

УДК 576.895

**А.К. Сибатаев<sup>1,2</sup>, С.Ю. Семенов<sup>1,2</sup>, В.П. Перевозкин<sup>2</sup>, Ю.В. Андреева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

<sup>2</sup> Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета» (г. Томск)

## **ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И ГИПЕРКАПНИИ НА ЛИЧИНОК КРОВСОСУЩИХ КОМАРОВ**

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № 02.740.11.0278).

Приведены результаты экспериментального исследования влияния гипоксии и гиперкапнии на личинок комаров родов *Anopheles*, *Aedes* и *Culex*. Установлено, что личинки комаров рода *Aedes* являются самыми устойчивыми к гипоксии при полном отсутствии кислорода. При высокой концентрации растворенного кислорода в воде большая жизнеспособность характерна для личинок малярийных комаров *Anopheles beklemishevi* и *An. atroparvus* II возраста. Личинки комаров родов *Aedes* и *Culex* проявили большую устойчивость к гипоксии и гиперкапнии в сравнении с *Anopheles*. Дано объяснение различий в реакциях на указанные факторы, основанное на морфологических отличиях дыхательного аппарата личинок комаров родов *Anopheles*, *Culex* и *Aedes*.

**Ключевые слова:** кровососущие комары; регуляция численности; гипоксия; гиперкапния.

### **Введение**

Кровососущие комары семейства *Culicidae* являются переносчиками возбудителей ряда эпидемических трансмиссивных заболеваний [1, 2].

Для уничтожения кровососущих комаров на различных стадиях развития используют физические, биологические, химические и генетические методы [3, 4]. Активное использование парижской зелени ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$ ) в первой половине XX столетия против личиночной стадии привело к снижению численности кровососущих комаров на территории бывшего Советского Союза [1], а также к уничтожению *Anopheles gambiae* Giles, 1902 в Северо-Восточной Бразилии [5, 6] и *Anopheles arabiensis* Patton, 1905 в Египте [7]. В последние годы основные усилия по регуляции численности комаров направлены на уничтожение их имагинальной стадии. Такой подход, вероятно, обусловил заметный рост случаев трансмиссивных заболеваний как в Российской Федерации, так и в других странах, особенно в связи с усложнившейся демографической и экологической обстановкой в мире. По-видимому, истребление комаров на преимагинальной стадии является более эффективным противоэпидемическим мероприятием.

Применение ядовитых веществ химической или биологической природы для уничтожения комаров противоречит задачам защиты окружающей среды

от загрязнения, а использование различных организмов в биологической борьбе против комаров серьезно затруднено в связи с их ограниченным диапазоном условий обитания в отличие от жертв. Поэтому применение различных токсинов для регуляции численности комаров остается пока основным методом. Однако при многократно повторяющейся обработке химическими или биологическими инсектицидами популяции насекомых становятся устойчивыми к используемому препарату, что требует или увеличения дозы препарата, или его смены.

Для снижения численности переносчиков возбудителей эпидемических трансмиссивных заболеваний сегодня требуется разработка безопасных, эффективных и экономичных процедур, которые будут оказывать наименее неблагоприятное воздействие на окружающую среду и не вызовут резистентности у насекомых.

Из известных способов регуляции численности личинок комаров наименее вероятно формирование устойчивости к методам, основанным на асфиксии. Использование для этого нефти, различных масел и жирных спиртов [1], образующих пленку на поверхности воды, – очень эффективный, но не экологичный подход, так как при этом вносятся загрязняющие вещества, длительное время нарушающие экологическое равновесие в водоеме. Существенно более чистым является предложенный недавно способ с использованием углекислого газа и неорганических восстановителей, которые быстро превращаются в безвредное для биоты водоема вещество [8]. Метод предусматривает одно- или многократную обработку водоема в зависимости от результата, зафиксированного после обработки. Очевидно, что знание степени устойчивости различных групп (возрастных, видовых) к асфиксии и экзогенной гиперкапнии позволит заранее рассчитывать требуемую кратность обработки в зависимости от состава и структуры заселенности водоема преимагинальными стадиями комаров и разработать более эффективные способы уничтожения личинок комаров. Выяснению влияния гипоксии, гиперкапнии и их сочетания на выживаемость личинок комаров разного возраста родов *Anopheles*, *Culex* и *Aedes* посвящена эта работа.

### Материалы и методики исследования

Материалом для экспериментов послужили личинки кровососущих комаров родов *Anopheles*, *Aedes* и *Culex*. Род *Anopheles* был представлен тремя видами: *An. messeae* Fall., 1926, *An. beklemishevi* Stegnii et Kabanova, 1976 и *An. atroparvus* Van Thiel, 1927. Личинки первых двух видов выведены 15.07–21.07.2009 г. в лабораторных условиях из кладок самок, отловленных 12.07.2009 г. в с. Тегульдет Томской области. Комары *An. atroparvus* взяты из лабораторной линии, длительно содержащейся в ОСП «НИИ биологии и биофизики ТомГУ» (г. Томск). Личинки и куколки *Aedes vexans* Meigen, 1818 отловлены 06.05.2009 г. в естественном водоеме в окрестностях г. Томска. Комары *Culex pipiens molestus* Forskal, 1775 были выловлены в подвальных помещениях г. Томска. Опыты проводились в лабораторных условиях с использованием отстоянной водопроводной воды через сутки после отлова.

В каждом эксперименте, где исключался доступ личинок к атмосферному воздуху, применялись прозрачные пластмассовые флаконы объемом 27 мл с плотно прилегающими пробками. Сосуды наполнялись до краев водой и закрывались крышками таким образом, чтобы не было воздушных пузырьков. Измерялось время с момента изоляции от атмосферного воздуха до гибели личинок в емкости. В каждой повторности опытов в один флакон помещались 10 личинок комаров одного вида и возраста. Концентрации растворенного кислорода задавались путем внесения расчетного количества раствора сульфита натрия и аэрирования воды с помощью аквариумного компрессора. Концентрацию кислорода определяли оксиметром HI 9143 «Hanna» (Германия).

В экспериментах с углекислым газом использовался открытый стеклянный сосуд объемом 700 мл, в который наливали 200–250 мл воды. Углекислый газ на поверхность воды подавали из углекислотного огнетушителя. Опыты в разных сериях проводились при температурах воды: +10, +20 и +23°C.

В экспериментах с личинками *C. p. molestus* IV возраста использовалась схема, представленная в табл. 1. Повторность опытов: от двух до пяти.

Таблица 1

Варианты условий экспериментов с личинками *Culex pipiens molestus*

№ серии опытов	Концентрация в воде O <sub>2</sub> , мг/л	Температура, °С	Способ изоляции от атмосферы
1	7,5	23	Крышка
2	8,3	10	Крышка
3	1,5	23	Крышка
4	1,5	10	Крышка
5	0	23	СО <sub>2</sub>
6	0	10	СО <sub>2</sub>

Статистическая обработка результатов экспериментов выполнена в программе StatSoft Statistica 6.0. Результаты экспериментов представлены в виде средней с доверительным интервалом с учетом t-критерия Стьюдента для 95%-ного уровня значимости. Статистическую значимость различий определяли с учетом этого же критерия ( $p < 0,05$ ) [9].

### Результаты исследования и обсуждение

В серии предварительных постановочных опытов определяли влияние на личинок комаров II, III и IV возрастов родов *Anopheles* и *Culex* отсутствия растворенного в воде кислорода в режимах с доступом к атмосферному воздуху и с заменой воздуха углекислым газом. Установлено, что личинкам вполне достаточно только атмосферного кислорода. Гибель личинок не наблюдается. Время восстановления равновесной концентрации кислорода в воде флаконов – 3 ч. При внесении углекислого газа на поверхность воды с концентрацией растворенного кислорода, близкой к равновесной, от 20 до 60% личинок впадают в оцепенение и опускаются на дно сосуда, остальные остаются на поверхности в состоянии гиперкапнии. Легкое механическое

воздействие на плавающую личинку приводит к тому, что она тонет. Тем не менее через 30–40 мин до 80% личинок поднимается на поверхность, где к этому времени восстанавливается нормальный газовый состав атмосферы. Повторное введение углекислого газа увеличивало долю погибших личинок до 50%.

В серии опытов с личинками комаров рода *Anopheles* изучалась их способность находиться под водой при двух альтернативных концентрациях растворенного в ней кислорода (рис. 1, 2). Во флаконы помещали личинок I, II, III возрастов *An. messeae*, *An. beklemishevi*, *An. atroparvus*. Личинки IV возраста были представлены *An. atroparvus*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что личинки младших возрастов отличаются большей жизнеспособностью при высокой концентрации кислорода в воде, а при уменьшении его количества гибнут быстрее, чем особи старших возрастов. Известно, что покровное дыхание у личинок старших возрастов менее выражено [1]. Видимо, такие физиологические различия объясняют особенности поведения личинок разного возраста. Наблюдения за поведением личинок в открытых сосудах с отстоянной водой показали, что для особей I и II возрастов свойственна малая восприимчивость к вспугиванию, например на внешнее движение, резкое затенение или колебание воды. При этом для них характерны длительные перемещения в толще воды (в наших экспериментах десятки минут на глубине до 4–5 см), несмотря на обилие плавающей на поверхности пищи и без видимых раздражителей.

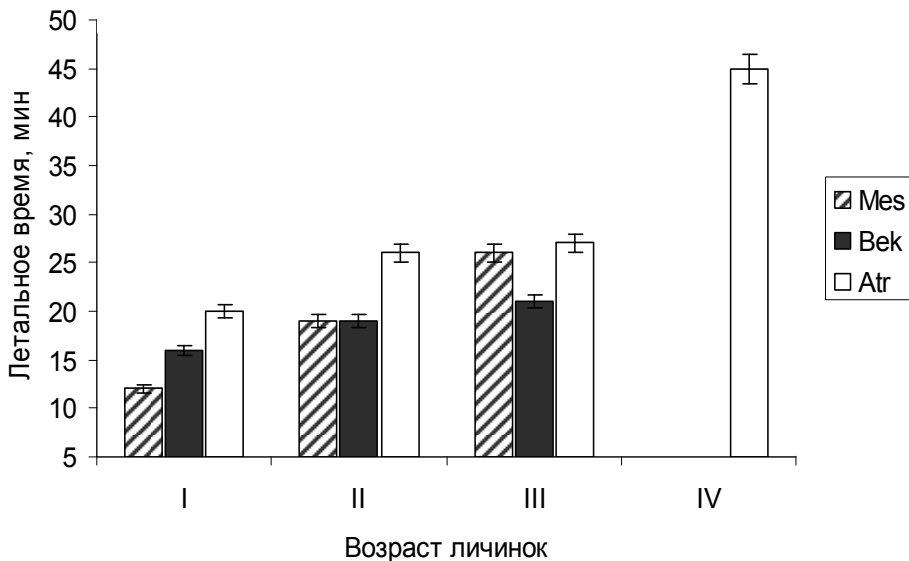


Рис. 1. Среднее значение времени гибели 100% личинок *Anopheles* от асфиксии при концентрации растворенного кислорода в воде 0 мг/л: Mes – *An. messeae*, Bek – *An. beklemishevi*, Atr – *An. atroparvus*

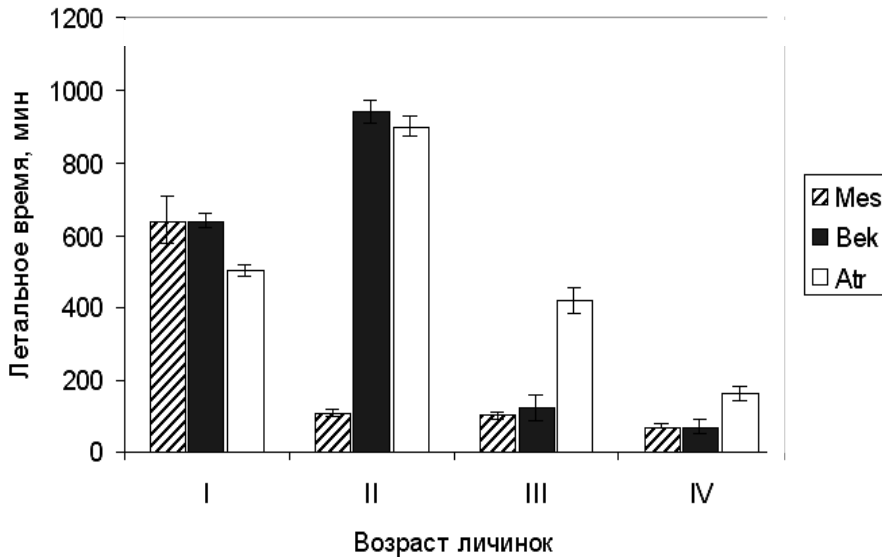


Рис. 2. Среднее значение времени гибели 100% личинок *Anopheles* от асфиксии при концентрации растворенного кислорода в воде 8,3 мг/л: Mes – *An. messeae*, Bek – *An. beklemishevi*, Atr – *An. atroparvus*

Личинки III и IV возрастов в спокойном состоянии находятся на поверхности воды, но при малейшем вспугивании резко ныряют и через несколько секунд (иногда десятков секунд) выныривают на небольшом удалении от места погружения.

Из трех видов *Anopheles* наибольшая устойчивость к кислородному голоданию в двух альтернативных вариантах опыта установлена для личинок *An. atroparvus*. Два других вида, в целом, продемонстрировали меньшую жизнеспособность в условиях гипоксии. Выявленные незначительные различия в реакции личинок I возраста разных видов на недостаток кислорода, растворенного в воде, по-видимому, отражают индивидуальные характеристики особей, связанные, в частности, с гетерохронностью развития личинок в опыте внутри стадии и соответствующим возрасту уровнем интенсивности газообмена. Во время развития личинок у всех насекомых наблюдаются периодические изменения газообмена в каждом личиночном возрасте. После линьки, отделяющей один возраст от другого, интенсивность дыхания падает, а в период подготовки к новой линьке газообмен вновь повышается [10]. Об этом, в частности, свидетельствует неожиданно высокая устойчивость к кислородному голоданию отдельных личинок *An. atroparvus* и *An. beklemishevi* II возраста при концентрации кислорода 8,3 мг/л (см. рис. 2). Зафиксировано, что 80–90% личинок этой стадии погибало в 1,5–2 раза быстрее, чем оставшиеся 10–20%. Очевидно, индивидуальные особенности устойчивости к асфиксии проявляются у личинок при времени нахождения в этих условиях более суток и нивелируются при сильном воздействии фактора, приводящего к относительно быстрой гибели особей.

В экспериментах с личинками IV возраста *Aedes vexans* получены следующие результаты: среднее значение времени гибели 100% личинок от асфиксии коррелирует с количеством исходной концентрации кислорода в воде – чем больше растворенного кислорода, тем дольше сохраняют жизнеспособность личинки (рис. 3). По-видимому, покровное дыхание позволяет им значительно увеличить время нахождения под водой.

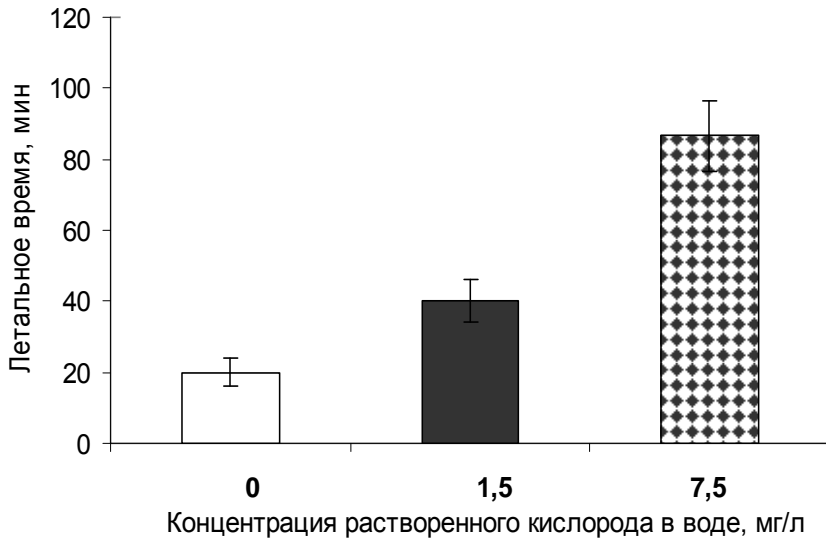


Рис. 3. Зависимость среднего значения времени гибели 100% личинок IV возраста *Aedes vexans* от концентрации растворенного в воде кислорода

В условиях отсутствия растворенного кислорода и в присутствии углекислого газа над поверхностью воды при температуре воздуха 20°C около 30% личинок IV возраста *C. p. molestus* перестали подавать признаки жизни не менее чем через 20 мин, гибель всех личинок наступила только через 33 мин. Для поддержания устойчивого эффекта приходилось трижды вносить углекислый газ (рис. 4).

В серии опытов с личинками *C. p. molestus* IV возраста (см. табл. 1) установлено, что температура оказывает существенное влияние на время их жизни как в условиях гипоксии разной степени (рис. 4), так и в условиях сочетания гиперкапнии и гипоксии. При температуре воды 23°C для гибели всех личинок потребовалась двукратная обработка углекислым газом, а при 10°C – трехкратная.

Личинки представителей рода *Anopheles* на появление углекислого газа на поверхности воды реагируют двумя способами. Часть личинок мгновенно впадает в оцепенение и остается на поверхности воды. Другая, большая часть, погружается на дно сосуда и через некоторое время погибает.

Все личинки комаров родов *Aedes* и *Culex* на внесение диоксида углерода реагируют нырянием и активным движением в толще воды либо сразу после

его внесения, либо через 5–10 с. Через некоторое время личинки всплывают и, обнаружив наличие газа, опять погружаются в толщу воды. Через 10–20 мин часть личинок впадает в оцепенение и опускается на дно сосуда. За это время (20 мин) слой углекислого газа, контактирующий с поверхностью воды, растворяется в ней, поэтому требуется его дополнительное внесение. При повторном (при температуре воды 10°C – трехкратном) внесении диоксида углерода погибают остальные личинки.

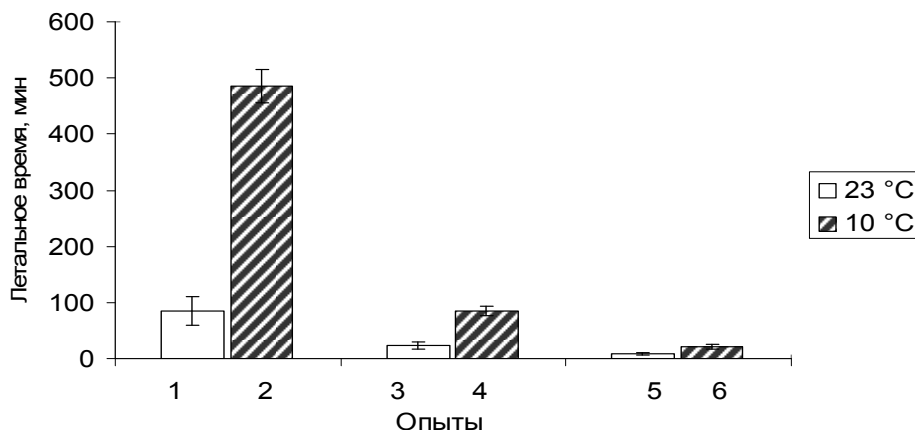


Рис. 4. Зависимость среднего значения времени гибели 100% личинок IV возраста комаров *C. p. molestus* от температуры и концентрации растворенного кислорода: 1, 2 – концентрация кислорода 8,4–8,6 мг/л; 3, 4 – концентрация кислорода 0 мг/л; 5, 6 – концентрация кислорода 0 мг/л и добавлен углекислый газ

Такое поведение личинок, скорее всего, обусловлено существенным отличием в строении дыхательного аппарата представителей рода *Anopheles* от родов *Culex* и *Aedes*. У более продвинутых в эволюционном плане комаров *Aedes* и *Culex* на последнем сегменте брюшка расположена сифональная трубка со стигмальной пластинкой на конце, посредством которой личинки удерживаются силой поверхностного натяжения воды, при этом тело находится в толще воды в «подвешенном» положении под определенным углом (рис. 5, 6).

Наличие дыхательной трубки у представителей родов *Aedes* и *Culex* ограничивает действие мышц только в одном направлении, параллельном продольной оси сифона, вследствие этого хитиновые элементы стигмальной пластинки приобретают более дифференцированное, чем у рода *Anopheles*, строение, обеспечивающее в этих условиях точную координацию их движения [13], что, возможно, влияет на быстроту реакции и обуславливает большую скорость замыкания стигм при внесении углекислого газа.

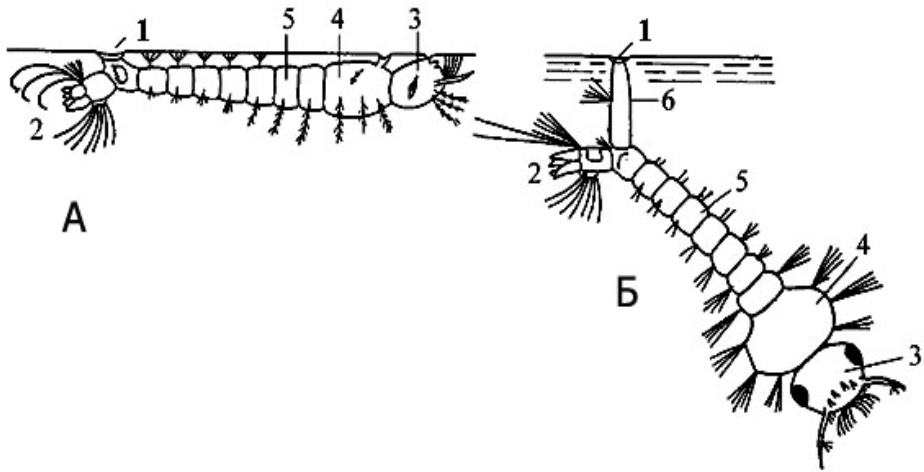


Рис. 5. Способы удержания у поверхности воды личинок *Anopheles* (А) и *Culex* (Б):  
 1 – стигмальная пластинка; 2 – анальные жабры; 3 – голова; 4 – грудь;  
 5 – брюшко; 6 – сифон [11]

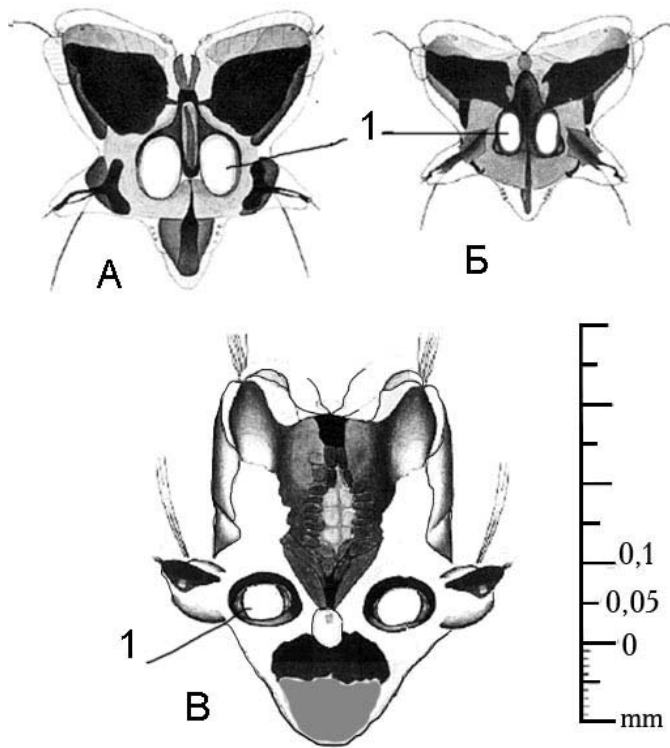


Рис. 6. Стигмальная пластинка личинок кровососущих комаров.  
 А – *Aedes*; Б – *Culex pipiens*; В – *Anopheles maculipennis*: 1 – стигма (дыхальце) [12]



Для личинок рода *Anopheles* характерно отсутствие дыхательной трубки. Вместо нее имеется специальное образование, поддерживающее стигмальную пластинку и гомологичное сифону [13].

При нырке личинки лопасти стигмальной пластинки закрывают дыхальца. Однако замыкание никогда не бывает полным. Между передней и боковыми лопастями образуется воздушная полость. Вода не может попасть в дыхальца и вытеснить оттуда воздух из-за несмачиваемости стигмальной пластинки, которая периодически смазывается секретом слюнных желез [13].

Дыхание личинок кровососущих комаров осуществляется с помощью трахейной системы открытого типа. От задней пары дыхалец отходят два главных трахейных ствола. Главные стволы разветвляются в каждом сегменте. Самые мелкие разветвления – трахеолы – заканчиваются на поверхности клеточных мембран. Дыхание совершается путем диффузии кислорода из атмосферы или воды в трахеи благодаря разнице в его парциальном давлении [10].

По всей видимости, личинки рода *Anopheles* практически мгновенно впадают в оцепенение при появлении углекислого газа на поверхности воды в связи с близостью дыхальца к трахейным стволам и трахеолам. У представителей родов *Culex* и *Aedes* между дыхальцем и системой трахеол имеется достаточно длинная трубка, на конце которой, по-видимому, находятся рецепторы газового состава атмосферы. Поэтому для поступления углекислого газа к трахеолам требуется значительно больше времени, и личинки успевают закрыть дыхальца и погрузиться в воду. Отсутствие в воде растворенного кислорода вынуждает личинок через несколько минут выныривать и, при наличии в атмосфере опасных концентраций диоксида углерода, опять погружаться в воду.

При нырке или пассивном погружении в воду все личинки, не впавшие в оцепенение, захватывают пузырек газа. Личинки комаров рода *Anopheles* захватывают углекислый газ в заметно большем, достаточном для засыпания количестве, так как площадь их стигмальной пластинки больше, чем у представителей родов *Culex* и *Aedes*, а скорость ее замыкания ниже. Личинкам комаров *Culex* и *Aedes* для засыпания требуется большее время контакта с углекислым газом, которое достигается дробно, за счет нескольких выныриваний.

Таким образом, в результате экспериментов выявлена различная устойчивость представителей разных родов к изменению концентрации растворенного в воде кислорода. Личинки комаров рода *Aedes* являются самыми устойчивыми к гипоксии при полном отсутствии кислорода. Личинки комаров родов *Aedes* и *Culex* проявили большую устойчивость к гипоксии и гиперкапнии, по сравнению с *Anopheles*. Большая жизнеспособность комаров родов *Aedes* и *Culex* в условиях сочетания гипоксии и экзогенной гиперкапнии определяется, по-видимому, наличием дыхательной трубки, устройством стигмальной пластинки и замыкательного аппарата. Устойчивость к гипоксии личинок комаров всех трех рассматриваемых родов в наибольшей степени связана с температурой воды, определяющей интенсивность метаболизма.

## Литература

1. Беклемисhev В.Н. Экология малярийного комара (*Anopheles maculipennis* Mgn). М.: Медгиз., 1944. 299 с.
2. Eldridge B.F., Edman J.D. Surveillance for arthropod-borne diseases, in Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods. Kluwer Academic: Dordrecht; Boston, 2000. 659 p.
3. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 3.5.2.1376-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению дезинсекционных мероприятий против синантропных членистоногих». М., 2003. Регистрационный № 4756.
4. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Madon M., Kaiser A. Mosquito and their control. 2nd ed. 2010. 577 p.
5. Soper F.L., Wilson D.B. *Anopheles gambiae* [sic] in Brazil 1930 to 1940. N.Y.: The Rockefeller Foundation, 1943. 262 p.
6. Killeen G.P., Fillinger U., Kiche I., Gouagna L.C., Knols B.G.J. Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? // Lancet Infectious Diseases. 2002. № 2. P. 618–627.
7. Shousha A.T. Species-eradication: The eradication of *Anopheles gambiae* from Upper Egypt 1942–1945 // Bulletin of the World Health Organization. 1948. № 1. P. 309–353.
8. Пат. 2370952 С1 РФ, А01М 1\20 (2006.01). Способ уничтожения личинок комаров / Семенов С.Ю., Сибатаев А.К., Перевозкин В.П.; заявитель и патентообладатель, ГОУВПО Томский государственный университет. 2008133300/12, заявл. 13.08.2008, опубл. 27.10.2009.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
10. Тыщенко В.П. Физиология насекомых. М.: Высш. шк., 1986. 303 с.
11. Генис Д.Е. Медицинская паразитология. М.: Медицина, 1979. 341 с.
12. Montschadsky A. Die Stigmalplatten der Culiciden-Larven // Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik. 1930. B. 58. P. 541–636.
13. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары. Семейство Culicidae // Фауна СССР. Новая серия № 100. Насекомые двукрылые. Т. 3, вып. 4. Л.: Наука, 1970. 384 с.

Поступила в редакцию 17.02.2011 г.

Anuarbek K. Sibataev<sup>1,2</sup>, Sergei Yu. Semyonov<sup>1,2</sup>, Valerii P. Perevozkin<sup>1,2</sup>,  
Yulia V. Andreeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>2</sup>Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University, Tomsk, Russia

#### THE INFLUENCE OF THE HYPOXIA AND HYPERCAPNIA ON THE BLOOD-SICKING MOSQUITOES LARVAE

*In this article we are present the results of study of the influence of the hypoxia and hypercapnia on the larvae of blood-sucking mosquitoes of Anopheles, Culex and Aedes genera. The ability of Anopheles larvae to be alive under water of different temperature and oxygen concentration was analyzed. The larvae of the early developmental stages at decrease of oxygen concentration in the water were died faster than older individuals. The An. atroparvus larvae are characterized by the greatest stability to hypoxia. Surprisingly, larvae of An. atroparvus and An. beklemishevi II age are highly resistant to oxygen starvation at oxygen concentration 8,3 mg/L. The experiments with carbon dioxide were spent at*

two variants of water temperature: +10°C and +23°C. Death of all larvae occur after two-fold entry of carbon dioxide at the water temperature +23°C, and after threefold entry at the water temperature +10°C. The longevity of *C. p. molestus* larvae IV stage correlates with water temperature. The differences of viability of *Culex* and *Aedes* from *Anopheles* most likely, are caused by the morphological differences of respiratory system.

The larvae of *Aedes* and *Culex* genera in the last segment of the abdomen have a siphon with a stigmal plate on the apex. *Anopheles* mosquitoes are characterized by a lack of siphon. Apparently, the larvae of *Anopheles* almost instantly fall into a stupor when a carbon dioxide entry on the water because the spiracles are close located to the tracheal trunks and tracheoles. The larvae of *Aedes* and *Culex* between the spiracle and the system tracheoles have a sufficiently long tube, at the end of which, probably, there are gaseous composition receptors. Therefore, for the inflow of carbon dioxide to tracheoles requires significantly more time and larvae have time to close the spiracles.

For members of different genera were found different resistance to change in the concentration of dissolved oxygen. Mosquito larvae of *Aedes* genus are resistant to complete absence of oxygen for a longer time. At the same time, the larvae of mosquitoes *An. beklemishevi* and *An. atroparvus* II age characterized by more vitality at a high concentration of dissolved oxygen in the water. Mosquito larvae genera of *Aedes* and *Culex* are more resistant to hypoxia and hypercapnia, compared with *Anopheles*. The more viability of *Culex* and *Aedes* mosquitoes by the combination of hypoxia and exogenous hypercapnia, are caused by the presence of respiratory tube, a structure of stigmal plate and closing apparatus. The resistance to hypoxia of mosquito larvae, all three considered genera, to the greatest extent on water temperature, which determines the intensity of metabolism.

**Key words:** blood-sucking mosquitoes; abundance control; hypoxia; hypercapnia.

Received February 17, 2011