

适合飞虱虫疔霉菌丝生产的液体培养基组分及发酵条件

刘志强 冯明光*

(浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

关键词 飞虱虫疔霉, 菌丝生产, 液体培养基, 微生物防治

中图分类号 Q93-335 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0463-04

蚜虫、飞虱、叶蝉等是威胁农业生产的刺吸式口器害虫, 长期以来依赖化学农药防治, 严重影响农产品的安全性和农业生态环境。探讨这类害虫的生物防治途径, 减轻农产品化学农药的残留污染, 一直受到国内外学者的关注。虫霉(Entomophthorales)的许多种类具有优异的诱病杀虫能力, 尤其通过主动弹射孢子而在害虫种群中高强度流行的特征, 可在短期内迅速压低虫口密度, 是极其重要的杀虫微生物资源^[1-3]。20 世纪 70~80 年代, 前苏联及欧盟国家曾试图生产暗孢耳霉(*Conidiobolus obscurus*)、根虫瘟霉(*Zoophthora radicans*)及新蚜虫疔霉(*Pandora neoaphidis*)等虫霉菌防治蚜虫, 但未获成功^[1-6], 主要原因在于虫霉的工业生产和应用存在许多技术困难, 其中高活性虫霉菌丝的生产和低成本发酵培养基的筛选至今仍然是阻碍利用虫霉防治害虫的主要困难之一。

我国虫霉资源十分丰富^[7], 几种虫霉近年已得到深入研究^[8-11], 尤其飞虱虫疔霉(*Pandora delphacis*)对蚜虫和飞虱的侵染力强和生态适应性较广, 极具开发应用潜力^[12-14]。本文从应用角度出发, 研究以廉价农副产品作为主要原料替代实验室专用培养基大量生产飞虱虫疔霉菌丝的方法, 重点对原料配比和培养条件进行了优化试验。

1 材料和方法

1.1 菌种来源与菌液制备

飞虱虫疔霉菌株 F95129 自杭州市郊褐稻虱(*Nilaparvata lugens* Stål)虫尸上分离获得并用 OS-SDAY 斜面于低温黑暗条件保存^[15]。菌液的制备始于斜面菌种在牛奶蛋黄培养基(SEMA)^[9]上的活化培养, 1 周后将菌落挑碎并移入 30 mL 萨氏培养液(SDB: 葡萄糖 40 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母 10 g/L, 并按 20 u/mL 加入 Penicillium-Streptomycin-Neomycin(PSN) antibiotic mixture)中, 在 20 °C 下黑暗振荡(150 r/min)培养 48~56 h, 即为液体菌种, 其干菌丝含量为 35 mg/mL。

1.2 试剂

进口酵母(美国 DIFCO 公司产)、国产酵母(北京生物化学试剂二厂)、蛋白胨(日本产)、鱼粉(丹麦产)、大豆粉(食用纯大豆粉, 自加工 120 目)、无机盐(KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等)和麸皮及玉米粉(饲料原料, 过 80 目筛)。

1.3 发酵液的原料配比试验

利用正交法试验培养基不同成分对液培菌丝产孢的影响, 其中酵母因子(A)取 3 水平: 不加酵母(A_1)、加进口酵母粉(A_2)和国产酵母粉(A_3)各 10 g/L; 蛋白类型因子(B)取 3 水平: 蛋白胨(B_1)、鱼粉(B_2)各 10 g/L 和大豆粉(B_3) 20 g/L; 麦麸皮浓度因子(C)取三水平: $\leq C_1$ 、 $1(C_2)$ 、 $15(C_3)$ g/L; 玉米粉浓度因子(D)取 3 水平: $1(D_1)$ 、 $15(D_2)$ 、 $20(D_3)$ g/L。将上述各因子水平进行 $L_9(3^4)$ 正交组合, 形成 9 个组合(即配方), 均重复 3 次。原料经煮沸 10~15 min, 100 mL 三角瓶装滤液 25 mL, 滤液中加入 KH_2PO_4 1.0 g/L, $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 3.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g/L, pH 7.0。经高压灭菌冷却后按 10% 接种量接入液体菌种, 在 26 °C 条件下振荡(150 r/min)培养 48~72 h。培养液菌丝生物量及菌丝弹孢结果见表 1。

1.4 蛋白与酵母的配比试验

发酵液中含麦麸 10 g/L, 玉米粉 15 g/L, 无机盐成分同上, 蛋白类营养分别为鱼粉 10 g/L、蛋白胨 10 g/L 和大豆粉 20 g/L。酵母分别为国产酵母 10 g/L 和进口酵母 10 g/L。以上各组分混配成 6 个组合, 重复 3 次。每只 100 mL 的三角瓶装发酵液 30 mL, 灭菌后按上述相同方法接种和培养。

1.5 发酵条件试验

利用正交试验研究 F95129 的发酵条件, 液体培养基由上述试验中筛选出的廉价营养成分组成, 主要包括国产工业酵母 10 g/L、工业鱼粉 10 g/L、麦麸皮 10 g/L、玉米粉 15 g/L。对发酵条件的优化, pH 因子取 3 个水平: pH 7.3、pH 不调和 pH 6.5; 温度因子取 3 个水平: 15 °C、25 °C 和 30 °C; 摇瓶装量

收稿日期 2000-12-12, 修回日期 2001-04-19。

基金项目 国家杰出青年科学基金(39525004)和国家自然科学基金资助项目(39870513)。

* 通讯作者。Tel 86-571-86971129, Fax 86-571-86971129, E-mail jmgfeng@cls.zju.edu.cn

取 3 个水平 :100 mL 三角瓶装发酵液 20 mL、40 mL 和 60 mL ; 接种量取 3 个水平 :液体菌种 2 mL、4 mL 和 6 mL/瓶。将各因子进行 $L_9(3^4)$ 正交组合 ,共 9 组 ,重复 3 次。

1.6 液培菌丝的生物量及产孢量测定

各组合处理的发酵液通过离心去掉上清液后于 100 ℃ 下烘干 2 h ,测定菌丝干重 (mg/mL) ,即为菌丝生物量。

从各处理中取发酵液 1 mL 均匀分散到水琼脂平板上 ,吸去多余水分后倒置培养(25 ± 1℃ ,12L:12D) ,并在平板下方的皿盖中央呈三角形安放 3 枚盖玻片(15 mm × 15 mm) ,收集自平板上菌丝产生并弹落的分生孢子。每隔 12 h 更换玻片 ,镜检玻片上的孢子并计数 ,换算成单位面积的孢子数(孢子数/mm²)。观察持续 108 h。

1.7 数据分析

液培菌丝生物量和累计产孢量的数据分析 ,采用 DPS 数据处理系统^[16]软件完成。

2 结果与讨论

2.1 不同营养组合对液培菌丝生物量及产孢量的影响

液培菌丝的生物量和累计产孢量可作为考查不同组分液体培养基是否适合飞虱虫疔霉的基本指标。表 1 为 F95129 菌株在不同组分液体培养中液培菌丝的生物量和产孢量。方差分析表明 ,酵母因子对液培菌丝的生物量及产孢量的影响极显著($F = 40.8$, $P < 0.01$; $F = 25.5$, $P < 0.01$) ,即酵母营养对提高其发酵产物的生物活性具有重要的作用。就菌丝产孢而言 ,含进口酵母组合的累计产孢量均高于国产酵母和不含酵母的对照 ,且对照的产孢量最低。在菌丝生物量方面 ,含国产酵母组合的菌丝产量最高 ,对照次之 ,蛋白胨则最低。蛋白因子水平间的变化对液培菌丝产孢量有显著影响($F = 37.7$, $P < 0.01$) ,其中以生化试剂蛋白胨为营养的菌丝累计产孢量最高 ,鱼粉次之 ,大豆粉最低 ,但蛋白因子不同水平对液培菌丝的生物量却无显著影响($F = 4.0$, $P >$

0.05)。这说明飞虱虫疔霉的液培菌丝产孢对氮源有明显的选择性。麦麸的 3 种不同浓度主要影响液培菌丝的累计产孢量($F = 15.4$, $P < 0.05$) ,但并不显著影响菌丝的生物量 ,说明麦麸的碳氮比有利于该菌的液体培养。麸皮用量为 10 g/L 的发酵优于 20 g/L ,而 30 g/L 的麸皮用量使培养液粘度增大 ,不利于发酵 ,因此麸皮以 10 g/L 的用量为宜。不同玉米粉用量对液培菌丝生物量和产孢量均无显著影响 ,考虑到培养液的粘度 ,以 15 g/L 为宜。综合以上分析 ,影响飞虱虫疔霉液体培养的营养因素依次为 :酵母 > 蛋白类型 > 麦麸 > 玉米淀粉 ,其中酵母和蛋白直接关系到发酵成本。

表 1 飞虱虫疔霉 F95129 菌株在不同配方的液体培养基中 48 h 发酵的菌丝生物量和累计产孢量

Table 1 The biomass yield and sporulation capacity of <i>Pandora delphacis</i> F95129 mycelia obtained from 48h cultures of different liquid media primarily consisting of yeast extract ,protein ,wheat bran and corn meal		
Composition of liquid medium	Mycelia biomass , ± SD (mg/mL)	Spore production , ± SD (Conidia/mm ²)
A ₁ B ₁ C ₁ D ₁	17.7 ± 2.9	2.2 ± 0.2
A ₁ B ₂ C ₂ D ₂	27.0 ± 4.6	2.5 ± 0.2
A ₁ B ₃ C ₃ D ₃	17.0 ± 3.1	3.7 ± 1.1
A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	17.9 ± 3.4	480.1 ± 12.4
A ₂ B ₂ C ₃ D ₁	15.6 ± 2.6	1342.7 ± 101.6
A ₃ B ₃ C ₁ D ₂	12.9 ± 2.2	326.2 ± 24.0
A ₃ B ₁ C ₃ D ₂	31.3 ± 5.1	498.3 ± 36.5
A ₃ B ₂ C ₁ D ₃	33.9 ± 5.6	1097.0 ± 69.0
A ₃ B ₃ C ₂ D ₁	25.5 ± 6.1	24.3 ± 0.3

有关 A、B、C、D 的说明见正文 1.3 节

2.2 酵母与蛋白不同比对液培菌丝产孢量的影响

表 2 为酵母与蛋白不同比对液培菌丝产孢量的影响。

表 2 不同类型蛋白与酵母配比下飞虱虫疔霉 F95129 菌株液培菌丝的产孢量

Table 2 Spore production of <i>P. delphacis</i> F95129 mycelia from liquid culture containing different sources of yeast extract and protein , supplemented with wheat bran and corn meal						
Period of sporulation	No. Spores produced per square millimeter , mean ± SD					
	A ₃ B ₂ C ₂ D ₃	A ₂ B ₂ C ₂ D ₃	A ₃ B ₁ C ₂ D ₃	A ₂ B ₁ C ₂ D ₃	A ₃ B ₃ C ₂ D ₃	A ₂ B ₃ C ₃ D ₃
0 ~ 12 h	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.3	135.5 ± 1.4	124.5 ± 2.5	9.1 ± 1.1	0.2 ± 0.0
12 ~ 24 h	426.3 ± 2.9	282.2 ± 1.8	678.4 ± 3.4	721.8 ± 2.3	281.2 ± 2.8	243.0 ± 1.2
24 ~ 36 h	622.3 ± 101.8	349.8 ± 57.3	716.8 ± 117.3	725.5 ± 118.8	454.2 ± 74.3	568.1 ± 93.0
36 ~ 48 h	307.4 ± 36.9	541.0 ± 65.0	301.6 ± 36.3	429.0 ± 51.6	225.6 ± 27.1	351.9 ± 42.3
48 ~ 60 h	171.2 ± 35.5	289.7 ± 60.1	157.2 ± 32.6	216.6 ± 44.9	141.4 ± 29.3	312.4 ± 64.8
60 ~ 72 h	92.1 ± 25.9	174.3 ± 49.1	97.7 ± 27.5	159.7 ± 45	105.1 ± 29.6	141.7 ± 39.9
72 ~ 84 h	51.0 ± 12.2	111.3 ± 26.7	102.9 ± 24.7	121.0 ± 29.0	65.6 ± 15.7	25.3 ± 6.1
84 ~ 96 h	32.8 ± 8.5	66.7 ± 17.3	56.2 ± 14.6	74.5 ± 19.3	37.9 ± 9.8	24.7 ± 6.4
96 ~ 108 h	21.2 ± 4.3	31.2 ± 6.3	40.1 ± 8.1	48.8 ± 9.9	26.3 ± 5.3	15.9 ± 3.2
Total	1724.7	1846.9	2286.4	2621.5	1346.3	1683.3

方差分析表明,不同蛋白类型对液培菌丝产孢量的影响极显著($F = 60.93, P < 0.01$),若以化学试剂蛋白胨营养产孢量为 100%,鱼粉和大豆粉营养处理的产孢量分别为蛋白胨的 72.4% 和 60.5%,但鱼粉为工业制品,价格远远低于蛋白胨。考虑经济实用性,应选择用鱼粉替代化学试剂蛋白胨,降低工业发酵成本。当麦麸皮和玉米粉浓度稳定在一定水平时,不同来源的酵母对液培菌丝产孢量影响减小许多($F = 11.7, P < 0.05$),考虑工业生产成本,完全可用国产工业酵母替代进口酵母。综合酵母与蛋白不同配比的分析结果,得出虫霉发酵培养基组成为:国产酵母 10 g/L,工业鱼粉 10 g/L,麦麸皮 10 g/L,玉米粉 15 g/L,所含无机盐与上述试验相同。

2.3 不同条件对液体发酵的影响

表 3 给出用廉价原料在不同发酵条件下所获飞虱虫疔霉菌液培菌丝的生物量和产孢量。数据分析表明,以发酵温度对液培菌丝生物量($F = 9.88, P < 0.01$)和产孢量($F = 7.51, P < 0.01$)影响最大,30℃下菌丝产孢量和生物量最高,表明该菌有较强的高温适应能力,印证了先前的相关报道^[8]。其次,pH 因子影响液培菌丝产孢量,当 pH6.5 时,产孢量显著高于 pH7.3($F = 10.27, P < 0.01$),说明微酸性条件有利于获得产孢量高的菌丝,但 pH 对菌丝生物量的影响不显著。在本实验测试的摇瓶装量和接种量范围内,两者对发酵结果的影响均不明显。根据经验,摇瓶装量以 40% 的效果较好,装量过多使通气量下降,不利于菌丝繁殖,而接种量一般取 10% 为宜。

表 3 飞虱虫疔霉 F95129 在不同液培条件下发酵 48 h 后菌丝的生物量和产孢量

Table 3 The biomass yield and spore production of <i>P. delphacis</i> mycelia produced in 48h liquid culture at different regimes of fermentation conditions					
pH	<i>T</i> (℃)	Liquid in 100 mL flask/mL	Inoculation (%, <i>V/V</i>)	Mycelial biomass (mg/mL)	Spore production (No. spores/mm ²)
—	30	20	2	45.7	381.4
—	25	40	4	37.1	351.2
—	15	60	6	26.7	200.6
7.3	30	20	2	36.7	269.0
7.3	25	40	4	35.2	305.3
7.3	15	60	6	23.5	173.1
6.5	30	20	2	42.6	485.5
6.5	25	40	4	25.1	342.8
6.5	15	60	6	33.5	323.5

综上所述,影响飞虱虫疔霉菌液培菌丝生物量和产孢量的主要因素是培养液中的酵母和蛋白类型。考虑生产成本,用国产酵母替代实验用进口酵母,用工业鱼粉替代实验用蛋白胨,配制用于生产的液体培养基虽然效果略逊于进口试剂,但其菌丝产量可以满足生产的需要(> 25 mg/mL)。培养温度和发酵液 pH 的变化对液培菌丝的活性影响较大,根据我们的经验,飞虱虫疔霉的适宜液培温度为 25 ~ 30℃,pH 为 6.5 ~ 6.8。

飞虱虫疔霉的液体培养及发酵工艺研究至今未见公开报道,本文仅在实验室条件下研究了适合该菌的液体培养基组分及发酵条件,所获结果为上罐试验提供了依据。

REFERENCES(参考文献)

[1] FENG M Q(冯明光). Entomophthorales-caused epizootics :importance for natural control of insect pests and utilization. In Study and application of entomogenous fungi in China ,Vol. 4(中国虫生真菌研究与应用,第四卷). Beijing :China Agricultural ScienTech Press ,1997 pp.6 ~ 17

[2] Feng M G , Nowierski R M , Johnson J B *et al* . Epizootics caused by entomophthoralean fung(*Zygomycetes* , Entomophthorales) in populations of cereal aphids(Hom. , Aphididae) in irrigated small grains of southwestern Idaho , USA . *Journal of Applied Entomology* ,1992 , **113** 376 ~ 390

[3] Milner R J. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* ,1997 **42** 227 ~ 239

[4] Latteur G , Destain J , Goderfroid J. Research on the feasibility of producing *in vitro* an entomophthorale biopreparation based on conidia or mycelium to control cereal aphids. EUR B-0752 ,1984 pp.407 ~ 416

[5] Latteur G , Godefroid J. Trial of field treatment against cereal aphids with mycelium of *Erynia neoaphidis*(Entomophthorales) produced *in vitro*. In :Cavalloro R(ed) , Aphid antagonists. Rotterdam :A A Balkema ,1983 pp.2 ~ 10

[6] Latge J P , Silvie P , Papierok B *et al* . Advantages and disadvantages of *Conidiobolus obscurus* and *Erynia neoaphidis* in the biological control of aphids. In :Cavalloro R(ed) , Aphid antagonists. Rotterdam :A A Balkema ,1983 pp.20 ~ 32

[7] LI Z Z(李增智). Flora fungorum sinicorum , Entomophthorales(中国真菌志). Beijing Science Press ,2000 **13** :1 ~ 168

[8] XU J H(徐均焕) ,FENG M Q(冯明光). The effect of photoperiods on the growth and sporulation of the entomophthoralean fungus , *Pandora delphacis* . *Mycosystema*(菌物系统) ,1998 **17** 349 ~ 355

[9] Feng M G , Liu C L , Xu J H *et al* . Modeling and biological implication of time-dose-mortality data for the entomophthoralean fungus , *Zoophthora anhuiensis* , on the green peach aphid *Myzus persicae* . *Journal of Invertebrate Pathology* ,1978 **72** 246 ~ 251

[10] XU Q(许谦) ,FENG M Q(冯明光) . Bioassay for the entomophthoralean fungus *Zoophthora radicans* against the green peach aphid *Myzus persicae* . *Journal of Zhejiang Agricultural University*(浙江农业大学学报) ,1999 **25** :151 ~ 154

[11] LIU C L(刘彩玲) ,FENG M Q(冯明光) . The time-dose effect of the entomophthoralean fungus , *Zoophthora anhuiensis* against the green peach aphid , *Myzus persicae* in bioassay. *Mycosystema*(菌物系统) ,1998 **17** 361 ~ 366

[12] Xu J H ,Feng M G. The time-dose-mortality modeling and virulence indices for the two entomophthoralean species , *Pandora delphacis* and *P. neoaphidis* , against the green peach aphid , *Myzus persicae* . *Biological Control* 2000 **17** 29 ~ 34

[13] Xu J H ,Feng M G , Xu Q. The virulence of the entomophthoralean fungus *Pandora delphacis* to the brown planthopper , *Nilaparvata lu-*

- [14] XU J H (徐均焕), FENG M Q (冯明光), LIU Z Q (刘志强) *et al.* . Potential and application prospect for aphid Control of *Pandora delphacis* . *Virologica Sinica* (Special Issue) (中国病毒学增刊) , 2000 , 25 : 139 ~ 144
- [15] Feng M G , Xu Q . A simple method for routine maintenance and preservation of entomophthoraceous cultures . *Journal of Invertebrate Pathology* 2001 77 : 141 ~ 143
- [16] TANG Q Y (唐启义), FENG M Q (冯明光) . Practical statistics and computer data-processing platform (实用统计分析及其计算机处理平台) . Beijing : Chinese Agricultural Press , 1997 pp. 1 ~ 406

Optional Growth Medium and Conditions for Mass Production of *Pandora delphacis* Mycelia in Submerged Culture

LIU Zhi-Qiang FENG Ming-Guang*

(Research Institute of Microbiology , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China)

Abstract The entomophthoraceous fungi are important microbial control agents for insect control but their mass production is usually difficult and expensive. To produce in large quantity the mycelia of the entomophthoraceous fungus , *Pandora delphacis* (isolate F95129) , this study was aimed at replacing expensive components of liquid medium that is usually used in laboratory only with cheap materials easily available. Based on comparative experiments with primary components of several media designed and optional conditions for submerged culture , an appropriate medium was recognized that included (per liter) 10 g of homemade yeast extract , 10 g industrial fish meal , 10 g wheat bran , 15 g corn meal , 1.0g KH_2PO_4 , 3.0g NH_4NO_3 , and 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The optional conditions for submerged culture was 25 ~ 30 °C , initial pH 6.5 and 40% (V/V) of flask filled with the medium and 10% of initial inoculum (liquid culture containing mycelia) for inoculation. Using the selected medium and the conditions considered , 48 h culture resulted in a considerably high yield of dry mycelia (> 25 mg/mL) with desirable capacity of spore production.

Key words *Pandora delphacis* , submerged culture , mass production , microbial control

Received : December 12 2000

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (39525004 and 39870513)

* Corresponding author. Tel 86-57-86971129 ; Fax 86-571-86971129 ; E-mail: mingfeng@cls.zju.edu.cn