

影响库蚊幼虫摄食鱼腥藻的因素

张世萍¹ 杨 洲¹ 聂刘明¹ 陈孝煊¹ 喻子牛²

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学微生物科学技术系, 武汉 430070)

摘要: 在实验室条件下, 致乏库蚊幼虫可大量摄食鱼腥藻, 并能消化利用, 完成生活史。鱼腥藻在蚊幼虫肠道中滞留时间约 6 h, 酵母约 5 h, 鱼腥藻比酵母稍难消化。对比 幼虫孵化至化蛹周期, 饲喂鱼腥藻为 194 h, 而饲喂酵母则为 142 h, 饲喂鱼腥藻比饲喂酵母延缓了蚊幼虫期 52 h。致乏库蚊幼虫摄食鱼腥藻的适宜条件为: pH7—8, 温度 25—30 , 藻液浓度愈高, 摄食越多。随着蚊幼虫的生长, 摄食量递增。

关键词: 致乏库蚊; 鱼腥藻; 摄食

中图分类号: Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)01-0039-006

致乏库蚊(*Culex pipiens Fatigans*)是班氏丝虫和流行性乙型脑炎的传播媒介, 因此消灭库蚊有助于减少人类疾病的传染。然而, 长期的化学药物防治使蚊虫产生了抗药性^[1], 陆宝麟^[2]强调重视生物防治的研究和应用, 他人亦先后有不少报道^[3-9]。库蚊对芽胞杆菌的毒力最为敏感^[10], 其中苏云金芽胞杆菌 H 14 (*Bacillus thuringiensis*) 和球形芽胞杆菌(*Bacillus sphaericus*) 是无残留、不污染环境的优良灭蚊细菌。利用苏云金芽胞杆菌通过生物技术构建的工程鱼腥藻灭蚊是一条有效途径^[11-12]。鱼腥藻(*A. nabaena* sp.) 隶属蓝藻门(Cyanophyta) 蓝藻纲(Cyanophyceae) 念珠藻目(Nostocales), 可直接从大气中固定游离氮, 增加田间有效氮含量^[13]。因此, 选用鱼腥藻作为杀蚊基因的受体具有很大的优越性^[14]。蚊幼虫摄食工程鱼腥藻后, 若表达量高, 则可节约藻类。但目前对蚊幼虫摄食鱼腥藻的情况尚不大清楚。为此, 本研究拟通过试验搞清致乏库蚊幼虫对鱼腥藻的摄食情况, 了解致乏库蚊幼虫摄食鱼腥藻的最佳环境条件, 为基因工程鱼腥藻灭蚊提供依据。

1 材料和方法

1.1 蚊种及饲养 致乏库蚊的卵由本校微生物科学技术系提供, 在盛有自来水的搪瓷盘中孵化, 水深 1—1.2 cm, 温度 27 ± 2 , 光照 450—1000 lx, 孵出的幼虫喂以酵母或鱼腥藻。

收稿日期: 2000-06-22; 修订日期: 2001-08-20

基金项目: UNDP/World Bank/WHO 热带疾病研究和培训特别项目的资助。本稿蒙中国科学院水生生物研究所梁彦龄研究员提出宝贵意见, 在此致谢

作者简介: 张世萍(1954—), 女, 河南省确山县人; 现主要从事水生生物学教学与科研

1.2 藻种及培养 鱼腥藻(PCC 7120)藻种由本校微生物科学技术系提供。培养基^[15]成分($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)如下: NaNO_3 , 1.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.04; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.036; 柠檬酸, 0.006; 柠檬酸铁铵, 0.006; EDTA(二钠镁盐), 0.001; Na_2CO_3 , 0.02; 痕量矿物质混合物 $\text{A}_5 + \text{Co}$, 1 mL; 去离子水 1000 mL; pH 7.4。其中微量矿物质混合物 $\text{A}_5 + \text{Co}$ 的成分($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)如下: H_3BO_3 , 2.86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.222; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.390; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.079; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0494。培养基配制好后盛入 500 mL 三角瓶中, 经 121 °C 灭菌 30 min^[11]。冷却后接种鱼腥藻, 置 26 ± 1 °C, 光照强度 450—1000 lx 的培养室培养。

1.3 蚊幼虫摄食鱼腥藻的观察估算方法 幼虫投入藻类饲养液后, 按 0、2、4、6、8、10、12 h 分别取饲养液样本, 用 XB-K-25 血细胞计数板计算鱼腥藻的浓度。由于鱼腥藻长短不一, 差别很大, 为了较好地反映其数量, 规定每 0.05 mm 为一个单位鱼腥藻。每次测量时, 摇匀藻液后取样四次, 每次测 0.1 mm³, 取四次平均值为所测浓度。为便于反映不同条件下摄食的差别, 引入摄食速度。摄食速度($\text{个} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) = (起始浓度 - 终末浓度) / 摄食所需时间。

1.4 鱼腥藻在蚊幼虫肠道中的观察方法 用解剖针轻轻将蚊幼虫肠拉出, 在 10×4 倍的解剖镜下, 观察前肠、中肠、后肠各部位充塞度及食物的消化程度和颜色, 以判断食物摄食量及消化程度。

1.5 摄食鱼腥藻幼虫粪便的培养 将 10 尾饱食鱼腥藻的蚊幼虫置于盛有过滤自来水的小烧杯中, 5 h 后, 用吸管吸取所排粪便, 放在鱼腥藻培养基中培养, 3—5 d 后镜检, 以确定培养液中是否有存活鱼腥藻。

1.6 幼虫摄食鱼腥藻和酵母的消化速度 在盛有高浓度鱼腥藻和酵母的两烧杯中分别放入 20 尾蚊幼虫, 待饱食后, 分别移入盛有自来水的烧杯中, 每小时各取一尾在解剖镜下观察肠道中的食物状况。

1.7 喂饲鱼腥藻和酵母对蚊幼虫生长发育速度的比较 分别将 20 尾刚孵出的幼虫放入盛有酵母和浓度不低于 8.5×10^5 个/mL 的鱼腥藻液的两烧杯中, 保持足够的酵母和鱼腥藻的供食量, 记录两烧杯中幼虫每次脱皮和化蛹时间。

1.8 不同龄期蚊幼虫对鱼腥藻的摄食 试验分设 1 龄、2 龄、3 龄、4 龄四个组, 每个组各取幼虫 20 尾, 放在盛有 20 mL 藻液的烧杯中, 每 2 h 测藻液浓度一次, 连续测 6 次。

1.9 不同 pH 值对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响 试验设五组, pH 值分别是 11—12, 9—10, 7—8, 5—6, 3—4, 用 0.3 mol/L HCl 调配而成, 然后用 pH 试纸检测, 并每 2 h 校正一次。每组放入四龄蚊幼虫 20 尾, 每 2 h 测藻液浓度一次, 连续测 6 次。

1.10 不同温度对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响 分设 21.5、24、26、28.5 和 31 °C 五个温度组, 每组放入二龄蚊幼虫 20 尾, 每 2 h 测藻液浓度一次, 连续测 6 次。

1.11 不同藻液浓度对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响 分设五个组, 浓度(10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$)依次为 17.2, 8.60, 4.30, 2.15, 1.08, 每组放入二龄蚊幼虫 20 尾, 每 2 h 测一次藻液浓度, 连续测 6 次。

2 结果与分析

2.1 幼虫摄食鱼腥藻所排粪便的培养结果

将饱食鱼腥藻的蚊幼虫经外表清洗后, 转入无菌水中排粪, 然后将幼虫的粪便移入藻类培养液中, 在 28℃条件下培养 3—5 d, 取样镜检。结果幼虫粪便中未发现鱼腥藻生长, 说明鱼腥藻可被蚊幼虫全部消化。

2.2 幼虫对鱼腥藻和酵母消化速度的对比

表 1 蚊幼虫摄食酵母和鱼腥藻后在肠道中滞留时间(h)

Tab. 1 Retention time(h) of *Anabaena* and *Saccharomyces* in mosquito larval intestine

摄食类别 Intake category	时间 Time			Time		
	1	2	3	4	5	6
酵母 <i>Saccharomyces</i>	++++	+++	++	+	0	0
鱼腥藻 <i>Anabaena</i>	++++	+++	++	++	+	0

注: +++++ 很多 +++ 多 ++ 较多 + 少 0 很少

由表 1 可知, 蚊幼虫摄食鱼腥藻的排空时间约 6 h, 摄食酵母的排空时间约 5 h, 说明酵母比鱼腥藻更易消化。

2.3 以鱼腥藻和酵母为食的蚊幼虫各生长阶段延续的时间

表 2 摄食鱼腥藻和酵母的蚊幼虫不同发育阶段所延续的时间(h)

Tab. 2 Duration (h) of different growth stages of mosquito larval fed by *Anabaena* and *Saccharomyces*

发育阶段 stages	第一次蜕皮 1st molt	第二次蜕皮 2nd molt	第三次蜕皮 3rd molt	化蛹 pupation
鱼腥藻 <i>Anabaena</i>	40	76	124	194
酵母 <i>Saccharomyces</i>	40	64	94	142

用鱼腥藻和酵母分别喂饲幼虫其不同发育阶段所需时间是不同的。由表 2 可知, 不同食物对一龄幼虫的影响差异不大, 共需 40 h, 在二龄期间, 喂食鱼腥藻的幼虫比喂食酵母的要慢 12 h, 三龄要慢 18 h, 四龄则慢 48 h, 至化蛹为止, 饲喂鱼腥藻的整个幼虫期比饲喂酵母的延长了 52 h。

2.4 不同龄期蚊幼虫对鱼腥藻的摄食趋势

由图 1 的浓度变化可见, 不同龄期的蚊幼虫在相同时间内对鱼腥藻的摄食趋势是不同的, 平均摄食速度分别为 $3.78 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $5.18 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $6.67 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$ 和 $1.41 \times 10^5 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$ 。可见, 随着龄期的增长, 蚊幼虫的摄食速度呈递增趋势。一龄、二龄、三龄之间的变化比较平缓均匀到四龄后, 摄食速度明显加快, 是其它龄的 2—4 倍。

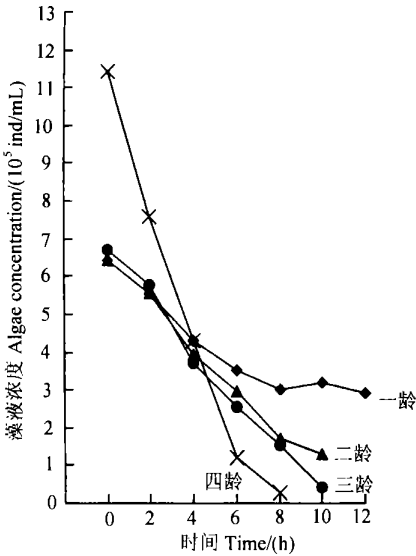


图 1 不同龄期蚊幼虫摄食鱼腥藻的趋势 (pH7—8, 27±1)

Fig. 1 Feeding tenacity of different Larval instars on *Anabaena* (pH7— 8, 27±1)

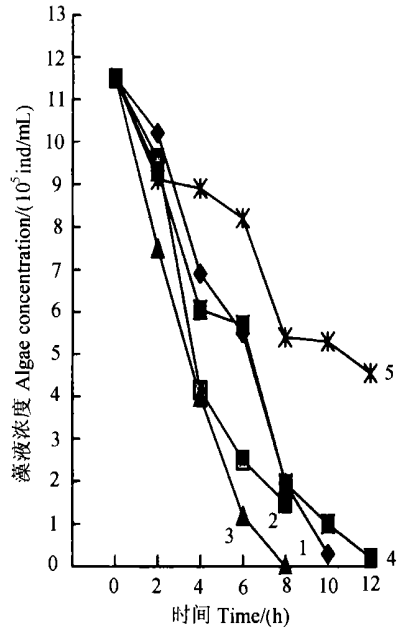


图 2 不同 pH 值对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响 (27)

Fig. 2 Effect of pH on feeding ability of mosquito larvae on *Anabaena*
1. pH 11— 12; 2. pH 9— 10; 3. pH 7— 8;
4. pH 5— 6; 5. pH 3— 4

2. 5 不同 pH 值对蚊幼摄食鱼腥藻的影响

由图 2 可知, 不同 pH 值对蚊幼虫的摄食影响较大。经计算 1—5 的速度分别为 $1.12 \times 10^5 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $1.42 \times 10^5 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $1.43 \times 10^5 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $9.40 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $5.40 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, 其中在 pH 为 7—8 时藻液浓度下降最快, pH 过大或过小均减慢。同时表明, 蚊幼虫的适应 pH 值范围较广, 在酸碱条件下均可摄食生存, 但以略碱性条件为最佳, 这可能与蚊幼虫肠道呈弱碱性有关。

2. 6 不同温度对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响

在一定温度范围内, 由图 3 可知, 随着温度的升高蚊幼虫的摄食量也加强, 表现为藻类浓度下降较快; 随着温度的进一步升高, 摄食强度有下降趋势。经计算摄食速度依次为: $21.5 : 2.30 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $24.0 : 2.90 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $26.0 : 5.53 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $28.5 : 7.20 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $31.0 : 3.00 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$ 。28.5 时摄食最为旺盛, 其次为 26 , 同蚊幼虫生活的适宜温度 25—30 的范围是一致的。

2. 7 不同藻液浓度对蚊幼虫摄食鱼腥藻的影响

由图 4 可知, 从 1—5 的浓度下降速度依次为 $8.00 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $6.30 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $3.40 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $2.40 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$, $3.00 \times 10^4 \text{ ind/mL} \cdot \text{h}$ 。可见在一定时间内随着浓度的增大, 藻液浓度下降速度有增大的趋势。这主要与蚊幼虫的滤食性^[11]摄食方式有关。蚊幼虫滤取一定时的藻液, 从高浓度的藻液中摄食的鱼腥藻比从低浓度的藻液摄取的鱼腥藻更多, 从而导致高浓度藻液的下降速度较低浓度的藻液为快。

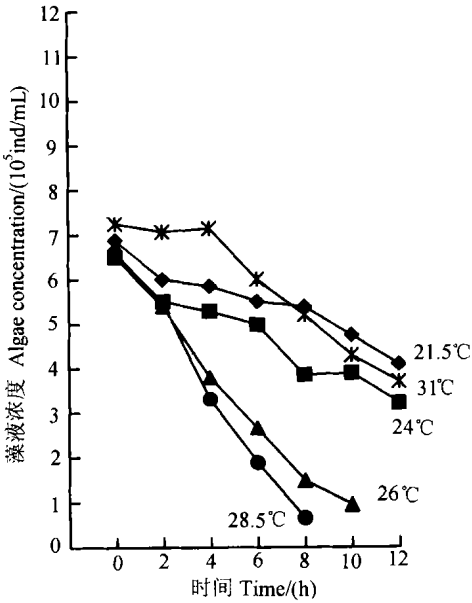


图3 不同温度蚊幼虫摄食鱼腥藻的结果(二龄幼虫, pH7- 8)

Fig. 3 Result of mosquito larvae feeding on *A. nabaena* at different temperature (second instar, pH7- 8)

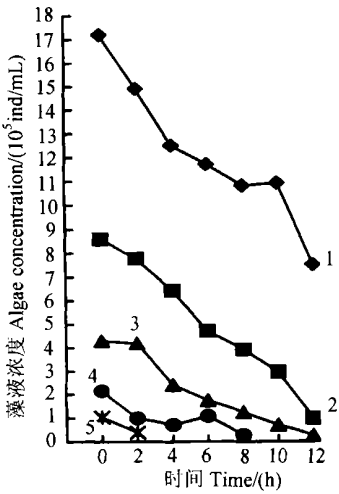


图4 不同藻液浓度蚊幼虫摄食鱼腥藻的结果(二龄幼虫, pH7- 8, 29)

Fig. 4 Result of mosquito larvae feeding on *A. nabaena* at different algal concentration second instar, pH 7- 8, 29)

3 小结和讨论

3. 1 从用鱼腥藻饲养蚊幼虫的一系列试验中可以看出, 较难为鱼类利用的鱼腥藻对蚊幼虫来说, 却是一种较合适的饵料。蚊幼虫能摄食鱼腥藻并可消化吸收, 最后完成其生活史。可见, 蚊幼虫的消化能力很强, 这与一般昆虫的消化作用极为发达^[15]是一致的。虽然鱼腥藻的饲养效果不及酵母, 使整个幼虫期延长了 52 h, 但估计对工程鱼腥藻的灭蚊效能应无明显妨碍。

3. 2 在不同的 pH 值试验中, 蚊幼虫在弱碱性条件下摄食旺盛。据资料^[13]记载, 细菌杀虫剂苏云金杆菌在弱碱条件下易萌发繁殖, 而双翅目的蚊虫中肠 pH 值在 6. 8—7. 8, 三者对弱碱要求的一致性, 更加证实了利用苏云金杆菌工程鱼腥藻灭蚊的可行性。

3. 3 在室内条件下, 综合多种因素的实验结果, 大致可以得出蚊幼虫摄食鱼腥藻的最佳条件是: pH 7—8, 温度 25—30 , 藻液浓度以较高为佳, 且随着幼虫龄期的增大, 摄食速度亦明显增加。

3. 4 在自然条件下, 鱼腥藻浓度很低, 而其它食物往往丰富, 蚊幼虫主要摄食细菌、腐屑和藻类^[11], 与本试验中饲喂浓度纯度培养的鱼腥藻相差甚远, 在实际应用中, 蚊幼虫能否摄食足够的鱼腥藻(假设已具有毒性)而达致死量, 尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] 刘维德等. 蚊类抗药性及其测定[M]. 北京: 科学出版社, 1979
[2] 陆宝麟. 蚊虫综合防治进展[J]. 昆虫学报, 1986, 29(1): 110—120
[3] 潘炯华. 食蚊鱼的生物学特性及其灭蚊用处的展望[J]. 华南师范学院学报, 1980, (1): 117

- [4] 李蓓思. 双季稻田养鱼防治效果观察[J]. 生物防治通报, 1986, 2(3): 135—137
- [5] 张世萍. 泥鳅在不同水体中的食谱及对蚊幼虫摄食量的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11: 373—377
- [6] 刘金发. 苏云金芽胞杆菌 H-14 现场灭蚊试验报告[J]. 昆虫学研究集刊, 1984(4), 139—144
- [7] 蔡保灵. 棒孢灭蚊霉对两种蚊虫的致病性研究初报[J]. 真菌学报, 1986, 5(1): 63—64
- [8] Schnetler, W, et al. Wirksamkeit von *Bacillus thuringiensis* Varisraelensis gegen Stechmücken larven and Nontarget organismen Mill dtsch, Gesally. Angew [J]. *Entomol*, 1981, (2): 195—202
- [9] 孔任秋, 徐旭东, 胡玉祥. 高效灭蚊幼转基因蓝藻的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1992, 5: 184—186
- [10] 吕颂雅, 刘子铎, 戴径元, 等. 苏云金芽胞杆菌杀蚊基因在鱼腥藻中克隆和表达的初步研究[J]. 水生生物学报, 1999(2): 174—178
- [11] Xu X D, Kong R Q, Hu Y X. High Larvicidal activity of intact recombinat Cyanobacteria *Anabaena* SP. PCC7120 expression gene 51 and gene 42 of *Bacillus sphaericus* SP. 2297[J]. *FEMS Microbiology etters*, 1993, 107: 247—250
- [12] Shang hao Li, Qianlin Wang. Nitrogen-fixing blue-green algae, a source of biofertilizer[R]. In, proc. Joint China-U. S. phycol. Symp, 1981, 479
- [13] De Marsac T, F. dela Torre, Saulmaister J. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus spharicus* 1593M in the Cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2[J]. *Mol. Gen Genet*. 1987, zoq: 396—398
- [14] Randy C M, Edward Stevens, JR. Cloning and expression of the Cry-IVO gene of *Bacillus thuringiensis* Subsp. israelensis in the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity [J]. *Appl. Envir. Microbiol*. 1992, 58(5): 1650—1655
- [15] Rosmarie rippka. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, 111: 1—61

FACTORS AFFECTING FEEDING ABILITY OF *CULEX PIPIENS* LARVAE ON *ANABAENA*

ZHANG Shi-ping, YANG Zhou, NIE Liu-ming, CHEN Xiao-xuan and YU Zi-mu
(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Under laboratory condition, the larvae of *Culex pipiens* Fatigans may feed a lot on *Anabaena* sp. and complete their life cycle. The retention time of *Anabaena* sp. in larval intestine was about 6 hours, while that of *saccharomyces* was about 5 hours, meaning that *Anabaena* sp is not so digestible for the larvae. From hatching to pupation, the larvae fed with *Anabaena* sp. lasted 194 hours and those fed with *Saccharomyces* were 142 hours, showing that the duration for complete larval stage of the former is 52 hours longer than that of the latter. By test, the optimum feeding conditions for mosquito larvae on *Anabaena* sp. are 7—8 in pH and 25—30 in water temperature. An increase in feeding quantity was observed when *Anabaena* sp. increases in density or mosquito larvae increased in size.

Key words: *Culex pipiens*; *Anabaena* sp; Feed