

布氏白僵菌菌丝制剂的贮存活力

农向群 邓春生 高 松 李俊国

(农业部农作物病虫害生防资源研究与利用重点开放实验室 北京 100081)
中国 农业 科学 学院 生物 防治 研究所

摘要 本试验制备了布氏白僵菌(*Beauveria brongniartii*)9405的几种菌丝颗粒剂和粉剂,并测定其贮存活力。当贮存6个月时,在4℃和室温贮存的藻胶颗粒剂的存活率比贮存1个月时分别下降了31.4%~76.8%和76.0%~92.6%。4个粉剂中,7号和10号在4℃的存活率比贮存1个月分别下降11.0%和8.5%,而其它两个的存活率却略有增加;在室温贮存的存活率下降8.2%~33.1%。颗粒剂在土壤中有一个恢复生长过程,然后逐渐衰落。

关键词 菌丝制剂,布氏白僵菌

分类号 Q93-925

在昆虫病原真菌用于害虫生物防治的实践中,菌剂是一个非常重要的制约因素。布氏白僵菌(*Beauveria brongniartii*)是最重要的昆虫病原真菌之一,对鞘翅目害虫的寄生效果尤为

引人注目。70年代以来,法国、瑞士等国家成功地用它防治森林西方五月鳃金龟(*Melolontha*

1997-05-06收稿

melolontha)^[1]; 近 10 年, 日本也用它防治桑树、无花果树的黄星天牛 (*Psacothaea hilari*)^[2~4]; 近几年我国用该菌防治花生、大豆田和林木上的暗黑鳃金龟 (*Holotricha parallela*) 和华北大黑鳃金龟 (*H. oblita*) 取得了肯定防效^[5,6]。但是, 在多年的生防应用实践中, 人们一直为如何低成本大量生产高质量菌剂的问题所困扰。目前, 布氏白僵菌的生产和使用主要采用传统的固体发酵或液固两相法生产分生孢子。由于布氏白僵菌在人工培养基上生长缓慢, 菌丝体丰富, 分生孢子产量较低, 这些特性造成生产周期长、成本高、容易污染。对于这个问题, 笔者认为, 有可能通过研究菌丝体的保护和加工, 得到一种贮存稳定的菌丝制剂来解决。

本实验研究制备了布氏白僵菌的几种菌丝制剂, 并测定了它们的恢复生长能力, 旨探讨菌丝制剂的实用性。

1 材料和方法

菌株: 布氏白僵菌 (*Beauveria brongniartii*) 9405, 从罹病暗黑鳃金龟 (*Holotricha parallela*) 幼虫僵尸上分离纯化得到。菌种保存在添加 1% 蛋白胨的 PDA 培养基上。

选择培养基: 葡萄糖 1%, 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.2%, 孟加拉红 0.0067%, 放线菌酮 0.025%, 氯霉素 50,000 单位。

菌丝体培养和收集: 500ml 摇瓶内装 150ml 培养基, 将分生孢子悬浮液接种到液体培养基: 蔗糖 3%, 鱼蛋白胨 0.5%, 酵母膏 0.2% 中, 在 25℃、140r/min 摇床上振荡培养 48h, 培养物作为二级种再扩大培养 66h。培养物经双层纱布过滤后待用。

菌丝体海藻胶颗粒剂: 参考 Walker^[7]的方法, 即湿菌丝与 1% 海藻酸钠溶液混合后, 滴加到 0.25M 的 CaCl₂ 溶液中, 成粒后沥水、干燥。试验设置添加麦麸、凹凸棒土 (attapulgit) 等处理, 在室温下吹风干燥。

菌丝体粉剂: 将湿菌丝直接干燥或添加麦麸、凹凸棒土等处理后在室温下风干。粉碎待测。

菌丝制剂贮存及恢复生长测定: 将菌丝制剂分别置于 4℃ 冰箱和 20~23℃ 室温, 测定贮存 1 个月、6 个月后的恢复产孢量, 以产孢量指示存活力。测定方法是: 用 1/1000 天平准确称取 100~120mg 制剂, 小心置于 2% 水琼脂上, 25℃ 温箱中培养 12d, 使其恢复生长并产孢。用 0.5% 吐温 80 洗下分生孢子制成孢子悬浮液, 经血球计数板计数, 计算产孢量。以贮存前的产孢量为 1, 贮存后的产孢量与之相比。

菌丝制剂在露天土壤中的存活试验: 取在 4℃ 贮存 2 个月的菌丝制剂 1、2、3 号各 10g 加土 20g 混匀, 分别装于尼龙绢网小袋中, 在内径 10cm、高 15cm 的小花盆中装入取自河北遵化花生地的土壤。先装约 5cm 高, 同时放置 3 个样品小袋各一袋, 加土至盆满, 共装 12 盆, 按 4×3 行列埋于露天土地。分别于 0、1、2、3 个月按拉丁方格排列取样 3 盆进行检测。检测方法如下: 从每个样品袋中各称取 1.00g 样品, 按相同样品号混合, 加无菌水匀散, 逐级稀释至 1000 倍, 接 0.1ml 于选择培养基上, 并用玻璃刮刀涂布均匀, 25℃ 温箱培养 7d, 计菌落数。以盆内小袋外土壤为对照, 分别进行比较。

2 结果与分析

10 种菌丝制剂在 4℃ 和室温贮存 1 个月和 6 个月后, 经复水恢复生长和产孢, 测定结果表明, 从总体上, 液体培养的菌丝体不加任何处理 (6 号), 其在 4℃ 和室温贮存 1 个月的产孢量基本相同, 均在 0.9 以上, 但 6 个月时生活力分别下降 60%、90%。藻胶颗粒剂 (1~5 号) 和干菌丝粉剂 (7~10 号) 对延缓菌丝体活力下降有一定作用, 后者的延缓效果明显比前者的好。这些经处理的菌剂在贮存 1 个月时, 产孢量最高的是低温下 3 号和室温 10 号, 达到 1.37, 最低的是室温 4 号, 为 0.81, 其余的在 0.94~1.22 之间, 均有较好的生活力。贮存 6 个月后, 1~6 号菌剂的产孢量明显下降, 其中贮存于室温的 4、5 号菌剂几乎不能恢复产孢; 而 7~10 号菌剂, 于低温贮存的产孢量与贮存 1 个月时相差不大, 于室温贮存的 7、8、9 号产孢量下降了 1/4~1/3, 10 号的产孢

量保持80%以上,即此号菌剂的贮存稳定性与分生孢子相当。

将在4℃贮存2个月的菌丝颗粒剂1、2、3号埋于露天土壤3个月的存活试验结果如下表。

菌丝制剂在露天土壤中的存活试验

制剂 编号	菌落数(10^4 /克菌剂)			
	0月	1月	2月	3月
1	52.2±2.3	52.2±1.8	64.3±1.6	31.7±2.2
2	75.6±3.2	114.8±4.1	149±5.0	80.3±4.1
3	68.2±3.5	28.6±2.0	23±1.1	13.7±0.8
对照	0±0.0	0.4±0.2	5.9±0.3	7.8±0.3

三种菌剂在土壤中的存活情况截然不同:1号菌剂在土壤中有一个缓慢恢复生长到衰落的过程,经1、2、3个月的增长率分别为0%、23.2%、-39.3%;2号菌剂的恢复生长比1号迅速,且生长量增长快,1、2月的增长率分别达到52.4%和97.1%,随后逐渐衰落,3个月时比2个月时的菌量减少46.1%,但仍比未贮存前的菌量高17.4%。3号菌剂在土壤中没有恢复生长而是逐步衰落,经1、2、3个月的增长率分别为-40.4%、-52.1%、-79.9%。经方差分析,3个菌剂处理间的 $F = 8.71$,大于临界值 $F_{0.05}(2, 9) = 4.26$,即表明2号菌剂在露天土壤中的恢复生长能力明显强于1号和3号。另外,从对照土壤检测的菌落数逐月缓慢增加,显示菌剂在土壤中有一定的扩散能力。上述结果说明布氏白僵菌的菌丝制剂对于田间防治地下害虫具有一定实践意义。

3 结论与讨论

菌丝制剂经贮存后必须能保持足够的生活力才具有实际应用价值。本试验的结果表明菌

丝干粉剂比藻胶颗粒剂的贮存活力高,在室温下6个月后仍能保持70%以上的活力,显示出一定的应用潜力。但要作为商品杀虫剂,6个月的贮存期显然不足。另外,本研究中只对颗粒剂而未对干粉剂在露天土壤中的存活情况作考察,干粉剂在土壤中的恢复生长能力有待确定。

本试验在进行露天埋盆阶段,每隔半个月检测盆中土壤含水量,其变化范围为13.12%~19.52%。由于试验期间下过几次暴雨,不宜评价土壤含水量对菌剂恢复生长和保持活力的作用,其相关性还需进一步研究。

目前国内外对菌丝制剂的研究较少,所得结果认为菌丝制剂在适宜条件下能很好恢复其产孢能力,主要存在问题是贮存期较短。如果进一步的研究能够延长其贮存期,增强其存活力,那么借助现代成熟的微生物发酵技术,真菌杀虫剂的菌丝制剂将可能成为一种新的实用形式,真菌杀虫剂的生产和质量控制将得到大幅度改进。

参 考 文 献

- [1] Ferron P, B Hurpin. *Annales de la societe Entomologique de France*, 1974, 10(3): 771~779.
- [2] Kashio T, T Ujiye. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu*, 1988, 34: 190~193.
- [3] Shibata E, T Higuchi. *Applied Entomology and Zoology*, 1988, 23(2): 199~201.
- [4] Shibata E, Thiguchi. *Applied Entomology and Zoology*, 1993, 28(2): 249~250.
- [5] 林莲欣,于迎春,胡继武. 中国昆虫真菌研究与应用, 1988, 第一卷: 134~139. 北京: 学术期刊出版社.
- [6] 邓春生,张爱文, 农向群等. 中国生物防治, 1995, 11(2): 56~59.
- [7] Walker H L, William J C. *Weed Science*, 1983, 31: 333~338.

A PRELIMINARY STUDY ON MYCELIUM PREPARATIONS OF *BEAUVERIA BRONGNIARTII*

Nong Xiangqun Deng Chunsheng Gao Song Li Junguo

(Key laboratory of bio-control resources research & utilization, ministry of agriculture
Institute of Biological Control, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081)

Abstract Alginate pellet and dry powder formulation of mycelium of *Beauveria brongniartii* were prepared. The survival rates of the pellets after 6 month storage at 4℃ and room temperature lower 36.4~75.0% and 76.9~90.0% respectively than 1 month storage's. The alginate pellets would revive and regrow in soil followed by declining and dying partly. Of 4 dry powders of mycelium, two reduced 7.1% and 8.3% survival respectively, but others were more 8.3% at 4℃. The 4 powders cut down 14.3~33.3% vitality at room temperature after 6 months.

Key words mycelium preparation, *Beauveria brongniartii*