

美和學校財團法人美和科技大學

100 年度教師產學合作計畫

結案報告書

計畫名稱：黑殭菌之量產及其活性指標技術建立

計畫編號：100-FI-DBT-IAC-R-004

計畫期間：100 年 6 月 1 日起至 101 年 5 月 31 日止

計畫主持人：劉上賓

經費總額： 70,000 元

經費來源：聯發生物科技股份有限公司

摘要

黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 為一種蟲生真菌，可有效防治鞘翅目、鱗翅目等害蟲，將其開發成微生物殺蟲劑極具潛力，加上台灣目前無微生物殺蟲劑之商品，位處於屏東農業生技園區聯發生物科技股份有限公司則主要是生產微生物肥料與微生物農藥產品，有鑒於此，故極力開發黑殭菌之微生物農藥。但目前在黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)產品的製程技術等方面成效不彰，本計畫為協助與改進聯發生技公司之黑殭菌發酵生產過程所遇到的某些問題與瓶頸，期望藉由本計畫的協助。

A. 黑殭菌的菌種保存：

1. - 80°C 低溫冷凍及液態氮保存
2. 加礦物油常溫保存

B. 建立黑殭菌菌種生物活性指標技術，以作為商品之品管把關與測試:

1. 利用小菜蛾四齡 幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標，測試半致死率 (LD^{50%})，比較 LD^{50%} 之穩定性。

2. 利用平板發芽法，觀察黑殭菌孢子發芽率，並將孢子發芽率與半致死率 (LD^{50%})

C.完成改進黑殭菌固體發酵培養技術，期望可量產黑殭菌進而開發出微生物殺蟲劑商品

1. 黑殭菌量產之固體發酵設備
2. 黑殭菌微粒劑量產之固體發酵
3. 黑殭菌平面量產之固體發酵

進而大量生產黑殭菌，並使其生產的黑殭菌產品品質更加穩定，施用於田間時能提高其防治功效，以提供未來作為病蟲防治之生物性農藥。

關鍵詞：黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)、量產(mass production)、生物活性(biological activity)

(一) 前人研究

許多本土分離之黑殭菌 (*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*) 也可從自然被感染的可可椰子紅胸葉蟲體內分離出來。其中MA-1分離體對鞘翅目及鱗翅目昆蟲具有很強的致病性，但對氨基甲酸鹽類殺菌劑很敏感。利用紫外光及化學藥劑的誘變處理，可以得到抗免賴得之MA-126分離體，其對標的昆蟲的毒性程度與親本相同。穀類、大豆和一些農業副產品如米糠及稻桿浸出液可用為添加物，製成固態發酵培養基以大量生產孢子；酵母菌浸出液、葡萄糖液和Sabouraud液則用為生產菌絲之深層發酵培養基。許多用來製備以孢子和菌絲為主的真菌型殺蟲劑中之分散劑、保護劑和惰性載體，則分析其對孢子發芽及成活的影響。1986至1988年在台灣南部進行兩個以MA-1和MA-126孢子製劑之小規模田間噴施試驗，會顯著降低被感染之椰子樹上的可可椰子紅胸葉蟲的族群。目前利用這類生物防治推廣計畫，已防治了80,000株以上的椰子樹免於蟲害。小菜蛾(*Plutella xylostella*)為台灣田間及溫室栽培十字花科蔬菜的主要害蟲，但接種每毫升 10^7 孢子濃度的MA-126懸浮液後三日，有90%以上的小菜蛾幼蟲死亡。當真菌菌絲經由體表氣孔侵入蟲體後，孢子發芽管會直接貫穿蟲體。目前在台灣小菜蛾綜合防治推廣計畫下，有120種蔬菜的網室栽培是利用MA-126可濕性粉劑和液劑劑型，配合低劑量的化學藥劑來防治小菜蛾。黑殭菌MA-126菌株，殺蟲寄主範圍廣，對鞘翅目、鱗翅目殺蟲致死力強，對同翅目及蜚蠊目害蟲之防治亦十分有效，不但可作為農業田間害蟲防治，也可作為室內衛生昆蟲之防治如蜚蠊。黑殭菌也可用於草皮地下害蟲之防治，尤其對鞘翅目之幼蟲特別有效，可以作為高爾夫球場害蟲生物防治，不施用殺蟲劑減少對球場環境之汙染，更可避免球友被殘留之農藥危害。

(二) 研究背景及目的

以往利用微生物防治害蟲之研究主要以病毒及細菌為主，而蟲生真菌較少引人重視，儘管具防治潛力之蟲生真菌約有750種之多，卻直到1980年美國才有一種蟲生真菌正式登記註冊商品化。而事實上首先被發現寄生於昆蟲之蟲生微生物是白殭菌(*Beauveria bassiana*)，於19世紀末期，美國中西部就曾利用白殭菌來防治長椿象(*Blissus leucopterus*)。過去有人認為蟲生真菌防治害蟲其效果較不穩定，但晚近因昆蟲流行病學(epizootiology)之發展以及強致病性蟲生真菌之選擇利用，使得害蟲防治成功例子增加不少，如蘇俄有商品化之白殭菌—Boverin防治科羅拉多馬鈴薯甲蟲(*Leptinotarsa decemlineate*)；巴西利用黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)防治甘蔗、牧草之泡沫蟲；世界衛生組織(WHO)亦曾資助研究黑殭菌防治蚊子試驗成功；西薩摩亞(West Samoa)利用黑殭菌防治可可椰子犀角

金龜；在英國利用 *Verticillium lecanii* 防治溫室中蚜蟲；在澳洲已發展出利用 *Culicinomyces clavosporus* 防治蚊子；美國 *Hirsutella thompsoni* 於1981年5月正式通過註冊登記，為第一個在美國商品化之蟲生真菌。

我國地處亞熱帶，害蟲問題也特別嚴重，多年來我國農業生產上對化學殺蟲劑得過分依賴與不當使用，所造成環境污染、抗藥性、殘毒等問題，近年來常為社會大眾所詬病。為解決此一問題，病蟲害綜合管理(IPM)策略得發展應用為一必然趨勢，生物農藥(Biological Pesticide)則為其傳統化學

農藥的最佳代替。隨著環保意識的高漲以及全球性對整體地球生態永續性的重視，生物農藥之研究發展以為時勢之所趨。有鑑於化學農藥所造成的環境問題，各地對於微生物防治病蟲害之研究逐漸受到重視。微生物殺蟲劑具寄主專一性、對環境生態影響小且害蟲不易產生抗藥性，因此具害蟲致病力之病原菌種類、變種、品系等不斷地被發覺、研究及應用。蟲生真菌黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)對多種害蟲均能成功防治，為生物防治之利器。聯發生技公司為屏東農業科學園之進駐廠商，其主要開發生物性農藥及生物性肥料為主，目前聯發公司遇到利用黑殭菌作為發酵生產時，菌種保存方面等問題，在農業、製藥及發酵工業上，環保菌株、生產菌株、接種源及分析用菌種之保存，均是非常重要的事，尤其是可信賴的優良母株，對於微生物利用工業而言，是絕對必要的，故保存微生物的方法很早就受到相當的重視。不管是農業、醫學、工業、食品等所使用的微生物，不僅要鑑定完善，而且必須在接種過程中，維持菌株特性之安定，如以慣用之定期繼代接種方法，在保存和製造種源時，其遺傳上的安定性較難控制，所以必須有一種穩定的保存方法，才能確保優良菌種的遺傳特性，加上克服黑殭菌大量生產之難題也是著手進行的重點。因此本計畫目的為輔導及協助廠商對於黑殭菌種保存方面、量產發酵技術，以及建立黑殭菌的生物活性指標，以確保往後所發酵用之菌種為優良菌種，仍具有殺蟲作用之效果，以作為品管之把關的方式。並且透過發酵技術的建立，能夠成功的以固態發酵槽進行黑殭菌之大量生產，提供農民於害蟲防治上之應用。

(三) 研究材料與方法

一、確認黑殭菌產品之菌種保存

微生物培養要成功之先決條件為菌種之來源，因此菌種的保存為首要因素。有良好的菌種保存方式，才能確保菌種優良的特性被保存，使每次的接種源皆能有相同的良好效果，因此了解黑殭菌的菌種保存方法之後，給予適當的建議與應注意事項。

黑殭菌的菌種保存：

1. - 80°C 低溫冷凍及液態氮保存

黑殭菌菌種（原原種及原種）為移植於Sabouraud's dextrose agar (SDA) and potato dextrose agar (PDA) (Difco, Sparks, USA)之斜面試管，經一週28°C定溫培養，保存低溫冷凍以超低溫冷凍機定溫於-80°C。

同前處理黑殭菌菌種斜面試管，保存於液態氮。

2. 加礦物油常溫保存

同前處理黑殭菌菌種斜面試管，加入消毒過後之礦物油，且超過試管斜面，放置於28°C之室溫保存。

前述兩種技術三種狀態保存之菌種，定時取出移植於SDA之斜面試管，檢測

1. 菌絲生長速率：量測菌絲生長長度，以cm/day為單位(圖一)

2. 產孢率：以血球計數器觀察計算

3. 黑殭菌菌種生物活性及殺蟲效率：以黑殭菌菌種生物活性指標測試

二、輔導黑殭菌菌種生物活性指標的建立

隨著微生物繼代培養的結果，往往會導致有些特性會消失，尤其是微生物作為應用生物防治用時，特別更是要考量到生物活性方面，以免生產到最後之微生物農藥商品的防治效果降低或失效，所以每次進行發酵培養時，所接入的菌種之生物活性能力就顯的格外重要。因此建立一套標準的生物活性指標，作為每次接種源的種菌篩選與把關為首要解決之問題。

建立黑殭菌菌種生物活性指標技術，以作為商品之品管把關與測試:

1. 利用小菜蛾 (Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*) 四齡幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標，測試LD⁵⁰%，比較LD⁵⁰%之穩定性(圖六)。

2. 利用平板發芽法，觀察黑殭菌孢子發芽率。並比較孢子發芽率與LD⁵⁰%之關係。找出以觀察黑殭菌孢子發芽率較簡易操作之方法替代，建立黑殭菌菌種生物活性指標技術。

三、改進黑殭菌發酵培養技術

目前大都是利用米粒太空包的方式來發酵量產黑殭菌，但其大量生產所需之生產成本將大大提高許多，因此藉由改進在發酵培養黑殭菌所面臨之問題及生產流程，從中加以協助解決黑殭菌之發酵技術。

1. 黑殭菌量產之固體發酵設備

利用劉顯達發明專利之黑殭菌量產之固體發酵設備（2005.1-2022.6 中華民國發明專利）量產黑殭菌，其為原型機（proto-type）（詳如附圖二、圖三），米粒經蒸煮，消毒，接種黑殭菌孢子懸浮液，固體發酵設備為可程式調控，供氧通氣，溫度調節，濕度調節及旋轉攪拌，為重要參數，影響黑殭菌產孢量至鉅。

米粒經接種培養，於固體發酵設備發酵十天後，黑殭菌產孢量可達 10^{11} conidia/g dry wt.（詳如附圖四、圖五）。

2. 黑殭菌微粒劑量產之固體發酵

由於量產之固體發酵設備設計不易，造價甚高，所以探討其他可行量產方法也是重要策略。黑殭菌微粒劑量產之固體發酵，為利用米粒磨成粉狀，再利用造粒機做成微粒，經消毒接種，培養黑殭菌產孢。此種方法較簡易，黑殭菌孢子也易收集純化，將來大量生產所需之生產成本將大大降低許多。

本方法雖較簡易且生產成本降低許多，然仍有許多變因需再深入探討。供氧通氣，溫度調節，濕度調節及旋轉攪拌等重要參數，尤其是濕度調節及水分控制，經消毒接種之微粒，受濕度調節及水分控制不當，造成微粒結成團狀或崩解，影響黑殭菌產孢量。

3. 黑殭菌平面量產之固體發酵

利用消毒後固態培養基於大型平板佈滿，厚度約 0.5cm，接種黑殭菌孢子懸浮液，經十天定溫照光培養，開蓋風乾，刮取收穫上層黑殭菌孢子。

本方法較簡易且不易污染，雜菌發生率低。唯本方法之工法較為繁瑣，將來大量生產，自動化設計較困難。

(四) 研究結果

一、 確認黑殭菌產品之菌種保存

- 80°C 低溫冷凍及液態氮保存及加礦物油常溫保存，兩種技術三種狀態保存之菌種，檢測 1. 菌絲生長速率 2. 產孢率 3. 黑殭菌菌種生物活性及殺蟲效率，其結果為以低溫冷凍及液態氮保存效果為佳，放置九個月後之黑殭菌菌種（原原種及原種）可維持與原菌種之特性。

二、 輔導黑殭菌菌種生物活性指標的建立

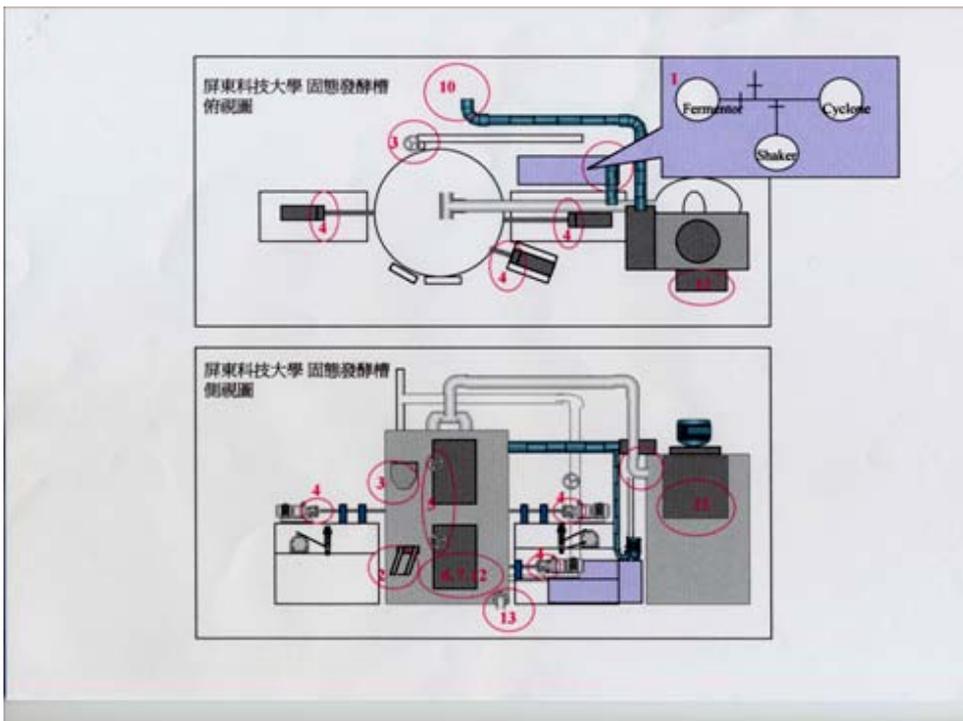
利用小菜蛾 (Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*) 四齡幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標，測試 LD⁵⁰%，結果發現此生物活性指標呈現與黑殭菌菌種活性正相關(圖七)。

三、 改進黑殭菌發酵培養技術

探討黑殭菌以固體發酵設備之量產，微粒劑量產之固體發酵及平面量產之固體發酵三種技術，結果發現以固體發酵設備之量產可有較高之產量。唯固體發酵設備現為原型，要發展成為商業化工業幾之設備仍要有供氧通氣，溫度調節，濕度調節及旋轉攪拌等重要參數配合設計。黑殭菌微粒劑量產之固體發酵不失為新方法，相當可行，濕度調節及水分控制為成功之要件，尚待進一步探討。



圖一 蟲生真菌黑殭菌(*Metarhizium anisopliae*)菌絲生長及產孢



圖二 黑殭菌量產之固體發酵設備之設計原理



圖三 黑殭菌量產之固體發酵設備之原型機



圖四 黑殭菌以固體發酵設備量產之米粒培養，外表長滿黑殭菌孢子



圖五 量產米粒培養之黑殭菌，以 hot floating collection 設備
收集孢子



圖六 利用小菜蛾 (Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*)
四齡幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標測試



圖七 小菜蛾 (Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*) 四齡幼蟲作為黑殭菌菌種生物活性指標測試，經接種黑殭菌孢子懸浮液，小菜蛾幼蟲死亡及長出菌絲孢子

(五) 研究成果

- 1、確認黑殭菌菌種之最適當保存方法，使其菌種能長時間維持高殺蟲效力。
- 2、協助建立黑殭菌菌種生物活性指標技術，以作為商品之品管把關與測試。
- 3、完成改進黑殭菌固體發酵培養技術，期望可量產黑殭菌進而開發出微生物殺蟲劑商品，進而減少使用化學性殺蟲劑對環境之影響及農藥留問題，如此一來非但具經濟效益，更為地球環保提供新資源。

(六) 參考文獻

- Allard, G. B., Chase, C. A., Heale, J.B., Isaac, J. E., and Prior, C. 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* Deuteromycotina:Hyphomycetes as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia variasaccharina* (Hemiptera: Cercopidae). J.Invertebr. Pathol. 55:41-46.
- Burges, H. D. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London, 949 pp.
- Caltagirone, L. E. 1981. Landmark examples in classical biological control. Ann. Rev. Entomol. 26:213-232.
- Daoust and Roberts. 1983. Studies on the prolonged storage of *Metarhizium anisopliae* conidia effect of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against mosquitoes. J. Invertebr. Pathol. 41 143-150.
- Daoust, R. A., Ward, M. G., and Roberts, D. W. 1982. Effect of formulation on virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 40:228- 236.
- Daoust, R. A., Ward, M. G., and Roberts, D. W. 1983. Effect of formulation on viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. J. Invertebr. Pathol. 41:151-160.
- Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Ann. Rev. Entomol. 23:409-442.
- Ferron, P., Robert, P. H., and Deotte, A. 1975. Susceptibility of *Oryctes rhinoceros* adults to *Metarhizium anisopliae* . J. Invertebr. Pathol. 25:313-319.
- Holdom, D.G., and Klashort, G. Van De 1986. Inexpensive culture media and methods for *Nomuraeu rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 48:246-248.
- Ignoffo, C. M. 1985. Manipulating enzootic-epizootic diseases of arthropods. P:243-262.

- Jimenez, J., and Gillespie, A. T. 1990. Use of the optical brightener Tinopal BOPT for the rapid determination of conidial viabilities in entomogenous deuteromycetes. *Mycol. Res.* 94:279-283.
- Kleespies, R. G. 1992 Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology.* 2: 127-135.
- Liu, S. D., Chang, Y. C., and Huang, Y. S. 1990. Application of entomopathogenic fungi as biological control of *Leucaena psyllid*, *Heteropsylla cubana* Crawford (Homoptera: Psyllidae) in Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 32:49-58.
- Liu, S. D., Lin, S. C., and Shiau, J. F. 1989. Microbial control of coconut leaf beetle *Brontispa longissima* with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 53:307-314.
- Martin, S. M. 1964. Conservation of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 18: 1-16.
- Pereira, R.M., and Roberts, D. W. 1990. Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 56:39-46.
- Prior, C. 1985. The infectivity of *Metarhizium anisopliae* to two insect pests of coconuts. *J. Invertebr. Pathol.* 45:187-194.
- Studdert, J. P., and Kaya, H. K. 1990. Effect of water potential, temperature, and claycoating on survival of *Beauveria bassiana* conidia and in a loam and peat soil. *J. Invertebr. Pathol.* 55:417-427.
- Tan, C. S. and J. A. Stalpers. 1991. Free-drying of fungal hyphae. *Mycologia* 83(5): 654-657.
- 劉顯達 2005 黑殭菌量產之固體發酵設備 2005.1-2022.6 中華民國發明專利 第 226369 號