

纳米银对大豆菌核病核盘菌的抑制作用研究

孙冬梅^{1,2,3}, 林志伟³, 迟 莉¹, 蒲子刚¹, 张树权¹, 赵 敏²

(1. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院博士后工作站, 黑龙江 齐齐哈尔 161041; 2. 东北林业大学 博士后流动站, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江八一农垦大学 生命学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘 要:利用生长速率抑制法、显微观察和生物化学方法研究了纳米银离子对大豆菌核病核盘菌的抑菌效果及初步机理。结果表明:纳米银水剂对大豆菌核病核盘菌具有较好的抑制能力,在 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下可达到 100% 的抑制效果,其对大豆菌核病核盘菌的有效中浓度(EC50)为 $13.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;菌丝在纳米银有效中浓度下的生长受到很强抑制;经纳米银处理的核盘菌菌体中过氧化氢酶、总超氧化物歧化酶、超微量 ATP 酶的活力均发生相应变化,处理 2 h 或 12 h 后,呈现增加趋势,但处理 24 h 后,则均表现为下降。因而纳米银对大豆菌核病菌的生长具有一定的抑制效果。

关键词:纳米银;大豆菌核病核盘菌;抑制作用

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0673-04

Restrain Ability of Nanometer Silver on Soybean *Sclerotinia sclerotium*

SUN Dong-mei^{1,2,3}, LIN Zhi-wei³, CHI Li¹, PU Zi-gang¹, ZHANG Shu-quan¹, ZHAO Min²

(1. Qiqihaer Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer161041; 2. Northeast Forestry University, Post-doctoral research station, Harbin 150040; 3. Department of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Reclamation University, Daqing 163319)

Abstract:The methods of growth speed inhibition, microexamination and biochemistry were used to study the restrain ability of Nanometer Silver on *Sclerotinia sclerotium* mycelium growth and its primary mechanism. The results indicated that Nanometer Silver significantly inhibited *Sclerotinia sclerotium* mycelium growth, the completely inhibited concentration was $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and the EC50 was $13.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. It was discovered that the *S. sclerotium* mycelium growth was restrained effectively under the EC50 of Nanometer Silver. The enzyme activities of CAT, SOD and ATP in mycelium treated by Nanometer Silver were also changed, when the mycelium were treated for 2 or 12 h, the enzyme activities were all increased, However, when the mycelium were treated for 24 h, the enzyme activities were all decreased. The results suggest that Nanometer Silver has the restrain ability on the *S. sclerotium* mycelium growth.

Key words:Nanometer Silver; *Sclerotinia sclerotium*; Restrain ability

大豆菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)是由子囊菌亚门真菌引起的一种大豆病害。该病分布较广,每年引起 2%~5% 的产量损失,自 1993 年以来,该病有加重的趋势^[1-2]。我国华北、华东、西南和东北地区均有发生,尤以黑龙江及内蒙古地区发生较重。且在黑龙江省大豆菌核病的发生与危害有逐年加重的趋势^[3-6]。

20 世纪 80 年代以来,纳米技术的发现与应用,使得具有较好抑菌能力的银离子应用更加广泛^[7-9]。如当金属或非金属被制备成的粉末达到纳米尺度时,其物理性质就发生根本的变化,纳米银克服了传统银的疗效缓慢和重金属弱点,表现出了极强的杀菌效力、且不产生耐药性、安全无污染^[10-11]。受纳米银在医学领域应用事例的启发,有

关学者开展了纳米银悬浮液防治农业有害生物的室内毒力测定及田间试验示范工作,发现纳米银悬浮液对多种植物病害具极高的防治效果。同时纳米银还具有用量少、使用安全、剂型优良、环保等突出优点^[12]。为将纳米化的银离子运用到菌核病的防治中,并明确该水剂对大豆菌核病菌的防治效果,现以福州凯立生物制品有限公司研制的纳米银为试验材料,研究了该水剂对核盘菌菌丝体生长的抑制效果及初步抑菌机理,为纳米银的进一步应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试验菌株 大豆菌核病核盘菌(*Sclerotinia*

收稿日期:2010-03-23

基金项目:黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z07021);黑龙江省教育厅资助项目(1152G023);黑龙江八一农垦大学博士启动基金资助项目。

第一作者简介:孙冬梅(1970-),女,博士,副教授,现从事应用微生物学研究。E-mail:sdmlzw@163.com。

通讯作者:张树权,研究员。E-mail:zsqlij@126.com。

sclerotiorum)由黑龙江八一农垦大学微生物实验室提供。

1.1.2 试验材料及培养基 真菌培养均采用马铃薯固体培养基(简称PDA),纳米银水剂由福州凯立生物制品有限公司提供;蛋白含量、ATP酶、过氧化氢酶和超氧化物歧化酶测定的试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 纳米银对核盘菌菌丝生长的抑制能力及有效中浓度测定 将生长能力一致的4 mm大豆菌核病核盘菌菌碟接种在含有不同浓度纳米银(0、5、10、15、20、30、50 mg·L⁻¹)的PDA平板上,3次重复,27℃恒温培养2 d,观察菌体生长状态,并记录菌落直径,计算抑菌率与有效中浓度。

抑菌率(%)=(对照菌的菌落直径-处理菌的菌落直径)/对照菌的菌落直径×100%。

利用最小二乘法对所得数据进行相关分析,以纳米银浓度为横坐标,以抑菌率为纵坐标,获得回归方程,根据方程求得纳米银对核盘菌菌丝生长的有效中浓度。

1.2.2 纳米银处理对核盘菌菌体蛋白含量及酶活性的影响 在PDA平板中接种核盘菌,培养4 d后,用打孔器取生长能力一致的4 mm菌碟,转接到PDA液体中,静止培养5 d后,取出长好的核盘菌菌丝体,用蒸馏水冲洗几次后吸干。准确称取重量为0.25 g的待测菌片,分别放入30 mg·L⁻¹的纳米银与清水中浸泡2、12、24 h,取出清水冲洗并吸干表面水分,加0.86%的生理盐水3 mL在冰浴下研磨,3 000 r·min⁻¹离心15 min,取上清液,置于4℃冰箱保存,待用。按试剂盒说明,测定菌体内蛋白、超微量ATP酶、过氧化酶及超氧化物歧化酶的含量。根据测得的OD值,计算处理后病原菌菌丝的各酶活变化百分率。

酶活变化百分率(%)=(对照菌的酶活-处理菌的酶活)/对照菌的酶活×100%。

2 结果与分析

2.1 纳米银对核盘菌菌丝生长的抑制能力

由图1可知纳米银对核盘菌菌丝生长有较强的抑制作用,抑制效果随浓度增大而增强。当水剂浓度达到30 mg·L⁻¹时抑制率达到100%。

通过对抑制率的相关分析,利用DPS软件处理后得到纳米银抑制核盘菌的相关方程为: $y = 0.0315x + 0.0617$ ($r = 0.9882 > r_{5,0.01} = 0.874$),方程中 Y 为菌体生长抑制率, x 为纳米银浓度。

据此方程计算当 $Y = 0.5$ (50%)时, x 值为13.91 mg·L⁻¹,故纳米银对该菌的有效中浓度为13.91 mg·L⁻¹。

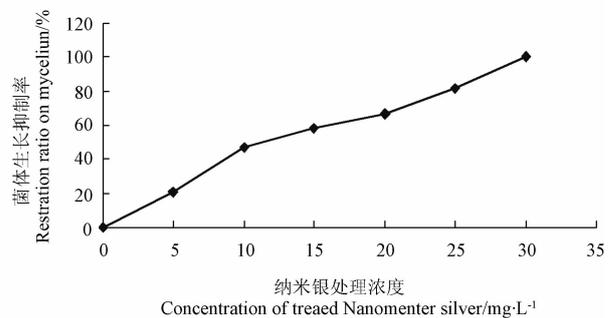


图1 不同浓度纳米银处理对核盘菌生长的抑制率

Fig.1 Restrain ratio on *Sclerotinia sclerotium* mycelium growth by different Nanometer Silver concentration

2.2 纳米银有效中浓度下核盘菌菌丝的状态

在有效中浓度下生长的核盘菌菌丝体呈现异常状态,菌丝体上出现不同程度的膨大、缢缩,而正常PDA平板上生长的核盘菌菌丝体细胞壁比较光滑,菌丝粗细较均匀(图2)。

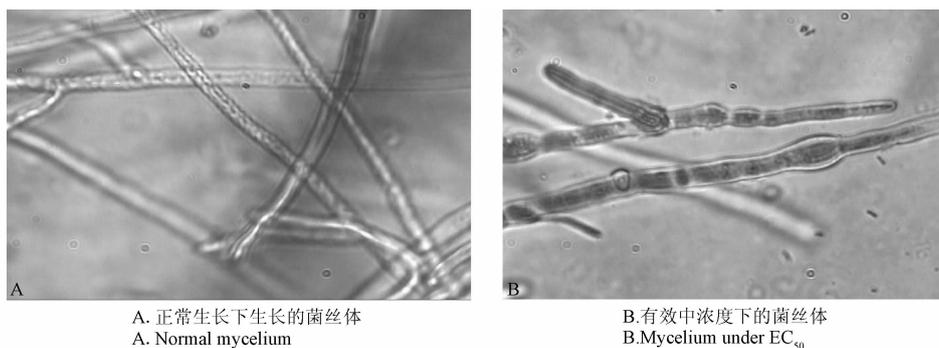


图2 核盘菌菌丝体生长状态比较

Fig.2 Comparison of *Sclerotinia sclerotium* mycelium

2.3 纳米银对核盘菌体蛋白含量的影响

由图3可以看出,纳米银处理后核盘菌菌体蛋白含量变化范围较小,均不超过3%,处理2、12 h

后,菌体中蛋白含量分别比对照升高了2.9%和1.2%,而处理24 h则比对照降低了1.7%。变化的幅度经方差分析,均未达到显著水平。

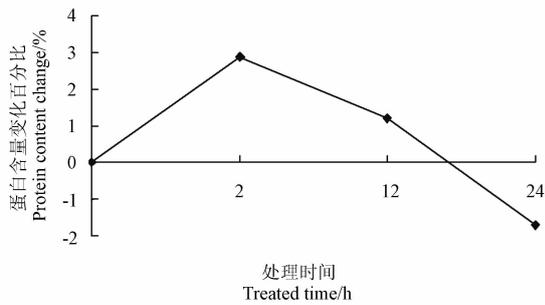


图3 纳米银对核盘菌体蛋白的影响

Fig. 3 Effect of Nanometer Silver on mycelium protein content of *Sclerotinia sclerotrum*

2.4 纳米银对核盘菌菌体酶活性的影响

2.4.1 过氧化氢酶 由图表可知纳米银处理后核盘菌菌体过氧化氢酶活性变化较大,处理 2、12 h 分别比对照升高了 27.3%、5.6%,处理 24 h 比对照降低了 19.5%。

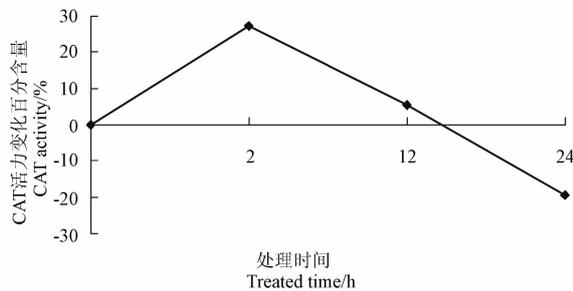


图4 纳米银对核盘菌过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4 Effect of Nanometer Silver on mycelium CAT activity of *Sclerotinia sclerotrum*

2.4.2 超氧化物歧化酶 由图5可以看出,纳米银处理后核盘菌菌体总超氧化物歧化酶活性变化较大,处理 2 h 比对照升高 23.2%,处理 12、24 h 分别比对照降低了 13.9%、20.1%。

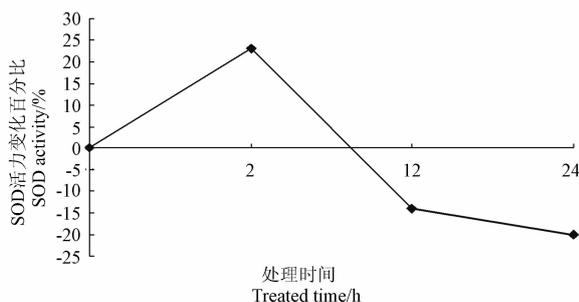


图5 纳米银对核盘菌总超氧化物歧化酶活性的影响

Fig. 5 Effect of Nanometer Silver on mycelium SOD activity of *Sclerotinia sclerotrum*

2.4.3 ATP 酶 纳米银处理后核盘菌菌体超微量 ATP 酶活性变化较大,处理 2 h 比对照升高 31.9%,处理 12、24 h 分别比对照降低了 12.2%、22.8% (图6)。

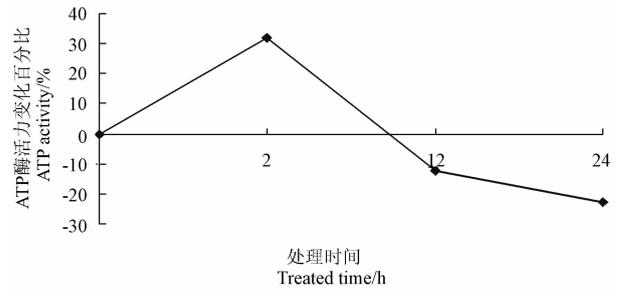


图6 纳米银对核盘菌超微量 ATP 酶的影响

Fig. 6 Effect of Nanometer Silver on mycelium ATP activity of *Sclerotinia sclerotrum*

结果表明,上述几种酶类均与抗氧化能力有一定的相关性,短时间的刺激,菌体通过产生过强的酶活来进行保护,但处理时间延长,菌体的生长受到强烈抑制,各种酶相应的逐步失活,最终导致机体死亡。

3 结论与讨论

纳米银对核盘菌的抑制能力较强,纳米银对该菌的有效中浓度为 $13.91 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对菌体抑制率可达到 100%;当核盘菌在纳米银的致死中浓度培养条件下生长时菌丝体出现异常;核盘菌菌体经纳米银处理不同时间后,菌体的蛋白含量变化较小,过氧化氢酶、总超氧化物歧化酶及超微量 ATP 酶活性变化较大,趋势较为一致,处理 2 h 菌体的各酶活性有升高现象,处理时间延长,菌体的酶活下降较大。

纳米银是一种长效性抗菌剂,安全性高,具有良好的应用前景。纳米银抗菌剂的作用主要包括 3 个环节^[12-13]:与致病菌代谢酶中的巯基结合,使酶失活;与暴露的细菌细胞壁发生肽聚糖反应,形成可逆复合物,使细菌不能将氧和能量转运至细胞;与致病微生物中的 DNA 结合,导致结构变性,抑制复制,目前关于此方面的报道主要集中在纳米银在临床对细菌的抑制作用上,而有关纳米银农用对真菌的作用报道的比较少。该文探讨了纳米银对菌丝体的作用及对菌体相关酶的影响,证实了纳米银对核盘菌的作用比较明显,可以开发纳米银的农用价值。通过测定相关酶的活性,发现纳米银处理的菌丝酶活性出现变化,这可能与纳米银的抑菌有一定的相关性,具体机制还有待进一步的研究与探讨。一般认为使用银是安全的^[14],但它与生物体接触是否会产生一些负面的效应,对正常细胞是否也具有杀伤作用等涉及到纳米银作为抗菌材料本身的生物安全性问题。

参考文献

- [1] Kelly A. Cultivar and herbicide selection affects soybean development and the incidence of Sclerotinia stem rot [J]. *Agronomy Journal*, 2002, 94(6): 127-128.
- [2] 许艳丽, 李兆林. 阿根廷大豆病害防治现状[J]. *世界农业*, 2000(4): 32-34. (Xu Y L, Li ZL. Soybean disease control situation in Argentina[J]. *World Agriculture*, 2000(4): 32-34.)
- [3] 李勇. 大豆菌核病药剂防治研究[J]. *大豆科学*, 1990, 9(4): 347-352. (Li Y. Study on the control of Sclerotinia rot in soybean [J]. *Soybean Science*, 1990, 9(4): 347-352.)
- [4] 赵丹, 许艳丽, 李春杰. 大豆菌核病的识别与综合防治[J]. *大豆通报*, 2006(3): 15-16. (Zhao D, Xu Y L, Li C J. Identification and integrated managements for soybean *Sclerotinia Sclerotiorum* [J]. *Soybean Bulletin*, 2006(3): 15-16.)
- [5] 李汉卿, 傅纯彦. 大豆菌核病寄主范围的研究[J]. *植物病理学报*, 1981, 11(3): 19-24. (Li H Q, Fu C Y. Study on the Sclerotinial rot of soybean [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1981, 11(3): 19-24.)
- [6] 马建华, 李明波, 丘继业, 等. 大豆菌核病的防治[J]. *大豆通报*, 2002(3): 12. (Ma J H, Li M B, Qiu J Y, et al. Prevention and control of soybean *Sclerotium disease* [J]. *Soybean Bulletin*, 2002(3): 12.)
- [7] Cui Z L, Dong L F, Hao C C. Microstructure and magnetic property of nano-Fe particles prepared by hydrogen arc plasma [J]. *Materials Science and Engineering A*, 2000, 286: 205-207.
- [8] 彭子飞, 汪国忠, 张立德. 用银氨配离子还原法制备纳米银 [J]. *材料研究学报*, 1997, 1(1): 104-106. (Peng Z F, Wang G Z, Zhang L D. Nanometer-scale silver powders prepared by diamminesilver ion reduction method [J]. *Chinese Journal of Materials Research*, 1997, 1(1): 104-106.)
- [9] Zhu X, Briinger R, Herr U, et al. X-ray diffraction studies of the structure of nanometer-sized crystalline marerials [J]. *Physical Review B*, 1987, 35(17): 9085-9090.
- [10] 徐燕鸣, 郁慧, 何其庄, 等. 具有核壳结构的纳米二氧化钛负载银离子掺杂稀土离子抗菌剂的合成、表征及抑菌活性研究 [J]. *稀土*, 2009, 30(2): 65-70. (Xu Y M, Yu H, He Q Z, et al. Synthesis, characterization and antibacterial properties of core-shell structure Ag⁺-loaded Nano-titania doped with rare earth ion antibacterial agent [J]. *Chinese Rare Earths*, 2009, 30(2): 65-70.)
- [11] 陈美婉, 彭新生, 吴琳娜, 等. 纳米银抗菌剂的研究和应用 [J]. *中国消毒学杂志*, 2009, 26(4): 424-426. (Chen M W, Peng X S, Wu L N, et al. Reasearch and applying on Nanosilver antibacterial agent [J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2009, 26(4): 424-426.)
- [12] 刘伟, 张子德, 王琦, 等. 纳米银对常见食品污染菌的抑制作用研究 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(5): 135-137. (Liu W, Zhang Z D, Wang Q, et al. The inhibitory effects of Nanosale silver on familar food pollutant bacteria [J]. *Food Research and Development*, 2006, 27(5): 135-137.)
- [13] 罗勇华, 赵丽, 孙竹华. “纳米银/羧甲基壳聚糖”生物敷料的研制、表征及抑菌试验研究 [J]. *交通医学*, 2009, 23(2): 141-144. (Lu Y H, Zhao L, Sun Z H. Preparation and characterization of “Nano-silver /Carboxymethyl Chitosan” biodressing and its antibacterial test [J]. *Medical Journal of Communications*, 2009, 23(2): 141-144.)
- [14] Mi F L, Wu Y B, Shyu S S, et al. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2002, 59(3): 438-449.

2011 年《黑龙江农业科学》征订启事

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊。是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊。现已被中国科学引文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、CNKI 系列数据库、万方数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和华艺电子出版事业群等多家权威数据库收录。

《黑龙江农业科学》现为月刊,每月 10 日出版,国内外公开发行。国内邮发代号 14-61,每期定价 5.00 元,全年 60.00 元;国外发行代号 BM8321,每期定价 8.00 美元,全年 96.00 美元。

热忱欢迎广大农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广人员、管理干部和广大农民群众踊跃订阅。全国各地邮局均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。汇款写明订购份数、收件人姓名、详细邮寄地址及邮编。

另外,编辑部现有少量 2007~2008 年合订本珍藏版。2007 年每册 80.00 元,2008 年每册 90.00 元,邮费各 10.00 元,售完为止。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《黑龙江农业科学》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86668373 电子信箱:nykx13579@sina.com