

蜡蚧轮枝菌固态发酵基质筛选和发酵条件研究

刘春来¹, 李新民^{1*}, 王克勤¹, 刘兴龙¹, 王爽¹, 杨明秀²

(1. 黑龙江省农业科学院植物保护研究所, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 在对昆虫病原真菌—蜡蚧轮枝菌菌株 Tri-BA81 进行单一基质和一般组合基质固体发酵初步筛选的基础上, 选取谷子、麦麸、磷酸盐和稻壳为 4 个组分因子, 每个因子分别设有不同质量比例的 3 个水平, 按正交设计 ($L_9 4^3$) 进行优化组合筛选研究。同时, 对影响该菌固体发酵产孢的几个因素进行了初步研究。结果表明, 产孢量最高的正交组合为 5 号配方, 分生孢子产量达 1.7×10^{10} 个/g。该菌固态发酵的最适初始含水量为固体基质与水的比例为 1:0.6, 最适 pH 为 5.87。

关键词 蜡蚧轮枝菌; 固体发酵; 初始含水量; pH

中图分类号 S 476.12

Selection of solid-state fermentation substrates and the fermentation conditions of *Verticillium lecanii*

Liu Chunlai¹, Li Xinmin¹, Wang Keqin¹, Liu Xinglong¹, Wang Shuang¹, Yang Mingxiu²

(1. Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;

2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 153330, China)

Abstract On the basis of primary selection of 5 single and 7 mixed substrates for solid fermentation of the *Verticillium lecanii* isolate Tri BA81, millet grain, wheat bran, rice husk and phosphate salt were chosen as the four components with three different weight levels for each component. The orthogonal design was used to optimize the solid media, and several factors affecting solid fermentation of *Verticillium lecanii* were also evaluated. The results showed that the orthogonal combination giving the highest sporulation quantity was prescription No. 5. The suitable initial water content was 1:0.6 of solid substrates to water, and the suitable pH was 5.87.

Key words *Verticillium lecanii*; solid-state fermentation; initial water content; pH

蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)是一种寄主范围和分布极其广泛的昆虫病原真菌。20 世纪 80 年代国外就将该菌注册登记、进行了商品化生产^[1, 2], 用于保护地蔬菜上白粉虱和蚜虫等害虫的防治。我国 80 年代始见一些专题研究, 90 年代后蜡蚧轮枝菌的研究取得了长足的进步^[3-5], 但至今未开发出产品。随着我国北方设施农业的发展, 温室虫害问题日趋严重。因此, 开展蜡蚧轮枝菌真菌生物杀虫剂的研究, 对于保护环境、减少化学农药的使用等方面显得尤为重要。本文是在蜡蚧轮枝菌固体发酵单一基质和一般组合基质初步筛选的基础上, 开展固体基质组合优化和发酵条件研究, 为进一步扩大该菌生产和菌剂研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

蜡蚧轮枝菌 Tri-BA81 由俄罗斯全俄植保所提供。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 初选培养基

5 种单一固体基质: 谷子、玉米碎粒、大米、麦麸、豆饼粉。

4 种一般组合固体基质: 谷子+麦麸+磷酸盐、谷子+豆饼粉+磷酸盐、玉米碎粒+豆饼粉+磷酸盐、玉米碎粒+麦麸+磷酸盐。各组分分别以不同

收稿日期: 2007-09-11

修订日期: 2007-11-23

基金项目: 农业部农业科技成果转化项目[(2003)165 号]

* 通讯作者 Tel: 0451-86668750; E-mail: xinmin63@yahoo.com.cn

比例混合,并分别加入一定量的稻壳与水。

1.1.2.2 液体培养基

以不加琼脂的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基作为接种固体发酵的二级菌种培养基。

1.2 方法

1.2.1 固体发酵正交组合设计

经 5 种单一基质发酵初步筛选结果,以谷子为基质产生的分生孢子最多,达到 0.44×10^{10} 个/g,与其他基质达到了显著性水平。因此,选取谷子为基本组分进行一般组合培养基的筛选试验,结果谷子+麦麸+磷酸盐组合分生孢子的产量最高,达到 1.34×10^{10} 个/g。根据以上结果选取谷子、麦麸、磷酸盐和稻壳为 4 个组分因子,每个因子分别按不同比例质量设 3 个水平,按正交设计($L_9 4^3$)配制成 9 种正交组合固体基质培养基(表 1)。

表 1 蜡蚧轮枝菌固体发酵正交试验
设计($L_9 4^3$)配方组合¹⁾

配方序号	4 因子质量 /g			
	谷子	麦麸	磷酸盐	稻壳
1	24.5	16.4	0.8	8.2
2	18.3	18.3	1.2	12.2
3	14.6	19.4	1.5	14.6
4	21.7	10.9	1.1	16.3
5	24.1	18.1	1.8	6.0
6	19.8	19.8	0.5	9.9
7	26.9	10.8	1.6	10.8
8	22.3	13.4	0.9	13.4
9	24.8	19.8	0.5	5.0

1) 每个因子分别设不同质量比例的 3 个水平。

1.2.2 固体发酵培养条件设计

依据正交组合筛选研究结果,以产孢量最高配方为研究对象,分别设基质与水的比例(初始含水量)分别为:1:0.4、1:0.6、1:0.8、1:1、1:1.2、1:1.4、1:1.6、1:2 等 8 个处理;设初始 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5 及自然 pH(5.87)等 8 个处理,每个处理 4 次重复,比较不同处理的分生孢子的产量。

1.2.3 发酵试验

液体发酵:活化后的一级斜面菌种中加入 0.05% Tween-80 无菌水,充分振荡,获得孢子悬浮液。取 0.5 mL 孢子悬浮液接种于 PDA 平板上,涂布均匀后,置 25 ℃ 培养箱培养。待菌丝长满培养皿后,用打孔器打成菌碟(直径 0.8 cm),将菌碟 5~10 个接种到装液量为 200 mL 的三角瓶中,置 25 ℃、160 r/min 摇床上振荡培养 3 d。用血球计

数板计数芽生孢子量,作为接种固体发酵基质的二级种子液。

固体发酵:将固体基质原料按一定的质量比混匀装入罐头瓶中,加入适量的自来水,浸泡 24 h 后灭菌;自然冷却后接入二级种子液 5 mL(2.56×10^9 个孢子/mL),用无菌的玻璃棒充分搅匀,牛皮纸封口,3~4 个重复,置于相对湿度 85%~95%、25 ℃ 培养箱内培养 7 d。

1.2.4 分生孢子产量测定

称取固体发酵物 20 g 装入内有若干个玻璃珠的三角瓶中,加入 180 mL 0.05% Tween-80 无菌水,放到摇床上充分振荡 30 min(170 r/min),获得孢子悬浮液,用血球计数板计数分生孢子量,3~4 个重复。

1.2.5 结果统计

试验数据用 SAS 统计软件进行 Duncan's 新复极差方差分析。

2 结果与分析

2.1 固体发酵正交组合筛选研究

蜡蚧轮枝菌菌株 Tri-BA81 在不同基质组合的固体培养基上发酵培养 7 d,分生孢子产量存在显著差异。3 号和 5 号配方分生孢子产量明显优于其他配方,分生孢子产量分别达到了 1.6×10^{10} 个/g、 1.7×10^{10} 个/g(表 2)。因此,以产孢量最高的正交 5 号配方为基本培养基进一步研究培养条件对分生孢子产生的影响。

表 2 蜡蚧轮枝菌正交组合固体基质发酵筛选结果¹⁾

配方序号	产孢量/ 1×10^{10} 个 · g ⁻¹		
	最高	最低	平均 ± SE
1	1.43	0.93	(1.20 ± 0.253 7)bc
2	2.01	1.11	(1.60 ± 0.508 7)ab
3	1.75	1.40	(1.64 ± 0.203 7)a
4	1.51	0.93	(1.22 ± 0.297 7)bc
5	2.23	1.09	(1.68 ± 0.582 5)a
6	0.68	0.49	(0.61 ± 0.114 0)d
7	1.61	1.12	(1.37 ± 0.322 0)abc
8	1.13	0.96	(1.04 ± 0.087 6)c
9	0.24	0.30	(0.26 ± 0.029 4)d

1) 表中平均值后标的字母相同,表示 Duncan 氏测验 $p=0.05$ 差异不显著。

2.2 初始含水量对固体发酵产孢量的影响

以 5 号配方为基本培养基的研究结果表明,培

培养基初始含水量对菌株 Tri-BA81 产孢量有显著的影响(图 1)。在所设定的固体基质与水的比例从 1:0.4 至 1:1.2 的 8 个水分梯度范围内,分生孢子产量较高的处理分别为固体基质与水的比例为 1:0.4、1:0.6 和 1:0.8,孢子产量分别为 1.58×10^{10} 、 1.73×10^{10} 和 1.56×10^{10} 个/g。当基质与水的比例从 1:0.8 提高到 1:1.2 时,随着培养基初始含水量的提高,分生孢子产量呈显著降低。基质与水的比例 1:0.6 的处理同基质与水比 1:1 相比,前者孢子产量提高了 60.2%,说明对于菌株 Tri-BA81 的固体发酵培养,5 号配方培养基最适的初始含水量为基质与水比 1:0.6。

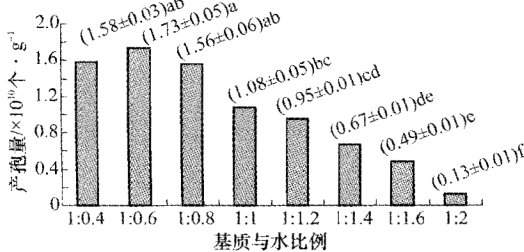


图 1 固体培养基水分含量对蜡蚧轮枝菌产孢量的影响

2.3 初始 pH 对产孢量的影响

从图 2 可以看出,pH 为 3.5 时,分生孢子的产量最低。随着 pH 的提高,菌株 Tri-BA81 分生孢子的产量也随之增加,当 pH 超过 7.5 后,产孢量显著降低。分生孢子的产量较高的 pH 范围在 5~7 之间,5 号正交配方培养基的自然 pH 5.87 时分生孢子产量最高,达 1.47×10^{10} 个/g,偏酸或偏碱均不利于分生孢子的生产。

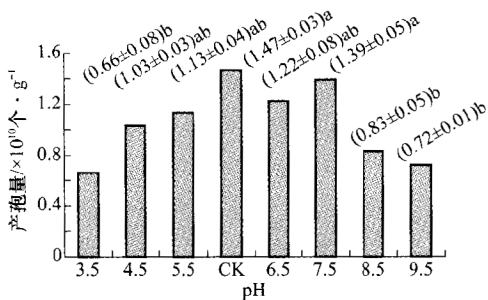


图 2 固体基质 pH 对蜡蚧轮枝菌产孢量的影响

3 讨论

固体基质成分及颗粒的大小对固态发酵过程

具有重要的影响,合适的底物颗粒可明显提高固态发酵反应速率^[6]。本研究在前期工作的基础上,以谷子、麦麸和稻壳 3 种固体基质和无机磷酸盐进行培养基组合研究。谷子颗粒大小适中,麦麸提供了丰富的营养,稻壳起到了疏松的作用,为菌株生长和分生孢子的生产提供了良好的营养和空间环境。

液固双相发酵法是目前真菌生物制剂生产最常用的生产工艺^[7],而菌株在液体或固体培养基上产孢能力的高低,决定了该菌株工业生产的价值和生产工艺。研究所筛选的正交 5 号配方培养基,菌株 Tri-BA81 分生孢子产量 (1.7×10^{10} 个/g) 是产孢量最高的单一基质的 3.89 倍。因此,以农副产品为基本营养原料的多种载体混合培养可进一步提高真菌分生孢子的产量。

培养基的含水量是影响固态发酵的重要环节之一,适宜的含水量,有助于菌体从培养基获得营养物质和氧的传递,从而促进生长繁殖^[8]。研究表明,当正交 5 号配方基质与水的比例大于 1:1 时,产孢量急剧降低,同水分过多培养基易成团,疏松度和通气条件差有关。同时,培养基含水量过多,易于滋生杂菌和污染。

参考文献

- [1] Rombach N C, Gillespie A T. Enomogenous hyphomycetes for insect and mite control on greenhouse crops[J]. Biocontrol News and Information, 1988, 9(1): 7-18.
- [2] Hall R A. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus, *Verticillium lecanii* for use in glasshouses[J]. Entomophaga, 1994, 29: 311-321.
- [3] 李新民, 王克勤, 刘春来, 等. 蜡蚧轮枝菌生物学特性及其对温室白粉虱致病性的研究[J]. 植物保护, 2002, 28(6): 28-31.
- [4] 李新民, 王克勤, 刘春来, 等. 保护地常用农药对蜡蚧轮枝菌菌丝生长影响研究[J]. 植物保护, 2003, 29(5): 19-21.
- [5] 李国霞, 周夏娣, 郭友中. 蜡蚧轮枝菌固体发酵基质优化组合正交筛选[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 28-30.
- [6] 姚伟芳, 弓爱君, 宋晓春, 等. Bt 固态发酵条件的研究进展[J]. 现代农药, 2006, 5(3): 4-6.
- [7] Deshpande M V. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1999, 25(3): 229-243.
- [8] 陶玉贵. 生物农药固态发酵条件的研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2001, 24(1): 31-33.