

载铜蒙脱石及其杀灭大肠杆菌机制的研究

马玉龙^{1,2*}, 郭彤^{1,2}

(1. 宁夏大学 化学化工学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏天然药物工程技术研究中心, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为制备载铜蒙脱石 (Cu-MMT) 并研究其杀菌活性及机制, 采用离子交换法制得 Cu-MMT, 对其结构与表面特性进行表征。以大肠杆菌为试验菌株, 检测 Cu-MMT 对细菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC), Cu-MMT 杀菌过程中菌液胞内酶活性的变化, 并观察细菌形态。结果显示, 载铜后蒙脱石的离子交换容量增大, 但比表面积和表面负电荷密度下降; Cu-MMT 对大肠杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 0.16 和 0.64 mg·mL⁻¹; Cu-MMT 可使细菌细胞膜受损, 胞内酶诸如冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶和丙氨酸氨基转移酶等外泄。Cu-MMT 对细菌具有较强的杀灭活性, 其杀菌机制: Cu-MMT 与细菌发生吸附作用, 使细菌细胞膜形态和通透性改变, 胞内物外泄而死亡。

关键词: 蒙脱石; 铜离子; 大肠杆菌; 抗菌活性; 杀菌机制

中图分类号: TQ455 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0318 - 05

Preparation of Cu²⁺-loaded montmorillonite and its bactericidal mechanism against *Escherichia coli*

MA Yu-Long*, GUO Tong

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;
2. Ningxia Engineering Research Center for Natural Medicines, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The aims of this study were to prepare Cu²⁺-loaded montmorillonite (Cu-MMT) and investigate its bactericidal activity and mechanism. Cu-MMT was prepared by the method of ion exchange reaction. The structure and surface characteristic of Cu-MMT were determined. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of Cu-MMT against the strain of *Escherichia coli* were determined. The activities of intracellular enzyme in bacterial solution were measured, and the morphology of *E. coli* was observed during the interaction between Cu-MMT and bacteria. The results showed that treatment with Cu²⁺ increased cation exchange capacity of montmorillonite, but specific surface area and surface negative charge density were decreased. The MIC and MBC of Cu-MMT against the tested *E. coli* were 0.16 and 0.64 mg·mL⁻¹, respectively. Cu-MMT could destroy bacterial cellular membrane and then resulted in leakage of intracellular enzymes such as aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase. These suggest that Cu-MMT has a strong bactericidal activity. The bactericidal mechanism of Cu-MMT may be that bacteria are adsorbed by Cu-MMT, and then morphology and permeability of cellular membrane are changed. This leads to an efflux of intracellular contents and the death of bacteria.

Key words: montmorillonite; copper ion; *Escherichia coli*; antibacterial activity; bactericidal mechanism

收稿日期: 2006-07-14.

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ0609); 宁夏高等学校科学研究项目资助。

* 通讯作者 Tel: 86 - 951 - 2062004,
E-mail: nxylma@163.com

饲用抗生素的大量使用及环境污染的日益加重, 最突出的问题之一是各种有害细菌 (尤其是耐药菌) 的泛滥^[1]。这些耐药菌已对人的身体健康、生存环境造成了危害, 甚至还威胁到整个人类的生命安全。为了减少抗生素的使用, 消除耐药菌所带

来的危害,研制和开发新的无公害的抗生素替代品已迫在眉睫。

蒙脱石是一类天然硅酸盐黏土矿物质,由两层硅氧四面体片夹一层铝氧八面体片所构成的 2:1 型层状结构。由于其表面特殊的理化性质,蒙脱石具有吸附、离子交换等多种特性,在工农业生产中得以广泛应用^[2,3]。近年来,通过对蒙脱石结构和组成进行适当修饰^[4-6],拓宽了蒙脱石的应用范围。

铜离子具有抗菌活性,也是动植物必需的一种微量元素。本试验以蒙脱石和硫酸铜为主要原料,制备载铜蒙脱石,研究其结构和表面特性,探讨载铜蒙脱石杀灭大肠杆菌的活性与机制。

材料与方 法

载铜蒙脱石的制备 采用内蒙古赤峰的钙型蒙脱石,粉碎后过 200 目筛。加入 5 倍质量的二次去离子水 (ddH₂O),搅拌 1 h 后,静置 3 h,弃上清液和底部杂质。重复此操作 3 次。再加入一定量 ddH₂O,搅拌 1 h 后过夜,弃上清液。重复加入一定量 ddH₂O,搅拌 1 h 后,静置 30 min,收集悬浮液并于 60 °C 下干燥,粉碎,过 200 目筛后,样品再经 500 °C 煅烧,细磨,过 400 目筛,得提纯的蒙脱石 (Montmorillonite, MMT) 样品。

取上述 MMT,加入 20 倍质量比的 ddH₂O,搅拌制成悬浮液,按 1.5 倍 (摩尔比) 离子交换容量加入 Cu²⁺ (CuSO₄ · 5H₂O,分析纯,上海振欣试剂厂)。搅拌 24 h,抽滤 (SHB-III 真空抽滤装置,郑州长城科工贸有限公司)后用 ddH₂O 洗涤 3 次。洗涤后的样品经真空干燥,磨碎,过 400 目筛,制得载铜蒙脱石 (Cu²⁺-loaded montmorillonite, Cu-MMT) 样品。经原子吸收法 (AA-6501 型原子吸收光谱仪,日本岛津公司)测得 Cu-MMT 中 Cu²⁺ 含量 (重量百分比) 为 3.80%。

载铜蒙脱石的表征 离子交换容量的测定采用醋酸铵-乙醇定氮蒸馏法^[7]。表面积采用气体吸附法比表面和孔径分布测定仪 (Autosorb-1, Quantachrome, 美国)测定。zeta 电位用 zeta 电位分析仪 (Zetasizer 3000HS, Malvern, 英国)测定。

抑菌、杀菌实验 实验菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922,由浙江省疾病预防控制中心提供。所用的培养液为 MH 肉汤培养液,平板培养基为伊红美蓝琼脂培养基。

取试验菌于 MH 肉汤培养基中,37 °C 摇床中孵育至对数生长期,4 °C 下 4 000 r · min⁻¹ 离心 10

min,用预冷的 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗涤 1 次,再悬浮于 PBS 液中。用紫外可见分光光度计 (752 型,上海广谱仪器有限公司),在 620 nm 处测定细菌吸光度 (A 值),将菌液浓度调至 1 × 10⁷ ~ 2 × 10⁷ CFU · mL⁻¹。

最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 测定参照美国国立临床实验室标准化委员会推荐的肉汤稀释法^[8]。取上述菌液 1 mL 于 99 mL 新鲜 MH 肉汤培养基中 (菌液浓度 1 × 10⁵ ~ 2 × 10⁵ CFU · mL⁻¹),然后分别加入 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128,, 2 048 mg MMT 或 Cu-MMT,混匀。37 °C 摇床中培养 24 h,未见细菌生长的最低抗菌剂浓度为 MIC。将未见细菌生长的最低抗菌剂浓度的肉汤管转种不含抗菌剂的伊红美蓝琼脂平板,再经 37 °C 培养 24 h。琼脂平板上未见细菌生长的最低抗菌剂浓度为 MBC。

分别取不同质量的 Cu-MMT 于 100 mL 菌液 (菌液浓度 1 × 10⁵ ~ 2 × 10⁵ CFU · mL⁻¹) 中,混匀,37 °C 摇床中培养,分别在 0, 2, 4, 6, 12 和 24 h 定量采样,在原子力显微镜 (SPM-9500J3, 日本岛津公司)下观察细菌形态的变化,并进行活菌计数,绘制活菌数随时间变化的曲线图。

细菌胞内酶活性检测 取已灭菌的装有 MH 肉汤培养基的试管 12 支,1 ~ 6 号试管接种大肠杆菌 (终浓度为 1 × 10⁵ ~ 2 × 10⁵ CFU · mL⁻¹),7 ~ 9 号试管加入 Cu-MMT (终质量浓度为 2 × MBC, 0.128 mg · mL⁻¹),10 ~ 12 管为空白对照。上述各试管于 37 °C 摇床中培养 10 h 后,在 1 ~ 3 号试管中加入 Cu-MMT (终质量浓度为 2 × MBC, 0.128 mg · mL⁻¹),混匀。各试管再继续培养 2 h 后,分别经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液在全自动生化分析仪 (240 RX Daytona, 英国)上检测天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶和丙氨酸氨基转移酶的活性。

数据处理 每个试验重复 3 次,抑菌、杀菌曲线用 3 个重复数据的平均值绘制。

结果与讨论

1 Cu-MMT 离子交换容量和比表面积

Cu-MMT 的离子交换容量和比表面积测定结果见表 1。离子交换容量是黏土矿物特性的一项重要物理参数,其值的高低不仅反映了黏土矿物的晶体结构中可交换离子的总量,也反映了黏土矿物离子交换吸附的能力。由表 1 可见,Cu-MMT 的离子交

换容量显著高于 MMT,提示蒙脱石对溶液中 Cu^{2+} 的作用,除离子交换吸附之外,还存在着其他吸附方式如静电吸附、范德华力吸附等,使吸附到矿物晶体中 Cu^{2+} 含量大于其交换出的阳离子量。Bahranowski 等^[9]用经过 Al^{3+} 等柱撑的蒙脱石进行 Cu^{2+} 的吸附试验表明, Cu^{2+} 主要以水合阳离子的形式,以交换吸附的方式存在于蒙脱石层间,同时还有少量 Cu^{2+} 以 $[\text{Cu}(\text{AlO})_n(\text{H}_2\text{O})_{4-n}]^{x+}$ 形式,以化学吸附的方式存在于层间。

黏土矿物的比表面积主要由微孔表面积和外表面积组成。本实验表明,与 MMT 相比, Cu-MMT 的外表面积较大,但微孔表面积却较小,这样 Cu-MMT 的总比表面积低于 MMT。说明载铜后,蒙脱石的微孔面积下降,可能是由于少量 Cu^{2+} 进入蒙脱石微孔。Heller-Kalla 等^[10]和 Mosser 等^[11]报道, Cu^{2+} 既可存在于蒙脱石层间,也可进入硅氧四面体片的复三角形微孔,推测可能还有少量 Cu^{2+} 进入了铝氧八面体微孔,这些 Cu^{2+} 占据了微孔空间,使微孔的比表面积下降。

Table 1 Cation exchange capacity and specific surface area of the tested materials ($n=3$)

Parameter	MMT	Cu-MMT
Cation exchange capacity/ $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	1.05 ± 0.05	1.19 ± 0.07*
Total surface area/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	760.1 ± 24.3	652.9 ± 22.0*
Micropore surface area/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	401.8 ± 21.7	200.8 ± 17.1*
External surface area/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	358.3 ± 19.7	452.1 ± 23.7*

* $P < 0.05$ vs MMT group

2 Zeta电位

Zeta电位测定结果表明(图1),载铜蒙脱石 zeta电位的绝对值低于蒙脱石,说明少量 Cu^{2+} 可通过静电作用吸附于蒙脱石的层间、棱边甚至微孔中,使蒙脱石所带负电荷的密度下降。就静电吸附而言,载铜蒙脱石吸附细菌的能力要大于蒙脱石。因为在生理条件下,细菌细胞壁带负电荷^[12]。另外,载铜后蒙脱石微粒 zeta电位峰的宽度缩小,提示 Cu^{2+} 降低了双电层的厚度,使带电微粒在热运动中的拖尾现象减弱。

3 载铜蒙脱石抑菌和杀菌活性

MIC和 MBC的测定结果见表2所示。Cu-MMT 对大肠杆菌有较强的抑制和杀灭作用, MIC和 MBC 分别为 0.16 和 $0.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而在所试验的浓度范围内, MMT 未见抗菌活性。由 Cu-MMT 对大肠杆菌的抑菌曲线(图2)可见,与对照 ($0.0 \times \text{MIC}$) 相

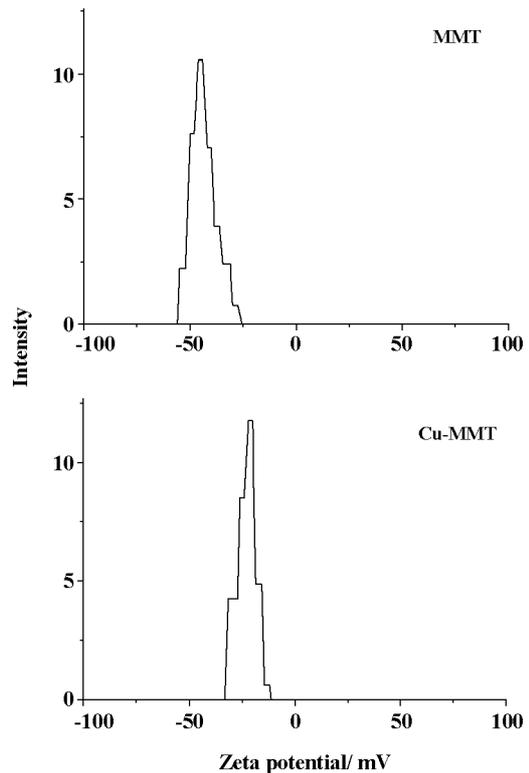


Figure 1 Zeta potential and its distribution of the tested materials

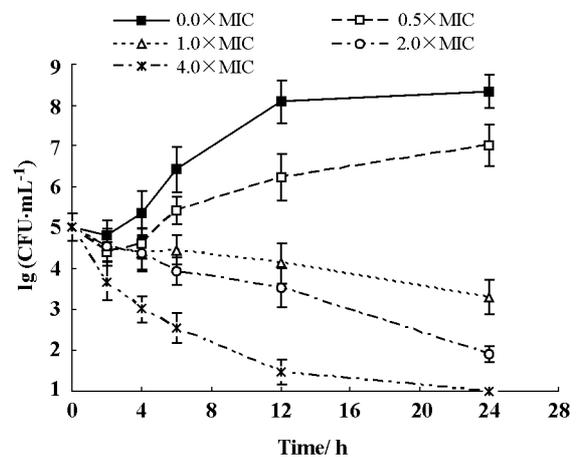


Figure 2 Inhibition curves of Cu-MMT against *E. coli*

Table 2 Values of MIC and MBC for the tested agents against *E. coli* ($n=3$)

Material	MIC/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	MBC/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
Cu-MMT	0.16	0.64
MMT	> 20.48	> 20.48

The initial concentration of *E. coli* was $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$

比,含 $0.5 \times \text{MIC}$ 质量浓度 Cu-MMT 细菌数虽有下

降,但还不能有效抑制大肠杆菌的生长与增殖。随着 Cu-MMT质量浓度的增加,其抑菌效果也随之增强。4.0 × MIC质量浓度 Cu-MMT与大肠杆菌孵育 24 h时,将检测不到活大肠杆菌的存在。

从 Cu-MMT杀灭大肠杆菌的曲线(图 3)分析,0.5 × MBC质量浓度 Cu-MMT就显示杀菌作用,在 24 h时完全杀灭大肠杆菌需 1.0 × MBC质量浓度。而 4.0 × MBC质量浓度 Cu-MMT,在 4 h内就能完全杀灭大肠杆菌。

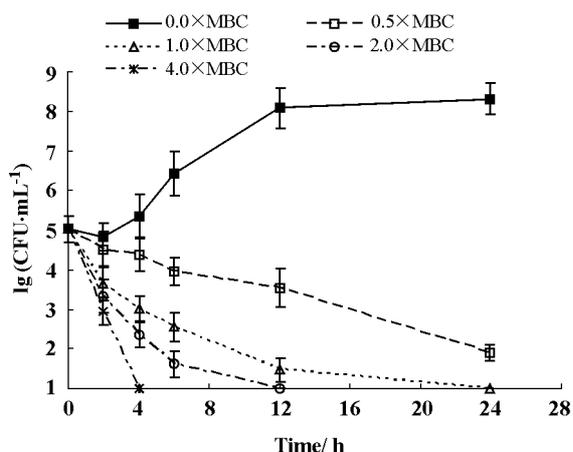


Figure 3 Killing curves of Cu-MMT against *E. coli*

4 菌液中胞内酶活性

在正常情况下,细菌胞内酶很少释放到菌体外,只有当细菌细胞膜结构发生变化,通透性明显增强时,胞内酶才能释放到菌体外。天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶和丙氨酸氨基转移酶是胞内酶,也常作为细胞受损程度的指示剂^[13]。菌液中酶活性升高,反映了细胞膜受损或细胞膜渗透压发生了改变。从表 3可知,大肠杆菌与 Cu-MMT作用 2 h后,可从滤液中检测到这 3种酶,其活性均显著高于对照组。说明 Cu-MMT可引起细菌细胞膜通透性改变,或使细菌细胞膜受损。

5 载铜蒙脱石抑制、杀灭大肠杆菌的机制

本实验浓度范围内未发现蒙脱石有抗菌作用,

Table 3 Activities of aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase in the tested bacteria solution (n = 3)

Group	Aspartate aminotransferase	Lactate dehydrogenase	Alanine aminotransferase
No Cu-MMT	12.98 ± 0.94	8.47 ± 0.74	13.87 ± 1.31
0.128 mg·mL ⁻¹ Cu-MMT	122.7 ± 16.8*	137.4 ± 12.9*	229.6 ± 21.0*

* P < 0.05 vs No Cu-MMT

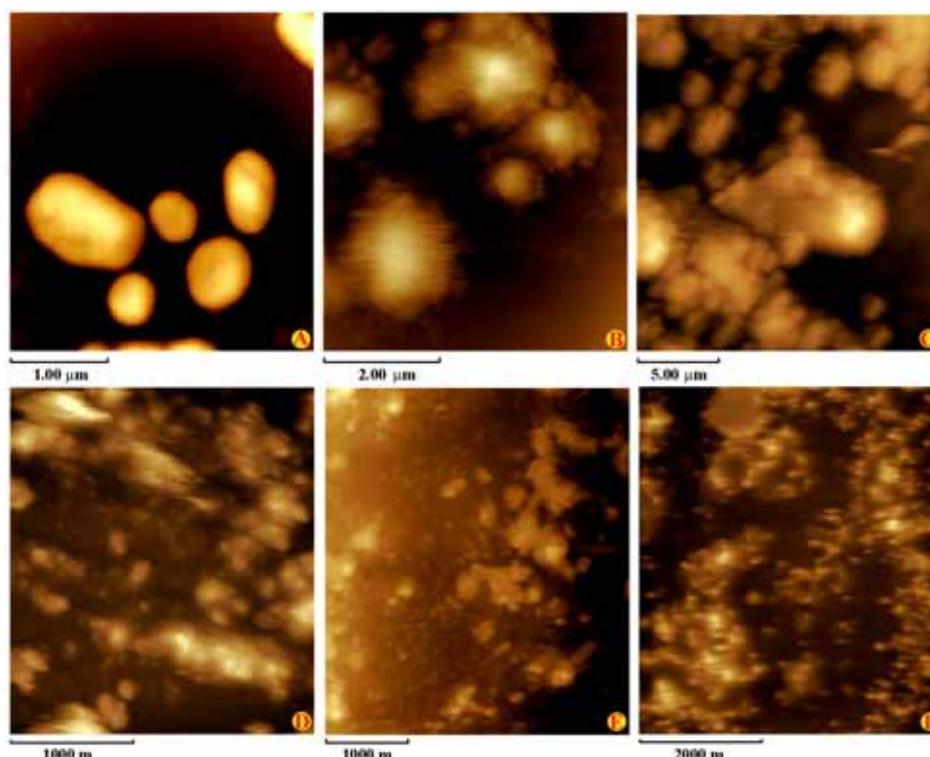


Figure 4 Atomic force microscopy of morphology of *E. coli* exposed to Cu-MMT for 0 h (A, no Cu-MMT addition), 2 h (B), 4 h (C), 6 h (D), 8 h (E), and 12 h (F). The initial inoculum was $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ CFU·mL⁻¹ and the Cu-MMT concentration was $2.0 \times$ MBC

这与胡秀荣等^[14]的研究结果一致。作者以前研究表明,蒙脱石对大肠杆菌、沙门菌和金葡菌无抑菌和杀菌活性,只呈现较强的吸附和固定作用^[15]。然而,当蒙脱石承载 Cu^{2+} 后,显示了较强的抑菌和杀菌活性,其机制可能是基于蒙脱石的吸附作用和 Cu^{2+} 的抑菌作用。蒙脱石吸附细菌能力主要源于表面张力、范德华力和静电作用等。较大的比表面积决定了 Cu-MMT 对细菌具有较强的物理吸附能力。但蒙脱石与细菌间的静电吸附相对较弱,因为细菌细胞壁带有负电荷^[12],而蒙脱石在生理 pH 值下表面也带负电荷^[16,17]。而载铜后蒙脱石表面的负电荷密度下降,可增强蒙脱石与细菌间的静电吸附作用。有关 Cu^{2+} 的抗菌机制尚处于假设验证阶段,一些学者认为, Cu^{2+} 可穿透细胞壁,与细胞膜蛋白质中存在的巯基、氨基等含硫、含氮官能团发生反应,使膜蛋白变性,膜通透性增大^[18]。从本实验拍摄的原子显微镜图(图 4)可见, Cu-MMT 先与大肠杆菌发生吸附作用,然后使细菌形态改变,细菌细胞膜损伤,细胞内容物外泄。这与菌液胞内酶活性的测定结果一致。推测 Cu-MMT 的杀菌机制为借助表面张力、范德华力及静电作用等与细菌发生强吸附作用; Cu-MMT 上富集的 Cu^{2+} 使细菌细胞膜或膜内蛋白变性,细胞膜形态改变,膜通透性增大,细胞内容物外泄,最后导致细菌死亡。

References

- [1] Levy SB. The challenge of antibiotic resistance [J]. *Sci Am*, 1998, 278: 46 - 53.
- [2] Ramos AJ, Hernández E. *In vitro* aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate: a study of adsorption isotherms [J]. *Anim Feed Sci Tech*, 1996, 62: 263 - 269.
- [3] Vieras C, Lopez-Galindo A. Pharmaceutical applications of some Spanish clay (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies [J]. *Appl Clay Sci*, 1999, 14: 69 - 82.
- [4] Herrera P, Burghardy RC, Phillips TD. Adsorption of *Salmonella enteritidis* by cetylpyridinium-exchanged montmorillonite clays [J]. *Microbiology*, 2000, 74: 259 - 272.
- [5] Xu ZR, Ma YL, Hu CH, et al. Effects of Cu (II)-exchanged montmorillonite on growth performance, intestinal microflora, bacterial enzyme activities, and morphology of broilers [J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2003, 16: 1673 - 1679.
- [6] Ma YL, Xu ZR, You P. Study on adsorption of modified montmorillonite for methylene blue [J]. *J Chin Ceram Soc (硅酸盐学报)*, 2004, 32: 970 - 974, 981.
- [7] Wang LD, Shen LD. A lab technique for the determination of the cation exchange capacity of argillaceous sandstone samples and its application [J]. *Pet Explor Dev (石油勘探与开发)*, 1993, 20: 72 - 78.
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard M7-A4. 4th ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards [S]. 1997.
- [9] Bahranowski K, Dula R, Labanowska M, et al. ESR study of Cu centers supported on Al-, Ti-, Zr-pillared montmorillonite clays [J]. *Appl Spectrosc*, 1996, 50: 1439 - 1445.
- [10] Heller-Kallai L, Mosser C. Migration of Cu ions in Cu montmorillonite heated with and without alkali halides [J]. *Clays Clay Miner*, 1995, 43: 738 - 743.
- [11] Mosser C, Michot LJ, Villieras F, et al. Migration of cations in copper (II)-exchanged montmorillonite and laponite upon heating [J]. *Clays Clay Miner*, 1997, 45: 789 - 802.
- [12] Breen PJ, Compadra CM, Fifer EK, et al. Quaternary ammonium compounds inhibit and reduce the attachment of viable *Salmonella typhimurium* to poultry tissues [J]. *J Food Sci*, 1995, 60: 1191 - 1196.
- [13] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 64: 313 - 320.
- [14] Hu XR, Lu GL, Chen LS, et al. Study of the mechanism of the interaction between montmorillonite and bacterium [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2002, 37: 719 - 720.
- [15] Ma YL. Study on Characterization of Cu^{2+} -loaded Layer Silicate Nanoparticles and Its Mechanism of Applied Effect in Broilers (载铜硅酸盐纳米微粒的表征及其对肉鸡应用效果的机制研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.
- [16] Stotzky G. Surface interactions between clay minerals and microbes, viruses, and soluble organics, and the probable importance of these interactions to the ecology of microbes in soil. *Microbial Adhesion to Surfaces [M]*. Chichester: Ellis Norwood, 1980: 231 - 247.
- [17] Lu XC, Yin L, Zhao LZ, et al. Surface characteristic of some layer silicate clay [J]. *J Chin Ceram Soc (硅酸盐学报)*, 2003, 31: 60 - 65.
- [18] Ma YL, Xu ZR. Advances in ion-type inorganic antibacterial materials [J]. *Mater Rev (材料导报)*, 2004, 18: 16 - 18.