

蚕蛹病原细菌的研究

郭爱莲 卞 科

(西北大学生物系, 西安)

夏 耀 潘宛人 王 进

(陕西省蚕桑研究所, 陕西周至)

摘要 桑蚕原蚕后期出现死蛹给养蚕业带来很大危害。作者对后期死蛹进行了细菌分离和病原性测定, 并对致病菌种作了鉴定。试验结果证明后期死蛹主要原因是条件致病菌和蚕蛹生理因素共同作用的结果, 其主要条件致病菌有芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌。蚕期饲喂和蛹期创伤两种感染途径都能引起桑蚕后期死蛹。对后期死蛹的防治, 应采取综合防治方法。

关键词 原蚕; 死蛹; 病原细菌

在养蚕业中, 后期出现死蛹会使蚕种生产受到影响, 从而严重危害养蚕业的发展。因此, 死蛹已成为蚕种生产中的突出问题。后期的死蛹种类很多, 包括僵蛹、干缩蛹和败血蛹等。几年来我们对引起败血性死蛹的病原菌进行了研究, 为蚕病的防治提供了依据。

材 料 和 方 法

(一) 供试蚕、蛹及其来源

供菌种分离用的蛹有苏 3、苏 4、皓月、青松等蚕品种 (每种都有♂, ♀)。败血性死蛹用的是上述蚕种的黑死蛹、红死蛹和黄死蛹。另外, 还有上述蚕种的健康蛹。这些蛹均由陕西省周至蚕种场提供。供病原性测定的蚕和蛹用 122 原蚕或 731×122 杂交原蚕, 由陕西省蚕桑研究所提供。

(二) 培养基

1. 普通牛肉汁蛋白胨琼脂培养基。1kg 蒸气灭菌 20 分钟。供菌种分离用。

2. 酵母膏葡萄糖培养基 (g): 酵母膏 10, 葡萄糖 20, CaCO_3 10—20, 蒸馏水 1000ml, 调 pH 6.8—7.2, 8 磅灭菌 30 分钟。固体培养基添加琼脂 20g。

(三) 蚕蛹的处理及菌的分离纯化

用 75% 的酒精溶液浸泡各种蚕的死蛹和

健康蛹 5 分钟, 取出浸入 0.1% 升汞溶液 5 分钟, 然后再用无菌水淋洗全身 5—6 次, 放在研钵中磨碎, 加适量无菌水制成菌悬液。菌液浓度约为 10^5 — 10^6 ml。将各种编号的菌悬液接种在上述培养基平板上, 划线分离纯化, 重复 3 次, 30—32℃ 培养, 共分离纯化出 47 株菌, 保储备用。

(四) 病原性测定

1. 菌液的制备: 在使用前 24 小时, 将纯化的菌株传代一次。在斜面试管内注入无菌水 10ml, 振荡半小时, 制成浓菌液, 稀释 10 倍后, 用麦法兰 (McFarLand) 测定法^[1], 根据细菌浓度与透光度关系曲线, 用 72 型光电分光光度计 (波长 438nm) 测出菌液浓度, 然后再稀释成每毫升含菌量为 1×10^6 (供蚕期添食接种用), 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 浓度的菌液 (供蛹期注射接种用)。

2. 接种和试验方法: 用 122 原蚕或 731×122 杂交原蚕在蚕期和蛹期进行病原性试验。蚕期试验用 1—4 龄蚕大区饲养 (蚕匾)。为了保证供试蚕蛹的健康, 3 龄蚕添食 500u 氯霉素一次; 4 龄蚕添食 500u 氯霉素二次和 3000u 青

中国科学院微生物研究所蔡妙英同志曾给予指导, 李利军, 杨荣伦, 张蓉参加了部分工作, 特此致谢。

表 1 蚕蛹致病菌的鉴别

菌 名	株 数	来 源	主要鉴别特征
芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)			
蜡状芽孢杆菌 (<i>B. cereus</i>)	3	黑死蛹	G ⁺ , 菌苔腊状, 兼性厌氧, 细胞杆状, 1.0—1.4×2.8—3.8μm, 周生鞭毛, 运动, 孢囊不明显膨大, 芽孢椭圆多中生, 细胞内有聚 β-羟基丁酸盐颗粒, 接触酶阳性, V.P 反应阳性, 在含有7%氯化钠中生长, pH5.7 生长。
苏芸金芽孢杆菌 (<i>B. thuringiensis</i>)	2	黑死蛹	产生伴孢晶体, 其它特征同上
葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>)			
金黄色葡萄球菌 (<i>S. aureus</i>)	1	黑死蛹	G ⁺ , 细胞球状, 呈不规则堆团, 0.7—1.0μm, 兼性厌氧, 发酵葡萄糖、甘露醇、乳糖产酸, 阿拉伯糖、木糖不产酸。还原硝酸盐为亚硝酸盐, 凝固酶和接触酶均为阳性, V.P 反应阳性, 细胞壁中含 A 蛋白
沙门氏菌属 (<i>Salmonella</i>)	3	黄死蛹(2) 黑死蛹(1)	G ⁻ , 细胞杆状, 0.3—1.0×1—2.5μm, 周生鞭毛, 葡萄糖发酵产酸产气, 不发酵乳糖 (48 hr.), 发酵阿拉伯糖、木糖产酸, 不分解尿素, 利用柠檬酸盐, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 苯丙氨酸脱氨酶阴性, M.R 反应阳性, V. P 反应阴性, 硝酸盐还原为阳性, 吲哚反应为阴性。
短杆菌属 (<i>Brevibacterium</i>)	2	黄死蛹	G ⁺ , 短的不分枝的直杆菌, 0.3—0.5×1.0—1.2μm, 周生鞭毛, 没有棒状膨大, 无异染粒, 胞壁染色无横隔, 呈单细胞状, 不折断分裂, 接触酶阳性, 葡萄糖不产酸, 石蕊牛奶微碱, 明胶液化, 硝酸盐还原阴性。
产碱菌属 (<i>Alcaligenes</i>)	6	黑死蛹(4) 黄死蛹(1) 健 蛹(1)	G ⁻ , 细胞杆状, 0.8—1.0×1.5—1.8μm, 周生鞭毛, 葡萄糖氧化发酵试验阴性, 不发酵乳糖 (48hr), 氧化酶阳性, 不水解藻氨酸、几丁质和琼脂, 石蕊牛奶产碱, 吲哚和 V. P 反应均阴性。
微球菌属 (<i>Micrococcus</i>)	3	黑死蛹	G ⁺ , 细胞球状, 排列呈不规则堆团或单个, 在肉汁陈培养基上菌苔呈肉红色、黄色和浅肉黄色, 接触酶阳性, 葡萄糖氧化产酸, 不液化明胶, 吲哚反应阴性, 在含有 5% NaCl 中能生长、好氧。
链球菌属 (<i>Streptococcus</i>)	1	黑死蛹	G ⁺ , 细胞球状, 1.0—1.5μm, 排列呈链状或成对, 不运动, 葡萄糖发酵主要产右旋乳酸, 联苯胺阴性, 接触酶阴性, 兼性厌氧。

毒素一次。1—2 龄蚕按照常规方法喂养。5 龄蚕在饲食前不作任何处理, 分成试验小区 (每个饲养盒养 40 头) 供试验用。大区中剩余的蚕按

常规方法喂养到 5 龄结束上簇, 上簇第 9 天剖茧后将蛹进行蛹期试验。

蚕期试验用 122 原蚕, 在 5 龄饲食和饲食

第2, 3天各喂一次蘸菌桑叶。在用731×122杂交原蚕时, 在5龄蚕第6天加喂一次蘸菌桑叶。每10头喂一片, 食完再喂新叶。每个处理重复三区。共作预试验3次, 正式试验2次。蘸菌桑叶的大小和老嫩大致相同, 桑叶蘸菌液后晾至半干使用。蛹期接种在上簇第10天进行, 用微量注射器从蚕蛹腹部节间注射5 μ l菌液。

结果和讨论

(一) 病原性测定结果

1. 蚕期试验: 分离纯化出的试验菌株共47株, 其中从黑死蛹分离菌20株, 黄死蛹分离菌19株, 红死蛹分离菌2株, 健康蛹分离菌6株。以无菌水蘸桑叶作为对照。喂食蘸菌桑叶后, 47株中有6株菌(红死蛹2株, 黑死蛹1株, 黄死蛹2株, 健康蛹1株)对蚕有一定的致病作用。蚕表现出食欲下降, 发育不良等症状。少数蚕出现软化症而死亡。其余菌株未表现病原性。

2. 蛹期试验: 45株菌(47株中有2株在保存中死亡)对蛹体均有一定的致病性。不同菌株对蚕蛹的LD₅₀也不同^[2]。LD₅₀在1000个菌以上的有4株, 其中3株是从黄死蛹分离的, 一株是从黑死蛹分离的。LD₅₀在100个菌以下的有18株, 其中12株是黄死蛹分离菌。LD₅₀在100—1000个菌之间的有22株, 其中12株是黄死蛹分离菌, 6株是黑死蛹分离菌, 3株是健康蛹分离菌, 1株是红死蛹分离菌。另有1株菌不表现致病性。从试验结果看出, 黑死蛹分离菌的败血性较强, 而且在健康蛹体内也存在着这类细菌。

(二) 蚕蛹致病菌的种类和鉴定^[3-6]

通过病原性试验, 选择出致病性较强的菌株21株, 其中黑死蛹分离菌15株, 黄死蛹分离菌5株, 健康蛹分离菌1株。经形态观察和生理

生化特性的鉴定结果有7个属(见表1)。其中以芽孢杆菌属的菌占多数。芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌, 链球菌等是蚕蛹的主要致病菌。

(三) 原蚕后期死蛹的原因及防治

1. 原因: 从试验中看, 蚕期喂蘸菌桑叶, 有些菌株对发育健康的蚕不表现明显致病性, 但如果喂养条件不好, 也可看到死蛹率有增加的趋势。在蛹期剖茧、鉴定过程中, 因受颠簸创伤造成死蛹率也大大增加。创伤是细菌侵入蛹体的重要途径。另外, 在健康蛹体内也能分离到致病力较强的菌, 说明蛹体内早已存在着致病菌, 蕴藏着发生死蛹的潜在因素^[7]。当寄主受到某些因素影响时, 这些菌即可导致寄主发病, 产生败血性死蛹。由于蚕期感染致死较慢, 蛹期创伤感染作用较快, 所以由创伤感染造成的死蛹中往往也包含着蚕期感染的因素。

2. 防治: 对后期死蛹的防治应采取综合措施。注意推广健康蛹的优良品种, 选用优质桑叶, 保持桑叶清洁和桑座干燥, 清洁, 在搬运、剖茧和鉴定过程中要防止激烈振动, 避免造成创伤。饲喂时可适当添食抗菌药物(多菌灵或灭菌灵等), 以增强抗菌能力。

参考文献

- [1] 万中达: 植病研究方法, 高等教育出版社, 158—159页, 1957。
- [2] 吕鸿声: 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社, 34页, 1982。
- [3] 王大帮: 细菌分类基础, 科学出版社, 1977。
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社, 1978。
- [5] Breed, R. S. et al.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957.
- [6] Buchanan, R. E. et al.; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., The Williams and Wilking Company, Baltimore, 1974.
- [7] E. H. 米哈依诺夫著, 吴载德译: 养蚕学, 财政经济出版社, 1957。