

具有杀虫效果的生物肥料的研制

张爱民¹, 章淑艳², 张双凤¹

(1. 河北大学 生命科学院, 河北 保定 071002; 2. 河北省微生物研究所, 河北 保定 071051)

摘 要:具有杀虫效果的生物肥料是一种集药效和肥效为一体的生物制剂. 本项目研究了胶质芽孢杆菌、圆褐固氮菌和阿维链霉菌的发酵工艺, 并研制出一种新型生物肥料. 该产品的各项技术指标均符合农业部有关肥料的质量标准, 既具有较好的增产作用, 同时具有较强的杀虫效果.

关键词:生物肥料; 胶质芽孢杆菌; 圆褐固氮菌; 阿维链霉菌; 发酵工艺

中图分类号: Q 599 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 1565(2006)04 - 0415 - 05

Study and Producing of Biofertilizer with the Effect of Insecticide

ZHANG Ai-min¹, ZHANG Shu-yan², ZHANG Shuang-feng¹

(1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Institute of Microbiology of Hebei Province, Baoding 071051, China)

Abstract: Biofertilizer with the effect of insecticide not only have the effect of biofertilizer, but also have the effect of insecticide. Fermentation technics of *Bacillus mucilaginosus*, *Azotobacteria chroococum* and *Streptomyces avermitilis* have been studied and biofertilizer with the effect of insecticide have been produced. All the technological index of preparation of insecticide and biofertilizer measure up the standard of biological fertilizer of Department of Agriculture of China. This product can increase the yield of plant and kill the insect.

Key words: biofertilizer; *Bacillus mucilaginosus*; *Azotobacteria chroococum*; *Streptomyces avermitilis*; fermentation technics

微生物肥料生产成本低, 应用效果好, 不污染环境, 使用后不仅增产, 而且提高农产品的质量, 因此, 在我国农业可持续发展中占重要地位^[1]. 随生态农业和绿色农业的发展, 化学农药和化学肥料对土壤和人类造成的危害愈来愈受到人们的重视, 限制使用化学农药和化学肥料已成为 21 世纪的主流^[2].

液体深层发酵具有周期短、效率高、成本低、可大规模工业化生产等特点^[3]. 该研究从该制剂的应用效果出发, 对药肥复合生物制剂的发酵工艺进行了研究, 并研制出该制剂的最佳发酵条件. 该研究针对目前我国单一品种微生物肥料作用效果缓慢、功能单一、范围小、效果不理想等因素, 研制出具杀虫效果和肥料效果为一体的复合生物制剂, 将成为我国微生物肥料今后的发展和研究趋势^[2].

本项研究中, 具有杀虫效果的生物肥料由 3 种有效成分组成, 即胶质芽孢杆菌、圆褐固氮菌和阿维链霉菌, 其中胶质芽孢杆菌可以将土壤中固定的磷、钾转化为植物可以吸收利用的速效磷和速效钾, 补充作物磷

收稿日期: 2005 - 10 - 20

基金项目: 河北省科技厅重点攻关项目 (018201106D)

作者简介: 张爱民 (1967 -), 男, 河北保定人, 河北大学副研究员, 主要从事微生物肥料及工农业废弃物的无害化处理研究.

钾养分的不足;圆褐固氮菌能够将空气中的 N_2 转化为铵态氮(NH_4^+),补充作物氮素营养,减少化学肥料的用量;阿维链霉菌可以产生阿维菌素,可有效杀死棉铃虫、玉米螟、美洲斑潜蝇等地上和地下害虫,减少化学农药的用量.

1 材料和方法

1.1 供试菌种

圆褐固氮菌:来源中国科学院北京微生物研究所菌保中心;胶质芽孢杆菌:来源于河北省微生物研究所;阿维链霉菌:来源于中国科学院上海药物所.

1.2 培养基

1.2.1 圆褐固氮菌的斜面及检验培养基(g/L) 葡萄糖(甘露醇) 10,硫酸钙 0.1,磷酸氢二钾 0.2,碳酸钙 5,硫酸镁 0.2,氯化钠 0.2,琼脂 20.

圆褐固氮菌的液体种子培养基将上述培养基中的琼脂去掉即可.圆褐固氮菌的液体发酵培养基:研究人员通过正交试验而得.

1.2.2 胶质芽孢杆菌的斜面及检验培养基(g/L) 蔗糖 5.0,磷酸氢二钠 2.0,硫酸镁 0.5,碳酸钙 0.1,三氯化铁 0.005,琼脂 18~20,pH 为 7.0.

胶质芽孢杆菌的液体种子培养基将上述培养基中的琼脂去掉即可.胶质芽孢杆菌液体发酵培养基:研究人员通过正交试验而得.

1.2.3 阿维链霉菌的斜面培养基 斜面培养基为高氏 1 号培养基,28 °C 培养 14 d.成熟斜面表面成灰色,孢子丰满.

阿维链霉菌的种子培养基(g/L):葡萄糖 5.0,黄豆饼粉 5.0,硫酸铵 0.5,磷酸氢二钾 0.5,pH 为 6.8.

阿维链霉菌的液体发酵培养基(g/L):葡萄糖 5.0,黄豆饼粉 5.0,硫酸铵 0.5,磷酸二氢钾 0.15,硫酸镁 0.025,磷酸氢二钾 0.25,pH 为 6.6.

1.3 主要仪器设备

HZQ-F160 型全温振荡培养箱;隔水式电热恒温培养箱;冰箱;722 型分光光度计;SK-1 型快速混匀器;日立牌高效液相色谱仪(HPLC);PHS-2C 型精密酸度计;双光束测汞仪;压力消解器;马福炉;原子吸收分光光度计等.

1.4 分析方法

pH 值采用酸度计法;砷的含量采用银盐法,参见国家标准中食品中砷的测定方法;汞的含量采用国家标准冷原子吸收光谱法之比色法测定;铅的含量采用二硫棕比色法测定,参见国家标准食品中铅的测定;镉的含量采用二硫棕-乙酸乙酯法测定,参见国家标准食品中镉的测定方法;铬的测定采用原子吸收石墨炉法进行测定,参见国家标准中的食品中铬的测定方法.

1.5 发酵液含菌量的测定

采用稀释平板法进行^[4],取发酵液进行一系列稀释,即用 10 mL 吸管吸取 5 mL 振荡均匀的发酵液,加到 45 mL 无菌水中,混匀成 10^{-1} 的稀释液,重复以上操作,可以得到 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 的稀释液,从 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 稀释液中取出 0.1 mL,分别涂胶质芽孢杆菌和圆褐固氮菌的平板 3 个,置于培养箱中,30 °C 培养 36 h,计数出现的菌落数,根据下面计算公式,可以得到相应发酵液的含菌量.

发酵液含菌量(亿个/mL) = 平板出现的菌落数 × 稀释倍数 × 10.

1.6 发酵液中药效成分的测定

根据农业部微生物肥料行业标准 NY410-2000,采用 HPLC 方法进行药效成分的测定,取发酵液 100 mL,4 500 r/min,离心 30 min,然后加样到高效液相色谱仪,进行液相色谱分析,所得到的曲线和标准曲线进行比较,可以测定发酵液中阿维菌素 B 组分(BLA + BLB)的含量.

2 工艺流程

具有杀虫效果的生物肥料的生产工艺见图1.

圆褐固氮菌、胶质芽孢杆菌和阿维链霉菌的保存菌种



图1 具有杀虫效果的生物肥料的生产工艺流程

Fig.1 Producing technological flow chart of the biofertilizer with the effect of insecticide

3 具有杀虫效果的生物肥料的发酵方法

3.1 菌种的活化

将3菌株的保存菌种分别接种在各自的种子斜面培养基上,圆褐固氮菌和胶质芽孢杆菌30℃恒温培养48 h,阿维链霉菌28℃培养14 d.

3.2 种子培养

1 000 mL三角瓶中分别分装3菌株的种子培养基,121℃,30 min灭菌,冷却至室温后分别接种各自的斜面种子,恒温摇床振荡培养,阿维链霉菌30℃,180 r/min培养48 h,镜检无杂菌,菌丝粗壮,种子液pH为6.5左右;圆褐固氮菌和胶质芽孢杆菌30℃,200 r/min培养14~18 h,镜检菌体成对或单个排列,菌体粗壮,结晶紫染色均匀,pH为6.0~6.3.

3.3 主发酵实验和结果

采用50 L全自动发酵罐进行实验,装料系数为70%,3菌株分别进行发酵实验,将各自的发酵培养基加到3个发酵罐中,121℃,30 min灭菌,冷却至室温后,分别接种.胶质芽孢杆菌的接种量为7%,培养条件为:温度30~33℃,罐压0.05~0.06 MPa,间歇搅拌,搅拌转速为200 r/min,通风比为1:(0.3~0.7)(以时间而

变化),发酵周期 36~40 h;圆褐固氮菌的接种量为 10%,培养条件为:温度(30 ± 1) °C,罐压 0.05~0.06 MPa,间歇搅拌,搅拌转速为 180 r/min,通风比为 1:0.5,发酵周期 36 h;阿维链霉菌的接种量为 10%,培养条件为:温度 30 °C,罐压 0.05~0.06 MPa,搅拌转速为 200 r/min,通风比为 1:0.5,发酵周期 8~9 d,上述工艺参数进行 3 次重复实验,并同步进行化验分析,其结果见表 1、表 2 和表 3。

表 1 圆褐固氮菌 3 次主发酵实验的平均结果

Tab. 1 Average results of three times fermentation experiments of *Azotobacteria chroococum*

发酵周期/h	发酵终点 pH	含菌量/(亿个 $\cdot$ mL $^{-1}$)
36	6.5	12.5

表 2 胶质芽孢杆菌 3 次主发酵实验的平均结果

Tab. 2 Average results of three times fermentation experiments of *Bacillus muciginosus*

发酵周期/h	发酵终点 pH	含菌量/(亿个 $\cdot$ mL $^{-1}$)
40	6.7	8.5

表 3 阿维链霉菌菌株 3 次主发酵实验的平均结果

Tab. 3 Average results of three times fermentation experiments of *Streptomyces avermitilis*

发酵周期/d	发酵终点 pH	总效价(HPLC)/(mg $\cdot$ L $^{-1}$)	B 组分(BLA + BLB)/(mg $\cdot$ L $^{-1}$)
8.5	6.4	4 250	1 225

4 具有杀虫效果的生物肥料的检验

按照 NY410-2000 和 NY413-2000 进行药肥复合生物制剂的检验,其中有效菌总数不低于 5 亿个/mL,杂菌含量低于 5%。结果表明本生产工艺流程生产的药肥复合生物制剂符合农业部有关的微生物肥料质量标准^[5]。具有杀虫效果的生物肥料的检验结果见表 4。

表 4 具有杀虫效果的生物肥料的检验结果

Tab. 4 Test results of the biofertilizer with the effect of insecticide

检验项目	结果	检验项目	结果
圆褐固氮菌含量/(亿个 $\cdot$ mL $^{-1}$)	5.5	蛔虫卵死亡率/%	100
胶质芽孢杆菌含量/(亿个 $\cdot$ mL $^{-1}$)	4.0	w(砷(以 As 计))/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	2.2
总菌数/(亿个 $\cdot$ mL $^{-1}$)	9.5	w(铅(以 Pb 计))/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	<0.05
药效成分(BLA + BLB)/(mg $\cdot$ L $^{-1}$)	224	w(镉(以 Cd 计))/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	<0.005
杂菌率/%	0	w(汞(以 Hg 计))/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	<0.03
pH	6.5	w(铬(以 Cr 计))/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	<1.0

5 结 论

1) 该项目研究了药肥复合生物制剂的生产工艺,并确立了圆褐固氮菌、胶质芽孢杆菌和阿维链霉菌的发酵工艺参数,所研制产品的各项指标均符合农业部有关微生物肥料的质量标准。

2) 该研究在国内首次将肥效菌株和药效(杀虫)菌株复配制成药肥复合生物制剂,工艺设计先进,操作

性强,适合于工业化生产。

3) 该研究的产品药肥复合生物制剂具有肥料和杀虫效果,应用前景广阔,由于研究时间较短,有关菌剂的保存实验有待进一步完善。

参 考 文 献:

- [1]谢明杰,程爱华,曹文伟.我国微生物肥料的研究进展及发展趋势[J].微生物学杂志,2000,20(4):42-45.
- [2]陈廷伟,葛 诚.我国微生物肥料发展趋向[J].土壤肥料,1995(6):16-20.
- [3]范贵增,杨一兵,熊国真.液体深层发酵食用菌丝体条件的研究[J].食品与发酵工业,1993(1):43-49.
- [4]沈 萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,2003.
- [5]胡晓敏,黄国良,王介庆. HPLC 法测定甲氨基阿维菌素苯甲酸盐[J].兽药和饲料添加剂,2001,6(5):13-14.

(责任编辑:梁俊红)

(上接第 414 页)

参 考 文 献:

- [1]袁勤生. SOD 在医药、食品和日化工业上的应用[J]. 中国生化药物杂志,1994,15(4):289-293.
- [2]张 翊,王军志,吴勇杰. 重组人超氧化物歧化酶的基因克隆、表达及产物纯化的研究[J]. 生物工程学报,2000,16(5):557-560.
- [3]静天玉,赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法[J]. 生物化学与生物物理进展,1995,22(1):84-86.
- [4]HARTMAN J R, GELLER T, YAVIN Z, et al. High-level expression of enzymatically active human Cu/Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli*. [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986,83:7142-7146.
- [5]张弘浩,赵晓瑜,静天玉. 重组人超氧化物歧化酶的复性[J]. 中国生化药物杂志,2003,24(1):32-33.
- [6]施惠娟,范立强,陈长华,等. 人铜锌超氧化物歧化酶 cDNA 的克隆、表达、发酵及纯化工艺研究[J]. 中国药理学杂志,1999,34(5):340-342.

(责任编辑:梁俊红)