

球形芽孢杆菌 TS-1 发酵条件的研究

陈月华 何屹* 任改新 王岳五 何艳莉**

(南开大学生物系,天津 300071)

摘要 本文用正交试验设计方法选出的球形芽孢杆菌发酵培养基配方,菌体数量可达到 100 亿/ml,芽孢形成率达到 70—80%,杀蚊幼的半致死剂量在 0.125ppm 以下。上述的三个指标明显优于以前的报道。通过摇瓶发酵验证和 50L¹小罐的放大试验,证明所有的实验结果都很稳定。使用现在的发酵配方,使每吨发酵液的成本降低了 33%。

关键词 正交试验设计;球形芽孢杆菌;发酵条件

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 制剂对库蚊幼虫有高效的毒性且持效期长,在蚊虫生物防治中的地位日益提高,成为当今利用生物制剂防治害虫的一个重要方面。国外已有研制球形芽孢杆菌粉剂的报道^[1-2]。该菌的发育形态与其对蚊幼的毒力有很大关系。当发酵液中存在大量的芽孢囊和芽孢时,杀虫效果更加显著。这是因为其杀虫活性与其在芽孢形成过程中的晶体毒蛋白有关^[3]。球形芽孢杆菌的杀虫活性随培养条件不同可有很大差异。因此研究球形芽孢杆菌发酵条件对芽孢的形成、菌体浓度及杀蚊活性的影响具有重要的意

义。这方面的研究国内仅有几篇报道^[4-5]。本文主要以球形芽孢杆菌的工业化生产为重要前提,选用适合我国国情、来源广、价格低的原材料,采用正交试验设计,筛选出菌体浓度高、芽孢率高而且杀虫效果明显优于以前有关报道^[4]的发酵培养基配方。

材料和方法

(一) 菌种

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) TS-1。

* 现在国家档案局工作, ** 现在天津儿童医院工作。

(二) 培养基

1. 斜面及平板测定培养基: 固体 LB 培养基。
2. 种子培养基: 液体 LB 培养基。
3. 发酵对照培养基(%): 鱼粉 5, 淀粉 1.25, 牛肉膏 0.5, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 均为 0.1, pH7.2—7.4。

(三) 正交试验设计

1. 以鱼粉为主要原料的正交试验设计表(表 1):

表 1 $L_8(4 \times 2^2)$ 因素水平表

实验号	A		B		C	
	鱼粉		牛肉膏		装液量	
	水平	百分含量(g)	水平	百分含量(g)	水平	ml/250ml瓶
1	1	4	1	0.3	1	25
2	1	4	2	0.5	2	50
3	2	4.5	1	0.3	1	25
4	2	4.5	2	0.5	2	50
5	3	5	1	0.3	2	50
6	3	5	2	0.5	1	25
7	4	6	1	0.3	2	50
8	4	6	2	0.5	1	25

2. 以棉籽粉、豆饼粉和花生饼粉为主要原料的正交试验设计分别同上表。
3. 除表中成份外, 其它成份均同发酵对照培养基, 但除去了淀粉(原因详见讨论部分)。

(四) 摇瓶试验

培养基按要求分别配制。将培养 14 小时的种子液以 3% (V/V) 的量接入发酵瓶, 28°C 180v/min 振荡培养。定时取样测定 pH 并涂片观察菌体长势及芽孢形成情况, 视芽孢脱落在 5% 以上时停止培养。菌体浓度及芽孢率的测定按 Kalfon 法^[1]及常规血球计数法。

(五) 发酵试验

使用 50L³ 通用罐, 两组六直叶搅拌器, 机械搅拌通风。种子培养及接种量均同摇瓶试验。发酵条件: 罐压 0.5—0.7kg/cm², 28 ± 2°C, 转数 150r/min, 通风量 1:0.8(V/V)/min。每隔 4 小时取样, 测定内容及方法同(四)。

(六) 杀蚊效果测定

参考任改新等的方法^[4]。

(七) 碳氮源利用的测定

1. 将发酵不同时期的各样品离心 (15,000 r/min, 15min) 除去培养基中不溶解的成分及菌体, 取上清液, 用 3-5 二硝基水杨酸钠法测定总糖。
2. 将棉籽粉以二倍于培养基的量置水中煮沸 1 小时, 过滤除去不溶解部分。其它成份均同发酵用培养基。取接种前及生长不同时期的各样品离心, 方法同前。用微量凯氏定氮法测定总氮和残氮。

结果和讨论

(一) 正交试验

表 2 为各种主要原料的正交试验计算结果。其中 K_i 为某一因素某一水平的试验平均值, R 为极值, 表示各因素对所需求指标的作用大小。杀蚊效果的测定用蚊幼为 3 龄库蚊 (以下相同)。

1. 从表 2 看出, 棉籽粉培养基菌体浓度最高, 四个水平平均 13×10^9 /ml, 尤以 K_3 (含量为 5%) 为最佳。鱼粉培养基次之, 平均 10×10^9 /ml, K_2 (含量为 4.5%) 为好。
2. 从杀蚊效果看, 棉籽粉培养基毒力最高, 其半致死剂量 (LC_{50}) 仅 0.082ppm, 低于部颁要求的 LC_{50} 为 0.125ppm 的标准, 这与其菌体浓度高是一致的。

3. 牛肉膏的 2 个水平对菌体浓度和芽孢率效果不明显, 而且多数结果为牛肉膏浓度升高, 芽孢量降低, 因此培养基中牛肉膏的含量可降至试验中的低水平(0.3%)。

4. 装液量间接反应着菌体生长过程中对氧的需求。所有的结果均表明, 凡是装液量少的培养物, 对菌体浓度和芽孢形成都有促进作用。

通过正交试验的结果分析, 我们认为最好的培养基配方为(%): 棉籽粉 5, 牛肉膏 0.3, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnSO_4$ 均为 0.1, pH7.4。

(二) 摇瓶发酵验证试验

用正交试验确定的配方进行了验证试验。

表2 四种培养基成份对菌体浓度影响及杀蚊效果的测定

菌体浓度 ($\times 10^7$)	因素	鱼粉	棉籽粉	豆饼粉	花生饼粉
K ₁		9.6	10.7	6.2	9.2
K ₂		13.5	9.1	7.7	5.2
K ₃		7.2	19.5	8.5	4.0
K ₄		11.0	11.1	8.4	5.4
R		6.3	10.4	2.2	5.2
LC ₅₀ (ppm)		0.164	0.082	0.241	
95%置信限		0.138—0.194	0.068—0.098	0.192—0.303	

同时对不同发酵时间的菌体浓度、芽孢率及 LC₅₀ 进行了测试。结果表明,用棉籽粉配方发酵各项指标均很稳定,而且发酵时间可提早到30小时以前(表3)。

表3 摇瓶发酵验证试验结果

批次	发酵时间(h)	菌体浓度($\times 10^{10}$)	芽孢率(%)	LC ₅₀ (ppm)	95%置信限
1	48	35	70以上	0.102	0.092—0.113
2	48	10	70以上	0.167	0.164—0.169
3	24	40	70以上	0.059	0.05—0.07
4	30	12	70以上	0.107	0.1066—0.107
5	30	9	70以上	0.124	0.118—0.133

(三) 摇瓶发酵残糖残氮测定

由图1看出,球形芽孢杆菌在其生长过程中不明显利用糖类作为碳源,发酵液中总糖含量趋于恒定。这为我们在培养基中去掉原配方中的淀粉提供了可靠的依据。

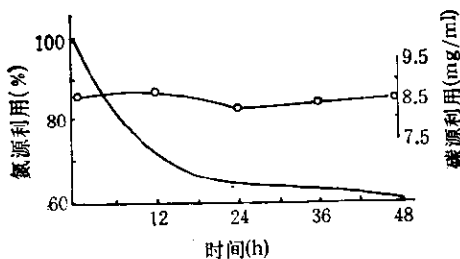


图1 摇瓶发酵不同时期的残糖残氮测定结果

从图1中还可看出,发酵至48小时,培养基中氮源的利用是总氮量的40%,发酵24小时之前呈现氮源利用的高峰,这与生长曲线是一致的,在24—28小时以后菌体浓度开始恒定。

(四) 50L³ 小罐发酵

在摇瓶发酵的基础上,进行了50L³罐的放大试验。由于发酵罐的搅拌和通氧条件均优于摇瓶发酵,因此菌体浓度和芽孢同步形成率都明显好于摇瓶发酵。在4批发酵试验中,选用第3批为典型罐。图2记录了此罐的菌体生长曲线及pH变化曲线。表4为4批50L³罐的发酵结果。

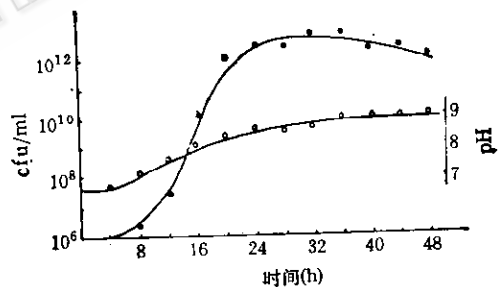


图2 典型罐的菌体生长及 pH 变化曲线

表4 50L³ 小罐发酵试验结果

批次	发酵终 pH	菌体浓度($\times 10^{10}$)	芽孢率(%)	LC ₅₀ (ppm)	95%置信限
1	9.0	82	80以上	0.085	0.04—0.125
2	8.5	216	80以上	0.077	0.038—0.157
3	9.0	530	80以上	0.121	0.105—0.140
4	9.0	221	80以上	0.103	0.042—0.169

1. 从菌体生长曲线来看,8—20小时为对数生长期,24小时后菌体数量达到最高量,36小时后菌体浓度稍有下降。从国内外资料来看,球形芽孢杆菌的培养终浓度多在 10^{10} cfu/ml左右,我们的结果多在 10^{11} cfu/ml,甚至更高些。其主要原因可能是,我们将通常的固体

接种改为二级发酵,即将在 LB 肉汤中培养 14 小时左右的菌液接入发酵液中,缩短了迟缓期,很快进入了对数期,使细胞数量迅速增高。其次,在系列稀释进行平板计数时,方法上的不同造成系统误差。

2. 发酵过程中,芽孢均在 12—16 小时逐渐形成,20—28 小时趋于成熟且达到最高量,80—90% 的细胞为芽孢,大部分脱落,到 30—35 小时芽孢全部脱落。可见,通过正交试验而获得的棉籽粉配方,使芽孢的同步形成率很高,明显优于以前的鱼粉配方。

3. 发酵 32 小时以后, pH 升到 8.5 以上,菌体生长异常,出现较长的丝状细胞。36 小时后, pH 达到 9 左右,这时可明显见到菌体碎片,细胞自溶,生长和代谢受到抑制。从这些情况看,

发酵终止应在 35 小时以前,24—32 小时终止发酵最好。

球形芽孢杆菌是大有潜力的生物农药开发菌株。我们所确定的发酵配方,其原料来源广,价格低,很适合我国国情,为球形芽孢杆菌农药的工业化生产提供了良好的条件。

参 考 文 献

1. Bourguin C et al.: *J. Invertebrate Pathology*, **44**: 146—150, 1984.
2. Obeta J A N et al.: *CAN. J. Microbiol.*, **29**(6): 704—709, 1983.
3. Kalfon A et al.: *Eur. Appl. Microbiol Biotechnol.*, **18**: 168—173, 1983.
4. 任改新等: *微生物学报*, **23**(1): 57—62, 1983.
5. 任改新等: *微生物通报*, **12**(4): 145—147, 1985.

STUDIES ON FERMENTATIVE CONDITIONS OF *BACILLUS SPHAERICUS* TS-1

Chen Yuehua He Yi Ren Gaixin Wang Yuewu He Yanli

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

The medium for fermentation has been selected by means of orthogonal designs. The number of cell has reached 10^{11} /ml, and spore forming rate is 70—80%. LC_{50} of mosquito larvicied is lower than 0.125 ppm. Three targets are obviously better than those of previous report. The stable results are proved by studying of fermentation in shaking flask and further in 50L³-bench fermenter. The production cost of per ton is decreased by 33%.

Key Words Orthogonal design; *Bacillus sphaericus*; Fermentative condition