

# 一种新的蜜蜂细菌性幼虫病原的分离鉴定

戎映君<sup>1,2</sup> 苏松坤<sup>1\*</sup> 陈集双<sup>2,3\*</sup> 陈盛祿<sup>1</sup>

(浙江大学<sup>1</sup>动物科学学院<sup>2</sup>生命科学学院 杭州 310029)

(<sup>3</sup>浙江理工大学生物工程研究所 杭州 310018)

**摘 要** 2005 年早春,在浙江部分地区出现了一种严重的蜜蜂细菌性幼虫病,该病导致蜜蜂幼虫颜色发黄,失去光泽;严重时幼虫死亡腐烂。从 10 批发病死亡幼虫样品中,分离得到并保存了 5 类纯培养物。通过蜂群接种试验和实验室人工培养的幼虫接种,确定 L2 菌株能引起与自然发病相似的症状,且能从接种发病的幼虫上再次分离到相同菌株,证明 L2 菌株是该蜜蜂细菌性幼虫病的致病菌。进一步对分离到的该致病菌从发病特征、病原形态学、生理生化特性、16S rRNA 序列等方面进行了分析鉴定,结果显示:该菌株属于肠球菌属的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*),不是目前报道的任何一种已知蜜蜂细菌性幼虫病的病原。

**关键词:** 蜜蜂细菌性幼虫病;病原;鉴定;屎肠球菌

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)06-0994-05

蜜蜂细菌性幼虫病是严重危害蜜蜂正常生长发育的传染性疾病,对养蜂生产和蜂产品质量安全构成重大威胁。至今为止,已报道的蜜蜂细菌性幼虫病包括美洲幼虫腐臭病和欧洲幼虫腐臭病,这两种蜜蜂细菌性幼虫病曾经给世界养蜂业造成了巨大的损失<sup>[1]</sup>。

2005 年早春,在浙江慈溪、富阳、江山等地出现了一种严重的蜜蜂幼虫病,其蜂群发病率在 10% 左右,一般感染小日龄幼虫,主要症状表现为发病幼虫颜色发黄,失去光泽,严重时腐烂,但腐烂幼虫没有难闻的酸臭味,病虫通常在 4~5 日龄时死亡,病重群出现成年蜂爬蜂症状,群势下降很快。使用抗生素饲喂发病蜂群,幼虫腐烂症状很快好转,所以,初步判断该病可能由致病性细菌引起。

该症状与目前已知的蜜蜂细菌性幼虫病——美洲幼虫腐臭病(美幼病)的症状有明显差异,与欧洲幼虫腐臭病(欧幼病)的发病症状虽有某些类似之处(两者都感染小日龄幼虫,病虫通常在 4~5 日龄死亡,发病后会腐烂),但也存在明显不同(该病腐烂幼虫没有难闻的酸臭味,病重蜂群出现成年蜂爬蜂症状)。采用美幼病和欧幼病病原检测方法对发病幼虫进行病原检测,没有检测到美幼病和欧幼病对应的病原<sup>[2-5]</sup>。据此,我们推测引起蜜蜂幼虫发病的病原可能是一种新的病原。在此基础上,我们

进行了病原的分离鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试幼虫:**浙江省江山市和慈溪市蜂场采集的自然发病的蜜蜂幼虫。

**1.1.2 供试蜂群:**杭州市西湖区转塘蜂场实验蜂群、浙江大学实验农场蜂场隔离区蜂群。

**1.1.3 培养基和蜜蜂幼虫食物:**致病菌分离筛选时选用 LB 培养基、AFB 培养基<sup>[6]</sup>和 EFB 培养基<sup>[7]</sup>,细菌鉴定时选用 AFB 培养基。蜜蜂幼虫人工培育时用蜜蜂幼虫基础食物(BLD)。蜜蜂幼虫基础食物(BLD)配方:王浆冻干粉 4.2g,葡糖糖 0.6g,果糖 0.6g,酵母粉 0.2g,无菌水 14.4mL。

**1.1.4 试剂:**生理生化试剂购自杭州天和微生物有限公司;PCR 产物纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;pGEM T-easy vector 连接试剂盒购自 Promega 公司;EcoR I 内切酶与 DNA Marker 购自 Fermentas 公司。

### 1.2 蜜蜂幼虫的人工培育

取消毒的 24 孔细胞培养板,每孔加 0.5mL BLD。从正常蜂群子脾中挑选 1 日龄健康小幼虫于细胞培养板中,35℃ 恒温培养,相对湿度保持在 80% 以上。每隔 24h,将幼虫转移至加有 BLD 的新的细胞培养板中培养。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30200206)

\* 通讯作者。Tel 86-571-86971095 E-mail susongkun@zju.edu.cn Tel:86-571-86843196 E-mail chenjs@zist.edu.cn

作者简介 戎映君(1981-)女 浙江余姚人 硕士研究生,主要从事病原微生物检测工作。E-mail: r-y-jmail@tom.com

收稿日期 2006-03-06 接受日期 2006-04-11 修回日期 2006-06-28

### 1.3 致病菌的分离筛选及致病性鉴定

**1.3.1 实验材料的采集和细菌的分离:**从 10 批自然发病的蜜蜂幼虫中,挑取 30 个症状典型的样品,分别放入 1.5mL 灭菌离心管中,用 75% 酒精进行表面消毒,无菌水冲洗 3 次,无菌条件下将其剪开后捣碎,取匀浆分别在 LB 培养基、AFB 培养基和 EFB 培养基平板上划线,37℃ 培养 1~2 d,挑选单菌落传代培养 2~3 代,直至得到菌落形态和镜检菌体形态一致的纯培养物<sup>[8]</sup>,每个样品挑选 20 个单菌落。

**1.3.2 致病性筛选鉴定:**(1)小范围蜂群试验筛选:将分离的各菌株在 AFB 液体培养基中,37℃ 培养 16~18h 后,培养物分别喷洒接种到健康蜂群中,各菌株接种两群,每蜂群(3 脾)接种 30mL 菌液,连续接种 3d。接种完成后每天注意观察蜜蜂幼虫发病情况。同时挑取发病幼虫和健康幼虫分离菌株。(2)实验室致病性鉴定:将筛选出的有致病性的菌株在 AFB 液体培养基中,37℃ 培养 16~18h,将菌液加到人工培育的蜜蜂幼虫的基础食物中,每孔加 10 $\mu$ L 菌液,观察并计算幼虫的死亡率,以接种灭菌的 AFB 液体培养基做为对照。试验组和对照组均做 3 组重复,每组 20 个蜜蜂幼虫。(3)大范围蜂群试验鉴定:将筛选出的有致病性的菌株在 AFB 液体培养基中,37℃ 培养 16~18h 后,喷洒接种到 15 群健康蜂群中,每蜂群(10~11 脾)接种 50mL 菌液,连续接种 3d;另选 15 群健康蜂群,接种灭菌的 AFB 液体培养基,作为对照。接种完成后每天注意观察幼虫发病情况,观察 12d,并记录实验前后蜂群封盖子、成蜂及幼虫数量的变化情况。同时挑取发病幼虫和健康幼虫分离菌株。

### 1.4 致病菌的种属鉴定

**1.4.1 形态和培养特征:**包括菌落、菌体形态,革兰氏染色阴阳性,是否有鞭毛等。

**1.4.2 生理生化特性:**参照伯杰细菌鉴定手册的方法<sup>[9]</sup>。

**1.4.3 16S rRNA 的序列分析:**细菌 DNA 的提取采用常规酚法。以 PrimerA(5'-AAGATTTGATC(CA)TGGCTCAG-3')和 PrimerB(5'-TACGGCTCTACCTTGTTACGACTT-3')作为引物扩增。PCR 扩增条件:94℃ 3min,94℃ 1min,53℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 10min。扩增产物参照文献[10]中基因工程的方法,经克隆后测序,将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的数据库进行比较(<http://ncbi.nih.gov/BLAST>)分析。采用 DNASTar 软件将获得的序列与相关菌株的相应序列进行同源性分析,以 *E. coli*

为外群构建系统发育树。

## 2 结果

### 2.1 致病菌的分离及致病性鉴定结果

**2.1.1 菌株的分离纯化:**根据病害流行病学特征、抗生素治疗效果等显示其不是真菌、病毒或原虫病害(结果未显示)。经划线分离后,从 10 批发病死亡幼虫样品中,分离得到并保存了 5 类纯培养物,取其代表菌株分别标记为 L1、L2、L3、L4、L5。

**2.1.2 小范围蜂群致病性试验:**从接种第 2 天开始,接种菌株 L2 的蜂群中的蜜蜂幼虫便出现虫体颜色变黄、逐渐失去光泽,表现与自然发病幼虫的症状基本相同,生病幼虫在 4~5 日龄大量死亡。取发病幼虫进行细菌平板分离,得到了与 L2 菌落形态和菌体形态相同的细菌菌株,而健康幼虫中则没有分离到与 L2 菌落形态和菌体形态相同的细菌菌株。接种其他 4 个细菌菌株的蜜蜂幼虫,在观察期内都未出现异样。

**2.1.3 实验室致病性鉴定:**从接种第 2 天开始,试验组幼虫与对照组相比,生长明显缓慢,出现死亡腐烂,5d 后大部分死亡,每组仅有 1~2 个幼虫存活,且存活的幼虫虫体也明显小于对照组。接种后的第 3 天和第 5 天,试验组和对照组的蜜蜂幼虫死亡率如表 1。接种 L2 菌株的幼虫死亡率与对照组相比,差异极显著,试验组死亡率明显高于对照组。

表 1 不同接种时间蜜蜂幼虫死亡率

Table 1 Mortality of honeybee larvae at different days after inoculation		
	Trial	Ck
3 days after inoculation	0.60 $\pm$ 0.10**	0.32 $\pm$ 0.03
5 days after inoculation	0.93 $\pm$ 0.03**	0.38 $\pm$ 0.08

Annotation: compared to control; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

**2.1.4 大范围蜂群试验鉴定:**从接种完 L2 菌株后的第 2 天开始,在实验组的 15 群蜜蜂中大都出现了

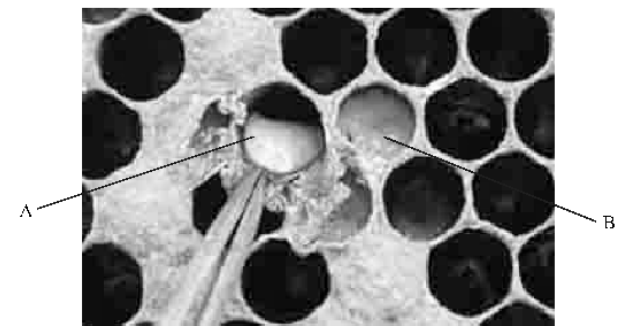


图 1 接种 L2 后的发病幼虫

Fig.1 Diseased morbid larvae after inoculation with L2. A: Diseased morbid larvae; B: Healthy larvae.

不同程度的发病,发病症状如前所述,见图1,而对对照组的15群蜜蜂中则没有出现异常。

实验组接种前后蜂群封盖子(封盖的幼虫和蛹)群势(成蜂数量)、幼虫数量的差异极其显著,而对照组在试验期间封盖子、群势、幼虫数量没有明显差异(表2~4)。取发病幼虫进行细菌平板分离,得到了与L2菌落形态和菌体形态相同的细菌菌株,而健康幼虫中则没有分离到与L2菌落形态和菌体形态相同的细菌菌株。

表2 接种前后蜂群封盖子数量

Table 2 Sealed brood number of the honeybee colony before and after inoculation

Group	Before inoculation( full frame )	After inoculation( full frame )
Test	3.45 ± 0.75	2.75 ± 0.66**
Ck	3.47 ± 0.72	3.54 ± 0.48

Annotation : compared to before inoculation ; \*  $P < 0.05$  ; \*\*  $P < 0.01$  .

表3 接种前后蜜蜂群势

Table 3 Colony size of the honeybee colony before and after inoculation

Group	Before inoculation( full frame )	After inoculation( full frame )
Test	8.13 ± 1.00	7.17 ± 1.08**
Ck	8.41 ± 0.62	8.39 ± 0.65

Annotation : compared to before inoculation ; \*  $P < 0.05$  ; \*\*  $P < 0.01$  .

表4 接种前后幼虫数量

Table 4 Larvae number of the honeybee colony before and after inoculation

Group	Before inoculation( full frame )	After inoculation( full frame )
Test	1.87 ± 0.70	1.31 ± 0.53**
Ck	1.82 ± 0.59	1.71 ± 0.41

Annotation : compared to before inoculation ; \*  $P < 0.05$  ; \*\*  $P < 0.01$  .

## 2.2 致病菌的种属鉴定

2.2.1 L2菌株的形态和培养特征 37℃,在AFB培养基中平板培养24h后,L2菌株的菌落直径为1mm左右,珍珠白,半透明水滴样,边缘整齐、表面光滑。在光镜和电镜下观察,L2菌体呈椭圆形,排列成短链或者成对散在,无鞭毛、革兰氏染色阳性(图2)。

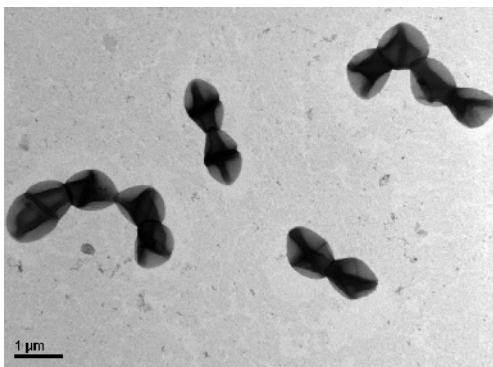


图2 L2菌体形态(15000×)

Fig.2 Shape of L2 in transmission electron microscope(15000×).

2.2.2 生理生化特性:通过测定可知,L2在10℃、45℃、6.5% NaCl以及pH9.6条件下均能生长;接触酶、氧化酶试验成阴性;能够产生乳酸;能利用葡萄糖、纤维二糖、阿拉伯糖、果糖、核糖、棉子糖、乳糖、水杨素、甘露糖、甘露醇、麦芽糖、蜜二糖、半乳糖、苦杏仁苷、海藻糖、蔗糖产酸,但不能利用葡萄糖酸钠、木糖、松三糖、鼠李糖、山梨醇;不能利用葡萄糖产气。

2.2.3 16S rRNA的序列分析 对克隆的阳性重组质粒进行全长测序,将所得结果经拼接后,获得1565bp的全长序列(GenBank登录号: DQ403193),将该序列输入GenBank的blast,以blast N程序对数据库中的所有序列进行比较,发现与它匹配度最高的几种全序列均是屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)各株系的16S rRNA序列,其匹配度均高达99%以上。

采用DNASTAR软件将获得的序列与肠球菌属的41个种的代表菌株的相应序列进行同源性比较,采用MEGA 3.1软件生成同源序列的进化树。结果显示(图3),L2菌株与肠球菌属的41个种的代表菌株的同源性均很高,在93.9%~99.5%之间不等,其中与*E. faecium*的同源性最高,达99.5%,在所构建的系统进化树上,L2菌株与*E. faecium*的距离最近,聚成一支。

综合细菌形态特征、培养特征、生理生化特性以及16S rRNA的序列分析,可以确定:作为新发现的一种蜜蜂致病细菌,L2菌株为肠球菌属的屎肠球菌(*E. faecium*)。

## 3 讨论

本文经过分离鉴定,确定我们从蜜蜂发病幼虫中首次分离得到的一株致病菌是肠球菌属的屎肠球菌。通过检索发现屎肠球菌能感染许多种动物,有广泛的致病性。据报道有12%的感染性疾病都是由它引起的。迄今为止,未曾见到屎肠球菌感染蜜蜂的报道。

目前已知的蜜蜂幼虫病都是人畜不共染的,但这次发现的蜜蜂幼虫病的新病原——屎肠球菌不排除具有人畜共染的可能,因为屎肠球菌在一定条件下对人也有致病性。譬如,1998年7月下旬至9月初,我国江苏部分地区发生成批生猪发病,数以千计病猪死亡,与病猪密切接触者也多人发病,其致病菌经鉴定就是屎肠球菌<sup>[11]</sup>。在非典、禽流感等对人类生命及财产安全构成严重威胁之后,我们应该对这种新的蜜蜂幼虫病引起高度重视,以防患于未然。

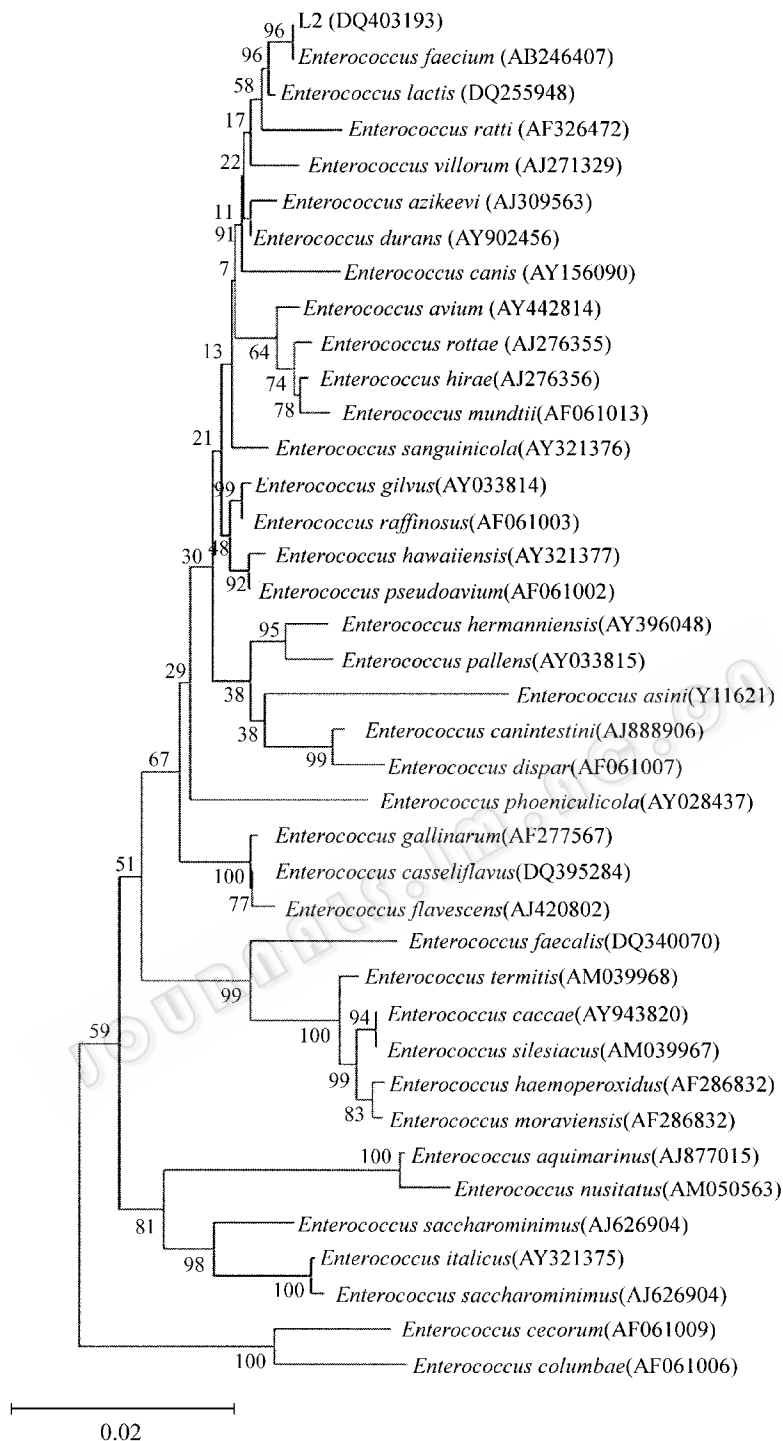


图3 L2和相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain L2 and its relatives. The bootstrap analysis by the unrooted NJ method was performed using the Clustal W program and MEGA 3.1 program. Numbers along each node indicate percentages of bootstrap replicates out of 500 that support each branch node.

The scaled bar represents distances scaled as substitutions per amino acid residue.

本实验中,从病虫中分离到的其他几株细菌,虽然单独对蜜蜂幼虫不具致病性,但是我们不能排除它对本实验中筛选出的致病菌——屎肠球菌的致病性具有强化或弱化的作用。因此,开展蜜蜂屎肠球菌的致病性和发病蜂群的生态学研究非常必要。

另外,新病发现后,寻找有效的防治方法是当务之急。抗生素虽然是防治细菌病的有效药物,但是抗生素的使用不但严重影响了蜂产品的质量,而且还会导致抗药性细菌变种的产生,从而使抗生素的防治效果不理想。加上屎肠球菌本身就有较强的抗生素

耐药性<sup>[12]</sup>,所以寻找有效的药物控制手段也非常迫切。

致谢 本实验得到了中国科学院微生物研究所周宇光研究员、中国农科院蜜蜂研究所周婷研究员、福建农林大学蜂学学院梁勤教授、浙江理工大学胡秀芳老师、浙江慈溪农业局罗建能老师的大力支持和帮助,谨此致以衷心的感谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 黄文诚. 蜜蜂细菌性幼虫病. 蜜蜂杂志, 2004, 4: 21 - 23.
- [ 2 ] Genersch E, Otten C. The use of repetitive element PCR fingerprinting ( rep-PCR ) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*, 2003, 34 ( 3 ): 195 - 206.
- [ 3 ] Dobbelaere W, Graaf DC, Peeters JE, *et al.* Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease ( *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 2001, 32 ( 4 ): 363 - 370.
- [ 4 ] Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, *et al.* Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae*

- in honey samples: Comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 ( 3 ): 1504 - 1510.
- [ 5 ] Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, *et al.* Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 3 ( 81 ): 195 - 201.
- [ 6 ] Alippi AM. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia*, 1995, 11: 343 - 350.
- [ 7 ] 周 婷, 冯 峰, 董秉义, 等. 中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病原的药物试验研究. 畜牧兽医学报, 2001, 32 ( 3 ): 283 - 288.
- [ 8 ] 齐放军, 刘 纓, 李志英. 一种新的甜菜夜蛾致病菌的分离和鉴定. 植物保护学报, 2004, 31 ( 2 ): 223 - 224.
- [ 9 ] Buchanan RE, Gibbonr NE. 伯杰细菌鉴定手册.《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 第八版. 济南: 山东大学出版社, 1988.
- [ 10 ] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 11 ] 卢洪洲, 翁心华, 尹有宽, 等. 一起由多重耐药屎肠球菌引起的人群感染暴发流行. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16 ( 5 ): 110, 113.
- [ 12 ] Klare I, Konstel C, Badstubner D, *et al.* Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 88 ( 2 ): 269 - 290.

## Isolation and identification of a new bacterial pathogen infecting larvae of honeybee ( *Apis mellifera* ) Perish

RONG Ying-jun<sup>1,2</sup>, SU Song-kun<sup>1\*</sup>, CHEN Ji-shuang<sup>2,3\*</sup>, CHEN Sheng-lu<sup>1</sup>  
 ( <sup>1</sup> Animal Science College, <sup>2</sup> Life Science College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China )  
 ( <sup>3</sup> Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China )

**Abstract** : A bacteroidal disease of honeybee ( *Apis mellifera* ) larvae was found in some regions of Zhejiang Province, China, in early spring 2005. The diseased larvae lost its shine, became yellow and rotted when serious. This symptom was different to any bacteroidal disease of honeybee larval been reported. So, it is considered to be a new bacteroidal disease of honeybee larval. Five pure cultures of bacteria were separated from ten collections of diseased honeybee larvae, named as L1, L2, L3, L4 and L5. Among these five pure cultures, only L2 could make the healthy honeybee larvae become diseased in both field and lab test. The symptom caused by L2 was similar to the natural-infection. From the diseased larvae caused by L2 could isolate bacteria the same as L2. Thus L2 was determined as the causing agent of this bacteroidal disease of honeybee larval. L2 was identified according to the characteristics of morphology, physiological biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. As a result, the morphology and physiological biochemical characteristics of L2 were similar to *E. faecium*. And its 16S rRNA sequences highly matched to *E. faecium*, the similarities between them were higher than 99%. The overall similarity values between L2 and the published 16S rRNA sequences of 41 typical species of *Enterococcus* were 93.9% ~ 99.5%, the top value was between L2 and *E. faecium*. In the phylogenetic tree, L2 and *E. faecium* were assembled in the same ramification. So L2 was identified as *E. faecium*. Although *Enterococcus faecium* was known as pathogen to many post, account for 12% of all nosocomial infections, only second to *E. coli*, but there is no report about this bacteria infects honeybee up to now. So it is a new pathogen to honeybee. The isolation and identification of pathogen of this new bacteroidal larvae disease, afford a good feasibility for available prevention and cure to this new disease.

**Keywords** : Bacteroidal diseases of honeybee larval ; Pathogen ; Identification ; *Enterococcus faecium*