

# 油豆角贮期病害分离鉴定及绿色防治技术研究

刁小琴, 关海宁

(绥化学院 食品与制药工程学院, 黑龙江 绥化 152061)

**摘要:**以黑龙江省地方主栽的油豆角为试材,对其贮藏期间的病害进行了分离鉴定,研究了臭氧、减压、壳聚糖及 1-甲基环丙烯等处理对已分离的病原菌生长的抑制效果。结果表明:油豆角贮期腐烂变质的病原菌是野油菜黄单胞杆菌和菜豆灰霉病菌。菜豆灰霉病菌在中性和弱碱性条件下均能很好的生长,而对强碱和酸性环境具有较高的敏感性。而黄单胞杆菌在中性环境下生长良好,偏酸或偏碱的条件下都会对该菌有抑制作用。壳聚糖对黄单胞杆菌和灰霉菌均有明显的抑制作用,且浓度越高效果越好,但高浓度的壳聚糖涂膜会造成油豆角的无氧呼吸,最终采用 2.0% 的浓度效果较好;臭氧处理病原菌 10 min 具有强烈的杀灭性;减压能抑制病原菌的生长,压力越低效果越好,40 kPa 压力处理,效果较好;1-甲基环丙烯是良好的保鲜剂,且浓度为 40 mg/L 时对病原菌的抑制效果最理想。

**关键词:**油豆角;贮期;病害;绿色防治技术

**中图分类号:**S 643.109<sup>+</sup>.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0154-05

油豆角是黑龙江省特有的菜豆品种,其荚嫩肉质厚,粗纤维少,味道鲜美,而且蛋白质含量较高,可达到干质量的 20% 以上。油豆角含有人体必须的 18 种氨基酸,其中必需氨基酸,特别是赖氨酸含量较高<sup>[1]</sup>。此外油豆角还富含膳食纤维、多种维生素和矿物质。无论从口感方面还是营养方面,油豆角都是优质的菜豆品种。但是油豆角采后呼吸强度高,寿命极短,常温 5~7 d 豆荚就会失水变色,同时,当温度低于 8℃ 时代谢作用就会受到干扰而出现冷害和变质腐烂,从而丧失食用价值和商品价值<sup>[2-3]</sup>。近年来,国内外在菜豆的品种筛选及贮藏生理特性方面做了一些研究,但有关油豆角贮藏期间的病害鉴定及防治技术的研究并不多见。因此,研究油豆角贮藏期间病害,能为油豆角的保鲜方法研究提供一定的理论依据。

现以黑龙江省地产油豆角为试材,对其贮藏期间的病害进行分离鉴定,并对该病原菌采用臭氧、减压、壳聚糖及 1-甲基环丙烯等处理手段研究对病原菌的生长抑制效果,旨在解决油豆角贮藏期间出现的腐烂问题,以期对油豆角产业的健康发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试油豆角从农户生产地采摘,要求均匀顺直、成

熟度适中、无机械损伤、无病虫害。试验试剂:牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉(北京奥博星生物技术责任有限公司);壳聚糖(上海源聚生物科技有限公司);1-甲基环丙烯(1-MCP)(武汉鲜保生物技术有限公司);氢氧化钠、盐酸等均均为分析纯。试验仪器:MX-100B-8 型霉菌培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备);HPX-9082MBE 数显电热培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备);自动菌落计数仪(杭州迅速科技有限公司);YX280B 型手提式不锈钢蒸汽消毒器(上海三申医疗器械有限公司);BY-TR 型光学显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司);S. SW-CJ-IF 型净化工作台(上海跃进医疗器械厂);CR-518 型多功能活氧消毒机(宁波斯诺沃电子有限公司);真空干燥器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 病原菌的培养、分离、纯化和鉴定** 将采后贮期感病的油豆角,用 75% 的酒精擦洗表皮消毒,无菌水冲洗数次,用消毒的解剖刀在病斑中部纵切 1 刀,在病斑与健康组织交界处用无菌镊子夹取病斑组织,涂抹接种于细菌培养基和 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)平板上,每皿放 3 块组织,呈三角形放置,放入培养箱培养。待长出菌落后,再取最有代表性的菌落边沿部分接种涂抹到新的细菌平板培养基和 PDA 平板培养基上,依次接种 3 次,直至纯化出菌落大小、形状、颜色、表面光滑程度、湿润程度等一致的菌落。用接种针挑取培养菌落少许,镜检细菌形态和菌丝、孢子形态,参照文献<sup>[4-5]</sup>进行

**第一作者简介:**刁小琴(1979-),女,山西怀仁人,硕士,讲师,现主要从事食品营养及农产品加工与贮藏的教学与科研等工作。

**收稿日期:**2012-07-18

鉴定。

1.2.2 菌悬液制备与侵染回接试验 取纯化后菌落接种培养,待长满平皿后,用 0.85% NaCl 无菌生理盐水分别将培养好的菌落洗入三角瓶中,加玻璃球充分摇匀,通过 3 层纱布过滤,制成菌悬液。选取健康、成熟度一致的油豆角,用水冲洗干净,75% 酒精消毒,无菌水冲洗数次备用,然后采用注射接种法进行接种,在油豆角表面不同部位选取接种点 3 个,用无菌注射器刺入表皮 2~3 mm 深,并注入 1 滴约 20  $\mu$ L 的菌悬液,用等量的无菌水作对照,每个处理用 10 个豆角。接种后于室温下培养 48 h 后,观察其发病情况,然后取病害斑点处 4~5 mm 小块进行病原菌重新分离培养鉴定。

1.2.3 抑制病原菌生长试验 细菌的抑制试验:用灭菌水将 37℃ 下培养 7 d 的菌种,配制成菌悬液,用无菌吸管吸取菌悬液 0.5 mL 于供测定的培养皿内,根据不同要求进行处理,每个处理均设 3 次重复,处理 7 d 后用自动菌落计数仪记录每毫升菌悬液中细菌的个数。霉菌的抑制试验:供试菌种经 5 d 平板培养,用直径 6 mm 的打孔器取菌落边缘的菌块,移入供测定的培养皿内,根据不同要求进行处理,每个处理均设 3 次重复,处理后 1 d 以十字交叉法测量菌落直径,此后每天测量 1 次,直到生长最快的菌落长满培养皿,同时观察菌落颜色和形状。

1.2.4 pH 值试验 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 培养基调配成 pH 为 5、7、9、11 的 4 种培养基,接入细菌菌悬液和霉菌菌块分别在 37℃ 和 28℃ 下培养。

1.2.5 添加壳聚糖试验 将 pH 为 5.5 的壳聚糖溶液经高压灭菌后,加入融化的牛肉膏蛋白胨无菌培养基和 PDA 无菌培养基中,分别获得壳聚糖浓度为 1.0%、1.5%、2.0% 和 2.5% 的培养基,分别接入细菌菌悬液和霉菌菌块,在 37℃ 和 28℃ 下培养。

1.2.6 减压试验 将接入细菌菌悬液的牛肉膏蛋白胨培养基和移植有菌块的 PDA 平板分别置于压力为 20.0、40.0、60.0、80.0、101.3 kPa 的真空干燥器中,每天抽真空 1 次,使其保持相应真空度,在室温下培养。

1.2.7 臭氧试验 将接入细菌菌悬液的牛肉膏蛋白胨培养基和移植有菌块的 PDA 平板置于塑料袋中,通臭氧 4、6、8、10 min 后扎紧袋口 0.5 h,后打开袋子在室温下培养。每天用臭氧处理 1 次。

1.2.8 1-MCP 熏蒸试验 将接入细菌菌悬液的牛肉膏蛋白胨培养基和移植有菌块的 PDA 平板分别置于 1-MCP 浓度为 10、20、30、40 mg/L 的干燥器中,在室温下培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 油豆角病原菌的鉴定及分离物的致病特性分析

2.1.1 细菌的分离鉴定 病原菌在牛肉膏蛋白胨培养基上的单菌落多为半球形,边缘整齐,表面光滑湿润且

具有粘稠性,菌落颜色为淡黄色(图 1)。显微镜下观察细菌直杆状,端生鞭毛运动(图 2)。根据病原菌的生化特征,并参考《伯杰细菌鉴定手册》,初步认为该细菌为野油菜黄单胞杆菌。

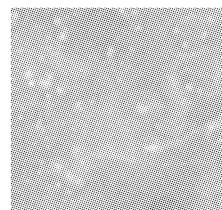


图 1 油豆角贮藏期间细菌菌落特征

Fig. 1 Colony character of bacterial colony of oil bean in storage

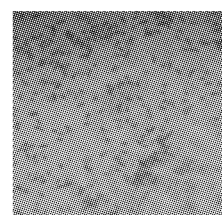


图 2 油豆角贮藏期间细菌的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of bacteria of oil bean in storage

2.1.2 霉菌的分离鉴定 病原菌在 PDA 培养上生长迅速,在 28℃ 下培养 48 h 后,组织块与培养基交界处及组织块上均有白色菌丝。培养 4 d 菌丝繁茂,菌落颜色为白色,后期菌核颜色变黑(图 3)。分生孢子梗以至树枝状分枝,顶端膨大或尖端,并且上有小突起,分生孢子单生于小突起上,球型或椭圆形,单细胞,无色(图 4)。因此,通过菌落特征和分生孢子的形态特征,可初步认定该菌属于半知菌类葡萄孢属的菜豆灰霉病菌。

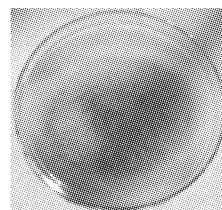


图 3 油豆角贮藏期间霉菌形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of mold of oil bean in storage



图 4 油豆角贮藏期间霉菌的孢子形态

Fig. 4 Sporulation conformation of mold of oil bean in storage

2.1.3 分离物的致病特性 将分离出来的 2 种病原菌分别接种于油豆角上,7 d 后测定其致病性。其中接种

细菌的油豆角的发病率为 78%，接种霉菌的油豆角的发病率为 72%。将油豆角的发病部位再次分离培养及感染回接，油豆角表现出同样的病害特征。上述结果证明，黄单胞杆菌和灰霉病菌是引起油豆角贮期病害的致病菌。

## 2.2 环境条件对病原菌生长的影响

2.2.1 不同 pH 环境对病原菌生长的影响 由图 5 可知，油豆角病害中的霉菌在 pH 为 7 和 9 的条件下，生长旺盛，培养 5 d 后，几乎长满平皿。当 pH 为 5 时，霉菌生长受到限制，而在 pH 为 11 时，霉菌受到明显抑制，说明该菌在中性和弱碱性环境下能够正常生长，而对酸性和强碱性环境有较高的敏感性。由图 6 可知，油豆角病害中的细菌在中性条件下，生长良好，偏酸或偏碱的条件下都会对该菌有抑制作用，在 pH 为 11 时抑菌作用最明显，所以可以采用碱性保鲜剂进行保鲜，既可以抑制霉菌又可以抑制细菌。

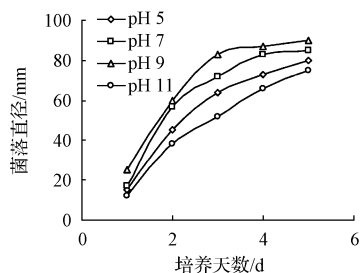


图 5 不同 pH 环境对灰霉菌落生长的影响  
Fig. 5 Effect of different pH on growth of mold

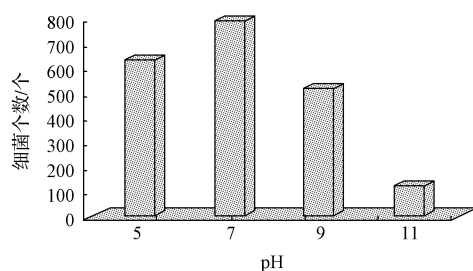


图 6 不同 pH 环境对细菌生长的影响

Fig. 6 Effect of different pH on growth of bacteria

2.2.2 壳聚糖对病原菌生长的影响 壳聚糖是一种优良的保鲜材料，由于其来源广泛、天然、无毒副作用及涂膜保鲜简单易行等优点受到国内外的广泛研究。壳聚糖作保鲜剂，在果蔬保鲜中应用广泛<sup>[6-8]</sup>。由图 7 可知，壳聚糖对霉菌有明显的抑制作用，且浓度越大，抑菌的效果越好。当浓度为 2.0% 时，抑菌率为 73%，2.5% 时抑菌率只增加了 2%，考虑到壳聚糖浓度太大会使油豆角造成无氧呼吸，因此选择最佳抑菌浓度为 2.0%。由图 8 可知，壳聚糖同样对细菌有明显的抑菌作用，且 2.0% 的浓度和 2.5% 的浓度抑菌效果无明显差异。综合考虑，2.0% 的壳聚糖浓度抑菌效果最理想。

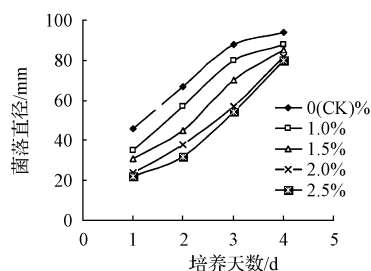


图 7 不同壳聚糖浓度对灰霉菌落生长的影响  
Fig. 7 Effect of different chitosan concentrations on growth of mold

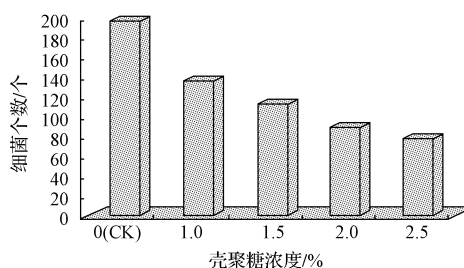


图 8 不同壳聚糖浓度对细菌生长的影响  
Fig. 8 Effect of different chitosan concentrations on growth of bacteria

2.2.3 不同压强处理对病原菌生长的影响 减压贮藏是把贮藏场所的气压降低，形成一定的真空度，使密闭容器内空气的各种气体组分的分压都相应降低，氧分压也相应降低，该环境能有效阻止细菌和霉菌的活动<sup>[9-11]</sup>。由图 9 可知，压力降低对灰霉菌生长具有明显的抑制作用，且压力越低，抑菌效果越好。病原菌在 PDA 上培养 5 d，用 20 kPa 压力处理的霉菌，其生长抑制率最高。同样，由图 10 可知，用 20 kPa 压力处理的细菌，其生长抑制率最高。但是，考虑到实际操作的可操作性，以 40 kPa 的压力处理对抑制病原菌生长较好。

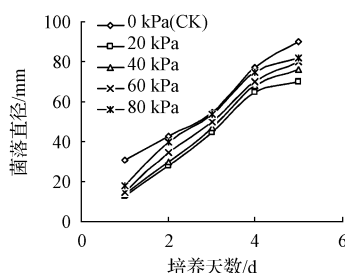


图 9 不同压强处理对灰霉菌落生长的影响  
Fig. 9 Effect of different pressures on growth of mold

2.2.4 臭氧处理时间对病原菌生长的影响 臭氧是一种强氧化剂，对细菌、霉菌和病毒均有良好的杀灭作用<sup>[12]</sup>，同时不存在残留物。由图 11 可知，臭氧具有抑制病原菌生长的作用，臭氧处理时间越长，抑菌效果越好。病原菌在 PDA 上培养 5 d，处理 8 和 10 min，臭氧抑菌效



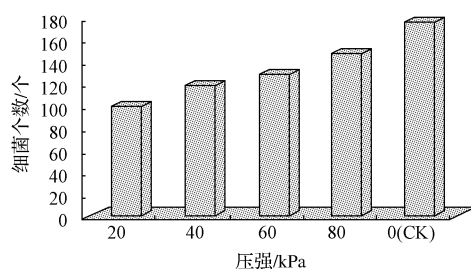


图 10 不同压强处理对细菌生长的影响

Fig. 10 Effect of different pressures on growth of bacteria

果较好。而抑制细菌同样是臭氧处理时间越长,抑菌效果越好,且处理 10 min 的效果最好。所以综合考虑,用臭氧处理 10 min 可以既抑制细菌又抑制霉菌,达到理想的效果。

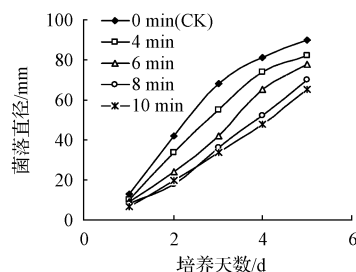


图 11 臭氧处理时间对灰霉菌落生长的影响

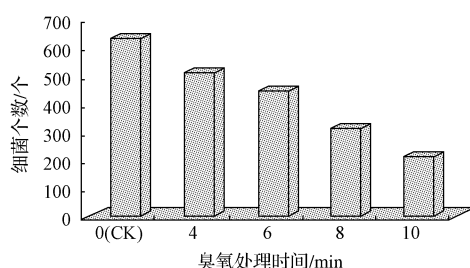
Fig. 11 Effect of different treatment time of O<sub>3</sub> on growth of mold

图 12 臭氧处理时间对细菌生长的影响

Fig. 12 Effect of different treatment time of

O<sub>3</sub> on growth of bacteria

### 2.2.5 不同浓度的 1-MCP 处理对病原菌生长的影响

1-MCP 是一种优良的保鲜剂,可以有效的延长果蔬的贮藏期,保持其良好的品质。由图 13 可知,1-MCP 对霉菌生长有明显的抑菌作用,且浓度越大,抑菌效果越好。当浓度为 30 和 40 mg/L 时抑菌效果无显著差异。由图 14 可知,1-MCP 同样对细菌有明显的抑制作用,且浓度为 40 mg/L 效果最好。综合考虑,40 mg/L 的 1-MCP 抑菌效果最理想。

## 3 结论

该试验结果表明,引起油豆角贮藏期间腐败变质的病原菌是野油菜黄单胞杆菌和菜豆灰霉病菌。菜豆灰霉病菌在中性和弱碱性条件下均能很好的生长,而对强

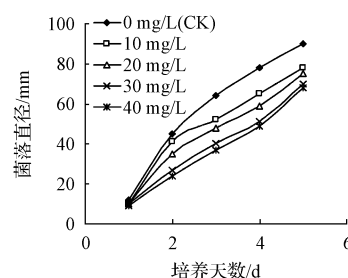


图 13 不同浓度 1-MCP 对灰霉菌落生长的影响

Fig. 13 Effect of different concentrations of 1-MCP on growth of mold

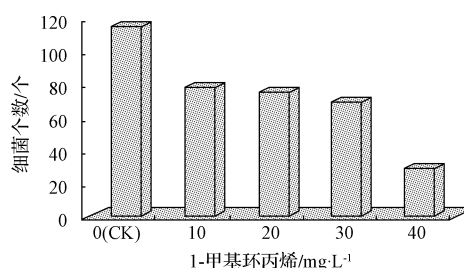


图 14 不同浓度 1-MCP 对细菌生长的影响

Fig. 14 Effect of different concentrations of 1-MCP on growth of bacteria

碱和酸性的环境具有较高的敏感性。而黄单胞杆菌在中性环境下生长良好,偏酸或偏碱的条件下都会对该菌有抑制作用。壳聚糖对黄单胞杆菌和菜豆灰霉病菌均有明显的抑制作用,但是高浓度的壳聚糖会造成油豆角的无氧呼吸,对油豆角的保鲜不利,最终采用 2.0% 的浓度效果较好。臭氧对该病原菌有强烈的杀灭性,臭氧处理 10 min 杀灭黄单胞杆菌和灰霉菌的效果显著。减压能抑制病原菌的生长,且压力越低效果越好,考虑到实际操作可行性,以压力 40 kPa 较为理想。1-甲基环丙烯是良好的保鲜剂,对野油菜黄单胞杆菌和菜豆灰霉病菌均有一定的抑制作用,且 40 mg/L 的 1-MCP 抑菌效果最理想。

## 参考文献

- [1] 鲍庆海,夏顺青,朱爱云,等. 绿色蔬菜品种紫花油豆角[J]. 中国种业,2001(4):37.
- [2] 唐慧敏. 油豆角采后生理及贮藏技术的研究[D]. 北京:中国农业大学,2003.
- [3] 陈曦. 贮藏冷油豆角保鲜试验研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [4] Buchanan R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所,《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译. 北京:科学出版社,1984:313.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982:566-567.
- [6] 连玉晶. N,O-羧甲基壳聚糖涂膜保鲜剂在油豆角上的应用研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [7] Reddy M V B, Belkacemi K, Corcuff F, et al. Effect of pre-harvest chitosan sprays on postharvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of straw harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruits

[J]. Postharvest Biol Tech, 2000(20):39-51.

[8] 吴永根,陈金印. 壳聚糖在果蔬保鲜上的应用现状及前景[J]. 食品与发酵工业, 2002(12):52-56.

[9] 谢启军,林奇. 减压保鲜技术的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3):294-296.

[10] 曹志敏,张平,王莉,等. 减压对冬枣生理生化变化的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10):250-252.

[11] 韩军岐,张有林. 蒜薹减压贮藏技术研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(2):222-225.

[12] 洪伯铿,郭春锋,王红梅,等. 涂膜与臭氧杀菌在油豆角保鲜中的应用研究[J]. 食品科技, 2004(11):84-86.

[13] Serek M, Sisler E C, Reid M S. Novel gaseous ethylene binding inhibitor prevents ethylene effects in potted flowering plants[J]. Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(6):1230-1233.

## Study on Isolation and Identification of Disease and Green Precautionary Methods in Storage of Oil Beans

DIAO Xiao-qin, GUAN Hai-ning

(College of Food and Pharmaceutical Engineering, Suihua College, Suihua, Heilongjiang 152061)

**Abstract:** Taking oil beans in Heilongjiang province as material, the disease was isolated and identified, and the inhibitory effect of  $O_3$ , pressure, chitosan and 1-MCP on mycelia growth were studied. The results showed that main pathogens were wild rapeseed yellow aeromonas and bean gray mold pathogen. Bean gray mold could grow well in the neutral and alkaline conditions and were highly sensitive to alkali and acidic environment. Yellow aeromonas grew well in a neutral environment, partial acid or alkali conditions would have the inhibition to the bacteria. The inhibitory action of chitosan on yellow aeromonas and gray mold was conspicuous, and the effect was good when chitosan concentration for 2.0%. The effect of sterilization by 10 minutes ozone treatment on the pathogen was obvious. Reduced pressure could inhibit the growth of pathogens, the inhibiting effect was optimal when the pressure dropped to 40 kPa. 1-methyl ring propylene was good preservative. The pathogens inhibitory effect was optimal when 1-MCP concentration 40 mg/L.

**Key words:** oil beans; storage period; disease; green prevention and control technology

## 花青素小常识

花青素又称花色素,是自然界一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,属类黄酮化合物。也是植物花瓣中的主要呈色物质,水果、蔬菜、花卉等五彩缤纷的颜色大部分与之有关。花青素存在于植物细胞的液泡中,可由叶绿素转化而来。在植物细胞液泡不同的 pH 条件下,使花瓣呈现五彩缤纷的颜色。秋天可溶糖增多,细胞为酸性,在酸性条件下呈红色或紫色,所以花瓣呈红、紫色是花青素作用,其颜色的深浅与花青素的含量呈正相关性,可用分光光度计快速测定,在碱性条件下呈蓝色。花青素的颜色受许多因子的影响,低温、缺氧和缺磷等不良环境也会促进花青素的形成和积累。

目前食品工业上所用的色素多为合成色素,几乎都有不同程度的毒性,长期使用会危害人的健康,因此天然色素就越越来越引起了科研领域的关注:由于至今国内市场上还没有花青素纯品,所以提取高纯度的花青素对花色苷类色素的深入研究与开发提供必备的表征条件和理论依据,并且有助于它的工业利用。由于没有市场还没有出现花青素纯品,因此需要摄入花青素,那么目前只能通过食补的方式了,譬如食用蓝莓、草莓、葡萄、紫玉米等获得。

花青素是纯天然的抗衰老的营养补充剂,研究证明是当今人类发现最有效的抗氧化剂,它的抗氧化性能比维生素 E 高出 50 倍,比维生素 C 高出 20 倍。它对人体否认生物有效性是 100%,服用后 20 min 就能在血液中检测到。

花青素在欧洲,被称为“口服的皮肤化妆品”尤其蓝莓花青素,营养皮肤,增强皮肤免疫力,应对各种过敏性症状。是目前自然界最有效的抗氧化物质。它不但能防止皮肤皱纹的提早生成,还可维持正常的细胞连结、血管的稳定、增强微细血管循环、提高微血管和静脉的流动,进而达到异常皮肤的迅速愈合。花青素是天然的阳光遮盖物,能够防止紫外线侵害皮肤,皮肤属于结缔组织,其中所含的胶原蛋白和硬性蛋白对皮肤的整个结构起重要作用。增强视力,消除眼睛疲劳;延缓脑神经衰老;对由糖尿病引起的毛细血管病有治疗作用;增强心肺功能;预防老年痴呆。

为了正确引导消费者如何使用具有花青素产品,许多花青素研发机构也纷纷发表文章,提醒消费者正确对待消费,不要盲目追求花青素产品,如果使用或者食用合成的花青素产品过多,对身体反而会产生副作用,结果得不偿失。