

陈忠杰,胡 燕. 枯草芽孢杆菌对板栗采后黑斑病的抑制效果[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):256-258.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.086

枯草芽孢杆菌对板栗采后黑斑病的抑制效果

陈忠杰,胡 燕

(河南牧业经济学院,河南郑州 450011)

摘要:将从发酵豆制品中分离出的枯草芽孢杆菌作为生防菌株,研究了该菌的菌悬液和培养液滤液对板栗采后黑斑病的抑制效果。结果表明,枯草芽孢杆菌菌悬液可以使板栗采后黑斑病的发病率降低约 75 百分点,其滤液也可以使板栗采后黑斑病的发病率降低约 45 百分点。这说明枯草芽孢杆菌可以显著降低板栗采后黑斑病的发病率,并且枯草芽孢杆菌的抑菌作用是通过菌体和代谢物质共同实现的,其代谢产物的抑菌效果比菌体强,起主要的抑菌作用。枯草芽孢杆菌可以作为一种新型的保鲜剂应用于板栗保鲜,对于减少板栗腐烂率、延长贮藏期、增加经济效益具有重要意义。

关键词:枯草芽孢杆菌;板栗;黑斑病;生物防治

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0256-03

板栗原产我国,是我国特色坚果之一,因其营养丰富,味道甘美,且有补肾益气、养胃健脾、活血止血、延缓人体衰老的功效而素有“干果之王”的美称^[1]。新鲜板栗含水量高,而且采后呼吸旺盛,在贮藏期间还易受到微生物的侵袭而产生霉变,因此板栗很不耐贮藏。中国板栗每年因贮藏不当或栗实霉烂而造成的损失可达板栗年总产量的 1/4 左右^[2]。板栗黑斑病的发生是造成板栗霉烂的重要原因之一。关于板栗的贮藏保鲜方法目前已有较多研究,主要有冷藏^[3]、化学防腐剂处理^[4-5]、热处理^[6]、涂膜^[7-8]等。这些方法在一定程度上确实能够延长板栗的贮藏期,减少因为霉烂而造成的经济损失,但是这些方法也有不足之处,如冷藏耗能高、成本高,热处理可能对板栗的质构和风味有一定影响,涂膜和化学防腐剂的使用有可能造成一定程度的食品安全隐患。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在自然界中广泛存在,对人畜无毒无害,不污染环境,能产生多种抗菌素和酶,具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力^[9]。枯草芽孢杆菌用于防治植物病害的作用已受到国内外的广泛认可,国内外均已有多以枯草芽孢杆菌开发的生物农药上市销售并推广到农业生产中。枯草芽孢杆菌应用于植物病害生物防治的研究已经有很多年的历史,目前在黄瓜、辣椒、水稻、小麦、玉米等农作物病害上显出较好的防治效果^[10]。但用枯草芽孢杆菌防治板栗黑斑病的研究还较少。本试验以采后的新鲜板栗为原料,研究了枯草芽孢杆菌对采后板栗黑斑病的抑制效果,以期对板栗的贮藏保鲜找到一个成本低、效果好并且安全环保的新方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌菌种由笔者所在实验室从发酵豆制品中分

离和保存;板栗,产地河南信阳,购于郑州市陈寨农产品批发市场;蛋白胨,郑州亚世生物技术有限公司生产;琼脂,郑州亚世生物技术有限公司生产;酵母浸膏,宜兴市江山生物制药有限公司生产;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

LHS-100CH 型恒温恒湿培养箱,上海一恒仪器有限公司生产;SHY-3 型水浴恒温振荡器,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂生产;722 型分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;YX280AS 手提式不锈钢压力蒸汽灭菌器,上海三申医疗器械有限公司生产;其他玻璃仪器均为河南铭骏仪器仪表有限公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 枯草芽孢杆菌菌种活化 分别称取蛋白胨 10.0 g,酵母浸膏 5.0 g,NaCl 10.0 g,1 L 蒸馏水,再调 pH 值至弱碱性,121 ℃湿热灭菌 20 min,配制好的 LB 液体培养基备用。用接种环挑取保存于固体斜面培养基上的枯草芽孢杆菌菌落 1~2 环,接种到配制好的 LB 液体培养基 100 mL 中,在 37 ℃左右的温度下振荡培养 24 h,得到活化菌悬液,备用。

1.3.2 枯草芽孢杆菌生长曲线的测定^[11] 分别准确吸取 1.0 mL 活化菌悬液(1×10^7 CFU/mL)于已装 50 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,在转速 150 r/min、37 ℃下恒温振荡培养。每隔 12 h 取出 2.0 mL 培养液于试管中,以不含菌 LB 液体培养基调零管,测定不同培养时间下 570 nm 处吸光度($D_{570\text{nm}}$)。浓度大的发酵液用 LB 液体培养基稀释适当倍数,使吸光度在 0.10~1.00 之间,将稀释液对应的吸光度乘以相应稀释倍数,换算成原发酵液吸光度,以培养时间为横坐标,570 nm 处吸光度为纵坐标,绘制枯草芽孢杆菌的生长曲线。

1.3.3 病原菌的分离 称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水 1 L,加琼脂 15 g,煮沸 0.5 h,纱布过滤,再加 10~20 g 葡萄糖,充分溶解后定容到 1 L,121 ℃灭菌 30 min,配制好 PDA 培养基备用。选择已产生严重斑点的黑斑病板栗病果为材料,将黑斑病板栗用小刀切成碎末,称取带菌板栗碎末

收稿日期:2014-02-21

作者简介:陈忠杰(1978—),男,河南商丘人,硕士,讲师,主要从事微生物资源的开发及利用研究。E-mail:chzhji@126.com。

5 g 于 30 mL 无菌水中,混合振荡 2 min,取一定稀释度的水洗液接种于已倒好 PDA 培养基的培养皿中,于 28 ℃ 左右的温度培养 5 d。再通过平板划线技术完成不同病菌种类的分离。将分离后的各种病原菌用 0.01% Tween80 无菌水溶液配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的孢子悬浮液,最后再等体积混合各种病原菌孢子悬浮液制成浓度为 5×10^4 个/mL 的混合病原菌孢子悬浮液。

1.3.4 枯草芽孢杆菌培养液对板栗黑斑病病菌的抑制作用

将枯草芽孢杆菌培养液分别按照 1:1 000、1:500、1:250 和 1:125 的比例加入到 30~40 ℃ 的 PDA 培养基中,摇动后倒入直径为 12 cm 的培养皿中,待培养基冷凝后,分别接种 10 μ L 浓度为 5×10^4 个/mL 的混合病原菌孢子悬浮液。接种后的培养皿放入 28 ℃ 的恒温培养箱中培养,以不加枯草芽孢杆菌培养液的为空白对照,各重复 3 次。培养 5 d 后测定菌落直径,计算平均抑制效果。

1.3.5 枯草芽孢杆菌培养液对采后板栗黑斑病的抑制作用

将分离后的各种病原菌用 0.01% Tween80 无菌水溶液配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的孢子悬浮液。灭过菌的打孔针在每个板栗仁上刺一个 3 mm(深)×3 mm(宽)的伤口,分别接种 20 μ L 枯草芽孢杆菌培养液,5 h 后再接种浓度为 5×10^4 个/mL 的混合病原菌孢子悬浮液 10 μ L。待伤口晾干后,将果实放于室温下贮藏,以不接种枯草芽孢杆菌培养液的板栗仁为空白对照,每隔 1 d 测定果实的发病率。

1.3.6 枯草芽孢杆菌代谢产物对板栗黑斑病病菌的抑制作用

将枯草芽孢杆菌培养液于 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,经过滤后得到滤液备用。将滤液分别按照 1:1 000、1:500、1:250 和 1:125 的比例加入到 30~40 ℃ 的 PDA 培养基中,摇动后倒入直径为 12 cm 的培养皿中,待培养基冷凝后,分别接种 10 μ L 浓度为 5×10^4 个/mL 的混合病原菌孢子悬浮液。接种后的培养皿放入 28 ℃ 的恒温培养箱中培养,以不加枯草芽孢杆菌培养液的为空白对照,各重复 3 次。培养 5 d 后测定菌落直径,计算平均抑制效果。

1.3.7 枯草芽孢杆菌代谢产物对采后板栗黑斑病的抑制作用

将枯草芽孢杆菌培养液于 4 ℃ 下 8 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液,经过滤后得到滤液备用。将分离后的各种病原菌用 0.01% Tween80 无菌水溶液配制成浓度为 5×10^4 个/mL 的孢子悬浮液。灭过菌的打孔针在每个板栗仁上刺一个 3 mm(深)×3 mm(宽)的伤口,分别接种 20 μ L 枯草芽孢杆菌培养液滤液,5 h 后再接种浓度为 5×10^4 个/mL 的混合病原菌孢子悬浮液 10 μ L。待伤口晾干后,将果实放于室温下贮藏,以不接种枯草芽孢杆菌培养液的板栗仁为空白对照,每隔 1 d 测定果实的发病率。

2 结果与分析

2.1 枯草芽孢杆菌生长曲线的绘制

任何生物都有出生、发育、繁殖、衰老和死亡的过程。微生物也不例外。不过,微生物的生长规律和大生物有些不同,大生物通常是以一个个体为对象,而微生物的生长通常指细胞数目的增加。微生物的生长规律可以用生长曲线来呈现。典型的微生物生长曲线一般包括延滞期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段。由图 1 可以看出,因测定间隔时间较长,枯草

芽孢杆菌生长的延滞期不太明显,曲线中没有呈现出来,接种后很快就进入快速生长的对数期,大概 24 h 后开始进入稳定生长期,培养时间大于 60 h 后,细胞数目开始减少,菌体开始衰老死亡。根据这个枯草芽孢杆菌生长曲线所呈现出的生长规律,选择菌种活化后 24 h 的菌悬液进行抑菌研究,因为这个时期的枯草芽孢杆菌生长旺盛,活力强。

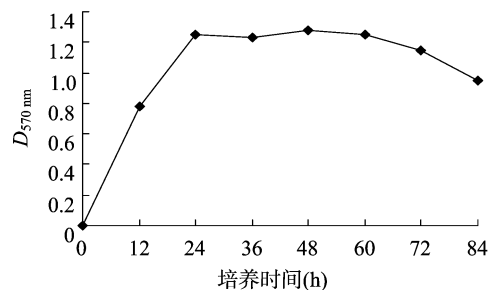


图1 枯草芽孢杆菌生长曲线

2.2 枯草芽孢杆菌培养液对板栗黑斑病病菌的抑制作用

试验测定结果表明,当枯草芽孢杆菌培养液的添加量为 0 时,病原菌菌落直径为 36.8 mm;当枯草芽孢杆菌培养液的添加量为 1:1 000 时,病原菌菌落直径为 25.3 mm;当枯草芽孢杆菌培养液的添加量为 1:500 时,病原菌菌落直径为 8.6 mm;当枯草芽孢杆菌培养液的添加量为 1:250 和 1:125 时,病原菌都没有生长。由此可见,枯草芽孢杆菌添加量越大,对病原菌的抑制效果越好。当枯草芽孢杆菌的添加量大于 1:250 时,就能够抑制板栗黑斑病病原菌的生长,并且抑菌效果能达到 100%。

2.3 枯草芽孢杆菌培养液对采后板栗黑斑病的抑制作用

由图 2 可见,与不加枯草芽孢杆菌培养液的空白对照相比,添加了枯草芽孢杆菌培养液的板栗接种病原菌后在贮藏过程中发病率明显要低很多。不加枯草芽孢杆菌培养液的板栗接种病原菌后发病很快,2 d 之后病原菌的生长就进入快速生长对数期,大量板栗开始发病,4 d 后,发病板栗基本上占到了 90%,7 d 后发病率达到了 95%。而添加了枯草芽孢杆菌培养液的板栗,在贮藏过程中板栗发病的速度相比要慢得多,而且一直维持缓慢增长的趋势,贮藏 4 d 后,发病率大概只有 10%,贮藏 7 d 后发病的板栗也只有不到 20%,比不加枯草芽孢杆菌培养液的板栗发病率降低了约 75 百分点。这说明枯草芽孢杆菌培养液能够显著抑制板栗采后黑斑病的发生。

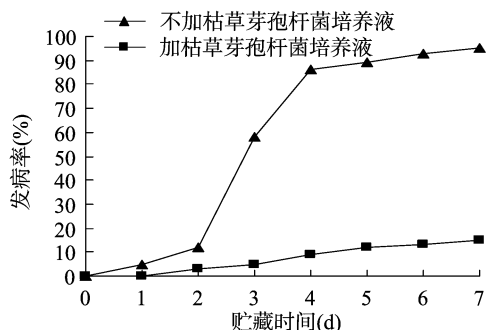


图2 枯草芽孢杆菌培养液对板栗采后黑斑病的抑制作用

2.4 枯草芽孢杆菌代谢产物对板栗黑斑病菌的抑制作用

试验测定结果表明,当枯草芽孢杆菌培养液滤液的添加量为 0 时,病原菌菌落直径为 38.2 mm;当枯草芽孢杆菌培养液滤液的添加量为 1:1 000 时,病原菌菌落直径为 29.5 mm;当枯草芽孢杆菌培养液滤液的添加量为 1:500 时,病原菌菌落直径为 15.8 mm;当枯草芽孢杆菌培养液滤液的添加量为 1:250 时,病原菌菌落直径为 7.5 mm;当枯草芽孢杆菌培养液滤液的添加量为 1:125 时,病原菌没有生长。由此可见,枯草芽孢杆菌的代谢产物也对病原菌的生长有一定的抑制作用。枯草芽孢杆菌代谢产物添加量越大,对病原菌的抑制效果越好。当枯草芽孢杆菌代谢产物的添加量大于 1:125 时,就能够抑制板栗黑斑病病原菌的生长,并且抑菌效果能达到 100%。对比枯草芽孢杆菌培养液对板栗黑斑病病菌的抑制作用试验结果可以看出,滤液的抑菌效果不如菌悬液显著。这可能是因为枯草芽孢杆菌的抗生作用是由芽孢杆菌及其代谢物质两部分作用共同构成的^[12]。

2.5 枯草芽孢杆菌代谢产物对采后板栗黑斑病的抑制作用

由图 3 可见,与空白对照相比,添加了枯草芽孢杆菌培养液滤液的板栗接种病原菌后发病率明显低于不添加枯草芽孢杆菌培养液滤液的板栗。不加枯草芽孢杆菌培养液滤液的板栗接种病原菌后发病很快,2 d 之后病原菌的生长就进入快速生长对数期,大量板栗开始发病,4 d 后,发病板栗就达到了约 90%。而添加了枯草芽孢杆菌培养液的板栗,在贮藏过程中发病速度要慢得多,而且一直维持缓慢增长的趋势,贮藏 7 d 后,发病板栗约 50%,比空白对照发病率低约 45 个百分点。这说明枯草芽孢杆菌代谢产物也能够显著抑制板栗采后黑斑病的发生。但是对照枯草芽孢杆菌培养液对采后板栗黑斑病的抑制作用试验结果可以看出,枯草芽孢杆菌培养液滤液的抗病效果没有菌悬液的抗病效果显著。这进一步印证了枯草芽孢杆菌的抗生作用是由芽孢杆菌及其代谢物质两部分作用共同构成的,单纯的代谢产物虽然也有抗病作用,但是效果不如既有菌体也有代谢产物存在的情况下好。

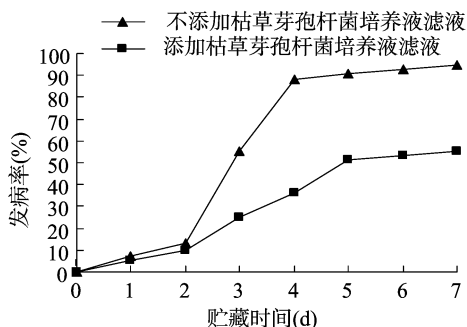


图3 枯草芽孢杆菌代谢产物对板栗采后黑斑病的抑制作用

3 结论

应用芽孢杆菌防治植物病害具有悠久的历史,许多优良菌株已应用于生产实践来防治果蔬、作物等的真菌、细菌病害^[13]。其中,枯草芽孢杆菌以其安全、对人畜无害、不污染环境的特点,广泛用于果蔬采后生物防治,如有文章报道,利用枯草芽孢杆菌可以防治桃褐腐病和荔枝果腐病^[14]。

陈坤等对信阳板栗 7 种病原真菌进行了生物学研究,认为微生物感染板栗果实,形成黑斑病,对板栗黑斑病进行病菌分离和鉴定,发现信阳板栗黑斑病常见 7 种病菌真菌,分别为炭疽菌(*Collectotrium* sp.)、镰孢菌(*Fusarium* sp.)、枝孢霉(*Cladosporium* sp.)、毛霉(*Mucor*)、疫霉(*Phytophthora pasitica*)、大茎点菌(*Macrophoma* sp.)和黄曲霉(*Aspergillusflavus*)^[15]。试验结果表明,枯草芽孢杆菌可以抑制板栗病原菌的生长繁殖,进而显著降低板栗采后黑斑病的发病率。枯草芽孢杆菌菌悬液可以使板栗采后黑斑病的发病率降低约 75 百分点,其滤液也可以使板栗采后黑斑病的发病率降低约 45 百分点。这说明枯草芽孢杆菌的抑菌作用是通过菌体和代谢物质共同实现的,而且其代谢产物的抑菌效果比菌体还要强,起主要的抑菌作用。由此也找到一条板栗采后保鲜的新途径,可以为我国板栗在贮藏过程中延长贮藏期、降低腐烂率、提高经济效益方面提供帮助。

参考文献:

- [1] 王海霞,刘正坪,朱晓清,等. 板栗贮藏期致病病原真菌种类鉴定及其侵染特性[J]. 北京农学院学报,2006,21(4):33-36.
- [2] 吴小芹,林海燕,熊春红,等. 贮藏方式对板栗品质及其微生物种类数量消长的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2001,25(3):47-51.
- [3] 鲁周民,吴万兴,李文华,等. 板栗低温冷藏工艺及 HACCP 质量控制研究[J]. 食品科学,2003,24(8):146-148.
- [4] 丛永亮,鲁周民,段振军,等. 焦亚硫酸钠水浴处理对板栗贮藏效果的影响[J]. 食品科学,2008,29(5):449-452.
- [5] 池明,鲁周民,刘驰晏,等. 水杨酸处理对板栗冷藏品质及呼吸强度的影响[J]. 食品工业科技,2010,31(1):347-349,353.
- [6] 蒋依辉,钟云,陈金印. 热处理对板栗贮藏过程中部分生理指标与贮藏效果的影响[J]. 果树学报,2004,21(3):237-240.
- [7] 徐芬芬,叶利民. 壳聚糖涂膜板栗贮藏试验[J]. 中国果树,2010(5):33-36.
- [8] 李莉,刘兴华. 液膜处理对板栗贮藏效果影响[J]. 食品工业,2009(3):38-40.
- [9] 黄海婵,裘娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学,2005(3):213-215,219.
- [10] 刘雪,穆常青,蒋细良,等. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用[J]. 中国生物防治,2006(增刊1):179-184.
- [11] 陈洁,黄佩佩,宋茹. 枯草芽孢杆菌发酵鱼蛋白制备抗氧化型发酵液工艺的初步研究[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版,2011,30(3):254-258.
- [12] 王东昌,辛玉成,郝寿青,等. 板栗烂果病的生物防治研究[J]. 中国果树,2001(3):10-12.
- [13] Chen Z Y, Zhang J, Huang D F. Research progress on antimicrobial mechanism genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol[J]. Acta Phytopathol Sin,2003,33(2):97-103.
- [14] 齐东梅,惠明,梁启美,等. 枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果[J]. 应用与环境生物学报,2005,11(2):171-174.
- [15] 谭正林,王利兵. 板栗贮藏病害及防治技术[J]. 湖北植保,2009,113(3):53,56.