

复合菌群选择培养试验研究

朱 亮 金 贤

(河海大学环境科学与工程学院 江苏 南京 210098)

摘要 :分别采用不同的培养基对复合菌群进行了富集培养研究 ,试验结果表明 :复合菌群富集培养的结果因富集所用的培养基和富集方法的不同而变化 ,其中采用复合菌培养基的培养效果优于其他培养基的培养效果 ;复合菌群原液中含有不同种类的微生物 ,通过选择培养基的定向富集培养 ,可以得到不同目标优势菌群 ,葡萄糖、蛋白胨、酵母膏是复合菌群富集培养合适的碳源和氮源。
关键词 :复合菌群 ;选择培养基 ;富集培养
中图分类号 :X17 **文献标识码** :A **文章编号** :1000-1980(2004)06-0632-04

复合菌群是由光合细菌、放线菌、酵母菌、乳酸菌等多种有益微生物经独特工艺发酵而成的微生物制品 ,广泛应用于污水生物降解、水体环境的修复等环境保护的各个领域。
对复合菌群选择富集培养 ,一方面可以模拟优化微生物繁殖条件 ,恢复有效微生物的代谢活性 ,缩短微生物进行反应的适应期^[1 2] ;另一方面可以提高生物降解的广谱性和效能。此外 ,微生物菌群通过富集培养或驯化 ,能促进微生物之间的基因交换或基因重组 ,从而获得特定的具有生物多样性的微生物扩大培养液。
本文研究复合菌群富集培养方法和选择培养具有占优菌种的复合菌群培养液 ,为其在优化生物降解微生物生态系统中的应用提供技术保障。

1 材料与方法

试验所用的 EM 菌液为日本株式会社爱睦乐 AMRO 环保生物技术有限公司提供的 EM-1 原液。不同碳源和氮源的培养基见表 1。

方案 1 的氮源 :酵母膏 5g ,蛋白胨 5g ,FeSO₄·7H₂O 0.01 g , MgSO₄·7H₂O 0.5 g ,KH₂PO₄1 g ,H₂O1L。方案 2 的碳源 :葡萄糖 20 g。

糖蜜按 4% 的比例与复合菌群原液进行混合 ,污染废水以 95% 的比例与复合菌群原液混合 ,其中低浓度时 ρ(COD_{Cr})为 300mg/L ,高浓度时 ρ(COD_{Cr})为 4000mg/L。糖蜜和污水进行富集时将混合液 500mL 分别放入 750 mL 发酵罐中 ,在 30℃ 的环境下密闭培养。3 d 以后 ,每天测定 pH 值 ,并镜检微生物。

不同碳源、氮源及选择培养基按表 2^[3]分别进行富集培养 ,每天调 pH 值在 6.0 左右 ,并测 OD 值和进行镜检^[4~6]。其中厌氧培养 :取培养液 500 mL 装入 750 mL 发酵罐中 ,按 3% 的比例接种 ,进行混合 ,30℃ 恒温密闭培养 ,敞开培养 :方法同上 ,但瓶口敞开 ,好氧培养 :方法同上 ,但微曝气 ,控制溶解氧在 2 ~ 4 mg/L。

2 结果与讨论

分别以不同碳源、氮源、糖蜜和污染废水为营养物质进行富集培养 ,实验结果见图 1 ~ 5。

2.1 不同碳源、氮源对复合菌群富集培养 OD 值的影响

用分光光度值 OD 可以衡量微生物的生长活动情况 ,OD 值越大说明微生物的聚集密度越大 ,反之则相反。从图 1 中可以看出 ,随着时间的增长 ,培养液的 OD 值越大 ,即其中的微生物生物量随时间的增长而增

表 1 不同碳源和氮源的培养基

Table 1 Culture media with different C-rsources and N-rsources

方案	A	B	C	D
不同碳源	葡萄糖	红糖	淀粉	白糖
不同氮源	蛋白胨	NH ₄ Cl	KNO ₃	酵母膏(8g)

长.葡萄糖、红糖、淀粉、白糖作为碳源时 相比可知葡萄糖优于其他碳源 ,作为氮源 ,有机氮好于无机氮 ,蛋白胨、酵母膏均可以作为复合菌群生长的合适的氮源 ,氯化铵也可以使复合菌群良好生长 ,但生长较慢 ,硝酸钾最差 ,不适宜作为复合菌群生长的氮源 .

表 2 选择培养基组成
Table 2 Composition of selected culture media

培养基(代码)	溶解氧条件	培养基配方
光合细菌培养基(1)	密闭,光照 3 000 lx,敞开,曝气	CH ₃ COONa 2 g, NaHCO ₃ 1 g, NH ₄ Cl 1 g, NaCl 1 g, KH ₂ PO ₄ 0.5 g, K ₂ HPO ₄ 0.2 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2 g, CaCl ₂ 0.01 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.3 g, H ₂ O 1 L.
放线菌培养基(2)	曝气,敞开,密闭	可溶性淀粉 20 g, K ₂ HPO ₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, KNO ₃ 1 g, FeSO ₄ 0.01 g, H ₂ O 1 L.
酵母菌培养基(3)	曝气,敞开,密闭	葡萄糖 100 g, 蛋白胨 7 g, 酵母膏 7 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, H ₂ O 1 L.
乳酸菌培养基(4)	厌氧	葡萄糖 20 g, 酵母膏 10 g, H ₂ O 1 L.
复合菌培养基(5)	密闭、曝气	葡萄糖 10 g, 可溶性淀粉 5 g, KH ₂ PO ₄ 1 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, KNO ₃ 1 g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 g, CaCl ₂ 0.01 g, H ₂ O 1 L.

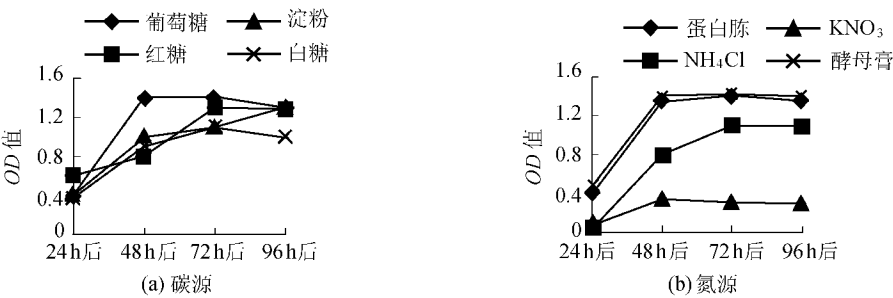


图 1 随时间的增长 OD 值的变化趋势
Fig.1 Variation of OD value with time

2.2 糖蜜及不同浓度食品废水富集培养

由图 2 可知 ,高浓度废水厌氧富集的活菌数较多 ,但根据微生物生长曲线 ,无平衡期出现 ,复合菌群培养液的投加时间难以确定 ,高浓度废水好氧富集所得活菌数不多 ,微生物生长缓慢 ,富集效果不明显 .

由图 3 可以看出 ,糖蜜厌氧和不同浓度污水富集 pH 值基本是下降趋势 ,在富集 5 d 后 pH 值下降到 3.5 ,此后几天 pH 值基本保持 3.5 左右不变 .对富集培养液进行镜检 ,观察到多种微生物 ,其中以酵母菌、乳酸菌、杆菌为主 ,也有少量的光合细菌和放线菌 .出现较多的是酵母菌 ,这是因为酵母菌对生活环境要求不高 ,在有氧条件下可进行有氧呼吸 ,使葡萄糖彻底氧化为 CO₂ 与 H₂O ;在无氧条件下则进行酒精发酵 ,发酵型酵母菌能将碳水化合物分解为酒精和二氧化碳 .酵母菌的生长在中性偏酸 (pH 值为 4.5 ~ 6.5)的条件下较好 .

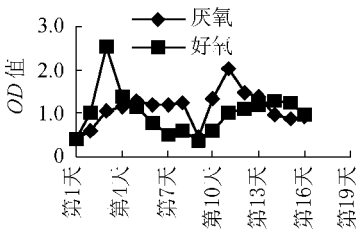


图 2 高浓度食品废水不同富集培养条件下 OD 值变化
Fig.2 Variation of OD value of high concentration foodstuff wastewater under different conditions of enriching cultivation

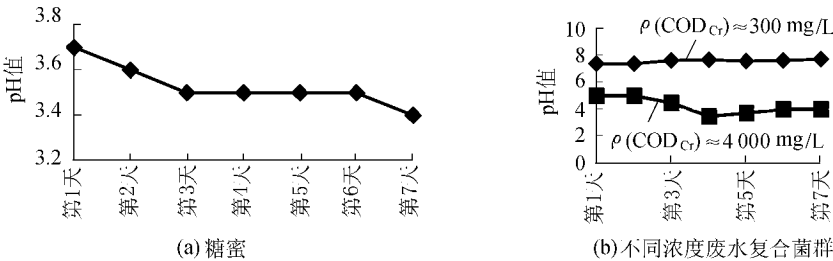


图 3 厌氧富集 pH 值变化

Fig.3 Variation of pH value under the condition of anaerobic enrichment

EM 微生物主要有光合细菌、乳酸菌、酵母菌、放线菌和霉菌,而影响这些微生物生长的最重要的因素是营养物质、氧气、温度和 pH 值^[4],因此有必要研究影响 EM 复壮的主要环境因素,以便为 EM 复壮选择一个更合适的生长环境.因为 EM 中的微生物主要是异养型微生物,其最主要的能源和碳源是糖类,尤其是葡萄糖.在厌氧条件下,葡萄糖主要进行发酵作用,包括两个方面:一方面是葡萄糖的分解,另一方面是氧化态氢载体的再生.因此,用糖蜜作为营养物质进行 EM 厌氧富集能够满足微生物的生长需求,使得富集试验获得成功.在糖蜜厌氧富集中,随营养物及 EM 原液投加量的增加,富集效果越来越好.

2.3 选择培养不同优势菌群

EM 原液中含有不同种类的丰富微生物,经过不同目标培养基的定向富集,可以得到以不同目标优势菌为主的 EM 富集培养液.

a. 光合细菌培养液.由图 4(a)可以看出,在光合细菌培养基的培养条件下,厌氧光照培养条件培养效果最好,其光密度值高于曝气条件.培养 7 d 后,培养液便由无色变为深红色且浑浊,说明有大量紫色非硫细菌生长,光合细菌生长占优势,同时也在第 7 天光密度也达到最大值.而在曝气好氧和敞开条件下,混合液体光密度值不高,显微镜观察也未见大量细菌生长,同时培养液并未变为红色,说明该条件下在光合细菌培养基中非但光合细菌不能很好生长,EM 中的其他微生物也不能充分活化和恢复活性,所以 1 号培养基在最佳培养条件——厌氧光照下培养出了以光合细菌为主的富集培养液.

b. 乳酸菌培养液.由图 4(b)可以看出,在乳酸菌培养基的培养条件下,经过 3~4 d 的密闭培养,光密度可达最大值.镜检可以发现大量的乳酸杆菌,且菌体较大,同时也有少量酵母菌,培养基有一股酸甜气味,说明培养基中的糖类经过发酵有乳酸生成.

c. 放线菌培养液.由图 4(c)可以看出,在放线菌培养基的曝气和敞开条件下培养都获得了成功,而在厌氧条件下,培养液的光密度值很小,说明厌氧条件下的培养效果要远远低于曝气和敞开条件.显微镜观察发现在曝气和敞开条件下有大量放线菌生长,菌丝体缠绕在一起,同时也发现有少量酵母菌和霉菌生长.2 号培养基的复壮结果说明培养以放线菌为主体的 EM 需在好氧条件下进行.

d. 酵母菌培养液.由图 4(d)可以看出,在酵母菌培养基培养条件下,3 种培养条件(曝气、密闭、敞开)都能培养出以酵母菌为主的 EM,显微镜观察可以发现大量的呈卵圆型和圆形的细胞,这是由于酵母菌在好氧和厌氧条件下皆能生长的缘故,但在曝气条件下生长最好,光密度值最高,菌体最多,同时培养液也有一股酸甜发酵的气味.

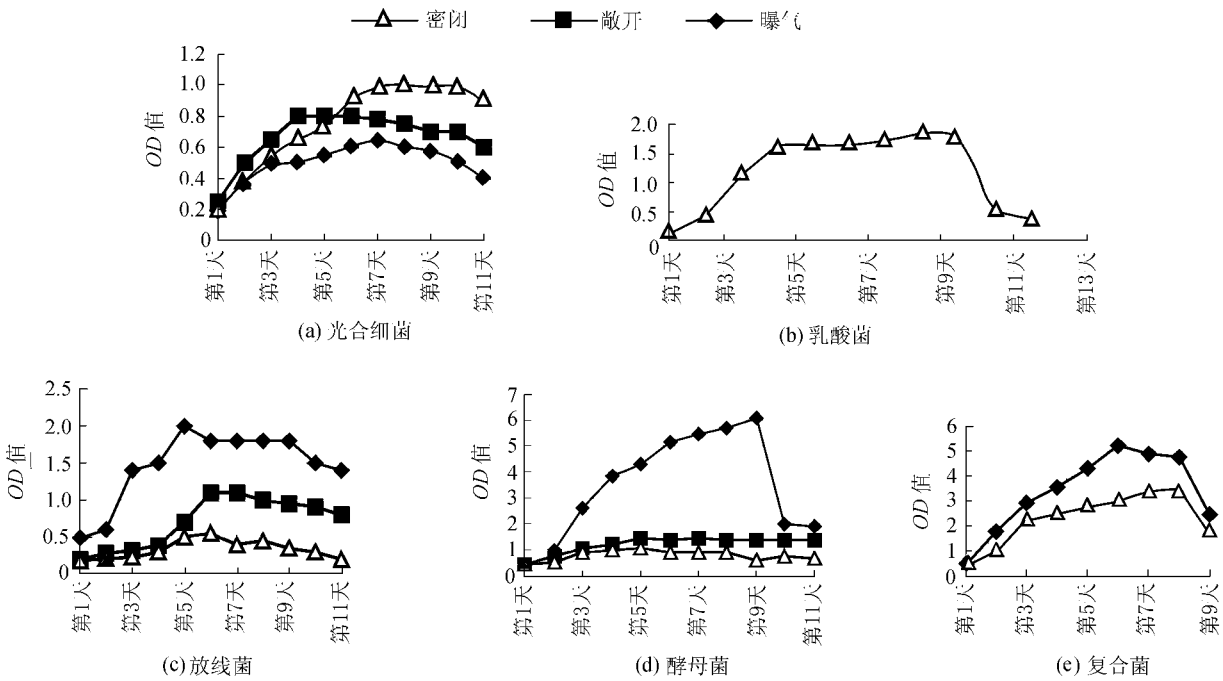


图 4 不同富集培养条件下 OD 值变化

Fig.4 Variation of OD value under different cultivation conditions

e. 复合菌培养液. 由图 4(e) 可以看出, 在复合菌培养基培养条件下, 无论曝气条件还是密闭条件, 采用复合培养基均能对复合菌群进行富集培养, 经过 5~6 d, 复合菌群生长达到最高值.

由图 4 可以看出 5 种培养基的 OD 值总体上随着时间的推移而增长, 其中由于复合菌培养基提供了比较全面的氮源和碳源, 使得复合菌培养液的 OD 值上升得最快, 即用复合菌培养基进行富集培养效果最好.

通过以上的培养结果分析可以看出, EM 原液经过不同的培养基富集培养, 分别培养出了不同的优势菌种, 有光合菌类、放线菌类、酵母菌类、乳酸菌类等, 证实了 EM 是由光合菌、放线菌、酵母菌、乳酸菌等多种有益微生物复合而成的微生物菌剂.

3 结 论

随着时间的增长, 培养液的 OD 值越大, 即其中的微生物量随时间的增长而增长, 以葡萄糖作为碳源、蛋白胨作为氮源对培养液中微生物的生长最佳.

用糖蜜作为营养物质进行 EM 厌氧复壮能够满足微生物的生长需求, 使得富集试验获得成功. 在糖蜜厌氧复壮中, 随营养物及 EM 原液投加量的增加, 富集效果也越来越好. 用低浓度食品废水进行富集培养时不能成功, 这可能与废水浓度太低, 不能给微生物的生长提供足够的营养成分有关, 而用高浓度食品废水进行富集培养, pH 值能快速地降到 3.5 以下, 说明高浓度的食品废水中有足够的营养物质供微生物生长, 然而根据微生物生长曲线可知, 用高浓度食品废水进行富集培养的投加时间难以控制^[7].

以不同的选择培养基进行富集培养可以培养出不同优势菌的富集培养液, 其中以复合菌培养基为最佳.

参考文献:

- [1] 朱雪诞. 用 EM 菌处理高浓度污水的试验研究[D]. 南京: 河海大学, 2001.
- [2] 车美芹. 有效微生物(EM)处理食品废水的实验研究[J]. 环境科学研究, 2002, 15(3): 53—55, 64.
- [3] 朱亮, 汪翊, 朱雪诞, 等. EM 菌富集培养及降解污水试验研究[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2002, 30(2): 6—8.
- [4] 李燕诚. 水处理实验技术[M]. 北京: 北京建工大学出版社, 1995. 121—122.
- [5] 周群英, 高廷耀. 环境工程微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 93—94.
- [6] 田娜, 朱亮. 高效复合菌处理高浓度食品污水的研究[J]. 污染防治技术, 2003, 16(2): 21—22, 33.
- [7] 田娜, 朱亮. 高效复合菌的富集培养试验研究[J]. 环境科学与技术, 2004, 27(2): 15—17.

Experimental study on synthetic-bacteria selective cultivation

ZHU Liang, JIN Xian

(College of Environmental Science and Engineering, Hohai Univ., Nanjing 210098, China)

Abstract Experimental study was performed on enriching cultivation of synthetic-bacteria by use of different kinds of culture media. Some conclusions are drawn: the effect of enriching cultivation of synthetic-bacteria varies with different culture media and methods for cultivation, and the effect of cultivation by use of the synthetic culture medium is superior to that by use of other culture media; many kinds of microorganisms exist in the original liquor of synthetic-bacteria, and through directive enriching cultivation with the selected culture medium, the superior synthetic-bacteria for different objectives can be obtained; glucose, peptone, and microzyme are suitable C-source and N-source for enriching cultivation of synthetic bacteria.

Key words synthetic bacteria; selection of culture medium; enriching cultivation