

蝴蝶兰组培苗内生细菌的抑菌与促生作用研究

郑秋桦 曾松荣 柯野 杨蓉

(韶关学院英东生命科学学院, 广东韶关, 512005)

【摘要】旨在探讨蝴蝶兰组培苗内生细菌的抑菌活性及其促生作用。从蝴蝶兰组培苗分离内生细菌,并分别对其进行摇瓶培养,采用其发酵液做体外抑菌试验并将菌苗共培养,结果发现,从蝴蝶兰组培苗分离到6株内生细菌,其中菌株H6对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和变形杆菌(*proteus species*)表现出较强的抑菌作用,同时该菌株对组培苗也有显著的促生作用,植株平均鲜重增长率达到135.52%。研究表明,蝴蝶兰组培苗内生细菌代谢产物具有抑菌活性和促生作用,为植物组织培养污染防治和兰科植物潜在有益共生菌的挖掘提供新的方法,也是开发新型药物、生物防腐剂的筛选源和内生菌技术的应用具有重要意义。

【关键词】蝴蝶兰;组培苗;内生细菌;抑菌活性;促生作用

植物内生菌(endophyte)是指存在于植物的健康组织内并在其中完成其部分或全部生活史,但不会使植物染病的一类微生物。植物内生菌按微生物的不同类群可以分为内生真菌、内生放线菌和内生细菌等,因此它们是巨大且宝贵的微生物资源库^[1]。植物内生菌的生物多样性十分丰富,它们在自然选择下会产生与宿主植物相同或相似天然生理活性物质^[2-3]等,或能通过合成植物激素、产生铁载体、光合作用和生物固氮等方式促进宿主植物的种子萌发和生长。

本文开展对蝴蝶兰组培苗内生细菌分离及其代谢产物抗菌作用的初步研究,以期从蝴蝶兰组织中分离和筛选出产抗菌活性物质和促进宿主植物蝴蝶兰生长的内生细菌,为防治植物组织培养的内生菌污染和外源菌污染提供新的方法,也为组培苗内生菌的进一步开发和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物

蝴蝶兰组培苗,由韶关学院英东生命科学学院植物组织培养实践教学平台提供。

1.1.2 检测菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和变形杆菌(*Proteus species*),均为韶关学院英东生命科学学院微生物学实验室保藏菌种。

1.1.3 培养基

内生细菌分离、纯化和检测均采用营养琼脂培养基。液体发酵及抑菌活性测定采用LB肉汤培养基。

1.1.4 药敏试纸

药敏试纸,购自杭州滨和微生物试剂有限公司,青霉素药敏试纸10μg/片、氯霉素30μg/片、强力霉素药敏纸30μg/片、庆大霉素药敏试纸10μg/片。

1.2 方法

1.2.1 内生细菌的分离与纯化

取组培瓶中的蝴蝶兰表面无菌组培苗不同部位材料研磨成匀浆,十倍梯度稀释后涂布营养琼脂平板,于37℃下倒置培养48h。根据菌落形态和

颜色的差异,分别挑取菌落在新鲜营养琼脂平板上做划线分离并培养48h得到单菌落,此为内生细菌的纯培养,观察记录菌落的形态,显微个体形态观察后,将经纯化后的内生细菌进行菌株编号,分别接入营养琼脂斜面培养基培养好后4℃冰箱保存备用。

1.2.2 抑菌活性筛选

采用管碟法测定分离得到的内生细菌抑菌活性。将已灭菌的营养琼脂培养基加热到完全融化,倒在培养皿内,每皿15mL(下层),待其凝固。此外,将融化的营养琼脂培养基冷却到50℃左右混入5%的 1×10^6 CFU/mL的检测菌悬液,将混有检测菌的培养基5mL加到已凝固的培养基上待凝固(上层)。以无菌操作在培养基表面直接垂直放上牛津杯,轻轻加压,使其与培养基接触无空隙,在杯中加入上述内生细菌发酵液上清液240μL,加样后盖上陶瓦盖,每种发酵液重复3次,以无菌水作对照试验,置37℃培养48h,观察结果,抑菌圈用游标卡尺测定其抑菌圈直径,取其平均值为该菌株发酵产物的抑菌直径。各样品抑菌效果的判定标准为:抑菌圈直径>15mm时为高度敏感,10mm~15mm时为中度敏感,7mm~9mm时为低度敏感,无抑菌圈者为不敏感^[4]。

1.2.3 促生作用内生细菌筛选

1) 内生细菌菌液制剂制备。在分离所得内生细菌中挑取两环接种装有LB肉汤培养基50mL的250mL摇瓶中,置于摇床37℃,160r/min恒温培养48h后,备用。

2) 菌苗共生接种。选取二至三叶期无根蝴蝶兰组培苗,在超净工作台,将幼苗取出用无菌水清洗粘附的培养基,无菌吸水纸吸干水分,称取鲜重后植入生根培养基中,分别取各菌液制剂1mL加入已接种组培苗培养瓶中。试验设不接种(对照)、接种6个菌株,共7个处理,每个菌株重复3次。置于25℃培养室中培养,光照6h/循环,光照强度1500~2000lx,逐日观察菌及苗生长状况。90d后,根据试验组与对照组的组培苗生长势,观察试验组在株高、根粗、叶片大小、植株净重等指标上与对照组的差别,以判断内生细菌发酵液的作用效果。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰组培苗内生细菌分离结果

经过观察记录菌落形态,革兰氏染色显微鉴定后,共得到6株内生细菌,菌株编号标为:H1、H2、H3、H4、H5、H6,如表1所示。

表1 蝴蝶兰组培苗内生细菌的显微鉴定结果

菌株号	基本形态	革兰氏染色
H1	短杆状	G ⁻
H2	棒杆状	G ⁺
H3	分枝状	G ⁻
H4	链球菌	G ⁺
H5	葡萄球菌	G ⁺
H6	短杆状	G ⁻

2.2 蝴蝶兰组培苗内生细菌发酵液抑菌效果

分离到的内生细菌对检测菌的抑菌活性强弱不一,具有一定的特异性。



图1 内生细菌H6促生作用效果(左图为H6发酵液促生图,右图为对照)

2.3 最大抑菌菌株发酵液与抗生素抑菌活性对比

与4种常用抗生素相比,蝴蝶兰组培苗内生细菌H6发酵液对检测菌具有较好的抑菌效果。

2.4 蝴蝶兰组培苗内生细菌对组培瓶苗生长的影响

蝴蝶兰与内生细菌共培养90d后,与菌株H6共培养的组培苗植株成活率高于对照组,植株长势明显好于对照组,存活植株平均鲜重增长率达到135.52%,表现出显著的促生作用。如图1所示。

3 讨论

本实验从蝴蝶兰组培苗分离得到的内生细菌中发现一株内生细菌H6,其表现出很强的抑菌活性,同时对组培苗具有显著的促生作用,该菌株生长繁殖速度快、酸碱条件和温度环境适应范围广,在植物组织培养防治污染和兰科植物病害生物防治方面具有潜在的应用开发价值。但是该菌株在分类鉴定、防病机理、产生有效活性成分的化学本质、对宿主的促生作用,以及内生细菌的发酵条件和应用效果等方面还需要进一步研究。由于促生作用只是在与组培苗共培养进行,瓶苗培养基上会有明显菌落和菌苔,难免会影响瓶苗的商品性,因此对内生细菌过滤发酵液中抗菌活性物质的温度敏感性以及加入培养基里灭菌后再接入组培苗后是否有促生作用仍需探究,以兼顾促生作用和瓶苗商品性。

作者简介:郑秋桦,1980年生,男,实验师,研究方向:微生物学与植物组织培养。

通讯作者:曾松荣,1964年生,男,副教授,研究方向:资源与环

境微生物学。

参考文献

- [1] 李振东,陈秀蓉,杨成德等.乳白香青内生菌RC14抑菌能力测定及其鉴定[J].草地学报,2012,20(4):753-758.
- [2] 张萍,宋希强.兰科植物内生细菌物种多样性及其促生机理研究进展[J].热带亚热带植物学报,2012(1):92-98.
- [3] 黎万奎,胡之璧.内生菌与天然药物[J].中国天然药物,2005,7(3):193-199.
- [4] 周邦靖.常用中药的抗菌作用及其测定方法[M].重庆:科学技术文献出版社重庆分社,1987.100-299.