

对蜱致病性球孢白僵菌培养条件的优化

孙明 任巧云 关贵全 刘志杰 李有全 马米玲 刘爱红 牛庆丽 杨吉飞 殷宏* 罗建勋*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室 甘肃兰州 730046)

摘要: 对前期筛选得到的具有生防潜力的杀蜱真菌 *Beauveria bassiana* AT17 菌株进行相关生物学性状的研究, 建立一套规范的实验室培养的技术和方法, 同时对其液固双相发酵技术进行优化, 在于提供优质高效的生防材料, 为其真菌制剂的规模化生产提供实践和理论基础。通过采用单因素筛选方案对其最适基础培养基、温度、pH 值、碳源、氮源、微量元素及液固双相发酵配方进行研究, 发现该菌株在 PDA、PPDA、PDAY、SDAY、SMAY 5 种培养基上均能较好生长, 在 PDA 上生长最快, 在 PDAY 上产孢量最大。温度对菌丝的生长和产孢影响显著, 25 °C 菌丝生长最快, 且产孢量最大。*B. bassiana* AT17 菌株在 pH 4–10 范围内均可生长, 在偏碱性环境内生长最快, 在 pH 5–6 的偏酸性环境内产孢量最大。综合评价真菌各项指标后, 葡萄糖和酵母粉为菌丝生长和产孢的最佳碳源和氮源, 固体物料麦麸+玉米粉+米粉与基础培养液 3/4 SDAY 按 2:1 均匀混合后, 添加 0.05% K⁺ 可作为菌株固体发酵的最佳物料配方组合。

关键词: 球孢白僵菌, 培养条件, 优化, 蜱

Optimization of cultural conditions of *Beauveria bassiana* pathogenic for ticks

SUN Ming REN Qiao-Yun GUAN Gui-Quan LIU Zhi-Jie LI You-Quan
MA Mi-Ling LIU Ai-Hong NIU Qing-Li YANG Ji-Fei YIN Hong*
LUO Jian-Xun*

(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Parasitology of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: The aim of this study was to establish and optimize standard laboratory techniques for cultivation and fermentation of a strain of *Beauveria bassiana* (*B. bassiana* AT17), which has shown potential biological activity against ticks. This will provide practical and experimental supports for the fur-

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD40B06, 2007BAD40B02); 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A207)

* 通讯作者: 罗建勋: Tel: 86-931-8342551; ✉: ljxbn@163.com

殷宏: Tel: 86-931-8342515; ✉: yinhong@caas.net.cn

收稿日期: 2010-11-03; 接受日期: 2011-01-30

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

ther research on preparation of biocontrol agents. Condition optimization was conducted by single factor experiment. The factors studied were basic culture medium, temperature, pH, carbon sources, nitrogen sources, microelements and liquid fermentation medium. The results showed that *B. bassiana* AT17 could grow well on PDA, PPDA, PDAY, SDAY and SMAY medium. Comparatively, *B. bassiana* AT17 had the fastest growth on PDA and the highest spore yields on PDAY. Temperature was the major factor that affects on growth speed and yields of *B. bassiana* AT17. It showed that 25 °C was the optimal temperature for both hyphal growth and the sporulation. *B. bassiana* AT17 could grow at pH 4–10 with the fastest growth in alkali condition, and produce optimal sporulation at pH 5–6. Based on all of fungal indexes, glucose and yeast were the best carbon and nitrogen sources. The best solid fermentation medium was wheat bran+indian meal+rice flour mixed with 3/4 SDAY containing suitable K⁺ in proportion of 2:1.

Keywords: *Beauveria bassiana*, Cultural conditions, Optimization, Tick

蜚(Tick)是一类存在于动物体表的常见外寄生虫,同时又是森林脑炎、新疆出血热、莱姆病、Q热、巴贝斯虫病等疾病的传播媒介,呈世界性分布。由于蜚种类繁多、数量大,不仅影响动物生产性能,而且是严重制约畜牧业发展、危害人畜健康的重要因素^[1]。国内外学者已在蜚类防治方面做了大量工作,虽然蜚的免疫学防治已取得了一些进展,基于Bm86的重组疫苗GavacTM已在古巴等国家注册并商品化,免疫率可达55%–100%,但因目前尚未大面积推广及疫苗生产技术的成本等问题制约了抗蜚疫苗的应用^[2–3]。对蜚的防治仍然是大量重复使用化学杀虫剂,而生物防治并没有太多报道。

目前,已经研究的能感染蜚的病原微生物主要包括病毒、细菌、真菌及寄生线虫等4大类^[4],其中苏云金芽孢杆菌、白僵菌属、绿僵菌属、斯氏线虫属及异小杆线虫属等被认为是较有前途的病原微生物种类。由于病原微生物具有选择性强、防效高、生产成本低、不污染环境、对人畜无害等特点,它们越来越多地被研究开发并用于蜚类防治,尤其病原真菌和寄生线虫为蜚的可持续控制提供了希望^[3]。

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)是寄生昆虫的病原性真菌,在害虫生物防治上起着重要作用,可寄生于15个目、149个科的700多种昆虫和蜚蠊类^[5–6]。继1986年首次报道病原真菌可感染微小牛蜚以来,国外研究学者已利用相关病原真菌对蜚进行了侵染性实验,并取得可喜的成效^[7–9]。而在国

内,除本实验室的任巧云等^[10]对白僵菌的杀蜚效果进行研究外,还未见其他研究报道。笔者等从罹病昆虫、土壤中分离获得6株球孢白僵菌菌株,以浸渍法对小亚璃眼蜚(*Hyalomma anatolicum anatolicum*)和微小牛蜚(*Boophilus microplus*)饱血雌蜚进行毒力测定,结果表明,不同菌株对蜚致病力不同,其中*B. bassiana* AT17菌株在 1×10^7 个/mL孢子悬液时,在4–12 d可使所有供试蜚全部死亡,具有较高的杀蜚毒性(另文发表)。另据文献报道,球孢白僵菌在我国曾有10余种商业剂型得到注册,对农林重要害虫如马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)、蛱蛄、象甲和天牛等已获得较好效果^[11],尤其我国用于马尾松毛虫的防治每年达到200万公顷规模,并取得了良好的防治效果及显著的经济、生态及社会效益^[12]。

我国的白僵菌生产、使用已有40年的历史,产业位居世界第一,但与世界现有水平相比较仍有一定差距,尚无现代化程度很高的工业化固态方式生产,而在当前真菌杀虫剂的生产中,液固双相培养法由于经济实用、易于操作和生产效率高而被广泛采用^[11,13]。鉴于病原真菌的诸多优点,对特定的具有良好生防潜力的菌株进行生物学特性的研究可以了解该菌株生长的适宜条件、生存的极限条件及在不同基质上的生长、产孢能力,同时可作为蜚的天敌微生物资源开发利用。但到目前为止,国内外尚未研制出用于蜚生物防治的商品化制剂,因此作者等对前期筛选得到的优势*B. bassiana* AT17

菌株进行了培养条件的研究,为更好的利用这一生物资源,进一步开发应用该菌株的杀蟑制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 试验用菌株 *B. bassiana* AT17 于 2010 年 4 月在江苏省射阳县周边地区的潮湿土壤中分离获得,经形态学和分子生物学方法鉴定为球孢白僵菌。

1.1.2 基础培养基: 马铃薯汁培养基(PDA); PPDA 为 PDA 添加 10 g/L 蛋白胨; PDAY 为 PDA 添加 10 g/L 酵母粉; 萨氏培养基(SDAY); SMAY 是 SDAY 中用麦芽糖代替葡萄糖。

1.1.3 液体培养基: 采用不含琼脂的萨氏培养基(SDAY),按不同比例缩减葡萄糖的含量,配制 1/4 SDAY 培养基、1/2 SDAY 培养基、3/4 SDAY 培养基、1/8 SDAY 培养基、SDAY 培养基。

1.1.4 固相培养基: 固相培养基以麦麸为基本组分,玉米粉、大米粉、苜蓿粉为辅料,培养基组分及配比见表 1。

表 1 固相培养基组分及配比 Table 1 Constituent and proportion of fermentation medium	
培养基组成 Constituent of fermentation medium	各组分分配比(质量比) Proportion of fermentation medium
Wheat bran	100
Wheat bran+Indian meal	95:5
Wheat bran+Rice flour	95:5
Wheat bran+Alfalfa meal	95:5
Wheat bran+Indian meal+Rice flour	95:3:2
Wheat bran+Indian meal+Alfalfa meal	95:3:2

1.2 方法

1.2.1 不同基础培养基对真菌生长和产孢的影响: 分别将 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液无菌条件下接种在 PDA、PPDA、PDAY、SDAY、SMAY 培养基上,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}$ C,湿度为 90% 的恒温保湿温箱内培养,十字交叉法每日测量菌落直径,培养 14 d 后用直径为 0.8 cm 的打孔器在菌落

边缘至中心 1/2 处重复打孔 3 次,并将打孔器打下的菌碟分别用相同体积的含 0.05%吐温-80 灭菌水全部冲洗下来,借助血球计数板和显微镜计数后除以菌碟面积得到其单位面积(cm^2)的平均产孢量,平均产孢量=平均每小格孢子数 $\times4\times10^6\times$ 稀释倍数/ $(0.16\times\pi)$ 。

1.2.2 不同温度对真菌生长和产孢的影响: 将 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液无菌条件下接种在 PDAY 培养基上,分别置于 15 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C 共 5 个温度梯度,湿度为 90%的条件下培养 14 d,每处理 3 次重复,菌落直径、生长速率及产孢量测定同上。

1.2.3 不同 pH 值对真菌生长和产孢的影响: PDAY 培养基灭菌后用除菌过滤的 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9、10 共 7 个梯度,分别将 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液无菌条件下接种在不同处理培养基中心,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}$ C,湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养,菌落直径、生长速率及产孢量测定同上。

1.2.4 不同碳源对真菌生长和产孢的影响: 在 PDAY 培养基上,用等重量的无水葡萄糖、麦芽糖、D-山梨醇、蔗糖代替碳源葡萄糖,配成含不同碳源的培养基。无菌条件下分别接种 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}$ C,湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养,菌落直径、生长速率及产孢量测定同上。

1.2.5 不同氮源对真菌生长和产孢的影响: 在 PDAY 培养基上,用等重量的 NaNO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、尿素、L-甘氨酸代替氮源酵母粉,配成含不同氮源的培养基。无菌条件下分别接种 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}$ C,湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养,菌落直径、生长速率及产孢量测定同上。

1.2.6 不同微量元素对真菌生长和产孢的影响: 在 PDAY 培养基中分别添加 0.005%的 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 ZnSO_4 、 CuSO_4 、 MgSO_4 、KCl,以不加微量元素的 PDAY 为对照组,配成含不同微量元素的培养基。无菌条件下分别接种 2 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液,每处理 3 次重复,置于 25 $^{\circ}$ C,湿度为 90%的恒

温保湿温箱内培养, 菌落直径、生长速率及产孢量测定同上。

1.2.7 不同固体配料物对真菌产孢的影响: 将固料混合物(表 1)与 50%的蒸馏水混合均匀后, 装入广口罐头瓶中灭菌 30 min, 冷却后接入 10%液体菌(该菌液培养条件是: 1/4 SDAY 液体; 接种量: 1×10^8 个/mL 分生孢子悬液 1 mL; 培养温度: 25 °C; 转速: 180 r/min; 培养时间: 3 d)和 20%的已灭菌蒸馏水, 每处理 3 次重复, 置于 25 °C, 湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养观察生长与产孢情况, 在培养 10、12 和 14 d 后将固体混合物置于 37 °C 的真空干燥箱内, 同时在箱内放入无水氯化钙, 直到氯化钙无明显吸水现象, 用粉碎机将固体混合物打成孢子粉, 精确称取 0.5 g 孢子粉用 0.05%吐温-80 的灭菌水适当稀释后, 借助血球计数板计数测定其单位重量的含孢量, 以 100%麦麸培养基为对照, 从而筛选出最佳比例的配料。每克菌粉含孢量=平均每小格孢子数 $\times 4 \times 10^6 \times$ 稀释倍数/称取克数。

1.2.8 不同液体培养基对真菌产孢的影响: 将麦麸与基础培养液(1/2 SDAY、1/4 SDAY、1/8 SDAY、3/4 SDAY、SDAY)按 2:1 均匀混合后, 装入广口罐头瓶中灭菌 30 min, 冷却后接入 10%液体菌(该菌液培养条件同上)和 20%的已灭菌基础培养液, 每处理 3 次重复, 置于 25 °C, 湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养观察生长与产孢情况, 在培养 10、12、14 d 后用真空干燥箱干燥后测定其含孢量, 以加蒸馏水的麦麸培养基为对照组, 从而筛选出最佳液体培养基。

1.2.9 最佳物料配方对真菌产孢的影响: 在单因素试验基础上, 取最佳固体物料麦麸+玉米粉+米粉与基础培养液 3/4 SDAY 按 2:1 均匀混合后, 添加 0.05% K^+ 为真菌菌株固体发酵的物料配方组合 A, 装入广口罐头瓶中灭菌 30 min, 冷却后接入 10%液体菌(该菌液培养条件同上)和 20%的已灭菌蒸馏水, 每处理 3 次重复, 置于 25 °C, 湿度为 90%的恒温保湿温箱内培养观察生长与产孢情况, 在培养 10、12 和 14 d 后用真空干燥箱干燥后测定其含孢量, 以不加 K^+ 的组合 B 为对照, 从而筛选出最佳比例的配料

组合。

1.2.10 最佳物料配方组合下孢子萌发率测定: 取适量培养 12 d 的 A 配方孢子原粉, 用无菌石英砂和含 0.05%吐温-80 的灭菌水兑成高浓度的孢子悬浮液, 用移液器在无菌条件下加入含 40 g/L 蔗糖和 10 g/L 蛋白胨的萌发液中, 高速涡旋振荡, 血球计数板计数后稀释成 1×10^6 个/mL 悬浮液。将孢子悬液在 25 °C \pm 1 °C 振荡(100 r/min)培养 24 h 后镜检计数萌发和未萌发的孢子数(>100 个), 由此计算萌发率, 每个处理设 3 个重复。

1.2.11 数据处理: 数据应用 DPS 数据处理系统进行统计分析^[14]。

2 结果

2.1 不同培养基对真菌生长和产孢的影响

对所选培养基进行筛选, 结果表明(表 2), *B. bassiana* AT17 菌株在 5 种培养基上均能较好的生长, 在 PDA 上生长速率最快, 在 SMAY 上次之, 但以产孢量来看, 该菌株在 PDAY 上较其它培养基产孢量大, 差异显著, 适合做菌株的基础培养基。

2.2 不同温度对真菌生长和产孢的影响

B. bassiana AT17 菌株在不同培养温度条件下, 分生孢子萌发、生长速率及产孢各不相同(表 3), 在 15 °C–35 °C 时均能生长, 随着温度的升高菌丝生长加快, 在 20 °C–30 °C 时菌株长势良好, 其中 25 °C 下生长最好, 高于 30 °C 后, 菌落随温度升高而缓慢生长, 甚至于不生长。在各温度处理中, 菌株生长速率和产孢量随温度变化差异显著, 25 °C 时生长速率和产孢量均达到最大值, 温度过高或过低, 对真菌生长和产孢均不利。

2.3 不同 pH 值对真菌生长和产孢的影响

B. bassiana AT17 菌株在 pH 4–10 范围内均可生长, 在偏碱性条件下, 菌丝生长较好, pH 值为 8 时生长速率可达到 5.28 mm/d (表 4)。在 pH 5–6 的偏酸性环境下, 球孢白僵菌产孢量明显高于偏碱性条件, pH 值为 6 时产孢量最大且差异显著, 所以在固体培养时, 培养基的 pH 值为 6 时最适宜 *B. bassiana* AT17 菌株的生长和产孢。

表 2 不同培养基对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 2 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain in different culture medium

培养基 Culture medium	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore (×10 ⁸ /cm ²)
PDA	67.11±1.76 ^a	4.82±0.09 ^a	2.43±0.23 ^b
PPDA	64.02±0.57 ^{ab}	4.72±0.06 ^a	0.66±0.19 ^d
PDAY	59.16±2.63 ^{bc}	4.21±0.21 ^b	3.19±0.19 ^a
SDAY	58.09±0.13 ^c	4.17±0.02 ^b	0.55±0.10 ^d
SMAY	65.07±0.10 ^a	4.65±0.01 ^a	1.00±0.20 ^c

注: $p<0.05$, 同列不同行小写字母不相同代表差异显著, 下表同上。
Note: $p<0.05$, followed by same letter(s) in the same column do not differ statistically at 5% significance, the same as follows.

表 3 不同温度对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 3 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain with different temperature

温度 Temperature (°C)	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore (×10 ⁸ /cm ²)
15	32.97±10.84 ^{bc}	2.30±0.11 ^d	4.87±0.52 ^d
20	50.23±3.29 ^{ab}	3.67±0.17 ^b	6.31±0.99 ^c
25	67.70±1.08 ^a	4.66±0.14 ^a	11.66±0.50 ^a
30	45.96±11.37 ^b	3.28±0.13 ^c	8.52±0.74 ^b
35	17.50±1.81 ^c	1.37±0.07 ^c	1.27±0.07 ^e

表 4 不同 pH 值对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 4 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain in different pH value

pH	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore (×10 ⁸ /cm ²)
4	56.28±1.51 ^c	3.96±0.06 ^c	4.76±0.46 ^b
5	69.42±2.21 ^{ab}	4.91±0.16 ^b	5.52±0.31 ^a
6	68.47±2.62 ^b	5.01±0.14 ^{ab}	5.88±0.26 ^a
7	72.77±0.47 ^{ab}	5.10±0.19 ^{ab}	3.17±0.23 ^c
8	73.88±1.22 ^a	5.28±0.04 ^a	2.53±0.18 ^d
9	72.89±0.67 ^{ab}	5.18±0.06 ^{ab}	1.53±0.23 ^e
10	69.41±2.43 ^{ab}	4.87±0.02 ^b	1.07±0.16 ^f

2.4 不同碳源对真菌生长和产孢的影响

B. bassiana AT17 菌株生长和产孢能利用几乎所有的碳源, 但生长状况各有不同(表 5), 以麦芽糖和 D-山梨醇作为碳源时, 菌丝生长健壮且菌丝浓密, 菌落生长较好。以葡萄糖和 D-山梨醇作为碳源时, 菌株产孢量较好, 而蔗糖作为碳源时, 菌丝稀疏, 产孢量较低, 不适合该菌株的培养。

2.5 不同氮源对真菌生长和产孢的影响

供试的几种氮源中, 菌株对尿素的利用较差, 菌丝生长较稀, 几乎不能生长, 而且不产孢(表 6)。L-甘氨酸作为氮源时, 菌株菌落直径最大, 生长速

率较快, 是菌丝生长最有利的氮源, 但相比有机氮源酵母粉, 菌株产孢量较低。因此, 为有效利用资源及其易得性, 有机氮源酵母粉相对经济实用。

2.6 不同微量元素对真菌生长和产孢的影响

微量元素的单因素筛选结果如表 7 所示, 微量元素对菌株生长与产孢量的影响与对照组差异不显著, 相对对照组而言, Mg^{2+} 可促进菌丝的生长, 但对产孢有抑制作用; Fe^{3+} 虽可促进菌株产孢, 但对菌株生长有抑制作用。因此, 在固体培养时, 菌株所需微量元素的筛选仍需进一步实验探索。

表 5 不同碳源对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 5 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain with different carbon source

碳源 Carbon source	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore ($\times 10^8/\text{cm}^2$)
Glucose	55.91 \pm 1.13 ^c	3.99 \pm 0.17 ^b	4.99 \pm 0.55 ^a
Anhydrous glucose	55.89 \pm 0.97 ^c	3.87 \pm 0.15 ^b	4.00 \pm 0.13 ^{ab}
Maltose	71.23 \pm 1.22 ^a	5.13 \pm 0.24 ^a	4.29 \pm 0.05 ^{ab}
D-Sorbierite	67.36 \pm 1.57 ^b	4.95 \pm 0.12 ^a	5.07 \pm 0.68 ^a
Sucrose	57.16 \pm 0.80 ^c	4.04 \pm 0.13 ^b	3.61 \pm 0.34 ^b

表 6 不同氮源对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 6 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain with different nitrogen source

氮源 Nitrogen source	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore ($\times 10^8/\text{cm}^2$)
Yeast	57.52 \pm 2.87 ^b	4.22 \pm 0.25 ^b	4.90 \pm 0.24 ^a
Sodium nitrate	65.06 \pm 3.84 ^b	4.55 \pm 0.22 ^b	1.02 \pm 0.08 ^b
Ammonium sulfate	44.51 \pm 3.27 ^c	3.25 \pm 0.33 ^c	1.21 \pm 0.35 ^b
Urea	11.37 \pm 1.33 ^d	0.83 \pm 0.02 ^d	0.00 \pm 0.00 ^c
L-Glycine	74.93 \pm 3.00 ^a	5.33 \pm 0.30 ^a	1.36 \pm 0.08 ^b

表 7 不同微量元素对 *B. bassiana* AT17 菌株生长及产孢的影响
Table 7 Effect on growth and the spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain with different microelements

微量元素 Microelement	菌落直径(14 d) The diameter of colonial morphology (mm)	生长速率 Speed of growth (mm/d)	产孢量 Yield of spore ($\times 10^8/\text{cm}^2$)
CK(Contrast)	56.83 \pm 0.89 ^{ab}	4.10 \pm 0.08 ^{ab}	5.18 \pm 0.56 ^a
Fe ³⁺	51.56 \pm 2.20 ^c	3.79 \pm 0.26 ^b	5.49 \pm 0.14 ^a
Zn ²⁺	54.75 \pm 1.55 ^b	3.89 \pm 0.13 ^{ab}	5.15 \pm 0.75 ^a
Cu ²⁺	54.15 \pm 0.71 ^b	3.87 \pm 0.05 ^{ab}	3.08 \pm 0.25 ^b
Mg ²⁺	58.43 \pm 0.36 ^a	4.32 \pm 0.54 ^a	3.40 \pm 0.51 ^b
K ⁺	55.96 \pm 1.81 ^{ab}	3.95 \pm 0.05 ^{ab}	5.22 \pm 0.50 ^a

2.7 固体基础配方对真菌产孢的影响

图 1 表明,以麦麸为载体的各组合产孢量均可达到 2.0×10^{10} 个/g 以上,虽然麦麸培养基通气性能好、容易操作,但其营养成分不全,物料表面容易干燥,产孢量不高。以单组分成分与麦麸混配的固体配方与多组分与麦麸混配的配方相比,其产孢量远远低于多组分配方。麦麸、玉米粉及米粉的配方培养 14 d 后产孢量达到最高,可达 3.86×10^{10} 个/g,这可能是因为玉米粉和米粉作为主要的碳氮源,同时对物料的保水能力有一定的影响。

2.8 不同液体对真菌产孢的影响

如图 2 所示,接种基础培养液及菌种后,培养

时间的不同,各处理组产孢量也明显增大,但由于营养含量(含糖量)越高越促进菌丝的生长,所以在后期的产孢过程中,营养过于丰富反而使菌株在这些培养基上产生的分生孢子相对较少。液体培养液 3/4 SDAY 配方较其它液体配方差异显著,可用于菌株液体发酵的营养来源。

2.9 复合配方对真菌产孢的影响

由图 3 可知,相对于其它供试配方来说,以添加 K⁺ 的 A 配方 200 目过筛下第 10 和 12 天产孢量达到最大。同时,为衡量配方所需的发酵时间,添加 K⁺ 的 A 配方培养 10 和 12 d 的发酵物产孢量较高,可作为发酵培养所需时间的参考。

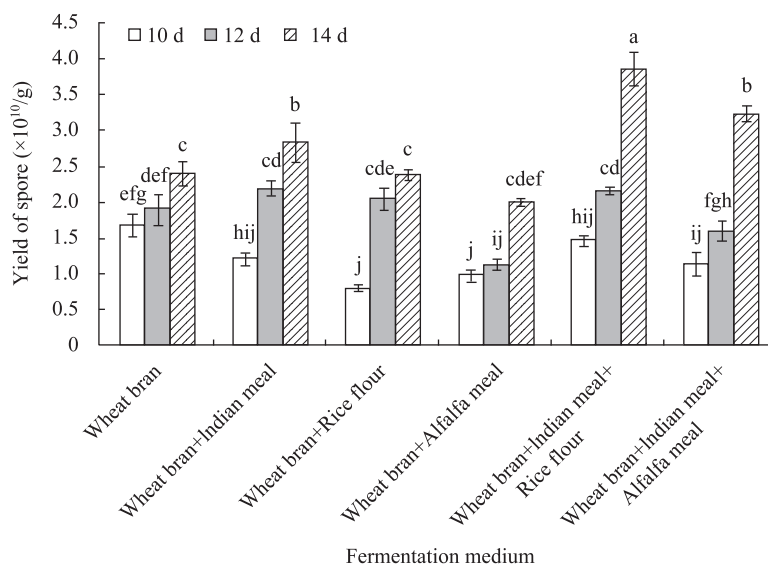


图 1 基础物料上 *B. bassiana* AT17 菌株不同时期内的产孢量情况

Fig. 1 The spore yields of the *B. bassiana* AT17 strain on materiel in difference phase

注: $P < 0.05$, 同列不同行小写字母不相同代表差异显著。以下相同。

Note: $P < 0.05$, followed by same letter(s) do not differ statistically at 5% significance. The same as follows.

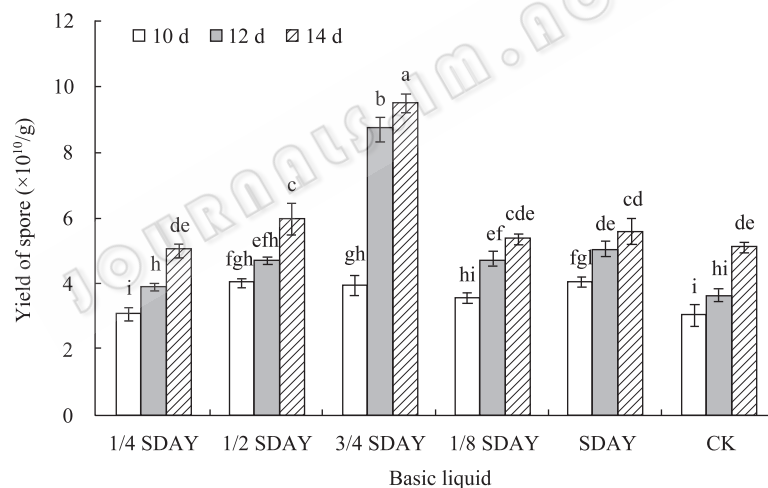


图 2 基础液对 *B. bassiana* AT17 菌株不同培养时间内的产孢量影响

Fig. 2 Effect on the spore yields of *B. bassiana* AT17 strain for basic liquids in difference incubation time

2.10 原粉萌发率的测定

通过上表筛选得出, 培养 12 d 的 A 配方为最佳物料配方, 以营养萌发法测定得到其原粉孢子萌发率为 84.61%–90.58%, 这可能是由于干燥时间过长, 导致了部分孢子的失活。

3 讨论

通过试验发现, *B. bassiana* AT17 菌株在 PDAY

培养基上长势较好且产孢量高。研究结果同时表明, 该菌在 15 °C–35 °C、pH 值为 4–10 的范围内都能生长, 说明该菌对环境条件的适应范围较广。该菌的最适培养温度为 25 °C, 温度过低, 该菌的生长及产孢缓慢甚至受到抑制, 而温度过高则对该菌也产生影响, 生长停滞, 甚至于不产孢。

球孢白僵菌生长发育需要的营养物质包括碳水化合物、氮素和微量元素, 由表 5 可以看出, 该菌

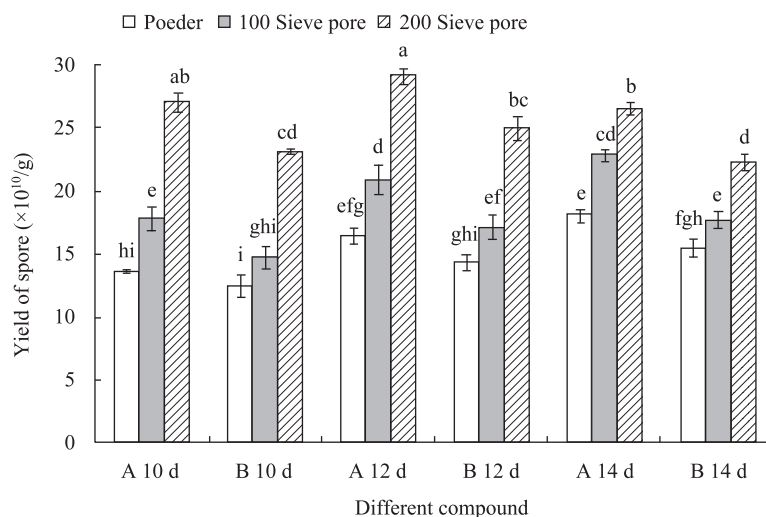


图3 各组合对 *B. bassiana* AT17 菌株不同时期内的产孢量影响
Fig. 3 Effect on the spore yields of *B. bassiana* AT17 strain with different compounds

能利用多种单糖、多糖及醇类做为碳源, 由于不同碳源价格的差异, 葡萄糖可作为最佳碳源的筛选, 这与程国华等对球孢白僵菌碳源筛选的结果相一致^[15]。氮素是真菌合成氨基酸、蛋白质、核酸和细胞质的主要成分, 尿素对球孢白僵菌菌丝的生长和产孢有抑制作用, 这与王芊、纪明山等^[16-17]的研究有类似的结果, 在实际生产中应尽量避免尿素作为产孢培养基的氮源。L-甘氨酸作为氮源时菌丝生长速率优于其他氮源, 但产孢量较少。从表 6 可知, 球孢白僵菌对有机氮源的利用远远高于无机氮源, 酵母粉为最佳氮源的首选。微量元素作为酶的组成部分并维护其活性, 调节细胞渗透压, 氧化还原电位等, 是真菌生长过程不可缺少的成分, 而本实验未能筛选出有效的微量元素, 还有待于进一步实验探索。

培养基成分是影响球孢白僵菌产孢量的重要因素之一, 固体培养基的优劣及其组配直接决定了菌株产孢能力, 因此对固体培养基的配方进行筛选是十分必须的。本试验采用以麦麸为主, 加入少量的玉米粉、米粉及苜蓿粉的培养基配方初步研究了适合培养 *B. bassiana* AT17 菌株的液固两相培养基和提高其产孢量的相关条件。结果表明: 3/4 SDAY 可用于液相培养, 麦麸+玉米粉+米粉组合产孢量最高, 可用于固相培养, 适量添加 K^+ 验证后, 产孢量明显

增加, 培养 12 d 后, 原粉产孢量高达 1.64×10^{11} 个/g, 100 目过筛下可达 2.09×10^{11} 个/g, 200 目过筛下可达 2.90×10^{11} 个/g, 这与合肥农药厂和江西天人生态工业有限责任公司生产的油悬浮剂和可湿性行粉剂含孢量相差不大^[18], 可以满足工业化生产的需要, 同时为考虑节约成本, 以 10–12 d 为参考培养时间。在固相培养过程中, 麦麸培养基能增加透气性, 提高其他组分的利用率, 添加微量元素 K^+ 为菌株的生长和产孢提供了良好的营养和空间环境, 这样使农业生产废料变废为宝, 既降低了培养成本, 又能增加孢子产量, 还能适当地缩短生长周期, 为进一步降低球孢白僵菌制剂生产成本提供了一个新的途径。

参考文献

- [1] Socolovschi C, Doudier B, Pages F, et al. Ticks and human tick-borne diseases in Africa[J]. Médecine tropicale, 2008, 68(2): 119–133.
- [2] de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac[J]. Genetic Analysis Biomolecular Engineering, 1999, 15(3/5): 143–148.
- [3] 高志华, 刘敬泽. 蛭类防治研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2003, 10(4): 251–256.
- [4] Samish M, Řeháček J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control[J]. Ann Rev Entomol, 1999, 44: 159–182.

- [5] 李正跃, 张青文. 球孢白僵菌对马铃薯块茎蛾的毒力及其与常用农药的生物相容性测定[J]. 植物保护, 2005, 31(3): 57-61.
- [6] 付志坚, 陈建新, 付丽君. 白僵菌对昆虫的致病机理研究综述[J]. 武夷科学, 2000, 12(16): 105-109.
- [7] Kaaya GP, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control[J]. Experimental and Applied Acarology, 2000, 24(12): 913-926.
- [8] Onofre SB, Miniuk CM, De Barros NM, et al. Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*[J]. American Journal of Veterinary Research, 2001, 62(9): 1478-1480.
- [9] Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP. Entomopathogenic fungi against South American tick species[J]. Experimental and Applied Acarology, 2008, 46(1/4): 71-93.
- [10] 任巧云, 关贵全, 李有全, 等. 一株白僵菌的分离鉴定及其对微小牛蜱的致病力试验[J]. 动物医学进展, 2009, 30(12): 14-16.
- [11] 李茂业, 林华峰, 刘苏, 等. 提高布氏白僵菌产孢量的培养基及培养条件研究[J]. 生物技术通报, 2009(z1): 380-383.
- [12] 林志伟, 刘洋. 氮素对球孢白僵菌的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2004, 16(4): 16-18.
- [13] 农向群, 涂雄兵, 张泽华, 等. 绿僵菌 R8-4 菌株大量培养固相阶段的条件[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 228-232.
- [14] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 488-491.
- [15] 程国华, 舒静, 丁克坚. 球孢白僵菌营养需求及培养条件研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(5): 365-368.
- [16] 王芊. 不同条件对木霉菌菌丝生长的影响[J]. 中国农学通报, 2002, 18(5): 57-59.
- [17] 纪明山, 李博强, 许远, 等. 绿色木霉 TR-8 菌株的生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(3): 195-199.
- [18] 高英, 薛皎亮, 范三红, 等. 布氏白僵菌代谢毒素的分离纯化及其对油松毛虫幼虫的毒性研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3125-3133.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名课讲堂”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!