

# 苏芸金杆菌 85-10-6(S) 发酵培养基的筛选

吴继星 谢天健 陈在珥 黄炳高 林学耀

(湖北省农科院植保所, 武昌)

**摘要** 采用正交设计及方差分析法, 筛选到 I 号、II 号、III 号高浓度培养基配方。通过以 85-10-6(S) 为供试菌株, I 号配方在 7 吨发酵罐进行发酵试验, 证实生产性能良好, 发酵液平均含菌量 71 亿/ml, 检查菌形、同步率、产品率均属正常。

**关键词** 正交试验; 菌株 85-10-6(S); 发酵

苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 培养基配方与发酵水平有着密切的关系。以发酵液中总固体物含量而言, 大致经历了两个发展阶段。第一阶段以 Megna(1963)<sup>[1]</sup> 为代表, 认为发酵罐培养基总固体营养物质浓度以 3—4% 为好, 并提出了典型的培养基配方, 其最终发酵液含活孢子 20—50 亿/ml。Drake 和 Smythe<sup>[2]</sup> 则认为总固体营养物质以 6—10% 为宜。他们提出典型培养基配方, 其最终发酵液含活孢子数 140 亿/ml, 最高达 150 亿/ml。随后还提出了总固体物达 12.3% 的高浓度配方<sup>[3]</sup>。此后, 国内外许多厂家纷纷采用更高浓度的培养基配方, 即为苏芸金杆菌生产的第二阶段。实践证明, 采用同一菌株在相同条件下的发酵液, 其所含芽孢数与毒力效价存在一定的正相关, 因而本文仍以活孢子数为质量标准。下面主要报道采用正交试验法, 选用适合我国具体情况, 即选用来源广、价格便宜的原材料, 按浓配方优选出较理想的 I、II、III 号培养基配方。

## 材料和方法

### (一) 菌种

*Bacillus thuringiensis* H<sub>333b</sub>-85-10-6(S) 系本所从 HD-1 诱变筛选获得的菌株。

### (二) 培养基

1. 斜面及平板测定培养基(%): 牛肉膏 0.5, 蛋白胨 1.0, NaCl 0.5, 琼脂 2.0, pH6.8—7.0。
2. 发酵对照培养基(%): 豆饼粉 3.0, 淀粉

0.4, 酵母粉 0.3, 鱼粉 0.5, 蛋白胨 0.1, CaCO<sub>3</sub> 0.1, 另加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1, pH7.6—8.0。

### (三) 正交设计

1. 以豆饼粉为主要氮源的正交设计(表 1)。

表 1 L<sub>3</sub>(3<sup>3</sup>) 因素水平表\*

因素 \ 水平	A	B	C
	豆饼粉(%)	鱼粉(%)	淀粉(%)
1	6	4	3
2	5	3	2
3	4	2	1

\* 其它原料均为: 酵母粉 0.5%, CaCO<sub>3</sub> 0.5%。

2. 以花生饼粉为主要氮源的正交设计表, 花生饼粉浓度分别为 6%、4%、2%, 其它成分同表 1。

3. 以蚕蛹粉为主要氮源的正交设计表, 蚕蛹粉浓度分别为 6%、5%、4%, 其它成分同表 1。

### (四) 摇瓶试验

培养基按试验设计要求分别配制, 使用 500ml 三角瓶, 每瓶装量 20ml 培养液, 灭菌消毒后置旋转式摇床振荡培养(温度 33℃、转速 230r/min), 培养至大部分芽孢、晶体脱落时停止(不能形成芽孢、晶体的均在 30 小时下摇床), 并逐一按常规方法<sup>[4]</sup> 进行稀释平板计数。最后统计结果, 进行方差分析。

### (五) 发酵试验

7 吨发酵罐投料 3.5 吨培养基, 接入 200ml

孢子悬浮液,以搅拌速度 200—230r/min,罐压 0.3—0.5kg/cm<sup>2</sup>,罐温 33℃ 条件下进行发酵试验,分别观察菌体的生长情况,并于 20% 孢子、晶体从菌体脱落时终止培养,最后采用稀释平板法测定活孢子数。

晶体率测定:待发酵液中菌体基本形成孢子囊时取样,小环涂布于玻片上(约为直径 1 厘米的圆形面积)、染色,油镜下计数,其中正常孢子囊为能形成晶体的菌体,变形营养体及畸形孢子囊均为不能形成晶体的菌体。晶体率即为正常孢子囊占全部计数菌体数的百分比。

### (六) 毒力测定

将发酵终止的培养液制备孢晶制剂,每个制剂使用五个稀释度。红铃虫试验采用浸药法,处理时用镊子轻轻夹住越冬老熟幼虫的前胸部浸入稀释液中,并迅速取出置于吸水纸上,以便吸干幼虫体上残留液体。菜青虫采自田间 2—3 龄健康幼虫,应用饲料感染法。最后调查死虫数、计算死亡率,并用最小自乘法求出 LC<sub>50</sub>,与发酵对照培养基相比较。

## 结 果

### (一) 不同氮源的正交设计试验结果

试验结果及方差分析表明(表 2),豆饼粉和淀粉两因素对发酵含孢数影响显著,筛选的最优组合为:豆饼粉 5%,鱼粉 3%,淀粉 3%,酵母粉 0.5%,CaCO<sub>3</sub> 0.5%。培养基配方以 I 号表示。

表 2 以豆饼粉为主要氮源的实验设计 (L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)) 方差分析结果

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	S <sub>A</sub> = 1324	2	662	19.13	**	A <sub>1</sub> (5%)
B	S <sub>B</sub> = 108	2	54	1.56		B <sub>2</sub> (3%)
C	S <sub>C</sub> = 531	2	266	7.69	*	C <sub>1</sub> (3%)
误差 e	S <sub>e</sub> = S <sub>d</sub> = 623	18	34.6			

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

以花生饼粉为氮源的试验结果及方差分析表明(表 3),花生饼粉和淀粉对发酵含孢数影

表 3 以花生饼粉为主要氮源的实验设计 (L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)) 方差分析结果

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	S <sub>A</sub> = 766	2	383	40.7	**	A <sub>1</sub> (6%)
B	S <sub>B</sub> = 123	2	61.5	6.5	*	B <sub>2</sub> (3%)
C	S <sub>C</sub> = 3067	2	1533.5	163	***	C <sub>1</sub> (3%)
误差 e	S <sub>e</sub> = 170	18	9.4			

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

表 4 以蚕蛹粉为主要氮源的实验设计 (L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)) 方差分析结果

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	S <sub>A</sub> = 1286	2	643	24.83	**	A <sub>1</sub> (5%)
B	S <sub>B</sub> = 27	2	13.5	0.52		B <sub>2</sub> (3%)
C	S <sub>C</sub> = 1044	2	522	20.15	**	C <sub>1</sub> (3%)
误差 e	S <sub>e</sub> = S <sub>d</sub> = 466	18	25.9			

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

响极其显著,据此筛选的最优组合为:花生饼粉 6%,鱼粉 3%,淀粉 3%,酵母粉 0.5%,CaCO<sub>3</sub> 0.5%。培养基配方以 II 号表示。

以蚕蛹粉为主要氮源的试验结果及方差分析表明(表 4),蚕蛹粉和主要碳源淀粉对发酵含孢数影响都很显著,据此筛选的最优组合应为:蚕蛹粉 5%,鱼粉 3%,淀粉 3%,酵母粉 0.5%,CaCO<sub>3</sub> 0.5%。培养基配方组成以 III 号表示。

### (二) 发酵试验结果

将菌株 85-10-6(S) 沙土管接入茄子瓶培养基,32℃ 培养三天后以无菌水制成孢子悬浮液,培养基为 I 号,并以生产常规发酵培养基作比较。当罐温降至 37℃ 时接种,其结果见表 5。

从表 5 所示 pH 值变化及发酵周期可以看出,菌株 85-10-6(S) 在 I 号培养基上发酵正常,与对照培养基相比,平均含活孢子数提高 56.7%。同时,晶体率除 22-52 批外,其余均达 90% 以上,说明其同步率均较理想。

表5 发酵试验结果

pH变化 罐批	时间 (小时)												发酵周期 (h)	含孢子数 (亿/ml)	C/S* (%)
	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26			
21-47	6.5	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	6.9	6.9	7.1	7.3	7.6	7.8	27	77	95
22-52	6.6	6.5	6.6	6.6	6.7	6.7	6.9	6.9	7.1	7.4	7.7		25.5	71	86
21-53	6.5	6.4	6.6	6.7	6.8	6.8	6.9	7.0	7.2	7.5	7.8		26	64	93
CK	6.4	6.5	6.5	6.6	6.7	6.9	6.9	7.0	7.4	7.6	7.8		23	45	91

\*C/S: 为计数的500个菌体中正常孢子囊所占的百分数。

表6 菌株 85-10-6(S) 对两种昆虫的毒力测定结果

罐批	红铃虫		菜青虫	
	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	毒效比值 $\frac{CKLC_{50}}{1号 LC_{50}}$	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	毒效比值 $\frac{CKLC_{50}}{1号 LC_{50}}$
21-47	4.2624	2.11	0.8796	1.67
22-52	8.5339	1.06	1.3998	1.05
21-53	5.0471	1.79	1.1340	1.30
CK	9.0145		1.4689	

试验温度 26—29℃, 均系三次试验的平均值。

### (三) 毒力测定结果

菌株 85-10-6(S) 在 I 号培养基及对照培养基上发酵液的生物测定结果见表 6。表 6 结果表明, 菌株 85-10-6(S) 在 I 号培养基上产生的晶体毒素较稳定, 与对照培养基相比较, 对两种昆虫的毒效都较高。尤其是 21-47 批, 对越冬红铃虫的毒效为对照培养基的 2.11 倍。同时还可发现, 同一培养基的 21-47 批也是 22-52 批毒效的 2 倍。由此说明, 同一菌株在不同培养基上产生的毒素存在差异, 即使在同一培养基上的不同罐批也存在某些差异。

## 讨 论

1. 为了提高苏芸金杆菌的发酵水平, 采用高浓度固形物配方是行之有效的。如选用总固形物浓度为 11% 的 I 号配方与总浓度为 4.5% 的对照配方相比, 浓度虽然提高 50%, 但发酵水平也相应提高了 56.7%, 按相同的回收率可多获产品 0.5 吨左右, 加上节省的时间和动力消耗, 每罐可净增收 1000 元以上。因而在生产

实践中无疑是可取的。

2. 通过正交试验和方差分析, 可以看出培养基中各种营养成分对发酵的影响情况, 并由此优选出高水平的发酵培养基。本试验可知, 玉米粉、花生饼粉、蚕蛹粉以及淀粉对发酵水平均具显著影响, 由此推断, 起主导作用的是氮源和碳源的含量。本试验还发现, 由于碳、氮比例的失调, 而导致相当一部分培养基同步率差, 甚至无法正常形成芽孢、晶体。因此, 合适的碳、氮比是筛选优良培养基的重要前提。

## 参 考 文 献

- [1] Megna, J. C.: U. S. Patent, 3, 073, 749, 1963.
- [2] Drake, B.B., and C.V. Smythe: U.S. Patent, 3, 087, 865, 1963.
- [3] Dulmage H.T. and R. A. Rhodes: Production of Pathogens in Artificial Media In «Microbial control of Insects and Mites», Edited By H. D. Burges and N. W. Hussey, 1971.
- [4] 刘崇乐等: 苏云金杆菌研究的五十年, 科学出版社, 北京, 1962。