

應用微生物生物膜提升作物耐逆境能力

陳郁璇¹、黃姿碧^{2*}

¹ 國立中興大學農業暨自然資源學院植物病理學系博士後研究員。

² 國立中興大學植物病理學系／循環經濟學院植物保健學程教授。

* tphuang@nchu.edu.tw

摘 要

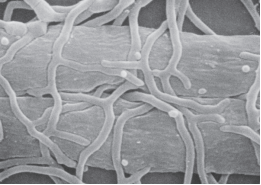
生物膜 (biofilms) 是由微生物菌體群聚附著於物體表面如葉表或根圈並由菌體與其所產生多醣與代謝物包覆所形成膜狀構造，且是微生物於環境中自然形成之現象，有助於菌體於環境中之生存，保護菌體免於受外部物理及化學因子之干擾，而具耐受環境壓力之能力。而存在於植物周邊之芽孢桿菌屬及鏈黴菌屬等根圈促進生長之細菌能否纏據植物表面，普遍被認為是影響其應用於作物病害防治、生長促進及耐逆境效益提升是否成功之關鍵，因此本研究利用分析微生物於非生物性表面、纏據於植物葉表及根圈形成生物膜能力，建立「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」，藉由測試影響及增益微生物增加作物對環境逆境的緩解效能關鍵因子，篩選高潛力耐逆境效益之菌株，並改良其關鍵培養配方，經試驗證實生物膜形成能力較優異之液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquifaciens* Tcba05 及鏈黴菌 *Streptomyces* sp. TCSF 7-6 菌株具有提升不結球白菜耐乾旱、淹水等逆境之能力。未來將持續利用此篩選平臺，快速開發對作物具高潛力耐逆境效益之有益微生物菌株，並篩選改良合適配方，提升有益微生物在作物耐候逆境之應用效益。

關鍵字：芽孢桿菌、鏈黴菌、生物膜、耐候、乾旱逆境、淹水逆境

前 言

微生物菌體群聚附著於物體表面如葉表或根圈形成膜狀構造，即稱之為生物膜 (biofilms)，生物膜為微生物於環境中生存所形成之自然現象，此生物膜可保護菌體免於受外部物理及化學因子之干擾，而具耐受環境壓力之能力，並有助其於植物體展現功能提升效用及適存性。已知多種和植物相關之細菌 (plant-associated bacteria) 生物膜 (biofilms) 為微生物菌體群聚附著於物體表面如：植物葉表或根圈形成膜狀

之構造 (Flemming & Wingender, 2010)，並且為微生物於環境中生存及形成之自然現象，此生物膜可保護菌體免於受外部物理及化學因子之干擾，而具耐受環境壓力之能力，並有助其於植物體展現功能提升效用及適存性。目前已知多種和植物共存之細菌 (plant-associated bacteria) 如：*Agrobacterium tumefaciens*、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pantoea stewartii*、*Sinorhizobium melilotii* 等皆可在植物葉表、根圈或植物細胞與維管束內形成生物膜，此生物膜之形成亦被證實為



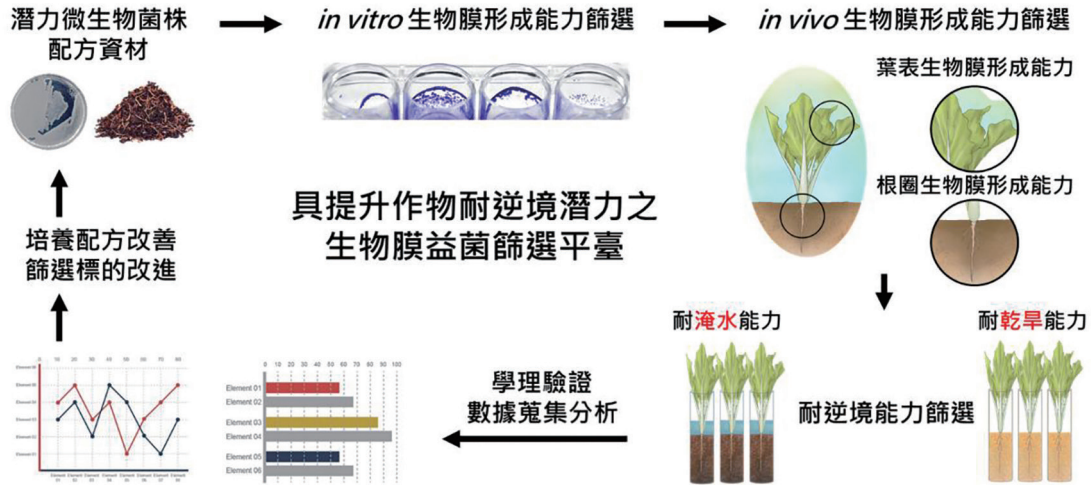
這些微生物是否能造成植物病害或保護植物、促進植物生長與抗病性等植物-微生物交互作用中扮演重要角色 (Danhorn & Fuqua, 2007; Parsek & Fuqua, 2004)。在芽孢桿菌屬 (*Bacillus* species) 中，有關於枯草桿菌 *Bacillus subtilis* 生物膜形成與其生物防治效力之相關性，Rudrappa 等人 (2008) 研究發現受 *Pseudomonas syringae* 感染之阿拉伯芥根部會分泌蘋果酸 (malic acid) 誘引生物防治用根圈細菌 *B. subtilis* FB17 纏據於根上並形成生物膜 (Rudrappa *et al.*, 2008)。該團隊研究中亦證實 *B. subtilis* 可纏聚於阿拉伯芥根上形成生物膜，同時伴隨脂胜肽抗菌物質 surfactins 之產生，surfactins 不僅為 *B. subtilis* 形成生物膜所需，其對 *P. syringae* 抑菌效力亦是保護植物免受感染之關鍵因子 (Bais *et al.*, 2004)。於葉部病害中，於接種柑桔潰瘍病原菌前一天噴灑枯草桿菌 *B. subtilis* TKS1-1 及 *B. subtilis* WG6-14 可明顯抑制潰瘍病原於墨西哥萊姆葉表生物膜形成及纏據能力，經染色觀察可見 TKS1-1 與 WG6-14 菌株纏據於葉表，且兩菌株應用後亦可明顯降低單位葉表面積柑桔潰瘍病斑數，顯示利用枯草桿菌抑制潰瘍病原於葉表形成生物膜能力可降低柑桔潰瘍病害發生 (Huang *et al.*, 2012)。而在鏈黴菌屬 (*Streptomyces* species) 益菌微生物在作物栽培的應用中，Patel 等人 (2018) 發現 *Streptomyces* spp. 可纏據在水稻的根系，減少枯病病菌的侵害，並且可提升植株地下部與地下部的生長 (Patel *et al.*, 2018)。而 *Streptomyces mutabilis* IA1 菌株也被發現可纏據在小麥幼苗的根系表面、根毛、根系內部組織以及穎果中，亦可降低小麥幼苗因感染 *Fusarium culmorum* 感染所導致的苗枯病徵 (Toumatia *et al.*, 2016)。由上述結果可知益生性芽孢桿菌屬與鏈黴菌屬菌株均可在作物表面纏據抵禦病原菌的侵害，其能否纏據植

物表面普遍被認為是影響其應用於作物病害防治、生長促進及耐逆境效益提升是否成功之關鍵，而本研究擬利用分析微生物於非生物性表面、纏據於植物葉表及根圈形成生物膜能力，開發「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」，並篩選高潛力耐逆境效益之芽孢桿菌屬與鏈黴菌屬菌株進行平臺功效驗證。

運用微生物生物膜形成能力作為開發高潛力耐逆境益生菌之策略

為篩選高潛力耐逆境效益之菌株，本研究以微量多孔盤測定法 (microplate assay) (Huang *et al.*, 2006) 將微生物培養於微量多孔盤中，經培養後以 0.1 % 結晶紫染色評估測試微生物在非生物性表面生物膜形成的能力，同時選定不結球白菜，將測試微生物接種到不結球白菜幼苗之葉表或根系，再以吖啶橙 (acridine orange) 或 SYTO 9 等螢光染劑，配合適宜濾鏡之螢光顯微鏡，來觀察測試微生物在生物性表面之生物膜形成能力。經評估完微生物之生物膜形成能力後，挑選生物膜形成能力較優異之菌株，直接測試微生物施用後對作物耐乾旱、淹水之效益，並以此模式改良微生物培養配方，提升微生物對於作物之耐逆境潛力 (圖一)。

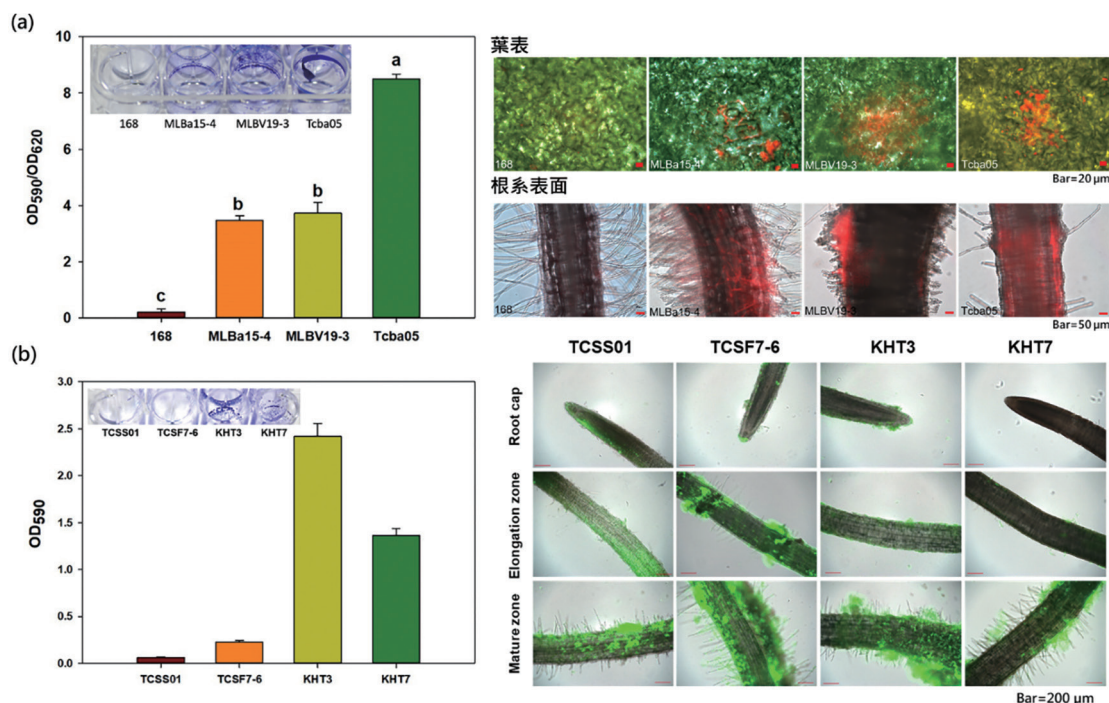
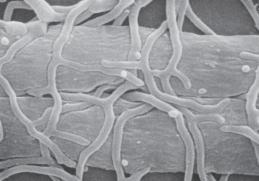
有益微生物可纏據於作物表面，直接或間接促進作物生長、保護作物生長抵禦病原菌的侵害，且在植物-微生物交互作用中扮演重要角色。本研究利用分析微生物於非生物性表面、纏據於植物葉表及根圈形成生物膜能力，建立「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」，篩選對作物具高潛力耐旱、淹水等逆境能力之有益微生物，同時改良微生物培養配方，提升有益微生物在作物耐逆境之應用效益。



圖一、微生物「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」流程圖示。

經試驗結果顯示本研究所建立之「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」皆可有效運用在芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 菌株或鏈黴菌屬 (*Streptomyces* spp.) 菌株之篩選上，將 *Bacillus amyloliquefaciens* MLBa15-4、*Bacillus velezensis* MLBV19-3 及 *Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05 等 3 株待測芽孢桿菌屬菌株，以及已知生物膜形成能力缺失之 *Bacillus subtilis* 168 菌株，以 LB 培養液培養並搭配微量多孔盤快速量測其非生物性表面生物膜形成能力，結果顯示於微量多孔盤中 *B. amyloliquefaciens* Tcba05 菌株具有較佳之生物膜形成能力，進一步以 0.025% 吖啶橙溶液染色不結球白菜之葉表與根系成熟部區域表面，亦可見 *B. amyloliquefaciens* MLBa15-4、*B. velezensis* MLBV19-3 及 *B. amyloliquefaciens* Tcba05 等 3 株芽孢桿菌屬菌株無論是在於葉

表生物膜形成，或是根系纏據能力皆優於 *B. subtilis* 168 菌株 (圖二a)。在鏈黴菌屬微生物的測試結果中，本研究以微量多孔盤測定法搭配 ISP2 培養液，分別測定 *Streptomyces* sp. TCSS01、*Streptomyces* sp. TCSF7-6、*Streptomyces* sp. KHT3 及 *Streptomyces* sp. KHT7 等 4 株菌株，可見 *Streptomyces* sp. KHT3 菌株於非生物性表面生物膜形成能力較佳，進一步以 1/2 MS 培養液懸浮後與不結球白菜種子進行共培養，以 SYTO 9 螢光染劑進行染色後再以螢光顯微鏡觀察各鏈黴菌株於根系不同部位纏據生物膜形成能力，則可見除了 *Streptomyces* sp. KHT7 菌株於白菜根系及延長部纏據能力較差外，其餘鏈黴菌菌株皆可纏據在根系根尖、延長部及成熟部位，又以成熟部的纏據效果最佳 (圖二b)。



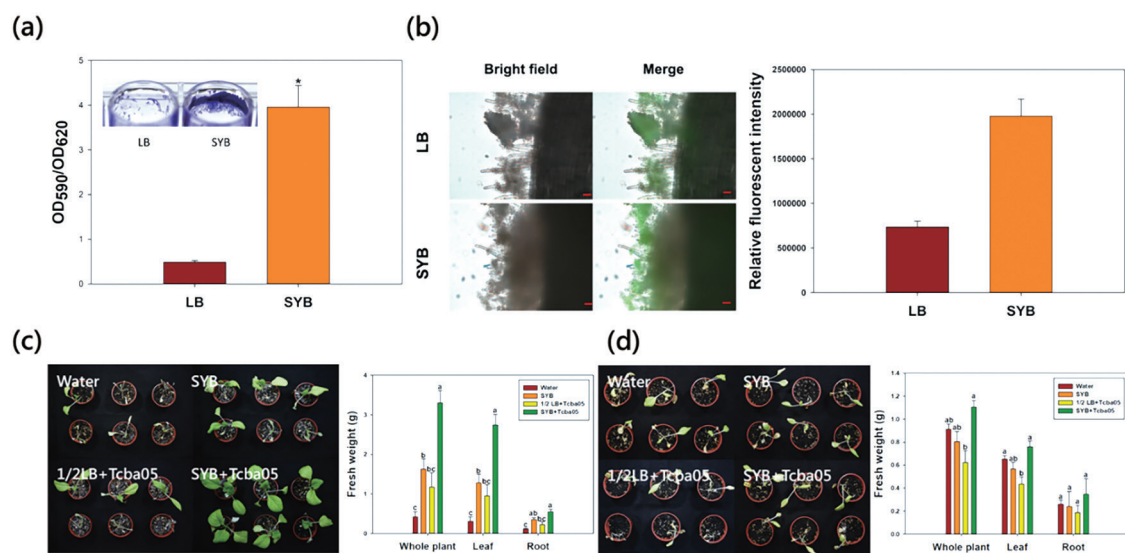
圖二、運用微生物於非生物性及作物根系表面生物膜形成能力篩選高耐逆境潛力之有益微生物菌株。(a) 運用芽孢桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 菌株在非生物性表面、作物葉表與根系表面生物膜形成能力，篩選高耐逆境潛力菌株。(b) 運用鏈黴菌屬 (*Streptomyces* spp.) 菌株在非生物性表面及作物根系形成生物膜之能力篩選高耐逆境潛力之菌株。

運用微生物生物膜形成能力改良益菌微生物培養配方強化耐逆境效益

本研究以生物膜形成能力作為指標改良及提升有益微生物在作物耐乾旱與耐淹水等逆境之效益，延續前述試驗成果，以於非生物性表面、葉表以及根系表面具優異生物膜形成能力之 *B. amyloliquefaciens* Tcba05 菌株進行測試，結果顯示 Tcba05 菌株以 SYB 培養液進行培養，相較 LB 培養液，於微量多孔盤中之生物膜形成能力強，且能形成較厚的生物膜 (圖三a)，進一步測試其於生物性表面生物膜形成能力，亦可見 Tcba05 菌株於 SYB 培養液中對不結球白菜根系成熟部之生物膜形成能力優於 LB 培養液處理 (圖三b)。將 Tcba05 菌

株以 1/2 LB 與 SYB 兩種培養配方震盪培養 5 天後，分別稀釋 100 倍施用於不結球白菜幼苗，而後進行 6 天乾旱逆境處理，結果可見 Tcba05 菌株以 SYB 培養液之處理相較於 1/2 LB 培養液處理組，可更顯著提升在 6 天乾旱逆境下不結球白菜的株高、根長及莖徑 (圖三c)；此外不結球白菜幼苗經處理 Tcba05 菌株培養於 1/2 LB 或 SYB 兩種培養液之 100 倍稀釋液，再進行 6 天淹水逆境處理後，也可發現 SYB 培養液處理組之不結球白菜鮮重，相較於 1/2 LB 培養液處理組具顯著提升之情形 (圖三d)。

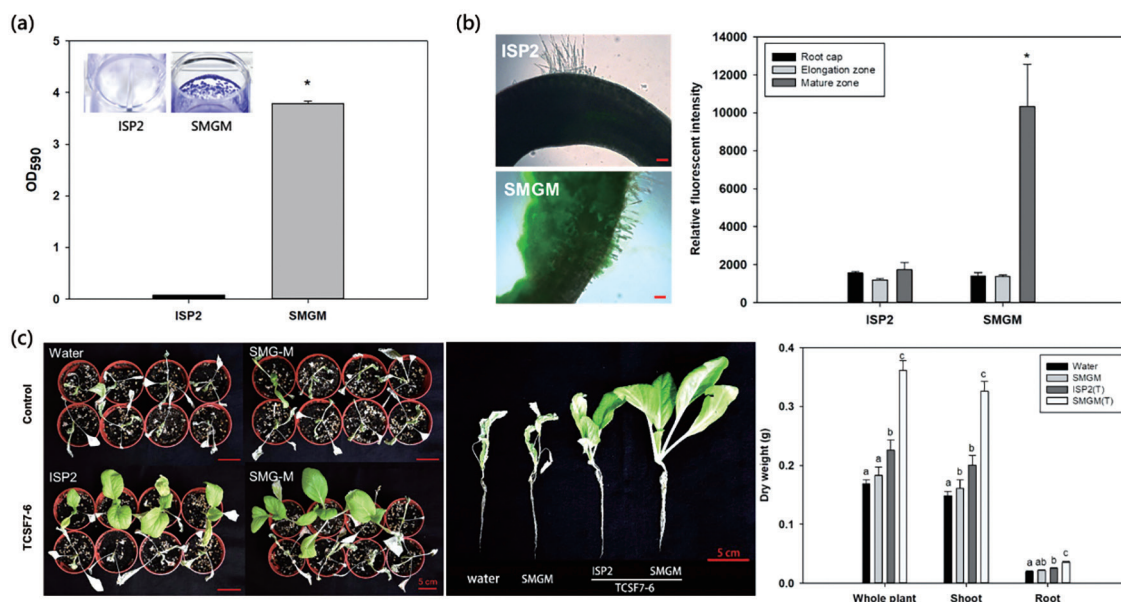
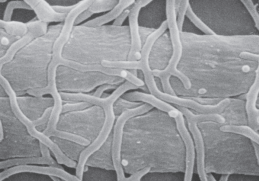
在鏈黴菌之測試結果中，本研究延續前述之試驗結果，選定於根系成熟部纏據能力較佳之 *Streptomyces* sp. TCSF 7-6 菌株進行測試，將菌株以 ISP2 或 SMG-M 等兩種培養液



圖三、運用「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」改良液化澱粉芽孢桿菌*Bacillus amyloliquifaciens* Tcba05配方提升耐逆境效用。(a) 運用配方改良提升液化澱粉芽孢桿菌Tcba05菌株於非生物性表面生物膜形成能力。(b) 運用配方改良提升液化澱粉芽孢桿菌Tcba05菌株於不結球白菜根系表面生物膜形成纏據能力。(c) 微生物培養配方改進提升Tcba05菌株對不結球白菜之耐乾旱效用。(d) 微生物培養配方改進提升Tcba05菌株對不結球白菜之耐淹水效用。

於微量多孔盤中培養，再以結晶紫染色評估TCSF 7-6菌株於兩種培養液之生物膜形成情形，結果顯示TCSF 7-6菌株於SMG-M培養液中生物膜形成能力明顯優於ISP2培養液處理組（圖四a）。進一步評估TCSF7-6菌株在含ISP2和SMG-M等2種培養配方下對不結球白菜根系纏據生物膜形成能力的影響，於24小時共培養後以SYTO 9螢光染劑進行染色，其試驗結果顯示TCSF 7-6菌株在SMG-M培養液培養下明顯纏據於不結球白菜幼苗之根系成熟部，以ImageJ軟體換算螢光區塊亮度，可見TCSF7-6菌株在成熟部纏據量明顯優於ISP2培養液處理（圖四b）。將TCSF7-6菌株分別培養於ISP2及SMG-M培養液，經震盪培養7天後，以稀釋100倍方式施用於不結球白菜幼苗，再進行連續6天的乾旱處理來測試不同培養配方對於不結球白菜耐乾

旱能力的影響，結果顯示處理TCSF 7-6菌株ISP2或SMG-M培養液後，相較於水對照組及SMG-M無菌培養液對照組，對不結球白菜的耐乾旱逆境能力皆有明顯提升，將植株根系介質洗淨去除後，可見施用SMG-M培養液的處理，其白菜植株生長狀態較ISP2處理佳，無論是ISP2或是SMG-M培養配方處理，其地下部乾重及全株乾重皆明顯高於水及無菌SMG-M對照組，且以SMG-M之植株重量為最高；而在地上部乾重之結果，則可見ISP2培養配方處理之地上部乾重高於水對照組，又SMG-M處理組明顯高於ISP2處理組，顯示在提升不結球白菜植株經處理含TCSF7-6菌株之培養液後，可有效提升植株耐乾旱的能力，且施用以SMG-M配方培養之菌液後，亦能提高植株在乾旱環境下的生長（圖四c）。



圖四、運用「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」改良鏈黴菌*Streptomyces* sp. TCSF 7-6配方提升耐逆境效用。(a) 運用配方改良提升鏈黴菌*Streptomyces* sp. TCSF 7-6菌株於非生物性表面生物膜形成能力。(b) 運用配方改良提升鏈黴菌*Streptomyces* sp. TCSF 7-6菌株於不結球白菜根表面生物膜形成纏據能力。(c) 微生物培養配方改進提升鏈黴菌*Streptomyces* sp. TCSF 7-6菌株對不結球白菜之耐乾旱效用。

結語

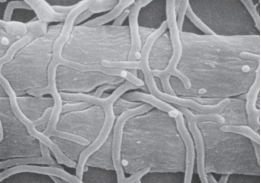
本研究證實微生物生物膜可作為微生物提升作物對環境逆境緩解效能的關鍵指標因子，並藉由分析比較微生物於非生物性表面、植物葉表及根系之形成生物膜能力建立「具提升作物耐逆境潛力之生物膜益菌篩選平臺」。利用此平臺測試多株芽孢桿菌屬與鏈黴菌屬菌株，結果顯示生物膜形成能力較優異之液化澱粉芽孢桿菌及鏈黴菌菌株，可顯著提升不結球白菜耐乾旱、淹水等逆境之能力。並且也藉由此平臺，快速篩選出可提升微生物生物膜形成能力之資材配方，同時亦具增益提升作物耐乾旱、淹水等逆境能力之效果。未來將持續利用此篩選平臺，快速開發對作物具高潛力耐逆境效益之多元微生物菌種，並篩選改良合適配方，提升有益微

生物在作物耐氣候逆境之應用效益。

參考文獻

1. Bais, H. P., Fall, R., Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134, 307-319.
2. Danhorn, T., Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 401-422.
3. Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.
4. Huang, T.P., Somers, E. B., Wong, A. C. L. 2006. Differential biofilm formation and

- motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol. 188, 3116-3120.
5. Huang, T. P., Tzeng, D. D. S., Wong, A. C., Chen, C. H., Lu, K. M., Lee, Y. H., *et al.* 2012. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. PLoS ONE 7(7), e42124.
6. Parsek, M. R., Fuqua, C. 2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. J Bacteriol. 186, 4427-4440.
7. Patel, J. K., Madaan, S., Archana, G. 2018. Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. Microbiol. Res. 215, 36-45.
8. Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., Bais, H. P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol. 148, 1547-1556.
9. Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F. *et al.* 2016. Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. S. Afr. J. Bot. 105, 234-239.



Application of Microbial Biofilms to Enhance Crop Stress Tolerance

Yu-Hsuan Chen ¹, Tzu-Pi Huang ^{2*}

¹ Postdoctoral Research Fellow, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

² Professor, Department of Plant Pathology/Program in Plant Health Care, Academy of Circular Economy, National Chung Hsing University, Nantou, Taiwan, ROC.

* Corresponding author, e-mail: tphuang@nchu.edu.tw

ABSTRACT

Biofilms are structures formed by microbial communities adhering to surfaces such as plant leaves or roots. These structures are encapsulated by the microorganisms themselves along with the polysaccharides and metabolites they produce. This natural phenomenon helps microbes survive in the environment by protecting them from external physical and chemical factors, thus enhancing their ability to withstand environmental stress. The plant growth-promoting bacteria such as *Bacillus* and *Actinobacteria* that adhere to plant surfaces are widely for their crucial roles in crop disease control, growth promotion, and stress resilience. Here, we assessed the biofilm-forming abilities of microorganisms on abiotic surfaces as well as their adherence to plant leaves and roots. We established a "Biofilm Screening Platform for Beneficial Microbe to Enhance Crop Stress Resilience" to identify high potential strains that improve crop stress tolerance. This platform allows for the evaluation the microbial efficacy in mitigating environmental stress on crops and optimization of the formulation. Through platform assays, we identified *Bacillus amyloliquefaciens* Tcba05 and *Streptomyces* sp. TCSF 7-6 with superior biofilm formation abilities that significantly enhance the drought and flooding tolerance in bok choy. In the future, we will continue to use this screening platform to rapidly develop beneficial microbial strains with high potential for improving crop stress resilience and refine suitable formulations to enhance the application efficacy of beneficial microbes in crop stress management.

Keywords: *Bacillus* species, Biofilm, Climate resilience, Drought stress, Flooding stress, *Streptomyces* species