

# 蓝藻发酵生产微生物农药的影响因素研究

蔡健<sup>1</sup>, 刘志<sup>2</sup>, 王跃强<sup>3\*</sup>, 徐荣险<sup>3</sup>, 周顺桂<sup>3</sup>

1. 中牧实业股份有限公司, 北京 100070; 2. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南 长沙 410128;

3. 广东省生态环境与土壤研究所, 广东 广州 510650

**摘要:** 采用摇瓶发酵试验探讨了蓝藻为原料制备苏云金杆菌生物杀虫剂的可行性, 并考察了不同培养条件(蓝藻含固率、种龄、接种量、初始pH、摇床转速、发酵温度)对苏云金杆菌生长增殖、产孢与产毒效果的影响。研究表明, 无需任何预处理工序, Btk 130 菌株能在蓝藻为唯一原料的培养基中正常生长发育, 并且产孢产毒。发酵48 h 后, 芽孢产率达到86.7%, 远高于常规培养基; 生物毒效为282 IU·mL<sup>-1</sup>, 与常规培养基相当。培养条件优化结果表明, 在蓝藻含固率为2%、初始pH为7.0、接种物种龄为9 h、接种量为2%、培养温度为30 ℃、摇瓶转速为200 r·min<sup>-1</sup>的条件下培养48 h, Btk 130 可达到较好的发酵效果, 活菌数及抗热芽孢数可达7.32 CFU·mL<sup>-1</sup>和6.38 CFU·mL<sup>-1</sup>, 生物毒效为528 IU·mL<sup>-1</sup>。该研究不仅为蓝藻提供了高附加值的处置新途径, 而且可显著降低生物杀虫剂的生产成本, 具有广阔的应用前景。

**关键词:** 蓝藻; 微生物农药; 苏云金芽孢杆菌; 培养条件

中图分类号: Q81

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906(2011)05-0951-05

苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis* (Bt) 是一类能在代谢过程中产生芽孢和伴孢晶体的革兰氏阳性细菌, 其制剂是目前世界上产量最大的微生物杀虫剂, 具有环境安全、选择性强、不易产生抗性等诸多优点<sup>[1-3]</sup>。目前Bt生物杀虫剂主流生产工艺为液体深层发酵, 发酵原料为葡萄糖、蛋白胨、酵母粉、黄豆粉、玉米淀粉、花生饼粉、麦麸等, 发酵原料昂贵、生产成本高是限制其推广的主要因素<sup>[4]</sup>。近年来, 味精废水<sup>[5]</sup>、啤酒废水<sup>[6]</sup>、鸡舍垫料浸出液<sup>[7]</sup>、玉米浸泡液<sup>[8]</sup>等工农业废弃物被用于生产Bt 生物杀虫剂。然而繁琐昂贵的预处理、较差的稳定性限制了这些原料的应用。因此, 如何采用低成本发酵原料生产微生物杀虫剂是近来国内外的研究热点。

蓝藻是一类广泛存在于自然界中的光合自养型原核生物。当前, 我国水体富营养化严重, 蓝藻水华频繁暴发, 严重威胁我国水体生态环境。目前我国蓝藻治理技术以打捞为主。据统计, 2008 年太湖蓝藻暴发时每天蓝藻打捞量高达数千吨, 这些打捞上来的大量蓝藻如不妥善处理, 容易通过渗漏、径流等造成二次面源污染。实际上, 蓝藻中含有丰富的碳水化合物、蛋白质、维生素、多种微量元素等<sup>[9-10]</sup>, 是一种巨大的环境资源库, 具有显著的资源化潜力。目前蓝藻资源化处置途径主要有生物质气化<sup>[11]</sup>、有机肥化<sup>[12]</sup>等, 但都存在脱水复杂、利用率低的缺陷。因此, 需要寻找新型高附加值蓝藻资源化技术。

本文针对蓝藻有机物丰富的特点, 对蓝藻作为低

成本发酵原料生产Bt 生物杀虫剂的可行性及影响因素进行了分析, 期望在降低Bt 生物杀虫剂生产成本的同时, 为蓝藻的资源化处置提供一条新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

供试菌株为苏云金芽孢杆菌*Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (简称Btk) 130, 本实验室保存。

### 1.2 培养基

LB 固体培养基 (g·L<sup>-1</sup>): 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 5.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.0。用于平板计数与斜面保存。

LB 液体培养基: 固体培养基成分中去除琼脂粉, 用于制作接种物。

### 1.3 供试蓝藻

供试蓝藻采自太湖, 置于4 ℃冰箱中保存。理化性质见表1。

### 1.4 摇瓶发酵试验与发酵液生物毒效测定

接种物制备: 斜面培养基中移取一环活化的Btk 130 斜面菌苔, 分别接种于100 mL LB 液体培养基(用500 mL锥形瓶盛装)中, 于(30 ± 1) ℃ 和 200 r·min<sup>-1</sup> 往复式摇床振荡培养9 h。预试验表明, 此时它们处于对数生长期。

发酵方法: 500 mL 锥形瓶内盛100 mL 蓝藻或 LB 培养基, 移取2%上述接种物, 接种后按照要求控制不同的培养条件进行发酵(除特殊说明外, 蓝藻含固率为2%, 初始pH 为7.0, 接种物培养时间为9 h,

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2010GB2E000347); 广东省科技成果转化启动项目(2010B060600010); 长沙市科技攻关项目(K0904037-11)

作者简介: 蔡健(1974生), 男, 工程师, 主要从事微生物资源开发研究。E-mail: danqing1000@yahoo.com.cn

\*通讯作者: 王跃强(1976年生), 男, 助理研究员, 主要研究方向为有机废弃物资源化处置。E-mail: yqwang@soil.gd.cn

收稿日期: 2011-05-04

表 1 供试蓝藻的理化性质

Table 1 Physical-chemical properties of selected blue-green algae

pH	w(总固体)/ %	w(可挥发性固体)/ %	w(灰分)/ %	$\rho$ (总碳)/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\rho$ (总氮)/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	总COD/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	可溶性COD/ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	MC-RR/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	MC-LR/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
6.25	0.91	0.79	0.12	450.6	77.1	14050	270	4.54	3.27

接种量为2%，培养温度( $30 \pm 1$ ) °C，摇床转速为200  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。每隔3 h 移取发酵液3 mL，测定pH、活菌数(VC)及抗热芽孢数(VS)。至48 h 发酵完成时用磷酸调节pH 至4.0~4.5，作为生物毒效测定样品。

### 1.5 分析方法

**活菌数与抗热芽孢数：**在无菌条件下，将发酵液进行梯度稀释，取适宜稀释度的菌液涂布平板，于30 °C 恒温培养16~18 h 后计活菌数；对于活芽孢数，需将适宜稀释度的菌液于80 °C 水浴处理15 min，然后进行平板涂布培养计数，每平板菌落数在30~300 内有效。芽孢与伴孢晶体采用苏云金芽孢杆菌菌体与晶体的区别染色法染色<sup>[13]</sup>，在光学显微镜下观察。

**生物毒效：**采用饲料喂食法，按照《中华人民共和国国家标准》GB/T 19567.3.2004，以小菜蛾幼虫作试虫，感染48 h 后检查试虫死亡情况，计算校正死亡率和毒力回归方程，求出致死中浓度(LC<sub>50</sub>)，最后根据式(1)计算出样品效价<sup>[15]</sup>。小菜蛾卵由中国农业部药检所提供，生物测定前将卵在养虫箱中于温度26 °C、湿度70~80% 条件下孵化并用萝卜苗进行饲养，取饲养7~8 d 的2 龄末幼虫进行试验。标准品为 *Bacillus thuringiensis* H<sub>3a3b</sub>，由中国农业部农药检定所提供，生物效价为55 000  $\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

样品毒力效价/( $\text{IU} \cdot \text{uL}^{-1}$ ) = 标准品LC<sub>50</sub> × 标准品效价 / 样品LC<sub>50</sub> (1)

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长代谢状况及可行性分析

图1比较了Btk 130在蓝藻(含固率0.91%)与LB常规培养基中的生长状况。从图1(a)可以看出，两培养基的pH值都是先稍微下降，而后持续缓慢上升。观察图1(b)可以发现，Btk 130菌种接入蓝藻培养基后，能够利用蓝藻所含的营养物质迅速增殖。至48 h 发酵结束时，蓝藻中活菌数达到最大值，为 $4.32 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与常规培养基LB培养基比较，Btk 130在蓝藻培养基中延滞期较长。图1(c)显示了Btk 130在两种培养基中芽孢形成状况。从图1(c)可知，Btk 130在蓝藻培养基中芽孢形成时间稍晚，但是芽孢的形成速度高于LB培养基。在21 h 时蓝藻中抗热性芽孢数基本达到峰值，为 $3.23 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，芽孢产率为85.22%，远高于同期常规培养基芽孢产率69.25%，说明蓝藻培养基

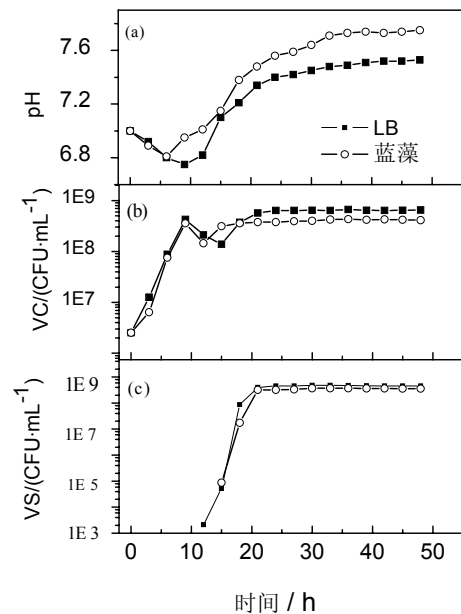


图 1 发酵过程中 pH (a)、活菌数 VC (b)、抗热芽孢数 VS (c) 及其变化规律

Fig.1 Variation of pH (a), viable cell count (a), and viable spore count (VS) of Btk 130 in two media

更适于芽孢形成。尽管 Btk 130 在蓝藻培养基中生长代谢状态稍弱于常规培养基，但由于蓝藻培养基未经任何处理，因此有理由相信，经过发酵条件优化的蓝藻将是一种适宜 Btk 130 发酵的培养基。

图2显示了Btk 130在蓝藻培养基中培养42 h

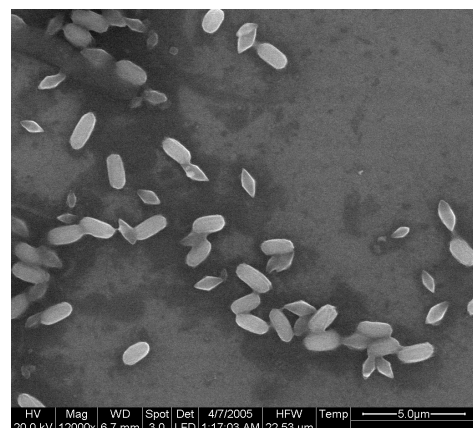


图 2 Btk 130 在蓝藻培养基中培养 42 h 的状态

Fig.2 SEM photos of Btk 130 produced from blue-green algae wastewater for 42 h

后芽孢与伴孢晶体的形态。可以看出，42 h 时芽孢与伴孢晶体完全形成，伴孢晶体已完全脱落，晶体大小不一，形态似菱形。

表2显示了在蓝藻培养基中发酵48 h 的Btk 130 菌株对小菜蛾幼虫的毒效。从表2 可以看出，Btk 130在常规培养基及蓝藻培养基发酵48 h 后，尽管Btk 130 活菌数及芽孢数均少于常规培养基，但是芽孢产率远高于常规培养基，其生物毒效相差不多，分别为282 IU·mL<sup>-1</sup>、289 IU·mL<sup>-1</sup>。实验证明，蓝藻培养基有利于Btk 130 产孢和产毒。

表2 Btk 130 菌株在蓝藻和 LB 培养基中的生长特性及其毒效  
Table 2 Growth characteristics of Btk 130 and toxicity against *PluteUa xylostella* in two media

培养基	活菌数/ (CFU·mL <sup>-1</sup> )	芽孢数/ (CFU·mL <sup>-1</sup> )	芽孢产率/ %	生物毒效/ (IU·mL <sup>-1</sup> )
蓝藻	4.12×10 <sup>8</sup>	3.57×10 <sup>8</sup>	86.7	282
LB	6.51×10 <sup>8</sup>	3.7×10 <sup>7</sup>	56.8	289

## 2.2 影响因素分析

### 2.2.1 蓝藻含固率的影响

废水的含固率是指废水中所含有的溶解性固体和悬浮固体的总和。含固率不同，发酵效果也不同。从图3 可以看出，在蓝藻含固率为2% 时Btk 130 发酵效果最好，48 h 后其活菌数及抗热芽孢数分别为6.35×10<sup>8</sup>、5.65×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>，远高于含固率为1% 和3% 的发酵效果。生物毒效与活菌数及抗热芽孢数结果基本一致。在蓝藻含固率为2% 时Btk 130 生物毒效达到最高，为358 IU·mL<sup>-1</sup>，高于含固率为1%和3%的31.62% 和33.09%。这是因为培养基含固率过低，培养基中营养物质较少，不能满足菌体生长需要；含固率过高，微生物发酵周期延长，芽孢及晶体形成受到抑制。同时培养基含固率越高，氧传递速度越慢，从而导致溶解氧减少，发酵过程也会受到抑制。

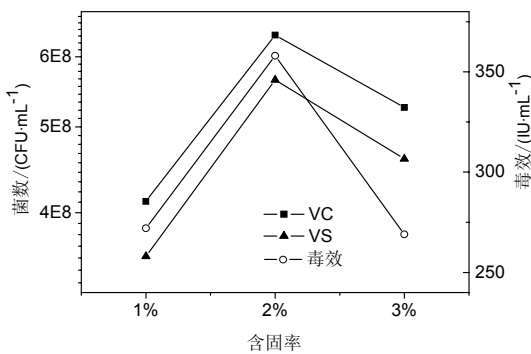


图3 培养基含固率对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.3 Effects of solid percentage of culture on the fermentation of Btk 130

### 2.2.2 接种物种龄的影响

调节蓝藻含固率为2%，分别移取2%（体积分数）分别接种培养时间为6、9、12 和15 h 的接种物进行发酵，发酵48 h 后结果见图4。从图4 可知，种龄为9 h 发酵效果最佳，其活菌数、抗热芽孢数和毒效均达到最高值，分别为6.38×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>、5.69×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>和385 IU·mL<sup>-1</sup>。结果表明，Btk 130在9 h 新陈代谢最旺盛，菌体活力最强。这是因为接种物种龄过低或过高，种子菌体活力降低，发酵延滞期长，从而影响芽孢和晶体的形成从而影响生物毒效。

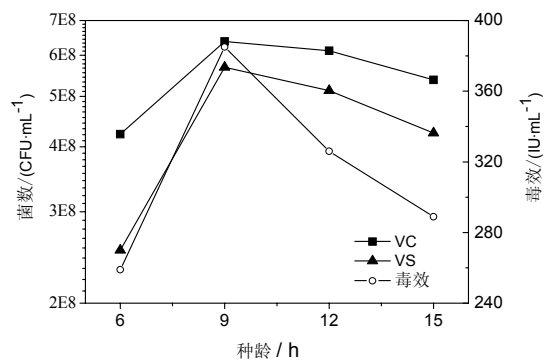


图4 接种物种龄对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.4 Effects of seed age on the fermentation of Btk 130

### 2.2.3 接种量的影响

调节蓝藻含固率为2%，分别接种1%、2%、3%、4%（体积分数）的接种物进行发酵，发酵48 h 后结果见图5。从图5 可知，接种量为2%时，其生物毒效达到401 IU·mL<sup>-1</sup>，远高于接种量为1%时的259 IU·mL<sup>-1</sup>。随着接种量的增加，活菌数、抗热芽孢数及生物毒效没有明显提高。Lachha<sup>[14]</sup>、卢娜<sup>[15]</sup>等研究结果表明，接种量为2%时可以满足发酵需要。接

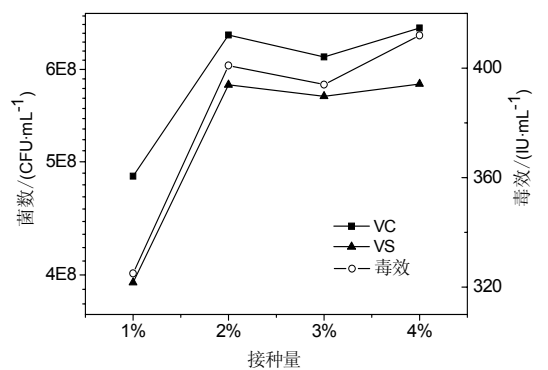


图5 接种物接种量对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.5 Effects of inoculum quantity on the fermentation of Btk 130

种量过少, 发酵时菌体总数增长过慢, 发酵周期延长; 接种量多, 菌体总数增长较快, 发酵周期较短, 进入发酵稳定期时间越短; 但是接种量过多, 菌体生长过快, 营养物质消耗较多, 不能满足后期芽孢及晶体蛋白形成的需要。因此, 接种量为2%时可以满足Btk 130 发酵需要。

2.2.4 初始 pH 的影响

pH 不仅影响芽孢的萌发, 而且也影响芽孢的形成。据研究, pH 值为7.0 左右时, 芽孢萌发率最高, 当pH值<6.5 或> 8.0 时, 萌发率均在45%以下<sup>[16]</sup>。不同初始pH 值条件下Btk 130 发酵效果见图6。从图6可知, Btk 130 在pH为7 和7.5 时发酵效果较好, 生物毒效可达 532 IU·mL<sup>-1</sup> 和 534 IU·mL<sup>-1</sup>。现有研究表明, Btk 参与合成伴孢晶体的酶最适pH 为6.5 ~ 7.5。在对数生长期中, 由于糖代谢产生大量有机酸, pH 会迅速下降, 当pH 小于6.5时, 严重影响晶体毒素蛋白的形成。如果发酵过程中pH 过高, 又会使营养体增殖提前结束, 影响到芽孢和晶体的产量。并且碱性条件下晶体毒素蛋白容易分解, 发酵液毒效降低。

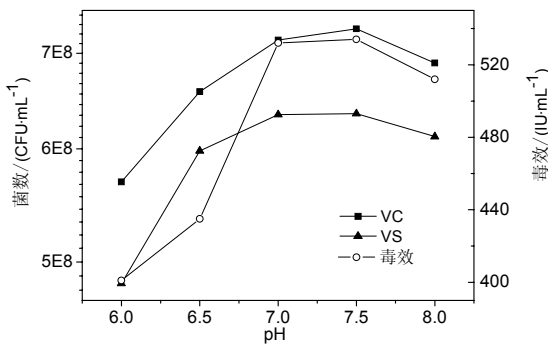


图 6 初始 pH 对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.6 Effects of solid percentage on the fermentation of Btk 130

2.2.5 转速的影响

苏云金杆菌是一种好气性芽孢杆菌, 在分解和利用发酵基质以及合成自身物质时需要消耗大量氧气。转速是衡量摇瓶发酵可溶性氧的一个重要因素。转速越高, 体系混合效果好, 氧传递速度高, 培养基中可溶性氧浓度高。图7为Btk 130在不同转速发酵48 h 后的发酵效果。从图7可知, 随着摇床转速升高, 发酵效果逐渐提高, 在200 r·min<sup>-1</sup> 时达到最高值, 生物毒效可达538 IU·mL<sup>-1</sup>。当转速升为 250 r·min<sup>-1</sup>时, 毒效降低, 这可能与发酵体系中剪切力过高有关<sup>[17]</sup>。

2.2.6 温度影响

苏云金杆菌的生长发育与温度关系密切。温度直接影响细胞内酶的形成与活性, 关系到细胞对营

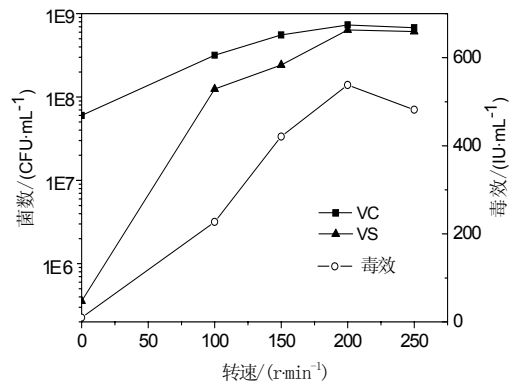


图 7 摇瓶转速对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.7 Effects of solid percentage on the fermentation of Btk 130

养物质的吸收与利用, 并影响到菌体数量与伴孢晶体质量。大量研究表明, 苏云金杆菌的最适生长温度为28 ~ 32 °C<sup>[18]</sup>, 发酵温度过高, 会导致毒素基因丢失, 毒效降低; 温度过低, 则生长缓慢, 发酵周期延长, 芽孢及晶体蛋白形成受到抑制。本试验结果表明, Btk 130 在30 °C 时发酵效果最好 (图8)。温度过高或过低, 均不利于菌体生长、芽孢及晶体蛋白的形成。

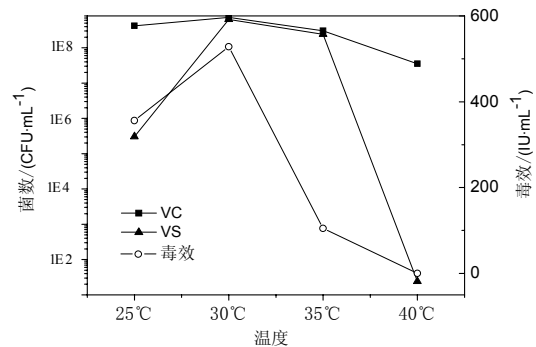


图 8 温度对 Btk 130 发酵的影响  
Fig.8 Effects of temperature on the fermentation of Btk 130

3 结论

(1) 蓝藻是生物杀虫剂菌株 Btk 130 的一种良好发酵原料。Btk 130 菌株能在蓝藻为唯一原料的培养基上正常生长发育, 并产生抗热性芽孢与伴孢晶体。在 30 °C 与 200 r/min 的往复式摇床培养 48 h, 其生物毒效可达 282 IU·mL<sup>-1</sup>, 与常规 LB 培养基相当。

(2) 培养条件优化结果表明, Btk 130 以蓝藻为唯一培养基的最佳培养条件为: 蓝藻含固率为 2%、初始 pH 为 7.0、接种物种龄为 9 h、接种量为 2%、培养温度为 30 °C、摇瓶转速为 200 r·min<sup>-1</sup>。该条件下发酵 48 h, Btk 130 活菌数及抗热芽孢数可达 7.32×10<sup>8</sup> 和 6.38×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 生物毒效为 528 IU·mL<sup>-1</sup>。

(3) 本研究不仅为蓝藻的资源化处置提供了一条崭新的途径, 而且可显著降低微生物杀虫剂的生产成本。

### 参考文献:

- [1] ZHUANG L, ZHOU S G, LIU Z, et al. Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* by solid state fermentation using sewage sludge: effects of heavy metals[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(7): 4820-4826.
- [2] POOPATHI S, KUMAR K A, KABILAN L, et al. Development of low-cost media for the culture of mosquito larvicides, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(3): 209-216.
- [3] COUCH T L, ROSS D A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, 22(7): 297-3104.
- [4] 常明, 周顺桂, 倪晋仁. 微生物转化污泥制备苏云金杆菌生物杀虫剂[J]. *环境科学*, 2006, 27(7): 1450-1455.  
CHANG Ming, ZHOU Shungui, LU Na, et al. Bioconversion of sewage sludge to biopesticide by *Bacillus thuringiensis*[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(7): 1450-1455.
- [5] 杨建州, 温官, 张洪勋, 等. 味精废水发酵培养苏云金芽孢杆菌的研究[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2000, 1(6): 28-32.  
YANG Jianzhou, WEN Guan, ZHANG Hongxun, et al. Study on fermentation propertiea of *Bacillus thuringiensis* in the glutamate wastewater[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2000, 1(6): 28-32.
- [6] SAKSINCHI S, SUPHANTHARIKA M, VERDUYN C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*: A physiological study[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 17: 307-316.
- [7] ADAMS T T, EITEMAN M A, ASANG M J. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* spore production in batch culture using broiler litter extracts as complex media[J]. *Bioresource Technology*, 1999, 67: 83-87.
- [8] 卢娜, 周顺桂, 常明, 等. 利用玉米浸泡液制备苏云金杆菌生物杀虫剂[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(12): 1978-1983.  
LU Na, ZHOU Shungui, CHANG Ming, et al. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using corn steepwater as raw material[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(12): 1978-1983.
- [9] YUAN Y, CHEN Q, ZHOU S G, et al. Bioelectricity generation and microcystins removal in a blue-green algae powered microbial fuel cell[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 187: 591-595.
- [10] MINOWA T, SAWAYAMA S. A novel microalgal system for energy production with nitrogen cycling[J]. *Fuel*, 1999, 78: 1213-1215.
- [11] 胡萍, 严群, 宋任涛, 等. 蓝藻与污泥混合厌氧发酵产沼气的初步研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3: 559-563.  
HU Ping, YAN Qun, SONG Rentao, et al. Biogas production through anaerobic digestion from the mixture of blue algae and sludge[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3: 559-563.
- [12] 王利娟, 谢利娟, 杨桂军, 等. 不同填充剂及复合微生物菌剂对蓝藻堆肥效果的影响[J]. *环境工程学报*, 2009, 12: 2261-2265.  
WANG Lijuan, XIE Lijuan, YANG Guijun, et al. Impact of different bluking agents and compound microbial inoculant on blue algae composting[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 12: 2261-2265.
- [13] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 43-44.  
ZHAO Bin, HE Shaojiang. *Microbiology Experiment*[M]. Beijing: Science Press, 2002: 69-71.
- [14] LACHHAB K, TYAGI R D, VALERO J R. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: Effect of inoeulum and sludge solids concentration[J]. *Process Biochemistry*, 2001, 37(2): 197-208.
- [15] 卢娜, 周顺桂, 常明, 等. 玉米浸泡液制备苏云金杆菌生物杀虫剂的影响因素研究[J]. *环境工程学报*, 2007, 1(9): 126-130.  
LU Na, ZHOU Shungui, CHANG Ming, et al. Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using corn steepwater as raw material[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2007, 1(9): 126-130.
- [16] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1993.  
YU Ziniu. *Production and Application of Bacillus thuringiensis Preparations*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1993.
- [17] WU W T, HSU Y L, KO Y F, et al. Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 58: 175-177.
- [18] MOTTIS O N, CONVERSE V, KANAGARATNAM P, et al. Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD 133)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1996, 67: 129-136.

## Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using blue algae as raw material

CUI Jian<sup>1</sup>, LIU Zhi<sup>2</sup>, WANG Yueqiang<sup>3</sup>, XU Rongxian, ZHOU Shungui<sup>3</sup>

1. China Animal Husbandry Industry Co. Ltd., Beijing 100070, China;

2. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. Guangdong Institute of Eco-Environmental and Soil Sciences, Guangzhou 510650, China

**Abstract:** This study investigated the bioconversion of blue algae into *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. The shake-flask experiments were conducted to study the effects of solid concentration of blue algae, inoculum age, inoculation amount, initial pH, shake frequency and fermentation temperature on the bacterial growth, spore formation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk). The experimental results showed that the blue algae wastewater, without any pretreatment procedures, was a potential raw material for Btk growth, sporulation and endotoxins synthesis. After 48-h fermentation, a higher sporulation of 86.7% was observed using blue algae wastewater compared to the Luria-Bertani medium, and an entomotoxicity of 282 IU·mL<sup>-1</sup> was achieved that was comparable to the value obtained from the Luria-Bertani medium. The optimal fermentation conditions for Btk production were: 2% for solid concentration of blue algae, 7.0 for initial pH, 9 h for inoculum age, 2% for inoculum size, 200 r·min<sup>-1</sup> for shake frequency and 30 °C for fermentation temperature. The optimal condition for Btk fermentation resulted in a total viable count of 7.32 CFU·mL<sup>-1</sup>, a heat-resistant spore count of 6.38 CFU·mL<sup>-1</sup> and an entomotoxicity value of 528 IU·mL<sup>-1</sup> at 48 h. This new approach offers a safe environmental alternative for blue algae wastewater treatment/disposal, and also a promising way to reduce the production cost of biopesticides.

**Key words:** blue-green algae; biopesticide; *Bacillus thuringiensis*; fermentation