

# 几丁质诱导球孢白僵菌产酶及杀虫作用研究

林志伟,曹强伟,黄志岳,孙 巍

(黑龙江八一农垦大学 农学院,黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**利用胶态几丁质诱导培养基液体发酵球孢白僵菌 Bz4 菌株,通过比色法测定发酵液中寡糖、几丁质酶的变化情况,并应用浸渍法测定其产生的孢子悬液对粘虫的致死能力,明确白僵菌 Bz4 菌株的应用价值。结果表明:球孢白僵菌 Bz4 菌株在供试的不同胶态几丁质浓度液体培养基中,均以培养 5 d 时产生的氨基寡糖量最高,而培养 6 d 时几丁质酶活力最大。利用几丁质培养基中制得的孢子悬液对粘虫幼虫具有较强的致死作用,致死中浓度约为  $1.04\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其致死中时间为 6~7 d。

**关键词:**球孢白僵菌;几丁质酶;致死中浓度

**中图分类号:**Q939.96 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)01-0064-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.01.0064

白僵菌(*Beauveria bassiana*)是一种寄主广泛的虫生真菌<sup>[1]</sup>,白僵菌孢子在昆虫体表萌发、侵入虫体,最终导致昆虫死亡。这一过程中存在机械压力与酶的协同作用中,菌体会合成许多种胞外水解酶<sup>[2-4]</sup>,其中包括蛋白酶、几丁质酶。白僵菌胞外酶不但与孢子侵染能力密切相关<sup>[5-6]</sup>,而且经诱导培养后的含上述诱导酶的白僵菌发酵液对孢子毒力有明显的增效作用<sup>[7]</sup>。几丁质在酶作用下降解产生几丁寡糖、氨基葡萄糖等,这些产物在农业生产中有广泛的应用<sup>[8-9]</sup>,有关球孢白僵菌胞外几丁质酶与菌株毒力的研究已有许多相关报道,并开展了几丁质酶基因的分子水平研究<sup>[10-11]</sup>,利用白僵菌发酵降解几丁质的相关研究较少,应用液体发酵的方法,测定几丁质诱导条件下,培养体系中物质变化情况,为探索白僵菌利用新途径奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试菌种 球孢白僵菌 Bz4 菌株,分离自大庆市的亚洲玉米螟染病幼虫虫体。

1.1.2 供试培养基 菌种活化培养基为 PDA 培养基;液体发酵培养基为改良察氏培养基:NaNO<sub>3</sub> 3 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO<sub>4</sub> 0.01 g、胶态几丁质 5 mL、葡萄糖 5 g、蒸馏水 1 000 mL;其中胶态几丁质分别加

入 5、10、20 g,制成不同物浓度培养液。

### 1.2 方 法

1.2.1 白僵菌孢子悬液制备 PDA 培养基活化保存的白僵菌菌种,温箱中培养至产生分生孢子。用无菌水冲洗获得孢子悬浮液,镜检,调整孢子浓度至  $10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 白僵菌降解几丁质测定 取 250 mL 三角瓶装入 180 mL 液体察氏几丁质培养基,每瓶加入 0.5 mL 白僵菌孢子悬液,28℃ 140 r $\cdot\text{min}^{-1}$  下振荡培养;每个底物浓度处理接种 10 瓶。48 h 后取 2.5 mL 培养液,5 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$  离心,取上清液,备用。将 1 mL 上述培养液稀释至 5 mL,利用乙酰丙酮法测定壳寡糖含量。

1.2.3 白僵菌产生几丁质酶活测定 将 1 mL 上述培养液加入试管中,利用还原糖测定方法,测定几丁质酶活力。几丁质酶活的大小利用几丁质酶作用于几丁质胶体生成的还原糖含量来测定,还原糖测定采用 DNS(3,5-二硝基水杨酸)法<sup>[10]</sup>。

1.2.4 孢子悬液杀虫测定 将 1.2.2 中振荡培养三角瓶静止培养放置 5 d,培养液表面产生大量孢子后,过滤,得到孢子悬液。镜检孢子浓度,达到  $10^7$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,做为原液,梯度稀释,配制  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  孢子悬液,利用浸渍法,测试对 3 龄粘虫幼虫的毒力。每处理重复 3 次,每次处理 30 头幼虫。第 3 天开始观察记录幼虫死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 白僵菌培养中氨基寡糖含量变化

由表 1 可知,在含有胶态几丁质培养液中接种球孢白僵菌孢子悬液,28℃ 下,振荡培养至第 3 天后,每天取培养液样品测定其中氨基寡糖含量,

收稿日期:2015-11-16  
基金项目:大学生创新创业资助项目;黑龙江农垦总局科技攻关资助项目  
第一作者简介:林志伟(1970-),男,黑龙江省勃利县人,硕士,副教授,从事有害生物综合治理研究与教学工作。E-mail:408160466@qq.com。

测量结果表明,在培养至第 5 天时,培养液中的氨基寡糖浓度为  $47.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,到高峰,此后呈下降趋势。对比不同胶态几丁质浓度底物条件下,各时间所测得产生寡糖浓度情况,整体上差异不大。氨基寡糖浓度的高峰期也均出现在第 5 天(见表 1)。由此可见,在所测定的加入  $5\sim 10\text{ g}$  胶态几丁质条件下,对降解物的产生没有影响。

2.2 培养液中几丁质酶活变化

几丁质酶是一类诱导水解酶,在含有几丁质的培养基中才能产生,对植物真菌病害也有一定

防治效果<sup>[12]</sup>。利用发酵液降解胶态几丁质产生还原糖的量来代表较几丁质酶活力,从测定的反应体系中还原糖浓度增加的结果分析(见表 2),所用球孢白僵菌菌株在含几丁质的液体培养基中,振荡培养至第 6 天,产生的几丁质酶活力最高,在第 5~6 天,能维持较高酶活力水平。第 6 天后,酶活力下降显著,培养至第 10 天时,降至较低水平;比较几丁质酶活高峰出现的时间表明,底物浓度对产酶时间没有影响,且在高峰期酶活力差异也不明显。

表 1 不同胶态几丁质浓度发酵液中氨基寡糖含量

胶态几丁质量/g		氨基寡糖含量/(mg·mL <sup>-1</sup> ) Oligosaccharide content						
Colloidal chitinous substance		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
5		3.59	9.402	47.57	26.05	20.67	18.69	20.39
10		2.97	9.317	46.58	28.17	23.64	19.96	20.76
20		3.34	11.27	46.58	27.89	24.21	22.08	22.37

表 2 不同胶态几丁质浓度发酵液酶解几丁质产生还原糖浓度

胶态几丁质量/g		还原糖浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) Reducing sugar contenten						
Colloidal chitinous substance		3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
5		17.12	96.33	196.67	230.74 a	139.26	147.37	138.11
10		16.89	91.08	204.23	255.45 a	149.68	144.67	125.08
20		14.88	96.41	184.01	238.85 a	169.76	136.95	116.87

2.3 孢子悬液对粘虫幼虫致死效应

对供试球孢白僵菌菌株孢子悬液的生物测定结果表明,在高浓度条件下,幼虫死亡时间短,死亡几率高;及时将死亡幼虫从试验种群中检出并单独放置,2~3 d 在虫体表面可见白色菌体。当孢子浓度下降至  $1\times 10^4$  以下时,最终死亡率低于 50%(见图 1);比较各时间供试幼虫的死亡情况,

以第 7 天时各处理的累计死亡率为标准,建立孢子浓度对数与死亡机率值间的线性方程为: $Y=0.840X+0.819$  ( $R^2=0.989$ ),据此估算白僵菌孢子对粘虫幼虫致死中浓度约为  $1.04\times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup>,其致死中时间 6~7 d。

3 结论与讨论

球孢白僵菌在害虫生物防治中具有广泛的应用,有报道认为几丁质酶活力与孢子杀虫毒力存在正相关<sup>[13-14]</sup>,故确定所应用球孢白僵菌的产酶能力可为其应用提供理论支持。本试验所用的菌株在接种培养第 5 天时,产生的寡糖浓度可达到  $47.57\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,在第 6 天时几丁质酶活力达到高峰。在几丁质培养基中获得的孢子悬液,对粘虫幼虫致死中浓度约为  $1.04\times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup>,其致死中时间为 6~7 d。

利用微生物资源降解几丁质,其降解产物氨基寡聚糖可作为植物功能性调节剂,能诱导植物产生抗性<sup>[15]</sup>。球孢白僵菌 Bz4 菌株在含胶态几

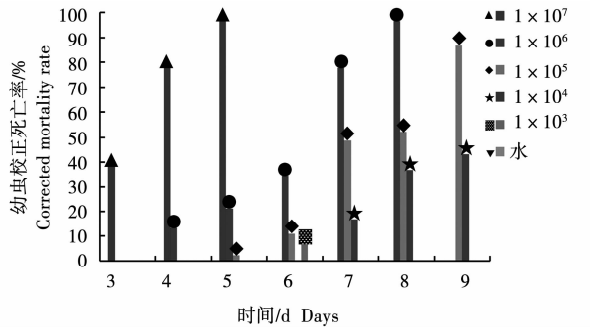


图 1 球孢白僵菌不同孢子浓度下幼虫逐日累计死亡率  
Fig. 1 Cumulative mortality rate of larva under different Beauveria bassianaspore concentrations

丁质  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的液体培养基中发酵,可产生含氨基寡聚糖  $47.57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的发酵液,发酵液对植物抗逆性的影响还有待于进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹伟平,王刚,甄伟,等. 球孢白僵菌不同感染方式侵染棉铃虫幼虫的毒性比较及组织病理变化[J]. 昆虫学报,2011,54(4):409-415.
- [2] 黄居敏,张普照,王芳,等. 白僵菌的代谢产物及药理活性研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(9):167-173.
- [3] 付志坚,陈建新,付丽君. 白僵菌对昆虫的致病机理研究综述[J]. 武夷科学,2000,16(12):105-108.
- [4] 季香云,杨长举. 白僵菌的致病性与应用[J]. 中国生物防治,2003,19(2):82-85.
- [5] 胡景云,樊美珍. 球孢白僵菌胞外蛋白酶与其毒力的关系[J]. 安徽农业大学学报,1996,23(3):273-278.
- [6] 彭仁旺,管考梅,黄秀梨. 球孢白僵菌两种胞外几丁质酶的诱导和纯化[J]. 微生物学报,1996,36(2):103-108.
- [7] 张旦妮,赵学,张媚,等. 球孢白僵菌诱导酶发酵液对其毒力的增效作用[J]. 农药学学报,2014,16(5):541-547.
- [8] Shi S Y, Wang W, Liu L Q, et al. Effect of chitosan/nano-silica coating on the physicochemical characteristic under

ambient temperature[J]. Journal of food Engineering,2013,118(1):125-131.

- [9] 高聪,张阿磊,陈可泉,等. Chitinibacter sp. GC72 的筛选鉴定及其几丁质降解产物研究[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(1):15-20.
- [10] 林海萍,魏锦瑜,毛胜凤,等. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性[J]. 中国生物防治,2008,24(3):290-292.
- [11] 王刚,董建臻,曹伟平,等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及几丁质酶的研究进展[J]. 中国农学通报,2009,25(13):175-178.
- [12] 熊国如,杨本鹏,王俊刚,等. 微生物几丁质酶研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(22):11685-11688.
- [13] 姚剑,黄大庆. 球孢白僵菌脂肪酶、酯酶、脂肪酶及其与毒力的关系[J]. 中国生物防治,2005,21(3):167-171.
- [14] 刘智辉,陈守文,郭志红,等. 球孢白僵菌胞外蛋白酶和几丁质酶活性与对亚洲玉米螟毒力的相关性分析[J]. 华中农业大学学报,2005,24(4):364-368.
- [15] 吴潇韞,朱旭芬. 生物降解甲壳质的研究[J]. 东海海洋,2001,19(2):15-21.

## Research on Enzyme Producing and Insecticidal Action of *Beauveria bassiana* Induced by Chitin

LIN Zhi-wei, CAO Qiang-wei, HUANG Zhi-yue, SUN Wei

(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

**Abstract:** Liquid fermentation of *B. bassiana* Bz4 strain induced by colloidal chitin was proceed, change of oligo-saccharides and chitinase were measured during fermentation by colorimetric method, and the lethal capabilities of its spores suspension on armyworm was determined by the dipping method in order to utilize the *B. bassiana* Bz4 strain better. The results showed that the content of oligosaccharides was higher when cultivated *B. bassiana* Bz4 strain for 5 days, and the enzyme activity of chitinase was higher when cultivated *B. bassiana* Bz4 strain for 6 days under the condition of different colloidal chitin content. Lethal capability of spores suspension gained by colloidal chitin fermentation on armyworm was stronger,  $LC_{50}$  was  $1.04 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $LT_{50}$  time was 6 to 7 days.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*; chitinase; median lethal content ( $LC_{50}$ )

欢迎加盟理事会协办单位