

DIE WALDTRACHTKRANKHEIT DER HONIGBIENE II. NACHWEIS VON BAKTERIEN IN DER HÄMOLYMPHE WALDTRACHTKRANKER BIENEN UND DER ZUSÄTZLICHE EINFLUSS DER FÜTTERUNG AUF DIE WALDTRACHTKRANKHEIT ⁽¹⁾

Helmut HORN * und Jürgen EBERSPÄCHER **

* Landesanstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim,
August von Hartmannstraße 13, D - 7000 Stuttgart 70

** Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim,
Garbenstraße 30, D - 7000 Stuttgart 70

ZUSAMMENFASSUNG

In der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen konnten Bakterien nachgewiesen werden, während sich die Hämolymphe gesunder Bienen stets als bakterienfrei erwies. In allen untersuchten Fällen ließ sich die Anwesenheit von zwei verschiedenen Bakterienarten zeigen, die als *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C und als *Yersinia pseudotuberculosis* identifiziert wurden. Bei Infektionsversuchen im Labor riefen beide Bakterienarten die Symptome der Waldtrachtkrankheit hervor. Auch in der Hämolymphe der infizierten Versuchsbiene waren die entsprechenden Bakterien nachzuweisen. In diesen Versuchen konnte außerdem ein großer Einfluß der Ernährung auf die Mortalitätsrate der Bienen nachgewiesen werden, wobei die Gruppe der mit mineralstoffreichem Honigtauhonig gefütterten Bienen etwa den doppelten Totenfall gegenüber der mit reinem Zuckerwasser ernährten Kontrollgruppe aufwies. Für *Pseudomonas fluorescens* ließ sich eine deutliche Abhängigkeit des Wachstums vom Kaliumgehalt des Nährmediums nachweisen.

EINLEITUNG

Die Waldimkerei stellt eine der schwierigsten Betriebsformen dar, da durch eine einseitige Massenhonigtautracht wichtige Nektar- und Pollenspender als Quelle eiweißhaltiger und antibiotischer Substanzen für das Bienenvolk ins Minimum geraten. Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß der Imker häufig durch unsachgemäße Eingriffe, in Verbindung mit bienenwidrigen Witterungs-

(1) Herrn Prof. Franz LINGENS zum 60. Geburtstag gewidmet.

verhältnissen, Streßsituationen induziert. Hinzu kommt die außerordentliche Belastung durch den unphysiologischen Mineralstoffgehalt von Honigtauhonigen im Vergleich zu Blütenhonigen, mit stark erhöhten K- und P-Gehalten, aber verringerten Ca- und Na-Werten, was die Disposition für Krankheitserreger im Bienenvolk verstärkt.

MATERIAL UND METHODEN

Isolierung und Identifizierung von Bakterien aus Hämolymphe

In den Jahren 1981 und 1982 wurde Hämolymphe von waldtrachtkranken und gesunden, in der Weißstannentracht eingesetzten, lebenden Bienen entnommen. Die Entnahme von 10-20 µl Hämolymphe erfolgte nach einer Betäubung mit CO₂ durch Einstechen von sterilen, dünn ausgezogenen Glaskapillaren in den Thorax, bzw. zwischen dem 2. und 3. Abdomensegment. Nach einer Verdünnung in physiologischer Kochsalzlösung oder künstlichem Hämolympheersatz (Graces Insect Medium, Catalogue Nr. 194 G) wurde das « Bienenblut » auf Agarplatten mit komplexen Nährmedien ausplattiert. Es wurden Blutagarplatten, Platten mit HNB-Medium (10 g Hefeextrakt, 10 g Nutrient Broth, 5 g Na Cl, 15 g Agar pro Ltr. H₂O) und Standard-I-Nähragarplatten (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Nach Inkubation (30 °C) von verdünnter Hämolymphe aus kranken Bienen entwickelten sich in allen Fällen zwei verschieden große Kolonien auf den Agarplatten. Durch nachfolgende Verdünnungsausstriche wurden Reinkulturen gewonnen. Zur Durchführung der Identifizierungsreaktionen wurden die Bakterien auf Standard-I-Nähragar angezüchtet. Die Identifizierung erfolgte nach bekannten Vorschriften (Manual of Microbiological Methods; Society of American Bacteriologists, Mc Graw-Hill, New York [1957]), wobei zusätzlich folgende standardisierte Testsysteme eingesetzt wurden :

— ENTEROTUBE und OXI-FERM TUBE von HOFFMANN LA ROCHE, Grenzach-Wyhlen und

— API 20 E System von BIO MERIEUX, Nürtingen.

Das AM-Medium zur Untersuchung des K-Einflusses auf das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* besitzt folgende Zusammensetzung :
3,5 g K₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄, 0,5 g Na-Citrat, 0,1 g MgSO₄ × 7 H₂O, 1,0 g (NH₄)₂SO₄ und 2,0 g Glucose auf 1000 ml deionisiertes Wasser.

Infektionsversuche mit isolierten Bakterien

Die aus der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen isolierten Reinkulturen wurden folgendermaßen auf ihre Pathogenität geprüft :

Jeweils 2,0 ml einer Suspension lebender Bakterien mit einer Keimzahl von etwa 5,0 Mio./ml in 30 %-iger Zuckerlösung wurden im Abstand von zwei Tagen insgesamt dreimal an 40 Flugbienen verfüttert. Die Versuche wurden mit beiden Kulturen getrennt und mit einem Gemisch aus beiden Stämmen durchgeführt. Im Kontrollversuch wurde 30 %-iges Zuckerwasser mit den im Autoklaven abgetöteten Bakterien verabreicht. Die einzelnen Versuchsgruppen wurden entweder mit reinem Zuckerwasser oder aber mit mineralstoffreichem Weißstannenhonig gefüttert. Bei der Auswertung der Versuche wurde der Verlauf der Absterbekurven als Kriterium für den pathogenen Einfluß der applizierten Bakterien auf die unterschiedlich gefütterten Bienen herangezogen. Die Ergebnisse basieren auf drei Wiederholungen.

ERGEBNISSE

Alle nach einem Bonitierungsschema als waldtrachtkrank eingestuften Bienenproben wiesen signifikant erhöhte Kalium- und Phosphor-Gehalte, aber deutlich verringerte Werte an Natrium und Calcium bei gleichen Stickstoffkonzentrationen auf (HORN, 1985). Bei diesen Bienen konnte in der Hämolymphe immer ein starker bakterieller Befall nachgewiesen werden. In gesunden Bienen wurden keine Mikroorganismen gefunden. In allen Fällen entwickelten sich zwei verschiedenartige Bakterien, die aufgrund ihrer Kolonienform als große « GK » — Kolonien und kleine « KK » — Kolonien bezeichnet wurden. Die Zahl der kleinen Kolonien lag stets deutlich höher (ca. 100 bis 1000 mal) als die der großen Kolonien. Die cremefarbenen, schleimig-viskosen, glattrandigen großen Kolonien « GK » waren punktförmig bis kreisrund, mit einem Durchmesser von 1,0-4,0 mm (nach 2-tägigem Wachstum auf Standard-I-Nähragar), von glatter Oberfläche und bildeten nach einigen Tagen ein grün-gelbliches, wasserlösliches Pigment, das im UV-Licht fluoreszierte. Unter dem Elektronenmikroskop erwiesen sich die Bakterien als monopolar begeißelt (siehe Abb. 1).

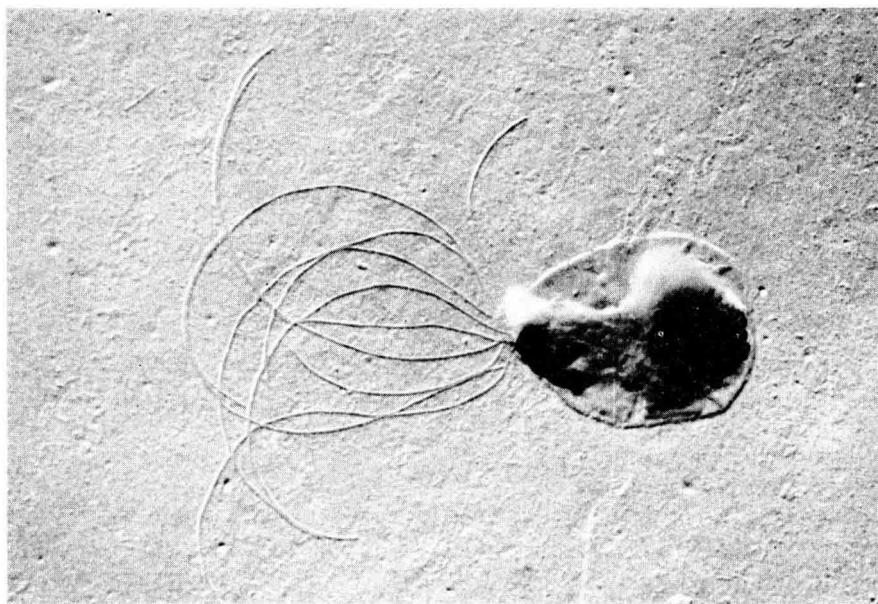


ABB. 1. — Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C, nach Schrägbeschattung ($2,1 \times 10^4$ -fach)

FIG. 1. — Electron micrograph of *Pseudomonas fluorescens*, biotype C, after diagonal shadowing (21,000 \times)

Die nahezu durchsichtigen kleinen Kolonien « KK » erschienen flach auseinandergeflücht, waren kurz nach dem Anzüchten schleimig, sehr schlecht suspendierbar und wurden nach etwa 4-5 Tagen trockener. Das Elektronenmikroskop zeigte peritrich begeißelte Mikroorganismen (siehe Abb. 2).



ABB. 2. — Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Yersinia pseudotuberculosis* nach Schrägbeschattung ($2,1 \times 10^4$ -fach)

FIG. 2. — Electron micrograph of *Yersinia pseudotuberculosis* after diagonal shadowing (21,000 \times)

Die Identifizierung der verschiedenen Kulturen erfolgte anhand der morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften der Bakterien vieler Einzelkulturen (entnommen aus Reinkulturen) eines jeden Kolonientyps. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 in den wichtigsten Auszügen zusammengefaßt.

Die erste Einordnung der Bakterien aus der großen Kolonie « GK » erfolgte nach BUCHANAN *et al.* (1974) in die Familie der Pseudomonadaceae und zwar in die Fluoreszenzgruppe. Beim Vergleich der biochemischen Reaktionen anderer pigmentbildender Pseudomonaden ergab sich die größte Übereinstimmung mit *Pseudomonas fluorescens*, einem Vertreter mit 7 Biotypen A-G (STANIER *et al.*, 1966). Nach Auswertung der entsprechenden biochemischen Reaktionen wurde die größte Übereinstimmung mit dem Biotyp C gefunden (siehe Tab. 2).

TAB. 1. — *Morphologische, physiologische und biochemische Merkmale der aus der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen isolierten Bakterien*

TABL. 1. — *Morphological, physiological and biochemical characters of bacteria isolated from the haemolymph of « black-diseased » bees*

Merkmal Character	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Große Kolonie « GK ») (large colony « GK »)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (Kleine Kolonie « KK ») (small colony « KK »)
Größe Size	0,5-1,5 μm \times 1,5-4,0 μm	0,4-0,5 μm \times 2,0-4,0 μm
Gram-Färbung Gram stain	—	—
Kapsel-Färbung Capsule stain	—	—
Ziehl-Neelsen-Färbung (Säurefestigk.) Acid-fast-stain	—	—
Geißelfärbung Flagella stain	+	+
Neisser-Färbung (Phosphatgranula) Neisser stain (Phosphate granula)	+	+
Lipidgranula Lipid granula	+	—
Sporen Spores	—	—
Beweglichkeit Motility	+	+ (bei 22 °C) — (bei 37 °C)
Wachstum bei / Growth at 4 °C	+	—
42 °C	—	—
Oxidase	+	—
Catalase	+	+
Nitrate reduction aerobic	+	+
anaerobic	+	+
H ₂ S-production	—	—
Indole-production	—	—
Methyl-red	—	—
Voges-Proskauer	—	—
Lackmus-Milch Litmus-milk	—	—

Merkmal Character	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Große Kolonie « GK ») (large colony « GK »)	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (Kleine Kolonie « KK ») (small colony « KK »)
Urease (Christensen)	+	+
Gelatineverflüssigung Liquefaction of gelatin	+	—
Amylase (starch-hydrolysis)	—	—
Lipase (Tween 80)	+	+
Lecithinase (egg-yolk)	+	—
β-Galactosidase	—	—
Arginine dihydrolase	+	—
Lysine decarboxylase	—	—
Ornithine decarboxylase	—	—
Phenylalaninedeaminase	—	—
Tryptophan deaminase	—	—
Fluorescein	+	—
C-Quellen-Verwertung : Carbon sources utilized :		
L-Arabinose	—	—
Glucose	+	+
Rhamnose	—	+
Sorbit Sorbitol	+	—
Adonit Adonitol	+	
β-Alanine	+	
L-Alanine	+	
Ethanol	+	
β-Hydroxybutyrate	—	
Lactate	+	
Propionate	+	
Succinate	+	
Trehalose	+	
Acetate	—	
Arginine	—	
Betaine	—	
Propyleneglycol	—	

TAB. 2. — Biochemische Merkmale von *Pseudomonas fluorescens*, zur Unterscheidung der Biotypen A - G
 TABL. 2. — Biochemical characters of *Pseudomonas fluorescens* which serve to differentiate the biotypes A - G

Merkmal Character	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Large Colony « GK »)							Biotyp G Biotype G
	Biotyp A Biotype A	Biotyp B Biotype B	Biotyp C Biotype C	Biotyp D Biotype D	Biotyp E Biotype E	Biotyp F Biotype F		
L-Arabinose	+	+	—	—	+	+	d	
Saccharate	+	+	—	+	+	+	d	
Propionate	+	+	+	+	+	—	d	
Sorbitol	+	+	d	—	—	+	d	
Adonitol	+	d	+	—	—	—	d	
Propyleneglycol	—	+	d	—	—	—	d	
Ethanol	—	+	d	+	—	—	—	
Denitrification	—	+	+	+	—	+	—	
Xylose	+	d	—	—	—	d	—	
Egg-yolk reaction	+	d	+	+	+	+	d	
Hydrolysis of Tween 80	+	—	d	+	+	d	d	
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	

+ : Positiv für 90-100 % der einzelnen Biotypen ;

— : Negativ für 90-100 % der einzelnen Biotypen ;

d : Unterschiedliche Reaktionen, positiv für 11-89 % der einzelnen Biotypen.

+ : Positive for 90-100 % of strains ;

— : Negative for 90-100 % of strains ;

d : Reactions differ, positive for 11-89 % of strains.

Die Bakterien der kleinen Kolonie «KK» wurden nach BUCHANAN *et al.* (1974) in die Familie der Enterobacteriaceae eingeordnet. Beim Vergleich der einzelnen biochemischen Reaktionen ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Merkmalen der Gattung *Yersinia*. Innerhalb dieser Gattung unterscheidet man die Species *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Nach DAVIES *et al.* (1980) wurden die Bakterien der kleinen Kolonie «KK» der Species *Yersinia pseudotuberculosis* zugeordnet.

Die aus der Hämolymphe von waldtrachtkranken Bienen isolierten Bakterien zeigen einige Eigenschaften, die nicht mit den Literaturangaben übereinstimmen :

— Nach BUCHANAN *et al.* müßten, anders als die Bakterien der großen Kolonie «GK», alle Pseudomonaden Acetat, DL-Arginin und Betain als C-Quellen verwerten.

— Die Bakterien der kleinen Kolonie «KK» zeigten im Gegensatz zu den für *Yersinia pseudotuberculosis* beschriebenen Eigenschaften negative Reaktionen im Methylrot-Test, im β -Galactosidase-Test und in der fermentativen Verwertung von Arabinose unter Säurebildung.

Der Einfluß von Kalium auf die Bakterienentwicklung

Die Untersuchungen haben eindeutig ergeben, daß Kalium einen stimulierenden Einfluß auf die Vermehrungsrate von *Pseudomonas fluorescens* ausübt (siehe Abb. 3). Im Ansatz II, bei dem alle Kaliumsalze durch Natriumsalze ersetzt wurden, konnten sich die Bakterien weitaus schlechter vermehren, als im Versuchsansatz I. Diese Versuche haben weiterhin gezeigt, daß das Kalium im Nährboden durch im Honigtauhonig enthaltene Nährstoffe vollwertig ersetzt werden kann, da das beste Bakterienwachstum in den Ansätzen V und VI erzielt werden konnte. In diesen Varianten wurde einem kaliumfreien Medium (V) und einem normalen Medium (VI) viel Waldhonig zugesetzt. Das Verhalten der Bakterienkultur im Versuchsansatz VI zeigt, daß mineralstoffreicher Weißtannenhonig fördernd auf die Vermehrungsrate dieser offenbar «kaliumliebenden» Kultur wirkt. Da die als *Yersinia pseudotuberculosis* identifizierte kleine Kolonie «KK» nur auf komplexen Nährmedien wächst, konnten die entsprechenden Versuche zur Kaliumabhängigkeit nicht durchgeführt werden.

Infektionsversuch durch Verfütterung von Bakteriensuspensionen bei unterschiedlicher Ernährungsweise der Bienen

Gesunde Bienen zeigen nach oraler Aufnahme der aus der Hämolymphe von waldtrachtkranken Bienen isolierten Mikroorganismen deutliche Krankheits-symptome. Aus den Kurvenverläufen (Abb. 4) wird ersichtlich, daß die Ver-

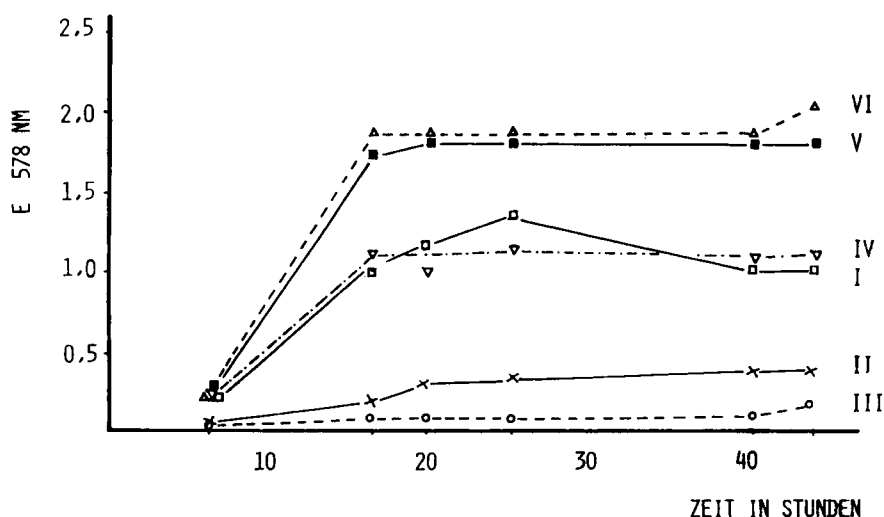


ABB. 3. — Wachstum von *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C, auf AM-Medium (Zusammensetzung, siehe Material und Methoden) mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen

- I : AM-Medium (3,5 g K_2HPO_4 und 1,5 g KH_2PO_4)
- II : Ersatz der K-Salze durch Na-Salze
- III : AM-Medium ohne K-Salze
- IV : AM-Medium ohne K-Salze, Zusatz von 1,0 ml Tannenhonig/ltr.
- V : AM-Medium ohne K-Salze, Zusatz von 10,0 ml Tannenhonig/ltr.
- VI : AM-Medium mit K-Salzen, Zusatz von 10,0 ml Tannenhonig/ltr.

FIG. 3. — Growth of *Pseudomonas fluorescens*, biotype C, on AM-Medium (composition see materials and methods) containing different amounts of potassium

- I : AM-medium (3.5 g K_2HPO_4 and 1.5 g KH_2PO_4)
- II : K-salts replaced by Na-salts
- III : AM-medium without K-salts
- IV : AM-medium without K-salts, addition of 1.0 ml honeydew honey/l.
- V : AM-medium without K-salts, addition of 10.0 ml honeydew honey/l.
- VI : AM-medium containing K-salts, addition of 10.0 ml honeydew honey/l.

abreichung lebender Mikroorganismen mit dem Futter den Totenfall in den einzelnen Versuchsvarianten sprunghaft ansteigen läßt, wobei die Art der Fütterung (Weißtannenhonig oder Zuckerwasser) einen großen Einfluß auf die Bienensterblichkeit in den einzelnen Versuchsvarianten besitzt. In den mit mineralstoffreichem Weißtannenhonig gefütterten Versuchsgruppen zeigten alle erkrankten Bienen ausnahmslos deutliche Symptome der Waldtrachtkrankheit, wie Haarverlust oder Flügelzittern. Bei der Untersuchung der Hämolymphe dieser erkrankten Versuchsbiene gelang in allen Fällen der Erregernachweis. In den mit Zuckerwasser gefütterten Versuchsvarianten war der Infektionserfolg gegenüber den mit Weißtannenhonig ernährten Gruppen wesentlich geringer, was sich durch eine

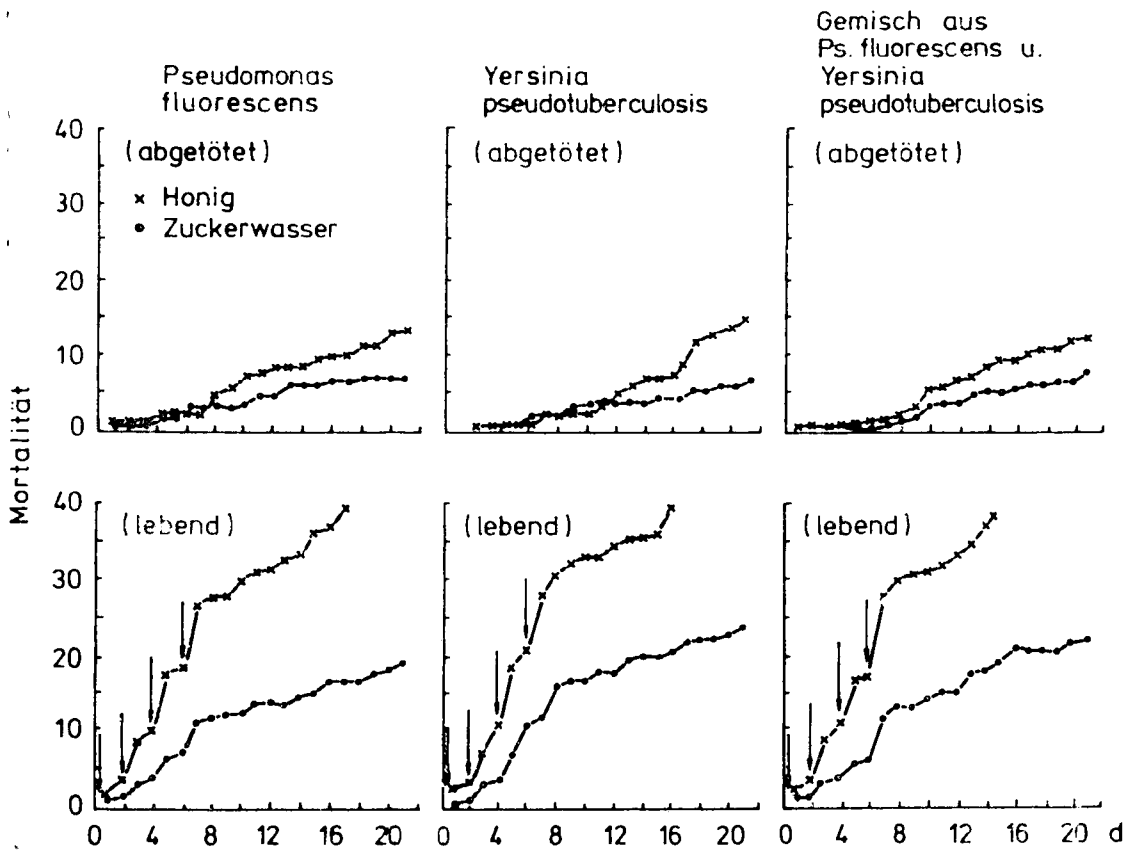


ABB. 4. — Anzahl toter Bienen bei oraler Verabreichung von *Pseudomonas fluorescens*, *Biotyp C* und *Yersinia pseudotuberculosis* bei unterschiedlicher Fütterung der Bienen

(• = Fütterung mit Zuckerwasser, 30 %-ig; × = Fütterung mit Weißtannenhonig). Jede Gruppe bestand aus 40 Bienen. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Verabreichung der Bakteriensuspension, die im infektiösen (Versuchsgruppen) und abgetöteten (Kontrollgruppen) Zustand verfüttert wurden

FIG. 4. — Number of dead bees during oral administration of *Pseudomonas fluorescens*, *biotype C*, and *Yersinia pseudotuberculosis*, with different food supplies

(• = aqueous sugar solution, 30 %; × = honeydew honey). Each group consisted of 40 bees. Arrows indicate the time of oral administration of bacterial suspensions, fed « alive » (test group) and « heat-killed » (control group)

verringerte Mortalitätsrate ausdrückt. In dieser Gruppe verendeten Bienen sowohl mit als auch ohne äußere Kennzeichen der Waldtrachtkrankheit. Ein Erregernachweis gelang nur aus Bienen mit deutlichen Krankheitssymptomen. Die mit abgetöteten Mikroorganismen gefütterten Kontrollgruppen zeigten eine wesentlich

geringere Sterblichkeitsrate als die mit lebenden Mikroorganismen gefütterten Versuchsbienen und während der ersten Versuchswoche keine unterschiedlichen, durch das Futter bedingten Mortalitätsraten. Gegen Versuchsende wurde ein Fütterungseinfluß bemerkbar, wobei die mit Weißtannenhonig gefütterten Gruppen gegenüber den mit Zuckerwasser ernährten Versuchsvarianten eine höhere Bienensterblichkeit aufwiesen. In den mit Weißtannenhonig gefütterten Kontrollgruppen konnten auch vereinzelt Bienen mit deutlichen Symptomen der Waldtrachtkrankheit beobachtet werden. Aus der Hämolymphe dieser Bienen ließen sich beide Species sicher identifizieren. Der Erregernachweis gelang jedoch nie aus Kontrollbienen, die während der Versuchsdurchführung mit reinem Zuckerwasser gefüttert wurden.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß

- a) aus der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen Bakterien isoliert werden können ;
- b) diese Bakterien auf Nährböden außerhalb erkrankter Bienen zu vermehren sind ;
- c) gesunde Bienen nach Aufnahme dieser Bakterien waldtrachtkrank werden ;
- d) aus den infizierten Versuchsbienen diese Bakterien wieder isoliert werden können.

Somit sind die Koch'schen Postulate erfüllt, und die Bakterien können als bienenpathogen eingestuft werden. Die als *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C und *Yersinia pseudotuberculosis* identifizierten Bakterien gehören zu den Erregern von Zoo-Anthroposen, also den Krankheiten, bei denen die Erreger direkt vom Tier auf den Menschen übertragbar sind, oder umgekehrt. *Pseudomonas fluorescens* ist nahezu ubiquitär vorhanden und kann aus Wasser- und Bodenproben leicht isoliert werden. In der Insektenpathologie sind *Pseudomonas Species* ebenfalls von großer Bedeutung. Sie werden hier in die Kategorie der potentiellen Krankheitserreger eingestuft. Darunter versteht man die Erscheinung, daß sich Keime im Hämocölo von Insekten extrazellulär vermehren und eine letal verlaufende Septikämie induzieren (KRIEG, 1961). Yersiniosen sind bei Haus- und Wildtieren weit verbreitet, führen jedoch nur ausnahmsweise zu Erkrankungen, während latente Infektionen häufig sind.

Im Bienenvolk gibt es eine Reihe von Krankheiten, die durch bakterielle Infektionen ausgelöst werden. Die bedeutendsten gehören in die Gruppe der Brutkrankheiten. Daneben wird die Septikämie als eine Krankheit der

TAB. 3. — *Eigenschaften von Pseudomonas apisepticus und den H-Stämmen (nach FEY), verglichen mit den aus der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen isolierten Mikroorganismen Pseudomonas fluorescens Biotyp C und Yersinia pseudotuberculosis*

TABL. 3. — *Characters of Pseudomonas apisepticus and H-Tribes (according to FEY), compared with characters of Pseudomonas fluorescens, biotype C and Yersinia pseudotuberculosis, isolated from haemolymph of black-diseased bees in honeydew flow*

Organismus Organism	<i>Pseudomonas</i> <i>apisepticus</i>	H-Stämme H-tribes	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Yersinia</i> <i>pseudotuberculosis</i>
Kleine Reihe nach FEY. Abbreviated series according to FEY.				
Mannit-Verwert.	+	—	+	+
Mannitol utiliz.				
Gas prod.	+	—	—	
Lactose-Verwert.	+	—	+	—
Lactose utiliz.				
Gas prod.	+	—	—	
Indole	—	—	—	—
Urease	+	—	+	+
Beweglichkeit	—	+	+	+
Motility				
KCN-Tolerance	+	+		—
Verlängerte Reihe nach FEY Extended series according to FEY				
Glucose-Verwert.	+	+	+	+
Glucose utiliz.				
Gas prod.	+	+	—	—
Adonit	+ / —	+	+	—
Adonitol				
Dulcit	—	—	—	—
Dulcitol				
Inosit	+	—	—	—
Inositol				
Saccharose-Verwert.	+	—	—	—
Saccharose utiliz.				
Gas prod.	+	—	—	
Simmons-citrate	+	+	+	
Voges-Proskauer	+	+	—	—
KNO ₃ -reduct.	+	+	+	+
Gelatine-Verflüssigung	+	*	+	—
Liquefaction of gelatin				
H ₂ S-prod.	+	x	—	—
Methyl red.	—	—	—	—

— = negative Reaktion ;

+ = positive Reaktion ;

+ / — = Reaktion positiv oder negativ ;

* = wenn positiv, dann stark verzögert ;

x = nur bei einem Teil der Stämme positive Reaktion.

— = negative reaction ;

+ = positive reaction ;

+ / — = positive or negative reaction ;

* = if positive, delayed reaction ;

x = positive only for some strains.

erwachsenen Bienen beschrieben, die zuerst von BURNSIDE (1928) beobachtet wurde. BURNSIDE identifizierte den Erreger als *Bacillus apisepticus*, der später durch LANDERKIN und KATZNELSON (1959) als *Pseudomonas apisepticus* bezeichnet wurde. Die an Septikämie erkrankten Bienen erinnern in ihrem Verhalten und Aussehen an waldtrachtkranke Bienen und zerfallen postmortal bei geringster Berührung. Auch WILLE *et al.* (1961) haben sich mit dem Problem der bakteriellen Septikämie bei der Honigbiene beschäftigt. Die Krankheit war dadurch gekennzeichnet, daß starke Völker in kürzester Zeit zusammenbrachen. Erkrankte Bienen zeigten jedoch in der Mehrzahl weder im Verhalten, noch äußerlich sichtbar, an Waldtrachtkrankheit erinnernde Symptome. Da die von BURNSIDE und WILLE beschriebenen Krankheitserscheinungen in vielen Merkmalen mit den von uns in der Weißtannentracht beobachteten Krankheitssymptomen übereinstimmen, erscheint es angebracht, die biochemischen Reaktionen von *Pseudomonas apisepticus* (BURNSIDE) und die von WILLE beschriebenen H-Stämme mit den von uns isolierten Species *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C und *Yersinia pseudotuberculosis* zu vergleichen (siehe Tab. 3).

Aufgrund der Vielzahl von unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften kann gefolgert werden, daß weder die von BURNSIDE, noch die von WILLE beschriebenen Mikroorganismen mit den von uns aus Reinkulturen isolierten Bakterien identisch sein können. Bemerkenswert erscheint jedoch die Tatsache, daß die von uns identifizierten Krankheitserreger entweder in die Familie der Pseudomonadaceae, wie der von BURNSIDE isolierte *Pseudomonas apisepticus*, oder aber in die Familie der Enterobacteriaceae, wie die von WILLE und Mitarbeiter beschriebenen H-Stämme gehören. Das Zustandekommen einer bakteriellen Septikämie, die bei allen von uns untersuchten Bienenproben mit typischen Symptomen der Waldtrachtkrankheit beobachtet wurde, könnte darauf beruhen, daß ubiquitäre Mikroorganismen aus der Darmflora der Honigbienen, z.B. nach uneingeschränkter Vermehrung, die Darmzellen so schädigen, daß die Darmschranke passierbar wird, und die Mikroorganismen in das Hämocölon einzudringen vermögen. Daß bei geschwächter Abwehr des Wirtsorganismus saprophytisch lebende Mikroorganismen pathogen wirken können, wird von WATKINS (1940) bei der Diskussion über den oder die Erreger der gutartigen Faulbrut vertreten, wobei *Bacillus pluton* als primäre und eine mangelhafte Versorgung der Larven mit Pollen als sekundäre Ursache der Krankheit angesehen wird. Ähnliche Verhältnisse könnten auch bei der Waldtrachtkrankheit vorliegen. Eine Stütze findet diese Hypothese in der Tatsache, daß sich nach TYSSET *et al.* (1968, 1969) die Darmflora gesunder Bienen aus 70 % gram-negativen, 29 % gram-positiven und 1 % Hefen zusammensetzt, wobei in Sommerbienen etwa 72 % der Arten zu der Familie der Pseudomonadaceae gehört, während der Rest überwiegend von der Familie der Enterobacteriaceae gebildet wird. Die von uns aus waldtrachtkranken Bienen isolierten Species *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp

C und *Yersinia pseudotuberculosis* wurden jedoch niemals von den genannten Autoren gefunden.

Da bei der Auswertung der biochemischen Reaktionen zur Identifizierung der Mikroorganismen im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Arten für beide Bakterienkulturen einige unterschiedliche Testergebnisse gefunden wurden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß es sich bei den von uns isolierten Mikroorganismen um neue, bisher noch unbeschriebene insekten- oder gar bienenspezifische Biotypen handelt. Nach KLUGE (1963) ist die Bakterienflora autochthon, d.h. nur von der zugeführten Nahrung abhängig. Möglicherweise ist dies auch der Grund dafür, daß die Symptome der Waldtrachtkrankheit nahezu ausschließlich bei Nutzung einer Weißtannentracht auftreten. Gestützt wird diese Hypothese noch dadurch, daß die als *Pseudomonas fluorescens*, Biotyp C identifizierte Bakterienkultur ausgesprochen « kaliumliebend » ist. Nach Zusatz von mineralstoffreichem Weißtannenhonig zu einem normalen Medium wird diese Kultur in ihrem Wachstum positiv beeinflußt. Für das Bienenvolk erweist sich dagegen die Nutzung einer guten Waldtracht als ausgesprochener Nahrungsstreß. In Fütterungsversuchen konnte eindeutig festgestellt werden, daß die Mortalitätsrate in den mit Weißtannenhonig ernährten Versuchsgruppen gegenüber den mit Zuckerwasser gefütterten Bienen deutlich erhöht war. Durch die typische Situation in der Weißtannentracht, mit all den negativ zu beurteilenden Einflüssen auf die Konstitution des Bienenvolkes, aber optimalen Voraussetzungen für die Vermehrung spezifischer Mikroorganismen, kann man sich die Ursachen der Waldtrachtkrankheit mit folgenden Möglichkeiten erklären :

a) Gesunde Bienen infizieren sich bei der Aufnahme von Honigtau mit trachtspezifischen Mikroorganismen, die in Abhängigkeit von der « Verfassung » des Bienenvolkes mehr oder weniger stark krankheitsauslösend wirken.

b) Die aus der Hämolymphe waldtrachtkranker Bienen isolierten Mikroorganismen gehören der normalen Darmbakterienflora gesunder Bienen an, die aufgrund der unphysiologischen Nahrungszusammensetzung und weiterer « Stressoren » die Darmschranke passieren und ins Hämocöloin gelangen.

Gegen die erste Theorie spricht die Beobachtung, daß trotz der hohen Virulenz der beiden Mikroorganismen nicht alle in der Weißtannentracht eingesetzten Bienenvölker Symptome der Waldtrachtkrankheit zeigen. Gegen die zweite Möglichkeit sprechen die Ergebnisse der Fütterungsversuche unter kontrollierten Versuchsbedingungen im Flugzelt, wobei es nicht gelang, bei der Verfütterung einer dem Honigtauhonig vergleichbaren Konzentration an Kalium, Krankheitssymptome an weiselrichtigen Bienenvölkern auszulösen. Da aber solche Versuche nicht in der Lage sind, die Situation freifliegender Völker in der Weißtannentracht, mit all den auftretenden Streßsituationen zu simulieren, kann eine Infektion durch im Bienendarm ubiquitär vorkommende Mikroorganismen nicht ausgeschlossen

werden. Neben den hier diskutierten Hypothesen über mögliche Ursachen der Schwarzsucht darf jedoch auch nicht vergessen werden, daß Symptome der Schwarzsucht auch durch Viren hervorgerufen werden können. BAILEY *et al.* (1963, 1965) konnten aus Bienen ein Virus isolieren und identifizieren, das bei Injektion in das Hämocölon, Symptome der Schwarzsucht auslösen kann. Ob dieses als Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) bezeichnete Virus auch bei waldtrachtkranken Bienen in der Weißtannentracht nachzuweisen ist, müssen weitere Untersuchungen klären.

Eingegangen im Dezember 1985.

Angenommen im März 1986.

DANKSAGUNG

Wir danken Frau Dr. KRIEGER, Institut für Infektionskrankheiten, Universität Ulm, für wertvolle Hinweise und Diskussionen im Zusammenhang mit der Identifizierung von *Yersinia pseudotuberculosis*.

RÉSUMÉ

LA MALADIE NOIRE DE L'ABELLE DOMESTIQUE.

II. PRÉSENCE DE BACTÉRIES DANS L'HÉMOLYMPHE DES ABEILLES ATTEINTES ET INFLUENCE SUPPLÉMENTAIRE DU NOURRISEMENT

En 1981 et 1982, au cours de la miellée de miellat, on a prélevé chez des abeilles saines et des abeilles atteintes de maladie noire de l'hémolymphe de la manière suivante : après avoir anesthésié les abeilles au CO₂, on enfonce de fins capillaires de verre dans leur thorax ou entre les 2^e et 3^e segments abdominaux. L'hémolymphe est diluée avec du liquide physiologique ou avec un succédané artificiel d'hémolymphe, puis étalée sur divers milieux complexes. Par dilutions successives on a obtenu des cultures pures, que l'on a identifiées selon des méthodes bien connues, comprenant les systèmes de tests d'identification bactériologique standardisés.

Dans tous les cas étudiés, on a trouvé que l'hémolymphe des abeilles malades renfermait deux espèces différentes de bactéries, tandis que l'hémolymphe des abeilles saines présentes sur la miellée de miellat ne contenait aucun micro-organisme. D'après leurs propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques, les bactéries ont été identifiées comme étant respectivement *Pseudomonas fluorescens* biotype C et *Yersinia pseudotuberculosis* (Tabl. 1 et 2).

La comparaison des caractéristiques biochimiques des bactéries de la maladie noire mentionnées ci-dessus avec celles de *Pseudomonas apisepticus* (Burnside) ou des tribus H décrites par WILLE montre des différences considérables entre les bactéries pathogènes de l'abeille (Tabl. 3).

Une suspension de bactéries vivantes (environ 5 millions de bactéries/ml) dans une solution aqueuse sucrée à 30 % a été administrée par voie orale, trois fois de suite à deux jours d'intervalle, à un groupe de 40 abeilles. Les deux espèces bactériennes ont été données séparément et en mélange. Dans les expériences témoins on a administré des bactéries tuées par la chaleur. Les différents groupes expérimentaux d'abeilles ont été nourris soit avec une solution de sucre pure, soit avec du miel de miellat riche en potassium.

Les expériences d'infection ont montré que les deux espèces de bactéries provoquaient les symptômes de la maladie noire. Les micro-organismes se sont montrés pathogènes pour les abeilles, qu'ils aient été administrés séparément ou ensemble. Les bactéries correspondantes ont pu être résolées à partir de l'hémolymphe des abeilles infectées, satisfaisant ainsi aux quatre postulats de

KOCH. La nourriture donnée au cours des expériences d'infection a joué un grand rôle : les abeilles nourries avec du miel de miellat riche en potassium ont présenté une mortalité environ deux fois plus élevée que celle du groupe témoin nourries avec une solution de sucre (Fig. 4). *Pseudomonas fluorescens*, biotype C, s'est beaucoup mieux développé dans un milieu riche en potassium (Fig. 3). L'absence de potassium a entraîné un taux de croissance moindre et l'addition de miel de miellat riche en potassium a provoqué la stimulation de la croissance.

La maladie noire semble être le résultat de l'infection des abeilles par des bactéries pathogènes que l'on trouve partout. A cause d'un régime déséquilibré en potassium, les abeilles se trouvent en mauvais état physiologique et sont donc plus sensibles à l'infection.

SUMMARY

BLACK DISEASE OF THE HONEY BEE

II. BACTERIA IN THE HAEMOLYMPH OF BLACK-DISEASED BEES AND THE ADDITIONAL INFLUENCE OF FOOD SUPPLY ON BLACK DISEASE

In 1981 and 1982 haemolymph of black-diseased and healthy bees was collected during the honeydew flow as follows : after narcosis with CO₂ bees were punctured with sterile, thin glass capillary tubes in the thorax or between the second and third abdominal segments. Haemolymph was diluted with physiological saline or with an artificial haemolymph substitute, and thereafter it was plated on different complex media. By the dilution streak technique on solid media, pure cultures were obtained which were identified according to well-known procedures including standardized bacteriological identification test systems.

In all cases under investigation the haemolymph of black-diseased bees was found to contain two different bacterial species, whereas haemolymph of healthy bees in honeydew flow contained no microorganisms. On the basis of morphological, physiological and biochemical properties the bacteria were identified as *Pseudomonas fluorescens*, biotype C, and *Yersinia pseudotuberculosis*, respectively (Table 1, 2).

A comparison of biochemical characteristics from the black-disease bacteria, mentioned above, with *Pseudomonas apisepticus* (Burnside) or with the H-tribes, described by WILLE, revealed considerable differences among the various bee-pathogenic bacteria (Table 3).

A suspension of viable bacteria (about 5 million bacteria/ml) in 30 % aqueous sugar solution was administered orally three times at two days intervals to a group of forty bees. The two bacterial species were fed separately and as a mixture. Control experiments included the administration of heat-killed bacteria. The different experimental groups of bees were fed either with a pure sugar solution or with potassium-rich honeydew honey. The infection experiments showed that both bacteria cause the symptoms of black disease. The microorganisms were found to be pathogenic for bees, whether administered separately or in a mixture. From the haemolymph of infected bees, the corresponding bacteria could be reisolated, thereby fulfilling KOCH's four postulates for these bee-pathogenic organisms. Food supply during the infection experiments was of great influence : bees fed with potassium-rich honeydew honey showed about a two-fold higher mortality when compared to the control group fed with sugar solution (Fig. 4). *Pseudomonas fluorescens*, biotype C, was found to grow considerably better in potassium-rich media (Fig. 3). Lack of potassium led to a reduced growth rate, and the addition of potassium-rich honeydew honey resulted in growth stimulation.

Black disease seems to be the result of the infection of bees by ubiquitous, bee-pathogenic bacteria. Due to an unbalanced potassium-rich diet, the bees are in poor physiological condition, and are therefore more susceptible to infection.

LITERATURVERZEICHNIS

- BAILEY L., GIBBS A.J., WOODS R.D., 1963. — Two Viruses from Adult Honey Bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, **21**, 390-395.
- BAILEY L., 1965. — Paralysis of the Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Invertebr. Pathol.*, **7**, 132-140.
- BUCHANAN R.E., GIBBONS N.E., 1974. — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.
- BURNSIDE C.E., 1928. — Septicemia of the Honey Bee. 9. Int. Congr. Entomol., vol. 2, 757-767, Ithaca, New York.
- BURNSIDE C.E., 1928. — A Septic Condition of Adult Bees. *J. Econ. Entomol.*, **21**, 379-386.
- COHN H.J., 1957. — *Manual of Microbiological Methods*. Society of American Bacteriologists, Mc Graw-Hill, New York.
- DAVIES B. *et al.*, 1980. — *Microbiology*. Third Edition. Harper International.
- FEY H., 1979. — Differenzierungsschema für gram-negative aerobe Stäbchen. *Schweiz. Z. Pathol. Bakteriolog.*, **22**, 641-652.
- HORN H., 1985. — Die Waldtrachtkrankheit der Honigbiene. 1. Der Einfluß des Mineralstoffgehaltes in Honigtauhonigen. *Apidologie*, **16** (2), 139-156.
- KLUGE R., 1963. — Untersuchungen über die Darmflora der Honigbiene (*Apis mellifica*). *Z. Bienenforsch.*, **6**, 141-169.
- KRIEG A., 1961. — *Grundlagen der Insektenpathologie*. Wissenschaftliche Forschungsberichte-Naturwissenschaftliche Reihe, Band 69. Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag, Darmstadt.
- LANDERKIN G.B., KATZNELSON H., 1959. — Organisms associated with Septicemia in the Honey Bee. *Canad. J. Microbiol.*, **5**, 169-172.
- STANIER R.Y., PALLERONI N.J., DOUDOROFF M., 1966. — The Aerobic Pseudomonads : A Taxonomic Study. *J. gen. Microbiol.*, **43**, 159-271.
- TYSSET C., DURAND C., 1968. — Contribution à l'étude du microbisme des abeilles butineuses saines (*Apis mellifica* L.). Dénombrement et étude des groupements constitutifs (1^{er} mémoire). *Bull. Apic. Doc. Sci. Tech. Inform.*, **11**, 2, 107-118.
- TYSSET C., DURAND C., 1969. — Contribution à l'étude du microbisme intestinal des abeilles butineuses saines (*Apis mellifica* L.). Etude de quelques groupements fonctionnels (2^e mémoire). *Bull. Apic. Doc. Sci. Tech. Inform.*, **12**, 1, 23-28.
- TYSSET C., BRISOU J., DURAND C., MALAUSSÈNE J., 1969. — Contribution à l'étude du microbisme intestinal des abeilles butineuses saines (*Apis mellifica* L.). Inventaire des populations bactériennes à gram négatif (3^e mémoire). *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, **113**, 31-52.
- TYSSET C., BRISOU J., DURAND C., MALAUSSÈNE J., 1969. — Contribution à l'étude du microbisme intestinal des abeilles butineuses saines (*Apis mellifica* L.). Inventaire des populations à gram négatif (4^e mémoire). *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, **116**, 41-53.
- WATKINS L.H., 1940. — On the Cause of European Foul Brood. *Gleanings in Bee Cult.*, **68**, 689.
- WILLE H., PINTER L., 1961. — Untersuchungen über bakterielle Septikämie der erwachsenen Honigbiene in der Schweiz. *Bull. Apic.*, **4**, 141-178.