

## 正交优化冬虫夏草菌种油混悬制剂

刘洪波<sup>1,2</sup> 王贵学<sup>1\*</sup> 毛先兵<sup>2\*</sup> 睢晓静<sup>1</sup> 朱华李<sup>2</sup> 陈仕江<sup>2</sup>

(1. 重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

(2. 重庆市中药研究院 重庆 400065)

**摘要:** 利用油混悬剂独有的剂型特性可提高人工培育冬虫夏草中的接种侵染率, 因而研制高活力冬虫夏草菌种油混悬剂可推动其产业化发展。根据油混悬剂的特殊性, 对 MTT 法进行改进及优化, 结果为: 反应时间 120 min、反应温度 37°C、以甲苯为萃取剂, 活细胞量与琥珀酸脱氢酶活力线性相关。依据该方法筛选制剂中助剂的种类及浓度, 并通过正交试验进一步优化, 获得冬虫夏草菌种油混悬剂高活力配方为: 菌种量 0.15 g/mL、硬脂酸铝 60 mg/mL、司班-80 50 μL/mL。稳定性试验结果表明, 该制剂在 4°C 下保存 1 个月, 活力仍保持在 90% 以上。

**关键词:** 细胞活力, MTT 法, 油混悬剂, 冬虫夏草, 中国被毛孢, 菌种

## Optimization on Oil Suspension Formulation of *Cordyceps sinensis* Spawn

LIU Hong-Bo<sup>1,2</sup> WANG Gui-Xue<sup>1\*</sup> MAO Xian-Bing<sup>2\*</sup> SUI Xiao-Jing<sup>1</sup>  
ZHU Hua-Li<sup>2</sup> CHEN Shi-Jiang<sup>2</sup>

(1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

**Abstract:** The particularities of oil suspension formulation can raise the invasive rate of *Hirsutella sinensis* to host of Hepialidae for the commercialization of artificial cultivation of *Cordyceps sinensis*. So it is important to develop a high cell viability oil suspension formulation of *C. sinensis* spawn. According to the characteristics of the oil suspension formulation, MTT assay is adapted and optimized. The result is as follows: reaction time 120 min, reaction temperature 37°C, methylbenzene as extracting agent, and a positive linear correlation established between active cell weights and cell viability. Varieties and concentrations of assistance agents in oil suspension formulation have been selected with the refined MTT assay, and further optimized together with cell concentrations through orthogonal experiment. The optimal combination project was obtained, namely, cell concentration 0.15 g/mL, aluminium stearate 60 mg/mL, and SPAN-80 50 μL/mL. Results of stability test on the oil suspension formulation indicate that cell viability can maintain above 90% at 4°C after one month.

**Keywords:** Cell viability, MTT assay, Oil suspension formulation, *Cordyceps sinensis*, *Hirsutella sinensis*, Spawn

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(No. 2006BAI06A13)

\*通讯作者: 王贵学: Tel: 86-23-65112675; ✉: guixue\_wang@163.com

毛先兵: Tel: 86-23-89029037; ✉: maoxianb@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-12; 接受日期: 2009-05-08

冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)是由真菌中国被毛孢(*Hirsutella sinensis*)侵染昆虫蝙蝠蛾(Hepialidae)幼虫形成的菌虫结合体,为我国特有的一种名贵真菌类中药<sup>[1]</sup>。由于对冬虫夏草野生资源的过度采挖及其生长自然环境的破坏,致使其处于灭绝的边缘,我国已将其列入国家二级保护物种。因而,急需实现冬虫夏草人工培育的产业化。但在人工培育冬虫夏草的各个环节中,中国被毛孢接种寄主蝙蝠蛾幼虫的低侵染率成为其产业化关键限制因素之一,其本质就是缺乏高活力高侵染力的冬虫夏草菌种制剂<sup>[2]</sup>。目前仅有报道直接利用中国被毛孢的子囊孢子、分生孢子或菌丝体作为侵染体侵染蝙蝠蛾幼虫,但用这些方法侵染率低,无法满足冬虫夏草人工培育产业化的需要<sup>[3,4]</sup>。

油混悬剂以其侵染体附着力强、渗透性好、利于侵入寄主虫体、稳定性好等特点可有效提高侵染率,使其成为真菌侵染昆虫的优选剂型<sup>[5,6]</sup>。目前研制的真菌制剂多以孢子为侵染体,以孢子萌发率评价制剂质量<sup>[7,8]</sup>。而冬虫夏草菌通过固体或液体培养还难以获得大量孢子,配制其孢子制剂困难;再者,中国被毛孢的孢子在固体培养基上难萌发且培养时间较长、易染杂菌,难以观察单个孢子的萌发,因而难以通过常规的萌发实验来评价冬虫夏草菌种制剂的质量,而菌丝体也是一种良好的侵染体<sup>[9,10]</sup>。为解决冬虫夏草菌孢子来源不足问题,本实验拟利用冬虫夏草菌菌丝体和分生孢子混合物来配制菌种制剂。MTT[3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑,噻唑兰]法是通过测定活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶(DHA)的活性来评价细胞的活力,已广泛用于测定细胞、孢子的活力<sup>[6,7,10-12]</sup>。本研究拟通过MTT法,以中国被毛孢菌粉、基本油剂及各类助剂为试验材料,研制高活力冬虫夏草菌种油混悬剂。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

冬虫夏草菌中国被毛孢(*H. sinensis*),保藏于重庆市中药研究院虫草研究室。收集 17°C 固体培养 20 天的中国被毛孢菌丝体和分生孢子混合物,低温干燥,粉碎并过 120 目筛即为试验菌粉。

### 1.2 实验试剂和仪器

MTT(Sigma 公司),邻苯二甲酸二丁酯、十二烷基硫酸钠、OP-10(烷基酚与环氧乙烷缩合物)、司班

-80、吐温-80、脂肪醇聚氧乙烯醚、硬脂酸铝、气相二氧化硅、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、甲苯、硫化钠、盐酸为分析纯,菜籽油(市售);UV-1605 型紫外可见分光光度计(岛津)、80-2 型电动离心机(金坛市新航仪器厂)。

### 1.3 方法

**1.3.1 冬虫夏草菌种油混悬剂的配制:**取 7 mL 菜籽油和 3 mL 邻苯二甲酸二丁酯于 20 mL 试管中,然后加入一定量各种助剂,混匀,再将冬虫夏草试验菌粉加入,经充分搅拌混合,制得菌种油混悬剂。静置 2 h,测定其沉降体积比(Sedimentation volume ratio, SVR)。SVR =  $(H_t/H_0) \times 100\%$ ,式中,  $H_0$  为沉降前混悬液的高度,  $H_t$  为沉降后混悬液的高度。

**1.3.2 MTT 法的操作步骤:**取 25 mL 离心管若干,每管中加冬虫夏草菌种油混悬剂 400  $\mu$ L,再加入 200  $\mu$ L MTT 溶液(5 mg/mL)。37°C 恒温反应 2 h,加入 1 mol/L 的盐酸 2 mL 终止反应,再加入 5 mL 甲苯,超声 10 min,静置萃取反应产物 MTTf (MTT formazan)30 min,3000 r/min 离心 10 min,取上清液于 560 nm 下比色测定吸光度。

**1.3.3 MTT 标准曲线的制定:**取 200  $\mu$ L 不同浓度(0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL、1.0 mg/mL)的 MTT 工作液于离心管中,加入油剂 400  $\mu$ L,再加入 2 mL 新配制的 Na<sub>2</sub>S 溶液(25%),摇匀。置于 37°C 反应 2 h,每个处理重复 3 次(取均值)。测定吸光度,操作同 1.3.2。

**1.3.4 酶活力和比活力计算:**酶活力大小由 Kat 单位数表示,1 个 Kat 单位(=1.0<sup>12</sup> pKat)定义为每秒钟使释放出 1 mol 的 MTTf 所需的酶量;比活力(Specific DHA)指每克细胞所含有的酶活力单位数,单位 pKat/g<sup>[8,9]</sup>。酶活力可由式(1)计算。

$$DHA = \frac{Y \times V \times D \times 10^9}{60 \times EM} \quad (1)$$

式中: DHA, 酶活力, pKat; Y, MTT 还原反应初速度, A/min; V, MTTf 萃取液体积, mL; D, 菌种制剂的稀释倍数; EM, MTTf 摩尔吸光系数, L/(mol·cm)。

摩尔吸光系数指单位吸光物质在一定波长的光透过吸收池时所产生的吸光度值 A。根据“方法 1.3.3”绘制的标准曲线和式(2),可求出 MTTf 的摩尔吸光系数 EM。

$$EM = M \times \frac{A}{b \times c} \quad (2)$$

式中:  $M$ , MTT 相对分子质量, 414.3;  $A$ , 吸光度;  $b$ , 吸收池光程, cm;  $c$ , MTT 浓度, g/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制定

为了测定 MTTf 的摩尔吸光系数并计算酶活力, 常用过量还原剂  $\text{Na}_2\text{S}^{[12,13]}$  将 MTT 还原成 MTTf 于最大吸收波长下测定吸收值, 绘制标准曲线。本实验测定 MTTf 最大吸收波长为 560 nm, 绘制的标准曲线见图 1。可见 MTT 浓度在 20  $\mu\text{g/mL}$ ~100  $\mu\text{g/mL}$  范围内吸光度与产物 MTTf 浓度线性关系良好, 依标准曲线和式(2)计算得 MTTf 的摩尔吸光系数  $EM$  为 3794.16 L/(mol·cm)。将  $EM$  代入式(1)中, 可计算酶活力。

### 2.2 活细胞量与酶活力的相关性

按照“方法 1.3.2”测定不同中国被毛孢细胞量的吸光度与“方法 1.3.4”算不同细胞量的酶活力, 结果见图 2。可见活细胞量与酶活力呈良好的线性关系。

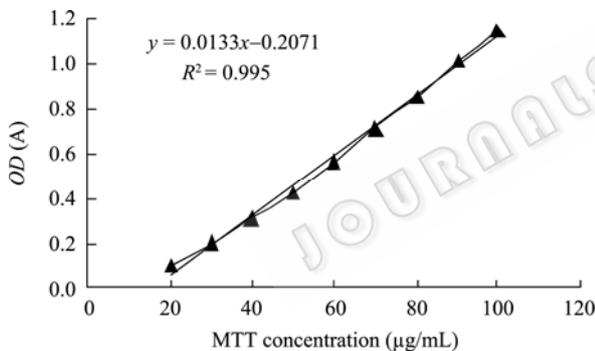


图 1 MTT-吸光度曲线图  
Fig. 1 Effect of MTT concentration on OD

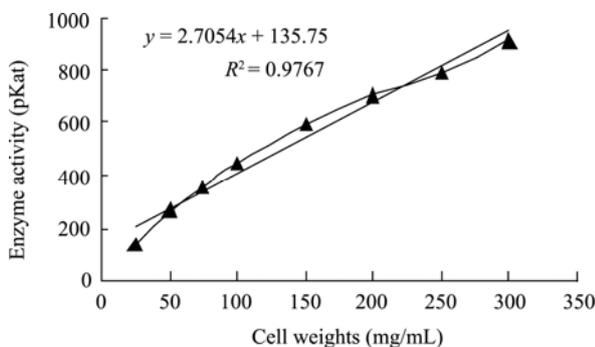


图 2 不同细胞量对酶活力的影响  
Fig. 2 Effect of the cell weights on enzyme activity

为了验证 MTT 法检测细胞活力的准确性, 进行了灭活细胞对酶活力测定的影响实验(结果未给出), 表明死细胞对酶活力没有影响, 细胞量中的活细胞与酶活力仍遵循上述线性关系。因而采用 MTT 法检测冬虫夏草菌种油混悬剂活力是可行的。

通过 MTT 法测定了中国被毛孢不同固体培养时间的细胞活力, 培养 15 d~25 d 的细胞活力较高且无显著变化, 而培养后期(30 d 后)细胞活力则明显下降。本实验选取培养 20 d 的细胞作为有效成分配制油混悬剂。

### 2.3 MTT 法的优化

反应时间对中国被毛孢酶活力的影响见图 3。在 250 min 内, 酶活力随着反应时间的延长而增加, 250 min 后开始进入稳定状态; 其反应速率在 150 min 内维持不变, 随后反应速率降低。本文确定反应时间为 120 min。这样既保证所测得的反应速度为酶促反应初速度, 又能使萃取液达到一定的吸光度, 以减少试验误差。

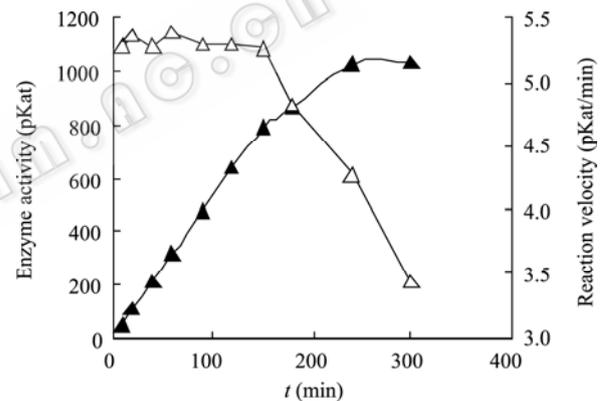


图 3 反应时间对酶活力的影响  
Fig. 3 Effect of the cell weights on enzyme activity

不同温度对中国被毛孢酶活力的影响见图 4。在 7°C~57°C 范围内, 酶活力先升高后又下降, 在 37°C 时达到最高值。因此, 检测酶活力的温度选定为 37°C。冬虫夏草菌属于低温菌, 最适培养温度较低(15°C~20°C)。酶活力最适温度与菌生长最适温度不一致, 其原因尚不明确, 在刘伯宁等<sup>[12]</sup>测定蓝色犁头霉活力时也观察到相似现象。

### 2.4 冬虫夏草菌种油混悬剂高活力因子筛选

高质量的油混悬剂, 要求添加合适的助剂(如助悬剂、表面活性剂等)及其适宜浓度<sup>[14]</sup>。为此, 选择了不同的助悬剂及表面活性剂(见表 1)。在油混悬剂中, 不同助剂对细胞活力可能有不同的影响。为获

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

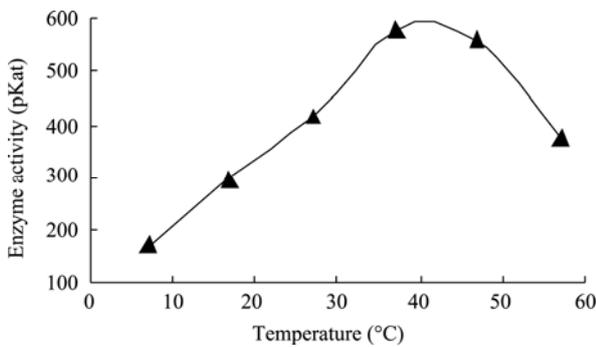


图4 反应温度对酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on enzyme activity

表1 助剂种类对细胞活力的影响  
Table 1 Effects of auxiliary agents on DHA in oil suspension formulation

助剂种类 Varieties of auxiliary agents	比活力 Specific DHA (pKat/g)	沉降体积比 SVR (%)
Assistant agents (30 mg/mL)		
Aluminium stearate	7016.7	85.2
Fumed silica	3129.8	63.5
Carboxymethyl cellulose	3651.4	76.6
Hydroxypropyl cellulose	672.6	73.8
Surfactants (25 $\mu$ L/mL)		
Span-80	6115.6	88.4
SDS	219.6	86.1
Tween-80	5337.0	64.4
OP-10	5031.0	84.5
AEO	521.6	83.8
Control	5161.4	86.6

得高活力的制剂,需筛选对细胞活力影响最小(即含该助剂的混悬剂活力最高)的助剂。另外,对于制剂本身,沉降体积比与其分散性、粘度、流动性、絮凝度等指标相关,可反映制剂本身的质量。为此,依据 MTT 法,选定细胞活力和沉降体积比为指标进行筛选试验,结果见表 1。

从表 1 可见,不同的助剂对细胞活力及稳定性的影响差别很大。与对照组相比,十二烷基硫酸钠、羟丙基纤维素和脂肪酸聚氧乙烯醚基本上完全抑制了细胞活力,气相二氧化硅、羧甲基纤维素对细胞活力也有很大程度的抑制,而硬脂酸铝、司班-80、OP-10 和吐温-80 对细胞活力则无抑制作用。从表中也可知,硬脂酸铝、司班-80、OP-10 的沉降体积比也较高。由于司班-80、OP-10 和吐温-80 都是对油混悬剂起表面活性剂的作用,故选取酶活力和沉降体积比最高的司班-80。因此,选取作为增稠剂的硬

脂酸铝和作为表面活性剂的司班-80 为高活力油混悬剂中助剂。

影响油混悬剂活力高低的因素,除了助剂,还涉及菌种量的多少。为此,对硬脂酸铝、司班-80 和菌种量进行单因子浓度实验,结果见表 2。

表2 单因子浓度实验  
Table 2 Results of the single factor experiment

单因子种类 Varieties of single factor	比活力 Specific DHA (pKat/g)	沉降体积比 SVR (%)
Span-80 ( $\mu$ L/mL)		
6.25	5213.31	83.6
12.5	5584.90	86.4
25	6014.35	89.3
50	6286.99	76.2
100	6497.76	65.5
Aluminium stearate (mg/mL)		
10	6354.40	75.6
30	6632.94	80.3
60	6724.26	83.7
90	4760.22	85.9
120	4177.86	88.4
Cell concentrations (g/mL)		
0.05	4589.5	68.2
0.10	4778.3	73.5
0.15	4969.6	78.3
0.20	5030.8	82.6
0.25	5159.4	86.5
0.30	5383.9	90.4

从表 2 中可知,对于司班-80,细胞比活力和沉降体积比随着浓度的增加而增加至一个峰值后开始下降。细胞比活力在 50  $\mu$ L/mL 时达到高峰,之后开始下降;沉降体积比于 25  $\mu$ L/mL 时为最高值,而后表现为降低趋势。综合两个指标考虑,选取 12.5  $\mu$ L/mL、25  $\mu$ L/mL、50  $\mu$ L/mL 三个浓度进行正交优化。对于硬脂酸铝,随着其浓度的增加,细胞比活力在 10 mg/mL~60 mg/mL 范围内逐步升高,可能低浓度的助剂对活力有促进作用;大于 60 mg/mL 后酶活力又显著降低,沉降体积比也仅略有增加,故选取 10 mg/mL、30 mg/mL、60 mg/mL 三个浓度进行正交设计。对菌种量来说,细胞比活力和沉降体积比明显随其增加而增大,但由 0.20 g/mL 到 0.30 g/mL 范围内增加幅度无显著性变化,趋于平缓。因此,选取 0.15 g/mL、0.20 g/mL、0.25 g/mL 三

个浓度用于正交试验。

### 2.5 冬虫夏草菌种油混悬剂正交实验优化

由单因子实验筛选出制备油混悬剂的 3 个关键因素(水平): 菌种量(0.15 g/mL、0.20 g/mL、0.25 g/mL)、硬脂酸铝(10 mg/mL、30 mg/mL、60 mg/mL)和司班-80(12.5  $\mu$ L/mL、25  $\mu$ L/mL、50  $\mu$ L/mL), 通过 L9(3<sup>3</sup>)正交试验, 结果见表 3。

实验结果表明, 在这 3 个不同的因素中, 以司班-80 的极差最大, 结合方差分析(表 4), 司班-80 的 F 值高于 F 临界值, 故该因素对冬虫夏草油混悬剂活力的影响最为突出; 硬脂酸铝次之。从各因素不同水平的平均值可见, 各因素水平对混悬剂活力影响的强弱顺序为: A1>A2>A3; B3>B2>B1; C3>C2>C1。

表 3 油混悬剂正交试验结果  
Table 3 Results of orthogonal test in the oil suspension formulation

因素 Factors	菌种量(A) Cell concentrations	硬脂酸铝(B) Aluminium stearate	司班-80(C) Span-80	比活力 Specific DHA (pKat/g)
Test 1	1	1	1	5134.0
Test 2	1	2	2	7714.7
Test 3	1	3	3	9430.6
Test 4	2	1	2	5957.6
Test 5	2	2	3	8099.1
Test 6	2	3	1	6744.7
Test 7	3	1	3	6788.1
Test 8	3	2	1	4770.2
Test 9	3	3	2	7213.7
Mean 1	7426.433	5959.910	5549.617	
Mean 2	6933.780	6861.330	6961.997	
Mean 3	6257.330	7796.303	8105.930	
Range	1169.103	1836.393	2556.313	

表 4 比活力方差分析结果  
Table 4 Results of variance analysis on specific DHA

类型 Sources	第三类离均差平方和 Type III sum of squares	自由度 DF	均方 Mean square	F 值 F	临界值 Sig.
Corrected model	16964306.7 <sup>(a)</sup>	6	2827384.5	26.641	0.037
Intercept	425083093.1	1	425083093.1	4005.269	0.000
Cell concentrations	2067094.5	2	1033547.3	9.738	0.093
Aluminium stearate	5059073.6	2	2529536.8	23.834*	0.040
Span-80	9838138.6	2	4919069.3	46.349*	0.021
Error	212262.0	2	106131.0		
Total	442259661.8	9			
Corrected total	17176568.7	8			

R squared = 0.988 (Adjusted R squared = 0.951)

注: \*: 具有显著性差异。

Note: \*: Means significant difference in the different column ( $P < 0.05$ ).

从表 4 中可见, 硬脂酸铝、司班-80 对冬虫夏草菌种油混悬剂有显著影响( $P < 0.05$ ), 且司班-80 对制剂的影响大于硬脂酸铝( $0.021 < 0.040$ ), 而菌种量对混悬剂活力则无显著性影响( $P > 0.05$ ), 3 个因素对制剂活力的影响大小顺序为: 司班-80>硬脂酸铝>菌种量。根据表 3 和表 4 确定油混悬剂最佳配方为 A1B3C3, 即菌种量为 0.15 g/mL、硬脂酸铝为

60 mg/mL、司班-80 为 50  $\mu$ L/mL。

### 2.6 高活力的冬虫夏草菌种油混悬剂贮存稳定性实验

通过正交试验筛选出了冬虫夏草菌种油混悬剂的最优配方, 接下来考察了该制剂在 4 $^{\circ}$ C (贮藏温度)和 17 $^{\circ}$ C (生长温度)下的酶活力和沉降体积比的变化情况, 以便有效的贮存和使用, 结果见图 5。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

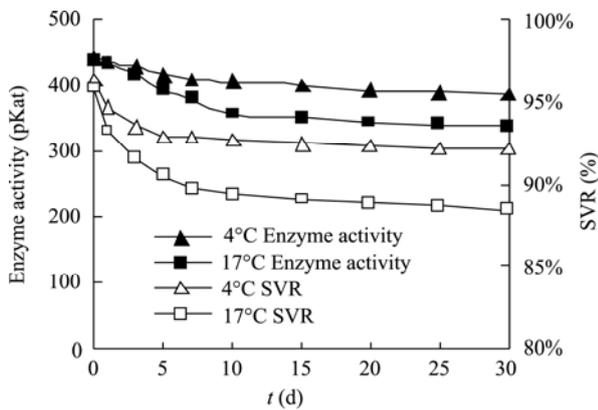


图5 冬虫夏草菌种油混悬剂的稳定性  
Fig. 5 The stability on oil suspension formulation of *Cordyceps sinensis* spawn

从图中可知,冬虫夏草菌种油混悬剂在4°C下,一个月内活力仅略为下降,活力仍保持在90%左右;17°C下活力的变化趋势与4°C的相似,但下降幅度较大。另外,相比油混悬剂,纯菌粉细胞活力下降更快(结果未给出)。对于沉降体积比,4°C下制剂在储藏早期略有下降,随后保持稳定;17°C的变化趋势与4°C的相近。结果表明,油混悬剂能有效地维持细胞活力和沉降体积比的稳定性,且在低温下储藏时制剂稳定性更好,从而保证了冬虫夏草菌种油混悬剂在生产中的应用。

### 3 讨论

#### 3.1 MTT法的改进及应用

常规的MTT法是将细胞与MTT水溶液反应后,反应产物MTTf经分离、乙酸乙酯或异丙醇提取,取提取液在分光光度计下测定吸光度并计算活力<sup>[7-9,11-13]</sup>。本实验研究的冬虫夏草菌种油混悬剂是以油为载体,按常规操作分析活力的样品反应前应除去油,操作繁琐且不彻底。因而,本试验采用不除油方式。然而,反应前不除油,反应后部分产物MTTf会溶解于油中,需采用特殊萃取剂将分散在固相(细胞)及油相中的产物同时萃取出来。再者,由于本制剂含有多种助剂,常规的萃取剂如乙酸乙酯萃取时会出现退色等不稳定现象。故此,一般的MTT法操作程序及萃取剂无法达到检测油剂细胞活力的目的。本实验改进了MTT法来检测冬虫夏草菌种油混悬剂活力。经试验证明,在油混悬剂与MTT反应前不必进行离心去油等操作,油不影响反应;反应后,直接加入甲苯作为萃取剂,经超声后,

离心或静置即可吸取上清液检测吸光度,在萃取量和稳定性方面均优于常规萃取剂,也大大简化了操作步骤。该方法也为检测其他生物制品油剂、油混悬剂等的活力提供了借鉴。

#### 3.2 冬虫夏草菌种油混悬剂质量检测新指标

目前的真菌农药制剂大多数是以真菌孢子作为侵染体配制而成的,在评价制剂质量时多以沉降体积比等物理指标<sup>[15]</sup>及孢子萌发率<sup>[7]</sup>为标准。由于冬虫夏草菌生长环境及生活习性的特殊性,难以获得其大量的孢子以制成制剂。冬虫夏草菌种制剂是以人工培育的菌丝体(或含部分孢子)为侵染体,这就要求制剂评价方法不同于孢子制剂。本实验在测定常规指标的基础上,将快速检测细胞活力的MTT法引入用以评价制剂质量。按照本实验改进MTT法直接测定活力,增加了对油混悬剂本身活力检测的科学性和可靠性,更可合理判定制剂的贮藏期和使用期,具有实际指导意义。

#### 3.3 高活力的冬虫夏草菌种油混悬剂及应用

本次研究中将冬虫夏草菌种油混悬剂直接接种到固体培养基和液体培养基上培养并观察其生长情况。实验结果表明,冬虫夏草菌种油混悬剂接种到固体培养基或液体培养基后,制剂的有效成分—菌丝及分生孢子均能正常生长(结果未给出),与上述MTT法检测结果一致。本实验应用MTT法测定细胞活力,通过优化制剂配方,制得高活力的冬虫夏草菌种制剂。由于冬虫夏草菌生长环境特殊、生长周期长、生长速度慢等许多因素,冬虫夏草菌种制剂依然无法通过采用常规的生物农药防治害虫的评价技术来衡量冬虫夏草菌种制剂的侵染力和侵染率,这也是制约人工培育冬虫夏草的关键瓶颈之一。因此,本实验选择利于冬虫夏草菌侵染虫体的剂型并通过筛选高活力制剂处方以期提高冬虫夏草菌种制剂接种效果。

### 参考文献

- [1] 魏鑫丽, 印象初, 郭英兰, 等. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析. 菌物学报, 2006, 25(2): 192-202.
- [2] 刘飞, 伍晓丽, 陈仕江. 冬虫夏草人工培育的研究概况. 中草药, 2007, 38(2): 302-305.
- [3] 俞永信. 人工培养冬虫夏草研究. 菌物研究, 2004, 2(2): 42-46.
- [4] 郭宏春, 高继全, 习欠云, 等. 冬虫夏草研究进展. 微

- 生物学杂志, 2003, 23(1): 50-55.
- [5] 镇 达, 吴继星, 钟连胜, 等. 苏云金杆菌超低容量油剂的研制. 中国生物防治, 2001, 17(4): 167-169.
- [6] 应盛华. 一种重要的真菌杀虫剂——球孢白僵菌制剂. 杭州科技, 1999, 6: 18-20.
- [7] 赵 云, 王中康, 彭国雄, 等. 绿僵菌孢子活性的 MTT 比色法快速检测技术研究. 菌物学报, 2006, 25(4): 651-655.
- [8] Stentelaire C, Antoine N, Cabrol C, *et al.* Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. *Enzyme Microb Tech*, 2001, 29: 560-566.
- [9] Arcas JA, Diaz BM, Lecuona RE. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Biotech*, 1999, 67: 151-158.
- [10] Wraight SP, Jackson MA, Dekock SL. Production, stabilization, and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jacson C, Magan N. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, UK: CABI Pub, 2001, pp.253-287.
- [11] Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, *et al.* Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 1991, 51: 2515-2520.
- [12] 刘伯宁, 乔长晟, 贾士儒. 一种丝状真菌活细胞生物量测定方法的研究. 药物生物技术, 2006, 13(1): 40-44.
- [13] Roslev P, King GM. Application of a tetrazolium salt with a water-soluble formazan as an indicator of viability in respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(9): 2891-2896.
- [14] 李春光, 张建萍, 余柳青. 助剂在微生物除草剂中的应用. 中国生物防治, 2006, 22(4): 265-267.
- [15] 李农昌, 王成树, 李增智, 等. 白僵菌油剂质量检验方法的研究. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 340-343.

## 征订启事

### 欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新、应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本 (210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2010 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: (010) 64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; Http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>