

# 地衣芽孢杆菌对香水百合生物保鲜的效应

向潇潇, 李姝江, 朱天辉, 譙天敏

(四川农业大学 林学院, 四川 雅安 625014)

**摘 要:**以从香水百合中分离得到的地衣芽孢杆菌为保鲜材料, 研究其对香水百合的生物保鲜效果; 通过百合形态指标的测定选取最佳保鲜液的浓度为 0.25% 原液和 0.25% 代谢液; 并对香水百合体内的花青素、SOD、MDA 的含量进行测定。结果表明: 此保鲜液能增加百合体内花青素的含量, 同时能抑制 SOD 活性的降低和 MDA 含量的增加。透射电镜观察显示, 经地衣芽孢杆菌保鲜液保鲜的百合切花茎切口导管较对照组的完整, 利于切花营养及水分的供给。

**关键词:**地衣芽孢杆菌; 香水百合; 鲜切花; 生物保鲜

**中图分类号:**S 482.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0134-04

香水百合(*Lilium casa blanca*)属百合科百合属植物, 又称卡萨布兰卡、天上百合。香水百合采收后其植物的生理会发生很大变化, 如花瓣呼吸增强、水解酶活性提高、MDA 含量显著增加、细胞膜稳定性遭到破坏等, 特别是水平衡失调, 乙烯大量产生和营养缺乏<sup>[1]</sup>, 导致香水百合的过早衰老, 因此对于香水百合保鲜研究显得尤为重要。目前, 花卉保鲜方法有物理保鲜、化学保鲜、生物保鲜。生物保鲜剂, 直接来源于生物体自身组成成分或其代谢产物, 具有无味、无毒、安全等特点, 并都可被生物降解, 不会造成二次污染<sup>[2]</sup>。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)为革兰氏阳性杆菌, 是芽孢杆菌中较具应用潜力的菌种之一<sup>[3]</sup>。迄今为止关于该菌的研究主要集中于发酵条件<sup>[4]</sup>、植物病害防治中的抗菌物质及其基因<sup>[5-8]</sup>、环境污染治理<sup>[9]</sup>、饲料加工<sup>[10]</sup>、医药<sup>[11]</sup>等方面, 将其应用于鲜切花生物保鲜方面尚鲜见报道。该试验采用从香水百合植物体内提取出的地衣芽孢杆菌对香水百合进行生物保鲜, 旨在为地衣芽孢杆菌运用于切花保鲜提供理论依据, 也为无毒、无污染的生物保鲜剂的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试香水百合切花“索帮”购自四川雅安市花卉市场, 切花产地为云南昆明, 花材均于当日从昆明转运至雅安。选取初开的香水百合蕾期切花, 其开放程度基本一致, 花

枝长 40~50 cm, 花茎粗壮挺直, 无病虫害和机械损伤。供试菌株: 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*), 分离于切花茎组织内部, 并对腐烂病菌有抑制作用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 保鲜浓度的筛选** 菌株发酵液制备: 将地衣芽孢杆菌从斜面转移至新的牛肉膏平板, 置于 28℃ 下培养 2 d, 用接种环挑取少量接种于灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基中(摇瓶容量为 300 mL, 装量为 100 mL)。28℃, 170 r/min 培养 3 d。代谢液的提取: 上述发酵液于 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用耐酸玻璃过滤漏斗( $G_5$ )进行真空无菌抽滤, 抽滤后的粗提液分别用 3 倍体积的甲醇萃取, 所得有机相经蒸发浓缩后与水相、原液一并作为待试保鲜液。保鲜液浓度筛选: 上述发酵液和保鲜液, 分别配置成浓度为 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%、0.45%、0.5% 的瓶插液(定容至 200 mL)。瓶口用塑料薄膜密封以减少水分蒸发。将处理好的花材插入三角瓶中, 每瓶 1 枝, 每处理重复 3 次。以自来水瓶插液为对照。试验花材置于室内通风处, 阳光充足但无直射光, 试验期间室温控制在 24.5~28℃, 相对湿度 57%~77%。

**1.2.2 生理指标测定** 花青素含量: 取 15 片等直径的花瓣圆片放于烧杯中, 加入 0.1 mol/L 盐酸 16 mL, 浸泡 6 h 后, 用分光光度计在 530 nm 处测定 OD 值<sup>[12]</sup>, 并以此表示花青素水平。每个处理 3 次重复, 统一取花朵由外向内第 6~10 片花瓣。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照王爱国等<sup>[13]</sup>的方法, 吸取 50  $\mu$ L 酶液, 加入 3 mL SOD 反应液(pH 7.8 磷酸缓冲液 1.5 mL, 130 mM Met 0.3 mL, 750  $\mu$ M NBT 0.3 mL, 100  $\mu$ M EDTA- $Na_2$  0.3 mL, 20  $\mu$ M FD 0.3 mL, 蒸馏水 0.3 mL), 4 000 lx 照光 30 min, 对照与酶液置于相同条件下照光, 空白置于

**第一作者简介:**向潇潇(1985-), 女, 硕士, 研究方向为园林植物保护。E-mail: lishujiangsumer@163.com.

**责任作者:**朱天辉(1963-), 男, 博士, 教授, 现主要从事园林植物保护学的教学与科研工作。E-mail: zhutianhui@yahoo.cn.

**收稿日期:**2012-09-11

暗处,用于调零,560 nm 比色;SOD 活性单位以抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活性单位表示。丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定<sup>[14]</sup>,测定时于不同瓶插时间(每隔 1 d),在花头各部取花瓣混合,称取 0.5 g 花瓣,在不同花枝上重复取样 3 次,2.0 mL 10% 三氯乙酸,再加少许石英砂,研磨成匀浆,分 3 次共加入 6.0 mL 10% 三氯乙酸继续冲洗研钵,洗涤液转入离心管中。5 000 r/min 离心 15 min,上清液即为酶的提取物。

1.2.3 茎切口扫描电镜观察 将所需的香水百合切花花茎横切后,立即用 2.5% 戊二醛(pH 7.0)固定过夜,然后用 pH 7.0 磷酸缓冲液冲洗并用 50%~100% 酒精脱水,将样品转入酒精与醋酸异戊酯混合液中(体积比为 1:1),最后放入 100% 醋酸异戊酯中。将浸透醋酸异戊酯的样品装入网篮,用 HCP-2 临界点干燥仪进行临界点干燥;干燥好的样品用 IB-5 离子溅射仪进行金属镀膜。样品制作完毕后,在扫描电镜上观察。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 软件进行整理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 保鲜液最优浓度的确定

用地衣芽孢杆菌制备生物保鲜制剂,经培养条件优化及浓度配比,确定最佳保鲜浓度为原液的 0.25% 和代谢的 0.25%,此浓度能有效延长百合切花的观赏期限。

### 2.2 保鲜液对百合切花衰老过程生理生化指标的影响

2.2.1 对花青素含量的影响 由图 1 可知,百合瓶插期间花瓣花青素含量先上升后下降,在前 3 d 花青素的含量基本相同。对照处理在瓶插第 3 天时达到最大值,此后一直处于下降趋势。代谢产物 0.25% 及原液 0.25% 处理于瓶插第 5 天达到最大值,此后缓慢下降,降幅明显小于对照组。这可能是由于代谢液中含有某些营养成分有助于花青素含量的保持。同时还可以看出,经原液 0.25% 及代谢液 0.25% 处理的百合中的花青素含量在整个瓶插期间均高于对照组的花青素含量。表明地衣芽孢杆菌代谢产物及原液 0.25% 浓度的处理可维持切花花青素含量的稳定,从而提高切花观赏品质。

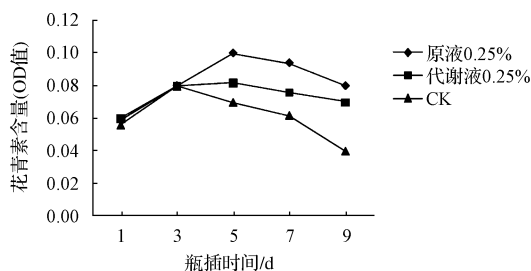


图1 保鲜液对切花花青素含量的影响

2.2.2 对 SOD 活性的影响 由图 2 可知,对照组的 SOD 活性在百合瓶插处理过程中呈下降趋势,而原

液 0.25% 浓度和代谢产物 0.25% 浓度处理的百合切花中 SOD 活性在瓶插的前 5 d 稍下降后一直呈上升趋势,其后才开始显著下降。并且在整个瓶插期,2 个处理组的百合切花中的 SOD 活性均比对照组的高。结果表明,经原液 0.25% 浓度及代谢产物 0.25% 浓度处理均能够有效增加 SOD 活性,增加切花清除超自由基的能力,减少花瓣中的活性氧伤害,从而减缓切花的衰老过程,可在一定程度上延长切花的寿命。

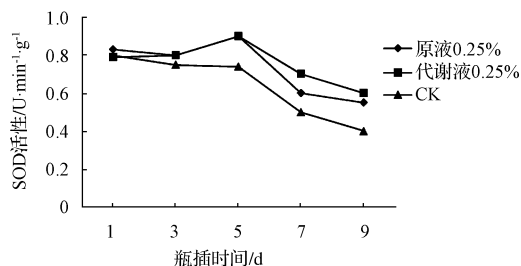


图2 保鲜液对切花 SOD 含量的影响

2.2.3 对 MDA 含量的影响 由图 3 可知,各处理 MDA 含量的变化规律基本一致,百合切花花瓣中 MDA 含量随着花朵衰老而增加,都处于上升趋势。原液 0.25% 浓度和代谢产物 0.25% 浓度的处理的切花 MDA 含量在整个瓶插期间均低于对照组,说明此处理能抑制植物体内膜脂过氧化物 MDA 的产生,能有效地减缓膜脂过氧化作用伤害,维持细胞膜结构的稳定性,对切花保鲜有一定的促进作用。

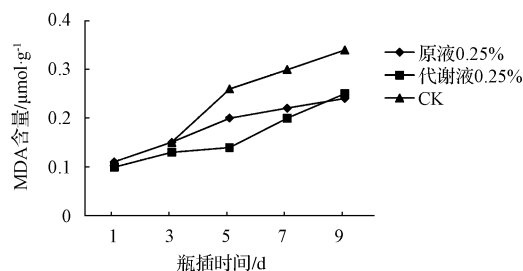


图3 保鲜液对切花 MDA 含量的影响

### 2.3 保鲜液对切花导管的影响

由图 4 可知,百合切花瓶插期间茎基部被堵塞,引起上端组织水分亏缺,导致切花最终衰老。新鲜的百合切花导管堵塞物较少,从而保障了植物供应养分及水分,而瓶插几天后的导管系统被堵塞,导管变形。经地衣芽孢杆菌保鲜液保鲜的百合切花在 8 d 后其导管中存在堵塞物,而对照组百合切花的导管受阻更为严重,表现在切花外部形态上,即此时对照组的百合切花已经萎蔫,失去观赏价值,而处理组切花仍具有一定的观赏性。

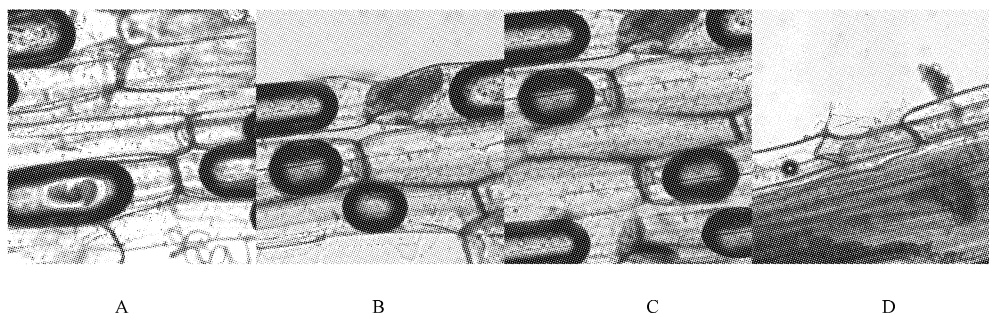


图5 扫描电镜下的百合茎切口形态特征比较

注:A:新鲜香水百合切花导管;B:0.25%原液瓶插8 d后导管;C:0.25%代谢液瓶插8 d后导管;D:对照瓶插8 d后导管。

### 3 结论与讨论

该试验中的最佳保鲜浓度为原液的0.25%,此结果与朱天辉等<sup>[15]</sup>的研究相符合,低浓度保鲜原液对切花保鲜有一定促生作用,而高浓度保鲜原液会加快切花的衰老萎蔫。此外,切花的色泽也是判断切花质量的标准,花青素是一种水溶性色素,是构成花瓣和果实颜色的主要色素之一<sup>[16]</sup>。因此,对香水百合花青素含量的测定也是检验保鲜效果的指标之一。该试验结果表明,百合花开前期花青素含量呈上升趋势,到盛花期含量达到最大值,之后开始下降;且处理组花瓣花青素含量高于对照,说明地衣芽孢杆菌处理后,可提高花瓣花青素的含量,从而提高切花的品质和观赏价值。SOD和MDA是反映植物体内自由基伤害、膜脂过氧化程度的常用生理指标。该试验用地衣芽孢杆菌菌液处理的SOD活性高于对照,而MDA含量低于对照,结合刘雅莉等<sup>[17]</sup>的报道,可以看出保鲜剂可增强SOD的活性,延缓MDA含量的增加,维持细胞膜结构的相对稳定性,从而减缓膜脂过氧化过程,减少对细胞膜的损伤,延迟切花的衰老。

切花离开母体后由于其环境发生了变化,从而引起导管形态的变化。Paul<sup>[18]</sup>认为,切花衰老的主要原因是花茎阻塞引起花瓣组织内部缺水,加重了切花的凋萎。切花采收后应及时置于水中,但插入水中的切花并不一定能保证水分的充分供应。该试验结果显示,地衣芽孢杆菌保鲜液能在一定的程度上抑制堵塞物的形成,为花瓣组织供应水分,延长切花寿命。

#### 参考文献

- [1] 李金枝,何光源.百合切花保鲜的研究进展[J].湖北农业科学,2008,47(6):720-722.
- [2] 熊涛,乐易林.生物保鲜技术的研究进展[J].食品与发酵工业,2004,

30(2):111-114.

- [3] 唐娟,张毅,李雷雷,等.地衣芽孢杆菌应用研究进展[J].湖北农业科学,2008,47(3):351-354.
- [4] 刘阳,谭明,潘宝平,等.一株地衣芽孢杆菌的性质研究及发酵培养基优化[J].安徽农业科学,2012,40(3):1348-1351.
- [5] Parini C, Fortina M G. Site-specific restriction endonucleases in *Bacillus licheniformis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 132(3): 285-289.
- [6] Kim Y, Cho J Y, Kuk J H, et al. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang[J]. Current Microbiology, 2004, 48(4): 312-317.
- [7] 齐东梅,梁启美,惠明,等.棉花枯萎、黄萎病拮抗芽孢杆菌的抗菌蛋白特性[J].微生物学通报,2005,32(4):42-46.
- [8] 唐丽娟,纪兆林,徐敬友,等.地衣芽孢杆菌W10对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J].中国生物防治,2005,21(3):203-205.
- [9] 丁海涛,李顺鹏,沈标,等.拟除虫菊酯类农药残留降解菌的筛选及其生理特性研究[J].土壤学报,2003,40(1):123-129.
- [10] 刘文斌,尹君,方星星,等.3种益生菌配伍对异育银鲫生长、消化及肠道菌群组成的影响[J].海洋与湖泊,2007,38(1):29-35.
- [11] 袁锦平.整肠生治疗慢性顽固性腹泻38例[J].现代医药卫生,2005,21(2):195.
- [12] 熊庆娥.植物生理学实验教程[M].成都:四川科学技术出版社,2003.
- [13] 王爱国,罗广华,邵从本,等.大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J].植物生理与分子生物学报,1983,9(1):77-84.
- [14] 邹琦.植物生理生化实验指导[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [15] 朱天辉,杨佐忠.切花生物保鲜剂的研究[J].四川林业科技,1999,20(1):6-7.
- [16] 马延蕊,张金文,梁慧光,等.植物花青素合成与基因调控[J].农业科学与技术,2012,13(3):507-511,540.
- [17] 刘雅莉,王飞,黄森.百合花朵不同发育期乙炔释放量与膜脂过氧化作用的研究[J].西北植物学报,1999,19(6):143-147.
- [18] Paul R N E, Chen N N J. Physiological changes of cut *Anthurium* and racemum during senescence[J]. HortScience, 1985, 110(2): 156-159.

## Effect of *Bacillus licheniformis* on Biological Preservation of *Lilium casa blanca*

XIANG Xiao-xiao, LI Shu-jiang, ZHU Tian-hui, QIAO Tian-min

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)



# 黄伞菌种培养基配方筛选研究

田景花, 杨旭, 李明, 李守勉

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

**摘 要:**选用 9 种母种培养基配方和 11 种原种培养基配方,研究了不同的菌种培养基对黄伞菌丝生长的影响;经过预备试验,观测黄伞菌丝的生长情况,以期筛选适合黄伞生长的母种和原种培养基配方。结果表明:不同配方的母种、原种培养基上菌丝生长存在显著差异,黄伞菌丝生长要求较低的氮浓度和较高的碳氮比。其中最合适黄伞菌丝生长的母种培养基为配方 2 和配方 4,在生产上,配方 2、4、1 均可选用。适合黄伞菌丝生长的原种培养基为配方 1、5、6。其中,配方 1 为麦粒培养基,成本较高,其中的菌丝老化较快,在生产上急需菌种时可选用。最适合生产上推广的原种培养基为配方 5,不仅原材料来源广泛,成本较低,而且菌丝生长速度快,老化慢,较耐贮存。

**关键词:**黄伞;菌丝生长速度;母种培养基;原种培养基

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)02-0137-04

黄伞(*Pholiota adiposa* (Fr.) Quél.)属球盖菇科鳞伞属真菌<sup>[1]</sup>,又名黄柳菇、多脂鳞伞、柳蘑、黄蘑、柳松菇、柳树菌等。黄伞子实体色泽鲜艳,菇质脆嫩,营养丰富,食之黏滑爽口,味道鲜美,风味独特。黄伞还具有很高的保健和药用价值,越来越受到人们的重视<sup>[2]</sup>。研究表明,黄伞子实体和菌丝体中粗蛋白、粗纤维和灰分的含量较高,粗脂肪含量较低,含有多种维生素、矿物质及氨基酸、多糖、麦角固醇等多种生物活性物质<sup>[3-4]</sup>。黄伞中所含的多糖、核酸等活性物质具有调节机体免疫力、抗肿瘤、降血脂、抗菌、抗氧化、抗衰老等生物活性<sup>[2,5-9]</sup>。是一种食药兼优、具有较高商品价值和推广前景的大型真菌。

黄伞是近年来河北省政府大力发展的珍稀食用菌

种类之一。由于黄伞栽培时间尚短,生产规模较小,技术仍不完善,远不能满足市场需求。目前,关于黄伞的研究大多集中在其营养、保健药用价值和液体发酵等方面,而有关黄伞育种和栽培技术方面研究较少,尤其是黄伞各级菌种培养基配方的研究鲜见报道。该试验旨在通过对黄伞母种、原种培养基配方进行比较研究,筛选出适合黄伞生产上使用的各级菌种培养基配方,从而推动黄伞栽培业的健康、持续发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株为“黄伞 1 号”,引自北京市农林科学院。

### 1.2 试验方法

1.2.1 母种培养基配制 以生产上常用的母种培养基原料为试材,通过预备试验,共设计 9 种母种培养基配方(表 1)。其中,配方 2~9 需要加入磷酸二氢钾 3 g,硫酸镁 1.5 g,维生素 B<sub>1</sub> 10 mg。采用直径 90 mm 的培养皿制作平板培养基。

1.2.2 原种培养基配制 以北方常见的棉籽壳、木屑、麦

**第一作者简介:**田景花(1969-),女,河北石家庄人,博士,副教授,现主要从事食用菌栽培及育种的教学与科研工作。E-mail:yytjh@hebau.edu.cn.

**基金项目:**河北省科学技术厅资助项目(08220201D)。

**收稿日期:**2012-09-17

**Abstract:** Using *Bacillus licheniformis* as the preservation material, the biological preservation of *Lilium casa blanca* were studied. Through the morphological index testing, the best preservation concentrations were fermentation liquid of 0.25% and metabolic liquid of 0.25%. The contents of anthocyanin and MDA, SOD activity were assessed, the results showed that the preservation liquid could increase the content of anthocyanin, as well as inhibiting the decrease of SOD activity and the increase of MDA content. TEM observation indicated that the duct of stem cut of lily cut-flower treated by the preservation liquid of *Bacillus licheniformis* was more complete than that of controls, which was beneficial to the nutrition and water supplies of cut-flower.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*; *Lilium casa blanca*; cut flowers; biological preservation