

Synthesis of ZnO Nanorods and AFM Study on Their Photocatalytic Antimicrobial Activity

Qing-shan Zhang

College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, China Email: qszhang8080@163.com

Abstract: ZnO nanorods were synthesized by solution method and the photocatalytic antimicrobial activities were characterized by AFM. The samples irradiated by ultraviolet for 30 minutes were used to research the photocatalytic antimicrobial activities against Escherichia coil (*E.coli*) HB101. The topography image and phase image of *E. coli* treated by ZnO were observed by AFM tapping mode, and force curve were obtained by AFM contact mode. The results show that the surface of the bacteria becomes inhomogeneity, and average surface roughness increases after the antimicrobially treating by ZnO nanorods, indicating the mechanism of the antimicrobial function. After the interaction of antibacterial reagent and the bacteria, the average surface roughness increases; the elasticity of the surface decreases and becomes out of order; the surface adherence decreases, so as to induce the death of the bacteria.

Keywords: ZnO; nanorods; photocatalytic antimicrobial; AFM

ZnO 纳米棒的制备及其光催化抗菌作用的 AFM 研究

张青山

青岛科技大学,环境与安全工程学院,青岛,中国,266042 Email: qszhang8080@163.com

摘 要:本文采用溶液法制备了 ZnO 纳米棒,并以其作为抗菌剂,经过紫外光照射 30 min 进行激发后, 对大肠杆菌 HB101 进行了抗菌实验。使用原子力显微镜 (AFM) 轻敲模式成像,得到了大肠杆菌细胞 的形貌图和相图,利用 AFM 接触模式,进行了细菌表面力曲线的测量。结果表明:细胞在受到 ZnO 纳米棒抗菌作用后,表面弹性变小且变得不均一、变化无规律;平均表面粗糙度变大,同时表面的粘 附力减弱,从而诱导细菌死亡。

关键词: ZnO; 纳米棒; 光催化抗菌剂; 原子力显微镜

1 引言

光催化抗菌剂是半导体型化合物,光激发后使位 于价带的电子跃迁至导带,导带中被激发的电子具有 强的还原能力,价带中的空穴具有强的氧化能力,故 可杀死细菌。如 ZnO 的禁带宽为 3.2eV,它吸收了波 长小于 387 nm 的近紫外光波后,价带中的电子就会被 激发到导带,形成带负电荷的高活性电子,同时在价 带上也产生带有正电荷的空穴。在电场作用下,电子-空穴对发生分离而迁移到 ZnO 表面上的不同位置。分 布在 ZnO 表面的空穴与吸附在表面的 OH-和 H₂O 氧 化成·OH 自由基。而高活性电子则具有较强的还原能 力,可将表面的氧还原成 O₂,也可将水中的金属离子 还原。·OH 自由基的氧化能力最强可不加选择地使有 机物全部氧化降解,包括穿透细胞膜,破坏膜结构使 细菌、病毒和癌症细胞分解,又能降解细胞产生的毒素^[1]。由于 ZnO 可以作用于一切有机物质,因此,它的抗菌性比金属离子的抗菌性更广。

与普通抗菌剂相比,纳米化的抗菌材料具有更大 的比表面积,对微生物有更强的吸附作用,从而可以 有更好的抗菌效果,表现出更高的抗菌活性。

原子力显微镜 (AFM) 是揭示微生物表面结构及 其与功能相关性的一种新的有力工具,它具有比传统 光学显微镜更高的放大倍数和极高的分辨率,能对从 原子到分子尺度的结构进行三维成像和测量,并且可 以在生理条件下实时进行^[2-8]。AFM 的发现为生命科 学的研究提供了不可缺少的有力工具,它在生命科学 领域的应用主要涉及以下几方面:一是 AFM 能在真 空、气体、液体等多种环境中使用,可以在生理条件 下以分子、亚分子分辨率得到生物分子及样品表面的



三维图象; 二是能对生物大分子的生理生化过程进行 实时动态观察; 三是能以皮克牛顿 (pN)的精确度直 接测量生物分子间及分子内的作用力。

本论文利用溶液法制备了形貌均一的 ZnO 纳米 棒,经过紫外光照射以后,将其作用于大肠杆菌,并 采用 AFM 研究了其光催化抗菌性能的表现。

由此可见,若能将用于热疗的物质与用于放疗的 物质复合在一起,必将获得一种能显著提高疗效的可 实现热放疗联合使用的肿瘤治疗新材料。

2 实验

2.1 ZnO 纳米棒的制备

将 1.1 g Zn(Ac)₂·2H₂O 和 2 mL NH₃·H₂O 分别溶解 在 40 mL 蒸馏水中,然后将 Zn(Ac)₂ 溶液添加到 NH₃·H₂O 溶液中(Zn²⁺/OH 的摩尔比为 1:4),得到白 色的悬浊液,将白色的悬浊液转入圆底烧瓶中,放入 80°C 水浴中反应 6 h,冷却至室温即得到白色沉淀。 沉淀物分别用水和酒精洗涤数次。

2.2 大肠杆菌生长曲线的测定

1) 干热灭菌

将试管、移液管放于干燥箱中,在170 ℃下灭菌2h。

2) 准备待测菌样

取试管倒入 25 mL LB 液体培养基,进行大肠杆 菌接种。把接种管置于恒温培养箱中,在 37 ℃ 下恒 温过夜培养。

3) 再接种

在无菌环境下,向1号试管中加入10 mL LB 液 体培养基。在过夜培养的试管中,用移液管吸取菌液 1 mL,转移到1号试管中,摇匀。然后,按上述的方 法向其余试管中接种过夜培养的菌种,混匀。

4) 再培养

把接种好的菌放在 37 °C 下培养。

5) 测量光密度(optical density, OD) 值

用未接种的 LB 培养基作为空白对照,设定波长 600 nm,测定菌液 OD 值。

6) 大肠杆菌数量的测定

每测完一次 OD 值,都用血球计数板在显微镜下 数一次大肠杆菌的个数。

7) 重复步骤 5 和 6。

2.3 ZnO 纳米棒光催化抗菌作用研究

(1)将玻璃器皿 170 ℃ 灭菌 2 h,同时将 ZnO 纳米棒粉末均匀平铺在纸上放入无菌操作台内,紫外 光照射 30 min 进行光催化剂的光激发。

(2)取一试管倒入一半的液体培养基,将接种环 在酒精灯上来回灭菌3次,自然冷却后,将接种环深 入大肠杆菌菌种试管中,轻微刮取微量的菌种,放入 装有液体培养基的试管中,塞上棉塞,振荡均匀,然 后放入恒温培养箱中进行过夜培养。

(3) 将固体培养基加热溶化, 微热时倒入灭菌的 培养皿中, 等培养皿中的固体培养基凝固后, 用移液 管吸取菌液滴入平板内, 将菌液铺平, 将培养皿倒置, 放入培养箱培养。

(4)培养一定时间后取出,用接种环在平板内取 出微量的菌,直接将菌涂到洗干净的玻璃片上,抹均 匀,用氦气吹干,此样品作为空白对照。

(5)将 ZnO 粉末分散于蒸馏水,浓度大约为 1%, 按照上述方法重复做一个样品,将此样品放入 ZnO 浊 液中,浸泡 20 min 后取出,在蒸馏水中洗涤以除去培 养基,用 N₂吹干样品,用 AFM 观察。

选定细菌在ZnO浊液中浸20 min,是因为之前进行了分别浸泡 10 min、20 min、30min、40min、50min 的实验,然后将玻璃片上的细菌进行平板培养,发现,从 40 分钟以后的样品都没有菌落的产生,表明与 ZnO 浊液作用 40 分钟后,细菌全部死亡,为了研究抗菌作用过程中细菌的表现,选定作用20 分钟的细菌作为研究对象。

2.4 产物表征

产物的形貌与结构借助于扫描电子显微镜(SEM) 来进行表征。

3 结果及讨论

3.1 ZnO 纳米棒的形貌分析

ZnO 纳米棒光催化抗菌剂的形貌如图 1 所示,可以清晰地看到 ZnO 呈放射状,每条 ZnO 放射棒具有 六方柱面。多个棒紧密地由中心部位呈放射状向外生 长。棒状晶须的直径在 100 nm 到 500 nm 之间,长度 为 1~3 μm 之间。

3.2 ZnO 纳米棒光催化抗菌性能研究

3.2.1 大肠杆菌的生长曲线绘制

由生长曲线(图 2)可知,大肠杆菌的对数生长



后期大约在 9.5 h 左右,此时期大肠杆菌对于外界环境 比较敏感,在此时期,对大肠杆菌进行 ZnO 光催化抗 菌作用实验,在原子力显微镜下观察大肠杆菌菌体的 形貌变化及其他表面特征。

3.2.2 ZnO 纳米棒光催化抗菌作用的 AFM 研究

将细菌样品置于原子力显微镜下,用轻敲模式 (Tapping 模式)观察其形貌图和相图。

形貌图和相图中都有颜色的变化,颜色的深浅代 表着相关的含义。

由文献^[9],对形貌图(高度图)来说,颜色越深, 表明样品区域离针尖越远,对样品平面来说越低,颜 色越浅,表明样品区域离针尖越近,样品区域高度越 高。对相图来说,颜色越深,弹性越小;颜色越浅, 弹性越大。

图 3 是未用 ZnO 纳米棒做抗菌处理的 E. coli 的形 貌图 A 和相图 B。此图的扫描范围是 3.00 µm x 3.00 µm, 扫描频率为 1.00 Hz, 由图可知未处理的 E. coli 表面平滑, E. coli 菌体比较完整, 从图中可清晰看到 细菌菌体的弹性比较均一变化有规律, E. coli 菌体的



Figure 1. SEM photos of ZnO nanorods











Figure 3. The topography image (A) and phase image (B) of untreated E. *coli* observed by AFM

图 3. 原子力显微镜观察得到的大肠杆菌的形貌图(A)和相图(B)

平均表面粗糙度(Ra)为4.70 nm(测量区域如图 3A 中虚线框所示,选定的区域范围为 330×330 nm),相 图中亮的区域表明大肠杆菌的表面弹性较大,表面弹性的大小在一定程度上表明大肠杆菌的生长状况,图 3 表明菌体处于正常的生长状态。并且大肠杆菌的相 图也比较均一,菌体状态良好。

图 4 是用 AFM 观察的紫外光照射激发后的 ZnO 纳米棒抗菌处理后所得到的 E. coli 形貌图 A 和相图 B,此图的扫描范围 3.00 µm x 3.00 µm,扫描频率为 0.70 Hz,从图中可明显看出大肠杆菌菌体表面与未受 ZnO 纳米棒抗菌处理的相比,从 B 图(相图)中可看 出菌体表面弹性大小变化变得无规律。如图 5,对虚 线所选区域(330×330 nm)进行表面粗糙度的测量, 其平均表面粗糙度 Ra=11.9 nm, Rq=14.8 nm, ZnO 处 理后的大肠杆菌的表面粗糙度明显增加了(见表 1), 菌体变得粗糙,这是由于 ZnO 的抗菌作用使得细菌菌 体表面的性质开始改变,表面的结构已开始发生变化。



Figure 4. The topography image (A) and phase image (B) of ZnO nanorods-treated-*E. coli* observed by AFM

图 4. ZnO 纳米棒抗菌处理后大肠杆菌的 AFM 形貌图(A) 和相图 (B)



 Table 1. Surface roughness of the *E. coli* before and after interaction with ZnO nanorods

表 1. ZnO 纳米棒抗菌作用前后大肠杆菌表面粗糙度

	Ra (nm)	Rq (nm)
正常大肠杆菌	4.70	5.86
ZnO 纳米棒作用后 的大肠杆菌	11.9	14.8



Figure 5. The topography image of ZnO nanorods-treated-*E. coli* observed by AFM

图 5. ZnO 纳米棒抗菌处理后的大肠杆菌 AFM 形貌图

图 6 为未作抗菌处理的大肠杆菌的形貌图及对应 的截面图,由截面图可看出,曲线在起伏处比较圆滑, 表明大肠杆菌的菌体表面比较光滑且完整,菌体表面 没有明显的凹槽和缺口。

图 7 为 ZnO 纳米棒抗菌作用后的大肠杆菌的形貌 图及所对应的截面图,可以看出,此曲线与未进行抗 菌作用处理的相比,大肠杆菌的菌体表面比较完整, 没有较大的起伏变化,表明抗菌剂对细菌的破坏是处 于中间过程,菌体没有破裂。



Figure 6. The AFM cross-section image of E. coli

图 6. 大肠杆菌的 AFM 截面图



Figure 7. The cross-section image of ZnO nanorods-treated_*E. coli* observed by AFM

图 7. ZnO 纳米棒抗菌处理后的大肠杆菌的 AFM 截面图

3.2.3 力曲线分析

采用接触模式进行了细菌菌体表面力曲线的测量,在测量前首先在一个硬的表面,如铁片或硅片的 表面,进行弹性常数的校准,得到准确的弹性常数后, 再进行待测样品的力曲线测试。

图 8 为接触模式下利用原子力显微镜对 ZnO 纳米 棒抗菌作用前后的大肠杆菌菌体表面的力一距离曲线 测试结果,两条曲线最大的区别在于:抗菌作用发生 后的(b)图相应部分离平衡位置最大距离较(a)图 小。分析可得,经过 ZnO 纳米棒抗菌作用过后的菌体 表面的粘附力减小,从而 AFM 针尖只发生很小的向 下的弯曲形变即回弹,恢复了原始状态,导致了如图 8 中曲线发生的变化。



Figure 8. Typical force-distance curves of the E.coli's surface measured by AFM. (a) untreated and (b1-b3) treated by ZnO nanorods

图 8. AFM 测量的大肠杆菌表面的力-距离曲线(a)未经抗菌处理 (b1-b3) 经过 ZnO 纳米棒抗菌处理

由文献^[10],力-距离曲线的斜率(slope)大小可以 反映测试菌体表面的弹性变化。斜率大的,弹性相对 较大。图 8 中,(a)曲线为正常大肠杆菌的力曲线图,

(b₁₋₃)曲线为从多次测试中选取的典型的氧化锌抗菌 作用后的菌体表面的力曲线图,相应部分的斜率比较 见表 2,可以定性地得出经过 ZnO 纳米棒抗菌作用后 的菌体的表面弹性变小了,性质开始发生改变了。弹 性和粘附力变小的机理方面,可能是由于 ZnO 纳米棒 抗菌剂表面具有强氧化能力的羟基自由基经过与大肠 杆菌的接触后,将菌体表面的有机物矿化所致。

3.2.4 紫外光抗菌作用的 AFM 研究

为了检验ZnO纳米棒对大肠杆菌的抑制作用的表现是不是有特殊性,还进行了原子力显微镜在轻敲模式(Tapping模式)下进行紫外光对大肠杆菌作用过程的观察。

实验方法同以上试验。对大肠杆菌样片的紫外光 照时间为 15 分钟。

在图 9 中,由大肠杆菌的形貌图和相图都很直接 的看出细菌表面已经不再光滑,弹性大小也不均一, 在细胞的表面上还有凹槽和囊泡。

Table 2. Force-distance curve slopes of E. coil before and after interaction with ZnO nanorods

表 2. ZnO 纳米棒抗菌作用前后大肠杆菌表面力曲线斜率的对比

	正常大肠杆 菌	ZnO 纳米棒作用后的大肠杆菌		
斜率	0.0258	0.0235	0.0234	0.0230



Figure 9. The AFM topography image (A) and phase image (B) of *E.coli* treated by ultraviolet

图 9. 紫外光处理后大肠杆菌的 AFM 形貌图(A) 和相图(B) Table 3. Surface roughness of the *E. coli* before and after UV radiation

the construction of the state o
--

	Ra (nm)	Rq (nm)
正常大肠杆菌	4.70	5.86
紫外作用后的大肠 杆菌	12.8	15.7



Figure 10. The section image of treated *E.coli* by ultraviolet radiation

图 10. 经紫外光照射后大肠杆菌细胞截面图

由紫外处理后的大肠杆菌的截面图(图 9)可以 看出,曲线不再圆润,表明菌体表面已变得不光滑。 再由图 10,在细菌表面取 330 nm×330 nm 的区域,其 平均表面粗糙度 Ra=12.8 nm, Rq=15.7 nm。与正常大 肠杆菌的表面粗糙度相比明显增大(表 3)。

可见,用 ZnO 纳米棒和用紫外光照射处理大肠杆 菌都能使细菌变得不光滑,弹性变化无规律,粗糙程 度增大。但是紫外光照射的菌体表面破坏现象更明显, 而且菌表面还有凹槽和囊泡。

4 结论

采用溶液法制备了形貌均一的ZnO纳米棒,并以 其作为光催化抗菌剂,经过紫外光照射30min进行激 发后,对大肠杆菌 HB101 进行了抗菌实验。使用原 子力显微镜轻敲模式成像,得到了大肠杆菌细胞的形 貌图和相图,利用 AFM 接触模式,进行了细菌表面 力曲线的测量。结果表明:细胞在受到ZnO纳米棒抗 菌作用后,表面弹性变小且变得不均一、变化无规 律;平均表面粗糙度变大,同时表面的粘附力减弱。 经过对紫外光对细菌的影响进行的观察,得出纳米 ZnO 纳米棒与紫外光具有相似的对细菌影响的表现。

抗菌机理方面,经紫外线照射的ZnO纳米棒产生的高活性的羟基自由基可以氧化分解各种有机物,将 其分解为无害的CO₂和H₂O,从而有效的抑制细菌等 微生物的大量繁殖,达到抗菌的目的。同时其抗菌能



力与其表面的空穴数量有关,当其表面具有尽可能多 的空穴时,就会产生更多的电子,同时空位也可直接 参与反应,从而使其具有更高的抗菌能力。在抗菌剂 的作用下,在抗菌作用发生的开始阶段,菌体的表现 为表面粗糙度变大,弹性变小且变得无规律,菌体表 面粘附力减弱,从而进一步导致了菌体最终的死亡。

References (参考文献)

- Wang R, Hashimoto K, Fujishima A, et al .Light-induced Amphiphilic Surfaces[J]. *Nature*, 1997, 388: 431-432.
- [2] Allen M J, Bradbury E M, Balhorn R. AFM Analysis of DNA-protamine Complexes Bound to Mica[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(11): 2221-2226.
- [3] Berge T, Ellis D J, Dryden D T F, et al. Translocation-independent Dimerization of the EcoKI Endonuclease Visualized by Atomic Force Microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 2000, 79: 479-484.
- [4] Umemura K, Nagami F, Okada T, et al. AFM Characterization of Single Strand-specific Endonuclease Activity on Linear DNA[J].

Nucleic Acids Research, 2000, 28(9): e39.

- [5] Berge T, Jenkins N S, Hopkirk R B, et al. Structural Perturbations in DNA Caused by Bis-intercalation of Ditercalinium Visualized by Atomic Force Microscopy, *Nucleic Acids Re*search, 2002, 30(13): 2950-2956.
- [6] Coury J E, Meafll-Isom L, Williams L D, et al. A Novel Assay for Drug-DNA Binding Mode, Affinity, and Exclusion Number: Scanning Force Microscopy[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 12283-12286.
- [7] Drake B, Prater C B, Weisenhorn A L. Imaging Crystals, Polymers and Processes in Water with the Atomic Force Microscope[J]. *Science*, 1989, 243: 1586-1589.
- [8] Lysetska M, Knoll A, Boehringer D, et al. UV Light-damgaed DNA and Its Interaction with Human Replication Rrotein A: An Atomic Force Microscopy[M]. *Nucleic Acids Research*, 2002.
- [9] Meincken M, Holroyd D L, Rautenbach M. Atomic Force Microscopy Study of the Effect of Antimicrobial Peptides on the Cell Envelope of Escherichia Coli[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(10): 4085-4092.
- [10] Arnoldi Markus, Fritz Monika, Bauerlein Edmund, Bacterial Turgor Pressure Can Be Measured by Atomic Force Microscopy[J]. *Physical Review E*, 2000, 62(1): 1034-1044.