

纳米二氧化钛对果蝇肠道共生菌的影响

刘倩¹, 姜建辉², 吴瑛^{2,3}

(1. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆兵团南疆化工资源利用工程实验室, 新疆 阿拉尔 843300; 3. 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, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:采用纳米 TiO₂ 喂食果蝇进行体内和体外抑菌试验的方法, 分别在紫外光和自然光线下研究了纳米 TiO₂ 对肠道共生菌的影响。结果表明: 纳米 TiO₂ 能够在体外抑制果蝇肠道共生菌的生长, 随着抑菌剂的加入呈现上升趋势; 纳米 TiO₂ 在果蝇体内环境中对肠道共生菌没有影响。说明肠道可以为共生菌提供良好的生长环境, 能使共生菌免受纳米 TiO₂ 影响。

关键词: 纳米 TiO₂; 肠道共生菌; 果蝇

中图分类号: TQ134 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)09-0094-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2017.09.0094

纳米级 TiO₂ 是一种半导体光电转换材料, 广泛地用作阳极催化分解水、太阳能电池等光化学及光电子器件的功能材料。纳米 TiO₂ 特殊的表面效应、体积效应和尺寸效应, 决定了它具有独特的力学、热学、光学和磁性等性质。作为一种催化剂纳米 TiO₂ 具有持久性、广谱性、耐热性、不易产生耐药性、杀菌彻底等优点, 且无毒、无味、对皮肤无刺激。它能够通过破坏细胞壁、细菌膜等结构使细菌等微生物分解, 起到抑制甚至杀死微生物的作用^[1], 且能同时降解由细菌释放出的有毒复合物。在处理环境污染、杀菌、消毒方面已被视为最佳的半导体材料。其优良的光催化性能作为抗菌剂发展迅速, 多数抑菌研究主要针对有害病原菌在体外生长的抑制作用, 而对体内肠道共生菌的作用研究较少。

2002 年美国食品与药物管理局(FDA)正式认可 TiO₂ 用于食品添加剂^[2], 我国也做出了在固体饮料中可按照生产需要加入 TiO₂ (GB 25577-2010) 的批示。纳米 TiO₂ 相对于常规尺度的 TiO₂, 具有口感细滑、折光率高和白色度好等特点, 对绿脓杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等具

有很强的杀灭能力^[3-7]。因此在食品领域中的应用发展迅猛。除了作为添加剂外, 其可以屏蔽紫外光阻止肉类食品的自氧化, 防止因维生素和芳香化合物的破坏而造成食品营养价值流失及腐烂, 应用于食品保鲜包装领域。它能氧化分解室内和大气中的污染物, 并可杀灭空气中的病菌、病毒等微生物, 空气中游离的细菌可以降低 90% 以上, 实现涂料的自洁、抗菌、抗霉和净化空气等功能^[8-9]。纳米 TiO₂ 材料越来越广泛地应用于塑料工程、生物医学工程和食品加工等领域, 大大增加了人体与它接触的机会, 易随饮食、空气、水进入人体肠道。研究表明, 目前市售的食品级 TiO₂ 粉末中 36% 的颗粒粒径都处于纳米尺度^[10]。美国成人通过饮食摄入纳米 TiO₂ 的暴露量大约为 0.25 mg·(kg·d)⁻¹^[11]。纳米 TiO₂ 含量最高的食品是糖果、口香糖和巧克力等食品, 儿童成了纳米 TiO₂ 的高暴露人群^[12]。

人体肠道内共生着大量的肠道菌群, 这些正常的共生菌群在宿主能量与代谢平衡中发挥着重要作用, 一旦失调对宿主也能产生毒害作用, 影响宿主身体健康, 导致肥胖症和糖尿病, 甚至精神性疾病的产生^[13-16]。因此, 研究肠道共生微生物与宿主生理效应的关系变得尤为重要。本试验主要探究了纳米 TiO₂ 对模式生物果蝇肠道共生菌的作用, 果蝇肠道内共生的肠道菌相比较于哺乳类动物要简单且与其通路相同, 有利于试验的开展。

1 材料与方法

1.1 材料

纳米材料为纳米 TiO₂ (进口德固赛 P25); 试

收稿日期: 2017-06-01

基金项目: 兵团人才培养基金资助项目; 国家重点实验室资助项目 (oic-201601010); 新疆维吾尔自治区研究生科研创新资助项目 (XJGRI2014138)

第一作者简介: 刘倩 (1995-), 女, 四川省资阳市人, 在读硕士, 从事纳米材料制备和应用研究。E-mail: 1504661548@qq.com。

通讯作者: 吴瑛 (1968-), 女, 甘肃省天水市人, 学士, 教授, 从事纳米材料研究。E-mail: wuyingjuayan@163.com。

验动物选用黑腹果蝇 *D. melanogaster* 品系 *Oregon R* 作为试验材料。试剂主要有葡萄糖(分析纯)、琼脂(分析纯)、苯甲酸钠(分析纯)、酵母粉(食用)、庆大霉素(山西同达药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 共生菌选择性培养基的配制 醋酸菌(*Acetobacteria*)的液体培养基包含 25 g•(LD⁻¹)甘露糖醇、5 g•L⁻¹酵母提取物、3 g•L⁻¹蛋白胨;配制固体培养基时加入 15 g•L⁻¹琼脂。肠杆菌(*Enterobacteria*)的液体培养基成分为 10 g•L⁻¹胰蛋白胨、1.5 g•L⁻¹酵母提取物、10 g•L⁻¹葡萄糖、5 g•L⁻¹氯化钠;配制固体培养基时加入 12 g•L⁻¹琼脂。乳酸菌(*Lactobacilli*)的培养采用 70 g•L⁻¹ MRS 培养基(Sigma, 美国),其固体培养基中含有 12 g•L⁻¹琼脂。体外培养的肠道共生菌稀释 10 倍后涂平板,倒置于 30 ℃ 培养箱中培养。36~48 h 后,统计每个平板上的菌落数(CFU),根据平行 4 组样品的统计结果计算平均菌落数^[17]。

1.2.2 果蝇肠道共生菌的体外培养 取 4 只果蝇三龄幼虫,先用乙醚麻醉,75%酒精消毒 30 s, PBS 清洗 3 遍,于显微镜下用镊子取出果蝇完整肠道,放入含有 0.1 mL PBS 的 EP 管中,研磨匀浆。加入 0.9 mL PBS 混匀,取 50 μL 上述混匀液体加入新的含有 950 μL PBS 的 EP 管中稀释。

将 1.2.1 中的 3 种培养基按所需温度灭菌 2 h,待其温度冷却至 60 ℃ 时,将培养基中的培养液均匀倾倒在灭过菌的培养皿中,超净工作台紫外(365 nm, 120 W)照射过夜。再取 100 μL 上述混匀液体涂板在适合醋酸菌、乳酸菌生长的固体培养基上,于 30 ℃ 培养箱中倒置培养 14 h,肠杆菌培养基在 37 ℃ 培养箱下培养 24~36 h。统计每个平板上的菌落数(CFU),根据平行 4 组样品的统计结果计算平均菌落数。

将体外培养的果蝇肠道共生菌生长在对照固体培养基和 150 μg•mL⁻¹ 的硫酸庆大霉素固体培养基上,通过统计形成的共生菌的菌落数量衡量其生长状况。

1.2.3 共生菌的保存 用接种针在上述培养基中挑出一环新鲜的菌落,在平板固体培养基上使用三线法连续划线,倒置于恒温培养箱中 30 ℃ 培养 24 h。用灭菌竹签从划线平板上挑出单个菌落,置于 5 mL 液体培养基的试管中,置震荡培养箱中培养,培养一定时间,得到的菌液待用。用移液枪分别吸取 0.5 mL 含有菌落的液体培养基和

0.5 mL 的甘油(40%),将其混合在甘油管中,摇匀后,置于-20 ℃ 冰箱冷冻保存。

1.2.4 纳米 TiO₂在果蝇体内对肠道内共生菌影响

果蝇食物的配方参考文献[17],将纳米 TiO₂在食物凝结前加入,搅拌混合。使纳米 TiO₂的量达到与体外试验相同的浓度。饲养直至幼虫发育到三龄晚期,解剖取其肠道,研磨后用缓冲溶液定容至一定体积,取 0.1 mL 进行涂平板(在对应不同菌的培养基上)培养,统计每只果蝇肠道内 3 种共生菌的数量。

分别称取 0.01、0.03、0.06、0.09、0.12 g 的纳米二氧化钛材料于小锥形瓶中,在 121 ℃ 下灭菌 2 h,冷却至 60 ℃ 后取出,置于超净工作台上。向灭过菌并装有纳米材料的锥形瓶中加入 1 mL 无菌水,将其置于涡旋振荡器上摇匀 15 min。(小纸片厚不超过 4 mm)将菌液用灭过菌的枪头吸取 0.1 mL 置于培养皿上,并用涂布器将菌液均匀涂布,将浸染不同浓度的滤纸片平铺培养基上,每次试样贴放 1 个染菌平板,每个平板贴放 3 片试验样片,用无菌镊子取样片贴放于平板表面。各样片中心之间相距 25 mm 以上,与平板的周缘相距 15 mm 以上。贴放好后,用无菌镊子轻压样片,使其紧贴于平板表面。使用硫酸庆大霉素作为阳性对照。将平板分别置于紫外灯光下和自然光 2 h,用保鲜膜将其密封包好,在恒温培养箱培养。测量抑菌圈直径,计算抑菌圈大小,以此来考察二氧化钛在不同条件下的抑菌性能。

2 结果与分析

2.1 抗生素对果蝇肠道共生菌的影响

为了客观的比较纳米材料在体内与体外对肠道共生菌的影响,用硫酸庆大霉素作为阳性对照,结果见表 1。结果表明,庆大霉素的使用能够显著抑制醋酸菌的生长,同样条件下抗生素对肠杆菌的抑制作用不如对醋酸菌的作用强,但也具有

表 1 抗生素对肠道菌的体外抑制效果

Table 1 Inhibition effect of antibiotics on intestinal bacteria in vitro

处理 Treatments	菌落数 Colony number		
	醋酸菌 Acetobacter	肠杆菌 Enterobacteria	乳酸菌 Lactobacillus
CK	48	47	28
庆大霉素	19	34	12

明显的抑制效应。

2.2 纳米 TiO₂在体外对果蝇肠道共生菌生长的影响

由图 1、2、3 可知,通过对添加不同浓度纳米 TiO₂微粉的抑菌圈的测量,发现 TiO₂在紫外和自然光均表现出抑菌的性能,自然光试验条件抑菌效果高于紫外光照的效果。随着加入的纳米材料的增加,抑菌性能增加。

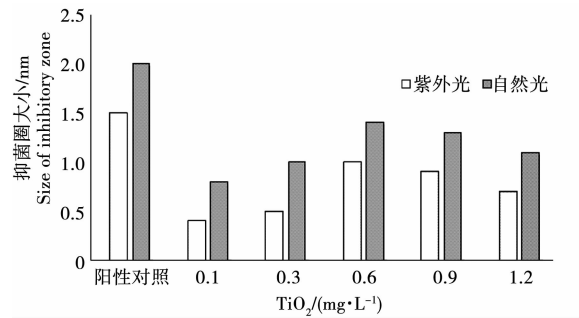


图 1 醋酸菌受 TiO₂加入量影响的抑菌圈大小
Fig. 1 Inhibitory zone size of Acetobacter affected by the amount of TiO₂ added

2.3 纳米 TiO₂在果蝇体内肠道内对共生菌生长的影响

由表 2 可知,相同剂量 TiO₂通过食物摄入果蝇体内后,对体内肠道共生菌无明显影响。因此,试验表明纳米材料在体内与体外有可能对肠道共

生菌产生不同的效应,TiO₂对肠道共生菌有抑菌作用,但肠道可为共生菌提供保护作用,免受外来纳米材料的影响,肠道共生菌可以为宿主提供有益的保护作用。

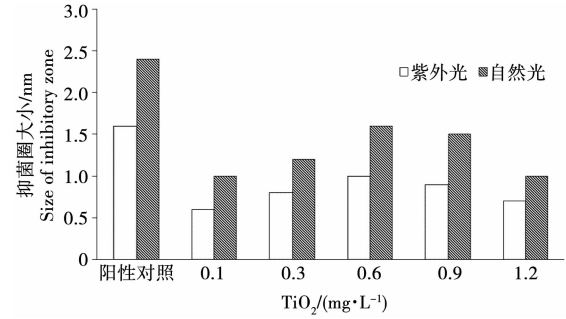


图 2 肠杆菌受 TiO₂加入量影响的抑菌圈大小
Fig. 2 The inhibitory zone size of Enterobacteria affected by the amount of TiO₂ added

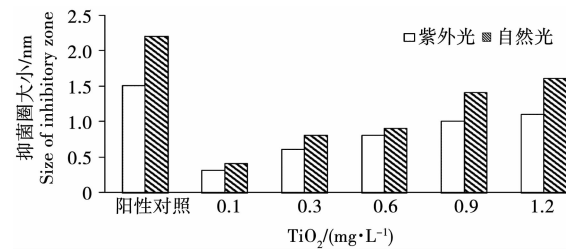


图 3 乳酸菌受 TiO₂加入量影响的抑菌圈大小
Fig. 3 Inhibitory zone size of Lactobacillus affected by the amount of TiO₂ added

表 2 纳米 TiO₂对果蝇肠道菌的体内抑制效果

Table 2 Inhibition effect of nano TiO ₂ on intestinal bacteria in <i>Drosophila melanogaster</i> in vivo							
肠道菌 Intestinal bacteria		菌落数 Colony nwumber					
		对照(CK)	0.1 mg·mL ⁻¹	0.3 mg·mL ⁻¹	0.6 mg·mL ⁻¹	0.9 mg·mL ⁻¹	1.2 mg·mL ⁻¹
醋酸菌	Acetobacter	46	43	46	47	46	46
肠杆菌	Enterobacteria	43	43	43	42	43	43
乳酸菌	Lactobacillus	33	33	34	30	31	31

3 结论

本试验中抗生素的使用能够明显抑制肠杆菌和醋酸菌的生长,同样条件下对肠杆菌的抑制作用虽不如对乳酸菌和醋酸菌的作用强,但也显示出明显的抑制效应。纳米 TiO₂在体外试验中表现出剂量依赖性的抑菌能力,能够抑制果蝇肠道共生菌的生长,其中乳酸菌表现的较为突出。在比较高的剂量(1.2 mg·L⁻¹)下抑菌性表现为:乳酸菌>醋酸菌>肠杆菌。同时在紫外和自然光均表现出抑菌的性能,自然光试验条件抑菌效果高于紫外光照的效果,即不受光照条件的影响。相

同剂量纳米 TiO₂对体内肠道共生菌无明显影响,果蝇肠道内环境能为肠道共生菌提供一定的保护作用。

肠道微生物与人体的营养、免疫、代谢等诸多生理功能紧密相关,在调节人体健康中起到重要作用^[18]。随着纳米 TiO₂的广泛应用,其对肠道菌影响还有待于进一步研究,如对肠道共生细菌组成和数量的影响,因为肠道菌群在维持人体健康稳态中起至关重要的作用,其主要依赖于菌种的多样性,菌群结构的稳定性和微生态的平衡性。这些研究可以为纳米 TiO₂材料的使用安全性提供参考依据。

参考文献:

- [1] Fujishima A, Rao T N, Tryk D A. Titanium dioxide photocatalysis[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology C Photochemistry Reviews, 2000, 1(1): 1-21.
- [2] 陈章健, 王云, 贾光. 纳米二氧化钛食品安全性研究进展[J]. 卫生研究, 2015, 44(6): 1036-1041.
- [3] Kayano Sunada, Yoshihiko Kikuchi, Kazuhito Hashimoto A, et al. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts[J]. Environmental Science & Technology, 1998, 32(5): 726-728.
- [4] Maneerat C, Hayata Y. Antifungal activity of TiO₂, photocatalysis against *Penicillium expansum*, *in vitro* and in fruit tests[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2): 99-103.
- [5] Chawengkijwanich C, Hayata Y. Development of TiO₂, powder-coated food packaging film and its ability to inactivate *Escherichia coli*, *in vitro*, and in actual tests[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 123(3): 288-292.
- [6] Liu W, Su P, Chen S, et al. Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. [J]. Nanoscale, 2014, 6(15): 9050-9062.
- [7] Wenjuan Tan, Wenchao Du, Ana C. Barrios, et al. Surface coating changes the physiological and biochemical impacts of nano-TiO₂ in basil (*Ocimum basilicum*) plants[J]. Environmental Pollution, 2017, 222(3): 64-72.
- [8] Wang R, Hashimoto K. Light-induced amphiphilic surfaces[J]. Nature, 1997, 338: 431-432.
- [9] 虞慧娴, 宁聪琴. CaSiO₃/TiO₂ 复合生物陶瓷的制备与体外性能研究[J]. 无机材料学报, 2013, 28(1): 69-73.
- [10] Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(4): 2242-2250.
- [11] Christine Ogilvie Robichaud, Ali Emre Uyar, Michael R Darby, et al. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment[J]. Environ Sci Technol, 2009, 43(12): 4227-4233.
- [12] Yang Y, Doud Rick K, BIX, et al. Characterization of food-grade titanium dioxide: the presence of nanosized particles[J]. Environ Sci Technol, 2014, 48(11): 6391-6400.
- [13] Shin S C, Kim S H, You H, et al. *Drosophila* microbiome modulates host development and metabolic homeostasis via insulin signaling[J]. Science, 2011, 334: 670-674.
- [14] Lee KA, Kim S H, Kim E K, et al. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*[J]. Cell, 2013, 153: 797-811.
- [15] You H, Lee W J. Homeostasis between gut-associated microorganisms and the immune system in *Drosophila*[J]. Curr Opin Immunol, 2014, 30: 48-53.
- [16] Othman A Baothman, Mazin A Zamzami, Ibrahim Taher, et al. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes[J]. Lipids Health Dis, 2016, 15: 108.
- [17] 刘利英, 孙丽, 宋海云. 纳米二氧化硅和纳米金刚石对果蝇肠道共生菌的影响[J]. 中国科学: 化学, 2015, 45(11): 1231-1236.
- [18] 陈卫, 田培郡, 张程程. 肠道菌群与人体健康的研究热点与进展[J]. 中国食品学报, 2016, 17(2): 1-7.

Effects of Titanium Dioxide on Intestinal Symbiotic Bacteria of *Drosophila melanogaster*

LIU Qian¹, JIANG Jian-hui², WU Ying^{2,3}

(1. College of Life Sciences, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Engineering Laboratory of Chemical Resources Utilization in South Xinjiang of XPCC, Alar, Xinjiang 843300; 3. Key Laboratory of Biological Resource Protection and Utilization of Tarim Basin, Xinjiang Production & Construction Group, Alaer, Xinjiang 843300)

Abstract: The effects of nanoparticles TiO₂ on intestinal commensal bacteria were studied under UV light and natural light by using nanoparticles TiO₂ feeding *Drosophila melanogaster* and bacteriostatic test *in vitro*. The results showed that the growth of intestinal symbiotic bacteria in fruit flies *in vitro* could be inhibited by nanoparticles TiO₂ and showed an upward trend with the addition of antibacterial agent. The nanoparticles TiO₂ had no effect on the intestinal symbiotic bacteria in the fruit flies. It was suggested that the symbiotic bacteria could be used to provide a good growth environment for the symbiotic bacteria, which could protect the symbiotic bacteria from the influence of nanoparticles TiO₂.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles; symbiotic bacteria; *Drosophila melanogaster*