

中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病病原的药物试验研究

周 婷, 冯 峰, 董秉义, 王风忠
(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘 要: 本研究在对自然发病的中蜂欧洲幼虫腐臭病(EFB)的病原蜂房蜜球菌进行分离鉴定的基础上,着重对蜂房蜜球菌的敏感药物进行了筛选研究。研究分为三个层次,第一层:临床常规用于蜂病防治的抗生素的研究;第二层:中草药有效成份提取物的研究;第三层:应用均匀设计原理进行中草药配方的研究。通过以上研究,拟对 EFB 防治药物的更新换代和“绿色蜂药”的使用打下基础。

关键词: 中华蜜蜂; 欧洲幼虫腐臭病; 蜂房蜜球菌; 药物敏感试验; 均匀设计

中图分类号: S895.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366- 6964(2001)03- 0283- 06

欧洲幼虫腐臭病(*European Foul brood* 简称 EFB)是由蜂房蜜球菌引起的蜜蜂幼虫的恶性传染病,在世界各地均有发生,其中中蜂(*Apis cerana Cerana Fabricius*)发病比意蜂(*Apis mellifera ligustica Spinola*)严重,我国也是主要的疫区之一。EFB 是一种消化道传染病,主要侵害 1~ 2 日龄的蜜蜂幼虫,经 2~ 3 天潜伏期,多在 3~ 4 日龄未封盖时死亡。该病具有传播迅速、发病快的特点,是蜜蜂的主要病害。

对于本病的研究是从本世纪初开始的,随着抗生素和磺胺类药物的相继问世,使 EFB 的流行得以有效的控制。许多国家都将四环素类列为治疗 EFB 的法定药物。但是由于使用年限的延续,加之药物滥用,近年来已有许多关于蜂房蜜球菌对四环素类抗生素产生抗药性的报道。同时随着人们环保意识和食品安全意识的加强,对无公害和绿色食品的要求日增,蜂产品中四环素类抗生素残留的检测已成为包括我国在内的许多国家蜂产品质量检测的必检项目。欧共体国家已禁止含有多种抗生素类残留的蜂产品进入本国市场。这对于 EFB 的防治工作又提出了新的要求。

本研究在对中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病的病原进行分离鉴定的基础上,从三个层次分别对目前常规用于蜂病防治的抗生素,植物有效成份提取物,以及中草药水提剂配方进行了筛选研究,拟为保护蜜蜂的健康,提高蜂产品质量,增加出口创汇打下基础。使我国的蜂病药物防治进入世界领先水平

1 材料与amp;方法

收稿日期: 2000-01-09

作者简介: 周 婷(1958~)女,汉,江苏无锡人,硕士,副研究员,研究蜜蜂病理学。

1.1 材料

(1) 供试幼虫: 广东昆虫研究所提供的自然发病的中蜂 EFB2~ 4 日龄死亡幼虫。(2) 供试血清: 英国国家农业实验站(Rolthamstde Experimental Stations UK) 提供。(3) 供试药品: 抗生素药敏片: 中国药品生物制品检定所提供。植物有效成份提取物-劲能, 由中国农科院蜜蜂研究所提供。植物有效成份提取物的合成品由中医药研究所提供。各种中草药: 国药堂提供。(4) 培养基: 酵母浸膏 1 g, 葡萄糖 1 g, 可溶性淀粉 1 g, 牛心浸出液干粉 1 g, 琼脂 1 g, KH_2PO_4 1.36 g, 蒸馏水 100 ml, pH6.6。

1.2 方法

1.2.1 病原研究: (1) 分离培养及形态鉴定: 罹病幼虫置入无菌研磨器匀浆, 加入同体积的 0.85% 无菌 NaCl 溶液制成悬浮液。给予不同的含氧条件(普通大气、普通大气+ 10% CO_2 、厌氧) 分离培养, 然后纯培养。培养结果用相差显微镜观察菌体形态、革兰氏染色, Tyler 法染色-荚膜、孔雀绿-沙黄染色-芽孢、半固体穿刺培养测定细菌运动性。(2) 生理生化特性测定: 细菌最适生长温度测定、细菌最适 pH 测定、糖类及柠檬酸盐的作用。(3) 分子生物学测定: 热变性温度法(T_m 法) 测定细菌 DNA 中 G+ Cmol%。(4) 致病性测定: 挑选 1~ 2 日龄健康小幼虫恒温恒湿箱孵育, 试验组 I 饲喂病虫提取液; 试验组 II 饲喂纯培养菌体悬液; 空白对照组饲喂王浆。再以发病虫体进行分离培养, 试验重复一次。(5) 血清学试验: 采用试管凝集法, 血清做连续稀释, 加入定量菌液。37 °C 水浴 4 h, 观察结果, 室温放置过夜再次观察。以出现(++) 凝集的最高稀释度为其凝集价。

1.2.2 药物敏感试验: (1) 临床常规用于蜂病防治的抗生素测定: 菌悬液制备: 将纯培养的蜂房蜜蜂球菌移入牛心液体培养基。34~ 35 °C 培养过夜, 使生长浊度达到 1.25×10^9 ; 使用时将菌液用无菌牛心液体培养基再作 1: 1000 倍稀释, 使菌数达到 1.25×10^6 /ml 备用。(2) 纸片扩散法(Disc diffusion method): 将灭菌琼脂置入灭菌平皿内, 每皿 20 ml, 凝固后将已制备好的菌液 0.1 ml 滴入平板, 涂布均匀, 然后将抗生素纸片放置在平皿中, 34~ 35 °C 培养 18~ 24 h, 测量抑菌环的直径。(3) 植物有效成分提取物 MIC 及 MBC 的测定: 稀释法(Serial dilution method): 以过滤的无菌牛心液体培养基稀释药物, 使各管含有不同的递减浓度, 然后逐管加入 0.15 ml 制备好的菌悬液, 34~ 35 °C 培养 24 h, 记录测定结果。

以药物最高稀释管中无细菌生长者为最低抑菌浓度(MIC), 然后将 MIC 测定管中未见细菌生长的各管培养物分别吸取 0.1 ml, 倾倒在已制备好的牛心琼脂板上, 再培养 18~ 24 h, 平皿上菌落数小于 5 个的最小稀释度的药物浓度即为最低杀菌浓度(MBC)。(4) 中草药配方的筛选: 受试中草药种类: 黄连、黄芩、金银花、菊花、板兰根、枝子、马齿苋、蒲公英。中草药水提剂制备: 称取中草药 10 g, 加 400 ml 蒸馏水, 浸泡 30 min, 煮沸 1~ 2 h, 滤出煎液后, 药渣再加 100 ml 蒸馏水煮沸, 合并两次煎液, 加热浓缩到 10 ml (100% 浓度), 8 磅 20 min 灭菌, 冰箱保存。(5) 管碟扩散法(Cylinder Plate diffusion method): 在涂布好菌液的牛心琼脂平板上安置灭菌钢圈, 钢圈内加入定量的中药水提剂, 培养 18~ 24 h, 测定抑菌环的直径。根据抑菌程度, 选择对蜂房蜜蜂球菌敏感的中药, 运用均匀设计原理, 设计出 4 因素 8 水平 8 组试验。

2 结果与分析

2.1 病原研究

- 2.1.1 分离培养与形态学鉴定:该菌为兼性厌氧菌。细菌菌落 ϕ 1 mm 左右,为珍珠白或半透明水滴样,边缘整齐、表面光滑中心凸突的小菌落。相差显微镜观察显示,菌体呈长圆形,披针样,排列成链状或单个、成对散在,无荚膜、不形成芽孢,无运动性。 G^+ ,培养时间 24~48 h。
- 2.1.2 生理生化特性鉴定:细菌最适培养温度是 35 $^{\circ}C$,适合该菌生长的最适 pH 在 6.5~7.5 之间,与蜂群育虫区的温度以及幼虫中肠的 pH 值相似。该菌能够利用葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖。不能利用甘露糖、乳糖、柠檬酸钾和柠檬酸钠。
- 2.1.3 分子生物鉴定:该菌 DNA 中 G+C mol% 为 39。
- 2.1.4 致病性测定:共观察 5 d,试验组幼虫在接种后,第三天开始发病死亡。与对照组相比发病幼虫生长缓慢,身体失去光泽,水肿、体节逐渐消失而死亡。对照组幼虫除一只死亡外其余未见异常。以发病虫体再分离仍得到相同的病原菌。
- 2.1.5 血清学试验:凝集反应结果:凝集价为 1:1280。根据细菌形态学、理化特性及分子生物学鉴定参照 Bailey 和 Collins(1982a; 1982b)对蜂房蜜蜂球菌的分类学标准,结合致病性试验和血清学试验结果,可以确定该菌为 EFB 的病原菌蜂房蜜蜂球菌的一株。在此基础上,我们进行了药物筛选研究。

2.2 药物筛选研究

- 2.2.1 常规用于防治 EFB 的抗生素测定:见表 1。

表 1 常规用于防治 EFB 的抗生素
Table 1 The Antibiotics commonly used for EFB

名 称 Name	药品含量 μ g/片 Medicinal content	抑菌环 ϕ mm(平均值) Bacteriostasis circle(mean)	判定标准 Standard		
			敏感 Sensitive	中度敏感 Subsensitive	耐药 Resistant
头孢氨苄 CX	30	34	≥ 21	16-21	≤ 15
麦迪霉素 MDM	15	41	≥ 23	14-22	≤ 13
红霉素 E	15	38	≥ 23	14-22	≤ 13
复方新诺明 SXT	25	-	≥ 16	11-15	≤ 10
诺氟沙星 NOR	10	-	≥ 17	13-16	≤ 12
交沙霉素 JOS	15	36	≥ 23	14-22	≤ 13

根据中国药品及生物药品检定所提供的判定标准可以确定头孢氨苄、红霉素、麦迪霉素、交沙霉素对该菌高度敏感,而该菌对复方新诺明、诺复杀星耐药。

- 2.2.2 植物有效成份提取物测定:植物有效成份提取物合成品 MIC、MBC 测定:培养 24 h 判定结果, MIC 为 1:1280,相当于药物含量 781.2 μ g/ml。MBC 为 1:320。相当于药物含量为 3125 μ g/ml。劲能 MIC 和 MBC 测定:方法同前,培养 24 h 观察结果, MIC 为 1:640 相当于药含量 3.125 μ l/ml; MBC 为 1:20,相当于药含量为 50 μ l/ml。

- 2.2.3 中草药配方的筛选:见表 2。

表2 几种中草药的抗菌效果
Table 2 The Antibiotic effect of some traditional Chinese
Medicine bacteriostasis circle(mean) 抑菌球 ϕ_{mm} (平均值)

稀释倍数 Diluting multiple	黄连 Rhizoma coptidis	黄芩 Radix scutellar- iae	菊花 Flos loniceriae	蒲公英 Herba taraxaci	板兰根 Radix ixatidis	马齿苋 Purslane	金银花 Flos loniceriae	枝子 Fructus gardeniae
100	36	24	19	15	14	14	13	15
1: 10	32	20	17	14	13	11	11	13
1: 20	28	16	16	11	12	-	10	-
1: 40	22	14	13	-	12	-	-	-
1: 80	15	11	-	-	-	-	-	-

2.2.4 均匀试验结果如下: 四因素八水平八组试验:

因素 Factor								
1	2	4	8	第一配方 Prescription No. 1	1	2	3	4
2	4	7	8		黄连	黄芩	菊花	板兰根
3	6	3	6	第二配方 Prescription No. 2	1	2	5	6
4	8	7	5		黄连	黄芩	金银花	蒲公英
5	1	2	4					
6	3	6	3					
7	5	1	2					
8	7	5	1					
水平 Level								

第一配方: 最优回归子集法: 原始数据: original data(省略)

第二配方: 最优回归子集法: 原始数据: original data(省略)

均匀试验结果表明: 第一配方中, 当黄连浓度为 56%, 黄芩 56%, 菊花 56%, 板兰根为 0, 各组份配比相等时, 抑菌效果最好; 第二配方中, 当黄连浓度为 56%, 黄芩 56%, 金银花 31.065%, 蒲公英为 0, 各组份配比相等时, 抑菌效果最好。

3 讨论与结论

3.1 从自然发病的 EFB 死亡中蜂幼虫体分离的病原菌, 其形态学, 生理生化特征, 与 Bailey 和 Collius(1982 2a, 1982b) 对蜂房蜜蜂球菌的分类学标准相一致, 结合临床症状, 流行病学调查和治疗效果可以初步认为该菌为蜂房蜜蜂球菌, 分子生物学鉴定, 致病性和血清学测定结果都支持了以上的结果, 确认本研究分离的细菌系 EFB 的病原菌——蜂房蜜蜂球菌。

3.2 抗生素类药物对于 EFB 的防治有疗效确定, 价格低廉和使用方便的特点, 所以在国内外一直广泛使用。目前蜜蜂细菌性传染病的常规用药是四环素类的抗生素。随着使用年限的延续, 近年来耐药性的报道逐渐增多, 所以需要筛选新的, 安全疗效可靠的抗生素药物。本研究结果, 蜂房蜜蜂球菌对磺胺类的复方新诺明、喹诺酮类药物的诺氟沙星耐药, 而对头孢菌素族的头孢氨苄和大环内酯类抗生素的红霉素, 交沙霉素, 麦迪霉素很敏感。大环内酯类抗生素的

特点是: 无严重的不良反应, 毒副作用较低。这类化合物具有大环内酯的共同核心, 为弱碱性, 其抗菌谱类似青霉素而略广, 主要抗革兰氏阳性菌, 及某些革兰氏阴性菌, 细菌对这类抗生素和很多临床常用的抗生素之间无交叉耐药性, 对耐药菌有较好的疗效。因此, 大环内酯类抗生素用于 EFB 的治疗, 在目前情况下, 是有很高实用价值的。与大环内酯类抗生素相比较, 头孢菌素的毒性较大, 而且价格偏高, 虽然该菌对其敏感程度与对大环内酯类抗生素相当, 但在 EFB 的治疗中, 应选择大环内酯类抗生素。

3.3 本研究所用的中草药有效成份的化学合成物, 通过光谱分析及生物实验等已证明与天然该中草药的有效成份提取物的化学结构和生物活性完全相同, 属于一种新型高效, 低毒的抗菌兽药。已有大量临床试验表明, 它在治疗奶牛乳房炎、仔猪白痢、黄痢、腹泻症, 鸡白痢等病方面优于青、链霉素、痢特灵等药物。临床应用 21 000 例治疗率达 85%~95%。本研究结果, 蜂房蜜蜂球菌对该药高度敏感, 其最小抑菌浓度为 781.2 ug/ml, 最低杀菌浓度为 3125 ug/ml。

“劲能”的主要成份乃天然果酸结晶“先锋劲酸。”是从柚子核中提取的天然抗菌、抗真菌作用物质。外用可以防腐消毒, 内服可以抗菌。在本试验中它的最小抑菌浓度为 3.125 μ l/ml, 最小杀菌浓度为 50 μ l/ml。对于蜂房蜜蜂球菌高度敏感。同时安全无毒, 用于蜂病治疗, 不存在对蜂产品化学药物的污染问题。

因此, 以上两种药物都是蜂病防治中很有开发利用前景的药物。关于这两种药对蜜蜂幼虫的毒性实验, 以及蜂群试验等有待于今后的研究。

3.4 大量资料显示许多中草药同时具有抗菌、抗真菌和抗病毒作用。根据前人所做的大量工作, 我们选择了 8 种中草药, 测定蜂房蜜蜂球菌对这些中草药的敏感性。并依据其结果, 选择对该菌敏感药物, 应用均匀设计的原理, 设计出 4 因素 8 水平 8 组试验, 挑选出抑菌效果最好的中草药配方。

均匀设计是中国科学院应用数学研究所王元、方开泰教授在 70 年代末提出的一种供多因素、多水平试验用, 可减少所需试验次数的最优试验方法。当时应用在导弹设计中, 并取得了显著的效果, 后来逐渐推广应用到各行各业。这种试验设计方法把深奥的教学理论应用到数理统计和试验设计领域中来, 解决了正交试验中多因素多水平的试验次数过多的缺陷, 引起了全世界有关人士的瞩目, 并已引进到日本、美国等地, 被认为是目前最先进的试验方法之一。在中草药配方的研究中, 药物浓度及组分间配比, 都是影响配方性能的重要因素。如何在较短的时间内以较少的人力和物力, 找到中草药的最佳浓度、最佳配比、采用全面试验和正交实验法, 有些力不从心。我们采用均匀设计法, 让实验点在其范围内充分“均匀”分散, 同时, 大大节省实验次数, 很快选出了两个抑菌效果最好的配方, 为中草药用于蜂病防治打下了基础, 同时也是实验方法改进的尝试。均匀试验结果表明: 第一配方: 当黄连浓度为 56%, 黄芩 56%, 菊花 56%, 板蓝根为 0 各组分分配比相等时, 抑菌效果最好。第二配方: 当黄连浓度为 56%, 黄芩 56%, 金银花为 31.065%, 蒲公英为 0 各组分分配比相等时, 抑菌效果最好。

3.5 黄连、黄芩、菊花等除了具有抗菌作用外, 同时兼有抗真菌和抗病毒作用。采用以黄连、黄芩为主的中草药配方, 在防治欧洲幼虫腐臭病的同时, 可望对蜂群中的真菌病和病毒病有一定的防治作用, 其有效性有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 冯 峰. 中国蜜蜂病理及防治学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995.
- [2] 韩文瑜, 等. 病原细菌检验技术[M]. 吉林科学技术出版社, 1992.
- [3] 方开泰, 等. 实用回归技术[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [4] 周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1987.
- [5] Wang Yuan, Fang Kaitai. A note on uniform distribution and experimented design Science Bulletin, 1981, 26: 485~ 489.
- [6] Bailey L. Melissococcus pluton, the cause of European Foulbrood of honey bees(Apis spp) [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1983, 55: 55~ 69.
- [7] Allen M F, Ball BV. The cultural characteristics and serological relationship of isolates of Melissococcus pluton [J]. Journal of Apicultural Research, 1993, 32(2): 80~ 88.
- [8] Bailey L, et al. Reclassification of Streptococcus pluton (White) in a new genus Melissococcus as Melissococcus pluton nom[J]. Rev; comb. nov. Journal of Applied Bacteriology, 1982a, 53: 215~ 217.
- [9] Bailey L, et al. Taxonomic studies on Streptococcus pluton[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1982b, 53: 209 ~ 213.

**STUDIES ON THE SENSITIVITY OF HONEY
BEE EFB PATHOGEN TO DRUGS**

Zhou Ting, Feng Feng, Dong Bingyi, Wang Fengzhong
(*Institute of Apicultural Research CAAS, Beijing 100093, China*)

Abstract: The honey bee EFB pathogen was isolated from the dead *Apis cerana cerana* larvae naturally infected with EFB. According to the cultural, morphological, physiological and biochemical, serological characteristics; and the results of molecular biological test and infectivity test the pathogen was identified as *Melissococcus pluton*. The sensitivity test divided into three steps. 1. Studying the antibiotics commonly used in honey bee diseases. The results showed that the pathogen was very sensitive to Erythromycin, Josamycin, Midecamycin, Cefalexin but was resistant to Sulfamethoxazole trimethoprim and Norfloxacin. 2. Studying the MIC and MBC of effective composition extraction from some traditional Chinese medicine, the results showed that Kandofort MIC 1: 640, the medicine content was 3.125 μl/ml, MBC 1: 20, 50 μl/ml. Another medicine's MIC 1: 1280, the medicine content was 781.2 μg/ml, MBC 1: 320, 3125 μg/ml. 3. Using Uniform Design method to manage test data, we used 8 kinds of traditional Chinese medicine and made up two effective prescriptions for EFB.

Key words: *Apis cerana cerana*; EFB; *Melissococcus pluton*; Sensitivity test; Uniform Design method