Zeitschrift: Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Entomologique Suisse = Journal of the Swiss Entomological Society

Herausgeber: Schweizerische Entomologische Gesellschaft

Band: 29 (1956)

Heft: 3

Artikel: Bacillus fribourgensis, n. sp. : Erreger einer "milky disease" im Engerling von Melolontha melolontha L.

Autor: Wille, Hans

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-401278

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN DER SCHWEIZERISCHEN ENTOMOLOGISCHEN GESELLSCHAFT
BULLETIN DE LA SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE SUISSE
Band XXIX Heft 3 25. Oktober 1956

Aus dem Entomologischen Institut und dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie der E.T.H., Zürich

Bacillus fribourgensis, n. sp., Erreger einer « milky disease » im Engerling von Melolontha melolontha L.

von

HANS WILLE
Zürich

Einleitung

In den USA werden Populationen von *Popillia japonica* NEWM. oft sehr stark durch *Bacillus popilliae* DUTKY, den Erreger der sogenannten « milky disease », dezimiert. Seit 1939 wird dieser Erreger auf grösserer Basis zur Bekämpfung der Engerlinge von *P. japonica* eingesetzt (BEARD, 1945). Dies ist eines der wenigen Beispiele, wo es gelungen ist, einen Schädling mit Hilfe pathogener Mikroorganismen erfolgreich zu bekämpfen. In europäischen Engerlingspopulationen dagegen wurde das Auftreten von « milky diseases » bis zur Zeit nie beobachtet. Seit 1949 sind am Entomologischen Institut (Vorstand : Prof. P. BOVEY) und am Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie (Vorstand : Prof. T. WIKÉN) Untersuchungen über die Möglichkeiten einer mikrobiologischen Engerlingsbekämpfung im Gange. Versuche, Engerlinge von *Melolontha melolontha* mit *B. popilliae* zu infizieren, verliefen negativ [1]. Wohl wurde in diesen Versuchen eine gewisse Mortalität erzielt, aber die Versuchstiere wiesen niemals die typischen Krankheitsmerkmale der « milky disease» auf. Es gelang aber aus kranken einheimischen Engerlingen u. a. pathogene terminale Sporenbildner, Kokken und einen Pilz aus der *Beauveria*-Gruppe zu isolieren und auf künstlichen Nährmedien zu vermehren. Die mit diesen Erregern durchgeführten Freilandversuche verliefen durchaus positiv (WIKÉN et al. 1954, WILLE, 1954,

[1] Die Sporenpräparate wurden freundlicherweise vom Japanese Beetle Control Laboratory des USDA zur Verfügung gestellt.

unveröffentlichte Versuchsdaten des Jahres 1955). Trotzdem seit 1949 mit Tausenden von Engerlingen aus verschiedenen Gebieten der Schweiz gearbeitet wurde, fanden wir erst Ende Juli 1955 Engerlinge, die äusserlich die Krankheitssymptome für eine « milky disease » aufwiesen und deren Haemolymphe dicht mit einem Sporenbildner besetzt war, der mit *B. popilliae* morphologisch grosse Aehnlichkeit aufwies. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Beschreibung des neuen Erregers sowie den Ergebnissen der ersten Laboratoriumsinfektionsversuche.

Fundort der Krankheit

Anlässlich unserer Reihenuntersuchungen über die Physiologie des Fettkörpers der Engerlinge (WILLE, GERIG und BRÖNNIMANN, 1956) stiessen wir auf einige Tiere, die sich äusserlich von den übrigen durch ein milchiges Aussehen unterschieden. Am auffälligsten war diese milchige Verfärbung am hinteren Teil des Abdomens, wo in normalen Tieren der prall gefüllte Dickdarm dunkel durchschimmert (Bild 1). Die weitere Untersuchung zeigte, dass die Haemolymphe dieser verdächtigen Engerlinge im Gegensatz zu der leicht opaleszierenden eines normalen Tieres auffallend milchig weiss und dicht mit einem Sporenbildner besetzt war. Diese kranken Engerlinge stammten aus zwei Versuchsflächen in Froideville (FR, Bernerfluggebiet). Der erste Versuch umfasste eine Fläche von 16 Aren und war in einer sehr mageren Heuwiese auf humusarmem Boden angelegt. Der zweite Versuch beanspruchte 20 Aren einer regelmässig stark gejauchten Mähwiese mit humosem Boden. Bei einer zweiten Kontrollgrabung im Herbst 1955 verfolgten wir das Auftreten dieser neuen Krankheit. Wir stellten fest, dass im ersten Versuchsfeld unter 393 Engerlingen nur 1 Tier die oben beschriebenen Krankheitssymptome aufwies. Im zweiten Versuchsfeld waren unter 212 Engerlingen nur 4 typisch an der « milky disease » erkrankt. In einem anderen Feld zu Luthern (LU, Bernerfluggebiet) lautete das Verhältnis 1 kranker zu 649 normalen. Diese Zahlen geben sicher ein falsches Bild über das

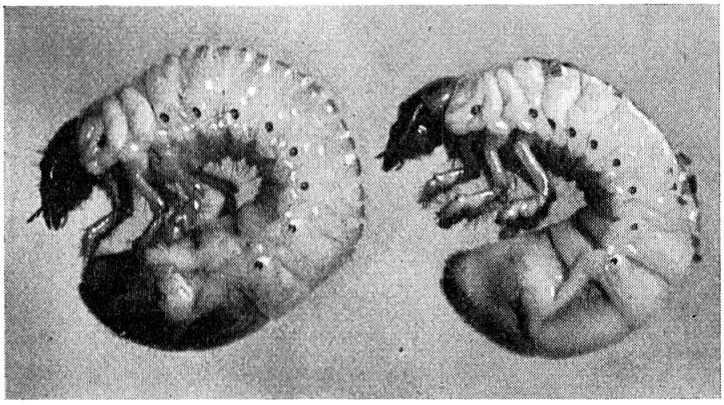


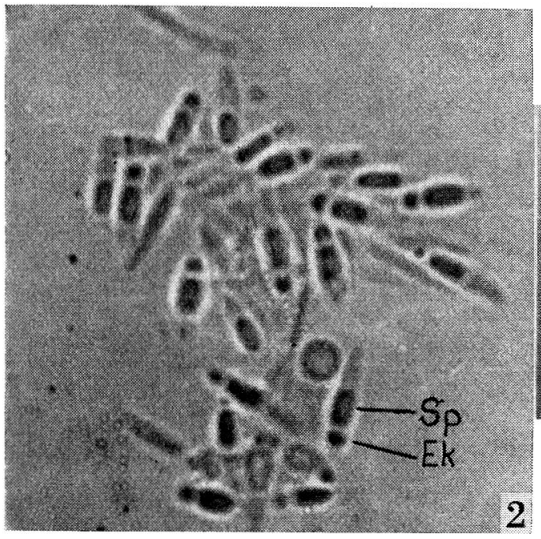
Abb. 1. — Gesunder Engerling des 3. Stadiums (links), bezw. Engerling des gleichen Stadiums durch *B. fribourgensis* infiziert (rechts).

Auftreten der « milky disease » in den Versuchsfeldern. U. a. wird diese Krankheit oft durch andere Krankheitssymptome maskiert. Zudem waren diese Erhebungen in Versuchsflächen unternommen worden, wo ein Bekämpfungserfolg von 41—48 % erzielt wurde. Bei Berücksichtigung dieser Momente wird die Vermutung zutreffen, dass der Prozentsatz Engerlinge, die an der « milky disease » im Laufe des Sommers in den betreffenden Versuchsflächen erkrankten, bedeutend höher gewesen ist.

Beschreibung des Erregers

Ein schlankes, nicht bewegliches Stäbchen von 1 × 8 μ bildet die vegetative Form des Erregers. Bei der Sporulation wird die Endospore subterminal in der Sporenmutterzelle angelegt, wobei die von der Spore besetzte Hälfte der Zelle immer stärker anschwillt. Anschliessend wird im freigebliebenen Teil dieses Abschnittes ein stark lichtbrechender Einschlusskörper gebildet. Das Protoplasma, das den Spore-Einschlusskörperkomplex umschliesst, hebt sich infolge verschiedener Lichtbrechung deutlich von der anderen Zellhälfte ab. Diese verschmälert sich sehr stark nach hinten (Bild 2). Niemals wurden Sporen oder Einschlusskörper frei ausserhalb der Sporenmutterzelle beobachtet.

Durchschnittlich beträgt die Länge der Sporenmutterzelle 7,1 μ, ihre Breite 1,4 μ. Für die Spore lauten die Masse : 2,2 μ × 1,3 μ, für den Einschlusskörper : 0,8 μ × 0,8 μ. Die Ausbildung der Sporenmutterzelle, namentlich die Anordnung der Spore und des Einschlusskörpers, weist mit *B. popilliae* morphologisch weitgehende Aehnlichkeiten auf. Die Grössenverhältnisse des letzteren sind aber meist klei-



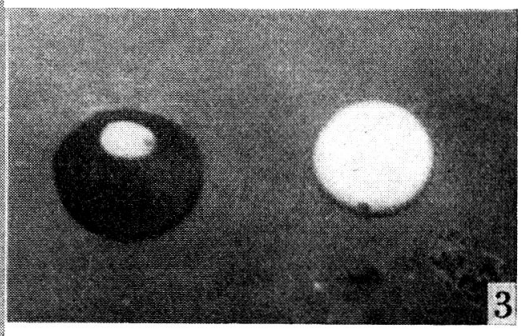


Abb. 2. und 3. — 2. *B. fribourgensis.* Suspension eines Blutausstriches von einem infizierten Engerling, ungefärbt. Sp = Sporen, Ek = Einschlusskörper. Ca 2000 ×. — 3. Bluttropfen eines gesunden (links) und eines mit *B. fribourgensis* infizierten Engerlings (rechts) auf schwarzer Unterlage.

ner. Sie lauten nach DUTKY (1940): Stäbchen 0,9 μ × 5,2 μ, Sporenmutterzelle: 1,6 μ × 5,5 μ, Endospore 0,9 μ × 1,8 μ. Im neuen Erreger ist derjenige Teil der Sporenmutterzelle, der vom Spore- Einschlusskörperkomplex nicht in Anspruch genommen wird, bedeutend länger als bei *B. popilliae*, beim letzteren ist dagegen die Protoplasmahülle um jenen Komplex breiter angelegt. Die Feststellung von BEARD (1945), dass bei *B. popilliae* die Anordnung von Spore und Einschlusskörper einem Fussabdruck gleicht, gilt auch für den neuen Erreger. Diese Besonderheit erlaubt es, namentlich bei Mischinfektionen sein Vorhandensein verhältnismässig leicht ausfindig zu machen.

Die Malachitgrün-, Safranin-Sporenfärbung nach SCHAEFFER und FULTON (1933) färbt wohl die Spore, aber der Einschlusskörper kann damit nicht dargestellt werden. BEARD (1945) machte die gleiche Feststellung für *B. popilliae* nach Färbung mit Karbolfuchsin.

Es gelang uns nicht den Erreger auf künstlichen Nährsubstraten zu züchten. Neben den üblichen bakteriologischen Nährböden kam ohne Erfolg das von WIKÉN und WILLE (1953) ausgearbeitete, streng synthetische Nährsubstrat zur Anwendung, dem 2 Vol % A-Z- Lösung a beigegeben wurden. STEINKRAUS und TASHIRO (1955) entwickelten ein Nährmedium, auf dem *B. popilliae* zum Wachstum und Sporulation gebracht werden konnte. Das von ihnen vorgeschlagene Nährsubstrat wurde mit dem neuen Erreger geimpft, jegliches Wachstum blieb jedoch aus. Nach Zusatz von Hefeautolysat zu allen oben erwähnten Nährsubstraten trat in keinem Fall Wachstum ein.

Für den neuen Erreger schlagen wir den Namen *Bacillus fribourgensis*, n.sp., Familie *Bacillaceae* vor.

Infektionsgang und Infektionsversuche

Technik. Die in sterilem dest. Wasser suspendierten *B. fribourgensis* Sporen wurden mit Hilfe der von KERN (1950) beschriebenen Injektionsapparatur intralymphal und peroral appliziert. Nur Larven des 3. Stadiums wurden intralymphal infiziert, während zur peroralen Infektion Larven des 2. und 3. Stadiums verwendet wurden. Pro Engerling enthielt das Inoculum bei intralymphaler Infektion 500 000, bei peroraler 500 000 bis 1 000 000 Sporen. In anderen Versuchen wurde die Erde der Zuchtdosen, die je mit einem Engerling des 2. oder 3. Stadiums versehen waren (Methode nach WILLE und WILDBOLZ, 1953), mit einer Sporensuspension geimpft. Die Impfmenge enthielt 75 000 000 Sporen pro Dose.

Ergebnisse der Infektionsversuche. Ähnlich wie bei *B. popilliae* sind auch bei *B. fribourgensis* die Kenntnisse des Infektionsvorganges noch sehr mangelhaft. Nach der Annahme von BEARD (1945), die auch für *B. fribourgensis* zutreffen mag, gelangen die Sporen von *B. popilliae* mit der Nahrungsaufnahme in den Darmkanal der Larven von *P. japonica*, wo sie auskeimen. Die vegetativen Formen sollen dann, vermutlich von den Malpighi'schen Gefässen her in die Haemolymphe eindringen.

Von diesem Moment an stimmt der weitere Gang der Infektion von *B. fribourgensis* weitgehend mit demjenigen von *B. popilliae* überein. Die eingedrungenen Stäbchen vermehren sich rasch und fangen dann an zu sporulieren, der Einschlusskörper wird ebenfalls angelegt. Bei dichtester Besetzung der Haemolymphe mit Sporen von *B. fribourgensis* weist das Tier äusserlich ein allgemein milchig-weisses Aussehen auf. Wie erwähnt, sind diese Veränderungen am auffallendsten am hinteren Teil des Abdomens. Das Blut solcher Engerlinge, das leicht durch Wegschneiden eines Beines gewonnen wird, ist blendend weiss, während es beim gesunden Tier mehr oder weniger intensiv perlmutterglänzend ist (Bild 3). In diesem Stadium ist das Tier noch durch einen stark herabgesetzten Turgor und häufig durch dünnflüssige rectale Ausstossungen gekennzeichnet. Nach Vollendung der Sporulation in der Haemolymphe wird das Tier in 5—14 Tagen sterben.

Die Faktoren, die die Sporulation von *B. fribourgensis* im Blut auslösen, sind nicht bekannt. BEARD (1945) machte bei *B. popilliae* die Beobachtung, dass sie erst dann einsetzt, wenn die vegetativen Formen sehr zahlreich geworden sind. In der Regel gilt dies auch für *B. fribourgensis*. Häufig aber beobachteten wir, dass die Sporulation schon bei einer sehr geringen Zahl Stäbchen einsetzen kann.

In allen unseren zahlreichen Infektionsversuche mit *B. fribourgensis* wurde eine recht hohe Mortalität erzielt. Aber höchstens 20 % der infizierten Engerlinge wiesen äusserlich die für die « milky disease » typischen Krankheitsmerkmale auf. In den Infektionsversuchen treten regelmässig folgende abweichende Krankheitsbilder auf :

1. Trotzdem die Haemolymphe äusserst dicht mit Sporen von *B. fribourgensis* besetzt ist, lassen sich oft solche Engerlinge äusserlich von normalen nur durch einen schwächeren Turgor und dünnflüssige rectale Ausstossungen unterscheiden. Das milchige Aussehen fehlt ganz.

2. Parallel zur Invasion der Haemolymphe mit *B. fribourgensis* kann eine starke Vermehrung der Darmbakterienflora im Mitteldarm stattfinden. Das Mitteldarmepithel wird aufgelöst und die Bakterien dringen ebenfalls in das Haemocoel ein, wo sie sich ausserordentlich rasch vermehren. Solche Engerlinge sind in der Regel äusserlich stark dunkelbraun bis schwarz verfärbt und erliegen einer raschen Auflösung. In solchen Fällen können alle Übergänge von stärkster Infektion der Haemolymphe durch *B. fribourgensis* neben sporadischer Anwesenheit von Darmbakterien bis zu einem sehr schwachen Vorliegen der ersteren bei förmlicher Überschwemmung durch die letzteren beobachtet werden.

3. Engerlinge, die mit *B. fribourgensis* infiziert wurden, erliegen oft Mykosen. Die daraus isolierten Pilze gehören meistens zur *Beauveria*-Gruppe. Die Untersuchung der Haemolymphe solcher Larven

zeigt, dass *B. fribourgensis* Sporen in wechselnder Stärke vorhanden sein können.

4. In den vergangenen letzten 2 Jahren machten wir die Feststellung, dass in schweizerischen Engerlingspopulationen Rickettsiosen auftreten, die im Fettkörper der befallenen Engerlinge ähnliche histopathologische Veränderungen hervorrufen wie die « Lorscher Krankheit » (WILLE und MARTIGNONI, 1952 ; KRIEG, 1955). Diese Rickettsiosen verlaufen sehr langsam. Vom Moment der Infektion bis die ersten Symptome äusserlich erkennbar sind, dauert es in der Regel 50—80 Tage. Dabei erscheint der hintere Teil des Abdomens grau-bläulich marmoriert. Es scheint nun, dass nach Infektion von Engerlingen, die die Rickettsiose latent in sich tragen, mit *B. fribourgensis* der Verlauf der ersten Krankheit stark beschleunigt wird. Bei der Untersuchung solcher Tiere findet man dann in wechselndem Mass *B. fribourgensis* und Rickettsien in der Haemolymphe.
5. Es wurden auch Fälle beobachtet, wo im gleichen Engerling die oben erwähnten Krankheitssymptome in den verschiedensten Kombinationen auftraten.

Diese Erscheinungen können wir vorläufig nur folgendermassen zu deuten versuchen : Es ist einerseits wohl denkbar, dass ein gewisser Prozentsatz von Engerlingen durch pathogene Pilze, Darmbakterien oder Rickettsien bereits schon latent infiziert ist. Durch eine hinzukommende Infektion mit *B. fribourgensis* mögen die Abwehrkräfte der Tiere so geschwächt werden, dass der Ausbruch jener Krankheiten sehr stark beschleunigt wird. Man darf aber anderseits wohl die Annahme treffen, dass Engerlinge primär durch *B. fribourgensis* infiziert werden. Dadurch mögen sie ebenfalls so geschwächt sein, dass ihr Tod durch den Ausbruch von Darmbakteriosen oder Mykosen beschleunigt wird. Die Möglichkeit, dass ein physiologischer Schwächezustand der Engerlinge vorerst eintreten muss, damit Infektionen überhaupt zustande kommen können, wird in einer anderen Arbeit besprochen (WILLE, GERIG und BRÖNNIMANN, 1956). Leider können wir heute noch nicht prüfen, welche der oben zitierten Hypothesen im Einzelfall zutreffen wird. Die Auswertung der Versuchsergebnisse mit *B. fribourgensis* ist durch das Auftreten solcher Mischinfektionen stark erschwert. Die Haemolymphe sämtlicher abgestorbener, kranker oder verdächtiger Engerlinge wurde deshalb auf das Vorhandensein von *B. fribourgensis* Sporen mikroskopisch geprüft. In den folgenden Ausführungen über die Ergebnisse der Infektionsversuche wurden der Einfachkeit halber beide untenstehenden Gruppen unterschieden :

Zur *Gruppe a* gehören :

1. Engerlinge mit den typischen äusseren Krankheitssymptome der « milky disease ». Ihre Haemolymphe ist dabei stark mit Sporen von *B. fribourgensis* besetzt.

2. Engerlinge ohne die typischen Krankheitsmerkmale, aber mit Sporen von *B. fribourgensis* in der Haemolymphe.
3. Engerlinge, die äusserlich Symptome einer Mykose, Septikaemie, Rickettsiose aufweisen, aber deren Haemolymphe deutlich mit Sporen von *B. fribourgensis* besetzt ist.

Auf die *Gruppe b* entfallen alle gestorbenen Engerlinge oder Larven mit sehr schwachen Lebenszeichen, bei denen *B. fribourgensis* Sporen im Blut nicht nachgewiesen werden konnten.

Anhand der Infektionsversuche können über den zeitlichen Verlauf der « milky disease » folgende Angaben gemacht werden : Nach intralymphaler Infektion treten die ersten äusserlich erkennbaren Krankheitssymptome frühestens 10 Tage nach Versuchsbeginn auf. In den folgenden 2—4 Wochen weisen immer mehr Engerlinge diese Merkmale auf. Ein ähnlicher Verlauf der Krankheit trifft auch für die Larven zu, die peroral infiziert wurden. Nach Infektion der Erde der Zuchtdosen mit *B. fribourgensis* findet man frühestens 3 Wochen später die ersten kranken Engerlinge.

Der Verlauf der von *B. fribourgensis* erzeugten « milky disease » ist von der Temperatur abhängig. Bei 25 ° C wurde das Maximum erkrankter Tiere nach 20 Tagen, bei 20 ° C nach 28 Tagen festgestellt. Nach Pasteurisation (10 Min. bei 80 ° C) behalten die Sporen von *B. fribourgensis* ihre Virulenz.

Die Ergebnisse der Laboratoriumsinfektionsversuche sind in den Tabellen 1—3 zusammengefasst. In diesen Versuchen wurden 4—5 Wochen alte Larven des 3. Stadiums bezw. 3 Monate alte Engerlinge desselben Stadiums, die Ende Juli bezw. Mitte Oktober aus dem Freiland geholt wurden, verwendet. Ebenfalls wurden die Infektionsversuche mit 6—7 Wochen alten Larven des 2. Stadiums, die sich nach weiteren 3—6 Wochen zum 3. Stadium häuteten, durchgeführt. Es erwies sich bald, dass bei den älteren Larven des 3. Stadiums die Krankheit ausgeprägter ist als bei den Larven des 2. Stadiums.

Intralymphale Infektion (Tabelle 1) : Eine recht hohe Mortalität von durchschnittlich 82,9 % gegenüber 22,3 % in der Kontrolle wurde erzielt. Zwischen der Höhe der Mortalität unter den infizierten bezw. derjenigen der Kontrolltiere besteht keine Korrelation. Dies trifft ebenfalls für die beiden anderen Infektionsarten zu. Die Höhe der Mortalität in der Gruppe a (siehe Seite 6) überragt in 8 von 11 Versuchreihen diejenige in Gruppe b. Sie beträgt durchschnittlich 50 %.

Perorale Infektion (Tabelle 2) : An einer Gesamtmortalität von durchschnittlich 78,2 % unter den infizierten Engerlingen ist Gruppe a nur mit 16,1 % beteiligt. Diese Gesamtmortalität ist rund 10 % kleiner als in den Versuchreihen mit intralymphaler Infektion. Dagegen ist die Mortalität in den Kontrollen ca 10 % höher.

Infektion der Erde der Zuchtdosen (Tabelle 3). Die Mortalität in der

TABELLE 1

Ergebnisse der Infektionsversuche mit B. fribourgensis. *Intralymphale Infektion, 500 000 Sporen pro Engerling. Versuchsdauer zur Erzielung der höchsten Mortalität (summiert)*

Datum	Versuch *	Larvenstadium	Zahl inf. Engerlinge	Vers. temp. °C	Höchst erzielte Mortalität nach x Versuchstagen								Versuchsdauer Tage
					Gruppe *a*		Gruppe *b*		Gruppe *a* + *b*		Kontrolle		
					% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	
27.VII.55	—	3	24	25	50,0	27	33,3	27	83,3	27	25,0	27	29
27.VII.55	—	3	95	20	46,3	35	53,7	35	100	35	25,0	27	35
5.VIII.55	—	3	48	20	37,5	29	56,2	25	93,7	29	37,5	29	29
8.XI.55	e_1	3	24	18	41,7	49	33,3	64	75,0	64	29,2	57	81
8.XI.55	e_4	3	24	18	66,7	41	29,2	64	95,9	64	29,2	57	81
26.XI.55	i_3	3	24	18	58,3	46	37,5	63	95,8	64	4,1	35	63
26.XI.55	i_4	3	24	18	33,4	63	62,5	54	95,9	63	4,1	35	63
29.XI.55	h_1	3	24	18	66,6	37	29,2	21	95,8	37	16,7	61	61
29.XI.55	h_3	3	24	18	33,3	44	37,4	52	70,7	52	50,0	52	61
6.XII.55	m_{5+6}	3	24	18	54,2	29	20,8	29	75,0	29	8,2	36	50
21.XII.55	n_3	3	24	18	58,2	39	41,6	39	100	39	16,1	39	39
Durchschnittlich					49,6		39,5		89,2		22,3		

* Siehe auch Tab. 4

TABELLE 2

Ergebnisse der Infektionsversuche mit B. fribourgensis. *Perorale Infektion, 1 000 000 Sporen pro Engerling. Versuchsdauer zur Erzielung der höchsten Mortalität (summiert)*

Datum	Versuch * ***	Larvenstadium	Zahl inf. Engerlinge	Vers. temp. °C	Höchst erzielte Mortalität nach x Tagen								Versuchsdauer Tage
					Gruppe *a*		Gruppe *b*		Gruppe *a* + *b*		Kontrolle		
					% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	
5.VIII.55	—	3	48	20	8,3	15	77.0	29	85,3	29	58,3	29	36
8.XI.55	e_2	3	24	18	30,0	57	40,0	64	70,0	64	20,0	49	81
8.XI.55	e_3	3	24	18	15,0	41	65,0	64	80,0	64	20,0	49	81
26.XI.55	i_1	3	24	18	25,0	46	58,3	54	83,3	54	20,9	54	63
26.XI.55	i_3	3	24	18	20,8	54	58,4	63	79,2	63	25,0	63	63
29.XI.55	h_2	3	24	18	16,7	52	37,9	52	54,6	54	50,0	52	63
6.XII.55	m_1 *	2	24	18	8,3	52	83,2	52	91,5	52	33,3	44	52
21.XII.55	n_2 **	2	48	18	4,2	39	77,2	39	81,4	39	45,8	39	39
Durchschnittlich					16,0		62,1		78,1		34,1		

* 500 000 Sporen pro Engerling.
** 750 000 Sporen pro Engerling.
*** Siehe auch Tab. 4.

TABELLE 3

Ergebnisse der Infektionsversuche mit B. fribourgensis. *Infektion der Erde der Zuchtdosen. Inoculum : 75 000 000 Sporen pro Dose. Versuchsdauer zur Erzielung der höchsten Mortalität (summiert)*

Datum	Versuch *	Larven-stadium	Zahl inf. Enger-linge	Vers. temp. ° C	Höchst erzielte Mortalität nach x Versuchstagen								Versuchs-dauer Tage
					Gruppe *a*		Gruppe *b*		Gruppe *a* + *b*		Kontrolle		
					% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	% Mort.	Tage	
9.XI.55	f_1	3	36	18	5,6	72	50,0	81	55,6	81	25,0	81	81
9.XI.55	f_2	2	48	18	29,2	72	33,3	81	62,7	81	25,0	81	81
9.XI.55	f_3	3	36	18	8,3	56	72,3	81	80,6	81	41,7	81	81
9.XI.55	f_4	2	48	18	16,7	63	33,3	63	50,0	63	25,0	81	81
25.XI.55	g_1	2	30	27	23,3	47	50,0	64	73,3	64	20,0	64	64
25.XI.55	g_2	2	30	27	10,0	47	56,6	64	66,6	64	20,0	64	64
25.XI.55	g_3	2	25	24	20,0	55	56,0	64	76,6	64	8,0	64	64
25.XI.55	g_4	2	30	24	20,0	47	60,0	64	80,0	64	8,0	64	64
29.XI.55	h_4	3	24	18	58,3	44	12,5	21	70,8	44	8,3	61	61
6.XII.55	m_2	2	24	18	8,3	44	70,9	52	79,2	52	33,3	44	52
21.XII.55	n_1	2	48	18	12,5	39	66,6	39	79,2	39	54,1	39	39
Durchschnittlich					19,3		51,0		70,4		24,4		

* Siehe auch Tab. 4

Gruppe a beträgt durchschnittlich 20 %. Die Gesamtmortalität erreicht durchschnittlich 70 % gegenüber 24 % in den Kontrollen.

Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen in den Tabellen 1—3 treten sehr grosse Schwankungen in Bezug auf die erzielte Mortalität in der Gruppe a auf. Es fällt sehr schwer, eine Erklärung zu diesen Ergebnissen zu geben. Die Frage der Virulenzschwankung bei *B. fribourgensis* sowie die Frage der Anfälligkeit der Engerlinge für eine Infektion durch diesen Bacillus sind leider zur Zeit noch zwei grosse unbekannte Problemkreise.

TABELLE 4

Ergebnis eines Passageversuches mit B. fribourgensis.

Passage Nr.	Bezeichnung der Versuches, Infektionsart und Larvenstadium	Versuchsdauer zur Erzielung der höchsten Mortalität (summiert)	
		% Mortalität (Gruppe a)	Tage
	« Milky disease » kranker Engerling aus dem Freiland		
1. Passage	Versuch e_4 intralymphal, L_3	66,7	41
2. Passage	Versuch h_2 peroral, L_3	16,7	52
	Versuch h_1 intralymphal, L_3	66,6	37
	Versuch h_4 Inf. der Erde, L_3	58,3	44
3. Passage	Versuch n_1 Inf. der Erde, L_2	12,5	39
	Versuch n_2 peroral, L_2	4,2	39
	Versuch n_3 intralymphal, L_3	58,2	39

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse von verschiedenen Passageversuchen dargestellt und mögen die Schwierigkeiten beleuchten, welche bei der Interpretation der Ergebnisse auftreten.

In Laboratoriuminfektionsversuchen mit *B. fribourgensis* wurde in der Regel, namentlich nach Infektion der Erde der Zuchtdosen, keine höhere Mortalität erzielt als in denjenigen, die mit dem terminalen Sporenbildner (WIKÉN et al., 1954) durchgeführt wurden. Es bleibt noch abzuklären, ob eine kombinierte Impfung beider Bakterienarten das Ergebnis verbessern kann. Nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen müssen wir annehmen, dass die Pathogenität des terminalen Sporenbildners im Boden rasch abnimmt. Der grosse Vorteil von *B. popilliae* liegt gerade darin, dass seine Virulenz jahrelang im Boden beibehalten wird. Falls *B. fribourgensis* sich gleich verhält wie *B. popilliae*, so wäre er dem terminalen Sporenbildner weit überlegen. Diese Frage kann einzig in Freilandversuchen abgeklärt werden.

Zusammenfassung

An zwei Stellen der Schweiz wurden einige verdächtige Engerlinge von *Melolontha melolontha* L. gefunden, die die Symptome einer « milky disease » aufwiesen. Aus ihrer Haemolymphe wurde ein Bacillus isoliert, der morphologisch weitgehend mit *B. popilliae*, dem Erreger der « milky disease » der Larven von *Popillia japonica* NEWM. übereinstimmt.

Der Erreger, für den der Name *Bacillus fribourgensis* n. sp. vorgeschlagen wird, wird beschrieben und mit *B. popilliae* verglichen.

Die Ergebnisse zahlreicher Infektionsversuche, die mit *B. fribourgensis* durchgeführt wurden (Intralymphale und perorale Infektion sowie Infektion der Erde der Zuchtdosen), werden besprochen.

LITERATURVERZEICHNIS

BEARD, R. L., 1945. *Studies on the milky disease of Japanese beetle larvae.* Conn. Agr. Expt. Sta., Bull. 491, 505-583.

DUTKY, S. R., 1940. *Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae.* Jour. Agr. Res. **61**, 57-68.

KERN, F., 1950. *Untersuchungen an Amphimallus solstitialis L. mit Versuchen zur bakteriologischen Bekämpfung von Engerlingen.* Diss. Zürich.

KRIEG, A., 1955. *Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie der « Lorscher Erkrankung » von Engerlingen und zur Zytologie der Rickettsia melolonthae, nov. spec.* Zeitschr. f. Naturforsch. **10**, 34-37.

SCHAEFFER, A. B., und FULTON, M. D., 1933. *A simplified method of staining endospores.* Science **77**, 194.

STEINKRAUS, K. H., und TASHIRO, H., 1955. *Production of milky disease spores (Bacillus popilliae Dutky and Bacillus lentimorbus Dutky) on artificial media.* Science **121**, 873-874.

WIKÉN, T., BOVEY, P., WILLE, H., und WILDBOLZ, Th., 1954. *Über die Ergebnisse der in der Schweiz im Jahre 1953 durchgeführten Freilandversuche zur mikrobiologischen Bekämpfung des Engerlings von Melolontha melolontha L.* Zeitschr. angew. Ent. **36**, 1-19.

WIKÉN, T., und WILLE, H., 1953. *Über den Wuchsstoffbedarf eines sporenbildenden, für den Engerling von Melolontha vulgaris Fabr. pathogenen Bakteriums.* Zbl. Bakt. II. Abt. **107**, 259.

WILLE, H., 1954. *Neue Versuchsergebnisse über die mikrobiologische Engerlingsbekämpfung.* Zentr. Maikäferbekämpfungsaktionen, Ber. 48.

WILLE, H., GERIG, L., und BRÖNNIMANN, H., 1956. *Uratkristalloide in den Fettkörperzellen von Engerlingen des Maikäfers, Melolontha melolontha L.* Mittl. Schweiz. Ent. Ges. **29**.

WILLE, H., und MARTIGNONI, E. M., 1952. *Vorläufige Mitteilung über einen neuen Krankheitstypus beim Engerling von Melolontha vulgaris Fabr.* Schw. Zeitschr. f. allg. Path. u. Bakt. **15**, 470-474.

WILLE, H., und WILDBOLZ, Th., 1953. *Beobachtungen über die Eiablage des Maikäfers und die Entwicklung des Engerlings im Laboratorium.* Mitt. Schw. Ent. Ges. **26**, 219-224.

Die vorliegende Arbeit wurde z.T. durch einen Beitrag des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Den zuständigen Behörden sprechen wir unseren besten Dank aus.