

杨尺蠖核多角体病毒的研究

V. AciNPV 杀虫剂的研制及产品检测*

王贵成 王志贤 崔士英 于在林

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘 要

本文报道 AciNPV 杀虫剂的生产工艺和安全性检测结果。AciNPV 杀虫剂是以多角体制备物加光保护剂和其它助剂,在电动混合筛内混合制备而成。生测证明,丙酮—乳糖共沉样品与病毒杀虫剂对幼虫的致病力很高。其 LC_{50} 均为 2.84×10^3 PIB/ml; 95% 置信限分别为 1.79×10^3 — 4.76×10^3 PIB/ml 或 1.43×10^3 — 5.66×10^3 PIB/ml。

几种粉剂可直接用水和矿物油(如零号柴油)稀释,使用较方便。野外试验表明,防治效果在85%以上。

动物安全性试验表明,该制剂无致病性和致突变作用,对人畜安全。细菌学检测证明,未发现任何与人有关的致病菌,如大肠杆菌、沙门氏菌、志贺菌、弧菌和破伤风杆菌等。

关键词 杨尺蠖; 核多角体病毒; 病毒制剂; 安全检测

近年来,由于化学农药对生态环境的污染及害虫产生抗药性等原因,世界各国均在寻找新的或具有选择性的微生物杀虫剂。其中昆虫病毒杀虫剂的开发利用,已取得不少成功的实例^[6-8],但有关杨尺蠖(*Apocheima cinerarius*)核多角体病毒(简称 AciNPV)杀虫剂的研制,尚未见任何报道。为此,我们在研究 AciNPV 的病原特性、生物活性、增殖技术及回收方法的基础上^[1-4],1982—1985年又进行了 AciNPV 杀虫剂的研制及产品检测试验,现将结果报道如下。

一、材料与方 法

(一) 病毒来源及多角体的回收方法

试验所用 AciNPV 均系河北坝上毒株,按室内外复制技术进行增殖^[3];以丙酮—乳糖

本文于1987年12月25日收到。

* 王志贤、崔士英参加了1982年部分工作,于在林参加了1985年部分工作,吴燕参加室内全部工作。

共沉法回收多角体^[4], 作为制剂的有效物质, 其含量为 5.0×10^{10} PIB/g。

(二) 辅助剂的种类及筛选方法

1. 辅助剂的种类及来源

(1) 填充剂或稀释剂 所用填充剂主要有白炭黑(上海试剂二厂)、皂土(上海试验器厂)、粉煤灰(北京市石景山发电厂)、白陶土(齐鲁石油化学总公司橡胶厂)。稀释剂一种为二线油(北京燕山石化总厂), 比重为0.82、粘度4.75、闪点10.7℃、pH值4.5。另一种为零号柴油(市场供应), 闪点78℃。

(2) 湿润剂、展着剂与粘着剂 主要为皂角粉(北京市顺义县农药厂)和甲基纤维素M₄₅₀(上海化学试剂厂)。

(3) 光保护剂 主要有UY-9(中国林科院木材所提供的进口样品)、活性炭(天津市塘沽海滨化工厂)、虫胶色素(云南虫胶厂)。

2. 辅助剂的筛选方法 为阐明各种辅助剂对杨尺蠖幼虫及AciNPV的影响, 单独或与病毒混合对杨尺蠖幼虫进行了感染试验和曝晒试验。各辅助剂使用同一浓度, 重复2—3次, 计40—60头幼虫, 以同样数量未处理幼虫作对照。逐日统计幼虫死亡数, 10d后全部结束, 计算其死亡率及校正死亡率。

(三) 制剂的加工程序及产品检验

1. 制剂的配制加工程序 制剂的加工程序及工艺流程按图1所示。配制前, 先将丙酮—乳糖共沉制备的多角体混合物研磨粉碎过筛(120目), 取样计数确定多角体的含量。配制时, 按一定比例称取各种辅助剂和多角体制备物, 搅拌混合后过筛(80—100目)、分装、密封。要求AciNPV可湿性制剂含量不得少于 12.5×10^9 PIB/g; 用于超低量喷洒的油剂, 干粉含量不得少于 8.33×10^9 PIB/g。

2. 制剂产品检测

(1) 制剂的毒力测定 标准样品与所配制剂的毒力测定, 按作者1983年确定的方法进行^[1], 每种制剂6种浓度, 每种浓度测试60头幼虫, 重复3次, 设未处理对照3个。逐日观察记载死亡虫数, 10d后全部结束, 按常规数理统计方法进行分析。

(2) 制剂的安全性检测 批量产品制剂的微生物检测按Burges等的程序进行^[10]。检查内容包括每克制剂所含好气、厌气微生物和细菌孢子总数, 以及主要致病病原细菌的检测。

二、结果分析

(一) 辅助剂的筛选

为了保证AciNPV加工制剂的分散性、稳定性和持久性, 我们就8种辅助剂对杨尺蠖3龄幼虫, 进行了单独或与病毒混合感染试验。单独试验结果证明(表1), 除填充剂白炭黑、皂土、粉煤灰、白陶土仅引起杨尺蠖幼虫死亡2.5—3.7%, 其它光保护剂和粘着剂等均未引起死亡, 说明上述辅助剂对宿主昆虫均无太大影响。混合感染试验表明(表2), 除甲基纤维素M₄₅₀+NPV的死亡率略低于90%外, 其它均在90%以上。其中尤以白陶土+活性炭+NPV或活性炭+NPV、粉煤灰+NPV为最好。

(二) 阳光对AciNPV的影响与光保护剂混合比例筛选

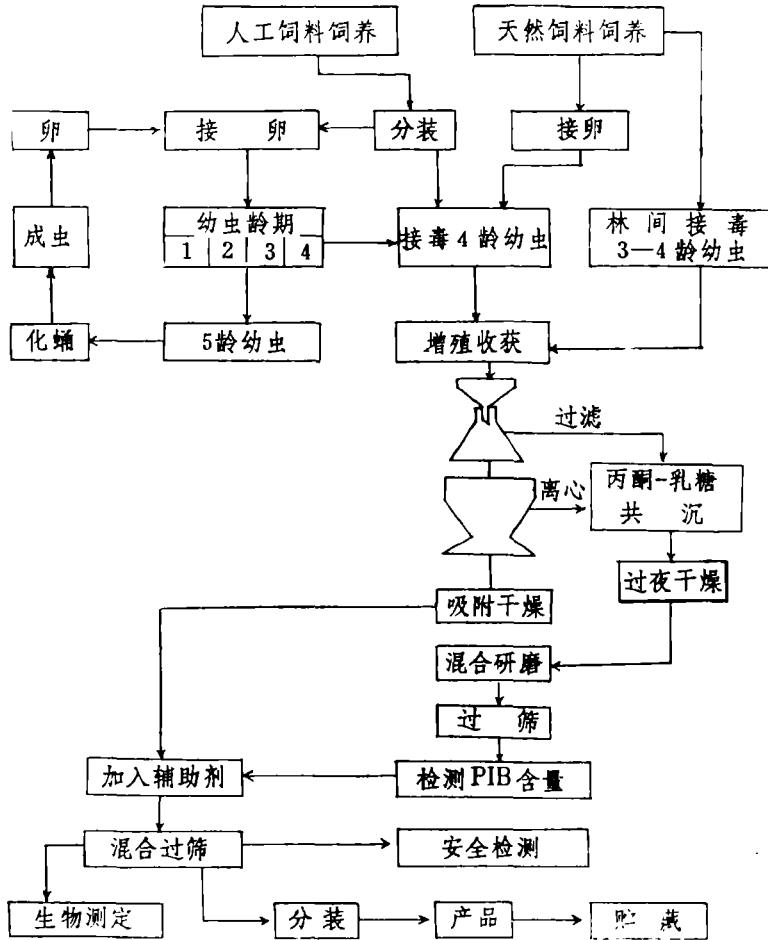


图1 杨尺蠖核多角体病毒制剂生产工艺流程示意

表1 各种辅助剂对杨尺蠖3龄初幼虫的影响 (北京, 1982.4)

辅助剂名称	使用浓度 (mg/ml)	供试幼虫数	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
活性炭	0.1	41	0	0
翠兰	0.05	40	0	0
uy-9	0.01	44	0	0
甲基纤维素M ₄₅₀	0.01	41	0	0
白炭黑	1.00	40	2.5	2.5
皂土	1.00	39	2.6	2.6
粉煤灰	1.00	39	2.6	2.6
白陶土	1.00	58	3.7	3.7

为了探明 AcNPV 在林间的持久性及稳定性, 寻找较好的光保护剂, 作者以提纯 AcNPV 水悬液(未加光保护剂及填充剂)进行了室内外两组试验。一组以 1.7×10^7 PIB/ml 浓度喷洒单株盆栽苗, 处理后分别于 1、2、3 d 后移至室内接虫, 并设有未经阳光曝晒的对照; 另一组结合林间防治试验, 以 2.9×10^6 PIB/ml 浓度喷洒, 经阳光照射 3h、15.5h 后, 任选一株套笼接虫, 观察幼虫的感染死亡率。单株试验结果表明(表 3), 喷毒后一天接虫, 感染死亡率为 90%, 与未经阳光照射的原始活性比较, 其

表 2 各种辅助剂对AciNPV的影响^①

(北京, 1982.4)

处理组合	使用浓度 (PIB/ml)	供试幼虫数	感染死亡率 (%)	校正死亡率 (%)
活性炭+NPV	1.1×10^6	40	95.7	95.7
翠兰+NPV	1.1×10^6	43	93.1	93.1
uy-9+NPV	1.1×10^6	41	92.9	92.9
甲基纤维素M ₄₅₀ +NPV	1.1×10^6	39	89.7	89.7
白炭黑+NPV	1.1×10^6	42	93.5	93.5
皂土+NPV	1.1×10^6	43	93.0	93.0
粉煤灰+NPV	1.1×10^6	26	95.9	95.9
白陶土+活性炭+NPV	2.5×10^6	54	98.3	98.2

① 使用浓度同表 1。

感染死亡率仅降低7.0%；2 d后接虫则降低42.1%；3 d后接虫，活力降低93.1%。林间喷洒试验表明(表4)，阳光照射3 h套笼接虫，对AciNPV的活力无明显影响；照射15.5 h后接虫，其活力降低达41.2%，与单株两天后接虫的试验结果基本一致。由此可见，不加光保护剂的病毒杀虫剂，在林间保持活力的时间仅为两天左右。故喷洒病毒的时间最好在15:00—16:00时至20:00时，4:30时至8:30时亦可。

在光照试验的基础上，为了寻找光保护剂的适当配比，又进行了AciNPV光保护剂不同混合比例的曝晒试验。其方法是在林间喷毒后，经阳光照射8 h，剪取杨树枝叶于室内接虫感染，48 h更换新鲜叶片，观察10 d结束。其结果表明(表5)，病毒与光保护剂的比例以1:10为最好，与未经阳光照射的标准样品相比，仅降低活力9.7%，若与照射的标准样品相比，可提高活力23.8%，LT₅₀约缩短1天多。1:20与1:5两组处理结果差异较小，若与照射的标准样品比较，仍然提高活性9.1—12.0%。由此可见，加入适当比例的光保护剂，可防止阳光照射引起病毒的失活，或增强病毒喷洒后的持久性或稳定性。这一结果，同国内外许多作者的结论基本一致^[6-14]。

表 3 阳光对AciNPV杀虫力的影响

(北京, 1981.4—5.)

阳光照射时间		供试 幼虫数	NPV感染死亡率		OAR ^① (%)
(d)	(h)		死亡数	(%)	
0	0	30	29	96.7	100.0
1	11	30	27	90.0	93.0
2	22	30	17	56.0	57.9
3	33	30	2	6.7	6.9

① OAR = 原始活性残留率(%)

$$= \frac{\text{阳光照射后的死亡率}}{\text{原始死亡率}} \times 100$$

表 4 林间光照对AciNPV杀虫力的影响

(内蒙古, 1981.5—6.)

光照时间 (h)	喷洒剂量 (PIB/亩)	供试 幼虫数	感染死亡率(%)	
			10 d	15 d
3.0	4.1×10^{10}	51	96.1	100.0
15.5	4.1×10^{10}	51	17.0	58.8

表 5 不同比例光保护剂对AciNPV的保护作用^①

(天津宝坻县, 1985.4.)

处理组合	光照 时期 (h)	供试幼 虫数	NPV 死亡率 (%)	OAR (%)	LT ₅₀ (d)
NPV	0	50	96.0	100.0	7.79
NPV	8	47	63.8	66.5	9.83
NPV+活性炭(1:5)	8	57	75.4	78.5	9.62
NPV+活性炭(1:10)	8	45	86.7	90.3	8.81
NPV+活性炭(1:20)	8	62	72.6	75.6	9.80

① 使用浓度为 2.5×10^6 PIB/ml。

(三) Ac1NPV 杀虫剂的配制及生产工艺流程

基于辅助剂的筛选及阳光照射试验，并考虑其经济效益，作者于1982—1985年共配制了可湿性制剂7种和油剂4种，其具体配方比例及生产工艺流程详见图1及表6。

表6 各种Ac1NPV制剂配方比例

(单位: %)

配方编号	制剂名称	主剂 NPV	填充剂及稀释剂						光保护剂		湿润剂
			皂土	白炭黑	粉煤灰	白陶土	二线油	零号柴油	活性炭	皂角粉	
1	BTV-821	1000 ^①	95.0		2.5				2.5		
2	WCV-822	1000		95.0	2.5				2.5		
3	PCV-823	1000			95.0				5.0		
4	TOV-824	200 ^①					(150) ^①		1.0		
5	BWV-831	2.5				85.0			12.5		
6	BWV-832	2.5				84.0			12.5	1.0	
7	BWV-833	2.5				97.5					
8	TOV-835	0.5					(150)		2.5		
9	OCV-841	0.5						(150)	2.5		
10	BWV-861	2.5				72.5			25.0		
11	OCV-862	0.5						(150)	5.0		

①被吸附的多角体总量1000=1×10¹¹ PIB、200=2×10¹⁰ PIB、(150)=150ml，喷洒时每亩加入量。

(四) 制剂产品的检测

1. 制剂的毒力测定 为了明确批量产品制剂的活性，以丙酮—乳糖共沉 Ac1NPV 标准样品与 Ac1NPV、BWV-831 杀虫剂进行了毒力测定比较。整个试验在内蒙古锡盟镶黄旗林场室温条件下进行，其结果列入表7，计算所得直线回归方程及函数图象如图2所示。可见两种制剂无多大差异，致死中浓度(LC₅₀)都为2.84×10³ PIB/ml，95%置信限范围分别在1.70×10³—4.76×10³ PIB/ml或1.43×10³—5.66×10³ PIB/ml之间(表8)。仅斜率(b值)略低于标准样品(图2)。

表7 Ac1NPV标准样品与BWV-831制剂的毒力比较

(内蒙古, 1983.5.)

制剂名称	NPV标准样品			BWV-831制剂		
	供试幼虫数(条)	感染死亡率(%)	校正死亡率(%)	供试幼虫数(条)	感染死亡率(%)	校正死亡率(%)
2.5×10 ⁷	58	100.0	100.0	60	100.0	100.0
2.5×10 ⁶	61	100.0	100.0	54	98.3	98.2
2.5×10 ⁵	64	96.8	96.7	47	81.9	81.3
2.5×10 ⁴	57	67.5	66.4	60	63.8	62.6
2.5×10 ³	51	50.9	49.3	51	44.6	42.8
2.5×10 ²	69	24.8	22.0	52	38.7	36.7
0	63	3.2	0	63	3.2	0

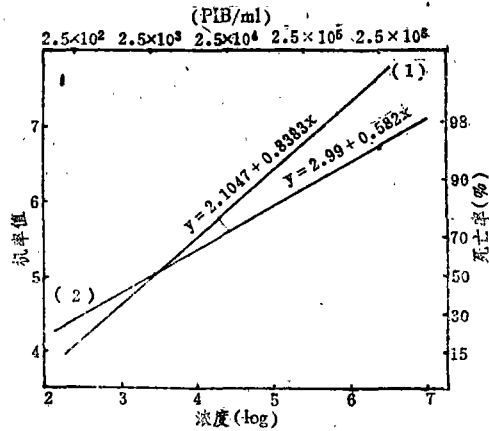


图2 Ac1NPV标准样品与BWV-831制剂的毒力比较
(1) 标准样品 (2) BWV-831

表 8 两种样品感染 3 龄初幼虫死亡 30—90% 所需浓度及其 95% 置信限

制剂名称	死亡率 (%)	感染浓度 (PIB/ml)	95% 置信限	
			下 限	上 限
AciNPV 标准样品	30	6.81×10^2	3.83×10^2	1.20×10^3
	50	2.84×10^3	1.70×10^3	4.76×10^3
	70	1.19×10^4	7.28×10^3	1.93×10^4
	90	9.57×10^4	4.57×10^4	2.00×10^5
AciNPV BWV-831 杀虫剂	30	3.63×10^2	1.25×10^2	1.05×10^3
	50	2.84×10^3	1.43×10^3	5.66×10^3
	70	2.22×10^4	1.09×10^4	4.54×10^4
	90	4.50×10^5	1.67×10^5	1.21×10^6

与此同时, 还对配制的 11 种制剂中的 9 种制剂, 进行了较大面积的林间防治试验, 杨尺蠖幼虫的感染死亡率及虫口密度下降均在 85—95% 之间^[4]。从加工程序、防治效果及经济效益等几方面来衡量, 其中以 3 种可湿性制剂 (BWV-831、BWV-833、BWV-861) 和 3 种油制剂 (TOV-835、OCV-841、OCV-862) 较好, 目前已用于生产防治。

2. 制剂的安全性试验及有害微生物检测 为了确定 AciNPV 杀虫剂实验室批量产品的安全性, 委托天津市卫生防疫站, 按我国“农药管理毒性试验方法暂行规定 (试行)”, 并参照联合国粮农组织农业研究报告

^[9], 以及细菌杀虫剂的安全试验及注册指标^[10], 对 9 种脊椎动物, 2 种脊椎动物细胞系和 1 种无脊椎动物细胞系, 进行了较全面的安全性试验, 并对制剂中的有害微生物进行了检测。

(1) AciNPV 对脊椎动物的安全性试验 对小鼠、黄雀、金鱼、牛羊、鸡等 6 种动物的急性口服毒性试验, 其中除金鱼以 $0.5 \text{ g}/10\,000 \text{ ml}$ ($2.0 \times 10^9 \text{ PIB/ml}$) 接触 48 h, 其它均按 0.5 g/kg (或 $2.5 \times 10^{10} \text{ PIB/kg}$) 体重剂量一次灌胃接毒。观察期限, 牛羊为 52 d, 其它均为 21 d。试验证明, 除少数小鼠因非试验因素死亡外, 其它动物均未发现死亡和中毒症状。其体重、体温及食物利用率与对照无明显差异。牛羊脏器经病理学检查, 也未发现异常。粪便电镜观察证明有多角体排出。

急性皮肤毒性试验证明, 以 $1.0 \times 10^{10} \text{ PIB/ml}$ 或 $2.0 \times 10^9 \text{ PIB}$ 病毒粒子/ml 浓度涂抹裸露皮肤, 除试验组动物的体重增加与对照组略有差异外 (但无显著性差异 $P > 0.05$), 食物利用率、体温、脏器比均无差别。对皮肤无刺激症状, 主要脏器无病变。急性吸入毒性试验证明, 除实验组 1 只大鼠死于非试验因素外, 其它动物在增重、体温、食饵效应及脏器比等方面, 均属正常范围, 无过敏反应。眼刺激试验证明, 动物表现正常, 眼粘膜无明显刺激症状。亚慢性多剂量 90 天饲喂试验证明, 动物的行为表现, 食饵效应、体温、增重及生化血象等均属正常, 主要脏器病理学检查, 未见特异性病理改变。致突致畸试验表明, 经沙门氏菌致突变实验、小鼠骨髓细胞微核实验及小鼠睾丸染色体畸变试验, 均未显示有致突变活性。与此同时, 还就 AciNPV 的多角体和病毒粒子, 接种原代人胚肾细胞 (HR)、传代非洲绿猴肾细胞 (Vero) 和蚊肠上皮传代细胞 (C 6 / 36), 并连续传代 3 次, 最后一代于光学和电子显微镜下观察, 未见细胞病变, 证明无侵染性。由此可见, AciNPV 的特异性较强, 对脊椎动物是安全的。这与国内外许多作者, 对杆状病毒科的其它 NPV 实验结果相一致。

(2) 制剂的安全性检测 按细菌杀虫剂的安全试验及注册指标程序^[10], 对实验室批量产品进行了检测。结果未发现任何与人有关的致病菌。如大肠杆菌、沙门氏杆菌 (*Salmonella*)、志贺氏杆菌 (*Shigella*)、弧菌 (*Vibrio*)、链球菌 [*Staphylococcus (coagulase positive)*]、梭状 (破伤风) 杆菌 (*Clostridium*) 等。而杂菌含量仅为 10^4 — $10^6 / \text{g}$, 比美国舞毒蛾 NPV 批量产量制剂 1.3×10^7 — $4.6 \times 10^9 / \text{g}$ 要低得多^[11], 可能与杨尺蠖幼虫感染发病期温度较低 (18°C 左

右)有关。

(五) AciNPV杀虫剂生产成本概算

为了比较实验室批量产品制剂的经济效益,分别就两种剂型的产品成本进行了初步估算。AciNPV可湿性制剂材料工本及设备折旧费约0.13元/亩;油剂为0.16元/亩。比常规化学农药费用0.41—1.12元/亩、生物农药(7216)费用1.40元/亩,大约低61.0—91.0%,由此可见,所配制剂无论从杀虫效果或是经济效益方面衡量,都是令人满意的。

参 考 文 献

- [1] 王贵成等, 1983, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 I. 病毒的活性测定, 林业科学昆虫专辑, 37—41.
- [2] 王贵成等, 1983, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 II. 林间防治试验效果, 林业科学昆虫专辑, 42—48.
- [3] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 III. 病毒的增殖及活性测定, 林业科学, 24(2):170—176.
- [4] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 IV. 病毒的回收试验, 林业科学研究 1(2):162—168.
- [5] 张友清等, 1983, 棉铃虫核多角体病毒(NPV)光保护剂的筛选和西维因增效作用的研究, 微生物学报, 10(3): 101—103.
- [6] 刘岱岳, 1983, 开发天敌病毒用于防治, 生物防治(五), 科学技术文献出版社重庆分社, 12—30.
- [7] Burges, H. D. (Ed), 1981, Microbial control of pest and plant diseases 1970—1980, Academic press (London), 313—440.
- [8] Kurstar, E. (Ed), 1982, Microbial and virus pesticides, Inc. New York and Basel, 335—386.
- [9] FAO and WHO, 1973, The use of viruses for the control of insect pests and disease vectors, FAO of The United Nations (Rome), 38—48.
- [10] Burges, H D. et al., 1982, Guidelines for safety tests and registration of bacterial pesticides, Entomophaga, 27(3):225—236.
- [11] Podgwaiti, J. D. et al., 1983, Microorganisms associated with production losses of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, Entomophaga, 28(1):9—10.

STUDIES ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF THE POPLAR LOOPER (*APOCHEIMA CINERARIUS*)

V. PREPARATION AND PRODUCT DETECTION OF ACINPV FORMULATION

Wang Guicheng Wang Zhixian Cui Shiyong Yu Zailing

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract

The present paper reports the processing techniques of the formulation of nuclear polyhedrosis virus of *Apocheima cinerarius*, and its detection of safety. New formulation of the AcINPV were made by incorporating the preparation of polyhedrals inclusion bodies (PIB) with sunlight protectant and other adjuvants in a blend screen of electroshak. Bioassays tests indicated that samples of the acetone-precipitation and new formulations of virus were very effective for early third-instar larvae. The LC_{50} and 95% fiducial limits were 2.84×10^3 PIB/ml, 2.84×10^3 PIB/ml, and $1.70 \times 10^3 - 4.76 \times 10^3$ PIB/ml and $1.43 \times 10^3 - 5.66 \times 10^3$ PIB/ml respectively.

Several powder formulations were directly diluted with water and mineral oil (NO. 0 diesel oil) when used in the field. The tests conducted on small plots and large blocks showed that several formulations of AcINPV were effective for the poplar looper 2—3 instar larvae in forest field. The mortality of poplar looper larvae was over 85% in 12—15 days.

Safety tests showed that formulation of AcINPV was not hamper to domestic animals and did not cause mutation. It was safety for man. Bacteriological detection proved that pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli*, *Salmonell*, *Vibrio*, and *Clostridium* were cultured without isolation.

Key words: poplar looper (*Apocheima cinerarius*); nuclear polyhedrosis virus; virus formulation; safety detection