

苏云金芽孢杆菌以色列亚种对花翅摇蚊作用特性研究*

雷 萍¹ 张金松² 周 令² 潘 晶³ 赵文明¹

(西安交通大学生命科学与技术学院 西安 710049)¹ (深圳水务集团水技术研究所 深圳 518031)²

(哈尔滨工业大学环境工程学院 哈尔滨 150090)³

摘要: 为探索对深圳水源红虫污染进行微生物防治的可行性, 首次用 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *Bti* (苏云金芽孢杆菌以色列亚种) 对花翅摇蚊 (*Chironomus kiiensis tokunaga*) 的作用特性进行研究。生物测定表明, *Bti* IPS82 和 187 对花翅摇蚊 3 龄幼虫的 LC_{50} (24h) 分别为 24.2 和 32.6 mg/L。对标准菌株 IPS82 进行的发酵研究表明, 发酵过程中的菌体密度、芽孢形成和溶解氧变化、对花翅摇蚊的毒力之间具有密切联系。IPS82 发酵液应用的环境因素中, 日光照射的影响最大, 可使其毒力半衰期从 21d 缩短至 10d; 环境温度在 15℃ ~ 30℃ 内变化, *Bti* 使蚊幼虫的致死率都保持在 50% 左右。当环境温度 35℃ 时, *Bti* 使蚊幼虫的致死率再提高 16%; 环境 pH 偏离 7 ~ 11 时, IPS82 的毒力从 66.7% 下降至 40% 左右, 环境 pH3 时其毒力下降至 16%; 在一定的幼虫密度 (低于 30 条/100mL) 范围内 IPS82 发酵液的毒力稳定, 但幼虫密度高于 30 条/100mL 时毒力呈下降趋势。本研究结果表明: 在一定条件下, *Bti* 对花翅摇蚊防治具有良好的应用潜力。

关键词: 苏云金芽孢杆菌以色列亚种, 生物防治, 花翅摇蚊, 水源

中图分类号: Q939.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 01-0017-05

A STUDY ON FUNCTIONAL CHARACTERS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAELENسيس* TO *CHIRONOMUS KIIENSIS TOKUNAGA* *

LEI Ping^[1] ZHANG Jin-Song^[2] ZHOU Ling^[2] PAN Jing^[3] ZHAO Wen-Ming^[1]

(School of Life Sciences and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xian 710049)¹

(Research Institute of Water Technology, Shenzhen Water Group, Shenzhen 518031)²

(School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090)³

Abstract: Aimed at feasibility of microbiological control of Chironomidae larvae in sourcewater, Shenzhen, China, the functional characters of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to *Chironomus kiiensis tokunaga* were studied for the first time. In this study, bioassays were carried out with third-instar larvae, results showed that the LC_{50} s (24h) were 24.2 and 32.6 mg/L for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82 and 187 respectively. Tests in fermentation of IPS82 show good correlations between toxicity, cell density, dissolved oxygen and spore-forming phase. The tests on environmental factors influencing toxicity to *Chironomus kiiensis tokunaga* showed that sunlight is the most important factor, shortening the half life of *Bti* from 21 days in dark to 10 days; temperature variations (15 ~ 30℃) caused no impact on toxicity, but 35℃ increases 16% of larvae mortality. The toxicity of IPS82 is relatively insensitive to change pH deviated from 7 to 11, due to drop of larvae mortality from 66.7 to 40%, at pH of 3, to 16%; its toxicity is stable in low larva density (< 30 larvae/100mL), but over the density, the higher the host density, the greater the dose required. The study indicated the feasibility of using *Bti* to control *Chironomus kiiensis tokunaga*.

Key words: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Biological control, *Kiiensis tokunaga*, Watersource

* 深圳市 2000 年科技计划项目 (No. 深科 2000-58)

国家高技术研究发展计划项目 ("863" 项目)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (NO.2002 AA601120)

收稿日期: 2002-12-09, 修回日期: 2003-02-22

摇蚊科 (*Chironomidae*) 与蚊科 (*Culicidae*) 同属于双翅目 (*Diptera*) 长角亚目 (*Nematocera*), 约有3,000余种, 广泛分布于世界各地。在城市水源中常有大量摇蚊孳生, 其卵和幼虫进入供水设施孳生繁殖, 其幼虫俗称红虫, 经常穿透砂滤层进入管网, 不仅影响水质感官指标, 并有传播疾病的潜在危险, 是国内外供水界的一大难题^[1]。我们对深圳的水源和供水设施中孳生的摇蚊进行调查并委托权威机构进行鉴定, 结果为花翅摇蚊 (*Chironomus kiiensis tokunaga*), 系广东摇蚊优势种。对城市水源进行昆虫防治, 选择并合理使用无公害药剂十分重要, 微生物防治具有高效、安全、易于分解、低残留的特征, 适于在水库等水域中应用。苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *Bti*) 是目前用于蚊虫防治的重要微生物菌株^[2]。大量的毒理学研究和在世界各国的应用试验证实, 它对蚊科某些种属具有高毒, 并对环境和其他生物种群具有良好安全性^[3]。摇蚊科也是 *Bti* 的敏感种属, 但针对摇蚊的 *Bti* 毒力相关研究多从 *Bti* 对其他生物种群的作用影响角度进行, 针对摇蚊微生物防治者甚少, 对花翅摇蚊防治的研究尚未见报导。根据 Ali (1981) 和 Maria (1999) 的研究, *Bti* 对摇蚊的毒理剂量比蚊虫控制剂量高几十倍以上^[4,5], 且不同种属摇蚊的敏感性相差 10 ~ 1,000 倍不等 (Kondo 等, 1995)^[6]。

为探索在中国南部水源应用微生物防治摇蚊的可能性, 本研究对 *Bti* 的两个菌株 IPS82 和 187 对花翅摇蚊的毒力进行比较, 并对 IPS82 在产芽孢培养基中的发酵特征和环境因素对毒力的影响进行了试验研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

Bti 的标准菌株 IPS82 由 Pasture 研究所 (法) 提供, *Bti* 187 菌株由深圳农科中心微生物研究室提供。

1.2 菌种发酵

菌株首先在牛肉汁培养基摇瓶培养 8h, 取 1mL 种子液加入产芽孢培养基 (500mL 锥形瓶, 装量 50mL), 30℃, 2,500 r/min. 发酵 36h, 发酵液冰箱保存。

1.3 蚊幼虫毒力的生物测定

每种发酵液采用放置 1d 的脱氯自来水进行梯度稀释。在 12cm 敞口平皿中倒入稀释菌液 100mL, 在其中滴加 3 滴经灭菌的泥砂, 用玻棒搅拌均匀。每个平皿放入 3 龄红虫 30 条, 置 26℃ 恒温培养 24h 后查活虫数。每个浓度梯度设置 3 个平行并设置空白对照。用 Abbott 公式计算校正死亡率并查找几率值, 采用最小二乘法计算致死中浓度 LC_{50} ^[7]。

1.4 发酵特性研究

待测菌株按 1.2 方法进行发酵, 在不同发酵时间检测发酵液的细菌密度 (平板稀释菌落计数法)、发酵液的 pH 值 (WTW330 型 pH 测定仪) 和溶解氧含量 (YS158 型溶解氧测定仪), 并镜检石炭酸复红染色涂片, 观察菌体发育、芽孢和晶体形成情况。发酵结束后, 分别对 24, 36 和 48h 的发酵液进行昆虫生物测定。

1.5 温度对毒力影响

Bti 浓度设定为 40mg/L, 按 1.3 进行生物测定, 分别放置于 10、15、20、30、35℃ 下培养。同时设定不经 *Bti* 处理的对照组。

1.6 pH 对毒力影响

将 40mg/L 的 *Bti* 稀释液调整到 pH 分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11，按 1.3 进行生物测定。

1.7 虫口密度对毒力的影响

在 40 和 80mg/L 使用浓度下，设置红虫密度梯度分别为 5、10、15、30、60、90、120 和 150 条/皿 (100mL)，其余生测条件与 1.3 同。

1.8 持效性和自然光照影响的测定方法

将发酵液稀释到 50mg/L 后，一部分避光存放；另一部分置于室外自然光下 (每天补充蒸发水分)，间隔 1d 取样测定并与对照比较。

2 结果与讨论

2.1 *Bti* IPS82、*Bti* 187 对花翅摇蚊的毒力

Bti IPS82 为 *Bti* 标准菌株，*Bti* 187 是汪耀南 1978 年发现的中国品系，将它们经产芽孢培养基发酵后对 *Chironomus kiiensis tokunaga* 进行毒力测定，*Bti* IPS82 和 187 的 LC_{50} (24h) 分别为 24.2 和 32.6 mg/L (见表 1)，这时通过平板菌落计数测得菌体密度分别为 4.8×10^4 CFU/mL。 *Bti* 对库蚊 (*Culex pipiens pallens*)、按蚊 (*Anopheles sinenses*) 和伊蚊 (*Aedes albopictus*) 的 LC_{50} 分别为 0.55、2.05 和 6.37×10^4 CFU/mL (Chen *et al.* 1985)^[8]，因而花翅摇蚊对 *Bti* 的敏感性总体约比库蚊低 10 倍，比按蚊低 1 倍，但比伊蚊高约 23%，此结果和 Ali (1981)、Maria (1999) 对其他摇蚊种属的研究结论有相似之处。*Bti* IPS82 对花翅摇蚊的毒力比 *Bti* 187 高约 60%，花翅摇蚊对 *Bti* 不同菌株的敏感性不同，通过菌株筛选有可能获得对花翅摇蚊的更高毒力菌株。

表 1 *Bti* IPS82 和 *Bti* 187 对花翅摇蚊的毒力比较

	<i>Bti</i> IPS82	<i>Bti</i> 187
LC_{50} (mg/L)	24.2	32.6
Slope	2.64	2.26
r	0.988	0.970

2.2 IPS82 的发酵过程研究

对 IPS82 用产芽孢培养基进行发酵，并对相关参数进行测定。发酵初期 (6h) 杆状菌体分裂成长连状，最多可达 22 个，最长者可达 8.2 μ m，以后随着菌体密度的升高，菌体缩短且连接数减少，菌体宽度 1.0 μ m 保持不变。发酵 20h 原生质开始浓缩；24h 全部形成卵圆型芽孢子囊，一端形成有光泽的卵形芽孢，直径 1.0 \times 1.5 μ m，另一端形成近似球形且大小不等的伴孢晶体，直径范围从 0.5 到 1.2 μ m；发酵 28h 菌体成熟分解，芽孢和晶体释放；36h 的菌落形成总数达到最高 (1.9×10^9 CFU/mL)，这时的芽孢和伴孢晶体形成率达到 95%；38h 后，菌落形成数下降，芽孢重新萌发。发酵

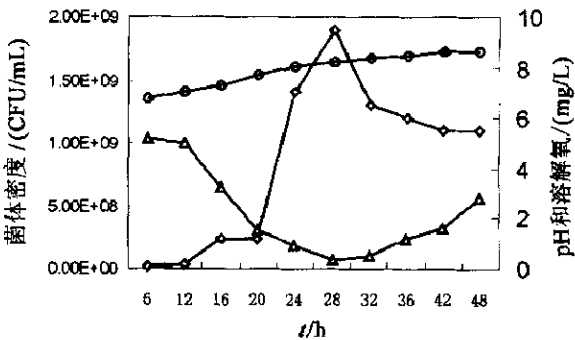


图 1 发酵过程中 IPS82 的菌数、pH 和溶解氧变化
◇ 菌体密度，△ 溶解氧，□ pH

表 2 不同发酵时间 *Bti* IPS82 培养液的 LC_{50}

发酵时间 (h)	24	36	48
LC_{50} /mg/L	69.30	24.2	73.7
slope	3.85	2.64	1.83
r	0.982	0.988	0.984

过程中 IPS82 的 pH 和溶解氧变化见图 1, pH 呈现持续缓慢升高趋势, 而溶解氧在生长延迟期 (16~24h) 随着菌体密度的升高下降, 在孢子囊形成期 (24~32h) 出现陡降, 在 28h 到达最低点, 以后随着芽孢的释放而回升。在 24、36 和 48h 分别中断发酵, 对发酵液进行生物测定, 结果见表 2: 发酵 24、36 和 48h 的 LC_{50} 分别为 69.3, 24.2 和 73.7mg/L。以上结果说明毒力形成和芽孢、伴孢晶体形成密切相关, 并和菌体密度、溶解氧变化密切相关。

2.3 环境温度、pH 对 IPS82 毒力的影响

将不同温度和 pH 下 40mg/L IPS82 发酵稀释液对 3 龄花翅摇蚊幼虫的死亡率进行了测定, 并和同样条件下的对照组进行对比, 结果见图 2 和图 3。

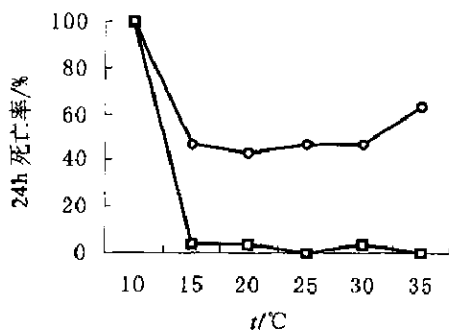


图 2 不同环境温度对 *Bti* 毒力的影响

○ *Bti* 处理组, □ 对照组

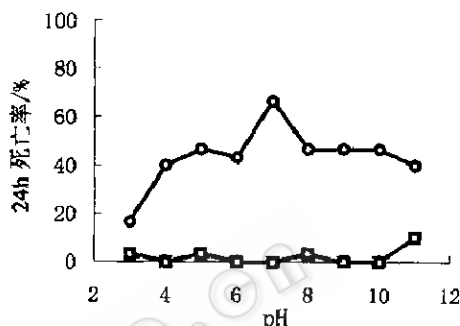


图 3 不同环境 pH 对 *Bti* 毒力的影响

○ *Bti* 处理组, □ 对照组

温度变化对 *Bti* 的影响见图 2。对照组中水温 10℃ 时红虫全部死亡, 高于 15℃ 幼虫能正常存活。试验组中, 在 10℃ 时红虫全部死亡; 15℃ 时, 幼虫死亡 50%。而且在 15℃~30℃ 变幅内, 温度变化不影响 *Bti* 对花翅摇蚊幼虫的毒力; 当 35℃ 时, *Bti* 作用下的红虫死亡率再提高 16%, 总的红虫死亡率达到 66%。针对蚊科幼虫, Atwood (1992) 等认为温度对 *Bti* 的毒力有显著影响, 水温降低和 *Bti* 的毒力下降成正比^[9], 这和我们花翅摇蚊的研究结果不符合, Sinegre (1981) 认为 19℃~33℃ 之间 *Bti* 对 *Cx. piliens* 毒力稳定, 和本结果较为相似^[10]。

环境 pH 对 *Bti* 的影响较为显著。从图 3 可见, 对照组中 pH 在 3~10 变化, 红虫死亡率没有上升的现象; 但 pH 11 时死亡率升高至 10%。这表明花翅摇蚊幼虫在强碱性环境中受到影响, 酸性环境对其影响较小。在 *Bti* 药剂处理组中, pH 从中性 7 偏碱到 11 时, 红虫死亡率从 66.7% 降低至 40%, 在 pH 3 时死亡率只有 16.7%, 这表明 *Bti* 毒力对环境 pH 的变化较为敏感, 特别是强酸环境对毒力的影响更为显著。关于 *Bti* 对蚊科幼虫的作用条件, Mulla (1985) 认为, pH 高于 8 时会造成 *Bti* 的毒力下降^[11], 这与本研究结果比较一致。

2.4 虫口密度对 IPS82 毒力的影响

每 100mL 溶液中, 幼虫密度为 5~30 条时, 40 和 80mg/L *Bti* 作用下的红虫死亡率均不发生显著变化, 说明这时红虫密度不影响 *Bti* 的毒力。随着密度的升高, 在 60~150 条的密度范围内, 死亡率呈现下降趋势, 150 条时, 40mg/L *Bti* 作用的死亡率下降 15.3%, 80 mg/L 时下降 31.3%。此结果和 Becker (1993) 针对蚊科幼虫的研究是一致的^[12]。

2.5 自然光照对持效的影响

试验周期内, 白天利用 JD-3 型照度计 (上海嘉定学联仪表厂) 测定光照强度,

10:00到16:00之间,光照强度一般为 $4 \sim 9 \times 10^4 \text{ Lux}$, 最强时达到 $1.2 \times 10^5 \text{ Lux}$, 其余时间光强为 $2 \sim 6 \times 10^4 \text{ Lux}$ 。在这样的光照条件下,置于室外自然光下的菌液持效期明显比室内避光保存者短(见图5)。避光下毒力下降缓慢,经拟合回归,其半衰期为 22d;而接受光照的菌液毒力下降迅速,半衰期只有 10d, 19d 后毒力完全消失。*Bti* 受日光中紫外线作用降解很快,和 Becker (1993) 的研究结论是一致的。

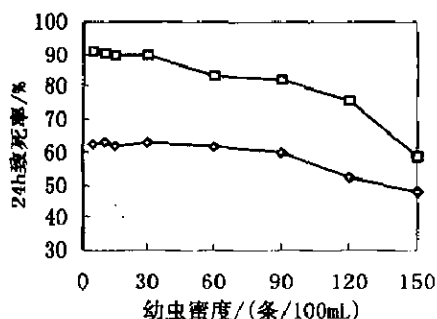


图4 花翅摇蚊幼虫密度与 *Bti* 毒力的关系

◇ 40mg/L, □ 8mg/L

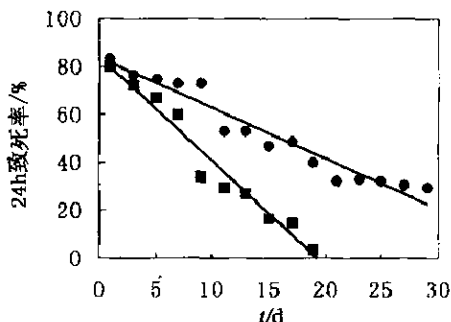


图5 光照与 *Bti* 对花翅摇蚊持效的关系

● 避光, ■ 自然光

3 结论

对造成深圳市水源和供水系统红虫污染的花翅摇蚊, *Bti*IPS82 的实验室应用剂量比伊蚊略低, 但比库蚊高 10 倍, 比按蚊高一倍。*Bti*187 与 *Bti*IPS82 的毒力相差 60%, 说明 *Bti* 不同菌株之间对花翅摇蚊具有毒力差异, 通过菌种筛选, 有可能获得毒力更高的菌株。*Bti* IPS82 在实验室发酵 36h 可达最大毒力, 发酵过程中的菌体密度、芽孢形成、溶解氧消耗和毒力变化之间具有密切联系。*Bti*IPS82 能应用于花翅摇蚊防治, 其毒力受温度影响较小, 但易受光照和水质 pH 等条件的影响, 在自然环境下应用于防治花翅摇蚊时, 其应用条件的控制非常重要。

致谢 此项目得到深圳农科中心微生物研究室的大力协助, 特此致谢。

参考文献

- [1] Michael K. Alexander Journal of the American Mosquito Control Association, 1997, 13 (2): 189 ~ 192.
- [2] De Bajas H. 14 C R Acad Sci (Paris), 1978, 286D: 797 ~ 800.
- [3] Siegel J P, Shaddock J A. In bacterial Control of mosquitoes and Black Flies Unwin-Hyman Ltd London 1990, 201 ~ 220.
- [4] Ali A. J Invertebr Pathol, 1981, 38: 264 ~ 272.
- [5] Maria Y, Volker S, Norbert B. Journal of Invertebrate Pathology, 1999, 74: 39 ~ 47.
- [6] Kondo S, Ohba M, Ishii T. Journal of Applied Entomology, 1995, 119: 123 ~ 125.
- [7] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定. 上海: 上海科学技术出版社, 1959.
- [8] Chen S F, Xiao T C, Lu F F. Natural Enemies of Insects Kunchong Tiandi, 1985, 6: 115 ~ 117.
- [9] Atwood D W, Robinson J V, Meisch. M V, et al. Journal of the American Mosquito Control Association, 1992, 8: 126 ~ 130.
- [10] Sinagre G. Entomologie Medicale Parasitologie, 1981, 19: 143 ~ 147.
- [11] Mullá M S, Federici B A, Darwazeh H A. Proceedings and Papers of the 48th Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association Inc (Grant C D ed) Quality Inn Anaheim California, 1980, 25 ~ 27.
- [12] Becker N, Margalit. J An Environmental Biopesticide: Theory and Practice John Wiley & Sons New York, 1993, 147 ~ 170.