* 药效与应用 *

蝗虫微孢子虫(Nosema locustae) 对环境非靶标 有益生物的毒性效应

袁善奎1,蒋金花2,张 龙3,吴声敢2,柳新菊2,安雪花2,李 岗2

(1. 农业农村部农药检定所,北京 100125; 2. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所,杭州 310021; 3. 中国农业大学,北京 100193)

摘要:参照NY/T 3152—2017《微生物农药 环境风险评价试验准则》测定了0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对日本鹌鹑、意大利蜜蜂、家蚕、大型溞和斑马鱼等环境非靶标生物的毒性。结果表明,在供试的最大危害暴露剂量下,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对蜜蜂经口毒性的致死率为8.3%,但与对照组无显著差异;日本鹌鹑、意大利蜜蜂、家蚕、大型溞和斑马鱼与其接触均未出现死亡。上述结果表明0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对主要的环境非靶标有益生物较安全。

关键词:蝗虫微孢子虫:微生物农药:生态毒理:非靶标生物:毒性

中图分类号:TQ 450.2+61 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2020.03.008

Toxic Effects of Nosema locustae on Environmental Non-target Beneficial Organisms

YUAN Shankui¹, JIANG Jinhua², ZHANG Long³, WU Shenggan², LIU Xinju², AN Xuehua², Li Gang²

(1. Institute of the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China; 2. Institute of Quality and Standard for Agro-Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The toxicity of 20 million spores/mL *Nosema locustae* SC to some environmental non-target organisms such as *Coturnix japonica*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Daphnia magna*, *Brachydanio rerio* were determined according to NY/T 3152-2017 "Environmental Risk Assessment Test Guidelines for Microbial Pesticides". The results showed that the lethal rate of 20 million spores/mL *Nosema locustae* SC to honeybee oral toxicity was 8.3% at the maximum exposure dose tested, but there was no significant difference with the control group. No death occurred in *Coturnix japonica*, *Bombyx mori*, *Daphnia magna*, *Brachydanio rerio*, and *Apis mellifera* contact toxicity. The above results showed that *Nosema locustae* was relatively safe for major environmental non-target beneficial organisms.

Key words: Nosema locustae; microbial pesticides; ecological toxicity; non-target organisms; toxicity

随着化学农药环境污染问题的日益凸显,微生物农药以其选择性强、来源广泛、对人畜低毒、不易产生抗性、能兼顾生态平衡等优势受到了越来越多的关注。微生物农药主要是指用于防治危害农作物的病、虫、草、鼠害及促进作物生长的活体微生物^[1,3]。主要包括细菌、真菌、病毒、线虫及原生动物等^[2,3]。其中可利用的原生动物类微生物农药主要为微孢

子虫,约有200种,常用的有蝗虫微孢子虫、玉米螟微孢子虫和枞色卷叶蛾微孢子虫等。此类农药在防治棉铃虫、蝗虫、松毛虫上均有应用。蝗虫微孢子虫(Nosema locustae)是蝗虫等直翅目昆虫的专性寄生的单细胞真核原生动物,由Canning^[4]于1953年从非洲飞蝗体内分离鉴定并命名,并在长期的剂型研究与虫害防控中,其应用技术逐渐得以成熟发展,在

收稿日期:2020-04-24

基金项目:国家重点研发专项(2018YFD200100)

作者简介:袁善奎(1976—),男,湖北利川人,博士,研究员,主要从事农药环境风险评估研究与管理工作。E-mail: yuanshankui@agri.gov.cn

控制草地蝗虫方面取得了良好的效果[5-9]。

由于微生物农药在应用中可能通过直接在水体表面施用或土壤径流、感染微生物的昆虫的迁移等途径进入环境,不可避免地会与环境非靶标有益生物暴露接触。为更好地评估蝗虫微孢子虫的环境暴露风险,本研究按照NY/T 3152—2017《微生物农药环境风险评价试验准则》[10-14]要求,选取了5种典型的环境生物日本鹌鹑、意大利蜜蜂、家蚕、大型溞和斑马鱼为试验对象,以探究蝗虫微孢子虫对典型环境生物的毒性效应和安全风险,为该产品的安全应用提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试生物

鸟类毒性试验:日本鹌鹑(Coturnix japonica), 日本鹌鹑种蛋购自山东省日照市东港区老孟孵化 场,于本单位实验室孵化后用于试验。 蜜蜂毒性试验:意大利蜜蜂(Apis mellifera),购自浙江省义乌市佛堂镇王焕兴蜂厂,在本单位空地上驯养后用于试验。

家蚕毒性试验:家蚕(Bombyx mori),品种为"皓月×菁松",蚕种由浙江省蚕种质量检验检疫站提供,催青孵化至二龄起蚕后用于试验。

溞类毒性试验:大型溞(Daphnia magna),其亲 溞由沈阳化工研究院有限公司安全评价中心提供, 于本单位实验室繁殖后用于试验。

鱼类毒性试验:斑马鱼(Brachydanio rerio),AB型品系,种鱼购自武汉中科院水生生物研究所的国家斑马鱼资源中心,于本单位实验室繁殖后用于试验。

1.1.2 供试微生物农药

供试微生物农药为0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫 悬浮剂,由南通德益化工有限公司生产并提供。

1.2 试验条件

各环境生物毒性试验条件如表1所示。

表 1 不同非靶标生物的试验条件

试验类别	温度/℃	相对湿度/%	光照/黑暗时间比	pH值	水硬度/(mg·L ⁻¹)	溶解氧质量浓度/(mg·L-1)
鸟类	25.5~28.0	61~72	14/10			
蜜蜂	28.5~30.5	55.0~68.5	0/24			
家蚕	24.8~26.0	$73.6 \sim 76.0$	16/8			
溞类	20.0~20.3		$16/8^{a}$	$7.51 \sim 7.68$	150	$8.54 \sim 8.79$
鱼类	22.7~24.5		14/10	$7.32 \sim 7.53$	65~110	60.4%~102.1% ASV

注: *溞类毒性试验光照强度为1180~1270 lux; ASV表示空气饱和值。

1.3 试验方法

1.3.1 鸟类毒性试验

根据中华人民共和国农业行业标准NY/T 3152.1—2017《微生物农药环境风险评价试验准则第1部分:鸟类毒性试验》[10],试验按照最大危害暴露量要求设置1.0×10⁸ 孢子/kg体重共1个试验剂量(被试物直接经口暴露,即被试物所能配制的最大剂量),同时设置灭活对照组和空白对照组。

试验时,按照每100 g体重日本鹌鹑灌喂0.5 mL 试验溶液进行,连续经口暴露5 d。每组用日本鹌鹑雌雄各10只,饲养空间不小于300 cm²/鸟,2 h中毒症状调查后按常规方法喂食。处理组、灭活对照组和空白对照组同时进行。处理后,每天观察并记录受试日本鹌鹑中毒与死亡症状,同时记录死亡数,死亡数累计计算。

1.3.2 蜜蜂毒性试验

根据中华人民共和国农业行业标准NY/T 3152.2—2017《微生物农药环境风险评价试验准则

第2部分:蜜蜂毒性试验》叫进行最大危害暴露量试验(被试物所能配制的最大剂量),同时设置灭活对照组和空白对照组。

蜜蜂接触毒性试验:取0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂10 mL,与100 μL杰效利混匀作为接触试验的处理溶液(被试物所能配制的最大剂量)。采用"点滴法"进行暴露。点滴前,先用CO₂麻醉试验蜜蜂,然后用手动微量点滴仪对准蜜蜂中胸背板处点滴处理药液或灭活对照药液1 μL/蜂,待药液挥发后将蜜蜂移入蜂笼中,用脱脂棉浸泡适量50%蔗糖水(W/W),通过网眼供蜜蜂摄食。空白对照组直接饲喂50%蔗糖水,处理组和对照组均设3个重复,每个重复20只蜜蜂。处理后,每天观察并记录供试蜜蜂的中毒症状和死亡数。

蜜蜂经口试验:取0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂2.0 g与2.0 g蔗糖混匀,作为经口试验的处理溶液(被试物所能配制的最大剂量)。在饲喂器(一次性塑料滴管)中加入400 μL处理药液或灭活对照

药液,对蜜蜂进行饲喂。暴露4h后,测定每组试验溶液的消耗量,并将饲喂器取出,换用不含被试物的50%蔗糖水进行饲喂。处理组和对照组均设3个重复,每个重复20只蜜蜂。处理后,每天观察并记录供试蜜蜂的中毒症状和死亡数。

1.3.3 家蚕毒性试验

根据中华人民共和国农业行业标准NY/T 3152.3—2017《微生物农药环境风险评价试验准则第3部分:家蚕毒性试验》[12]进行试验,试验按照最大危害暴露量要求设置0.2亿孢子/mL共1个试验剂量(被试物直接浸渍桑叶,即被试物所能配制的最大剂量),同时设置灭活对照组和空白对照组。

试验时,将2cm×2cm左右的桑叶约5.0g放入保鲜袋中,加入浓度为0.2亿孢子/mL的试验药液5.0mL,桑叶充分浸润药液后取出自然晾干后,分成4等份转入培养皿中。将二龄起蚕挑入培养皿中,每皿20头,并盖上盖子,于植物培养箱内饲养,各处理设4个重复,每一培养皿为一重复。试验组和对照组同时进行。喂食染毒桑叶24h后,转入干净的培养盒内每天用不含被试物的桑叶正常饲喂。给药后,每天观察并记录家蚕的中毒症状和死亡情况。上簇第8天采茧调查幼虫死亡数、死笼数、结茧数、全茧量和茧层量等。计算家蚕幼虫死亡率、结茧率、茧层率及化蛹率。

1.3.4 潘类毒性试验

根据中华人民共和国农业行业标准NY/T 3152.5—2017《微生物农药环境风险评价试验准则第5部分: 溞类毒性试验》[13]进行试验,试验按照最大危害暴露量要求设计1.0×10⁶孢子/mL共1个试验浓度,同时设置灭活对照组和空白对照组。

试验时,将50 mL试验溶液加入到结晶皿(直径60 mm)中,然后用滴管加入试验用溞,每皿5只,盖上结晶皿盖后放入光照培养箱。处理组和对照组均设4个平行,每皿为1个平行。试验组和对照组同时进行。试验期间,每天喂新鲜浓缩的羊角月芽藻藻液,每隔3 d更换试验溶液。试验持续21 d,每天观察并记录大型溞受抑制数和中毒症状。

1.3.5 鱼类毒性试验

根据中华人民共和国农业行业标准NY/T 3152.4—2017《微生物农药环境风险评价试验准则第4部分: 鱼类毒性试验》[14]进行试验,试验按照最大危害暴露量要求设计1.0×10⁶ 孢子/mL共1个试验浓度,同时设置灭活对照组和空白对照组。

试验时,将斑马鱼加入到浓度为1.0×10⁶孢子/mL

蝗虫微孢子虫的试验溶液中,每烧杯10尾鱼,各处理设4个重复,每杯为1重复。试验组和对照组同时进行。试验期间,每天饲喂2次丰年虾,每隔3 d更换试验溶液。试验持续30 d,每天观察并记录斑马鱼的饲料食用情况、中毒症状和死亡情况。

1.4 数据处理

应用DPS软件对试验溶液处理组、灭活对照组和空白对照组进行差异显著性分析,并以此评估最大危害暴露量下0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对不同生物的影响。

2 结果与分析

2.1 鸟类毒性试验

试验期间,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂处理组、灭活对照组和空白对照组的日本鹌鹑均未出现死亡,且各处理日本鹌鹑均表现正常。表明0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量下对日本鹌鹑无致死毒性。

2.2 蜜蜂毒性试验

蜜蜂接触试验中空白对照组和灭活对照组的 蜜蜂平均死亡率分别为1.67%和0,蜜蜂经口试验中 空白对照组和灭活对照组的蜜蜂平均死亡率均为 1.67%(表2和表3),符合NY/T 3152.2—2017《微生物 农药 环境风险评价试验准则 第2部分:蜜蜂毒性试 验》中的质量控制要求,即空白对照组受试蜜蜂死 亡率不得超过20%,表明本试验有效。

蜜蜂接触试验中,空白对照组、灭活对照组和被试物处理组蜜蜂的平均存活率分别为98.3%、100%和100%。在蜜蜂经口试验中,空白对照组、灭活对照组和被试物处理组蜜蜂的平均存活率分别为98.3%、98.3%和91.7%。t检验结果显示,蜜蜂接触试验中t=-1.P>0.05。蜜蜂经口试验中t=-2.16,P>0.05(表2和表3),表明蜜蜂接触试验和经口试验的被试物处理组与其对应的对照组之间无显著性差异。因此,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量下对蜜蜂无致死毒性。

2.3 家蚕毒性试验

经0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂处理后,各处理对家蚕的影响如下:

对家蚕幼虫的影响:处理组、灭活对照组和空白对照组的家蚕幼虫均表现正常,且均未出现死亡,即受试家蚕的死亡率均为0,表明0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量下对家蚕无致死毒性。

表2	0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对蜜蜂接触毒性试验结果

AL TH	壬仁	/#· \- \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \		平均存活率			
处理	重复	供试数/只	死亡数/只	死亡率/%	存活率/%	(平均死亡率)/%	
	1	20	0	0	100		
空自对照	2	20	0	0	100	98.3 (1.67)	
	3 20		1 5.00 95.0		95.0		
	1	20	0	0	100		
灭活对照	2	20	0	0	100	100(0)	
	3	20	0	0	100		
	1	20	0	0	100		
被试物处理组	2	20	0	0	100	100(0)	
	3	20	0	0	100		

表3 0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对蜜蜂经口毒性试验结果

处理	重复	供试数/只 -	14 d					
处连			死亡数/只	死亡率/%	平均死亡率(平均存活率)/%	校正死亡率/%	校正存活率/%	
	1	20	0	0				
空白对照	2	20	0	0	1.67 (98.3)			
	3	20	1	5.00				
	1	20	1	5.00			95.0	
灭活对照	2	20	0	0	1.67 (98.3)		100	
	3	20	0	0			100	
	1	20	2	10.0		8.47	91.5	
被试物处理组	2	20	2	10.0	8.33 (91.7)	8.47	91.5	
	3	20	1	5.00		3.39	96.6	

对家蚕化蛹率的影响:空白对照组、灭活对照组和处理组的家蚕化蛹率分别为97.5%、96.2%和93.8%。差异显著性分析表明,处理组家蚕化蛹率与空白对照组、灭活对照组之间均无显著性差异(表4)。

对家蚕产茧量的影响:空白对照组、灭活对照

组和处理组的家蚕全茧量平均值分别为1.8369g、1.8466g和1.8788g; 茧层量平均值分别为0.3803g、0.3743g和0.3797g; 茧层率平均值分别为20.85%、20.44%和20.41%。差异显著性分析表明,处理组家蚕全茧量、茧层量和茧层率与空白对照组、灭活对照组之间相比均无显著性差异(见表5)。

表4 0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对家蚕生长发育、结茧率及化蛹率的影响

试验浓度/(孢子·mL-1)	供试虫数/头	幼虫死亡率/%	结茧率/%	化蛹率/%	$P_{0.05}$
CK(空白)	80	0	100	97.5 ± 2.89	a
CK (灭活)	80	0	100	96.2 ± 7.50	a
2.00×10^{7}	80	0	100	93.8 ± 4.79	a

注: Poss是指5%显著水平, Poss所在列中字母相同表示各处理间无显著性差异, DPS (18.10版) 计算所得。下表同。

表5 0.2亿孢子/毫升蝗虫微孢子虫悬浮剂对家蚕产茧量的影响

试验浓度/(孢子·mL-1)	全茧量/g	$P_{0.05}$	茧层量/g	$P_{0.05}$	茧层率/%	$P_{0.05}$
CK(空白)	1.836 9 ± 0.221 3	a	$0.380\ 3 \pm 0.044\ 0$	a	20.85 ± 2.21	a
CK(灭活)	$1.846\ 6 \pm 0.288\ 3$	a	$0.374\ 3 \pm 0.053\ 3$	a	20.44 ± 2.41	a
2.00×10^{7}	$1.878~8 \pm 0.280~1$	a	$0.3797 \pm 0.046 \ 5$	a	20.41 ± 2.25	a

2.4 溞类毒性试验

试验期间,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂处理组、灭活对照组和空白对照组的大型溞均未出现中毒症状。处理组、灭活对照组和空白对照组的大型溞活动抑制率均为0,表明0.2亿孢子/mL蝗虫微

孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量下对大型溞无致 死毒性。

2.5 鱼类毒性试验

试验期间,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂处理组、灭活对照组和空白对照组斑马鱼的死亡率

均为0,并且斑马鱼取食正常,无中毒症状,表明0.2 亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量 下对斑马鱼无致死毒性。

3 结论与讨论

本研究选取了5种典型的环境生物鸟、蜜蜂、家蚕、溞、鱼,通过最大危害剂量试验探究了0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对环境生物的毒性和安全风险。研究发现,0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂在最大危害暴露量条件下对鸟、蜜蜂、家蚕、溞、鱼均无致死毒性,并且对家蚕结茧数、化蛹率、全茧量、茧层量、茧层率等指标均无显著性差异影响,表明0.2亿孢子/mL蝗虫微孢子虫悬浮剂对供试环境有益生物安全。

蝗虫微孢子虫主要通过感染寄主脂肪细胞,释 放出孢原质裂殖增殖,产生新一代孢子,严重受感 染的脂肪体可完全被孢子取代。寄主由于丧失脂肪 体,以致取食和活动减少,发育延滞,蜕皮困难,产 卵减少,最后死亡。蝗虫微孢子虫作为疾病可以通 过健虫与病虫的相互残食、取食孢子污染的食物等 自然水平传播方式, 也可通过母带直接将该病传 播给子代的垂直传播方式, 在蝗虫种群中传播、流 行[1415]。故研究蝗虫微孢子虫对环境生物脂肪体的 影响,有利于更好地探究蝗虫微孢子虫对环境生物 的毒性及其致毒机制。研究发现,微生物农药在环 境和有机体内存在一个增值的过程,除了对生物体 的致死毒性,更多表现在致病性和对后代的影响。 因此,进一步深入开展蝗虫微孢子虫等微生物农药 在环境生物亲代和子代中的繁殖毒性,比如鸟类繁 殖毒性、蜜蜂幼虫毒性、大型溞和鱼类繁殖毒性等 有利于更好地评估微生物农药的环境风险。

目前,我国已发布实施了微生物农药对鱼类、鸟类、蜜蜂、家蚕、藻类、溞类等6项毒性试验的农业行业标准,以及微生物农药环境增殖试验准则3项(水、土壤、叶面),尚缺乏微生物农药环境风险评估程序类的标准^[16]。由于微生物农药是活的生物体,通常采用发酵或培养的技术进行生产,因此给产品质量控制带来困难,不同批次的产品质量差异较大,并且微生物菌种经过长期培养后还存在退化和变异的问题。因此,应对微生物农药进行深一步的环境毒理学研究,关注长期生产链和应用链,以及完善后期风险评估程序,推进微生物农药产业的健康发展。

参考文献

- [1] 束长龙, 曹蓓蓓, 袁善奎, 等. 微生物农药管理现状与展望 [J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 297-303.
- [2] 陈源, 卜元卿, 单正军. 微生物农药研发进展及各国管理现状[J]. 农药, 2012, 51(2): 83-89.
- [3] 张化霜. 微生物农药研究进展[J]. 农药科学与管理, 2011, 32(11): 22-25
- [4] CANNING E U. A new microsporidian, *Nosema locustae* n.sp., from the fat body of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides[J]. Parasitology, 1953, 43(3/4): 287-290.
- [5] 严毓骅. 试论拓宽生物防治范围,发展虫害可持续治理[J]. 昆虫学报, 1998(增刊1): 3-6.
- [6] 任程, 蒋湘, 石旺鹏. 蝗虫微孢子虫防治青藏高原蝗虫对主要天 敌种群数量的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004(4): 11-13.
- [7] 蒋湘.我国应用蝗虫微孢子虫治理草原蝗虫的现状及展望[J]. 青海草业, 2001, 10(2): 20-21.
- [8] 王振平, 塔娜, 严毓骅, 等. 蝗虫微孢子虫病在优势蝗虫种类中的 持续传播[J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 132-134.
- [9] 曹国兵,于红妍. 2 种不同剂型蝗虫微孢子虫防治草地蝗虫的药效研究[J]. 畜牧与饲料科, 2018, 39(8): 53-55.
- [10] 农业部农药检定所,环境保护部南京环境科学研究所. NY/T 3152.1—2017微生物农药环境风险评价试验准则 第1部分: 鸟类毒性试验[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [11] 农业部农药检定所,环境保护部南京环境科学研究所. NY/T 3152.2—2017微生物农药环境风险评价试验准则 第2部分:蜜蜂毒性试验[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [12] 农业部农药检定所,环境保护部南京环境科学研究所. NY/T 3152.3—2017微生物农药环境风险评价试验准则 第3部分:家蚕毒性试验[S]. 北京: 中国农业出版社,2017.
- [13] 农业部农药检定所,环境保护部南京环境科学研究所. NY/T 3152.5—2017微生物农药环境风险评价试验准则 第5部分: 溞类 毒性试验[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [14] 农业部农药检定所,环境保护部南京环境科学研究所. NY/T 3152.4—2017微生物农药环境风险评价试验准则 第4部分: 鱼类毒性试验[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [15] HENRY J E, OMA E A. Effect of prolonged storage of spores on field applications of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) against grasshoppers[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1974, 23 (3): 371-377.
- [16] 袁善奎, 王以燕, 师丽红, 等. 我国生物源农药标准制定现状及展望[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(1): 1-7.

(责任编辑:高蕾)