

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2014.04.003

纳米 ZnO 的抗菌性能研究

庞 昕, 陈蕴智

(天津科技大学 包装与印刷工程学院, 天津 300222)

摘 要: 纳米 ZnO 是一种常见的光学材料, 将其与其他材料复配可以制得抗菌性能良好的包装材料。根据 GB/T 21510—2008《纳米无机材料抗菌性能检测方法》, 以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为测试菌种, 以 SiO₂ 为对照试验, 测试了纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能; 同时, 采用抑菌圈法对其抗菌性能进行了定性研究。结果表明: 纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有良好的抑菌性能, 且初步测定了纳米 ZnO 对这两种菌的最小抑菌浓度, 分别为 0.312 5% 和 0.625 %; 纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌高度敏感, 纳米 ZnO 对二者的抑菌圈直径都大于 15 mm。

关键词: 纳米 ZnO; 抗菌性能; 抑菌圈法; 最小抑菌浓度

中图分类号: TQ132.4⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2014)04-0013-04

Study of Antibacterial Properties of Nanometer ZnO

Pang Xin, Chen Yunzhi

(College of Packaging and Printing Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: Nanometer ZnO is a common optical material which can be processed into an antibacterial packaging material while compounding with other materials. According to GB/T 21510—2008 of Detection Method for Antibacterial Properties of Nanometer Inorganic Material, adopting SiO₂ for controlled trials, the antibacterial properties of nanometer ZnO was tested against Escherichia coli and staphylococcus aureus strains. The qualitative research was conducted using bacteriostatic circle method. The result showed that nanometer ZnO performed well in antibacterial activity against the tested bacteria. The minimum inhibitory concentration of the nanometer ZnO was initially determined as 0.312 5% and 0.625% respectively for the tested bacteria. Nanometer ZnO was highly sensitive to these two kinds of tested bacteria with the antibacterial circle diameter greater than 15 mm in both cases.

Key words: nanometer ZnO; antibacterial properties; bacteriostatic circle method; the minimum bacteriostasis concentration

0 引言

近年来, 随着人们对资源的过度开发, 细菌和真菌等微生物对人们的健康产生了巨大危害, 寻找绿色环保、无危害的抗菌材料成为广大学者的研究热

点之一^[1]。纳米无机材料因其良好的抑菌性和长效性而越来越受到人们的关注, 目前已报道的具有抗菌活性的纳米无机材料主要有银、铜、氧化锌 ZnO 和二氧化钛 TiO₂ 等。其中, 纳米银因其抗菌活性显著、抗菌谱广而成为广泛应用的无机抗菌材料。而

收稿日期: 2014-05-29

作者简介: 庞 昕 (1988-), 女, 山东德州人, 天津科技大学硕士生, 主要研究方向为包装材料与包装技术,

E-mail: pangxin1111@126.com

银是重金属,即便以纳米形式存在,与人体过多接触也会产生毒性,且纳米银的成本与其他无机抗菌成分相比也相对较高^[1]。纳米TiO₂的抗菌性原理同纳米ZnO的相似^[2],但是胡占江等人^[3]在研究纳米ZnO的抗菌性能及机制时发现:纳米ZnO的光催化活性强于纳米TiO₂,且TiO₂在未进行紫外光照射时是一种生物相容性很好的材料,但经UVA进行照射后又可以显示出极强的细胞毒性;纳米TiO₂的成本是纳米ZnO的1.5倍左右,且纳米ZnO具有良好的热稳定性、持久性。

作为抗菌包装材料,特别是食品抗菌包装材料,所选用的抗菌剂必须是对人体无害的。纳米ZnO中的锌元素是人体必需的微量元素之一,与人体具有良好的相容性^[4]。因此,研究纳米ZnO的抗菌性能,并且与其他材料混合可制得具有抗菌性能的包装材料,已成为抗菌材料方面的研发热点^[5-8]。本研究拟根据GB/T 21510—2008《纳米无机材料抗菌性能检测方法》,以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为测试菌种,以SiO₂为对照试验,测试纳米ZnO对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度,并采用抑菌圈法对其抗菌性能进行定性研究,研究其含量对2种试验菌抑菌性能的影响,以期为研制含纳米ZnO的抗菌包装材料提供一定的理论参考依据。

1 试验方法

1.1 国标方法测定纳米ZnO的抗菌性能

1.1.1 材料

根据GB/T 21510—2008《纳米无机材料抗菌性能检测方法》中的相应要求,制备质量分数为0.1%的吐温-80磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液)和普通营养琼脂培养基,PBS缓冲液用于稀释菌悬液和制备纳米ZnO悬液。

测试菌株为大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,由天津科技大学食品学院提供。

SiO₂,天津江天化工公司生产,用作空白对照。

纳米ZnO,杭州万景新材料有限公司生产,粒径为20 nm。

1.1.2 方法

1)准确称取5 g纳米ZnO,然后将其加入495 mL PBS缓冲液中,边加入边搅拌,制备质量分数为1%的纳米ZnO抑菌悬液。

2)取8个具塞试管,并分别装入10 mL PBS缓冲液,然后将试管中的缓冲液、配备的抑菌悬液和培养基置于121 °C温度下高压灭菌20 min,再将灭菌后

的培养基放在80 °C温度下的恒温水浴锅中待用。

3)向16个真空灭菌过的培养皿中各倒入15 mL的培养基和2 mL灭菌后的抑菌悬液,均匀地铺满平皿底,冷却。同时,向16个培养皿中倒入15 mL培养基和2 mL质量分数为1%的SiO₂溶液,铺满皿底冷却,用作对照组试验。

4)待培养基冷却后进行接种,分别将菌悬液稀释100倍和10 000倍。取2种浓度的菌悬液各1 mL,均匀涂布到对应的培养基上,接种完毕后在恒温培养箱中培养18~24 h,并观察试验结果。

1.2 纳米ZnO的最小抑菌浓度测试

最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)是抗菌药物能抑制细菌生长的最小浓度,是药物抗菌活性的指标之一。

1.2.1 抑菌液的制备

取5 g纳米ZnO,并加入45 mL PBS缓冲液中,震荡摇匀,配制出初始质量分数为10%的抑菌液;然后,按照对倍稀释法将抑菌液稀释成质量分数分别为5%,2.5%,1.25%,0.625%,0.312 5%,0.156 25%的稀释液;取各浓度抑菌液10 mL进行高压灭菌,然后置于45~50 °C恒温水浴中备用。

1.2.2 抑菌液培养基的制备

参照国标要求制备测试纳米无机材料最小抑菌浓度的水解酪蛋白琼脂培养基(MH培养基),其成分为:酸水解酪蛋白,17.5 g;可溶性淀粉,1.5 g;牛肉浸出粉,2.0 g;琼脂,17.0 g;蒸馏水,1 000 mL。并将培养基于121 °C温度下高压灭菌15 min,然后将灭菌后的培养基置于45~50 °C水浴中备用。

分别取系列稀释的抑菌液10 mL,加入培养皿内,并加入10 mL于45~50 °C水浴中静置的MH培养基,边加边摇晃平皿,使抑菌液和培养基充分混合均匀,待凝固后即得含抑菌液的培养基。

1.2.3 接种测试

待含抑菌液的培养基冷却后,用灭菌后的镊子将直径为5~8 mm的滤纸片放于培养基中间,并用加样器取10 μL菌悬液点种于滤纸片上。再将接种后的平板置于37 °C恒温培养基中,培养18~24 h后观察试验结果。

1.3 抑菌圈法测试纳米ZnO的抗菌性能

1.3.1 材料

普通营养琼脂培养基:调节其pH值为7.2~7.4,并于121 °C温度下高压蒸汽灭菌20 min;

PBS缓冲液:将其于121 °C温度下高压蒸汽灭菌20 min,用于抑菌液和菌悬液的稀释。

抑菌悬液:称取5 g纳米ZnO粉末,然后加入

195 mL 的 PBS 缓冲液中, 制得初始质量分数为 2.5% (标注为①) 的抑菌悬液, 再将其逐步稀释到 2.0% (标注为②), 1.5% (标注为③), 1.0% (标注为④), 0.5% (标注为⑤)。量取①~⑤的抑菌悬液各 10 mL, 加入具塞试管中, 并高压蒸汽灭菌。

1.3.2 方法

1) 将灭菌后的琼脂培养基倒入培养皿中, 铺满培养皿底部, 制成平板。

2) 将菌液稀释至质量分数分别为 10% 和 1%, 然后分别取 100 μ L 稀释后的菌悬液, 滴到培养基上, 用涂布棒涂抹均匀。

3) 将用打孔器制成的滤纸片在抑菌液中润湿, 然后置于对应的平板中央 (每种浓度 2 个试样, 放在对应的培养基中央)。

4) 将培养皿置于 30 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中, 24 h 后测定试样周围的抑菌圈直径。

2 结果与讨论

2.1 国标方法测定结果分析

图 1 所示为以国标方法测定的试验组和对照组的抑菌结果。

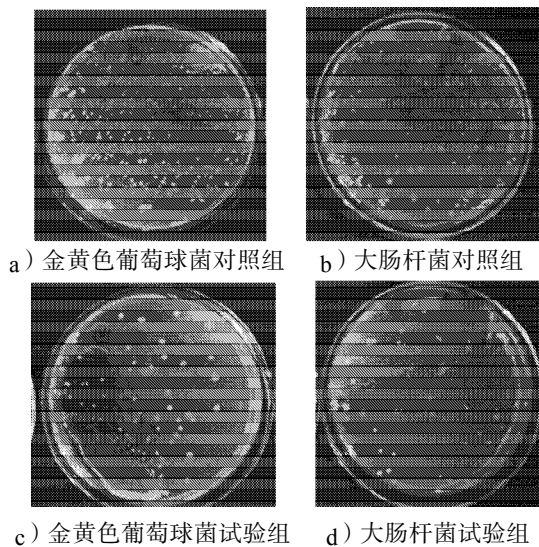


图 1 试验组和对照组测试结果

Fig. 1 The experimental group and the control group test results

图 1 中, 白点部分为生长的菌落, 从图中可以明显看出, 相较于对照组, 试验组中金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的菌落数均明显减少, 说明纳米 ZnO 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有明显的抑菌性能。

2.2 纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC

菌落生长被完全抑制的最低抑菌液浓度为纳米

ZnO 对受试菌的 MIC。本试验中, 单一生长的菌落忽略不计, 所以纳米 ZnO 的 MIC 是对应培养皿中没有菌落生成的前一组试验的抑菌液浓度。依据这一判别标准, 由试验结果可得出, 纳米 ZnO 对大肠杆菌的 MIC 是 0.312 5%, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 是 0.625%。且纳米 ZnO 的抑菌效果在浓度为 0~5% 时逐渐升高, 当浓度为 2% 时, 其抑菌率接近 100%。

2.3 抑菌圈测试结果

图 2 所示为纳米 ZnO 对稀释 10 倍的金黄色葡萄球菌菌悬液的抑菌圈测试结果, 图 3 是对稀释 10 倍的大肠杆菌菌悬液的抑菌圈测试结果。

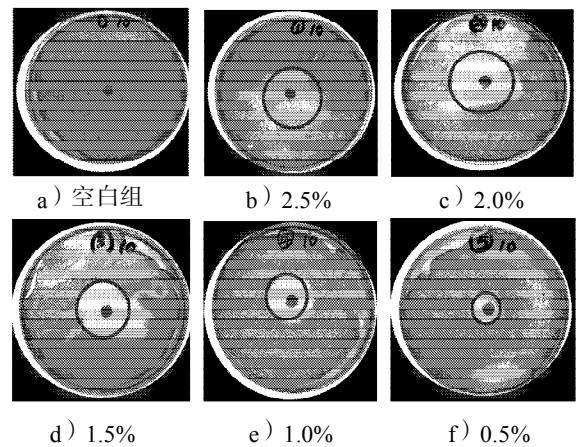


图 2 不同浓度纳米 ZnO 对金黄色葡萄球菌抑菌圈测试结果

Fig. 2 The bacteriostatic circle test results of staphylococcus aureus under different concentrations of nanometer ZnO

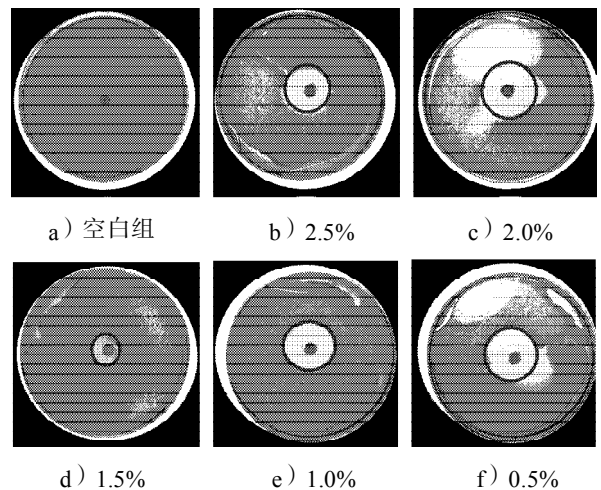


图 3 不同浓度纳米 ZnO 对大肠杆菌抑菌圈测试结果

Fig. 3 The bacteriostatic circle test results of Escherichia coli under different concentrations of nanometer ZnO

试验所得具体的金黄色葡萄球菌菌悬液和大肠杆菌菌悬液抑菌圈大小见表 1。由图 2~3 可看出, 抑菌圈并不是规则的圆形, 因此, 测定抑菌圈直径时, 按照互成 120 $^{\circ}$ 方向测试 3 个值, 然后取其平均值作为

最终结果。

表 1 不同浓度纳米 ZnO 对受试菌株的抑菌圈直径

Table 1 The bacteriostatic ring size of the tested strains of different concentrations of nanometer ZnO mm

| 菌种 | 抑菌悬液的质量分数 / % | | | | |
|---------|---------------|-----|-----|-----|-----|
| | 2.5 | 2.0 | 1.5 | 1.0 | 0.5 |
| 金黄色葡萄球菌 | 22 | 25 | 21 | 19 | 20 |
| 大肠杆菌 | 25 | 30 | 24 | 23 | 15 |

为了更直观地观察各浓度下受试菌株的抑菌圈大小, 将表 2 中的数据转化为折线图, 见图 4。

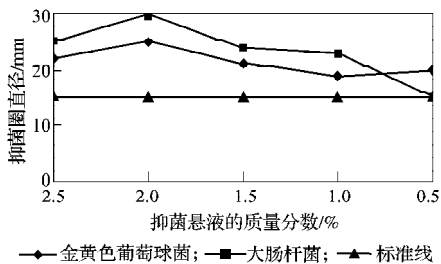


图 4 抑菌圈结果折线图

Fig. 4 The line chart of bacteriostatic circle

当抑菌圈直径小于 7 mm 时, 材料对细菌不敏感, 即抑菌效果不明显; 当抑菌圈直径大于 7 mm 而小于 15 mm 时, 其对细菌中度敏感, 即抑菌效果一般; 当抑菌圈直径大于 15 mm 时, 材料对细菌高度敏感, 即抑菌效果较好。因此, 设置了抑菌圈直径 15 mm 为标准线。由图 4 可以看出, 不同浓度下纳米 ZnO 对金黄色葡萄球菌悬液和大肠杆菌悬液两种菌的抑菌圈曲线均在标准线上方, 即 2 种菌的抑菌圈直径均大于 15 mm。

由表 1 和图 4 可知, 纳米 ZnO 对金黄色葡萄球菌悬液和大肠杆菌悬液两种菌的抑菌圈直径均大于 15 mm, 即纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有明显的抑菌性能。

3 结论

1) 根据 GB/T 21510—2008《纳米无机材料抗菌性能检测方法》测定了纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果, 得出纳米 ZnO 对 2 种试验菌都有明显的抑菌效果。

2) 纳米 ZnO 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果在其浓度为 0~5% 时逐渐升高, 当其质量浓度为 2% 时, 抑菌率接近 100%; 且初步测定出纳米 ZnO 对大肠杆菌的 MIC 是 0.312 5%, 对金黄色葡萄球菌的 MIC 是 0.625%。

3) 抑菌圈法对纳米 ZnO 抗菌性能的定性研究结果表明, 纳米 ZnO 对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌

的抑菌圈直径都大于 15 mm, 表明纳米 ZnO 对这 2 种菌高度敏感。

以上结论表明, 纳米 ZnO 在具备光学材料优良性能的同时, 对常见的细菌有显著的抑菌性, 同时对于人体有良好的相容性, 将纳米 ZnO 与常见的包装材料复合制备具有抗菌性能的包装材料将为食品无菌包装等提供一条新的途径。

参考文献:

- [1] 李彦峰, 汪斌华, 黄婉霞, 等. 纳米无机抗菌材料性能的研究[J]. 化工新型材料, 2002, 30(6): 44-46.
Li Yanfeng, Wang Binhua, Huang Wanxia, et al. Study on the Antibacterial Properties of Nanometer Inorganic Antibacterial Materials[J]. New Chemical Materials, 2002, 30(6): 44-46.
- [2] 张钟凯, 汪进前, 盖燕芳, 等. 钛酸酯偶联剂对纳米氧化锌表面改性研究[J]. 现代纺织技术, 2013(4): 8-10.
Zhang Zhongkai, Wang Jinqian, Gai Yanfang, et al. Study on Surface Modification of Nano-ZnO with Titanate Coupling Agent[J]. Advanced Textile Technology, 2013(4): 8-10.
- [3] 胡占江, 赵忠, 王雪梅. 纳米氧化锌抗菌性能及机制[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3): 527-530.
Hu Zhanjiang, Zhao Zhong, Wang Xuemei. Antibacterial Properties and Mechanism of Nano-Zinc Oxide[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2012, 16(3): 527-530.
- [4] 周双喜. 纳米 ZnO 的制备及其抗菌特性的研究[J]. 五邑大学学报: 自然科学版, 2008, 22(2): 36-40.
Zhou Shuangxi. Preparation of Nanometer-Sized ZnO and Research on Its Antibacterial Property[J]. Journal of Wuyi University: Natural Science Edition, 2008, 22(2): 36-40.
- [5] Han Zhicheng. The Promotion and Application of Food Wrappers[J]. Printing World, 2006(8): 11-13.
- [6] Ahamed M, Posgai R, Gorey T J, et al. Silver Nano Particles Induced Heat Shock Protein70 Oxidative Stress and Apoptosis in Drosophila Melano Gaster[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 242(3): 263-269.
- [7] Brody A L, Bugusu B, Han J H, et al. Innovative Food Packaging Solutions[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(8): 107-116.
- [8] Emamifar A, Kadivar M, Shahedi M, et al. Evaluation of Nanocomposites Packaging Containing Ag and ZnO on Shelf Life of Fresh Orange Juice[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11, 742-748.

(责任编辑: 廖友媛)

