

柞蚕空胴病的研究

II. 柞蚕空胴病病原菌的鉴定*

王大帮 战立克

(中国科学院微生物研究所, 北京)

于溪滨 张春发

(辽宁省蚕业科学研究所, 凤城)

柞蚕空胴病病原菌是一种新发现的柞蚕病原菌。该菌系革兰氏阳性球菌, 多成对排列, 无芽孢。发酵葡萄糖产乳酸, 但不产气。接触酶阴性。在 10℃ 和 45℃ 均生长。其生理生化特性与粪链球菌和鸟链球菌相似, 但又有不同之处。血清学分析结果表明, 该菌所产生的抗体与 Lancefield D 群和 Q 群抗原都有低滴度的交叉反应, 反之亦然; 此外, 它还具有未确定的其它抗原结构。由于其形态、生理生化和血清学特征不同于已知的链球菌, 而确定为链球菌属的一个新种, 命名为柞蚕链球菌 (*Streptococcus pernyi* sp. nov.)。

柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 空胴病在全国各柞蚕区均有发生, 辽宁、吉林等蚕区受害较重, 平均受害率为 30—40%, 严重地区可达 70% 以上, 对柞蚕生产威胁极大。于溪滨等对该病的病原、病症、病变、传染规律和防治等进行了全面的研究, 认为是柞蚕的一种新发现的细菌病害。我们对该菌进行了鉴定, 现将结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株来源

柞蚕空胴病病原菌系从病蚕中肠和病蛹分离。本文试验菌株 78501 和 78502 分离自辽宁省宽甸县病蛹, 78503 和 78504 分离自辽宁省凤城县病蛹, 78506 由吉林省蚕业科学研究所分离并供给。对照菌株粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) AS 1.2、AS 1.130 和 AS 1.131 由中国科学院微生物研究所供给。血清型标准株 Lancefield A 群菌株 32115、Lancefield B 群菌株 32116、Lance-

field C 群菌株 32117、Lancefield D 群菌株 32118、Lancefield N 群菌株 32126 和 Lancefield Q 群菌株 32146 由卫生部药品生物制品检定所供给。

(二) 致病性测定

将菌悬液涂于柞叶上, 阴干后饲养蚁蚕。饲养到一眠结束, 统计结果。每株菌饲养蚕 10 头, 重复两次。

(三) 形态和生理生化特征

1. 形态特征

培养基: 蔗糖 20 克, 蛋白胨 20 克, NaCl 5 克, 牛肉汁 1000 毫升, pH7.5; 固体培养基则另加琼脂 20 克; 15 磅 30 分钟灭菌。

培养温度 30℃。

平板菌落形态系培养 7 天后观察; 斜面生长形态系培养 2 天后观察。于斜面上培养 7、30 和 50 小时后, 用革兰氏染色法染色后镜检或用相差

本文于 1979 年 7 月 12 日收到。

* 李广泽、王桂晨同志参加致病性测定工作; 图 2 由中国科学院林业土壤研究所电镜组提供, DNA 的 G + C 含量由刘聿太同志测定。

技术观察个体形态。

2. 生理生化特征

除下列注明的生理生化试验外,均采用常规方法^[1]。以精氨酸作为能源的测定用 Deibel 氏法^[2]。精氨酸产氨试验主要依据 Kedde 氏法^[3]。需叶酸生长试验参照 Nowlan 和 Deibel 二氏^[4]和 DIFCO 手册^[5]进行。除注明者外,均于 30℃ 培养。

(四) 血清学试验

用 Lancefield 氏酸抽提法^[6]制备抗原。用 3% 福尔马林生理盐水菌悬液免疫家兔,制备抗血清。血清学试验除在试管内进行沉淀反应外,还进行了凝集反应。为了确定抗原关系,还进行了抗体吸收试验。

(五) DNA 的 G + C 克分子百分比的测定

采用热变性温度法进行测定。

结 果

试验菌(78501—78504,78506)的个体形态为球形(图 1,2);革兰氏染色阳性;多成对排列,个别细胞为单个或三个细胞联成短链;直径约为 1—1.2 微米;不形成芽孢、荚膜和鞭毛。菌落圆形,生长较快,培养 24 小时的菌落直径可达 1.5—2.0 毫米,凸起,光滑,闪光,呈油菜花黄。在兔血平板上有乙型溶血。三株对照菌 AS 1.2、AS



图 1 78501 菌株的个体形态(3,750×)

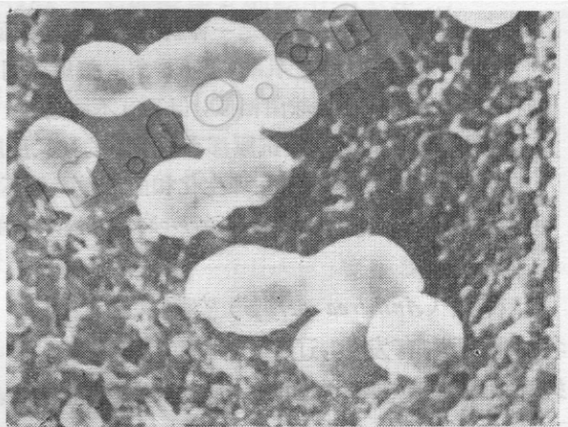


图 2 78501 菌株的个体形态(电镜照片 10,000×)

表 1 试验菌与对照菌不同的生理生化特征

菌 号		78501	78502	78503	78504	78506	AS 1.2	AS 1.130	AS 1.131
特征	在 0.1% 美蓝牛奶中还还原美蓝	+	+	+	+	+	++	+++	+++
	最 高	11.2—11.5	11.2—11.5	11.2—11.5	11.2—11.5	11.2—11.5	9.8—10.0	9.8—10.0	9.8—10.0
	最 低	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	4.8	4.8	4.8
	培养液最终	5.15	5.0	5.02	5.02	4.9	4.5	4.3	4.4
木糖生酸		+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
山梨糖生酸		—	—	—	—	—	±	+	±
甘油生酸		+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
山梨醇生酸		+++	+++	+++	+++	+++	—	+++	+++
鼠李糖生酸		+++	+++	+++	+++	+++	—	—	—

注 “—”无反应;“±”反应可疑;“+”少部分变色;“++”大约 1/2 变色;“+++”全部变色。

1.130 和 AS 1.131 所形成的细胞链较长，可达 6—8 个细胞。菌落生长慢而差，培养 24 小时直径仅达 0.5 毫米，呈白或杏仁黄色。

五株试验菌的生理生化特征与三株对照菌相同者有以下各项：在 10℃、45℃或含 6.5% NaCl 的培养基中均生长，石蕊牛奶产酸、还原，不利用精氨酸，不从精氨酸产氨，叶酸不是生长时所必需的生长素，接触酶阴性，不液化明胶，不产生吡啶或硫化

氢，从葡萄糖产乳酸不产气，从阿拉伯糖、果糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、棉子糖（78505 不生酸）、糊精、甘油和甘露醇产酸，不从赤藓醇或肌醇产酸。五株病原菌与三株对照菌不同之处见表 1。

试验菌对柞蚕的死亡率为 95%，个别菌株稍低为 83.3%，而对照菌株对柞蚕无毒力。

试验菌的血清学特征见表 2—4。

表 2 沉淀反应结果

滴 抗 原 度 抗血清	78501	78502	78503	78504	78506	32115	32116	32117	32118	32126	32146
78501	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	0	0	0	1:8	0	1:4
32118	1:8	—	—	—	—	—	—	—	1:64	—	—
32146	1:2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:16

表 3 凝集反应结果

滴 细 度 胞 抗血清	78501	32118	32146
78501	1:512	1:32	1:16
32118	1:2	1:512	—
32146	0	—	1:256

表 4 吸收试验结果

滴 抗 原 度 抗血清	沉 淀 反 应			凝 集 反 应		
	78501	32118	32146	78501 细胞	32118 细胞	32146 细胞
78501	1:128	1:8	1:4	1:512	1:32	1:16
78501-32118	1:128	0	1:4	1:512	0	1:8
78501-32146	1:128	1:8	0	1:512	1:32	0
78501-32118-32146	1:128	0	0	1:256	0	0
32118	1:8	1:64	—	1:2	1:512	—
32118-78501	0	1:64	—	0	1:512	—
32146	1:2	—	1:16	0	—	1:256
32146-78501	0	—	1:8	0	—	1:128

试验结果表明: 试验菌株除具有低滴度的 Lancefield D 和 Q 群的抗原外, 还具有独特的高滴度的未知抗原, 而与 Lancefield A、B、C 和 N 群抗原均无关系。

78501 菌株 DNA 的 G + C 比例为 36.1 克分子 %。

讨论与结论

1. 试验菌分离自辽宁、吉林两省的柞蚕空胴病病蛹, 并对柞蚕有高度致病力。

2. 试验菌系革兰氏阳性球菌, 多成对排列, 少数单个或成短链; 无芽孢; 不运动。接触酶阴性, 发酵葡萄糖产乳酸不产气。根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版)^[7], 该菌应属于链球菌属 (*Streptococcus*)。

3. 试验菌在 10℃ 和 45℃ 均能生长, 与鸟链球菌 (*Streptococcus avium*) 和粪链球菌 (*S. faecalis*) 的某些特征相同, 但其生长最终 pH 值偏高, 对柞蚕有致病力。在 0.1% 美蓝牛奶中生长, 叶酸并非生长所必需, 不从山梨糖产酸, 从阿拉伯糖生酸, 不利用精氨酸, 有独特的高滴度的抗原。这些特征均与上述两种细菌不相符。

4. 试验菌与 Holdeman 等^[8]所描述的四

种链球菌及 Pier 和 Madin^[9] 所报道的 *S. iniae* 也不同。

5. 根据以上结果, 我们认为试验菌是链球菌属内的一个新种, 依其来源, 命名为柞蚕链球菌 (*Streptococcus pernyi* sp. nov.)。菌株 78501 为模式株, 存放于中国科学院微生物研究所 (菌号为 AS 1.1010) 和辽宁省蚕业科学研究所。

参考文献

- [1] 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, 北京, 1978。
- [2] Deibel, R. H.: *J. Bact.*, **87**: 988—992, 1964.
- [3] Keddie, R. M.: *J. Appl. Bact.*, **22**: 403—416, 1959.
- [4] Nowlan, S. S. and R. H. Deibel: *J. Bact.*, **94**: 297—299, 1967.
- [5] DIFCO Manual, 9th ed., DIFCO Laboratories, 1953, p. 225.
- [6] Harrigan, W. F. and M. E. McCance: *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, 1966, p. 817.
- [7] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [8] Holdeman, L. V. et al.: *Int. J. Systemat. Bacteriol.*, **24**: 260, 1974.
- [9] Pier, G. B. and S. H. Madin: *Int. J. Systemat. Bact.*, **26**: 545—553, 1976.

STUDIES ON EMPTY-GUT DISEASE OF TUSSAH

II. IDENTIFICATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF EMPTY-GUT DISEASE OF TUSSAH, *STREPTOCOCCUS PERNYI* SP. NOV.

Wang Da-si

Zhan Li-ke

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Yu Xi-bin

Zhang Chun-fa

(Liaoning Institute of Science of Silkworm, Fengcheng)

The causative agent of empty-gut disease, a newly discovered disease, of tussah is a newly discovered pathogenic bacterium for tussah, a wild silk worm with economic significance in China. This pathogenic bacterium is a Gram positive coccus, 1—1.2 μm in diameter, mostly in pairs, single cells or short chains are seldom. No spore. Non motile. In a medium containing sucrose 20 g, peptone 20 g, NaCl 5 g, meat extract solution 1 liter, pH 7.5, abundant growth is produced. On agar plate, the colonies are circular, entire, convex, smooth, opaque, 1.5—2.0 mm in diameter, and pale yellow in color. In liquid culture, uniform turbidity is formed at first, and abundant flocculent precipitates are produced three days later. Catalase negative. Lactic acid, but no gas, is produced from glucose, i. e. homofermentative. Growth occurs at both 10°C. and 45°C., at pH 9.6, in 6.5% NaCl and in 0.1% methylene blue milk, and is able to be initiated within the pH range from 6.4 to 11.5. No growth occurs at pH 4.9. The final pH of broth culture is between 4.9 to 5.15. Arginine is not utilized and no ammonia is produced from it. Folic acid

is not required for growth. Acid is produced from litmus milk and litmus is reduced. Acid is produced from arabinose, xylose, fructose, lactose, maltose, sucrose, raffinose, dextran, glycerol, mannitol, sorbitol and rhamnose, but not from sorbose, inositol and erythritol. β -haemolysis is produced on rabbit blood agar plate.

Serological analysis shows that the antigenic structure of this tussah pathogen is complex. It contains not only Lancefield group D and group Q antigens with lower titer, but also an unique unknown antigen group of Lancefield with higher titer. Its antiserum does not react with antigens of Lancefield group A, B, C, and N.

Accordingly, the morphological, physiological, biochemical and serological characteristics of the organism in question are identical with those of Genus *Streptococcus*, but differ from those of all known species. This causative agent of empty-gut disease is designated as a new species of *Streptococcus*, *Streptococcus pernyi* sp. nov., and culture 78501 is assigned as the type strain, deposited in Type Culture Collection, Academia Sinica, as AS 1.1010.