

文章编号: 1003-8701(2007)04-0056-03

载锌蒙脱石对大肠杆菌 K88 抗菌效果的影响

苗志国, 李国旺, 郭丽萍

(河南科技学院动物科学学院, 河南 新乡 453003)

摘 要: 通过阳离子交换反应合成了载锌蒙脱石($\text{Zn}^+\text{Ca- MMT}$ & $\text{Zn}^+\text{Na- MMT}$), X 射线衍射分析显示, 载锌反应前后, 蒙脱石的(001)面网间距增大, 表明锌是以水合阳离子形式进入蒙脱石晶格层间位置。体外抗菌试验表明, 蒙脱石(Ca- MMT & Na- MMT)未显抗菌活性, 而 $\text{Zn}^+\text{Ca- MMT}$ 和 $\text{Zn}^+\text{Na- MMT}$ 对大肠杆菌 K88 均有很强的抑制和杀灭作用, 且后者的杀菌效果优于前者。

关键词: 载锌蒙脱石; 大肠杆菌 K88; 杀菌效果

中图分类号: S852.61*2

文献标识码: A

新生及断乳仔猪的痢疾非常普遍, 主要由大肠杆菌 K88 引起的^[1], 解决此问题的关键途径就是使用抗生素, 然而, 抗生素的滥用必将产生一系列的副作用以及增加细菌的抗生素抗性^[2]。因此, 开发新型的抗生素替代品作为饲料添加剂是非常有必要的。无机抗菌剂材料日益受到人们关注。特别是金属离子型无机抗菌剂, 具有抗菌和杀菌的效果。其中应用效果最好的金属离子是 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等^[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, 具有很强的吸附、离子交换能力^[4], 对各种病毒、细菌以及所产生的毒素等有优良的吸附能力, 鉴于目前国内外有关 Ag^+ 、 Cu^{2+} 型无机抗菌剂的研究较多, 而有关 Zn^{2+} 的无机抗菌剂报道较少, 故本试验通过吸附、离子交换反应, 把抗菌性 Zn^{2+} 植入蒙脱石晶格, 制成了载锌蒙脱石。来研究体外条件下其对大肠杆菌 K88 杀菌效果的影响, 旨在研究载锌蒙脱石替代抗生素作为饲料添加剂的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料制备

本试验选用的钙蒙脱石(Ca- MMT)和钠蒙脱石(Na- MMT)材料取自于内蒙古赤峰地区。将材料粉碎后过 300 目, 加入 5 倍质量的双蒸水, 搅拌 1 h, 静置 3 h, 弃上清和底部的杂质, 重复 2~3 次, 补加双蒸水至原来体积, 再搅拌 1 h, 静置 30 min 后收集悬浮液在 80~85℃ 的烘箱中烘干, 磨细过 400 目, 制得蒙脱石纯品。

分别取上述提纯后的蒙脱石, 加入 10 倍质量的双蒸水, 搅拌 1 h 后, 按照 1.5 阳离子交换容量(Cation exchange capacity, CEC)加入锌离子(7 水硫酸锌, 分析纯), 搅拌 24 h, 离心后用双蒸水洗涤 2~3 次, 于 80~85℃ 条件下烘干、磨细过 400 目筛备用, 即制得载锌蒙脱石样品($\text{Zn}^+\text{Ca- MMT}$, $\text{Zn}^+\text{Na- MMT}$)。

1.2 载锌蒙脱石中锌含量的测定

在载锌材料制备过程中, 收集上清液和洗涤液, 经过适当的稀释定容后, 用原子吸收光谱测定未交换的锌离子含量, 从而计算出载锌钙蒙脱石($\text{Zn}^+\text{Ca- MMT}$)、载锌钠蒙脱石($\text{Zn}^+\text{Na- MMT}$)材料中锌的含量, 作 3 个平行试验, 每个试验重复 3 次。

1.3 材料的 XRD 分析与阳离子交换容量的测定

收稿日期: 2007-02-03

作者简介: 苗志国(1977-), 男, 在读博士, 讲师, 从事市场营养研究。

使用 XD-98 型自动射线衍射仪对 Ca-MMT、Na-MMT、Zn²⁺-Ca-MMT、Zn²⁺-Na-MMT 材料进行载锌前后的 XRD 衍射谱线分析; 并采用醋酸铵-乙醇定氮蒸馏法测定各材料的阳离子交换容量^[5]。

1.4 菌株及其培养基

实验菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*)ATCC K88, 购自中国药品生物制品监察所。MH 肉汤培养基、MH 营养琼脂培养基, 购自 Difco 公司。

1.5 实验方法

1.5.1 细菌悬液

取保存的大肠杆菌 K88 菌株, 解冻后接种于 MH 肉汤培养基中, 37℃摇床中(80cycles/min)培养过夜, 为获得对数期生长的细菌, 将 5 μL 菌液接种于 5 mL 的新鲜 MH 肉汤培养基中, 37℃摇床中孵育至对数生长期, 4℃下 4 000 r/min 离心 10 min, 用预冷的 PBS 液洗涤 2 次, 然后悬浮于 PBS 液中。用 752 型紫外可见分光光度计, 在 620 nm 处测定细菌光密度(OD)值。按: 细菌数=OD₆₂₀×5×10⁷/0.20(CFU/mL), 使最终接种菌量为 1-2×10⁵ CFU/mL。

1.5.2 最小抑菌浓度(MIC)的测定

采用美国国立临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的肉汤稀释法的基础上稍加改动。分别将 Ca-MMT、Na-MMT、Zn²⁺-Ca-MMT、Zn²⁺-Na-MMT 材料于 96 孔培养板上进行 2 倍稀释, 然后加入实验菌株使最初菌液浓度为 1-2×10⁵ CFU/mL, 混匀。37℃摇床中(80cycles/min)培养 24 h, 未见细菌生长的最低抗菌浓度为 MIC。每个材料重复 3 次, 有 2 次或 2 次以上结果相同时作为材料的 MIC。

1.5.3 最小杀菌浓度(MBC)的测定

在 MIC 测定结束时, 将未见到细菌生长的最低抗菌浓度相对应的肉汤孔内容物转接到不含抗菌剂的琼脂平皿上, 之后, 再经过 37℃摇床中(80cycles/min)培养 24 h, 琼脂平皿上未见细菌生长的最低抗菌剂浓度为 MBC。每个材料重复 3 次, 有 2 次或 2 次以上结果相同时作为材料的 MBC。

2 结果与讨论

2.1 XRD、CEC 和锌含量分析

从表 1 可以看出, 载锌前 Ca-MMT、Na-MMT 的 d(001)值分别为 1.543 nm 和 1.248 nm, 说明两者分别属于典型的钙质和钠质蒙脱石; 因为钙质蒙脱石常出现奇数级的底面反射, d(001)在 1.518 2~1.555 0 nm 之间, 而钠型蒙脱石常出现偶数级底面反射d(001)在1.240 4~1.298 7 nm之间^[6], 而载锌之后 Zn²⁺-Ca-MMT、Zn²⁺-Na-MMT 的 d(001)值分别为 1.571 nm 和 1.586 nm, 说明承载锌离子之后, 层状硅酸盐的(001)面网间距增加, 因此认为, 锌离子交换层间的阳离子引起蒙脱石 d(001)值增大的原因, 可能是由于锌离子主要是以水合阳离子的形式进入了蒙脱石晶格的层间位置。

CEC 值的高低不仅反映黏土矿物的晶体结构中可交换离子的总量, 而且也反映了黏土矿物离子交换吸附的能力。由表 1 可以看出, 载锌后的蒙脱石 CEC 值与载锌前相比均有提高, 说明层状硅酸盐对溶液中锌离子的作用, 除了离子交换吸附之外, 还存在其他形式的吸附方式如静电吸附、范德华力吸附等, 这样使吸附到矿物晶体中锌离子含量要大于其交换出的阳离子量。Zn²⁺-Na-MMT 的 CEC 值为 1.48 mol(+)/kg 高于 Zn²⁺-Ca-MMT 的 CEC 值为 1.35 mol(+)/kg, 所以前者的载锌量高于后者。

2.2 MIC 和 MBC 分析

由表2可以看出, Ca-MMT和Na-MMT对E.coli K88无抑菌和杀菌作用 (MIC、MBC>8 192 μg/ml)。而载锌之后的 Zn²⁺-Ca-MMT 和 Zn²⁺-Na-MMT 对 E.coli K88 均有抑菌和杀菌作用。其中, Zn²⁺-Ca-MMT 对 E.coli K88 的 MIC 为 128 μg/ml,

表 1 不同蒙脱石材料的表征系数

materials	CEC(mol(+)/kg)	d(001)(nm)	Zn (%)
Ca-MMT	1.15	1.543	
Na-MMT	1.42	1.248	
Zn ²⁺ -Ca-MMT	1.35	1.571	2.08
Zn ²⁺ -Na-MMT	1.48	1.586	2.56

表 2 不同蒙脱石材料对大肠杆菌 K88 抗菌活性的影响
μg/mL

Materials	MIC	MBC
Ca-MMT	> 8 192	> 8 192
Na-MMT	> 8 192	> 8 192
Zn ²⁺ -Ca-MMT	128	512
Zn ²⁺ -Na-MMT	64	256

MBC 为 $512\mu\text{g/ml}$; 而 $\text{Zn}^+ \text{Na}^- \text{MMT}$ 对 *E.coli* K88 的 MIC 为 $64\mu\text{g/ml}$, MBC 为 $256\mu\text{g/ml}$ 。即 $\text{Zn}^+ \text{Na}^- \text{MMT}$ 与 $\text{Zn}^+ \text{Ca}^- \text{MMT}$ 相比, MIC 和 MBC 分别降低了 2 倍。说明载锌后蒙脱石的杀菌作用与其所含的锌离子量呈正比。

这不难看出, 硅酸盐本身无抑菌、杀菌作用, 但其层间阳离子具有可交换的特性, 能将具有杀菌作用的无机锌离子交换、吸附至层间, 从而导致纳米硅酸盐电价失衡, 使矿物质本身带正电荷, 而和带负电荷的 *E.coli* K88 通过静电吸引, 使细菌大量吸附在纳米载锌蒙脱石表面, 然后锌离子发挥直接的杀菌作用。因此, 蒙脱石表面的有效锌离子浓度远远大于它在介质中的实际浓度, 它的杀菌作用是静电吸附和锌离子杀菌能力共同作用的综合结果。而且锌离子与细菌表面官能团的亲和力很强, 与之结合后, 使细菌蛋白变性, 进而杀死病原菌。这可能就是载锌蒙脱石的杀菌机理。

3 小 结

本实验以蒙脱石和硫酸锌为原料制得的载锌蒙脱石中, 锌主要以水合阳离子的形式, 且以离子交换的方式进入层状蒙脱石硅酸盐的晶格层间。此外还有少量的锌以化学吸附的形式进入 Si-O 四面体和 Al-O 八面体的微孔中, 通过离子交换和静电吸附于层间的锌, 可以降低蒙脱石所带的负电荷, 从而增加对大肠杆菌的吸收功能, 为蒙脱石表面高浓度的锌离子杀灭细菌创造了有利的条件。载锌蒙脱石对大肠杆菌 K88 具有较强的抑菌、杀菌功能, 故可以作为抗生素替代品的候选材料。

参考文献:

- [1] Hampson, D.J., Postweaning *Escherichia coli* diarrhea in pigs. In: Gyles CL (ed) *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, UK, 1994: 629- 647.
- [2] Kunin, C.M., Resistance to antimicrobial drugs- a worldwide calamity. *Ann Intern Med.* 1993, 118(7):557- 561 .
- [3] 许 莹. 无机抗菌剂的制备及在建筑用杀菌涂料中的应用[J]. 装饰装修材料, 2003(2): 17 .
- [4] Ramos A J, Hernandez E. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate. A study of adsorption isotherms. *Animal Feed Science Technology*, 1996, 62: 263- 269 .
- [5] 王连娣, 沈联蒂, 泥质砂炭阳离子交换能力测试技术及其应用 [J]. 石油勘探与开发, 1993, 20(2): 72- 78 .
- [6] 杨雅秀, 张乃嫻, 中国黏土矿物[M]. 北京: 地质出版社, 1994: 116- 124 .

Effect of Zinc Bearing Montmorillonite on Antibacterial *Escherichia Coli* K88

MIAO Zhi- guo, LI Guo- wang, GUO Li- ping

(Animal Science College, Henan Science and Technology College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Zinc bearing montmorillonite ($\text{Zn}^+ \text{Ca}^- \text{MMT}$ & $\text{Zn}^+ \text{Na}^- \text{MMT}$) were produced by zinc cation exchange reaction. X- ray diffraction analysis showed that the (001) basal spacing of montmorillonite crystal lattice increased after zinc cation exchange. This indicated that Zn^{2+} entered into the interlayer position of MMT as a hydrated cation or composite cation. The results obtained from antimicrobial trial in vitro indicated that MMT ($\text{Ca}^- \text{MMT}$ & $\text{Na}^- \text{MMT}$) has no antibacterial activity. $\text{Zn}^- \text{MMT}$ has strong antibacterial ability on the *E.coli* K88, and the antibacterial activity of the latter better than former.

Key words: Zinc Bearing Montmorillonite; *E. coli* K88; Antibacterial Activity