

## 蜡蚧轮枝菌和球孢白僵菌的共发酵

刘锦霞 杜文静\* 李晶 武建荣 李娜 丁品 张建军

(甘肃省科学院生物研究所 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 【目的】球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)和蜡蚧轮枝菌(*Verticillium lecanii*)是国内目前研究应用最广泛的杀虫生防真菌,欲扩大其防治范围、增强防治效果、降低生防成本。【方法】采用共发酵技术,通过组合菌株产孢能力和杀虫毒力比较试验,确定蜡蚧轮枝菌和球孢白僵菌共发酵的可行性。【结果】蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵的最佳配比为 1:1 时,按 10%总量接种于发酵培养液中(培养液按酵母膏 5.0 g/L、葡萄糖 20.0 g/L、麦芽糖提取物 5.0 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L、黄小米 200.0 g/L, pH 6.5 配制),  $23.0\text{ }^\circ\text{C}\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$  恒温静置发酵 12 d,共发酵液的含孢量可达  $1\times 10^9$  CFU/mL 以上,杀虫毒力比较强,其对温室白粉虱和菜青虫可同时显效,处理 9 d 后的致死中浓度  $LC_{50}$  分别为  $2.09\times 10^4\pm 0.12$  CFU/mL 和  $3.17\times 10^5\pm 0.11$  CFU/mL,发酵液浓度为  $1\times 10^8$  CFU/mL 时的致死中时间  $LT_{50}$  分别为  $2.11\pm 0.14$  d 和  $4.27\pm 0.43$  d,温室小区试验校正防效在 80%以上,与其各单一菌株发酵液的防效之间存在显著性差异。【结论】通过两株生防真菌的共发酵研究,为杀虫真菌的扩谱增效以及植物害虫的有效防治提供科学依据和有效途径。

**关键词:** 生物防治,蜡蚧轮枝菌,球孢白僵菌,共发酵

## Co-fermentated with *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*

LIU Jin-Xia DU Wen-Jing\* LI Jing WU Jian-Rong LI Na  
DING Pin ZHANG Jian-Jun

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China)

基金项目: 甘肃省重点科技项目(No. QS061-C31-06)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-931-8768420; 信箱: liujinx0168@163.com

收稿日期: 2011-05-28; 接受日期: 2011-10-10

**Abstract: [Objective]** Both *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii* are insecticide fungus for biological pest control in the using of study at home and abroad. In order to extend the scope and strengthen the effect of prevention and reduce the cost of biological pest control. co-fermentation have been applied in this investigation. **[Methods]** The feasibility of co-fermentation have been studied through comparing sporulation capacity, indoor antibiotic activities of two mixed strains. **[Results]** Results showed that the best ratio at 1:1 of *Verticillium lecanii* L-31 and *Beauveria bassiana* Q-55 by co-fermentation. Taked 10% from every inoculated in fermentation medium (Fermentation medium were prepared by yeast extract 5.0 g/L, glucose 20.0 g/L, malt extract 5.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0 g/L, millet 200.0 g/L, pH 6.5), 23.0 °C±0.1 °C fermentation temperature 12 d standed the total of spore-containing fermentation broth could reached  $1 \times 10^9$  CFU/mL or more and have the stronger insecticide toxicity. It had inhibited effect on both *Trialeurodes vaporariorum* and *Pieris rapae* L. 9 d after treatment of the lethal concentration  $LC_{50}$  were  $2.09 \times 10^4 \pm 0.12$  CFU/mL and  $3.17 \times 10^5 \pm 0.11$  CFU/mL, broth concentration  $1 \times 10^8$  CFU/mL at the time of death in the  $LT_{50}$  was  $2.11 \pm 0.14$  d and  $4.27 \pm 0.43$  d, correct anti-greenhouse effect in the plot experiment more than 80%, having significant difference with the single strain fermentation control effect. **[Conclusion]** It provides a scientific basis for further application of the two insecticidal fungi and a reference efficiency way for Spread-spectrum anti-fungal for spread spectrum efficiency of fungal biocontrol agents.

**Keywords:** Biological pest, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, Co-fermentation

生防真菌的自然资源十分丰富, 已知的昆虫病害中约 70%左右为真菌性病害, 而且生防真菌具有触杀性、流行性, 对环境和人、畜安全等优点, 因此, 在害虫的生物防治中具有极大的开发应用潜力<sup>[1-3]</sup>。球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.] 和蜡蚧轮枝菌 [*Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas] 是目前国内外广泛应用的生防真菌, 可以防治多种农林害虫<sup>[4-7]</sup>。生防真菌的侵染致病机理比较复杂, 不同的生防真菌在生长发育和侵染致病过程中产生的代谢产物和防治对象均有差异。有关资料显示两种亲源关系较远的生防菌, 在防治效果上可能产生协同效应<sup>[8-10]</sup>, 所以根据它们各自产生的毒素和靶标对象的差异将其复配, 可以达到扩谱增效的目的。关于生防微生物的复配增效研究目前已有一些相关报道<sup>[11-13]</sup>, 但是它们的发酵生产工艺均是各自发酵后再混合的简单复合技术, 这种混配技术成本高, 费时费工, 而且混配后菌株间是否存

在相互拮抗、增效程度如何等相关研究较少。由于不同生防菌种生长所需要的环境条件不完全一样, 而且它们之间的相互关系也比较复杂<sup>[14]</sup>, 所以探索研究它们的共发酵培养方法, 了解它们共发酵后的毒力变化, 是降低其生产成本、提高其增效复配应用前景的手段之一。有关球孢白僵菌和蜡蚧轮枝菌的共发酵目前尚未见相关文献报道。本研究通过对蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 的共发酵培养方式、共培养周期、菌株间的最佳配比, 结合其兼防多种植物害虫的室内外毒力测定等试验, 详细研究了两菌株的共发酵培养技术及其共培养物对靶标生物的毒力变化, 为进一步扩大其应用提供技术资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 供试菌株和试虫:** 蜡蚧轮枝菌 (*Verticillium lecanii*) L-31 以及球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*)

Q-55, 为中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供, 经虫体复壮的优良保存菌种。温室白粉虱 [*Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)] 若虫和菜青虫 [*Pieris rapae* (Linnaeus)] 低龄幼虫均从温室 (兰州市榆中县和平开发区生物基地) 即时采集的。

**1.1.2 培养基:** 单菌斜面培养基(g/L): 酵母膏 10.0、蛋白胨 10.0、葡萄糖 40.0、琼脂粉 12.0, pH 6.5。组合菌株共发酵培养基(表 1) pH 为 6.5。表 1 中的配方均为重量体积比(g/L)。

## 1.2 方法

**1.2.1 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 菌株间相互关系实验:** (1) 将蜡蚧轮枝菌 L-31 浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液与 45 °C 左右的 PDA 培养基混合倒平板, 其上均匀点接球孢白僵菌 Q-55 菌株, 25 °C 恒温培养 15 d。(2) 将球孢白僵菌 Q-55 浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液与 45 °C 左右的 PDA 培养基混合倒平板, 其上均匀点接蜡蚧轮枝菌 L-31 菌株, 25 °C 培养 15 d。(3) 将蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 同浓度 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 的菌悬液, 按 1:1 混合后取适量

均匀点接在 PDA 平板上, 另外取相同量与 45 °C 左右的牛肉膏蛋白胨培养基混合倒平板, 25 °C 恒温培养 15 d。

以上每种处理各 5 个重复, 观察两种菌株的生长情况, 以纯种培养作对照。

**1.2.2 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵最佳发酵培养基、发酵方式和发酵周期筛选:** 将蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢子白僵菌 Q-55 在单菌斜面培养基上培养至生成大量孢子, 再用相应液体发酵培养基(5 mL/试管斜面)将其洗下, 按 1:1 比例以 10% 总量分别接种于设计的 12 种培养基(表 1)中, 培养基装量为 100 mL/500 mL 锥形瓶, 25.0 °C $\pm$ 0.1 °C 恒温静置培养, 5 d 后每天定时取样测定各发酵物含孢量及其杀虫生物活性, 绘制出菌株生长曲线, 并以各单菌发酵物为对照, 综合比对, 确定组合菌株共发酵培养的最佳发酵周期、发酵培养基和发酵方式。

**1.2.3 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵最佳配比筛选:** 将蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 的种子液按 1:1、1:2、2:1、3:2、2:3、

表 1 组合菌株共发酵培养基配方  
Table 1 Formula of combined strains in cultivation medium

培养基 Medium formula	酵母膏 Yeast extract	蛋白胨 Peptone	葡萄糖 Glucose	麦芽糖提取物 Maltose extracts	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	马铃薯 Potatoes	小米 Millet	琼脂 Agar
1	10.0	10.0	30.0	10.0	3.0	1.5			
2			20.0		3.0	1.5	200.0		
3	10.0	10.0	40.0						
4			20.0				200.0		
5	5.0		20.0	5.0	3.0			200.0	
6		10.0	20.0	5.0	3.0			200.0	
7	10.0	10.0	30.0	10.0	3.0	1.5			12.0
8			20.0		3.0	1.5	200.0		12.0
9	10.0	10.0	40.0						12.0
10			20.0				200.0		12.0
11	5.0		20.0	5.0	3.0			200.0	12.0
12		10.0	20.0	5.0	3.0			200.0	12.0

1:0、0:1 的组合比例以 10%总量接种于最佳共发酵培养基中,培养基装量为 100 mL/500 mL 锥形瓶,25.0 °C±0.1 °C 恒温静置培养 n 天(n=最佳发酵周期),以各单菌发酵物为对照,测定各共发酵培养物的产孢量及其杀虫生物活性。综合比对,确定共发酵菌株最佳组合配比。

**1.2.4 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵培养物的室内杀虫毒力测定方法:** (1) 以温室白粉虱若虫为试虫的室内杀虫毒力测定方法: 处理液包括组合菌株各共发酵培养物的原液、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  及  $10^5$  倍稀释液,为试验药剂;各单菌发酵物的原液、 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  及  $10^5$  倍稀释液为阳性对照;0.1%吐温-80 水溶液为空白对照,也是稀释剂。

选取温室白粉虱若虫比较集中的一品红新鲜叶片(幼虫数>30 个/片),记录实际虫口数并将卵用小镊子轻轻剥离,然后用浸湿透的棉花团将叶柄包裹,外用保鲜膜包扎,置于铺有两层湿滤纸的平皿(直径 12 cm)中,叶背向上(温室白粉虱均在一品红的叶背生长);将各处理液 20 mL 分别用小喷壶喷于备好的叶片上,每处理叶片分 3 次喷施,中间间隔 1 h,每次喷施药量 5-7 mL。处理完后用带小孔的保鲜膜封口,置于温箱中,每日 L:D=10 h:14 h,25.0 °C±0.1 °C 恒温培养。24 h 后每天用滴管滴入 9-10 滴无菌水(保持适宜湿度,确保一品红叶片新鲜和真菌孢子萌发)。每种处理重复 5 次。连续 9 d 观察记录死亡虫口数(幼虫翅膀分开较大角度、颜色灰白、不动,且在保湿环境下虫体有白色菌丝长出者为死亡虫体)。计算累计死亡率、校正累计死亡率、致死中浓度  $LC_{50}$  和致死中时间  $LT_{50}$ ,相关数据处理采用 SPSS13 软件进行统计分析。

累计死亡率(%)=累计死亡虫口数/基础虫口数×100;

校正累计死亡率(%)=(试验组累计死亡率-对照组累计死亡率)/(100-对照组累计死亡率)

×100。

(2) 以菜青虫低龄幼虫为试虫的室内杀虫毒力测定方法:各处理液同(1);用叶碟法<sup>[15]</sup>测定各处理液对菜青虫低龄幼虫的室内毒力,计算公式也同(1)。

**1.2.5 组合菌株最佳共发酵培养物同时防治温室白粉虱和菜青虫的温室内小区试验:** 经过 1.2.1-1.2.4 试验筛选,用最佳共发酵方法将蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 混合发酵培养 200 mL,用 0.1%吐温-80 水溶液以 10 倍递增各稀释 3 个浓度梯度备用。以相同方法发酵的蜡蚧轮枝菌 L-31 单菌液和球孢白僵菌 Q-55 单菌液为阳性对照。

在菜青虫和温室白粉虱危害相对较重的小白菜温室中,选取约有 1 500 株小白菜(株高 20 cm 以上,最少有 6 片叶子)的集中区域平均分成 13 个长方形小区,12 个为试验药品小区,1 个为空白对照小区,小区之间设保护行,每小区选取 40 株菜青虫和温室白粉虱均较多的植株,记录每株的基础虫口数,并挂牌标记,然后,同时喷施实验药品和对照,从植株上下全株喷施,以植株滴水为度。施药后的前 3 天遮阴、保湿,并于施药后第 3、5、7、15 天观察记录活虫数及其有无药害。计算虫口减退率和校正虫口减退率,并用 DPS3.01 软件作统计分析比较。

虫口减退率(%)=(试前虫口密度-试后虫口密度)/试前虫口密度×100;

校正虫口减退率(%)=(试区虫口减退率-对照区虫口减退率)/(100-对照区虫口减退率)×100。

温室内小区防效试验在甘肃省科学院生物试验基地完成。

**1.2.6 组合菌株最佳共发酵培养液的相关生物量测定:** 将蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢子白僵菌 Q-55 分别在单菌斜面培养基上培养 15 d 后,各用 5 mL 最佳共发酵液(g/L) (酵母膏 5.0、葡萄糖 20.0、麦芽糖提取物 5.0、 $KH_2PO_4$  3.0、黄小米 200.0, pH

6.5; 高压灭菌 25 min, 备用)将生成的大量孢子洗下, 按 1:1 比例以 10%总量接种于上述最佳共发酵培养液中, 培养液装量为 100 mL/500 mL 锥形瓶, 25.0 °C±0.1 °C 恒温静止培养, 12 d 后取样测定共发酵液的含孢量, 并将全部共发酵液通过 8 800 r/min 低温离心 30 min, 离心沉淀物在 55 °C 条件下恒温干燥, 称重。以各单菌发酵液为对照, 分析比较。

## 2 结果

### 2.1 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 菌株间相互关系

通过稀释混合平板法进行蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 之间相互关系试验, 在 3 种混合培养方法中两菌株均能够正常生长, 二者混合培养不存在相互拮抗作用, 可以进行共培养。为进一步共发酵奠定了基础。

### 2.2 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵的最佳发酵培养基、发酵方式和发酵周期筛选结果

该试验从原料来源、生产成本和发酵效果等方面综合考虑, 以正交试验结果筛选的两种单菌最佳发酵培养基为依据设计了 12 种共发酵培养基。研究结果(图 1)表明: 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 的 1:1 组合在各培养基中产孢能力依次(培养基序号)为 1>3>5>7>9>4>6>11>12>10>2>8, 在适宜的培养基中组合菌株发酵 10–12 d 即可达到产孢量高峰期, 单位体积的产孢量可达  $1 \times 10^9$  CFU/mL 以上, 继续发酵产孢量上升缓慢, 增加不到一个数量级。从表 2–4 可知, 组合菌株在 12 种培养基中的发酵物对两种靶标虫害的毒力效果基本一致, 对温室白粉虱毒力强, 对菜青虫的毒力作用也强, 它们的室内毒力强弱依次(培养基序号)为 5>6>12>11>1>3>7>9>4>2>8>10, 5 号培养基的共发酵物对温室

白粉虱和菜青虫的毒力最强, 其校正累计死亡率均在 90%以上, 用药 9 d 后的  $LC_{50}$  分别为  $2.09 \times 10^4 \pm 0.12$  CFU/mL 和  $3.17 \times 10^5 \pm 0.11$  CFU/mL, 发酵液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 时的致死中时间  $LT_{50}$  分别为  $2.11 \pm 0.14$  d 和  $4.27 \pm 0.43$  d, 与其它培养基共发酵物及各单菌培养均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。而且从产孢量和对靶标害虫的毒力活性两方面因素综合考察, 组合菌株液体发酵培养比固体发酵培养产孢量高, 毒力较强, 成熟菌丝体和孢子也容易完全收集, 因此其最佳共发酵培养基选 5 号培养基。但整体来看, 所有共发酵物对温室白粉虱的毒力作用要比对菜青虫稍强一些, 这可能与害虫的生理特性有关, 菜青虫个体比较大, 对同浓度致毒物质的耐受力比温室白粉虱强。

### 2.3 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵时的最佳配比的优选结果

蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵的最佳配比试验结果(表 5, 表 6)表明。共发酵菌株的组合比例对其产孢量和杀虫生物活性影响很大, 总体来看, 蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 无论哪一个比例较高时, 都不利于共发酵时组合菌株中比例较小菌株的生长和拮抗生物活性的产生, 与单一菌株发酵液相比其产孢量和发酵液杀虫生物活性均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而只有两菌株比例相当(1:1)时, 结合平面培养以及显微观察发现两株菌都能正常生长, 而且由于存在公平竞争反而促进两菌株生长活力均有提高, 代谢产物增加, 其对温室白粉虱和菜青虫幼虫的毒力作用增强, 校正累计死亡率均在 90%以上, 用药 9 d 后的  $LC_{50}$  分别为  $2.23 \times 10^4 \pm 0.11$  CFU/mL 和  $3.55 \times 10^5 \pm 0.14$  CFU/mL, 发酵液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 时的致死中时间  $LT_{50}$  分别为  $2.30 \pm 0.13$  d 和  $4.11 \pm 0.16$  d, 比其它组合比例发酵液的致死中浓度和致死中时间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 综上所述, 组合菌株共发酵的最佳比例应为 1:1。

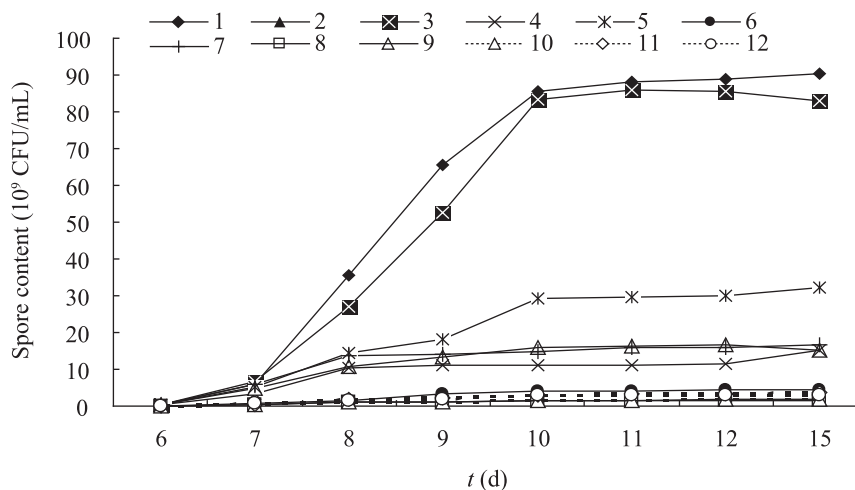


图 1 菌株 L-31 和 Q-55 (1:1) 在不同培养基中共发酵时产孢量变化曲线

Fig. 1 Sporification curve of combined strains with L-31 and Q-55 (1:1) co-fermented in different media

表 2 菌株 L-31 和 Q-55 (1:1) 不同培养基共发酵菌液及其单菌液的室内杀虫生物活性

Table 2 Indoor insecticidal and antibiotic activities of fermented broth of L-31, Q-55 (1:1) co-fermentation and strain fermentation

培养基 Culture medium	校正累计死亡率 Rectification accumulative mortality (%)					
	对温室白粉虱若虫的毒力 Insecticidal activities on <i>T. vaporariorum</i> larvae			对菜青虫的毒力 Insecticidal activities on <i>Pieris rapae</i> L.		
	组合菌株 Co-fermentation strains	菌株 L-31 Strain L-31	菌株 Q-55 Strain Q-55	组合菌株 Co-fermentation strains	菌株 L-31 Strain L-31	菌株 Q-55 Strain Q-55
1	92.60 a	91.59 a	68.27 b	88.33 a	70.00 c	87.27 a
2	79.50 b	51.67 f	75.07 b	81.33 b	70.49 c	69.65 c
3	90.83 a	92.81 a	76.32 b	90.50 a	70.00 c	88.42 a
4	80.31 b	65.74 ce	66.38 e	83.86 b	65.53 c	80.91 b
5	94.55 a	91.03 a	73.05 c	91.00 a	66.71 c	83.37 b
6	93.82 a	90.67 a	60.21 e	89.33 a	63.00 e	81.50 b
7	84.70 ab	87.84 a	76.99 c	87.12 a	67.59 c	85.42 a
8	77.32 b	45.79 fg	79.49 b	81.63 b	55.84 e	75.10 b
9	81.57 b	87.43 a	78.70 b	76.60 b	59.59 e	83.52 b
10	71.50 c	63.60 e	72.38 c	79.85 b	66.26 c	72.78 c
11	93.00 a	90.83 a	57.79 e	89.25 a	66.84 c	85.86 a
12	90.62 a	87.38 a	60.50 e	86.70 a	63.93 e	79.42 b

注: 同行和同列数据后面的不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ .

Note: Data followed by different letter in the same line and row are significantly different at 0.05 level.

表 3 菌株 L-31 和 Q-55 1:1 组合的不同培养基共发酵液及其单菌液对温室白粉虱若虫的致死中浓度( $LC_{50}$ )和致死中时间( $LT_{50}$ )

Table 3 The  $LC_{50}$  and  $LT_{50}$  from fermented broth of L-31, Q-55 (1:1) co-fermentation and strain fermentation against *T. vaporariorum* larvae

培养基 Culture medium	对温室白粉虱若虫的 $LT_{50}$ 和 $LC_{50}$ $LT_{50}$ (d) and $LC_{50}$ (CFU/mL) of fermented broth on <i>T. vaporariorum</i> larvae					
	组合菌株 Co-fermentation strains		菌株 L-31	Strain L-31	菌株 Q-55	Strain Q-55
	$LC_{50}$	$LT_{50}$	$LC_{50}$	$LT_{50}$	$LC_{50}$	$LT_{50}$
1	$2.73 \times 10^4 \pm 0.21a$	$2.48 \pm 0.19 a$	$4.07 \times 10^4 \pm 0.12 a$	$3.37 \pm 0.15 b$	$6.10 \times 10^7 \pm 0.14 d$	$6.87 \pm 0.16 e$
2	$2.93 \times 10^5 \pm 0.11b$	$4.83 \pm 0.13 c$	$1.88 \times 10^7 \pm 0.11 d$	$7.19 \pm 0.13 f$	$5.77 \times 10^6 \pm 0.16 c$	$5.92 \pm 0.14 d$
3	$2.90 \times 10^4 \pm 0.15 a$	$2.88 \pm 0.16 a$	$3.55 \times 10^4 \pm 0.11 a$	$3.16 \pm 0.18 b$	$5.74 \times 10^6 \pm 0.13 c$	$5.88 \pm 0.17 d$
4	$2.95 \times 10^5 \pm 0.19 b$	$4.73 \pm 0.14 c$	$5.22 \times 10^6 \pm 0.20 c$	$6.03 \pm 0.14 e$	$6.15 \times 10^7 \pm 0.12 d$	$7.02 \pm 0.11 e$
5	$2.09 \times 10^4 \pm 0.12 a$	$2.11 \pm 0.14 a$	$4.10 \times 10^4 \pm 0.14 a$	$3.50 \pm 0.19 b$	$6.68 \times 10^6 \pm 0.11 c$	$5.90 \pm 0.18 d$
6	$2.45 \times 10^4 \pm 0.11 a$	$2.39 \pm 0.13 a$	$4.62 \times 10^4 \pm 0.13 a$	$3.59 \pm 0.16 b$	$7.13 \times 10^7 \pm 0.18 d$	$7.57 \pm 0.18 f$
7	$2.50 \times 10^5 \pm 0.16 b$	$4.19 \pm 0.15 c$	$1.17 \times 10^5 \pm 0.11 b$	$4.60 \pm 0.15 c$	$5.70 \times 10^6 \pm 0.15 c$	$5.69 \pm 0.16 d$
8	$3.03 \times 10^6 \pm 0.13 c$	$5.08 \pm 0.17 d$	$3.73 \times 10^7 \pm 0.13 d$	$7.39 \pm 0.15 f$	$5.75 \times 10^6 \pm 0.23 c$	$5.54 \pm 0.17 d$
9	$2.85 \times 10^5 \pm 0.14 b$	$4.33 \pm 0.16 c$	$1.23 \times 10^5 \pm 0.13 b$	$4.88 \pm 0.11 c$	$5.36 \times 10^6 \pm 0.20 c$	$5.72 \pm 0.19 d$
10	$3.13 \times 10^6 \pm 0.18 c$	$5.67 \pm 0.16 d$	$5.43 \times 10^6 \pm 0.15 c$	$6.15 \pm 0.19 e$	$6.93 \times 10^6 \pm 0.16 c$	$5.95 \pm 0.15 e$
11	$2.15 \times 10^4 \pm 0.13 a$	$2.31 \pm 0.13 a$	$5.22 \times 10^4 \pm 0.15 a$	$3.81 \pm 0.15 b$	$7.38 \times 10^7 \pm 0.13 d$	$7.80 \pm 0.13 f$
12	$2.81 \times 10^4 \pm 0.15 a$	$2.73 \pm 0.11 a$	$1.09 \times 10^5 \pm 0.16 b$	$4.33 \pm 0.13 c$	$7.15 \times 10^7 \pm 0.16 d$	$7.49 \pm 0.18 f$

注:  $LC_{50}$ : 用药 9 d 后的致死中浓度;  $LT_{50}$ : 发酵液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 时的致死中时间. 下表同.

Note: The  $LC_{50}$  has been treated by fermentation brothes after 9 day; the  $LT_{50}$  has been treated by  $1 \times 10^8$  CFU/mL of fermentation brothes. The same as in the following table.

表 4 菌株 L-31 和 Q-55 (1:1)组合的不同培养基共发酵液及其单菌液对菜青虫幼虫的致死中浓度( $LC_{50}$ )和致死中时间( $LT_{50}$ )

Table 4 The  $LC_{50}$  and  $LT_{50}$  from fermented broth of L-31, Q-55 (1:1) co-fermentation and strain fermentation against *Pieris rapae* L.

培养基 Culture medium	对菜青虫低龄幼虫的 $LT_{50}$ 和 $LC_{50}$ $LT_{50}$ (d) and $LC_{50}$ (CFU/mL) of fermented broth on <i>Pieris rapae</i> L.					
	组合菌株 Co-fermentation strains		菌株 L-31	Strain L-31	菌株 Q-55	Strain Q-55
	$LC_{50}$	$LT_{50}$	$LC_{50}$	$LT_{50}$	$LC_{50}$	$LT_{50}$
1	$3.05 \times 10^6 \pm 0.25 b$	$5.70 \pm 0.23 b$	$6.33 \times 10^7 \pm 0.21 c$	$7.15 \pm 0.24 d$	$3.41 \times 10^6 \pm 0.31 b$	$5.88 \pm 0.30 b$
2	$5.56 \times 10^6 \pm 0.18 b$	$6.60 \pm 0.33 c$	$6.08 \times 10^7 \pm 0.25 c$	$7.10 \pm 0.25 d$	$8.82 \times 10^7 \pm 0.20 d$	$7.38 \pm 0.22 d$
3	$3.20 \times 10^5 \pm 0.35 a$	$4.53 \pm 0.31a$	$6.30 \times 10^7 \pm 0.20 c$	$7.18 \pm 0.26 d$	$2.97 \times 10^6 \pm 0.30 b$	$5.76 \pm 0.28 b$
4	$4.15 \times 10^6 \pm 0.22 b$	$6.20 \pm 0.37 c$	$5.54 \times 10^8 \pm 0.30 d$	$8.38 \pm 0.30 e$	$7.51 \times 10^6 \pm 0.33 b$	$6.21 \pm 0.35 c$
5	$3.17 \times 10^5 \pm 0.11 a$	$4.27 \pm 0.43 a$	$8.23 \times 10^7 \pm 0.35 c$	$7.57 \pm 0.34 d$	$6.32 \times 10^6 \pm 0.28 b$	$5.57 \pm 0.27 b$
6	$3.31 \times 10^5 \pm 0.30 a$	$4.81 \pm 0.18 a$	$8.85 \times 10^7 \pm 0.29 d$	$7.83 \pm 0.27 d$	$6.37 \times 10^6 \pm 0.21 b$	$5.89 \pm 0.23 c$
7	$3.73 \times 10^6 \pm 0.43 b$	$5.80 \pm 0.35 b$	$1.70 \times 10^8 \pm 0.33 d$	$7.89 \pm 0.29 d$	$4.50 \times 10^6 \pm 0.29 b$	$5.91 \pm 0.23 c$
8	$5.77 \times 10^6 \pm 0.35 b$	$6.83 \pm 0.19 c$	$8.93 \times 10^8 \pm 0.32 e$	$8.95 \pm 0.31 f$	$4.30 \times 10^7 \pm 0.17 c$	$6.90 \pm 0.19 c$
9	$2.01 \times 10^7 \pm 0.24 c$	$7.15 \pm 0.27 d$	$8.60 \times 10^8 \pm 0.26 d$	$8.84 \pm 0.28 e$	$6.41 \times 10^6 \pm 0.31 b$	$6.04 \pm 0.33 b$
10	$2.13 \times 10^7 \pm 0.22 c$	$7.79 \pm 0.23 d$	$7.62 \times 10^8 \pm 0.34 d$	$8.20 \pm 0.31 e$	$3.32 \times 10^7 \pm 0.19 c$	$6.93 \pm 0.15 d$
11	$3.09 \times 10^5 \pm 0.13 a$	$4.31 \pm 0.19 a$	$7.58 \times 10^8 \pm 0.31 d$	$8.16 \pm 0.33 e$	$4.47 \times 10^6 \pm 0.25 b$	$5.84 \pm 0.21 b$
12	$3.78 \times 10^6 \pm 0.41 b$	$5.52 \pm 0.40 b$	$7.80 \times 10^8 \pm 0.27 d$	$8.50 \pm 0.29 e$	$2.39 \times 10^7 \pm 0.27 c$	$6.58 \pm 0.28 c$

表 5 菌株 L-31 和 Q-55 以不同比例共发酵时其产孢量及其共发酵液的室内生物活性测定结果  
Table 5 Strain ratio-dependent effect of co-fermentation broth on sporification and insecticidal antibacterial bioactivities

菌株 L-31 和 Q-55 组合比例 Proportions of L-31 and Q-55	孢子浓度 Spore content $10^9$ CFU/mL	对温室白粉虱若虫的室内毒力 Insecticidal active of fermented broth on <i>T. vaporariorum</i> larvae.		
		校正累计死亡率 Rectification accumulative mortality (%)	致死中浓度 $LC_{50}$ (CFU/mL)	致死中时间 $LT_{50}$ (d)
		1:1	62.40 a	92.81 a
1:2	38.13 c	60.25 c	$6.55 \times 10^6 \pm 0.23$ c	$6.36 \pm 0.21$ d
2:1	26.07 d	85.42 a	$1.14 \times 10^5 \pm 0.21$ b	$4.48 \pm 0.19$ c
3:2	29.45 c	83.58 a	$1.06 \times 10^5 \pm 0.35$ a	$4.86 \pm 0.32$ c
2:3	39.39 b	66.73 c	$5.19 \times 10^6 \pm 0.19$ c	$6.23 \pm 0.19$ d
1:0	48.52 b	90.03 a	$5.30 \times 10^4 \pm 0.15$ a	$3.82 \pm 0.17$ b
0:1	53.74 ab	72.80 b	$6.82 \times 10^6 \pm 0.13$ c	$5.92 \pm 0.15$ d

表 6 菌株 L-31、Q-55 以不同比例共发酵时其产孢量及其共发酵液的室内毒力测定结果  
Table 6 Strain ratio-dependent effect of co-fermentation broth on sporification and insecticidal antibacterial bioactivities

菌株 L-31、Q-55 组合比例 Proportions of L-31 and Q-55	孢子浓度 Spore content ( $\times 10^9$ CFU/mL)	对菜青虫幼虫的室内毒力 Insecticidal activities of fermented broth on <i>Pieris rapae</i> L.		
		校正累计死亡率 Rectification accumulative mortality (%)	致死中浓度 $LC_{50}$ (CFU/mL)	致死中时间 $LT_{50}$ (d)
		1:1	62.4 a	90.54 a
1:2	38.13 c	73.52 b	$2.39 \times 10^6 \pm 0.16$ b	$6.02 \pm 0.19$ b
2:1	26.07 d	60.88 c	$2.82 \times 10^7 \pm 0.21$ c	$7.55 \pm 0.21$ c
3:2	29.45 c	56.30 d	$4.57 \times 10^7 \pm 0.28$ c	$7.75 \pm 0.26$ c
2:3	39.39 b	76.30 b	$5.29 \times 10^6 \pm 0.17$ b	$6.11 \pm 0.15$ c
1:0	48.52 b	65.38 b	$8.46 \times 10^7 \pm 0.25$ c	$7.70 \pm 0.27$ c
0:1	53.74 ab	84.50 a	$5.79 \times 10^6 \pm 0.30$ b	$5.23 \pm 0.28$ b

## 2.4 组合菌株最佳共发酵培养液同时防治温室白粉虱和菜青虫的小区试验结果

该试验用优选的最佳共培养方法发酵的组合菌株共发酵液进行了同时防治温室白粉虱和菜青虫的小区防效试验,结果显示其对靶标害虫表现出了较强的防治效果(表 7, 表 8),持效期可达 15 d 以上。对两种靶标害虫在防效高峰期(第 7 天)的校正虫口减退率均可达 80%以上,稀释 1 000 倍校正虫口减退率也在 70%左右,与各单一菌株发酵物相比均存在显著性差异( $P < 0.05$ ),达到了增效的目的。而且对于单一菌球孢白僵菌 Q-55 和蜡蚧轮枝菌 L-31 而言,也扩大了防治范

围,球孢白僵菌 Q-55 对刺吸式害虫温室白粉虱为非专性寄主,防效很弱,校正虫口减退率最高为 55.76%,而蜡蚧轮枝菌 L-31 对鳞翅目昆虫菜青虫为非专性寄主,校正虫口减退率最高为 51.06%,但是其共发酵液可同时对这两种害虫有效,防治效果也远远强于相应的单菌液,达到了扩谱的目的。

## 2.5 组合菌株最佳共发酵培养液的相关生物量积累

试验结果表明(表 9),蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 单独发酵及其最佳组合共发酵产生的生物量有显著性差异( $P < 0.05$ )。在相同的发



表 7 组合菌株最佳共发酵液对温室白粉虱的防治效果  
Table7 Control effect of the optimum fermentation broth on *Trialeurodes vaporariorum*

处理 Treatment	孢子浓度 Spore content (CFU/mL)	校正虫口减退率 Corrected decrease rate of <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (%)			
		第 3 天 The third day	第 5 天 The fifth day	第 7 天 The seventh day	第 15 天 The fifteenth day
		菌株 L-31 发酵液 L-31 fermentation broth	$5.33 \times 10^{10}$	58.63 d	76.20 b
	$5.33 \times 10^9$	60.14 d	74.13 b	77.42 b	61.29 d
	$5.33 \times 10^8$	54.37 d	66.37 c	70.95 c	58.90 d
	$5.33 \times 10^7$	44.38 f	58.21 d	66.25 c	50.72 e
菌株 Q-55 发酵液 Q-55 fermentation broth	$6.74 \times 10^{10}$	42.52 fg	45.92 f	55.76 e	39.35 g
	$6.74 \times 10^9$	40.76 g	44.50 f	53.60 e	36.50 g
	$6.74 \times 10^8$	38.71 g	45.09 f	51.51 e	32.89 g
	$6.74 \times 10^7$	35.83 g	38.55 g	42.38 f	30.09 h
组合菌株共发酵液 Co-fermentation broth	$5.15 \times 10^{10}$	54.52 e	76.50 b	85.03 a	70.10 c
	$5.15 \times 10^9$	64.71 c	79.10 a	83.52 a	68.70 c
	$5.15 \times 10^8$	64.10 c	72.86 b	80.50 a	63.28 d
	$5.15 \times 10^7$	44.71 f	67.89 c	76.28 b	56.30 d

表 8 组合菌株最佳共发酵液对菜青虫的防治效果  
Table8 Control effect of the optimum fermentation broth on *Pieris rapae L.*

处理 Treatment	孢子浓度 Spore content (CFU/mL)	校正虫口减退率 Corrected decrease rate of <i>Pieris rapae L.</i> (%)			
		第 3 天 The third day	第 5 天 The fifth day	第 7 天 The seventh day	第 15 天 The fifteenth day
		菌株 L-31 发酵液 L-31 fermentation broth	$5.33 \times 10^{10}$	29.47 h	39.42 f
	$5.33 \times 10^9$	26.29 h	36.50 g	49.30 e	35.83 g
	$5.33 \times 10^8$	23.94 h	34.72 g	44.56 f	32.51 h
	$5.33 \times 10^7$	21.62 i	26.98 h	35.56 g	28.72 h
菌株 Q-55 发酵液 Q-55 fermentation broth	$6.74 \times 10^{10}$	44.58 f	55.61 d	78.75 ab	57.36 d
	$6.74 \times 10^9$	45.03 f	55.70 d	73.82 b	55.27 d
	$6.74 \times 10^8$	44.92 f	50.17 e	68.49 b	52.43 e
	$6.74 \times 10^7$	38.32 g	46.58 e	63.85 c	48.25 e
组合菌株共发酵液 Co-fermentation broth	$5.15 \times 10^{10}$	48.35 e	71.33 b	82.53 a	73.80 b
	$5.15 \times 10^9$	45.80 f	69.58 b	80.50 a	70.00 b
	$5.15 \times 10^8$	41.68 f	63.55 c	76.75 b	62.81 c
	$5.15 \times 10^7$	38.95 g	58.23 d	69.28 b	52.50 e

酵条件下, 两单菌的孢子浓度和干物质的积累差异不显著( $P < 0.05$ ), 而它们 1:1 混合发酵时其孢子浓度达  $6.24 \times 10^{10}$  CFU/mL, 干物质质量可达 0.817 5 g, 与两单菌相比其产孢量和代谢物质的积累显著提高, 为其共发酵液杀虫生物活性显著

增强提供了物质依据。

### 3 讨论

微生物的生长受营养物质、pH、温度、湿度、氧、时间等条件因素的影响, 这些因素共同协调

表9 菌株 L-31 和 Q-55 最佳共发酵培养液的产孢量及干物质积累  
Table9 The sporification and the dry matter of the optimum fermentation broth

处理 Treatment	孢子浓度 Spore content (CFU/mL)	干物质 Dry matter (g)
组合菌株共发酵液 Co-fermentation broth	$6.24 \times 10^{10}$ a	0.817 5 a
菌株 L-31 发酵液 L-31 fermentation broth	$4.85 \times 10^{10}$ b	0.676 2 b
菌株 Q-55 发酵液 Q-55 fermentation broth	$5.17 \times 10^{10}$ b	0.684 3 b

作用才能使其正常生长繁殖,而且不同的菌种生长繁殖过程和所需的生长条件不尽相同<sup>[16-18]</sup>,所以不同菌株之间的共发酵培养条件与其单菌培养有一定差异,需要进行系统的实验筛选。本研究依据发酵液的产孢量和毒力变化对生防菌株蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 的共发酵培养条件进行了筛选,结果证明,菌株 L-31 和 Q-55 之间无明显的相互拮抗,当最初的菌数相当(1:1)时,在黄小米-酵母膏培养基中液体静置发酵 12 d 时,有效孢子含量和杀虫毒力都比在其它培养条件下有显著提高。这说明适中的发酵周期和黄小米、酵母膏、麦芽提取物等富含有机氮、碳的培养基有利于提高组合菌株的生长代谢和发酵液的毒力特性。

蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 是两株极具潜力的生防菌株,但由于单一菌株用于田间生物防治时,往往存在着防治效果不够稳定、杀虫谱窄等问题,这是因为生防菌在田间条件下,除了其菌株本身的生防特性外,还受不同地区生态环境条件包括温湿度、土壤结构、含水量以及微生物区系等因素的影响,不同的生防菌其适应环境的能力和对靶标生物致病过程产生的代谢产物不同,复合使用可以在一定程度上解决这个问题<sup>[19-22]</sup>。该研究的室内外毒力试验证明蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 的共发酵液不但有明显的增效作用,而且也扩大了各单菌的防治范围,小区试验中对鳞翅目昆虫害青虫和同翅目昆虫温室白粉虱同时显示了较好的防治效果,校正

防效均在 80%以上,与各单一菌株发酵液的防效之间存在显著性差异,在开发应用中更具有优势。

研究蜡蚧轮枝菌和球孢白僵菌的共发酵,对拓宽各单菌的杀虫谱、提高防效能力以及降低发酵成本和阻止延缓害虫抗药性等方面都具有重要意义,应用前景十分广阔。该研究得到的蜡蚧轮枝菌 L-31 和球孢白僵菌 Q-55 共发酵技术是实验室摇瓶发酵的结果,而且主要是从其毒力效果方面进行评价,虽然有一定参考价值,但也有一定缺陷,因为不同菌种间的共发酵,要确切地肯定两种菌共发酵后的各种变化,还需要从分子水平对其菌株生长和代谢产物进行定性定量分析研究,而且要实现工厂化生产应用也需要进一步做中试放大发酵试验,以验证各发酵参数的稳定性,为这一技术的产业化应用奠定坚实基础,相关方面的研究我们正在进行。

## 参 考 文 献

- [1] 周焱,王中康,喻子牛. 微生物农药研发与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 56-98.
- [2] 杨晓昱,于蓉蓉. 蜡蚧轮枝菌防治植物病虫害研究进展[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(5): 9-11.
- [3] Ashouri A, Arzanian N, Askary H, et al. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii*, to the green peach aphid, *Myzus persicae*[J]. Commum Agriculture Application Biology Science, 2004, 69(3): 205-209.
- [4] 李运帷,杨嘉寰. 利用昆虫病原真菌防治森林害

- 虫的展望. 中国虫生真菌研究与应用[M]. 北京: 学术期刊出版社, 1998: 32-53.
- [5] Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 1994, 4(1): 3-34.
- [6] Wang L, Huang J, You M, et al. Effects of toxins from two strains of *Verticillium lecanii* (Hyphomycetes) on bioattributes of a predatory ladybeetle, *Delphastus catalinae* (Col., Coccinellidae)[J]. *Journal of Applied Entomology*, 2005, 129(1): 32-38.
- [7] 孔琼, 袁盛勇, 郭亚力, 等. 球孢白僵菌 MZ041016 菌株及其与化学农药混配对禾谷缢管蚜的毒力测定[J]. *江苏农业科学*, 2008(4): 115-117, 169.
- [8] 张小霞, 尹新明, 梁振普, 等. 害虫生物防治技术基础与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 159-194.
- [9] 来燕学, 柳建定, 徐企尧, 等. 球孢白僵菌×蜡蚧轮枝孢菌(BV制剂)对松墨天牛幼虫寄生试验初报[J]. *江苏林业科技*, 2003, 30(4): 7-9.
- [10] 黄大昉. 生防微生物生物技术研究与发展[J]. *植物保护*, 2003, 29(5): 3-4.
- [11] 柳春燕, 郭敏, 林学政, 等. 拟康氏木霉和枯草芽孢杆菌对黄瓜枯萎病的协同防治作用[J]. *中国生物防治*, 2005, 21(3): 206-208.
- [12] 葛红莲, 郭坚华, 祁红英, 等. 复合菌剂 AR99 防治辣椒青枯病[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(2): 162-165.
- [13] De Boer M, Bom P, Kindt F, et al. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(5): 626-632.
- [14] 王丽红. 苏云金杆菌 NU-1, NU-2 的混合发酵及毒力保护的研究[D]. 西安: 西北大学硕士毕业论文, 2005.
- [15] 汤清波, 王琛柱. 一种测定鳞翅目幼虫取食选择的方法——叶碟法及其改进和注意事项[J]. *昆虫知识*, 2007, 44(6): 912-915.
- [16] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 137-148.
- [17] 李国霞, 周夏娣. 影响蜡蚧轮枝菌发酵产孢量和孢子活力的基本因素分析[J]. *昆虫天敌*, 2001, 23(2): 49-54.
- [18] Ibrahim YB, Low W. Potential of mass-production and field efficacy of isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against *Plutella xylostella*[J]. *International Journal of Pest Management*, 1993, 39(3): 288-292.
- [19] 中国农业百科全书总编辑委员会. 中国农业百科全书(植物病理学卷)[M]. 北京: 农业出版社, 1996: 34-40.
- [20] Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, et al. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression[J]. *Phytopathology*, 2002, 92(9): 976-985.
- [21] 谷祖敏, 李璐, 纪明山, 等. 6 种常用农药与球孢白僵菌和蜡蚧轮枝菌的相容性[J]. *农药*, 2006, 45(5): 325-326.
- [22] Kaaya GP, Munyinyi DM. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1995, 66(3): 237-241.