DOI: 10.22092/vj.2019.123353.1498
شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

بررسی اثرات ضد باکتریائی عصاره الکلی آویشن علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل و میزان سالم بودن آن برای زنبوران بالغ

• مصطفی مرادی (نویسنده مسئول)
استادیار پژوهشی سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۷-۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۲-۰۵
Email: M.MORADI@RVSRI.IR

چکیده

در این بررسی اثرات ضد باکتریائي عصاره اتانولی آویشن روي باکتري پني باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکایی زنبورعسل و میزان سالم بودن این عصاره براي زنبوران بالغ مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا از برگ‌های گیاه آویشن با استفاده از الکل اتانول عصاره‌گیری به عمل آمد. سپس رقت‌های مختلف از عصاره در محیط کشت مایع و دیسک‌های کاغذی استاندارد ایجاد گردید و باکتري پني‌باسیلوس لاروا به دو شیوه انتشار در آگار و براث دیلوشن تحت تأثیر آن‌ها قرار داده شد. همچنین تعدادي زنبورعسل بالغ در گروه‌هاي مختلف با رقت‌هاي مختلف عصاره الکلي آویشن مورد تغذیه قرار گرفتند. رقت‌هاي مختلف عصاره الکلي آویشن باعث مهار رشد باکتري پني‌باسیلوس لاروا در محیط کشت شد و با گروه‌هاي شاهد تفاوت معني‌داري مشاهده گردید ($p<0/05$). همچنین رقت‌هاي مختلف عصاره الکلي آویشن در مقایسه با گروه‌هاي شاهد، منجر به بروز هیچ‌گونه عارضه‌اي در زنبوران بالغ تحت درمان نگردیدند. تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلي گیاه آویشن داراي اثرات ضد باکتریائي زیادي روي باکتري پني باسیلوس لاروا عامل بیماري لوك آمریکائي زنبورعسل در محیط کشت بوده و با توجه به سالم بودن براي زنبوران بالغ، در صورت بررسي‌هاي بیشتر مي‌تواند به عنوان یکي از روش‌هاي مبارزه با بیماري مذکور مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: زنبورعسل، آویشن، بیماري لوك آمریکائي، باکتري پني باسیلوس لاروا، اثر ضد باکتریائي

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 118-127

Survey of Antibacterial Effects of Thymus Vulgaris Ethanolic Extract on the Paenibacillus larvae, the Causative Agent of Honeybee American Foulbrood Disease and Its Safety for Adult Honeybees

By: Moradi, M., (Corresponding Author) member of board scientific agriculture research center and nature resource west azarbaijan.

Received: 2018-10-07 **Accepted: 2019-02-24**

Email: M.MORADI@RVSRI.IR

In this study, the antibacterial effects of thyme ethanolic extract on the Paenibacillus larvae, the Causative agent of honeybee American Foulbrood Disease were studied and the effect of this extract was studied on the adult bees. First, the leaves of the thyme were extracted using ethanol. Paenibacillus larvae was subjected todifferent dilutions of thymus vulgaris extract by two methods: Agar Diffusion and Broth Dilution. Also, adult honey bees were fed with different dilutions of thyme extract.Different dilutions of thyme extracts inhibited the growth of Paenibacillus larvae in the culture medium, and there was a significant difference between the treatments and control groups (P<0.005). Also, different dilutions of thyme extract had not any side effects on the treated adult bees, in comparison with control groups.The results of this study showed that alcoholic extract of thymus vulgaris has a high antibacterial effect on Paenibacillus larvae, the causative agent of American Foulbrood disease in the culture medium. On the other hand, this extract is safe for adult honeybees and can be used as a remedy for American Foulbrood disease in the bee colonies.

Keyword: Honeybee, Thymus Vulgaris, American Foulbrood Disease,Paenibacillus Larvae, Antibacterial Effect

مقدمه

زنبوران عسل جزو خانواده زنبور *Apidae* مربوط به راسته بال غشائيان Hymenoptera و در جنس *Apis* قرار دارند كه شامل يك گونه زنبورعسل غربي، *Apis mellifera* و هشت گونه زنبورعسل آسيائي مي‌باشند. زنبورعسل نقش بسيار مهمي در اكوسيستم گياهي و جانوري داشته و عدم حضور آن خسارت جبران‌ناپذيري به بقاي ساير موجودات خواهد زد. انسان از فراورده‌هاي زنبورعسل از جمله عسل، گرده، موم، ژله رويال و زهر علاوه بر استفاده غذائي، در صنايع داروسازي و آرايشي و صنايع دستي استفاده‌هاي زيادي مي‌نمايد و صنعت زنبورداري بطور مستقيم و غير مستقيم اثرات زيادي بر توسعه اقتصاد كشاورزي هر كشوري دارد. زنبوران عسل فايده بسيار مهم ديگري را براي بشر دارند كه گرده افشاني گياهان و درختان وحشي و پرورشي است. گرده افشاني گياهان نقش بسيار مهمي در سلامتي و تغذيه انسان دارد. بطوري‌كه از هر سه لقمه غذاي انسان يك لقمه آن بطور مستقيم و غير مستقيم وابسته به گرده افشاني توسط حشرات است و بر اساس تخمين‌ها، ۵۲ نوع از ۱۱۵ نوع غذاي انسان حاصل از فوايد زنبورعسل است و بدون زنبورعسل ۱۰ الي ۹۰ درصد كاهش در آن‌ها اتفاق مي‌افتد (۱۳). ارزش گرده افشاني زنبورعسل در كشاورزي آمريكا بيش از ۱۴ ميليارد دلار در سال و ارزش اقتصادي آن در كل جهان بيش از ۱۵۳ ميليارد يورو در سال ۲۰۰۵ بر آورد شده است.ارزش زنبورعسل در گرده افشاني گياهان طبيعي براحتي تخمين زده نمي‌شود (۱۸).

زنبوران عسل ازعوامل بيماري‌زاي زيادي از جمله باكتري‌ها، ويروس‌ها، تك ياخته‌ها، قارچ‌ها و مايت‌هاي انگلي آسيب ديده و هر ساله ميزان زيادي از آن‌ها از بين مي‌رود. اين بيماري‌ها خسارت اقتصادي زيادي را در زنبورداري و كشاورزي سراسر دنيا ايجاد مي‌كنند (۹). بيماري لوك آمريكائي زنبورعسل يكي از بيماري‌هاي عفوني مرحله لاروي زنبورعسل و ساير گونه‌هاي زنبوراست و در تمام نقاطي از جهان كه زنبورعسل پرورش داده مي‌شود گسترده است و هر ساله تعداد زيادي از كلني‌هاي زنبورعسل در اثر ابتلا به اين بيماري نابود مي‌گردند (۱۱). با توجه به عدم درمان قطعي آن، در بسياري از كشورها كلني‌هاي آلوده از بين برده مي‌شوند و از اين طريق زيان‌هاي زيادي به زنبورداري‌ها وارد مي‌شود. پني باسيلوس لاروا، عامل ايجاد كننده اين بيماري، يك باسيل گرم مثبت اسپور دار است كه در هر لارو مبتلا مي‌تواند بيش از يك ميليارد اسپور ايجاد نمايد (۳). اسپورها قادرند كه در فراورده‌هاي زنبور(عسل و موم)، لاروهاي تلف شده و محيط اطراف كندو به مدت سه الي ۱۰ سال و در فلس‌هاي خشك شده لاروها به مدت ۳۵ سال زنده بمانند. اسپورهاي تخليص شده حتي تا بيش از ۷۰ سال هم زنده مي‌مانند.اسپورهاي باكتري پني‌باسيلوس لاروا باعث ايجاد شكل عفوني بيماري مي‌شوند. لاروها از طريق خوردن اسپورهاي موجود در غذا آلوده مي‌شوند. زماني كه باكتري قبل از مرحله شفيرگي وارد بافت‌هاي لارو مي‌شود، لاروها اكثراً در مرحله پيش شفيرگي در سن ۱۱ روزگي بعد از هچ شدن تخم‌ها، بسرعت تلف شده و اسپورها شكل مي‌گيرند (۱۰). علائم بيماري لوك آمريكائي بسيار متنوع و وابسته به ژنوتيپ‌هاي دخيل، مرحله بيماري و توانائي كلني زنبور (و مقاومت احتمالي آن در برابر بيماري

www.SID.ir

Archive of SID

لوك آمريكائي) است. زنبوران كارگر لاروهاي تلف شده را برداشته و سلول را خالي مي‌كنند. قاب‌ها در كلني‌هاي شديداً بيمار حالت متخلخل پيدا كرده اند كه دراثر وجود سلول‌هاي سرپوشيده نوزادان، سلول‌هاي بدون سرپوش حاوي بقاياي لاروهاي تلف شده و سلول‌هاي خالي بوجود آمده است. درپوش سلول‌هاي حاوي نوزاد تلف شده ظاهري مرطوب و تيره داشته و به سمت داخل فرو رفته و با پيشرفت عفونت سوراخ‌دار مي‌شوند (۳).

با توجه به واگيري شديد بيماري لوك آمريكائي و خسارات زيادي كه به يك زنبورستان وارد مي‌آورد روش‌هاي درماني و كنترلي زيادي براي آن مورد استفاده قرار گرفته است و از همان آغاز تشخيص عامل بيماري از مواد شيميائي زيادي از جمله آنتي‌بيوتيك‌ها بر عليه عامل آن استفاده گرديده است و در حال حاضر در اكثر زنبورداري‌ها از آنتي‌بيوتيك‌هاي اكسي تتراسايكلين و تايلوزين استفاده مي‌شود (۳،۱۰،۲۰) كه علاوه بر مشكلاتي كه در مصرف كنندگان فراورده‌هاي زنبورعسل بوجود خواهد آمد، امكان بروز سويه‌هاي پني باسيلوس لاروا مقاوم به آنتي‌بيوتيك هم وجود دارد، لذا روش‌هاي ديگري در كنترل و مبارزه با بيماري اتخاذ شده است، بطوري‌كه در بسياري از كشورها بويژه كشورهاي عضو اتحاديه اروپا استفاده از آنتي‌بيوتيك‌ها ممنوع است و با نابود كردن كل كلني‌هاي مبتلا به لوك آمريكائي ميزان شيوع و پراكنش آن‌را به شدت كاهش داده‌اند (۲۰). در بسياري از كشورهاي ديگر از جمله ايران كه حمايت‌هاي مالي زيادي از زنبورداري‌ها صورت نگرفته و امكان نابودي يك كلني براي زنبوردار وجود ندارد، از انواع آنتي بيوتيك‌ها استفاده مي‌شود كه مي‌تواند مشكلات ناخواسته‌اي را به دنبال داشته باشد. با توجه به اين مشكلات، محققين در پي يافتن روش‌هاي جديدي هستند كه اولاً روي عامل بيماري مؤثر بوده، ثانياً امكان ايجاد مقاومت داروئي در عامل بيماري را به حداقل رسانده و ثالثاً باقي مانده آن در فراورده‌هاي زنبورعسل خطرات كمتري براي مصرف‌كنندگان داشته باشد. در چند سال اخير در مبارزه با بيماري لوك آمريكائي زنبورعسل از عصاره گياهان داروئي و فراورده‌هاي خود زنبور از جمله بره موم استفاده گرديده كه در مورد گياهان داروئي نتايج قابل توجهي حاصل شده است (۲،۱،۱۷). نگارنده در يك بررسي تحقيقاتي (در حال انتشار) اثرات داروئي عصاره الكلي گياه آويشن را روي تك ياخته نوزما آپيس عامل بيماري نوزموزيس در زنبوران بالغ را بررسي نموده و در مقايسه با گروه‌هاي كنترل كاهش چشمگيري در ميزان اسپور اين تك ياخته در زنبوران درمان شده با رقت‌هاي مختلف عصاره الكلي آويشن مشاهده گرديده است و پيشنهاد شده كه در صورت سالم بودن اين عصاره براي كلني‌هاي زنبورعسل مي‌توان از آن در درمان و پيشگيري بيماري نوزموزيس استفاده نمود. در اين بررسي سعي شده با استفاده از روش‌هاي مختلف تأثير ضدباكتريائي عصاره الكلي آويشن روي باكتري پني‌باسيلوس لاروا عامل بيماري لوك آمريكائي زنبورعسل مورد بررسي قرار گيرد و در صورت دست‌يابي به نتايج قابل توجه در آزمايشگاه، سعي در استفاده از اين عصاره در كلني‌هاي زنبورعسل شود.

مواد و روش‌ها

تهيه عصاره الكلي از گياه آويشن

گياه آويشن از يكي از عطاري‌هاي معتبر خريداري گرديد و با استفاده از دستورالعمل‌هاي هرباريوم مركز تحقيقات كشاورزي شناسائي گرديد. مقدار g۲۰۰ از برگ‌هاي تازه خشك شده گياه آويشن را به وسيله آسياب برقي آزمايشگاهي به شكل پودر در آورده و آنرا در mL ۵۰۰ الكل اتانول ۷۰٪ ريخته و در محيط آزمايشگاه قرار داده و هر چند ساعت يكبار تكان داده تا مواد موجود در گياه آويشن در داخل الكل حل شود و بعد از چند شبانه روز محتويات داخل ظرف را از طريق كاغذ صافي واتمن شماره ۱ صاف نموده و در داخل پليت‌هاي شيشه‌اي بزرگ ريخته و در داخل انكوباتور ۴۵ درجه سانتي‌گراد قرار داده تا الكل عصاره‌ها تبخير شود. بعد از اينكه عصاره‌ها كاملاً خشك شد با استفاده از تيغه اسكالپل يا كاردك تيز آنرا از سطح پليت‌ها برداشته و در داخل ظرف تيره‌اي ريخته و تا زمان آزمايش در داخل يخچال يا دماي محيط آزمايشگاه نگهداري گرديد (۲۳، ۸، ۶).

تهيه غلظت‌هاي مختلف از عصاره الكلي آويشن

براي اينكار با استفاده از ترازوي ديجيتالي آزمايشگاهي (با دقت mg۱) mg ۱۰۰۰ از عصاره خشك شده را در داخل mL ۱ الكل اتانول ۷۰٪ ريخته و با استفاده از همزن الكتريكي آنرا هم زده تا عصاره در الكل بطور كامل حل شود و از اين محلول غلظت‌هاي ۵۰، ۱۰۰، ۱۲/۲۵،۵۰ و ۶/۲۵ گرم در ميلي‌ليتر تهيه گرديد (۸،۶).

تهيه ديسك‌هاي كاغذ صافي استاندارد آغشته به غلظت‌هاي مختلف عصاره الكلي آويشن

براي اين‌كار ديسك‌هاي كاغذي استاندارد mL ۶/۶ تهيه شد و با استفاده از اتوكلاو استريل گرديده و سپس با غلظت‌هاي مختلف عصاره آويشن آغشته شدند. با توجه به تجارب كسب شده، ميزان Lµ ۲۰ مايع براي آغشتن كامل ديسك‌ها كافي به نظر مي رسد، لذا از هر كدام از غلظت‌ها با استفاده از سمپلر اپندورف Lµ ۲۰ از عصاره روي ديسك‌ها ريخته شد و با توجه به غلظت‌هاي تهيه شده از عصاره آويشن، ميزان عصاره موجود در هر ديسك به شرح زير تعيين گرديد:

۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۵/۰، ۲۵/ و ۱۲۵/ ميلي‌گرم در ديسك (براي تهيه غلظت mg ۴۰ در ديسك دو بار به فاصله نيم ساعت ۲۰ ميكروليتر عصاره ۱۰۰۰ ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر ريخته شد). علت انتخاب غلظت mg ۴۰ در ديسك به عنوان غلظت حداكثري عصاره آويشن، غلظت mg ۳۰ داروي اكسي تتراسيكلين موجود در ديسك‌هاي اين آنتي‌بيوتيك بوده است. ديسك‌ها بعد از خشك شدن در داخل ظروف استريل تا زمان آزمايش نگهداري شدند (۲۱،۸،۶).

كشت باكتري پني باسيلوس لاروا و تهيه مايه اسپور

سويه‌ايي از باكتري پني‌باسيلوس لاروا از بخش تحقيقات بيماري‌هاي زنبورعسل و كرم ابريشم موسسه رازي تهيه گرديد. اين سويه از زنبورستان‌هاي آلوده به بيماري لوك آمريكائي جداسازي و بوسيله روش PCR شناسائي شده است. باكتري مذكور را در محيط كشت MYPGP-agar كشت داده و بمدت ۴۸ ساعت در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد شرايط پي‌هوازي (۵٪ CO_2) در انكوباتور قرار داده شد تا اسپورها جوانه زده و به شكل رويشي تبديل شوند. بعد از اينكه كلني‌هاي باكتري ظاهر گرديد پليت‌ها را به مدت چهار روز در شرايط هوازي قرار داده تا باكتري به فرم

www.SID.ir

Archive of SID

اسپوري تبديل شود. سپس با استفاده از آب معمولي استريل سطح پليت را چند بار شستشو داده و محلول حاصله در ظرف ديگري جمع‌آوري گرديد و تا زمان استفاده در داخل يخچال نگهداري شد. براي تعيين ميزان اسپور موجود در هر ميلي‌ليتر از محلول، از دور روش استفاده شد. ابتدا با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمائي ۴۰۰ ميكروسكوپ نوري، تعداد اسپورهاي موجود در هر ميلي‌ليتر از محلول تعيين گرديد. سپس براي اطمينان از زنده بودن اسپورها و بررسي امكان رشد آن‌ها در سطح محيط كشت، رقت‌هاي مختلفي از محلول حاوي اسپور را تهيه كرده و در سطح محيط كشت، كشت داده و بعد از رشد باكتري تعداد كلني‌هاي آن را در هر رقت شمارش نموده و با ضرب تعداد كلني‌ها در فاكتور رقت، تعداد اسپورهاي موجود در هر ميلي‌ليتر از محلول تعيين گرديد و از اين رقت‌ها در مراحل بعدي استفاده شد (۱۷).

روش انتشار در آگار

بعد از تهيه محلول اسپور به شكل فوق، با استفاده از محلول استاندارد مك فارلند نيم مايه تلقيحي آماده گرديد و با استفاده از سوآپ استريل سطح پليت‌هاي حاوي محيط كشت آغشته به اسپور باكتري گرديد. بعد از خشك شدن سطح پليت‌ها با استفاده از پنس استريل ديسك‌هاي آغشته به غلظت‌هاي مختلف عصاره آويشن را به فاصله‌هاي مشخص از همديگر و ديواره پليت روي محيط كشت قرار داده و با اندكي فشار به سطح محيط چسبانيده شد. براي هر غلظت سه تكرار در نظر گرفته شد و از ديسك‌هاي كاغذ صافي خالي به عنوان كنترل منفي و ديسك‌هاي حاوي mg ۳۰ آنتي بيوتيك اكسي تتراسايكلين(داروي انتخابي بيماري لوك آمريكائي زنبورعسل) به عنوان كنترل مثبت استفاده گرديد (جدول ۱).

بعد از آماده نمودن پليت‌ها آنها را بصورت وارونه در انكوباتور ۳۷ درجه سانتي‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده تا مراحل رشد را طي نمايند. بعد از اين مدت قطر هاله ممانعت از رشد اطراف ديسك‌ها با استفاده از خط‌كش اندازه گيري گرديد (۲۱).

روش براث دیلوشن

براي اينكار ابتدا باكتري پني باسيلوس لاروا را در محيط MYPGP-broth كشت داده و سپس مقادير مختلف عصاره خشك آويشن را به لوله‌هاي حاوي محيط كشت و باكتري مذكور اضافه نموده و به مدت ۴۸ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه‌سانتي‌گراد قرار داده شد. براي هر رقت سه تكرار در نظر گرفته شد. همچنين دو گروه به عنوان شاهد مثبت(دوز دارويي داروي اكسي تتراسيكلين (۰/۰۵ mg/mL) و شاهد منفي (بدون استفاده از دارو و عصاره) در نظر گرفته شدند. بعد از اين مدت محتويات لوله‌ها را در سطح محيط كشت آگار كشت گرديد و ۴۸ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه‌سانتي‌گراد و شرايط بي‌هوازي قرار داده شد. سپس تعداد كلني‌هاي باكتري موجود در سطح پليت‌ها شمارش گرديد (۲۱،۱۷). غلظتي از عصاره الكلي آويشن كه منجر به ممانعت از رشد باكتري مذكور در محيط براث گرديد به عنوان حداقل غلظت مهاركنندگي رشد (MIC) باكتري پني باسيلوس لاروا در نظر گرفته شد(جدول ۲).

بررسي ميزان سالم بودن عصاره الكلي آويشن براي زنبوران بالغ

جدول ۱- گروه هاي مختلف بررسي اثرات ضد باكتريائي عصاره الكلي آويشن روي باكتري پني باسيلوس لاروا در روش انتشار در آگار

گروه (تيمار و كنترل)	غلظت عصاره آويشن يا داروی اكسی تتراسيكلين (mg/disk)
۱	/۱۲۵
۲	/۲۵
۳	/۵۰
۴	۱
۵	۲
۶	۵
۷	۱۰
۸	۲۰
۹	۴۰
كنترل مثبت(ديسک واجد دارو)	۳۰
كنترل منفی(ديسک فاقد دارو)	۰

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به اينكه تمام داروها و مواد شيميائي كه بصورت خوراكي در اختيار كلني‌هاي زنبورعسل قرار داده مي‌شوند، توسط زنبوران بالغ همراه با شربت شكر مصرف شده و بعد از مصرف و تركيب با عسل ذخيره شده در اختيار نوزادان زنبور قرار داده مي‌شود، لذا در صورتي‌كه مواد مصرف شده براي زنبوران بالغ كشنده باشند، علائم ناشي از آن‌ها در همان ابتداي مصرف مشاهده خواهد شد. لذا در اين بررسي بعد از اينكه اثرات ضدباكتريائي عصاره الكلي آويشن روي باكتري پني‌باسيلوس لاروا به اثبات رسيد، ابتدا زنبورهاي هم سن از يك كلني سالم و بدون علائم هرگونه بيماري انتخاب و در گروه‌هاي مختلف در داخل انكوباتور ۳۷ درجه سانتي‌گراد و رطوبت ۶۵٪ تحت درمان با غلظت‌هاي مختلف عصاره الكلي آويشن (حداقل غلظت عصاره آويشن در گروه‌ها ۵ mg/mL در نظر گرفته شد) همراه با شربت شكر قرار داده شدند و هر روز ميزان مرگ و مير و علائم غير طبيعي در آنها در مقايسه با گروه‌هاي شاهد مورد مشاهده قرار مي‌گرفت (شكل ۳). هر گروه شامل ۱۰ عدد زنبور بالغ و در سه تكرار انتخاب شدند (۱۲،۷) (جدول ۳).

آناليز آماري

مقايسه ميانگين قطر هاله‌هاي عدم رشد اطراف ديسك‌هاي حاوي عصاره آويشن و بررسي قدرت ضد ميكروبي رقت‌هاي مختلف آن و مقايسه تلفات گروه‌هاي مختلف زنبورهاي بالغ تحت درمان با رقت‌هاي مختلف عصاره

جدول ۲ - گروه هاي مختلف بررسي اثرات ضد باكتريائي عصاره الكلي آويشن روي باكتري پني باسيلوس لاروا در روش براث ديلوشن

گروه (تيمار و كنترل)	غلظت عصاره آويشن يا داروی اكسی تتراسيكلين (mg/disk)
۱	/۱۲۵
۲	/۲۵
۳	/۵۰
۴	۱
۵	۲
۶	۵
۷	۱۰
۸	۲۰
۹	۴۰
كنترل مثبت(واجد دارو)	۳۰
كنترل منفی(فاقد دارو)	۰

جدول ۳ -گروه هاي مختلف زنبوران بالغ تحت تغذيه با غلظتهاي مختلف عصاره الكلي آويشن همراه با شربت شكر۱+۱

گروه ها(تيمار و كنترل)	تعداد زنبورها	غلظت عصاره الكلي آويشن(mg/ml)
۱	۳۰	۵
۲	۳۰	۱۰
۴	۳۰	۲۰
۵	۳۰	۴۰
كنترل منفی	۳۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

آويشن، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون T مورد تجزيه و تحليل قرار گرفت. در اين تحقيق مقدار P کمتر از ۰/۰۰۵ از لحاظ آماري معني‌دار مي‌باشد.

نتايج

نتايج حاصل از تأثير غلظت‌هاي مختلف عصاره‌هاي الکلي آويشن در دو روش انتشار در آگار و براث ديلوشن به ترتيب در جدول‌هاي ۴ و ۵ ذکر شده است. همانطور که مشاهده مي‌شود در روش انتشار در آگار اندازه قطر هاله ممانعت از رشد باکتري رابطه مستقيمي با غلظت عصاره موجود در ديسک دارد. با توجه به عدم رشد باکتری در محيط براث حاوی MG/ML ۵ عصاره آويشن، اين غلظت از عصاره به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد (جدول ۵). همچنين در شکل‌های ۱ و ۲ قطر هاله ممانعت از رشد اطراف ديسك‌هاي حاوي غلظت‌هاي مختلف عصاره آويشن و داروی اکسی تتراسيکلين مشاهده مي‌شوند.

بحث

بيماري لوك آمريکائي يکي از مهلك‌ترين بيماري‌هاي زنبورعسل است که هر ساله تعداد زيادی کلني زنبورعسل سراسر جهان در اثر ابتلاء به آن از بين رفته يا معدوم مي‌گردند. براي درمان اين بيماري از آنتي‌بيوتيك‌هاي متعددي استفاده شده است و در حال حاضر از دو آنتي‌بيوتيك اکسي تتراسيکلين و تايلوزين به اشکال مختلف در کلني‌هاي زنبورعسل استفاده مي‌گردد(۱۵). آنتي‌بيوتيك‌ها علي رغم کنترل علائم بيماري در کلني‌ها تأثيري در نابودي اسپورهاي عامل بيماري مذکور ندارند و اسپورها سالیان متمادي در زنبورستان‌ها و روي ملزومات زنبورداري زنده باقي مانده و به محض فراهم شدن شرايط منجر به ابتلاء و مرگ نوزادان زنبورعسل مي‌گردند. جستجوي روش‌ها و مواد مؤثر و کم خطر براي زنبور عسل و مصرف‌کنندگان فراورده‌هاي آن از اولويت ويژه‌اي برخوردار است. اين بررسي براي اولين بار اثرات ضد باکتريائي عصاره‌ي الکلي آويشن را روي باکتري پني باسيلوس لاروا عامل بيماري لوك آمريکائي و ميزان سالم بودن آنرا براي زنبوران بالغ را مورد مطالعه قرار داده است. با توجه به نتايج حاصله و در صورت ادامه اين بررسي مي‌توان از عصاره الکلي آويشن به عنوان يکي از راه‌هاي درمان بيماري لوك آمريکائي زنبورعسل استفاده نمود. نتايج اين بررسي نشان داد که عصاره الکلي آويشن در غلظت‌هاي مختلف اثرات متفاوتي روي باکتري پنی باسيلوس لاروا داشته و در غلظت نزديك به غلظت اکسي تتراسيکلين در ديسك‌هاي آنتي‌بيوتيکي، موجب مهار رشد و نابودی باکتری مذکور می‌شود. بطوري‌که در غلظت ۴۰ disk/mg با ايجاد هاله ممانعت از رشد ۴۰ mm موجب مهار رشد باکتري مذکور مي‌گردد. همچنين در غلظت ۵ mg/mL باعث نابودي باکتري شده است که اين غلظت‌ها با توجه به نتايج بررسي‌هاي انجام گرفته روي ساير باکتري‌ها بسيار قابل توجه مي‌باشد. نتايج اين بررسي مشابهت و همخواني زيادي با نتايج بررسي‌هاي ساير محققين دارد. بطوري‌که زهرائی و همکاران(۲۳) با بررسي اثرات ضد باکتريائي اسانس گياه آويشن شيرازي روي باکتري‌هاي اشرشياکلي، استافيلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتيه مشاهده کردند که قطر هاله مهار از رشد باکتري‌هاي مذکور از mg ۶۰- ۳۰متغيير

جدول ۴- نتايج حاصل از بررسي اثر ضد باکتريائي عصاره الکلي آويشن روي باکتري پني باسيلوس لاروا به روش انتشار در آگار. داده ها ميانگين ± انحراف معيار سه تکرار مي باشد.

گروه (تيمار و کنترل)	غلظت عصاره آويشن يا داروی اکسی تتراسيکلين (mg/disk)	ميانگين قطر هاله ممانعت از رشد (mm)
۱	/۱۲۵	۰
۲	/۲۵	۱۰/۳۳±/۴۶۶
۳	/۵۰	۱۵/۶۶±۱/۶۳۳
۴	۱	۱۸±/۸۱۶
۵	۲	۲۰/۶۶±۱/۶۳۳
۶	۵	۲۴/۶۶±/۸۱۶
۷	۱۰	۲۷/۶۶±/۸۱۶
۸	۲۰	۳۵/۶۶±۱/۲۴۷
۹	۴۰	۴۰/۶۶±۱/۲۴۷
کنترل مثبت(واجد دارو)	۳۰	۵۹±/۸۱۶
کنترل منفی(فاقد دارو)	۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

است. البته اين محققين بجاي عصاره الكلي گياه آويشن از اسانس خالص آن استفاده نموده‌اند كه مي‌تواند در تفاوت نتايج دو تحقيق مؤثر باشد. بهنيا و همكاران با مطالعه اثرات ضد تك‌ياخته‌اى آويشن ايرانى روى Entamoeba histolytica دريافتند كه MIC عصاره‌هاى هيدروالكليک و هگزانيک و روغن اسانسى گياه آويشن بر روى اين تک ياخته بعد از ۲۴ ساعت به ترتيب ۴،۴ mg/ml و ۷/ مى باشد(۴).

موسوى و همكاران اثر اسانس گياه آويشن شيرازي بر روي ميزان رشد سالمونلا تيفي موريوم در سوپ جو تجارتي مورد مطالعه قرار داده و مشاهده كردند كه اين اسانس قادر به مهار رشد باكتري مذكور است و مي‌تواند به عنوان نگهدارنده ى مناسب عليه باكتري‌هاي بيماري‌زاي غذائي مورد استفاده قرار گيرد (۱۹). سيلوا و همكاران در يك بررسي مشاهده كرده‌اند كه اسانس آويشن باعث مهار رشد ميسليوم‌ها و توليد آفلاتوكسين قارچ‌هاى مورد مطالعه از جمله آسپرژيلوس فلاووس مى‌شود(۲۲). بنيادیان و كريم در بررسى تأثير روغن‌هاي فرار برخي از گياهان از جمله آويشن بر روي باكتري‌هاي اكولاي و استافيلوكوكوس اورئوس دريافته‌اند كه اسانس آويشن نسبت به ساير گياهان بيشترين اثر را دارد و حداقل غلظت مهاركنندگي آن براي دو باكتري مذكور به ترتيب ۱/ و ۰۵/٪ و حداقل غلظت كشندگي آن ۱۵/ و ۱/٪است (۵). دلير ثانى و همكاران در بررسي اثرات ضد باكتريائي عصاره الكلي آويشن و نه گياه ديگر روي استرپتوكوكوس موتانس عامل پوسيدگي دندان، در مقايسه با كلرهگزيدين گلوكونات، دريافتند كه اين عصاره روي باكتري مذكور اثرات ضدباكتريائي چشمگيري دارد (۶). فياد و همكاران با بررسي اثرات ضدباكتريائي عصاره‌هاي آبي و الكلي آويشن روي باكتري‌هاي استافيلوكوكوس اورئوس و اشريشيا كلي به دو روش انتشار در آگار و براث ديلوشن مشاهده كردند كه عصاره الكلي در غلظت mg/ml ۲۵ به ترتيب باعث ايجاد هاله ممانعت از رشد باكتري‌هاي مذكور به قطر ۲۱ mm و ۱۹ mm مي‌شود و عصاره آبي آن در اين غلظت هاله ممانعت از رشد ۱۵ mm و ۱۴ mm را در دو باكتري ايجاد نمود (۸). صبيحه شريف در بررسي اثرات ضدباكتريائي عصاره الكلي آويشن عليه سويه‌هايي از باكتري سالمونلا تايفى موريوم جداسازي شده از بيماراني كه از تب تيفوئيد رنج مي‌بردند مشاهده نمود كه حداقل غلظت مهاركنندگي اين عصاره µg/mL ۲۵۰۰ است. ايشان همچنين در بررسي اثرات ضد باكتريائي اين عصاره در خرگوش‌هايي كه با اين سويه‌ها آلوده شده بودند مشاهده كرد كه تعداد خرگوش‌هاى نجات يافته از بيماري نسبت به گروه‌هاي كنترل بيشتر است (۲۱). در رابطه با مواد ضدباكتريائي مؤثر در عصاره‌هاي الكلي آويشن ذكر شده كه بيشترين اثرات ضدباكتريائي آن مربوط به تركيبات فنولي (تيمول و كارواكرول) آن است كه بيشترين حجم مواد تشكيل دهنده اين گياه را تشكيل مي‌دهند (۱). نتايج اين بررسى‌ها و بررسى حاضر نشان مى‌دهند كه گياهان داروئى مى‌توانند به عنوان يكى از روش‌هاى درمانى بيمارى‌هاى زنبورعسل بويژه بيمارى‌هاى عفونى(لوک آمريكائى) مورد استفاده قرار گيرند. البته براى رسيدن به اين هدف بايد بررسى‌هاى بيشترى در شرايط آزمايشگاه و مزرعه انجام گيرد.

در بررسي حاضر ميزان تلفات زنبورهاي گروه شاهد منفى و گروه‌هاي آويشن تفاوت معني‌داري (P </ ۰۰۵) با هم نداشتند و به نظر نمي‌رسد كه عصاره آويشن باعث مرگ زنبورهاي تحت درمان شده باشد، چرا كه

جدول ۵- ميزان رشد باكتري پني باسيلوس لاروا در مجاورت غلظت هاي مختلف عصاره الكلي آويشن در روش براث ديلوشن. داده ها ميانگين ± انحراف معيار سه تكرار مي باشد.

گروه (تيمار و كنترل)	غلظت عصاره آويشن يا داروى اكسى تتراسيكلين (mg/ml)	ميانگين تعداد كلنى در سطح آگار
۱	/۱۲۵	غير قابل شمارش
۲	/۲۵	۱۰۳/۶۶±۴/۶۴۲
۳	/۵۰	۶۶/۳۳±۴/۳۰۵
۴	۱	۲۱/۳۳±۵/۲۸۸
۵	۲	۱۵±۴/۰۸۲
۶	۵	۰
۷	۱۰	۰
۸	۲۰	۰
۹	۴۰	۰
كنترل مثبت (واجد دارو)	/۰۵	۰
كنترل منفى (فاقد دارو)	۰	غير قابل شمارش

www.SID.ir

Archive of SID

اگر غلظت‌های آویشن استفاده شده در این بررسی براي زنبورها کشنده بود باید در هفته اول آزمایش تلف مي‌شدند در حالي بیشترین تلفات این گروه‌ها در هفته سوم و چهارم است و تفاوت زیادي با گروه‌هاي شاهد نداشتند. همچنان‌که در جدول ۱ مشاهده مي‌شود تعدادي از زنبورهای دریافته‌کننده ۲ mg/mL آویشن حتي تا اواسط هفته ششم هم زنده ماندند در حالي که زنبورهای گروه شاهد منفي و گروه فوماژیلین در پایان هفته پنجم تلف شدند. این امر نشان می‌دهد که احتمالاً عصاره آویشن باعث افزایش طول عمر زنبورها مي‌شود. البته این موضوع نیاز به بررسي بیشتری دارد. در رابطه با سالم بودن تیمول(ماده مؤثره آویشن) در یک بررسی ایمدورف و همکاران دریافتند که تفاوت معنی‌داری بین تلفات زنبورهای بالغ در گروه‌های تحت درمان و گروه‌های کنترل وجود ندارد، لذا نتیجه‌گیری نمودند که با توجه به سالم بودن این عصاره‌ها و اثرات درمانی آنها روی مایت واروآ، دو عصاره حاصل از آویشن T. minuta و گیاه Heterothecalatifolia می‌توانند در برنامه مبارزه با واروآ در کلنی‌های زنبورعسل مد نظر قرار گیرند(۱۲). در بررسی دیگری ابرت و همکاران سالم بودن عصاره‌های تعداد زیادی از گیاهان داروئی از جمله آویشن را در زنبورعسل مورد مطالعه قرار دادند و بعد از مصرف خوراکی این عصاره‌ها هیچ گونه تلفات غیر معمولی در زنبورهای بالغ مشاهده نگردید، لذا پیشنهاد نموده‌اند که این فراورده‌ها را می‌توان براحتی در کلنی‌های زنبورعسل مورد مصرف قرار داد (۷).

در پایان متذکر می‌شود که با توجه به توسعه پرورش گیاهان داروئی در ایران و امکان استحصال فراورده‌های داروئی از آن‌ها، با بررسی‌های بیشتر می‌توان از عصاره یا اسانس آن‌ها در جهت کنترل و درمان بیماری‌ها و آفات زنبورعسل هم استفاده نمود و از عوارض انواع داروهای شیمیائی در کلنی‌های زنبورعسل و مصرف کنندگان فراورده‌های آن جلوگیری نمود.

منابع مورد استفاده

1. Albo, G . N., C. Henning., J.Ringuelet., F.J. Reynaldi., M.R. De Giusti., and A..M. Alippi. 2003. Evaluation Of Some Essential Oils For The Control And Prevention Of American Foulbrood Disease In Honey Bees. *Apidologie* 34: 417–427.

2. Alippi, A.M., G. N. Albo., D. Leniz., l. Rivera., M.L. Zanelli., and A.E. Roca. 1999. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control AFB of bees. *Journal of Apicultural Research* 38(3-4):149-158.

3. Bailey, L. and B.V. Ball .1991. Honey Bee Pathology. 2nd edn. Academic Press, London.

4. Behnia, M., A. Haghighi., H. Komeylizadeh., S. J. Seyyedtabaei, And A. Abadi .2008. Inhibitory Effects Of Iranian Thymus Vulgaris Extracts On In Vitro Growth Of Entamoeba histolytica. *The Korean Journal Of Parasitology (Kjp)*46(3):153-156.

5. Bonyadian,M and G. karim.2003. Study of the effects of some volatile oils of herbs(pennyroyal, peppermint, tarragon, caraway seed and Thyme) against E.coli and S. aureus in broth media. *Journal of Veterinary Research* 57(4) :,81-84(in farsi).

6. Dalirsani, Z., M. Aghazadeh., M. Adibpour., M. Amirchaghmaghi., A. Pakfetratp,. M. Mozaffari., M. Mehdipour And A. Taghavi Zenooz. 2011..In Vitro Comparison Of The Antimicrobial Activity Of Ten Herbal Extracts Against Streptococcus Mutans With Chlorhexidine. *Journal Of Applied Sciences*11(5) : 878-88.

7. Ebert, T,A., P.G. Kevan., B.L. Bishop., S.D. Kevan and R.A. Downer. 2007. Oral Toxicity Of Essential Oils And Organic Acids Fed To Honey Bees (Apis Mellifera), *Journal of Apicultural Research* 46: 220–224.

8. Fayad, N.K.2013. Water And Alcohol Extraction Of Thyme Plant (Thymus Vulgaris) And Activity Study Against Bacteria, Tumors And Used As Anti-Oxidant In Margarine Manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*4(1) : 41-51.

9. Gallai, N., J.M. Salles., J. Settele and B.E.Vaissiere.2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68: 810-821.

10. Genersch, E.2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: 510–519.

11. Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke., B. Hoste., P. Janssen., K. Kersters., P. De Vos., N. A. Logan., N. Ali and R.C.W. Kerkeley.1996. Reclassification Of Paenibacillus (Formerly Bacillus)Pulvifaciens (Nakamura, 1984). Ash Et Al., 1993, A Later Subjective Synonym Of Paenibacillus(Formerly Bacillus) Larvae (White, 1906) Ash Et Al., 1994, As A Subspecies Of P. Larvae, With Amended Descriptions Of P. Larvae As P. Larvae Ssp. Larvae And P. Larvae Ssp. Pulvifaciens. *International Journal Of Systematic Bacteriology* 46: 270-279.

12. Imdorf A., V. Kilchenmann., S. Bogdanov., B. Bachofen., C. Beretta.1995. Toxic Effects Of Thymol, Camphor, Menthol And Eucalyptol On Varroa Jacobsoni Oud And Apis Mellifera L. In A Laboratory Test. *Apidologie*26: 27–31.

13. Klein, A.M., B. E. Vaissiere., J.H.Cane., I. Steffan-Dewenter., S. A. Cunningham., C. Kremen., T. Tscharntke.2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings Of The Royal Society B: *Biological Sciences* 274: 303-313.

14. Machado,M., Am. Dinis., L. Salgueiro., C. Cavaleiro., Jb. Custódio., Mdo. C. Sousa. 2010. Anti-Giardia Activity Of Phenolic-Rich Essential Oils: Effects Of Thymbra Capitata, Origanum Virens, Thymus Zygis Subsp. Sylvestris, And Lippia Graveolens On Trophozoites Growth, Viability, Adherence, And Ultrastructure. *Parasitology Research* 106(5) : 1205-1215.

15. Matheson, A. And M. Reid.1992. Strategies For The Prevention And Control Of AFB. Parts I, II And III. *The American Bee Journal* 134(8) : 534-547.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Mohammad Pour (2010(. Evaluation of antibacterial and antifungal properties of essential oils of three species of thyme and two ecotypes of Kakotti and Satureja bachtiarica. *Journal of Basic Sciences, Islamic Azad University* 20(1/78): 111-120 (In farsi).

17. Moradi .M. 2009. Antibacterial Effect Of Etanolic Extract of Honeybee Propolis on the Paenibacillus Larvae Larvae (Causative Agent Of Honeybee American Foulbrood Disease). *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)* 83: 57-61(in farsi).

18. Moritz, R.F.A., J. De Miranda., I.Fries., Y. Le Conte., P. Neumann., R.J. Paxton.2010. Research Strategies To Improve Honeybee Health In Europe. *Apidologie* 41: 227-242.

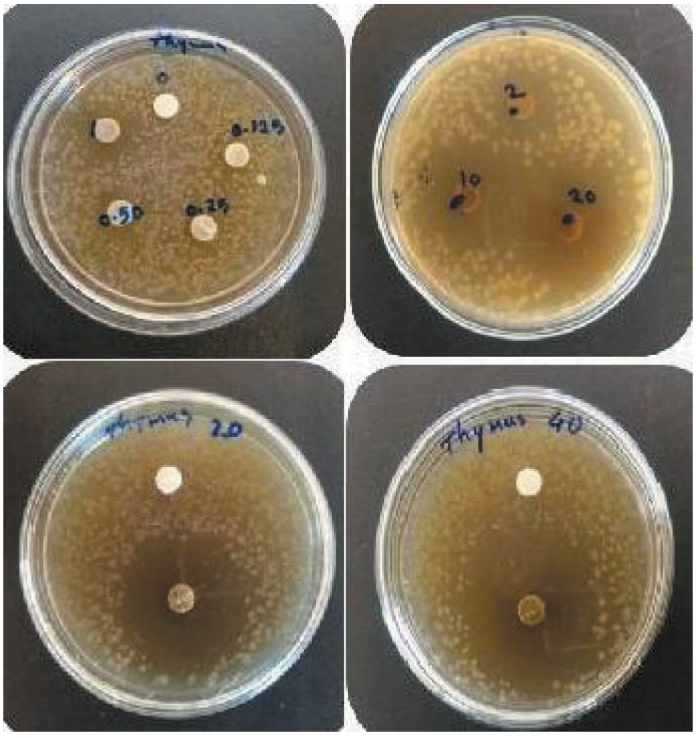
19. Moosavy, M., A. Basti., A. Misaghi., H. Jabbari-Khamaneh., G. Karim and T. Zahraei Salehi. 2010. Survey The of Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential Oil on the Growth of Salmonella typhimurium in a Commercial Barley Soup. *Journal of Medicinal Plants* 2 (34):109-116 (In farsi).

20. Peng, C.Y.S., E. Mussen., A.Fong., P. Wong. G. Cheng and M.A. Montague.1996. Laboratory And Field Studies On The Effects Of The Antibiotic Tylosin On Honey Bee Apis Mellifera L. (Hymenoptera:Apidae). Development And Prevention of AFB Disease. *Journal Of Invertebrate Pathology* 67: 65-71.

21. Sabiha, S. S.2012. The Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of Thymus vulgaris on Salmonella typhi in Rabbets. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*3(4) : 147-150.

22. Silva, F.C.D., S.M.Chalfoun., V.M.D.Siqueira., D.M.D.S. Botelho., N.Lima and L.R. Batista.2012. Evaluation Of Antifungal Activity Of Essential Oils Against Potentially Mycotoxigenic Aspergillus Flavus And Aspergillus Parasiticus. *Revista Brasileira De Farmacognosia* 22:1002–1010.

23. Zahraei –Salehi, T., M. Vojgani., M. Bayat, H. Torshizi., A. Akhondzadeh.2005. Determination of minimum inhibitory concenteration (MIC) of extract of zataria multiflora against the Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and E.coli . *Journal of Veterinary Research* 60: 107-110(in farsi).

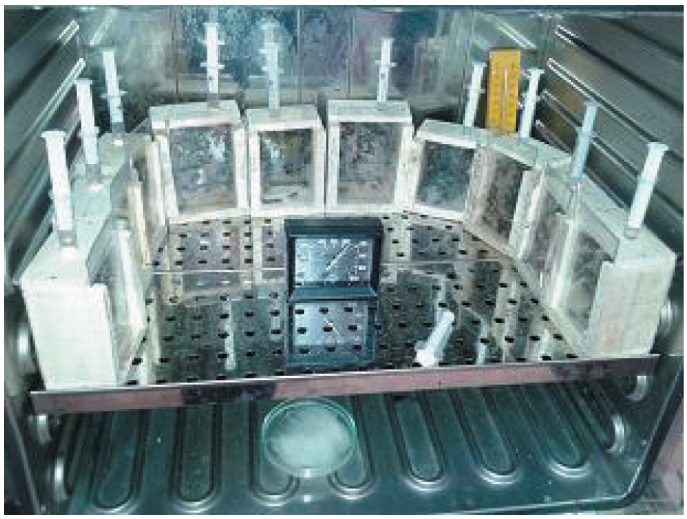


شكل ۱- هاله ممانعت از رشد باكتري پني باسيلوس لاروا در اطراف ديسكهاي آغشته به غلظت هاي مختلف عصاره الكلي آويشن؛ غلظت mg/disk ۱۲۵/ ، بدون تشكيل هاله؛ غلظت mg/disk ۲۵/ ،با ايجاد هاله mm ۱۰ ؛ غلظت mg/disk ۵/ با ايجاد هالهmm ۱۲ وغلظتmg/disk ۱ با ايجاد هاله mm ۱۵؛ غلظتmg/disk ۲ با ايجاد هالهmm ۲۱، غلظتmg/disk ۵ با ايجاد هالهmm ۲۵؛ غلظتmg/disk ۱۰ با ايجاد هالهmm ۲۸ ؛ غلظتmg/disk ۲۰ با ايجا هالهmm ۳۵ وغلظت mg/disk ۴۰ با ايجاد هاله mm۴۰ در اطراف ديسك كاغذي استاندارد.

www.SID.ir

Archive of SID

شكل ۲- هاله ممانعت از رشد mm ۶۰ در اطراف ديسك استاندارد حاوي mg ۳۰ آنتي بيوتيك اكسي تتراسيكلين.



شكل ۳- گروه های مختلف زنبورهای بالغ در داخل قفسهای چوبی- توری تحت تغذیه با شربت شکر حاوی غلظتهای مختلف عصاره آویشن قرار داده شده در انکوباتور C° ۳۷ و رطوبت ۶۵٪ .

www.SID.ir