

不同碳、氮营养对球孢白僵菌 HFW-05 的生长及胞外蛋白酶产量的影响

陆 晴^{1,2}, 曹伟平¹, 董建臻², 王金耀¹, 冯书亮¹, 王容燕¹, 杜立新¹

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001)

摘要:在基础培养基中添加 14 种碳源和 11 种氮源测定, 球孢白僵菌 HFW-05 菌株的萌发率、生长速率、产孢量及胞外蛋白酶活性。综合各项指标得出, HFW-05 菌株生长的最适碳源为蔗糖, 产孢量与产酶量最大, 分别为 16.13×10^7 孢子/ cm^2 和 $117.38 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$; 最适氮源为豆粕粉, 其产孢量和酶活远高于对照和无机盐类, 分别为 15.62×10^7 孢子/ cm^2 和 $74.01 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ 。除硝酸钾外, 无机盐类在供试浓度上均对孢子萌发和生长有抑制作用。在各种碳(氮)源培养基中添加 1% 蛋白胨(葡萄糖)后, 菌株的产孢量和产酶量均有所提高。结果表明, HFW-05 菌株的产孢量和胞外蛋白酶之间具有一定的相关性。

关键词:球孢白僵菌; 营养; 生长; 胞外蛋白酶

中图分类号: S476.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0142-05

Effects of Different Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Extracellular Protease Production of *Beauveria bassiana* HFW-05

LU Qing^{1,2}, CAO Wei-ping¹, DONG Jian-zhen², WANG Jin-yao¹,
FENG Shu-liang¹, WANG Rong-yan¹, DU Li-xin¹

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and

Forestry Sciences, IPM Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China;

2. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The spore germination rate, growth, sporulation and extracellular protease of *Beauveria bassiana* HFW-05 were investigated with 14 carbon sources and 11 nitrogen sources in media without any carbon and nitrogen nutrition. The results showed that the best carbon source was sucrose in which sporulation (16.13×10^7 conidia/ cm^2) and extracellular protease ($117.38 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$) reached the highest. The bean cake was the best nitrogen nutrition in which the quantity of conidium (15.62×10^7 conidia/ cm^2) and extracellular protease ($74.01 \mu\text{g}/(\text{min} \cdot \text{mL})$) were much higher than that of the contrast and inorganic salts. All the inorganic salts except nitre restrained spore germination and growth in experiment conditions. The sporulation and extracellular protease were both enhanced by adding 1% peptone into carbon media and 1% glucose into nitrogen media. There were relationships among sporulation and extracellular protease of *B. bassiana*.

Key words: *Beauveria bassiana*; Nutrition; Growth; Extracellular protease

球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana* Vuillemin) 是一种广谱性的昆虫病原真菌, 在防治农林害虫上具有显著的应用潜力。目前国内外已开发出多种制剂类型, 进一步增强了菌剂的使用寿命及杀虫效果^[1]。

研究表明, 白僵菌可利用多种营养来满足自身生长, 其中包含多种碳源、氮源及微量元素。碳源是维持白僵菌生长的营养成分及能源物质, 氮源构成白僵菌细胞的基本成分, 微量元素也可为其生长提供营

收稿日期: 2008-05-18

基金项目: 国家农业部“948”项目资助(2006C54(B))

作者简介: 陆 晴(1982-), 女, 河北秦皇岛人, 硕士, 主要从事杀虫微生物研究工作。

通讯作者: 冯书亮(1957-), 男, 河北威县人, 研究员, 主要从事生物防治及杀虫微生物研究工作。

养。李农昌等^[2]指出,不同的营养因素影响着白僵菌的生长及产孢水平,适宜的营养会促进菌株生长,增强杀虫活性。在杀虫过程中,真菌中的各种酶类特别是胞外蛋白酶发挥着重大的作用,冯明光^[3]测定发现球孢白僵菌胞外蛋白酶活性(PU)是重要的毒力因子,但有关营养成分影响白僵菌产酶的国内外报道较少。本试验采用球孢白僵菌 HFW-05 菌株,测定不同营养对菌株生长的影响,同时分析营养成分与胞外蛋白酶的关系,为 HFW-05 菌株的进一步发酵培养提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

对蔬菜主要害虫粉虱、小菜蛾高杀虫活性的球孢白僵菌 HFW-05^[4],由杀虫微生物实验室提供。

1.2 供试培养基

基础培养基:氯化钾 0.5 g、七水硫酸镁 0.5 g、磷酸二氢钾 0.5 g、磷酸氢二钠 0.65 g、蒸馏水 1 000 mL,自然 pH 值。固体培养基再加入 2 %琼脂。

不同碳源培养基:选用吐温-20、吐温-80、CMC(羧甲基纤维素钠盐)、甘油、甘露醇、碳酸钾、碳酸钠、玉米淀粉、土豆淀粉、红薯淀粉、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖和乳糖等 14 种碳源,以 1 % (m/V) 比例加入到基础培养基中。

不同氮源培养基:选用尿素、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾、蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、花生饼粉、豆粕粉、棉籽粉和鱼粉等 11 种氮源,以 1 % (m/V) 比例加入到基础培养基中。

氮碳组合培养基:在不同碳(氮)源培养基中另添加 1 % (m/V) 蛋白胨(葡萄糖)。

1.3 萌发率及产孢量测定

在固体培养基上接种浓度为 1×10^7 孢子/mL 的孢悬液 200 μ L,用灭菌玻璃涂棒涂布均匀,(26 ± 1) 培养,各处理培养 24 h 后进行镜检,统计孢子萌发率,每次镜检 5 个视野,不少于 500 个孢子,每处理重复 5 次。待孢子成熟后,使用直径 8 mm 打孔器在菌苔上均匀打孔,放入装有玻璃珠的 10 mL 无菌水(含 0.5 % OP 乳化剂)三角瓶中,170 r/min 振荡 15 min,使用血球计数板于相差显微镜(40 \times)下计数,计算平均产孢量,每处理 5 次重复。

1.4 生长速率测定

取浓度为 1×10^7 孢子/mL 的孢悬液 5 μ L 接种于固体培养基中央,(26 ± 1) 下培养 10 d,每隔 2 d 用游标卡尺十字交叉测量菌落生长直径,记录生长速率,每处理设 5 次重复。

1.5 酶液制备与胞外蛋白酶测定

HFW-05 菌株胞外蛋白酶通过摇床振荡培养获得。250 mL 三角瓶装入液体培养基 100 mL,接种 1 mL 孢悬液(1×10^8 孢子/mL),(25 ± 1) 下振荡(170 r/min)培养 5 d,4 离心,取上清液于 -20 保存。采用福林酚法测定胞外蛋白酶^[5]:以酪蛋白为底物,用 Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH 8.5)配成 1 % (m/V) 的酪蛋白溶液,取此溶液 1 mL,并加待测酶液 1 mL,37 反应 30 min,用 0.4 mol/L 三氯乙酸 2 mL 终止反应,反应液经过离心(10 000 r/min)取上清液 1 mL,用 Folin 试剂进行检测。以每分钟催化分解蛋白质生成 1 μ g 酪氨酸的酶量为一个酶活性单位(μ g/(min mL))。测定并记录不同碳氮源对该菌株胞外蛋白酶的影响,每处理 5 次重复。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对 HFW-05 菌株生长及胞外蛋白酶的影响

HFW-05 菌株在添加各种碳源的基础培养基中均可生长,但对营养的利用水平相差较大(表 1)。助剂吐温-20、吐温-80 及甘油可在很大程度上促进白僵菌孢子的萌发,在甘油(丙三醇)培养基中萌发率最高,可达 97.8 %,其次为吐温-80,两者之间差异不显著;在麦芽糖的培养基中萌发率最低,仅为 0.3 %。白僵菌在添加甘露醇(六碳糖醇)的固体培养基上的生长速率最快,显著高于其他碳源;以添加碳酸钠的生长速率最低,仅为 0.3 mm/d。对于产孢量而言,HFW-05 菌株对蔗糖的利用率最佳,产孢量为 16.13×10^7 孢子/ cm^2 ;以添加碳酸钾的产孢量最低,仅为 1.63×10^7 孢子/ cm^2 。结果显示 14 种碳源的产孢量均显著高于无碳对照。

产酶结果表明(表 1),添加蔗糖后的胞外蛋白酶活性最大,为 117.38 μ g/(min mL),其次是葡萄糖,且两者差异显著,以添加碳酸钾的酶活最低,仅为 0.29 μ g/(min mL),其数值远低于对照。

综合四项测定指标可知,营养丰富的培养基并不能较好的促进孢子萌发,添加适量助剂(如吐温-80)对孢子萌发有促进作用;菌株对多糖淀粉类的利用明显劣于单糖和双糖;产孢量增大的同时,HFW-05 菌株的酶活性也具有增高趋势,这表明菌株产孢量与产酶量有一定的相关性。

2.2 不同碳源对 HFW-05 菌株产孢量与产酶量的相关性分析

除碳酸钾和碳酸钠外,各类碳源基础上添加 1 % 蛋白胨后,会在一定程度上促进 HFW-05 菌株生

长,产孢量可提高 3~8 倍,但酶活性变化趋势不明显。结果(图 1)表明,HFW-05 菌株在添加蔗糖的培养基上产孢量最大,酶活最高,说明蔗糖是 HFW-05 菌株的最适碳源;无机盐类的产孢几乎为零,酶活性

均低于对照。由此可见,无机盐类在一定程度上抑制菌株生长。吐温-80 等助剂及甘油的使用可提高菌株的生长,且效果与营养含量高的糖类物质相当。

表 1 碳源对 HFW-05 菌株生长指标及胞外蛋白酶影响的测定结果

Tab.1 Effects of different carbon sources on the growth extracellular protease activity of HFW-05				
碳源 Carbon sources	萌发率/ % Rate of germination	生长速率/ (mm/ d) Rate of growth	产孢量/ (×10 ⁷ / cm ²) Sporulation	酶活性/ (μg/ (min mL)) Extracellular protease
对照 CK	67.4 ±4.7b	1.5 ±0.1def	0.38 ±0.05h	4.05 ±0.02fg
吐温 20 Tween-20	83.5 ±6.9ab	1.5 ±0.01ef	7.04 ±0.55fg	76.04 ±0.31b
吐温 80 Tween-80	97.2 ±2.8a	1.8 ±0.1bc	7.77 ±0.44ef	54.35 ±0.27cd
羧甲基纤维素钠盐 CMFC Na	72.9 ±7.0b	1.4 ±0.1f	4.47 ±0.31g	104.95 ±1.12b
甘油 Glycerol	97.8 ±2.2a	1.5 ±0.2def	9.63 ±0.22cd	12.72 ±0.11fg
甘露醇 Mannite	90.8 ±2.5ab	2.4 ±0.0a	5.39 ±0.46fg	9.54 ±0.02fg
碳酸钾 K ₂ CO ₃	1.3 ±1.3d	0.7 ±0.0g	1.63 ±0.10h	0.29 ±0.01g
碳酸钠 Na ₂ CO ₃	3.5 ±2.1d	0.3 ±0.0h	6.07 ±0.30efg	16.77 ±0.10f
玉米淀粉 Corn starch	40.0 ±4.6c	1.5 ±0.0def	6.81 ±0.95ef	52.04 ±0.04d
土豆淀粉 Potato starch	42.7 ±5.5c	1.4 ±0.1f	7.98 ±0.35ef	8.38 ±0.06fg
红薯淀粉 Sweet potato starch	46.3 ±11.6c	1.5 ±0.0def	6.79 ±0.12ef	54.64 ±0.31d
麦芽糖 Maltose	0.3 ±0.3d	2.0 ±0.1b	10.09 ±0.10c	65.34 ±0.72c
葡萄糖 Glucose	78.7 ±3.1b	1.8 ±0.1bc	12.51 ±0.07b	108.99 ±0.80b
蔗糖 Sucrose	50.7 ±5.8c	1.9 ±0.1bc	16.13 ±0.19a	117.38 ±0.17a
乳糖 Lactose	66.0 ±6.1b	1.7 ±0.2cde	4.93 ±0.22fg	32.38 ±5.95e

注:表中数据经 Duncan 氏新复极差检验,同列数据后不同字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。
Note:Table entries (Mean ±SE) followed by different lower-case letters in each column were different at the significance level of p < 0.05 base on Duncan's new multiple rang test ,the same as Tab.2.

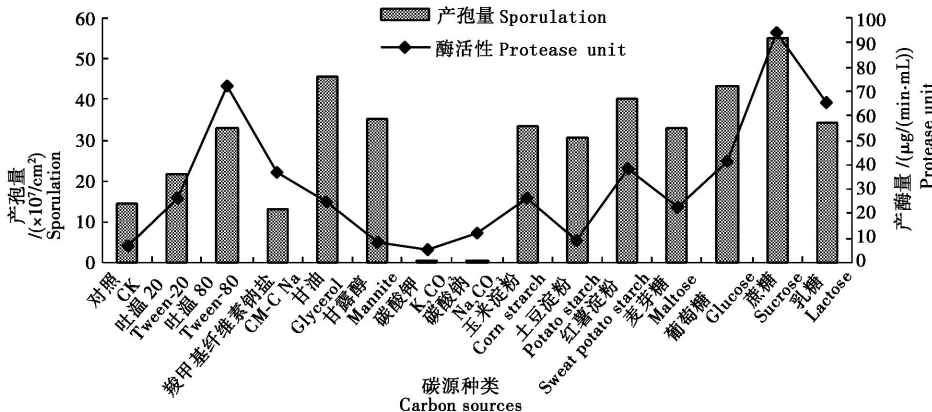


图 1 不同碳源培养基中加入 1 %氮源后菌株的产孢量及产酶量

Fig.1 Effects of different carbon sources on the sporulation and extracellular protease activity of HFW-05 with 1 % peptone

2.3 不同氮源对 HFW-05 菌株生长及胞外蛋白酶的影响

在基础培养基中添加的氮源种类不同,菌株的生长也会有所差别(表 2)。有机氮源(蛋白胨、牛肉膏、酵母浸膏、花生饼、豆粕粉、棉籽粉及鱼粉)对菌株生长有利,而无机氮源(尿素、硫酸铵及硝酸铵)在一定程度上抑制孢子萌发和生长。

24 h 镜检孢子萌发情况,添加无机氮源尿素的培养基上基本无孢子萌发,硫酸铵及硝酸铵的萌发率也仅在 10 %左右,且大多刚萌发出芽管,生长速率缓慢,均小于 1 mm/ d;而有机氮源中(如酵母浸膏)的萌发率几乎可达 100 %,且孢子已长出长菌丝。

菌株在有机氮源中的生长速率明显高于无机氮源,其中在添加酵母浸膏的培养基中生长速率最高,为 3 mm/ d。菌株在添加豆粕粉的培养基上产孢量最大,为 15.62 ×10⁷ 孢子/ cm²,其次是鱼粉及棉籽粉。就产酶量而言,有机氮源同样要高于无机氮源。以添加酵母浸膏和豆粕粉的产酶量最大,分别为 75.17,74.01 μg/ (min mL),二者之间无显著差异。无机氮源中的尿素和硫酸铵产酶量均高于对照,但差异不显著,而硝酸钾的酶活性明显高于对照,且差异显著。

结果表明,无机氮源在一定程度上抑制菌株生长,而无机盐硝酸钾在一定程度上可促进孢子萌发及生长,各项生长指标在无机氮源中最高,其中生长

速率是硝酸铵的 9 倍 ,产孢量是尿素的 494 倍 ,表明 HFW-05 菌株可较好的利用硝酸钾。

表 2 不同氮源对 HFW-05 菌株生长及胞外蛋白酶影响的测定结果

Tab.2 Effects of different nitrogen sources on the growth and extracellular protease activity of HFW-05				
氮源 Nitrogen sources	萌发率/ % Rate of germination	生长速率/ (mm/ d) Rate of growth	产孢量/ (×10 ⁷ / cm ²) Sporulation	酶活性/ (μg/ (min mL)) Extracellular protease
对照 CK	67.4 ±4.7c	0.8 ±0.1f	0.32 ±0.05d	6.94 ±0.50ef
尿素 Carbamide	3.0 ±0.1e	0.2 ±0.0h	0.01 ±0.00d	14.46 ±0.83de
硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄	7.9 ±0.2e	0.5 ±0.0g	0.08 ±0.02d	5.23 ±0.17f
硝酸铵 NH ₄ NO ₃	14.6 ±0.8d	0.1 ±0.0h	0.71 ±0.09d	13.30 ±0.11def
硝酸钾 KNO ₃	82.5 ±2.5b	0.9 ±0.2f	4.45 ±0.67c	19.08 ±1.56d
蛋白胨 Peptone	99.3 ±0.6a	2.2 ±0.1d	6.16 ±1.87c	46.26 ±1.68c
牛肉膏 Beef extract	97.0 ±1.1a	2.9 ±0.0ab	7.65 ±0.89c	67.36 ±0.41b
酵母浸膏 Yeast extract	100.0 ±0.3a	3.0 ±0.0a	11.85 ±1.60b	75.17 ±4.20a
花生饼 Peanut cake	99.5 ±1.6a	2.5 ±0.2cd	7.44 ±1.05c	42.84 ±1.55c
豆粕粉 Soybean powder	99.8 ±0.4a	1.4 ±0.0e	15.62 ±2.27a	74.01 ±0.59a
棉籽粉 Cottonseed meal	99.9 ±0.3a	2.5 ±0.10c	13.05 ±1.23ab	47.12 ±1.43c
鱼粉 Fish meal	100.0 ±0.2a	2.7 ±0.1bc	14.97 ±1.97ab	20.82 ±1.45d

2.4 不同氮源对 HFW-05 菌株产孢量与产酶量的相关性分析

在不同氮源的基础上加入 1 % 葡萄糖后 ,对 HFW-05 菌株的影响与单独添加氮源趋势一致 ,有机氮源的产孢量及胞外蛋白酶均显著高于无机氮源 (图 2)。加入碳源后 ,不同氮源培养菌株的产孢量都提高了 5 ~ 7 倍 ,其中牛肉膏培养基提高近 10 倍 ;有机氮源 (牛肉膏、花生饼、棉籽粉及鱼粉) 的产酶量

均有提高。以添加豆粕粉及鱼粉培养基的产孢和产酶量最高 ,其次为棉籽粉和牛肉膏 ;在添加尿素和硫酸铵的培养基中加入 1 % 葡萄糖后 ,对菌株产酶无明显促进作用。结果显示 ,在氮源培养基中添加适量碳源更利于提升菌株生长及产酶水平 ,可能由于有机氮源中富含多种氨基酸及蛋白质 ,能为菌株生长提供更多的营养来源。

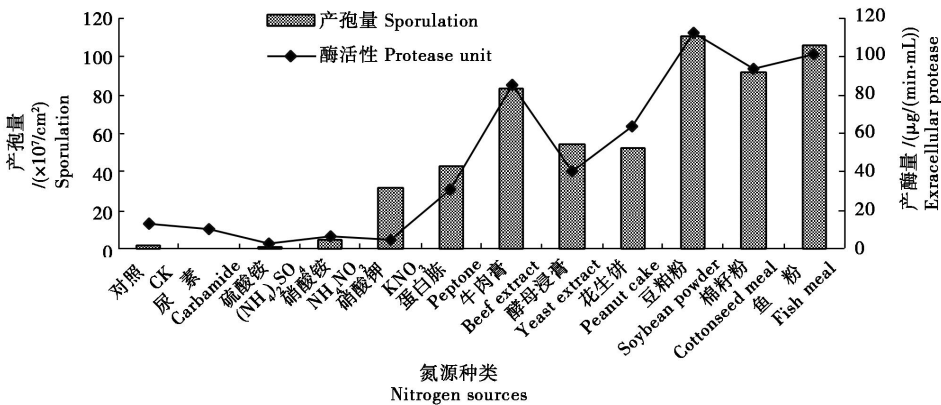


图 2 不同氮源培养基中加入 1 %碳源后菌株的产孢量及产酶量

Fig.2 Effects of different nitrogen sources on the sporulation and extracellular protease activity of HFW-05 with 1 % glucose

3 结论与讨论

营养条件是影响白僵菌菌株生长的重要因素之一 ,营养贫乏或缺失会导致菌株性状的退化 ,造成菌落局变等现象 ,进而影响真菌的活力^[6,7]。

本试验通过测定萌发率、生长量、产孢量及产酶量等多项生长指标 ,综合考察 HFW-05 菌株的生长水平 ,反映了营养条件与菌株生长之间的关系。在供试碳源培养基中 ,HFW-05 菌株虽产孢正常 ,但菌苔瘠薄 ,正面观呈灰白色、半透明 ,菌饼变异大。结果表明 ,菌株对蔗糖的利用最好 ,产孢量及酶活力最大 ,可能由于双糖会先消化成单糖后被菌株吸收与

利用 ,作为双糖的蔗糖能为菌株提供更多能量 ;供试淀粉类为多糖 ,消化为单糖的时间较长 ,从而导致菌株对此吸收变慢。在生长初期 ,助剂吐温-80、吐温-20、甘油的适量添加对孢子的萌发有较大促进作用 ,萌发率显著高于其他无机或有机碳源 ,菌丝生长加快 ,有利于菌株产孢。宋彰^[8]认为培养液中添加适量吐温-80 可使培养液的粘稠度适中 ,形成发育良好的细小菌丝团 ,令产孢结构发育充分 ,加大白僵菌的产孢量。本研究进一步证实了此类助剂在真菌培养中的作用。

Peczynska-Czoch 等^[9]指出营养丰富的氮源可提高白僵菌的萌发及产孢水平 ,与本试验结果相符。

HFW-05 菌株在各氮源培养基上生长繁密,正面观为乳白色或乳黄色,色泽纯正;在有机氮源培养基中的各项生长指标均明显高于无机氮源。在供试浓度下,菌株可较好的利用豆粕粉、酵母浸膏及鱼粉等有机氮源;无机氮源中硝酸钾对孢子萌发及生长有一定促进作用,与张丽靖^[10]的研究结果相吻合;尿素和硫酸铵等氮源则抑制白僵菌生长及产孢。结果表明,HFW-05 菌株的生长速率与产孢量之间存在一定相关性,除铵盐及豆粕粉外,菌株在氮源培养基上生长速率增加,其产孢量均随之提高;同时菌株产酶量也会随产孢量的提高而增大,两者之间存在一定相关性。

试验数据显示,单项菌株生长指标并不能判断选取营养的优劣,只有综合分析对菌株生长、产孢及产酶的影响,才能为进一步发酵生产提供参考。有研究表明^[2],在植物性氮源营养中以麦麸的产孢量及毒力较好,同时动物性氮源的产孢量及毒力水平又稍高于植物性氮源,如白僵菌在蛋白胨和牛肉膏培养基上生长最好;本研究同样显示出添加含有蛋白质较多的花生饼粉、棉籽饼粉等各种复合营养物质可提高菌株生长活性。笔者认为,添加来源广泛且价格低廉的豆粕粉作为发酵料用于白僵菌的培养,可促进菌丝生长,有效提高菌株产孢量,建议应用于此菌株的发酵。不同碳氮组合及比例如何影响白僵菌 HFW-05 生长有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Bidochka MJ, Kamp A M, De Croos J N A. Insect pathogenic fungi: from genes to populations[M]// Kronstad J W. Fungal Pathology. The Netherlands: Kluwer Academic Press, 2000: 171 - 193.
- [2] 李农昌,樊美珍,李春如. 白僵菌有关培养条件及其与毒力关系的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 254 - 259.
- [3] 冯明光. 胞外蛋白酶和酯酶活性作为球孢白僵菌毒力指标的可靠性分析[J]. 微生物学报, 1998, 38(6): 461 - 467.
- [4] 曹伟平,王金耀,冯书亮. 球孢白僵菌 HFW-05 的诱变筛选及其对烟粉虱若虫的毒力测定[J]. 中国生物防治, 2007, 23(2): 133 - 137.
- [5] Lowry O H, Rosbrough NJ, Farr A L, et al. Protein measurement with folin phenol reagent[J]. Biol Chem, 1955, 193: 265.
- [6] 唐晓庆,樊美珍,李增智. 球孢白僵菌继代培养中菌落局变现象及环境影响因素的研究[J]. 真菌学报, 1996, 15(3): 188 - 196.
- [7] James R R. Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hymenoptera[J]. Invertebr Pathol, 2001, 77(2): 99 - 107.
- [8] 宋 漳. 白僵菌分生孢子深层培养及其对马尾松毛虫的毒力[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 93 - 97.
- [9] Peczynska-Czoch W, Urbanczyk M J. Production of beauvericin by *Beauveria bassiana* on L-methionine enriched medium[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1991, 39(1 - 2): 181 - 184.
- [10] 张丽靖. 球孢白僵菌孢子粉生产、制剂和贮存技术的改进及其淀粉酶特性测定[D]. 杭州: 浙江大学, 2003.