Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۲ پاییز ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106297

بررسی فلور قارچی کلنی‌های زنبورعسل استان آذربایجان غربی

• **مصطفی مرادی (نویسنده مسئول)**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی
• **مجتبی محرمی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
تاریخ دریافت: آذر ۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۹۴
Email: m.moradi@rvsri.ir

چکیده

در این بررسی که هدف اصلی آن شناسائی فلور قارچی کلنی های زنبورعسل استان آذربایجان غربی بوده است، طی سالهای ۱۳۸۴ الی۱۳۸۹ از تعدادی از کلنی های زنبورعسل این استان بالغ بر ۲۰۰۰ نمونه شامل زنبور بالغ، لارو و شفیره، گرده گل و عسل در شرایط تمیز ودر ظروف نمونه برداری پلاستیکی جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها بعد از آماده سازی، بطور جداگانه در محیط کشت سابرودگستروز آگار کشت شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و تا ۱۰ روز بعد از کشت نمونه ها، قارچها و مخمرهای مختلف موجود در آنها شناسائی وثبت گردیدند. در طول سه فصل نمونه برداری از ۵۰۰ نمونه زنبوربالغ ۳۵۷ مورد(۷۱/۴ درصد) و از ۵۰۰ نمونه لارو و شفیره ۳۵۳ مورد(۷۰/۶ درصد) و از ۵۰۰ نمونه گرده گل ۴۵۹ مورد(۹۱/۸ درصد) و از ۵۰۰ نمونه عسل ۳۶۴ مورد(۷۲/۸ درصد) آلوده به قارچها و مخمرهای مختلف بوده اند. قارچها و مخمرهای جداسازی شده و میزان حضور آنها در نمونه ها عبارتند از: مخمرها(۲۹ درصد)، پنی سیلیوم(۱۲ درصد)، موکور(۸ درصد)، هلمنتوسپوریوم(۴ درصد)، آلترناریا(۳ درصد)، کلادوسپوریوم(۲/۵ درصد)، پسیلومایسس(۱/۱ درصد)، اسکوپولاریوپسیس(۱ درصد)، رایزوپوس(۸/ درصد)، استمفیلیوم(۸/ درصد) و سپتونیوم(۳/ درصد). این نتایج نشان می دهد که انواع قارچها ومخمرها با میزان نسبتاً زیادی درکلنی های زنبور عسل وجود دارند که در صورت عدم رعایت بهداشت کلنی های زنبورعسل و عدم دقت در استحصال و نگهداری فراورده های آن، می توانند به عنوان یکی از عوامل بروز عوارض در زنبورعسل و کاهش کیفیت فراورده های آن و همچنین مخاطراتی در مصرف کنندگان فراورده های زنبورعسل تلقی شوندکه البته میزان تأثیر این عوامل در بروز این مشکلات نیازمند بررسیهای بیشتری است.

کلمات کلیدی: کلنی زنبورعسل، آذربایجان غربی،زنبورستان، قارچ، مخمر

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 112 pp: 51-59

Study of honeybee colonies Mycoflora in West Azarbaijan Province

By: Moradi, M., (Corresponding Author) Member of Board Scientific Agriculture Research Center and Nature Resource West Azarbaijan. and Moharami, M., Member of Board Scientific Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Received: November 2015 Accepted:December 2015

Email: m.moradi@rvsri.ir

In this study that its main goal is identification of honeybee colonies mycoflora in West Azarbaijan province, 2000 samples of adult bee (500 samples), larvae and pupae (500 samples), pollen (500 samples) and honey (500 samples), randomly collected of apiaries in 1384-1389. After preparing and culturing of samples in SDA media, many different fungi and yeasts isolated. During three seasons of sampling, 357 samples of Adult bee (71.4 %), 353 samples of larvae and pupae (70.6 %), 459 samples of pollen (91.8 %) and 364 samples of honey (72.8 %) were contaminated with different fungi and yeasts. Main fungi and yeasts that identified and their percent were: *Aternaria spp.* 2.9%, *Aspergillus. fl* (4.5%), *Aspergillus fumigatus* (4.55%), *Aspergillus niger* (13%), *Aspergillus spp.* (0.1%), *Cladosporium spp.* 0.65%, *Helmetosporiun spp.* 3.9%, *Mucor spp.* 7.65%, *Paecilomyces spp.* 0.8%, *Penicillium spp.* (12.15%), *Rhizopus spp.* (0.4%), *Scopolariupsis spp.* (0.9%), *Sepdonium spp.* (0.3%), *Stemphylium spp.* (0.9%), Yeasts (58.05%). This study shows that honey bee colonies can be contaminated with many fungi and yeasts that much of them are pathogenic for human. In other hand, most of those fungi can produce different mycotoxines and metabolites that are harmful for honeybee products consumers.

Key words: Honey bee colony, Apiary, West Azarbaijan, Fungi,Yeast

مقدمه

در حال حاضر میزان بسیار زیادی زنبورعسل در مناطق مختلف جهان پرورش داده می‌شود و از جنبه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. از سوی دیگر زنبورعسل نقش بسیار مؤثری در گرده افشانی و افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و بطور مستقیم و غیر مستقیم نقش بی‌بدیلی در ارتقای اقتصاد کشاورزی کشور دارد (Klein et al., 2007). بطوریکه مشخص شده است که ارزش گرده افشانی زنبورعسل در کشاورزی آمریکا بیش از ۱۴ میلیارد دلار در سال است (Morse and Calderone, 2000) و ارزش اقتصادی گرده افشانی زنبورعسل در کل جهان بیش از ۱۵۳ میلیارد یورو در سال ۲۰۰۵ بر آورد شده است (Gallai et al.,2009). لذا پرداختن به امر پرورش و بهداشت آن حائز اهمیت بوده و نیاز به برنامه‌ریزی و اقدامات لازم دارد. یکی از عواملی که می‌تواند صنعت زنبورداری کشور را با خطر مواجه سازد عوامل بیماری‌زا و آفات مختلف زنبورعسل است که در صورت شیوع در زنبورستان‌ها می‌توانند خسارات زیادی به این صنعت وارد سازند. از سوی دیگر بسیاری از عوامل بیولوژیک و شیمیائی که وارد فراورده‌های زنبورعسل می‌شوند می‌توانند برای مصرف کنندگان محصولات این موجود خطراتی به همراه داشته باشند که از آن جمله می‌توان به عوامل قارچی اشاره نمود که علاوه بر ایجاد خسارت مستقیم در کلنی‌های زنبورعسل می‌توانند فراورده‌های آن را از جمله عسل و گرده گل را آلوده نموده و مصرف آن‌ها را برای انسان مشکل آفرین نمایند که مهم‌ترین مشکل حاصله تولید آفلاتوکسین‌های مختلف است که در صورت افزایش میزان آن‌ها، خطرات زیادی برای مصرف کنندگان خواهند داشت (Reybroeck. W,2003; WHO 2009). در نتیجه شناسائی قارچها و مخمرهای مختلف کلنی‌های زنبور عسل از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که با این کار می‌توان قارچها و مخمرهای خطرساز برای بهداشت زنبورعسل و مصرف‌کنندگان فراورده‌های آن را مشخص نموده و اقدامات لازم برای جلوگیری از گسترش، رشد و تکثیر زیاد در فراورده‌های کلنی‌های زنبورعسل صورت پذیرد. لذا با این دیدگاه و اهمیتی که در شناسائی فلور قارچی کلنی‌های زنبور عسل وجود دارد، این بررسی در سطح زنبورستان‌های استان آذربایجان غربی طی سال‌های ۱۳۸۴ الی ۱۳۸۹ انجام گرفته است.

اکثر قارچها و مخمرهای مختلفی که معمولاً بصورت ساپروفیت در سطح بدن زنبور و در شان‌های مومی محل پرورش نوزادان حضور دارند بر روی گیاهان و محیط‌های مورد بازدید زنبورعسل حضور داشته و زنبوران چراگر آن‌ها را به داخل کندوها می‌آورند و با توجه به فراهم بودن دما و رطوبت مناسب در داخل کندوها، محیط مناسبی برای رشد انواع قارچها فراهم می‌آید (Jennings and Lysek, 1999). بسیاری از قارچهای موجود در داخل کلنی‌های زنبورعسل برای حیات کلنی و فراوری گرده گل ذخیره شده(نان زنبور) لازمند و تعدادی دیگر از قارچها می‌توانند به عنوان عوامل بیماری‌زای زنبورعسل عمل نمایند (Gillian & Vandenberg, 1997) ولی

www.SID.ir

Archive of SID

مکانیسم‌های دفاعی زنبورعسل می‌تواند زنبورها را در مقابل خطرات آن‌ها محافظت نمایند (Glinski and Buczek, 2003).

دو بیماری قارچی نوزاد گچی و نوزاد سنگی در زنبورعسل از اهمیت خاصی برخوردارند (Bailey, 1991). این دو بیماری دارای علائم مشخص در کلنی‌های زنبورعسل بوده و گاهی تلفات شدیدی را در آن‌ها ایجاد نموده و خسارت زیادی به زنبورداران وارد می‌آورند و در اکثر نقاط جهان به عنوان دو بیماری مهم زنبورداری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. عامل بیماری نوزاد گچی قارچ هتروتالیک آسکوسفرا آپیس و عامل بیماری نوزاد سنگی قارچهای آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس است که بسته به شرایط محیط و سایر عوامل مستعدکننده کلنی‌ها، می‌توانند مشکلات زیادی در آن‌ها ایجاد نمایند (K.A 2010, Aronstein).

قارچهای بسیار زیادی که به داخل کلنی‌های زنبورعسل و فراورده‌های آن نفوذ کرده‌اند در صورت فراهم شدن شرایط رشد می‌توانند خطراتی برای زنبورعسل و بالاخص مصرف‌کنندگان فراورده‌های آن بوجود آورند. در یک بررسی که توسط Martha Gilliam در سال ۱۹۷۷ روی زنبوران بالغ کارگر انجام گرفته است ۲۵ درصد از زنبورها واجد انواع قارچها بوده‌اند که بیشترین میزان آن‌ها مربوط به قارچهای *Torulopsis magnoliae, Torulopssi glabrata*, *Hansenula anomala*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium cyclopium var. echinulatum* بوده است. ایشان کپک‌ها را در زنبورانی که با سوکروز تغذیه می‌شدند بیشتر از گروه‌های دیگر جداسازی نموده است.

M.N. Shoreit در سال ۱۹۹۵ در مصر در کلنی‌های زنبورعسلی که مبتلا به بیماری نوزاد سنگی قارچهای *Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus oryzae* and *Penicillium* funiculosum جداسازی نموده است. در یک بررسی دیگر توسط Martha Gilliam در سال ۱۹۷۴ قارچهای *Torulopsis magnoliae, Candida parapsilosis* و *Torulopsis grabrata* از کانال گوارشی زنبوران بالغ جداسازی شده است. Martha Gilliam در زنبورانی که با آنتی بیوتیک‌ها تغذیه می‌شدند قارچهای *Alternaria tenuissima, Cladosporium cladosporoides, Bipolaris spp., Curvularia brachyospora, Penicillium ochro-chloron, Penicillium urticae, and Rhizopus arrhizus* را به میزان فراوان جداسازی نموده است. Miroslava Kačániová و همکارانش(۲۰۰۹) انواع قارچها را از گرده گل موجود در داخل کلنی‌ها جداسازی نموده‌اند که قارچهای *Alternaria, Cladosporium* و Penicillium دارای بیشترین فراوانی بوده‌اند همچنین ایشان قارچهای *Penicillium*, *Cladosporium* و *Alternaria* را به میزان زیاد در عسل‌های بررسی شده جداسازی نمودند. محققین در بررسی آلودگی قارچی محتویات داخل کلنی‌های زنبورعسل اقدام به بررسی آلودگی انگل‌های زنبورعسل از جمله مایت واروآ با انواع قارچهای داخل کلنی نموده‌اند بطوری‌که Benoit و همکارانش(۲۰۰۴) در بررسی آلودگی مایت‌های واروآ با انواع قارچها، قارچهای *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma, Alternaria, Rhizopus, Mucor* را به میزان زیاد از این مایت‌ها جداسازی نموده‌اند و متذکر شده‌اند که این مایت‌ها در انتقال قارچها به نوزادان زنبور عسل نقش مؤثری خواهند داشت.

بسیاری از قارچهای موجود در فراورده‌های زنبورعسل قادر به تولید متابولیت‌ها و آفلاتوکسین‌های متعددی‌اند که می‌توانند مشکلاتی را در مصرف کنندگان فراورده‌های کلنی‌ها بوجود آورند. بطوری‌که Martins و همکارانش که با استفاده از روش کروماتوگرافی به جستجوی آفلاتوکسین در عسل پرداخته‌اند نسبت به حضور آن‌ها در عسل هشدار داده‌اند. البته آن‌ها در نمونه‌های مورد بررسی حضور آفلاتوکسین را ثابت ننموده‌اند (Martins et al, 2003). اما Gonzalez و همکارانش در یک بررسی نشان داده‌اند که تعدادی از قارچهای موجود در گرده گل داخل کلنی‌های زنبورعسل قادر به تولید مایکوتوکسین می‌باشند. آن‌ها با بررسی میزان آلودگی نمونه‌های گرده گل با انواع قارچها، قارچ پنی سیلیوم و انواع مخمرها را به میزان زیادی جداسازی نموده‌اند و قارچهای دیگری از جمله پنی سیلیوم وروکوزوم، آسپرژیلوس نیجر، آسپروژیلوس کاربوناریوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آلترناریا که از نظر تولید مایکوتوکسین مهمند، جداسازی نموده‌اند و ذکر نموده‌اند که آلترناریا به میزان زیاد جداسازی شده است. این محققین بعد از کشت قارچهای جداسازی شده، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایکوتوکسین‌های اوکراتوکسین A(OTA) و آفلاتوکسین‌های B۱، B۲، G۱ و G۲ را مورد جستجو قرار داده‌اند. در نهایت ذکر کرده‌اند که به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۵۳/۳ درصد، ۳۳/۳درصد و ۲۵ درصد از جدایه‌های آسپرژیلوس کاربوناریوس، آسپرژیلوس اوکراسئوس، پنی سیلیوم وروکوزوم و آسپرژیلوس نیجر تولید OTA می‌کنند. علاوه بر این ۲۸/۶ درصد از جدایه‌های گروه آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتکوس قادر به تولید آفلاتوکسین B۱ می‌باشند. آفلاتوکسین B۲ فقط در ۱۰ درصد از کشت‌ها تشخیص داده شده است. از سوی دیگر آفلاتوکسین‌های G۱ و G۲ در کشت‌ها تشخیص داده نشده‌اند (Gonzalez et al, 2006). با توجه به نقش قارچها در سلامتی زنبورعسل و بهداشت فراورده‌های آن، انجام یک بررسی روی میزان آلودگی کلنی‌های زنبورعسل در ایران ضروری به نظر می‌رسید. لذا در این بررسی که طی پنج سال در استان آذربایجان غربی انجام گرفته است اقدام به جداسازی انواع قارچها و مخمرها از کلنی‌های زنبور عسل شده است که می‌تواند شروعی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه باشد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری

در این بررسی از روش نمونه‌گیری خوشه‌ای چند مرحله‌ای- تصادفی استفاده شد. انتخاب نمونه‌ها در سطح استان به این صورت بوده است که از میان شهرستان‌های استان ۵ شهرستان در هر فصل(بهار، تابستان و پائیز) و از میان زنبورستان‌های هر شهرستان ۸ زنبورستان و در هر زنبورستان ۵ کلنی بطور کاملاً تصادفی انتخاب شده و از هر کلنی حدود ۳۰ عدد زنبوربالغ، ۲۰ عدد لارو و شفیره، ۱۰ گرم عسل و ۵×۵ سانتی متر از سلول‌های مومی حاوی گرده گل را در ظروف پلاستیکی استریل شده با اشعه گاما و در شرایط تمیز برداشت گردیده و به آزمایشگاه انتقال داده شده است. شهرستان‌های مورد نظر، تعداد زنبورستان، تعداد کندو و تعداد نمونه‌های اخذ شده از آن‌ها را در طی زمان نمونه‌گیری در جدول‌های ۱ و ۲ ذکر شده‌اند.

روش آزمایش

آماده‌سازی محیط‌های کشت قارچی

در این بررسی برای جداسازی قارچهای موجود در نمونه‌ها از محیط

www.SID.ir

Archive of SID

کشت قارچی سابرودکستروز آگار (SDA) حاوی کلرامفنیکل(جهت جلوگیری از باکتری‌ها) استفاده گردید. محیط کشت بعد از تهیه در پلیتهای شیشه‌ای استریل تقسیم و تا زمان کشت نمونه‌ها در داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کشت نمونه‌ها

نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه به شیوه زیر کشت داده شدند:

۱-زنبور بالغ: بعد از بیهوش نمودن و کشتن زنبورها با پنبه آغشته به اتر در داخل ظروف نمونه‌گیری، آن‌ها را بیرون آورده و با استفاده از پنس ریز، لوله گوارشی آن‌ها را بیرون کشیده و در داخل ظرف دیگری با آب مقطر استریل چند بار شستشو داده می‌شد. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی ۸۵/۰٪ استریل از آن‌ها هموژنی تهیه نموده و در کنار شعله و با رعایت شرایط نسبتاً استریل در سطح محیط کشت سابرودکستروز آگار کشت داده و روی پلیت‌ها کد شهرستان، زنبورستان و کلنی نمونه‌گیری شده، نوشته می‌شد.

۲- لارو و شفیره: نمونه‌های لارو و شفیره را بعد از بیرون آوردن از ظروف نمونه‌گیری، در داخل درب همان ظرف قرار داده و با استفاده از آب مقطر استریل از آن‌ها هموژنی تهیه کرده و به شیوه فوق کشت داده و کد شهرستان، زنبورستان و کلنی نمونه‌برداری شده را روی آن‌ها نوشته می‌شد.

۳- عسل: نمونه‌های عسل را از داخل سلول‌های مومی خارج کرده و با چند میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط نموده و از آن‌ها هموژن کاملی تهیه کرده و همانند نمونه‌های قبل داده شدند.

۴- گرده گل: نمونه‌های گرده گل همانند نمونه‌های عسل آماده و کشت داده شدند.

انکوباسیون نمونه‌ها

بعد از کشت نمونه‌ها در محیط کشت سابرودکستروز آگار، پلیت‌ها

جدول ۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی کل نمونه های مورد آزمایش بر حسب شهرستان در استان آذربایجان غربی

ردیف	نام شهرستان	نمونه	
		فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
۱	ارومیه	۴۰۰	٪ ۲۰
۲	خوی	۴۰۰	٪ ۲۰
۳	سلماس	۳۲۰	٪ ۱۶
۴	میاندوآب	۳۲۰	٪ ۱۶
۵	اشنویه	۴۰۰	٪ ۲۰
۶	پیرانشهر	۸۰	٪ ۴
۷	نقده	۸۰	٪ ۴
جمع		۲۰۰۰	٪ ۱۰۰

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی کل نمونه های مورد آزمایش بر حسب نوع نمونه در استان آذربایجان غربی

ردیف	نوع نمونه	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
۱	زنبور بالغ	۵۰۰	٪ ۲۵
۲	شفیره	۵۰۰	٪ ۲۵
۳	گرده	۵۰۰	٪ ۲۵
۴	عسل	۵۰۰	٪ ۲۵
جمع		۲۰۰۰	٪ ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

حداکثر به مدت ۱۰ روز در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

تشخیص قارچ‌ها

طی دوره انکوباسیون نمونه‌ها، روزانه پلیت‌ها را مورد مشاهده قرار داده و قارچ‌های رشد کرده و تعداد پرگنه‌های آن‌ها در جداول مربوطه ثبت می‌شدند. از قارچ‌هائی که از نظر ماکروسکوپیک و شکل پرگنه‌ها قابل تشخیص نبودند لام میکروسکوپی تهیه کرده و با رنگ کاتن بلو رنگ‌آمیزی نموده و خصوصیات مرفولوژیکی آن‌ها را در زیر میکروسکوپ مشاهده نموده و تشخیص نهائی داده می‌شدند. در صورتی که با این روش قارچ‌ها قابل تشخیص نبودند، از آن‌ها کشت روی لام (Slide culture) تهیه نموده و بعد از رشد لازم، طبق دستورالعمل‌های موجود تشخیص داده می‌شدند.

نتایج

طی این بررسی جمعاً از هرکدام از نمونه‌ها تعداد ۵۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید و بعد از مراحل کشت و تشخیص قارچ‌های جداسازی شده، بطور کلی ۷۱/۴ درصد از نمونه‌های زنبور بالغ، ۷۰/۶ درصد از نمونه‌های لارو و شفیره، ۹۱/۸ درصد از نمونه‌های گرده گل و ۷۲/۸ درصد از نمونه‌های عسل دارای آلودگی قارچی بودند که در جدول ۳ به تفصیل بیان شده‌اند.

در جدول ۴ قارچ‌های جدا سازی شده و درصد آن‌ها در تک تک نمونه‌ها قید شده است. که در میان قارچ‌های جدا شده انواع مخمرها، آسپرژیلوس‌ها، پنی سیلیوم و موکور به ترتیب در رده‌های اول تا چهارم آلودگی قرار داشته و سایر قارچها به نسبت‌های متفاوتی جدا شده‌اند.

بحث

در این بررسی قارچ‌ها و مخمرهای مختلفی در نمونه‌های اخذ شده از کلنی‌های زنبورعسل استان آذربایجان غربی جداسازی گردیدند. گرده گل با ۹۱/۸ درصد آلودگی در بالاترین حد و بعد از آن عسل با ۷۲/۸ درصد و زنبور بالغ با ۷۱/۴ درصد و لارو و شفیره با ۷۰/۶ درصد در رده‌های بعدی آلودگی قرار داشتند. آلودگی بیشتر گرده گل می‌تواند به آلودگی‌های قارچی گیاهان مورد بازدید زنبورعسل مربوط باشد. اما آلودگی مخمری گرده‌های گل از سایر نمونه‌ها کمتر است (۱۸/۳) که می‌تواند مربوط به عدم آلودگی مخمری گیاهان و عدم رطوبت مناسب رشد مخمرها در گرده گل جمع‌آوری شده باشد. بیشترین موارد قارچهای جداسازی شده در نمونه‌های گرده گل آسپرژیلوس‌ها می‌باشند که دلیل این امر هم مربوط به پراکندگی زیاد این قارچها در محیط اطراف زنبورستان‌ها و پاتوژن بودن آن‌ها در اکثر گیاهان محیط‌های پرورشی زنبورعسل است. سایر قارچهای جداسازی شده هم جزو قارچهای ساپروفیت موجود در محیط بوده و بعضی از آن‌ها جزو عوامل بیماری‌زای گیاهان و درختان می‌باشند.

در نمونه‌های عسل به غیر از مخمرها میزان زیادی از قارچها جداسازی نشده‌اند که این امر می‌تواند دلایل زیر را داشته باشد:

۱- شهد گیاهان در داخل جام گل‌ها کمتر در معرض آلودگی‌های قارچی محیط قرار می‌گیرد.

۲- در فرایند تغلیظ و فراوری شهد جمع آوری شده اسپور قارچهای وارد شده پالایش گشته و از ورود آن‌ها به داخل عسل جلوگیری به عمل می‌آید.

۳- خواص ضد قارچی عسل و غلظت زیاد قند و رطوبت پائین آن مانع بقا و رشد قارچهای مختلف می‌گردد.

۴- عسل رسیده در سلول‌های مومی سر بسته در معرض آلودگی‌های قارچی داخل کندو قرار نمی‌گیرد.

آلودگی‌های مخمری نمونه‌های عسل در سه فصل نمونه‌گیری بطور متوسط ۳۸/۸۳ درصد بوده است که دلیل این میزان آلودگی می‌تواند ناشی از آلودگی شربت‌های شکر تهیه شده در محیط زنبورستان و امکان آلودگی آب‌های مورد استفاده با انواع مخمرها و رطوبت ایجاد شده در اثر تغذیه‌های آبکی در داخل کندوها باشد. بعد از مخمرها، در نمونه‌های عسل قارچهای آسپرژیلوس نیجر و پنیسیلیوم به میزان چشمگیری جداسازی شدند که علت این امر هم می‌تواند فراوانی این قارچها در محیط اطراف و مقاوم بودن آن‌ها به غلظت بالای قند عسل و رطوبت پائین آن باشد.

در نمونه‌های لارو و شفیره آلودگی‌های قارچی در سه فصل نمونه‌برداری بطور متوسط ۶۵/۸ درصد بوده است که بالاترین میزان آلودگی مربوط به

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی قارچی در نمونه‌های جمع آوری شده از کلنی‌های زنبورعسل استان آذربایجان غربی

نتیجه کشت / نوع نمونه	واجد آلودگی		فاقد آلودگی		مجموع	
	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
زنبوربالغ	۳۵۷	۷۱/۴	۱۴۳	۲۸/۶	۵۰۰	۲۵
لارو و شفیره	۳۵۲	۷۰/۶	۱۴۷	۲۹/۴	۵۰۰	۲۵
گرده گل	۴۵۹	۹۱/۸	۴۱	۸/۲	۵۰۰	۲۵
عسل	۳۶۴	۷۲/۸	۱۳۶	۲۷/۲	۵۰۰	۲۵
مجموع	۱۵۳۳	۷۶/۶۵	۴۶۷	۱۳/۳۵	۲۰۰۰	۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچهای جداسازی شده در نمونه‌های اخذ شده از کلنی های زنبورعسل استان آذربایجان غربی

نوع نمونه			گرده گل	عسل	لارو و شفیره	زنبوربالغ	مجموع
تعداد نمونه			۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۰۰۰
فراوانی مطلق موارد آلوده			۴۵۹	۳۶۴	۳۵۳	۳۵۷	۱۵۳۳
فراوانی نسبی موارد آلوده			۹۱/۸	۷۲/۸	۷۰/۶	۷۱/۴	۷۶/۶۵
قارچهای جداسازی شده	*Alternaria spp.*	فراوانی مطلق	۵۲	۲	۴	۰	۵۸
		فراوانی نسبی	۱۰/۴	/۴	/۸	۰	۲/۹
	Aspergillus.flavus	فراوانی مطلق	۵۴	۱۳	۲۱	۲	۹۰
		فراوانی نسبی	۱۰/۸	۲/۶	۴/۲	/۴	۴/۵
	Aspergillus fumigatus	فراوانی مطلق	۸۳	۱	۳	۴	۹۱
		فراوانی نسبی	۱۶/۶	/۲	/۶	/۸	۴/۵۵
	Aspergillus niger	فراوانی مطلق	۱۴۴	۵۲	۵۱	۱۳	۲۶۰
		فراوانی نسبی	۲۸/۸	۱۰/۴	۱۰/۲	۲/۶	۱۳
	Aspergillus spp.	فراوانی مطلق	۰	۲	۰	۰	۲
		فراوانی نسبی	۰	/۴	۰	۰	/۱
	Cladosporium spp.	فراوانی مطلق	۹	۲	۲	۰	۱۳
		فراوانی نسبی	۱/۸	/۴	/۴	۰	/۶۵
	Helmetosporiun spp.	فراوانی مطلق	۶۶	۴	۶	۲	۷۸
		فراوانی نسبی	۱۳/۲	/۸	۱/۲	/۴	۳/۹
	Mucor spp.	فراوانی مطلق	۱۲۴	۱۳	۶	۱۰	۱۵۳
		فراوانی نسبی	۲۴/۸	۲/۶	۱/۲	۲	۷/۶۵
	Paecilomyces spp.	فراوانی مطلق	۱۶	۰	۰	۰	۱۶
		فراوانی نسبی	۳/۲	۰	۰	۰	/۸
	Penicillium spp.	فراوانی مطلق	۷۴	۸۱	۷۸	۱۰	۲۴۳
		فراوانی نسبی	۱۴/۸	۱۶/۲	۱۵/۶	۲	۱۲/۱۵
	.Rhizopus spp	فراوانی مطلق	۵	۰	۲	۱	۸
		فراوانی نسبی	۱	۰	/۴	/۲	/۴
	Scopolariupsis spp.	فراوانی مطلق	۱۴	۲	۲	۰	۱۸
		فراوانی نسبی	۲/۸	/۴	/۴	۰	/۹
	Sepdonium spp.	فراوانی مطلق	۶	۰	۰	۰	۶
		فراوانی نسبی	۱/۲	۰	۰	۰	/۳
	Stemphylium spp.	فراوانی مطلق	۱۵	۳	۰	۰	۱۸
		فراوانی نسبی	۳	/۶	۰	۰	/۹
	Yeasts	فراوانی مطلق	۱۳۶	۳۸۱	۲۹۵	۳۴۹	۱۱۶۱
		فراوانی نسبی	۲۷/۲	۷۶/۲	۵۹	۶۹/۸	۵۸/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

مخمرها است(۳۷/۷ درصد) و بعد از مخمرها قارچ پنیسیلیوم، آسپرژیلوس نیجر و موکور در حد پائینتری قرار دارند و قارچهای دیگر هم به میزانهای مختلفی جداسازی شدهاند. آلودگی قارچی نمونههای لارو و شفیره مربوط به آلودگیهای قارچی داخل کندو و احتمالاً غذای لاروها(گرده گل و عسل) است.

نمونههای زنبور بالغ نسبت به سایر نمونهها از نظر تنوع و درصد قارچهای جداسازی شده در پائینترین حد آلودگی قارچی قرار دارند و بیشترین میزان آلودگی آنها مربوط به مخمرها است(۳۴/۵ درصد). دلایل کم بودن تنوع و درصد قارچها را میتوان به عواملی از جمله مکانیسم پالایش اندام پیش معده که میزان بسیار زیادی از اسپور قارچها را بصورت تودههائی در آورده و در داخل غشاء پروتروفیک مورد تجزیه قرار داده یا اینکه از طریق مدفوع به بیرون انتقال داده میشوند، نسبت داد. از سوی دیگر آنزیمها و شیرههای گوارشی زنبورعسل بر اسپور قارچها اثر کرده و از خاصیت رشد و تکثیر آنها میکاهد. همچنین فلور باکتریائی دستگاه گوارش زنبوران بالغ تأثیر زیادی روی کاهش میزان قارچهای موجود در دستگاه گوارش خواهند داشت (Evans and Lopez, 2004 Hamdi. C; et al, 2011).

بالا بودن میزان مخمرهای جداسازی شده از زنبوران بالغ را میتوان اینگونه توجیه نمود که مخمرها جزو میکروارگانیسمهای طبیعی دستگاه گوارش زنبورعسلاند یا اینکه نسبت به شرایط داخلی دستگاه گوارش زنبورعسل مقاوم بوده و تحت تأثیر مکانیسمهای گوارشی قرار نمیگیرند. از سوی دیگر امکان دارد عواملی از جمله تنشها و استرسهای وارد شده به زنبوران جمعآوری شده(مثلاً محصور نمودن آنها در داخل ظروف نمونهگیری به مدت بیش از ۲۴ ساعت تا زمان آزمایش) و آلودگیهای مخمری شربتهای شکر و عسل مصرف شده منجر به افزایش میزان مخمرها در دستگاه گوارش زنبوران بالغ شده باشد.

محققین دیگر از سایر نقاط جهان در بررسیهای مختلف قارچهای متعددی را از زنبورها جداسازی نمودهاند بطوریکه Batra و همکارانش(۱۹۷۳) قارچهای پنی سیلیوم، آسپرژیلوس، موکور، تریکودرما را به میزان زیادی از نمونههای زنبوران بالغ تلف شده، قابها، غذای زنبورعسل، شهد گلها، عسل و گرده گل جداسازی نمودهاند. Glinski و Buczek در سال ۲۰۰۳ گونههای قارچ آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و موکور را از لاروها و پیش شفیرههای مرده زنبورعسل جداسازی نمودند.

نتایج حاصل از این بررسی مشابه با بررسی سایر محققین در جاهای دیگر است. بطوریکه Martins و همکارانش که بر روی میزان آلودگی ۸۰ نمونه عسل با انواع باکتریها و قارچها کار میکردند در ۸۸/۸ درصد از نمونهها مخمرها و قارچها را جداسازی نمودهاند که بیشترین میزان آلودگی به قارچهای آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و موکور و دو مخمر ساکارومایسس و کاندیدا اختصاص داشته است. در بین آسپرژیلوسها بیشترین میزان آلودگی مربوط به آسپرژیلوس فلاووس (۵۷/۵ درصد)، آسپرژیلوس نیجر (۵۱/۳ درصد) و آسپرژیلوس فومیگاتوس (۴۵ درصد) و آسپرژیلوس کاندیدوس (۲۸/۷ درصد) بوده است. پنی سیلیوم و موکور به ترتیب در ۳۸/۸ و ۳۱/۳ درصد نمونهها و ساکارومایسس و کاندیدا به ترتیب در ۸۸/۸ و ۷۵ درصد نمونهها جداسازی گردیدهاند (Martins et al, 2003). Jimenez و همکارانش قارچهای آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس کاندیدوس، آسپرژیلوس ترئوس، پنی سیلیوم، ساکارومایسسها و زیگوساکارومایسسها را از عسل جداسازی نمودهاند (Jimenez, M et al, 1994). Gonzalez و همکارانش قارچهای متعددی از جمله آسپرژیلوسها، پنی سیلیوم، فوزاریوم، کلادوسپوریوم، آلترناریا، رایزوپوس، موکور، بوتریتیس، اپیکوکوم و مخمرها را از نمونههای گرده جداسازی نمودهاند (Gonzalez et al, 2005).

علی رغم اینکه قارچهای متعددی از نمونههای مورد بررسی جداسازی شدهاند اما بیماری خاصی مشاهده نگردید. در منابع علمی بیماریهای زنبورعسل قارچهای زیادی را عامل بیماری در زنبورعسل دانستهاند، بطوریکه راجر مورس به قارچهای زیادی اشاره میکند که باعث بیماری در زنبورعسل میشوند و متذکر میشود که بعضی از محققین با خوراندن آسپرژیلوسهای زیر باعث بیماری و تلفات در زنبورعسل شدهاند:*Aspergillus flavus, Aspergillus effusus, Aspergillus parasiticus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus ochraceus, Aspergillus glaecus* و قارچ ملانوزلا مورس آپیس (*Melanosellamors apis*) را عامل بیماری ملانوزیس ملکههای زنبورعسل میدانند (Rager A. Morse ۱۹۸۰.) و محققین دیگری پنیسیلیومها را شایعترین قارچهای داخل کندو میدانند و هیچکدام از آنها انگل حقیقی زنبورعسل نبودهاند. قارچهای تریکودرمالیگنوروم(*Trichoderma lignorum*) و موکور موسدو (*Mucor mucedo*) به طور تجربی باعث بیماری و تلفات در زنبورعسل شدهاند و قارچ موکور هیمالیس(*Mucor hiemalis*) در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد باعث بروز بیماری حاد زنبوران عسل میشود، ولی دمای طبیعی منطقه پرورش نوزاد زنبورعسل بیش از حد تحمل این قارچ است و یا لارو ملکه زنبورعسل در سلول سر پوشیده مورد تهاجم قارچ آسپرژیلوس نیجر قرار میگیرد و همچنین این قارچ را از نوزادان نر و کارگر تغییر رنگ یافته جداسازی نمودهاند و قارچی متعلق به جنس کلاویسپس(Claviceps) را در یک بیماری شبیه به بیماری نوزاد سنگی جداسازی نمودهاندو قارچ رایزوپوس اکوئینوس و اسکوپولاریوپسیس برویکولیس را عامل بیماری نوزاد زرد و نوزادان سیاه زنبورعسل میدانند. ذکر شده که مخمرها عامل بیماریزای زنبورعسل نمی باشند. گرچه برخی از گونههای اسمز دوست آنها عسل را تخمیر میکنند و مخمر متعلق به جنس تورولوپسیس را از دستگاه گوارش زنبورهای مبتلا به یک بیماری ناشناخته جداسازی نمودهاند و با تزریق بعضی از مخمرها به زنبورعسل باعث مرگ آنها شدهاند. ولی مخمرها میتوانند در تولید و حفاظت نان زنبورعسل و تأمین ویتامینها و دیگر عوامل رشد نقش مفیدی داشته باشند (Hamdi. C et al, 2011). اما مخمرها در کلنیهائی که الف: با آنتی بیوتیکها درمان شدهاند، ب: علف کشها در مورد آنها بکار رفتهاند، ج: در قفس تحت کنترل بودهاند، د: مبتلا به بیماریهائی بودهاند که مخمرها منشاء آنها نبوده است و ه: جیره غذائی کمی دریافت داشتهاند به آسانی و به میزان زیادجداسازی میشوند (Roger.A. Morse, 1980).

با توجه به نتایج بررسی Gonzalez و همکارانش روی میزان آلودگی گردههای جمعآوری شده توسط زنبورعسل با انواع قارچها و آفلاتوکسینهای حاصل از آنها، گرده گل میتواند منبع مهمی از آفلاتوکسینهای مختلف باشد و مصرف بدون مجوز بهداشتی آن خالی از اشکال نیست (Gonzalez. G et al,2005). بسیاری از قارچهای جداسازی شده در این بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

جـزو قارچهـای بیماریزای انسـان، دام و گیاهان می‌باشـند که علاوه بر ایجـاد عارضه در زنبورعسـل می‌تواننـد عوارضـی را در مصرف‌کنندگان فراورده‌هـای زنبورعسـل بوجود آورنـد. اطلاعات زیادی در مـورد اینکه قارچهای جداسازی شـده به غیر از آسـپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس تهدیدی جدی برای کلنی‌های زنبورعسـل باشند در دسترس نیست. البته علت اصلی اینکه بیماری‌های زیادی ناشی از قارچها و مخمرها در زنبورعسـل مشـاهده نمی‌گردد می‌تواند ناشـی از رفتارهای بهداشتی و مکانیسـم‌های ایمنـی زنبور عسـل در مقابل قارچهای مختلف باشـد (Evans and Lopez, 2004 Hamdi. C et al, 2011) کـه علاوه بر تحقیق روی این موضوع، باید بررسـی‌های بیشتری روی تشخیص گونه قارچهای جداسـازی شـده و نقش آن‌ها در تولید متابولیت‌ها و مایکوتوکسین‌های مختلف در فراورده‌های زنبورعسل انجام پذیرد.

پیشنهادات

با توجه به اینکه قارچهای بیماری‌زای زنبورعسل(بویژه آسپرژیلوس‌ها) و حتی قارچهای بیماری‌زای انسـان و بسـیاری از قارچهای ساپروفیت از نمونه‌های اخذ شـده از کلنی‌های زنبورعسل جداسازی شده‌اند، لذا، تحت شرایط مساعد رشد قارچها، امکان شیوع بیماری‌های قارچی در زنبورعسل و آلودگی فراورده‌های زنبورعسل (بخصوص گرده و عسل) که بصورت خام و پالایش نشـده مصرف می‌شوند، وجود داشـته و می‌تواند برای بهداشت انسـانی خطراتی به دنبال داشته باشند، لذا جهت حفظ سلامتی کلنی‌های زنبورعسـل و جلوگیری از آلودگی فراورده‌های آن پیشنهاداتی به شرح زیر ارائه می‌گردد:

۱-از پوشـاندن کندوها با پوشش‌های پلاسـتیکی غیر قابل نفوذ هوا و رطوبت خودداری شود.

۲-از قـرار دادن کندوها در مکان‌های مرطوب و فاقد تهویه مناسـب خودداری شود.

۳-از تهیه شـربت شـکر با آب‌های آلوده و غیر قابل شرب خودداری شود.

۴-از مصرف آنتی بیوتیک‌ها به میزان زیاد و بدون مشورت با کارشناسان مربوطه خودداری شود.

۵-قاب‌هـای گـرده گل ذخیره‌ای در جای خشـک و خنک نگهداری شوند.

۶-قاب‌های عسل قبل از اینکه درب کل سلول‌های حاوی عسل با موم پوشیده شود، از داخل کندو خارج نشده و عسل آن‌ها استحصال نگردد.

۷-عسل‌های انباری حتماً در جای خشک و خنک نگهداری شوند.

۸-در صورتی‌که عسـل‌های صاف شـده به مدت طولانـی نگهداری می‌شوند حتماً با رعایت اصول صحیح پاستوریزه شوند.

۹-از خریـد و فروش قاب‌های مومی، کندوهای مسـتعمل ضد عفونی نشده، وسایل زنبورداری سایر زنبورستان‌ها خودداری شود.

۱۰-گرده گل استحصال شده را بخوبی خشک نموده و به شیوه صحیح بسته‌بندی شود.

۱۱-کندوهای خالی، قبل از اسـتفاده مجدد، با شعله یا مواد ضدعفونی کننده رایج و سالم ضد عفونی گردند.

۱۲-بررسـی‌های بیشـتری روی نقـش بیماری‌زائی انـواع قارچها و مخمرهای جداسازی شده در کلنی‌های زنبورعسل انجام پذیرد.

۱۳-بررسی‌های بیشـتری روی نقش آنتی بیوتیک‌ها و سایر داروهای مورد مصرف درکلنی‌های زنبورعسل در افزایش یا کاهش میزان مخمرها و قارچهای مختلف در کلنی‌ها انجام پذیرد.

منابع مورد استفاده

1. Aronstein K.A., Murray. K.D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 :20–29

2. Bailey L. (1991). Honeybee Pathology. London, Academic Press

3. Barnes. R.D, (1987). Invertebrate zoology. CBS College publishing. USA.

4. Batra, L.R., S.W.T. Batra and G.E. Bohart (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoedea). *Mycopathol. Mycol. Appl.* 49: 13-44

5. Benoit et al(2004). Mycoflora and fungal vector capacity of the parasitic mite Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Internationa journal of Acarology*, 30:2, 102-106

6. Evans JD, Lopez DL, 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera:Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97, 752–756.

7. Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissiere, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810-821.

8. Gilliam Martha, Morton. Howard L. (1977). The mycoflora of adult worker honeybees, *Apis mellifera*: Effects of 2,4,5-T and caging of bee colonies. J*ournal of Invertebrate Pathology*, 30:1, 50–54

9. Gilliam Martha et al (1974). Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology,* 24: 3, 349–356

10. Glinski, Z. and K. Buczek (2003). Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta*. 38: 183-189

11. Gonzalez. G et al. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology,* 105: 1, 1–9

12. Hamdi.C et al (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *J. Appl. Entomol.* 135, 524–533

13. Jimenez, M et al. (1994). Influence of the storage conditions on some Physicochemicla and Mycological Parameters of Honey. *J. Sci. Food Agric.* 64: 67-74

14. Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen,C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. Roy. Soci. Lond. B 274, 303-313.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Martins. H. M , Martins M. Ligia and Bernardo Fernando M. A(2003). Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *RPCV*, 98(546): 85-88

16. Miroslava Kačániová et al. (2009). Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica,* 56: 3/S ,285-295

17. Morse, R.A., Calderone, N.W. (2000). The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Culture,* 128, 1-15.

18. Moritz, R.F.A., de Miranda, J., Fries, I., Le Conte, Y., Neumann, P., Paxton, R.J. (2010). Research strategies to improve honeybee health in Europe. *Apidologie* 41, 227-242.

19. Reybroeck. Wim (2003). Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the belgian market. *Apiacta,* 38, 23-30

20. Roger.A. Morse, (1980). Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Cornell Univesrsity Press.

21. Shoreit. M.N, Bagy. M.M.K. (1995). Mycoflora associated with stonebrood disease in honeybee colonies in Egypt. *Microbiological Research,* 150: 2, 207–211

22. WHO. (2009) Evaluation Of Certain Veterinary Drug Residues In Food. Who Technical Report Series; No. 954.

www.SID.ir