

文章编号:1005-8737(2000)01-0064-04

糊状光合细菌的生长培养与特征

常仁亮, 冯秋星

(中国水产科学研究院 东海水产研究所, 上海 200090)

摘要:糊状光合细菌制品所用菌种,经鉴定属球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas spheroides*)。在增殖培养后,浓缩成糊状光合细菌,再培养7~9 d后,吸收光谱值(OD)可达到1.908,其产品跟踪检测浓缩比可达到40:1,水分含量小于94%,生物量为1.2%~2.0%,比活率为95%~203%。经2年贮藏,糊状光合细菌的复活性能及技术指标稳定,不影响使用价值。

关键词:糊状光合细菌;培养;球形红假单胞菌

中图分类号:S963.21;S917.1

文献标识码:A

球形红假单胞菌(*Rhodopseudomonas spheroides*),大多数单个,稍有成链二分裂繁殖,细胞以球形为主。可在简单的有机物和无机盐培养液中补加硫胺素等生长因子的培养基上生长。在鱼(虾)类生活的水域中,经常有排泄物和分解产物污染水质。球形红假单胞菌能利用此种物质而得到增殖,并可使水质净化、病菌难以发展,从而改善养殖环境。研究使用证明,液体状态的光合细菌,在水产养殖池中使用,菌体细胞自然沉降困难;保质期较短,包装运输成本偏高。经过2年的研究,开发生产出1种糊状的光合细菌,使之性质得以改善。

1 材料和方法

1.1 菌株样品

由东海水产研究所、上海水产大学《光合细菌的生产性应用推广》课题组提供。

1.2 培养基

种子培养基采用(RCVBN培养基)^[1]。敞开式富集培养基成分为:CH₃COONa, 3 g/L; NaCl, 0.1 g/L; (NH₄)₂SO₄, 0.3 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g/L;

KH₂PO₄, 0.5 g/L; K₂HPO₄, 0.3 g/L; 柠檬酸铁3.35 mg/L。

1.3 培养条件

光照厌氧培养,采取人工连续光照,光量强度约1 000 lx,温度28~32℃;敞开式培养,采用静置培养,每日早晚搅拌1次;种子培养,采用封闭式连续搅拌培养。

1.4 糊状光合细菌原菌液的制备

取自液体培养的光合细菌菌液,用电位仪测定菌液的电位决定离子(Pdi)。一般情况下,经过7 d培养的菌液的Pdi为32 mV。添加絮凝剂使Pdi至-132 mV,在弱碱的作用下使菌液中Pdi升至+132 mV。形成絮状后调节Pdi为32 mV。经陈化、过滤即形成糊状光合细菌产品。

1.5 糊状光合细菌的培养

将上述光合细菌浓缩后,浓缩比为40:1,取26 g左右糊状光合细菌,加入7 000 ml的培养液,以15%接种量液体光合细菌培养为对照。

1.6 生长状态的测定

1.6.1 培养周期生长情况 糊状光合细菌的培养周期一般为7 d。每隔24 h测定1次生长情况,测定其OD_{660 nm}值。

1.6.2 pH对生长影响的测定 初始pH和生长过程中pH,都能影响菌体的生长,同时也能反映培养

收稿日期:1998-12-17

作者简介:常仁亮(1941-),男,湖北武汉人,中国水产科学研究院东海水产研究所副研究员,从事水产食品加工及水产动物营养剂研究。

液的污染情况^[2]。采用 ZD-2 型自动电位滴定测定 pH。

1.6.3 糊状光合细菌的水分测定、生物量(干菌丝)和比活率的测定 水分和生物量按常规方法测定。比活率测定是将糊状物解吸后,在培养液中培养后测定 OD_{660 nm} 值^[3]。取 5 组糊状光合细菌样品,前 3 组样品是当年生产的糊状光合细菌,第 2 组样品是存贮了 1 年的样品,第 3 组样品是存贮了 2 年的样品,对照组采用新鲜菌种培养。接种是按生产方式 15% 种子量接种,培养时间 7~9 d。

2 结果与讨论

2.1 糊状光合细菌的生长

糊状光合细菌的生长情况见图 1。在封闭式容器中,用液体菌种的光合细菌,经过 24 h 培养 OD 值可以达到 0.43。再经过 96 h 培养,即 120 h 可以达到 OD_{660 nm} 峰值 1.78,每周可以收获 1 次,生长周期一般为 7 d。经浓缩后的糊状光合细菌,按相同的比例接种,70 h 内生长缓慢,78 h 后 OD 值可达到 0.75,再经过 147 h 培养 OD 值可达到 1.908。说明糊状光合细菌在培养液中约有 3 d 的缓释过程。经

过缓释后的菌体生长比未浓缩的菌体生长繁殖旺盛。

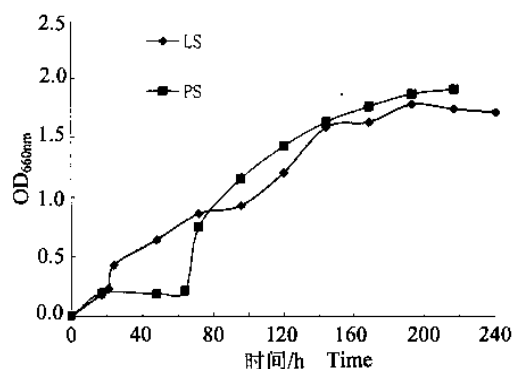


图 1 糊状光合细菌(PS)和液体光合细菌(LS)的 OD 生长曲线(培养温度 30℃,光强 1 000 lx,生长周期 216 h,厌氧)

Fig. 1 Growth curves of pasty photosynthetic bacteria and liquid photosynthetic bacteria

2.2 光合细菌浓缩后吸光值回归分析

光合细菌浓缩前后吸光值测定结果见表 1。

表 1 糊状光合细菌 OD 值

Table 1 OD value of pasty photosynthetic bacteria

(N=16)

取样时间 Sampling time		样品号 Sample No.															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
浓缩前 Before enriched	X	1.326	1.721	1.752	1.339	1.351	1.024	1.707	1.425	1.318	1.637	1.707	1.055	1.656	1.494	1.909	1.863
浓缩后 After enriched	Y	1.94	2.15	2.15	1.675	1.68	1.50	2.51	1.868	1.71	2.16	2.16	1.504	2.02	2.16	2.30	2.30
平均 Mean	Y	1.76	2.15	2.18	1.78	1.79	1.47	2.14	1.86	1.76	2.07	2.14	1.50	2.09	1.924	2.33	2.29

根据线性回归式: $Y = A + BX$

$$B = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$A = \frac{\sum Y - B \sum X}{n}$$

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2] \cdot [n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

X - 光合细菌浓缩前的 OD 值;

Y - 光合细菌浓缩后的 OD 值。

运用上面公式将浓缩光合细菌最终吸光值(OD)计算如下:

$$\hat{Y} = 0.4634 + 0.980X \quad (r = 0.9648)$$

通过比较,这些数据的相关性好,在实际应用中

可以给予实施。

3 应用与效果

3.1 糊状光合细菌的质量指标

自 1994 年开始试制糊状光合细菌以来,累计生产了 6 t 多糊状光合细菌,相当于 250 t 液体光合细菌液。分销秦皇岛、河北三野、上海郊区、锦州市太、海盐市等地及马来西亚。主要用于虾、蟹育种、扇贝育苗、斑节对虾水质净化以及甲鱼越冬各期水质净化,收到了较理想的效果。产品技术指标为:

浓缩比(W/W), 40:1;生物量, 1.5%~2.0%;比活率, >95%。

3.2 糊状光合细菌技术指标跟踪测试

标如表 2。

在 15 批产品中,监测了糊状光合细菌的质量指

表 2 糊状光合细菌跟踪测试指标

Table 2 Trail detective indexes of pasty photosynthetic bacteria

序号 Order	光合细菌 Photosynthetic bacteria						沉淀剂/g Dry weight of floculation	菌丝净重/g Net weight of hypha	生物量/% Biomass	备注 Note
	体积 Volume	OD	湿重/g Wet weight	干重/g Dry weight	纯度/% Purity	水分/% Water content				
1	200	0.570	5.076 8	0.262 5	5.170 6	94.83	0.170 5	0.092 1	1.812 2	
2	200	0.681	5.193 8	0.312 4	6.014 9	93.99	0.170 5	0.141 9	2.732 1	
3	200	0.865	5.170 1	0.222 7	4.307 5	95.69	0.106 7	0.116 0	2.242 7	
4	500	0.883	12.695	0.562 7	4.432 5	95.5 6	0.403 3	0.159 4	1.255 6	
5	200	1.018	4.984 0	0.274 2	5.501 6	94.50	0.143 5	0.130 7	2.622 4	
6	500	1.076	12.117	0.589 3	4.863 6	95.14	0.403 3	0.186 0	1.535 1	
7	200	1.194	4.902 5	0.265 2	5.410 0	94.59	0.106 7	0.158 5	3.233 6	波长 660nm Wave length 比色杯 Optical length 1 cm
8	200	1.285	5.308 3	0.296 2	5.579 9	94.42	0.143 5	0.130 7	2.876 6	
9	200	1.296	4.987 8	0.346 9	6.955 0	93.05	0.176 6	0.170 3	3.414 4	
10	200	1.296	4.891 9	0.277 7	5.676 7	94.32	0.143 5	0.128 0	3.495 5	
11	200	1.348	4.794 4	0.271 5	5.662 9	94.34	0.143 5	0.128 0	2.669 8	
12	200	1.416	4.781 5	0.272 7	5.703 2	94.30	0.143 5	0.129 2	2.702 0	
13	200	1.526	5.157 8	0.312 1	6.051 0	93.95	0.149 6	0.165 2	3.202 9	
14	100	1.699	2.611 3	0.166 5	6.376 1	93.62	0.097 2	0.069 3	2.653 8	
15	500	1.699	12.387	0.856 7	6.916 3	93.08	0.596 0	0.260 7	2.104 6	

通过质量跟踪调查,糊状光合细菌产品的浓缩比基本上稳定在 40:1。经浓缩后的光合细菌,不仅减少了包装和运输成本,重要意义在于使用方便。经解吸后的糊状光合细菌在养殖池中形成一种絮状悬浮物,均匀布置在养殖池的底层,使菌体能获得自身所需养分,并改善了水质。在养殖池换水时,避免了光合细菌的流失。浓缩光合细菌产品中干物质质量占总量的 0.111%~0.200%。干物质包括细菌干重和培养液中溶质的干重。经过收集的糊状光合细菌(湿重),占总容积的比率在 4.3%~6.9%之间。将糊状光合细菌解吸后,再用水洗涤 3 次所获得的菌丝干重占总容积的比率在 0.03%~0.08%之间。根据国内报道,在实验室培养的光合细菌的干重比率为 1.07 g/L^[4]。大规模生产所获得的生物量(干重)与实验室所获得数据相差甚远。二者由于为满足培养条件所用手段不同,处理干重的方法也不同,故导致了数据上的差异。

在光合细菌的试验培养和规模化培养中,通常采用菌体细胞内细胞器的吸收光谱值(OD)来表达菌体含量。其实菌绿素 a 的光谱分析,吸收峰值是 530.0 nm、690.0 nm 和 760.0 nm^[5]。采用 1 cm 比

色杯,波长 660 nm 处 OD 值是以上 3 个峰值的平均值。所以,在不同的文献资料中采用不同厚度的比色杯和不同的波长,所获 OD 值不同。

3.3 糊状光合细菌的贮藏和比活率测定

3.3.1 糊状光合细菌的包装形态和贮藏方法 在生产制备过程中,将絮状沉淀物进行陈化,其目的是去除小的絮状颗粒之间水分子,使胶状沉淀物更稳定,有利于过滤。将过滤后的糊状光合细菌产品分装于 250 g、550 g 塑料瓶并装于 20 kg、25 kg 桶装,加盖密封,常温贮藏备用。

3.3.2 糊状光合细菌的比活率测定 糊状光合细菌产品经过贮存,其表现形态比液体光合细菌产品表现出更具耐藏性。色泽、菌体均匀度、无污染等特征都十分明显。它的商品价值,即经过贮藏后糊状光合细菌的使用价值,与液体光合细菌比较是否有显著的变化,需采用比活率测定来说明,即每单位种子菌量的增加率(表 3)。从表 3 可以看出,其比活率不低于 94%,完全达到新制订的产品标准。经过 1~2 年存贮后,比活率可达 127%~155%。存贮后的产品比活率和表现形态-感官指标是一致的,说明糊状光合细菌具有耐藏性特征。

表 3 糊状光合细菌贮藏期比活率比较

Table 3 The comparison of growth rate of pasty photosynthetic bacteria during storage

取样时间 Sampling time	编号 No.	菌株吸光值 Strains OD		培养终止吸光值 End OD		增加值 OD increment		单位增加值 Unit OD increment		比活率/% Growth rate
		试验组 Exp.	对照组 Control	试验组 Exp.	对照组 Control	试验组 Exp.	对照组 Control	试验组 Exp.	对照组 Control	
当年样品 The first year	1	1.29	1.352	1.89	2.02	0.6	0.668	0.465	0.494	94.13
	2	0.439	0.616	1.925	1.641	1.486	1.025	3.38	1.664	203
	3	0.528	0.680	1.966	2.01	1.438	1.328	2.723	1.95	139
贮存 1 年 Storage for one year	4	0.23		1.71		1.48		6.43		127
			0.31		1.869		1.569		5.06	
贮存 2 年 Storage for two year	5	0.214		1.90		1.686		7.88		155

参考文献:

- [1] 焦瑞身. 微生物生理代谢实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] 李 筠. 红根单胞菌的分离鉴定与生长特性[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 25. 2: 187-192.
- [3] 李林恩. 光合细菌计数方法的探讨[J]. 水产科技情报, 1993, 20 (5): 232-233.
- [4] 张道南. 红螺菌种光合细菌分离、培养及其作为鱼虾类饲料添加剂的初步研究[J]. 水产学报, 1988, 12(4): 347-369.
- [5] 许 兵. 海洋光合细菌的分离及其生长条件的研究[J]. 海洋湖沼通报, 1993(3): 67-73.

Growth and incubation characteristics of pasty photosynthetic bacteria

CHANG Ren-liang, FENG Qiu-xing

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: The strain which is used for pasty photosynthetic bacteria product was identified to be *Rhodopseudomonas spheroides*. A kind of enriched pasty photosynthetic bacteria was made after mutipling incubation. After the photosynthetic bacteria was incubated for 7~9 d, the absorption spectrum value (OD) grew up to 1.908. The shadow detective results showed that the concentrating rate of the product is 40:1. The water content is less than 94%; the biomass was 1.2%~2.0%, per unit of growth rate 95%~203%, respectively. The reactivating ability and qualifications remained steady and usable value was not affected after 2 years storage.

Key words: pasty photosynthetic bacteria; incubation; *Rhodopseudomonas spheroides*