

蝴蝶兰组培苗内生菌分离及其抑菌效果研究

Research on the Endophytic Bacteria Separation of Phalaenopsis Group and Its Antibacterial Effects

郑秋桦 许启晓 曾松荣 白音

Qiuhua Zheng Qixiao Xu Songrong Zeng Yin Bai

韶关学院 英东生命科学学院, 中国·广东 韶关 512005

Henry Fok College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong, 512005, China

【摘要】分离蝴蝶兰组培苗内生菌,并对其代谢产物抗菌作用进行初步研究,以期从蝴蝶兰组织苗内生菌中筛选出产抗菌活性物质的优质菌株,为防治植物组织培养内生菌污染和外源菌污染提供新的方法。在本次研究中,对蝴蝶兰组培苗的内生菌分离及抑菌效果进行分析,发现其从根茎叶共分离得到 18 株内生菌,其对金黄色葡萄球菌、变形杆菌、酵母菌、黑曲霉以及青霉具有一定的抑菌作用,可以应用于植物防治污染。

【Abstract】The endophytic bacteria of the tissue culture seedlings of Phalaenopsis were isolated and the antibacterial effects of their metabolites were preliminarily studied in order to screen the high-quality strains producing antibacterial active substances from the endophytic bacteria of Phalaenopsis to provide a new method for controlling endophytic contamination and exogenous bacterial contamination in plant tissue culture. In this research, the endophytic isolation and antibacterial effects of the Phalaenopsis plantlets were analyzed, and it was found that 18 endophytes were isolated from the roots and leaves, which have certain antibacterial effects on *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, yeast, *Aspergillus niger* and *Penicillium*, and can be applied to plant pollution control.

【关键词】蝴蝶兰;内生菌分离;抑菌效果

【Keywords】Phalaenopsis; endophytic bacteria separation; antibacterial effects

【DOI】<https://doi.org/10.26549/jxxfxyj.v1i2.1347>

1 引言

蝴蝶兰属于名贵花卉,具有较高的观赏性,通过组织培养技术可以在短期内获取大量的植株^[1]。植物内生菌主要是指生活在植物组织间隙的微生物,包括细菌和真菌等,蝴蝶兰是单茎性附生兰,茎短,叶大,花茎一至数枚,拱形,花大,因花形似蝶得名^[2]。其花姿优美,颜色华丽,为热带兰中的珍品,有“兰中皇后”之美誉。其出产最多的地方当属台湾。但是对于蝴蝶兰内生菌的抗菌作用以及内生菌分离的研究较少^[3],本次研究从生物学角度出发,探究蝴蝶兰组培苗内生菌分离及其抑菌效果。

2 材料与方法

2.1 材料

本次研究采用的蝴蝶兰组培苗,由韶关学院岭南特色中药材和花卉产学研孵化基地提供。检测菌种主要包括:金黄色葡萄球菌、变形杆菌、酵母菌、黑曲霉和青霉。由韶关学院英东生命科学学院微生物学实验室提供。培养基为纯化 PDA 培养

基,同时采用营养琼脂培养基对其检测菌的生长进行测试。药敏试验方面,选择链霉素、庆大霉素以及苯甲酸。

2.2 内生菌的分离

采用点植法筛选消毒方法,取蝴蝶兰组培苗的叶、根和茎,用 75% 的酒精漂洗 120s,之后采用无菌水冲洗 5 次,之后用 0.1% 的氯化汞进行漂洗,时间分别为 30s、60s、90s 和 120s,之后用无菌水冲洗 4 次,在 28℃ 的情况下静置 7d,选择最佳的消毒方案。

根据消毒结果的选择,将蝴蝶兰的叶、根或者茎采用自来水冲洗,之后用 75% 的酒精^[4]浸洗,经过无菌水的冲洗之后置入 0.1% 的氯化汞,之后用无菌水冲洗,将消毒后的部位切成 0.5cm 的方块,重复 3 次,在 28℃ 的情况下静置 7d,根据菌落的形态以及颜色差异来挑选培养基,记录形态,对其进行编号处理。

2.3 抑菌活性筛选

在纯化用的内生菌培养基上,采用 0.4cm 的打孔器在平

板上获取菌块 10 块,接种在培养基上静置 24h,在 28℃以及 160r/min 的情况下恒温培育 7d,将其称为发酵产物,之后在 3500r/min 的情况下离心 10min,取上清液保存在 4℃的环境中。

在抑菌效果的检测中,需要配置 106CFU/ml 的检测菌悬液,取 100μl,涂布在 LB 平板上,将具有发酵液的无菌滤纸置于培养基中,重复发酵 3 次,采用无菌水进行对照,在 37℃的情况下培养 8h,测定抑菌直径。判定标准^[9]为:抑菌圈直径>15mm 为高度敏感;10~15mm 为中度敏感;7~9mm 为低度敏感,无抑菌作用时不敏感。

在抑菌作用分析中,取 100μl 检测菌悬液,将其涂布在 LB 平板,静置 0.5h,取滤纸片发酵液中浸泡 2.5h,之后置于到指示菌平板上,将其静置 10min 后,采用链霉素、庆大霉素以及苯甲酸进行药敏对比试验,在 37℃的环境下培养 24h,观察平板上检测菌的生长情况以及抑菌圈的大小。

3 结果与分析

3.1 消毒方法的选择

在本次研究中,选择 75%的乙醇和 0.1%的氯化汞作为消毒剂,对蝴蝶兰组培苗组织表面进行消毒,通过不同消毒时间来选择消毒方法,通过实验发现,茎和根采用 75%乙醇浸泡 2min,之后采用氯化汞浸泡 1min,叶片采用 75%的乙醇浸泡 2min,之后采用 0.1%的氯化汞浸泡 0.5min,其属于最佳的消毒方法。具体数据见表 1。

表 1 不同消毒时间的杀菌效果表(120s)

	0.1%氯化汞浸泡时间/s							
	30s		60s		90s		120s	
根	+	+	+	+	+	-	-	-
茎	+	+	+	+	+	-	-	-
叶	+	-	-	-	-	-	-	-

注:+表示有菌长出;-表示没有菌长出

3.2 内生菌的分离结果分析

在本次研究中,对蝴蝶兰组培苗的内生菌进行分离,经过 7d 的测试发现,其清洗水涂布的培养基中经培养未发现菌生长,证明通过培养基的分离,可以确定微生物为蝴蝶兰的内生菌。通过对不同部位的分离效果发现,叶中分离的内生菌数量较多,占据 51%左右,其次为茎部,占据 33%,最后为根部,占据比例为 16%。具体数据见表 2。

表 2 蝴蝶兰内生菌分离结果表

组织	分离菌株数	分离率(%)
根	3	16
茎	6	33
叶	9	51
总数	25	

3.3 抑菌效果分析

在本次研究中,对蝴蝶兰的抑菌效果进行分析,通过对 18 株内生菌的测试中发现,其至少对 1 种检测菌具有抑菌作用,另外,在研究中发现,Y-8 具有强活性,具体数据如表 3 所示。

表 3 蝴蝶兰抑菌效果分析表

菌株号码	金黄色葡萄球菌	变形杆菌	酵母菌	黑曲霉	青霉素
Y-1	+++	+	-	+	-
Y-2	++	+	-	+	+
Y-3	-	-	+	-	-
Y-4	+	-	+	+	-
Y-5	++	-	-	++	+
Y-6	++	-	+	-	-
Y-7	-	-	-	-	-
Y-8	+++	++	+++	+++	+
Y-9	+	+	++	-	-
J-1	+	+++	+	++	+
J-2	-	-	-	-	-
J-3	+++	-	+	++	+
J-4	-	-	-	-	-
J-5	++	-	-	+	-
J-6	-	-	-	-	-
J-7	-	-	+	-	-
J-8	+	-	-	-	-
J-9	-	-	-	-	-

注:+++表示高活性;++表示中度活性;+表示低活性;-表示无抑菌效果

在对蝴蝶兰的内生菌抑菌效果分析中发现,其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最为明显,而对其他菌种的抑菌效果相对较弱,另外,其对青霉的抑菌效果最低。具体数据如表 4 所示。

表 4 蝴蝶兰内生菌抑菌效果分析表

检测菌种	+	++	+++
金黄色葡萄球菌	4	4	3
变形杆菌	1	1	1
酵母菌	6	1	1
黑曲霉	4	3	1
青霉素	5	0	0

3.4 Y-8 发酵液与抗生素的抑菌活性比较

在本次研究中,将 Y-8 发酵液与常规抗生素的抑菌效果进行对比,通过研究发现,Y-8 发酵液具有较好的抑菌效果,其对金黄色葡萄球菌的抑菌作用高于庆大霉素;其对变形杆菌的抑菌作用高于链霉素和庆大霉素;其对酵母菌的抑菌作用高于链霉素、庆大霉素和苯甲酸;其对青霉的抑菌效果较低。具体数据如表 5 所示。

表 5 Y-8 抑菌活性对比表(mm)

样品	金黄色葡萄球菌	变形杆菌	酵母菌	黑曲霉	青霉素
Y-8	20.6	19.6	22.6	17.6	10.5
链霉素	21.0	18.2	25.0	15.4	12.6
庆大霉素	16.8	15.8	18.6	13.6	16.7
苯甲酸	25.5	22.5	28.7	14.8	19.9

4 讨论

在本次研究中,选择 75%的乙醇和 0.1%的氯化汞作为消毒剂,对蝴蝶兰组培苗的组织表面进行消毒,经过实验发现,茎和根采用 75%乙醇浸泡 2min,之后采用氯化汞浸泡 1min,叶片采用 75%的乙醇浸泡 2min,之后采用 0.1%的氯化汞浸泡 0.5min,其属于最佳的消毒方法。其主要是由于内生菌存活在植物组织内部,不会使宿主出现明显的感染症状,需要将内生菌进行分离^[9],但是消毒效果与试剂的选择具有明显的关联,而采用乙醇以及氯化汞对蝴蝶兰组培苗进行消毒,可以达到最佳的消毒效果。

在本次研究中,对蝴蝶兰的内生菌进行分离,叶中分离的内生菌数量较多,占据 51%左右,其次为茎部,占据 33%,最后为根部,占据比例为 16%。其主要是由于内生菌与植物处于共生的环境,二者通常会产生相似的代谢产物^[7],因而内生菌具有产生活性物质的功效,在此情况下,通过对内生菌的分离,这样便于获取活性物质,在本次研究中,虽然证实叶片中分离率相对较高,但是由于样本数量相对较少,因此实验结果有待进一步验证。

在本次研究中,对蝴蝶兰的抑菌效果进行分析,通过对 18 株内生菌的测试中发现,其至少对 1 种检测均具有抑菌作用,另外,在研究中发现,Y-8 具有强活性,在对蝴蝶兰的内生菌抑菌效果分析中发现,其对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最为明显,而对其他菌种的抑菌效果相对较弱,另外,其对青霉的

抑菌效果最低,其主要是由于内生菌可以脱离寄主独立生长^[8],在模拟环境下,通过该方式,可以获取大量的植物^[9],研究发现,蝴蝶兰组培苗大部分内生菌具有较高的抑菌作用,部分菌株无法确定其抑菌活性,可能是由于其组织内部处于休眠状态,会对其抑菌性产生直接的影响。

在本次研究中,将 Y-8 发酵液与常规抗生素的抑菌效果进行对比,通过研究发现,Y-8 发酵液对于常见的菌种具有较强的抑制活性,尤其对于金黄色葡萄球菌的抑制性。因此,在该菌株的进一步研究的过程中,可以加强对该菌株的开发利用。

5 结语

内生菌种类相对较多,通过对蝴蝶兰的内生菌分离以及抑菌研究,发现 Y-8 菌种具有较强的抑菌活性,相对于常规抗菌和抑菌药剂,其具有较高的应用价值,可以为植物防治微生物污染提供借鉴价值。

参考文献

- [1]苗智,马养民,孔阳,等.夹竹桃内生真菌 J14 次生代谢产物的分离和抑菌活性[J].贵州农业科学,2016(01):88-92.
- [2]柳斌斌.一株蓝果树科植物内生真菌的分离和抑菌效果测定[J].安徽农学通报,2015(21):43-45.
- [3]杜晓宁,徐惠娟,黄盼盼,等.宁夏枸杞内生细菌的多样性及其抑菌活性研究[J].微生物学通报,2015(09):1779-1787.
- [4]金岩,孙晶波,高洁.五味子中内生拮抗性细菌的分离与筛选[J].中草药,2014(07):996-1001.
- [5]高振峰,张宝骏,刘慧芹,等.酸枣内生真菌的分离及抑菌活性测定[J].山西农业大学学报(自然科学版),2014(02):121-123.
- [6]李海云,阮贵华,李子院,等.桂花树内生真菌的分离及其抗氧化抑菌活性[J].桂林理工大学学报,2014(01):138-145.
- [7]毕江涛,王小霞,陈卫民,等.甘草内生真菌分离及其抑菌活性初探[J].草业科学,2013(03):357-364.
- [8]苏香萍,汪洋,霍丽丽,等.交让木内生真菌的分离和抑菌活性的研究[J].安徽农业科学,2013(03):1041-1043.
- [9]高玲玲,陈小龙,蒋涛,等.具有拮抗作用的水稻内生固氮菌的分离与鉴定[J].华中农业大学学报,2012(05):553-557.

基金项目

韶关市科技计划项目(项目编号:2013CX/K93);韶关学院大学生创新创业训练计划项目(项目编号:Syxcxy2017-003)。