

**Untersuchungen zum Auftreten von möglichen
Resistenzerscheinungen bei *Aedes vexans*
(Diptera, Culicinae) nach 15 Jahren Applikation
von *Bacillus thuringiensis israelensis***

MARIO LUDWIG & NORBERT BECKER

Eingegangen am 3. Juni 1997

Summary

Bacillus thuringiensis var *israelensis* has been widely used against the flood-water mosquito *Aedes vexans* for more than 15 years in the Upper Rhine Valley. *B.t.i.*-treatment by the German Mosquito Control Association (KABS) is covering an area of approximately 600 km².

In order to investigate a possible resistance against *B.t.i.*, the susceptibility of larvae of *Aedes vexans* field populations in 3 untreated areas (Lake Constance) and 6 *B.t.i.*-treated areas on both sides of the Rhine within the Upper Rhine Valley were assessed by bioassaying them with *B.t.i.* Comparing log-probit-analyses by statistical evaluations it was demonstrated that neither LC₅₀-values and slopes nor probit-lines of bioassays of the larvae deriving from the different areas showed significant differences. The results have been confirmed by resistance ratios which were 1.0 - 1.1 in all tests carried out, demonstrating that no resistance phenomena have yet developed in the areas of the Upper Rhine Valley treated with *B.t.i.*

1. Einleitung

In der Oberrheinebene spielen die Stechmücken als Lästlinge eine große Rolle und können die Lebensqualität der Bewohner der betroffenen Gebiete massiv beeinflussen. Besonders plagerregend ist die Überschwemmungsmücke *Aedes vexans* (Diptera, Culicinae), deren Brutplätze temporäre Gewässer im Überschwemmungsbereich des Rheines sind, die bei Hochwasser entstehen und nach 2 - 3 Wochen wieder trocknenfallen (BECKER & LUDWIG 1989). *Aedes vexans* zeichnet sich durch eine außergewöhnliche Massenvermehrung während der Sommermonate, einen starken Wandertrieb sowie eine ausgeprägte Stechlust aus (BECKER & LUDWIG 1983).

Seit 20 Jahren werden die Stechmücken des Oberrheingebietes im Rahmen des „integrierten Bekämpfungsprogrammes“ durch die Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage (KABS), Waldsee mit umweltverträglichen Mitteln bekämpft (BECKER & LUDWIG 1983, BECKER 1989). Seit 15 Jahren stellt die Bekämpfung mit *Bacillus thuringiensis israelensis* (*B.t.i.*) den Großteil der Bekämpfungsmaßnahmen dar. Diese Methode, die auf der toxischen Wirkung der bei der Sporulation gebildeten Proteinkristalle (Delta-Endotoxine) beruht, hat sich seit 1981 sehr bewährt, da sie äußerst selektiv und zudem kostengünstig ist (BECKER & LUDWIG 1981).

Nach 15 Jahren Bekämpfung stellt sich jetzt allerdings die Frage der Resistenz der Stechmücken gegenüber *B.t.i.* 1991 konnte durch eine Untersuchung gezeigt werden (BECKER & LUDWIG 1993), daß es noch keine Resistenzerscheinungen von *Aedes vexans* gegenüber *B.t.i.* im Oberrheingebiet gibt. Neuere Untersuchungen von SINEGRE et al. (1994), die erstmals im Freiland Resistenzerscheinungen von *Culex pipiens* gegenüber *Bacillus sphaericus* in Südfrankreich nachweisen konnten sowie erste Anzeichen von Resistenz bei *A. vexans*-Populationen, die im Labor über 25 Generationen unter Selektionsdruck gehalten wurden (KUHN, pers. Mitteilung) erforderten eine erneute, umfangreichere Überprüfung des Resistenzverhaltens von *A. vexans* im Bekämpfungsgebiet der KABS.

In der vorliegenden Untersuchung wird die Empfindlichkeit gegenüber *B.t.i.* von *Aedes vexans*-Populationen aus den seit 15 Jahren mit *B.t.i.* behandelten Oberrheingebieten mit der Empfindlichkeit von *Aedes*-Populationen aus noch nie mit *B.t.i.* bekämpften Gebieten (Bodenseegebiet, ca. 300 km entfernt) verglichen. Durch diesen Vergleich läßt sich zeigen, ob der 15 Jahre währende Selektionsdruck der *B.t.i.*-Bekämpfung im Oberrheingebiet bereits zu einer Resistenz geführt hat.

2. Material und Methode

Sogenannte „Schnakenerde“ (Erdproben, die Eier von *Aedes vexans* enthalten) wurde an folgenden Probestellen entnommen: A) Unbekämpfte Gebiete: 3 verschiedene Stellen am Bodensee (1, 2, 3) und B) Seit 15 Jahren mit *B.t.i.* bekämpfte Gebiete: 3 verschiedene Stellen rechtsrheinisch (4, 5, 6) und 3 verschiedene Stellen linksrheinisch (7, 8, 9).

Alle Erdproben wurden im April 1996 gesammelt. Die Bodenoberfläche (ca. 1 m²) an den verschiedenen Probestellen wurde mit einer Maurerkelle in einer Schichtdicke von ca. 1 - 3 cm zusammen mit den anhaftenden Pflanzenteilen abgetragen, in Plastikbeuteln verpackt und in ein Labor des Zoologischen Instituts I der Universität Heidelberg gebracht.

Da es sich bei *Aedes vexans* um eine polyzyklische Art handelt (BECKER & LUDWIG 1981), deren Larven erst nach einer winterlichen Kältephase und anschlie-

Bendem Temperaturanstieg schlüpfen, mußten die Eier konditioniert werden. Dazu wurden die Bodenproben im Gewächshaus bei $25 \pm 1^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von 3 Wochen gelagert, damit eine ausreichende Konditionierung (BECKER 1989) gewährleistet war.

Zum Fluten wurden die Erdproben in Plastikschüsseln gegeben und mit 20°C warmem Brunnenwasser überflutet, so daß eine Wasserschicht von $>10\text{ cm}$ über jeder Probe stand. Die geschlüpften Larven wurden bei 25°C , einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 80 % und einem 16 H/8 D Tag in den oben beschriebenen Aufzuchtgefäßen gehältert und mit zerriebenem Fischfutter (Tetramin®) gefüttert. Zum Erstellen der Bioassays wurden späte L_3 -Larven verwendet.

Die Bioassays wurden nach den WHO-Richtlinien (WORLD HEALTH ORGANIZATION 1981) durchgeführt: 50 mg BACTIMOS WP (Novo Nordisk, Dänemark) wurden in einem 20 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml Aqua bidest. gemischt. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines Magnetrührers (IKA-COMBIMAG REO) bei 700 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten. Eine weitere Homogenisierung erfolgte mit Ultraschall ($4 \times 15\text{ sec.}$ mit Pausen von 10 sec.) in einem Ultraschallbad der Firma Branson Instruments. Durch Hinzufügen von 0,1 ml des Homogenats zu 9,9 ml Aqua bidest. und anschließender Mischung wurde dann eine Gebrauchslösung hergestellt.

Von der mit *B.t.i.* behandelten Ausgangslösung (10 mg *B.t.i.*/Liter) wurde abhängig von der jeweils benötigten Endkonzentration eine bestimmte Menge in Plastikbecher mit einem Fassungsvermögen von 200 ml gegeben, die vorher mit 148 ml Aqua dest. gefüllt wurden. Anschließend wurden in jeden Becher mit Hilfe einer Pipette jeweils 25 Drittlarven von *Aedes vexans* in 2 ml Wasser eingesetzt. Als Kontrollen wurden Becher ohne *B.t.i.*-Zusatz benutzt. Pro Untersuchungsgebiet wurden 3 Runs durchgeführt. Ein Run bestand aus bis zu 7 unterschiedlichen Konzentrationen (0.005 - 0.1 mg *B.t.i.*/Liter), die aus statistischen Gründen in jeweils 3 Parallelansätzen durchgeführt wurden. Die Bioassays wurden bei $18 \pm 1^\circ\text{C}$ und einem 16 H/8 D-Tag durchgeführt.

Nach 24 und 48 h wurden die überlebenden Larven ausgezählt. Die prozentuale Mortalität wurde berechnet und mit Hilfe von Abbott's Formel (ABBOTT 1925) korrigiert. Die Resultate wurden mittels eines Computerprogrammes (FINNEY 1971, RAYMOND 1985) einer log-probit-Analyse unterzogen und die LC_{50} und LC_{90} -Werte bestimmt. Mit Hilfe des *t*-Tests nach Student und Duncan's multiple range Test (KÖHLER et al. 1984) wurden die Werte auf Signifikanz überprüft.

3. Ergebnisse

Sowohl die LC_{50} -Werte als auch die Steigungen der log-probit-Geraden (Tabelle 1) der Bioassays, die mit Larven aus den Gebieten 1 - 9 durchgeführt wurden, zeigten, keine signifikanten Unterschiede ($p \leq 0.05$) beim Vergleich mit Duncan's multiple range Test. Dieses Ergebnis wurde durch die Resistenzverhältnisse (Tab. 1), die mit einer Ausnahme (Gebiet 4: 1.1) alle exakt 1.0 betrugten, bestätigt.

Abb. 1. zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der LC_{50} - und LC_{90} -Werte der Bioassays, die mit Larven aus den Gebieten 1 - 9 durch-

Tabelle 1
LC₅₀-Werte, Steigung der log-probit-Geraden und Resistenzverhältnis
für alle Gruppen

Gebiet/Gruppe	LC ₅₀ ^a	Steigung	Rv ^b
unbehandelt 1	0.01151 ± 0.00113 a	5.58 a	
unbehandelt 2	0.01100 ± 0.00174 a	4.25 a	
unbehandelt 3	0.01105 ± 0.00132 a	4.53 a	
unbehandelt $\bar{x}$	0.01119 ± 0.00126 a	4.79 a	
behandelt 4	0.01212 ± 0.00155 a	5.31 a	1.1
behandelt 5	0.01114 ± 0.00146 a	4.77 a	1.0
behandelt 6	0.01131 ± 0.00176 a	4.01 a	1.0
behandelt 7	0.01157 ± 0.00186 a	5.17 a	1.0
behandelt 8	0.01087 ± 0.00031 a	4.17 a	1.0
behandelt 9	0.01102 ± 0.00168 a	3.78 a	1.0
behandelt $\bar{x}$	0.01131 ± 0.00138 a	4.53 a	1.0

^a Mittelwerte ± Standardabweichung (3 Parallelansätze) in µg/l nach 48 h.

^b Resistenzverhältnis (LC₅₀-Werte der Gruppen aus den mit *B.t.i.* behandelten Gebieten/ Mittelwert der LC₅₀-Werte der Gruppen aus den unbehandelten Gebieten. Werte die vom gleichen Buchstaben gefolgt sind, sind nicht signifikant verschieden ($p \leq 0.05$).

geführt wurden. Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede zwischen bekämpften und unbekämpften Gebieten festzustellen.

Abb. 2 vergleicht die log-probit-Geraden der Bioassays, die mit *Aedes vexans* aus unbekämpften und bekämpften Gebieten durchgeführt wurden. Die Parallelität der Geraden, die nahezu deckungsgleich sind, zeigt, daß es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Resistenzerscheinungen in den mit *B.t.i.* behandelten Gebieten des Oberrheingebietes gibt.

4. Diskussion

Resistenz gegenüber verschiedenen Mikroorganismen wurde nicht nur bei freilebenden Insektenpopulationen festgestellt, sondern wurde auch künstlich im Labor erzeugt (DAVIDSON 1992). So konnten SINEGRE et al. (1994) bei Untersuchungen in Südfrankreich eine signifikante Resistenz von *Culex pipiens* gegenüber *Bacillus sphaericus* nachweisen. TABASHNIK et al. (1990) konnten zeigen, daß Routinebehandlungen mit *B.t. kurstaki* in der Landwirtschaft innerhalb weniger Jahre zur Resistenz führen können.

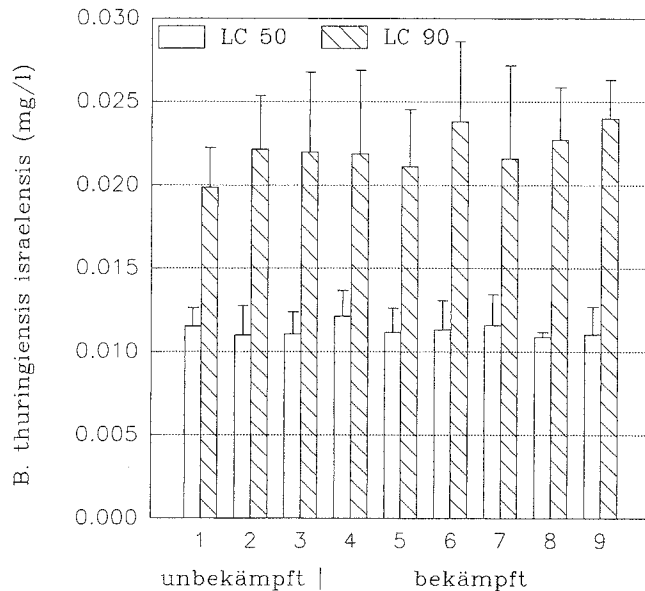


Abb. 1. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der LC₅₀- und LC₉₀-Werte der Bioassays mit *Aedes vexans*-Larven aus den 9 verschiedenen Gebieten (1 - 3 = nicht mit *B. t. i.* bekämpft, 4 - 9 = mit *B. t. i.* bekämpft).

Nur wenige Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Resistenzpotential von *B. t. i.* gegenüber Stechmücken und die Ergebnisse vermitteln kein eindeutiges Bild. Für das Freiland konnten KURTAK et al. (1989) zeigen, daß eine siebenjährige Dauerbehandlung mit *B. t. i.* innerhalb eines Onchocercose-Bekämpfungsprogramms in Westafrika keinerlei Resistenz bei *Simulium damnosum* hervorgerufen hat. BECKER & LUDWIG (1993) fanden keinerlei Anzeichen für eine *B. t. i.*-Resistenz bei *Aedes vexans* nach 10 Jahren *B. t. i.*-Applikationen im Oberrheingebiet. Im Labor konnte dagegen VASQUEZ-GARCIA (1983) bei *Culex quinquefasciatus* nach 32 Generationen unter künstlichem Selektionsdruck (LC₅₀) eine 5 - 7fach geringere Empfindlichkeit als bei der Parentalgeneration gegenüber *B. t. i.* feststellen. Dieses Resistenzphänomen verschwand allerdings nach 3 weiteren Generationen ohne Selektionsdruck wieder fast vollständig. GOLDMAN et al. (1986) fanden nach 14 Generationen Selektion nur bei einer von drei *Aedes aegypti* Populationen eine Verdopplung des Resistenzverhältnisses. GEORGHIOU et al. (1983), die einen höheren Selektionsdruck (LC₉₅) verwendeten, konnten bei *Culex quinquefasciatus* nach 32 Generationen eine 11fach geringere Empfindlichkeit gegenüber *B. t. i.* feststellen.

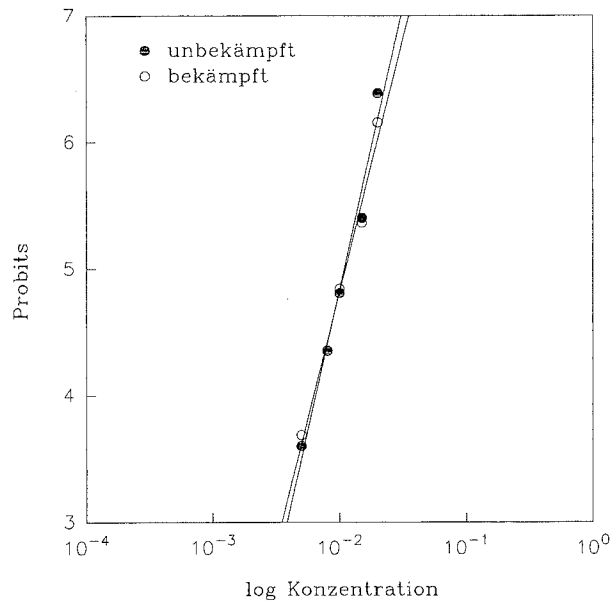


Abb. 2. Vergleich der log-probit-Geraden der Bioassays mit *Aedes vexans* aus bekämpften und unbekämpften Gebieten. Die Daten aus den Gebieten 1 - 3 und 4 - 9 wurden jeweils zusammengefaßt.

Es scheint mehrere Gründe zu geben, warum das Resistenzpotential bei *B.t.i.* so schwach ist:

1. Die *B.t.i.*-Toxine persistieren nicht über einen langen Zeitraum in der Umwelt (BECKER & LUDWIG 1989), da die Proteinkristalle nach wenigen Tagen von Mikroorganismen in den Gewässern bzw. im Boden abgebaut werden. So fehlt der ständige Kontakt zwischen Wirkstoff und Zielorganismus, der für eine Resistenzentwicklung notwendig ist.

2. Der einzigartige und sehr komplexe Wirkmechanismus von *B.t.i.* Die tödlichen Veränderungen an der Mitteldarmzellwand der Stechmücken werden von den synergistischen Effekten von mindestens 3 verschiedenen Protein-Toxinen (FEDERICI et al. 1990) hervorgerufen.

Wirken dagegen nur ein oder zwei Proteinkristalle, wie z.B. bei *B.t. kurstaki* oder *B. sphaericus* (SINEGRE et al. 1994), kann sich Resistenz offensichtlich schneller entwickeln.

3. Möglicherweise hat sich *B.t.i.* im Laufe der Evolution an seine Zielorganismen angepaßt und eigene Strategien entwickelt, die deren

Unempfindlichkeit entgegenwirken. Der o.g. komplexe Wirkmechanismus könnte eine solche Strategie darstellen.

4. *Aedes vexans* zeigt ein ausgeprägtes Wanderverhalten zwischen den einzelnen Brutgebieten (BECKER 1989). Dadurch kommt es zu einem ständigen Genaustausch. Durch diesen Genaustausch sowie durch die Tatsache, daß bei einem Hochwasser meist Larven verschiedener Generationen zum Schlüpfen kommen (BECKER & LUDWIG 1983), besitzt *Aedes vexans* einen großen Genpool. Aufgrund dessen können sich Resistenzgene offensichtlich nicht durchsetzen oder sind nicht vorhanden.

Zusammenfassung

Das Bakterium *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* wird seit mehr als 15 Jahren im Oberrheingebiet erfolgreich zur Bekämpfung der Überschwemmungsmücke *Aedes vexans* eingesetzt. Die *B.t.i.*-Behandlung durch die German Mosquito Control Association (KABS) erstreckt sich dabei auf ein Gebiet von nahezu 600 km².

Um eine mögliche Resistenz gegenüber *B.t.i.* zu untersuchen, wurde die Empfindlichkeit gegenüber *B.t.i.* von *Aedes vexans* Populationen aus 3 unbehandelten Gebieten (Bodenseegebiet) und 6 seit 15 Jahren mit *B.t.i.* behandelten Oberrheingebieten zu beiden Seiten des Rheins mit Hilfe von Bioassays miteinander verglichen. Ein Vergleich der log-probit Analysen mit Hilfe statistischer Methoden zeigte, daß weder die LC₅₀-Werte noch die Steigungen der log-probit Geraden der Bioassays mit Larven aus den verschiedenen Gebieten signifikante Unterschiede aufwiesen. Dieses Ergebnis wurde durch die Resistenzverhältnisse, die 1.0 - 1.1 betrugten, bestätigt. Es konnte somit gezeigt werden, daß sich in den seit 15 Jahren mit *B.t.i.* behandelten Oberrheingebiet noch keine Resistenz entwickelt hat.

Literatur

- ABBOTT, W. S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265 - 267.
- BECKER, N. (1989): Life strategies of mosquitoes as an adaptation to their habitats. Bull. Soc. Vector Ecol. 14: 6 - 25.
- BECKER, N., LUDWIG, H. W. (1981): Untersuchungen zur Faunistik und Ökologie der Culicinae und ihrer Pathogene im Oberrheingebiet. Mitt. dtsh. Ges. allg. angew. Entomol. 2: 186 - 194.
- BECKER, N., LUDWIG, H. W. (1983): Mosquito control in West Germany. Bull. Soc. Vector Ecol. 8: 85 - 93.
- BECKER, N., LUDWIG, H. W. (1989): Mikrobiologische Stechmückenbekämpfung. Biologie in unserer Zeit 19(4): 105 - 111.
- BECKER, N., LUDWIG, M. (1993): Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. J. Am. Mosq. Control Assoc.: 221 - 224.

- DAVIDSON, E. W. (1992): Development of insect resistance to biopesticides. *Pesq. Agropec. Brasil.* 27 (S/N): 47 - 57.
- FEDERICI, B. A., LÜTHY, P., IBARRA, J. (1990): Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis israelensis*. In: DE BARJAC, H., SUTHERLAND, D. J. (Hrsg.) *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. Rutgers University Press, New Brunswick/New Jersey: 17 - 44.
- FINNEY, D. J. (1971): *Probit analysis*. Cambridge Univ. Press, Cambridge 334 pp.
- GEORGHIOU, G. P., BAKER, J., AL-KHATIB, Z., MELLON, R., MURRAY, C., TRAN, H., VASQUEZ, M., PELSUE, F., HAZELRIGG, J. (1983): Insecticide resistance in mosquitoes: Research on new chemicals and techniques for management. *Annu. Rpt. Mosquito Control Research*, University of California: 86 - 90.
- GOLDMAN, I. F., ARNOLD, J., CARLTON, B. C. (1986): Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 317 - 324.
- KÖHLER, W., SCHACHTEL, G., VOLESKÉ, P. (1984): *Biometrie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 230 pp.
- KURTAK, D., BACK, C., CHALIFOUR, A., DOANNIO, J., DOSSOU-YOVO, J., DUVAL, J., GUILLET, P., MEYER, R., OCRAN, H., WAHLE, B. (1989): Impact of *B.t.i.* on black-fly control in the Onchocerciasis Control Programme in West-Afrika. *Israel J. Entomol.* 23: 21 - 38.
- RAYMOND, M. (1985): Présentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM, Ser. Entomol. med. Parasitol.* 22: 117 - 121.
- SINEGRE, G., BABINOT, M., QUERMEL, J. M., GAVEN, B. (1994): First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in Southern France. Abstracts of the VIII European meeting of the Society for Vector Ecology in Barcelona, Spain: 17.
- TABASHNIK, B. E., CUSHING, N. L., FINSON, S., JOHNSON, M. W. (1990): Development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of *Plutella xylostella* in Hawaii. *J. Econ. Entomol.* 83: 1671 - 1676.
- VASQUEZ-GARCIA, M. (1983): Investigations of the potentiality of resistance to *Bacillus thuringiensis* ser. H-14 in *Culex quinquefasciatus* through accelerated selection pressure in the laboratory. Ph.D. Dissertation, University of California, Riverside: 252 pp.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981): Report of informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H-14. Mimeographed documents TDR/BCV/BTH-14/811, WHO/VBC/81-828, Geneva 24 pp.

Adresse der Autoren:

Dr. MARIO LUDWIG

Dr. NORBERT BECKER

Kommunale Aktionsgemeinschaft zur
Bekämpfung der Stechmückenplage (KABS)
Ludwigstraße 99
D-67165 Waldsee