

苏云金杆菌发酵条件的研究

Ⅱ. 83002菌株在14 L 发酵罐发酵条件与制剂生产

王学聘 戴莲韵

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 以苏云金杆菌83002菌株在14 L 发酵罐条件下研究表明:培养温度和搅拌速度对菌数表现出一定的相关性,但对培养基 pH 变化规律影响不大;培养基灭菌前的初始 pH 值高低对发酵过程中 pH 变化规律有一定影响;培养温度、搅拌速度、培养基灭菌前 pH 值高低对发酵过程中培养基 C、N 变化的规律均表现出一定影响。上述结果,为苏云金杆菌发酵条件参数提供了依据,确立了各种剂型的制备工艺。

关键词 苏云金杆菌; 发酵条件; 剂型

在微生物杀虫制品的商品性生产中,除选择优良菌株外,尚需维持菌株的最佳生长条件以获得高产和优质。在苏云金杆菌制剂生产中,产品的杀虫活性是衡量制剂质量的主要标准, Majumber (1966) 认为苏云金杆菌的杀虫活性取决于附有菱形伴孢晶体的活孢子^[1]。一些学者还报道了苏云金杆菌不同血清型在杀虫活性方面的差异, Dalmage (1970) 指出杀虫活性不仅取决于苏云金杆菌的品系,而且也与培养基成份有关^[2]。我们的试验结果进一步阐明了即使在苏云金杆菌同一品系中的不同菌株,对目的昆虫的杀虫活性也表现出差异。同时提出,只有同一菌株在同一培养基上,其活孢子数与杀虫活性才有明显的相关性^[3]。在上述试验基础上,本文以分离和筛选的一株优良苏云金杆菌——83002菌株,在确定其发酵培养基后,用14 L 发酵罐研究其发酵过程与培养温度、搅拌速度、pH 变化的相关性及其剂型,现将结果报道如下。

一、材料和方法

(一) 菌种来源

本试验所用菌株为83002,菌种鉴定详见参考文献[3]。

(二) 发酵培养基主要成份

玉米面 0.5%; 豆饼粉 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.03%; MgSO_4 0.03%;
 Na_2HPO_4 0.03%; CaCO_3 0.1%。

(三) 培养方法

1. 种子制备 取培养4天(30 ± 1 °C)的克氏瓶,用100 ml 无菌蒸馏水洗下菌苔制成菌悬浮液,经同步处理后为一级种子。

2. 发酵罐培养 采用 14 L 发酵罐 (L. E. MARUBICHI, CO. LTD. MJ-N-14L 3. Japan), 装液量 8 L 进行一级发酵培养试验, 其温度、搅拌速度、pH 值测试和通风量均为自动控制。

3. 发酵罐灭菌 用 MODEL HK SERIES 全自动高压灭菌器 (MODEL: HK-530E, HIRAYAMA MANUFACTURING CORPORATION, Japan), 127 °C 灭菌 40 min。

4. 接种量 为一个克氏瓶的菌悬液。

(四) 菌数测定

采用常规血球计数板方法^[4]。

(五) 培养基全氮(N)、有机碳(C)测定

培养基经灭菌, 在接种前和接种培养后 16、20、24、28 h 取一定量经 5 000 r/min 离心 20 min (4 °C), 取上清液进行分析。全氮采用凯氏定氮法——瑞士布奇 (BÜCHI 322) 全自动定 N 仪测定, 有机碳采用重铬酸钾法^[6]。

(六) 乳化剂的选择

1. 乳化剂的种类 选用以下 9 种乳化剂: OP-4, OP-7, OP-10, 乳百灵 A, 平 OS-15, 平 A-20, JEC, 油酸三异丙醇油酯, 吐温 (TWEEN)-80。

2. 选择方法 采用钢圈琼脂平板法 (杯碟法)^[4], 将混有被测菌株菌悬液的培养基, 倾入 ϕ 9 cm 培养皿内, 待凝固后放入内径 6 mm 的灭菌不锈钢圈, 将待测乳化剂定量放于不锈钢圈内, 于 30 ± 1 °C 培养, 观察其抑菌圈大小。

二、结 果

(一) 培养温度与培养基全 N、有机 C、pH 变化和菌数的相关性

在培养基初始 pH、搅拌速度、通风量相同的条件下, 进行了培养温度试验, 分别选用 25、30、35 °C。不同时间取样, 测定培养基 N、C、pH 和菌数, 其结果见图 1。从中可见, 不同培养温度培养基 pH 值变化规律基本相同, N、C 在 16 h 以前 25 °C 培养表现为上升趋势, 30 °C 和 35 °C 培养表现为下降趋势, 25 °C 培养菌数高峰为 28 h, 30 °C 和 35 °C 培养分别为 24 h 和 16 h。在 35 °C 培养时, 28 h 已有 1/4~1/3 菱形晶体脱落, 可见培养温度高可相应缩短发酵周期, 反之则相应延长。

(二) 搅拌速度与培养基全 N、有机 C、pH 变化和菌数的相关性

在培养基初始 pH、培养温度和通风量均相同的条件下, 进行了搅拌速度分别为 100、175 rpm 和 250 rpm 试验。不同时间取样, 测定培养基 N、C、pH 和菌数, 其结果见图 2。从中可见, 搅拌速度对培养基 pH 变化规律影响不大, 但 100 rpm 时 pH 值回升过慢, 在 28 h pH 值为 5.7, 因此使其菌数呈下降

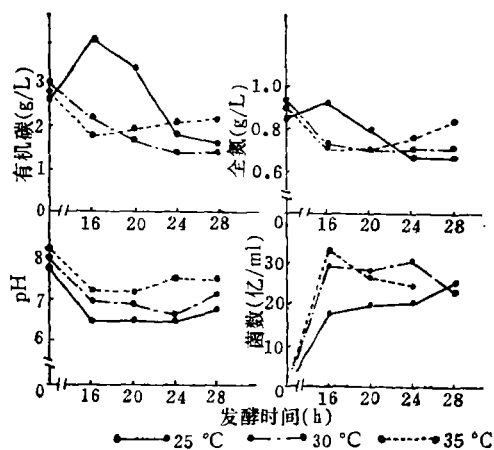


图 1 培养温度与培养基 N、C、pH 变化和菌数的相关性

趋势，搅拌速度对培养基N、C变化规律影响不大，只是在100 rpm时，16 h以前无下降或略有下降趋势。175 rpm和250 rpm其菌数高低差异不大，但250 rpm在28 h已有1/4~1/3的菱形晶体脱落，可见搅拌速度高可相应缩短发酵周期。

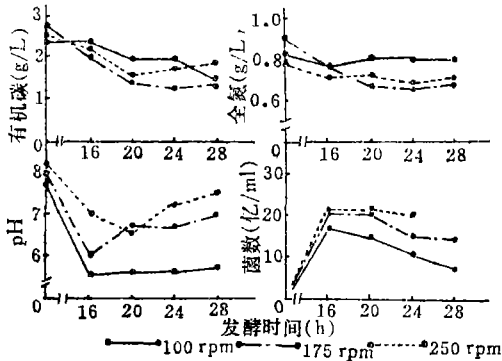


图2 搅拌速度与培养基N、C、pH变化和菌数的相关性

(三) 培养基灭菌前pH值与培养基全N、有机C、pH值变化和菌数的相关性

在培养温度、搅拌速度、通风量均相同的条件下，培养基灭菌前pH值分别调至6.0、7.0和8.5，不同时间取样，测定培养基N、C、pH和菌数，其结果见图3。从中可见，pH为6.0和7.0时，发酵过程中pH变化在20 h以前不出现下降趋势的规律，pH为8.5时在16 h以前则出现下降趋势，对培养基C的变化规律影响不大，而对N的变化在pH 8.5时，16 h以前呈下降趋势，而pH

6.0和7.0时未见下降趋势，pH值对其菌数影响不大。

(四) 苏云金杆菌剂型的研究

1. 乳化剂的筛选 用9种乳化剂对苏云金杆菌83002菌株进行了抑菌试验，其结果见图4。从中看出乳化剂OP-4、OP-7、油酸三异丙醇油酯对苏云金杆菌83002菌株无抑菌作用。油酸三异丙醇油酯在常温下为膏状物，使用不便；OP-4、OP-7均可用做苏云金杆菌制剂的乳化剂，吐温-80对83002菌株也无抑菌作用，它在苏云金杆菌制剂中既可做乳化剂又可用作分散剂。其它几种乳化剂对83002菌株表现出程度不等的抑菌作用。其中以乳百灵A和JEC最为突出。

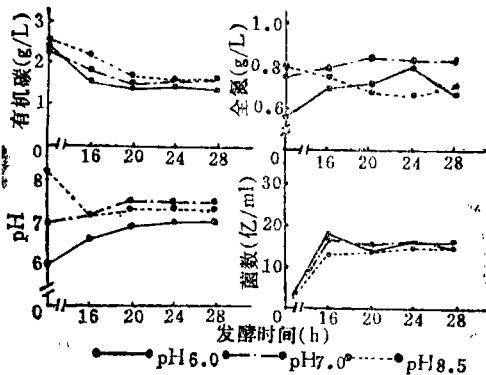


图3 培养基灭菌前pH与培养基N、C、pH变化和菌数的相关性

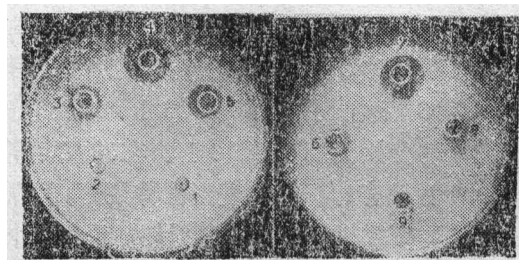


图4 乳化剂抑菌比较试验

- 1. OP-4; 2. OP-7; 3. OP-10; 4. 乳百灵A;
- 5. 平OS-15; 6. 平A-20; 7. JEC; 8. 油酸三异丙醇油酯; 9. 吐温-80

2. 苏云金杆菌不同剂型的制备工艺 小试产品的工艺基本上按Dulmage, et al. (1970)的孢子-晶体回收方法^[9]，获得高菌数的粉剂再使用不同的乳化剂制备出油乳剂和乳剂或悬乳剂的小试产品。在该工艺中也可以将离心分离的产物直接配制成悬乳剂，同样取得较好效果。

三、讨 论

(一) 在苏云金杆菌发酵过程中, 培养温度、搅拌速度及培养基初始 pH 等最佳条件选择, 必须综合考虑, 才能获得满意的结果。至于培养基 N、C、pH 变化与菌生理代谢之间的相关性, 有待进一步研究。

(二) 试验表明, 83002 菌株最佳发酵岗位参数(对 14 L 发酵罐而言): 培养温度 $30 \pm 1^\circ\text{C}$, 搅拌速度 250 rpm, 培养基灭菌前初始 pH 8 左右, 既能减少动力消耗, 又能达到最佳放罐要求。

(三) 在苏云金杆菌生产中对数生长期之后, 孢子囊形成后期, 菱形伴孢晶体脱落之前出现的菌数减少现象, 可能是由于菌体自溶所致。因此, 要控制好放罐时间, 才能获得高菌数和质量好的产物, 一般在显微镜观察出现 $1/3 \sim 1/4$ 的菱形伴孢晶体脱落时即可放罐提取。

(四) 采用本试验所确定的苏云金杆菌后提取工艺流程, 可获得含孢量在 1 000 亿/g 以上高菌数粉剂, 为制备适于林业用的液剂、悬乳剂和油乳剂提供了原料, 保证了制剂的质量。

参 考 文 献

- [1] Burges, H. D., 1971, Microbial control of insects and mites, Academic Press.
- [2] Dulmage, H. T., 1970, Production of spore—endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media, *J. of Invert. Path.*, 16: 385~386.
- [3] 王学聘等, 1988, 苏云金杆菌发酵条件的研究 I. 发酵条件与昆虫毒性之间的相关性, 林业科学, 24(3): 291~296.
- [4] 微生物研究法讨论会编, 1975(程光胜等译, 1981), 微生物学实验法, 科学出版社。
- [5] 中国土壤学会农业化学专业委员会编, 1983. 土壤农业化学常规分析方法, 科学出版社。
- [6] Dulmage, H. T. et al., 1970, Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*, *J. Invert. Path.*, 15: 15~20.

STUDIES ON THE FERMENTATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

II. FERMENTATIVE CONDITION OF 14L FERMENTOR AND PREPARATION PRODUCTION

Wang Xuepin Dai Lianyun

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract In this paper, the relationship between the culture temperature, speed of agitation, the pH before autoclaving with the varies of N, C, pH of medium and bacterial numbers during fermentation process were studies by 14L fermentor. The culture temperature and speed of agitation are in relation to bacterial numbers. The starting pH before autoclaving of medium bear a relation to pH variation during fermentative process. The culture temperature, speed of agitation and starting pH value have an effect on N, C of the medium. Technological process of preparation type of *Bacillus thuringiensis* has been defined.

Key words *Bacillus thuringiensis*; fermentative condition; preparation type