

菌肥用光合菌在纤维素水解液中的培养

杨启银, 陈育如

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

[摘要] 对光合菌在天然培养基、合成培养基以及来自植物纤维素水解液的半合成培养基中的培养进行了研究, 对适宜的培养基、营养物质的稀释度、菌种接种量、pH 值等进行了选择. 对选出的 4 号加有纤维素水解液的培养基, 接入 5% 的菌液, pH 为 7.0 ~ 7.5, 温度为 25 ~ 30℃, 厌氧条件下, 光合菌生长良好, 菌量达 2.2×10^9 亿个/mL. 在加入光合菌生长促进液(1%)后, 菌量达 4.01×10^9 个/mL.

[关键词] 光合菌, 菌肥, 纤维素水解液, 培养

[中图分类号] Q93 - 335 ; [文献标识码] A ; [文章编号] 1001-4616(2001)03-0083-05

0 引言

光合菌(*Photosynthetic bacteria*, 简称 PSB)是一类以光为能源, 以 CO_2 或有机碳源进行光合作用的有益微生物^[1]. 在水田、湖泊、沼泽、硫磺泉及海岸等无氧气之处均有分布. 光合菌的形态有杆状、螺旋状、球形、卵圆形等多种, 大小约 $0.6 \sim 2 \mu\text{m}$ 不等. 根据其产生的色素不同, 菌悬液呈多种颜色. PSB 的菌体富含蛋白质、辅酶、各种 B 族维生素, 尤其维生素 B_{12} 、叶酸和生物素含量丰富. 用于养殖业能促进动物生长发育, 用作生物菌肥, 可使作物增产增收^[2]. 光合菌内存在着细菌叶绿素, 可利用光能进行光合作用. 特别是红螺菌科的红假单胞菌属, 具有在厌气光照、厌气黑暗条件下能利用有机物迅速增殖的特点. 对光合菌的应用, 国内外都进行了大量研究, 在处理废水、生产有机肥料、防治病虫害等方面都有着广泛的应用. 据报道, 光合菌能促进土壤微生物的增殖, 改善植物营养, 促进作物生长和减少植物病害^[3-6].

通常的光合菌合成培养基成本较高, 制约了其大规模推广应用. 因此, 降低生产成本, 寻找价廉的原料是应用中迫切需要解决的问题. 为此, 本工作对光合菌的合成培养基、半合成培养基和天然培养基进行了比较, 对光合菌在这些培养基中的生长特性等进行了研究, 以期扩大光合菌培养的原料来源, 降低生产与应用成本.

1 材料及方法

1.1 实验菌株及仪器

红螺菌(*Rhodospirillum*)、红假单胞菌(*Rhodopseudomonas*)、红微菌(*Rhodomicrobium*), 前两种来自农业部菌种保藏中心, 后一种为本研究室筛选.

LRH-250-A 自动控温生化培养箱, 722 分光光度计, 雷磁 pH-3 型 pH 计.

收稿日期 2001-02-12

基金项目 南京师范大学引进人才基金(2001SWXXQB911)与青年科技基金(2000SWX0000XQ1)资助.

作者简介 杨启银, 1951—, 南京师范大学副教授, 从事植物学和资源微生物方面的教学与研究.

万方数据

1.2 实验材料与方法

合成培养基(氯化铵 1 g,磷酸氢二钾 0.5 g,氯化镁 0.2 g,氯化钠 2 g,酵母膏 0.1 g,碳酸氢钠 5 g,溶于 1000 mL 蒸馏水中,调 pH 值为 7.0~8.0)按文献 4 配制,为 1 号培养基。

以纤维素水解液、淀粉质原料等配制的复合天然培养基,分别为 2 号和 3 号培养基。
半合成培养基采用部分合成培养基的成份,加上玉米棒芯植物纤维素的水解液作为碳源,使用时稀释至 5 mg/mL 还原糖,加入 NaCl 等无机盐,灭菌备用,为 4 号培养基。

光合菌生长促进液 NS-1 型(本研究室配制),添加量 0.2%。
培养基的选择:向四种培养基中分别接入光合菌,置于无色透明密封的塑料瓶中,在自然光照条件下培养,测定光密度值和 pH 值变化,筛选适合的培养基。
稀释度的选择:根据稀释度不同的条件下光合菌的生长情况,选出最适稀释度。
pH 值的选择:根据调节和不调节 pH 值时,光合菌的生长情况,掌握 pH 值变化规律,选择适宜的 pH 值。

接种量的选择:对选定的培养基,分别以 1%、2%、5% 的菌量接种,通过 OD 值的测定,选择适宜接种量。
光合菌生长促进液的影响:在选择培养基中,观察添加光合菌生长促进液对菌量的影响。

2 结果与讨论

2.1 培养基对菌体生长的影响

光合菌培养过程中的颜色变化,与菌体中所含色素和菌含量密切相关,对于一定的菌株,单位体积菌液中菌含量越高,则菌液颜色越深。本工作首先对在几种不同培养基中的菌体生长与颜色变化进行了比较,结果见表 1。

表 1 光合菌在四种培养基中的生长情况

时间	2 d	10 d	14 d
颜色深度	1# > 4# > 2# > 3# *	4# > 3# > 2# > 1#	4# > 2# > 3# > 1#
沉淀情况	未见沉淀	微量沉淀	有絮状沉淀

* 注:表中的 1#、2#、3#、4# 表示培养基号。

实验观察到,所用的四种培养基在接入菌种培养 24 h 后,菌液开始向红色(OD 值升高)转变,培养 2 d 时,培养基 1、培养基 4 中菌液的颜色略深于培养基 2 和培养基 3。说明菌体在培养基 3 和 4 中的生长速度在培养初期比在培养基 1 和 2 中的生长速度快。当培养至第 10 天时,培养基 4 的颜色与培养基 3 相当,颜色深度明显高于培养基 1,优势较为明显。

第 14 天时,菌体在培养基 3 与培养基 2 中的生长速度已有一定差别,培养基 2 的菌量已超过培养基 1 的菌量,培养基 4 的菌量仍维持较高(见图 1)。这说明合成培养基(1 号)在培养的前期能较快地被菌体所利用,但消耗较快,而天然培养基和半合成培养基的养分在经过一定

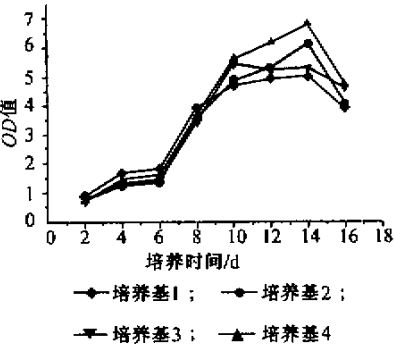


图 1 在四种培养基中,光合菌生长情况(5%接种量)比较

的时间后能逐渐地被菌体利用,后劲较足。

由此可见,营养基质的种类不同,对菌体的生长和菌量影响较大,培养基 4 明显优于其他三种培养基,同时也说明营养成分对于光合菌的生长是重要的影响因素之一。培养基 4 中的有机物、无机盐等成本较低,适宜作为大规模培养光合菌的原料来源。

2.2 pH 值对光合菌生长的影响

2.2.1 光合菌培养过程的 pH 变化

对自然生长条件下生长的光合菌液每隔 24 h 进行 pH 测定,以掌握其变化规律,为条件优化和生产提供依据。

从图 2 的 pH 变化曲线可以看出,培养基 pH 的变化趋势是先剧烈下降,然后慢慢加速上升。在培养的第 2 天, pH 下降很快(降至 6.0 左右),在第 2 天至第 6 天, pH 缓慢上升,在第 6 天至第 10 天, pH 继续上升,速度加快。培养基的 OD 值从第 6 天开始迅速升高,第 10 天至 11 天时,达到周期内的最高值。在此期间, pH 的变化范围为 6.0~7.8。从第 11 天后, pH 值开始下降,逐渐至 7.5 左右。其他二种培养基的 pH 变化情况与培养基 2 相似,分析是由于光合菌的生理特性所致。

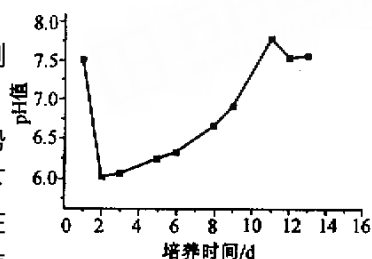


图 2 光合菌培养过程中的 pH 变化
(培养基 2)

2.2.2 控制 pH 值对光合菌生长的影响

为探讨控制 pH 值对光合菌生长的影响,实验设计了 2 份相同的培养基(培养基 1),一份在培养过程中始终调节 pH 使其维持在 7.5 左右,另一份不调节 pH 值,任其生长,在相同光照、温度的条件下,观察其生长情况。结果发现:在 1 至 3 天内,不控制 pH 值与控制 pH 的培养基中,光合菌的生长状况(根据菌液颜色分析)基本一致。培养至第 4 天,不控制 pH 值的菌液颜色明显低于控制 pH 的培养基菌液色度。第 6 天,两者生长速度均加快。第 8 天后,菌液颜色均较深,通过测定菌液 OD 值表明不控制 pH 值的菌体浓度低于控制 pH 的培养基菌体浓度。因此控制培养基 pH 值有利于菌体的生长。

2.3 光合菌不同接种量的影响

在选择培养基 4 中,分别以 1%、5%、10% 的接种量接种培养,测定菌液的 OD 值。结果如图 3 所示。

从图 3 可见,总体而言,大接种量有利于提高菌量,减少杂菌污染,因为大接种量有利于光合菌形成优势菌群。但接种量提高意味着所需的接种菌液量加大,成本随之增加。且从图 3 可见,用 5% 与 10% 的接种量培养的菌液,在达到较高浓度时菌量差别不大,因此选择 5% 接种量有利于降低用于接种菌液的成本。

2.4 光合菌生长促进液对菌体生长的影响

为缩短光合菌的培养周期,本研究室研制了光合菌生长促进液,用 4 号培养基,将加与不加生长促进液的培养基(添加量占原培养基的 1%)接种后进行培养,观察生长促进液对光合菌生长的促进作用。从图 4 可见,光合菌生长促进液的添加可较大幅度地提高光合菌浓度和产量,对设定的菌液浓度,添加助剂后可缩短培养时间(见表 2)。实验条件下,最高菌量可达 4.01×10^9 个/mL 菌液。

表 2 添加光合菌生长促进液前后的菌量 （培养基为 4 号,含菌量 :个/mL）

时间/d	1	3	7	11	15
未加生长促进液	1.4×10^8	2.7×10^8	8.8×10^8	1.54×10^9	2.2×10^9
添加生长促进液	1.5×10^8	3.3×10^8	1.36×10^9	2.04×10^9	4.01×10^9

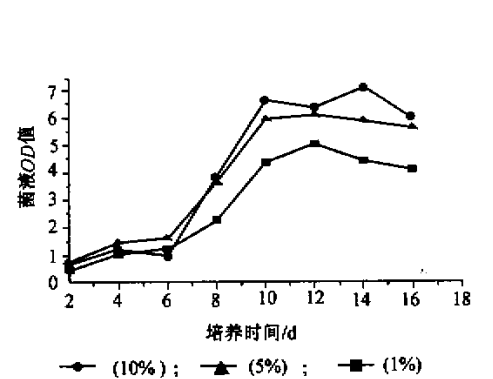


图 3 在培养基 4 中 ,不同接种量对菌体生长的影响

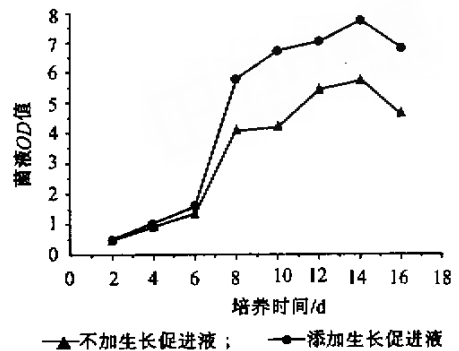


图 4 添加光合菌生长促进液对菌体生长的影响

3 结论

根据对四种培养基的实验比较 ,光合菌在培养基 4 中的生长比其它 3 个培养基更具优势 ,说明由合成培养基和天然培养基组成的复合半天然培养基可结合前两种培养基的优点 ,培养基 4 采用的原料为价格较低的原料 ,成本较低.除培养基成份外 ,pH 值、培养基的稀释度、接种量和生长促进液的添加都对光合菌的生长有不同程度的影响.通常条件下 ,采用培养基 4 的总菌数为 2.2×10^9 个/mL ,如果加入生长促进液 ,实验条件下的菌量可达 4.01×10^9 个/mL 菌液 ,3 次计数结果分别为 : 3.92×10^9 , 3.97×10^9 , 4.15×10^9 ,均值为 : 4.01×10^9 ,标准误差 : $\sigma = 0.0988 \times 10^9$).

[参考文献]

[1] 包建中.中国的白色农业[M].北京 :中国农业出版社 ,1998.

[2] 周正东 ,景明宝 ,赵林 ,等.光合生物肥在水稻上的喷施效果初报[J],南京师大学报(自然科学版) ,1999 ,22(2) 89—91.

[3] Sawada H. Photosynthetic Bacteria in Waste Treatmen[J] J. Ferment. Technol ,1977 ,55 326—336.

[4] 刘如林 ,刁虎欣 ,梁凤来 ,等.光合细菌及其应用[M].北京 :中国农业科技出版社 ,1991.

[5] Shipman R H. Single-Cell Protein Production by Photosynthetic Bacteria Cultivation in Agricultural By-Products[J]. Biotechnol. Bioeng ,1975 ,17 : 1561—1570.

[6] Matsunaga T ,Mistui A. Seawater-Based Hydrogen Production by Immobilized Marine Photosynthetic Bacteria[J]. Biotechnol. Bioeng ,1982 ,12 441—450.

The *Photosynthetic Bacteria* Culture Using Lignocellulose Hydrolyzate for Bio-Fertilizer Manufacture

Yang Qiyin ,Chen Yuru

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

Abstract :The *Photosynthetic bacteria* (PSB) culture in a serial medium was carried on. Results indicated that medium composition ,pH ,inoculation volume and adding of growth stimulate factor could effected on the cultivating of PSB. A kinds of low-price and availability culture medium constituted of lignocellulose hydrolyzate and other inorganic composition was developed for the manufacture of PSB bio-fertilizer. After adding growth stimulate liquid(1%) ,the 4.01×10^9 bacteria cells/mL amount of PSB was obtained in suitable culture condition.

Key words :*Photosynthetic bacteria* ;lignocellulose hydrolyzate ;culture ;fertilizer

[责任编辑 孙德泉]

(上接 82 页)

- [7] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis . Molecular Cloning : A Laboratory Manual[J]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 .
- [8] 金顺钱 ,彭琼 ,陆士新 ,等 . 食管癌组织中 MTS1/P16 基因的缺失 [J]. 中华肿瘤杂志 ,1998 ,20(1) :9—11 .
- [9] Quelle D E ,Zindy F ,Ashmun R A ,*et al* . Alternative Reading Frames of the INK4a Tumor Suppressor Genes Encode Two Unrelated Proteins Capable of Inducing Cell Cycles Arres[J]. Cell ,1995 ,83 :993—1000 .
- [10] Zindy F ,Quelle D E ,Roussel M F ,*et al* . Expression of the p16^{INK4} Tumor Suppressor Versus Other INK4 Family Members during Mouse Development and Aging[J]. Oncogene ,1997 ,15(2) :203—211 .

Analysis of p16^{INK4} Gene Exon 2 in *Elaphodus Cephalophus*

Cao Xiangrong ,Wang Ying ,Li Shufeng ,Chen Tao ,Zhang Xiran

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

Abstract :The DNA fragment containing exon 2 of p16^{INK4} gene was cloned by PCR method from *Elaphodus cephalophus* genomic DNA. Southern blotting and sequencing analysis showed there was very high homology (98.4%) of p16^{INK4} gene exon 2 between them. The exon 2 region is very conservative ,it plays an important role in the function of p16^{INK4} gene.

Key words :*Elaphodus cephalophus* ;p16^{INK4} gene ;exon ;sequence

[责任编辑 孙德泉]