



## 蜜蜂幼虫粪肠球菌的分离与鉴定

吴艳艳<sup>1,2</sup> 周婷<sup>1,2\*</sup> 王强<sup>1,2</sup> 代平礼<sup>1,2</sup> 罗其花<sup>1,2</sup> 宋怀磊<sup>1,2</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093)

(2. 农业部授粉昆虫生物学重点开放实验室 北京 100093)

**摘要:** 在对患有欧洲幼虫腐臭病的蜜蜂幼虫进行细菌分离与培养时, 获得 1 株未知菌株。从分离培养特性、形态学、生理生化特性和分子生物学等方面对该菌株进行了鉴定, 得知该菌株为欧洲幼虫腐臭病的次生菌——粪肠球菌, 属于肠球菌属, 并暂定名为 *Enterococcus faecalis* FB102。同时, 得知根据该菌的分离培养特性可与欧洲幼虫腐臭病病原区分, 并且将其单独接种蜜蜂幼虫后未能使幼虫患病。根据粪肠球菌较欧洲幼虫腐臭病病原易于分离培养的特性, 得知通过对粪肠球菌的鉴定可以简化欧洲幼虫腐臭病的诊断过程, 而且推测该菌株可能对人体健康有一定的影响。

**关键词:** 欧洲幼虫腐臭病, 系统进化树, 致病性

## Isolation and Identification of *Enterococcus faecalis* in Honeybee Larvae

WU Yan-Yan<sup>1,2</sup> ZHOU Ting<sup>1,2\*</sup> WANG Qiang<sup>1,2</sup> DAI Ping-Li<sup>1,2</sup> LUO Qi-Hua<sup>1,2</sup>  
SONG Huai-Lei<sup>1,2</sup>

(1. Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

(2. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Beijing 100093, China)

**Abstract:** An isolate of unknown bacterium was isolated from honeybee larvae infected with European foulbrood. Based on its characteristics of isolation and culturing, colony morphology, physiological-biochemical characteristics and Molecular Biology, this isolate was identified the secondary invader of European foulbrood, *Enterococcus faecalis*, which was belong to the genus of *Enterococcus*, and was named *Enterococcus faecalis* FB102 tentatively. Meanwhile it showed that people could different the bacterium from the pathogen of European foulbrood by the biological characters of isolates and cultivation. The bacterium could not infect honeybee larvae alone, and it could simplify the diagnosis process of European foulbrood by the isolation and culturing of *Enterococcus faecalis*, furthermore the bacterium from honeybee larvae might threaten human health.

**Keywords:** European foulbrood, Phylogenetic tree, Pathogenicity

欧洲幼虫腐臭病是危害蜜蜂幼虫的传染性病害,在世界各地均有分布。对中华蜜蜂造成的危害较西方蜜蜂的严重。该病害的病原为蜂房蜜蜂球菌(*Melissococcus pluton*),并伴有多种次生菌<sup>[1]</sup>,如蜂房芽胞杆菌(*Paenibacillus alvei*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和尤瑞狄斯杆菌(*Bacterium eurydice*)等。2006年,浙江大学的戎映君等人报道,在患病蜜蜂幼虫体内分离到具有致病性的屎肠球菌(*E. faecium*)<sup>[2]</sup>,可见蜜蜂细菌病的病原不止一种。

本实验室在对患有欧洲幼虫腐臭病的幼虫进行细菌分离与培养时,除蜂房蜜蜂球菌外,另外获得了1株纯培养的菌株A;通过对菌株A从分离培养特性、形态学和分子生物学等方面进行鉴定,以探求该菌株的属种关系,并且检测其对蜜蜂幼虫是否具有致病性,为诊断和预防蜜蜂病害提供一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试幼虫

患有欧洲幼虫腐臭病的中华蜜蜂幼虫尸体由福建农林大学梁勤教授馈赠;将幼虫放于冰盒内运输,并于4℃冰箱短暂存放,幼虫保存完好。

### 1.2 试剂

PCR和凝胶回收试剂盒购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;引物合成和扩增片段的序列测定由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

### 1.3 细菌A的分离与培养

分离菌株的步骤均在无菌工作台内完成,首先利用75%酒精对幼虫表面洗涤1次,在酒精灯外焰处经过3~5次,然后利用无菌蒸馏水洗涤2次,将幼虫放入1.5 mL离心管,利用无菌蒸馏水对其体内内容物进行10倍梯度稀释,分别吸取100 μL菌液涂布EFB培养基<sup>[3]</sup>和酵母胡萝卜固体培养基<sup>[4]</sup>,35℃培养过夜。

将分离到的单菌落分别由固体培养基转接至对应的液体培养基中,200 r/min、35℃培养过夜。另外,将其在新鲜的固体培养基上进行划线培养。两种培养条件:(1)35℃,有氧条件培养24 h;(2)35℃,5%~10% CO<sub>2</sub>培养24 h。

### 1.4 菌落和菌体的形态

菌落形态:对液态培养24 h的菌液进行10倍梯

度稀释,分别取100 μL菌液涂布于EFB固体培养基,35℃有氧条件培养24 h。在体式解剖镜下对菌落进行观察与测量。

菌体形态:将液体培养的菌液梯度稀释后,在相差显微镜下进行观察(×1500),利用数码采集器与软件Motic Images Advanced 3.2对菌体进行测量。

### 1.5 生理生化特性

参照伯杰细菌鉴定手册的方法<sup>[5]</sup>。

### 1.6 PCR和扩增片段的测序

采用菌体PCR扩增菌株A的16S rRNA基因片段,引物采用EFBF(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和EFBR(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[6]</sup>。

模板的制备:收集培养过夜的菌液1.5 mL,5000 r/min离心5 min,超纯水洗涤1次,弃上清,150 μL超纯水悬浮菌体,95℃水浴15 min,12000 r/min离心3 min。

PCR体系:取上述上清液5 μL作为模板,引物各2 μL(10 μmol/L),dNTPs混合液(各2.5 mmol/L)3 μL,10×buffer(含Mg<sup>2+</sup>)5 μL,Taq酶(5 U/μL)0.25 μL,补加超纯水至50 μL。PCR条件:95℃3 min;94℃1 min,50℃1 min,72℃1 min,35个循环;72℃5 min,预计扩增片段约1.5 kb<sup>[7]</sup>。

PCR扩增片段测序后由DNASar软件分析,并在GenBank数据库登录。将获得的序列利用程序BLAST进行比对,根据与其序列相似性最大的相似菌种确定该菌的属,进而选取该属中不同种的16S rRNA基因序列作为构建系统进化树的序列,与该属同在一科的相近属作为外群。系统进化树的构建的方法为软件MEGA程序中ClustalW方法。

### 1.7 蜜蜂幼虫的人工培育

取消毒的24孔细胞培养板,每孔加入保温在35℃的鲜蜂王浆0.5 mL。分别从正常发育的中华蜜蜂和意大利蜜蜂子脾中挑选1日龄健康幼虫放置于细胞培养板中,35℃恒温培养,相对湿度为80%±5%。每隔24 h将幼虫转移至加有鲜蜂王浆的新的细胞培养板中培养。

### 1.8 接种试验

将菌株A接种于EFB液体培养基中,35℃培养16 h,将菌液加入鲜蜂王浆中,设置3组处理,终浓度分别为每毫升鲜蜂王浆中含有20、100和200 μL菌液,每孔加入上述混合液0.5 mL,培养条件见1.7,以接种灭菌菌液的培养基作为对照,试验组和

对照组均做 3 组重复, 每组 20 个蜜蜂幼虫。观察和记录幼虫的死亡数, 并对试验组和对照组幼虫进行体内细菌的分离与培养。

## 2 结果

### 2.1 分离培养特性

通过在液体和固体培养基中对细菌 A 进行培养, 表明该菌可在 EFB 和酵母胡萝卜培养基(液体和固体)中生长。培养 24 h 后, 在 EFB 固体培养基上的菌落稍大于酵母胡萝卜培养基上的; 在有氧和 5%–10% CO<sub>2</sub> 条件下均能生长, 为兼性厌氧菌。

### 2.2 菌落和菌体的形态

菌株 A 在 EFB 固体培养基上长出圆形菌落, 直径 1 mm–2 mm, 中央凸起, 边缘整齐, 表面光滑, 颜色均一, 呈乳白色, 菌落无迁移性(图 1A), 革兰氏染色阳性。

将菌悬液制成水悬片, 经相差显微镜可见菌体呈球形或椭球形, 直径为 0.5 μm–1.0 μm, 单个、成对或短链状存在, 继续培养数天, 不形成芽胞(图 1B)。

### 2.3 生理生化特性

通过测定可知, 菌株 A 在 10°C、45°C、6.5%的 NaCl 培养液中和 pH 9.6 时均能生长, 利用精氨酸为能源, 发酵山梨醇, 能利用核糖、半乳糖、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、棉子糖、水杨素、海藻糖和蔗糖, 不能利用木糖、乳糖和苦杏仁苷; 根据伯杰细菌鉴定手册可初步判断该菌为粪肠球菌。

### 2.4 扩增片段的分析结果

经 PCR 扩增到一条片段, 大小为 1500 bp, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳和凝胶回收该片段, 测序后得知

1468 bp 片段的序列 FB102, 并获得其 GenBank 登录号 GQ449688。通过 BLAST 程序得知 FB102 与 *E. faecalis* ATCC 19433 (DQ411814), *E. faecalis* KLDS4 (GQ337884) 和 *E. faecalis* XR7 (EU708623) 的 16S rRNA 基因核酸序列相似性均为 99%; 利用肠球菌属中不同菌种<sup>[2]</sup>的 16S rRNA 核酸序列(与 FB102 相对应的部分)对 FB102 进行系统进化树的构建(见图 2), 并选取与肠球菌属同为链球菌科(*Streptococcaceae*)<sup>[8]</sup>的无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*, GenBank 登录号 DQ303183)作为外群。从图 2 中可知, 序列 FB102 与粪肠球菌的相应序列距离最近, 聚为同一支。

综上所述, 将菌株 A 归为肠球菌属中的粪肠球菌较为合理, 暂定名为 *Enterococcus faecalis* FB102。

### 2.5 接种试验

将菌株 A 饲喂蜜蜂幼虫, 3 d 和 5 d 后, 试验组幼虫的相对死亡率均为 0; 试验组幼虫与健康幼虫均发育良好, 无明显差异, 在试验组幼虫体内未分离到菌株 A。

## 3 讨论

通过对生理生化特性和核酸序列分析得知菌株 A 为粪肠球菌。该菌属于肠球菌属, 为该属的代表种。它分布广泛, 常在人类和其它动物的肠道内存在。目前该菌多作为生活饮用水、管道水和其它水质的污染指示菌之一, 在人体粪便中的数量仅次于大肠菌群。由于该菌对外界环境抵抗力强、生长营养要求低, 而且能够耐受多种抗生素, 因此在自然界中存活较为持久, 即使在经冷冻、干燥和中等强度加

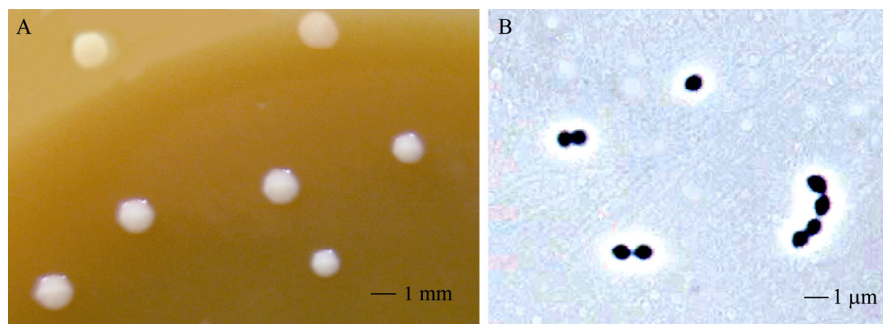


图 1 菌株 A 的菌落和菌体形态

Fig. 1 Colony morpha of the strain A and bacterial cell

注: A: 菌株 A 的菌落; B: 菌株 A 的菌体。

Note: A: Colony morpha of the strain A; B: Bacterial cell of the strain A.

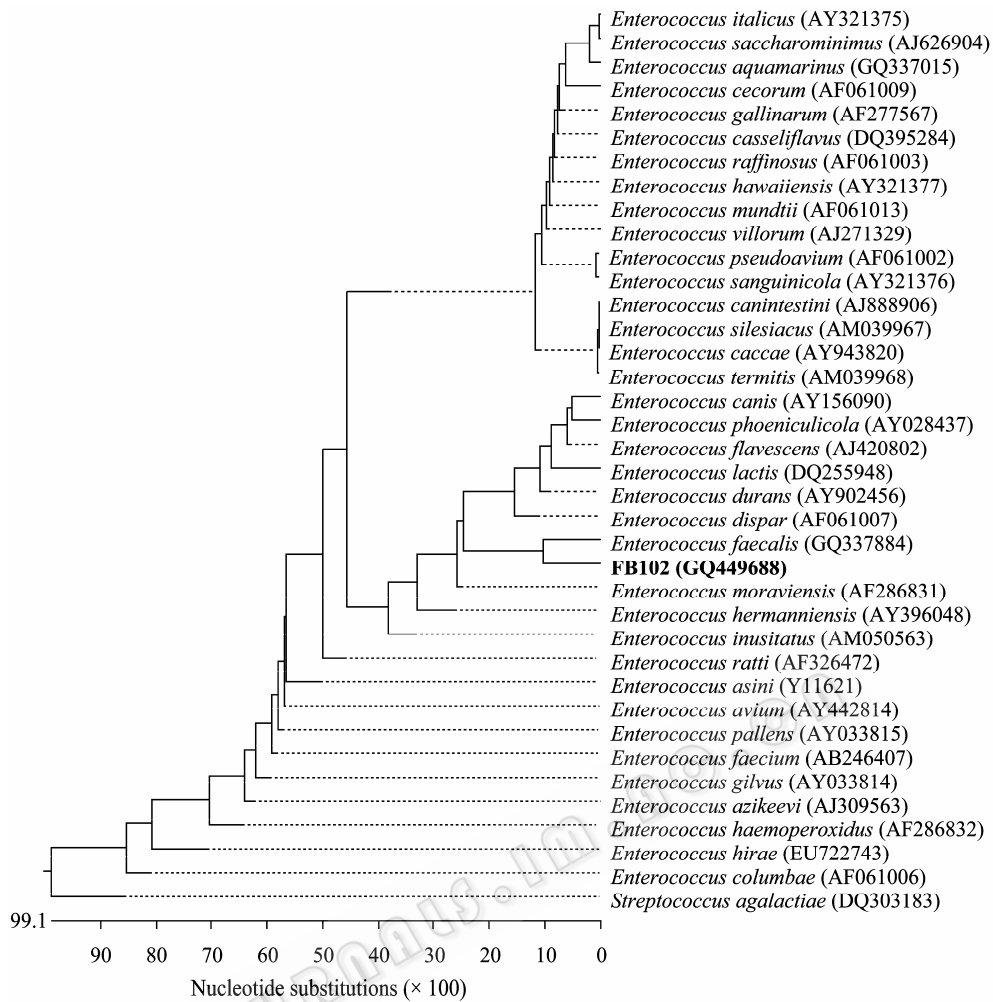


图 2 菌株 A 和相关菌种的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain A and its relatives

热处理后的食物中仍能检测到。由此可见,对蜜蜂幼虫体内分离到的粪肠球菌的相关特性进行分析有益于人们了解其对蜜蜂和人类健康的影响。通过将该菌株的特性与相关文献进行比较可获得以下 4 个观点:

(1) 通过分离培养特性可区分粪肠球菌和蜂房蜜蜂球菌。区别一,前者为兼性厌氧菌,可以在有氧或 5%–10% 的  $\text{CO}_2$  条件下生长<sup>[1]</sup>,而后者为厌氧菌,需依靠 5%–10% 的  $\text{CO}_2$  生长<sup>[3]</sup>;区别二,前者 24 h 长出 1 mm–2 mm 的乳白色菌落,而后者生长 4–5 d 才长出直径约 1 mm 的珍珠白色菌落。由于两者菌体和菌落形态极其相似,在蜜蜂病害诊断中容易造成混淆<sup>[9–10]</sup>,由上述二点区别可在分离培养实验中进行区分。

(2) 单独感染粪肠球菌的蜜蜂幼虫不患病,并

且不会在其体内分离到该菌株。这与 2008 年版世界动物卫生组织陆生手册 2.2.3 欧洲幼虫腐臭病章节 (OIE Terrestrial Manual 2008, 405–409 页,以下简称 OIE) 中“在没有蜂房蜜蜂球菌的蜜蜂幼虫体内,粪链球菌不能繁殖”的说法一致,只有当蜂房蜜蜂球菌在蜜蜂幼虫体内繁殖之后,幼虫中肠的各种生理生化条件改变,此时才适于粪肠球菌的繁殖;否则,不会分离到粪肠球菌,但该菌对蜂房蜜蜂球菌具有增效作用(OIE)。

(3) 通过分离培养粪肠球菌可简化欧洲幼虫腐臭病的诊断过程。由上可知蜜蜂幼虫体内无蜂房蜜蜂球菌存在时,粪肠球菌不能繁殖,而且 OIE 中同样指出当幼虫体内存在大量粪肠球菌时,即发生了欧洲幼虫腐臭病,综合两种说法可知粪肠球菌可作为欧洲幼虫腐臭病的指示菌,即只要分离到大量的

粪肠球菌就可确定蜜蜂幼虫患有欧洲幼虫腐臭病。粪肠球菌较蜜蜂蜂房球菌的鉴定方法简单,即前者的鉴定方法是首先对疑似患有欧洲幼虫腐臭病的幼虫尸体进行细菌分离培养,应用 EFB 培养基和普通细菌培养箱(不需要 5%–10% CO<sub>2</sub>)进行培养,如 24 h 后获得大量乳白色的圆形菌落,再经相差显微镜观察菌体的形态,当菌落和菌体形态特性均与粪肠球菌的特性一致时,可初步判断该菌为粪肠球菌,进而得知蜜蜂幼虫患有欧洲幼虫腐臭病,也可通过分子手段对粪肠球菌进行下一步的验证;而后的培养条件苛刻,并且更易受到其他细菌的竞争压力(OIE),需要特殊培养条件(5%–10% CO<sub>2</sub>),生长缓慢(4–5 d),鉴定周期长。由此可见,如果能通过分离到大量指示菌,即粪肠球菌,判定幼虫患有欧洲幼虫腐臭病,可简化该病的诊断过程。

(4) 源自蜜蜂幼虫的粪肠球菌可能对人体健康有一定的影响。该菌为人和动物的条件致病菌,可引起泌尿系统感染、菌血症、腹腔感染、伤口感染和心内膜炎等疾病<sup>[11–13]</sup>;此外,粪肠球菌还可在人与动物之间进行水平传播<sup>[14–15]</sup>;近年来,由于免疫抑制剂、侵入性治疗方法以及抗菌药物的频繁使用,使得由粪肠球菌属所致的临床感染病例不断增加,已成为医院感染的重要病原菌之一<sup>[16]</sup>,因此,还需对本室分离到的粪肠球菌的血清学、药敏反应以及与人体中的粪肠球菌的关系进行研究。

**致谢:**感谢福建农林大学梁勤老师对病虫的馈赠,同时感谢中日友好医院的贾红兵老师在该菌株生理生化鉴定方面的诸多帮助。

## 参 考 文 献

[1] 吴杰,周婷,韩胜明,等. 蜜蜂病敌害防治手册. 北京: 中国农业出版社, 2001: 106–109.

[2] 戎映君,苏松坤,陈集双,等. 一种新的蜜蜂细菌性幼虫病病原的分离鉴定. 微生物学报, 2006, 46(6): 994–998.

[3] 周婷,冯峰,董秉义,等. 中华蜜蜂欧洲幼虫腐臭病病

原的药物试验研究. 畜牧兽医学报, 2001, 32(3): 283–288.

- [4] Bailey L. An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton* and observations on its distribution and ecology. *Journal of Insect Pathology*, 1959(1): 80–85.
- [5] Buchanan RE, Gibbonr NE. 伯杰细菌鉴定手册. 济南: 山东大学出版社, 1988: 671–675.
- [6] Takashi H, Michiko A, Takehito K. *In vitro* propagation of herbaceous peony by a longitudinal shoot—split method. *Plant Cell Reports*, 1989(8): 243–246.
- [7] Govan VA, Brozel V, Allsopp MH, et al. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1983–1985.
- [8] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2002: 332–358.
- [9] Shimanu K, Hachiro R, David AK. Diagnosis of honey bee diseases. *Agriculture Handbook*, 2000(690): 61.
- [10] 周婷, 冯峰, 董秉义. 中华蜜蜂的欧洲幼虫腐臭病病原研究. 昆虫学报, 2000(43): 104–108.
- [11] 朱波, 强华. 肠球菌的毒力因子. 检验医学与临床, 2006, 3(3): 113–115.
- [12] Eliopoulos GM, Farber BF, Murry BE, et al. Rbosomal resistance of clinical enterococcal isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984(25): 3998–3999.
- [13] Rybkine T, Mainardi JC, Sougakoff W, et al. Penicillin binding protein sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of betalactam resistance. *J Infect Dis*, 1998(178): 159–163.
- [14] Van den Bogaard AE, Jansen LB, Stobberingh EE. Vancomycin-resistant *Enterococci* in turkeys and farmers. *N Engl J Med*, 1997(337): 1558–1559.
- [15] Jensen LB, Hammerum AM, Poulsen RL, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999(43): 724–725.
- [16] Sanchezsilos RM, Perezgiraldo C, Martin P, et al. Pathogenicity of *Enterococcus* spp. characteristics of 169 hospital isolates. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2000(18): 165–169.