

蒙脱石对水相中沼泽红假单胞菌的吸附研究

王彦波, 韩剑众, 朱军莉

(浙江工商大学食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310035)

摘要:通过测定吸附条件对吸附率及吸附菌量的影响,研究了蒙脱石对水相中沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)的吸附特性。结果表明,当蒙脱石重量为0.5 g时,吸附菌量和吸附百分率均达到较恒定的状态,且受到菌液起始浓度和体积的影响。不同pH条件下,蒙脱石对菌的吸附率随着pH值的升高而逐渐降低,当pH=9时,有效吸附率为72.67%。蒙脱石对菌的吸附率与离子强度成反比。不同温度条件下,蒙脱石对菌的吸附率呈现出先升高、后降低的趋势,温度30℃时吸附率最高,为86.55%。表明蒙脱石对水相中菌的吸附不仅依赖于生物体的化学属性和表面属性,也受到环境温度等条件的影响。

关键词:沼泽红假单胞菌;蒙脱石;吸附

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)05-0046-04

养殖水质的控制与改善已成为水产养殖业能否可持续发展的关键因素。池塘中的益生菌与水环境密切相关,许多情况下可直接外源添加于养殖水体中,通过降解多余有机质,进而改善水质和底质、拮抗病原菌,对养殖动物产生有益的影响(王彦波等, 2006)。近年来,掀起了益生菌特别是以沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)为主的光合细菌改善养殖水质进而提高水生动物品质的应用和机理研究的热潮,很多学者报道了益生菌 *Rhodopseudomonas palustris* 的特性以及在水产养殖上的应用效果(王梦亮等, 2001;王彦波等, 2004; Larimer et al, 2003; Wang et al, 2005),但迄今所应用的大多是游离态的,易受水流影响,限制了其处理池塘水体有机物的能力。蒙脱石是一种天然的含水层状铝硅酸盐矿物,由于具有很好的吸附性、离子交换性、悬浮性等性质,在水和土壤的污染处理中,得到了日益广泛的应用(Ramos & Hernhndez, 1996)。如果充分发挥蒙脱石和益生菌 *Rhodopseudomonas palustris* 的优点,联合处理养殖用水,将具有非常重要的现实意义。鉴于此,本研究通过测定吸附条件对吸附率及吸附负载量的影响,研究了蒙脱石对水相中沼泽红假单胞菌的吸附特性,并初步探讨了蒙脱石在水相中吸附益生菌的机制,为生物蒙脱石的构建以及在池塘养殖环境修复的进一步应用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蒙脱石(内蒙古赤峰)参照马玉龙等(2005)方法制备,沼泽红假单胞菌由本实验室保存,富集培养基参照钱存柔和黄仪秀(1999)。

1.2 试验方法

1.2.1 蒙脱石对水相中菌的吸附 蒙脱石灭菌后干燥至衡重备用。将培养(30℃、72 h)的益生菌沼泽红假单胞菌加入无菌水中,制成不同浓度的菌悬液,按不同比例加入处理好的蒙脱石,每个处理组设6个重复,分别测定蒙脱石重量、菌液起始浓度以及菌液体积等不同吸附条件对吸附的影响。同时于30℃、250 r/min振荡0.5 h后静置2 h,用平板涂布计数法测定上清液和对照组中的菌量,计算有效菌量。数据采用SAS软件进行统计分析。

1.2.2 蒙脱石吸附菌的影响因素 通过测定在不同的pH值、离子强度和温度条件下,蒙脱石对沼泽红假单胞菌菌悬液的吸附率,研究蒙脱石吸附菌的影响因素(Mills & Dejesus, 1994),每个处理组设6个重复。菌悬液的处理参照Yee等(2000),将一定浓度的菌悬液悬浮在10 mL NaNO₃中(0.1 mol/L),加入0.5 g的蒙脱石,调节pH为5~9或温度20~50℃,不同离子强度(0.0001~0.1000 mol/L)通过NaNO₃调节。水浴中菌、蒙脱石和电解液共同平衡作用2 h,利用蔗糖密度梯度法测定吸附前后菌体湿重并计算吸附率(Nathan & Jeremy, 2000)。对照组为不添加蒙脱石的菌悬液,计算菌体损失率。将试验的实测率减去损失率即为有效吸附率,本实验最

收稿日期:2009-02-22

基金项目:国家自然科学基金(No. 30700620)资助。

作者简介:王彦波,男,1978年生,山东利津人,博士,副教授,主要从事水产养殖水质与水产品质量安全研究。E-mail: wangyb@mail.zjgsu.edu.cn

后结果均为有效吸附率。数据采用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 蒙脱石重量对菌吸附的影响

不同重量的蒙脱石分别加入相同起始浓度 2.55×10^9 个/mL、体积 10 mL 的菌液,蒙脱石重量对菌吸附的影响见图 1。结果表明,在一定的蒙脱石重量范围内,随着其重量的增加,吸附的菌量也不断增加。当蒙脱石重量为 0.5 g 时,其吸附量达到较恒定的状态,此时,所附载的菌量为 2.25×10^{10} 个,占总菌数的 88.24%。

2.2 菌液起始浓度对吸附的影响

在相同体积的菌液中,相同重量的蒙脱石(0.5 g)吸附的菌量与菌液起始浓度成正比,随着起始浓度的增大,蒙脱石吸附的菌量也不断增加(图 2a)。如果要提高单位重量蒙脱石附载的菌量,可以提高益生菌起始浓度。但由于蒙脱石对益生菌的吸附率在 74%~87%(图 2b)。因此,益生菌起始浓度越高,附载后所剩菌体的绝对数量也就越多。

2.3 载菌量与益生菌体积的关系

菌液(2.55×10^9 个/mL)不同体积对蒙脱石

(0.5 g)吸附的影响见图 3。结果表明,适当增加益生菌液的体积,可以提高单位重量蒙脱石吸附的菌体数量(图 3a);但是从吸附率来看(图 3b),随着益生菌液体积的增加,总菌量在不断增加,这样蒙脱石吸附菌体所占总菌数量的百分比不断下降,即菌液中吸附后剩余的菌体越来越多。

2.4 pH、离子强度和温度对吸附的影响

不同 pH 条件下,蒙脱石对菌的吸附能力随着 pH 值的升高而逐渐降低,当 pH = 9 时,有效吸附率仅有 72.67%(图 4a)。从图 4b 不同离子强度对吸附的影响可见,蒙脱石对菌的吸附率与离子强度成反比。不同温度条件下,蒙脱石对菌的吸附率呈现出先升高后降低的趋势(图 4c),当温度在 30℃ 时吸附率最高,为 86.55%。

3 讨论

蒙脱石是我国丰产的一类天然粘土矿物,是一种层状硅酸盐。蒙脱石对水相中沼泽红假单胞菌的吸附结果显示,当蒙脱石重量为 0.5 g 时,吸附菌量和吸附率均达到了较恒定的状态,且随着菌液起始浓度和体积的增大而增加。但是,随着菌液起始浓度和体积的进一步增大,吸附后所剩菌体的绝对数

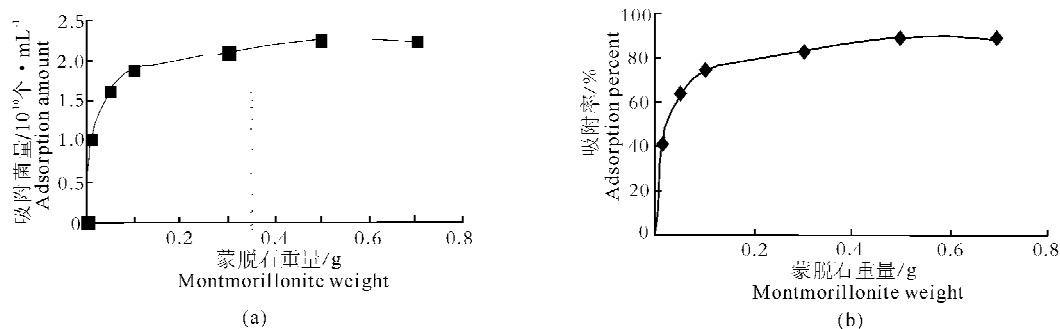


图 1 蒙脱石重量对菌吸附的影响

Fig.1 Effect of montmorillonite weight on the adsorption of *Rhodopseudomonas palustris*

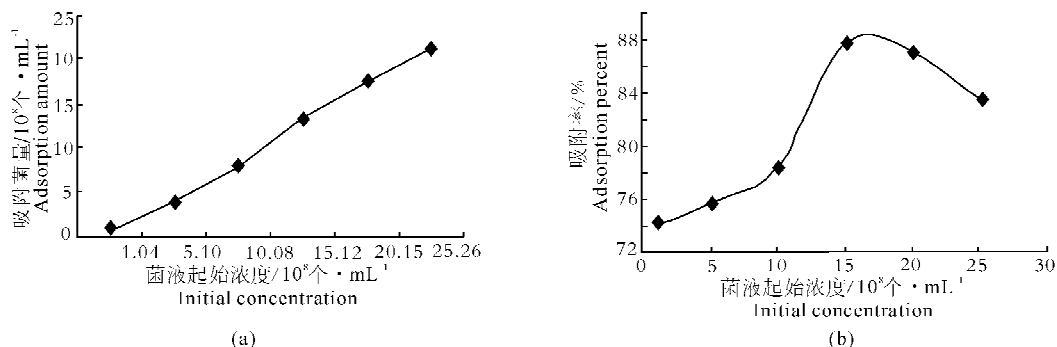


图 2 菌液起始浓度对吸附的影响

Fig.2 Effect of the initial concentration of strain on the adsorption of *Rhodopseudomonas palustris*

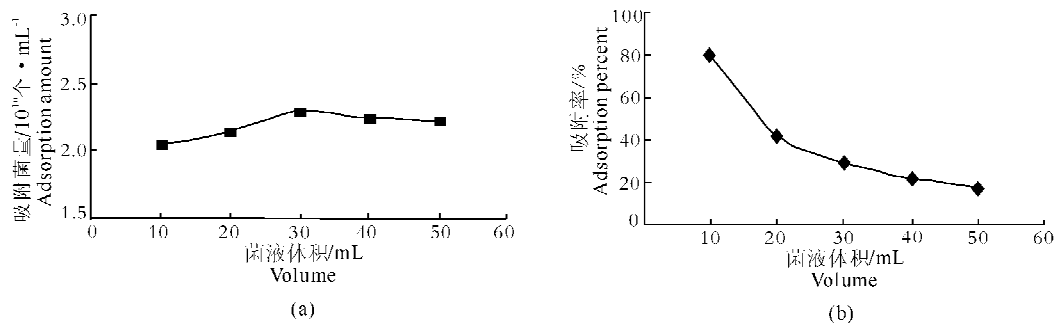


图3 菌液体积对吸附的影响

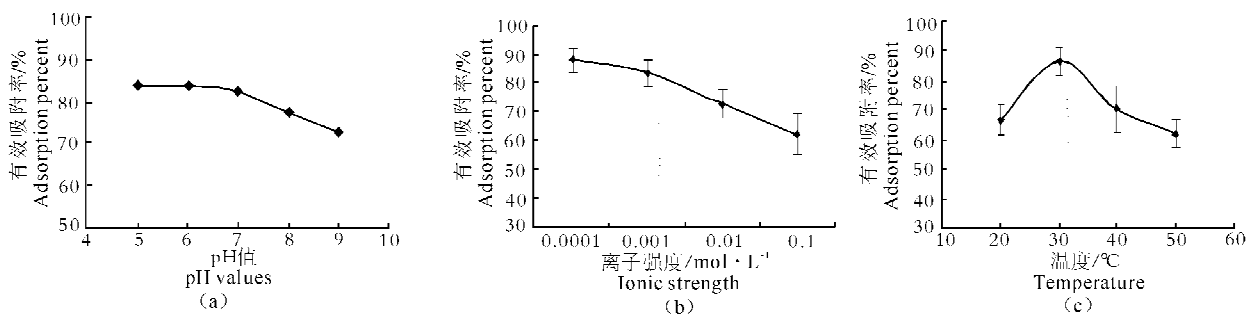
Fig.3 Effect of the volume of probiotics on the adsorption of *Rhodopseudomonas palustris*

图4 不同 pH (a)、离子强度 (b) 和温度 (c) 对吸附的影响

Fig.4 Effect of the different pH values (a), ionic strength (b) and temperature (c) on the adsorption between montmorillonite and *Rhodopseudomonas palustris*

量也就越多,所以在应用中,应根据实际需要,合理选择菌液的起始浓度和体积。蒙脱石的结构片层是纳米尺度,包含有3个亚层,亚层之间通过共用氧原子以共价键连接,结合极为牢固。水化膨胀的层状硅酸盐是带负电的板块表面与带正电的边缘相连接,具有凝胶-溶胶-凝胶的触变性 (Permien & Lagaly, 1994)。天然蒙脱石特有的水化膨胀所形成的具有触变特性的“车厢”式悬浮颗粒是其吸附固定细菌的本质所在。“车厢”式结构的蒙脱石凝胶能将菌固定到“车厢”中,且吸附量的多少与蒙脱石的比表面积和菌的数量有关。因此在处理天然蒙脱石时,可通过在层间交换易水化的阳离子和强行粉碎增加边缘,强化其水化剥片性能,以增加“车厢”数量,进而增加对菌体的吸附能力。

研究表明,pH值、离子强度、菌种类和矿物表面性质强烈影响菌体吸附到其表面的程度 (Van Loosdericht et al, 1989; Mills & Dejesus, 1994);本次研究结果也证明了pH、离子强度和温度对吸附的影响。菌体细胞壁表面含有大量的官能团,如 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{PO}_4^{3-}$ 等 (Beveridge & Koval, 1981)。在相对较低的pH值条件下,菌体细胞壁大多数呈中性 (Fowle & Fein, 1999),而蒙脱石表面主要为 $\text{Si}-\text{OH}_2^+$,随着pH值的升高,负电性增加,主要是

由于这些表面基团去质子化作用的结果。本研究结果显示,相对低较pH值条件下,蒙脱石对菌的吸附率较高,表明在此吸附过程中静电不是主要的作用力,吸附作用主要是依靠疏水作用力完成的。随着pH值的增大,菌体细胞表面官能团和蒙脱石表面负电性增加,出现部分排斥作用,导致了蒙脱石吸附菌的能力显著下降。当加入电解质时,随着离子强度的升高, Na^+ 从蒙脱石表面扩散开,Stem层吸附的离子增多,扩散层中反离子浓度增大,部分阳离子被压入紧密层,限制了蒙脱石和菌体表面的相互作用,因而附载作用减小,吸附率降低。此外,研究结果还显示,蒙脱石对菌的吸附不仅依赖于生物体的化学属性和表面属性,还受到温度的影响。由于物理吸附随温度的改变不大,推测这是由于蒙脱石对水相中沼泽红假单胞菌的吸附不仅存在物理吸附,还存在化学吸附。

参考文献:

- 马玉龙, 郭彤, 许梓荣, 等. 2005. 载铜蒙脱石的制备与表征 [J]. 硅酸盐学报, 33(8): 1 041-1 044.
- 钱存柔, 黄仪秀. 1999. 微生物学试验教程 [M]. 北京: 北京大学出版社.
- 王梦亮, 马清瑞, 梁生康. 2001. 光合细菌对鲤养殖水体生态系统的影响 [J]. 水生生物学报, 25(1): 98-101.
- 王彦波, 查龙应, 许梓荣. 2006. 微生态制剂改善对虾养殖池

- 塘底质的效果[J]. 应用生态学报, 17(9): 1 765 - 1 767.
- 王彦波, 许梓荣, 邓岳松. 2004. 生物修复菌 *Rhodopseudomonas palustris* 的分离与培养特性研究[J]. 中国饲料, (13): 32 - 33.
- Beveridge T J, Koval S F. 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12 [J]. Appl Environ Microbiol, 42: 325 - 335.
- Fowle D A, Fein J B. 1999. Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: testing the chemical equilibrium model [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 63: 3 059 - 3 067.
- Larimer F W, Chain P, Hauser L. 2003. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* [J]. Nature Biotechnology, 22: 55 - 61.
- Mills A L, Dejesus T H. 1994. Effect of solution ionic strength and iron coatings on mineral grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand [J]. Appl Environ Microbiol, 60: 3 300 - 3 306.
- Nathan Y, Jeremy B F. 2000. Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria - mineral adsorption [J]. Geochimica Cosmochimica Acta, 64: 609 - 617.
- Permien T, Lagaly G. 1994. The rheological and colloidal properties of bentonite dispersion in the presence of organic compounds [J]. Clay Mineral, 29: 761 - 766.
- Ramos A J, Hernandez E. 1996. In vitro aflatoxin adsorption by means of a montmorillonite silicate, a study of adsorption isotherms [J]. Anim Feed Sci Tech, 62: 263 - 269.
- Van Loosdericht M C C, Lyklema J, Norde W, et al. 1989. Bacterial adhesion: a physicochemical approach [J]. Microbial Ecology, 17: 1 - 15.
- Wang Y B, Xu Z R, Xia M S. 2005. The effectiveness of commercial probiotics in Northern White Shrimp (*Penaeus vannamei* L.) ponds [J]. Fisheries Science, 71: 1 034 - 1 039.
- Yee N, Jeremy B F, Christopher J D. 2000. Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteria - mineral adsorption [J]. Geochimica Cosmochimica Acta, 64: 609 - 617.

(责任编辑 万月华)

Adsorption Research between Montmorillonite and *Rhodopseudomonas palustris* in Aqueous Phase

WANG Yan-bo, HAN Jian-zhong, ZHU Jun-li

(Key laboratory of Food Safety of Zhejiang Province, Food & Bioengineering College, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

Abstract: The adsorption characters between montmorillonite and probiotic, *Rhodopseudomonas palustris*, were investigated through measuring the adsorption rates and strains amount in different conditions and observing the characters. The results showed that the amount of probiotic and adsorption rate attached to montmorillonite were invariableness at montmorillonite weight of 0.5 g and affected with the initial concentration and volume of probiotic. The adsorption ability decreased with the increasing pH values and the real adsorption rate was only 72.67% in pH 9. Adsorption rate presented the same trend in different ionic concentrations. At different temperature, the adsorption rate of montmorillonite to probiotics increased firstly and then decreased and the highest adsorption percent was up to 86.55% at 30 °C. This research indicated that the strains adsorption depended on not only the biochemical and surface characters, but also the environmental condition such as temperature.

Key words: *Rhodopseudomonas palustris*; Montmorillonite; Adsorption