

乳状菌研究的有关问题

杨明华

(中国科学院动物研究所, 北京)

乳状菌是金龟蝼幼虫的主要病原菌之一。它的分布较广,在我国许多地区均有发现^[1,2]。目前部分地区采用人工方法由活虫繁殖该菌来生产菌粉,用以防治蛴螬。在国外,从四十年代开始研究应用乳状菌,至今已发表有关文献近三百篇^[3]。本文拟从国内研究的实际出发,结合国际上的研究现状,综述有关重要问题。

分类及命名

目前分离到的乳状菌大部分属于芽孢杆菌。它们的共同特征是:营养体棒状,能形成芽孢,孢子囊两侧明显膨胀。它们寄生于多种金龟蝼幼虫体内,虫体感染此菌后会幼虫血淋巴呈乳白色,故又称“乳状病杆菌”,是专一性的昆虫病原菌。1935年 Hawley 最早发现这种乳状病,认为它是两种不同类型的感染性病原引起的。1940年 Dutky 把这两种病原引起的疾病分别称为“A”型和“B”型乳状病,并将前者的病原定

名为日本金龟蝼芽孢杆菌 (*Bacillus popilliae*),后者定名为缓死芽孢杆菌 (*B. lentimorbus*)。当时区别这两个种的主要依据是罹病幼虫的体色和孢子囊中紧靠芽孢有无伴孢体。五十年代以后,在欧洲和澳洲等地区相继发现了许多乳状菌,如夫赖堡芽孢杆菌 (*B. fribourgensis*),独角仙芽孢杆菌 (*B. euloomarahae*),澳洲缓死芽孢杆菌 (*B. lentimorbus australis*) 及新西兰乳状菌等共十多种。因此有些人便开始研究乳状菌的分类。1967年 Steinkraus 等^[4]根据芽孢大小和有无伴孢体,将乳状菌大致归为三类,一类以日本金龟蝼芽孢杆菌为代表,有伴孢体;另一类是缓死芽孢杆菌,无伴孢体;再一类是独角仙芽孢杆菌,孢子比前两类要小。随着对乳状菌生理生化研究的深入,以及血清学技术在细菌分类学上的广泛应用,有人便对上述以形态为主要依据的分类提出了不同看法。1971年 Wyss^[5]研究了15株不同寄主中的乳状菌,根据它们的形态、生

理生化特点以及对氨基酸的需要程度提出了一个新的分类方法。他建议将全部已知乳状菌分成二个种和三个变种。即日本金龟芽孢杆菌和独角仙芽孢杆菌,前一种下设三个变种:日本金龟芽孢杆菌日本金龟芽孢变种 (*B. popilliae* var. *popilliae*), 日本金龟芽孢杆菌缓死变种 (*B. popilliae* var. *lentimorbus*) 以及日本金龟芽孢杆菌五月鳃角金龟变种 (*B. popilliae* var. *melonthae*)。Krywienczyk 和 Lüthy^[6] 支持 Wyss 的分类法,因为他们用双扩散和免疫电泳技术证明这三个变种有着密切的血清学关系。同时他们还根据试验结果纠正了几个菌的名称,把夫赖堡芽孢杆菌和日本金龟芽孢杆菌五月鳃角金龟变种归成一种,以后者名称命名。显然, Wyss 等人把日本金龟芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌都看成是一个种。

运用生理生化及血清学方法分类的首要条件是待分类的每株乳状菌都能在相同的人工培养基上生长,以便进行比较。但是由于不同菌株对培养基的成分有不同的选择性,故往往不易得到相同结果。如 Hurbart 和 Rhodes 研究日本金龟芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌的血清学关系,并未发现二者间的交叉反应,与 Krywienczyk 和 Lüthy 的结果相反。后来 Krieg 和 Gordon 等人主张根据有无伴胞体来区分乳状菌。1973 年, Gordon 等人对日本金龟芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌的特征进行了对比,并将结果作为该种的主要描述依据而列入 Bergey 鉴定细菌学手册第八版(表 1)。这样,日本金龟芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌都成了独立的种。而夫赖堡芽孢杆菌和新西兰乳状菌等有伴胞体的菌株都归为日本金龟芽孢杆菌的变种。

综上所述,乳状菌有两种不同的分类方法: Gordon 等主张根据孢子囊中有无伴胞体来分类; Wyss 等则更注重伴胞体以外的其它特征。目前不同作者仍根据不同标准来分类。1974 年 Milner^[7] 从昆虫 *Rhopaca verreaux* 的罹病幼虫中分离到一株含有伴胞体的乳状菌,它的生理生化特征与日本金龟芽孢杆菌基本相似,但伴胞体的形状及寄主范围有差异(表 2),因而被定名为日本金龟芽孢杆菌 *Rhopaca* 变种 (*B. popilliae* var. *rhopaca*)。对专一性的昆虫病原来说,寄主范围上的差异也许是很重要的。例如我国从华北大黑鳃金龟的罹病幼虫体内分离到的乳状菌,与日本金龟芽孢杆菌的引进菌株一样,具有伴胞体,但前者对华北大黑鳃金龟十分敏感,而后者却无感染力。因此,考虑到寄主范围和芽孢形态等的差异,在种下设变种有一定意义。

我国近几年分离到的来自不同寄主的乳状菌,大部分属于日本金龟芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌。至于它们的确切分类地位,还有待在形态比较的基础上,结合原始分离物的寄主分布地区、致病范围和生理生化特征等方面的资料加以肯定。

表 1 日本金龟芽孢杆菌与缓死芽孢杆菌之比较

	日本金龟芽孢杆菌	缓死芽孢杆菌
营养体大小(微米)	0.5—0.8×1.3—5.2	0.5—0.7×1.8—7.0
伴胞体	有	无
革兰氏染色	阴 性	阴 性
动 力	可 变	不 活 动
生长温度(℃)	20—35	20—35
从甘露糖产酸	阴 性	阴 性
硝化作用	阴 性	阴 性
在 2% NaCl 中的生长	生 长	不 生 长
酪蛋白水解	阴 性	阴 性
明胶水解	阴 性	阴 性

表 2 日本金龟芽孢杆菌几个变种之比较*

变种名称	日本金龟芽孢变种	缓死变种	五月鳃角金龟变种	<i>Rhopaca</i> 变种
特征				
来源地区	美 国	美 国	西 欧	澳大利亚
寄 主	日本金龟芽孢(<i>Popilliae japonica</i>)	日本金龟芽孢	五月鳃角金龟(<i>Melolontha melolontha</i>)	<i>Rhopaca verreaux</i>
孢子囊大小(微米)	1.6×5.5	1.0×3.0	1.4×7.1	1.5×6.0
芽孢大小(微米)	0.9×1.8	0.9×1.8	1.3×2.2	1.2×2.4
伴胞体大小(微米)	0.5×0.5			
革兰氏染色	阴 性	阴 性	阴 性	可 变
体外最高生长温度(℃)	37	37	33	32
体内最高生长温度(℃)	36	30	27	30
可利用的糖 类	海藻糖, 葡萄糖, 果糖, 甘露糖, 蔗糖, 水杨酸, 麦芽糖	同 左	同 左	海藻糖, 葡萄糖, 甘露糖, 蔗糖, 麦芽糖

* 这四个变种的过氧化氢酶反应都是阴性, 在营养琼脂上均不生长, 在 K-1 琼脂上都生长。

病原的某些生理学特点

乳状菌对蛱蝶有较高的致病力, 但它们难于在人工培养基上形成芽孢, 因而它们的利用受到了限制。长期以来, 许多科学工作者致力于乳状菌的芽孢形成和

萌发、生长等方面的研究,以探索人工体外培养的可能性。

一、生长和营养条件

主要研究过日本金龟蚬芽孢杆菌和缓死芽孢杆菌的生长。一般认为这两种菌的营养体在人工培养基上是很容易生长的。在标准培养基(含1.5%酵母膏、0.6%磷酸氢二钾和0.2%葡萄糖)上,通常培养16—20小时营养体生长即达高峰期。问题在于当高峰期菌的数量达到最高点后活菌数量便迅速下降,其原因至今不明。不少人企图从大分子化合物在培养过程中的合成情况来探讨营养体大量死亡的原因。Bulla^[1]发现核糖核酸、蛋白质和脂肪含量在对数生长期迅速增加。但在其后期,核糖核酸和蛋白质的合成速度却明显下降;而脂肪合成速度却始终是稳定的,只有当营养体开始死亡时才下降。整个培养过程中脱氧核糖核酸不断增加,在死亡期不显示出停止合成的迹象。Bulla认为,由于蛋白质合成在后期受阻碍,脂肪的合成最终也将被迫停止,这便严重地影响了营养体细胞膜的形,致使营养体生长停顿。Багдасарян等人认为,蛋白质合成速度依赖于RNA的合成能力,而不是RNA在细胞中的含量。菌的生长及蛋白质合成速度缓慢,是因为利用培养基中有效成分的过程受阻碍。

目前,乳状菌的培养基成分中以酵母膏为主,它要求较多种类的氨基酸。某些其它有机氮源可以代替酵母膏。但一般来说,酵母膏最适合乳状菌的生长需要。许多试验表明,维生素B是不可缺少的,肌醇和烟酸是生长刺激素,而核黄素能起抑制生长的作用。巴比妥酸在半合成培养基中是一种重要的生长素,可是它的确切作用尚不清楚。有人发现这种化合物能促进核酸和蛋白质的合成,但本身并未参入细胞质成分中。Costilow曾提出用天然有机氮源——酪蛋白、蛋白胨等的水解产物作为培养基成分,但效果不太理想。Багдасарян等利用含酪蛋白水解物、复合维生素和葡萄糖的复合培养基培养日本金龟蚬芽孢杆菌2.309菌株也不能形成芽孢。所以,迄今尚未设计出较好的,既能维持乳状菌生长,也能形成芽孢的人工合成培养基。

二、芽孢的形成及萌发

最近几年,对乳状菌在人工培养基上芽孢形成和萌发的条件,进行了较多的研究,因为不论在昆虫寄主体内或体外,乳状菌的芽孢形成率都很低。有些种类的芽孢能在人工培养基上萌发并形成营养体,但很难发育到形成芽孢的阶段。为了提高乳状菌形成芽孢的能力,Sharpe曾用含酵母膏、海藻糖和磷酸盐的固体培养基成功地使NRRL-B 2309M菌株的营养体形成了20%的芽孢。该菌株在含活性炭的液体培养基上也可形成相同比例的芽孢。他在最近一篇报告^[2]中进一步指出了芽孢形成同营养体分裂时间的关系,认为芽孢形成的先决条件是营养体缓慢而稳步地生长,而

旺盛生长的营养体不一定芽孢形成率就高。营养体分裂时间越短,芽孢形成能力则越小。因此,对于选择培养基成分,营养体分裂时间是一个很重要的参数。为了使营养体缓慢生长,Sharpe设计了一个小型恒化器,通过控制培养基的供给连续培养了40多天,但目前芽孢形成率为1%左右。

为了有利于形成芽孢,还应在接种时完全排除活的营养体。因为幼虫常因个别不生芽孢的亚株迅速繁殖而很快死亡。一般认为乳状菌是会变异的,在它的繁殖过程中,必须注意使其特征保持稳定。Sharpe最近指出,目前各国所使用的NRRL 2309菌株及其野生型菌株,都是具有三种不同生长特点的混合亚株,这三个亚株在菌落形态,生长速度,对寄主的致病力方面,都有明显的差别。

关于乳状菌芽孢的萌发条件,也有较多的研究。通常将芽孢萌发分成萌发和长出两个阶段。萌发是指芽孢由折光和抗热变为不折光不抗热的阶段;长出是指由萌发后的芽孢到第一次营养体分裂的全过程。Sharpe等^[10]用载玻片培养技术研究乳状菌的萌发过程,这样不致扰乱它的小环境。他们发现,不同来源的芽孢,其萌发和长出的时间有很大差异。如在幼虫血淋巴中形成的感染性芽孢,要在24小时后才开始长出,而在人工培养基上产生的非感染性芽孢只需12小时。每个芽孢萌发和长出的变化并不是同时发生的,整个群体完成此过程一般需要若干天。加热可以刺激芽孢萌发,经50℃处理20分钟的芽孢,其萌发率可由1%提高到12%。腺苷或L-丙氨酸单独使用,或与葡萄糖结合使用,可提高萌发率3—10%。二价阳离子对于乳状菌芽孢的萌发是不可缺少的,但长出时则不必需。Splittstoesser等在1975年用载玻片技术培养日本金龟蚬芽孢杆菌时发现,白菜尺蠖幼虫的血淋巴、酪氨酸酶和提高基质pH值,都能促进萌发。

致病机制

一、侵染途径

乳状菌的芽孢通过寄主的消化道造成感染,但尚不清楚芽孢在消化道的哪一部位萌发。本文作者^[11]在研究日本金龟蚬芽孢杆菌对四纹丽金龟的侵染途径时,首先在后肠肠腔中发现营养体,然后侵入中肠柱形细胞中。芽孢主要在幼虫血腔中形成。不论是注射感染或喂食感染,营养体和孢子囊大都集中在幼虫体腔各器官的结缔组织中。这种组织往往含有一些从血细胞中排泄出来的粘多糖物质,这也许对营养体的生长和芽孢形成有利。

乳状菌在昆虫血腔内的感染过程大体可分为四个时期:①芽孢萌发期,芽孢失去折光性,昆虫血淋巴透明,约需1—3天;②营养繁殖期,血淋巴中充满单链或双链的营养体,血淋巴轻度混浊,需3—5天;③芽孢形

成期,营养体变成梭形,原生质凝聚,先形成芽孢,伴胞体小而不折光,需5—10天;④芽孢成熟期,血淋巴中充满具有折光性的芽孢和伴胞体,血淋巴呈乳状,需10—14天。据统计,在4—6天内约有20%的营养体开始形成芽孢,10天后可增加到40—80%。一般认为,一条充分感染的幼虫可含有50亿个芽孢。

在实验室感染的幼虫,大多数于芽孢形成后期死亡,田间自然感染的,则大多是在营养繁殖期和芽孢形成期死亡。因此,在田间发现的病、死虫体内,乳状菌大多是处于营养体和芽孢形成期。这表明,要在田间造成昆虫乳状菌病的流行,并不是想像中的那么容易。

感染蛱蝶需要很大剂量的芽孢,通常每头幼虫注射40万芽孢,才能有50%死亡。其原因除芽孢本身萌发率很低外,寄主本身的防卫反应也有很大关系。蛱蝶消化道内有一层几丁质和蛋白质组成的围食膜,它能阻挡微生物进入中肠柱形细胞,因此有相当一部分芽孢由消化道排出体外。被注入昆虫血腔的芽孢会引起寄主的血细胞防卫反应,注射后5—15分钟之内即形成囊状体,使入侵的部分芽孢很快失去感染力。

二、病原与寄主的相互关系

乳状菌营养体的大量繁殖和芽孢形成,主要在寄主血淋巴中进行,因此对寄主有很大的依赖性。研究健康和罹病幼虫血淋巴的化学组成,以及寄主和病原相互间的代谢关系,不仅有助于了解侵染机制,而且对乳状菌的人工体外培养,可以提供可靠的依据。

健康昆虫血淋巴中,苹果酸、羟基乙酸、酒石酸、丙酮酸、乙醛酸含量都比罹病昆虫中为高,但丁酸、丙酸、乙酸、甲酸、琥珀酸、乳酸、柠檬酸和 α -酮戊二酸的浓度是相同的,都含微量的葡萄糖酸和草酰乙酸。在幼虫血淋巴中,含量较高的是谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸和胱氨酸;较低的是谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、天冬酰胺、羊毛甾氨酸、鸟氨酸和 β -丙氨酸。有趣的是,氨基酸总含量不论是正常的还是罹病的,都基本相同。在罹病幼虫体内,谷氨酸、 β -丙氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸和赖氨酸比健康幼虫体内为多,而甘氨酸、组氨酸和酪氨酸较少。

血淋巴中主要的蛋白质是脂糖蛋白,在感染过程中它的浓度明显降低。这类蛋白质中所包含的脂肪酸主要是棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和二十四碳酸。感染过程中棕榈油酸含量减少。脂糖蛋白的氨基酸组成,健虫和病虫体内是相类似的。这些物质的含量变化对于弄清对昆虫的致病机制具有很重要的意义,但这方面的研究还很缺乏。

罹病昆虫的脂肪和碳水化合物总量降低了。脂类的减少对中性脂和磷脂来说,它们的比例是相同的。

它的中性脂由固醇、单酸甘油酯、游离脂肪酸、1,2-和1,3-二酯酰甘油酯、三酯酰甘油酯、固醇酯和糖组成;磷脂基本上由卵磷脂、磷脂酰乙醇胺和磷脂酸组成。幼虫体内血淋巴的脂肪酸组成与乳状菌的脂肪酸有很大差别,后者的支链脂肪酸比例大于直链的。这种结构上的差异向人们提出了一些有趣的问题:在细菌生长和形成芽孢的过程中,支链脂肪酸是怎样合成的?支链脂肪酸是否由直链的转变而成?它是否会影响参与芽孢形成过程的酶的活性?也许日本金龟蛱蝶芽孢杆菌能氧化血淋巴中的脂肪,利用小分子化合物作为生长和形成芽孢的碳源。

乳状菌的研究和利用已有较长的历史,但它致死金龟蛱蝶幼虫的原因还不清楚。许多人证实乳状菌并不分泌毒素,因此有人认为可能是由于感染期间造成生理学饥饿而使幼虫死亡的。另一个重要问题是尚未搞清楚在活虫体内大量形成芽孢的条件。

从目前乳状菌的实际应用情况看,由于人工培养未获成功而受到很大限制。国外的商品制剂仍通过对活虫体注射接种的方法来生产芽孢,这不仅费工,而且价格昂贵。为了打开乳状菌广泛应用的局面,必须设法通过发酵方法来生产菌剂。今后主要研究课题将仍然是研究昆虫和病原二者之间在代谢方面的关系,以及调节控制罹病过程中细菌形态发生的机制。在此基础上,就有可能研究出使乳状菌能在体外人工培养的技术,从而扩大它在生物防治中的利用。

参 考 文 献

- [1] 张书芳等:昆虫学报,20(3):335—336,1977。
- [2] 解思泌等:微生物学通报,6(2):4—7,1979。
- [3] Klein, M. G., C. H. Johnson and T. L. Ladd Jr.: *Bull. Entomol. Soc. Amer.*, 22:305—310, 1976。
- [4] Steinkraus, K. H. and H. Tashiro: *Appl. Microbiol.*, 15:325—333, 1967。
- [5] Wyss, C.: *Zentbl. Bakt. Parasit. Kde (Abt. 11)*, 126:461—492, 1971。
- [6] Krywienzyk, J. and P. Luthy: *J. Invertebr. Pathol.*, 23:275—279, 1974。
- [7] Milner, R. J.: *Aust. J. Biol. Sci.*, 27:235—247, 1974。
- [8] Bulla, L. A. Jr. and R. N. Costilow: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23:1—18, 1978。
- [9] Sharpe, E. S. and L. A. Bulla Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:601—609, 1978。
- [10] Sharpe, E. S. and L. A. Bulla Jr.: *J. Invertebr. Pathol.*, 30:241—248, 1977。
- [11] 杨明华等:日本金龟蛱蝶芽孢杆菌对四纹丽金龟幼虫侵染途径的研究,动物学集刊(中国科学院动物研究所编),印刷中。