

神奇的殺蚊幼蟲藥劑——

蘇利菌以色列變種

蔡在壽

國立臺灣師範大學生物系

一、緒 論

過去四十年由於殺蟲劑之發明，使得各種疾病病媒之防治相當簡易，尤其在廣大之熱帶區，危害人類生命之瘧疾因而一度瀕臨絕跡。然而，却因為爆發出許多病媒昆蟲對殺蟲劑之抗藥性，環境污染以及新化學殺蟲劑之價格昂貴等等問題，使得病媒管制不只是在化學藥劑的使用而已。

許多重要的瘧媒蚊已對有機氯劑（organochlorines，如 DDT、BHC）、有機磷劑（organophosphates，如巴拉松、馬拉松）和氨基碳酸鹽（carbamates，如拜貢）產生了多重的抗性。例如，拉丁美洲的 *Anopheles albimanus* 和 *An. pseudopunctipennis*（表一），希臘和土耳其之 *An. sacharovi*，印度、伊朗、伊拉克和巴基斯坦之 *An. stephensi*，以及非洲之 *An. arabiensis*。最近，西非之蚋蠅 *Simulium soubrense* 和 *S. sanctipauli* 也已對新上市的藥劑 Temaphos 產生抗藥性了。

基於上述原因，大家已逐漸轉而求向病媒蟲之捕食者（predator）、寄生物（parasite）和致病原（pathogen）等天敵了。很不幸地，因為這許多天敵中，多數須在病媒昆蟲體內（in vivo）方可培育。因此至今尚沒有一種捕食者或寄生物可大量的培養或長期保存，以做為病媒管制之用。顯然，我們亟需一種具有化學殺蟲劑之性質（對標的生物具強毒性），可以大量生產，有長時效且可方便運送的生物殺蟲劑。

桿菌科（Bacillaceae）的桿菌（*Bacillus*）及芽胞桿菌（*Clostridium*）兩屬的細菌

表一 玻利維亞瘧媒蚊 *An. pseudopunctipennis* 對 4% DDT 之感受性試驗結果

試驗日期	蚊蟲源自地區	子代次*	死亡率	試驗紙 使用次別	評 斷**
1984-01-22	Tatarenda, Z-VII	F3	80	2	V
1984-05-25	Sarcocucho, Z-II	F1	98	1	S
1984-10-01	Chaco, Z-III, frente	HdC	83	2	V
1984-10-16	Sarcocucho, Z-II	F3	86	3	V
1984-11-27	Saipina, Z-VI	F18	85	1	V
1984-11-08	Palmar Chico, Z-VII	F2	85	1	V
1984-11-29	Palmar Chico, Z-VII	F3	43	2	R
1984-12-12	Guayabos, Z-III	HdC	98	1	S
1985-01-03	Chaco, Z-III, pueblo	F43	22	2	R
1985-01-04	Chaco, Z-III, pueblo	F43	45	1	R
1985-01-10	Saipina, Z-VI	F20	53	1	R
1985-01-15	La Aguada, Z-II	F30	96	1	V
1985-01-23	Guayabos, Z-III	F2	100	1	S
1985-01-30	La Plazuela, Z-IV	F26	97	1	V
1985-02-05	La Aguada, Z-II	F31	75	2	R
1985-02-14	Masicuri, Z-VI	F4	99	1	S
1985-02-18	Pescadito, Z-VI	F4	84	1	V
1985-02-21	Pescadito, Z-VI	F4	83	1	V
1985-02-26	Mataral, Z-II	F3	98	1	S
1985-04-02	Penones, Z-VI	F6	50	1	R

*HdC：就地測試 F：子代

**S：死亡率 98-100%，具感受性

V：死亡率 80-97%，待重新測試

R：死亡率 < 80%，具抗藥性

會形成孢子 (spores)。該兩屬細菌中，有些亦可產生毒素 (toxin) 以毒害昆蟲的胃部。其中一種形如結晶狀又可形成孢子的細菌，蘇利菌 (*Bacillus thuringiensis*, 簡寫為 *B.t.*)，於 1915 年首次被提及。今天，大家爭相以普通培養基來培養之結果，始樹立了“微生物殺蟲劑”工業。

公元 1975~76 年間，達和莉與瑪格莉特博士 (Drs. Tahori and Margalit) 在以色列進行滅蚊之生物殺蟲劑調查時，偶然發現在乾涸河床的一個水窟內 (15 × 60 公尺，水深不及 30 公分，鹽度為 900 mg Cl/1) 含有豐富的有機物，却有大量的家蚊 (*Culex pipiens*) 死亡，垂死的幼蟲如同瘟疫般滿佈在水面。此外，蛹及正欲自蛹殼羽化的成蟲也都溺死在水面上。

從該水窟邊緣取得的樣品水中 (含死亡和已被分解的幼蟲)，竟可分離並純化出細菌來。而自此純系培養的細菌 (命名為 ONR 60A)，已衍製出目今市售之 *B.t.i.* 試劑。此菌株 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) 之殺蚊幼蟲效力於 1976 年試驗，證實其對斑蚊、家蚊、瘧蚊及小蚊共四屬五種蚊幼蟲極具效力。該菌種後經世界衛生組織 (WHO) 帶給法國巴黎巴士德學院的哈咯博士 (Dr. H. de Barjac) 鑑定結果，確定為蘇利菌以色列變種血清型 H-14 (serotype H-14)，並加以詳細描述。

截至現在，蘇利菌共有 27 變種，24 個 H 血清型以及超過 50 種之突變株 (mutant)。

二、標的生物

自從 *B.t.i.* 應市後，世界各國之科學家已測試其對 72 種蚊幼蟲之毒性，該 72 種蚊蟲分別為：瘧蚊 (21 種)，斑蚊 (21 種)，家蚊 (17 種)，絨蚊 (5 種)，小蚊 (1 種)，沼蚊 (1 種)，叢蚊 (1 種)，苛蚊 (1 種) 及 *Limatus* (2 種)，*Psorophora* (1 種)，*Trichoprosopon* (1 種)。

該菌亦被證實對 22 種蚋蠅頗具效力：計有 *Simulium* (14 種)，*Cnephia* (2 種)，*Prosimulium* (1 種)，*Austrosimulium* (2 種)，*Eusimulium* (1 種)，*Odogonia* (1 種) 及 *Stegopterna* (1 種)。其他被用於測試對 *B.t.i.* 具感受性的昆蟲有 4 種屬濾食性之搖蚊及一種網蚋。這些昆蟲雖具感受性，唯其致死濃度約為殺蚊幼蟲之百倍濃度。因此，該藥劑最可推廣之處，乃其不傷及非標的生物。縱使將非標的生物與蚊幼蟲共養一處，亦不受 *B.t.i.* 之影響。如今，亦有報導指出 *B.t.i.* 對埃及斑蚊 (*Aedes*

表二 以生物殺蟲劑“Bactimos”(3,500 ITU/mg)之可濕性粉劑處理玻利維亞蚊幼蟲之半數致死劑量(LC₅₀)

蚊 蟲 種 別	品 系 及 子 代	LC ₅₀ (mg/l)
<i>Culex coronator</i>	La Aguada (Cochabamba)	0.0065
<i>Culex surinamensis</i>	Tiquipaya (Cochabamba)	0.01
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Tiquipaya (Cochabamba)	0.01
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Ciudad de Cochabamba	0.018
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Chaco (Chuquisaca) F1	0.03
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Estacion Caiza, F8	0.06
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	La Aguada (Cochabamba) F1	0.06
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	Rio pojo (Cochabamba) F7	0.11
<i>Anopheles argyritarsis</i>	La Aguada (Cochabamba)	0.15
<i>Anopheles albitarsis</i>	Guayaramer'in (Beni) F1	0.3
<i>Anopheles darlingi</i>	Guayaramer'in (Beni) F1	0.5
<i>Anopheles trinkae</i>	San Mateo Bajo (Cochabamba)	1.2
	F1	

F1 第 1 子代

aegypti, 該蚊乃黃熱病之主要病媒)之成蟲亦有效。將自該菌純化之完整晶體和已溶解之配劑,分別以灌腸法(enema)從蚊蟲之肛門注入蟲體內,其半數致死劑量(LD₅₀)為0.21和0.01 $\mu\text{g}/\ell$ 。

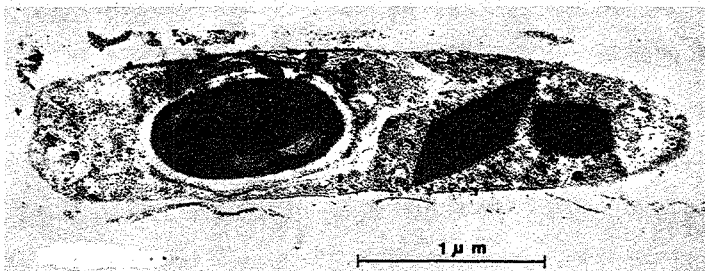
筆者於南美工作期間,曾多次以B.t.i.測試當地數種家蚊及瘧蚊幼蟲之感受性,結果如表二所示,其半數致死劑量顯然比前項結果為高,唯仍具效果。

三、蘇利菌以色列變種(B.t.i)之遺傳與生化特性

經萃取B.t.i. ONR 60A純系細菌後,發現該菌含九個質體(plasmid)。這些質體之分子量分別為3.6, 4.2, 4.8, 9.8, 10.2, 65, 72, 105及130百萬道爾頓(million dalton, 簡稱為Md)。究竟係那個質體帶有合成毒性晶體之基因,仍頗多爭辯

，然目今已有報告指出 72 Md 質體乃唯一與毒性有關，且所有晶體蛋白質均由 72Md 質體所合成。

蘇利菌以色列變種所異於其他變種者，乃其胞內結晶體並非規則的雙錐形（圖一）。該結晶體至少由三種蛋白質組成：一個明顯的蛋白質帶（分子量為 25,000~28,000，在 polyacrylamide 膠體電泳分析，可再分離成分子量為 25,000 及 28,000 之兩個電泳帶）及二個細帶（分子量為 65,000 及 130,000 之蛋白質）。該結晶體之電子顯微圖片似可見到其網狀基質（matrix）含有三個截斷面，以氫氧化鈉可將蛋白質溶解，殘餘的便是網狀基質。



圖一 蘇利菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的電子顯微照。其內有一個孢子及兩個毒素晶體（右）。當蚊子幼蟲吃進該孢子與結晶體後，腸內之鹼性溶液即將晶體溶解，使毒素釋出而溶蝕蟲蚊蟲之腸壁細胞，終而死亡。

結晶體未被蚊幼蟲吞食前即被溶解，將大大地減弱其殺蚊幼蟲之能力。因此，至今尚未知三個蛋白質中那一個具有殺幼蟲的能力？是否如前所述，只有 72Md 質體存在時，方能合成該三種蛋白質？

溶解的結晶對組織培養的細胞（如昆蟲和哺乳類之組織細胞）具有強毒性，以注射方法（非口服）注入尚在吮奶的老鼠體內，會引起溶血而致死。唯未明述對組織培養物之毒性，是否與殺蚊幼蟲之效力是否相同。最近，自 ONR 60A 菌種已育出不含分子量為 65,000 及 130,000 兩蛋白質之突變種，其對蚊蟲之毒性並不因缺乏該兩種蛋白質而受影響。因此，殺幼蟲之能力應屬分子量為 25,000~28,000 之結晶成分了。

四、作用機制（mechanism of action）

蘇利菌以色列變種之主要殺蟲活性，存在於側孢體（parasporal body），即通稱為

“結晶體”之內涵物。以色列變種之側孢體呈不規則狀，通常有兩個或多個緊臨著孢子。

蘇利菌其他變種之結晶和其次單元只是原毒素（protoxin），並不具有生物活性。其基本成分為分子量為 128,000 和 136,000 之多胜肽（polypeptide）。當此結晶被感受性昆蟲吞服後，腸分泌液使該晶體溶解，蛋白質分解酶（protease）使原毒素變成分子量為 65,000 之毒素（toxin）。此種溶解及蛋白質分解酶之作用方式並不見於以色列變種。前面已述，以色列變種之毒素分子量（25,000）遠小於其他變種，同時也未見有結晶溶解及蛋白質分解之現象；倘有溶解則會減弱毒性。

因此，蘇利菌結晶之真正作用方式迄今尚未完全瞭然。只知當結晶被吞入昆蟲腸道後，即釋出毒素。雖然具毒性之多胜肽尚未被分析出來，蘇利菌以色列變種結晶之毒蛋白，顯然有別於其他變種。以色列變種之結晶可在數分鐘內殺死蚊幼蟲，蘇利菌施放在鱗翅目（如蝶、蛾）幼蟲體上，數分鐘內也有類似的毒性作用。因此，我們認為各變種之 δ -內毒素（ δ -endotoxin）都具有相似之作用方式。

蘇利菌 δ -內毒素之主要標的物，在鱗翅目幼蟲為腸上皮細胞之質膜（plasma membrane）。以色列變種 δ -內毒素之標的細胞亦為腸上皮。B.t.i 毒素的水溶性製劑被證實可引起昆蟲和哺乳類細胞之快速溶解，對細菌的原質體却無作用。此外，某些細胞膜之磷脂質也是該內毒素之攻擊目標。B.t.i 毒素和由脂質構成的質膜相互作用，結果使膜的完整性受破壞，細胞發生溶解（cytolysis）。

五、生產與配方

目今西方工業國家只有三家公司專事生產 B.t.i，中國大陸已生產十噸且正改良醱酵技術以加速進展中。由於 B.t.i 可用人工培養基生產，因此許多具有椰子工業的開發中國家（如印尼、馬來西亞）多以椰子水或椰胚乳殘渣等廢料來做培養。

商業上大量生產 B.t.i 多採用深型醱酵槽。醱酵過程中需供應大量的空氣、含氮物、葡萄糖或澱粉及一些無機鹽。該過程中產生的毒素量取決於培養基的種類、溫度和菌株；毒素的產量與殺蟲力亦因生產裝置而異，至今尚未能以化學方法測定之。因此，直到現在決定毒素之活性仍以特定的蚊幼蟲做生物檢驗試驗（bioassay test），結果再換算成國際通用的毒性單位（ITU, International Toxic Unit）。現以酵素接合之免疫檢定（ELISA）可能發展成為 B.t.i 結晶之化學分析法。

B.t.i 主要有兩種配方。可濕性粉劑（wetable powder）之粒子集成小顆粒狀

；而懸浮液劑（suspension）則為孢子或結晶之濃縮液。可濕性粉劑之殺蚊幼蟲效果，常隨顆粒變大而增加，而以 $40 \sim 70 \mu\text{m}$ 為最佳。除此之外，現也發展出粒劑（granulate reagent），施用於植物覆蓋之發生地。為求顆粒能夠漂浮在水面上，讓昆蟲幼蟲有機會攝食之，常拌著軟木屑而施用。現歐美上市的兩種貨品，“Bactimos”及“Vectobac”均有上述粉劑與粒劑之配方出售。臺灣目前仍無生產，唯某些農藥公司已自國外引進一些由蘇利菌其他變種之毒素所製成的成品，專為防治農業及森林害蟲之用。對某些昆蟲之防治雖佳，惟成本偏高未能普及。

現就 B. t. i 在進入廣泛使用前所遭遇之困難敘述如下：

1. 蘇利菌以色列變種之製劑成品，常於施用後的產物，出現不同的成分與物理性質，也因而影響其生物效能。
2. 由於至今尚未有正確方法以檢驗該菌製劑之活性成分。目前，蘇利菌以色列變種之效力，只能以 20% 誤差之生物檢驗方法測定之，亟待發展出更新更精確的檢測之方法。
3. 蘇利菌以色列變種之製劑是一種天然微生物之產物，不易取得專利權。因此商家多半保有醱酵方法及配方之秘密了。而若能以遺傳工程方法建立變種方為上策。
4. 該變種若以遺傳工程為之，當不致有問題。問題乃如何建立一個可在低成本之培養基上，可快速生長且毒素產量多之品系。

六、安全性

由於 B. t. i 甚具專一性（specificity），對非標的生物包括人，均極安全。於施用約十年中，未曾發現有人類中毒之事件發生。經美國公共衛生單位多方安全試驗，證實其確實不對人有任何危險性之後，於 1980 年正式公告准以該菌種做大規模之野外試驗。B. t. i 極為安全，且無最高容忍量（maximum of tolerance），縱使加之於飲水內亦無妨。

最近雖有報導指出 B. t. i 之毒素晶體溶於鹼性溶液後，以高劑量注射於尚在餵乳之小白鼠腹腔內，會引起毒發而死亡；然以口服之老鼠則無碍。事實上，溶解之毒素根本無法進入人類或哺乳類之血液中，而引起明顯之危害。

1982 年於西非曾施用 240 噸的 B. t. i 以消滅蚊幼蟲及其他水生昆蟲，並沒有發生過任何不幸的事件。如今，蘇利菌以色列變種被視為最安全的殺蚊幼蟲劑。

七、野外田間試驗

全世界以 B.t.i 做小規模的野外試驗已有多次。從這些試驗中發現液體濃縮劑 (concentrate) 優於可濕性粉劑；而施用於水面又效果更優於空中噴灑。

以 B.t.i 做大規模消滅蚊幼蟲之野外試驗，曾在德國萊茵河畔之蚊蟲發生地進行過。以直升機對 1200 公噸水域施放蘇利菌以色列變種粉劑，和對 2200 公頃水域噴灑 750 公斤 B.t.i 粉劑與 2550 公升濃縮液之結果，均顯示頗具效果。

從事以蘇利菌以色列變種防治瘧蚊之試驗，中南美洲瘧疾猖獗的國家，均有機會獲世界衛生組織之援助並提供各種廠牌之藥劑，以防治瘧媒蚊。無奈南美天候地形之限制，大規模試驗之場地不易求；復加當地人民懶散，專業知識缺乏，故一些應進行的滅蚊計畫始終擱置，也使得該區依舊是瘧疾嚴重流行區域。

印尼曾以 B.t.i 試劑對瘧媒蚊 (*An. sundaicus*) 做野外評估，已證實其確可減少蚊幼蟲之密度，致人口居住區之蚊成蟲密度也因而降低。

八、蘇利菌以色列變種藥劑之持久性

蘇利菌以色列變種之最大經濟弊失，乃其施用於蚊幼蟲滋生地後之低穩定度。野外實地試驗之效果又常受水中有機物及固體粒子之影響：B.t.i 的滅蚊幼蟲效力常因水中出現有機物或不能表現其作用力，或大減其持久力。

九、未來展望

直到現在，B.t.i 尚未發生與化學殺蟲劑相互拮抗 (cross-resistance) 之現象，也未有蚊幼蟲對其產生抗性的報導。蘇利菌以色列變種藥劑之價格偏高，是大量施用的最大阻碍。如液體製劑之施用成本每公頃約需 1.87~5.7 美元。縱然如此，其價格仍只是傳統殺蟲劑之半價而已。而成本之計價顯然與施用者技術之熟練程度和環境之生態條件均有關。人們盼望於不久之將來，B.t.i 之價格會因生產技術之改進與銷售市場之擴大而逐漸滑落。

將來，B.t.i 或許也會涉及遺傳工程。若能將其細胞內質體之毒素基因轉接到某些種細菌，而建立一可在靜水池內低有機營養物之環境下發育良好，且可產生大量毒素的

菌種品系，則更是人們所期待的。雖然報導稱 *Bacillus sphaericus* 桿菌，可在上述的環境中生存，唯所含有之毒性遠不如 *B.t.i*。希望在遺傳學家、細菌學家以及昆蟲病理學家之共同努力下，昆蟲病媒之防治指日可待。

十、參考文獻

1. Barjac, H. de. 1978. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sero-type 14. C.R. Aca. Sci. Paris, ser. D., 286:797-800.
2. Clark, B.D. and D.H. Dean. 1983. A high molecular weight plasmid is associated with toxicity in *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Abst. Annu. Mtg. Am. Soc. Microbiol. p. 121.
3. Fast, P.S. 1982. Chemistry and biochemistry of biocides, pp. 21-27. In: F. Michal. Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases. UNDP/World Bank/WHO.
4. Goldberg, L.H. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37:355-358.
5. Gonzalez, J.M., Jr. and B. C. Carlton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. Plasmid 11:28-38.
6. Huber, H.E. and P. Luthy. 1981. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Composition and activation. p.2. In: E. Davidson. Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allenheld, Osmun Totowa, NJ.
7. Klowden, M. J., G.A. Held and L.A. Bulla, Jr. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol. 46:312-315.
8. Luthy, P., F. Jacquet, H.E. Hubert-Lukac and M. Hubert-Lukac. 1982. Physiology of the delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* including the ultrastructure and histopathological studies, pp. 29-36. In: F.

- Michal. Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases. UNDP/World Bank/WHO.
9. McLaughlin, R. E., H. T. Dulmage, R. Alls, T. L. Couch, D. A. Dame, I. M. Hall, R. I. Rose and P. L. Versoi. 1984. U. S. Standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. Bull. Entomol. Soc. Am. 30:26-30.
 10. Margalit, J., and H. Bobroglio. 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotype H-14. Entomol. 97:516-520.
 11. Margalit, J. and D. Dean, 1985. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1:1-7.
 12. Mosquito control, some perspectives for developing countries, pp. 37-40. Natl. Acad. Sci., Washington, D. C., March 1973.
 13. Ramoska, W. A., S. Watts and R. E. Rodriguez. 1982. Influence of suspended particulates on the activity of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. J. Econ. Entomol. 75:1-4.
 14. Schaefer, C. H. 1984. Development and field evaluation of *B. thuringiensis* H-14 against mosquitoes: Review of research activities outside of the special program (1980-1984). WHO.
 15. Smoth, R. A. and J. T. Ulrich. 1983. Enzyme-linked immunosorbant assay for quantitative detection of *Bacillus thuringiensis* crystal protein. Appl. Environ. Microbiol. 45:586-590.
 16. Thomas, W. E. and D. J. Ellar. 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. J. Cell Sci. 60:181-197.
 17. World Health Organization. 1982. Biological control of vectors of disease, World Health Organization, Geneva.
 18. Yamamoto, T., I. Iizuka and J. N. Aronson. 1983. Mosquito protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: Identification and partial isolation of the protein. Curr. Microbiol. p:270-284.