

the phloem of witches' broom diseased *Vaccinium myrtillus* plants in the Netherlands. *Phytopath. Z.* **83**, 91–94.
 MARWITZ, R. und H. PETZOLD, 1983: Mykoplasmaähnliche Organismen als Krankheitserreger an Primeln. *Gesunde Pflanzen* **35**, 336–341.
 MARWITZ, R., H. PETZOLD und H. KÜHNE, 1984: Mykoplasmen an Primeln. *Gb + Gw Gärtnerbörse Gartenwelt* **84**, 608–612.
 REYNOLDS, E. S., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–213.

SILLER, W., W. LEDERER und E. SEEMÜLLER, 1986: Ursache und Verbreitung der Hexenbesenkrankheit der Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) in Waldgebieten Süddeutschlands. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **38**, 1–5.
 SPURR, A. R., 1969: A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.* **26**, 31–43.
 USCHDRAWITZ, H. A., 1961: Eine für Deutschland neue Virose bei *Vaccinium myrtillus*. *Phytopath. Z.* **40**, 416–419.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., **39** (9), S. 132–134, 1987, ISSN 0027-7479.
 © Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

Über den Erreger einer Bakteriose im Parasit-Wirts-System *Ernestia consobrina/Mamestra brassicae: Serratia liquefaciens*

The causative agent of a bacteriosis in the parasite-host system *Ernestia consobrina/Mamestra brassicae: Serratia liquefaciens*

Von A. Krieg und A. M. Huger

Zusammenfassung

In Zuchten der larviparen Tachinide *Ernestia consobrina* auf Larven von *Mamestra brassicae* traten etwa 2 bis 3 Tage nach der Parasitierung immer wieder hohe Ausfälle bei Wirt und Parasit auf. In diesem Zusammenhang konnte sowohl aus der Hämolymphe moribunder und toter Wirtslarven als auch aus larvalen Parasiten als Krankheitserreger ein gram-negatives Kurzstäbchen isoliert und als *Serratia liquefaciens* identifiziert werden. Aufgrund des Antibiotogramms dieses Bakteriums wird für eine Sanierung der Wirts- und Parasitenzucht neben den üblichen Hygienemaßnahmen die Anwendung von Nalidixinsäure und Chloramphenicol als Therapeutica empfohlen.

Abstract

In rearings of the larviparous tachinid *Ernestia consobrina* on host larvae of *Mamestra brassicae*, parasitization was followed by heavy mortalities of both hosts and parasites after 2 to 3 days. From the hemolymph of moribund and dead host larvae as well as from larval parasites the causative agent, a gram-negative coccobacillus, was isolated and identified as *Serratia liquefaciens*. Based on the antibiogram of the bacterium it is suggested that, in addition to common hygienic measures, nalidixinic acid as well as chloramphenicol could be useful therapeutics for sanitation of parasite and host rearing.

1. Material und Methoden

Im Commonwealth Institute of Biological Control, European Station, in Delémont (Schweiz) traten in der Zucht der larviparen Tachinide *Ernestia consobrina* auf Larven der Kohleule, *Mamestra brassicae*, laufend hohe Mortalitäten bei parasitierten Wirtslarven auf, die schließlich zum Zusammenbruch der Parasitenzucht führten. In der Regel gingen die auf Kunstfutter gehaltenen Wirtslarven 2 bis 3 Tage nach erfolgter Parasitierung, d. h. nach dem Einbohren der Parasitenlarven durch das Integument in die Körperhöhle, ein. Zur Aufklä-

rung der Mortalitätsursache und zur Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes wurde unserem Institut Tiermaterial aus der genannten Parasitenzucht zur Diagnose übersandt. Herrn Dr. K. C. CARL sei für die Überlassung des Materials und das Interesse an dieser insektenpathologischen Studie gedankt.

Nach lichtmikroskopischen Untersuchungen an moribunden und frisch toten parasitierten Wirtslarven war als Ursache der anhaltenden hohen Sterblichkeit eine Bakteriose anzunehmen. In allen Fällen waren nämlich in der Hämolymphe kurzstäbchenförmige Bakterien in Massen nachweisbar (Abb. 1). Daher wurde versucht, aus den parasitierten Raupen von *M. brassicae* sowie aus Larven des Parasiten *E. consobrina* den mutmaßlichen Krankheitserreger zu isolieren und zu identifizieren.

Zur Isolation wurden Hämolympheproben aus abgängigen Wirtslarven sowie Gewebeproben von toten Parasitenlarven auf Nähragar (Pepton, Glucose, Hefextrakt) fraktioniert ausgestrichen und die Platten bei 30 °C inkubiert. Zur taxonomischen Einordnung der Isolate dienten insgesamt 30 in der diagnostischen Bakteriologie übliche biochemische Tests, davon 16 zur Artbestimmung. Eine weitere Charakterisierung der Stämme erfolgte anhand ihres Antibiotogramms gegenüber 17 verschiedenen Antimetaboliten. Als sich im Verlauf der Differentialdiagnose die Einordnung der Isolate in das Genus *Serratia* abzeichnete, wurden zum Vergleich noch zwei früher von uns isolierte entomogene Stämme von *Serratia marcescens* herangezogen.

2. Ergebnisse

Die aus Wirts- und Parasitenlarven erhaltenen Bakterienisolate bildeten bei 30 °C auf Nähragar innerhalb von 24 Stunden einheitlich feuchte, glänzende, weißliche Kolonien von runder Form und mit glattem Rand. Sie bestanden nach lichtmikroskopischer Untersuchung im Phasenkontrast aus beweglichen

Kurzstäbchen (0,6 × 0,8 . . . 1,2 µm). Sporulation trat nicht auf. Die Keime reagierten nach GRAM negativ; entsprechend fiel die KOH-Reaktion nach RYU positiv aus. Aus Glucose und einer Reihe weiterer Kohlenhydrate (s. u.) wurde sowohl Säure als auch Gas gebildet. Kulturell erwiesen sich die Bakterien im Oxydations-Fermentations-Test nach HUGH & LEIFSON als aerogen fermentativ. Sie waren Cytochromoxydase-negativ und Katalase-positiv. Nitrat wurde zu Nitrit reduziert. Diese Kriterien sprechen für eine Einordnung der Isolate in die Familie Enterobacteriaceae.

Die Zugehörigkeit zum Tribus Klebsielleae wurde für alle Isolate durch folgende Eigenschaften gesichert (vgl. BERGEY, 1974): KCN-Resistenz (Ausschluß von *Escherichiae*¹), Yersinia- und den meisten *Erwiniae*, keine Produktion von Phenylalanin-Desaminase (Ausschluß von *Proteeae*).

Der Ausschluß der meist phytopathogenen *Erwiniae* erfolgte gruppenweise: Produktion von DNase im Gegensatz zur *amylovora*- und *carotovora*-Gruppe; keine Synthese von gelbem Pigment im Gegensatz zur *herbicola*-Gruppe.

Außerdem zeigten im Gegensatz zu den meisten *Erwinia*-Arten unsere Isolate eine positive Lysin- und Ornithin-Decarboxylase-Reaktion.

Für die Einordnung unserer Isolate in das Genus *Serratia* war u. a. der Nachweis von Tween-Esterase-Produktion (LOVELL & BIBEL, 1977) maßgebend. Weitere relevante Eigenschaften waren: kein Alkali aus Malonat, keine Produktion von Arginin-Dihydrolase oder von Urease. Ebenfalls nicht gebildet wurden Indol und H₂S. Dagegen produzierten die Isolate neben DNase auch Proteinase.

Unsere Isolate aus *M. brassicae* und *E. consobrina* synthetisierten kein rotes Pigment. Im Gegensatz zu *S. marcescens* fermentierten sie nicht Aconitat, wohl aber Raffinose, L-Arabinose und D-Xylose. Sie unterschieden sich von Stämmen

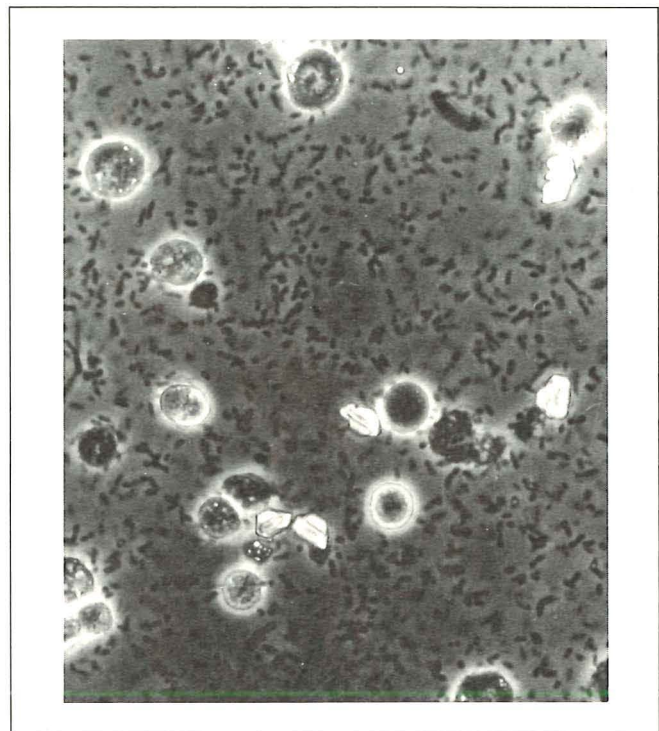


Abb. 1. Mit *Serratia liquefaciens* infizierte Hämolymphe einer moribunden Wirtslarve (*Mamestra brassicae* - L₄) 2 Tage nach der Parasitierung durch *Ernestia consobrina*. Phasenkontrast-Aufnahme; Vergrößerung 640×.

von *S. rubidaea* bzw. *S. marinorubra* durch Produktion von Ornithin-Decarboxylase und Abbau von Sorbit. Damit handelt es sich bei unseren Isolaten um Vertreter der Species *S. liquefaciens* (vgl. EWING et al. 1973 und GRIMONT et al., 1977). In Tabelle 1 werden die biochemischen Leistungen

¹) Mit Ausnahme von *Citrobacter* (der aber keine Proteinase bildet) und mit Ausnahme von *Salmonella* subgen. IV (die aber H₂S produziert).

Tab. 1. Biochemische Leistungen unserer Isolate EC¹ und MB² von *Serratia liquefaciens* im Vergleich zu zwei entomogenen Stämmen E-11³ und E-43⁴ von *Serratia marcescens*

Test (Kriterium)	<i>S. liquefaciens</i>			<i>S. marcescens</i>		
	erwartet ⁵	beobachtet EC ¹	beobachtet MB ²	erwartet ⁵	beobachtet E-11 ³	beobachtet E-43 ⁴
Wachstum 39°C	0	0	0	+	+	+
Prodigiosin (Pigment)	0	0	0	+	+	(+)
Lezithinase	d	+ ⁷	+ ⁷	+	+	+
Chitinase	d	+ ⁷	+ ⁷	+	+	+
Urease	d	0 ⁷	0 ⁷	d	0 ⁷	0 ⁷
Lysin-Decarboxylase	d	+ ⁷	+ ⁷	+	+	+
Acetylmethylcarbinol	d	+ ⁷	+ ⁷	+	+	+
Gas aus Glucose	+	+	+	0	0	+ ⁶
Adonit-Abbau	0	0	0	+	+	0 ⁶
Sorbit-Abbau	d	+ ⁷	+ ⁷	+	+	+
Laktose-Abbau	d	0 ⁷	0 ⁷	+	0	0
Cellobiose-Abbau	d	0 ⁷	0 ⁷	0	0	0
Raffinose-Abbau	+	+	+	0	0	0
D-Arabinose-Abbau	0	0	0	0	0	0
L-Arabinose-Abbau	+	+	+	d	0 ⁷	0 ⁷
D-Xylose-Abbau	+	+	+	0	0	0
Aconitat-Abbau	0	0	0	+	+	+

¹ Isolat aus *Ernestia consobrina* (Diptera)

² Isolat aus *Mamestra brassicae* (Lepidoptera)

³ Isolat aus *Acheta domesticus* (Orthoptera)

⁴ Isolat aus *Blatta orientalis* (Orthoptera)

⁵ nach EWING et al. (1973) sowie GRIMONT et al. (1977)

⁶ Abweichung von der Erwartung

⁷ stamm-spezifische Reaktion

d = differierend

+ = positive Reaktion bzw. Produktion

0 = keine Reaktion oder Produktion

Tab. 2. Antibiogramm (Plättchentest) unserer Isolate EC¹ und MB² von *Serratia liquefaciens* im Vergleich zu zwei entomogenen Stämmen von *Serratia marcescens* E-11³ und E-43⁴

Hemmstoff/Beladung	<i>S. liquefaciens</i>		<i>S. marcescens</i>	
	EC ¹	MB ²	E-11 ³	E-43 ⁴
Ampicillin/25 µg	0	0	0	0
Aureomycin/50 µg	(+)	(+)	(+)	(+)
Chloramphenicol/50 µg	++	++	++	++
Cloxacillin/5 µg	0	0		
Colistin/50 µg	(+)	(+)	0	0
Fusidinsäure/10 µg	0	0		
Hexamethylentetraaminmandelat/500 µg	(+)	(+)	(+)	(+)
Kanamycin/5 µg	(+)	(+)		
Methicillin/10 µg	0	0		
Nalidixinsäure/30 µg	++	++	++	++
Neomycin/10 µg	(+)	(+)		
Nitrofurantoin/200 µg	(+)	(+)	(+)	(+)
Novobiocin/30 µg	0	0	0	0
Streptomycin/25 µg	+	+	+	+
Sulfafurazol/500 µg	0	0	(+)	(+)
Tetracyclin/50 µg	+	+	+	+

¹ Isolat aus *Ernestia consobrina* (Diptera)² Isolat aus *Mamestra brassicae* (Lepidoptera)³ Isolat aus *Acheta domesticus* (Orthoptera)⁴ Isolat aus *Blatta orientalis* (Orthoptera)

Hemmzone im Plättchentest (9-mm-Plättchen):

0 = keine Hemmung, (+) = < 19 mm; + = 19 ... 29 mm; ++ > 29 mm

unserer Isolate verglichen mit den Eigenschaften von zwei anderen *Serratia*-Isolaten aus Insekten, die beide in die Species *S. marcescens* eingeordnet wurden.

Die Bakterienisolate aus Tachinen und Wirtslarven erwiesen sich morphologisch, kulturell und biochemisch als identisch. – Spezifische biochemische Eigenschaften unserer Isolate gegenüber anderen Stämmen von *S. liquefaciens* (nach EWING et al.) sind: Bildung von Acetylmethylcarbinol, Abbau von Sorbit, kein Abbau von Cellobiose und Laktose, Produktion von Lysin-Decarboxylase, fehlende Produktion von Urease und Lezithinase.

Zur weiteren Charakterisierung wurde im Hinblick auf die Zielsetzung der Untersuchung ein Antibiogramm der Isolate erstellt. Das Ergebnis im Plättchen-Agar-Diffusionstest ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Bemerkenswert ist die hohe Empfindlichkeit unserer *Serratia*-Isolate gegenüber Nalidixinsäure, Chloramphenicol und Streptomycin. Eigenartigerweise zeigte sich kein auffällender Unterschied zu den Vergleichsstämmen von *S. marcescens*, auch nicht im Hinblick auf Tetracyclin. Der einzige Unterschied bestand in der Reaktion der Stämme beider Arten gegenüber Sulfafurazol.

Infektionsversuche zur Erfüllung der KOCHSchen Postulate mit Wirtslarven von *Mamestra brassicae* verliefen erfolgreich. Über die Pathologie dieser Bakteriose soll anderenorts berichtet werden.

3. Diskussion

Erstmals diagnostizierten GRIMONT et al. (1979) aus kranken oder toten Insekten *Serratia liquefaciens*. Aufgrund ihrer biochemischen Leistungen erwiesen sich von 48 *Serratia*-Isolaten 39% (19 nichtpigmentierte) der *S. liquefaciens* und 58% (18 rotpigmentierte und 10 nichtpigmentierte) der *S. marcescens* zugehörig; nur ein Isolat wurde als *S. marinorubra* identifiziert. Keines der in dieser Arbeit erwähnten Bakterien stammte aus Entomophagen (Räuber oder Parasiten). Indes-

sen hatte bereits 1959 STEINHAUS in einer Übersicht über die Bedeutung von *S. marcescens* als Insektenpathogen berichtet, unter anderem über die Tatsache, daß Parasiten wie die Braconiden *Macrocentus ancylivorus* und *Dibrachys cavus* sich in der Zucht an Wirtsraupen (hier *Gnorimoschema operculella*) infizieren können. Im Jahr 1963 beschrieb dann BUCHER die experimentelle Übertragung von *S. marcescens* auf Wirtsraupen durch den kontaminierten Ovipositor der Ichneumonide *Itopectis conquisitor* und diskutierte die möglichen fatalen Folgen dieser Übertragung für den Wirt und die Parasitenzucht. BRACKEN & BUCHER diagnostizierten 1967 nochmals *S. marcescens* als Mortalitätsfaktor bei einer Ichneumonide, und zwar bei *Exeristis comstockii*. In beiden Fällen waren Raupen der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* als Ersatzwirte verwendet worden. Schließlich isolierten KING et al. (1975) *S. marcescens* aus der Tachinide *Lixophaga diatraeae*, die sich über ihren Wirt, die Raupe des Amerikanischen Zuckerrohrbohrers (*Diatraea saccharalis*), infiziert hatte. Auch hier wirkte das Bakterium als Erreger einer spezifischen Bakteriose fatal auf das Parasit-Wirts-System. In einem ähnlich gelagerten Fall isolierten wir jetzt aus der Tachinide *Ernestia consobrina* und ihrem Wirt *Mamestra brassicae* identische Klone einer *Serratia*-Art. Sie wurde als *S. liquefaciens* determiniert. Es handelt sich hierbei um den ersten gesicherten Nachweis dieser Bakterien-Art als Krankheitserreger in einem Parasit-Wirts-System.

Bei KING et al. (l.c.) erwies sich bei dem Versuch einer Dekontamination von Wirts- und Parasiten-Zuchten Nalidixinsäure neben Hexamethylentetraaminmandelat gegenüber der von ihnen als Erreger isolierten *S. marcescens* als effektiv. Dagegen war ihr Isolat unempfindlich gegenüber anderen Antibiotika wie z. B. Tetracyclin.

Unser Isolat von *S. liquefaciens* erwies sich nur schwach sensitiv gegenüber Hexamethylentetraaminmandelat und mäßig sensitiv gegenüber Tetracyclin. Es ist jedoch hochempfindlich gegenüber Nalidixinsäure und Chloramphenicol. Deshalb bieten sich diese beiden Antimetabolite als orale Therapeutika für eine Sanierung von Wirts- und Parasiten-Zucht im vorliegenden Fall an. Daneben bleiben die bei Insektenzuchten üblichen hygienischen Präventivmaßnahmen unabdingbar.

Literatur

- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 1974: 8. Aufl. Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1268 pp.
- BUCHER, G. E., 1963: Transmission of bacterial pathogens by the ovipositor of a hymenopterous parasite. – *J. Insect Pathol.*, **5**, 277–283.
- BRACKEN, G. K., G. E. BUCHER, 1967: Mortality of hymenopterous parasite caused by *Serratia marcescens*. – *J. Invertebrate Pathol.*, **9**, 130–132.
- EWING, W. H., B. R. DAVIS, M. A. FIFE, E. F. LESSEL, 1973: Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. (formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. – *Int. J. system. Bact.*, **23**, 217–225.
- GRIMONT, P. A. D., F. GRIMONT, H. L. C. DULONG DE ROSNAY, P. H. SNEATH, 1977: Taxonomy of Genus *Serratia*. – *J. gen. Microbiol.*, **98**, 39–66.
- GRIMONT, P. A. D., F. GRIMONT, O. LYSENKO, 1973: Species and biotype identification of *Serratia*-strains associated with insects. – *Curr. Microbiol.*, **2**, 139–142.
- KING, E. G., J. V. BELL, D. F. MARTIN, 1975: Control of the bacterium *Serratia marcescens* in an insect host-parasite rearing program. – *J. Invertebrate Pathol.*, **26**, 35–40.
- LOVELL, D. J., D. J. BIBEL, 1977: Tween 80 medium for differentiating nonpigmented *Serratia* from other Enterobacteriaceae. – *J. clin. Microbiol.*, **5**, 245–247.
- STEINHAUS, E. A., 1959: *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. – *Hilgardia* (Berkeley), **28**, 351–380.