

根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究*

吴红慧 周俊初**

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要:以费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HN01 和大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110 作为供试菌,进行 YMA、TY、SM、PA 和 BSE 等 5 种培养基的比较试验。结果表明,两种菌都在 BSE 中生长速度最快。对 USDA110 进行培养基的优化试验,筛选出一种能将生长速度提高 2 倍左右的优化培养基。制作了供试菌的固体、液体与冻干菌剂,结果表明在 3 种供试固体剂型载体中,草炭要优于蛭石,蛭石又优于珍珠岩。供试菌在两种液体剂型中的存活率和活菌数均较高,氮气或真空剂型对存活率的影响没有明显的差别。两种冻干菌剂的结果表明,供试菌在冻干过程中的死亡率较高,液氮冻干优于常规冻干。冻干菌剂在储存条件下的存活率为: $-20^{\circ}\text{C} > 4^{\circ}\text{C} > \text{室温}$ 。

关键词:大豆根瘤菌,培养基优化,剂型

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0014-06

MEDIUM OPTIMIZATION AND INOCULANT TYPE COMPARISON OF RHIZOBIUM

WU Hong-Hui ZHOU Jun-Chun

(Key Laboratory of Agriculture Microbiology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

Abstract: BSE media was screened from five media including YMA, TY, SM, PA and BSE as the best for the growth of representative strain *Sinorhizobium fredii* HN01 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Based on YMA, one optimized medium was obtained from orthogonal tests. According to survival percentage, concentrated liquid type was proved to be the highest among solid, liquid and freeze-dried inoculant types tested. Peat was better than vermiculite and the latter was better than perlite among three solid inoculant carriers tested. Freeze-dry method was not suitable for the production of rhizobium inoculant since the high death ratio during freeze-dry process. The survival percentage of freeze at liquid nitrogen was higher than at -20°C and the order for its storage was $-20^{\circ}\text{C} > 4^{\circ}\text{C} > \text{room temperature}$.

Key words: Soybean Rhizobia, Medium optimization, Inoculant

接种根瘤菌剂已成为世界各国豆科作物增产的一项技术措施,在许多国家都有大规模的商品菌剂生产和出售,应用面积也不断扩大,为了适应中国大豆根瘤菌剂生产的需求,本研究通过 5 种培养基的比较和优化试验,得到了活菌数高,生产成本低,适合大量工业发酵的培养基。

在古代,农民常用客土法将多年种植豆科作物的老区土壤移到新区,以提高作物的产量^[1],自 Beijerinck (1888) 首次从豆科植物根瘤中分离出根瘤菌后,用纯培养的根瘤菌剂接种豆科植物已在全世界大多数国家普及,并成为一项重要的农业增产技术措

* 欧盟国际合作计划课题 (No. ICA4-CT-2001-10056)

国家 863 计划课题 (No. 2001AA214021)

** 联系人 Tel: 027-87281685

收稿日期: 2003-06-11, 修回日期: 2003-08-30

施。

根瘤菌剂主要有琼脂、固体、颗粒、液体和冻干等 5 种主要剂型。琼脂剂型是最早应用的菌剂,在上世纪 20 年代,美国已用草炭菌剂取代了它。固体剂型主要以草炭、蛭石或珍珠岩等为吸附剂,由于有效期较长和菌数较高目前已为大多数生产厂家采用。并已成为当代微生物肥料生产的主要剂型。灭菌的草炭菌剂优于未灭菌的草炭菌剂^[2,3],在低温条件下储存的根瘤菌存活率更高^[3]。颗粒菌剂是将根瘤菌液或浓缩液喷在草炭、多孔石膏、方解石或白云石颗粒上制作而成,特别适合于机械播种或在种子拌有化学药剂时使用。液体菌剂是将液体发酵的菌液直接用于根瘤菌接种的剂型。冻干菌剂是用冷冻干燥技术除去细胞水分制成,国外已有商品出售。

新近的研究结果表明,蛭石是一种理想的吸附剂^[4],蛭石原料在我国分布广泛,价格低廉,适于在根瘤菌剂生产上推广应用。根瘤菌在珍珠岩中存活率较高,也可以作为载体应用^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种:分别为费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*) HN01,本实验室保存;大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110,本实验室保存。

1.1.2 固体菌剂载体:草炭:来自河南辉县;蛭石:河北省灵寿县地矿开发二厂生产;珍珠岩:鄂州市珍珠岩加工厂生产。

1.1.3 培养基:YMA、TY、SM^[6]、PA^[7]。豆芽汁培养基(代号 BSE):甘露醇(或蔗糖) 10.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2g, K_2HPO_4 0.5g, NaCl 0.1g, CaCl_2 0.1g, Rh 微量元素 4mL, 豆芽汁(豆芽汁配制法:500g 豆芽 + 1500mL H_2O 煮沸 30 min 后用纱布过滤两次即得。) 1000mL, pH 6.8~7.0。

1.1.4 培养条件:摇床培养为 200r/min, 28℃, 平板培养为 28℃。

1.2 试验方法

1.2.1 生长曲线和 OD 值曲线的绘制:使用 UV7501 分光光度计测 OD 值,绘制两种菌在 TY、YMA、SM、PA 和 BSE 中生长的 OD 值曲线。绘制 HN01 和 USDA110 在 TY 和 BSE 中的生长曲线。

1.2.2 菌剂制作:固体剂型:将培养至对数期的菌液加入无菌的载体中,加入量分别为:草炭(5mL 菌液/50g),蛭石(25mL/10g)、珍珠岩(15mL/10g),混合均匀,在无菌条件下封口,于室温保存(武汉,4月到9月),定期取样,一次一袋,稀释平板测数。浓缩液体剂型 1:将摇到对数期的菌液离心(5,000 r/min, 15min),去上清液,加无菌水洗涤两次,去上清液,加入生理盐水,浓缩到 1/20,用巴氏吸管分装到冻干管中,每管加入 0.5mL 菌液,放入已开机预冷的冻干机中抽干,真空条件下封口。4℃保存,定期取样,稀释平板测数,计算存活率。浓缩液体剂型 2:步骤同上,只是封口前要加入氮气,封口,4℃保存。常规冻干菌剂:将摇到对数期的菌液离心(5,000 r/min, 15min),去上清液,加无菌水洗涤两次,去上清液,加入脱脂牛奶作为保护剂,浓缩到 1/20 体积,用巴氏吸管分装到冻干管中,每管加入 0.5mL 菌液,常规冻干菌剂置于 -20℃条件下,24h 冻干,抽干后在真空条件下封口,分别置于 4℃, -20℃和室温下保存。液氮冻干菌剂:制作方法同上,只是用液氮冻干,抽干后在真空条件下封口,分

别置于 4℃、-20℃和室温下保存。

1.2.3 存活率测定：定期取样，稀释平板测数。

1.2.4 正交设计：采用正交表 $L_9(3^4)$ 安排试验^[8,9]，方差分析采用 SAS 软件。

2 结果与分析

2.1 根瘤菌培养基的选择

2.1.1 HN01 的培养基比较试验：本实验测定了 HN01 在 TY、YMA、SM、PA 和 BSE 中生长的 OD 值，并绘制曲线，结果见图 1。由图可见：HN01 在 TY、YMA 和 BSE 培养基中的生长速度远快于在 PA 和 SM 中的生长速度，前 3 者的生长速度相近。进一步测定了 HN01 在 TY 和 BSE 培养基中的生长速度，结果表明 HN01 在 BSE 中的生长速度更快，菌含量要高。

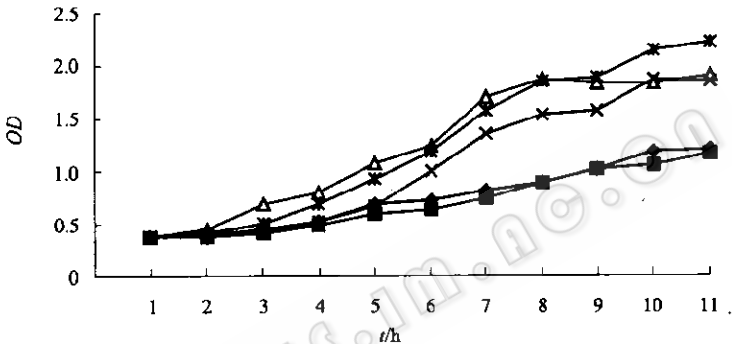


图 1 不同培养基对 HN01 生长速度的影响

◆ PA, ■ SM, ▲ YMA, × TY, → BSE

2.1.2 USDA110 的培养基比较试验：本实验测定了 USDA110 在 TY、YMA、SM 和 BSE 中生长的 OD 值，并绘制曲线（图 2）。由图可见：USDA110 在 BSE 中的生长速度远快于 TY 和 YMA，在 YMA 中生长缓慢，在 SM 中的生长速度最慢，几乎不长。USDA110 在 TY 和 BSE 中生长的比较测定结果表明，USDA110 在 TY 和 BSE 中生长的代时分别为 7.8h 和 6.0h，在 BSE 中生长速度更快。

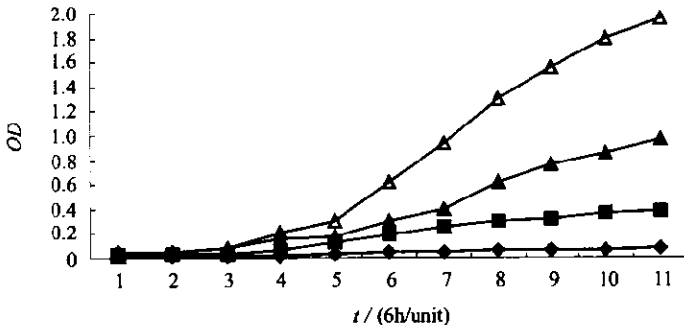


图 2 不同培养基对 USDA110 生长速度的影响

◆ SM, ■ YMA, ▲ TY, → BSE

2.2 培养基优化

2.2.1 碳源优化试验：鉴于根瘤菌的常规培养基 YMA 不适于慢生菌 USDA110 生长，

本研究对其进一步优化。供试碳源的比较测定结果见图 3，由图可见：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，52h 后，USDA110 在葡萄糖中的 OD 值达到 1.05，在甘露醇中却只有 0.68，所以选葡萄糖作为进一步优化的碳源。

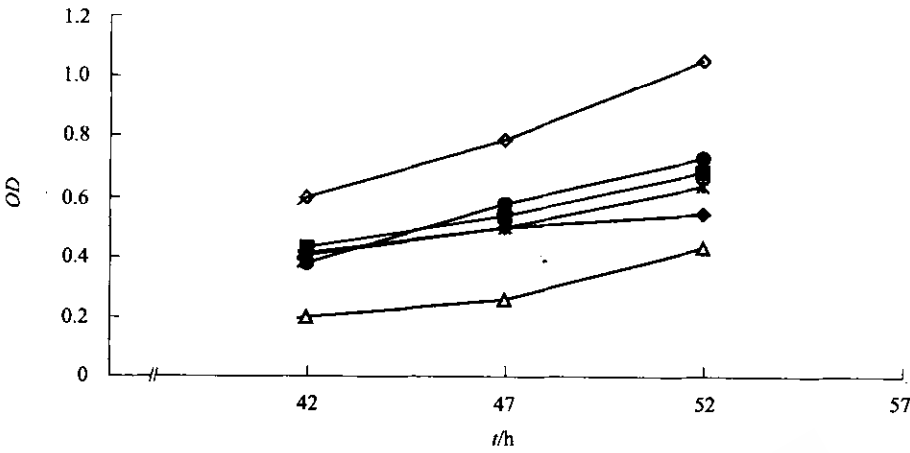


图 3 USDA110 在供试碳源中的 OD 值

◆ 蔗糖, ■ 甘露醇, ▲ 乳糖, ○ 葡萄糖, ★ 甘油, ● 甘油+蔗糖

2.2.2 $L_9(3^4)$ 优化结果分析: 本实验采用 $L_9(3^4)$ 正交设计方案 (表 1) 进一步优化, 结果表明: USDA110 在 3 号配方的培养基中生长速度最快 (表 1)。表 2 的极差分析结果表明: USDA110 在优化培养基中培养时, 4 种营养成分对其生长速度影响的顺序是: 葡萄糖 (A) > 酵母粉 (B) > K_2HPO_4 (C) > $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D), 最佳表现组合为 A1B3C1D3, 即葡萄糖 15g, 酵母粉 4g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g 为最佳组合。经进一步方差分析表明, 葡萄糖与酵母粉两因素的影响达极显著水平, K_2HPO_4 和 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 影响较小。优化培养基的成分为: 葡萄糖 15g, 酵母粉 4g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1 g, $CaCl_2$ 0.05g, Rh 液 4mL。

表 1 正交设计及结果

实验号	因素 (g)				实验结果: OD 值	
	A 葡萄糖	B 酵母粉	C K_2HPO_4	D $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	第 1 次	第 2 次
1	1 (15)	1 (2)	1 (0.5)	1 (0.05)	0.963	0.913
2	1 (15)	2 (3)	2 (0.8)	2 (0.1)	1.035	1.072
3	1 (15)	3 (4)	3 (1)	3 (0.2)	1.062	1.108
4	2 (20)	1 (2)	2 (0.8)	3 (0.2)	0.819	0.817
5	2 (20)	2 (3)	3 (1)	1 (0.05)	0.822	0.91
6	2 (20)	3 (4)	1 (0.5)	2 (0.1)	0.963	0.977
7	3 (25)	1 (2)	3 (1)	2 (0.1)	0.424	0.365
8	3 (25)	2 (3)	1 (0.5)	3 (0.2)	0.716	0.78
9	3 (25)	3 (4)	2 (0.8)	1 (0.05)	0.716	0.75

表 2 $L_9(3^4)$ 培养基优化实验结果的极差分析表

	A	B	C	D
k_1	1.073	0.760	0.966	0.915
k_2	0.931	0.960	0.932	0.833

续表 2

	A	B	C	D
k_3	0.718	1.000	0.822	0.973
R	0.255	0.240	0.144	0.058
最优水平	A1	B3	C1	D3
因素主次顺序	A>B>C>D			

2.2.3 优化培养基的验证：优化培养基验证试验在培养 36h 后测定的优化培养基和正交试验 3 号培养基的 OD 值分别为 1.228 和 1.186，而对照 YMA 只有 0.64，结果表明优化培养基和 3 号培养基的效果相当，都优于 YMA。

2.3 供试菌在不同剂型中的存活率测定

2.3.1 固体剂型存活率的测定：本研究分别测定了两种供试菌在草炭、蛭石和珍珠岩载体中的存活率，实验结果汇列于表 3。由表可见：在草炭载体中，HN01 的活菌数前 15d 有较大的增长，菌数可达到初始的 4.6 倍以上，然后菌数开始下降，一个月后菌数恢复到初始状态，前 3 个月的存活率较高，但超过 3 个月后，死亡率急剧上升，第 3 个月存活率为 22.86%，但第 4 个月只有 5.81%。USDA110 在草炭中的增长速度较慢，但是持续时间较长，一个月后为最初的 1.5 倍左右，到 2 个月后，菌数下降到初始菌数，死亡速度也较 HN01 缓慢，存放 4 个月的存活率为 15.75%，蛭石剂型只有 1.24%，珍珠岩剂型仅为 0.55%，5 个月后草炭剂型的存活率只有 4.61%。在 3 种供试载体中，草炭要优于蛭石，蛭石又优于珍珠岩。

表 3 HN01 和 USDA110 在固体剂型中的存活率 (%)

供试菌株	剂型	7d	15d	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月
HN01	草炭	220.00	461.43	91.43	87.14	22.86	5.81	0.82	0.45
	蛭石	13.93	1.74	1.26	1.03	0.66	0.51	0.41	0.28
	珍珠岩	21.65	2.06	1.64	1.36	0.31	0.06	0.05	0.02
USDA110	草炭	177.27	213.64	145.45	104.55	43.64	15.75	4.61	1.24
	蛭石	23.00	10.27	5.23	3.63	1.53	1.24	0.77	0.23
	珍珠岩	22.39	14.44	4.75	3.12	1.13	0.55	0.3	0.05

2.3.2 液体剂型存活率的测定：本研究测定了供试根瘤菌在两种液体剂型中的存活率，结果见表 4。由表可见：两种供试菌在保存期内的存活率和活菌数都较高，氮气或真空对存活率没有明显的影响，其中 HN01 4 个月后液体 1 和液体 2 的存活率分别为 9.4% 和 9.6%，5 个月之后存活率为 5% 和 5.4%；USDA110 4 个月后液体 1 和液体 2 的存活率分别为 12.2% 和 11.7%，5 个月之后存活率仍有 5.0% 和 4.1%。本研究结果表明：浓缩液体剂型很有推广应用前景。

表 4 HN01 和 USDA110 浓缩液体剂型存活率 (%)

供试菌株	剂型	7d	15d	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月
HN01	液体 1 (氮气)	91.8	78.3	58.6	23.3	12.6	9.4	5.0	2.6
	液体 2 (真空)	93.3	68.3	33.9	33.9	19.4	9.6	5.4	3.3
USDA110	液体 1 (氮气)	95.7	77.7	49.3	27.8	20.6	12.2	5.0	2.4
	液体 2 (真空)	99.1	84.2	60.0	31.3	21.2	11.7	4.1	2.9

2.3.3 冻干菌剂存活率的测定：本研究测定了两种供试菌在两种冻干剂型中的活菌数，并比较了不同保存温度对活菌数的影响，结果见表 5。由表可见：由于供试菌在制作菌

剂的过程中大部分细胞死亡, HN01 经常规冻干后的存活率仅为 18.51%, 液氮冻干后稍高, 为 33.86%。USDA110 直接冻干后的存活率为 22.04%, 液氮冻干后的存活率为 32.59%, 相比之下液氮冻干法制作的菌剂绝对活菌数稍高, 保存过程中的存活率也高于常规冻干。本研究结果还表明: 冻干菌剂的保存温度对存活率有明显的影响, 以-20℃最好, 4℃次之, 室温存放最差。

表 5 HN01、USDA110 冻干剂型存活率

菌株	剂型	冷冻后	7d	15d	1月	2月	3月	4月	5月	6月
HN01	常规 (4℃)	18.51	8.30	6.14	2.54	1.38	0.94	0.54	0.41	0.19
	常规 (-20℃)	18.51	18.42	16.93	12.78	11.50	8.55	6.37	3.96	0.37
	液氮 (4℃)	33.86	9.04	4.29	1.37	0.25	0.16	0.09	0.05	0.03
	液氮 (-20℃)	33.86	22.87	18.42	17.52	16.14	8.91	6.37	2.18	0.35
USDA110	常规 (4℃)	22.04	1.40	0.75	0.32	0.20	0.06	0.05	0.03	0.02
	常规 (-20℃)	22.04	19.83	18.46	13.09	7.99	3.83	2.47	1.83	0.67
	液氮 (4℃)	32.59	22.20	14.38	3.14	1.24	0.44	0.31	0.07	0.05
	液氮 (-20℃)	32.59	29.92	25.70	24.88	15.84	6.61	4.71	2.89	1.25

3 讨论

YMA 是根瘤菌的常规培养基, 大多数的根瘤菌都能在 YMA 上生长, 但有些菌株尤其是慢生根瘤菌在 YMA 上生长缓慢。由于 YMA 是半合成培养基, 大规模生产时, 成本较高。本研究筛选到的 BSE 培养基优于 YMA, 且成本低廉, 适用于大规模的工业发酵。

考虑到在一般实验中配制 BSE 培养基较为麻烦和豆芽供应的不确定性与季节性, 本研究以 YMA 为基础又筛选到适用于培养慢生菌的优化培养基, 并证明葡萄糖和酵母粉对生长速度的影响达到极显著水平。

在供试剂型存活率的测定结果中, 发现在室温下经 3 个月存放后草炭菌剂的存活率急剧下降, 原因可能与武汉 6 月开始入夏的高温有关。本研究结果也表明: 虽然蛭石菌剂的存活率比草炭菌剂略低, 但由于原料价格低廉, 运输方便, 可在只需短期保存时用于代替草炭。本研究中珍珠岩的存活率很低, 与 Temprano (2002) 报道的结果不一致, 可能是由于 pH 变化了, 所以产生了不利于根瘤菌的碱性环境, 因为在保存过程中发现载体变成黑色, 测定其 pH 为 8.85, 而最初测定的 pH 是 6.58。

浓缩液体剂型具有生产工艺简单、菌数高、体积小和运输方便等优点, 且存活率较高, 其 4℃的保存条件在大多数农村乡镇也不难实现, 应当很有发展前景。

参 考 文 献

[1] Fred E B, Baldwin I L, McCoy E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: University of Wisconsin Press, 1932.
[2] Brockwell J, Bottonley P J. Soil Biol and Biochem. 1995, 27: 683 ~ 697.
[3] Rodriguez-Navarro D N, Temprano F, Orvire R. Soil Biol and Biochem, 1991, 23: 375 ~ 379.
[4] 刘惠琴, 宁国赞, 管南珠. 土壤通报, 1994, 24 (3): 144 ~ 145.
[5] Temprano F J, Albareda M, Camacho M, et al. Int Microbiol, 2002, 5: 81 ~ 86.
[6] 李友国, 李 杰, 刘墨青, 等. 高技术通讯, 2000, 10 (5): 1 ~ 7.
[7] 缪礼鸿, 马向东, 周俊初. 华中农业大学学报, 2002, 21 (2) .117 ~ 122.
[8] 北京大学数学力学系概率统计组编. 正交设计法. 北京: 石油化学工业出版社, 1976.
[9] 周季维. 生物统计学入门. 昆明: 云南人民出版社, 1985.