

## 生物学研究

## 壳聚糖对红掌组培污染菌的抑制作用

李春香, 高凤菊, 孙献明

(唐山师范学院 生命科学系, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 在污染的红掌继代培养基中提取污染菌并进行了分离及纯化, 初步鉴定为半知菌亚门 (Deuteromycotina), 丝孢纲 (Hyphomycetes), 丝孢目 (Hyphomycetales), 淡色孢科 (Dematiaceae), 木霉属 (trichoderma)。研究了壳聚糖对该菌的抑制作用, 探索了3种分子量及其6种浓度的壳聚糖对该菌的抑制效果。结果表明: 壳聚糖对该污染菌有抑制作用, 5万和25万分子量的抑菌效果高于3000分子量, 浓度越高, 抑菌效果越好。初步证实了壳聚糖对组培污染菌类有很好的抑制作用, 在花卉组织培养污染防治方面具有应用价值。

**关键词:** 组织培养; 污染; 壳聚糖; 抑制作用

**中图分类号:** S436.8

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-9115(2008)05-0044-05

## The Inhibition Effect of Chitosan on the Fungi in Anthurium Subculture Medium

LI Chun-xiang, GAO Feng-ju, SUN Xian-ming

(Department of Biology Science, Tangshan Teachers College, Hebei Tangshan 063000, China)

**Abstract:** The fungi was isolated and purified from polluted anthurium subculture medium, identified to be Deuteromycotina Hyphomycetes Hyphomycetales Dematiaceae and trichoderma. The inhibition effect of the three kinds of chitosan on the fungi was conducted. The results showed that the chitosan had inhibition effect on the fungi. The higher concentrations of chitosan had a better inhibition effect than the lower ones. The inhibition effect of 50,000 and 250,000 molecular weight chitosan is better than that of the 3000 molecular weight. It is preliminarily proved that chitosan had good inhibition effect on the fungi from polluted tissue culture, and will have good application value in the fields of pollution prevention in flowers tissue culture.

**Key words:** tissue culture; contamination; Chitosan; inhibition effect

植物组织培养不仅在植物育种、苗木快速繁殖和有用次生代谢产物生产等方面应用广泛, 也是植物基因工程和植物分子生物学研究的重要基础之一<sup>[1]</sup>。污染、褐化、玻璃化等是组织培养存在的主要问题, 其中污染最普遍<sup>[2]</sup>。因此采取有效的防控措施, 降低污染发生的机率, 是组织培养成功的重要保障。

壳聚糖 (chitosan) 是甲壳素在强碱性条件下进行脱乙酰基作用后形成的一种重要的衍生物, 是由多个 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -(1-4)糖苷键连接起来, 但它的性质较为活泼<sup>[1]</sup>。

壳聚糖具有天然抑菌性能, 且抑菌谱广<sup>[1-10]</sup>, 近年来壳聚糖在各个领域如农业<sup>[2]</sup>、医学<sup>[3]</sup>、制造<sup>[4]</sup>、食品<sup>[5]</sup>等方面中的运用受到很大的重视。有关壳聚糖在组织培养中的抑菌应用尚未见报道。

本实验拟从污染的红掌继代培养基中提取、纯化污染菌并进行鉴定, 用不同分子量及其不同浓度的壳聚糖对其进行抑制实验, 摸索出抑菌效果最好的壳聚糖分子量及最佳抑菌浓度, 为探索壳聚糖成为新型的抑菌剂提供具体信息。

### 1 材料与方法

基金项目: 唐山师范学院科学与发展研究计划 (07C24)。

收稿日期: 2008-03-21

作者简介: 李春香 (1968-), 女, 河北乐亭人, 硕士, 唐山师范学院副教授, 研究方向为植物生物防治。

## 李春香, 等: 壳聚糖对红掌组培污染菌的抑制作用

## 1.1 试验材料

## 1.1.1 供试菌株

霉菌污染菌(代号 WCHPA), 分离于唐山师范学院实验室污染的红掌继代培养基中。

## 1.1.2 供试药品

壳聚糖, 有浙江澳兴生物科技有限公司提供, 分子量为 3kd(脱乙酰度) 80%); 50kd(脱乙酰度) 90%), 25kd(脱乙酰度) 90%)。

## 1.1.3 培养基 PDA 培养基

土豆 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000ml, pH 值自然。

## 1.2 试验方法

## 1.2.1 污染菌的分离及纯化

在超净工作台中挑出红掌继代培养基中的污染真菌, 接到 PDA 培养基中。重复若干次, 直至菌落特征及其显微形态不再有变化, 可确定菌种已纯化。

## 1.2.2 污染菌的鉴定

连续观察纯化后的菌落形态。制作装片, 进一步观察菌株、菌丝、孢子、产孢细胞的形态及产孢细胞的产孢方式和形态等, 用数码显微镜进行拍照。

## 1.2.3 抑菌试验

称取不同分子量壳聚糖用 1M 的乙酸溶液溶解后与 PDA 培养基混合, 制成壳聚糖终浓度分别为 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0) mg/ml 的培养基, 用 1M 的氢氧化钠溶液调节 pH 值为 6.0, 对照除不加壳聚糖外, 其他与加有壳聚糖的培养基相同。高压灭菌锅 121℃ 下灭菌 30min 后倒平皿。

制备菌悬液, 用直径为 2.5cm 的经高压灭过菌的滤纸片沾取悬液放入平皿中央(如图 1 所示), 放置 26℃ 的培养箱中培养。每个处理 3 个重复。每天观察菌落变化情况、拍照。并用十字交叉法每天测量记录各皿中菌落直径并计算其抑菌率。

抑菌率(%)=(1-处理皿中菌落直径/对照皿中菌落直径) × 100%。



图 1 污染的红掌继代培养基 图 2 污染菌的菌落特征

## 2 结果与分析

## 2.1 红掌继代培养基污染症状

在红掌继代培养基中长出褐色的菌毛, 培养基表面呈黑色, 褐色的菌丝上间有白色絮状的菌丝(如图 2 所示)。

## 2.2 真菌纯培养的形态特征及鉴定结果

菌落在 PDA 培养基上等径生长, 边缘整齐, 孢子萌发

产生白色菌丝 24h 后变为绿色继而变为褐色, 菌丝发达, 绒状, 培养 3d 左右, 在褐色菌丝中间有白色絮状的菌毛产生。菌丝有隔, 分生孢子梗长, 产生侧向分枝, 分生枝上轮生短的产孢瓶体。分生孢子单胞卵圆形、光滑(如图 3 所示)。

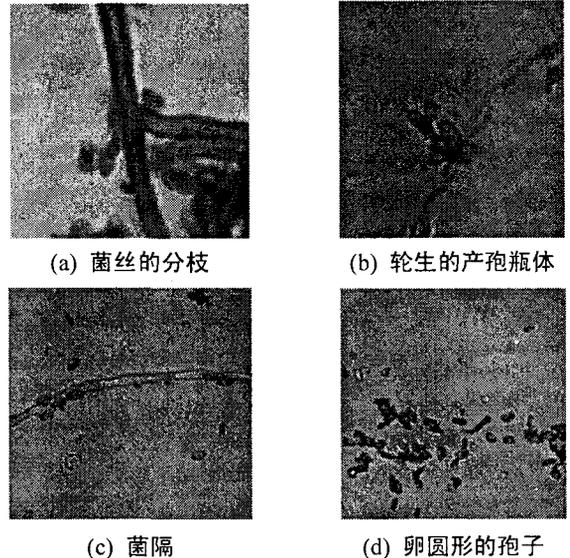


图 3 WCHPA 菌的显微照片

根据菌落形态及其菌丝与孢子的显微结构初步鉴定 WCHPA 归为半知菌亚门(Deuteromycotina), 丝孢纲(Hyphomycetes), 丝孢目(Hyphomycetales), 淡色孢科(Dematiaceae), 木霉属(trichoderma)。

## 2.3 壳聚糖抑菌结果

## 2.3.1 形态学观察

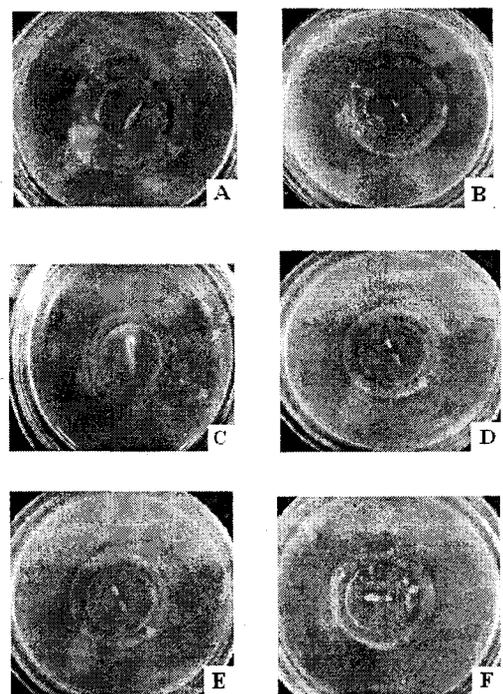


图 4 5 万分子量壳聚糖不同浓度抑菌效果的比较 (A~F 浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mg/ml)

加入壳聚糖的 PDA 培养基, 4d 后能明显观察到菌落周围有黑色晕圈, 且黑色晕圈随着菌落的生长而向外移。一般抑菌效果越好黑色晕圈越明显。对照菌落始终没有出现这种现象。壳聚糖的分子量和浓度影响抑菌效果。(如图 4 及图 5 所示)

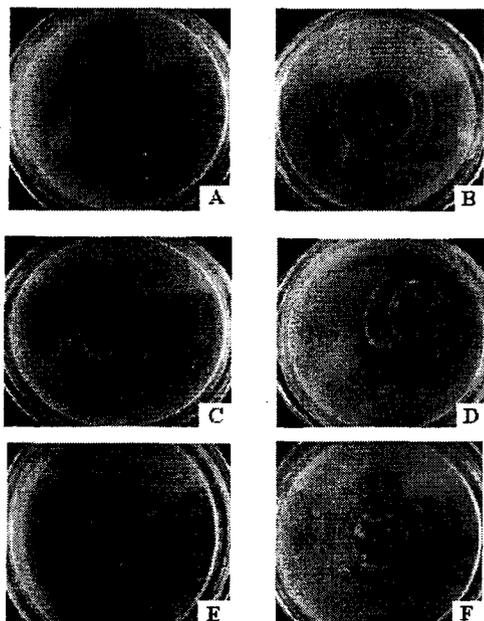


图 5 25 万分子量壳聚糖不同浓度抑菌效果的比较 (A~F 浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0mg/ml)

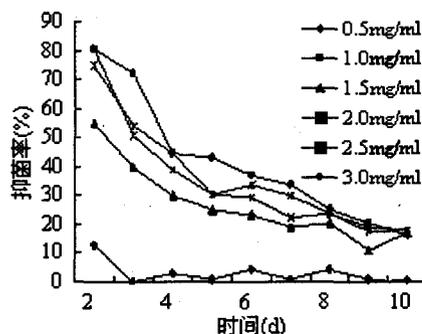


图 8 25 万分子量壳聚糖对 CHPA 菌落的抑制率

由图 6~8 可以看出, 壳聚糖浓度不同抑菌效果不同, 抑菌效果随壳聚糖浓度增高而增大, 3.0mg/ml 浓度时抑菌率最高。在第 2d 抑菌效果最好。

分子量为 3000 的壳聚糖抑菌率最高达 62.5%; 0.5mg/ml 浓度的抑菌率最差, 最高抑菌率为 10.0%。分子量为 5 万的壳聚糖抑菌率最高达 77.27%; 分子量为 25 万的壳聚糖抑菌率最高值为 79.55%, 出现在 3.0mg/ml 和 2.0mg/ml 两个浓度中, 0.5mg/ml 浓度的抑菌率最差。1.5、2.0、2.5、3mg/ml 浓度的抑菌率随着时间的延长基本上成下降趋势, 而 0.5 和 1.0mg/ml 浓度的抑菌率在第 2d 至第 5d 是下降的; 5d 以后抑菌率不再有明显的下降趋势。

方差分析在 5% 显著水平上, 三种分子量壳聚糖抑菌率在 0.5 与 1.0mg/ml、1.0 与 1.5mg/ml、1.5 与 2mg/ml 浓度之间有差异, 而 2.0、2.5 及 3.0mg/ml 浓度之间的抑菌率差异不显著。结果表明在 2mg/ml 浓度以下浓度越高抑菌效果越好; 在浓度达到 2.0mg/ml 以后抑菌效果不再有显著增加。

### 2.3.3 相同浓度的三种分子量壳聚糖抑菌效果的比较

#### 2.3.3.1 浓度为 0.5mg/ml 3 种分子量壳聚糖对 WCHPA 菌落的抑制效果

6 个浓度 3 种分子量壳聚糖对 WCHPA 菌落的抑菌率结果分别见图 9~14。

由图 9~图 14 可以看出在不同浓度下不同分子量壳聚糖的抑菌趋势。

由图 9 可以看出 0.5mg/ml 浓度的 3 种分子量壳聚糖之间没有明显的规律, 最高抑菌率出现在分子量为 5 万的壳聚糖培养基中为 20.45%。抑菌率和时间上也没有紧密的联系。结果表明在 0.5mg/ml 浓度下 3 种分子量的壳聚糖的抑菌效果都不理想。

由图 10 可知在第 5d 之前 3 种分子量壳聚糖分子量越大抑菌率越高, 而且都是随着时间的延长抑菌率降低。在第 5d, 3000 分子量的抑菌率超过其它两种分子量的抑菌率, 而 3000 分子量的抑菌率也达到最高值。在第 7d 后抑菌效果和第 5d 之前的相似, 分子量越大抑菌率越高。

### 2.3.2 相同分子量不同浓度壳聚糖抑菌效果的比较

分子量 3000、5 万、25 万壳聚糖抑菌结果见图 6~8。

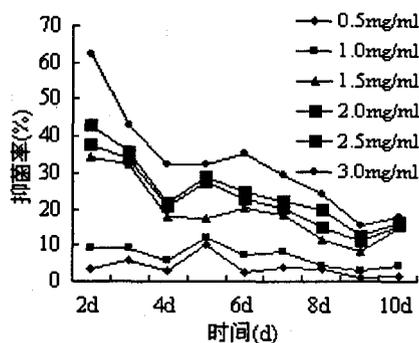


图 6 分子量为 3000 的壳聚糖对 WCHPA 菌落的抑菌率

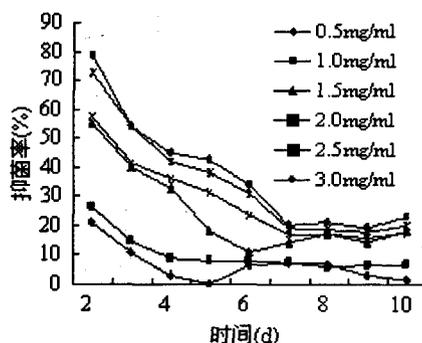


图 7 5 万分子量壳聚糖对 CHPA 菌落的抑制率

李春香, 等: 壳聚糖对红掌组培污染菌的抑制作用

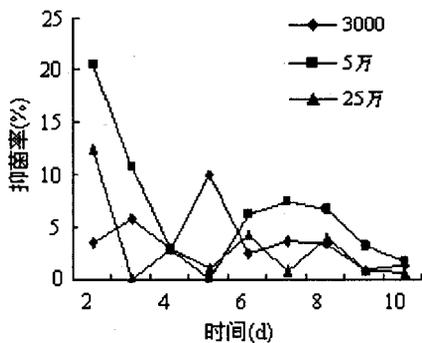


图9 0.5 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

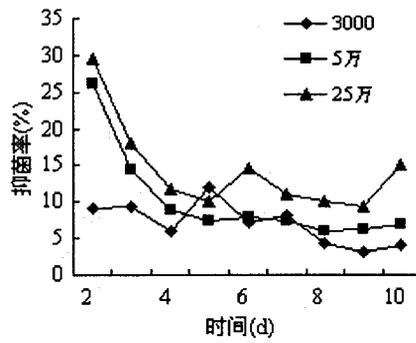


图10 1.0 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

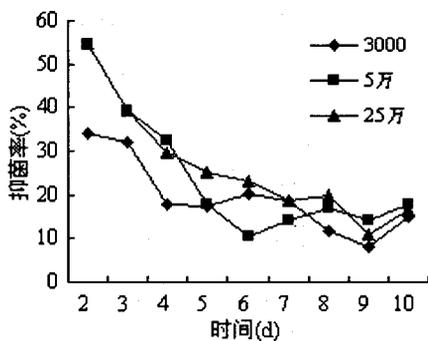


图11 1.5 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

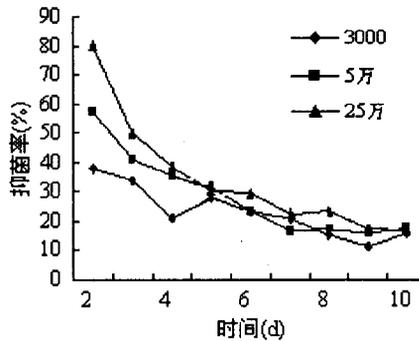


图12 2.0 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

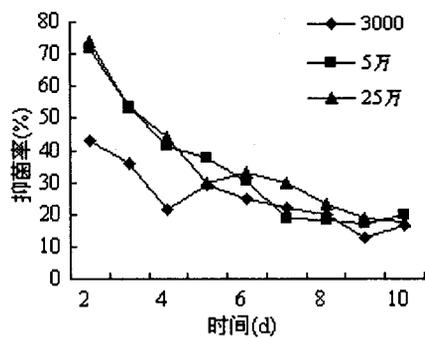


图13 2.5 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

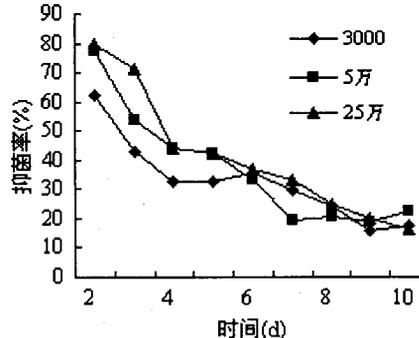


图14 3.0 mg/ml 3种分子量壳聚糖对 WCHPA 的菌落率

由图 11 可以看到 3000, 5 万和 25 万分子量的壳聚糖对 WCHPA 菌落的抑菌率几乎相互平行, 都随时间呈下降趋势。方差分析, 1.5mg/ml 浓度的壳聚糖 3 种分子量的抑菌率差异水平不显著 (P0.05)。

在 2mg/ml、2.5mg/ml、3mg/ml 浓度下 3 种分子量壳聚糖抑菌率没有差异。3 种分子量的壳聚糖抑菌效果在第 2、3、4d, 5 万分子量和 25 万分子量的壳聚糖的抑菌效果要好于 3000 分子量, 而在第 5d 之后 3 种分子量壳聚糖的抑菌效果没有明显的区别。方差分析表明差异不显著。

3 讨论与结论

3.1 壳聚糖成为新型抑菌剂的可能

植物组培的污染大致可分为两种, 一种是操作中产生得污染, 主要是霉菌的污染; 一种是外植体自身所带杂菌主要是由真菌和细菌的污染<sup>[10]</sup>。

高抑菌率高达 79.55%。抗生素是现在组培中最常见和

最有效的抑菌剂, 但抗生素价格昂贵而且在组培中产生很多的副作用<sup>[11]</sup>, 而壳聚糖可以弥补这些缺点和不足从而成为一种新型低廉、高效的抑菌剂。

3.2 分子量对壳聚糖抗菌性能有重要影响

从实验结果来看 5 万和 25 万壳聚糖的抑菌效果要好于 3000 分子量的; 最高抑菌率出现在 25 万分子量 3.0mg/ml 和 2.0mg/ml 两个浓度中。但总体考虑到价格及其操作因素上本实验的结论是 5 万分子量 1.5mg/ml 浓度为最佳。

3.3 浓度对壳聚糖抗菌性能有重要影响

冯小强<sup>[11]</sup>、钟秋平<sup>[12]</sup>等的研究结果均表明壳聚糖的抑菌作用随其浓度的增加而增大, 本实验结果支持上述研究结果。

甲壳素应用范围广泛, 壳聚糖在医学、食品、环保、日化用品等领域都有着广泛而重要的应用。将壳聚糖用于花卉组织培养将有很好的前景。

**[参考文献]**

- [1] M.K..Razdan.肖尊安,祝扬译.植物组织培养导论[M].北京:化学工业出版社,2006:1-2.
- [2] 胡凯,张立军,白雪梅,等.植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J].安徽农业科学,2007,35(3):680-681.
- [3] 汪一婷,王连平,牟豪杰,等.工厂化生产组培苗的污染及其控制研究[J].安徽农业科学,2005, 33(12):2357- 2358.
- [4] 蒋挺大.甲壳素[M].北京:中国环境科学出版社,1996.
- [5] 付田霞,刘晓宇,刘志恒.壳聚糖的抑菌性能应用研究进展[J].辽宁化工,2005,12 34 (12):541-544.
- [6] 于汉寿,吴汉章,杨冰.壳聚糖抑制植物病害的研究进展[J].天然产物研究与开发,1999,12(3):94-97.
- [7] 崔丽方,石亚伟.壳聚糖的制备及在食品工业中应用的机理[J].食品与药品,2006(03A):19-22.
- [8] 吴俊,夏文水.非生物因素对壳聚糖抗菌活性的影响[J].食品科学,2004,25(7):53-55.
- [9] 吴小勇,曾庆孝,莫少芳.几种壳聚糖的抑菌性能[J].食品与发酵工业,2005,206(2):18-21.
- [10] 胡凯,张立军,白雪梅,等.植物组织培养污染原因分析及外植体的消毒[J].安徽农业科学, 2007,35(3):680-681.
- [11] 冯小强.壳聚糖降解、抑菌性能及其应用研究[D].兰州:兰州大学,2007.
- [12] 钟秋平,夏文水.壳聚糖对芒果炭疽病菌、蒂腐病菌的拮抗作用[J].食品与机械,2005,21,(1):25-27.

(责任编辑、校对: 锯行松)

