

微生物杀虫剂苏云金杆菌液体发酵技术的研究

张俊亭 李治祥 张克强 黄士忠

(农业部环境保护科研监测所,天津 $z\tau\omega\omega Zx$)

摘要 采用不同固形物含量的发酵液,确定出苏云金杆菌发酵液的最佳碳氮比为 $x:yB$ 。不同固形物含量发酵液的试验证明,采用高固形物含量($Z\%$)的发酵液在生产上可有效降低生产费用。应用造价低、便于维修、抵御感染能力强、节能省电的气升式发酵罐对 $O\omega$ 进行发酵,发酵液不用浓缩其效价就达到国家行业标准($\Phi\xi y\Delta BX\beta / \mu\theta$),很适宜在实际生产上采用。

关键词 苏云金杆菌 液体发酵 碳氮比 气升式发酵罐

苏云金杆菌 ($O\xi\pi\theta^0 9 7 8 \varphi^0 \chi^2 \nu\chi\sigma^2 7 \chi^t$, $O\omega p$) 是一种杀虫效果良好的微生物农药,可以应用于多种害虫的防治^[1]。 $O\omega$ 的液体发酵在生产上应用最多,它的杀虫毒力与其发酵水平有着密切的关系。 $\sigma U^2 \xi^{\theta 2 \kappa}$ 采用固形物在 $z\%$ — $A\%$ 左右的发酵液来培养,最终发酵液含活孢子 $y\omega-B\omega$ 亿/ θ 。 $P^6 \xi \omega\sigma$ 等^[2] 则采用了固形物含量 $\Gamma\%$ — $x\omega\%$ 的发酵液,最终的活孢子数达到 $x\Delta\omega$ 亿/ θ 。在配方的成本上来看,国外用料成本比较高;而国内由于产品售价低,只能采用一些比较便宜的原料。我们采用了廉价的农产品原料(豆饼粉等),来研究苏云金杆菌的液体发酵技术。研究表明,苏云金杆菌的活孢子数与杀虫毒力之间虽有一定关系,但用活孢子数来表示杀虫效价是不科学的。我们选用棉铃虫作供试害虫,来评价发酵液的杀虫效价。

x 材料与方法

$x\omega$ 菌种

$O\xi\pi\theta^0 9 7 8 \varphi^0 \chi^2 \nu\chi\sigma^2 7 \chi^t$ $\Phi P-x$

$x\omega y$ 斜面培养基

牛肉膏 $\tau\omega B\%$, 蛋白胨 $x\omega\omega\%$, 氯化钠

$\tau\omega B\%$, 琼脂 $y\omega\omega\%$, 余量为水。

$x\omega\kappa$ 发酵配方的筛选

发酵的基本配方为豆粉 $A\%$, 玉米粉 $z\%$, 酵母粉 $x\%$, 鱼粉 $x\%$ 和碳酸钙 $\tau\omega y\%$ 。在此基础上,通过变换配方的碳氮比,通过摇瓶试验来确定发酵培养基各组分最佳配比。将选定发酵配方的发酵液 $y\omega 1 \theta$ 装入 $yB\omega 1 \theta$ 三角瓶,灭菌后,接活化后的斜面菌苔一大环。在 $z\omega C$ 下进行摇床振荡培养 $x\omega-x y \varphi$, 作为种子。然后,以 $z\%$ 的量加入到灭菌处理过并含有 $y\omega 1 \theta$ 培养液的 $yB\omega 1 \theta$ 三角瓶中。在 $z\omega C$ 恒温条件下摇床振荡培养 $yE-z y \varphi$ 。发酵液均按稀释平板计数方法对菌体进行计数^[3]。将发酵液在玻片上染色,在油镜下计数测定晶胞比。

$x\omega A$ 发酵促进剂的筛选

在选出最佳发酵培养基配方的基础上,分别向内添加 $x\%$ 玉米糖浆、微量元素(硫酸锰、硫酸锌、硫酸铜、硫酸亚铁, $x\%$ 溶液)、 $x\%$ 氨基酸(xE 种氨基酸混合物)、 $x\%$ 螺旋藻粉等营养物质,期望它们能使发酵水平有所提高。上述发酵液经灭菌后,用摇

瓶发酵的方法在zw℃恒温发酵。将终点发酵液用平板计数法测定各发酵液的菌数，以此来评价各种物质对苏云金杆菌生长是否有促进作用。

x iB 发酵罐试验

O₁₈ 液体深层发酵是一典型的好氧化过程，目前国内外普遍用的O₁₈ 发酵反应器都为机械搅拌式发酵罐。尽管此种发酵罐也有不少改进，形式有多种，但存在着如下固有的并且难以克服的缺点(A)内部结构复杂和轴封处有传动部件，使罐内有死角和难以实现密封，易感染杂菌和嗜菌体，造成发酵失败。(y) 每台发酵罐必须配备一台相应的电动机和动态搅拌装置，电力消耗多，设备投资大。(z) 受结构限制，罐体高径比小，不能较多地利用无菌空气中的氧气，因而无菌空气需要量大，增加了生产成本。(A) 设备维修复杂，降低了安全运转的可靠性。(B) 罐体不易大型化。

最近几年来新发明的气升式发酵罐无搅拌装置，它是利用通入的空气使罐内的不同区域形成密度差和宏观循环流，同时并形成局部湍流和微观混合流，以达到搅拌、混合和使空气中的氧气溶解在发酵液中的目的。它具有结构简单、无运动部件、无菌操作可靠性高、电耗少、操作维修方便和造价低等诸多优点。气升式发酵罐现在在单细胞蛋白和多糖好氧发酵中得到了一些应用，但在O₁₈ 液体深层发酵中尚未见报道。我们分别用z₁₈∂气升式发酵反应器和z₁₈∂机械搅拌式发酵反应器进行扩大试验。并将所获得的发酵液进行生测，用所得结果来评价气升式发酵反应器的优劣。机械搅拌式发酵罐设置发酵温度z₁₈℃，搅拌转速z₁₈—AB₁₈° / 1χ²，罐压y₁₈Z₁₈×xw^A—A₁₈Z₁₈×xw^Aφξ²，通气量x : x—iB (通气量缓加)，培养时间根据芽孢的破裂程度来确定。气升式发酵罐除无搅拌和通气量略有增加外，其余的设置同机械式搅拌自控发酵罐。根据碳氮比为x : y iB，固形物Z%发

酵培养基的配方，分别用机械搅拌式发酵罐和气升式发酵罐进行了z次发酵。把发酵液用各种助剂配制成液体剂型，分别进行毒力测定，并求得平均值。

x iΓ 生物测定

按照中华人民共和国农业行业标准∂ξ yZz—ZB所提供的方法进行测定，供试害虫为棉铃虫。

y 结果与讨论

y iw 摇瓶发酵的试验结果

摇瓶试验结果(表x)表明，固形物含量为Z%的发酵液最终的菌数明显超过A%的发酵液，在同样含量的发酵液中，碳氮比对发酵水平有着很大的影响。各发酵液的晶胞比除一个处理外均超过E₁₈%，说明同步率较好。当采用固形物含量Z%、碳氮比为x : y iB的发酵培养基发酵时，发酵液中的菌数最多。用初孵棉铃虫生测时，此发酵液的杀虫效价亦最高，可达x ΔZΔ Xβ /μ∂。虽然固形物含量提高一倍时，发酵液菌数没能增加一倍，但在实际生产上采用高浓度发酵却很有意义。这是因为提高固形物含量后发酵水平的提高，可使生产费用大幅下降，无形中就提高了生产效益。

表x 培养基不同固形物含量和碳氮比对菌体生长的影响

固形物含量 o %φ	碳氮比	菌数 o 亿/∂p	晶胞比 o %φ	最终 Φ
A iB	x : y iB	Δy iw	Z A iw	E i y
	x : z iB	Γ E i B	Z y i Δ	E i w
	x : A i B	B Δ i y	Z i w	E i w
Z i w	x : y iB	x x Γ i A	E E i ε	E i w
	x : z iB	Z i w i ε	E Δ i w	Δ i Z
	x : A i B	Δ Z i Γ	Δ E i y	Δ i E

y i y 营养物质对发酵水平的影响

各种营养物质添加到培养液后，试验结果见表y。结果表明，除玉米糖浆使菌株ΦP—x的菌数略有降低外，其余的添加剂对O₁₈ 发酵的影响不大，方差分析的结果表明

表y 可能的发酵促剂对发酵的影响

发酵促剂	添加量 o %p	菌数 o 亿/∂p	晶胞比 o %p	最终 Φ
玉米糖浆	x	xxE ι B	EB ι x	Δ ι E
微量元素	w ι B	xxA ι Z	Z ι wB	Δ ι Z
氨基酸	x	xxZ ι uA	EZ ι uA	E ι w
螺旋藻	x	xx Γ ι u Δ	Z ι w ι u Δ	E ι w
对照		xx Γ ι uA	EE ι x	E ι w

差异不显著。由此可见，发酵的基础培养基的固形物含量和碳氮比对O ι 发酵的影响比较大，即起主导作用的是碳氮比和固形物含量。另外，实验还表明如果配方中碳氮比例失调，会导致芽孢和总菌数比例失调，甚至无法正常形成芽孢和晶体，发酵液的 Φ 值仍停留在酸性。因此，配方中的碳氮比是决定配方优劣的决定因素，而某些营养物质和微量元素对总菌数的影响不大。

y ι u ϵ 发酵方式对杀虫效价的影响

固形物含量Z%、碳氮比为x:y ι uB的发酵液经摇瓶、机械搅拌式和气升式发酵罐三种方式发酵后，各自的效价分别为x Δ Z Δ X β / ι v ι y ι x γ Γ X β / ι v和y ι y Δ BX β / ι v。气升式反应器所得到的效价最高，这应该与它的良好供氧有关。机械搅拌式比摇瓶发酵好的原因也应该归于供氧能力的改善。由于气升式反应器具有设备造价低、安全运转期长、能耗少，再加上发酵液毒力效价不低于机械搅拌

式，它也就成为一种优良的O ι 发酵反应器。

通过研究证明，不同固形物含量和不同碳氮比的发酵液，对苏云金杆菌的液体发酵水平影响较大。采用固形物含量高的发酵液在生产上可有效降低生产费用。采用造价低、便于维修、抵御感染能力强、节能省电的气升式发酵罐对O ι 进行发酵，发酵液不用浓缩就可达到国家行业标准，很适宜在实际生产上采用。

参 考 文 献

x 毛水莲 u 世界农业 xZZA@y) Hz—zA
y 吴继星 u 湖北植保 xZZA@B) H β E—yZ
z ϵ sv ι z ξ Ψ Π u β us u ϕ ξ σ ι σ sz u ι w Δ x s Δ AZ
A P β ξ w σ O O ξ ι ρ s ι ι σ ϕ σ Π γ u β us u ϕ ξ σ ι σ sz s
 ι E Δ s E Γ B
B 刘崇乐等 u 苏云金杆菌研究的五十年,北京I科学出版社 xZY

作者简介

张俊亭, 副研究员。xZED年浙江农业大学植保系农药残毒研究方向硕士研究生毕业。在农业部环境保护科研监测所的早期工作以农药和天然毒物的残留分析为主, 后转向无公害农药和其它绿色技术的开发与研究, 并有多项成果获国家专利, 现已发表论文y ι w余篇。

o上接第y Δ 页p

参 考 文 献

x P β ι z ξ ι ξ ϕ Ψ Σ ι \mathcal{P} Ξ ι π τ τ Ξ ι ξ ι Π ϕ σ ι s Δ ZZ ι @ Δ o B β H Δ ι B
y \mathcal{P} ϵ ι v T ι σ ξ ι u β σ ι γ ρ ι σ s π ξ s Δ ZEZ ϕ Γ o z ι x ρ H ι x Δ
z T ι σ σ ι ϕ ξ ι v ϕ ρ σ ξ ι u β σ ι γ ρ ι σ s π ξ ρ ρ O ρ ι s π ϕ μ
 ι σ ι v ι ι O ξ π w ι σ ι H ι τ ι ρ u Δ ZEGH Δ x—zAE
A T ϕ ϕ ϵ s ι u ξ σ σ ι Ψ Σ ι ρ χ ι σ ι Ξ ι ξ ι Π ϕ σ ι s Δ ZEG ϕ Γ H γ ZB
B O ι ϕ ι ξ ι ρ Ψ σ ι ξ ι u β σ ι π σ ρ ξ ι v ι τ T χ γ ι X ϵ σ ι ξ ι ξ ι ξ ι

s ι ι ι ι ι ι χ ι ι τ T χ σ ρ s π ι σ ι χ ι v ϵ σ ϕ ι ρ ι τ ι ι Φ ξ ι μ
 ξ ι ρ ι ι δ ξ ι σ s χ ξ σ X ϵ ι σ ι σ ι χ ι ξ ι s β s Σ ι ρ χ ι ι σ ι ξ ι
 ϕ β σ ι σ ι χ ι ι Ξ u σ ι π ι s ∂ ξ ι γ sv ξ ι s Δ ZEE ϕ Δ xz— Δ ϵ Δ
 Γ s π ϕ ι ξ ι o σ ϵ σ ξ ι ι \mathcal{P} Ξ u ι χ ι T ι ι ρ Π ϕ σ ι s Δ ZEA ϕ γ H Δ x A
 Δ T ι σ σ ω σ Ψ ι \mathcal{P} Ξ ι π τ τ Ξ ι ξ ι Π ϕ σ ι s Δ ZEA ϕ ι EA

作者简介

李治祥, 男, 研究员, 主要从事农药环境毒理学研究。在农药对农业生态环境影响研究、农药残毒速测技术、免疫分析技术、多残留测试技术以及农药检测用实物标准研制等项研究成果为国内领先, 达到国际同类项目研究的先进水平。获奖x ι 项, 发表论文 Γ w多篇。