

第 2 屆大專校院綠色化學創意競賽成果報告書

組 別：大專組；研究組

隊伍名稱：紅橙黃綠能不止

主 題：綠色合成多功能與多樣性奈米氧化鋅於環境友善農業抗菌之
研究

目錄

摘要.....	2
壹、動機.....	3
貳、目的.....	3
參、設備及器材.....	6
一、高壓水熱釜.....	6
肆、研究方法與步驟.....	7
一、多型態奈米氧化鋅的合成與特性表徵.....	7
1. 奈米氧化鋅的合成.....	7
2. 奈米氧化鋅的特性表徵.....	8
二、多功能奈米氧化鋅的抗微生物性測試.....	9
三、以 SEM 和 EDS 觀察 Fon 孢子上奈米氧化鋅之作用.....	9
伍、結果與討論.....	10
一、不同結構之奈米氧化鋅的合成與鑑定.....	10
二、多分支花狀奈米氧化鋅的光降解特性和環境耐性.....	13
三、三維多分支花狀顆粒氧化鋅的抗真菌特性.....	15
四、多功能奈米氧化鋅使 Fon 細胞變形之應用.....	17
五、三維多分支花狀奈米氧化鋅在 Fon 細胞上顯著的機械作用.....	19
六、結論.....	21
七、參考文獻.....	21

本研究已發表在 *Journal of Cleaner Production* : Chang, T. H., Lu, Y. C., Yang, M. J., Huang, J. W., Chang, P. F., Hsueh, H. Y. Multibranched flower-like ZnO particles from eco-friendly hydrothermal synthesis as green antimicrobials in agriculture. *J. Clean. Prod.* 2020, 262, 121342

摘要

奈米結構的氧化鋅 (nZnO) 是適用於永續農業發展的一種材料，基於其獨特的性質，它具有顯著的潛力可以減少有害化學農藥的殘留，也可因應安全有機食品需求的日益增長。在該研究中，我們通過調控水熱反應的時間來進行不同型態氧化鋅的合成，分別有奈米棒狀(一維)，奈米片狀(二維)，以及奈米花狀顆粒(三維)。接著，在幾種對農業造成嚴重威脅的植物病原體上，對這些多結構的奈米氧化鋅進行抗菌性能的測試。結果顯示，三維的奈米花狀顆粒氧化鋅表現出優於其他結構的抗真菌活性，而從掃描式電子顯微鏡也觀察到，花狀顆粒的奈米結構對植物病原體造成明顯的機械損傷。因此，由研究結果可知，三維的奈米花狀顆粒因其具有特殊的抗菌性能機械層，使其成為適用於永續農業的一種材料。

Keywords：奈米材料，ZnO，水熱沉澱，多分支，抗菌，農業

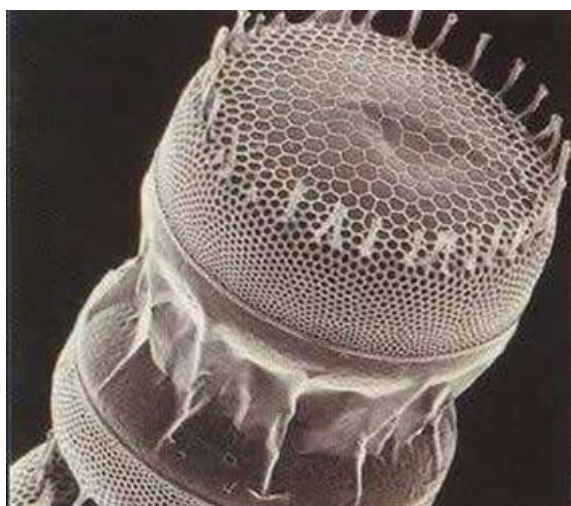
壹、動機

近來全球人口急速增長，提高農業生產力將可因應不斷增長的糧食需求。因此改善農業的品質如農作產量與植物病害控管，是現今農業相當重要的議題。近年來土壤傳播病原菌對植物體造成病害，在農業栽培上為相當嚴重的限制因子[1]。除了造成植物病害外，病原菌在土壤環境中高度的適應性使它們更加的難以防治，如導致植物萎凋病的土傳性尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)，會形成具有高度耐逆境細胞壁的厚膜孢子，這些結構將有助於它們在土壤中長時間的殘存，直到與適當的寄主接觸[2]。這些由土傳性病原菌引起的疾病會誘發不同的植物症狀，如根腐，壞疽，萎凋等，並在發病造成植物的死亡[1]。目前針對土傳性植物病害有化學、物理與生物性等的防治方法，然而這些方法尚無法有效的防除病害的發生，且對環境友善的程度仍有相當的疑慮，例如：化學性農藥的合成及使用會造成環境污染、抗藥性等等的問題。因此，隨著永續發展意識的抬頭，開發出可以有效防治這些土傳性病害發生且對栽培環境友善的新技術是相當重要的研究課題。

貳、目的

目前用於農作物疾病管控的方法有遺傳育種、化學防治、物理防治與綜合病蟲害管理等。除此之外，也出現了一些特殊的方法，例如非常引人注目的矽藻土防蟲機制，即是利用「物理性」的手法來進行，所謂物理性的手法是指利用矽藻土多尖刺的形貌，如圖一所示，當菌類或是軟體動物爬過其上時，因受到尖刺的物理性攻擊而受到創傷，進而達到無毒農藥且抗植物疾病的功效。而奈米技術是一新興的領域，在改善農業和相關領域上具有相當大的潛力，有助於永續農業的發展[3]。其中，奈米材料的合成和功能引起了研究方相當大的興趣，因為它們在宏觀下具有良好的特性，而在微觀的系統中又擁有與宏觀迥異的潛在性質，可應用於不同的領域。目前也已有一些研究顯示出奈米結構材料(如納米顆粒 (NPs))可用於抑制病原體[4]。例如，在乾旱的環境下奈米鈦對小麥的生長有助益的效果，可抑制病原體對它的影響 [5]。此外，眾所周知的，奈米材料會與植物病原體的細胞壁結合，並透過高

能量的轉移導致其畸變，進而死亡[6]。現今全球正致力於減少有害化學農藥的殘留及對安全有機食品日益增長的需求，奈米材料因其獨特物理和化學特質，為現今植物保健提供新的角度，或許可以解決現今農業栽培所遭遇的瓶頸[7]。我們設想以「生物性農藥」取代化學性農藥的使用，「生物性農藥」是指由天然的物質，例如：動植物、微生物及其分泌的活性物質來達到病蟲害的防治效果，是種無毒、低殘留的高安全性新型農藥，也可避免抗藥性的產生。其中近年來新興的矽藻土防蟲機制非常引人注目。本研究將仿此機制，利用特定奈米無機物之尖銳的物理結構優勢，對蟲體或菌體造成破壞，達到降低植物病害之目的，此外，奈米無機物特殊的化學穩定性及環境抗性也可確保使用時的環境友善，同時達成降低病害與環境保護的雙重目的。



圖一、矽藻土的表面形貌。(來源:<https://ifun01.com/8BIRQFS.html>)

在不同的奈米無機材料中，金屬氧化物由於其無毒、穩定和特殊的性質而被充分的研究。各種奈米結構材料如 SiO_2 ， TiO_2 ， ZnO ， Fe_2O_3 ， Ag_2O ， CaO ， MgO ，和 CuO 等已被用來作為抗微生物的試劑，而這些材料的抗微生物活性主要和其尺寸、組成，結晶度和形態有關[8]。在這幾種抗微生物的材料中，二氧化鈦(TiO_2)和氧化鋅(ZnO)已被廣泛的研究[9]。然而，二氧化鈦雖然可以有效抗菌，但其具有毒性且容易殘留於土壤中，若施用於農業環境中，則會加重土壤系統的負擔及危害，因此本研究選擇以氧化鋅來進行環境友善抗菌。氧化鋅之最特別的抗菌活性是它具有產生活性氧 (ROS) 的能力，如過氧化氫等[10]。活性氧的

生成會提高細胞膜的通透性，使得奈米氧化鋅更容易被生物細胞吸收，並在細胞中內化，造成微生物細胞之破壞。除此之外，奈米氧化鋅也已被證實對人體的細胞沒有毒性[11]，在農業中甚至可以作為植物生長增強劑，促進植物吸收重要元素與微量元素[12]，而它也被美國食品藥品監督管理局（FDA, U.S. Food and Drug Administration）列為公認安全材料（GRAS, General recognized as safe）。總而言之，奈米氧化鋅的特殊性質及食用安全特色，或許在永續發展農業中可做為理想的殺菌劑。

氧化鋅的纖鋅礦結構中具有六方單位晶胞，其兩個晶格參數 $a = 3.250 \text{ \AA}$ ， $c = 5.207 \text{ \AA}$ ，屬於空間群 P63mc13。氧化鋅為一先進材料，除了因為具有寬帶隙($\sim 3.37 \text{ eV}$)及大的激活能($\sim 60 \text{ meV}$)而可作為 II-VI 型半導體之外，另一個重要特點為它的型態多樣性[14]。氧化鋅是所有已知材料中具有最多結構集合的其中一種，可分為一、二、三和零維結構，像是一維結構的奈米棒狀、奈米針狀和奈米帶狀；二維結構的奈米片狀[15]；三維結構的多分支花狀、雪花狀、奈米籠狀；和零維結構的奈米顆粒狀、奈米粉末等。

目前已有多種方法來合成奈米結構的氧化鋅，例如在氣體中的鋅粉熱蒸發、化學氣相沉積法、電化學沉積技術，和濺射沉積技術等[15、16]。然而，這些方法都需要嚴格的反應條件，例如高真空的維持、載氣使用的必要性、複雜的合成操作、催化劑的使用，以及無法控制的殘留物等。為了試圖避開上述所提及的問題，水熱法是製備各型態奈米氧化鋅的最理想方法[17]。與其他方法相比，水熱法具有許多優點，如操作簡單、控制容易、溫和的反應條件、低成本，和環保等。因此，在這項研究中，我們使用水熱法沉澱合成出各種奈米結構的氧化鋅，包含一維的奈米棒狀，二維的奈米片狀和三維的多分支花狀顆粒，並透過調控水熱沉澱反應的時間來獲得所需的形態。接著進行掃描式電子顯微鏡（SEM）和 X 光繞射分析（XRD）來觀察判定它們的型態特徵和晶體結構。此外，為了評估在農業中此環保友善抗菌劑的潛力，我們也將以製備出的奈米氧化鋅與市面上所購得的零維奈米顆粒狀氧化鋅來進行一個抗菌性能的比較。而為了更進一步的了解抗菌的效果與型態結構的影響，零維至三維的各種奈米結構將被使用於五種不同的土傳病原菌，分別有西瓜蔓割病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum* (Fon))、番茄萎凋病菌(*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Fol))，胡瓜猝倒病菌(*Pythium aphanidermatum* (Pap))、薑軟腐病菌(*P. myriotylum* (Pmy))和番茄青枯病菌

(*Ralstonia solanacearum* (Rals))來進行測試。此外，也會進行氧化鋅光催化活性和環境耐性的測量，來確認其特殊的性質。在此研究中，我們將開發出一種低成本且具有環保性能的抗菌劑，以期能有效降低病蟲害對農業栽培的危害，因應與日俱增的安全糧食需求，同時也維護環境的生態，促進永續農業之發展。我們也將從實驗中了解到各型態氧化鋅的合成方法、生長機制、抗菌活性，和結構對抗菌的影響等，增進對奈米材料及氧化鋅領域的認識，便於後續研究之發展。

參、設備及器材

一、高壓水熱釜

合成不同結構之奈米氧化鋅的方法為水熱法，水熱法為一種在高溫、高壓條件下，以水為溶劑的非均相化學反應，可產生高純度的結晶陶瓷材料。此方法不需要嚴格的反應條件控制，以簡單的裝置、相對低的溫度就能完成，且低成本，還能大面積的沉積。此外，以水為溶劑對環境的污染將更少，可達到環境友善。同時，水熱法只須調控反應環境，就能很好的控制產物的多樣結構。水熱法所使用的器材為高壓水熱釜，如圖二所示，將配製好的氧化鋅前驅溶液放入白色的鐵氟龍內膽後，依序組裝水熱釜罐並且鎖緊，以確保其處於高壓的反應環境中。接著，將此水熱釜放入高溫烘箱中，便可達成水熱法所需之高溫高壓的環境，利於奈米氧化鋅之合成。



圖二、實驗器具，不鏽鋼外殼與鐵氟龍內膽。

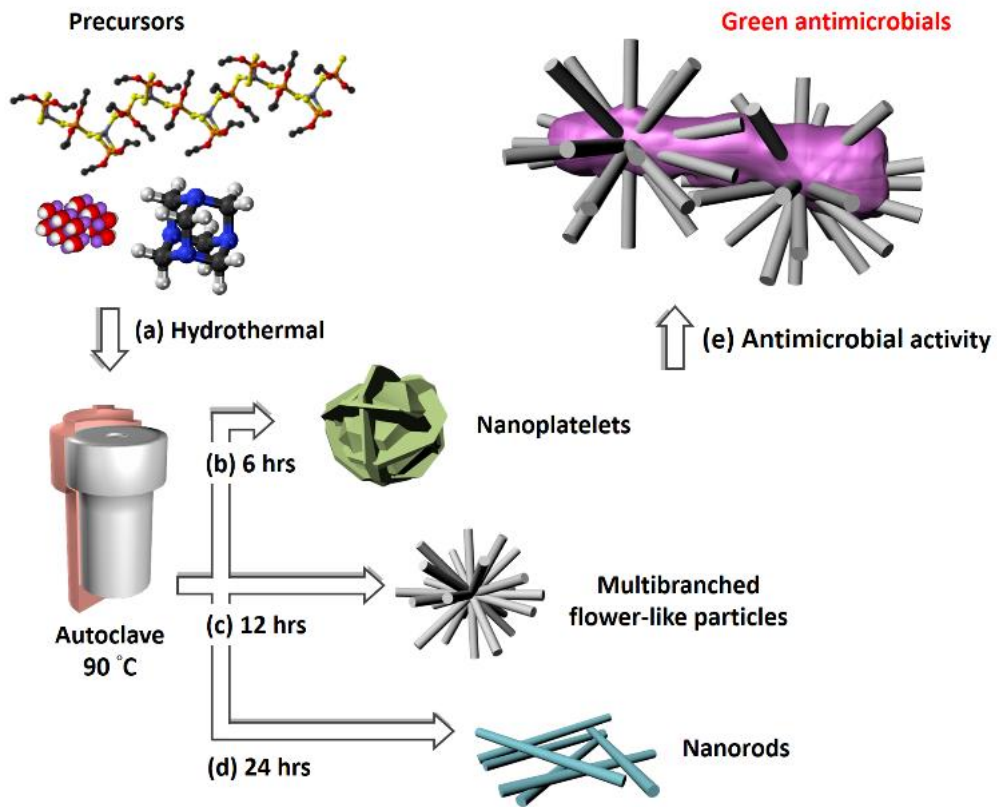
肆、研究方法與步驟

一、多型態奈米氧化鋅的合成與特性表徵

1. 奈米氧化鋅的合成

本研究以水熱法來合成奈米結構的氧化鋅粉末，其實驗流程簡圖如圖三所示。首先，秤量藥品醋酸鋅 $[Zn(CH_3COOH)_2]$ (0.1 g)、六亞甲基四胺 $[C_6H_{12}N_4: HMT]$ (0.1g)，和濃度 2M 的氫氧化鈉水溶液(10 ml)，並在去離子水(DI 水)中混和形成 30ml 的溶液，pH 值約為 12.5。接著，將製備好的溶液轉移到 45ml 的高壓水熱釜中，在 $90^\circ C$ 下分別加熱 6 小時，12 小時和 24 小時來進行水熱反應，以獲得不同的奈米結構氧化鋅，分別為奈米片狀，多分支花狀顆粒和奈米棒狀。反應完成後，將其冷卻至室溫，再以孔徑為 450 nm 的鐵氟龍過濾膜過濾出白色沉澱物，並用去離子水和乙醇交替洗滌數次，以除去殘留在最終產物中的鋅離子。最後，將過濾出的沉澱物在 $60^\circ C$ 烘箱中進一步乾燥 12 小時，以去除所有有機殘留物和表面污染物。此外，用來作為對照組的氧化鋅奈米顆粒，是購自於 BAKER ANALYZED，無須其他進一步

的純化即可使用。此實驗中使用的所有化學藥品皆為分析試劑等級，皆無需經其他處理即可按原樣使用。



圖三、實驗流程簡圖

2. 奈米氧化鋅的特性表徵

我們使用場發射掃描式電子顯微鏡 (FE-SEM) (JEOL JSM-6700F)，並以 1.5~3 keV 的加速電壓來觀察所製備之氧化鋅粉末的表面型態。接著，為了進一步觀察奈米氧化鋅的結晶型態，我們以其粉末進行了 X 射線繞射分析實驗 (XRD，使用 Philips 3710W 的 X 射線繞射儀)，以 $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.1542\text{nm}$) 來觀察其晶體結構。其中的工作電壓和電流分別為 40kV 和 100mA，掃描的 2θ 角在 20° 至 120° 之間，每次掃描的角度為 0.0334° ，而時間約為 100s。接著再由國際繞射數據中心 (ICDD) 數據庫所得之資料來比對繞射結果，確認其晶體結構(氧化鋅之卡號為 36-1451)。

二、多功能奈米氧化鋅的抗微生物性測試

供試的植物病原菌株由以下培養基保存生長，真菌病原 Fon 和 Fol 置於減糖 PDA 培養基上生長（馬鈴薯葡萄糖瓊脂 Potato dextrose agar，1L 培養基中含有 200g 馬鈴薯萃取物、10g 葡萄糖和 20g 瓊脂）；而卵菌病原 Pmy 和 Pap 在 V8 培養基上生長（1L 培養基中含有 200mL V8 汁，2g 碳酸鈣和 20g 瓊脂）；細菌病原則在 NA 培養基上生長（營養瓊脂，1L 培養基含有 5g 蛋白胨，3g 牛肉提取物，5g 氯化鈉和 20g 瓊脂）。接著，我們將真菌孢子、卵菌孢子和細菌置於含有各類奈米氧化鋅且最終濃度為 1, 10, 50, 100 ppm 的 96 孔培養盤中生長[37]，測試病原在具有氧化鋅之環境下的生長情況。在真菌生長抑制的試驗中，Fon 和 Fol 自生長七日的真菌收集其分生孢子；卵菌生長抑制的試驗則是將 Pmy 和 Pap 的菌絲浸入冷水中 12 小時以形成孢子囊，再置於室溫下 2 小時來誘發游動孢子的釋放。接著利用血細胞計數器來檢測 Fon、Fol、Pmy 和 Pap 孢子懸浮液的濃度，病原菌孢子的最終濃度為 10^4 spores mL⁻¹，並利用 96 孔微盤分光光度計紀錄在波長 595 nm 光密度下的吸光值變化量。而細菌病原 Rals 之抑制試驗方式為培養細菌於 96 孔培養盤中，且內含有不同濃度氧化鋅之 NB 培養液，並在培養後記錄每小時波長 595 nm 的吸光值變化量。接著，利用實驗所得之各吸光值變化曲線圖，來計算曲線下的面積，藉由公式：
$$\left(1 - \left(\frac{AUC(treatment)}{AUC(Control)}\right)\right) \times 100\%$$
（AUC 為生長曲線下的面積），推算出在不同濃度之奈米氧化鋅的處理下，其對不同病原菌的抑制率。

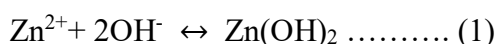
三、以 SEM 和 EDS 觀察 Fon 孢子上奈米氧化鋅之作用

利用掃描式電子顯微鏡（SEM）和能量色散 X-射線光譜（EDS）來觀察 Fon 和奈米氧化鋅間的相互作用。觀察樣品的製備修改自 de Lucas-Gil 氏[35]之方法，將預觀測之 Fon 真菌孢子培養於含有各類奈米氧化鋅（100 ppm）的懸浮液中，培養一日後將 10 μL 的樣品取出且置於矽基板上，並在抽風櫃中風乾殘餘液體。製備完成後，利用場發射掃描式電子顯微鏡（FE-SEM）（JEOL JSM-6700F）來觀察其作用情況。而為了進一步確定 Fon 和奈米氧化鋅間的相互作用，培養處理後的樣品也將通過 EDS 的分析，碳元素的分佈可代表 Fon 細胞，而鋅元素之分佈則代表奈米氧化鋅。

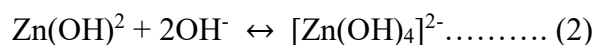
伍、結果與討論

一、不同結構之奈米氧化鋅的合成與鑑定

為了研究氧化鋅奈米結構的型態演變，我們進行了以時間為變數的實驗。在整個水熱過程中，氧化鋅的成長單元是 $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ 。事實上，奈米結構氧化鋅的生長機制與較大的氧化鋅晶體成長是相似的，其化學反應如下所示：



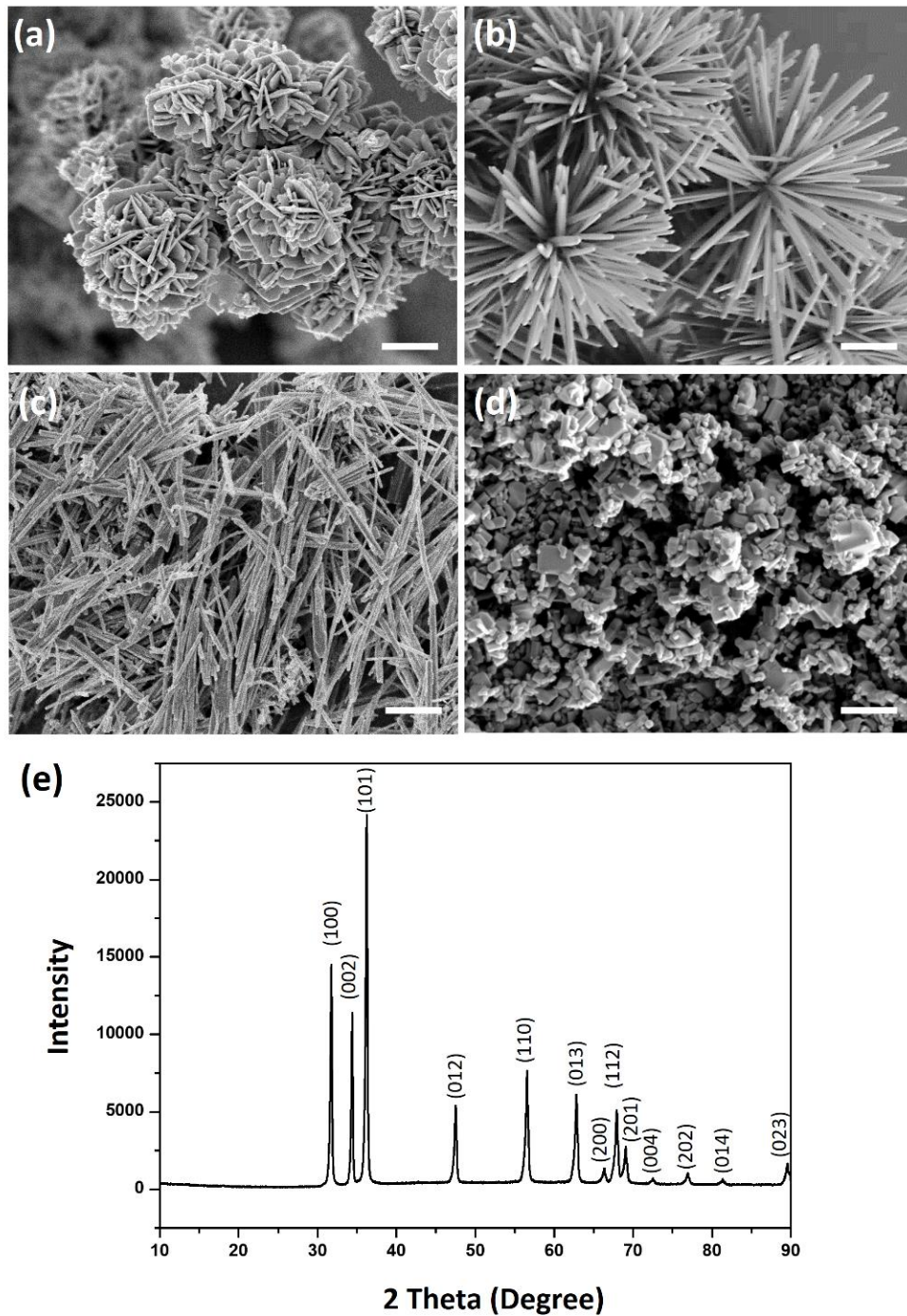
在這個合成系統中，HMT ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$) 和 NaOH 在水溶液中提供氫氧根離子(OH^-)，而醋酸鋅提供鋅離子(Zn^{2+})，在與鋅離子的濃度相比之下，氫氧根離子相對豐富，所以新製備成的 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 很容易就會通過以下的反應機制轉化成 $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ 。



在上述反應(2)中得到的 $[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$ 是新的成長前驅物，而在反應(1)中獲得的 $\text{Zn}(\text{OH})_2$ 是核種。因此在水溶液環境下進行成長時，核種的各活性位點會發生氧化鋅的異向性成長，最後成長為不同結構的奈米級氧化鋅。在此，氧化鋅前驅物的濃度和 pH 值分別保持在約 0.6 M 和 12.5，在整個水熱過程中沒有改變。透過控制在該條件下的加熱沉澱時間（即生長時間），即可合成各種不同奈米結構的氧化鋅。如圖四(a)所示，奈米片狀的氧化鋅可在 90°C 加熱 6 小時後製成，其是由許多片狀的板聚集而成的，呈現出一複雜的球狀，其直徑約為 5 μm ，平均厚度約為 150 nm。而當加熱時間延長至 12 小時，一些片狀板演變成棒狀的形式，同時，整個團聚體變成多分支的花狀顆粒，如圖四(b)所示，花狀顆粒的每個分支長約 2.5-3.0 μm ，基部直徑約為 100-150 nm，且每個花狀顆粒的平均寬度約為 6.0-8.0 μm 。當在更長的加熱沉澱時間下（例如 24 小時），則可以形成直徑約 200 nm 的奈米棒狀氧化鋅，如圖四(c)所示，可以觀察到花狀顆粒的分支向心生長，形成了一徑向的線狀聚集，且這些過度生長的分支會各自分，形成一奈米棒狀的氧化鋅團聚體。而如圖四(d)所示，由市面上所購得來進行比較的奈米氧化鋅為顆粒狀，其直徑約 150 nm。接著，我們對奈米氧化鋅進行 XRD 分析，以觀察其結晶型態。圖四(e)所示為所合成之花狀顆粒氧化鋅的 XRD 峰值圖，其中所有的繞射峰都指示氧化鋅為六方晶系的結構，且晶格常數 $a = 3.2533 \text{ \AA}$ ， c

=5.0273Å。各繞射峰則對應於晶面 (100)，(002)，(101)，(012)，(110)，(013)，(200)，(112)，(201)，(004)，(202)，(014)和(023)，且沒有其他雜質峰值出現。

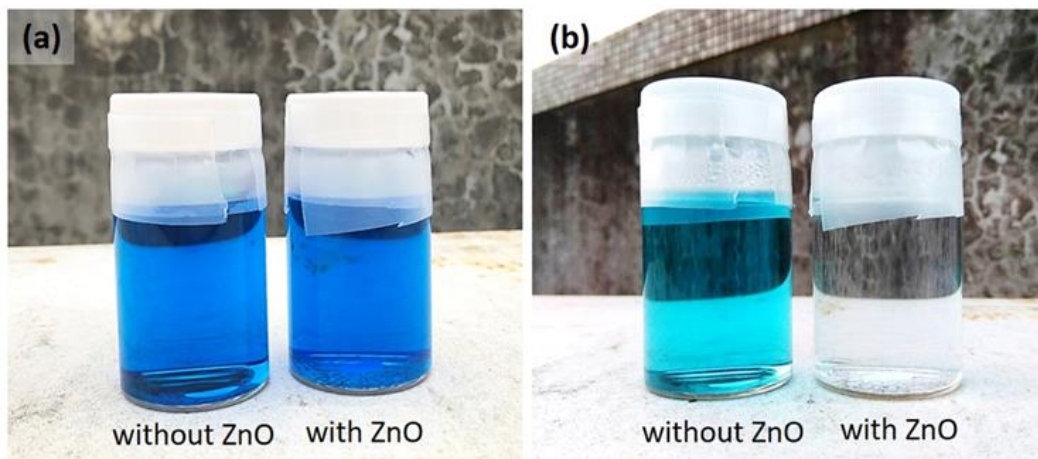
眾所周知的，奈米結構的氧化鋅具有不均勻的表面紋理、尖端和粗糙的角部等表面特徵，使其在與塊材相比之下具有較明顯的磨蝕性，對微生物的細胞壁或細胞膜可以造成較大的機械損傷。此外，棒狀結構的氧化鋅具有 (111) 和 (100) 面，球形的奈米顆粒則主要是 (100) 面，而因 (111) 面具有較高的原子堆積密度，所以會表現出較高的抗菌活性。由此可知，不同型態的奈米氧化鋅會具有不同的活性面，抗菌活性也不同，但在與零維的奈米顆粒狀相比之下，其他維度結構的氧化鋅都擁有較強的抗菌活性。



圖四、奈米氧化鋅型態演變之 FE-SEM 圖。在 90°C 下，分別水熱沉澱 (a) 6 小時，(b) 12 小時，(c) 24 小時，形成了奈米片狀，多分支花狀顆粒和奈米棒狀的氧化鋅，(d) 為市面上所購得之顆粒狀奈米氧化鋅，圖中比例尺皆為 1 μm 。(e) 為合成之多分支花狀顆粒氧化鋅的 XRD 繞射峰值圖。

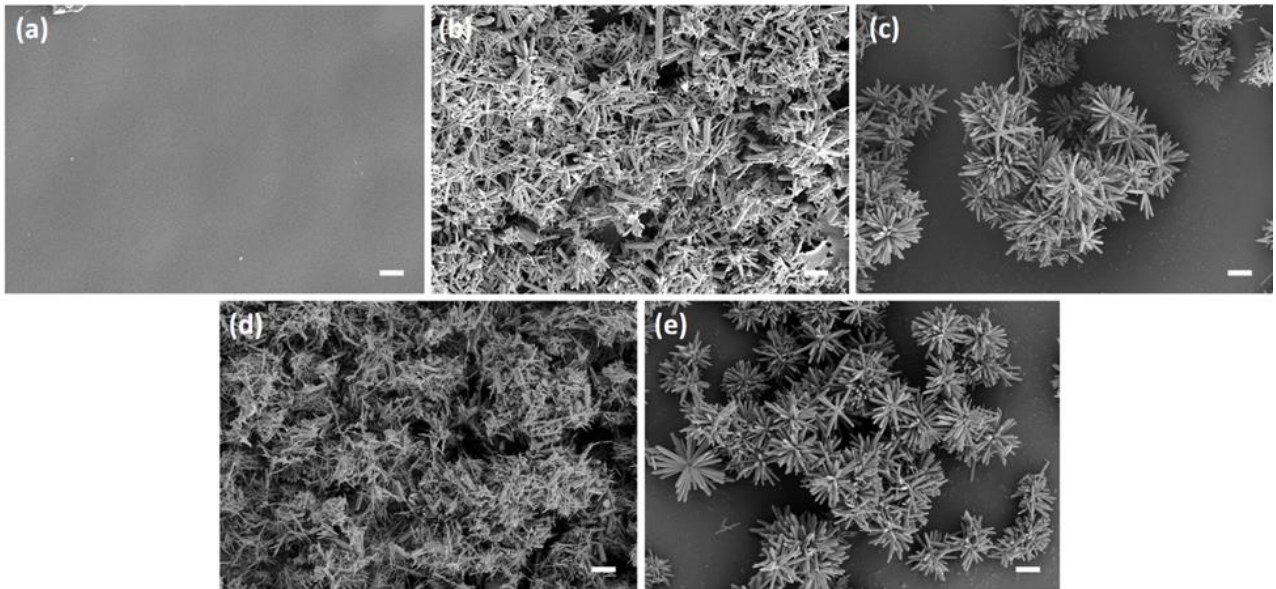
二、多分支花狀奈米氧化鋅的光降解特性和環境耐性

除了獨特的抗細菌和抗真菌特性外，奈米氧化鋅還具有高催化性和高光化學活性。在過去的十年中，有機化學廢料對土壤系統的污染造成了越來越嚴重的環境威脅，且由於它們的毒性，動物和人類在食用這些由污染土壤所生長出的植被後，也會面臨食品安全上的問題。而氧化鋅因為具有寬的能帶隙、高的光吸收度(UVA 和 UVB 區段)，和產生高氧化力電洞的特性[24, 25]，使其在以外線的照射下能夠降解環境的有機污染物，並將其完全礦化。因此，氧化鋅是一理想的光催化材料，有利於抗菌反應的進行。而為了進一步確認其光催化的特性，我們以多分支花狀的奈米氧化鋅進行光催化實驗，觀察在自然光照下亞甲藍被降解的過程，模擬其在土壤中的光降解能力。首先，如圖五(a)所示，製備兩瓶在封閉環境中初始濃度為 10 mg/L 的亞甲藍水溶液，其中右側溶液含有花狀顆粒的奈米氧化鋅作為光催化劑（催化劑負載量為 0.5 g/L），而左側的溶液為對照組。在經太陽光照射一天後，結果如圖五(b)所示，很明顯的可以觀察到右側瓶中的亞甲藍被氧化鋅分解，顏色由藍色轉為透明；相反的，左側瓶仍保持藍色，也就是說瓶內還存有著亞甲藍染料分子沒有被分解。由此可知，多分支的花狀顆粒氧化鋅在日常的光照下對有機化學物質有著顯著的光降解能力，如此一來，當氧化鋅被釋放到土壤中進行抗菌時，它可以同時發揮其光降解特性，分解土壤中的有機化學物質，降低土壤系統中的汙染。



圖五、在自然光照射下，沒有(左側)/具有(右側)多分支花狀顆粒氧化鋅的亞甲藍水溶液之光降解過程：(a) 照射陽光前，(b) 照射陽光一天後。

然而要作為一使用於天然土壤中的環保友善殺菌劑，氧化鋅的殘留物會不會對環境穩定性和公眾健康造成影響，將會是一個很重要且應該被高度關注的議題。我們測試了多分支花狀氧化鋅的環境耐性，以了解奈米氧化鋅在土壤中的穩定性和殘留情況。首先，將樣品分別浸入不同的溶劑中一週，這些溶劑分別為具有不同 pH 值的水溶液(pH = 3, 5, 9, 11)和常用的工業有機溶劑（甲苯）。結果如圖六(a)所示，氧化鋅在強酸溶液中（pH 值=3）會完全被分解且沒有殘留，在 SEM 下只觀察到光滑的矽基材；而在 pH 值為 5 的溶液中，花狀顆粒氧化鋅的核被破壞，只剩下其分支，並形成棒狀和線性的結構（圖六(b)）。若當氧化鋅被浸泡在略鹼的溶液中（pH 值=9），如圖六(c)所示，其多分支的花狀顆粒可以保持結構不變形。然而，在 pH 值為 11 的環境下，多分支花狀的型態會被破壞，形成棒狀分支的團聚體，此與浸泡在 pH 值為 5 之溶液中的氧化鋅有相似的分解情況（圖六(d)），這顯示了氧化鋅在強鹼溶液中的不穩定性。此外，氧化鋅在有機溶劑中相當穩定(如甲苯)，它們的型態保留完整，如圖六(e)所示，為花狀顆粒結構。因此，我們可以總結奈米氧化鋅在強酸和強鹼性的環境下會分解，而在微鹼性及有機溶劑的環境中可以保持其結構。值得注意的是，近年來地球上高達 70% 區域的土壤為酸性，其中甚至有 33% 的土壤 pH 值低於 5，在這樣酸性特徵的土壤環境下，氧化鋅應會逐漸的被分解，因此，我們不必擔心奈米氧化鋅的殘留污染問題，而這也恰恰符合此專題之目標，以奈米氧化鋅進行環境友善的農業植株抗菌。



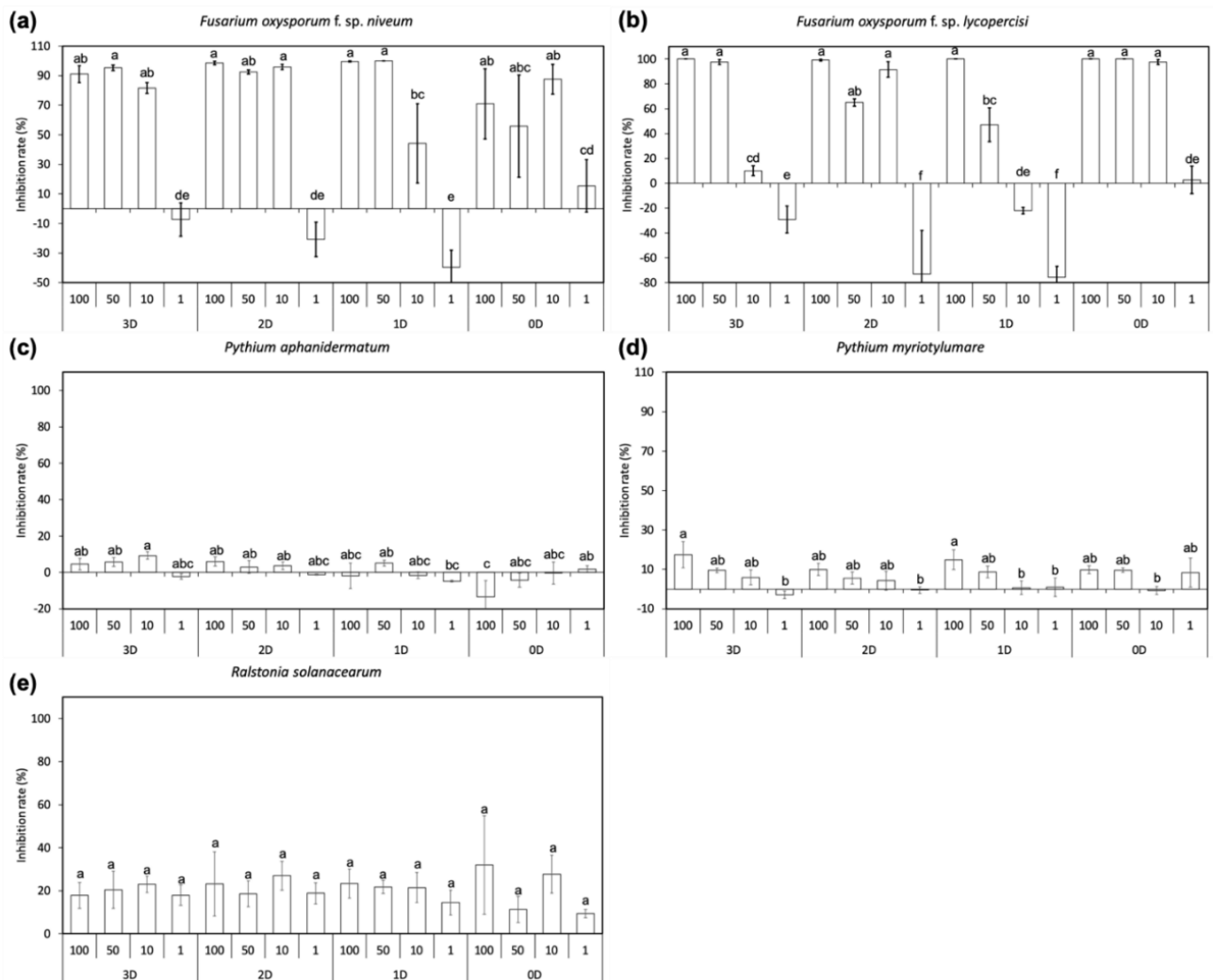
圖六、將多分支花狀的奈米氧化鋅浸入 pH 值為 (a) 3, (b) 5, (c) 9, (d) 11 的水溶液, 以及(e)常見的工業有機溶劑(甲苯)中一週後的 SEM 圖像。比例尺為 2 μ m。

三、三維多分支花狀顆粒氧化鋅的抗真菌特性

據文獻得知, 奈米氧化鋅對幾種人體的細菌病原體和植株病原體具有抗菌活性[27,28], 因此, 奈米氧化鋅對土傳病原體所能展現出的抗菌活性是非常值得研究的。我們透過 96 孔培養盤來測定抗微生物活性, 其中以不同濃度的奈米氧化鋅和五種土傳病原體來進行分析。實驗結果如圖七所繪製, 呈現出不同濃度的奈米氧化鋅對植株病原體的抑制率。由圖七可知, 真菌病原體 Fon (圖七(a)) 和 Fol (圖七(b)) 對大多數的奈米氧化鋅都較為敏感, 有較高的抑制率, 其次是細菌 Rals (圖七(e)), 最後則是兩種卵菌 (圖七(c)和(d))。此外, 一到三維的奈米氧化鋅在 1ppm 的濃度下對 Fon 和 Fol 都沒有抑制效果, 反而促進了它們的生長。在圖七(a)中也可觀察到, 當濃度高於 10 ppm 時, 所有的奈米氧化鋅均顯示出對 Fon 的抑制作用。至於零維奈米氧化鋅的抑制作用, 與其他結構相比之下是較不穩定的, 但從實驗中發現到一有趣的現象, 即是當使用濃度高於 10 ppm 的零維奈米氧化鋅抑制 Fol 時, 竟然顯示出高於其他種結構的抑制率。而除了抑菌效果的觀察外, 我們還發現當使用濃度為 1 ppm 和 10 ppm 的一、二維奈米氧化鋅及 1ppm 的三維奈米氧化鋅處理時, 不但沒有抑制病原菌的效果, 反而促進了它們的生長。

抑菌實驗證明了三維的奈米氧化鋅具有顯著的抗微生物活性，但由於奈米材料特殊的化學和機械性質，其抗微生物活性會受到尺寸及結構的影響。例如在先前的研究中已發現，鈇奈米粒子對大腸桿菌和金黃色葡萄球菌的抗菌活性會受到尺寸的影響[29]，而氧化鋅也有相同的情況，當對大腸桿菌和金黃色葡萄球菌進行抗菌時，會因不同的大小和型態而呈現不同的抗菌活性[20]，也就是說，不同的奈米結構確實會影響其抗菌的活性。在此實驗結果中顯示，三維結構的氧化鋅對 Fon 有很穩定的抑制效果，而與它相比之下，零維氧化鋅的抑制作用則較不穩定。由此可知，三維結構的奈米氧化鋅具有較穩定的奈米顆粒特性，能較穩定的進行抗菌，而這是在奈米氧化鋅的研究中首次發現的。

從文獻中我們已知奈米氧化鋅可以抑制幾種細菌的病原體，且對真菌病原體也有抑制的效果，但其抗真菌的機制尚不清楚。在此次的研究中，我們發現真菌病原體對所有的奈米氧化鋅皆敏感，皆會被抑制，且和細菌及卵菌病原體相較下，真菌被抑制的效果是更強的。然而，不同病原體的抑制率差異，可能導因於病原體本身的尺寸差異。一般來說，真菌的孢子大小約為 $32-56 \times 3.1-5.7 \mu\text{m}$ ，大於卵菌（ $12-22 \mu\text{m}$ ）和細菌細胞（ $0.5-0.7 \times 1.5-2.0 \mu\text{m}$ ）的孢子[30, 31]。因此我們推測，由於尺寸上的差異，真菌孢子與氧化鋅有較多的接觸，從而增加其抗菌活性。



圖七、經連續濃度氧化鋅處理之不同病原體的抑制率。

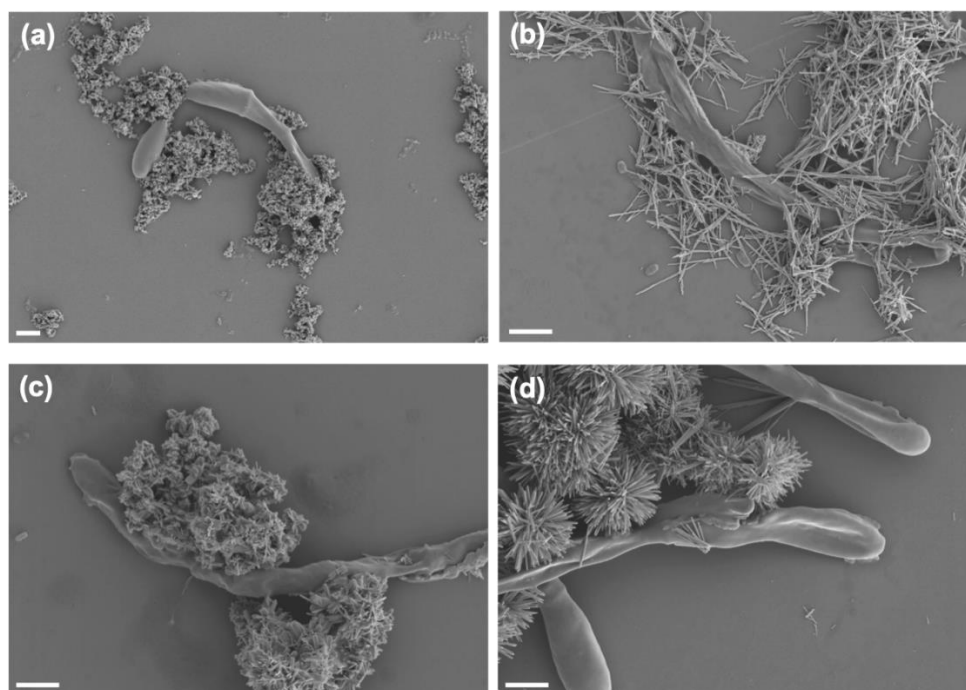
將五種土傳病原體(a: *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, b: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, c: *Pythium aphanidermatum*, d: *P. myriotylum* and e: *Ralstonia solanacearum*)在含有不同種類及濃度 (100, 50, 10 和 1ppm) 的奈米氧化鋅溶液中培養。病原體的抑制率計算如公式：
$$\left(1 - \frac{AUC(\text{實驗組})}{AUC(\text{對照組})}\right) \times 100\%$$
，其中 AUC 代表 OD₅₉₅ 變化曲線下的面積。誤差線為重複三次實驗後的標準誤差。

四、多功能奈米氧化鋅使 Fon 細胞變形之應用

在先前的實驗結果中發現，Fon 對奈米氧化鋅是較為敏感的，因此，進一步的透過掃描式電子顯微鏡 (SEM) 來觀察 Fon 和奈米氧化鋅間的交互作用。在經奈米氧化鋅處理後，

Fon 孢子和其發芽管有明顯的皺縮現象 (圖八(a)-(d))，此外也觀察到奈米氧化鋅聚集並附著在 Fon 細胞的表面上，如在圖八(b)中，一維的奈米氧化鋅覆蓋了整個菌絲體。另外，在與正常光滑的 Fon 細胞相比下，可發現經奈米氧化鋅處理後，其表面呈現粗糙顆粒狀的情況。

奈米氧化鋅的抑菌機制可分為三種。第一種，由於其尺寸小，奈米氧化鋅可以很容易的被吸收並內化在細胞中，導致細胞受到機械性的損傷或化學毒性的傷害[9]。第二種，奈米材料往往會增加活性氧的生成[32]，而活性氧對細胞有毒性作用，甚至在某些情況下會引發細胞的死亡，例如從先前的研究得知，奈米氧化鋅可以產生多種的活性氧，並藉由其毒性抑制了酵母白色念珠菌[34]。在本次的實驗結果中，經氧化鋅處理後的 Fon 細胞有外部的變化，由此可推論其抑制作用可能是因為活性氧的生成而導致的。至於最後一種，即是因為奈米材料具有多種不同的結構，而這些型態上的差異會影響其抑制微生物生長的能力。如在實驗中我們發現三維的奈米氧化鋅在 Fon 細胞表面上造成了一些刺穿的痕跡，而這是因其具有特殊的結構才能造成的機械損傷，表明了它對 Fon 細胞具有比其他結構更穩定的抑制效果。

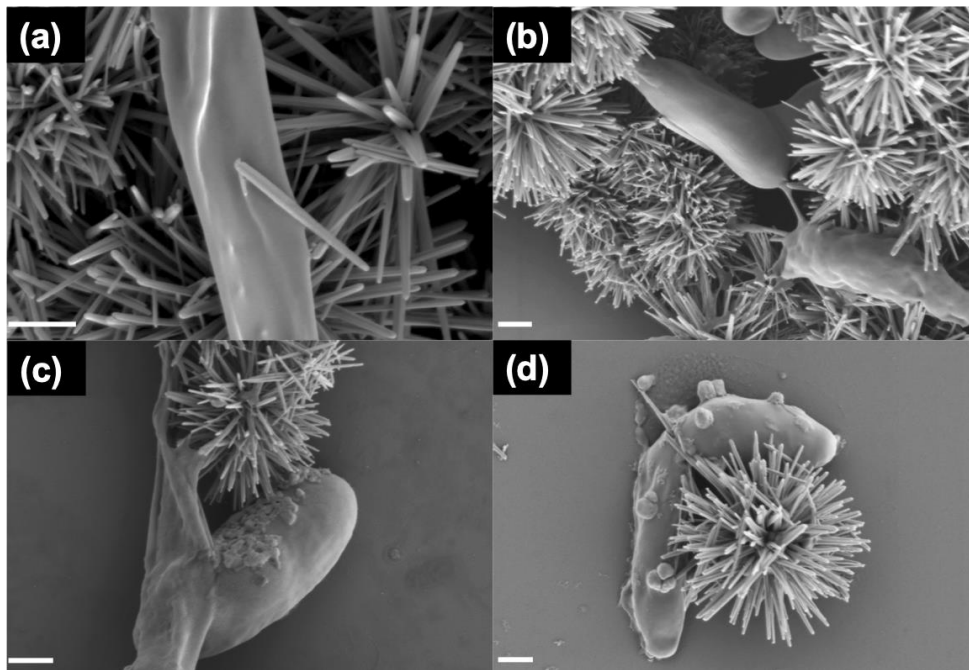


圖八、以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察在經過 (a) 零維，(b) 一維，(c) 二維及 (d) 三維的奈米氧化鋅處理後，*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 孢子的外部形變，比例尺為 2 μ m。

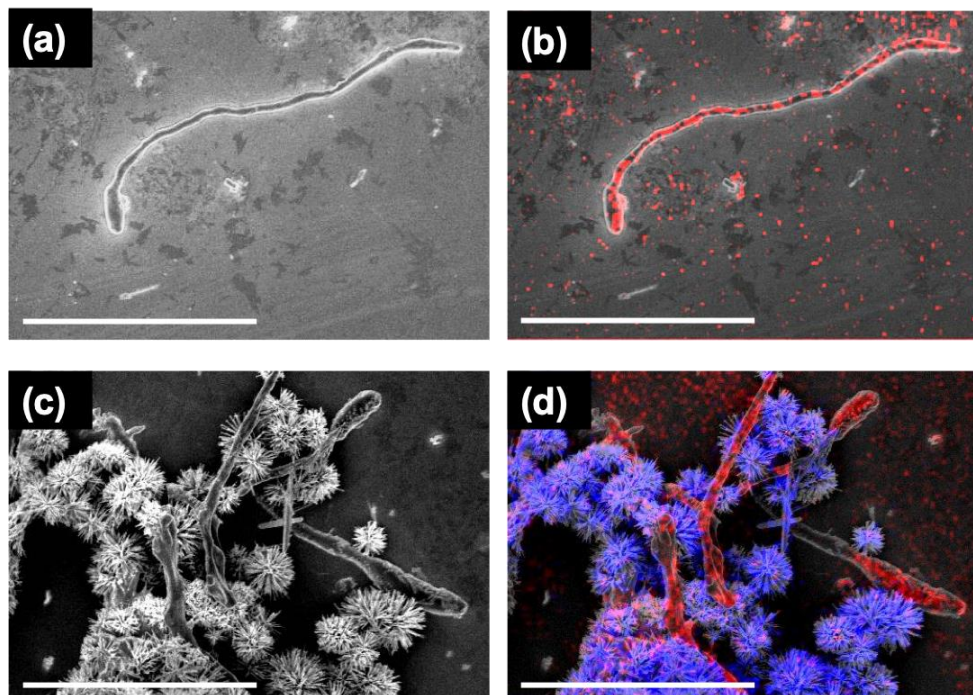
五、三維多分支花狀奈米氧化鋅在 Fon 細胞上顯著的機械作用

由於多分支花狀顆粒的奈米氧化鋅對 Fon 有顯著的抑制效果，因此我們透過掃描式電子顯微鏡進一步的觀察了兩者間的交互作用，如圖九所示。在圖九中我們發現到經此奈米氧化鋅處理後的 Fon 細胞，在表面上出現了明顯的凹洞和尖端，在圖九(a)中還可以觀察到塌陷的 Fon 菌絲體有被刺穿透過的痕跡，此證實了三維的奈米氧化鋅會穿透 Fon 細胞（圖九(b)），並造成其細胞表面粗糙的情況（圖九(c)）。此外，我們還觀察到了三維奈米氧化鋅切穿 Fon 細胞，並破壞了其細胞能力的現象（圖九(d)）。接著，我們利用能量色散 X 射線光譜（EDS）來進一步的觀察三維奈米氧化鋅的穿透現象，如圖十所示，以碳元素（代表 Fon 細胞）和鋅元素（代表三維奈米氧化鋅）來識別。在圖十(d)中我們除了可以直接觀察到氧化鋅有穿透 Fon 細胞的情形，更發現了部分的氧化鋅上有碳的紅色信號點出現，為一更有力的證據，可證實 Fon 細胞被三維奈米氧化鋅穿透的現象。

微生物抗藥性（AMR）是現今衛生醫療和農業生技上的重要議題，目前已確立了幾種 AMR 的機制，包含了抗微生物劑標靶的改變或過表達，抗微生物劑轉運蛋白的促進調控，以及增強對逆境的耐受性等[36]。抗微生物劑的選汰壓力會增加病原體 AMR 的發生。因此，在抗微生物藥劑的研發上傾向於增加抗微生物劑作用模式，利用多樣的作用模式來避免 AMR 的發生。本研究結果顯示三維奈米氧化鋅的抗微生物活性比其他種類的氧化鋅更穩定，除了會造成細胞型態的改變外，也在 Fon 細胞表面上發現了額外的機械損傷，由此可知，三維的多分支花狀顆粒奈米氧化鋅具有多種的殺菌作用模式，能控制土傳的病原菌。未來也將會在 Fon 病土中使用此奈米氧化鋅，進一步確立其在防治土傳性植株病害的潛力。



圖九、以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察經三維奈米氧化鋅處理後的 *Fusarium oxysporum* f. *sp. niveum* 孢子。(a)為 Fon 細胞被刺穿；(b)為氧化鋅的聚集現象；(c)為與氧化鋅接觸後，Fon 細胞表面粗糙的現象；(d)為三維氧化鋅切割 Fon 細胞，將其分成兩部分。圖中比例尺皆為 $1\mu\text{m}$ 。



圖十、以能量色散 X 射線光譜 (EDS) 觀察經三維奈米氧化鋅處理後的 *Fusarium oxysporum* f. *sp. niveum* 孢子。(a)為 Fon 細胞的正常狀態。(c)為 Fon 細胞和三維奈米氧化鋅間的相互作用。(b)和(d)則分別是(a)和(c)對應的 EDS 疊圖，紅色代表碳元素，藍色則代表鋅元

素，其中碳元素代表真菌生物體，鋅元素代表三維的奈米氧化鋅。圖中比例尺為 6 μ m。

六、結論

儘管二氧化鈦已被廣泛的認知為對人體細胞具有良好生物相容性的代表性材料，但在自然界中氧化鋅比二氧化鈦更容易被分解，於土壤中的殘留污染也較少，因此更適合於農業中應用。其中，我們還發現了不同的奈米結構會有不同的抗菌活性表現，而三維多分支花狀顆粒的奈米氧化鋅具有最佳的抗真菌性和光催化活性，其結構上的優勢還可對土傳病原體造成額外的機械損傷，對抑菌效果有提升的作用，能更有效的達到環保抗菌之目的。如此一來，奈米材料技術於植物病害管控上的應用，將可有效的解決目前農業上所遇到的瓶頸與限制，並同時達成環境友善，此外，在食品加工以及其他方面的應用，也將會為各領域帶來一片創新且光明的前景，能以更先進的技術及科技背景來促進產業發展。

七、參考文獻

- (1) Katan, J. Diseases Caused by Soilborne Pathogens: Biology, Management and Challenges. *J. Plant Pathol.* **2017**, *99*, 305–315.
- (2) Dean, R.; van Kan, J. A. L.; Pretorius, Z. A.; KOSACK, K. E. H.; Pietro, A. D.; Pietro D SPANU; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; *et al.* The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414–430.
- (3) Servin, A. D.; White, J. C. Nanotechnology in Agriculture: Next Steps for Understanding Engineered Nanoparticle Exposure and Risk. *NanoImpact* **2016**, *1*, 9–12.
- (4) Servin, A.; Elmer, W.; Mukherjee, A.; La Torre-Roche, De, R.; Hamdi, H.; White, J. C.; Bindraban, P.; Dimkpa, C. A Review of the Use of Engineered Nanomaterials to Suppress Plant Disease and Enhance Crop Yield. *J. Nanopart. Res.* **2015**, *17*, 1–21.
- (5) Jaberzadeh, A.; Moaveni, P.; Tohidi Moghadam, H. R.; Zahedi, H. Influence of Bulk and Nanoparticles Titanium Foliar Application on Some Agronomic Traits, Seed Gluten and Starch Contents of Wheat Subjected to Water Deficit Stress. *Not. Bot. Horti Agrobot.* **2013**, *41*, 201–207.
- (6) Seil, J. T.; Webster, T. J. Antimicrobial Applications of Nanotechnology: Methods and Literature. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 2767–2781.
- (7) Parisi, C.; Vignani, M.; Rodríguez-Cerezo, E. Agricultural Nanotechnologies: What Are the Current Possibilities? *Nano Today* **2015**, *10*, 124–127.

- (8) Ram, P.; Vivek, K.; Kumar, S. P. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Present Concerns and Future Aspects. *Afr. J. Biotechnol.* **2014**, *13*, 705–713.
- (9) Sirelkhatim, A.; Mahmud, S.; Seeni, A.; Kaus, N. H. M.; Ann, L. C.; Bakhori, S. K. M.; Hasan, H.; Mohamad, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* **2015**, *7*, 1–24.
- (10) Zhang, H.; Chen, B.; Jiang, H.; Wang, C.; Wang, H.; Wang, X. A Strategy for ZnO Nanorod Mediated Multi-Mode Cancer Treatment. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1906–1914.
- (11) Colon, G.; Ward, B. C.; Webster, T. J. Increased Osteoblast and Decreased Staphylococcus Epidermidis Functions on Nanophase ZnO and TiO₂. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *78*, 595–604.
- (12) Milani, N.; McLaughlin, M. J.; Stacey, S. P.; Kirby, J. K.; Hettiarachchi, G. M.; Beak, D. G.; Cornelis, G. Dissolution Kinetics of Macronutrient Fertilizers Coated with Manufactured Zinc Oxide Nanoparticles. *J. Agric. Food. Chem.* **2012**, *60*, 3991–3998.
- (13) Zhang, J.; Sun, L.; Yin, J.; Su, H.; Liao, C.; Yan, C. Control of ZnO Morphology via a Simple Solution Route. *Chem. Mat.* *14*, 4172–4177.
- (14) Wang, Z. L. Nanostructures of Zinc Oxide. *Mater. Today* **2004**, *7*, 26–33.
- (15) Ali, A.; Phull, A.-R.; Zia, M. Elemental Zinc to Zinc Nanoparticles: Is ZnO NPs Crucial for Life? Synthesis, Toxicological, and Environmental Concerns. *Nanotechnology Rev.* **2018**, *7*, 413–441.
- (16) Amin, G.; Asif, M. H.; Zainelabdin, A.; Zaman, S.; Nur, O.; Willander, M. Influence of pH, Precursor Concentration, Growth Time, and Temperature on the Morphology of ZnO Nanostructures Grown by the Hydrothermal Method. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 1–9.
- (17) Wang, H.; Xie, J.; Yan, K.; Duan, M. Growth Mechanism of Different Morphologies of ZnO Crystals Prepared by Hydrothermal Method. *J. Mater. Sci. Technol.* **2011**, *27*, 153–158.
- (18) Stanković, A.; Dimitrijević, S.; Uskoković, D. Influence of Size Scale and Morphology on Antibacterial Properties of ZnO Powders Hydrothermally Synthesized Using Different Surface Stabilizing Agents. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2013**, *102*, 21–28.
- (19) Yang, H.; Liu, C.; Yang, D.; Zhang, H.; Xi, Z. Comparative Study of Cytotoxicity, Oxidative Stress and Genotoxicity Induced by Four Typical Nanomaterials: the Role of Particle Size, Shape and Composition. *J. Appl. Toxicol.* **2009**, *29*, 69–78.
- (20) Talebian, N.; Amininezhad, S. M.; Doudi, M. Controllable Synthesis of ZnO Nanoparticles and Their Morphology-Dependent Antibacterial and Optical Properties. *J. Photoch. Photobio. B* **2013**, *120*, 66–73.
- (21) Rajesh Kumar; Ahmad Umar; Girish Kumar; Nalwa, H. S. Antimicrobial Properties of ZnO Nanomaterials_ a Review. *Ceram. Int.* **2017**, *43*, 3940–3961.
- (22) Singh, A.; Singh, N. B.; Afzal, S.; Singh, T.; Hussain, I. Zinc Oxide Nanoparticles: a Review of Their Biological Synthesis, Antimicrobial Activity, Uptake, Translocation and Biotransformation in Plants. *J. Mater. Sci.* **2017**, *53*, 185–201.

- (23) He, L.; Liu, Y.; Mustapha, A.; Lin, M. Antifungal Activity of Zinc Oxide Nanoparticles Against *Botrytis Cinerea* And *Penicillium Expansum*. *Microbiol. Res.* **2011**, *166*, 207–215.
- (24) Han, J.; Qiu, W.; Gao, W. Potential Dissolution and Photo-Dissolution of ZnO Thin Films. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *178*, 115–122.
- (25) Hariharan, C. Photocatalytic Degradation of Organic Contaminants in Water by ZnO Nanoparticles: Revisited. *Catal. A-Gen.* **2006**, *304*, 55–61.
- (26) Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M. F.; Fiévet, F. Toxicological Impact Studies Based on EscherichiacoliBacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 866–870.
- (27) Jones, N.; Ray, B.; Ranjit, K. T.; Manna, A. C. Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle Suspensions on a Broad Spectrum of Microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *279*, 71–76.
- (28) Zabrieski, Z.; Morrell, E.; Hortin, J.; Dimkpa, C.; McLean, J.; Britt, D.; Anderson, A. Pesticidal Activity of Metal Oxide Nanoparticles on Plant Pathogenic Isolates of *Pythium*. *Ecotoxicology* **2015**, *24*, 1305–1314.
- (29) Adams, C. P.; Walker, K. A.; Obare, S. O.; Docherty, K. M. Size-Dependent Antimicrobial Effects of Novel Palladium Nanoparticles. *Plos one* **2014**, *9*, 1–12.
- (30) Paul, B.; Bala, K.; Gognies, S.; Belarbi, A. Morphological and Molecular Taxonomy of *Pythium Longisporangium* Sp. Nov. Isolated From the Burgundian Region of France. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *246*, 207–212.
- (31) *Compendium of Potato Diseases (APS Compendium of Plant Disease Series)*; Steveson, W. R.; Loria, R.; Franc, G. D.; Weingartner, D. P., Eds.; 2001.
- (32) Adams, L. K.; Lyon, D. Y.; Alvarez, P. J. J. Comparative Eco-Toxicity of Nanoscale TiO₂, SiO₂, And ZnO Water Suspensions. *Water Res.* **2006**, *40*, 3527–3532.
- (33) Ghosh, N.; Das, A.; Chaffee, S.; Roy, S.; Sen, C. K. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Cell Death. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease*; Elsevier Inc., 2017; pp. 43–56.
- (34) Lipovsky, A.; Nitzan, Y.; Gedanken, A.; Lubart, R. Antifungal Activity of ZnO Nanoparticles—the Role of ROS Mediated Cell Injury. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 105101–105106.
- (35) de Lucas-Gil, E.; Fernández, J. F.; Rubio-Marcos, F. One More Step Against Nanotoxicity: Hierarchical Particles Designed to Antifungal Properties. *Mater. Des.* **2017**, *134*, 188–195.
- (36) Revie, N. M.; Iyer, K. R.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 70–76.
- (37) Meletiadiis, J.; Dorsthorst, te, D. T. A.; Verweij, P. E. Use of Turbidimetric Growth Curves for Early Determination of Antifungal Drug Resistance of Filamentous Fungi. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4718–4725.