

## 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 شناسایی فلور قارچی کلنی‌های زنبورعسل استان آذربایجان غربی بوده است، طی سالهای ۱۳۸۴ الی ۱۳۸۹ از تعدادی از کلنی‌های زنبورعسل این استان بالغ بر ۲۰۰۰ نمونه شامل زنبور بالغ، لارو و شفیره، گرده گل و عسل در شرایط تمیز و در ظروف نمونه برداری پلاستیکی جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها 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 نمونه‌ها، قارچها و مخمرهای مختلف موجود در آنها شناسائی و ثبت گردیدند. در طول سه فصل نمونه برداری از ۵۰۰ نمونه زنبور بالغ 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 بوده‌اند. قارچها و مخمرهای جداسازی شده و میزان حضور آنها در نمونه‌ها 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 (۸/۸ درصد)، استمفیلیوم (۸/۸ درصد) و سپتونوم (۳/۳ درصد). این نتایج نشان می‌دهد که انواع قارچها و مخمرها با میزان نسبتاً زیادی در کلنی‌های زنبور عسل وجود دارند که در صورت عدم رعایت بهداشت کلنی‌های زنبورعسل و عدم دقت در استحصال و نگهداری فرآورده‌های آن، می‌توانند به عنوان یکی از عوامل بروز عوارض در زنبورعسل و کاهش کیفیت فرآورده‌های آن و همچنین مخاطراتی در مصرف کنندگان فرآورده‌های زنبورعسل تلقی شوند که البته میزان تأثیر این عوامل در بروز این مشکلات نیازمند بررسیهای بیشتری است.

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

• 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%, *Helmetosporium spp.* 3.9%, *Mucor spp.* 7.65%, *Paecilomyces spp.* 0.8%, *Penicillium spp.* (12.15%), *Rhizopus spp.* (0.4%), *Scopulariopsis spp.* (0.9%), *Septonium 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 زنبور عسل در مناطق مختلف جهان پرورش داده می شود و از جنبه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. از سوی دیگر زنبور عسل نقش بسیار مؤثری در گرده افشانی و افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و بطور مستقیم و غیر مستقیم نقش بی بدیلی در ارتقای اقتصاد کشاورزی کشور دارد (Klein et al., 2007). بطوریکه مشخص شده است که ارزش گرده افشانی زنبور عسل در کشاورزی آمریکا بیش از ۱۴ میلیارد دلار در سال است (Morse and Calderone, 2000) و ارزش اقتصادی گرده افشانی زنبور عسل 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 برنامه ریزی و اقدامات لازم دارد. یکی از عواملی که می تواند صنعت زنبورداری کشور را با خطر مواجه سازد عوامل بیماری زا و آفات مختلف زنبور عسل است که در صورت شیوع در زنبورستان ها می توانند خسارات زیادی به این صنعت وارد سازند. از سوی دیگر بسیاری از عوامل بیولوژیک و شیمیایی که وارد فرآورده های زنبور عسل می شوند می توانند برای مصرف کنندگان محصولات این موجود خطرناکی به همراه داشته باشند که از آن جمله می توان به عوامل قارچی اشاره نمود که علاوه بر ایجاد خسارت مستقیم در کلنی های زنبور عسل می توانند فرآورده های آن را از جمله عسل و گرده گل را آلوده نموده و مصرف آن ها را برای انسان مشکل آفرین

نمایند که مهم ترین مشکل حاصله تولید آفلاتوکسین های مختلف است که در صورت افزایش میزان آن ها، خطرات زیادی برای مصرف کنندگان قارچ ها و مخمرهای مختلف کلنی های زنبور عسل از اهمیت ویژه ای برخوردار است که با این کار می توان قارچ ها و مخمرهای خطرناک برای بهداشت زنبور عسل و مصرف کنندگان فرآورده های آن را مشخص نموده و اقدامات لازم برای جلوگیری از گسترش، رشد و تکثیر زیاد در فرآورده های کلنی های زنبور عسل صورت پذیرد. لذا با این دیدگاه و اهمیتی که در شناسایی فلور قارچی کلنی های زنبور عسل وجود دارد، این بررسی در سطح زنبورستان های استان آذربایجان غربی طی سال های ۱۳۸۴ الی ۱۳۸۹ انجام گرفته است.

اکثر قارچ ها و مخمرهای مختلفی که معمولاً بصورت ساپروفیت در سطح بدن زنبور و در شان های مومی محل پرورش نوزادان حضور دارند بر روی گیاهان و محیط های مورد بازدید زنبور عسل حضور داشته و زنبوران چراگر آن ها را به داخل کندوها می آورند و با توجه به فراهم بودن دما و رطوبت مناسب در داخل کندوها، محیط مناسبی برای رشد انواع قارچ ها فراهم می آید (Jennings and Lysek, 1999). بسیاری از قارچ های موجود در داخل کلنی های زنبور عسل برای حیات کلنی و فراوری گرده گل ذخیره شده (نان زنبور) لازمند و تعدادی دیگر از قارچ ها می توانند به عنوان عوامل بیماری زای زنبور عسل عمل نمایند (Gillian & Vandenberg, 1997) ولی

متابولیت‌ها و آفاتوکسین‌های متعددی‌اند که می‌توانند مشکلاتی را در مصرف‌کنندگان فراورده‌های کلنی‌ها بوجود آورند. بطوری که Martins و همکارانش که با استفاده از روش کروماتوگرافی به جستجوی آفاتوکسین در عسل پرداخته‌اند نسبت به حضور آن‌ها در عسل هشدار داده‌اند. البته آن‌ها در نمونه‌های مورد بررسی حضور آفاتوکسین 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 و روکوزوم، اسپریژیلوس نیجر، اسپریژیلوس کاربوناریوس، اسپریژیلوس اوکراسئوس، اسپریژیلوس فلاووس، اسپریژیلوس 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 (OTA) و آفاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 را مورد جستجو قرار داده‌اند. در نهایت ذکر کرده‌اند که به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۵۳/۳ درصد، ۳۳/۳ درصد و ۲۵ درصد از جدایه‌های اسپریژیلوس کاربوناریوس، اسپریژیلوس اوکراسئوس، پنی سیلیوم و روکوزوم و اسپریژیلوس نیجر تولید OTA می‌کنند. علاوه بر این ۲۸/۶ درصد از جدایه‌های گروه اسپریژیلوس فلاووس و اسپریژیلوس پارازیتیکوس قادر به تولید آفاتوکسین B1 می‌باشند. آفاتوکسین B2 فقط در ۱۰ درصد از کشت‌ها تشخیص داده شده است. از سوی دیگر آفاتوکسین‌های G1 و G2 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 می‌رسد. 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 پاییز) 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 زنبور بالغ، ۲۰ عدد لارو و سفیره، 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

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 اسپریژیلوس فلاووس و اسپریژیلوس 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*, *Torulopsis 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. 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 بطوری که 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

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 ساپرو دکستروز آگار، پلیت‌ها

کشت قارچی ساپرو دکستروز 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 اثر 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 ۱/۸۵٪ استریل از آن‌ها هموژنی تهیه نموده و در کنار شعله و با رعایت شرایط نسبتاً استریل در سطح محیط کشت ساپرو دکستروز آگار

جدول ۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی کل نمونه‌های 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 نمونه‌های 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

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

۲- در فرایند تغلیظ و فراوری شهد جمع‌آوری 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

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 قارچ‌هایی که از نظر ماکروسکوپی 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 هر کدام 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

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

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

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

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

قارچه‌های جداسازی شده



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).

علی‌رغم 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 خوردن آسپرژیلوس‌های زیر باعث بیماری و تلفات در زنبورعسل شده‌اند: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus effusus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Melanosellamors* و *Aspergillus glaucus* (Morse ۱۹۸۰). 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 هیمالیسیس (*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 کلایسیپس (*Claviceps*) را در یک بیماری شبیه به بیماری نوزاد سنگی جداسازی نموده‌اند و قارچ رایزوپوس اکوتینوس و اسکوپولاریوپسیس برویکولیس را عامل بیماری نوزاد زرد و نوزادان سیاه زنبورعسل می‌دانند. ذکر شده که مخمرها عامل بیماری‌های زای زنبورعسل نمی‌باشند. 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 کلنی‌هایی که الف: با آنتی بیوتیک‌ها درمان شده‌اند، ب: علف کش‌ها در مورد آن‌ها بکار رفته‌اند، ج: در قفس تحت کنترل بوده‌اند، د: مبتلا به بیماری‌هایی بوده‌اند که مخمرها منشاء آن‌ها نبوده است و ه: جیره غذایی کمی دریافت داشته‌اند به آسانی و به میزان زیاد جداسازی 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 آفات توکسین‌های حاصل از آن‌ها، گرده گل می‌تواند منبع مهمی از آفات توکسین‌های 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

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 توده‌هایی 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 باکتریایی 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،

مخمرهای جداسازی شده در کلنی های زنبور عسل انجام پذیرد. ۱۳- بررسی های بیشتری روی نقش آنتی بیوتیک ها و سایر داروهای مورد مصرف در کلنی های زنبور عسل در افزایش یا کاهش میزان مخمرها و قارچ های مختلف در کلنی ها 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 (Apoidea). *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. *Journal 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., Tschamtk, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Roy. Soci. Lond. B* 274, 303-313.

جزو قارچ های بیماریزای انسان، دام و گیاهان می باشند که علاوه بر ایجاد عارضه در زنبور عسل می توانند عوارضی را در مصرف کنندگان فرآورده های زنبور عسل بوجود آورند. اطلاعات زیادی در مورد اینکه قارچ های جداسازی شده به غیر از اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس فومیگاتوس تهدیدی جدی برای کلنی های زنبور عسل باشند در دسترس نیست. البته علت اصلی اینکه بیماری های زیادی ناشی از قارچ ها و مخمرها در زنبور عسل مشاهده نمی گردد می تواند ناشی از رفتارهای بهداشتی و مکانیسم های ایمنی زنبور عسل در مقابل قارچ های مختلف باشد (Evans and Lopez, 2004 Hamdi. C et al, 2011) که علاوه بر تحقیق روی این موضوع، باید بررسی های بیشتری روی تشخیص گونه قارچ های جداسازی شده و نقش آن ها در تولید متابولیت ها و میکوتوکسین های مختلف در فرآورده های زنبور عسل انجام پذیرد.

### پیشنهادات

- با توجه به اینکه قارچ های بیماریزای زنبور عسل (بویژه اسپرژیلوس ها) و حتی قارچ های بیماریزای انسان و بسیاری از قارچ های ساپروفیت از نمونه های اخذ شده از کلنی های زنبور عسل جداسازی شده اند، لذا، تحت شرایط مساعد رشد قارچ ها، امکان شیوع بیماری های قارچی در زنبور عسل و آلودگی فرآورده های زنبور عسل (بخصوص گرده و عسل) که بصورت خام و پالایش نشده مصرف می شوند، وجود داشته و می تواند برای بهداشت انسانی خطراتی به دنبال داشته باشند، لذا جهت حفظ سلامتی کلنی های زنبور عسل و جلوگیری از آلودگی فرآورده های آن پیشنهاداتی به شرح زیر ارائه می گردد:
- ۱- پوشاندن کندوها با پوشش های پلاستیکی غیر قابل نفوذ هوا و رطوبت خودداری شود.
  - ۲- از قرار دادن کندوها در مکان های مرطوب و فاقد تهویه مناسب خودداری شود.
  - ۳- از تهیه شربت شکر با آب های آلوده و غیر قابل شرب خودداری شود.
  - ۴- از مصرف آنتی بیوتیک ها به میزان زیاد و بدون مشورت با کارشناسان مربوطه خودداری شود.
  - ۵- قاب های گرده گل ذخیره ای در جای خشک و خنک نگهداری شوند.
  - ۶- قاب های عسل قبل از اینکه درب کل سلول های حاوی عسل با موم پوشیده شود، از داخل کندو خارج نشده و عسل آن ها استحصال نگردد.
  - ۷- عسل های انباری حتماً در جای خشک و خنک نگهداری شوند.
  - ۸- در صورتی که عسل های صاف شده به مدت طولانی نگهداری می شوند حتماً با رعایت اصول صحیح پاستوریزه شوند.
  - ۹- از خرید و فروش قاب های مومی، کندوهای مستعمل ضد عفونی نشده، وسایل زنبورداری سایر زنبورستان ها خودداری شود.
  - ۱۰- گرده گل استحصال شده را بخوبی خشک نموده و به شیوه صحیح بسته بندی شود.
  - ۱۱- کندوهای خالی، قبل از استفاده مجدد، با شعله یا مواد ضد عفونی کننده رایج و سالم ضد عفونی گردند.
  - ۱۲- بررسی های بیشتری روی نقش بیماریزایی انواع قارچ ها و



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.

