

脱硅细菌 *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂ 的培养条件研究*曾晓希^{1,2} 周洪波¹ 柳建设¹ 胡岳华¹

(1 中南大学资源加工与生物工程学院 长沙 410083 2 湖南工业大学绿色包装与生物纳米技术应用实验室 株洲 412008)

摘要:在倡导环保和节能的现代工业中,生物选矿以能耗低,工艺简单,环境污染少等优点日益受到人们的关注。选矿菌种的筛选和培养是生物选矿中至关重要的一个环节。为了掌握细菌的生长特性,提高生物选矿的效率,本文对作者筛选到的脱硅细菌 *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂ 的生长和培养条件进行了研究。实验结果表明,该菌的生长速度快,接种后约 36 h 进入生长对数期,60h 进入稳定期。最适培养条件是:温度 30 ℃,起始 pH 值为 7.5,摇床转速为 220rpm。细菌的浓度随装液量的增加而降低。能利用多种碳源和氮源,最佳碳源是葡萄糖,氮源是硫酸铵。

关键词:硅酸盐细菌; *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂; 生长曲线; 培养条件

中图分类号: 文献标识码:

The Cultural Conditions of the Desilication Strain *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂

ZENG Xiao-xi, ZHOU Hong-bo, LIU Jian-she, HU Yue-hua

(1, School of Mineral Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083

2, Green Packaging and Biological Nanotechnology Laboratory, Hu'nan University of Technology, Zhuzhou 412008, Hu'nan, China)

ABSTRACT: In the modern industry, advocating environment protection and energy saving, biological beneficiation has been paid more attention with low energy, simple operation and less pollution. The screening and culture of the bacteria are most important step. In order to manage the growth characteristics of the bacteria and to enhance the beneficiation efficiency, the cultural conditions of *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂ were studied in this paper. The results showed that the strain entered the logarithmic growth phase after inoculating 36h, and the stable phase, after 60h. The optimum cultural conditions are as follows: temperature, 30 ℃; initial pH value, 7.5; shaking speed of rotary shaker, 220rpm. The concentration of the strain decreases with the increasing of the culture media in the flask. The optimum carbon resource and nitrogen resource are glucose and (NH₄)₂SO₄ respectively.

Key words: Silicate bacteria; *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂; Growth curve; Cultural condition

前言

前苏联学者亚历山大洛夫从土壤中分离能分解正长石和磷灰石而释放出磷钾的细菌,称之为硅酸盐细菌^[1]。在我国又称之为钾细菌。硅酸盐细菌有解钾溶磷的功能,可将硅酸盐类矿物中的不溶性的钾和磷释放出来变成可溶性离子,被植物直接吸收利用^[2]。我国有众多学者致力于硅酸盐细菌在农业生产上的研究^[3-5],并且已将硅酸盐细菌制成细菌肥料应用在农业生产中。硅酸盐细菌在释放钾和磷的过程中也将矿物中的其它的一些物质释放出来,如 Fe、Si、Ca 和 Mg 等^[6]。有研究表明,可以利用硅酸盐细菌将矿物中的有用金属提取出来^[7],也可以利用它除去矿物中的有害杂质进行生物选矿^[8]。

在能源短缺,优质矿产日益减少的今天,生物选矿以工艺简单易行、成本低、能耗少且污染少等特点在选矿中显示出良好的应用前景。目前我国对硅酸盐细菌的研究主要集中在农业生产方面,在生物选矿领域的报道很少。作者从铝土矿中筛选到一株硅酸盐细菌 *B. mucilaginosus* Lv₁₋₂,该菌对铝土矿中的主要杂质伊利石有明显的脱硅作用^[9]。为了了解该菌的生长特性,本文对它的培养条件进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌种

B. mucilaginosus Lv₁₋₂ 由作者筛选。

1.2 培养基(g/L)

蔗糖 5, (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄ 2.0, MgSO₄ 7H₂O 0.5, NaCl 0.1, 酵母膏 0.5, CaCO₃ 1.0; pH 7.5。

1.3 培养方法

将 100mL 培养基注入 250mL 的锥形瓶中,121℃ 灭菌 20-30min,冷却后接种对数期的种子液 1mL,置于 200rpm、30 ℃ 的空气浴振荡器中振荡培养。培养 2 天后计数。在具体的实验中,除研究因素改动外,其它的培养条件不变。

1.4 细菌计数方法

显微直接计数法

2 结果与分析

2.1 生长曲线

样品从接种开始每隔 6 h 取样,用血球计数板在显微镜下直接计数,计数三次重复取平均值。从显微计数来看,在该培

* 基金项目:国家自然科学基金创新研究群体科学基金项目(No. 50321402)

作者简介:曾晓希,(1972-),女,硕士,讲师,主要研究方向:微生物和生物工程

通讯作者:胡岳华, E-mail: hyh@mail.csu.edu.cn

(收稿日期:2006-06-26 接受日期:2006-07-30)

培养基中细菌的最高浓度可达 5.07×10^8 个/mL, 从生长曲线可看出(图 1), 在该培养基中培养大约 36 h 后进入生长的对数期, 60h 后进入稳定期。从而可知, 种子液最好取培养 36h - 72h 的菌体, 显微计数在培养 50h - 60h 左右适宜。

2.2 温度和 pH 值的影响

温度是影响有机体生长与存活的最重要的因素之一。在微生物的生长过程中, 酶的活性、细胞质膜的流动性以及物质的溶解等会受到温度的影响。温度的变化会对微生物的代谢过程产生影响, 通过改变它们的生长速率, 以适应温度的变化而生存。在不同的温度条件下培养细菌 Lv_{1-2} , 计数结果见图 2, 从中可看出 Lv_{1-2} 在 $25^\circ\text{C} - 35^\circ\text{C}$ 的培养基中均能生长。适宜生长的温度范围在 $25^\circ\text{C} - 32^\circ\text{C}$ 。最适温度是 30°C , 细菌浓度可达到 4.14×10^8 个/mL。当温度达到 35°C 时, 细菌的生长明显受到影响。

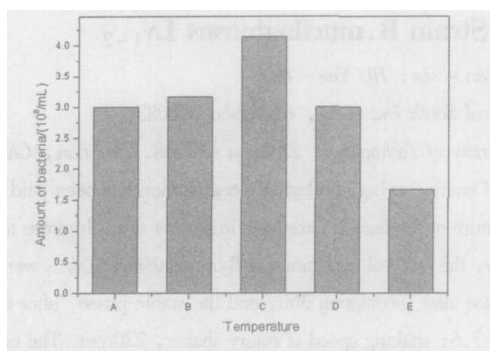


图 2 温度对菌株 Lv_{1-2} 的影响

Fig.2 Effect of temperature on the strain Lv_{1-2}

微生物生长过程中机体内发生的绝大多数的反应是酶促反应, 而酶促反应都有一个最适 pH 范围, 在此范围内只要条件适合, 酶促反应速率最高, 微生物生长速率最大, 因此微生物生长也有一个最适生长的 pH 范围。pH 通过影响细胞膜的透性、膜结构的稳定性和物质的溶解性或电离性来影响营养物质的吸收, 从而影响微生物的生长速率。

将 Lv_{1-2} 的对数期种子液接入起始 pH 值分别为 5.5 - 8.5 的液体培养基中, 从图 3 可看出, 起始 pH 值对细菌的生长有明显影响, 最始的起始 pH 值范围是 7.0 - 7.5, 在 7.5 时细菌浓度最高达到 4.37×10^8 个/mL, 当 pH 值下降到 5.5 时, 细菌的浓度低于 10^8 个/mL。实验表明硅酸盐细菌适宜在中性或偏碱性的条件下生长。

2.3 转速和装液量的影响

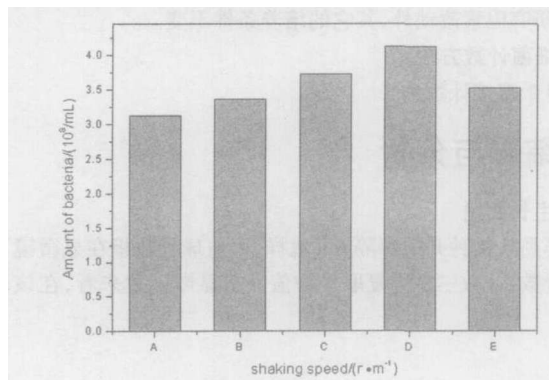


图 4 转速对菌株 Lv_{1-2} 的影响

Fig.4 Effect of shaking speed on the strain Lv_{1-2}

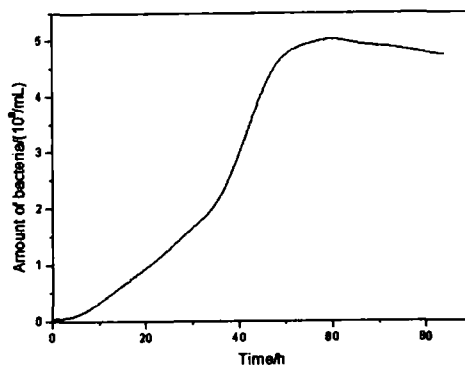


图 1 菌株 Lv_{1-2} 的生长曲线

Fig.1 Growth curve of the strain Lv_{1-2}

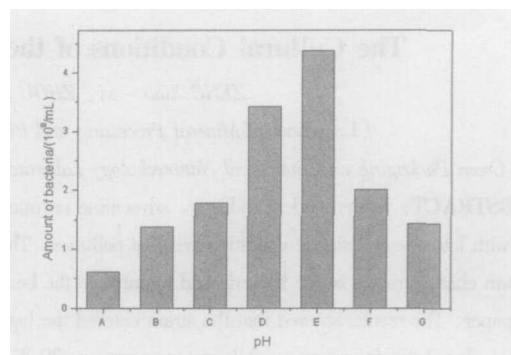


图 3 pH 值对菌株 Lv_{1-2} 的影响

Fig.3 Effect of pH on the strain Lv_{1-2}

硅酸盐细菌是好氧菌。氧气对好氧微生物有两个主要作用, 一是作为微生物好氧呼吸的最终电子受体, 二是参与甾醇类不饱和脂肪酸的生物合成。振荡培养中摇床的转速和锥形瓶中的培养基的装液量是影响液体培养基中的氧气溶解的主要因素。

不同的转速对细菌生长的影响见图 4, 在转速分别为 160rpm - 240rpm 的摇床中, 细菌的生长有明显差异, 在 220rpm 的条件下, 细菌的浓度最高。硅酸盐细菌 Lv_{1-2} 是好氧菌, 随着转速增大, 培养基中的溶氧增多, 促进细菌的生长。但当转速过高时, 由于剪切力给细菌造成机械损伤, 影响细菌正常的生理活动。所以在 240rpm 的培养条件下细菌的浓度又下降了。

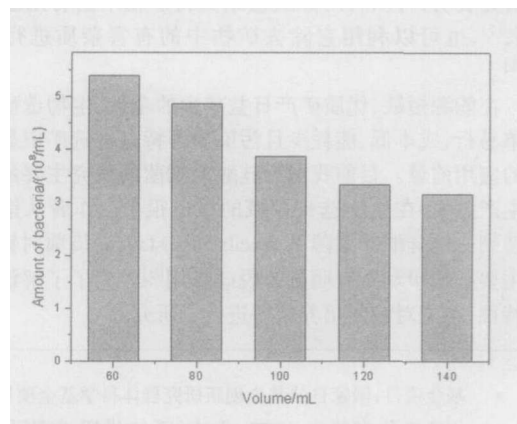


图 5 装液量对菌株 Lv_{1-2} 的影响

Fig.5 Effect of media volume on the strain Lv_{1-2}

在 250mL 的锥形瓶中,分别装入 60mL、80mL、100mL、120mL 和 140mL 的培养基,灭菌后均接种 1mL 的种子液,培养 2 天后测培养基中的细菌数量,结果见图 5。从图中可知,细菌的数量随装液量的增加而减少,在 60mL 的装液量中,细菌的浓度达 5.4×10^8 个/mL,而在 140mL 的装液量中,细菌的浓度下降到 2.97×10^8 个/mL,原因是在同样大小的锥形瓶中,培养基中的溶氧量随装液量的增加而减少,而细菌的生长速率与培养基中的溶氧量呈正相关。

从实验结果分析,60mL 并不是最佳的装液量,细菌的数量随装液量的增加而减少,但是为了得到较多的样品,节省能源

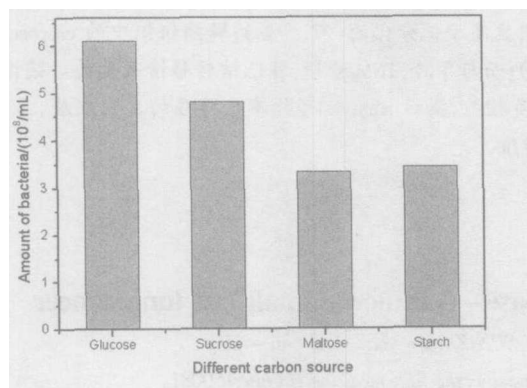


图 6 碳源对菌株 Lv_{1-2} 生长的影响

Fig.6 Effect of carbon resources on the strain Lv_{1-2}

硅酸盐细菌是异养菌,能利用多种碳源。实验考察了实验室常见的四种碳源蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和淀粉对硅酸盐细菌 Lv_{1-2} 生长的影响。在不加蔗糖的培养基中,分别加入 0.5% 以上四种物质作碳源,培养 2 天后计数,结果见图 6。从图 6 中可得知, Lv_{1-2} 的最适碳源是葡萄糖和蔗糖。在葡萄糖中的细菌浓度最高,达到 6.1×10^8 个/mL,而在麦芽糖和淀粉中的细菌浓度明显降低。可能是因为葡萄糖是单糖,比较容易被细菌所吸收利用。

硅酸盐细菌能在无氮培养基上生长,有固氮作用。也能在有氮培养基中生长,实验考查了不同的氮源对细菌 Lv_{1-2} 生长的影响。在培养基中去掉硫酸铵和酵母膏,分别用 0.15% 无机氮硫酸氨、硝酸氨、氯化氨和有机氮尿素、酵母膏、蛋白胨为唯一氮源,对 Lv_{1-2} 进行液体培养,2 天后显微计数,结果如图 7 所示,从中可发现以上六种物质均能作为该菌的氮源,其中硫酸氨和硝酸氨是该细菌生长的最适氮源,尤其是硫酸铵作氮源时生长最好,细菌浓度达到 4.24×10^8 个/mL。从实验结果可知,无机氮源比有机氮源能较好促进细菌的生长。

3 结论

从实验结果可看出,脱硅细菌 *B. mucilaginosus* Lv_{1-2} 的繁殖速度快,接种后大约 36h 进入生长对数期,最适培养条件是:温度 30℃,起始 pH 值为 7.5,摇床转速为 220rpm。细菌的浓度随装液量的增加而降低。能利用多种碳源和氮源,最佳碳源是葡萄糖,氮源为硫酸铵。该细菌的培养条件温和,生长速度快,易于在实验室和生产中进行繁殖,这是有利于将它应用在工业生产中的优点。但是因为它是异养菌,培养条件不苛刻,

和时间,我们不能把装液量降得太低,一般在 250mL 的锥形瓶中装液量为 100mL。

2.4 碳源和氮源的影响

凡能供给微生物碳素营养的物质,称为碳源。碳源的主要作用是构成微生物细胞的含碳物质和供给微生物生长、繁殖及运动所需要的能量。微生物细胞中的碳素含量相当高,占干物质质量的 50% 左右。凡是能够供给微生物氮素营养的物质称为氮源,氮源的作用是提供微生物合成蛋白质的原料。碳源和氮源是微生物的主要营养物质,不同的碳源和氮源会对微生物的生长产生不同的影响。

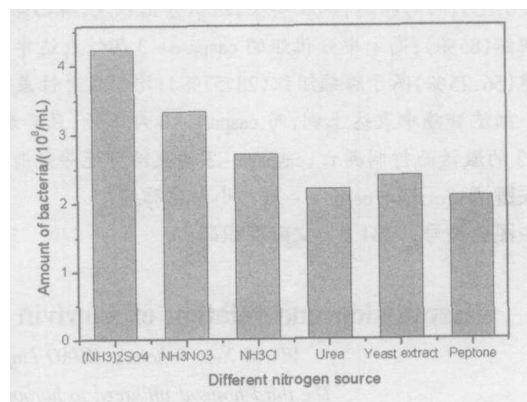


图 7 氮源对菌株 Lv_{1-2} 生长的影响

Fig.7 Effect of nitrogen resources on the strain Lv_{1-2}

在生长中也容易受到杂菌的污染,所以在培养过程中如何防止被污染是需要考虑和研究的问题。现在国内关于生物选矿的研究逐渐增多,但基本上处于实验室阶段,细菌生长过程中的不稳定性、菌种的退化、杂菌污染、浸矿周期长、浸矿效率低等诸多问题限制了生物选矿的工业化,如何克服这些问题将生物选矿早日应用到生产中,还需要科学工作者们进行大量的研究工作。

参考文献

- [1] 周吉奎,胡岳华,邱冠周.硅酸盐细菌在矿物工程领域应用研究进展[J].金属矿山,2002,(1):26-28
- [2] 吴小琴.硅酸盐细菌的应用概况[J].江西科学,1997,(3):60-66
- [3] 李明.硅酸盐细菌 JF88 菌株选育的研究[J].云南师范大学学报,2001,(5):58-61
- [4] 盛下放,黄为一.硅酸盐细菌 NBT 菌株释钾条件的研究[J].中国农业科学,2002,35(6):673-677
- [5] 刘荣昌,李凤汀.生物钾肥(硅酸盐菌剂)开发研究与推广[J].中国农业科学,1998,31(1):95-96
- [6] 刘光桦,林洋,黄昭贤.解钾兼拮抗活性菌株的筛选[J].应用与环境生物学报,2001,7(1):66-68
- [7] Willscher S, Bosecker K. Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump [J]. Hydrometallurgy, 2003,71(10):257-264
- [8] Styriakova I, Styriak I, Kraus I, et al. Biodestruction and deferritization of quartz sands by bacillus species[J]. Minerals Engineering, 2003,16(8):709-713
- [9] 曾晓希,周洪波,刘飞飞.一株胶质芽孢杆菌的筛选和鉴定[J].湖南农业大学学报,2006,32(3):298-301