

# 生物农药苏云金芽孢杆菌的研究进展

朱玮, 赵兵, 王晓东, 王玉春

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)制剂是目前应用广泛而有效的一种微生物杀虫剂。本文介绍了苏云金芽孢杆菌的菌种优选、发酵过程及剂型研究进展, 具体阐述了发酵过程中培养基和发酵条件的优化、各种发酵方式和发酵设备等。指出了目前发酵生产苏云金芽孢杆菌中存在的问题, 提出了解决问题的建议并展望了其发展前景。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; 杀虫晶体蛋白; 微生物杀虫剂

**中图分类号:** S476<sup>+</sup>.11    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1009-606X(2004)03-0282-07

## 1 前言

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)于1901年在日本被发现, 1911年由柏林纳从地中海粉螟的患病幼虫中分离出来, 并依其发现地点德国苏云金省而命名。苏云金芽孢杆菌简称苏云金杆菌, 是内生芽孢的革兰氏阳性土壤细菌, 在芽孢形成初期会形成杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein), 对敏感昆虫有特异性的防治作用。1956年前苏联发表了用液体培养基摇瓶培养苏云金杆菌并用于防治菜青虫的报道, 从而揭开了苏云金杆菌大规模培养的序幕。中国从上世纪60年代也开始了规模化生产。同苏云金杆菌有关的研究, 特别是有关分子生物学方面的研究正在持续展开, 但在发酵工艺方面还需进一步加强。

随着人们的环保意识不断增强, 生物农药正在引起越来越多的关注。苏云金杆菌制剂克服了传统化学农药污染环境、危害人畜、易产生抗性等优点, 具有选择性强、安全、原料简单等优点, 在生物杀虫剂市场中所占份额也日益增加<sup>[1-3]</sup>。

## 2 苏云金杆菌的优选

近30年来已从世界各地的土壤、昆虫及其接触物中分离出大量苏云金杆菌的菌种。现在大约已知有69个血清型, 82个血清亚种<sup>[4]</sup>。大多数生产厂家主要使用血清III型、V型、VII型菌株, 包括HD-1, Bt-K, 8010等。在连续的人工转接和生产中, 苏云金杆菌会出现芽孢和晶体变小和数量减少、生长速度缓慢等退化性状, 一般采用虫体复壮的方法重新得到高毒力的菌株。

针对苏云金杆菌菌种发酵效价低、杀虫谱窄、见效慢、菌种退化等问题, 可以采用诱变的方法筛选高毒力的菌株。选择合适的诱变剂量, 将化学诱变和物理诱变结合能显著提高突变率。丁学知等<sup>[5]</sup>将菌株701<sup>2C</sup>经紫外线和两次亚硝基胍的交替复合诱变, 菌株的毒力与原始菌株相比提高了7.5倍。

目前许多科学家致力于采用遗传工程的办法, 对原有的ICP基因重组改造, 构建成杂种基因或工程菌, 以提高杀虫效率, 扩大杀虫谱, 延长有效期或改进制剂效能。商品化的苏云金杆菌杀虫剂主要源自库斯塔克亚种, 如HD-1及类似菌株。将cry1C基因导入这类菌株后, 可扩充其对甜菜

夜蛾等灰翅夜蛾属昆虫的活性,开发出的产品或制剂有美国的 Cutlass 和我国的 WG 系列和 BtTnY。国内一些实验也证明,表达后对夜蛾科昆虫有毒效的 cry1E、对双翅目昆虫有效的 cry11A 及对蚊子有毒效的 cry11A 等基因,均可在构建菌株中有效表达,为进一步建立广谱的工程菌打下了基础。除了广谱杀虫工程菌,提高杀虫活性的工程菌、延缓抗性的工程菌、延长持效期的工程菌等也已研制成功<sup>[6-8]</sup>。此外,还可以在体外操作 ICP 基因后插入新载体,其中包括将 cry 基因转入假单孢菌以增加持效期、转入植物内生菌防治玉米螟、转入蓝细菌以增强水体中防蚊功能、转入杆状病毒杀虫剂以利用病毒的垂直传播的特性等。与传统育种方法相比,构建的工程菌不仅能提高自身性状,而且可以有目的、定向地增加新的性状。这些工程菌有的已开发出制剂并投入田间应用,有的还处于研究阶段,它们的应用效果和开发前景还有待实践检验。虽然大量的苏云金芽孢杆菌基因已进行过序列分析,但毒性受体、作用机制及抗性机制综合研究还很有必要。苏云金杆菌工程菌建立后,还需考察其基因表达量、遗传稳定性以及生产工艺<sup>[9]</sup>。

### 3 苏云金杆菌的发酵工艺

苏云金芽孢杆菌发酵生产包括液态发酵和固态发酵两种方式。

#### 3.1 液态发酵

液体发酵是目前苏云金杆菌杀虫剂大规模生产中的主要发酵方式,其产品杀虫毒力与其发酵水平有着密切的关系。发酵过程的研究主要集中在培养基组份和浓度、培养过程的通气量、温度、溶解氧量等因素对芽孢数、伴孢晶体及毒力效价影响的相关性研究上。

##### 3.1.1 培养基的优化

Yousten 等<sup>[10]</sup>, Rogoff 等<sup>[11]</sup>, Nickerson 等<sup>[12]</sup>对苏云金杆菌的基本营养需要、代谢途径、伴孢晶体形成和抑制伴孢晶体形成的因素等作了研究,为苏云金杆菌制剂的生产提供了生理学依据<sup>[13,14]</sup>。苏云金杆菌对培养基的要求不严,多种因地制宜的农副产品都可被其吸收利用,但对多种不同来源的复合培养基,不同的菌种要实现可行的工业生产需要有针对性地进行培养基优化。Dulmage<sup>[15]</sup>在研究两种培养基对 12 个亚种的影响后发现,不同亚种在同一培养基中或同一亚种在不同培养基中,产生的活芽孢数和杀虫活性会相差几倍到几百倍不等。因此,菌种和培养基组份均对发酵产品的毒力效价有重要影响。为了获得高效价水平的发酵培养基配方,研究人员相继采用正交设计、快速登高法、优选法或二次正交旋转组织设计等方法进行优化筛选,验证后用于工业生产。

在深层液态发酵中,培养基的浓度和碳氮比很重要。早期研究发现<sup>[16]</sup>,随培养基营养成分浓度增加,芽孢数和毒蛋白随之增加。Arcas 等<sup>[17]</sup>将培养基中的葡萄糖浓度从 8 g/L 增加到 56 g/L 后,毒力水平和芽孢数也分别提高了 6 和 7 倍。但是浓度过高会抑制其生长,不能形成正常的芽孢和毒蛋白。培养基浓度在一定范围内增加,必需营养元素浓度加大,有利于细胞的生长和芽孢的生成;而当培养基浓度过大,粘度增加,物质交换速度下降,局部代谢产物不能及时排出,氧传递速度降低,苏云金杆菌的生长受到抑制,芽孢数也随之下降。

保持合适的碳氮比对高效价产品生产也很关键,不合适的碳氮比会导致 pH 不能回升而影响最终产量。在半合成培养基中,苏云金杆菌在对数生长期由于利用葡萄糖产生丙酮酸、醋酸,pH 下降到 4.8~5.0,几小时后这些物质再次被利用,pH 回升,芽孢和晶体开始形成。如果对数生长期后 pH 不能回升而一直在 6.0 以下,芽孢和晶体都不能形成。苏云金杆菌在芽孢形成的初始阶段,菌体合成一种胞外蛋白酶,参与伴孢晶体的蛋白质转化合成过程,而这种酶的合成和酶活性最适 pH 均为中性,pH 在 6.5 以下或 9.1 以上该酶活性急剧下降,丧失形成这种酶的能力的变异株既不

能形成芽孢也不能形成晶体<sup>[14]</sup>。

在培养基优化时要综合考虑碳氮比和营养物浓度这两个因素。不同的菌种有不同的生理特性和相应的营养需求<sup>[18-20]</sup>。Farrera 等<sup>[21]</sup>在培养基碳氮比为 3~11 和培养基浓度 60~150 g/L 条件下分别对苏云金杆菌 HD-73 实验,发现当碳氮比为 7 时,不同浓度条件下毒蛋白产量都是最高,而培养基浓度每增加 2.5 倍,毒蛋白量增加 6 倍,芽孢数则在碳氮比为 4、培养基浓度为 150 g/L 时最多。

一些微量元素对苏云金杆菌的发酵也有明显的作用。苏云金杆菌生长繁殖过程中,糖的初级异化是通过 E-M 途径进入 TCA 循环的,因此  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  是 E-M-P 途径中磷酸化过程不可缺少的物质; $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的缓冲作用有利于芽孢和晶体的形成<sup>[14]</sup>。矿物质钙元素也是苏云金芽孢杆菌必需的元素。 $\text{Ca}^{2+}$  在芽孢皮层形成时与 DPA 结合形成 DPA-Ca 复合物,促使形成不可逆热稳定芽孢,而且明显影响伴孢晶体的外蛋白酶的合成。

苏云金杆菌培养基还可利用碳氮源丰富的工业废水进行生产<sup>[22-25]</sup>。例如,味精厂高浓度有机废水本身含有丰富的氮源,酒糟废液中富含未被利用的碳水化合物、脂肪、灰份、氨基酸和多种维生素。逐渐提高废水浓度和浓缩倍数的方法可使苏云金杆菌适应恶劣的废水培养环境,获得在废水中正常生长且具有高毒力单位的驯化菌株。在使用废水前进行预处理也很重要, Maria 等<sup>[26]</sup>以 7 种不同来源的废水交替作为生产苏云金杆菌的培养基,用作培养基的废水包括未经预处理、酸水解处理和水解污泥离心后的上清液,结果发现酸水解处理的培养基毒蛋白产量提高。这样的发酵过程不仅节约能源,降低了生产成本,而且在治理环境的同时变废为宝。

### 3.1.2 发酵条件

目前苏云金杆菌的培养温度多采用  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 温度低于  $28^\circ\text{C}$  发酵的周期会延长,但温度超过  $37^\circ\text{C}$  时伴孢晶体数量几乎为零。苏云金杆菌在对数生长期要消耗大量的氧气,并相应释放出大量的热量<sup>[27]</sup>。如果中断供氧,细胞停止生长,不能形成芽孢和晶体,最终导致细胞自溶。通气量与供氧直接相关,增加通气量和搅拌速度可以加速氧传递、代谢物质的交换及热量的释放,具体的数值需根据发酵设备、容量、培养基成份和菌体不同的生长阶段确定。

### 3.1.3 发酵方式

液态发酵有分批发酵、补料分批发酵、连续发酵等方式。分批发酵一次性投料和放罐,产品质量比较稳定,设备和操作技术水平要求不高,目前很多厂家都采用这种方式。但要达到较高的发酵水平,需要使用高浓度培养基。在一次性投料时,高浓度培养液容易产生基质和代谢产物的抑制,同时培养基的粘度增加后,由于影响混合和流动而不利于氧的传递。苏云金杆菌是快速好氧菌,若氧气供应不足生长繁殖就会受到很大影响,因此单纯的分批发酵难以实现细胞的高密度培养。连续发酵可以解决发酵中存在的这种问题。由于一级连续发酵芽孢形成率低,研究者尝试使用第一级连续第二级间歇的二级发酵方法以及变温二级发酵。Acras 等<sup>[17]</sup>用梯度连续流加的方法也使芽孢晶体增加 1 倍多。但经过较长时间的连续培养后很容易染菌,菌种易发生退化,因此要实现大规模的连续发酵生产仍然存在很多问题,不仅有一定的设备要求,还需要较高的操作技术。

补料高密度培养介于分批培养和连续培养之间,兼有两者的优点,而又克服了两者的缺点。多组实验表明<sup>[28]</sup>,在其它条件相同的情况下,补料发酵的细胞密度、晶体含量和毒力效价综合平均值高于分批发酵。寻求最佳的补料时间和流加速率十分重要,对不同的物料和菌种及生产目的,可有多种方案。在发酵过程中,淀粉首先被液化酶分解为低分子糖,再被利用。发酵 4~8 h 细胞吸收养份,个体增大并且分裂增殖合成蛋白质核酸、碳源等能源物质消耗较快。针对葡萄糖的消耗情况,在发酵中可以适时适量地添加葡萄糖,在工业生产也可以使用淀粉液化液达到同样效果。补料发

酵的需氧高峰相对平缓,在生长旺盛期较易避免溶氧低谷,对生产过程改善溶氧从而确保高密度培养具有实际意义<sup>[29,30]</sup>。

#### 3.1.4 发酵设备

苏云金杆菌的液态发酵设备主要参照传统的抗生素发酵生产模式建立。发酵过程中的不同阶段耗氧速率各不相同,发酵过程往往会出现低于临界溶氧值的缺氧期,因此加快溶氧速率是工业生产中需要解决的问题。使用传统的机械搅拌罐可以变速搅拌,在细胞增殖前期和后期采用低转速搅拌,中期采用高速搅拌,不同时期的最佳转速应根据溶氧曲线的变化进行调整<sup>[31]</sup>。但机械搅拌罐受结构限制,罐体高径比小,不能较多地利用无菌空气中的氧气。最近几年新出现的气升式发酵罐无机械搅拌装置,它利用空气作为搅拌动力,使罐内的不同区域形成密度差和宏观循环流得以混合。它具有结构简单、无运动部件、无菌操作可靠性高、耗电少、造价低等优点,适合苏云金杆菌的发酵。李稳宏等<sup>[32]</sup>将冷模实验中优化选择出的外环流气升式反应器与机械搅拌罐作平行实验,结果表明该工艺不仅操作方便、控温精度高,与普通的机械搅拌发酵罐相比,在规模和培养基等条件相同的情况下,发酵周期由 42 h 缩短到 33 h,细胞密度增加了 35%。杨建州<sup>[33]</sup>的发酵实验表明,折流元件可改善环流反应器的发酵性能,并将研究结果放大到 20 m<sup>3</sup>的气升式环流反应器中,与工厂同等规模的搅拌式发酵罐相比,在完全省去搅拌功耗又不增加空气用量的条件下,菌体密度在 10<sup>10</sup> ml<sup>-1</sup> 以上,发酵液的毒力效价高于在机械搅拌式发酵罐内的发酵结果约 10%,并且节电 30%以上。

#### 3.2 固态发酵

固态发酵起源于我国传统的“制曲”技术,是利用颗粒载体表面所吸附的营养物质来培养微生物。在相对小的空间内,这种颗粒载体可提供相当大的液气界面,从而满足好气微生物增殖所需要的水份、氧气和营养。Mechalas<sup>[34]</sup>取得了苏云金杆菌的固体发酵专利权。简单的固态发酵通常是将含有活芽孢的菌粉或种子液加入培养基,根据自然气候状态在网盘、大池或地坪进行半封闭的发酵,虽然成本低,但是设备简陋,条件粗糙,生产质量低。随着人们对固态发酵苏云金杆菌特有优势的认识和研究的深入,这项技术逐渐成熟。研究发现液体种子培养基初始 pH 值、种龄、发酵温度、固体培养基含水量、微量元素等都是影响芽孢形成和毒力效价的重要因素。控制含水量可协调发酵过程菌体周围的气液环境,发酵基质中若含水量过大则芽孢、晶体游离晚,发酵周期延长;含水量少则扩散阻力使局部代谢产物积累过多,吸收不到营养物质,物料的高粘度还会影响通风和菌体对氧气的利用,减少了固态发酵液气界面的优势,导致发酵受到抑制。其它条件如 pH 值、种龄、发酵温度等可借鉴液态发酵。杨淑兰等<sup>[35]</sup>通过苏云金杆菌从实验室实验到百公斤级固体发酵实验,研究了适合苏云金杆菌 HD-1 固体发酵规模生产的各种条件。

能用于苏云金杆菌固态发酵的原材料很广泛,但选择时既要考虑到材料的营养性,也要考虑到它的通气性。通常可分为有机载体和无机载体。有机载体如麦麸、米糠、黄豆饼粉、花生饼粉等,这些载体本身就是很好的碳氮源;无机载体如多孔珍珠岩、细沙等,这些则需要另外添加营养成分。在使用时往往是根据需要结合起来,可以因地制宜地选择一些材料。张怡等<sup>[36]</sup>尝试使用废次烟草为主要材料,与麸皮相比,可降低粘度,增加孔隙率。但考虑到植物叶的挥发性物质对菌种生理生化的影响,还需对烟叶进行浸泡预处理。啤酒糟作为主要原料也可用于苏云金杆菌发酵<sup>[37]</sup>。研究发现不同原料对应的最佳含水量差异也很大。

传统浅盘静止发酵存在诸多缺陷,固体物料的非均一性会带来温度、湿度、氧传递等问题。苏云金杆菌在对数生长期会产生大量的热量,如何使发酵过程中所产热量及时排出,避免料层温度

升高而影响菌体的生长和杀虫蛋白晶体等合成,需要设计科学合理的应用于苏云金杆菌的固态发酵设备.压力脉动发酵<sup>[38]</sup>、全自动固体发酵系统、转鼓发酵、传送带移动式等发酵设备也在不断的研究和应用中,但目前适于大规模固态发酵的先进设备仍然缺乏,成为限制大规模固态发酵生产苏云金杆菌制剂发展的瓶颈.

## 4 产品的剂型

苏云金杆菌制剂常用的剂型包括以水为介质的水悬剂、以有机溶剂为介质的油悬剂和以固体填充剂为介质的可湿性粉剂.近10年来还开发出了水分散性粒剂和胶囊剂等新剂型,已投入使用.应该根据防治对象和所处生态环境选择方便储存和使用的剂型.与化学农药相比,苏云金杆菌制剂安全性增强,但产品的稳定性差,残效期短,杀虫速度慢,而且受施用环境影响大.解决这些问题除了使用合适的剂型外,还可以添加一些辅助剂.为了增加田间残效,目前使用的辅助剂包括由液态发酵产品制成粉剂所需的吸附剂、使菌剂在表面展着的湿润剂、防止芽孢萌发和其它微生物生长的防腐剂、促进昆虫食欲的引诱剂、防紫外的保护剂,还有粘着剂、乳化剂和增效剂等<sup>[2]</sup>.

## 5 存在问题及展望

苏云金杆菌制剂作为微生物农药,要取代化学农药,除了依靠人们生态意识的提高,更要从技术上达到高效价、低成本、规模化,从选育菌种、降低培养基成本、提高发酵控制水平、减少后处理过程中毒效损失等各环节优化.

在发酵及后处理过程中,液态发酵和固态发酵存在各自的优势和缺点.液态发酵的流动性好,有利于传质、传热和控制,但液态深层发酵在溶氧技术和设备方面还有改善的潜力,气升式反应器有望用于苏云金杆菌大规模液态深层发酵.除培养基成本外,发酵液的后处理是制约苏云金杆菌液态发酵生产的重要因素之一.常用的工艺是吸附-压滤法,加入大量碳酸钙作为吸附助滤的载体,占产品质量的80%~90%,造成产品效价低、体积大.还可采用离心、沉淀的方法,但离心工艺需投资高转速的离心设备,且上清液流失了很多有效成份,要求回收.沉淀法简单,但回收效果差,污染环境.加强发酵液后处理研究,提高有效成份回收率对液态深层发酵具有重要意义.

同液态深层发酵相比,苏云金杆菌固态发酵以麸皮等为载体,发酵后可直接进行干燥、粉碎,步骤简单.固态发酵在后处理过程中节省了能源,但产品存在湿润性能较差的问题.国内大部分厂家使用麸皮为主原料,麸皮既是碳源,也是发酵载体,但麸皮粘度大,不利于通风散热,且亲水性差,导致有的产品湿润时间高达十几分钟,达不到三分钟以下的部颁标准.需要寻找新的、廉价的、营养源丰富、通气好、湿润性能强的原料和载体,或选择合适的表面活性剂处理产品,以在不影响发酵水平和毒力效价的情况下缩短湿润时间.苏云金杆菌固态发酵的发酵工艺和设备目前普遍的状况是生产规模小、设备简陋、劳动强度大,由于人工操作造成产品质量不稳定,发酵过程产生的热量不能及时排出而影响了菌体生长和伴孢晶体的形成.固态发酵正在逐步从浅盘发酵向深层发酵发展,从浅盘式半开放式发酵逐步发展成为全封闭、全自动固态发酵,生产过程逐渐实现计算机在线控制,有效地解决了固态发酵过程中的供氧、散热、湿度调节、防止污染等问题.在物料准备、蒸料、接种、发酵及干燥等方面,采用连续蒸料、接种,使用洁净封闭式固态发酵设备,发酵、烘干过程在同一设备中顺序完成,形成完整的自动化生产流水线,可以大大改善生产环境,消除人为因素对产品质量的影响,提高产品毒力效价.

苏云金芽孢杆菌液态发酵与固态发酵各有优点,应因地制宜地选择生产方式.预计在今后一定时期内,苏云金杆菌的液态发酵与固态发酵将共存.

## 参考文献 :

- [1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins [J]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62(3): 775–806.
- [2] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂 [M]. 北京: 农业出版社, 1993. 66–105.
- [3] 格拉泽 AN, 二介堂弘. 微生物生物技术 [M]. 陈守文, 喻子牛, 译. 北京: 科学出版社, 2002. 144–158.
- [4] Lecadet M M, Frachon E, Cosmao D V, et al. Updating the H-antigen Classification of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Appl. Microbiol.*, 1999, 86: 660–672.
- [5] 丁学知, 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育 [J]. *中国生物防治*, 2001, 17(4): 163–166.
- [6] 王清峰, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 cry1E 的改造 [J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(5): 391–395.
- [7] 余健秀, 庞义, 李建华, 等. 利用转座子 Tn917 构建杀虫 Bt 工程菌 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(4): 52–57.
- [8] 孙明, 刘子铎, 李林, 等. 细菌基因工程杀虫剂研究进展 [J]. *中国病毒学*, 2000, 15: 16–23.
- [9] 关雄. 苏云金芽孢杆菌 8010 的研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1997. 19–25.
- [10] Yousten A A, Rogoff M H. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in Relation to Spore and Crystal Formation [J]. *J. Bacteriol.*, 1969, 100(3): 1229–1236.
- [11] Rogoff M H, Yousten A A. *Bacillus thuringiensis*: Microbiological Considerations [J]. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1969, 23: 356–381.
- [12] Nickerson K W, Bulla L A. Lipid Metabolism During Growth, Sporulation, and Germination: An Obligate Nutritional Requirement in *Bacillus thuringiensis* for Compounds that Stimulate Fatty Acid Synthesis [J]. *J. Bacteriol.*, 1975, 123(2): 598–603.
- [13] Benoit T G, Wilson G R, Baugh C L. Fermentation during Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1 [J]. *Lett. in Appl. Microbiol.*, 1990, (10): 15–18.
- [14] 和致中. 碳、氮、磷三因素对苏芸金杆菌的影响 [J]. *微生物学通报*, 1980, (7): 7–10.
- [15] Dulmage H T. Production of the Spore- $\delta$ -endotoxin Complex by Variants of *Bacillus thuringiensis* in Two Fermentation Media [J]. *J. Invertebr. Pathol.*, 1970, 16: 385–389.
- [16] Drake B B. Process for Making Pesticide Compositions [P]. US Patent: 3087865, 1961–06–02.
- [17] Acras J, Yantorno O, Ertola R. Effect of High Concentration of Nutrients on *Bacillus thuringiensis* Culture [J]. *Biotechnol. Lett.*, 1987, 9(2): 105–110.
- [18] 张俊亭, 李治祥, 张克强, 等. 微生物杀虫剂苏云金杆菌液体发酵技术的研究 [J]. *农业环境保护*, 1998, 17(6): 248–250.
- [19] 关雄, 陈锦权, 黄志鹏, 等. 苏云金芽孢杆菌培养基的优化及间歇发酵 [J]. *生物工程学报*, 1998, 14(1): 76–80.
- [20] 申烨华, 孙珺, 张粉艳, 等. 苏云金杆菌发酵培养基的研究 [J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2000, 30(1): 32–34.
- [21] Farrera R R, Pérez-Guevara F, Torre de la M. Carbon:Nitrogen Ratio Initial Concentration of Total Solid on Insecticidal Crystal Protein and Spore Production in *Bacillus thuringiensis* HD-73 [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 49: 758–765.
- [22] 林剑, 邓丽, 郭尽力, 等. 苏云金杆菌在味精废水中的培养和发酵特性 [J]. *生物技术*, 1998, 8(5): 32–35.
- [23] 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.
- [24] 郭爱莲, 刘诗峰. 利用工业废液摇瓶培养苏云金杆菌 [J]. *微生物学通报*, 1995, 22(2): 83–85.
- [25] Lachhab K, Tyagi R D, Valéro J R, et al. Production of *Bacillus thuringiensis* Biopesticide Using Wastewater Sludge as a Raw Material Effect of Inoculum and Sludge Solids Concentration [J]. *Process Biochem.*, 2001, (37): 197–208.
- [26] Tirado Montiel M L, Tyagi R D, Valero J R. Wastewater Treatment Sludge as a Raw Material for the Production of *Bacillus thuringiensis* Based Biopesticides [J]. *Water Res.*, 2001, 35(16): 3807–3816.
- [27] Anderson R K I, Jayaraman K, Voisard D, et al. Heat Flux as an On-line Indicator of Metabolic Activity in Pilot Scale Bioreactor during the Production of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*-based Biopesticides [J]. *Thermochim. Acta*, 2002, 386: 127–138.
- [28] Sachidanandham R, Jenny K, Fiechter A, et al. Stabilization and Increased Production of Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* in Steady- and Transient-state Continuous Cultures [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, 47: 12–17.
- [29] 刘森林, 宗敬华, 姜文勇. 苏云金杆菌补料高密度培养的研究 [J]. *工业微生物*, 2000, 30(4): 41–43.
- [30] 李世杰, 方尚玲, 刘华梅, 等. 苏云金杆菌深层发酵补料分批培养工艺 [J]. *湖北农业科学*, 2001, 1: 39–41.
- [31] 陈锦权, 黄志鹏. 苏云金杆菌(Bt8010)工业发酵过程研究 [J]. *农业工程学报*, 1998, 3: 243–246.
- [32] 李稳宏, 刘永强, 孙晓红, 等. 苏云金杆菌在外环流气升式反应器中发酵工艺的研究 [J]. *化学工程*, 2000, 28(3): 42–44.
- [33] 杨建州. 环流反应器培养苏云金芽孢杆菌的研究 [A]. 喻子牛. 生物农药及其产业化 [C]. 北京: 科学出版社, 2000.

92-97.

- [34] Mechals B J. Method for the Production of Microbial Insecticides [P]. US Patent: 3086922, 1963-04-23.
- [35] 杨淑兰, 张怡, 梁淑兰, 等. 生物杀虫剂苏云金杆菌的固态发酵 [J]. 化工冶金, 1993, 14(2): 162-167.
- [36] 张怡, 杨天雪. 废次烟草作为载体的固态发酵体系中的综合利用 [J]. 烟草科技, 2000, 7: 5-7.
- [37] 陶玉贵, 项驷文. 啤酒糟固态发酵生产生物农药条件的优化 [J]. 安徽机电学院学报, 2002, 17(2): 17-19.
- [38] 陈洪章, 李佐虎. 微生物固态发酵反应器 [J]. 化工科技市场, 2001, 2: 26-27.

## Progress of the Study on *Bacillus thuringiensis* as Biopesticides

ZHU Wei, ZHAO Bing, WANG Xiao-dong, WANG Yu-chun

(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is one of the most effective and the most widely used microbial insecticides at present. The genetic bacterial strains, the fermentation process and the formulation of *Bacillus thuringiensis* as biopesticides are reviewed in this paper. The optimization of culture medium, operating conditions and type of fermentors are also addressed. Moreover, the existing problems and suggestions are discussed.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein; microbial insecticide