

# 对金龟子幼虫有杀虫活性的苏云金杆菌 HBF-1 菌株发酵培养基优选

王容燕, 冯书亮, 范秀华, 曹伟平, 胡明峻

(河北省农林科学院植物保护研究所, 河北 保定 071000)

**摘要:** 通过正交试验优选出对金龟子幼虫有杀虫活性的苏云金杆菌 HBF-1 菌株的发酵培养基组合为: 氮源 B 4.4%, 淀粉 1.2%, 酵母粉 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.04%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%。用此配方进行摇瓶发酵, 发酵液的平均菌数可达 44 亿/mL, 晶体产生量为 2 1130 mg/mL, 发酵液稀释 50 倍对铜绿丽金龟幼虫进行生测, 14 d 平均死亡率达到 78.3%。

**关键词:** 苏云金杆菌; HBF-1 菌株; 金龟子幼虫; 发酵; 正交试验

中图分类号: S476<sup>+</sup>.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0096-03

## Optimization of Medium for *Bacillus thuringiensis* HBF-1 with Insecticidal Activity to Scarabaeoidae Larva

WANG Rong-yan, FENG Shu-liang, FAN Xiu-hua, CAO Wei-ping, HU Ming-jun

(Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

**Abstract:** Through orthogone experiment, the optimal medium was obtained for *Bacillus thuringiensis* HBF-1 with insecticidal activity to scarabaeoidae larva. The medium contained 4.4% nitrogen B, 1.2% starch, 0.5% yeast power, 0.04%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4$ . Fermentation was done with this medium in shaking flask. Results showed that the number of cells was  $44 \times 10^8$  cfu/mL, and the produce of crystal was 2 1130 mg/mL. The mortality of *Anomala corpulenta* larva treated with 50 fold of HBF-1 fermented liquid was 78.3% on the 14th day of treatment.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; HBF-1 strain; Scarabaeoidae larva; Fermentation; Orthogonal experiment

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)制剂是目前应用最广泛、最为有效的微生物杀虫剂。在苏云金杆菌的工业化发酵生产过程中,其发酵效价除了取决于高毒力菌株的晶体蛋白(ICPs)组成和培养特性外,培养基组分的筛选作为发酵的关键技术,对提高发酵效价至关重要。HBF-1菌株是河北省农科院植保所首次在我国筛选获得的一株对地下害虫鞘翅目丽金龟科幼虫具有较高杀虫活性的苏云金杆菌。笔者已经对其生物学特性及杀虫毒力进行了较深入的研究<sup>[1]</sup>,明确了这一菌株对防治地下害虫金

龟子类幼虫具有较好的应用前景。本文对 HBF-1 菌株的发酵培养基优选结果进行了阐述。

### 1 材料和方法

#### 1.1 供试菌株

HBF-1 菌株由本研究室筛选获得。

#### 1.2 发酵培养基的正交设计

以农副产品为主要原料,辅以添加无机盐等<sup>[2,3]</sup>,原料过 100 目筛,初步正交试验采用  $L_9(3^4)$  设计,二次正交试验采用  $L_{16}(4^5)$  设计,再将优选出

收稿日期: 2003-03-01

基金项目: 河北省科技攻关项目(01220164D)

作者简介: 王容燕(1971-),女,湖南长沙人,助理研究员,主要从事生物防治方面的研究工作,联系作者为冯书亮。

的培养基组合进行综合评比。

1.3 发酵培养基的综合评比

以发酵液菌数、发酵液晶体蛋白量及发酵液生物测定结果作为评价指标, 将优选出的培养基组合进行综合评比, 重复 3 次, 进行方差分析。

1.4 培养方法

将 HBF-1 菌株接种到装有普通细菌培养基( 蛋白胨 1%, 牛肉膏 0. 5%, 氯化钠 0. 2%, 葡萄糖 0. 3%) 的三角瓶中, 30 ℃振荡培养 8 h 后, 以 2% 的接种量转接到装有发酵培养基的三角瓶中, 250 r/ min, 30 ℃摇瓶振荡培养, 至 90% 胞晶脱落停止培养。

1.5 菌数测定

采用平板稀释法对各处理发酵液的活芽胞数进行计数测定。

1.6 HBF-1 菌株晶体蛋白的定量测定

将各发酵液样品经碱溶处理<sup>[5]</sup>, 适当稀释后, 在 751 紫外分光光度计上测定 280 nm 波长下的 OD 值。标准晶体蛋白浓度曲线的测定采用 HBF-1 菌株的纯晶体( 纯度为 98%) 经碱溶处理后, 稀释成系列已知浓度, 在紫外分光光度计上分别测定不同浓度的 OD 值, 通过回归分析, 求出浓度( $y$ ) 和 OD 值( $x$ ) 之间的相关式为:  $y = 0. 807\ 2x + 0. 016\ 4$ ,  $a = 0. 016\ 4$ ,  $b = 0. 807\ 2$ ,  $r = 1. 000$ , 呈高度相关。将测定出的各样品碱溶晶体蛋白溶液的 OD 值代入此相关式, 即可计算出各样品的晶体蛋白含量。

1.7 生物测定方法

将各发酵液分别稀释 50 倍, 加入到有均匀粗细土豆丝的灭菌细土中, 混匀, 使土壤含水量保持在 18% ~ 20%。接入健康、大小一致的铜绿丽金龟 (*Anomala corpulenta*) 一龄幼虫 20 头, 以加入清水的处理为空白对照, 28 ℃感染饲养, 14 d 检查死虫数, 计算死亡率。

2 结果与分析

2.1 发酵培养基的初筛

初步正交设计试验结果表明, 在氮源 B 培养基 1 号组合 HBF-1 菌株中晶体蛋白产生量最高可达到 1. 9563 mg/ mL。根据统计分析, 各因素对晶体产生量的影响程度依次是: C> B> D> E, 理论最优培养基组合( 培养基 2 号) 为氮源 B 4. 0%, 淀粉 1. 5%, 酵母粉 0. 5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0. 03%, 与氮源 B 培养基 1 号组合的成分只有 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的量有差异( 表 1, 2)。

表 1 初步正交试验 L9(3 <sup>4</sup> ) 水平表						%
	氮源 A 或 氮源 B	淀粉 C	酵母粉 D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> E	固定成分	
					MgSO <sub>4</sub> ·0. 03	MnSO <sub>4</sub> ·0. 005
1	4	1. 5	0. 5	0. 05	CaCO <sub>3</sub> ·0. 1	
2	3	1. 0	0. 3	0. 03		
3	2	0. 8	0. 2	0. 01		

表 2 HBF-1 菌株发酵培养基 优选初步正交试验结果					
	氮源 A		氮源 B		
	同步率 (%)	晶体蛋白含量 (mg/ mL)	同步率 (%)	晶体蛋白含量 (mg/ mL)	
1	95	0. 514 1	95	1. 956 3	
2	90	0. 473 0	80	1. 406 7	
3	90	0. 446 3	70	0. 220 1	
4	90	0. 468 2	90	1. 358 3	
5	90	0. 448 8	65	0. 285 5	
6	98	0. 528 7	70	0. 399 3	
7	80	0. 318 0	85	1. 375 2	
8	98	0. 647 3	90	0. 912 7	
9	85	0. 400 3	60	0. 125 7	

2.2 发酵培养基的二次筛选

根据初次正交试验结果, 重新调整各因素水平, 以氮源 B、淀粉、酵母粉、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 MgSO<sub>4</sub> 为主要因素, 按照 L16(4<sup>5</sup>) 正交表设计各培养基组合, 结果见表 3。在 8 号培养基组合中, 晶体蛋白产生量达到 2. 111 3 mg/ mL。以晶体蛋白产生量为检测指标统计分析试验结果, 各因素的 R 值明显变小, 其影响程度依次为 B> C> F> E> D, 与初次正交试验的排列顺序有所不同。理论最优培养基组合( 培养基 3 号) 为氮源 B 4. 0%, 淀粉 1. 5%, 酵母粉 0. 5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0. 04%, MgSO<sub>4</sub> 0. 05%。

2.3 发酵培养基的综合评比

选择初次正交试验的培养基组合氮源 B 1 号和理论优选培养基 2 号, 以及二次正交试验的培养基组合氮源 B 8 号和理论优选培养基 3 号作为综合评比的 4 种培养基组合。通过 3 批次的重复试验, 计算 95% 水平上的显著差异。以晶体蛋白量为指标, 氮源 B 8 号培养基组合的产生量为 2. 113 0 mg/ mL, 显著高于其他 3 种培养基组合; 以死亡率为指标, 氮源 B 8 号培养基组合发酵液 50 倍液对铜绿丽金龟幼虫生物测定的死亡率最高, 达到 78. 3%, 与优选的 3 号培养基组合的死亡率 76. 7% 差异不显著。由此可以说明, 氮源 B 8 号培养基组合即氮源 B 4. 4%, 淀粉 1. 2%, 酵母粉 0. 5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0. 04%, MgSO<sub>4</sub> 0. 05% 为 HBF-1 菌株的最佳发酵培养基组合。

表 3 HBF-1 菌株发酵培养基二次正交 L16(4<sup>5</sup>) 试验

	氮源 B	淀粉(%)	酵母粉(%)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MgSO <sub>4</sub> (%)	晶体蛋白含量
	(%)	C	D	E	F	(mg/ mL)
1	1(4.8)	1(2.0)	1(0.7)	1(0.05)	1(0.05)	1.122 0
2	1	2(1.8)	2(0.6)	2(0.04)	2(0.03)	1.315 0
3	1	3(1.5)	3(0.5)	3(0.03)	3(0.01)	1.345 9
4	1	4(1.2)	4(0.4)	4(0.02)	4(0)	0.938 9
5	2(4.4)	1	2	3	4	1.267 6
6	2	2	1	4	3	1.804 9
7	2	3	4	1	2	1.944 4
8	2	4	3	2	1	2.111 3
9	3(4.0)	1	3	4	2	1.641 9
10	3	2	4	3	1	1.920 6
11	3	3	1	2	4	1.973 5
12	3	4	2	1	3	1.893 0
13	4(3.6)	1	4	2	3	1.251 0
14	4	2	3	1	4	1.605 6
15	4	3	2	4	1	1.978 7
16	4	4	1	3	2	1.268 8
K1	4.721 8	5.282 5	6.169 2	6.565 0	7.132 6	固定成份(%)
K2	7.128 2	6.646 1	6.454 3	6.650 8	6.170 1	MnSO <sub>4</sub> 0.005
K3	7.429 0	7.242 5	6.704 7	5.802 9	6.294 8	CaCO <sub>3</sub> 0.1
K4	6.104 1	6.212 0	6.054 9	6.364 4	5.785 6	
R	2.787 6	1.960 0	0.650 0	0.848 0	0.947 2	

表 4 优选培养基组合的综合评比结果

序号	同步率 (%)	菌数 (亿/mL)	晶体蛋白含量 (mg/mL)	14 d 幼虫 死亡率(%)
氮源 B 1 号	95	36.7	1.8178 b*	65.0 b
优选培养基 2 号	95	38.3	1.8695 b	66.7 b
氮源 B 8 号	98	44.0	2.1130 a	78.3 a
优选培养基 3 号	98	38.7	1.8860 b	76.7 a

注: \* 表中防治效果数据是三个重复的平均值。数据进行方差分析后,以 LSD 法进行比较,同列中带相同字母者表示在 95% 水平上无显著差异

3 讨论

目前生产上常用的苏云金杆菌 HD-1 菌株在工业发酵生产中,其晶体蛋白产生量一般为 4‰~5‰,而 HBF-1 菌株的晶体蛋白产生量则仅为 2‰左右。笔者认为,造成这种差异的原因除培养基组份及培养条件的影响外,主要是由该菌株本身的杀虫晶体蛋白基因表达量决定的,不同的菌株其晶体蛋白产生量不同。

本文在 HBF-1 菌株的发酵培养基优选中,仅对

2 种氮源、1 种碳源、2 种无机盐组分进行了优选,因此,要进一步提高 HBF-1 菌株的晶体蛋白的产生量,还需对多种不同营养组分进行筛选,并对发酵条件进行优化。

参考文献:

[1] 冯书亮,王容燕,范秀华,等.一种对金龟子幼虫具有特异杀虫活性的苏云金杆菌新分离株[J].中国生物防治,2000,16(2):74-78.

[2] 王容燕,冯书亮,范秀华,等.苏云金杆菌新菌株对金龟子幼虫的毒力比较[J].植物保护学报,2003,30(2):223-224.

[3] 南京农学院主编.田间试验和统计方法[M].北京:农业出版社,1979,163-193.

[4] 喻子牛主编.苏云金杆菌[M].北京:科学出版社,1990.268-291.

[5] 罗绍彬,张艺兵,阎建平,等.紫外吸收法测定苏云金杆菌伴孢晶体蛋白质的研究[J].微生物学杂志,1990,10(4):48-50.