

铜掺杂氧化锌微米棒灭菌特性研究

潘惊明, 王丽娜

大连海洋大学海洋科技与环境学院, 辽宁 大连
Email: l.n.w@163.com

收稿日期: 2021年8月16日; 录用日期: 2021年9月19日; 发布日期: 2021年9月27日

摘要

本文主要利用化学气相沉积(CVD)法制备氧化锌微米棒并对样品进行铜(Cu)掺杂。研究Cu掺杂对氧化锌微米棒灭菌特性影响。结果表明, Cu掺杂有效地改变了样品的表面形貌。进一步研究表明, Cu掺杂后样品灭菌性能显著提高。我们分别采用大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌为试验菌株进行了灭菌实验。实验结果表面, 针对四种菌株, 氧化锌微米棒灭菌率分别为60.42%、73.67%、95.34%、99.19%; 铜掺杂后对四种菌落的灭菌特性分别为70.33%、88.93%、98.51%、99.81%, Cu掺杂后其灭菌率分别提高了9.91%、15.26%、3.17%、0.62%。

关键词

氧化锌, 微米棒, 灭菌特性, 铜掺杂

Sterilization Characteristics of Cu Doped ZnO Microrods

Jingming Pan, Lina Wang

School of Marine Science and Environment, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning
Email: l.n.w@163.com

Received: Aug. 16th, 2021; accepted: Sep. 19th, 2021; published: Sep. 27th, 2021

Abstract

In this paper, ZnO micro rods were prepared by chemical vapor deposition (CVD) and doped with copper (Cu). The effect of Cu doping on the sterilization characteristics of ZnO micro rods was studied. The results show that Cu doping effectively changes the surface morphology of the samples. Further research shows that the sterilization performance of Cu doped samples is significantly improved. We used *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* as test

strains for sterilization experiments. The results showed that the sterilization rates of ZnO Microrods were 60.42%, 73.67%, 95.34%, 99.19%, and the sterilization rates of Cu doped ZnO Microrods were 70.33%, 88.93%, 98.51%, 99.81%, after Cu doped the sterilization rates of the four strains were increased by 9.91%, 15.26%, 3.17% and 0.62% respectively.

Keywords

ZnO, Microrods, Sterilization Characteristics, Copper Doping

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在过去的 100 年里, 世界范围内出现多次大流行病肆虐的情况, 由于不断出现新的病原体, 因此需要新的抗菌素疗法。除了药物之外, 最可靠的预防感染和传播的方法是表面抗菌材料。市场上对抗菌材料的需求主要集中在医疗保健领域。尽管很多文献描述了抗菌材料及它们在各个领域的应用, 但是促进抗菌材料的商业化发展仍然存在很多挑战。为了能够将抗菌材料尽快地应用到工业和商业领域, 如何降低其毒性、提高抗菌性能、降低生产成本是该领域所面临的主要挑战[1]。

氧化锌(ZnO)材料是一种低温聚合物半导体材料, 可以广泛地应用于光电探测器、柔性电子材料、可穿戴设备、抗菌材料等领域。单晶 ZnO 主要沿着 c 轴生长, 晶体不仅具有性能稳定的优点而且具有较高的导电性, 可以为生物电子设备提供电子和电子设备之间的无缝集成生物组织, 可以应用在医疗保健领域, 例如实时监测和在线刺激。有机半导体和硅基柔性材料电子产品主要用作可穿戴和可植入设备。目前最常见的具有显著优势的宽带隙(WBG)材料如 II-VI 化合物的 ZnO, III-V 族化合物的氮化物(GaN)和 IV-IV 族化合物的碳化硅(SiC) [2] [3]。

ZnO 纳米材料由于其独特的光电特性, 包括比表面积大、结构稳定、生物相容性好、原料便宜, 特别是优异的光催化和光热性能, 可以作为新型抗菌剂用于对抗广谱细菌, 缓解传统抗生素对细菌耐药的问题。此外, 形貌不同的二维纳米材料的杀菌机制还包括直接温度产生、活性氧(ROS)产生或 ROS 独立氧化应激, 或各种协同抗菌模式[4]。

为了提高氧化锌纳米结构的光电特性, 国内外学者用不同的制备手段生长了形貌各异的 ZnO 纳米结构, 包括化学和物理方法。例如, Drobek 等人, 提出了用薄分子覆盖 ZnO 纳米膜提高半导体金属氧化物纳米线传感器的一般方法。韦伯等人, 报道了铅(Pd)纳米粒子与其他纳米材料的协同效应。利用电化学沉积(ECD)技术合成氧化锌一维结构, 具有成本效益低廉、可以大面积沉积、光学性能优异的特点。ECD 方法还可以实现多种离子金属的有效掺杂例如镉(Cd)、铕(Eu)、银(Ag)、铜(Cu)、氯(Cl)、铝(Al)等。最近, 利用 ECD 方法实现了 Pd 和金(Au)表面掺杂。更进一步研究表明, 可以通过 ECD 方法生长的单个纳米和微米结构, 例如 Ag 掺杂的 ZnO 纳米线、Au 和 Pd 表面修饰的 ZnO 纳米线, 所制备的气敏传感器, 可以在工作温度为 25°C~150°C 范围内, 检测 H₂ 的响应时间。也可以通过对 ZnO 纳米线进行 Al 掺杂, 它对室内检测挥发性有机化合物的敏感特性表现出色且具有长期稳定性[5]。

有学者利用扫描探针显微镜(SPM)技术研究了 Cu 和钴(Co)共掺杂氧化锌(ZnO)薄膜样品中的双极性电荷现象。研究发现共掺杂(Cu 和 Co)可以稳定双极电荷, 而 Cu 掺杂只能稳定 ZnO 薄膜中的正电荷。金

属有机框架(MOFs)材料的抗菌效果基本上取决于它们的特性包括控制和刺激释放抗菌成分, 可调尺寸, 形态和表面电荷, 光生 ROS 形成能力, 高螯合引起的亲脂性, 以及负载和提供不同的抗菌剂。基于 MOF 的材料, 按其作用可以分为以下几类: 组分释放(金属离子、配体或两者)、光催化、螯合抗菌剂以及其他功能材料的载体和协同抗菌剂(抗生素、酶、金属、金属氧化物、碳材料等) [6] [7]。

Khan 等人利用溶胶-凝胶法制备了 ZnO 纳米尖峰(ZNs), 研究了两个不同潜伏期的影响(4 和 6 周), 即分别为 ZN_1 和 ZN_2 。进一步分析了 ZN_1 和 ZN_2 对假单胞菌群体感应(QS)和生物膜形成的影响铜绿假单胞菌(PAO1)和紫色杆菌(菌株 12472 和 CVO26)的抑制作用。研究表明, 在铜绿假单胞菌中, ZN_2 显示出对 QS 以及生物膜发展的抑制作用。因此, ZN_2 是可以用于治疗铜绿假单胞菌感染有效抗菌剂[8]。

ZnO 具有光催化抗菌性能, 当纳米 ZnO 受到能量大于其禁带宽度的光照射时, 其价带上的电子(e^-)受激发跃迁到导带, 在价带上留下带正电荷的空穴(H^+), e^- 和 H^+ 会与吸附在材料表面的氧气、羟基和水等反应产生氢氧根、氧负离子和过氧化氢等物质。其中 H^+ 和氢氧根具有极强的氧化活性, 可以使大部分有机物的化学键断裂, 因此能够将组成微生物的各种成分分解, 从而起到杀菌作用; 此外, 氧负离子具有较高的还原能力, 也会起到抗菌作用[9]。

本工作中研究的氧化锌微纳米棒是通过化学气相沉积法(CVD)和水热法生长, 然后对其进行形貌和结构表征。采用对照法和控制变量法, 对纳米氧化锌的灭菌性能进行探究。实验选用四种较为典型的代表性菌株, 分别为大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌。实验过程中, 通过改变灭菌剂的种类, 灭菌光照环境和灭菌温度环境等实验条件, 来探索氧化锌微纳米结构的灭菌性能最佳条件。并且通过对不同条件下氧化锌微纳结构灭菌性能的对比, 就对结果进行分析, 讨论氧化锌微米结构的灭菌性能不同的原因, 旨在优化纳米氧化锌材料。本论文获得的结果加深了对氧化锌微纳米材料的杀菌机制的理解, 激发多种设计策略的发展并合成了具有强杀菌力的新型微纳米材料。提高了生物安全性, 促进了微纳米材料在更多领域的应用。

2. 实验过程

2.1. CVD 法制备氧化锌微米棒

本文中用到 CVD 系统为真空管式高温烧结炉(GSL-1600X 型, 合肥科晶材料技术有限公司), 实验系统示意图如图 1 所示。使用分析天平, 称取氧化锌粉末(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)和碳粉(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 使氧化锌粉末和碳粉质量比为 8:3, 充分研磨后用药匙取出置于石英管的中间。通过气体控制系统面板设置氮气流速为 30 标准状态立方厘米每分钟(sccm), 氧气气阀通入量设置为 60 sccm。待炉中实时温度达到 800℃时打开氧气气阀, 通入氧气, 实验仪器已设定温度为 1000℃, 到达设定温度后, 将以 1000℃持续加热 1 小时, 使两种样品充分反应。待温度下降, 样品冷却到室温后, 关闭仪器。取出石英管进行观察, 在石英管管口上方发现白色针状物, 取下并标记样品。将部分样品留出, 用扫描电子显微镜(SEM)对其进行表征。

2.2. 水热法 Cu 掺杂氧化锌微米棒

取上述 CVD 法制得的氧化锌微米棒, 与配好的 1% mol/l 硫酸铜(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)溶液, 先后放入反应釜内胆中, 拧紧反应釜内胆盖子, 将内胆置入反应釜外壳中, 旋紧外盖, 放入干燥箱(101-1AB 型, 天津市泰斯特仪器有限公司)加热。加热温度设置为 200℃, 加热时间设置为 4 小时。加热结束后待其降至室温, 打开反应釜, 使用滤纸将内胆中的微米棒过滤。过滤后使用去离子水冲洗镀铜后的微米线表面沉淀。冲洗后令其自然干燥, 放入样品盒并标记, 将部分样品留出, 用 SEM 对其进行表征。

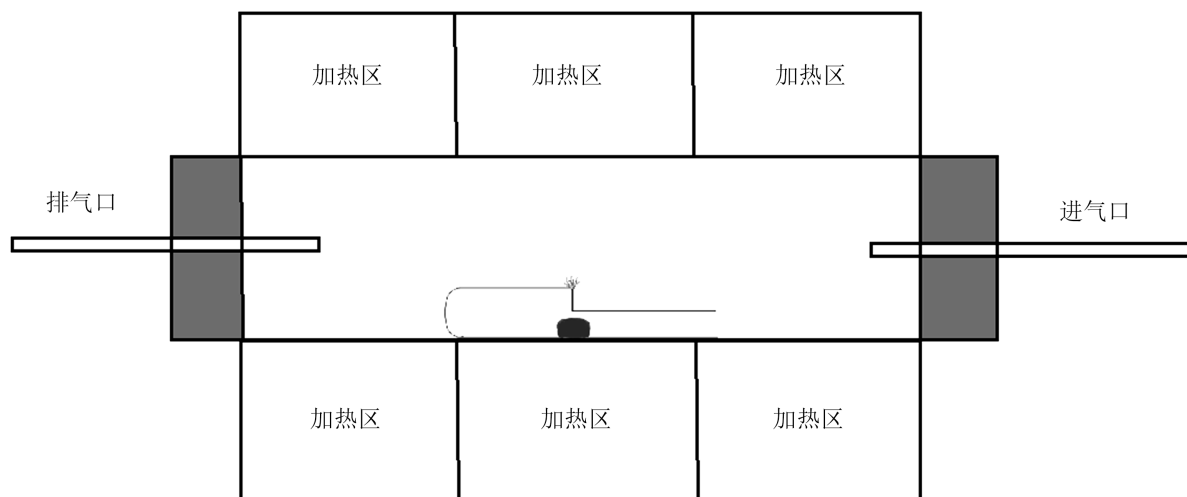


Figure 1. The schematic diagram of experiment system
图 1. 实验装置示意图

2.3. 灭菌实验

1) 稀释: 从恒温振荡器中取出培养好的四种菌液, 此时 EP 管中菌液浓度为 10^8 , 由于菌液浓度过大会对实验结果产生影响, 所以要将菌液稀释至浓度为 10^6 , 此时实验效果更佳。

2) 添加灭菌剂: 不同结构的氧化锌材料杀菌性能对比实验中设置 12 组对照组, 各组实验添加的菌液及杀菌剂材料如表 1 所示。将 12 组浓度稀释为 10^6 的菌液取出, 用移液枪吸取, 放入 1.5 mL EP 管中, 并且添加相应的杀菌剂, 盖紧盖子, 标记组别, 再使用高速震荡器将其震荡混合均匀。混合后放入组别设定的环境条件中, 静置 15 min 进行杀菌反应。

3) 涂布: 从酒精烧杯中取出涂布器, 用酒精冲洗, 再用酒精灯灼烧, 对其进行灭菌消毒处理。使用移液枪在各组菌液中取 100 μ L 菌液缓慢滴加至 NA 培养基中心, 将培养皿平板至于接种旋转器上, 转动接种旋转器, 同时使用涂布器将 NA 培养基表面的菌液涂抹均匀。将涂布好的培养基盖好盖子, 标记组别及梯度。平置于超净工作台中 5 min, 使菌液能良好的渗透到培养基内, 保证培养时能正常生长、分布后将平板倒置。

4) 培养及计数: 涂布完成后需要对所有 NA 平板培养基进行培养, 将培养基平板倒置, 放入恒温培养箱中。培养箱的培养温度设置为 37°C , 培养时间需要设置为 24 h。培养时间结束后, 即可取出平板培养基。直接观察培养基菌落面积, 再使用电子显微镜观察其微观生长情况, 记录面积大小并且计数, 以对比不同结构的氧化锌材料杀菌性能。

5) 为保证实验数据准确性、科学性, 所有杀菌实验均重复三次以上操作, 取其平均值。

Table 1. Experimental setup of bactericidal performance of different zinc oxide materials
表 1. 不同氧化锌材料的杀菌性能实验设置

组别	A1	A2	A3	A4
菌悬液	1 ML 10^6 大肠杆菌 菌液	1 ML 10^6 金黄色葡萄球菌 菌液	1 ML 10^6 枯草芽孢杆菌 菌液	1 ML 10^6 蜡样芽孢杆菌 菌液
杀菌剂	无	无	无	无
环境	20°C 、室光	20°C 、室光	20°C 、室光	20°C 、室光

Continued

组别	B1	B2	B3	B4
菌悬液	1 ML 10 ⁶ 大肠杆菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 金黄色葡萄球菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 枯草芽孢杆菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 蜡样芽孢杆菌 菌液
杀菌剂	15 mg ZnO 微米棒	15 mg ZnO 微米棒	15 mg ZnO 微米棒	15 mg ZnO 微米棒
环境	20℃、室光	20℃、室光	20℃、室光	20℃、室光
组别	C1	C2	C3	C4
菌悬液	1 ML 10 ⁶ 大肠杆菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 金黄色葡萄球菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 枯草芽孢杆菌 菌液	1 ML 10 ⁶ 蜡样芽孢杆菌 菌液
杀菌剂	15 mg Cu 掺杂 ZnO 微米棒	15 mg Cu 掺杂 ZnO 微米棒	15 mg Cu 掺杂 ZnO 微米棒	15 mg Cu 掺杂 ZnO 微米棒
环境	20℃、室光	20℃、室光	20℃、室光	20℃、室光

3. 结果与讨论

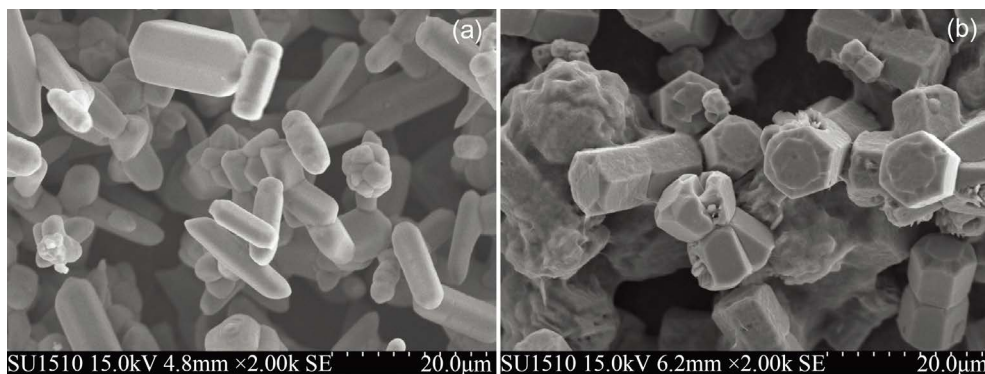


Figure 2. (a) SEM images of ZnO microrods; (b) SEM images of Cu doped ZnO microrods

图 2. (a) 氧化锌微米棒 SEM 图像; (b) 铜掺杂氧化锌微米棒 SEM 图像

为了讨论实验所得样品的形貌特性, 我们对样品进行了 SEM 表征。图 2 给出了样品的 SEM 图像, 图 2(a)为氧化锌微米棒, 由图中可以看出微米棒呈现典型六角结构, 表面光滑, 其长度在 8~24 微米之间, 直径在 2~6 微米之间。部分微米棒呈现叠加生长形态, 微米棒排列不规律, 存在部分空隙。图 2(b)是铜掺杂氧化锌微米棒, 可以看出掺杂之后样品表面不再光滑, 说明掺杂主要发生在样品表面, 由截面可以看出掺杂后在样品横截面形成六边形凸起, 这是因为表面离子参与氧化还原反应, 内部离子未与溶液接触所以没有发生掺杂现象, 内外离子参与反应程度不一致, 导致界面有突起现象。由两图对比可知, 铜掺杂引起样品表面形貌变化, 未掺杂前形貌更规则。

灭菌实验中, 大肠杆菌实验培养结果图如图 3 所示, 其中 a 为 20℃, 室光环境下未添加杀菌剂的对照组, b 为 20℃, 室光环境下添加氧化锌微米棒的实验组, c 为 20℃, 室光环境下添加 Cu 掺杂氧化锌微米棒的实验组。经计算, 氧化锌微米棒的杀菌率为 60.42%, Cu 掺杂氧化锌微米棒杀菌率为 70.33%。两种微米棒对大肠杆菌都有较好的杀菌能力, 但是 Cu 掺杂后氧化锌微米棒的杀菌能力得到了提高。

杀菌率计算公式如下:

$$r = (s_0 - s_1) / s_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中, s_0 为对照组培养皿中的菌落数, s_1 为实验组培养皿中菌落数。

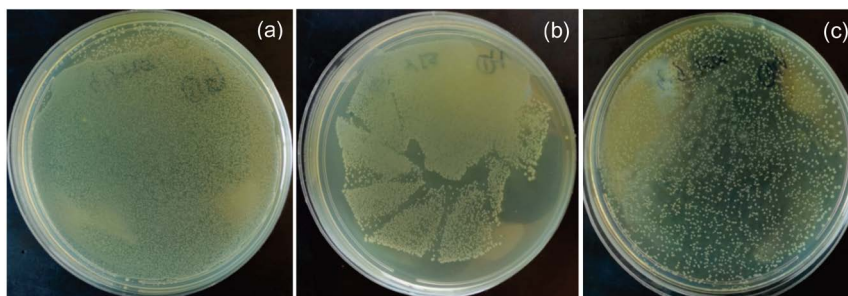


Figure 3. Escherichia coli culture results

图 3. 大肠杆菌培养结果

灭菌实验中, 金黄色葡萄球菌实验培养结果图如图 4 所示, 其中 a 为 20℃, 室光环境下未添加杀菌剂的对照组, b 为 20℃, 室光环境下添加氧化锌微米棒的实验组, c 为 20℃, 室光环境下添加 Cu 掺杂氧化锌微米棒的实验组。经计算, 氧化锌微米棒的杀菌率为 73.67%, Cu 掺杂氧化锌微米棒杀菌率为 88.93%。两种微米棒对金黄色葡萄球菌都有较好的杀菌能力, 但是 Cu 掺杂后氧化锌微米棒的杀菌能力得到了提高。

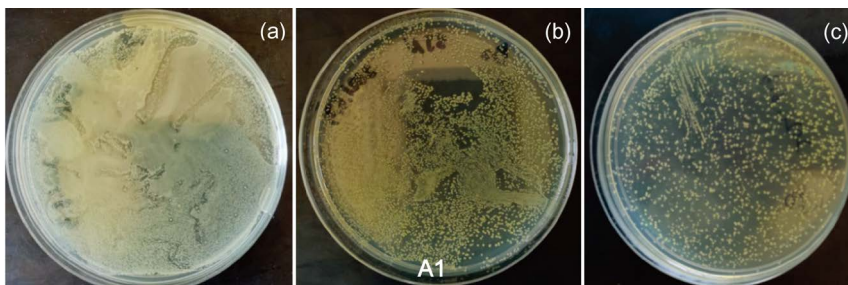


Figure 4. Culture results of *Staphylococcus aureus*

图 4. 金黄色葡萄球菌培养结果

灭菌实验中, 枯草芽孢杆菌实验培养结果图如图 5 所示, 其中 a 为 20℃, 室光环境下未添加杀菌剂的对照组, b 为 20℃, 室光环境下添加氧化锌微米棒的实验组, c 为 20℃, 室光环境下添加 Cu 掺杂氧化锌微米棒的实验组。经计算, 氧化锌微米棒的杀菌率为 95.34%, Cu 掺杂氧化锌微米棒杀菌率为 98.51%。两种微米棒对枯草芽孢杆菌都有较强的杀菌能力, 均在 95% 以上, 但是 Cu 掺杂后氧化锌微米棒的杀菌能力得到了改善。

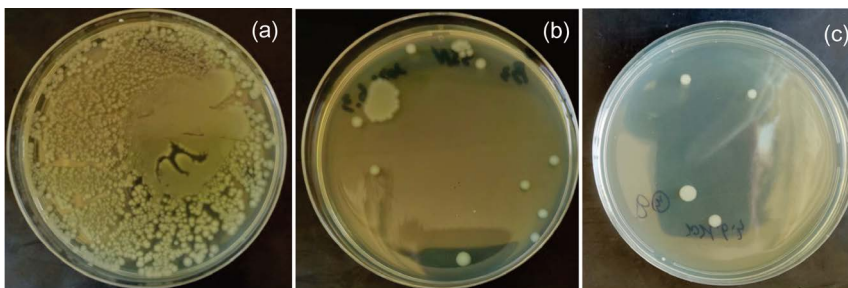


Figure 5. Culture results of *Bacillus subtilis*

图 5. 枯草芽孢杆菌培养结果

灭菌实验中, 蜡样芽孢杆菌实验培养结果如图 6 所示, 其中 a 为 20℃, 室光环境下未添加杀菌剂的对照组, b 为 20℃, 室光环境下添加氧化锌微米棒的实验组, c 为 20℃, 室光环境下添加 Cu 掺杂氧化锌微米棒的实验组。经计算, 氧化锌微米棒的杀菌率为 99.19%, Cu 掺杂氧化锌微米棒杀菌率为 99.81%。两种微米棒对蜡样芽孢杆菌都有极强的杀菌能力, 都能达到 99% 以上, 但是 Cu 掺杂后氧化锌微米棒的杀菌能力得到了提高。

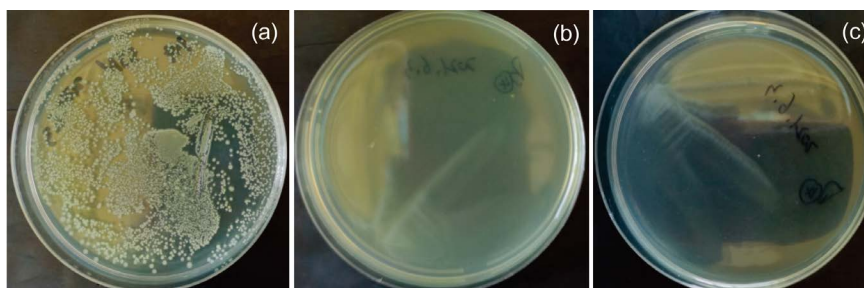


Figure 6. Culture results of *Bacillus cereus*
图 6. 蜡样芽孢杆菌培养结果

从图 3 至图 6 可以看出, 这四种菌培养结果共同点为: 每种杀菌剂对以上四种菌都有杀菌能力。不同点为: 杀菌剂的杀菌能力不同, 对于同一菌种来讲, 与未添加任何杀菌剂的对照组 a 相比, 添加了氧化锌微米棒的 b 实验组杀菌效果较为明显, 添加了 Cu 掺杂氧化锌微米棒的 c 实验组杀菌效果十分明显, 四个菌种的实验结果都符合这一规律。其次, 对于同一杀菌剂来讲, 对以上四种菌的杀菌能力不同, 对蜡样芽孢杆菌杀菌效果最为明显, 其次是枯草芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌, 最后是大肠杆菌。由于细菌间生物结构存在差异, 导致其杀菌率不同。

4. 实验结论

本文主要利用化学气相沉积法制备了氧化锌微米棒, 其中部分氧化锌微米棒利用水热法进行 Cu 掺杂, 比较两种实验方法得到的氧化锌微米棒灭菌特性。实验结果表明, 氧化锌微米棒直径在 2~6 μm 左右, 长度大约为 8~24 μm 。SEM 表征结果显示氧化锌微米棒表面光滑, 主要形貌为六角结构, 生长均匀, 无其它附着物产生; 其中样品 b 掺 Cu 后的 ZnO 微米棒, 其表面较为粗糙, 原因是氧化锌微米棒与铜发生氧化还原反应, 从而促使样品表面不再光滑。分别对两种样品灭菌特性做了测试, 根据公式(1)计算可得, 氧化锌微米棒对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌的灭菌率分别为 60.42%、73.67%、95.34%、99.19%; 铜掺杂后对四种菌落的灭菌特性分别提高至 70.33%、88.93%、98.51%、99.81%, Cu 掺杂后其灭菌率分别提高了 9.91%、15.26%、3.17%、0.62%。由此可见铜掺杂有效地提高了氧化锌微米棒的灭菌特性, 实验证明对于 ZnO 纳米材料来说, 对其进行金属元素掺杂可以进一步开发其优良性质, 而利用其优秀的光催化特性, 可以在今后的生物医学领域、医疗器材领域的抗菌、杀菌方向取得更好成果。

参考文献

- [1] Balasubramaniam, B., Ranjan, S., Saraf, M., *et al.* (2021) Antibacterial and Antiviral Functional Materials: Chemistry and Biological Activity toward Tackling COVID-19-like Pandemics. *ACS Pharmacology & Translational Science*, **4**, 8-54. <https://doi.org/10.1021/acspsci.0c00174>
- [2] Nguyen, N.-K., Nguyen, T., Nguyen, T.-K., Yaday, S., *et al.* (2021) Wide-Band-Gap Semiconductors for Biointegrated Electronics: Recent Advances and Future Directions. *ACS Applied Electronic Materials*, **3**, 1959-1981. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.0c01122>

-
- [3] Young, S.-J., Liu, Y.-H., *et al.* (2020) Flexible Ultraviolet Photodetectors Based on One-Dimensional Gallium-Doped Zinc Oxide Nanostructures. *ACS Applied Electronic Materials*, **2**, 3522-3529. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.0c00556>
- [4] Zhao, J., Huang, S.Y., Ravisankar, P. and Zhu, H.J. (2003) Two-Dimensional Nanomaterials for Photoinduced Antibacterial Applications. *ACS Applied Bio Materials*, **3**, 8188-8210. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00950>
- [5] Lupan, O., Magariu, N., Khaledialidusti, R., Mishra, A.K., Hansen, S., *et al.* (2021) Comparison of Thermal Annealing versus Hydrothermal Treatment Effects on the Detection Performances of ZnO Nanowires. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **13**, 10537-10552. <https://doi.org/10.1021/acsaami.0c19170>
- [6] Kumar, A., Heng, T.S., Zeng, K.Y. and Ding, J. (2012) Bipolar Charge Storage Characteristics in Copper and Cobalt Co-Doped Zinc Oxide (ZnO) Thin Film. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **4**, 5276-5280. <https://doi.org/10.1021/am301220h>
- [7] Li, R., Chen, T.T. and Pan, X.L. (2021) Metal-Organic-Framework-Based Materials for Antimicrobial Applications. *ACS Nano*, **15**, 3808-3848. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09617>
- [8] Khan, M.F., Husain, F.M., Zia, Q., Ahmad, E., *et al.* (2020) Anti-Quorum Sensing and Anti-Biofilm Activity of Zinc Oxide Nanospikes. *ACS Omega*, **5**, 32203-32215. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03634>
- [9] 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.