

中国 Bt Ken-Ag 最佳发酵培养基的优选 及其发酵生理学研究

陈月华 任改新 梁凤来 邹建国* 赵 钢

(南开大学 生命科学院 天津 300071)

摘要 用正交试验方法选出 Bt Ken-Ag 菌株的发酵培养基 M3 和 FBH2 两个配方, 其发酵液菌数可稳定的保持 70 亿/ml, 芽孢晶体形成率达 80—90%, 用 FBH2 配方, 对棉铃虫的毒力效价在 2000IU/ μ l 以上。同时研究了在发酵培养基上的生长, pH 变化、芽孢晶体形成以及糖、氮的代谢情况。

关键词 苏云金杆菌肯尼亚亚种, 正交试验, 发酵培养基, 发酵生理学

近年来, 有些学者为了提高苏云金杆菌苏云金素的发酵水平, 应用正交试验等方法对培养基组份和培养条件进行优选取得了一定的成效^[1]。我国自己分离鉴定的野生型苏云金杆菌肯尼亚亚种 Ag 菌株, 简称 Bt Ken-Ag 为血清 H₁₀₀ 型, 是国内外尚未开发成制剂的新菌株, 对夜蛾科的棉铃虫、粘虫以及松毛虫等害虫具有较高的毒力^[2,3], 但其发酵培养基、发酵条件

及发酵过程中菌体芽孢的生长动力学和碳、氮源的利用情况尚未见系统的研究报道。Bt 的杀虫毒力主要来源于伴孢晶体, 而伴孢晶体的形成及发育取决于培养条件。不同的菌株或同一

本文系国家八五“85-010-02-02”资助项目

1994-01-07 收稿

* 89 级本科生

菌株用不同的发酵培养基, 对不同虫种的毒力会有很大差异。本文首次采用正交试验方法, 对 Bt Ken-Ag 菌株的培养基成份、浓度、交互作用等因素及其毒力的影响和发酵生理学进行了详细的考查。

1 材料和方法

1.1 菌种 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* Ag

1.2 培养基:

1.2.1 NB 培养基: 菌数及活芽孢数测定用培养基。

1.2.2 发酵对照培养基(%): 鱼粉 3.5—4.0, 牛肉膏 0.2, 玉米淀粉 1.25, K_2HPO_4 0.13, $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 均微量, pH7.4。

1.3 正交试验设计

按参考文献[4]的方法。正交试验采用正交表 $L_{12}(2^{11})$, $L_8(2^7)$ 和 $L_4(2^3)$ 。它们的特点是: 均衡分散性好, 有很强的代表性, 对实验结果能进行最有效的比较。利用正交表共设计 36 个实验, 考查因素为组成培养基中的主要物质如玉米淀粉、豆饼粉、棉籽粉、酵母粉以及某些物质的相互比例即交互作用。这些因素

均设计了 4—6 个水平, 供试培养基的固形物含量为 4—12.6%。

1.4 摇瓶培养

培养基按试验设计要求分别配制, 接种量为 2.5—3% (v/v), 接种用 65℃ 30min 处理的孢子悬液。30℃ 220r/min 振荡培养, 定时取样测定 pH, 并涂片染色观察菌体长势及芽孢晶体形成同步率, 视芽孢脱落在 5—10%, pH 达到 7.5—8.0 时停止培养。

1.5 发酵液菌数、活芽孢数及芽孢形成同步率的测定

方法 I: 用 Olympus BH-2 相差显微镜和血球计数板计数并同时观察芽孢晶体形成的情况和比例。此方法适于大批正交试验检测。

方法 II: 用平板测 cfu/ml 和活孢子数。测活孢子数时, 先将稀释的发酵液置 65℃ 水浴处理 30min 后再铺平板。

1.6 碳氮源利用的测定

分别按文献[5、6]方法测定还原糖及氨基氮。

1.7 生物测定

用三龄初粘虫和初孵棉铃虫, 按标准生物测定方法进行^[7]。

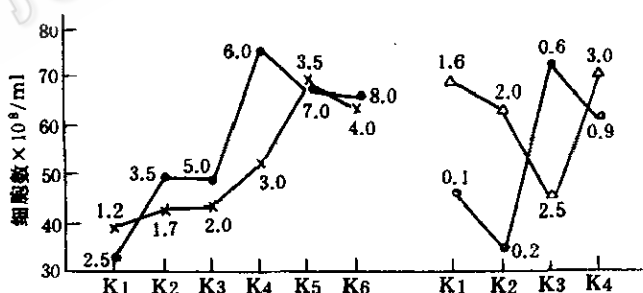


图1 棉籽粉等四因素与细胞数关系图

·——· 棉籽粉 ×——× 玉米淀粉 ○——○ 酵母粉 △——△ N/C

“K”, 示正交试验中的不同水平, 即各种物质不同的百分含量 (N/C 除外)

曲线上的数值为具体的 K 值

2 结果与讨论

2.1 正交试验结果

2.1.1 棉籽粉等四因素与细胞数关系: 由图 1

可见, 每一曲线的最高点与最低点的细胞数之差表示这一因素的极差值 (R), 由 R 值可以看出某一因素的不同含量对细胞数的影响作用。四因素对细胞数增长的影响作用的顺序为: 棉

籽粉>酵母粉>玉米淀粉>N/C。它们的极差值分别为43、37、30、25。作为碳氮源的三种物质具有一个共同的趋势,即含量低时,细胞数均不高,随着浓度的增加,细胞数也相应的增加,说明碳、氮源对菌体生长发育的重要性。当这些物质增加到一定的浓度后,便不再有这一效应,反而因固形物含量过高而影响通气使细胞数下降。最适水平:A4B5C3。

2.1.2 豆饼粉等四因素与细胞数关系:图2中的四因素对细胞数增长的影响作用的顺序为:酵母粉>豆饼粉>玉米淀粉>N/C。其极差值分别为34、31、26、21。三种主要物质的不同含量对细胞数影响的趋势同图1。它们的最适水平:A3B3C3。

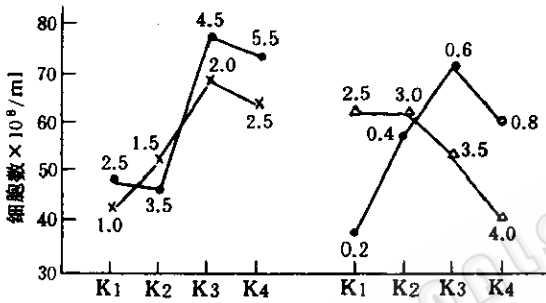


图2 豆饼粉等四因素与细胞数关系图

—•— 豆饼粉 ×——× 玉米淀粉
○—— 酵母粉 △——△ N/C

2.1.3 N/C 因素的影响: N/C 一项在两图中均为最不显著的因素,原因可能是豆饼粉和棉

籽粉各含有30%和23%的碳水化合物^[8],它们在作为主要氮源的同时,也可作为部分碳源,因此碳氮交互作用就不是很明显了。

2.2 最佳培养基的优选

在正交试验的结果上,根据图1各因素的最好水平作为最优组合,配成M2培养基(%):棉籽粉6.0、玉米淀粉3.5、酵母粉0.6,其余的四种无机盐均同本文1.2.2项。根据图2各因素的最适水平作为最优组合,配成FB培养基(%):豆饼粉4.5、玉米淀粉2.0、酵母粉0.6,其余均同M2培养基。考虑工业化生产中不可能用试剂酵母粉,只能用价格低廉的工业酵母粉,故对某些因素稍做调整,分别在M2、FB基础上又设计出展望配方M3和FBH2。以上四种培养基经再次摇瓶试验做进一步的优选。四种培养基的发酵液菌数、芽孢含量及对初孵棉铃虫和三龄初粘虫的毒力方面测定结果见表1。

表1证明,由正交试验优选出的四个培养基配方在发酵液的细胞数、芽孢的绝对数量及杀虫毒力方面明显优于对照配方。

经过正交试验的30多个培养基配方的初筛和进一步复筛考查,显示出以棉籽粉为主要原料的M3配方和以豆饼粉为主要原料的FBH2配方为最优配方。

表1 四种培养基的发酵考查结果

考查指标	发酵培养基				
	M2	M3	FB	FBH2	CK
细胞数(×10 ⁸ /ml)	72	77	66	78	42
芽孢含量(%)	85	85	89	85	92
生物测定*	1197	1605		2458	1179
	1071	2058		3700	
	2500	1175		3200	
	1200	1777		1500	
棉铃虫(IU/μl)	—	—		2100	
	\bar{x} :1492	\bar{x} :1654		\bar{x} :2592	
粘虫(LC ₅₀)	—	—	1.8×10 ³ μg	—	6.7×10 ³ μg

* 表中每一样品每次生物测定的受试幼虫数为240头

培养基的成份及配比对 Bt 的毒力影响是 相当复杂的,要选出一个较好的培养基工作量

非常大, 正交试验方法能科学的安排多因素多水平的选择, 只要所确定的水平合理, 得出的结果可以举一反三。如表 1 中的培养基 M3 和 FBH2 均是在 M2 和 FB 基础上提出的展望配方, 结果也是较理想的。

2.3 碳氮源利用、菌体生长及生理指标的测定

用 FBH2 培养基的发酵产物进行了还原糖及氨基氮的测定, 以了解碳氮源的利用情况, 同时也进行了菌体生长、芽孢形成和 pH 变化的测定, 反映在发酵培养基上菌体在不同时期的生长状况及其生理代谢变化 (图 3)。

2.3.1 菌体生长发育的对数期是 6—16h, 随后细胞数便不再大幅度的增加 (见图 3-b)。芽孢形成出现在发酵 22—24h, 到 32h 成熟芽孢已达 85% 以上, 并且已有 10% 左右的芽孢晶体游离

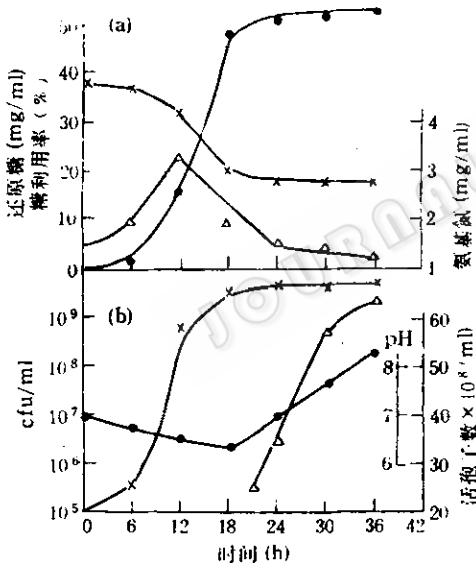


图 3 碳氮源利用、菌体生长及生理指标测定结果

A: ····糖利用率 B: ····pH
 ×···×还原糖 ×···×细胞数
 Δ····Δ氨基氮 Δ····Δ芽孢数

2.3.2 还原糖的测定结果 (图 3-a) 说明糖的利用高峰在 6—18h, 这与对数生长期是吻合的, 此时期糖的利用率达到 48%, 占总利用率的 91%, 而继续培养至 36h, 糖的利用率仅仅增加 5% 达到 53%。pH 变化曲线 (图 3-b) 也可证明糖的利用情况, 从培养开始至 18h, pH

始终是下降趋势, 说明此时菌体繁殖迅速, 大量利用糖类而产生丙酮酸、乳酸和乙酸^[9,10] 导致 pH 下降。18h 后菌体生长进入稳定期, 不再大量的利用糖类, 此时 pH 曲线开始上升。

2.3.3 氨基氮的变化曲线 (图 3-a) 证明, 从培养开始至 12h, 培养物中的氨基氮含量明显增加, 说明这一时期细胞大量的分泌蛋白酶分解发酵液中的蛋白质固形物, 边分解边利用氮源。12—24h 氨基氮的含量明显下降, 为大量利用氮源时期, 这一时期正是芽孢晶体形成的前期, 说明芽孢晶体的形成起始于细胞对于富含蛋白质物质的累积。培养至 24h 以后, 氮源利用很少, 此时为芽孢形成期, 能量来自 β -羟丁酸, 这一物质是细胞利用糖代谢中的某些有机酸而产生, 并在芽孢形成时逐渐消耗^[10], 故培养基中的氮源不再降解利用。

苏云金杆菌肯尼亚亚种是大有潜力的微生物防治开发菌株。本文利用正交试验法优选出了成份简单、价格便宜的最适发酵培养基, 同时较详细的考查了其发酵进程中的生理代谢情况, 为苏云金杆菌新制剂的开发应用提供了可靠的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 喻子牛, 沈陶群, 熊春林. 生物防治通报, 1990, 6 (增刊): 54—59.
- [2] 任改新, 李克田, 杨明华, 等. 微生物学报, 1975, 15 (4): 292—301.
- [3] 中科院动物所 Bt 研究组. 微生物学报, 1978, 18 (4): 352—354.
- [4] 北京大学数学系试验设计组. 电视讲座 正交试验法, 北京: 科学普及出版社, 1979, 1—38.
- [5] 陈月华, 何屹, 任改新, 等. 微生物学通报, 1992, 19 (5): 261—264.
- [6] 北京大学生物系生化教研室. 生物化学试验指导, 北京: 人民教育出版社, 1979, 22—24, 93—94.
- [7] 钟连胜, 谢天健, 吴继星等. 生物防治通报, 1990, 6 (增刊): 1—5.
- [8] 喻子牛, 苏云金杆菌, 北京: 科学出版社, 1989, 274.
- [9] 和致中. 微生物学通报, 1980, 7 (1): 7—10.
- [10] TG, Benoit, GR, Wilson, CL, Baugh, et al. Letters in Appl. Microbiology, 1990, 10: 15—18.

SELECTED FERMENTATION MEDIUM FOR CHINESE BT KEN -AG AND STUDIED FERMENTATIVE PHYSIOLOGY

Chen Yuehua Ren Gaixin Liang Fenglai Zou Jianguo Zhao Gang

(School of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The medium for fermentation has been selected by means of arthogonal designs. The number of cell has reached $6-7 \times 10^9/\text{ml}$, and spore forming rate is 80—90%. The IU for just hatched cotton bollworm is about 2000. The growth, pH, sporulation, carbohydrates and nitrogen sourees using have been examined.

Key words *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*, Orthogonal test, Fermentative medium, Fermentative physiology