

碳、氮、磷三因素对苏芸金杆菌的影响*

和 致 中

(中国科学院昆明动物研究所,昆明)

近年来, Yousten, Rogoff, Aronson 等人对于苏芸金杆菌的基本营养需要、代谢途径、伴孢晶体形成的基本要求和抑制晶体形成的因素等方面作了研究^[1-6],为苏芸金杆菌制剂的生产提供了生理学依据。可是有关苏芸金杆菌对于碳、氮、磷及其比例的要求尚无明确资料。为了使培养基配方优选具有明确的指导思想,为苏芸金杆菌工业生产提供必要的参考资料,我们试验研究了碳、氮、磷三因素对苏芸金杆菌的影响。

材 料 和 方 法

碳源: 葡萄糖(北京化工厂, A. R.)。

氮源: 蛋白胨(北京市生化制药厂, A. R.)。

磷源: KH_2PO_4 (北京化工厂, A. R.)。

菌种: “17-1”菌株系本所自三化螟(*Tryporyza incertulas*)自然死亡幼虫尸体分离得到,经鉴定为苏芸金杆菌蜡螟变种(*Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, H_{5a-5b})。

试验设计: 用正交优选方法,按 $L_9(3^4)$ 和 $L_8(2^7)$ 正交表安排试验。 $L_9(3^4)$ 试验设计中碳、

氮、磷三因素水平值: 葡萄糖(A), $A_1 = 0.1\%$, $A_2 = 0.8\%$, $A_3 = 1.5\%$; 蛋白胨(B), $B_1 = 0.5\%$, $B_2 = 1.0\%$, $B_3 = 1.5\%$; KH_2PO_4 (C), $C_1 = 0.05\%$, $C_2 = 0.2\%$, $C_3 = 0.5\%$ 。 $L_8(2^7)$ 试验设计中三因素水平值: 葡萄糖(A), $A_1 = 0.1\%$, $A_2 = 0.8\%$; 蛋白胨(B), $B_1 = 1.0\%$, $B_2 = 1.5\%$; KH_2PO_4 (C), $C_1 = 0.2\%$, $C_2 = 0.5\%$ 。

培养条件: 200毫升三角瓶中分装培养基20毫升,每瓶接入0.4毫升孢子悬液。培养基pH均为7.0—7.2。常规培养。每4小时取样,每次0.3毫升,检查pH、透光率和菌体形态。

试 验 结 果

根据 $L_9(3^4)$ 试验结果,分别去掉 $A_3(1.5\%)$, $B_1(0.5\%)$ 和 $C_1(0.05\%)$ 三个水平(表1),再以 $L_8(2^7)$ 安排试验,结果见表3。

一、碳、氮、磷三因素对菌数的影响

表1方差分析表明,碳、氮、磷三因素水平

* 本工作在河南洛阳林药厂和云南宣威溶剂厂进行。

变化对发酵液菌数的影响高度显著,氮源起主导作用,碳源次之,再次为磷。在含氮0.5—1.5%范围内,用氮水平增加,菌数也增加。用糖(碳源)水平从0.1%增至0.8%,菌数相应增加,但增至1.5%时,菌数反而下降(图1)。

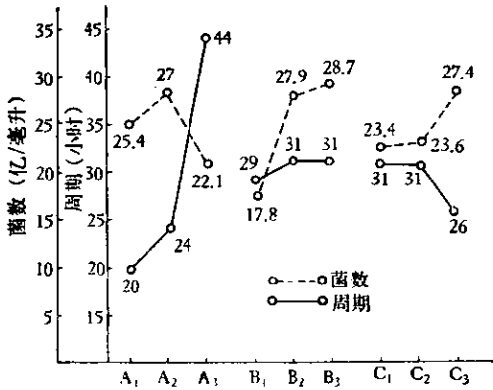


图1 $L_9(3^4)$ 试验结果与 A, B, C 三因素的关系

A: 葡萄糖 ($A_1 = 0.1\%$, $A_2 = 0.8\%$, $A_3 = 1.5\%$)
 B: 蛋白胨 ($B_1 = 0.5\%$, $B_2 = 1.0\%$, $B_3 = 1.5\%$)
 C: KH_2PO_4 ($C_1 = 0.05\%$, $C_2 = 0.2\%$, $C_3 = 0.5\%$)

二、用糖(碳源)水平对生长繁殖周期的影响

试验表明,培养基中糖水平低则周期短,反之则周期长。如糖水平为0.1%的1、2、3号试验在20小时内形成芽孢、晶体;糖水平为

0.8%的4、5、6号在24小时形成芽孢、晶体;糖水平为1.5%的7、8、9号,其中除7号在35小时形成部分芽孢和晶体之外,8和9号到48小时仍为营养体而未形成芽孢和晶体(表1)。

三、用糖水平、碳氮比与 pH 的关系

培养基 pH 变化曲线依用糖水平和碳氮比明显地分为三组(图2,表2)。1、2、3号为一组,用糖水平为0.1%,碳氮比在0.44—1.3之间。这一组接种后4小时 pH 降至6.5左右,以后很快回升,12小时升至 pH 7.5,20—24小时 pH 达8.0以上(图2-a)。4、5、6号为一组,用糖水平为0.8%,碳氮比为3.6—10.7。这一组接种后8小时 pH 降至6.3—6.5,一直到12小时才回升,24小时升至7.0—7.4(图2-b)。7、8、9号为一组,用糖水平为1.5%,碳氮比为6.7—20.0,这一组 pH 一直很低,除7号到16小时回升到6.6外,其余的 pH 一直在6.0左右,至48小时 pH 仍在6.0以下(图2-c)。

四、碳、氮、磷交互作用对菌数的影响

$L_9(2^7)$ 试验结果的方差分析表明(表3),除碳、氮以外,碳氮交互作用和碳磷交互作用对发酵液菌数的影响高度显著。根据 $A \times B$ 和 $A \times C$

表1 $L_9(3^4)$ 试验结果统计

试验号		1	2	3	4	5	6	7	8	9
试验结果	第一次	22.4	22.9	34.0	20.0	27.3	28.8	17.6	30.2	26.8
	第二次	18.9	28.0	35.0	21.5	37.5	25.5	12.5	16.5	29.5
	第三次	15.5	22.5	29.5	17.5	39.0	25.5	15.0	27.0	24.0
	合计	56.8	73.4	98.5	59.0	103.8	79.8	45.1	73.7	80.3
芽孢、晶体形成时间(小时)		20	20	20	24	24	24	35	48*	48*

方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F 比	显著性	最适水平
A(葡萄糖)	$S_A = S_1 = 108$	2	54	8.71	$P < 0.05$	A_2
B(蛋白胨)	$S_B = S_2 = 708$	2	354	57.1	$P < 0.01$	B_3
C(KH_2PO_4)	$S_C = S_3 = 94$	2	47	7.58	$P < 0.05$	C_3
误差(e)	$S_e = S_4 = 112$	18				

* 48小时仍为营养体。

$F_{0.05}(2, 18) = 3.55$, $F_{0.01}(2, 18) = 6.01$ 。

表 2 9 个试验组合培养基中碳、氮、磷含量*

试验号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
碳(葡萄糖, %, W/V)	0.10	0.10	0.10	0.80	0.80	0.80	1.50	1.50	1.50
氮(蛋白胨, %, W/V)	0.075	0.15	0.225	0.075	0.15	0.225	0.075	0.150	0.225
磷(KH ₂ PO ₄ , %, W/V)	0.0115	0.046	0.115	0.046	0.115	0.0115	0.115	0.0115	0.046
碳/氮	1.3	0.67	0.44	10.7	5.3	3.6	20.0	10	6.7

* 蛋白胨含氮量以洛阳林药厂测定 15% 计; KH₂PO₄ 含磷量为 23%。

表 3 L₈(2⁷) 试验结果统计

试验号		1	2	3	4	5	6	7	8
透光率(%)	第一次	8.0	7.5	4.5	5.0	3.0	2.5	2.2	2.5
	第二次	5.8	8.2	6.0	5.7	2.4	2.5	3.0	2.5
	合计	13.8	15.7	10.5	10.7	5.4	5.0	5.2	5.0

方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F 比	显著性	最适水平
A(葡萄糖)	$S_A = S_1 = 113.3$	1	113.3	30.6	$P < 0.05$	A ₂
B(蛋白胨)	$S_B = S_2 = 9.0$	1	9.0	24.3	$P < 0.05$	B ₂
A×B	$S_{A×B} = S_3 = 8.2$	1	8.2	22.1	$P < 0.05$	
C(KH ₂ PO ₄)	$S_C = S_4 = 2.8$	1	2.8	7.57	$P > 0.10$	C ₁
A×C	$S_{A×C} = S_5 = 9.1$	1	9.1	24.6	$P < 0.05$	
误差 e	$S_e = S_6 + S_7 = 0.73$	2	0.37			

$F_{0.01}(1,2) = 98.5, F_{0.05}(1,2) = 18.5, F_{0.10}(1,2) = 8.53$

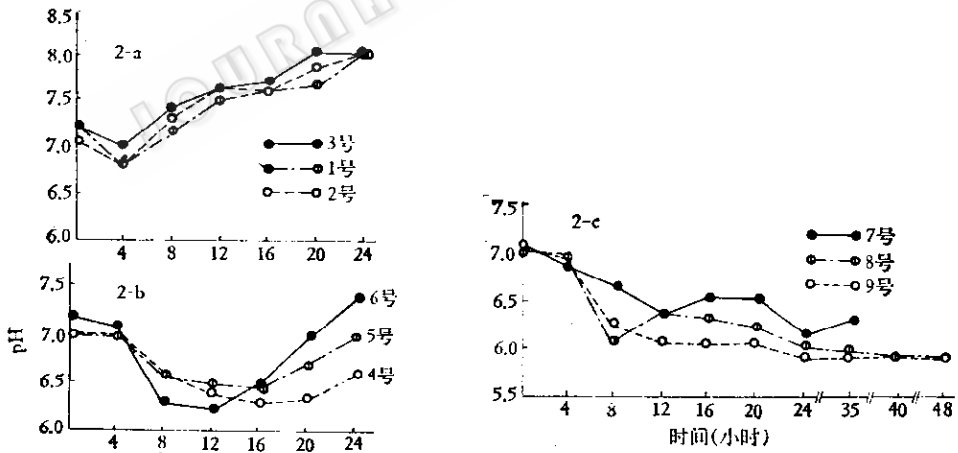


图 2 L₈(3⁴) 试验中的 pH 变化曲线

交互作用得出 A₂(0.8%)B₂(1.5%)C₁(0.2%) 配方菌数最高的结果。但综合菌数和生长周期两项指标,糖(碳)水平仍选用 A₁(0.1%) 较好,因此, A₁B₂C₁ 配方作为种子和其它试验用配方是比较理想的。

综上所述,鉴于糖和 KH₂PO₄ 水平决定着发酵周期的长短和芽孢晶体的形成,氮的水平 and 碳氮交互作用、碳磷交互作用决定着菌数的高低等结果,在“17-1”菌以及其它苏芸金杆菌制剂生产中,为了选择发酵周期短、菌数高、芽孢

和伴孢晶体正常形成的生产用培养基配方,应考虑在培养基中含丰富的氮源,搭配适当的糖和磷酸盐,碳氮比控制在 5.3 以下,用磷水平在 46—115 毫克% (W/V) 为宜。如在 $L_9(3^4)$ 试验设计中,1、2、3、5、6 号试验组合中,菌数平均为 82.5 亿/毫升,发酵周期为 21.6 小时。其碳氮比在 5.3 以下。而 4、7、8、9 号试验组合中,其碳氮比在 5.3 以上,菌数平均为 64.5 亿/毫升,发酵周期平均为 39 个小时。

讨 论

1. KH_2PO_4 对“17-1”发酵过程中菌数的增长有一定影响,对发酵周期有显著影响;碳磷交互作用对菌数的增长也有影响。这种影响是通过两方面起作用的:其一,苏芸金杆菌生长繁殖过程中,糖的初级异化是通过 E—M 途径进入 TCA^[3,9]的。因此, KH_2PO_4 是 E—M—P 中磷酸化过程不可缺少的物质;其二, KH_2PO_4 的缓冲作用有利于芽孢和晶体的形成^[1,8,11]。7 号用氮水平低于 8、9 号,用糖水平与 8、9 号相同而能在 35 小时形成部分芽孢和晶体,可能就是其 KH_2PO_4 水平高于 8、9 号的缘故。

2. 在半合成培养基中,苏芸金杆菌在对数生长期里由于利用葡萄糖产生丙酮酸、醋酸,pH 下降达 4.8—5.0,2—3 小时后 pH 开始回升,芽孢和晶体开始形成^[1]。如果对数生长期后 pH 不能回升,pH 一直在 6.0 以下,芽孢和晶体都不能形成^[1,7,8]。苏芸金杆菌在芽孢形成的初始阶段,菌体合成一种胞外蛋白酶参与伴孢晶体的蛋白质转化合成过程^[10],而这种酶的合成与酶活性最适 pH 为中性,pH 在 6.5 以下或 9.1 以上酶活性急剧下降^[9],丧失形成这种酶的变异菌株既不能形成芽孢,也不能形成晶体^[1,8,11]。

因此,试验中 8、9 号到 48 小时芽孢和晶体尚未形成乃是由于培养基中碳、氮、磷供应比例不当,含碳水平高, KH_2PO_4 水平低,致使 pH 一直不能回升而维持在 6.0 以下,抑制了芽孢和晶体的形成。

3. 伴孢晶体占孢子囊干重的 30%^[3]。为获得大量菌体并使菌体基本按 1:1 的比例形成芽孢和晶体,而培养基中氮源水平对菌数的增长起着主导作用,因此,培养基必须含有丰富的氮源以保证发酵的顺利进行。

参 考 文 献

- [1] Yousten, A. A. and M. H. Rogoff: *J. Bact.*, **100**: 1220—1236, 1969.
- [2] Bulla, L. A., G. S. Jullian, R. A. Rhodes and C. W. Hesseltine: *Can. Microbiol.*, **16**: 243—248, 1970.
- [3] Nickerson, K. W. and L. A. Bulla, Jr.: *Appl. Microbiol.* **28**: 124—128, 1974.
- [4] Nickerson, K. W. and L. A. Bulla, Jr.: *J. Bact.* **123**: 598—603, 1975.
- [5] Bulla, L. A., Jr., G. S. Jullian and R. A. Rhodes: *Can. Microbiol.*, **17**: 3, 1073—1079, 1971.
- [6] Aronson, J. N. and D. P. Borris et al.: *Appl. Microbiol.*, **30**: 3, 489—492, 1975.
- [7] Nickerson, K. W., G. S. Jullian, and L. A. Bulla, Jr.: *Appl. Microbiol.*, **28**: 129—132, 1974.
- [8] Rogoff, W. H. and A. A. Yousten: *Ann. Rev. microbiol.*, **23**: 357—381, 1969.
- [9] Euenia, L. and A. A. Yousten: *Appl. Microbiol.*, **23**: 30(3): 493—498, 1975.
- [10] Norris, J. R.: *In Microbial Control of Insects and Mites* (Ed. by Burges, H. D. and N. W. Hussey), Academic press, London, New York, 1971, pp. 229—246. 广东农林学院林学系等译:《昆虫和螨类的微生物防治》,科学出版社,北京,1977,第 156—167 页。
- [11] Dulmage, H. T. and R. A. Rhodes: *Microbial Control of Insects and Mites* (Ed. by Burges, H. D. and N. W. Hussey), Academic press, London, New York, 1971, pp. 507—538. 广东农林学院林学系等译:《昆虫和螨类的微生物防治》,科学出版社,北京,1977,第 330—352 页。