

# Production of Microbial Pesticides Using Wastewater Sludge as Fermentation Materials

Xueyong Zhou<sup>1</sup>, Qingjie Dong<sup>2</sup>, Ning Liu<sup>2</sup>,

1. Department of Food Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin, China 300384

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin, China 300384

1. e-mail address: zhouxueyongts@163.com, 2. e-mail address: dylan\_liu@163.com

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is currently the most widely used commercial biopesticide and it has been extensively used for four decades in biopesticidal formulations due to its safe environmental and human health records. *Bacillus thuringiensis* is traditionally produced by submerged fermentation. The low-cost production of *Bacillus thuringiensis* using wastewater sludge as a raw material has been successfully achieved. This mode is a new way to link the environmental protection and energy conservation. A material systems for the production of microbiological pesticide was constructed from the view point of sustainable development. This system would promote the mutual development of urban environmental security, microbiological pesticide production and agricultural environmental protection, and reduce the production cost of *Bacillus thuringiensis*. The new technologies for the production of *Bacillus thuringiensis* using urban wastewater sludge, wastewater from monosodium glutamate fermentation and from starch extraction as fermentation materials were introduced in this paper.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; biopesticide; wastewater; sludge

## 利用废水污泥作发酵原料生产微生物农药

周学永<sup>1</sup>, 董庆洁<sup>2</sup>, 刘宁<sup>2</sup>

1. 天津农学院食品科学系, 天津, 中国, 300384;

2. 天津理工大学化学化工学院, 天津, 中国, 300384

1. e-mail address: zhouxueyongts@163.com, 2. e-mail address: dylan\_liu@163.com

**摘要:** 苏云金杆菌是目前世界上开发最成功的微生物杀虫剂, 由于环境友善、对人类安全等优点已经推广应用了 40 年。苏云金杆菌通常采用深层液体发酵法生产。为了节约能源、减少发酵培养对粮食的消耗, 采用城市污水、发酵废水作为部分替代培养基进行苏云金杆菌发酵, 实现了环保、节能偶联发展的模式, 从可持续发展的角度构建微生物农药产业链式的原料保障体系, 促进了城市环保、微生物农药生产和农业环保三个产业的相互发展, 降低了废弃物的治理成本和微生物农药的生产成本。本文介绍了城市污水、味精发酵废水、淀粉提取废水水作原料发酵生产微生物农药的新技术。

**关键词:** 苏云金杆菌; 生物农药; 废水; 污泥

### 1 前言

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 是目前开发最成功的生物农药, 广泛用于农业、林业和公共卫生方面<sup>[1]</sup>。苏云金杆菌是一种环保农药, 破坏生态平衡, 具有广阔的应用前景。苏云金杆菌的生产模式是通过微生物发酵来实现的, 发酵培养基需要玉米浆、黄豆饼粉、鱼粉、淀粉等粮食产品, 并具备合理的碳源与氮源比例, 控制严格的溶氧和 pH 等条

件。由于农副产品价格上扬和能耗过大, 导致 Bt 生产成本与化学农药相比竞争力较低。为了节省能源, 世界上一些发达国家探索利用工农业废弃物作发酵原料, 实现了环保、节能偶联发展的模式, 从可持续发展的角度构建微生物农药产业链式的原料保障体系, 促进了城市环保、微生物农药生产和农业环保三个产业的相互发展, 降低了废弃物的治理成本和微生物农药的生产成本。本文重点介绍城市污泥、味精废水、苏云金杆菌传统工艺废水作原料发酵生产微生物农药

的最新技术。

## 2 城市污水污泥发酵苏云金杆菌

随着城市化的发展，城市污水处理厂产生的废水污泥日益增多，目前美国城市废水污泥的总量则达到了  $8.2 \times 10^6$  t<sup>[2]</sup>。如何处理废水污泥，各国政府都面临着巨大的公众压力和环境污染问题。研究发现，污水处理厂的废水富含碳、氮、磷和其它营养元素，可以用于培养苏云金杆菌的原料（表 1）。

城市污水使用前必须在 121 °C 灭菌 30min，杀灭杂菌和朊病毒后方可用于苏云金杆菌发酵。Yezza 等<sup>[3]</sup>将城市污水进行沉降浓缩处理，使固形物含量达 25g/L 以上，然后分别在 15L 搅拌罐式反应器和 150L 带溶氧、pH、消泡等辅助设备的自动控制反应器中利用进行苏云金杆菌发酵试验，结果显示在大反应器中更能实现氧的传递，与摇瓶发酵相比活细胞数增加 38%-55%，芽孢数增加 25%，杀虫活性提高了 30%，但反应器体积大小对芽孢数没有影响。

Table 1. Main ingredient of urban wastewater sludge<sup>[1]</sup>

表 1. 城市污水主要成分<sup>[1]</sup>

检测项目	测试数值
Total solids (g/L)	29
Volatile solids (g/L)	19
Suspended solids (g/L)	25
Volatile suspended solids (g/L)	18
pH	5.7
Total carbon (% dry total sludge solids)	40.43
Total nitrogen (% dry total sludge solids)	5.25
Ammonical nitrogen (mgN/kg)	632
Total phosphorus (mgP/kg)	10,525
Orthophosphates (mgP/kg)	5,830
Al <sup>3+</sup> (in mg/kg)	16,445
Ca <sup>2+</sup> (in mg/kg)	18,778
Cd (in mg/kg)	3.3
Cr (in mg/kg)	94
Cu <sup>+</sup> (in mg/kg)	271
Fe (in mg/kg)	12,727
Mg (in mg/kg)	2,556
Mn (in mg/kg)	182
K <sup>+</sup> (in mg/kg)	2,563
Pb (in mg/kg)	67
Zn (in mg/kg)	551

Montiel 等<sup>[4]</sup>从不同的污水处理厂取来 7 种废水，将污水样品分为不预处理、酸预处理和酸预处理后取上清液三种。将上述污水 25 ml 放入 50 ml 锥形瓶，接种 Bt 后转入摇床，30 °C 条件下 250r/min 进行摇瓶培养，每隔一定时间取样测定发酵液中的菌数，直至培养结束。结果显示，Bt 在酸处理污水中生长良好，发酵液杀虫活性在 3000-4100IU/  $\mu$ l 之间；未酸处理的

污水次之，发酵液杀虫活性在 900-3000 IU/  $\mu$ l 之间；上清液的培养效果最差，发酵液效价在 900-3000 IU/  $\mu$ l 之间。不同的污水来源对发酵液杀虫活性有较大影响，其中挥发固含量和悬浮固含量高的污水有利于提高 Bt 芽孢数和杀虫活性。发酵液初始 pH 过低则不利于发酵进行。Vidyarthi 等<sup>[5]</sup>采用 6 个污水处理厂的污水进行 Bt 发酵，发现污水固含量对发酵液杀虫活性

影响明显, 25 g/L 时毒力最高, 为  $11054 \pm 442$  IU/ $\mu$ l, 而当固含量增加至 33 g/L 时, Bt 生长缓慢, 发酵液毒力降至  $9299 \pm 372$  IU/ $\mu$ l。污水固含量对芽胞和杀虫毒力的影响并不一致, 固含量低时发酵液中芽胞数低, 但杀虫毒力高<sup>[6]</sup>。接种量在 1%-5% 之间时, 芽胞数均能达到工业化水平, 但 1% 接种量比 5% 时杀虫毒力提高。

研究还发现, 污水中的碳氮比对 Bt 发酵有影响, 污水处理厂的一级废水固含量低但碳源丰富, 而二级废水固含量高且氮源丰富。因此, 将一级和二级废水混合更适于 Bt 发酵。污水在 95 °C 灭菌 2 h 后于 4-10 °C 贮存, 3 个月内不影响 Bt 发酵质量。

### 3 利用传统苏云金杆菌上清液添加发酵

传统苏云金杆菌发酵完成后, 得到的发酵液含有 90% 的水份, 需要经过离心或超滤浓缩后喷雾干燥制备原粉, 或直接浓缩液体制剂。分离出的上清液则进入废水处理系统, 进行无害化处理后排放。苏云金杆菌生产企业每年产生大量上清液污水, 处理成本很高。Luna 等<sup>[7]</sup>在苏云金杆菌原始发酵配方中分别添加 25%、50% 和 75% (w/v) 的分离上清液, 其配方组成为 (g/L): 玉米浆 25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{CaCO}_3$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, glucose 10, 发酵前调 pH 7.4。结果显示, 上清液添加比例越高, 发酵液中苏云金杆菌芽胞数越高, 添加 25%、50% 和 75% (w/v) 上清液后, 发酵液中芽胞数分别为:  $2.2 \times 10^9$ 、 $2.3 \times 10^9$  和  $10.3 \times 10^9$  CFU/mL。这一研究成果表明, 发酵培养基中添加上清液具有工业化潜力, 起到节省能源、减少污水处理量的作用。

## 4 利用发酵废水发酵苏云金杆菌

### 4.1 味精发酵废水作发酵原料

味精是氨基酸工业的一个重要分支, 排放的污水量很大。味精废水含有多种氨基酸且 BOD 和 COD 超标严重, 造成废水处理困难, 存在能耗高和二次污染等问题。近年来研究发现, 苏云金杆菌是一种生态效益良好的生物农药, 利用味精废水进行生产可获良好的经济效益。将味精废水中和至 pH 7.0, 添加适量碳源、氮源及微量元素, 最终用于苏云金杆菌 HM-1 菌株的发酵培养基配方为: 玉米浆 10-12 ml/L, 淀粉 20-25 g/L, 葡萄糖 5-12 g/L, 碳酸钙 1-2 g/L, 磷酸氢二钠 0.3 g/L, 总固形物 32-36 g/L。在通风比 1: 1.1、搅拌转速 400

r/min、温度 32-34 °C 条件下培养, 24 h 开始出现芽胞, 32 h 部分芽胞破裂并观察到伴胞晶体, 芽胞最终浓度可达  $7.5 \times 10^9$  个/ml<sup>[5-6]</sup>。

杨建州等<sup>[8]</sup>对味精废水发酵苏云金杆菌工艺条件进行研究, 确定培养基基本配方为: 豆饼粉 2.5%, 酵母粉 2.5%, 淀粉 1.5%, 玉米浆 4.0%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{ZnSO}_4$  0.02%,  $\text{MnSO}_4$  0.02%,  $\text{CaCO}_3$  0.3%。配制液体种子培养基添加 50% 的味精废水, 发酵培养基则完全添加高浓度味精废水。在 5 L 发酵罐中 (装料液 3 L) 31 °C 振荡培养 (转速 180 r/min) 48 h, 晶体释放率 20%, 发酵液毒力效价与标准品没有显著差别。

味精废水中的  $\text{SO}_4^{2-}$  影响苏云金杆菌生长, 可以通过添加钙氧化物形成硫酸钙沉淀, 再利用重力沉淀或离心方法分离。废水中重金属元素浓度较高时, 可采用离子交换树脂技术加以分离。

### 4.2 利用酿酒废水作发酵原料

我国目前有酒精生产厂 1100 多家, 年产发酵酒精  $3 \times 10^6$  t, 年排放酒糟废液约  $4.5 \times 10^7$  t。酒糟废液中富含未被利用的碳水化合物、酵母、脂肪、灰分、氨基酸和多种维生素, 其 BOD 高达 28000-35000 mg/L。如不经过处理直接排放不仅浪费资源, 而且还会生态环境的严重污染<sup>[9]</sup>。

王程辉等对酒糟废液发酵 Bt 进行研究<sup>[10]</sup>。由于酒糟中氮含量仅为 0.2%-0.4%, 不能满足 Bt 生长、芽胞和伴胞晶体形成的需要, 适量添加氮源是必须的。添加无机氮源特别是尿素, 芽胞数虽然有较大幅度的提高, 但发酵周期明显延长, 伴胞晶体明显减少。添加有机氮源不仅芽胞数大量增加, 而且发酵终了伴胞晶体数量增多。有机氮源中蛋白胨、牛肉膏效果最好, 但考虑到成本问题, 添加富含氮源的农副产品也可以达到较好效果。

对酒糟废液进行适当预处理, 并添加合理比例的氮源就可达到正常培养基的 Bt 发酵效果, 摇瓶发酵活芽胞数可达  $3.3 \times 10^9$  个/ml, 10L 罐可达  $4.1 \times 10^9$  个/ml。上述结果表明以酒糟废液为基本原料培养 Bt 是完全可行的。

## 5 淀粉提取废水作发酵原料

淀粉的制备主要采用玉米和薯类提取工艺, 当淀粉提出以后, 其中的可溶性糖、可溶性蛋白质、矿物质、维生素及其它生物活性物质均随废液流失。Yezza 等<sup>[10]</sup>利用淀粉废水发酵苏云金杆菌, 经生物测定其杀

虫活性为  $1.8 \times 10^{10}$  SBU/L, 高于大豆发酵培养基的杀虫活性 ( $1.0 \times 10^{10}$  SBU/L)。王丽芳研究发现, 以淀粉废液为主要原料培养 Bt, 其成本与玉米面为主要成分的培养基相比降低了 30%。培养基组成为: 淀粉废液 5%, 酵母粉 0.2%, 豆饼粉 2%,  $\text{CaCO}_3$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.03%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.03%。上述配方在 7000 L 发酵罐进行发酵试验, 接种量 1%, 32℃ 发酵 20 h 以上, 发酵液芽胞数大于  $2.6 \times 10^9$  个/ml。发酵液干燥制得菌粉, 经沈阳农业大学进行田间药效试验, 杀虫效果达 96%–100%。

淀粉厂的玉米浸泡液也能用作 Bt 发酵培养基。将玉米浸泡液煮沸 30 min 脱硫, 冷却后加入  $\text{CaCO}_3$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.03%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.01%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.03%。121℃ 灭菌 30 min 后接种 Bt, 24 h 芽胞数达  $2.61 \times 10^9$  个/ml, 伴胞晶体产生量也较多<sup>[11]</sup>。

## 6 展望

利用城市污水处理厂废水、味精发酵废水以及苏云金杆菌传统分离工艺中的上清废液部分取代生产原料, 具有实现生物农药苏云金杆菌的正常发酵生产潜力, 产品的毒力效价达到或接近商业制剂的水平。污水处理厂和发酵厂的废水经过简单处理, 可以在中试水平上完全代替农副产品培养基, 显示出较好的应用前景。目前, 国外已经就添加废水污泥对发酵培养基流变性以及对微生物农药产品悬浮性、固形物粒度的影响等进行了深入研究<sup>[12]</sup>, 取得了一系列成果。污水处理厂废水来源充足, 为生物农药的生产的节能降耗开辟了一条新途径。

## 致 谢

天津市自然科学基金重点项目 (No.08JCZDJ18800), 天津市农业科技成果转化项目 (No.08ZHNZNC03300) 和天津农学院科技发展基金 (No.2008D016) 联合资助。

## References (参考文献)

- [1] Yang X, Wang S S. Phase-specific optimization of multiple endotoxin-protein production with genetically engineered *Bacillus thuringiensis*[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31, P71-76
- [2] Tyagi R D, Surampalli RY, Yan S, Zhang TC, Kao CM, Lohani BN. Sustainable sludge Management[M]. American Society of Civil Engineers, Virginia. 2009.
- [3] Tyagi R D, Valèro J R, Surampalli R Y, Smith J. Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2004, 31, P545–552.
- [4] Montiel M D L T, Tyagi RD, Valero JR. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides[J]. *Water Research*, 2001, 35(16), P3807-3816.
- [5] Vidyarthi AS, Tyagi RD, Valero JR, et al. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material[J]. *Water Research*, 2002, 36, P4850-4860
- [6] Sachdeva V, Tyagi RD, Valero JR. Production of biopesticides as a novel method of wastewater sludge utilization/disposal[J]. *Water Science Technology*, 2000, 42(9), P211-216
- [7] Luna CL, Silva G R, Rios EMM. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* production involving re-use of the supernatant[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26, P143–145.
- [8] Yang Jianzhou, Zhang Peng. Study on the fermentation conditions for producing *Bacillus thuringiensis* by monosodium wastewater[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2002, 28(4), P28-32 (Ch).  
杨建州, 张松鹏. 利用味精废水发酵生产苏云金芽胞杆菌的发酵条件研究[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(4), P28-32.
- [9] Wang Chenhui, Zhang Keqing, Lu Xiaoqing. Study on the cultivation of *Bacillus thuringiensis* by vinasse wastewater[J]. *Making Wine*, 2001, 28(1), p81-83(Ch).  
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(1), p81-83.
- [10] Bar SK, Verma M, Tyagi RD, et al. Starch industry wastewater based stable *Bacillus thuringiensis* liquid formulations. *Journal of Economic Entomology*, 2005, 98:1890-1898.
- [11] Brar SK, Verma M, Tyagi RD, et al. *Bacillus thuringiensis* fermentation of wastewater and wastewater sludge—presence and characterization of chitinases[J]. *Environmental Technology*, 2008, 29(2), P161-170.
- [12] Vasconceosa JMT, Rodrigusa JML, Orvalho SCP, et al. Effect of contaminants on mass transfer coefficients in production of biopesticides using wastewater sludge as a raw materials[J]. *Water Science and Technology*, 2003, 44(10), P 255-259.