

一株磷细菌发酵条件的研究

唐勇 陆玲 杨启银 蒋洁蓉 陈育如

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

[摘要] 对一株磷细菌的发酵条件进行了研究. 其中, 单因素发酵试验表明, 碳源以 2% 的淀粉最佳, 氮源以 0.1% 的 NH_4Cl 最好. 最适培养温度为 37℃, 最适初始 pH 为 7.0, 最佳振荡频率为 200 r/min, 装液量为 30/250 mL, 并进行了中试罐发酵分析, 测定了罐发酵过程中的菌量、pH、还原糖及总氮的变化情况.

[关键词] 解磷细菌 发酵 发酵条件

[中图分类号] Q93-335; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)01-0083-05

0 引言

磷是植物生长发育所必需的重要营养元素之一. 虽然土壤含磷不少, 但其中大多(约 99%) 是处于植物不能吸收利用的有机和无机磷化物状态. 只有剩余不足 1% 是处于植物可直接利用的有效状态的. 磷肥的施用虽可满足植物高产对磷的需要, 但由于土壤的固定作用, 磷肥的利用率一般不超过 20%^[1]. 因而研究土壤中磷素的有效化过程对提高土壤肥力有重要意义. 由于微生物在土壤中磷素的转化过程中起主导作用, 所以利用解磷微生物来分解土壤难溶性磷素日益引起重视.

对于磷细菌的研究可以追溯到本世纪初, 1935 年前苏联研究者蒙基娜从土壤中分离到一种解磷巨大芽孢杆菌分解核酸和卵磷脂的能力很强^[2]. 此后又有许多有关磷细菌解磷研究的报道. 南京师范大学生命科学学院微生物实验室对自己筛选的一株磷细菌的一些理化特性和解磷效果做了初步的研究, 发现该菌有良好的解磷能力. 为了让该菌早日实现工业化生产, 使其作为解磷微生物肥料应用于农业生产中, 我们对其进行了摇瓶和 70 L 中型发酵罐液体发酵的研究.

1 材料和方法

1.1 菌种

磷细菌 *A. phosphaticum*), 系本实验室筛选之菌种.

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

牛肉膏蛋白胨培养基^[3], 解无机磷细菌培养基.

1.2.2 发酵培养基

培养基 B.

收稿日期 2000-07-14

基金项目 江苏省教育委员会基金(1999SWX0000SJ5)

作者简介 唐勇, 1976—, 南京师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事微生物方面的学习与研究.

1.3 仪器和设备

50 mL 侧臂三角摇瓶, 250 mL 摇瓶, LRH-250-Z 自动控温调速振荡生化培养箱, 722 分光光度计, 雷磁 pH-3 型 pH 计, BIO-RAD smart-3000 紫外/可见光分光光度计, 7 L、70 L 全自动中型发酵罐(镇江东方生物工程设备技术公司)。

1.4 方法

1.4.1 培养方法

(1) 摇瓶培养: 菌种在斜面培养基上 37℃ 培养 24 h 后, 接一环入种子培养基(装液量 20 mL/100 mL 三角瓶), 37℃, 150 r/min 往复摇床上培养 20 h 后以 6% 接种量接入发酵培养基(装液量 50 mL/250 mL 三角瓶)摇床培养 20 h。

(2) 罐发酵: 采用常规微生物发酵工艺, 取摇瓶培养 20 h 左右的种子培养液, 以 6% 的接种量接入 7 L 种子罐进行扩大培养, 发酵 20 h 后再移入 70 L 中型罐。发酵初始 pH 控制在 7.0 ~ 7.4, 37℃, 200 r/min, 通气量(V/V)为 1:1, 罐压控制在 0.03 ~ 0.05 MPa, 自动记录发酵过程中 pH 变化。

1.4.2 分析测量方法

(1) 计数方法: 血球计数法和比浊法。将用血球计数板计过数的一定数量的菌液稀释成不同梯度, 在 600 nm 处比色, 绘制吸光度与菌密度相关的标准曲线。用 600 nm 的 OD 值记为发酵液菌密度指标。

(2) pH 的测定: 取发酵液或其离心上清液, 用 pH 计测量。

(3) 还原糖含量测定: 将发酵液 3500 r/min 离心 15 min 后, 取上清液用 ZnSO_4 去除蛋白质, 离心后取上清液, 用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸比色法)测定还原糖的含量^[4]。

(4) 总氮的测定: 根据标准 GB-11894-89, 采用碱性过硫酸钾消解, 紫外分光光度法测定。

2 结果与讨论

2.1 单因子试验

2.1.1 碳源试验

碳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。本试验比较了 3 种常见的碳源对菌量的影响, 按基本培养基的配方将碳源作葡萄糖、蔗糖和淀粉 3 种成分的调试, 结果见图 1。从图 1 中可看出, 在其它条件相同的情况下, 使用淀粉时菌体生物量比其它 2 种碳源都高, 故适宜碳源应选为淀粉。

2.1.2 氮源试验

试验选用了最常见的 3 种氮源: KNO_3 、 NH_4Cl 、 NH_4NO_3 , 其它成分不变, 作氮源单一因子试验, 结果见图 2。由图 2 可以看出, 3 种供试氮源的试验结果以 NH_4Cl 为好。

2.1.3 不同 C/N 对菌量的影响

根据上述筛选结果, 分别以淀粉为碳源, NH_4Cl 为氮源, NH_4Cl 浓度控制为 0.1% 不变。通过改变碳源的浓度以实现不同的 C/N, 结果见图 3。由图 3 可以看出, 2% 的淀粉, 0.1% 的 NH_4Cl 最有利于菌体生物量的增加, 故在试验的几组 C/N 中, 最适 C/N = 20。

2.2 温度试验

细菌生长的最适温度一般为 30 ~ 37℃, 为此实验在这一温度范围内选择 30、34、37℃, 在恒温自动培养箱中进行摇瓶培养, 转速同为 200 r/min, 其结果见图 4。由图 4 可见, 37℃ 恒温发

酵最有利于菌体生物量的增加,34℃处理略次之,30℃处理效果最差.这一结果表明,在一定温度范围内,提高温度有利于菌体生物量的增加.

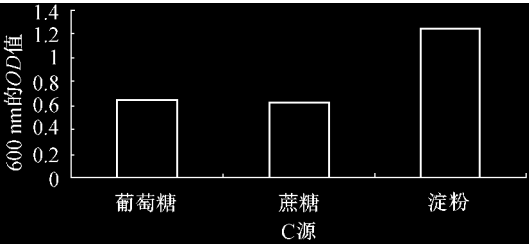


图1 不同碳源(2%)对菌量的影响

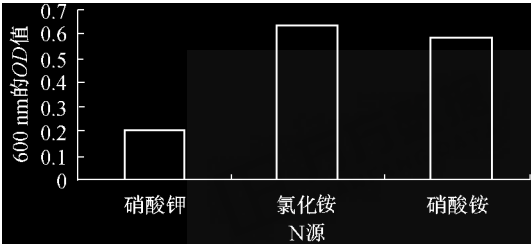


图2 不同氮源(0.1%)对菌量的影响

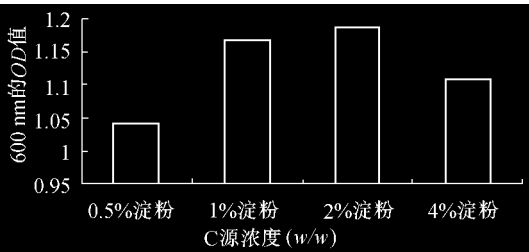


图3 不同C/N比对菌量的影响

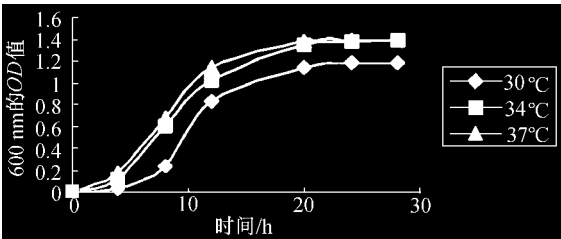


图4 温度对菌量的影响

2.3 初始 pH 试验

在发酵培养基的基础上,把初始 pH 值分别调至 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 五个梯度,37℃,200 r/min 培养 20 h 后,测量 600 nm 的 OD 值,结果见图 5.从图中可以看出,pH7.0 最有利于菌体的生长,pH7.5 次之,故该菌发酵培养基的初始 pH 值可以控制在 7.0~7.5 的范围内,这也是一般细菌的最适 pH.

2.4 接种量试验

斜面菌种中注入适量无菌生理盐水,刮下菌苔并摇匀,制成一定浓度的菌悬液,其浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL,然后根据摇瓶装液量,将菌悬液按 2%、4%、6%、8%、10% 的不同接种量接入摇瓶,37℃,200 r/min 培养 20 h 后测量 600 nm 的 OD 值,结果见图 6.结果表明,接种量为 6% 时菌量最多.由图中不同接种量对菌量的影响的变化趋势来看,接种量过低会导致延滞期过长,菌体生物量不高.接种量过高,带入培养基内的代谢产物亦多,反而不利于菌体的生长,生物量也不高.

2.5 装液量试验

用 250 mL 的三角瓶分别以 20、30、40、50 mL 的培养基进行摇瓶试验(图 7).结果表明 30 mL 装液量所得 600 nm 的 OD 值最高,即菌体生物量最高,从图 7 中还可以看到装液量越大,600 nm 的 OD 值越低,表明菌体生物量越低.原因是装液量多,通气量变少,培养基中溶解氧也变小,故而影响菌体的生物量.

2.6 转速试验

振荡培养的菌体生长量显著优于静置培养生长量,试验设计了 3 个梯度的转速,分别为 100、150、200 r/min,培养温度为 37℃,20 h 后取出测量 600 nm 的 OD 值,结果见图 8.由图 8 可见,摇瓶转速为 200 r/min 时,菌量最多,而且随着转速的加大,菌量也有递增的趋势.

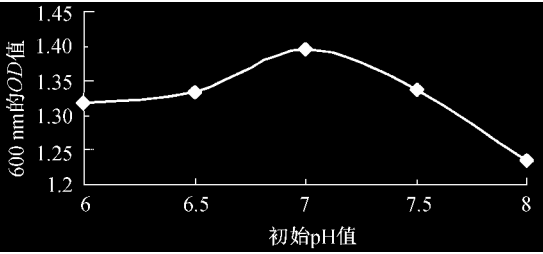


图 5 不同初始 pH 值对菌量的影响

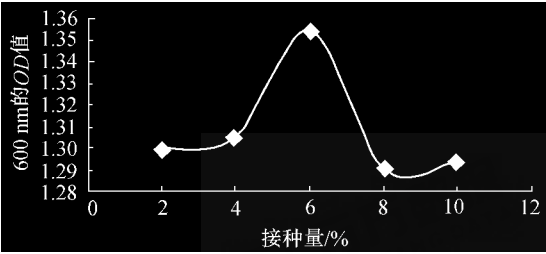


图 6 不同接种量对菌量的影响

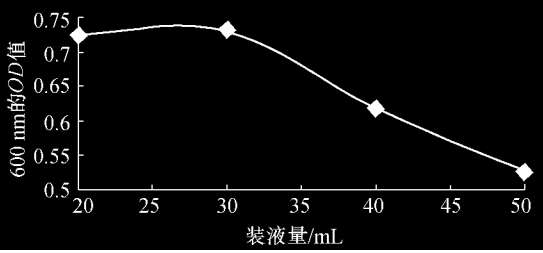


图 7 装液量对菌量影响

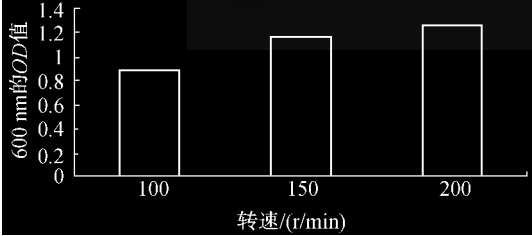


图 8 不同转速对菌量的影响

2.7 发酵罐中试试验

根据摇瓶试验的结果,进行 70L 发酵罐中试发酵试验,测定了发酵过程中的 pH、总氮、还原糖及菌量的变化情况,结果见图 9、10。

从图中可以看出,发酵过程中培养液的 pH 值先降低后增高,总氮的变化也有这种现象。分析原因可能是因为在菌体生长的对数期生长代谢旺盛,大量利用碳、氮,菌体利用碳源代谢产生有机酸,从而使得培养液 pH 迅速下降,而氮源的利用直接导致培养液总氮下降。随着发酵时间的延长,菌体到达生长稳定期之后部分菌体发生自溶现象,释放出胞内氨态氮等碱性物质,使得 pH 和总氮的含量上升。发酵过程中菌量的变化基本遵循细菌的生长曲线的趋势,而还原糖的变化恰与菌量的变化相反,即在对数期下降得很多,延滞期之后基本不变。

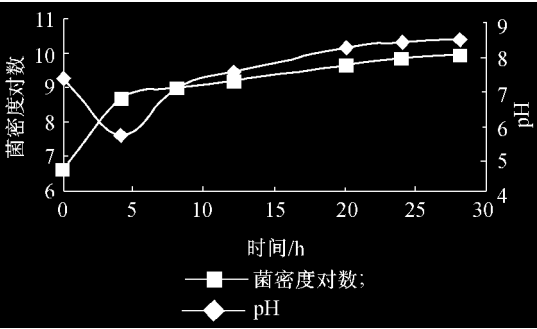


图 9 发酵过程中菌量与 pH 的变化

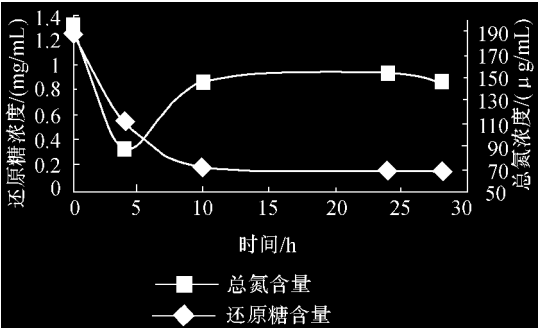


图 10 发酵过程中还原糖与总氮的变化

3 结论

对磷细菌 A 发酵条件的研究表明,通过对一些理化因素的优化搭配,可以大幅度地提高菌量,温度和振荡频率的增加,有利于菌体生物量的提高,该菌最适宜生长在一个中性偏碱的环境中;从发酵过程中还原糖的变化可看出,该菌生长需消耗大量碳源。当然以上只是对磷细

菌 A 发酵条件的初步探讨,欲使其早日实现工业化生产,有关筛选效果良好且成本低廉的培养基以及最佳发酵时间的确定还有待进一步深入研究和报道。

[参考文献]

- [1] 陈廷伟.微生物对不溶性无机磷化合物的分解能力及其接种效果[J].微生物,1955,2(5):210—215.
- [2] 陈华葵.生物学[M].北京:北京农业出版社,1962.321—323.
- [3] 中国微生物菌种保藏管理委员会农业微生物中心.中国农业菌种目录[M].北京:中国农业科技出版社,1991.92.
- [4] 张龙翔.生化实验方法和技术[M].北京:高等教育出版社,1981.9—11.

Studies on the Fermentation Condition about a Kind of Phosphate-solubilizing Bacterium

Tang Yong ,Lu Lin ,Yang Qiyin ,Jiang Jierong ,Chen Yuru

(College of Life Science ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210097 ,PRC)

Abstract: The fermentation condition about a kind of phosphate-solubilizing bacterium was studied. The single factor fermentation experiment indicated that the optimal carbon source was 2% starch and optimal nitrogen 0.1% NH_4Cl . The optimal cultivation temperature was 37 °C and optimal pH 7.0. The most suitable shake frequency was 200 r/min , and the most suitable volume of cultivated liquid in 250 mL conic bottle was 30 mL. We measured biomass and pH on the process of fermentation as well as the changes of sugar and nitrogen.

Key words phosphate-solubilizing bacteria ferment fermentative condition

[责任编辑 孙德泉]