

陈 翠,陈丹丹,冯 清,等. 根际促生菌 D5A 菌株发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):516-518.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.149

# 根际促生菌 D5A 菌株发酵条件优化

陈 翠,陈丹丹,冯 清,陈祁怡,吴向华

(南京晓庄学院应用生态研究所,江苏南京 211171)

**摘要:**考察不同碳源、氮源、碳氮比、生长因子、温度、pH 值、装液量、转速、接种量、时间等参数对根际促生菌 D5A 菌株发酵的影响。结果表明,在装液量为 30 mL/250 mL 的三角瓶中,按 5% 接种量将 D5A 菌株接种到以 3% 葡萄糖为碳源、1.5% 牛肉膏为氮源、碳氮比为 2:1、生长因子为酵母粉、pH 值为 6 的培养基中,150 r/min、37 ℃ 培养 48 h,可发酵产生最大生物量。

**关键词:**根际促生菌;发酵;优化

**中图分类号:** S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0516-03

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PG-PR)是指自由生活在土壤或附生于植物根系的一类可促进植物生长及对矿质营养的吸收和利用,并能抑制有害生物的有益菌类<sup>[1]</sup>。PGPR 具有固氮、解磷、释钾、产生植物激素和分泌抗生素等能力,或具有其中之一的能力<sup>[2-3]</sup>。PGPR 对植物生长具有直接或间接促进作用。PGPR 的直接促进作用是指某些植物根际促生菌可合成对植物生长发育有直接作用的物质(如生长素等)以及改变土壤中某些无效元素的形态,使之有效化而利于植物吸收(如固氮、解磷等)<sup>[4-5]</sup>。对植物生长的间接作用是指某些植物根际促生菌抑制或减轻某些植物病害对植物生长发育和产量的不良影响<sup>[6-7]</sup>。接种 PGPR 普遍被认为是一种环境友好、经济有效的提高作物产量和品质的方法,应用前景广阔。本研究选择碳源、氮源、碳氮比、生长因子、温度、pH 值、装液量、转速、接种量、时间等参数,探索优化根际促生菌 D5A 菌株的发酵条件,旨在为工业化生产根际促生菌 D5A 菌株提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

根际促生菌 D5A 菌株克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)<sup>[8]</sup>由中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室惠赠。

### 1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[9]</sup>。

### 1.3 方法

1.3.1 碳源对 D5A 菌株生长的影响<sup>[10-11]</sup> 以牛肉膏蛋白胨培养基为基础,分别以 3% 糖蜜、3% 可溶性淀粉、3% 葡萄糖、3% 蔗糖、3% 玉米糁为碳源,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培

养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.2 氮源对 D5A 菌株生长的影响 以牛肉膏蛋白胨培养基为基础,以筛选出的最适碳源为碳源,分别以 1.5% 牛肉膏、1.5% 硫酸铵、1.5% 草酸铵、1.5% 蛋白胨、1.5% 氯化铵、1.5% 硫酸铁铵、1.5% 酵母膏为氮源,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.3 碳氮比对 D5A 菌株生长的影响 以牛肉膏蛋白胨培养基为基础培养基,以筛选出的最佳碳源、氮源为碳氮源,分别用 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 碳氮比,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.4 生长因子对 D5A 菌株生长的影响 以牛肉膏蛋白胨培养基为基础培养基,以筛选出的最佳碳氮比为碳氮比,分别用 2 020 μg/L 维生素 B<sub>2</sub>、2 020 μg/L 酵母粉、2 020 μg/L 叶酸为生长因子,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.5 pH 值对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最佳碳氮比、生长因子配制培养基,分别调节 pH 值至 5、6、7、8、9,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.6 温度对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最佳培养基配方配制培养基,按 2% 接种量分别于 28、37、42 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.7 装液量对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最佳培养基配方配制培养基,按 2% 接种量将 D5A 菌株分别接种到装液量为 30、50、80、100、150 mL 的 250 mL 培养基中发酵培养,于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.8 转速对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最适装液量、最适培养基配方配制培养基,按 2% 接种量接入 D5A 菌株,分别在 100、150、180 r/min 下于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.9 接种量对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最佳培养基配方配制培养基,分别按 1%、2%、5%、10%、20% 的接种量将 D5A 菌株分别接种到装液量为 30 mL/250 mL 的培养基中发酵培养,于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定发酵液生物量。

1.3.10 培养时间对 D5A 菌株生长的影响 以筛选出的最佳培养基配方配制培养基,按 5% 接种量将 D5A 菌株接种到

收稿日期:2015-04-29

基金项目:江苏省大学生创新项目(编号:201311460046X);江苏省“生态学”重点一级建设学科项目。

作者简介:陈 翠(1992—),女,江苏淮安人,硕士研究生,主要从事生物学研究。E-mail:1448405968@qq.com。

通信作者:吴向华,博士,副教授,主要从事微生物学教学与研究工作。E-mail:xhw610@163.com。

装液量为 30 mL/250 mL 的培养基中发酵培养,分别于 37 ℃ 培养 12、24、36、48、60、72 h,测定发酵液生物量。

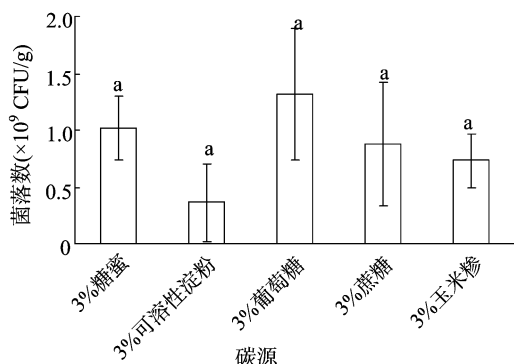
1.3.11 生物量的测定 按照稀释平板计数法<sup>[12]</sup>测定活菌总数。

1.3.12 数据统计 采用 SPSS 16.0 软件分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适碳源选择

由图 1 可知,葡萄糖作为碳源能获得最大生物量,其次是糖蜜、蔗糖、玉米糝,D5A 菌株在可溶性淀粉中生长状况最差。究其原因,可能是由于葡萄糖、蔗糖都属于速效性碳源,适合菌体大量生成,玉米糝、淀粉都属于缓释型碳源,需要分解为单糖后菌体才能大量生长。因此,选择葡萄糖作为最适碳源。



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

图1 碳源对D5A菌株生长的影响

### 2.2 最适氮源选择

由图 2 可知,D5A 菌株在牛肉膏中生长最好,但与硫酸铁铵差异不显著,但显著高于硫酸铵、蛋白胨、氯化铵。牛肉膏不仅可以作为氮源,而且在碳源不足时可补充碳源,也可提供微量元素,故选择牛肉膏为最适氮源。

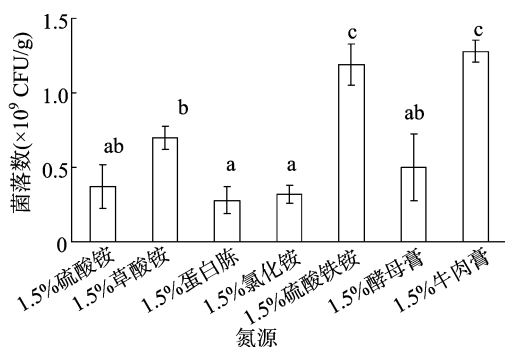


图2 氮源对D5A菌株生长的影响

### 2.3 最适碳氮比选择

以葡萄糖、牛肉膏作为碳氮源,分别按 1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 比例配制培养基,按 2% 接种量于 37 ℃ 连续培养 48 h,测定生物量。由图 3 可以看出,碳氮比为 2:1 时 D5A 菌株生长状况最好,其次为 1:1、1:3、5:1 比较差,且 2:1、1:1 组处理下菌株生物量与其他几组之间存在显著差异,故选用 2:1 为最佳碳氮比。

### 2.4 最适生长因子选择

以维生素 B、酵母粉、叶酸为生长因子,按 2% 接种量于

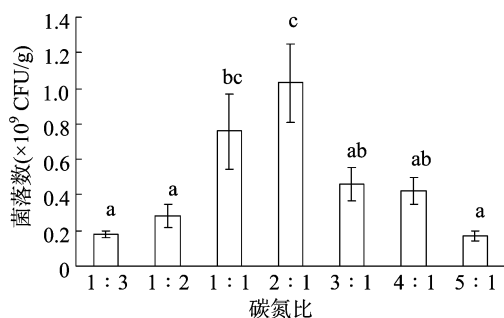


图3 碳氮比对D5A菌株生长的影响

37 ℃ 连续培养 48 h,由图 4 可以看出,不同生长因子下根际促生菌的发酵情况由好到差依次为:酵母粉 > 叶酸 > 维生素 B,且酵母粉与其 2 两组之间无显著差异,选用酵母粉为最佳生长因子。

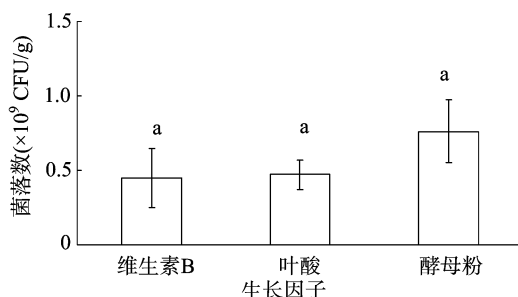


图4 生长因子对D5A菌株生长的影响

### 2.5 最适 pH 值选择

由图 5 可知,D5A 菌株在 pH 值为 6 时生长最好,其次是 pH 值为 9.5,在 pH 值为 7.8 时 D5A 菌株生长较差。pH 值为 6 处理下菌落数与 pH 值为 7.8 存在显著差异,因此选择 pH 值为 6 为最佳 pH 值。

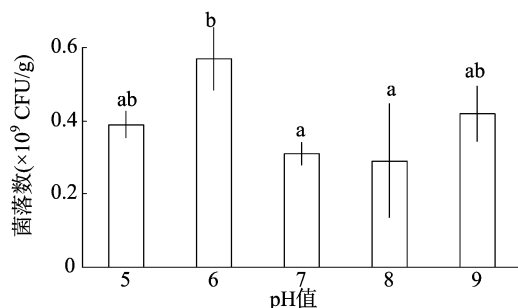


图5 pH值对D5A菌株生长的影响

### 2.6 最适温度的选择

由图 6 可知,37 ℃ 时菌株生长情况最好,其次是 42、28 ℃,但各温度处理之间无明显差异。菌株一般在 37 ℃ 时生长较好,本试验也说明了这点,温度过高或过低对酶都有一定影响,有可能导致酶失活,故选用 37 ℃ 为最佳发酵温度。

### 2.7 最适装液量的选择

由图 7 可知,D5A 菌株在 30 mL/250 mL 装液量处理下生长最好,其次是 50 mL/250 mL、100 mL/250 mL,较差的是 80 mL/250 mL、150 mL/250 mL,因此装液量选择 30 mL/250 mL 最佳。

### 2.8 转速对D5A菌株生长的影响

由图8可知,150 r/min转速处理下D5A菌株生长状态

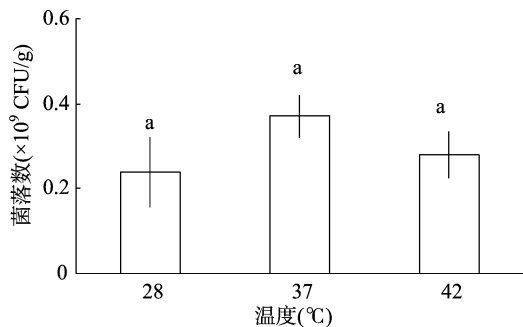


图6 温度对 D5A 菌株生长的影响

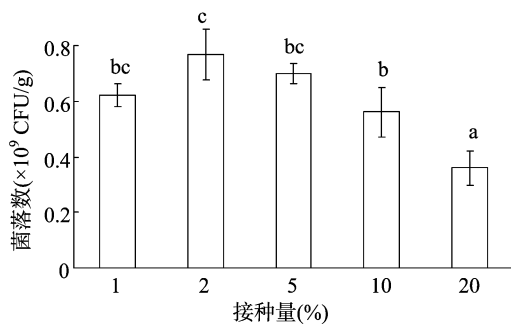


图9 接种量对 D5A 菌株生长的影响

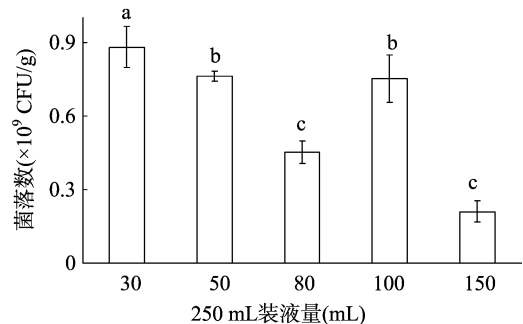


图7 装液量对 D5A 菌株生长的影响

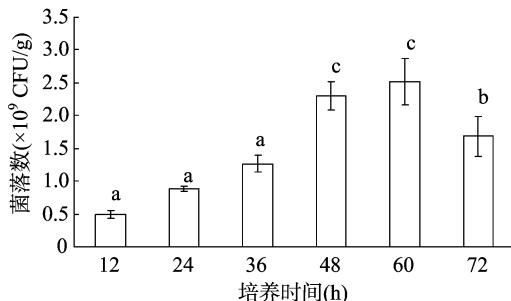


图10 培养时间对 D5A 菌株生长的影响

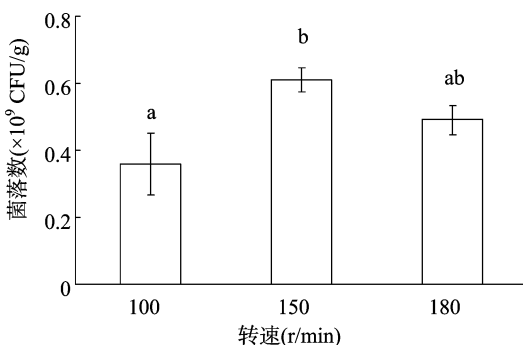


图8 转速对 D5A 菌株生长的影响

装液量、转速、接种量、发酵时间等单因子试验,获得根际促生菌的最适发酵条件是在牛肉膏蛋白胨培养基中,以3%葡萄糖为碳源、1.5%牛肉膏为氮源,碳氮比为2:1,生长因子为酵母粉,在37℃、pH值为6、装液量30 mL/250 mL、5%接种量、150 r/min条件下培养48 h,根际促生菌产量最高。

#### 参考文献:

- [1] 李 引. 红壤中花生根际促生菌的筛选鉴定及其应用[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [2] Karakurt H, Kotan R. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya) [J]. Turkish Journal of Biology, 2011, 35(3): 283–291.
- [3] Weyens N, van der Lelie D, Taghavi S. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation [J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(10): 591–598.
- [4] 沈崇灵. 法理学[M]. 北京:北京大学出版社,2014.
- [5] 康贻军, 程 洁, 梅丽娟, 等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. 应用生态学报, 2010, 21(1): 232–238.
- [6] 黄晓东, 季尚宁, Bernard Click, 等. 植物促生菌及其促生机理[J]. 现代化农业, 2002(6): 7–15.
- [7] 梁建根, 施跃峰, 竺利红. 植物根围促生细菌作用机制的研究[J]. 现代农业科技, 2008(17): 133–135.
- [8] 张国壮. 产ACC脱氧酶根际促生菌的分离鉴定及其接种对小麦乙烯代谢和生长的效应[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.
- [9] 沈 萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2013.
- [10] 马海林, 邢尚军, 刘方春, 等. 樱桃根际促生细菌YT3的培养基及发酵条件优化[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(5): 126–129.
- [11] 洪 鹏, 安国栋, 胡英美, 等. 解淀粉芽孢杆菌HF-01发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569–578.
- [12] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,2010.

最佳,150、180 r/min处理下菌落数差异性较小,但150 r/min与100 r/min之间存在显著差异,故转速选择150 r/min对D5A菌株进行培养。

#### 2.9 接种量对 D5A 菌株生长的影响

由图9可知,随着接种量的增加,菌株的生长情况变好,但是当接种量增长到20%时菌落数明显减少。5%、10%接种量处理下菌株生长较佳,且两者之间无显著差异,10%接种量与20%接种量之间差异显著。考虑到经济因素,选择5%接种量更为合适。

#### 2.10 培养时间对 D5A 菌株的影响

由图10可知,随着培养时间的增加,菌株的生长状态逐渐变好,但当培养时间增加为72 h时,菌落数有所下降。培养时间为48、60 h时菌株的生长状态最好,且两者之间无显著差异。培养时间为12 h时菌株生长情况最差。综合考虑,选择48 h培养时间最为合适。

### 3 结论

本试验设置碳源、氮源、碳氮比、生长因子、温度、pH值、