نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

فراوانی عوامل بیماری‌زای فرصت طلب قارچی (*آسکوسفرا آپیس، آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) در کندوهای زنبور عسل استان مازندران

• **نصرالله واحدی نوری (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران
• **مجتبی محرمی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
تاریخ دریافت: آبان ۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۴
Email: nsvahedi@yahoo.com

چکیده

عوامل بیماری‌زای فرصت طلب قارچی (*آسکوسفرا آپیس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس*) در زنبوران عسل، سبب زیان‌های اقتصادی و بهداشتی قابل توجهی می‌گردند. این مقاله به بررسی فراوانی این عوامل در کندوهای زنبور عسل استان مازندران می‌پردازد. برای این منظور، در سال ۱۳۸۰، درسطح استان، پنج منطقه (شهرستان‌های: نوشهر، نور، آمل، ساری و بهشهر) انتخاب گردید. نمونه‌گیری در سه فصل بهار، تابستان و پائیز انجام شد. در هر فصل از هر منطقه، ۱۰ زنبورستان و ازهر زنبورستان، ۴ کندو و از هر کندو نمونه‌های (زنبور، لارو، گرده و عسل) به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند. درمجموع این تحقیق از ۴۶۸ کندو در طی سه فصل نمونه‌گیری به عمل آمده است. در آزمایشگاه، کشت میکروبی برروی نمونه‌ها انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که ۳۶/۵٪ از کل نمونه‌های مورد آزمایش آلوده به قارچ‌های بیماری‌زا (*آسکوسفرا آپیس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس*) بوده‌اند، برحسب نوع نمونه (زنبور، لارو، گرده و عسل) میزان آلودگی به ترتیب ۳۷/۴۰٪ ، ۳۳/۳۰٪، ۳۷/۱۰٪ و ۳۶/۷۰٪ می‌باشد که به لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین بر حسب نوع قارچ‌های بیماری‌زا، میزان آلودگی نمونه‌ها به قارچ *آسکوسفرا آپیس*، ۰/۴۳٪ ، قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ، ۳۶/۰۷٪ تعیین گردیده است، که تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. بنابر این در این تحقیق، در کندوهای زنبور عسل استان مازندران ، آلودگی به قارچ *آسکوسفرا آپیس* بسیار اندک بوده، درصورتی‌که آلودگی به قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس* فراوان می‌باشد.

کلمات کلیدی: فراوانی، *آسکوسفرا آپیس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس*، زنبورعسل

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 57-64

The frequency of opportunist fungal pathogens (*Ascosphaera apis, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus*) in a bee hives in Mazandaran Province

By: Vahedi Nouri, N., (Corresponding Author) member of scientific board, research center of agriculture and natural resourses, Mazandaran Province, Agricultural, Education and Extension Organisation, Tehran, Iran. and Moharrami, M., Member of scientific board, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural, Education and Extension Organisation, Tehran, Iran.

Received: October 2015 Accepted: February 2016

Email: nsvahedi@yahoo.com

Opportunist fungal pathogens (*Ascosphaera apis, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus*) cause considerable economic and health losses in honey bees. This article deals with the frequency of these agents in the bee hive in Mazandaran province. For this purpose, five regions (Noshahr, Nour, Amol,sari and Behshahr) were chosen in 1380. Samplings were conducted in the spring, summer and autumn.10 apiaries of each region and from each of which 4 hives were randomly selected In each season. In this study, a total of 468 hives were sampled during three seasons. In the laboratory, microbial cultures Operation were performed on samples. The results showed that 36.5% of samples were contaminated with pathogenic fungi (*Ascosphaera apis, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus*). According to the type of sample (bees, larvae, pollen and honey), contamination rate are 37.4 %, 33.3%, 37.1 % and 36.7 %, respectively which is not statistically significant. Also according to the type of pathogenic fungi, contamination rate with *Ascosphaera apis*, 0.43% and (*Aspergillus flavus* + *Aspergillus fumigatus*) , 36.07 % has been determined. The difference is statistically significant. Therefore, in this study, *Ascosphaera apis* infection is very low, whereas *Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus* infection is abundant.

Key words: frequency, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus,* bee

مقدمه

زنبوران عسل به عنوان یکی از سودمندترین حشرات برای انسان محسوب می‌گردند، زیرا علاوه بر تولید محصولات طبیعی با ارزش از قبیل عسل و موم، نقش بسیار مهمی در اکوسیستم و بقای بسیاری از گیاهان ایفا می‌نمایند. این موجودات به طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای زنده و تهدیدات محیطی حساس می‌باشند (۹). تا به امروز بسیاری از عوامل محیطی و ژنتیکی موثر بر سلامتی زنبوران عسل شناخته شده‌اند. همچنین جانداران ذره بینی عامل بیماری‌های زنبورعسل شناسائی و داروهای جدید برای مبارزه با آن‌ها تولید شده است (۱۲). کلنی‌های زنبورعسل به سرعت و با کاهش جمیعت زنبوران و یا جمیعت لاروهای خود، نسبت به تغییرات محیط زیست واکنش نشان داده، بطوری‌که امروزه سلامتی زنبوران عسل را می‌توان به عنوان یک شاخص در تعیین سلامت محیط زیست آن‌ها در نظر گرفت (۱۶). قارچها نیز به عنوان ساپروفیت‌های معمولی زنبور و شان‌های کندو هستند، ولی دسته‌ای از آنها به عنوان قارچهای بیماری‌زا محسوب می‌شوند. بیماری‌های قارچی در زنبور عسل جزء آن دسته از بیماری‌هایی محسوب می‌شوند که عمدتا " نوزادان را مورد حمله قرار داده و مبتلا می‌سازند. در این میان نقش قارچ *آسکوسفرا آپیس* به عنوان عامل بیماری لارو گچی و قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نیجر* به عنوان عوامل بیماری لارو سنگی قابل توجه می‌باشند. در بیماری نوزاد گچی، لاروهای آلوده در داخل سلول‌هائی که به تازگی درب آن‌ها بسته شده تلف می‌شود، سپس قارچ در سطح بدن لارو گسترش یافته و موجب می شود که لارو خشک شده به رنگ سیاه یا سفید در آمده به اصطلاح مومیائی می‌شود. در هنگام اوج بیماری نوزادان مومیائی شده در جلوی دریچه پرواز دیده می‌شوند، این لاروها توسط زنبوران از داخل حجرات بیرون کشیده شده و به خارج از کندو حمل می‌شوند. در بیماری نوزاد سنگی، نیز شاهد لاروهای مرده در حجره‌های باز و بسته می‌باشیم. شکل لارو در اوایل شیوع بیماری سفید و پف کرده، سپس سبز تا قهوه‌ای روشن و در نهایت سفت و سخت می‌شود. از دیگر نشانه‌های بیماری این است که لارو مرده به راحتی و بدون چسبندگی از حجره‌ها جدا می‌شود. بعلاوه در این بیماری، کلونی دچار ضعف، ناتوانی و بی قراری می‌شود (۴). اسپور قارچهای *آسکوسفرا آپیس*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نیجر* به طور عمده در خاک، گیاهان، کندوها، عسل ذخیره شده، شان‌ها، گرده، سیستم گوارشی و بدن زنبورعسل وجود دارند. با بوجود آمدن شرایط مناسب در اثر شرایط جغرافیائی منطقه و محل استقرار کندوها و برخی از عوامل در داخل کندو، این اسپورها فعال شده و سبب بیماری در زنبوران می‌گردند (۱۰). تحقیقات نشان می‌دهد

که در شرایط مختلف آب و هوائی، اسپور این قارچها تا ۱۵ سال فعال باقی مانده و در دمای ۶- درجه سانتی گراد تا ۵ روز زنده می‌مانند (۱۴). در شدت بروز بیماری‌های قارچی، عوامل فیزیکی و شیمیائی از قبیل عوامل استرس‌زای بیولوژیکی، تغییرات دمای محیط، رطوبت، آلودگی محیط، سموم آفت‌کش‌ها، حمله انگل‌ها و شکارچیان و همچنین سویه‌های قارچ و ژنتیک زنبوران نیز به عنوان عوامل مساعدکننده موثر می‌باشند. تحقیقات در این زمینه نشان می‌دهد که در کلنی‌های زنبور عسل با تنوع ژنتیکی بالا، میزان شیوع بیماری لارو گچی به مراتب کمتر از کلنی‌هایی بوده است که از تنوع ژنتیکی کمتری برخوردار بوده‌اند (۲۳). از سوی دیگر رفتار بهداشتی زنبوران عسل یک شکل مهم از ایمنی اجتماعی در کلنی‌ها محسوب می‌گردد (۱۹). این رفتار بهداشتی ناشی از یک صفت ژنتیکی است که توسط ۲ تا ۷ جایگاه ژنی کنترل می‌گردد (۲۰). مکانیزم رفتاری زنبوران کارگر در راستای تنظیم دمای کندو، در کاهش شیوع بیماری لارو گچی موثر می‌باشد. تصور بر این است که زنبوران کارگر با افزایش نسبی دمای کندو، سبب کاهش شیوع بیماری لارو گچی می‌گردند (۱۵). از طرف دیگر عوامل استرس‌زا زنده و غیر زنده از طریق تضعیف سیستم ایمنی زنبوران عسل، آن‌ها را مستعد به عفونت‌های قارچی می‌نمایند (۴). به همین دلیل در طی چند سال اخیر سعی بر آن بوده است که با اصلاح نژاد، زنبوران مقاوم به بیماری را بوجود آورند و در این زمینه نیز به موفقیت‌های هم دست یافته‌اند (۱۱). در مجموع این عوامل بیماری‌زای فرصت طلب، همه ساله بدلیل کاهش قابل توجه جمعیت زنبوران عسل در یک کلنی، سبب ضرر و زیان‌های اقتصادی قابل توجه‌ای به صنعت زنبورداری کشور می‌گردند. از سوی دیگر، در بیماری قارچی نوزاد سنگی، احتمال آلودگی فرآورده‌های کندو به توکسین حاصل از عامل این بیماری و به خطر افتادن بهداشت انسان در اثر تغذیه به این فرآورده‌ها وجود دارد. در استان مازندران با توجه به گستردگی پرورش زنبورعسل و همچنین وسعت زیاد و شرایط مناسب آب و هوائی، امکان شیوع گسترده این قارچها در زنبورستان‌ها و بیماری‌های ناشی از آنها دور از انتظار نیست (۱). بر همین اساس این تحقیق به بررسی و جداسازی عوامل بیماری‌زای فرصت طلب قارچی در کندوهای زنبور عسل استان مازندران می‌پردازد.

مواد و روش کار

به منظور انجام این تحقیق در سال ۱۳۸۰، در سطح استان مازندران پنج منطقه (شهرستان‌های نوشهر، نور، آمل، ساری و بهشهر) انتخاب گردیدند. نمونه‌گیری در سه فصل بهار، تابستان و پائیز انجام شد. در هر فصل از هر شهرستان ۱۰ زنبورستان و سپس از هر زنبورستان، ۴ کندو به صورت تصادفی انتخاب و نمونه‌های لازم اخذ شده‌اند. به دلیل مشکلات موجود در زنبورستان‌ها و شرایط نامناسب جوی در فصل پائیز، بر خلاف فصول بهار و تابستان، تنها تعداد ۶۸ عدد کندو مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین در مجموع در این تحقیق ۴۶۸ کندو در طی سه فصل در استان مازندران مورد بررسی قرار گرفته است. جدول ۱ توزیع فراوانی کندوهای مورد بررسی بر حسب فصول مختلف سال را نشان می‌د هد.

نمونه‌های اخذ شده از هر کندو شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱- زنبور پرستار و زنبور بالغ: ده عدد زنبور بالغ و ده عدد زنبور پرستار مجمو عا" بیست عدد را در داخل یک شیشه کوچک درب دار استریل قرار داده شده‌اند.

۲- لارو: ده عدد لارو ۴ الی ۵ روزه، ده عدد لارو بالغ و ده عدد شفیره از سلول‌های سربسته مجمو عا" سی عدد لارو و شفیره را با پنس ضدعفونی شده خارج و در داخل یک شیشه کوچک درب دار استریل قرار داده شده‌اند.

۳- گرده: یک قطعه کو چک ۱×۱ سا نتی‌متر از سلول‌های حاوی گرده در روی قاب را جدا کرده و در شیشه کوچک درب دار استریل قرار داده شده‌اند.

۴- عسل: مقدار ۵۰ گرم (حدودا") عسل را از قاب برداشته و در یک ظرف استریل دربدار شیشه‌ای قرار داده شده‌اند.

با توجه به اینکه نمونه‌های جمع‌آوری شده از هر کندو شامل: ۱- لارو و شفیره ۲ – زنبور پرستار و بالغ ۳ – عسل ۴ – گرده بوده است، لذا در مجموع این طرح ، ۱۸۷۲ نمونه مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. جدول ۲ توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های مورد بررسی بر حسب نوع نمونه و در صد هر یک را در کل سه فصل نشان می‌دهد.

سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و آزمایش قارچ‌شناسی به شرح ذیل

جدول ۱- توزیع فراوانی کندوهای مورد آزمایش بر حسب فصل

ردیف	فصل	کندو	
		تعداد	در صد
۱	بهار	۲۰۰	٪۴۳/۷
۲	تابستان	۲۰۰	٪۴۳/۷
۳	پا ئیز	۶۸	٪۱۲/۶
	جمع	۴۶۸	٪۱۰۰

صورت گرفته است:

۱- زنبور پرستارو زنبور بالغ: دستگاه گوارش ۴ عدد زنبور را خارج نموده و ۵ الی ۸ بار در آب مقطر استریل شستشو داده و سپس در ۲۵mL سرم فیزیولوژی ۰٫۸۵٪ هموژنیزه کرده و سپس برروی محیط کشت سابرودکستروز آگار (با سیکلوهگزامید و بدون سیکلوهگزا مید) کشت داده شده‌اند.

۲- لا رو و شفیره: ۸ عدد لارو و شفیره را در آب مقطر استریل (mL ۱۰) هموژنیزه کرده و سپس برروی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (با سیکلوهگزامید و بدون سیکلوهگزامید) کشت داده شده‌اند.

۳- گرده: ۱۰۰ میلی‌گرم گرده را با ۰٫۲ mL آب مقطر استریل مخلوط کرده و سپس برروی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (با سیکلو هگزامید و بدون سیکلوهگزا مید) کشت داده شده‌اند.

۴- عسل: عسل ابتدا" در درجه حرارت سی الی چهل درجه سانتی‌گراد قرار داده تا روان گشته و سپس از یک تنظیف عبور داده تا نا خالصی‌ها گرفته شود. ده گرم عسل را با ۱۰ mL آب مقطر استریل مخلوط نموده و بعد از یکنواخت کردن بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار (با سیکلو هگزامید و بدون سیکلوهگزا مید) کشت داده شده‌اند.

نهایتا" پلیت ها درانکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شده و نتایج رشد قارچ در پلیت‌های با سیکلوهگزامید ۱۴ و در پلیت‌های بدون سیکلوهگزامید ۷ روز بعد از کشت در زیرمیکروسکوپ نوری و با بزرگنمائی ۱۰۰ مورد بررسی قرارگرفته و ثبت گردیده‌اند (۳). لازم به توضیح است که آزمون‌های آماری این تحقیق با استفاده از نرم افزار spss انجام شده است .

نتایج

نمونه‌های چهارگانه (زنبور بالغ، لارو، گرده و عسل) پس از جمع‌آوری، از لحاظ آلودگی به قارچ‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرارگرفته‌اند. نتایج بدست آمده از کشت نمونه‌های مذکور، نشان می‌دهد که در مجموع ۳۶/۵٪ از کل نمونه‌های مورد آزمایش به لحاظ آلودگی به قارچ‌های بیماری‌زا مثبت

جدول ۲ - توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های مورد برر سی بر حسب نوع نمونه در کل سه فصل

ردیف	نوع نمونه	تعدادنمونه	درصداز کل نمونه
۱	زنبور	۴۶۸	٪۲۵
۲	لا رو	۴۶۸	٪۲۵
۳	گرده	۴۶۸	٪۲۵
۴	عسل	۴۶۸	٪۲۵
جمع		۱۸۷۲	٪۱۰۰

جدول ۳- تعداد و درصد آلودگی به قارچ‌های بیماری‌زا (*آسکوسفرا آپیس، آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس*) بر حسب نوع نمونه درکل سه فصل

وضیعت آلودگی	نمونه های آلوده		نمونه های غیرآلوده	
نمونه	تعداد	درصد	تعداد	درصد
زنبور	۱۷۵	۳۷/۴۰	۲۹۳	۶۲/۶۰
لارو	۱۵۶	۳۳/۳۰	۳۱۲	۶۶/۷۰
گرده	۱۷۴	۳۷/۱۰	۲۹۴	۶۲/۹۰
عسل	۱۸۱	۳۶/۷۰	۲۸۷	۶۱/۳۰
جمع کل	۶۸۶	۳۶/۵۰	۱۱۸۶	۶۳/۵۰

بوده‌اند. این میزان برحسب نوع نمونه زنبور، لارو، گرده و عسل به ترتیب ۳۷/۴۰٪ ، ۳۳/۳۰٪، ۳۷/۱۰٪ و ۳۶/۷۰٪ می‌باشد (جدول ۳).

شایان ذکر است، اختلاف قابل توجهی در ارتباط با فراوانی و یا درصد آلودگی در بین نمونه‌های مورد مطالعه (زنبور بالغ، لارو، گرده و عسل) به قارچ‌های بیماری‌زا (*آسکوسفرا آ پیس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) وجود ندارد. بر اساس جدول ۳ میزان آلودگی نمونه‌های زنبور، لارو، گرده و عسل به ترتیب برابر با ۳۷/۴، ۳۳/۳۰، ۳۷/۱۰ و ۳۶/۷۰ درصد بوده است. شایان ذکر است انجام آزمون کای اسکوئر، در ارتباط با تفاوت میزان آلودگی‌های قارچی نیز برابر با ۰/۳۳ بدست آمده که این تفاوت در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار نیست.

همچنین درصد آلودگی بر حسب نوع قارچ‌های بیماری‌زا (*آسکوسفرا آ پیس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) درکل سه فصل در این مطالعه نیز تعیین گردیده است (جدول ۴). بر این اساس میزان آلودگی نمونه‌ها به قارچ *آسکوسفرا آ پیس*، ۰/۴۳٪ و میزان آلودگی به قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، ۳۶/۰۷٪ تعیین گردیده است. انجام آزمون کای اسکوئر، در ارتباط با تفاوت میزان بر اساس نوع آلودگی‌های قارچی برابر با ۱۷/۸۱ بدست آمده است که این تفاوت در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار می‌باشد.

همچنین میزان آلودگی کندوها به قارچ‌های بیماری‌زا بر حسب نوع نمونه و در فصول مختلف (بهار- تابستان- پائیز) نیز درجدول ۵ نشان داده شده است. بر این اساس آلودگی به قارچ *آسکوسفرا آ پیس* تنها در فصل بهار و به میزان ۱٪ می‌باشد، در صورتی‌که آلودگی با قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در فصل‌های بهار، تابستان و پائیز به ترتیب به میزان ۳۸٪ ، ۳۱٪ و ۴۹/۳٪ تعیین گردیده است (جدول ۵). لازم به یادآوری است انجام آزمون کای اسکوئر در بین درصد و فراوانی قارچ‌های بیماری‌زا در فصول مختلف بهار، تابستان و پائیز، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۹۵ درصد نشان نداده است. لازم به ذکر است مقدار کای اسکوئر محاسبه شده برابر ۴/۱۰ می‌باشد که از مقادیر کای اسکوئر جدول کمتر بوده است.

بحث

در این تحقیق ما به بررسی فراوانی عوامل بیماری‌زای قارچی (*آسکوسفرا آ پیس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) درکندوهای زنبورعسل استان مازندران پرداخته‌ایم. نتایج بدست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد که بخشی، به لحاظ آلودگی قارچی (*آسکوسفرا آ پیس*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) مثبت بوده‌اند که این میزان آلودگی بر اساس نوع نمونه مورد آزمایش (زنبور بالغ ، لارو، گرده و عسل) ، به ترتیب ۳۷/۴۰٪ ، ۳۳/۳۰٪ ، ۳۷/۱۰٪ و ۳۶/۷۰٪ تعیین گردیده است (جدول ۳). با توجه به اینکه در این تحقیق، دو عامل بیماری‌زا و مهم فرصت طلب قارچی از کندوهای زنبور عسل استان مازندران جداسازی و شناسائی گردیده‌اند، لذا بحث پیرامون نتایج بدست آمده را در دو قسمت الف: عامل بیماری لارو گچی (*آسکوسفرا آ پیس*) و ب: عوامل بیماری لارو سنگی (*آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) ادامه می‌دهیم.

عامل بیماری لارو گچی (*آسکوسفرا آ پیس*)

آسکوسفرا آ پیس به عنوان مهم‌ترین پاتوژن قارچی با حدت بالا در زنبورعسل مطرح می‌باشد. اسپور قارچ بطورعمده در خاک، گیاهان، کندو، عسل ذخیره شده، شان، گرده و دستگاه گوارش زنبوران وجود دارد و تحت شرایط مناسب سبب بروز بیماری در لاروها می‌گردند (۱۵). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در مجموع ۰/۴۳٪ از کل نمونه‌های مورد آزمایش، آلوده به قارچ *آسکوسفرا آ پیس* می‌باشند، که با علائم بالینی نیز همراه بوده است (جدول ۴). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج سایرمحققان نشان می‌دهد که فراوانی این قارچ درکندوهای زنبور عسل استان مازندران پائین می‌باشد. در حالی‌که پورغفور (۱۳۸۵) در مطالعات خود در استان گلستان میزان آلودگی کندوها به قارچ *آسکوسفرا آ پیس* را ۲٪ تعیین نموده است (۲) ، بررسی‌های آزمایشگاهی Encarna و همکاران (۲۰۱۳) در اسپانیا، میزان آلودگی کندوها به قارچ آسکوسفرا آپیس را ۵٪، Emek و همکاران (۲۰۱۳) در استانبول ترکیه این میزان را ۱۰/۲٪ و Yoshiyama و همکاران (۲۰۱۱) در ژاپن آن را ۲۴/۱٪ گزارش نموده‌اند (۷،۸،۲۴). همچنین Ozkırım و

جدول ۴- درصد آلودگی بر حسب نوع قارچ‌های بیماری‌زا (*آسکوسفرا آ پیس*،*آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس*) درکل سه فصل

وضعیت آلودگی قارچی	درصد
آسکوسفرا آپیس	۰/۴۳
آسپرژیلوس فلاووس ، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*	۳۶/۰۷
غیر آلوده	۶۳/۵۰
جمع کل	۱۰۰

همـــکاران (۲۰۰۲) و Cakmak و همـــکاران (۲۰۰۳) در مطالعات خود در آنکارا آلودگی کندوها به قارچ *آسکوســـفر آ پیس* را به ترتیب ۳/۸۴٪ و ۲۶٪ اعـــلام نموده‌اند (۶،۲۱). بنابراین نتایج این تحقیق حاکی از آن اســـت که فراوانی عامل بیماری لارو گچی در اســـتان مازندران همانند استان گلستان بســـیار پائین می‌باشد. شـــاید عواملی از قبیل: ویژگی‌های قارچ *آسکوسفر آ پیس* که یک انگل اجباری در زنبوران عسل می‌باشد و برای رشد به شرایط خاصی نیاز دارد، و از طرف دیگر زنبوران عســـل عموما" نوزادان مرده را به خارج از کندو حمل می‌نمایند و همچنین بارندگی نســـبتا" کم منطقه در زمان مورد مطالعه، دلایل پائین بودن آلودگی در کندوهای مربوطه باشـــد. البته این موضوع نیاز به بررســـی بیشتری دارد. همچنین نتایج تحقیقات ما بیانگر این موضوع است که آلودگی به این قارچ فقط در فصل بهار مشاهده شده است (جدول ۵). تحقیقات نشان می‌دهد، جهت بروز بیماری در کندو، یک دوره سرمای کوتاه مدت (۲۴ ساعت) تحت عنوان استرس سرمائی نیاز می‌باشـــد (۲۲). به همین دلیل بیماری معمولا" در فصول زمســـتان و بهار و زمانی که هوا ســـرد و مرطوب بوده و تهویه کندو نامناســـب باشد، شایع است(۱۴). بنابراین جداسازی عامل بیماری همراه با بروز نشانی‌های بالینی آن در فصل بهار، می‌تواند بدلیل شرایط ذکر شده باشد.

عوامل بیماری لارو سنگی (*آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس*)

لاروســـنگی نیـــز به عنوان یک بیمـــاری کم حدت در زنبوران عســـل می‌باشـــد. به همین دلیل کمتر مورد توجه زنبورداران قرار گرفته است (۵). در این میان تعدادی از گونه‌های جنس آسپرژیلوس که انگل اجباری بوده، به عنوان عامل لارو سنگی در زنبوران عسل مطرح می‌باشند.

جدول ۵ - توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ‌های بیماری‌زای جدا شده بر حسب نمونه و در فصول مختلف (بهار- تابستان- پائیز)

وضعیت و نوع آلودگی / فصل و نمونه مورد آزمایش		نمونه های آلوده					نمونه های غیرآلوده	
		آسکوسفرا آ پیس		*آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس فومیگاتوس*		جمع	تعداد	درصد
		تعداد	درصد	تعداد	درصد			
بهار	زنبور	۲	٪۱	۷۸	٪۳۹	۸۰	۱۲۲	٪۶۱
	لارو	۲	٪۱	۷۰	٪۳۵	۷۲	۱۳۱	٪۶۵/۵
	گرده	۲	٪۱	۷۹	٪۳۹/۵	۸۱	۱۲۰	٪۶۰
	عسل	۲	٪۱	۷۷	٪۳۸/۵	۷۹	۱۲۳	٪۶۱/۵
	جمع	۸	٪۱	۳۰۴	٪۳۸	۳۱۲	۴۸۸	٪۶۱
تا بستان	زنبور	۰	۰	۶۵	٪۳۲/۵	۶۵	۱۳۵	٪۶۷/۵
	لارو	۰	۰	۵۳	٪۲۶/۵	۵۳	۱۴۷	٪۷۳/۵
	گرده	۰	۰	۵۹	٪۲۹/۵	۵۹	۱۴۱	٪۷۰/۵
	عسل	۰	۰	۷۱	٪۳۵/۵	۷۱	۱۲۹	٪۶۴/۵
	جمع	۰	۰	۲۴۸	٪۳۱	۲۴۸	۵۵۲	٪۶۹
پا ئیز	زنبور	۰	۰	۳۲	٪۴۷	۳۲	۳۶	٪۵۳
	لارو	۰	۰	۳۴	٪۵۰	۳۴	۳۴	٪۵۰
	گرده	۰	۰	۳۵	٪۵۱/۴	۳۵	۳۳	٪۴۸/۶
	عسل	۰	۰	۳۳	٪۴۸/۵	۳۳	۳۵	٪۴۱/۵
	جمع	۰	۰	۱۳۴	٪۴۹/۳	۱۳۴	۱۳۸	٪۵۰/۷

نتایج آزمایشگاهی بدست آمده ه در این تحقیق حاکی از آن است که میزان آلودگی به اسپور قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در نمونه‌های مورد مطالعه ۳۶/۰۷٪ می‌باشد، که فاقد هر گونه علائم بالینی نیز بوده‌اند (جدول ۴). بر خلاف عامل لارو گچی، میزان آلودگی کندوهای استان به اسپور قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بسیار بالا می‌باشد. مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان نیز این موضوع را تائید می‌نماید. پورغفور (۱۳۸۵) در مطالعات خود در استان گلستان میزان آلودگی کندوهای استان را به قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* ۱۰/۵٪ تعیین نموده است که بدون نشانی‌های بالینی نیز بوده‌اند (۲). همچنین تحقیقات Emek و همکاران (۲۰۱۳) در استانبول این میزان را ۵/۵٪ و Kirpik و همکاران (۲۰۱۰) نیز حتی آن را ۱/۵٪ تعیین نموده‌اند (۷،۱۷). اصولا" گونه‌های مختلف آسپرژیلوس از ساکنان عادی کندو و انگل‌های اختیاری زنبوران عسل هستند که بطور عمومی در خاک و دیگر مواد زنده و غیرزنده وجود دارند. کونیدیای این قارچها دارای ظرفیت تولید مثلی بسیار بالا بوده و تحمل دامنه دمائی آنها از ۱۲ درجه سانتی‌گراد تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد متغییر می‌باشد(۵). در مجموع این امر سبب می‌گردد که گونه‌های این قارچ هم در زنبوران بالغ به ظاهر سالم و هم در لاروهای به ظاهر سالم حضور داشته و سبب تضعیف سیستم ایمنی زنبوران گردند (۱۳،۱۸). فقط در شرایطی که سویه‌های بسیار حاد این دسته از قارچها به کندوهای ضعیف حمله کنند و همچنین دز اسپور و دمای کندو بالا و تهویه ناقص باشد و یا اینکه زنبور به مدت طولانی حبس شود، بیماری بروز می‌کند. به همین دلیل در بررسی‌های انجام گرفته از لحاظ آزمایشگاهی موارد بالائی از آلودگی جدا شده ولی هیچگونه موارد بالینی این بیماری مشاهده نشده است.

همچنین آلودگی کندوها به قارچهای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در فصول مختلف (بهار، تابستان، پائیز) به ترتیب به میزان ۳۸٪ ، ۳۱٪ و ۴۹/۳٪ تعیین گردیده است (جدول ۵). اگرچه این میزان آلودگی به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد، اما میزان آلودگی قارچی در فصل پائیز در مقایسه با سایر فصول اندکی بیشتر. می‌باشد که این امر می‌تواند به دلایل ذیل باشد.

۱- بارندگی زیاد در این فصل و در نتیجه رطوبت بالا

۲- تجمع زنبورها در کندو به علت شرایط نامناسب جوی

۳- مصرف غذا به صورت شربت و به دنبال آن انتقال آلودگی از طریق شربت (اضافه نمودن آنتی بیوتیک در شربت برای رشد قارچها مطلوب خواهد بود).

منابع مورد استفاده

۱- امامی تبریزی، مهین .(۱۳۷۳). تشخیص و جدا سازی عامل قارچهای بیماری‌زای لارو زنبور عسل در ایران. فصلنامه پژوهش و سازندگی شماره ۲۵ : صفحات ۱۰۷- ۱۰۵.

۲- پورغفور لنگرودی، پرستو. (۱۳۸۵). انتشار جغرافیائی بیماری‌های قارچی (با عامل *Ascosphaera apis* و *Aspergillus flavus* و *Aspergillus fumigatues*) در کندوهای زنبور عسل استان گلستان. پژوهش و سازندگی، شماره ۷۱ : ص ۹۳-۹۴.

3-Anderson, D.L., Gibson, N.L., 1998. New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Aust. Syst. Bot*. 11, 53–72.

4-Bailey, L., 1981. Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK. pp. 40–44.

5-Bhabhra, R., Askew, D.S., 2005. Thermo tolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus. *Med. Mycol*. 43 (Suppl. 1) S87–S93.

6-Cakmak İ, Aydın L, Güleğen AE. Honey bee pests and diseases in southern Marmara region of Turkey. *Uludağ Arıcılık Derg* 2003; 1: 33–35 (article in Turkish with an English abstract).

7-Emek D. Hayrettin A. Gülay M Z. Funda H S. (2013). Microbiological and parasitological quality of honey produced in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 37: 602-607

8-Encarna G B, Mariano H, Amparo M S, Karina A, Cristina B.(2013) . The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis, Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microbial Biotechnology*. Volume 6, Issue 6 .pages 731–739, November 2013

9-Evans, J.D., Schwarz, R.S., 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614–620.

10-Flores, J.M., Ruiz, J.A., Ruz, J.M., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F., 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie* 27, 185–192.

11-Gilliam, M., Taber, S., Richardson, G.V., 1983. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 14, 29–39.

12-GILLIAM, M; VANDENBERG, J (1997) Fungi. In Morse, R A; Flottum, K (Eds). Honey bee pests, predators, & diseases (3rd Edition). A I Root Co.; Medina, USA. pp. 81-110.

13-Glinski z. Kostro, K (2001). Key stones in insect immunity. *Central European journal of immunology* 26: 43-50.

14-Hale, P.J., Menapace, D.M., 1980. Effect of time and temperature on the viability of *Ascosphaera apis*. *J. Invert. Pathol.* 36, 429–430

15-Heath, L.A.F., 1982a. Development of chalk brood in a honey bee colony; chalk brood pathogens: a review. *Bee World* 63 (3) , 119–135.

16-Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*. 2013 8:e54092.

17-Kırpık MA, Aydoğan MN, Örtücü S, Hasenekoğlu İ. Determin-

ing microfungus flora of body surface and intestinal system of Caucasian race bees (*Apis mellifera* caucasica Pollmann, 1889) (Hymenoptera: Apidae). *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 347–352 (article in Turkish with an English abstract).

18-Kirsten F, Geraldine F, Annette B., William O.H. (2014). The distribution of Aspergillus spp. opportunistic parasites in hives and their pathogenicity to honey bees. *Veterinary Microbiology* 169 203–210.

19-Milne C.P. (1985a) Laboratory test of honey bee hygienic behavior and resistance to European Foulbrood, *Am. Bee J.* 125, 578–580.

20-Moritz R.F.A. (1988) A re-evaluation of the two locus model for hygienic behavior in honeybees (*Apis mellifera* L.) , J. Hered. 79, 257–262.

21-Ozkırım A, Keskin N.(2002). Distribution of the major bacterial brood diseases diagnosed in apiaries in Ankara and its surroundings. *Mellifera* 2: 40–44.

22-Vojvodic S .Jensen A B . James R R . Boomsama J J . Eilenberg J . (2010). Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Veterinary Microbiology* 149 (2011) 200–205

23-Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H., StarksP.T. (2009) Genetic, individual, and group facilitationof disease resistance in insect societies, *Annu.Rev. Entomol*. 54, 405–423.

24-Yoshiyama, M., and Kimura, K. (2011) Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. J Invertebr Pathol 106: 263–267.