

致蜜蜂大肚病黄杆菌的分离与鉴定

王廷璞,王 静,李一婧,马伟超,马兰波

(天水师范学院 生命科学与化学学院,甘肃 天水 74001)

摘要:为更好地预防和控制蜜蜂大肚病的发生和蔓延,从患“大肚病”的蜜蜂中分离出致病菌,通过细菌镜检和培养,结果表明:此致病菌为 G 球杆菌,不溶血,在普通肉汤培养基上呈乳白色圆形菌落,在 SS 培养基上不生长;该菌接触酶试验为阳性,不产生 H_2S ,不能还原硝酸盐;经血清鉴定该菌为黄杆菌属。进一步药敏纸片试验分析表明,庆大霉素、硫酸阿米卡星对该菌的半数抑菌量(IC_{50})分别为 8.73 和 36.92 $IU \cdot mL^{-1}$,该菌对菌必治、环丙沙星高度敏感。用 20~30 $IU \cdot mL^{-1}$ 剂量的庆大霉素可有效地预防“大肚病”的发生和蔓延。

关键词:蜜蜂;黄杆菌;分离;鉴定

中图分类号:S895.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)12-0063-06

蜜蜂是一种常见益虫,其疾病的发生主要有 2 个特点:一是爆发性危害,表现为流行速度快,发病区域广泛并且难以控制;二是两种或多种病原混合感染,致病力强,对蜂群威胁大,病情反复,重复感染可能性大^[1]。2010 年以来,甘肃省天水市养蜂研究所的蜜蜂出现了一种俗称大肚病的传染病,患病蜜蜂全身水肿,行动呆滞,对外界刺激反应迟钝,严重者完全丧失飞行能力或在麻木中死亡。病蜂腹部胀大或瘦小,体毛较为完整或被同群健康蜂撕咬净尽而呈漆黑油亮状,故群众又称之为“黑蜂”^[2-3]。该病全年都有发生,受风、雨、雪和寒等外界恶劣气候的影响,蜜蜂无法出巢,导致不能飞行排泄,后肠积粪膨胀,加上外界粉、蜜源断绝,全靠人工饲养,营养往往不能满足蜂体需要,抵抗力逐渐减弱而易患此病^[4-5]。患病严重的蜂群,死蜂堆满整个箱底,使巢门堵塞。该病传染很快,几周内可以蔓延到全群和全场,这样不仅造成了巨大损失,而且严重影响了整个蜂群的健康发展。该研究对引起蜜蜂“大肚病”的病原进行了分离鉴定,通过药敏实验,筛选出了能抑制此病发生及传染的药物,抑制了“大肚病”的发生和蔓延,为今后该病的诊断和预防提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 供试蜜蜂为甘肃省天水市养蜂研

究所患病死亡蜜蜂。

1.1.2 药敏纸片及抗生素药敏纸片 药敏纸片含克林霉素、左旋氧氟、头孢他啶、氯化乙丙烯、头孢噻肟、环丙沙星、庆大霉素、阿齐霉素、头孢唑林、丁胺卡那霉素、菌必治、舒普深和西梭霉素,由天水市中医医院化验室提供。抗生素为青霉素钠(哈药集团制药总厂,产品批号 A101102407)、头孢唑林钠(哈药集团制药总厂,产品批号 B100551113)、硫酸小诺霉素(江苏吴中医药集团有限公司苏州第六制药厂,产品批号 H20040581)、硫酸卡那霉素(梯希爱)(上海化成工业发展有限公司,产品批号 25389-94-0)、硫酸庆大霉素(宜昌人福药业有限责任公司,产品批号 100815)、硫酸阿米卡星(哈药集团制药总厂,产品批号 20101217)、盐酸林可霉素(哈药集团制药总厂,产品批号 110202)。沙门氏菌抗血清及黄杆菌兔抗血清为兰州生物制品所产品。

1.1.3 培养基 供试培养基为马丁培养基、普通肉汤培养基、伊红美蓝培养基、麦康凯琼脂培养基、鲜血培养基、SS 培养基、牛肉膏蛋白胨半固体直立柱培养基、蛋白胨水、Simmons 氏枸橼酸钠培养基、硝酸盐培养基、甲基红培养基、淀粉培养基、柠檬酸铁铵半固体培养基、明胶斜面培养基、三糖铁琼脂斜面培养基^[6]。

1.2 方法

1.2.1 分离致病菌 病蜂用无菌水清洗 3 次,用 70%乙醇洗 3~5 min,将蜜蜂剖腹,腹内物质稀释后接种于马丁培养基和肉汤培养基上,37℃恒温培养,1~2 d 后观察,在马丁培养基上分离到两种微生物,菌落分别为白色和红褐色。普通肉汤培养基上分离到一种微生物,菌落大小约

收稿日期:2012-09-27

基金项目:天水师范学院科研资助项目(TSB-1015)

第一作者简介:王廷璞(1965-),男,甘肃省秦安县人,学士,研究员。从事畜禽传染病及免疫学研究。E-mail: wangtp002@163.com。

3 mm,菌落白色、圆形、隆起、湿润、光滑、边缘整齐(见图1)。

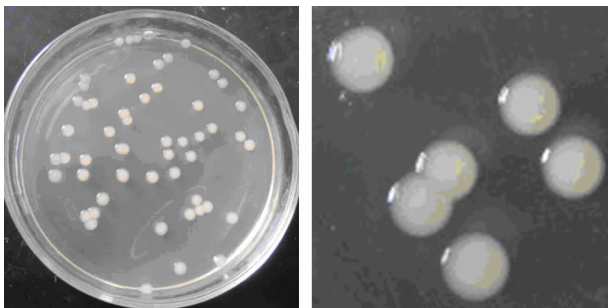


图1 细菌的菌落

Fig.1 Colonies morpha of the bacteria

1.2.2 回归试验 分别将0.1 mL两种培养基上微生物的菌悬液加入10 mL蔗糖水溶液,拌匀。准备4只缸,每个缸中放入50只健康蜜蜂,用铁丝网罩住缸口,其中2只缸中的蜜蜂分别用马丁培养基上分离的两种微生物所拌糖水喂养,另外1只缸中的蜜蜂用普通肉汤培养基上分离的一种微生物所拌糖水喂养,最后1只缸设置对照,蜜蜂用无菌糖水喂养。

1.2.3 细菌染色镜检及分离培养 取纯培养物在洁净载玻片上抹片并经干燥火焰固定后,进行简单染色和革兰氏染色,在光学显微镜下观察。同时,将该细菌分别接种于麦康凯琼脂培养基、鲜血培养基和SS琼脂培养基,置37℃恒温箱培养24 h后观察。

1.2.4 测定细菌生长稳定性 取致病菌斜面菌种1支,以无菌操作挑取1环菌苔,接入5 mL肉汤培养液中,37℃静置培养24 h,作为种子培养液。无菌操作下吸取0.1 mL种子培养液接于50 mL肉汤培养液中,37℃、150 r·min⁻¹,摇振培养24 h后,将增菌后的菌悬液0.1 mL接于50 mL肉汤培养液,以同样条件培养。采用平板菌落计数法,在0、1、2、3、5、7和9 h时,以10倍系列稀释菌液,将稀释到一定浓度的菌液涂布平板,各做3个平行试验,置于37℃恒温箱培养,待平板上长出菌落后,计数。同时将摇振培养0、1、2、3、5、7和9 h的菌液在600 nm波长下测其OD值^[6]。

1.2.5 生化指标与血清学鉴定 (1)生化指标鉴定项目:硫化氢、明胶、甲基红、吲哚、乳糖、葡萄糖、乙酰甲基甲醇(V-P)、过氧化氢酶、硝酸盐、运动性、枸橼酸盐、三糖铁(TSI)、淀粉水解实验。(2)血清型鉴定:用玻板凝集试验进行血清型

鉴定。

1.2.6 药敏试验 将2 mL庆大霉素(8万IU)稀释成100、200、300、400和500 IU·mL⁻¹的浓度梯度,分别吸取0.1 mL加入4 mL培养液中,接入5 μL菌液,分别振荡培养4和9 h后,测其OD值,以确定该药物的最适抑菌浓度和有效抑菌时间。

将1 mL硫酸小诺霉素(3万IU)稀释成300、450、600、750和900 IU·mL⁻¹的浓度梯度;将2 mL硫酸卡那霉素(50万IU)稀释成250、500、750、1 000、1 250 IU·mL⁻¹的浓度梯度;将2 mL盐酸林可霉素(0.6 g)稀释成0.3、0.6、0.9、1.2和1.5 mg·mL⁻¹的浓度梯度;将2 mL头孢唑林钠(0.5 g)稀释成0.25、0.50、0.75、1.00和1.25 mg·mL⁻¹的浓度梯度;将2 mL青霉素钠(0.48 g)稀释成0.24、0.48、0.72、0.96和1.20 mg·mL⁻¹的浓度梯度;将2 mL硫酸阿米卡星(20万IU)稀释成100、200、300、400和500 IU·mL⁻¹。以同法测其OD值,确定各药物的最适抑菌浓度和有效抑菌时间。

1.2.7 抑菌圈测定 采用纸片扩散(K-B)法在无菌条件下,将分离纯培养菌株接种于普通营养肉汤中,37℃培养9 h,将培养菌液用普通营养肉汤稀释至100倍液,吸取0.1 mL滴入普通营养琼脂平板均匀涂布,再放入药敏纸片,37℃培养24 h,测量抑菌圈大小,并记录结果^[7-10]。

2 结果与分析

2.1 回归试验

用普通肉汤培养基上的细菌所拌的蔗糖水喂养的50只蜜蜂患病,甚至死亡。对照和其它2只缸中的蜜蜂无患病症状。说明,普通肉汤培养基上的细菌是致病菌。

2.2 细菌染色镜检及分离培养结果

对细菌进行简单染色、革兰氏染色和荚膜染色,在光学显微镜下观察。同时,将该细菌分别接种于麦康凯琼脂培养基、伊红美蓝培养基、鲜血培养基和SS琼脂培养基,置37℃恒温箱培养24 h观察,其结果见图2~图6。

分离的细菌染色后,镜检可看出该细菌为两端钝圆小杆菌,单个存在。在伊红美蓝培养基上为紫黑色带金属光泽的菌落;在鲜血培养基上为灰白色菌落,不透明,不溶血,无荧光;在SS培养基上不生长;在麦康凯培养基上为白色菌落。参照伯杰细菌鉴定手册,可初步判断该菌属于肠杆

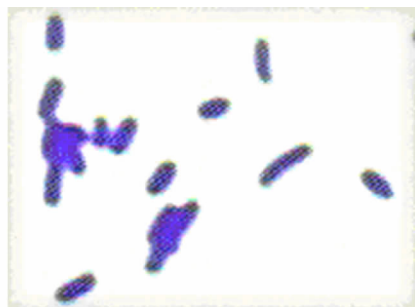


图2 简单染色
Fig. 2 Simple staining

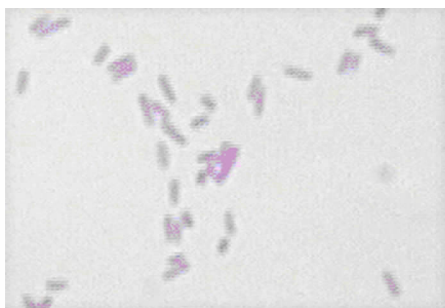


图3 革兰氏染色
Fig. 3 Gram stain



图4 伊红美蓝培养基上菌落
Fig. 4 Colonies on eosin methylene blue medium



图5 鲜血培养基上菌落
Fig. 5 Colonies on blood medium

菌科,埃希氏菌属^[11-12]。

2.3 细菌生长稳定性测定

从表1可看出,在0~1 h细菌处于迟缓期,在2~9 h处于对数期,9 h后处于稳定期,即在后

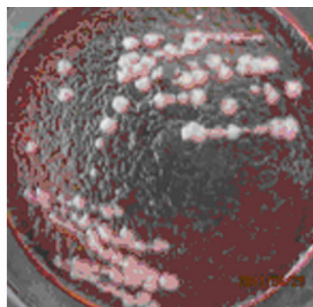


图6 麦康凯琼脂培养基上菌落
Fig. 6 Colonies on macconkey agar medium

续的生化指标测定及药敏试验时将细菌培养至9 h时测定,结果更为准确。

表1 细菌生长稳定性指标分析

Table 1 Analysis on stable index
of bacterial growth

项目 Item	时间 Time/h								
	0	0.5	1	2	3	5	7	9	9.5
活菌数对数 Logarithm of viable count	6.35	6.43	6.63	6.65	6.83	6.91	8.34	9.24	9.22
OD值 OD value	0.019	0.032	0.055	0.189	0.426	0.559	1.440	1.689	1.559

2.4 生化指标鉴定

2.4.1 生化试验结果 由表2可知,该菌能发酵葡萄糖、乳糖;甲基红试验、吲哚试验、三糖铁试验为阳性;接触酶(过氧化氢酶)产生试验阳性;乙酰甲基甲醇(V-P)试验、硝酸盐还原试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、硫化氢产生和枸橼酸盐利用试验均为阴性,可运动。

表2 生化试验结果分析

Table 2 Result analysis of biochemical test

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
甲基红试验	+	吲哚试验	+
乳糖发酵试验	+	葡萄糖发酵	+
乙酰甲基甲醇(V-P)试验	-	硝酸盐还原试验	-
过氧化氢酶	+	运动力的观察	+
三糖铁(TSI)琼脂试验	+	明胶液化试验	-
枸橼酸盐利用试验	-	淀粉水解试验	-
硫化氢产生试验	-		

2.4.2 血清型鉴定结果 根据各项试验结果选择相关血清进行血清型鉴定,结果表明:该细菌与所有沙门氏菌抗血清不发生凝集反应,而与兔抗

黄杆菌血清发生特异性凝集,确诊该细菌为黄杆菌。

2.5 药敏试验结果

2.5.1 细菌半数抑菌量测定结果 由图 7~图 13 可看出,不同药物不同浓度对该致病菌的抑制效果。根据各图数据,利用公式(1)和(2)计算出距离比和半数抑菌率(IC_{50}),再求其反对数即可算出半数抑菌量(见表 3)。

距离比 = $-(\text{高于 } 50\% \text{ 的致死率} - 50\%) \times \lg \text{ 浓度倍数} / (\text{高于 } 50\% \text{ 的致死率} - \text{低于 } 50\% \text{ 的致死率})$ (1)

$\lg IC_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 的致死率的低浓度对数} + \text{距离比}$ (2)

由图 7 可知,随着庆大霉素浓度的增加,细菌培养液 4 和 9 h 的 OD 值均在减小,浓度为 $70 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,OD 值接近 0,并且每个浓度 4 h 和 9 h 的 OD 值相近,因此,在 $70 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度时的庆大霉素对细菌高度敏感,并计算得该药物的半数抑菌量约 $9 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

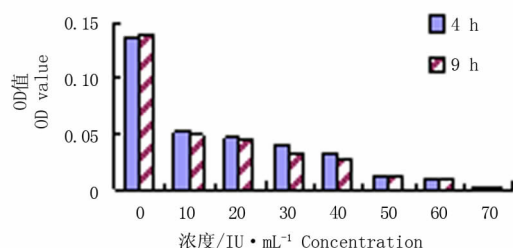


图 7 不同浓度庆大霉素在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 7 Antibacterial effect on different concentration of Gentamicin at 4 and 9 h

由图 8 可知,随着硫酸阿米卡星浓度的增加,细菌培养液 4 和 9 h 的 OD 值在 $30 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之前,有所减小, $30 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之后,OD 值略有降低,并且每个浓度 4 和 9 h 的 OD 值相近,因此,硫酸

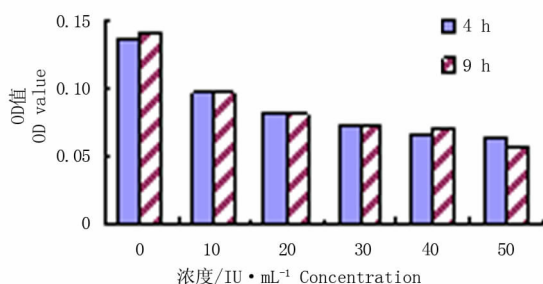


图 8 不同浓度硫酸阿米卡星在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 8 Antibacterial effect on different concentration of Amikacin sulfate at 4 and 9 h

阿米卡星的有效抑菌浓度是 $40 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,并计算得该药物的半数抑菌量约 $37 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

由图 9 可知,随着硫酸卡那霉素浓度的增加,细菌培养液 4 和 9 h 的 OD 值均在减小,浓度为 $25, 50, 75 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,4 和 9 h 的抑菌效果较差,浓度为 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,4 和 9 h 的抑菌效果相同,因此,硫酸卡那霉素的有效抑菌浓度是 $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,并计算得该药物的半数抑菌量约 $90 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

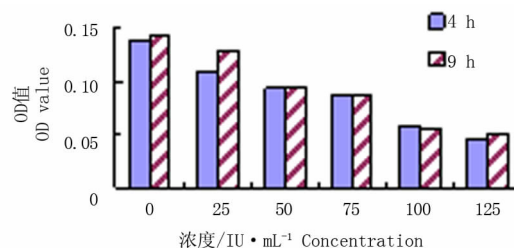


图 9 不同浓度硫酸卡那霉素在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 9 Antibacterial effect on different concentration of Kanamycin sulfate at 4 and 9 h

由图 10 可知,随着小诺霉素浓度的增加,细菌培养 4 和 9 h 的 OD 值均在减小,浓度在 $30, 45, 60 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 OD 值变化不大,在 $75 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时接近于 0,因此,小诺霉素的有效抑菌浓度在 $75 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,并计算得该药物的半数抑菌量约为 $64 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

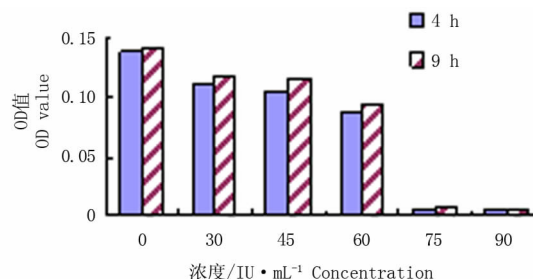


图 10 不同浓度小诺霉素在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 10 Antibacterial effect on different concentration of Micronomicin at 4 and 9 h

由图 11 可知,随着青霉素钠浓度的增加,细菌培养液 4 和 9 h 的 OD 值变化不大,并计算得该药物的半数抑菌量约 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

由图 12 可知,头孢唑林钠浓度为 $0.25, 0.5, 0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,OD 值变化不大,抑菌效果较差,浓度为 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,OD 值明显减小,而且 4 和 9 h 的 OD 值相近,因此,头孢唑林钠的有效抑菌浓度在 $1.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,并计算得该药物的半数抑菌量约为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

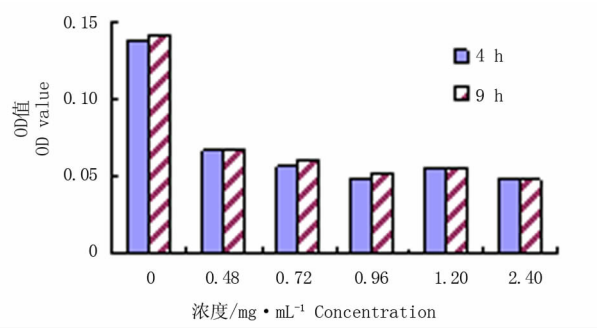


图 11 不同浓度青霉素钠在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 11 Antibacterial effect on different concentration of penicillin sodium at 4 and 9 h

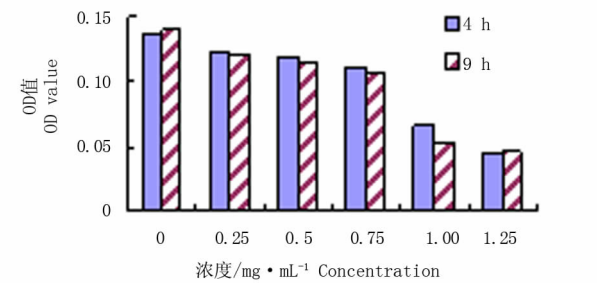


图 12 不同浓度头孢唑啉钠在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 12 Antibacterial effect on different concentration of cefazolin sodium at 4 and 9 h

由图 13 可知,随着盐酸林可霉素浓度的增加,细菌培养液 4 和 9 h 的 OD 值都在减小,并且相近,浓度在 1.2、1.5 mg·mL⁻¹ 时 OD 值近似,因此,盐酸林可霉素的有效抑菌浓度在 1.2 mg·mL⁻¹ 左右,并计算得该药物的数抑菌量约为 0.9 mg·mL⁻¹。

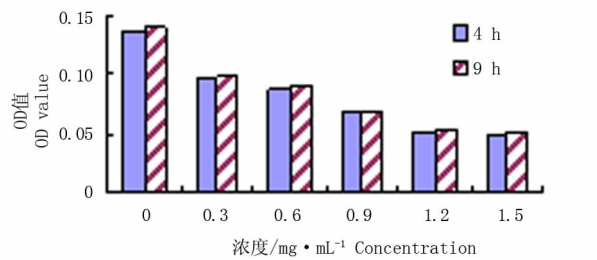


图 13 不同浓度盐酸林可霉素在 4 和 9 h 的抑菌效果
Fig. 13 Antibacterial effect on different concentration of lincomycin hydrochloride at 4 and 9 h

2.5.2 抑菌圈直径测定结果 由表 4 可看出,黄杆菌对菌必治、环丙沙星、克林霉素、左旋氧氟、氯化乙丙烯、舒普深和阿奇霉素高度敏感,对头孢他啶和头孢噻肟中度敏感,对丁胺卡那霉素、庆大霉素、头孢唑啉和西梭霉素不敏感。不同的药物用量不同,抑菌效果也不同,故可在实际情况中,选

用 2 种或 2 种以上的敏感药物交替使用,以防止该细菌对抗生素产生抗性。根据药敏试验结果,建议采用 20~30 IU·mL⁻¹ 剂量庆大霉素进行防治,可取得较好效果。

表 3 细菌的半数抑菌量
Table 3 Half of the amount of bacterial inhibition

抗生素 Antibiotics	细菌的半数抑菌量 Half of the amount of bacterial inhibition	
	4 h	9 h
庆大霉素/IU·mL ⁻¹	8.73	8.47
硫酸阿米卡星/IU·mL ⁻¹	36.92	36.76
小诺霉素/IU·mL ⁻¹	63.09	64.06
硫酸卡那霉素/IU·mL ⁻¹	90.22	88.43
青霉素钠/mg·mL ⁻¹	0.48	0.47
头孢唑林钠/mg·mL ⁻¹	0.99	0.91
盐酸林可霉素/mg·mL ⁻¹	0.91	0.90

表 4 细菌抑菌圈测量结果
Table 4 Result of inhibition zone of bacteria

药物 Medicine	抑菌圈/mm Zones of inhibition	药物 Medicine	抑菌圈/mm Zones of inhibition
菌必治	26	庆大霉素	9
丁胺卡那霉素	0	头孢唑啉	0
环丙沙星	34	舒普深	31
克林霉素	19	西梭霉素	9
左旋氧氟	37	阿奇霉素	20
头孢他啶	13	头孢噻肟	14
氯化乙丙烯	18		

注:0 mm 为不敏感;1~10 mm 为低度敏感;10~15 mm 为中度敏感;大于 15 mm 为高度敏感。
Note:0 mm means insensitive;1~10 mm means less sensitive;10~15 mm means medium sensitive;more than 15 mm means high sensitive.

3 结论与讨论

试验分离出了蜜蜂“大肚病”的致病菌。虽然该菌株在普通营养琼脂、伊红美蓝培养基、鲜血培养基上的性状与大肠杆菌的性状相似^[15],但是在 SS 琼脂培养基上不生长,麦康凯琼脂培养基上呈白色菌落。生理生化特性鉴定结果参照伯杰细菌鉴定手册发现,唯有硝酸盐还原试验结果与大肠杆菌不符,即在接入致病菌的试管中加入格里斯氏试剂时,溶液不变色,说明该细菌不能把培养液中的硝酸盐还原为亚硝酸盐,而在接入大肠杆菌的试管中加入格里斯氏试剂时,溶液变成红色,说明大肠杆菌可还原硝酸盐,排除大肠杆菌后结合血清型鉴定结果诊断为黄杆菌科黄杆菌属黄

杆菌。

药敏试验测定了不同药物不同浓度对致病菌的抑制效果,并确定了庆大霉素等药物的半数抑菌量,为确定有效抑制细菌生长的药物浓度提供了依据,抑菌圈直径测量结果表明该细菌对菌必治、环丙沙星和左旋氧氟具有很高的敏感性,因此,在“大肚病”的治疗过程中,通过使用这几种药剂,或是几种药剂联合使用,有很好的防治效果。此外,对丁胺卡那霉素和头孢唑啉等具有很高的耐药性。因此,在对蜜蜂疾病的防治过程中,一定要查明病因,科学合理利用抗生素。在规模化养殖场中定期分离病原菌,并进行药敏试验,监测细菌耐药性的变化。同时在抗菌药物的选择上应考虑采取联合用药、交叉用药和轮换用药的方式,一方面可以充分发挥抗菌药物之间的协同作用,增加疗效;另一方面可以避免细菌长期与某一种药物接触,增加产生耐药性的几率^[16]。

蜜蜂疾病是蜂业发展的一个永恒话题,蜂病的发生往往与环境条件有密切的关系,季节、天气、饲养条件、管理技术和蜜源条件等都会影响蜂病的发生和危害程度。根据季节、天气的变化及时调整蜂巢,蜂场要选择蜜粉源条件好、无工业污染、有清洁水源的地方,地势高燥向阳,避免使用低洼、潮湿的场地,保持蜂场和蜂群内的清洁卫生;及时摇出蜜蜂采回的甘露蜜和茶花蜜,补喂优质白糖^[17],创造适合蜂群生活的良好条件,提高蜂群本身对病害的抵抗力。

参考文献:

[1] 冯峰.蜜蜂传染性疾病发生的特点与防治对策[J].蜜蜂杂

志,2000(7):19.

- [2] 田素润.蜜蜂主要疾病特征及防治方法[J].安徽农业科学,2010,38(17):9034-9038.
- [3] 柳东然.蜜蜂大肚病的防治[J].蜜蜂杂志,1997(7):19.
- [4] 施根吉.“爬蜂病”原因简析[J].蜜蜂杂志,1999(1):19.
- [5] 成茹.如何防治蜜蜂麻痹病[J].实用技术,2005(1):31.
- [6] 诸葛健.工业微生物实验与研究技术[M].北京:科学出版社,2007:134-140.
- [7] 刘从森,胡小东,管俊昌.药物敏感实验方法学概述[J].中国病原生物学杂志,2010,5(12):951-952.
- [8] 常新耀,谢红兵,魏刚才,等.鸡大肠杆菌的生化特征致病性及药敏实验研究[J].安徽农业科学,2008,36(11):4536-4538.
- [9] 武志强,陈建荣,郭银秀,等.鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏实验[J].韶关学院学报:自然科学版,2004,12(25):64-66.
- [10] 吴华俊,任文,周梅霞,等.扬州地区鸡病原性大肠杆菌的分离与鉴定[J].现代农业科技,2009(15):306-307,310.
- [11] 刘国刚,郭立力,宁官保.一例肉鸡大肠杆菌病的诊治报告[J].国外畜牧学:猪与禽,2008,28(4):88-89.
- [12] 唐婕,刘文华,王永奇.大肠杆菌引起林麝死亡的初步研究[J].特产研究,2009(1):23-24.
- [13] Buchanan R E, Gibbon N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版.北京:科学出版社,1984:382-462.
- [14] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌鉴定手册[M].北京:科学出版社出版,2001:66-75.
- [15] 于阿芳.鸡致病性大肠杆菌药敏实验、血清型鉴定及耐药基因的PCR检测[D].山东:山东农业大学,2009:21-26.
- [16] 王红林,杨峻,邵华斌,等.鹌鹑致病性大肠杆菌与沙门氏菌混合感染的病原分离与药敏实验[J].2010,31(1):156-158.
- [17] 金汤东,陈盛禄,钱建华,等.我国蜜蜂疾病发生趋势与防治技术[J].中国蜂业,2007,58(2):23-24.

Isolation and Identification of Flavobacterium Causing the Big Belly Disease in Honeybee

WANG Ting-pu, WANG Jing, LI Yi-jing, MA Wei-chao, MA Lan-bo

(Life Science and Chemistry College of Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001)

Abstract: In order to better prevent and control the occurrence and spread of the big belly disease of honeybee, the pathogenic bacterium was isolated from “the big belly disease” of honeybee. The microscopic examination and bacterial cultural results showed that the pathogenic bacterium was ball rod-shaped Gram-negative bacterium, no hemolysis, milk-white circular colonies on normal medium, which could not grow on SS medium; Based on physiological, biochemical characteristics and serological identification, the pathogenic bacterium belonged to flavobacterium. Further drug sensitivity results revealed that IC₅₀ of Gentamicin and Amikacin sulfate were 8.73 and 36.92 IU·mL⁻¹ to the bacterium, and it had high sensitivity to Rocephin and Ciprofloxacin. 20~30 IU·mL⁻¹ dose of Gentamicin could effectively prevent occurrence and spread of the big belly disease honeybee.

Key words: honeybee; flavobacterium; isolation; identification