

果蔬中灰霉菌的快速检测

孙秀兰, 杨婷婷, 哈尹昕 (江南大学食品学院, 江苏无锡214122)

摘要 介绍了灰霉菌侵染葡萄的方式、果实采后的防治方法以及灰霉菌的传统检测法、快速检测法, 并将以 ELISA 法为主的快速检测法与传统检测法进行了比较。结果表明, ELISA 法灵敏度高、干扰小、安全性高、污染少, 而且操作简便、快捷。

关键词 灰霉菌; ELISA; 快速检测

中图分类号 TS201.6 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)28-08803-02

Fast Determination of *Botrytis cinerea* in Fruits and Vegetables

SUN Xiulan et al (School of Food Science and Technology of Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract The infection way of *Botrytis cinerea*, the prevention methods on postharvest fruit, and the traditional detection methods and fast determination methods for *Botrytis cinerea* were introduced. The traditional detection methods were compared with fast determination methods. Results showed that the method of ELISA was characterized by high sensitivity, little interference, high safety and less pollution. And the method was simple and fast.

Key words *Botrytis cinerea*; ELISA; Fast determination

1 灰霉菌简介

灰霉菌、灰霉葡萄孢(*Botrytis cinerea*) 属半知菌亚门葡萄孢属, 其最适生长条件为 pH 值 5~6、温度 18~26℃。灰霉菌分生孢子梗细长, 灰黑色, 大小为(960~1200) μm × (16~22) μm, 不规则树状分支, 分支顶端细胞膨大成球形, 其上着生许多小梗, 小梗上着生分生孢子, 形似葡萄穗状。分生孢子单胞无色, 椭圆形或卵圆形, 大小为(8~14) μm × (6~9) μm, 孢子集生呈灰色。菌核褐色, 形状不规则, 大小为(2~4) mm × (1~3) mm^[1]。灰霉菌能够侵染 200 多种植物^[2], 是引起葡萄采摘后病害的主要病原真菌之一。葡萄灰霉菌可在田间潜伏侵染, 采后由健康果实携带进入销售市场。该菌的明显致病症状为果实软腐和脱落。与葡萄的其他采后致病菌相比, 灰霉菌不仅表现出明显的潜伏侵染优势, 而且具有较强的低温(4℃)条件下的致病性。接种灰霉菌, 可造成果粒软腐、干腐、裂果, 还可引起果粒脱落^[3]。灰霉菌能够自身分泌或诱导寄主产生果胶酶, 具有能够长期潜伏侵染、适应寄主生理状态和降低寄主产生防御反应的共生亲和功能, 因此灰霉菌具有比其他致病菌更强的致病优势。

2 灰霉菌侵染葡萄的方式

灰霉菌侵染葡萄的方式有 3 种。早期侵染葡萄开放的花柱柱头, 并潜伏在坏死的柱头和花柱组织中。随着浆果的发育, 灰霉菌仍然潜伏而无活性, 直到浆果成熟后发展; 另一种潜伏侵染是孢子萌发侵入浆果果皮, 停止发育, 直到浆果成熟时恢复生长发育。通过机械伤口侵入浆果的角质层和表皮。该病有两个明显的发病高峰: 开花前、幼果期, 主要为害花、幼果; 在果实着色至成熟期, 主要为害葡萄浆果^[1]。

3 灰霉菌的检测方法

3.1 传统检测法

3.1.1 琼脂培养基法。琼脂培养基法是将样品稀释后在琼脂培养基上培养。该法采用的培养基需要实验室配制, 培养时间长达 5~7 d, 培养温度采用特殊低温 28℃。基层单位和食品企业难以采用该方法^[4]。

3.1.2 平板计数法(AFP)。霉菌和酵母常用的测定方法是培养法。通过对样品进行稀释分离、培养以及鉴定、计算, 考察污染程度和污染微生物种类。对于一些比较特别的农产品如果蔬, 可以将表面消毒后的样品直接置于培养基上, 通过观察微生物的生长考察内部的污染情况。该培养方法具有准确、直观和结果可靠等优点, 但是费时、费力。为此, 出现了很多检测食源性真菌的快速检测方法, 免疫学方法就是其中之一^[7]。

3.2 快速检测法

3.2.1 霉菌快速检验纸片法。霉菌快速检验纸片是将滤油纸裁成 4 cm × 4 cm 的正方形纸片, 然后在培养基中浸泡, 晾干, 用⁶⁰Co 20 kGy 辐照灭菌制成。将不同稀释度的样品置于霉菌快速检验纸片上, 放入 25℃ 生化培养箱, 培养 48 h 后取出观察。按照广东省地方标准 DB44/T89-1997, 计算出每克或每毫升食品中霉菌的菌落数^[5]。

3.2.2 光谱检测(NIR)。近红外光谱检测法具有取样量少、准确、快速、便宜等优点。Ruan 等采用 NIR 检测果仁疮痂病。Areshansley 等检测了苹果组织上的 *Venturia inaequalis* 感染, 发现在 600~930 nm 波长下反射也减少。Mniliina fructicola 引起的果实组织褐腐在 700~800 nm 波长下反射也减少。Hahn 采用傅立叶光谱信号检测西红柿 *Fusarium oxysporum*, 准确率达 91.31%。Federico 等采用近红外光谱扫描检测西红柿根霉菌, 准确率达 78.00%。

3.2.3 酶联免疫法(ELISA)。血清学是研究体液(主要是血液)中抗体、抗原在体外各种免疫反应现象的科学。该方法已被应用于生物学的各个领域。最近二三十年来, 生物大分子物质分离纯化技术的发展以及血清技术的完善, 特别是 20 世纪 70 年代初期酶联免疫吸附检测的提出和广泛应用, 大大地提高了血清学的灵敏度和安全性, 极大地推动了血清学技术在真菌研究中的应用。

1971 年瑞典科学家 Engvall、Perlmann 和荷兰科学家 Van Weeman、Schuurs 都报道了将免疫酶技术发展为检测体液中微量物质的固相免疫测定方法, 并且称其为酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)。把抗原抗体的免疫反应与酶的高效催化作用原理有机地结合起来。其突出优点是敏感性高, 特异性强, 反应迅速, 结果定量。

ELISA 不仅具有免疫荧光试验和放射免疫试验的优点,而且克服了上述两种方法的缺点^[6]。

从20世纪80年代中后期开始,Gousin等运用ELISA进行了大量有关食品中污染真菌快速特异检测的研究。一些常见的植物病原菌(如疫霉、腐霉、根霉、黑盘菌等)和商品化的检测试剂盒目前都有出售。1986年Lin等以西红柿汁中常见的污染菌交链孢霉(*Alternaria alternata*)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、匍枝根霉(*Rhizopus stolonifer*)为研究对象,以其冷冻干燥菌丝为抗原,通过免疫兔子获得特异性抗体,发现ELISA试验结果的交叉反应率小于10%,样品中最小检出量达到1 μg干菌丝/g,无背景干扰,ELISA读数和西红柿汁中污染真菌含量具有较好的相关性。通过把西红柿汁中常见的污染菌交链孢霉、白地霉、匍枝根霉等菌种所获得的抗体与污染果蔬产品、面包、奶酪、粮食等中得到的不同种属近30个菌株进行交叉试验,发现交叉反应率小,特异性强,而且背景影响小,所以可以用于检测相应的污染真菌。将ELISA的结果与Hward计数结果相比较,发现它们之间有很好的相关性,并且多糖为其特异性抗原。Notermans等以真菌的胞外多糖为抗原,采用ELISA检测了坚果、水果、果汁、蔬菜、粮食中曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、分枝霉属(*Cladsporium*)、毛霉属(*Mucor*)、青霉属(*Penicillium*)等真菌,发现ELISA能准确地反映食品中真菌的污染程度。1990年Dewey等以污染谷物的产毒青霉——岛青霉(*Penicillium islandicum*)为研究对象,发现变色粮食中印度尼西亚和菲律宾的岛青霉检出率分别为32%和14%^[7]。1991年Ricker等采用ELISA方法定量分析了成熟葡萄中灰霉葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的污染情况。

3.3 传统检测法和快速检测法的比较

传统检测法具有以下缺点:操作繁琐,处理样品时工作量大;在检测过程中操作人员必须直接接触标准品,从而不仅危害操作人员的身体健康,而且对周围环境产生不利的影响;灵敏度差,一般传统检测方法的最低检测限为5 μg/kg,与毒性安全剂量0.01 μg/kg相差很大。为了提高灵敏度,首先必须改进样品的提取和净化方法,同时必须提高薄层色谱分析性能。这势必大大增加劳动强度和检测成本。

与传统方法相比,快速检测法中的ELISA方法应用了抗原抗体免疫反应的特异性,灵敏度高,干扰小。目前用于食品安全检测的方法有薄层色谱法(TLC)、微生物法、气相色谱法(GC)、质谱法(MS)、高效液相色谱法(HPLC)和核酸探针技术等。其中,TLC法必须进行较为复杂的样品预处理和抽提,而且不能定量,灵敏度低;微生物法不易筛选到特别敏感的菌株,只能定性,不能定量,而且易受其他抗菌药物的影响;GC法和HPLC法等虽然灵敏度高,但是设备昂贵,样品预处理复杂,检测费用高,难以推广使用;核酸探针则在试验过程中易受到污染。ELISA法不仅灵敏度高、干扰小、安全性高、污染少,而且操作简便、快捷。所以,ELISA法被广泛应用于蔬菜产区、蔬菜批发市场和海关检测^[8]。

4 采后防治方法

灰霉菌是鲜食葡萄采后贮藏中主要的病原菌,尤其在

低温冷藏、运输中发病严重^[9]。果蔬采后病害的防治技术主要采用冷藏结合化学杀菌剂的方法。

4.1 SO₂ 控制 使用SO₂来抑制灰霉菌的生长,可通过每周熏蒸贮藏场所一次,或把SO₂发生药垫(包)与葡萄同时包装于聚乙烯薄膜袋内^[10]。但是使用SO₂存在以下问题:若用量较大,则易造成SO₂残留超标;若多次或大剂量熏蒸,则会造成果实漂白伤害;有机食品标准规定,葡萄贮藏不能使用SO₂^[11]。

4.2 乙醇和山梨酸浸泡或熏蒸 果蔬通过乙醇和山梨酸浸泡或熏蒸可抑制灰霉菌的生长。乙醇对霉菌孢子的抑制作用随其浓度的增加而增强。乙醇浓度大于30%时,可以迅速杀死灰霉葡萄孢子;而乙醇浓度低于20%时,不能使灰霉葡萄孢子全部致死。亚致死浓度的乙醇结合山梨酸钾,可以有效抑制由灰霉菌孢子引起的葡萄采后病害。在允许使用的防治霉菌的化合物中,乙醇和山梨酸钾的负面影响最小^[11]。

4.3 大蒜乙醇提取液和乙酸乙酯提取液抑制 大蒜乙醇提取液和乙酸乙酯提取液对番茄灰霉菌孢子的萌发有较强的抑制作用;大蒜乙酸乙酯提取液对番茄灰霉菌菌丝生长及其在离体叶片上的侵染有较强的抑制作用^[12]。

4.4 其他方法 由于对国外市场上水果用化学杀菌剂处理有着严格的限制,因此应开展减少杀菌剂用量以及采后病害控制技术的研究,如拮抗菌、诱抗剂等。

5 展望

灰霉菌与果蔬采后腐烂相关性的研究,可以为新型无公害果蔬保鲜剂的应用提供依据,对减少化学杀菌剂的使用量,对人类、环境友好的新型保鲜技术的推广应用具有重要意义。研制出专用于果蔬中灰霉菌快速检测的方法,使得操作过程简便快速、灵敏度高、检测成本低,是现代分析检测技术发展的方向。随着McAb技术的成熟,新ELISA法的出现,免疫试剂盒的商业化,ELISA等快速检测方法将得到进一步的应用和推广。

参考文献

- [1] 陈宇飞,文景芝,李立军.葡萄灰霉病研究进展[J].东北农业大学学报,2006,37(5):693-699.
- [2] PRINS T L. Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens[M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [3] 许玲,张晟瑜,王奕文,等.灰霉菌采摘后致病性研究[J].植物病理学报,2006,36(1):74-79.
- [4] 汪琦.食品中霉菌检测两种方法的比较[J].中国误诊学杂志,2004,4(4):617-618.
- [5] 刘秀锋,潘珍瑜,刘红,等.应用霉菌检测纸片快速检测食品霉菌的研究[J].广西预防医学,2001(7):99-100.
- [6] ANDERSON D P. Diseases in Asian aquaculture. Fish health section[C]. Manila: Asia Fisheries Society, 1995.
- [7] TSAI G J, YUS C. Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999,50:181-189.
- [8] 肖韦华,买娜,王旭峰,等.酶联免疫吸附法在植物性食品安全检测中的应用[J].食品科学,2006,27(12):920-923.
- [9] DENNIS C. Postharvest pathology of fruit and vegetables[M]. London: Academic Press, 1983.
- [10] HARVEY J, MANDUM. Table grapes and refrigeration: Fungitoxin with sulfur dioxide[J]. Int J Refrig, 1978,1:16.
- [11] 李自强,林贍,孙鸿举.乙醇和山梨酸钾对鲜食葡萄采后灰霉菌的抑制作用[J].食品研究与开发,2006,27(9):130-133.
- [12] 宋卫国,李宝聚,石延霞,等.大蒜提取物抑制番茄灰霉菌活性测定[J].中国蔬菜,2005(8):21-22.