

## 真空干燥球孢白僵菌纯孢粉的活孢率、毒力与贮存期\*

应盛华 冯明光\*\*

(浙江大学微生物研究所 杭州 310029)

**摘要:** 采用真空冷冻干燥法(冻干)和真空室温干燥法(抽干)对球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)原菌粉进行了干燥工艺的比较。在固体产孢基质上生产的新鲜纯孢粉(原菌粉)含水量达58.65%,经36 h冻干或抽干,孢子粉的含水量分别降至3.97%和4.26%,含孢量分别为 $1.29 \times 10^{11}$ 孢子/g和 $1.25 \times 10^{11}$ 孢子/g,活孢率分别为99.0%和97.9%。冻干粉和抽干粉之间的活孢率无显著差异,但萌发速度不同。原菌粉、抽干粉及冻干粉对桃蚜(*Myzus persicae*)在接种后第7 d的 $LC_{50}$ 分别为1.15, 5.89和 $2.95 \times 10^4$ 个孢子/mL;在 $10^6$ 个孢子/mL的剂量下对桃蚜的 $LT_{50}$ 分别为3.6 d、4.4 d和3.9 d。从生产成本低得多,抽干法比冻干法在白僵菌纯孢粉的生产中更有应用前景,尽管冻干粉的质量略优于抽干粉。在4℃和20℃下贮存冻干粉并进行为期一年的孢子萌发率和毒力检测。结果显示,冻干粉在20℃下贮存至255 d时完全失活而丧失染虫能力,而在4℃下贮存一年后的活孢率仍达90.2%, $LT_{50}$ 仅从初始的3.9 d延长至4.7 d。这说明仅通过降低含水量以延长白僵菌孢子粉在常温下的贮存期仍是不可能的。

**关键词:** 球孢白僵菌, 纯孢粉, 干燥工艺, 活孢率, 毒力, 贮存期

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0042-06

VIABILITY, VIRULENCE AND STORAGE OF VACUUM-DRIED  
BEAUVERIA BASSIANA CONIDIA POWDER

YING Sheng-Hua FENG Ming-Guang

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

**Abstract:** The fresh conidia powder of *Beauveria bassiana* SGBB8702 produced with diphasic technology was dried using 36-h procedures of vacuum-freeze drying (VFD) or vacuum drying (VD). The VFD and VD procedures reduced water content of the fresh conidia powder from 58.56% to 3.97% and 4.26%, resulting in preparations containing  $1.29$ , and  $1.25 \times 10^{11}$  conidia/g. The VFD or VD conidia had the same viability ( $\geq 98\%$ ) as the fresh ones but germinated slightly more slowly than the fresh ones. The estimates of  $LC_{50}$ s for the fresh, VFD, and VD conidia against *Myzus persicae* on day 7 after inoculation were 1.15, 5.89, and  $2.95 \times 10^4$  conidia/ml, respectively. At the concentration of  $10^6$  conidia/ml, the  $LT_{50}$  of the fresh conidia against *M. persicae* was estimated as 3.6 d, corresponding to 3.9 d and 4.4 d for the VFD and VD conidia, respectively. Due to much lower cost, the VD procedure was of greater potential for drying *B. bassiana* conidia in mass production though the VFD procedures resulted in slightly better quality of conidia powder. The viability and virulence of the VFD conidia were assessed periodically during 12-mon storage at 4℃ and 20℃, respectively. No viable conidia stored at 20℃ were detected 255 d after storage whereas those stored at 4℃ had a viability of 90.15% and an  $LT_{50}$  of 4.7 d at the end of 12-mon storage. The results showed that storage of *B. bassiana* conidia

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.39870513)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870513)

国家杰出青年基金资助项目 (No.39525004)

教育部“长江学者奖励计划”

\*\* 联系人 E-mail: mgfeng@cls.zju.edu.cn

收稿日期: 2001-07-18, 修回日期: 2001-10-10

powder at ambient temperature was unable to maintain shelf life at commercially acceptable level even though its water content was reduced to < 5%.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, Conidia powder, Drying technology, Viability, Virulence, Shelf life

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin) 是害虫微生物防治可资利用的一种重要杀虫真菌, 其分生孢子作为主要侵染体已得到广泛深入的研究, 在国外已被开发成多个商品制剂用于防治多种农林和卫生害虫<sup>[1-3]</sup>。我国球孢白僵菌分生孢子粉的生产技术已比较成熟<sup>[4]</sup>。国内现有的菌粉生产工艺采用恒温干燥法, 即自然晾干 4 d 后再在 35℃ 恒温下干燥 40 h 或 38℃ 下干燥 24 h, 所生产的孢子粉含水量只能保证不超过 12%<sup>[4]</sup>。如此高的含水量往往导致孢子过早萌发和自溶, 使孢子制剂不耐贮存和毒力下降<sup>[5]</sup>, 成为制约我国白僵菌制剂登记注册和商品化的技术瓶颈, 而国外一般采用常温鼓风干燥的方法。因此, 获得含水量低且活力高的孢子粉是白僵菌制剂的重要质量保证。远红外低温干燥可将孢子粉含水量降至 6% 以下, 但活孢率只能保证在 85% 左右<sup>[6]</sup>。真空干燥能将孢子粉含水量降至 4% ~ 8%<sup>[7]</sup>, 但迄今未见详尽的研究报道。此外, 为保证孢子制剂在使用时有足够的活力, 必须选择合适的贮存条件。目前, 常温贮存期一般不超过半年, 半年以后使用的制剂必须在 4℃ 下保存<sup>[4]</sup>, 因而孢子粉制剂的贮存技术也需进一步摸索改进。

为了探索球孢白僵菌纯孢粉干燥工艺的改进途径和延长孢子粉贮存期的可能性, 本研究采用真空室温干燥 (抽干) 和真空冷冻干燥 (冻干) 两种不同方法大幅降低孢子粉的含水量, 并就其含孢量、活孢率、毒力及孢子萌发时序过程进行了比较研究。在此基础上, 系统测定了冻干的低含水量孢子粉在 4℃ 和 20℃ 下贮存一年期间的毒力和萌发率变化, 以求证低含水量是否能延长孢子粉在常温下的贮存期。

## 1 材料与方法

### 1.1 孢子粉制备

球孢白僵菌 BBSG8702 菌株自病死蚜尸上分离而得<sup>[8]</sup>, 保存于 4℃ 下的萨氏平板上。孢子粉的生产方法参照 Goettel 的两相发酵法<sup>[9]</sup>。种子培养基为萨氏培养液 (葡萄糖 40 g/L, 蛋白胨 10 g/L), 产孢培养基配方为玉米粉 20g/L、麦麸 10g/L、蛋白胨 5g/L、磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 3g/L、水合硫酸镁 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 1g/L、硝酸铵 ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) 1g/L 和琼脂 20g/L。

### 1.2 孢子粉干燥

所获孢子粉分成 3 份, 1 份是不干燥的新鲜菌粉 (简称原菌粉) 作为对照, 其余两份不作任何预处理便进行干燥。干燥的方法分别为抽干和冻干, 均在 12LS 型冷冻干燥机 (VirTis Company, New York, USA) 上完成。真空室温干燥的程序为室温下真空干燥 36 h。真空冷冻干燥的程序是: 先将孢子粉放入已预冷至 -48℃ 的真空冷冻干燥仓中, 经 1 h 升温至 -46℃, 维持 9 h 后经 2 h 升温至 -28℃, 维持 6 h 后经 2 h 升温至 -8℃, 维持 4 h 后经 20 min 升温至 5℃, 维持 4 h 后经 2 h 升温至 25℃, 在此温度维持 6 h 后干燥结束, 总计 36 h。

### 1.3 孢子粉质量检测

含水量、含孢量和萌发率测定参照白僵菌生产企业标准<sup>[4]</sup>, 第 24 h 的萌发率视为

孢子粉的活孢率。毒力测定参照 Feng (冯明光) 等的方法<sup>[10-12]</sup>。

#### 1.4 孢子粉贮存

将冻干粉分别在 4℃ 和 20℃ 下贮存, 每隔 15 d 测定孢子粉的萌发率, 每隔两个月测定孢子粉的毒力, 连续测定一年。孢子粉萌发率和毒力的测定方法同上。

#### 1.5 数据处理

对所有含水量、含孢量及萌发率数据进行方差分析, 毒力测定数据用时间-剂量-死亡率模型模拟方法进行分析。所有数据分析与模型模拟均用 DPS 数据处理系统软件完成<sup>[13]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 干燥方法对孢子粉质量的影响

**2.1.1 含水量:** 方差分析表明, 冻干粉、抽干粉和原菌粉之间的含水量差异极显著 ( $F = 1,655.06$ ,  $P < 0.01$ ), 而 3 次重复间无显著差异 ( $F = 0.64$ ,  $P = 0.58$ )。多重比较分析显示, 冻干和抽干粉的含水量分别为 3.97% ( $\pm 0.93\%$ ) 和 4.26% ( $\pm 0.91\%$ ), 均显著低于原菌粉的 58.56% ( $\pm 1.92\%$ ), 但冻干与抽干粉间的含水量差异不显著。

**2.1.2 含孢量:** 冻干粉、抽干粉与原菌粉的含孢量之间差异极显著 ( $F = 374.50$ ,  $P < 0.01$ ), 而 5 次重复间无显著差异 ( $F = 1.09$ ,  $P = 0.43$ )。冻干粉和抽干粉的含孢量分别为 1290 ( $\pm 30$ ) 亿/g 和 1250 ( $\pm 50$ ) 亿/g, 显著高于原菌粉的含孢量 727 ( $\pm 20$ ) 亿/g。冻干粉与抽干粉的含孢量间无显著差异。

**2.1.3 孢子萌发率:** 在 30 h 的振荡液培发芽实验中, 冻干粉、抽干粉和原菌粉的孢子萌发率观察值见图 1 中标示。同一干燥法获得的孢子粉在不同培养时段的萌发率存在极显著差异 ( $F = 12,340.67$ ,  $P < 0.01$ )。原菌粉和冻干粉的孢子萌发率达到 98% 以上所需的时间均为 18 h, 而抽干粉为 24 h, 但 3 种孢子粉在第 30 h 的萌发率差异并不显著, 均达到 99.9% 左右。

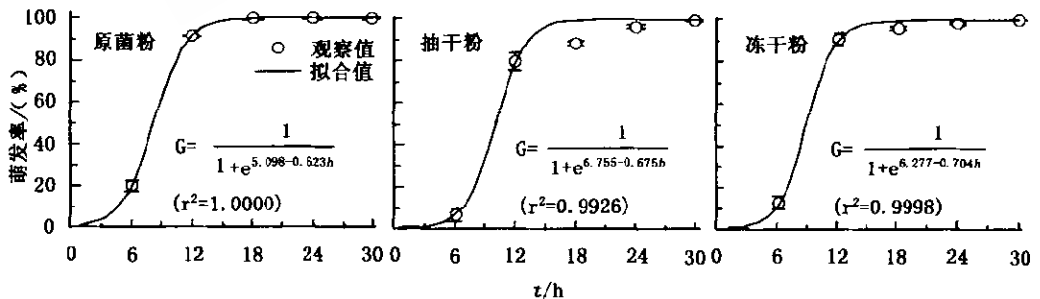


图 1 原菌粉、抽干粉和冻干粉的活孢率及孢子萌发时序比较

用 Logistic 方程  $G = \frac{1}{1 + e^{-\ln}}$  拟合 3 种孢子粉的萌发率 ( $G$ ) 随培养时数 ( $h$ ) 变化的过程, 拟合结果极好 ( $r^2 > 0.99$ ), 图 1 中曲线给出拟合结果与观察值间的比较。根据拟合模型 (图 1) 计算孢子萌发率达到 50% 和 90% 所需的时间, 原菌粉分别为 8.19 h 和 11.72 h, 冻干粉分别为 8.92 h 和 12.04 h, 抽干粉分别为 10.00 h 和 13.25 h。虽然 3 种孢子粉

的最终萌发率是一致的，但萌发进度显然以不经干燥处理的原菌粉最快，冻干粉比原菌粉略慢 0.4~0.7 h，而抽干法比原菌粉要慢 1.5~1.8 h。

**2.1.4 孢子粉毒力：**用时间—剂量—死亡率模型<sup>[11-13]</sup>模拟 3 种孢子粉对桃蚜 (*Myzus persicae*) 的生测数据并计算毒力指标，表 1 给出用不同孢子粉接种桃蚜后第 4~8 d 的  $\log_{10}$  ( $LD_{50}$ ) 及其标准误。原菌粉、抽干粉及冻干粉在  $10^6$  个孢子/mL 剂量下的  $LT_{50}$  分别为 3.60 d、4.38 d 和 3.93 d。将各种孢子粉第 8 d 对桃蚜的  $\log_{10}$  ( $LD_{50}$ ) 在  $\alpha=0.05$  的水平下进行  $t$  测验 ( $t_{0.05}=1.96$ ) 比较，抽干粉显著高于原菌粉 ( $t=2.15$ )，但原菌粉与冻干粉之间和抽干粉与冻干粉之间无显著差异。因此，原菌粉毒力最高，冻干粉次之，抽干粉再次。

表 1 不同干燥法获得的球孢白僵菌孢子粉在对桃蚜生测中的毒力指标 (剂量单位: 孢子数/mL)

菌粉类型	$\log_{10}$ ( $LD_{50}$ ) $\pm$ SE				
	第 4 d	第 5 d	第 6 d	第 7 d	第 8 d
原菌粉 (对照)	5.66 $\pm$ 0.12	4.85 $\pm$ 0.17	4.27 $\pm$ 0.21	4.06 $\pm$ 0.23	4.06 $\pm$ 0.23
抽干孢子粉	6.53 $\pm$ 0.10	5.24 $\pm$ 0.17	4.90 $\pm$ 0.18	4.77 $\pm$ 0.19	4.70 $\pm$ 0.19
冻干孢子粉	5.90 $\pm$ 0.11	4.88 $\pm$ 0.17	4.61 $\pm$ 0.18	4.47 $\pm$ 0.19	4.43 $\pm$ 0.19

2.2 冻干孢子粉贮存

**2.2.1 活孢率变化动态：**冻干孢子粉的含水量仅 3.97%，其在 4℃ 和 20℃ 下贮存一年期间的活孢率测定结果见图 2 所示。经方差分析，活孢率在不同贮存温度之间 ( $F=72,484.34$ ,  $P<0.01$ ) 和不同贮存时段之间 ( $F=3,404.07$ ,  $P<0.01$ ) 存在极显著差异。在 4℃ 下贮存的冻干粉，在贮存过程中活孢率下降缓慢，1 年中仅从 98.99% 下降至 90.15%；而在 20℃ 下贮存的冻干粉，活孢率从 98.99% 开始，在前 165 d 下降缓慢，此后活孢率迅速下降，至第 240 d 时几乎全部失活。值得注意的是，在贮存的前 135 d 之内，两种温度下贮存的冻干粉在活孢率的变化方面无显著差异，此后 4℃ 下贮存的孢子粉萌发率均显著地高于 20℃ 下贮存的孢子粉。

**2.2.2 毒力变化：**在 4℃ 和 20℃ 下贮存的冻干粉在 1 年中对桃蚜的毒力测定数据，经时间—剂量—死亡率模型模拟<sup>[11-13]</sup>，并计算出每次测定的毒力指标。表 2 中列出每次测定第 8 d 的  $LD_{50}$  及在  $10^6$  孢子/mL 剂量下的  $LT_{50}$ 。毒力指标的变化趋势表明，随着时间的推移，贮存于 4℃ 和 20℃ 下孢子粉的毒力均有不同程度的下降。在前 2 个月的贮存中，两种温度下的孢子粉毒力均显著下降 ( $LD_{50}$  和  $LT_{50}$  值增大)。但 4℃ 下贮存 2 个月和 12 个月的  $LD_{50}$  相比差异不显著 ( $t=1.69$ ,  $P>0.05$ )， $LT_{50}$  在第 2 个月后又变化不大 (4.06~4.68 d)。在 20℃ 下贮存的冻干粉，第 2 和第 4 个月测定的毒力指标差异不明显。第 6 个月的测定因夏季断电培养箱温度失控，所有数据均无法分析。此后的测定中，20℃

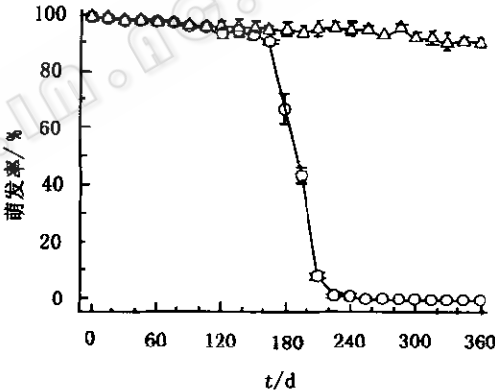


图 2 真空冷冻干燥粉在 4℃ 和 20℃ 下贮存一年间的活孢率变化  
—△—4℃，—○—20℃

下贮存的冻干粉因孢子失活而未能检测出毒力, 但 4℃ 下贮存的孢子粉仍然毒力很高。

表 2 冻干粉在 4℃ 和 20℃ 下 1 年贮存期间的毒力指标  $\log_{10} (LD_{50})$  和  $LT_{50}$

贮存月数	4℃		20℃	
	$\log_{10} (LD_{50}) \pm SE$	$LT_{50} (d)$	$\log_{10} (LD_{50}) \pm SE$	$LT_{50} (d)$
0	$4.43 \pm 0.19$	3.93	$4.43 \pm 0.19$	3.93
2	$5.15 \pm 0.07$	4.48	$5.44 \pm 0.08$	4.79
4	$5.20 \pm 0.15$	4.69	$5.18 \pm 0.16$	4.82
8	$5.13 \pm 0.16$	4.06	—	—
10	$5.17 \pm 0.10$	4.23	—	—
12	$5.33 \pm 0.08$	4.66	—	—

3 讨论

在球孢白僵菌分生孢子粉的生产中, 如何降低孢子粉的含水量以延长其贮存期, 一直是白僵菌孢子制剂研究中的亟待解决的问题。本研究采用的真空冻干和真空抽干的方法均能显著降低孢子粉含水量和提高孢子粉含孢量。冻干粉和抽干粉的含水量分别是 3.97% 和 4.26%, 均大大低于企业标准<sup>[4]</sup>中 12% 以下的含水量, 验证了真空干燥能使白僵菌孢子粉含水量降至 4% ~ 8% 的推断<sup>[8]</sup>。冻干粉和抽干粉的含孢量分别为 1,290 亿/g 和 1,256 亿/g, 均高于含孢量 1,200 亿/g 的企业标准<sup>[4]</sup>。就活孢率而言, 冻干粉和抽干粉与原菌粉相比均无显著差异 (图 1)。生测结果表明 (表 1), 两种干燥法对孢子粉的毒力也无显著影响。虽然冻干粉的上述质量指标略优于抽干粉, 但由于抽干法所需设备价格较低且工艺相对简单, 更值得在规模生产中应用。

目前, 白僵菌孢子粉的活孢率以 24 h 的萌发率表示<sup>[4]</sup>。然而, 活孢率相同的孢子粉并不意味着其孢子的萌发进程一致。冻干和抽干均未影响孢子粉的活孢率, 但与原菌粉相比, 孢子萌发率达到 50% 和 90% 所需的时间却有所延长。因此, 冻干和抽干可能影响孢子恢复活力的进程或吸水萌发的速度。即使真空干燥法不影响孢子的存活率, 然而从模拟预测达到 50% 和 90% 萌发率所需的时间看 (图 1), 孢子恢复萌发的速度确实受到影响, 而这种影响在以往的研究中从未引起重视。若要客观评价不同干燥法对孢子活力的影响, 不仅应比较活孢率的差异, 还要比较孢子萌发 50% 和 90% 所需时间的差异。冻干粉和抽干粉的活孢率与原菌粉的相同, 但对桃蚜的毒力却有或多或少的下降, 这种差异正好从 3 种孢子粉萌发速度差异的比较中得到合理解释, 即萌发速度越快的孢子粉毒力越强。由此印证, 任何抑制孢子萌发的因素都将导致孢子毒力下降<sup>[14]</sup>。

迄今, 白僵菌孢子粉的常温贮存只能保证短期的稳定性, 延长保存期必须降低温度。在本研究中, 低温 (4℃) 下贮存一年的冻干粉的活孢率仍达 90% (图 2), 毒力也维持较高水平 (表 2)。长期以来, 人们一直试图通过降低孢子粉的含水量来延长制剂的常温贮存期。本研究采用冻干法将孢子粉含水量成功地降至 5% 以下, 但为期一年的检测表明, 含水量仅为 3.97% 的冻干粉并未能在常温 (20℃) 下安全贮存一年。常温贮存孢子粉的活孢率在前 5 个月较为稳定, 但 165 d 后迅速下降, 到 180 d 时仅为 66.9%, 至 240 d 时几乎所有孢子失活, 孢子粉的毒力也随之丧失。大多数杀虫真菌制剂在室温下的货架期仅为 6 个月左右<sup>[15]</sup>, 与本实验的结果趋势一致。因此, 白僵菌纯孢粉的常温贮存仍是制约其商品化的技术瓶颈, 以上实验结果证明通过降低孢子粉含

水量来延长其常温贮存期的技术途径是难以行得通的。这是因为孢子粉的含水量和贮存温度交互影响着贮存中孢子内源营养物质的代谢,其中含水量主要影响代谢水平,温度主要影响代谢速度<sup>[16]</sup>,常温下较高的代谢速度使含水量5%以下的孢子粉只能稳定贮存5个月左右。

### 参考文献

- [1] Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G. *Biocontrol Sci Technol*, 1994, 4: 3~34.
- [2] Milner R J. *Entomophaga*, 1997, 42: 227~239.
- [3] 李增智. 中国生物防治, 1999, 15: 35~40.
- [4] 殷凤鸣, 潘务耀, 李增智. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 321~325.
- [5] 王成树. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 375~380.
- [6] 李运帷, 金得森, 伊可儿, 等. 中国虫生真菌研究与应用, 第3卷. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. 124~129.
- [7] 李农昌, 王成树, 唐燕平, 等. 安徽农业大学学报, 1996, 23: 329~335.
- [8] Feng M G, Johnson J B, Kish L P. *Environ Entomol*, 1990, 19: 1534~1542.
- [9] Goettel M S. *J Microbiol Meth*, 1984, 3: 15~20.
- [10] Feng M G, Johnson J B. *Environ Entomol*, 1990, 19: 785~790.
- [11] Feng M G, Poprawski T J. *Subtrop Plant Sci*, 1999, 51: 36~38.
- [12] Feng M G, Liu C L, Xu J H, et al. *J Invertebr Pathol*, 1998, 72: 246~251.
- [13] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及计算机处理平台. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [14] Anderson T E, Roberts W D. *J Econ Entomol*, 1983, 76: 1437~1441.
- [15] Soper R S, Ward M D. In: Pavizas G C (ed), *Biological control in crop production*, BARC Symposium No. 5. Totowa: Osmon, 1981. 161~180.
- [16] 冯明光, 应盛华. 应用生态学报, 2002, 13: 439~443.