

文章编号: 1000-324X(2003)03-0569-06

新型无机抗菌材料: 载铜蒙脱石及其抗菌机理讨论

叶 瑛¹, 周玉航¹, 夏枚生², 胡彩虹², 凌洪飞³

(1. 浙江大学地球科学系, 杭州 310027; 2. 浙江大学动物科学院饲料研究所, 杭州 310029; 3. 南京大学地科系成矿作用国家重点实验室, 南京 210093)

摘 要: 以内蒙赤峰蒙脱石为原料合成了载铜蒙脱石. 它对革兰氏阴性菌 *E. coli* 和革兰氏阳性菌 *S. faecalis* 均有很强的抑止和杀灭作用, 其抗菌能力大大优于载铜沸石. 蒙脱石在载铜反应后矿物表面带有剩余正电荷, 它的抗菌能力来自两方面因素, 一方面是矿物对带相反电荷的细菌的吸附作用, 另一方面是矿物释放出的铜离子对细菌的杀灭作用. 这是载铜蒙脱石抗菌能力优于载铜沸石的本质原因.

关 键 词: 无机抗菌材料; 载铜蒙脱石; 铜交代反应; 抗菌机理

中图分类号: TQ 455 **文献标识码:** A

1 引言

天然非金属矿物用作抗菌剂的载体已经受到了广泛重视^[1]. 内田真志^[2]、大桥文彦^[3]和 Rivera-Garza 等人^[4]分别以沸石和蒙脱石为载体, 搭载银离子用作抗菌剂, 取得了较好的效果. 但是, 银是一种贵金属, 使得载银矿物材料成本较高, 而且银离子在见光、受热条件下极易还原成金属银; 银离子还能与水介质中的 Cl^- 、 HS^- 、 S^{2-} 和 SO_4^{2-} 等多种阴离子反应, 形成不溶于水的 AgCl 和 Ag_2S , 从而失去抗菌活性, 因此, 用银作为无机杀菌剂, 存在一定的不足. 在另一方面, 由于铜的无机化合物也是常用的无机杀菌剂之一, 如硫酸铜、氢氧化铜等, 因此, 我们考虑选用铜来作为无机杀菌剂. 与银相比, 它们不仅价格低廉, 而且铜离子具有较高的化学稳定性和环境安全性. 这些是载铜非金属矿物用作无机抗菌材料的潜在优势.

在载体的选择上, 我们用了蒙脱石. 蒙脱石属于 2:1 型结构的具膨胀性含水铝硅酸盐矿物. 在由硅氧四面体和八面体组成的结构层之间, 是易于被取代的水合阳离子层, 易于被其它阳离子或功能团所置换, 因此能够通过阳离子交换反应及插层反应把具有抗菌功效的阳离子或有机化合物植入其晶格. 此外, 蒙脱石在水介质中具有良好的分散性与阳离子交换能力. 上述特性使它十分适合于用作各种无机、有机抗菌剂的载体. 与人工合成的抗菌载体相比, 蒙脱石具有明显的价格优势.

本次工作利用离子交换反应, 制备了载铜蒙脱石, 并在实验室条件下, 测定了它对两种常见致病菌, 即大肠杆菌 (*E.coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S.faecalis*) 的抑止与杀灭能力. 实验

收稿日期: 2002-05-15, 收到修改稿日期: 2002-06-06

基金项目: 国家重点基础研究发展规划课题 (G2000078503); 南京大学内生矿床成矿机制国家重点实验室资助 (09-03-08)

作者简介: 叶 瑛 (1957-), 男, 博士, 教授. E-mail: gsyeying@emb.zju.edu.cn

表明载铜蒙脱石的抗菌能力明显优于前人报道的载铜沸石^[2,5]。本文试图从载体矿物与抗菌阳离子关系角度,讨论载铜蒙脱石的抗菌机理。

2 样品性质, 处理步骤及表征

2.1 样品性质与前处理步骤

实验所用的蒙脱石样品由内蒙古赤峰地质矿产勘查开发院提供, 产自内蒙古赤峰市宁城县, 根据李艳兵等人的见解^[6], 属火山沉积岩系热液蚀变型。矿石中除蒙脱石外, 所含杂质为石英及少量火山玻璃。为除去杂质, 对原矿作了以下处理:

- 1) 在温度为 80°C 的烘箱中干燥, 研磨至 <300 目;
- 2) 加水配制成浓度为 10% 的悬浮液, 在高速搅拌机中打浆;
- 3) 沉淀除去粒度 >2 μm 的组分;

4) 离心处理, 得到提纯蒙脱石, 在 80°C 的烘箱中干燥, 研磨至 <300 目备用。提纯后的蒙脱石化学式为: $[\text{Na}_{0.158}\text{K}_{0.082}\text{Ca}_{0.256}\text{Mg}_{0.063}][\text{Mg}_{0.376}\text{Fe}_{0.014}^{2+}\text{Fe}_{0.136}^{3+}\text{Al}_{1.474}][\text{Si}_{3.87}\text{Al}_{0.13}]\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 。据赤峰市地质矿产勘查院提供的分析数据, 吸蓝量为 148.8~149.8 mol/100g, 阳离子交换能力 (CEC) 115.5~139.9 mol/100g。

2.2 离子交换反应与载铜蒙脱石的制备

实验所用的含 Cu^{2+} 离子溶液采用分析纯化学试剂配制。实验步骤如下:

- 1) 称取 5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 加蒸馏水稀释到 500mL, 搅拌至完全溶解;
- 2) 称取 10g 提纯蒙脱石, 移入上述溶液, 搅拌均匀;
- 3) 在 60°C 烘箱中, 反应 6h, 期间搅拌数次;
- 4) 离心处理至蒙脱石完全沉淀, 倾去上层清液, 加入蒸馏水清洗、离心, 并重复 1 次, 清洗结束时溶液 pH 值约为 5.6。

经原子吸收光谱分析, 载铜蒙脱石的铜含量为 2.45%。

2.3 样品的 XRD 分析

对原矿、钠基蒙脱石和载 Cu^{2+} 蒙脱石和 XD98 型自动 X 射线衍射仪测定了样品的结晶结构。分析条件为: Cu 靶 $\text{K}\alpha$ 线, 40kV, 20mA, 扫描范围 3~50°, 速度 4°/min, 步长 0.02°。

3 载 Cu^{2+} 蒙脱石的抗菌实验

3.1 菌种与培养液

实验所用的大肠杆菌 (*E.coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S.faecalis*) 均由浙江省微生物研究所提供。所用的培养液为肉汤培养液, 所用的平板培养基, 大肠杆菌为伊红美兰培养基, 金色葡萄球菌为普通培养基。

3.2 微生物培养实验

细菌过夜培养: 细菌在有氧情况下培养过夜 (12h 左右), 温度 37°C, 培养液用离心分离洗涤两次 (1 万转), 用蒸馏水冲洗, 然后制成悬浮液, 细菌含量为 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL。

在 100mL 菌悬液里分别加入 0、1、2.5、5、10 和 20mg 载铜蒙脱石, 振荡, 使混合均匀, 然后振荡培养 24h, 培养温度 37°C。

生长分析: 分别在 0、2、4、6 和 24h 后, 从上述混合液里取出 0.1mL 溶液, 稀释为一定浓度, 平板培养 24h, 温度 37°C。然后进行平板计数。每个样品做三个平行培养计数,

取平均值。

4 结果与讨论

4.1 载铜前后蒙脱石的 XRD 表征

图 1、2 分别为载铜反应前后蒙脱石定向薄片的 XRD 衍射曲线。从矿石中分离出的蒙脱石的 (001) 面网间距为 1.544nm(图 1), 为典型的钙基蒙脱石。在衍射谱线上尚未见有其它矿物的衍射峰, 表明分离提纯效果理想。而在搭载 Cu^{2+} 离子后, 蒙脱石的 (001) 面网间距增加到 1.588nm(图 2)。由于 Cu^{2+} 离子半径为 0.072nm 远小于 Ca^{2+} 的离子半径 (0.099nm), 溶液中的铜离子置换蒙脱石中的 Ca^{2+} 所引起的矿物 (001) 面网间距增加, 说明前者主要是以水合阳离子 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ 形式进入蒙脱石晶格的层间位置 (Bahranowski, et al. 1996^[7])。据 Stadler^[8] 等人 (1993) 研究, 当介质 $\text{pH} > 4.5$ 时, 进入蒙脱石层间位置的铜离子以 $[\text{Cu}(\text{AlO})_n(\text{H}_2\text{O})_{4-n}]^{x+}$ 形式为主。此外, Heller-Kallai et al. 和 Mosser et al.^[9,10] 认为, Cu^{2+} 还可以进入蒙脱石 Si-O 四面体中的复三角形孔洞, 以及八面体中的空位, 何宏平等人^[11] 对载铜蒙脱石的 EPR 分析, 证实了这两种形式铜离子的存在。处于层间可交换位置和晶内孔隙位置的铜离子, 均易于进入溶液, 从而表现出抗菌活性。

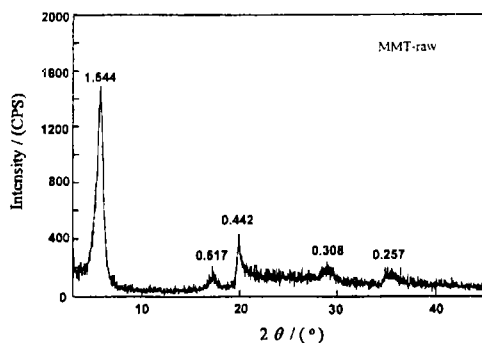


图 1 载铜反应前蒙脱石的 XRD 衍射谱线
Fig. 1 XRD pattern of raw montmorillonite

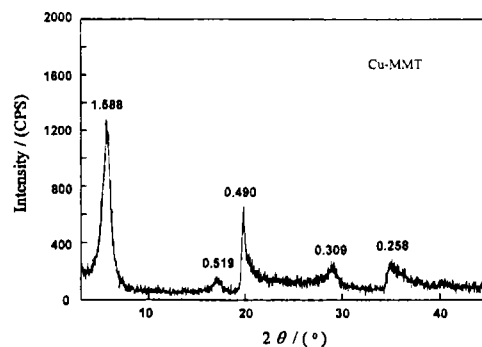


图 2 载铜反应后蒙脱石的 XRD 衍射谱线
Fig. 2 XRD pattern of Cu-MMT

4.2 杀菌效果与抗菌机理讨论

表 1、2 第一行为每 100mL(含菌 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL) 菌悬液中添加的载铜蒙脱石的重量, 第一列为加入载铜蒙脱石后培养的时间, 其余为平板培养计数统计结果 (三个平行样品的平均值)。

实验结果表明, 载铜蒙脱石对于革兰氏阴性菌 (大肠杆菌) 和革兰氏阳性菌 (金黄葡萄球菌) 均具有很强的杀灭能力。当 100mL 菌悬液中含有 20mg 载铜蒙脱石 (浓度为 200mg/L) 时, 可以在 2h 内将这两类细菌完全杀灭。

内田真志^[2] 报道了合成 4Å沸石搭载银、铜、锌等不同阳离子后的抗菌能力。其中含铜 10% 的沸石对 *E. coli* 和 *S. faecalis* 的最小发育阻止浓度 (Minimal Inhibitory Concentration, 即 MIC) 不低于 2000ppm。另据 G. Cik^[5] 等人实验, 载铜 ZSM-5 型沸石对 *E. coli* 的杀灭浓度约为 1.25%。根据表 1、2 数据, 本次工作合成的载铜蒙脱石的 MIC 仅为 10ppm。当它在水介质中的浓度达到 50ppm 时, *E. coli* 和 *S. faecalis* 分别在 6h 和 4h 内被完全杀灭, 这说明载铜蒙脱石的抗菌效果大大优于载铜沸石。据此可以认为, 以非金属矿物为载体的无机抗菌

剂, 其性能不仅取决于所搭载的阳离子种类, 而且还取决于载体矿物的性质, 以及二者之间的相互作用等因素.

表 1 大肠杆菌平板培养计数结果 (个/mL)

Table 1 *E. coli* counts per mL on agar plates after growth assay

	0mg	1mg	2.5mg	5mg	10mg	20mg
0h	9.2×10^4	9.2×10^4	9.2×10^4	9.2×10^4	9.2×10^4	9.2×10^4
2h	9.3×10^4	5.2×10^4	3.0×10^4	1.5×10^4	6.4×10^3	0
4h	8.65×10^4	1.6×10^4	8.9×10^3	70	0	0
6h	8.2×10^4	7.3×10^2	0	0	0	0
24h	8.35×10^4	0	0	0	0	0

表 2 金黄色葡萄球菌平板培养计数结果 (个/mL)

Table 2 *S. faecalis* counts per mL on agar plates after growth assay

	0mg	1mg	2.5mg	5mg	10mg	20mg
0h	1.19×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5	1.19×10^5
2h	9.8×10^4	8.9×10^4	5.2×10^4	9.7×10^3	0	0
4h	9.37×10^4	1.2×10^4	6.1×10^3	0	0	0
6h	7.5×10^4	9.5×10^2	0	0	0	0
8h	6.35×10^4	0	0	0	0	0

作为载体矿物, 沸石具有和蒙脱石完全不同的结晶结构, 前者为架状硅酸盐, 后者为层状硅酸盐. 沸石晶体内部充满了由 Si-O 四面体和 Al-O 八面体围成的多面体笼与隧道孔, 其分子式可以表示为: $M_x[(AlO_2)_x(SiO_2)_y]n(H_2O)$. 式中 $x+y$ 为晶格中四面体单元总数, x 为可置换阳离子数. 即一个 Al-O 八面体带一个负电荷, 当铜离子进入沸石晶格时, 其正电荷可由相邻的 Al-O 八面体平衡. 此外, 由于沸石晶内孔隙较大, 溶液中的阴离子和配位基可随阳离子一起进入沸石的晶内隧道孔, 使矿物总体电价保持平衡^[12~14]. 在完成上述离子交换反应后, 沸石的 XRD 衍射晶胞参数通常没有变化^[14], 从这一意义上说, 沸石对阳离子的吸附是一种物理吸附, 即矿物主晶与客体阳离子之间没有形成化学键. 载铜沸石的抗菌机理主要是铜离子的溶出与缓释作用^[5], 抗菌效果取决于进入介质的铜离子的浓度.

与沸石不同, 蒙脱石吸附铜离子后 (001) 面网间距明显增加, 因而它是一种化学吸附. 由于蒙脱石晶格的层间位置只能容纳阳离子, 当多核络离子 $[Cu(AlO)_n(H_2O)_{4-n}]^{x+}$ 替代蒙脱石层间的 Ca^{2+} 离子, 以及 Cu^{2+} 离子进入蒙脱石 Si-O 四面体晶内孔和八面体中的空位时, 都将导致蒙脱石电价失衡, 使矿物带有正电荷. 而大多数细菌细胞壁表面带有负电荷, 载铜蒙脱石与细菌之间的静电引力, 能使细菌被大量吸附在矿物表面. P. Herrera^[15] 等人研究了经有机阳离子处理的蒙脱石对沙门氏菌的吸附与杀灭作用. 他们采用吡啶类阳离子型抗菌剂处理蒙脱石, 所得产物 (CP - MMT) 能有效去除水介质中沙门氏菌, 他们在扫描电镜下观察到, 沙门氏菌被大量吸附在 CP-MMT 表面, 而未经处理的蒙脱石不具有吸附沙门氏菌的能力. 蒙脱石在搭载阳离子型抗菌剂后的表面剩余正电荷, 对其抗菌能力无疑有重要贡献. 此时由蒙脱石释放出来的铜离子将直接作用于细菌, 而不是先进入水介质再作

用于细菌. 也就是说, 矿物表面的有效铜离子浓度, 大大高于它在水介质中的实际浓度. 这是载铜蒙脱石抗菌能力大大优于载铜沸石的根本原因. 这一见解对以蒙脱石为载体的阳离子型抗菌剂具有普遍意义.

5 结论

1. 在 $\text{pH} > 4.5$ 的水溶液中, 铜离子对蒙脱石的置换, 使其 (001) 面网间距明显膨胀, 说明铜是以复合阳离子形式进入蒙脱石晶格的层间位置.

2. 载铜蒙脱石抗菌能力大大高于载铜沸石, 其根本原因是: 前者在载铜反应后表面带有剩余正电荷, 而后者在反应后基本保持电中性.

3. 载铜蒙脱石的抗菌能力和两方面因素有关, 一方面是其表面剩余正电荷能从水介质中大量吸附表面带负电荷的细菌, 另一方面是矿物释放的铜离子对细菌的抑止和杀灭作用, 它的抗菌效能, 是静电吸附与铜离子杀菌能力协同作用的综合结果.

4. 以非金属矿物为载体的抗菌材料, 其抗菌能力不仅和客体阳离子有关, 而且与载体矿物晶体结构, 以及载体、客体之间相互作用有关.

致谢 内蒙古赤峰地质矿产勘查开发院总工程师王子祥教授为本工作提供了样品及相关资料, 谨此致谢.

参考文献

- [1] 王 宁, 李博文, 李惠文, 等. 高校地质学报, 2000, **6** (2): 306-309.
- [2] 内田真志. 防霉防菌志, 1996, **24** (11): 735-742.
- [3] 大桥文彦. 防霉防菌志, 1997, **25** (2): 112-117.
- [4] Rivera-Garza M, Olguin M T, Garica-Sosa I, et al. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2000, **39**: 431-444.
- [5] Cik G, Bujdakova H, Serren F, et al. *Chemosphere*, 2001, **44**: 313-319.
- [6] 李艳兵, 王克勤, 陈相花, 等. 建材地质, 1997, **4**: 2-8.
- [7] Bahrsnowaki K, Dula R, Labanowska M, et al. *Appl. Spectro*, 1996, **50**: 1439-1445.
- [8] Stadler M, Schindler P W. *Clays and Clay Minerals*, 1993, **41**: 288-296.
- [9] Heller-Kallai L, Mosser C. *Clays and Clay Minerals*, 1995, **43**: 738-743.
- [10] Mosser C, Michot L J, Villiarns F, et al. *Clays and Clay Minerals*, 1997, **45**: 789-802.
- [11] 何宏平, 郭九皋, 谢先德, 等. 地球化学, 2000, **29** (2): 198-201.
- [12] Wichterlova B, Sobalik Z, Dedecek J. *Catalysis Today*. 1997, **38**: 199-203.
- [13] Godelitsas A, Charistos D, Dwyer J, et al. *Microporous and Mesoporous Materials*. 1999, **33**: 77-87.
- [14] Delabie A, Pierloot K, Groothaert M H, et al. *Microporous and Mesoporous Material*. 2000, **37**: 209-222.
- [15] Herrera P, Burghardt R C, Phillips T D. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**, 259-272.

A New Type of Inorganic Antibacterial Material: Cu-bearing Montmorillonite and Discussion on Its Mechanism

YE Ying¹, ZHOU Yu-Hang¹, XIA Mei-Sheng², HU Cai-Hong², LING Hong-Fei³

(1. Department of Earth Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Feedstuff Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3. Department of Earth Sciences, State Key Laboratory of Ore Genesis, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: With the raw material coming from Chifeng, the Inner Mongolia Autonomous Region, Cu bearing montmorillonite (Cu-MMT) was synthesized through cation exchange reaction. XRD analysis shows that, (001) basal spacing of montmorillonite expands from 1.544 nm to 1.588 nm after cation exchange. This indicates that Cu^{2+} enters interlayer position of montmorillonite as hydrated cation or composite cation. Through antibacterial experiment, it is found that Cu-MMT has strong antibacterial ability on *E. coli* and *S. faecalis*. Minimal inhibitory concentration (MIC) and killing concentration are 10 and 50 ppm respectively. The antibacterial ability of Cu-MMT is much better than that of Cu-carrying zeolite. Taking the up-to-date characterization on Cu-MMT and Cu-zeolite into account, it is clear that Cu-zeolite retains electric neutrality after cation exchange. Its antibacterial capacity relies on the amount of Cu^{2+} released into medium. On the other hand, Cu-MMT has residual positive charge after cation exchange. Its antibacterial ability results from two aspects, one is electrostatic attraction which makes large amount of bacterium being adhered on montmorillonite surface, the other is the same as Cu-zeolite, i.e., Cu^{2+} slowly released into medium which can kill bacterium. The former aspect is the main reason that Cu-MMT has better antibacterial ability than Cu-zeolite.

Key words inorganic antibacterial material; Cu bearing montmorillonite; Cu^{2+} cation exchange; antibacterial mechanism