



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

The Effect of Oxytetracycline to Control American Foulbrood in Honeybee, and the OTC Residue in Honey 【Research report】

經四環素對蜜蜂美洲幼蟲病的防治效果與蜂蜜中的殘留檢測【研究報告】

Chong-Yu Ko, Hao-Chun Cheng, Chun-Ting Chen, and Yue-Wen Chen*

柯仲宇、鄭浩均、陳春廷、陳裕文*

*通訊作者E-mail: chenyw@niu.edu.tw

Received: 2012/12/10 Accepted: 2013/02/12 Available online: 2013/03/01

Abstract

American foulbrood (AFB) is a severe bacterial disease in larval honeybee (*Apis mellifera*) caused by the spores of *Paenibacillus* larvae. Because several reports have documented oxytetracycline (OTC) resistance in *P. larvae* in some regions, we used OTC-tolerated spores isolated from an apiary in Taiwan as the source of inoculum to conduct a field experiment to test the efficacy of OTC and determine the OTC residue levels in the honey extracted. The 1-day-old larvae from 8 strong honeybee colonies were each inoculated by *P. larvae* spores, and the colonies were fed sugar syrup containing 50 and 125 mg OTC respectively. The results showed that two doses of OTC could effectively control AFB. All honey of the experimental colonies was removed at 10, 20 and 30 days after medication to check for OTC residue in the honey. The results showed that there was no detectable residue left in the honey at 30 days after the 50 mg OTC medication, but 8 and 25 ppb were detected respectively in two of the colonies that had received a 125 mg dosage application on the same sampling date. Our results show that OTC medication still provides good control against infection of OTC-tolerated spores. However, the contaminated honey needs to be removed twice in a row to decrease the OTC residues in the honey to below the required 25 ppb.

摘要

美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 是一種危害西洋蜂 (*Apis mellifera* L.) 的重要細菌性病害，病原為可形成孢子的幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*)。由諸多文獻報導顯示該病原已對常用的經四環素 (oxytetracycline, OTC) 產生抗性，本文利用對 OTC 具耐藥性的幼蟲芽孢桿菌台灣本土分離株做為接種源，以探討 OTC 的防治藥效；並且探討以搖除儲蜜的方式，減低 OTC 殘留於蜂產品的風險。在防治藥效評估方面，選取 8 群健康西洋蜂的 1 日齡幼蟲接種本土具耐藥性的 *P. larvae* 孢子，並於試驗期間分別給予一次 800 mL 含有 OTC 50 mg 與 125 mg 二種劑量的糖水，結果顯示兩種處理皆能有效抑制 AFB 病徵的發生。在藥劑殘留量方面，所有蜂群均於施藥後第 10、20 及 30 日分別搖去儲蜜，並檢測蜂蜜中 OTC 的殘留量。結果顯示，在施藥後 30 日的儲蜜樣本中，施用 50 mg OTC 劑量的蜂群均未檢測出殘留，而施用 125 mg 的蜂群則有 2 群有檢出殘留，分別為 8 ppb 及 25 ppb。綜合以上結果顯示，OTC 對台灣本土耐藥性病原仍具良好的防治效果，但施藥蜂群須經過 2 次以上的搖除儲蜜，才能將蜂蜜中經四環素殘留量降低至 25 ppb 以下。

Key words: American foulbrood, honeybee, oxytetracycline, control, residue

關鍵詞: 美洲幼蟲病、西洋蜂、經四環素、防治、殘留。

Full Text: [PDF \(1.78 MB\)](#)

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

羧四環素對蜜蜂美洲幼蟲病的防治效果與蜂蜜中的殘留檢測

柯仲宇、鄭浩均、陳春廷、陳裕文*

國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 宜蘭市 26047 神農路一段 1 號

摘要

美洲幼蟲病 (American foulbrood, AFB) 是一種危害西洋蜂 (*Apis mellifera* L.) 的重要細菌性病害，病原為可形成孢子的幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*)。由諸多文獻報導顯示該病原已對常用的羧四環素 (oxytetracycline, OTC) 產生抗性，本文利用對 OTC 具耐藥性的幼蟲芽孢桿菌台灣本土分離株做為接種源，以探討 OTC 的防治藥效；並且探討以搖除儲蜜的方式，減低 OTC 殘留於蜂產品的風險。在防治藥效評估方面，選取 8 群健康西洋蜂的 1 日齡幼蟲接種本土具耐藥性的 *P. larvae* 孢子，並於試驗期間分別給予一次 800 mL 含有 OTC 50 mg 與 125 mg 二種劑量的糖水，結果顯示兩種處理皆能有效抑制 AFB 病徵的發生。在藥劑殘留量方面，所有蜂群均於施藥後第 10、20 及 30 日分別搖去儲蜜，並檢測蜂蜜中 OTC 的殘留量。結果顯示，在施藥後 30 日的儲蜜樣本中，施用 50 mg OTC 劑量的蜂群均未檢測出殘留，而施用 125 mg 的蜂群則有 2 群有檢出殘留，分別為 8 ppb 及 25 ppb。綜合以上結果顯示，OTC 對台灣本土耐藥性病原仍具有良好的防治效果，但施藥蜂群須經過 2 次以上的搖除儲蜜，才能將蜂蜜中羧四環素殘留量降低至 25 ppb 以下。

關鍵詞：美洲幼蟲病、西洋蜂、羧四環素、防治、殘留。

前言

美洲幼蟲病 (American foulbrood, 以下簡稱 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，還可能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。台灣於 1967 年首度發現 AFB (Yen and Chyn, 1971)；目前，全世界主要養蜂地區皆有 AFB 的發生 (Matheson, 1995)。

引發 AFB 的病原為一種可形成孢子的幼蟲芽孢桿菌 (*Paenibacillus larvae*) (Genersch *et al.*, 2006)，只有孢子期具有感染力，西洋

*論文聯繫人

Corresponding email: chenyw@niu.edu.tw

蜂成蜂對其具有抗性 (Riessberger-Gallé *et al.*, 2001), 病原孢子對蜜蜂幼蟲的致病力與蟲齡大小關係密切; 對西洋蜂 1 日齡幼蟲 LD_{50} 為 21 個孢子, LD_{95} 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)。染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並死亡, 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.*, 2002b)。由於病原孢子的傳染力很高, 且具有極強的環境抗逆性 (Reybroeck *et al.*, 2012), 因此有發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, 許多研究探討蜂蜜中病原孢子的檢測法與防治意義 (Shimanuki and Knox, 1988; Hornitzky and Clark, 1991; Steinkraus and Morse, 1992; Nordström and Fries, 1995; Chen *et al.*, 2002a; Antúnez *et al.*, 2004; Pernal and Melathopoulos, 2006; Chen *et al.*, 2008), 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, 因此早期偵測帶病蜂群具有預防蜂場 AFB 發生的意義。

經四環素 (oxytetracycline, 以下簡稱 OTC) 具有控制 AFB 蔓延的效果 (Chen *et al.*, 2001), 美國、加拿大利用 OTC 防治 AFB 已數十年, 惟當地已出現抗性菌株 (Alippi, 2000; Cox, 2000; Miyagi *et al.*, 2000; Piccini and Zunino, 2001; Evans, 2003; Alippi *et al.*, 2007)。在台灣雖然 OTC 並未被核准使用作為 AFB 防治藥劑, 但因為使用 OTC 防治 AFB 的效果佳且價格低廉, 早期仍有許多養

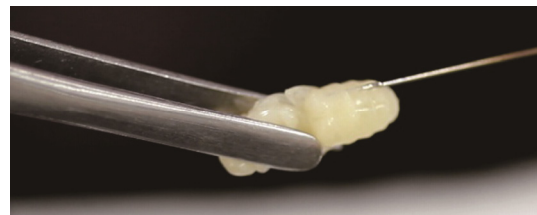
蜂業者用以作為防治藥劑。Chen *et al.* (2008) 廣泛收集並檢測台灣地區的蜂蜜樣品共 838 件, 其中 208 件樣品 (24.8%) 被檢出含 AFB 病原孢子, 這些被檢出的病原接著被建立了 219 株幼蟲芽孢桿菌分離株, 其中有 50 株 (24.0%) 對 OTC 已出現明顯的耐藥性。本研究旨在探討 OTC 對於已出現耐藥性菌株的防治效果如何? 是否可以利用蜂群管理的方式藉以減低 OTC 殘留於蜂產品的風險, 最後並討論利用 OTC 防治美洲幼蟲病的適用性。

材料與方法

一、OTC 防治 AFB 的效果

(一) 孢子接種源的製備

選取 Chen *et al.* (2008) 報告中指出, 由台灣國產蜂蜜中分離出對 OTC 具有低敏感性之本國分離株 (對 $5 \mu\text{g}$ OTC 抑菌圈直徑為 21 mm), 利用移菌環選取 *P. larvae* 菌落培養於 BHIB (brain heart infusion broth, DIFCO), 37°C , 200 rpm 震盪式恆溫培養箱 48~72 hr 之後, 將此培養液於 25°C , 6,000 g 離心 5 min, 去除上清液, 再以無菌水定量至 1 mL, 利用微量注射器注射進入 1 日齡工蜂蛹體腹部的第一與二體節之間 (圖一), 注射量約 $3 \mu\text{L}$, 共 100 隻, 注射後的蛹置於恆溫培養箱



圖一 利用微量連續注射器注射西洋蜂一日齡工蜂蛹的情形。

Fig. 1. Using continuous micro-injector to inject inoculums into the body of a 1-day-old pupa.



圖二 同日齡 (一日齡) 西洋蜂工蜂蛹體注射 *P. larvae* 營養體的發育情形。左者為注射含有 *P. larvae* 營養體的蛹體, 14 日後蛹體塌陷且體色變黑死亡, 無法順利羽化; 右者為注射無菌水之陰性對照組, 已順利羽化。

Fig. 2. Development of the honeybee after injecting *P. larvae* vegetative cells into a 1-day-old pupa. Left: the pupa became black, sunken and did not emerge 14 days after the injection containing *P. larvae* vegetative cells. Right: The negative control of a pupa injected with ddH₂O did emerge completely.

(34°C) 中, 約一個月可出現典型 AFB 病徵 (圖二), 收集其中 12 隻感病蟲體先加入 1 mL ddH₂O 磨碎後, 再加入 2 mL ddH₂O 沖洗 Pellet, 將上述液體注入 50 mL 離心管並震盪混勻, 將此均質液體低速離心 (500 g, 5 min), 取上清液, 再以 6,000 g 離心 40 min, 去上清液, 以磷酸緩衝鹽液 (phosphate buffer saline, PBS) 定量至 12 mL, 最後以水浴加熱 (80°C, 20 min) 殺除雜菌, 以 PBS 做 10 倍量序列稀釋, 之後取 100 µL 稀釋菌液均勻塗於 BHITN (BHI 培養基添加 0.1 µg thiamine/mL + 9 µg nalidixic acid/mL) 培養基上, 各進行二重覆, 培養於 37°C, 5% CO₂ 恆溫培養箱 72 hr, 用以估算接種孢子源的濃度 (colony-forming unit/mL, CFU)。

(二) 田間蜂群的防治試驗

於 2007 年 10 月選取宜蘭大學試驗蜂場內 8 群健康的西洋蜂, 每群蜜蜂其工蜂族群均滿 9 巢片且有 1 隻產卵正常的后蜂。試驗蜂群各餵飼 800 mL (約 1 公斤) 含 OTC 的糖漿 (蔗

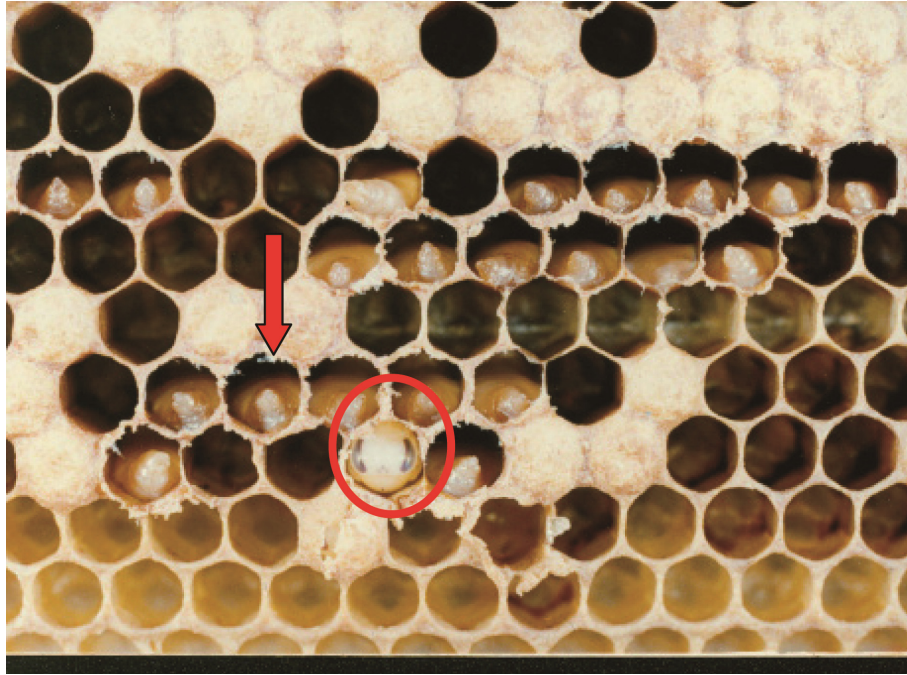
糖: 水=1:1, W/W) 1 次, 糖漿中分別含有 OTC 50 與 125 mg 二種劑量, 換算 OTC 濃度分別約為 63 與 156 µg/mL (以下均以 50 與 125 mg 做為低、高劑量組之代號), 各劑量均餵飼四群 (四重複); 另外所有蜂群均於施藥後 10、20、30 日搖去所有儲蜜, 並檢測該儲蜜中 OTC 殘留量。為探討 OTC 的防治效果, 選取 1 日齡幼蟲接種前述製備之本土分離具耐藥性的 *P. larvae* 孢子, 分別於餵食 OTC 前 6、3 日, 餵飼後 0、3、6、10 日, 選取 1 日齡工蜂幼蟲分別接種 1 µL 含有 10 及 100 CFU 劑量孢子, 每劑量於試驗蜂群各接種 50 隻, 對照組則接種 1 µL 無菌水, 染病情形如圖三所示, 以探討 OTC 對 *P. larvae* 的防治效果及藥效的持續性。

二、蜂蜜中 OTC 的檢測法

參考 Pena *et al.* (2005) 的方法, 敘述如下:

1. 試藥與器材

OTC 標準品 (純度 90%, Sigma, USA),



圖三 接種 *P. larvae* 孢子於 1 日齡工蜂幼蟲，12 天後蟲體呈現腐爛狀美洲幼蟲病徵 (箭頭處)，與同齡蛹體 (紅框處) 的比較。

Fig. 3. Development of the honeybee after inoculating *P. larvae* spores into a 1-day-old larva. The immature brood show signs of American foulbrood (arrow point) at the 12th days post-inoculation, compared to a normal individual at the same age (red circle).

氰甲烷 (皓峰, 台灣)、甲醇 (Mallinckrodt, USA)、乙晴 (純度 99.8%, J. T. Baker, USA) 均為 LC 級, 正己烷 (95%, J. T. Baker, USA)、醋酸乙酯 (Mallinckrodt, USA)、檸檬酸 (石津製藥, 日本)、磷酸氫二鈉 (石津製藥, 日本)、鹽酸 (FERAK, Germany)、咪唑 (Fluka, Germany)、醋酸鎂 (J. T. Baker, USA)、草酸 (J. T. Baker, USA) 為試藥級。真空固相萃取裝置包括矽膠過濾層析管柱 (DSC-PH cartridge, SUPELCO), 真空減壓濃縮裝置包括冷凝機 (water bath D-606)、抽氣幫浦 (BUCHI Vac[®] V-500)、控制器 (BUCHI vacuum controller V-800)、旋轉濃縮器 (BUCHI rotavapor R-215)、加熱器

(BUCHI heating bath B-491)。

2. 分析方法：

(1) HPLC 操作條件

- 高效液相色層分析儀 (HPLC, Agilent 1200) 包括多溶液輸送系統 (multisolvent delivery system)、螢光檢測器 (fluorescence detector)。
- 層析管：ZORBAX SB-C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm, Agilent)。前置 Frit Filter 的 Guard-Pak holder, 以延長層析管之使用壽命。
- 移動相：咪唑 (imidazole) 緩衝溶液/甲醇 (77 : 23, v/v), 流速 1.0 mL/min, 進樣量 100 μL, 螢光檢測器的激發波長 380

nm，發散波長 520 nm。

(2) 檢量線

精秤 10 mg OTC 標準品，置於定量瓶中，加甲醇至 100 mL，均勻混合，即為 100 ppm 原液。取適量原液以 0.5 N 鹽酸稀釋成 5、1、0.5、0.1、0.05、0.01 ppm，注入高效能液相色層分析儀，分別測定各濃度波峰面積，以製作檢量線。

3. 蜂蜜樣品的分離與淨化

取 2.9 g 蜂蜜並人為添加 100 μ L 濃度 50 μ g/mL 之 OTC，之後加入 6 mL 0.01 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液並震盪混勻。再以 3,000 rpm 轉速下離心 15 min，取上清液，使用 DSC-PH (phenyl, 7% C) 固相萃取管柱進行淨化，先分別用 5 mL 乙晴、10 mM 草酸、飽和 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 進行活化管柱，接著注入蜂蜜樣品，再用 5 mL 之 10 mM 草酸進行清洗的步驟，最後用 5 mL 乙酸乙酯與甲醇的混合比例 (90:10) 進行沖提，將沖提液利用真空減壓濃縮機進行濃縮至完全乾為止，再用 10 mM 草酸定量至 1 mL，最後用 0.22 μ m 濾膜來過濾，之後取 100 μ L 的樣品過濾液注入 HPLC 並測定波峰面積進行 OTC 殘留分析 (圖四)。

4. 田間蜂蜜樣品的檢測

田間試驗蜂群所搖取下來的蜂蜜樣本共 24 件，每件取 3.0 g 蜂蜜樣本再加入 6 mL 0.01 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ pH 4.0 MacIlvaine 緩衝溶液並震盪混勻，利用前述蜂蜜樣品的分離與淨化方法來進行 OTC 殘留檢測。

結 果

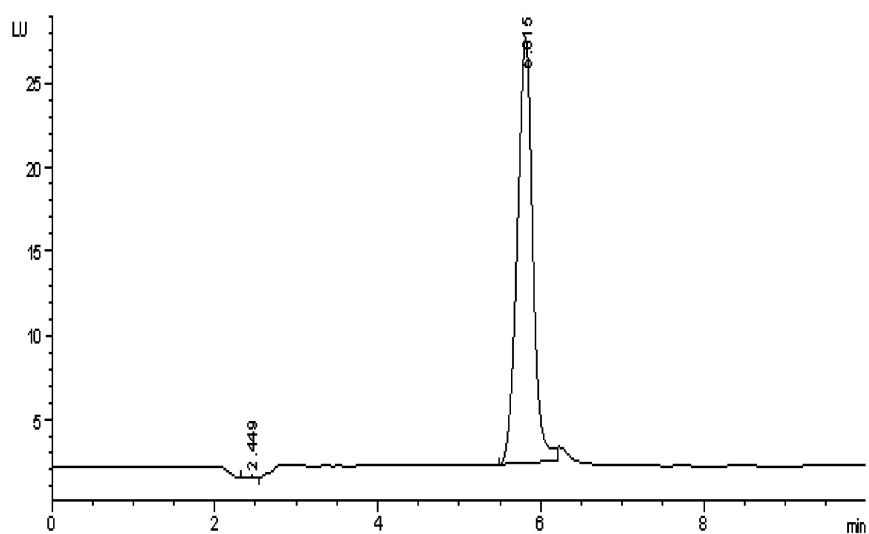
一、田間蜂群防治試驗

本研究評估以 OTC 防治本土具耐藥性 *P. larvae* 的適用性？分別以含 50 和 125 mg

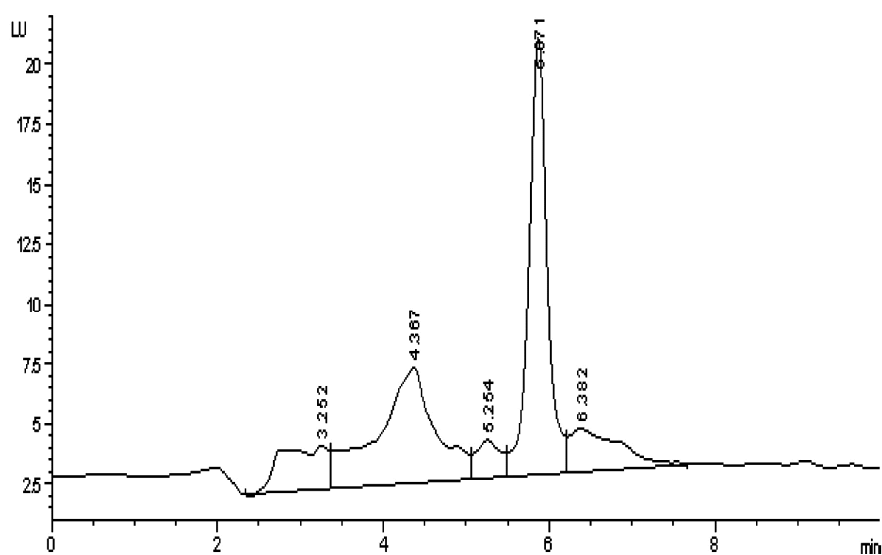
OTC 糖漿餵飼蜂群 1 次，再於施藥前後選取 1 日齡幼蟲，接種本土分離具耐藥性的幼蟲芽孢桿菌孢子，每隻幼蟲接種劑量分別為 10 和 100 CFU，以探討 OTC 防治的效果與藥效持續性。蜂群餵飼 125 mg OTC 的結果顯示 (圖五)，施藥前 6 日接種孢子的幼蟲，因其幼蟲取食期全程皆未接觸藥劑，因此接種後的幼蟲於封蓋期約 80~90% 蟲體出現典型 AFB 病徵。施藥前 3 日接種者，於中、末齡幼蟲期能有機會接觸到 OTC，可發現接種孢子的幼蟲，蛹存活率大幅提高，均未出現典型 AFB 病徵，而且蛹存活率已和陰性對照組無顯著性差異 ($p > 0.05$)，顯示此 OTC 劑量可以完全防治已經感染孢子的幼蟲。而施藥當日、施藥後 3 日、6 日經接種孢子處理的幼蟲，此 OTC 劑量亦皆能有效地防治 AFB 病徵的發生；施藥後 10 日接種孢子的幼蟲 (因需檢測蜂蜜中 OTC 殘留量，所以搖去儲蜜)，試驗結果仍顯示所有接種孢子的處理組皆無 AFB 病徵的發生，顯示 125 mg OTC 可以完全防治高劑量孢子感染至少達 13 日 (施藥前 3 日+施藥後 10 日)。

蜂群餵飼 50 mg OTC 的結果顯示 (圖五)，施藥前 6 日接種孢子的幼蟲，同樣因幼蟲取食期未接觸藥劑而出現典型 AFB 病徵 (80~90%)。但施藥前 3 日接種、施藥當日、施藥後 3 及 6 日所感染孢子的幼蟲，皆未出現 AFB 病徵者，顯示 50 mg OTC 可以完全防治施藥前 3 日至施藥後 6 日感染孢子的幼蟲；但施藥後 10 日接種者，則於 10 和 100 CFU 劑量接種幼蟲分別出現 15.8 及 38.4% AFB 發生率，此結果說明在試驗蜂群搖去儲蜜後，50 mg OTC 的防治效果才比 125 mg OTC 低，前者藥效的持續性與藥效下降的速度比後者來的明顯，已無法完全防治遭受感染的幼蟲 (圖三)。

A. OTC Standard



B. Honey



圖四 濃度 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 OTC (standard and in honey) 於高效能液相層析儀所呈現的圖譜，所使用的管柱為 ZORBAX SB-C18, 5 μm ，移動相為咪唑緩衝溶液/甲醇 (77:23, v/v)，檢測器為螢光，檢測波長分為激發波長 380 nm，發射波長 520 nm，流速 1.0 mL/min，進樣量 100 μL ，(A) OTC 標準品；(B) 蜂蜜。

Fig. 4. High performance liquid chromatography chromatograms of oxytetracycline with 5.0 $\mu\text{g/mL}$ concentration using C18 column and a mobile phase containing imidazole buffer/methanol (77:23, v/v), with fluorescence detection at 380 nm excitation and 520 nm emission. Flow rate, 1 mL/min; injection sample 100 μL . (A) OTC standard; (B) OTC in honey.

表一 餵飼含 50 及 125 mg OTC 之糖水處理後，各蜂箱 10、20 及 30 日蜂蜜的 OTC 殘留量
Table 1. OTC residues in honey after medicating honeybee colonies with 50 and 125 mg OTC sugar syrups

Hive no.	OTC dose (mg)	OTC residues post-treatment (ppb)		
		Day 10	Day 20	Day 30
A5	50	2,800	33	ND*
A6	50	3,100	8	ND
A7	50	1,600	95	ND
A8	50	3,000	25	ND
Mean ± s.d.		2,625 ± 695a**	40 ± 38a	-
A9	125	5,480	33	ND
A10	125	5,120	200	25
A11	125	13,040	90	8
F11	125	4,290	74	ND
Mean ± s.d.		6,983 ± 4,096b	99 ± 71a	-

* ND, non-detectable (OTC < 5 ppb).

** Group means in the same column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

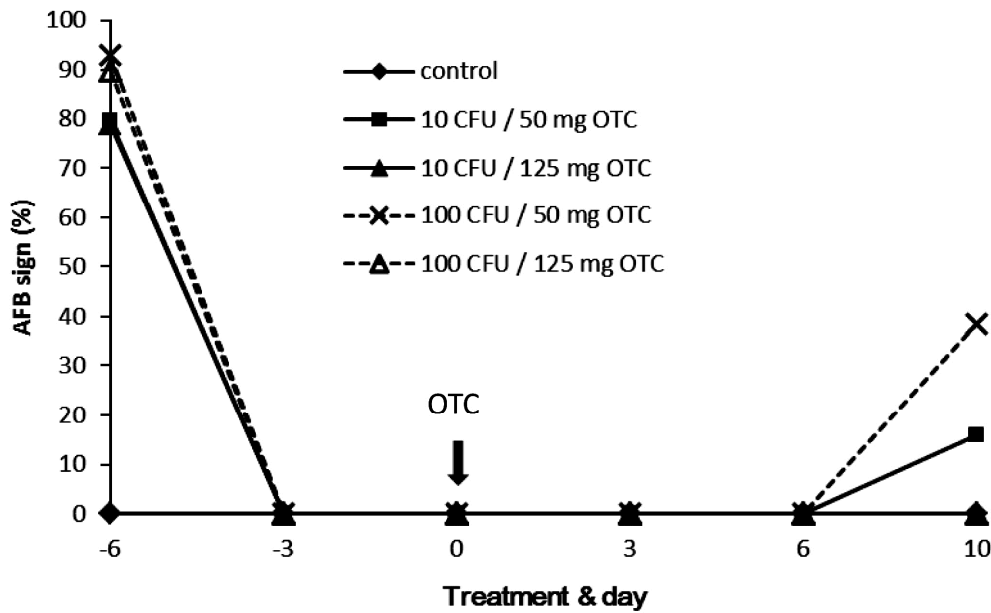
二、田間蜂蜜樣品中 OTC 殘留測定

利用蜂蜜中 OTC 殘留檢測法，蜂蜜樣品先由 DSC-Ph 固相萃取管柱淨化，再用 HPLC 進行分析，檢測其蜂蜜樣本的殘留量。試驗蜂群在餵飼 50 mg OTC 劑量的結果顯示，施藥前各試驗蜂群的蜂蜜樣本皆無抗生素殘留，另檢測施藥後 10 及 20 日所搖除的蜂蜜樣本，所有的樣本皆可檢出 OTC 殘留（表一），其平均殘留量為分別為 2,625 ± 695 及 40 ± 38 ppb；在施藥後 30 日所搖除的蜂蜜樣本中，餵飼 50 mg OTC 的試驗蜂群則皆未檢測出 OTC 殘留 (OTC < 5 ppb)。另外在試驗蜂群餵飼 125 mg OTC 劑量的結果顯示，施藥前各試驗蜂群的蜂蜜樣本亦皆無抗生素殘留，但施藥後第 10 及 20 日所搖除的蜂蜜樣本，所有的樣本也皆可檢出 OTC 殘留，其平均 OTC 殘留量分別為 6,983 ± 4,069 及 99 ± 71 ppb；而施藥後 30 日所搖除的蜂蜜樣本，也有 2 群蜜蜂檢測出 OTC 殘留，其殘留量分別為 8 與 25 ppb。此結果說明餵食 50 與 125 mg OTC 的試驗蜂群，皆必須經過 2 次以上搖除儲蜜，才能有效將其 OTC 殘留量降低至 25 ppb 以下。

討 論

一、OTC 對 AFB 的防治效果

許多抗生素藥劑具有控制 AFB 蔓延的效果 (Moffett *et al.*, 1970)，Chen *et al.* (2002b) 的實驗中餵飼一次含 OTC 125 及 50 mg 的糖漿即可有效控制 AFB 病徵的發生；且 Chen *et al.* (2002a) 的實驗中指出，幼蟲食物中添加 OTC 低於 25 ppm 的處理組，幼蟲生長情形與正常狀態下無顯著差異。本研究特別選取對 OTC 具低敏感性的本國分離菌株，將 OTC 糖漿餵飼健康蜂群，再於 OTC 處理前、後接種低和高劑量 *P. larvae* 孢子於標的幼蟲，因此只要觀察標的幼蟲的存活情形，即可評估以 OTC 來防治耐藥性 *P. larvae* 的適用性與藥效持續的時間。結果可發現蜂群餵飼 1 次 800 mL 含 125 mg OTC 的糖漿後 (圖五)，立即出現防治藥效，而且可以完全抑制 AFB 病徵的發生至少達 13 日 (施藥前 3 日 + 施藥後 10 日)，這段期間所有接種孢子的幼蟲皆未出現 AFB 病徵。然而，餵飼 1 次 800 mL 含 50 mg OTC 的糖漿後 (圖五)，能與餵飼



圖五 蜂群分別餵飼 50 與 125 mg OTC 糖水處理前後 1 日齡幼蟲接種 *P. larvae* 孢子的平均發病率。
 Fig. 5. The AFB disease incidence of 1-day-old larvae infected with *P. larvae* spores, which the honeybee colonies were medicated with 50 and 125 mg OTC syrup respectively.

125 mg OTC 之組別一樣立即具有防治藥效，但防治效果稍低，提前於施藥後 10 日接種低和高劑量孢子者分別出現 5.88 和 38.4% 的 AFB 罹病體（圖五）。其中可觀察到，OTC 對餵藥前 3 日的幼蟲具有如治療的效果，Chen *et al.* (2002b) 指出，只要在室內飼養幼蟲的食物中添加 0.2 ppm 的 OTC，即可達到抑制 AFB 發生的效果，亦可對於感染 *P. larvae* 達 4 日齡的幼蟲具有類似治療的效果，然而本試驗是餵予成年工蜂，OTC 須經由餵食行為傳給幼蟲，結果亦與 Chen *et al.* (1997) 的結果相似，本研究餵給成蜂的 OTC 糖漿濃度達 50 ppm 以上，顯示只要其中約 1/250 傳遞至幼蟲食入，就能有效防治 AFB 病徵的發生至少達 9 日（施藥前 3 日 + 施藥後 6 日）。另外低濃度的 OTC 處理組中，於施藥後 10 日接種孢子出現了 AFB 病徵，可能與進行第一次搖除儲蜜

有相當大的關係，此舉大幅的降低 OTC 的殘留，但仍有少量殘留的 OTC 可能存在於成蜂體內及巢房內未搖淨的蜂蜜中，經由餵食行為抑制了 AFB 病徵的發生，發病率依然低於實驗前，而高劑量的組別中於餵藥 20 日後仍可檢測到近 0.1 ppm 的 OTC（表一），且 OTC 殘存於成蜂體內的劑量較高，很可能因此尚無發病現象。綜觀本文結果，雖然人為接種本土耐藥性 *P. larvae* 的孢子於 1 日齡蜜蜂幼蟲，但 OTC 的防治藥效似乎並無明顯減退的現象，本文中無論是餵飼 50 mg 或 125 mg OTC 之組別，皆可有效防治 AFB 病徵的發生至少達 9 日。

二、蜂蜜中 OTC 殘留測定探討

就 OTC 殘留量而言，歐盟訂定的蜂蜜中 OTC 殘留暫行標準在 25 ppb 以下

(EMEA/CVMP/581586/2008)，本研究已建立蜂蜜中 OTC 殘留的檢測法，經由固相萃取方式，檢測其蜂蜜樣本的殘留量，確認了 HPLC 適合用於檢測四環素類的殘留 (Peres *et al.*, 2010)。從表一可發現餵飼 50 或 125 mg OTC 組的試驗蜂群，檢測施藥後 10 及 20 日所搖除的蜂蜜樣本，其平均 OTC 殘留量分別為 $2,625 \pm 695$ 、 $6,983 \pm 4,069$ 及 40 ± 38 、 99 ± 71 ppb；於施藥後 30 日所搖除的蜂蜜樣本中，餵飼 50 mg OTC 的試驗蜂群皆未檢測出 OTC 殘留，而餵飼 125 mg OTC 的試驗蜂群則部分檢測出 OTC 殘留，其殘留量為 8~25 ppb。

此結果顯示，無論餵飼 50 或 125 mg OTC 的蜂群均可藉由搖除儲蜜的方法以減少其殘留量，但如果要達到歐盟的規定，則須搖除 2 次以上的儲蜜才能有效將 OTC 殘留減低至 25 ppb 以下。Tayar *et al.* (2010) 檢測四環素類在蜂蜜中的穩定性，經過儲存了 60 天與 UV 光的照射之後，OTC 減少了 97%。Matsuka and Nakamura (1990) 測得在 25°C 蜂蜜環境下 OTC 的半衰期為 70 天，35°C 的半衰期為 42 天；另外許多養蜂業者為了防止發酵與結晶會將蜂蜜做熱處理的加工程序，Molino *et al.* (2011) 則使用了巴氏德殺菌法 (pasteurization) 處理含有 OTC 的蜂蜜，能夠減少 10.2% 的 OTC 殘留，但經過了 180 天的儲存後，四環素類依然有近 20% 的殘留。OTC 在蜂蜜中的殘留是個難以解決的問題，本文則以蜂農生產端看待此問題，由本實驗結果得知，若經過搖除儲蜜的程序，可大幅度且快速的減少 OTC 的殘留，蜂群如施用 OTC 來防治 AFB，需停止生產蜂蜜一個月並於停產期間搖除 2 次以上儲蜜才能達到合乎歐盟標準的殘留量。值得注意的是，目前，歐盟各國也尚未核准 OTC 在養蜂業的使用，並且 OTC 的最大殘留限制 (maximum residual

limits) 及人類每日最大攝取量 (acceptable daily intake) 也一直為歐盟各國爭論的議題 (Molino *et al.*, 2011)。

由於 OTC 只能抑制幼蟲芽孢桿菌營養體的增殖，無法殺滅病原孢子 (Chen *et al.*, 2008)，所以搖除的蜂蜜也不可用於餵飼蜂群，以避免病原孢子的傳播 (Chen *et al.*, 2002a)。如果要延長防治天數就須經常給予藥劑，但這可能存在著會使本土菌株產生耐藥性增強的風險，Chen *et al.* (2001) 已證實可藉由換箱處理，並搭配使用一次 50 mg 的 OTC 即可降低甚至隔絕孢子。根據本研究的結果，OTC 在蜂蜜中的殘留問題的確為一大隱憂，AFB 的防治應倚靠長期監測蜂蜜中的孢子含量，Chen *et al.* (2001) 已指出，輕微感染 AFB 的蜂群，只需使用換箱處理，並換以新巢脾，則蜂蜜中孢子即不再檢出。此外已有報告指出，乳酸菌 (lactic acid bacterium, LAB) 運用在防治 AFB 可得到一定的效果 (Yoshiyama *et al.*, 2013)，不過 LAB 似乎是提升了蜜蜂幼蟲本身的免疫反應，這與 OTC 抑制 *P. larvae* 營養體的增殖 (Chen *et al.*, 2008) 有所差異性，但是 LAB 或許可成為另一種替代 OTC 使用的益生菌。

誌謝

本文蒙動植物防疫檢疫局科技計畫經費補助 (96 農科-14.2.1-檢-B6)，謹此誌謝。

引用文獻

Alippi AM. 2000. Is terramycin losing its effectiveness against AFB? The Argentinean experience. *Bee Bizz* 11: 27-29.

- Alippi AM, Lopez AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar OM.** 2007. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood (AFB) disease in honeybee. *Vet Microbiol* 125: 290-303.
- Anonymous.** 2008. Summary opinion of the committee for medicinal products for veterinary use on the establishment of maximum residue limits. EMEA/CVMP/581586/2008. London, 14 November 2008.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Piccini C, Corbella E, Zunino P.** 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J Invertebr Pathol* 86: 56-58.
- Chen YW, Wang CH, Ho KK.** 1997. Pathogenicity of *Bacillus larvae* to the larvae of honeybee (*Apis mellifera*). *Formosan Entomol* 17: 23-32. (in Chinese)
- Chen YW, Wang CH, An JK, Ho KK.** 2000. Susceptibility of the Asian honey bee, *Apis cerana*, to American foulbrood, *Paenibacillus larvae larvae*. *J Apicult Res* 39: 169-175.
- Chen YW, Liu JS, Ho KK, Wang CH, An J.** 2001. Control effects of oxytetracycline on American foulbrood, *Paenibacillus larvae* of honeybee, *Apis mellifera*. *Formosan Entomol* 21: 209-220. (in Chinese)
- Chen YW, Huang GY, Ho KK.** 2002a. Detection and application of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey. *Formosan Entomol* 22: 261-270. (in Chinese)
- Chen YW, Wang CH, Ho KK.** 2002b. Effects of oxytetracycline on larval honeybee, *Apis mellifera*, reared in vitro. *Formosan Entomol* 22: 53-64. (in Chinese)
- Chen YW, Cheng HC, Huang CU.** 2008. American foulbrood spores in honey samples in Taiwan. *Formosan Entomol* 28: 133-143. (in Chinese)
- Cox RL.** 2000. Incidence of oxytetracycline-resistance *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Iowa. *Amer Bee J* 140: 903.
- Evans DJ.** 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 83: 46-50.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikainen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwiski J, Fries I.** 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 501-511.
- Goodwin RM, Perry JH, Houten AT.** 1994. The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *J Apicult Res* 34: 209-212.
- Hornitzky MAZ, Clark S.** 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American

- foulbrood. *J Apicult Res* 30: 13-16.
- Matheson A.** 1995. World bee health update. *Bee World* 76: 31-39.
- Matsuka M, Nakamura H.** 1990. Oxytetracycline residues in honey and royal jelly. *J Apicult Res* 29: 112-117.
- Miyagi T, Peng CYS, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH.** 2000. Verification of oxytetracycline-Resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J Invertebr Pathol* 75: 95-96.
- Molino F, Lázaro R, Pérez C, Bayarri S.** 2011. Effect of pasteurization and storage on tetracycline levels in honey. *Apidologie* 42: 391-400.
- Moffett JO, Hitchcock JD, Lockett JJ, Elliot JR.** 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. *J Apicult Res* 9: 111-119.
- Nordström S, Fries I.** 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J Apicult Res* 34: 97-103.
- Pena A, Pelantova N, Lino CM, Silveira MIN, Solich P.** 2005. Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 53: 3784-3788.
- Peres GT, Rath S, Reyes FGR.** 2010. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food Control* 21: 620-625.
- Pernal SF, Melathopoulos AP.** 2006. Monitoring for American foulbrood spores from honey and bee samples in Canada. *Apiacta* 41: 99-109.
- Piccini C, Zunino P.** 2001. American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J Invertebr Pathol* 78: 176-177.
- Reybroeck W, Daeseleire E, De Brabander HF, Herman L.** 2012. Antimicrobials in beekeeping. *Vet Microbiol* 158: 1-11.
- Riessberger-Gallé U, Ohe W von der, Crailsheim K.** 2001. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. *J Invertebr Pathol* 77: 231-236.
- Shimanuki H, Knox DA.** 1988. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am Bee J* 128: 353-354.
- Steinkraus KH, Morse RA.** 1992. American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. *Apidologie* 23: 497-501.
- Tayar G, Rath S, Guillermo F, Reays R.** 2010. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey.

Food Control 21: 620-625.

Yen DF, Chyn LC. 1971. Studies on a bacterial disease of honeybee in Taiwan. Plant Prot Bull 13: 12-17. (in Chinese)

Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C. 2013. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. J Invertebr Pathol 112: 62-67.

收件日期：2012年12月10日

接受日期：2013年2月12日

The Effect of Oxytetracycline to Control American Foulbrood in Honeybee, and the OTC Residue in Honey

Chong-Yu Ko, Hao-Chun Cheng, Chun-Ting Chen, and Yue-Wen Chen*

Department of Biotechnology and Animal Science, National I-Lan University, I-Lan, Taiwan

ABSTRACT

American foulbrood (AFB) is a severe bacterial disease in larval honeybee (*Apis mellifera*) caused by the spores of *Paenibacillus larvae*. Because several reports have documented oxytetracycline (OTC) resistance in *P. larvae* in some regions, we used OTC-tolerated spores isolated from an apiary in Taiwan as the source of inoculum to conduct a field experiment to test the efficacy of OTC and determine the OTC residue levels in the honey extracted. The 1-day-old larvae from 8 strong honeybee colonies were each inoculated by *P. larvae* spores, and the colonies were fed sugar syrup containing 50 and 125 mg OTC respectively. The results showed that two doses of OTC could effectively control AFB. All honey of the experimental colonies was removed at 10, 20 and 30 days after medication to check for OTC residue in the honey. The results showed that there was no detectable residue left in the honey at 30 days after the 50 mg OTC medication, but 8 and 25 ppb were detected respectively in two of the colonies that had received a 125 mg dosage application on the same sampling date. Our results show that OTC medication still provides good control against infection of OTC-tolerated spores. However, the contaminated honey needs to be removed twice in a row to decrease the OTC residues in the honey to below the required 25 ppb.

Key words: American foulbrood, honeybee, oxytetracycline, control, residue

* Corresponding email: chenyw@niu.edu.tw