

载铜蒙脱石的抗菌机理研究

夏枚生 胡彩虹 赵文艳

(浙江大学动物科学学院 动物分子营养学教育部重点实验室 杭州 310029)

摘 要 :研究载铜蒙脱石对副溶血弧菌的抗菌效果和机理。载铜蒙脱石对副溶血弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 75mg/L 和 300mg/L,而蒙脱石未显抗菌活性。细菌胞内酶活性结果显示,载铜蒙脱石可使细菌细胞膜发生损伤或通透性增大,导致细菌胞内酶的外漏。载铜蒙脱石对细菌呼吸代谢影响的结果表明,载铜蒙脱石可抑制三羧酸循环途径。原子力显微镜动态观察载铜蒙脱石作用下副溶血弧菌形态变化的结果发现,载铜蒙脱石能破坏细菌细胞膜。

关键词 载铜蒙脱石;抗菌;机理

中图分类号 S941.42 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2006)03-0432-04

长期使用抗生素和抗菌药物,造成诸如细菌抗药性、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。

采用无机材料为载体,掺入抗菌金属离子而制成的无机抗菌剂,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。蒙脱石是一种双八面体层状结构的天然纳米级铝硅酸盐矿物,具有良好的分散性与阳离子交换能力,十分适合于用作各种无机抗菌剂的载体。我们通过吸附、离子交换反应把抗菌性铜离子植入蒙脱石晶格,制成载铜蒙脱石,并使蒙脱石在搭载铜离子后表面剩余正电荷,从而提高其吸附带负电荷的细菌的能力;另一方面,利用蒙脱石巨大的比表面积及其缓释效应,通过抗菌性铜离子的溶出而具有很强的吸附、杀菌能力^[1,2]。载铜蒙脱石对猪、鸡、罗非鱼作用效果的结果表明,载铜蒙脱石能有效抑制肠道病原菌增殖,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^[3~5]。本文以副溶血弧菌为水产病原菌模型菌,研究载铜蒙脱石的抗菌机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 原料:以内蒙古赤峰的钙基蒙脱石和硫酸铜

为主要原料,采用液相离子交换法制备载铜蒙脱石^[1~5]。载铜蒙脱石中铜的质量分数为 2.5%,阳离子交换容量为 1.48mol(+)/kg, BET 比表面积为 302.3m²/g。

1.1.2 试验用菌株:副溶血弧菌 ATCC 27519 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.3 主要试剂和仪器:Tryptic Soy Broth(TSB)和 Tryptic Soy agar(TSA)购自 Difco 公司。RX-DAYTONA 型全自动生化分析仪(英国)、SP-II 型溶氧电极(Rank Brothers, Cambridge, UK)、SPM-9500J3 型 AFM(日本岛津)。

1.2 细菌培养

副溶血弧菌解冻后接种于含 30g/L NaCl 的 TSB 中 28℃ 培养过夜。接种 50μL 菌液于 50mL 30g/L NaCl 的 TSB 中,28℃ 摇床孵育至对数生长期,4℃、4000r/min 离心 15min。用含 30g/L NaCl 的无菌去离子水洗 2 次,然后悬浮于含 30g/L NaCl 的无菌去离子水中,并调整上述试验菌液浓度为 1~2 × 10⁵ colony forming unit(CFU)/mL 备用。

1.3 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

采用美国国立临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory standards, NCCLS)^[6]推荐的肉汤稀释法,分别将蒙脱石和载铜蒙脱石进行 2 倍稀释,然后加入试验菌株使最初菌液浓度为 1~2 × 10⁵ CFU/mL,混匀。28℃ 摇床培养

基金项目 浙江省科技厅重点攻关项目(2005C22054)

作者简介 夏枚生(1965-),男,江西余干人,博士,副研,从事饲料添加剂和营养调控研究 Tel: 86-571-86985607; Fax: 86-571-86946710;

E-mail: mxsxia@zju.edu.cn

收稿日期 2005-07-16; 接受日期 2005-09-19; 修回日期 2005-12-21

24h, 未见细菌生长的为最低抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC)。将未见细菌生长的低抑菌浓度的肉汤管转种至不含抗菌剂的琼脂平皿, 再经 28℃ 培养 24h, 琼脂平皿上未见细菌生长的为最低杀菌浓度 (Minimal bactericidal concentration, MBC)。

1.4 细菌胞内酶活性分析

载铜蒙脱石以 600mg/L 的浓度与 10mL 菌液 (菌液浓度为 4×10^5 CFU/mL) 混匀, 另取 1 支不含载铜蒙脱石的菌液做空白对照。上述各管 160r/min、28℃ 培养 2h。悬浮液经 0.45 μ m 微孔滤膜 (Millipore) 过滤, 滤液在 RX Daytona 全自动生化分析仪上用试剂盒分析天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 活性。每一实验重复 3 次。数据分析采用 SAS (6.12) 软件, 用 Student's t-test 进行差异显著性分析。P < 0.05 表示差异显著。

1.5 载铜蒙脱石对细菌呼吸代谢的影响

采用 SP-II 型溶氧电极 (Rank Brothers, Cambridge, UK) 测定耗氧量^[7]。在反应杯中加入 1.5mL 4.0×10^8 CFU/mL 悬浮在 pH 7.2 的磷酸盐缓冲液中的菌液, 平衡 5min 后加入 0.8mL 葡萄糖溶液 (终浓度为 1mmol/L), 然后密封系统。10min 后, 加入载铜蒙脱石 (终浓度为 600mg/L)。由菌液中溶氧量的变化求出菌体的呼吸速率 (μ mol O₂/g·min)^[8]。根据载铜蒙脱石加入前后菌体的呼吸速率, 用下式求出载铜蒙脱石对菌体呼吸的抑制率:

$$I_R(\%) = \frac{(R_0 - R_1)}{R_0} \times 100$$

其中 I_R 为载铜蒙脱石对菌体呼吸的抑制率 (%), R_0 、 R_1 分别为载铜蒙脱石加入前后菌体的呼吸速率。根据典型抑制剂加入前后菌体的呼吸速率, 用下式求出典型抑制剂对载铜蒙脱石的叠加率:

$$R_R(\%) = \frac{(R_1 - R_1')}{R_1} \times 100$$

其中 R_R 为典型抑制剂对载铜蒙脱石的叠加率 (%), R_1 为载铜蒙脱石加入后菌体的呼吸速率, R_1' 为加入典型抑制剂后菌体的呼吸速率。根据叠加率的大小推断其作用部位。典型抑制剂为丙二酸、碘乙酸、磷酸钠^[8]。每一实验重复 3 次。

1.6 原子力显微镜动态观察载铜蒙脱石作用下细菌形态的变化

参考张永青等^[9]的方法。载铜蒙脱石以

600mg/L 的浓度与菌液 (菌液终浓度为 $1 \sim 2 \times 10^5$ CFU/mL) 混匀, 28℃ 摇床培养, 分别在 0、0.5、3、6h 时定量采样, 用 2.5% 戊二醛 4℃ 固定, 用培养液适当稀释, 吸取少量细菌悬液, 小心滴于天然的新解离的云母片上, 待水分自然风干, SPM-9500J3 型 AFM 观察细菌形态变化。采用接触式扫描模式在大气环境下进行成像, 扫描针尖为 Si₃N₄ 针尖, 图像采集为恒力模式, 所有图像均通过自动平滑处理以消除慢扫方向的低频噪音。

2 结果

2.1 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度

载铜蒙脱石对副溶血弧菌的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度分别为 75mg/L 和 300mg/L, 而蒙脱石在试验浓度范围内, 未显抗菌活性 (其最小抑菌浓度和最小杀菌浓度 > 50000mg/L)。

2.2 载铜蒙脱石对细菌胞内酶活性的影响

载铜蒙脱石对细菌胞内酶活性的影响见表 1。载铜蒙脱石使滤液中天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶活性显著升高 (P < 0.05)。

表 1 载铜蒙脱石对细菌胞内酶活性的影响 (U/L)

Table 1 Effect of Cu-MMT on enzyme activity of bacteria (U/L)

Bacterial enzyme	Control	Treatment
Aspartate aminotransferase	15.3 ± 1.9	114.8 ± 13.8*
Alanine aminotransferase	15.5 ± 1.8	146.6 ± 18.8*
Lactate dehydrogenase	18.2 ± 1.4	210.6 ± 14.8*

Values are presented as means and standard deviations; n = 3 per treatment. Means in a line labeled * differ significantly (P < 0.05).

2.3 载铜蒙脱石对细菌呼吸代谢的影响

从表 2 可见, 载铜蒙脱石对副溶血弧菌的呼吸抑制率为 31.8%, 与典型抑制剂磷酸钠、碘乙酸、丙二酸的叠加率分别为 48.6%、27.8% 和 17.5%。比较叠加率可知, 载铜蒙脱石与丙二酸的叠加率最小, 说明丙二酸与载铜蒙脱石的增效作用最弱。

表 2 载铜蒙脱石对对细菌呼吸代谢的影响

Table 2 Effect of Cu-MMT on the respiratory metabolism of bacteria

Inhibitors	$I_R, \%^1$	$R_R, \%^2$
Cu-MMT	31.8 ± 2.8	
Sodium phosphate	62.5 ± 5.7	48.6 ± 5.3
Iodine acetic acid	59.4 ± 6.2	27.8 ± 2.8
Malonic acid	52.2 ± 4.9	17.5 ± 2.2

¹ I_R represents the respiratory inhibition percent of bacteria after Cu-MMT addition; ² R_R represents the respiratory superposing inhibition percent of bacteria after typical inhibitor addition.

2.4 原子力显微镜动态观察载铜蒙脱石作用下副溶血弧菌形态的变化

图 1-A 为副溶血弧菌的原子力显微镜 (AFM) 图, 显示副溶血弧菌呈杆状, 其细胞表面比较光滑。图 1-B、图 1-C 和图 1-D 分别表示载铜蒙脱石作用 30min、3h、6h 时副溶血弧菌 AFM 图, 结果显示, 载铜蒙脱石作用 30min 时细胞表面变得比较粗糙, 但仍保持其杆状的整体形貌; 载铜蒙脱石作用 3h 时, 细菌细胞膜破裂; 载铜蒙脱石作用 6h 时, 细菌裂解。

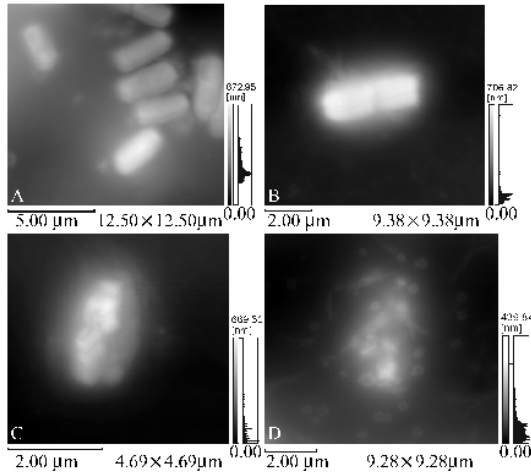


图 1 (A) 副溶血弧菌 AFM 图 (B~D) 载铜蒙脱石作用 30min (B)、3h (C) 和 6h (D) 的副溶血弧菌 AFM 图

Fig. 1 AFM image of *Vibrio parahaemolyticus* (A); AFM image of *Vibrio parahaemolyticus* exposed to Cu-MMT for 30min (B) 3h (C) 6h (D).

3 讨论

本研究表明, 在所试浓度范围内, 未发现蒙脱石对副溶血弧菌有抗菌作用, 但载铜蒙脱石具有较强的抗菌作用, 这与胡秀荣等^[10]、夏枚生^[1]和胡彩虹等^[2]的报道一致。蒙脱石与细菌间的吸附作用分为物理吸附和化学吸附。蒙脱石、载铜蒙脱石、副溶血弧菌在 pH 为 6.0 时的 Zeta 电位分别为 -21mV、-11.8mV、-22mV (另文发表)。因此, 蒙脱石与细菌间靠静电作用的化学吸附较弱, 蒙脱石主要以物理吸附的形式与细菌发生作用。载铜蒙脱石所载铜主要以水合或复合阳离子形式进入蒙脱石层间, 还有少量铜进入蒙脱石的微孔, 进入层间和微孔的铜均可降低蒙脱石所带负电荷的密度, 并可导致电价失衡, 使之带正电荷, 从而增大其与细菌间的静电吸附。细菌吸附到载铜蒙脱石表面后, 表面富集的 Cu^{2+} 对其执行杀菌作用^[1-5]。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至表面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, 载铜蒙脱石对细菌的抗菌效能, 是静电吸附与铜离子杀菌能力协同作用的综合结果^[1-5]。

载铜蒙脱石对细菌胞内酶活性影响的结果显示, 载铜蒙脱石使滤液中天冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、丙氨酸氨基转移酶活性显著升高。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^[11]。本实验结果表明细菌细胞膜在载铜蒙脱石作用后通透性增加或受损严重, 酶从菌体内大量释放出来, 从而导致细菌死亡。原子力显微镜动态观察载铜蒙脱石作用下副溶血弧菌形态变化的结果也显示, 载铜蒙脱石先与细菌细胞膜发生反应, 细菌表面变得比较粗糙, 然后使细胞膜破裂, 细菌内容物外泄而死亡。

许多抗菌剂的抗菌途径是通过具有抗菌作用的离子渗透进入菌体细胞, 抑制微生物的呼吸作用, 从而导致细菌死亡。本试验所用的抗菌剂是载铜蒙脱石, 典型抑制剂是丙二酸、碘乙酸、磷酸钠, 它们分别抑制呼吸代谢途径中的三羧酸循环、糖酵解和磷酸戊糖途径^[8]。当抗菌剂与典型抑制剂抑制不同呼吸代谢途径时, 对微生物抑制作用较强, 表现出叠加率较大; 当抗菌剂与典型抑制剂抑制相同呼吸代谢途径时, 对微生物抑制作用较弱, 表现出叠加率较小^[8]。比较叠加率可知, 载铜蒙脱石与丙二酸的叠加率最小, 说明载铜蒙脱石与丙二酸抑制细菌呼吸代谢的途径相同, 即主要抑制细菌呼吸代谢的三羧酸循环途径。

参 考 文 献

- [1] Xia MS, Hu CH, Xu ZR, et al. Effects of copper bearing montmorillonite (Cu-MMT) on *Escherichia coli* and diarrhea on weanling pigs. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2004, **17**(12): 1712 - 1716.
- [2] Zhou YH, Xia MS, Ye Y, et al. Antimicrobial ability of Cu^{2+} -montmorillonite. *Applied Clay Sci*, 2004, **27**(3-4): 215 - 218.
- [3] Xia MS, Hu CH, Xu ZR. Effects of copper bearing montmorillonite on growth performance, digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci*, 2004, **83**(11): 1868 - 1875.
- [4] Hu CH, Xia MS, Xu ZR, et al. Effects of copper bearing montmorillonite on growth performance and digestive function of growing pigs. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2004, **17**(11): 1575 - 1581.

- [5] Xia MS, Hu CH, Xu ZR. Effects of copper bearing montmorillonite on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. *Anim Feed Sci Tech*, 2005, **118**(3-4):307-317.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory standards. Approved Standard M7-A4. 1997. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Pennsylvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- [7] Camper AK, McFeters GA. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1979, **37**: 633-641.
- [8] 陈亚非, 黄凯玲, 高健华, 等. α -溴代肉桂醛及烷烯基酸酯类对微生物的呼吸代谢的抑制作用研究. *食品与发酵工业*, 1994, **3**:26-29.
- [9] 张永青, 王睿, 朱曼, 等. 原子力显微镜观察头孢美唑抗生素后效应期间大肠埃希菌形态学特征. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, **9**:1123-1127.
- [10] 胡秀荣, 吕光烈, 陈林深, 等. 天然蒙脱石与细菌相互作用机理的研究. *药学学报*, 2002, **37**:718-720.
- [11] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Meth*, 1983, **64**:313-320.

Study on the antibacterial mechanisms of copper-bearing montmorillonite

XIA Mei-sheng*, HU Cai-hong, ZHAO Wen-yan

(College of Animal Science, The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27519 was chosen as indicator of aquacultural pathogenic bacteria to determine the antibacterial activity and mechanism of copper-bearing montmorillonite (Cu-MMT) in vitro. The results indicated that montmorillonite (MMT) had no antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal concentration (MBC) of Cu-MMT on *Vibrio parahaemolyticus* were 75 and 300 mg/L, respectively. The activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) of bacteria were examined and the results showed treatment with Cu-MMT could lead to significant release of intracellular enzymes from the tested bacteria suggesting that the permeability of the cell membrane increased and bacteria suffered injury. Three typical inhibitors (malonic acid, iodine acetic acid and phosphate sodium) were used to further study the inhibitory pathways of respiratory metabolism. Cu-MMT effectively inhibited respiratory metabolism of *Vibrio parahaemolyticus*, with the respiratory inhibition percent (I_R) of 31.8%. The respiratory superposing inhibition percent after addition of phosphate sodium, iodine acetic acid and malonic acid was 48.6%, 27.8% and 17.5%, respectively. These results indicated that the effect of malonic acid on superposing inhibition percent of Cu-MMT for bacteria is the lowest; thus, the synergic action between Cu-MMT and malonic acid is the weakest, indicating that they inhibited the same pathway of respiratory metabolism, i.e. the TCA pathway, which is the most important pathway of carbohydrate metabolism. The atomic force microscope image of *Vibrio parahaemolyticus* exposed to Cu-MMT showed that Cu-MMT could rupture the bacterial cell membrane.

Keywords: Cu bearing montmorillonite; Antibacterial mechanism; *Vibrio parahaemolyticus*