

苏芸金杆菌以色列变种对蚊幼虫毒力的稳定性及影响因素的研究

陈世夫 吕建芳 肖永昌 刘淑萍

(山东省莱阳县卫生局科研组)

苏芸金杆菌以色列变种(以下称 B.t.i.) 是 Goldberg 博士等 1977 年从以色列分离到的一个新菌株^[1]。它是一个很有发展前途的灭蚊微生物。我们从 1980—1982 年, 对 B.t.i. 杀虫毒力的稳定性及影响因素和液体制剂的贮存稳定性进行研究, 现报道如下。

材 料 和 方 法

一、菌种

苏芸金杆菌以色列变种 1897 株来自中国科学院动物研究所, 经分离纯化毒力稳定后备用。

二、菌液的制备

1. 摇瓶培养基(%): 蛋白胨 1, 葡萄糖 0.1, NaCl 0.2, 牛肉膏 0.3, K_2HPO_4 0.2。30℃ 振荡培养 48 小时后进行生物测定。装入 500ml 高压灭菌的无色玻璃瓶内备用。

2. 发酵罐培养: 用 500L 发酵罐, 培养基为 30% 河蚬浸煮液^[2]。在 30±1℃ 培养 30 小时后, 经镜检大部分菌体的芽孢和伴孢晶体分离后放罐回收。

3. 固体平板培养的孢子晶体悬液: 采用开放性固体平板培养法, 30℃ 培养 48 小时后用脱氯自来水洗下菌苔即为孢子晶体悬液。

上述方法获得的 B.t.i. 液体, 进行孢子计

数和生物测定, 最后装入灭过菌的玻璃瓶内备用。

三、毒力的生物测定

用稀释浸液法测定, 容器为白色搪瓷碗, 试虫为室内饲养的淡色库蚊 3 龄末幼虫。每个处理用脱氯自来水 250ml, 试虫 25 条, 每次试验一般设 4—6 个稀释度和对照, 重复 2 次, 试验温度 26℃, 24 小时记录结果。

结 果

一、贮存液体制剂

1. 冷藏贮存: 将菌液置 4℃ 冰箱保存 10 个月, 贮存期间测定毒力效价 55 次, 结果表明无明显下降, 见表 1。

表 1 摇瓶培养物冷藏贮存效价的变化

测定时间 (年、月、日)	项目 结果	不同稀释倍数对蚊幼虫的毒力		
		1/5 万	1/10 万	1/20 万
80. 5. 23		100	94	72
81. 3. 14		94	92	74

2. 室温贮存: 将发酵罐生产的发酵液和开放性固体表层发酵生产的孢子晶体悬液, 置于室温条件下贮存, 前者贮存 14 个月, 后者 9 个

月，其间曾多次测定对蚊幼虫的毒力。结果见表 2。

表 2 菌液室温贮存时毒力的变化

项目 结果 培养方法	测定时间 (年·月·日)	Lc50	t 值	显著性测验
发酵罐培养	80.5.13	4.5	0.34	不显著
	81.10.14	5.2	0.34	
开放性固体 平板培养	81.9.17	0.69	0.20	不显著
	82.6.17	0.75	0.20	

3. 室外日光照射下菌液毒力的变化：将开放性固体平板培养的浓缩液体制剂，置无色玻璃瓶内于室外直射日光下照射，60 天后经测定对蚊幼虫毒力稍有下降。

二、不同因素对 B.t.i. 培养物杀灭蚊幼虫毒力的影响

1. 温度：将测定毒力效价后的菌液放入大试管中用不同温度水浴处理，并于不同时间取样测定毒力效价。结果说明在 50 和 60℃ 处理 3 小时菌液毒力无变化。70℃ 处理 1 小时，对蚊幼虫毒力下降 77%，3 小时下降 80%，80℃

表 3 培养物与其干燥后的毒力比较

结果 处 理	项目	不同浓度菌液对蚊幼虫的毒力 (%)				
		1/10 万	1/20 万	1/40 万	1/80 万	1/160 万
液体原培养物		—	100	94	98	74
干燥 2.5 小时样品		94	92	90	72	50
干燥 6.5 小时样品		94	92	80	50	18

处理 1 小时毒力下降 99.6%，但此温度处理 3 小时后，毒力仍未完全破坏。90℃ 处理菌液 1 小时毒力则完全破坏。

2. 干燥：平板培养物测定效价后，分别取 5ml 和 20ml，各加碳酸钙 5g 搅拌均匀置 60℃ 干燥箱内干燥。5ml 的样品于 2.5 小时基本干燥，20ml 样品 6.5 小时基本干燥，其含水量为 2.1%。测定结果见表 3。干燥温度为 60℃。

表 3 说明培养物 60℃ 时对蚊幼虫毒力的变化随时间的延长而加重。据报道在室温下自然干燥破坏较少^[3]。

3. pH：用 HCl 和 NaOH 调菌液 pH 至 3、4、5、10、11、12、13。处理后 24、48、72 小时测定生物效价。以后每周测定一次，每次测定以原菌液作对照，共试验 3 个月。结果 pH 值在 3—11 之间的菌液，杀虫毒力无明显下降。pH 值为 12，24 小时培养物对蚊幼虫毒力明显下降，pH 值为 13，24 小时培养物毒力基本消失。详见表 4。

4. 稀释度与渗透压：① 稀释度：将培养 48 小时的菌液用脱氯自来水稀释至 1:10，1:50，1:100，1:1000，1:1 万，1:10 万。前三个

表 4 不同 pH 值菌液的杀虫毒力*

蚊幼虫死亡 复测时间 (天)	项目	原菌液 pH (7.5)	菌液调整后 pH 值							
			3	4	5	10	11	12	13	
1		90	88	81	88	92	88	68	8	—
10		94	92	92	94	84	86	54	—	—
30		90	84	100	100	92	100	28	—	—
50		90	68	96	96	88	72	4	—	—
90		92	78	80	88	78	80	—	—	—

* 菌液稀释 5 万倍进行毒力试验。

浓度菌液置无色玻璃瓶内加塞。后三个浓度的菌液盛在瓷盆内。室内放置的每二天测定一次对蚊幼虫毒力，试验进行 3 个月。结果说明 1:10、1:50、1:100 三个浓度菌液，对蚊幼虫毒力无明显下降。而 1:1000、1:1 万、1:10 万三个浓度菌液依次于 15、10、2 天对蚊幼虫毒力开始下降，在 33、15、7 天对蚊幼虫毒力消失。② 渗透压：将菌液用脱氯自来水稀释 10 万倍后，立即进行对蚊幼虫毒力测定，然后分盆放置，每盆 4000 ml。取 3 盆加氯化钠，浓度分别为 (%)：0.45、0.9、1.8。3 盆加葡萄糖，浓度分别为 (%)：2.5、5、10。设相同含量的氯化钠或

葡萄糖溶液(不加菌液)和不含葡萄糖、氯化钠的溶液为对照。经 20 天试验,其毒力无明显差别。

5. 阳光与紫外线: ① 阳光: 将菌液稀释 10 万倍后作活孢子计数和测定毒力效价。然后将其盛入搪瓷盆内, 每盆 4000 ml, 液体深 9cm, 在室内(无直射阳光)和室外(直射阳光)各放一盆, 同时在室外放一水缸, 盛稀释菌液 125 公斤, 其液体深 90cm。试验时阳光照度为 5—8 万 Lx, 水温在 23—34℃ 范围内。上述稀释液在不同时间取样测定生物效价和活孢子数, 结果室外盆内照射 3 小时, 活孢子数下降 80%, 毒力效价下降 34%, 6 小时活孢子数下降 97%, 毒力下降 76%, 9 小时活孢子数极少, 毒力完全丧失。而缸内菌液照射 9 小时后, 活

孢子数下降 50%, 毒力下降 50%, 照射 2 天后毒力下降 80%, 一周后仍有少量芽孢存活。上述结果表明, 菌液芽孢及毒力均易被阳光照射所破坏, 但毒力较芽孢稳定。这与 Cantwell 等报道的苏芸金杆菌对阳光耐受的结果相似^[4,5]。在室内放置的菌液 48 小时内毒力不变, 从第三天开始下降, 至第 7 天完全破坏。这一结果说明阳光照射并不是使该菌对蚊幼虫毒力破坏的唯一因素, 但它会加速这一过程。如果将菌液稀释较低倍数时, 在 100ml 无盖烧杯内, 阳光直射 9 天(每天照射 7—9 小时), 对蚊幼虫毒力无明显影响。② 紫外线: 将菌液放在平皿中, 其深度 0.5 cm, 距灯管 28 cm, 在 30 W2573 Å 紫外线灯下连续照射 168 小时, 对蚊幼虫毒力无明显影响。

表 5 含不同杂菌数的水样对菌液毒力的影响

样 品 种 类	无菌水	自来水	河 水	湾 水	圈 水	放置时 间(天)
含杂菌数 (个/ml)	0	370	5×10^3	2×10^6	312×10^4	
放置前毒力 (%)	100	100	100	100	98	
放置后毒力* (%)	98	94	86	98	90	8
	86	32	46	50	44	15
	56	60	18	74	11	22
	10	28	54	54	0	30
	0	0	10	8	12	38

* 原液稀释 10 万倍, 测定 24 小时蚊幼虫死亡百分率。

6. 外界微生物群的影响: 取四种不同的外界自然液体和无菌水, 测定菌数。然后按 1:1 与菌液混合后立即进行生物测定, 最后放置不同时间复测生物效价, 结果见表 5。

结果说明, 水中杂菌对菌液毒力无明显破坏作用。

条件下贮存 9—14 个月, 对蚊幼虫的毒力无明显下降。这说明液体状态贮存是相当稳定的, 它为菌剂的生产和应用提供了方便。直接使用液体制剂可省去粉剂加工和填充剂, 因此可降低成本。

参 考 文 献

[1] Goldberg et al.: Mosquito News, 37: 355, 1977.
[2] 陈世夫等: 医学研究通讯, 9: 17, 1981。
[3] 王瑛等: 昆虫学报, 24: 44, 1981。
[4] Cantwell, G. E.: J. Invertebrate Path. 9: 138, 1966.
[5] Cantwell, G. E. and Franklin, B. A.: J. Invertebrate Path. 8: 256, 1966.
[6] 周达生等: 流行病学杂志, 3: 191, 1981。

讨 论

据报道^[6]在室温条件下贮存菌液一个月, LD₅₀ 不下降。而王瑛等^[3]报道, 在 4℃ 保存 15 天晶体芽孢悬液的毒力有所下降。而本文用不同方法制取的液体培养物, 在 4℃ 冰箱和室温