

红枣贮藏期果面微生物功能多样性

沙月霞

(宁夏农林科学院植物保护研究所, 银川 750002)

摘要 【目的】了解果品微生物功能多样性信息,为红枣贮藏期贮藏病害的防控提供技术支撑,同时希望为果品果面微生物多样性的研究提供新的方法。【方法】采用 Biolog 方法研究了红枣贮藏期果品果面微生物群落结构功能多样性。【结果】红枣在不同贮藏时间内果面微生物群落的功能多样性差异很大,贮藏时间越长微生物越丰富,对不同碳源的利用程度越高;采用保鲜剂处理后红枣果面微生物群落的多样性、均匀度指数和 AWCD 均显著低于未作任何处理的红枣果面微生物。四种不同处理的红枣果面微生物的特征碳源主要有六类:碳水化合物类、羧酸类、聚合物类、酚类化合物、氨基酸类、胺类。【结论】我们的研究结果首次初步揭示了红枣在贮藏期果面微生物的功能多样性,并证明 Biolog 方法可以应用到果品微生物功能多样性的研究。

关键词: 红枣;贮藏期;果面微生物;功能多样性;Biolog

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)10-1317-06

枣(*Zizyph jujuba* Mill.)是鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Zizyph* Mill.)植物,是我国的原产果树之一^[1],已有数千年的栽培历史。枣树在我国分布面广,适应性强,品种多,风味好,深受人民群众的喜爱,已成为我国果树发展的新热点^[2-3]。红枣营养成分丰富,富含维生素 C,每 100 g 果肉中维生素 C 含量高达 400~600 mg,其营养价值与保健、医疗功能正适合新时期人们崇尚营养保健果品的消费心理^[2]。但红枣自然保鲜能力很差,在贮藏中果实极易感染微生物而引起腐烂变质失去商品价值,这一现状严重制约了我国红枣产业的健康发展^[3]。枣果的采后病害可分为 2 种类型,一是生理病害,即果实贮藏过程中,由于生理活动受到不适宜的外界条件干扰而造成的;另一是病理病害(侵染性病害),即由病原微生物引起的。本试验通过采用 Biolog 方法^[4-6]对红枣贮藏期果面微生物多样性分析研究,为红枣贮藏期贮藏病害的防控提供技术支撑,同时希望为果品果面微生物多样性的研究提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料:灵武长枣。

微平板的类型:FF 丝状真菌鉴定微平板、ECO 生态微平板。

1.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂 0.9% 的生理盐水。

主要仪器:Biolog Microsoft 全自动微生物鉴定分型系统;Biolog 电动八孔移液器。

1.2 试验设计:

处理 I(Treat I):入库时用保鲜剂处理过的贮藏 15 天的红枣。CK I:入库时未作任何处理的贮藏 15 天的红枣。处理 II(Treat II):入库时用保鲜剂处理过的贮藏 30 天的红枣。CK II:入库时未作任何处理的贮藏 30 天的红枣。

1.3 试验步骤

分别在红枣贮藏 15 d 和 30 d 时从未处理和用

保鲜剂处理过的红枣中,采用上中下五点取样的方法分别随机选取 10 颗健康鲜枣(果梗完好)放入 1000 mL 已灭菌的生理盐水中,充分振荡培养 30 min 取菌悬液以 1:3 的比例稀释。将制备好的菌悬液倒入无菌移液槽中,使用八孔移液器将其接种于微平板的 96 孔中。接种量为 150 μL /孔。接种好的微平板用保鲜膜包裹,保鲜膜上用注射针头扎若干个小眼,以保证微生物的培养所需要的氧气,放到铺有纱布的塑料饭盒中,为防止微平板鉴定孔中的菌悬液挥发,纱布保持一定的湿度,将微平板避光培养。

1.4 培养温度

FF 鉴定微平板 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养;ECO 生态板放到 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。

1.5 微平板读数时间

微平板分别在培养 24、48、72、96、120、144 h 时读数。

1.6 测定波长

测定波长为 590 nm。

1.7 数据分析方法

每 24 h 读数 1 次,连续 6 天,利用 Biolog 自动分析系统对 FF 板结果进行数据统计及分析;利用 EXCEL 和 DPS 软件^[7]对 ECO 结果统计及分析。

2 结果和分析

2.1 宁夏红枣贮藏期果面微生物在 FF 板上的功能多样性研究

2.1.1 红枣贮藏期果面微生物 FF 板上代谢图谱研究:单孔平均颜色变化率(AWCD, average well color development)是反映微生物活性,即利用单一碳源能力检验微生物生理活动强度的一个重要指标^[8-10]。图 1 结果明显反映了不同处理的红枣在不同贮藏时期微生物与碳源的反应情况:红枣贮藏 15 天时,用保鲜剂处理过的红枣果面微生物与碳源的反应比较缓慢,反应程度也不是很高,144 h 时达到峰值 AWCD 为 0.1;对照 I 在培养 48 h 之间,对碳源的利用程度不高,48 h 之后增长较快。贮藏 30 天时,对照 II 与处理 II 的微生物对碳源的利用明显增强,120 h 峰值达到了 AWCD 为 0.8 以上,120 h 以后呈一条直线;处理 II 96 h 时对碳源的利用达到峰值 AWCD 为 0.5 左右,之后呈一条直线。

2.1.2 宁夏红枣贮藏期果面微生物 FF 板上对碳源的利用情况研究:图 2 显示了在 AWCD 一致的情况下,不同红枣样品的果面微生物群落对 FF 板上主

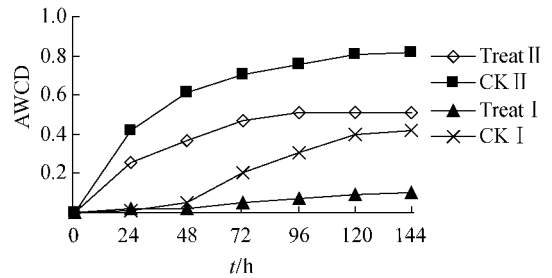


图 1 红枣贮藏期果面微生物在 FF 板上的代谢图谱

Fig. 1 Metabolizing figure of fruit surface microorganism on jujube storage in the FF micro-plate.

要碳源的利用情况。利用碳源种类上的多少,表征了能够利用 Biolog 微孔板上碳源的果面微生物的丰富度和多样性指数,即功能多样性^[11-12](能够利用 Biolog 微孔板上碳源的果面微生物只代表了整个微生物群落的一部分,这种代谢多样性类型不一定反映整个果面微生物群落的功能多样性)。

试验结果表明:羧酸类、聚合物类、碳水化合物、酯类、氨基酸类及胺类碳源是红枣果面微生物群落在 FF 板上的主要碳源;而且随着贮藏时间的延长,红枣果面微生物对碳源的利用情况差异较大;红枣贮藏时间越长,果面微生物与碳源的氧化还原反应程度越高;用保鲜剂处理过的红枣果面微生物对碳源的利用远远低于未处理的红枣果面微生物。

4 个处理的碳水化合物在 FF 板上的代谢趋势基本一致,在整个培养时间内向上增长,处理 I 的增长较为缓慢,对碳水化合物的利用程度也是最低的;处理 II 与 CK II 的动态趋势一致,144 h 时 AWCD 峰值最高,分别在 0.9 左右和 0.5 左右。FF 板上处理 I 与 CK I 的氨基酸类代谢图谱一致,144 h 时 AWCD 的达到峰值,CK I 的峰值 0.5 高于处理 I 的峰值 0.1。处理 II 与 CK II 96 h 时对氨基酸的利用程度最高,以后随培养时间的延长对碳源的利用降低。

不同处理的红枣果面微生物利用 FF 板上酯类代谢差异较大:处理 I 与酯类碳源基本上没有反应;CK I 48 h 之前没有,之后反应加快;CK II 与酯类碳源 24 h 时峰值接近 0.2,之后没有变化呈一条直线;处理 II 对酯类 48 h 之前利用较快,96 h 时 AWCD 达到 0.8 以上,之后缓慢变化,接近直线。不同处理的红枣果面微生物在 FF 板上胺类代谢差异较大:CK II 的胺类在培养 48 h 时 AWCD 值接近 0.8,96 h 以后 AWCD 开始下降;处理 II 整个培养时间内呈上升趋势,但 24 h 至 48 h 之间有一个短时间的下降;处理 I 在整个培养时间内对胺类没有反应;CK I 48 h

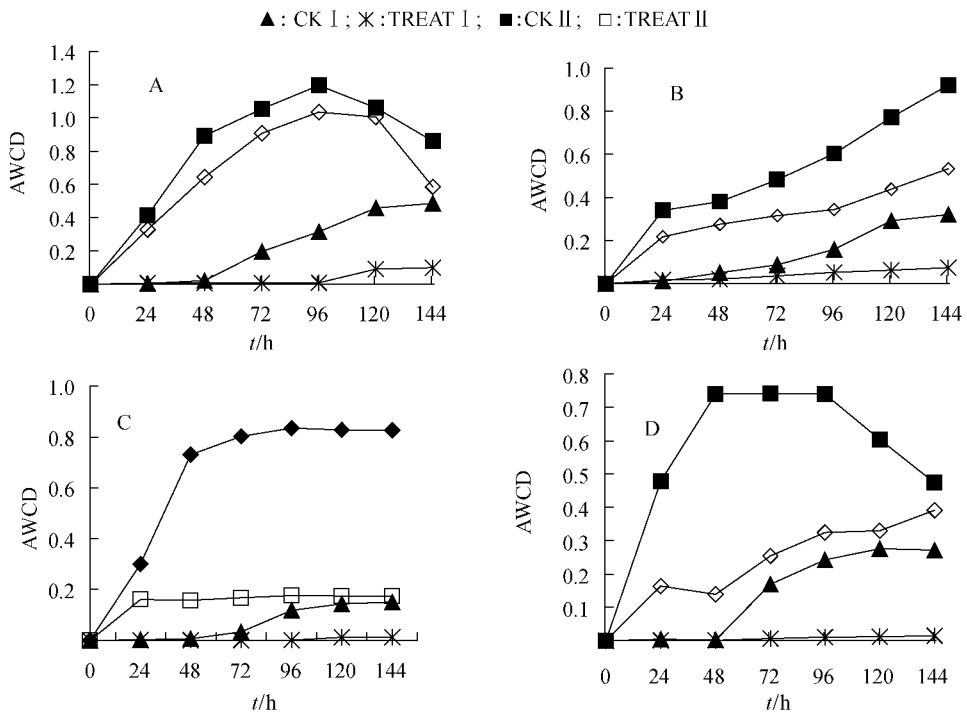


图2 红枣贮藏期果面微生物对 FF 板上主要碳源的利用情况图谱

Fig.2 Figure of the main C source utilized by jujube surface microorganism on storage in the FF micro-plate. A : Metabolizing figure of Amino Acids. B : Metabolizing figure of Carbohydrate Compounds. C : Metabolizing figure of Esters. D : Metabolizing figure of Amine.

后 AWCD 值上升较快。

2.2 宁夏红枣贮藏期果面微生物在 ECO 板上的代谢功能多样性研究

2.2.1 红枣贮藏期果面微生物 ECO 板上代谢图谱研究

红枣果面微生物在 ECO 上的代谢规律见图 3^[13-14] 红枣贮藏 15 天时,用保鲜剂处理过的红枣果面微生物与碳源的反应随培养时间的延长没有发生变化;对照 I 在培养 72 h 达到高峰,以后没有发生显著变化。贮藏 30 天时,对照 II 与处理 II 的微生物对碳源的利用明显增强,72 h 峰值达到了 1.4 以上,72 h 以后呈一条直线;处理 II 在整个培养时间内呈匀速的变化,144 h 达到了最高 1.0 以上。

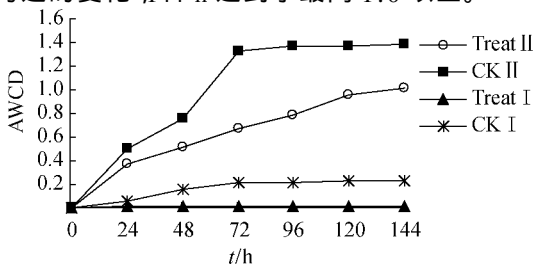


图3 红枣贮藏期果面微生物在 ECO 板上的代谢图谱

Fig.3 Metabolizing figure of jujube surface microorganism on storage in the ECO micro-plate.

2.2.2 宁夏红枣贮藏期果面微生物对 ECO 板上碳源的利用情况研究

图 4 结果表明:红枣在贮藏 15 天时,没有采用保鲜剂处理的红枣果面微生物在 ECO 板上对 6 类碳源都有不同程度的利用,尤其对羧酸类碳源的利用最高,其次是聚合物类碳源。羧酸类碳源在整个检测时间内从 0 h 培育开始直至 144 h 呈现直线上升趋势;聚合物类碳源在 24 h 时利用最高,但随着培养时间的延长反而下降,在 96 h 时较低,从 96 h 到 144 h 反应又加强;其它四种碳源动态变化趋势与聚合物类相似。采用保鲜剂处理过的红枣果面微生物在 ECO 板上对碳水化合物的利用最高,其次是羧酸类,对其他类碳源的利用程度不高。碳水化合物与羧酸类碳源的动态趋势一致,96 h 时数值最高,从 96 h 开始微生物对碳水化合物和羧酸类碳源不再反应。

图 5 结果显示:红枣在贮藏 30 天时,两个处理对碳源的利用程度明显比贮藏 15 天复杂。采用保鲜剂处理过的红枣果面微生物对 6 类碳源都有不同程度的利用,对羧酸类碳水化合物和聚合物类利用较高。没有采用保鲜剂处理过的红枣果面微生物对碳水化合物的利用最高,其次是氨基酸类和羧酸类,这三类碳源的变化趋势大致一致。

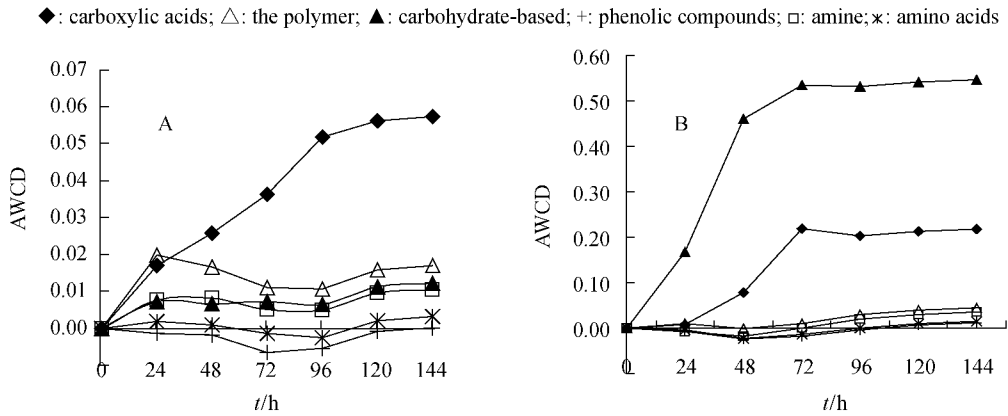


图4 宁夏红枣贮藏15天时果面微生物在ECO板上对碳源的利用情况

Fig.4 Figure on the main C source utilized by jujube surface microorganism on storage period of 15 days in the ECO micro-plate. A: Research of microorganism utilizing carbon source on CK I. B: Research of microorganism utilizing carbon source on Treat I.

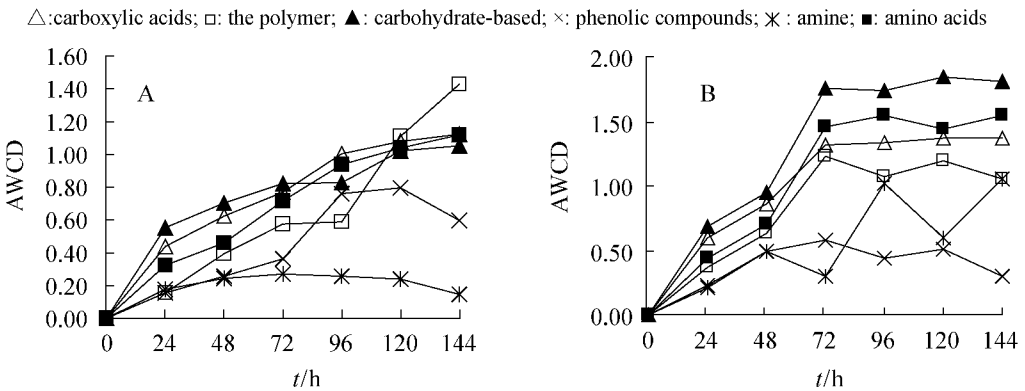


图5 宁夏红枣贮藏30天时果面微生物在ECO板上对主要碳源的利用情况

Fig.5 Figure on the main C source utilized by jujube surface microorganism on storage period of 30 days in the ECO micro-plate. A: Research of microorganism utilizing carbon source on Treat II. B: Research of microorganism utilizing carbon source on CK II.

2.2.3 红枣贮藏期果面微生物群落的生物多样性分析:由表1可以看出,当红枣贮藏30天时,对照果面微生物多样性指数和均匀度都最高,SIMPSON和SHANNON分别是0.98892和4.326367,均匀度是0.924797,用保鲜剂处理过的红枣果面微生物的丰富度最高,但多样性指数和均匀度都明显低于未处理的红枣。红枣经保鲜剂处理后贮藏15天时微生物多样性、均匀度和丰富度都未检测出。

3 讨论

微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落的作用具有重要意义^[15-17]。而平板上肉眼计数的分类技术只检测到环境样品中的一小部分微生物使得微生物群落的定量描述成为微生物学家面临的最艰巨的任务之一^[18]。Garland和Mills(1991)建立起一套利用Biolog微平板鉴定系统来研究不同环境下的土壤微生物群落结构和功能多样性的方



表1 不同处理的红枣贮藏期果面微生物群落的生物多样性分析

Table 1 Analysis in biodiversity of jujube fruit surface microorganism in different treating storage

Treatment	Richness index	SIMPSON	SHANNON	Homogeneity
CK I	14	0.95799	2.66055	0.71049
Treat I	/	/	/	/
Treat II	28	0.96709	3.957247	0.82916
CK II	26	0.98892	4.326367	0.92480

法^[19-20]。借助于多底物的酶联反应(ELISA)平板-Biolog(Biolog, Inc., Hayward, CA)^[21]可研究不同微生物群落对单一碳源底物的利用能力(Sole-Carbon-Source Utilization, SCSU)的差异,通过对所得数据作统计分析,可获得大量土壤微生物群落结构和功能多样性方面的信息。

我国是水果种植大国,贮藏保鲜占有很大的市场份额,贮藏病害已经是影响果品商品价值的重要

因素。尤其病原菌的种类复杂,既有真菌也有细菌,而且往往是多种病原菌复合侵染所致,因而贮藏期果品果面微生物的群落结构变化很大,功能多样性信息更难已捕捉。本研究采用 Biolog 方法对红枣贮藏期果面微生物多样性分析研究,了解了红枣贮藏期果面微生物分别在 FF 板和 ECO 板的功能多样性,明确了红枣果面微生物对碳源的利用程度,为红枣贮藏期贮藏病害的防控提供技术支撑,同时也可以为果品果面微生物多样性的研究提供新的方法。

4 结论

Biolog 微平板用于分析红枣果面微生物的功能多样性,能较快捷、敏感地反映果面微生物群落特征的变化,且得到丰富的信息。从试验的结果来看,红枣在不同的贮藏时间内果面微生物群落的功能多样性差异很大,贮藏时间越长微生物越丰富,对不同碳源的利用程度越高;采用保鲜剂处理后红枣果面微生物群落的多样性明显降低,对碳源的利用也较低,说明采用保鲜剂对果面微生物有明显的抑制作用,这与平板计数法得到的结果一致。4 种不同处理的红枣果面微生物的特征碳源主要有六类:碳水化合物类、羧酸类、聚合物类、酚类化合物、氨基酸类、胺类。

本实验首次在国内将 Biolog 土壤微生物功能多样性研究的方法应用于红枣贮藏期果面微生物多样性的研究,试验结果比传统微生物研究方法——平板计数法得到数据更深入,时间也更快捷。

参考文献

- [1] 曲泽洲, 王永蕙. 中国果树志(*China Fruit Tree Records*). 北京: 中国林业出版社, 1993.
- [2] 刘孟军. 枣属植物分类学研究进展. 园艺学报(*Acta Horticulturae Sinica*), 1999, 26(5): 302 - 308.
- [3] 曲泽洲, 李三凯, 武元苏, 等. 枣贮藏保鲜试验技术研究. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*), 1987, 20(2): 86-91.
- [4] Keun-Hyung Choi, Fred C, Dobbs. Comparison of two kinds of Biolog microplates(GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of MicroBiological Methods*, 1999, 36 : 203 - 213.
- [5] Wang Guanghua, Liu Junjie, Qi Xiaoning, et al. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(1): 220 - 226.
- [6] Mats Gyllenberg, Timo Koski, Peter Dawyndt, et al. New Methods for the Analysis of Binarized Biolog GN Data of *Vibrio* species: Minimization of Stochastic Complexity and Cumulative Classification. *System and Applied MicroBiology*, 2002, (25): 403 - 415.
- [7] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统(*DPS Data Processing System for Practical Statistics*). 北京: 科学出版社, 2002 : 367 - 386.
- [8] 李春格, 李晓鸣, 王敬国. 大豆连作对土体和根际微生物群落功能的影响. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2006, 26(4): 1144 - 1150.
- [9] 章家恩, 蔡燕飞, 高爱霞, 等. 土壤微生物多样性实验研究方法概述. 土壤(*Soils*), 2004, 36(4): 346 - 350.
- [10] 滕应, 骆永明, 李振高. 污染土壤的微生物多样性研究. 土壤学报(*Acta Pedologica Sinica*). 2006, 43(6): 1010 - 1026.
- [11] 谭兆赞, 刘可星, 廖宗文. 土壤微生物 Biolog 分析中特征碳源的判别. 华南农业大学学报(*Journal of South China Agricultural University*), 2006, 27(4): 10 - 13.
- [12] Sean O'Connell, Robert D. Lawson, Mary E. Watwood, R. M. Lehmana, BASIC program for reduction of data from community-level physiological profiling using Biolog microplates: rationale and critical interpretation of data. *Journal of MicroBiological Methods*, 2000 (40): 213 - 220.
- [13] 郑华, 陈法霖, 欧阳志云, 等. 不同森林土壤微生物群落 BiologGN 板碳源的利用. 环境科学(*Environmental Science*), 2007, 28(5): 1126 - 1130.
- [14] 徐华勤, 肖润林, 邹冬生, 等. 长期施肥对茶园土壤微生物群落功能多样性的影响. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27(8): 3355 - 3361.
- [15] 焦晓丹, 吴凤芝. 土壤微生物多样性研究方法的进展. 土壤通报(*Chinese Journal of Soil Science*), 2004, 35(6): 789 - 792.
- [16] 刘岳燕, 姚槐应, 黄昌勇. 水分条件对水稻土微生物群落多样性及活性的影响. 土壤学报(*Acta Pedologica Sinica*), 2006, 43(5): 828 - 834.
- [17] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles-a critique. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 2002, 42 : 1 - 14.
- [18] Alexander M. *Introduction to Soil MicroBiology*. New York : John Wiley and Sons, 1977 : 68 - 72.
- [19] Garland JL, Mills AL, Young JS. Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP). *Soil Biolog and Biochemistry*, 2001, 33 : 1059 - 1066.

[20] Jason Andrew Grove. Assessment of the Potential Functional Diversity of the Bacterial Community in a Biofilter. *A thesis presented to the University of Waterloo in fulfilment of the thesis requirement for the degree of Doctor of Philosophy in*

Chemical Engineering. Canada, 2006.

[21] Howard, P J A. Analysis of data from Biolog plates : comments on the method of Garland and Mills. *Soil Biolog and Biochemistry*, 1997, 29 : 1755 – 1757.

Research on functional diversity of microorganisms on jujube fruit surface in storage

Yuxia Sha *

(Institute of Plant Protection ,Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences ,Yinchuan 750002 ,China)

Abstract [Objective] Disease during storage caused by microbial infection is a serious problem of jujube fruits. The aim of the study was to characterize the microbial diversity in stored jujube fruits. **[Methods]** I used Biolog in experiment. The types of micro-plates were Filamentous Fungi micro-plate and Economicmicro-plate. **[Results]** There was much difference in microbial functional diversity on the surface of stored jujube fruit. The microbial functional diversity of stored 30 days was richer than it of stored 15 days. The diversity, homogeneity and average well color development of jujube used by fruit perservatives were lower than it not used by fruit preservatives. There were six kinds of the characteristic carbon. **[Conclusion]** Our study firstly showed microbial diversity on the surface of stored jujube fruit. Biolog could be applied in the research on microbial functional diversity of fruit surface.

Keywords : Jujube ; Storage period ; Fruit surface microorganism ; Functional diversity ; Biolog

(本文责编 : 张晓丽)

Supported by the Natural Science Foundation of Ningxia, China (NZ0753)

* Corresponding author. Tel : + 86-951-6882372 ; Fax : + 86-951-6886917 ; E-mail : yuxiasha@126.com

Received : 6 June 2009 / Revised : 6 August 2009

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要 :基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
 2. 综述摘要 :包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
 3. 英文摘要的撰写要点 :英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective] [Methods] [Results] [Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
- (1)在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2)建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3)建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
 - (4)摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
 - (5)摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如 :DNA、ATP 等。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。