

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02133074.3

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1312273C

[22] 申请日 2002.9.30 [21] 申请号 02133074.3

[73] 专利权人 中国科学院沈阳应用生态研究所
地址 110016 辽宁省沈阳市沈河区文化路
72 号

[72] 发明人 薛德林 胡江春 马成新 王 伟
刘 军 王书锦

[56] 参考文献

JP7184667A 1995.7.25

WO9300443A1 1993.1.7

哈尔滨市污染水质中光合细菌的分离、鉴定及发酵条件研究 杨晨敏, 哈尔滨师范大学自然科学学报, 第 15 卷第 6 期 1999

培养基组成对光合细菌产生类胡萝卜素的
影响 肖念平, 大连民族学院学报, 第 4 卷第 3
期 2002

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司

代理人 许宗富 周秀梅

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

一种光合细菌培养基用添加剂

[57] 摘要

本发明涉及光合细菌的培养, 具体的说是一种光合细菌培养基用添加剂, 其中包括丙酸钠 0.5 ~ 2.0 克/每升培养基, 铁离子盐 10 ~ 100PPM。本发明产品在适应生长的条件下, 使光合细菌快速繁殖, 形成光合细菌产品。其培养基成本低、用途适用性广、菌体繁殖速度快、生产安全性好、对生态环境友好。可用于农业、环保、医药等诸多方面。大批量生产光合细菌时, 在农业、畜牧业、环保业应用, 可以城市有机工业废水、工业下脚料、农副产品废弃物经综合处理后为原料, 接种光合细菌后进行发酵培养研制成高浓度光合细菌产品; 在医药业等方面应用, 则应以分析纯无机盐类化学试剂为原料, 制成培养基, 接种、培养、提纯、精制制成光合细菌产品。

1.一种光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：每升培养基中含有丙酸钠 0.5~2.0 克，铁离子盐 10~16PPM。

2.按照权利要求 1 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中丙酸钠为 0.6~1.5 克/每升培养基。

3.按照权利要求 2 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中丙酸钠 0.8~1.2 克/每升培养基。

4.按照权利要求 3 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中丙酸钠 1.0 克/每升培养基。

5.按照权利要求 1、2、3 或 4 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中所述铁离子盐为有机铁离子盐。

6.按照权利要求 1、2、3 或 4 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中含有酵母膏 0.2~1.0 克/每升培养基。

7.按照权利要求 1 所述的光合细菌培养基用添加剂，其特征在于：其中所述培养基是指实验室常用种子发酵培养基或按常规方式综合处理的城市有机工业废水、农副产品废弃物或工业下脚料。

8.一种光合细菌培养基，其特征在于组成如下：氯化铵 1.0g、醋酸钠 1.0g、硫酸镁 0.2g、碳酸氢钠 1.0g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.2g、柠檬酸铁 0.005g、丙酸钠 1.0g、酵母膏 1.0g、蛋白胨 1.0g、无机盐溶液 10mL、生长辅助因子 0.01g、蒸馏水 1000mL、PH=7.0；其中所述无机盐溶液组成为：三氯化铁 5mg/L、硫酸钙 0.05 mg/L、硼酸 1 mg/L、二氧化锰 0.05 mg/L、硫酸锌 1 mg/L。

9.一种权利要求 1 所述的光合细菌培养基用添加剂的应用，其特征在于：将光合细菌种子液按重量 20~30%高接量接种到培养基中，其中加入权利要求 1 所述的光合细菌培养基用添加剂，利用自然光照使光合细菌繁殖。

一种光合细菌培养基用添加剂

技术领域

本发明涉及光合细菌培养方法,具体地说是一种光合细菌培养基用添加剂。

技术背景

光合细菌(Photosynthetic Bacteria 简称 PSB)生态分布极为广泛,主要分布在海洋、江河、湖沼、活性污泥和土壤中,是一类水生、水圈微生物。光合细菌以太阳光作为能源,以醋酸钠、乳酸钠、甘露醇、苹果酸、柠檬酸、葡萄糖、甘油等多种有机物为碳源和氮源,并且菌体具有生长繁殖速度快、培养基来源广泛容易培养、代谢产物营养丰富等特点,其产品能广泛用于饲料工业、农业生产、环境保护等诸多方面;因此,愈来愈受到科技工作者和企业界人士重视;在以往的研究中,人们往往注重于光合细菌的分类学地位、分子生物学内容、光合固氮与放氢的过程、光合固氮与放氢基因的表达与调控上。近年来,人们对光合细菌的研究非常广泛,应用研究也获得很大的进展,诸多研究表明,光合细菌在农业环保、医药等方面均有较高的应用价值,经测定:光合细菌干菌体蛋白质含量为60.15%,其中氨基酸组成比例合理;另外,还含有丰富的维生素和不饱和脂肪酸、细菌多糖、核酸和各种辅酶及农作物、动物及人体生长所需的生理活性物质等等。伴随着市场经济的渗入,人们愈来愈重视光合细菌的应用研究与应用技术开发,将光合细菌应用于农业、家禽饲养业、水产养殖业、环境保护、土地污水处理和保健食品等方面。但是常规的培养方法其不足之处在于菌株生长繁殖慢、含菌量少,远远不能满足生产应用的要求。

发明内容

本发明的目的在于提供一种能促使光合细菌菌株快速生长繁殖的光合

细菌培养基用添加剂。

为实现上述目的，本发明采用的技术方案为：

一种光合细菌培养基用添加剂，每升培养基中含有丙酸钠 0.5~2.0 克，铁离子盐为 10~100PPM；

其中较好的取值范围为：丙酸钠 0.6~1.5 克/每升培养基，铁离子盐为 40~100PPM；更好的取值范围为：丙酸钠 0.8~1.2 克/每升培养基，铁离子盐为 80~100PPM；最佳值为：丙酸钠 1.0 克/每升培养基，铁离子盐为 100PPM；

其中所述铁离子盐为有机铁离子盐（例如：柠檬酸铁、柠檬酸铁铵、琥珀酸铁、乳酸亚铁等）或无机铁离子盐（例如：硫酸亚铁、氯化铁等）；

添加剂中还可以含有酵母膏 0.2~1.0 克/每升培养基；其较好的取值范围为：0.5~1.0 克/每升培养基；更好的取值范围为：0.8~1.0 克/每升培养基；最佳值为：1.0 克/每升培养基；

所述培养基是指实验室常用种子发酵培养基、按常规方式综合处理的城市有机工业废水、农副产品废弃物或工业下脚料（例如：淀粉加工厂废水下脚料、豆腐制品厂废水下脚料或牲畜屠宰厂废水下脚料）成为能发酵培养光合细菌的营养原料（培养基）。

应用光合细菌培养基进行高浓度光合细菌的培养方法为：将光合细菌种子液高接量（20~30%）接种到扩大的种子发酵培养液中或接种到城市有机工业废水、下脚料综合处理好的发酵培养液中，其中加入光合细菌培养基用添加剂，利用自然光照使光合细菌繁殖，使光合细菌每毫升达到 20 亿个以上，并将其研制成光合细菌产品。

在室内或室外先按照种子培养基发酵培养成光合细菌种子液（种子液需要用标准菌种作对比指示进行检查以保证质量），种子培养用发酵培养基的较佳组成如下：氯化铵 1.0g、醋酸钠 1.0g、硫酸镁 0.2g、碳酸氢钠 1.0g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.2g、柠檬酸铁 0.005g、丙酸钠 1.0g、酵母膏 1.0g、蛋白胨 1.0g、无机盐类溶液 10mL、生长辅助因子 0.01g、蒸馏水 1000mL、PH=7.0。

其中生长辅助因子包括：维生素 B1、氨基苯甲醇、生物素等细菌培养常用物质。

其中无机盐类溶液是指：微量的无机盐类溶液，每升蒸馏水中含有三氯化铁 5 毫克、硫酸钙 0.05 毫克、硼酸 1 毫克、二氯化锰 0.05 毫克、硫酸锌 1 毫克。

要求种子培养物纯度要高，操作时应注意培养基消毒灭菌和无菌操作技术。

在实验室条件下，配置种子发酵培养基，以分析纯无机盐化学试剂和生化试剂为原料，接种光合细菌进行发酵培养。大批量生产光合细菌时，以城市有机工业废水、工业下脚料、农副产品废弃物经综合处理后为原料或以分析纯无机盐化学试剂和生化试剂为原料，接种光合细菌进行发酵培养。接种光合细菌进行发酵培养时，可利用自然太阳光为能源，也可以日光灯为能源（或者在日光温室塑料大棚内），在摄氏 30~32 度下培养，使其快速生长繁殖，光合细菌每毫升可达到 20 亿个以上，并将其研制成光合细菌产品。

应用时可首选对蔬菜、人参等经济类作物和畜禽类动物中进行应用。

本发明具有如下优点：

1. 光合细菌繁殖快速。在相同的适应生长条件下，应用本发明使光合细菌生长繁殖快，较一般通用培养基培养快 2~3 天，产品菌数浓度高，较一般通用培养基培养菌数提高 30%以上。

2. 培养基原料来源广泛。本发明光合细菌培养原料简单普遍；大批量生产光合细菌时，可以城市有机工业废水、工业下脚料、农副产品废弃物经综合处理后为原料，接种光合细菌后进行发酵培养研制成高浓度光合细菌产品；在医药业等方面应用，则应以分析纯无机盐类化学试剂为原料，制成培养基，接种、培养、提纯、精制制成光合细菌产品。

3. 用途广。可用于农业、环保、医药等诸多方面。

4. 菌体适应性好，降低了生产成本。本发明降低了光合细菌对培养基

营养成分的要求，并且生产安全性好，对生态环境友好。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步详细说明。

实施例 1

按下列步骤操作：

(1) 种母活化：对光合细菌的种母进行活化（移接新斜面，或转接到液体培养基中培养 3~5 天）；其中采用加入本发明添加剂的培养基培养需 3 天达到使用要求，采用未加入本发明添加剂的培养基培养则需 5 天；

(2) 种子发酵培养：将光合细菌活化好的种母接入到种子发酵培养基中，盛装于 2000 毫升透明的玻璃瓶内（培养基量为 70%，余量为接种量），放在自然太阳光下照射培养（温度在 20~30℃），7 天种子培养基成熟，含菌量达到每 2 亿/ml，培养液呈鲜红或深红色，显微镜下检查光合细菌运动活泼，整齐，即可供扩大发酵培养用；

种母活化与发酵培养的培养基为：

氯化铵 1.0g、醋酸钠 1.0g、硫酸镁 0.2g、碳酸氢钠 1.0g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.2g、硫酸亚铁 0.001g、丙酸钠 1.0g、酵母膏 1.0g、蛋白胨 1.0g、生长辅助因子（维生素 B1：氨基苯甲醇：生物素=1：1：1）0.01g、无机盐类溶液 10mL、蒸馏水 1000mL、PH=7.0。

(3) 扩大发酵培养：将光合细菌种子发酵培养液以 30%大接种量，装入到扩大发酵培养液中，盛装于 5000 毫升透明的玻璃瓶（也可以采用白色塑料桶）内（培养基量为 70%）放在自然太阳光下照射培养（温度 20~30℃范围内），10 天扩大发酵培养成熟，含菌量达到 10 亿/毫升以上，培养液呈鲜红或深红色，显微镜下检查光合细菌运动活泼，菌体健壮，无污染、无异味、无异常现象，即可应用于蔬菜或人参等作物的施肥。施用量可掌握在每 100 平方米上施 1Kg 光合细菌扩大发酵培养液，此培养液可以直接浇灌根部，也可以用 10 倍水稀释后喷洒根茎基部或叶面。

本扩大发酵培养基的组成配方如下：

氯化铵 1.0g、醋酸钠 1.0g、硫酸镁 0.2g、碳酸氢钠 1.0g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.2g、硫酸亚铁 0.001g、丙酸钠 1.0g、酵母膏 1.0g、蛋白胨 1.0g、微量元素溶液 10 毫升、自来水 1000 毫升

实施例 2

对本发明可按下列步骤操作：

- (1) 种母活化：同实施例 1 (1)；
- (2) 种子发酵培养：同实施例 1 (2)；
- (3) 扩大发酵培养：

将光合细菌种子发酵培养液（活跃的光合细菌数，每 ml 达到 2 亿个），按 30% 转接到扩大发酵培养基中扩繁，本扩大用发酵培养基选用豆制品废水，在 10 公斤白色塑料桶中装豆制品废水 7 公斤，（其中添加剂的组成为：丙酸钠 1.0 克/每升，硫酸亚铁 0.001 克/每升，酵母膏 0.5 克/每升。）转接后的白色塑料桶可放在自然太阳光照下培养，10 天成熟，其技术指标可达到如下表 1。

表 1

	PH	BOD (ppm)	COD (ppm)	光合细菌数(亿个/ml)
培养前	6.4	7120	6840	0
培养后	8.5	542	210	12

实施例 3

对本发明可按下列步骤操作：

- (1) 种母活化：同实施例 1 (1)；
- (2) 种子发酵培养：同实施例 1 (2)；
- (3) 扩大发酵培养(在实验室条件下)：接种与培养方法同实施例 1(3)；

在实验室条件下，进行加入添加剂的发酵培养基优选，500 毫升的瓶子中装 350 毫升无添加剂的培养基，加不同组合的添加剂（其加入量见均匀设计方案表 2），共设 9 个处理，编号为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 然后

每瓶接种光合细菌种子液 30%，放在自然太阳光照下培养（温度 25~30℃）10 天，测定光合细菌菌数。

表 2

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
丙酸钠 (g/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6
柠檬酸铁 (g/L)	0.002	0.006	0.01	0.014	0	0.004	0.008	0.012	0.016
酵母膏 (g/L)	0.3	0.2	0.1	0	0.35	0.25	0.15	0.05	0.4

试验是以无添加剂的发酵培养基作为对照组；

发酵培养基配方组成如下：

氯化铵 1.0g、醋酸钠 1.0g、硫酸镁 0.2g、碳酸氢钠 1.0g、氯化钠 0.5g、磷酸氢二钾 0.2g、蛋白胨 1.0g、无机盐类溶液 10mL、生长辅助因子 0.01g、蒸馏水 1000mL、PH=7.0。不同添加剂组合的试验结果如表 3。

表 3

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	对照组
菌数 (亿个/毫升)	6.0	7.5	7.4	9.5	7.0	11.5	10.0	9.5	9.3	5.6

对照组为发酵培养基中不含添加剂组

试验结果表明，以 6 号试样加入添加剂量（即丙酸钠 1.0 克/每升、硫酸亚铁 0.004 克/每升、酵母膏 0.25 克/每升）的组合为最佳。

实施例 4

对本发明可按下列步骤操作：

- (1) 种母活化：同实施例 1 (1)；
- (2) 种子发酵培养：同实施例 1 (2)；
- (3)、扩大发酵培养：将光合细菌种子发酵培养液（含活越的光合细菌数，每 ml 达到 2 亿个），按 30%接种量转接到扩大发酵培养基中扩繁，本扩大发酵培养基选用屠宰鸡场有机废水，在 10 公升白色塑料桶中装有屠宰鸡场有机废水 7 公斤，再添加（添加剂组成为：丙酸钠、柠檬酸铁、酵母

膏), 然后放在自然太阳光照下培养(温度 20~30℃), 10 天, 其光合细菌含量可达到如下表 4: 每 ml 达到 7 亿个, 即可应用;

表 4

处理编号	屠宰鸡场废水 (Kg)	丙酸钠 (g/L)	柠檬酸铁 (g/L)	酵母膏 (g/L)	光合细菌 (亿个/mL)
1	5	2.0	0.01	1.0	9
2	5	1.0	0.005	0.5	8
3	5	0.5	0.001	0.25	5
4	5	0.25	0.0005	0.125	4.5
5	5	0.125	0.00025	0.0625	4
6	5	0.063	0.00013	0.0313	3
7	5	0	0	0	1.2

本发明实施例中所采用的光合细菌种母均可市购获得, 对其并无特殊要求。

本发明应用时扩大发酵培养基的选取原则为:

在农业、畜禽业、环保业应用, 可以城市有机工业废水、工业下脚料、农副产品废弃物经综合处理后为原料, 再加入添加剂; 在医药业等方面应用, 则应以分析纯无机盐类化学试剂为原料, 制成培养基, 接种、培养。

本发明添加剂对于优势的光合细菌菌种(例如: 中国科学院沈阳生态研究所分离保存的光合细菌 9218 菌种), 其应用效果更为显著。