

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی آویشن علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبور عسل 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: ۱۵-۰۷-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۰۵-۱۲-۱۳۹۷

Email: M.MORADI@RVSRI.IR



چکیده

در این بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی آویشن روی باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکایی زنبور عسل و میزان سالم بودن این عصاره برای 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 باکتری پنی باسیلوس لاروا به دو شیوه انتشار در آگار و برات دیلوشن تحت تأثیر آن‌ها قرار داده شد. همچنین تعدادی زنبور عسل بالغ در گروه‌های مختلف با رقت‌های مختلف عصاره الکلی آویشن مورد تغذیه قرار گرفتند. رقت‌های مختلف عصاره الکلی آویشن باعث مهار رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا در محیط کشت شد و با گروه‌های شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($p < 0/05$). همچنین رقت‌های مختلف عصاره الکلی آویشن در مقایسه با گروه‌های شاهد، منجر به بروز هیچ‌گونه عارضه‌ای در زنبوران بالغ تحت درمان نگردیدند. تحقیق حاضر نشان داد که عصاره الکلی گیاه آویشن دارای اثرات ضد باکتریایی زیادی روی باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبور عسل در محیط کشت بوده و با توجه به سالم بودن برای زنبوران بالغ، در صورت بررسی‌های بیشتر می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های مبارزه با بیماری مذکور مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: زنبور عسل، آویشن، بیماری لوک آمریکائی، باکتری پنی باسیلوس لاروا، اثر ضد باکتریایی

- 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 to different 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

تك ياخته‌ها، فارچ‌ها 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 لوک آمريکائي زنبورعسل يکي از بيماري‌هاي عفوني مرحله لاروي زنبورعسل و ساير گونه‌هاي زنبوراست و در تمام نقاطي از جهان که زنبورعسل پرورش داده مي‌شود گسترده است و هر ساله تعداد زيادي از کلني‌هاي زنبورعسل در اثر ابتلا به اين بيماري نابود مي‌گردند (۱۱). با توجه به عدم درمان قطعي آن، در بسياري از کشورها کلني‌هاي آلوده از بين برده مي‌شوند و از اين طريق زيان‌هاي زيادي به زنبورداري‌ها وارد مي‌شود. پني باسيلوس لاروا، عامل ايجاد کننده اين بيماري، يک باسيل گرم مثبت اسپور دار است که در هر لارو مبتلا مي‌تواند بيش از يک ميليارد اسپور ايجاد نمايد (۳). اسپورها قادرند که در فراورده‌هاي زنبور(عسل و موم)، لاروهاي تلف شده و محيط اطراف کندو به مدت سه الي ۱۰ سال و در فلس‌هاي خشک شده لاروها به مدت ۳۵ سال زنده بمانند. اسپورهاي تخليص شده حتي تا بيش از ۷۰ سال هم زنده مي‌مانند. اسپورهاي باکترتي پني باسيلوس لاروا باعث ايجاد شکل عفوني بيماري مي‌شوند. لاروها از طريق خوردن اسپورهاي موجود در غذا آلوده مي‌شوند. زماني که باکترتي قبل از مرحله شفبرگي وارد بافت‌هاي لارو مي‌شود، لاروها اکثراً در مرحله پيش شفبرگي در سن ۱۱ روزگي بعد از هچ شدن تخم‌ها، بسرعت تلف شده و اسپورها شکل مي‌گيرند (۱۰). علائم بيماري لوک آمريکائي بسيار متنوع و وابسته به ژنوتپ‌هاي دخيل، مرحله بيماري و توانائي کلني زنبور (و مقاومت احتمالي آن در برابر بيماري

مقدمه

زنبوران عسل جزو خانواده زنبور *Apidae* مربوط به راسته بال غشائیان Hymenoptera و در جنس *Apis* قرار دارند که شامل يك گونه زنبورعسل غربي، *mellifera Apis* و هشت گونه زنبورعسل آسيائي مي‌باشند. زنبورعسل نقش بسيار مهمي در اکوسيستم گياهي و جانوري داشته و عدم حضور آن خسارت جبران‌ناپذيري به بقای ساير موجودات خواهد زد. انسان از فراورده‌هاي زنبورعسل از جمله عسل، گرده، موم، ژله رويال و زهر علاوه بر استفاده غذايي، 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 که گرده افشاني گياهان و درختان وحشي و پرورشي است. گرده افشاني گياهان نقش بسيار مهمي در سلامتي و تغذيه انسان دارد. بطوري که 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 کاهش در آن‌ها اتفاق مي‌افتد (۱۳). ارزش گرده افشاني زنبورعسل در كشاورزي آمريکا بيش از ۱۴ ميليارد دلار در سال و ارزش اقتصادي آن در کل 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 از عوامل بيماري‌زاي زيادي از جمله باکترتي‌ها، ويروس‌ها،

لوک آمریکائی) است. زنبوران کارگر لاروهای تلف شده را برداشته و سلول را خالی می‌کنند. قاب‌ها در کلنی‌های شدیداً بیمار حالت متخلخل پیدا کرده اند که در اثر وجود سلول‌های سرپوشیده نوزادان، سلول‌های بدون سرپوش حاوی بقایای لاروهای تلف شده و سلول‌های خالی بوجود آمده است. درپوش سلول‌های حاوی نوزاد تلف شده ظاهری مرطوب و تیره داشته و به سمت داخل فرو رفته و با پیشرفت عفونت سوراخ‌دار می‌شوند (۳).

با توجه به واگیری شدید بیماری لوک آمریکائی و خسارات زیادی که به یک زنبورستان وارد می‌آورد روش‌های درمانی و کنترلی زیادی برای آن مورد استفاده قرار گرفته است و از همان آغاز تشخیص عامل بیماری از مواد شیمیائی زیادی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها بر علیه عامل آن استفاده گردیده است و در حال حاضر در اکثر زنبورداری‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و تایلوزین استفاده می‌شود (۳، ۱۰، ۲۰) که علاوه بر مشکلاتی که در مصرف کنندگان فراورده‌های زنبورعسل بوجود خواهد آمد، امکان بروز سویه‌های پنی‌باسیلوس لاروا مقاوم به آنتی‌بیوتیک هم وجود دارد، لذا روش‌های دیگری در کنترل و مبارزه با بیماری اتخاذ شده است، بطوری‌که در بسیاری از کشورها بویژه کشورهای عضو اتحادیه اروپا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممنوع است و با نابود کردن کل کلنی‌های مبتلا به لوک آمریکائی میزان شیوع و پراکنش آن‌را به شدت کاهش داده‌اند (۲۰). در بسیاری از کشورهای دیگر از جمله ایران که حمایت‌های مالی زیادی از زنبورداری‌ها صورت نگرفته و امکان نابودی یک کلنی برای زنبوردار وجود ندارد، از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که می‌تواند مشکلات ناخواسته‌ای را به دنبال داشته باشد. با توجه به این مشکلات، محققین در پی یافتن روش‌های جدیدی هستند که اولاً روی عامل بیماری مؤثر بوده، ثانیاً امکان ایجاد مقاومت دارویی در عامل بیماری را به حداقل رسانده و ثالثاً باقی مانده آن در فراورده‌های زنبورعسل خطرات کمتری برای مصرف‌کنندگان داشته باشد. در چند سال اخیر در مبارزه با بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل از عصاره گیاهان دارویی و فراورده‌های خود زنبور از جمله بره موم استفاده گردیده که در مورد گیاهان دارویی نتایج قابل توجهی حاصل شده است (۱۷، ۱۲). نگارنده در یک بررسی تحقیقاتی (در حال انتشار) اثرات دارویی عصاره الکی گیاه آویشن را روی تک یاخته نوزما آپیس عامل بیماری نوزموزیس در زنبوران بالغ را بررسی نموده و در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش چشمگیری در میزان اسپور این تک یاخته در زنبوران درمان شده با رقت‌های مختلف عصاره الکی آویشن مشاهده گردیده است و پیشنهاد شده که در صورت سالم بودن این عصاره برای کلنی‌های زنبورعسل می‌توان از آن در درمان و پیشگیری بیماری نوزموزیس استفاده نمود. در این بررسی سعی شده با استفاده از روش‌های مختلف تأثیر ضدباکتریایی عصاره الکی آویشن روی باکتری پنی‌باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل مورد بررسی قرار گیرد و در صورت دستیابی به نتایج قابل توجه در آزمایشگاه، سعی در استفاده از این عصاره در کلنی‌های زنبورعسل شود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره الکی از گیاه آویشن

گیاه آویشن از یکی از عطاری‌های معتبر خریداری گردید و با استفاده از

دستورالعمل‌های هرباریوم مرکز تحقیقات کشاورزی شناسائی گردید. مقدار ۲۰۰g از برگ‌های تازه خشک شده گیاه آویشن را به وسیله آسیاب برقی آزمایشگاهی به شکل پودر در آورده و آنرا در ۵۰۰ mL الکل اتانول ۷۰٪ ریخته و در محیط آزمایشگاه قرار داده و هر چند ساعت یکبار تکان داده تا مواد موجود در گیاه آویشن در داخل الکل حل شود و بعد از چند شبانه روز محتویات داخل ظرف را از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف نموده و در داخل پلیت‌های شیشه‌ای بزرگ ریخته و در داخل انکوباتور ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا الکل عصاره‌ها تبخیر شود. بعد از اینکه عصاره‌ها کاملاً خشک شد با استفاده از تیغه اسکالپل یا کاردک تیز آنرا از سطح پلیت‌ها برداشته و در داخل ظرف تیره‌ای ریخته و تا زمان آزمایش در داخل یخچال یا دمای محیط آزمایشگاه نگهداری گردید (۲۳، ۸، ۶).

تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره الکی آویشن

برای اینکار با استفاده از ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی (با دقت ۱ mg) ۱۰۰۰ از عصاره خشک شده را در داخل ۱ mL الکل اتانول ۷۰٪ ریخته و با استفاده از همزن الکتریکی آنرا هم زده تا عصاره در الکل بطور کامل حل شود و از این محلول غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۲۵، ۶/۲۵ گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید (۸، ۶).

تهیه دیسک‌های کاغذ صافی استاندارد آغشته به غلظت‌های مختلف

عصاره الکی آویشن

برای اینکار دیسک‌های کاغذی استاندارد ۶/۶ mL تهیه شد و با استفاده از اتوکلاو استریل گردیده و سپس با غلظت‌های مختلف عصاره آویشن آغشته شدند. با توجه به تجارب کسب شده، میزان ۲۰ μm مایع برای آغشتن کامل دیسک‌ها کافی به نظر می‌رسد، لذا از هر کدام از غلظت‌ها با استفاده از سمپلر ایندورف ۲۰ L μm از عصاره روی دیسک‌ها ریخته شد و با توجه به غلظت‌های تهیه شده از عصاره آویشن، میزان عصاره موجود در هر دیسک به شرح زیر تعیین گردید:

۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲، ۱، ۰/۵، ۲۵، ۱۲۵ / میلی‌گرم در دیسک (برای تهیه غلظت ۴۰ mg در دیسک دو بار به فاصله نیم ساعت ۲۰ میکرولیتر عصاره ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ریخته شد). علت انتخاب غلظت ۴۰ mg در دیسک به عنوان غلظت حداکثری عصاره آویشن، غلظت ۳۰ mg داروی اکسی‌تتراسایکلین موجود در دیسک‌های این آنتی‌بیوتیک بوده است. دیسک‌ها بعد از خشک شدن در داخل ظروف استریل تا زمان آزمایش نگهداری شدند (۲۱، ۸، ۶).

کشت باکتری پنی‌باسیلوس لاروا و تهیه مایه اسپور

سویه‌ای از باکتری پنی‌باسیلوس لاروا از بخش تحقیقات بیماری‌های زنبورعسل و کرم ابریشم موسسه رازی تهیه گردید. این سویه از زنبورستان‌های آلوده به بیماری لوک آمریکائی جداسازی و بوسیله روش PCR شناسائی شده است. باکتری مذکور را در محیط کشت MYPGP-agar کشت داده و مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شرایط بی‌هوازی (۵٪ CO₂) در انکوباتور قرار داده شد تا اسپورها جوانه زده و به شکل رویشی تبدیل شوند. بعد از اینکه کلنی‌های باکتری ظاهر گردید پلیت‌ها را به مدت چهار روز در شرایط هوازی قرار داده تا باکتری به فرم

بیوتیک اکسی تتراسایکلین (داروی انتخابی بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (جدول ۱). بعد از آماده نمودن پلیت‌ها آنها را بصورت وارونه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده تا مراحل رشد را طی نمایند. بعد از این مدت قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید (۲۱).

روش براث دیلوشن

برای اینکار ابتدا باکتری پنی باسیلوس لاروا را در محیط MYPGP-broth کشت داده و سپس مقادیر مختلف عصاره خشک آویشن را به لوله‌های حاوی محیط کشت و باکتری مذکور اضافه نموده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین دو گروه به عنوان شاهد مثبت (دوز دارویی داروی اکسی تتراسایکلین 0.5 mg/mL) و شاهد منفی (بدون استفاده از دارو و عصاره) در نظر گرفته شدند. بعد از این مدت محتویات لوله‌ها را در سطح محیط کشت آگار کشت گردید و ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی قرار داده شد. سپس تعداد کلنی‌های باکتری موجود در سطح پلیت‌ها شمارش گردید (۲۱، ۱۷). غلظتی از عصاره الکلی آویشن که منجر به ممانعت از رشد باکتری مذکور در محیط براث باسیلوس لاروا در نظر گرفته شد (جدول ۲).

بررسی میزان سالم بودن عصاره الکلی آویشن برای زنبوران بالغ

اسپوری تبدیل شود. سپس با استفاده از آب معمولی استریل سطح پلیت را چند بار شستشو داده و محلول حاصله در ظرف دیگری جمع‌آوری گردید و تا زمان استفاده در داخل یخچال نگهداری شد. برای تعیین میزان اسپور موجود در هر میلی‌لیتر از محلول، از دور روش استفاده شد. ابتدا با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری، تعداد اسپورهای موجود در هر میلی‌لیتر از محلول تعیین گردید. سپس برای اطمینان از زنده بودن اسپورها و بررسی امکان رشد آنها در سطح محیط کشت، رقت‌های مختلفی از محلول حاوی اسپور را تهیه کرده و در سطح محیط کشت، کشت داده و بعد از رشد باکتری تعداد کلنی‌های آن را در هر رقت شمارش نموده و با ضرب تعداد کلنی‌ها در فاکتور رقت، تعداد اسپورهای موجود در هر میلی‌لیتر از محلول تعیین گردید و از این رقت‌ها در مراحل بعدی استفاده شد (۱۷).

روش انتشار در آگار

بعد از تهیه محلول اسپور به شکل فوق، با استفاده از محلول استاندارد مک‌فارلند نیم مایه تلقیحی آماده گردید و با استفاده از سوآپ استریل سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت آغشته به اسپور باکتری گردید. بعد از خشک شدن سطح پلیت‌ها با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره آویشن را به فاصله‌های مشخص از همدیگر و دیواره پلیت روی محیط کشت قرار داده و با اندکی فشار به سطح محیط چسبانیده شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد و از دیسک‌های کاغذ صافی خالی به عنوان کنترل منفی و دیسک‌های حاوی 30 mg آنتی

جدول ۱- گروه‌های مختلف بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی آویشن روی باکتری پنی باسیلوس لاروا در روش انتشار در آگار

غلظت عصاره آویشن یا داروی اکسی تتراسایکلین (mg/disk)	گروه (تیمار و کنترل)
۱۱۲۵	۱
۲۵	۲
۵۰	۳
۱	۴
۲	۵
۵	۶
۱۰	۷
۲۰	۸
۴۰	۹
۳۰	کنترل مثبت (دیسک واجد دارو)
۰	کنترل منفی (دیسک فاقد دارو)

آویشن (حداقل غلظت عصاره آویشن در گروه‌ها ۵ mg/mL در نظر گرفته شد) همراه با شربت شکر قرار داده شدند و هر روز میزان مرگ و میر و علائم غیر طبیعی در آنها در مقایسه با گروه‌های شاهد مورد مشاهده قرار می‌گرفت (شکل ۳). هر گروه شامل ۱۰ عدد زنبور بالغ و در سه تکرار انتخاب شدند (۱۲،۷) (جدول ۳).

آنالیز آماری

مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌های حاوی عصاره آویشن و بررسی قدرت ضد میکروبی رقت‌های مختلف آن و مقایسه تلفات گروه‌های مختلف زنبورهای بالغ تحت درمان با رقت‌های مختلف عصاره

با توجه به اینکه تمام داروها و مواد شیمیایی که بصورت خوراکی در اختیار کلنی‌های زنبور عسل قرار داده می‌شوند، توسط زنبوران بالغ همراه با شربت شکر مصرف شده و بعد از مصرف و ترکیب با عسل ذخیره شده در اختیار نوزادان زنبور قرار داده می‌شود، لذا در صورتی که مواد مصرف شده برای زنبوران بالغ کشنده باشند، علائم ناشی از آنها در همان ابتدای مصرف مشاهده خواهد شد. لذا در این بررسی بعد از اینکه اثرات ضدباکتریایی عصاره الکی آویشن روی باکتری پنی‌باسیلوس لاروا به اثبات رسید، ابتدا زنبورهای هم سن از یک کلنی سالم و بدون علائم هرگونه بیماری انتخاب و در گروه‌های مختلف در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵٪ تحت درمان با غلظت‌های مختلف عصاره الکی

جدول ۲ - گروه‌های مختلف بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکی آویشن روی باکتری پنی‌باسیلوس لاروا در روش برات دیلوشن

غلظت عصاره آویشن یا داروی اکسی‌تتراسیکلین (mg/disk)	گروه (تیمار و کنترل)
۱۲۵	۱
۲۵	۲
۱۵۰	۳
۱	۴
۲	۵
۵	۶
۱۰	۷
۲۰	۸
۴۰	۹
۳۰	کنترل مثبت (واجد دارو)
۰	کنترل منفی (فاقد دارو)

جدول ۳ - گروه‌های مختلف زنبوران بالغ تحت تغذیه با غلظت‌های مختلف عصاره الکی آویشن همراه با شربت شکر ۱+۱

غلظت عصاره الکی آویشن (mg/ml)	تعداد زنبورها	گروه‌ها (تیمار و کنترل)
۵	۳۰	۱
۱۰	۳۰	۲
۲۰	۳۰	۴
۴۰	۳۰	۵
۰	۳۰	کنترل منفی

تأثیری در نابودی اسپوره‌های عامل بیماری مذکور ندارند و اسپورها سالیان متمادی در زنبورستان‌ها و روی ملزومات زنبورداری زنده باقی مانده و به محض فراهم شدن شرایط منجر به ابتلاء و مرگ نوزادان زنبورعسل می‌گردند. جستجوی روش‌ها و مواد مؤثر و کم خطر برای زنبور عسل و مصرف‌کنندگان فراورده‌های آن از اولویت ویژه‌ای برخوردار است. این بررسی برای اولین بار اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی آویشن را روی باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکایی و میزان سالم بودن آنرا برای زنبوران بالغ را مورد مطالعه قرار داده است. با توجه به نتایج حاصله و در صورت ادامه این بررسی می‌توان از عصاره الکلی آویشن به عنوان یکی از راه‌های درمان بیماری لوک آمریکایی زنبورعسل استفاده نمود. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره الکلی آویشن در غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی روی باکتری پنی باسیلوس لاروا داشته و در غلظت نزدیک به غلظت اکسی تتراسیکلین در دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، موجب مهار رشد و نابودی باکتری مذکور می‌شود. بطوری‌که در غلظت ۴۰ disk/mg با ایجاد هاله ممانعت از رشد ۴۰ mm موجب مهار رشد باکتری مذکور می‌گردد. همچنین در غلظت ۵ mg/mL باعث نابودی باکتری شده است که این غلظت‌ها با توجه به نتایج بررسی‌های انجام گرفته روی سایر باکتری‌ها بسیار قابل توجه می‌باشد. نتایج این بررسی مشابهت و همخوانی زیادی با نتایج بررسی‌های سایر محققین دارد. بطوری‌که زهرانی و همکاران (۲۳) با بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاه آویشن شیرازی روی باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه مشاهده کردند که قطر هاله مهار از رشد باکتری‌های مذکور از ۶۰-۳۰ mg متغیر

آویشن، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون T مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این تحقیق مقدار P کمتر از ۰/۰۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد.

نتایج

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی آویشن در دو روش انتشار در آگار و برآث دیلوشن به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ ذکر شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در روش انتشار در آگار اندازه قطر هاله ممانعت از رشد باکتری رابطه مستقیمی با غلظت عصاره موجود در دیسک دارد. با توجه به عدم رشد باکتری در محیط برآث حاوی MG/ML ۵ عصاره آویشن، این غلظت از عصاره به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد (جدول ۵). همچنین در شکل‌های ۱ و ۲ قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره آویشن و داروی اکسی تتراسیکلین مشاهده می‌شوند.

بحث

بیماری لوک آمریکایی یکی از مهلک‌ترین بیماری‌های زنبورعسل است که هر ساله تعداد زیادی کلنی زنبورعسل سراسر جهان در اثر ابتلاء به آن از بین رفته یا معدوم می‌گردند. برای درمان این بیماری از آنتی‌بیوتیک‌های متعددی استفاده شده است و در حال حاضر از دو آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسیکلین و تایلوزین به اشکال مختلف در کلنی‌های زنبورعسل استفاده می‌گردد (۱۵). آنتی‌بیوتیک‌ها علی‌رغم کنترل علائم بیماری در کلنی‌ها

جدول ۴- نتایج حاصل از بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره الکلی آویشن روی باکتری پنی باسیلوس لاروا به روش انتشار در آگار. داده‌ها میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار می‌باشد.

گروه (تیمار و کنترل)	غلظت عصاره آویشن یا داروی اکسی تتراسیکلین (mg/disk)	میانگین قطر هاله ممانعت از رشد (mm)
۱	۱۲۵	۰
۲	۲۵	۱۰/۳۳ \pm ۱/۴۶۶
۳	۵۰	۱۵/۶۶ \pm ۱/۶۳۳
۴	۱	۱۸ \pm ۱/۱۶
۵	۲	۲۰/۶۶ \pm ۱/۶۳۳
۶	۵	۲۴/۶۶ \pm ۱/۸۱۶
۷	۱۰	۲۷/۶۶ \pm ۱/۸۱۶
۸	۲۰	۳۵/۶۶ \pm ۱/۲۴۷
۹	۴۰	۴۰/۶۶ \pm ۱/۲۴۷
کنترل مثبت (واجد دارو)	۳۰	۵۹ \pm ۱/۸۱۶
کنترل منفی (فاقد دارو)	۰	۰

باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی به دو روش انتشار در آگار و برات دیلوشن مشاهده کردند که عصاره الکلی در غلظت mg/ml ۲۵ به ترتیب باعث ایجاد هاله ممانعت از رشد باکتری‌های مذکور به قطر ۲۱ mm و ۱۹ mm می‌شود و عصاره آبی آن در این غلظت هاله ممانعت از رشد ۱۵ mm و ۱۴ mm را در دو باکتری ایجاد نمود (۸). صبیحه شریف در بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره الکلی آویشن علیه سویه‌هایی از باکتری سالمونلا تایفی موریوم جداسازی شده از بیمارانی که از تب تیفوئید رنج می‌بردند مشاهده نمود که حداقل غلظت مهارکنندگی این عصاره $\mu\text{g/mL}$ ۲۵۰۰ است. ایشان همچنین در بررسی اثرات ضد باکتریایی این عصاره در خرگوش‌هایی که با این سویه‌ها آلوده شده بودند مشاهده کرد که تعداد خرگوش‌های نجات یافته از بیماری نسبت به گروه‌های کنترل بیشتر است (۲۱). در رابطه با مواد ضدباکتریایی مؤثر در عصاره‌های الکلی آویشن ذکر شده که بیشترین اثرات ضدباکتریایی آن مربوط به ترکیبات فنولی (تیمول و کارواکرول) آن است که بیشترین حجم مواد تشکیل دهنده این گیاه را تشکیل می‌دهند (۱). نتایج این بررسی‌ها و بررسی حاضر نشان می‌دهند که گیاهان دارویی می‌توانند به عنوان یکی از روش‌های درمانی بیماری‌های زنبورعسل بویژه بیماری‌های عفونی (لوک آمریکائی) مورد استفاده قرار گیرند. البته برای رسیدن به این هدف باید بررسی‌های بیشتری در شرایط آزمایشگاه و مزرعه انجام گیرد.

در بررسی حاضر میزان تلفات زنبورهای گروه شاهد منفی و گروه‌های آویشن تفاوت معنی‌داری ($P < / 0.05$) با هم نداشتند و به نظر نمی‌رسد که عصاره آویشن باعث مرگ زنبورهای تحت درمان شده باشد، چرا که

است. البته این محققین بجای عصاره الکلی گیاه آویشن از اسانس خالص آن استفاده نموده‌اند که می‌تواند در تفاوت نتایج دو تحقیق مؤثر باشد. بهنیا و همکاران با مطالعه اثرات ضد تک‌یاخته‌ای آویشن ایرانی روی *Entamoeba histolytica* دریافتند که MIC عصاره‌های هیدروالکلیک و هگزانیک و روغن اسانسی گیاه آویشن بر روی این تک‌یاخته بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب ۴/۴ mg/ml و ۷/ می‌باشد (۴).

موسوی و همکاران اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی موریوم در سوپ جو تجارتي مورد مطالعه قرار داده و مشاهده کردند که این اسانس قادر به مهار رشد باکتری مذکور است و می‌تواند به عنوان نگهدارنده‌ی مناسب علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذائی مورد استفاده قرار گیرد (۱۹). سیلو و همکاران در یک بررسی مشاهده کرده‌اند که اسانس آویشن باعث مهار رشد میسلیوم‌ها و تولید آفلاتوکسین قارچ‌های مورد مطالعه از جمله اسپرژیلوس فلاووس می‌شود (۲۲). بنیادیان و کریم در بررسی تأثیر روغن‌های فرار برخی از گیاهان از جمله آویشن بر روی باکتری‌های اکولای و استافیلوکوکوس اورئوس دریافته‌اند که اسانس آویشن نسبت به سایر گیاهان بیشترین اثر را دارد و حداقل غلظت مهارکنندگی آن برای دو باکتری مذکور به ترتیب ۱/ و ۰/۵٪ و حداقل غلظت کشندگی آن ۱/۵ و ۱٪ است (۵). دلیر ثانی و همکاران در بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی آویشن و نه گیاه دیگر روی استرپتوکوکوس موتانس عامل پوسیدگی دندان، در مقایسه با کلرهگزیدین گلوکونات، دریافتند که این عصاره روی باکتری مذکور اثرات ضدباکتریایی چشمگیری دارد (۶). فیاد و همکاران با بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی آویشن روی

جدول ۵- میزان رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره الکلی آویشن در روش برات دیلوشن. داده‌ها میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار می‌باشد.

گروه (تیمار و کنترل)	غلظت عصاره آویشن یا داروی اکسی تتراسیکلین (mg/ml)	میانگین تعداد کلنی در سطح آگار
۱	۱/۱۲۵	غیر قابل شمارش
۲	۱/۲۵	۱۰۳/۶۶ \pm ۴/۶۴۲
۳	۱/۵۰	۶۶/۳۳ \pm ۴/۳۰۵
۴	۱	۲۱/۳۳ \pm ۵/۲۸۸
۵	۲	۱۵ \pm ۴/۰۸۲
۶	۵	۰
۷	۱۰	۰
۸	۲۰	۰
۹	۴۰	۰
کنترل مثبت (واجد دارو)	۱/۰۵	۰
کنترل منفی (فاقد دارو)	۰	غیر قابل شمارش

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*) *Pulvificiens* (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. *Pulvificiens*. *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 *Thymus 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.

اگر غلظت‌های آویشن استفاده شده در این بررسی برای زنبورها کشنده بود باید در هفته اول آزمایش تلف می‌شدند در حالی بیشترین تلفات این گروه‌ها در هفته سوم و چهارم است و تفاوت زیادی با گروه‌های شاهد نداشتند. همچنان‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تعدادی از زنبورهای دریافت‌کننده ۲ mg/mL آویشن حتی تا اواسط هفته ششم هم زنده ماندند در حالی که زنبورهای گروه شاهد منفی و گروه فوماژیلین در پایان هفته پنجم تلف شدند. این امر نشان می‌دهد که احتمالاً عصاره آویشن باعث افزایش طول عمر زنبورها می‌شود. البته این موضوع نیاز به بررسی 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 *Heterotheca latifolia* 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 دارویی 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 نمودند که این فراورده‌ها را می‌توان براحی در کلنی‌های زنبورعسل مورد مصرف قرار داد (۷).

در پایان متذکر می‌شود که با توجه به توسعه پرورش گیاهان دارویی در ایران و امکان استحصال فراورده‌های دارویی 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., I. 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. Haghghi., 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).

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).

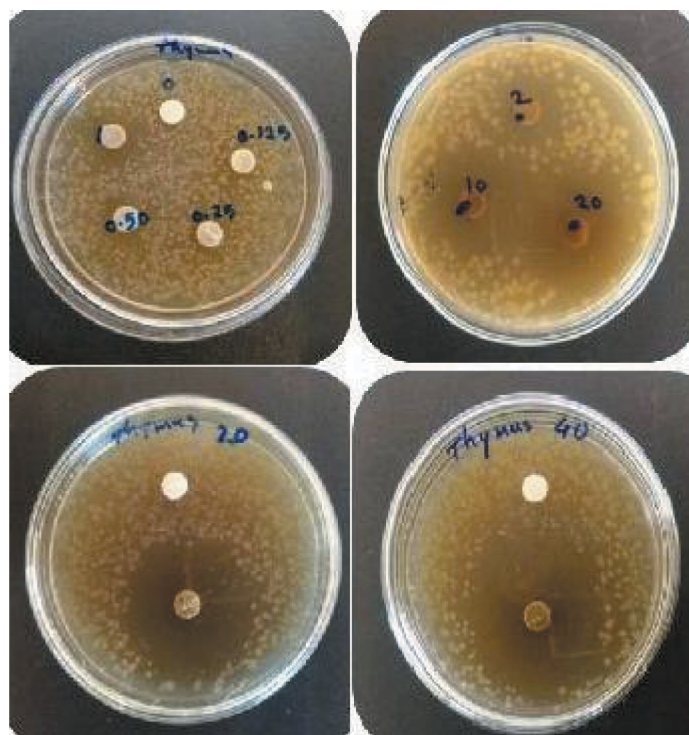
20. Peng, C.Y.S., E. Mussen., A.Fong., P. Wong. G. Cheng and

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 concentration (MIC) of extract of zataria multiflora against the Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and E.coli . *Journal of Veterinary Research* 60: 107-110(in farsi).



شکل ۱- هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا در اطراف دیسکهای آغشته به غلظت های مختلف عصاره الکلی آویشن؛ غلظت ۱۲۵ mg/disk / ، بدون تشکیل هاله؛ غلظت ۲۵ mg/disk /، با ایجاد هاله ۱۰ mm ؛ غلظت ۵ mg/disk / با ایجاد هاله ۱۲ mm و غلظت ۱ mg/disk / ۱ با ایجاد هاله ۱۵ mm؛ غلظت ۲ mg/disk / با ایجاد هاله ۲۱ mm، غلظت ۵ mg/disk / با ایجاد هاله ۲۵ mm؛ غلظت ۱۰ mg/disk / با ایجاد هاله ۲۸ mm؛ غلظت ۲۰ mg/disk / با ایجاد هاله ۳۵ mm و غلظت ۴۰ mg/disk / با ایجاد هاله ۴۰ mm در اطراف دیسک کاغذی استاندارد.



شکل ۲- هاله ممانعت از رشد ۶۰ mm در اطراف دیسک استاندارد حاوی ۲۰ mg آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین.



شکل 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 ۳۷ °C و رطوبت ۶۵٪.