纳米 $Ag@TiO_2$、$Fe@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 的抑菌活性比较研究

龙　威，　陈志龙，　刘穗汕
（广东石油化工学院 化学学院，广东 茂名 525000）

摘要：探索常见金属离子掺杂对抑菌片的抑菌性能的影响，为新型纳米 TiO_2 抑菌片的制备与改善提供依据。选择固定质量分数的 Ag^+、Zn^{2+}和 Fe^{3+}掺杂 TiO_2，通过抑菌圈、最小抑菌质量浓度(MIC)与最小杀菌质量浓度(MBC)综合评价其抑菌性能，对微观结构进行表征分析，探讨抑菌性能差异的原因。结果表明：抑菌性能大小顺序为 $Ag@TiO_2$> $Zn@TiO_2$> $Fe@TiO_2$，$Zn@TiO_2$ 的抑菌活性较好但抑菌稳定性差。$Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 均是 10、20 mg/L，$Zn@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 均是 30、50 mg/L。表征发现抑菌活性强弱主要归因于纳米 TiO_2 表面与金属离子共同产生的活性位点数量及稳定性，与孔结构或表面官能团的关联不大。

关键词：TiO_2；抑菌活性；最小抑菌质量浓度；金属掺杂；最小杀菌质量浓度
中图分类号：Q 93; O 614.41 **文章编号**：1673-1689(2023)06-0084-11 **DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.06.011

Comparative Research on Antibacterial Activity of Nano-$Ag@TiO_2$, $Fe@TiO_2$ and $Zn@TiO_2$

LONG Wei,　*CHEN Zhilong*,　*LIU Suishan*
(College of Chemistry, Guangdong University of Petrochemical Technology, Maoming 525000, China)

Abstract: This study aimed to investigate the antibacterial properties effect of common metal ions doping on antibacterial tablets, providing a technical basis for the preparation and improvement of novel nano-TiO_2 antibacterial tablets. The fixed mass fractions of Ag^+, Zn^{2+} and Fe^{3+} doped on TiO_2 antibacterial tablets were selected for comparative research, and the antibacterial properties were in-depth evaluated by antibacterial circle, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. The microscopic structure was characterized and analyzed to investigate the reasons for the differences in antibacterial properties. The results showed that the order of antibacterial activity was $Ag@TiO_2$>$Zn@TiO_2$>$Fe@TiO_2$. $Zn@TiO_2$ had higher antibacterial activity but poorer antibacterial stability. The MIC and MBC of $Ag@TiO_2$ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were 10 mg/L and 20 mg/L, while those of $Zn@TiO_2$ were 30 mg/L and 50 mg/L, respectively. Characterization revealed that the antibacterial activity was mainly attributed to the number and stability of active sites produced by the interaction between the

收稿日期：2021-09-18
基金项目：2021 年度广东省大学生创新创业训练计划项目(73321098)；茂名市科技计划项目(2021624，2019395)；广东石油化工学院人才引进启动基金项目(2018rc50)。
* **通信作者**：龙　威(1983—)，男，博士，讲师，主要从事功能材料的设计与分子催化方面的研究。E-mail：usclw2013@163.com

nano-TiO_2 surface and metal ions, and it was not closely related to the pore structure or surface functional groups.

Keywords: TiO_2, antibacterial activity, MIC, metal doping, MBC

随着生活水平的不断提高，人们对自身健康的认识和保护层次逐渐提升，抑菌材料作为科技领域的新兴分支已悄然兴盛起来[1]。不管是医疗卫生行业还是食品生产与保鲜，抑菌材料均发挥着重要的作用，甚至在交通工具、衣着防护、公共设施等方面抑菌材料也有广泛的用途[2]。

纳米 TiO_2 的抑菌性能良好，归因于自身的高氧化态，无毒无害易保存，在众多科技领域内均有应用与报道[3-5]，而它并非是万能的。纯的 TiO_2 粉末质量很轻，空气的浮动就可将 TiO_2 粉末吹散。TiO_2 粉末与其他物质复合形成功能材料，可有效弥补这个缺陷，于是各种含 TiO_2 的纤维、布料、薄膜等被研制出来[6]。研究者为了进一步提高抑菌活性，将金属离子掺杂在纳米 TiO_2 中加强 TiO_2 的抑菌活性已有报道[7-9]。

通常来说，直接负载掺杂法指仅经过一个步骤合成载有其他金属离子的纳米 TiO_2（合成纳米 TiO_2 的同时引入金属离子），此种方法的优点是混合均匀、结构统一、重复性好。间接负载法是指通过 2 个步骤对 TiO_2 进行改性，即先合成好基体 TiO_2，然后通过浸渍法、物理吸附法等方法将金属离子负载上去[10]，这种方法只修饰表面、节约成本、稳定性较差。因此，2 种方法都有自身的优点和不足，其制备工艺和运用推广都有报道[11]。单纯的 TiO_2 粉末具有良好的抑菌和光催化活性[12-13]，但抑菌活性并未达到 100%，光催化活性如何控制也有待解决。为了有效地提升抑菌活性，将 TiO_2 粉末进行金属离子掺杂引起了研究者的关注。

2008 年，周建斌等将 TiO_2 与竹炭结合，发现改性后的竹炭对黑曲霉菌和绿色木霉菌的抑菌效果好，TiO_2 可有效地运用于竹炭的加工和保护[14]。董成成等提出对 TiO_2 进行修饰改性或与其他材料复合，可赋予材料更好的抑菌活性[15]，主要修饰的成分有非金属的 N 和 S、金属的 Ag 和 Zn、稀土元素的 La 和 Ce 等。黄卓林等采用脲和硫脲对 TiO_2 进行 N、S 的掺杂改性，制备的复合淀粉膜在可见光下对大肠杆菌的抑菌率分别提高到 89%和 95%，比单纯 TiO_2 的抑菌率提高了近 30%，可用于圣女果的保存与储藏过程[16]。郑苗苗等采用了溶胶凝胶法和水热法制备了 Ag–TiO_2 整理棉织物实验，发现掺杂银后的 TiO_2 可大大提高棉织物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能，抗紫外线活性也很好，经 25 次洗涤后仍保持不变[17]。秦汤等也采用液相沉淀法成功制备了 Ag^+/TiO_2/SiO_2 纳米复合材料，讨论了正硅酸四乙酯的加入量对复合材料的抗变色性能和抑菌性能，发现其对大肠杆菌抑菌 99%的最小质量浓度为 55 mg/L[18]。石振武等则使用光沉积法制备 Ag@TiO_2@SiO_2 复合材料，发现其在紫外光照射下有高催化活性，当 Ag^+质量浓度为 0.6 mg/mL 时，此复合材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率高达 93%以上，可用于水处理或医疗器械的消毒[19]。

在 TiO_2 基体上掺杂其他元素也有报道，如马超等通过溶胶–凝胶法制备了含 Zn^{2+}掺杂的纳米 TiO_2 微粉，在自然光线下对红枣链格孢、黄瓜枯萎病等 6 种病原菌进行实验，发现质量分数为 0.4%的 Zn^{2+}掺杂会明显改善抑菌活性，对黄瓜枯萎菌抑制有较好的选择性，且稳定性非常好[20]。陈霞等选择稀土金属 La 和 Ce 掺杂改性 TiO_2 复合材料，发现稀土金属 La 对金黄色葡萄球菌的抑菌具有明显的促进作用，而稀土金属 Ce 的作用不明显[21]。当掺杂金属 La 的质量分数为 8.24%时，复合材料对罗丹明 B 的脱色率高达 91.2%，对金黄色葡萄球菌最小抑制质量浓度为 37.5 mg/mL[22]。掺杂 Fe、Au 等元素的纳米 TiO_2 微粉在光催化和抑菌性能方面也有报道[23-24]，但过高的贵金属比例会提高抑菌片成本，不利于在食品工业中推广和运用[25]。

抑菌材料十分重要，为了研究掺杂金属对 TiO_2 抑菌片的性能差异，作者选择固定质量分数的 Ag^+、Zn^{2+}和 Fe^{3+}掺杂 TiO_2，通过抑菌圈、MIC、MBC 的综合评价方法对其进行抑菌性能评估，通过微观结构表征进行比较分析，探讨常见的 3 种金属离子掺杂后抑菌片的抑菌性能差异及相关影响因素，获得了较好的结果。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

无水乙醇、钛酸四丁酯、冰醋酸、$AgNO_3$、$FeCl_3$、$(CH_3COO)_2Zn$、尿素：分析纯，购于天津市大茂化学试剂厂；马铃薯淀粉、氯化钠、琼脂、牛肉膏、蛋白胨：分析纯，购于上海麦克林生化有限公司；大肠杆菌斜面二代(型号为 ATCC25922)、金黄色葡萄球菌斜面二代(型号为 ATCC65438)：购于北京生物保藏中心；去离子水：自制。

智能马弗炉(XL-1A 型)：杭州卓驰仪器有限公司；恒温鼓风干燥箱(DHG-9030A 型)：上海一恒科学仪器有限公司；恒温加热搅拌器(85-2A 型)：金坛亿能实验仪器厂；恒温培养箱(DGH 型)：泸鸿仪器设备有限公司；高温高压灭菌锅(JX-18B 型)，上海金鑫医疗器械有限公司；可见光分光光度计(721 型)：大地自动化仪器有限公司；手动药片压片机(直径 10 mm)：东莞市日顺兴金属制品有限公司；比浊管、玻璃培养皿(无菌型)：北京宝元兴业科技有限公司。

1.2 金属掺杂纳米 TiO_2 的制备

取质量为 17.0 g 的无水乙醇和质量为 3.0 g 的冰醋酸，混合均匀后，在磁力搅拌下向溶液中缓慢滴加钛酸四丁酯(TBOT)，混合均匀后继续搅拌 30 min，分别将 Ag、Fe、Zn 元素代表物按 Ti 元素质量的 0.4%加入溶液中，待固体粉末完全溶解后，继续搅拌 1.5 h 后将溶液转移至聚四氟乙烯内衬中，置 110 ℃烘箱加热 15 h，冷却后抽滤，用去离子水及无水乙醇分别洗涤 3 次，烘干研磨后即得金属掺杂的纳米 TiO_2 粉末。取上述少许干燥粉末与干燥好的马铃薯淀粉充分研磨均匀后放入压片机进行压片，制作好的抑菌片质量控制在 0.20 g，直径大小固定为 1.0 cm，后续抑菌活性实验备用。

1.3 表征方法

BET 在贝士德仪器科技有限公司生产的 3h-2000PS1 型比表面积分析仪上进行，采用 N_2 吸附脱附方式测定孔径孔容数据；XRD 在日本理学株式会社生产的 Ultima 型 X 射线衍射仪上进行，CuKα 射线，石墨单色器，管电压 40 kV，管电流 30 mA，闪烁计数器记录衍射强度；IR 表征在美国热电公司生产的 Thermo Scientific 型红外光谱分析仪上进行，采用 KBr 压片制样；SEM 利用日本电子 JEQL 公司生产的 JSM-6510 LV 型扫描电镜仪进行拍摄，钨丝灯作为光源。

1.4 抑菌测试方法

配置固体培养基：准确称量 5.0 g 蛋白胨、15.0 g 琼脂粉、3.0 g 牛肉浸膏和 5.0 g 氯化钠，溶解在 1 000 mL 去离子水中，不断搅拌加热溶解。煮沸 5~10 min，待琼脂完全溶解，调节 pH 为 7.0~7.2。然后分装到试管或锥形瓶内，试管装到 1/3 处，在高温高压灭菌锅内于 120 ℃灭菌 20 min，冷却后密闭无菌冷藏备用。

将已活化的菌种接种至已灭菌的无菌液体培养基中，放入培养箱中于 37 ℃培养 18 h，取 4 mL 菌液至比色皿中，用可见光分光光度计测量菌液在 625 nm 处的吸光度。通过比浊管中特定浓度菌液在可见光分光光度计中测吸光度，形成标准质量浓度曲线，利用吸光度数值再推导出试样菌液的质量浓度。

抑菌圈测试：将抑菌片紧密粘贴在培养基中央，放置于 3 W 的 LED 光照下的细菌培养箱中，37 ℃培养特定时间后测量培养基上出现的抑菌环直径的大小，通过对比不同的抑菌材料抑菌圈的大小及抑菌圈直径随时间的变化趋势，初步得到不同抑菌材料的抑菌性能。抑菌圈实验在相同条件下平行做 2 次，结果取 2 次数据的平均值。

MIC 测试：配置一系列浓度的抑菌溶液，再将溶液加到实验用菌液中，放入培养箱于 37 ℃进行培养，每隔 2 h 将菌液取出摇匀后，测定它在 625 nm 处的吸光度，得到多组数据后拟合成曲线，可以判断菌落的生长情况，曲线中吸光度不随时间变化的抑菌材料最低质量浓度即为抑菌材料的最小抑菌质量浓度 MIC。实验在相同条件下平行做 3 次，结果取 3 次数据的平均值。

MBC 测试：根据 MIC 中的测试结果，选取几组配置好的菌液进行涂平板观察菌落生长情况。将菌液用生理盐水稀释至 10^{-6} 倍后，取 0.1 mL 稀释后的菌液滴加至培养基中，涂布均匀，放入培养箱中培养，对比不同抑菌材料质量浓度对菌液生长状况的影响，能完全杀灭细菌的最低质量浓度即为 MBC。实验在相同条件下平行做 3 次，结果取 3 次数据的平均值。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈测试性能分析

2.1.1 对大肠杆菌的抑菌测试 利用纯 TiO_2 粉末制作成质量分数分别为 10%、20%和 30%的抑菌片，培养 12 h 后测试其抑菌圈直径，分别为 14、16、20 mm，可作为参比数据[26]。将 3 种不同的样品 $Ag@TiO_2$、$Fe@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 的粉末，分别制作成质量分数为 10%、20%、30%的抑菌片对大肠杆菌进行抑菌圈测试实验。当 TiO_2 的质量分数为 10%时，相对于无金属掺杂情况，掺杂了 Ag^+、Zn^{2+}、Fe^{3+}的纳米 TiO_2 抑菌片的抑菌圈直径分别增加至 34、17、15 mm；当TiO_2 的质量分数为 20%时，相对于无金属掺杂情况，掺杂了 Ag^+、Zn^{2+}、Fe^{3+}的纳米 TiO_2 抑菌片的抑菌圈直径分别增加至 38、29、22 mm；当 TiO_2 的质量分数为 30%时，相对于无金属掺杂情况，掺杂了 Ag^+、Zn^{2+}、Fe^{3+}的纳米 TiO_2 抑菌片的抑菌圈直径分别增加至 40、29、24 mm。抑菌圈直径的增加表明 3 种金属离子的掺杂一定程度上改善了纳米 TiO_2 的抑菌性能，而掺杂 Ag^+具有最大的优势，掺杂 Zn^{2+}次之。

为了更准确地研究抑菌的持久性能，分别固定 TiO_2 的质量分数为 10%、20%和 30%制作抑菌片，研究 3 种不同样品 $Ag@TiO_2$、$Fe@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 的抑菌片对大肠杆菌连续抑菌圈培养的影响。当 TiO_2 的质量分数为 10%时，培养 12 h 后每隔 3 h 记录抑菌圈直径大小，得到“抑菌圈直径–时间”曲线，见图 1。

由图 1 可以看出，$Ag@TiO_2$ 的抑菌片的抑菌性能远超其他 2 组样品，且其抑菌性能随时间的变化比较稳定。12 h 时抑菌圈直径达 34 mm，24 h 内抑菌圈直径都维持在 32 mm 以上，36 h 后 $Ag@TiO_2$ 的抑菌片仍有较大的抑菌圈，表明它的抑菌持久性好。$Zn@TiO_2$ 的抑菌片的抑菌性能相对于 $Fe@TiO_2$ 的抑菌片较好一些，两者的抑菌圈直径随时间延长变化的趋势基本一致。

当 TiO_2 的质量分数为 20%时，3 种金属掺杂的纳米 TiO_2 抑菌片对大肠杆菌的抑菌效果影响用连续抑菌圈测试，培养 12 h 后每隔 3 h 记录菌圈直径，得到“抑菌圈直径–时间”曲线，见图 2。

由图 2 可知，TiO_2 抑菌片中纳米 TiO_2 的质量分数为 20%时，$Ag@TiO_2$ 的抑菌片的抑菌性也远超其他 2 组样品，且 12 h 时抑菌圈直径达 38 mm，24 h

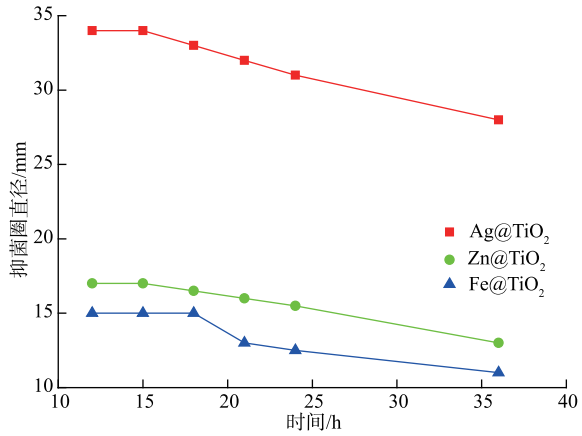


图 1　3 种质量分数为 10%的 TiO_2 抑菌片随时间变化对大肠杆菌的抑菌圈直径的影响

Fig. 1　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 10% on *Escherichia coli*

时抑菌圈直径达 34 mm，36 h 后 $Ag@TiO_2$ 的抑菌片仍有较大的抑菌圈，表明它的抑菌持久性好。$Zn@TiO_2$ 抑菌片的抑菌圈直径明显比 $Fe@TiO_2$ 抑菌片的大，两者的抑菌圈直径随时间的变化趋势基本一致，而 $Fe@TiO_2$ 抑菌片的抑菌活性降低更为明显。

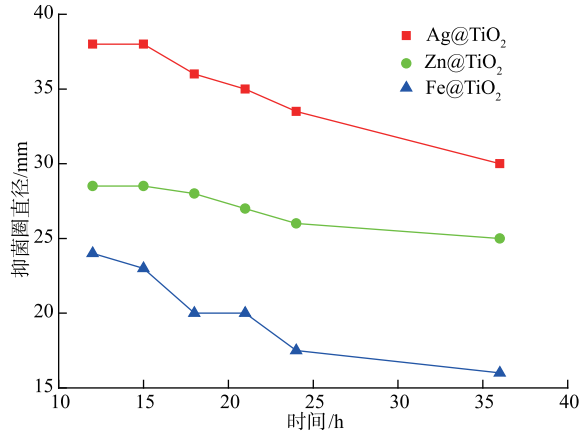


图 2　3 种质量分数为 20%的 TiO_2 抑菌片随时间变化对大肠杆菌的抑菌圈直径的影响

Fig. 2　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 20% on *Escherichia coli*

当 TiO_2 的质量分数为 30%时，3 种金属掺杂的纳米 TiO_2 抑菌片对大肠杆菌的抑菌效果用连续抑菌圈测试，培养 12 h 后每隔 3 h 记录抑菌圈直径，得到“抑菌圈直径–时间”曲线，也出现了上述类似的结果，见图 3。

综合图 1~3 的情况,随着抑菌片中纳米 TiO_2 粉末质量分数的增加，抑菌圈直径数据有所增大,纳米 TiO_2 抑菌性能有明显提升。Ag@TiO_2、Zn@TiO_2 和 Fe@TiO_2 的抑菌片抑菌性能比无掺杂的有明显提高,且三者抑菌圈直径随时间的变化很小,其抑菌持久性好。说明 Ag^+和 Zn^{2+}掺杂对纳米 TiO_2 抑制大肠杆菌具有很大提升作用;Fe^{3+}的掺杂对纳米 TiO_2 的抑菌圈直径虽有改善但相对较小,其抑菌性能提升的幅度相对较弱。

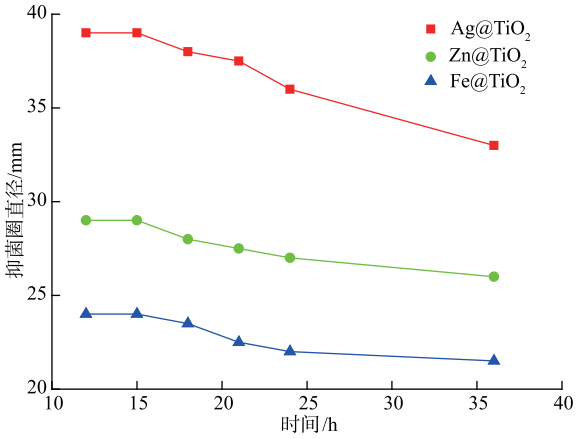


图 3　3 种质量分数为 30% 的 TiO_2 抑菌片随时间变化对大肠杆菌的抑菌圈直径的影响

Fig. 3　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 30% on *Escherichia coli*

Fe@TiO_2 对大肠杆菌的抑菌效果较弱，主要体现在纳米 TiO_2 的质量分数分别为 10%、20%、30%时，培养 12 h 时 Fe@TiO_2 抑菌圈直径仅分别增加 1、6、4 mm；培养至 36 h 后抑菌圈直径减小至 12、16、19 mm,抑菌效果较差。纳米 TiO_2 的质量分数为 20%时,培养 12 h 时抑菌圈直径为 22 mm;培养 36 h 后抑菌圈直径减小特别明显。Ag@TiO_2 和Zn@TiO_2 的抑菌片抑菌效果好,尤其是 Ag@TiO_2 抑菌片不管纳米 TiO_2 的质量分数高低均体现了较大的抑菌圈直径,且抑菌圈直径随时间的延长变化小,在抑菌性能上具有最大的优势。

2.1.2　对金黄色葡萄球菌的抑菌测试　利用纯 TiO_2 粉末制作成质量分数分别为 10%、20%和 30%的抑菌片,对金黄色葡萄球菌培养 12 h 后测试其抑菌圈直径,数据分别为 14、17、19 mm,可作为参比数据。将 3 种不同的样品 Ag@TiO_2、Fe@TiO_2 和 Zn@TiO_2 的粉末，选择 TiO_2 质量分数为 10%、20%和 30%也分别制作成抑菌片,对金黄色葡萄球菌进行抑菌圈测试实验。相对于无金属掺杂的情况,Ag@TiO_2 的抑菌性能有明显提高,Zn@TiO_2 抑菌片的抑菌性能有较好的改善但不稳定,Fe@TiO_2 的抑菌性能无明显改善。

为了更准确地研究抑菌的持久性能,分别固定 TiO_2 的质量分数为 10%、20%和 30%制作抑菌片,研究 Ag@TiO_2、Fe@TiO_2 和 Zn@TiO_2 抑菌片对金黄色葡萄球菌的连续抑菌圈培养的影响。当 TiO_2 的质量分数为 10%时,培养 12 h 后每隔 3 h 记录抑菌圈直径大小,得到“抑菌圈直径–时间”曲线,见图 4。发现 Ag@TiO_2 抑菌片对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径高达 30 mm,Zn@TiO_2 的纳米 TiO_2 抑菌片对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径高达 22 mm,Fe@TiO_2 的抑菌效果无明显改善。

由图 4 可知,Ag@TiO_2 抑菌片的抑菌效果远超其他 2 组样品,且其抑菌性能与无掺杂的纳米 TiO_2 相比,12 h 时抑菌圈直径高达 30 mm，抑菌圈直径随时间的延长变化小，说明其抑菌持久性好。Zn@TiO_2 的抑菌圈直径也有较大的增加，但抑菌圈直径随时间的延长变化大,抑菌持久性弱。Fe@TiO_2 的抑菌圈直径与没有掺杂时无明显变化,其抑菌活性比较稳定。

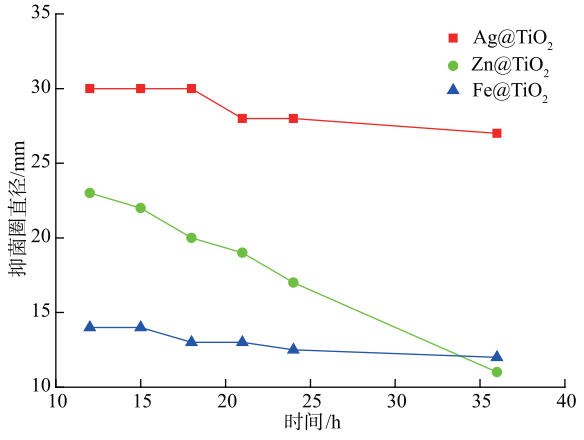


图 4　3 种质量分数为 10% 的 TiO_2 抑菌片随时间变化对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径的影响

Fig. 4　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 10% on *Staphylococcus aureus*

当 TiO_2 的质量分数为 20%时,研究了 3 种金属掺杂的纳米 TiO_2 抑菌片对金黄色葡萄球菌的抑菌效果的影响,培养 12 h 后每隔 3 h 记录抑菌圈直径

大小，见图 5。

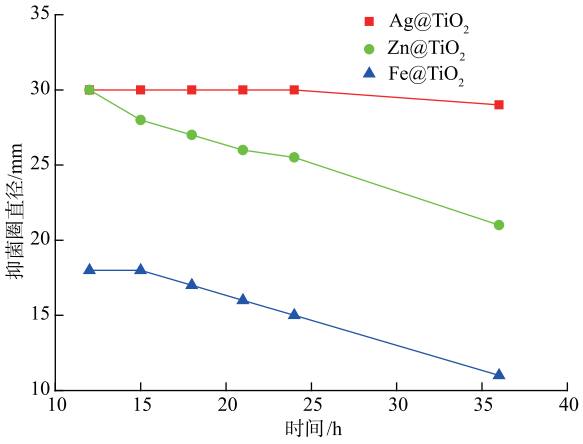


图 5　3 种质量分数为 20% 的 TiO_2 抑菌片随时间变化对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径的影响

Fig. 5　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 20% on *Staphylococcus aureus*

由图 5 可知，抑菌片中纳米 TiO_2 的质量分数增加到 20%，Ag@TiO_2 抑菌性能稍有提升，抑菌圈直径随时间延长变化变小，抑菌持久性进一步提高。Zn@TiO_2 的抑菌圈直径与 Ag@TiO_2 的一样，但随着时间的延长迅速减少，36 h 的抑菌圈直径已经减少到 22 nm，Fe@TiO_2 的抑菌圈直径较无金属掺杂的变化不大，且随时间的延长下降明显。

当 TiO_2 的质量分数为 30%时，研究了 3 种金属掺杂的纳米 TiO_2 抑菌片对金黄色葡萄球菌的抑菌效果。培养 12 h 后每隔 3 h 记录抑菌圈直径大小，结果见图 6。

由图 6 可知，当纳米 TiO_2 的质量分数为 30%时，Ag@TiO_2 抑菌片的抑菌性能较 TiO_2 质量分数为 20%时有明显提高（增加了 10 mm），Zn@TiO_2 和 Fe@TiO_2 的抑菌环直径增加幅度仅约 2 mm。随着时间的延长，Ag@TiO_2 抑菌片还保持了稳定的抑菌活性，24 h 的抑菌圈直径为 38 mm，36 h 的抑菌圈直径为 37 mm。Zn@TiO_2 的抑菌环在 24 h 降低至 25 mm，36 h 的抑菌圈直径降低至 20 mm，表明 Zn@TiO_2 的抑菌活性非常不稳定。Fe@TiO_2 的抑菌活性比较稳定，抑菌环直径与无金属掺杂时相当。

抑菌性能的提升与 TiO_2 的质量分数也有一定关系，抑菌片中 TiO_2 的质量分数越大，金属掺杂后抑菌性能提升越明显。从 3 种金属掺杂的纳米 TiO_2 对金黄色葡萄球菌的抑菌效果随时间的变化趋势可知，Ag@TiO_2 的抑菌效果最佳，不仅抑菌环直径增大且抑菌稳定时间长，抑菌环直径随时间延长的变化小。Zn@TiO_2 也有改善抑菌的效果，但抑菌环直径随时间延长的变化大，十分不稳定。Fe@TiO_2 抑菌效果较无金属掺杂的纯 TiO_2 粉末变化不明显，但增加了抑菌的稳定时间。

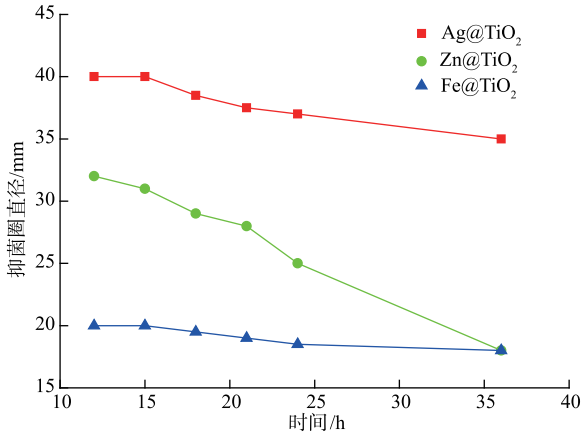


图 6　3 种质量分数为 30% 的 TiO_2 抑菌片随时间变化对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径的影响

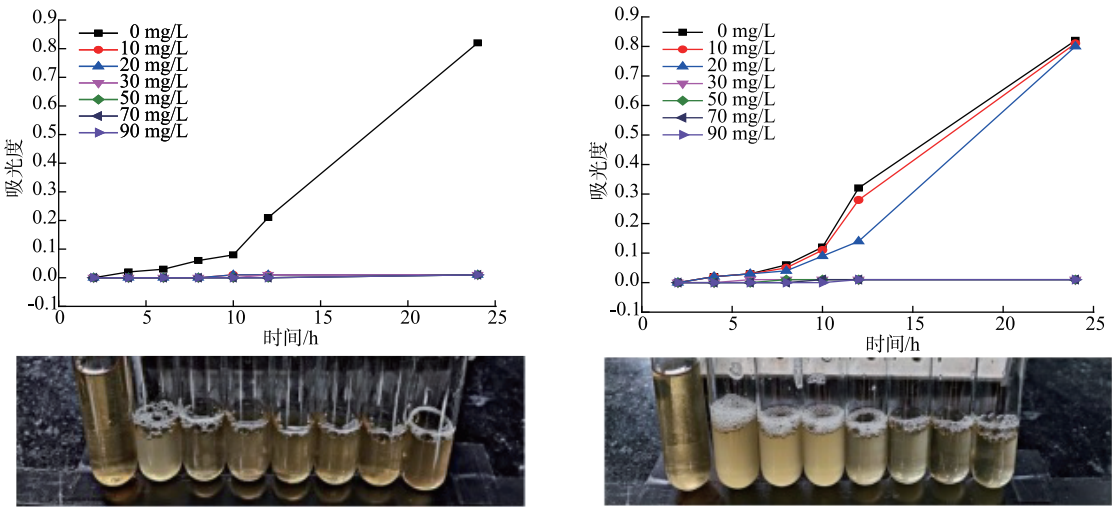
Fig. 6　Variation trends of antibacterial zone diameters and time for three TiO_2 antibacterial tablets with a mass fraction of 30% on *Staphylococcus aureus*

2.2　最小抑菌质量浓度测试（MIC）

因为 Fe@TiO_2 抑菌效果远低于 Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2，选择 Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2 分别进行对大肠杆菌菌液进行 MIC 测试实验，结果见图 7。

在不添加样品时，溶液的吸光度快速增长，符合菌落的对数生长规律，图 7(a)为不同质量浓度下的 Ag@TiO_2 在 24 h 内对大肠杆菌菌液吸光度的影响。在菌落培养的过程中发现，在质量浓度不小于 10 mg/L 的 3 组试样在波长 625 nm 下的后段时间内吸光度并没有很大变化，表明大肠杆菌的生长受该质量浓度的 Ag@TiO_2 试样的抑制，因此，Ag@TiO_2 对大肠杆菌的 MIC 约为 10 mg/L。由图 7(a)可以看出，在 Ag@TiO_2 试样质量浓度小于 10 mg/L 时溶液摇匀后浑浊，而试样质量浓度大于 10 mg/L 时溶液摇匀后较为澄清，与吸光度变化曲线一致。

图 7(b)为不同质量浓度下的 Zn@TiO_2 在 24 h 内对大肠杆菌菌液吸光度的影响。在菌落培养的过程发现，在 Zn@TiO_2 试样质量浓度不小于 30 mg/L 的 2 组试样在波长 625 nm 下的后段时间内吸光度



(a) $Ag@TiO_2$　　(b) $Zn@TiO_2$

图 7　$Ag@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 样品对大肠杆菌的 MIC 测试

Fig. 7　MIC test of $Ag@TiO_2$ and $Zn@TiO_2$ against *Escherichia coli*

并没有很大变动,表明大肠杆菌的生长受该质量浓度 $Zn@TiO_2$ 试样的抑制。当 $Zn@TiO_2$ 试样质量浓度小于 30 mg/L 时,试样吸光度基本与 0 mg/L 的菌液吸光度相符，因此 $Zn@TiO_2$ 对大肠杆菌的 MIC 为 30 mg/L。图 7 也可以看出,在试样 $Zn@TiO_2$ 质量浓度小于 30 mg/L 前溶液摇匀后成浑浊，而质量浓度大于或等于 30 mg/L 时溶液摇匀后较为澄清，与吸光度变化曲线一致。

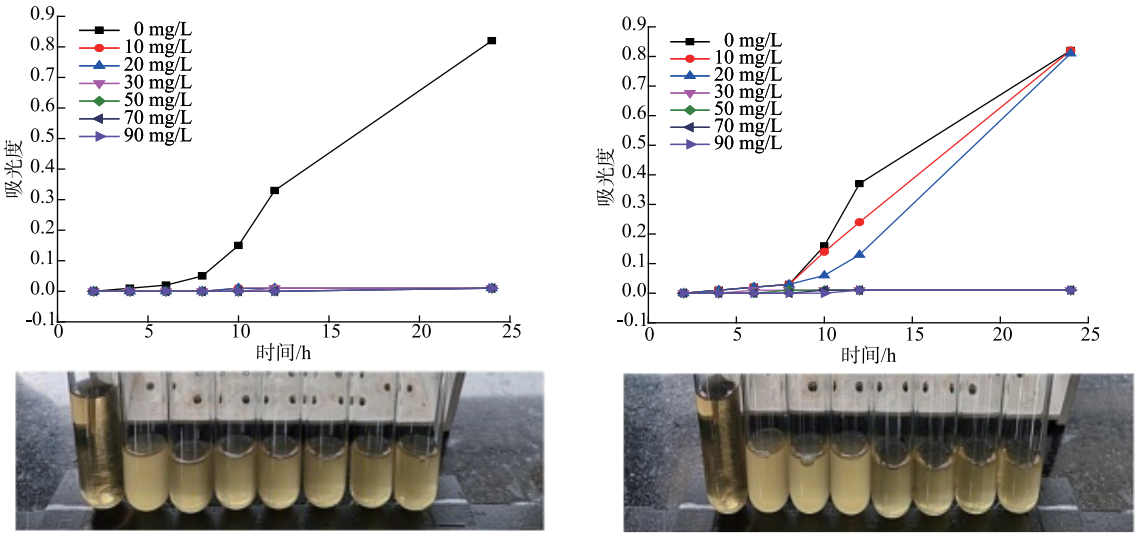
选择 $Ag@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 分别进行对金黄色葡萄球菌菌液的 MIC 实验,结果见图 8。在不添加样品时,溶液吸光度快速增长,符合菌落的对数生长规律,图 8(a)为不同质量浓度下的 $Ag@TiO_2$ 试样在 24 h 内对金黄色葡萄球菌菌液吸光度的影响。在菌落培养的过程发现,$Ag@TiO_2$ 试样质量浓度不小于 10 mg/L 的 3 组试样在后段时间内在 625 nm 下的吸光度并没有很大的变动,表明金黄色葡萄球菌的生长受该质量浓度 $Ag@TiO_2$ 试样的抑制。因此,$Ag@TiO_2$ 试样对金黄色葡萄球菌的MIC 为 10 mg/L,且 $Ag@TiO_2$ 试样质量浓度为 0 mg/L 溶液摇匀后浑浊,而 10 mg/L 摇匀后溶液较为澄清,与吸光度变化曲线一致。

图 8(b)为不同质量浓度下的 $Zn@TiO_2$ 试样在 24 h 内对金黄色葡萄球菌菌液吸光度的影响。在菌落培养的过程中发现,在 $Zn@TiO_2$ 试样质量浓度不小于 30 mg/L 的 2 组试样在后段时间内在 625 nm 下的吸光度几乎没有变化,表明金黄色葡萄球菌的生长完全受该质量浓度 $Zn@TiO_2$ 试样的抑制;当 $Zn@TiO_2$ 试样质量浓度小于 30 mg/L 时，试样吸光度基本与 0 mg/L 的菌液吸光度相符,因此 $Zn@TiO_2$ 试样对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 30 mg/L。可以看出，在 $Zn@TiO_2$ 试样质量浓度小于 30 mg/L 摇匀后浑浊，而质量浓度大于等于 30 mg/L 摇匀后溶液较为澄清,与吸光度变化曲线一致。

2.3　最小杀菌质量浓度测试(MBC)

为了进一步评价样品的抑菌性能,通过平板菌液计数法来测量样品的 MBC。步骤可具体概括为:每个样品根据 MIC 的测试结果选取接近 MIC 的几个试样，然后每个质量浓度稀释至 10^{-6} 倍。取 0.1 mL 稀释的菌液至无菌的固体培养基中,涂布均匀,培养 24 h 后，观察菌落的生长情况，并拍照计数。$Ag@TiO_2$ 试样及 $Zn@TiO_2$ 试样对大肠杆菌的 MBC 测试结果见图 9。图 9(a)样品质量浓度为 0、10、20、30 mg/L,图中培养基 1 和培养基 2 中有菌落出现,表明此时大肠杆菌还没完全被杀死；培养基 3 和培养基 4 中无菌落生长，菌落数为 0，即该质量浓度的 $Ag@TiO_2$ 可全部杀死大肠杆菌;$Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌的最小杀菌质量浓度 MBC 约为 20 mg/L。

图 9(b)中培养基 1~4 样品质量浓度分别为 0、20、30、50 mg/L，培养基 1~3 均能看到菌落出现,表明此时大肠杆菌还没完全被杀死;培养基 4 中无菌落生长,菌落数为 0,即该质量浓度的 $Zn@TiO_2$ 可全部杀死大肠杆菌。因此,$Zn@TiO_2$ 对大肠杆菌的最小杀

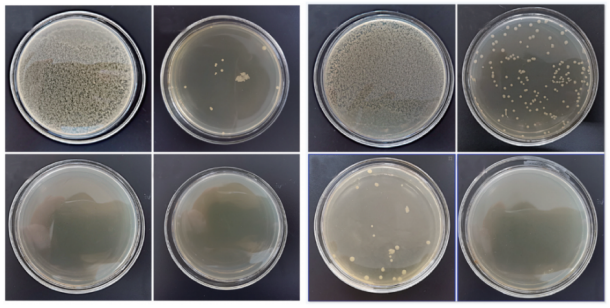


（a）$Ag@TiO_2$　　（b）$Zn@TiO_2$

图 8　$Ag@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 样品对金黄色葡萄球菌的 MIC 测试

Fig. 8　MIC test of $Ag@TiO_2$ and $Zn@TiO_2$ against *Staphylococcus aureus*

菌质量浓度MBC 约为 50 mg/L。



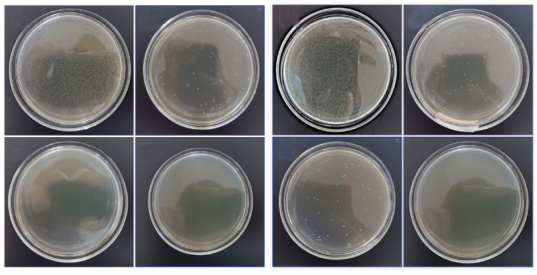
（a）$Ag@TiO_2$　　（b）$Zn@TiO_2$

图 9　$Ag@TiO_2$ 与 $Zn@TiO_2$ 对大肠杆菌的 MBC 测试

Fig. 9　MBC test of $Ag@TiO_2$ and $Zn@TiO_2$ against *Escherichia coli*

同理，$Ag@TiO_2$ 与 $Zn@TiO_2$ 试样对金黄色葡萄球菌的 MBC 测试结果见图 10。图 10(a)中样品质量浓度分别为 0、10、20、30 mg/L，培养皿 1~2 均能看到菌落，表明此时金黄色葡萄球菌还没完全被杀死；培养皿 3~4 中无菌落生长，菌落数为 0，即该质量浓度的 $Ag@TiO_2$ 可全部杀死金黄色葡萄球菌。因此，$Ag@TiO_2$ 对金黄色葡萄球菌的最小杀菌质量浓度 MBC 约为 20 mg/L。

同理，图 10(b)样品质量浓度分别为 0、20、30、50 mg/L。培养皿 1~3 均有能看到菌落出现，表明此时金黄色葡萄球菌还没完全被杀死；培养皿 4 中无菌落生长，菌落数为 0，即该质量浓度的 $Zn@TiO_2$ 可完全杀死金黄色葡萄球菌。因此，$Zn@TiO_2$ 试样对金黄色葡萄球菌的最小杀菌质量浓度 MBC 为 50 mg/L。



（a）$Ag@TiO_2$　　（b）$Zn@TiO_2$

图 10　$Ag@TiO_2$ 与 $Zn@TiO_2$ 对金黄色葡萄球菌的 MBC 测试

Fig. 10　MBC test of $Ag@TiO_2$ and $Zn@TiO_2$ against *Staphylococcus aureus*

通过 MIC 法和 MBC 法测试可知：金属掺杂后细菌的 MIC 和 MBC 的值变小，表明抑菌能力增强。$Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌的 MIC、MBC 分别是 10、20 mg/L，对金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 也分别是10、20 mg/L，比未掺杂前的纳米 TiO_2 降低了约 40 mg/L，抑菌性能显著提高，这与文献[27]报道的结果基本一致。本研究制备的 $Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 数值均变小，表明制备的 $Ag@TiO_2$ 抑菌性能优势大，$Zn@TiO_2$ 的抑菌性能次之，而 $Fe@TiO_2$ 的抑菌性能欠佳。为了进一步揭示该材料的内部影响机制，我们对部分样品进行表征分析。

2.4　表征分析

2.4.1　BET 与红外光谱分析　将纯 TiO_2、$Ag@TiO_2$、$Zn@TiO_2$ 和 $Fe@TiO_2$ 分别进行了 BET 分析，孔结构

性质数据列于表 1。

表 1　不同样品的物理结构性质

Table 1　Physical structure and properties of different samples

样品	比表面积/(m^2/g)	平均孔径/nm	孔容/(cm^3/g)	平均粒径/nm
TiO_2	58.3	7.5	0.23	62.3
Ag@TiO_2	59.6	7.5	0.25	62.7
Zn@TiO_2	59.4	7.5	0.24	62.9
Fe@TiO_2	57.8	7.2	0.20	64.5

因为样品中 Ag、Zn、Fe 的含量非常低，基本上不改变样品的孔结构数据，但 Fe@TiO_2 样品中孔径数据有变小的特征。可能是由于含铁的粒子引起孔道结构的部分堵塞所致，其平均粒径的数值也明显增大，不利于抑菌性能的发挥。Ag@TiO_2 的比表面积更大，孔容更大，平均粒径更小。

在前述的抑菌性能测试中，Fe@TiO_2 的抑菌性能并未提高，故选择 Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2 分别进行红外光谱表征，见图 11。700~500 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 Ti—O—Ti 伸缩振动；1 750~1 350 cm^{-1} 的吸收峰归属于表层羧基中 COO—的伸缩振动；3 600~3 000 cm^{-1} 吸收峰归属于—OH 的伸缩振动。Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2 中均含有 Ti—O—Ti、COO—和—OH，说明制备过程中 TiO_2 基体上引入了大量的—COOH 和—OH 官能团，而金属对应的特征峰由于含量过低无法显示[28]，而表层的官能团种类、性质基本一致。

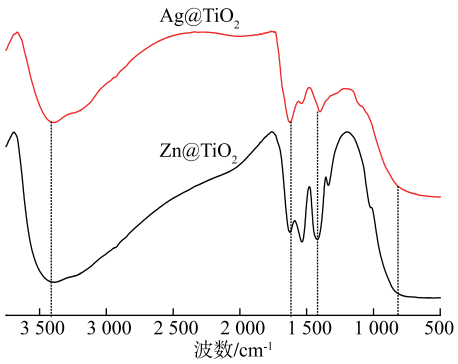


图 11　Ag@TiO_2 与 Zn@TiO_2 的红外光谱图

Fig. 11　Infrared spectra of Ag@TiO_2 and Zn@TiO_2

2.4.2　X 射线衍射表征　选择 Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2 粉末分别进行XRD 表征分析，结果见图 12。2 条曲线的轮廓十分相似，Ag@TiO_2 曲线在 2θ 为 25.3°、38.1°处出现的尖锐峰，归属于 TiO_2 的(101)、(004)晶面；2θ 为 44.3°、66.4°、77.4°处的小峰，归属于 TiO_2 的(200)、(220)、(311)晶面[29]；2θ 为 48.4°、56.4°处的小峰，归属于锐钛矿型 TiO_2 的其他晶面(ICDD PDF #21-1272)。由于金属 Ag 和 Zn 的质量分数低，较好地分散镶嵌在纳米 TiO_2 表面，特征峰十分弥散，光谱中未明显出现。

Ag@TiO_2 样品的抑菌性能好，是由于锐钛矿型的纳米 TiO_2 与 Ag^+发生了复合，双重抑菌能力互相促进有叠加，比单一的纳米 TiO_2 强。Zn^{2+}与纳米 TiO_2 复合亦能提高纳米 TiO_2 的抑菌性能，但 Zn^{2+}本身没有抑菌能力，故 Zn@TiO_2 的抑菌能力没有 Ag@TiO_2 强。

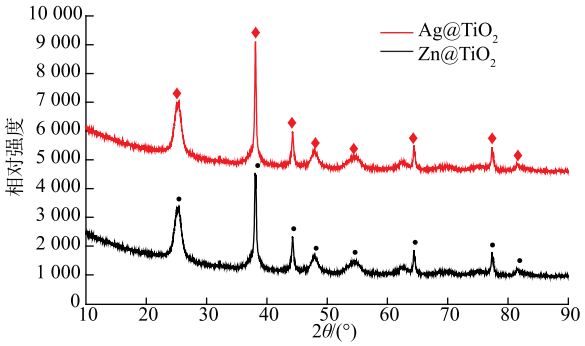


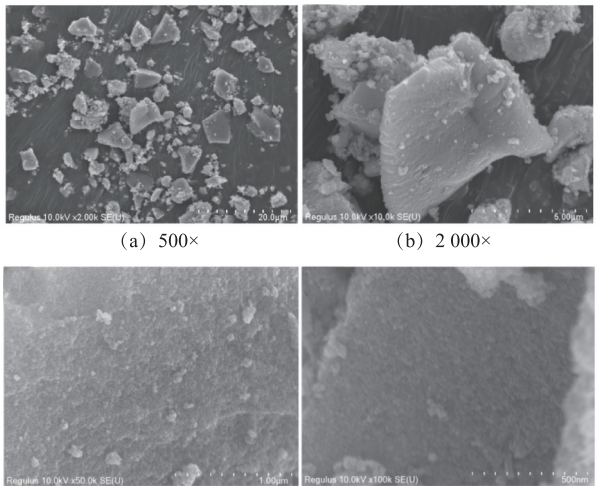
图 12　Ag@TiO_2 和 Zn@TiO_2 的 X 射线衍射图

Fig. 12　XRD spectrum of Ag@TiO_2 and Zn@TiO_2

2.4.3　扫描电子显微镜（SEM）　对样品 Zn@TiO_2 进行扫描电子显微镜测试，结果见图 13。图 13 中(a)~(d) 分别为 500、2 000、10 000 和 20 000 倍下的电镜形貌，观察到纳米 Zn @TiO_2 外貌形态呈块状堆积。当放大倍数高达 10 000 倍及20 000 倍时，可看出块状样品由许多细小颗粒堆积形成。说明样品颗粒太小易团聚，SEM 图中块状固体表面黏附的细小颗粒，可能是 Zn^{2+}与 TiO_2 产生的活性位点。Zn@TiO_2 试样良好的抑菌活性与纳米 TiO_2 的颗粒尺寸密切有关，这也是抑菌圈直径大的原因[30]。细小的颗粒更容易吸附在细菌的表面，使质量分数较小的 Zn@TiO_2 样品也拥有较大的抑菌活性，但细小颗粒容易受外界影响发生脱落，导致抑菌活性不稳定。

Ag@TiO_2 的扫描电镜见图 14。图 14(a)~(d)分别为 500、2 000、10 000 和 20 000 倍下的电子扫描电镜影像，可看到 Ag@TiO_2 的外貌形态呈不定型。当放大倍数为 500 倍时，可看出它是一些块状的固体。随着放大倍数的增加，粉末的形貌逐渐变为不定型散乱分布，在固体表面能看到很多突起的细小颗粒。可能是 Ag^+与 TiO_2 共同产生的活性位点，此位

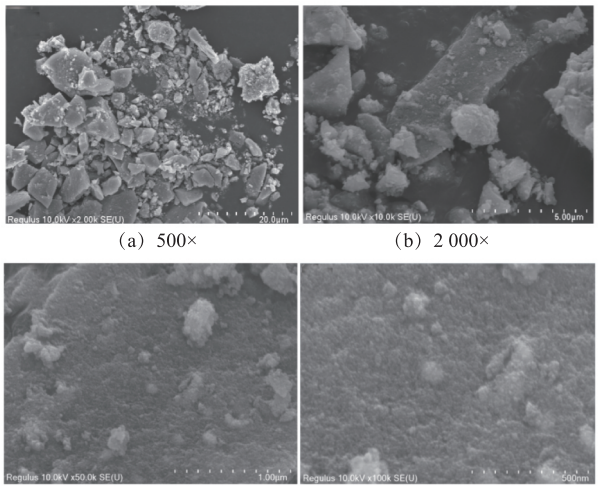
点稳固地固定在 TiO_2 的表层，抑菌活性稳定持久。



（a）500×　（b）2 000×　（c）10 000×　（d）20 000×

图 13　纳米 $Zn@TiO_2$ 的扫描电镜图

Fig. 13　SEM images of nano-$Zn@TiO_2$



（a）500×　（b）2 000×　（c）10 000×　（d）20 000×

图 14　纳米 $Ag@TiO_2$ 的扫描电镜图

Fig.14　SEM images of nano-$Ag@TiO_2$

$Ag@TiO_2$ 试样良好的抑菌活性与纳米 TiO_2 的颗粒尺寸密切相关，它也是 $Ag@TiO_2$ 抑菌片抑菌圈直径大和持久的另一个原因。细小的颗粒有利于 Ag^+ 的扩散分布，抑制细菌的滋生，即使质量分数较小的样品，也拥有较大的抑菌活性，抑菌性能不断提高，因此，$Ag@TiO_2$ 抑菌性能更好且持久。

当前对 TiO_2 的研究十分火爆，不仅在光催化和污染物的降解领域，更多地是利用它独特的抑菌活性，将其与其他物质形成薄膜材料或响应功能材料[31-32]在抑菌领域发挥着重要的作用。

3　结　语

选择 $Ag@TiO_2$、$Zn@TiO_2$ 和 $Fe@TiO_2$ 为研究对象，通过抑菌圈法、最小抑菌质量浓度 MIC 及最小杀菌质量浓度 MBC 进行抑菌性能评价，通过 BET、IR、XRD、SEM 等对样品进行表征。得到如下结论：

1）通过抑菌圈直径测试可知，在相同情况下抑菌性能顺序为 $Ag@TiO_2$> $Zn@TiO_2$>$Fe@TiO_2$。其中 $Zn@TiO_2$ 的抑菌性能不稳定，随着时间的延长容易降低；$Fe@TiO_2$ 的抑菌性能提升不明显；$Ag@TiO_2$ 的抑菌性能提升明显且持久，抑菌活性的提升在 TiO_2 质量分数为 30%时更显著。

2）MIC 和 MBC 测试表明，$Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 分别均是 10、20 mg/L；$Zn@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 分别是 30、50 mg/L；$Ag@TiO_2$ 的抑菌性能更优。

3）XRD 表征表明，$Ag@TiO_2$ 和 $Zn@TiO_2$ 中 TiO_2 为锐钛矿型，金属分散良好无明显衍射峰。SEM 表征发现，$Zn@TiO_2$ 微观结构呈球形颗粒状，$Ag@TiO_2$ 微观结构呈不定型。$Ag@TiO_2$ 试样的抑菌性能好，归因于锐钛矿型 TiO_2 与 Ag^+ 复合，双重抑菌效果叠加。

因此，$Ag@TiO_2$ 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均有很好的抑菌作用，可用于食物保鲜、医药消毒行业；$Zn@TiO_2$ 的抑菌持久性有待改进和优化加强；$Fe@TiO_2$ 的抑菌性能较差。

参考文献：

[1] FU G，VARY P S，LIN C T. Anatase TiO_2 nanocomposites for antimicrobial coatings[J]. **The Journal of Physical Chemistry B**，2005，109(18)：8889-8898.

[2] 隆泉，郑保忠，周应揆，等. 新型纳米无机抑菌剂的抑菌性能研究 1.对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌作用[J]. 功能材料，2006，37(2)：274-276.

[3] PARIDA K M，SAHU N. Visible light induced photocatalytic activity of rare earth *Titania nanocomposites*[J]. **Journal of Molecular Catalysis A：Chemical**，2008，287(1/2)：151-158.

[4] NAKANO R，HERA M，ISHIGURO H，et al. Broad spectrum micro bicidal activity of photocatalysis by TiO_2[J]. **Catalysts**，

2013,3(1):310-323.
[5] SIRSAT S A,HHECHT O,MIRABAL C,et al. Bacteriostatic effect of CoO-TiO_2 on *Listeria monocytogenes* by the presence of the Co-catalytic CoO nanoparticles[J]. **Journal of Envir onmental Chemical Engineering**,2020,8(5):104259-104265.
[6] GAO D G,LIU G G,LI Y J,et al. Construct the multifunction of cotton fabric by synergism between nano ZnO and Ag[J]. **Fibers and Polymers**,2020,21(3):505-512.
[7] SLEPICKA P ,KASALKOVA N S ,SIEGEL J ,et al. Nano-structured and functionalized surfaces for cytoco mpatibi lity impro vement and bactericidal action[J]. **Biotechnology Advances**,2015,33(6):1120-1129.
[8] CHENG C W,YANG C I,OU S L,et al. Bending mattress and antibacterial effect of TiO_2/nAg/chitosan nano particle applied intelligent patient bed[J]. **Sensors and materials**,2020,32(5):1757-1766.
[9] WU J,ZHANG G L,LIU J,et al. Characteristics,and antibacterial activity of a rare earth sama Rium/Silver/Titanium dioxide inorganic nanomaterials[J]. **Journal of Rare Earths**,2014,32(8):727-732.
[10] LI D D,GAO X,HUANG X CH,et al. Preparation of organic-inorganic chitosan@silver/sepiolite composites with high synergistic antibacterial activity and stability[J]. **Carbohydrate Plymers**,2020,249:116858-116867.
[11] MORIT M,MALGORZAZT G. The newest achievements in synthesis,immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles[J]. **Chemical Engineering Journal**,2013,228:596-613.
[12] 胡敏,郭嘉,吴华东,等. N-Zn/TiO_2 光催化氧化脱硫废液中亚硫酸钠的研究[J]. 无机盐工业,2020,52(10):151-156.
[13] YOU Y F,XU C H,XU S S,et al. Structural characterization and optical property of TiO_2 powders prepared by the sol-gel method [J]. **Ceramics International**,2014,40(6):8659-8666.
[14] 周建斌,叶汉玲,魏娟,等. 纳米 TiO_2 改性竹炭和竹炭抑菌性能比较的研究[J]. 林产化学与工业,2008,28(5):31-34.
[15] 董成成,关壬铨,王姿,等. TiO_2 基复合材料光催化抑菌功能研究新进展[J]. 化工新型材料,2021,49(12):33-36.
[16] 黄卓林,张静,宋贤量. N、S 改性 TiO_2 及其与淀粉复合膜的抑菌性能及保鲜效果[J]. 食品工业科技,2020,41(4):252-259.
[17] 郑苗苗. Ag-TiO_2 整理棉织物的抗紫外和抑菌性能[J]. 印染助剂,2021,38(5):43-46.
[18] 秦汤,孙宏浩. Ag^+/TiO_2/SiO_2 纳米复合材料的制备及抗变色性能、抑菌性能研究[J]. 化工新型材料,2019,47(9):122-126.
[19] 石振武,郭少波,薛群虎. 纳米复合材料 Ag@TiO_2@SiO_2 的制备、光催化及其抑菌性能[J]. 无机材料学报,2016,31(5):466-472.
[20] 马超,张越锋,吴瑛. 掺 Zn 纳米 TiO_2 对 6 种植物病的抑菌性能研究[J]. 化工新型材料,2019,47(1):229-232.
[21] 陈霞,陆改玲,计晶晶,等. 稀土元素(镧、铈)掺杂复合材料的制备及其光催化性和抑菌性的研究[J]. 人工晶体学报,2020,49(1):62-66.
[22] 陈霞,陆改玲,计晶晶,等. 稀土元素镧掺杂 TiO_2 复合材料的制备及其抑菌性研究[J]. 化工新型材料,2020,48(4):98-101.
[23] 张丽,李恩泽,李振兴,等. Fe^{3+}/TiO_2/ZSM 多相光 Fenton 降解甲基橙的研究[J]. 无机盐工业,2018,50(4):75-78.
[24] MA J Q,GUO S B,GUO X H,et al. A mild synthetic route to Fe_3O_4@TiO_2-Au composites:preparation,characterization and photocatalytic activity[J]. **Applied Surface Science**,2015,353:1117-1125.
[25] NAN Z H,LIU P,FU B Q,et al. Preparation of nanometer titanium dioxide adsorbent and its application in industrial wastewater treatment[J]. **Advanced Materials Research**,2012,573-574:521-525.
[26] 鞠剑峰,李澄俊,徐铭,等. 纳米二氧化钛复合材料的抑菌性能研究[J]. 精细化工,2003,20(11):641-643.
[27] 陈月梅. TiO_2 与改性 TiO_2 介孔微球的制备及其光催化和抑菌性能研究[D]. 深圳:深圳大学,2016.
[28] WCHLING J,MAAS M,RCZWAN K. Bactericidal activity of partially oxidized nano diamonds[J]. **ACS Nano**,2014,8(6):6475-6483.
[29] LI J,XU D. Tetragonal faceted-nanorods of anatase TiO_2 single crystals with a large percentage of active {100} facets[J]. **Chem ical Communication**,2010,46(13):2301-2303.
[30] CHEN H,HE J,TANG H,et al. Porous silica nano capsules and nanospheres dynamic self assembly synthesis and application in controlled release[J]. **Chemistry of Materials**,2008,20(18):5894-5900.
[31] 徐林冲,袁爱群,吴胜富,等. 响应面优化核 - 壳结构 TiO_2@SiO_2 的制备工艺[J]. 无机盐工业,2020,52(10):77-83.
[32] 龙威,陈志龙,刘穗汕. 制备方法对新型纳米 TiO_2 抑菌片抑菌活性的影响[J]. 有色金属科学与工程,2022,13(5):80-91.