

行政院衛生署八十六年度 科技研究發展計畫期末報告

計畫編號：**DOH-86-TD-038**

計畫名稱：應用黑色素以保護蘇力菌以色列變種對矮
小瘧蚊之毒殺能力

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：陳正成

研究人員：劉雨田教授、李靜嫻、周思穎

本年度計畫執行期限：**85年7月1日至86年6月30日**

全程計畫執行期限：**85年7月1日至88年6月30日**

中華民國八十六年八月三十一日

目錄

目次

中文摘要	2
英文摘要	3
前言	4
材料與方法	6
結果	9
討論	11
結論與建議	13
參考文獻	14

圖次

圖一：蘇力菌以色列變種(1884 株)對埃及斑蚊幼蚊(Bora-Bora 株)毒殺效力之測定。	17
圖二：蘇力菌以色列變種(1884 株)可漂浮乳化劑對埃及斑蚊幼蚊(Bora-Bora 株)毒殺效力之測定。	18
圖三：紫外光(uv)對蘇力菌以色列變種(1884 株)毒殺中華瘧蚊幼蚊效力之影響。	19
圖四：黑色素對蘇力菌以色列變種(1884 株)毒殺中華瘧蚊幼蟲能力之保護效率之測定。	20
圖五：紫外光(uv)對蘇力菌以色列變種(1884 株)漂浮製劑毒殺中華瘧蚊幼蚊毒殺效力之影響。	21
圖六：紫外光(uv)對蘇力菌以色列變種(1884 株)漂浮防光製劑毒殺中華瘧蚊幼蚊毒殺效力之影響。	22

中文摘要

應用黑色素作為光保護劑，本實驗發展出一種蘇力菌以色列變種的飄浮防光製劑，且評估此一製劑對於蚊子幼蟲之毒殺效果。結果發現，在被 uv 照射後，蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑對瘧蚊的幼蟲的致死率顯然高於飄浮非防光製劑。此一結果顯示蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑將可用於防治瘧蚊尤其應用於不適宜使用化學殺蟲劑的瘧蚊滋生地。

關鍵詞：蘇力菌以色列變種；飄浮防光製劑；中華瘧蚊；微小瘧蚊；埃及斑蚊。

ABSTRACT

Using melanin as photoprotective agent, a flowable, uv-protective formulation of *Bacillus thuringensis* var. *israelensis* has been developed and its efficacy in mosquito larvicidal activity was evaluated. After exposure to uv radiation, the flowable, uv-protective formulation of *Bacillus thuringensis* var. *israelensis* resulted in significantly higher mortality rates of anopheline larvae at 24 hr posttreatment as compared with those of flowable non-uv-protective formulation. These results suggested that flowable, uv-protective formulation may be used for the management of anopheline populations, especially where the application of chemical insecticides is not suitable.

Key words : *Bacillus thuringensis* var. *israelensis* ; Flowable, uv-protective formulation ;
Anopheles minimus ; *Anopheles sinensis* ; *Aedes aegypti* •

壹、前言

目前應用最廣，且防治效果最佳之蚊蟲生物防治製劑為蘇力菌以色列變種 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*; B.t.i.)。B.t.i.在形成孢子過程中會在其孢子旁邊產生一個球狀蛋白結晶體，大小約為直徑 1 μm ，稱為 parasporal body，此 parasporal body 由 27KDa，65KDa，128KDa 和 135KDa 四個主要蛋白質構成，這些蛋白質對蚊子幼蟲皆有毒性，且為 protoxin (de Barjac, 1990)。Protoxins 經蚊子幼蟲吞食後，在中腸內會被鹼性腸液分解為 toxin，其分子量分別為 25KDa，30-35KDa 和 53KDa。而 toxin 會附在腸壁表皮細胞膜之 phospholipid 接受器上面，並且嵌入細胞膜使細胞膜產生微孔，進而造成細胞之 colloid-osmotic lysis 反應，細胞會因水的注入而膨脹，進而使表皮細胞脹破(Chilcott et al., 1990)。最後蚊蟲會因中腸壁之破壞而停止進食，並在數小時至三週內死亡(de Barjac, 1987; Charles & se Barfac, 1983; Lahkim-Tsor et al., 1983; Hofmann et al, 1988)。B.t.i.的毒性專一性很高，只對蚊子和蚋等雙翅目昆蟲有毒殺作用，對其它昆蟲如甲蟲，蜚蠊，蜻蜓，蝦，蟹等甲殼類動物及魚，蛙和哺乳類等脊椎動物皆無毒性(Siegle & Shaddock, 1990)為安全性非常高的微生物殺蟲劑。

由於 B.t.i.之毒蛋白結晶體易沉於水底因此在早期 B.t.i.對水面攝食之瘧蚊幼蟲的防治效果並不好，然而近年來 B.t.i.可飄浮性粒劑和濃液(flowable granules, flowable concentrates)之發展成功，已使此類殺蟲劑在非洲，亞洲和中南美洲等瘧疾嚴重流行區廣汎且有效的防治瘧疾主要病媒如 *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. albimanus*, *An. stephensi* 和 *An. quadrimaculatus* 等(Meisch & Oldacre, 1981; Sandoski et al., 1985; Major, et al., 1987; Lacey & Inman, 1985; Sandoski, et al., 1986; Basi, et al., 1989; Perich et al., 1990; Somask & Sattabongkot, 1990; Karch et al., 1991; Zaim et al., 1992; Asimeng & Mutinga, 1993)。然而 B.t.i.飄浮於水面時間愈長，其毒蛋白被紫外線破壞的機率就愈高(Ignoffo et al., 1981; Kuster, 1976; Pozsgay et al., 1987)。Ignoffo 和 Garcia(1978)就發現 UV 會使 B.t.i.毒蛋白之氨基酸產生過氧化游離根，進而使 B.t.i.在野外之毒性不穩定。我們的研究結果亦發現，在經過強度為 $1.34 \times 10^5 \text{ J/m}^2$ 之 253nm 波長 uv 照射後 B.t.i.完全喪失其對埃及斑蚊幼蟲之毒性(Liu et al., 1993)。因此保護 B.t.i.不受 uv 破壞，就成了以 B.t.i.防治瘧蚊幼蟲的重要課題。本實驗室的研究結果得知由遺傳工程製造之黑色素(melanin)在水中能有效的對抗 uv 照射以保護 B.t.i.對埃及斑蚊幼蟲之毒殺能力。當水中黑色素之含量為 3.4 $\mu\text{g/ml}$ 時，即使 B.t.i.被 $1.34 \times 10^5 \text{ J/m}^2$ 強度之 uv 照射其毒殺埃

及斑蚊幼蟲之能力仍可完全保存(Liu et al., 1993)，至於黑色素是否亦有保護 B.t.i. 毒殺瘧蚊幼蟲之能力則不得而知。因此本計劃擬以三年的時間來發展一套應用黑色素以增加 B.t.i. 在田間毒殺矮小瘧蚊幼蟲之能力，以達到矮小瘧蚊之生物防治效果。本計劃第一年將發展一套含有黑色素 B.t.i. 可飄浮防光濃液，並測試此類製劑在不同強度之紫外線照射下對矮小瘧蚊之毒殺能力，第二年則將矮小瘧蚊滋生地作小規模田間試驗，並找出最適當的施用劑量及施用期間，第三年本計劃則將探討此一製劑應用於其它病媒蚊如登革熱，日本腦炎之生物防治之可能性，本計劃若能發展成功，對我國病媒蚊之防疫工作必會有極大助益。本報告為第一年研究計劃的結果。

貳、材料與方法

一. 菌種及昆蟲：

a. 蘇力菌以色列變種 (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*)

蘇力菌以色列變種採用法國巴斯德研究所提供之標準菌株—1884 株。

b. *Streptomyces lividans* 66 及質體 PIJ 702

來自國內新竹食工所之菌種中心。

c. 埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*)

埃及斑蚊採用法國巴斯德研究所提供之標準蚊株 Bora-Bora，此蚊用以測定 B.t.i.之毒力。

d. 中華瘧蚊 (*Anopheles sinensis*)

中華瘧蚊自中興大學昆蟲系引進並在本實驗室進行繼代培養。

e. 矮小瘧蚊 (*Anopheles minimus*)

矮小瘧蚊採自臺南縣新化鎮，將採集幼蟲攜回實驗室，飼養至成蚊，再以人工交尾方式，維持生活史。

二. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 之製備：

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* 的培養方法依 Stewart 等人(1981)所描述的方法進行。芽胞和 endotoxin 結晶以 15,000g (Beckman, Model J2-21)離心收集。然後將收集之芽胞和 endotoxin 結晶懸浮液於 5 倍之冷去離子水中並於 Homogenizer 中打成均質化的溶液。均質液經 500 倍之 50 mM Tris HCl 緩衝液透析過濾後，凍乾保存於 4 °C 備用。

三. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 毒力之生物檢定：

依國際標準方法----de Barjac Protocol (Dulmage et al., 1990)進行。供測試之蚊子依標準方法飼養之四齡早期 Bora-Bora 株埃及斑蚊幼蟲(early L4, Bora-Bora strain *Aedes aegypti*)。每項測試至少有 5 個 B.t.i. 濃度。每個濃度測試三杯蚊蟲，每杯盛有 200ml 去離子蒸餾水內有 25 隻供試幼蟲，而對照組為 4 杯幼蟲，惟不加 B.t.i.，每項測試重複三次。IPS-82 之標準國際單位為 15,000 ITU/mg。

四. 黑色素之產生及分離純化(Liu et al., 1993)

先以質體 PIJ 702 轉形 *S. lividans* 66，因 PIJ 702 帶有黑色素生產基因，因此以

其轉形之 *S. lividans* 66 做為生產黑色素之生產菌株。生產菌株在含有 1.6% trypton, 1.0% yeast extract, 0.1% tyrosine 及 0.0017% CuCl₂ 之 50ml 黑色素培養基的 300ml 內凹三角錐瓶中於 28 °C 之振盪培養箱進行培養 4 天，然後取 50ml 菌液接種於含有一公升相同培養基之五升內凹錐瓶再於 28 °C 之振盪培養箱進行培養 4 天。最後將菌液以濾紙過濾，以 5N HCl 調濾液之 pH 3.0，再以離心方法收集沉澱之黑色素。黑色素之純化則先將黑色素溶於 pH8.0 之蒸餾水中，再以 sephadex DH-20 玻柱液態層析法，依 Chaug (1968) 的步驟進行。

五. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 之飄浮性防光製劑之製備：

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* 之飄浮性防光製劑之處方，綜合 Griffon (1954)，Overbreek(1952)，Lissant (1984), Fox (1986) 和 Melik & Fog (1988) 等人之研究結果，設計如下：

Part A	Mineral oil	40.0%
	Vegetable oil	5.0%
	Sorbitan sesquioleate	3.0%
Part B	δ-endotoxin solution	25.0%
	Melanin solution	25.0%
	Propylene glycerol	1.8%
	Carbomer 934 (resins)	0.2%

其中 sorbitan sesquioleate 做為乳化劑，而 Carbomer resins 做為乳化穩定劑，處方中之 δ-endotoxin 及黑色素的含量將依實驗的設計而改變，其它成份則固定不變。乳劑的備製係將 part B 加入 part A 以同一方向攪伴至成乳劑為止。其中油相佔 48% 而水相佔 52%。

六. 飄浮性防光製劑之生物檢定：

以上述(三)之 de Barjac Protocol 測試，並以 IPS-82 standard 作為比對，且另有不加 B.t.i. 之對照組所得之結果，依下列方式計算其 international unit (Dulmage et al., 1990)。

$$\text{Potency sample (ITU/mg)} = \frac{\text{LC}_{50} \text{ IPS-82}}{\text{LC}_{50} \text{ sample}} \times 15,000 \text{ ITU/mg}$$

七. 黑色素對 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 之保護效果測定

將含有不同黑色素濃度之 B.t.i. 飄浮性防光製劑以 253nm 波長之紫外線照射後依上述 (五) 測定其殘存之殺蟲效率 (ITU/mg) 而 uv 照射之劑量及方法悉依 Liu et al., 1993 所建立之方法進行。

參、結果

一、蘇力菌以色列變種和埃及斑蚊之培養及生物檢測系統之建立

本實驗室自法國巴斯德研究所引進蘇力菌以色列變種之標準菌株(*Bacillus thuringiensis israelensis* strain 1884)和標準蚊種(*Aedes aegypti* Bora-Bora strain)。兩者皆已在本實驗室繼代培養。然後檢定本實驗室所生產之蘇力菌以色列變種(1884株) δ -endotoxin 之毒力為 15,000ITU，與國際標準之 IPS 82 δ -endotoxin 相同。

二、蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑對 Bora-Bora strain 埃及斑蚊毒殺能力之測定

如圖一所示蘇力菌以色列變種(1884株)具有很強的毒殺 Bora-Bora strain 埃及斑蚊的能力。惟若 δ -endotoxin 被 $14 \times 10^4 \text{J/m}^2$ 之 uv 光照射 2.5 小時後，則完全喪失其對幼蚊毒殺能力。而黑色素具有防止 uv 破壞蘇力菌以色列變種的毒殺幼蚊能力，例如 4 mg/ml 濃度之黑色素，具有保護蘇力菌以色列變種(4 μg δ -endotoxin/ml) 被 U.V 破壞其幼蚊毒殺能力之 38.7%。又如圖二所示由本實驗設計之可飄浮蘇力菌以色列變種之乳化製劑其毒殺幼蚊之能力則稍受影響，其可能原因有二，一為埃及斑蚊之幼蚊較喜在水底攝食，而飄浮在水面之蘇力菌以色列變種則較不易被幼蚊取食，因此飄浮製劑之幼蚊毒殺能力較沈於水底之非飄浮性蘇力菌以色列變種稍差。二為飄浮製劑之製造過程影響蘇力菌以色列變種之毒殺幼蚊能力。本研究之另一項發現為本實製備之蘇力菌以色列變種可飄浮乳化劑具有抵抗 uv 光照射破壞的能力，(圖二)飄浮製劑加上黑色素所製成之飄浮防光製劑則其保護 uv 破壞幼蚊毒殺能力之效果更佳。顯然本實驗所製備之飄浮防光製劑確實有防 uv 破壞的效果。

三、蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑對瘧蚊幼蟲毒殺能力之測定

如圖三所示，蘇力菌以色列變種對中華瘧蚊幼蟲具極佳的毒殺能力。當濃度為 25 $\mu\text{g/ml}$ 時，蘇力菌以色列變種能毒殺所有中華瘧蚊之幼蟲。而紫外光照射可以顯著降低蘇力菌以色列變種對中華瘧蚊幼蟲之毒殺能力。當照射強度為 $14 \times 10^4 \text{J/m}^2$ 時其幼蟲毒殺能力降至 32%~45%。而無論有無照射紫外光，黑色素皆無法有效保護蘇力菌以色列變種對中華瘧蚊之毒殺能力(圖四)。

如圖五所示，蘇力菌以色列變種之飄浮製劑被 uv 照射後其對中華瘧蚊幼蟲之

反而增加近 1.8 倍，而 25ug/ml 之黑色素存在於蘇力菌以色列變種時，可將中華瘧蚊之致死率提高近四倍，顯然黑色素具有提高蘇力菌以色列變種之毒殺能力，且具保護蘇力菌以色列變種對瘧蚊幼蟲毒殺能力被紫外光破壞之能力。

肆、討論

蘇力菌以色列變種 (*Bacillus thuringensis* var. *israelensis*) 對某些雙翅類幼蟲具有高度的毒殺能力 (Harvey et al., 1983; Hofmann et al., 1988; Knowles and Ellar, 1987)。目前已廣泛用於防治家蚊、瘧蚊和蚋等重要的人類疾病的病媒。雖然其詳盡的幼蟲毒殺機制尚未完全被闡明。一般認為其毒殺作用主要是因其毒蛋白 δ -endotoxin 在被昆蟲幼蟲攝食至其腸道後，被鹼性的腸液蛋白酵素分解成毒蛋白然而附在腸壁細胞之 phospholipid 接受器上，引起腸壁表皮細胞之 colloid-osmotic lysis 而使細胞脹破所致 (Chilcott et al, 1990)。而許多實驗證據顯示 250 至 380nm 的紫外光照射對蘇力菌以色列變種的活性和毒性皆有決定性的影響 (Ignoffo et al., 1981; Kuster, 1976; Pozsgay et al., 1987)。而本實驗的結果，亦證實當 253nm 之紫外光照射能量為 1.34×10^5 J/m² 時，可使蘇力菌以色列變種對埃及斑蚊和中華瘧蚊之幼蟲毒殺能力完全喪失 (圖和圖)。Pozsgay et al. (1987) 發現當蘇力菌以色列變種被紫外光照射 40 小時後，其 30% 之 tryptophan 和 20% 之 histidine 之殘基皆被破壞，因此他們建議此一作用機制為紫外光被吸收後，將能量轉化為氧分子的光激發作用。Cohen et al. (1991) 則進一步推測 tryptophan 可能是蘇力菌以色列變種與接受器結合之主要 domain，而破壞 tryptophan 引起毒蛋白的三度結構改變，繼而失去其生物活性。

針對瘧蚊幼蟲喜好於水面攝食的習性，目前已有多種蘇力菌以色列變種之可漂浮性粒劑和濃液上市，且有效的使用於亞洲、非洲和中南美洲等瘧疾流行區來防治其主要病媒如 *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. funestus*, *An. albimanus*, *An. stephensi* 等 (Meisch and Oldacre, 1981; Sendoski et al., 1985; Major et al., 1987; Lacey and Inman, 1985; Sandoski et al., 1986; Bassi et al., 1989; Perich et al., 1990; Somsak and Sattabongkot, 1990; Karch et al., 1991; Zaim et al., 1992; Asimeng and Mutingna, 1993)。然而蘇力菌漂浮於水面時間愈長，其毒性受紫外光破壞的機率就愈高 (Ignoffo et al., 1981; Kuster, 1976; Pozsgay et al., 1987)。因此有不少的蘇力菌之防光製劑，如應用包囊技術 (Dunkle & Shasha, 1988)，粒劑 (Ashmed et al., 1973) 和加入紫外光遮避劑 (Morris, 1983) 等已被發展。此外亦有使用 chromophores 以與被激發的蘇力菌蛋白交換能量或者電子 (Margulies et al. 1985)。Colen et al., 1991 成功的利用陽性 chromophores 如 acriflavin, methyl green 和 rhodamine B 等對 *B. thuringensis* var. *kurstaki* HDI 作光保護。本實驗則發現黑色素在水中能有效的對抗紫外光照射以保護蘇力菌以色列變種對埃及斑蚊和中華瘧蚊幼蟲之毒

殺能力。

而本實驗室更進一步利用黑色素設計的蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑，則能保護紫外光對瘧蚊幼蟲毒殺能力，可將蘇力菌以色列變種對中華瘧蚊之毒殺能力提高約 4 倍左右，顯然此一製劑對瘧蚊的防治具有極佳效果。

伍、結論與建議

本實驗針對瘧蚊幼蟲在水表面攝食的習性，所設計的一種蘇力菌以色列變種飄浮防光製劑，具有極佳的瘧蚊幼蟲毒殺能力，因此應於下一年度進一步評估其在田間應用的效果以爲國內防治瘧蚊的參考。

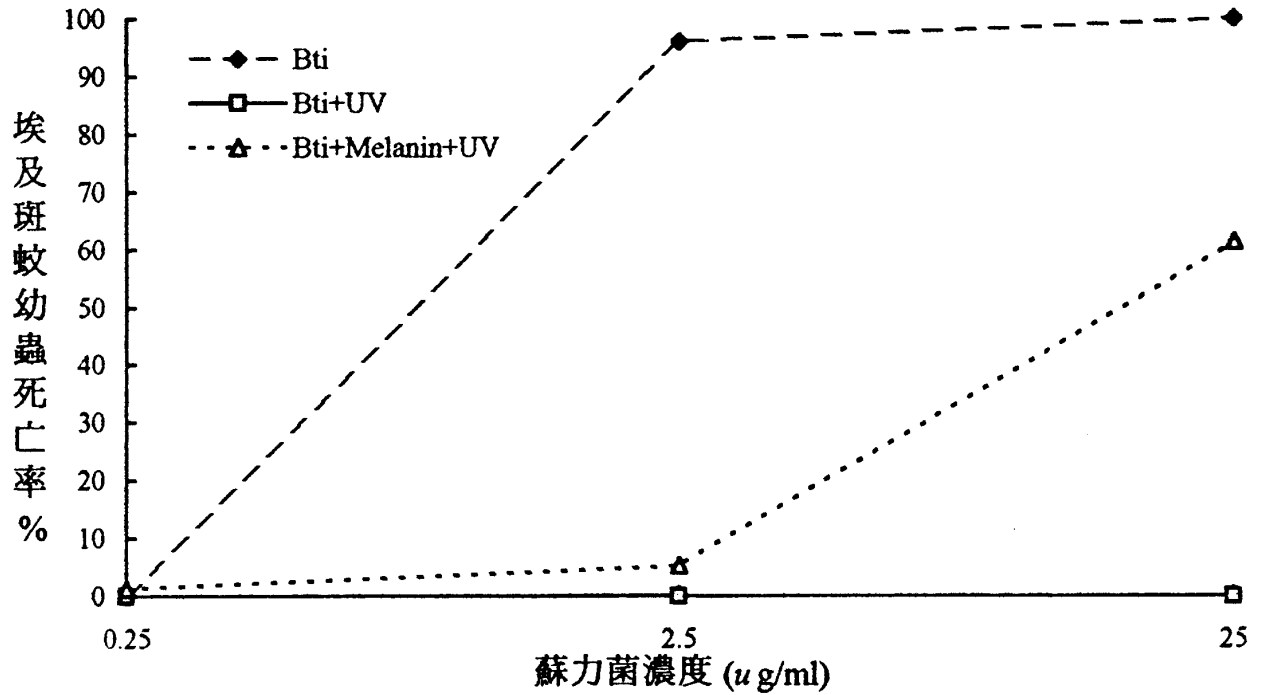
陸、參考文獻

- Asimery, E. J., Mutinga, M. J. 1993. Effect of rice husbandry on mosquito breeding at Mivea rice irrigation scheme reference to biocontrol strategies. 9:17-22.
- de Barjac, M. 1990. Charavterization and prospective view of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In :*Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. (de Barjac, H. & Sutherland, D. J. eds) Rutgers University Press, New Brunswick, pp. 11-44.
- Bassi, D. N., Weathersbee, A. A., Meisch, M. V., Inman, A. 1989. Efficacy of duplex and vectobac against *Psorophora columbiae* and *Anopheles quadrimaculatus* larvae in Arkansas rice fields. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 5:264-266.
- Chilcott, C. N., Knowes, B. H., Hillar, D. J., Drobniowski, F. A. 1990. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis israelensis* Parasporal body. In: *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies* (de Barjac, H. & Sutherland, D. J. eds.) Rutgers University Press, New Brunswick, pp. 45-65.
- Department of Health, 1991. Malaria eradication in Taiwan. Department of Health, The Execution Yuan, Republic of China Taipei.
- Fox, C. 1986. Rational for the selaction of emulsifying agente, *Cosmet. Toiletries*, 101(11):25-26, 28, 34, 36, 38-40, 44.
- Griffon, W. C. 1954. Calculation of HLB values of nonionic surfactante, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 5:249-256.
- Ignoffo, C. M., Garcia, C. 1978. UV-photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. *Environ. Entomol.* 7:270-272.
- Ignoffo, C. M., Garcia, C., Kroha, M., Fukuda, T., Couch, T. 1981. Labrotory test to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosq. News.* 41:85-93.
- Karch, S., Manzambi, Z. A. Salaun, J. J. 1991. Field trials with Vectolex (*Bacillus sphaericus*) and Vectobac (*Bacillus thuringiensis* H-14) against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* breeding in Zaire. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 7:176-179.
- Lacey, L. A., and Inman, A. 1985 Efficacy of Granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Anopheles* larvae in rice field. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 1:38-42

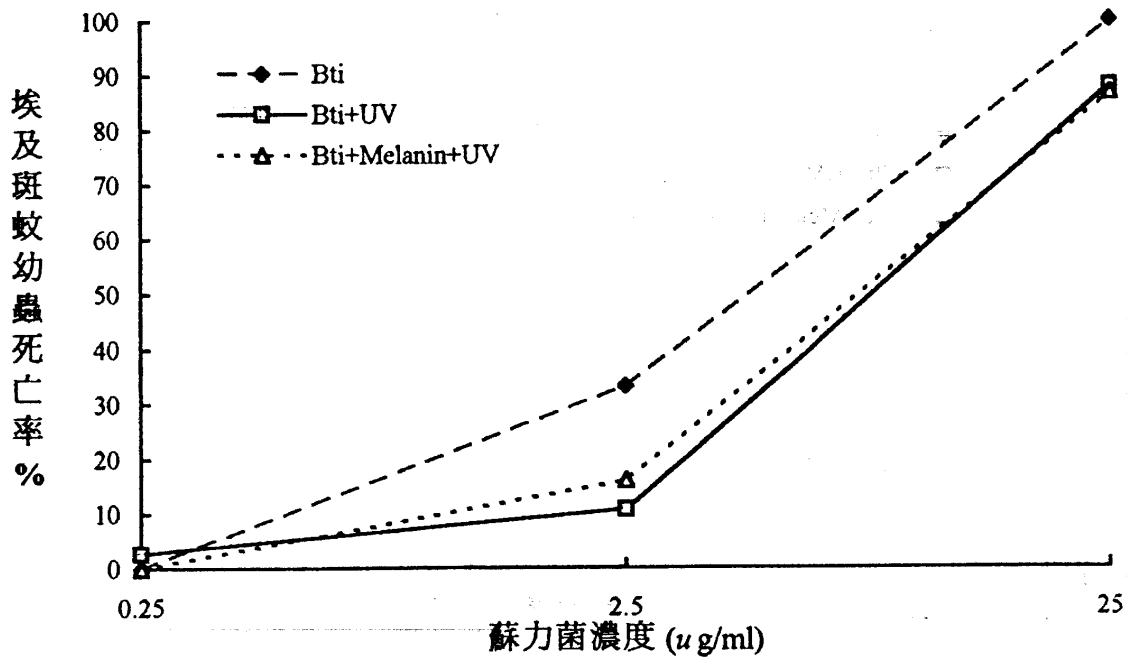
- Lissant, K. J. 1984. Thermodynamics. In : *Emulsions and Emulsion Technology* , part III (Lissant KJ, ed.), Marcel Dekker, New York, pp, 181-214.
- Liu, Y. T., Sui, M. J., Ji, D. D., Wu, I. H., Chou, C. C., and Chen, C. C. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62:131-136.
- Major, G., Ali, A., Sabatinelli, G. 1987. Laboratory and field efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Anopheles gambiae* s. l. and *Culex quinquefasciatus* in Ouagadougou, Burkina Faso. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3:20-25.
- Meisch, M. V., Oldacre, S. C. 1981. Assessment of industrial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Mosquito News*. 41:540-546.
- Melik, D. H., Fogler, H. S. 1988. Fundamentals of colloidal stability in quiescent-media. In: *Encyclopedia of Emulsion Technology*, vol 3 (Becher P, ed.), Marcel Dekker, New York, pp.3-78.
- Morishita, K., Kataga, T. 1933. Examination of the blood meals of Formosan anophelines by precipitin tests. *Journal of Zoology* (Tokyo) , (in Japanese) , Cited by DOH , 1991, Malaria Eradication in Taiwan.
- Perich , M. J., Boobar, L. R., Stivers, J. C., Rivera , L. A . 1990. Field evaluation of four biorational larvicide formulations against *Anopheles albioramus* in Honduras. *Medical and Veterinary Entomology*, 4:393-396.
- Overbeek, J. Th. G, 1952. The interaction between colloidal particle, In : *Colloid Science*, vol 1 (Krug HR, ed.), Elsevier, New York, pp.5-15.
- Pletch, D. J., Tseng, P. T., Chen, H. H. 1956. Daytime populations of anophelines in houses and stables of rural Taiwan (Formosa) , China. *Journal of the Formosan Medical Association*, 55:614-621.
- Pozsgay , M., Fast, P., Kaplan, H., and Carey, P. R. 1987. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12 : A Raman spectroscopy study. *J. Invertebr. Pathol.* 50:620-622.
- Sandoski, C. A., Yates, M. M., Olsom, J. K., and Meisch, M. V. 1985. Evaluation of Beecomist-applied *Bacillus thuringiensis* (H-14) against *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice field. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1 :316-319.
- Sandoski, C. A., Yearian, W. C. and Meisch, M. V. 1986. Swath width determination for

- Beecomist-applied *Bacillus thuringiensis* (H-14) against *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice field. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2 :461-468.
- Somsak, P., and Satta bongkot. 1990. Comparison of development of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate pathology*. 55 : 189-201.
- Tseng, P. T., and Hsieh, H. C. 1954. Natural infections of *Anopheles* with malaria parasites in Southern Taiwan (Formosa) : A report on recent dissections. *Journal of the Formosan Medical Association*. 50:263-267.
- World Health Organization. 1993. International travel and health-vaccination requirements and health advice. Geners.
- Zaim, M., Kasiri, H., and Motabar, M. 1992. Efficacy of flowable concentrate formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against larval mosquitoes in Southern Iran. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 8:156-158.
- 連日清. 1978. 本省產蚊蟲生態及其防治. 昆蟲生態與防治研討會講稿集. pp.37-69. 中央研究院動物研究所，臺北。

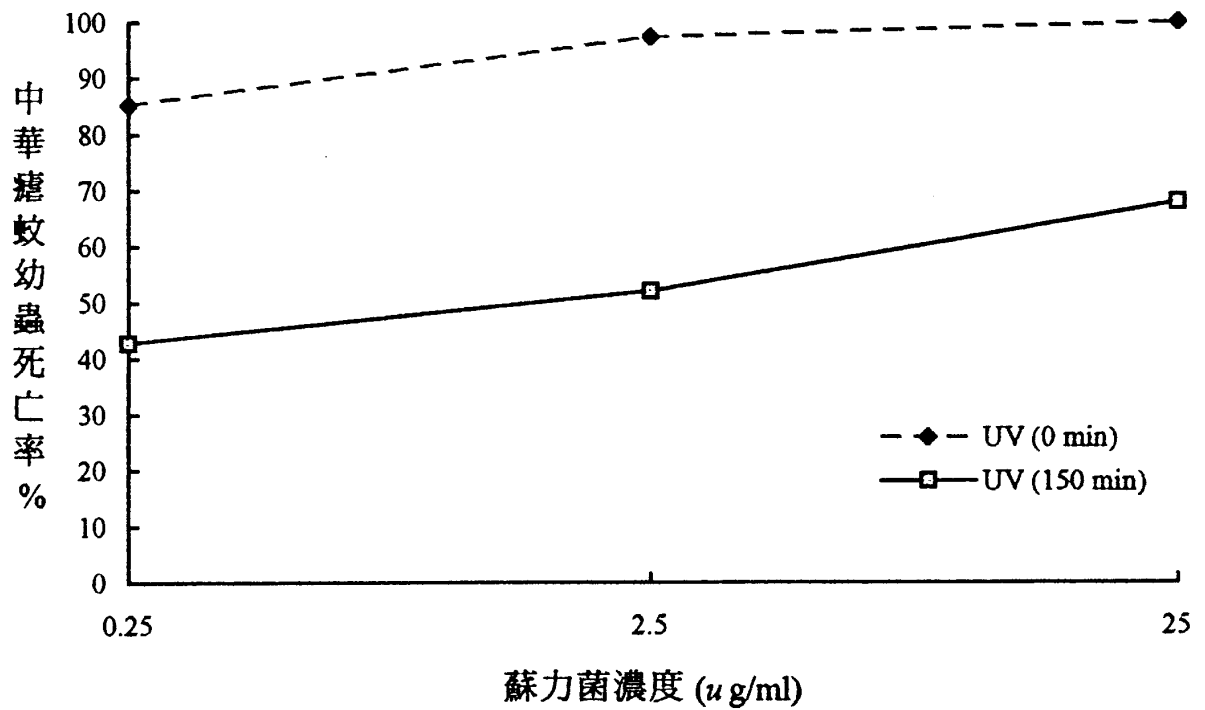
柒、圖表



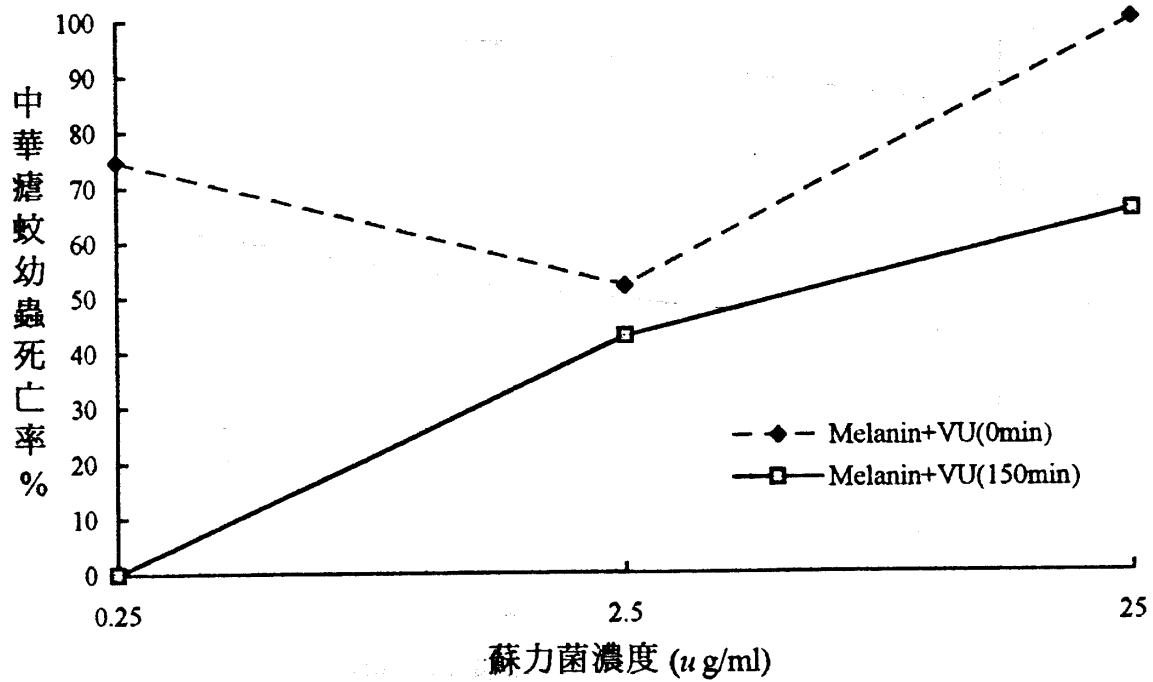
圖一：蘇力菌以色列變種(1884株)對埃及斑蚊幼蚊(Bora-Bora株)毒殺效力之測定。紫外光(UV)之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間為2.5小時，黑色素濃度為4mg/ml。Bti:*Bacillus thuringiensis israelensis*。



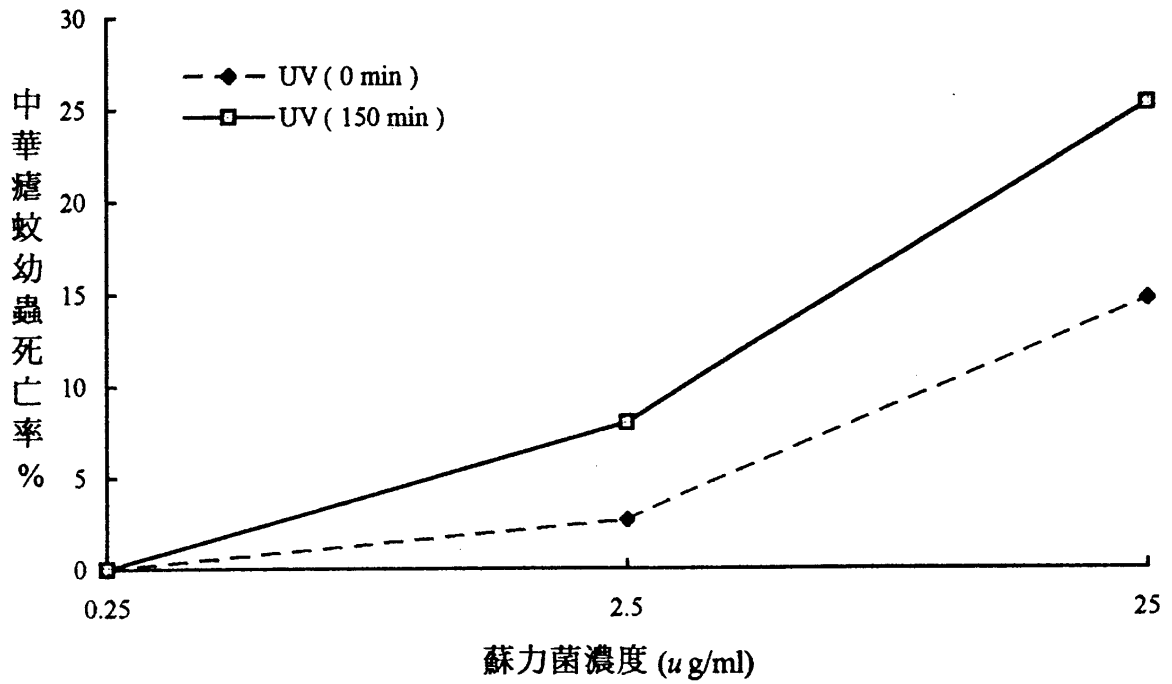
圖二：蘇力菌以色列變種 (1884株)可漂浮乳化劑對埃及斑蚊幼蚊(Bora-Bora株)毒殺效力之測定。紫外光(UV)之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間為2.5小時，黑色素濃度為4mg/ml. Bti:*Bacillus thuringiensis israelensis*.



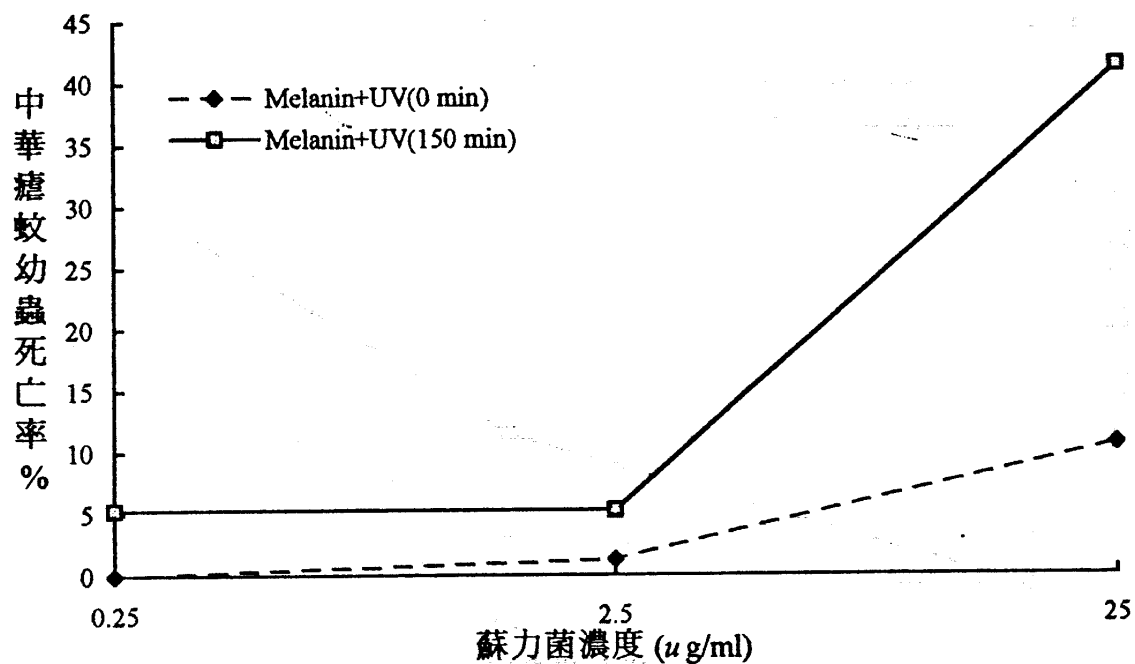
圖三：紫外光(UV)對蘇力菌以色列變種(1884株)毒殺中華瘧蚊幼蚊效力之影響。UV之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間分別為0及150分鐘，黑色素濃度為 4 mg/ml 。Bti:*Bacillus thuringiensis israelensis*。



圖四：黑色素對蘇力菌以色列變種 (1884株) 素殺中華瘧蚊幼蟲能力之保護效率之測定。UV之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間分別為0, 150分鐘，黑色素濃度為 4 mg/ml 。Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*。



圖五：紫外光(UV)對蘇力菌以色列變種(1884株)漂浮製劑毒殺中華瘧蚊幼蚊毒殺效力之影響。UV之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間分別為0, 150分鐘，黑色素濃度為 4 mg/ml 。Bti:*Bacillus thuringiensis israelensis*.



圖六：紫外光(UV)對蘇力菌以色列變種(1884株)漂浮防光製劑毒殺中華瘧蚊幼蟲毒殺效力之影響。UV之強度為 $14 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ ，照射時間分別為0及150分鐘，黑色素濃度為 4 mg/ml 。Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*.