

# 苹果采后病害拮抗细菌的筛选与防腐效果研究

全桂静

(沈阳化工大学 制药与生物工程学院, 辽宁 沈阳 110142)

**摘 要:**采用平板分离法从健康的“红富士”苹果果皮筛选到3株拮抗细菌,通过活体试验和离体试验研究了拮抗细菌对青霉的抑制作用。结果表明:3株细菌都具抑菌活性,其中菌株BF-2的防效可达87.6%,而对峙试验中菌株BF-3的抑制率达33.3%。利用牛肉膏蛋白胨液体培养基发酵拮抗细菌,发现发酵液具抑菌活性,其中BF-3发酵液的抑菌圈为27.4 mm,且发酵时间和温度对抑菌活性有影响。

**关键词:**生物防治;细菌;青霉;苹果;采后病害

**中图分类号:**S 661.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0130-03

果蔬采后病害导致的巨大损耗已成为一个全球关注的问题。在发达国家约有10%~30%的新鲜果品由于采后病害导致腐烂损失,而在缺乏贮运冷藏设备的发展中国家,腐烂损失率则更高,达40%~50%<sup>[1]</sup>。目前,果蔬采后病害的防治方法主要包括低温防病、气调贮藏、热处理及化学杀菌剂处理等,其中物理方法的成本较高,而化学杀菌剂处理存在一定的安全问题<sup>[2-3]</sup>。

生物防治主要是通过采用拮抗微生物来抑制病菌或降低接种物的密度,以减轻病害,也可利用动植物产生的自然抗病物质或诱导寄主产生抗性达到抑菌目的<sup>[4]</sup>。生物防治没有化学防腐保鲜带来的环境污染、农药残留及连续使用产生抗药性的问题,具有贮藏条件易控制、可避免紫外线和干燥的破坏作用等优点,因此其将成为果蔬采后病害防治的主要手段<sup>[5]</sup>。从果蔬表面筛选的拮抗细菌对果蔬采后的病害具有一定的防治作用。辽宁省是苹果的种植大省,年产量较高,但也受到采后病害的影响。该试验从辽宁瓦房店市采集的“红富士”苹果上分离了3株拮抗细菌,通过活体和离体试验,研究了拮抗细菌对青霉的抑制作用,以为苹果采后病害的生物防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试苹果品种为“红富士”,产自瓦房店市。选成熟度好、直径为85 cm左右、无病虫害的果实备用。

培养基配方:牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):牛肉膏3 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,pH 7.2~7.4。PDA培养基

(g/L):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,pH自然。

### 1.2 试验方法

1.2.1 苹果病害菌—青霉菌的筛选 用接种环从苹果的伤口处挑取病原菌的孢子,于PDA培养基平板上划线分离,28℃培养3 d,观察菌落特征及利用生物显微镜观察孢子器的形态<sup>[6]</sup>。

1.2.2 拮抗细菌的筛选 称取10.0 g果皮加入装有90 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基的250 mL三角瓶中,同时加入4 000单位的制霉菌素,于28℃、200 r/min条件下振荡富集培养48 h。采用10倍稀释法对富集培养液进行稀释,分别取 $0.2 \times 10^{-5}$ 、 $0.2 \times 10^{-6}$ 、 $0.2 \times 10^{-7}$  mL富集培养的稀释液涂布于牛肉膏蛋白胨固体平板上,30℃下培养36 h,挑取培养特征各异的单菌落进行平皿划线。从培养过的培养皿中选取分离较好、形态各异的细菌菌落转接斜面<sup>[6]</sup>。利用牛肉膏蛋白胨液体培养基扩大培养筛选到的拮抗菌株,取1 mL菌液与 $10^7$ 个/mL病原青霉的单孢子悬液混合后,涂布于牛肉膏蛋白胨固体平板上,挑选抑菌效果好的拮抗细菌。

1.2.3 活体试验 拮抗细菌斜面培养36 h,用无菌水冲洗,配制成 $10^8$  CFU/mL的菌悬浮液备用。取外形无损、大小与成熟度接近且无病虫害的新鲜红富士苹果,用2% NaClO溶液表面消毒。晾干后,用手术刀片划出3 mm×3 mm的伤口,接种20  $\mu$ L约 $10^8$  CFU/mL的细菌悬浊液,35℃恒温2 h后再接种20  $\mu$ L  $5 \times 10^4$ 个/mL的病原菌孢子悬浮液;对照伤口分别接种病原菌和无菌水,晾干后将果实放入托盘上,置于相对湿度95%、温度28℃的霉菌培养箱中培养5 d。测定果实的发病情况和病斑直径,3次重复。酵母菌防效(%)=(对照病斑直径-处理病斑直径)/对照病斑直径×100%<sup>[6-7]</sup>。

1.2.4 离体试验 采用平板对峙法<sup>[8]</sup>,病原青霉于

**作者简介:**全桂静(1975-),女,辽宁沈阳人,硕士,讲师,现主要从事资源微生物方面的研究工作。E-mail:qgj\_8012@163.com。

**收稿日期:**2013-01-17

PDA 培养基平板上划线培养 1 d,在划线长菌处打取病原菌块,贴于 PDA 培养基平板中间;将拮抗细菌分别点植在牛肉膏蛋白胨培养基平板上,培养 1 d 后用打孔器打下菌落,贴于病原菌块四周,距离菌块 15 mm。以只贴有病原菌菌块的平板作为对照平板,测定拮抗细菌的生防效果。

1.2.5 拮抗细菌发酵液的抑菌研究 采用抑菌圈法<sup>[9]</sup>,用接种环取 1 环细菌,接种到装有 30 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的 50 mL 三角瓶中,35℃、150 r/min 恒温培养 36 h,5 000 r/min 离心 20 min,取其上清液;取 3 个牛津杯置于涂有病原菌孢子悬液的 PDA 培养基平板上,添加 200  $\mu$ L 拮抗细菌的发酵液,28℃ 培养 3 d,测定抑菌圈尺寸。另有一牛津杯添加无菌水作为对照。发酵时间对抑菌效果的影响:将 3 株拮抗细菌分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,35℃ 培养不同时间,离心所得发酵液进行抑菌试验,测定抑菌效果。发酵温度对抑菌效果的影响:将 3 株拮抗细菌分别接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于不同温度下进行培养,离心所得发酵液进行抑菌试验,测定抑菌效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗细菌的筛选

经过富集培养后,在牛肉膏蛋白胨固体平板上分离纯化得到 8 株细菌。经过与病原霉菌孢子混合培养后,发现有 3 株细菌的抑菌效果较好,分别命名为 BF-1、BF-2、BF-3。

### 2.2 活体条件下拮抗细菌对青霉的防治效果

由表 1 可知,筛选得到的 3 株细菌都具有抑制病原青霉生长的作用,但效果有差异,其中 BF-2 的防治效果最好。

表 1 活体条件下拮抗细菌对青霉的防治效果

Table 1 The control effect of the antagonist bacteria for the mold

处理	病斑直径/mm	防治效果/%
BF-1	15.2	46.3
BF-2	3.5	87.6
BF-3	5.7	79.9
病菌对照	28.3	—
无菌水对照	0	—

### 2.3 离体条件下拮抗细菌对青霉的防治效果

采用对峙试验方法检测筛选的拮抗细菌离体条件下的防治效果。由表 2 可知,离体条件下筛选到的 3 株拮抗细菌对病原青霉具有抑制作用,其中 BF-3 的作用

表 2 活体条件下拮抗细菌对青霉的抑制效果

Table 2 The inhibitory effect of the antagonist bacteria for the mold

菌株	菌圈生长大小/mm	抑菌率/%
对照	18	—
BF-1	13	27.8
BF-2	15	16.7
BF-3	12	33.3

效果突出。对峙试验结果与活体试验结果有差异,主要是由于 3 种拮抗细菌在苹果上的生长速率与在培养基上的生长速率存在差异导致的。

### 2.4 拮抗细菌发酵液的抑菌效果

拮抗细菌发酵过程中能产生一定的抑菌因子,具有防治青霉的作用。利用牛肉膏蛋白胨液体培养基发酵拮抗细菌,考察抑菌因子的产生能力,通过抑菌圈尺寸进行考察。从表 3 可以看出,3 株拮抗细菌的发酵液都具有防治青霉的作用,其中 BF-3 的效果最好。这一结果与对峙试验的结果基本相同,说明 BF-3 菌株在生长过程能产生大量的抑菌因子。

表 3 拮抗细菌发酵液对青霉的抑制效果

Table 3 The inhibitory effect of the antagonist bacteria fermentation broth for the mold

菌株	BF-1	BF-2	BF-3	对照
抑菌圈直径/mm	18.2	21.0	27.4	0

从图 1 可以看出,3 株拮抗细菌发酵液的抑菌效果有一定差异,发酵液中的抑菌因子形成高峰时间大致相同,基本上都在 36~40 h 之间。

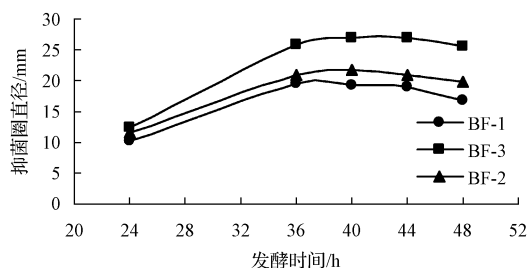


图 1 发酵时间对抑菌效果的影响

Fig. 1 Influence of fermentation time on the antibacterial effect

由图 2 可知,发酵温度对抑菌效果的影响较大,3 株拮抗细菌产生抑菌因子的适宜温度都为 38℃。

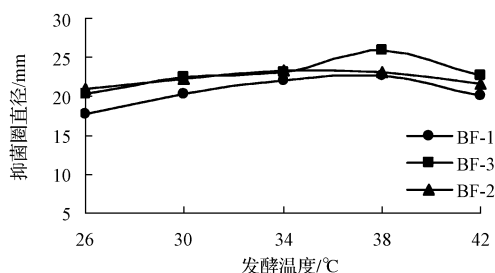


图 2 发酵温度对抑菌效果的影响

Fig. 2 Influence of fermentation temperature on the antibacterial effect

## 3 结论

从健康“红富士”苹果表面筛选到的 3 株拮抗细菌在活体及离体条件下均表现出明显的抑菌作用,但抑菌效果有差异,其中活体条件下 BF-2 的抑菌效果最好;而离体条件下 BF-3 的抑菌效果最好。主要是由于苹果和

牛肉膏蛋白胨培养基为拮抗菌提供的营养要素有差异,而不同细菌对营养的要求也是不同的,所以在离体和活体条件下产生的抑菌因子浓度有差异。

拮抗菌细胞用于水果保鲜存在诸多问题,如使用量、使用成本及细菌安全性等,考虑利用液体发酵形式生产抑制病原青霉的活性物质来保鲜水果。该试验结果表明,发酵液中确实有抑菌因子,且抑菌效果明显;3株拮抗菌的生防效果仍有差异,其中BF-3的抑菌效果最好,且在38℃下培养40h时,发酵液的抑菌效果达到最佳。

#### 参考文献

- [1] 范青,田世平,姜爱丽,等. 采摘后果实病害生物防治拮抗菌的筛选和分离[J]. 中国环境科学,2001,21(4):313-316.
- [2] 魏长宾,孙光明,李绍鹏,等. 水果贮藏保鲜研究进展[J]. 热带农业科学,2005,25(3):65-70.
- [3] 车建美,刘波,郑雪芳,等. 水果保鲜技术及其保鲜机理的研究进展[J]. 保鲜与加工,2012,12(1):44-50.

- [4] 安红波,李占双. 绿色农药的研究现状及进展[J]. 应用科技,2003,30(9):3.
- [5] 钟敏,赖崇德,涂国全. 链霉菌702发酵液对水果的防腐保鲜作用初探[J]. 江西农业大学学报,2005,27(1):27-30.
- [6] 巩文峰,马青. 3株拮抗酵母菌对苹果采后青霉病的防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(12):191-194.
- [7] 马瑜,李勃,田稼,等. 苹果采后病害拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 保鲜与加工,2010,10(20):39-43.
- [8] 张小舟,徐剑宏,李顺鹏. 植物生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定[J]. 土壤,2005,37(1):85-88.
- [9] 暴增海,蒋茜. 3株抗植物病原真菌的海洋细菌的分离筛选[J]. 河南农业科学,2002,21(2):181-186.
- [10] 周防震,彭振坤. 番茄早疫病拮抗菌酵母的筛选[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2003,21(4):2.
- [11] 谢昕,杨英歌,黄继翔. 植物病原真菌广谱拮抗菌的筛选鉴定及发酵条件初步研究[J]. 生物技术通报,2012(9):143-148.
- [12] 汪倬,王茅,周骏江. 抗黄瓜灰霉病菌生防放线菌的筛选及其抑菌机理的初步研究[J]. 农药科学与管理,2009,30(1):18-21.

## Study on Screening of Antagonistic Bacteria for Apple Postharvest Diseases and Biocontrol Efficacy

QUAN Gui-jing

(College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang, Liaoning 110142)

**Abstract:** 3 strains of antagonistic bacteria were screened from healthy 'Red Fuji' apple peel by the flat panel separation, and the inhibition of antagonistic bacteria to blue mould was studied through the living test and *in vitro* test. The results showed that the bacteriostatic effect was obvious; the control effect of strain BF-2 reached 87.6%, and the inhibition rate of BF-3 was 33.3% in the confrontation experiment. The antagonistic bacteria were fermented with the beef extract peptone liquid medium, and there was bacteriostatic factor in fermentation medium, and the diameter of bacteriostatic ring caused by strain BF-3 zymotic fluid was 27.4 mm. The antibacterial ability was affected by the fermentation time and temperature.

**Key words:** biological control; bacteria; blue mould; apple; postharvest diseases

## 食品有色彩吃法要科学 (二)

### 黑色食物:益脾补肝的女性食品

读一读中医书籍,你会发现很多黑色食物都是滋阴的佳品,比如黑木耳和蘑菇就是味道鲜美营养丰富的典型“女性食品”。黑木耳中含有天然激素,女运动员在大赛前1周连续吃黑木耳就可以成功地错过经期,让身体在比赛时处于最佳竞技状态。蘑菇中含有能促进皮肤新陈代谢和抗衰老的抗氧化物质一硒,它有助于加速血液循环,防止皱纹产生。另外,黑米中含有人体所需的18种氨基酸,还含有很高的铁、锰、钙、锌等多种微量元素,其营养成分远远高于普通稻米;黑豆还有预防肥胖和动脉硬化的功效;而黑芝麻中的维生素E含量极丰富,具有养颜润肤、益脾补肝、强身益寿的作用。

### 绿色食品:肠胃的天然“清道夫”

这是一个崇尚绿色的时代,人们满眼看到的都是对绿色食品的种种宣传,比如,人们已经知道大部分绿色的食物都含有纤维素,能清理肠胃防止便秘,减少直肠癌的发病。另外,经常吃绿色蔬菜能让人的身体保持酸碱平衡的状态,更大程度上避免癌症的发生。不仅如此,从心理方面讲,经常吃绿色食物还可舒缓压力并能预防偏头痛等疾病。关于绿色食品最新的发现是它对视力的好处,营养学家大力提倡多多摄入绿色尤其是深绿色水果蔬菜,因为绿色蔬果中有丰富的维生素A,而维生素A对我们的视力和身体大循环意义重大。所以,营养学家建议每天绿色蔬菜的摄入量应该至少在4种以上。