

王志勇,刘秀娟,易 曲. 植物内生菌分离时表面消毒条件的比较[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):366-367.

植物内生菌分离时表面消毒条件的比较

王志勇,刘秀娟,易 曲
(咸宁职业技术学院,湖北咸宁 437100)

摘要:为了探索植物内生菌分离时表面消毒条件的一般规律,分别用不同消毒剂对水花生的茎处理不同时间,并以最佳组合对植物材料进行消毒处理,放置于分离培养基平板中,在适温下培养不同时间,观察各个处理对植物内生菌数量的影响。结果表明,用 5% NaClO 浸泡 4 min、0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 或先用 75% 乙醇浸泡 0.5 min 再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min,分离内生菌的效果均较好;0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 后置于分离培养基平板上培养 2 d,内生菌数量极显著增加。

关键词:水花生;内生菌;分离;表面消毒;富集作用
中图分类号: Q938.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0366-02

由于植物内生菌具有促生、抗虫、抗菌、抗重金属污染等作用,在调节植物生长、促进植物抗病虫害、抗干旱、固氮等方面有较广泛的应用,并可作为生物工程菌为植物病虫害的防治提供新的途径^[1-3]。植物内生菌在人类多种疾病的防治、环境污染降解等方面也有较为广泛的应用^[1-4]。目前,这些应用均以得到植物内生菌的纯培养物为前提,因此植物内生菌的分离纯化是应用研究最关键的一个环节。研究人员对近几年植物内生菌的分离方案进行归纳,发现几乎没有一个消毒程序是相同的^[5]。为此,本试验以茎分节且中空、输导组织极发达的水花生为材料,探索植物内生菌分离时表面消毒过程的一般规律,以期为其他植物内生菌的分离提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集与预处理

植物样品水花生全部采自湖北咸宁职业技术学院校园内,样地土壤为熟化的红色黏土,主要植被为栀子花、红花檵木等。采样时按随机性原则,采集健康无病虫害的植株带回实验室,切取无受伤、无虫蛀、无斑点的茎,两端留节,每份约 1.5 g,流水冲洗 1 h 备用。

1.2 分离培养基

分离培养基为牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。

1.3 表面消毒方案

1.3.1 最适消毒方案的探索 将植物材料按以下方案分别处理:75% 乙醇分别浸泡 2、4、6、8、10 min(处理 1 至处理 5);75% 乙醇先浸泡 2 min,无菌水洗 3 次,再用 5% NaClO 分别浸泡 2、4、6、8、10 min(处理 6 至处理 10);5% NaClO 分别浸泡 2、4、6、8、10 min(处理 11 至处理 15);0.1% HgCl₂ 分别浸泡 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 min(处理 16 至处理 20);75% 乙醇先浸泡 0.5 min,再用 0.1% HgCl₂ 分别浸泡 0.25、0.50、1.00、1.50 min(处理 21 至处理 24)(表 1)。消毒后的植物材

料用无菌水洗 3 次,放在分离培养基平板表面至少 1 min,用无菌剪刀将其剪细,加入石英砂研磨后稀释 10~100 倍,取 100 μL 涂布。每处理重复 3 次,37℃ 培养 48 h 后计数^[5]。

表 1 不同处理方案对消毒结果的影响

处理	消毒时间(min)			印迹对照	内生菌含量 (×10 ² CFU/g)
	75% 乙醇	5% NaClO	0.1% HgCl ₂		
处理 1	2			+	
处理 2	4			+	
处理 3	6			+	
处理 4	8			+	
处理 5	10			+	
处理 6	2	2		+	
处理 7	2	4		+	
处理 8	2	6		+	
处理 9	2	8		+	
处理 10	2	10		0	15.0±5.6
处理 11		2		+	
处理 12		4		0	241.0±9.6A
处理 13		6		0	69.3±6.5B
处理 14		8		0	23.7±3.2C
处理 15		10		0	8.0±2.0C
处理 16			0.25	+	
处理 17			0.5	0	172.7±8.6A
处理 18			1.0	0	145.7±6.0B
处理 19			1.5	0	94.7±8.5B
处理 20			2.0	0	61.0±13.4C
处理 21	0.5		0.25	+	
处理 22	0.5		0.5	0	173.0±10.3A
处理 23	0.5		1.0	0	38.7±6.5B
处理 24	0.5		1.5	0	21.0±2.3B

注:印迹对照中“+”表示染菌,“0”表示未染菌;内生菌含量后标有不同大写字母表示处理 12 至处理 15 之间、处理 17 至处理 20 之间、处理 22 至处理 24 之间差异极显著($P<0.01$)。下同。

1.3.2 富集培养对待分离内生菌数量的影响 将植物材料分别用 5% NaClO 浸泡 5 min、0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 或先用 75% 乙醇浸泡 0.5 min 再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 消毒,用无菌水洗 3 次,分别置于盛有分离培养基的平板中,

收稿日期:2013-11-20
基金项目:湖北省教育厅科研计划(编号:B20129304)。
作者简介:王志勇(1967—),男,湖北咸宁人,硕士,副教授,从事微生物生态学研究。E-mail:472027278@qq.com。

37 ℃ 培养 0、1、2、3 d 再研磨涂布。每处理重复 3 次。

1.4 数据统计与分析

用 SPSS 16.0 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 最适消毒方案

由表 1 可见,75% 乙醇单独处理时(处理 1 至处理 5),印迹对照均为阳性,这说明浸泡时间 10 min 内,乙醇不适合单独用于水花生茎的消毒;采用 75% 乙醇处理 2 min,再用 5% NaClO 消毒到 10 min 时,可以分离少量内生菌,这可能是由于乙醇具有脱水、促使蛋白质凝固且具有一定脂溶性的作用,而水花生的茎分节且中空,其输导组织非常发达,适宜浓度的乙醇在杀死植物表面微生物的同时,可以脱水至用无菌水清洗时茎仍能吸入水分,从而保证内生菌少量存活;单独用 5% NaClO 消毒 4 min 时,内生菌分离含量较大,随消毒时间的延长,分离得到的内生菌含量在一定范围内极显著递减;单独用 0.1% HgCl₂ 消毒 0.5 min 或先用 75% 乙醇处理 0.5 min 后再用 0.1% HgCl₂ 消毒 0.5 min 时,分离得到的内生菌含量较高,并随消毒时间的延长,分离得到的内生菌含量在一定范围内极

显著递减。因此,对水花生的茎而言,比较适合采用的消毒方案为处理 12、处理 17 和处理 22。

2.2 不同处理消毒后培养不同时间对植物内生菌数量的影响

由表 2 可见,水花生的茎用 75% 乙醇先浸泡 0.5 min 再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 后,放置于分离培养基平板中 37 ℃ 培养不同时间,对植物内生菌数量的影响极显著;用 0.1% HgCl₂ 浸泡 0.5 min 或用 5% NaClO 处理 5 min,在当天研磨处理时印迹对照为 0,培养过夜后印迹对照均为阳性。这说明消毒水花生的茎如要放置过夜,宜用 75% 乙醇与 0.1% HgCl₂ 配合使用,其原因可能是因为乙醇在促使蛋白质变性的同时还有脱水、脱脂的作用,先用 75% 乙醇消毒后再用 0.1% HgCl₂ 处理可能会促进 HgCl₂ 进入水花生茎的两端, HgCl₂ 在杀死微生物的同时沉积在切口中延迟了茎中内生菌的外溢,而单独用乙醇或 HgCl₂ 溶液消毒则无此效应。另外,水花生的茎经乙醇与 HgCl₂ 配合处理并放置在分离培养基平板中过夜后,内生菌数量极显著增加,这可能是因为植物材料经表面消毒后,其内生菌处于一个温度、湿度相对稳定的环境,基本不受外来干扰,导致内生菌数量稳定增长。

表 2 不同消毒处理后培养不同时间对植物内生菌数量的影响

消毒处理	培养不同时间内生菌含量(× 10 ² CFU/g 样品)				培养不同时间的印迹对照			
	0 d	1 d	2 d	3 d	0 d	1 d	2 d	3 d
75% 乙醇 0.5 min + 0.1% HgCl ₂ 0.5 min	173.3 ± 10.3C	398.7 ± 13.1B	764.7 ± 19.4A		0	0	0	+
0.1% HgCl ₂ 0.5 min	172.7 ± 8.6				0	+	+	+
5% NaClO 5 min	191 ± 10.5				0	+	+	+

3 结论

植物内生菌分离过程中常用的消毒剂主要有乙醇、NaClO 和 HgCl₂。本研究表明,乙醇不适合单独用于茎分节且中空植物的表面消毒。由于 NaClO 溶液易挥发且不易久存(保存期约 1 年),因此在用于植物内生菌分离时要尽量使用新鲜的 NaClO 溶液。HgCl₂ 尽管对人体及环境有一定副作用,但因其浓度稳定、消毒效果好且所需时间少,分离得到的内生菌数量较稳定,因此比较适合用于植物内生菌,尤其是茎分节且中空植物内生菌的分离。

由于植物种类、部位、生境、生长时期等存在差异,研究人员在进行植物内生菌分离时采用的消毒方案往往各不相同,其原则是尽可能杀死植物表面微生物的同时,应获得最大量的内生菌。由于植物体内与体外的环境差别较大,分离得到的大多数植物内生菌在分离培养基中生长较慢,而也会有一些内生菌在分离培养基上生长较快,因此在培养 1 d 后需要观察 1 次,2 d 后再计数,3 d 后再复核 1 次。另外,植物内生菌在分离过程中通常设漂洗对照、印迹对照、环境对照^[5],而本研究只设置了印迹对照,是因为水花生的茎经消毒后再用无菌水清洗 3 次,放入培养皿时材料本身黏附了约 100 μL 左右的漂洗液,因此无需再设漂洗对照。

为了获得在自然界中数量少或难培养的微生物,通常要进行富集培养,就是用一定的选择性培养基,使样品中所含的特殊微生物数量从混杂的微生物类群中经培养后得到提高,便于分离^[6]。微生物的富集培养和分离技术在土壤、水、空气或生活垃圾微生物的分离纯化中有广泛的应用,但在植物内生菌的

分离中却鲜见报道。本研究将水花生的茎经乙醇与 HgCl₂ 配合消毒后,再置于分离培养基平板中在适宜温度下培养过夜,其实质是为植物内生菌创造了良好的温、湿度条件,促使这些内生菌数量增加,有利于其分离与纯化,可认为是对植物内生菌的一种富集作用,这与 Thomas 等的研究结果^[7-8]一致。

参考文献:

[1] 肖淑贤,高俊明. 植物内生菌的研究概况及应用进展[J]. 农业技术与装备,2011,01B(2):74-77.
[2] 卢镇岳,杨新芳,冯永君. 植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用[J]. 生命科学,2006,18(1):90-94.
[3] 王莉莉,戴志聪,祁珊珊,等. 植物内生细菌及其对入侵生态学的启示[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):9-12.
[4] Yenn T W, Lee C C, Ibrahim D, et al. Enhancement of anti-candidal activity of endophytic fungus *Phomopsis* sp. ED2, isolated from *Orthosiphon stamineus* Benth, by incorporation of host plant extract in culture medium[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(4):581-585.
[5] 王利娟,贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4):55-60.
[6] 祝优珍,仇玉兰,袁涛. 环境卫生生物学与监测技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:165.
[7] Thomas P, Soly T A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(4):952-964.
[8] Vendan R T, Yu Y J, Lee S H, et al. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion[J]. Journal of Microbiology, 2010, 48(5):559-565.