

苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)毒效的生物测定和产品标准化的初步研究^{*}

生物系昆虫学教研室

苏芸金杆菌类产品对害虫的毒效,与产品内所含芽孢的多少不一定成正相关,即有些产品或制品芽孢多而毒力小,有些芽孢少反而毒力大。这一现象早为我国从事杀螟杆菌生产或应用的工作人员所认识,也是1966年国际微生物治虫及昆虫病理会议所依据而提出的不能用芽孢数量作为苏芸金杆菌毒力指标的意见,该会建议用生物测定法来确定毒力指标,用法国巴斯德研究院所制备的苏芸金杆菌制品 E61为标准制剂,并指定每毫克的毒力为1000国际单位。用哪一种昆虫来作苏芸金杆菌的生物测定,意见颇不一致,菜粉蝶(*Pieris brassicae*)幼虫、家蚕、地中海粉螟幼虫、灯蛾(*Estigmene acraea*)、菜蛾、甘兰夜蛾幼虫及其他在国外都曾用过,并认为有些适于作为测定标准之用。1970年的第四届国际昆虫病理会议,建议用粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)幼虫作为标准的生物测定材料。

我国的苏芸金杆菌产品,目前只用于国内,有许多产品质量未十分稳定,如何稳定及提高产品质量和扩大使用范围,国内正在开展研究。产品的毒力测定为当前所急需。近年来,我国个别单位虽然使用一些生物测定的办法,但仍须进一步加以改进。准确地指出毒力指标,是生产和使用上的一个关键,解决毒力指标之后,又可据以制备全国(或全省)自己的统一标准毒力单位的杆菌产品而使产品标准化,这也就是本研究的目的。

国际昆虫病理学会议所建议用于生物测定的粉纹夜蛾,在我国虽有记载,但测定手续颇为复杂,不便于生产单位。为了找出一种适于苏芸金杆菌毒力测定的昆虫及测定方法,我们曾用蓖麻蚕三龄幼虫、粉斑螟一龄幼虫、蓖麻蚕的将孵蚕卵及二化性家蚕的将孵蚕卵进行毒力测定。测定蓖麻蚕幼虫的方法是用菌液浸叶法,测定粉斑螟幼虫用菌混饲料法,测定将孵蚕卵则用菌液浸卵法。菌液分为五个浓度,测试虫数或卵数为三十至五十。根据试验结果,我们初步认为二化性家蚕将孵卵是比较理想的测定材料。现将家蚕将孵卵的测试方法及结果简列如下:

* 1974. 1. 15接稿

将苏芸金杆菌变种蜡螟菌工业制剂用生理盐水加0.1%合成洗衣粉(广州出品迎春牌)稀释成50、100、200、400、800倍五个浓度,并设对照;把将孵二化性家蚕卵箱(每次用一单蛾区)均等剪分为六小片,分别将各卵片浸入上述不同浓度的菌液中,经30秒钟取出,自然晾干后分放于编号的培养皿中,在温度 $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 相对湿度75—85%温箱中催青,蚁蚕孵化的当天早上(五时至六时)亮灯感光至将近全部孵化,即检除未孵卵,加入一小团清洁湿水棉花,再经二十四小时检查,结果列如下表:

菌液稀释倍数	供试虫数	死虫数	校正死亡率(%)	对数值	机率值
50	45	34	75.6	1.7	5.70
100	45	31	68.9	2.0	5.48
200	35	8	22.9	2.3	4.26
400	53	6	11.3	2.6	3.80
800	89	7	7.9	2.9	3.58
对照	48	0	—	—	—

根据上表结果制成剂量与死亡率相关直线,得出菌剂的致死中浓度为130倍。如果要比较其他苏芸金杆菌产品间、变种间或菌株间的毒效,都可用这种材料和方法求出其致死中浓度,作为比较。

用家蚕将孵卵作为毒力测定材料,我们认为有这样几种优点:(1)品系统一,而且供试蚕卵是由单蛾产出的,孵化整齐,又未经过喂饲,因而个体间的生理差异较少;(2)蚁蚕孵化时咬破卵壳,将沾着于孵化孔卵面的菌剂连同卵壳同时食入,提供了一个对菌剂感受较一致的机会;(3)避免饲养管理的麻烦;(4)二化性家蚕在我国各养蚕区均有饲养,只要与制种单位订好计划,根据不同发育期放入冷库(或电冰箱)冷藏,制种一次可用3—4个月,一年只需委托制种场制种3—4次,便可随时供作产品毒力测试之用。因此,用二化性家蚕品种作苏芸金杆菌毒力测定,是最简便易行的一种方法,结果也较准确,适于我国的实际情况,各省、地区、县、甚至公社生产此类产品的机构都可整年应用。因此,我们建议用以作为全国苏芸金杆菌类产品毒力测试虫种。当然,我们希望有关单位选出更适当虫种,更简便方法而又能更准确地反映出菌剂的毒效。用二化性家蚕将孵卵作为测定材料的缺点是敏感性较差,我们选用普通工业产品的致死中浓度为130倍,这一稀释倍数嫌其偏低,虽然一般较好的工业产品会达到这个水平的毒效,但对于较低毒效的产品,就不易测出结果来。因此,从增加卵面沾着量和加入适当粘着剂(以不影响正常孵化为度)等方面继续加以研究是有意义的。另外,我们所用的蚕种是“新四农”,其他二化

性家蚕品种对菌剂毒效感应如何,哪一个品种适用于测定,值得作进一步的试验。

关于苏芸金杆菌类产品毒效的标准化问题,我们建议,依上述方法求出的产品对二化性家蚕的致死中浓度(LC₅₀),定为每毫克产品的毒力单位数。如某产品对规定标准虫的致死中浓度LC₅₀ = 200倍,那末该产品的生物效价应是200单位/毫克,余类推。另外,为使其能长期稳定,我们建议规定二化性家蚕标准虫应用我国现用的一种原种,不用外来种或杂交种,以免产生变异而影响标准;而且,标准虫应由有关机构统一制发。标准虫规定以后,还必须得到一个标准制剂作为标准品,用一已标明毒力单位(生物效价)的标准品与待测样品同时作毒力测定,可依下式得出样品的效价:

$$x = \frac{c}{b} \times a$$

此处

- a— 标准品效价(单位/毫克)
- b— 标准品在当时的致死中浓度
- c— 样品在当时的致死中浓度
- x— 样品效价(单位/毫克)

上面已提到,国际上是采用法国巴斯德研究院制备的 E61(规定1000U/mg)作为标准制剂,我们识为,在产品仅限于国内使用的情况下,我们不一定以此制剂作为标准品,但国内选用一个标准制剂是有必要的。标准制剂应是含菌纯一、晶体毒力强、有代表性、耐保存并对规定的标准虫有一个稳定的毒力指标的制品。我们曾对标准品的制备进行过一些尝试,曾选用本教研室保存的蜡螟菌(*Var. galleria*)、苏芸金菌(*Var. thuringiensis*)及松毛虫菌(*Var. dendrolimus*)等三个变种的菌株各一个,分别在牛肉膏1.0%、蛋白胨0.2%、葡萄糖0.2%、琼脂2.0%、PH7.4的培养基上用克氏瓶培养,至孢子囊成熟后期收获菌苔,加水成悬液打碎均匀后,按200亿/毫升晶体加一克轻质碳酸钙粉吸附,抽滤并置55°C烘干,至含水量2—3%,粉碎过筛,用家蚕经几次生物测定而得致死中浓度的平均值,然后依下式再加入适当填充料(碳酸钙粉)调整到所需毒效制品(LC₅₀以菌液稀释倍数为量):

$$\text{加入填充料重量} = \frac{\text{原品LC}_{50} - \text{调整品LC}_{50}}{\text{调整品LC}_{50}} \times \text{原品重量}$$

如上制作,易于稳定和重复,但嫌量太少,不能供很多单位应用。为此,可由有关机关和生产部门协作,选定一菌株,用深层通气培养生产一批产品,确定标准生物“效价”(单位/毫克),作为国内“标准品原品”,并妥加保存,以供各地长期使用,如需复制,亦用该菌株按同法生产并严格测定调整至原品“效价”。标准品同标准虫一样,应由有关部门统一制发,并在标签上标明“效价”——每毫克制品所

含毒力单位数。有了标准品和规定标准昆虫,便可用以测定未知毒效产品的标准“效价”。产品的毒效标准统一以后,在用于害虫防治实践之前,应预先做好对防治对象的简单毒效测定,使更能发挥该产品的治虫效率。

参 考 文 献

- 刘崇乐等 1962 苏芸金杆菌研究的五十年 科学出版社。
中山大学生物系昆虫学教研室 1972 害虫生物防治 中山大学。
广东省水稻害虫生物防治研究大会战工作队 1972 国外苏芸金杆菌研究近况。
Burgers, H. D. 1967 Standardization of *Bacillus thuringiensis* products: Homology of the standard. *Nature* 215:664-665.
Dulmage, H. T. 1970 Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invert. Pathol.* 15(2):232-239.
Dulmage, H. T. 1971 A Proposed standardized bioassay for formation of *Bacillus thuringiensis* based on the international units. *J. Invert. Pathol.* 18 (2): 240-245.
Pendlestone, J. R. 1969 Comparative toxicity of crystal serotype of *Bacillus thuringiensis* for larvae of *Philosamia cynthia* var. *ricini*. *J. Invert. Pathol.* 13:423-428.
Yamvrias, C. 1962 Contribution a l'etude du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-a-vis de la teigne de la farine *Anagaster (Ephestia) kühniella* Zeller (*L'epidoptere*). *Entomophaga* 7(2):101-159.
Yamvrias, C. and Angus, T. A. 1970 The Comparative pathogenicity of some *Bacillus thuringiensis* varieties for larvae of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Invert. Pathol.* 15:92-99.