

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2009) 06-0338-03

壳聚糖抑菌作用的研究

张 茹^{1,2}, 李金花^{1,3}, 柴兆祥³, 王 蒂^{1,2*}(1. 甘肃省作物遗传与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 利用纸碟抑菌圈法, 对分离自贮藏期马铃薯腐烂块茎的 3 种细菌 (欧文氏菌 *Erwinia persicinus*, 泛菌属菌 *Pantoea* sp. 和假单胞菌 *Pseudomonas* sp) 进行了抑菌效果的研究。试验药剂为壳聚糖、双氧水和农用药剂爱诺链宝, 后两种药剂作为对照。结果表明, 壳聚糖的抑菌效果最好, 即使最低浓度的壳聚糖 (1.0%) 对 3 种细菌的抑制效果也较最大浓度的其它两种药剂明显, 并且随着壳聚糖浓度的增大抑菌效果增加, 超过最适浓度后抑菌效果下降。对不同的细菌种类, 同一浓度的壳聚糖有着不同的抑菌效果。

关键词: 植物生长物质; 马铃薯; 同化物; 产量; 品质

壳聚糖又名甲壳胺, 是甲壳素脱去一定乙酰基后的产物, 学名聚-2-脱氧- β -D 葡萄糖。壳聚糖来源于甲壳动物或昆虫的外骨骼, 在地球上含量极为丰富^[1]。壳聚糖具有生物相容性、抗菌、环境友好和提取方便等优点, 已在许多领域得到了广泛应用^[2], 包括废水处理、层析、抗菌材料、生物降解膜、药剂载体^[3-5]。近年来, 壳聚糖在农业方面显示出了特有的作用。利用壳聚糖为原料, 采用现代生物技术分解、提取并添加多种微量元素 (植物生长所必需) 精制而成的肥料, 因其在农业方面所取得的良好效果, 被人们誉为“植物疫苗”。壳聚糖在农业生产应用中, 不仅能使作物长势好, 植株健壮, 光合作用增强, 而且在抗逆性、抗病虫害方面也表现出明显效果, 所以有稳定而显著的增收效果。此外, 壳聚糖对作物品质的改善和食品营养价值、经济价值的提高有较大的意义^[6]。

马铃薯是世界上重要的粮食作物之一, 细菌性病害却较为严重。这不仅影响了马铃薯的生产, 其

品质与产量也受到了严重的制约。

本试验以农用药剂爱诺链宝和双氧水为对照试剂, 观察低分子量壳聚糖对从马铃薯腐烂块茎分离到的部分细菌的抑制效果, 旨在探讨壳聚糖的抑菌机理, 并为更好地防治植物病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

分离自贮藏期马铃薯腐烂块茎的欧文氏菌 (*Erwinia persicinus*), 泛菌属菌 (*Pantoea* sp) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* sp), 由甘肃农业大学作物遗传与种质创新重点实验室提供。

1.2 供试药剂及浓度

低分子量壳聚糖 (美国 MSDS 公司), 常用农业药剂爱诺链宝 (华北制药集团) 以及 30% 的 H_2O_2 。

(1) 用 0.5% 的冰醋酸作为溶剂将固体壳聚糖配制成 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、4.0% 的五种浓度的壳聚糖溶液, 放置完全溶解后使用。

(2) 用灭菌水稀释 30% 的 H_2O_2 , 配制成浓度为 6、12、18、24、30 mmol·mL⁻¹ 的 5 种浓度的溶液。

(3) 根据常用农药的稀释倍数范围, 将爱诺链宝配制成 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25% 五种浓度的溶液。

1.3 室内药剂抑菌实验

室内药剂抑菌效果采用纸碟法进行测定。

收稿日期: 2009-05-19

基金项目: 转基因抗逆耐盐及抗病马铃薯新品系培育研究 (GNSW-2006-01); 马铃薯优质高效配套生产技术与示范 (2006BAD21B053); 马铃薯镰刀菌干腐病原菌学及抗病种质资源筛选研究 (GKLAU0603) 资助。

作者简介: 张茹 (1978-), 女, 在读博士, 主要从事生物技术在育种中的应用研究。

* 通讯作者: E-mail: jiangze@public.lz.gs.cn

将保存的菌株以划线法在 NA 培养基平板上(牛肉浸膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 琼胶 15 g, 水 1 000 mL, pH 7.0~8.4) 25℃活化培养, 24 h 后挑单菌落至 NA 培养液中, 25℃振荡培养 24 h。用血球计数板测定菌悬液浓度。在无菌环境中, 向灭菌的培养皿(D = 9 cm) 中加入浓度为 $106\sim107$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 菌悬液 1 mL, 随即迅速倒入约 12 mL 温度为 40~50℃的 NA 培养基, 摇匀后冷却制成平板。将浸泡在不同浓度抑菌试剂中 24 h 的无菌吸水纸片(D = 5 mm) 放置于平板中央, 28℃恒温培养。

1.4 药剂效果评价依据

每个药剂处理重复 5 次, 无菌水为空白对照, 以 0.5%醋酸为壳聚糖的对照, 分别于 24 h, 48 h 后测量抑菌圈的大小, 评价药剂的作用效果。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖对分离自马铃薯上细菌的作用效果

由表 1 可知, 低分子量的壳聚糖对分离自马铃薯腐烂块茎的欧文氏菌、泛菌属菌和假单胞菌均有不同程度的抑制作用。浓度为 1.0%时, 壳聚糖作用 24 h 后对 3 种细菌的抑菌圈大小(直径)分别为 3.8 cm, 3.22 cm, 3.97 cm; 浓度为 2.5%时, 抑菌圈大小(直径)分别为 5.7 cm, 3.82 cm, 4.72 cm; 壳聚糖浓度达到 4.0 %时, 对欧文氏菌和泛菌属菌的抑菌圈直径大小开始有所降低, 而对假单胞菌的抑菌作用则还在增加, 说明随着壳聚糖浓度的升高抑菌效果有所增加, 但存在着最适浓度, 对于不同菌种其最适浓度范围有所不同。

表 1 不同浓度壳聚糖溶液对接种菌的抑菌效果

接种细菌	0.5%醋酸 (CK)	不同浓度壳聚糖(%) 对接种菌的抑菌圈平均直径(cm)				
		1.0	1.5	2.0	2.5	4.0
泛菌属菌	1.15	3.80	4.36	4.64	5.70	5.44
欧文氏菌	1.15	3.22	2.04	3.54	3.82	3.74
假单胞菌	1.15	3.97	4.36	4.38	4.72	4.96

2.2 H_2O_2 和爱诺链宝溶液对 3 种细菌的作用效果

从表 2 和表 3 中可以看出, 最高浓度的 H_2O_2 和农用杀菌剂爱诺链宝溶液比最低浓度的壳聚糖溶液作用效果还要差。配制浓度为 $30\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ (最大浓度) 的 H_2O_2 , 对三种细菌的抑菌圈大小(直径)分别为 2.8 cm, 1.4 cm, 1.1 cm。而配制成 0.25% (最大浓

度) 的农用杀菌剂爱诺链宝, 抑菌圈大小(直径)分别为 3.12 cm, 1.57 cm, 1.3 cm。此数据表明壳聚糖对这 3 种细菌的抑制效果明显高于 H_2O_2 溶液和农用杀菌剂爱诺链宝的作用效果。

表 2 不同浓度 H_2O_2 溶液对接种菌的抑菌效果

接种细菌	灭菌水 (CK)	不同浓度 H_2O_2 ($\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对接种菌的抑菌圈平均直径(cm)				
		6	12	18	24	30
泛菌属菌	0	1.66	2.20	3.10	2.46	2.80
欧文氏菌	0	0.84	0.90	1.00	1.10	1.40
假单胞菌	0	0.72	0.78	0.84	0.86	1.10

表 3 不同浓度爱诺链宝溶液对接种菌的抑菌效果

接种细菌	灭菌水 (CK)	不同浓度爱诺链宝(%) 对接种菌的抑菌圈平均直径(cm)				
		0.05	0.10	0.15	0.20	0.25
泛菌属菌	0	2.67	2.82	2.87	3.02	0.25
欧文氏菌	0	1.42	1.42	1.67	1.32	3.12
假单胞菌	0	0.95	0.93	1.07	1.05	1.57

图 1~3 是不同浓度的壳聚糖、 H_2O_2 、爱诺链宝溶液对泛菌属菌的抑制效果图。

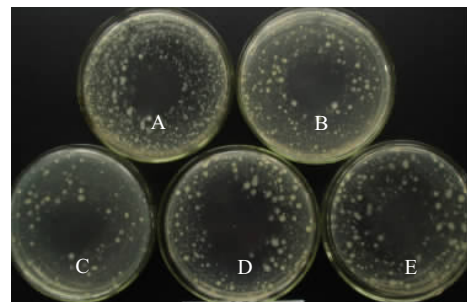


图 1 不同浓度的壳聚糖溶液对泛菌属菌的抑制作用
壳聚糖溶液浓度(%) : A-1.0 ; B-1.5 ; C-2.0 ; D-2.5 ; E-4.0。

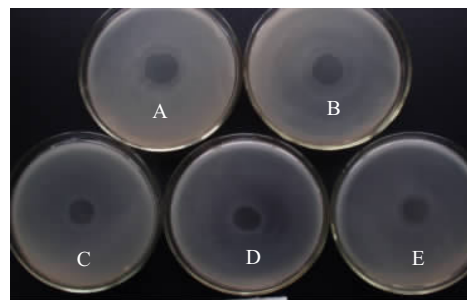


图 2 不同浓度的 H_2O_2 溶液对泛菌属菌的抑制作用
 H_2O_2 溶液浓度 ($\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) : A-30 ; B-24 ; C-18 ; D-12 ; E-6。

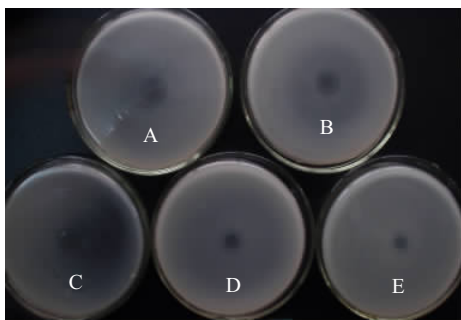


图 3 不同浓度的爱诺链宝溶液对泛菌属菌的抑制作用
爱诺链宝溶液浓度 (%) : A-0.25 B-0.20 C-0.15 D-0.10 E-0.05。

3 讨 论

农业药剂爱诺链宝和 H_2O_2 作用机制较为清楚。爱诺链宝的活性成份为氨基糖苷类抗生素, 它作用于细菌细胞膜相关的核糖体而干扰细菌蛋白质的合成, 从而达到杀菌的功效。而 H_2O_2 的杀菌能力主要依靠过氧化氢分解产生大量的氧化性很强的游离氧, 也称活性氧, 使细菌细胞中酶蛋白上的巯基氧化失去活性, 表现出杀菌效果。对于壳聚糖的抑菌机理, 存在着多种解释。有些报道认为, 壳聚糖与细菌细胞膜之间电荷作用导致两者之间的相互吸附, 从而引起了细菌细胞内物质的一系列变化, 包括蛋白质性质的变化以及其它成分的外泄, 从而抑制了细菌的正常生活与生长, 打乱了细菌的生长周期与生活力, 起到了抑菌的效果^[7-9]。

从本次试验来看, 壳聚糖的抑菌作用在一定范围内远高于其它两种抑菌剂, 这可能与壳聚糖的抑菌机理有着很大程度的联系。壳聚糖的作用在于对细菌的胞内物质起到了改变, 而造成了细菌的生长与生活的变化, 从而达到抑菌^[9], 并且根据壳聚糖浓度的不同, 抑菌效果也显示出不同, 这说明壳聚糖也存在着抑菌最适浓度, 这个浓度根据不同的病原菌而有所不同。用 0.5% 的醋酸溶液配制低分子量壳聚糖以增加其溶解度和分散度, 尽管醋酸在一定程度上表现出抑菌现象, 但是用醋酸配制的壳聚糖溶液的作用效果要比单纯的醋酸溶液明显的多。而试验中随着爱诺链宝浓度的增大, 抑菌效果也有所增强, 但是农药的使用会对环境、人畜健康产生危害以及出现病原的生理小种对药剂抗性的增强, 因此, 对于农药的使用, 尤其是农药增量过渡的使用要进行相应的控制。随着 H_2O_2 的浓度的增大, 亦可

以达到较好的抑菌的效果, 但生产成本很高, 因此找到合理、有效以及经济的抑菌方法是十分有意义的。

综上所述, 对于较大浓度的爱诺链宝与 H_2O_2 抑菌效果的研究显得并无太大意义, 而通过这两种药剂的对照, 可以确定出壳聚糖的抑菌效果。这说明了壳聚糖不仅抑菌效果占优势, 而且还属生物防治。针对于植物病害的防治, 大力开发和利用资源丰富的壳聚糖则成为一项十分有益的工作, 但对于不同的病原菌, 应该因势利导, 进行合理的防治, 才能达到抑菌与环保的统一。

壳聚糖的抑菌效果存在最适浓度, 并对于不同菌种最适浓度范围有所不同, 可能与壳聚糖溶液自身存在竞争作用有关。高浓度的壳聚糖溶液, 对细菌抑制的同时, 自身的分子之间产生了竞争作用, 从而影响了抑菌效果; 浓度较大的壳聚糖溶液亲和性与流动性下降, 进入细菌体内的量相应下降, 也会影响抑菌效果。本研究中, 对于欧文氏菌与泛菌属菌, 壳聚糖产生最大抑制作用的浓度为 2.5 %; 而对于假单胞菌, 4.0 % 的壳聚糖浓度抑制作用要高于 2.5 %, 最适作用浓度应需继续寻找。

[参 考 文 献]

- [1] 刘楠, 陈西广, 刘成圣, 等. 壳聚糖抑菌性能研究进展[J]. 海洋科学. 2005, 29(10): 90-92.
- [2] Kobayashi S, Kiyosada T, Shoda S. Synthesis of artificial chitin, irreversible catalytic behavior of a glycosyl hydrolase through a transition state analogue substrate[J]. J Am Chem Soc, 1996, 118: 13113-13114.
- [3] Shin Y, Yoo D I, Min K. Antimicrobial finishing of polypropylene nonwoven fabric by treatment with chitosan oligomer[J]. J Appl Polym Sci, 1999, 74(12): 2911-2916.
- [4] 郑连英, 朱江峰, 孙昆山. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. 材料科学与工程, 2000, 18(2): 22-24.
- [5] Sezer A D, Akbuga J. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads [J]. J Microencapsul, 1999, 16(6): 687-696.
- [6] 蒋桂芳, 宋力, 黄俊生. 农业中壳聚糖的功能与应用研究[J]. 渝西学院学报(自然科学版), 2005, 4(3): 58-60.
- [7] Chen C S, Liao W Y, Tsai G J. Antibacterial effect of N-sulfonated and N-sulfo benzoyl chitosan and its application to oyster preservation[J]. Food Prot, 1998, 61: 1124-1128.
- [8] 章玉萃, 陈霞, 吴优利. 壳聚糖——新型生防农药的应用研究进展[J]. 世界农药, 2003, 25(4): 39-42.
- [9] 刘保友, 张广民, 张伟, 等. 壳聚糖抑制细菌作用研究[J]. 山东农业科学, 2006(2): 68-69.

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635 (2009) 06-0341-03

反光膜对秋马铃薯保苗的试验研究

孔令强, 马海艳, 张家森, 韩文贺, 吴建军

(山东省滕州市农业局, 山东 滕州 277500)

摘要: 反光膜应用在秋马铃薯的栽培过程, 理论上可以适当提前播种期, 并起到降低土壤温度、控制土壤湿度、保全苗的作用。本研究以马铃薯品种荷兰 15 号为试材, 设覆膜和不覆膜两个处理, 探讨了反光膜对秋马铃薯土壤湿度、土壤温度及马铃薯出苗率的影响。结果表明, 使用反光膜可有效降低土壤温度并控制土壤温度的剧烈变化, 控制土壤湿度, 提高马铃薯出苗率和出苗整齐度, 增加单位面积产量。

关键词: 秋马铃薯; 反光膜; 土壤温度; 土壤湿度

反光膜是一种正面镀铝箔、背面可为各种颜色的聚氯乙烯塑料薄膜, 这种膜的反光率可达 70%~80%, 透光率低于 2%, 可以在增加正面光照的同时降低背面的温度, 具有控制土壤湿度剧烈变化的优点^[1]。滕州地区秋马铃薯播种期正值高温多雨后期, 田间湿度大, 土壤温度高, 马铃薯播种后容易烂种, 田间缺苗严重, 亩株数少, 产量低; 如果推迟播种, 秋马铃薯有效生育期短, 产量很低时

即被冻死^[2]。把反光膜应用在秋马铃薯上, 以起到降低土壤温度、控制土壤湿度、保全苗的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

马铃薯品种为荷兰 15 号。

反光膜在市场购买, 正面镀铝箔、背面为绿色, 宽 65 cm, 总重 10 kg。

1.2 试验设计

试验在滕州市姜屯镇马厂村某农户责任田内进行。共设 2 个处理: A 覆盖反光膜; B 不覆盖反光

收稿日期: 2009-04-14

基金项目: 国家行业科技专项资助 (3-6-4)。

作者简介: 孔令强 (1970-), 男, 高级农艺师, 从事农业技术研究与推广工作。

Bacteriostatic Effect of Chitosan in Potato

Zhang Ru^{1,2}, Li Jinhua^{1,3}, Chai Zhaoxiang³, Wang Di^{1,2}

(1. Gansu Key Lab of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. Gansu Agricultural University, College of Agronomy, Lanzhou, Gansu 730070, China ;

3. Gansu Agricultural University, College of Grassland Science, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Inhibition effects of chitosan isolated from rotten potato tubers on *Erwinia persicinus*, *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. were studied by the paper dishzone inhibition assay. Three kinds of reagents were chitosan, H₂O₂ and bactericide, with H₂O₂ and bactericide being as reference groups. The inhibition effect of chitosan was best, even though the lowest concentration of chitosan (1.0%) was better than the highest concentration of the other two reagents. With the increase in chitosan, the inhibition effect was enhanced, but it was decreased beyond the optimum concentration. The same concentration of chitosan had different inhibition effects on different species of bacteria.

Key Words: plant growth substance; potato; assimilation substance; output; quality