

文章编号: 1000-5692(2006)01-0089-05

壳聚糖金属盐抑菌效果研究

毛胜凤¹, 孙芳利², 段新芳³, 文桂峰²

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院 浙江 临安 311300; 2. 浙江林学院 工程学院
浙江 临安 311300; 3. 中国林业科学研究院 木材工业研究所, 北京 100091)

摘要: 采用抑菌圈法研究了壳聚糖金属盐防霉剂对木霉 *Trichoderma viride*, 青霉 *Penicillium citrinum*, 黑曲霉 *Aspergillus niger*, 黄曲霉 *Aspergillus flavus* 以及酵母菌 *Microzyme* sp. 的抑菌作用, 并筛选出最佳抑菌质量分数。结果表明壳聚糖铜盐对于所选菌种的抑制效果高于其他几种试剂, 且抑制持续性也较长; 质量分数为 $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 壳聚糖对木霉和酵母菌的抑菌效果特别明显, 且抑制持续性也最长; 壳聚糖锌盐对木霉和酵母菌的抑菌效果高于硼酸; 硼酸只对黑曲霉有较长的抑制持续性。图 9 参 11

关键词: 林业工程; 抑菌剂; 抑菌试验; 壳聚糖; 壳聚糖金属盐

中图分类号: S782.33 **文献标识码:** A

随着全球环境的恶化, 热带森林的锐减, 天然林保护日益受到重视。竹材作为一种很好的木材代用品越来越受到欢迎, 竹制品在国际市场上需求迅速增加。但是, 竹材富含营养和水分, 极易滋生霉菌, 发生霉腐^[1]。竹材霉腐可导致竹材材质劣化污损, 不仅影响了竹材及其制品的外观, 而且还为其他菌虫危害创造了条件。目前所用竹材防霉剂, 如五氯酚钠等由于对环境及人类健康带来不良影响而被禁止使用, 所以亟须探求一种新型、无毒或低毒的防霉剂。^[2,3]壳聚糖金属盐(CMS)系列防霉剂由壳聚糖和金属盐复合而成, 是一种对环境友好的木(竹)材保护剂^[4]。探求它们对竹材霉菌的抑制效果, 为壳聚糖金属盐系列防霉剂的进一步研究开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂 ①抑菌剂: 壳聚糖铜盐(CCS)溶液, 质量分数分别为 0.05 , 0.10 , $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 壳聚糖锌盐(CZS)溶液, 质量分数分别为 0.05 , 0.10 , $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 壳聚糖(C)溶液, 质量分数分别为 0.05 , 0.10 , $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 硼酸(B)溶液, 质量分数分别为 0.05 , 0.10 , $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。②空白对照(ck)。

1.1.2 试验设备与仪器 智能恒温恒湿培养箱、立式自动电热压力灭菌器、超净工作台、电子天平(感量为 0.1 mg)、电炉、酒精灯和水浴锅。

1.1.3 试验菌种 选择 5 种最易引起竹材霉变的菌种: 木霉 *Trichoderma viride*, 青霉 *Penicillium citrinum*, 黑曲霉 *Aspergillus niger*, 黄曲霉 *Aspergillus flavus*, 酵母菌 *Microzyme* sp.^[5~7]。菌种来自浙江林学院微生物实验室。

收稿日期: 2005-03-08; 修回日期: 2005-10-14

基金项目: Supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, and the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, The Netherlands (D/3284-1)

作者简介: 毛胜凤, 实验师, 从事森林保护与微生物等研究。E-mail: maof@126.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.1.4 PDA 培养基的制备^[8,9] 配方为: 去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1.0 L。

1.2 试验方法

实验方法参见文献[10]。

1.2.1 试管接种与培养 用接种环在酒精灯火焰上消毒后挑取菌种在已灭菌的试管斜面上划线接种, 均接种于 PDA 培养基上, 5 种菌各接 3 支试管。接种后按不同菌种, 分别捆扎用牛皮纸封口后放入恒温恒湿培养箱中培养, 温度控制在 25~28 ℃, 相对湿度 75%, 培养 1 周。

1.2.2 浸泡滤纸片 将已灭菌的滤纸片(直径 5 mm)用镊子(已灭菌)浸入已准备好的抑菌剂中浸泡 24 h, 经水浸泡的滤纸片作对照。

1.2.3 抑菌工艺 在无菌条件下, 取出已灭菌的 PDA 培养基, 将它快速分别倒入灭过菌的培养皿中, 每皿需培养基量 10~15 mL, 并使培养基分布均匀, 共计 123 只培养皿。将培养好的菌种分别用接种环挑取 2 环菌放入已准备好的无菌水中, 制成菌悬液, 按不同的菌种, 用灭过菌的移液管(1.0 mL)吸取 0.1 mL 菌悬液注入相应的培养皿中, 并用已灭过菌的玻璃推棒在培养基上轻轻来回推动, 使菌液分布均匀。用无菌镊子夹取浸泡在药剂中的滤纸片, 稍稍晾干后放入培养皿中, 每皿放 3 片, 呈正三角形放置, 每个滤纸片都要与培养基完全接触。将以上培养皿放入智能恒温恒湿培养箱中培养, 温度控制在 25 ℃, 相对湿度 75%。

接种 1 d 后开始观察, 在每天的同一时间段将培养皿从培养箱中取出, 观察各皿中的霉菌生长状况, 并用游标卡尺(刻度为 0.02 mm)量取抑菌圈的直径(单位为 mm)。观察 7 d。

1.3 抑菌效果评定方法

如果抑菌剂能杀死或抑制皿中供试菌的生长, 则在滤纸片的周围会出现一个无菌生长的透明圈, 即抑菌圈。以抑菌圈的直径作为评定指标, 抑菌圈直径越大, 说明该抑菌剂对此种供试菌的抑制效果越好, 反之则抑制效果越差。

2 结果与分析

2.1 不同抑菌剂对所选菌种的抑制效果

抑菌剂在 7 d 中对所选菌种的抑制效果以前 2 天最有效, 所以本实验对抑菌剂抑菌效果的评定以接种后前 2 天平均值为依据。

2.1.1 不同抑菌剂对木霉的抑制效果 图 1 表明, CCS, CZS 和 C 等 3 种抑菌剂对木霉的抑制效果明显比硼酸好, 其中 C 最为显著; 在这 3 种抑菌剂中, 随着霉菌培养时间的增加, 抑菌圈直径均逐渐减小; 硼酸在第 3 天以后就已经丧失了抑菌效果, CCS 和 CZS 在第 5 天以后对木霉的抑菌效果已不明显, 而药剂 C 在第 7 天后对霉仍有一定的抑菌效果, 抑菌圈直径稳定在 0.88 mm。

2.1.2 不同抑菌剂对青霉的抑制效果 图 2 表明, CCS 和 C 这 2 种抑菌剂对青霉的抑制效果明显比 CZS 和硼酸要好; 在这 2 种抑菌剂中, 随着霉菌培养时间的增加, 抑菌圈直径均逐渐减小; CZS 和硼酸在第 3 天以后就已经丧失了抑菌效果, 而 CCS 和 C 在第 5 天以后对青霉的抑菌效果不明显。

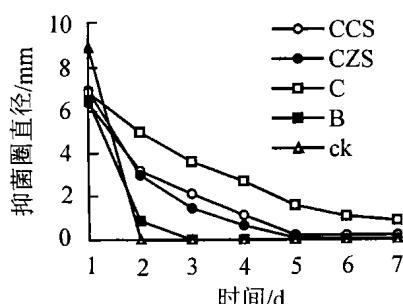


图 1 不同抑菌剂对木霉的抑制效果

Figure 1 Restraining results of different fungicides to *Trichodema viride* after inoculation

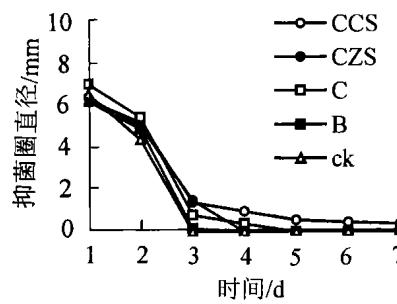


图 2 不同抑菌剂对青霉的抑制效果

Figure 2 Restraining results of different fungicides to *Penicillium citrinum* after inoculation

2.1.3 不同抑菌剂对黑曲霉的抑制效果 图 3 表明, CCS, C 和硼酸 3 种抑菌剂对黑曲霉的抑制效果

明显比CZS要好, 其中CCS最为显著; 在这3种抑菌剂中, 随着霉菌培养时间的增加, 抑菌圈直径均逐渐减小; CZS在第4天以后就已逐渐丧失了抑菌效果, C在第6天以后对黑曲霉的抑菌效果已不明显, 硼酸对黑曲霉的抑菌效果从第3天开始急剧下降, 到第7天以后, 抑菌效果降为零; 而药剂CCS从第3天开始抑菌圈直径稳定在1.0 mm。

2.1.4 不同抑菌剂对黄曲霉的抑制效果 图4表明, CCS对黄曲霉的抑制效果明显比CZS、C和硼酸要好。CZS和C在第2天以后几乎丧失了抑菌效果, 硼酸在第3天以后也丧失了抑菌效果, 说明这3种抑菌剂对黄曲霉的抑制效果均比较差。而CCS到第4天后, 抑菌圈直径稳定在0.63 mm, 且在第7天后对黄曲霉仍有一定的抑菌效果。

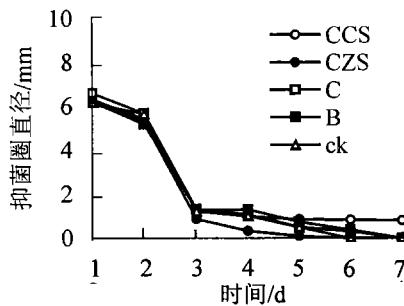


图3 不同抑菌剂对黑曲霉的抑制效果

Figure 3 Restraining results of different fungicides to *Aspergillus niger* after inoculation

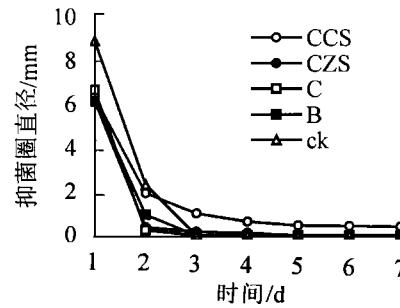


图4 不同抑菌剂对黄曲霉的抑制效果

Figure 4 Restraining results of different fungicides to *Aspergillus flavus* after inoculation

2.1.5 不同抑菌剂对酵母菌的抑制效果 图5表明, CCS、CZS和C这3种抑菌剂对酵母菌的抑制效果明显高于硼酸, 其中C最为显著。硼酸在第3天以后丧失了酵母菌的抑菌作用。CCS和CZS到第3天以后抑菌圈直径稳定在1.78 mm和1.28 mm左右。C到第3天以后抑菌圈直径变化也均趋于平缓, 在第7天后对酵母菌抑菌圈直径稳定在2.00 mm。

由以上不同抑菌剂在7 d内对所选菌种的抑制效果图可以看出, 在前第2天和第3天的抑菌圈直径下降最快, 说明本实验所选菌种在前第2天和第3天繁殖生长最快。

CCS对所选菌种有很好的抑制效果, 尤其对黑曲霉、黄曲霉和酵母菌的抑制效果持续性最好, 其他3种抑菌剂对所选菌种的抑制效果具有选择性。C抑制效果良好, 其中对木霉和酵母菌的抑制效果最好, 持续性也最好; CZS对木霉和酵母菌的抑制效果优于硼酸, 对黑曲霉、黄曲霉抑制效果不如硼酸。

2.2 不同质量分数的抑菌剂在第2天的平均抑制效果

2.2.1 不同质量分数的CCS在第2天对所选菌种的平均抑制效果 图6表明, CCS对酵母菌的抑制效果最好, 对黄曲霉的抑制效果最差。其中, 质量分数为10.0 g·kg⁻¹的CCS对青霉、酵母菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径分别为5.96 mm和6.26 mm; 质量分数为20.0 g·kg⁻¹的CCS对黑曲霉、酵母菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径分别为6.18 mm和6.55 mm; 对黄曲霉, CCS的抑制效果不如对其他几种菌, 抑菌圈直径平均为4.15 mm, 且抑制效果与质量分数关系不大。

2.2.2 不同质量分数的CZS在第2天对所选菌种的平均抑制效果 图7表明, CZS对酵母菌的抑制效果最好, 对黄曲霉的抑制效果最差。其中, 质量分数为20.0 g·kg⁻¹的CZS对黑曲霉、酵母菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径分别为6.01 mm和7.75 mm; 而3种质量分数的CZS对青霉和黑曲霉抑菌圈直径在6.00 mm左右, 且抑制效果与质量分数关系不大。同CCS一样, CZS对黄曲霉的抑制效果也较差, 抑菌圈直径平均为3.27 mm。

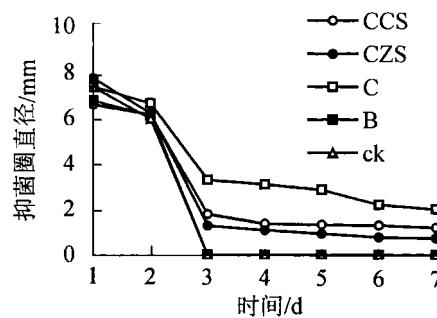


图5 不同抑菌剂对酵母菌的抑制效果

Figure 5 Restraining results of different fungicides to *Mucoraceae* sp. after inoculation

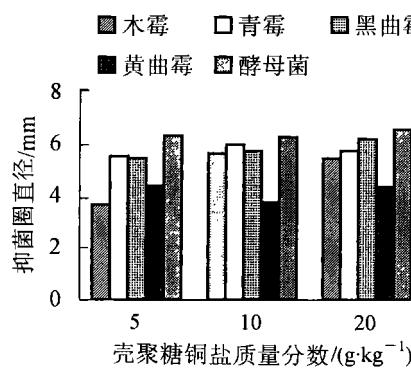


图6 不同质量分数的壳聚糖铜盐在第2天对霉菌的抑制效果

Figure 6 Restraining results of CCS to molds on the 2nd day after inoculation

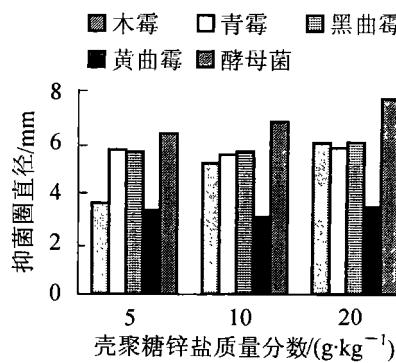


图7 不同质量分数壳聚糖锌盐在第2天对霉菌的抑制效果

Figure 7 Restraining results of CZS to molds on the 2nd day after inoculation

2.2.3 不同质量分数的壳聚糖在第2天对所选菌种的平均抑制效果 图8表明, C对酵母菌的抑制效果最好, 对黄曲霉的抑制效果最差。其中, 质量分数为 $20.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的C对木霉、青霉、黑曲霉和酵母菌的抑制效果较好, 抑菌圈直径分别为6.95, 6.92, 6.98和8.31 mm; 同 CCS 和 CZS 一样, C对黄曲霉的抑制效果也较差, 抑菌圈直径平均为3.46 mm。

2.2.4 不同质量分数的硼酸在第2天对所选菌种的平均抑制效果 图9表明, 硼酸对酵母菌的抑制效果最好, 对木霉和黄曲霉的抑制效果最差。其中, 质量分数为 $20.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硼酸对青霉、酵母菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径为5.86, 6.24 mm, 质量分数为 $10.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硼酸对酵母菌的抑制效果最好, 抑菌圈直径为6.47 mm; 而3个质量分数的硼酸对黑曲霉的抑制效果接近, 抑菌圈直径为5.71 mm。另外, 不同质量分数的硼酸对木霉和黄曲霉的抑制效果均较差, 抑菌圈直径平均分别为3.65和3.55 mm。

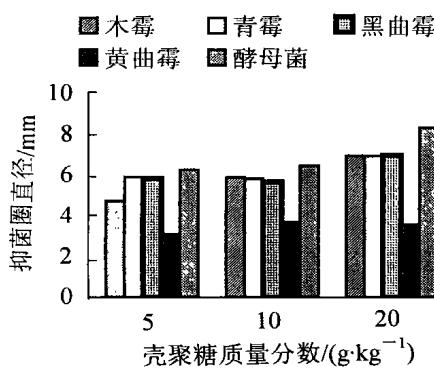


图8 不同质量分数的壳聚糖在第2天对霉菌的抑制效果

Figure 8 Restraining results of chitosan to molds on the 2nd day after inoculation

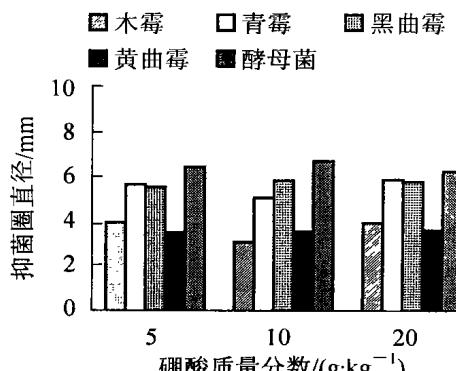


图9 不同质量分数的硼酸在第2天对霉菌的抑制效果

Figure 9 Restraining results of H_3BO_3 to molds on the 2nd day after inoculation

以上分析表明, 4种药剂对酵母菌的抑制效果明显比其他4种菌好, 其中以 $20.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的CZS和C效果最好; 但所选抑菌剂对黄曲霉的抑制效果普遍较差, 除CCS以外, 抑菌圈直径均在4.00 mm以下, 而且药剂质量分数的影响也不大。

3 结论

由不同抑菌剂在7 d内对所选菌种的抑制效果图可以看出, 在前2天的抑菌圈直径比较大, 说明本实验所用的药剂在前2天作用最明显。

壳聚糖铜盐对于所选菌种都有很好的抑制效果, 尤其对黑曲霉、黄曲霉、酵母菌的抑制效果持续

性最好; 其他 3 种抑菌剂对所选菌种的抑制效果是有选择性的药剂; 壳聚糖对木霉、青霉、黑曲霉和酵母菌均有很好的抑制效果, 其中对木霉和酵母菌的抑制效果最好, 持续性也最好; 壳聚糖锌盐对木霉和酵母菌的抑制效果优于硼酸, 而对黑曲霉、黄曲霉抑制效果不如硼酸。

4 种药剂对酵母菌的抑制效果明显比其他 4 种菌好, 其中以质量分数为 $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 壳聚糖锌盐和壳聚糖的效果最好; 但所选抑菌剂对黄曲霉的抑制效果普遍较差, 除壳聚糖铜盐以外, 抑菌圈直径均在 4.00 mm 以下, 而且药剂质量分数的影响也不大。

壳聚糖是一种天然高分子化合物, 它无毒无害且资源丰富, 本身已具有抑菌杀菌作用^[1]。而铜和锌 2 种元素本身也具有抑菌、杀菌作用, 将壳聚糖与这 2 种元素结合以后可以大大提高抑菌杀菌效果, 所以壳聚糖金属盐系列防霉剂是一种极有前途的高效低毒防霉剂, 它们在竹材中的固着性及防霉机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴开云, 翁月霞. 竹材霉腐类型及其与环境条件的关系[J]. 林业科学, 2000, 13(1): 63—70.
- [2] 冉隆贤. 竹材防霉研究进展[J]. 经济林研究, 1996, 14(4): 56—58.
- [3] 施振华, 骆土寿, 李云. 8 种防霉剂对橡胶木和竹材霉菌及蓝变菌的毒性试验[J]. 木材工业, 1994, 8(3): 34—38.
- [4] 孙芳利. 壳聚糖前处理木材染色及壳聚糖金属盐木材防腐性能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2000.
- [5] 吴光金, 林雪坚, 冉隆贤. 竹材霉菌的鉴定及防霉剂的筛选[J]. 经济林研究, 1994, 12(2): 50—54.
- [6] 赵桂华, 何文龙, 金重为. 竹材真菌的研究[J]. 南京林业大学学报, 1994, 18(3): 87—90.
- [7] 王文久, 辉朝茂, 陈玉惠, 等. 竹材霉腐与霉菌真菌[J]. 竹子研究汇刊, 2000, 19(2): 40—43.
- [8] 杜复元, 马灵飞. B. B. P-841 药剂对竹材防霉试验研究[J]. 浙江林学院学报, 1985, 2(2): 53—56.
- [9] 宋桢, 尤纪雪, 何文龙. ACB 防腐剂用于竹材防霉的试验[J]. 林业科技开发, 1994(3): 29—30.
- [10] 中华人民共和国国家质量技术监督局. GB/T18261-2000 防霉剂防治木材霉菌及蓝变菌的试验方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [11] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

Anti-fungi test of chitosan metal salts

MAO Sheng-feng¹, SUN Fang-li², DUAN Xin-fang³, WEN Gui-feng²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. School of Engineering, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 3. Research Institute of Wood Industry, China Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The restraining effects of Chitosan metal salts series on *Trichoderma viride*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Microzyme* sp. were studied. Results showed as the follows: chitosan Cu salt had good restraining effects to all chosen fungi than other fungistat, and the persistence of restraining was longer. Chitosan with the concentration of $20.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ had the best effects to *Trichoderma viride* and *Microzyme* sp. and with the longest persistence. Chitosan Zn salt had better effects to *Trichoderma viride* and *Microzyme* sp. than boric acid. Boric acid only had some effects to *Aspergillus niger*. [Ch, 9 fig, 11 ref.]

Key words: forest engineering; fungistat; anti-fungitest; chitosan; chitosan metal salts