取 10^8 cfu/mL 的大肠杆菌菌悬液 0.2mL 接种于上述 1~6# 试管中，于 37℃ 恒温培养 24h；

3、取第 2 步试管中的培养液 0.2mL，将其涂布到各琼脂平板上，每个浓度做三个平皿，于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 24h，观察菌落的生长情况，以不长菌的最低浓度为最小抑制浓度(MIC)。

4、同时接种未加抗菌剂的空白液作阳性对照。

5、以相同的方法测定其它六种菌株的最小抑菌浓度 (MIC)。与细菌不同的是应该将酵母菌涂布在 YEPD 固体培养基上，放置在 28℃ 恒温培养箱中倒置培养 48h。

3.3.3 最大杀菌浓度 (MBC) 的测定

1、取三只灭菌试管，分别加入上述实验测定的最小抑菌浓度的纳米银溶液 1.8mL；

2、在无菌操作台上,将受试菌液进行 10 倍系列稀释成 10^9 、 10^8 、 10^7 cfu/mL,各取 0.2mL 接种于上述试管中,于 37℃ 恒温培养 24h;

3、取第 2 步试管中的培养液 0.2mL,将其涂布到各琼脂平板上,每个浓度做三个平皿,于 37℃ 恒温培养箱中倒置培养 24h,观察菌落的生长情况,以不长菌的最低浓度为最大杀菌浓度 (MBC);

4、以未加抗菌剂的空白液作为阳性对照。

5、以相同的方法测定其它六种菌株的最大杀菌浓度 (MBC)。与细菌不同的是应该将酵母菌涂布在 YEPD 固体培养基上,放置在 28℃ 恒温培养箱中倒置培养 48h。

3.3.4 浓度及作用时间与抑菌率的关系

选取 200、400、800 (单位为 $\mu\text{g/L}$) 3 个浓度梯度作为对五种细菌的实验浓度,400、800、1000 (单位为 $\mu\text{g/L}$) 3 个浓度梯度作为对两种酵母菌的实验浓度,测定作用时间和抑菌率的关系。取不同浓度的纳米银溶液 1.8 mL 分别与 0.2 mL 七种受试菌悬液混合,充分摇匀,在作用 3、6、9、12、15、18h 这几个时间点上,取 0.2mL 混合液将其涂布到相应的固体培养基上。另取上述菌悬液 0.2 mL 分别与 1.8mL 无菌水混合均匀,在这几个时间点上也分别取 0.2mL 混合液将其涂布到相应的固体培养基上作为对照。然后,细菌在 37℃ 培养 24h,酵母菌在 28℃ 培养 48 小时,分别统计各个平板上的菌落数并计算出各个时间点下不同浓度的纳米银的抑菌率。

3.3.5 纳米颗粒生长时间与抑菌率的关系

将纳米银溶胶低温放置熟化 10 天,使其纳米颗粒继续生长,然后制成 200 $\mu\text{g/L}$ 的溶液,测定大肠杆菌在最小抑菌浓度下的抑菌率,确定纳米颗粒生长时间与抑菌率的关系。

3.3.6 金属银离子与纳米银抗菌能力的比较

根据以上几项试验的结果,选取合适浓度的 AgNO_3 溶液以及大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,测试其的抗菌效果,并计算出抑菌率,与以上实验中得到的纳米银的抗菌效果作出比较。

3.3.7 纳米银对受试菌作用的扫描电镜观察

选取大肠杆菌、下面酵母 206 两种菌株,将其经过一定浓度下纳米银溶液一定时间的作用后,送样做环境扫描电镜观察,样品制作完全按照标准扫描电镜制片程序制做^[56]。

3.4 实验结果及讨论

3.4.1 抑菌圈试验

细菌在培养皿中,能够迅速生长,但由于材料具有抗菌能力,细菌在样品的周围会

出现一个明显的细菌禁止圈，即抑菌圈，如图 3.1 所示。样品的抗菌性能由抑菌圈的大小来评价，抑菌圈的直径越大，表面该材料的抗菌效果越好；反之，则表明该材料的抗菌效果越差。

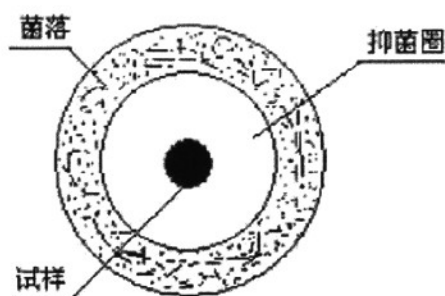


图 3.1 抑菌圈示意图

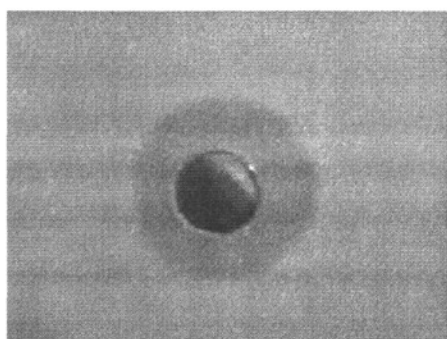


图 (a) 枯草芽孢杆菌

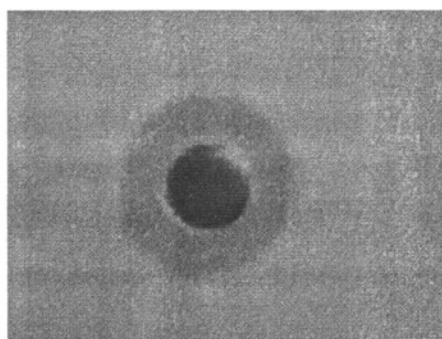


图 (b) 大肠杆菌

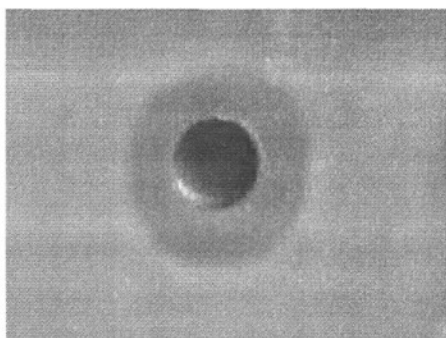


图 (c) 沙门氏菌

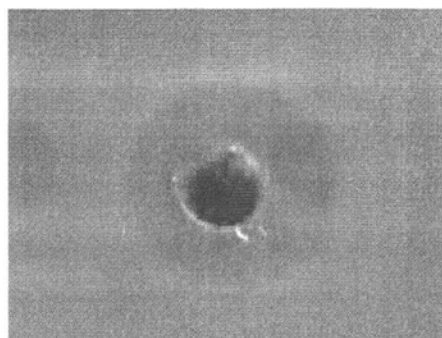


图 (d) 乳酸杆菌

图 3.2 纳米银抑菌圈实际效果图

如图 3.2 所示，纳米银对各种受试菌都有较为明显的抑制作用。纳米银对各受试菌

株的抑菌圈试验结果，如表 3.1 所示。

表 3.1 纳米银抑菌圈实验结果

受试菌种	各样品的抑菌环直径(mm)				孔穴直径(mm)
	1	2	3	平均值	
金黄色葡萄球菌	12.9	12.8	12.5	12.7	5.0
大肠杆菌	12.1	11.7	12.4	12.1	5.0
枯草芽孢杆菌	12.5	12.3	12.1	12.3	5.0
沙门氏菌	11.8	11.4	12.1	11.8	5.0
乳酸杆菌	11.8	12.2	12.5	12.2	5.0
上面酵母	10.2	10.0	9.5	9.9	5.0
下面酵母	10.1	9.3	9.6	9.7	5.0

从表 3.1 所示可以看出，纳米银对七种受试菌株都产生了较为明显的抑菌圈，即纳米银对七种受试菌株都产生了较为明显的抑菌作用，这就定性的说明了纳米银对这七种受试菌都具有很好的抑制效果，而这七种受试菌株代表了细菌和酵母菌的不同类型，因此，实验结果较好的说明纳米银具有广谱抗菌效果。如果仅仅从抑菌圈大小这方面来看，纳米银的对细菌抑制效果要优于酵母菌，对革兰氏阳性细菌要优于革兰氏阴性细菌。

3.4.2 最小抑菌浓度（MIC）的测定

选用纳米银作为抗菌剂，在 100、200、400、800、1000 和 2000(单位为 $\mu\text{g/L}$)浓度下的抗菌效果如表 3.2 所示。

表 3.2 纳米银对受试菌株最低抑菌浓度的测定

菌种	纳米银溶液浓度($\mu\text{g/L}$)					
	100	200	400	800	1000	2000
金黄色葡萄球菌	+	-	-	-	-	-
大肠杆菌	+	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	+	-	-	-	-	-
沙门氏菌	+	-	-	-	-	-
乳酸杆菌	+	-	-	-	-	-
上面酵母 362K	+	+	-	-	-	-
下面酵母 206	+	+	-	-	-	-

注：“+”表示有菌落出现，“-”表示无菌落出现。

对全部受试菌株测定纳米银对其的 MIC，结果见表 3.2。由表 3.2 可以直观地看出，纳米银对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、乳酸杆菌等细菌的最小抑菌浓度是 $200\mu\text{g/L}$ ，对啤酒酵母的最小抑菌浓度是 $400\mu\text{g/L}$ 。这可能与细菌和真菌的细胞壁和细胞膜的不同结构有关系。

3.4.3 最大杀菌浓度（MBC）的测定

根据上述实验得到的最小抑菌浓度，选取 $200\mu\text{g/L}$ 浓度测定最大最大杀菌浓度，具体结果如表 3.3 所示。

表 3.3 纳米银对受试菌株最大杀菌浓度的测定

受试菌	受试菌浓度 (cfu/mL)	有无菌落
金黄色葡萄球菌	1.34×10^9	++
	1.21×10^8	+
	1.30×10^7	-
大肠杆菌	1.14×10^9	++
	1.24×10^8	+
	1.20×10^7	-
枯草芽孢杆菌	1.24×10^9	++
	1.29×10^8	+
	1.35×10^7	-
沙门氏菌	1.21×10^9	++
	1.19×10^8	+
	1.11×10^7	-
乳酸杆菌	1.25×10^9	++
	1.20×10^8	+
	1.19×10^7	-
上面酵母 362K	1.23×10^7	++
	1.11×10^6	+
	1.31×10^5	-
下面酵母 206	1.22×10^7	++
	1.25×10^6	+
	1.31×10^5	-

注：+表示有菌落生长，-表示无菌落生长，++表示菌落数量较多。

从表 3.3 可以看出，纳米银对金黄色葡萄球菌等细菌的最大杀菌浓度（MBC）都大于 $1\times 10^7\text{cfu/mL}$ ，当受试菌的浓度大于 10^7cfu/mL 时，细菌在平板上没有菌落出现，即培养液里存在的细菌都已经被杀灭。而两种啤酒酵母菌的最大杀菌浓度（MBC）要比几

种细菌要小，为 10^5 cfu/mL。

3.4.4 浓度及作用时间与抑菌率的关系

测定不同作用浓度与不同作用时间下的抑菌率，确定浓度及作用时间与抑菌率的关系，结果如图 3.3~图 3.9 所示。

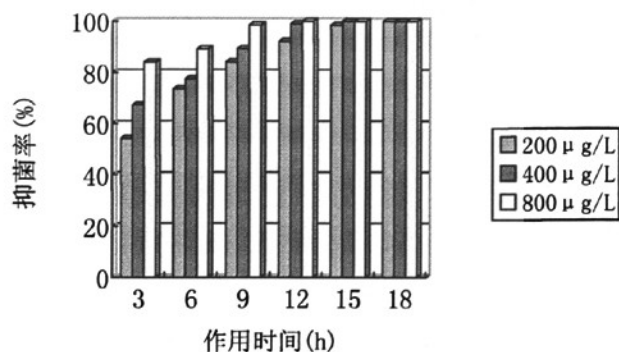


图 3.3 不同浓度及作用时间下纳米银对金黄色葡萄球菌的抑菌率

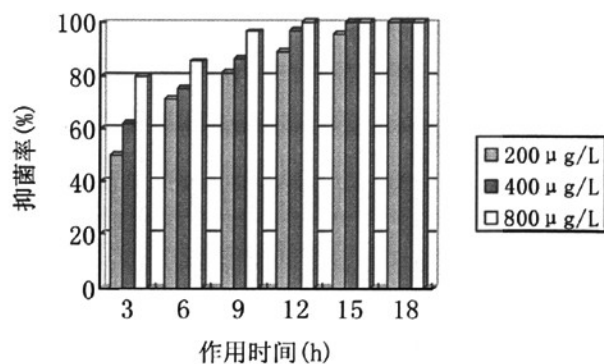


图 3.4 不同浓度及作用时间下纳米银对大肠杆菌的抑菌率

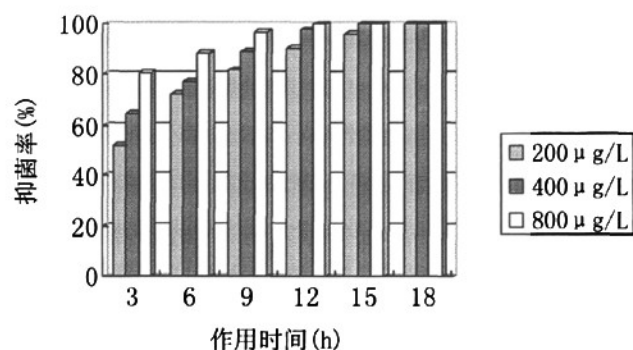


图 3.5 不同浓度及作用时间下纳米银对枯草芽孢杆菌的抑菌率

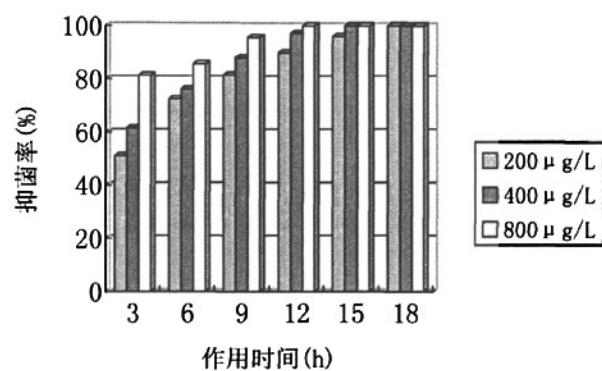


图 3.6 不同浓度及作用时间下纳米银对沙门氏菌的抑菌率

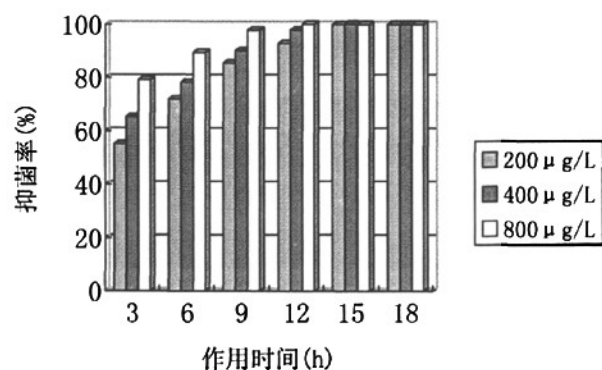


图 3.7 不同浓度及作用时间下纳米银对乳酸杆菌的抑菌率

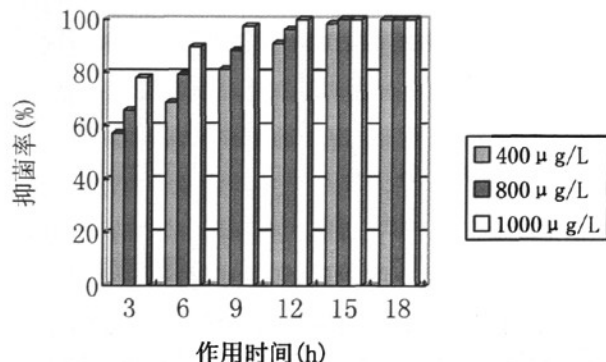


图 3.8 不同浓度及作用时间下纳米银对啤酒酵母 362K 的抑菌率

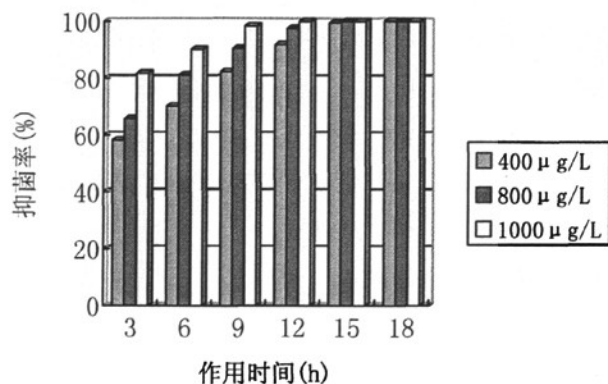


图 3.9 不同浓度及作用时间下纳米银对啤酒酵母 206 的抑菌率

将图 3.3~图 3.9 各图单独分析, 先将图中的数据横向来, 在同一个纳米银的浓度下, 不同作用时间下其抑菌率是不一样的, 随着作用时间的增长, 它的抑菌率也呈现出逐渐增长的态势, 即在抗菌剂浓度相同的情况下, 作用时间越长, 抑菌率越高, 杀灭效果越好; 再将表中的数据纵向来, 在相同的作用时间下, 不同浓度下其抑菌率也是不一样的, 当纳米银的浓度逐渐升高, 它的抑菌率也是逐渐升高的。这是符合我们所知道的常识的, 即抗菌剂浓度越高, 作用时间越长, 他的抑菌率越高, 杀灭效果也就越好。将图 3.3~图 3.9 各表所得到的结果结合起来纵向分析。首先, 可以明显看出五种细菌和两种酵母菌的作用效果有明显的差异, 纳米银作用于细菌的效果要好于酵母菌。在 18 小时内, 可以将受试菌全部杀灭的纳米银浓度, 对细菌来说是 $200\mu\text{g/L}$, 而杀灭相同浓度的酵母菌需要的浓度为 $400\mu\text{g/L}$ 。也就是说在相同作用时间内, 完全杀灭酵母菌 (真菌) 所需要的纳米银的浓度要比杀灭细菌要高, 其它浓度梯度的实验结果也印证了这一结论。这与前面抑菌圈实验、MIC 以及 MBC 实验所得到的结论是相符的。

纳米银对几种细菌都具有良好的抑制杀灭作用,但从革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌细菌之间实验数据的相互比较来看,纳米银对G⁺菌要比对G⁻菌的作用效果稍好。在相同的纳米银浓度和相同的作用时间下,其对G⁺菌的抑菌率都要比对G⁻菌的抑菌率要稍高一点。从上面酵母和下面酵母的角度来说,根据实验所得出的结果,纳米银对下面酵母206的作用效果要比上面酵母362K要好。另外,纳米银对枯草芽孢杆菌一直效果要比其他G⁺菌要弱,这是由于枯草芽孢杆菌能够产生抗性非常强芽孢,在适宜的条件下少量的可以重新转变成为营养态细胞,致使其抑菌率下降。

G⁺菌细胞壁的特点^[57]是厚度大(20~80nm)和化学成分简单,一般含90%的肽聚糖和10%磷壁酸。G⁻菌的细胞壁的特点是厚度较G⁺菌薄,但层次较多,成分较复杂,肽聚糖层很薄(仅2~3nm),与G⁺菌相比,G⁻菌的机械强度较弱,但是对细胞抗溶菌酶的能力要比G⁺菌强。G⁻菌有一种特有的结构——外膜,外膜具有控制细胞的透性、决定细胞壁抗原多样性等作用。它包括脂多糖、磷脂和若干种外膜蛋白。外膜蛋白中有一类三聚体跨膜蛋白,叫孔蛋白,这类蛋白中间有孔道、可控制某些物质(如抗生素等)进入外膜。这个特性是G⁺菌所没有的,可能正是因此,纳米银对G⁺菌的作用效果要比G⁻菌弱一些^[58]。

酵母菌的细胞壁厚约25nm,重量达细胞干重的25%,主要成分为“酵母纤维素”,它呈三明治状——外层为甘露聚糖,内层为葡聚糖,都是分枝状聚合物,中间夹着一层蛋白质(包括多种酶,如葡聚糖酶、甘露聚糖酶等)。酵母葡聚糖和甘露聚糖都有抗原作用,可以引起直接的抗体应答,充当免疫刺激因子,增加细胞免疫能力,再加上细胞壁的三明治结构,是抵御攻击的重要保障^[59]。

3.4.5 纳米银颗粒生长时间与抑菌率的关系

测定200μg/L生长10天纳米银颗粒对大肠杆菌的抑菌率,了解颗粒大小与抑菌率的关系,结果如图3.10所示。

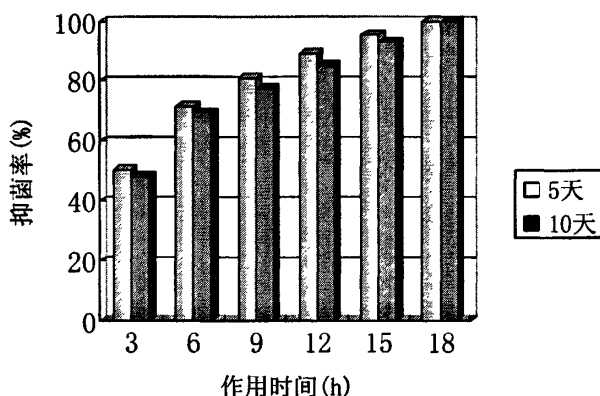


图 3.10 不同颗粒大小纳米银颗粒对大肠杆菌的抑菌率

以大肠杆菌为代表，测定纳米银颗粒生长 5 天、10 天以后的抑菌率，将所得到的大肠杆菌抑菌率的实验数据相比较。可以发现，在相同的纳米银浓度和相同的作用时间下，熟化时间越长的纳米银的作用效果要比原来的纳米银的作用效果稍差。究其原因，可能是因为纳米颗粒在放置了 10 天以后，由于发生奥斯德丽尔熟化而使纳米颗粒逐渐长大，从而使一小部分颗粒的纳米性质减弱，它的抗菌性能也相应的减弱。

3.4.6 金属银离子与纳米银抗菌能力的比较

根据以上实验结果，为了和 Ag^+ 的抗菌能力做一个直观的对比，我们选取最小抑菌浓度 $200\mu\text{g/L}$ 来作为与纳米银抗菌能力比较的实验浓度。

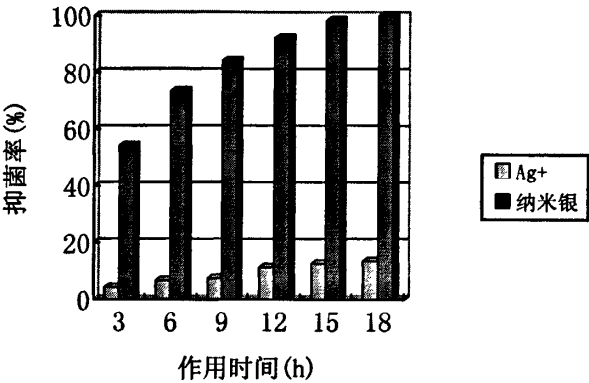


图 3.11 Ag^+ 和纳米银对金黄色葡萄球菌抑菌率对比

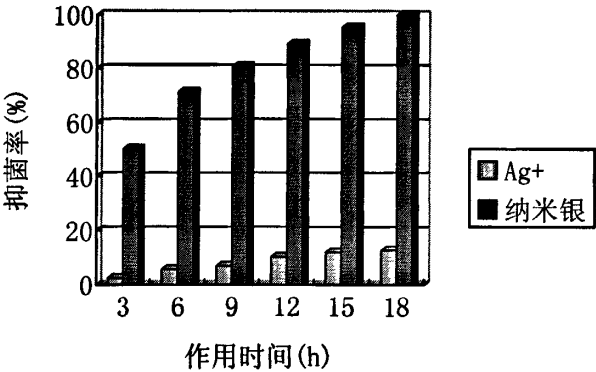
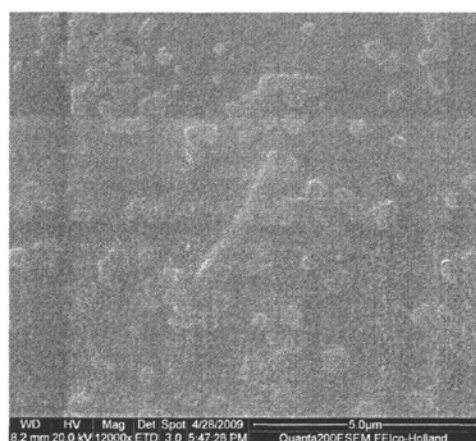


图 3.11 Ag^+ 和纳米银对大肠杆菌抑菌率对比

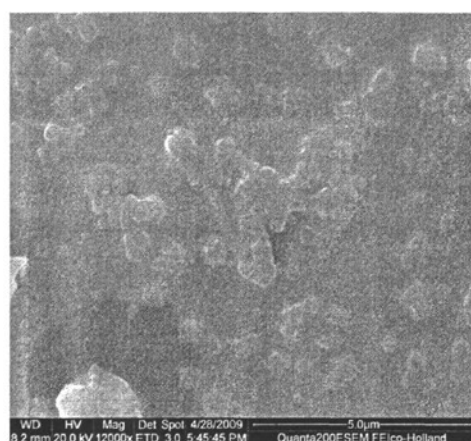
如图3.11所示,在200 $\mu\text{g/L}$ 浓度下,未经还原的 Ag^+ 的杀菌效果是比较弱的,与相同浓度下的纳米银相比差距很大,由此可以判断出 Ag^+ 与纳米银的作用机理应该是有较大区别的。

3.4.7 纳米银对受试菌作用的扫描电镜观察

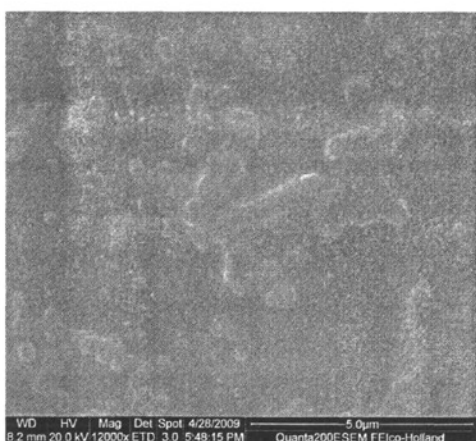
按照标准制片程序将大肠杆菌和下面酵母206制作样品,送样做环境扫描电镜观察,观察结果如图3.12及图3.13所示。



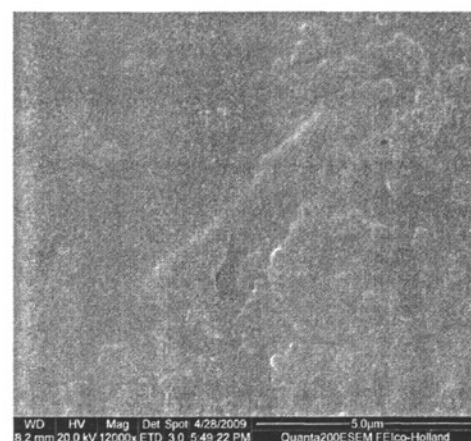
(a) 形态较为完好的大肠杆菌



(b) 纳米银颗粒吸附在大肠杆菌胞壁

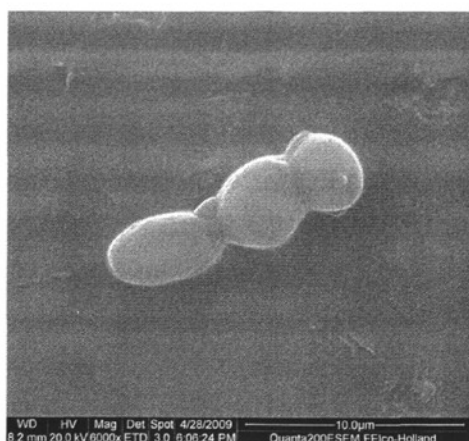


(c) 细胞壁被部分破坏的大肠杆菌

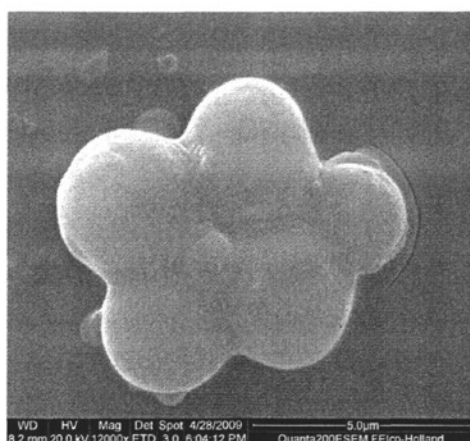


(d) 细胞壁被大部分破坏的大肠杆菌

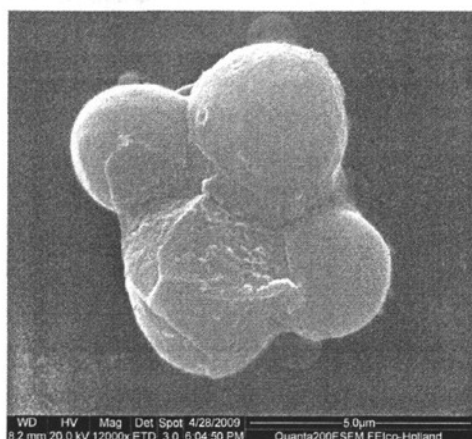
图 3.12 纳米银杀灭大肠杆菌环境扫描电镜观察



(a) 形态较为完好的酵母菌



(b) 细胞壁轻微破坏的酵母菌



(c) 细胞壁被严重破坏的酵母菌

图 3.13 纳米银杀灭酵母菌环境扫描电镜观察

图3.12中，图（a）是一张较为完好的大肠杆菌照片，细胞壁光滑规则，周质间隔连接紧密，完好无孔洞，在它的周围分布着一定浓度的纳米银颗粒；而图（b）中，大肠杆菌的细胞壁上已经吸附了相当多的纳米银的颗粒，这些颗粒正在对大肠杆菌“展开进攻”；而仔细观察图（c）可以发现，大肠杆菌的细胞壁明显地凹凸不平，已经有了孔洞，细胞壁已经被部分破坏了；而图（d）中的大肠杆菌的细胞在左上的部分已经明显缺失了一部分，有可能是细胞内容物已经有了部分缺失，细胞壁也严重被破坏。

与图3.12相似，图3.13中，图（a）是一张较为完好的大肠杆菌照片，细胞壁光滑规则，周质间隔连接紧密，完好无孔洞；图（b）中，细胞壁明显地凹凸不平，已经有了孔洞，细胞壁已经被部分破坏了；图（c）中，细胞壁已经被严重破坏，特别是最下方的一个酵母细胞，从正面来看，破坏最为严重。

应该指出的是，纳米银虽然颗粒微小，但是与细菌和酵母菌的大小相比差距并不明显，这使得纳米银颗粒不可能像某些离子一样通过细胞物质运输通道正常的进入细胞内

部，从而越过细胞壁和细胞膜直接破坏细胞内部。

由两组图可以看出，在纳米银作用的初期，首先是纳米银颗粒吸附在细胞壁的表面，这在随后出现了细胞壁的破损、裂解，细胞壁上出现空洞，渗透屏障消失，大分子物质可以自由进入，细菌细胞壁和质膜已经丧失了维持渗透压，抵御外物入侵的功能，从而导致细胞失去正常功能而死亡。电镜观察为催化假说提供了直观证据。

3.5 小结

本章主要研究了纳米银的抗菌性能和杀灭菌体过程。

首先，利用抑菌圈法定性测定了纳米银的抗菌效果，而七种菌在纳米银的作用下或大或小的都能产生抑菌圈，证明了纳米对多种细菌和真菌等具有广谱抗菌效果。

其次，测定了纳米银的最小抑菌浓度（MIC）和最大杀菌浓度（MBC）。纳米银对细菌的最小抑菌浓度是 $200\mu\text{g/L}$ ，对啤酒酵母的最小抑菌浓度是 $400\mu\text{g/L}$ ；在最大杀菌浓度（MBC）方面，对细菌的为 $1.0\times 10^7\text{ cfu/mL}$ ，对酵母菌为 $1.0\times 10^5\text{ cfu/mL}$ 。

纳米银的作用效果与其浓度成正比，与作用时间成正比，浓度越高，作用时间越长，作用效果越好。

从以上实验可以得出结论，纳米银对 G^+ 菌的抑制作用最强，对 G^- 菌的作用次之，对酵母菌的作用相对较弱，在 G^+ 菌中对有芽孢的枯草芽孢杆菌作用要比其它 G^+ 菌弱。究其原因，这可能与各种类型的菌体的细胞壁和细胞膜的不同结构以及有无芽孢有关系。

因为发生奥斯德丽尔熟化，纳米银颗粒变大，所以生长10天的纳米银的作用效果要比开始时的稍差。

实验证明，未经还原的 Ag^+ 的杀菌效果是比较弱的，与相同浓度下的纳米银相比差距很大，由此可以判断出 Ag^+ 与纳米银的作用机理应该是有较大区别的。

利用环境扫描电镜（ESEM）观察了纳米银对受试菌的杀灭过程，在纳米银作用的初期，首先是纳米银颗粒吸附在细胞壁的表面，这在随后出现了细胞壁的破损、裂解，细胞壁上出现空洞，渗透屏障消失，大分子物质可以自由进入，细菌细胞壁和质膜已经丧失了维持渗透压，抵御外物入侵的功能，从而导致细胞失去正常功能而死亡。

第4章 纳米 TiO₂ 抑菌作用及机理的研究

4.1 实验材料

4.1.1 受试菌株和纳米抗菌材料

(1) 受试菌株

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、乳酸杆菌 (*Bacillus acidilactici*)；大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)；啤酒酵母362K(上面酵母)、啤酒酵母206(下面酵母) (*Saccharomyces cerevisiae*)。

(2) 纳米材料

P25型纳米TiO₂粉末 (由山东大学晶体材料国家重点实验室刘宏教授提供。)

4.1.2 培养基及溶液的配制

(1) 营养肉汤培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
蒸馏水	1000mL

按上述成分混合，溶解后校正pH7.4，分装烧瓶，每瓶225mL，0.1MPa高压灭菌15min。

(2) 营养琼脂培养基

蛋白胨	10g
牛肉膏	3g
氯化钠	5g
琼脂	15~20g
蒸馏水	1000mL

将除琼脂以外的各成分溶解与蒸馏水内，加入15%氢氧化钠溶液约2mL，校正pH至7.2~7.4。加入琼脂，加热煮沸，使琼脂溶化。分装烧瓶，0.1MPa高压灭菌15min。

(3) YEPD培养基

葡萄糖	20g
蛋白胨	20g
酵母粉	10g
琼脂	20g

蒸馏水 1000mL

将除琼脂以外的各成分溶解与蒸馏水内,加入15%氢氧化钠溶液约2mL,校正pH至6.0。加入琼脂,加热煮沸,使琼脂溶化。分装烧瓶,0.1MPa高压灭菌15min。液体培养基不加琼脂。

(4) MRS培养基

蛋白胨	10g	牛肉膏	10g
酵母粉	5g	K ₂ HPO ₄	2g
柠檬酸二铵	2g	乙酸钠	5g
葡萄糖	20g	吐温80	1mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.58g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.25g
琼脂	15~20g	蒸馏水	1000mL

将以上成分加入到蒸馏水中,加热使完全溶解,调pH至6.2~6.4,分装于三角瓶中,0.1MPa高压灭菌15min。液体培养基不加琼脂。

(5) 生理盐水稀释液

制备0.85%氯化钠溶液,0.1MPa高压灭菌15min,备用。

(6) 玻璃器皿的灭菌

将培养皿、三角刮刀、试管洗净烘干,用牛皮纸包扎(将烘干的试管用脱脂棉塞封口),在180℃干热空气中灭菌2h。备用。

4.1.3 实验仪器

电热培养箱	江苏省东台县电器厂
SW-CT-2FD型超净工作台	苏州安泰空气技术有限公司
自动立式压力蒸汽灭菌器	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
101-3型电热鼓风干燥箱	上海阳光实验仪器有限公司
JT202N型电子天平	上海精天电子仪器有限公司
HZQ-Q全文振荡器	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
pHS-25数显pH计	上海精密科学仪器有限公司
芬兰可调式移液器	上海雷勃分析仪器有限公司
84-1A磁力搅拌器	上海司乐仪器厂
Quanta200环境扫描电镜	FEI co-Holland
游标卡尺	

4.2 实验准备

4.2.1 受试菌液制备

本章所有的受试菌液的准备与第三章相同。

4.2.2 抗菌剂溶液和悬浮液的制备和稀释

将第2章制备的纳米 TiO_2 粉末颗粒配制成 $10000\mu\text{g/L}$ ，将其分别稀释至浓度为 $4000\mu\text{g/L}$ 、 $2000\mu\text{g/L}$ 、 $1000\mu\text{g/L}$ 、 $500\mu\text{g/L}$ 、 $200\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 的，低温保存，备用。

4.2.3 培养基准备

将灭菌后的营养琼脂培养基和 YEPD 固体培养基倒入培养皿(已灭菌)中，置 37°C 恒温箱中培养 24h，无杂菌者方可使用。

4.2.4 菌液活化

将受试菌液(浓度为 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8 \text{cfu/mL}$)分别置于 37°C 和 28°C 恒温培养箱中，活化 2h。

4.2.5 菌液稀释

在无菌操作台上，将活化好的菌液进行 10 倍系列稀释 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 不同浓度菌液。

4.2.6 “0”接触时间菌落数

取上述 10^{-6} 稀释度(即 1000cfu/mL)菌液 0.1mL 直接接种于营养琼脂平皿或 YEPD 固体培养基平皿中，用三角刮刀涂布均匀，于 37°C 培养 24h，共做 3 个平皿，求其平均菌落数为“0”接触时间菌落数。

4.2.7 菌落数计算

菌落数的计算参考 3.2.7。

4.3 实验方法

4.3.1 抑菌圈实验

在超净工作台内，将灭菌后的营养琼脂培养基倒入已灭菌的培养皿中，制成平板，用可调式移液器移取 1mL 浓度为 10^8cfu/L 的大肠杆菌于无菌的营养琼脂平板上，用三角刮刀均匀涂布。约 5min 后，用打孔器在已凝固的平板上打孔，孔径约为 5mm，每个表面皿打孔 4 个，其中 3 个作为平行实验，另一个作为空白对照；将已灭菌的 TiO_2 纳米粉体小心地移至孔中，然后将其置于无菌室内，放在所用光源下照射若干时间；置于 37°C 恒温培养箱中培养 24h。按互成 60° 的 3 个直径方向测量透明抑菌圈直径，计算平均值，从而测量出大肠杆菌在纳米 TiO_2 作用下的抑菌圈大小。在相应培养基上以相同的方法测量其它六种菌株的抑菌圈直径。与细菌不同的是应该将 10^7cfu/L 酵母菌涂布在 YEPD 固体培养基上，放置在 28°C 恒温培养箱中培养 48h。

另做一组实验,不将其放在光源下照射,其它方法与以上相同。

4.3.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

1、将6支灭菌的试管分别编号1~6#,将已经配制好的不同浓度的6种纳米TiO₂悬浮液各取1.8mL至编号为1~6#的灭菌试管中;

2、取10⁸cuf/mL的大肠杆菌菌悬液0.2mL接种于上述1~6#试管中,在光照下于37℃恒温培养24h;

3、取第2步试管中的培养液0.2mL,将其涂布到营养琼脂平板上,每个浓度做三个平皿,于37℃恒温培养箱中倒置培养24h,观察菌落的生长情况,以不长菌的最低浓度为最小抑制浓度(MIC)。

4、同时接种未加抗菌剂的空白液作阳性对照。

5、以相同的方法测定其它六种菌株的最小抑菌浓度(MIC)。与细菌不同的是应该将酵母菌涂布在YEPA固体培养基上,放置在28℃恒温培养箱中倒置培养48h。

4.3.3 最大杀菌浓度(MBC)的测定

1、取三只灭菌试管,分别加入上述实验测定的最小抑菌浓度的纳米TiO₂溶液1.8mL;

2、在无菌操作台上,将受试菌液进行10倍系列稀释成10⁹、10⁸、10⁷cufm/L,各取0.2mL接种于上述试管中,在光照条件下于37℃恒温培养24h;

3、取第2步试管中的培养液0.2mL,将其涂布到营养琼脂平板上,每个浓度做三个平皿,于37℃恒温培养箱中倒置培养24h,观察菌落的生长情况,以不长菌的最低浓度为最大杀菌浓度(MBC);

4、并以未加抗菌剂的空白液作阳性对照。

5、以相同的方法测定其它六种菌株的最大杀菌浓度(MBC)。与细菌不同的是应该将酵母菌涂布在YEPA固体培养基上,放置在28℃恒温培养箱中倒置培养48h。

4.3.4 浓度及作用时间与抑菌率的关系

选取200、400、800(单位为μg/L)3个浓度梯度作为对五种细菌的实验浓度,400、800、1000(单位为μg/L)3个浓度梯度作为对两种酵母菌的实验浓度,测定作用时间和抑菌率的关系。在作用3、6、9、12、15、18h这几个时间点上,取0.2mL混合液将其涂布到相应的固体培养基上,细菌在37℃培养24h,酵母菌在28℃培养48小时,分别统计各个平板上的菌落数并计算出各个时间点下不同浓度的纳米TiO₂的抑菌率。同步进行空白(不加抗菌剂)对照样的活菌培养试验。

4.3.5 光照时间与抑菌率的关系

根据上面实验所得出的最小抑菌浓度 (MIC), 选取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及上面酵母 362K 作为试验菌株将适量纳米 TiO_2 和大肠杆菌菌悬液(1mL)分别加入盛有 100mL 无菌生理盐水的锥形瓶中, 盖上瓶塞; 放在振荡器上, 调节振荡频率为 125 次/分, 在普通日光灯光源作用下, 作用不同的时间后(30min, 60min, 90min), 关掉光源, 培养满 12h, 然后按菌落计数法测得无菌生理盐水中的菌数; 同时设空白对照, 即将不含纳米 TiO_2 的大肠杆菌菌悬液加入盛有 100ml 缓冲液的锥形瓶中, 在相同条件下放置相应的时间。

同样方法测定其它菌株光照时间与抑菌率的关系。

4.4.6 纳米 TiO_2 的热稳定性研究

选取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及酵母 362K 作为试验菌株将各稀释度的纳米 TiO_2 溶液, 分别置于 80°C 、 100°C 水浴和 121°C 湿热条件下, 热处理 15 min, 测定其抑菌率。

4.4.7 纳米 TiO_2 对受试菌作用的扫描电镜观察

选取枯草芽孢杆菌、下面酵母 206 两种菌株, 将其经过一定浓度下纳米 TiO_2 溶液一定时间的作用后, 送样做环境扫描电镜观察, 样品制作完全按照标准扫描电镜制片程序制做^[56]。

4.4 实验结果与讨论

4.4.1 抑菌圈实验

在有光照和无光照两个条件下, 利用孔穴平板扩散法测量纳米 TiO_2 的抑菌圈直径, 结果如表 4.1 所示。

表 4.1 纳米 TiO_2 抑菌圈实验结果

受试菌株	光照条件下的平均直径(mm)	无光照条件下的平均直径(mm)	孔穴直径(mm)
金黄色葡萄球菌	12.0	8.5	5.0
大肠杆菌	10.8	7.3	5.0
枯草芽孢杆菌	11.5	8.0	5.0
沙门氏菌	11.2	7.1	5.0
乳酸杆菌	11.8	8.7	5.0
上面酵母 362K	9.1	5.9	5.0
下面酵母 206	9.6	6.4	5.0

从表 4.1 所示可以看出，虽然抑菌圈的大小不一，但纳米 TiO₂ 对七种受试菌株都产生了的抑菌圈，而这七种受试菌株代表了细菌和真菌的不同类型，因此，实验结果较好的说明纳米 TiO₂ 具有广谱抗菌效果。但是从上表中可以很直观的看出，有无光照对抑菌圈的大小影响很大，在有光照条件下的纳米 TiO₂ 抑菌圈要比无光照条件下大出许多，这可以定性说明光照对纳米 TiO₂ 的活性有很大的影响。如果仅仅从抑菌圈大小这方面来看，不管是有无光照都可以得到这样一个结论，纳米 TiO₂ 对细菌的抑制效果要优于酵母菌，对革兰氏阳性细菌要优于革兰氏阴性细菌，对无芽孢的细菌也要优于有芽孢的细菌。

4.4.2 最小抑菌浓度（MIC）的测定

选用纳米 TiO₂ 作为抗菌剂，在 100、200、400、800、1000 和 2000(单位为 μg/L) 浓度下的测定抗菌剂的抗菌效果，结果如表 4.2 所示。

表 4.2 纳米 TiO₂ 对受试菌株最低抑菌浓度的测定

菌种	不同纳米 TiO ₂ 浓度(μg/L)下菌落生长情况					
	100	200	400	800	1000	2000
金黄色葡萄球菌	+	-	-	-	-	-
大肠杆菌	+	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	+	-	-	-	-	-
沙门氏菌	+	-	-	-	-	-
乳酸杆菌	+	-	-	-	-	-
上面酵母 362K	+	+	-	-	-	-
下面酵母 206	+	+	-	-	-	-

注：“+”表示有菌落出现，“-”表示无菌落出现。

由表 4.2 可以直观地看出，纳米 TiO₂ 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、乳酸杆菌等细菌的最小抑菌浓度是 200μg/L，对啤酒酵母的最小抑菌浓度是 400μg/L。这可能与细菌和真菌的细胞壁和细胞膜的不同结构有关系。

4.4.3 最大杀菌浓度（MBC）的测定

根据上述实验得到的最小抑菌浓度，选取 200μg/L 浓度测定最大最大杀菌浓度，具体结果如表 3.3 所示。

表 4.3 纳米 TiO_2 对受试菌株最大杀菌浓度的测定

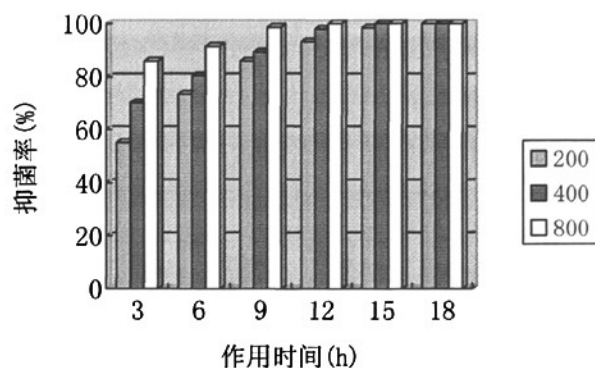
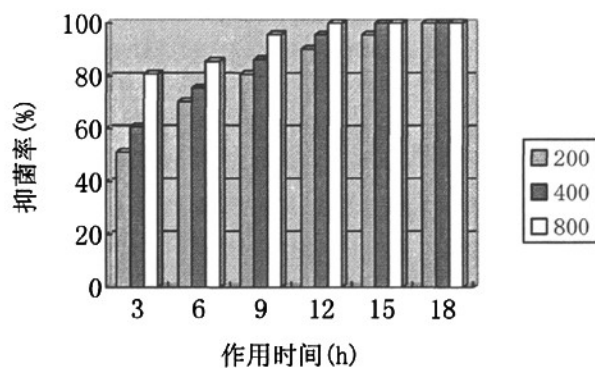
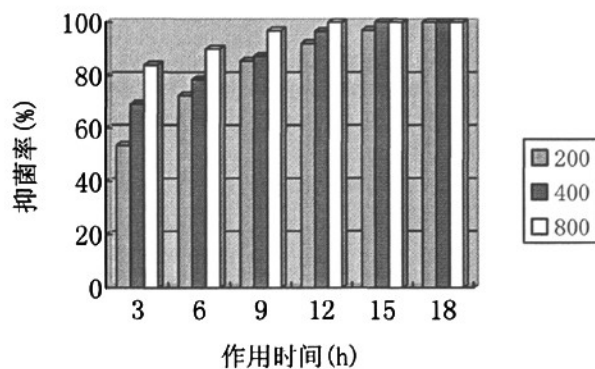
受试菌	受试菌浓度 (cfu/mL)	有无菌落
金黄色葡萄球菌	1.34×10^9	++
	1.21×10^8	+
	1.30×10^7	-
大肠杆菌	1.14×10^9	++
	1.24×10^8	+
	1.20×10^7	-
枯草芽孢杆菌	1.24×10^9	++
	1.29×10^8	+
	1.35×10^7	-
沙门氏菌	1.21×10^9	++
	1.19×10^8	+
	1.11×10^7	-
乳酸杆菌	1.25×10^9	++
	1.20×10^8	+
	1.19×10^7	-
上面酵母 362K	1.23×10^7	++
	1.11×10^6	+
	1.31×10^5	-
下面酵母 206	1.22×10^7	++
	1.25×10^6	+
	1.31×10^5	-

注：+表示有菌落生长，-表示无菌落生长，++表示菌落数量较多。

从表 4.3 可以看出，纳米 TiO_2 对金黄色葡萄球菌等细菌的最大杀菌浓度（MBC）都大于 $1 \times 10^7 \text{cfu/mL}$ ，当受试菌的浓度大于 10^7cfu/mL 时，细菌在平板上没有菌落出现，即培养液里存在的细菌都已经被杀灭。而两种啤酒酵母菌的最大杀菌浓度（MBC）要比几种细菌要小，为 10^5cfu/mL 。

4.4.4 浓度及作用时间与抑菌率的关系

测定不同作用浓度与不同作用时间下的抑菌率，确定浓度及作用时间与抑菌率的关系，结果如下。

图 4.1 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对金黄色葡萄球菌的抑菌率图 4.2 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对大肠杆菌的抑菌率图 4.3 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对枯草芽孢杆菌的抑菌率

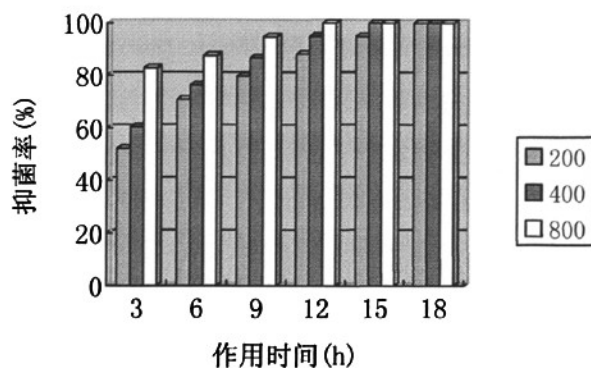


图 4.4 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对沙门氏菌的抑菌率

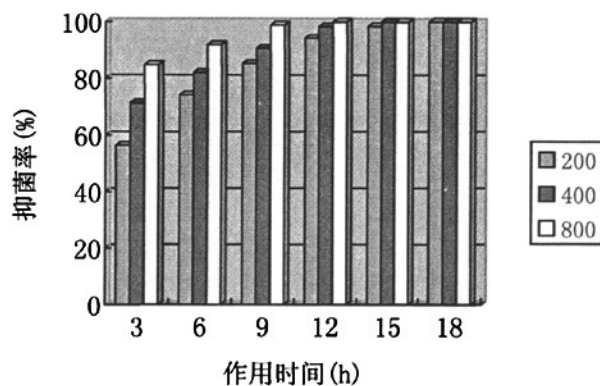


图 4.5 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对乳酸杆菌的抑菌率

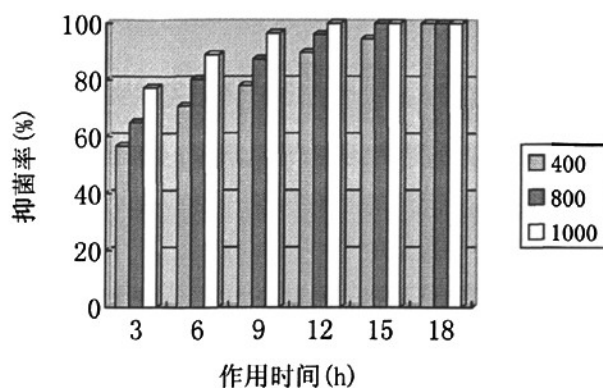


图 4.6 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对啤酒酵母 362K 的抑菌率

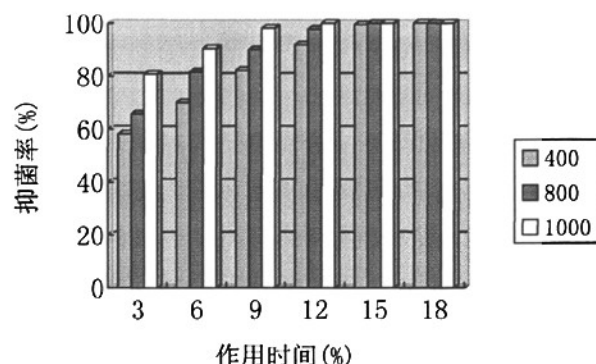


图 4.7 不同浓度及作用时间下纳米 TiO₂ 对啤酒酵母 206 的抑菌率

将表 4.1~4.7 进行分析, 可以得出是与纳米银作用效果相同的结论。抗菌剂浓度相同的情况下, 作用时间越长, 抑菌率越高, 杀灭效果越好; 在相同的作用时间下, 抗菌剂浓度越高, 抑菌率就越高, 杀灭效果也就越好。纳米银对 G⁺ 菌的抑制作用最强, 对有芽孢的枯草芽孢杆菌作用次之, 对 G⁻ 菌的作用稍弱, 对酵母菌的作用相对最弱。

4.4.5 光照时间与抑菌率的关系

根据上述实验得到的最小抑菌浓度, 测定光照时间与抑菌率的关系。选取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及上面酵母 362K 作为试验菌株, 将经过 30min、60min、90min 光照的样品, 培养 12 小时后, 测定其抑菌率, 结果如图 4.8 所示。

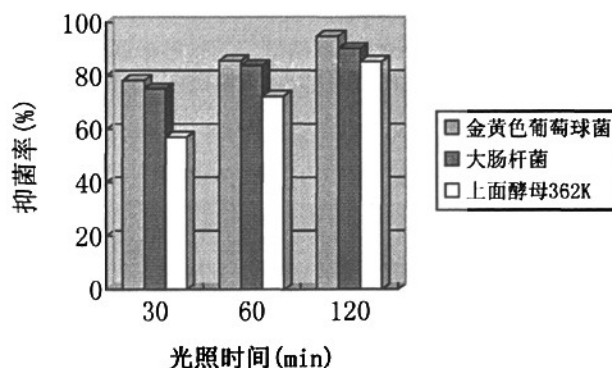


图 4.8 不同光照时间下纳米 TiO₂ 的抑菌率

根据表 4.11 所示, 随着光照时间的增长, 纳米 TiO₂ 的抑菌率就越高。这可能是由于纳米 TiO₂ 是光催化型抗菌剂材料, 在光作用下在表面可以产生大量的羟基自由基和氧自由基, 照射时间越长, 产生的自由基越多, 抑菌效果也就越好。

4.4.6 纳米 TiO_2 的热稳定性研究

选取金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及上面酵母 362K 作为试验菌株, 将各最小抑菌浓度的纳米 TiO_2 溶液, 分别置于 80°C 、 100°C 水浴和 121°C 湿热条件下, 热处理 15 min, 测定作用于菌体 12 小时后的抑菌率, 结果如下表所示。

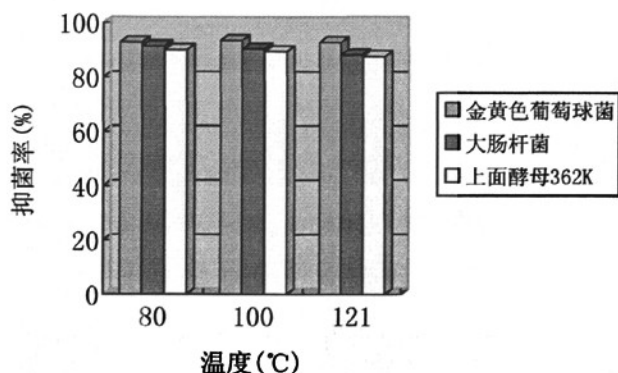
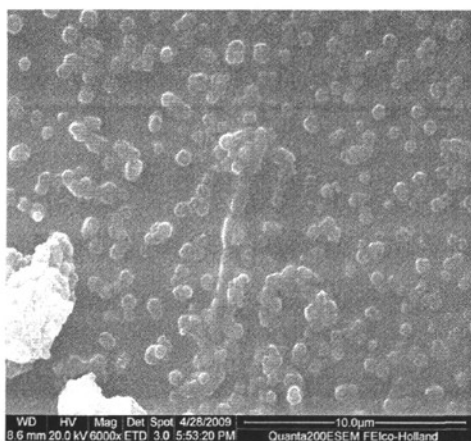


图 4.9 不同温度下纳米 TiO_2 的抑菌率

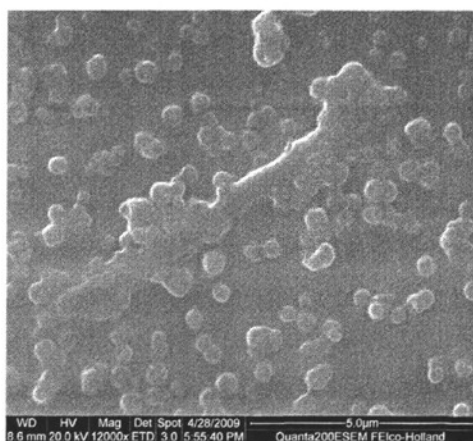
由表 3 可知, 纳米 TiO_2 水溶液经 80°C 、 100°C 、 121°C 处理后, 抑菌率没有明显减弱, 仍具有较好的抑菌性能, 说明高温对纳米 TiO_2 水溶液的抑菌性能没有明显的影响, 其对热有良好的稳定性。

4.4.7 纳米 TiO_2 对受试菌作用的扫描电镜观察

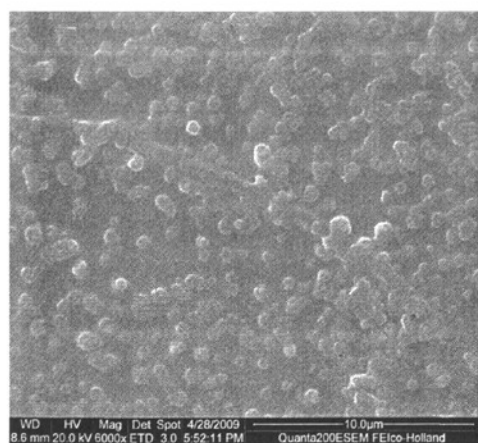
按照标准制片程序将枯草芽孢杆菌和下面酵母 206 制作样品, 送样做环境扫描电镜观察, 观察结果如图 4.10 及图 4.11 所示。



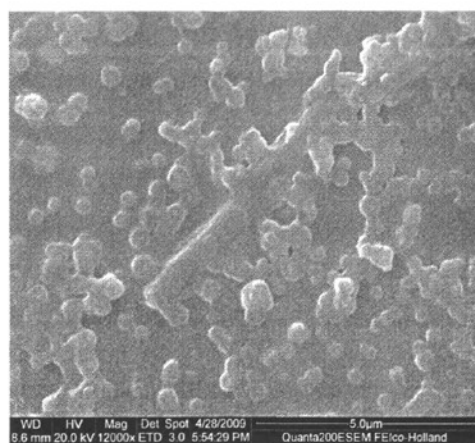
(a) 形态较为完好的枯草芽孢杆菌



(b) 纳米银颗粒吸附枯草芽孢杆菌胞壁

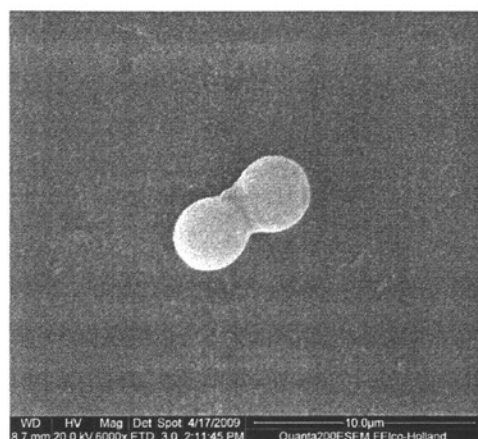


(c) 细胞壁被部分破坏的枯草芽孢杆菌

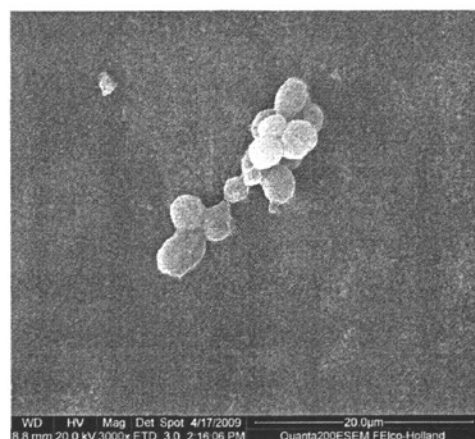


(d) 细胞壁被严重破坏的枯草芽孢杆菌

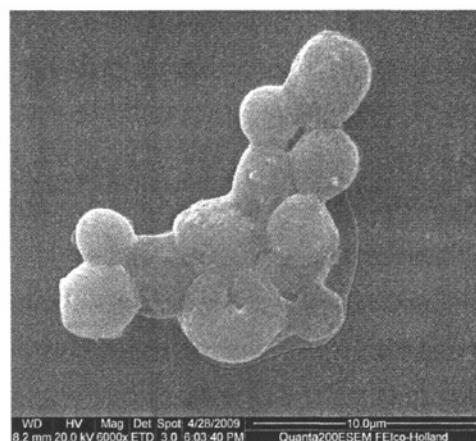
图 4.10 纳米 TiO_2 杀灭枯草芽孢杆菌环境扫描电镜观察



(a) 形态较为完好的酵母菌



(b) 细胞壁轻微破坏的酵母菌



(c) 细胞壁被严重破坏的酵母菌

图 4.11 纳米 TiO_2 杀灭酵母菌环境扫描电镜观察

观察图4.10及图4.11, 在 TiO_2 作用的初期, 枯草芽孢杆菌和酵母菌均是首先出现细胞壁的破损、裂解, 细胞壁上出现空洞, 渗透屏障消失, 大分子物质可以自由进入。证明 TiO_2 对细菌的作用应首先从破坏细胞壁开始。而随后枯草芽孢杆菌和酵母菌内容物都已经有了部分缺失, 说明菌体细胞壁和质膜已经丧失了维持渗透压, 抵御外物入侵的功能。最后死亡细菌菌体均有大量内容物溢出, 细胞质凝聚, 细胞壁和质膜破碎, 而图2(c)所示大肠杆菌还出现了菌体空化现象, 细胞质凝聚在两极而较少的溢出。以上观察结果充分显示了 TiO_2 在光催化下产生高活性自由基氧化破坏细胞的全过程。另外, TiO_2 也可通过与细菌的直接接触杀灭细菌, 而本实验采用低浓度的 TiO_2 和高浓度的细菌, 观察到的微生物结构破坏以前者为主。

纳米 TiO_2 抑菌没有特异性, 主要是依靠光激发产生的强氧化性的活性氧类物质 $\cdot\text{OH}$ 来作用于细菌。 $\cdot\text{OH}$ 能破坏有机分子中的不饱和键, 使菌体组成物受损, 导致细胞壁膜破裂, 使细胞维持活性的渗透屏障消失, 内容物溢出。同时产生的 O_2^- 和 H_2O_2 进入细胞, 攻击细胞内部功能组分, 最终使细胞死亡。电镜观察则为此作用机理提供了直观证据。

4.5 小结

本章主要研究了纳米 TiO_2 的抗菌性能及其杀灭菌体过程。

首先, 利用抑菌圈法定性测定了纳米 TiO_2 的抗菌效果, 而七种菌在纳米 TiO_2 的作用下或大或小的都能产生抑菌圈, 证明了纳米 TiO_2 对多种细菌和真菌等具有广谱抗菌效果; 并且在有无光照的对照实验中, 直观的证明了光对纳米 TiO_2 的重要影响。

其次, 测定了纳米 TiO_2 的最小抑菌浓度(MIC)和最大杀菌浓度(MBC)。纳米 TiO_2 对细菌的最小抑菌浓度是 $200\mu\text{g/L}$, 对啤酒酵母的最小抑菌浓度是 $400\mu\text{g/L}$; 在最大杀菌浓度(MBC)方面, 对细菌的为 10^7 cfu/mL , 对酵母菌为 10^5 cfu/mL 。

纳米 TiO_2 的作用效果与其浓度成正比, 与作用时间成正比, 浓度越高, 作用时间越长, 作用效果越好。

从以上实验可以得出结论, 纳米 TiO_2 对 G^+ 菌的抑制作用最强, 对有芽孢的枯草芽孢杆菌作用次之, 对 G^- 菌的作用稍弱, 对酵母菌的作用相对最弱。究其原因, 这可能与有无芽孢以及各种类型的菌体的细胞壁和细胞膜的不同结构有关系。

高温对纳米 TiO_2 水溶液的抑菌性能没有明显的影响, 其对热有良好的稳定性。

纳米 TiO_2 抑菌没有特异性, 主要是依靠光激发产生的强氧化性的活性氧类物质 $\cdot\text{OH}$ 来作用于细菌。 $\cdot\text{OH}$ 能破坏有机分子中的不饱和键, 使菌体组成物受损, 导

致细胞壁膜破裂，使细胞维持活性的渗透屏障消失，内容物溢出。同时产生的 O_2^- 和 H_2O_2 进入细胞，攻击细胞内部功能组分，最终使细胞死亡。电镜观察则为此作用机理提供了直观证据。

第5章 结论与展望

5.1 结论

1、利用本实验室已有的三株细菌和两种酵母菌及自行分离出的两种的细菌，利用抑菌圈法定性测定了纳米银和纳米TiO₂的抗菌效果，七种菌在纳米银和纳米TiO₂的作用下或大或小的都能产生抑菌圈，证明了纳米银和纳米TiO₂都没有特异性，对多种细菌和真菌等具有光谱抗菌效果。

2、测定了纳米银和纳米TiO₂的最小抑菌浓度(MIC)和最大杀菌浓度(MBC)，两者基本相同。纳米银和纳米TiO₂对细菌的最小抑菌浓度200μg/L，对啤酒酵母的最小抑菌浓度是400μg/L；在最大杀菌浓度(MBC)方面，对细菌的为10⁷ cfu/mL，对酵母菌为10⁵ cfu/mL。

3、纳米银和纳米TiO₂对G⁺菌的抑制作用最强，对有芽孢的枯草芽孢杆菌作用次之，对G⁻菌的作用稍弱，对酵母菌的作用相对最弱。究其原因，这可能与有无芽孢以及各种类型的菌体的细胞壁和细胞膜的不同结构有关系。

4、纳米银和纳米TiO₂的作用效果与其浓度成正比，与作用时间成正比，浓度越高，作用时间越长，作用效果越好。未经还原的Ag⁺的杀菌效果是比较弱的，与相同浓度下的纳米银相比差距很大，由此可以判断出Ag⁺与纳米银的作用机理应该是有较大区别的；纳米银颗粒越小，作用效果越好。高温对纳米TiO₂水溶液的抑菌性能没有明显的影响，其对热有良好的稳定性。

5、利用环境扫描电镜(ESEM)观察了纳米银对受试菌的杀灭过程。在纳米银作用的初期，首先是纳米银颗粒吸附在细胞壁的表面，这在随后出现了细胞壁的破损、裂解，细胞壁上出现空洞，渗透屏障消失，大分子物质可以自由进入，细菌细胞壁和质膜已经丧失了维持渗透压，抵御外物入侵的功能，从而导致细胞失去正常功能而死亡。电镜观察为催化假说提供了直观证据。

6、利用环境扫描电镜(ESEM)观察了纳米TiO₂对受试菌的杀灭过程。纳米TiO₂抑菌没有特异性，主要是依靠光激发产生的强氧化性的活性氧类物质·OH来作用于细菌。·OH能破坏有机分子中的不饱和键，使菌体组成物受损，导致细胞壁膜破裂，使细胞维持活性的渗透屏障消失，内容物溢出。同时产生的O₂⁻和H₂O₂进入细胞，攻击细胞内部功能组分，最终使细胞死亡。电镜观察则为此作用机理提供了直观证据。

5.2 展望

1、虽然利用环境扫描电镜观察到了纳米材料的杀菌过程，但是对其机理的解释仍然需要更进一步的研究和探讨，利用其它方法对其进行进一步的证实和研究。

2、本科题进行的是理论研究，对应用研究涉及不多，下一步有条件的话应该进行应用方面的研究。

3、银离子虽然具有广谱抗菌能力，但其化学性质活泼，容易转变为棕色的氧化或经紫外光催化还原成黑色的单质银，不但影响了产品外在质量，而且影响了抗菌性能，本课题在实验中也遇到了相同的问题。而且金属银属于贵金属，因为释放消耗而难以回收。以后纳米银的发展方向应该包括以下两个方面：

第一，对于变色问题可以采用螯合的方法去做些工作；

第二，用与有机高分子嫁接的办法，通过回收有机高分子而回收银离子；

4、对于纳米 TiO_2 抗菌材料，其最大的问题是抗菌环境条件之一紫外线的要求，怎样克服这些缺点是今后研究工作的重点。可将银、铜等抗菌金属离子以及它们的结合体与纳米 TiO_2 相复合，提高二氧化钛在黑暗中的抗菌作用。

5、复合型抗菌剂将是抗菌材料发展的方向。金属离子之间、金属离子与光催化抗菌材料、金属离子与稀土元素等的复合是研究的重点。

6、利用生物学方法大规模地生产纳米材料也将是今后纳米技术研究的主题。

附 录

附表 1.1 乳酸菌在不同培养基上菌落特征

	改良 TJA	改良 MC
杆菌	平皿底为黄色，菌落中等大小，微白色，湿润，边缘不整齐，直径 $3\text{mm} \pm 1\text{mm}$ ，如棉絮团状菌落	平皿底为粉红色，菌落较小，圆形，红色，边缘似星状，直径 $2\text{mm} \pm 1\text{mm}$ ，可有淡淡的晕
球菌	平皿底为黄色，菌落光滑，湿润微白色，边缘整齐	平皿底为粉红色，菌落较小，圆形，红色，边缘整齐，可有淡淡的晕

注:干酪乳杆菌在改良 TJA 培养基上为圆形光滑，边缘整齐，侧面呈菱形状。

附表 1.2 沙门菌属各亚属在各种选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	亚属 I， II， IV， V	亚属 III
亚硫酸铋琼脂	产 H_2S 菌落为黑色有金属光泽、棕褐色或灰色，菌落周围培养基可呈黑色或棕色；有些菌株不产生 H_2S ，形成灰绿色的菌落，周围培养基不变	黑色有金属光泽
DHL 琼脂	无色半透明；产 H_2S 菌落带黑色或几乎全黑色	乳糖迟缓阳性或阴性的菌株，与亚属 I， II， IV， V 相同；乳糖阳性的菌株为粉红色，中心带黑色
HE 琼脂	蓝绿色或蓝色；多数菌株产 H_2S ，菌落中心黑色或几乎全黑色	乳糖阳性的菌株为黄色，中心黑色或几乎全黑色，乳糖迟缓阳性或阴性的菌株为蓝绿色或蓝色，中心黑色或几乎全黑色
SS 琼脂	无色、半透明；产 H_2S 菌株有的菌落中心带黑色，但不如以上培养基明显	乳糖迟缓阳性或阴性的菌株，与亚属 I， II， IV， V 相同；乳糖阳性的菌株为粉红色，中心带黑色，但中心无黑色形成时与大肠埃希菌不能区别

附表 1.3 肠杆菌科各菌属在三糖铁琼脂内的反应结果

斜面	底层	产气	H ₂ S	可能的菌属
-	+	+/-	+	沙门菌属、变形杆菌、枸橼酸杆菌属、爱德华菌属
+	+	+/-	-	沙门菌属亚属Ⅲ、变形杆菌、枸橼酸杆菌属
-	+	+	-	沙门菌属、艾希菌属、哈夫尼亚菌属、摩根菌属、普罗菲登斯菌属
-	+	-	-	伤寒沙门菌、鸡沙门菌、志贺菌属、艾希菌属、哈夫尼亚菌属、摩根菌属、普罗菲登斯菌属
+	+	+/-	-	艾希菌属、肠杆菌属、克雷伯菌属、沙雷菌属、枸橼酸杆菌属

注：+ 表示阳性；- 表示阴性；+/- 表示多数阳性，少数阴性。

附表 1.4 肠杆菌科各属生化反应初步鉴别表

反应 序号	H ₂ S	胨基 质	pH7.2 尿素	氰化钾	赖氨 酸脱 羧酶	判定菌属
A ₁	+	-	-	-	+	沙门菌属
A ₂	+	+	-	-	+	沙门菌属、爱德华菌属
A ₃	+	-	+	+	-	枸橼酸杆菌属、奇异变形杆菌
A ₄	+	+	+	+	-	普通变形杆菌
B ₁	-	-	-	-	+	沙门菌属、艾希菌属
	-	-	-	-	-	甲型副伤寒沙门氏菌、志贺菌属、艾希菌属
B ₂	-	+	-	-	+	艾希菌属
	-	+	-	-	-	艾希菌属、志贺菌属
B ₃	-	-	+/-	+	+	克雷伯菌族各属阴沟肠杆菌、枸橼酸杆菌属
	-	-	+	+	-	
B ₄	-	+	+/-	+	-	摩根菌属、普罗菲登斯菌属

注 1：三糖铁琼脂底层均应产酸，不产酸者可排除，斜面产酸与否不限。

注 2：KCN 和赖氨酸可选用其中一项，但不能判定结果时，仍需补做另一项。

注 3：+ 表示阳性；- 表示阴性；+/- 表示多数阳性，少数阴性。

参考文献

- [1] 张立德, 牟季美. 纳米材料和纳米结构[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [2] 黄德欢. 纳米技术与应用[M]. 上海: 中国纺织大学出版社, 2001
- [3] 张志琨, 崔作林. 纳米技术与纳米材料[M]. 北京: 国防工业出版社, 2000
- [4] 张立德. 纳米材料的研究现状和发展趋势[J]. 现代科学仪器, 1998, (1): 27-29
- [5] Eychmuller A.. Structure and photophysics of semiconductor nanocrystals[J]. J Phys Chem B, 2000, 104: 6514-6528
- [6] 尾崎又治, 架集诚一郎. 纳米微粒导论[M]. 赵健泽, 张联盟译. 武汉: 武汉工业大学出版社, 1991
- [7] 张立德. 纳米材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001
- [8] 王世敏, 许祖勋, 傅晶. 纳米材料制备技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002
- [9] 顾大明, 高农, 等. 次磷酸盐液相还原法快速制备纳米银粉[J]. 精细化工, 2002, 19(11): 634—635, 674
- [10] Han Minghan, Lin Hongfei, Yuan Yanhui, et al. Pressure drop for two phase cocurrent-current flow in a packed column with a novel internal[J]. Chemical Engineering Journal, 2003, 94(3): 171-260
- [11] 姚素薇, 曹艳蕊, 张卫国. 光还原法制备不同形貌银纳米粒子及其形成机理[J]. 应用化学, 2006(4): 438-440
- [12] 徐甲强, 潘庆谊, 孙雨安, 等. 纳米氧化锌的乳液合成、结构表征与气敏性能[J]. 无机学报, 1998, 14(3): 355-359
- [13] NEMEC-P, MIKESD, ROHOVECJ, et al. Light-controlled Growth of CdSe Nanocrystalline Films Prepared by Chemical Deposition[J]. Material Science and Engineering, 2000, B69-70: 500-504
- [14] 瞿华峰, 李建保, 欧阳可青, 等. T-ZrO₂-TiO₂ 固溶体纳米粉的制备[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2003, 43(6): 758-761
- [15] 沃恒洲, 胡献国, 胡淑丽, 等. 均匀沉淀法制备纳米二硫化钼粉末的研究[J]. 合肥工业大学学报, 2003, 26(4): 486-489
- [16] 杨晓娟, 刘尔生, 陈耐生, 等. 几种尖晶石复合氧化物纳米粉体的制备及气敏性[J]. Chinese Journal of Applied-chemistry, 1998, (5): 14-17
- [17] 郑典模, 苏学军. 化学沉淀法制备纳米 SiO₂ 的研究[J]. 南昌大学学报(工科版), 2003, 25(2): 39-41
- [18] 潘庆谊, 徐甲强, 刘宏民, 等. 微乳液法 SnO₂ 材料的合成、结构与气敏性能[J]. 无机材料学报, 1999, 14(1): 85-88

- [19] 江贵长, 官文超, 郑启新. 苯乙烯/甲基丙烯酸-二氧化钛纳米微球的性能[J]. 华中科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(11): 98-100
- [20] QMGSHENG WU, NENGWU ZHENG, YADONG LI, et al. Preparation of Nanosized Semiconductor CdS Particles by Emulsion Liquid Membrane with α -phenanthroline as Mobile Carrier[J]. Journal of Membrane Science, 2000, 172: 199-201
- [21] 李小兵, 刘竞超. 纳米粒子与纳米材料[J]. 塑料, 1999, 28(1): 19-22
- [22] 张泰. 纳米材料的制备技术及进展[J]. 辽宁化工, 1999, 28(1): 3-8
- [23] 刘静波, 王智民, 郑春萍, 等. 铜掺杂钛酸钡纳米晶陶瓷元件的湿敏特性[J]. 功能材料与器件学报, 2000, 6(2): 106-110
- [24] 李蓉萍, 辛颖. 纳米 TiO_2 敏感特性的研究[J]. 传感技术, 2002, 21(11): 57-60
- [25] Sanz N., Baldeck Pl., Ibaneza. Organic Nanocrystals Embedded in Sol-gel Glasses For Optical Applications[J]. Synthetic Metals, 2000, 115: 229-234
- [26] Shaofeng Yang, Yanghua Liu, Yupeng Guo, et al. Preparation of Rutile Titania Nanocrystals by Liquid Method at Room Temperature[J]. Material Chemistry and Physics, 2002, 77: 501-506
- [27] 薛天峰, 胡季帆, 秦宏伟, 等. 掺铝 ZnO 纳米粉的制备与气敏特性研究[J]. 金属功能材料, 2003, 10(4): 20-23
- [28] Lifshitz, Dagi, Litvini, et al. Optical Properties of CdSe Nanoparticle Films Prepared by Chemical Deposition and Sol-gel Methods[J]. Chem Phys Lett, 1998, 288(2-4): 188-196
- [29] Ken-ichi Shizume, Martin Vacha, Toshiro Tani. Preparation and Optical Properties of Capped-CdSe Nanocrystals[J]. Journal of Luminescence, 2000, 87-89: 402-404
- [30] Yujun Bai, Zhenggang Liu, Xiangang Xu, et al. Preparation of InN Nanocrystals by Solvo-thermal Method[J]. Journal of Crystal Growth, 2002, 241: 189-192
- [31] 张元广, 陈友存. 在油酸表面活性剂中制备高晶度纳米 CaCO_3 微晶[J]. 化学世界, 2003, (5): 243-245
- [32] Qian Yt., Suy. Hydrothermal Preparation and Characterization of Nanocrystalline Powder of Spha Lerite[J]. Mater Res Bull, 1995, 30(5): 601-605
- [33] 李东风, 贾振斌, 魏雨. 尖晶石型软磁铁氧体纳米材料的制备研究进展[J]. 电子元件与材料, 2003, 22(6): 37-40
- [34] 姚志强, 王琴, 钟炳. 超临界流体干燥法制备锰锌铁氧体超细粉末[J]. 磁性材料与器件, 1998, 29(1): 69
- [35] 张文钲, 王广文. 纳米银抗菌材料研发现状[J]. 化工新型材料, 2003, (2): 55-58

- [36] 李彦峰, 汪斌华. 纳米无机抗菌材料抗菌性能研究[J]. 化工新型材料, 2002, (30): 11-14
- [37] 姚恩亲, 马家举. 新型抗菌剂——纳米 TiO_2 的研究与应用[J]. 化学与生物工程, 2003, (6): 50~52
- [38] 肖新颜, 陈焕钦, 万彩霞. TiO_2 光催化空气净化及抗菌材料的研究与应用[J]. 化学研究与应用, 2002, (5): 15-18
- [39] 刘强, 柳清菊, 王宝玲等. 纳米 TiO_2 的制备及光催化特性的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2002, (1A): 21-23
- [40] 解宪英. 纳米级二氧化钛的制备及其应用进展(下) [J]. 上海化工, 2001, (5): 45-46
- [41] 董晓旭. 抗菌高分子材料抗菌性检验方法的研究[J]. 工程塑料应用, 2000, 28(2): 27
- [42] 李毕忠. 抗菌塑料的发展和应用[J]. 化工新型材料, 2000, 28(6): 11
- [43] 冯乃谦, 严建华, 等. 无机抗菌剂、抗菌制品及其测试方法[J]. 中华预防医学, 1998, 32(5): 316
- [44] 汤戈, 王振家. 无机抗菌材料的发展和应用[J]. 材料科学与工程, 2002, 20(2): 300
- [45] 季君晖, 史维明. 抗菌材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 1-3
- [46] Walter G. MultiPle Choice: New Microbial Control Option for Paint and Coating[J]. Modern Paint and Coatings, 2001, (1): 21-23
- [47] Trigg D. J.. Pharmaceutical sciences in the next millennium[J]. Amn Phamacother, 1999, 33(2): 241-246
- [48] 奚正英. 纳米材料抗菌性能的研究[D]. 天津, 天津大学, 2005. 1
- [49] 熊德鑫、梁明等. 纳米材料对常见需氧致病菌最低抑菌浓度的测定[J]. 中华临床新医学, 2002, (2): 881~882
- [50] 林爱红, 秦彦珉, 饶健等. 纳米抗菌剂抑菌杀菌性能研究[J]. 实用预防医学, 2003, 10(2): 168~170
- [51] 隆泉, 郑保忠, 周应揆等. 新型纳米无机抗菌剂的抗菌性能研究[J]. 功能材料, 2006, (2): 274~276
- [52] GB/T 4789.35—2003, 食品卫生微生物学检验乳酸菌饮料中乳酸菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996
- [53] 王叔淳. 食品卫生检验技术手册(第三版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 917-953; 974-979
- [54] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 215

- [55] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 109-112
- [56] 马成华, 严启团, 单秀琴等. 细菌的环境扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 1999, 18 (5): 19
- [57] 周德庆. 微生物学教程 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 12-16
- [58] 郑国昌. 细胞生物学 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1992: 204
- [59] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 (第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 96-103

致 谢

本论文是在我的导师于同立教授和副导师郝鲁江副教授的悉心指导下进行并完成的。从论文的选题、实验方案的确立、实验工作的开展到最后论文的写作无不包含着于老师和郝老师的心血和汗水。于老师和郝老师严谨的治学态度、孜孜不倦的创新精神、实事求是的工作作风和科学的工作方法给了我极大的帮助和影响，使我终身受益。在此，谨向于老师和郝老师致以崇高的敬意和由衷的感谢！

感谢山东大学晶体材料国家重点实验室刘宏教授对实验方案、方法的指导和对纳米材料的提供，并对在材料合成中给予帮助的吕跃晖博士表示感谢。

感谢刘天明教授、侯运华副教授、吕红线老师、王锦老师、关凤梅老师在我实验期间给予的无私的帮助和热情指导。

我的师姐孙海云，同学田永、王海波、孙丙升、郑莉莉、刘文龙、王乐、赵迎春、井瑞洁、刘霞，师弟陈江魁等在实验过程中都给了我很大的帮助和支持，借此机会一并向大家致以衷心的感谢，并祝愿他们工作顺利、学业有成！

最后，特别感谢我的我的父母和姐姐，他们的理解和支持使我能够在学校专心完成我的学业。

感谢所有曾经帮助过和关心我的人！

在学期间主要科研成果

一、发表学术论文

- [1] 孔彬彬, 郝鲁江, 于同立. 纳米抗菌材料抗菌作用及机理的研究进展[J]. 中国酿造. 2008(8): 1~3
- [2] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Bis(pentane-2,4-dionato)bis[2-(4-pyridyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide]nickel(II)[J]. Structure reports, 2008, E64, m957
- [3] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Diazidobis(2,2-biimidazole)iron(II)[J]. Structure reports, 2008, E64, m956
- [4] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Tris[2-(propyliminomethyl)phenolato- κ^2 N, O]iron(III)[J]. Structure reports, 2008, E64, m955
- [5] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Tricyclohexyl(piperidine-1-dithiocarboxylato- κ S)tin(IV)[J]. Structure reports, 2008, E64, m1035
- [6] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Catena-Poly[[[triaquacopper(II)]- μ -pyridine-2,3-dicarboxylato- κ^3 N,O²:O³]monohydrate][J]. Structure reports, 2008, E64, m1229
- [7] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. catena-Poly[[[diacrylato- κ^4 O,O'-neodymium(III)]-di- μ -acrylato- κ^3 O,O':O'; κ^3 O:O,O'-[triaquaneodymium(III)]-di- μ -acrylato- κ^3 O,O':O'; κ^3 O:O,O']trihydrate][J]. Structure reports, 2008, E64, m1492~m1493
- [8] Lujiang Hao, Chunhua Mu, Binbin Kong. Bis{ μ -2,2'-[ethane-1,2-diylbis(nitrilomethylidyne)]diphenolato}bis[(thiocyanato- κ N)iron(III)][J]. Structure reports, 2008, E64, m1034

二、其它科研成果