

# 苏云金芽孢杆菌和平沙绿僵菌混配对酒曲害虫大谷盗的毒杀效果研究

李新社<sup>1</sup>, 陆步诗<sup>2</sup>, 廖翔<sup>1</sup>

(1.邵阳学院生物与化学工程系, 湖南 邵阳 422000; 2.邵阳学院城市建设系, 湖南 邵阳 422004)

**摘要:** 利用苏云金芽孢杆菌与平沙绿僵菌混配杀灭酒曲害虫大谷盗。研究结果表明, 在温度 30 ℃、相对湿度为 73%~75% 的条件下, 苏云金芽孢杆菌与平沙绿僵菌液体制剂按 1:1 比例混配后, 使用量为 5 mL 时, 在杀虫第 20 天时可使大谷盗的死亡率与校正死亡率达 100%。与试验前相比, 酒曲的液化力、糖化力和发酵力分别下降了 15.2%、2.0% 和 1.2%。酒曲中细菌数、霉菌数及酵母菌数分别下降了 5.3%、0.3% 和 1.6%。

**关键词:** 微生物; 苏云金芽孢杆菌; 平沙绿僵菌; 大谷盗; 酒曲

中图分类号: Q93-3; TS261.1; TQ925.7 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2008)12-0020-03

## Research on Insecticidal Effects of *Bacillus thuringiensis* Mixed with *M.pinshaense* on Starter Insect *Tenebroides mauritanicus*

LI Xin-she<sup>1</sup>, LU Bu-shi<sup>2</sup> and LIAO Xiang<sup>1</sup>

(1. Department of Biology and Chemical Engineering, Shaoyang College, Shaoyang, Hu'nan 422000; 2. Department of Urban Construction, Shaoyang College, Shaoyang, Hu'nan 422004, China)

**Abstract:** The starter insect *Tenebroides mauritanicus* could be killed by use of *Bacillus thuringiensis* mixed with *M.pinshaense*. The research results showed that as the temperature was at 30 ℃, the relative humidity was 73%~75%, the mixture ratio of *Bacillus thuringiensis* and *M.pinshaense* was 1:1, and the use level was 5 mL, the mortality and the corrected mortality of *Tenebroides mauritanicus* could reach up to 100% 20 d after insect-killing. Compared with the starter before insect-killing, its liquefying power, saccharifying power, and fermenting power dropped by 15.2%, 2.0% and 1.2% respectively, and the number of bacteria, mold and yeast in the s tarter decreased by 5.3%, 0.3% and 1.6% respectively.

**key words:** microbe; *Bacillus thuringiensis*; *M.pinshaense*; *Tenebroides mauritanicus* panzer; starter

“曲是酒之母”, 酒曲的生产是酿制优质白酒的一道重要工序。传统工艺要求新鲜酒曲必须入库贮存 3~6 个月, 而在贮存期, 曲库内丰富食料为曲虫的生长、发育提供了优越的条件, 在适宜的温度条件下, 曲虫极易爆发成灾<sup>[1]</sup>。

大谷盗 (*Tenebroides mauritanicus* (Linnaeus)) 属鞘翅目, 谷盗科, 是酒曲贮存期的主要害虫之一<sup>[2]</sup>。目前对于大谷盗的治理在一些农副产品生产部门采用以 80% DDV1:30 高浓度对仓顶、墙壁、地面喷雾, 密封熏蒸消毒。对危害较重、虫口密度较大的仓库, 以含量为 33% 的磷化铝片剂进行熏蒸灭虫处理<sup>[3]</sup>。然而, 随着昆虫抗药性的增强, 有机农药高毒、高残留、对人畜的毒害及环境的污染逐步引起了人们的重视。生物农药具有来源广、成本低、杀虫谱较广、低毒或无毒、无污染等特点, 日益

受到人们的重视, 寻求一种生物学防治酒曲害虫的方法迫在眉睫。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 制剂是目前世界上产量最大的微生物杀虫剂, 它在形成芽孢的同时, 产生伴孢晶体即  $\delta$ -内毒素, 这种晶体蛋白在进入昆虫中肠, 在中肠碱性条件下降解为具有杀虫活性的毒素, 破坏肠道内膜, 引起肠道穿孔, 使昆虫停止取食, 最后因饥饿和败血症而死亡。Bt 杀虫剂广泛应用于防治农林害虫、贮藏害虫和卫生昆虫, 目前国内已有多种商品制剂<sup>[4]</sup>。

绿僵菌 (*M.pinshaense*) 是用于防治和杀死目标昆虫的真菌杀虫剂, 它侵染寄主昆虫时, 通过分生孢子附着在昆虫体表, 孢子萌发后产生入侵菌丝, 穿过体壁, 在虫体内大量繁殖, 产生毒素, 形成圆筒状孢子, 最终导致寄

基金项目 湖南省教育厅资助科研项目(编号 07C670)。

收稿日期: 2008-09-12

作者简介: 李新社(1965-), 女, 湖南省邵阳人, 副教授, 主要从事微生物教学与应用研究工作。

主死亡<sup>[5]</sup>。

本课题拟对苏云金芽孢杆菌杀虫剂和平沙绿僵菌混配对酒曲害虫大谷盗毒杀效果进行研究, 寻求一种生物学防治酒曲害虫的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) GIM1.144 菌株, 由广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心提供。平沙绿僵菌 (*M.pinshaense*) GIM3.437 菌株, 由广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心提供。

#### 1.1.2 供试昆虫

大谷盗 (*Tenebrio-mauritanicus* (Linnaeus)) 采集于湖南湘窖酒业股份有限公司大曲车间。

#### 1.1.3 培养基与试剂

##### 1.1.3.1 苏云金芽孢杆菌培养基

菌种活化用培养基: 4.0% 玉米淀粉、2.0% 黄豆饼粉、2.0% 酵母粉、2.0% 鱼粉、0.5% 蛋白胨, pH 值为 7.4, 培养温度为 32℃。扩大培养用培养基: 葡萄糖 4%、蛋白胨 4%、酵母水溶性浸出物 2.5%、无机盐混合 0.5%, 培养温度: 1~20 h 为 30℃, 20 h 后 33℃ 培养<sup>[6]</sup>。

##### 1.1.3.2 平沙绿僵菌培养基

活化菌种用固体培养基: 以蔗糖为碳源产孢量最大, 氮源以酵母最好, 加入微量元素 Mn 产孢量最大, 最佳 C:N 为 1~2.5:1, 最佳产孢温度为 27℃, 最佳培养时间 7 d 以内。液体深层培养绿僵菌的适宜温度应为 25~28℃。适宜的 pH 值为 6.5~6.8<sup>[7]</sup>。

##### 1.1.3.3 害虫培养基

湖南湘窖酒业股份有限公司大曲车间提供的酒曲。

##### 1.1.3.4 试剂

均为市售分析纯商品。

##### 1.1.4 主要设备

超净工作台、恒温干燥箱、生化培养箱、高压蒸汽灭菌锅、显微镜、摇床等。

## 1.2 方法

### 1.2.1 液体杀虫剂的制备

#### 1.2.1.1 Bt 杀虫剂制备

菌种活化 (28~30℃ 培养 12~16 h, 2~3 次) → 一级种子培养 (32℃ 培养 14~16 h) → 二级种子培养 (摇床 170 r/min, 30℃ 培养 6~10 h) → 液体杀虫剂 (摇床 170 r/min, 30℃ 培养 1~20 h, 20 h 后 33℃)<sup>[8]</sup>。

#### 1.2.1.2 绿僵菌杀虫剂的制备

菌种活化 (31℃ 培养 4~7 d) → 一级种子的培养 (pH6.5~6.8, 27℃ 培养 7 d) → 液体杀虫剂 (pH6.5~

6.8, 25~28℃ 培养 7 d)。

### 1.2.2 Bt 液体制剂芽孢数和平沙绿僵菌孢子数检测<sup>[9]</sup>

摇动菌液使其混合均匀, 用无菌微量移液管取菌液 0.01 mL 于载玻片上, 并用无菌接种环均匀涂布在 1 cm<sup>2</sup> 的面积上, 风干, 固定, 结晶紫染色 1 min, 冲洗, 干燥备用。用测微尺在微量显微镜油镜下测定视野直径, 并以  $S=\pi r^2$  公式计算出视野面积, 将涂布片置于载物台上, 以油镜观察 10 个视野, 计算每一视野中的孢子个数。菌液中孢子数 (个/mL) = (1 cm<sup>2</sup> / 一个视野面积) × 视野中的平均菌数 × 100 × 稀释倍数。

检测的 Bt 杀虫剂的芽孢数为 3.74 × 10<sup>9</sup> 个/mL, 绿僵菌的孢子数为 5.69 × 10<sup>11</sup> 个/mL。

### 1.2.3 杀虫剂的混配

Bt 制剂与平沙绿僵菌液体制剂采用 1:1 的比例混合, 分别按 5.0 mL、4.5 mL、4.0 mL、3.5 mL 和 3.0 mL 添加到定量酒曲当中, 每组做 2 个平行试验, 并以空白做对照。

### 1.2.4 微生物数量的检测

采用平板菌落计数法<sup>[10]</sup>。

### 1.2.5 糖化力的检测<sup>[11]</sup>

以 1 g 固体曲在 40℃、pH4.6 时, 1 h 能将 2% 的可溶性淀粉水解生成 1 mg 葡萄糖时, 定为一个糖化力单位。单位为 mg/g·h。

### 1.2.6 液化力的检测<sup>[11]</sup>

采用碘量法。以每 1 mL 液体曲, 在 60℃、pH6.0 时, 1 h 内液化淀粉的 mg 数。单位为 mg/g·h。

### 1.2.7 发酵力的检测<sup>[11]</sup>

采用 CO<sub>2</sub> 重量法。发酵力以 CO<sub>2</sub> 重量计, 发酵力 (g/100 g) = [(W<sub>1</sub> - W<sub>2</sub>) / W] × 100

式中: W<sub>1</sub>——发酵前发酵瓶加内容物重 (g);

W<sub>2</sub>——发酵后发酵瓶内容物重 (g);

W——取样量 (g)。

### 1.2.8 杀虫试验前酒曲各指标检测

杀虫前对酒曲的液化力、糖化力、发酵力、细菌数、霉菌数及酵母菌数进行检测, 检测结果见表 1。

表 1 杀虫试验前酒曲的质量指标 (个/g 曲)

样品	液化力	糖化力	发酵力	细菌数	霉菌数	酵母数
a	1.2632	693.74	4.82	3.50 × 10 <sup>7</sup>	5.89 × 10 <sup>6</sup>	2.43 × 10 <sup>6</sup>
b	1.1429	671.32	4.97	4.26 × 10 <sup>7</sup>	5.86 × 10 <sup>6</sup>	2.49 × 10 <sup>6</sup>
c	1.2371	677.28	5.21	4.29 × 10 <sup>7</sup>	5.82 × 10 <sup>6</sup>	2.38 × 10 <sup>6</sup>
平均值	1.2144	680.78	5.00	4.14 × 10 <sup>7</sup>	5.87 × 10 <sup>6</sup>	2.43 × 10 <sup>6</sup>

### 1.2.9 杀虫试验

将采集回来的大谷盗按每瓶 20 只分装在广口瓶中, 称取 50 g 的酒曲作为培养基, 并将混合液体制剂按设定配比喷洒到酒曲上。每个处理重复 2 次, 以空白处

理作对照。然后置于 30℃、相对湿度 73%~75% 的培养箱中培养,每天取出观察杀虫效果并记录死虫数。计算死亡率与校正死亡率。

死亡率与校正死亡率的计算方法如下:

$$\text{死亡率}(\%) = \text{死虫数} / \text{供试虫数} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率}(\%) = (\text{死亡率} - \text{对照死亡率}) / (100 - \text{对照死亡率}) \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 混合液体制剂的杀虫效果

将苏云金芽孢杆菌杀虫剂与平沙绿僵菌按设定混配比例添加到酒曲中,并以酒曲为培养基饲养大谷盗,每天记录死虫数,计算死亡率,结果见表 2。

表 2 混合液体制剂的杀虫效果

饲养时间(d)	空白	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0
3	0	0	1	1	2	0
4	0	0	2	1	0	0
5	1	0	3	1	2	0
6	2	0	2	3	2	1
7	1	0	1	1	1	1
8	0	0	2	2	1	0
9	0	0	1	2	3	2
10	0	1	1	2	1	1
11	1	0	1	1	1	0
12	2	0	2	0	3	2
13	0	1	2	2	3	2
14	1	1	1	0	2	1
15	0	0	1	1	1	0
16	1	0	2	1	1	0
17	0	2	0	1	0	0
18	1	1	0	1	0	0
19	0	0	1	0	0	1
20	1	2	0	1	0	0
死亡率(%)	47.5	100	97.5	97.5	92.5	75.0
校正死亡率(%)		100	95.23	95.23	85.71	52.38

由表 2 可知,当混合液体制剂使用量为 5 mL 时,试验用虫在第 20 天已经全部死亡,死亡率和校正死亡率均达 100%。

### 2.2 杀虫后酒曲各指标的检测

对混合液体制剂最佳使用量杀虫后的酒曲液化力、糖化力、发酵力、细菌数、霉菌数及酵母菌数进行检测,结果见表 3。

表 3 杀虫试验后酒曲的质量指标 (个/g 曲)

样品	液化力	糖化力	发酵力	细菌数	霉菌数	酵母数
a	1.0256	660.17	4.87	$3.86 \times 10^7$	$5.88 \times 10^5$	$2.38 \times 10^6$
b	1.0000	664.42	5.13	$3.94 \times 10^7$	$5.83 \times 10^5$	$2.44 \times 10^6$
c	1.0619	676.74	4.81	$3.98 \times 10^7$	$5.84 \times 10^5$	$2.37 \times 10^6$
平均值	1.0292	667.11	4.94	$3.92 \times 10^7$	$5.85 \times 10^5$	$2.39 \times 10^6$

对比表 1 和表 3,可看出,与杀虫前相比,杀虫后酒曲的液化力、糖化力、发酵力分别下降了 15.2%、2.0% 和 1.2%;细菌数、霉菌数及酵母菌数分别下降了 5.3%、0.3% 和 1.6%。

## 3 结论与讨论

### 3.1 结论

苏云金芽孢杆菌与平沙绿僵菌液体制剂按 1:1 比例混配后,使用量为 5 mL 时,在温度 30℃、相对湿度为 73%~75% 条件下,杀虫第 20 天时可使大谷盗的死亡率与校正死亡率均达 100%。比单用苏云金芽孢杆菌杀虫剂毒杀大谷盗(30℃ 条件下,Bt 液体制剂处理浓度为 0.004 mL/g 时,在杀虫的第 26 天,可使大谷盗校正死亡率达 91.8%)<sup>[12]</sup>效果要好。

与试验前相比,酒曲的液化力、糖化力、发酵力分别下降了 15.2%、2.0% 和 1.2%;酒曲中细菌数、霉菌数及酵母菌数分别下降了 5.3%、0.3% 和 1.6%。

### 3.2 讨论

在利用混合溶液防治大谷盗过程中杀虫周期较长,不利于害虫大规模爆发时的防治。如果通过基因工程等手段筛选杀虫效果更强、对大谷盗的毒性更强的菌种,可望杀虫周期缩短。

其实,曲虫的治理,除了施用杀虫剂以外,还可以采取其他一些方法配合使用。如曲酒害虫有耐湿不耐干的性能,曲块湿度相当低时,害虫容易死亡。因此,应保持曲房中空气干燥,有利于生产优质酒曲<sup>[13]</sup>。

由于试验时间短,没有太多的时间进行多次重复试验,以确定苏云金芽孢杆菌制剂和平沙绿僵菌最佳混配比例,试验中只探讨了二者以 1:1 的比列混配时的最佳使用量。同时,由于受时间及条件的影响,笔者获得的试验数据没有应用到酒厂做现场试验,但实验室条件下获得的数据能为酒曲害虫的微生物治理提供理论依据,为各酒厂治理酒曲害虫提供参考。

### 参考文献:

- [1] 程开禄,黄富,潘学贤,等.论析酒曲曲虫的发生及危害[J].酿酒,2005,(5):28-29.
- [2] 中国农业百科全书总编辑委员会昆虫卷编辑委员会,中国农业百科全书编辑部.中国农业百科全书·昆虫卷[M].北京:农业出版社,1990.
- [3] 程开禄,黄富,潘学贤.酒曲害虫的发生及危害规律研究.西南农业学报[J].2001,4(1):168-170.
- [4] 王成球,朱珠.苏云金杆菌 HD-1 制剂对小菜蛾的抗性筛选及抗性特征[J].中国生物防治,1999,(51):12-15.
- [5] Ana Paula G F, Itabajara da S V J, Aoi M, et al. In vitro

(下转第 26 页)

发酵性能较好的 YS3 酵母菌株进行 50 L 发酵罐的甘蔗汁发酵试验,在甘蔗汁浓度 23° Bx,起始 pH4.5,发酵温度 28 °C 进行发酵,降糖速率见图 2,产酒精图 3。

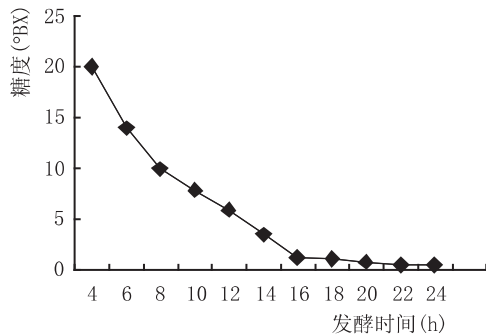


图 2 YS3 酵母菌降糖曲线

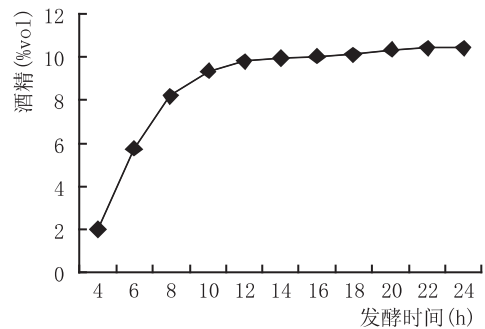


图 3 YS3 酵母菌的酒精发酵曲线

### 3 讨论

以甘蔗汁为发酵基质,对 YS 酵母原始菌株选育试验,选育出的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)YS3 菌株具有在较高温度下能够起发、能够耐较高浓度的糖度、发酵速率快、成熟醪液酒度高、残糖少的优良发酵性能,可以适应于甘蔗汁发酵生产燃料乙醇的要求。

#### 参考文献:

[1] 诸葛健,王正祥.工业微生物实验技术手册[M].北京:中国轻

工业出版社,1994.

[2] 王福荣.酿酒分析与检测[M].北京:中国化学工业出版社,2005.

[3] 陈叶福,王正祥,王晨霞,等.耐高温酵母菌株的分离、鉴定及其酒精发酵的初步研究[J].微生物学通报,2003,30(5):24-27.

[4] 马立安.耐高温酒精酵母的驯化与筛选[J].湖南农学院学报,2000,20(1):72-73.

[5] 穆文斌,余让扬,袁志强.酵母菌的分离及其特性的研究[J].酿酒,2004,31(1):29-30.

[6] 毛志群,张伟,檀建新.燃料乙醇用高产酒精酵母的筛选及鉴定[J].酿酒,2003,30(3):35-37.

(上接第 22 页)

assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*[J]. *Veterinary Parasitology*, 2000,94:117-125.

[6] 廖湘萍,付三乔,易华蓉,等.苏云金杆菌液态发酵培养基的优化[J].湖北农业科学,2007,46(4):571-572.

[7] 宋漳.金龟子绿僵菌液体深层培养研究[J].热带作物学报,2002,23(2):72-75.

[8] A.N.格拉泽,二介堂弘著;陈守文,喻子牛,等译.微生物生物技术-应用微生物学基础原理[M].北京:科学出版社,2003.145-168.

[9] 曲冬梅,弓爱君,高鹤永,等.苏云金芽孢杆菌毒力检测方法综述[J].生物技术通讯,2003,15(6):639-641.

[10] 沈萍,范秀容,李广武,等.微生物学实验(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2005.92-94.

[11] 蔡定域.酿酒工业分析手册[M].北京:轻工业出版社,1988.259-271.

[12] 李新社,曾建德,陆步诗,等.苏云金芽孢杆菌对大曲害虫大谷盗的毒杀效果研究[J].中国酿造,2008,192(8):47-49.

[13] 程开禄,黄富.酒曲害虫发生危害与酒曲生产周期关系的研究[J].酿酒科技,2000,(4):78-82.

## 未来 10 年习酒销售收入力争 30 亿元

本刊讯 据悉,自 1998 年成立茅台集团习酒有限责任公司以来,公司累计生产销售成品酒 57891 千升,实现销售 24.64 亿元,实现税金 5.13 亿元,上缴税金 4.34 亿元,实现利润 1.38 亿元。10 年来,习酒公司产量增长了 5.72 倍,销量增长了 2.84 倍,销售收入增长了 5.11 倍,员工收入增长了 7.35 倍。现在,习酒步入成熟企业的发展机遇期和高速增长期,争取在 3~5 年内创建 10~20 个销售 5000 万元以上的省外市场,开发 5~10 个销售 5000 万元以上的白酒品牌,提前实现“十一五”发展目标,加快技改步伐,在 2018 年前使生产能力力争达到浓香型半成品酒 16000 千升,酱香型半成品酒 12000 千升,成品酒包装 30000 千升,力争成为年销售收入 30 亿元的大型现代化白酒工业企业。(妮)