



大豆埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 菌株培养基的筛选与优化

冷 飘, 金拂晓, 黄 毅, 张婵娟, 单志慧, 杨中路, 袁松丽, 陈海峰

(中国农业科学院 油料作物研究所/农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘 要: 为了促进广谱高效大豆埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 菌株的高效生产与推广应用, 本研究对其培养基进行了筛选与优化。首先比较了 Y63-1 在 YMA、TY、SM、PA 和 BSE 5 种根瘤菌基本培养基中的生长速度, 结果表明 Y63-1 在 TY 基本培养基中生长最快。以 TY 为基本培养基进行单因素碳源及无机盐利用试验, 结果表明葡萄糖是 Y63-1 生长的最佳碳源, CaCl_2 为必要的培养基成分, Rh 微量元素对菌株的生长有很大的促进作用。进一步对蛋白胨、葡萄糖、酵母粉及 Rh 微量元素 4 种组分进行正交优化, 获得了适宜 Y63-1 生长的最佳培养基, 配方(1 L)为: 8 g 蛋白胨、10 g 葡萄糖、3 g 酵母粉、0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、3 mL Rh 微量元素, pH7.0。此培养基也能显著提升 USDA110 的生长速率, 可以广泛应用于慢生根瘤菌菌剂的大规模生产。

关键词: 大豆根瘤菌; 埃氏慢生根瘤菌 Y63-1; 培养基筛选; 培养基优化; 正交试验

Screening and Optimization of Culture Medium for *Bradyrhizobium elkanii* Y63-1

LENG Piao, JIN Fuxiao, HUANG Yi, ZHANG Chanjuan, SHAN Zhihui, YANG Zhonglu, YUAN Songli, CHEN Haifeng

(Key Laboratory of Oil Crop Biology and Genetic Breeding, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430062, China)

Abstract: In order to promote the efficient production and application of the Y63-1 strain of soybean slow growing rhizobia with broad-spectrum and high efficiency, this study screened and optimized its culture medium. Firstly, the growth rate of Y63-1 was compared in five basic culture media for rhizobia, including YMA, TY, SM, PA and BSE. The results showed that Y63-1 grew the fastest in TY basic medium. Single factor carbon source and inorganic salt utilization experiments were conducted using TY as the basic culture medium. The results showed that glucose was the optimal carbon source for the growth of Y63-1, CaCl_2 was a necessary component of the culture medium, and Rh trace elements had a significant promoting effect on the growth of the strain. Further orthogonal optimization was conducted on the four components of peptone, glucose, yeast powder, and Rh trace elements to obtain the optimal culture medium for the growth of Y63-1. The formula (1 L) was: 8 g peptone, 10 g glucose, 3 g yeast powder, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and 3 mL Rh trace elements, pH7.0. This culture medium can also significantly improve the growth rate of USDA110 and can be widely used in the large-scale production of slow growing rhizobia agents.

Keywords: soybean rhizobia; *Bradyrhizobium elkanii* Y63-1; medium screening; medium optimization; orthogonal experiment

氮是蛋白质和核酸的重要组成部分之一, 对作物生长发育至关重要^[1]。在土壤中, 氮主要以硝酸盐和铵态氮的形式被植物根部吸收^[2]。现代化农业生产中大量施用化学氮肥, 不仅会造成资源的浪费、耕地土壤退化, 也会污染环境^[3-4]。为实现农业可持续发展, 研发能替代化学氮肥的优质、高产、高效、环保安全的微生物肥料显得尤其重要, 也成为了国内外研究的热点^[5]。微生物肥料 (microbial fertilizer) 又称微生物菌肥, 主要是以活性微生物的生命活动为植物提供生长所需的营养物质^[6]。菌肥中的微生物活体, 可以通过自身的代谢活动, 为作物提供可以直接吸收的营养元素、促生长类物

质, 同时还能够改善土壤理化性质和土壤的生物种类^[7-8]。微生物在自然界分布广, 种类多, 功能多样, 可开发研制成多种功效不同的菌肥^[9]。

根瘤菌是一种革兰氏阴性细菌, 广泛存在于土壤中。根瘤菌菌肥不仅可以有效地提高豆科植物的产量, 而且还可以改良土壤的肥力, 具有重要的农业及生态学意义^[10]。高效根瘤菌菌肥的研发与应用主要侧重于根瘤菌的广谱适应性、高效固氮性、以及低廉的生产成本, 是充分发挥豆科植物共生固氮作用的重要前提。近年来, 越来越多的学者参与到根瘤菌的分离、鉴定以及应用技术的研究。不同大豆品种与根瘤菌之间存在共生匹配差异, 筛

收稿日期: 2024-03-21

基金项目: 湖北省重点研发计划 (2022BBA0036); 国家自然科学基金面上项目 (32071964)。

第一作者: 冷飘 (1997—), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: lengpiao1997@163.com。

通讯作者: 袁松丽 (1984—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事大豆共生固氮育种研究。E-mail: songliyuan@caas.cn;

陈海峰 (1978—), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: chenhaifeng@caas.cn。

选出具有广谱高效的根瘤菌菌株以提升大豆-根瘤菌的共生固氮能力是目前主要的研究方向。李彦连等^[10]从黄淮海地区主栽大豆品种徐豆 24 的种植田中捕捉、分离得到 32 株根瘤菌,筛选出与徐豆 24 共生匹配的高效根瘤菌株,确定 *S. fredii*3 为与徐豆 24 相匹配的高效菌株。田间回接试验结果进一步证明 *S. fredii*3 是试验地区的优势种。蒋攀^[12]采用自然选育的研究方法从各采样点采集的根瘤中分离根瘤菌,将这些菌株水培初筛,经盆栽复筛后,进行大田试验,筛选出结瘤能力强且固氮效果好的菌株 S65。王敏等^[13]以从 187 株大豆根瘤菌株中筛选出的 7 株强耐盐性根瘤菌株为供试材料,筛选与山西主栽品种晋大 88 匹配性较好的强耐盐根瘤菌。上述研究为我国高效根瘤菌菌剂的选取奠定了坚实基础。

根瘤菌菌剂的推广应用不仅需要根瘤菌具有高效性,也与菌剂生产成本、保存后的有效活菌数有关。我国根瘤菌菌剂制备技术已经非常成熟,秦皇岛领先科技有限公司研制的根瘤菌菌剂有效活菌数超过 2×10^9 CFU·mL⁻¹,与美国相当并且保质期达到半年至 1 年^[14]。目前,市场上常见的根瘤菌菌剂根据载体与制备工艺主要分为固体菌剂、液体菌剂、颗粒菌剂以及冻干菌剂 4 种类型^[15],其中液体菌剂在我国现阶段使用较普遍。根据根瘤菌的生长速率将其划分为快生型根瘤菌(*Sinorhizobium*)、慢生型根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、中慢生型根瘤菌(*Mesorhizobium*)3 大类以及诸多变种^[16-17]。研究表明,快生型根瘤菌产生酸,具有不同程度的耐盐性、能广泛适用多种碳源。而慢生型根瘤菌产生碱,所适用碳源较少,所以在大多数培养基中生长缓慢^[18]。根瘤菌培养基常用碳源有葡萄糖、蔗糖、甘油与甘露醇,其中甘油不仅成本高昂并且贮运中要防潮、防热、防水不利于大规模工业生产^[7]。此外 KH₂PO₄、KNO₃等无机盐可为根瘤菌生长提供氮、磷等营养元素,有利于菌株的生长代谢,经过单因素试验能有效筛选有利于菌株吸收的物质,简化培养基组分^[14]。工业发酵的根瘤菌培养基及发酵生产的时间是决定根瘤菌菌剂生产成本的关键因素,由此筛选并优化适宜高效根瘤菌特别是慢生根瘤菌菌剂生产的培养基在生产应用中至关重要。

大豆埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 菌株是由中国农业科学院油料作物研究所于 2021 年从湖北洪湖高产、优质、多抗、广适的中豆 63 高产示范田中分离所得,是一株广谱高效的大豆根瘤菌,具有较好的应用前

景^[19]。前期研究中 16S rDNA 序列测序比对分析结果表明 Y63-1 为埃氏慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium elkanii*),在传统的根瘤菌培养基 YMA 培养基上生长缓慢,生长周期较长(5~8 d),根瘤菌菌剂的生产成本显著提高。为了促进 Y63-1 菌株的高效生产与推广应用,本研究对 Y63-1 菌株的培养基进行筛选与优化,以期获得能显著提高该菌株的生长速度,且适合大规模生产(大量工业发酵)的培养基,为 Y63-1 根瘤菌菌剂的高效生产提供依据。此外,优化后的新培养基也能显著提升其它大豆慢生根瘤菌(比如 USDA110)的生长速度,可以广泛应用于慢生根瘤菌菌剂的大规模生产。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大豆埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 菌株分离自湖北省洪湖市中豆 63 高产示范田大豆根瘤,NCBI 基因序列号为 CP127861 与 CP127862,由本实验室分离保藏。大豆根瘤菌 USDA110 菌株由本实验室保藏。

1.1.2 培养基 YMA 液体培养基(1 L):10.0 g 甘露醇、0.4 g 酵母粉、0.5 g K₂HPO₄、0.2 g MgSO₄·7H₂O、0.1 g CaCl₂·6H₂O、0.1 g NaCl、4 mL Rh 微量元素液、用 ddH₂O 定容至 1 L。在 1 L 液体培养基中添加 15 g 琼脂粉即可配制成 YMA 固体培养基。

SM 培养基(1 L):10.0 g 甘露醇、0.5 g K₂PO₄、0.2 g MgSO₄·7H₂O、0.5 g KNO₃、0.1 g CaCl₂·6H₂O、4 mL Rh 微量元素液、用 ddH₂O 定容至 1 L。

TY 培养基(1 L):5.0 g 蛋白胨、3.0 g 酵母粉、1.0 g CaCl₂·6H₂O、用 ddH₂O 定容至 1 L。

PA 培养基(1 L):2.0 g 蛋白胨、0.5 g MgSO₄·7H₂O、用 ddH₂O 定容至 1 L。

BSE 培养基(1 L):10.0 g 甘露醇、0.2 g MgSO₄·7H₂O、0.5 g K₂HPO₄、0.1 g NaCl、0.1 g CaCl₂·6H₂O、4 mL Rh 微量元素液、用 ddH₂O 定容至 1 L。

Rh 微量元素液(1 L):5.0 g H₃BO₃、5.0 g Na₂MoO₄,用 ddH₂O 定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化 将大豆根瘤菌 Y63-1 菌液在添加了 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素的 YMA 平板上划线,于 28 ℃ 恒温培养箱中培养至清晰的菌落长出(5 d 左右)。挑取活化的 Y63-1 根瘤菌菌落接种于 75 mL YMA 液体培养基中,170 r·min⁻¹,28 ℃ 摇床培养。

1.2.2 不同基础培养基中生长速率对比 将上述活化培养的大豆根瘤菌 Y63-1 菌株按 1% 接种量分别接种于 TY、YMA、SM、PA 以及 BSE 5 种液体培养基中(每个培养基体积为 75 mL),于 28 ℃ 恒温培养箱中 $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 进行培养。分别在 5,11,20 及 31 h 选取 1 瓶,使用 A360 型分光光度计测定培养菌液的 OD_{600} 值。绘制 Y63-1 在 TY、YMA、SM、PA 以及 BSE 中生长的 OD_{600} 值曲线,表征生长速率。根据 Y63-1 的生长曲线选择生长速率最快的培养基。

1.2.3 不同碳源培养基中生长速率对比 改变上述选定培养基中的碳源成分,以葡萄糖、蔗糖以及甘露醇为碳源,分别添加至基本培养基中。活化的 Y63-1 菌株按 1% 接种量分别添加至基本培养基及添加有不同碳源后的基本培养基中,同样每瓶液体培养基的体积为 75 mL。然后于 28 ℃ 恒温摇床中 $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养,24 h 后测定 OD_{600} 值,比较不同碳源对大豆根瘤菌 Y63-1 生长速率的影响。

1.2.4 不同无机盐培养基中生长速率对比 根据上述试验筛选的基础培养基及最佳碳源,设置 4 组试验:A 组去除 $\text{CaCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$;B 组增加 4 mL Rh 微量元素;C 组增加 0.5 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$;以不改变任何有机盐成分的改良培养基为对照组(CK)。活化的 Y63-1 菌株按 1% 接种量分别添加至对照培养基及 A、B、C 组培养基中,于 28 ℃ 恒温培养基中, $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养,31 h 后测定 OD_{600} 值,比较不同无机盐对大豆根瘤菌 Y63-1 生长速率的影响。

1.2.5 正交优化试验 根据以上单因素的试验结果,选取关键碳源(葡萄糖)、无机盐成分(Rh 微量元素液)以及基本培养基中蛋白胨及酵母粉 4 个因素,分别取 3 个水平,并按 $\text{L}_9(3^4)$ 进行正交试验,通过极差分析得出较优组合和影响 Y63-1 生长因素的主次顺序。以方差分析结果为依据,列出其中的关键因素的显著性,制定出本试验范围内适合埃氏慢生型根瘤菌 Y63-1 生长的最佳配方。

1.2.6 优化培养基的验证 选取最具代表性的慢生根瘤菌 USDA110,分别培养于 YMA 基本培养基及优化后的培养基,培养 31 h 后测定 OD_{600} 值,比较 USDA110 在两种培养基中的生长速率,评估优化后的培养基是否也能提升其它慢生根瘤菌(如 USDA110)的生长速率。

1.3 数据分析

先用 Excel 2016 软件进行数据整理,然后用 SPSS ver. 25.0 软件(SPSS Inc. USA, IL;Chicago)进行正交试验设计以及显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大豆埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 基础培养基的筛选

为了筛选适于大豆根瘤菌 Y63-1 菌株生长、稳定性好、成本低廉、来源广的基础培养基。根据 Y63-1 在 YMA、PA、SM、TY 和 BSE 培养基中生长 31 h 的 OD_{600} 值绘制的生长曲线如图 1 所示:接种 Y63-1 之后,5 h 前,在 5 种培养基中的生长速率差异并不明显;5~11 h,Y63-1 在 TY 以及 PA 培养基中生长速率显著上升,超过了 YMA、SM 和 BSE 培养基;11 h 后,Y63-1 在 TY 培养基中生长速率持续快速增长,远远超过了 YMA、PA、SM 和 BSE 培养基。培养 31 h,Y63-1 在 PA 培养基中生长速率列第二位,YMA 位列第三位,在 BSE 培养基与 SM 培养基中无明显差别。结果表明,埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 在 TY 培养基中的生长速率最快,菌量更高,TY 培养基为最佳基础培养基。

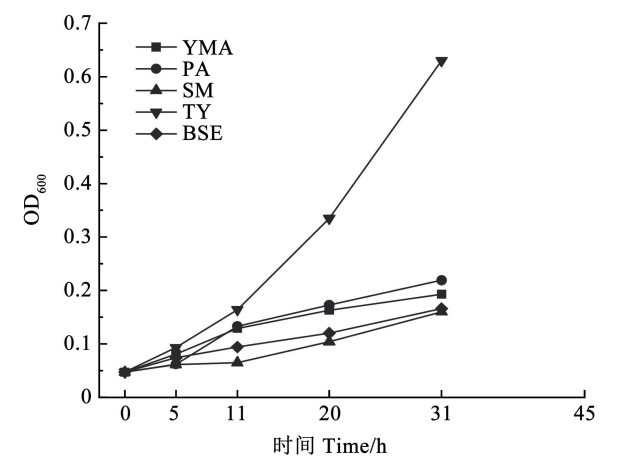
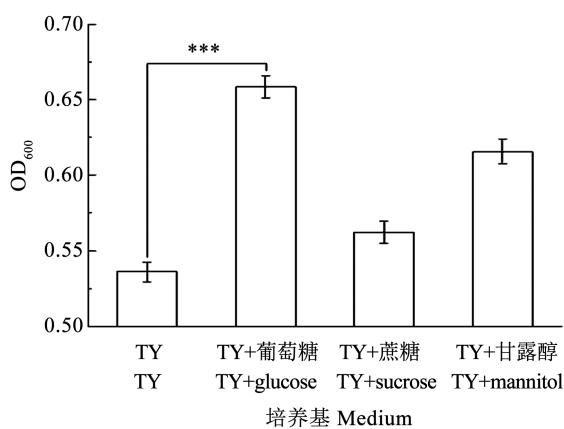


图 1 Y63-1 在 5 种培养基中的生长曲线
Fig.1 Growth curve of Y63-1 in five medias

2.2 Y63-1 在含有不同碳源的 TY 培养基中的生长速率比较

碳源是培养基的重要组成部分,它既能构成菌体细胞和代谢产物,又能提供微生物生命活动中所需能量^[20]。鉴于 TY 培养基组分中并无主要碳源,为提高埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 的生长速率,对其进行进一步优化。结果表明,Y63-1 在以葡萄糖为碳源的 TY 培养基中生长速率最快,显著高于以蔗糖与甘露醇为碳源的 TY 培养基, OD_{600} 值达到 0.659,在 TY 培养基中的 OD_{600} 为 0.536,以葡萄糖为碳源的菌株生长速率比基础培养基高 22.95%,且差异达到极显著性水平。由此,以葡萄糖为进一步优化的培养基碳源。



注：* . 处理间存在显著差异 ($P < 0.05$) ; *** . 处理间存在极显著差异 ($P < 0.001$) 。下同。
Note: * . There is difference between treatments ($P < 0.05$) ; There is extremely difference between treatments ($P < 0.001$) . The same below.

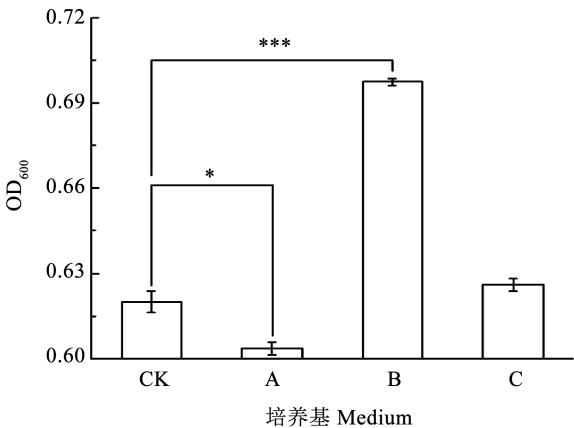
图2 添加不同碳源的TY培养基培养Y63-1后24 h的OD₆₀₀值

Fig.2 OD₆₀₀ value of TY mediums added with different carbon sources after culturing Y63-1 for 24 h

2.3 Y63-1 在含葡萄糖及不同无机盐成分的TY培养基中的生长速率比较

由图1可知,Y63-1在TY培养基生长速度最快,PA培养基第二,YMA培养基第三。PA培养基相较于TY培养基都是以蛋白胨为氮源,只增加了MgSO₄·7H₂O。TY培养基与YMA相比,菌株生长速率存在显著性差异,由于TY培养基已有蛋白胨提供氮源,则YMA培养基在成分上相较于TY增加了Rh微量元素。因此以葡萄糖为碳源分别探究MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·6H₂O以及Rh微量元素对Y63-1生长速率的影响并进行验证。如图3所示,A组为缺少CaCl₂·6H₂O的TY培养基,在培养24 h后其OD值与对照相比显著下降,表明CaCl₂·6H₂O为原培养基中不可缺少的营养成分;B组为添加Rh微量元素的TY培养基,在培养24 h后其OD值显著高于对照($P < 0.001$),表明添加Rh微量元素可以

促进Y63-1菌株的生长;C组为添加MgSO₄·7H₂O的TY培养基,培养24 h后其OD值较CK有所提升,但并不存在显著性差异,表明MgSO₄·7H₂O对Y63-1的生长影响并不大。



注:CK. TY + 葡萄糖;A. TY + 葡萄糖 - CaCl₂·6H₂O;B. TY + 葡萄糖 + Rh 微量元素;C. TY + 葡萄糖 + MgSO₄·7H₂O。

Note: CK. TY + glucose; A. TY + glucose - CaCl₂·6H₂O; B. TY + glucose + Rh trace element; C. TY + glucose + MgSO₄·7H₂O.

图3 不同无机盐成分培养24 h对Y63-1生长速率的影响

Fig.3 OD₆₀₀ of Y63-1 cultured in different trace element media for 24 h

2.4 正交优化试验

单因素试验结果表明,在TY培养基中添加葡萄糖及Rh微量元素液都可以促进埃氏慢生根瘤菌Y63-1的生长,此外蛋白胨及酵母粉是TY培养基的主要成分。设计L₉(3⁴)正交试验对以上4个因素进一步优化,如表1所示:Y63-1在4号培养基中生长速度最快。极差分析结果如表2所示:在优化培养基中培养Y63-1时,4种营养成分对其生长速率的影响为蛋白胨>葡萄糖>酵母粉>Rh微量元素。且方差分析表明4种成分均对Y63-1生长速率有显著性影响(表3)。正交优化试验的最佳组合为:8 g 蛋白胨、10 g 葡萄糖、3 g 酵母粉、0.1 g CaCl₂·6H₂O、3 mL 微量元素。

表1 L₉(3⁴)正交试验设计及结果
Table 1 L₉(3⁴) orthogonal experimental design and results

实验号 Test No.	因素 Influence factors				OD ₆₀₀
	葡萄糖 Glucose	蛋白胨 Peptone	酵母粉 Yeast	Rh 微量元素 Rh trace element	
1	5	5	4	4	0.6255
2	5	3	2	3	0.5835
3	10	8	2	4	0.7640
4	10	5	3	3	0.7695
5	15	3	3	4	0.6715
6	15	5	2	5	0.6600

表 1 (续)

实验号 Test No.	因素 Influence factors				OD ₆₀₀
	葡萄糖 Glucose	蛋白胨 Peptone	酵母粉 Yeast	Rh 微量元素 Rh trace element	
7	15	8	4	3	0.7355
8	5	8	3	5	0.7430
9	10	3	4	5	0.6255

表 2 L₉ (3⁴) 培养基优化结果的极差分析表

Table 2 Basis analysis table of L₉ (3⁴) medium optimization results

项目 Item	葡萄糖 Glucose	蛋白胨 Peptone	酵母粉 Yeast	Rh 微量元素 Rh trace element
K ₁	1.952	2.055	1.984	2.061
K ₂	2.156	1.877	2.007	2.088
K ₃	2.067	2.243	2.184	2.026
k ₁	0.651	0.685	0.661	0.687
k ₂	0.719	0.526	0.669	0.696
k ₃	0.689	0.748	0.728	0.675
R	0.068	0.122	0.067	0.021
最佳水平 Optimal level	10	8	3	3
主次顺序 Primary and secondary	蛋白胨 > 葡萄糖 > 酵母粉 > Rh 微量元素			

表 3 方差分析

Table 3 Variance analysis

因素 Factor	平方和 Sum of squares	df	均方 Mean square	F	P
蛋白胨 Peptone	0.070	2	0.011	36.333	0.027 *
葡萄糖 Glucose	0.022	2	0.004	11.924	0.077
酵母粉 Yeast	0.001	2	0.004	13.044	0.071
Rh 微量元素 Rh trace elements	0.008	2	0.001	0.077	0.929
R ²	0.791				

2.5 优化培养基的验证

对优化的培养基进行验证的结果如表 4 所示, Y63-1 在正交优化最佳水平组合培养基上培养 30 h 后,OD₆₀₀值达到 1.539,在原始 TY 中为 1.251,生长速率提高了 23.02%,且达到了极显著性差异。与

慢生大豆根瘤菌 USDA110 培养 30 h 进行对比表明;USDA110 在原始培养基中 OD₆₀₀ 为 1.167,在优化培养基中 OD₆₀₀ 为 1.797,生长速率提升 59.13%。结果表明,通过正交试验优化后的新培养基同样可以促进其它慢生根瘤菌的生长,具有较好应用潜力。

表 4 Y63-1 正交优化培养基验证

Table 4 Validation of orthogonal optimization medium

大豆根瘤菌 Soybean rhizobia	OD ₆₀₀		生长速率提升比例 Increase of growth rate ratio/%
	TY 培养基	正交优化培养基	
	TY medium	Optimized orthogonal culture medium	
Y63-1	1.251	1.539	23.02
USDA110	1.167	1.857	59.13

3 讨论

根瘤菌菌肥的推广应用不仅可以充分利用大豆共生固氮作用,还可以改良土壤,在农业以及生态学方面具有重要的意义。根瘤菌菌剂的田间高效利用不仅需要根瘤菌具有高效性,也跟菌剂发酵

生产的成本等有关。生产成本中的关键因素主要是发酵的根瘤菌培养基成分及发酵生产的时间。本课题组前期研究表明根瘤菌 Y63-1 是一株具有广谱高效结瘤特性的埃氏慢生型根瘤菌,中豆 63 接种 Y63-1 的结瘤共生效果优于 USDA110、113-2 等高效大豆根瘤菌,并且能与中豆 41、天隆一号等数 10 个

大豆品种有效结瘤,具有较好的应用前景^[7]。基于 Y63-1 在常用的根瘤菌培养基 YMA 中生长缓慢,不利于大规模工业发酵生产,本研究从常用的根瘤菌基本培养基中筛选出最佳基本培养基,通过单因素试验筛选出最佳的碳源与无机盐,最后通过正交设计试验筛选出适宜 Y63-1 的优化培养基,大大提升了 Y63-1 的生长速率,且优化后的培养基也能提升其它慢生根瘤菌的生长速率,可以广泛应用于慢生根瘤菌菌剂的大规模生产。

YMA 培养基是最常用的根瘤菌基本培养基,多数根瘤菌在 YMA 培养基上生长良好。不同根瘤菌基本培养基的主要区别在于所利用的碳源。碳源是构成微生物细胞和代谢产物中碳架来源的重要营养物质^[21]。研究表明,快生型根瘤菌较慢生型根瘤菌利用碳源的范围更广泛,因为它具有多种糖酵解的途径,快生型根瘤菌能利用的碳源种类多于慢生型根瘤菌^[22]。肖亦农等^[23]以快生型大豆根瘤菌 HH103 为供试菌株,进行单因素碳氮源利用试验和正交设计试验,确定最佳培养基及其配方。结果表明:该菌株在 YMA 中生长良好,最佳碳源为蔗糖,最佳氮源为酵母膏。吴红慧等^[14]以快生型大豆根瘤菌 HN01 和慢生型大豆根瘤菌 USDA110 作为供试菌,HN01 在 TY、YMA 和 BSE 培养基中的生长速度相近且远快于在 PA 和 SM 中的生长速度;对 USDA110 基于 YMA 培养基优化试验筛选出一种能将生长速度提高 2 倍左右的优化培养基;慢生型根瘤菌 USDA110 在葡萄糖中的生长速度远快于在其它几种碳源中的生长速度,最佳氮源为酵母粉,并且葡萄糖与酵母粉两因素的影响达极显著水平。李萍等^[21]以快生型大豆根瘤菌 CCBAU110 为供试菌株,在 YMA、TY、PA 和 BSE 4 种培养基中进行生长情况试验,结果表明该菌株在 YMA 中生长较快;在 YMA 培养基中进行的碳源利用试验表明,以甘露醇为碳源,酵母粉为氮源的培养基中根瘤菌生长最好。

肖亦农、吴红慧以及李萍等^[14,21,23]的研究都是基于常用的 YMA 培养基,含有足够的碳源。当培养基中碳源不足时,蛋白胨可作为补充碳源,可以构成微生物细胞和含氮的代谢产物^[24]。根瘤菌 Y63-1 在进行基础培养基筛选时在 TY 培养基中生长最快,显著高于在其它培养基(包括 YMA)中的生长速率,表明 TY 培养基中蛋白胨可以为 Y63-1 生长提供充足的氮源与一定的碳源,而在 TY 培养基中加入适当碳源又显著提高了根瘤菌 Y63-1 的生长速率。用于工业发酵的微生物,无论是生长繁殖还是产品合成,都需要铁、镁、钙、钾等无机盐和微量元素^[25]。其中许多金属离子对微生物生理活性的作用与其浓度相关,低浓度时往往呈现刺激作用,

高浓度却表现出抑制作用。最适浓度要依据菌种的生理特性和发酵工艺条件来确定^[26]。无机盐既能促进菌体的基础代谢,又能影响许多代谢产物的生物合成,是菌体生命活动必需的元素之一^[27]。微量元素大多是存在某些酶中或者作为酶制剂的激活剂,是酶制剂发挥重要作用的重要组成部分。因此,本研究针对这些关键营养成分实施了单因素试验,筛选出了关键无机盐及微量元素组分,最后再对蛋白胨,葡萄糖,酵母粉及 Rh 微量元素 4 个元素进行正交设计试验,优化每一组分的最适含量,获得最优的培养基配方。

4 结论

本研究通过绘制埃氏慢生根瘤菌 Y63-1 在 YMA 培养基、SM 培养基、TY 培养基、PA 培养基和 BSE 培养基中菌体的生长曲线,从中筛选出 TY 培养基为 Y63-1 的最佳基础培养基。单因素试验分析表明,在蔗糖、甘露醇、葡萄糖 3 种碳源中以葡萄糖为碳源的培养基中 Y63-1 生长速率最快,并且葡萄糖来源广且经济;Rh 微量元素与 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 对 Y63-1 生长有明显促进作用。在以上试验的基础上,选取葡萄糖、蛋白胨、Yeast Extract、Rh 微量元素 4 个对 Y63-1 生长有显著性影响的因素进行正交试验,通过极差分析,在本试验范围内得到改良的培养基配方(1 L):8 g 蛋白胨、10 g 葡萄糖、3 g 酵母粉、0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、4 mL Rh 微量元素。本研究以高效广谱性的优良大豆根瘤菌 Y63-1 为基础,针对其在传统培养基 YMA 中生长缓慢的特性,筛选改良了适合其生长且经济的培养基,为 Y63-1 根瘤菌菌剂的推广应用提供了重要理论基础。此外,优化后的新培养基也能显著提升其它大豆慢生根瘤菌(比如 USDA110)的生长速度,可以广泛应用于慢生根瘤菌菌剂的大规模生产。

参考文献

[1] FRINK C R, WAGGONER P E, AUSUBEL J H. Nitrogen fertilizer: Retrospect and prospect[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96 (4): 1175-1180.

[2] CAFARO LA MENZA N, MONZON J P, LINDQUIST J L, et al. Insufficient nitrogen supply from symbiotic fixation reduces seasonal crop growth and nitrogen mobilization to seed in highly productive soybean crops[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(8): 1958-1972.

[3] 刘保平,周俊初. 根瘤菌菌剂研究[J]. 湖北农业科学, 2006, 45(1): 57-61. (LIU B P, ZHOU J C. Study on *Rhizobium* inoculant[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2006, 45(1): 57-61.)

[4] 许景钢,孙涛,李嵩. 我国微生物肥料的研发及其在农业生

产中的应用[J]. 作物杂志, 2016(1): 1-6. (XU J G, SUN T, LI S. Application of microbial fertilizers in agricultural production of China[J]. Crops, 2016(1): 1-6.)

[5] 刘鹏, 刘训理. 中国微生物肥料的研究现状及前景展望[J]. 农学学报, 2013, 3(3): 26-31. (LIU P, LIU X L. Current research status and prospect of microbial fertilizer in China[J]. Journal of Agriculture, 2013, 3(3): 26-31.)

[6] 黄启亮, 韩广泉, 侯红艳, 等. 新型微生物肥料发展现状与前景[J]. 现代农业科技, 2015(3): 218-220. (HUANG Q L, HAN G Q, HOU H Y, et al. Development status and prospect of new microbial fertilizer [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2015(3): 218-220.)

[7] 郝尚华, 刘林贵, 王冠男. 康地宝改良盐碱地试验研究[J]. 内蒙古科技与经济, 2004(22): 78. (HAO S H, LIU L G, WANG G N. Experimental study on improving saline-alkali land with Kangdibao [J]. Inner Mongolia Science Technology & Economy, 2004(22): 78.)

[8] 刘京京, 陈学文, 梁爱珍, 等. 微生物肥料及其对黑土旱田作物应用的效果[J]. 土壤与作物, 2023, 12(2): 179-195. (LIU J J, CHEN X W, LIANG A Z, et al. Microbial fertilizer and its mechanism on the growth and development of dry farmland crops in black soil [J]. Soils and Crops, 2023, 12(2): 179-195.)

[9] 薛德林, 胡江春, 张仲良, 等. 微生物有机肥料的研制、生产及应用[J]. 腐植酸, 2005(2): 20-26. (XUE D L, HU J C, ZHANG Z L, et al. Preparing, production and application of microbial organic fertilizer[J]. Humic Acid, 2005(2): 20-26.)

[10] 孙志蓉, 耿业业, 张铮茹, 等. 一种甘草的根瘤菌肥及其制备方法: CN115536466A[P]. 2022-12-30. (SUN Z R, GENG Y Y, ZHANG Z R, et al. A rhizobium fertilizer for licorice and its preparation method: CN115536466A[P]. 2022-12-30.)

[11] 李彦连, 王传雷, 徐保民, 等. 徐豆 24 大豆根瘤菌共生匹配性筛选及应用[J]. 大豆科学, 2020, 39(4): 612-620. (LI Y L, WANG C L, XU B M, et al. Screening and application of suitable symbiotic combination between rhizobia and soybean cultivar Xudou 24 [J]. Soybean Science, 2020, 39(4): 612-620.)

[12] 蒋攀. 四川大豆根瘤菌高效菌株的初步筛选[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013. (JIANG P. Preliminary screening of soybean rhizobia strains with high efficiency in Sichuan [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2013.)

[13] 王敏, 秦杰, 杨万明, 等. 晋大 88 高匹配性强耐盐根瘤菌筛选[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 385-393. (WANG M, QIN L, YANG W M, et al. Screening of salt-tolerant and well symbiotic matching soybean rhizobia strains for Jinda 88 [J]. Soybean Science, 2021, 40(3): 385-393.)

[14] 管凤贞, 邱宏端, 陈济琛, 等. 根瘤菌菌剂的研究与开发现状[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 755-759. (GUAN F Z, QIU H D, CHEN J C, et al. *Rhizobium* inoculants: Research progress and development status[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 755-759.)

[15] 吴红慧, 周俊初. 根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 14-19. (WU H H, ZHOU J C. Medium optimization and inoculant type comparison of rhizobium[J]. Microbiology China, 2004, 31(2): 14-19.)

[16] 姚延轩, 接伟光, 杜燕, 等. 根瘤菌的分类、鉴定及应用技术研究现状[J]. 中国农学通报, 2020, 36(15): 100-105. (YAO Y X, JIE W G, DU Y, et al. Taxonomy, identification and application of *Yhizobium* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(15): 100-105.)

[17] GUBRY-RANGIN C, BÉNA G, CLEYET-MAREL J C, et al. Definition and evolution of a new symbiovar, sv. *rigiduloides*, among *Ensifer meliloti* efficiently nodulating *Medicago* species[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2013, 36(7): 490-496.

[18] 徐玲玫, 樊惠, 葛诚, 等. 快生型大豆根瘤菌的理化特性和共生效应[J]. 大豆科学, 1984, 3(2): 101-109. (XU L M, FAN H, GE C, et al. Physico-chemical characteristics and symbiotic effects of fast-growing soybean rhizobia [J]. Soybean Science, 1984, 3(2): 101-109.)

[19] LENG P, JIN F, LI S, et al. High efficient broad-spectrum *Bradyrhizobium elkanii* Y63-1 [J]. Oil Crop Science, 2023, 8(4): 228-235.

[20] 顾寅钰, 张亚平, 陈传杰, 等. 蝇虫草培养基碳源和氮源对菌丝生长量的影响[J]. 山东农业科学, 2008, 40(7): 77-79. (GU Y Y, ZHANG Y P, CHEN C J, et al. Effects of carbon and nitrogen sources in culture medium on growth amount of *Cordyceps militaris* hyphae[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2008, 40(7): 77-79.)

[21] 李萍, 杨会青, 李泰仑, 等. 费氏中华根瘤菌培养基的选择及优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2007, 19(6): 71-74. (LI P, YANG H Q, LI T L, et al. Medium selection and optimization of *Sinorhizobium fredii* [J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2007, 19(6): 71-74.)

[22] 樊惠, 徐玲玫, 葛诚, 等. 快生型大豆根瘤菌的理化特性和共生效应(二)[J]. 大豆科学, 1986, 5(1): 57-64. (FAN H, XU L M, GE C, et al. Physico-chemical characteristics and symbiotic effects of fast-growing soybean rhizobia (II) [J]. Soybean Science, 1986, 5(1): 57-64.)

[23] 肖亦农, 徐琼. 大豆根瘤菌 HH103 菌株培养基的筛选与优化[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(6): 92-95. (XIAO Y N, XU Q. Medium screening and optimization for soy bean *Rhizobium* (*Rhizobium fredii*) HH103 [J]. Journal of Microbiology, 2011, 31(6): 92-95.)

[24] 陈小龙. 生物合成法生产腺苷蛋氨酸[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2002. (CHEN X L. Production of adenosylmethionine by biosynthesis [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2002.)

[25] 陆香庆. 固定化米根霉发酵生产 L-乳酸的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2006. (LU X Q. Study on L- lactic acid production by immobilized *Rhizopus oryzae* fermentation [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2006.)

[26] 王艳萍, 郭金体, 张阳, 等. 无机盐 $MgCl_2$ 和微量金属离子 Zn^{2+} 对克拉维酸产量的影响[J]. 天津科技大学学报, 2008, 23(1): 13-16. (WANG Y P, GUO J T, ZHANG Y, et al. Effect of mineral salt $MgCl_2$ and trace metal ion Zn^{2+} on clavulanic acid production [J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2008, 23(1): 13-16.)

[27] 刘书娟, 辛嘉英, 张颖鑫, 等. 红酵母发酵产类胡萝卜素的研 究[J]. 农产品加工·学刊, 2010(7): 40-43, 47. (LIU S J, XIN J Y, ZHANG Y X, et al. Study on production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2010(7): 40-43, 47.)