

## 球形芽孢杆菌的发酵试验

任改新 朱呈智 钱广华

(南开大学生物系)

孙桂华 李泽江

(天津市卫生防疫站)

一些球形芽孢杆菌因能杀灭蚊子幼虫而受到重视,目前已分离出 30 多个有效菌株<sup>[1]</sup>。1981 年我们首次从国内分离到一株有高度灭蚊效果的球形芽孢杆菌<sup>[2]</sup>。但目前这类菌还没有进行大规模工业化生产,也没有通用的商品制剂<sup>[3]</sup>。我们参照国外在这方面的研究工作<sup>[4]</sup>,选配了多种培养基,采用工业化生产苏芸金杆菌的发酵条件,对球形芽孢杆菌进行了摇瓶及 50 和 500L 发酵罐发酵试验,研究了不同时间的发酵液与其毒力的关系。

## 材料和方法

## (一) 菌株

*Bacillus sphaericus* Ts-1, 1981 年分离自南开大学水塘内<sup>[2]</sup>。

## (二) 培养基及发酵条件

培养基配方(克/100ml):

1. FBS: 鱼粉 30, 玉米淀粉 12, 肉膏 1,  $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  1.3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.08,  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.08。

2. NYSM: 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1, 酵母膏 0.05,  $MgCl_2$  0.001,  $CaCl_2$  0.0002,  $MnCl_2$  0.00005。

3. GPYB: 葡萄糖 1.5, 棉籽饼粉 1, 酵母膏 0.2, 蛋白胨 0.2,  $CaCO_3$  0.1,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002。

4. GSC: 葡萄糖 1, 豆饼粉 1.8, 玉米粉 0.5,

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03,  $K_2HPO_4$  0.07,  $FeSO_4$  0.001,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001,  $CaCO_3$  0.05。

5. SGCY: 豆饼粉 15, 玉米淀粉 10, 葡萄糖 2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02,  $CaCO_3$  1.0, 酵母浸出汁 2。

6. NB 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1。

将 pH 调到 7.4, 121℃ 蒸汽灭菌 30 分钟。

摇床培养用 250ml 锥形瓶, 装量为 25 ml, 于 802 型恒温调速摇瓶机上 32℃ 培养; 50L 发酵罐使用不锈钢通风搅拌发酵罐, 定容为 30L; 500L 发酵罐的发酵试验在天津市酶制剂厂进行。种子液在摇瓶中培养到对数增殖期。罐温为  $30 \pm 1^\circ C$ , 罐压为  $0.6-0.8 kg/cm^2$ , 通气量 1: 0.6-0.8。每 4 小时检查一次菌数、发育形态及发酵液的 pH。

生物测定按常规方法进行<sup>[5]</sup>。试验昆虫为淡色库蚊 (*Culex pipiens* Pallens) 二龄末三龄初幼虫。

## 结果与讨论

## (一) Ts-1 菌摇瓶培养结果

Ts-1 菌在 6 种培养基中均可生长及形成芽孢, 但各种培养液所含菌数、芽孢数以及对淡色库蚊幼虫的毒力却有明显差异(表 1)。其中 FBS 培养基含菌数多, 毒力也大, 是培养 Ts-1

表 1 Ts-1 在 6 种培养液中摇瓶培养比较

培养基	发育形态				培养时间 (小时)	菌数 (亿/ml)	pH	毒力**
	12 (小时)	24	36	48				
1	ve + sp	s + ve + sp*	s + ve + sp	s + sp + ve	24	59	8.3	87
2	ve + sp	ve + sp	ve + sp + s	ve + s	24	37.5	8.3	76
3	sp + ve + s	s + sp + ve	s + sp + ve	s + ve	24	14.2	7.5	13
4	ve + sp	ve + sp + s	ve + s + sp	ve + s	24	38.1	8.5	3
5	—	s + sp + ve	—	s + ve	24	34.9	8.5	19
6	ve	ve + sp	ve + sp	ve + sp + s	24	22	8.4	4

\* ve: 菌体, sp: 芽孢囊, s: 芽孢。

\*\* 1ppm 终止发酵液生物测定 48 小时的幼虫百分死亡率,对照死亡率为 0。

表 2 Ts-1 发酵试验结果

项目		50L				500L	
		I	II	III	IV	V	VI
培养基		FBS	F <sub>1</sub> BS*	F <sub>1</sub> BS	SBS**	FBS	FBS
发酵时间(小时)		48	44	30	36	22	24
发酵液的终止 pH		8.2	8.0	8.5	8.0	8.0	8.0
菌数(亿/ml)		49.6	38.15	42.1	48.15	42.63	49.43
发育形态		s + sp + ve	ve + sp + s	ve + sp + s	s + sp + ve	s + ve + sp	s + ve + sp
毒力	1ppm 发酵液的死亡率	100	89	89	98	100	98
	LC <sub>50</sub> (ppm)	0.125	0.28	0.28	0.289	0.125	0.125

\* F<sub>1</sub>BS 培养基同 FBS, 但鱼粉产地不同。

\*\* SBS 培养基同 FBS, 但以豆饼粉代替鱼粉。

菌的较好培养基。

(二) 发酵罐发酵试验结果

在摇瓶初步培养的基础上,我们以 FBS 培养基为主进行了 50 及 500 L 发酵罐发酵试验,结果见表 2。从表 2 可以看出, Ts-1 菌在几种含有鱼粉及豆饼粉的培养基中均可产生较多的菌体,而且毒力也高,但仍以 FBS 培养基为好,其菌数为 49.6 亿/ml,毒力也最高,LC<sub>50</sub> 为 0.125ppm。

(三) 菌的发育形态与其毒力的关系

用不同时间的发酵液进行生物测定的结果表明,菌的发育形态与其对淡色库蚊幼虫的毒力有很大关系。如表 3 所示,用 FBS 培养基 50L 罐 8 小时的发酵液进行毒力测定,蚊子幼虫的死亡率仅为 2—5%,此时 Ts-1 菌处于均质的营养体阶段,毒力很低;16 小时的发酵液中已有少量芽孢囊形成,杀虫效果可达 39%;而 24 小时的发酵液中已有大量芽孢囊及芽孢形成,杀虫效果达 100%。用其他培养基也得到了类似的结果。这与 Myers 等<sup>[6]</sup>的研究结果

表3 50L 罐不同时间发酵液对淡色库蚊二龄幼虫的毒力测定

培养基	培养时间 (小时)	pH	菌数 (亿/ml)	形态	不同浓度发酵液 48 小时死亡率 (%)						对照 死亡率 (%)
					2 (ppm)	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	
FBS	8	6	8.7	ve	2	4					0
	16	6.6	17.5	ve + sp	19	5	1				0
	24	7.2	39.7	ve + sp + s		100	96	79	51		0
	48	8.2	59.5	ve + s + sp			100	92	47	29	3
F <sub>1</sub> BS	8	7	21.3	ve		28	15	11	5		0
	16	7.3	31.9	ve + sp		51	19	20	9		0
	24	7.8	44.8	ve + sp + s			51	45	16	4	1
	48	8.5	42.1	ve + sp + s	100	89	76	40	19		0
SBS	8	6	2.1	ve	6	1	3	2			0
	16	6.8	32.1	ve + sp	45	16	3	1			0
	24	7.3	48.2	ve + sp + s			57	92	40	52	0
	48	8.4	45	ve + s + sp		99	95	38	23		1

表4 Ts-1 在 FBS 培养液中发酵 24 及 48 小时的毒力测定

发酵时间 (小时)	生物测定观察时间 (小时)	LC <sub>50</sub> (ppm)	95% 可信限	回 归 式
24	24	0.84	1.46—0.843	$Y = 0.557 + 2.899X$
	48	0.125	0.153—0.12	$Y = 1.884 + 2.866X$
48	24	0.6	1.864—0.366	$Y = 0.975 + 2.264X$
	48	0.126	0.533—0.03	$Y = 0.6003 + 2.949X$

相一致。因此在发酵时应尽量提高芽孢形成的比例。

#### (四) 关于发酵周期的探讨

从表 3 可以看出, 24 小时发酵液所含的菌数及其毒力与 48 小时的相比, 差异并不十分显著。FBS 培养基 48 小时发酵液的菌数虽然比 24 小时的多, 但两者的毒力差异并不明显。这表明 Ts-1 菌的发酵周期可以适当缩短, 发酵 24 小时左右基本上可以达到菌数及毒力的高峰。表 4 是 Ts-1 菌在 FBS 培养基中发酵 24 及 48 小时的毒力比较。

在发酵过程中, 可根据菌数稳定、芽孢形成

多、pH8—8.5 作为终止发酵的指标, 一般约为 30—40 小时。

#### 参 考 文 献

- [1] Davidson, E. W.: *Mosquito News*, **44**: 147—152, 1984.
- [2] 任改新等: *昆虫学报*, **25**(3): 349—350, 1982.
- [3] Lacey, L. A.: *Mosquito News*, **44**: 153—155, 1984.
- [4] Singer, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**: 1335—1355, 1980.
- [5] 任改新等: *微生物学报*, **23**(1): 57—62, 1983.
- [6] Myers, P. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **25**: 1227—1231, 1979.