Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۹۳- ۱۰۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

اثرات تغذیه سطوح مختلف اسید استیک، پروبیوتیک، اکسی تتراسیکلین و نئومایسین بر جمعیت باکتریایی کلی فرم و لاکتوباسیل در شفیره زنبور عسل (*Apismellifera L.*)

عباسعلی قیصری *: استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، ایران، gheisari.ab@gmail.com
محمد بهجتیان اصفهانی: کارشناس ارشد علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، ایران، behjatian86@gmail.com

چکیده

مقدمه: عوامل محیطی و همچنین جیره غذایی از جمله مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش است. سیستم‌های ضد میکروبی بسیاری به طور طبیعی در زنبوران عسل و غذای آن‌ها وجود دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر تغذیه‌ای استفاده از استیک اسید، کنسانتره مخلوط پروبیوتیکی و آنتی بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و نئومایسین بر تغییرات جمعیت باکتریایی کلیفرم و لاکتوباسیل در شفیره زنبورعسل است.

مواد و روش‌ها: این آزمایش با ۱۴ تیمار آزمایشی شامل سطوح مختلف اسید استیک ۵ درصد (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر)، پروبیوتیک پروتوکسین و آنتی بیوتیک‌های اکسی‌تتراسیکلین و نئومایسین ۲۰ درصد با سطوح ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر و شربت شکر ۵۰ درصد و شربت عسل ۵۰ درصد با ۴ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به مدت ۲۰ روز انجام شد. پس از تغذیه گروه‌های آزمایشی، از هر تکرار یک گرم از نمونه شفیره‌های زنبوران کارگر ۱۸ روزه داخل ۹ سی سی محلول فیزیولوژی ریخته شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف، از هر نمونه در محیط کشت مک کانکی آگار و ام آر اس آگار تلقیح شد. در پایان دوره انکوباسیون شمارش کلونی‌های کلی فرم و لاکتوباسیلوس انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیش‌ترین جمعیت باکتری‌های کلی فرم مربوط به تیمار شربت شکر (۲/۵۸ لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم) و کم‌ترین مقدار مربوط به تیمارهای ۰/۲ و ۰/۳ گرم نئومایسین، اکسی تتراسیکلین و پروبیوتیک و برابر صفربود ($P\ value<0/05$). همچنین، بیش‌ترین جمعیت لاکتوباسیل‌ها به تیمار ۰/۲ گرم پروبیوتیک (۴/۰۵ لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم) و کم‌ترین مقدار به تیمارهای ۰/۲ و ۰/۳ گرم نئومایسین و برابر صفر مربوط بود ($P\ value<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که افزودن پروبیوتیک به شربت شکر مورد استفاده در تغذیه کلونی‌های زنبور عسل، سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در بدن شفیره‌های زنبور عسل نسبت به گروه‌های شاهد خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: تغذیه زنبور عسل، شفیره، اکسی تتراسیکلین، پروبیوتیک، اسید استیک، کلی فرم، لاکتوباسیلوس

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

توسعه اقتصادی نگهداری زنبورعسل به طور مستقیم به سلامت کلونی‌های زنبورعسل بر می‌گردد. تا کنون چندین بیماری باکتریایی مؤثر بر کندوهای زنبورعسل شناسایی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به بیماری لوک آمریکائی[1] و لوک اروپایی[2] اشاره کرد. عوامل این ۲ بیماری به ترتیب باکتری‌های *پانی باسیلوس لاروا*[3] و *ملیسوکوکوس پلوتون*[4] هستند (۱). با وجود این تاکنون مطالعات کمی در مورد میکروفلورای موجود در کندوهای زنبورعسل انجام شده (۲)، ولی مشخص شده است که تعداد باکتری‌های موجود در شان‌های نوزادان کمتر از باکتری‌های موجود در نمونه‌های زنبور بالغ (10^{5}- 10^{1} در مقایسه با 10^{8} - 10^{3}) هستند (۳). تخم‌های تولیدی ملکه زنبور عسل، زنبورانی که در مرحله پیش شفیرگی یا شفیرگی هستند و یا زنبوران عسل کارگر تازه متولد شده معمولاً عاری یا دارای تعداد اندکی میکروارگانیسم در داخل اندام‌های داخلی هستند (۴- ۶). سیستم‌های ضد میکروبی بسیاری به طور طبیعی در زنبوران عسل و غذای آن‌ها وجود داشته (۷ و ۸) و بدون شک نقشی در حفظ این فضای کمابیش عاری از میکروب در نوزادان دارند. به هر حال بعضی از لاروها میکروارگانیسم‌هایی را از زنبوران بالغ، گرده گل، شان‌ها و یا در طی بلعیدن غذای آلوده دریافت می‌کنند (۹). به طور کلی عوامل محیطی و تغذیه‌ای از جمله مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر فلور میکروبی دستگاه گوارش زنبور عسل هستند (۱۰). در این ارتباط از نخستین منابع تغذیه‌ایی که به عنوان افزودنی‌های غذایی مورد توجه قرار گرفتند آنتی بیوتیک‌ها و عوامل ضد باکتریایی بودند (۱۱). این داروها در غلظت‌های پایین همراه با غذا به عنوان محرک رشد و در غلظت‌های درمانی نیز برای مبارزه با بیماری‌ها به کار می‌روند. البته مشخص شده که استفاده نامنظم و زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای حیوانات، با هدف پیشگیری از بروز بیماری می‌تواند به مقاومت در برابر آنتی بیوتیک منجر شود (۱۱). در ارتباط با زنبور عسل نیز پژوهش‌های انجام شده نشان داده که تعداد زیادی از میکروب‌های مفید از جمله لاکتوباسیلوی‌ها شناخته شده در فعل و انفعالات بدن زنبور عسل شرکت دارند. بدین ترتیب استفاده بی‌رویه ازآنتی بیوتیک‌ها ممکن است این میکروارگانیسم‌های مفید را نیز از بین برده و زنبور عسل را از مزایای آن‌ها بی‌بهره سازد (۱۰). علاوه بر این، آنتی‌بیوتیک‌ها دارای خطرات سمیت برای زنبورها بوده و احتمال آلوده شدن عسل نیز وجود دارد (۳ و ۱۲). به همین علت در کشورهایی که استفاده از آنتی بیوتیک ممنوع می‌باشد، بیشتر کلونی‌های مبتلا به بیماری باید معدوم شوند (۱۳). به طور کلی تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر نتیجه درمان بیماری، بیشتر به جمعیت میکروبی دستگاه گوارش مربوط است. بنابراین، هر نوع پژوهش روی تغییرات حاصل از اعمال یک رژیم غذایی خاص بر جمعیت باکتریایی در میکروفلور دستگاه گوارش، به عنوان نقطه آغازی برای یافتن جایگزین‌های مناسبی برای آنتی بیوتیک است (۱۴). اجرای مدیریت تغذیه‌ای به کمک برخی از باکتری‌هایی که به تازگی به عنوان پروبیوتیک‌ها ارزیابی شده‌اند، می‌تواند اثرات سودمندی در بهبود سلامتی ایفا کند. در حال حاضر استفاده از پروبیوتیک‌ها در تغذیه دام و طیور رایج و متداول شده است (۱۵- ۱۸). در رابطه با زنبور عسل نیز نتایج مطالعات مختلف بیان کننده قابلیت باکتری‌های غیربیماری‌زا و مفید به عنوان تحریک کننده سیستم دفاعی زنبور عسل است. در این ارتباط برخی از

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشگران افزایش قابل توجه سطوح رونوشت پپتید ضد باکتریایی آباسین[5] در همولنف زنبور عسل را پس از ۱۲ ساعت ازشروع تغذیه با پروبیوتیک گزارش کرده‌اند (۱۳ و ۱۹).

اسیدهای آلی نیز ترکیبات دیگری هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و به عنوان جایگزین بالقوه برای آنتی بیوتیک‌ها پیشنهاد می‌شوند. این اسیدها می‌توانند به دیواره سلولی باکتریایی مضر نفوذ کرده و عملکردهای طبیعی انواع مشخصی از آن‌ها شامل *سالمونلا*[6]، *اشریشیاکلی*[7]، *کلستریدیا*[8]، *لیستریا*[9] و برخی از انواع کلی فرم[10] را تخریب سازند. البته اسیدی‌کننده‌ها تأثیرات متفاوتی بر انواع میکروب‌های روده ای دارند. این تفاوت‌ها در نتیجه استفاده از انواع و سطوح مختلف اسیدهای آلی در رژیم‌های غذایی ممکن است متغیر باشد (۲۰). واردال[11] گزارش کرد که اسیدیته روده نوزادان زنبور عسل بین ۵ تا ۷/۲ متغیر است (۲۱)، در حالی که بیگنل و هیس[12] بیان کردند که اسیدیته روده بین ۶/۶ تا ۶/۸ در نوسان است (۲۲). همچنین، واردال گزارش کرد که ایجاد تغییر در اسیدیته روده نوزادان زنبور عسل می‌تواند بر تکثیر باکتری *ملیسوکوکوس پلوتون* در دستگاه گوارش و در نتیجه ابتلای نوزادان به بیماریلوک اروپایی تاثیر گذار باشد (۲۱). در بررسی‌های انجام گرفته مشخص شده است که این باکتری به خوبی روی محیط کشت با اسیدیته۶/۶ رشد می‌کند (۲۳)، اما نمی‌تواند روی محیط‌های کشت با اسیدیته ۴ یا ۸ رشد و تکثیر داشته باشد (۲۴). او همچنین اثبات کرد که جمعیت باکتری‌ها در روده نوزادان زنبور عسل در پاسخ به اسیدیته متغیر خواهند بود. این پژوهشگر به طور مؤثری بیماری لوک اروپایی را از طریق تغذیه کردن نوزادان با گرده‌های دارای اسیدیته بالا کنترل کرد (۲۱).

با توجه به موارد بیان شده مربوط به تعاملات بین گونه‌های مختلف باکتریایی درون کندوها و پویایی جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش زنبور عسل می‌توان از این موضوع برای توسعه راهکارهای جدید به منظور کنترل بیماری‌ها و اجتناب از استفاده مواد ضدمیکروبی تجاری مثل آنتی‌بیوتیک استفاده کرد. بدین ترتیب پژوهش حاضر به منظور مقایسه اثرات تغذیه‌ای سطوح مختلف اسید استیک، پروبیوتیک و آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسیکلین و نئومایسین بر جمعیت باکتری‌های کلی فرم و لاکتوباسیل موجود در کل بدن شفیره زنبور عسل انجام گرفت، تا غلظت تأثیر گذاری هر کدام از مواد آزمایشی مورد مطالعه نیز مشخص شود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از نمونه‌های زنبورعسل اروپایی[13] استفاده شد تیمارهای آزمایشی شامل سطوح مختلف اسید استیک ۵ درصد (۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر)، کنسانتره مخلوط پروبیوتیکی[14] (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر) به نام تجاری پروتوکسین و ساخت کشور انگلستان، آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسیکلین ۲۰ درصد (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر) از شرکت داملران رازک، آنتی‌بیوتیک نئومایسین ۲۰ درصد (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر) از شرکت داملران رازک و شربت شکر ۵۰ و شربت عسل ۵۰ درصد (به عنوان گروه‌های شاهد) بودند. برای ممانعت از ترکیب عناصر و یون‌های موجود در آب با مواد افزودنی نیز از آب مقطر استفاده شد. بدین ترتیب آزمایش حاضر با ۱۴ تیمار و ۴ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. کلونی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

تحت آزمایش با ۴ قاب جمعیت زنبور بالغ که حاوی لاروهای زنبور عسل بودند نیز به صورت روزانه از مواد آزمایشی مورد نظر به مدت ۲۰ روز و در ماه مهر تغذیه شدند. سپس، از هر کلونی یک قطعه شان سر بسته به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر که حاوی شفیره‌های زنبوران کارگر با سن ۱۸ روز که از زمان تخم گذاری ملکه علامت‌گذاری شده بودند انتخاب شدند تا اثر مصرف مواد آزمایشی در پایان دوره نوزادی و قبل از تولد زنبوران مشخص شود. سطح شان‌های منتقل شده به آزمایشگاه، ابتدا با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی شد و سپس، شفیره‌ها از سلول‌های شان خارج و در ظرف استریل کاملاً له شد. سپس یک گرم از نمونه داخل ۹ سی سی محلول فیزیولوژی ریخته و با کمک شیکر کاملاً مخلوط شد. پس از تهیه رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5}، از هر نمونه در محیط کشت اختصاصی کلی فرم‌ها (مک کانکی آگار[15]) و محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس‌ها (ام آر اس آگار[16]) تلقیح شد. تمامی محیط‌های کشت ام آر اس ابتدا داخل شیشه بی‌هوازی حاوی گاز پک قرار داده و به همراه بقیه محیط‌های کشت در انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کلونی‌های کلی فرم بعد از ۲۴ ساعت و کلونی‌های لاکتوباسیل بعد از ۷۲ ساعت توسط شمارشگر الکترونیکی شمارش شد (۲۵ و ۲۶).

اطلاعات حاصل از این پژوهش نیز با استفاده از بسته نرم افزاری SAS (۲۷) و با کاربرد مدل آماری طرح‌های کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل آماری شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (۲۸) انجام شد.

نتایج

مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر تغذیه‌ای تیمارهای آزمایشی بر جمعیت باکتری‌های کلی فرم و لاکتوباسیل شفیره‌های زنبور عسل در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از آزمایش حاضر بیانگر آن است که بیش‌ترین جمعیت باکتری کلی فرم مربوط به تیمار شربت شکر (۲/۵۸ لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم) و کم‌ترین یا به عبارتی مقادیر عددی صفر جمعیت کلی‌فرمی مربوط به تیمارهای ۰/۲ و۰/۳گرم نئومایسین، اکسی تتراسیکلین، و پروبیوتیک می‌باشد ($P\ value<0/05$). علاوه بر این، به موازات افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک از میزان جمعیت کلی فرم به میزان زیادی کاسته شد. استفاده از سطوح مختلف استیک اسید و شربت عسل نیز سبب کاهش جمعیت کلی فرم‌ها شد ولی این کاهش‌ها نسبت به تیمار شربت شکر معنادار نبود.

با مراجعه به جدول ۱ می‌توان مشاهده کرد که تیمارهای آزمایشی آثار معناداری روی باکتری‌های لاکتوباسیل داشتند ($P\ value<0/05$)، به نحوی که بیش‌ترین جمعیت لاکتوباسیلوس مربوط به تیمار ۰/۲ گرم پروبیوتیک (۴/۰۵ لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم) و کم‌ترین جمعیت مربوط به تیمارهای ۰/۲ و۰/۳ گرم نئومایسین و برابر صفر بود. استفاده از غلظت ۱۰ گرم در لیتر استیک اسید ۵ درصد نیز سبب افزایش لاکتوباسیلوس در شفیره زنبور عسل نسبت به گروه‌های آنتی بیوتیک و شاهد شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه میانگین جمعیت باکتری‌های کلی فرم و لاکتوباسیل موجود در شفیره زنبور عسل (لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم) (Log CFU/g)

تیمار	عامل	جمعیت کلی فرم‌ها (لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم)	جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها (لگاریتم واحد تشکیل کلونی بر گرم)
استیک اسید ۵ درصد	۱۰ گرم در لیتر	۰/۸۳^{ab}	۳/۹۱^{ab}
استیک اسید ۵ درصد	۲۰ گرم در لیتر	۱/۶۵^{ab}	۲/۳۸^{abc}
استیک اسید ۵ درصد	۳۰ گرم در لیتر	۰/۸۳^{ab}	۱/۱۶^{bc}
پروبیوتیک	۰/۱ گرم در لیتر	۰/۸۳^{ab}	۱/۲۵^{bc}
پروبیوتیک	۰/۲ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۴/۰۵^{a}
پروبیوتیک	۰/۳ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۳/۸۴^{ab}
نئومایسین ۲۰ درصد	۰/۱ گرم در لیتر	۰/۸۳^{ab}	۰/۸۳^{c}
نئومایسین ۲۰ درصد	۰/۲ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}
نئومایسین ۲۰ درصد	۰/۳ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}
اکسی تتراسیکلین ۲۰ درصد	۰/۱ گرم در لیتر	۱/۶۵^{ab}	۰/۸۳^{c}
اکسی تتراسیکلین ۲۰ درصد	۰/۲ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۱/۰۶^{c}
اکسی تتراسیکلین ۲۰ درصد	۰/۳ گرم در لیتر	۰/۰۰^{b}	۲/۳۲^{abc}
شاهد	شربت شکر (۱:۱)	۲/۵۸^{a}	۰/۹۸^{c}
شاهد	شربت عسل (۱:۱)	۰/۸۳^{ab}	۰/۸۳^{c}
خطای استاندارد		۱/۰۱	۱/۴۷

a-c در هر ستون میانگین‌های با حروف متفاوت، با یکدیگر تفاوت معناداری دارند ($P\ value<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر مشاهده شد که برخی از سطوح مواد آزمایشی مورد استفاده سبب کاهش جمعیت کلی‌فرم‌ها شدند. با توجه به اینکه لاروهای جوان (۱ تا ۳ روزه) فقط از ژله رویال تغذیه شده و لاروهای مسن (۴ تا ۶ روزه) از مخلوط عسل رقیق شده (یا شربت شکر) و گرده تغذیه می‌شوند، این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب جیره غذایی در طی دوره لاروی زنبور عسل بر میزان جمعیت کلی فرم‌های آن تأثیرگذار بوده است. مطالعات ال لیتی[۱۷] و همکاران نیز نشان داد که تغذیه منبع تأثیرگذار بر جمعیت میکروبی زنبور عسل است (۱۰). اسمولسکا زیمکاوسکا[۱۸] نیز گزارش کرد که استفاده از آنتی‌بیوتیک فوماژیلین سبب کاهش جمعیت کلی‌فرم‌ها در زنبور عسل شد (۲۹). البته استفاده از سطوح مختلف استیک اسید نیز سبب کاهش جمعیت کلی فرم‌ها نسبت به تیمار شربت شکر شد ولی این کاهش معنادار نبود (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمایش‌های دیگر پژوهشگران نیز نشان داده که اسیدی‌کننده‌ها آثار متغیری بر جمعیت میکروبی روده داشته و این تغییرات ممکن است در نتیجه استفاده انواع مختلف و سطوح متفاوت اسیدهای آلی به اندازه تغذیه آن‌ها با رژیم‌های غذایی متنوع متغیر باشد (۱۶). البته برخی پژوهشگران نیز اظهار داشته‌اند که در محیط آزمایشگاه، نوزادان زنبورعسل قادرند غلظت یونی (بافری) غذای خود را ثابت نگه داشته و در نتیجه، تحت تأثیر تغییرات اسیدیته غذا قرار نمی‌گیرند (۲۱ و ۲۴). در آزمایش حاضر

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه دو گروه کنترل مثبت با یکدیگر نیز نشان داد که اگر چه استفاده از شربت عسل در مقایسه با شربت شکر جمعیت کمتری از کلی‌فرم‌ها را در شفیره‌های زنبوران نشان می‌دهد اما این کاهش از نظر آماری معنادار نیست و به نظر می‌رسد علت این کاهش با حضور مواد ضدمیکروبی درون شهد و عسل قابل توجیه باشد (۳۰).

در این پژوهش استفاده از سطوح ۰/۲ و ۰/۳ گرم در لیتر پروبیوتیک به علت داشتن طیف وسیعی از باکتری‌های لاکتوباسیل بر خلاف سطوح مختلف آنتی‌بیوتیک نئومایسین به طور مؤثری سبب افزایش معنادار آن‌ها در شفیره زنبور عسل شد. بهجتیان اصفهانی[۱۹] و همکاران نیز نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک‌ها سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و آنتی بیوتیک سبب کاهش آن‌ها در دستگاه گوارش زنبوران بالغ شد (۳۱). همچنین، استفاده از استیک‌اسید ۵ درصد با غلظت ۱۰ گرم در لیتر نیز سبب افزایش جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیل در شفیره زنبور در مقایسه با گروه‌های شاهد شده است.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد با استفاده از یک اسیدی کننده مناسب همانند استیک‌اسید ۵ درصد (سرکه معمولی) و یا به واسطه استفاده از پروبیوتیک در تغذیه زنبوران عسل می‌توان نسبت به افزایش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در نوزادان زنبور عسل اقدام کرد.

References

(1) Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., et al. Reclassification of Paenibacillus. Pulvifaciens. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46 (1): 270- 9.

(2) Piccini C., Antunez K., Zunino P. An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. *Journal of Apicultural Research* 2004; 43 (3): 101- 4.

(3) Peng C.Y.S., Mussen E., Fong A., Montigue MA., Tyler T. Effects of Chlortetracycline on honey bee worker larvae reared in vitro. *Journal Invertebrate Pathology* 1992; 60 (2): 127- 33.

(4) Burri R. Die Beziehungen der Bakterienzumlebenszuklus der honigbiene. *SchweizerischeBienen-Zeitung*1947; 70 (6): 273- 6.

(5) Gilliam M. Microbial sterility of the intestinal content of the immature honey bee, *Apismellifera. Journal of Entomology Society* 1971; 64 (1): 315- 6.

(6) Kluge R. Untersuchungenüber die Darmflora der honigbienen, *Apismellifera*. Z. Bienen-Forsch 1963; 6 (1): 141- 69.

(7) Burgett D.M. Antibiotic systems in honey nectar and pollen. In: Morse RA., Nowogrodzki R., editors. *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*, Second Edition. Xi 474p. Ithaca, New York, Usa; London, England, Uk: Cornell University Press; 1990: 329- 40.

(8) Yatsunami K., Echigo T. Antibacterial action of honey and royal jelly. *Honeybee Science* 1984; 5 (3): 125- 30.

(9) Gilliam M., Prest DB. Microbiology of the feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1987; 49 (1): 70- 5.

(10) Van den Bogaard AE. Antimicrobial resistance- relation to human and animal exposure to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40 (1): 453- 4.

(11) Lehnert T., Shimanuki H. Oxytetracycline residues in honey following three different methods of administering the antibiotic. *Apidologie* 1981; 12 (2): 133- 6.

www.SID.ir

Archive of SID

(12) Gregorc A., Bowen ID. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apismellifera L.*) after infection with Bacillus larvae, the causative agent of American foulbrood disease. *Journal Cell Biology International* 1998; 22 (2): 137- 44.

(13) Bedford M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World's Poultry Science Journal* 2000; 56 (4): 347- 65.

(14) Cartman S., La Ragione R.M., Woodward MJ. Bacterial spore formers as probiotics for poultry. *Journal International Food Information Service* 2007; 4 (3): 21- 30.

(15) Gunal M., Yayli G., Kaya O., Karahan N., Sulak O. The effects of antibiotic growth promoter: probiotic or organic Acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science* 2006; 5 (2): 149- 55.

(16) Rekiel A., Wiecek J., Bielecki W., Gajewska J., Cichowicz M., Kulisiewicz J., et al. Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIOMOS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of intestine and composition of microflora. Archives of Animal Breeding. *Tierzucht. Dummerstorf* 2007; 50 (2): 172- 80.

(17) Schrezenmeir J., Devrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73 (2): 361- 4.

(18) Armitage S.A.O., Thompson J.J.W., Rolff J., Sivajothy M.T. Examining costs of induced and constitutive immune investment in tenebriomolitor. *Journal of Evolutionary Biology* 2003; 16 (5): 1038- 44.

(19) Moines D. Non- antimicrobial production enhancers for swine: A review. Pork Checkoff. National Pork Board Fact Sheet 2010: 1- 12.

(20) Wardall G.I. European foulbrood: Association with Michigan blueberry pollination, and control. [Dissertation]. Michigan: Michigan University; 1982.

(21) Bignell D.E., Heath L.A. Electropositive redox state of the fifth-instar larval gut of Apismellifera. *Journal of Apiculture Research* 1985; 24 (4): 211- 3.

(22) Hornitzky M., Smith L. Procedures for the culture of Melissococcus pluton from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research* 1998; 37 (4): 293- 4.

(23) Djordjevic S.P., Noone K., Smith L., Hornitzky M.A.Z. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of Melissococcus pluton. *Journal of Apicultural Research* 1998; 37 (3): 165- 74.

(24) Grabow W.O.K., Hilner C.A., Coubrough P. Evaluation of Standard and Modified M-FC., MacConkey., and Teepol Media for Membrane Filtration Counting of Fecal Coliforms in Water. *Applid and Environmental Microbiology* 1981; 42 (2): 192- 9.

(25) Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparison of the growth of lactobacillus acidophilus and bifidobacterium bifidum species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Scientiarum Polonorum of Technologia Alimentaria* 2008; 7 (2): 5-20.

(26) SAS Institute. *SAS Users Guide*: *Statistics*, 6th ed. USA: SAS Institute, Cary, NC; 1988.

(27) Duncan D.B. Multiple range and multiple F test. *Biomettrics* 1955; 11: 1- 42.

(28) Smolska-Szymczewska B. The influence of the chosen chemotherapeutics on the intestinal flora of the honey bee. *Apiacta* 1989; 24 (3): 71- 8.

(29) Tichy J., Novak J. Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2000; 6 (5): 383- 9.

www.SID.ir

Archive of SID

(30) Behjatian Esfahani M., Gheisari A.A., Kasra Kermanshahi R., Khodami A., Sariyan S. Nutritional effects of oxytetracycline, probiotic and acetic acid with sugar syrup on the bacterial flora of the gastrointestinal tract of adult bees. *Proceeding of The 4th Congress on Animal Science*; Iran Karaj; 2010: 4818- 22.

[1]- American foul brood (AFB)
[2]- European foul brood (EFB)
[3]- *Peanibacilluslarvae larvae*
[4]- *Melissoccus pluton*
[5]- Abaecin
[6]- *Salmonella spp*
[7]- *Escherichia coli*
[8]- *Clostridia spp*
[9]- *Listeria spp*
[10]- Coli forms
[11]- Wardall
[12]- Bignell and Heath
[13]- *Apis mellifera L.*
[14]- پروبیوتیک پروتوکسین به شکل کنسانتره مخلوط ۲×۱۰^{۹} و دارای مجموعه‌ای از سویه‌های گوناگون از باکتری‌های سودمند شامل *Lactobacillus plantaroum*، *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*، *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus rhamnosus* و *Bifidobacteriumbifidum* بود و در داروخانه دامپزشکی موجود است.
[15]- MacConkey agar
[16]- MRS agar
[17]- El-Leithy
[18]- Smolska-Szymczewska
[19]- Behjatian Esfahani

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of feeding different levels of acetic acid, probiotic, Oxytetracycline and Neomycin on populations of Coliform and Lactobacillus in pupae of honey bee (*ApismelliferaL)*

Abbasali Gheisari *
Associate Professor of Poultry Nutrition, Isfahan Agricultural Research Center, Isfahan, Iran, gheisari.ab@gmail.com
Mohammad Behjatian Esfahani
M.Sc. of Animal Science, Isfahan Agricultural Research Center, Isfahan, Iran, behjatian86@gmail.com

Abstract

Introduction: Environmental factors and diet are of the most important factors that affect the microbial population of the gastrointestinal tract and there are many antimicrobial systems in honey bees and their foods naturally. The purpose of this study was to investigate the effect of dietary acetic acid and concentrated mixture of probiotic and antibiotics of oxytetracycline and neomycin on population coliform bacteria and lactobacilli changes in honey bee pupae.

Materials and methods: The experimental treatments consisted of different levels of acetic acid 5 % (10, 20 and 30 g/l), protexin probiotic, Oxytetracycline 20 % and Neomycin 20 % antibiotics with levels of 0.1, 0.2 and 0.3 g/l and sugar syrup 50 % and honey syrup 50 % was performed in a completely randomized design with four replications for 20 days. After feeding the experimental groups, one gram of 18 day old worker bees' pupae samples of each colony was poured into 9 ml of physiological solution. After preparing different dilutions, each sample was inoculated on MRS agar and MacConkey agar medium. Lactobacillus and coliform colonies were counted after finishing incubation period.

Results: The results showed that the highest population of coliform bacteria treated with sugar syrup (2.58 log CFU/g) and the lowest in treatments 0.2 and 0.3 g Neomycin, Oxytetracycline, and probiotic that were equal to zero (*P value* <0.05). The highest population of Lactobacillus bacteria belonged to 0.2 g probiotic treatment (4.05 log CFU/g) and the lowest was for 0.2 and 0.3 g Neomycin treatment which was equal to zero (*P value* <0.05).

Discussion and conclusion: This study showed that the addition probiotic in sugar syrup for feeding larvae resulted in increasing population of Lactobacilli in the body of the bee pupae than the control groups.

Key words: Honey bee feeding, Pupae, Oxytetracycline, Probiotic, Acetic acid, Coliform, Lactobacillus

* Corresponding author
Received: April 6, 2014 / **Accepted:** June 21, 2014

www.SID.ir