

# 苏芸金杆菌制剂的生产和应用

吴继星 陈在悒

(湖北省天门县微生物研究所)

## 一、苏芸金杆菌制剂的生产

苏芸金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 1930 年前后用于生物防治, 最早的商品制剂 Sporeine 于 1938 年在法国开始生产。1960 年后, 美、苏、加、捷、比等国相继投产。目前, 商品制剂已达 20 多种。

我国自 1959 和 1961 年先后引进苏芸金杆菌和青虫菌, 1970 年前后, 在湖北、上海、湖南、河北等省市建立起生产苏芸金杆菌制剂的专门工厂或车间。

苏芸金杆菌制剂的生产方法主要有液体深层发酵

和半固体发酵两类。前几年我国农村社队普遍推行的利用工业菌粉接种的一步扩大法也是行之有效的。当代大规模生产都采用液体深层发酵法。为了获得高质量的制剂, 国内外都十分强调生产中如下六个重要环节:

### (一) 选用优良菌种

大量研究表明, 苏芸金杆菌不同变种的杀虫范围、生产性能和杀虫毒力差异很大; 同一亚种的不同菌株也有差异。

1. 品系选择: 在选用生产用菌种时, 各工厂常根

据菌种的血清型、培养特征和对不同对象害虫的致病力等指标进行选择。如比利时生化制品公司与法国巴斯德研究所合作,选种时以血清型为基础,主要选用血清型 H<sub>1</sub> 作为菌剂 Bacto:pcine 的生产菌种。美国国际矿物化学公司等大都选用 H<sub>3,3b</sub> 的库斯塔克亚种(HD-1),较著名的菌剂有 Thuricide、Dipel、Biotrol 等。苏联常选用 H<sub>3,3b</sub> 的蜡螟亚种和 H<sub>4,4b</sub> 的松毛虫亚种。我国大多数工厂则选用 H<sub>3,3b</sub> 的 7216 和 HD-1 及 H<sub>3,3b</sub> 的青虫菌亚种。荷兰壳牌国际研究所<sup>[10]</sup>曾提出用几种不同品系分别进行发酵,并把不同发酵产物混合起来。目前,国外许多学者已倾向于直接将产品与防治对象挂钩,即根据不同对象害虫而采用不同亚种进行生产。投产菌种的选择,除按常规方法考核外,还需通过生物测定选取毒力最强的菌株。在美国<sup>[11]</sup>,HD-1 品系就是用生物测定法测知其对红铃虫的毒力比其它商品制剂高约 20 倍而评选出来的。

2. 菌种选育: 随着苏芸金杆菌制剂的推广应用,单纯依靠从自然界寻找新的菌株已不能满足生产实际的要求。因此对原有菌加以改良选育已成为苏云金杆菌研究的一个重要课题。

除采用常规自然分离和通过寄主传代的方法外,利用诱变选育也有一些成功的例子。在养蚕国家和地区,希望选择对家蚕低毒而对害虫保持高效的菌株。如结泽<sup>[12]</sup>等采用紫外线照射、改变培养法和利用溶源性噬菌体等途径获得一些对蚕低毒而对白纹粉蝶、小菜蛾、美国白蛾、二化螟等害虫毒力高的菌株。Nishii-tsutsuji-UWO<sup>[13]</sup> 等用 0.1% 的亚硝基胍(MNNG) 处理两个变种,获得 5 个完全不形成芽孢而晶体形状却很规则的突变体,其杀虫活性大体与原株相同。张用梅<sup>[14]</sup>等采用相似的方法,获得无孢子突变株、产棕色色素突变株、生化反应突变株共 21 株,其中 9401 株对粘虫毒力是出发菌毒力的 13 倍。Norris 用紫外线照射菌种后,选育出对大菜粉蝶毒力提高 7 倍的多晶体突变株。

利用转导、转化等遗传学技术选育的菌株也有人进行了尝试。Reeves<sup>[15]</sup> 用 *thuringiensis* 亚种作给体,用 *finitimus* 亚种作受体。前者对粉纹夜蛾和家蝇毒力强、后者则很弱。通过转化获得的菌株对粉纹夜蛾毒力提高了 3—5 倍,对家蝇的致死率由原株的 4% 提高到 20—30%。

值得注意的是,国内外正在尝试用基因工程技术来选育高毒菌株。如果此项工作有所突破,必将大幅度改进苏芸金杆菌的杀虫毒力及其它性能。

## (二) 适宜的培养基

为获得高质量的发酵产物,各国都进行了广泛研究。Megna 认为培养基中总固体营养物质以 3—4% 为好。其典型培养基为: 糖蜜 1.86%, 玉米浆 1.7%, CaCO<sub>3</sub> 0.1%, 棉籽饼粉 1.4%。最终发酵液含活孢子 20—50 亿/ml。研究者十分强调碳氮平衡,认为碳氮

比例不平衡将导致芽孢形成不完全,要求可利用的碳源和氮源应同时耗尽或至少两者耗尽时间之差不超过 6 小时。Drake 等则认为总固体营养物质以 6—10% 为宜。最终发酵液含活孢子 140 亿/ml。我国大多采用低浓度配方,含活孢子 25 亿/ml 左右。近两年,湖北省天门县微生物所采用高浓度配方(总固体营养物质为 11.6%),发酵液含菌量 100 亿/ml 以上。

## (三) 严格控制培养条件

国外报道的苏云金杆菌发酵培养温度多数为 30℃,温度管理采用自动控制。天门县微生物所在“7216”菌剂生产中采用 33—35℃,菌体增殖快、生长周期短且无退化现象。荷兰专利提出,发酵液维持 pH 6.3—7.0,可防止芽孢形成末期以前因深层通气培养引起的细胞过早自溶。通气量的大小与搅拌直接影响生长速率、菌数、芽孢和晶体数量。捷克 Vankova 等报道通气量为 1/2,搅拌次数 300 转/分。指出良好的通气和搅拌有利孢子形成。

## (四) 严格防止噬菌体的污染

在国内外的生产中都发现噬菌体感染<sup>[17,18]</sup>,据研究,血清型 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub> 中有较多对噬菌体敏感的菌株,而血清型 H<sub>3</sub> 中的菌株抗噬菌体能力较强。有人认为溶源性菌株是此菌制剂生产中噬菌体的重要来源。另一些人则认为菌种溶源性与其杀虫力有某种联系,淘汰溶源性菌株必须慎重。沙棧云<sup>[19]</sup>等建议,结合本地区噬菌体情况进行多噬菌体筛选抗株,菌株轮换使用及环境卫生措施,就能防止噬菌体侵袭。

## (五) 采用先进的后处理工艺

通常将发酵液经浓缩干燥制成粉剂或其它剂型,以适于保存、运输和使用。国外大都生产可湿性粉剂。捷克是将离心后菌块用水稀释成乳浆状,加入 5% 的烷基-磺酸盐作增湿剂混匀后喷雾干燥。苏联曾报道在菌剂气流干燥前添加 0.8% 的食盐,此干燥品可长期保存,而且杀虫成分和活孢子在干燥中都不损失。

为适应各种用途,保证或提高防效,已研制出各种剂型,有液剂、可湿性粉剂、粉剂及颗粒剂等,还加入各种添加剂如填充剂、增效剂、展着剂、粘着剂、乳化剂及保护剂。比利时生化制品公司生产乳剂,生物效价为每毫克 6 千国际单位,比重为 1 左右,在液相中极均匀、粘着性能良好。此公司还发展了一种颗粒剂。其活性物包含在颗粒内部,使用时不怕雨淋,包含在颗粒内的有效物质是逐渐释放,故能大大延长持效期。

## (六) 建立制剂产品质量检验标准

五十年代初,一般都采用制剂的芽孢数作为产品质量的主要标准,随着研究和应用实践的不断深入,人们发现制剂的毒效与产品中所含芽孢数并不一定成正比。因此仅测定芽孢数显然不能正确反映菌剂的杀虫毒力。只有用防治对象昆虫的毒力测定作重要指标,同时考虑菌剂芽孢数及各种物理性能指标,才能正

确反映产品的质量。

1966年在荷兰瓦金尼根召开的国际病理学和微生物防治会议上,对该菌制剂标准化进行了专门讨论,并推荐法国巴斯德研究所的制品 E-61 为国际标准化制剂,定其效价为 1000 国际单位(I.U.)/mg<sup>[2]</sup>。1971年,美国以 E-61 作为比较根据,用 HD-1 品系制成菌剂“HD-1-S-1971”,规定其毒力为 18,000 国际单位(I.U.)/mg,并于 1972 年定为美国法定的标准制剂<sup>[12]</sup>。选用什么昆虫作为生测对象,是至关重要的。在 1970 年第四届国际昆虫病理学会上,有人建议用粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)幼虫作为苏芸金杆菌毒效的生测昆虫<sup>[13]</sup>。我国中山大学<sup>[14]</sup>用家蚕蚁蚕对本国六个该菌产品进行了毒力测定,发现蚁蚕对菌剂的受毒剂量死亡反应较稳定,与菜青虫、稻纵卷叶虫、马尾松毛虫的受毒反应呈正相关。苏联同时以法国 E-61(H<sub>1</sub>)、E-1195(H<sub>4</sub>)、E-968(H<sub>2</sub>)作为本国几种相应菌剂的标准。日本也在进行研究。如果每个国家的标准制剂都与某一国际商定标准(如 E-61)相联系,则可达到国际化的目的。

## 二、苏芸金杆菌在害虫防治上的应用

苏芸金杆菌制剂对鳞翅目、双翅目、鞘翅目、膜翅目、直翅目中大约 200 种昆虫有毒效。法国 Roger Bellon 实验室和比利时生化制品公司证实该菌对 560 种以上的鳞翅目昆虫均有效。虽然如此,但真正在田间使用的防治对象并不多。

在美国,除应用于森林、行道树和观赏植物外,还获准用于防治 20 种以上的农作物和果树上的至少 23 种害虫。在菜粉蝶、小菜蛾、玉米螟、棉铃虫、烟青虫等昆虫上应用较广泛。法国主要用于防治蔬菜、果树、森林害虫及玉米螟。苏联主要防治西伯利亚松毛虫等森林害虫及蔬菜、果树害虫。

我国用于防治农林果蔬菜害虫达 20 多种。主要有稻苞虫、稻纵卷叶螟、玉米螟、高粱条螟、甘薯天蛾、棉小造桥虫、茶毛虫、烟青虫、豆天蛾、菜青虫、小菜蛾、茶尺蠖等,防效均在 80% 以上<sup>[15,16]</sup>。天门杆菌(7216)用 0.5—1 亿/ml 浓度防治棉铃虫效果可达 80% 以上。近几年,以 0.05—0.5 亿/ml 浓度成功进行了飞机喷洒防治松毛虫等森林害虫。湖北安陆县用武汉杆菌(140)与白僵菌配合使用,连续 6 年控制了 30 万亩松林中松毛虫的为害。

苏芸金杆菌制剂的应用技术已有不少研究。在田间应用上,应用技术是最重要的但又是常被人们忽视的问题。实践中常因各种综合因素影响防治效果。

### (一) 菌剂的类型和质量

同一亚种的菌剂对不同害虫的毒效有差异,不同亚种的菌剂对同种害虫的毒效也有差异,甚至同一亚种的不同菌株也存在差异。Morris<sup>[17]</sup>研究过五种该

菌商品制剂对几种森林昆虫的毒力,证明目前的商品制剂对不同昆虫的效果差异很大。中国科学院动物研究所<sup>[18]</sup>选用血清型 H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>4</sub>、H<sub>5</sub> 四个血清型 10 个菌株对粘虫、棉铃虫、玉米螟进行了毒效比较研究,表明同一菌株对不同昆虫、不同菌株对同种昆虫、甚至同一血清型中不同菌株其毒效差异均很明显。因此,评价各亚种所特有的杀虫效果对微生物防治实践是有很大指导意义的。从这一点出发,将几种亚种制成商品,每一制剂可针对性的防治一种或几种害虫。

### (二) 环境条件

阳光的照射显然是一个主要的有害环境因素。Cantwell 等<sup>[19]</sup>发现该菌在滤膜或载玻片上的孢子,在实验室中经紫外光照射 10 分钟失活 99.9%;暴露在自然光中 60 分钟失活 80%。温度是另一限制因素。Ignoffo 曾将苏芸金杆菌孢子注入红铃虫体内,结果造成幼虫死亡的最适温度为 40.1℃。另有报道,欧洲玉米螟幼虫在 34℃ 下比在 27℃ 或 20℃ 下死亡多。故认为在细菌生长和昆虫代谢速度最快的温度下,苏芸金杆菌的致病力最高。湖南省微生物研究所<sup>[20]</sup>研究了在自然光照条件下,天门杆菌(7216)芽孢和晶体失活情况和对稻纵卷叶螟杀虫活性的影响。认为天门杆菌杀虫活性受光照、气温影响较大,建议在大田应用时在下午四时以后施药为宜。

### (三) 田间应用技术

在使用上,除菌剂外,还必须注意到目标害虫的习性和敏感性、寄主作物和环境条件、增效剂应用等。在这方面,我国已积累了不少成功经验。例如防治水稻三化螟应掌握在盛孵期施药 2—3 次,特别在蚁螟防治效果好,螟虫一旦蛀入茎内效果就差。防治玉米螟必须严格掌握在玉米心叶末期用菌,才能收到良好效果。用“7216”防治棉铃虫应掌握在盛卵初孵期施药,防效显著。施药方法有喷雾、点兜、泼浇、撒粉、液剂灌心、飞机喷洒等。因该菌剂属于胃毒剂,所以无论采用哪种方法,原则上力求施药均匀。

为了有效提高防治效果,用该菌制剂与低剂量化学农药、真菌制剂或病毒制剂等混用,也取得了成功。Govindarajan 等报道,因苏芸金杆菌的伴孢晶体在斜纹夜蛾的中肠不能很好地显示活性,致病效果差,曾试验加入一定量的斜纹夜蛾微孢子虫病原后,结果并发败血症,从而使试虫提早死亡且死亡率增加。微孢子虫和苏芸金杆菌对美洲棉铃虫的增效作用也有报道。还有报道,在苏芸金杆菌制剂中加入一种几丁质酶能明显提高对该菌不敏感的夜蛾科昆虫毒效。

## 三、关于我国苏芸金杆菌研究工作的几点看法

在国外,此制剂的产量逐年上升,已达近万吨。美国已列为大吨位生产农药,几乎全部蔬菜的蛾类害虫和 20% 的烟草种植园都用此制剂进行防治。苏联、法

国、日本、比利时、南斯拉夫等国发展迅速,商品已进入国际市场。1976年,我国产量近千吨,同美国同年产量差不多。但美国迅速加强了该菌剂的研究工作,使质量、应用效果都趋于稳定,且降低了成本,于1980年上升到4000吨。而我国在1980年却下降到100吨,原有60多个工厂所剩无几。随着剧毒化学农药的禁用,将会促进生物农药的发展。为了把我国苏芸金杆菌农药搞上去,应注意以下几点:

1. 切实加强对该菌科研工作的领导,迅速建立我国该菌研究中心。

2. 加强菌种管理工作,防止到处引种,不作鉴别,以致使一些毒力差、生产性能低的菌株被盲目用于工业生产。

3. 加强该菌制剂的标准化研究,尽快实行我国该菌制剂的毒力标准化。

4. 提高生产效率,降低产品出厂价格。在使用费用上争取与化学农药相当。

此外,我国该菌制剂产品剂型单一,产品未纳入国家计划,产、供、销渠道不畅通都影响该农药的推广应用。

### 参 考 文 献

[1] Dulmage, H. T. and R. A. Rhodes: In "Microbiol Control of Insects and Mites", Burges, H. T. and N. W. Hussey (eds.), Academic Press, 1971. pp. 507—540.  
[2] Dulmage, H. T.: *J. Invert. Pathol.*, **15**: 232—239,

1970.

[3] 鮎泽启夫: 化学と生物, **5**(6): 373—375, 1967.  
[4] Nishiitsutsuji-UWO et al.: *J. Invert Pathol.*, **25**(3): 355—361, 1975.  
[5] 张用梅等: 遗传, **3**(1): 20—22, 1981.  
[6] Reeves, E. L.: *Dissertation Abstracts*, **27**(9—10): 320 4B, 1967.  
[7] Chapman, H. M. and Norris, J. R.: *J. Appl. Bact.*, **29**(3): 529—535, 1966.  
[8] Colasito, D. J. and Rogoff, M. H.: *J. Gen. Virol.*, **5**(2): 267—274, 1969.  
[9] 沙糕云等: 昆虫学报, **18**(3): 273—280, 1975.  
[10] 何能被等: 微生物学报, **18**(3): 220—224, 1978.  
[11] Dulmage, H. T.: *J. Invert Pathol.*, **25**: 279—281, 1975.  
[12] Dulmage, H. T.: *J. Invert Pathol.*, **18**: 240—245, 1971.  
[13] 中山大学生物系昆虫学教研室昆虫微生物组: 昆虫学报, **20**(1): 5—13, 1977.  
[14] 蒲蛰龙主编: 害虫生物防治的原理和方法, 科学出版社, 北京, 189—191, 1978.  
[15] 河北省果树研究所: 昆虫知识, **1**(3): 24—26, 1974.  
[16] Morris, O. N.: *J. Invert Pathol.*, **13**: 134—146, 1969.  
[17] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌研究组: 微生物学报, **18**(4): 352—354, 1978.  
[18] Cantwell, G. E. and B. A. Franklin: *J. Invert Pathol.*, **8**: 256—258, 1966.  
[19] 湖南省微生物研究所药效药理组: 微生物学通报, **8**(4): 157—159, 1981.