

大豆根瘤菌 AHM2B 菌株培养条件的筛选与优化

吴 萍, 李正鹏, 何庆元, 史 钧, 祝嫦巍

(安徽科技学院 应用微生物研究所, 安徽 凤阳 233100)

摘 要: 试验对大豆根瘤菌 AHM2B 菌株在 YMA、TY、PA、BSE 共 4 种培养基中的生长情况进行了比较, 并通过单因素和正交试验确定最佳培养条件。结果表明: 该菌株在 BSE 培养基中生长较快, 最佳碳源为蔗糖、氮源为酵母粉、pH 8.0、温度为 28℃, 接种量为 4%。在单因素试验的基础上, 采用正交试验对培养条件中的蔗糖、酵母粉、pH 和接种量 4 个因素进行优化, 得到最佳培养条件为: 蔗糖 10 g, 酵母粉 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, Rh 溶液 4 mL, 豆芽汁 1 000 mL, pH 7.0, 温度 28℃, 接种量 4%。

关键词: 大豆根瘤菌; 培养基; 培养条件优化; 正交试验

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0953

Screening and Optimization of the Culture Conditions for Soybean Rhizobium Strain AHM2B

WU Ping, LI Zheng-peng, HE Qing-yuan, SHI Jun, ZHU Chang-wei

(Institute for Applied Microbiology, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: The growth conditions of the Soybean *Rhizobium* strain AHM2B were compared in the YMA, TY, PA and BSE mediums. The results showed that the strain grew faster in the BSE medium than in the others. The single factor experiments showed that the best carbon and nitrogen sources was sucrose and yeast extract, respectively, pH was 8.0, culture at 28℃, and 4% inoculation volumes. The best culture conditions were obtained by orthogonal test, the results were: sucrose 10 g, yeast extract 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, Rh solution 4 mL, bean spouts extract 1 000 mL, pH 7.0, inoculation volumes 4% and culture at 28℃.

Key words: Soybean rhizobia; Medium; Optimization of the culture conditions; Orthogonal experiment

氮肥是作物的主要肥料之一, 化学氮肥的生产不仅浪费能源, 而且污染环境, 而与大豆共生的大豆根瘤菌可在常温常压下把空气中的氮转变成能被作物利用的有机氮化合物^[1-3], 根瘤菌与豆科植物共生固氮体系是自然界固氮效率最高, 固氮量最多的生物固氮体系^[4-7]。

大豆生产中使用根瘤菌是一项成熟的、广泛使用的技术, 在许多国家都有大规模的商品菌剂生产和出售。随着无公害农业的发展, 接种高效大豆根瘤菌, 将产生更显著的社会与环境效益^[8]。据报道, 接种的根瘤菌要发挥作用, 除了要具有高的固氮能力和高的竞争结瘤能力外, 还要具有足够的活菌数。因此, 生产低成本和高活菌数的根瘤菌菌剂对农业生产很重要^[2]。本文旨在通过单因素及正交试验筛选适合大豆根瘤菌 AHM2B 菌株生长的最佳条件, 以为根瘤菌剂的生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 大豆根瘤菌 AHM2B 菌株, 由安徽科技学院生物技术实验室提供。

1.1.2 培养基 斜面培养基(YMA 培养基): 甘露醇 10 g, 酵母粉 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, 琼脂 15 ~ 20 g, H_2O 1 000 mL, pH 6.8 ~ 7.0, Rh 微量元素液 4 mL^[9]; 液体种子培养基: 不加琼脂的 YMA 培养基; 发酵培养基: 1) YMA 培养基; 2) TY 培养基: 胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 3 g, CaCl_2 1.3 g, H_2O 1 000 mL, pH 6.8 ~ 7.0; 3) PA 培养基: 蛋白胨 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, H_2O 1 000 mL, pH 6.8 ~ 7.0; 4) BSE 培养基: 甘露醇 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, Rh 微量元素液 4 mL,

收稿日期: 2014-02-11

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2011Z066, KJ2013A077); 安徽科技学院自然科学基金(ZRC2013367); 安徽科技学院生物学重点建设学科项目(AKXK20102-1)。

第一作者简介: 吴萍(1958-), 女, 教授, 主要从事生物肥料研究。E-mail: wupinggu@126.com。

豆芽汁 1 000 mL, pH 6.8 ~ 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 在无菌条件下将根瘤菌 AHM2B 菌株接种于斜面培养基(YMA)上,于 28℃ 培养 3 d。

1.2.2 种子液制备 将已活化的根瘤菌 AHM2B 菌株接一环到 YMA 液体种子培养基(250 mL 的三角瓶装 80 mL 培养基)中,置于 28℃、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中震荡培养 3 d 得种子液备用。

1.2.3 根瘤菌在培养基中的生长情况 将培养好的种子液,按照 3% (V/V) 接种量接入 YMA、TY、PA 和 BSE 这 4 种液体培养基(250 mL 的三角瓶装 100 mL 培养液)中,置于 28℃、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中震荡培养,分别在 12, 24, 36, 48 h 时测定 OD₆₂₀ 值。

1.2.4 单因素试验 从 4 种培养基中选择根瘤菌 AHM2B 菌株生长较好的一种,进行培养基碳源、氮源、初始 pH 及培养温度的单因素试验。

1) 培养基碳源的筛选:分别用 10 g 的葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、乳糖、蔗糖及甘油进行试验,培养基其他成分不变;

2) 培养基氮源的筛选:确定最佳碳源后,在培养基中分别加入 2 g 酵母粉、蛋白胨、大豆粉、玉米粉及牛肉膏的不同氮源进行试验,培养基其他成分不变;

3) 培养基初始 pH 的筛选:确定最佳碳氮源后,将培养基中的初始 pH 设定为 4, 5, 6, 7, 8, 9 进行试验,培养基中其他成分不变;

4) 培养温度的筛选:确定最佳碳氮源、pH 后,将培养温度设定为 20, 25, 28, 30, 35 和 40℃ 进行试验,培养基其他成分不变。

以上 4 种单因素筛选方法均按 3% 接种量将种子液接入上述培养基,置于 28℃、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中震荡培养,在 48 h 时测定 OD₆₂₀ 值;

5) 接种量的筛选:确定最佳碳氮源、pH 和温度后,将接种量设定为 1%、2%、3%、4%、5% 进行试验,培养基其他成分不变。置于 28℃、150 r·min⁻¹ 的恒温摇床中震荡培养,在 48 h 时测定 OD₆₂₀ 值。

1.2.5 正交试验设计 在单因素试验的基础上,采用 L₉(3⁴) 正交试验法对碳、氮源添加量、pH、接种量 4 个影响菌体生长的因素进行优化。因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

Table 1 The table of factors and levels

水平 Level	因素 Factors			
	A 蔗糖 Sucrose/g	B 酵母粉 Yeast/g	C pH	D 接种量 Inoculum/%
1	9	1	7	3
2	10	2	8	4
3	11	3	9	5

2 结果与分析

2.1 AHM2B 菌株在不同培养基的生长情况

由图 1 可见,大豆根瘤菌 AHM2B 菌株在 YMA、TY、PA、BSE 4 种培养基中不同时期的 OD₆₂₀ 值的变化情况。试验结果表明,AHM2B 菌株在 BSE 培养基中生长较快,其次是 YMA 和 TY 培养基,在 PA 培养基中生长最慢,因此本试验最佳培养基为 BSE 培养基,选定 BSE 培养基进行以下培养条件优化。

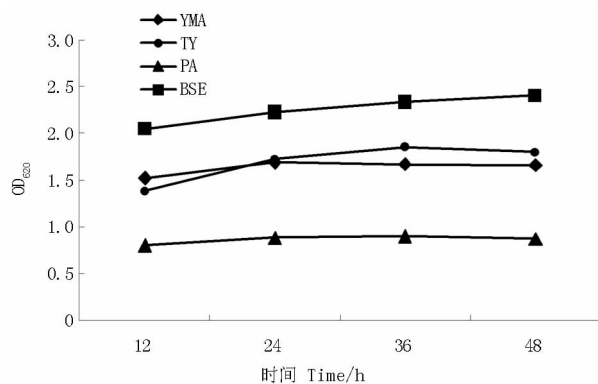


图 1 AHM2B 菌株在 4 种培养基中的生长状况

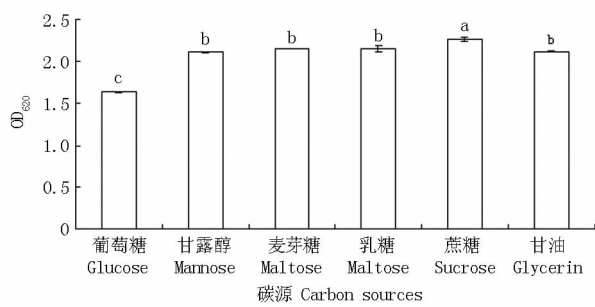
Fig. 1 The growth of the strain AHM2B cultivated in the different mediums

2.2 培养条件的筛选

2.2.1 AHM2B 菌株对不同碳源的利用情况 由图 2 可知,AHM2B 菌株在蔗糖为碳源的培养基生长最好,生长状况顺序依次为:蔗糖 > 乳糖 > 麦芽糖 > 甘油 > 甘露醇 > 葡萄糖,AHM2B 菌株在以蔗糖为碳源的培养基中生长状况显著优于其他培养基。而甘露醇、麦芽糖、乳糖和甘油 4 种碳源之间的差异不显著,所以选用蔗糖作为培养基中最佳碳源。

2.2.2 AHM2B 菌株对不同氮源的利用 在以蔗糖为碳源的 BSE 培养基上,AHM2B 菌株对不同氮源的利用情况如图 3 所示,AHM2B 菌株在以酵母粉为氮源的培养基中生长最好,生长状况顺序依次为:酵母粉 > 蛋白胨 > 牛肉膏 > 玉米粉 > 大豆粉,AHM2B

菌株在以酵母粉为氮源的培养基中生长状况显著优于其他培养基,所以选用酵母粉作为培养基中最佳氮源。



图中不同小写字母表示 0.05 水平差异显著,下同。

Different lowercase letters stand for significant difference at 0.05 level. The same below.

图 2 AHM2B 菌株对不同碳源的生长情况

Fig. 2 The growth of AHM2B in the mediums with different carbon sources

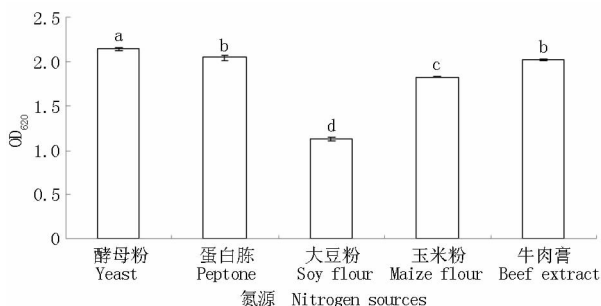


图 3 AHM2B 菌株对不同氮源的生长情况

Fig. 3 The growth of AHM2B in the mediums with different nitrogen sources

2.2.3 不同 pH 对 AHM2B 菌株生长的影响 在以蔗糖、酵母粉为碳氮源的 BSE 培养基上,不同 pH 对 AHM2B 菌株生长影响如图 4 所示,AHM2B 菌株在 pH 为 8 时生长最好,显著优于其他 pH,所以确定培养基最佳 pH 值为 8.0。

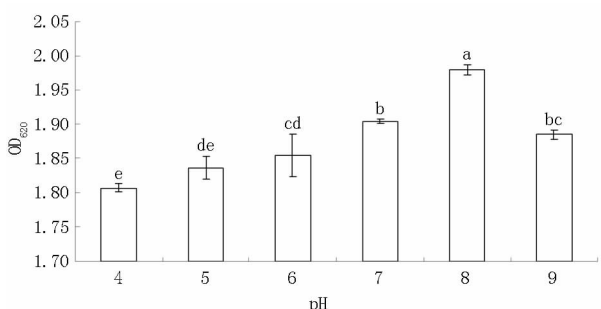


图 4 不同 pH 对 AHM2B 菌株生长的影响

Fig. 4 The effect of the initial pH on the growth of AHM2B

2.2.4 不同培养温度对 AHM2B 菌株生长的影响

在以蔗糖、酵母粉为碳氮源的 BSE 培养基上及 pH 8.0 时,不同培养温度对 AHM2B 菌株生长影响见图 5 所示,AHM2B 菌株在培养温度为 28℃ 的时生长最好,不同的培养温度对菌株生长状况影响顺序依次为:28℃ > 25℃ > 20℃ > 30℃ > 35℃ > 40℃,其中 28℃ 时 AHM2B 菌株生长状况显著优于其他培养温度。

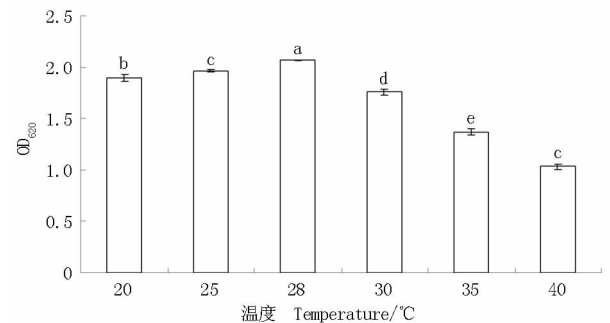


图 5 不同培养温度对 AHM2B 菌株生长影响

Fig. 5 The effect of culture temperature on the growth of AHM2B

2.2.5 不同接种量对 AHM2B 菌株生长的影响

在以蔗糖、酵母粉为碳氮源的 BSE 培养基上,pH 8.0、培养温度为 28℃ 时,不同接种量对 AHM2B 菌株生长影响如图 6 所示,AHM2B 菌株在接种量为 4% 生长最好,不同接种量对菌株生长影响状况顺序依次为:4% > 3% > 2% > 5% > 1%,其中 4% 接种量对 AHM2B 菌株生长显著优于其他接种量。

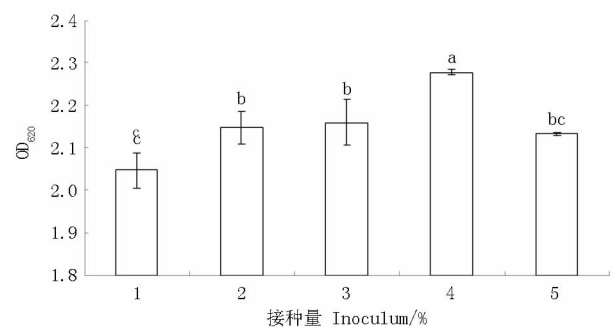


图 6 不同接种量对 AHM2B 菌株生长影响

Fig. 6 The effect of inoculation volume on the growth of AHM2B

2.3 最佳培养条件的正交优化

经极差分析(表 2)可见,4 种主要因素对其生长速度影响的顺序依次为:蔗糖(A) > pH(C) > 酵母粉(B) > 接种量(D);其中蔗糖为主要因素。正交分析最佳组合为 A₂B₃C₁D₂,即培养基的最佳碳源为蔗糖 10 g,氮源为酵母粉 3 g,pH 为 7.0,接种量为 4%。

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

处理 Treatment	因素 Factors				OD ₆₂₀
	A 蔗糖 Sucrose/g	B 酵母粉 Yeast/g	C pH	D 接种量 Inoculum/%	
1	1(9)	1(1)	1(7)	1(3)	0.269
2	1	2(2)	2(8)	2(4)	0.291
3	1	3(3)	3(9)	3(5)	0.292
4	2(10)	1	2	3	0.382
5	2	2	3	1	0.278
6	2	3	1	2	0.318
7	3(11)	1	3	2	0.313
8	3	2	1	3	0.374
9	3	3	2	1	0.384
K ₁	1.98943	2.05043	2.06930	2.04787	
K ₂	2.08695	2.02173	2.01555	2.06752	
K ₃	2.06230	2.06652	2.05383	2.02330	
R	0.0975	0.0448	0.0538	0.0442	

3 结 论

最佳培养基是 BSE 培养基,以此培养基为基础进行正交试验,得出的最佳培养条件为:蔗糖 10 g,酵母粉 3 g,MgSO₄·H₂O 0.2 g,K₂HPO₄ 0.5 g,NaCl 0.1 g,CaCl₂·H₂O 0.1 g,Rh 微量元素液 4 mL,豆芽汁 1 000 mL,pH7.0,接种量为 4%。

参考文献

[1] 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.)

[2] 李萍,杨会青,李泰仑,等.费氏中华根瘤菌培养基的选择与优化[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* medium selection and optimization of *Sinorhizobium fredii*[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University,2007,19(6):71-74.)

[3] 卢秉林,王文丽,李娟,等.自生固氮菌的固氮能力及其对春小麦生长发育的影响[J].中国生态农业学报,2009,17(5):895-899. (Lu B L,Wang W L,Li J,et al. Nitrogen fixation ability of a-zotobacter and its effect on growth of spring wheat [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,2009,17(5):895-899.)

[4] 朱剑光,尉亚辉,吴艺舟.花生慢生根瘤菌的分离与鉴定[J].生物技术,2006,16(2):45-48. (Zhu J G,Wei Y H,Wu Y Z. Iso-lation and identify of *Bradyrhizobium Bacteriuln* from peanut [J]. Biotechnology,2006,16(2):45-48.)

[5] 迟玉成,樊堂群,禹山林,等.慢生型花生根瘤菌培养基优化研究[J].花生学报,2007,36(4):25-28. (Chi Y C,Fan T Q,Yu S L,et al. Study of medium optimization of peanut *Bradyrhizobium* strain [J]. Journal of Peanut Science,2007,36(4):25-28.)

[6] 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,2005,31(2):14-19. (Wu H H,Zhou J C. Medi-um optimization and inoculant type comparison of rhizobium [J]. Microbiology China,2005,31(2):14-19.)

[7] 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):94-95. (Xiao Y N,Xu Q. Me-dium screening and optimization for soybean rhizobium(*Rhizobium fredii*)HH103 [J]. Journal of Microbiology,2011,31(6):94-95.)

[8] 李郑军,许修宏.不同地区大豆根瘤菌培养条件的优化[J].东北农业大学学报,2009,40(11):11-13. (Li Z J,Xu X H. Opti-mization on culture conditions of rhizobia in different areas [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2009,40(11):11-13.)

[9] Pan B,Smith D L. Genistein preincubation of *Bradyrhizobium ja-ponicum* cells improves strain competitiveness under greenhouse, but not field conditions [J]. Plant and Soil,2000,223:229-234.)