

灭蚊真菌贵阳腐霉对蛋白核小球藻的安全性检测^{*}

李振光¹, 苏晓庆^{1,2**}

(1. 珠海盈嘉行科技有限公司, 广东 珠海 519000; 2. 贵州医科大学 生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 检测贵阳腐霉对蛋白核小球藻的安全性。方法: 用小球藻培养液培养小球藻, 实验组在培养液中加入贵阳腐霉, 对照组不加贵阳腐霉; 观察并比较培养6 d时各组培养液的颜色和色深, 在100倍显微镜下观察各组小球藻细胞形态; 比较培养3 d和6 d时各组小球藻细胞密度, 评估贵阳腐霉对蛋白核小球藻的安全性。结果: 培养6 d时, 各组培养液都显示出鲜艳的绿色, 无明显区别; 在100倍显微镜下观察各组小球藻细胞形态也正常, 各组间无明显差别; 培养3 d和6 d时各组的小球藻细胞密度, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 贵阳腐霉对蛋白核小球藻具有较高的安全性。

[关键词] 贵阳腐霉; 灭蚊; 真菌; 小球藻属; 细胞培养; 安全性

[中图分类号] R184.31; R379; Q939.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)03-0258-03

A Test on the Safety of *Pythium guiyangense* to *Chlorella vulgaris*

LI Zhenguang¹, SU Xiaoqing^{1,2}

(1. Yingjiahang S. T. Co. LTD, Zhuhai 519060, Guangdong, China; 2. Department of Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To test the safety of *Pythium guiyangense* to *Chlorella vulgaris*. **Methods:** *C. vulgaris* was cultured in liquid medium, and was divided into experimental group and control groups. In experimental group, mycelia of *P. guiyangense* was added, while no fungus was added in control groups. During incubation, the condition of whole culturing liquid and cellular morphology of *C. vulgaris* cells were observed under the 100 times microscope. *C. vulgaris* cell density was tested with densitymetry, and the results were compared between the two groups at day three and day six. Finally, the safety of *Pythium guiyangense* to *Chlorella vulgaris* was evaluated. **Results:** 6 days after culture, culturing liquid of both groups showed bright green color and no significant difference was found between groups. The cellular morphology of *C. vulgaris* cells under the 100 times microscope was normal in both groups and no significant difference was found. In terms of cell density of *C. vulgaris*, there was no statistical difference in both groups between 3 day culture and 6 day culture. **Conclusion:** *P. guiyangense* is safe to *C. vulgaris*.

[Key words] *Pythium guiyangense*; mosquito; fungi; *Chlorella vulgaris*; cell culture; safety

蚊不但骚扰人类,而且还通过吸血传播多种疾病。目前国内外使用的灭蚊剂多为化学灭蚊剂,大量使用不仅容易引起抗药性,还会对环境造成污染,寻找减少或替代化学杀虫剂的灭蚊方法现已成

为国内外害虫防治研究的热点。贵阳腐霉是1994年在贵阳分离到的灭蚊真菌,其无性繁殖阶段游动孢子可以主动感染蚊幼虫,可长期控制蚊虫密度(待发表)。刘萍^[1-3]、张传博^[4]和杨平^[5]的实验

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No:30760140)

^{**} 通信作者 E-mail:su.xiaoqing@aliyun.com

网络出版时间:2016-03-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160317.1103.056.html>

确认了贵阳腐霉对 6 种植物和 11 种动物的安全性。藻类是水体生态系统中比较重要的构成部分,既是水生环境中食物链的重要环节,同时对环境中不良因素比较敏感,常被用来作为水质评价的标准之一。本研究采用核蛋白小球藻(*Chlorella vulgaris*)作为代表来检测贵阳腐霉对水环境中藻类的安全性,报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

真菌贵阳腐霉为本实验室保种,并定期在 SFE 培养基中传代和经致倦库蚊幼虫复壮,核蛋白小球藻为市售,小球藻培养基为市售的小球藻盐营养液。

1.2 实验方法

1.2.1 菌丝制备 取 100 mL 葵花籽匀浆液于 250 mL 三角瓶中,接种适量贵阳腐霉真菌,25 ℃ 恒温 120 r/min 震荡培养 7 d。收集培养好的真菌并粉碎 10 s,备用。

1.2.2 分组及小球藻培养 根据加入的培养液分为盐营养液组(于 100 mL 三角瓶加入 35 mL 的盐营养液)和无菌水组(于 100 mL 三角瓶加入 35 mL 的无菌水),2 组培养液中均接种小球藻种液 10 mL,把盐营养液组分为 3 份,分别加入 0.1 mL 的贵阳腐霉菌液(实验组)、SFE 培养液(空白对照组)和无菌水(阴性对照组),无菌水组分为 2 份,分别加入 0.1 mL 的贵阳腐霉菌液(实验组)、SFE 培养液(空白对照组)。每天 25 ℃ 恒温 120 r/min 震荡 30 min,光照 12 h 培养。每个研究重复 3 次。

1.2.3 绘制小球藻细胞密度标准曲线 收集 SFE 培养液中已培养好的小球藻液,3 000 r/min 离心 30 min,去上清液,取双蒸水作对倍稀释,采用光密度法测得 680 nm 处吸光值。采用血球计数板计数细胞数,计算小球藻细胞密度(小球藻细胞密度 = 小球藻细胞数/稀释的双蒸水体积),以小球藻细胞密度为纵坐标,吸光值为横坐标绘制小球藻细胞密度标准曲线。

1.3 观察指标

观察小球藻细胞密度标准曲线的线性关系,根据培养 3 d 和 6 d 时各组小球藻样品在 680 nm 处的吸光值(A)在小球藻细胞密度标准曲线上获得小球藻细胞密度;同时比较培养 6 d 时各组三角瓶

里培养液的颜色和色深,在 100 倍显微镜下观察各组小球藻细胞形态;分析贵阳腐霉真菌对小球藻的影响,评价贵阳腐霉对蛋白核小球藻的安全性。

1.4 统计学方法

数据用 SPSS 15.0 软件分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,各组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小球藻细胞密度和吸光度的关系曲线

从绘制的标准曲线和得到的回归方程($\hat{y} = 1\,868.3x - 24.346$, $R^2 = 0.999\,8$)可以看出在所测定的小球藻细胞密度范围内,小球藻细胞密度和吸光度存在良好的线性关系(图 1),利用小球藻细胞在 680 nm 的吸光度值可以在标准曲线上直接获得小球藻细胞密度。

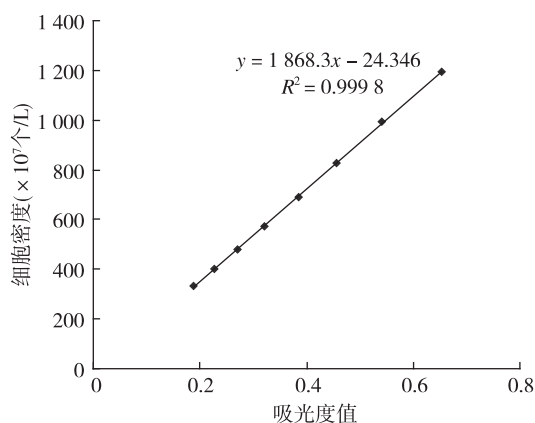


图 1 小球藻细胞密度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of cell density of *C. vulgaris*

2.2 培养液的外观和小球藻细胞形态

培养 6 d 时,阴性对照、空白对照和实验组三角瓶中的培养液的颜色及色深都显示出鲜艳的绿色,没有明显区别,说明小球藻均生长正常。在 100 倍显微镜下观察各组小球藻细胞形态也正常,各组间无明显差别。见图 2。提示贵阳腐霉菌对小球藻的颜色、色深及小球藻形态无影响,证实贵阳腐霉对蛋白核小球藻具有较高的安全性。

2.3 培养 3 d 和 6 d 时的小球藻细胞密度

从表 1 可知,培养 3 d 和 6 d 时加入盐营养液各组和无菌水各组的小球藻细胞密度分别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),证实贵阳腐霉菌对培养的小球藻细胞密度无影响。

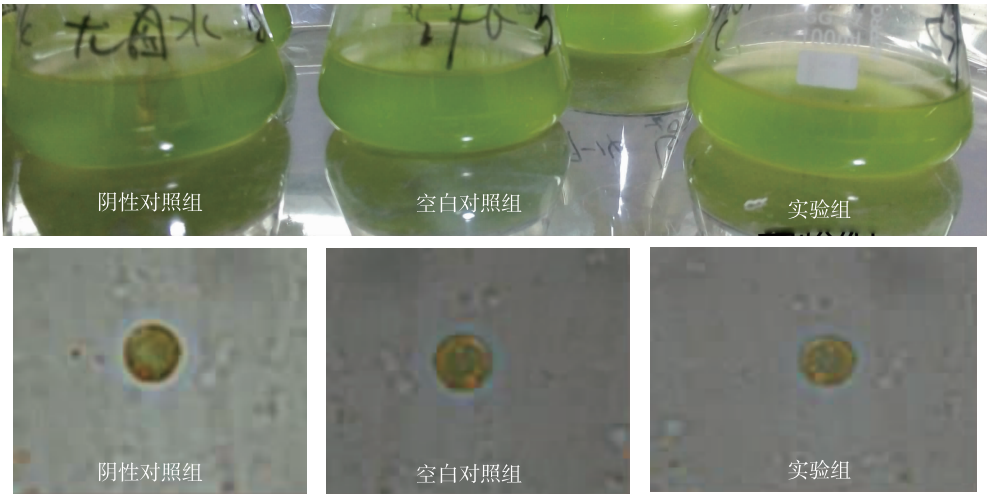


图 2 小球藻培养 6 d 时培养液外观和小球藻细胞形态

Fig. 2 The extrinsic feature and cell morphology of *C. vulgaris* cultures in the 6th day of incubation

表 1 培养 3 d 和 6 d 时的小球藻细胞密度

Tab. 1 Cell density of *C. vulgaris* cultured for 3 and 6 days respectively

分组	小球藻细胞密度(×10 ⁷ 个/L)	
	培养 3 d	培养 6 d
盐营养液组		
阴性对照组	1 881. 21 ±4. 53	2 097. 90 ±164. 85
空白对照组	1 780. 32 ±85. 92	1 879. 29 ±262. 89
实验组	1 843. 98 ±45. 00	1 812. 03 ±45. 90
无菌水组		
空白对照组	947. 04 ±110. 70	1 087. 17 ±0. 24
实验组	778. 89 ±42. 78	1 012. 44 ±47. 76

3 讨论

核蛋白小球藻为绿藻门绿藻纲绿球藻目卵孢藻科小球藻属的单细胞藻类,直径 3 ~ 8 μm,是一种高效的光合植物。作为水生生态系统中的初级生产者和食物链中的基本环节,它对维持生态系统的平衡起着重要的作用^[6]。因为对水环境中各类化学物质较为敏感,因此藻类是检测和评价水环境质量的重要指标^[7]。小球藻所属的绿藻在水产养殖过程中是能提供一定饲料的生物,属于有益藻^[8]。如果对小球藻有害,则会波及养殖业^[9]。所以贵阳腐霉是否对小球藻有不良影响是值得重视的问题。

本实验中采用 3 个指标来判定贵阳腐霉对小球藻的生长是否有影响。首先,从培养物的整体来看,实验组和对照组的外观没有明显差别,都显示出鲜艳的绿色。说明其中的小球藻生长正常。细胞层次的观察主要涉及 100 倍视野下的小球藻细胞形态。实验组和对照组没有明显差异。细胞无异常。第 3 个观察指标就是小球藻的细胞密度。本实验是采用光密度法在培养的第 3 天和第 6 天测定和比较各组的小球藻密度。实验中涉及到小球藻的培养。为了增加小球藻的生长繁殖量,需要提供它需要的无机盐。但是实际灭蚊中,淡水或淡盐水中都可能施放贵阳腐霉。所以本研究在实验分组中设计了盐营养液组和无菌水组,又在两组中分别设立阴性对照和空白对照。结果显示,在盐营养液组和无菌水组组间,小球藻的细胞密度不同。但是在组内,实验组和对照组的细胞密度没有显著性差异($P>0.05$),说明贵阳腐霉的存在并没有影响小球藻的生长繁殖。综上,证实贵阳腐霉对蛋白核小球藻具有较高的安全性。

4 参考文献

[1] 刘萍,苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉 *Pythium guiyangense* 对大鼠的长期安全性测试[J]. 菌物学报, 2007(3): 440 - 447.

[2] 刘萍,苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉对几种动物的急性安全性测试[J]. 贵阳医学院学报, 2007(4):331 - 336.

(下转第 264 页)

为经济实用的手段。本实验结果显示 Pg 复壮后最高组 Pg 平均感染率、单碗 Pg 最高感染率及单碗 Pg 最低感染率均达到 40% 或以上,单碗 Pg 最高感染率甚至达 100%,说明本复壮实验成功使毒力减退的 Pg 通过复壮恢复了毒力,虽然复壮过程中,不良的培养基材料导致了一次反复,证明了培养条件也是影响菌种毒力的因素。这对于实际生产也提供了有益的经验。长期在人工培养基上传代会导致菌种退化,提示在 Pg 的工业化生产中必须加强菌种的复壮工作。经宿主复壮是保持和提高 Pg 毒力的有效途径。

4 参考文献

- [1] 孟凤霞,王义冠,冯磊,等. 我国登革热疫情防控与媒介伊蚊的综合治理[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015(1):4-10.
- [2] 赵明惠,冉鑫,李春晓,等. 淡色库蚊和致倦库蚊对杀虫剂抗药性的调查研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014(2):116-118.
- [3] 蔡蓉,邵宗贤,陈跃,等. 淮安市三带喙库蚊和白纹伊蚊对常用杀虫剂的抗药性测定[J]. 中华卫生杀虫药械, 2015(1):23-25.
- [4] 苏晓庆,刘萍,张传博,等. 灭蚊真菌贵阳腐霉及其研究进展[J]. 中华卫生杀虫药械, 2010(2):141-143.
- [5] 王荣新,雷大卫,苏晓庆. 贵阳腐霉 PrI 蛋白酶的诱导条件研究[J]. 贵阳医学院学报, 2008(1):12-15.
- [6] 刘新宇,祁玉良,熊在东,等. 食用菌菌种退化的遗传学分析[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2001(2):16-18.
- [7] 唐晓庆,唐燕平,李增智. 球孢白僵菌菌种退化及其对马尾松毛虫防治的影响[J]. 安徽农业大学学报, 1996(3):246-253.
- [8] Zhao JN, Su XQ. The genetic transformation of *Pythium guiyangense* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J] *Mycosistema*, 2008(4):594-600.
- [9] 江梅,苏晓庆. 灭蚊真菌贵阳腐霉原生质体诱变育种实验研究[J]. 贵阳医学院学报, 2008(6):586-596.
- (2015-12-03 收稿,2016-02-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌
- (上接第 260 页)
- [3] 刘萍,周顺,先丹,等. 灭蚊真菌贵阳腐霉对小菜蛾幼虫安全性的室内检测[J]. 贵阳医学院学报, 2007(3):225-226, 230.
- [4] 张传博,苏晓庆. 一株灭蚊真菌-贵阳腐霉的田间生态安全性评价[J]. 安徽农业大学学报, 2008(3):426-429.
- [5] 杨平,刘萍,苏晓庆,等. 新分离的灭蚊真菌(*Pythium* sp. GY1938)对家蝇幼虫的安全性检测[J]. 贵阳医学院学报, 2006(3):203-204,207.
- [6] 陈琼,张瑾,李小猛. 几种抗生素对蛋白核小球藻的时间毒性微板分析法[J]. 生态毒理学报, 2015(2):190-197.
- [7] 胡瑞,李英东,陆怡菁,等. 非离子表面活性剂对水生生物的影响[J]. 环境科学与技术, 2015(6):15-19.
- [8] 徐丰都,胡梁及,周泽琴,等. 藻类变化对水产养殖影响的研究进展[J]. 水产养殖, 2015(1):48-52.
- [9] 王存文,孟阳,汪铁林,等. 三种抑菌剂对蛋白核小球藻生物量和脂质含量的影响[J]. 武汉工程大学学报, 2014(4):1-6.
- (2015-12-20 收稿,2016-02-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华