

黑曲霉拮抗细菌的筛选、鉴定和生防条件优化

徐晓裕, 李 甜, 史学伟, 王 斌

Screening, Identification and Optimization of Biocontrol Conditions for Antagonistic Bacteria of *Aspergillus niger*

XU Xiaoyu, LI Tian, SHI Xuwei, and WANG Bin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021090271>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

果蔬保鲜中拮抗菌生物防治研究进展

Research Progress on Microbial Antagonist Control of Biological Preservation of Fruits and Vegetables

食品工业科技. 2021, 42(19): 383-394

一株拮抗酿酒葡萄灰霉病的枯草芽孢杆菌T3筛选、鉴定及抑菌分析

Screening and Identification of Antagonistic *Bacillus subtilis* T3 against Wine Grape Gray Mold and Analysis of Its Antimicrobial Activity

食品工业科技. 2020, 41(23): 99-105,113

桃果实褐腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其拮抗活性

Isolation and identification of antagonistic bacteria against peach brown rot and its antibacterial activity

食品工业科技. 2017(09): 128-132

市售草莓腐败菌的分离鉴定及拮抗酵母的筛选

Isolation and Identification of Spoilage Organism in Strawberry and Screening of Antagonistic Yeast

食品工业科技. 2020, 41(1): 98-104

采后番木瓜果实炭疽病原菌分离鉴定及其拮抗菌的筛选

Isolation and Identification of Anthracnose Pathogen in Postharvest Papaya Fruits and Screening of the Antagonistic Bacteria

食品工业科技. 2020, 41(6): 111-118,130

96孔板法筛选抗黑曲霉性乳酸菌及抑菌机理研究

Screening and inhibition mechanism of lactic acid bacteria against *Aspergillus niger* using 96-well microtiter plates

食品工业科技. 2017(12): 171-175



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

徐晓裕, 李甜, 史学伟, 等. 黑曲霉拮抗细菌的筛选、鉴定和生防条件优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 132–138. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090271

XU Xiaoyu, LI Tian, SHI Xuewei, et al. Screening, Identification and Optimization of Biocontrol Conditions for Antagonistic Bacteria of *Aspergillus niger*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 132–138. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090271

· 生物工程 ·

黑曲霉拮抗细菌的筛选、鉴定和生防条件优化

徐晓裕, 李甜, 史学伟, 王斌*
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要:为筛选出对葡萄贮藏中污染黑曲霉具有良好抑制作用的拮抗菌, 本研究通过平板稀释法从土壤中筛选出对葡萄采后引起霉菌病变的黑曲霉有较强抑菌作用的菌株, 采用形态学和分子生物学相结合的方式对拮抗细菌进行鉴定, 并使用单因素和正交试验方法优化其生防条件。结果表明: 本研究从新疆葡萄园土壤中分离到 14 株对黑曲霉具有抑菌效果的细菌, 其中, 菌株 G8 对黑曲霉的抑菌效果最佳。经鉴定, 黑曲霉拮抗细菌 G8 为暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*)。暹罗芽孢杆菌 G8 最佳生防条件为: 接种量 3%, 培养基初始 pH 为 7, 培养温度为 33 ℃, 培养温度摇床转速为 160 r/min, 培养时间为 33 h, 该条件下抑菌直径达到 28.79 mm。研究结果将为拮抗细菌在葡萄采后黑曲霉生物防治中的应用提供理论依据。

关键词:拮抗菌, 生物防治, 黑曲霉, 生防条件, 暹罗芽孢杆菌

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)13-0132-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021090271



本文网刊:

Screening, Identification and Optimization of Biocontrol Conditions for Antagonistic Bacteria of *Aspergillus niger*

XU Xiaoyu, LI Tian, SHI Xuewei, WANG Bin*

(Food College, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: In order to screen for antagonistic bacteria with good inhibitory effect on black fungal disease in grape storage, in this study, strains with strong inhibitory effect on *Aspergillus niger*, which causes mycorrhizal lesions in grapes after harvest, were screened from soil by plate dilution method, identified using a combination of morphology and molecular biology, and optimized their growth and control conditions using single-factor and orthogonal tests. The results showed that 14 strains of bacteria with inhibitory effect on *A. niger* were isolated from vineyard soil in Xinjiang, among which, strain G8 had the best inhibitory effect on *A. niger*. The bacterium G8, which can antagonise *A. niger*, was identified as *Bacillus siamensis*. The optimum conditions for *Bacillus siamensis* G8 were: 3% inoculum, initial pH7, incubation temperature of 33 ℃, shaking speed of 160 r/min, and incubation time of 33 h. The inhibition diameter reached 28.79 mm under these conditions. The results of the study will provide theoretical basis for the application of antagonistic bacteria in the biological control of *A. niger* after grape harvest.

Key words: antagonistic bacteria; biological control; *Aspergillus niger*; biocontainment conditions; *Bacillus siamense*

霉菌侵染是引起葡萄采后霉变腐烂的主要原因^[1-2]。作为世界范围内的果蔬生产大国, 我国每年有近 8500 万吨果蔬因保鲜技术和设备的落后而腐

烂变质, 腐烂率高达 20%~30%, 给我国果蔬产业造成巨大的经济损失^[3-4]。因此, 在果蔬储存运输过程中采取一些有效的防治手段来延缓腐败变质就显得

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 五师科技计划项目 (20GY01); 兵团重点领域科技攻关计划项目 (2020AB014)。

作者简介: 徐晓裕 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 食品微生物、发酵工程, E-mail: xuxiaoyu62429@163.com。

* 通信作者: 王斌 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品微生物与发酵, E-mail: binwang0228@shzu.edu.cn。

尤为重要。葡萄在运输、贮藏等过程中的挤压及机械伤口就极易引起黑曲霉(*Aspergillus niger*)的感染,即黑粉病,导致葡萄果实失去食用和商品价值^[5-6]。长期以来,使用化学杀菌剂来防止果蔬的腐败变质一直被认为是最有效的方法,但是该方法存在着农药残留、环境污染和病原菌抗药性等诸多弊端,迫切需要新的安全方法来取而代之。因此,生物防治应运而生。生物防治是指选择对产品及人体不造成危害的微生物,利用微生物之间的拮抗作用来抑制病原菌生长的一种有效防治采后病害的新途径。

在微生物生命活动过程中,通过产生某种拮抗物质或改变自身的生长环境,达到阻碍其他微生物增殖的目的,人们将这类微生物统称为拮抗微生物^[7-8]。目前,有研究发现劳伦隐球菌(*Cryptococcus laurentii*)对苹果采后灰霉病、梨的灰霉病和青霉病具有显著的防治效果^[9-10]。高抗甜瓜品种内分离的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)Mg15 对甜瓜白粉病具有显著防治效果^[11]。葡萄园筛选的枯草芽胞杆菌对酿酒葡萄灰霉病具有良好抑制作用^[12]。寻找到有效的拮抗菌株是防治果蔬采后病害的一种高效、环保、经济的方法,用生物防治技术取代传统的化学药物防治也是目前果蔬病害防治的研究热点^[6,13-14]。虽然有研究表明黑粉病是葡萄贮藏过程中产生的主要病害^[15],但目前关于生物防治黑粉病的报道还很少。本文旨在通过从新疆葡萄土壤中分离筛选获得对黑曲霉具有抑制作用的拮抗细菌,明确拮抗菌株产抑菌活性物质的最佳培养条件,以期为由黑曲霉引起采后病害的生物防治提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

黑曲霉(*Aspergillus niger*) 从玛纳斯中信国安葡萄园中的葡萄表皮分离,现保存于石河子大学食品学院葡萄与葡萄酒工程中心实验室;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 北京陆桥生物技术有限公司;酵母膏胨葡萄糖(YPD)、琼脂培养基(葡萄糖 20 g/L、酵母膏 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、琼脂 20g/L)、LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母浸粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L) 北京奥博星责任有限公司。

MLS-3750 型高压灭菌锅 上海申安医疗器械厂;FX-2000FO 电子天平 济南欧莱博科学仪器有限公司;FE20 基础型 pH 计 上海一恒科学仪器有限公司;SW-CJ 超净工作台 美国伯腾仪器有限公司;CX41RF 光学显微镜 深圳市华显光学仪器有限公司;DNP-9272 型恒温培养箱 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集 用五点取样法在玛纳斯中信国安的葡萄园中采取土壤样品,装入 50 mL 无菌离心管中,储存于 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 拮抗菌的分离及筛选 采用平板稀释涂布法

在 LB 固体培养基上对土壤样品中的细菌进行分离,30 ℃ 培养 2 d,并挑取不同形态的单菌落采用平板划线法纯化并编号保存备用。

以黑曲霉为指示菌,采用平板对峙法筛选拮抗细菌。抑菌直径(mm)=测量菌落直径(mm)-菌饼直径(mm),每个处理做三个平行^[16]。

1.2.3 拮抗菌活体抑菌实验 选取新鲜无病害九成熟的鲜食葡萄,用体积分数为 75% 乙醇喷洒表面,并用无菌水清洗 3 次后取出、晾干后用作反接实验。用灭菌牙签挑取纯化好的黑曲霉菌丝在葡萄果实腰部穿刺,并同时接入浓度为 10⁷ CFU/mL 浓度的拮抗菌悬液,仅接入黑曲霉菌丝的葡萄果实作为对照,常温保存 5 d,观察防治效果^[17]。

1.2.4 拮抗菌的鉴定 形态学和生理生化实验:将拮抗菌株接种于 LB 固体培养基上,30 ℃ 培养 2 d 后观察菌落的大小、颜色和质地,表面及边缘的形状等菌落特征;再采用革兰氏染色法对其进行染色,在光学显微镜下进一步观察其染色情况和形态。依据《常见细菌系统鉴定手册》中芽孢杆菌属内特征进行生理生化鉴定^[18-19]。

分子生物学:使用 OMEGA 细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌株的 DNA 进行提取,利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCA TGGCTCAG-3')和 1492F (5'-AAGGAGGTGA TCCAACCGCA-3') 进行 PCR 扩增。将所有提取的 DNA 样品发送到 Sangon Biotech 公司(中国上海)进行 PCR 的扩增和产物测序。然后将测序所得的 16S rDNA 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 序列比对分析以明确该菌株的种属关系,并使用 MEGA-X 软件构建系统发育树^[20]。

1.2.5 菌株生长曲线的测定 用接种环刮取活化好的单菌落接种于装有 60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,培养温度为 30 ℃,160 r/min 的摇床培养,每隔 2 h 取样并在 OD_{600 nm} 下测定吸光度值。

1.2.6 发酵条件的优化

1.2.6.1 装液量对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响

将拮抗菌的种子液以 3% 的接种量接种于含有 40、60、80、100、120 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,pH 为 7,转速设置为 160 r/min,置于 30 ℃ 的条件下进行恒温振荡培养 30 h 后,取样并测定发酵液的抑菌活性(方法同 1.2.2),每个处理做三个平行。

1.2.6.2 接种量对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响

将拮抗菌的种子液分别以 1%、2%、3%、4%、5% 的接种量接种于含有 60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,pH 为 7,转速设置为 160 r/min,置于 30 ℃ 的条件下进行恒温振荡培养 30 h 后,取样并测定发酵液的抑菌活性,每个处理做三个平行。

1.2.6.3 培养温度对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌的种子液以 3% 的接种量接种于含有

60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, pH 为 7, 转速设置为 160 r/min, 分别置于 20、25、30、35、40 ℃ 的条件下进行恒温振荡培养 30 h 后, 取样并测定发酵液的抑菌活性, 每个处理做三个平行。

1.2.6.4 培养时间对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌的种子液以 3% 的接种量接种于含有 60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, pH 为 7, 转速设置为 160 r/min, 置于 30 ℃ 的条件下进行恒温振荡, 分别培养 20、25、30、35、40、45、50 h 后, 取样并测定发酵液的抑菌活性, 每个处理做三个平行。

1.2.6.5 初始 pH 对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌的种子液以 3% 的接种量接种于含有 60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, pH 分别设定为 5、6、7、8、9, 转速设置为 160 r/min, 置于 30 ℃ 的条件下进行恒温振荡培养 30 h 后, 取样并测定发酵液的抑菌活性, 每个处理做三个平行。

1.2.6.6 转速对拮抗菌株发酵液抑菌活性的影响 将拮抗菌的种子液以 3% 的接种量接种于含有 60 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, pH 为 7, 转速分别设置为 100、120、140、160、180、200、220 r/min, 置于 30 ℃ 的条件下进行恒温振荡培养 30 h 后, 取样并测定发酵液的抑菌活性, 每个处理做三个平行。

1.2.7 正交试验 根据单因素实验结果, 选取三个对抑菌效果影响显著的因素设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1), 确定最佳的培养条件。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及水平
Table 1 $L_9(3^3)$ orthogonal experiment factors and levels

水平	A 培养温度(℃)	B 培养时间(h)	C pH
1	28	28	6
2	30	30	7
3	33	33	8

1.2.8 验证实验 采用确定的最佳培养条件对菌株的抑菌直径进行测量, 验证其抑菌效果。

1.3 数据处理

采用 SPSS 软件进行数据分析和差异显著性检验($P<0.05$), 采用 Minitab 14.0 进行单因素和正交试验方差分析, 利用 origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离

从采集到的土壤上共分离获得 60 株细菌, 14 株细菌对黑曲霉具有拮抗作用(表 2), 其中, G8 的抑菌直径最大, 达 28.19 mm(图 1)。

拮抗菌株对黑曲霉的防治效果如图 2 所示。未接入拮抗菌株的葡萄果实发生腐烂及褐变, 接入拮抗菌株的 G8 对于黑曲霉有明显的抑菌效果。接种该菌株的葡萄果实均没有发生明显的黑粉病症状。这可能是由于接种的拮抗细菌迅速繁殖, 同时与黑曲霉

表 2 葡萄园土壤拮抗细菌的筛选

Table 2 Screening of antagonistic bacteria in vineyard soil

拮抗菌	抑菌直径(mm)	拮抗菌	抑菌直径(mm)
A2	10.02±0.45 ^a	D3	24.65±1.75 ^h
A8	12.25±0.22 ^c	D9	25.01±1.41 ^h
B5	21.65±0.65 ^e	E5	21.25±0.90 ^e
B7	12.13±0.79 ^c	E6	13.01±0.63 ^d
B9	11.71±0.87 ^c	E9	18.60±0.37 ^f
C1	16.97±0.44 ^e	E7	12.05±0.57 ^c
C3	10.86±0.63 ^b	G8	28.19±0.46 ⁱ

注: 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

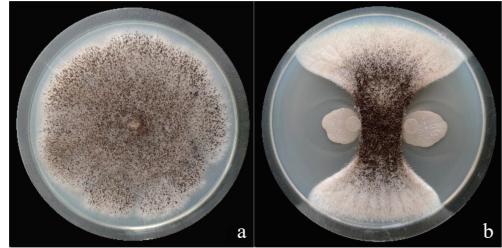


图 1 G8 对黑曲霉的拮抗效果

Fig.1 The antagonistic effect of G8 on *Aspergillus niger*

注: a-黑曲霉单菌落; b-菌株对黑曲霉拮抗效果。

竞争营养与生存空间, 导致病原菌失去营养物质和生存空间, 无法生长繁殖以及产生有毒物质, 从而抑制了病害的发生^[21]。

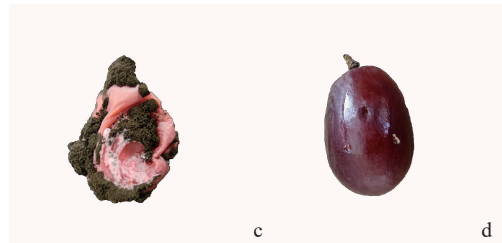


图 2 拮抗菌 G8 对黑曲霉的活体拮抗效果

Fig.2 The antagonistic effect of antagonistic antibacterial G8 on *Aspergillus niger* in vivo

注: c-仅接入黑曲霉的葡萄果实 (5 d); d-同时接入黑曲霉及拮抗菌株的葡萄果实 (5 d)。

2.2 拮抗细菌的鉴定

2.2.1 形态特征 菌株 G8 在 LB 固体培养基上培养, 菌落呈现乳白色, 表面稍微隆起, 较为粗糙, 不透明; 经革兰氏染色后呈紫色, 杆状(图 3)。

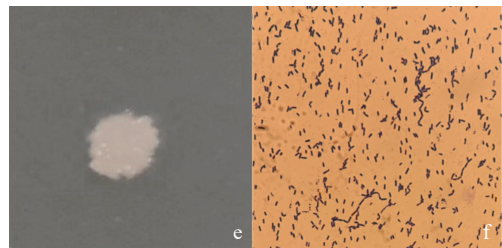


图 3 菌株 G8 形态学特征

Fig.3 Morphological characteristics of strain G8

注: e-菌株 G8 在 LB 固体培养基上的菌落形态; f-菌株 G8 的革兰氏染色形态(1000×)。

2.2.2 生理生化特征测定 菌株 G8 的生理生化特征显示,该菌株可以利用葡萄糖、木聚糖、山梨醇、果糖、麦芽糖、淀粉、甘露醇等碳源进行生长,并能水解淀粉和明胶,还原硝酸盐。接触酶实验、葡萄糖产气实验、甲基红实验和脲酶实验均呈阳性,能够利用丙二酸盐(表 3)。结合形态特征和生理生化特征^[22],菌株 G8 符合暹罗芽孢杆菌的特性。

表 3 菌株 G8 的生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain G8

测定项目	测定结果	测定项目	测定结果
接触酶反应	+	硝酸盐还原实验	+
淀粉水解	+	硫化氢实验	-
明胶水解	+	葡萄糖产气实验	+
甲基红实验	+	丙二酸盐利用	+
脲酶实验	+	柠檬酸盐利用	-
吡啉反应	-	壳聚糖	-
葡萄糖	+	果糖	+
乳糖	-	麦芽糖	+
木聚糖	+	淀粉	+
山梨醇	+	甘露醇	+

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.2.3 分子生物学鉴定 将 G8 菌株 16S rDNA 扩增产物送至生工(上海)有限公司测序,将测序获得的序列与 Genbank 中序列进行比对,并用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。基于 16S rDNA 系统发育分析结果显示(如图 4),菌株 G8 与暹罗芽孢杆菌的亲缘关系最近,处于系统发育树的同一分枝。结合形态学与生理生化特征,确定菌株 G8 为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)。

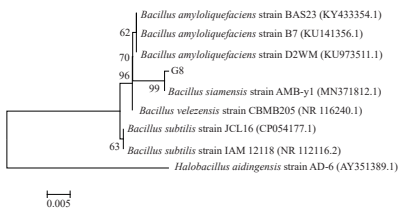


图 4 G8 菌株基于 16S rDNA 的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of G8 strain based on 16S rDNA

2.3 拮抗菌 G8 生长曲线的测定

菌株 G8 的生长曲线如图 5 所示。菌株 G8 延缓期为 4 h,在 4~22 h 处于对数生长期,菌体代谢旺盛,繁殖速度快,24 h 后菌株的生物量逐渐趋于稳定。但随着培养时间的延长,菌株在 40 h 之后进入衰老期。

2.4 菌株 G8 发酵条件的优化

2.4.1 装液量的影响 由图 6 可知,不同装液量对抑菌效果的影响很小。当装液量为 60 mL/250 mL 时菌株 G8 有较大的抑菌直径,为 28.26 mm。方差结果显示,不同装液量对抑菌效果的影响并不显著($P>0.05$),故不选择装液量作为后续影响抑菌效果的考

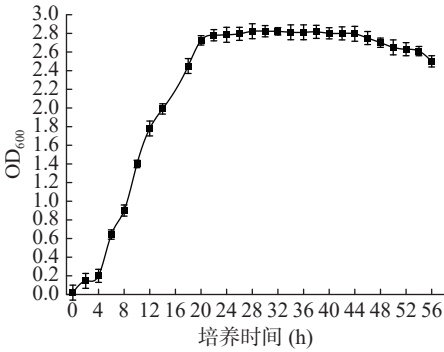


图 5 菌株 G8 的生长曲线
Fig.5 Growth curve of strain G8

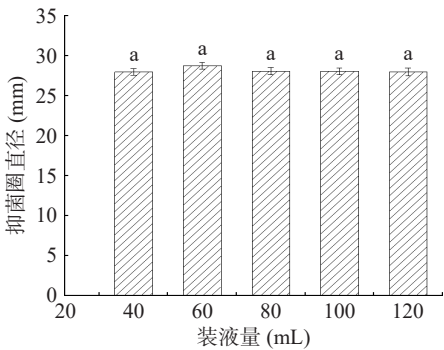


图 6 不同装液量对抑菌效果的影响

Fig.6 The influence of different liquid volume on the antibacterial effect

注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);图 7~图 11 同。

察因素。

2.4.2 接种量的影响 由图 7 可知,不同的接种量对菌株的抑菌效果的影响很小。当接种量为 3% 时,抑菌直径较高,但方差结果显示不同接种量对抑菌效果的影响不显著($P>0.05$),这可能是由于抗菌物质是菌体生长到一定阶段,为适应环境变化而产生的,它的合成是受菌体细胞群体感应调节的^[23]。虽然试验最开始采用了不同的接种量,但是在发酵 24 h 后,各处理菌体生物量基本一致,抗菌肽的活性差异不大,抑菌效果也基本一致。鉴于此,在后续的实验固定接种量为 3%。

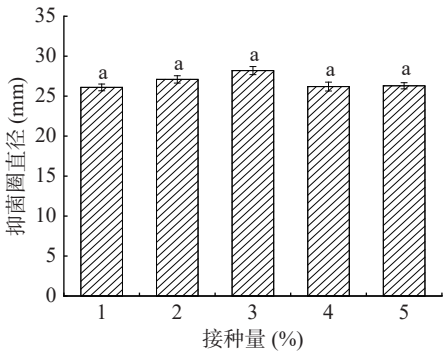


图 7 不同接种量对抑菌效果的影响

Fig.7 The effect of different inoculum on the antibacterial effect

2.4.3 培养温度的影响 由图 8 可知,不同温度对菌株的抑菌效果差异显著($P<0.05$)。随着温度的上升,

抑菌直径呈现先增大后减小的趋势。培养温度对菌体细胞中的酶、蛋白质、DNA 等大分子的合成与活性会产生一定的影响,培养温度较最适温度高或低,生长速率都会随之下降^[24]。当培养温度为 30 ℃ 时,菌株 G8 有最大的抑菌直径(28.62 mm)。因此,确定菌株最适生长温度为 30 ℃,并选择其作为下一步正交试验的中心试验点。

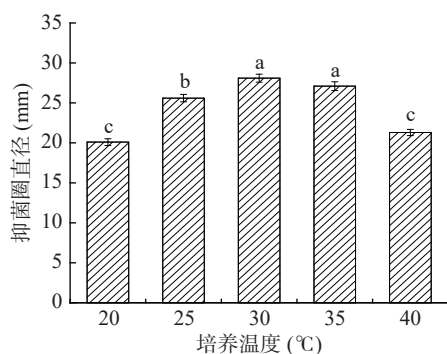


图 8 不同培养温度对抑菌效果的影响

Fig.8 The influence of different culture temperatures on the antibacterial effect

2.4.4 培养时间的影响 由图 9 可知,菌株在 20 h 已经开始产生了抑菌物质,并随着发酵时间的延长,抗菌活性物质的产量逐渐增大。当培养时间达到 30 h 时,菌株 G8 的抑菌直径最大(28.64 mm)。但当菌株生长到一定时间时,抗菌活性物质的产量逐渐降低。这可能是由于菌株在生长后期,会发生自溶现象,并释放如蛋白酶、脂肪酶等次级代谢产物降解了部分抗菌活性物质^[25-26]。方差分析结果显示不同培养时间对菌株的抑菌效果有显著影响($P < 0.05$)。因此,确定菌株适宜培养时间为 30 h,并选择其作为下一步正交试验的中心试验点。

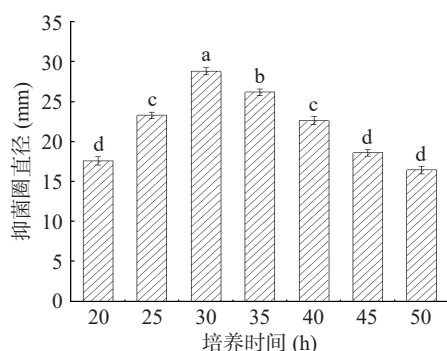


图 9 不同培养时间对抑菌效果的影响

Fig.9 The influence of different culture time on the antibacterial effect

2.4.5 初始 pH 的影响 由图 10 可知,不同初始 pH 对菌株的抑菌效果影响较为显著($P < 0.05$)。当发酵 pH 在 5~7 时,菌株 G8 的抑菌效果逐渐增加。当 pH 为 7 时,菌株 G8 表现出最大的抑菌直径(28.34 mm)。当后续 pH 持续增加时,抑菌效果呈现逐渐下降的趋势,这可能由于不同的酸或碱性条件影响了菌体的生

长以及次级代谢产物的分泌^[27]。因此,确定菌株 G8 产生最好抑菌效果的初始 pH 为 7,并选择其作为下一步正交试验的中心试验点。

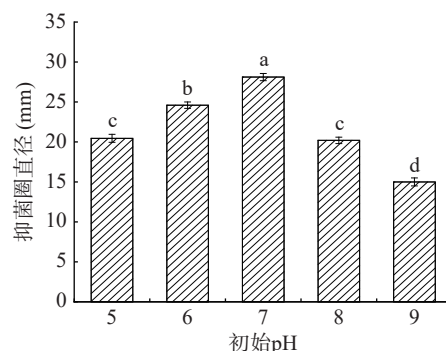


图 10 不同初始 pH 对抑菌效果的影响

Fig.10 The effect of different initial pH on the antibacterial effect

2.4.6 转速的影响 由图 11 可知,转速为 140、160、180 r/min 时对菌株 G8 抑菌效果的影响并不显著($P > 0.05$)。转速不断升高时,菌株的抑菌效果逐渐增强。当转速为 160 r/min 时,菌株的抑菌直径达到了最大值。然而,随着转速的不断升高,菌株的抑菌效果不断下降。因此,确定菌株的产生最优抑菌效果的转速为 160 r/min。

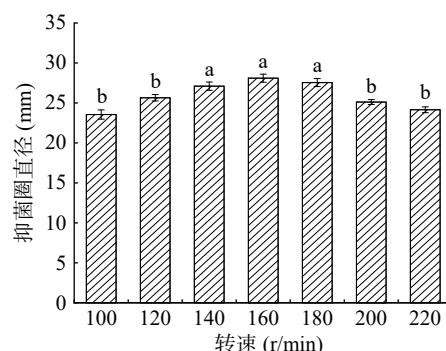


图 11 不同转速对抑菌效果的影响

Fig.11 The influence of different speeds on the antibacterial effect

2.5 正交试验优化

菌株 G8 在发酵条件正交试验设计各处理中产生的抑菌效果如表 4 所示。R 绝对值大小代表不同因素对菌体产生抑菌效果的影响程度,R 值越大,说明该因素影响程度越大。因此可以从实验结果中可以看出这三个因素对抑菌效果的影响大小顺序为培养时间> pH>培养温度。经数据分析可得到最优的发酵条件培养参数为 $B_3C_2A_3$,即培养时间为 33 h, pH 为 7,培养温度为 33 ℃。

2.6 发酵条件优化后的抑菌效果测定

使用优化后的发酵条件对菌株 G8 进行培养,即装液量为 60 mL/250 mL,接种量为 3%,培养温度为 33 ℃,pH 为 7,转速为 160 r/min 的条件下培养 33 h,得到的发酵液对黑曲霉的抑菌直径达到了 28.79 mm。

表 4 正交试验结果
Table 4 Orthogonal experiment results

序号	A 培养温度	B 培养时间	C pH	抑菌直径
1	28	28	6	22.20
2	28	30	7	23.23
3	28	33	8	25.83
4	30	28	7	23.41
5	30	30	8	23.96
6	30	33	6	24.61
7	33	28	8	21.33
8	33	30	6	24.15
9	33	33	7	26.63
K ₁	23.753	22.313	23.653	
K ₂	23.993	23.780	24.423	
K ₃	24.036	25.690	23.706	
R	0.283	3.377	0.77	

3 结论

本研究从新疆葡萄园土壤中共筛选出 14 株对黑曲霉有抑菌效果的拮抗细菌,其中菌株 G8 对黑曲霉的抑菌效果最佳。经鉴定,菌株 G8 为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)。在常温下,暹罗芽孢杆菌能显著降低黑曲霉引起的病害问题,有效抑制葡萄果实霉变。其产生抑菌活性物质最适的生长条件为:装液量为 60 mL/250 mL、培养温度为 33 ℃、培养时间为 33 h、接种量 3%、pH7、转速为 160 r/min。上述研究结果将为暹罗芽孢杆菌在黑曲霉采后病害的生物防治应用方面提供理论依据。本实验室将进一步对暹罗芽孢杆菌 G8 所产抗菌物质的纯化、鉴定与抑菌机制等进行深入研究。

参考文献

[1] 杜蕊,王春明,郭建国,等. 葡萄生单轴霉菌对葡萄几种防御酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(15): 151-154. [DU H, WANG C M, GUO J G, et al. Effects of *Plasmopara viticola* on activity of defense-related enzymes in grape[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(15): 151-154.]

[2] TOURNAS V H, KATSOUDAS E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 105(1): 11-17.

[3] ZHOU Q, FU M, XU M, et al. Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(3): 1499-1508.

[4] 张迪. 葡萄灰霉病拮抗酵母菌的筛选及产挥发性抑菌物质特性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2018. [ZHANG D. Screening and antibiotic characterization of volatile organic compounds produced by antagonistic yeasts against grape grey mold[D]. Shihezi: Shihezi University, 2018.]

[5] 李丽梅,刘霞,李喜宏,等. 常温下黑曲霉对刺伤红提葡萄的致病规律研究及拮抗菌筛选[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(15): 35-39. [LI L M, LIU X, LI X H, et al. Study on the wound pathogenicity of *Aspergillus niger* and its antagonistic bacteria screening of postharvest red globe grapes at room temperature[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(15): 35-39.]

[6] SCHWEIZER G, HAIDER M B, BARROSO G V, et al. Population genomics of the maize pathogen *Ustilago maydis*: Demographic history and role of virulence clusters in adaptation[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2021, 13(5): e73.

[7] RYPIEN K L, WARD J R, AZAM F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(1): 28-39.

[8] AIYAR P, SCHAEEME D, GARCÍA-ALTARES M, et al. Antagonistic bacteria disrupt calcium homeostasis and immobilize algal cells[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1756.

[9] GUO J, FANG W, LU H, et al. Inhibition of green mold disease in mandarins by preventive applications of methyl jasmonate and antagonistic yeast *Cryptococcus laurentii*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 88: 72-78.

[10] WEI Y, XU M, WU H, et al. Defense response of cherry tomato at different maturity stages to combined treatment of hot air and *Cryptococcus laurentii*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2016, 117: 177-186.

[11] 马英元, 梁非时, 马鸿艳, 等. 甜瓜白粉病内生拮抗细菌的筛选鉴定及其防治效果的研究[J]. *植物保护*, 2011, 37(2): 25-30. [MA Y Y, LUAN F S, MA H Y, et al. Screening, identification and control efficacy of melon endophytic antagonistic bacteria against *Sphaerotheca fuliginea*[J]. *Plant Protection*, 2011, 37(2): 25-30.]

[12] 夏俊芳, 郑素慧, 翟少华, 等. 一株拮抗酿酒葡萄灰霉病的枯草芽孢杆菌 T3 筛选、鉴定及抑菌分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(23): 99-105, 113. [XIA J F, ZHENG S H, ZHAI S H, et al. Screening and Identification of antagonistic *Bacillus subtilis* T3 against wine grape gray mold and analysis of its antimicrobial activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(23): 99-105, 113.]

[13] 赵中辉. 果树高产技术及病虫害防治要点探究[J]. *南方农业*, 2021, 15(18): 26-27. [ZHAO Z H. Research on high yield techniques and pest control of fruit trees[J]. *South China Agriculture*, 2021, 15(18): 26-27.]

[14] KUSSTATSCHER P, CERNAVA T, ABDELFAATTAH A, et al. Microbiome approaches provide the key to biologically control postharvest pathogens and storability of fruits and vegetables[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2020, 96(7): 119-130.

[15] 沙月霞, 王国珍, 陈慧娟. 宁夏主要优特农产品贮藏病害发生种类的初步研究[J]. *宁夏农林科技*, 2007(1): 12-14. [SHA Y X, WANG G Z, CHEN H J. Preliminary study on the occurrence types of storage diseases of main premium agricultural products in Ningxia[J]. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2007(1): 12-14.]

[16] 赵月. 拮抗酵母对番茄果实灰霉病的抑制作用研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017. [ZHAO Y. Study on inhibition of the antagonistic yeast on gray mold of postharvest tomato fruit[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2017.]

[17] 周倩, 冯肖, 纪淑娟, 等. 蓝莓果实常温贮藏过程中表面病原真菌的分离与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 271-279. [ZHOU Q, FENG X, JI S J, et al. Isolation and identification of surface pathogenic fungi for blueberry during storage at room tem-

- perature[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(2): 271-279.]
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 166-171. [DONG X Z, CAI M Y. Common bacterial system identification manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 166-171.]
- [19] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 26-120. [ZHAO B, HE S J. Microbiology experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002: 26-120.]
- [20] 詹艺舒, 李婕, 褚秀丹, 等. 一株真菌拮抗细菌 Z21 的筛选与鉴定及其发酵条件优化 [J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1503-1514. [ZHAN Y S, LI J, CHU X D, et al. Screen, identification and fermentation optimization of an antifungal bacterium Z21[J]. Microbiology China, 2020, 47(5): 1503-1514.]
- [21] YANG Q, WANG H, ZHANG H, et al. Effect of *Yarrowia lipolytica* on postharvest decay of grapes caused by *Talaromyces rugulosus* and the protein expression profile of *T. rugulosus*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 126: 15-22.
- [22] 许本宏, 林俊芳, 叶志伟, 等. 带鱼肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵液抗菌性质研究 [J]. 水产科学, 2018, 37(2): 193-200. [XU B H, LIN J F, YE Z W, et al. Isolation and identification of *bacillus* from gastrointestinal tract of hairtail (*Trichiurus haumela*) and antibacterial characteristics of their fermented liquids[J]. Fisheries Science, 2018, 37(2): 193-200.]
- [23] 沙月霞, 黄泽阳, 马瑞. 嗜碱假单胞菌 Ej2 对稻瘟病的防治效果及对水稻内源激素的影响 [J]. 中国农业科学, 2022, 55(2): 320-328. [SHA Y X, HUANG Z Y, MA R. Control efficacy of *Pseudomonas alcaliphila* strain Ej2 against rice blast and its effect on endogenous hormones in rice[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(2): 320-328.]
- [24] 叶婵, 周南, 蒋选利. 蓝莓根腐病生防细菌的筛选与鉴定 [J]. 中国森林病虫, 2018, 37(5): 11-15. [YE C, ZHOU N, JIANG X L. Screening and identification of biocontrol bacteria for blueberry root rot[J]. *Forest Pest and Disease*, 2018, 37(5): 11-15.]
- [25] JENAL U, FUCHS T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(19): 5658-5669.
- [26] 李智琪. 清香酒醅中高自溶度乳酸菌的分离鉴定及其自溶酶的研究 [D]. 临汾: 山西师范大学, 2020. [LI Z Q. Isolation and identification of lactic acid bacteria with high autolysis from fermented grains of light-flavor baijiu and research on autolysin[D]. Linfen: Shanxi Normal University, 2020.]
- [27] 马斌. 卵转铁蛋白抗菌肽的制备及纳米粒应用研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021. [MA B. Preparation of ovotransferrin antimicrobial peptide and application of nanoparticles[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.]