

## 研究报告

## 聚赖氨酸和 1-MCP 联合处理对草菇贮藏期间表面细菌变化的影响

杨国辉<sup>#1</sup>, 陈天赐<sup>#1</sup>, 郑舒桓<sup>1</sup>, 武少兰<sup>1</sup>, 江丹霞<sup>1</sup>, 刘培培<sup>1</sup>, 陈炳智<sup>\*1,2</sup>, 江玉姬<sup>\*1,2</sup>

1 福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002

2 福建农林大学菌物研究中心, 福建 福州 350002

杨国辉, 陈天赐, 郑舒桓, 武少兰, 江丹霞, 刘培培, 陈炳智, 江玉姬. 聚赖氨酸和 1-MCP 联合处理对草菇贮藏期间表面细菌变化的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3232-3243

Yang Guohui, Chen Tianci, Zheng Shuhuan, Wu Shaolan, Jiang Danxia, Liu Peipei, Chen Bingzhi, Jiang Yuji. Effect of  $\epsilon$ -polylysine combined with 1-MCP on the surface bacteria of *Volvariella volvacea* fruit bodies during storage[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3232-3243

**摘要:**【背景】草菇具有很高的营养价值和药用价值, 草菇采后品质易劣变主要是由其表面腐败菌引起的。保鲜处理条件下草菇表面菌的研究目前未见相关报道。【目的】探究聚赖氨酸( $\epsilon$ -polylysine,  $\epsilon$ -PL)和 1-甲基环丙烯(1-methylcyclopropene, 1-MCP)联合处理对草菇贮藏期间表面细菌变化的影响。【方法】采用平板培养与 16S rRNA 基因高通量测序技术两种方法, 分离、鉴定  $\epsilon$ -PL 和 1-MCP 联合处理后草菇贮藏期间的表面微生物, 确定草菇贮藏期间菇体表面优势腐败菌。【结果】平板培养法结果表明, 草菇子实体表面的菌落总数随着贮藏时间的延长逐渐上升。贮藏 6 d 时, 处理组(PC)草菇表面菌落总数为 7.16 lg (CFU/g), 极显著( $P<0.01$ )低于 CK 组[7.42 lg (CFU/g)]; 从 PC 组、CK 组分离鉴定的细菌分别为 16 株和 19 株, 以假单胞菌属、金黄杆菌属、芽孢杆菌属和寡养单胞菌属为主; 16S rRNA 基因高通量测序结果表明, PC 组共鉴定出 370 个属的细菌隶属于 27 个门; CK 组共鉴定出 366 个属的细菌隶属于 25 个门; 寡养单胞菌属为相对丰度最高的优势菌。【结论】寡养单胞菌属为草菇优势腐败菌之一,  $\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理可明显抑制草菇贮藏期间表面细菌的生长。

**关键词:** 草菇; 平板培养; 高通量测序; 细菌菌群结构

基金项目: 国家自然科学基金(31801920); 国家现代农业产业技术体系(CARS-20); 福建省自然科学基金(2020J01557)

#对本文贡献相同

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (31801920); China Agriculture Research System (CARS-20); Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01557)

#These authors equally contributed to this work

\*Corresponding authors: E-mail: CHEN Bingzhi: cbz\_2006@163.com; JIANG Yuji: jyj1209@163.com

Received: 2021-12-12; Accepted: 2022-01-18; Published online: 2022-02-11

## Effect of $\epsilon$ -polylysine combined with 1-MCP on the surface bacteria of *Volvariella volvacea* fruit bodies during storage

YANG Guohui<sup>#1</sup>, CHEN Tianci<sup>#1</sup>, ZHENG Shuhuan<sup>1</sup>, WU Shaolan<sup>1</sup>, JIANG Danxia<sup>1</sup>,  
LIU Peipei<sup>1</sup>, CHEN Bingzhi<sup>\*1,2</sup>, JIANG Yuji<sup>\*1,2</sup>

1 College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

**Abstract:** [Background] *Volvariella volvacea* has high nutritional and medicinal value. Post-harvest quality deterioration of *V. volvacea* fruit bodies (VVFB) is mainly caused by the surface spoilage bacteria. There is no report on the surface bacteria of VVFB under fresh-keeping treatment. [Objective] To investigate the effect of  $\epsilon$ -polylysine ( $\epsilon$ -PL) combined with 1-methylcyclopropene (1-MCP) on surface bacteria of VVFB during storage. [Methods] VVFB were treated with  $\epsilon$ -PL and 1-MCP and then stored. Through the plate culture method and 16S rRNA gene high-throughput sequencing, the surface bacteria of VVFB during storage were isolated and identified, and the dominant spoilage bacteria were determined. [Results] The plate culture method showed that the total number of colonies on the surface of VVFB increased during the storage. To be specific, the colony number of the treatment group (PC,  $\epsilon$ -PL+1-MCP) was up to 7.16 lg (CFU/g) on the 6th day, smaller ( $P<0.01$ ) than that 7.42 lg (CFU/g) in the control group (CK). A total of 16 and 19 strains were isolated from the PC group and CK group, respectively, which were dominated by *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, and *Stenotrophomonas*. The 16S rRNA gene high-throughput sequencing suggested 370 bacterial genera in 27 phyla were identified in the PC group, and 366 genera in 25 phyla were identified in the CK group. Among the strains, *Stenotrophomonas* had the highest relative abundance. [Conclusion] *Stenotrophomonas* is one of dominant spoilage bacterial genus of VVFB, and  $\epsilon$ -PL combined with 1-MCP can effectively inhibit the growth of bacteria on the surface of VVFB.

**Keywords:** *Volvariella volvacea*; plate culture; high-throughput sequencing; bacterial flora structure

草菇(*Volvariella volvacea*)主要栽培地在东南亚地区, 口感脆嫩, 兼具营养价值与药用价值<sup>[1]</sup>。草菇采后呼吸强烈, 菇体表面微生物丰富, 采后褐变、腐烂反应强烈<sup>[2]</sup>, 鲜菇难以保鲜贮藏。草菇在室温下的贮藏期为 1–2 d。本课题组在探究其保鲜方法时发现, 聚赖氨酸( $\epsilon$ -polylysine,  $\epsilon$ -PL)和 1-甲基环丙烯(1-methylcyclopropene, 1-MCP)联合处理可显著延长草菇贮藏期至 5–6 d<sup>[3]</sup>。 $\epsilon$ -PL 是一种抑菌谱广的功能性多肽<sup>[4–5]</sup>, 属于天然防腐剂; 1-MCP 可减少草菇等果蔬的采后呼吸和腐败变质<sup>[6–8]</sup>。草菇采后品质劣变受其表面腐败菌影响较大, 本试验从微生物角度评价

$\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理方法对草菇保鲜的影响。

明确外源微生物的种类和数量是研究草菇表面菌相变化的根本。研究菌相变化的传统方法是平板分离法, 该方法只能分离培养小部分环境微生物<sup>[9]</sup>。随着科学技术的发展, 16S rRNA 基因高通量测序技术已成功应用于发酵食品、肠道环境、自然环境等多个领域的微生物群落鉴定<sup>[10–12]</sup>, 是一种了解微生物时空演替规律的新方法<sup>[13–14]</sup>。李婕等<sup>[15]</sup>通过平板培养法和高通量测序技术发现假单胞菌是双孢蘑菇 4 °C 贮藏保鲜期间的优势致腐菌; 潘欣圆等<sup>[16]</sup>通过传统平板培养法和高通量测序技术发现乳酸乳球菌

是金针菇贮藏保鲜期间的优势菌; Wang 等<sup>[17]</sup>利用高通量测序技术分析环境温度和保存时间对草菇细菌群落的影响, 结果发现赖氨酸杆菌属、假单胞菌属等菌群会加速草菇的腐烂。目前保鲜处理条件下草菇表面菌研究未见相关报道, 因此, 本实验采用平板分离培养法与高通量测序技术相结合探究草菇贮藏期间表面菌相变化。

本研究通过  $\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理草菇, 研究并确定草菇贮藏期间表面微生物的变化和优势菌, 以期为草菇保鲜及其机理研究提供参考, 也为其他食用菌贮藏保鲜中腐败菌的分析提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

实验所用草菇品种为 V23, 由漳州市九冬蘑菇产业园提供, 采收后立即运回福建农林大学食品科学学院微生物实验室进行处理。

### 1.2 主要试剂和仪器

2×Easy Taq Mix 试剂盒, 近岸蛋白质科技有限公司;  $\epsilon$ -PL, 浙江新银象生物工程有限公司。

生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 无菌采样袋, 比克曼生物科技有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

### 1.3 样品处理

样品预处理: 选取无损伤、大小外观一致的蛋形期草菇, (15±1) °C 预冷 2 h。

PC 组: 采用  $\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理草菇(以下简称联合处理), 将预处理后的草菇喷洒 0.3 g/kg 的  $\epsilon$ -PL 溶液处理, 喷洒 2 min 后将处理好的草菇样品经风干后置于保鲜盒中, 在 1-MCP 纸片上喷少量水, 平铺在保鲜盒的沥干层下面, 1-MCP 浓度为 0.75  $\mu$ L/L。

CK 组: 将预处理后的草菇喷施无菌水处理,

喷洒 2 min 后将处理好的草菇样品经风干后置于保鲜盒中, 在沥水层下加入 3 mL 无菌水。

将保鲜盒放置于(15±1) °C 培养箱中进行贮藏。各处理组分别处理 3 盒, 每盒 10 颗草菇于第 0、2、4 和 6 天取样, 进行细菌鉴定。PC 组编号为 P0、P2、P4 和 P6, CK 组编号为 C0、C2、C4 和 C6。

## 1.4 方法

### 1.4.1 平板分离

参照李婕等<sup>[15]</sup>的方法对草菇贮藏期表面细菌计数, 并进行分离纯化、镜检及形态学观察, 每份样品均设置 3 个生物学重复。

### 1.4.2 细菌 PCR 扩增与测序

细菌基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因 PCR 扩增反应条件参照李婕等<sup>[15]</sup>方法: 扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 27F 和 1492R (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 2×Easy Taq Mix 25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L。经琼脂糖凝胶电泳检测后, 将 PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。得到的序列在 NCBI 上进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 找到相似度最高的菌株。

### 1.4.3 16S rRNA 基因高通量测序分析

各处理组定期分别取草菇保存于-80 °C 冰箱, 第 6 天取样完成后, 将样品送至北京奥维森基因科技有限公司提取草菇表面细菌 DNA, 针对 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行 PCR 扩增。扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3'), 扩增后进行测序并构建测序文库, 每份样品均设置 3 个生物学重复。

## 1.5 数据分析

参考李婕等<sup>[15]</sup>方法分析高通量测序结果, 使用 Origin 2017、Excel 2010 软件进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 草菇表面可培养细菌分析结果

#### 2.1.1 联合处理对草菇贮藏期表面细菌总数的影响结果

贮藏期间, 草菇表面的菌落总数呈上升趋势。2 d 时, CK 组菇体表面菌落总数为 6.18 lg (CFU/g), 显著高于 PC 组( $P<0.05$ ); 4 d 后, CK 组菇体表面菌落总数与 PC 组差异极显著( $P<0.01$ ); 6 d 时, CK 组菇体表面菌落总数达到 7.42 lg (CFU/g)。草菇表面微生物负载量为 5.27–7.42 lg (CFU/g) (图 1)。

草菇贮藏期间感官品质不断下降。新鲜草菇菇体饱满、色泽亮白, 具有典型鲜菇味; 贮藏第 2 天时, CK 组少数出现小块水斑, 菇体有轻微凹陷, PC 组草菇无明显变化; 第 4 天时, CK 组草菇底部大多数发生褐变并产生异味, 部分草菇在褐变处出现自溶萎缩现象, PC 组无明显变化; 第 6 天时, CK 组草菇全部严重劣变, 出水发黏, 已完全丧失商品价值和食用价值, PC 组草菇除少数出现小块水斑外, 菇体仍为饱满状, 具有良好的感官品质(图 2)。

综合分析可知, 贮藏期间, CK 组草菇感官品质劣变速度明显快于 PC 组, 其表面的培养细菌菌落数始终大于联合处理组, 其原因为处理组经聚赖氨酸处理后部分细菌的生长被抑制, 因此草菇采后感官品质保持良好; CK 组草菇无任何处理, 表面细菌可正常生长, 菇体品

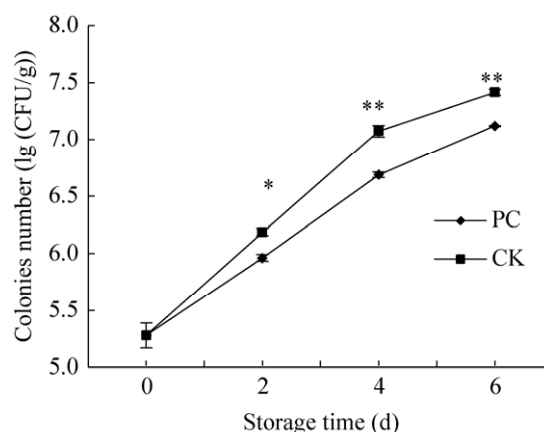


图 1 联合处理对草菇贮藏期表面细菌总数的影响  
Figure 1 Effects of combined treatment on the total colony number of bacteria on VVFB during storage.  
\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .

质下降迅速。由此可见, 草菇采后品质劣变与表面菌落总数变化趋势相同, ε-PL 联合 1-MCP 处理可维持草菇贮藏品质, 延长草菇贮藏期。

#### 2.1.2 贮藏期间菇体表面可培养细菌的分离鉴定

草菇样品表面细菌分离纯化后, 对细菌 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 经凝胶电泳验证, 目标产物条带大小约为 1 500 bp, 符合预期。将验证后的 PCR 产物进行 16S rRNA 基因测序。测序结果和标准菌株的 16S rRNA 基因序列进行比对与进化分析, PC 组分离的细菌共 16 株, 隶属于 3 个门 5 个纲 6 个目 7 个科 7 个属, CK 组分离的细菌共 19 个菌株, 隶属于 3 个门 5 个纲 7 个目 7 个科 10 个属, 对分离的菌株进行形态学观察和革兰氏鉴定, 鉴定结果符

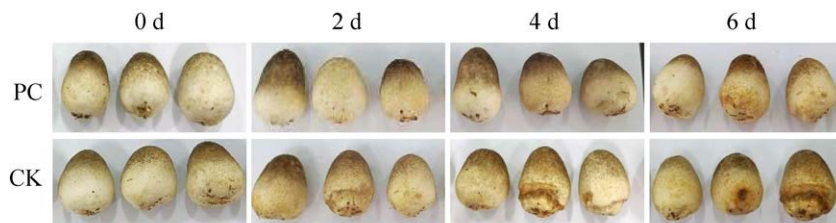


图 2 不同贮藏时间草菇的感官品质变化

Figure 2 Changes of sensory quality of VVFB at different storage time.

合相应细菌的特性,可进一步证明 BLAST 比对的结果。PC 组草菇表面 16 个细菌菌株中杆状菌株 14 个、球状菌株 2 个,革兰氏阳性菌株有 2 个、阴性菌株有 14 个,CK 组表面 19 个细菌菌株中杆状菌株 17 个、球状菌株 2 个,革兰氏阳性菌株仅有 3 个、阴性菌株有 16 个(表 1)。

表 1 草菇贮藏过程中可培养的细菌组成及生物学特性

Table 1 Composition and biological characteristics of culturable bacteria from VVFB during storage

| No.  | Taxon                                  | Gram stain     | Colony morphology and color   | Morphological identification |
|------|--|----------------|---|------------------------------|
| P1   | <i>Acinetobacter baumannii</i>         | G <sup>-</sup> | Raised, smooth surface, translucent, off-white  | Baculiform                   |
| P2   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>     | G <sup>-</sup> | Smooth, white   | Baculiform                   |
| P3   | <i>Azospirillum lipoferum</i>          | G <sup>-</sup> | Neatly edged, transparent, milky white  | Baculiform                   |
| P4   | <i>Bacillus cereus</i>                 | G <sup>+</sup> | Colony large, flat, rough surface, irregular edge, shiny white                                    | Baculiform                   |
| P5   | <i>Bacillus thuringiensis</i>          | G <sup>+</sup> | Irregular edges, opaque, yellowish  | Baculiform                   |
| P6   | <i>Burkholderia gladioli</i>           | G <sup>-</sup> | Moist, smooth, neatly edged, creamy white   | Baculiform                   |
| P7   | <i>Chryseobacterium cucumeris</i>      | G <sup>-</sup> | Neatly edged, bulging in the middle, smooth surface, yellow                                       | Baculiform                   |
| P8   | <i>Chryseobacterium gleum</i>          | G <sup>-</sup> | Opaque, smooth surface, neatly edged, yellow  | Baculiform                   |
| P9*  | <i>Chryseobacterium indologenes</i>    | G <sup>-</sup> | Viscous, translucent, neatly edged, raised in the middle, smooth and shiny surface, yellow-orange | Baculiform                   |
| P10  | <i>Chryseobacterium</i> sp. MN13.3d    | G <sup>-</sup> | Translucent, neatly edged, yellow-orange  | Baculiform                   |
| P11* | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          | G <sup>-</sup> | Flat, moist, bright green   | Linear                       |
| P12  | <i>Pseudomonas monteilii</i>           | G <sup>-</sup> | Smooth edges, white   | Baculiform                   |
| P13* | <i>Pseudomonas putida</i>              | G <sup>-</sup> | Neat, moist, raised, light green  | Baculiform                   |
| P14* | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>    | G <sup>-</sup> | Regular outline, raised in the middle, yellowish  | Baculiform                   |
| P15  | <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>     | G <sup>-</sup> | Smooth surface, neatly edged, yellow  | Short bacilliform            |
| P16  | <i>Stenotrophomonas</i> sp. <i>pho</i> | G <sup>-</sup> | Smooth, yellow  | Baculiform                   |
| C1   | <i>Bacillus ginsengihumi</i>           | G <sup>+</sup> | Surface opaque, smooth edge, pale yellow  | Baculiform                   |
| C2   | <i>Bacillus</i> sp. PA23               | G <sup>+</sup> | Smooth, pale yellow   | Baculiform                   |
| C3   | <i>Bacillus</i> sp. YX                 | G <sup>+</sup> | Smooth surface, opaque, yellowish   | Baculiform                   |
| C4   | <i>Bordetella muralis</i>              | G <sup>-</sup> | Smooth, raised, pearly luster, pale yellow  | Spherical                    |
| C5   | <i>Cedecea neteri</i>                  | G <sup>-</sup> | Surface wet and smooth, opaque, edges are not neat, sticky, milky white                           | Baculiform                   |
| C6   | <i>Enterobacter asburiae</i>           | G <sup>-</sup> | Smooth, raised, moist, white-gray   | Baculiform                   |
| C7   | <i>Enterobacter cloacae</i> complex    | G <sup>-</sup> | Moist, white  | Rod-shape                    |
| C8   | <i>Enterobacter kobei</i>              | G <sup>-</sup> | Smooth surface, neat edge, white  | Baculiform                   |
| C9   | <i>Enterobacter roggenkampii</i>       | G <sup>-</sup> | Opaque, white   | Baculiform                   |
| C10  | <i>Klebsiella michiganensis</i>        | G <sup>-</sup> | Neatly edged, smooth and moist surface, shiny in dense places, light red                          | Baculiform                   |
| C11  | <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | G <sup>-</sup> | Mucilaginous, off-white   | Rod-shape                    |
| C12  | <i>Pseudomonas boreopolis</i>          | G <sup>-</sup> | Raised, smooth, white   | Bacilliform                  |
| C13  | <i>Pseudomonas hibiscicola</i>         | G <sup>-</sup> | Opaque, regular margins, raised, regular margins, smooth surface, white                           | Baculiform                   |
| C14  | <i>Serratia marcescens</i>             | G <sup>-</sup> | Raised, opaque in the center, irregular at the edges, red   | Spherical                    |
| C15  | <i>Sphingobacterium multivorum</i>     | G <sup>-</sup> | Smooth and moist surface, neat edge, yellow   | Baculiform                   |

注: P: PC 处理; C: CK 处理; \*: PC 处理与 CK 处理共有的细菌

Note: P: PC treatment; C: CK treatment; \*: The bacteria common to PC treatment and CK treatment.

PC 组与 CK 组草菇表面共有 4 株同种的细菌, 分别为产吡啶金黄杆菌(*Chryseobacterium indologenes*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。

实验结果表明, 草菇表面可培养的细菌隶属于变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*), 以革兰氏阴性菌为主, 其中假单胞菌属、金黄杆菌属和寡养单胞菌属总共占比 50%以上, 革兰氏阳性菌主要隶属于芽孢杆菌属; 细菌形态主要为杆状。

## 2.2 16S rRNA 基因高通量测序质控信息

### 2.2.1 测序基本数据处理结果

经测序后, 草菇样品表面细菌共获得 1 875 287 条 16S rRNA 基因的 V3-V4 区有效序列, 其中样品的最大序列数为 187 329 条, 最小序列数为 25 935 条, 每个样品平均序列数为 78 137 条。质控后的序列长度分布较为集中, 大部分在 420–440 bp 之间, 优质序列占有有效序列的比例平均为 99.9% (图 3)。样品测序的有效序列均达到后续分析要求。

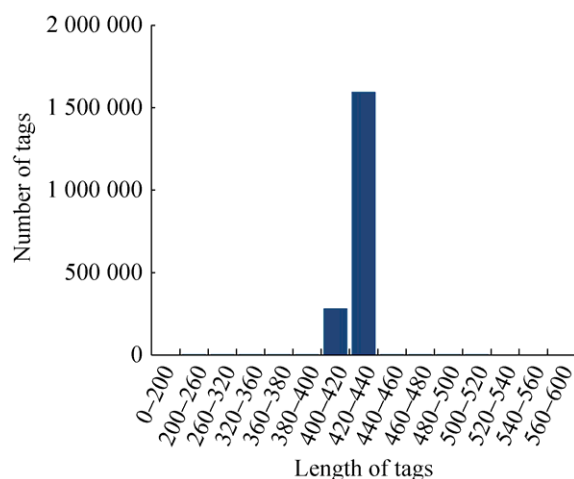


图 3 优质序列长度分布图

Figure 3 Length distribution of high quality sequence.

### 2.2.2 OTU 聚类结果

按照优质序列的相似性进行 OTU 聚类分析<sup>[18]</sup>。PC 处理组草菇样品 4 个不同贮藏保鲜时间测序共获得的 OTU 数目为 5 293 个, P0、P2、P4 和 P6 这 4 个不同贮藏时间特有的 OTU 序列数分别为 227、124、72 和 225 个。CK 处理组草菇样品共获得的 OTU 数目为 6 365 个, C0、C2、C4 和 C6 这 4 个不同贮藏时间特有的 OTU 序列数分别为 390、54、109 和 73 个 (图 4)。

### 2.2.3 $\alpha$ 多样性分析

$\alpha$  多样性分析主要包括 Shannon 和 Chao1 指数, 是评价物种丰富度的指标。随着测序深

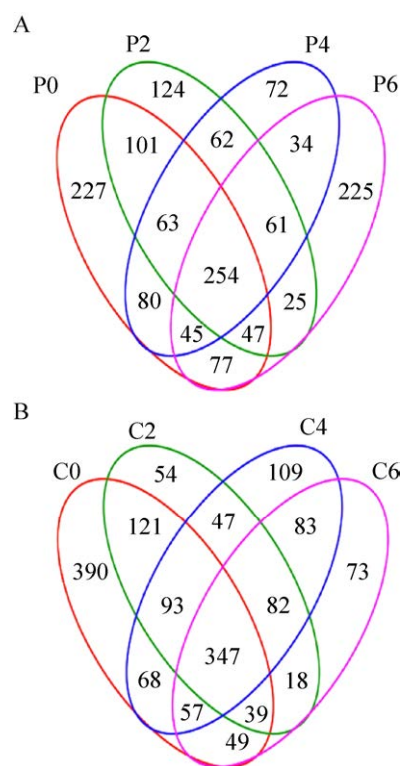


图 4 草菇贮藏期间表面细菌 16S rRNA 基因高通量测序 OTU 统计分析韦恩图 A: PC 处理; B: CK 处理

Figure 4 Venn diagram of OTU statistical analysis from 16S rRNA gene high-throughput sequencing of surface bacteria during storage of VVFB. A: PC treatment; B: CK treatment.



度的增加,所有草菇样品 Shannon 稀疏曲线趋于平缓(图 5),说明测序数据量足够大,能够反映样品中绝大部分微生物信息。

PC 处理组和 CK 处理组草菇贮藏期间,Chao1 值均大于 600,表明各样本草菇表面细菌群落丰富,Chao1 值随着贮藏时间的增加而降低,表明草菇表面细菌群落丰富度在贮藏期间逐渐降低。所有草菇样品 Goods coverage 均大于 99% (表 2),说明测序结果可反映样品的实际情况。

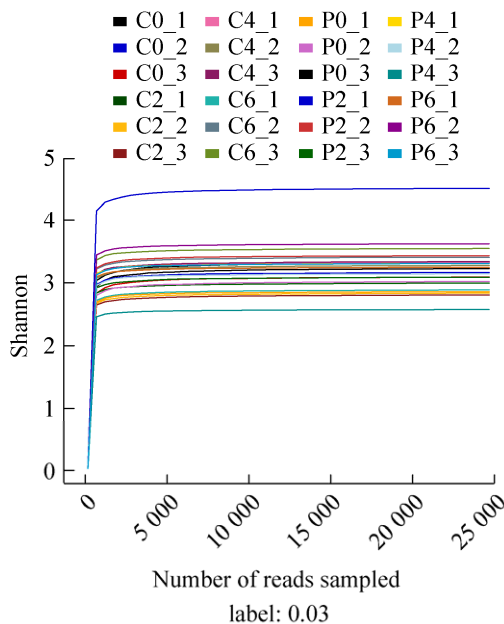


图 5 草菇表面细菌高通量测序 Shannon 曲线

Figure 5 Shannon curve for high throughput sequencing of surface bacteria from VVFB.

表 2 草菇贮藏期间表面细菌  $\alpha$  多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of surface bacteria during storage of VVFB

| Sample ID | OTUs   | Chao1  | Goods coverage |
|-----------|--------|--------|----------------|
| P0        | 528.33 | 775.07 | 0.99           |
| P2        | 434.33 | 627.88 | 0.99           |
| P4        | 382.00 | 602.90 | 0.99           |
| P6        | 419.67 | 634.73 | 0.99           |
| C0        | 695.67 | 937.53 | 0.99           |
| C2        | 456.33 | 843.96 | 0.99           |
| C4        | 524.67 | 847.18 | 0.99           |
| C6        | 445.00 | 679.95 | 0.99           |

## 2.2.4 Anosim 分析

Anosim 分析<sup>[19]</sup>用来判断分组是否有意义。结果如表 3 所示,  $R$  值大于 0, 说明草菇样品组间差异显著, 而且组间差异大于组内差异, 本次实验处理组所有组间  $P$  值均为 0.001, 统计分析具有显著性。

## 2.3 贮藏期间草菇表面细菌群落结构及动态变化

### 2.3.1 基于门分类水平的菌群多样性分析

草菇贮藏期间, PC 组一共检出 27 个门的

表 3 不同处理两两组间 Anosim 分析结果

Table 3 The results of Anosim analysis between the two groups of different treatments

| Group              | $R$ value | $P$ value |
|--------------------|-----------|-----------|
| P0-P2              | 0.814 8   | 0.098     |
| P0-P4              | 0.740 7   | 0.085     |
| P0-P6              | 1.000 0   | 0.084     |
| P0-C0              | 0.296 3   | 0.108     |
| P0-C2              | 0.407 4   | 0.101     |
| P0-C4              | 1.000 0   | 0.089     |
| P0-C6              | 0.963 0   | 0.098     |
| P2-P4              | 0.111 1   | 0.313     |
| P2-P6              | 1.000 0   | 0.108     |
| P2-C0              | 0.370 4   | 0.116     |
| P2-C2              | 0.851 9   | 0.104     |
| P2-C4              | 0.740 7   | 0.105     |
| P2-C6              | 0.925 9   | 0.099     |
| P4-P6              | 0.777 8   | 0.113     |
| P4-C0              | 0.407 4   | 0.097     |
| P4-C2              | 0.407 4   | 0.104     |
| P4-C4              | 0.333 3   | 0.114     |
| P4-C6              | 0.703 7   | 0.104     |
| P6-C0              | 0.555 6   | 0.123     |
| P6-C2              | 0.851 9   | 0.109     |
| P6-C4              | 0.222 2   | 0.112     |
| P6-C6              | 0.222 2   | 0.335     |
| C0-C2              | 0.407 4   | 0.096     |
| C0-C4              | 0.518 5   | 0.089     |
| C0-C6              | 0.666 7   | 0.098     |
| C2-C4              | 0.444 4   | 0.207     |
| C2-C6              | 0.777 8   | 0.104     |
| C4-C6              | 0.296 3   | 0.195     |
| Between all groups | 0.576 9   | 0.001     |

细菌。其中占比大于 1% 的微生物种类从高到低排序依次为变形菌门、拟杆菌门、放线菌门 (*Actinobacteria*)、厚壁菌门。0 d 时, PC 组草菇表面变形菌门相对丰度为 77.13%, 到 6 d 时为 62.07%, 丰度下降了 15.06%, 为优势菌; 放线菌门和厚壁菌门丰度变化不明显; 拟杆菌门丰度从 19.47% (0 d) 上升至 33.54% (6 d), 上升了 14.07%。

CK 组一共检出 25 个门的细菌。其中占比大于 1% 的微生物种类从高到低排序, 依次为变形菌门、拟杆菌门、蓝细菌门 (*Cyanobacteria*)、放线菌门。0 d 时, CK 组草菇表面变形菌门相对丰度为 63.67%, 到 6 d 时为 53.78%, 丰度下降了 9.89%, 依旧为优势菌; 放线菌门和蓝细菌门丰度变化不明显; 拟杆菌门丰度从 26.46% (0 d) 上升至 43.77% (6 d), 上升了 17.31%, 成为草菇另一优势菌(图 6)。由此可知, 草菇表面细菌以变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门为主, 与传统培养法试验结果一致; 联合处理可有效抑制草菇表面变形菌门和拟杆菌门细菌生长。

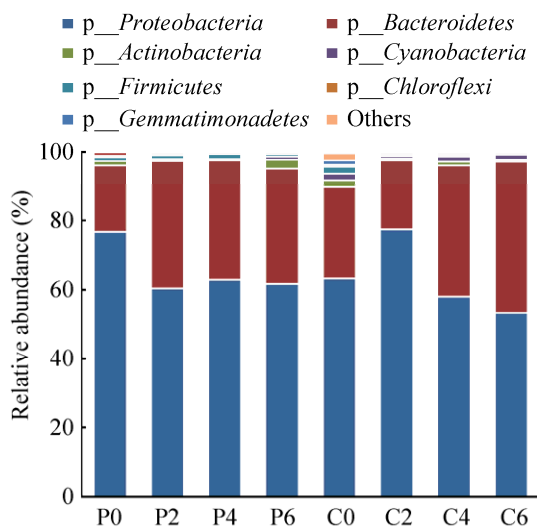


图 6 草菇基于门水平的细菌分析图

Figure 6 Frequencies of different phylum bacteria from VVFB.

### 2.3.2 基于属分类水平的菌群多样性分析

草菇贮藏期间, PC 组共检出 370 个属的细菌, 其中占比前五的菌属依次为寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、鞘脂杆菌属 (*Sphingobacterium*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。0 d 时, PC 组草菇表面寡养单胞菌属相对丰度为 46.48%, 到 6 d 时为 30.41%, 丰度下降了 16.07%, 为优势腐败菌; 鞘脂杆菌属丰度从 4.00% (0 d) 上升至 20.91% (6 d), 上升了 16.91%; 金黄杆菌属丰度从 9.21% (0 d) 下降至 1.26% (6 d), 下降了 7.95%。假单胞菌属和黄杆菌属丰度分别上升了 5.96% 和 5.49%。

CK 组草菇表面共检出 366 个属的细菌, 其中占比前五的属依次为寡养单胞菌属、鞘脂杆菌属、假单胞菌属、金黄杆菌属和黄杆菌属。0 d 时, CK 组草菇表面寡养单胞菌属相对丰度为 36.56%, 到 6 d 时为 31.80%, 丰度下降了 4.76%, 为优势腐败菌; 鞘脂杆菌属丰度从 3.22% (0 d) 上升至 29.00% (6 d), 上升了 25.78%; 金黄杆菌属丰度从 11.74% (0 d) 下降至 1.26% (6 d), 下降了 10.48%; 黄杆菌属丰度上升了 5.40%; 假单胞菌属丰度逐渐上升而后下降, 上升了 6.72%。

由此可知, 草菇表面细菌菌属以寡养单胞菌属、鞘脂杆菌属、金黄杆菌属、黄杆菌属、假单胞菌属为主, 与传统培养法结果类似; 联合处理可有效抑制草菇表面寡养单胞菌属、鞘脂杆菌属和假单胞菌属细菌生长。寡养单胞菌属细菌在各样品中占比均超过 30%, 占比最高, 为草菇贮藏期间的优势腐败菌(图 7)。

### 2.3.3 NetWork 分析

微生物间的网络分析可以用来发现微生物之间可能的相互“协作”或“竞争”关系<sup>[20]</sup>。选取



所有样本绝对丰度前 16 的属结果进行相互关联性分析, 绝对丰度前 16 的菌属属于拟杆菌门 7 个属、变形菌门 7 个属、蓝细菌门(*Cyanobacteria*) 1 个属、放线菌门 1 个属, 其中绝对丰度最高的是寡养单胞菌属, 与土地杆菌属(*Pedobacter*)

呈负相关关系, 推断互为竞争关系, 说明其中一种细菌生长繁殖快、耗营养, 抑制其他菌属生长; 鞘脂杆菌属与土地杆菌属和假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)丰度呈正相关关系, 说明这些菌属细菌生长互不影响(图 8)。

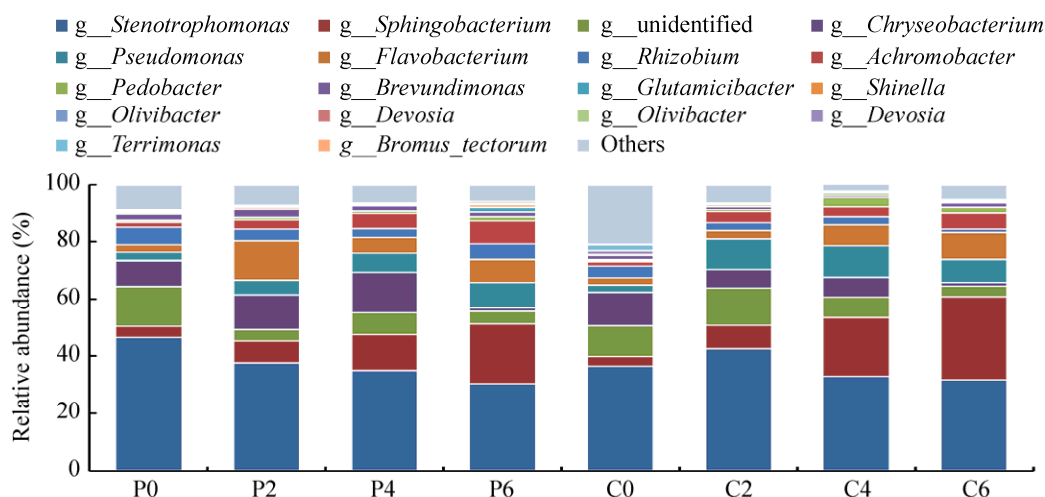


图 7 草菇基于属水平的细菌分析图

Figure 7 Frequencies of different genus bacteria from VVFB.

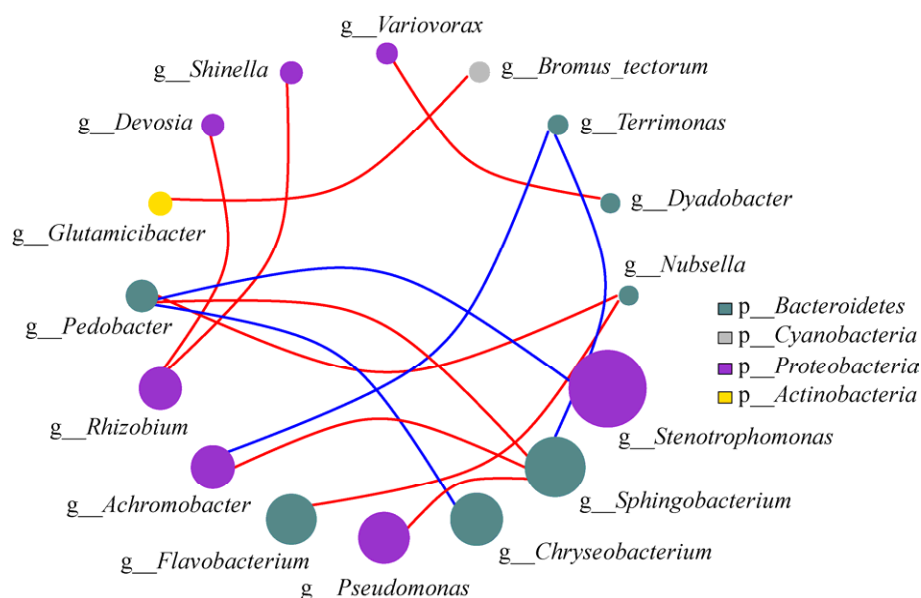


图 8 属间网络互作图 点的大小代表丰度的大小, 样品间连线的粗细代表相关性大小, 线为红色表示呈正相关, 蓝色表示负相关

Figure 8 Inter-genus network interaction diagram. The size of the dots represents the size of the abundance, and the thickness of the line between samples represents the correlation size, with red lines indicating positive correlation and blue lines indicating negative correlation.

### 3 讨论与结论

传统平板培养法只能分离到好氧菌和兼性厌氧菌, 而 16S rRNA 基因高通量测序方法会更加全面和准确<sup>[21]</sup>, 因此, 本实验采用微生物传统平板培养法和 16S rRNA 基因高通量测序技术两种方法相结合, 对联合处理后草菇表面细菌进行综合分析, 准确全面地分析了草菇表面细菌的种群及动态变化, 为延长草菇保鲜期及探究微生物导致腐败变质的机理提供了依据。

草菇贮藏期间可培养细菌数量不断上升, 联合处理组显著低于对照组, 菌种鉴定结果显示, 联合处理组分离到 3 个门 7 个属共 17 株细菌, 对照组分离到 3 个门 10 个属共 19 株细菌, 以假单胞菌属、金黄杆菌属、芽孢杆菌属和寡养单胞菌属为主。高通量测序结果显示, 处理组共鉴定出 27 个门 370 个属的细菌, 对照组共鉴定出 25 个门 366 个属的细菌, 其中丰度最高的菌属是寡养单胞菌属。高通量测序结果中处理组中细菌的门、属数量高于对照组, 其原因可能是高通量测序技术更灵敏, 微量细菌和不可培养细菌均可检测出来; 另一方面, 可能是  $\epsilon$ -PL 喷施处理时喷施不均匀, 部分菇体未接触试剂, 不受试剂影响导致; 也有可能是贮藏期间 CK 组草菇表面优势菌生长未受影响, 细菌间的竞争关系加剧, 导致贮藏后期细菌的种类变少。

两种方法均检测到寡养单胞菌属细菌且丰度最高, 因此, 我们推测寡养单胞菌属细菌可能是草菇主要的腐败菌之一。寡养单胞菌属是一类革兰氏阴性好氧菌群, 最适生长温度为 20–37 °C, 在自然界中广泛分布, 通常来自临床标本、植物根系、土壤、动物食品等, 是引起人和水稻等植物感染的条件致病菌<sup>[22]</sup>。草菇

属于高温型的草腐性真菌, 其出菇环境高温、高湿且草菇菇体营养丰富, 是该菌属细菌生长的良好基质, 因此寡养单胞菌属细菌可在草菇表面大量繁殖。据报道寡养单胞菌属细菌是鲜切胡萝卜、韭黄中的主要污染菌<sup>[23-24]</sup>, 寡养单胞菌、假单胞菌、芽孢杆菌等细菌也会引起草菇的腐烂<sup>[17]</sup>。据相关报道, 黄单胞细菌、*Pseudomonas chlororaphis* 和肠杆菌属细菌是草菇腐败菌<sup>[25-27]</sup>, 本研究也发现了这些菌属, 但丰度不高, 这可能与草菇来源、处理和环境因素有关。

本文采用平板培养法和 16S rRNA 基因高通量测序两种方法全面分析了经  $\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理后草菇贮藏期间表面细菌数量和种类的变化。研究表明, 寡养单胞菌属是草菇主要腐败菌之一,  $\epsilon$ -PL 联合 1-MCP 处理可有效抑制草菇表面细菌生长, 维持草菇采后品质。

### REFERENCES

- [1] 何焕清, 肖自添, 彭洋洋, 刘明, 徐江. 草菇栽培技术发展历程与创新研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(12): 53-61  
He HQ, Xiao ZT, Peng YY, Liu M, Xu J. Development history and innovation research progress of straw mushroom cultivation technology[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(12): 53-61 (in Chinese)
- [2] Zha L, Chen M, Yu C, Guo Q, Zhao X, Li Z, Zhao Y, Li C, Yang H. Differential proteomics study of postharvest *Volvariella volvacea* during storage at 4 °C[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 13134
- [3] 杨国辉, 江丹霞, 武少兰, 陈天赐, 刘培培, 陈炳智, 江玉姬. 聚赖氨酸联合 1-MCP 处理对草菇保鲜效果的影响[J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3347-3359  
Yang GH, Jiang DX, Wu SL, Chen TC, Liu PP, Chen BZ, Jiang YJ. Effects of combined treatment of  $\epsilon$ -polylysine and 1-methylcyclopropene on the storage quality of *Volvariella volvacea* fruiting bodies[J]. Mycosystema, 2021 40(12): 3347-3359 (in Chinese)
- [4] 李秋莹, 张东栋, 王司雯, 钟克利, 徐永霞, 李颖畅, 孙彤, 励建荣. 溶菌酶与  $\epsilon$ -聚赖氨酸盐酸盐复合涂膜的制备及性能分析[J]. 食品科学, 2019, 40(19):

- 249-255  
Li QY, Zhang DD, Wang SW, Zhong KL, Xu YX, Li YC, Sun T, Li JR. Preparation and properties of lysozyme and  $\epsilon$ -polylysine hydrochloride composite coating[J]. Food Science, 2019, 40(19): 249-255 (in Chinese)
- [5] Jia SL, Liu YM, Zhuang S, Sun XH, Li Y, Hong H, Lü YM, Luo YK. Effect of  $\epsilon$ -polylysine and ice storage on microbiota composition and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stored at 0 °C[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 27-35
- [6] 吴国虹. 草菇 1-MCP 保鲜技术及褐变机理研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2014  
Wu GH. Study on preservation technique of *Volvaria volvacea* fruit bodies using 1-MCP treatment and their browning mechanism[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2014 (in Chinese)
- [7] Chen BZ, Wu GH, Li L, Wei Q, Zhong QG, Chen XN, Xiao KQ, Xie BG, Jiang YJ. Effects of 1-methylcyclopropene on the quality attributes of harvested Chinese mushroom (*Volvariella volvacea*) fruiting bodies[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(2): 747-754
- [8] Lin YF, Lin YX, Lin HT, Lin MS, Li H, Yuan F, Chen YH, Xiao JB. Effects of paper containing 1-MCP postharvest treatment on the disassembly of cell wall polysaccharides and softening in Younai plum fruit during storage[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 1-8
- [9] Mehta A, Bhardwaj KK, Shaiza M, Gupta R. Isolation, characterization and identification of pesticide degrading bacteria from contaminated soil for bioremediation[J]. Biologia Futura, 2021, 72(3): 317-323
- [10] Ali N, Wang SR, Zhao J, Dong ZH, Li JF, Nazar M, Shao T. Using a high-throughput sequencing technology to evaluate the various forage source epiphytic microbiota and their effect on fermentation quality and microbial diversity of Napier grass[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(8): 4879-4890
- [11] 邓祥宜, 李婵娟, 李璐, 李池茜, 张涵池, 李佳鑫. 小龙虾肠道细菌群落多样性及产蛋白酶细菌的筛选[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1151-1159  
Deng XY, Li CJ, Li L, Li CX, Zhang HC, Li JX. Diversity of bacterial community and screening of protease producing bacteria in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) intestine[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1151-1159 (in Chinese)
- [12] Yang JY, Wei SJ, Su DF, Zhang ZR, Chen SY, Luo ZW, Shen XM, Lai YH, Jamil A, Tong JY, et al. Comparison of the rhizosphere soil microbial community structure and diversity between powdery mildew-infected and noninfected strawberry plants in a greenhouse by high-throughput sequencing technology[J]. Current Microbiology, 2020, 77(8): 1724-1736
- [13] Jang MJ, Kim SY, Ricke SC, Rhee MS, Kim SA. Microbial ecology of alfalfa, radish, and rapeseed sprouts based on culture methods and 16S rRNA microbiome sequencing[J]. Food Research International, 2021, 144: 110316
- [14] 吴冬雪, 李玉红, 裴盛斐, 王林, 杨璐铭, 张咪, 王雪, 朱晗璐, 郝金奇, 冯福民. 基于 16S rDNA 测序技术分析异烟肼致大鼠肝损伤中肠道菌群变化特征[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(9): 1374-1378  
Wu DX, Li YH, Pei SF, Wang L, Yang LM, Zhang M, Wang X, Zhu HY, Hao JQ, Feng FM. Analysis of gut microbiota changes in isoniazid-induced rats based on 16S rDNA sequencing technology[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2021, 56(9): 1374-1378 (in Chinese)
- [15] 李婕, 黄琳翔, 詹艺舒, 褚秀丹, 肖淑霞, 陈炳智, 江玉姬. 双孢蘑菇贮藏保鲜过程中菇体表面的菌相变化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 109-114  
Li J, Huang LX, Zhan YS, Chu XD, Xiao SX, Chen BZ, Jiang YJ. Changes of microflora on the surface of *Agaricus bisporus* fruit body during chilled storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(9): 109-114 (in Chinese)
- [16] 潘欣圆, 杨娟, 施乐乐, 蔡志英, 李若熙, 陈炳智, 江玉姬. 金针菇贮藏保鲜期间表面细菌菌相变化[J]. 食用菌学报, 2020, 27(1): 29-35  
Pan XY, Yang J, Shi LL, Cai ZY, Li RX, Chen BZ, Jiang YJ. Bacterial microflora on exterior of *Flammulina velutipes* fruiting bodies during chilled storage[J]. Acta Edulis Fungi, 2020, 27(1): 29-35 (in Chinese)
- [17] Wang XL, Liu SJ, Chen MJ, Yu CX, Zhao Y, Yang HL, Zha L, Li ZP. Low temperature (15 °C) reduces bacterial diversity and prolongs the preservation time of *Volvariella volvacea*[J]. Microorganisms, 2019, 7(10): 475
- [18] Li Y, Chen W, Zheng XY, Liu Q, Xiang W, Qu JX, Yang CF. Microbial community structure analysis in a hybrid membrane bioreactor via high-throughput sequencing[J]. Chemosphere, 2021, 282: 130989
- [19] Wang DD, Sun TT, Zhao SY, Pan LM, Liu HF, Tian XL. Physiological change alters endophytic bacterial community in clubroot of tumorous stem mustard infected by *Plasmodiophora brassicae*[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 244

- [20] 林力涛, 马克明. 网络分析在宿主植物与菌根真菌共生关系研究中的应用[J]. 菌物学报, 2019, 38(11): 1826-1839  
Lin LT, Ma KM. Applications of network analyses in the studies of symbiotic relationship between host plants and mycorrhizal fungi[J]. Mycosystema, 2019, 38(11): 1826-1839 (in Chinese)
- [21] 李婕. 双孢蘑菇保鲜期的菌相变化及假单胞菌生长预测模型的研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2020  
Li J. Mathematical modeling *Pseudomonas* spp. and microflora composition variation on *Agaricus bisporus* fruiting bodies during chilled storage[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2020 (in Chinese)
- [22] 邓阳, 姜竹鸣, 张玉琴. 寡养单胞菌属细菌的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 1-9  
Deng Y, Jiang ZM, Zhang YQ. Research progress on the genus *Stenotrophomonas*[J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 1-9 (in Chinese)
- [23] 王祖莲, 陈晴, 李焕秀, 罗芳耀, 朱永清, 郭云建, 高佳. ‘唐元韭黄’采后常温货架期致病病原菌的分离与鉴定[J]. 西南农业学报, 2020, 33(12): 2833-2839  
Wang ZL, Chen Q, Li HX, Luo FY, Zhu YQ, Guo YJ, Gao J. Isolation and identification of decay-causing microorganisms in postharvest normal temperature shelf period of ‘Tang Yuan hotbed chives’[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(12): 2833-2839 (in Chinese)
- [24] 陈湘宁, 钟思琼, 金文斌, 张继荣, 孟令川, 刘慧. 膜包装鲜切蔬菜中主要腐败菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2012, 12(5): 154-160  
Chen XN, Zhong SQ, Jin WB, Zhang JR, Meng LC, Liu H. Separation and identification of the dominant spoilage microorganism in film packaged fresh-cut vegetables[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(5): 154-160 (in Chinese)
- [25] 朱逸娴, 王笑梅, 周洁, 徐兵. 草菇污染菌的微生物菌落结构及多样性分析[J]. 常熟理工学院学报, 2020, 34(5): 106-110  
Zhu YX, Wang XM, Zhou J, Xu B. An analysis of microbial colony structure and diversity of *Volvariella volvacea* contaminating bacteria[J]. Journal of Changshu Institute of Technology, 2020, 34(5): 106-110 (in Chinese)
- [26] 林德锋, 袁滨, 柯丽娜, 吴顺章. 草菇褐腐病综合防治效果研究[J]. 福建农业学报, 2015, 30(2): 188-191  
Lin DF, Yuan B, Ke LN, Wu SZ. Integrated control effects for brown rot of *Volvariella volvacea*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(2): 188-191 (in Chinese)
- [27] 黄李琳. 草菇常见病虫害及其无公害防治技术[J]. 福建农业科技, 2017(3): 38-39  
Huang LL. Common pests and diseases occurring in straw mushroom and its harmless control[J]. Fujian Agricultural Science and Technology, 2017(3): 38-39 (in Chinese)