

固定化苏云金杆菌以色列变种控制水中红虫的研究

张金松¹, 潘晶², 赵庆良², 周令¹

(1. 深圳市水务[集团]有限公司, 深圳 518031; 2. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090)

摘要:采用聚乙烯醇(PVA)加少量海藻酸钠及活性炭的方法固定一株对红虫具有高效毒力的苏云金杆菌以色列变种(B.t.i)。结果表明,控制质量分数分别为10%PVA、1%海藻酸钠和20%活性炭,采用4%CaCl₂的饱和硼酸溶液(pH为6.7)作为交联剂且交联时间为24h时,制得的凝胶颗粒机械强度好,操作简单,制作成本低。B.t.i固定化微球缓慢释放,且对红虫具有很高的毒力作用。

关键词:固定化苏云金杆菌以色列变种;水处理;红虫

中图分类号:X703.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)05-0109-03

Control of Chironomids in Water by Immobilized *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac

ZHANG Jin-song¹, PAN Jing², ZHAO Qing-liang², ZHOU Ling¹

(1. Shenzhen Water Group Co. Ltd., Shenzhen 518031, China; 2. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: A strain from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac (B.t.i), having a fatal toxicity to chironomids, was immobilized in the PVA-H₃BO₃ gel beads confected with a bit of sodium alginate and activated carbon. The result showed that optimal weight ratios were 10% PVA, 1% sodium alginate and 20% activated carbon, respectively. When 4% calcium chloride saturated boric acid solution (pH=6.7) was used as gelatin agent for gelating 24h, the produced gel beads had good performance in mechanical strength. This method is proved to be simple and cheap. The toxicity of the beads to chironomids is high and the release is slow.

Key words: immobilization of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac; water treatment; chironomid

我国南方城市气候常年温暖潮湿,适于昆虫繁殖,在地表水体普遍受到污染的情况下,水源容易滋生红虫,进入供水系统,成为困扰国内外供水界的一个难题^[1,2]。红虫属于昆虫双翅目摇蚊科的摇蚊的幼虫^[3],现有的治理措施主要是物理、化学、生物等方法,但是这些手段存在成本高、见效慢等缺点,难以在实际生产中推广应用。据报道^[4],苏云金杆菌以色列变种(*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac,以下简称 B.t.i)是苏云金杆菌中唯一确知具有防治蚊虫的活性菌株,而且对高等动物无毒害。B.t.i的主要杀虫活性物质为伴孢晶体蛋白和芽孢,其中伴孢晶体蛋白是 B.t.i 在形成芽孢时产生的一类蛋白质。

细胞固定化技术是利用化学或物理的手段将游离细胞定位于限定的空间区域,并使其保持活性,反复利用的一种新型生物技术^[7]。固定化方法主要有吸附法、交联法、包埋法^[5]。聚乙烯醇(PVA)包埋材料具有强度好、化学稳定性好、价格低廉等特点,是一种在水处理中具有实际应用可能的包埋材料^[5]。本研究利用 PVA 对 B.t.i 进行包埋时,添加1%的海藻酸钠作为助形剂,能增强 PVA 凝胶的成球能

力,有效地克服附聚现象,凝胶成球性好,操作简单^[6],同时加入少量活性炭,可以达到吸附与包埋的双重效果。

1 材料和方法

1.1 菌种

苏云金杆菌以色列变种(B.t.i)从微生物制剂分离纯化得到。

1.2 培养基

种子培养基为:牛肉膏0.3%,蛋白胨1%,NaCl 0.5g,琼脂1.5%~2.0%,pH=7.2,发酵培养基为:玉米淀粉1%,鱼粉2%,棉子饼粉3%,黄豆饼粉1%,酵母粉0.3%,CaCO₃1%,pH=7.2。

1.3 发酵菌液对红虫毒杀实验

无菌水将发酵液稀释成含有若干个菌的溶液各100 mL,对照组溶液为100 mL 无菌水,分别放入敞口容器做毒力实验。放入30条3龄红虫,2滴牛奶,

收稿日期:2003-10-20;修订日期:2003-12-16

基金项目:国家高新技术研究发展计划(863计划)项目
(2002AA601120)

作者简介:张金松(1963~),男,教授级高工,主要从事水处理工艺及饮用水深度净化技术研究。

3 滴泥沙,观察 24h 红虫死亡率,实验重复 3 次.

1.4 B.t.i 的固定化

B.t.i 的固定化按图 1 所示进行.

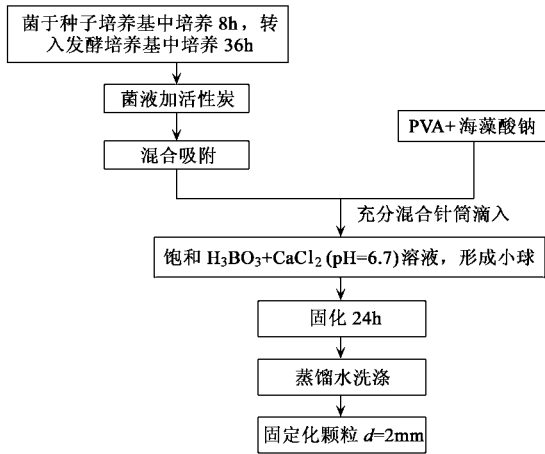


图 1 菌固定化流程
Fig.1 Process of immobilizing B.t.i

1.5 菌的释放和毒杀红虫实验

(1)微球的累积释放 5 mL 混合液(质量分数为 10 % PVA、1 % 海藻酸钠、20 % 活性炭和 20 % 菌液)制作的微球放置于盛有 150 mL 无菌水的无菌培养皿中,加盖,共做 6 个,每隔一定时间测定其中一个的细菌总数,确定微球释放菌和活芽孢的数目,然后从中倒出 100 mL,对照组溶液为 100 mL 无菌水,分别放入敞口容器做毒力实验,放入 30 条 3 龄红虫,2 滴牛奶,3 滴泥沙,观察 24h 红虫的死亡率,实验重复 3 次.

(2)微球的缓慢释放 5 mL 混合液(同上)制作的微球放置于盛有 150 mL 无菌水的无菌培养皿中,加盖,每 24h 测定细菌总数,换无菌水 1 次,倒出水取 100 mL,对照组溶液为 100 mL 无菌水,分别放入敞口容器做毒力实验,放入 30 条 3 龄红虫,2 滴牛奶,3 滴泥沙,观察 24h 红虫的死亡率,实验重复 3 次.

2 结果与讨论

2.1 固定化细胞的制备条件

采用 PVA 作为固定化载体,PVA 浓度太小,颗粒形状不规则,有拖尾.添加少量海藻酸钠可克服两液滴粘连现象,有助于颗粒成型.添加少量活性炭能改变其通透性,有利于菌和伴孢晶体的释放,但活性炭加入量太大,孔径过大,释放的速度增大,毒力的

持效时间会缩短.

2.1.1 PVA 浓度的影响

PVA 浓度对固定化操作和固定化菌的性质有显著影响.表 1 是最终浓度对操作性、成球性、固定化菌颗粒的机械强度(以手感确定)的影响,综合考察这些因素,选定 PVA 最终浓度为 10 %.

表 1 PVA 浓度对固定化效果的影响					
Table 1 Effect of PVA concentration on immobilization					
PVA 最终浓度/ %	4	6	8	10	12
操作性	较易	易	易	易	难
成球性	好	好	好	好	差
相对机械强度	弱	较强	强	很强	很强

2.1.2 交联剂的影响

交联剂 pH 值和浓度对固定化操作和固定化菌的性质有显著影响.表 2 是最终 pH 值和浓度对操作性、成球性、固定化菌颗粒的机械强度的影响.综合考察这些因素,选定交联剂是 4 % 的 CaCl₂ 饱和硼酸的溶液(pH 为 6.7).

表 2 交联剂浓度和 pH 值对包埋效果的影响						
Table 2 Effect of coagulant agent pH and concentration on immobilization						
颗粒性能	交联剂浓度		交联剂 pH			
	稀溶液	饱和溶液	6.0	6.7	7.0	8.0
操作性	易	易	易	易	易	易
成球性	差	好	较好	好	较好	差
相对机械强度	一般	好	一般	好	好	差

2.2 发酵液中菌数与红虫死亡率关系

红虫的死亡率随着发酵液中菌数的增加而增加,即红虫的杀灭效果与发酵液菌数正相关,如图 2 所示,对照组红虫死亡率为 0.

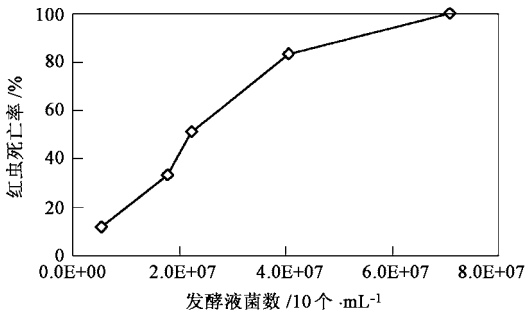


图 2 发酵液菌数与红虫死亡率关系
Fig.2 The relationship between zymogenic amount and the death rate of red worm

2.3 释放曲线和毒力曲线

2.3.1 微球的累积释放和毒力曲线

微球累积释放 *B.t.i* 的曲线如图 3 所示,微球释放的菌数随着时间的增加而增加,但到一定时间后,细菌数几乎不再增加,原因是微球内部的细菌数和溶液中的细菌数相同,细菌的释放达到动态平衡.从毒力曲线(见图 4)可以得出,固定化微球对红虫具有灭杀作用,且在静水环境这种毒杀作用持续的时间会更长,对照组红虫死亡率为 0.

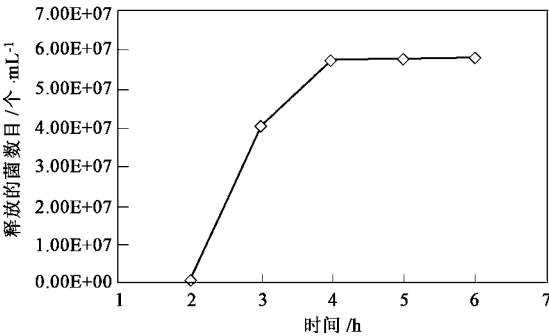


图 3 微球的累积释放曲线

Fig.3 The cumulative release of gel beads

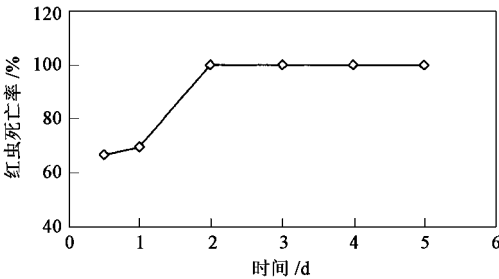


图 4 微球累积释放毒力曲线

Fig.4 The cumulative release toxicity of gel beads

2.3.2 微球的缓慢释放和毒力曲线

微球缓慢释放 *B.t.i* 的曲线如图 5 所示,微球释放的菌数先增加后减少,最初微球内固定的菌逐

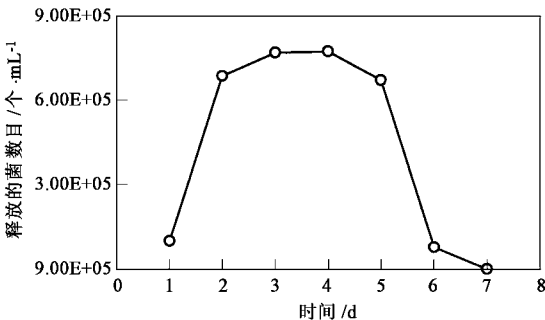


图 5 微球的缓慢释放曲线

Fig.5 The slow release of gel beads

渐释放出来,微球内的菌越来越少,释放出来的菌也随之减少.从毒力曲线(图 6)可得微球中菌是缓慢释放的,开始毒力缓慢增强,其后毒力下降,与细菌数结果吻合,对照组红虫死亡率为 0.加大其固定菌量可以延长其释放时间,同时可增强其毒力.

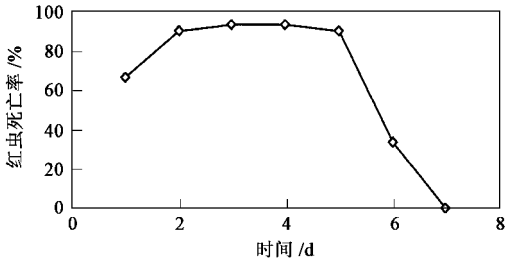


图 6 微球缓慢释放毒力曲线

Fig.6 The slow release toxicity of gel beads

3 结论

采用质量分数分别为 10 %PVA、1 %海藻酸钠、20 %活性炭,以 4 %CaCl₂ 的饱和硼酸溶液(pH 为 6.7) 作为交联剂,交联时间为 24h 时,制得的凝胶颗粒机械强度好,操作简单.*B.t.i* 固定化微球对红虫具有较高的毒力,而且其释放缓慢.发酵液菌数与红虫的死亡率正相关.通过菌体固定化,一方面可避免大量 *B.t.i* 进入制水工艺,另一方面使生物制剂易于回收与清除,又能减弱日光中的紫外线和制水工艺中液氯对晶体蛋白毒力的影响.利用生物防治技术进行蚊幼虫控制,是解决南方地区红虫问题的可能途径之一.

参考文献:

[1] Michael K Alexander. New Strategies for the Control of the Parthenogenetic Chironomid [J], Journal of the American Mosquito Control Association, 1997, 13(2):189 ~ 192 .
[2] Berg M B. Infestation of enclosed water supplies by chironomids (Diptera: Chironomidae): two case studies. In: P.S. Cranston (ed.). Chironomids - from Genes to Ecosystems[M]. Australia: CSIRO Publications, 1995 .
[3] 王俊才,鞠复华. 摇蚊幼虫的水生态研究进展[J]. 辽宁城乡环境科技, 1993, 18(3): 83 ~ 84 .
[4] 蒲蛰龙. 苏云金杆菌以色列变种防蚊治幼虫的研究[M]. 广州: 中山大学出版社, 1983 .
[5] 桥本奖,等. 第 24 回下水道研究代表会讲演集[R], 1988, 281 ~ 283 .
[6] 王双飞,陈嘉翔,等. PVA-H₃BO₃ 包埋白腐菌处理苇浆漂白废水的研究[J]. 中国造纸学报, 1997, 12: 75 ~ 81 .
[7] 于霞,柴立元,甘雪萍. 细胞固定化技术及其在废水处理中的应用研究[J]. 工业水处理, 2001, 21(10): 9 ~ 12 .