

# 提高布氏白僵菌产孢量的培养基及培养条件研究

李茂业 林华峰 刘苏 李世广

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

**摘要:** 采用液固两相培养法, 筛选出了适用于培养布氏白僵菌 Bbr84 菌株的培养基, 并测定了培养基、培养时间和光照条件对产孢量的影响。结果表明: 用液固双相培养法培养布氏白僵菌获取高孢粉, 在液相培养阶段, SDAY+2% 麦芽糖是较好的培养基; 固相培养阶段, 以大米 + 稻壳 + 黄粉虫粪组合产孢量较高, 且在培养的第五天白僵菌产孢量即达到高峰, 这比已报道的其他培养料配方的产孢高峰时间缩短 2-3 天。培养前期, 应以黑暗环境为主, 以增强菌丝生长, 但后期应当供给光照, 以促进菌丝大量产孢。

**关键词:** 布氏白僵菌 液固双相培养 培养技术 产孢量

## Study on Medium and Cultivation Conditions to Increase Spore Yield of *Beauveria brongniartii*

Li Maoye Lin Huafeng Liu Su Li Shiguang

(College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Using the Liquid-solid culture medium to select the suitable medium culture for the strain of Bbr84 and determine the spore yield of different medium, different time and different illumination of development. The results show that using liquid and solid media fermentation to culture *Beauveria brongniartii* Petch and obtain spores. SDAY supplied with 2% malt sugar was good liquid medium in the period of liquid culture. During the course of solid-phase culture, The solid culture medium of boiled rice mixed with the excrement of *Tenebrio molitor* L. and rice husk produced the most spore, and the peak of spore yield was 5 days after culture, 2-3 days was decreased according to former report. It should mainly give dark environment in order to increase hyphal growth in early period culture, however, the latter period should be adequate light so as to promote a large number of spore yield.

**Key Words:** *Beauveria brongniartii* Petch Liquid-solid culture Culture technique Spore yield

### 前言

布氏白僵菌 (*Beauveria brongniartii* Petch) 又名卵孢白僵菌, 是一种重要的昆虫病原真菌, 能够寄生 7 目 70 多种昆虫<sup>[1-3]</sup>。多年来, 我国用布氏白僵菌防治农林重要害虫如马尾松松毛虫、蛴螬、象甲和天牛等, 已获得较好效果<sup>[4,5]</sup>。有研究表明, 在田间每 m<sup>2</sup> 土壤以 10<sup>10</sup> 孢子处理, 能造成次年害虫流行病, 而且真菌在虫尸和土壤中的宿存保证了对下一代害虫的侵染, 从而维持其在田间的持效性<sup>[6]</sup>,

因而布氏白僵菌杀虫剂是目前防治地下害虫、发展无公害生产的首选生物药剂<sup>[7,8]</sup>, 在防治林业害虫方面, 布氏白僵菌粉剂已被大面积推广使用<sup>[9]</sup>。真菌的大量培养生产是满足田间应用的前提, 但迄今仍无成熟的白僵菌杀虫剂产品, 也缺乏高技术的工业化生产<sup>[10]</sup>。在当前真菌杀虫剂的生产中, 液固两相培养法由于经济实用、易于操作 (生产效率高) 而被广泛采用<sup>[11-13]</sup>。这种生产工艺中, 培养基质对产孢量影响显著, 而菌物产生的孢子是真菌杀虫剂中有

收稿日期: 2009-03-20

基金项目: 蒙国家自然科学基金重点项目 (30330500), 国家农业行业科研专项 (03\_200803003)

作者简介: 李茂业 (1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫病理及害虫生物防治

通讯作者: 林华峰 (1957-), 教授, 博士生导师, 主要研究方向为昆虫病理及害虫生物防治; E-mail: hf.lin@163.com

效活性成分,是评估真菌杀虫剂质量的重要指标。要使真菌大量产孢,满足真菌杀虫剂大量生产的需要,需要筛选出能使真菌大量产孢的合适培养基质,并掌握相关的培养技术。

本试验以对土栖害虫(特别是花生蛴螬)有高致病力的布氏白僵菌 Bbr84 菌株为材料,研究了液固两相培养阶段不同培养基质组合对菌株产孢量的影响,通过试验筛选出适合该菌株的液固两相培养基配方,并研究了接种量、培养时间及光照条件对产孢量的影响,为大量生产适于田间使用的布氏白僵菌提供技术数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

根据室内毒力测定的结果,选用对花生蛴螬毒力较强的布氏白僵菌 Bbr84 菌株作为供试菌株。

### 1.2 液相培养

采用 3 种液体培养基:PD 培养基(马铃薯 20%、葡萄糖 2%)、SDY 培养基(葡萄糖 4%、蛋白胨 1%、酵母粉 1%)、SDY 培养基+2%麦芽糖,将真菌孢子均匀接种于液体培养基中,置于 1000ml 三角瓶,温度 25℃,180r/min 摇床培养 96 h,得到种子培养液,每种培养基 3 次重复。

### 1.3 固相培养

1.3.1 培养基的选择 固体培养基以大米为基本组分,以稻壳、麦麸、麦芽糖和黄粉虫粪等为辅料,培养基组分与配比见表 1。

表 1 不同组分固体培养基上的产孢量

| 培养基组成      | 各组分配比<br>(质量比) | 产孢量<br>( $\times 10^9$ 孢子/g) |
|------------|----------------|------------------------------|
| 大米         | 1              | 1.1 $\pm$ 0.84d              |
| 大米+稻壳      | 10:1           | 18.4 $\pm$ 0.2c              |
| 大米+稻壳+麦芽糖  | 10:1:0.04      | 83.3 $\pm$ 1.87bc            |
| 大米+稻壳+麦麸   | 10:1:0.5       | 84.6 $\pm$ 2.45b             |
| 大米+稻壳+黄粉虫粪 | 10:1:0.5       | 112.8 $\pm$ 2.53a            |

1.3.2 接种 将 3 种种子培养液分别接种于固体培养基中,接种量为固体培养基重量的 10%。培养基置于灭过菌的有网眼的不锈钢托盘中,培养基初始含水率为 60%,25℃、95%RH 条件下培养 10 d,每处理重复 3 次。

1.3.3 光照处理 设置不同的光照处理时间,先连续黑暗培养然后连续光照培养,光照强度为 3400lx,黑暗培养时间加上光照培养时间为总培养时间(表 2),检测各处理中固体培养基的产孢量。

表 2 光照对产孢量的影响

| 处理 Treatment |              | 产孢量 spore yield<br>(10 <sup>9</sup> 孢子/g) |
|--------------|--------------|---|
| 暗培养 Dark(d)  | 光培养 Light(d) |   |
| 0            | 10           | 9.34 $\pm$ 1.16f                          |
| 2            | 8            | 11.83 $\pm$ 1.64e                         |
| 4            | 6            | 12.8 $\pm$ 1.02d                          |
| 6            | 4            | 18.4 $\pm$ 0.2a                           |
| 8            | 2            | 15.2 $\pm$ 1.50c                          |
| 10           | 0            | 16.7 $\pm$ 0.44b                          |

### 1.4 产孢量检测

待菌丝充分产孢后。用直径 30mm、高 50mm 取样器从培养基中多点取样,混合后从中称取 1 g,置于 250ml 三角瓶中,加 100ml 0.05%吐温-80 无菌水和若干玻璃珠,用 SZ-1 型快速混匀器振荡 20 min,将得到的孢子液稀释后,用血球计数板进行显微计数,重复 3 次,取平均值。同时取样用烘干法测定基质含水量,以每克干基质的孢子含量作为产孢量<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

2.1 不同液体种子培养基对固相培养基上产孢量的影响

表 3 三种种子培养液接种于固体培养基的产孢量

| 液体培养基<br>liquid medium | 产孢量( $\times 10^9$ 孢子/g)<br>spore yield |
|------------------------|---|
| PD                     | 17.8 $\pm$ 0.83bc                       |
| SDY                    | 18.2 $\pm$ 0.27ab                       |
| SDY+2%麦芽糖              | 18.4 $\pm$ 0.27a                        |

注:表中不同小写字母表示不同处理间差异显著( $P < 0.05$ )。Different small letters showed significant difference at 0.05 level. 下同 The same below

从表 3 可以看出,三种液体培养基的种子培养液分别接种于大米加稻壳(10:1 接种量)固体培养基上,产孢量最高是 SDY+2%麦芽糖,最低的是 PD,两者在 0.05 水平上差异显著,但与 SDY 差异

均不显著。说明液体培养基对固相阶段培养的产孢量影响不大。

## 2.2 固体培养基组分对产孢量的影响

表 1 表明,固相培养基中,稻壳是良好的培养基载体。以稻壳为载体的各组合产孢量均可达到  $18.4 \times 10^9$  孢子/g 以上,相比之下,仅以大米做培养基,产孢量只有大米加稻壳组合的 10%~25%。以黄粉虫粪加稻壳加大米组合在相同培养条件下的产孢量最高,为  $112.8 \times 10^9$  孢子/g。黄粉虫粪具疏松的团粒结构,表面包有黄粉虫消化道分泌液形成的微膜,透气性好,且含蛋白质、脂肪和粗纤维等<sup>[14,15]</sup>,有利于真菌菌丝生长发育,提高产孢量。

## 2.3 液体种子接入量对产孢量的影响

表 4 液固接种比对产孢量的影响

| 液固接种比(质量比) | 产孢量( $\times 10^9$ 孢子/g) |
|------------|--------------------------|
| 0.25:10    | $0.5 \pm 1.44e$          |
| 0.5:10     | $8.9 \pm 1.21d$          |
| 1:10       | $18.4 \pm 0.27ab$        |
| 1.5:10     | $18.8 \pm 0.73a$         |
| 2:10       | $17.7 \pm 0.89c$         |

本实验中,以大米加稻壳为固相培养基,设置不同的液固接种比(表 4),液固接种量不同对产孢量的影响也很大。从表 4 可以看出,在基质含水量一定的前提下,液固接种比为 1.5:10 时产孢量最高,为  $18.8 \times 10^9$  孢子/g,与接种比 2:10、0.5:10 和 0.25:10 处理的差异达到显著水平,但与接种比为 1:10 处理的差异不显著。而后者所需的接种量较小,故在培养中按固 1:10 比例接种比为宜。如果液固接种比低于 0.5:10,则固体培养基中的营养得不到充分利用,产孢量明显降低。

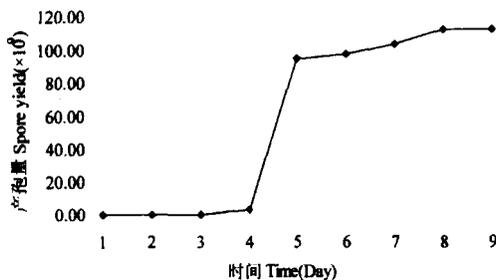


图 1 不同培养时间的产孢量

## 2.4 不同培养时间的产孢量

采用大米+稻壳+黄粉虫粪组合作为固体培养基来培养 Bbr84 菌株,各组分质量比为 10:1:0.5。从培养的第 3 d 开始取样,进行观察、计数,由图 1 可见接种后 3~4d 产孢缓慢,第 5d 进入产孢高峰期,产孢量为  $95.2 \times 10^9$  孢子/g,其后产孢量增长缓慢,接种后第 8 d 达到最大值  $112.8 \times 10^9$  孢子/g。

## 2.5 光照对产孢量的影响

从表 2 可以看出,布氏白僵菌的菌丝生长和产孢过程对光照有不同的敏感度和需求,在黑暗环境下培养,布氏白僵菌能够正常产孢。接种后的固体培养基先置于黑暗环境中培养 6 d,再转为光照培养,产孢量显著高于其它几种处理,最终产孢量达  $18.4 \times 10^9$  孢子/g;完全光照环境下培养,产孢量最低,只有  $9.34 \times 10^9$  孢子/g。说明在培养前期,黑暗环境可促进真菌菌丝生长,而在后期,一定的光照可提高孢子转化效率,因此在固相培养过程中,前期 6 d 内可不必提供光照,但后期应给予适当光照,以促进菌丝产孢。

## 3 讨论

培养基是影响真菌产孢量的重要因子。在用液固两相培养法培养昆虫病原真菌过程中,固相阶段的条件参数及其控制方法直接影响生产成本和孢子产量<sup>[16]</sup>。本试验初步研究了适合培养布氏白僵菌 Bbr84 菌株的液固两相培养基和提高其产孢量的相关条件,结果表明,SDY 和 SDY+2% 麦芽糖可用于液相培养;在固相阶段,黄粉虫粪+稻壳+大米组合产孢量最高,且比已报道的其他培养料配方的产孢高峰时间缩短 2~3d<sup>[17]</sup>。

真菌在不同生长阶段对光照要求不同,布氏白僵菌在黑暗中菌丝生长更快,而在孢子生长期,产孢结构和孢子具有向光性,可促进菌丝产孢<sup>[18]</sup>。因而在培养前期,应以黑暗环境为主,以增强菌丝生长,节约能耗,但后期应给予适当光照以促进菌丝上产孢结构的分化。在固相培养过程中,在大米中加入稻壳作载体,稻壳能增加透气性,提高大米营养的利用率;添加黄粉虫粪,增加菌物生长所需的蛋白质、矿物质和微量元素,为菌株生长和分生孢子的生产提供了良好的营养和空间环境。这样既

可使稻壳和黄粉虫粪变废为宝,降低培养成本,又能增加孢子产量,缩短生产周期,为进一步降低真菌杀虫剂生产总成本提供一条新的途径。

#### 参考文献

- 1 农向群.植物保护学报,2000,27(1):84~87.
- 2 Gaitan A, Valderrama AM, Saldarriaga G, Velez P, Bustillo A. Mycol. Res, 2002.106:1307~1314.
- 3 林华峰,黄勃,李增智,胡萃.菌物系统,1998,25(4):342~347.
- 4 李世广,林华峰,蛭蟥的生物防治研究和应用概况.有害生物综合治理策略.中国农业科技出版社,2002,116~120.
- 5 林华峰,杨新军,赵晓亮.应用生态学报 2007,(18)4:937~940.
- 6 Ferron P. Symbioses,1983,15(1):75~83.
- 7 Ferron, P. Entomophaga, 1974,19(1):103~114.
- 8 林华峰,王萍丽,张磊,杨新军,李世广,周义文.中国生物防治,2006,22(2):123~128.
- 9 冯明光,应盛华.应用生态学报,2002,13(4):439~43.
- 10 林华峰,李世广,张磊,王萍莉,周义文.应用生态学报,2006,17(2):351~354.
- 11 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学,合肥:安徽科学技术出版社.
- 12 Callot G, Vercambre B, et al. Journal of Invertebrate Pathology, 1996, 68(2):173~176.
- 13 农向群,涂雄兵,张泽华,等.中国生物防治,2007 23(3):228~232.
- 14 叶榕村.黄粉虫粪代替麦麸栽培香菇试验,2008,(04):34~35.
- 15 刘怀如,等.泉州师范学院学报,2004,26(3):68~71.
- 16 吴振强,潘景龙,夏枫耿,等.昆虫天敌,2004,26(1):1~6.
- 17 柴新义,李农昌,樊美珍,等.安徽农业大学学报,2004,31(3):335~339.
- 18 吴振强,彭景龙,李运南,等.农药杂志,2004,43(3):123~126.

(上接第 379 页)

- invasion of lung epithelial cells. Infect Immun, 2008, 76 (7): 2833~2842.
- 4 Braun V. Int J Med Microbiol, 2001,291(2):67~79.
- 5 Pan X. Med J Chin PLA, 2008, 33(5):505~508.
- 6 Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, et al. J Med Microbiol, 2006,55(3):251~258.
- 7 Clemens DL, Horwitz MA. J Exp Med, 1996,184(4): 1349~55.
- 8 Barnewall RE, Ohashi N, Rikihisa Y. Infect Immun, 1999,67(5): 2258~65.
- 9 Deng K, Blick RJ, Liu W, et al. Infect Immun, 2006,74 (7): 4224~4236.
- 10 Pechous RD, McCarthy TR, Mohapatra NP, et al. PLoS ONE. 2008, 3(6):e2487.
- 11 Ellis J, Oyston PC, Green M, et al. Tularemia. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(4):631~646.
- 12 Wu TH, Hutt JA, Garrison KA, et al. Infect Immun, 2005, 73 (5): 2644~2654.