

球形芽孢杆菌对致倦库蚊的后致死作用

裴国凤¹, 袁志明^{1,2*}, 蔡全信¹, 张用梅¹, 庞义²

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071;

2. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘要: 研究了球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* C3-41 菌株对致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 幼虫的毒力及其后致死作用。生物测定表明, 该菌株对目标蚊幼虫具有很高的毒力, 其丙酮粉剂对 3~4 龄幼虫 48 h 的半致死浓度 (LC₅₀) 为 (6.92 ± 0.22) μg/L。用不同亚致死浓度处理 2~3 龄致倦库蚊幼虫, 存活幼虫在后期发育中存在明显的延续死亡和损伤现象, 经 LC₃₀、LC₅₀、LC₇₀、LC₉₀ 和 LC₉₈ 剂量的 C3-41 粉剂处理的致倦库蚊羽化前的总死亡率分别为 84%、91%、95%、97% 和 100%, 同时存活的幼虫、蛹和成蚊的发育和行为也受到一定的影响。这种后致死作用随处理浓度的升高而增强, 可能同球形芽孢杆菌毒素蛋白对处理期间蚊幼虫中肠上皮细胞造成的损伤相关。

关键词: 球形芽孢杆菌; 致倦库蚊; 杀蚊毒性; 后致死作用

中图分类号: Q969.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2001) 04-0433-06

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*, Bs) 对蚊幼虫具有特异性的毒杀作用。研究表明, 高毒力的菌株如 1593、2362、C3-41 等对库蚊 *Culex* sp. 具有很高的毒力, 对按蚊 *Anopheles* sp. 次之, 对伊蚊 *Aedes* sp. 低毒或无毒^[1,2]。Bs 菌株对蚊幼虫毒效的高低一般是通过常规的生物测定来确定。实验室内主要通过测定不同浓度的 Bs 制剂在一定的时间内 (48 h) 对蚊幼虫的致死百分率来确定其 50% 和 90% 致死浓度 (LC₅₀ 值和 LC₉₀ 值), 在野外也是采用相似的方法进行其杀蚊药效评价。然而这种毒力测定方法并不能准确而全面地反映 Bs 对蚊幼虫的实际毒杀效果。

人们在用高毒力的 Bs 菌株防治蚊幼虫的时候, 十分重视 Bs 在短期内对蚊幼虫的致死百分率, 而对短期内未能致死的蚊幼虫是否会受到 Bs 的持效作用却研究甚少。Lacey 等^[3] 和 Mulla 等^[4] 曾研究过 2362 菌株对致倦库蚊的毒性, 初步证明 Bs 对处理后的存活幼虫具有后致死效应。这种后致死作用使大部分存活幼虫不能完成正常的全发育过程, 而在发育为成蚊之前, 被延续致死或损伤, 从而导致蚊虫的存活率大大降低, 使得 Bs 杀蚊制剂在野外应用中具有较高的毒性和较长的持效期, 有利于蚊虫的综合治理。

Bs C3-41 菌株是本室分离的一株对蚊幼虫具高毒力的菌株, 属血清型 H5a5b^[5]。本研究的目的是在实验室测定 Bs C3-41 丙酮粉剂对致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的毒力, 并考察其对致倦库蚊各发育期的后致死作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770170)

* 通讯作者, 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 邮编: 430071

收稿日期: 1999-04-26; 接受日期: 1999-12-26

1 材料和方法

1.1 材料

球形芽孢杆菌 C3-41 丙酮粉剂和标准品 SPH-88 由法国巴斯德研究所昆虫病原菌室制备和提供, 效价分别为 1 750 IU/mg 和 1 700 IU/mg。

1.2 方法

1.2.1 C3-41 粉剂对致倦库蚊的毒力: C3-41 粉剂对致倦库蚊幼虫的毒力测定采用 WHO 提供的标准生物测定方法^[6]。供试致倦库蚊来源于湖北省医学科学院长期饲养的敏感品系。记录 48 h 死亡蚊幼虫数, 通过 Log-Probit 分析确定 C3-41 粉剂对 3~4 龄致倦库蚊幼虫的 30%、50%、70%、90% 和 98% 致死浓度 (LC_{30} 、 LC_{50} 、 LC_{70} 、 LC_{90} 和 LC_{98})。

1.2.2 C3-41 对致倦库蚊的后致死作用: 将 300 头 2~3 龄幼虫分别置于 500 mL 含不同亚致死浓度 (LC_{30} 6.25 $\mu\text{g/L}$, LC_{50} 6.94 $\mu\text{g/L}$, LC_{70} 12.3 $\mu\text{g/L}$, LC_{90} 18.3 $\mu\text{g/L}$ 和 LC_{98} 19.8 $\mu\text{g/L}$) C3-41 粉剂的白瓷碗中, 每个处理 3 个重复, 在 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下处理 48 h。同时用 3 个碗 (每碗 300 头) 作对照, 定时加食, 检查 48 h 不同处理组和对照组死亡蚊幼虫数, 计算幼虫死亡率。

将各处理组仍然存活的幼虫用无菌水清洗 2 次后, 转移到白瓷碗中进行正常饲养, 每天定时检查死亡蚊幼虫数及化蛹数, 计算蚊幼虫累计死亡率和累计化蛹率, 同时每天从碗中清除死幼虫, 并将蛹挑出置于成蚊笼中, 每天定时检查死蛹数和非完全羽化的成蚊数, 计算死蛹率 (死蛹数/总蛹数) 和非正常羽化率 (非正常羽化成蚊数/总羽化蛹数)。采用同样的处理和饲养方法进行对照组的蚊幼虫观察和记录。

1.2.3 Bs 在延续致死的蚊幼虫和蛹体内的变化规律: 将 400~500 头 2~3 龄致倦库蚊幼虫用 15 $\mu\text{g/L}$ C3-41 粉剂处理 48 h 后, 存活幼虫用无菌水清洗 2~3 次, 进行正常饲养, 每个处理 8 个重复。在蚊幼虫开始化蛹后的不同时间 (1、2、3、4、5、6 和 7 天) 分别取当天的死蚊幼虫和死蛹各 20 头, 用 5% 乙醇和无菌水洗涤数次后, 于无菌研钵中破碎, 然后稀释涂布在选择性培养基上^[7], 48~72 h 记数菌落数, 镜检细菌形态, 计算出不同时间延续致死的蚊幼虫及蛹体内残留的 Bs 菌数。同时收集未羽化的死蛹 200 头, 挑出放入装无菌水的试管中, 置于室温 27°C 下, 在不同时间取样, 采用平板菌落记数法测定不同时间死蛹体内的 Bs 菌数。

2 结果

2.1 Bs C3-41 粉剂对致倦库蚊幼虫的毒力

生物测定结果 (表 1) 表明 Bs C3-41 丙酮粉剂对 3~4 龄致倦库蚊幼虫的效价略高于 SPH-88 粉剂, 对 3~4 龄致倦库蚊幼虫 48 h 的 LC_{30} 、 LC_{50} 、 LC_{70} 、 LC_{90} 和 LC_{98} 值 ($\mu\text{g/L}$) 分别为 6.25、6.92、12.3、15.2 和 19.8。

2.2 幼虫期的延续死亡

将 2~3 龄幼虫用不同的亚致死浓度处理 48 h 后, 存活幼虫清洗 2~3 次后进行正常饲养, 然而各处理组的存活幼虫出现了不同程度的延续死亡 (图 1)。 LC_{30} 、 LC_{50} 、 LC_{70} 、 LC_{90} 和 LC_{98} 处理组, 48 h 的幼虫死亡率为 30%、48%、67%、84% 和 89%; 当处理终止后, 存活幼虫还

会延续死亡, 到化蛹前, 各处理组的幼虫死亡率分别增加到 78%、86%、92%、95% 和 99%。然而, 对照组的同龄期幼虫 48 h 死亡率为 2%, 到化蛹前死亡率增加到 5%。延续死亡的幼虫除丧失正常的体态外, 部分死亡幼虫的颈区明显拉长。

表 1 球形芽孢杆菌 C3-41 丙酮粉剂对致倦库蚊的毒力*

Table 1 Toxicity of *B. sphaericus* C3-41 acetone powder to 3rd ~ 4th larvae of *C. quinquefasciatus*

样品 Samples	毒力 Toxicity (Mean ± SEM)			效价 Potency (IU/mg)
	LC ₅₀ ** (μg/L)	LC ₉₀ ** (μg/L)	Slope	
C3-41 粉剂 C3-41 powder	6.92 ± 0.22	15.2 ± 0.280	4.22 ± 0.499	1 744.2
SPH-88 粉剂 SPH-88 powder	7.1 ± 0.23	18.3 ± 0.41	3.618 ± 0.366	1 700

* 3 次生物测定结果的平均值 average values for 3 repeats; ** 48 h 结果 results at 48 h

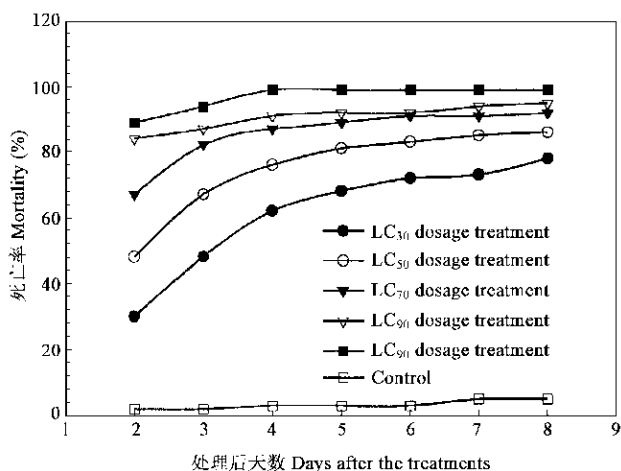


图 1 球形芽孢杆菌 C3-41 对致倦库蚊幼虫期的后致死作用

Fig. 1 The delayed mortalities of survival *C. quinquefasciatus* larvae after 48 h exposure of *B. sphaericus* C3-41

2.3 Bs 对蛹期和羽化期的后致死作用

经 C3-41 粉剂处理后, 部分存活幼虫能成功化蛹, 进入蛹期。但统计结果表明处理组的死蛹率(死蛹数/总蛹数)明显高于正常组(图 2)。LC₃₀、LC₅₀、LC₇₀ 和 LC₉₀ 处理组的死蛹率分别为 19%、40%、56% 和 81%; 而对照组的死蛹率仅为 2%。从图 2 可以看出, Bs 对蛹期存在明显的后致死作用, 而且, 处理浓度越高, 后致死作用越强。观察死蛹的外部形态, 可以发现在不同发育阶段被延续致死的蛹, 如蜕皮不完全的蛹, 蜕皮后的白化蛹和已完成黑色素转化的长尾蛹。

处理组的蛹在羽化为成蚊的过程中, 除死蛹外, 还有许多个体发育异常, 不能完全羽化为健康的成蚊, 实验中可以观察到: 部分羽化的成蚊, 仅头部羽化出来或尾部还残留着蛹皮,

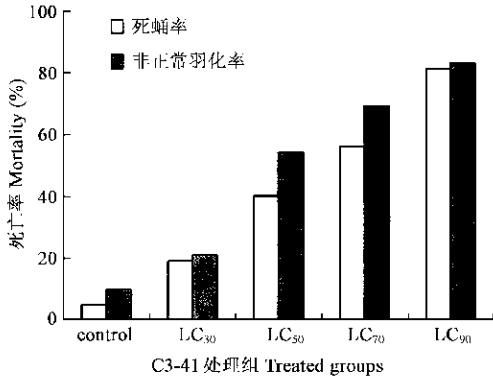


图2 球形芽孢杆菌对致倦库蚊蛹期和羽化期后致死作用

Fig. 2 Effects of *B. sphaericus* C3-41 on pupation and emergence of 48 h treated survival *C. quinquefasciatus* individuals

天,对照组的累计化蛹率达83%,而LC₃₀、LC₇₀和LC₉₀处理组的幼虫累计化蛹率分别为46%、36%和20%。由此表明,Bs处理后,存活幼虫的发育受到影响,幼虫期延长,从而导致化蛹延迟。

羽化后失去飞行能力的畸形成蚊。和对照组相比,处理组的蛹不能正常羽化为成蚊的比率明显偏高,LC₃₀至LC₉₀处理组的非正常羽化率(非正常羽化成蚊数/总羽化蛹数)分别为21%~83%。而对照组的非正常羽化率为10%。

根据死幼虫数,死蛹数及非正常羽化的成蚊数,计算各发育期的后致死率,可以看出各处理组蚊幼虫在后期发育中的累积死亡率,LC₃₀、LC₅₀、LC₇₀、LC₉₀和LC₉₈处理组蚊虫羽化前的累积总死亡率分别为84.2%、91.0%、95.4%、97.7%和100%(图3)。

2.4 Bs对致倦库蚊发育的影响

在中断处理后,统计对照组和处理组幼虫每天的化蛹数,计算累计化蛹率,其结果为:在同一时间各处理组幼虫的累计化蛹率都比同龄期对照组幼虫的累计化蛹率要低。在处理后正常饲养的第6

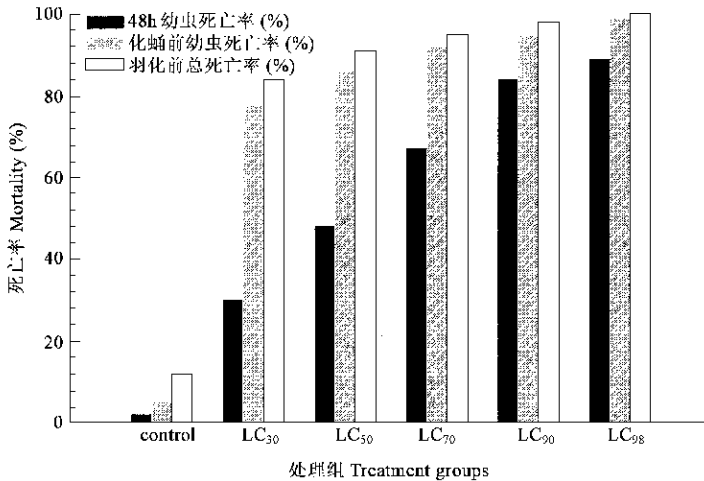


图3 对照组和球形芽孢杆菌处理组致倦库蚊的累积死亡率

Fig. 3 Comparison of mortality of *C. quinquefasciatus* in different development stages after 48 h exposure of *B. sphaericus* C3-41

示经不同浓度C3-41粉剂处理后48h的*C. quinquefasciatus*幼虫死亡率(mortality at 48 h),化蛹前幼虫死亡率(cumulative larval mortality)及羽化前的总死亡率(cumulative preadult mortality)

在对照组和处理组的成蚊同时供给糖水和鼠血的情况下，各处理组成蚊的产卵时间没有明显差别，均在供血后的第4天开始产卵，然而对照组的成蚊在供血后的第3天就开始产卵，处理后的成蚊产卵时间推迟。

2.5 Bs 在延续致死蚊幼虫和蛹体内的变化规律

随着饲养时间的延长，蚊幼虫体内的芽孢被破坏或经正常的排泄作用被排出体外，所以延续死亡的蚊幼虫及蛹体内的芽孢和菌体数量逐渐减少，分别由第1天取样的每头蚊幼虫209个菌数和每头蛹177菌数下降至第7天取样的每头蚊幼虫91个菌数和每头蛹37个菌数，说明Bs在活幼虫及活蛹体内不能再增殖，延续死亡主要是由于Bs毒素作用后造成的损伤不能恢复所致。

在一定的时间内（7天）死蛹体内的Bs菌数并没有呈数量级增加，说明Bs在死蛹体内不能增殖。镜检观察也表明Bs在死蛹体内不会萌发和生长。

3 讨论

Bs高毒力菌株在芽孢形成过程中能产生由51.4和41.9 kD蛋白组成的伴孢晶体。蚊幼虫取食芽孢/晶体混合物后，晶体蛋白被降解形成活性蛋白而结合到敏感蚊幼虫中肠上皮细胞的特异性结合位点上，最后导致中肠上皮细胞损伤和蚊幼虫死亡^[8]。Bs对蚊幼虫的后致死作用与许多因素有关，如幼虫的个体差异、取食细菌的时间和数量、受伤的程度、幼虫病变发展的快慢、幼虫体内是否残留芽孢等。但可以肯定Bs对蚊虫的后致死作用并不是由于Bs在蚊虫体内增殖和再循环决定的。由于受上述因素的影响，部分取食Bs的幼虫虽在短期内不足以致死，但Bs的毒杀作用会造成幼虫中肠上皮细胞不同程度的损伤，部分幼虫可将损伤重新修复，正常完成后期发育，然而损伤严重的幼虫不能恢复正常的生理状态，以致在随后的发育中被致死或成为畸形。

不同浓度的Bs制剂，对蚊幼虫后致死作用的程度并不相同，经低浓度处理后的大多数幼虫因为取食了少量的Bs，引起部分受伤个体在幼虫期延续死亡，其余的受伤幼虫若能在幼虫期得以恢复，那么在蛹期和羽化期的死亡机率就大大减少。然而，用高浓度处理，幼虫取食Bs的量多，绝大多数幼虫会在短期内死亡，而损伤严重的幼虫即使能够成功化蛹也会因毒素蛋白的干扰和体内残留的Bs破坏，而不能完全羽化为成蚊，Bs浓度越高，幼虫期、蛹期和羽化期的后致死作用越强。

Bs不仅能够短时间内杀死一定数量的幼虫，而且对处理后的存活幼虫产生明显的后致死作用，其中延续死亡使最后能够羽化为健康成蚊的个体数量大大减少，而且Bs造成的损伤也降低了成蚊对环境的适应力。此外，Bs处理后，幼虫发育减慢，化蛹延迟，成蚊产卵推迟，这种滞后发育对蚊幼虫的生存十分不利。Bs对蚊虫的延迟致死作用，使其在野外应用中具有更高的杀蚊毒效和更长的持效期。

致谢 感谢法国巴斯德研究所Nielsen-LeRoux博士帮助制备球形芽孢杆菌C3-41丙酮粉剂(This investigation was partly supported by grant from UNDP/World Bank WHO Special Program for Research and Training in Tropical Disease, by foundation from the Key State Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University)

参 考 文 献 (References)

- [1] Priest F G. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol., 1992, 72: 357 ~ 369
- [2] Thiery I, Back C, Barbazan P *et al.* Application de *Bacillus thuringiensis* et de *B. sphaericus* dans la demoustication et la lutte contre les vecteurs de maladies tropicales, Ann. Institut. Pasteur., 1996, 72: 247 ~ 260
- [3] Lacey L A, Day J, Heitzman C M. Long-term effects of *Bacillus sphaericus* on *Culex quinquefasciatus*. J. Invert. Pathol., 1987, 49: 116 ~ 123
- [4] Mulla M S, Darazed H, Davidson E *et al.* Delayed mortality and morphogenetic anomalies induced in *Culex quinquefasciatus* by the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. J. Am. Mosq. Control Assoc., 1991, 7 (3): 412 ~ 419
- [5] 张用梅, 刘娥英, 袁志明等. 两株高毒力球形芽孢杆菌的分离. 杀虫微生物, 1987, 1: 98 ~ 101
- [6] WHO. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS. 1985, 85.3, p 24
- [7] 袁志明, 张用梅, 刘娥英等. 球形芽孢杆菌 C3-41 对致倦库蚊的毒性及在蚊幼体内的再循环. 昆虫学报, 1992, 37 (4): 404 ~ 410
- [8] Charles J F, Nielsen-LeRoux C, Delecluse A. *Bacillus sphaericus* toxin: molecular biology and mode of action. Ann. Rev. Entomol., 1996, 41: 451 ~ 472

Delayed effects of mosquito-larvicidal *Bacillus sphaericus* on *Culex quinquefasciatus*

PEI Guo-feng¹, YUAN Zhi-ming^{1,2}, CAI Quan-xin¹, ZHANG Yong-mei¹, PANG Yi²

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2. State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The toxicity and the delayed effects of *Bacillus sphaericus* C3-41 to *Culex quinquefasciatus* larvae has been studied. The bioassay results indicated that the C3-41 acetone powder has a considerable toxicity against target under the laboratory condition, with a fifty percent lethal concentration (LC_{50}) of $6.92 \pm 0.22 \mu\text{g/L}$ against 3rd ~ 4th instar larvae at 48 h. The significant continued mortalities and abnormal development were observed in larval, pupal and emergence stages after the initial 48 h exposure of larvae were terminated, and the cumulative preadult corrected mortality of LC_{30} , LC_{50} , LC_{70} , LC_{90} , LC_{98} dosage treatment were 84%, 91%, 95%, 98% and 100% respectively. In comparison, only 5% cumulative preadult corrected mortality was observed in control. Moreover, the delayed pupation, abnormal emergence and delayed oviposition were also noticed in surviving treated individuals. These long-term effects of C3-41 to mosquito larvae may be resulted from the damage of the midgut epithelium caused by binary toxins in initial treatment and would be contributed a great deal to the efficacy of *B. sphaericus* in field application for mosquito control.

Key words: *Bacillus sphaericus*; *Culex quinquefasciatus*; long-term effects; toxicity