نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۲ پاییز ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106294

بررسی اثرات ضد باکتریائی باکتریهای *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus casei* روی باکتری *Paenibacillus larvae* عامل لوک آمریکائی زنبورعسل در شرایط آزمایشگاه

• **مصطفی مرادی**
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی
• **عبدالغفار اونق (نویسنده مسئول)**
دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی ارومیه
تاریخ دریافت: آذر ۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۹۴
Email: ownagh@yahoo.com

چکیده

در این بررسی با اســـتفاده از روش‌های Agar spot test و انتشار در چاهک و Microdilution اثرات ضد باکتریائی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل مورد مطالعه قرار گرفت. در روش Agar spot test غلظت 10^7 cfu/ml باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب باعث ایجاد هاله ممانعت از رشد باکتری به قطر ۴۵ میلی متر و ۴۰ میلی متر علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا گردیدند. در روش انتشار در چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع روئی عاری از سلول(cfcs)، باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب باعث ایجاد هاله ممانعت از رشـــد باکتری به قطر ۴۰ و ۳۰ میلی متر و ۵۰ میکرولیتر مایع روئی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و باکتری لاکتوباســـیلوس اســـیدوفیلوس به ترتیب باعث ایجاد هاله ممانعت از رشد ۳۰ و ۲۵ میلی متر و ۳۰ میکرولیتر مایع روئی باکتری لاکتوباســـیلوس کازئی و باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب باعث ایجاد هاله ممانعت از رشد ۲۰ و ۱۲ میلی‌متر شـــدند. در روش میکرودیلوشن غلظت‌های 10^8 الی 10^3 cfu/ml هر دو باکتری اسید لاکتیک مانع از رشد باکتری پنی‌باسیلوس لاروا در غلظت 10^4 cfu/ml گردیدند. ولی هر دو باکتری در غلظت 10^2 cfu/ml تأثیری روی باکتری مذکور نداشتند. لذا غلظت 10^3 cfu/ml هر دو باکتری اسیدلاکتیک استفاده شده به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد(MIC) و حداقل غلظت کشـــندگی(MBC) هر دو باکتری علیه باکتری پنی‌باسیلوس لاروا در نظر گرفته شدند. نتایج این بررسی نشان داد که باکتری‌های لاکتوباســـیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث مهار رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعســـل در محیط کشت شـــده و با اثراتی که روی جوانه زدن اســـپور باکتری مذکور و همچنین نابودی شکل رویشی آن می‌گردنـــد می‌توانند در صورت بی خطری آن‌ها برای لاروهای زنبورعســـل، به عنوان یکی از روش‌های مبارزه با این بیماری در کلنی‌های زنبورعسل مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: زنبورعسل، بیماری لوک آمریکائی، باکتری پنی باسیلوس لاروا، باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 112 pp: 25-36

Antibacterial effects of ***Lactobacillus casei*** and ***Lactobacillus acidophilus*** on the ***Paenibacillus larvae*** causative agent of honeybee American foulbrood disease ***In vitro***

By: Moradi, M., Member of Scientific Board of Research Centre for Agriculture and Natural Resources of West Azarbahjan. and Ownagh, A., (Corresponding Author) Assosiate Professro Group Microbiology Facoulty of Oroumiah

Received: November 2015 Accepted: December 2015

Email: ownagh@yahoo.com

In this survey antibacterial effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* against *Painibacillus larvae*, causative agent of honeybee American foulbrood disease, has investigated by Agar spot test, Well diffusion and Microdilution methods. In Agar spot test 10^7cfu/ml of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* made inhibition zone 45 and 40 mm around spots on the agar medium respectively. In the well diffusion method, 100 microliters of cell free supernatant (cfcs) of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* mede inhibition zone 40 and 30 mm around wells respectively, 50 microlitrs of *L. casei* and *L. acidophilus* supernatant mede inhibition zone 30 and 25 mm around wells respectively and 30 microlitrs of *L. casei* and *L. acidophilus* supernatant made inhibition zone 20 and 12 mm around wells respectively. In the microdulation method 10^3 -10^8cfu/ml concentrations of two lactobacillus inhibited *P. lrvae* growth completely, but 10^2 and 10 cfu/ml of two lactobacillus have not any effect on the *P. larvae* growth. The results of this study show that *L. casei* and *L. acidophilus* have antibacterial effects on the *P. larvae*, causative agant of the honeybee American foulbrood disease and can use as a safe remedy for treatment of this disease.

Key words: Honeybee, American foulbrood disease, *Paenibacillus larvae, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus*

مقدمه

زنبوران عسل جزو خانواده زنبور Apidae مربوط به راسته بال غشائیان Hymenoptera و در جنس آپیس قرار دارند که شامل یک گونه زنبورعسل غربی Apis mellifera، و هشت گونه زنبورعسل آسیائی می‌باشند (Old-royd and Wongsiri, 2006). زنبورعسل نقش بسیار مهمی در اکوسیستم گیاهی و جانوری داشته و عدم حضور آن خسارت جبران‌ناپذیری به بقا سایر موجودات خواهد زد. انسان از فراورده‌های زنبورعسل از جمله عسل، گرده، موم، ژله رویال و زهر علاوه بر استفاده غذائی، در صنایع داروسازی و آرایشی و صنایع دستی استفاده‌های زیادی می‌نماید و صنعت زنبورداری بطور مستقیم و غیر مستقیم اثرات زیادی بر توسعه اقتصاد کشاورزی هر کشوری دارد. زنبوران عسل فایده بسیار مهم دیگری را برای بشر دارند که گرده افشانی گیاهان و درختان وحشی و پرورشی است(Southwick and Southwick, 1992). گرده افشانی گیاهان نقش بسیار مهمی در سلامتی و تغذیه انسان دارد. بطوری‌که از هر سه لقمه غذای انسان یک لقمه آن بطور مستقیم و غیر مستقیم وابسته به گرده افشانی توسط حشرات است و بر اساس تخمین‌ها، ۵۲ نوع از ۱۱۵ نوع غذای انسان حاصل از فواید زنبورعسل است و بدون زنبورعسل ۱۰ الی ۹۰ درصد کاهش در آن‌ها اتفاق می‌افتد(Klein et al., ۲۰۰۷). 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). ارزش زنبورعسل در گرده افشانی گیاهان طبیعی براحتی تخمین زده نمی‌شود (Moritz et al., 2010).

زنبوران عسل از عوامل بیماری‌زای زیادی از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها، تک یاخته‌ها، قارچ‌ها و مایت‌های انگلی آسیب دیده و هر ساله میزان زیادی از آن‌ها از بین می‌رود. این بیماری‌ها خسارت اقتصادی زیادی را در زنبورداری و کشاورزی سراسر دنیا ایجاد می‌کنند (Genersch. E., 2010). بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل یکی از بیماری‌های عفونی مرحله لاروی زنبورعسل و سایر گونه‌های زنبور است و در تمام نقاطی از جهان که زنبورعسل پرورش داده می‌شود گسترده است و هر ساله تعداد زیادی از کلنی‌های زنبورعسل در اثر ابتلا به این بیماری نابود می‌گردند و با توجه به عدم درمان قطعی آن، در بسیاری از کشورها کلنی‌های آلوده از بین برده می‌شوند و از این طریق زیان‌های زیادی به زنبورداری‌ها وارد می‌شود. پنی‌باسیلوس لاروا، عامل ایجاد کننده این بیماری، یک باکتری گرم مثبت است که در هر لارو مبتلا می‌تواند بیش از یک میلیارد اسپور ایجاد نماید (Heyndrickx et al., 1996). اسپورها قادرند که در فراورده‌های زنبور(عسل، موم و لاروهای تلف شده) و محیط اطراف کندو به مدت ۳ الی ۱۰ سال و در فلس‌های خشک شده لاروها به مدت ۳۵ سال زنده بمانند. اسپورهای تخلیص شده حتی تا بیش از ۷۰ سال هم زنده می‌مانند. اسپورهای باکتری پنی باسیلوس لاروا باعث ایجاد شکل عفونی بیماری می‌شوند. لاروها از طریق خوردن اسپورهای موجود در غذا آلوده می‌شوند. زمانی که باکتری قبل از مرحله شفیرگی وارد بافت‌های لارو می‌شود، لاروها اکثراً در مرحله

پیش شـفیرگی در سـن ۱۱ روزگی بعد از هچ شدن تخم‌ها، بسرعت تلف شـده و اسپورها شکل می‌گیرند. لاروهای ۱۳ الی ۱۴ روزه حاوی اسپور در تمام بافت‌هایشان می‌باشند (Bailey and Ball, 1991). علائم بیماری لوک آمریکائی بسـیار متنوع و وابسـته به ژنوتیپ‌های دخیل، مرحله بیماری و توانائی کلنی زنبور (و مقاومت احتمالی آن در برابر بیماری لوک آمریکائی) اسـت (Genersch. E. 2010). زنبوران کارگر لاروهای تلف شده را برداشته و سلول را خالی می‌کنند. قاب‌ها در کلنی‌های شدیداً بیمار حالت متخلخل پیدا کرده‌اند که در اثر وجود سـلول‌های سرپوشـیده نوزادان، سلول‌های بدون سـرپوش حاوی بقایای لاروهای تلف شده و سلول‌های خالی بوجود آمده است. درپوش سلول‌های حاوی نوزاد تلف شده ظاهری مرطوب و تیره داشـته و به سمت داخل فرو رفته و با پیشرفت عفونت سوراخ‌دار می‌شوند (Bailey and Ball, 1991;Genersch. E. 2010; OIE ,2014).

با توجه به واگیری شـدید بیماری لوک آمریکائی و خسـارات زیادی کـه به یک زنبورسـتان وارد می‌آورد روش‌های درمانـی و کنترلی زیادی برای آن مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت و از همان آغاز تشـخیص عامل بیمـاری از مواد شـیمیائی زیادی از جمله آنتـی بیوتیک‌ها بر علیه عامل آن اسـتفاده گردیده اسـت (Bailey and Ball, 1991) و در حال حاضر از آنتی‌بیوتیک‌های اکسـی تتراسـایکلین و تایلوزین در اکثـر زنبورداری‌ها استفاده می‌شود (Genersch. E., 2010; Peng et al., 1996; Alippi et al., 1999) که علاوه بر مشکلاتی که در مصرف‌کنندگان فراورده‌های زنبورعسل بوجـود خواهـد آمـد (Martin. P., 2003 ; 2009Reybroeck. W,2003; WHO)، امکان بروز سویه‌های پنی‌باسـیلوس لاروا مقاوم به آنتی بیوتیک هـم وجود دارد، لذا روش‌های دیگـری در کنترل و مبارزه با بیماری اتخاذ شـده است، بطوری‌که در بسیاری از کشورها بویژه کشورهای عضو اتحادیه اروپا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ممنوع بوده (Mutinelli, F., 2003) و با نابود کـردن کل کلنی‌های مبتلا به لوک آمریکائی میزان شـیوع و پراکنش آنرا به شدت کاهش داده‌اند (Morse and Shimanuki, 1990; Matheson and Reid, 1992). در بسیاری از کشورهای دیگر از جمله ایران که حمایت‌های مالـی زیادی از زنبورداری‌ها صورت نگرفته و امکان نابودی یک کلنی برای زنبوردار وجود ندارد، از انواع آنتی بیوتیک‌ها اسـتفاده می‌شود که می‌تواند مشـکلات ناخواسته‌ای را به دنبال داشته باشـد. با توجه به این مشکلات، محققین در پی یافتن روش‌های جدیدی هستند که اولاً روی عامل بیماری مؤثـر بوده، ثانیاً امکان ایجاد مقاومت داروئی در عامل بیماری را به حداقل رسـانده و ثالثاً باقی‌مانده آن در فراورده‌های زنبورعسـل خطرات کمتری برای مصرف کنندگان داشـته باشد. از روش‌هائی که در چند سال اخیر در مبارزه با بیماری لوک آمریکائی مورد اسـتفاده قرار گرفته است می‌توان به اسـتفاده از عصاره گیاهان داروئی، فراورده‌های خود زنبور از جمله بره موم اشاره نمود که در مورد گیاهان داروئی نتایج قابل توجهی حاصل شده است. از راه‌های دیگری که مورد توجه محققین قرار گرفته و امید زیادی به مؤثر بودن آن‌ها وجود دارد شناسائی فلور میکروبی دستگاه گوارش زنبوران عسل (Alejandra. V and Olofsson. T. C., 2009; Hamdi. C,et al., 2011; Martha. G.,1997; Olofsson, T.C, 2011) و نقش آنتی گونیستی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا (Olofsson and Vasquez, 2008) می‌باشد، بطوری‌که با توجه به نقش باکتری‌های اسـید لاکتیک در نابودی و جلوگیری از رشد عوامـل بیماری‌زای انسـان و دام (Gregor. R, Jeremy. B.,2002; Vuyst. L. De, Leroy F.,2007) ، محققین اقدام به بررسـی امکان استفاده از این باکتری‌هـا بر علیـه باکتری‌های عامل بیماری زنبورعسـل هم نموده‌اند و مشخص شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل (Mrazek. J et al, 2008) بر باکتری پنی باسیلوس لاروا مؤثـر بوده و علاوه بر ممانعت از رشـد آن موجب نابودی آن هم می‌گردند (Evans. J. D, Armstrong .T.-N, 2006; Eva Forsgren et al 2010). این نتایج امیدهای زیادی را در اسـتفاده از باکتری‌های اسـیدلاکتیک در مبارزه با بیماری‌های عفونی زنبورعسل ایجاد نموده است. باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک‌ها تاریخچه طولانی در بهبود سـلامتی انسان و دام و حتی نابودی عوامل بیماری‌زای آن‌ها داشـته و استفاده از آن‌ها به عنوان مکمل‌های رشـد و تقویت کننده سیستم ایمنی میزبان مورد توجه قـرار گرفته‌انـد (Ongol. M. P.,2012; Jay D. Evans and Dawn L. Lo-pez,2004).

در انسـان و دام تحقیقات زیادی در مورد نقش درمانی این باکتری‌ها و متابولیت‌هـای آن‌ها صورت گرفته اسـت و از آن‌هـا بصورت خالص و یا متابولیت‌هـای حاصل در تهیـه مکمل‌های غذائی و حتی دارو اسـتفاده می‌شـود (Earl F. Bloch1,et al,2013). اما در صنعت زنبورداری استفاده چندانی از پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل غذائی یا درمانی نشده است و فقط تعداد معدودی بررسـی آزمایشـگاهی صورت گرفته است که برای کسب نتایج بهتر بررسی‌های بیشتری نیازمند است.

در این بررسی برای اولین بار اثر ضدباکتریائی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسـل به چند روش مورد بررسـی قرار گرفته اسـت و با توجه به نتایج حاصله شـاید بتوان در آینده از این باکتری‌ها در کنترل و درمان این بیماری استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

باکتری پنی باسیلوس لاروا

سـویه باکتری پنی باسـیلوس لاروا از بخش تحقیقـات بیماری‌های زنبورعسـل و کرم ابریشـم موسسـه رازی تهیـه گردید. این سـویه از زنبورسـتان‌های آلوده به بیماری لوک آمریکائی جداسازی و بوسیله روش PCR شناسائی شده اسـت. باکتری مذکور را در محیط کشت MYPGP-agar کشـت داده و بمدت ۴۸ سـاعت در دمای ۳۷ درجه سـانتی گراد و شرایط بی هوازی(۵٪ CO_2) نگهداری شد تا اسپورها جوانه زده و به شکل رویشی تبدیل شـوند. بعد از اینکه کلنی‌های باکتری ظاهر گردید پلیت‌ها را بـه مدت ۴ روز در شـرایط هوازی قرار داده تا باکتری به فرم اسـپوری 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 شـد. برای تعیین میزان اسپور موجود در هر میلی‌لیتر از محلول، از دور روش اسـتفاده شد. ابتدا با استفاده از لام نئوبار و بزرگنمائی ۴۰۰ میکروسـکوپ نوری، تعداد اسـپورهای موجود در هر میلی‌لیتر از محلول تعیین گردید (Eva Forsgren et al 2010). سـپس برای اطمینان از زنده بودن اسـپورها و بررسـی امکان رشد آن‌ها در سطح محیط کشـت، 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 شـمارش نموده و با ضرب تعداد کلنی‌ها در فاکتور رقت، تعداد اسپورهای موجود در هر میلی لیتر از محلول تعیین گردید و از این رقت‌ها در مراحل بعدی استفاده شد.

باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)

در این بررسی از باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC No 1643) و لاکتوباسـیلوس کازئی (PTCC No 1608) اسـتفاده گردید. این باکتری‌ها را بصورت لیوفیلیزه از سـازمان پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه نموده و طبق دستورالعمل مربوطه برای فعال نمودن آن‌ها از محیط کشت MRS اسـتفاده گردید و پلیت‌ها و لوله‌های حاوی باکتری لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و باکتری لاکتوباسـیلوس کازئی در شـرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ الی ۴۸ سـاعت قرار داده شـدند (Eva Forsgren et al 2010). سـپس از محتویات لوله‌ها کشـت مجدد تهیه نموده و در شرایط لازم قرار داده تا از میزان رشد طبیعی باکتری‌ها اطمینان حاصل گردد.

تهیه محلول روئی عاری از سلول (cfcs) باکتریهای اسید لاکتیک

برای تهیه محلول روئی عاری از سلول (Cell free culture supernatant) باکتری‌های لاکتوباسـیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی، آن‌ها را در محیط براث کشـت داده و بعد از ۲۴ سـاعت که باکتری‌ها بطور کامل رشد نمودند محتویات لوله‌ها را در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و مایع‌روئی را از فیلترهای استریل ۲۲/ میکرونی عبور داده تا سـلول‌های باکتری و قطعات باقی مانده آن‌ها جداسـازی گردد (Imani Fooladi et al, 2014). مایع صاف شده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد.

اثر ضد باکتریائی لاکتوباسیلوس‌ها علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا

بـرای ایـن‌کار از روش‌هـای Agar spot test و انتشـار در چاهک و Microdilution استفاده گردید.

روش Agar spot test

فعالیـت ضدباکتریائی باکتری‌های لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس و لاکتوباسـیلوس کازئی به روش Agar spot test ارزیابی گردید. بدینصورت که از کشـت تازه باکتری‌های فوق به اندازه ۱۰ میکرولیتر که حاوی غلظت 10^7 cfu/ml بـود، روی محیط کشـت MRS agar نقطه‌گذاری شـد و در شـرایط رشـد مربوط به هر باکتری به مدت ۲۴ سـاعت قرار داده شد تا کلنی‌های باکتری‌ها رشـد و توسعه یابند. سپس اسـپورهای باکتری پنی باسـیلوس لاروا را که قبلاً آماده شده بود، به میزان 10^4 اسپور در هر میلی لیتـر به محیط MYPGP آگار نرم (۴۵ درجه سـانتی‌گراد) اضافه نموده و روی لکه‌های باکتری‌های لاکتوباسیلوس ریخته شد تا سطح پلیت را کاملاً بپوشاند (Karska-Wysocki. B et al, 2010). بعد از اینکه آگار نرم بسته شد، پلیت‌ها را در شـرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده تا باکتری پنی باسیلوس لاروا موجود در محیط رشد نماید. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین که داروی انتخابی مبارزه با بیماری لوک آمریکائی در کلنی‌های زنبورعسل است به عنوان شاهد مثبت و از دیسـک‌های کاغذ صافی خالی به عنوان شـاهد منفی استفاده گردید. روش کار به این صورت اسـت که مایه اسپور باکتری پنی باسیلوس لاروا را به میزان 10^4 اسـپور در میلی لیتر در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت MYPGP آگار کشـت داده و بعد از خشـک شدن سطح محیط با استفاده از پنس اسـتریل دیسک‌های کاغذ صافی خالی و حاوی آنتی بیوتیک را در وسـط پلیت حاوی مایه اسپور باکتری قرار داده و به همان شکل پلیت‌های حاوی باکتریهای اسـیدلاکتیک در انکوباتور گذاشته شدند. برای هر تیمار سـه تکرار در نظر گرفته شـد. بعد از این مدت با استفاده از خط‌کش قطر هاله ممانعت از رشـد اطراف لکه‌های لاکتوباسیلوس‌ها و دیسک‌های آنتی بیوتیک و دیسک‌های خالی اندازه‌گیری شد.

روش انتشار در چاهک

فعالیت ضدباکتریائی متابولیت‌های حاصل از باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس و لاکتوباسـیلوس کازئی علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا با اسـتفاده از روش انتشـار در چاهک هم مورد بررسـی قرار گرفت. برای این‌کار ابتدا در سـطح محیط کشت MYPGP آگار مایه اسپور باکتری پنی باسـیلوس لاروا که حاوی 10^4 اسـپور در هر میلی لیتر بود پخش گردید و حدود نیم سـاعت صبر کرده تا سـطح محیط خشـک گردد، سپس با استفاده از پانچر چاهک‌های را در سطح محیط ایجاد نموده و در هر چاهک سطوح مختلف(۵۰، ۱۰۰ و ۳۰ میکرولیتر) مایع روئی حاصل از باکتری‌های لاکتوباسـیلوس را ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گراد قرار داده شـدند. بعد از این مدت قطر هاله ممانعت از رشد اطراف چاهک‌ها بوسـیله خط کشت اندازه گیری شد (Nikolova. D et al, 2009).

روش Microdilution

این روش برای ارزیابی اثرات آنتی‌گونیستی باکتری‌های لاکتوباسیلوس علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا بکار برده شد. برای این‌کار از میکروپلیت‌های ۴۸ خانه‌ای اسـتفاده گردید و باکتری‌های لاکتوباسیلوس و پنی باسیلوس لاروا بصورت تـوأم در داخل خانه‌های میکروپلیت حاوی ترکیبی از محیط کشـت‌های MRS و MYPGP براث (به میزان برابر) کشـت داده شدند. به ایـن ترتیب که ابتدا در داخل هر یک از خانه‌ها ۱ میلی لیتر از ترکیب برابر دو محیط کشت مذکور ریخته شد. سپس بطور جداگانه با استفاده از روش رقت‌سازی سریالی، از باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس که ۲۴ ساعت قبل کشت شده بودند، غلظت‌های 10^8 تا 10^3 در داخل خانه‌ها تهیه شد. سپس از مایه اسپور باکتری پنی باسیلوس لاروا که قبلاً تهیه شده بود، غلظت 10^4 در میلـی لیتر(محتویات هر خانه میکروپلیت) تهیه کرده و به تمام خانه‌های حاوی محیط کشـت ترکیبی اضافه گردید. ستون‌های اول و آخر به ترتیب به عنوان شـاهد مثبت و منفی انتخاب گردیدند. بدین معنی که در سـتون اول فقط باکتری پنی‌باسیلوس لاروا بدون باکتری‌های لاکتوباسـیلوس و در سـتون آخر فقط باکتری‌های لاکتوباسیلوس ریخته

شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸،۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت بعد از کشت، ۲۰ میکرولیتر از محتویات داخل خانه‌ها را بصورت مجزا در سطح محیط‌های کشت MRS و MYPGP آگار کشت داده و بعد از قرار دادن در شرایط لازم برای رشد هر یک از باکتری‌ها، میزان رشد و تعداد کلنی‌های باکتری‌های لاکتوباسیلوس و پنی باسیلوس لاروا در هر یک از رقت‌های لاکتوباسیلوس‌ها مورد شمارش قرار گرفتند (Carey.C.M et al, 2008).

نتایج

روش Agar spot test

۴۸ ساعت بعد از کشت باکتری‌ها، طی سه روز متوالی پلیت‌های حاوی لکه‌های باکتری‌های لاکتوباسیلوس و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین و دیسک‌های خالی و باکتری پنی باسیلوس مورد مشاهده قرار گرفتند. اثر ضد باکتریائی دز باکتری‌های اسید لاکتیک علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا طی سه روز متوالی بر اساس تشکیل هاله ممانعت از رشد بر روی آگار نشان داده شده است. قطر هاله ممانعت از رشد با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. میانگین قطر هاله ممانعت از رشد هر یک از باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در جدول ۱ ارائه شده است.

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود در اطراف لکه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک و دیسک آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین حلقه مهار رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا در اندازه‌های مختلف تشکیل شده است. اندازه قطر این حلقه در داروی اکسی تتراسایکلین نسبت به باکتری‌های لاکتوباسیلوس استفاده شده بسیار بیشتر است و این نشان‌دهنده حساس بودن باکتری پنی‌باسیلوس لاروا به آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین می‌باشد. همچنان‌که مشاهده می‌شود قطر هاله ممانعت از رشد در اطراف باکتری‌های اسیدلاکتیک در روزهای اول مشاهده نسبت به روزهای آخر بیشتر است که بیان‌گر اثری مهاری این باکتری‌ها روی جوانه زدن اسپور باکتری پنی باسیلوس لاروا است که بتدریج که اثر آن‌ها از بین می‌رود در حاشیه لکه‌ها باکتری مذکور شروع به جوانه زدن و تکثیر می‌کند. البته لازم به ذکر است که حتی بعد از یک هفته هم میزان رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا بیشتر از این میزان نگردید که این موضوع هم نشان‌دهنده ممانعت کامل از رشد باکتری مذکور و یا نابودی آن می‌باشد. البته این مسئله باید در بررسی‌های بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش انتشار در چاهک

از روش انتشار در چاهک برای بررسی اثرات ضد باکتریائی متابولیت‌های حاصل از دو باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا استفاده گردید. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ و ۳۰ میکرولیتر مایع روئی

جدول ۱- قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از باکتریهای لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا بعد از سه روز متوالی

نوع باکتری	دز استفاده شده (در میلی لیتر)	قطر هاله ممانعت از رشد(میلی متر)	قطر هاله ممانعت از رشد(میلی متر)
لاکتوباسیلوس کازئی	10^7	۴۵	۴۵
		۴۴	۴۴
		۴۴	۴۴
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	10^7	۴۰	۴۰
		۴۰	۴۰
		۳۹	۳۹
دیسک اکسی تتراسایکلین		۶۰	۶۰
		۶۰	۶۰
		۶۰	۶۰
دیسک خالی		۰	۰
		۰	۰
		۰	۰

لاکتوباسیلوس‌های مورد استفاده موجب ایجاد هاله ممانعت از رشد علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا به میزان مختلف شده اند.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود مایع روئی باکتری‌های اسید لاکتیک موجب مهار رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا شده‌اند و قطر هاله مهار رشد در میزان‌های مختلف مایع روئی متفاوت می‌باشد که علت این تفاوت میزان پخش مایع روئی در اطراف چاهک‌ها است.

روش Microdilution

این روش برای بررسی MIC رقت‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از آماده‌سازی میکروپلیت‌ها و قرار دادن در انکوباتور، به فواصل ۲۴ ساعت تا ۱۴۴ ساعت بعد از کشت، از محتویات هریک از خانه‌ها نمونه‌برداری انجام گرفت و در سطح محیط‌های کشت MRS agar , MYPGP agar به طور مجزا کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت میزان رشد هر یک از باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تست در جدول ۴ ارائه شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شده در غلظت‌های 10^3 cfu/ml الی 10^8، بعد از ۲۴ ساعت رشد نموده و کدورت کامل را در محیط ترکیبی ایجاد نمودند و بعد از کشت مجزای آن‌ها روی محیط کشت اختصاصی هم تفاوت زیادی در تعداد کلنی‌های باکتری مشاهده نگردید، ولی باکتری پنی باسیلوس لاروا در کنار غلظت‌های فوق باکتری‌های لاکتوباسیلوس فاقد رشد بود و بعد از کشت در سطح محیط اختصاصی هم هیچگونه کلنی از این باکتری مشاهده نشد. هر دو باکتری لاکتوباسیلوس در غلظت 10^2 cfu/ml فاقد رشد بودند و کدورت قابل مشاهده‌ای را ایجاد نکردند و بعد از کشت محتویات خانه‌ها در سطح محیط کشت اختصاصی هم هیچ‌گونه کلنی باکتری مشاهده نگردید. ولی بعد از کشت محتویات خانه‌ها در سطح محیط MYPGP agar کلنی‌های باکتری پنی باسیلوس لاروا به تعداد زیاد مشاهده گردید و تفاوت زیادی با گروه کنترل مثبت نداشتند. لذا باکتری‌های اسید لاکتیک در غلظت‌های 10^2 cfu/ml و ۱۰ فاقد رشد بوده و مانع از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا نگردیده اند. با توجه به این‌که باکتری پنی باسیلوس لاروا در غلظت‌های بالاتر از 10^3 cfu/ml باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی فاقد رشد می‌باشد لذا غلظت 10^3 cfu/ml هر دو باکتری لاکتوباسیلوس به عنوان حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) باکتری پنی باسیلوس لاروا در نظر گرفته شد. از سوی دیگر با توجه به عدم باکتری پنی باسیلوس لاروا بعد از قرار گرفتن در غلظت‌های فوق باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شده در سطح محیط MYPGP agar فاقد رشد بود لذا غلظت 10^3 cfu/ml باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) این باکتری‌ها علیه باکتری پنی‌باسیلوس لاروا در نظر گرفته می‌شود.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای اثرات ضد باکتریائی روی باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی زنبورعسل می‌باشند. این باکتری‌ها در هر سه روش بکار رفته علاوه بر ممانعت از رشد باکتری مذکور باعث نابودی آن شده و از جوانه زدن اسپورهای آن هم ممانعت به عمل می‌آورند. بر هم کنش باکتری‌های اسیدلاکتیک و باکتری پنی باسیلوس لاروا در محیط مایع منجر به نابودی(اثر باکتریسیدال) باکتری پنی باسیلوس لاروا شده است. این نتایج می‌تواند راه‌گشای اتخاذ روش‌های جدیدی در مبارزه با بیماری‌های عفونی زنبورعسل بویژه بیماری لوک آمریکائی آن باشد. البته باید بررسی‌های بیشتری هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط زیستی انجام پذیرد و روش‌ها و سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک مورد ارزیابی قرار گیرند. اثرات ضد باکتریائی باکتری‌های اسید لاکتیک استفاده شده در این بررسی قبلاً توسط سایر محققین مورد بررسی قرار گرفته است، بطوری‌که Millette (۲۰۰۶) و همکارانش نشان داده‌اند که باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی باعث مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس به میزان

جدول ۲- قطر هاله ممانعت از رشد غلظت های مختلف مایع روئی عاری از باکتری، باکتریهای لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا

قطر هاله ممانعت از رشد(میلی متر)	حجم مایع روئی عاری از باکتری(میکرولیتر)	نوع باکتری اسیدلاکتیک
۴۰	۱۰۰	لاکتوباسیلوس کازئی
۳۰	۵۰	
۲۰	۳۰	
۳۰	۱۰۰	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
۲۵	۵۰	
۱۲	۳۰	

۸۵ درصد، لیستریا مونوسیتوژنز به میزان ۷۸ درصد و اکولای H:۰۱۵۷ به میزان ۷۷ درصد شده‌اند. همچنین Beausoleil و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که افزودن ماده‌ای تجاری حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلو کازئی به غذای افراد مبتلا به اسهال ناشی از کلستریدیوم دیفیسیل حاصل از مصرف آنتی بیوتیک، منجر به بهبودی آنان گشته است. Karska-Wysocki و همکارانش(۲۰۱۰) با استفاده از روش‌های انتشار در آگار و میکرودیلوشن نشان داده‌اند که باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی به میزان ۹۹ درصد روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از بیماران مؤثر بوده و باعث مهار رشد آن می‌شوند. Fooladi و همکارانش (۲۰۱۴) با استفاده از روش ماکرودیلوشن اثرات ضد باکتریائی لاکتوباسیلوس‌های *L. casei, L.acidophilus, L. helveticus* و *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* جداسازی شده از ماست را بررسی نمودند و دریافتند که این باکتری‌ها به میزان زیادی باکتری *E. coli* O157:H7 را از بین می‌برند. Mohankumar. A (۲۰۱۱) با جداسازی لاکتوباسیل‌های زیادی از شیر گاو، گاومیش و بز و تولید باکتریوسین بوسیله آن‌ها، دریافتند که تعدادی از آن‌ها باکتریوسین تولید نموده و بر باکتری‌های *Bacillus mycoides, Staphylococcus aureus, S. faecalis, Klebsiella pnuemoniae* و *Proteus vulgaris* مؤثر می‌باشند ولی باکتریوسین‌های تولید شده بر باکتری‌های *Bacillus amyloliquifaciens, Bacillus cereus, Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa* مؤثر نبوده‌اند (۱۹۸۲) . A. B. Watkins و همکاران با بررسی اثرات ضدباکتریائی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی باکتری اشرشیا کولی در جوجه‌های عاری از جرم بیماری‌زا دریافتند که جوجه‌هائی که دو روز قبل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دریافت کرده بودند میزان مرگ و میر بسیار پائینی ناشی از باکتری اکولای نسبت به جوجه‌های گروه کنترل داشته اند.

M. M. Aween و همکاران (۲۰۱۲) با جداسازی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از عسل و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن، دریافتند که این باکتری و مایع بدون باکتری‌روئی آن باعث مهار رشد باکتری‌های گرم منفی *Salmonella typhimurium, Escherichia coli* and Enterobacter می‌گردد . Evans .J.D (2004) در بررسی اینکه آیا باکتری‌های لاکتوباسیلوس همانند باکتری پنی باسیلوس لاروا موجب تحریک سیستم ایمنی زنبورعسل می‌گردند، اقدام به تغذیه لاروهای زنبورعسل با غذائی حاوی تعدادی باکتری لاکتوباسیلوس از جمله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی و همچنین باکتری پنی باسیلوس لاروا نمود. نتایج حاصله نشان داد که باکتری‌های اسیدلاکتیک موجب افزایش دو پپتید ضدباکتریائی آباسین و دیفیسین می گردد که بیانگر آن است که این

جدول ۳- میزان تأثیر غلظتهای مختلف باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه باکتری پنی باسیلوس لاروا در روش میکرودیلوشن طی ۱۴۴ ساعت

تعداد کلنی باکتری پنی باسیلوس لاروا	تعداد کلنی باکتری لاکتوباسیلوس	زمان کشت مجدد(ساعت)	غلظت باکتری لاکتوباسیلوس (cfu/ml)
۰	بیش از ۳۰۰	۲۴	$۱۰^{۳}$-$۱۰^{۸}$
۰	بیش از ۳۰۰	۳۶	
۰	بیش از ۳۰۰	۴۸	
۰	بیش از ۳۰۰	۷۲	
۰	بیش از ۳۰۰	۹۶	
۰	بیش از ۳۰۰	۱۲۰	
۰	بیش از ۳۰۰	۱۴۴	
۴۰	۰	۲۴	$۱۰^{۲}$
۴۲	۰	۳۶	
۴۳	۰	۴۸	
۴۱	۰	۷۲	
۴۳	۰	۹۶	
۴۰	۰	۱۲۰	
۴۰	۰	۱۴۴	

باکتری‌ها همانند باکتری پنی باسیلوس لاروا موجب تحریک سیستم ایمنی زنبورعسل شده و بدون ایجاد بیماری می‌توانند در دفاع لارو زنبورعسل در برابر بیماری لوک آمریکائی مؤثر باشند.

Kazimierczak. B (۲۰۰۶) بـا افزودن ماده پروبیوتیک "Biogen-N" حاوی باکتری‌هـای *Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* و مـاده *Pediococcus acidlactiti* دیگـر "Trilac" حـاوی باکتری‌هـای *Lactobacil-lus* acidophilus *L. delbrueckii subsp.bulgaricum*, و *Bifidobacterium bifidum* بـه گـرده گل مورد مصرف زنبوران عسـل، متوجه شـدند که میزان مرگ و میر این زنبورها نسبت به گروه‌های کنترل کاهش چشمگیری داشته است. Mikio Yoshiyama (۲۰۱۳) هم با اضافه کردن پروبیوتیک‌های حاوی باکتری‌های اسـیدلاکتیک از جمله لاکتوباسـیلوس‌ها به غذای لاروهای زنبورعسـل موجب افزایش پپتیدهای ضدباکتری پنی باسـیلوس لاروا از جمله آباسین، دیفیسـین و هیمنوپتاسین به میزان چشـمگیری شده‌اند که می‌توانند در پیشـگیری بیماری لوک آمریکائی زنبورعسـل مؤثر باشـند. J . Killer و همـکاران (۲۰۱۴) با جداسـازی sp *Lactobacillus apis* از معده زنبوران عسل و بررسی اثرات ضد باکتریائی آن روی باکتری‌های پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمریکائی و ملیسوکوکوس پلوتونیوس عامل بیماری لوک اروپائی زنبورعسـل، دریافتند که این باکتری قادر به مهار رشد باکتری‌های مذکور در شرایط آزمایشگاه می‌باشـد. Eva Forsgren و همکاران(۲۰۱۰) باکتری‌هـای لاکتوباسـیلوس و بیفیدوباکتریـوم را از معده زنبور عسـل جداسازی نموده و اثر ضد باکتریائی آن‌ها روی باکتری پنی باسیلیوس لاروا را با استفاده از روش انتشار در آگار و همچنین در لاروهای زنبورعسل مورد بررسی قرار دادند. در روش انتشار در آگار جدایه‌های مختلف اثرات متفاوتی داشـته‌اند ولی ترکیب آن‌ها مانع از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا بطور کامل گردیده اسـت و در لاروهای زنبورعسل باعث کاهش چشمگیر تلفات ناشی از باکتری پنی باسیلوس لاروا شده اند.

بیشـتر محققین مکانیسـم اثر باکتری‌های اسـیدلاکتیک روی سایر میکروارگانیسم‌ها اثرات ضد باکتریائی متابولیت‌های حاصل از آن‌ها می‌دانند. متابولیت‌ها شـامل مواد ضد میکروبی با وزن کم از جمله اسـیدهای آلی اسـید استیک و اسید لاکتیک، هیدروژن پروکسید، دی استیل، استالدئید، اسـتوئین، دی اکسید کربن، رئوترین، رئوتریسیکلین و مواد ضدمیکروبی با وزن زیاد از جمله باکتریوسین‌ها می‌باشند که هر کدام از این مواد با اثرات مختلف موجب نابودی یا کاهش رشـد عوامل بیماری‌زا می‌گردند. در رابطه با باکتری‌های اسپوردار از جمله باکتری پنی باسیلوس لاروا ذکر شده است که باکتری‌های اسیدلاکتیک مانع از جوانه زدن اسپورها در محیط کشت و جلوگیری از رشد باکتری می‌گردند (Suskovic Jagoda, 2010).

در حـال حاضر فراورده‌های تولید می‌شـوند که حـاوی باکتری‌های اسـیدلاکتیک یـا متابولیت‌های آن‌ها می‌باشـند و به عنـوان مکمل‌های غذائی یـا دارو مورد اسـتفاده قرار می‌گیرنـد. بعنوان مثـال می‌توان به BS-10(*Lb. lactis spp. lactic*)، BIOPROFIT (Lb. rhamnosus LC705) و Bovamine Meat Cultures مؤثر بر سـالمونلا و اشرشیاکلی، HOLD- BAC حـاوی باکتری‌های *Lb. plantarum* ، *Lb. paracasei*, *Lb. sakei*, Lb. *rhamnosus, Proprionibacterium freudenreichii spp. Shermanii* مؤثر بر لیستریا اشاره نمود (Rodgers S, 2008).

بررسی حاضر برای اولین بار اثر ضدباکتریائی باکتری‌های اسیدلاکتیک لاکتوباسـیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس روی باکتری پنی باسیلوس لاروا را مورد مطالعه قرار داده است، نتایج آن مشابه نتایج بررسی سایر محققین روی عوامل بیماریزای انسان و دام است، و می‌تواند به عنوان آغازگر اسـتفاده از روش‌های سالم‌تر برای زنبورعسـل و مصرف‌کنندگان فراورده‌های آن در مبارزه و درمان بیماری‌های زنبورعسـل باشـد. از سوی دیگر با توجه به اینکه دو باکتری اسیدلاکتیک مورد استفاده در این بررسی از دیرباز در فراورده‌های لبنی و گیاهی مورد مصرف انسـان وجود داشته و طی بررسـی‌های مختلف سالم بودن آن‌ها برای انسان اثبات گردیده است، لذا استفاده از آن‌ها در زنبورعسل علاوه بر مبارزه با بیماری‌های آن می‌تواند وارد فراورده‌های زنبور شـده و برای سلامتی مصرف کنندگان فوایدی هم داشـته باشد. ادامه این بررسی باید در شـرایط زیستی روی زنبوران عسل انجـام گرفته و در صورت حصول نتایـج مورد نظر، این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک در صنعت زنبورداری مورد استفاده قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

1. Alejandra Vasquez1 and Tobias C. Olofsson (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 48(3): 189-195.

2. Alippi, A.M., Albo, G.N., Leniz, D., Rivera, L., Zanelli, M.L. and Roca, A.E (1999). Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control AFB of bees. *J. Apic.*

3. Aween. M.M., Hassan. Z., Muhialdin. B. J., Mohd Noor. H. and Eljamel.Y.A (2012). Evaluation on Antibacterial Activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey. *American Journal of Applied Sciences* 9 (6): 807-817.

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

5.Beausoleil M, FortierN, Gue´nette S, l'Ecuyer A, Savoie M, Franco M, et al (2007). Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophillus* CL1285s and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: A. randomised, double-blind placebo-controled trial. Canadian Journal Gastroenterology;21:732–736.

6.Carey, C.M., Kostrzynska, M., Ojha, S., Thompson, S (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-Toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of microbiological methods*. 73, 125-132.

7.Earl F. Bloch1, Ronald D. Schultz and Willie Turner (2013). Mini-Review: Probiotics and Disease Prevention in Different Host Systems. *British Microbiology Research Journal* 3(1): 42-57.

8.Eva Forsgren, Tobias C. Olofsson, Alejandra V´asquez, Ingemar Fries (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41 99–108.

9.Evans .J.D and Armstrong. T-N (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC *Ecology* 2006, 6:4.

10.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.

11.Genersch. E (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S10–S19.

12.Gregor Reid, Jeremy Burton (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes and infection 4, 319–324 Hamdi. C, et al (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *J. Appl. Entomol.* 135 ,524–533.

13.Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N. and Kerkeley, R.C.W (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. /nt. *J. Syst. Bacteriol.*, 46: 270-279.

14.Hitchcock, J.D., Moffet, J.O., Lackett, J.J. and Elliot, J.R (1970). Tylosin for the control of AFB disease in honey bees. *J . Econ. Entomol.*, 63: 204-207.

15.Imani Fooladi. A. A., Chavoshi Forooshai. M., Saffarian. P And Mehrab. R (2014). Antimicrobial effects of four Lctobacilli strains isolated from yoghurt against *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Food Safety. 34, 150–160.

16.Jagoda suskovic, Blazenka Kos, Jasna Beganovic, Andreja Lebos Pavunc, Ksenija Habjanic and Srecko Matosic (2010). Antimicrobial Activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48 (3) 296–307.

17. Jay D. Evans and Dawn L. Lopez (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97(3): 752-756.

18.Karska-Wysocki. B; Bazo. M and Smoragiewicz. W (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research.* 165, 674—686.

19.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.

20. Martha. Gilliam (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Micorbiology Letters 155, 1-10.

21.Matheson, A. and Reid, M(1992). Strategies for the prevention and control of AFB. Parts I, II and III. *Amer. Bee. J.,* 132(6): 399-402; 133(7): 471-475; 134(8): 534-547.

22. Millette M, Luquet FM, LacroixM (2006). Invitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. *Letters in Applied Microbiology*;44:314–319.

23. Mohankumar. A. Murugalatha. N (2011). Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing lactobacillus isolated from raw cattle milk sample. *International Journal of Biology* 3: 3. 128-143.

24.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.

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

26.Morse, R.A. and Shimanuki. H(1990). Summary of control methods. In Honey Bee Pests, Predatorsand Diseases, 2nd edn, Morse, R.A and Nowogrodzki, R. (eds). Cornell University Press, USA, pp.341 -361.

27.Mrazek. J., Strosova. L., Fliegerova. K., Kott. T. and Kopecny. J(2008). Diversity of Insect intestinal microflora. *Folia Microbiol.* 53 (3), 229-233.

28.Mutinelli, F(2003). European legislation governing the authorisation of veterinary medical products with particular reference to the use of drugs for the control of honeybee diseases. *Apiacta* 38, 156-168.

29.Nikolova. D, Petrova. M., Evstatieva. Y, Danova. S And , Atev. A(2009). Antimicrobial Activity Of *Lactobacillus helveticus* Strain 50p1.*Trakia Journal Of Sciences.* 7, 2. 40-44.

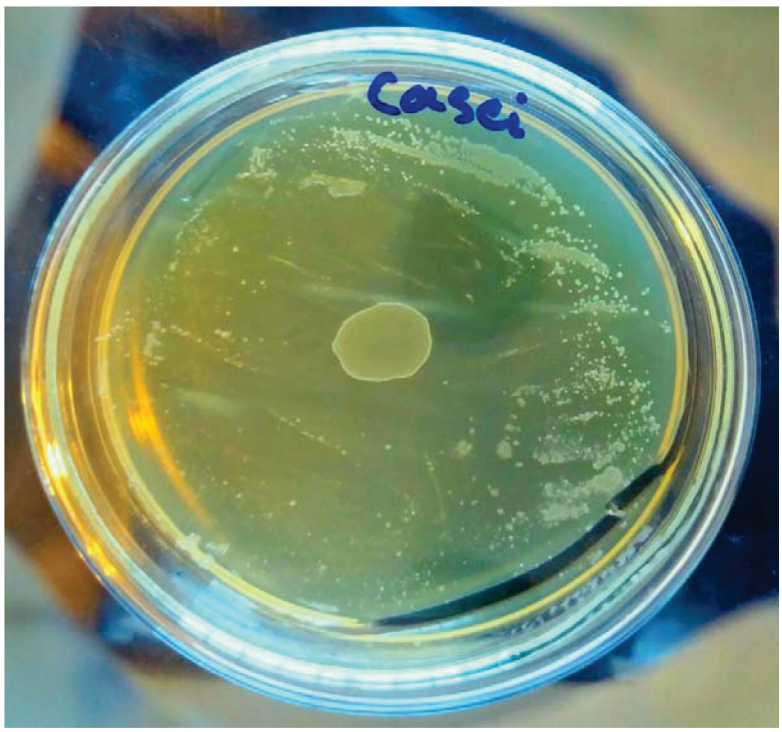
30.OIE (2014). World Organisation for Animal Health -Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Volume 1, Chapter 2.2.2. — American foulbrood of honey bees.

31.Olofsson, T.C., Vásquez, A., Sammataro, D., Macharia, J (2011). A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies; *Apis mellifera* (Buckfast), *A.m. scutellata, A. m. mellifera*, and *A. m. monticola*. *Apidologie* 42, 696-699.

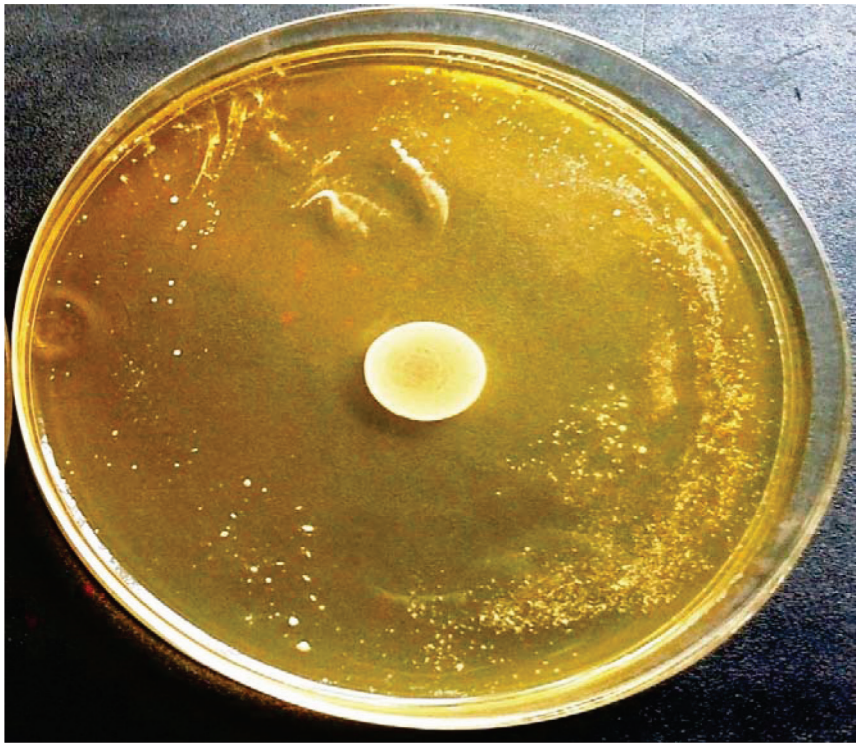
32.Ongol Martin Patrick (2012). Lactic acid bacteria in health and disease. *Rwanda Journal of Health Sciences,* Vol.1, Issue 1, 39-50

33.Peng, C.Y-S., Mussen, E., Fong, A., Cheng, P. Wong, G. and Montague, M.A (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 dis-

ease. *J. lnvertebr. pathol*., 67: 65-71.
34.Reybroeck. Wim (2003) Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the belgian market. *Apiacta* 38, 23-30.
35.Rodgers S(2008). Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science & Technology*;19:188–197.
36.Southwick.E.E., Southwick, L.J (1992). Estimating the value of honeybees (Hymenoptera:Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *Econ. Entomol.* 85, 621-633.
37.Vuyst. L. De and Leroy. F (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13 194–199.
38.Watkins. B.A., Miller. B.F., And Neil. D. H (1982). *In vivo* Inhibitory Effects of *Lactobacillus acidophilus* Against Pathogenic *Escherichia coli* in Gnotobiotic Chicks. *Poultry Science* 61:1298-1308.
39.Who. (2009) Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Who Technical Report Series; No. 954.
40. Kazimierczak - Baryczko Magdalena, Szymas Bozena (2006). Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.) through implementation of probiotic preparations. *Journal Of Apicultural Science.* 50 : 1, 15-23.
41.Mikio Yoshiyama, Meihua Wu, Yuya Sugimura, Noriko Takaya and Hiromi Kimoto-Nira (2013). Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. Journal of *Invertebrate Pathology*. 112: 1, 62–67.
42.Killer. J., Dubna. S, I. Sedlacek and vec. P. S (2014). *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 152–157.

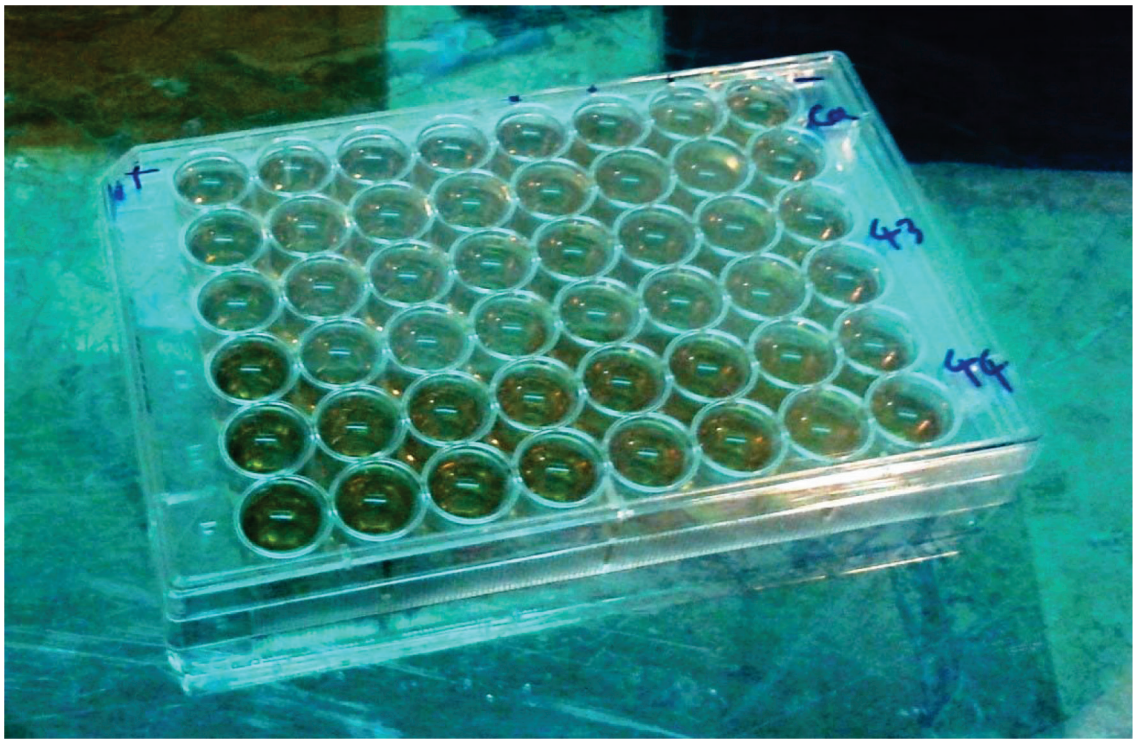


تصویر ۱- ایجاد هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا بوسیله باکتری لاکتوباسیلوس کازئی درروش Agar Spot Test



تصویر ۲- هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا بوسیله باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روش
Agar Spot Test

تصویر ۳- ایجاد هاله ممانعت از رشد باکتری پنی باسیلوس لاروا بوسیله رقتهای ۱۰۰، ۵۰ و ۳۰ میکرولیتر مایع روئی
عاری از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روش انتشار در چاهک



تصویر ۴- میکروپلیت ۴۸ خانه ای مملو از محیط کشت مخلوط محیط‌های MRS و MYPGP براث حاوی باکتریهای پنی باسیلوس لاروا و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی.ستون اول کنترل مثبت(باکتری پنی باسیلوس بدون لاکتوباسیلوس) ستون آخر کنترل منفی(لاکتوباسیلوس بدون پنی باسیلوس لاروا)، ستونهای ۲ الی ۷ حاوی باکتری پنی باسیلوس لاروا در رقت 10^4 CFU/ml و رقت‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها (۱۰۷ CFU/ml الی ۱۰۲)، دو ردیف پائین عاری از باکتری