

技术与方法

分光光度法测定白僵菌孢子粉的含孢量

王成树 黄 勃 樊美珍 李增智

(安徽农业大学 合肥 230036)

摘要 研究了用分光光度计法测定白僵菌孢悬液的含孢量。首先用筛选出的适宜稀释液 SF1 将孢子粉作不同浓度的稀释,使用分光光度计在 470nm 波长下测出孢悬液的吸光度值(x),再用血球计数板测出对应含孢量(y),得到回归方程 $y=10^{0.8895x+6.5869}$ ($r=0.9678$)。经检验,方程回归显著,并且不存在菌株间的差异。孢悬液的适宜稀释浓度范围为 1500-2000 倍。

关键词 白僵菌,含孢量,分光光度计

分类号 Q93-37

物质的颜色不同和在溶液中的浓度不同,决定了该物质的最大吸收波长和吸光度值大小的不同,据此可以使用分光光度计来测定溶液中物质的含量。溶液中微生物个体含量的测定通常有计数计数法、培养皿计数法和混浊度计数法,其中混浊度计数法测定细菌的繁殖量最为常见^[1]。真菌和酵母孢子的计数常采用血球计数板计数法来测定。作为重要生防材料的球孢白僵菌,计数其孢子粉或孢悬液的含孢量是经常遇到的问题,使用血球计数板计数显得非常烦琐。普遍使用的吐温-80 分散剂对白僵菌孢子的湿润分散性较差,需要搅拌或振荡较长时间才能将孢子打散,对于生产和研究单位来说,这种方法很难满足快速测定和大量样品的检测需要,研究选择适宜的分散剂和采用分光光度计来测定白僵菌孢悬液的含孢量是非常必要的。

1 材料与方法

1.1 适宜分散剂的筛选

白僵菌孢子是亲油脂性的,实验表明,孢子 在色拉油、菜籽油或煤油中,可以快速均匀地分散,而这些油的 HLB 值 (Hydrophilic-Lipophilic Balance,亲水亲油平衡值)均在 15 左右^[2]。根据“相似相容”的理论,能够很好地分散白僵菌孢

子的单一或复合表面活性剂的 HLB 值也应在 15 左右(复合表面活性剂的 HLB 值等于各单一表面活性剂的 HLB 值乘以其在混合物中所占的比例累加后所得的和)。为了筛选出分散性较好的表面活性剂或其不同组合,设计了 10 个不同处理(表 1),测定各自的湿润时间、悬浮率、分散度(以变异系数来表示)等三个指标,筛选最佳的分散剂^[2]。

表1 不同处理的表面活性剂组合及其配比

处理	代号	不 同 处 理
1	SF1	10%十二烷基硫酸钠+0.3%OP+1.5%Tween20
2	SF2	3%十二烷基硫酸钠+1% 吐温80
3	SF3	0.5%洗衣粉
4	SF4	1%十二烷基硫酸钠+1%PEG+1% 吐温20
5	SF5	2%PEG+1% 吐温80
6	SF6	1% 吐温80
7	SF7	1% 吐温20
8	SF8	0.3%OP+0.5%NS-2
9	SF9	0.5%NNO
10	SF10	0.5%木质素磺酸钠

1.2 适宜测定波长的选择

物质对光的吸收是有选择的,不同颜色物质的吸收波长也不相同^[3]。将白僵菌 SH 菌株孢子铺成薄层(约 0.5mm),用日立 850 型荧光

1997-03-25 收稿

分光光度计 (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan) 测定孢子的最大吸收波长。以此波长为依据, 再设定两个对照波长, 在 721 分光光度计 (上海第三光学仪器厂) 上测定白僵菌孢悬液在不同波长下的吸光度。再在血球计数板下测出对应孢悬液的含孢量 (y , 个/ml)。由 x 和 $\lg y$ 建立线性方程, 根据所得方程的相关系数和估计标准误差的大小来确定适宜测定波长下所得吸光值的精确性。

1.3 白僵菌孢悬液适宜稀释浓度的确定

将待测 SH 菌株孢子悬浮液稀释成不同的浓度: 200 倍、600 倍、1000 倍、1500 倍、2000 倍及 2600 倍稀释液, 分别在上述实验确定的波长下测出其吸光度值, 进行卡方检验, 由卡方值的大小, 确定孢悬液适宜的稀释范围, 卡方值越大, 则拟合越差。

1.4 不同菌株孢悬液含孢量可靠性检验

为了检验不同菌株对方程的可靠性, 另外测定了 5S03 菌株不同浓度的吸光度值 (x) 及对应的含孢量 (y), 由所得方程的相关系数同 SH 菌株所得方程的相关系数进行差异显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 孢子粉适宜分散剂的选择

由湿润时间、悬浮率和分散度三个指标来评价供试表面活性剂或其组合的结果表明, SF1 对白僵菌孢子分散程度好 (孢子个数/视野的变异数小)、对孢子的悬浮率高、相对湿润时间短, 故可以用来作为测定含孢量的一种理想的分散剂。

2.2 适宜测定波长的确定

经荧光分光光度计测定, 白僵菌孢子在 449.9nm 下具有最大的吸收峰。成熟的白僵菌孢子粉为淡乳黄色, 这同朱世盛报道的黄-橙色物质的吸收波长范围为 450—490nm 是相吻合的^[3]。结合考虑此两项结果, 在 721 分光光度计下, 以 470nm 的波长测定孢悬液的吸光度, 同时以 580nm 和 650nm 作对照, 线性回归后分别得到线性方程、相关系数及估计标准误差, 经检验, 方程相关均极显著 ($v = 13$, $r_{0.01} = 0.641$)。对于不同的测定波长下所得方程, 相关系数大,

估计标准误差小, 则所得方程的拟合度高, 所以确定 470nm 为测定波长 (表 2)。

2.3 孢悬液适宜测定浓度的确定

随着稀释倍数渐小, 孢悬液的实际含孢量同理论含孢量的卡方值也渐小, 但一定倍数后 (2600 倍), 卡方值又会增大, 从而又增大了测量数值的不稳定性, 所以孢子的稀释倍数以 1500—2000 倍为宜 (表 3)。

表2 不同浓度白僵菌孢悬液在不同波长下测定的吸光度值及对应含孢量对数 ($\lg y$)

不同处理号	A _{470nm}	A _{580nm}	A _{650nm}	$\lg y$
1	0.301	0.236	0.215	6.69
2	0.542	0.430	0.395	7.13
3	0.739	0.583	0.540	7.31
4	0.910	0.738	0.675	7.33
5	1.150	0.835	0.760	7.51
6	0.310	0.244	0.211	6.73
7	0.528	0.429	0.339	7.16
8	0.685	0.560	0.515	7.19
9	0.925	0.762	0.702	7.35
10	0.990	0.825	0.760	7.49
11	1.168	0.899	0.826	7.54
12	1.225	0.951	0.889	7.57
13	1.280	1.125	0.978	7.64
14	1.350	1.210	1.125	7.70
15	1.400	1.279	1.129	7.76
回归方程	$\lg y = 0.8454x + 6.1 \lg y = 0.9388x + 6.1 \lg y = 1.0272x +$			
	5789	6447	6.6511	—
相关系数	0.9706	0.9584	0.9572	—
估计标准误差	0.0799	0.0948	0.0962	—

表3 白僵菌孢悬液不同稀释倍数下的卡方检验

稀释倍数	吸光度值 (λ)	理论 ($\lg y$)	实测 ($\lg y$)	卡方值 ($\times 10^{-3}$)
200	1.603	8.0128	8.2632	7.8250
600	1.294	7.7379	7.9558	6.1361
1000	1.400	7.8322	7.7377	1.1402
1500	1.106	7.5707	7.5185	0.3600
2000	0.943	7.4257	7.3741	0.3586
2600	0.788	7.2878	7.2041	0.9613

2.4 不同菌株所得方程的差异性检验

由 470nm 波长下的测量值 (表 4), 得到 5S03 菌株的方程 $\lg y = 1.0091x + 6.5505$ ($r = 0.9591$), SH 菌株的方程: $\lg y = 0.8454x + 6.5789$ ($r = 0.9706$), 将两者进行回归系数的差异性检验 (t 检验), $t = 1.5561 < t_{0.01, 26} = 2.779$, 所以不同菌株所得方程的回归系数差异不显著。合并数据后得到方

表4 白僵菌不同菌株在470nm下吸光度(x)及对应含孢对数(lgy)

处理号	SH菌株		5S03菌株	
	吸光度(x)	lgy	吸光度(x)	lgy
1	0.301	6.69	1.335	7.75
2	0.542	7.13	0.878	7.55
3	0.739	7.31	0.281	6.82
4	0.910	7.33	1.125	7.69
5	1.150	7.51	0.780	7.46
6	0.310	6.73	0.800	7.51
7	0.528	7.16	0.759	7.47
8	0.685	7.19	0.499	7.08
9	0.925	7.35	0.570	7.11
10	0.990	7.49	0.841	7.53
11	1.168	7.54	0.075	6.43
12	1.225	7.57	0.361	6.91
13	1.280	7.64	0.680	7.17
14	1.350	7.70	0.450	7.04
15	1.400	7.76	0.558	7.09

程 $\lg y = 0.8895x + 6.5869$ ($r = 0.9678$)。所以用方 SF1 将白僵菌孢子稀释适当倍数后 (1500–2000 倍), 用分光光度计测出孢悬液的吸光度值, 参照此方程, 即可求出对应孢悬液的含孢量。

通过测定白僵菌孢子粉的吸收波长及其颜色, 确定以 470nm 作为测定孢悬液的选择波长, 经检验所得到的孢悬液吸光度与含孢量之间的方程相关极显著。但两个对照波长, 580nm 和 650nm 的测定结果所得的方程相关也极显著,

另外其估计误差与 470nm 测定估计误差相差不大, 可以作为测量误差而不予考虑。所以白僵菌孢悬液吸光度的大小受孢子颜色的影响不大, 而主要是由混浊度决定的, 这样也可以将吸光度换算成混浊度后建立标准方程。

对光线的散射能力主要受颗粒的大小与入射波长的影响, 粒径大、入射波长短则散射量大^[3]。球孢白僵菌孢子的直径平均为 2–3 μm , 所以影响其散射光大小的主要因素是入射波长的大小。测定无色细菌混浊度的波长为 450nm, 对于淡乳黄色的白僵菌孢子最终确定以 470nm 来进行测定, 可以在一定程度上减小散射光的影响。

本研究最后得到白僵菌孢悬液的吸光度(x)与含孢量(y)之间的标准方程为 $y = 10^{0.8895x + 6.5869}$, 该方程经 t 检验没有菌株间的差异, 精度也符合要求。该方程适合于测定白僵菌高孢粉的含孢量和菌落的产孢量, 对于杂质含量高或带有色素的孢子混合物, 不适于以此方程进行标定。

参 考 文 献

- [1] 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979, 173~174.
- [2] 赵国玺. 表面活性剂的物理化学. 北京: 北京大学出版社, 1984, 470~477.
- [3] 朱世盛. 仪器分析. 上海: 复旦大学出版社, 1983, 23~69.

MEASURING CONIDIAL COUNT OF *BEAUVERIA BASSANA* CONIDIAL POWDER BY HEMOCYTOMETER

Wang Chengshu Huang Bo Fan Meizhen Li Zhengzhi

(College of Forest Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract In the present paper, the conidial count of *Beauveria bassiana* conidial powder determined by hemocytometer was studied. After diluted with the selected surfactant "SF1", the acquired conidial suspension was tested for absorbance at the wavelengths of 470nm with model 721 spectrophotometer. The regression equation of absorbance (x) and conidial count (y) from hemocytometer counting was $y = 10^{0.8895x + 6.5869}$ ($r = 0.9678$). There was no significant difference to different strains. In measuring proceeding, the conidial suspension should be diluted by 1500–2000 fold.

Key words *Beauveria bassiana*, conidial count, spectrophotometer