

# 二氧化氯溶液對軟腐細菌 *Pectobacterium chrysanthemi* 之殺菌效率及 防治文心蘭花梗軟腐病之效果

趙永椿<sup>1,2,3</sup> 徐世典<sup>2</sup> 曾國欽<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 屏東縣內埔鄉 國立屏東科技大學植物醫學系

<sup>2</sup> 台中市 國立中興大學植物病理系

<sup>3</sup> 聯絡作者，電子郵件：chaoyc@mail.npust.edu.tw；傳真：+886-8-7740-293

接受日期：中華民國 99 年 7 月 6 日

## 摘要

趙永椿、徐世典、曾國欽 2010. 二氧化氯溶液對軟腐細菌 *Pectobacterium chrysanthemi* 之殺菌效率及防治文心蘭花梗軟腐病之效果. 植病會刊 19: 127-136.

本研究在探討不同濃度之二氧化氯 (chlorine dioxide, ClO<sub>2</sub>) 溶液對文心蘭花梗軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi*) 之殺菌效率及其應用於切花處理對花梗軟腐病之發生及切花壽命之影響。以 ClO<sub>2</sub> 溶液 5 ppm 處理軟腐病菌 5 分鐘，可完全抑制所有供試菌株之生長。文心蘭花梗以 ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理之濃度在 50 ppm 或以上時，會造成花梗基部產生褐化之藥害現象，但在較低濃度 (1、5 及 10 ppm) 時，則無明顯藥害。文心蘭切花浸漬於不同濃度 (10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) 之軟腐病菌懸浮液後，花梗軟腐病之發生程度隨病菌濃度增加而增加，而在此病菌懸浮液中加入最終濃度為 5 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 後，軟腐病之發生程度均顯著降低。若 ClO<sub>2</sub> 之濃度達 10 ppm，則完全防止軟腐病之發生。文心蘭切花花梗以 5 或 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理 7 天後，與只接種軟腐病菌者比較，可顯著減少花朵枯萎或落花數，但與單獨浸漬無菌水相比，則無顯著性差異。此結果表示浸漬處理 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液，可防治切花花梗軟腐病，且不會影響切花之壽命。以 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液每週一次連續噴灑處理文心蘭植株 15 週後，不會影響其葉片之生長，且連續噴灑處理 40 週後，亦不會影響其抽梗數。

關鍵詞：二氧化氯、軟腐病菌、軟腐病、防治、文心蘭

## 緒言

文心蘭 (*Oncidium*) 英名為 Dancing lady，是原產於熱帶、亞熱帶中南美洲地區之熱帶性花卉，原生種有七百多種。台灣主要栽培品種為「南西」(Onc. Grower Ramsey)，其栽培範圍遍布台灣各地，主要產區則集中在中南部，尤其是屏東縣。目前台灣地區文心蘭以切花生產為主要銷售產品，是台灣第三大之外銷切花，主要銷往日本，出口量每年持續增加<sup>(21)</sup>。根據農委會之農業統計資料顯示，台灣在 2008 年栽種面積為

216.12 公頃，年產量為 4,615,235 打 ([http://agr.afa.gov.tw/afa/afa\\_frame.jsp](http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp))。

*Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) 屬於革蘭氏陰性，兼性嫌氣菌，短桿狀，具周生鞭毛，在 523 培養基<sup>(10)</sup> 上之菌落型態為白色透明狀，會分泌果膠分解酵素，分解植物細胞壁中膠層的果膠質，可在廣泛溫度範圍內生長，生長適溫為 26-34°C，可引起一般蔬菜、花卉、特用及糧食作物之軟腐病<sup>(19)</sup>。Pch 引起之文心蘭細菌性軟腐病 (bacterial soft rot)，為文心蘭栽培及生長過程中最重要之病害之一，多發生於高溫多雨季節，

通風不良，又施用過多的氮肥時，在台灣幾乎全年皆會發生。其病徵最初在葉片或心葉產生水浸狀病斑，後迅速擴散，用手輕壓即破裂，後期發生惡臭，病葉轉黃而落葉，全株軟化腐爛而死<sup>(17)</sup>。其亦可危害偽莖、花梗<sup>(2, 3)</sup>，外銷時造成切花花梗切口處發生水浸狀黃化，並有脫皮及惡臭之腐爛症狀，嚴重影響文心蘭切花之外銷與等級，造成花農極大的損失。這種情況多在夏秋高溫盛產時，以高屏地區最多，發生率可達 40% 以上。目前並無防治策略，為保持切花壽命，外銷上僅將切花於包裝場進行分級、重切花梗、預措及 1-甲基環丙烯(乙炔抑制劑)薰蒸後，置入含保鮮液之保鮮管內作為外銷切花之前處理<sup>(9)</sup>，因此研發適合的防治方法對文心蘭產業之發展為一重要課題。

二氧化氯(Chlorine dioxide; 以下簡稱 ClO<sub>2</sub>) 為赤黃色氣體，由一個氯原子和二個氧原子組成，內在鏈且結合許多電子，而在外層的鏈域中存在一個未成對的活性自由電子，氧化能力為氯液之 2.5 倍，易溶解於水而生成水溶液，5% ClO<sub>2</sub> 水溶液具有高度穩定性<sup>(20)</sup>。低濃度 ClO<sub>2</sub> 水溶液，在短時間內，能有效地殺滅廢水原液中之微生物<sup>(7, 8, 13)</sup>。ClO<sub>2</sub> 在處理過程中絕對安全，國內衛生署食品相關法規於 1993 年歸類為第二類殺菌劑，可作為食品添加劑 (<http://food.doh.gov.tw/foodnew/MenuThird.aspx?LanguageType=1&SecondMenuID=5&ThirdMenuID=167>)。ClO<sub>2</sub> 本身會緩慢地分解為氯(chlorine)和氧(oxygen)。根據劉與賴<sup>(13)</sup>的研究顯示 ClO<sub>2</sub> 溶液濃度平均每日衰減 11.6%，其殘留時間短，且對環境之污染較低。目前 ClO<sub>2</sub> 廣範應用於環境衛生、飲用水、游泳池、食品加工、廢水處理、醫療衛生等之消毒、殺菌、除臭處理及紡織品、紙漿、纖維之漂白處理<sup>(20)</sup>。Agius 等學者<sup>(1)</sup>，更指出以 5-7.5 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液處理混合槽或貯存槽，可作為 cleaning-in-place (CIP) 作業系統中的熱水(85°F/185°F)消毒處理之替代方法。

ClO<sub>2</sub> 運用於防除蔬果、農畜產品及海鮮食品上有害人體微生物之污染，已有良好效果<sup>(5, 6, 11, 14, 22, 23)</sup>。以 ClO<sub>2</sub> 處理採收後番茄或馬鈴薯，能有效降低由 *P. chrysanthemi* 引起之軟腐病<sup>(15, 16, 18)</sup>，顯示 ClO<sub>2</sub> 對 *P. chrysanthemi* 具有良好殺菌力。因 ClO<sub>2</sub> 之低毒性、低濃度即具高效率之殺菌效果、分解快殘留時間短、安全及對環境較友善，故本研究主要目的在測試 ClO<sub>2</sub> 溶液對軟腐病菌 Pch 之殺菌效果，並測試 ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭切花花梗軟腐病之防治效果及對切花壽命之影響。同時探討以 ClO<sub>2</sub> 溶液定期連續噴灑處理文心蘭植株後對植株生長之影響，以便作為日後實際運用於蘭園消毒及切花處理之參考。

## 材料與方法

### 供試藥劑、植株與菌株之來源

本研究所使用之 ClO<sub>2</sub> 溶液，係由汲鑫科技股份有限公司(高雄縣鳳山市)提供新鮮製備之產品，該產品生產係將食鹽電解產生 ClO<sub>2</sub> 氣體後存放水中，經導電度、氧化還原電位與 pH 值測定後製備濃度為 1,000 ppm 之原液，盛裝於白色不透明塑膠桶內，取得後立即進行測試，測試時不需要活化，直接加水稀釋至測試所需之濃度即可使用。本研究所使用文心蘭切花(每枝盛開十朵)，係購買自屏東縣內埔鄉之花店及竹田鄉文心蘭產銷三班，品種為南西。實驗所使用之測試菌株均來自於屏東科技大學植物醫學系細菌實驗室保存之菌株。文心蘭軟腐病菌 Pch OT2-1、OT1-1、OT1-2 及 OT1-3 菌株，係分離自屏東縣文心蘭園罹病之花梗。

### 培養基

523 培養基：sucrose 10 g, casein hydrolysate (N-Z-AMINEA) 8 g, yeast extract 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, agar 20 g 及蒸餾水 1,000 ml<sup>(10)</sup>。

### 軟腐病菌 *P. chrysanthemi* 之分離及鑑定

將田間採集之罹患花梗軟腐病之花心蘭切花花梗以 70% 酒精表面消毒，於無菌操作台內，用滅菌過的刀片將病斑與建全部位交接處之花梗組織切下並切成小片段，置入裝有 10 ml 無菌水之 20 ml 滅菌螺旋蓋玻璃管(National Scientific Company)內，靜置 30 分鐘後以震盪器震盪均勻，利用移殖環沾取上述製備之液體部分菌體，在 523 培養基平板上進行劃線法分離，於 30°C 培養 2~3 天，觀察培養基平板上是否產生白色、外緣不規則形及中央凸起之軟腐病菌典型菌落。

將分離之軟腐病菌菌落經純化後，培養於 523 培養基，於 28°C 培養 24-48 小時後懸浮於無菌水，再利用光電比色計於波長 600 nm 下，調整 OD 值至 0.45，此濃度約含 10<sup>8</sup>CFU ml<sup>-1</sup>。另將馬鈴薯塊莖以 70% 酒精表面消毒，於無菌操作台內用消毒過的刀片將塊莖切片，後以無菌鑷子將切片置入含無菌濾紙與 2 ml 無菌水之無菌塑膠培養皿內，再利用劃線接種法將分離之菌株接種於馬鈴薯塊莖切片上，置入 30°C 培養，定期觀察塊莖切片是否有產生軟腐病病徵，以確定分離菌株之病原性。經病原性確認後，將其編號並製備菌種保存於 -20°C 冰櫃中備用。

確認病原性之軟腐病菌以 GeneMark 公司的 DNA 純化試劑組(GeneMark DP021)進行 DNA 純化，再以

專一性引子對進行 PCR 鑑定。鑑定時將純化之 DNA 液 10  $\mu$ l、朱<sup>(4)</sup> 研發設計之 E5A (5'-GCG GTT GTT CAC CAG GTG TTT T-3') 與 E5B (5'-ATG CAC GCT ACC TGG AAG TAT-3') 引子對各 1  $\mu$ l、5X PCR Master Mix 10  $\mu$ l 和去離子水 28  $\mu$ l 混合後，使反應混合液總量達 50  $\mu$ l，將反應混合液置入溫度循環器中進行 PCR 反應，其反應條件為先以 94°C 預跑 5 分鐘；再以 94°C，30 秒，55°C，30 秒，72°C，30 秒進行 32 次循環；最後再以 72°C 反應 5 分鐘。取 10  $\mu$ l PCR 產物與 1  $\mu$ l 染劑均勻混合並進行膠體電泳 30 分鐘，並利用電泳照相及分析系統觀察是否增幅出 500-bp 專一性條帶，以確認所分離之軟腐病菌。

### ClO<sub>2</sub> 溶液對 *P. chrysanthemi* 之殺菌效率

將 *P. chrysanthemi* OT2-1、OT1-1 及 OT1-2 菌株劃線於 523 培養基，於 28°C 培養 24-48 小時後懸浮於無菌水，再利用光電比色計於波長 600 nm 下，調整 OD 值至 0.45。後將濃度為 1,000 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液以 0.22  $\mu$ m millipore 過濾滅菌後，配製濃度分別為 2、10、20、100 及 200 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液。於 2.0 ml 滅菌螺旋蓋冷凍小管中分別加入各濃度之 ClO<sub>2</sub> 溶液 500  $\mu$ l 及測試菌株懸浮液 500  $\mu$ l，使其 ClO<sub>2</sub> 最終濃度分別為 1、5、10、50 及 100 ppm，另以細菌懸浮液添加至無菌水之處理作為對照。利用震盪培養器 (HIPOINT OS-54，巨興化學儀器) 於 150 rpm 下，震盪處理 5 分鐘，後隨即置入離心機以 3,000 rpm 離心 2 分鐘，以便將細菌和藥劑分離，倒掉上層液並加入 1 ml 無菌水懸浮後，以微量吸管吸取 10  $\mu$ l 懸浮液，滴至培養皿底蓋外劃有井形之 523 培養基平板小區內，每處理四重複，於 30°C 培養 24-48 小時，觀察細菌是否生長而形成菌落，並以“+”表示細菌生長；“-”表示細菌不生長記錄之。依上述同樣的方法，另測試 OT2-1 菌株懸浮液與不同濃度 ClO<sub>2</sub> 溶液混合後震盪處理 5 分鐘，如前述經離心及無菌水再懸浮後，利用稀釋平板法測定存活之細菌菌落數，並以無菌水處理者為對照。

### ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭花梗之藥害測試

將濃度為 2、10、20、100、200 及 1,000 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液，分別各取 5 ml 加入含有 5 ml 無菌水玻璃試管 (長與直徑分別為 12.5 與 1.5 cm) 內，使 ClO<sub>2</sub> 最終濃度分別為 1、5、10、50、100 及 500 ppm。因 ClO<sub>2</sub> 接觸光易分解，以錫箔紙包裹試管，使其不透光。將長度為 20 cm 之文心蘭花梗以 70% 酒精表面消毒後，分別置入上述內含不同濃度 ClO<sub>2</sub> 溶液之試管中，後以石臘膜封口並放置於 28°C 恆溫箱，另以處理無菌水之花

梗為對照，每處理三重覆，本實驗共重複三次，每日觀察並記錄有無藥害產生。

### ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對 *P. chrysanthemi* 引起之文心蘭切花花梗軟腐病之防治測試

如前述製備濃度約為 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> 之 Pch OT2-1 菌株細菌懸浮液後，以無菌水系列稀釋為 10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup> 及 10<sup>2</sup> CFU ml<sup>-1</sup> 之懸浮液，並以 5 ml/tube 分裝至長 12 cm 與直徑 1.5 cm 玻璃試管中。另取 5 ml 濃度分別為 10 與 20 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液添加至上述含不同濃度 *P. chrysanthemi* 細菌懸浮液中，使 ClO<sub>2</sub> 最終濃度分別為 5 及 10 ppm，以錫箔紙包裹試管，使其不透光。將長度為 20 cm 之文心蘭切花花梗以 70% 酒精做表面消毒後置入上述玻璃試管中，每一試管放置一支花梗，再以石臘膜固定切花及封住試管口。對照組係以 20 cm 之文心蘭切花花梗分別置於無菌水、ClO<sub>2</sub> 溶液及不同濃度 Pch OT2-1 菌株細菌懸浮液中來處理，每處理三重覆。各處理之花梗於 27°C 室溫下培養，每日觀察並於 5 天後以發病級數記錄花梗軟腐病發生之情形。花梗軟腐病之發病級數分為六級，0 級：無病徵，1 級：花梗切口往上黃化腐爛在 2 公分內，2 級：黃化腐爛 2 至 4 公分，3 級：黃化腐爛 4 至 6 公分，4 級：黃化腐爛 6 至 8 公分，5 級：黃化腐爛 8 公分以上。

### ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭切花壽命之影響

如前述將 ClO<sub>2</sub> 溶液與濃度為 10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> Pch OT2-1 菌株懸浮液於試管內混合，使 ClO<sub>2</sub> 最終濃度分別為 10 及 5 ppm，Pch OT2-1 菌株之濃度為 5×10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup>。再以錫箔紙包裹試管，使其不透光。取同等級文心蘭切花，剪取長度相同之花梗並以 70% 酒精做表面消毒後置入各處理之試管中，再以石臘膜封口，後將切花花梗上之花朵由下而上以 1 到 10 編號，每處理三重覆。另以浸漬無菌水、10 與 5 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液及 5×10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> 之 Pch OT2-1 菌株懸浮液之文心蘭切花花梗為對照，置於室溫下，每日觀察各編號之花朵，記錄各花朵枯萎掉落情形，以了解 ClO<sub>2</sub> 溶液處理對文心蘭切花花朵壽命之影響。

### ClO<sub>2</sub> 溶液噴灑處理對文心蘭葉片生長及抽花梗之影響

購買植株大小相同之文心蘭 (南西) 植株，每盆選取長寬大小相同之葉片兩片經標示後，於 28°C 溫室中，以 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液每 7 天噴灑處理一次，每處理 6 盆，每盆每次噴灑 15 ml，另以噴灑處理蒸餾水之植株為對照，連續處理至實驗結束，並於處理 5、10 及

15 週後分別測量及記錄大小相同已標示之兩片葉片之長寬，每盆記錄兩片葉片。另於處理 40 週後，計算每種處理之每盆平均抽花梗數目。

## 結 果

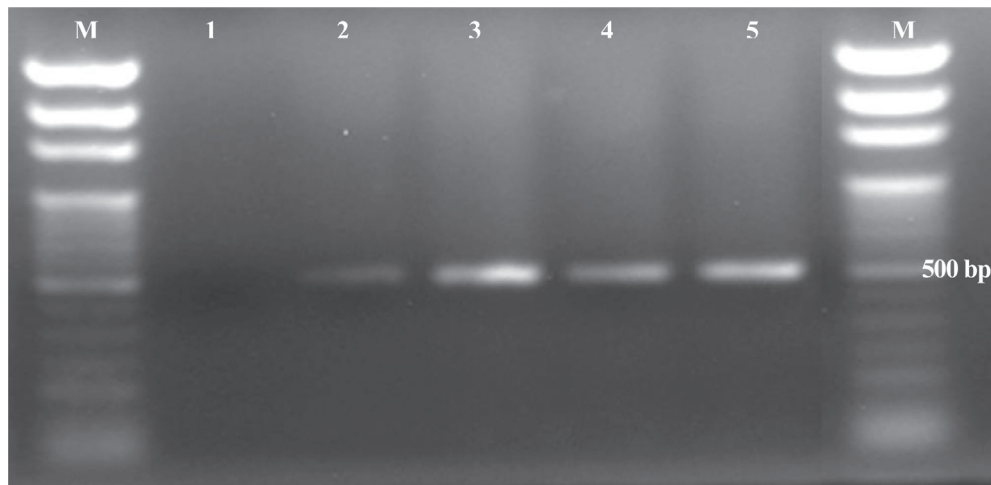
### 軟腐病菌 *P. chrysanthemi* 之分離及鑑定

由罹患軟腐病文心蘭花梗上分離之病菌，在 523 培養基平板上產生白色透明狀、中凸、外緣不規則之軟腐病菌典型菌落，接種於馬鈴薯塊莖切片上，可產生軟腐病徵。具病原性之菌株，進一步以 E5A 與 E5B 引

子對進行聚合酵素連鎖反應，均可增幅產生出 500 bp 專一性條帶 (圖一)，由此可知所分離之菌株均屬於 *P. chrysanthemi*。

### ClO<sub>2</sub> 溶液對 *P. chrysanthemi* 之殺菌效率

供試 Pch OT2-1、OT1-1 及 OT1-2 菌株以 5 ppm 以上之 ClO<sub>2</sub> 溶液震盪處理 5 分鐘後，其生長即被完全抑制 (表一)。以 Pch OT2-1 菌株測試時，1 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液處理 5 分鐘即可將該菌株之族群量降低 0.14 個 log 值，而在 5 ppm 或以上處理 5 分鐘後，則無活菌的存在 (表二)。



圖一、利用 PCR 鑑定文心蘭罹病花梗分離之軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi*)。電泳圖列分別為 1，無菌蒸餾水；2，已知之 *Pectobacterium chrysanthemi*；3 至 5，罹病花梗分離之軟腐病菌菌株，M，Gen-100 bp DNA Ladder (禾鑫生技)。

Fig.1. Identification of strains of soft rot bacteria isolated from soft rotted stalks of *Oncidium* as *Pectobacterium chrysanthemi* by PCR using primer pairs E5A/E5B. Lane 1, sterile distilled water; lane 2, a known strain of *Pectobacterium chrysanthemi*; lanes 3-5, strains of soft rot bacteria isolated from diseased stalks of *Oncidium*; lane M, Gen-100 bp DNA Ladder (GeneMark).

表一、二氧化氯溶液對軟腐病菌 (*Pectobacterium chrysanthemi*) 不同菌株之殺菌效果

Table 1. Bactericidal efficacy of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution against strains of *Pectobacterium chrysanthemi*

Strain	ClO <sub>2</sub> (ppm) <sup>1</sup>					
	0	1	5	10	50	100
OT2-1	+ <sup>2</sup>	+	+	—	—	—
OT1-1	+	+	—	—	—	—
OT1-2	+	+	—	—	—	—

<sup>1</sup> Five hundred  $\mu$ l of different concentrations of ClO<sub>2</sub> solution was mixed with 500  $\mu$ l of 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> of a test bacterial suspension. The final concentrations of ClO<sub>2</sub> in the mixtures were 1, 5, 10, 50 and 100 ppm. After mixing and shaking for 5 min, the bacterial cells were separated by centrifugation and suspended in sterile distilled water. Aliquots (10  $\mu$ l) of the suspension were placed on agar plates and incubated for 24 to 48 hr at 30°C.

<sup>2</sup> + indicates bacterial growth and — indicates no bacterial growth.

**ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭花梗之藥害**

文心蘭花梗在浸漬處理 50、100 及 500 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液 5 天後，其切口處出現白化及基部出現褐化現象，並隨濃度增加而加重褐化程度 (圖二)，表示 ClO<sub>2</sub> 溶液在濃度 50 ppm 以上會造成切花花梗之藥害，而浸漬處理 1、5 及 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液之花梗無明顯藥害情形發生。由於 5 及 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液對 *P. chrysanthemi* 具有殺菌效果，且對切花花梗無明顯藥害，故作為後續防治試驗之測試濃度。

**ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭切花花梗軟腐病之防治效果**

文心蘭切花花梗單獨接種不同濃度 *P. chrysanthemi* 5 天後，發病程度隨接種濃度之增加而增高 (表三)，但以 5 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液處理後，均可顯著降低各接種濃度引起之發病等級，而以 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液處理後，則可完全阻止花梗軟腐病之發生 (表三、圖三)。

表二、軟腐病菌 *Pectobacterium chrysanthemi* OT2-1 菌株經不同濃度二氧化氯溶液處理 5 分鐘後之族群減少量

Table 2. Reduction of populations of *Pectobacterium chrysanthemi* OT2-1 in water after treatment with different concentrations of chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution for 5 min

Conc. (ppm)	Population (log CFU ml <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>		Log reduction after ClO <sub>2</sub> treatment (log CFU ml <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
	Before treatment	After treatment	
0	6.57	6.57	0.00
1	6.57	6.43	0.14
5	6.57	N.D. <sup>3</sup>	≥ 6.57
10	6.57	N.D.	≥ 6.57
50	6.57	N.D.	≥ 6.57
100	6.57	N.D.	≥ 6.57

<sup>1</sup> Five hundred µl of different concentrations of ClO<sub>2</sub> solution was mixed with 500 µl of 10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup> of OT2-1 suspension. The final concentrations of ClO<sub>2</sub> in the mixtures were 1, 5, 10, 50 and 100 ppm. After mixing and shaking for 5 min, the bacterial cells were separated by centrifugation and suspended in sterile distilled water. The suspension was serially diluted and plated on agar plates for counting the survived bacterial cells.

<sup>2</sup> Log reduction = population after mixing and shaking for 5 min with sterile distilled water - population after ClO<sub>2</sub> solution treatment.

<sup>3</sup> N.D.: viable *P. chrysanthemi* OT2-1 was not detected by the dilution plate method.

表三、文心蘭切花花梗浸漬接種不同濃度軟腐病菌 *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) OT2-1 菌株後之發病程度及以 5 或 10 ppm 二氧化氯溶液處理之防病效果

Table 3. Severity of bacterial soft rot on *Oncidium* stalks inoculated with various concentrations of *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) OT2-1 by stalk dipping inoculation method and the disease control by treatment with 5 or 10 ppm chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution

Treatment <sup>1</sup>	Inoculum concentration (0.5 × log CFU ml <sup>-1</sup> )							
	2	3	4	5	6	7	8	
Pch	2.98a <sup>2</sup>	2.99a	4.00a	3.99a	4.65a	5.00a	5.00a	
Pch + 5 ppm ClO <sub>2</sub>	0.22b	0.11b	0.33b	1.22b	0.22b	0.11b	0.00b	
Pch + 10 ppm ClO <sub>2</sub>	0.00b	0.00b	0.00b	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	
5 ppm ClO <sub>2</sub>	0.00b	0.00b	0.00b	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	
10 ppm ClO <sub>2</sub>	0.00b	0.00b	0.00b	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	
SDW	0.00b	0.00b	0.00b	0.00c	0.00b	0.00b	0.00b	

<sup>1</sup> Treatment of ClO<sub>2</sub> was done by mixing 5 ml of Pch bacterial suspension with 5 ml of ClO<sub>2</sub> solution to make the final concentration of ClO<sub>2</sub> at 5 or 10 ppm. Then each of stalks of *Oncidium* cut flowers was dipped into the mixture. The check used was sterilized distilled water (SDW).

<sup>2</sup> Disease was recorded 5 days after treatment. Disease rating was done on 0-5 rating scale: 0, no symptoms; 1, ≤ 2 cm stalk rotted; 2, 2-4 cm stalk rotted; 3, 4-6 cm stalk rotted; 4, 6-8 cm stalk rotted; 5, ≥ 8 cm stalk rotted. Data are means of 3 replications with 3 cut flowers per replication. Means followed by the same letter in each column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.



圖二、文心蘭切花花梗浸漬處理不同濃度二氧化氯溶液 5 天後產生褐化及白化之藥害情形 (箭頭所指)。  
Fig. 2. Toxicity of chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ ) to *Oncidium* cut flower stalks showing brown discoloration (arrows) after dipping into different concentrations of  $\text{ClO}_2$  solution for 5 days (From left to right: sterile distilled water, 1, 5, 10, 50, 100, and 500 ppm of  $\text{ClO}_2$ ).



圖三、二氧化氯溶液浸漬處理對文心蘭切花花梗軟腐病之防治效果。圖為浸漬五天之結果，左 1 為單獨浸漬接種  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  *Pectobacterium chrysanthemi* OT2-1、左 2 為無菌水、左 3 至左 9 為 10 ppm  $\text{ClO}_2$  溶液分別與  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  與  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  OT2-1 細菌懸浮液混合之處理。  
Fig. 3. Control of bacterial stalk rot of *Oncidium* cut flowers by dipping treatment with chlorine dioxide ( $\text{ClO}_2$ ) solution for 5 days. From left to right :  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  of *Pectobacterium chrysanthemi* OT2-1 only, sterile distilled water, and  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ , and  $10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$  OT2-1 suspension mixed with  $\text{ClO}_2$  solution at the final concentration of 10 ppm, respectively.

**ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理對文心蘭切花壽命之影響**

文心蘭切花花梗浸漬接種濃度為  $5 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> 之 Pch OT2-1 菌株懸浮液 7 天後，落花數為 7.55 朵，而只浸漬處理無菌水之落花數為 2.89 朵。接種之花梗經 5 或 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理後可減少花朵之枯萎及落花數，且與單獨浸漬處理 ClO<sub>2</sub> 溶液或無菌水之對照組無顯著性差異 (表四)，顯示 ClO<sub>2</sub> 溶液處理不會影響文心蘭切花花朵之壽命。

**ClO<sub>2</sub> 溶液噴灑處理對葉片生長及抽花梗之影響**

於溫室內，利用 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液，每隔 7 天噴灑文心蘭植株之結果顯示，連續噴灑處理 5、10 與 15 週後之文心蘭植株葉片平均增加之長及寬，與連續噴灑處理蒸餾水之對照組無顯著差異 (表五)。在連續處理 40 週後，以 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液噴灑處理後之文心蘭植株平均抽梗數，亦與噴灑蒸餾水之對照組無顯著差異 (表六)。

表四、二氧化氯溶液及 *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) OT2-1 菌株浸漬處理對文心蘭切花壽命之影響

Table 4. Effect of inoculation with *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch) OT2-1 and/or treatment with chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution on the longevity of Oncidium cut flower

Treatment <sup>1</sup>	No. withered and fallen flowers <sup>2</sup>
Pch only	7.55 ± 0.69 a
5 ppm ClO <sub>2</sub> + Pch	2.44 ± 0.19 b
10 ppm ClO <sub>2</sub> + Pch	2.56 ± 0.51 b
5 ppm ClO <sub>2</sub>	2.89 ± 1.17 b
10 ppm ClO <sub>2</sub>	3.78 ± 0.33 b
SDW	2.89 ± 0.19 b

<sup>1</sup> The stalk of each cut flower was inoculated (or treated) by dipping into a glass tube containing  $5 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> of Pch OT 2-1 only, ClO<sub>2</sub> solution only, or mixture of Pch OT 2-1 and ClO<sub>2</sub> solution.

<sup>2</sup> Data were recorded 7 days after treatment. Data are mean of 3 replications with 3 cut flowers per replication ± standard deviation. Means followed by the same letter in the column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

表五、以 10 ppm 二氧化氯溶液每週一次連續噴灑文心蘭植株不同週後對其葉片生長之影響

Table 5. Effect of spraying 10 ppm chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution on leaves of Oncidium plants at weekly intervals for different weeks on growth of the leaves

Week	Treatment	Leaf length (cm) <sup>1</sup>		Length increased (mm) <sup>2</sup>	Leaf width (cm) <sup>1</sup>		Width increased (mm) <sup>2</sup>
		Before treatment	After treatment		Before treatment	After treatment	
5	ClO <sub>2</sub>	26.7	27.4	6.5 ± 4.0a	2.7	2.8	1.0 ± 1.5a
	DW	24.3	24.8	4.8 ± 3.0a	2.4	2.5	0.9 ± 0.8a
10	ClO <sub>2</sub>	26.7	27.5	7.8 ± 4.3a	2.7	2.8	1.5 ± 1.5a
	DW	24.3	25.0	6.5 ± 3.6a	2.4	2.5	1.1 ± 1.0a
15	ClO <sub>2</sub>	26.7	27.6	9.1 ± 4.6a	2.7	2.8	1.5 ± 1.5a
	DW	24.3	25.1	7.4 ± 3.5a	2.4	2.5	1.1 ± 1.0a

<sup>1</sup> Leaves with similar size were selected and marked, two leaves per pot, and only the marked leaves were measured.

<sup>2</sup> Data are mean of 3 replications with 6 plants per replication. Means at the same week treatment followed by the same letter in each column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

表六、以 10 ppm 二氧化氯溶液每週一次連續噴灑處理文心蘭植株 40 週後對其抽梗數之影響

Table 6. Effect of spraying 10 ppm chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution on leaves of Oncidium plants at weekly intervals for 40 weeks on the number of stalks developed

Treatment	Mean no.stalks
ClO <sub>2</sub>	3.50 ± 0.84 a <sup>1</sup>
DW	3.33 ± 1.03 a

<sup>1</sup> Data are mean of 3 replications with 6 plants per replication. Means followed by the same letter in the column do not differ significantly at P=0.05, according to Duncan's multiple range test.

## 討 論

文心蘭切花花梗常受細菌性軟腐病之危害，造成花農損失<sup>(2, 3)</sup>。採收後切花，外銷所需之運輸時間長，尤其主要出口國日本，對品質要求極高，因此切花之保鮮與花梗軟腐病之防治處理就十分重要。外銷時，切花會浸漬於含保鮮液之塑膠保鮮管內，保鮮液雖能夠延長切花之壽命及維持切花的品質，但無法有效抑制軟腐病之發生，且切花花梗軟腐病目前尚無良好的防治方法。本研究發現 ClO<sub>2</sub> 溶液對文心蘭軟腐病菌具有很強殺菌力，也有極佳的防病效果，可做為防治本病之參考。但使用時應注意 ClO<sub>2</sub> 之濃度，因濃度在 50 ppm 及以上會產生藥害，使花梗出現褐化現象。本研究結果顯示 10 ppm 及低於此濃度之 ClO<sub>2</sub> 溶液處理，沒有出現花梗之褐化，表示低濃度 ClO<sub>2</sub> 溶液之浸漬，應不致對文心蘭花梗有傷害性，且 5 及 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液對花梗軟腐病有良好防治效果，對切花壽命也無不良影響，故低濃度 ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理文心蘭切花花梗，不但不影響切花之正常花期，且能防治花梗軟腐病。在田間，文心蘭切花採收後立即插水，以維持切花細胞之膨壓，採收到 20 枝左右，先以報紙或其他包覆物包紮後再放入大型水桶，減少花枝交錯並減少搬運及取花時造成的物理傷害，再將切花連插水水桶一起運輸到包裝場<sup>(9)</sup>。未來可嘗試將 ClO<sub>2</sub> 溶液添加至切花插水時所用之水桶內，以作為外銷切花花梗切口之消毒殺菌處理或直接添加至文心蘭切花之保鮮劑內，以預防花梗軟腐病之發生。本研究另於溫室內利用 10 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液每週一次連續噴灑處理文心蘭植株 15 週，不會影響葉片之正常生長，連續噴灑 40 週亦不影響花梗之抽梗數。未來可進一步進行田間試驗，以評估 ClO<sub>2</sub> 在蘭園消毒應用之可行性。唯應用 ClO<sub>2</sub> 溶液作消毒處理時，就經濟效益來看，濃度 1,000 ppm ClO<sub>2</sub> 溶液價格(每瓶裝 2.3 公升目前市價 550 元)，可稀釋為 230 公升有效抑菌濃度 10 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液，每公升單價約為 2.39 元，若以每株噴灑 15 ml 之量計算，可處理約一萬五千三百餘株，每次每株施用後，約增加使用者之成本約 0.036 元，此一成本效應，亦需列為日後進行田間處理時的考慮因子之一。

溫度對切花壽命及軟腐病發生之影響，有待探討。根據劉等<sup>(12)</sup> 報告中，指出溫度會影響菊花扦插苗細菌性軟腐病之發生，在 25-30°C 時 *Pectobacterium* 軟腐細菌引起之扦插苗軟腐病明顯較 15-20°C 時為嚴重。本實驗利用 10 ppm 之 ClO<sub>2</sub> 溶液浸漬處理，處理之切花花梗置於 27°C 室溫下，可完全抑制花梗軟腐病之發生，且切花之花勢維持正常。但處理之切花若放置於 30°C 恆溫箱，切花花朵會迅速凋謝，整枝花梗黃化枯

萎，即使控制恆溫箱內的溼度，亦無法維持花朵的正常(未發表資料)，故切花在裝箱後的運輸過程中，溫度的控制亦十分重要，目前採行之措施係將切花裝箱後，放入 10°C 冷藏庫預冷，紙箱與紙箱間預留空間讓空氣流通，大約 6-8 小時，使箱內溫度降到 12°C<sup>(9)</sup>。但在此種處理及其後的運輸流程下，軟腐病發生程度如何，有待進一步研究。

就 ClO<sub>2</sub> 之化學性質而言，其殺菌效果迅速、無殘留等特性，對於日後應用於植物細菌性病害之防治上，仍有研究發展空間，如國外已有將其應用於軟腐病菌之相關研究，特別在收穫後病害或貯藏期病害之防治上尤具其應用潛力<sup>(15, 16, 18)</sup>。

## 謝 辭

本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局「97 農科 -14.4.2- 檢 -B1 及 98 農科 -9.4.2- 檢 -B1 (5)」經費補助及汲鑫科技股份有限公司提供 ClO<sub>2</sub> 溶液，以及屏東科技大學植醫學系植物病原細菌研究室參與研究同學協助實驗工作之進行，特致謝忱。

## 引用文獻 (LITERATURE CITED)

1. Agius, G., Burkeen, S., and Mynatt, J. 2004. Benefits of using chlorine dioxide as an alternative to hot-water sanitation. *MBAA TQ* 41: 42-44.
2. Chao, Y. C. 1999. Fungal and bacterial diseases of *Oncidium*. Pages 41-46. *in*: Cultural Management and Postharvest Handling of *Oncidium*. Lin, J., Ko, L. S., and Hung, J. K. eds. Agr. Ext. Com., Natl. Pingtung Univ. Sci. Technol., Pingtung, Taiwan. (in Chinese)
3. Chao, Y. C., Su, M. M., and Liang, W. J. 1999. The caused organism, occurrence and preliminary control test of bacterial soft rot of *Oncidium*. *Bull. Natl. Pingtung Univ. Sci. Technol.* 8: 203-212. (in Chinese with English abstract)
4. Chu, M. K. 1995. *Erwinia chrysanthemi*: Genetic diversity, molecular cloning of blue pigment genes and detection by PCR. Doctoral thesis, National Chung-Hsing University. (in Chinese with English abstract)
5. Du, J., Han, Y., and Linton, R. H. 2003. Efficacy of chlorine dioxide gas in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on apple surfaces. *Food Microbiol.* 20: 583-591.
6. Han, Y., Sherman, D. M., Linton, R. H., Nielsen, S. S., and Nelson, P. E. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiol.* 17: 521-533.



7. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Liu, X. L., Sun, R. N., and Yang, G. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water. *Water Res.* 31: 455-460.
8. Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F, and, Juli. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.* 31: 607-613.
9. Huang, J. J., Chen, Y. P., and Lin, Z. Y. Postharvest handling procedure of *Oncidium* cut flower. *Taiwan Flower Hort.* 177: 40-43. (in Chinese)
10. Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
11. Kim, J. M., Huang, T. S., Marshall, M. R., and Wei, C. I. 1999. Chlorine dioxide treatment of seafoods to reduce bacterial loads. *J. Food Sci.* 64: 1089-1093.
12. Liu, H. L., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 2002. Bacterial soft rot of chrysanthemum cuttings: Characteristics of the pathogens and factors affecting its occurrence. *Plant Pathol. Bull.* 11: 157-164. (in Chinese with English abstract)
13. Liu, M. J., and Lai, C. G. 2003. Environmental disinfectant- Studied on the disinfection efficiency of chlorine dioxide. *Environ. Analysis Commun. Mag.* 48: 16-23.(in Chinese)
14. Mahmoud, B. S. M., Bhagat, A. R., and Linton, R. H. 2004. Inactivation kinetics of inoculated *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* on strawberries by chlorine dioxide gas. *Food Microbiol.* 24: 736-744.
15. Mahovic, M. J., Tenney, J. D., and Bartz, J. A. 2007. Applications of chlorine dioxide gas for control of bacterial soft rot in tomatoes. *Plant Dis.* 91: 1316-1320.
16. Pao, S., Kelsey, D. F., Khalid, M. F., and Ettinger, M. R. 2007. Using aqueous chlorine dioxide to prevent contamination of tomatoes with *salmonella enterica* and *Erwinia carotovora* during fruit washing. *J. Food Prot.* 70: 629-634.
17. Su, C. C., and Leu, L. S. 1992. Soft rot of *Oncidium* (Go.wer Ramsey) and *Cymbidium* sp. caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *Plant Pathol. Bull.* 1: 190-195. (in Chinese with English abstract)
18. Tsai, L. S., Huxsoll, C. C., and Robertson, G., 2001. Prevention of potato spoilage during storage by chlorine dioxide. *J. Food Sci.* 66: 472-477.
19. Tzeng, K. C., and Hsu, S. T. 2003. Diagnosis and identification of important plant bacterial diseases. Pages 95-115. *in: Workshop on Diagnosis and Identification Techniques of Plant Important Quarantine Pests(II)*. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine. Council of Agriculture, Taipei, Taiwan. (in Chinese)
20. Wang, C. H. 1990. Disinfection by the stabilized chloride dioxide solution. *Food Ind.* 22: 14-17. (in Chinese)
21. Wang, R. C., Sun, W. C., Chen, C. J., and Hu, W. R. 2005. Assistance and guidance in production and marketing of *Oncidium* for export. *Special Report, Tainan Distr. Agri. Res. Ext. Sta.* 51: 20-22. (in Chinese)
22. Wu, V. C. H., and Kim, B. 2007. Effect of a simple chlorine dioxide method for controlling five foodborne pathogens, yeasts and mold on blueberries. *Food Microbiol.* 24: 794-800.
23. Yunhee, H., Ku, K., Kim, M., Won, M., Chung, K., and Song, K. B. 2008. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* inoculated on chicken by aqueous chlorine dioxide treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 742-745.

## ABSTRACT

Chao, Y. C.<sup>1,2,3</sup>, Hsu, S. T.<sup>2</sup>, and Tzeng, K. C.<sup>2</sup> 2010. Bactericidal Efficacy of Chlorine Dioxide Against *Pectobacterium chrysanthemi* and Its Control for Bacterial Soft Rot on Stalk of Oncidium Cut Flower. Plant Pathol. Bull. 19: 127-136. (<sup>1</sup> Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan; R.O.C., <sup>2</sup> Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan; R.O.C. <sup>3</sup> Corresponding author, E-mail: c@mail.npust.edu.tw ; Fax: +886-8-7740-293)

The efficacy of chloride dioxide (ClO<sub>2</sub>) solution in inhibition of growth of *Pectobacterium chrysanthemi* (Pch), the causal agent of soft rot of Oncidium was evaluated, and its application on Oncidium cut flowers for control of bacterial stalk rot and its effect on longevity of the cut flowers were also studied. Treatment of strains of Pch with 5 ppm ClO<sub>2</sub> solution for 5 min completely inhibited the growth of all strains tested on an agar medium. Oncidium cut flower stalks showed sign of toxicity (brown discoloration at basal part) after dipped into 50 ppm or above of ClO<sub>2</sub> solution for 5 days, but lower concentrations (1, 5 and 10 ppm) were no toxic to the cut flower stalks. Stalks of Oncidium cut flowers were inoculated by dipped into different concentrations (10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> CFU ml<sup>-1</sup>) of Pch. The severity of stalk rot increased with increasing concentrations, but when the inoculum was added with 5 ppm ClO<sub>2</sub> solution, the disease severity was reduced significantly at all inoculum level, and the disease was completely controlled with ClO<sub>2</sub> added at 10 ppm. Treatment of cut flower stalks by dipping into Pch suspension containing 5 or 10 ppm ClO<sub>2</sub> for 7 days reduced significantly the number of withered and fallen flowers as compared with the stalks treated with Pch only, but was not significantly different from those that treated with sterile water. These indicate that dipping treatment with 10 ppm ClO<sub>2</sub> solution could control the bacterial stalk rot and did not affect the longevity of cut flower. Spraying leaves of Oncidium plants with 10 ppm ClO<sub>2</sub> solution at weekly intervals after 15 weeks did not affect the growth of the leaves, and also did not affect the number of stalks developed after spraying for 40 weeks.

Key words: chloride dioxide, *Pectobacterium chrysanthemi*, soft rot, control, Oncidium cut flower