

BARBARA GŁOWACKA-PILOT

Bakterie *Serratia marcescens* Bizio — sprawca epizoocji larw borecznika sosnowca *Diprion pini*

Бактерия *Serratia marcescens* Bizio — причина эпизоотии личинок обыкновенного соснового пилильщика *Diprion pini* L.

The bacteria *Serratia macrescens* Bizio responsible for the epizooty in *Diprion pini* L. larvae

WSTĘP

Choroby infekcyjne ograniczające liczebność populacji, borecznika sosnowca *Diprion pini* L. obserwowano od dawna, jednakże dokładniejsze badania dotyczyły jedynie grzybów powodujących mykozy larw w kokonach. Rudnie w (cyt. za Escherichem) (7) opisał gradację borecznika na Ukrainie, podczas której 26% zimujących larw zostało zniszczonych przez choroby grzybowe i bakteriozy. Schedl (18) badał mykozy borecznika w 1938 r. w okolicach Gdańska i stwierdził, że *Isaria* (prawdopodobnie *Paecilomyces farinosus*) była przyczyną śmierci 1,2—9,25% larw przebywających w kokonach. Schedl wspominał również o drugiej chorobie larw zabijającej borecznika w stadium wyrosniętej larwy lub w okresie sporządzania kokonów, nie podał jednak żadnych spostrzeżeń ani przypuszczeń dotyczących jej sprawcy. Choroby grzybowe borecznika sosnowca na terenie NRD badała Urbana (21), która stwierdziła, że przyczyną mykoz larw w kokonach były najczęściej: *Paecilomyces farinosus* (Dicks.) Brown et Smith, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. i *Cephalosporium* sp. Podobnie Górnaś¹ stwierdził występowanie tych trzech gatunków grzybów na larwach borecznika w Polsce.

Szczegółowe obserwacje bakteriozy larw borecznika w okolicach Leningradu oraz na Ukrainie opisał Shiperovitsch (cyt. za Escherichem) (7). Choroba atakowała przeważnie larwy po 3 lub 4 wylince i doprowadzała do silnej redukcji populacji szkodnika. Przyczyną jej była bakteria, którą Shiperovitsch nazwał *Bacillus septicemiae lophyri*. Koehler i wsp. (11) sygnalizowali pojaw bakteriozy, która gwałtownie wystąpiła w populacjach borecznika sosnowca w wielu okolicach Polski w 1959 r. Przyczyna choroby nie została określona.

Brak jest również w piśmiennictwie dokładnych danych dotyczących

¹ materiały nieopublikowane

chorób wirusowych borecznika sosnowca. Wprawdzie Balch i Bird (1) wspominali o wirozie larw tego gatunku, informacja ta jednak nie została potwierdzona przez innych autorów.

MATERIAŁ I METODYKA

We wrześniu 1971 r. stwierdzono masowe występowanie drugiej generacji borecznika sosnowca *Diprion pini* L. na terenie nadleśnictw Antonin i Ostrzeszów. Obserwacje wykazały, że na powierzchni około 20 hektarów nastąpiło załamanie się gradacji szkodnika spowodowane epizootcją larw.

W celu określenia przyczyny śmiertelności pobrano spod 20 drzew w obu nadleśnictwach próbki chorych i martwych larw, które następnie poddano badaniom w laboratorium. Ponieważ obserwacje mikroskopowe wykazały, że hemolimfa badanych larw zawiera duże ilości komórek bakteryjnych, przeprowadzono izolację i oznaczanie bakterii.

Zebrano również 200 żywych larw z chorych populacji i hodowano je do czasu sporządzenia przez nie kokonów w laboratorium w szklanych kloszach na pędach sosnowych. Po dwu tygodniach przechowywania kokonów w obniżonej temperaturze przeprowadzano sekcje i badano zdrowotność larw w kokonach oraz izolowano patogeny.

Izolowanie bakterii przeprowadzano w sposób następujący: martwe lub obumierające (uśpione octanem etylowym) larwy odkazano powierzchniowo tamponem waty zwilżonej 50% alkoholem etylowym, następnie po rozerwaniu oskórka igłami preparacyjnymi, pobierano eż niewielką ilość wyciekającej hemolimfy do próbki z 5 ml jałowej wody. Kroplę takiej zawiesiny posiewano na pożywkę bulionowo-agarową w szalce Petriego. Pożywkę inkubowano w temperaturze 27°C i w miarę wzrostu bakterii, kolonie bakteryjne różniące się morfologicznie przeszczepiano na skosy bulionowo-agarowe.

Ogółem przebadano po 50 martwych lub obumierających larw zebranych w obu nadleśnictwach oraz po 35 larw, które obumarły w hodowlach laboratoryjnych.

W celu identyfikacji wyizolowanych szczepów bakterii określano ich cechy morfologiczne, hodowlane i biochemiczne na podłożach przygotowanych zgodnie z metodyką podaną przez Pelczara (16) oraz w Report (17). Identyfikację przeprowadzano według Bergeya (2) oraz Gibbsa i Skinnera (9).

Badano następujące cechy wyizolowanych szczepów bakteryjnych:

- 1) morfologię komórek,
- 2) cechy hodowlane — wzrost na agarze i żelatynie,
- 3) cechy biochemiczne — stosunek do tlenu atmosferycznego, fermentacja glukozy, laktozy, sacharozy, ksylozy, mannitolu, dulcytolu, salicyny, inozytolu i adonitolu, wytwarzanie indolu, acetylmetylkarbinolu, siarkowodoru i ureazy w obecności KCN, upłynnianie żelatyny i kazeiny redukcja azotanów, próba z czerwienią metylową, dezaminacją fenyloalaniny, dekarboksylacja lizyny, argininy i ornityny, wzrost na podłożu cytrynianowo-amonowym oraz na podłożu z malonianem sodu.

Wszystkie hodowle na pożywkach płynnych i agarowych prowadzono w temperaturze 27°C. Hodowle na podłożach żelatynowych inkubowano w temperaturze pokojowej.

Tabela 1

Cechy morfologiczne i fizjologiczne wyizolowanych gatunków bakterii

Badana cecha	Gatunek		
	<i>Serratia marcescens</i> Bizio	<i>Proteus vulgaris</i> Hauser	<i>Aerobacter cloacae</i> Jordon
wymiary w μ	0,4—0,5 × 0,5—0,8	0,7—0,9 × 1—1,8	0,7—0,9 × 1—1,5
ruchliwość	+	+	+
glukoza	+	+	+
laktoza	—	—	+
sacharoza	+	+	+
ksyloza	+	+	+
mannitol	+	—	+
dulcytol	—	—	+
salicyna	+	+	+
adonitol	+	—	—
inzytol	+	—	—
indol	—	+	—
czerveń metylowa	—	—	—
acetylmetylkarbinol	+	+	+
cytrynian amonu	+	+	+
siarkowodór	—	+	—
ureaza	—	+	—
żelatyna	+	+	+
kazeina	+	+	—
KCN	+	+	+
malonian sodu	—	—	—
dezaminacja fenyloalaniny	—	+	—
dekarboksylacja lizyny	+	—	+
dekarboksylacja argininy	—	—	—
dekarboksylacja ornityny	+	—	—
redukcja azotanów	+	+	+

+ reakcja pozytywna
— reakcja negatywna

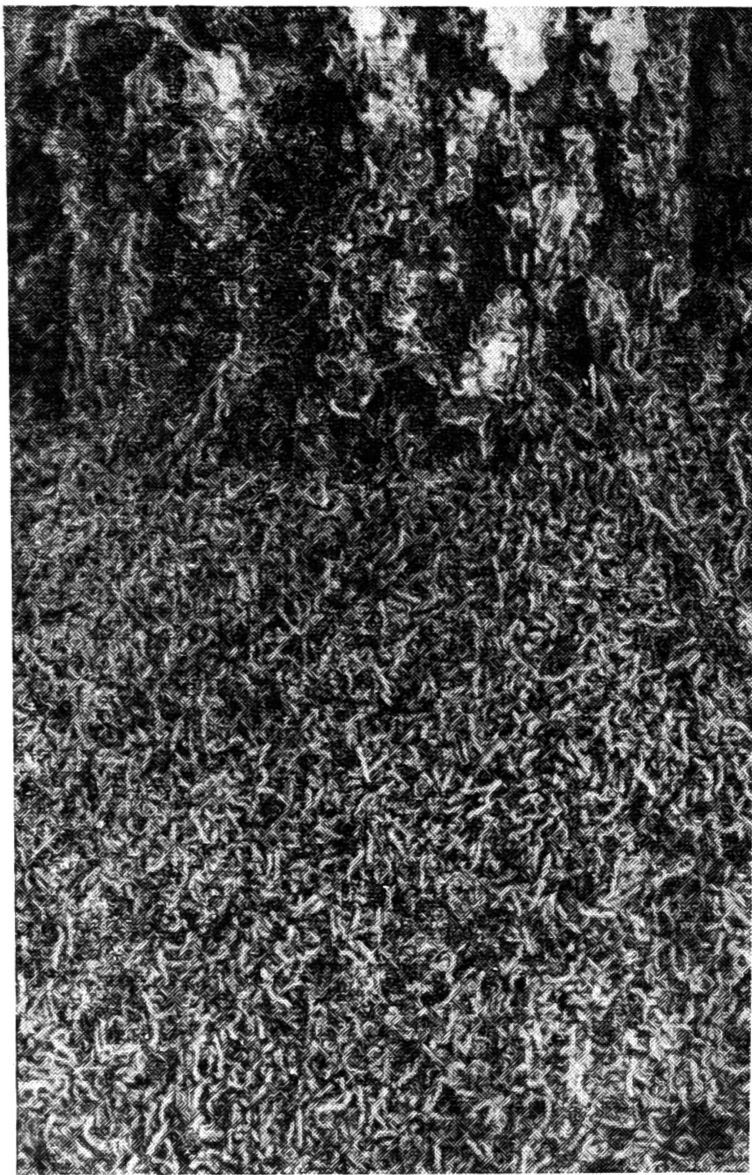
WYNIKI

Ogółem ze 170 badanych martwych lub obumierających larw borecznika sosnowca wyizolowano 183 szczepy bakteryjne należące do 3 gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*. 170 szczepów należało do gatunku *Serratia marcescens* Bizio, 10 szczepów do gatunku *Proteus vulgaris* Hauser i 3 szczepy do gatunku *Aerobacter cloacae* Jordon. Cechy morfologiczne i fizjologiczne bakterii, podane w tabeli 1, na ogół odpowiadały ich charakterystykom opisanym w literaturze (2, 9). Szczepy *S. marcescens* nie wytwarzały prodigiozyny.

Z 100 larw badanych bezpośrednio po zebraniu ich w terenie wyizolowano 100 szczepów *S. marcescens*, z 70 larw obumarłych w czasie hodowli laboratoryjnej wyizolowano 70 szczepów *S. marcescens*, 10 szczepów *P. vulgaris* i 3 szczepy *A. cloacae*.

Spośród 200 larw hodowanych w laboratorium obumarło 88% (65% larw przed sporządzeniem kokonu i 23% w stadium eonymfy). Pozostałe 12% larw było żywe w czasie przeprowadzania sekcji kokonów.

Obserwacje mikroskopowe wykazywały duże ilości ruchliwych komórek bakteryjnych w osoczu hemolimfy chorych larw. Ciała martwych larw



Ryc. 1. Chore larwy borecznika sosnowca *Diprion pini* L. zgromadzone wokół pnia na ściółce.
Fot. E. Górnaś

ciemniały, a bakterie rozmnażały się w nich w dalszym ciągu, doprowadzając do rozrzedzenia tkanek. W hodowlach laboratoryjnych chore i martwe larwy wisiały niejednokrotnie na igłach sosnowych przyklejone wydzieliną z otworu gębowego lub analnego. W warunkach terenowych larw gromadziły się na ściółce wokół pni drzew i tu pozostawały aż do śmierci (ryc. 1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ze 170 badanych larw borecznika sosnowca zebranych w czasie epizoocji na terenach nadleśnictw Ostrzeszów i Antonin została wyizolowana barwiąca się gramujemnie pałka, którą mimo, że nie wytwarzała prodigiozyny oznaczono na podstawie cech morfologicznych i fizjologicznych jako *Serratia marcescens* Bizio. Davis i wsp. (6) oraz Martinec i Kocur (14), którzy przebadali wiele szczepów *Serratia* sp. uznali tylko jeden gatunek *S. marcescens* w tym rodzaju. Pozostałe, *S. plymouthensis*, *S. kielensis* i *S. indica* przyjęli jako synonimy *S. marcescens*.

Bakteria ta, znana jako patogen około 70 gatunków owadów m. in. z rodziny *Diprionidae*, nie była dotychczas izolowana z borecznika sosnowca. Duża liczba owadów znanych ze swej wrażliwości na *S. marcescens* wynika z faktu, że bakteria ta występuje w dwu odmianach, z których jedna wytwarza charakterystyczny czerwony barwnik — prodigiozynę, będący

bardzo łatwą cechą diagnostyczną. Szczepy bezbarwne, również patogenne dla owadów, są trudniejsze do identyfikacji i prawdopodobnie liczne bakterie izolowane dotychczas z owadów i opisywane jako nowe gatunki należały w istocie do *Serratia marcescens*. Również opisany przez Shipero-vitscha *Bacillus septicemiae lophyri* powodujący epizoocje borecznika sosnowca w warunkach naturalnych mógł być bezbarwnym szczepem *S. marcescens*. Shiperovitsch opisuje wyizolowanego przez siebie patogena jako bakterię bardzo podobną do *Bacillus acridiorum* d'Herelle, obecnie *Aerobacter cloacae* — gatunek należący podobnie jak *S. marcescens* do rodziny *Enterobacteriaceae*.

Serratia marcescens była przyczyną licznych epizoocji owadów hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Już w 1817 r. obserwowano czerwone zabarwienie martwych gąsienic *Bombyx mori* (19).

W ostatnich latach Stevenson (20) izolował tę bakterię z martwej szarańczy, Bucher (5) ze szkodników tytoniu i pomidorów, Moore i Wool (15, 22) z larw chrząszczy, Lipa (12) obserwował epizoocję gnatarza rzepakowca wywołaną przez *S. marcescens*, a Głowacka-Pilot (10) izolowała ją z chorych gąsienic barczatki sosnowki. Znane są również powodowane przez tę bakterię przypadki epizoocji wśród owadów żyjących w warunkach naturalnych, zwłaszcza wśród szarańczaków (3).

Badania Buchera (4) wykazały, że *S. marcescens* może być przenoszona na pokładku pasożytów i wystarczające jest wprowadzenie 1 komórki bakteryjnej do jamy ciała wrażliwego owada, aby spowodować jego chorobę i śmierć. *S. marcescens* wytwarza egotoksyny (13) i enzym lecytynazę (8) umożliwiające inwazję jamy ciała owada i prawdopodobnie dzięki tym mechanizmom może w odróżnieniu od innych C^- pałek powodować epizoocję. Oprócz niej, z rodziny *Enterobacteriaceae*, jedynie *Aerobacter cloacae* zdolny jest wywołać epizoocje owadów żyjących w warunkach naturalnych. Nie znane są dotychczas takie epizoocje powodowane przez pozostałe gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae*.

WNIOSKI

1. Sprawcą epizoocji larw borecznika sosnowca *Diprion pini* L. w nadleśnictwach Antonin i Ostrzeszów był niewytwarzający barwnika szczep bakterii *Serratia marcescens* Bizio.

2. *S. marcescens* znana jest jako przyczyna epizoocji owadów żyjących w warunkach naturalnych i prawdopodobnie może odgrywać ważną rolę w ograniczaniu liczebności populacji borecznika sosnowca.

LITERATURA

1. Balch R. E., Bird F. T. — A disease of the European spruce sawfly, *Gilpinia hercyniae* (Htg.) and its place in natural control. „Sci. Agr.” 25, 65—80, 1944.
2. Bergey's manual of determinative bacteriology. Bailliere, Tindall and Cox, LTD, London, 1957.
3. Bucher G. E. — Bacteria of grasshoppers of western Canada: III. Frequency of occurrence pathogenicity „J. Insect. Pathol” 1, 391—405, 1959.
4. Bucher G. E. — Transmission of bacterial pathogens by the ovipositor of a hymenopterous parasite. „J. Insect Pathol” 5, 3, 277—283, 1963.
5. Bucher G. E. — Pathogens of tobacco and tomato hornworms. „J. Invert. Pathol”. 9, 82—89, 1967.

6. Davis B. R., Ewing W. H., Reavis R. W. — The biochemical reactions given by members of the *Serratia* group. „Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature Taxonomy” 7, 151—160, 1957.
7. Escherich K. — Die Forstinsekten Mitteleuropas. Bd. 5, Parey, Berlin, 1942.
8. Esselmann M. T., Liu P. W. — Lecithinase production by gram — negative bacteria. „J. Bacteriol” 81, 939—945, 1961.
9. Gibbs B. M., Skinner F. A. — Identifications methods for microbiologists. Academic Press, London, 1966.
10. Głowacka-Pilot B. — Owadobójcze bakterie i grzyby występujące na gąsienicach barczatki sosnowki (*Dendrolimus pini* L.) „Prace IBL”, w druku.
11. Koehler W., Schnaider Z., Śliwa E. — Stan zagrożenia lasów polskich ze strony szkodliwych owadów leśnych w r. 1959/1960. „Prace IBL”, 225, 5—45, 1961.
12. Lipa J. J. — Zarys patologii owadów. PWRiL, Warszawa, 1967.
13. Liu P. V. — Observations on the specificities of extracellular antigens of the genera *Aeromonas* and *Serratia*. „J. Gen. Microbiol.”, 24, 145—153, 1961.
14. Martinec T., Kocur M. — The taxonomic status of *Serratia marcescens* Bizio. „Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature Taxonomy” 11, 7—12, 1961.
15. Moore G. E. — Microflora from the alimentary tract of healthy southern pine beetles, *Dendroctonus frontalis* (Scolytidae) and their possible relationship to pathogenicity. „J. Invert. Pathol.”, 19, 72—75, 1972.
16. Pelczar M. J. — Manual of microbiological methods. Mc Graw-Hill, New York, 1957.
17. Raport of the *Enterobacteriaceae* subcommittee of the nomenclature committee of the international association of microbiological societies. „Intern. Bull. Bacteriol. Nomenclature Taxonomy”, 8.1, 25—70, 1958.
18. Schedl K. E. — Zur Blattwespen-Prognose. „Mitt. Forstwirtschaft. u. Forstwiss.”, 9, 192—241, 1938.
19. Steinhaus E. A. — *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. „Hilgardia”, 28, 14, 351—380, 1959.
20. Stevenson J. P. — An infection of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forskål with a nonchromogenic strain of *Serratia marcescens* Bizio. „J. Insect Pathol.”, 1, 2, 129—141, 1951.
21. Urban S. — Die Begrenzungsfaktoren der Übervermehrung der Kiefernbuschhornblattwespe (*Diprion pini* L.) in den Jahren 1960 und 1961. „Arch. Forstwesen”, 14, 11/12, 1965.
22. Wood D. L. — The occurrence of *Serratia marcescens* Bizio in laboratory populations of *Ips confusus* (Leconte) (Coleoptera, Scolytidae). „J. Ins. Pathol.”, 3, 330—331, 1961.

Краткое содержание

В сентябре 1971 г. была установлена эпизоотия личинок обыкновенного соснового пилильщика *Diprion pini* L. на территории надлесничеств Антонин и Остшешув в познанском воеводстве. Для определения причины смертности в лаборатории исследовались умирающие и мёртвые личинки. Наблюдения под микроскопом показали, что в гемолимфе больных личинок находятся большие количества подвижных бактериальных клеток G. Из 170 исследованных личинок выделено 170 поколений *Serratia marcescens* Bizio, 10 поколений *Proteus vulgaris* Hauser и 3 поколения *Aerobacter cloacae* Jordan.

Summary

The epizooty of *Diprion pini* L. larvae was found in September 1971 on the area of the Antonin and Ostrzeszów forest districts in the Poznań province. Dying and dead larvae have been examined in laboratory in order to identify the cause of mortality. Microscopic examination revealed great quantities of mobile G- bacterial cells in the haemolymph of infected larvae. 170 strains of *Serratia macrescens* Bizio, 10 strains of *Proteus vulgaris* Hauser, and 3 strains of *Aerobacter cloacae* Jordan were isolated from the 170 examined larvae.