

La₂O₃ 纳米纤维的制备及抗菌性能研究

邢 岩¹, 叶丽艳², 成 婧¹, 潘 伟¹

(1. 清华大学 新型陶瓷与精细工艺国家重点实验室, 北京 100084)

(2. 中国人民解放军总医院 (301 医院), 北京 100853)

摘 要: 采用静电纺丝法制备了氧化镧纳米纤维, 并通过 X 射线衍射 (XRD), X 射线光电子能谱 (XPS), 扫描电子显微镜 (SEM), 透射电子显微镜 (TEM) 以及比表面积分析仪 (BET) 分析了物相结构和显微形貌。探究了氧化镧纳米纤维的抗菌性能和机理。结果表明, 静电纺丝法可成功制得高长/径比, 直径均匀且连续的氧化镧纳米纤维。该纤维在负载量极低 (200 mg/L) 的情况下, 对高浓度革兰氏阴性大肠杆菌 (10⁷ CFU/L) 具有超快速灭菌效果, 可在 100 min 内达到 95% 以上的细菌灭活率。通过长时间的培养和观察表明, 该纤维具有彻底且长效的抑菌效果, 长时间培养后未观察到细菌的反复增殖。此外, 氧化镧纳米纤维对鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌也具有良好的灭菌效果, 是一种潜在的广谱抗菌材料。

关键词: 氧化镧; 静电纺丝; 大肠杆菌; 抗菌性能

中图分类号: TB383; TB34

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2020)02-0676-06

高致病菌群在生活用水中的快速繁殖对人类的健康带来巨大威胁^[1-4]。其中, 大肠杆菌 O157 可经过受污染的食物和水直接进入人体, 引起严重的疾病, 包括非血性腹泻, 出血性结肠炎和溶血性尿毒综合症, 甚至威胁生命。近年来, 基于无机氧化物的新型抗菌材料在水处理领域得到了普遍的关注, 具有广阔的应用前景^[5-8]。

目前得到广泛研究和应用的抗菌材料包括抗生素、抗菌酶和具有毒性的氧化物等。抗生素和抗菌酶的残余以及杀菌过程中释放的毒素对人体健康具有潜在的危害^[9]。因此, 研究人员致力于开发安全可靠且绿色环保的无机氧化物抗菌材料。氧化钛及其复合材料无疑是近年来受到持续关注且得到广泛应用的半导体光催化材料。研究者发现氧化钛在紫外光激发下不仅可以降解有机污染物, 还可以通过产生的氧化活性物质使细菌失活^[10-12]。但是, 仅占太阳光谱 5% 的紫外光是光催化杀菌过程的必备条件。因此, 对光能利用率低, 成本较高等问题大大限制了氧化钛材料的进一步应用。此外, 氧化锌, 氧化镁以及氧化钙等无机氧化物也被发现具有不同程度的抑菌效果, 但是抗菌效率还有待提高^[13-15]。

稀土元素因其 4f 轨道电子带来的独特物理和化

学性质被广泛应用于电子器件, 燃料电池, 催化和水处理等领域^[16,17], 然而在抗菌方面的应用鲜有报道。本研究通过静电纺丝的方法制备 La₂O₃ 纳米纤维, 对纳米纤维的形貌, 相结构, 以及抗菌性能进行了表征, 并对抗菌反应机理进行了讨论。为扩展稀土金属氧化物在抗菌领域的应用提供了实验和理论基础。

1 实 验

本实验选用硝酸镧 (La(NO₃)₃·nH₂O) 与聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, M_w=1,300,000, Alfa Co.) 作为原料。首先将 PVP 以 1:6.25 的质量比加入到无水乙醇中, 室温下磁力搅拌 2 h 使之完全溶解; 再将硝酸镧溶于去离子水中, 室温下磁力搅拌至溶解。然后, 将得到的硝酸镧水溶液与 PVP 溶液混合, 室温下搅拌均匀后得到透明且具有适当粘度的纺丝前驱体溶液。

将纺丝前驱体溶液转移至注射泵中, 并与不锈钢注射针头连接。设置注射泵推进速度为 1 mL/h。在施加 20 kV 电压并调整纺丝距离为 20 cm 后, 在作为接收电极的铝箔上收集到纤维前驱体无纺布。将纤维无纺布于 700 °C 煅烧 2 h (升温速度 5 °C/min), 可得到 La₂O₃ 纳米纤维。

选取大肠杆菌 (*E. coli* O:H157) 作为目标菌群,

收稿日期: 2019-02-21

基金项目: 国家自然科学基金 (51323001)

作者简介: 邢 岩, 女, 1992 年生, 博士生, 清华大学材料科学与工程学院, 北京 100084, 电话: 010-62772859, E-mail: xingy14@mails.tsinghua.edu.cn

评估 La₂O₃ 纳米纤维的抗菌性能。首先, 将大肠杆菌在 Luria-Bertani (LB) 培养基中过夜培养, 培养温度为 37 °C。当菌落生长超过 10⁸ CFU/mL 后, 取悬浮液离心 (3000 r/min) 10 min 后用生理盐水 (质量分数 0.9% NaCl) 洗涤, 去除 LB 培养基中的营养成分, 最终将菌液浓度稀释到 10⁴ CFU/mL。取 4 mL 离心管, 加入 0.5 mL La₂O₃ 纳米纤维分散液 (1 g·L⁻¹) 和 2 mL 大肠杆菌菌液, 混合后在 37 °C 的摇床中培养。分别在培养时间达到 0 min, 10 min, 70 min, 100 min, 1 d, 2 d 以及 3 d 时, 取出定量菌液, 稀释后涂布在 LB 培养基上, 过夜培养 24 h 后, 记录菌落生长情况。同时, 选取 0.5 mL 去离子水与 2 mL 菌液混合作为对照组, 在相同的实验条件下进行培养, 记录细菌的生长曲线。

纳米纤维的形貌通过德国蔡司的扫描电子显微镜 (SEM, Merlin VP compact) 以及日本电子的透射电子显微镜 (TEM, JEOL-2010F) 表征。采用透射电子显微镜附带能谱仪配件对纤维进行元素分析, 测试加速电压为 200 kV。物相结构通过日本 Rigaku 公司生产的 D/max-2550 X 射线衍射仪表征, 扫描范围为 20°~80°, 扫描速度为 5°/min, 射线源为 Cu K α ; X 射线光电子能谱由 Thermo Fisher 的 ESCALAB 250Xi 仪器测得, 用于表征材料中元素的化学状态; Zeta 电位由 Nano ZS90 测得; 纤维的比表面积由美国康塔的 SI-MP 型全自动气体吸附分析仪测得。测试过程中, 样品首先在 300 °C 下脱气 6 h, 然后通入超纯氮气, 并在 77 K 的液氮腔体内测试吸脱附曲线, 比表面积数据由 BET 模型计算。

2 结果与讨论

2.1 氧化镧纳米纤维的形貌分析

图 1a 是在铝箔上收集到的纤维无纺布, 即 La₂O₃ 纳米纤维前驱体的扫描电镜照片。从图中可以看出, 前驱体纤维细长而连续, 表面光滑, 直径约为 500 nm。将前驱体纤维于 700 °C 煅烧 2 h 后, 其形貌如图 1b 所示。热处理过程中, 由于前驱体中有机物与硝酸盐的分解, 纤维表面变得粗糙, 纤维直径显著缩减至 100 nm 左右。煅烧后, 从 SEM 图像中可以观察到直径约 60 nm, 厚度为 10 nm 左右的氧化镧片状晶粒。纳米纤维整体呈现晶粒串珠堆砌的微观形貌。

La₂O₃ 纳米纤维的微观形貌以及元素分布通过 TEM 以及 EDS 面扫描进一步分析。图 2a 中清晰地显示出单根纳米纤维直径约为 80 nm, 由连续薄片状晶粒组成, 与 SEM 结果吻合。将纤维表面的薄区进行高分辨表征, 可得到图 2b, 可以更清晰地观察到氧化镧的薄片状晶粒以及氧化镧的晶格条纹。通过测量并与

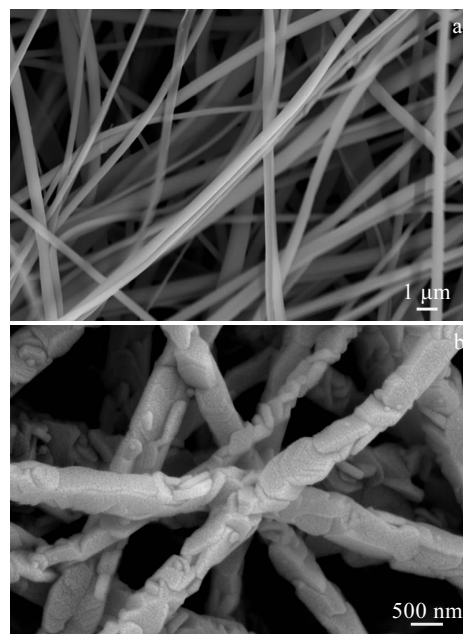


图 1 La₂O₃ 纳米纤维煅烧前和煅烧后的 SEM 照片
Fig.1 SEM images of La₂O₃ nanofibers before (a) and after (b) calcination

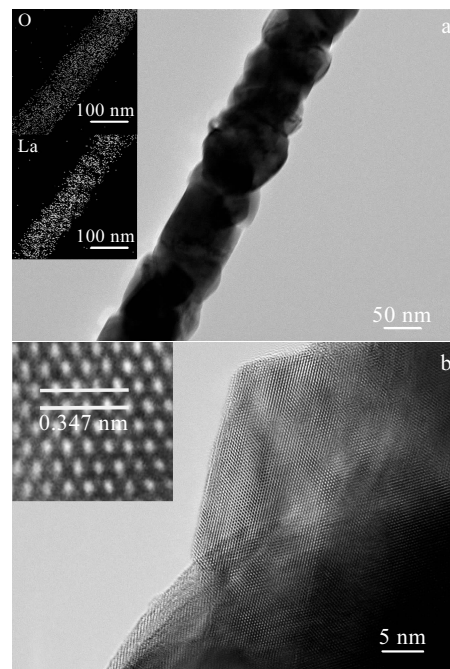


图 2 La₂O₃ 纳米纤维的 TEM 图像及 EDS 面扫描和高分辨 TEM 图像

Fig.2 TEM images with EDS mapping (a) and high-resolution TEM image (b) of La₂O₃ nanofibers

氧化镧标准卡片对比, 晶面间距 0.347 nm 对应于氧化镧的 (100) 晶面。通过对氧化镧纳米纤维进行能谱 (energy dispersive spectrometer, EDS) 的面扫描来分析 La 和 O 元素在氧化镧纳米纤维中的分布情况。如图 2a 中插图显示, 氧元素与镧元素均匀分布在纳米纤维的内部, 进一步证明了材料的组成和元素的分布情况。

2.2 氧化镧纳米纤维的相结构分析

La₂O₃ 纳米纤维的物相结构以及结晶性可以用 X 射线衍射 (XRD) 进行分析, 如图 3 所示。图谱中各衍射峰强度高, 尖锐且对称, 证明 La₂O₃ 纳米纤维结晶性良好。所有衍射峰均与六方氧化镧结构相对应 (JCPDS# 83-1344), 并无其他杂质的衍射峰出现。通过谢乐公式(1)对氧化镧的平均晶粒大小进行了计算。

$$D = \frac{K\gamma}{B\cos\theta} \quad (1)$$

其中, K 为 Scherrer 常数 ($K=0.89$), D 为晶粒垂直于晶面方向的平均厚度, B 为衍射峰的半高宽度, θ 为衍射角, γ 为 X 射线波长。结果显示, 氧化镧纳米纤维的平均晶粒大小为 52.2 nm, 与 SEM 和 TEM 观测结果一致。

为了进一步确定氧化镧纳米纤维中的元素成分以及化学状态, 采用 X 射线光电子能谱 (XPS) 进行分析。如图 4a 所示, XPS 全谱中含有 La, O 和 C 3 种元素。显然, 出现在结合能 $E_b=284.6$ eV 处的 C1s 峰来源于 XPS 仪器本身的碳氢化合物。结果显示 La 和 O 的原子比为 32.5:46.2, 与氧化镧的化学计量比符合。

图 4b 为氧化镧纳米纤维中 La 的 XPS 图谱。其中结合能为 833.5 eV 处出现的是 La 的 3d_{5/2} 主峰, 在其右侧 5 eV 处出现对应的卫星峰; 结合能为 850.6 eV 处出现的是 La 的 3d_{3/2} 主峰, 在其右侧 4.6 eV 处出现

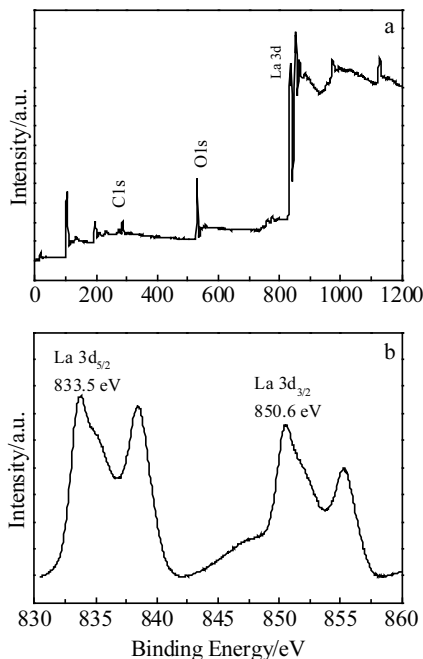


图 4 La₂O₃ 纳米纤维的 XPS 全谱和纳米纤维中 La 元素的 XPS 图谱
Fig.4 XPS spectra of La₂O₃ nanofibers: (a) full spectrum of the sample and (b) La 3d spectrum

对应的卫星峰。以上结果均与数据库相符合, 说明镧元素是以三价离子态存在于纳米纤维中。

2.3 氧化镧纳米纤维的比表面积分析

氧化镧纳米纤维的比表面积影响到纤维与细菌的接触过程, 因此使用美国康塔公司的全自动气体吸附分析仪测试纤维的吸/脱附曲线并计算比表面积。图 5 为氧化镧纳米纤维的氮气吸/脱附曲线。BET 法是基于

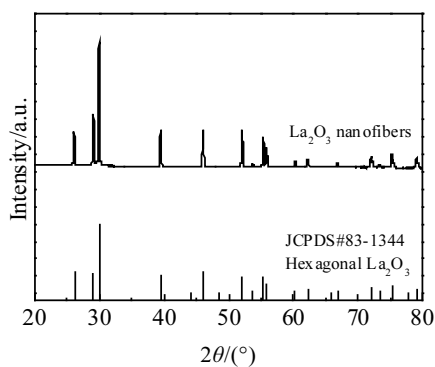


图 3 La₂O₃ 纳米纤维的 XRD 图谱
Fig.3 XRD pattern of La₂O₃ nanofibers

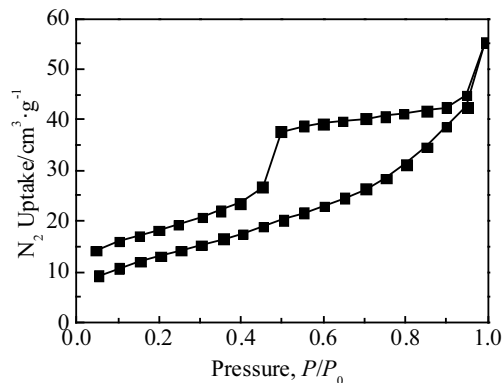


图 5 La₂O₃ 纳米纤维的氮气吸附/脱附曲线
Fig.5 N₂ adsorption and desorption isotherms of La₂O₃ nanofibers

多层吸附理论的常用比表面积计算方法,通过拟合计算,氧化镧纳米纤维的比表面积为 78.774 m²/g。对于具有一维纤维结构的材料而言,氧化镧纤维具有较高的比表面积。这是因为氧化镧纳米纤维的直径小,氧化镧的晶粒尺寸小,且片状晶粒堆砌的结构有利于增加比表面积。高的比表面积和长/径比能加速氧化镧纳米纤维与细菌的接触,进而提高灭菌效率。

2.4 氧化镧纳米纤维的灭菌效果

大肠杆菌属于革兰氏阴性细菌,在水中极易繁殖且常引起腹泻和败血症等疾病。图 6 显示了 La₂O₃ 纳米纤维处理时间为 0, 10, 30, 70 以及 100 min 时菌落的生长情况。从图中可以清晰地看出,La₂O₃ 纳米纤维在极低的负载量(200 mg/L)时显示出对高浓度大肠杆菌(10⁷ CFU/L)快速且高效的抗菌效果,在处理时间为 10 min 的初期阶段已显示接近 30%的灭活率,在处理时间达 100 min 时即可达到 95%以上的灭活效果。

本实验在达到预期抗菌效果后,继续培养 La₂O₃ 纳米纤维与大肠杆菌的混合液并每天取出适量菌液,在 LB 培养基中过夜培养并记录菌种数目。图 7 显示了 La₂O₃ 纳米纤维处理后和未经 La₂O₃ 纳米纤维处理的大肠杆菌在 LB 培养基上的生长情况。从图中可清晰地看出,La₂O₃ 纳米纤维对大肠杆菌具有彻底的灭菌效果,在连续 3 d 的培养周期内未发现有大肠杆菌的出现或繁殖。

除大肠杆菌外,选取鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌对氧化镧纳米纤维的抗菌性能进行评估。图 8 显示了鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌分别于氧化镧纳米纤维培养一天后的菌落生长情况。从图 8 中未观察到两种细菌的菌落生长,说明氧化镧纳米纤维对鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌也有较好的灭菌效果。

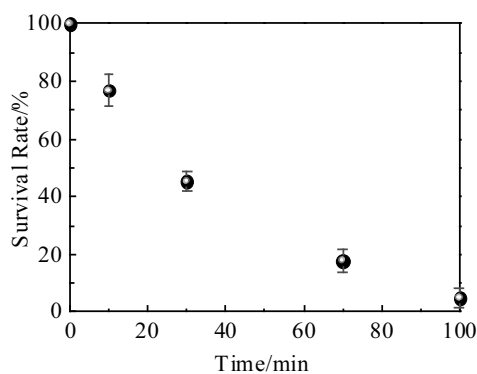


图 6 La₂O₃ 纳米纤维的抗菌效果

Fig.6 *E. coli* survival rate under La₂O₃ nanofiber treatment

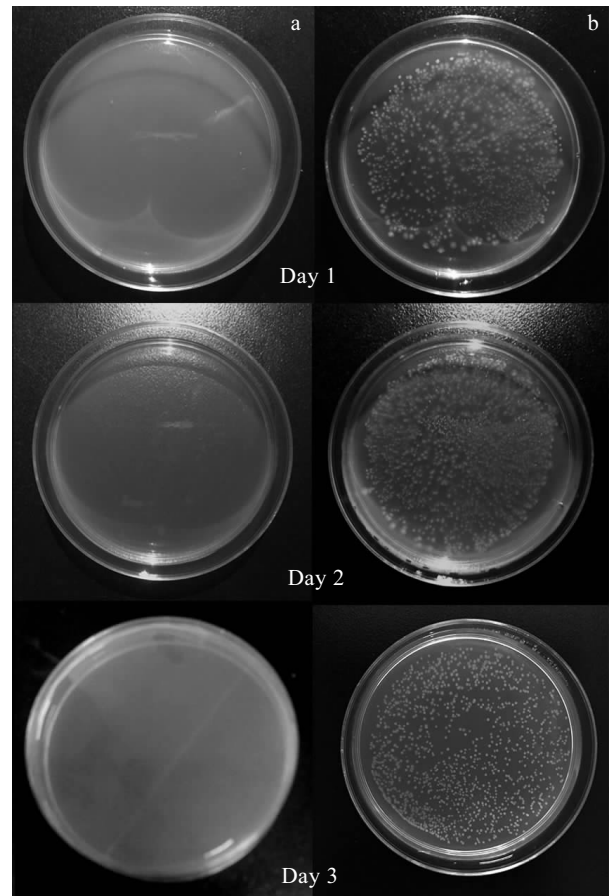


图 7 La₂O₃ 纳米纤维处理后以及未经 La₂O₃ 纳米纤维处理的大肠杆菌在 LB 培养基上的生长情况

Fig.7 Growth of *E. coli* with (a) and without (b) La₂O₃ nanofibers

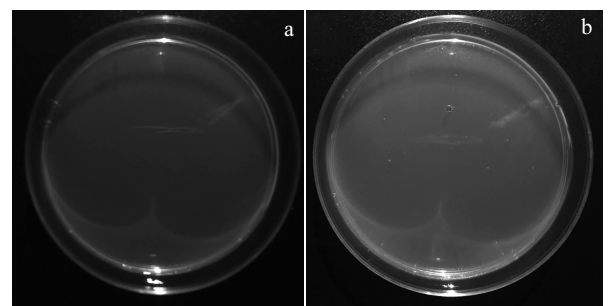


图 8 La₂O₃ 纳米纤维处理后鲍曼不动杆菌以及绿脓杆菌在 LB 培养基上的生长情况

Fig.8 Growth of *Acinetobacter baumannii* (a) and *P.aeruginosa* (b) after La₂O₃ nanofibers treatment

2.5 氧化镧纳米纤维的灭菌机理探究

灭菌反应通常包括静电吸引、灭菌剂与细菌接触、

细胞膜通透性改变以及胞质泄漏等一系列导致细菌死亡的反应^[18]。当 La_2O_3 纳米纤维分散液与菌液混合后, 具有高长/径比和 Zeta 电位为负值的纳米纤维能快速与细菌的细胞壁接触, 并与细胞壁上的带正电的金属离子产生静电吸引。镧离子可作为生化系统中 Ca^{2+} 的同构替代物^[19,20], 且比 Ca^{2+} 更紧密地结合到核酸酶及细胞壁等蛋白质的金属结合位点中。一方面造成细胞壁蛋白质的失活引起细胞通透性的改变, 使大量遗传物质泄露, 致使细胞失活; 另一方面, 与细胞外核酸酶的结合阻碍了细菌遗传物质的复制, 导致细胞失活^[20]。如图 9 所示, 大肠杆菌在经过 La_2O_3 纳米纤维处理后, 细胞壁失去原有光滑的表面而变得粗糙。由于通透性丧失, 细胞壁产生收缩, 并观察到孔洞和遗传物质的泄漏。

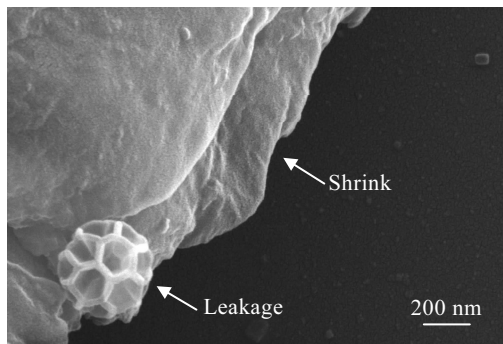


图 9 La_2O_3 纳米纤维处理后大肠杆菌细胞壁破坏及胞质的泄漏

Fig.9 Disruption of *E. coli* cell wall and cytoplasm leakage after La_2O_3 nanofiber treatment

3 结 论

1) 采用静电纺丝法可以制备 La_2O_3 纳米纤维。纳米纤维细长且连续, 直径约 100 nm, 整体呈现晶粒串珠堆砌的微观形貌。纤维结晶性良好, 未出现杂质。

2) La_2O_3 纳米纤维对大肠杆菌具有优异的抗菌性能, 在处理时间为 100 min 时可达到 95% 灭菌率。同时, 对鲍曼不动杆菌和绿脓杆菌也有较好的灭菌效果。

3) La_2O_3 纳米纤维能快速与细菌接触, 引起细胞壁通透性改变及遗传物质受损, 最终导致细胞失活。

参考文献 References

- [1] Mead Paul S, Griffin Patricia M. *Lancet*[J], 1998, 352(9135): 1207
- [2] Richardson Susan D. *Analytical Chemistry*[J], 2009, 86(12): 4645
- [3] Solomon Ethan B, Yaron Sima, Matthews Karl R. *Appl Environ Microbiol*[J], 2002, 68(1): 397
- [4] Schwarzenbach René P, Escher Beate I, Fenner Kathrin *et al. Science*[J], 2006, 313(5790): 1072
- [5] Sirelkhatim Amna, Mahmud Shahrom, Seeni Azman *et al. Nano-Micro Letters*[J], 2015, 7(3): 219
- [6] He Quanguo(贺全国), Liu Jun(刘 军), Huang Chunyan(黄春艳) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2013, 42(10): 2169
- [7] Wang Shuai(王 帅), Yang Ke(杨 柯), Ren Ling(任 玲) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2015, 44(10): 2496
- [8] Wang Bin(王 斌), Zhang Li(张 莉), Guo Zhihua(郭志华) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2015, 44(1): 169
- [9] Brogden Kim A. *Nat Rev Microbiol*[J], 2005, 3(3): 238
- [10] Akhavan O. *J Colloid Interface Sci*[J], 2009, 336(1): 117
- [11] Liu Chong, Kong Desheng, Hsu Po Chun *et al. Nat Nanotechnol*[J], 2016, 11(12): 1098
- [12] Fagan Rachel, McCormack Declan E, Dionysiou Dionysios D *et al. Mater Sci Semicond Process*[J], 2016, 42: 2
- [13] Hirota Ken, Sugimoto Maiko, Kato Masaki *et al. Ceram Int* [J], 2010, 36(2): 497
- [14] Sawai J, Yoshikawa T. *J Appl Microbiol*[J], 2004, 96(4): 803
- [15] Adams Laura K, Lyon Delina Y, Alvarez Pedro J. *Water Res* [J], 2006, 40(19): 3527
- [16] Mekhemer Gamal A H. *Phys Chem Chem Phys*[J], 2002, 4(21): 5400
- [17] Trogadas Panagiotis, Parrondo Javier, Ramani Vijay. *ACS Appl Mater Interfaces*[J], 2012, 4(10): 5098
- [18] Croxen M A, Finlay B B. *Nat Rev Microbiol*[J], 2010, 8(1): 26
- [19] Jing F J, Huang N, Liu Y W *et al. J Biomed Mater Res A*[J], 2008, 87(4): 1027
- [20] Furie Barbara C, Mann K G, Furie Bruce. *The Journal of Biological Chemistry*[J], 1976, 251(10): 3235

Synthesize and Antibacterial Performance of La₂O₃ Nanofiber

Xing Yan¹, Ye Liyan², Cheng Jing¹, Pan Wei¹

(1. State Key Laboratory of Advance Ceramics & Fine Processing, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(2. PLA General Hospital, Beijing 100853)

Abstract: La₂O₃ nanofibers was synthesized through electrospinning and heat treatment process. The phase structure, morphology and antibacterial performance were characterized by SEM, TEM, XRD, XPS and BET. The result shows that La₂O₃ nanofibers possess high length-diameter ratio, uniform morphology and pure phase. The La₂O₃ nanofibers have an excellent germicidal effect against the high-risk human pathogen *Escherichia coli* O157. More than 95% inactivation rate of high concentration bacterial (10⁷ CFU/L) is achieved within 100 min by low addition of La₂O₃ nanofibers (200 mg/L) and no *E. coli* recovery is detected in following three days. Furthermore, La₂O₃ nanofibers show highly efficient bactericidal performance against *Acinetobacter baumannii* and *P.aeruginosa*, demonstrating its potential application as an efficient and broad-spectrum antimicrobial material.

Key words: La₂O₃; electrospinning; *Escherichia coli* O157; antibacterial

Corresponding author: Pan Wei, Ph. D., Professor, School of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, P. R. China, Tel: 0086-10-62772858, E-mail: panw@mail.tsinghua.edu.cn