

解钾硅酸盐细菌培养基及培养条件的研究

陈育如, 杨启银

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

[摘要] 以所筛选的硅酸盐细菌 RM-01 菌株为材料, 对所需的培养基和培养条件进行了研究分析. 在选择的适宜培养基中(TR 复合培养基), 对培养基 pH 值、培养温度、摇床转速及摇瓶装液量等影响因素进行了正交实验. 结果表明, 在 pH 为 7、温度 36℃、转速 220 r/min、装液量 50 mL 时, 硅酸盐细菌菌量可达 10.6×10^8 个/mL.

[关键词] 硅酸盐细菌 培养条件 生物菌肥 正交实验

[中图分类号] Q93-335; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)03-0088-05

0 引言

自人们从土壤中分离出解钾硅酸盐细菌(*Bacillus mucilaginosus*, 简称钾细菌)以来, 许多研究结果证明了这种细菌能够分解钾长石、云母等硅酸盐类的原生态矿物, 可以使难溶于水的钾转化为植物所能吸收的有效钾, 同时还能分解土壤和矿物中难以被作物吸收利用的无效磷成为有效磷, 并有微弱的固氮能力, 因而适合用作生物菌肥^[1].

钾细菌肥施入土壤后, 除了为作物提供速效性钾、磷、硅等营养元素外, 还具有促使土壤结晶构造破坏的作用, 从而有利于农作物的营养吸收^[2]. 解钾细菌作为生物菌肥正得到越来越多的应用. 降低成本, 采用来源更广泛的原材料生产钾细菌对其推广应用有着积极的意义. 本工作对筛选的一株解钾硅酸盐细菌, 采用合成培养基、淀粉质原料培养基等几种配方, 对硅酸盐细菌在其中的生长特性进行比较, 并对培养条件进行了优化.

1 材料、设备和方法

1.1 材料与设备

菌种: 硅酸盐细菌(*Bacillus mucilaginosus*) BM-01, 从南京地区土壤中筛选, 本研究室保藏.

培养基: 淀粉铵培养基(1号): 可溶性淀粉 5.0 g, 蔗糖 4.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, K_2HPO_4 2.0 g, CaCO_3 0.1 g, 1% FeCl_3 溶液 30 滴, 水 1000 mL, pH 7.5; 玻粉培养基(2号)^[3], 蛋白胨培养基(3号), TR 培养基(4号)为复配培养基; SU 为蔗糖培养基(5号)^[4, 5].

设备: DHZ-D 冷冻恒温振荡器, PHS-25 型 pH 计, OLYMPUS CH 显微镜, FA1004 型电子天平等.

收稿日期: 2001-05-15

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: 陈育如, 1965—, 博士, 南京师范大学生命科学学院副教授, 从事生化和资源微生物的教学与研究.

1.2 实验方法

1.2.1 培养方法

根据配方要求,配制各培养基,每个 250 mL 三角瓶分别装入一定量(50 mL、100 mL、120 mL) 培养液,塞上棉塞,121℃蒸汽压力灭菌 20 min.冷却后,用斜面菌种或液体菌液接种.置一定温度下培养(转速依培养条件).

1.2.2 涂片观察和计数

将硅酸盐细菌接种于各培养基中,在 pH、温度、接种量一致的条件下培养,每隔一定的时间用血球计数板计数,并用结晶紫染色涂片,在显微镜下用油镜观察菌体及芽孢生成情况.

2 结果与讨论

2.1 培养基对菌体生长及产芽孢的影响

硅酸盐细菌属芽孢杆菌属,实验观察到,BM-01 菌在玻粉无氮固体培养基上生长良好(这说明其有一定的固氮能力);同时,不同的培养基对菌体的生长作用不同,实验发现,C/N 比较高的培养基有利于菌体生长(在 SU 培养基中);反之则不易生长(在淀粉铵培养基中),因此以下实验主要以 SU 蔗糖培养基和 TR 复合培养基进行.

表 1 菌株在不同液体培养基中的菌体生长与产芽孢情况

培养基	Ⅰ(淀粉铵)	Ⅱ(玻粉)	Ⅲ(蛋白胨)	Ⅳ(TR)	Ⅴ(SU)
菌体生长与产芽孢情况	菌量较少,产生芽孢速度较慢	菌体细长,产芽孢较多	菌量少,芽孢量较少	菌体较大,生长最快,产芽孢多	菌体生长良好,生长快,芽孢出现早

2.2 转速和装液量对菌量的影响

该菌株为好氧菌,因此培养过程中的供氧充足与否将影响到其生长.在摇瓶培养中,装液量和转速是影响供氧的重要因素,为考察这两个因素的影响,实验采用 SU 培养基,分别设计了改变摇瓶装液量和改变摇床转速,观察在这些条件下的菌体生长情况,结果见图 1 和图 2.

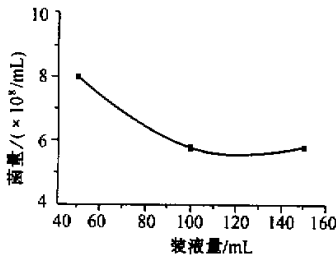


图 1 装液量对菌量的影响
(温度 30℃ 转速 180 r/min)

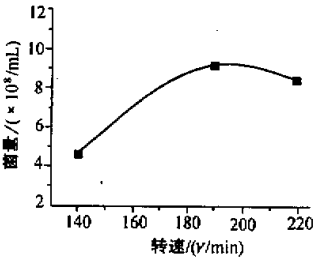


图 2 摇瓶转速对菌量的影响
(温度 30℃ 装液量 80 mL)

一般而言,摇瓶装液量越少,溶氧量越大,越有利于好氧菌的生长.由图 1 可见,在选定的培养基和实验条件下,减少装液量对菌量的影响是提高其产生量,因此低装液量对提高菌量有利,但装液量过少将影响实验过程的取样和菌液总产量,在生产中也不利于设备利用效率的提高,因此本实验中装液量取 50 ~ 80 mL 为宜.

由图 2 可见,摇床转速加快有利于菌量的提高,但当转速提高至一定程度后,效果不再显著,且高转速将增加动力消耗,因此一般转速取 190 r/min.

2.3 氮源对菌体生长的影响

虽然硅酸盐菌株能在无氮的玻粉固体培养基上生长,但在玻粉液体培养基中菌量却难以提高,在添加一定的氮源后培养,菌量有所增长.可见此时其对氮的需求还是有一定的要求.在加硫酸铵(以氮计为 0.1 mol/L)的 SU 培养基中,菌量随培养时间的变化曲线见图 3,不同的氮源对最高菌量的影响见图 4.

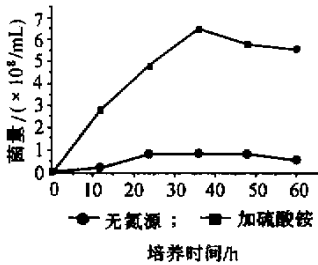


图 3 以硫酸铵为氮源时菌量的变化(30℃)

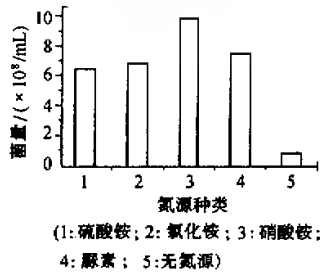


图 4 氮源对菌体生长的影响(30℃)

由图 3 可见,以硫酸铵为氮源培养基的菌量(6.4 亿个/mL)比未加氮源的培养基菌量(0.9 亿个/mL)要高.由图 4 可见,在对不同氮源种类(硫酸铵、氯化铵、硝酸铵和脲素)进行菌体培养的实验中,硝酸铵是培养该菌的适宜氮源,实验条件下产菌量最高为(9.9 亿个/mL).

2.4 温度和 pH 值对菌量的影响

预实验中,发现培养温度和培养基的初始 pH 值对菌量有影响,图 5 和图 6 是用 SU 培养基,在改变培养温度和 pH 值的条件下菌量的变化曲线.

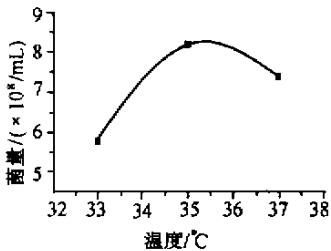


图 5 培养温度对菌量的影响

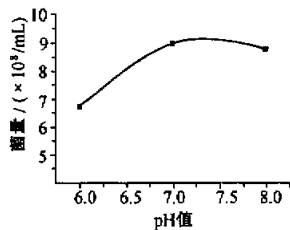


图 6 pH 值对菌量的影响

由图 5 可见,在 33~37℃ 的范围内,菌量以 35~36℃ 时较高.图 6 是培养基初始 pH 值对产菌量的影响,由图 6 可见,pH 为 8 时,所产菌量虽然与 pH 7 时相差不明显,但显微镜下观察发现,长出的菌体外形不如在后者的环境中匀称,因此培养基初始 pH 值以 7 左右较为适宜.

2.5 正交实验

经以上的培养基种类筛选比较,SU 培养基和 TR 培养基都比较适合于实验所用菌株的发酵,鉴于 TR 复合培养基所用原料成本比 SU 培养基成本更低,因此选取 TR 复合培养基进行正交实验,以进一步优化发酵条件.以 pH 值、培养温度、转速、摇瓶装液量四个因素,各选取三个 — 90 万方数据

水平进行实验(A. pH 值 :6、7、8 ;B. 温度 :34℃、36℃、38℃ ;C. 转速 :160、190、220 r/min ,D. 装液量 :50 mL、80 mL、120 mL),以产菌量为目标 ,寻求最适培养条件.正交设计表及实验结果见表 2.

表 2 四因素三水平正交表 $L_9(3^4)$ 及结果

试验号/ 列号	A pH	B 温度/℃	C 转速/(r/min)	D 装液量/mL	菌量/($\times 10^8$)
1	6	34	160	50	$y_1 = 6.58$
2	6	36	190	80	$y_2 = 8.92$
3	6	38	220	120	$y_3 = 7.60$
4	7	34	190	120	$y_4 = 6.87$
5	7	36	220	50	$y_5 = 10.6$
6	7	38	160	80	$y_6 = 8.61$
7	8	34	220	80	$y_7 = 5.29$
8	8	36	160	120	$y_8 = 7.95$
9	8	38	190	50	$y_9 = 7.53$
M_1	$M_{11} = 23.10$	$M_{12} = 18.74$	$M_{13} = 23.14$	$M_{14} = 24.71$	$T = 69.50$
M_2	$M_{21} = 26.08$	$M_{22} = 27.47$	$M_{23} = 23.32$	$M_{24} = 22.82$	$\bar{y} = T/9$
M_3	$M_{31} = 20.77$	$M_{32} = 23.74$	$M_{33} = 23.49$	$M_{34} = 22.42$	$\bar{y} = 7.77$

图 7 至图 10 是正交实验中 ,四个单因素对菌量的影响结果 ,由这 4 个图可见 ,其对菌量的影响与前述单因素影响的结果基本一致. 由对表 2 的正交设计表的数据处理可知 ,9 次实验中 ,最高菌量为 10.6 亿/mL ,由正交设计得出的最适的培养条件组合为 : $A_2B_2C_3D_1$,即 :pH 为 7、温度为 36℃、转速为 220 r/min、装液量为 50 mL.

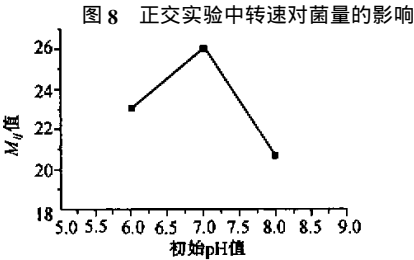
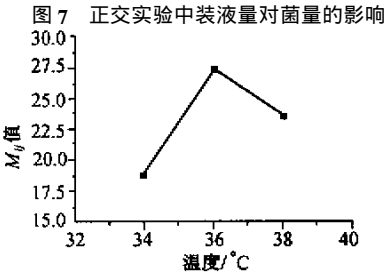
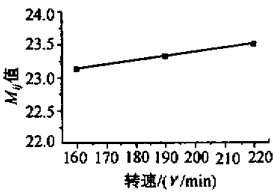
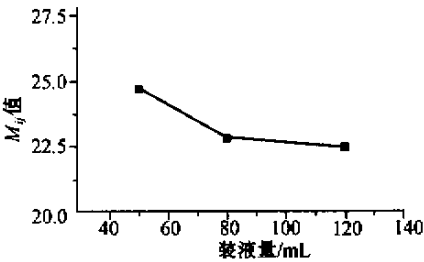


图 9 正交实验中温度对菌量的影响

图 10 正交实验中 pH 对菌量的影响

3 结论

本工作通过对硅酸盐细菌在淀粉铵培养基、玻粉培养基、蛋白胨培养基、TR 复合培养基和 SU 蔗糖培养基中分别进行培养和影响因素初步分析 ,结果表明 SU 培养基和 TR 复合培养基为 万方数据

该菌株的适宜培养基.通过对 TR 复合培养基的三水平四因素的正交实验,所得的最适培养条件为: $A_2B_2C_3D_1$,即 pH7、温度 36℃、转速 220 r/min、装液量 50 mL,最高菌量为 10.6 亿/mL.

硅酸盐细菌是生物菌肥生产的重要菌株^[6],其对含钾矿物解钾能力是产业化应用的基础^[7],对本工作所用菌株的后续优化及解钾实验,我们将陆续进行报道.

致谢:虞光华教授、陈晓红、郭世英、刘五星、唐勇同学参加了部分实验工作,特此致谢.

[参考文献]

- [1] 湖南省益阳地区农业科学院.编.钾细菌肥[M].北京:农业出版社,1978.
- [2] 李凤汀,郝正然,杨则瑗.硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究[J].微生物学报,1997,37(1):79—81.
- [3] 中国微生物菌种保藏委员会农业微生物中心编.中国农业菌种目录[M].北京:中国农业出版社,1991.
- [4] 俞大绂.编.植物病理学和真菌学汇编[M].北京:高等教育出版社,1959.
- [5] 中华人民共和国农业行业标准[M].微生物肥料(NY227-94),1994.
- [6] 刘佳铭.生物发酵有机复混肥的开发研究[J].磷肥与复肥,1984,4:9—11.
- [7] 蒋先军,谢德林.硅酸盐细菌对土壤的解钾强度及来源研究[J].西南农学报,1999,21(5):473—476.

The Study on *Bacillus mucilaginosus* Culture Media and Condition Optimization

Chen Yuru, Yang Qiyin

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

Abstract: This paper dealt with *Bacillus mucilaginosus* cultured and condition optimized, culture experiment was carried on using a serial of media. The results indicated that medium composition, pH, inoculation volume effected the growth of *Bacillus mucilaginosus*. A kinds of low-price and availabilty culture medium was developed for the culture of *Bacillus mucilaginosus*. The 10.6×10^8 bacteria cells/mL was obtained in experiment conditon by design orthogonal experiment. The optimizing condition is pH7, 36℃, 220 r/min, and 50 mL medium volume.

Key words: *Bacillus mucilaginosus*; culture media; bacterium fertilizer; orthogonal design

[责任编辑:孙德泉]