Bacillus pumilus HN-10 对 *Trichothecium roseum* 的拮抗作用及菌体结构的影响

黄玉琴，贠建民*，张紊玮，艾对元，漆倩涯，姚 博

（甘肃农业大学 食品科学与工程学院，甘肃 兰州 730070）

摘要：探究一株分离自腐败马铃薯湿粉条的短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus* HN-10）对粉红单端孢（*Trichothecium roseum*）的拮抗作用及菌体结构的影响.采用体外拮抗法检测其对 *T.roseum* 菌丝体生长和孢子萌发的影响，结合甜瓜（*Cucumis melo L*）损伤接种试验验证其对病害控制效果，测定了供试病原菌粉红单端孢的生长曲线，电导率，胞内蛋白和核酸渗出量等生理，生化指标，并借助扫描电镜图像来进一步考察拮抗效果.结果表明：短小芽孢杆菌（*B.pumilus* HN-10）发酵液对 *T.roseum* 菌丝生长和孢子萌发有明显抑制效果，发酵液对接种粉红单端孢的甜瓜引起的腐烂抑制效果显著，且随发酵液浓度越大，伤口腐烂病斑直径越小；发酵液蛋白粗提物能够抑制 *T.roseum* 菌体生物量增加；电导率、吸光度（OD_{260}，OD_{280}）及扫描电镜结果发现，该粗提物处理改变或破坏了细胞膜结构完整性，提高了细胞膜的通透性，使胞内物质渗出.

关键词：粉红单端孢；短小芽孢杆菌；拮抗作用；抑菌机理

中图分类号：TS 201.3　**文章编号：**1673-1689(2019)06-0025-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.004

Effect of *Bacillus pumilus* HN-10 on Antagonistic Activity and Cell Structure of *Trichothecium roseum*

HUANG Yuqin，*YUN Jianmin**，*ZHANG Wenwei*，*AI Duiyuan*，*QI Qianya*，*YAO Bo*

（College of Food Science and Engineering，Gansu Agricultural University，Lanzhou 730070，China）

Abstract： A strain isolated from the decayed potato vermicelli，which was identified as *Bacillus pumilus* HN-10. In this test，the effect of *Bacillus pumilus* HN-10 on antagonistic activity and cell structure of *Trichothecium roseum* was studied. In vitro antifungal activity of *B pumilus* HN-10 was determined through the mycelial growth and spore germination of *T roseum*. Meanwhile，the disease control effect was verified in melon （*Cucumis melo L*） fruits inoculated with pores treated with *B pumilus* HN-10 fermentation fluid. Furthermore，a series of physiology and biochemistry indexes，which including growth curve，conductivity，the exudation content of Intracellular protein and nucleic acid etc，and combined with scanning electron microscope （SEM） observation，were measured to elucidate the antagonistic effect against the pathogen. The results showed that *B pumilus*

收稿日期：2016-11-30

基金项目：国家自然科学基金项目（31360405）；甘肃省自然科学基金项目（18JR3RA172）。

*** 通信作者：**贠建民（1968—），男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品微生物学研究。E-mail：yunjianmin@gsau.edu.cn

引用本文：黄玉琴，贠建民，张紊伟，等. *Bacillus pumilus* HN-10 对 *Trichothecium roseum* 的拮抗作用及菌体结构的影响[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：25-33.

HN-10 fermentation fluid on T.roseum mycelial growth and spore germination had a significantly inhibiting effect. The fermentation fluid had a great inhibitory effect for the decay of *T.roseum*, and companing with the higher fermentation fluid concentration, the diameter of the wound rot changed smaller. The growth curve of *T.roseum* implied that *B pumilus* HN-10 fermentation fluid crude protein extract had an obvious inhibition effect on *T.roseum* biomass. In addition, the fermentation fluid crude extract could change or destroy the structural integrity of cell membrane of *T.roseum* and significantly enhance the permeability of cell membrane, which led to leakage of the intracellular contents.

Keywords: *Trichothecium roseum*, *Bacillus pumilus* HN-10, antimicrobial activity, antifungal mechanism

粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)作为一类弱寄生植物病原真菌,是重要的果蔬采后致病菌。会引起苹果霉心病[1]、甜瓜粉霉病[2]和棉铃红粉病[3]。此外,也会引发芒果[4]、葡萄[5]、番茄[6]和坚果[7]等果蔬采后腐烂,造成极大经济亏损。其还可产生具有生物毒性的次级代谢产物对人畜的健康存在潜在的安全隐患[8-9]。目前由 *T.roseum* 引起的病害控制主要依赖人工合成的杀真菌剂[10],长期大量使用会增加病原物的抗药性,还会带来环境污染和农药残留的问题[11]。近年来,开展拮抗微生物分离筛选及其活性物质功能开发已成为研究热点[12],利用自然的生物资源防止病害已成为生物防治的重要趋势,有益的拮抗菌也成为重要生防因子[13]。

芽孢杆菌属(*Bacillus*)是重要的生防细菌。短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)近年来被陆续报道具有拮抗灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),腐霉菌(*Pythium* spp)等病原真菌的能力[14-15]。Akhtar 等[16]报道将短小芽孢杆菌作为生物菌肥用于鹰嘴豆根腐病获得了很好的防治效果。崔云龙等[17]报道了短小芽孢杆菌 D82 对小麦根腐病菌有极强的拮抗作用。游春平等[18]分离的短小芽孢杆菌对稻瘟病菌有显著的抑制作用。李静等[19]报道短小芽孢杆菌对芒果炭疽病的抑制率达到 94.28%。然而,有关短小芽孢杆菌对果蔬采后重要病原菌 *T.roseum* 的拮抗作用及其机理的研究还鲜见报道。

本实验室从腐败的马铃薯湿粉条中分离获得了一株具有拮抗活性的菌株,经生物学特性测定和 16SrDNA 序列分析鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* HN-10)。为此,本试验中以该菌株作为拮抗菌,采用体外拮抗法检测其对 *T.roseum* 菌丝体生长和孢子萌发的影响,结合甜瓜(*Cucumis melo L*)损伤接种试验验证其对病害控制效果,通过测定供试病原菌粉红单端孢的生长曲线、电导率、吸光度(OD_{260},OD_{280}),及扫描电镜(scanning electron microscope,SEM)观察形态变化等为切入点,研究短小芽孢杆菌(*B.pumilus* HN-10)发酵液粗提物对 *T.roseum* 生长及细胞结构的影响,旨在揭示其拮抗作用机理,以期为新的生防治剂开发及果蔬采后病害控制提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* HN-10)从腐败马铃薯湿粉条分离得到,经生物学特性测定和 16SrDNA 序列分析鉴定;粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)由甘肃农业大学食品科学与工程学院微生物实验室保存;甜瓜(*Cucumis melo L*)于 2016 年 7 月采自甘肃省民勤县农场。

硫酸铵:分析纯

PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,pH 值自然,水 1 000 mL,用于 *T.roseum* 菌种活化,培养,拮抗试验;PDA 液体培养基用于 *T.roseum* 液体培养。

LB 固体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,琼脂 15~20 g,pH 值 7.0,蒸馏水 1 000 mL,用于 *B.pumilus* HN-10 斜面及平板培养;LB 液体培养基用于 *B.pumilus* HN-10 发酵培养。

1.2 仪器

PHS-3C 型酸度计,上海佑科仪器公司产品;SW-CJ-1FD 型洁净工作台,苏净安泰公司产品;

THZ-98A 型电热恒温培养箱,上海一恒科学仪器厂制造;FA1204B 型电子分析天平,上海精密科学仪器厂制造;YXJ-2 离心机,湘仪离心机仪器有限公司产品;U-3010 型紫外-可见分光光度计,Hitachi 公司产品;DDS-11A 型电导率仪,上海分析仪器厂制造;HITACHI S-4800-I 型扫描电镜,日本 Hitachi 公司产品。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵液蛋白粗提物的制备 在无菌条件下将斜面保存的短小芽孢杆菌(*B.pumilus* HN-10)转接到平板上,培养 24 h 后,将其单菌落接种于 LB 液体培养基,37 ℃摇床振荡培养,连续培养 3 代种子液后将其按 5%接种体积分数接种到发酵瓶中,置 37 ℃,180 r/min 的振荡器中振荡培养 3 d,10 000 r/min 离心 20 min,上清液加固体硫酸铵至 70%饱和度,置 4 ℃下过夜。然后用高速冷冻离心机在 10 000 r/min、4 ℃下离心 20 min。所得沉淀溶解于 50 mmol/L 的 Tris-Hcl(pH 6.8)缓冲液中,之后利用截留相对分子质量为 12 000~14 000 之间的透析袋进行脱盐。透析 48 h 后,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得到的液体为发酵液蛋白质粗提物,置 4 ℃储存,待用。

1.3.2 *T.roseum* 孢子悬浮液制备 参照 Bi 等[20]方法。在 28 ℃培养 7 d 的 *T.roseum* 平皿中,加入含 0.05 g/dL Tween80 的无菌水,刮下孢子转入三角瓶,双层纱布过滤后旋涡振荡。用血球计数板数出孢子悬液的浓度,稀释至 1×10^8 个孢子/mL 的孢子悬液,备用。

1.3.3 抑菌效果的测定 采用牛津杯法进行抑菌实验,取已灭菌的牛津杯置于涂有 *T.roseum* 孢子悬液的 PDA 平板上,吸取经 0.22 μm 微孔滤膜过滤的发酵液 0.3 mL 滴加于牛津杯中,每个平板放 4 个牛津杯,加等量无菌蒸馏水(CK_1)和无菌 LB 液体培养基(CK_2)做为空白对照,培养 7 d,观察抑菌情况。

1.3.4 不同体积稀释度发酵液对 *T.roseum* 孢子萌发的影响 参照 Li 等[21]方法,在 1 g/dL 的水琼脂平板上,用 5 mm 的打孔器打孔,然后用无菌的镊子将水琼脂饼夹到灭菌的载玻片上,每个载玻片上放置 3 个,在每个琼脂饼上滴加用 0.22 μm 滤膜过滤的 10 μL 的不同体积比(发酵原液按 1:1,1:2,1:3,1:4(体积比)稀释)的发酵液,以同体积的无菌水做对照,每个琼脂饼分别加入 10 μL 的孢子悬浮液,28 ℃培养 15 h,观察孢子萌发情况,每个琼脂饼观察 200 个孢子,芽管长度达到孢子直径的一半时认为萌发。

1.3.5 不同体积稀释度发酵液对 *T.roseum* 菌丝生长的影响 参照 Liu 等[22]方法,将灭菌后的 PDA 培养基冷却至温度 60 ℃,加入不同体积稀释度用 0.22 μm 滤膜过滤(发酵原液按 1:1,1:2,1:3,1:4(体积比)稀释)的发酵液 2 mL,充分溶解,均匀平铺于培养皿,以加入等量无菌水的 PDA 平板为对照。将培养 7 d 的 *T.roseum* 平板,打孔器打取菌饼接于培养基,28 ℃培养 7 d 后,用十字交叉法测定菌落直径,每个浓度重复试验 3 次。

1.3.6 不同体积分数发酵液对甜瓜损伤接种后对病斑直径的测定 孢子悬浮液创伤接种 参照 Bi 等[20]方法。选取外观大小均一,无损伤和病虫害的甜瓜,2 g/dL 的次氯酸钠浸泡 2 min,自来水冲洗室温晾干,用体积分数为 75%的酒精对甜瓜表面消毒,用无菌打孔器在果实上刺 5 mm×3 mm 的伤口 4 个,接入 0.22 μm 滤膜过滤的 10 μL 不同稀释度的发酵液,20 min 后,接入 10 μL 孢子悬液,保鲜袋包装,室温条件下贮藏 15 d,十字交叉法测病斑直径。每个处理 3 个甜瓜,3 次重复,加同体积无菌水作为对照。

菌丝块创伤接种。参照章战华[23]的方法,略加修改。用打孔器在甜瓜上刺 5 mm×4 mm 的伤口 3 个,接入 0.22 μm 滤膜过滤的 20 μL 不同稀释度的发酵液,20 min 后,将培养了 7 d 的 *T.roseum* 菌苔用 5 mm 的打孔器打下菌丝边缘的菌碟,接种到刺伤后的伤口上,以接入同体积的无菌水作为对照。

1.3.7 发酵液蛋白粗提物处理后 *T.roseum* 生长曲线的测定 将 PDA 液体培养基加入发酵瓶中,灭菌冷却后按 10%的加液体积分数加入 1×10^8 个孢子/mL 的菌悬液和 0.22 μm 滤膜过滤的发酵液蛋白粗提物,对照接等量的无菌蒸馏水,之后在 28 ℃、180 r/min 条件下振荡培养。每隔 12 h 时分别取样 50 mL,8 000 r/min 离心 30 min,收集菌丝体,105 ℃烘干至恒重,称其质量,每组重复 3 次,取平均值绘制生长曲线。

1.3.8 发酵液粗提物处理后 *T.roseum* 菌液电导率的测定 参照王鑫等[24]的方法,并稍加修改。将 1×10^8 个孢子/mL 的菌悬液按 10%接种体积分数接种于 PDA 液体培养基,后按 10%的加液体积分数加入 0.22 μm 滤膜过滤的发酵液粗提物,对照加等量的

无菌去离子水，在 28 ℃、180 r/min 条件下振荡培养，每隔 4 h 取菌悬液 5 mL，8 000 r/min 离心 20 min，将上清液用去离子水稀释 20 倍，将电导电极浸入到待测溶液中，缓慢搅拌，待测量值稳定后读数，试验重复 3 次。

1.3.9 *发酵液粗提物处理后 T.roseum 核酸和蛋白质渗出量的测定* 参照 Paul 等[25]的方法稍作修改。将孢子浓度为 1×10^8 个孢子/mL 的悬液和 0.22 μm 滤膜过滤的发酵液粗提物分别按 10%接入体积分数加入 PDA 液体培养基，无菌去离子水作为对照。在 28 ℃、180 r/min 摇床中震荡培养，每隔 4 h 取菌液 6 mL，6 000 r/min 离心 20 min 所得的上清液在 260 nm 和 280 nm 处测定吸光值，试验重复 3 次。

1.3.10 *发酵液粗提物处理对 T.roseum 菌体表面形态的观察* 为进一步确定抑菌机理是否为破坏该菌体的细胞结构，采用扫描电子显微镜观察孢子及菌体形态。参照 Li 等[26]方法，并稍加修改。在 PDA 液体培养基中，按 10%的加液体积分数分别加入 0.22 μm 滤膜过滤的发酵液粗提物和孢子悬浮液（1×10^8 个孢子/mL），无菌水处理作为对照。在 28 ℃，180 r/min 摇床培养 4、12、20 h 后，4 ℃条件下用体积分数为 2 g/dL 戊二醛固定 2 h，PBS 溶液洗 3 次，每次 10 min；再浸泡在 1 g/dL 锇酸溶液中，4 ℃下 2 h 左右。用体积分数 50%、70%、95%和 100%的梯度乙醇各脱水 10 min。醋酸异戊酯置换 20 min，干燥，真空镀金。在扫描电镜下观察，并采集照片。

1.4 数据分析和统计

采用 Excel2007 进行统计处理数据，以上测定均为 3 组平行，结果以平均值±标准差方式表示。SPSS19.0 对各测定指标进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 *B.pumilus* HN-10 发酵液对 *T.roseum* 的抑制效果

由图 1 看出，无菌蒸馏水（CK1）和无菌的 LB 液体培养基（CK2）为空白对照的牛津杯周围长满了 *T.roseum* 菌丝体，而加注 *B. pumilus* HN-10 发酵液的牛津杯周围没有菌丝体生长，说明 *B.pumilus* HN-10 发酵液对 *T.roseum* 菌体生长具有显著的抑菌效果，且该抗菌活性物质为胞外产物。同时证明发酵液的抑菌活性与 LB 培养基的成分无关。

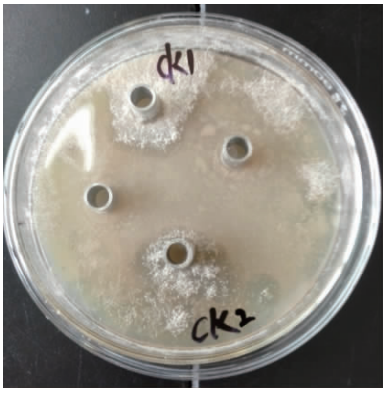
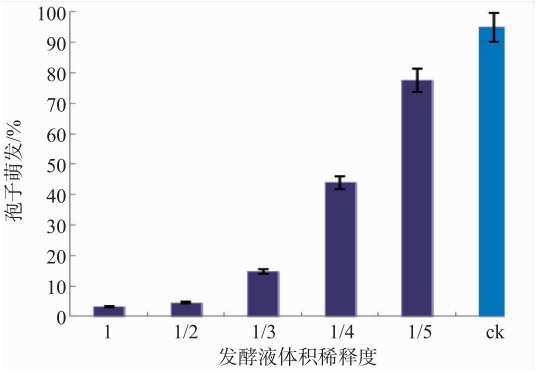


图 1 *B. pumilus* HN-10 发酵液对 *T.roseum* 的抑制效果

Fig. 1 Antibacterial effect of *B. pumilus* HN-10 fermentation fluid on *T.roseum*

2.2 不同体积稀释度发酵液对 *T.roseum* 孢子萌发的影响

由图 2 可知，不同体积稀释度的发酵液均能有效抑制孢子萌发，但不同的稀释度之间存在着显著效果差异，发酵液稀释倍数越小，抑制效果越好。发酵液处理几乎完全抑制了孢子萌发，且孢子萌发率仅为对照的 3.29%。



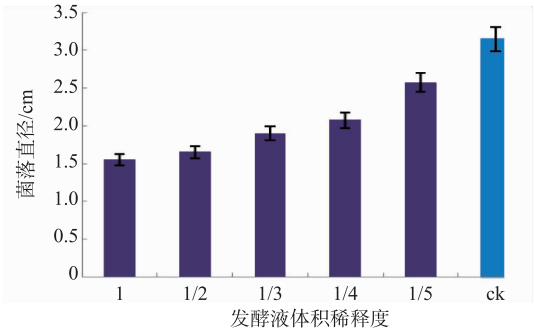
1 表示发酵原液；1/2~1/5 分别表示将发酵原液按 1:1，1:2，1:3，1:4（体积比）稀释

图 2 不同体积稀释度发酵液对 *T.roseum* 孢子萌发的影响

Fig. 2 Effects of the different concentration fermentation fluid on spore germination of *T.roseum*

2.3 不同浓度发酵液对 *T.roseum* 菌丝生长的影响

由图 3 可知，发酵液处理可显著抑制 *T.roseum* 的菌落直径的扩展，并呈现出浓度效应。不同稀释度的发酵液抑制的效果有差异，但值得注意的是，整个培养阶段发酵原液的抑菌效果最好，几乎完全抑制了菌落直径的扩展，其菌落直径仅为对照的 49.21%。



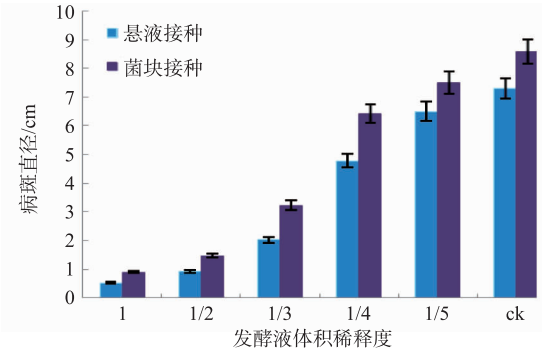
1 表示发酵原液;1/2~1/5 分别表示将发酵原液按 1:1,1:2,1:3,1:4(体积比)稀释

图 3　不同体积稀释度发酵液对 *T.roseum* 菌丝生长的影响

Fig. 3　Effects of the different concentration fermentation fluid on mycelial growth of *T.roseum*

2.4　不同体积稀释度发酵液对甜瓜损伤接种后病斑直径的影响

由图 4 可知,不同稀释度的发酵液对甜瓜的致病效果存在着差异。无论是悬液接种还是菌丝块接种,发酵原液对病原菌的抑制效果最好,病斑几乎没有扩展,其腐烂病斑直径控制率分别为 92.74%和 89.50%;比较孢子悬浮液创伤接种和菌丝块创伤接种可以发现,菌丝块创伤接种所致甜瓜病斑面积,比孢子悬浮液创伤接种病斑直径要大,由此可以推测发酵液对 *T.roseum* 孢子萌发的抑制作用要大于对菌丝生长的影响。



1 表示发酵原液;1/2~1/5 分别表示将发酵原液按 1:1,1:2,1:3,1:4(体积比)稀释

图 4　不同体积稀释度发酵液对甜瓜悬液和菌块接种的抑制效果

Fig. 4　Antibacterial effect of the different concentration fermentation fluid on melon of suspension and mycelia plugs inoculation

2.5　*B.pumilus* HN-10 发酵液蛋白粗提物对 *T.roseum* 生长曲线的影响

为进一步考察 *B.pumilus* HN-10 发酵液的抑菌效果及机理,本试验进行了发酵液中蛋白质的粗提,开展了液体培养条件下发酵液蛋白粗提物对 *T.roseum* 生长曲线的影响。结果如下:

典型微生物生长曲线粗分为 4 个时期:迟缓期、对数生长期、稳定期及衰退期。微生物生长曲线反映了微生物各个生长阶段的群体生长状况及规律,能反映菌体生物量的变化[27]。因此,可以通过测定菌体生物量来判断抑菌效果。由图 5 可知,对照组的 *T.roseum* 生长良好,具有典型的生长曲线特征,在 72 h 已开始进入稳定期,108 h 时达到最大生物量为 0.408 g。而处理组生长曲线位于对照组下方,生长曲线呈现为平缓的波浪状,且发酵液粗提物在对数期即表现出显著抑菌作用。处理组,在整个生长周期 *T.roseum* 的生长受到抑制,导致对数增长期斜率平缓、稳定期最大生物量明显减小,呈不典型生长特征,且最大生物量仅为 0.082 g。结果说明发酵液粗提物能够明显抑制 *T.roseum* 的生长繁殖。

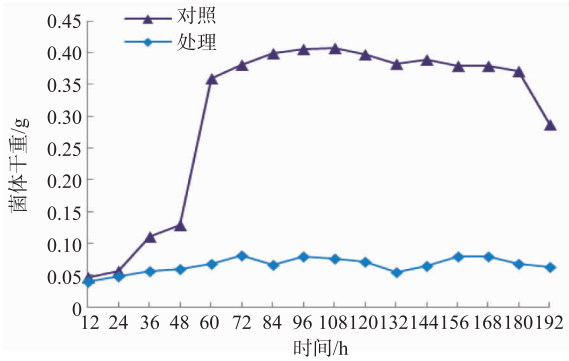


图 5　发酵液粗提物对 *T.roseum* 生长曲线的影响

Fig. 5　Effect of fermentation fluid crude extract on growth curve of *T.roseum*

2.6　*B.pumilus* HN-10 发酵液粗提物对 *T.roseum* 菌液电导率的影响

电导率是衡量溶液中离子强度高低的一个特征参数,其值与离子组分浓度密切相关[28]。菌体的保护屏障是细胞膜,当遇到强抑菌剂时会使细胞膜遭到破坏,菌体的保护屏障被打破,其内部的电解质外泄至溶液中,从而使电导率上升,因此菌液电导率的变化可以反映细胞膜通透性的变化[29]。由图 6 可知,处理组的电导率明显高于对照组,且整体上呈上升趋势,可以推测发酵液粗提物中的抗菌活性成分对 *T.roseum* 的生长抑制作用可能是通过破坏

其细胞膜,使细胞的通透性增加,内容物渗出而达到抗菌的目的,也可能是菌体在生长过程中产生的代谢物质使电导率发生变化。

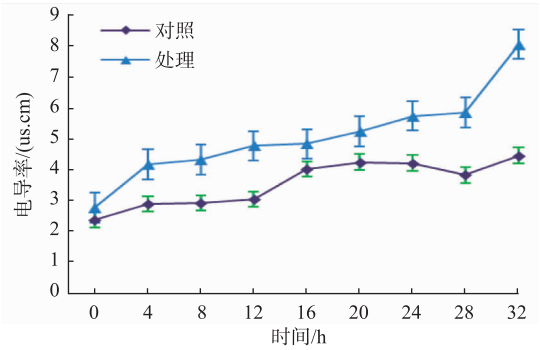


图 6　发酵液粗提物对 *T.roseum* 电导率的影响

Fig. 6　Effect of fermentation fluid crude extract on the conductivity of *T.roseum*

2.7　*B.pumilus* HN-10 发酵液粗提物对 *T.roseum* 核酸和蛋白质渗出量的影响

细胞内物质的泄漏是细胞膜破损的重要指标之一。蛋白质,核酸及其衍生物是细胞的重要生命物质,正常细胞的蛋白质及核酸物质不会泄漏到细胞外。了解胞内蛋白质与核酸的泄漏情况,可以间接反映细胞膜的破损程度[30]。由图 7 可知,随着处理时间的增加,处理和对照组的 OD_{260} 值、OD_{280} 值都不断增大,但处理组的值总是大于对照组,说明细胞内的蛋白质、核酸都有泄漏发生,另外还可以看出处理后 0~20 h,吸光值大幅度增加,说明发酵液粗提物处理前期对物质泄漏的影响最大。其变化趋势和电导率的变化趋势相吻合,这也进一步验证了电导率的增加是由于细胞内的蛋白质、核酸泄漏增加。电导率、OD_{260} 值和 OD_{280} 值的变化都不完全呈直线状态,这表明发酵液粗提物对细胞膜通透性的影响是比较复杂的。

2.8　*B.pumilus* HN-10 发酵液粗提物对菌体表面形态变化的影响

为了进一步验证发酵液粗提物对 *T.roseum* 孢子及菌丝体结构的破坏作用。本试验采用扫描电镜观察了不同时期孢子萌发的形态变化。由图 8 可知,处理显著改变了菌体表面形态,处理时间越长,形态的改变也就越明显。无菌蒸馏水对照组在 4 h 时孢子表面形状完整,体态饱满;在 12 h 时孢子有萌发迹象,芽管开始凸出,孢子体表完整。在 20 h 时绝大多数孢子都已长出菌丝,且菌丝分布均匀,形

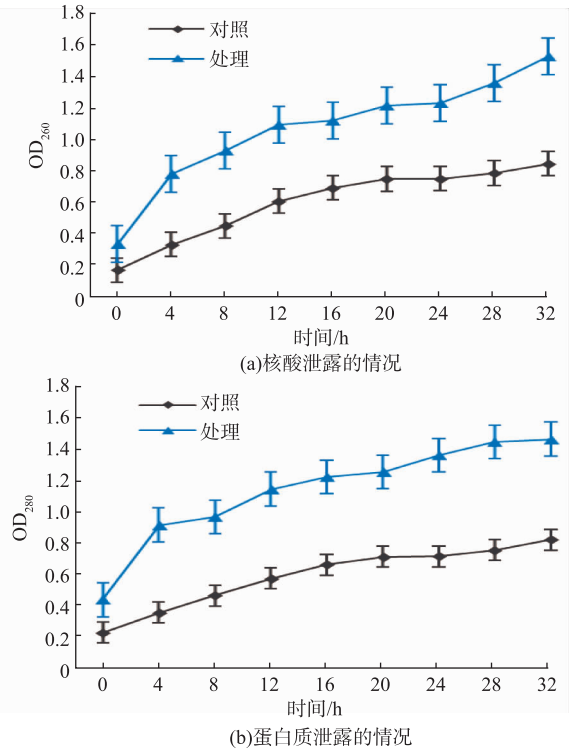
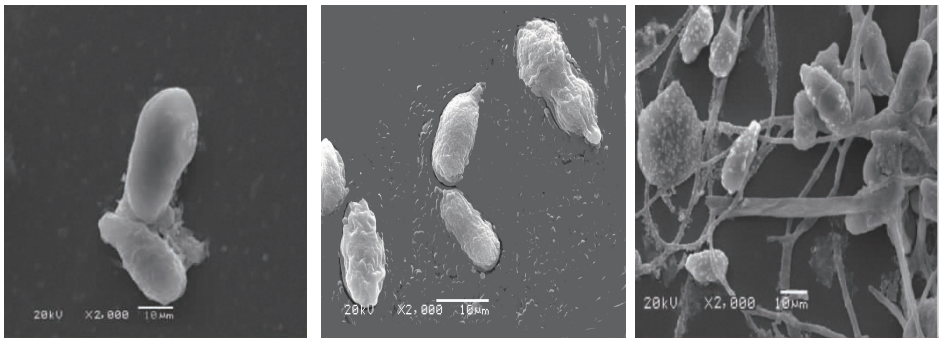


图 7　发酵液粗提物对 *T.roseum* 内核酸、蛋白质泄露的影响

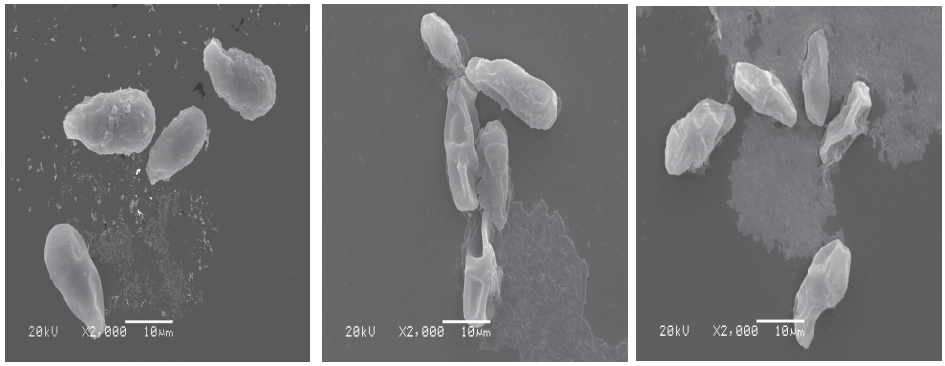
Fig. 7　Effects of fermentation fluid crude extract on permeation of nucleic acid and protein of *T. roseum*

态规则。而粗提物处理组,孢子皱缩,表面粗糙,体表凹陷明显(图 4(d)-(f)),处理 4 h 时孢子形态与对照相比变化不大,随时间的延长,在 12 h 时,孢子的皱缩程度显著增强,聚集粘连。在 20 h 时,孢子表面极具褶皱,明显抑制了孢子萌发过程芽管的形成。

本研究在对短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* HN-10) 发酵液处理粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)后其生理生化指标,如电导率,胞内蛋白和核酸渗出量等的测定基础上,采用扫描电镜图像分析方法,从 *T.roseum* 孢子萌发形态及结构特征方面开展进一步考察,二者间相互映衬,互为补充,可为进一步推测 *B.pumilus* HN-10 发酵液对 *T.roseum* 的抑菌机理提供证据。扫描电镜观察到 *B.pumilus* HN-10 菌株发酵液处理使 *T.roseum* 菌体形态发生了明显变化,孢子萌发受到抑制,菌体细胞壁表面出现凹陷变形,细胞膜的平滑形态变得褶皱。据此,我们推测其抑菌机理可能是发酵液粗提物破坏了菌体细胞壁,膜结构,细胞膜的表面积增大并使细



(a)对照组处理4 h　(b)对照组处理12 h　(c)对照组处理20 h



(d)发酵液粗提物处理4 h　(e)发酵液粗提物处理12 h　(f)发酵液粗提物处理20 h

图 8　发酵液粗提物处理对 *T.roseum* 表面形态的影响

Fig. 8　Effect of fermentation fluid crude extract on spore morphology of *T.roseum*

胞膜的磷脂双分子层变得更为疏松细胞通透性增大,致使细胞内溶物渗出,细胞代谢发生紊乱,菌体的生长繁殖受到阻碍抑制,进而发挥抑菌作用。这一结果与吴海霞[31]用扫描电镜观察银杏种仁抑菌蛋白作用 *Klebsiella.peneumoniae* 菌后使其形态结构变化,以及秦楠[32]通过扫描电镜观察的方法研究解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌蛋白对禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)得出的实验效果相一致,均推测可能是一些抑菌蛋白作用于菌体细胞膜,引起膜的损伤、破坏和通透性改变。当然,关于 *B. pumilus* HN-10 菌株对 *T.roseum* 抑菌机理的揭示,还有待于通过透射电镜等试验来进一步研究和验证。

3 结　语

短小芽孢杆菌(*Bacillus.pumilus* HN-10)的发酵液能够有效抑制粉红单端孢(*Trichothecium.roseum*)菌体生物量增加,对其菌丝生长和孢子萌发有明显抑制效果。同时,甜瓜(*Cucumis melo L*)悬液和菌丝块接种试验验证了发酵液对病原菌粉红单端孢引起的腐烂抑制效果显著,其腐烂病斑直径控制率分别为 92.74%和 89.50%。

B.pumilus HN-10 发酵液蛋白粗提物处理对 *T. roseum* 液体培养条件下的电导率,细胞内蛋白质、核酸渗出量均较对照显著提高;扫描电镜观察结果表明,处理组菌体表面出现明显的皱褶,有效抑制了孢子萌发过程芽管的形成。

B.pumilus HN-10 发酵液粗提物对 *T.roseum* 的抑菌机理可能主要是对细胞膜结构造成破坏作用,细胞内溶物大量流出,使菌体代谢紊乱,菌体的生长繁殖受到阻碍和抑制。

参考文献:

[1] XU Ling,ZHANG Shengyu,WANG Yiwen,et al. Pathogenicity of *Botrytis cinerea* on postharvest grape berries[J]. **Acta Phyto-pathologica Sinica**,2006,36(1):74-79.(in Chinese)

[2] GE Y,DENG H,BI Y,et al. Postharvest ASM dipping and DPI pre-treatment regulated reactive oxygen species metabolism in

muskmelon(*Cucumis melon*,*L.*) fruit[J]. **Postharvest Biology & Technology**,2015,99:160-167.
[3] 燕璐. 体外条件下柠檬酸处理对 *T.roseum* 的抑制及部分机理[D]. 兰州:甘肃农业大学,2015.
[4] HE S L,LIU Z L,LIU X M,et al. A new disease in mango caused by *Trichothecium roseum*[J]. **Journal of Fruit Science**,2011,28(3):474-478.
[5] SERRA R,KOZAKIEWICZ Z. *Aspergillus ibericus*:a new species of section Nigri isolated from grapes.[J]. **Mycologia**,2006,98(2):295-306.
[6] INACIO,C. A,PEREIRA-CARVALHO,R. C,MORGADO,F. G. A,et al. A tomato fruit rot caused by *Trichothecium roseum*,in Brazil[J]. **Plant Disease**,2011,95(10):1318-1320.
[7] HONG C X,MICHAILIDES T J. Prune,plum,and nectarine as hosts of *Trichothecium roseum* in California Orchards[J]. **Plant Disease**,1997,81(1):112-113.
[8] TANG Y,XUE H,BI Y,et al. A method of analysis for T-2 toxin and neosolaniol by UHPLC-MS/MS in apple fruit inoculated with *Trichothecium roseum*[J]. **Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**,2014,32(4):480-487.
[9] WEI Jinmei,ZHOU Wei,BI Yang. Inquire into the toxin production condition of *Trichothecium roseum* in vitro and toxicity bioassay[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2007(5):110-112.
[10] WANG Hui,SANG Weijun1,NI Yunyue,et al. lndoor toxicity test of different fungicides to apple mold core rot[J]. **Hubei Agricultural Sciences**,2013,52(6):1309-1311.(in Chinese)
[11] AVIS T J,RIOUX D,SIMARD M,et al. Ultrastructural alterations in Fusarium sambucinum and Heterobasidion annosum treated with aluminum chloride and sodium metabisulfite[J]. **Phytopathology**,2009,99(99):167-175.
[12] 于婷. 短小芽孢杆菌 BSH-4 抗菌蛋白的理化性质分析及初步分离[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
[13] 营金凤. 粉红单端孢对几种重要植物病原真菌的拮抗作用及其机制[D]. 合肥:安徽农业大学,2009.
[14] MARI M,GUIZZARDI M,PRATELLA G C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria[J]. **Biological Control**,1996,7(7):30-37.
[15] WALKER R,POWELL A S B. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species[J]. **Journal of Applied Microbiology**,1998,84(5):791-801.
[16] AKHTAR M S,SIDDIQUI Z A. Glomus intraradices,*Pseudomonas alcaligenes*,and *Bacillus pumilus*:effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. **Journal of General Plant Pathology**,2008,74(1):53-60.
[17] CUI Yunlong,Yl Haiqing. Antagonism of *Bacillus pumillus* D82 to Helminthosporium sativum,a common root rot pathogen of wheat[J]. **Chinese Journal of Biological Control**,1995,11(3):114-118.(in Chinese)
[18] YOU Chunping,XIAO Aiping,LI Xiangming,et al. Screening and identification of antagonistic microorganisms against *Pyricularia grisea*[J]. **Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis**,2001,23(4):519-521.(in Chinese)
[19] LI Jing,LIU Lina,WANG Anjian,et al. Research progress of microbial preservation technology on fruits and vegetables[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014 33(4):337-343.(in Chinese)
[20] BI Y,TIAN S P,GUO Y R,et al. Sodium silicate reduces postharvest decay on Hami melons:induced resistance and fungistatic effects[J]. **Plant Disease**,2006,90(3):279-283.
[21] LI Y,YANG Z,BI Y,et al. Antifungal effect of borates against *Fusarium sulphureum*,on potato tubers and its possible mechanisms of action[J]. **Postharvest Biology & Technology**,2012,74(6):55-61.
[22] JIA L,ZONG Y,QIN G,et al. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of silicon against *Penicillium digitatum*[J]. **Current Microbiology**,2010,61(4):274-279.
[23] 章战华. 不同寄主来源的粉红单端孢比较及活性研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2007.
[24] WANG Xin,ZHANG Rui,WU Shuhui. Advances in research antibacterial activity of resveratrol and mechanism[J]. **Journal of Modern Laboratory Medicine**,2014(6):62-64.(in Chinese)
[25] PAUL S,DUBEY R C,MAHESWARI D K,et al. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens[J]. **Food Control**,2011,22(5):725-731.
[26] LI Y C,BI Y,GE Y H,et al. Antifungal activity of sodium silicate on *Fusarium sulphureum*,and its effect on dry rot of potato

tubers[J]. **Journal of Food Science**，2009，74(5)：213-218.

[27] 张军宁. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)复合保鲜剂的研制及其抑菌机理初步研究[D]. 青岛：中国海洋大学，2012.

[28] FENG Yajing，ZHANG Yuanyuan，WANG Ruixin，et al. Antibacterial effect of Lignanoid from Fructus Schisandrae chinensis on the *Escherichia coli* and its mechanism[J]. **Food and Fermentation Industries**，2016，42(2)：72-76.

[29] ZHAO Shuyan，HU Shibin，WU Huanli，et al. Study on stability of bacteriostatic active compositions extracted from Fructus Corni [J]. **Food Science**，2008，29(1)：98-101.(in Chinese)

[30] RITZ M，THOLOZAN J L，FEDERIGHI M，et al. Physiological damages of *Listeria monocytogenes*，treated by high hydrostatic pressure[J]. **International Journal of Food Microbiology**，2002，79(1-2)：47-53.

[31] 吴海霞. 银杏种仁抑菌蛋白及其抑菌机制研究[D]. 南京：南京林业大学，2014.

[32] 秦楠. 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌蛋白鉴定及抑菌机理研究[D]. 晋中：山西农业大学，2015.

会　议　消　息

会议名称：第五届化工、材料与食品工程国际学术会议

大会时间：2019 年 7 月 5-7 日

大会官网：https://www.keoaeic.org/ICCMFE2019

大会地点：中国-青岛

投稿邮箱：ICCMFE@163.com

手机/微信：+86-13798148224

QQ 咨询：3326203643

AEIC 学术交流群：815234922(QQ 群)录检索：Ei, Scopus,CPCI and SCI

会议简介：第五届化工、材料与食品工程国际学术会议(ICCMFE 2019)将于 2019 年 7 月 5-7 日在中国青岛召开。会议主要围绕“化工”“材料”“食品工程”等研究领域展开讨论。旨在为化工、材料和食品工程研究的专家学者及企业发展人提供一个分享研究成果、讨论存在的问题与挑战、探索前沿科技的国际性合作交流平台。欢迎海内外学者投稿和参会。

论文评审及出版：所有的投稿都必须经过 2-3 位组委会专家审稿，经过严格的审稿之后，所有录用论文将提交 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (EES)(Online ISSN: 1755-1315 Print ISSN: 1755-1307) 出版，见刊后由期刊社提交至 EI, Scopus and CPCI 检索。目前该期刊 EI 和 CPCI 检索非常稳定。