

文章编号:1001-1498(2005)02-0177-06

相思根瘤菌和解磷菌培养基优化及解磷能力研究

尚军红¹, 康丽华^{1*}, 罗玉萍², 江业根¹, 马海宾¹

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 研究绘制了相思根瘤菌 MZ 菌株和解磷菌 217 菌株在 4 种培养基中的 OD 值生长曲线, 结果表明: 它们都能在 BSE 培养基中较好的生长; 对 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的常规培养基进行优化, 获得了它们的优化培养基, 进一步绘制的生长曲线证明了优化培养基更利于菌株的生长, 且活菌数更多。217 解磷能力的研究也表明: 菌体数量与 pH 值、解磷强度之间有着密切的关系。

关键词: 相思; 根瘤菌; 解磷细菌; 培养基优化; 解磷能力

中图分类号: S718.83 **文献标识码:** A

Medium Optimization of *Acacia Rhizobia* and *Phosphobacteria* and the Study of Phosphate-dissolving Ability

SHANG Jun hong¹, KANG Li-hua¹, LUO Yu ping², JIANG Ye-gen¹, MA Hai-bin¹

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China)

Abstract: The growth curves of MZ rhizobium and 217 phosphobacteria were drawn in four media in this study. The results showed that these two strains could both grow well in BSE medium. Based on the conventional media, the optimized media of MZ rhizobia and 217 phosphobacteria were obtained from orthogonal tests. Furthermore, the optimized media were testified to be more suitable for the growth of both of the strains, with more live bacteria, by the growth curves got afterwards. The tight relationship between pH level, phosphate-dissolving and bacterial growth ability was also discussed in the study on the phosphate-dissolving ability.

Key words: *Acacia*; rhizobia; phosphobacteria; media optimization; phosphate-dissolving ability

近年来,我国广泛引进澳大利亚的优良速生相思属(*Acacia* Milld.)树种,引种试验表明:相思(*Acacia* spp.)在我国热带、南亚热带地区具有广阔的推广前景^[1]。相思作为豆科(Leguminosae)树种,其共生固氮作用日益受到重视。已有研究表明:在大叶相思(*Acacia auriculaeformis* A. Cunn.)和马占相思(*Acacia mangium* Willd.)吸收的氮素中,52%~66%来自根瘤菌的固氮作用^[2,3]。目前世界上一些国家如澳大利亚、菲律宾等已进行相思生物固氮的研究,但这些研究多集中在固氮共生体间的相互作用方

面^[4],对在共生体中发挥固氮作用的相思根瘤菌的优化培养,则未有报道,然而这是相思根瘤菌肥料生产的基础,因此,本文着重研究了相思根瘤菌优化培养基配方,该研究结果为实现相思根瘤菌的高密度发酵培养提供了基础和依据。

磷是植物生长发育所必需的重要营养元素之一,但是土壤中的磷绝大部分呈有机或无机磷化物状态,植物不能直接吸收,解磷菌能将植物难以吸收利用的磷转化为植物可吸收利用的磷^[5],因此,利用微生物的解磷作用弥补土壤磷素营养的不足,已成

收稿日期:2004-07-05

基金项目:国家十五攻关项目“南方主要速生阔叶树种新品种选育及培育技术”(2002BA515B02)和国家863计划“新型多功能林用微生物肥料关键技术研究”(2003AA2411533)部分内容

作者简介:尚军红(1978—),男,安徽蚌埠人,南昌大学在读硕士生。

*通讯作者。

为当前国内外非常关注的研究课题,但对于解磷菌发酵条件的研究报道却不多见。本研究对相思根瘤菌和解磷菌进行了培养基优化,为研制具有固氮、解磷功能的微生物肥料提供了条件和基础。

1 实验材料与方法

1.1 供试菌种

相思根瘤菌: MZ 菌株,由本课题组分离于广东省江门市鹤山马占相思的根瘤。

解磷菌巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* de Barry): 217 菌株,来源于广东省微生物研究所,由本课题组保存。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 根瘤菌采用 YMA 培养基^[6]; 解磷菌采用牛肉膏蛋白胨培养基^[7]。

1.2.2 发酵培养基 供试培养基有 TY、YMA、PA、BSE(豆芽汁培养基)^[6]、牛肉膏蛋白胨合成培养基^[7]和解无机磷细菌培养基^[8]。

1.3 菌种活化

1.3.1 根瘤菌的活化 根瘤菌在斜面培养基上 30 培养 4 d 后,接一环到 YMA 培养基(250 mL 的三角瓶装 50 mL 培养基)中,在 28^o、128 r·min⁻¹ 的摇床中震荡培养 4 d。

1.3.2 解磷菌的活化 解磷菌在斜面培养基上 30 培养 3 d 后,接一环到牛肉膏蛋白胨培养基(250 mL 的三角瓶装 50 mL 培养基)中,在 28^o、130 r·min⁻¹ 的摇床中震荡培养 3 d。

1.4 发酵培养

1.4.1 根瘤菌发酵培养 将培养好的 YMA 培养基,按照 4% 接种量接入发酵培养基(250 mL 三角瓶装 150 mL 培养基)中,在 28^o、128 r·min⁻¹ 的摇床中培养。

1.4.2 解磷菌发酵及解磷能力测定的培养 将培养好的牛肉膏蛋白胨培养基,按照 3% 接种量接入发酵培养基(250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基)中,在 28^o、130 r·min⁻¹ 的摇床中培养。

1.5 不同培养基的 OD 值比较

用 Spectronic601 分光光度计测定不同培养基中根瘤菌、解磷菌在不同培养时间 580 nm 下的 OD 值,绘制 2 种菌株在 BSE、PA、TY 和常规培养基中生长的 OD 值曲线。

1.6 培养基的优化

在常规培养基的基础上对 MZ 根瘤菌和 217 解

磷菌的培养基进行优化,先进行碳源筛选,接着采用正交表 L₉(3⁴) 安排实验^[9],数据采用 Genwin32 软件分析。

1.7 菌株在不同培养基中的生长曲线

采用平板活菌计数法计算出不同培养时间的活菌数,绘制出 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的生长曲线。平板培养温度为 30^o。

1.8 解磷能力测定

217 解磷菌的解磷能力测定方法见文献[10]。

2 结果与分析

2.1 培养基的选择

2.1.1 根瘤菌在不同培养基中生长情况的比较 根据 MZ 根瘤菌在 BSE、YMA、PA 和 TY 培养基中的生长情况所测得的 OD 值绘制出 OD 值曲线(图 1)。由图 1 可见,MZ 根瘤菌在 BSE 和 TY 培养基中生长速度较快,在 YMA 培养基中生长速度却较慢。

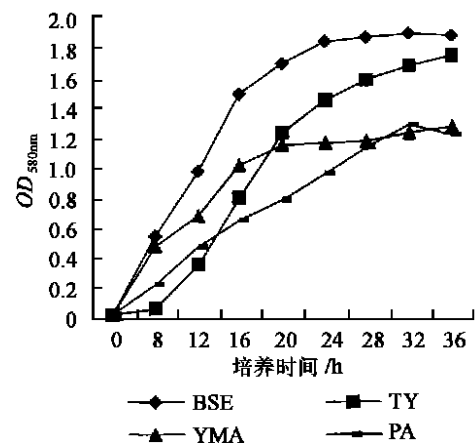


图 1 不同培养基对 MZ 根瘤菌生长的影响

2.1.2 解磷菌在不同培养基中生长情况的比较 根据 217 解磷菌在 BSE、PA、TY 和牛肉膏蛋白胨合成培养基中生长情况所测得的 OD 值绘制出 OD 值曲线(图 2)。由图 2 可见,217 解磷菌在 BSE 培养基和牛肉膏蛋白胨合成培养基中的生长速度较在 TY 和 PA 培养基中快,其中在 BSE 培养基中生长最好,其 OD 值高达 2.0。

2.2 培养基优化

鉴于 MZ 根瘤菌不能在根瘤菌的常规培养基 YMA 中较好的生长和为了获得较好的 217 解磷菌合成培养基,本研究对这两株菌株的培养基进行了优化。

2.2.1 碳源的筛选 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,故碳源的选择对微生物培养至关重要。本研究比较了葡萄糖、蔗

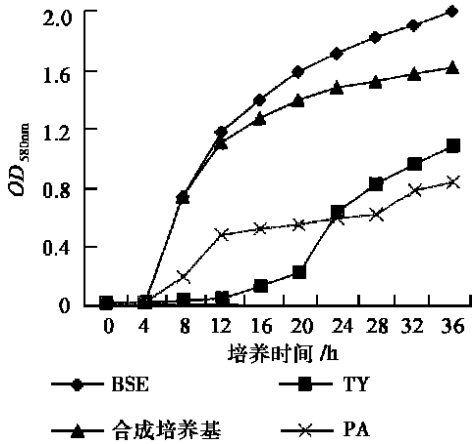


图 2 不同培养基对 217 解磷菌生长的影响

糖、甘露醇、乳糖、甘油、麦芽糖和甘油 + 蔗糖等 7 种常见碳源对 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌生长的影响, 实验结果见图 3、4。从图 3、4 中可看出, 不同碳源对 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌生长的影响是不同的。MZ 根瘤菌在麦芽糖为碳源的培养基中生长最好, 其 OD 值为 1.628, 在甘油 + 蔗糖为碳源的培养基中生长较差, 其 OD 值仅为 1.194; 而 217 解磷菌在以葡萄糖为碳源的培养基中生长最好, 其 OD 值高达 2.033, 在乳糖为碳源的培养基中生长最差, 故选麦芽糖作为 MZ 根瘤菌培养基进一步优化的碳源, 而

选葡萄糖作为 217 解磷菌培养基进一步优化的碳源。

2.2.2 正交设计优化结果分析 在碳源筛选的基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计方案对 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的培养基进一步优化, 试验结果 (表 1) 表明: MZ 根瘤菌在 6 号培养基中生长速度最快, 而 217 解磷菌在 2、3 号培养基中生长速度较快。MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的 $L_9(3^4)$ 培养基优化极差分析结果 (表 2) 表明: MZ 根瘤菌在优化培养时, 4 种营养成分对其生长速度影响的顺序是: 酵母粉 (B) > K_2HPO_4 (C) > 麦芽糖 (A) > $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D), 最佳组合为 $A_1B_3C_1D_1$, 即麦芽糖 10 g, 酵母粉 3 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, 而 217 解磷菌在优化培养时, 4 种营养成分对其生长速度影响的顺序是: 酵母粉 (B) > 葡萄糖 (A) > $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D) > K_2HPO_4 (C), 最佳组合为 $A_1B_2C_2D_3$, 即葡萄糖 10 g, 酵母粉 2 g, K_2HPO_4 0.8 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g。经过 $L_9(3^4)$ 培养基优化方差分析表明: 麦芽糖, 酵母粉和 K_2HPO_4 三个因素对 MZ 根瘤菌的影响均达极显著水平, 葡萄糖, 酵母粉两个因素对 217 解磷菌的影响均达极显著水平, 而 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对 217 解磷菌的影响达显著水平。

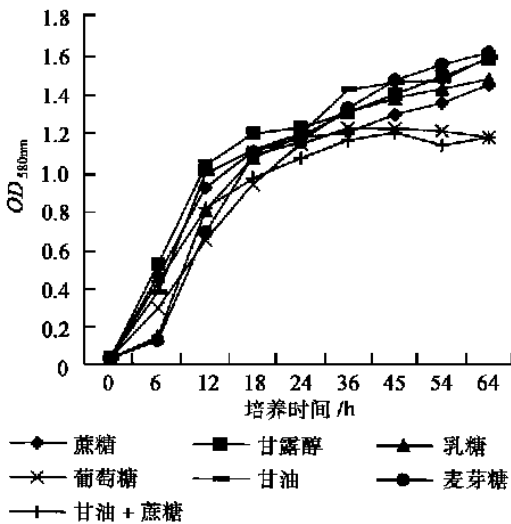


图 3 不同碳源对 MZ 根瘤菌生长的影响

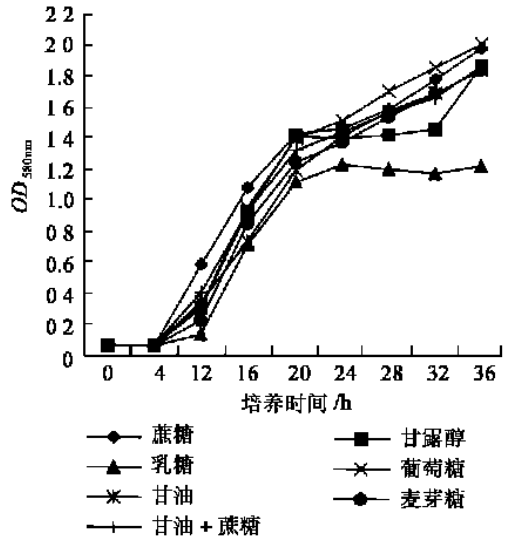


图 4 不同碳源对 217 解磷菌生长的影响

表 1 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的 $L_9(3^4)$ 正交设计及实验结果

| 实验号 | 因素与水平 | | | | OD 值 | | | |
|-----|--------------------------|------------|-------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | MZ:麦芽糖 217:葡萄糖 (A) | 酵母粉 (B) | K_2HPO_4 (C) | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D) | 第 1 次 | | 第 2 次 | |
| | | | | | MZ | 217 | MZ | 217 |
| 1 | 1(10 g) | 1(1 g) | 1(0.5 g) | 1(0.05 g) | 0.536 | 0.739 | 0.889 | 1.338 |
| 2 | 1(10 g) | 2(2 g) | 2(0.8 g) | 2(0.1 g) | 0.680 | 1.145 | 0.980 | 1.597 |
| 3 | 1(10 g) | 3(3 g) | 3(1.0 g) | 3(0.2 g) | 0.877 | 1.069 | 1.246 | 1.588 |
| 4 | 2(15 g) | 1(1 g) | 2(0.8 g) | 3(0.2 g) | 0.281 | 0.789 | 0.708 | 1.292 |
| 5 | 2(15 g) | 2(2 g) | 3(1.0 g) | 1(0.05 g) | 0.581 | 0.943 | 1.055 | 1.450 |
| 6 | 2(15 g) | 3(3 g) | 1(0.5 g) | 2(0.1 g) | 0.981 | 1.008 | 1.283 | 1.510 |
| 7 | 3(20 g) | 1(1 g) | 3(1.0 g) | 2(0.1 g) | 0.235 | 0.531 | 0.679 | 1.028 |
| 8 | 3(20 g) | 2(2 g) | 1(0.5 g) | 3(0.2 g) | 0.903 | 1.010 | 1.228 | 1.513 |
| 9 | 3(20 g) | 3(3 g) | 2(0.8 g) | 1(0.05 g) | 0.950 | 0.837 | 1.239 | 1.345 |

表 2 MZ 根瘤菌和 217 解磷菌的 $L_9(3^4)$ 培养基优化极差与方差分析

| 项目 | MZ:麦芽糖 217:葡萄糖(A) | | 酵母粉(B) | | K_2HPO_4 (C) | | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (D) | |
|------|----------------------|---------|---------------------|-------|----------------|-------|--------------------------|-------|
| | MZ | 217 | MZ | 217 | MZ | 217 | MZ | 217 |
| | 各水平的影响值 | 1 0.698 | 0.984 | 0.351 | 0.686 | 0.807 | 0.919 | 0.689 |
| | 2 0.614 | 0.913 | 0.721 | 1.033 | 0.637 | 0.924 | 0.632 | 0.894 |
| | 3 0.696 | 0.792 | 0.936 | 0.971 | 0.564 | 0.847 | 0.687 | 0.956 |
| 极差 R | 0.084 | 0.192 | 0.585 | 0.347 | 0.243 | 0.077 | 0.057 | 0.117 |
| 最优水平 | A1 | A1 | B3 | B2 | C1 | C2 | D1 | D3 |
| 主次顺序 | MZ | | B** > C** > A** > D | | | | | |
| | 217 | | B** > A** > D* > C | | | | | |

注:经过方差分析: **为极显著; *为显著。

2.2.3 优化培养基的验证实验 对正交实验得出的优化培养基与它们的常规培养基及正交实验中生长速度最快的 6、2、3 号培养基进行验证,结果见图 5、6。由图 5、6 可见,MZ 根瘤菌培养 32 h 后在优化培养基和 6 号培养基中的生长速度相近,OD 值分别是 1.601 和 1.549,均高于常规培养基 YMA 的 1.150,同样 217 解磷菌在优化培养基和 2、3 号培养基中的生长速度相近,都快于它在牛肉膏蛋白胨培

培养基中的生长速度。MZ 根瘤菌、217 解磷菌的生长曲线(图 7、8)更进一步说明了筛选出来的优化培养基优于常规培养基。由图 7、8 可见,MZ 根瘤菌在优化培养基中的菌体数量为 8.2×10^9 个 $\cdot mL^{-1}$,是 YMA 培养基的 3.64 倍;217 解磷菌在优化培养基中的菌体数量为 5.2×10^9 个 $\cdot mL^{-1}$,是牛肉膏蛋白胨合成培养基的 1.13 倍。

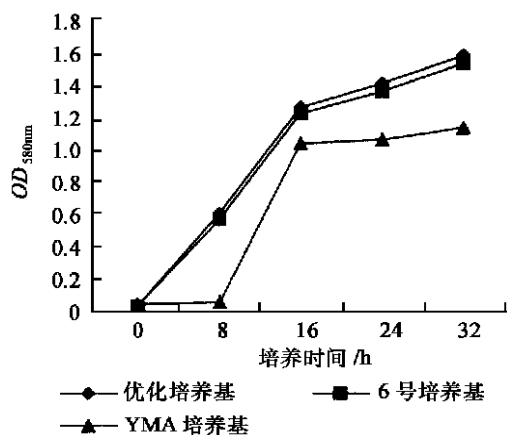


图 5 MZ 根瘤菌的优化培养基验证试验

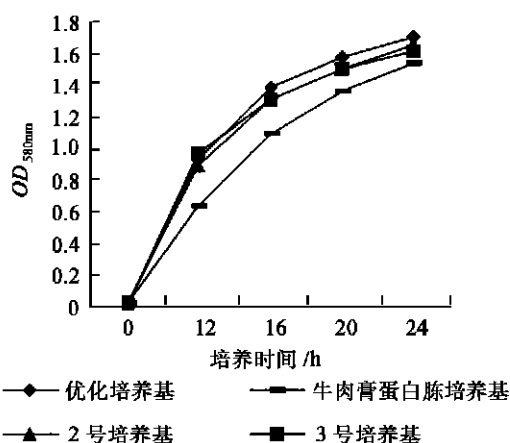


图 6 217 解磷菌的优化培养基验证试验

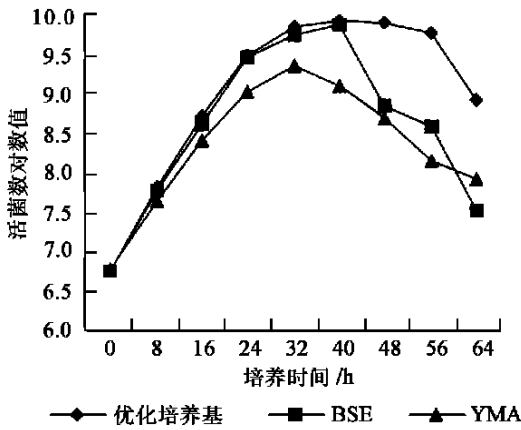


图 7 MZ 根瘤菌在不同培养基中的生长曲线

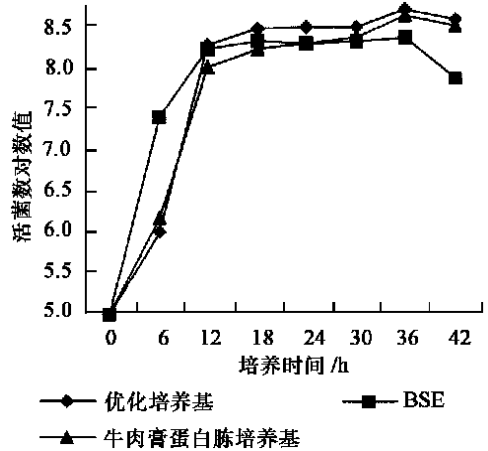


图 8 217 解磷菌在不同培养基中的生长曲线

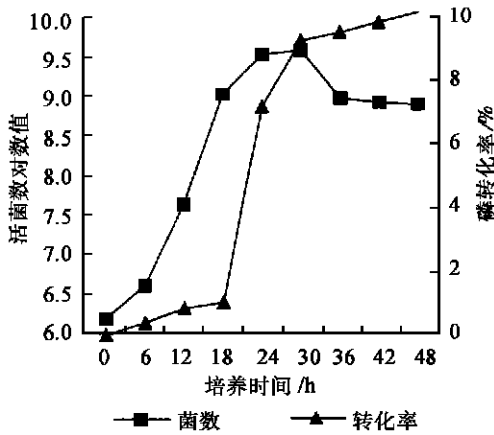


图 9 菌体数量与磷转化率之间的关系

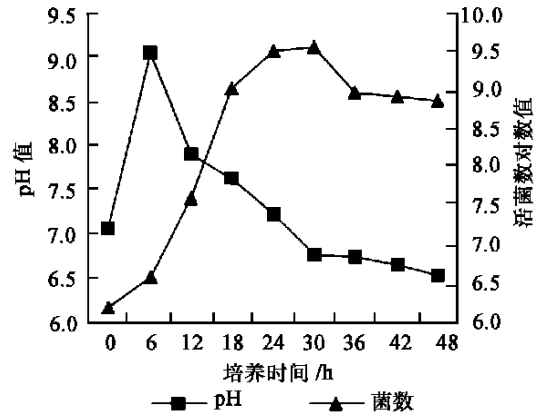


图 10 菌体数量与 pH 值之间的关系

2.3 解磷能力的测定

2.3.1 固体解磷能力测定结果 对 217 解磷菌液作适当的稀释接种在无机磷固体平板培养基上, 30 培养 8 h 长出典型的单菌落, 24 h 后出现明显的黄色透明圈。通过观察平板透明圈进行解磷能力的测定, 这是一种简单而方便的定性测定磷细菌的方法。结果表明: 217 解磷菌的菌落和透明圈平均直径分别为 1.7 ~ 3.2 mm 和 3.7 ~ 8.0 mm, 透明圈与菌落直径之比高达 2.2 ~ 2.5。

2.3.2 菌体数量与磷转化率、pH 值之间的关系 217 解磷菌的菌体数量与磷转化率、pH 值三者之间的动态变化见图 9、10。从图 9、10 中可以看出, 解磷菌菌体数量和它的磷转化能力变化趋势基本一致, 当菌体数量增多时其磷转化率也增高, 最高磷转化率达 10.19%; 但解磷菌菌体数量与培养基中的 pH 值变化趋势正好相反, pH 值较高时其菌体数量较低。一般认为, 解磷菌在生长过程中产生各种有机酸, 这些有机酸能够降低培养液中的 pH 值, 与铁、

铝、钙、镁等离子结合, 从而使难溶性的磷酸盐溶解, 将其中的磷溶解释放出来。本实验的结果也证实了这一结论, 由此可见, 菌体数量与 pH 值、解磷强度之间有着密切的关系。

3 讨论

根瘤菌的常规培养基是 YMA 培养基, 大多数根瘤菌能在 YMA 培养基上较好的生长, 但有些菌株尤其是慢生根瘤菌在 YMA 培养基上生长缓慢。由于 YMA 培养基是半合成培养基, 用于大规模发酵生产时, 成本较高。本研究筛选到了 BSE 培养基优于 YMA 培养基, 且价格低廉, 同时又在 YMA 培养基的基础上获得了优化培养基, 这为实现相思根瘤菌的高密度发酵培养提供了基础和依据。

本研究的解磷能力实验表明: 217 解磷菌具有较强解磷能力, 其溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的效率高达 10.19%。关于解磷机制目前一般认为是与解磷菌分泌的各种有机酸有关。这些有机酸既能够降低 pH 值, 又可与 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子结合, 从而使难溶性磷酸

盐溶解。赵小蓉等^[11]和 Paul^[12]都发现了培养基中的菌体数量与 pH 值、解磷强度之间有着密切的关系,本研究通过对 pH、解磷转化率的动态研究也证实了这一事实。另外,还有报道解磷菌与根瘤菌或菌根菌配合使用,对发挥解磷功能和提高农作物的产量都具有很好的作用^[13,14]。总之,解磷菌和根瘤菌的应用前景巨大,作者将继续对解磷菌和根瘤菌作更深入的研究。

参考文献:

- [1] 洪菊生. 澳大利亚阔叶树研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 1993: 11 ~ 26
- [2] Peoples M B. Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Modulated Legumes in the Field[J]. ACIAR Monograph, 1989, 11: 76 ~ 78
- [3] Richardson A E, Peoples M B. The 9th Australian Nitrogen Fixation Conference[C]. Canberra: Australian Society Nitrogen Fixation, 1991: 124 ~ 125
- [4] Dart P. Role of symbiotic associations in nutrition of tropical acacias[J]. ACIAR proceedings: Advances in tropical acacia research, 1991, 11: 13 ~ 19
- [5] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001 (3): 7 ~ 11
- [6] 吴红慧, 周俊初. 大豆根瘤菌培养基的优化和剂型的比较研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004: 19 ~ 21
- [7] 张爱华, 陈育如, 杨启银, 等. 溶磷巨大芽孢杆菌培养条件的优化研究[A]. 第二届全国微生物肥料生产应用技术研讨暨产品展示会论文摘要集[C]. 中国无锡, 2003: 263 ~ 267
- [8] 李阜棣, 喻子牛, 何绍江, 等. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 130 ~ 131
- [9] 吴红慧, 周俊初. 大豆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
- [10] 万璐, 康丽华, 廖宝文, 等. 红树林根际解磷菌分离、培养及解磷能力的研究[J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 89 ~ 94
- [11] 赵小蓉, 林启美. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1 ~ 4
- [12] Paul N B, Sundara rao W V B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes [J]. Plant and Soil, 1971, 35: 127 ~ 132
- [13] Kucey R M N. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphate-dissolving *Penicillium bilaji* strain and with Vesicular-*Arbuscular mycorrhizal* fungi [J]. Appl Environ Micro, 1987, 53 (12): 2699 ~ 2703
- [14] Rice W A, Lupwayi N Z. Field evaluation of dual inoculation of alfalfa with *Sinorhizobium melioli* and *Pencillium bilaji* [J]. Canadian Journal of plant science, 2000, 80: 303 ~ 308