

幼蟲芽孢桿菌對蜜蜂的致病力

陳裕文* 王重雄 何鎧光 國立台灣大學植物病蟲害學系 台北市羅斯福路四段 1 號

摘 要

利用人工接種幼蟲芽孢桿菌 (*Bacillus larvae*) 孢子於 1 日齡工蜂幼蟲，發現幼蟲罹病率與死亡率並無季節性的差異，LD₅₀ 及 LD₉₅ 分別為 21 個孢子與 442 個孢子，顯示病原孢子對此齡幼蟲有很高的致病力。罹病幼蟲進入封蓋期 (capping stages) 後才會呈現典型美洲幼蟲病 (American foulbrood) 的病徵，高劑量的感染會造成部分幼蟲 (13.8%-23.3%) 無法進入封蓋期。相對於 1 日齡幼蟲的高致病力，此病原孢子對 2 日齡幼蟲的致病力大為降低，接種高劑量孢子 (4.5×10^4 個孢子) 只有 37.2% ± 3.4% 的死亡率。幼蟲芽孢桿菌對 3 日齡幼蟲的致病力極低，接種同一劑量孢子仍無罹病蟲體的出現。

關鍵詞：蜜蜂、幼蟲芽孢桿菌、美洲幼蟲病、致病力

前 言

美洲幼蟲病 (American foulbrood, 以下簡稱 AFB) 是西洋蜂 (*Apis mellifera*) 最嚴重的疾病 (Morse, 1978)，染病蜂群若無妥善處理，除了會導致該染病蜂群滅亡外，更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 發生的報導 (Matheson, 1993)；無可避免的，台灣於 1967 年首度發現 AFB 後 (Yen and Chyn, 1971)，此病至今仍嚴重地威脅台灣養蜂業。引發

AFB 的病原體為幼蟲芽孢桿菌 (*Bacillus larvae*)，此菌只有孢子期具有感染力，工蜂、雄蜂和後蜂的幼蟲皆會感病 (Rinderer and Rothenbuhler, 1969)。

幼蟲芽孢桿菌對蜜蜂幼蟲的致病力，與日齡蟲的大小關係密切 (Bamrick and Rothenbuhler, 1961; Bamrick, 1967)，蜜蜂的品系亦影響 *B. larvae* 的致病力表現 (Rothenbuhler and Thompson, 1956)。Woodrow (1942) 將 *B. larvae* 孢子滴加於幼蟲食物研究其致病力，Bucher (1956) 則綜合 Woodrow 的資料估算出 *B. larvae* 孢子對 1 日齡幼蟲的致死中量 (LD₅₀) 為 35 個孢

* 抽印本索取及論文聯繫之負責人

子。Hoage and Rothenbuhler (1966) 利用相同的方法，發現病原體對孵化 3 小時幼蟲的 LD₅₀ 即達 187-275 個孢子，與前者差異甚大。為探討其致病力是否與地區性的蜜蜂品系或感染季節的不同有關，本研究以台灣地區分離所得 *B. larvae* 孢子為接種源，探討病原孢子對本地飼養西洋蜂群幼蟲的致病力，並比較季節因子對其致病力的影響。

材料與方法

一、試驗蜂群與接種源

西洋蜂係於 1995 年 7 月購自新竹一處養蜂場，以可容 10 片巢脾的單箱飼養於台大昆蟲館，視外界蜜粉源狀況補充糖漿（果糖：水 = 2:1, v/v）和花粉，提供試驗的 8 群蜂其工蜂族群皆滿 9 片且有 1 隻正常產卵的后蜂。*B. larvae* 孢子接種源取自台大蜂場於 1994 年 8 月自然罹患 AFB 的蜂群，將罹病巢脾保存於 -20 °C，接種試驗前以小刮勺取出 50 隻罹病蟲體，加入適量的無菌水以振盪器混勻成懸浮液。懸浮液以 500 rpm, 4 °C 離心 10 分鐘去除蟲體碎片，上清液再以 5000 rpm, 4 °C 離心 30 分鐘，捨棄上清液，沉澱物則加入 10 ml 無菌水，並以振盪器重新混勻後即為接種源孢子源。接種源以血球計數器 (haemocytometer) 在光學顯微鏡下估算懸浮液的孢子濃度為 $4.5 \times 10^9 / \text{ml}$ ，保存於 4 °C。

二、幼蟲接種試驗

以隔王板將蜂群分隔為 2 區，有王區含 1 片完整幼蟲脾和 1 片未含幼蟲與卵的空脾，如此可誘使后蜂集中產卵於空脾上；24 小時後移出后蜂，可於空脾上獲得約 1000 粒同日齡的卵。卵期設定為 72 小時，卵脾置於無王區 3 日後即得 1 日齡幼蟲，放置 4 或 5 日則得 2 與 3 日齡幼蟲。以上述 3 個日

齡幼蟲為供試蟲源，進行下列試驗：

(一) 接種幼蟲的孢子殘留率

選取 1 日齡幼蟲 30 隻，分別以微量吸量管 (Gilson, P2) 滴加 1 μl 孢子懸浮液 (4500 孢子 / μl) 於幼蟲食物池中，次日以 100 μl 無菌水沖洗 15 隻接種幼蟲與其巢房 4 次，另 15 隻幼蟲則於二日後沖洗之。分別收集各幼蟲巢房沖洗液置於 80 °C 加熱 10 分鐘去除雜菌，取其中 200 μl 塗盤於 BHIT (Difco, brain-heart infusion supplemented with 0.1 ppm thiamine) 平板上，置於 37 °C 培養 4 日。平板上菌落依其形成的時間與菌落形態，並結合過氧化氫沖測試 (catalase test) 為陰性與革蘭氏染色 (Gram-stain) 陽性等性質 (Steinkraus and Morse, 1992)，判定各平板上 *B. larvae* 的菌落數，以估算 CFU 值 (colony-forming units)。相同方法於接種次日沖洗 15 個與接種幼蟲相鄰的幼蟲房，對照組則將 1 μl 的孢子懸浮液以 400 μl 無菌水稀釋，加熱後取 200 μl 塗盤於 BHIT 平板，以檢測孢子殘留於接種巢房和污染未接種巢房的程度。

(二) *B. larvae* 孢子對一日齡幼蟲的致病力

於 1995 年 11-12 月 (15-20 °C) 取出 8 群蜜蜂 1 日齡幼蟲脾，選取距離巢脾周緣 3 cm 以上的幼蟲 30-35 隻為一處理區，各處理區間隔 3 個巢房以上，並以塑膠透明片標示選取幼蟲的位置。處理區內幼蟲分別以微量吸量管滴加 1 μl 相同濃度的孢子懸浮液，共分為 7、17、33、72、167、333、3,333 與 33,333 等不同孢子劑量的處理區，對照組則滴加等量的無菌水，每個處理進行 3-8 重覆。幼蟲接種完畢後，巢脾隨即置回原蜂群。俟幼蟲進入封蓋期 (capping stage)，抖去處理巢脾上的成蜂，記錄各處理的封蓋幼蟲數後，巢脾移入 34 °C, 70 % R.H. 的生長箱，9 日後取出觀察蛹體的存活

率與 AFB 發病率；部分死亡蟲體未呈現典型 AFB 病徵者，依 Hornizky and Wilson (1989) 方法判定是否為 *B. larvae* 感染，並分別計算出 LD₃₀、LD₅₀、LD₇₀ 和 LD₉₅ 之劑量。

(三) *B. larvae* 孢子感染的季節性變異和對二、三日齡幼蟲的致病力

將試驗(二)的 8 群蜜蜂均分為 2 組，取其中 4 群 1 日齡幼蟲於 1996 年 5 月中旬 (25-30 °C) 進行接種試驗，接種的方式與觀察的方法亦同試驗(二)，接種的孢子量則為應用試驗(二)的資料分析所得之 LD₃₀、LD₅₀、LD₇₀ 和 LD₉₅ 劑量與無菌水對照組，以比較 *B. larvae* 於冬初與初夏所表現的致病力。另 4 群蜂則提供 2 和 3 日齡幼蟲進行接種，接種劑量為 45、450、4,500、45,000 個孢子與無菌水，以探討 *B. larvae* 對 2 和 3 日齡幼蟲的致病力。

結 果

一、幼蟲房的孢子殘留率

純化的 *B. larvae* 孢子 (4,500 個孢子) 以 BHIT 為培養基，於 37 °C 培養 4 日可形成 264-404 個菌落，菌落數平均為 331.60，

孢子萌發率平均為 7.4%。*B. larvae* 為專性病原體 (obligate pathogen)，因此孢子於培養基的萌發率較低 (Nordstrom and Fries, 1995)。接種 *B. larvae* 孢子的幼蟲房，僅於接種次日可檢測出孢子的殘留，於 2 日後則未能檢出；前者雖可檢測發現 46.7% 幼蟲房有孢子殘留，但孢子殘留量極低，沖洗液經培養可形成 0-12 個菌落，平均菌落數僅 2.14，因此接種的孢子於 24 小時後僅有 0.64% 仍殘留於原幼蟲房 (表一)。此外，於接種次日檢測與接種孢子幼蟲房相鄰的巢房，可發現 13.3% 幼蟲房有孢子的污染，但孢子污染率極微，平均僅有 0.26 (0-2) 個菌落，表示接種的孢子於 24 小時後僅有 0.13% 孢子會污染相鄰幼蟲房。上述資料顯示，一日齡工蜂幼蟲可於 24 小時內將大部分接種的孢子食入，而且接種孢子污染其他巢房的情形十分輕微。

二、*B. larvae* 孢子對一日齡幼蟲的致病力

於冬初將不同劑量之 *B. larvae* 孢子接種 1 日齡幼蟲的結果如表二所示。由於試驗期間外界氣溫約為 15-20 °C，幼蟲區保溫不易，因此接種無菌水之對照組在封蓋期前有 22.4% ± 7.1% (mean ± S.D.) 幼蟲被工蜂移除，但其餘進入封蓋期的幼蟲 (77.6%

表一 接種 4.5×10^3 幼蟲芽孢桿菌孢子於 1 日齡工蜂幼蟲的殘留孢子數

Table 1. Residue of spores after inoculating 1-day-old worker larvae with 4.5×10^3 *B. larvae* spores/ larva

Investigation period	N	Bacterial colonies (range)	Residue (%) ^a	Residue cells/N (%) ^b
1st day				
Inoculated cells	15	2.14 (0-12)	0.64	46.7
Neighbor cells	15	0.26 (0-2)	0.13	13.3
2nd day				
Inoculated cells	15	0	0	0
Control	5	331.60 (264-404)	—	—

^a (Residue of spores /inoculating spores) × 100%.

^b (Observed cells containing residue of spores / N) × 100%.

± 5.8%) 則於封蓋 9 日後檢視發現全數存活。接種 *B. larvae* 孢子的幼蟲，其死亡率隨接種劑量的增加而遞增，接種高劑量孢子 (3,333 孢子 / 幼蟲以上) 者全部死亡；接種中劑量孢子 (72-333 孢子 / 幼蟲) 者，死亡率隨孢子劑量呈緩慢遞增之趨勢，蛹體平均存活率為 6.9%-18.8%，校正死亡率為 79.0%-90.9%；接種低劑量孢子 (7-33 孢子 / 幼蟲) 者，各處理組間的存活率與校正死亡率均隨孢子劑量的增加而顯著的遞增 ($P < 0.05$)，其平均存活率為 32.5%-59.2%，校正死亡率則為 24.4%-57.6%。將死亡率資料以 log-probit 程式分析得迴歸方程式為 $Y = 3.34 + 1.25X$ ($\chi^2 = 3.2 < \chi^2_{0.05, 5}$, $df = 11.1$)，以此方程式估算 *B. larvae* 孢子對 1 日齡幼蟲的致死劑量為 $LD_{30} = 8$, $LD_{50} = 21$, $LD_{70} = 56$ 和 $LD_{95} = 442$ 孢子。

表二中亦可發現，接種中、高劑量者於封蓋前遭工蜂移除的比例顯著高於對照組 ($P < 0.05$)，比對照組高出 13.8%-23.3%，接種低劑量者則移除率與對照組沒有顯著差

異 ($P > 0.05$)，顯然中、高劑量的孢子會造成部分幼蟲無法進入封蓋期。在封蓋期蟲體感染 AFB 的比例上，接種高劑量者蟲體呈現典型 AFB 病徵者的比例達處理幼蟲數一半以上 (53.3%-60.0%)，中劑量為 44.2%-48.7%，低劑量則為 15.0%-36.6%；中、高劑量的差異不大，此乃部分幼蟲於封蓋前即遭工蜂移除，降低了各處理組間的差距。惟檢視 AFB 罹病蟲體佔封蓋幼蟲的比例，各處理組均有顯著的差異 ($P < 0.05$)，高劑量處理之封蓋蟲體罹病率 100%，中劑量為 71.0%-86.6%，低劑量為 20.1%-52.3%。同時，各處理組的封蓋蟲體罹病率與其校正死亡率十分接近，約僅略低 0%-8%，因此觀察封蓋蟲體的罹病率亦可作為幼蟲接受 *B. larvae* 孢子的劑量估值。

利用上述接種試驗估算所得致死劑量，於隔年初夏接種 LD_{30} , LD_{50} , LD_{70} 與 LD_{95} 劑量孢子於 1 日齡工蜂幼蟲，以比較病原孢子於不同季節之致病力。由於本次試驗期間外界氣溫達 25-30 °C，幼蟲區的溫度易維持

表二 冬季 (15-20 °C) 接種不同劑量幼蟲芽孢桿菌孢子於 1 日齡工蜂幼蟲的死亡率
Table 2. Mortality of 1-day-old worker larvae after inoculation with various doses of *B. larvae* spores in winter season (15-20 °C)

No. spores inoculated	Total larvae treated ^a	Living pupae (%)	Missing larvae (%)	AFB/treated cells (%)	AFB/capped cells (%)	Corrected mortality ^b (%)
33,333	90	0 ± 0 a ^c	46.7 ± 12.0 c	53.3 ± 12.0 ef	100 ± 0 f	100 ± 0 f
3,333	90	0 ± 0 a	40.0 ± 8.8 bc	60.0 ± 8.8 f	100 ± 0 f	100 ± 0 f
333	230	6.9 ± 2.2 ab	44.4 ± 15.7 c	48.7 ± 16.5 def	86.6 ± 6.6 e	90.9 ± 2.5 ef
167	180	9.6 ± 5.5 bc	46.2 ± 10.6 c	44.2 ± 9.7 cde	82.1 ± 8.8 e	87.7 ± 6.4 de
72	180	18.8 ± 7.2 c	36.2 ± 6.7 bc	45.0 ± 4.1 cde	71.0 ± 8.8 d	79.0 ± 8.0 d
33	255	33.7 ± 8.3 d	29.7 ± 6.2 ab	36.6 ± 5.7 cd	52.3 ± 8.5 c	57.6 ± 13.8 c
17	200	40.6 ± 5.9 e	27.8 ± 6.7 ab	31.6 ± 11.5 c	43.1 ± 11.5 c	46.6 ± 10.4 c
7	200	59.2 ± 2.5 f	25.8 ± 4.2 ab	15.0 ± 4.1 b	20.1 ± 4.8 b	24.4 ± 6.8 b
Water	255	77.6 ± 5.8 g	22.4 ± 7.1 a	0 a	0 a	0 a

^a Each assay contained 30-35 larvae in a colony and 3-8 colonies were tested.

^b Corrected mortality = (1 - living pupae of treatments / living pupae of control) × 100% .

^c Means in the same column followed by the same letter are not significantly different by LSD multiple range test ($P < 0.05$).

於生長適溫 (35 °C) , 且外界粉、蜜源較充足, 因此對照組幼蟲的移除率較低, 平均為 10.3% ± 8.4% (表三), 比冬初接種時降低了 12.1% , 其餘進入封蓋期的 89.7% ± 8.4% 幼蟲亦於 9 日後檢視發現全部存活, 並無出現 AFB 病徵者。接種 *B. larvae* 孢子的幼蟲, 其存活率隨接種孢子劑量的增加而降低, 各處理組的校正死亡率均接近於期望值, 顯示 *B. larvae* 孢子對 1 日齡幼蟲的致病力並沒有季節性的差異。此外, 接種 LD70 與 LD95 劑量的幼蟲移除率亦顯著高於對照

組 ($P < 0.05$) , 顯示中、高劑量的孢子確會造成部分幼蟲無法進入封蓋期。再者, 各處理組的封蓋蟲體罹病率亦十分接近於校正死亡率, 僅略低 0%-9.6% , 上述現象均與冬初接種時相同。

三、*B. larvae* 孢子對二、三日齡幼蟲的致病力

接種 $4.5 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^4$ 劑量孢子於 2 日齡幼蟲的結果 (表四), 可發現接種相當高劑量 ($4.5 \times 10^3-4$ 孢子 / 幼蟲) 存活率才會顯著降低 ($P < 0.05$) , 值得注意的是

表三 夏季 (25-30 °C) 接種不同劑量幼蟲芽孢桿菌孢子於 1 日齡工蜂幼蟲的死亡率

Table 3. Mortality of 1-day-old worker larvae after inoculation with doses of *B. larvae* spores in summer season (25-30 °C)

No. spores inoculated	Total larvae treated ^a	Living pupae (%)	Missing larvae (%)	AFB/treated cells (%)	AFB/capped cells (%)	Corrected mortality ^b (%)
LD95 (442)	120	5.8 ± 5.7 a ^c	53.3 ± 24.2 c	40.8 ± 28.2 b	89.5 ± 9.5 e	93.7 ± 6.3 d
LD70 (56)	120	21.7 ± 19.3 a	45.0 ± 21.2 bc	33.3 ± 18.7 b	66.3 ± 15.1 d	75.9 ± 21.6 d
LD50 (21)	120	47.5 ± 13.2 b	25.0 ± 13.5 ab	27.5 ± 17.3 b	46.8 ± 5.6 c	46.8 ± 14.8 c
LD30 (8)	119	70.6 ± 9.9 c	11.7 ± 7.9 a	17.7 ± 11.6 ab	19.7 ± 8.6 b	21.4 ± 7.9 b
Water	117	89.7 ± 8.4 d	10.3 ± 8.4 a	0 a	0 a	0 a

^a Each assay contained 29-30 larvae in a colony and was performed with 4 colonies.

^b Corrected mortality = (1 - living pupae of treatments / living pupae of control) × 100% .

^c Means in the same column followed by the same letter are not significantly different by LSD multiple range test ($P < 0.05$).

表四 夏季 (25-30 °C) 接種不同劑量幼蟲芽孢桿菌孢子於 2 日齡工蜂幼蟲的死亡率

Table 4. Mortality of 2-day-old worker larvae after inoculation with various doses of *B. larvae* spores in summer season (25-30 °C)

No. spores inoculated	Total larvae treated ^a	Living pupae (%)	Missing larvae (%)	AFB/treated cells (%)	AFB/capped cells (%)	Corrected mortality ^b (%)
4.5×10^4	119	60.7 ± 5.3 a ^c	11.3 ± 9.8 a	28.0 ± 4.8 d	31.5 ± 2.1 d	37.2 ± 3.4 c
4.5×10^3	119	77.5 ± 8.0 b	10.2 ± 3.6 a	12.4 ± 5.1 c	13.9 ± 6.0 c	19.8 ± 5.9 b
4.5×10^2	115	90.2 ± 8.3 c	2.6 ± 4.4 a	7.3 ± 4.1 bc	7.6 ± 4.6 bc	6.5 ± 8.7 a
4.5×10^1	119	96.6 ± 0.1 c	2.3 ± 2.0 a	1.1 ± 1.9 ab	1.1 ± 1.9 ab	-0.3 ± 3.7 a
Water	117	96.5 ± 3.6 c	3.5 ± 3.6 a	0 a	0 a	0 a

^a Each assay contained 29-30 larvae in a colony and was performed with 4 colonies.

^b Corrected mortality = (1 - living pupae of treatments / living pupae of control) × 100% .

^c Means in the same column followed by the same letter are not significantly different by LSD multiple range test ($P < 0.05$).

表五 夏季 (25-30 °C) 接種不同劑量幼蟲芽孢桿菌孢子於 3 日齡工蜂幼蟲的死亡率
 Table 5. Mortality of 3-day-old worker larvae after inoculation with various doses of *B. larvae* spores in summer season (25-30 °C)

No. spores inoculated	Total larvae treated ^a	Living pupae (%)	Missing larvae (%)	AFB (%)
4.5×10^4	120	90.0 ± 6.7 a	10.0 ± 6.7 a	0
4.5×10^3	120	89.8 ± 10.2 a	10.2 ± 10.2 a	0
4.5×10^2	119	93.3 ± 3.3 a	6.7 ± 3.3 a	0
4.5×10^1	118	91.1 ± 9.6 a	8.9 ± 9.6 a	0
Water	120	96.7 ± 3.3 a	3.3 ± 3.3 a	0

^a Each assay contained 29-30 larvae in a colony and was performed with 4 colonies.

^b Means in the same column followed by the same letter are not significantly different by LSD multiple range test ($P < 0.05$).

2 日齡幼蟲食入 4.5×10^2 孢子 (相當於 1 日齡幼蟲 LD₉₅ 值) 存活率仍達 90.2% ± 8.3%，與對照組並無顯著的差異 ($P > 0.05$)；從校正死亡率的資料分析結果亦是如此，2 日齡幼蟲接種 4.5×10^3 與 4.5×10^4 劑量者，死亡率分別增加 19.8% ± 5.9% 與 37.2 ± 3.4%，但 4.5×10^2 劑量以下則死亡率無顯著差異 ($P > 0.05$)，顯示病原孢子對 2 日齡幼蟲的致病力大幅降低，接種 4.5×10^4 的高劑量仍只會造成 37.2% 的死亡率，無法藉由統計分析估算 LD₅₀ 值。在幼蟲的移除率方面，接種高劑量者雖然高於低劑量與對照組，但並無顯著差異 ($P > 0.05$)，因此接種幼蟲大部分均可進入封蓋期。此外，接種 4.5×10^1 與 4.5×10^2 劑量者，死亡率雖無顯著增加，惟其封蓋蟲體仍分別有 1.1% ± 1.9% 和 7.6% ± 4.6% 的 AFB 罹病率；接種 4.5×10^3 與 4.5×10^4 劑量者，AFB 罹病率則達 13.9% ± 6.0% 與 31.5% ± 2.1%，顯示 2 日齡幼蟲對病原孢子的感受性 (susceptibility) 雖然大幅降低，仍有部分幼蟲會罹病。

接種 $4.5 \times 10^1 \sim 4.5 \times 10^4$ 同劑量孢子於 3 日齡幼蟲的結果 (表五)，可發現各

處理組的存活率與移除率均與對照組無顯著差異 ($P > 0.05$)，而且均無出現 AFB 者，顯然，*B. larvae* 孢子對三日齡幼蟲已無致病力。

討 論

台灣地區研究 AFB 的文獻十分缺乏，僅有 Yen and Chyn (1971) 曾做病原分離鑑定的研究。本研究針對台灣地區分離的病原與飼養的蜂群加以探討，結果顯示孢子對於一日齡幼蟲 LD₅₀ 僅 21 孢子 / 幼蟲，低於 Bucher (1956) 所估算之 35 孢子 / 幼蟲，當然，更遠低於 Hoage and Rothenbuhler (1966) 的估算 (187 -275 孢子 / 3 小時幼蟲)。造成如此差異的原因，除可能與蜂群品系和孢子源有關外，本研究認為接種方法才是主要原因。早期的幼蟲接種試驗，乃以玻璃針筒盛裝孢子懸浮液後架設於機械式的微量分注器上，利用 26 或 27-gauge 針頭將 0.2 - 0.3 μl 懸浮液注入幼蟲食物池，但一日齡幼蟲體長約僅 1 mm，呈 C 字型躺於深約 1 cm 的巢房底部，如此欲把微量的孢子準確注入食物池而為幼蟲食入，實為不易，因此

Hoage and Rothenbuhlor (1966) 注入 114,000 孢子於一日齡幼蟲食物池，仍有 6%-15.7% 的幼蟲存活，Woodrow (1942) 注入 100,000 孢子，亦有 11.7% 的幼蟲存活。本研究乃利用最大吸容量 2 μ l 的微量吸量管，只需將巢脾平放即可把定量的孢子懸浮液準確地注入幼蟲巢房內的食物池中。再者，接種量為 1 μ l，亦可減低接種孢子劑量的誤差，因此接種 3,333 孢子（約為前述 1/30 劑量）時，一日齡幼蟲的死亡率即達 100%（表二）。此外，Bailey (1981) 認為幼蟲感病無明顯的季節性變化，從本研究的資料（表二、三）則再度肯定其假說，因此致病力之差異可將季節因子排除。

一日齡幼蟲對 *B. larvae* 孢子的感受性甚高，二日齡幼蟲的感受性有顯著減低（表四），三日齡幼蟲則呈完全不感性（表五），此現象可能與幼蟲中腸環境的改變有關。Bamrick (1967) 發現一日齡幼蟲接種孢子後 22 小時，即可於 75% 幼蟲的中腸發現萌發的 *B. larvae* 營養體，但 2 日齡幼蟲則於 25 小時僅有 55% 幼蟲的中腸有營養體，且數目較前者為少；Bamrick (1964) 則發現孵化 51 小時的幼蟲（約 3 日齡）接種孢子 30 小時後鏡檢，雖仍可發現少數萌發的營養體，但此後檢視則未再發現營養體，顯然末齡幼蟲的中腸環境已不利於 *B. larvae* 的萌發與增殖。Rose and Briggs (1969) 收集抗性與感性品系一日齡幼蟲的食物，發現前者對 *B. larvae* 孢子的萌發與營養體的增殖均有較高的抑制能力；Rinderer and Rothenbuhler (1974) 則發現添加花粉於幼蟲食物中，可降低幼蟲感染 *B. larvae* 的死亡率。再從護士蜂 (nurse bees) 餵予幼蟲食物的角度觀之，一日齡幼蟲的食物乃是下咽頭腺 (hypopharyngeal gland) 分泌的澄清狀物質，二日齡幼蟲食物則再加入大顎腺

(mandibular gland) 分泌的乳白狀物質，三日齡起則食物中開始添加花粉 (Winston, 1987)。從上述現象分析，中、末齡幼蟲可能因食物的改變，造成 *B. larvae* 對其致病力的減低。

美洲幼蟲病的發病過程 (pathogenesis)，一般認為 1-2 日齡的幼蟲取食有孢子污染的食物後，孢子可在 24 小時內於中腸萌發增殖，但隨後中腸的環境已不利營養體的增殖而被抑制，直到染病幼蟲化蛹時才會穿越中腸壁，進入血體腔 (haemocoel) 大量增殖而造成蟲體敗血症死亡，此時期已是 10-15 日齡 (Bailey, 1981)。從本接種試驗的結果（表二、三）顯示，高劑量的孢子會造成部分幼蟲於封蓋期 (6 日齡) 前遭工蜂移除，Bamrick (1964) 接種 15,000 個孢子於 3 小時幼蟲，2.5 日後即在幼蟲的腸道和血體腔中發現營養體，因此工蜂移除者可能即是重度感染死亡的幼蟲，此現象適足以說明早期發現蜂群感染 AFB 的困難性，因為封蓋期前死亡的幼蟲迅速為工蜂清除，發現不易，進入封蓋期死亡者又有封蓋的覆蓋而難以觀察發現，因此蜂群如發現巢脾有明顯凹陷封蓋房且有特殊的魚臭味時，已屬重度感染 AFB。目前有許多研究者探討蜂群罹病程度與蜂群儲蜜含孢子數的關係 (Shimanuki and Knox, 1988; Hornitzky and Clark, 1991; Steinkraus and Morse, 1992; Derakhshifar, 1994)，冀望可以早期發現感染 AFB 的蜂群，以避免 AFB 在蜂場的蔓延。

人為感染 AFB 於蜂群的方式有二，一是將定量孢子添加於餵飼的糖漿或花粉餅 (Gochnauer, 1970; Hansen *et al.*, 1988)，經由成蜂將孢子傳遞予幼蟲；另一方式則將定量的孢子直接添加於標的幼蟲之食物池內。前者藉由間接的方式感染幼蟲，幼蟲實

際接受孢子的劑量受成蜂活動因子的影響甚鉅，尚且經常以目視檢查巢脾中出現典型 AFB 病徵數作為感染指標，忽略了在封蓋期前即被移除的感染者，因此常見接種相同孢子數的蜂群，卻有明顯不同的感染結果。後者即是本研究採行的方法，可精確地控制幼蟲接受的孢子量，而且接種孢子污染其他未處理幼蟲的程度極微，表一中發現孢子殘留的相鄰幼蟲房，幼蟲食入的機率不高，因為本接種試驗中未曾發現對照組或其他無處理幼蟲感染 AFB 者。再者，接種的幼蟲脾進入封蓋期即移出蜂箱，一則可排除工蜂的清潔行為 (hygienic behavior) 而準確地觀察接種幼蟲出現 AFB 病徵的比例，再則可避免接種幼蟲產生大量 *B. larvae* 孢子而感染其他幼蟲，因此本研究的實驗蜂群於 1995 年 12 月進行第一次接種試驗後，於 1996 年 5 月再次進行試驗前，蜂群仍未發生 AFB。目前評估防治 AFB 藥劑效果的方法，多將防治藥劑施用於感染 AFB 的蜂群 (Moffett *et al.*, 1970; Hoopingartner and Nelson, 1988)，或將防治藥劑與孢子同時施用於蜂群 (Oldroyd *et al.*, 1989)，以評估防治效果與藥效持續的時間，惟其孢子接種的途徑與罹病調查的方法皆採行前述間接的方式，因此所得結果無可避免地變異較大。利用本研究估算得 LD 值與接種技術，則可以做較精確的藥效評估；即於藥劑施用之前、後直接接種 LD₅₀ 或 LD₉₅ 劑量孢子於標的幼蟲，如此則可正確地評估防治率與藥效持續的時間，以提供蜂群防治 AFB 用藥的參考。

誌 謝

本研究蒙農委會 85 科技-1.6-糧-32(9) 經費補助，投稿期間，復蒙審稿委員細心斧正，作者衷心誌謝。

參考文獻

- Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. Academic Press, New York. 124 pp.
- Bamrick, J. F. 1964. Resistance to American foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *J. Insect Pathol.* 6: 284-304.
- Bamrick, J. F. 1967. Resistance to American foulbrood in honey bees. VI. Spore germination in larvae of different ages. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 30-34.
- Bamrick, J. F., and W. C. Rothenbuhler. 1961. Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *J. Insect Pathol.* 3: 381-390.
- Bucher, G. E. 1956. General summary and reviews of utilization of disease to control insects. *Proc. 10th Int. Congr. Entomol.* 4: 695-701.
- Derakhshifar, U. 1994. Occurrence of *Bacillus larvae* spores in Austrian honeys. *Apidologie* 25: 475-476.
- Gochnauer, T. A. 1970. Experimental infections with *Bacillus larvae*. III. The effect of carrier on quantitative spore inoculation of small colonies of honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 16: 305-306.
- Goodwin, R. M., J. H. Perry, and A. T. Houten. 1994. The effect of drifting honey bees on the spread of Ameri-

- can foulbrood infections. *J. Apic. Res.* 33: 209-212.
- Hansen, H., B. Rasmussen, and F. Christensen.** 1988. A preliminary experiment involving induced infection from *Bacillus larvae*. *Tidsskrift for Planteavl* 92: 11-15.
- Hoage, T. R., and W. C. Rothenbuhler.** 1966. Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *J. Econ. Entomol.* 59: 42-45.
- Hoopingarner, R., and K. Nelson.** 1988. American foulbrood cleanup rate using three terramycin treatments. *Am. Bee J.* 128: 120-121.
- Hornitzky, M. A. Z., and S. C. Wilson.** 1989. A system for the diagnosis of the major bacterial brood disease of honeybees. *J. Apic. Res.* 28: 191-195.
- Hornitzky, M. A. Z., and S. Clark.** 1991. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.* 30: 13-16.
- Matheson, A.** 1993. World bee health report. *Bee World* 74: 176-212.
- Moffett, J. D., J. D. Hitchcock, J. J. Lockett, and J. R. Elliott.** 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foulbrood. *J. Apic. Res.* 9: 39-44.
- Morse, R. A.** 1978. Honey bee pests, predators, and diseases. Cornell Univ. Press, London. 430 pp.
- Nordstrom, S., and I. Fries.** 1995. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J. Apic. Res.* 34: 97-103.
- Oldroyd, B. P., R. D. Goodman, M. A. Z. Hornitzky, and D. Chandler.** 1989. The effect on American foulbrood of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of European foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Aust. J. Agric. Res.* 40: 691-697.
- Rinderer, T. E., and W. C. Rothenbuhler.** 1969. Resistance to American foulbrood in honey bees. X. Comparative mortality of queen, worker, and drone larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 13: 81-86.
- Rinderer, T. E., and W. C. Rothenbuhler.** 1974. The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 23: 347-350.
- Rose, R. I., and J. D. Briggs.** 1969. Resistance to American foulbrood in honey bees. IX. Effects of honey-bee larvae food on the growth and viability of *Bacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 13: 74-80.
- Rothenbuhler, W. C., and V. C. Thompson.** 1956. Resistance to American foulbrood in honey bees. I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *J. Econ. Entomol.* 49: 470-475.
- Shimanuki, H., and D. A. Knox.** 1988. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey.

- Am. Bee J. 128: 353-354.
- Steinkraus, K. H., and R. A. Morse.** 1992. American foulbrood incidence in some US and Canadian honeys. *Apidologie* 23: 497-501.
- Winston, M. L.** 1987. The biology of the honey bee. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. 281 pp.
- Woodrow, A. W.** 1942. Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *J. Econ. Entomol.* 35: 892-895.
- 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：1996年12月18日
接受日期：1997年1月18日

Pathogenicity of *Bacillus larvae* to Larvae of the Honeybee (*Apis mellifera*)

Yue-Wen Chen*, Chung-Hsiung Wang and Kai-Kuang Ho
Department of Plant Pathology and Entomology,
National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Pathogenicity of *Bacillus larvae* spores to 1-day-old larvae of the worker honeybee, *Apis mellifera*, in winter season (15-20 °C) was determined by experimental infection in Taiwan. Pooled data showed that LD₅₀ and LD₉₅ are 21 spores and 442 spores, respectively. The results revealed that 1-day-old larvae are highly susceptible to *B. larvae*. From the results of winter bioassay, 4 selected lethal doses, LD₃₀, LD₅₀, LD₇₀, and LD₉₅, were inoculated onto 1-day-old larvae the following early summer (25-30 °C). The results showed no significant differences in pathogenicity between these 2 bioassays ran in different seasons. However, the mortality of 2-day-old larvae to *B. larvae* was much lower than that of 1-day-old larvae. The mortality of 2-day-old larvae was 37.2% ± 3.4% after 4.5×10^4 spores/larva inoculation, while 3-day-old larvae were not susceptible to this pathogen even at the same dose.

Key words: honeybee, *Bacillus larvae*, American foulbrood, pathogenicity