

文章编号: 1000-324X(2007)04-0652-05

载铜蒙脱石对嗜水气单胞菌的吸附研究

夏枚生^{1,2}, 胡彩虹², 徐 勇², 赵文艳²

(1. 浙江大学 地球科学系, 杭州 310027; 2. 浙江大学 动物科学学院, 杭州 310029)

摘 要: 以钙基蒙脱石、钠基蒙脱石、酸活化蒙脱石为原料制备了载铜蒙脱石并研究它们对嗜水气单胞菌的吸附性能. 蒙脱石和嗜水气单胞菌的 Zeta 电位随 pH 值升高而降低; 载铜蒙脱石的 Zeta 电位随 pH 值升高而增大, 当 pH=4~6 时 Zeta 电位从负值转变为正值. 酸活化蒙脱石、钠基蒙脱石和钙基蒙脱石对细菌的平衡吸附率分别为 36.5%、20.1% 和 14.3%, 其相应的载铜蒙脱石对细菌的平衡吸附率分别为 99.6%、93.1% 和 87.4%. 蒙脱石对细菌的吸附率随着 pH 的增加而减小, 载铜蒙脱石对细菌的吸附率先随 pH 值的增大而减小, 到 pH=5.0 后随 pH 值的增大而增大. 载铜蒙脱石 Cu^{2+} 脱附实验表明, 经过脱附后的沉淀物基本保持着原来的吸附活性, 而经过脱附后的上清液对细菌的吸附率很低. 载铜蒙脱石的抗菌作用是静电吸附细菌与铜离子抗菌的综合作用.

关 键 词: 蒙脱石; 载铜蒙脱石; 嗜水气单胞菌; 吸附

中图分类号: TD 985; X172; TQ445 **文献标识码:** A

Adsorption of *Aeromonas Hydrophila* by Copper-bearing Montmorillonite Clays

XIA Mei-Sheng^{1,2}, HU Cai-Hong², XU Yong², ZHAO Wen-Yan²

(1. Department of Earth Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Calcium montmorillonite (Ca-MMT), sodium montmorillonite (Na-MMT) and acid-activated montmorillonite (AAM), and their Cu^{2+} -exchanged montmorillonites (Cu-MMT), $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$, $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ and Cu^*AAM , were used to study the adsorptive activity on *Aeromonas hydrophila*. The Zeta potentials of MMTs and *A. hydrophila* are all decreased with increasing pH, and those of Cu-MMTs are increased with increasing pH and transformed from the negative to positive value when pH=4–6. AAM, Na-MMT and Ca-MMT show some ability to reduce bacterial plate counts by 36.5%, 20.1% and 14.3%, respectively. The Cu^*AAM , $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ and $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$ reduce the bacterial plate counts by 99.6%, 93.1% and 87.4%. The extent of bacterial adsorption onto MMTs is decreased with increasing pH. However, the bacterial adsorption onto Cu-MMTs is decreased with increasing pH and increased with increasing pH when pH>5.0. The study of desorption of Cu^{2+} by washing with physiological saline for 24h reveals that the washing solutions don't show a significant reduction of the bacterial counts, while the washed Cu-MMTs retain their full antibacterial activity. The mechanism by which bacterial counts are reduced may involve the enhanced affinity of Cu-MMT for *Aeromonas hydrophila* and the antibacterial activity of Cu^{2+} .

Key words montmorillonite; copper-bearing montmorillonite; aeromonas hydrophila; adsorption

1 引言

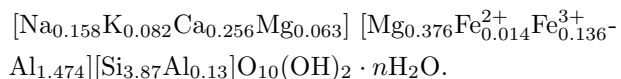
长期使用抗生素和抗菌药物, 造成诸如细菌耐药性、耐药基因转移、水产品中药物残留等不良后果, 直接或间接威胁人类健康, 而且由于长期滥用抗生素引起水环境污染, 导致养殖环境恶化, 生态平衡失调. 因此, 研制新型的抗菌材料已迫在眉睫.

硫酸铜是水产养殖常用的杀菌杀藻药物, 但是, 该药存在安全浓度范围小, 应用效果受环境因子影响大; 直接使用易造成铜离子局部浓度过高, 药效持续时间短; 铜离子易在生物体内蓄积等诸多缺点^[1]. 采用无机材料为载体, 掺入抗菌金属离子而制成的金属系无机抗菌材料, 具有抗菌谱广、细菌不易产生耐药性、使用安全等特点, 引起了人们的极大关注^[2,3]. 蒙脱石是一种双八面体层状结构的天然纳米铝硅酸盐矿物, 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, 易于被其他阳离子或功能团所置换. 通过吸附、离子交换反应, 把抗菌性铜离子植入蒙脱石晶格制成的载铜蒙脱石具有较强的抗菌活性^[4], 其对猪、鸡作用效果的结果表明, 载铜蒙脱石能有效抑制肠道病原菌的增殖, 阻断病原菌与肠上皮细胞的粘附, 使肠粘膜始终处于健康状态, 以益于消化酶的分泌和饲料养分的消化, 从而提高生长性能^[5-7]. 载铜蒙脱石的制备方法会影响其抗菌性能, 本实验以嗜水气单胞菌为水产病原菌的模型菌, 研究钙基蒙脱石 (Ca-MMT), 钠基蒙脱石 (Na-MMT) 和酸活化蒙脱石 (AAM) 及其它们的铜交换蒙脱石的吸附、抗菌性能.

2 实验

2.1 材料

钙基蒙脱石 (Ca-MMT): 产自内蒙古赤峰, 原矿蒙脱石含量 >95%. 经分离提纯后其化学式为



钠基蒙脱石 (Na-MMT): 10g Ca-MMT 与 100mL 0.2mol/L NaCl 溶液搅拌均匀, 室温搅拌反应 10h. 矿浆离心分离后用蒸馏水洗 3 次, 得到的沉淀物 80°C 干燥, 研磨至 >300 目.

酸活化蒙脱石 (AAM): 10g Ca-MMT 与 75mL 0.05mol/L HCl 溶液搅拌均匀, 室温搅拌反应 24h. 矿浆离心分离后用蒸馏水洗 3 次, 得到的沉淀物 80°C 干燥, 研磨至 >300 目.

载铜蒙脱石 (Cu-MMT): 分别取上述制备的 5g Ca-MMT、Na-MMT 或 AAM 与 100mL 0.05mol/L CuSO_4 溶液搅拌均匀成悬浮液, 调节溶液 pH 至 5.0. 悬浮液在 60°C 加热 6h 以加速离子交换反应. 矿浆离心分离后用蒸馏水洗 3 次, 得到的载铜蒙脱石 80°C 干燥, 研磨至 >300 目. 制备的三种载铜蒙脱石分别命名为 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$, $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM . 嗜水气单胞菌 ATCC 14715 购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC). 培养基胰酶大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) 和胰酶大豆琼脂 (Tryptic Soy agar, TSA) 购自 Difco 公司. 嗜水气单胞菌解冻后接种于 TSB 中, 28°C 培养过夜. 接种 50 μL 菌液于 50mL TSB 28°C 摇床孵育至对数生长期, 4°C、4000r/min 离心 15min. 嗜水气单胞菌用 0.9% 生理盐水 (pH=7) 洗涤 2 次, 然后悬浮于生理盐水并调整试验菌液浓度为 2×10^5 colony forming unit (CFU)/mL.

2.2 材料的表征

用 XD-98 型自动 X 射线衍射仪进行物相分析, 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°. 用醋酸铵-乙醇定氮蒸馏法测定离子交换容量^[8]. 用气体吸附法比表面和孔径分布测定仪 (AUTOSORB-1, Quantachrome, USA) 测定 BET 比表面积. 用原子吸收光谱法测定载铜蒙脱石中铜含量.

Zeta 电位: 1g/L 矿物、 1×10^5 CFU/mL 细菌分别悬浮在不同 pH 值 (2.0~10.0) 0.9% 生理盐水中分散过夜, 采用纳米粒径及 Zeta 电位分析仪 (Zetasizer 3000HS, Malvern) 测定矿物和细菌的 Zeta 电位. pH 值用 5% HCl (v/v) 或者 5mol/L NaOH 调节.

2.3 细菌吸附实验

2.3.1 细菌的吸附动力学

1g/L 矿物和 1×10^5 CFU/mL 细菌悬浮在 pH 为 6.0% 的 0.9% 生理盐水溶液, 28°C 恒温振荡, 分别在 0、10、20、40、60、90、120、150min 测定吸附率. 不含矿物的细菌生理盐水溶液作为对照, 每个实验重复三次. 所有时间点的样品 100r/min 离心 10min, 上清液用生理盐水适当稀释后接种至 TSA, 再经 28°C 培养 24h, 菌落计数. 通过比较实验管和对照管的菌落数计算吸附率, 绘出吸附动力学曲线.

2.3.2 pH 值对细菌吸附率的影响

1g/L 矿物和 1×10^5 CFU/mL 细菌悬浮在不同 pH 值 (2.0~10.0) 的 0.9% 生理盐水溶液中, 28°C 恒

温振荡 2h, 测定吸附率.

2.3.3 Cu^{2+} 脱附实验

1g/L 载铜蒙脱石 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$, $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM 分别悬浮在 pH 为 6.0 的 0.9% 生理盐水溶液, 28°C 恒温振荡 24h, 悬浮浆液 8000r/min 离心 10min, 得到上清液和沉淀物. 按照 2.3.1 的方法测定上清液和沉淀物对细菌的吸附率.

3 结果和讨论

3.1 材料表征

测试结果见表 1.

表 1 材料表征结果
Table 1 Characterization of the used montmorillonite

	Cation exchange capacity	BET surface area/ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$	$d(001)$ /nm	Cu /%
	$\text{mol}(+)\cdot\text{kg}^{-1}$			
Ca-MMT	1.10	117.4	1.544	
Na-MMT	1.37	340.7	1.307	
AAM	1.33	385.4	1.584	
$\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$	1.30	89.2	1.571	2.1
$\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$	1.48	302.3	1.588	2.6
Cu^*AAM	1.51	311.6	1.620	3.4

3.2 蒙脱石、载铜蒙脱石和嗜水气单胞菌的 Zeta 电位

由图 1 可见, 蒙脱石 Ca-MMT、Na-MMT、AAM 和嗜水气单胞菌 Zeta 电位随 pH 值升高而降低, 这可能是由于蒙脱石表面含有丰富的 Si-OH 和 Al-OH, 而细菌表面官能团主要有 -OH, -COOH 和 $-\text{PO}_4$, 随 pH 值的增大, 这些基团容易去质子化, 变为 Si-O^- , Al-O^- , O^- , $-\text{COO}^-$ 和 PO^- , 因而负电荷增加, 表现为 Zeta 电位减小. 而载铜蒙脱石 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$, $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM 的 Zeta 电位随 pH 值升高而增大, 当 $\text{pH}=4\sim 6$ 时, Zeta 电位从负值转变为正值. 铜离子的水解沉淀 pH 值较低, pH 值较高又会形成络合物, 这可以部分解释载铜蒙脱石 Zeta 电位随 pH 值变化的现象.

3.3 蒙脱石和载铜蒙脱石对细菌的吸附动力学

由图 2 可见, 蒙脱石 Ca-MMT、Na-MMT、AAM 对细菌的吸附在 60min 左右达到平衡, 吸附率分别为 14.3%、20.1% 和 36.5%. 载铜蒙脱石 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$ 、 $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM 对细菌的吸附在 120min 左右达到平衡, 吸附率分别为 87.4%、93.1%

和 99.6%.

3.4 pH 值对细菌吸附率的影响

由图 3 可见, 蒙脱石 Ca-MMT、Na-MMT、AAM 对细菌的吸附率随 pH 值的增大而逐渐减小. 载铜蒙脱石 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$, $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM 对细菌的吸附率先随 pH 值的增大而减小, 然后到 $\text{pH}>5.0$ 后又随 pH 值的增大而增大, 当 $\text{pH}=5.0$ 时, 吸附率最低, 呈现出 “V” 字型吸附曲线.

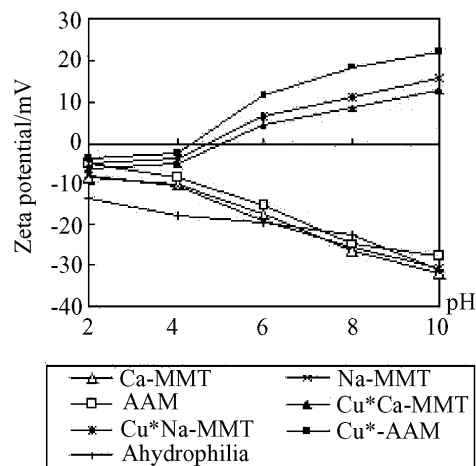


图 1 蒙脱石、载铜蒙脱石和嗜水气单胞菌在不同 pH 值的 Zeta 电位

Fig. 1 Zeta potential of the used montmorillonite and *Ahydropilia* as a function of pH

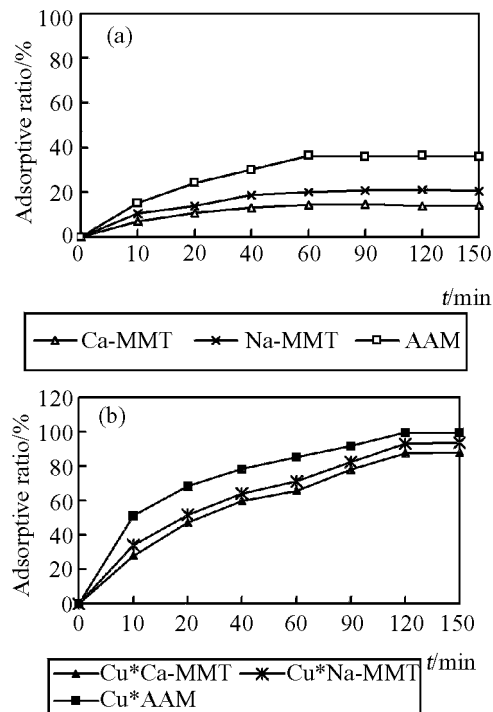


图 2 蒙脱石 (a) 和载铜蒙脱石 (b) 对细菌的吸附动力学

Fig. 2 Adsorption kinetic curve of the used montmorillonite

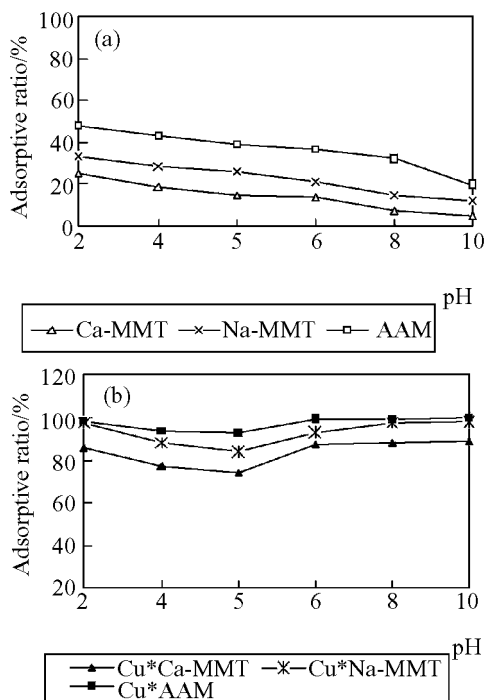


图3 pH值对蒙脱石(a)和载铜蒙脱石(b)吸附细菌的影响

Fig. 3 Percent of bacteria adsorbed as a function of pH

3.5 Cu^{2+} 脱附实验

原载铜蒙脱石 $\text{Cu}^*\text{Ca-MMT}$ 、 $\text{Cu}^*\text{Na-MMT}$ 和 Cu^*AAM 在 $\text{pH}=6.0$ 时对细菌的吸附率分别为 87.4%、93.1% 和 99.6%。载铜蒙脱石经过 Cu^{2+} 脱附后的沉淀物在 $\text{pH}=6.0$ 时对细菌的吸附率分别为 84.1%、90.5% 和 95.7%，基本保持着原来的吸附活性。而经过脱附后的上清液对细菌的吸附率仅为 4.1%、3.8% 和 4.6%。

3.6 讨论

研究表明, 静电吸引力、范德华力、疏水作用力及表面粗糙程度都影响细菌在矿物表面的吸附。DLVO 理论^[9]和表面络合理论^[10]很好地解释了吸附作用。在吸附过程中, 细菌和矿物表面的 Zeta 电位以及它们之间所产生的静电作用力、疏水作用力以及表面官能团起了重要作用。

Bahranowski 等^[11]报道, Cu^{2+} 主要以 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ 形式, 以交换吸附的方式存在于蒙脱石的层间, 同时有少量的 Cu^{2+} 以 $[\text{Cu}(\text{AlO})_n(\text{H}_2\text{O})_{4-n}]^{x+}$ 的形式, 以化学吸附的方式存在于层间。Stadler 等^[12]报道, 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。Mosser 等^[13]认为, Cu^{2+} 还可以进入 MMT Si-O 四面体中的复三角形孔洞以及八面体中的空位。

He 等^[14]对载铜蒙脱石的 EPR 分析, 证实了这两种形式铜离子的存在。进入微孔、层间和棱边的铜, 可降低蒙脱石所带负电荷的密度, 这有助于蒙脱石和细菌间的静电吸附作用。本实验中, 在 pH 为 6.0 时蒙脱石、载铜蒙脱石、嗜水气单胞菌的 Zeta 电位分别为 $-15.17 \sim -18.86\text{mV}$ 、 $8.41 \sim 18.25\text{mV}$ 、 -22.13mV 。可见, 蒙脱石和细菌靠静电作用的化学吸附较弱, 主要以物理吸附的形式与细菌发生作用。钙基蒙脱石钠化或酸化处理较大幅度地增加了 BET 比表面积, 从而使其对细菌的平衡吸附率也相应增加。蒙脱石承载铜后 BET 比表面积虽降低, 但是其对细菌的吸附能力却远高于蒙脱石, 这是因为蒙脱石承载铜后使之带正电荷, 增大了其与细菌间的静电吸附。载铜蒙脱石 Cu^{2+} 脱附实验表明, 经过 Cu^{2+} 脱附后的沉淀物基本保持着原来的吸附活性, 而经过 Cu^{2+} 脱附后的上清液对细菌的吸附率很低, 说明载铜蒙脱石的抗菌活性主要位于载铜蒙脱石表面, 而不是释放到介质中的铜。胡彩虹等的体外抗菌试验表明, 蒙脱石未显抗菌活性, 而载铜蒙脱石对所试水产病原菌均有很强的抑制和杀菌作用^[3]。因此, 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介质中大量吸附表面带负电荷的细菌; 另一方面是载铜蒙脱石释放出来的铜离子直接作用于细菌, 而不是先进入介质再作用于细菌, 也就是说, 载铜蒙脱石表面的有效铜离子浓度, 大大高于它在介质中的实际浓度。

pH 值对细菌吸附率影响的结果表明, 蒙脱石对细菌的吸附率随 pH 值的增大而减小。这是由于在 $\text{pH}=2\sim 10$ 范围内, 蒙脱石的 Zeta 电位均为负值, 而且随 pH 值的增大而减小, 而细菌在 $\text{pH}=2\sim 10$ 的范围内也随 pH 值的增大负电性增强, 因而导致吸附率减少。一般而言, pH 值 <2 时, 细菌细胞壁是中性的, 细菌细胞表面主要是 R-COOH^0 位点^[15], 而蒙脱石表面主要为 $>\text{Si-OH}_2^+$ 。但从结果可见, 低 pH 时蒙脱石对细菌也有较高的吸附力, 表明在此吸附过程中静电作用力不是主要的作用力, 在此过程中疏水作用力起了主要作用, 控制着这一吸附过程。反应过程可表示为: $>\text{Si-OH}_2^+ + \text{R-COOH}^0 \rightleftharpoons >\text{Si-OH}_2-\text{R-COOH}^+$, 这里 R 代表与官能团相连的细菌; $>\text{Si}$ 表示蒙脱石表面结合的硅原子。随着 pH 值的增大, 由于细菌细胞表面官能团质子化程度较高形成 R-COO^- , 使其带有更多的负电荷; 而蒙脱石表面主要为 $>\text{SiO}^-$, 因而使蒙脱石对细菌的吸附率降低。而载铜蒙脱石对细菌的吸附率先随 pH 值

的增大而减小, 然后到 $\text{pH}>5.0$ 后又随着 pH 值的增大而增大, 呈现出“V”字型吸附曲线. 这是由于载铜蒙脱石的 Zeta 电位随 pH 值增大而增大; $\text{pH}=5.0$ 左右时达到其等电点, 吸附率为最小, 当 $\text{pH}>5.0$ 时, 载铜蒙脱石电荷反转而带正电荷, 而且其 Zeta 电位随 pH 值增大而增大, 而细菌 Zeta 电位随 pH 值增大而减小, 因而通过静电作用使其对细菌的吸附率增大.

4 结论

蒙脱石负载铜可降低蒙脱石所带负电荷的密度, 这有助于增强蒙脱石和细菌间的静电吸附作用. 在 pH 为 6.0 条件下, 酸活化蒙脱石、钠基蒙脱石和钙基蒙脱石对细菌的平衡吸附率分别为 36.5%、20.1% 和 14.3%, 其相应的载铜蒙脱石对细菌的平衡吸附率分别为 99.6%、93.1% 和 87.4%. 蒙脱石对细菌的吸附率随着 pH 值的增大而减小, 载铜蒙脱石对细菌的吸附率先随 pH 值的增大而减小, 到 $\text{pH}=5.0$ 后又随 pH 值增大而增大. 载铜蒙脱石 Cu^{2+} 脱附实验表明, 经过脱附后的沉淀物基本保持着原来的吸附活性, 而经过脱附后的上清液对细菌的吸附率很低. 载铜蒙脱石的抗菌作用是静电吸附细菌与铜离子抗菌的综合作用.

参考文献

[1] Hawkins P R, Griffiths D J. *J. Water Res*, 1987, **21**: 475–

480.

- [2] 李吉东, 李玉宝, 王学江, 等 (LI Ji-Dong, *et al*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2006, **21**(1): 162–168.
- [3] 侯文生, 魏丽乔, 戴晋明, 等 (HOU Weng-Sheng, *et al*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2005, **20** (4): 907–913.
- [4] 胡彩虹, 夏枚生 (HU Cai-Hong, *et al*). 硅酸盐学报 (J. Chin. Ceram. Soc.), 2005, **33** (11): 1376–1380.
- [5] Xia M S, Hu C H, Xu Z R. *J. Poultr. Sci.*, 2004, **83** (11): 1868–1875.
- [6] Hu C H, Xia M S, Xu Z R. *J. Asian-Aust J Anim. Sci.*, 2004, **17** (11): 1575–1581.
- [7] Xia M S, Hu C H, Xu Z R. *J. Anim. Feed. Sci. Technol.*, 2005, **118** (3-4): 307–317.
- [8] Theng B K G, Hayashi S, Soma M, *et al*. *J. Clays. Clay. Miner.*, 1997, **45**: 718–723.
- [9] Van Loosdrecht M C C, Lyklema J, Nored W. *J. Microbial Ecology*, 1989, **17**: 1–15.
- [10] Davis J A, Kent D B. Surface complexation modeling in aqueous geochemistry. Mineral-water interface geochemistry. In: Hochella M.F.Jr., White A.F. Eds.. Reviews in Mineralogy and Mineralogical Society of American, Washington, D.C, 1990. 177–260.
- [11] Bahranowski K, Dula R, Labanowska M, *et al*. *Appl. Spectr.*, 1996, **50**: 1439–1445.
- [12] Stadler M, Schindler P W. *J. Clays and Clay Miner*, 1993, **41**: 288–296.
- [13] Mosser C, Michot L J, Villiers F, *et al*. *J. Clays. Clay. Miner.*, 1997, **45**: 789–802.
- [14] He H P, Guo J G, Xie X D, *et al*. *J. Environ. Int.*, 2001, **26**: 347–352.
- [15] Fowle D A, Fein J B. *J. Geochimica Cosmochimica Acta*, 1999, **63**: 3059–3067.