

应用二次通用旋转组合设计优化黄绿绿僵菌固相培养基配方

徐阿妹, 林华峰*, 李茂业, 王 慧

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘 要: 在真菌孢子粉大规模生产中, 筛选生防真菌最佳产孢培养基是提高产孢量的先决条件。选用廉价易得的实验材料作固体培养基, 在单因素试验的基础上, 采用二次通用旋转组合设计, 对影响黄绿绿僵菌 Mf82 菌株固相发酵阶段产孢量的固体培养基组分及其配比进行了优化, 并检测了所获孢子粉的质量指标。结果表明, 单因素试验, 从大米粉、面粉、玉米粉、豆角壳和黄粉虫蛻中选择面粉、豆角壳与黄粉虫蛻以 4:1:0.2 配比混合作为固体培养基配方时, 该菌产孢量最高; 优化实验, 固相培养基中面粉、豆角壳和黄粉虫蛻的配比为 4:1:0.25 时, 该菌产孢量高达 2.39×10^{12} 个·kg⁻¹; 孢子粉的指标检测, 显示用该培养基配方生产的黄绿绿僵菌孢子粉达到了真菌孢子粉生产的企业标准。

关键词: 黄绿绿僵菌; 固相培养; 二次通用旋转组合设计; 指标检测

中图分类号: S476.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0649-07

Optimization of *Metarhizium flavoviride* solid phase medium formula by quadratic general rotary unitized design

XU A-mei, LIN Hua-feng, LI Mao-ye, WANG Hui

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: It is the precondition for improving conidia production to screen the best conidia medium for biocontrol fungi during the mass production of fungal conidia. In this study, cheap and convenient experimental materials were used to make solid culture medium, and on the basis of single factor experiment, quadratic general rotary unitized design was used to optimize the composition and proportion of solid medium which influenced solid fermentation stage conidia production amount of *Metarhizium flavoviride* Mf82, and the quality indicators of conidia powder were further tested. Results showed that in single factor experiment, conidia production of *Metarhizium flavoviride* Mf82 was of the highest amount, when flour, beans shell and tenebrio slough with proportion of 4:1:0.2 were selected from rice meal, flour, corn starch, beans shell and tenebrio slough; further quadratic general rotary unitized design showed that conidia production of *Metarhizium flavoviride* was of the highest amount of 2.39×10^{12} conidia per kg medium, when ratio of flour, beans shell and tenebrio slough in the solid medium was 4:1:0.25; quality testing indicators showed that *Metarhizium flavoviride* conidia powder produced by this medium formula had reached the enterprise standard for fungi conidia powder production.

Key words: *Metarhizium flavoviride*; solid culture; quadratic general rotary unitized design; quality testing indicators

黄绿绿僵菌(*Metarhizium flavoviride*)是一种重要的昆虫病原真菌, 利用它对害虫进行微生物防治具有广阔的前景^[1]。研究表明, 黄绿绿僵菌对蝗虫、

褐飞虱、马铃薯瓢虫和菜青虫等害虫均有显著的防治效果^[2-5]。其中, 多种真菌对褐飞虱成虫的毒力比较显示, 黄绿绿僵菌 Mf82 菌株对褐飞虱的毒力最

收稿日期: 2013-03-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2011AA10A204-5, 2011AA10A205)资助。

作者简介: 徐阿妹, 女, 硕士研究生。E-mail: xuameiahau@126.com

* 通信作者: 林华峰, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: hf.lin@163.com

强,褐飞虱的累计校正死亡率和僵虫率均达80%以上,几丁质酶活力达 $9.78 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,各项指标都显著高于其他受测菌株,表明该菌是一种很好的生防材料,在褐飞虱的生物防治中具有良好应用前景^[6-7]。

绿僵菌作为生防真菌,其孢子粉的大规模发酵生产是进行害虫生物防治的必备环节,如何在降低生产成本的同时提高产孢量是工业化生产中十分关注的问题。目前,多采用液固两相培养法^[8]生产绿僵菌分生孢子粉,其固相发酵阶段培养基配方的优化对于提高产孢量具有重要意义。生产真菌孢子粉一般利用大米等天然基质作为固体培养基,也可利用粮食加工副产品如谷糠、麦麸等^[9],以及玉米秸秆粉碎物^[10],甚至是害草紫茎泽兰^[11]等。但大米单独使用,其颗粒较大的表面积限制了真菌的利用空间,如果单独使用底物,就需要引进一种增加水和空气利用率的介质。本研究在考虑降低成本、提高产量、确保质量的基础上,选择方便易得的大米粉、面粉、玉米粉作为培养基基质为绿僵菌提供相对平衡的营养,选择菜市场废弃的豆角壳作为培养基载体为该菌提供足够的生长空间,选择廉价的黄粉虫养殖基地副产品黄粉虫蜕作为培养基添加剂为该菌的发酵增产提供可能。

为了弥补单因子试验的缺陷,多种优化方法已被成功地运用于微生物发酵培养基的优化研究中^[12-13]。二次通用旋转组合设计具有准确性高、综合性好、系统性强、信息量大等优点,广泛应用于生产试验和科学试验^[14]。本实验以绿僵菌产孢量为评价指标,在单因素试验的基础上,通过二次通用旋转组合设计法优化固相培养阶段培养基配方,确定了各因素的最优水平,并对收获的黄绿绿僵菌孢子粉进行了质量指标检测,以期绿僵菌高孢粉的工业化生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株和虫体 供试菌株是从褐飞虱上分离的黄绿绿僵菌菌株 Mf82,保存于安徽农业大学昆虫病理实验室。在SDAY斜面上接种分离菌株并培养10 d左右,然后保存于4℃冰箱中,备用。供试褐飞虱采自安徽霍邱县田间,在安徽农业大学植保学院智能人工气候培养室内繁殖10代以上,可为实验提供不同虫龄的褐飞虱。

1.1.2 培养基制备 液体培养基:SDY液体培养基(葡萄糖40 g、蛋白胨10 g、酵母浸出粉10 g,溶于1 000 mL无菌水中,分装至250 mL三角瓶中,每

瓶装100 mL,121℃高压灭菌20 min,自然冷却后备用)。固体培养基:将豆角壳和黄粉虫蜕烘干,豆角壳剪碎至 1 cm^2 大小,将米粉、面粉、玉米粉、豆角壳和黄粉虫蜕以不同配比混合而成。

1.1.3 实验仪器 JA2103电子天平,上海民桥电子仪器厂;GRX-9071B烘箱,上海福玛设备有限公司;BL-50A高压灭菌锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BSD-100振荡培养箱,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;SW-CJ-2D超净工作台,苏州净化设备有限公司;DGX-400B孢子霉菌培养箱,浙江联合赛福实验科技有限公司;Mycocarvester V型收孢机,英国CABI Bioscience;FD-1-50冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;美国Crystal可调速涡旋混匀器HYQ-3110,广州市深华实验仪器设备有限公司;Leica双目立体显微镜,上海精光电科技有限公司;25×16血球计数板,上海达明实验仪器有限公司;BCD-266SN冰箱,日本SANYO电器集团。

1.2 研究方法

1.2.1 种子液制备 在超净工作台内,从平板培养的真菌菌落上挑取少量(3~4接种环)孢子粉接种到100 mL SDY液体培养基中,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的振荡培养箱中培养72 h,作为接种用的种子液。

1.2.2 固相产孢发酵 用酒精棉球擦拭孢子霉菌培养箱内部及发酵盘,灭菌24 h。将米粉、面粉、玉米粉、豆角壳和黄粉虫蜕按配方设计混合后,用双层报纸包裹,在160℃干热灭菌箱中灭菌2 h。灭菌后将固体培养基平摊在培养盘上,待冷却至室温,按每500 g固体培养基100 mL种子液的比例接入种子液,拌种均匀后放入发酵箱中培养。在培养过程中保持发酵箱内环境为:温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$;前期6 d内不供给光照,后期给予12L:12D的光照;前3 d湿度为100%,后续5 d为90%^[15],之后逐渐降低箱内湿度,以促进真菌产孢。

1.2.3 孢子粉收获 当绿僵菌在固体培养基上充分产孢(即固体培养基上覆盖一层孢子粉)后,打开发酵箱门,在室温下通风3 d,待培养基充分干燥后取出,用Mycocarvester V型收孢机收孢,并检测如下产能指标。

(1) 产孢量测定。孢子粉量为从每kg(干重)固体培养基中收获的孢子粉的重量(g),用电子天平称量收获的孢子粉精粉,计算各处理的平均值。孢子粉含孢量为每克孢子粉精粉中的绝对孢子数($\times 10^8$ 个 $\cdot \text{g}^{-1}$)。产孢量换算公式为:产孢量($\times 10^8$ 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$) = 孢子粉量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) \times 含孢量($\times 10^8$ 个 $\cdot \text{g}^{-1}$)

(2) 孢子粉指标检测。含水率、含孢量和萌发率测定参照白僵菌生产企业标准^[16], 第 24 小时的萌发率视为孢子粉的活孢率。毒力测定参考李茂业^[17]的方法。

1.2.4 单因素试验 (1) 固体发酵培养基基质的筛选。分别以大米粉、面粉和玉米粉为培养基基质, 豆角壳为载体, 以基质、载体比例为 3:1 混合作为黄绿绿僵菌固相培养阶段的培养基, 各处理培养基干重均为 500 g, 设 3 个重复, 经 10 d 的固相培养后, 收获孢子粉, 记录各处理收获的孢子粉量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 计算平均值。

(2) 固体发酵培养基基质与载体配比的初步筛选。试验设面粉与豆角壳配比为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1 和 7:1 共 7 个处理, 每处理设 3 个重复, 方法如固体发酵培养基基质的筛选, 初步筛选出最佳基质载体比例。

(3) 培养基中黄粉虫蜕添加量的初步筛选。试验设面粉、豆角壳与黄粉虫蜕的配比为 4:1:0、4:1:0.05、4:1:0.1、4:1:0.15、4:1:0.2 及 4:1:0.25 共 6

个处理, 每处理设 3 个重复, 方法如固体发酵培养基基质的筛选, 初步确定最佳黄粉虫蜕添加量。

1.2.5 二次通用旋转组合试验 在单因素试验基础上, 设计 3 因素 3 水平的二次通用旋转组合试验^[18], 选取最佳基质(X_1)、豆角壳(X_2)和黄粉虫蜕(X_3)3 个因素, 以黄绿绿僵菌产孢量(Y)为指标, 结合 DPS v7.05^[18]软件分析, 确定最优固相培养基配方。

1.3 统计分析

使用 DPS v7.05 数据处理软件进行二次通用旋转组合试验设计, 以产孢量作为评价指标, 建立数学模型, 对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 固体发酵培养基基质的筛选

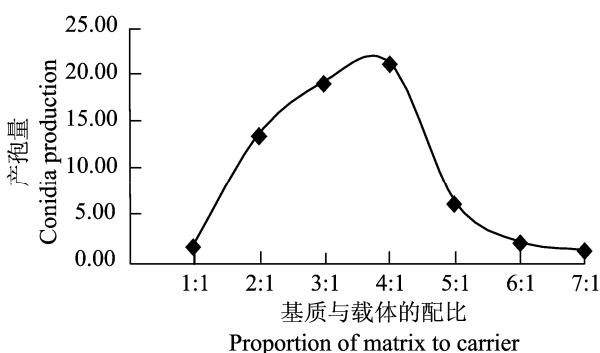
按产孢量换算公式, 计算平均产孢量 ($\times 10^8$ 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$), 结果如表 1。从表 1 可见, 以面粉为基质的培养基的产孢量显著最于大米粉和玉米粉基质, 为每 kg 培养基 1.61×10^{12} 个孢子, 因此, 选择面粉作为本次试验的固相培养基基质。

表 1 固相培养阶段不同固体培养基基质对应的平均产孢量
Table 1 Corresponding average conidia productions to different solid medium matrix

培养基 Medium	平均产孢量/ $\times 10^{11}$ 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$ Average conidia production
大米粉+豆角壳 Rice meal and bean shell	5.26 ± 0.76^b
面粉+豆角壳 Flour and bean shell	16.10 ± 0.60^a
玉米粉+豆角壳 Corn meal and bean shell	6.41 ± 0.21^b

注: 同列数据后不同字母表示差异显著(5%)水平。下同。

Note: Data (means \pm SE) followed by different letters in the same column show significant difference ($P < 0.05$). The same below.



产孢量的单位为 $\times 10^{11}$ 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$ 。下同

The unit of conidia production is $\times 10^{11}$ conidias per kg medium. The same below

图 1 不同面粉与豆角壳对比对黄绿绿僵菌产孢量的影响
Figure 1 Effect of different proportions of flour to beans shell on *Metarhizium flavoviride* conidia production

2.2 固体发酵培养基基质与载体配比的初步筛选

由图 1 可见, 随着基质与载体的配比逐渐上升, 黄绿绿僵菌产孢量呈先升后降的趋势。在 7 个处理

中, 基质与载体的配比为 4:1 时, 平均产孢量最高, 为 2.10×10^{12} 个 $\cdot \text{kg}^{-1}$; 随着配比的继续增加, 产孢量呈下降趋势。分析原因可能是面粉与豆角壳配比达到 4:1 之前, 基质中的碳源和氮源对产孢量起决定性作用; 面粉与豆角壳配比达到 4:1 之后, 随着基质含量的继续增加, 载体相对含量减少, 培养基密度增大, 真菌生长空间变小, 固体培养基的通气性变差, 不利于真菌菌丝生长。因此, 选择面粉与豆角壳配比为 4:1 为宜。

2.3 培养基中黄粉虫蜕添加量的初步筛选

由表 2 可见, 添加黄粉虫蜕的培养基均比不添加黄粉虫蜕的培养基的产孢量显著增高; 随着黄粉虫蜕占组分比例的增加, 产孢量先显著增加, 后有所下降。分析原因可能是黄粉虫蜕中含有几丁质、蛋白质和油脂等营养成分, 能增加培养基的营养, 此外, 黄粉虫蜕富含几丁质, 培养基中添加几丁质能诱导绿僵菌几丁质酶的产生, 增强几丁质酶的活

力,进而可能刺激真菌产孢;几丁质酶活达到最高值后,继续添加黄粉虫蜕已无法增加产孢量。因此,初步选择面粉、豆角壳与黄粉虫蜕的配比为4:1:0.2。

表 2 培养基中黄粉虫蜕的添加量对黄绿绿僵菌产孢量的影响

Table 2 Effect of tenebrio slough quantity in culture medium on conidia production of *Metarhizium flavoviride*

面粉、豆角壳与黄粉虫蜕的配比 Proportion of flour, bean shell and tenebrio slough	平均产孢量/ $\times 10^{11}$ 个 $\cdot\text{kg}^{-1}$ Average conidia production
4:1:0	15.54 \pm 0.34 ^e
4:1:0.05	18.74 \pm 0.41 ^d
4:1:0.1	21.00 \pm 0.36 ^c
4:1:0.15	22.76 \pm 0.10 ^b
4:1:0.2	24.64 \pm 0.18 ^a
4:1:0.25	23.25 \pm 0.17 ^b

表 3 因素水平编码

Table 3 Encode factor and level

处理水平 Level	最佳基质/g The optimal medium X_1	豆角壳/g Bean shell X_2	黄粉虫蜕/g Tenebrio slough X_3
-1.682	315.9	66.36	11.59
-1	350	80	15
0	400	100	20
1	450	120	25
1.682	484.1	133.64	28.41

表 4 二次通用旋转组合设计试验方案及结果

Table 4 Quadratic general rotary unitized design testing program and the results

处理编号 Code of treatment	编码值 Code value			平均产孢量/ $\times 10^{11}$ 个 $\cdot\text{kg}^{-1}$ Average conidia production
	X_1	X_2	X_3	Y
1	1	1	1	20.3
2	1	1	-1	19.4
3	1	-1	1	18.1
4	1	-1	-1	18.0
5	-1	1	1	20.8
6	-1	1	-1	17.9
7	-1	-1	1	19.6
8	-1	-1	-1	16.5
9	-1.682	0	0	15.6
10	1.682	0	0	22.7
11	0	-1.682	0	16.1
12	0	1.682	0	22.1
13	0	0	-1.682	20.6
14	0	0	1.682	23.6
15	0	0	0	24.7
16	0	0	0	22.6
17	0	0	0	23.6
18	0	0	0	25.8
19	0	0	0	22.4
20	0	0	0	23.9

2.4 优化试验

根据单因素试验结果,以面粉(X_1)、豆角壳(X_2)、黄粉虫蛻(X_3)为 3 个试验因素,以黄绿绿僵菌产孢量(Y)为目标,设计 3 因素 3 水平的二次通用旋转组

合试验,用以优化黄绿绿僵菌的固体培养基配方。确定面粉(X_1)、豆角壳(X_2)与黄粉虫蛻(X_3)的零水平分别为 400 g、100 g 和 20 g,试验设计及结果如表 3 和表 4。

表 5 试验结果方差分析

Table 5 Variance analysis of test results

变异来源 Variation source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	偏相关 Partial correlation	F 值 F value	P 值 P value
X_1	12.262 2	1	12.262 2	0.548 8	4.310 0	0.064 6
X_2	19.432 6	1	19.432 6	0.637 1	6.830 4	0.025 9*
X_3	10.624 1	1	10.624 1	0.521 4	3.734 3	0.082 1
X_1^2	50.978 9	1	50.978 9	-0.801 1	17.918 7	0.001 7**
X_2^2	51.941 7	1	51.941 7	-0.803 8	18.257 1	0.001 6**
X_3^2	10.116 0	1	10.116 0	-0.512 2	3.555 7	0.088 7
X_1X_2	0.125 0	1	0.125 0	0.066 1	0.043 9	0.838 2
X_1X_3	3.125 0	1	3.125 0	-0.314 6	1.098 4	0.319 3
X_2X_3	0.045 0	1	0.045 0	0.039 7	0.015 8	0.902 4
回归 Regression	142.855 3	9	15.872 8	$F_2=5.579 17$		0.008 2
剩余 Residue	28.450 2	10	2.845 0			
失拟 Lack of fit	20.196 8	5	4.039 4	$F_1=2.447 11$		0.107 1
误差 Error	8.253 3	5	1.650 7			
总和 Total	171.305 5	19				

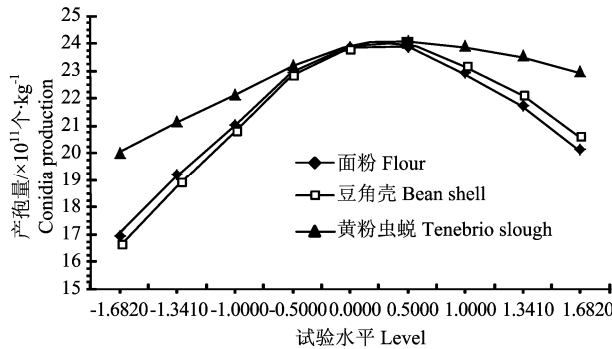


图 2 各单因素与产孢量的关系

Figure 2 The relationship between each single factor and average conidia production

2.4.1 模型的建立与显著性测验 由面粉(X_1)、豆角壳(X_2)、黄粉虫蛻(X_3)3 个因素对黄绿绿僵菌产孢量(Y)相互作用所得结果见表 5。同时,根据多项式回归方程 $Y=b_0+\sum b_iX_i+\sum b_{ij}X_iX_j+\sum X_{ii}^2$,按试验结果计算出拟合方程的各项系数,从而得到回归方程: $Y=23.867 76 + 0.947 56X_1 + 1.192 86X_2 + 0.882 00X_3 - 1.880 80 X_1^2 - 1.898 48 X_2^2 - 0.837 82 X_3^2 + 0.125 00 X_1X_2 - 0.625 00 X_1X_3 + 0.075 00 X_2X_3$ 。

由表 5 对试验结果的方差分析可知,失拟性检验 $F_1=2.447 11 < F_{0.05}(5,5) = 5.05$,差异不显著,说明未知因素对实验结果干扰很小,拟合不足被否定,

可进一步对回归模型进行拟合检验;拟合检验 $F_2=5.579 17 > F_{0.01}(9,10) = 4.94$,达到极显著水平,复相关系数 $R^2 = \text{回归平方和}/\text{总平方和} = 0.833 9$,表明该数学模型 3 个因素对产孢量的影响达到 83.39%,而其他因素的影响和误差仅有 16.61%。因此,该方程与实际情况拟合良好,正确反映了产孢量与面粉、豆角壳及黄粉虫蛻的关系。3 个因素的单因素分析均达到了显著水平;下面公式为 $\alpha=0.10$ 显著水平剔除不显著项,简化后的回归方程: $Y = 23.867 76 + 0.947 56 X_1 + 1.192 86 X_2 + 0.882 00 X_3 - 1.880 80 X_1^2 - 1.898 48 X_2^2 - 0.837 82 X_3^2$ 。

2.4.2 数学模型的解析 (1) 主因子效应分析。由于各因素处理均经无量纲线性编码代换,偏回归系数已经不受因素取值的大小和单位的影响,即已标准化,其绝对值的大小直接反映了变量对响应值的影响程度。因此,各因素在试验取值范围内对产孢量的影响大小顺序依次为: X_2 (豆角壳) $>X_1$ (面粉) $>X_3$ (黄粉虫蛻),且三者都是正效应。

(2) 单因子效应分析。根据试验结果对单因素进行效应分析,结果表明,豆角壳对黄绿绿僵菌产孢量影响最大,其次是面粉,黄粉虫蛻对产孢量影响最小(见图 2)。随着豆角壳含量的增加,黄绿绿僵菌产孢量也随之增加,当豆角壳的试验水平为

0.000 0, 即 100 g 时, 黄绿绿僵菌产孢量达到最高。随着豆角壳含量的继续增加, 产孢量呈下降趋势, 这是因为达到一定量后, 继续添加豆角壳虽然能提供更多的真菌生长空间, 但受培养基基质含量限制, 单位培养基的孢子产量反而会下降。

面粉对黄绿绿僵菌产孢量的影响在试验水平 0.000 0 时达到最高, 此时面粉含量为 400 g。随着面粉含量的继续增加, 产孢量呈下降趋势, 这是因为此时载体相对含量减少, 所能提供的真菌生长空间相对变小, 固体培养基的通气性变差, 不利于真菌菌丝生长。

随着黄粉虫蜕的增加, 黄绿绿僵菌产孢量逐渐增大, 当黄粉虫蜕的试验水平为 1.000 0, 即 0.25 g 时, 黄绿绿僵菌产孢量达到最高。而后黄粉虫蜕含量增加, 产孢量则略有降低, 分析原因可能是几丁质酶活达到最高值后, 增加几丁质已无法继续诱导

真菌产孢。

(3) 交互作用效应分析。对模型的方差检验表明, 交互项偏回归系数均未达到显著水平($P>0.50$), 即各因素之间的交互作用不显著, 因此, 不进行讨论。

2.4.3 数学模型寻优 根据已建立的数学模型, 在 $-1.682 \leq X_i \leq 1.682 (i=1, 2, 3)$ 范围内, 每个因素取 5 个水平($\pm 1.682, 1$ 和 0), 对 $5^3=215$ 个方案进行统计寻优, 在试验范围内可得产孢量最高值为 23.91×10^{11} 个·kg⁻¹, 此时各因素水平编码值: $X(X_1, X_2, X_3) = X(0, 0, 1)$, 即面粉用量为 400 g, 豆角壳用量为 200 g, 黄粉虫蜕添加量为 25 g。以 0 水平试验的均值每 20.72×10^{11} 个·kg⁻¹ 为临界值, 求得产孢量大于临界值的方案共 19 个, 各变量取值的频率分布见表 6。

表 6 优化提取方案中 X_i 取值频率分布
Table 6 The probability distribution of X_i in the combined application

水平 Level	X_1		X_2		X_3	
	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency	次数 Times	频率 Frequency
-1.681 8	0	0.000 0	0	0.000 0	0	0.000 0
-1.000 0	2	0.105 3	2	0.105 3	3	0.157 9
0.000 0	10	0.526 3	10	0.526 3	6	0.315 8
1.000 0	7	0.368 4	7	0.368 4	6	0.315 8
1.681 8	0	0.000 0	0	0.000 0	4	0.210 5
加权均数 <i>WMD</i>	0.263 0		0.263 0		0.512 0	
标准误 <i>SD</i>	0.146 0		0.146 0		0.206 0	
95%的分布区间 95% distribution interval	-0.023 ~ 0.549		-0.023 ~ 0.549		0.108 ~ 0.916	

由表 7 可知, 在 95% 的置信区间产孢量大于 2.07×10^{12} 个·kg⁻¹ 的优化方案为: 面粉用量 398.85 ~ 427.45 g, 豆角壳用量 99.54 ~ 110.98 g, 黄粉虫蜕用量 20.54 ~ 24.58 g。为了确认这一试验结果, 按得出的条件重复 3 次验证试验, 结果表明, 产孢量都不小于 2.07×10^{12} 个·kg⁻¹, 进一步证实了分析的可靠性。

2.5 孢子粉指标检测

按优化试验所得的理论最佳配比 4:1:0.25, 用液-固两相发酵法收获绿僵菌孢子粉。指标检测结果显示, 含孢量为 4.2×10^{10} 个·g⁻¹, 含水率为 4.9%, 活孢率为 95.24%, 均符合真菌孢子粉企业标准^[15]。用两相培养收获的孢子粉和 SDAY 培养基上得到的孢子粉分别制成 1×10^8 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液, 对每处理 60 头褐飞虱成虫进行毒力测定, 设 3 次重复, 结果显示前者毒力测定的校正死亡率达 81.6%, 感

染率达 87.7%, LT_{50} 为 4.5 d, 均比后者高。以上质量指标结果表明, 用本文方法生产绿僵菌孢子粉产量高且质量优。

3 讨论

本研究首先通过 3 组单因素试验, 以产孢量为试验指标, 确立了面粉为最佳培养基基质, 确定了最佳基质载体比例为 4:1; 明确了黄粉虫蜕的添加量, 初步得到固体培养基配方。接着, 通过二次通用旋转组合设计, 建立了黄绿绿僵菌的产孢量(Y)与固体培养基配方组分面粉(X_1)、豆角壳(X_2)、黄粉虫蜕(X_3) 3 个因素的回归方程, 此模型在试验范围内能较准确地预测黄绿绿僵菌的产孢量。通过数学模型寻优, 得出最佳产孢培养基为面粉:豆角壳:黄粉虫蜕为 4:1:0.25, 产孢量高达 2.39×10^{12} 个·kg⁻¹。

真菌液固两相发酵的固相培养基配方直接影响

孢子粉的产量、质量及生产成本^[17]。因此,在选择固相培养基组分时,既要考虑真菌的生长情况,又要使生产成本尽量低廉。对孢子粉的指标检测显示,孢子粉的质量已达到企业生产标准。本实验将废弃的豆角壳和廉价的黄粉虫蜕应用于真菌生产,不仅变废为宝,还降低了生产成本。同时,本实验室在真菌发酵研究中发现,向基础培养基面粉中添加适量豆角壳和黄粉虫蜕,能有效提高产孢量。推测原因,面粉中含有蛋白质、碳水化合物、酶、脂肪和维生素等物质,为真菌生长提供必需的营养;适量的豆角壳能够提高固体培养基质的通风和散热性能,利于真菌菌丝生长;而黄粉虫蜕中含有几丁质、蛋白质和油脂等营养成分,一方面能增加培养基的营养,另一方面培养基中添加黄粉虫蜕能诱导绿僵菌几丁质酶的产生,进而可能刺激真菌产孢。因此,用本实验设计的固相培养基生产绿僵菌孢子粉具有成本低、质量优和产量高的优点。

此外,黄粉虫蜕富含几丁质,有助于增强绿僵菌几丁质酶活力。几丁质酶活性高的菌株,其毒力也相对较高^[3]。毒力测定显示,该菌产孢量与杀虫毒力之间存在明显的相关关系。因此,该固相培养基配方可应用于真菌孢子粉的工业化生产,能进一步加工为真菌制剂或直接用于害虫的生物防治。

参考文献:

- [1] 林华峰. 虫生真菌研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 1998, 25(3): 251-254.
- [2] 董辉, 苏红田, 高松, 等. 绿僵菌对蝗虫及其捕食性天敌的影响[J]. 中国生物防治, 2005(1): 60-62.
- [3] Li M Y, Lin H F, Li S G, et al. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae)[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(44): 7162-7167.
- [4] 郭艳琼, 李友莲. 黄绿绿僵菌对马铃薯瓢虫体内几种酶活性的影响[J]. 植物保护, 2007(3): 39-42.
- [5] 刘树峰, 叶华智, 蒋素蓉. 一株绿僵菌的分离及其毒力的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 17: 5058-5059, 5077.
- [6] 李茂业, 林华峰, 李世广, 等. 褐飞虱高毒力绿僵菌菌株的筛选[J]. 菌物学报, 2012, 31(3): 331-340.
- [7] Li M Y, Lin H F, Chen P R, et al. Virulence of entomopathogenic fungal isolates (Ascomycota: Hypocreales) to adults and eggs of *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae)[J]. African Journal of Agricultural Research, 2012, 7(14): 2183-2190.
- [8] 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(S1): 380-383.
- [9] 蒲莹龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [10] 朱天辉, 邱德勋, 杨世璋, 等. 利用玉米秆粉碎物生产白僵菌[J]. 四川林业科技, 2002, 23(4): 45-48.
- [11] 冯玉元. 紫茎泽兰生产白僵菌研究[J]. 中国森林病虫害, 2006, 25(2): 4-6.
- [12] Heck J X, De Barros Soares L H, Ayub M A Z, et al. Optimization xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 37(4): 417-423.
- [13] Liu H L, Lan Y W, Cheng Y C. Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology [J]. Process Biochem, 2004, 39: 1953-1961.
- [14] 肖占文, 赵致禧. 回归旋转设计在甜菜种衣剂配方研究中的应用[J]. 中国糖料, 2005(1): 23-25.
- [15] 谢翎, 陈红梅, 樊美珍, 等. 利用大米固态发酵生产球孢白僵菌的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(10): 85-88.
- [16] 殷凤鸣, 潘务耀, 李增智. 白僵菌生产企业标准[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 321-325.
- [17] 李茂业, 林华峰, 李世广, 等. 黄绿绿僵菌 Mf82 菌株对不同虫态褐飞虱的毒力[J]. 昆虫学报, 2012, 03: 316-323.
- [18] 唐启义, 冯明光. DPS 数据处理系统: 实验设计、统计分析 & 数据挖掘[M]. 北京: 科学出版社, 2007.