

杀虫素 48 号产生菌株最适液体营养条件的筛选

刘正学¹ 李德舜^{1*} 张英¹ 刘明锋²

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)¹ (山东鲁抗集团 济宁 272121)²

摘要: 以杀虫素 48 号产生菌株为研究对象, 通过正交试验和方差分析, 对其最适液体营养条件进行了筛选, 其组成为 (%): 可溶性淀粉 3, 葡萄糖 2, 花生饼粉 4, 蛋白胨 0.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3, K_2HPO_4 0.10。进一步通过在最适配方和原始配方营养条件下的对比试验, 结果表明, 在最适配方营养条件下, 该菌株生物量提高了约 59% ($P < 0.01$)。

关键词: 杀虫素, 正交试验, 生物量, 营养条件

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 04-0044-04

SCREENING OF OPTIMAL NUTRITION CONDITIONS OF THE STRAIN PRODUCING INSECTICIDE NO. 48 IN LIQUID CULTURE

LIU Zheng-Xue¹ LI De-Shun¹ ZHANG Ying¹ LIU Ming-Feng²

(State Key Laboratory of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)¹

(Shandong Antibiotics Group Corporation, Jining 272121)²

Abstract: By using method of design and result analysis of the orthogonal experiment, optimal nutrition conditions for the strain producing insecticide No. 48 in liquid cult were screened, which were composed of (%): Starch soluble 3, Glucose 2, Peanut cake powder 4, Protose peptone 0.6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 and K_2HPO_4 , 0.10. Furthermore, the experiment of comparison between optimal and initial put n. showed that this strain biomass increased by 59 percent ($P < 0.01$).

Key words: Insecticide, Orthogonal experiment, Biomass, Nutritional conditins

杀虫素 48 号, 它是一种能够杀虫的抗生素物质, 其产生菌株是八十年代初由山东

• 通讯联系人

收稿日期: 2000-01-12, 修回日期: 2000-10-08

省济宁农科所与山东大学微生物系共同从我国7个省采集的600份土样中分离得到的一种放线菌,于1981年经中国科学院微生物研究所闫逊初教授鉴定并定名为黑微紫链霉菌浅色变种^[1] (*Streptomyces nigroviolens* var. *pallens* Yan & Zhang)。经室内外杀虫活性试验证明,该杀虫素对水果、蔬菜等14种农作物上的红蜘蛛有特效,其防治效果可达90%~100%;同时,对菜青虫、舟形毛虫、梨花网蝽等害虫亦有较强的杀伤力,其防治效果为80%~100%。通过元素分析,该杀虫素的质谱、红外光谱、紫外光谱和核磁共振图谱等与已报道的杀螨素、杀螺素、杀蚜素等杀虫素均不相同,初步认为是一种新的抗生素。实验证明:该杀虫素是一种胞内物质,其产生菌株菌丝体产量的大小将直接影响到其总效价的高低,因此,本文特通过正交试验对其产生菌株最適液体营养条件进行了筛选。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

黑微紫链霉菌浅色变种,山东大学生命科学院菌种室保存。

1.2 培养基原始配方

可溶性淀粉 20g, 葡萄糖 20g, 花生饼粉 20g, K_2HPO_4 0.2g, NaCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g, 蒸馏水 1000mL, pH值 7.2~7.4, $1 \times 10^5 Pa$ 灭菌 20~25min 备用。

1.3 正交试验设计法 (表1, 表2)

见文献 [2]。根据对杀虫素 48 号多年的研究,首先固定了 K_2HPO_4 0.02%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, NaCl 0.05% 以及葡萄糖 2%; 比较可溶性淀粉、花生饼粉、 $(NH_4)_2SO_4$ 、蛋白胨等 4 个主要碳、氮源因子对生物量的影响,选用正交表 $L_9 (3^4)$, 且每组试验增加一组重复。

再固定可溶性淀粉 3%, 葡萄糖 2%, 花生饼粉 4%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3% 和蛋白胨 0.6%; 进而比较 K_2HPO_4 、NaCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 等 4 个主要无机盐因子对生物量的影响,选用正交表 $L_9 (3^4)$ 。

1.4 对比试验 (表3)

见文献 [3]。

1.5 培养方法

采用摇瓶培养法。在 250mL 三角摇瓶中装入 50mL 液体培养基,接种量 10% (v/v), 120r/min, 28℃ 振荡培养 5d。

1.6 生物量测定

培养液菌丝体经真空泵抽滤,蒸馏水反复冲洗,于 60℃ 烘干至恒重,称重。

1.7 统计分析

见文献 [2, 3]。

2 结果与分析

2.1 主要碳、氮源对生物量的影响

花生饼粉水平变化对结果影响高度显著,而 $(NH_4)_2SO_4$ 只表现出一定的影响,根

据 ΣK_1 、 ΣK_2 、 ΣK_3 的大小，其最适水平分别是 4% 和 0.3%；可溶性淀粉和蛋白胨的水平变化对结果没有显著影响，但考虑到可溶性淀粉与蛋白胨、蛋白胨与 $(NH_4)_2SO_4$ 以及可溶性淀粉与 $(NH_4)_2SO_4$ 之间的交互作用^[2]对结果影响高度显著，因此，可溶性淀粉和蛋白胨的最适水平以分别选取 3% 和 0.6% 为好；由此可知，各碳、氮源因子的最适水平为：可溶性淀粉 3%，葡萄糖 2%，花生饼粉 4%， $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%，蛋白胨 0.6% (表 1)。

2.2 主要无机盐对生物量的影响

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $NaCl$ 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 对该菌株生长均有不同程度的抑制作用，尤以 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 最为显著，均以不加为好。 K_2HPO_4 的水平变化对结果没有显著影响，但亦无抑制作用，根据其 ΣK_1 、 ΣK_2 、 ΣK_3 大小，其最适水平为 0.10%。由此次试验可获得该菌株的最适营养配方：可溶性淀粉 3%，葡萄糖 2%，花生饼粉 4%，蛋白胨 0.6%， $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%， K_2HPO_4 0.10% (表 2)。

表 1 主要碳、氮源因子正交试验方案
与结果分析

No.	可溶性淀粉 (%)	花生饼粉 (%)	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	蛋白胨 (%)	生物量 (g)
1	3	0	0.1	0.4	0.167
2	3	2	0.2	0.5	0.230
3	3	4	0.3	0.6	0.374
4	4	0	0.2	0.6	0.155
5	4	2	0.3	0.4	0.318
6	4	4	0.1	0.5	0.362
7	5	0	0.3	0.5	0.147
8	5	2	0.1	0.6	0.299
9	5	4	0.2	0.4	0.321
ΣK_1	0.771	0.469	0.828	0.806	
ΣK_2	0.835	0.847	0.706	0.739	
ΣK_3	0.767	1.057	0.839	0.828	
$F_{比}$	0.50	24.83	3.16	0.67	
显著性		**	⊕		

注：以第二类偏差作为误差估计， $F_{0.01}(2.9) = 8.02$
 $F_{0.05}(2.9) = 4.26$ $F_{0.10}(2.9) = 3.01$

**, ⊕: 分别表示所对应因子水平的变化对试验结果有高度显著影响和一定的影响

表 2 主要无机盐因子正交试验方案
与结果分析

No.	K_2HPO_4 (%)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	$NaCl$ (%)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	生物量 (g)
1	0	0	0	0	0.222
2	0	0.05	0.05	0.002	0.180
3	0	0.10	0.10	0.005	0.161
4	0.05	0	0.05	0.005	0.204
5	0.05	0.05	0.10	0	0.213
6	0.05	0.10	0	0.002	0.220
7	0.10	0	0.10	0.002	0.231
8	0.10	0.05	0	0.005	0.215
9	0.10	0.10	0.05	0	0.216
ΣK_1	0.563	0.657	0.657	0.673	
ΣK_2	0.637	0.608	0.600	0.631	
ΣK_3	0.662	0.597	0.605	0.580	
偏差平方和	0.0018	0.0007	0.0007	0.0106	
$F_{比}$	2.57	1.0	1.0	15.14	
显著性				*	

注：以偏差平方和最小的列作为误差估计， $F_{0.01}(2.4) = 18.0$ $F_{0.05}(2.4) = 6.04$ $F_{0.10}(2.4) = 4.32$

*: 表示该因子水平的变化对试验结果有显著的影响

表 3 不同营养条件对生物量的影响 ($X \pm SE$)

营养条件	n	生物量 (g)	生物量提高率 (%)
最适配方	3	0.221 ± 0.11 **	59
原始配方	3	0.139 ± 0.007	

注: ** 表示两均数间差别有非常显著意义, $P < 0.01$

2.3 不同营养条件对生物量的影响

在最适配方营养条件下，该菌株生物量较原始配方营养条件提高了约 59% ($P < 0.01$)，从而表明上述正交试验方案合理，结果可靠 (表 3)。

参考文献

- [1] 陈肖庆等编著. 第四次全国抗生素学术会议论文集(下). 上海: 上海科学技术文献出版社, 1985, 299-303.
- [2] 上海市科学技术交流展组编. 正交试验设计法. 上海: 上海人民出版社, 1975.
- [3] 诸葛健等编译. 工业微生物实验技术手册. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.