

利用废弃毛发生产生物农药苏云金杆菌的研究

唐凌云, 王世梅, 周立祥

(南京农业大学资源与环境科学学院环境工程系, 江苏 南京 210095)

摘要:采用鸡毛水解液和头发水解液代替常规黄豆粉培养基中的氮源进行发酵培养苏云金杆菌,在发酵过程中测定总菌数,芽孢数和 pH 值等指标,并与常规黄豆粉培养基进行了比较。结果表明,用鸡毛水解液和头发水解液培养的 B.t 546 在 48 h 总菌数达到 5.0×10^8 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右,芽孢数达到 $1.0\times10^8\sim2.0\times10^8$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右,效果略低于常规黄豆粉培养基 (48 h 总菌数 4.8×10^9 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,芽孢数 2.6×10^9 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$),但可以达到工业生产水平 (芽孢 10^8 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$);而且镜检结果表明,毛发水解液培养的 B.t 546 在 18 h 左右就出现芽孢和伴孢晶体,比常规黄豆粉培养基出现时间要早 6 h 左右。以棉铃虫为供试虫进行了室内毒力测定,利用毛发水解液生产的苏云金芽孢杆菌比常规黄豆粉培养基生产的苏云金芽孢杆菌杀虫效果略高。因此,利用毛发等废弃物生产生物农药以降低其生产成本是一个值得推广的废物资源化方法。

关键词: 毛发;水解液;发酵;苏云金杆菌;毒力

中图分类号: X713 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-1248-06

Production of *Bacillus thuringiensis* Using Feather and Hair Hydrolyzaion as Raw Material

TANG Ling-yun, WANG Shi-mei, ZHOU Li-xiang

(College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* 546 was fermented by using hair hydrolyte as N sources to replace soybean meal medium in this study. Viable cell, sporulation and pH were evaluated by colony fermentation approach in the hair hydrolyte medium and conventional soybean meal medium. The results showed that the growth and sporulation of B.t depended, to a great extent, on the composition of medium especially for different N sources. The rate of sporulation in the hydrolyte medium was 6 hours earlier than that in the conventional soybean meal medium. The number of viable cells in the hair hydrolyte medium with 5.0×10^8 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ were a little lower than in the soybean meal medium with 4.8×10^9 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ at 48 hours. Likewise, it was found that the hair hydrolyte medium produced $1.0\times10^8\sim2.0\times10^8$ cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ of B.t spores, which was similar to that obtained from the conventional soybean meal medium at 2.6×10^9 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$. Furthermore, higher entomotoxicity using the *Helicoverpa armigera* as a worm of bioassay was observed in the hair hydrolyte mediums compared to the normal soybean meal medium.

Keywords: hair; hydrolyte; fermentation; *Bacillus thuringiensis*; entomotoxicity

我国是种植业大国,因为虫害造成的损失每年都在增长,为了保证作物的稳产、高产,长期以来都采用化学防治^[1]。化学农药虽然在防治虫害上取得了显著经济效益,但随着时间的推移,其弊端日益突出,其一,长期、大量和频繁的使用化学杀虫剂会使害虫产生抗药性,从而使杀虫效果降低;其二,化学杀虫剂大多田间残效期长,难以降解,其残留与积累严重污染

人类生存环境,导致三致效应;其三,化学杀虫剂专一性不强,在杀死害虫的同时会杀死害虫天敌和其他有益生物,破坏生态平衡^[2]。这促使人们寻找更为安全的替代方案,以微生物杀虫剂为核心的微生物防治逐渐成为最为热门的研究领域。在开发的微生物杀虫剂中,苏云金杆菌杀虫剂是开发最成功、也是国际市场上用量最多的生物农药,约占整个生物农药的 90%。但其用量仅占化学农药的 2%,而国际公认的适合比例是 50%左右,才能使生态环境趋于正常^[3]。可见,苏云金杆菌作为应用最广泛的生物农药,其发展空间仍然非常巨大。然而苏云金杆菌制剂的推广应用在很大

收稿日期:2007-08-25

作者简介:唐凌云 (1981—),女,硕士研究生,主要从事废物资源化研究。

通讯作者:王世梅 smwang@njau.edu.cn

程度上受原料成本的限制,其中原料占整个生产成本的 35%~59%^[4], 选择低成本的原料是生产的关键。国内外曾经采用味精废水^[5]、鸡舍垫料浸出液^[6]、乳清^[7]、废啤酒酵母浸出液^[8]、谷氨酸^[9]、酒糟废液^[10]、污水污泥^[11,12]等生产苏云金杆菌,均取得了一定程度的成功。

苏云金杆菌生产成本主要受碳源和氮源的限制,各种研究均表明,氮源水平对芽孢数量的增长起着主导作用,发酵培养基中必须含有丰富的氮源以保证发酵生产的顺利进行。工业生产通常采用的都是像鱼粉、黄豆粉等高成本的物料,大大限制了苏云金生物农药的推广使用。而鸡毛和头发等废弃物,其组成成分主要是蛋白质,水解后可以产生大量的氨基氮,如果能用鸡毛头发水解液代替黄豆粉和鱼粉,苏云金杆菌的生产成本可望降低。为此,本研究探索了采用鸡毛头发水解液生产苏云金杆菌的可行性,以期利用废物生产苏云金杆菌制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌种为苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 B.t) 546,为本实验室分离保存。

棉铃虫由南京农业大学昆虫系养虫室提供。

毛发材料:鸡毛采自南京卫岗菜市场,头发采自南京农业大学校内的理发馆。

1.2 毛发水解方法

分别称取 50 g 经洗净并干燥过的鸡毛和头发,加入 150 mL 3 mol·L⁻¹ 硫酸,在恒温快速消煮器上加热水解,反应温度控制在 115~118 ℃,水解 10 h。

总氮含量测定:凯氏定氮法^[13],测得鸡毛水解液总氮含量为 0.043 g·mL⁻¹,头发水解液总氮含量为 0.046 g·mL⁻¹。

氨基氮的测定:采用改进的中性甲醛法^[14,15]。取水解液 10 mL 于 100 mL 烧杯中,加入 2 mL 0.01 mol·L⁻¹ EDTA 溶液,以掩蔽金属离子的干扰,用酸度计调节试液 pH 至 8.20,加入 200 mL·L⁻¹ 中性甲醛溶液 10 mL,摇匀,静置 10 min,用 0.05 mol·L⁻¹ 氢氧化钠标准溶液滴定,直到 pH 达 9.20 为终点,记录消耗的氢氧化钠体积。同法做空白试验。

$$\rho(\text{N}) = \frac{c(\text{NaOH}) \times (V_1 - V_0) \times 14.01}{V_s}$$

式中: $\rho(\text{N})$ 为氨基氮(试液中氨基酸和 NH_4^+ 的总氮)质量浓度, g·L⁻¹; V_1 为滴定样品消耗的体积, mL; V_0 为

滴定空白消耗的体积, mL; V_s 为所取供试液的体积, mL; 14.01 为氮的摩尔质量, g·mol⁻¹。测得鸡毛水解液的氨基氮含量为 0.014 8 g·mL⁻¹, 头发水解液的氨基氮含量为 0.019 5 g·mL⁻¹。

1.3 培养基成分

细菌牛肉膏蛋白胨培养基 (g·L⁻¹): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15~20, pH7.2。

苏云金杆菌黄豆粉发酵培养基 (g·L⁻¹): 黄豆粉 15.0, 葡萄糖 5.0, 可溶性淀粉 5.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, CaCO_3 1.0, pH7.2~7.4。

毛发水解液合成培养基: 分别用鸡毛水解液和头发水解液代替常规黄豆粉培养基中的黄豆粉, 保证各培养基中总氮含量一致, 其他营养成分不变。

1.4 苏云金杆菌发酵

在 250 mL 三角瓶内装 50 mL 细菌牛肉膏蛋白胨液体培养基, 121 ℃, 灭菌 20 min。接一环新鲜的 B.t 546 斜面菌种, 于 28 ℃, 180 r·min⁻¹ 的摇床上培养 24 h, 作液体菌种。以 2% (V/V) 接种量接种至黄豆粉发酵培养基和毛发水解液合成培养基中(已灭菌), 置 28 ℃, 180 r·min⁻¹ 的摇床上培养 72 h, 每隔 12 h 取样, 测定 pH、总菌数及芽孢数, 每个处理设置 3 个重复。

1.5 分析方法

细胞学观察: 采用菌体晶体区别染色法^[16]。取一环发酵液涂片、染色, 在显微镜油镜下观察, 伴孢晶体呈深天蓝色, 芽孢无色, 菌体呈复染的浅红色。

细胞总数测定: 取 1 mL 发酵液样品于 9 mL 无菌水中作系列稀释, 取 0.1 mL 适当稀释度的菌悬液涂布细菌平板, 平板于 30 ℃ 培养箱中培养 20~24 h, 计数平板上的菌落数。

活孢子数测定: 取适当稀释度的菌悬液, 在 75 ℃ 的水浴中, 处理 15 min, 以杀死营养体, 再涂布细菌平板。平板于 30 ℃ 培养箱中培养 20~24 h, 计数平板上的菌落数。

B.t 546 发酵液生物毒性测定: 采用饲料感染法^[17,18]。取上述在不同培养基中发酵 48 h 的 B.t 546 孢晶混合液, 稀释一定倍数后混合于棉铃虫的饲料中, 棉铃虫为 2~3 龄幼虫, 感染时间为 72 h, 饲养温度为 28~30 ℃, 湿度为 80%~85%, 计算死亡率。为消除影响, 设置 3 个对照: 灭菌处理的黄豆粉培养基 (对照 1)、灭菌处理的鸡毛水解液培养基 (对照 2)、灭菌处理的头发水解液培养基 (对照 3)。

2 结果与讨论

2.1 摇瓶试验中 B.t 546 细胞学观察

利用常规培养基和毛发水解液合成培养基培养的 B.t 546 菌株菌体、芽孢和伴孢晶体(见图 1,图 2)在形态上没有差别。B.t 546 的菌体呈杆状,单生或短链状,芽孢为椭圆形,伴孢晶体呈菱形。

细胞学观察能直观的表征发酵过程中 B.t 546 的生长代谢情况,为规模化生产的放罐提供有效依据。表 1 比较了 B.t 546 在黄豆粉培养基和两种毛发水解



图 1 *Bacillus thuringiensis* 546 菌体形态(10×100)
Figure 1 Morpha of *Bacillus thuringiensis* 546

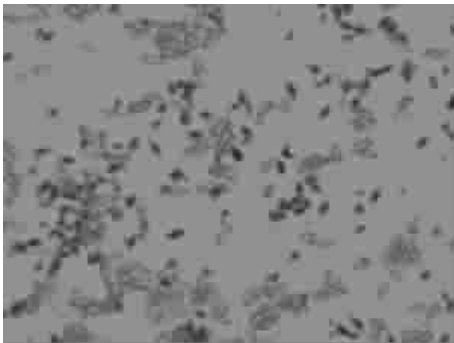


图 2 *Bacillus thuringiensis* 546 芽孢与伴孢晶体(10×100)
Figure 2 Spore and parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* 546

液合成培养基中不同时期的生长状况。可以看出,与黄豆粉培养基相比,B.t 546 在毛发水解液合成培养基中的代谢过程较快,36 h 就可见大量菌体自溶,释放出芽孢和伴孢晶体,而在黄豆粉培养基中则要慢一些。

2.2 B.t 546 在 3 种培养基中的生长情况

培养基组成影响 B.t 546 的生长与代谢过程,不同培养基培养的 B.t 细胞及芽孢数量均明显不同。图 3、4、5 分别描绘了 48 h 内 B.t 546 在 3 种不同培养基中细菌总数、活孢子数与 pH 的动态变化。由图可见,菌种接入后,B.t 546 在 3 种培养基中细菌总数和活孢子数的变化趋势是一致的,均是先经历对数生长期,然后趋于平稳期。但其生长曲线也不尽相同,B.t 546 在黄豆粉培养基中发酵 30 h 左右结束对数生长期,达到 3×10^9 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,随着时间的延长,总菌数基本保持不变;而合成培养基中 B.t 546 生长总菌数是在 24 h 结束对数生长期,达到 4×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,之后随着时间的延长,总菌数基本保持不变,并且两种合成培养基的生长曲线非常相似。在培养前期 24 h 内,B.t 546 在合成培养基中的生长速度高于黄豆粉培养基,是因为合成培养基中的氮源主要是以氨基氮的形态存在,有利于微生物的吸收利用,所以前期生长较快,到后期数量略低于常规培养基的生长总菌数,是因为合成培养基中生长后期总氮量不如黄豆粉培养基的高。导致总氮下降的原因一是灭菌过程造成了总氮的损失,二是某些不稳定的氮源在微生物培养过程中分解成氨态氮而挥发了,这些都会导致后期细菌生长总量的下降。培养基中氮源的缺乏导致了 B.t 546 数量在 24 h 后就不再增长,而黄豆粉培养基中作为氮源的黄豆粉成分比较稳定,能够持续不断的提供 B.t 546 生长所需,故黄豆粉培养基 48 h 培养后总菌数要高于合成培养基培养的 B.t 546 的总菌数。

表 1 发酵过程中 B.t546 在 3 种培养基中的细胞学观察特征比较
Table 1 Cellular characteristic during B.t546 fermentation in three different mediums

时间/h	常规培养基	鸡毛水解液培养基	头发水解液培养基
0	细长杆状菌体,染色均匀	细长杆状菌体, 染色均匀	细长杆状菌体, 染色均匀
12	多数内部呈现亮斑,染色变浅仅两端颜色较深	菌体两端变窄, 一端颜色较深另一端接近透明	亮斑明显, 一端蓝色一端透明
24	多数菌体粗短,可见明显亮斑,少数菌体两端变窄, 一端染色较深,一端透明	部分菌体芽孢和晶体形成少量菌膜自溶	部分菌膜自溶, 可见较多的游离椭圆形芽孢和菱形晶体
30	多数菌体粗短,可见明显亮斑,少数菌体两端变窄, 一端染色较深,一端透明	多数芽孢, 晶体已经形成, 仍有少量细长杆状菌体较为瘦小	大量游离芽孢和晶体, 晶体呈深天蓝色, 芽孢无色菌体较为瘦小
36	可见大量菌体、游离的芽孢晶体较小	只有少量的菌体, 可见大量的芽孢和晶体	几乎无菌体, 只见芽孢和晶体。
48	大量的芽孢和晶体, 仍有少数菌体存在	几乎无菌体, 大量芽孢和晶体	几乎无菌体, 大量芽孢和晶体

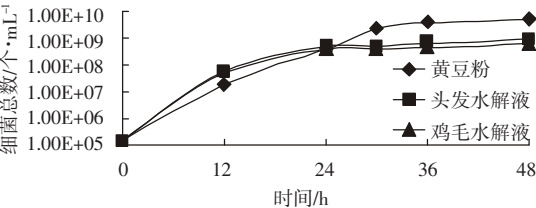


图 3 B.t 546 在 3 种不同原料的培养基中生长总菌数的动态变化

Figure 3 Dynamics of *Bacillus thuringiensis* 546 cell cultured in three different mediums

B.t 的生长发育一般经历 3 个阶段：营养生长阶段(对数生长期)、孢子囊和伴孢晶体形成阶段、孢子和伴孢晶体脱落阶段^[19]。苏云金杆菌在形成孢子的同时,会产生具有杀虫毒性的伴孢晶体。苏云金杆菌的晶体是杀虫活性的主要成分,对大多数变种来说,一个营养体通常只形成一个芽孢和一个晶体,因此孢子数在理论上可以代表晶体数,从而反映出制剂的毒效^[20]。苏云金杆菌的生长受多方面因素的影响,如碳源、氮源、无机盐等培养基成分及培养条件,而氮源组成差异会直接影响发酵周期和伴孢晶体的形成。无机氮源,特别是尿素,虽然会使芽孢数有较大幅度提高。但发酵周期会明显延长,晶体明显减少。高浓度的无机氮源会使苏云金杆菌的生长发育受到明显抑制。有机氮源,不仅芽孢数大量增加,发酵终了晶体也较大,同步率也较高。因为原料中氨基酸组成的差异,使单一氮源往往不能完全满足苏云金杆菌生长(特别是伴孢晶体形成)的需要^[10]。

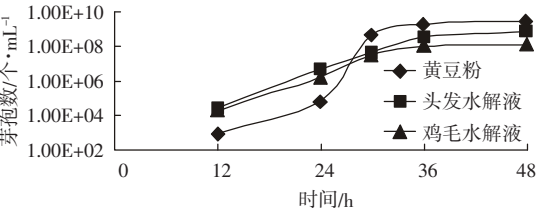


图 4 B.t 546 在 3 种不同原料的培养基中生长形成芽孢数的动态变化

Figure 4 Dynamics of *Bacillus thuringiensis* 546 spore cultured in three different mediums

由图 4 可以看出,合成培养基在发酵初期产生的芽孢数明显要高于常规培养基,12 h 即可达到 5×10^4 个·mL⁻¹,36 h 左右可以达到最大值 10^8 个·mL⁻¹。利用头发水解液生产的 B.t 546 数量要稍高于利用鸡毛水解液生产的 B.t 546, 常规培养基发酵初期产生的芽孢数较少,12 h 只有 8×10^2 个·mL⁻¹,48 h 才达最大

值 2×10^9 个·mL⁻¹。毛发水解液的成分比较复杂,除了含有大量氨基酸外,还含有钙、磷等其他营养成分,其中含有的某种或某些成分可能会加快苏云金杆菌菌体形成芽孢,所以培养前期合成培养基的芽孢数要大于常规黄豆粉培养基的芽孢数;后期数量不如常规培养基的多是因为到生长后期合成培养基中氨基氮和总氮的浓度不如常规培养基中的高,满足不了正常形成芽孢的需要,但仍可以达到工业生产水平。而常规培养基中氮源来源是黄豆粉,属于缓效氮源,可以提供芽孢形成的正常需要。发酵过程中镜检结果显示,合成培养基芽孢出现要早于黄豆粉培养基。

发酵过程中 pH 变化直接影响着苏云金杆菌的生长和芽孢的形成,更重要的是,不适宜的 pH 值会降低毒素的产量,甚至完全不产生伴孢晶体毒素^[21]。苏云金杆菌生长的 pH 范围是 5.6~8.5, 过高或者过低均会影响苏云金的生长。由图 5 可看出,3 种培养基在培养过程中均没有超出苏云金杆菌适宜的生长 pH。

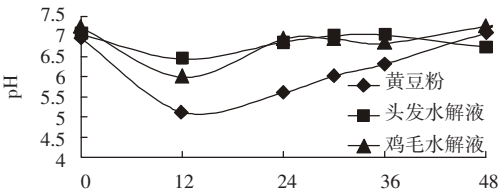


图 5 B.t 546 在 3 种不同的培养基中 pH 值的变化

Figure 5 Change of the pH values for *Bacillus thuringiensis* 546 in three different mediums

随着发酵的进行,三者的 pH 变化都表现出 B.t 发酵的一般规律,即先下降后上升,但程度有所不同。如图 5 所示,B.t 546 在黄豆粉培养基发酵过程中的 pH 起伏波动较大,pH 值起始时 7.00 左右,在 12 h 降至 5.12,然后再逐渐上升,到 48 h 升至 7.16。在合成培养基中培养的 B.t 546 的 pH 值变化幅度小,鸡毛水解液合成培养基中 pH 在 12 h 降至 6.43,然后逐渐上升,到 48 h 升至 6.81,头发水解液合成培养基中 pH 在 12 h 降至 5.98,然后再逐渐上升,到 48 h 升至 7.26。发酵过程中 pH 的变化与 B.t 的代谢过程息息相关。B.t 的代谢过程是:发酵初期,营养体释放出的胞外淀粉酶使多糖转化为可利用的葡萄糖^[22],葡萄糖再经 EMP 途径降解形成丙酮酸、乳酸及乙酸,导致溶液 pH 下降,随后有机酸开始进一步异化,胞外蛋白酶使蛋白质转化为细胞可利用的氨基酸,同时 NH_4^+ 不断生成,使 pH 回升,这预示着已到对数生长期后

表 2 不同处理的发酵液对棉铃虫的致死率

Table 1 The mortality of Heliothis armigera treated by B.t products from different culture media				
不同处理	供试虫数	72 h 后活虫数	平均死亡率/%	校正死亡率/%
黄豆粉培养基	30	13	56.7	55.2bc
鸡毛水解液	30	10	66.7	64.3a
头发水解液	30	12	60.0	58.6ab
对照 1	30	29	3.3	—
对照 2	30	28	6.7	—
对照 3	30	29	3.3	—

注:校正死亡率= $\frac{\text{样品死亡率}-\text{对照死亡率}}{1-\text{对照死亡率}}\times 100\%$

期,开始大量形成芽孢。当 pH 上升到一定程度,蛋白质转化为氨基酸的能力下降,同时 NH₄⁺被菌体利用生成晶体蛋白,于是 pH 上升变缓,甚至出现上下波动。到发酵后期菌膜自溶,释放出芽孢和伴孢晶体,完成整个代谢进程。B.t 546 在常规培养基中生长时,pH 降幅较大是因为其中含有丰富的糖(葡萄糖 0.5%,淀粉 0.5%),合成培养基中虽然也含有大量的糖,但是因为其氮源以氨基氮为主,容易转变为氨态氮,在培养基中起到了缓冲作用,故其 pH 变化幅度较小。

2.3 B.t 546 在不同培养基中发酵产物的生物毒性比较

评价不同培养基的发酵效果,主要由发酵产物的生物毒性决定,表 2 列出了用 2~3 龄棉铃虫作为试虫检测发酵 48 h 的 B.t 546 孢晶混合液生物毒性的结果。由表 2 可以看出,用鸡毛水解液培养的 B.t 546 毒性略强,72 h 棉铃虫死亡率为 64.3%,其次是头发水解液培养基,72 h 棉铃虫死亡率为 58.6%,再次是黄豆粉培养基,72 h 棉铃虫死亡率为 55.2%。3 种对照死亡率均较低。

3 结论

利用毛发水解液代替常规培养基中的氮源生产苏云金杆菌,48 h 总菌数达到 5.0×10⁸ 个·mL⁻¹ 左右,芽孢数达到 1.0×10⁸~2.0×10⁸ 个·mL⁻¹ 左右,与常规以黄豆粉作为氮源的培养基相比,效果略低(黄豆粉培养基 48 h 总菌数 4.8×10⁹ 个·mL⁻¹,芽孢数 2.6×10⁹ 个·mL⁻¹),但可以达到工业生产水平(芽孢 10⁸ 个·mL⁻¹),而且芽孢出现时间(18 h)比黄豆粉培养基(24 h)的早,由营养体转变成芽孢所用的时间短,36 h 芽孢即可达到最大值;利用棉铃虫做试虫的生物毒性实验也表明,利用毛发水解液合成培养基生产的苏云金杆菌生物农药毒性要略高于常规黄豆粉培养基生产

的生物农药。所以,利用毛发水解液代替氮源是可行的,有望降低苏云金生物农药的生产成本。

参考文献:

[1] 施跃峰,郭三堆.微生物杀虫剂研究进展[J].植物保护,2000,26(5):32-34.
SHI Yue-feng, GUO San-dui. The progresses of microbial insecticide [J]. *Plant Protection*, 2000, 26(5):32-34.

[2] 刘清术,刘前刚,陈海荣,等.生物农药的研究动态、趋势及前景展望[J].农药研究与应用,2007,11(1):17-22.
LIU Qing-shu, LIU Qian-gang, CHEN Hai-rong, et al. Advance, Development trend and perspective of studies on bio-pesticides [J]. *Agro-chemicals Research & Application*, 2007, 11(1):17-22.

[3] 闫洪波.苏云金杆菌 β-外毒素的生态安全性研究[D].东北林业大学硕士学位论文.2006.
YAN Hong-bo. Studies on Ecological Risk of *Bacillus thuringiensis* β-exotoxin [D]. Master thesis of Northeast Forestry University. 2006.

[4] CPL Scientifics Ltd. *The Bacillus thuringiensis* Production Handbook [M]. UK: CPL Press, 1993.

[5] 杨建州,温 官,张洪勋,等.味精废水发酵培养苏云金芽孢杆菌的研究[J].环境污染治理技术与设备,2000,1(6):28-32.
YANG Jian-zhou, WEN Guan, ZHANG Hong-xun, et al. Study on fermentation properties of *Bacillus thuringiensis* in the glutamate wastewater [J]. *Techniques and Equipment for Enviro poll cont*, 2000, 1(6):28-32.

[6] Adams T T, Eiteman M A, A dang M J. *Bacillus thuringiensis* subsp kurstaki spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media [J]. *Bioresource Technol*, 1999, 67: 83-87.

[7] Salama H S, Foda M S, Mulmage H T, et al. A novel approach for whey recycling in production of bactecial insecticides[J]. *Entomophaga*, 1983, 28(2):151-160.

[8] Saksinchai S, Supphantharika M, Verduyn C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*: a physiological study [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2001, 17:307-316.

[9] 周学永,李凌凌,唐 萍,等.利用工业废水生产生物农药苏云金杆菌[J].内蒙古石油化工,2006,(5):31.

ZHOU Xue-yong, LI Ling-ling, TANG Ping, et al. Production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides using industrial wastewater as a raw material[J]. *Inner Mongolia Petrochemical Industry*, 2006, (5): 31.

- [10] 王程辉,章克昌,卢晓清.利用酒糟废液培养苏云金杆菌的研究[J].酿酒,2001, 28(2): 81-83.

WANG Cheng-hui, ZHANG Ke-chang, LU Xiao-qing. Culture of *Bacillus thuringiensis* from distiller's solubles[J]. *Liquor-making*, 2001, 28(2): 81-83.

- [11] 常 明,周顺桂,卢 娜,等.微生物转化污泥制备苏云金杆菌生物杀虫剂[J]. 环境科学, 2006, 27(7): 1450-1454.

CHANG Ming, ZHOU Shun-gui, LU Na, et al. Bioconversion of sewage sludge to biopesticide by *Bacillus thuringiensis*[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(7): 1450-1454.

- [12] 王世梅,梁剑茹,周立祥.利用城市污泥生产苏云金杆菌生物农药[J]. 中国环境科学, 2006, 26(1): 77-81.

WANG Shi-mei, LIANG Jian-ru, ZHOU Li-xiang. Production of *Bacillus thuringiensis* using sewage sludge as raw material[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(1): 77-81.

- [13] 曲格平.关注生态安全之二:影响中国生态安全的若干问题[J].环境保护,2002,6:3-8.

QU Ge-ping. Some problems of affecting ecological safety in China [J]. *Environmental Protection*, 2002, 6:3-8.

- [14] GB/T5009. 39-1996. 酱油卫生标准的分析方法[S].

GB/T5009.39-1996.The Analytical Method of Standard for Sauce Quality[S].

- [15] 张 莉,刘 利,徐铭熙.毛发蛋白水解液中混合氨基酸的测定方法研究[J].氨基酸和生物资源,1998,20(4):31-34.

ZHANG Li, LIU Li, XU Ming-xi. Study on the determination of amino acids in the hydrolysate of hair[J]. *Amino Acid & Biotic Resources*, 1998,20(4):31-34.

- [16] 赵 斌,何绍江.微生物学实验[M].北京:科学出版社,2002.

ZHAO Bin, HE Shao-jiang. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Science Press, 2002.

- [17] 钟连胜,谢天键,吴继星,等.棉铃虫作供试虫的苏云金杆菌制剂毒力生物测定的研究[J]. 生物防治通报, 1990, 6(增刊):1-5.

ZHONG Lian-sheng, XIE Tian-jian, WU Ji-xing, et al. A Study on bioassay for toxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations using cotton bollworm as test insect[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1990, 6:1-5.

- [18] 汤慕瑾,余健秀,刘静宇,等.苏云金杆菌毒力的生物测定[J]昆虫天敌, 2006, 22(2): 84-86.

TANG Mu-jin, YU Jian-xiu, LIU Jing-yu, et al. *Bacillus thuringiensis* bioassay methodology[J].*Natural Enemies of Insects*, 2006, 22(2):84-86.

- [19] 张用梅,库 竹,梁世平.速灭丁对苏云金杆菌武汉变种(140)生长发育及其毒力的影响[C]//杀虫微生物(第一卷).北京:北京农业大学出版社, 1987. 113-116.

ZHANG Yong-mei, KU Zhu, LIANG Shi-ping. Effect of Su Mie-ding on the Growth and Entomotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Strain Wuhan (140)[C]//Pesticidal Microorganism.vol.(1). Beijing: Beijing Agriculture university Press ,1987.113-116.

- [20] 余雅丽,方红英,张汉珍.苏云金杆菌制剂活孢子数与杀虫毒效的关系[J].湖北农业科学,1984,9,27.

YU Ya-li, FANG Hong-ying, ZHANG Han-zhen. The relation of the *Bacillus thuringiensis* sporulation and pesticidal effect[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 1984, 9, 27.

- [21] 李今煜.苏云金芽孢杆菌 WB-7 菌株发酵条件的研究[D].福建:福建农林大学硕士学位论文.2004.

LI Jin-yu. Studies on the Fermentation Condition of *Bacillus Thuringiensis* Isolate WB_7[D]. Fujian Master thesis of Fujian Agriculture and Forestry University.2004.

- [22] 杨建州.高效气升式环流反应器研究及其在废水资源化方面的应用[D].北京:中国科学院生态环境研究中心.1997.

YANG Jian-zhou.The Study of the Properties of Air-lift Loop Reactors and the Utilization on the Wastewater Resourceization [D]. Beijing: Research Center for EcocrEnvi. 1997.