

纳米银对甘蓝黑腐病菌抑制作用的研究

甘林^{1,2}, 许文耀^{1*}, 江茂生¹, 何炳辉¹, 苏漫菁¹

(1. 福建农林大学 植物保护学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省农科院 植物保护研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 测定纳米银对甘蓝黑腐病菌的抑制作用。结果表明: 纳米银对甘蓝黑腐病菌的毒力 (EC_{50}) 为 $0.0209 \mu\text{g/mL}$; 当处理质量浓度为 $0.02 \mu\text{g/mL}$ 时, 甘蓝黑腐病菌的呼吸强度和群体的生长数量均受到明显的抑制; 剂量为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的纳米银可使甘蓝黑腐病菌细胞膜受损, 电导率明显提高。盆栽试验结果表明: 质量浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 的纳米银对小白菜黑腐病的防治效果可达 67.67% 。

关键词: 纳米银; 甘蓝黑腐病菌; 毒力; 抑制机理

中图分类号: S482.2⁺8 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)03-0493-05

A Study on the Inhibitory Activities of Nano-silver to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

GAN Lin^{1,2}, XU Wen-yao^{1*}, JIANG Mao-sheng¹, HE Bing-hui¹, SU Man-jing¹

(1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: The inhibitory activities of nano-silver to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* were tested. The result showed that the EC_{50} value of nano-silver to the tested bacteria was $0.0209 \mu\text{g/mL}$. It is found that the respiration and the group growths of *X. campestris* pv. *campestris* were inhibited at the dose of $0.02 \mu\text{g/mL}$. The nano-silver of $0.1 \mu\text{g/mL}$ could destroy the cell membrane and increase the cell conductivity of the tested bacteria. When the concentration of nano-silver was $30 \mu\text{g/mL}$, the control effect was 67.67% to cabbage black rot in the pot experiment.

Key words: nano-silver; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; toxicity; antibacterial mechanism

目前, 农业生产中常见的细菌病害防治剂主要是抗生素类、无机铜制剂类和噻唑类, 这些药剂在防治植物细菌性病害中发挥了重要的作用, 但农用抗生素广泛应用带来的耐药菌株日趋增多、对人类健康造成危害等问题越来越被人们所认识。近年来, 许多国家和地区已经逐步禁、限用抗生素类农用杀菌剂, 而考虑到农产品的质量, 各国政府也纷纷颁布和实施了农产品中农药残留量严厉限制的法律、法规^[1]。因此, 应用药剂轮换是治理植物病原菌的抗药性和减少农产品中农药残留量的有效途径。利用纳米技术制成的纳米银, 具有杀菌效能高、病菌较难产生抗药性、用量少、化学性质稳定、并对人类安全等优点^[2-3]。孙超等^[4]发现载银无机抗菌制剂对大豆根腐病有一定的防治效果。纳米银抑菌作用的报道多见于卫生细菌^[3,5], 如 Jong-Seok Kim^[6]以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为供试细菌, 采用抑菌圈法测定了纳米银的抗菌效果。结果发现, 制备的纳米银对大肠杆菌的抑菌效果好于金黄色葡萄球菌。

收稿日期: 2010-03-03 修回日期: 2010-05-12

基金项目: 教育部生物农药与化学生物学福建农林大学重点实验室项目 (B-12)

作者简介: 甘林 (1981-), 男, 实习研究员, 硕士, 主要从事杀菌剂毒理学研究, E-mail: millergan@yeah.net; * 通讯作者: 许文耀, 教授, 主要从事杀菌剂毒理学研究, E-mail: xwy@fjau.edu.cn

但在纳米银对植物病原细菌的抑制作用方面却罕有报道。本试验研究了纳米银对甘蓝黑腐病菌的抑制效果和作用机理,旨在探索纳米银对植物病原细菌的抑制作用,为进一步研究与开发纳米级植物病原细菌防治剂奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病菌 甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*),由福建农林大学植物保护学院植物病理学实验室分离、保存。

1.1.2 供试药剂 1 300 $\mu\text{g/mL}$ 纳米银水悬浮剂 (福州凯立生物制品有限公司研制),硫酸链霉素水剂 (效价 $U = 1\ 000\ 000$,深圳华药南方制药有限公司生产)。根据设计的剂量用无菌蒸馏水分别将供试药剂稀释成一定质量浓度的药液。

1.2 方法

1.2.1 纳米银对甘蓝黑腐病菌的毒力测定 供试纳米银设计 2.5, 2.0, 1.0, 0.5, 0.075, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 6 个质量浓度,链霉素设计 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 5 个质量浓度。参照游文莉等^[7]方法,将设计浓度的纳米银药剂、菌悬液和 NA 培养基 (40~50) 充分混匀,制成含菌带药培养基,以加入无菌蒸馏水为对照,每个处理设置 5 个重复。在 28 下恒温培养,至平板表面长出肉眼可见菌落时计数,测定供试药剂对甘蓝黑腐病菌的毒力。将抑制率转换为几率值,用最小二乘法计算出抑菌几率值与供试药剂浓度对数的毒力回归式,求出 EC_{50} 、 EC_{90} 及其 95% 置信限,置信限计算时,以对照每一平板出现的菌落数为供试生物个体数 (n)。

1.2.2 纳米银对甘蓝黑腐病菌群体生长的影响 参考黄青春等^[8]的吸光度法,测定细菌浅层培养后悬浮液中的菌体数量。取活化后的细菌悬浮液至装有纳米银 (终质量浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$) 的 NB 培养基中振荡培养,并以不含纳米银的同条件细菌培养液为对照,每 2 h 取处理与对照各 3 个培养样,测定 OD_{600} 值,至 24 h。

1.2.3 纳米银对甘蓝黑腐病菌呼吸作用的影响 参考黄青春等^[8]方法。采用改装的 Wasburg 微量气体呼吸仪测定甘蓝黑腐病菌的氧呼吸速率。活化甘蓝黑腐病菌并制成细菌悬浮液,吸取 100 μL 至 50 mL NB 培养基中,28、180 r/min (下同) 振荡培养 24 h 后,将纳米银悬浮液加入装有细菌培养液 (菌体数量约 10^9 cfu/mL) 的三角烧瓶中,使供试纳米银的终浓度为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。利用 NaOH 吸收甘蓝黑腐病菌呼出的二氧化碳,通过数显微压差表测定甘蓝黑腐病菌氧呼吸量。每 5 min 记录 1 次呼吸代谢过程中导致瓶中的压力减少值,连续记录 90 min,并以不加药同条件培养的细菌培养液为对照。实验在 100 000 Pa, 28 (301 K) 恒温水浴中进行。试验重复 3 次。细菌的氧呼吸体积 (μL) 按下列公式计算:

$$V(O_2) = P \times \frac{\frac{(120 \times 273)}{301} + 50 \times 0.02649}{100\ 000} \quad (1)$$

(1) 式中: P —体系内压力减少值,单位 Pa; 120—三角瓶及导气管空间的总体积,单位 mL; 273—0 的华氏温度,单位 K; 301—28 的华氏温度,单位 K; 50—细菌悬浮液体积,单位 mL; 0.02649—301 K 下每 mL 水 O_2 的溶解度; 100 000—1 个大气压,单位 Pa。

1.2.4 纳米银对甘蓝黑腐病菌细胞膜透性的影响 采用黄青春等^[9]的方法。吸取活化的细菌悬浮液至 50 mL NB 培养基中振荡培养,24 h 后,用无菌蒸馏水稀释至菌体数量约为 10^8 cfu/mL,分别加入纳米银悬浮液 (使终质量浓度为 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$),以不加纳米银的细菌悬浮液为对照,并设置无菌蒸馏水为空白对照,重复 3 次,在 120 r/min 的摇床中振荡,静置,每隔 5 min 振荡 30 s,每隔 20 min 测定细菌悬浮液的电导率 1 次。测得的电导率按下列公式校正:

$$\text{校正电导率} = \text{实测电导率} - \text{相应空白对照电导率} \quad (2)$$

1.2.5 纳米银对小白菜黑腐病的盆栽防治效果 小白菜种子 (上海青,市场购买) 经催芽后,播种于装有灭菌菜园土的营养钵中,在网室中常温培育成苗,每盆定植 2 株,长出 4~5 片叶时,分别用质量浓度

为 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ 纳米银药液和蒸馏水对菜苗叶片均匀地喷雾, 处理后 4 h 使用灭过菌的剪刀, 蘸取甘蓝黑腐病菌菌液 (菌体数量 10^9 cfu/mL) 在叶缘剪叶接种, 剪口长度约 10 mm, 每剪接 1 次蘸取菌液 1 次, 每片叶子剪 4 个剪口, 每处理共接种 30 张叶片, 重复 3 次。接种后在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、100% 相对湿度下保湿。接种后 5~6 d, 对照剪口出现典型黑腐病病痕时, 调查病情。病情分级参照李经略^[10]的方法, 调查接种叶每一剪口的病级, 计算病情指数和相对防治效果。

2 结果与分析

2.1 纳米银对甘蓝黑腐病菌的毒力测定

毒力测定结果: 纳米银对甘蓝黑腐病菌毒力回归方程 $y = 1.155x + 6.94$, 相关系数 $R = 0.9803$, $EC_{50} = 0.0209$ 置信限 (95% CL $\mu\text{g/mL} = 0.0166 \sim 0.0252$), $EC_{90} = 0.7224$ $\mu\text{g/mL}$ (95% $CL = 0.7168 \sim 0.7280$)。对照药剂链霉素的 $EC_{50} = 0.4773$ $\mu\text{g/mL}$ (95% $CL = 0.4655 \sim 0.4894$), $EC_{90} = 0.7892$ $\mu\text{g/mL}$ (95% $CL = 0.7697 \sim 0.8092$)。结果表明, 纳米银对甘蓝黑腐病菌的毒力比链霉素强。

2.2 纳米银对甘蓝黑腐病菌群体生长的影响

在纳米银药剂的作用下, 甘蓝黑腐病菌的群体生长受到一定的抑制。菌药作用 8 h, 由于细菌群体生长此时处于迟缓期, 对照组和处理组的群体数目基本没有区别; 8~16 h, 细菌群体生长处于对数期, 处理组细菌悬浮液的 OD_{600} 值增幅明显比对照组小, 说明处理组细菌群体的增长量比对照组明显减少; 16~24 h, 细菌群体生长处于稳定期, 处理组和对照组群体数目分别保持在一定的范围内, 但处理组的菌体数目仍明显少于对照组 (图 1)。上述结果表明, 纳米银对甘蓝黑腐细菌群体生长有明显的抑制作用。

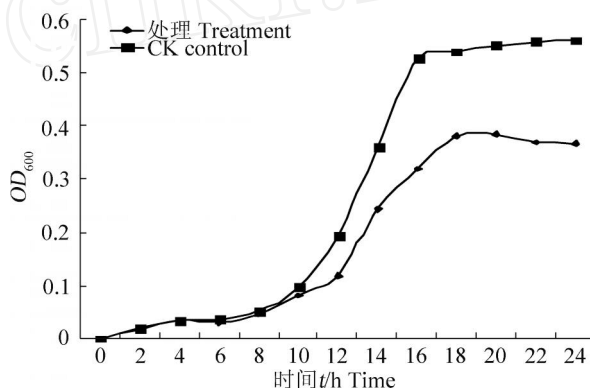


图 1 纳米银对甘蓝黑腐病菌群体生长的影响

Fig 1 The effect of nano-silver on the group growths of *X. canipestris* pv. *canipestris*

2.3 纳米银对甘蓝黑腐病菌呼吸作用的影响

纳米银对甘蓝黑腐病菌呼吸作用的抑制试验结果表明, 剂量为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 的纳米银可明显抑制甘蓝黑腐病菌的呼吸强度, 且其作用效果随着药剂处理时间的延长而增大 (图 2)。药剂与菌体接触 20 min, 药剂处理的甘蓝黑腐病菌呼吸量和对照的呼吸量增长幅度大致相同。之后, 对照甘蓝黑腐病菌的呼吸量仍然以较大的幅度增加, 而纳米银处理的甘蓝黑腐病菌呼吸量的增幅缓慢。从两者呼吸量的变化趋势来看, 对照随时间增加与呼吸量变化趋势线的斜率值比处理趋势线的斜率值大 1.8 倍。

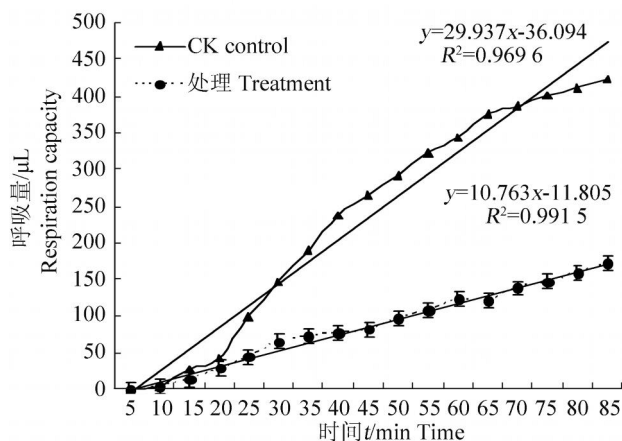


图 2 纳米银对甘蓝黑腐病菌呼吸作用的影响

Fig 2 The effect of nano-silver on the respiration of *X. canipestris* pv. *canipestris*

2.4 纳米银对甘蓝黑腐病菌细胞膜透性的影响

纳米银处理后甘蓝黑腐病菌菌体的电导率变化情况表明, 剂量为 0.001 $\mu\text{g/mL}$ (处理 1) 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (处理 2) 的纳米银均会提高甘蓝黑腐病菌细胞的电导率。其中在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下菌体细胞的电导率比对照有显著提高, 且在处理起始至 50 min 时段, 电导率大幅度增加 (净增加量为 158 μs), 而反应

50 ~ 100 min,电导率又呈缓慢下降趋势(图 3)。菌体数量一定的细菌悬浮液电导率变化可以显示菌体细胞内电解质渗透的变化情况,从而间接反应菌体细胞膜透性的变化^[11]。

2.5 纳米银对小白菜黑腐病的防治效果

纳米银处理防治小白菜黑腐病的盆栽试验结果发现,经纳米银处理后小白菜叶片的黑腐病病斑数量比对照少,且病斑面积小。随着药剂浓度的提高,纳米银对小白菜黑腐病的防治效果显著增加,30 μg/mL 纳米银溶液对小白菜黑腐病的防治效果可达 67.67% (表 1)。

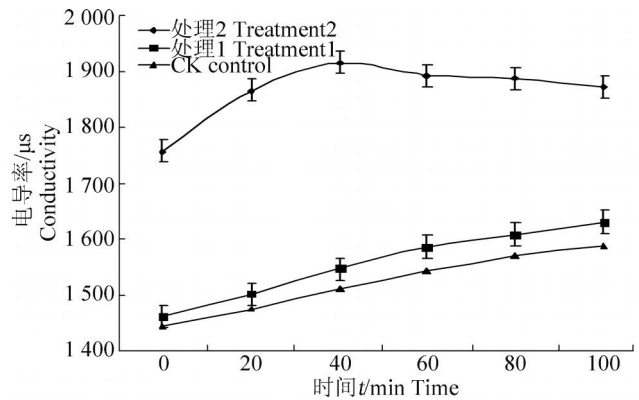


图 3 纳米银对甘蓝黑腐病菌电导率的影响

Fig 3 The effect of nano - silver on the cells conductivity of *X. campestris* pv. *campestris*

表 1 纳米银对小白菜黑腐病的保护效果

Tab 1 The prevention effect of nano - silver to cabbage black rot

	对照 Contro1	纳米银浓度 / (μg · mL ⁻¹) Nano - silver concentration		
		10	20	30
病情指数 Disease index	84.44	55.55	45.08	27.30
防治效果 / % Prevention effect	0 D	34.21 C	46.61 B	67.67 A

表中同行数据后的不同大写字母分别表示差异达极显著水平 (P=0.01)。

The data floolwed by the different letters are significantly different(P=0.01).

3 小结与讨论

目前在国内外,关于纳米银的抑菌试验主要集中在对日常卫生细菌,如大肠杆菌等方面的研究^[12]。而近几年在农业病虫害化学防治上,农用抗生素的广泛使用导致了具多重耐药性的菌株出现,此外,在食品安全上抗生素的滥用也给人类的健康带来危害。因此,使用不同药剂的轮换不仅可以防止抗药性菌株的出现,而且保证了对人类的健康。本试验中,在相同的试验条件下比较了生产上常用的细菌防治药剂——链霉素与纳米银对甘蓝黑腐病菌的毒力。结果发现,在离体的条件下纳米银对甘蓝黑腐病菌的 EC₅₀大于链霉素的 EC₅₀。而在活体上,质量浓度为 30 μg/mL 的纳米银对小白菜黑腐病也有较好的防治效果。因此,利用纳米技术制成的纳米银,防治病菌用量少,对人类安全。将纳米银进一步开发成十字花科蔬菜黑腐病的防治剂具有良好的前景。

在纳米银抗菌机理方面,纳米银颗粒能牢固地吸附在细菌表面,穿透细菌细胞壁,使细菌蛋白质凝固而丧失分裂能力最终死亡,并且能破坏细菌的电子传输、呼吸系统等功^[13]。菌体的呼吸代谢是其生命体进行生命活动的重要表现形式,它提供了细胞生命活动所需的能量和中间产物合成。本研究通过细菌呼吸强度的测定发现,供试的纳米银能显著抑制病原细菌的呼吸强度,且这种抑制效果随着作用时间的增加而增大,最终从根本上干扰细菌正常的呼吸系统,抑制细菌的生长。呼吸强度测定的试验结果与黄青春^[9]的研究结果相符。黄青春等^[8]曾报道,拌种灵对病原细菌呼吸作用影响的原理是药剂对菌体细胞琥珀酸—细胞色素 C 还原酶系的活性有明显的抑制作用,而本试验中纳米银对菌体呼吸作用的抑制机理是否也是影响菌体细胞琥珀酸—细胞色素 C 还原酶系的活性,尚待进一步查明。

细胞膜是一种选择透过性膜,细胞膜透性的异常增加是细胞受到损失的表现之一。甘蓝黑腐病菌在浓度为 0.1 μg/mL 的纳米银处理下,菌体细胞的电导率增加显著,表明细胞膜透性增大,胞内电解质外渗明显。对甘蓝黑腐病菌细胞膜透性影响的试验结果与 Soni^[14]和 Sukdeb Pal^[15]的发现相符。

盆栽试验发现,质量浓度为 $30 \mu\text{g/mL}$ 的纳米银对小白菜黑腐病有较好的防治效果。因此用纳米银防治十字花科蔬菜黑腐病的药液浓度(以有效成分含量计)可以考虑在 $30 \mu\text{g/mL}$ 以上,具体施用浓度需进一步的田间药效试验后确定。此外,纳米银的抑制效果在田间的实际药效是否可以达到农用杀菌剂的标准,也有待进一步探明。

在离体条件下,通过与对照药剂链霉素的毒力比较,说明纳米银对甘蓝黑腐病菌的抑制作用优于链霉素,而盆栽试验结果也表明纳米银能在较低的浓度下对小白菜黑腐病有较好的防治效果。药剂盆栽试验同样需要一个阳性对照进行比较以反映供试药剂的防治效果,由于时间和环境的原因,未能及时进行纳米银和对照药剂(农用链霉素)对小白菜黑腐病防治效果的研究对比,这需要进一步完善。

纳米银可提高甘蓝黑腐病菌细胞的呼吸强度、破坏细胞膜的透性、抑制病菌群体的生长,说明纳米银不仅作用于日常卫生细菌,而且对植物病原细菌也具有明显的抑制作用,本研究结果进一步拓展了纳米银的应用领域,同时对防治植物病原细菌也具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 杨永珍,宋俊华,吴厚斌,等. 欧盟农药管理措施对我国的影响及对策 [J]. 农药科学与管理, 2004, 25(4): 32 - 37.
- [2] 汤庆国,王雪峰,沈上越,等. 金属离子抗菌剂的抗菌效果及应用 [J]. 研究环境与健康杂志, 2005, 22(2): 159.
- [3] 钟金栋,夏雪山,张若愚,等. 纳米银材料抗菌效果研究及其安全性初步评价 [J]. 昆明理工大学学报:理工版, 2005, 30(5): 91 - 93.
- [4] 孙超,郭荣君,李世东. 载银无机抗菌制剂对大豆根腐病的防治效果 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(6): 550 - 554.
- [5] Yeo S Y, Lee H J, Jeong S H. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect [J]. Journal of Materials Science, 2005, 38(10): 2143 - 2147.
- [6] Kim J S. Antibacterial Activity of Ag^+ ion - containing silver nanoparticles prepared using the alcohol reduction method [J]. Journal Industry Eng Chemistry, 2007, 13(4): 718 - 722.
- [7] 游文莉,许文耀. 杀细菌剂毒力测定方法研究 [J]. 农药科学与管理, 2002, 23(2): 21 - 22.
- [8] 黄青春. 拌种灵对柑桔溃疡病菌作用机制研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2001.
- [9] 黄青春,周明国,叶钟音. 拌种灵对柑桔溃疡病菌菌体细胞活性的影响 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(3): 23 - 26.
- [10] 李经略,李惠兰,干正荣,等. 甘蓝对 TuMV 和黑腐病菌期兼抗性平行鉴定研究 [J]. 陕西农业科学, 1994(1): 19.
- [11] 李清禄,何海斌. 实验化学 [M]. 2版. 北京:中国林业出版社, 2000: 281.
- [12] 张林祺,高勃,杨聚才,等. 三种纳米载银无机抗菌剂对口腔致病菌的抗菌活性比较 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(5): 254 - 256.
- [13] 戴晋明,魏丽乔,许并社. 纳米 TiO_2 - Ag 复合材料抗菌机理及其在聚乙烯基体中分散性的研究 [J]. 合成纤维, 2003, 32(3): 22 - 24.
- [14] Soni I, Salopek B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram - negative bacteria [J]. J Colloid Interface Science, 2007, 313(1): 77 - 82.
- [15] Sukdeb P, Tak Y K, Song J M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram - negative bacterium *Escherichia coli* [J]. Applied and environment microbiology, 2007, 73(6): 1712 - 1720.