

苏芸金杆菌以色列变种在不同培养基上的产毒能力

陈世夫* 肖永昌 左常智 吕建芳 陈 丽

(山东省莱阳县卫生局科研组)

苏芸金杆菌以色列变种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) 对蚊幼虫的杀虫活性, 主要在于蛋白质晶体, 而营养条件对晶体的合成有着重要影响。据研究, 苏芸金杆菌不同血清型对培养基的要求各有差异^[1]。关于适合苏芸金杆菌以色列变种产生毒力的培养基, 特别是适合生产发酵的培养基, 国内报道较少, 对此, 我们进行了初步实验, 其结果报道如下:

材 料 和 方 法

1. 菌种: 苏芸金杆菌以色列变种 1897 菌株来自中国科学院动物研究所。

2. 试虫: 系昆虫室饲养的三龄末淡色库蚊幼虫。

3. 培养基: 参照文献 [2, 3] 设计其配方 (表 1)。

4. 培养方法: 在三角瓶中加入 200ml 培养基, 高压灭菌后, 接种 1/10 斜面, 30℃ 振荡培养 48 小时。

5. 毒力测定: 具体方法见文献 [4], 标准菌

本文经中国科学院武汉病毒研究所罗绍彬同志、上海植物生理研究所陈俊标教授审阅指正; 本组徐志军、葛玉敏同志参加部分工作, 特致谢忱!

* 陈世夫同志现在的工作单位是山东省卫生防疫站。

表 1 培养基配方 (g%)

编 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
成 分									
蛋 白 胨	5			15	7.5		7.5	10	
牛 肉 膏				10				5	
葡 萄 糖	5				20		20		10
酵 母 粉				2		2		3	
花 生 饼		50				50	50		
豆 饼									15
鱼 粉			50						5
NaCl				5				5	
KH ₂ PO ₄					6.8		6.8		1
MgSO ₄					0.123		0.123		
MnSO ₄					0.123		0.123		
ZnSO ₄					0.014		0.014		
(NH ₄) ₂ SO ₄									2
Fe ₂ (SO ₄) ₃					0.02		0.02		
CaCO ₃						3			5
CaCl ₂					0.183		0.183		
K ₂ HPO ₄	5			1		1			

粉为法国巴斯德研究所提供, IPS-78 效价为 1000IU/mg。

结 果 和 讨 论

(一) 1897 菌株在不同培养基上的产毒能力 (表 2)

由表 2 看出, 1897 菌株在培养基 (1) (4) (5) (7) (8) (9) 上生长发育无明显区别, 毒力收率 (即每毫升菌液所含国际单位) 在 $1.9—4.3 \times 10^4$ IU/ml 之间, 未发现各种培养基中无机盐及微量元素的差异, 对其生长发育及产毒能

力所产生的影响。而在仅含花生饼的培养基中, 毒力收率为 11.4×10^4 IU/ml, 较其它培养基毒力收率高 2—5 倍, 由此看来, 不同来源的氮、碳源对 1897 菌株的生长发育及产毒能力有明显影响, 而磷酸盐等无机盐培养基对 1897 菌株的产毒能力的影响则不明显。Proom 等曾证实苏芸金杆菌可在含有亮氨酸、丙氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、天门冬氨酸等七种氨基酸的培养基上生长, 而不需增加其它营养物质^[3]。罗绍彬等报道, 1897 菌株在由 2—3 种氨基酸组成的培养基上极易生长, 并能生成大量芽孢和

表 2 1897 菌株在不同培养基上的毒力收率

培养基号	实验次数	毒 力 收 率 (IU/ml)		
		范 围	平 均	95% 可信限
1	5	$1.8—3.3 \times 10^4$	2.5×10^4	$2.0—3.06 \times 10^4$
2	6	$8.3—13.6 \times 10^4$	11.4×10^4	$10.0—13.6 \times 10^4$
3	3	$3.0—5.0 \times 10^4$	3.6×10^4	$3.0—4.4 \times 10^4$
4	6	$3.0—6.0 \times 10^4$	4.3×10^4	$3.75—5.0 \times 10^4$
5	7	$3.0—5.0 \times 10^4$	4.0×10^4	$3.4—5.0 \times 10^4$
6	8	$8.3—15.0 \times 10^4$	10.7×10^4	$8.9—12.7 \times 10^4$
7	5	$7.9—12.5 \times 10^4$	10.0×10^4	$7.9—13.6 \times 10^4$
8	2	$2.0—2.35 \times 10^4$	2.3×10^4	$2.1—2.6 \times 10^4$
9	2	$3.0—7.5 \times 10^4$	4.8×10^4	$3.8—6.6 \times 10^4$

表 3 1897 菌株在花生饼培养基与鱼粉培养基上产毒能力的比较

氮源来源	培养基浓度 (%)							
	1		3		5		7	
	细胞数 (个/ml)	毒力 (IU/ml)	细胞数 (个/ml)	毒力 (IU/ml)	细胞数 (个/ml)	毒力 (IU/ml)	细胞数 (个/ml)	毒力 (IU/ml)
鱼粉	1.1×10^8	2.4×10^4	3×10^8	3×10^4	3.8×10^8	3.6×10^4	5.5×10^8	5.6×10^4
花生饼	2.1×10^8	2.9×10^4	3.5×10^8	6×10^4	5.3×10^8	10.7×10^4	5.5×10^8	12.5×10^4

表 4 同一培养基不同批次活孢子数与毒力收率的关系

培养基号	2		4		6	
批 次	I	II	I	II	I	II
活孢子数 (个/ml)	6.6×10^8	5.3×10^8	3.5×10^8	5.9×10^8	4.5×10^8	6.85×10^8
毒力收率 (IU/ml)	8.3×10^4	10.7×10^4	3.0×10^4	6.0×10^4	8.3×10^4	14.4×10^4

晶体^[5]。

由表 2 还可看出,单一的花生饼浸液培养基其毒力收率平均为 11.4×10^4 IU/ml,可信限为 $10-13.6 \times 10^4$ IU/ml,能满足苏云金杆菌以色列变种的生长和产毒要求,不需添加其它营养成分及微量元素,是生产苏云金杆菌以色列变种制剂较为理想的发酵原料。

(二) 1897 菌株在培养基(2, 3)中产毒能力的比较(表 3)

在花生饼培养基与鱼粉培养基相同浓度下,1897 菌株的生长发育基本一致,孢子数相近,但毒力收率却有很大差异,花生饼浸液明显高于鱼粉。在相同氮源的培养基上,孢子数及毒力收率与氮源的用量呈正相关。国外生产苏芸金杆菌制剂多采用鱼粉作氮源, Pendlefon 认为一种成功的发酵培养基中,主要也是鱼粉作氮源^[1]。但对 1897 菌株花生饼优于鱼粉,这可能与 1897 菌株所需氨基酸的配比和不同来源的氮源利用能力有关。据分析花生饼含有 18 种氨基酸,其中谷氨酸和天门冬氨酸占比例最大,与苏芸金杆菌晶体蛋白所含氨基酸^[6]的比

例相近。以鱼粉为原料的蛋白胨所含氨基酸以苏氨酸最高,二者明显不同。关于培养基中氨基酸含量、配比与苏云金杆菌以色列变种的培养及产毒能力的关系,尚待进一步研究。

(三) 1897 菌株在不同培养基中活孢子数与毒力的关系

1897 菌株在同一培养基上生长,活孢子数与毒力水平相一致,不同批次存有差异,而在不同培养基上,毒力收率与活孢子数无一致的关系,在孢子数相近的情况下,不同培养物的毒力收率可相差 2—5 倍(表 4)。

参 考 文 献

- [1] H. D. 伯吉斯, N. W. 赫西主编: 昆虫和螨类的微生物防治, 广东农林学院林学系、中国科学院动物研究所昆虫病理组、辽宁省林业土壤研究所生物杀虫剂组合译, 科学出版社, 1977 年。
- [2] 任改新等: 微生物学报, 23(2): 163—167, 1983。
- [3] 刘崇乐等: 苏云金杆菌研究五十年, 科学出版社, 1962 年。
- [4] Barjae, H. de and I. Langel: WHO/VBC/79. 744.
- [5] 罗绍彬等: 微生物学通报, 10(3): 97, 1983。
- [6] 潘哲龙: 害虫生物防治的原理和方法, 科学出版社, 170 页, 1978 年。