

文章编号: 1673-1689(2007)01-0106-05

新疆苏云金杆菌 35 高效菌株液体深层 发酵培养基的筛选

史应武¹, 赵思峰², 李国英²

(1. 新疆特殊环境微生物实验室, 新疆 乌鲁木齐 830091 2. 新疆生产建设兵团绿洲生态实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要:以对棉铃虫高毒力的苏云金芽孢杆菌 35 作为研究菌株, 采用正交试验法及生物测定验证法, 对该菌株发酵培养基进行了优化实验。获得了优化培养基(棉籽饼 3.25 g/dL、玉米粉 1.4 g/dL、麸皮 1.2 g/dL、 KH_2PO_4 0.11 g/dL、 FeSO_4 0.0049 g/dL)。该培养基与对照培养基相比, 发酵液含菌数高达 40.8×10^8 cfu/mL, 比对照培养基提高了 63.7% ; 发酵液毒力高达 66.1% , 比对照培养基提高了 81.5%。

关键词: 苏云金芽孢杆菌 液体深层培养基 M_2 筛选

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Screening of Formula of Deep-Tank Fermentation Medium for High Effect *Bacillus thuringiensis* 35

SHI Ying-wu¹, ZHAO Si-feng², LI Guo-ying²

(1. Extremophiles lab of Xinjiang, Xinjiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 832200, China ; 2. The Oasis Ecological Lab. Xinjiang BING TUAN, Shihezi 832003, China)

Abstract : *Bacillus thuringiensis* (Bt) strain 35 which is highly toxic to *Helicoverpa armigera*. The orthogonal design has been developed to determine the optimum fermentation medium composition and the culture condition by shaking flasks. The formulas of medium M_4 shows higher production than original fermentation medium. The production of spore and bacteria was 725% higher than that of the control fermentation medium in shaker. A optimum fermentation media (the optimized KH_2PO_4 0.11 g/dL, FeSO_4 0.0049 g/dL) was achieved. Compared with that of the control media, the concentration of superior media reached 40.8×10^8 cfu/mL, increased 63.7% ; the potency of the optimized media reached 66.1% , increased 81.5% . The fermentation media is characterized by green environmental protection and this locality and ecology and economy and society.

Key words : *Bacillus thuringiensis* ; deep-tank fermentation medium M_4 ; screen

在微生物杀虫剂中,苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种宝贵的杀虫微生物资源^[1],它能产生多种对昆虫有致病力或毒杀作用的毒素,主要有 α 、 β 、 γ -外毒素和 δ 内毒素^[2-5]。它是目前世界上产量最大、应用最广的微生物杀虫剂,Bt杀虫剂现已广泛应用于农业生产^[6]。据不完全统计,近年来我国Bt杀虫剂的使用量已超过2万t,成为Bt杀虫剂的生产和应用大国^[7]。新疆是我国优质棉基地,由于连作及特殊的耕作措施及农业生态气候等环境因素的影响,棉铃虫危害有逐渐加重的趋势。

研究证明,Bt的营养要求不高,除能在牛肉膏蛋白胨培养基中生长良好外,在许多由农副产品组成的培养基中也能生长得很好^[8]。利用农副产品作为发酵的营养成分,既可扩展农副产品的市场,又可明显降低生产成本。据报道,Bt各亚种对不同类型的糖和碳的利用能力不一样,因此必须筛选出生长同步能达到全部释放芽孢和伴孢晶体的培养基。然而据报道,生长同步的培养基因糖碳比的不同,对昆虫的致死率也不一样。培养基的成分及其比例是影响苏云金杆菌制剂毒力的另一重要因素^[9]。为了提高35号Bt菌株的发酵单位,除了有高效菌株、最适培养条件外,还需要高产培养基^[10]。

近年来,我国在Bt资源发酵营养、剂型及毒力方面的研究有许多报道,但在Bt培养基的筛选优化,尤其在利用农副产品作为发酵成分营养学方面的研究却很少。因此,在我国Bt制剂使用量逐年增加及农业可持续发展和对无公害绿色有机食品日趋重视的情况下,研究利用当地农副产品作为Bt发酵培养基具有特别重要的意义。作者研究了新疆苏云金杆菌35高效菌株发酵培养基的优选。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

苏云金杆菌35号菌株,2002年分离于石河子146团三连棉田自然病死棉铃虫。

1.2 发酵培养基

1.2.1 基本培养基A(组分g/dL) 棉子饼1.0,玉米粉0.4,小麦麸皮0.4, KH_2PO_4 0.04, FeSO_4 0.0015, H_2O 1 000 mL。

1.2.2 加倍培养基B、C、D 将原始发酵A培养基的各种营养组分的量均加浓2.0、3.0、4.0倍,组成B、C、D 3种新配方。棉子饼主要提供氮源,玉米粉和小麦麸皮主要提供碳源, KH_2PO_4 主要提供磷酸盐, FeSO_4 提供亚铁盐。

1.3 发酵液的稀释涂板记数法

将融化后凉至不烫手的LB固体培养基倒入平板中(8~10 mL),迅速正向和反向旋转平板3次,在超净工作台中凝固,倒置平板于30℃培养20~24 h。将发酵液样品以10或20倍级数稀释,稀释液为0.1% Tween-80,然后吸取200 μL 稀释液涂布于固体平板上。28℃培养1 d后观察菌落数,选择平板菌落数在100个左右的浓度进行记数。以合理的稀释浓度再次涂5个板,取平均值,计算发酵液样品的含菌数。重复3次,得出最终含菌数。

1.4 培养基加倍试验

将A、B、C、D 4种配方在摇床上进行摇瓶培养试验,将35号菌株接种斜面,30℃培养3 d,转入250 mL的三角瓶,前24 h于30℃培养,后48 h于35℃培养,120 r/min 摇瓶振荡培养72 h,用稀释涂板记数法测发酵原液含菌数,通过方差分析及显著性测定比较^[11],说明Bt发酵原液单位菌量的高低与培养基浓度的关系。

1.5 正交试验

在摇瓶发酵试验中,设置影响芽孢产生的5个因素(棉籽饼、玉米粉、小麦麸皮、磷酸二氢钾、硫酸亚铁质量浓度),4个水平(基本培养基A水平为1倍,B、C、D水平分别为2.0、3.0、4.0倍)进行,然后进行方差分析及多重比较^[12]。初步正交优选出配方 M_1 。由于第一次正交试验结果中转化率 K 值除 KH_2PO_4 、 FeSO_4 外,其余在3.0倍水平上产菌量最高,则再调整各因素浓度水平为2.75、3.0、3.25、3.5倍,做第二次正交试验,优选出产菌量较高的3种配方 M_2 、 M_3 、 M_4 。用 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 和基本培养基A分别进行摇瓶发酵试验^[13],用方差分析和多重比较的方法选出高产培养基。

2 结果与分析

2.1 培养基浓度加倍试验

结果见表1。

从表1可以看出,在A、B、C、D 4个培养基的浓度中,C发酵后产量最高,达 7.29×10^8 cfu/mL。经方差分析多重比较,A、B、C、D有显著差异,得出D加倍效果最好,说明培养基3.0倍的C/N及盐离子较适合Bt的生长繁殖。

2.2 培养基正交试验

结果见表2。

表 1 浓度加倍试验结果
Tab.1 The result of density double

培养基 浓度	单位菌量/ (× 10 ⁸ cfu/mL)	单位菌量/ (× 10 ⁸ cfu/mL)	单位菌量/ (× 10 ⁸ cfu/mL)	单位菌量/ (× 10 ⁸ cfu/mL)	总和 <i>T</i> (59. 15)	平均值 <i>X</i> (3. 70)
<i>A</i> (1. 0 倍 CK)	2. 43	2. 20	3. 09	2. 67	10. 93	2. 60
<i>B</i> (2. 0 倍)	3. 29	3. 10	3. 64	2. 98	13. 01	3. 25
<i>C</i> (3. 0 倍)	7. 21	7. 42	7. 17	7. 34	29. 14	7. 29
<i>D</i> (4. 0 倍)	5. 25	5. 17	5. 69	5. 34	21. 45	5. 36

表 2 初步正交试验结果 L₁₆(4⁵)
Tab.2 The result of density double

因素	棉籽饼质量浓度	玉米粉质量浓度	麸皮质量浓度	KH ₂ PO ₄ 质量浓度	FeSO ₄ 质量浓度	发酵原液单位		
	<i>A</i> /(g/dL)	<i>B</i> /(g/dL)	<i>C</i> /(g/dL)	<i>D</i> /(g/dL)	<i>E</i> /(g/dL)	菌量/(× 10 ⁸ cfu/mL)		
	1	2	3	4	6	重复 I	重复 II	<i>F_t</i>
1	1(1. 0)	1(0. 4)	1(0. 4)	1(0. 04)	1(0. 0015)	2. 40	1. 20	3. 60
2	1	2	2	2	2	5. 40	6. 26	11. 66
3	1	3	3	3	3	8. 66	6. 06	14. 72
4	1	4	4	4	4	9. 84	5. 84	15. 68
5	2(2. 0)	1	2(0. 8)	3	4	4. 47	5. 26	9. 73
6	2	2(0. 8)	1	4	3	5. 54	5. 76	11. 30
7	2	3	4	1	2(0. 003)	9. 12	9. 91	19. 03
8	2	4	3	2(0. 08)	1	10. 80	11. 12	21. 92
9	3(3. 0)	1	3(1. 2)	4	2	10. 13	10. 66	20. 79
10	3	2	4	3(0. 12)	1	11. 27	12. 14	23. 41
11	3	3(1. 2)	1	2	4	14. 26	15. 17	29. 43
12	3	4	2	1	3(0. 0045)	12. 89	12. 11	25. 00
13	4(4. 0)	1	4(1. 6)	2	3	10. 17	10. 82	20. 99
14	4	2	3	1	4(0. 006)	11. 66	12. 07	23. 73
15	4	3	2	4(0. 16)	1	8. 72	7. 98	16. 70
16	4	4(1. 6)	1	3	2	6. 91	7. 24	14. 15
<i>K</i> ₁	45. 66	55. 11	58. 48	71. 36	65. 61			
<i>K</i> ₂	61. 98	70. 10	63. 03	83. 94	65. 63			
<i>K</i> ₃	98. 63	79. 88	81. 16	62. 01	72. 01			
<i>K</i> ₄	75. 57	76. 75	79. 11	64. 47	78. 57			
<i>R</i>	52. 97	24. 77	22. 68	21. 93	12. 96			

对表 2 中 *R* 值比较,可以确定各因素对 35 号菌株产量的影响依次为:*A*(棉籽饼质量浓度) > *B*(玉米粉质量浓度) > *C*(麸皮质量浓度) > *D*(KH₂PO₄质量浓度) > *E*(FeSO₄质量浓度)。但比较各因素 *R* 值,*E* 较小,因此影响发酵的主要因素包括 *A*、*B*、*C*、*D*。经 *F* 测验,*A*(棉籽饼质量浓度)、*B*(玉米粉质量浓度)、*C*(麸皮质量浓度)、*D*(KH₂PO₄质量浓度)和 *E*(FeSO₄质量浓度)均具有显著差异。

由 *K* 值得初步优选培养基配方:棉籽饼 3. 0 g/dL、玉米粉 1. 2 g/dL、麸皮 1. 2 g/dL、KH₂PO₄ 0. 08 g/dL、FeSO₄ 0. 006 g/dL(*A*₃*B*₃*C*₃*D*₂*E*₄)。对表 2 中 *K* 值观察,除 *D* 因素外,其余各因素均偏向较高水平为好,个别因素 *E* 的 *K* 值变化很不规则。因此再调整各因素质量浓度水平,进行第二次正交试验,结果见表 3。

表 3 第二次正交试验结果 $L_{16}(4^5)$
Tab.3 The result of density double

因素	棉籽饼质量浓度	玉米粉质量浓度	麸皮质量浓度	KH_2PO_4 质量浓度	FeSO_4 质量浓度	发酵原液单位		
	$A/(\text{g/dL})$	$B/(\text{g/dL})$	$C/(\text{g/dL})$	$D/(\text{g/dL})$	$E/(\text{g/dL})$	菌量/ $(\times 10^8 \text{ cfu/ml})$		
	1	2	3	4	6	重复 I	重复 II	Ft
1	1(2.75)	1(1.1)	1(1.1)	1(0.11)	1(0.0041)	8.42	8.38	16.80
2	1	2	2	2	2	9.38	9.24	18.62
3	1	3	3	3	3	11.24	11.40	22.64
4	1	4	4	4	4	12.01	12.12	24.13
5	2(3.0)	1	2(1.2)	3	4	10.23	10.15	20.38
6	2	2(1.2)	1	4	3	11.41	11.29	22.70
7	2	3	4	1	2(0.0045)	14.19	13.72	27.91
8	2	4	3	2(0.12)	1	12.78	11.67	24.45
9	3(3.25)	1	3(1.3)	4	2	10.66	10.41	21.07
10	3	2	4	3(0.13)	1	11.23	11.19	22.42
11	3	3(1.3)	1	2	4	13.34	13.29	26.63
12	3	4	2	1	3(0.0049)	16.17	16.32	32.49
13	4(3.5)	1	4(1.4)	2	3	11.17	10.99	22.16
14	4	2	3	1	4(0.0053)	10.13	9.89	20.02
15	4	3	2	4(0.14)	1	9.74	9.14	18.88
16	4	4(1.4)	1	3	2	8.23	8.38	16.61
K_1	23.00	27.38	25.92	25.82	23.88			
K_2	24.20	26.38	25.52	24.30	21.68			
K_3	23.36	21.64	25.18	25.24	29.34			
K_4	31.92	27.08	25.86	27.12	27.58			
R	8.92	5.74	0.74	2.82	7.66			

由表 3 可以看出,经第二次正交试验,各因素 R 值均明显变小,而棉籽饼仍为主要因子,这与初步正交试验结果一致。同时细化各因素水平后,Bt 浓度明显提高,说明对配方质量浓度水平调整是正确的。 F 测验表明,各因素水平均具差异显著性。从 Ft 值观察,处理 7、11、12 效果较好。将此 3 个配方分别设为 M_2 、 M_3 、 M_4 ,并将初步正交优选配方 M_1 和原始发酵培养基配方(CK)一起进入综合比较试验。

2.3 培养基综合优选

结果见表 4。
结果表明,5 种培养基 Bt 发酵产量均大于原始配方。 M_2 配方 Bt 发酵产量最高,为 $14.5 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$,同时经棉铃虫生测验证,最高浓度对应的毒力也最高,为 80.5%。经多重比较,培养基 M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 、CK 具有差异显著性。因此 M_4 为最优培养基。

表 4 综合优选试验结果

Tab.4 The results of the comprehensive optimization experiments

培养基编号	发酵原液含菌量/ (10^8 cfu/mL)	将发酵原液稀释 100 倍 感染棉铃虫 3 龄幼虫的 生测死亡率/%
M_1	11.6	39.8
M_2	12.9	44.1
M_3	12.2	43.6
M_4	14.5	51.2
CK	2.0	11.2

2.4 小试发酵结果

小试发酵结果表明,培养基 M_2 、 M_4 在小罐中发酵原液 100 倍稀释液对棉铃虫三龄幼虫的毒力比原始配方好,特别是 M_4 发酵 Bt 产量更高,达到 66.1%,是原始发酵液毒力百分率的 541 倍。

3 结 论

1) 优良的培养基是微生物发酵中影响发酵水平的关键因素之一。华中农业大学采用正交试验选出 Bt 高产苏云金素的培养基配方^[14]。本试验也证明了正交试验在培养基筛选中的可行性。据吴继星报道^[15]，“正交试验→浓度加倍→生物测定”是 Bt 发酵培养基配方优选中一种简便、实用、快速的优选模型。作者采用“正交试验→浓度加倍→生物测定”，通过浓度加倍和正交综合优选试验，筛选出 35 号高效 Bt 菌株发酵培养基配方为 M₄。摇瓶培养试验(M₄)比原始发酵培养基(CK)发酵水平提高了 625%，毒力提高了 111%。

2) 据文献[16]报道,不同 Bt 菌株的营养需求不同。对于同一发酵条件,用同一种子的菌种接种,采用不同培养基配方时 35 号 Bt 菌株发酵水平具有明显差异,说明合理的配方可以提高产量。

3) 本研究表明,培养基的固形物含量与发酵液含菌数有一定的相关性,且固形物含量不光影响发酵液含菌数,还最终影响毒力。

4) 本试验的出发点是利用农产品,节本降耗,最大限度地增加杀虫物质,达到生态、经济、社会效益的完美结合。

5) 要提高含菌数及毒力,高产发酵培养基是必需的,同时要从 Bt 菌株的优选及 Bt 发酵过程的调控两方面进行研究。

参考文献(References)：

- [1] Flexner J L, Lighthart B, Croft B A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods[J]. *Argri Econsyst Environ*, 1986, 16: 203–254.
- [2] Agaisse H, Lereclus D. How dose *Bacillus thuringiensis* so much insecticidal protein[J]. *J Bacteriol*, 1995, 21: 6027–6032.
- [3] Triisrisook M, Pantuwatana S, Bhumiratana A, et al. Molecular cloning of the 130-kilodalton mosquitocidal δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Bacillus sphaericus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(6): 1710–1716.
- [4] Thomas W E, Ellar D J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo[J]. *J Cell Sci*, 1983, 60: 181–197.
- [5] Federici B, Bauer L S. Abstracts of the Society for Invertebrate Pathology 30th annual Meeting[C]. Canada: Banff Alberta, 1997: 24–29.
- [6] Croft BA. Arthropod Biological Control Agents and Pesticides[M]. New York: John Wiley & Sons, 1990: 723.
- [7] Yang Ziwen, Wang Kaimei, Wu Jixing, et al. Commercialization of *Bacillus thuringiensis* in China[M]. *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*, 2000, 3: 205–210.
- [8] 沈萍主编. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [9] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [10] 高家合, 王革, 李天飞, 等. 苏云金杆菌 33 菌株的培养基优化研究[C]. 第九届全国杀虫微生物学术研讨会论文摘要集[C]. 武汉: 中国微生物学会, 2002: 78.
- [11] 南京农业大学主编. 《田间试验和统计方法》[M]. 北京: 农业出版社, 1995.
- [12] 朱燕堂主编. 《应用概率统计学》[M]. 西安: 西北工业出版社, 1995.
- [13] 沈鞠群, 王锦举, 喻子牛. 苏云金杆菌制剂标准化的程序和方法[J]. *生物防治通报*, 1990(增刊): 12–16.
Shen juqun, Wang jinju, Yu ziniu. Bioassay procedure and method of standardization of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1990, s1, 12–16. (in Chinese)
- [14] 喻子牛, 沈鞠群, 熊春林. 高产苏云金素培养基和培养条件的优选[J]. *生物防治通报*, 1990(增刊): 54–59.
Yu ziniu, Shen juqua, Xiong chanlin. Selections of medium formulae and incubate conditions for high-yield *thuringiensin* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1990, s1, 56–61. (in Chinese)
- [15] 吴继星, 陈在悒, 谢天健, 等. 苏云金杆菌高效培养基优选模型的研究[J]. *生物防治通报*, 1994, 10(3): 110–113.
Wu ji xing, Chen zai er, Xie tian jian, et al. A study on a new model of highly effective media of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Chinese journal of biological control*, 1994, 10(3): 15–18. (in Chinese)
- [16] 金玉来. 苏云金杆菌 7216 菌株的摇瓶发酵试验[J]. *工业微生物*, 1994, 24(3): 35–39.
Jin Yulai. Shaking flask culture of *B. Thuringiensis* 7216 [J]. *Industrial Microbiology*. 1994, 24(3): 38–43. (in Chinese)

(责任编辑 李春丽)