

用黄酒滤渣生产苏云金杆菌的研究*

王学聘 戴莲韵

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 研究表明,利用生产黄酒的滤渣代替苏云金杆菌制剂生产中的部份原料,如酵母粉、淀粉等,取得了较好效果。用黄酒滤渣配方生产的苏云金杆菌,杀虫活性不低于原生产配方,并且生产成本降低30%以上。

关键词 苏云金杆菌 HD-1; 黄酒滤渣; 发酵

我国自1959年由捷克引进苏云金芽孢杆菌以来^[1],已有30多年历史。国际上生产苏云金杆菌制剂的主要原料为酵母浸出液、大豆粉、淀粉、葡萄糖等^[2]。我国生产时将酵母浸出液改用酵母粉。由于上述原料价格较贵,使苏云金杆菌制剂的生产成本相应较高,成为该类微生物杀虫剂应用和推广的难题。鉴于此,我们在开展苏云金杆菌发酵条件研究的同时,进行了降低生产成本的研究。从菌剂生产的原料入手,选用来源丰富,价格低廉,含有大量酵母和丰富碳、氮源的黄酒生产下脚料——黄酒滤渣,开展了摇瓶筛选和14L发酵罐研究,筛选出适宜苏云金杆菌 HD-1生产的培养基配方,并对发酵产物进行了三种主要林业害虫的室内生物测定,现将结果报道如下。

一、材料和方法

(一) 菌种

苏云金杆菌 HD-1 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)。

(二) 黄酒滤渣

黄酒滤渣取自工厂黄酒车间,经本实验室稍加处理后待用。

(三) 培养方法

1. 摇瓶振荡培养 取培养四天的菌种试管斜面,用无菌蒸馏水洗下菌苔制成菌悬浮液,经同步处理后取1ml接种于500ml三角瓶(内盛100ml培养基,127℃高压蒸气灭菌30min)中,在TZ-2型台式往复旋转振荡器上,往复式振荡培养(振幅5cm,频率140次/min),培养温度为 30 ± 1 ℃。

2. 14L容量发酵罐培养 采用日本产发酵装置(L. E. MARUBISHI. CO. LTD. MJ-N-14L)。

本文于1990年2月19日收到。

*本文为国家“七五”攻关项目的部分研究内容。

(四) 菌数测定

1. 菌数测定采用常规血球计数板方法^[3]。
2. 活孢子计数采用稀释平板法^[3]。

(五) 生物测定

1. 油松毛虫(*Dendrolimus tabulaeformis*) 待发酵结束, 取发酵液10 ml, 稀释10倍后, 浸油松枝叶1~2 min(以针叶全部浸润为准), 取出晾干, 插入盛水小玻璃瓶中, 放于玻璃缸内(10 cm×15 cm), 将被测油松毛虫(2~3龄)30头放入缸内, 以清水浸枝叶为对照, 放入光照培养箱中, 生测温度25±1℃, 光照周期12 h/24 h, 观察死亡结果。

2. 舞毒蛾(*Lymantria dispar*)、杨尺蠖(*Apocheima cinerarius*) 待发酵结束, 将发酵液于人工饲料中稀释10倍, 在直径为7.5 cm的烧杯(250 ml容量)中放入30 ml带菌人工饲料, 以清水为对照, 将试虫(2~3龄)20~30头放于杯中, 置光照培养箱, 温度25±1℃, 光照周期12 h/24 h, 观察死亡结果。

(六) 培养基中全氮、有机碳测定

培养基经蒸气灭菌及接种培养后, 取样经6 000转/min离心, 取上清液, 用凯氏定氮法, 使用瑞士布奇(BÜCHI 322)全自动定氮仪测定全氮; 用重铬酸钾法测定有机碳^[4]。

(七) 代料培养基配方的筛选

以黄酒滤渣为主要原料, 通过正交试验筛选出节粮代料培养基, 其编号为培养基 I, 通常工厂使用的培养基为培养基 II。

二、试验结果

(一) 两种培养基发酵产物对三种试虫室内生物测定比较

两种培养基产物对油松毛虫、舞毒蛾、杨尺蠖的室内生物测定结果(表1)可见, 培养基 I(以黄酒滤渣为主要原料)和培养基 II(原工厂配方)的发酵产物对三种试虫的毒力基本一致。培养基 I对油松毛虫、杨尺蠖的毒力比培养基 II略高, 而对舞毒蛾则略低, 死亡率均在73.3%以上。可见用黄酒滤渣培养基配方生产的苏云金杆菌产物, 其质量不低于原工厂配方产物, 而原料成本却大幅度降低。

(二) 14L 容量发酵罐试验

1. 发酵过程中培养基全氮、有机碳、pH和菌数的变化 使用黄酒滤渣为主要原料的培养基 I, 用NaOH调 pH 7.5左右, 投料容量为8 L, 127℃高压蒸气灭菌30 min, 一级发酵, 接种量为经同步处理的一个茄瓶斜面的菌悬液, 培养温度30±1℃, 搅拌速度250转/min, 通气量5 L/min, pH变化自动记录。发酵过程中不同取样时间的 pH、菌数增长情况、全氮和有机碳变化结果见图1。发酵16 h和20 h, 其培养基 pH值、全氮、有机碳均达

表1 两种培养基产物对三种试虫室内生物测定比较

(单位: 头、%)

培养基	发酵液稀释倍	2 d				4 d			12 d				
		杨尺蠖幼虫				舞毒蛾幼虫			松毛虫幼虫				
		试虫数	活虫数	死虫数	死亡率	试虫数	活虫数	死虫数	死亡率	试虫数	活虫数	死虫数	死亡率
I	10	30	4	26	86.6	30	6	24	80	30	6	24	80
II	10	30	6	24	80	30	5	25	83.3	30	8	22	73.3
对照		30	30	0	0	30	30	0	0	30	30	0	0

到最低值,全氮16 h为0.384 1 g/L,有机碳16 h为1.997 0 g/L, pH在20 h为6.5,在24 h后回升至7.5。菌数在16 h为15 亿/ml, 20 h为25 亿/ml,在24 h则有近40 %的菱形晶体脱落,可见由于菌数的增加消耗培养基中的氮和碳后产酸,培养基的pH值下降,当菱形晶体从细菌孢子囊中脱落时,使发酵pH值开始回升,此时即可放罐进行提取。

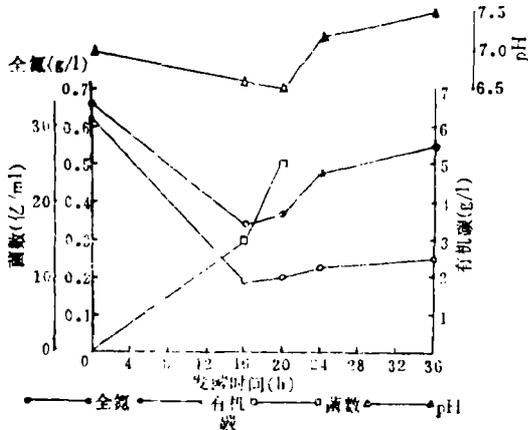


图1 发酵过程中pH、菌数、全氮、有机碳变化

表2 14L发酵罐发酵液对舞毒蛾室内生物测定

(单位:头、%)

发酵液稀释(倍)	活孢子数(亿/ml)	试虫数	2 d		4 d		5 d		累积		
			死	活	死	活	死	活	死亡半		
10	1.2	20	0	20	15	5	5	0	20	0	100
20	0.6	20	1	19	15	4	3	1	19	1	95
40	0.3	20	0	20	14	6	3	3	17	3	90
80	0.15	20	0	20	8	12	9	3	17	3	90
对照	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0

2. 14L发酵罐发酵液室内生物测定 发酵结束,取发酵液一定量进行稀释,使之在进行生物测定的人工饲料中的稀释倍数依次为发酵液的10倍、20倍、40倍、80倍。试虫为经人工饲料饲养的2~3龄舞毒蛾。其结果(表2)以黄酒滤渣为主要原料的培养基的发酵产物对试虫有较高的杀虫活性,当活孢子数为0.15亿/ml时,其死亡率在90%以上。因此,用黄酒滤渣为主要原料生产苏云金杆菌制剂是可行的。

3. 原料成本概算 由于用黄酒滤渣代替了原培养基中酵母粉等原料,使原料成本降低30%以上。

三、讨 论

1. 用黄酒滤渣为主要原料生产的苏云金杆菌发酵产物对人工饲料饲养的杨尺蠖和舞毒蛾二、三龄幼虫及野外采集的油松毛虫2~3龄幼虫的毒效均表现出80%以上的死亡效果,与工厂原配方培养基的发酵产物毒效基本一致。

2. 在国内林业用苏云金杆菌制剂标准化及毒力效价测定尚未确定和统一的情况下,根据本文苏云金杆菌发酵产物对三种试虫致死的相关性,建议选用易于人工饲养,有一定代表性和相关性的舞毒蛾幼虫作为标准化生测试虫。

3. 根据作者试验证明^[6],发酵过程中同一菌株在同一培养基中的菌数与试虫毒性成正比相关,因此,本文表2列出活孢子数,而同一菌株在不同培养基中菌数与试虫毒性不成正相关,表1中发酵产物以同一稀释倍数表示更为科学。

参 考 文 献

- [1] 刘崇乐等, 1962, 苏云金杆菌研究的五十年, 科学出版社。
- [2] Dulmage, H. T. et al., 1970, Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*, *J. of invert. Path.*, 15: 15~20.
- [3] [日]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。
- [4] 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。
- [5] 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。

STUDIES ON PRODUCING *BACILLUS THURINGIENSIS* WITH YELLOW RICE WINE RESIDUE

Wang Xuepin Dai Lianyun

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract In this paper, applying YELLOW RICE WINE RESIDUE (after making yellow rice wine) as the main component of medium instead of yeast powder and starch, the results are promising. The toxicities against the test insects (*Dendrolimus tabulaeformis*, *Lymantria dispar*, *Apocheima cinerarius*) of two fermentation products (e.g. the yellow rice wine residue medium I and medium II used in the factory) were similar. The cost of medium I material was reduced by above 30 %.

Key words *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1); yellow rice wine residue; fermentation

林木遗传及统计研讨班在广州举行

根据中国林业科学研究院与澳大利亚国际农业研究中心(ACIAR)合作项目 8848 的实施方案, 澳大利亚遗传学家 Colin Matheson 博士和统计学家 Emlyn Williams 博士, 于 1990 年 5 月 13~26 日, 在广州中国林科院热林所举办了林木遗传及统计研讨班。来自林业所, 亚林所及热林所的 20 多名青年学者参加。

在研讨班上, C. Matheson 博士重点讲授了遗传方差及其分量的估算, 遗传力估计, 基因型×地点交互作用的分析 and 育种策略等内容。E. Williams 博士讲授了林木遗传试验中的试验设计、统计分析及其结果解释。他们还讲授了自己最新研制的多功能数据处理软件包数据链(Datachain)的应用以及 Genstat、Alphanal、Reml 几种统计软件包的应用。双方就项目实验中遇到的问题进行了讨论。通过这次研讨班, 学员们收获很大, 学到了一些新理论和新方法, 在今后的项目实施中将发挥很大作用。

在研讨班开始之前, 澳方项目助理 Suzeet Searle 小姐和两位博士还检查、参观了在云南、广东、海南和福建等地已建立的试验林, 并提出了宝贵意见。

(中国林业科学研究院林业研究所 郑勇奇)