



白僵菌微囊化的初步研究

伊可儿 李运帷 金得森 范弘达 陈仙景

(福建省林业科学研究所,福州 350012)

摘要 通过对白僵菌的微囊化试验,探索延长白僵菌液生孢子的保存时间,以利于白僵菌的工业化生产。结果表明,白僵菌液生孢子可贮藏10个月,发芽率仍达62.89—80.28%,活孢下降率为11.95—25.92%。贮藏12个月后,对马尾松毛虫进行毒力测定,其校正死亡率仍可达66.11—76.83%。白僵菌微囊化是贮存液生孢子的一种行之有效的办法。

关键词 白僵菌;微型胶囊;液生孢子

微型胶囊(简称微囊)是近20多年来发展起来的一种新剂型和新技术。系利用天然的或合成的高分子材料,将固体或液体药物包裹成微小胶囊,外观呈粒状或圆球形,直径为1—5000 μm。

微囊已广泛用于医药、食品、机械等工业。特别在农业方面使用更多。将某些杀虫剂、杀鼠剂、除草剂以及各种抗微生物的农药等制成微囊,以保持药效的持久性^[1]。但有关杀虫微生物微囊化的报道,目前尚未见到。

本试验试图将白僵菌微囊化,使孢子的代谢活动处于不活泼状态,以达到较长期保存其活力的目的。

材料与方 法

(一) 材 料

1. 供试菌种及来源: 白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill] 是自然选优的闽林-04号菌株。节孢子是用合成培养基摇床振荡培养3天生产的;分生孢子是用林下林场1985.6.12与1986.2.19生产的孢子粉混合而成的。

2. 微囊材料的选择: 选材的原则是,制备微囊所用的物品和试剂必须对孢子无毒,在微囊化过程中及其在贮藏期均能保持白僵菌孢子的活性,使孢子不受损伤。

经多次筛选出的材料有可溶性淀粉、A胶、

氯化钙、乙二胺四乙酸二钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钾等。

3. 仪器: 磁力搅拌器,喷漆枪(或注射器),离心机,显微镜等。

(二) 方 法

1. 微囊的制备:

(1) 节孢子(即液生孢子)的提取: 白僵菌孢子在液体合成培养基中培养72小时后,先用纱布滤去粗渣,再将滤液离心去清液,即成湿块状浓缩节孢子^[2]。

(2) 胶液的制备: 将固体A胶2g加水100ml,水浴加热溶化,搅拌均匀。

(3) 固化液的配制: 称3g无水氯化钙溶于100ml水中即配成3%氯化钙溶液。

(4) 微囊制备过程: 将胶液、固化液等经1.5kg/cm²压力湿热灭菌30分钟。烧杯、漏斗等玻璃器皿160℃干热灭菌2小时后置于无菌室备用。待胶液冷却后用纱布过滤去渣,在胶液中加入浓缩节孢子充分搅拌均匀。然后用注射器(或喷漆枪)将菌胶液骤然注入到用磁力搅拌器不断搅拌的固化液中。立即形成许多固化的含有白僵菌孢子的微囊。用纱布滤去固化液。用无菌水将微囊冲洗两次后再滤干。最后将微囊分散在滤纸上,置无菌室自然干燥(或用干燥器吸干或干燥箱烘干)。将干燥后的微囊

本试验得到福建师范大学高分子研究所高桂云老师指导,谨此致谢。

装瓶蜡封保存。分生孢子微囊化在制备时应加吐温 80 乳化均匀, 制法与节孢子相同。

2. 微囊崩解方法: 在测微囊化的白僵菌孢子存活率和毒力时必须先解囊。解囊液的配方是: 磷酸氢二钠溶液 (11g/L) 和磷酸二氢钾溶液 (9g/L) 以 1:1 (V/V) 混合在 20ml 混合液中加入 0.1g 乙二胺四乙酸二钠搅拌均匀^[3]。

3. 微囊的孢子发芽率测定: 将节孢子微囊 (或分生孢子微囊) 放入解囊液中振荡。待微囊崩解后取少量接种于已灭菌的培养液 (0.5% 蔗糖和 0.5% 蛋白胨) 中。经摇床振荡培养 24 小时后, 镜检孢子的发芽率。用血球计数板计数发芽和不发芽的孢子数 (节孢子和分生孢子的测法相同)。每个待测的微囊做三个重复, 取平均值。

$$\text{孢子存活率}(\%) = \frac{\text{发芽的孢子数}}{\text{检查的总孢子数}} \times 100$$

4. 孢子毒力测定: (1) 取新鲜马尾松枝叶置养虫笼中盛清水的三角瓶里, 每笼放 20 条 3—4 龄松毛虫幼虫, 每组三笼共 60 条, 共 3 组。

(2) 微囊溶解, 镜检孢子数, 然后加适量水稀释成一定浓度的菌液, 喷虫。分生孢子微囊液的浓度为每毫升 2 亿孢子。节孢子为每毫升 1.5 亿孢子。每笼喷菌液 10ml, 每组作三个重复, 设不喷菌液的为空白对照。隔日观察死虫数, 30 天结束试验。

试验结果

(一) 贮藏期微囊化孢子存活率测定

白僵菌微囊贮藏半年和一年后测孢子发芽率 (表 1、2)。

从表 1 结果看, 白僵菌分生孢子微囊化贮藏一年后, 其发芽率与对照比较, 活孢下降率 6.60—10.28%, 平均下降 7.67%, 初步证明了

表 1 分生孢子微囊化贮藏期活孢率测定

结果 编号	活 孢 率 (%)				贮藏一年的 活孢下降率 (%)
	制囊前 (1987.10.14)	制囊后 (1987.10.24)	贮藏半年 (1988.4.4)	贮藏一年 (1988.10.19)	
41	80.70	79.93	75.92	70.42	10.28
42	80.70	80.14	77.54	73.03	6.67
43	80.70	78.76	77.27	73.58	7.12
44	80.70	80.09	78.77	74.10	6.60
对照	80.70	80.12	0	0	0

注: 制囊时间为 1987 年 10 月 22 日。

表 2 节孢子微囊化贮藏期活孢率测定

结果 编号	活 孢 率 (%)			活孢下降率 (%)	
	制囊后 1987.12.16	贮藏 3 个月 1988.3.19	贮藏 10 个月 1988.10.19	贮藏 3 个月	贮藏 10 个月
52	88.81	73.74	62.89	15.07	25.92
56	92.23	89.93	80.28	2.30	11.95
58	91.77	89.02	76.79	2.75	15.04
62	89.62	80.54	69.79	9.08	19.83
对照	93.30	0			

注: 制囊时间为 1987 年 12 月 10 日。

白僵菌分生孢子微囊化是一种较有效的贮藏方法。

从表2活孢率测定结果看,节孢子微囊化后贮藏10个月,孢子发芽率降至11.95—25.92%,平均下降18.19%。说明微囊化后贮藏对生活力较弱的节孢子也是行之有效的办法。

(二) 孢子毒力测定 (表3、4)

表3 分生孢子微囊后毒力测定

(制囊时间: 1987.10.22)

结果 编号	制囊后8个月		制囊后14个月	
	松毛虫 死亡率(%)	校正死 亡率(%)	松毛虫 死亡率(%)	校正死 亡率(%)
42	76.67	75.00	56.67	53.68
43	73.33	71.42	53.33	50.11
44	76.67	75.00	58.33	55.45
对照	6.67		6.45	

注: 每组试虫数60条, 下表同。

从表3结果看出, 用混合孢子粉(分生孢子发芽率为80.70%)制微囊贮藏14个月后的杀虫效果分别为53.68, 50.11和55.45%。

从表4结果看出, 用合成培养基振荡培养3天的节孢子微囊化贮藏12个月后的杀虫效果分别为73.27, 76.83和66.11%。上述结果均表明白僵菌分生孢子和生活力较弱的节孢子经微囊化再贮藏仍有较好的杀虫效果。

表4 节孢子微囊后毒力测定

(制囊时间: 1987.12.10)

结果 编号	制囊后6个月		制囊后12个月	
	松毛虫 死亡率(%)	校正死 亡率(%)	松毛虫 死亡率(%)	校正死 亡率(%)
56	93.33	92.85	75.00	73.27
58	93.33	92.85	78.33	76.83
62	91.67	91.07	68.33	66.11
对照	6.67		6.45	

讨 论

1. 湿微囊在干燥过程中因失水缩小很多, 外观呈不规则形, 易粘连。镜检100个微囊, 粒径平均为426 μm , 个体略大。据报道, 若能用喷雾干燥法, 可得到粒径较小的自然流动的粉末。

2. 为了克服解囊的烦琐, 应进一步作菌胶液的喷雾干燥试验来制取微囊。这样既不必固化囊膜, 使用时也无需解囊。

参 考 文 献

1. 顾学裘: 药物制剂新剂型选编, 人民卫生出版社, 北京, 第6—10页, 1984。
2. 李运帷等: 白僵菌的生产和应用, 中国林业出版社, 北京, 第66页, 1981。
3. 方中达: 植病研究方法, 农业出版社, 北京, 第47—49页, 1979。