

# 伊枯草菌素 A 对草莓腐败菌的抑制效果研究

王晓琼<sup>1</sup>, 毕秀芳<sup>1\*</sup>, 谢晓凤<sup>2</sup>, 邢亚阁<sup>1</sup>, 李明元<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西华大学食品与生物工程学院, 成都 610039; <sup>2</sup>宜宾西华大学研究院, 宜宾 644000

**摘要:**实验研究了伊枯草菌素 A 对草莓腐败菌镰刀霉 (*Fusarium fujikuroi*) 和灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 的抑菌效果。实验采用脱氢乙酸钠和纳他霉素为阳性对照。研究结果得出, 对 *F. fujikuroi*, 脱氢乙酸钠、纳他霉素、伊枯草菌素 A 的最低抑菌浓度 (MIC) 分别为 3.0、7.5、0.051 8 mg/mL; 对 *B. cinerea*, 脱氢乙酸钠、纳他霉素、伊枯草菌素 A 的 MIC 分别为 20、20、0.037 0 mg/mL。上述结果表明, *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 对伊枯草菌素 A 的敏感性均大于脱氢乙酸钠和纳他霉素。对三种抑菌剂处理后的腐败菌进行核酸蛋白质泄露情况测定。结果表明, 三种抑菌剂均是以破坏腐败菌的细胞膜, 导致核酸蛋白质的泄露, 从而达到抑菌效果。本文研究了伊枯草菌素 A 对采后草莓腐败真菌的抑菌效果, 为伊枯草菌素 A 在草莓采后保鲜中的应用提供理论依据。

**关键词:**伊枯草菌素 A; 镰刀霉; 灰葡萄孢霉; 最低抑菌浓度; 核酸蛋白质泄露

中图分类号: S436.68

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)11-1889-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.11.012

## Antibacterial effect of iturin A on strawberry spoilage mold

WANG Xiao-qiong<sup>1</sup>, BI Xiu-fang<sup>1\*</sup>, XIE Xiao-feng<sup>2</sup>, XING Ya-ge<sup>1</sup>, LI Ming-yuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Food and Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China;

<sup>2</sup>Yibin Xihua University Research Institute, Yibin 644000, China

**Abstract:** The antimicrobial effect of iturin A on *Fusarium fujikuroi* and *Botrytis cinerea* was studied. The sodium dehydroacetate and natamycin were used as positive controls. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium dehydroacetate, natamycin, and iturin A for *F. fujikuroi*, were 3, 7.5 and 0.051 8 mg/mL, respectively. For *B. cinerea*, the MIC of sodium dehydroacetate, natamycin, and iturin A were 20, 20 and 0.037 0 mg/mL, respectively. These results indicated that both *F. fujikuroi* and *B. cinerea* were more sensitive to iturin A than sodium dehydroacetate and natamycin. The nucleic acid and protein leakage were measured for the spoilage mold treated after the three bacteriostatic agents. The results showed that all the three bacteriostatic agents could destroy the cell membrane of the spoilage mold, which led to the leakage of nucleic acid and protein, thereby achieving the antibacterial effect. In this paper, possible data on antibacterial effect of iturin A on the spoilage mold of postharvest strawberries in this study might provide a theoretical basis for the use of iturin A on postharvest preservation of strawberries.

**Key words:** iturin A; *Fusarium fujikuroi*; *Botrytis cinerea*; minimum inhibitory concentration; nucleic acid and protein leakage

近年来我国草莓产业发展迅猛, 据农业部统计数据, 2010 年我国草莓的播种面积为 11.7 万公顷, 产量达 200 万吨<sup>[1]</sup>。草莓中富含糖类、蛋白质、氨基酸等多种营养物质, 具有清热消暑、健脾和胃、润肺止咳、补益气血等功效, 有“水果皇后”的美称<sup>[2]</sup>。但草莓皮薄多汁, 贮运过程中表皮极易破

而遭受微生物的侵染导致腐烂变质, 并且草莓收获时间较为集中, 货架期比较短<sup>[3]</sup>。目前, 草莓最常见的保鲜方法是低温冷藏、化学保鲜剂相结合的处理方法, 化学保鲜剂虽有较好的防腐保鲜效果, 但一些化学保鲜剂长期使用会产生抗药性致病菌株<sup>[4]</sup>, 且很多化学合成物质有污染环境和危害健康等缺陷, 甚至对人体有致畸、致癌、致突变毒性<sup>[5]</sup>。因此, 随着生活水平的提高, 人们趋向于追求广谱、高效、低(无)毒、无污染的果蔬天然保鲜剂的开发利用。

伊枯草菌素 A 是由枯草芽孢杆菌发酵产生的

收稿日期: 2020-03-15 接受日期: 2020-09-17

基金项目: 成都市科技局技术创新研发项目 (2018-YF05-00095-SN); 四川省科技厅科技计划 (18ZDYF0655); 宜宾市科技计划 (2018ZSF002); 四川省科技计划 (2019YF N0174)

\* 通信作者 E-mail: bxfl221@163.com

一种环脂肽类化合物,具有抑菌谱广、抑菌能力强、无毒安全和不易引起耐药性等优点,是一种极具研究和开发潜力的生物杀菌剂<sup>[6]</sup>。同时,Sun等<sup>[7]</sup>研究发现经口服的抗菌肽对小鼠无急性毒性作用;Dey等<sup>[8]</sup>对伊枯草菌素 A 安全性进行评估,发现伊枯草菌素 A 能抑制体内肿瘤生长。伊枯草菌素 A 等脂肽类表面活性剂主要作用于病原菌细胞膜的磷脂双分子层,改变细胞膜通透性和功能性,从而抑制病原微生物的生长<sup>[9]</sup>。近几年,有少量研究利用伊枯草菌素 A 发酵液进行果蔬采后腐败控制。Ambri-co等<sup>[10]</sup>研究了 *Bacillus subtilis* ET-1 发酵上清液对绿霉和青霉的抑制效果,发现抑菌圈直径随着伊枯草菌素 A 浓度的增加而增加,且伊枯草菌素 A 可显著抑制病原菌侵染后柠檬和草莓的病害。Arroyave等<sup>[11]</sup>发现 9 种病原菌对 *Bacillus subtilis* EA-CB0015 发酵液表现出不同的敏感性,发酵液中的伊枯草菌素 A 和 fengycin C 对 *Colletotrichum acutatum* 和 *B. cinerea* 的抑菌效果较好。这些研究为伊枯草菌素 A 在果蔬采后病害防治中的应用提供了一定理论支撑。此外,脂肽类化合物是一种新一代有价值的抗菌药物,随着抗菌肽研究的不断深入和技术的进步,如何将其应用于果蔬保鲜已成为研究热点。本文研究了伊枯草菌素 A 对草莓腐败菌的抑制作用,为草莓的病害防治提供了新的方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*F. fujikuroi* 由本实验室保藏,菌种编号为 *Fusarium fujikuroi* XHF11312 30.01,分离自四川草莓腐败果实表面;*B. cinerea* 购自中国农业微生物菌种保藏管中心(China Agricultural Microbial Species Preservation Center, ACCC),菌种编号为 ACCC.37271,菌种斜面均于 4 °C 条件下贮藏。

氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);脱氢乙酸钠(湖北海顺达食品科技有限公司);纳他霉素(浙江一诺生物科技有限公司);伊枯草菌素 A(2.59 mg/mL,中国科学院成都生物研究所提供);马铃薯葡萄糖琼脂(北京奥博星生物技术有限责任公司)。

### 1.2 仪器与设备

HNY-2102C 立式智能恒温培养振荡器(天津欧诺仪器股份有限公司);GI54DWS 立式自动压力蒸汽灭菌器(致微(厦门)仪器有限公司);SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州安泰空气技术有限公

司);SCSP-02 电热恒温隔水式培养箱(黄石市恒丰医疗器械有限公司);DS-11A 数显电导率仪(上海雷磁创益仪器仪表有限公司);TGL-16 冷冻离心机(湖南湘仪赛德仪器有限公司);UV-2200 紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);BL23 光学显微镜(上饶天策莱光仪器有限公司)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 菌种的活化与菌悬液的制备

将试管中的 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 于无菌环境接种至 PDA 平板上,在 28 °C 恒温箱中培养 24 ~ 48 h,培养出灰葡萄孢霉备用。将活化后的菌种用无菌生理盐水稀释,制成浓度为  $10^6 \sim 10^7$  CFU/mL 的菌悬液。

### 1.3.2 不同抑菌剂的制备

用无菌水分别配制浓度为 1、3、5、7.5、10、12.5、15、17.5、20、22.5、25、27.5、30 mg/mL 的脱氢乙酸钠和纳他霉素溶液,浓度为 0.032 4、0.037 0、0.043 2、0.051 8、0.064 8、0.086 3、0.129 5、0.259 mg/mL 的伊枯草菌素 A 溶液,并用 0.22 μm 微孔过滤膜除菌待用。

### 1.3.3 抑菌实验

抑菌实验采用滤纸片定量加药法<sup>[10]</sup>。将 1 mL 菌悬液在 PDA 平板上涂布均匀,再将灭菌后的滤纸片(直径:6 mm)用无菌镊子平贴于涂布后的 PDA 平板上,每个平板放置 3 ~ 6 个纸片,每个纸片上再滴加 10 μL 抑菌液,且纸片间间距均匀。处理后的平板在 28 °C 恒温箱中培养 48 h,测定各平板抑菌圈直径,确定最小抑菌浓度(MIC)。

吸取不同剂量最小抑菌浓度的抑菌剂(100 ~ 300 μL)于 30 mL PDA 培养基混合震荡均匀,再吸取 1 mL 菌悬液涂布均匀,于 28 °C 恒温条件下培养 48 h 后观察是否有菌,以确定三种抑菌剂的最小用量。所有步骤不同时间重复三次。

### 1.3.4 抑菌剂处理对腐败菌细胞膜通透性的影响及显微镜结构变化

吸取最小用量的抑菌剂于 20 mL 悬浮液中,混匀。再取 1 mL 加入抑菌剂的菌悬液于载玻片上,盖上盖玻片,置于光学电子显微镜下放大  $4 \times 10$  倍观察菌体形态,并保存图像。细胞膜通透性的测定参考 Zhang<sup>[11]</sup>的方法并稍加修改,将以上悬浮液在 10 000 rpm 下离心 10 min 去除菌体,取上清液于紫外分光光度计 260 和 280 nm 处测定吸光值( $A_{260}$  和  $A_{280}$ )。由于核酸和蛋白质分别在 260 nm 和 280 nm

处有最大吸光值,因此在此波长下的吸光值变化可用来估测核酸和蛋白质的含量<sup>[14]</sup>。实验重复三次,并以加无菌水的菌悬液为空白对照。

### 1.3.5 数据统计分析

试验数据采用 Origin 8.5 进行统计并绘图;采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,组间数据采用单因素方差分析(ANOVA),显著水平为 0.05,当  $P < 0.05$  时差异显著,结果以标记字母(a、b、c)表示,不同字母表示有显著差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同抑菌剂对草莓腐败菌的抑菌效果

#### 2.1.1 三种抑菌剂对两种草莓腐败菌的初步抑菌

由图 1 可知,*F. fujikuroi* 在 PDA 平板上的生长分布密集,少量点状分布;*B. cinerea* 则为点状均匀分布于平板上。经过三种抑菌剂处理后,两种草莓腐败菌平板上每个纸片周围均有抑菌圈的形成,且肉眼可见,表明脱氢乙酸钠、纳他霉素和伊枯草菌素 A 三种抑菌剂对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的生长均有抑制作用。此外,从图 1 中的抑菌圈大小以及抑

菌浓度可初步判断伊枯草菌素 A 具有较强的抑菌能力,存在较强的优势。

#### 2.1.2 不同浓度的脱氢乙酸钠的抑菌效果

由图 2 可知,3 mg/mL 的脱氢乙酸钠对 *F. fujikuroi* 产生明显的抑菌作用,抑菌圈直径达到 14.44 mm,随着浓度的增加,抑菌效果逐渐增强。Li 等<sup>[15]</sup>等研究发现脱氢乙酸钠能够抑制饲料中 *F. fujikuroi* 的生长,最低抑菌浓度为 80 mg/kg。对于 *B. cinerea*,0 ~ 17.5 mg/mL 的脱氢乙酸钠无明显抑菌作用,提高浓度到 20 mg/mL 时出现抑菌圈,抑菌直径为 6.84 mm,随着脱氢乙酸钠浓度的增加,抑菌作用增强。Wang 等<sup>[16]</sup>研究发现脱氢乙酸钠对 *B. cinerea* 有较明显的抑制作用,0.5 mg/mL 的脱氢乙酸钠抑菌率达到 93.2%。脱氢乙酸钠有广谱的较强的抗腐败菌能力,主要通过渗透进入微生物的细胞壁,干扰细胞内各种酶体系而产生抑菌作用<sup>[15]</sup>。结果表明脱氢乙酸钠对 *F. fujikuroi* 的抑菌效果比对 *B. cinerea* 更好。

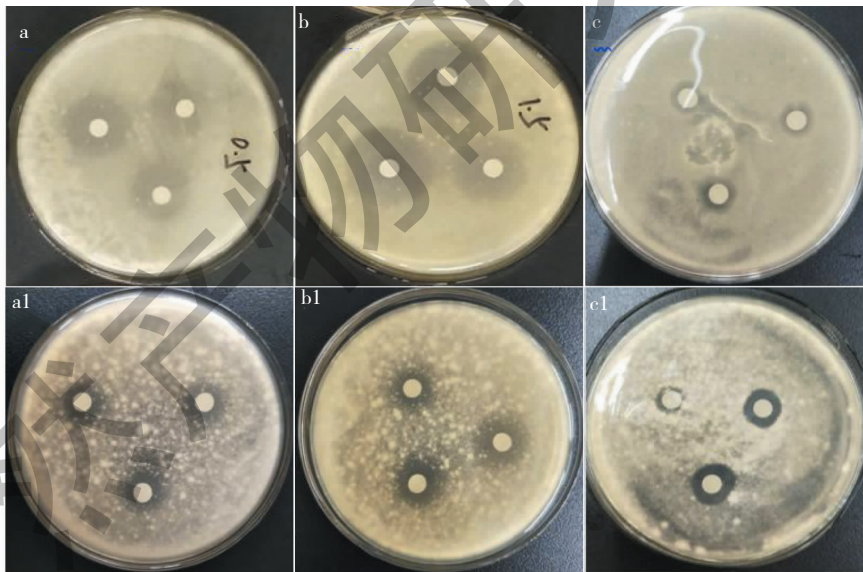


图 1 不同抑菌剂对 *F. fujikuroi* 与 *B. cinerea* 的抑菌效果

Fig. 1 Antibacterial effect of different bacteriostatic agents on *F. fujikuroi* and *B. cinerea*

注:a(5 mg/mL)、b(15 mg/mL)、c(0.051 8 mg/mL)分别为脱氢乙酸钠、纳他霉素和伊枯草菌素 A 三种抑菌剂处理 *F. fujikuroi* 的效果图,a1(25 mg/mL)、b1(30 mg/mL)、c1(0.037 0 mg/mL)为三种抑菌剂处理 *B. cinerea* 的效果图。Note:The a (5 mg/mL),b (15 mg/mL) and c (0.051 8 mg/mL) were the effects of sodium dehydroacetate, natamycin, and iturin A on *F. fujikuroi*, respectively. The a1 (25 mg/mL),b1 (30 mg/mL) and c1 (0.037 0 mg/mL) were the effect diagrams of the antibacterial agents for *B. cinerea*.

#### 2.1.3 不同浓度的纳他霉素的抑菌效果

由图 3 可知,7.5 mg/mL 的纳他霉素开始对 *F. fujikuroi* 产生明显的抑菌作用,抑菌圈直径达到

14.76 mm,且随着浓度的增加抑菌效果逐渐增强。对 *B. cinerea*,0 ~ 17.5 mg/mL 的纳他素无明显抑菌作用,提高浓度到 20 mg/mL 时出现抑菌圈,抑菌圈

直径为 8.21 mm,同时随着浓度的增加,抑菌作用增强。Li 等<sup>[17]</sup>研究发现 0.25 mg/mL 的纳他霉素对青霉的抑制直径为 19 mm,可以有效地抑制腐败菌的生长。纳他霉素的作用机理是通过与细胞膜里的甾醇,特别是麦角固醇形成复杂的复合物,改变细胞渗透性,从而抑制和杀灭真菌<sup>[18]</sup>。结果表明纳他霉素对 *F. fujikuroi* 的抑菌效果比对 *B. cinerea* 更好。

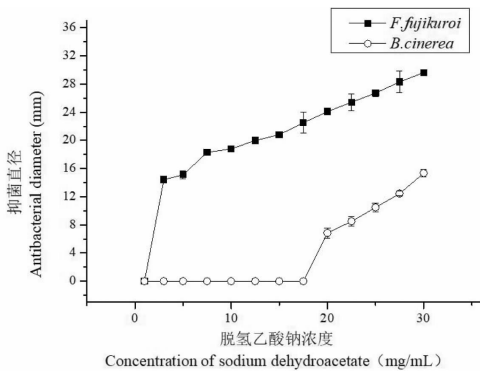


图 2 脱氢乙酸钠对草莓腐败菌的抑菌效果

Fig. 2 Antibacterial effect of sodium dehydroacetate on strawberry spoilage bacteria

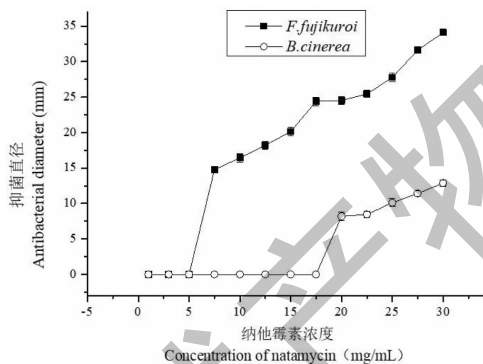


图 3 纳他霉素对草莓腐败菌的抑菌效果

Fig. 3 Antibacterial effect of natamycin on strawberry spoilage bacteria

#### 2.1.4 不同浓度的伊枯草菌素 A 的抑菌效果

由图 4 可知,0.051 8 mg/mL 的伊枯草菌素 A 开始对 *F. fujikuroi* 产生明显的抑菌作用,抑菌圈直径为 8.41 mm。对 *B. cinerea*,0.037 0 mg/mL 的伊枯草菌素 A 产生明显的抑菌作用,抑菌圈直径为 10.43 mm。随着伊枯草菌素 A 浓度的增加,*F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的抑菌圈直径逐渐增大,但是,当伊枯草菌素 A 浓度增加到 0.064 8 mg/mL 时,随着浓度的增加,伊枯草菌素 A 对 *F. fujikuroi* 与 *B. cinerea* 的抑菌作用趋于平缓,0.064 8 ~ 0.259 0 mg/mL

之间抑菌圈直径分别只增加了 0.45 mm 和 0.69 mm。Gu 等<sup>[19]</sup>研究发现 1mg/mL 粗伊枯草菌素 A 溶液在黄瓜灰霉病菌的 PDA 平皿上可形成 1 ~ 2 mm 的抑菌带,对灰霉菌有一定的抑制效果。Gong<sup>[20]</sup>研究发现 100  $\mu$ g/mL 伊枯草菌素 A 对 *F. fujikuroi* 孢子抑制率为 100%,50  $\mu$ g/mL 时抑制率为 97.51%。伊枯草菌素 A 对细胞的破坏是通过在真菌细胞膜上形成小孔,使离子从小孔中通过使膜的通透性发生变化实现抑菌作用<sup>[21]</sup>。因此,伊枯草菌素 A 对 *F. fujikuroi* 的抑菌效果比对 *B. cinerea* 更好。

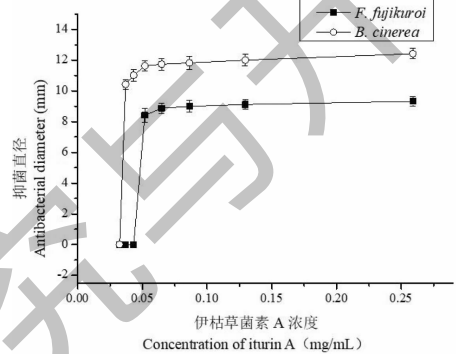


图 4 伊枯草菌素 A 对草莓腐败菌的抑菌效果

Fig. 4 Antibacterial effect of iturin A on strawberry spoilage bacteria

以上实验结果表明,三种抑菌剂对两种草莓腐败菌均有抑制效果,且随着浓度的变大,*F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的抑菌圈直径也相应增加。当三种抑菌剂的浓度较低时,对于两种菌的抑菌效果较差,可能是由于低浓度中的抑菌剂量少,对于腐败菌菌落数的作用数量有限。而且抑菌纸片的直径为 6 mm,低浓度下产生的抑菌直径太小(抑菌圈直径 < 6 mm),不能观察到。随着抑菌剂浓度的增加,抑菌剂量有效作用的腐败菌菌落数量也相应增加,抑制效果更好。

#### 2.2 抑菌剂的最小用量

脱氢乙酸钠、纳他霉素和伊枯草菌素 A 对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的最小抑菌浓度和最小用量如表 1 所示,通过实验结果可知伊枯草菌素 A 对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的 MIC 分别为 0.051 8 mg/mL 和 0.037 0 mg/mL,远低于脱氢乙酸钠和纳他霉素的 MIC,同时最小用量均低于 300  $\mu$ L,结果表明三种抑菌剂的敏感性为伊枯草菌素 A > 纳他霉素 > 脱氢乙酸钠。

表 1 三种抑菌剂的对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的最小抑菌浓度和最小用量Table 1 Minimum inhibitory concentration and minimum dosage of three bacteriostatic agents against *F. fujikuroi* and *B. cinerea*

抑菌剂 Bacteriostat	菌种 Strain	最小抑菌浓度 Minimum inhibitory concentration (mg/mL)	最小用量 Minimal dose ( $\mu$ L)
伊枯草菌素 A Iturin A	<i>F. fujikuroi</i>	0.051 8	190
	<i>B. cinerea</i>	0.037 0	300
纳他霉素 Natamycin	<i>F. fujikuroi</i>	7.5	160
	<i>B. cinerea</i>	20	260
脱氢乙酸钠 Sodium dehydroacetate	<i>F. fujikuroi</i>	3	170
	<i>B. cinerea</i>	20	280

## 2.3 抑菌剂处理对腐败菌紫外吸收物质渗漏的影响

### 2.3.1 抑菌剂处理后对腐败菌核酸渗漏的影响

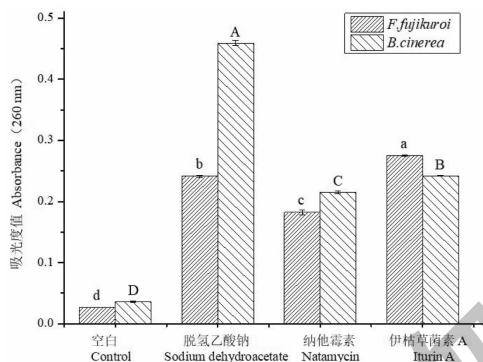


图 5 抑菌剂处理对腐败菌核酸渗漏的影响

Fig. 5 Effect of bacteriostatic treatment on nucleic acid leakage of spoilage bacteria

注:图中大写、小写字母分别表示不同抑菌剂对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。Note: Uppercase and lowercase letters indicated the significant difference of *F. fujikuroi* and *B. cinerea* treated by different bacteriostatic agents, respectively ( $P < 0.05$ ), the same below.

细胞正常代谢必须依靠一个完整的细胞膜结构,当细胞膜遭到破坏时,胞内的一些磷酸盐、碳酸盐、DNA 与 RNA 等均会先后从细胞膜中释放出来,而这些核内物质在 260 nm 处有很强的紫外吸收<sup>[22-23]</sup>。因此,可以通过检测菌悬液的紫外吸收来推测菌体细胞膜完整性的变化。不同抑菌剂处理后两种草莓腐败菌内核酸物质泄露情况如图 5 所示,脱氢乙酸钠、纳他霉素和伊枯草菌素 A 处理后,*F. fujikuroi* 内的核酸泄漏量均从 0.027 分别增加至 0.241、0.182 和 0.275,而 *B. cinerea* 内的核酸泄漏量均从 0.036 增加至 0.459、0.215 和 0.242。以上结果说明三种抑菌剂均能破坏细胞膜,使胞内 ATP

及核酸物质泄露而导致吸光值增大,并且不同抑菌剂处理同一腐败菌,核酸变化差异显著 ( $P < 0.05$ )。抑菌剂处理后菌悬液中核酸含量增加,可能是由于抑菌剂破坏了腐败菌细胞的细胞壁,使得核酸流入菌悬液<sup>[24]</sup>。

### 2.3.2 抑菌剂处理后对腐败菌蛋白质渗漏的影响

不同抑菌剂处理后两种草莓腐败菌内蛋白质泄露情况如图 6 所示,脱氢乙酸钠、纳他霉素和伊枯草菌素 A 处理后,*F. fujikuroi* 内的蛋白质泄漏量均从 0.016 分别增加至 0.155、0.167 和 0.213,而 *B. cinerea* 内的蛋白质泄漏量均从 0.027 增加至 0.359、0.141 和 0.211。不同抑菌剂处理同一腐败菌,蛋白质变化差异显著 ( $P < 0.05$ )。Wang<sup>[25]</sup> 研究发现 2% 荆芥原液和 2% 荆芥提取物溶液处理 2.5 min 后,腐败菌的菌悬液胞外蛋白的质量浓度大约增加了 49  $\mu$ g/mL 和 62  $\mu$ g/mL。抑菌剂处理后菌悬液中蛋白质含量增加,可能是由于抑菌剂造成细胞质中蛋白质的外泄。细胞膜破损后,细胞内容物外渗,细胞吸胀受损甚至死亡从而达到抑菌作用<sup>[23]</sup>。

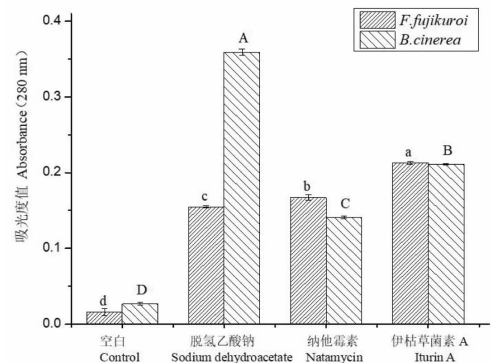


图 6 抑菌剂处理对腐败菌蛋白质渗漏的影响

Fig. 6 Effect of bacteriostatic treatment on protein leakage of spoilage bacteria



由不同抑菌剂处理后腐败菌悬浮液的紫外吸收物质的增加可知,三种抑菌剂均可通过破坏细胞膜、增大菌体细胞膜的通透性以及完整性从而使细胞内

容物外渗,细胞吸胀受损甚至死亡,达到抑菌目的。

## 2.4 三种抑菌剂处理后草莓腐败菌的显微镜结构变化

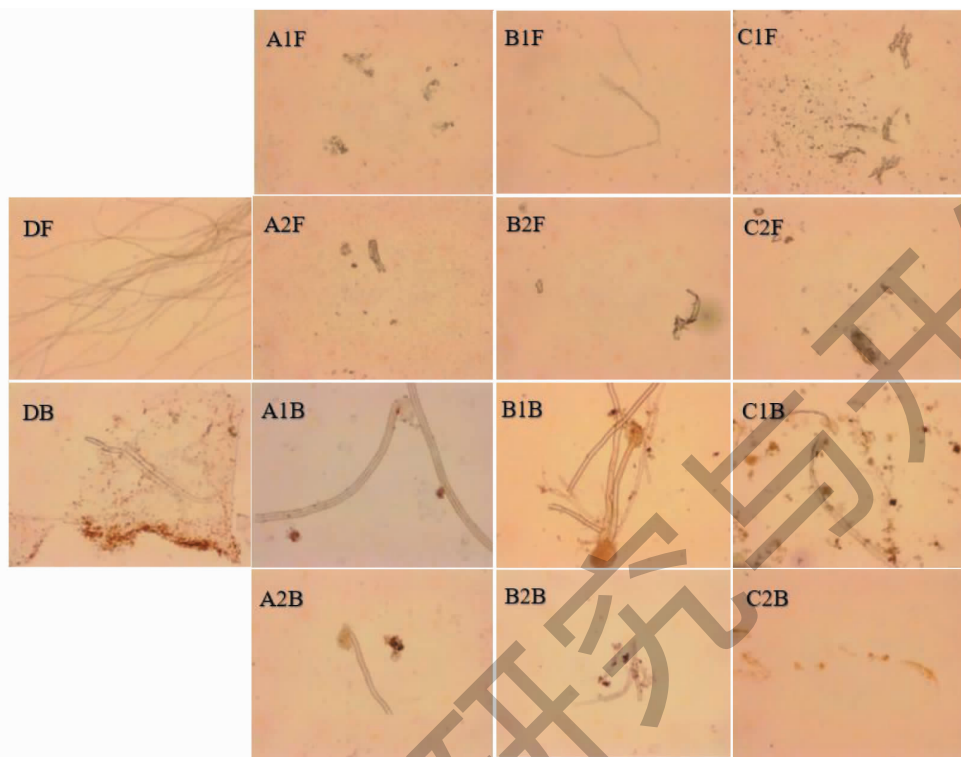


图7 最小抑菌剂用量处理后 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 细胞结构变化

Fig. 7 Changes in cell structure of *F. fujikuroi* and *B. cinerea* after treatment with minimal inhibitor

注:图片编号中首位A、B、C、D分别代表脱氢乙酸钠、纳他霉素、伊枯草菌素A和空白对照处理;次位1和2分别代表MIC最小用量和大于最小用量(本次实验一取400  $\mu$ L)处理;三位F和B分别表示 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* ( $4 \times 10$  倍)。Note: The first digits A, B, C and D in the picture number represented the treatments of sodium dehydroacetate, natamycin, iturin A and the control respectively; The second digits 1 and 2 respectively represented the minimum dosage and greater than the minimum dosage of MIC (400  $\mu$ L) for processing; The three digits F and B represented *F. fujikuroi* and *B. cinerea* ( $4 \times 10$  times), respectively.

如图7所示,三种抑菌剂最低浓度最小用量的处理使 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 原本的菌丝由连贯变得断裂,破碎成条状。随着抑菌剂的增加,菌丝断裂破碎得更加彻底甚至菌丝破碎成块状,而对照组菌丝表面光滑、平整、细长。目前,其他研究同样发现抑菌剂会导致孢子菌丝分离,菌丝断裂。Zhou等<sup>[26]</sup>研究发现12.5 mg/mL的桂枝提取液使青腐败菌菌丝畸形,底端及末端肿大,而50 mg/mL的桂枝提取液使青霉病菌菌丝顶端肿大,甚至断裂,内容物外渗,得出高浓度的桂枝提取液对青腐败菌丝的生长代谢有明显的抑制作用。因此,抑菌剂通过改变细胞膜稳定性,导致细胞结构受损,菌丝体断裂,从而达到抑菌效果。

## 3 结论

以草莓中两种常见的腐败菌(*F. fujikuroi* 和 *B. cinerea*)为实验菌,研究不同浓度的脱氢乙酸钠、纳他霉素、伊枯草菌素A对草莓腐败菌的抑菌效果。通过三种抑菌剂对 *F. fujikuroi* 和 *B. cinerea* 的最低抑菌浓度和最小用量分析,得出抑菌敏感性伊枯草菌素A > 纳他霉素 > 脱氢乙酸钠。并通过处理后蛋白核酸泄露实验证实了三种抑菌剂均是通过改变细胞膜通透性,引起胞内核酸、蛋白质等物质流出,达到抑菌效果。然而,现有研究是草莓的体外抑菌,未来研究可通过草莓保鲜实验来确定伊枯草菌素A的抑菌效果。

## 参考文献

- and heat sterilization on the quality of strawberry cloudy juice and clear juice[J]. Chin J High Pressure Phys(高压物理学报),2014,28:631-640.
- 2 Feng Y. Natural health fruit and vegetable juice[M]. Beijing:Chemical Industry Press(化学工业出版社),2013:20-23.
  - 3 Yang Z. Research progress of storage technology of strawberry[J]. Storage Process(保鲜与加工),2017,17(2):133-138.
  - 4 Ma ZQ, Li HX, Yan ZH, et al. Preliminary research on detection of apple ring rot(*Macrophoma kawatsukai*) to carbendazim[J]. Chin J Pestic Sci(农药学报),2000(3):94-96.
  - 5 Zhu DX, Rao JP, Li SY. Overview of application research of fruit and vegetable preservatives[J]. Shaanxi J Agr Sci(陕西农业科学),2003(1):30-33.
  - 6 Fu W, Gao YX, Zhang XY. Research progress of iturin[J]. Anhui Agr Sci Bull(安徽农学通报),2014,20(24):23-26.
  - 7 Shun LJ, Wang YL, Liu HM, et al. Evaluation of hemolytic and acute toxicity of a new antibacterial peptide APNT-6[J]. J Fish China(水产学报),2012,36:974-978.
  - 8 Dey G, Bharti R, Banerjee I, et al. Pre-clinical risk assessment and therapeutic potential of antitumor lipopeptide 'iturin A' in an *in vivo* and *in vitro* model[J]. RSC Adv, 2016,6:71612-71623.
  - 9 Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2000,53:495-508.
  - 10 Ambrio A, Trupo M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold[J]. Postharvest Biol Technol, 2017,134:5-10.
  - 11 Arroyave-toro JJ, Mosquera S, Villegas-escobar V. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens[J]. Biol Control,2017,114:195-200.
  - 12 Liu RY. Evaluation and comparison of several common antimicrobial test methods[J]. Mod Enterp Edu(现代企业教育),2013(14):341-342.
  - 13 Zhang TJ. Study on the antimicrobial activity and mechanism of plants extracts[D]. Nanjing: Nanjing Normal University(南京师范大学),2017.
  - 14 Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, et al. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Entomocidus HD110[J]. Microbiol Res,2008,163:684-692.
  - 15 Li ZP, Zhou YM, Chen M, et al. A Study on Effect of anti-mildew agent dehydrogenated sodium acetate[J]. Cereal Feed Ind(粮食与饲料工业),2008(7):32-34.
  - 16 Wang XY, Cong JF, Ding B. Study on inhibition of five kinds of food additives on bacteria and fungi[J]. China Condiment(中国调味品),2017,42(12):28-31.
  - 17 Li Y, Wu CE, Fan GJ, et al. Antimicrobial and preservative Effects of natamycin on ginkgo fruits[J]. Food Sci(食品科学),2014,35(4):220-225.
  - 18 Medina A, Jimenez M, Mateo R, et al. Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin in a production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions[J]. J Appl Microbiol,2007,103:2234-2239.
  - 19 Gu ZR, Wu W, Gao XH, et al. Antifungal substances of *Bacillus subtilis* strain G3 and their properties[J]. Acta Phytopathol Sin(植物病理学报),2004,34:166-172.
  - 20 Gong AD. Isolation and antagonistic mechanism analyses of biocontrol agents against *Fusarium* and *Aspergillus* species[D]. Wuhan:Huazhong Agriculture University(华中农业大学),2015.
  - 21 Thimon L, Peypoux F, Wallach J, et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells[J]. Fems Microbiol Lett,2010,128(2):101-106.
  - 22 Zuo L, Yao DJ. Relationship between permeability of *Pseudomonas aeruginosa* adventitia and drug resistance[J]. Chin J Antibiotics(中国抗生素杂志),1998,23:241-245.
  - 23 Song XZ, Shen YX. The antibiotic activity of  $\alpha$ -chitosan with different molecular weights[J]. J Shanghai Fish Univ(上海水产大学学报),2002,9:138-141.
  - 24 Ge QY, Pan XX, Li Q, et al. Application of ATP-bioluminescence method for the evaluation of biocides used for cultural heritage conservation[J]. Sci Conserv Archaeol(文物保护与考古科学),2014,26(4):39-46.
  - 25 Wang DH. Study on the antimicrobial activity and mechanism of plants extracts[J]. Jiangsu Agri Sci(江苏农业科学),2019,47(3):98-99.
  - 26 Zhou MJ, Wan C P, Chen JY. Screening and antifungal mechanism of Chinese herb extracts against green mold of citrus[J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2014,30(3):144-149.