

植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉的抑制作用

吕欣然, 高永悦, 杜宏, 葛永红, 励建荣, 白凤翎*

(渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心)

辽宁省食品安全重点实验室 辽宁锦州 121013)

摘要 互隔交链孢霉是导致果蔬采后黑斑病的主要病原体。本文采用菌饼法从发酵蔬菜来源的乳酸菌中筛选对互隔交链孢霉有拮抗作用的菌株,利用生理生化及 16S rDNA 测序鉴定乳酸菌。并进一步观察霉菌孢子超微结构的变化,通过测定霉菌孢子的电导率、丙二醛、可溶性蛋白质及可溶性糖含量的变化,初步探究乳酸菌对互隔交链孢霉的抑制机理。结果表明:植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉的抑制率为 80.86%,作用最强。采用 10^9 CFU/mL 的植物乳杆菌 LNL2-4-2 菌悬液处理互隔交链孢霉孢子 8 h 后,其细胞膜完整性降低 10.98%,胞外丙二醛、可溶性蛋白质、可溶性糖含量分别增加 10.66%,3.10%,11.21%。超微结构分析表明:菌株 LNL2-4-2 导致互隔交链孢霉的孢子表面皱缩,边缘模糊,顶端破裂,内容物泄漏。在苹果生物防治研究中,贮藏 6 d 时,浓度为 10^3 CFU/mL 的植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉造成损伤的抑制率达 47.24%。结论:植物乳杆菌 LNL2-4-2 可作为针对果蔬采后传统杀菌剂的新型替代品。

关键词 植物乳杆菌;互隔交链孢霉;抑菌机制;筛选

文章编号 1009-7848(2022)07-0021-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.07.002

互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)隶属于半知菌亚门、暗色孢科、交链孢属,是一种广泛存在于自然环境中的真菌。互隔交链孢霉可以产生互隔交链孢酚、细交链孢菌酮酸和互隔交链孢酚单甲醚等致病因子,引起采后苹果、梨、西兰花、胡萝卜等果蔬的黑斑病和枯萎病,造成一定的经济损失^[1-2]。通常用化学杀菌剂控制互隔交链孢霉的危害,然而,其存在药物残留,产生抗药性和污染环境等问题。目前急需研发一种无残留、无毒副作用和环境友好型的天然杀菌剂。Pane 等^[3]研究发现野生辣椒提取物对互隔交链孢霉具有拮抗活性,以剂量依赖的方式影响菌丝体生长,抑制分生孢子萌发,菌丝体抑制率为 43%~82%,孢子萌发抑制率为 40%~53%,同时,可显著减少人工感染的成熟番茄软腐病发生。张伟等^[4]发现鹿蹄草素对链格孢菌的抑制作用随质量浓度升高而增强,当质量浓度为 2.50,5.00 g/L 时,抑菌率均达 100%。植物源活性物质对互隔交链孢霉的抑制作用研究较

多,而微生物制剂对互隔交链孢霉的抑制作用研究较少。

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)作为一种生物制剂,其能够分解碳水化合物产生乳酸、脂肪酸、过氧化氢、罗伊氏菌素和细菌素,来抑制细菌和真菌的生长^[5]。李院等^[6]从酱菜中分离 3 株对青霉及曲霉有较强拮抗作用的乳酸菌 L511、L520、L544,它们的抑菌圈直径均大于 18 mm。石金鑫^[7]从发酵食品中分离筛选出 2 株对扩展青霉和黑曲霉有较强拮抗活性的乳酸菌 SC3 和 PC3,对扩展青霉的抑制率分别为 61.92%和 62.62%,对黑曲霉抑制率分别为 65.96%和 76.03%。Lv 等^[8]筛选获得 1 株植物乳杆菌 C10,对粉红单端孢有显著抑制作用,抑制率达 93.93%;在甜瓜感染粉红单端孢的体外应用研究中,经植物乳杆菌 C10 处理,感染区面积减少了 19.58%。然而,目前乳酸菌对互隔交链孢霉的抑制作用鲜有研究报道。

本文以来自典型苹果黑斑病果实的互隔交链孢霉为研究对象,采用菌饼法从发酵蔬菜中分离筛选对互隔交链孢霉有较强抑制作用的乳酸菌。研究不同浓度乳酸菌处理对互隔交链孢菌丝生长及孢子萌发、孢子膜完整性、丙二醛、可溶性蛋白质、可溶性糖含量以及超微结构的影响,阐明乳酸菌对互隔交链孢霉的拮抗机制;并进一步探究乳

收稿日期: 2021-07-27

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2017YFD0400106);辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNKLFS202112)

作者简介: 吕欣然(1990—),女,博士,讲师

通信作者: 白凤翎 E-mail: baifling@163.com

酸菌对苹果黑斑病的控制作用。本研究以期研发乳酸菌生物制剂控制果蔬采后病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)菌株 Bd-12:分离自典型苹果黑斑病果实。

乳酸菌菌株:LNL1-4、LNL1-5、LNL2-4-1、LNL2-4-2、LNL2-5 分离自辽宁锦州百合食品有限公司腌渍萝卜。

以上菌种均保藏于本院微生物学与分子生物学实验室。

富士苹果,辽宁省锦州市科技路市场。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、MRS 液体培养基、马铃薯葡萄糖肉汤(PDB),北京奥博星生物技术有限责任公司;Taq PCR Master mix、细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、DNA marker-D,生工生物工程(上海)股份有限公司;乳酸菌生化鉴定管,杭州天合微生物试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SPX-250 生化培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;5804R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;GI54DS 高压灭菌锅,至微仪器有限公司;DL-CJ-2N 超级洁净工作台,北京市东联哈尔仪器制造有限公司;THZ-D 台式恒温振荡器,太仓市试验设备厂;尼康 Ti-s 双端口倒置显微镜,上海衡浩仪器有限公司;UV2550 紫外分光光度计,日本岛津;DDSJ-308A 电导率仪,上海精密仪器仪表有限公司;S-4800 扫描电镜,日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 乳酸菌的分离 参考文献[9]将准备好的锦州发酵萝卜切成 2 cm×2 cm 的块状,放入无菌生理盐水中浸泡 15 min,取样品浸泡液 1.0 mL 倒入生理盐水制成 10 倍稀释液。在无菌条件下,吸取 0.1 mL 稀释液涂布在 1.0% 碳酸钙的 MRS 培养基表面,37 °C 培养 24 h。挑取具有溶钙圈白色单菌落在 MRS 培养基上分区划线纯化,重复上述操作 3 次,并进行革兰氏染色和过氧化氢试验。将纯化后菌株接种于 MRS 斜面,置于 -20 °C 条件下保藏备用。

1.3.2 对互隔交链孢霉具有抑制活性乳酸菌的筛选 取保藏乳酸菌菌株以 2.0% 接种量在 MRS 肉汤中活化,37 °C 静置培养 24 h,活化至 3 代。体外菌丝体生长的测量按照 Tatsadjieu 等^[10]的方法并稍作修改,将活化好的乳酸菌菌悬液以 1.0% 接种量分别添加在 PDA 培养基平板表面,并用涂布器涂均匀,然后接种互隔交链孢霉菌饼。以 MRS 液体培养基作对照,26 °C 避光培养 7 d,观察菌丝生长,测定其菌落直径。当对照组平板中菌丝长满平板表面时,用游标卡尺交叉测量菌落生长直径(mm),并按式(1)计算乳酸菌对互隔交链孢霉的抑菌率。分析比较不同乳酸菌对互隔交链孢霉的抑菌效果,筛选 1 株对互隔交链孢霉生长有较强拮抗作用的菌株,进行后续试验。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{d_0 - d_1}{d_0 - d_2} \times 100 \quad (1)$$

式中, d_0 ——对照组互隔交链孢霉菌落直径(mm); d_1 ——试验组互隔交链孢霉菌落直径(mm); d_2 ——原菌饼直径(mm)。

1.3.3 乳酸菌菌株鉴定 生理生化反应:参照《常见细菌系统鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》对乳酸菌菌株进行生理生化鉴定^[11-12]。

16S rDNA 序列鉴定:参照文献[13],PCR 应用 25 μL 扩增反应体系:扩增引物为 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGGYTACCTTTGTTACGACTT-3' 各 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, Taq PCR Master mix 12.5 μL, 超纯水 9.5 μL。PCR 扩增反应程序:94 °C 2 min, 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 90 s, 循环 30 次, 4 °C 保温。PCR 产物进行凝胶电泳并照相,将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果与 NCBI 数据库进行 BLAST 同源比对,MEGA5.0 构建系统发育进化树。

1.3.4 乳酸菌对互隔交链孢霉菌丝体的拮抗活性研究 将不同浓度($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9$ CFU/mL)的乳酸菌菌悬液按 1.3.2 节的方法进行试验,分析不同浓度乳酸菌对互隔交链孢霉菌丝体的拮抗作用。

1.3.5 乳酸菌对互隔交链孢霉孢子萌发的抑制作用 参照 Kivanc 等^[14]方法并稍作修改,向培养 7 d 长满互隔交链孢霉的 PDA 培养基中添加 10.0 mL

无菌水,刮下孢子后使用400目无菌纱布过滤。用无菌水制成 1.0×10^6 spores/mL的孢子悬浮液,备用。将孢子悬浮液与不同浓度乳酸菌菌悬液按照1:1混合均匀,取200 μ L混合液加入PDA培养基,涂布器涂布均匀。封口膜密封,26 $^{\circ}$ C恒温培养。接种后每隔2 h将不同浓度乳酸菌处理的菌种制片,在倒置显微镜下观察其孢子萌发形态,并用计数器计数,每个浓度3组数据,每组计 1.0×10^2 孢子。

1.3.6 乳酸菌对互隔交链孢霉抑菌机制研究

1.3.6.1 对互隔交链孢霉细胞膜完整性的影响

参照夏晓明等^[15]方法并稍作修改。将 1.0×10^6 spores/mL的孢子悬浮液加入100 mL的PDB液体培养基中,摇床120 r/min培养3 d后,加入一定量的乳酸菌,以不加乳酸菌为阳性对照,只加乳酸菌为阴性对照。立即取出5.0 mL,用DDSJ-308A电导率仪测定电导率,继续培养2,4,6,8 h,5 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心10 min,将沉淀重悬于无菌水中测电导率,95 $^{\circ}$ C水浴30 min后冷却至室温测定最终电导率。相对电导率由式(2)计算:

$$\text{相对电导率}(\%) = \frac{D_2 - D_1}{D_2} \times 100 \quad (2)$$

式中, D_1 ——初始电导率(μ S/cm); D_2 ——最终电导率(μ S/cm)。

1.3.6.2 对互隔交链孢霉胞外泄漏物的影响
将 1.0×10^6 spores/mL孢子悬浮液加入到100 mL PDB中,26 $^{\circ}$ C 200 r/min振荡培养3 d后加入乳酸菌,以不加乳酸菌为阴性对照组,只加乳酸菌为阳性对照组。继续振荡培养,每隔2 h取培养液,于12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心20 min,取上清液用于丙二醛含量、可溶性蛋白以及可溶性糖含量的检测。

丙二醛含量测定:参考文献^[16]测量丙二醛含量,取上述所得上清液2 mL,加入2 mL 0.5%的硫代巴比妥酸(溶于15%的三氯乙酸),混匀后沸水中放置20 min,冷却后4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心20 min。上清液分别在450,532,600 nm波长处测定其吸光值。按公式(3)计算丙二醛含量:

$$\text{丙二醛含量} = 6.45 \times (\text{OD}_{532\text{nm}} - \text{OD}_{600\text{nm}}) - 0.56 \times \text{OD}_{450\text{nm}} \quad (3)$$

可溶性蛋白含量测定:参考Bradford^[17]的方法,取1 mL上述上清液,加入5.0 mL考马斯亮蓝

G250溶液,静置2 min测定 $\text{OD}_{595\text{nm}}$ 值。

可溶性糖含量测定:参照Morris^[18]的方法,采用蒽酮比色法对胞外可溶性糖进行定量分析。取0.2 mL上清液加入0.6 mL蒸馏水与0.2 mL蒽酮试剂混合,再加入2.0 mL浓硫酸,沸水中放置1 min,冷却后测定 $\text{OD}_{630\text{nm}}$ 值。

1.3.6.3 乳酸菌对互隔交链孢霉孢子超微结构的影响
扫描电镜样品的制作:参考文献^[19]并稍作修改,将1.0 mL孢子悬浮液(1.0×10^6 spores/mL)与1.0 mL乳酸菌菌悬液(1.0×10^9 CFU/mL)混合,以不加乳酸菌菌悬液为对照组,在26 $^{\circ}$ C 200 r/min摇床培养24 h。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心20 min,去上清。将沉淀用PBS(pH 6.8)洗涤3次后,在4 $^{\circ}$ C条件用体积分数为2.5%的戊二醛固定12 h后,PBS溶液洗3次,每次10 min;再用体积分数为1%的锇酸溶液4 $^{\circ}$ C下固定2 h左右,用PBS溶液洗3次;将样品用体积分数为30%,50%,70%,95%,100%的乙醇各脱水15 min。胶头滴管吸取1滴于洁净盖玻片上,空气干燥,真空喷金镜检。

1.3.7 乳酸菌对接种互隔交链孢霉的苹果果实病变的影响
参照葛永红等^[20]方法并稍作修改。选择大小、色泽和成熟度相似且无损伤的苹果果实,用70%酒精对苹果表面进行消毒,然后用无菌注射器在苹果表面制备3个小孔(每个小孔深2 mm \times 宽2 mm),无菌风风干后,将 $0, 10^1, 10^3, 10^5, 10^7, 10^9$ CFU/mL的乳酸菌菌悬液20 μ L注射到每个小孔中。无菌风再次风干,在每个小孔中接种20 μ L互隔交链孢霉孢子悬浮液(1.0×10^6 spores/mL)。处理后的苹果用自封袋封起,并在自封袋留下呼吸孔,置于28 $^{\circ}$ C培养箱培养6 d,相对湿度为70%~80%。记录接种后2,4,6 d的苹果病变直径。

1.4 数据处理与统计分析

试验重复3次,数据采用“平均值 \pm 标准差”表示。SPSS 19.0进行数据分析,采用Origin 8.0绘图。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的分离纯化

通过对锦州发酵萝卜进行切块、浸泡、培养、分离纯化等操作,共分离得到有溶钙圈、革兰氏染色阳性、过氧化氢酶阴性的40株乳酸菌菌株,图

1 是菌株 LNL2-4-2 的菌落形态和革兰氏染色结果,由图 1a 可知,菌落呈乳酸菌典型生长特征:乳白色,表面光滑整齐,中央凸起,由图 1b 可知菌株 LNL2-4-2 为革兰氏阳性菌,直杆状排列,无鞭毛,无芽孢。

2.2 筛选对互隔交链孢霉具有拮抗活性的乳酸菌

表 1 是从 40 株乳酸菌中筛选出对互隔交链孢霉有抑制作用的菌株及其抑菌率结果。从表 1 可以看出:菌株 LNL2-4-2 的抑菌率达 80.86%,效果最好;LNL1-5、LNL2-4-1 和 LNL1-4 效果次之,分别为 75.45%、72.16%、70.58%;LNL2-5 效果较差,抑菌率为 60.29%。综上所述,选择菌株 LNL2-4-2 进行后续试验。

2.3 乳酸菌菌株鉴定

2.3.1 生理生化鉴定 菌株 LNL2-4-2 生理生化

表 1 乳酸菌对互隔交链孢霉的抑制作用

Table 1 Inhibition rate of lactic acid bacteria against *Alternaria alternata*

| 菌株 | LNL1-4 | LNL1-5 | LNL2-4-1 | LNL2-4-2 | LNL2-5 |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 抑菌率/% | 70.58 ± 1.39 ^c | 75.45 ± 0.57 ^b | 72.16 ± 1.21 ^c | 80.86 ± 0.32 ^a | 60.29 ± 2.58 ^d |

表 2 菌株 LNL2-4-2 生理生化鉴定结果

Table 2 Physiological and biochemical test results of strain LNL2-4-2

| 项目 | LNL2-4-2 | 项目 | LNL2-4-2 | 项目 | LNL2-4-2 | 项目 | LNL2-4-2 |
|------|----------|-----|----------|------|----------|-------|----------|
| 蔗糖 | + | 麦芽糖 | + | 木糖 | - | 果糖 | + |
| 甘露醇 | + | 水杨苷 | + | 蜜二糖 | + | 七叶苷 | + |
| 甘露糖 | + | 葡萄糖 | + | 阿拉伯糖 | + | 明胶液化 | - |
| 山梨醇 | + | 棉籽糖 | - | 乳糖 | + | 葡萄糖酸盐 | - |
| 纤维二糖 | + | 鼠李糖 | - | 半乳糖 | + | | |

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

2.3.2 16S rDNA 鉴定 菌株 LNL2-4-2 16S rDNA 基因扩增电泳图如图 2 所示。将 PCR 产物进行凝胶电泳检测,结果发现在 1 500 bp 左右出现特异性亮带,表明目标片段被成功扩增。菌株 LNL2-4-2 16S rDNA 系统发育树见图 3,由图可知,菌株 LNL2-4-2 和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) MF369877.1 的 16S rDNA 最为相似,支持率为 99%。可确证菌株 LNL2-4-2 为植物乳杆菌。

2.4 乳酸菌对互隔交链孢霉菌丝体的抑制作用

图 4 是不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉菌丝体生长的抑制结果,从图中可以

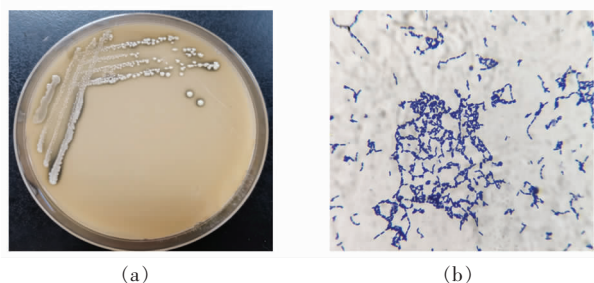


图 1 菌株 LNL2-4-2 的菌落形态图(a)和革兰氏染色图(b,1 000×)

Fig.1 Colony morphology (a) and Gram stain (b, 1 000×) of strain LNL2-4-2

鉴定结果如表 2 所示,依据《常见细菌系统鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》可初步判断菌株 LNL2-4-2 为乳杆菌属。

看出,不同浓度的乳酸菌对互隔交链孢霉菌丝的生长均有抑制作用,且浓度越高,抑制作用越好。当植物乳杆菌 LNL2-4-2 浓度为 10^9 CFU/mL 时,对互隔交链孢霉菌丝体的抑制作用最强(图 4A),抑制率为 $80.86\% \pm 0.32\%$ (图 4B),可以显著抑制菌丝体的生长($P < 0.05$)。

2.5 乳酸菌对互隔交链孢霉孢子的抑制作用

图 5 为不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对孢子萌发的抑制作用。由图 5 可知随着乳酸菌浓度升高,对孢子的抑制作用增强。培养 10 h 后,对照组萌发率为 91.67%,菌株 LNL2-4-2 浓度为 10^9 CFU/mL 的处理组抑制率为 48.00%,显著抑制孢

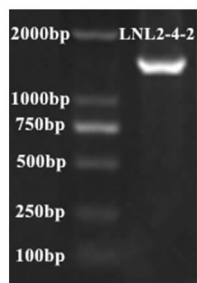


图 2 菌株 LNL2-4-2 的 16S rDNA 基因扩增电泳图

Fig.2 PCR amplification of 16S rDNA gene of strain LNL2-4-2

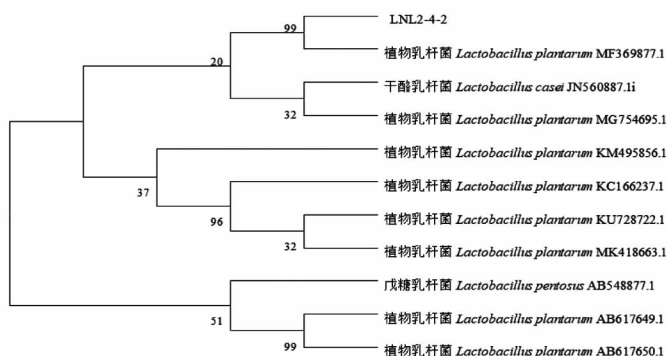
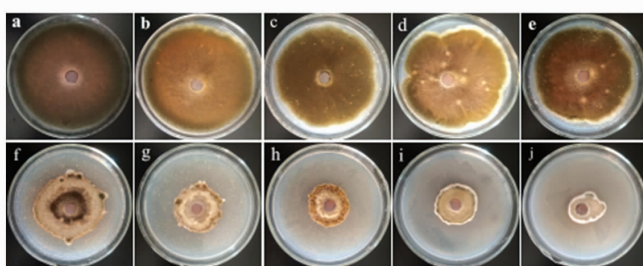
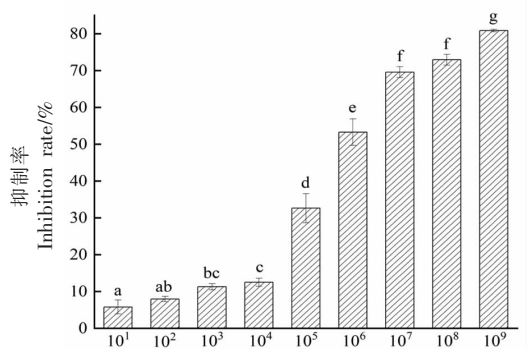


图 3 菌株 LNL2-4-2 的 16S rDNA 系统发育树

Fig.3 The phylogenetic tree for sequences of strain LNL2-4-2



(A)



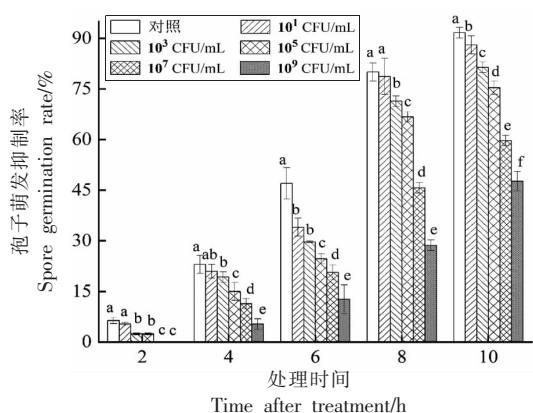
植物乳杆菌 LNL2-4-2 浓度
Concentration of *L. plantarum* LNL2-4-2/CFU·mL⁻¹

(B)

注:图 A 中 a~j 表示菌株 LNL2-4-2 浓度为 0, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ CFU/mL 对互隔交链孢霉菌丝抑制效果, 图 B 中 a~g 表示不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对菌丝体抑菌率的显著性分析 (P<0.05)。

图 4 不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉菌丝体抑制效果

Fig.4 Inhibitory effect of different concentrations of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the mycelium of *A. alternata*



注:a~c 表示相同时间的不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 显著性分析 (P<0.05)。

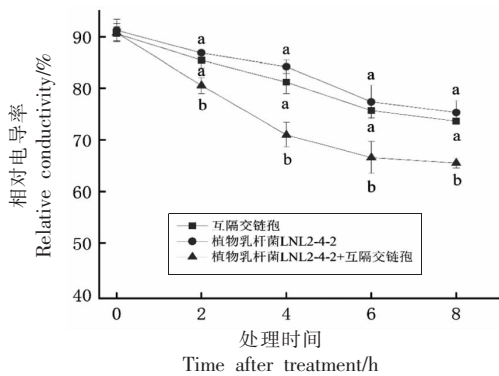
图 5 不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉孢子萌发的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the germination of *A. alternata* spores

子萌发 (P<0.05)。本文的研究结果与现有文献报道一致,杨晓蕾等^[21]将枯草芽孢杆菌 JR-C 处理梨黑斑病菌孢子悬浮液时发现,拮抗菌 JR-C 代谢产物可显著抑制孢子萌发,且随着浓度的增加抑制效果越好。综上所述,浓度为 10⁹ CFU/mL 的植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉菌丝体生长和孢子萌发的抑制效果显著,选用浓度 10⁹ CFU/mL 的菌株 LNL2-4-2 探究抑菌机理。

2.6 乳酸菌对互隔交链孢霉抑菌机理研究

2.6.1 对互隔交链孢霉细胞膜完整性的影响
细胞膜的完整性是维持胞内环境稳定代谢的重要基础,当其被破坏时,会导致细胞内电解质外流,因此,通常选用检测电导率来检测细胞膜完整性^[22]。图 6 表示菌株植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理对互隔交链孢霉电导率的影响。由图可知,随



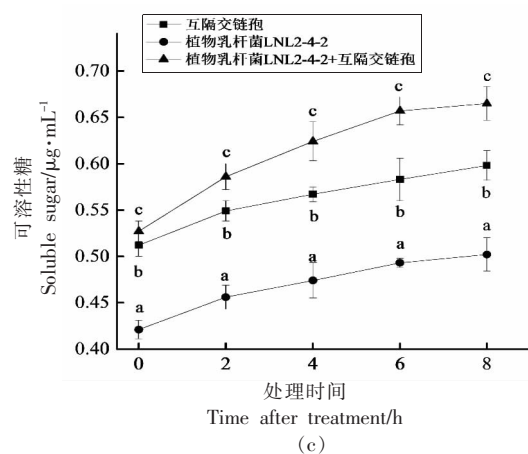
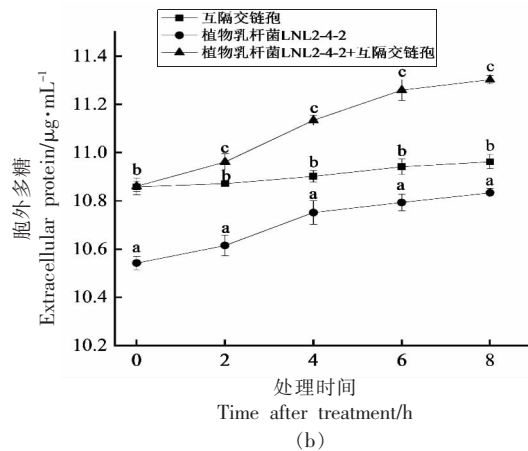
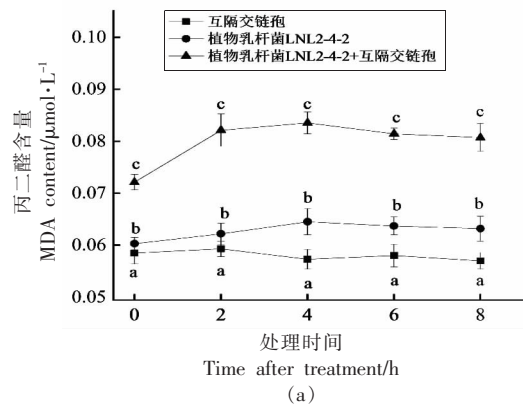
注:a,b表示相同时间的不同处理显著性分析($P < 0.05$)。

图6 植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉电导率的影响
Fig.6 Effect of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the integrity of *A. alternata* cell membrane

随着作用时间的延长,未处理的互隔交链孢霉组、乳酸菌组以及乳酸菌处理的互隔交链孢霉相对电导率逐渐下降,然而乳酸菌处理互隔交链孢霉组的下降速率显著高于未处理的互隔交链孢霉组和乳酸菌组($P < 0.05$),表明菌株 LNL2-4-2 处理互隔交链孢霉后,其胞内电解质泄漏值显著高于未处理的互隔交链孢霉和乳酸菌组。有研究发现,1.0 mmol/L 硝普钠处理粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 1.5 h 后,胞内电导率下降速率显著高于对照组^[23],该结果与本研究结果相似。

2.6.2 对互隔交链孢霉胞外泄漏物的影响 丙二醛(MDA)是衡量脂质过氧化程度的主要标志物,MDA 含量显著增加,表明病原体脂质过氧化程度严重,进而导致其细胞膜的重度氧化损伤^[24],这加剧了对膜完整性的损害,并导致细胞内蛋白质和糖类析出,从而使胞外蛋白含量和可溶性糖含量增加。植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理对互隔交链孢霉的丙二醛、胞外蛋白、可溶性糖含量的影响如图 7 所示。

由图 7a 可知,未处理的互隔交链孢霉组丙二醛含量基本保持不变,乳酸菌组以及乳酸菌处理的互隔交链孢霉组在 0~4 h 随时间的延长丙二醛含量增加,4~8 h 随时间的延长丙二醛含量呈下降趋势,然而乳酸菌处理的互隔交链孢霉组丙二醛含量始终显著高于未处理的互隔交链孢霉组 ($P < 0.05$),表明植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理刺激了互隔交链孢霉细胞膜脂质过氧化。这一结果与 Li 等^[25]



注:a~c表示相同时间的不同处理显著性分析($P < 0.05$)。

图7 植物乳杆菌 LNL2-4-2 对 *A. alternata* 丙二醛(a)、胞外蛋白(b)、可溶性糖(c)含量的影响
Fig.7 Effects of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the contents of *A. alternata* malondialdehyde (a), extracellular protein (b) and soluble sugar (c)

用对香豆酸乙酯(EpCA)作用于互隔交链孢霉的研究结果相一致。与对照组相比,分别用 100,800

$\mu\text{g/mL}$ EpCA 处理互隔交链孢霉,MDA 含量分别增加了 1.06 倍和 1.59 倍。

图 7b 中,未处理的互隔交链孢霉组、乳酸菌组以及乳酸菌处理的互隔交链孢霉组的胞外蛋白含量均随着培养时间的延长而不断上升,而植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理后的蛋白含量显著高于另外 2 组 ($P<0.05$)。Rocha 等^[26]使用 2.5 mmol/L 水杨酸(SA)处理扩展青霉 30 min 后导致可溶性蛋白质泄漏达 3.2 $\mu\text{g/g}$,而对照组为 1.8 $\mu\text{g/g}$,该结果与本研究结果相似。

糖类是细胞在生长过程中必不可少的营养物质,图 7c 中,未处理的互隔交链孢霉组与乳酸菌组可溶性糖含量均随时间的延长而逐渐上升,乳酸菌处理的互隔交链孢霉组在 0~6 h 的可溶性糖含量逐渐升高,而 6~8 h 开始呈下降趋势,处理组可溶性糖含量均显著高于其它 2 组的含量 ($P<0.05$)。Li 等^[27]用 800 mg/L 对羟基苯甲酸甲酯(MpCA)处理互隔交链孢霉,可溶性糖含量在培养 5 h 后比对照组高 8.9 倍。该结果与本研究结果类似。由此可知,植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理互隔交链孢霉后对其细胞膜完整性有一定的破坏作用。

2.7 乳酸菌对互隔交链孢霉孢子超微结构的影响

图 8 为植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理互隔交链孢霉孢子后扫描电镜观察结果。从图中可以看出,对照组孢子形态为倒梨形,结构完整,表面较光滑。经植物乳杆菌 LNL2-4-2 处理后,有大量乳酸

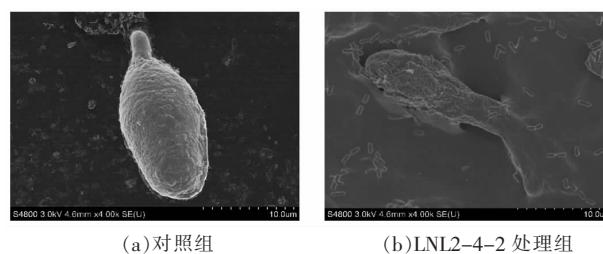


图 8 植物乳杆菌 LNL2-4-2 对 *A. alternata* 孢子超微结构的影响

Fig.8 Effect of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the ultrastructure of *A. alternata* spores

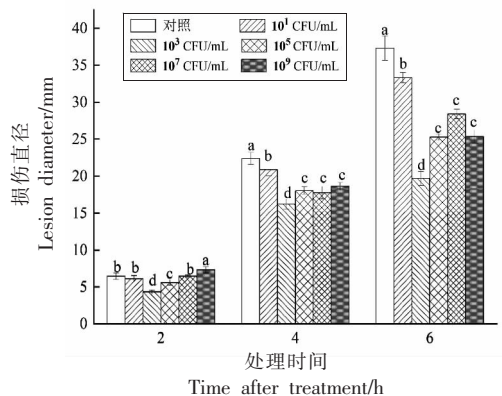
菌附着在孢子表面,使其表面出现褶皱,边缘模糊,顶端破裂,有内容物泄漏,结构完整性被破坏。表明菌株 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉孢子细胞膜有一定的损伤作用,从而破坏其细胞膜的完整性,使其胞内物质泄漏,该结果与 2.6 节的测定结果相一致。

2.8 乳酸菌对接种互隔交链孢霉的苹果果实病变的影响

如图 9 所示,病变直径随贮存时间延长而增加,不同浓度的植物乳杆菌 LNL2-4-2 会抑制接种互隔交链孢霉的苹果果实病变直径的增长。在第 2 天,与对照相比,除了 10^9 CFU/mL 处理组显著促进病变直径的增加,浓度为 10^1 CFU/mL 和 10^7 CFU/mL 处理组与对照无明显差异, 10^3 CFU/mL 和 10^5 CFU/mL 处理组对互隔交链孢霉抑制作用显著。在第 4 天和第 6 天,各浓度处理组均可显



(A)



(B)

注:图 A 中 a~f 表示植物乳杆菌 LNL2-4-2 的处理浓度为 0, 10^1 , 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 CFU/mL;图 B 中 a~d 表示不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对苹果果实损伤直径的显著性分析 ($P<0.05$)。

图 9 不同浓度植物乳杆菌 LNL2-4-2 对接种互隔交链孢霉的苹果损伤直径的影响

Fig.9 Effects of different concentrations of *Lactobacillus plantarum* LNL2-4-2 on the damage diameter of apples inoculated with *Alternaria alternata*

著抑制苹果果实的损伤直径,其中 10^3 CFU/mL 的植物乳杆菌 LNL2-4-2 抑制效果最好, 10^5 , 10^7 , 10^9 CFU/mL 处理组抑制作用无显著性差异 ($P>0.05$)。在第 2,4,6 天中 10^3 CFU/mL 的植物乳杆菌 LNL2-4-2 对苹果损伤直径的抑制率分别为 26.97%, 27.48%, 47.24%。李灿婴等^[28]研究了不同浓度的植物乳杆菌 XCT1-10 对接种灰葡萄孢菌的苹果损伤直径的影响,结果表明,较低浓度 10^6 CFU/mL 的植物乳杆菌 XCT1-10 可显著降低苹果果实损伤直径,高浓度的植物乳杆菌 XCT1-10 会增加苹果果实损伤直径,可推测高浓度的植物乳杆菌 LNL2-4-2 会增加互隔交链孢霉的侵染程度,原因可能是植物乳杆菌 LNL2-4-2 可能会分泌某些促进互隔交链孢霉生长的代谢物质。上述研究与本研究结果类似,说明植物乳杆菌 LNL2-4-2 可作为水果保鲜的生物防治剂。

3 结论

本文从发酵蔬菜分离的乳酸菌中筛选出对互隔交链孢霉有显著抑制作用的植物乳杆菌 LNL2-4-2,抑制率为 80.86%。此外,菌株 LNL2-4-2 可抑制互隔交链孢霉离体菌丝生长和孢子萌发,且随着浓度升高,抑制作用增强。浓度为 10^9 CFU/mL 的乳酸菌处理互隔交链孢霉孢子后,使其细胞膜完整性降低,孢外丙二醛、可溶性蛋白质、可溶性糖含量增加。超微结构图像显示菌株 LNL2-4-2 破坏了霉菌孢子的细胞膜,导致孢子表面皱缩,顶端破裂使其内容物泄漏。植物乳杆菌 LNL2-4-2 对互隔交链孢霉的作用位点是其孢子的细胞膜,通过膜损伤来发挥拮抗作用。植物乳杆菌 LNL2-4-2 在体外对感染互隔交链孢霉的苹果具有保鲜防腐作用,因此植物乳杆菌 LNL2-4-2 可作为抑制互隔交链孢霉的出发菌株,为研发控制果蔬采后腐败变质的生物制剂提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] ESTIARTE N, CRESPO-SEMPERE A, MARÍN S, et al. Exploring polyamine metabolism of *Alternaria alternata* to target new substances to control the fungal infection [J]. Food Microbiology, 2017, 65: 193-204.
- [2] 马欢欢, 吕欣然, 缪璐欢, 等. 鼠李糖乳杆菌对互隔交链孢霉的抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(17): 180-184.
MA H H, LV X R, MIAO L H, et al. Effects of the inhibitory activity of *Lactobacillus rhamnosus* against *Alternaria alternata* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(17): 180-184.
- [3] PANE C, FRATIANNI F, PARISI M, et al. Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts[J]. Crop Protection, 2016, 84: 81-87.
- [4] 张伟, 艾启俊, 吴振宇, 等. 鹿蹄草素对梨采后黑斑病原菌的抑制作用[J]. 果树学报, 2008(5): 755-759.
ZHANG W, AI Q J, WU Z Y, et al. Inhibitory effect of pyrolin on *Alternaria alternata* causing occurrence of black spot in postharvest pear [J]. Journal of Fruit Science, 2008(5): 755-759.
- [5] PUTRA T F, SUPRAPTO H, TJAHJANINGSIH W, et al. The antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from peda, an Indonesian traditional fermented fish[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2018, 137: 012060.
- [6] 李院, 魏新元, 王静, 等. 抑制青霉菌乳酸菌的分离、鉴定及抑菌物质分析[J]. 食品科学, 2015, 36(21): 150-155.
LI Y, WEI X Y, WANG J, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting *Penicillium* and analysis of their antimicrobial components[J]. Food Science, 2015, 36(21): 150-155.
- [7] 石金鑫. 抗霉菌乳酸菌的筛选及其应用研究[D]. 辽宁锦州: 渤海大学, 2016.
SHI J X. Screening of lactic acid bacteria with antifungal and its application in food [D]. Jinzhou: Bohai University, 2016.
- [8] LV X R, MA H H, LIN Y, et al. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* C10 against *Trichothecium roseum* and its application in promotion of defense responses in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit[J]. Journal of Food Science and Technology, 2018, 55(9): 3703-3711.
- [9] 王昱敬, 黄艾祥, 刘雪英, 等. 德宏水牛乳饼中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(2): 226-230.

- WANG Y J, HUANG A X, LIU X Y, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from buffalo milk cakes in Dehong and analysis of fermentability[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(2): 226-230.
- [10] TATSADJIEU N L, DONGMO P M J, NGASSOUM M B, et al. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries[J]. Food Control, 2009, 20(2): 161-166.
- [11] 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: 289-294.
- DONG X Z, CAI M Y. Manual of identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 289-294.
- [12] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 130-137.
- LING D W, DONG X Z. Classification, identification and experimental methods of lactic acid bacteria[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 130-137.
- [13] 林洋, 马欢欢, 吕欣然, 等. 传统发酵蔬菜中拮抗温和气单胞菌的乳酸菌的筛选与鉴定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(4): 231-235.
- LIN Y, MA H H, LV X R, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Aeromonas sobria* from traditional fermented vegetables[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(4): 231-235.
- [14] KIVANC M, KIVANC S A, PEKTAS S. Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against fungi[J]. Journal of Food Processing and Technology, 2014, 5(3): 1000310.
- [15] 夏晓明, 王开运, 范昆, 等. 抗戊唑醇禾谷丝核菌的渗透压敏感性及其相对渗透率变化研究[J]. 农药学报, 2005(2): 126-130.
- XIA X M, WANG K Y, FAN K, et al. Changes of relative leakage and osmolarity sensitivity to tebuconazole-resistant strains of *Rhizoctonia cerealis* [J]. Chinese Journal Pesticide Science, 2005(2): 126-130.
- [16] 李明杨. 抗链格孢乳酸菌的筛选及其对库尔勒香梨品质及生理的影响[D]. 新疆: 塔里木大学, 2018.
- LI M Y. Screening of the lactic acid bacteria against *Alternaria* and its effects on quality and physiology of Korla fragrant pear[D]. Xinjiang: Tarim University, 2018.
- [17] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [18] MORRIS D L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent[J]. Science (Washington), 1948, 107: 254-255.
- [19] BUENO D J, SILVA J O, OLIVER G, et al. *Lactobacillus casei* CRL 431 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1224 as biological controls for *Aspergillus flavus* strains [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(10): 2544-2548.
- [20] 葛永红, 王毅, 毕阳. 柠檬酸处理对厚皮甜瓜黑斑病的抑制及苯丙烷代谢的作用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(19): 308-312.
- GE Y H, WANG Y, BI Y. Control of black spot and potentiating of phenylpropanoid pathway in muskmelon fruit treated by citric acid[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(19): 308-312.
- [21] 杨晓蕾, 钱国良, 范加勤, 等. 梨黑斑病菌拮抗细菌的筛选鉴定及其拮抗活性的研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(1): 68-74.
- YANG X L, QIAN G L, FAN J Q, et al. Selection and identification of antagonist *Alternaria alternate* and initial analysis of its antipathogenic activity[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(1): 68-74.
- [22] TIAN J, WANG Y, ZENG H, et al. Efficacy and possible mechanisms of perillaldehyde in control of *Aspergillus niger* causing grape decay[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 202: 27-34.
- [23] 陈延儒, 葛永红, 魏美林, 等. 硝普钠对粉红单端孢的离体抑菌作用[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 19-24.
- CHEN Y R, GE Y H, WEI M L, et al. Inhibition effects of sodium nitroprusside on the *Trichothecium roseum in vitro*[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 19-24.
- [24] 秦晓杰, 肖红梅, 罗凯, 等. 水杨酸结合拮抗酵母菌处理对冷藏草莓果实的抗性影响[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 290-294.
- QIN X J, XIAO H M, LUO K, et al. Effect of antagonistic yeast in combination with salicylic acid on chilling resistance of strawberry fruits during cold

- storage[J]. Food Science, 2013, 34(18): 290–294.
- [25] LI W, YUAN S, SUN J, et al. Ethyl p-coumarate exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against fruit *Alternaria alternata* via membrane-targeted mechanism[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 278: 26–35.
- [26] DA ROCHA NETO A C, MARASCHIN M, PIERO R M D. Antifungal activity of salicylic acid against *Penicillium expansum* and its possible mechanisms of action[J]. Food Microbiology, 2015, 215: 64–70.
- [27] LI W, YUAN S, LI Q, et al. Methyl p-coumarate inhibits black spot rot on jujube fruit through membrane damage and oxidative stress against *Alternaria alternata* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 145: 230–238.
- [28] 李灿婴, 程园, 侯佳宝, 等. 植物乳杆菌 XCT 1–10 对灰葡萄孢体内和体外生长的影响及其可能机制[J]. 食品科学, 2021, 42(22): 140–147.
- LI C Y, CHENG Y, HOU J B, et al. *In vitro* and *in vivo* effect of *Lactobacillus plantarum* XCT 1–10 on the growth of *Botrytis cinerea* and its possible mechanisms involved [J]. Food Science, 2021, 42 (22): 140–147.

Inhibition Effect of *Lactobacillus plantarum* LNL2–4–2 on *Alternaria alternata*

Lü Xinran, Gao Yongyue, Du Hong, Ge Yonghong, Li Jianrong, Bai Fengling*

(National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, School of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning)

Abstract Black spot disease caused by *Alternaria alternata* is one of the main diseases of fruits and vegetables after harvest. The aims of this study were to screen lactic acid bacteria (LAB) with antagonistic activity to *A. alternata*, and to preliminarily explore the antibacterial mechanism of LAB. The strains with strong inhibitory activity against *A. alternata* was screened by fungus cake method, and it was identified by biochemical tests and 16S rDNA sequencing. The inhibition mechanism of *L. plantarum* was preliminarily investigated by the determination of cell membrane integrity, malondialdehyde, soluble protein, soluble sugar content, and spore ultrastructural changes. Results indicated that the strain LNL2–4–2 had a strong inhibitory effect on *A. alternata*, and the inhibition rate was 80.86%. It was identified as *Lactobacillus plantarum*. Different concentrations of strain LNL2–4–2 inhibited the growth of *A. alternata* mycelium and spore germination, and the inhibition effect increased with increasing concentration. When the concentration of strain LNL2–4–2 was 10^9 CFU/mL, the membrane integrity rate of *A. alternata* spores decreased by 10.98%, and the extracellular malondialdehyde, soluble protein and soluble sugar content increased by 10.66%, 3.10% and 11.21%, respectively. The scanning electron microscope images showed that strain LNL2–4–2 damaged *A. alternata* plasma membrane, resulting in spore surface to shrink, the edges to be blurred, and the top to disrupt. In the study of apple biological control, when stored for 6 days, the inhibition rate of LNL2–4–2 at a concentration of 10^3 CFU/mL on the diameter of the damage caused by *A. alternata* reached 47.24%. These results indicated that the action site of *L. plantarum* LNL2–4–2 on *A. alternata* was cell membrane of spores, which exerted antagonism through membrane damage. The study proved that *L. plantarum* LNL2–4–2 can act as a biological preservative for inhibiting *A. alternata*.

Keywords *Lactobacillus plantarum*; *Alternaria alternata*; antibacterial mechanism; screen