

苏云金芽孢杆菌发酵上清中增效物质生成的相关研究

陈振民^{1,2} 李青² 刘华梅² 谢天健² 曹军卫^{1*}

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)¹ (武汉科诺生物农药有限公司 武汉 430074)²

摘要: 利用 BIostat[®]-CL15L 全自动发酵罐和 2.0 t 不锈钢发酵罐, 对苏云金芽孢杆菌不同菌株 (GC-91, MP342, HD-1) 发酵上清液中增效物质的生成进行了研究, 发现增效物质于对数生长期前期开始产生并积累, 至对数生长期末期达到高峰, 并保持稳定; 不同菌株的发酵上清中增效物质生成量不同, 其中 GC-91 最强 (增效倍数 $f=6.0$), MP342 次之 ($f=3.7$), HD-1 最弱 ($f=1.5$); GC-91 菌株上清液中增效物质生成曲线与晶体含量, 效价代谢曲线相似, 说明三者之间有显著的正相关。溶氧对 GC-91 上清增效物质生成有明显影响, 供氧充足, 增效物质合成量较高 ($f=6$), 供氧不足合成量较低 ($f=4$)。

关键词: 苏云金芽孢杆菌, 上清液增效物质, 生成

中图分类号: S476.11 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 01-0022-04

STUDY ON THE GROWTH OF SYNERGIER IN THE SUPERNATANT OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

CHEN Zhen-Min^{1,2} LI Qing² LIU Hua-Mei² XIE Tian-Jian² CAO Jun-Wei¹

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)¹

(Wuhan kernel biopesticide company, Wuhan 430074)²

Abstract: The growth curves of synergier in the supernatant from strains of *Bacillus thuringiensis* GC-91, MP-342 and HD-1 were studied. The results showed that the production and accumulation of synergier began in the beginning of the logarithmic growth phase, and reached the top in the end of the logarithmic growth phase, and kept stable during the stable phase. Synergier in the supernatant from different *Bacillus thuringiensis* strains grew differently, strain GC-91 (whose synergistic fold was 6) grew better than strain MP-342 (whose synergistic fold was 3.4), strain HD-1 grew badly (whose synergistic fold was only 1.8); There was much similarity among the synergistic growth curve, crystal growth curve and bioassay potency curve, which indicated that the relations among synergier, crystal and bioassay potency was remarkably positive correlation. Dissolved oxygen had some degree influence on the synergier growth, abundant provision oxygen was contributed to the synergistic growth.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Synergier in supernatant, Grow

以往的研究认为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 以下简称 *Bt*) 的毒力来源于伴孢晶体和芽孢, 但近 10 年来, 有研究报道 *Bt* 发酵上清液中含有一种分子量为 1,000 D, 结构与抗生素 ZwittermicinA 相似的增效物质, 对 *Bt* 的毒力有着显著影响。大多数苏云金芽孢杆菌亚种能产生这种发酵上清增效物质, 其自身的杀虫活性极低, LC_{50} 高达 3,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 但是其能使微生物杀虫活性至少增加 50%, 使杀虫晶体蛋白的杀虫活性增加 1.5 ~ 1,000 倍, 且对原毒素和活化毒素都有增效作用。其增效作用包括 3 个方面: (1) 增加与杀虫有关的芽孢杆菌的杀虫活性; (2) 增强化学杀虫剂的杀虫活性;

* 联系人

收稿日期: 2002-12-09, 修回日期: 2003-02-24

(3) 增加具有杀虫性能的病毒的杀虫活性。发酵上清增效物质在增加与杀虫有关的芽孢杆菌的杀虫活性同时, 还能降低害虫对芽孢杆菌的抗药性^[1,2]。李青等曾报道了^[3]菌株 GC-91 发酵上清液有较强增效作用。本文对苏云金芽孢杆菌菌株 GC-91, MP-342, HD-1 发酵上清液中增效物质的生成与菌体生长的时间进程和溶氧对增效物质生成的影响进行了研究, 以期了解上清液增效物质的生成规律, 为高效生产这些菌株的增效物质提供最佳条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

苏云金芽孢杆菌 GC-91 引自 Ciba-geigy 公司, 内毒素基因为 *cryIA* (a), *cryIA* (c), *cryIC*, *cryID*, 无 *cryt* 基因, 不产 β -外毒素。HD-1, MP-342 菌株为本实验室保存菌种, 血清型为三型。

1.2 培养基

豆粕和淀粉为主的生产培养基。

1.3 苏云金芽孢杆菌 GC-91 孢晶标准品的制备

取生产批号为 1995097 原粉 (1995-07-21 生产), 用无菌蒸馏水制成悬液, 8,000 r/min 离心去上清, 补入同体积的水, 捣碎均匀, 重新离心洗涤 4~5 次, 直至洗涤上清澄清透明为止。沉淀物经 50℃~54℃, 热膨化 4~5h, 40℃ 下冷冻干燥 20h, 用研钵磨碎, 200 目过筛, 混合均匀, 分装棕色小瓶 4℃ 冷藏备用。标定其晶体含量为 5 μ g/mg, LC_{50} 为 180 μ g/g。

1.4 发酵和发酵上清液样品制备

2.0 t 发酵罐投料 1.2 t, 采用生产培养基, 自发酵 3h 开始, 每 2h 取发酵液 1 次; 发酵液经 8,000 r/min 离心 10min, 镜检上清液中无晶体和芽孢, 留取上清液备用。

1.5 发酵液菌数测定

平板稀释计数法。

1.6 溶氧测定

在 BIOSTAT®-CL15L 全自动发酵罐中, 采用 INGOLD 溶氧电极直接测定培养基中的残留氧 (%)。

1.7 pH 测定

在 BIOSTAT®-CL15L 全自动发酵罐中, 采用 INGOLD pH 电极直接测定培养基的 pH。

1.8 生物效价测定

准确取一定重量的发酵液在 0.9mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中混合均匀, 使最高稀释浓度生测死亡率为 85%~90%, 作为生测样品, 以初孵棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼虫为供试虫。将标准品和样品按 5 个稀释度进行稀释, 均匀混于人工配制饲料中, 分装 24 孔塑料盘。挑取孵化后不超过 10h 且未取食的幼虫, 每孔挑入 1 头, 上盖, 置于 30℃ 温室中饲养, 72h 后观察死虫数, 计算死亡率和毒力回归方程式, 求出样品的 LC_{50} 和标准品的 LC_{50} ^[4], 按下式计算样品效价:

$$\text{样品效价} = \frac{\text{标准品效价} \times \text{标准品 LC}_{50}}{\text{样品 LC}_{50}}$$

1.9 增效物质测定

准确取 2mL 上清样品与一定量的孢晶标准品在 0.9mol/L 磷酸缓冲液 (pH 为 7.0) 中混合均匀, 使最高稀释浓度生测死亡率为 85% ~ 90%, 作为生测样品, 其余步骤与生物效价测定相同, 计算死亡率和毒力回归方程式, 求出样品的 LC_{50} 和标准品的 LC_{50} ^[4], 用增效倍数 (f) 来表示上清中增效物质含量, 按下式计算增效倍数:

$$\text{增效倍数 (f)} = \frac{\text{标准品的 LC}_{50}}{\text{样品的 LC}_{50}}$$

1.10 伴孢晶体含量测定

取发酵液样品加入 1% 溶菌酶, 30℃ 恒温下充分研磨至镜检 60% ~ 70% 菌体细胞壁破碎, 再用超声波处理 30s 打碎细胞, 参照 Laemmli (1951) 方法^[5], 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 10%, 加入 10% SDS, 电泳后的聚丙烯酰胺凝胶经过考马斯亮蓝染色后再脱色处理。运用 ImageMasterID 软件对蛋白质进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 不同菌种发酵上清增效物质生成的时间进程研究

按材料和方法所述, 采用生产配方培养, 在 BIOSTAT®-CLI5L 全自动发酵罐中, 分别接种菌株 HD-1, MP-342, GC-91。控制溶氧在 15% 以上^[6], 不同时间测定增效物质增效倍数 (f), 以培养时间为横坐标, 以增效倍数为纵坐标作图 (图 1)。其中增效倍数乘以 10, 增效倍数大于 10 以上表示上清液开始有增效作用。图 1 表明不同菌株开始产生上清增效物质的时间和达到最高并保持稳定的时间不同, 菌株 HD-1, MP-342, GC-91 的增效物质分别于 3h, 9h, 11h 开始产生, 并分别至 5h, 15h, 17h 达到最高并保持稳定。分析认为这种现象主要由菌株特性所决定, 因为 HD-1, MP-342, GC-91 进入对数生长期的时间依次较早, 导致增效物质产生的时间依次提前。3 个菌株达到最高的增效倍数依次为 1.8, 3.4, 6, 说明不同菌株上清增效物质的生成能力不同。崔云龙等^[1]报道, HD-1 发酵液通过离心分离上清液, 用磷酸缓冲液同体积替代上清液, 替代后的磷

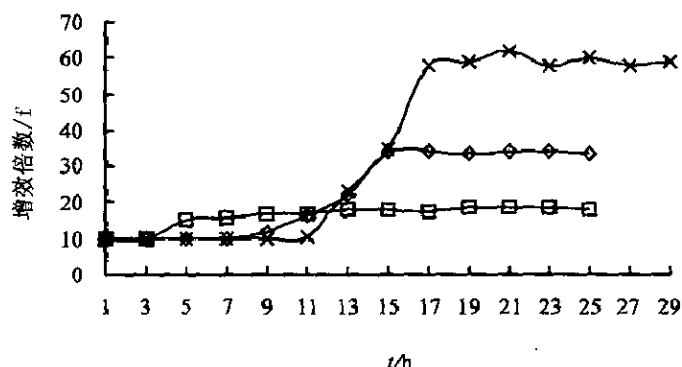


图 1 不同菌种上清液中增效物质生成曲线

—x— GC-91 f/10, —◇— MP-342 f/10, —□— HD-1 f/10

酸缓冲液与离心沉淀混和液对小菜蛾毒力下降 27.5%; 李青等^[3]报道, GC-91 发酵液通过离心分离上清液, 用磷酸缓冲液替代上清液, 替代后的发酵液对棉铃虫毒力下降 70%。本研究也发现菌株 GC-91 上清液中增效物质的合成代谢明显强于菌株 HD-1, 因此对菌株 GC-91 进行了进一步研究。

2.2 菌株 GC-91 上清增效物质与晶体, 效价, 菌数的关系

按材料和方法所述, 在 2.0 t 发酵罐中, 采用生产配方培养 GC-91 菌株, 控制溶氧在 15% 以上, 不同时间取样, 测定上清增效物质含量、晶体含量、生物效价和细菌菌数, 以时间为横坐标, 以增效倍数含量、晶体含量、生物效价和菌数为纵坐标作图, 其中增效倍数和晶体含量分别乘以 10, 100, 生物效价除以 1,000 (图 2)。图 2 表明, 其增效物质产生于对数生长期前期 (约 11h), 在对数生长期末期 (约 17~18h) 达到高峰期, 并保持稳定, 说明增效物质主要在对数期产生。图 2 还表明, 增效物质产生量与晶体含量, 效价曲线有相似性, 表明三者间有显著的正相关性。

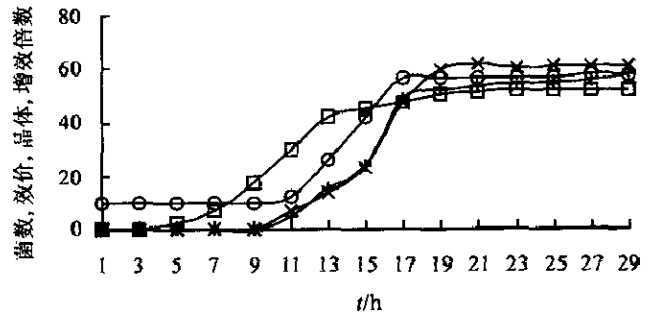


图 2 GC-91 增效物质与晶体含量, 效价, 菌数的关系

—□— 菌数 n 亿/g, —○— 增效倍数 $f/10$,
—+— 晶体含量 (%) $/100$, —*— 效价 (IU/ μ L) $\times 1,000$

2.3 溶氧对 GC-91 上清液增效物质生成的影响

据刘华梅等^[6]报道, 发酵液中残留氧 $\geq 15\%$ 为不影响 GC-91 发酵的最低溶氧, 本研究设置对数生长期溶氧为两个不同水平, 即 $DO \geq 15\%$ 以上, 和 $DO < 15\%$ 。GC-91 菌株在不同溶氧条件下增效物质生成曲线见图 3, 结果表明, $DO \geq 15\%$ 以上的增效物质增效倍数约为 6, 而 DO 从 9~11h 溶氧为零, 增效物质增效倍数约为 4, 说明供氧充分有利于增效物质生成, 反之则有抑制作用。

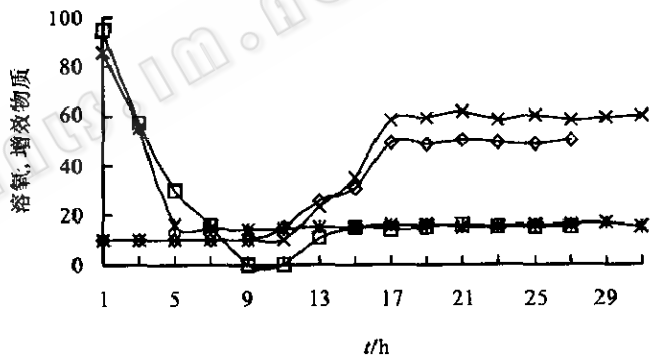


图 3 溶氧对 GC-91 上清液中增效物质产生的影响

—+— $DO > 15$, —◇— $DO < 15$, —*— $DO > 15$, —◇— $f DO < 15$

通过对 GC-91, MP-342, HD-1 菌株上清增效物质生成的相关研究, 以及研究增效物质的生成与晶体含量, 效价, 菌数的关系, 溶氧对上清增效物质生成的影响, 进一步证明上清增效物质是苏云金芽孢杆菌毒力的重要组成部分, 并对增效物质生成的最佳条件, 提高增效物质的产量, 从而提高苏云金芽孢杆菌毒力作了初步研究。对于上清增效物质的性质与结构鉴定, 上清增效物质的生产工艺回收和应用, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] 崔云龙, 冈部宗一, 浅野昌司. 微生物学报, 1993, 33 (1): 62~68.
- [2] Manker, Denise, Carol, et al. potentiator of *Bacillus* pesticidal activity, 1994, PCT/US93/10671. 94-11-05.
- [3] 李青, 吴继星, 谢天键, 等. 中国生物防治, 1997, 13 (4): 166~168.
- [4] 钟连胜, 谢天键, 吴继星, 等. 生物防治通报增刊, 1990, 1~5.
- [5] Laemmli U K. Nature, 1970, 227~280.
- [6] 刘华梅, 李青, 陈振民, 等. 武汉大学学报 (杀虫微生物专刊), 1998, 44: 59~61.