

分析测试

悬浮培养体系中白腐真菌浓度的测定

王敏, 柴涛, 林凡聪, 武春艳

(中北大学化工与环境学院, 山西太原 030051)

摘要:在悬浮培养体系中,采用浊度法测定白腐真菌的浓度,首先确定了330nm作为测定白腐真菌菌液吸光度的波长,通过确定菌体浓度与吸光度之间的函数关系,绘制标准曲线,可以快速、准确的得到待测悬浮培养体系中白腐真菌的浓度,进而绘出白腐真菌在液体培养环境下的生长曲线。同时,对不接种不离心的培养液、高速离心后的上清液、高速离心后的上清液稀释10倍的3种液体测定了其吸光度值,结果表明,悬浮培养体系中的色素对菌体浓度的测定有一定影响,可通过对培养液稀释来降低该类影响。

关键词:白腐真菌;浊度法;吸光度;浓度;生长曲线

中图分类号:Q93-31

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2010)09-0090-03

The determination of the concentration of white-rot fungi in suspended culture environment

WANG Min, CHAI Tao, LIN Fan-cong, WU Chun-yan

(College of Chemical Engineering & Environmental, North University of China, Taiyuan 030051, China)

Abstract: In the suspended culture environment, in order to determine the concentration of white-rot fungi using nephelometry, first of all, identified 330nm as the wavelength to determine the absorbency of white-rot fungi, then, established the function between the absorbency and concentration, plotted the standard curve, we can quickly and accurately get the concentration of untested white rot fungi, and then, plotted the growth curve of white-rot fungi which cultured in liquid. Simultaneously, tested the absorbency of the three liquid; without centrifugal and inoculated culture medium, supernatant after high-speed centrifugal, diluted 10 times of the supernatant after high-speed centrifugal, the results showed that the pigment of the suspended culture environment have certain influence on determining the concentration, which can be reduced by diluting the culture medium.

Key words: white-rot fungi; nephelometry; absorbency; concentration; growth curve

在微生物学研究中,生物量的测定是确定微生物培养过程中菌体生长动力学和深入研究微生物代谢调控的基础。常规测定菌体浓度的方法有多种,如离心法、浊度法^[1]、显微镜直接计数法^[2]、重量法^[3]、血球计数板计数法^[4]等,每种方法都有其特定的适用范围和优缺点。对于悬浮培养液没有固体颗粒和色素产生的体系,浊度法具有简单、迅速且可连续测定的特点,非常适用于实际生产监控。白腐真菌由于其降解功能表现出高效、低耗、适用性强等特点^[5],已经被应用于染料^[6-7]、垃圾渗沥液^[8]、五氯酚^[9]、TNT炸药废水^[10]等的降解。本文主要采用浊度法研究测定培养液对吸光度值和白腐真菌(white-rot fungi,以下简称W.X菌)生长曲线测定结果的影响,确定白腐真菌的生长曲线,最终获得悬浮培养体系中白腐真菌的准确浓度,为白腐真菌培养条件的综合调控提供有利的参数因子。

1 实验原理

采用浊度法测定悬浮培养体系中白腐真菌的浓

度:当光线通过微生物菌悬浮液时,菌体的散射和吸收作用使光线的透过量降低。在一定的范围内,细胞浓度与透光度成反比,与吸光度成正比。应用该方法首先确定由细胞所造成的最大吸收峰,然后用一系列已知浓度的菌悬液测定吸光度,作出吸光度—菌体浓度(A—C)标准曲线。从标准曲线查出对应的吸光度值即可换算出培养液中菌体的浓度^[11-13]。

2 实验材料与方法

2.1 菌种来源

实验所用菌种为自行培养的白腐真菌,其选育方法是在土壤中埋入长有白毛状菌丝的腐烂木块,培养一段时间后,在木块上用灭菌后的接种环挑取白毛状菌丝接种到特定培养基上分离、纯化、培养。

2.2 仪器设备

SPX-150B-D型振荡培养箱、YXQ-LS-S II型全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅、SW-CJ-1F型

收稿日期:2010-06-08

作者简介:王敏(1985-),女,硕士生,从事微生物法处理工业废水方面研究,通讯联系人,wm_20070818@126.com;柴涛(1968-),女,博士,教授,硕士生导师,从事工业水处理方面研究。

无菌操作台、AL204-IC型电子天平、WFZ UV-2000型紫外可见分光光度计、YXJ-2A型电动离心机等。

2.3 培养基

综合马铃薯培养基:取去皮马铃薯切成小块,称80 g,放入烧杯,加入500 mL蒸馏水,在80℃恒温水浴中煮沸30 min,边煮边搅拌,然后用纱布过滤,滤去马铃薯块,在滤液中加入1.2 g KH_2PO_4 后倒入1 000 mL烧瓶中,加蒸馏水至标线,在高温高压(121℃)下灭菌20 min,再加入经紫外光灭菌的葡萄糖10 g,pH取自然状态。

2.4 培养条件

将上述培养基冷却至45~50℃,然后分装到经高温灭菌的250 mL锥形瓶中,用接种环挑取1环保存于试管中的W.X菌到装有蒸馏水的试管(经121℃灭菌20 min)中,摇匀,稀释到适宜浓度后静置5 min,用微量移液管移取1 mL上清液至装有培养基的锥形瓶中,用4层纱布和1层滤纸封口,恒温摇床振荡培养(30℃,转数140 r/min)。

3 实验结果与分析

3.1 最大吸收峰的确定

取30℃恒温摇床振荡培养2 d的W.X菌菌液10 mL,用浓盐酸调节pH=3,抑制菌体的继续生长,利用紫外可见分光光度计在290~500 nm波长内进行测量,选出最大吸收峰。经测定实验所测波长与吸光度的关系曲线见图1。

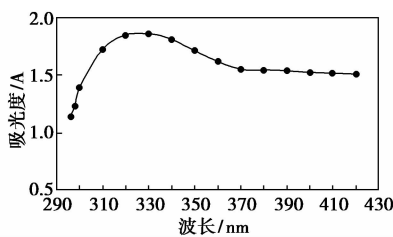
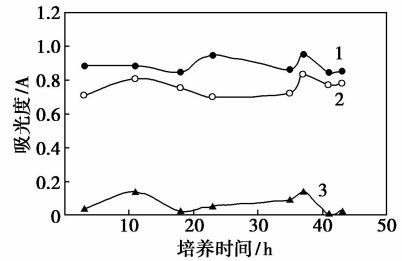


图1 波长与吸光度的关系曲线图

从图1中可以看出,在330 nm处,菌液的吸收峰达到最大值,因此选用330 nm作为测定菌液吸光度的波长。

3.2 培养液中色素的影响

悬浮培养体系中测定浊度时的主要影响因素是综合马铃薯培养基的黄色色素,因此,在W.X菌培养过程中,取不同培养时间的培养液,用浓盐酸调节pH=3,分别取不接种不离心的培养液、高速离心后的上清液、高速离心后的上清液稀释10倍的3种液体,在330 nm下测其吸光度,结果见图2。



1—高速离心后的上清液稀释10倍;2—高速离心后的上清液;
3—不接种不离心的培养液

图2 培养液中色素的影响曲线图

由图2表明,W.X菌在连续培养48 h过程中,上述3种液体的变化趋势一致,只是在数量上存在一定的差异,可以确定;培养基的色素基本保持不变,培养基的色素对菌体浓度测定的影响可视为恒定。当离心后的上清液稀释10倍后,其吸光度值接近零,因此可将培养液稀释10倍后采用浊度法测定悬浮培养体系中白腐真菌的浓度。

3.3 标准曲线的绘制

3.3.1 重量法测菌液浓度

取液体培养基培养48 h的菌液进行该组实验。将一支离心试管置于干燥箱中烘干至恒重,自然冷却后用电子天平称其质量。准确量取10 mL W.X菌菌液,调节pH=3,送入离心机进行离心分离(4 000 r/min,15 min),倒去上清液,加无菌水,再一次离心分离,倒去上清液,将菌体送干燥箱烘干至恒重,自然冷却后取出称量,得到培养液中菌体的真实浓度。

3.3.2 测定系列标样的吸光度

取与重量法同一白腐真菌菌液0.5、1.0、2.0、2.5、5.0、8.0、10.0、12.5 mL,定容至25 mL比色管中,以1 cm比色皿比浊,波长330 nm,分别测其吸光度。实验所测数据见表1。

表1 菌液浓度与吸光度的关系

体积/mL	稀释倍数	菌液质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	菌液吸光度
0.5	50.0	0.136	0.001
1.0	25.0	0.272	0.038
2.0	12.5	0.544	0.106
2.5	10.0	0.680	0.131
5.0	5.0	1.360	0.368
8.0	3.1	2.176	0.738
10.0	2.5	2.720	0.918
12.5	2.0	3.400	1.091

3.3.3 标准曲线的绘制

以菌体浓度为横坐标,其对应的系列标样吸光度为纵坐标,绘制 A-C 标准曲线。结果见图 3。

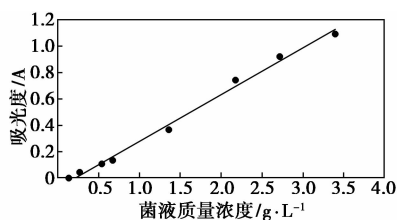


图3 菌液浓度与吸光度的关系曲线图

回归方程为 $y = 0.3521x - 0.0729$, $R^2 = 0.9939$, 线性关系良好。

3.4 菌体浓度的测定

将不同培养时间的待测菌液按 3.3.2 中的相关步骤操作,测得吸光度,通过图 3 查出菌体浓度值,再乘以相应稀释倍数,即可得到菌液浓度。也可通过回归方程计算。

3.5 生长曲线的绘制

将 W. X 菌接种于装有 100 mL 综合马铃薯培养液的锥形瓶中恒温摇床振荡培养,培养条件:30℃、140 r/min,从 0 时刻开始,每隔一段时间取培养液稀释 10 倍后在 330 nm 下测其浊度,记录实验数据,从标准曲线查出对应的吸光度值即可换算出培养液中菌体的浓度,以时间为横坐标,菌体浓度为纵坐标,则白腐真菌 W. X 的生长曲线如图 4 所示。

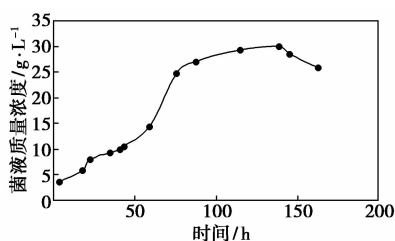


图4 白腐真菌 W. X 的生长曲线图

由白腐真菌 W. X 的生长曲线图可以看出,经过 168 h 的培养,0~48 h 内菌液浓度缓慢增长,48~96 h 内菌液浓度快速增长,到 96~144 h 达到最大值且在这段时间内基本保持稳定不变,之后菌液浓度下降。由此说明,0~48 h 为白腐真菌的适应期(迟缓期),48~96 h 为白腐真菌的对数生长期,96~144 h 为白腐真菌的稳定期,144 h 以后为衰亡期。

4 结论

(1) 确定了白腐真菌 W. X 在悬浮培养体系中的最大吸收波长为 330 nm;

(2) 悬浮培养体系中的色素对菌体浓度的测定有一定影响,可通过对培养液稀释以降低该类影响;

(3) 对白腐真菌 W. X 进行了生长曲线的测定,由生长曲线图可以看出,W. X 菌经历了适应期、对数生长期、稳定期和衰亡期 4 个时期,这与一般微生物的生长周期一致,与固体培养基上的 W. X 菌生长情况保持一致,说明了该种方法的准确性,也为确定悬浮培养体系中白腐真菌的浓度提供了依据;

(4) 将白腐真菌 W. X 菌液稀释 10 倍后,用浊度法测定悬浮培养体系中 W. X 菌的生物量快速方便,准确度高。

参考文献

- [1] 贾士儒. 生物工艺与工程实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2002.
- [2] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [3] 孙悦迎. 食品微生物[M]. 北京:中国商业出版社,1991.
- [4] 牛天贵. 食品微生物学实验技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002.
- [5] 李慧蓉. 白腐真菌及其技术的潜在工业应用[J]. 工业微生物,1996,26(2):35-39.
- [6] 金敏,李君文. 白腐真菌处理染料废水的研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备,2003,4(3):54-58.
- [7] Zhang F M, et al. Development of bioreactor systems for decolorization of orange II using white rot fungus[J]. Enzyme & Microbial Technology,1999,24(1/2):48-53.
- [8] 高航,徐宏勇,刘勇弟. 白腐真菌附着式生物膜反应器处理垃圾渗沥液技术研究[J]. 环境科学学报,2004,24(2):309-314.
- [9] Pallerla S, Chambers R P. Reactor development for biodegradation of pentachlorophenol[J]. Catalysis Today,1998,40:103-111.
- [10] 何德文,肖羽堂,周申范. 白腐真菌处理难生物降解的有机废水研究[J]. 工业水处理,2000,20(3):16-18.
- [11] 熊海燕,王为国,王存文,等. 介绍测量菌液浓度的一种方法[J]. 四川食品与发酵,2003(4):45-46.
- [12] 谢涛,廖安平,黄春好,等. 浊度法快速测定甘露醇发酵液中的生物量[J]. 广西民族大学学报:自然科学版,2008,14(3):75-77.
- [13] 杨广. 液体培养条件下细菌浓度两种测定方法比较[J]. 微生物学杂志,2005,25(4):71-72. ■

《现代化工》欢迎广大作者踊跃投稿,投稿邮箱:mci@cheminfo.gov.cn,增刊投稿邮箱:zhaoxy@cheminfo.gov.cn。