

松毛虫质型多角体病毒杀虫剂 杂菌含量检测及控制方法研究*

高志和 陈昌洁 王志贤 陶 粮

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 对松毛虫质型多角体病毒杀虫剂中的杂菌检测表明, 制剂中不含高等动物致病菌, 细菌不再继续增殖。抑灭菌试验表明, 适当浓度的洗必泰、洁尔灭、磺胺及苯甲酸钾等对制剂中的真菌有控制效果。用丙酮按1:1处理离心沉淀物使制剂中的杂菌含量减少了1 000倍。用等量过饱和乳糖丙酮处理离心沉淀物可获得粉剂。经测定, 除叠氮钠处理的制剂外, 其它处理在毒力上与对照无差异。

关键词 松毛虫; 质型多角体病毒杀虫剂; 杂菌; 检测; 控制

松毛虫质型多角体病毒杀虫剂, 目前主要采用活虫复制、捣碎、过滤、差速离心的方法提取^[1,2], 制成水悬液。在保存过程中与粉剂不同^[3-6], 它具备了水这一杂菌生长的必要条件。因此, 检测储存过程中杂菌的增殖情况, 研究并提出有效的控制措施, 是防止杂菌对制剂质量产生影响的关键。以往对微生物杀虫剂除要求不含高等动物致病菌外, 总是限定所含杂菌的可接受水平^[6], 而未考虑杂菌是否继续增殖。本文以松毛虫质型多角体病毒杀虫剂为材料, 检测高等动物致病菌、杂菌含量及增殖情况, 并提出了控制杂菌增殖的有效措施。

1 材料和方法

1.1 制剂的制备

取接种后中肠变白的病虫, (经腐熟)按1:1加水捣碎, 按1:10加水过滤。300~500 rpm、30 s 弃沉淀, 4 000 rpm、15 min 弃上清液, 反复两次, 沉淀悬浮于水中保存备用。

1.2 致病菌的检测

制剂接种于PBP, 置37℃培养4~6 h, 同时直接分离于S. S 麦康开和碱性琼脂平板, 培养24 h。从PBP取0.1、1 ml 转接于R₁₀和KWP, R₁₀于42℃培养20 h, KWP于37℃培养24 h, 然后同上分离。

1.3 杂菌含量及其增殖情况, 抑灭菌剂对杂菌的效果检测

选用多角体(CPB)含量为50~200亿(适于每亩用量)为一个小包装的制剂, 于28℃放置8天检测杂菌含量, 同时设对照。制剂中加各种抑灭菌剂, 终浓度分别为0.2%、0.02%、0.002%叠氮钠, 0.1%、0.01%、0.001%磺胺, 0.01%、0.001%洁尔灭, 0.003%、

本文于1989年8月7日收到。

*北京市卫生防疫站路文彬先生协助致病菌的检测, 本院王贵成先生提供部分试虫, 特此致谢。

0.000 3 % 盐酸洗必泰, 28 °C 放置 15 天检测杂菌含量, 同时设对照。样品经 TZ-3 型台式旋转振荡器 160 rpm、30 min, 按范秀容介绍的方法^[7], 检测杂菌含量及抑灭菌效果。培养基选用 SDA + Y 培养基(真菌)^[8]和肉汤蛋白胨培养基(细菌)。

为验证抑灭菌剂的效果, 取自制剂分离所得、增殖后悬浮均匀的真菌, 加少量 SDA + Y, 再加各种抑灭菌剂, 终浓度分别为 0.02 %、0.01 %、0.005 %、0.002 % 叠氮钠, 0.01 %、0.005 %、0.002 5 %、0.001 % 磺胺, 0.01 %、0.001 % 洁尔灭, 0.003 %、0.000 3 % 盐酸洗必泰, 于 28 °C 放置 8 天后检测含菌量, 同时设对照。检测方法同上。

1.4 感病幼虫中肠中杂菌基数的检测

取病变典型的活虫中肠, 经加工(研磨)后检测杂菌含量。方法同前。

1.5 苯甲酸钾与磺胺对杂菌效果比较

方法同前。

1.6 丙酮处理对杂菌的影响及对制剂性状的影响

用 0.1、0.35 ml 丙酮分别处理离心沉淀物 420 mg, 搅动 15、30 min, 检测杂菌含量, 同时设对照。检测方法同上。参考王贵成等^[4]的试验方法, 用过饱和乳糖丙酮(2.6 g/100 ml)按体积湿重比为 1:1 及 0.5:1 处理离心沉淀物, 过夜后观察制剂性状, 同时设对照。

1.7 抑灭菌剂对制剂毒力的影响

1.7.1 供试昆虫 舞毒蛾(*Lymantria dispar*), 3 龄虫采自林间, 经室内观察无死亡后作试虫。其余为人工饲料饲养的舞毒蛾, 适应取食天然饲料后作试虫。

1.7.2 病毒悬液 将各种处理的制剂稀释成 1×10^8 及 1×10^7 CPB/ml。

1.7.3 感染程序 用 1/10 000 洗衣粉清洗大小一致的杨树叶, 阴凉处风干。将各种处理的制剂分别等量均匀地涂于叶面上, 阴凉风干。喂养饥饿 24 h 的试虫。

1.7.4 检查方法 每天更换饲料, 收集死虫, 观察典型症状结合镜检确认是否为 CPV 所致。同时设对照。

2 结果与分析

2.1 致病菌的检测

在松毛虫质型多角体病毒杀虫剂中, 未检测出与人有关的霍乱及副霍乱弧菌、沙门氏菌、志贺氏菌。证明该制剂不含致病菌。

2.2 杂菌增殖情况及抑灭菌剂对杂菌的控制效果

在常温条件下, 制剂中的细菌不再增殖(表 1, 2), 而真菌总数无论在 28 °C 保存 8 或 15 天(表 1~3), 还是在 4 °C 保存 60 天(表 2), 均有增多现象。文中所列的抑灭菌剂对制剂中的真菌及高含量真菌均有控制效果(表 2, 3)。抑灭菌试验结果表明, 0.02 % 叠氮钠、0.01 % 磺胺、0.001 % 洁尔灭、0.003 % 盐酸洗必泰均可抑灭制剂中的真菌。又经苯甲酸钾与磺胺比较发现, 0.01 % 苯甲酸钾对制剂中真菌的效果比 0.1 % 磺胺好, 两者只对处于代谢活动状态下的某些生物有作用, 故为理想的抑灭杂菌剂。各种抑灭菌剂的使用浓度很低, 几乎不影响制剂的成本。

杂菌基数的检测结果为, 当多角体含量为 36.1×10^8 个/ml 时, 细菌含量为 1 240 个/ml, 真菌含量为 0。由此可知, 制剂中的细菌含量(细菌/CPB)比加工前增加了 10 000 倍以上, 制

表1 常温下制剂中杂菌的增殖情况

处理项目	病毒含量		细菌		真菌 ^①		
	(CPB/mL)	适宜稀度	平均菌落数 (个/皿)	总菌数 ($\times 10^6$ 个/mL)	适宜稀度	平均菌落数 (个/皿)	总菌数 ($\times 10$ 个/mL)
处理前	40×10^8	10^{-6}	72.3	362	10^{-1}	3.5	17.5
28℃/8d	40×10^8	10^{-6}	43.0	215	10^{-1}	9.5	47.5

① 于SDA+Y培养基增殖后,经虫体体表和添食松毛虫接种,未发现致病性。

表2 28℃/15d 抑灭菌剂对杂菌的效果

抑灭菌剂终浓度 (%)	病毒含量 (CPB/mL)	细菌			真菌 ^①		
		适宜稀度	平均菌落数 (个/皿)	总菌数 ($\times 10^5$ 个/mL)	适宜稀度	平均菌落数 (个/皿)	总菌数 ($\times 10^5$ 个/mL)
叠氮	32×10^8	10^{-5}	62.0	31.0	10^{-1}	0	0
氮	32×10^8	10^{-5}	69.1	34.7	10^{-1}	0	0
钠	32×10^8	10^{-5}	54.0	27.0	10^{-3}	28.0	140
碘	32×10^8	10^{-5}	56.0	28.0	10^{-1}	0	0
胺	32×10^8	10^{-5}	56.0	28.0	10^{-1}	0	0
胺	32×10^8	10^{-5}	62.5	31.3	10^{-3}	26.0	130
处理前	32×10^8	10^{-6}	28.5	14.3	10^{-1}	4.5	0.225
对照 1	32×10^8	10^{-5}	60.3	30.2	10^{-2}	35.5	17.8
对照 2	32×10^8				10^{-3}	50	250

① 除处理前及对照 1 外,其它样品又经冰箱保存 60 天。

表3 28℃/8d 抑灭菌剂对高含量真菌的效果

抑灭菌剂	终浓度 (%)	适宜稀度	平均菌落数 (个/皿)	总菌数 (个/mL)
洁尔灭	0.01	10^{-1}	0	0
	0.001	10^{-1}	0	0
洗必泰	0.003	10^{-1}	0	0
	0.0003	10^{-2}	72.3	3.62×10^4
对照 (28℃/8d)	10^{-4}	21.0		105×10^4
	0.02	10^{-2}	0	0
叠氮钠	0.01	10^{-2}	0	0
	0.005	10^{-2}	0	0
	0.002	10^{-2}	0	0
	0.01	10^{-4}	23.5	118×10^4
碘胺	0.005	10^{-4}	46.0	230×10^4
	0.0025	10^{-4}	46.0	230×10^4
	0.001	10^{-4}	45.0	225×10^4
对照 (28℃/8d)	10^{-4}	44.5		223×10^4
冰箱保存	10^{-4}	13.0		45.0×10^4

剂中所检出的真菌为污染、增殖的结果。

2.3 丙酮对杂菌含量及制剂性状的影响

用丙酮处理制剂可降低杂菌含量。当体积湿重比达 1:1 时,不仅使全部真菌丧失生物活性,且使杂菌总量降低 3 个对数值。经丙酮处理后,制剂中多角体与杂菌的数量比值约为 1.4×10^4 ,这与某些粉剂相当^[3,9]。获得 100 亿多角体的丙酮用量为 1ml,与加工等量多角体粉剂的丙酮损失量相当^[4]。增加离心次数不能使杂菌含量减少(表 4)。用过饱和乳糖丙酮按体积湿重比 1:1 处理离心沉淀物,可获得粉剂,而用等量丙酮及 1/2 量过饱和乳糖丙酮处理未能得到粉剂(表 5)。

2.4 活性测定

生测结果表明,除叠氮钠外,未发现抑灭菌剂对制剂毒力有影响(表 6)。比较表 2、3 中叠氮钠对杂菌的效果可看出,当样品中

含有病毒时, 其对杂菌的效果不如样品中没有病毒时好, 这可做为叠氮钠对病毒活力有影响之旁证。因为叠氮钠作用于病毒后, 使其对杂菌的有效浓度有所减少。

表 4 丙酮对制剂中杂菌的效果

丙酮用量 (ml)	病 毒		细 菌			真 菌		
	含 量 (CPB/ml)	湿 重 (mg/ml)	适宜 稀度	平均菌落数 (个/皿)	总 菌 数 ($\times 10^6$ 个/ml)	适宜 稀度	平均菌落数 (个/皿)	总 菌 数 ($\times 10$ 个/ml)
0.1	40×10^8	420	10^{-6}	35.5	178	10^{-1}	1.0	5.0
0.35	40×10^8	420	10^{-3}	58.0	0.29	10^{-1}	0	0
对 照	40×10^8	420	10^{-6}	69.5	348	10^{-1}	3.0	15.0
离心一次	40×10^8	420	10^{-6}	72.3	362	10^{-1}	3.5	17.5

表 5 过饱和乳糖丙酮(过夜)对制剂性状的影响

处 理 方 法	制 剂 病 毒 含 量		性 状
	(CPB/ml)	(mg/ml)	
过饱和乳糖丙酮(体积):制剂(湿重)=1:1	40×10^8	420	粉 状
过饱和乳糖丙酮(体积):制剂(湿重)=0.5:1	40×10^8	420	湿粘、结块
丙酮(体积):制剂(湿重)=1:1	40×10^8	420	湿粘、结块

表 6 各种样品对舞毒蛾的活性测定

抑灭菌剂终浓度 (%)	处理时间 ($^{\circ}\text{C}/\text{d}$)	供试 虫数 (头)	虫 龄 (龄)	接毒浓度 (CPB/ml)	20 d 累计 死亡 率 (%)	LT50 (d)	处理时间 ($^{\circ}\text{C}/\text{d}$)	供试 虫数 (头)	虫 龄 (龄)	接毒浓度 (CPB/ml)	20 d 累计 死亡 率 (%)
洁尔灭0.01	28/10	50	3	1×10^6	60.9	18.52	28/10~4/40	15	5 初	1×10^7	53.3
盐酸洗必泰0.003	28/10	50	3	1×10^6	56.5	18.89	28/10~4/40	15	5 初	1×10^7	60.0
对 照	28/10	50	3	1×10^6	60.9	17.84	28/10~4/40	15	5 初	1×10^7	60.0
叠氮钠0.02	28/15~4/365	50	3	1×10^6	26.1	—	28/15~4/365	15	5 初	1×10^7	20.0
磺胺0.1	28/15~4/365	50	3	1×10^6	63.0	17.69	28/15~4/365	15	5 初	1×10^7	66.7
对 照	28/15~4/365	50	3	1×10^6	60.9	18.37	28/15~4/365	15	5 初	1×10^7	60.0
健 虫	—	46	3	—	0	—	—	15	5 初	—	0

3 讨 论

松毛虫质型多角体病毒杀虫剂中的细菌不再增殖属首次报道。这表明, 细菌主要起破坏昆虫组织, 释放病毒的作用, 因此不会影响制剂中病毒的质量。至于细菌总数略有减少, 则为自身消耗或环境不适所致。由于真菌能继续增殖, 其必然以制剂中的成份为营养原, 产生代谢产物。因此, 在制剂保存过程中有必要控制真菌增殖。对于微生物杀虫剂, 特别是病毒杀虫剂, 只要不含高等动物致病菌, 杂菌不增殖, 就不必限定所含杂菌的可接受水平。

用过饱和乳糖丙酮处理离心沉淀物, 得到了粉剂。该法为制剂生产提供了与常规方法^[3~6]不同的加工途径。它比传统法多了离心步骤, 但大大节约了丙酮, 简化了处理, 省去了回收程序, 但制剂经丙酮处理后活性是否受影响有待测定。

参 考 文 献

- [1] 吕鸿声, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社, 365。
- [2] 陈昌洁等, 1988, 赤松毛虫质型多角体病毒的引进和利用研究, 林业科学研究, 1(1):14~24。
- [3] Podywaite, J. D. et al., 1983, Microorganisms associated with production losses of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, *Entomophaga*, 28(1): 9~16。
- [4] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 IV. 病毒多角体的回收试验, 林业科学研究, 1(2):162~168。
- [5] 曾云添等, 1987, 油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的安全检测, 病毒学报, (4):49~53。
- [6] Burges, H. D. et al., 1982, Guideline for safety tests and registration of bacterial pesticides, *Entomophaga*, 27(3): 225~236。
- [7] 范秀容等, 1985, 微生物学试验, 高等教育出版社, 31、52~53。
- [8] George O. Poinar, Jr. et al., 1978(段道怀等译, 1983), 昆虫病原物鉴定诊断手册, 农业出版社, 123。
- [9] 王贵成等, 1988, 杨尺蠖核多角体病毒的研究 V. Aci NPV 杀虫剂的研制及产品检测, 林业科学研究, 1(5): 508~514。

*Detections on the Other Microbial Contaminants in
the CPV Insecticide for Pine Caterpillar and
Studies on the Control Methods*

Gao Zhihe Chen Changjie Wang Zhixian Tao Liang

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract The results of detections on the microbial contaminants in CPV agent for Pine Caterpillar (*Dendrolimus* spp.) showed that there were not enteric pathogenic microorganisms for human beings in the agent, the germ in the agent was not generative and the fungus in the agent could be controlled by inhibitors and disinfectants practiced in the test. The microbial contaminants in the agent were decreased by a thousand times when the pellet of the agent was treated with acetone, volume/wet-weight = 1:1. A powder was easily obtained through treating the pellet of the agent with supersaturated-lactose-acetone in the ratio of 1:1. The results of bioassay showed that the treated and untreated agents did not indicate any evident difference in pathogenicity except the sample treated with sodium azide.

Key words Pine Caterpillar; CPV insecticide; other microbial contaminants; detection; control