

餐厨垃圾半固态发酵产 Bt 生物农药及其稳定性

邹 惠^{1,2}, 张文毓^{1*}, 姜 林¹, 姚珏君¹, 梁 竞¹, 汪群慧²

(1. 北京市环境保护科学研究院污染场地风险模拟与修复北京市重点实验室, 北京 100037;

2. 北京科技大学环境工程系, 北京 100083)

摘 要: 为降低苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 生物农药的生产成本, 该研究采用餐厨垃圾为原料半固态发酵生产 Bt 生物农药, 并对其产物稳定性的影响因素进行了考察。结果表明, 发酵 48 h 后半固态发酵样品中的伴孢晶体产率较相同体积的固态发酵样品和液态发酵样品分别提高了 54% 和 162%。体系含盐量、pH 值、温度及紫外线 4 种常见因素中, 体系含盐量的变化对伴孢晶体稳定性的影响并不显著; 温度对伴孢晶体稳定性的影响显著, 但当体系温度在 0~60℃ 间变化时, 各组数据差异并不显著。pH 值对伴孢晶体稳定性的影响显著, 且各数据间存在显著性差异; 紫外线对伴孢晶体稳定性影响极显著, 试验表明, 当伴孢晶体在紫外线 (36 W, 距离 40 cm) 下暴露 3 h 后, 其毒力效价即下降 50%。为进一步提高伴孢晶体的抗紫外能力, 采用聚乳酸为载体包覆伴孢晶体制备缓释剂, 结果表明该缓释农药可有效延缓晶体在紫外线照射下的失活速度, 使其在紫外线照射 72 h 后仍然能保持 85% 的活性, 较相同照射条件下的伴孢晶体原粉提高了 10 倍左右, 并能在 30 d 的作用周期内稳定的释放伴孢晶体, 该成果对 Bt 生物农药产品优化具有重要的应用价值。

关键词: 发酵; 垃圾; 农药; 苏云金芽孢杆菌; Bt 生物农药; 毒力效价

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.039

中图分类号: X705

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2016)-05-0268-06

邹 惠, 张文毓, 姜 林, 姚珏君, 梁 竞, 汪群慧. 餐厨垃圾半固态发酵产 Bt 生物农药及其稳定性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(5): 268—273. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.039 <http://www.tcsae.org>

Zou Hui, Zhang Wenyu, Jiang Lin, Yao Juejun, Liang Jing, Wang Qunhui. Bt biopesticide produced by semi-solid state fermentation from kitchen waste and its stability[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(5): 268—273. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2016.05.039 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

苏云金芽孢杆菌是一种能够在代谢过程中产生内生芽孢和伴孢晶体的革兰氏阳性菌, 其杀虫机理是依靠其所含有的伴孢晶体、外毒素及卵磷脂酶等致病物质引起靶向昆虫肠道等病症从而使昆虫致死^[1]。资料显示, 苏云金杆菌共对鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、双翅目等 32 个科 50 多种昆虫害虫有不同程度的致病和毒杀作用^[2], 且具有专一、高效和对人畜安全等优点, 现已成为世界上应用最广、效果最好的微生物杀虫剂。

目前, Bt 生物农药的主流生产工艺是以葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、豆饼粉、玉米粉等工农业产品或农副产品为原料, 采用液态深层发酵制备而成。仅其原料价格即占总生产成本的 35%~59%, 且液态发酵设备占地面积大、产物浓度低、提纯工艺繁琐^[3], 为降低生产成本, 研究者曾使用如动物粪便^[4], 农业废弃物^[5], 城市污泥^[6], 沼气发酵残渣^[7]等成本更加低廉的有机质废弃物作为原

料并取得了阶段性的成果^[8]。但这些原料大多营养成分较为单一, 需外加碳源或氮源才能满足发酵过程的基本需求, 部分原料还需水解、脱脂等预处理过程, 实际操作十分繁琐。除此之外, 采用固态发酵方式也被视为降低成本的有效方法之一, 该方法具有占地面积小、发酵能耗低、能有效缓解液态发酵过程中常见的底物抑制及产物抑制等问题等优势, 但也仍然存着发酵速率慢, 周期长, 工艺参数难检测和控制等缺点^[9], 亟待进一步改进和完善。

除了高昂的生产成本, 田间持效期短也制约了 Bt 菌的进一步推广应用, 研究证明, Bt 菌杀虫的主要活性成分伴孢晶体是一种碱性蛋白质, 极易受到温度、pH 值、紫外线等外界因素的影响而降低其杀虫效能^[10-11], 因此需频繁施用以保证其效果, 在一定程度上提高了使用成本。

本研究探索采用餐厨垃圾为原料, 不外加任何营养物质, 通过半固态法发酵生产 Bt 生物农药。对比了半固态法与传统液态法、固态法的发酵效果; 并对发酵和使用过程中可能对伴孢晶体稳定性造成影响的因素进行了考察, 在此基础上开发了以聚乳酸为载体的 Bt 生物农药缓释剂, 既为餐厨垃圾的大规模资源化开辟了一条新的途径, 也为生物农药在农业上的广泛应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

本研究所用菌种为苏云金芽孢杆菌库尔斯塔克亚种

收稿日期: 2015-08-04 修订日期: 2015-12-10

基金项目: 北京市自然科学基金 (No.8144048); 北京市环境保护科学研究院科技基金 (No.2013B06)

作者简介: 邹 惠, 女 (汉族), 四川广安人, 主要从事固体废物资源再利用方面的研究。北京 北京市环境保护科学研究院, 100037. Email: zhqjxf_163@163.com
*通信作者: 张文毓, 助理研究员, 博士, 主要从事固体废物资源再利用及生物质资源化研究。北京 北京市环境保护科学研究院, 100037. Email: zhangwenyu@cee.cn

(*Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki*)，购买于中国工业微生物菌种保藏管理中心 (CICC)，菌种编号 21707。发酵所用餐厨垃圾取自北京市环境保护科学研究院食堂，挑去骨头、卫生纸等不易发酵杂物后，粉碎混匀保存于-20℃的冰箱内待用。其成分如表 1 所示。

表 1 餐厨垃圾成分

Table 1 Characteristics of food waste

测定指标 Parameters	范围 Range	测定方法 Test methods
含水率 Moisture content/%	70~80	烘干法 ^[12] Oven-drying method
pH 值 pH value	5.5~6.5	玻璃电极法 ^[12] Glass electrode method
含盐量 Salt content/%	2.12~3.57	硝酸银滴定法 ^[13] Silver nitrate titration method
总糖 Total sugar/%	56.26~65.34	DNS 法 ^[12] DNS method
淀粉 Starch content/%	39.86~50.27	蒽酮法 ^[12] Anthrone method
粗脂肪 Crude fat/%	13.99~17.76	索氏抽提法 ^[12] Soxhlet extractor method
粗蛋白 Crude protein/%	12.32~16.88	凯氏法 ^[12] Kjeldahl method
粗纤维 Crude fiber/%	1.55~3.95	酸碱消煮法 ^[12] Heating digestion method

1.2 以餐厨垃圾为原料半固态发酵制备生物农药

餐厨垃圾经粉碎烘干后，分别调节含水率至 50% (固态样品)，75% (半固态样品) 及 99% (液态样品)，混合均匀，取 500 mL 装入 1 L 三角瓶中，121℃灭菌 30 min，待冷却后按照 0.2 g (菌体湿质量)/100 mL (发酵培养基) 接入预先培养的 Bt 菌种 (24 h 菌龄)，30℃下 100 r/min 振荡发酵 72 h。

取同等质量的发酵物料，加无菌水调制成悬浮液，500 r/min 下离心 5 min，上清液用纱布过滤 (去除未被利用的固态物质)，所得滤液 8 000 r/min 下离心 10 min，去上清液，得到菌体与伴孢晶体混合物，再利用高速离心法制备纯伴孢晶体，经冻干机冷冻干燥后得到伴孢晶体原粉。

1.3 影响伴孢晶体稳定性的因素研究

1.3.1 餐厨垃圾中含盐量对伴孢晶体稳定性影响

盐分伴随着整个发酵过程，可能会对伴孢晶体稳定性产生影响，本次试验分别配制含盐量为 0、1%、2%、3%、4% 和 5% 的伴孢晶体悬浮液，定时取样测定其毒力效价大小。

1.3.2 发酵过程中温度及 pH 值对伴孢晶体稳定性影响

餐厨垃圾发酵过程中 pH 值上升至 11 左右，碱度过高可能会影响伴孢晶体的稳定性，因此本试验分别将伴孢晶体静置在不同 pH 值 (pH 值为 3、5、7、9、11 和 12) 下进行，定时取样并测定其毒力效价。

温度是发酵过程中的重要影响参数，温度过高容易使伴孢晶体变性，因此将伴孢晶体静置在温度为 0、20、40、60 及 80℃下，定时取样并测定其毒力效价。

1.3.1 及 1.3.2，3 组试验的样品量均为 100 mL，伴孢晶体悬浮液质量浓度均为 0.1 g/mL。

上述每组试验重复 3 次。

1.3.3 紫外照射时间对伴孢晶体稳定性影响

研究表明，阳光中的紫外线是降低伴孢晶体稳定性的首要因素^[14-15]，本试验将伴孢晶体原粉平铺直接置于强度约 60 μW/cm² 的紫外线照射下 (紫外线消毒灯 TUV36W，飞利浦，距离 40 cm)，定时测定其毒力效价。

1.4 利用聚乳酸为缓释材料优化伴孢晶体的稳定性

将伴孢晶体原粉与分子量 1 万的聚乳酸按质量比 1:3 进行配比，混合均匀后注入低压注塑机制成直径为 2 mm 的圆柱体，即得到 Bt 缓释农药。

将伴孢晶体原粉与 Bt 缓释农药同时暴露于紫外线下，定时取样分别测定毒力效价，考察伴孢晶体在缓释材料的作用下抗紫外线能力是否有所提高。

称取 5 g 缓释农药，密封浸泡在 1 L 装满水的烧杯中，进行 30 d 的静态试验，室内温度保持在 25℃左右，每隔 2 d 测定伴孢晶体释放量，考察缓释农药中伴孢晶体的释放能力及释放速率。

1.5 测定方法

活孢子数测定用平板计数法^[6]，每个梯度下设 5 个平行样，平板菌落数在 30-300CFU 的样品视为有效；还原糖用 DNS 法测定^[12]；pH 值用 pH 计测定；伴孢晶体采用高速离心法制备，并使用考马斯亮蓝法测定其含量^[16-17]；毒力效价的测定参照 GB/T19567.2-2004，以 CS-1995、H_{3ab} (效价 20 000 IU/mg) 为标准品，并以三龄健康棉铃虫幼虫为试虫，毒力效价可用如下公式计算。

待测品毒力效价 (IU/mg) =

标准品 LC₅₀ 值×标准品效价/待测品 LC₅₀ 值，

式中 LC₅₀ 为半致死浓度，表示杀死 50%防治对象的药剂浓度，mg/L。

2 结果与讨论

2.1 餐厨垃圾半固态发酵生物农药伴孢晶体产率

根据定义，在没有或基本没有游离水的基质中进行的发酵过程为固态发酵；在主要成分为游离水的基质中进行的发酵过程为液态发酵；在体系中含有部分游离水的基质中进行的发酵过程为半固态发酵^[18]。但由于不同物料的理化性质具有差异，难以使用统一的含水率标准对这 3 种不同的发酵方式进行定量，在以往的相关研究中，研究者也多采用经验值来定量不同的发酵方式^[19]，如 Naveena 等曾在研究中阐述：当发酵体系中固态物料与水的质量体积比≥10%时，体系将由半固态转化为固态^[20]。因此本研究参考其他研究者分类方法，依照前期研究经验，采用表观判断法，定义正常状态下无法流动的餐厨垃圾体系为固态发酵体系，其含水率约为 50%左右；定义正常状态下可以自由流动的餐厨垃圾体系为液态发酵体系，其含水率约为 99%左右；定义正常状态下可以缓慢流动的餐厨垃圾体系为半固态发酵体系，其含水率约为 60%~90%左右。

试验考察了相同体积及接种量的固态发酵、半固态发酵与液态发酵体系中伴孢晶体产率随时间的变化，试验结果如图 1 所示，发酵 48 h 后，半固态发酵 (含水率 75%) 体系中伴孢晶体产率可达 833 μg/mL，较相同体积的固态发酵 (含水率 50%) 及液态发酵 (含水率 99%) 样品中产率分别提高了 54%和 162%。由于随着发酵过程的不断进行，伴孢晶体不断溶解于发酵液中使体系 pH 值上升，因此半固态样品中较高的 pH 值和较快的 pH 值上升速度也同样印证了半固态样品具有较高的伴孢晶体产率 (图 2) ^[21]。

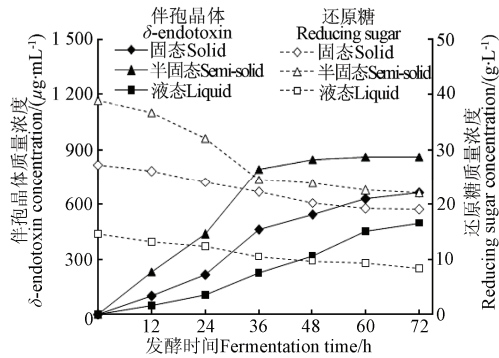


图1 三种发酵体系中伴孢晶体和还原糖的变化趋势

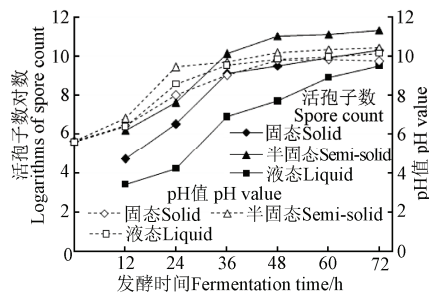
Fig.1 Variation of δ -endotoxin and reducing sugar under three different water contents

图2 三种发酵体系中活孢子数和 pH 值的变化趋势

Fig.2 Variation of visible cells and pH value under three different water contents

由图 1 也可看出,在发酵初始时期,半固态发酵体系中可溶性还原糖的浓度最高^[22]。这是由于餐厨垃圾的灭菌过程为淀粉的水解提供了良好的条件,餐厨垃圾中含有丰富的有机酸作为催化剂,在高温高压过程下,体系中的淀粉逐渐水解生成葡萄糖,该方法在工业上称为酸解法。有研究指出,在使用酸解法水解淀粉的过程中,淀粉的浓度不宜过高,过高会使淀粉的转化率下降^[23]。由于固态体系中自由水的含量太少,致使灭菌过程中淀粉的水解过程没有半固态体系的彻底,而液态体系中过多的自由水又稀释了体系中的还原糖含量,造成固态体系和液态体系的初始还原糖浓度与半固态体系相比均较低。

发酵结束后,3 种发酵条件下伴孢晶体产量相差较大,因此对其进行了统计学分析,结果表明:不同发酵状态下的 F 校值=7.69,介于 $F_{0.05}(2,6)$ 与 $F_{0.01}(2,6)$ 之间,说明餐厨垃圾含水率对伴孢晶体产率有显著影响,半固态发酵体系的样品伴孢晶体产量最多,含水率过高或过低均会降低伴孢晶体产量。

同时,苏云金芽孢杆菌数量随发酵时间的延长而增加,发酵 36 h 后半固态发酵体系中的活孢子数达到了 2.17×10^{11} ,远远超过固态发酵 (4.23×10^{10}) 与液态发酵 (3.37×10^9) 体系中孢子的数量。由此可见,与固态发酵相比,半固态发酵具有更好的传质效率和更均一的物化特性,使得底物能够更充分的水解从而更加便于体系中的微生物的吸收利用,其抵抗体系中底物抑制与产物抑制的能力也更强^[24]。而对液态发酵来说,半固态发酵的优势主要在于其体系具有更高的底物浓度与菌种浓度,从而使后续的提纯过程简便易行。

2.2 影响伴孢晶体稳定性的因素分析

2.2.1 含盐量对伴孢晶体稳定性的影响

伴孢晶体是一种毒性蛋白质,有研究表明^[25]在体系中加入稀浓度的盐可促进蛋白质溶解,同时稀盐溶液中盐离子与蛋白质部分结合,具有保护蛋白质不易变性的优点,但含盐量过高时,可降低蛋白质的溶解度,使得蛋白质发生沉淀。

表 1 结果所示餐厨垃圾中含盐量最高达 4%,因此本试验选定不同水平的含盐量进行,结果如图 3。伴孢晶体在含盐量 0~3% 的溶液中静置 48 h 内毒力效价呈现缓慢降低趋势,但当体系中含盐量超过 4% 时,伴孢晶体的毒力效价在 6 h 后迅速下降,同时溶液中出现少部分沉淀物质。伴孢晶体在各含盐量下得到的 F 值=2.81 介于 $F_{0.10}(5,12)$ 与 $F_{0.05}(5,12)$ 之间,说明含盐量对伴孢晶体有一定影响,但其影响并不显著。

上述结论表明,当体系中的含盐量在 0~3% 时,对体系中伴孢晶体的基本不产生影响,相反低浓度的含盐量能加速伴孢晶体蛋白溶解,使溶液变得更澄清,当含盐量增加至 4%~5% 甚至更高时,盐离子会慢慢夺取伴孢晶体蛋白表面的水分子,破坏其表面的水化膜,并中和电荷,加速蛋白沉淀,使蛋白发生不可逆变性,进而影响伴孢晶体的稳定性。

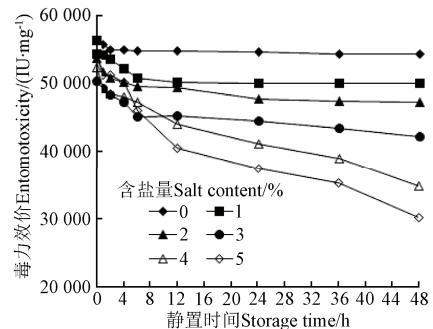


图3 不同含盐量下伴孢晶体毒力效价的变化

Fig.3 Variation of entomotoxicity of Bt under different salt contents

2.2.2 温度对伴孢晶体稳定性的影响

伴孢晶体是由多种氨基酸通过肽键构成的高分子化合物,其内有非常多的氢键,不同氢键对蛋白质构象的影响大小而不同。一般来说,适当的提高温度有利于伴孢晶体溶解,但温度过高时会使氢键受到破坏,致使伴孢晶体变性失活^[26],可见温度的变化对于伴孢晶体的稳定性至关重要。图 4 为不同温度下伴孢晶体毒力效价变化情况。

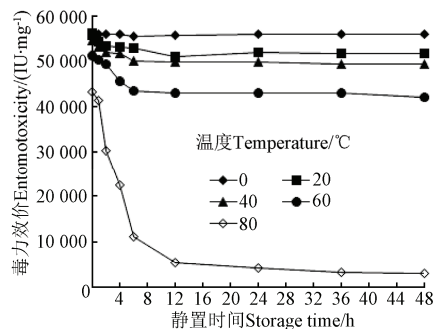


图4 不同温度下 Bt 生物农药毒力效价变化

Fig.4 Variation of entomotoxicity of Bt under different temperature

由图4所示,伴孢晶体悬浮液在0~40℃时毒力效价在整个过程中变化趋势较为平缓,温度处于60℃以上时,毒力效价开始呈现下降趋势,当温度达到80℃时,毒力效价在12 h后降低了90%,这是因为组成伴孢晶体蛋白的肽键因受到过分的热振荡而引起氢键破坏,使得伴孢晶体失活,因而其毒力效价下降较快^[23]。

从统计学角度来看,不同温度下的 F 检验值=4.56,介于 $F_{0.05}(4,10)$ 与 $F_{0.01}(4,10)$ 之间,说明温度对伴孢晶体稳定性影响显著,进一步用 t 检验法分析0、20、40与60℃间的数据差异,得到的样本离差分别为2.56、1.98及3.01均小于临界值3.182。因此可见,在温度低于60℃时,温度对伴孢晶体稳定性影响的差异并不显著,而温度达到80℃的体系会对伴孢晶体的稳定性造成显著影响。

2.2.3 pH值对伴孢晶体稳定性的影响

pH值可以影响伴孢晶体蛋白表面等电点位,而强酸、强碱可引起蛋白质表面必需基团的电离,由于组成蛋白质的各种氨基酸残基所带电荷的相互吸引或排斥使得蛋白质的空间结构发生较大变化,造成蛋白质分子聚集,导致不可逆失活。图5表示不同pH值下伴孢晶体毒力效价的变化。

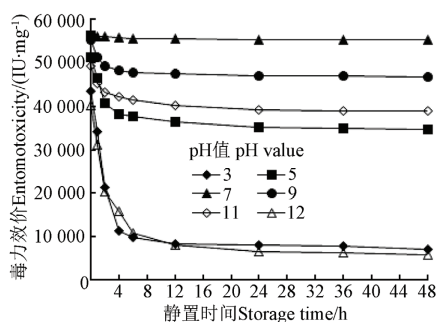


图5 不同pH值下伴孢晶体毒力效价变化

Fig.5 Variation of entomotoxicity of Bt under different pH

pH值处于中性(pH值=7)时,整个过程中毒力效价变化不明显,当体pH值偏酸(pH值=5)或偏碱(pH值=9,11)时,伴孢晶体的毒力效价出现小幅度下降,但当伴孢晶体处于强酸(pH值=3)或强碱(pH值=12)体系时,毒力效价迅速降低,这是因为强酸能使伴孢晶体蛋白氢键断裂,同时可使 COO^- 基变为 COOH 基,破坏盐键,使得其发生结构和功能的不可逆改变,强碱也能使晶体蛋白氢键断裂,同时可以和游离的 NH_3^+ 基结合($-\text{NH}_3^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_2-$)而破坏盐键,致使晶体蛋白变性失活,发生不可逆的破坏^[24]。

从统计学角度分析来看,不同pH值下的 F 检验值=4.92,介于 $F_{0.05}(5,12)$ 与 $F_{0.01}(5,12)$ 之间,表明pH值对伴孢晶体有显著性影响,进而分析不同pH值组间的数据差异性,得到的检验值 P 值均小于0.05,说明不同pH值下的数据存在显著性差异。

2.2.4 紫外线对伴孢晶体稳定性的影响

阳光中的紫外线是降低苏云金芽孢杆菌制剂田间防治效果的首要因素,有报道称甘蓝叶上的芽孢经紫外灯(36 W, 40 cm)照射10 min,失活率可达99%以上,伴

孢晶体对紫外线的敏感性虽然比芽孢低,但经过一段时间的紫外照射,伴孢晶体也基本上失去活性^[14]。图6为紫外照射时间对毒力效价的影响。

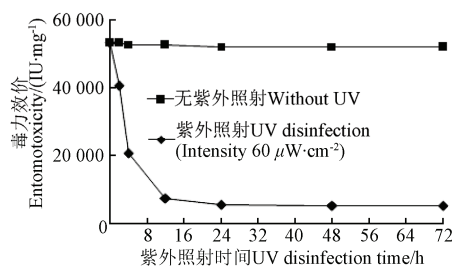


图6 不同紫外照射时间下Bt生物农药毒力效价变化

Fig.6 Variation of entomotoxicity of Bt under different illumination time

如图6可知,伴孢晶体经过紫外线照射后,毒力效价下降较快,照射12 h毒力效价下降了86%。分析两组数据的 F 检验值=34.27 $>F_{0.01}(1,4)$,说明紫外线对伴孢晶体的毒力效价有极显著影响,2组数据计算所得的 P 值为 $0.012 < 0.05$,表明2组数据存在显著差异。导致这种显著性差异的原因是紫外线照射能破坏伴孢晶体蛋白分子中的氢键,影响晶体蛋白的一级结构和立体结构,导致伴孢晶体的表面结构和形态发生变化,从而使晶体蛋白变性、变脆,难溶于昆虫的胃液,不能降解为具有杀虫活性的毒素蛋白,进而失去杀虫活力^[27]。

2.3 利用聚乳酸为缓释材料优化伴孢晶体的稳定性

上述试验得出:在可能对伴孢晶体稳定性造成影响的因素中,紫外线的影响最为显著,且无法通过调整试验条件缓解其影响,为提高伴孢晶体原粉的抗紫外能力,本试验以聚乳酸为缓释材料,将伴孢晶体原粉包覆在聚乳酸材料内以抵抗紫外线的影响,而聚乳酸具有良好的生物相容性以及生物可降解性,其最终降解产物乳酸,具有无毒无副作用的特点^[28],从而能够弥补生物农药在使用过程中稳定性差的缺点^[29]。图7为经聚乳酸包覆后紫外线对伴孢晶体稳定性的影响。

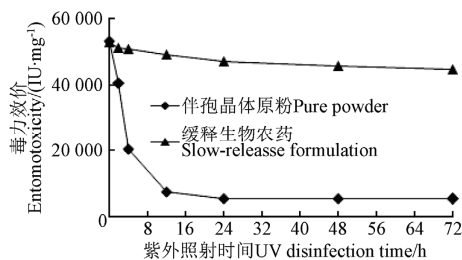


图7 经过缓释后不同紫外照射下对伴孢晶体毒力效价影响

Fig.7 Influence of entomotoxicity of Bt under different illumination time after slow-release

图7所示,缓释农药紫外照射12 h后毒力效价基本不变,72 h后毒力效价仅下降了15%,相比之下,未经聚乳酸包覆的伴孢晶体原粉在紫外照射2 h后毒力效价下降了24%,此举说明伴孢晶体原粉在聚乳酸的包覆下能很好地抵挡紫外线,保持伴孢晶体的稳定性,从而保证生物农药的活性及稳定性。

为进一步考察以聚乳酸为载体的缓释体的释放性能,进行了为期 30 d 的缓释试验,试验结果见图 8。

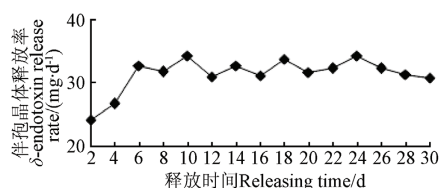


图 8 聚乳酸与伴孢晶体质量比 1:3 时伴孢晶体释放量随时间的变化
Fig.8 δ -endotoxin release rate with quality proportion of poly(lactic acid) and δ -endotoxin is 1:3

如图 8 所示,在整个释放周期内,前 6 天伴孢晶体释放量呈现较快的增长趋势,之后进入较稳定的释放状态,释放量仅存在微小波动,说明聚乳酸缓释体起到了良好的缓释作用,能够保证在至少 30 d 的释放周期内稳定地释放伴孢晶体,释放周期结束后伴孢晶体释放率超过 75%。

3 结 论

1) 通过对比固态、半固态及液态 3 种发酵方式的发酵效果,结果表明半固态发酵体系中目标产物伴孢晶体产率最高,与传统方式相比具有明显的优越性。

2) 考察含盐量、pH 值、温度及紫外线 4 个因子对伴孢晶体稳定性的影响,结果表明含盐量对伴孢晶体有一定影响但并不显著,pH 值及温度对伴孢晶体有显著影响,而紫外线对伴孢晶体有极显著影响,经紫外线照射 12 h 后毒力效价下降了 86%,说明伴孢晶体对紫外线最为敏感。

3) 利用聚乳酸制备的伴孢晶体缓释体能有效抵抗紫外线,在紫外线下 72 h 后毒力效价仅下降 15%,较未经处理的伴孢晶体原粉抗紫外能力提高了近 10 倍,且缓释体在 30 d 的周期内能稳定释放伴孢晶体,起到了良好的缓释作用,为 Bt 生物农药的工业化应用提供了有效途径,应用前景广阔。

参 考 文 献

- Burges H D, Hussey N W. Microbiol control of insects and mites[J]. Academic Press, New York and London, 1971.
- Benoit T G, Wilson G R, Baugh C L. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1[J]. Appl Microbiol, 1990, 10: 1518.
- Brar S K, Verma M, Tyagi R D, et al. *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge-Rheology and formulation studies[J]. Chemosphere, 2007, 67: 674—683.
- Adams T T, Eiteman M A, Hanel B M. Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents[J]. Bioresource Technology, 2002, 82(1): 33—41.
- 杜雷, 赵高岭, 席宇, 等. 烟梗废料固态发酵生产苏云金芽孢杆菌的适宜条件筛选[J]. 烟草科技, 2011(12): 69—72.
- Du Lei, Zhao Gaoling, Xi Yu, et al. Screening of solid state fermentation conditions of waste stem for producing *Bacillus Thuringiensis*[J]. Tobacco Science & Technology, 2011, 12: 69—72. (in Chinese with English abstract)
- Zhuang Li, Zhou Shungui, Wang Yueqiang, et al. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(7): 4820—4826.
- Wang X Q, Wang Q H, Ma H Z, et al. Lactic acid fermentation of food waste using integrated glucoamylase production[J]. J Chem Technol. Biotechnol, 2009, 84: 139—143.
- 张玮玮. 以沼渣为原料固态发酵生产 Bt 生物农药[J]. 农业工程学报, 2013, 29(8): 212—217.
- Zhang Weiwei, Gong Aijun, Qiu Lina, et al. Solid state fermentation of biogas residues for production of *Bacillus Thuringiensis* based bio-pesticide[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2013, 29(8): 212—217. (in Chinese with English abstract)
- Poopathi S, Abidha S. Use of feather-based culture media for the production of mosquitocidal bacteria[J]. Biocontrol, 2007, 43: 49—55.
- El-Bendary M A. Production of mosquitocidal *Bacillus sphaericus* by solid state fermentation using agricultural wastes[J]. World J Microbiol. Biotechnol, 2010, 26: 153—159.
- Holmberg A, Sievanen R. Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin Production: Process analysis study[J]. Biotechnol Bioeng, 1980, 22: 1707—1724.
- 马鸿志, 宫利娟, 汪群慧, 等. Plackett-Burman 试验设计优化餐厨垃圾发酵产燃料酒精的研究[J]. 环境科学, 2008, 29(5): 1452—1456.
- Ma Hongzhi, Gong Lijuan, Wang Qunhui, et al. Optimization of fuel ethanol production from kitchen waste by plackett-burman design[J]. Environmental Science, 2008, 29(5): 1452—1456. (in Chinese with English abstract)
- 周建强, 方海兰, 朱丽, 等. 3 种测定餐厨垃圾中氯离子含量的方法比较[J]. 上海农业学报, 2014, 30(3): 45—48.
- Zhou Jianqiang, Fang Hailan, Zhu Li, et al. Comparison of three methods for determining the content of chloride ion in food waste[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2014, 30(3): 45—48. (in Chinese with English abstract)
- 崔云龙, 田明, 邵宗泽. 紫外线使苏云金芽孢杆菌伴孢晶体失活机理的研究[J]. 微生物学通报, 2003, 28(4): 193—197.
- 游红, 镇达, 徐家文, 等. 苏云金芽孢杆菌微胶囊剂的制备及其抗紫外线降解活性研究[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(11): 1288—1291.
- Navon A, Keren S, Levski S, et al. Granular feeding baits based on *Bacillus thuringiensis* products for the control of lepidopterous pests[J]. Phytoparasitica, 1997, 25: S101—S110.
- 王子佳, 李红梅, 弓爱君, 等. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的制备[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(9): 56—58.
- Wang Zijia, Li HongMei, Gong Aijun, et al. Preparation of Crystal Protein from *Bacillus Thuringiensis*[J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(9): 56—58. (in Chinese with English abstract)
- 陈洪章. 现代固态发酵技术-理论与实践[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- Zhang W W, Qiu L N, Gong A J, et al. Solid-state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based bio-pesticide[J]. Bioresource, 2013(8): 1124—1135.
- Naveena B J, Altaf M, Bhadrappa K, et al. Production of L⁽⁺⁾-lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran[J]. Food Technol Biotechnol, 2004, 42: 147—152.
- 韩北忠. 发酵工程. 中国轻工业出版社, 2013.
- Economou C N, Makri A, Aggelis G, et al. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil[J]. Bioresour Technol, 2010, 101: 1385—1388.
- 史双枝, 陈复生, 赵俊廷. 温度和盐离子强度对蛋白质和 AOT 分离及相互作用的影响[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2006, 25(5): 9—12.
- Shi Shuangzhi, Chen Fusheng, Zhao Junting, et al. The

- influence of temperature and NaCl ionic intension on the separation and combination of protein and aot[J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition, 2006, 25(5):9—12. (in Chinese with English abstract)
- [24] 许长明. 温度对航空煤油中微生物生长繁殖的影响[J]. 石油化工腐蚀与护, 2011, 28(1): 23—25.
- [25] Marcel J I. The influence of salt and temperature on the natural fermentation of African locust bean[J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 8:133—139.
- [26] 李淑艳, 王建中. 萌发 pH 值对大豆种子蛋白质代谢的影响研究[J]. 种子, 2009, 28(3): 1—8.
Li Shuyan, Wang Jianzhong. Study the effect of pH on protein metabolism during germination of soybean seed[J]. Seed, 2009, 28(3): 1—8. (in Chinese with English abstract)
- [27] Ignoffo C M, Hostetter D L, Sikorowski P P, et al. Inactivation of representative species of entomo-pathogenic viruses, a bacterium, fungi and protozoan by an ultraviolet light source[J]. Environ Entomli, 2007, 6(3): 411—415.
- [28] Zhao J, Wilk R M. Low molecular weight polylactic acid as amatrix for the delayed release of pesticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53: 4076—4082.
- [29] 郭瑞峰, 黄彬彬, 杨晓伟, 等. 毒死蜱-聚乳酸微球的制备及其性能评价[J]. 农药学学报, 2011, 13(4): 409—414.
Guo Ruifeng, Huang Binbin, Yang Xiaowei, et al. Preparation and characteristics analysis of microspheres of chlorpyrifos and polylactic acid[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2005, 53: 4076—4082. (in Chinese with English abstract)

Bt biopesticide produced by semi-solid state fermentation from kitchen waste and its stability

Zou Hui^{1,2}, Zhang Wenyu^{1*}, Jiang Lin¹, Yao Juejun¹, Liang Jing¹, Wang Qunhui²

(1. Beijing Key Laboratory for Risk Modeling and Remediation of Contaminated Sites, Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection, Beijing 100037, China; 2. Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Kitchen garbage is usually discharged from restaurants, public catering rooms and school canteens, and it is reported that 2000 t kitchen garbage would be produced per day in Beijing, China. In other big cities similar phenomena can be observed, and it is reported that half of the municipal waste is composed of kitchen garbage. Kitchen garbage is characterized by high moisture content, easily deteriorating and abundant in nutrition, but it should be treated as a kind of resource rather than simple waste because it is mainly composed of starch, protein, cellulose, fat, and trace element, such as potassium (K), sodium (Na), calcium (Ca), magnesium (Mg), and iron (Fe); kitchen garbage can be regarded as a suitable substrate for microbial growth. In this research, kitchen garbage was used as the raw material to produce *Bacillus thuringiensis* (Bt) bio-pesticide which is one of the most commonly used and extensively studied bio-pesticides because of its various field applications, such as in agriculture, forestry, and public health sectors. However, the costly raw materials, high equipment investment, and complicated operation procedures in traditional Bt production process have seriously constrained its use at the industrial production scale. In this work we conducted to determine the potential and superiority of using kitchen garbage for Bt bio-pesticide production through semi-solid fermentation to reduce the production cost, and the effects of several parameters on the stability of the product were also studied. In this work, the semi-solid state sample with 75% water content presented the highest δ -endotoxin efficiency of 833 $\mu\text{g/mL}$, which increased by 54% compared to that of the solid-state sample (water content of 50%) and 162% compared to that of the submerged sample (water content of 99%), and proved that using kitchen garbage as the raw material for Bt production through semi-solid state fermentation has obvious advantages compared with traditional techniques and some similar studies. Mainly because of its nutritious substrate and effective fermentation mode, this technology can not only solve the problem of civil solid waste pollution but also bring a cost-effective resource for Bt bio-pesticide production. Among the main affecting factors during Bt bio-pesticide manufacturing and application, salinity, pH value and temperature had the minimal impact on the stability of the parasporal crystal; when these 3 factors were controlled at 3%, 11 and 60 °C, respectively, the entomotoxicity of parasporal crystal could still remain above 70% after the fermentation of less for 48 h, and therefore common fermentation process would not inactivate the goal product sharply. By contrast, ultraviolet irradiation had more significant impact on parasporal crystal's stability, and the entomotoxicity of parasporal crystal declined by 50% when exposed to the ultraviolet (36 W, 60 $\mu\text{W/cm}^2$, 40 cm) for about 3 h. On account of this, polylactic acid was used as the carrier to produce Bt slow-release formulation to mitigate the effects of ultraviolet. Experiments showed that the activity of Bt slow-release formulation remained over 75% of its initial value after 72 h ultraviolet irradiation, which was 10 times the untreated parasporal crystal. And the release rates of parasporal crystal in formulation were generally metastable in a 30-day period, and the compact structure of polylactic acid was proven to effectively protect δ -endotoxin from ultraviolet damage.

Keywords: fermentation; wastes; pesticides; *Bacillus thuringiensis*; entomotoxicity