

病原菌在红壤胶体上的吸附机制研究*

赵文强¹ 刘星¹ 蔡鹏^{1,2†} 黄巧云^{1,2}

(1 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

(2 华中农业大学资源与环境学院, 农业部长江中下游耕地保育重点实验室, 武汉 430070)

摘要 研究了 pH 和 KCl 离子强度对猪链球菌和大肠杆菌在红壤胶体表面吸附的影响, 结合表面物化性质和 Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) 理论分析互作机制。结果表明, 细菌在红壤胶体表面的吸附等温线能较好拟合 Freundlich 方程 ($R^2 > 0.97$), 猪链球菌在红壤胶体表面吸附的分配系数 (K_f) 是大肠杆菌的 4.5 倍 ~ 6.1 倍, 细菌在去有机质胶体表面吸附的 K_f 值为含有机质胶体的 2.4 倍 ~ 3.2 倍。比表面积越大或 zeta 电位绝对值越小, 细菌吸附能力越强, 吸附态细菌位于距红壤胶体表面 90 ~ 100 nm 处的次级小能位置。随着体系 pH 降低 (9.0 ~ 4.0) 或离子强度增大 (1 ~ 10 mmol L⁻¹), 细菌与红壤胶体互作能障降低, 细菌吸附量增大, 吸附机制符合 DLVO 理论; 而在高离子强度下 (50 ~ 100 mmol L⁻¹), 猪链球菌吸附量降低了 3.4% ~ 5.6%, 表明除 DLVO 作用力外, 非 DLVO 作用力如空间位阻排斥和疏水作用对吸附也有贡献。

关键词 红壤胶体; 猪链球菌; 大肠杆菌; 吸附; DLVO 理论

中图分类号 S154.3 **文献标识码** A

全球畜牧业每年产生约 10¹¹ t 的动物粪便, 很大一部分没有经过消毒处理直接施入到农田^[1], 这些动物粪便含有许多对人和动物有致病性的微生物, 其中以粪大肠菌群和链球菌数量最多^[2-4]。据报道, 美国有近 1/2 的饮用水并能检测出大肠杆菌, 每年导致 75 ~ 590 万人染病^[5]; 猪链球菌曾于 2005 年在我国四川省大面积爆发, 引起数百人感染或死亡^[6-7]。在土壤环境中, 土壤颗粒与病原菌的相互作用过程深刻影响着病原菌在土壤中的迁移、分布以及感染活性^[2]。因此, 研究土壤对病原菌的吸附机制, 对于揭示病原菌在土壤中的生态行为以及指导污染土壤的修复和健康风险评价具有重要理论和实践意义。

细菌在土壤组分表面的吸附受菌株种类、细菌表面生物大分子、矿物类型、溶液组成和土壤粒径的影响。有研究表明, 枯草芽孢杆菌 (革兰氏阳性菌) 在石英砂表面的吸附量高于门多萨假单胞菌 (革兰氏阴性菌), 氢氧化铁覆盖在石英砂表面后对细菌的吸附能力增强^[8]。大肠杆菌表面的脂多糖分子链越长, 其在玻璃及金属氧化物 (Al₂O₃ 和 Fe₂O₃ 等) 表面的吸附量越大; 铜绿假单胞菌 PA01 和 PDO300 的胞外聚合物促进了细菌在玻璃表面的吸附^[9]。高岭石对恶臭假单胞菌及枯草芽孢杆菌的吸附亲和力和吸附自由能高于蒙脱石, 恶臭假单胞菌在蒙脱石和高岭石表面的解吸率分别为 88.7% 和 9.3%; 二种细菌在针铁矿上的吸附过程均为放热反应, 吸附焓变随 pH (5.0 ~ 9.0) 和离子强度 (1 ~ 100 mmol L⁻¹ KNO₃) 升高而增大^[10-13]。恶臭假单胞菌在针铁矿表面的吸附量最大, 高岭石次之, 蒙脱石最小, 细菌在黏土矿物和土壤颗粒表面的吸附量随 pH 降低 (9.0 ~ 4.0) 或离子强度升高 (0 ~ 30 mmol L⁻¹ NaCl 和 MgCl₂) 而增大, MgCl₂ 对细菌吸附的促进效率高于 NaCl^[14-15]。低分子量有机配体 (柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐和醋酸盐) 抑制了苏云金芽孢杆菌在高岭石、蒙脱石和针铁矿表面的吸附^[16]。大肠杆菌吸附在黏粒 (0.45 ~ 5 μm)、粉粒 (5 ~ 53 μm) 和砂粒 (> 53 μm) 上的比例分别为 80%、18% 和 2%^[17]。粪大肠菌群在黏粒 (< 2 μm) 和粉粒 (2 ~ 50 μm) 上的吸附量高于砂粒 (62.5 ~ 500 μm), 溶液中添加粪肥后, 菌群在砂粒上的吸附

全球畜牧业每年产生约 10¹¹ t 的动物粪便, 很大一部分没有经过消毒处理直接施入到农田^[1], 这些动物粪便含有许多对人和动物有致病性的微生物, 其中以粪大肠菌群和链球菌数量最多^[2-4]。据报道, 美国有近 1/2 的饮用水并能检测出大肠杆菌, 每年导致 75 ~ 590 万人染病^[5]; 猪链球菌曾于 2005 年在我国四川省大面积爆发, 引起数百人感染或死亡^[6-7]。在土壤环境中, 土壤颗粒与病原菌的相互作用过程深刻影响着病原菌在土壤中的迁移、分布以及感染活性^[2]。因此, 研究土壤对病原菌的吸附机制, 对于揭示病原菌在土壤中的生态行为以及指导污染土壤的修复和健康风险评价具有重要理论和实践意义。

* 国家自然科学基金项目 (41171196, 40825002)、国家高技术研究发展计划 (2009AA06Z302) 和全国优秀博士学位论文作者专项资金 (201066) 资助

† 通讯作者, E-mail: cp@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 赵文强 (1988—), 男, 博士研究生, 主要研究方向为土壤环境微生物。E-mail: 136663737@163.com

收稿日期: 2012-06-21; 收到修改稿日期: 2012-08-24

量与粉粒和黏粒相当^[18]。然而,在上述研究中,细菌和土壤组分表面性质的表征较为欠缺,缺乏实测证据阐明细菌在土壤颗粒上的吸附机制。此外,以往研究中的土著细菌不能完全反映病原菌的情况,病原菌在土壤胶体表面的吸附机制研究尚未见报道。

本实验选取动物源传染性大肠杆菌和猪链球菌作为供试菌株,在充分表征细菌和红壤胶体表面物化性质的基础上,研究了菌株种类、土壤有机质含量、溶液 pH 和离子强度对红壤胶体吸附细菌的影响,并利用 DLVO 理论探讨了细菌在红壤胶体表面吸附的机理。

1 材料与方 法

1.1 细菌悬液的制备及其性质测定

供试病原菌为革兰氏阴性菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和革兰氏阳性菌猪链球菌 (*Streptococcus suis*),分离自华中农业大学实验猪场,为该校动物科学技术学院原生动物实验室保存菌株。大肠杆菌呈杆状,对数生长期 1~12 h,兼性厌氧菌;猪链球菌为球形,常呈链状排列,对数生长期 1~6 h,厌氧菌,二种病原菌的最适生长温度均为 37℃。用接种环挑取一环 4℃ 保藏的大肠杆菌于盛有 10 ml LB (Lysogeny broth, 溶菌肉汤) 液体培养基的 PA 瓶中,37℃、150 r min⁻¹ 条件下活化 3 h。吸取活化菌液 2.5 ml 于 250 ml LB 培养基,同条件下培养 10 h 至对数后期。对于猪链球菌,培养基替换为 TSB (Tryptone soy broth, 胰蛋白胨大豆肉汤) 和 10% 的小牛血清,静置培养 5 h 至对数后期,其他培养条件与大肠杆菌相同。培养完成后的菌液于 4 075 × g 离心 15 min,弃去上清培养基。沉降下来的菌体用无菌去离子水清洗三次,弃去上清液,重悬浮于 1 mmol L⁻¹ KCl 溶液中,经稀释平板法检测细菌细胞数为 7.0 × 10⁹ ml⁻¹。细菌比表面积、zeta 电位/直径、疏水性、胞外聚合物 (Extracellular polymeric substances, EPS) 含量分别用亚甲基蓝吸附法^[19],zetasizer 分析仪 (Nano ZS90, Malvern Instruments Ltd, UK)、MATH (microbial adhesion to hydrocarbon) 法^[20] 和乙醇沉淀法^[21] 进行测定,其中直径平均值大小 (Z-Average) 由 zetasizer 软件 (zetasizer software) 直接计算得到。

1.2 供试土壤胶体及其性质测定

供试土壤为我国地带性土壤红壤,采自湖南省

长沙市长沙县,属于农田耕作土,成土母质为第四纪红土,采样深度为 0~20 cm,风干过 2 mm 筛后,利用沉降法分离出小于 2 μm 的胶体^[22]。取部分胶体颗粒加入 30% 的 H₂O₂,不断搅拌去除有机质,直至加入 H₂O₂ 无气泡产生^[23]。至此,分离出红壤含有机质胶体和红壤去有机质胶体。红壤胶体的比表面积、zeta 电位/直径、水接触角、有机质含量和阳离子交换量的测定分别采用 N₂ 吸附法、zetasizer 分析仪、VCA-Optima 接触角测量仪 (AST Products Inc, Billerica, MA)^[24]、K₂Cr₂O₇-H₂SO₄ 外加热法和中性乙酸铵法^[25]。

1.3 红壤胶体对病原菌的等温吸附

称取红壤胶体 100 mg 于 50 ml 三角瓶中,以 1 mmol L⁻¹ KCl 为背景电解质,分别加入 0、0.5、1、2、3、4、5、6 ml 的菌液,并补充 1 mmol L⁻¹ KCl 溶液至总体积 30 ml,吸附体系 pH 控制在 5.0 (接近实际红壤 pH)。25℃、150 r min⁻¹ 条件下摇床振荡吸附 1 h 达到平衡后,吸取 10 ml 混合液于 20 ml 离心管中,于离心管底部加入 5 ml 60% 质量比的蔗糖分离液,3 220 × g 离心 20 min,吸取上清未吸附菌液 10 ml,考马斯亮蓝法测定其含量^[14],用加入的细菌蛋白总量减去上清未吸附细菌蛋白质含量得到的差值,根据细菌数量与蛋白质含量的线性方程,计算出吸附细菌的数量。

1.4 pH 和离子强度对红壤胶体吸附病原菌的影响

称取红壤胶体 100 mg 于 50 ml 三角瓶中,依次加入 27 ml 不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的 1 mmol L⁻¹ KCl 溶液,以及含有相应 pH 的菌悬液 3 ml;或分别加入 27 ml 不同离子强度的 KCl 溶液 (1、5、10、50、100 mmol L⁻¹) 和相应 KCl 浓度的菌悬液 3 ml。混合液于 25℃、150 r min⁻¹ 条件下吸附 1 h,同上进行离心和分离步骤,用考马斯亮蓝法测定上清蛋白质含量^[14],计算吸附细菌的数量。

1.5 红壤胶体与病原菌相互作用的 DLVO 能量计算

经典的 DLVO 理论可用来定性地反映胶体颗粒之间的总作用能随分隔距离变化的趋势,总作用能等于范德华和静电作用能之和,视红壤胶体颗粒和病原菌为球形,采用球形-球形模型进行计算^[26]。Gregory^[27] 导出以下方程来计算范德华作用能 (Φ_{VDW}):

$$\Phi_{VDW} = -\frac{Aa_{p1}a_{p2}}{6h(a_{p1}+a_{p2})} \left[1 - \frac{5.32h}{\lambda} \ln \left(1 + \frac{\lambda}{5.32h} \right) \right]^{-1}$$

式中, A 为 Hamaker 常数,取其值为 7.5 × 10⁻²¹

$J^{[28]}$; h 为胶体颗粒之间的距离 (nm); a_{p1} 和 a_{p2} 分别为细菌和红壤胶体的半径 (μm); λ 为特征波长 (100 nm)。静电作用能 (Φ_{EDL}) 的计算公式为^[29]:

$$\Phi_{\text{EDL}} = \frac{2\pi a_{p1} a_{p2} n_{\infty} kT}{(a_{p1} + a_{p2}) k^2} (\psi_{p1}^2 + \psi_{p2}^2) \left(\frac{2\psi_{p1} \psi_{p2}}{\psi_{p1} + \psi_{p2}} \right)$$

$$\ln \left[\frac{1 + \exp(-kh)}{1 - \exp(-kh)} \right] + \ln [1 - \exp(-2kh)]$$

式中, n_{∞} 为溶液离子的数量密度 (N m^{-3}); k 为 Boltzmann 常数 ($1.38 \times 10^{-23} \text{J K}^{-1}$); T 为吸附实验的绝对温标 (此处取 298 K); ψ_{p1} 和 ψ_{p2} 分别根据病原菌 (ζ_1) 和土壤胶体 (ζ_2) 的 zeta 电位计算得到, 公式为 $\psi = ze\zeta/kT$, 其中 z 为离子价数, e 为电子电荷量 ($1.60 \times 10^{-19} \text{C}$), κ 为德拜长度的倒数 (m^{-1})。

1.6 统计学分析

zeta 电位、直径、疏水性和所有吸附实验均含三个重复, 结果取平均值 \pm 标准偏差, 数据之间的显著性差异采用独立样本 t 检验方法进行, $p < 0.05$ 时可认为二组数据具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 红壤胶体与病原菌的 zeta 电位和疏水性

zeta 电位为胶体颗粒扩散双电层滑动面处的电位, 用来表征胶粒表面净电荷量大小, 可度量胶粒之间静电作用力的强度^[30]。图 1a 和图 1b 分别为不同 pH 和离子强度下细菌和胶体的 zeta 电位。由 zeta 电位数据可知, 在 pH 4.0 ~ 9.0 范围内, 细菌和红壤胶体的表面净电荷都呈电负性, 随着 pH 升高,

表面负电荷量逐渐增多 (图 1a)。在供试 pH 和 KCl 浓度范围内, 猪链球菌所带负电荷量均显著低于大肠杆菌 ($p < 0.05$); 对于红壤胶体而言, 去有机质胶体表面负电荷量更少。随着离子强度不断增大 ($1 \sim 10 \text{mmol L}^{-1}$), 细菌和红壤胶体的 zeta 电位逐渐升高并接近于 0 mV (图 1b)。这种变化趋势是由于随着体系离子强度的增大, 溶液中反离子浓度加大, 从而更多地进入滑动面内, 使扩散层压缩变薄, 负电荷量减少^[31]。在高离子强度下 ($50 \sim 100 \text{mmol L}^{-1}$), 随着离子强度增大, 细菌和红壤胶体的表面 zeta 电位不变 ($p > 0.05$), 这可能是由于胶粒表面扩散双电层的厚度已压缩到极限值^[32]。

图 2a 和图 2b 显示的是病原菌在正十二烷和水的混合体系中, 分配到正十二烷中的百分比含量, 代表供试 pH 和离子强度下细菌的疏水性大小^[20]。大肠杆菌在 pH 4.0 ~ 9.0 以及猪链球菌在 pH 4.0 ~ 6.0 范围内, 疏水性没有显著变化 ($p > 0.05$), 分别位于 16% 和 7% 附近。猪链球菌在 pH 7.0 ~ 9.0 时的疏水性比低 pH (4.0 ~ 6.0) 条件提高了 89.9% ~ 127.8%, 除 pH 9.0 外, 疏水性均为大肠杆菌 \geq 猪链球菌 (图 2a)。离子强度 1 ~ 10 mmol L⁻¹ 时细菌疏水性不变 ($p > 0.05$), 高离子强度 50 ~ 100 mmol L⁻¹ 条件下细菌的疏水性数值降低了 3.2% ~ 9.0%, 与大肠杆菌相比, 猪链球菌疏水性较高 (图 2b)。水接触角大小能直接反映固体界面的疏水性程度, 不同溶液组成下固体颗粒的疏水性保持不变^[33]。由表 1 可知, 红壤含有有机质胶体水接触角 (33.3°) 高于去有机质胶体颗粒 (29.8°), 表明红壤含有有机质胶体疏水性高于去有机质胶体颗粒。

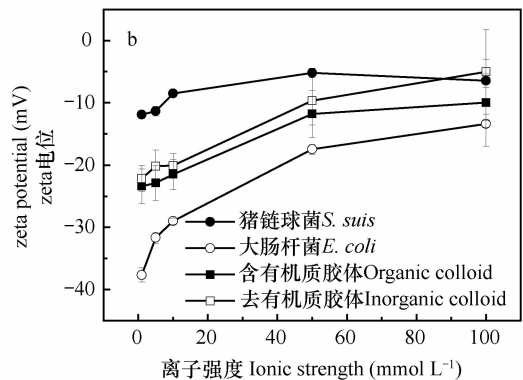
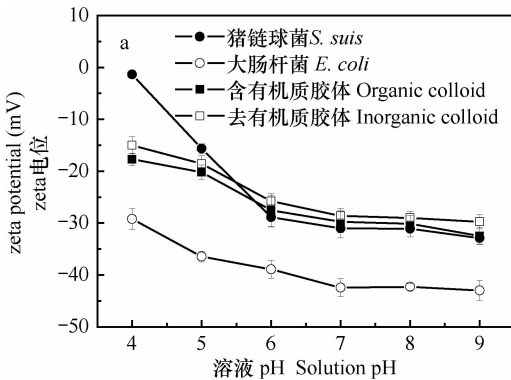


图 1 不同溶液 pH(a) 和离子强度 (b) 下病原菌和红壤胶体的 zeta 电位

Fig. 1 zeta potentials of bacterial pathogens and Red soil colloids as a function of solution pH (a) and IS (b)

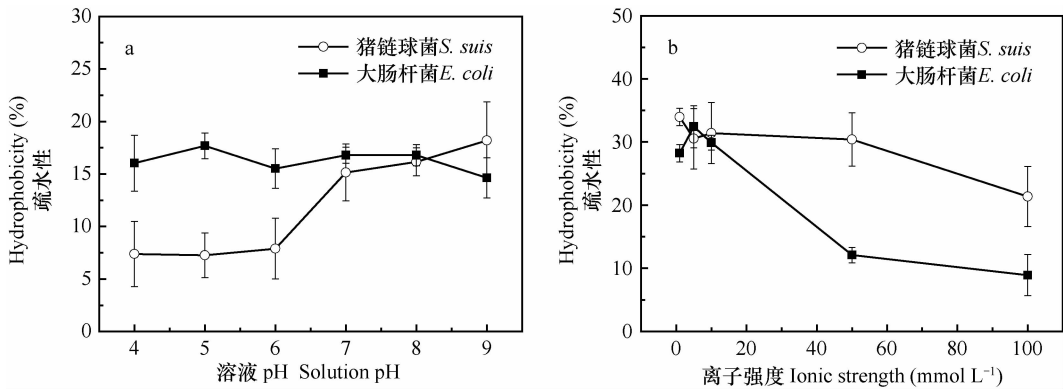
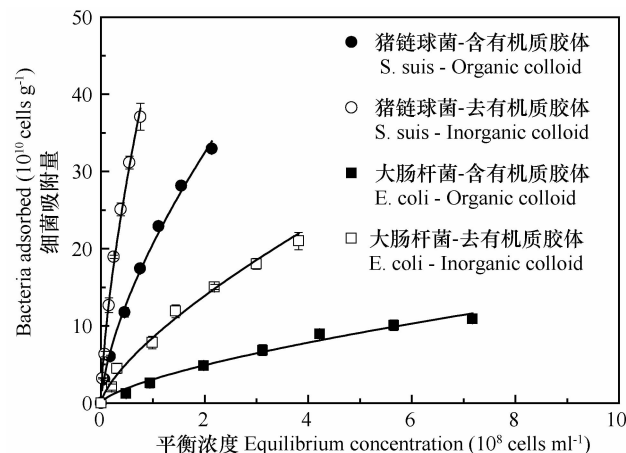


图2 不同溶液 pH(a) 和离子强度(b) 下病原菌的疏水性

Fig. 2 Hydrophobicity of bacterial pathogens as a function of solution pH (a) and IS (b)

2.2 病原菌在红壤胶体表面的等温吸附

由病原菌在红壤胶体表面的吸附等温线可见(图3),随着加入细菌量的逐渐增大,胶体对细菌的吸附量也随之升高,吸附等温线均能较好拟合 Freundlich 方程 ($R^2 > 0.97$)。该方程表达式为: $Y = K_f X^{1/n}$, 此处 Y 表示细菌在胶体上的单位吸附量; X 为未吸附的上清细菌平衡浓度; K_f 为平衡吸附常数(即分配系数),反映吸附能力的强弱; $1/n$ 为有关吸附等温线线性程度的经验常数。从表2可看出,猪链球菌在红壤胶体表面吸附的 K_f 值 ($421.1 \sim 999.4 \text{ ml g}^{-1}$) 是大肠杆菌 K_f 值 ($69.1 \sim 224.3 \text{ ml g}^{-1}$) 的 4.5 倍 ~ 6.1 倍,细菌在去有机质胶体上吸附的 K_f 值 ($224.3 \sim 999.4 \text{ ml g}^{-1}$) 是含有有机质胶体 ($69.1 \sim 421.1 \text{ ml g}^{-1}$) 的 2.4 倍 ~ 3.2 倍。猪链球菌在去有机质胶体表面的吸附能力最强,这与它们比表面积较高有关,猪链球菌和去有机质胶

图3 病原菌在红壤胶体上的吸附等温线
(pH 5.0, IS 1 mmol L⁻¹ KCl)Fig. 3 Equilibrium adsorption isotherms of bacterial pathogens on Red soil colloids at pH 5.0 and IS 1 mmol L⁻¹ KCl

体的比表面积分别高于大肠杆菌和含有机质胶体(表1),能为吸附提供更多位点^[34]。

细菌表面的 zeta 电位和疏水性可作为细菌在初始吸附阶段吸附趋势的预测指标^[35]。一般而言,增加静电引力或降低静电斥力有利于细菌的吸附,反之则会使细菌的吸附量减少。疏水作用是指水相中非极性分子或基团间的吸引力,细胞及土壤颗粒表面的疏水性越大,二者越倾向于通过疏水作用相吸附,从而使体系的化学能降低。由表1可知,pH 5.0 条件下病原菌与土壤胶体表面均为电负性,二者作用时以静电斥力为主,猪链球菌所带的负电荷量 (-15.6 mV) 更少,因而与胶体作用的静电斥力弱于大肠杆菌;猪链球菌的疏水性 (7.3%) 低于大肠杆菌 (17.7%),不能解释吸附实验的结果。对于土壤胶体而言,CEC 和 zeta 电位数据均表明,去有机质胶体的负电荷量少于含有机质胶体,因而含有机质胶体吸附病原菌时静电斥力更强。含有机质胶体的水接触角 (33.3°) 高于去有机质胶体 (29.8°),同样也不能解释吸附实验的结果。通过 DLVO 理论可发现(图4),红壤胶体与病原菌的分隔距离在较长范围内 (0 ~ 50 nm) 均表现为斥力(正值),细菌-胶体体系遇到的能障大小(斥力峰值)顺序为:猪链球菌-去有机质胶体 (44.9 kT) < 猪链球菌-含有机质胶体 (52.4 kT) < 大肠杆菌-去有机质胶体 (146.9 kT) < 大肠杆菌-含有机质胶体 (172.1 kT)。结合 K_f 值和 DLVO 预测结果,可以发现能障越大,细菌在土壤胶体表面的吸附能力越弱,细菌吸附受 DLVO 作用力控制。图4中插入的小图代表 DLVO 能谱的次级小能(引力峰值)位置,出现在分隔距离 90 ~ 100 nm 处,大小约为 -0.027 kT,这表明细菌能通过较弱作用力可逆地吸附在次级

表 1 病原菌和红壤胶体的基本性质

Table 1 Basic properties of bacterial pathogens and Red soil colloids

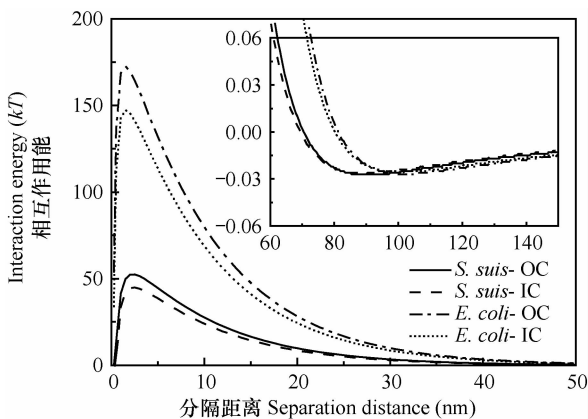
病原菌/红壤胶体 Bacterial pathogen/ Red soil colloid	直径 Diameter (μm)	比表面积 SSA ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	zeta 电位 zeta potential (mV)	疏水性 Hydrophobicity	阳离子交换量 CEC (cmol kg^{-1})	有机质 OM (g kg^{-1})	EPS 含量 EPScontent ($\text{mg } 10^{-10} \text{ cells}$)
猪链球菌 <i>S. suis</i>	0.68 ± 0.07	109.1	-15.6 ± 0.9	$7.3\% \pm 2.1\%$	ND	ND	5.5
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	0.88 ± 0.10	39.0	-36.5 ± 1.0	$17.7\% \pm 1.2\%$	ND	ND	2.6
含有机质胶体 Organic colloid	1.69 ± 0.04	59.0	-20.2 ± 1.4	$33.3\% \pm 0.7\%$	30.6	11.5	ND
去有机质胶体 Inorganic colloid	1.42 ± 0.04	72.3	-18.6 ± 1.6	$29.8\% \pm 1.2\%$	26.9	1.8	ND

注: zeta 电位和疏水性是在 pH 5.0 和 IS 1 mmol L^{-1} KCl 条件下测定。ND: 未测定 Note: zeta potential and hydrophobicity were measured at pH 5.0 and IS 1 mmol L^{-1} KCl. ND: not determined

表 2 病原菌与红壤胶体相互作用的 Freundlich 参数

Table 2 Freundlich parameters of interactions between bacterial pathogens and Red soil colloids

病原菌-红壤胶体 Bacterial pathogen- Red soil colloid	Freundlich 参数 Freundlich parameter		
	K_f (ml g^{-1})	$1/n$	R^2
猪链球菌-含有机质胶体 <i>S. suis</i> -Organic colloid	421.1 ± 48.3	0.66 ± 0.03	0.995
猪链球菌-去有机质胶体 <i>S. suis</i> -Inorganic colloid	999.4 ± 183.0	0.67 ± 0.03	0.992
大肠杆菌-含有机质胶体 <i>E. coli</i> -Organic colloid	69.1 ± 13.3	0.68 ± 0.06	0.974
大肠杆菌-去有机质胶体 <i>E. coli</i> -Inorganic colloid	224.3 ± 42.3	0.71 ± 0.05	0.990



注: 插入小图为对应体系的次级小能位置, OC和IC分别代表含有机质胶体和去有机质胶体

Note: The inserted figure highlights the corresponding secondary energy minima, OC and IC represents organic-matter-containing colloid and organic-matter-depleted colloid, respectively

图 4 病原菌与红壤胶体的相互作用能谱
(pH 5.0, IS 1 mmol L^{-1} KCl)

Fig. 4 Interaction energy profiles between bacterial pathogens and Red soil colloids at pH 5.0 and IS 1 mmol L^{-1} KCl

小能处^[36]。由病原菌与土壤胶体的表面性质可知, 静电斥力和比表面积主导着细菌在土壤胶体上的吸附量大小, 而疏水作用力对吸附的贡献程度不大。细菌吸附在分隔距离较远的次级小能位置, 表面大部分非极性基团无法通过短程的疏水引力与土壤颗粒相互作用, 可能是导致疏水作用力较弱的主要原因。

2.3 pH 对红壤胶体吸附病原菌的影响

图 5 所示, 在 pH 4.0 时, 细菌在红壤胶体上的吸附量最大, 随 pH 升高, 吸附量呈逐渐降低趋势 ($p < 0.05$)。结合细菌疏水性的数据, 可以发现随着 pH 升高, 大肠杆菌疏水性无显著变化 ($p > 0.05$), 猪链球菌疏水性增大 (89.9% ~ 127.8%), 这表明细菌疏水性对吸附过程没有显著影响。细菌吸附量随着 pH 升高而降低的现象符合 DLVO 理论, 这是由于随着 pH 的增大, 细菌和胶体表面的负电荷量逐渐增多, 静电斥力和总作用能障随之扩大 (表 3)。pH 4.0 条件下细菌-胶体体系的能障最小,

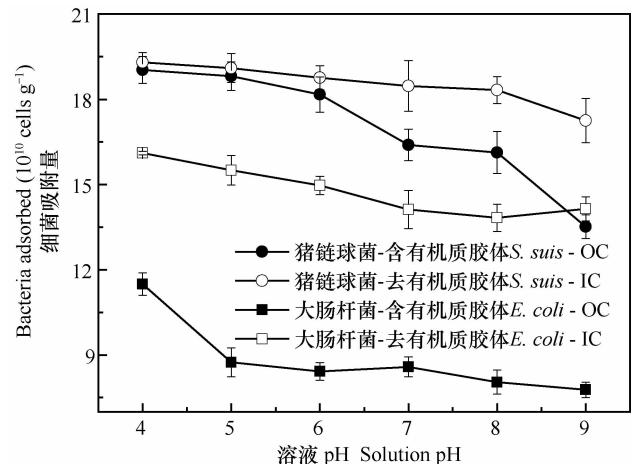


图 5 溶液 pH 对红壤胶体吸附病原菌的影响

Fig. 5 Effects of solution pH on bacterial pathogens adsorption on Red soil colloids

表 3 不同溶液 pH 下病原菌与红壤胶体相互作用的能障和次级小能

Table 3 Energy barrier and secondary minimum between bacterial pathogens and Red soil colloids in solutions different in pH

红壤胶体 Red soilcolloid	溶液 pH	猪链球菌-胶体相互作用能 Interaction energy of <i>S. suis</i> -colloid		大肠杆菌-胶体相互作用能 Interaction energy of <i>E. coli</i> -colloid	
		能障	次级小能	能障	次级小能
		Energy barrier (<i>kT</i>)	Secondary minimum (<i>kT</i>)	Energy barrier (<i>kT</i>)	Secondary minimum (<i>kT</i>)
含有机质胶体 Organiccolloid	4	0.6	-0.070	113.7	-0.029
	5	52.4	-0.027	172.1	-0.027
	6	157.5	-0.022	262.8	-0.025
	7	186.2	-0.021	317.2	-0.024
	8	189.3	-0.021	319.9	-0.024
去有机质胶体 Inorganiccolloid	4	0.3	-0.074	87.9	-0.028
	5	44.9	-0.027	146.9	-0.026
	6	138.5	-0.021	228.7	-0.023
	7	169.0	-0.020	284.9	-0.023
	8	172.2	-0.020	288.0	-0.022
	9	188.4	-0.020	301.8	-0.022

为 0.3 ~ 113.7 *kT*, 猪链球菌可通过布朗运动跨越较低能障(0.3 ~ 0.6 *kT*), 不可逆地吸附于红壤胶体表面, 而大肠杆菌无法克服较高能障(87.9 ~ 113.7 *kT*), 吸附在次级小能位置^[26]。细菌在含有机质胶体表面的吸附量变化受 pH 影响更大, 体系 pH 从 4.0 升高至 9.0, 吸附量下降了 $3.7 \times 10^{10} \sim 5.5 \times 10^{10}$ cells g^{-1} , 相比之下去有机质胶体仅下降了 $2.0 \times 10^{10} \sim 2.1 \times 10^{10}$ cells g^{-1} 。DLVO 理论计算的能障趋势也表明, 含有机质胶体的能障增加幅度(219.0 ~ 240.9 *kT*) 明显高于去有机质胶体(188.1 ~ 213.9 *kT*), 表明含有机质胶体与细菌的互作受 DLVO 作用力控制更为显著。

2.4 离子强度对红壤胶体吸附病原菌的影响

从图 6 可发现, 当实验体系离子强度从 1 mmol L^{-1} 上升至 10 mmol L^{-1} , 病原菌在红壤胶体上的吸附量逐渐升高($p < 0.05$), 此规律符合 DLVO 理论, 胶粒的扩散双电层厚度随离子强度增大而递减, 所带负电荷量及胶粒之间的静电斥力逐渐减小, 细菌与胶体的分隔距离不断缩小并通过更多的吸附位点相结合^[37], 表 4 也证实 DLVO 能障大小随离子强度的升高而降低。低离子强度下(1 ~ 10 mmol L^{-1}) 细菌疏水性集中在 30% 左右(图 2 b), 且无显著性差异($p > 0.05$), 对吸附量的影响作用不大。当离子强度从 50 mmol L^{-1} 上升至 100 mmol L^{-1} 时, 大肠杆菌在胶体上的吸附量略微升高或持平($p > 0.05$),

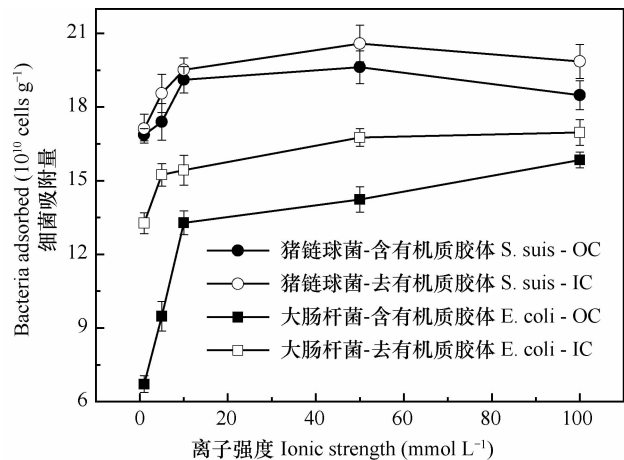


图 6 离子强度对红壤胶体吸附病原菌的影响

Fig. 6 Effects of IS on bacterial pathogens adsorption on Red soil colloids

图 1b 表明 50 ~ 100 mmol L^{-1} 高离子强度下大肠杆菌和红壤胶体的 zeta 电位不变($p > 0.05$), 静电斥力变化不大, 符合吸附趋势。而高离子强度条件下猪链球菌的吸附量下降了 3.4% ~ 5.6% ($p < 0.05$), 此吸附趋势偏离了 DLVO 理论。由表 4 可知 50 ~ 100 mmol L^{-1} 时猪链球菌与红壤胶体之间的互作能障不存在, 总作用能全为负值(引力), 表现为亲和性很强的不可逆吸附状态, 二者吸附位点的分隔距离较近, 短程的非 DLVO 作用力可能参与了该吸附过程^[38]。有类似研究表明, 随着磷酸缓冲液的离子强

度从 185 mmol L^{-1} 上升至 560 mmol L^{-1} , 大肠杆菌在硅氧化物表面的吸附量不断递减^[39], CaCl_2 浓度大于 300 mmol L^{-1} 时盐单胞菌在石英砂表面的吸附也呈现降低趋势^[40]。这种现象可能是由于高离子强度下细菌表面胞外聚合物的空间构象发生改变, 与胶体接触时产生空间位阻排斥效应阻碍吸附过程^[41]。

猪链球菌胞外聚合物含量 ($5.5 \text{ mg } 10^{-10} \text{ cells}$) 高于大肠杆菌 ($2.6 \text{ mg } 10^{-10} \text{ cells}$), 空间位阻作用可能更强。此外, 高离子强度下猪链球菌的疏水性数值下降了 9.0% , 而大肠杆菌仅下降了 3.2% (图 2b), 在长程的静电斥力无明显改变时, 逐渐减弱的短程疏水作用力也可能在一定程度上抑制了猪链球菌的吸附。

表 4 不同离子强度下病原菌与红壤胶体相互作用的能障和次级小能

Table 4 Energy barrier and secondary minimum between bacterial pathogens and Red soil colloids as a function of IS

红壤胶体 Red soilcolloid	离子强度 IS (mmol L^{-1})	猪链球菌-胶体相互作用能 Interaction energy of <i>S. suis</i> -colloid		大肠杆菌-胶体相互作用能 Interaction energy of <i>E. coli</i> -colloid	
		能障 Energy barrier (kT)	次级小能 Secondary minimum (kT)	能障 Energy barrier (kT)	次级小能 Secondary minimum (kT)
含有机质胶体 Organiccolloid	1	45.0	-0.028	211.4	-0.026
	5	27.9	-0.202	140.4	-0.176
	10	10.0	-0.536	101.3	-0.406
	50	NB	NB	NB	NB
	100	NB	NB	NB	NB
去有机质胶体 Inorganiccolloid	1	39.9	-0.027	186.6	-0.024
	5	21.7	-0.201	111.9	-0.171
	10	7.9	-0.525	86.3	-0.390
	50	NB	NB	NB	NB
	100	NB	NB	NB	NB

注: NB 表示不存在能障或次级小能 Note: NB denotes no energy barrier or secondary energy minimum

3 结 论

有机质抑制猪链球菌和大肠杆菌在红壤胶体表面的吸附, 红壤胶体和细菌的比表面积以及表面电位是决定细菌吸附能力强弱的关键因素。在 pH 4~9 和低离子强度 ($1 \sim 10 \text{ mmol L}^{-1}$) 范围内, 细菌吸附行为符合经典的 DLVO 理论, 吸附过程主要受静电作用力调控, 疏水作用无显著影响。高离子强度 ($50 \sim 100 \text{ mmol L}^{-1}$) 下, 短程的非 DLVO 作用力 (空间位阻和疏水作用力) 在猪链球菌吸附过程中起着更加重要的作用。

参 考 文 献

[1] Fayer R, Trout J M. Zoonotic protists in the marine environment//Belkin S S, Cowell R. Oceans and health: Pathogens in marine environment. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005: 143—163

[2] Pachepsky Y A, Sadeghi A M, Bradford S A, et al. Transport and fate of manure-borne pathogens: Modeling perspective. Agricultural Water Management, 2006, 86(1/2): 81—92

[3] Unc A, Goss M J. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. Applied Soil Ecology, 2004, 25(1): 1—18

[4] Santamaría J, Toranzos G A. Enteric pathogens and soil: A short review. International Microbiology, 2003, 6: 5—9

[5] Macler B A, Merkle J C. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. Hydrogeology Journal, 2000, 8: 29—40

[6] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: A new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? Future Microbiology, 2010, 5: 371—391

[7] Segura M. *Streptococcus suis*: An emerging human threat. Journal of Infectious Diseases, 2009, 199(1): 4—6

[8] Ams D A, Fein J B, Dong H L, et al. Experimental measurements of the adsorption of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas mendocina* onto Fe-oxyhydroxide-coated and uncoated quartz grains. Geomicrobiology Journal, 2004, 21(8): 511—519

[9] Li B, Logan B E. Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004, 36(2): 81—90

[10] Rong X M, Huang Q Y, He X M, et al. Interaction of *Pseudomonas putida* with kaolinite and montmorillonite: A combination study by equilibrium adsorption, ITC, SEM and FTIR. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 64(1): 49—55

- [11] Rong X M, Chen W L, Huang Q Y, et al. *Pseudomonas putida* adhesion to goethite; Studied by equilibrium adsorption, SEM, FTIR and ITC. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 80(1): 79—85
- [12] 荣兴民, 黄巧云, 陈雯丽, 等. 细菌在二种土壤矿物表面吸附的热力学分析. *土壤学报*, 2011, 48(2): 331—337. Rong X M, Huang Q Y, Chen W L, et al. Surface thermodynamical analysis of adsorption of bacteria on two soil clay minerals (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(2): 331—337
- [13] Hong Z N, Rong X M, Cai P, et al. Effects of temperature, pH and salt concentrations on the adsorption of *Bacillus subtilis* on soil clay minerals investigated by microcalorimetry. *Geomicrobiology Journal*, 2011, 28(8): 686—691
- [14] Jiang D H, Huang Q Y, Cai P, et al. Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 54(2): 217—221
- [15] Wu H Y, Jiang D H, Cai P, et al. Adsorption of *Pseudomonas putida* on soil particle size fractions; Effects of solution chemistry and organic matter. *Journal of soils and sediments*, 2012, 12: 143—149
- [16] 吴华勇, 蒋代华, 蔡鹏, 等. 低分子量有机配体对黏粒矿物吸附附云金芽孢杆菌的影响. *土壤学报*, 2011, 48(6): 1293—1297. Wu H Y, Jiang D H, Cai P, et al. Effects of low-molecular-weight organic ligands on adsorption of *Bacillus thuringiensis* by clay minerals (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48(6): 1293—1297
- [17] Jeng H C, England A J, Bradford H B, et al. Indicator organisms associated with stormwater suspended particles and estuarine sediment. *Journal of Environmental Science and Health*, 2005, 40(4): 779—791
- [18] Guber A K, Pachepsky Y A, Shelton D R, et al. Effect of bovine manure on fecal coliform attachment to soil and soil particles of different sizes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 3363—3370
- [19] Lee M H, Bradley M T. Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus* sp. Strain SG-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 1123—1129
- [20] Tazehkand S S, Torkzaban S, Bradford S A, et al. Cell preparation methods influence *Escherichia coli* D21g surface chemistry and transport in saturated sand. *Journal of Environmental Quality*, 2008, 37: 2108—2115
- [21] Kim H N, Walker S L. *Escherichia coli* transport in porous media; Influence of cell strain, solution chemistry, and temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71(1): 160—167
- [22] 熊毅. 土壤胶体. 北京: 科学出版社, 1985. Hseung Y. *Soil colloids* (In Chinese). Beijing: Science Press, 1985
- [23] Cai P, Huang Q Y, Zhang X W. Interactions of DNA with clay minerals and soil colloidal particles and protection against degradation by DNase. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(9): 2971—2976
- [24] Chen G X. *Microbial and colloidal deposition to solid surfaces; Effect of heterogeneity*. Riverside: University of California, 2009
- [25] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000. Bao S D. *Analysis methods for soil agro-chemistry* (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000
- [26] Haznedaroglu B Z, Kim H N, Bradford S A, et al. Relative transport behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Pullorum in packed bed column systems; Influence of solution chemistry and cell concentration. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(6): 1838—1844
- [27] Gregory J. Approximate expressions for retarded van der Waals interaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1981, 83(1): 138—145
- [28] Syngouna V I, Chrysikopoulos C V. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(12): 4539—4544
- [29] Hogg R I, Healey T W, Fuerstenau D W. Mutual coagulation of colloidal dispersions. *Transactions of the Faraday Society*, 1966, 62: 1638—1651
- [30] Heimenz P. Electrophoresis and other electrokinetic phenomena//Lagowski J J. *Principles of colloid and surface chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1977: 487—542
- [31] Schinner T, Letzner A, Liedtke S, et al. Transport of selected bacterial pathogens in agricultural soil and quartz sand. *Water Research*, 2010, 44(4): 1182—1192
- [32] Sharma M M, Chang Y I, Yen T F. Reversible and irreversible surface charge modification of bacteria for facilitating transport through porous media. *Colloids and Surfaces*, 1985, 16(2): 193—206
- [33] Wang L X, Xu S P, Li J. Effects of phosphate on the transport of *Escherichia coli* O157:H7 in saturated quartz sand. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(22): 9566—9573
- [34] Chu Y, Jin Y, Baumann T, et al. Effect of soil properties on saturated and unsaturated virus transport through columns. *Journal of Environmental Quality*, 2003, 32: 2017—2025
- [35] Fletcher M, Loeb G I. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 37: 67—72
- [36] Redman J A, Walker S L, Elimelech M. Bacterial adhesion and transport in porous media: Role of the secondary energy minimum. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(6): 1777—1785
- [37] Harvey R W. Parameters involved in modeling movement of bacteria in groundwater//Hurst C J. *Modeling the environmental fate of microorganisms*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1991: 89—114
- [38] Rochex A, Lecouturier D, Pezron I, et al. Adhesion of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine to cellulose fibres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65: 727—733
- [39] Otto K, Elwing H, Hermansson M. Effects of ionic strength on initial interactions of *Escherichia coli* with surfaces, studied online by a novel quartz crystal microbalance technique. *Journal of bacteriology*, 1999, 181: 5210—5218
- [40] Chen G, Walker S L. *Role of solution chemistry and ion valence*

on the adhesion kinetics of groundwater and marine bacteria. Langmuir, 2007, 23(13): 7162—7169

[41] Kim H N, Hong Y, Lee I, et al. Surface characteristics and ad-

hesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules. Biomacromolecules, 2009, 10(9): 2556—2564

MECHANISMS OF BACTERIAL PATHOGENS ADSORPTION ON RED SOIL COLLOIDS

Zhao Wenqiang¹ Liu Xing¹ Cai Peng^{1,2†} Huang Qiaoyun^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2 Key Laboratory of Arable Land Conservation in Middle and Lower Reaches of Yangtse River, Ministry of Agriculture, College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Effects of soil pH and ionic strength (KCl) on adsorption of *Streptococcus suis* and *Escherichia coli* on Red soil colloids were studied, and mechanisms of their interactions analyzed from the aspects of surface physicochemical properties of the bacteria and soil colloids and Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory. Results show that the adsorption isotherms of bacteria on Red soil colloids fitted well to the Freundlich equation ($R^2 > 0.97$). The partition coefficients (K_f) of *S. suis* adsorption on soil colloids were 4.5 ~ 6.1 times as high as those of *E. coli*. The K_f values of organic-matter-depleted colloids were 2.4 ~ 3.2 times as high as those of organic-matter-containing colloids. The bigger the specific surface areas or the lower the absolute zeta potential values, the higher the bacteria adsorption capacity, and the adsorbed bacteria were found at the secondary minimum, 90 ~ 100 nm apart from the colloids surface. With decreasing solution pH (9.0 ~ 4.0) or increasing IS (1 ~ 10 mmol L⁻¹), the interaction energy barrier between the Red soil colloids and the bacteria decreased and as a result more and more bacteria got adsorbed. This trend was in full agreement with the DLVO theory. The adsorption of *S. suis* on colloids decreased by 3.4% ~ 5.6% under high IS (50 ~ 100 mmol L⁻¹), which, besides the DLVO effect, was also ascribed to some non-DLVO effects, like steric repulsion and hydrophobic interaction.

Key words Red soil colloids; *Streptococcus suis*; *Escherichia coli*; Adsorption; DLVO theory

(责任编辑:汪叔生)