苏芸金杆菌以色列变种产毒条件的研究

左常智 陈 丽 肖永昌 吕建芳
（山东省莱阳市卫生防疫站）

摘要 产毒条件对苏芸金杆菌以色列变种(*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*)产毒能力的影响试验表明：提高该菌产毒能力的各种适宜条件是，氮源以花生蛋白的促进作用最高，蛋白胨次之，尿素有显著的抑制作用；碳源以葡萄糖、麦芽糖，甘油及淀粉有促进作用；所试的6种生长素均能不同程度的提高产毒能力；Mg^{++}、Ca^{++} 有明显的促进作用，Mn^{++} 则有显著的抑制作用。最适 pH 为 7.0—7.5，最适温度为 28—32℃，在 500ml 烧瓶内最适装液量为 100ml 以内，培养 24 小时该菌的产毒能力最强。

关键词 苏芸金杆菌以色列变种 1897 菌株：淡色库蚊幼虫；产毒能力。

1977年 Goldberg[1]从以色列分离到一株苏芸金杆菌以色列变种（*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*）对蚊幼虫具有高度的毒杀作用。对此至今已有不少研究报道[2-4]。该菌的安全性实验水平已达到可免验用于野外大规模水体消灭蚊幼[5,6]，而系统研究发酵条件对苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的影响，国内尚未见报道。本文较为系统的研究了提高该菌产毒能力的各种因素，结果如下：

材 料 与 方 法

（一）菌种

苏芸金杆菌以色列变种 1897 菌株由中国科学院动物研究所提供。

（二）培养基（g）

1. 花生饼 5，蒸馏水 100ml，pH7.2—7.6[7]。

2. 蛋白胨 1，牛肉膏 0.5，蒸馏水 100ml，pH7.2—7.6[8]。

3. 酵母 0.3，NaCl 0.5，蒸馏水 100ml pH 7.2—7.6。

（三）培养方法

在 500ml 烧瓶内装入 40ml 培养基，灭菌后接种，用国产 THZ-82 型台式恒温振荡器，回转速度为每分钟 180—200 转，30℃ 培养 48 小时。

（四）毒力测定

参照 WHO 生物防治专家会议推荐的标准方法进行[9]，准备菌粉为法国巴斯德研究所提供，IPS-78 效价为 1000IU/mg。供试虫种为昆虫室饲养的 3 龄末淡色库蚊幼虫。细菌计数采用稀释平板法。

结 果 与 讨 论

（一）氮源对产毒能力的影响

分别以 0.3% 酵母，0.5% 氯化钠为基础培养基，添加各种含氮的有机物及无机物与不添加者进行比较试验，结果见表 1。

表 1 不同氮源对苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的影响

氮源种类	浓度（%）	折合标准氮（%）	细菌数（亿/ml）	毒力效价（IU/mg）
蛋白胨	1.0	1.3×10^{-3}	4.3	29
花生蛋白	1.0	1.2×10^{-3}	8.2	79
硝酸铵	1.4	4.9×10^{-3}	1.35	3.3
硫酸铵	2.0	4.2×10^{-3}	1.0	3.0
尿素	1.0	4.7×10^{-3}	0.07	0.8
无	0	0	0.04	1.9

注：为 5 次实验结果平均值

由表 1 可以看出，苏芸金杆菌以色列变种在不同氮源培养基上生长发育及产毒能力明显不同。在加入含氮量高尿素培养基中，生长发育明显受到抑制，菌量极少，菌体粗短，培养终了时，未见典型晶体出现，毒力水平较不添加者

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

低2倍以上。而在以花生蛋白、蛋白胨、硝酸铵和硫酸铵为氮源的培养基中，生长发育基本一致，毒力水平却有显著差异（$P < 0.01$），以含氮量低的有机氮最高，而有机氮中则以植物性花生蛋白为最高，较不添加者高49倍以上。据分析花生蛋白含有18种氨基酸，其中谷氨酸和天门冬氨酸所占比例最高，其配比恰好与苏芸金杆菌晶体蛋白所含氨基酸[8]相近。而其它氮源则明显不同。这可能是花生蛋白优于其它氮源的重要原因。Smirnoff 曾报道，0.4*M* 的尿素对苏芸金杆菌形成芽孢和伴孢晶体的抑制率达20—100%[10]。而对苏芸金杆菌以色列变种仅 0.15*M* 的尿素就已有显著的抑制作用了。

（二）碳源对产毒能力的影响

以1%蛋白胨，0.5%牛肉膏为基础培养基，另加入0.5%的各种不同的碳源进行试验，以不添加者为对照。结果（如表2）说明葡萄糖、麦芽糖，甘油和淀粉对苏芸金杆菌以色列变种的生长有促进作用，并能提高产毒能力。山梨醇、蔗糖虽能刺激生长，但不能提高产毒能力。

表2 碳源对苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的影响

碳源种类	浓度（%）	细菌数（亿/ml）	毒力效价（IU/mg）
葡萄糖	0.5	5.7	25
麦芽糖	0.5	6.15	28
蔗　糖	0.5	3.6	15
甘　油	0.5	3.0	27
淀　粉	0.5	5.7	28
山梨醇	0.5	3.85	14
无	0	2.5	14

注：4次实验结果平均值

（三）生长素对产毒能力的影响

在以1%蛋白胨，0.5%牛肉膏为基础培养基中，分别加入硫胺素、核黄素等6种生长素，苏芸金杆菌以色列变种生长发育及产毒能力的影响（表3），表3结果说明，所试6种生长素中，在此试验浓度下，均有不同程度的促进作用（$t > 3$），并能提高产毒能力，其中以生物素最为明显。

（四）金属离子对产毒能力的影响

表3 生长素对苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的影响

生长素	浓度（μg/ml）	细菌数（亿/ml）	毒力效价（IU/mg）
硫胺素	5.0	4.5	5.0
核黄素	5.0	4.0	4.4
烟　酸	10.0	3.6	4.3
吡哆素	10.0	3.75	4.8
生物素	0.013	3.55	5.8
叶　酸	0.12	4.4	4.7
无	0	3.0	3.3

注：4次实验结果平均值

表4 金属离子对苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的影响

金属离子 ＼ 毒力效价（IU/mg） ＼ 浓度（mg/ml）	0.05	0.1	5	10	无
Ca^{++}	7.1	7.1	8.3	9.4	6.5
Mn^{++}	3.8	3.8	3.0	<1.5	6.0
Mg^{++}	62.5	50.0	34.9	31.9	14.3
K^{+}	10.0	6.5	6.3	6.3	6.8

注：为5次实验结果平均值

据文献报道[11]，苏芸金杆菌的生长由对数期进入稳定期时会产生一种胞外蛋白酶。这种酶的作用，据 Rogoff[12] 研究认为该酶是参与伴孢晶体的形成过程中蛋白质转换过程。这种酶的形成或活化需要在培养基中加入Ca^{++}、Mn^{++}和Mg^{++}。我们在以1%蛋白胨和0.5%牛肉膏为基础培养基中加入不同浓度的Ca^{++}、Mn^{++}、Mg^{++}和K^{+}进行试验，结果（表4）说明，加有Ca^{++}、Mg^{++}的培养基，对苏芸金杆菌以色列变种的产毒能力有明显的提高，但Ca^{++}的促进作用随着浓度的增高而增强。Mg^{++}随浓度的增加而降低；K^{+}低于0.05mg/ml时有促进作用，超过0.1mg/ml时作用不显著；Mn^{++}则有显著的抑制作用，浓度增高抑制性增强。

（五）装液量与产毒能力的关系

将不同体积的5%花生饼培养基分别装入500ml三角烧瓶内，接种该菌菌种，30℃培养48小时，进行细菌计数及毒力测定，结果见表5。

由表5可以看出，培养基的装液量不同，对苏芸金杆菌以色列变种的生长及产毒能力有显

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 5　装液量与苏芸金杆菌以色列变种产毒能力的关系

装液量 (ml)	最终 pH	细菌数 (亿/ml)	毒力效价 (IU/mg)
30	8.5	3.3	197
40	8.5	3.4	190
60	8.5	3.3	190
80	8.5	3.0	210
100	8.5	3.3	197
150	7.5	1.9	39
200	7.0	2.0	9
250	6.5	0.5	2.3

注　为 4 次实验结果平均

著影响，装液量在 30—100ml 时最终 pH 均为 8.5，细菌数及毒力效价无显著性差异（t<2），当装液量超过 100ml 时，随装液量的增加而产毒能力下降。由此看来，装液量不宜过多，而且在发酵中还应适当加大通气量，才能提高该菌的产毒能力。

（六）初试 pH 对产毒能力的影响

将 5% 花生饼培养基用 NaOH 或 HCl 调 pH3—13，灭菌后接种，培养 48 小时作毒力测定（4 次），说明在 pH5—11 均能生长及产生毒力，最适 pH 为 7.0—7.5，pH5 以下或 pH11 以上，苏芸金杆菌以色列变种的生长发育明显受到抑制，不能形成芽孢，失去产毒能力。

（七）培养时间与产毒能力的关系

苏芸金杆菌以色列变种经摇瓶培养不同时间取样涂片镜检，保存 4℃ 冰箱，在同一条件下作细菌计数及毒力测定（5 次），发现 2—4 小时芽孢萌发为着色均匀的营养体，并开始大量增殖，6—9 小时原生质明显凝集，12 小时原生质明显分化出一端为孢子，另一端为点状晶体的孢子囊，24 小时进入自溶期。培养到第 12 小时出现明显的杀虫活性，24 小时细菌数及毒力已达高水平，延长至 120 小时，产毒能力无明显提高。

（八）培养温度与产毒能力的关系

将不同温度条件下苏芸金杆菌以色列变种培养物，贮存于 4℃ 冰箱，在同一条件下作毒力测定及细菌计数（4 次），试验表明该菌在 10—40℃ 均能生长，24—36℃ 培养物的细菌数虽然基本一致，但毒力高峰却在 28—32℃，低于 28℃ 或高于 32℃ 时，产毒能力下降。在 10—20℃ 条件下，菌体发育迟缓，毒力产生缓慢，当温度超过 36℃ 时，生长发育加快，但易衰老，毒力处在极低水平。

参　考　文　献

[1] Goldberg et al.: Mospuito News, **37**:355, 1977.
[2] 蒲蛰龙主编：苏芸金杆菌以色列变种防治蚊幼虫的研究，中山大学出版社，1984。
[3] 陈世夫等：微生物学通报，**11**(1)：6—8，1984。
[4] 王瑛等：昆虫学报，**24**(1)：42—47，1981。
[5] Singer, S.: Biotech Bioengin., **32**:1335, 1980.
[6] World Health Organization,: Bull. WHO. **59**(6): 857—863, 1981.
[7] 陈世夫等：微生物学通报，**12**(4)：153—155 1985。
[8] 蒲蛰龙主编：害虫生物防治的原理和方法，科学出版社，1978。
[9] Barjac. H. de and I. largel: WHO/VBC/79. 744.
[10] Smirnoff, W. A: *J. Insect Pathol.*, **5**:389—392, 1963.
[11] 和致中：微生物学通报，8(6)：274—276，1981。
[12] Rogoff, M. H. and A. A. Yousten: *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**:357—381, 1969.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn