

苏云金杆菌微胶囊剂的研制

朱丽云¹, 马良进², 孙培龙³, 张立钦²

(1.中国计量学院生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 2.浙江林学院生命科学学院, 浙江 临安 311300; 3.浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310032)

摘要:苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* 简称 Bt)的晶体蛋白是主要的杀虫成分,抗紫外照射能力差,造成野外防治过程中易失活、防效不稳定、残效期短。为改良 Bt 剂型,探讨了以明胶-阿拉伯胶为囊壁材料的复凝聚相分离法制备 Bt 微胶囊剂的加工工艺,并用平板活菌计数法对得到的 Bt 微胶囊剂进行了抗紫外能力分析及用毒力测定法比较微胶囊前后的杀虫活性。结果表明,经过紫外 2 h 的照射,原 Bt 菌液平板活菌计数成活率只有 11.4%,微胶囊化后的 Bt 菌液成活率高达 78%;相应地,原 Bt 菌液已基本丧失杀虫活性,而微胶囊化后的 Bt 菌液对小菜蛾致死率仍达 66.7%,比原菌液抗紫外能力大大增强。

关键词:苏云金杆菌; 复凝聚相; 微胶囊剂

中图分类号:S482.292 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)05-0966-04

Formulation of Microcapsulation of *Bacillus thuringiensis*

ZHU Li-yun¹, MA Liang-jin², SUN Pei-long³, ZHANG Li-qin²

(1. China Institute of Metrology College of Life Sciences, Hangzhou 310018, China; 2. Zhejiang Institute of Forestry College of Life Sciences, Linan 311300, China; 3. Zhejiang University of Technology College of Biological and Environmental Engineering, Hangzhou 310032, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* crystal protein was a key active ingredient to kill insects, which was sensitive to ultra violet in the field. The naked *Bacillus thuringiensis* was the less activity, unstable and reduced the time of residual toxicity. In order to improve the effect, we studied how to pack the *Bacillus thuringiensis* into the microcapsule of double phase separation-coacervation used by gelatin glue-acacia glue. The experiment was designed by the orthogonal test with four group parameters of wall density, *Bacillus* concentration, temperature and shaking rate. The goal character, such as, appearance and character, suspend, rate of in-wrap, average diameter, storage stability and virulence were checked and compared. The result indicated that *Bacillus* concentration 1%, the concentration of gelatin glue-acacia glue 3%, the system temperature 50℃, and shaking rate 200 r·min⁻¹. The effect on the UV resistant by counted living bacterium with plate cultivation and the toxicity of the *Bacillus thuringiensis* microcapsule were investigated by the naked *Bacillus thuringiensis* as a control, the results show that the survival so low, the rate of microcapsule *Bacillus thuringiensis* was 78% and the control only 11.4%. after two hours shinning of UV, the 66.7% of small cabbage moth can be killed by the microcapsule *Bacillus thuringiensis* and almost all the moth was alive at the control group.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; double phase separation-coacervation; microcapsule

为解决苏云金杆菌(简称 Bt)在使用中杀虫活性成分在紫外照射下易失活,防效不稳定,残效期短等不足,近年来国内外致力于对 Bt 基因水平的研究。瑞士 Ciba-Geigy 公司、美国 Mycogen 公司、Econge 公司

利用分子生物学技术分别开发出高效、耐紫外线照射和杀虫谱广的 Bt 工程菌。另外,对剂型的研究也很活跃,现今存在的 120 多种 Bt 商品中,国外存有粉剂、可湿性粉剂、悬浮剂、油剂、油乳剂、颗粒剂、片剂、缓释剂、生物包衣剂等剂型^[1]。而我国目前使用较多的剂型仅有粉剂、可湿性粉剂、悬浮剂和油剂等几种,对 Bt 微胶囊剂已有研究,并有相关微胶囊加工工艺方面报道,但加工过程对 Bt 活性损失很大^[2],且尚未有结合昆虫毒力测定的 Bt 微胶囊研究成果报道。

收稿日期:2004-11-09
基金项目:浙江省自然科学基金资助(399437)
作者简介:朱丽云(1976—),女,浙江永康人,硕士,中国计量学院讲师,主要从事微生物发酵及制药方面的研究。
E-mail:zly@cjl.edu.cn

本文用明胶、阿拉伯胶、果胶、海藻胶、羧甲基纤维素钠等天然化合物为壁材,通过凝聚相分离法^[3]对 Bt 进行微胶囊化研究,并分析了 Bt 微胶囊剂抗紫外光处理的稳定性及毒力测定,结果表明微胶囊化对 Bt 活性损失很小,抗紫外线能力大大增强,杀虫效果明显提高。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫:小菜蛾(*Plutella xylostella* L.)2~3 龄幼虫(浙江大学昆虫研究所提供)。

菌种:Bt(扬州农科所提供,由产品中分离得到)。

试剂:明胶、阿拉伯胶、10%醋酸、甲醛、吐温-80。

仪器:JB-2 型恒温磁力搅拌器,JNOEC 光学显微镜,摄影生物显微镜 OLYMPUS BHT-312,气浴恒温振荡器 THZ-82,冰箱,紫外分光光度仪。

1.2 方法

1.2.1 囊心(菌浆)的制备

菌种→活化→培养→高速离心→菌浆→2 ℃~4 ℃保存备用^[4,5]。

1.2.2 加工工艺研究

把菌浆配成一定浓度的菌液倒入反应器中,加入适量吐温-80,搅拌均匀。镜检菌液分散均匀后加入适量的明胶水溶液,调节体系温度为 40 ℃左右并调整转速。用 10%醋酸溶液调节至 pH4,继续搅拌 15 min,加入适量阿拉伯胶水溶液,继续搅拌。20 min 后,加入适量甲醛水溶液固化囊壁,再反应 10 min,即得微胶囊水溶液^[6,7]。

包裹过程中对壁材浓度(明胶:阿拉伯胶=1:1)、浓缩菌液浓度、温度、搅拌速度几个重要工艺参数设计 4 因素 3 水平正交试验,以确定微胶囊加工工艺的最佳工艺条件。正交试验因素水平见表 1。

1.2.3 Bt 微胶囊剂抗紫外光处理的稳定性

将储存不同时期的没有微胶囊化的菌液和 Bt 微胶囊剂分别配成 10⁸ cfu·mL⁻¹ 的悬浮液,置于烧杯中,用紫外线(15W,距离 40 cm)分别处理 1、2 h 后(每隔

20 min 摇一次悬浮液,以便均匀照射),系列稀释,取 10⁴ cfu·mL⁻¹ 的浓度 2 滴涂平板活菌计数,并以相应的微胶囊材料水溶液作为对照,求得不同处理的原菌液和 Bt 微胶囊剂的活菌数^[8,9]。

1.2.4 毒力测定

将供试 Bt 微胶囊剂和菌液分别稀释,配制成相同浓度(10⁴ cfu·mL⁻¹)的溶液,然后将菜叶浸泡在溶液中 3~5 min,自然晾干,分别经紫外 1、2 h 的照射处理,在每一片叶子上放 30 头小菜蛾 2~3 龄幼虫,以相应微胶囊材料水溶液为对照,各处理设 3 个重复,在温度为 25 ℃,相对湿度为(80±5)%下,于光照培养箱内培养,每隔 12 h 观察死亡情况。

2 结果与分析

2.1 最佳工艺的确定

明胶-阿拉伯胶为壁材,以壁材浓度(明胶:阿拉伯胶=1:1),浓缩菌液浓度,温度及搅拌速度 4 个因素设计正交试验为 L9(3⁴),分析结果可知以明胶-阿拉伯胶为壁材的最佳工艺配方为:1%菌液浓度,3%壁材浓度,50 ℃,转速为 200 r·min⁻¹。其包裹率为 80.1%,平均粒径为 53.6 μm。

由表 2 可得,菌液浓度中平均包裹率的极差为 5.7%,壁材浓度中平均包裹率的极差为 70.8%,温度平均包裹率的极差为 11%,搅拌速度平均包裹率的极差为 15%。由此说明壁材浓度对包裹率影响最大,温度和搅拌速度的影响其次,菌液浓度的影响最小。所以明胶-阿拉伯胶为壁材的最佳工艺条件为:1%菌液浓度,3%壁材浓度,50 ℃,转速为 200 r·min⁻¹。其包裹率为 80.1%,平均粒径为 53.6 μm。

表 2 正交试验及包裹率、平均直径测定表
Table 2 Orthogonal test and inwrap rate and averaged diameter

	菌液浓度	壁材浓度	温度 /℃	搅拌速度 /r·min ⁻¹	包裹率 /%	平均直径 /μm
①	1	1	1	1	70.2	30.2
②	1	2	2	2	65.3	55.2
③	1	3	3	3	0	0
④	2	1	2	3	80.5	101.2
⑤	2	2	3	1	67	88.2
⑥	2	3	1	2	0	0
⑦	3	1	3	2	50.3	66
⑧	3	2	1	3	80.1	53.6
⑨	3	3	2	1	0	0
K1	45.2%	67%	50.1%	45.7%		
K2	49.2%	70.8%	48.6%	38.5%		
K3	43.5%	0	39.1%	53.5%		

2.2 微胶囊剂形态观察及理化性质

各种微胶囊剂加工工艺中,采用明胶-阿拉伯胶复凝聚相分离法所制备的微胶囊大小形状较好。图 1 为光学显微镜高倍镜下观察到的 Bt 微胶囊形态。Bt 微囊剂的理化性质,见表 3。

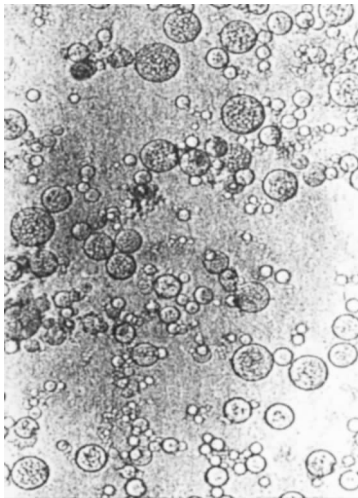


图 1 高倍镜下的显微照片(40×)

Figure 1 High power microscopic photo (40×)

表 3 Bt 微胶囊剂的理化性质

理化性质		Bt 微胶囊剂
平均粒径/ μm		53.6
包裹率/%		80.1
外观及性状		浅白色圆球形粘稠悬浊液
悬浮性		悬浮性好,长期放置不发生分层
稳定性	室温保存	室温保存半年性质不发生改变
	高温保存	40℃高温保存 6 个月稳定
喷雾观察		稀释后喷雾基本不堵喷头
施药后破囊时间		二周后有破囊现象

表 4 Bt 微胶囊剂紫外照射平板活菌计数结果

Table 4 Living bacterium under hand led with UV to Bt microcapsule					
项目	菌液/个	成活率/%	Bt 微胶囊剂/个	成活率/%	对照 CK
未照紫外	1 756		1 630		0
紫外照射	526	30.0	1 320	81	0
紫外照射	201	11.4	1 271	78	0

2.3 抗紫外能力结果

平板活体培养方法测定微胶囊剂抗紫外的稳定性,因为存在微胶囊化后涂布不均匀的现象,计数法出现误差较大,但从结果分析可得微胶囊化后抗紫外线能力比原菌液大大增强。原菌液经过 2 h 的紫外照射后成活率很低,只有 11.4%,而微胶囊化的 Bt 菌液紫外照射 2 h 以后成活率仍很高达 78%,见表 4。

2.4 毒力测定结果

苏云金杆菌主要是经口感染昆虫,被目标昆虫吞食后进入消化道而发挥毒杀作用的,昆虫中毒后就停止取食,所以虽然昆虫死亡速度较慢,但可以及时控制农作物受损失。从表 5 中可以发现没有经过包裹的菌液(浓度为 $10^4\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)紫外照射 2 h 以后几乎没有任何杀虫活性,相应浓度的 Bt 微胶囊剂紫外照射 2 h 以后其昆虫死亡率仍为 66.7%,比原菌液抗紫外能力大大增强。

3 讨论

将菌液和 Bt 微胶囊剂悬浮液分别稀释到 $10^8\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度,用紫外线(15W,距离 40 cm)处理 1、2 h 后,系列稀释,取 $10^4\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度 2 滴涂平板,活菌计数结果和对小菜蛾的毒力测定试验结果相一致。说明了经过包裹技术的 Bt 抗紫外能力明显比未经过包裹的菌液强,稳定性大大增强。据报道南京医

表 5 Bt 微胶囊剂对小菜蛾的杀虫效果试验

Table 5 The virulence of Bt microcapsules on young cabbage mot

项目		接虫数 /头	死虫数/头					60 h 死亡率 /%	60 h 校正死亡率 /%
			12 h	24 h	36 h	48 h	60 h		
菌液	未照紫外	30	4	9	15	29	30	100%	100%
	紫外照射 1 h	30	2	5	9	15	18	60%	60%
	紫外照射 2 h	30	0	0	0	1	1	3.3%	3.3%
	对照 (CK)	30	0	0	0	0	0	0	0
Bt 微胶囊	未照紫外	30	3	8	16	28	30	100%	100%
	紫外照射 1 h	30	2	5	10	18	25	83.3%	83.3%
	紫外照射 2 h	30	1	2	5	10	20	66.7%	66.7%
	对照 (CK1)	30	0	0	0	0	0	0	0

学院寄生虫学教研室章子豪等人按美国哈佛大学专利技术^[10]制备的苏云金杆菌微胶囊剂型(EBtI)与标准菌粉剂(SBtI)灭蚊效果比较,结果表明 EBtI 持效显著高于 SBtI,在施用后 4 周内仍保持 100%的蚊蚋死亡率。而相同浓度的 SBtI 在施用 2 周后,蚊蚋死亡率逐周下降,至第 4 周灭蚊蚋效力消失^[11]。

微胶囊剂型的开发不仅提高了 Bt 活菌制剂抗外界不良环境的能力,而且为进行生物与化学杀虫剂、植物源杀虫剂等混配的研究工作提供了条件。化学农药如氯氰菊酯、敌百虫、氟虫腈、吡虫啉一般对活体细菌都有一定的杀伤作用,细菌经过微胶囊化后提高了对化学农药的抵抗力,更利于不同化学农药对微生物农药的混配。

参考文献:

[1] 喻子牛.苏云金芽孢杆菌制剂的生产应用[M].北京:农业出版社,1993.
[2] 朱丽云,孙培龙,张立钦.微生物农药微胶囊技术及其应用前景[J].浙江林学院学报,2002,(01):109-112.

[3] 梁冶齐.微胶囊技术及其应用[M].北京:中国轻工业出版社,1999.4-15.40-57.
[4] 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,1998,14(1):243-247.
[5] Mi Fwu-Long, Wong Tsung-Bi, Shyu Shin-Shing, et al. Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 1999, 71 (5):747-759.
[6] 王显伦.凝聚法制备微胶囊技术研究[J].郑州粮食学院学报,1997,18 (3):17-34.
[7] 朱正昌,唐进根,夏民洲,等.混合型农药微胶囊剂生产工艺设计及药效试验[J].西南林学院学报,1995,15(1):44-52.
[8] Wang Yingjin. Development of new polycations for cell encapsulation with alginate. *Materials Science and Engineering C*[J].*Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2000,13(1):59-63.
[9] 曹永梅.两歧双歧杆菌 F-35 的微胶囊化[博士论文][D].无锡:无锡轻工业大学,1999.
[10] Rha, et al. Process for encapsulation and encapsulated active material system[P]. United States Patent:4,744,933.
[11] 孙传红,甄天民,王怀位,等.Bt 微胶囊制剂防治蚊虫的研究[J].中国媒介生物学及控制杂志,1999,6(6):408-411.