



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Detection and Application of *Paenibacillus larvae* Spores in Honey 【Research report】

蜂蜜中幼蟲芽孢桿菌的檢測與應用【研究報告】

Yue-Wen Chen Guan-Ying Hwang and Kai-Kuang Ho*

陳裕文、黃冠穎、何鑑光*

*通訊作者E-mail: kkho@ccms.ntu.edu.tw

Received: 2002/08/27 Accepted: 2002/10/08 Available online: 2002/09/01

Abstract

For this study, we constructed methods to detect the number of *Paenibacillus larvae* spores in honey, and found that the detection limit was 181 spores/g of honey. Honey samples were examined using this method, and we found detectable levels of *P. l.* larvae in 31 of 124 samples from Taiwan. This method was also used to investigate the control effects of oxytetracycline (OTC) on American foulbrood (AFB). The results showed that in bee colonies with a heavy AFB infection (AFB signs > 500), the larval mortality might reach 62%, and the spore density might reach 1.2×10^6 spores/g of honey. All combs of these infected colonies were replaced with healthy ones and divided into three groups: one group was just fed syrup; one was medicated with 125 mg OTC; and the other one was given 50 mg OTC syrup. Their AFB signs, larval mortality, and spore density in honey were counted weekly. The results showed that 125 mg of OTC syrup eventually prevented AFB recurrence; i.e. no detectable levels of AFB signs or spores and normal larval mortality were found in the investigating period. However, good AFB prevention could not be achieved with treatment using syrup only or with 50 mg OTC medication. The larval mortality of these groups decreased with treatments but then increased again, and detectable spores and AFB signs were found in most samples in 3-6 weeks post-treatment.

摘要

本文建立了檢測西洋蜂 (*Apis mellifera*) 蜂蜜中蜜蜂美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 病原菌—幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae larvae*) 的檢測方法，最低檢出量為181 spores/g。利用此方法檢測國產蜂蜜樣本共124件，結果顯示31件 (25%) 可檢出幼蟲芽孢桿菌。本文也利用此檢測法評估羧四環素 (oxytetracycline, OTC) 對AFB的防治效果。實驗結果顯示，當蜂群嚴重感染AFB時 (病徵數 > 500)，其蜂群幼蟲死亡率可達62%，蜂蜜中的幼蟲芽孢桿菌孢子密度則達 1.2×10^6 spores/g；此時將蜂群進行換箱處理後區分為三個組別，其中兩組分別餵食含125 mg OTC與50 mg OTC的果糖漿，另一組則餵食純果糖漿，此後每週定期檢測試驗蜂群的AFB病徵數、幼蟲死亡率與蜂蜜中幼蟲芽孢桿菌孢子密度。實驗結果顯示，餵食含125 mg OTC果糖漿者，其蜂群未再檢出AFB病徵與幼蟲芽孢桿菌孢子，幼蟲死亡率也迅速下降至正常水平，如此顯示罹病蜂群已獲得有效防治。餵食含50 mg OTC果糖漿與純果糖漿者，則無法有效防治AFB，其幼蟲死亡率多呈現短暫下降而後上升的趨勢，而且蜂群多於3-6週後再度檢出AFB病徵與幼蟲芽孢桿菌孢子。

Key words: *Paenibacillus larvae larvae*, American foulbrood, *Apis mellifera*, honey, oxytetracycline.

關鍵詞: 幼蟲芽孢桿菌、美洲幼蟲病、西洋蜂、蜂蜜、羧四環素

Full Text: [PDF\(2.34 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

蜂蜜中幼蟲芽孢桿菌的檢測與應用

陳裕文 國立宜蘭技術學院應用動物系 宜蘭市 260 神農路 1 號
黃冠穎 何鑑光* 國立台灣大學昆蟲學系 台北市 106 羅斯福路 4 段 1 號

摘 要

本文建立了檢測西洋蜂 (*Apis mellifera*) 蜂蜜中蜜蜂美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 病原菌—幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae larvae*) 的檢測方法, 最低檢出量為 181 spores/g。利用此方法檢測國產蜂蜜樣本共 124 件, 結果顯示 31 件 (25%) 可檢出幼蟲芽孢桿菌。本文也利用此檢測法評估羧四環素 (oxytetracycline, OTC) 對 AFB 的防治效果。實驗結果顯示, 當蜂群嚴重感染 AFB 時 (病徵數 > 500), 其蜂群幼蟲死亡率可達 62%, 蜂蜜中的幼蟲芽孢桿菌孢子密度則達 1.2×10^6 spores/g; 此時將蜂群進行換箱處理後區分為三個組別, 其中兩組分別餵食含 125 mg OTC 與 50 mg OTC 的果糖漿, 另一組則餵食純果糖漿, 此後每週定期檢測試驗蜂群的 AFB 病徵數、幼蟲死亡率與蜂蜜中幼蟲芽孢桿菌孢子密度。實驗結果顯示, 餵食含 125 mg OTC 果糖漿者, 其蜂群未再檢出 AFB 病徵與幼蟲芽孢桿菌孢子, 幼蟲死亡率也迅速下降至正常水平, 如此顯示罹病蜂群已獲得有效防治。餵食含 50 mg OTC 果糖漿與純果糖漿者, 則無法有效防治 AFB, 其幼蟲死亡率多呈現短暫下降而後上升的趨勢, 而且蜂群多於 3-6 週後再度檢出 AFB 病徵與幼蟲芽孢桿菌孢子。

關鍵詞: 幼蟲芽孢桿菌、美洲幼蟲病、西洋蜂、蜂蜜、羧四環素

前 言

美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 是西洋蜂 (*Apis mellifera*) 最嚴重的病害, 染病蜂群若無妥善處理, 除了該染病蜂群會滅亡外, 還會藉由人為管理或蜂群間的盜蜂與迷巢蜂等途徑 (Goodwin *et al.*, 1994), 迅速蔓

延整個蜂場, 造成重大損失。目前, 全世界主要養蜂地區皆有 AFB 的發生 (Matheson, 1995); 由於病原孢子具有很高的環境抗逆性, 在養蜂技術十分進步的美國, 蜂群仍有 1.8% 的發生率 (Shimanuki *et al.*, 1992); 阿根廷於 1989 年首度發生 AFB, 由於缺乏適當的防治措施, AFB 迅速蔓延, 造成養蜂者幾

*論文聯繫人
e-mail: kkho@ccms.ntu.edu.tw

乎血本無歸，估計每年約損失 1 千萬美元（只估算蜂群的死亡與蜂蜜的減產值），損失約佔該國蜂蜜年產值的 1/5 (Alippi, 1996)，AFB 的嚴重性可見一斑。台灣於 1967 年首度發現 AFB 後 (Yen and Chyn, 1971)，至今仍嚴重發生於西洋蜂群。

引發 AFB 的病原為幼蟲芽孢桿菌 (*Paeniacillus larvae larvae*)，本菌只有孢子期具有感染力，其對蜜蜂幼蟲的致病力與齡蟲的大小關係密切；對西洋蜂 1 日齡幼蟲 LD₅₀ 為 21 個孢子，LD₉₅ 為 442 個孢子；對 2 日齡幼蟲的致病力大為減低，接種 4.5×10^4 個孢子只引起 37.2% 的死亡率 (Chen *et al.*, 1997)，而東方蜂 (*A. cerana*) 對本病則具有抗性 (Chen *et al.*, 2000)。感病的幼蟲通常於進入封蓋期 (capping stages) 後才會呈現典型美洲幼蟲病的病徵，但接種高劑量孢子會造成部分幼蟲無法進入封蓋期 (Chen *et al.*, 2002)。許多抗生素藥劑具有控制 AFB 蔓延的效果 (Moffett *et al.*, 1970)，其中羥四環素 (oxytetracycline, OTC) 對台灣本土蜂群極具防治效果 (Chen *et al.*, 2001)，西洋蜂群餵飼 1 次含羥四環素 125 mg 的糖漿，可完全抑制美洲幼蟲病的發生至少達 9 日，而羥四環素 50 mg 則可完全抑制至少達 3 日。

然而，AFB 的傳染力很高，其病原孢子可於土壤中維持達 35 年，因此有感病紀錄的養蜂場不易完全根治，而且 AFB 染病初期不易察覺，一旦在蜂群中發現典型 AFB 病徵時，通常已蔓延多數蜂群而不自知。為了早期偵測染病的蜂群，具高環境抗逆性的幼蟲芽孢桿菌孢子便成為偵測的對象；多數研究者探討蜂蜜中病原孢子的檢測法 (Shimanuki and Knox, 1988; Hornitzky and Clark, 1991; Steinkraus and Morse, 1992; Nordström and Fries, 1995)，也有研究者建立成蜂體上

病原孢子的檢測法 (Hornitzky and Karlovskis, 1989; Goodwin *et al.*, 1996)，而這些研究均指出被檢出含有病原孢子的蜂群，多數並未發現典型 AFB 病徵，因此具有早期偵測感病蜂群的意義。本文除探討病原孢子在台灣的分佈狀況外，並進一步建立蜂群感病程度與其儲蜜中孢子數的關係，藉以評估 OTC 的防治藥效。

材料與方法

一、蜂蜜中幼蟲芽孢桿菌檢測法的建立

取 7×10^4 及 2.1×10^5 兩種數量的孢子置於 15 g 蜂蜜中，再加入 30 ml 無菌水稀釋混勻後，以 $3000 \times g$ 離心 30 分鐘，小心去除上層液，只留下最底部之 5 ml 溶液，並與沈澱物再次混勻，置於 80°C 水浴加熱 15 分鐘，藉以除去雜菌。取 0.2 ml 樣本液，塗抹於 BHITN (DIFCO, brain-heart infusion supplemented with 0.1 ppm thiamine and 0.3 ppm nalidixic acid) 平板上，放入 37°C 培養箱中培養 72 小時，計算菌落數，以建立本檢測法的最低檢出量。以上試驗各處理均進行 4 重複。

由於考量田間取樣的蜂蜜可能含有 OTC 而影響孢子的萌發，因此本文也探討以多次離心的方式降低 OTC 的影響；即預先於 15 g 蜂蜜中添加 20 ppm OTC，孢子接種量為 7×10^4 ，再於第一次離心後，取 35 ml 無菌水加入殘留液中再次混勻離心，如此重複離心 1-4 次，再分別取 0.2 ml 樣本液塗抹於 BHITN 平板，比較其菌落數的差異，以建立最適之離心次數。以上試驗各處理亦進行 4 重複。

二、田間蜂蜜的檢測

選定位於台北縣市、苗栗頭份、宜蘭員山

與台南玉井等地的六處蜂場，於 1998 年 4-5 月流蜜期時調查取樣；取樣調查時以單一蜂群為單位，先以肉眼檢視是否出現 AFB 病徵，再抽取其儲蜜樣本共 71 件，送回實驗室檢測其孢子數。另以養蜂場為單位，於 1998 年 5-6 月委請宜蘭、苗栗頭份、彰化員林、台南白河與玉井等地養蜂產銷班，提供當季採收的蜂蜜樣本共 53 件，送回實驗室檢測其孢子數。

三、試驗蜂群的接種與管理

選取台大蜂場內 10 群工蜂族群為 8-9 片的西洋蜂，分別放入 1 片嚴重感染 AFB 的巢脾，約 4-5 週後蜂群已嚴重感染 AFB，且出現典型 AFB 病徵的罹病體可達 500 隻以上。此時準備新的蜂箱，蜂箱中放入 1-2 片新巢礎和 3-4 片從健康蜂群移入的封蓋幼蟲脾或蜜脾，新蜂箱備妥後將罹病群的成蜂全數抖入，原有巢脾則於記錄 AFB 罹病數後全部移除，僅保留成蜂於新蜂箱中繼續飼養。蜂群換箱處理後，分別進行下列 3 種不同的處理：

1. 換箱 2 日後餵飼蜂群 1 kg 含 OTC 125 mg 的糖漿，共餵食 4 群。
2. 換箱 2 日後餵飼含 OTC 50 mg 的糖漿，共餵飼 3 群。
3. 換箱後僅餵飼純糖漿，共餵飼 3 群。

四、試驗蜂群的監測

以週為單位，自蜂群接種 AFB 巢脾起，持續追蹤監測試驗蜂群的下列項目：

1. 儲蜜中孢子數：試驗蜂群以電動抽氣機抽取儲蜜約 60 g，利用前述之蜂蜜樣品檢測法（重複離心 2 次），以監測試驗蜂群儲蜜中孢子密度的變化。
2. AFB 病徵數：將試驗蜂群的巢脾逐一取出抖去成蜂，先以肉眼仔細觀察巢脾上出現幼蟲體色變黃且呈腐爛狀的可

見 AFB 病徵數，並以鑷子逢機挑開 100 個封蓋房，檢視封蓋內的 AFB 病徵數；兩者加總則為其 AFB 病徵數。

3. 幼蟲死亡率：每群蜜蜂逢機以透明片標示工蜂卵 100 顆，2 週後檢視其死亡率。

結 果

一、蜂蜜檢測法的建立

本文分別以 7×10^4 及 2.1×10^5 個孢子置於 15 g 蜂蜜中，經試驗流程各得 5 ml 孢子懸浮液，分別取 0.2 ml 懸浮液（內含孢子量分別為 2.8×10^3 spores 及 8.4×10^3 spores）塗抹於 BHITN 平板，得菌落數分別為 27.0 ± 5.9 與 79.0 ± 18.5 （表一），孢子萌發率分別為 $0.90\% \pm 0.21\%$ 與 $0.94\% \pm 0.15\%$ ，換算得蜂蜜樣品之最低檢出密度分別為 185 與 177 spores/g，兩者差異不顯著 ($P > 0.05$)，取平均數得最低檢出量為 181 spores/g。若將等量的孢子置於 15 g 無菌水，再經同樣的試驗流程，得孢子萌發率為 1.90% - 1.93%，約比蜂蜜樣本高出 1%。

脛四環素為養蜂者常用防治 AFB 的藥劑，因此檢測的蜂蜜樣品可能含有 OTC 而影響孢子的萌發，本文以多次離心的方式降低 OTC 的影響，測試結果見表二。結果顯示蜂蜜樣品如以前述流程僅經 1 次離心，則孢子均無法萌發；2 次重複離心處理則得最高之孢子萌發率 $0.71\% \pm 0.19\%$ ，3 次以上之重複離心則萌發率略為降低。如此顯示離心次數過多會造成多量的孢子流失，而次數不足則會造成誤判，因此於分析含有 OTC 之蜂蜜樣本時，以重複 2 次離心的分法最佳，其最低檢出量為 235 spores/g。

表一 幼蟲芽孢桿菌孢子懸浮液於 BHITN 平板的萌發狀況

Table 1. Germination of *Paenibacillus larvae larvae* spore suspensions on BHITN plates

Suspended samples	No. of spores inoculated	Bacterial colonies	Spore germination (%) ¹	Detection limit (spores/g) ²
Honey	2.8×10^3	27.0 ± 5.9	0.90 ± 0.21	185
Honey	8.4×10^3	79.0 ± 18.5	0.94 ± 0.15	177
Water	2.8×10^3	53.0 ± 9.8	1.90 ± 0.34	87
Water	8.4×10^3	164.0 ± 29.7	1.93 ± 0.34	86

¹ (Bacterial colonies/ no. of spores inoculated) \times 100%.

² $1/[15 \text{ g} \times (0.2 \text{ ml}/5 \text{ ml}) \times \text{germination rate}]$.

表二 離心次數對含 20 ppm OTC 蜂蜜樣品中幼蟲芽孢桿菌孢子萌發的影響

Table 2. Effects of different number of times centrifuged on the germination of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey containing 20 ppm OTC

No. of times centrifuged	Spore germination (%) ¹	Detection limit (spores/g)
1	0	-
2	0.71 ± 0.19	235
3	0.57 ± 0.10	292
4	0.52 ± 0.11	320

¹ There were 2.8×10^3 spores inoculated on each BHITN plate, with four replicates in each assay.

二、田間蜂蜜的檢測結果

由於本文無法確認田間蜂蜜是否含 OTC，再者 2 次離心法的最低檢出量僅略高於原始檢測法 (235 spores/g 相較於 181 spores/g)，因此均以 2 次離心法檢測之。自行到台北、頭份、員山與玉井等六處蜂場採樣，共計採樣得 71 件蜂群之儲蜜樣品，取樣蜂群均未發現罹患美洲幼蟲病個體，但檢測結果 (表三) 共有 17 件 (24%) 樣品檢出含有幼蟲芽孢桿菌孢子，檢出量多為 1×10^3 至 1×10^4 spores/g (11 群, 15.5%)，另有 2 群高於 1×10^4 spores/g，其中最高量達 3.2×10^5 spores/g。另以本省蜂場為取樣單位，由五地養蜂產銷班共提供 53 件蜂蜜樣品，檢測結果 (表四) 與自行採樣蜂群儲蜜者 (表三) 類似，共有 14 件 (26.4%) 樣品檢出孢子，而且檢出量亦多介於 1×10^3 至 1×10^4 spores/g (10 件, 18.9%)，亦有 2 件高於 1×10^4 spores/g。

整體而言，本文共檢測 124 件蜂蜜樣品，共有 31 件檢出含幼蟲芽孢桿菌孢子，陽性率達 25%，其中多數樣品 (21 件, 16.9%) 的檢出量介於 1×10^3 至 1×10^4 spores/g 間。

三、試驗蜂群的監測結果

1. 儲蜜中孢子數之變化

試驗蜂群接種大量幼蟲芽孢桿菌後，每週對各蜂群進行蜂蜜取樣，檢測樣品中所含孢子密度結果見圖一至圖三。接種之 10 箱蜂群中，孢子的密度快速增加，俟接種後 4-5 週實施換箱處理時，AFB 病徵數均超過 500，此時儲蜜的孢子密度已達 6×10^4 至 1.2×10^6 spores/g 之間；蜂群經換箱換片處理後，原有儲蜜已全部移除，但成蜂體上仍有孢子，因此換箱 1 週後仍有 5 群儲蜜樣品檢測少量的孢子。換箱後未經 OTC 防治者 (A 組蜂群)，雖於換箱 1 週後均未檢

表三 台灣地區飼養蜂群儲蜜樣品中幼蟲芽孢桿菌孢子的檢測結果 (單位: 蜂群)

Table 3. Culture results of *Paenibacillus larvae larvae* spores in hive honeys sampled from Taiwan (units: no. of colonies)

Sampled area	n	Negative for spores	Positive for spores		
			<10 ³ spores/g	10 ³ -10 ⁴ spores/g	>10 ⁴ spores/g
Taipei	16	12	1	3	0
Toufen	17	14	0	2	1
Yuanshan	19	13	2	3	1
Yuching	19	15	1	3	0
Total	71	54	4	11	2

表四 台灣地區養蜂場蜂蜜樣品中幼蟲芽孢桿菌孢子的檢測結果 (單位: 養蜂場)

Table 4. Culture results of *Paenibacillus larvae larvae* spores in apiary honeys sampled from Taiwan (units: no. of apiaries)

Sampled Area	n	Negative for spores	Positive for spores		
			<10 ³ spores/g	10 ³ -10 ⁴ spores/g	>10 ⁴ spores/g
Ilan	8	6	0	1	1
Toufen	18	14	0	3	1
Yuanlin	9	5	1	3	0
Yuching	10	7	0	3	0
Paiho	8	7	1	0	0
Total	53	39	2	10	2

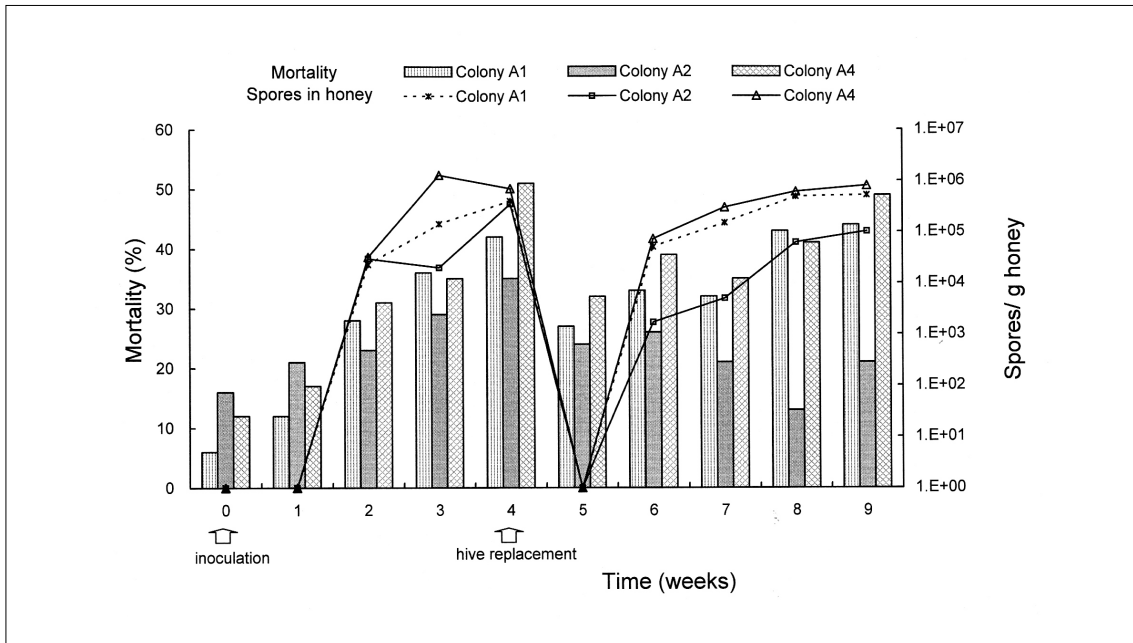
出孢子,但於第 2 週起,孢子密度即大幅提升至 1×10^4 spores/g 以上,已回復至換箱前的水準(圖一)。換箱並餵食一次 125 mg OTC 之實驗蜂群(B 組蜂群),雖於換箱 1 週後仍有 2 群檢出少量的孢子,但於第 2 週起至試驗結束,取樣蜂蜜均未檢出孢子(圖二),如此顯示 125 mg OTC 的劑量可有效抑制 AFB,使得孢子密度自然下降,終至不可檢測。餵食 50 mg OTC 者(C 組蜂群),3 群均於換箱 1 週檢出少量的孢子,此後有 1 群其儲蜜孢子密度一直維持約 1×10^3 spores/g 的水準;但有 2 群則呈現逐漸提升的現象,終至回復至換箱前的孢子密度(圖三),如此顯示 50 mg OTC 的劑量無法有效抑制 AFB,使得試驗蜂群再度發生 AFB。

2. 病徵數的變化

試驗蜂群於接種後 4-5 週進行換箱換片,原有 AFB 罹病體均已汰除。換箱後未經 OTC 防治者,均於換箱後 3-5 週再度出現 AFB 罹病體,試驗結束時病徵數多已超過 500,顯示蜂群再度嚴重感染 AFB。相反地,換箱並餵食 125 mg OTC 者,均未於觀察期間出現明顯病徵;餵食 50 mg OTC 者,有 1 群未再出現 AFB 罹病體,但有 2 群分別於換箱後 4-5 週再度出現病徵,顯示 50 mg OTC 的劑量無法有效抑制 AFB,使得試驗蜂群再度發生 AFB。

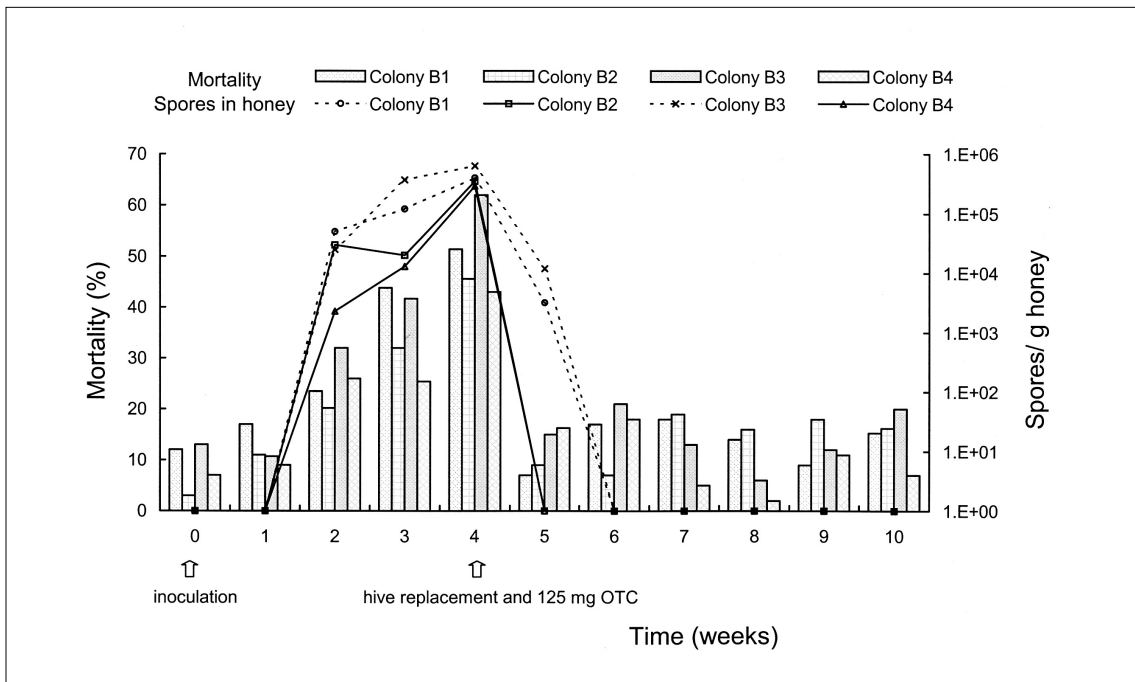
3. 幼蟲死亡率的變化

由接種前的資料顯示,幼蟲由卵發育至蛹期的存活率約為 83-98%,即死亡率約為 2-15%,平均約 $7\% \pm 3.5\%$ 。經接種後,



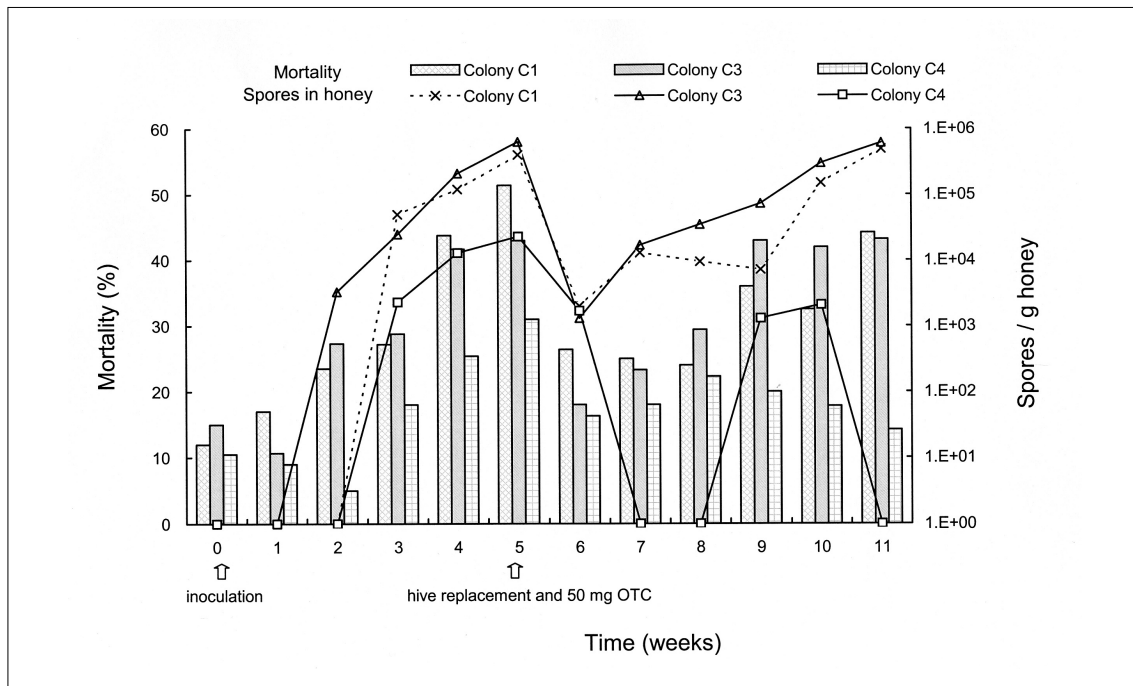
圖一 感病蜂群只經換箱處理，儲蜜中幼蟲芽孢桿菌孢子密度與幼蟲死亡率的變化。

Fig. 1. Variations in the number of *Paenibacillus larvae* spores in comb honey and larval mortality of diseased colonies treated with hive replacement only.



圖二 感病蜂群經換箱與125 mg OTC處理，儲蜜中幼蟲芽孢桿菌孢子密度與幼蟲死亡率的變化。

Fig. 2. Variations in the number of *Paenibacillus larvae* spores in comb honey and larval mortality of diseased colonies treated with hive replacement and 125 mg OTC syrup medication.



圖三 感病蜂群經換箱與50 mg OTC處理，儲蜜中幼蟲芽孢桿菌孢子密度與幼蟲死亡率的變化。

Fig. 3. Variations in the number of *Paenibacillus larvae* spores in comb honey and larval mortality of diseased colonies treated with hive replacement and 50 mg OTC syrup medication.

幼蟲死亡率在 4-5 週內即上升至 31%-62%。若換箱後未餵食 OTC (A 組，圖一)，幼蟲死亡率仍達 23-33%，並未回復至正常水準。換箱後餵食 OTC 125 mg 之實驗蜂群 (圖二)，於餵藥 1 週後幼蟲死亡率即下降至 14% ± 6.4%，此後一直至試驗結束，幼蟲死亡率一直維持約 10% 左右。換箱並餵食 OTC 50 mg 之實驗蜂群 (C 組，圖三)，於餵藥後 1-3 週的幼蟲死亡率下降至 15-30%，但第 4 週後有兩群的幼蟲死亡率再度上升至 36-43%，另有一群則因未再出現 AFB 罹病體，幼蟲死亡率於試驗期間一直維持於約 15%。

討 論

蜂蜜本身具抑菌性 (Molan, 1996)，因而可能影響幼蟲芽孢桿菌的萌發；Shimanuki and Knox (1988) 利用 BHIT 培養基並結合透析與離心濃縮等步驟，得最低檢出量為 80 spores/ml，約與本文將孢子置於無菌水者的結果類似 (表一)，此可能因透析而排除蜂蜜的抑菌性所致，但每個蜂蜜樣品的透析時間長達 18 h 以上，不適於大量樣品的檢測。

一般而言，蜂蜜中常含有蜂房芽孢桿菌 (*P. alvei*) 而影響結果的判讀 (Hornitzky and Karlovskis, 1989)，因此本文參考 Hornitzky and Clark (1991) 的方法，於 BHIT 中添加 0.3 ppm nalidixic acid。此外，與其他培養基相比較，幼蟲芽孢桿菌於本文的 BHITN 培養基之萌發率不高 (約 1.9%)，Nordström and Fries (1995) 曾比較幼蟲芽孢桿菌孢子於不

同培養基與培養條件的萌發率，發現以 MYPGP 培養基結合 5% CO₂ 環境者最佳，萌發率可達 23%，但其最後因未考量蜂蜜本身的抑菌性，將蜂蜜直接以等量水稀釋後即塗抹於 MYPGP 平板，得最低檢出量為 200 spores/g，如此反而略高於本文之 181 spores/g。

Hornitzky and Clark (1991) 從澳洲的三處蜂蜜集散地取樣蜂蜜共 505 件樣品，結果發現 63 件檢出幼蟲芽孢桿菌孢子，研究者繼續追蹤其貨源，發現檢出的樣品來自 52 個養蜂場，其中 23 個養蜂場蜂群感染 AFB，但只有 5 個養蜂場主知道 AFB 的感染，其餘 18 位場主不知情；此外，有 12 個蜂場曾於 2 年內感染 AFB 但近期並未出現病徵，更有 17 個蜂場未有感病記錄卻檢出孢子。Steinkraus and Morse (1992) 檢測美加地區共 82 件蜂蜜樣品，樣品檢出幼蟲芽孢桿菌孢子者有 7 件 (8.5%)；Shimanuki and Knox (1988) 檢測美國超市上的蜂蜜共 58 件，可能由於檢測靈敏度較高 (80 spores/ml honey)，檢出率達 56.9%。由前述研究結果顯示，AFB 普遍發生於全球各地養蜂場，而檢測蜂蜜中的幼蟲芽孢桿菌孢子，則可於蜂群出現 AFB 病徵前，提早偵測潛伏感染的蜂群。

美洲幼蟲病是台灣地區危害西洋蜂最嚴重的病害，養蜂者一直不敢輕忽，由本文檢測 124 件蜂蜜樣品的結果顯示，台灣地區約有 1/4 的蜂群可檢出幼蟲芽孢桿菌孢子，進一步證實 AFB 在台灣的普遍性與嚴重性，但可能本文的蜂蜜採樣期正值流蜜期，取樣蜂群的群勢處於極盛期，因此均未出現病發情況，乃是呈現潛伏感染的狀態。這些潛伏感染的蜂群一旦環境發生改變，AFB 即可能大發生，確實不容小覷。在 AFB 的防治策略上，Chen *et al.* (2001) 已證實嚴重感病蜂群可藉換箱處理 5

日後，餵飼 1 次含 125 mg OTC 的糖漿，則蜂群不會復發 AFB；本文則進一步從蜂群儲蜜孢子數與幼蟲死亡率的角度監測試驗蜂群，發現 125 mg OTC 的劑量確可有效防治 AFB，除了蜂群不再出現 AFB 罹病體，幼蟲死亡率也回復至正常水準，儲蜜中的病原孢子更因此而未再檢出。Chen *et al.* (2001) 也發現僅以換箱處理或換箱後餵飼 50 mg OTC 劑量者，試驗蜂群多於 3-9 週後再次出現 AFB 罹病體，本文亦得類似的結果，而且從其幼蟲死亡率與儲蜜孢子數的監測結果觀之，AFB 罹病體的再次出現，實屬必然。Chen *et al.* (2001) 亦指出，輕度感染 (AFB 病徵數 < 50) 的蜂群，可藉換箱處理即可有效防治 AFB；如此對於台灣地區高達 1/4 檢出病原孢子的潛伏感染蜂群，也可藉換箱處理，甚至只需將儲蜜搖除，即可防患 AFB 的發生，惟搖下的蜂蜜不可用於餵飼蜂群，以避免病原孢子傳佈于其他蜂群。

引用文獻

- Alippi, A. M. 1996. World news, International Workshop on American Foulbrood. *Bee World* 77: 112-115.
- Chen, Y. W., C. H. Wang, and K. K. Ho. 1997. Pathogenicity of *Bacillus larvae* to the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). *Chin. J. Entomol.* 17: 23-32 (in Chinese).
- Chen, Y. W., C. H. Wang, J. K. An, and K. K. Ho. 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. *J. Apicult. Res.* 39: 169-175.

- Chen, Y. W., J. S. Liu, K. K. Ho, C. H. Wang, and J. An.** 2001. Control effects of oxytetracycline on American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae* of honey bee, *Apis mellifera*. Formosan Entomol. 21: 209-220 (in Chinese).
- Chen, Y. W., C. H. Wang, and K. K. Ho.** 2002. Effects of oxytetracycline on larval honey bee, *Apis mellifera*, reared *in vitro*. Formosan Entomol. 22: 53-64 (in Chinese).
- Goodwin, R. M., J. H. Perry, and A. T. Houten.** 1994. The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. J. Apicult. Res. 34: 209-212.
- Goodwin, R. M., J. H. Perry, and H. M. Haine.** 1996. A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. J. Apicult. Res. 35: 118-120.
- Hornitzky, M.A.Z., and S. Clark.** 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. J. Apicult. Res. 30: 13-16.
- Hornitzky, M.A.Z., and S. Karlovskis.** 1989. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. J. Apicult. Res. 28: 118-120.
- Matheson, A.** 1995. World bee health report. Bee World 76: 31-39.
- Moffett, J. O., J. D. Hitchcock, J. J. Lockett, and J. R. Elliott.** 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. J. Apicult. Res. 9: 111-119.
- Molan, P. C.** 1996. Honey as an antimicrobial agent. pp. 27-37. In: A. Mizrahi and Y. Lensky, eds. Bee Products-Properties, Applications, and Apitherapy. Plenum Press, New York and London.
- Nordström, S., and I. Fries.** 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. J. Apicult. Res. 34: 97-103.
- Shimanuki, H., and D. A. Knox.** 1988. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. Am. Bee J. 128: 353-354.
- Shimanuki, H., D. A. Knox, B. Furgala, D. M. Caron, and J. L. Williams.** 1992. Diseases and pests of honey bees. pp. 1083-1151 In: J. M. Graham, ed. The Hive and the Honey Bee. Dadant & Sons, Hamilton, IL.
- Steinkraus, K. H., and R. A. Morse.** 1992. American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. Apidologie 23: 497-501.
- Yen, D. F., and L. C. Chyn.** 1971. Studies on a bacterial disease of honeybee in Taiwan. Plant Prot. Bull. 13: 12-17 (in Chinese).

收件日期：2002年8月27日

接受日期：2002年10月8日

Detection and Application of *Paenibacillus larvae larvae* Spores in Honey

Yue-Wen Chen Department of Applied Animal Science, National Ilan Institute of Technology, Ilan, Taiwan 260, R.O.C.

Guan-Ying Hwang and Kai-Kuang Ho* Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.

ABSTRACT

For this study, we constructed methods to detect the number of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey, and found that the detection limit was 181 spores/g of honey. Honey samples were examined using this method, and we found detectable levels of *P. l. larvae* in 31 of 124 samples from Taiwan. This method was also used to investigate the control effects of oxytetracycline (OTC) on American foulbrood (AFB). The results showed that in bee colonies with a heavy AFB infection (AFB signs > 500), the larval mortality might reach 62%, and the spore density might reach 1.2×10^6 spores/g of honey. All combs of these infected colonies were replaced with healthy ones and divided into three groups: one group was just fed syrup; one was medicated with 125 mg OTC; and the other one was given 50 mg OTC syrup. Their AFB signs, larval mortality, and spore density in honey were counted weekly. The results showed that 125 mg of OTC syrup eventually prevented AFB recurrence; i.e. no detectable levels of AFB signs or spores and normal larval mortality were found in the investigating period. However, good AFB prevention could not be achieved with treatment using syrup only or with 50 mg OTC medication. The larval mortality of these groups decreased with treatments but then increased again, and detectable spores and AFB signs were found in most samples in 3-6 weeks post-treatment.

Key words: *Paenibacillus larvae larvae*, American foulbrood, *Apis mellifera*, honey, oxytetracycline