

掺 Zn 纳米 TiO₂ 对 6 种植物病原菌的抑菌性能研究

马 超¹ 张越锋^{1,2} 吴 瑛^{1,2*}

(1.塔里木大学生命科学学院,阿拉尔 843300;

2.新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护与利用重点实验室,阿拉尔 843300)

摘 要 通过溶胶-凝胶法制备 TiO₂ 纳米材料,并进行 Zn²⁺ 掺杂改性,采用冷冻干燥法获得纳米微粉,在自然光下对红枣链格孢、黄瓜枯萎病、辣椒疫霉病、棉花枯萎病、棉花黄萎病和玉米弯孢等 6 种病原菌做抗菌实验,研究其对植物病原微生物的杀灭与抑制作用。用 X 射线衍射仪和透射电镜进行物性表征,采用菌丝抑制率法统计病原菌存活数、相对抑菌率。结果表明:冷冻干燥处理的 TiO₂ 材料颗粒大小均匀,抑菌能力好于焙烧处理,Zn²⁺ 掺杂后纳米 TiO₂ 对植物病原菌抑制与未掺杂时相比有较好地抑制作用,黄瓜枯萎病菌的抑制率达到 65.3%,红枣链格孢菌较低仅为 47.5%,纳米微粉具有抗暴晒和水浸湿能力。

关键词 纳米 TiO₂, 冷冻干燥, 植物病原菌, 抗菌活性

Preparation of nano TiO₂ doped with Zn and its antibacterial activity for 6 kinds of plant pathogenic bacteria

Ma Chao¹ Zhang Yuefeng^{1,2} Wu Ying^{1,2}

(1.College of Life Sciences, Tarim University, Alaer 843300; 2.Key Laboratory of Biological Resource Protection and Utilization of Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group, Alaer 843300)

Abstract Sol-gel method was used to prepare zinc doped nano TiO₂ materials, used freeze drying method to obtain the nano powder, in natural light the antibacterial experiment for 6 kinds of plant pathogenic bacteria was carried out, studied the killing and inhibition for plant pathogenic microorganisms. X-ray diffraction and transmission electron microscope were used for physical characterization, and the bacterial inhibition rate was used to determine the survival number of pathogen and the relative antibacterial rate, and the antibacterial effect of TiO₂ was identified. The results showed that TiO₂ materials from freeze drying processing had uniform particle size, its bacteriostatic ability was better than that from the roasting process. Nano TiO₂ doped zinc ions had better inhibition than that did not doping for the plant pathogen. The nano powders had the ability to resist exposure and wet.

Key words nano TiO₂, freeze drying, plant pathogenic bacteria, antibacterial activity

植物病原菌在单一药剂长期作用下,会通过遗传、变异获得适应性而产生抗药性。特别是随着高效、内吸、选择性强的杀菌剂被开发和广泛应用,杀菌剂抗性越来越严重和普遍^[1-6]。纳米 TiO₂ 具有良好的光催化活性^[7],可通过分解和破坏微生物细胞的结构物质,对环境中的细菌、病毒等微生物进行消灭或削弱,并将微生物及其释放的毒素分解,且具有生物相容和低廉的价格,而受到广泛的关注。利

用纳米 TiO₂ 光催化抑制细菌、病毒、真菌等方面的研究取得了较好的效果^[8-10],在农业上的应用报道还较少。李敏等^[11]用叶绿素进行敏化后作用于白菜的软腐病菌可达到 100%。张萍等^[12]研究纳米 TiO₂ 对黄瓜霜霉病害的防治作用,同时发现纳米 TiO₂ 还可以提高植物的光合作用。陶希芹等^[13]采用壳聚糖/纳米 TiO₂ 对稻瘟菌、玉米大斑、灰霉菌和小麦赤霉菌进行了实验。李玲玲等^[14]制备了陶

基金项目:新疆维吾尔自治区研究生创新项目(XJGR12014138);新疆建设兵团人才培养项目(00608004)

作者简介:马超(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向为分子生物学与生物化学。

联系人:吴瑛(1968-),教授,主要从事无机材料化学的研究工作。

瓷 TiO_2 膜对黄瓜细菌性角斑病菌等病毒的抑菌率达到了 100%。蒲丽等^[15]用 TiO_2 悬浮液处理烟草青枯菌,抑菌率达到 90%以上。

本研究以本地农作物常见的红枣链格孢、黄瓜枯萎病、辣椒疫霉病、棉花枯萎病、棉花黄萎病和玉米弯孢等 6 种植物病原菌为研究对象,通过统计 6 种植物病原菌的相对抗菌率,探讨复合 TiO_2 悬浮剂对植物病原微生物的抑制作用,不同于已有的报道,采用冷冻干燥处理获得纳米微粉制成悬浮剂,模拟实际使用状态进行抑菌实验。且 Zn^{2+} 的掺杂提高了纳米 TiO_2 材料对光的选择范围和利用率^[16]。目的是探讨研制一种不仅起到抑制植物病原菌,同时可去除终端农产品农药残留问题,环保无污染、低毒绿色和便于使用的无机纳米抗菌喷剂。为纳米 TiO_2 在植物病害实际防治的应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

钛酸丁酯、三乙醇胺、无水硫酸铜、硫酸锌、三氯化铁、氢氧化钠,均为分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;去离子水,自制。

X 射线衍射仪(XRD, D8 Advance 型),德国布鲁克公司;透射电镜(TEM, JEM-2010F 型),日本电子株式会社;真空冷冻干燥机(LGJ-10C 型),北京四环科学仪器厂有限公司;马弗炉(SXL-1008 型),上海精宏实验设备有限公司;高速离心机(Multifuge X1 型),赛默飞世尔科技有限公司;超纯水仪(UWP-UP-III-20 型),成都天萃宁科技有限公司;紫外-可见分光光度计(2450 型),日本岛津公司。

1.2 实验方法

1.2.1 复合型纳米 TiO_2 的制备

以钛酸四丁酯为前驱体,将其缓慢滴加到无水乙醇溶液中,充分搅拌,记为溶液 A;另将适量无水乙醇和冰醋酸、去离子水及表面活性剂混合均匀,记为溶液 B。将 A 溶液在剧烈搅拌下逐滴滴加到 B 溶液中,用酸调节 pH 至适当酸度,形成均匀透明的溶胶,室温下陈化。一部分进行预冷冻后放入冷冻干燥机中,另一部分凝胶放入马弗炉中恒温焙烧。掺杂抗菌剂制备过程与上述类似,在 B 溶液中加入硝酸锌作为 Zn 源,其中 Zn^{2+} 含量分别为 0.1% (wt, 质量分数,下同)、0.2%、0.4%、0.8% 和 1.6%。考察原材料物料比、制备温度、陈化时间和研磨粒度等因素对纳米复合材料物化性及抑菌效果的影响。

1.2.2 表征

XRD: 采用 Ni 滤波片,管压 40kV,波长 0.15406nm, $2\theta=10\sim90^\circ$,扫描速度 $10^\circ/\text{min}$,步长 0.02° 。

TEM: 将少量纳米 TiO_2 微粉溶于无水乙醇中,超声 10min 使溶液形成均一的悬浊液,用胶头滴管吸取少量悬浊液至覆盖有碳膜的铜网上,在红外灯下烤干。

1.2.3 复合纳米 TiO_2 抗植物病原菌性能实验

选取 6 种植物病原菌菌种(红枣链格孢、玉米弯孢、黄瓜枯萎病、辣椒疫霉病、棉花枯萎病和棉花黄萎)进行培养。抗菌实验是将复合纳米 TiO_2 样品用无菌水配制成不同实验浓度梯度,与冷却至 50°C 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基混匀,倒平板(直径 90mm)。以加入等量无菌水的 PDA 培养基为空白对照。用打孔器打取供试菌菌落边缘的菌丝块(直径为 9mm),菌面朝下,移至平板中央,置于生态气候箱(温度 28°C ,光照 80%,湿度 80%)中培养 5d 后,采用十字交叉法测量菌落直径[式(1)],并计算抑菌率[式(2)],每处重复处理 3 次,取平均值。

菌落直径(cm) =

$$\text{测量菌落直径平均值(cm)} - 0.90\text{cm} \quad (1)$$

抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 XRD 和 TEM 分析

掺杂前后的纳米 TiO_2 ,以及高温与冷冻干燥处理后的 TiO_2 均为淡黄色粉末。对试样进行了 XRD 和 TEM 表征,结果分别见图 1 和图 2。

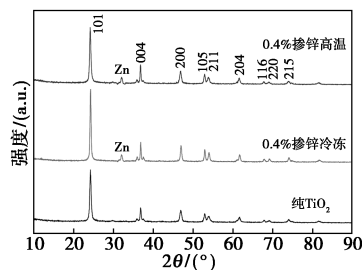


图 1 0.4% 掺锌纳米 TiO_2 的 XRD 谱图

由图 1 可知, $2\theta = 24.86^\circ$ 、 36.86° 、 46.97° 、 52.98° 、 54.06° 和 61.68° 处分别为锐钛矿 TiO_2 的 (101)、(004)、(200)、(105)、(211)和 (204) 衍射峰(JCPDS No. 21-1272)。这表明所得到的纳米微粉为锐钛矿相。掺杂后, Zn/TiO_2 样品中 (101)、

(004)、(105)和(200)衍射峰的强度没有减弱,说明掺杂 Zn²⁺ 对 TiO₂ 的晶型影响不大。采用不同处理方法得到的纳米微粉也没有明显改变,说明在 500℃ 高温处理下,所制纳米微粉还没有完全向金红石型转变。且随着 Zn²⁺ 含量增加,晶型也没有太大的变化。但是在 $2\theta=32.04^\circ$ 处出现了一个 Zn²⁺ 的峰。高温处理组, Zn²⁺ 的峰值更大,说明高温更有利于 Zn²⁺ 与 TiO₂ 结合形成含 Zn²⁺ 的晶体结构。

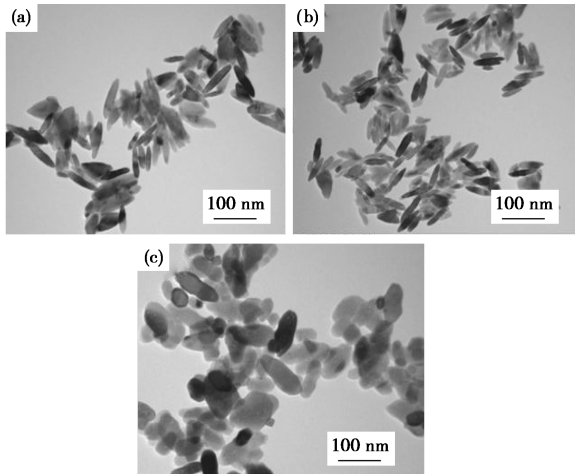


图 2 TiO₂(a)、0.4% Zn²⁺ 冷冻干燥 TiO₂(b)和 0.4% Zn²⁺ 高温煅烧 TiO₂(c)的 TEM 图

由图 2 可知,掺杂 Zn²⁺ 冷冻干燥处理后的 TiO₂ 颗粒均匀,呈梭型形状与无掺杂一样,颗粒更加均匀、干净和细小。而高温焙烧处理后, TiO₂ 的颗粒不均匀、尖头消失变得较为圆润。冷冻干燥形状保持不变,可能是由于冷冻干燥过程是溶剂升华的过程,湿凝胶内部孔隙中的溶剂直接从固态升华到气态,从而避免液相的出现,因此可以有效地阻止孔隙干燥过程产生的毛细管压力,防止孔塌陷,保持材料原有的结构形貌。

2.2 复合纳米 TiO₂ 抗植物病原菌性能

在红枣链格孢、黄瓜枯萎病、辣椒疫霉病、棉花枯萎病、棉花黄萎病和玉米弯孢等 6 种植物病原菌环境中,考察 Zn²⁺ 掺杂量对复合纳米 TiO₂ 抑菌性能的影响,结果见图 3。

由图可知, Zn²⁺ 的掺入增加了纳米 TiO₂ 的抗病性,且随着 Zn²⁺ 掺入量的增大,对菌丝抑制率先增大后降低,6 种病原菌均对含 0.4% Zn²⁺ 复合纳米 TiO₂ 较为敏感。高浓度 Zn²⁺ 的加入,增加了电子-空穴的复合几率,导致抑菌的性能减弱。Zn²⁺ 本身具有离子毒性,故抑菌性减少变化速率较缓慢。同等掺杂量下,冷冻处理样品的抑菌能力略强于高温处理样品。

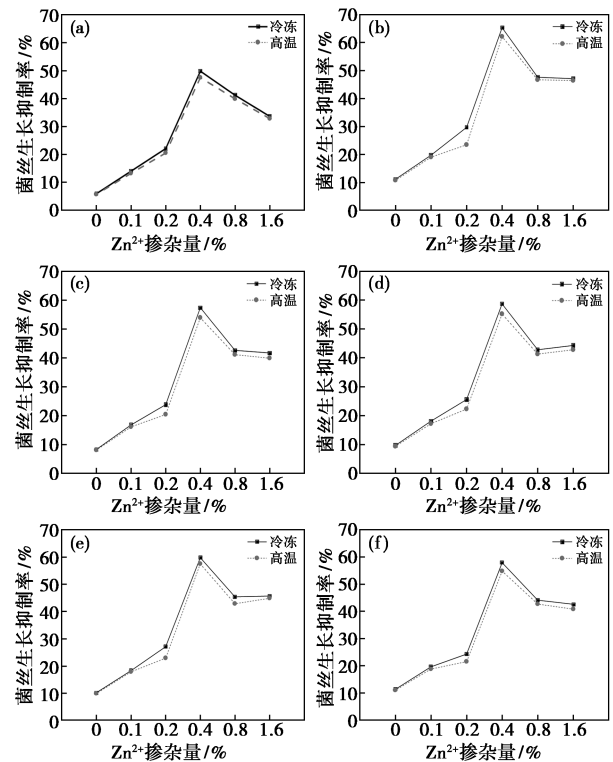


图 3 6 种植物病原菌环境中 Zn²⁺ 掺杂量对复合纳米 TiO₂ 抑菌性能的影响

[(a)红枣链格孢;(b)黄瓜枯萎病;(c)辣椒疫霉病;(d)棉花枯萎病;(e)棉花黄萎病;(f)玉米弯孢]

0.4% Zn²⁺ 掺杂下处理条件对 Zn/TiO₂ 抑菌性能的影响见图 4。由图可知,冷冻干燥试样对 6 种植物病原菌的菌丝生长抑制率均高于高温处理试样。冷冻干燥样品对黄瓜枯萎菌的菌丝生长抑制效果最好,抑制率达到 65.3%。试样对红枣链格孢菌丝生长抑制率效果较低,高温干燥试样对红枣链格孢的菌丝生长抑制率仅为 47.5%。

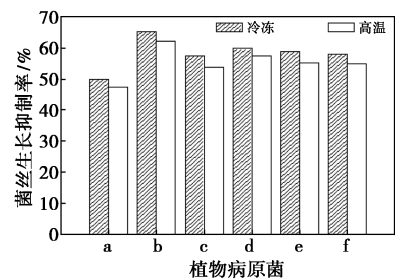


图 4 0.4% Zn²⁺ 掺杂下处理条件对 Zn/TiO₂ 抑菌性能的影响

(a:红枣链格孢;b:黄瓜枯萎病;c:辣椒疫霉病;d:棉花枯萎病;e:棉花黄萎病;f:玉米弯孢)

2.3 复合纳米 TiO₂ 长效性和稳定性

根据复合纳米 TiO₂ 抑制植物病原菌的实验结果,对 0.4% Zn²⁺ 试样进行长效性和稳定性检验。

将复合纳米 TiO_2 进行水浸 24h 和高温曝晒 3d 后, 进行抑菌实验, 考察抗菌剂对湿热(水浸)和光(曝晒)的耐受性, 结果见表 1。

表 1 长效性和稳定性检验结果

供试菌	菌丝生长抑制率/%		
	原样	水浸	曝晒
红枣链格孢	49.8	48.3	49.3
黄瓜枯萎	65.3	63.8	64.4
辣椒疫霉	57.4	55.9	55.2
棉花黄萎	59.8	58.2	59.1
棉花枯萎	58.7	57.0	58.0
玉米弯孢	57.9	56.1	56.9

由表可知, 复合纳米 TiO_2 经水浸和暴晒处理后, 对 6 种植物病原菌菌丝的生长抑制率均有下降, 但是降低的程度较小, 说明材料长效性和稳定性较好。作为抗菌剂可以长时间存放, 在实际使用中不会因为光照、雨水等环境因素影响抗菌效果。

3 结论

(1) 冷冻干燥处理和掺杂不改变纳米 TiO_2 的晶体结构。高温煅烧处理的纳米 TiO_2 材料出现外貌改变是因为晶型发生转变, 从后面的抑菌能力稍弱于冷冻干燥也能说明这点。

(2) Zn^{2+} 掺杂提高了 TiO_2 的抑菌活性, 且 0.4% Zn^{2+} 为具有最高抑菌活性的纳米 TiO_2 材料, 这在 6 种病原菌上的体现是一样的。6 种病原菌种材料对黄瓜枯萎菌抑制力较强, 红枣链格孢菌较弱。

(3) 所采用的制备方法获得的抗菌纳米微粉可以长时间保存, 不受光照、雨水等因素的侵扰, 稳定性较好。

纳米 TiO_2 悬浮剂易团聚, 使用前需要剧烈摇动或超声分散, 不利于使用, 因此需要寻找合适的负

载体或溶剂制备出易于喷施的悬浊剂。另外, 其在果实和作物上的附着能力也需要进一步研究。

参考文献

- [1] 王明爽, 孙颖, 陈国庆, 等. 赣南脐橙绿霉病菌对常用杀菌剂抗性监测[J]. 植物病理学报, 2013, 43(5): 532-540.
- [2] 高启迅. 小麦赤霉病菌对常用杀菌剂的抗性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [3] 王文桥, 马志强, 张小风, 等. 植物病原菌对杀菌剂抗性风险评估[J]. 农药学报, 2001, 3(1): 6-11.
- [4] 祁之秋, 王建新, 陈长军, 等. 现代杀菌剂抗性研究进展[J]. 农药, 2006, 45(10): 654-659.
- [5] 石延霞, 唐明, 晋知文. 蔬菜作物灰葡萄孢菌对不同类型杀菌剂的抗性评价[J]. 中国蔬菜, 2016(3): 60-65.
- [6] 成禄艳. 芒果炭疽病菌对几种杀菌剂的抗药性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [7] Mills A, Hunte S L. An overview of semiconductor photocatalysis[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(Transactions of the CSAE), 1997, 108(1): 1-35.
- [8] 石振霞, 郭少波, 薛群虎. 纳米复合材料 $\text{Ag}@\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ 的制备、光催化及其抑菌性能[J]. 无机材料学报, 2016, 31(5): 466-472.
- [9] Luo Y, Huang J G. Hierarchical-structured anatase-titania/cellulose composite sheet with high photocatalytic performance and antibacterial activity[J]. Chemistry (A European Journal), 2015, 21: 2568-2575.
- [10] Zimbone M, Buccheri M A, Cacciato G, et al. Photocatalytic and antibacterial activity of TiO_2 nanoparticles obtained by laser ablation in water[J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2015, 165: 487-494.
- [11] 李敏, 王振岭, 石恒真, 等. 敏化的 TiO_2 纳米晶表面形貌、晶相、光谱及光催化灭菌研究[J]. 无机材料学报, 2003, 18(6): 1261-1266.
- [12] 张萍, 崔海信, 李玲玲. 纳米 TiO_2 半导体溶胶的光生物学效应[J]. 无机材料学报, 2008, 23(1): 55-60.
- [13] 陶希芹, 王明力, 谯顺彬. 壳聚糖/纳米 TiO_2 复合膜的抗菌性能研究[J]. 广州化工, 2015, 43(13): 85-87.
- [14] 李玲玲, 崔海信, 张萍. 纳米 TiO_2 光半导体溶胶对植物病原微生物的抗菌性能[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 223-226.
- [15] 蒲丽, 蒋家珍, 李效禹. 纳米 TiO_2 悬浮液对烟草青枯菌杀菌活性的研究[J]. 农药学报, 2005, 7(4): 339-342.
- [16] 孙秀敏, 徐金光, 刘苏静, 等. 纳米 TiO_2 的改性及其性能研究[J]. 化工新型材料, 2014, 42(3): 130-133.

收稿日期: 2017-08-29

(上接第 228 页)

- [9] Mujumdar A N, Young S G, Merker R L, et al. A study of solution polymerization of polyphosphazenes[J]. Macromolecules, 1990, 23(1): 14-21.
- [10] Zhang S K, Wang J Q, Zhu H C, et al. Evaluation of poly(dia-ryloxyphosphazene) elastomer for heat shielding insulations and morphology of charred layers[J]. High Performance Polymers, 2017, 29: 450-457.
- [11] Allcock H R. Chemistry and applications of polyphosphazenes[M]. John Wiley & Sons Inc: Hoboken, NJ, 2003, 26-98.
- [12] Tate D P. PNF fluoroelastomer-A new semi-inorganic rubber[J]. Rubber World, 1975, 172: 41-43.
- [13] Tian Z, Liu X, Manseri A, et al. Limits to expanding the PN-F

series of polyphosphazene elastomers[J]. Polym Eng Sci, 2014, 54: 1827-1832.

- [14] 米志安, 钱黄海, 李根华, 等. 共聚氟硅橡胶耐油性性能的研究[J]. 有机硅材料, 2004, 18(2): 8-10.
- [15] 张录平, 李晖, 庞明磊, 等. 特种氟橡胶耐油介质老化性能研究[J]. 世界橡胶工业, 2011, 38(1): 27-30.
- [16] Ghosh A, De P P, De S K, et al. Studies on flammability, thermal stability and hot oil resistance of silicone rubber, fluororubber and their blends[J]. Kautschuk Und Gummi Kunststoffe, 2003, 56(3): 96-100.
- [17] 宋中勤, 李宏, 胡海华, 等. 特种橡胶耐油性性能的对比研究[J]. 特种橡胶制品, 2012, 33(2): 40-42.

收稿日期: 2017-09-31

修稿日期: 2018-10-31