

壳聚糖对公园污水渠杀菌效果研究

成庆利, 刘秉涛, 闫金霞 (华北水利水电学院环境与市政工程学院, 河南郑州450011)

摘要 以郑州市国家森林公园内污水渠为对象, 研究了酸溶剂 pH 值、壳聚糖分子量和浓度对壳聚糖杀菌效果的影响。结果表明: 乙酸为较好的酸溶剂; 最适 pH 值为 5~6; 壳聚糖分子量为 4.4 kd 时, 杀菌效果最好, 其余分子量的壳聚糖杀菌曲线均出现峰值, 10 h 后培养液中细菌数均极少; 壳聚糖杀菌率随浓度的增大而增大。壳聚糖可以应用于部分地表水的除菌。

关键词 壳聚糖; 杀菌作用; 地表水

中图分类号 Q53 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6266-02

Studies on the Anti-bacterial Activity of Chitosan Against Surface Water

CHENG Qing-li et al (Institute of Environment and Municipal Engineering, North China Institute of Water Conservancy and Hydroelectric Power, Zhengzhou, Henan 450011)

Abstract Effect of anti-bacterial activity of CIS against surface water were studied and the acid solvent, molecular weight, pH value and concentration were also investigated. The result showed that acetic acid was the better acid solvent; the fittest pH value was between 5~6. The inhibiting rate was the highest when molecular weight was 4.4 kd and the antibacterial kinetic curves of CIS with other molecular weights had summit value. The number of bacteria was few after 10 hours. The antibacterial rate of CIS was enhanced with the rising of concentration. CIS can be used to inhibit bacterial in some surface water.

Key words Chitosan; Antibacterial activity; Surface water

壳聚糖是由甲壳素在强碱条件下脱乙酰基后形成的一种重要的衍生物, 呈白色或灰白色、无定形、半透明、略有珍珠光泽, 在自然界中产量仅次于纤维素。壳聚糖的化学结构与纤维素相似, 由多个 N 乙酰氨基葡萄糖通过 -(1-4) 糖苷键连接起来, 但它的性质更为活泼。早在 1979 年, Allen 等就提出壳聚糖具有广谱抗菌性, 尤其是对许多细菌和真菌有抑杀作用, 并且对其安全性进行过测定, 证实壳聚糖是无毒的^[1]。因此, 在食品领域被广泛应用, 如 Park SI 等^[2] 将壳聚糖用于草莓的保鲜, V Cona^[3] 和 Ausar SF^[4] 用壳聚糖作为乳制品的包装材料等。笔者针对地表水污染严重的现状, 将壳聚糖直接用于地表水絮凝杀菌, 通过改变外界环境的 pH 值、壳聚糖的添加量及其分子量等测定其杀菌效果, 从而评价壳聚糖作为地表水杀菌剂的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 水样。取自郑州市森林公园污水渠, 渠水颜色较黑, 有轻微恶臭。

1.1.2 试剂和培养基。壳聚糖(chitosan, CIS) 购自青岛海生生物有限公司, 脱乙酰度为 78%, 用 H₂O₂ 降解法制得分子量分别为 740.0、100.0、74.0、13.0、4.4 kd 的 CIS。细菌培养基为牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 方 法

1.2.1 10.0 g/L CIS 溶液的制备。称取不同分子量的 CIS 1.0 g, 溶于 100 ml 体积分数为 1% 的酸溶液中, 试验中采用的酸溶剂分别为 HAc、HCl、H₃PO₄。

1.2.2 菌液的制备。为减少其他微生物如藻类等对 CIS 除菌试验的干扰, 将水样放于恒温振荡器中, 在 30℃、200 r/min 的条件下, 富集培养。

1.2.3 CIS(740.0 kd) 不同酸溶液的杀菌试验。将用磷酸、乙酸、盐酸 3 种酸配制的 10 g/L CIS 分别编号为 1[#]、2[#]、3[#], 水

样中终浓度为 2 g/L, 每个水样均有平行样及空白 1(0.5 ml 菌液+10 ml 液体培养基) 和空白 2(在空白 1 的基础上添加 1 ml 1% 相应的酸)(下同)。将水样和空白放入恒温振荡器中振荡培养, 每隔 1.5 h 取适量培养液均匀涂布到盛有牛肉膏蛋白胨固体培养基的培养皿中, 30℃ 恒温培养 24 h, 用活菌计数法进行计数。

1.2.4 pH 值对 CIS(740.0 kd) 抑菌作用的影响。用 HCl 或 NaOH 调节培养基的 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8, CIS 浓度为 1 g/L, 空白和水样加样量及培养方法参照“1.2.3”, 24 h 后观察平板菌落的生长情况, 以无菌落或少菌落生长的平板中的 pH 值为最佳抑菌环境。

1.2.5 分子量对 CIS 杀菌效果的影响。为了详细研究不同分子量 CIS 的杀菌效果及杀菌趋势, 用液体培养绘制其杀菌动力学曲线, 水样中 CIS 浓度为 0.8 g/L, 将分子量为 4.4、13.0、74.0、100.0、740.0 kd 的 CIS 分别编号为 1[#]、2[#]、3[#]、4[#]、5[#], 培养及计数方法参照“1.2.3”, 时间延长到 15 h。

1.2.6 CIS(740.0 kd) 最低抑菌浓度的测定。

1.2.6.1 固体培养杀菌试验。用分子质量为 740 kd、1% HAc 溶解的浓度为 10.0 g/L CIS, 与菌液添加到固体培养基中, 测其不同浓度(1、2、3 g/L) 的抑菌效果。

1.2.6.2 杀菌动力学曲线。在固体培养杀菌试验的基础上, 设 CIS 的浓度梯度为 1.5、2.0、2.5 g/L, 编号为 1[#]、2[#]、3[#], 每隔 1 h 把水样均匀涂布到培养皿中, 共 12 h。

2 结果与分析

2.1 CIS 不同酸溶剂抑菌效果的测定 将平皿取出, 进行活菌计数(图 1)。由空白 1 的生长曲线可以看出, 细菌在接种 2 h 后进入对数生长期, 细胞快速分裂, 细胞数增长呈直线上升, 4~6 h 为稳定生长期, 细胞数目较稳定, 繁殖率和死亡率相近, 之后进入衰亡期。3 种酸所配制的空白 2 均有杀菌效果, 其培养液中细菌生长曲线与空白 1 相似。水样 1[#]、2[#]、3[#] 与空白相比, 培养液中细菌浓度更小, 杀菌效果更明显, 而且水样 1[#]、2[#]、3[#] 细菌生长曲线相似, 培养 1~5 h 时的生长曲线几乎重合, 水样中的细菌数远低于空白, 杀菌率较

大,说明在对数生长期细菌对 CIS 十分敏感。Tsa 等^[5]用大肠埃希杆菌作为供试菌,研究了细菌菌龄对 CIS 抗菌活性的影响,也同样得出了细菌在对数生长后期对 CIS 最敏感的结论。另外,水样1#的细菌数一直最低,其次为3#和2#,综合考虑避免加剧地表水体的富营养化问题、CIS 溶解度的不同(乙酸中溶解度约为1.12 g/L,磷酸中约为0.96 g/L),以及经济实用等原因,最终选用乙酸作为 CIS 的酸溶剂。

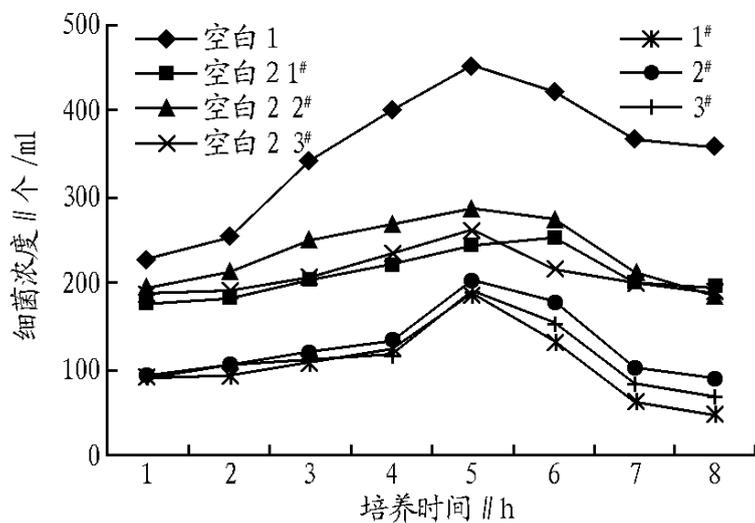


图1 CIS 不同酸溶液抑菌效果比较

2.2 pH 值对 CIS 抑菌作用的影响 CIS 是一种聚电解质,其抗菌活性对环境 pH 值有很大的依赖性。不同 pH 值环境下 CIS 对污水中细菌的抑制结果见图2。由图2可见,CIS 在 pH 值为5~6 时,对菌悬液中细菌抑菌效果最明显。关于环境 pH 值对 CIS 抗菌活性的影响,国内外报道很多^[5,6],结论也非常相似,均认为 CIS 在 pH 值5~7 时杀菌效果明显,但是对于不同细菌 pH 值略有差别。

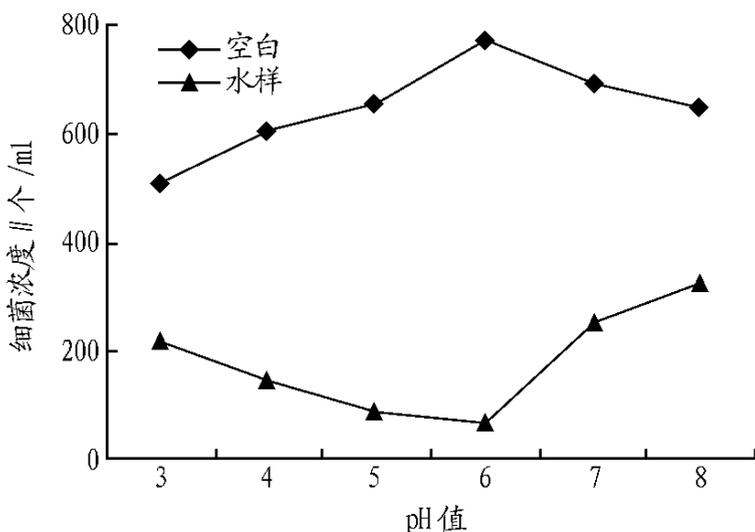


图2 不同pH 值环境下 CIS 抑菌性能比较

2.3 不同分子量 CIS 抑菌作用试验 由图3可见,1# CIS 杀菌曲线趋势与2#、3#、4#、5#明显不同,其杀菌曲线在1~4 h 内一直呈下降趋势,5 h 后已经检测不出活细菌;2#、3#、4#、5# CIS 杀菌曲线均出现峰值,但时间不同,3# 峰值在培养3 h,2# 和4# 在4 h,5# 最晚,在5 h 时出现,与前面试验结果相同,峰值出现后,曲线均呈快速下降趋势,10 h 后,培养液中细菌数均极少。出现这种情况的原因可能为不同分子量 CIS 的杀菌机理不同,高分子量的 CIS 溶于酸后,成为一种阳离子型生物絮凝剂,在絮凝过程中使菌体细胞聚沉,高分子链密集于细菌菌体表面,形成一层高分子膜,影响细菌对营养物质的吸收,阻止代谢废物的排泄,导致菌体的新陈代谢紊乱,从而起到杀菌和抑菌的作用^[7-9],但细菌对不利环境有一定的抗性,所以杀菌时间较长;而低分子量的 CIS 则可以通过渗透作用穿过多孔细胞壁,尤其是革兰氏阴性

菌,细胞壁较薄,交联松散,低分子量 CIS 进入细菌内部^[8],破坏细胞质中内含物的胶体状态,使其絮凝、变性,细菌无法进行正常的生理活动,或者直接干扰其带负电荷的遗传物质 DNA 和 RNA^[10],抑制细菌的繁殖,导致微生物的死亡,杀菌作用方式直接,所用时间较短。

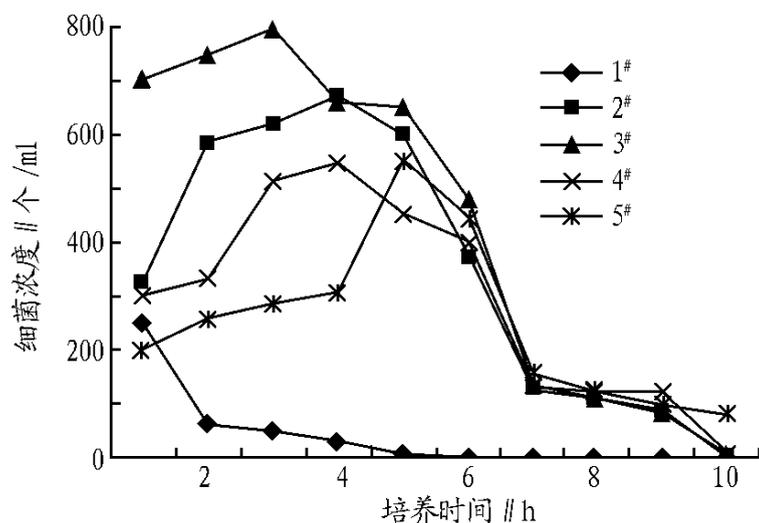


图3 不同分子量 CIS 抑菌性能比较

2.4 CIS 最低抑菌浓度的测定

2.4.1 固体培养杀菌试验。 平皿活菌计数后,细菌数及杀菌率见表1。由表1可见,3 个浓度的 CIS 杀菌率均在90% 以上,且随着添加量的增加,CIS 抑菌效果有明显的增强,考虑到经济和实用等原因,在以下试验时 CIS 浓度以2 g/L 作参考。

表1 不同浓度 CIS 固体培养抑菌性能比较

CIS 浓度 g/L	空白中细菌浓度 个/ml	水样中细菌浓度 个/ml	杀菌率 %
1	852	81	90.5
2	927	53	94.3
3	1 002	23	97.7

2.4.2 杀菌动力学曲线。 依照“1.2.6.2”操作后,培养计数,结果见图4。由图4可见,水样1#、2#、3# 培养液中细菌浓度的变化趋势较相似,在1~5 h 时间段浓度逐渐增大,之后逐渐减少,但增减幅度不同,水样3# 中细菌浓度减小幅度最大,杀菌率变化最明显,其次为水样2# 和水样1#;在相同的培养时间段内,水样1#、2#、3# 培养液中细菌浓度依次减少,杀菌率则相反,2.5 g/L 的 CIS 杀菌率最高,即 CIS 浓度越大,杀菌效果越好。

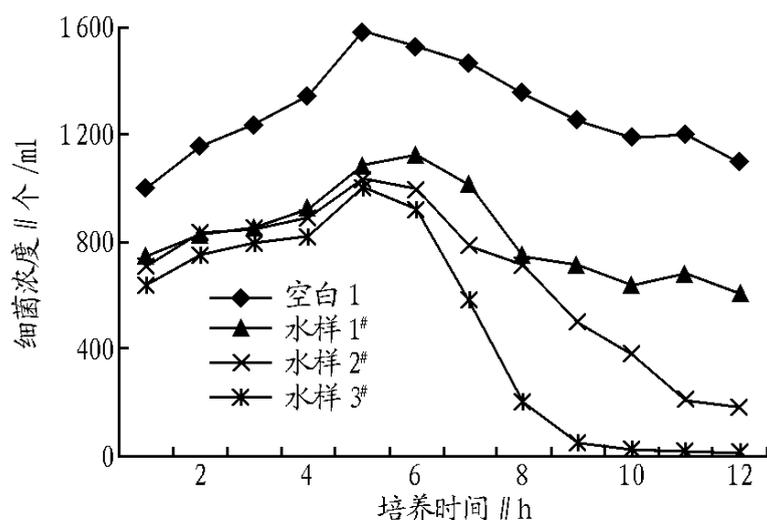


图4 不同浓度 CIS 液体培养杀菌动力学曲线

3 结论

- (1) 以磷酸作为酸溶剂时,CIS 杀菌效果最好,其次是盐

(下转第6270 页)

(上接第6267页)

酸和乙酸,但综合考虑地表水的富营养化问题和CTS溶解度的不同,以及经济实用等原因,最终选用乙酸作为CTS的酸溶剂。

(2) CTS是一种聚电解质,其抗菌活性对环境pH值有很大的依赖性,在pH值为5~6时对菌悬液中细菌抑菌效果最明显,这与国内外报道的结论相似。

(3) CTS分子量为4.4 kd时,杀菌曲线趋势与其他分子量明显不同,其杀菌曲线在1~4 h内一直呈下降趋势,5 h后已经检测不出活细菌;其余分子量的CTS杀菌曲线均出现峰值,之后曲线均呈快速下降趋势,10 h后培养液中细菌数均极少,原因可能为不同分子量CTS的杀菌机理不同。

(4) 以分子量为740.0 kd CTS为例,在固体和液体培养杀菌试验中,杀菌率随浓度的增大而增大,浓度3 g/L杀菌率最高,1 g/L杀菌率最低,但考虑到经济以及实用等原因,以浓度为2 g/L为最佳杀菌剂量。

参考文献

[1] 尹莲.含金属离子的壳聚糖涂膜剂常温保鲜葡萄的研究[J].食品科

学,1998(9):51-53.

- [2] PARKSI, STAN S D, DAESCHEL M A, et al. Antifungal coating on fresh strawberries (*Fragaria xananassa*) to control mold growth during cold storage[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(4): 202-207.
- [3] COMA V, DESCHAMPS A, MARIAGROS A. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants[J]. *Journal of Food Science*, 2003, 68(9): 2788-2792.
- [4] AUSAR S F, PASSALACQUAN, CASTAGNA L F, et al. Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making[J]. *International Dairy Journal*, 2002, 12(11): 899-906.
- [5] TSAI G J, WU Z Y, SU W H. Antibacterial activity of a chitodigosaccharide mixture prepared by cellulose digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation[J]. *J Food Prot*, 2000, 63(6): 747-752.
- [6] 张燕婉,王光华.壳聚糖对五种食物中毒菌生长的影响[J].微生物学通报,1991,18(6):344-347.
- [7] 杨冬芝,刘晓飞,李治.壳聚糖抗菌活性的影响因素[J].应用化学,2000,17(6):598-602.
- [8] 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.
- [9] HELANDER I M, NURMIAHO LASSILA E L, AHVENAINEN R, et al. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria[J]. *International Journal of Microbiology*, 2001, 71: 235-244.
- [10] ISSAMS T, ADELE M G, ADELE C P, et al. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(2): 100-104.