

技术与方法

管碟法测定苏云金杆菌上清液中增效物质含量的研究

李青¹ 刘华梅¹ 陈振民¹ 张亮² 谢天健¹(武汉科诺生物农药有限公司 武汉 430074)¹ (清华大学生命科学院 北京 100084)²

摘要: 以草生欧文氏杆菌 LS005 为指示菌, 用管碟法测定苏云金杆菌 KN-11 发酵液中增效物质的相对浓度。结果表明管碟法和生物测定法在测定增效物质的代谢曲线有较好的一致性, 均表明, 菌株 KN-11 的增效物质在营养体时 (约 9h) 开始产生, 到芽孢初步形成时 (约 20h) 已达到最高值的 80% 以上, 之后是一个缓慢的积累过程。

关键词: 管碟法, 草生欧文氏杆菌, 苏云金杆菌 KN-11, 增效物质

中图分类号: S476.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 03-0073-03

THE RESEARCH ON THE CYLINDER-PLATE METHOD APPLIED IN MEASURING
THE SYNERGIZER IN THE SUPERNATANT OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

LI Qing¹ LIU Hua-Mei CHEN Zhen-Min¹ ZHANG Liang² XIE Tian-Jian(Wuhan Kernel Bio-pesticidal Co., Ltd., Wuhan 430074)¹(The life institute of Qunhua University, Beijing 100084)²

Abstract: A strain of *Erwinia herbicola* LS005 is used in cylinder-plate method as a sensitive indicator to synergiser in the Bt culture supernatant. The results of both bioassay and cylinder-plate method correspond to each other, which indicating Bt KN-11 begin to produce synergiser at the vegetative cell phase (about 9h), and the synergiser has reached up to 80% of total quantity when spores are primarily formed (about 20h), then the synergiser is accumulated slowly.

Key words: Cylinder-plate method, *Erwinia herbicola*, *Bacillus thuringiensis* KN-11, Synergiser

管碟法是利用抗生素在含有敏感指示菌的琼脂培养基内的扩散渗透作用, 经过一段时间后, 抗生素扩散到适当的范围, 产生透明的抑菌圈。已有研究^[1]表明, 某些苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在发酵过程中可产生类似抗生素 Zwittermicin A 的增效物质, 该增效物质是水溶性的, 在 Bt 生产后处理工艺的离心浓缩干燥阶段往往随着上清液的丢弃而不能被利用。定量检测上清液中的增效物质含量对 Bt 生产具有重要的指导意义。现在定量检测上清液中的增效物质含量的方法通常有毛细管电泳法, 高压液相色谱法及生物测定法, 前两者均需要纯标准品, 后一种方法工作量大, 时间较长。文献 [2] 报道了此类增效物质对草生欧文氏杆菌 (*Erwinia herbicola*) 的生长具有抑制作用。作者应用管碟法对定量检测上清液中的增效物质含量作了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 苏云金杆菌 KN-11 由武汉科诺生物农药有限公司提供, 敏感指示菌 *Erwinia herbicola* LS005 由美国 Wisconsin 大学 Jo Handelsman 先生赠送。

1.2 方法

1.2.1 增效作用的测定：生物测定法测定发酵上清液对粉剂的增效作用同有关报道^[3]。

1.2.2 管碟法的建立：把 15mL 琼脂浓度为 2.0% 的牛肉膏蛋白胨培养基倒入直径为 9cm 的培养皿，把在斜面上长好的草生欧文氏杆菌制成菌悬液，每皿涂布 3 滴（约 0.12mL）菌悬液。Bt 发酵液，10000r/min 离心 4min，上清液过滤除菌后，取 50μL 上清液在牛津杯中点样，点样后的平板在 28℃ 培养 12h 即检测抑菌圈的大小。

1.2.3 发酵上清液中增效物质浓度与抑菌圈直径的关系：已经知道牛津杯中抗生素浓度的对数和抑菌圈直径的平方是直线关系^[4]。取 2001-014 批 Bt 生产样，离心得上清液，设此上清液中增效物质浓度为 CK，用 pH = 7.0 的磷酸缓冲液分别稀释 2, 3, 4, 5 倍，产生大小不同的抑菌圈。计算增效物质浓度对数与抑菌圈直径平方关系的回归方程式。

1.2.4 增效物质的代谢曲线：在 2001 年 2 月 20 日 2.0t 罐发酵过程中在一定时间间隔取样，用生物测定法测定上清液对粉剂的增效倍数，用管碟法计算样品中增效物质的相对浓度。

2 结果与分析

2.1 发酵上清液中增效物质浓度与抑菌圈直径的关系

将表 1 中 CK 增效物质浓度设为 10 个单位，则浓度的对数 lgM 与直径的平方 Φ^2 有对应关系，由表 2 得出其回归方程式为： $\Phi^2 = 3.64 \lg M + 0.32$ ，相关系数 $r = 0.998$ 。

2.2 增效物质的代谢曲线

用管碟法和生物测定法分别测得不同时间样品上清液产生的抑菌圈的

(下转 104 页)

表 1 增效物质浓度与抑菌圈直径的关系

增效物质浓度	抑菌圈直径 (cm)
CK	1.98
2 倍稀释	1.72
3 倍稀释	1.48
4 倍稀释	1.31
5 倍稀释	1.20

表 2 浓度的对数 lgM 与直径的平方 Φ^2 的关系

lgM	Φ^2
1.000	3.92
0.699	2.96
0.523	2.19
0.398	1.72
0.301	1.44

表 3 管碟法和生测法分别测得的结果

时间 (h)	直径 (cm)	按方程 $\Phi^2 = 3.68 \lg M + 0.29$ 得增效物质相对浓度	样品上清液对粉剂的增效倍数
9	无	0	0
11	1.00	1.54 个单位	1.21
13	1.35	2.59 个单位	2.57
15	1.55	3.73 个单位	4.21
17	1.64	4.47 个单位	5.66
19	1.75	5.62 个单位	5.63
21	1.77	5.90 个单位	5.62
23	1.79	6.20 个单位	5.99
25	1.82	6.68 个单位	5.63
27	1.85	7.20 个单位	5.77
29	1.82	6.68 个单位	6.11

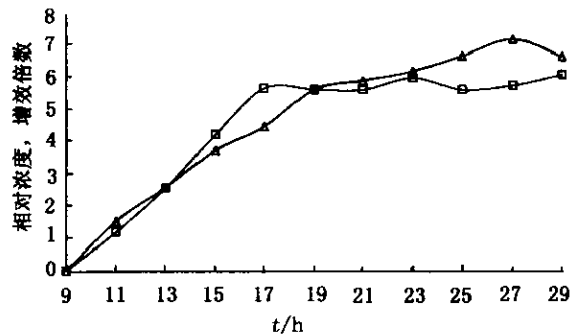


图 1 增效物质代谢曲线

—△— 管碟相对浓度, —□— 生测增效倍数

(上接 74 页) 直径及上清液对粉剂的增效倍数 (表 3), 用两种方法得到的苏云金杆菌 KN-11 的增效物质代谢曲线基本是一致的 (图 1), 增效物质在营养体 (约 9h) 时开始产生, 到芽孢初步形成时 (约 20h) 已达到最高值的 80% 以上, 之后是一个缓慢的积累过程。以上试验也表明通过以草生欧文氏杆菌为敏感指示菌的管碟法来初步定量测定苏云金杆菌在发酵过程中产生的增效物质的相对浓度是可行的。

参 考 文 献

- [1] Manker, Denise, Carol, *et al.* Potentiator of *Bacillus* poesticidal activity, 1994, PCT/US93/10671. 94-11-05.
- [2] Eric v, Stabb, Lynn M, *et al.* *Appl Environ Microbial*, 1994, **60**: 4404 ~ 4412.
- [3] 李 青, 吴继星, 谢天健, 等. *中国生物防治*, 1997, **13** (4): 166 ~ 168.
- [4] 钱存柔主编. *微生物学实验*. 北京: 北京大学出版社, 1985, 142 ~ 148.