

# بررسی اثرات ضد قارچی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم روی قارچ آسکوسفرا آپیس عامل بیماری نوزاد گچی زنبور عسل

مصطفی مرادی<sup>۱</sup>، عبدالغفار اونق<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، ارومیه، ایران  
<sup>۲</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ آذر ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۸ اسفند ماه ۱۳۹۷)

## چکیده

زمینه مطالعه: بیماری نوزاد گچی زنبور عسل یکی از بیماری‌های دوران نوزادی آن است که در مناطق شمالی ایران شیوع نسبی داشته و در برخی مواقع می‌تواند مشکلاتی برای کلنی‌های زنبور عسل ایجاد نماید. جهت کنترل و مبارزه با این بیماری از مواد شیمیایی استفاده می‌شود که می‌توانند وارد محصولات کلنی‌ها شده و مشکلاتی برای مصرف‌کنندگان آن‌ها در پی داشته باشند، لذا بررسی اثرات مواد طبیعی و بی‌ضرر برای زنبورها و مصرف‌کنندگان فرآورده‌های آن از اولویت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف: در این بررسی اثرات ضد قارچی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم روی قارچ آسکوسفرا آپیس جداسازی شده از کلنی‌های زنبور عسل مبتلا به بیماری نوزاد گچی مورد ارزیابی قرار گرفت. روش کار: باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط MRS و قارچ آسکوسفرا آپیس در محیط SDA کشت داده شدند و با استفاده از روش‌های Overlay assay، Confrontation Assay، Agar Spot، Simultaneous Inoculation اثرات ضد قارچی آن‌ها روی قارچ آسکوسفرا آپیس بررسی شد.

نتایج: مشخص گردید که باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجب مهار رشد قارچ آسکوسفرا آپیس می‌گردند ولی باکتری بیفیدوباکتریوم تأثیری در مهار رشد قارچ مذکور نداشت، همچنین مایع روئی عاری از باکتری این باکتری‌ها موجب مهار رشد قارچ آسکوسفرا آپیس نشدند.

نتیجه گیری نهائی: نتایج این بررسی نشان می‌دهد که برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به مهار رشد قارچ آسکوسفرا آپیس در محیط کشت بوده و در صورت مهار رشد این قارچ در داخل بدن نوزادان زنبور عسل، می‌توانند به عنوان یکی از روش‌های کمکی در کنترل بیماری نوزاد گچی در کلنی‌های زنبور عسل بکار برده شده و تا حدودی از مصرف مواد شیمیایی و اثرات سوء آن‌ها بر سلامتی زنبور عسل و مصرف‌کنندگان فرآورده‌های آن بکاهند.

واژه‌های کلیدی: زنبور عسل، باکتری‌های اسیدلاکتیک، بیماری نوزاد گچی، قارچ آسکوسفرا آپیس، فعالیت ضد قارچی

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

\* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۷۰۵۰۸، نمابر: ۰۴۴-۳۲۷۷۱۹۲۶، Email: ownagh@yahoo.com

## How to Cite This Article

Moradi, M., Ownagh, A. (2019). Antifungal Effects of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the *Ascosphaera apis* Causative Agent of Honey bee Chalkbrood Disease. *J Vet Res*, 74(2), 273-282. doi: 10.22059/jvr.2019.217394.2533



## مقدمه

میوه‌ای قارچ در خارج از بدن لارو تلف شده تشکیل می‌شوند. معمولاً در طبیعت انتشار بیماری نوزاد گچی در داخل یک کلنی محدود است، که احتمالاً به دلیل کم بودن تعداد لاروهای نئوست که با میسلیم‌های هر دو سویه ی قارچ آلوده می‌گردند که در این صورت اسپورهای عفونت‌زا تشکیل نمی‌شوند (۱۵، ۲). بهترین شرایط برای رشد این قارچ در داخل کلنی‌های زنبور عسل رطوبت بالا و عدم تهویه مناسب کندوهاست (۱۴) که این شرایط در مناطق شمالی ایران و زنبورستانهایی که شرایط بهداشتی و پرورشی کلنی‌ها را رعایت نمی‌کنند فراهم بوده و میزان شیوع بیماری نوزاد گچی در زنبورستانهای استان‌های شمالی کشور بسیار بالاتر از سایر مناطق است. بطوریکه در مناطق خشک و نیمه مرطوب ایران شکل بالینی بیماری نوزاد گچی کمتر مشاهده می‌شود.

برای کنترل و درمان این بیماری از روش‌ها و مواد مختلفی استفاده شده است ولی با توجه به شیوع پائین بیماری، استفاده از داروهای ضدقارچی در کلنی‌های زنبور عسل چندان مقرون به صرفه نبوده و محققین در جستجوی روش‌های سالمتری می‌باشند. روش‌های مدیریتی یکی از روش‌های سالم و مقرون به صرفه در مبارزه و کنترل بیماری‌های زنبور عسل است که مورد توجه زنبورداران و محققین بهداشت زنبور عسل قرار گرفته است از جمله این روش‌ها می‌توان به تقویت کلنی‌های ضعیف از طریق دادن نوزاد از کلنی‌های قویتر، ادغام کلنی‌های ضعیف با کلنی‌های قوی، محافظت از کلنی‌ها در برابر شرایط نامساعد جوی، کاهش رطوبت داخل کلنی و تهویه مناسب آن‌ها، نابود کردن قاب‌های آلوده و حتی کلنی‌های شدیداً آلوده و از بین بردن قاب‌های کهنه نام برد (۳۹، ۳۳). علی‌رغم اثرات نامناسب مواد شیمیایی روی بهداشت کلنی‌های زنبور عسل و آلودگی فرآورده‌های آن‌ها با این مواد و بروز خطراتی در مصرف کنندگان آن‌ها (۹)، مواد شیمیایی زیادی جهت کنترل بیماری نوزاد گچی زنبور عسل مورد استفاده قرار گرفته است که می‌توان به تعدادی از آن‌ها از جمله اسید سوربیک، سدیم پروپیونات، متیل پاراهیدروکسی بنزوات، تیابندازول، بنومیل، گریزوفولون، نپاجین، سیکلوهاگزامید، آمفوتریسین ب، نیستاتین، مایکوستاتین، مایکوسیدین و سیترال اشاره نمود که در شرایط محیط کشت یا داخل آزمایشگاه و داخل کلنی‌های زنبور عسل مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴). مشکل اصلی این مواد این است که هیچکدام از آن‌ها بر اسپورهای قارچ مؤثر نمی‌باشند، از سوی دیگر این مواد امکان دارد روی بقا و طول عمر نوزادان و زنبوران تأثیر منفی داشته باشند (۱۲) و همچنین منجر به بروز سویه مقاومی از قارچ مذکور در برابر داروهای مختلف گردند. در کنار بررسی‌هایی که روی مواد شیمیایی صورت گرفته است توجه زیادی هم به مواد طبیعی و کم خطر برای زنبور عسل و مصرف کنندگان فرآورده‌های آن شده است و محققین موادی از جمله تیمول، اسیدهای آلی از جمله سالیسیلیک اسید، اسید استیک و بره موم زنبور عسل را مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۳۰، ۲۱، ۱).

زنبوران عسل حشرات اجتماعی‌اند و ارتباط متقابل آن‌ها با بشر تاریخچه طولانی دارد. انسان فرآورده‌های زنبور عسل از جمله عسل، گرده، موم، ژله رویال و زهر را علاوه بر مصارف غذایی، در صنایع داروسازی و آرایشی و صنایع دستی مورد استفاده قرار می‌دهد. زنبوران عسل فایده بسیار مهم دیگری برای بشر دارند که گرده افشانی گیاهان و درختان است. 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. زنبوران عسل به عنوان مهم‌ترین گرده افشانها نقش بسیار زیادی در رشد و توسعه کشاورزی مدرن کل جهان دارند، بطوریکه بر اساس تخمین‌ها، ۵۲ نوع از ۱۱۵ نوع غذای انسان وابسته به نقش زنبور عسل است و بدون وجود زنبور عسل، کاهش ۱۰ الی ۹۰ درصد در آن‌ها اتفاق می‌افتد (۲۲). ارزش گرده افشانی زنبور عسل در کشاورزی آمریکا بیش از ۱۴ میلیارد دلار در سال است (۲۹) و ارزش اقتصادی گرده افشانی زنبور عسل در کل جهان در سال ۲۰۰۵ بیش از ۱۵۳ میلیارد یورو برآورد شده است (۱۰). ارزش زنبور عسل در گرده افشانی گیاهان طبیعی براحتی تخمین زده نمی‌شود (۲۸).

بیماری نوزاد گچی یک مایکوزیس مهاجم زنبوران عسل *Apis mellifera* L است که بوسیله قارچ *آسکوسفر* \ *آپیس* *Ascospaera apis* ایجاد می‌گردد و منحصراً نوزادان زنبور را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیماری گرچه برای لاروها کشنده است ولی منجر به نابودی یک کلنی کامل نمی‌گردد. اما می‌تواند باعث کاهش چشمگیر تعداد زنبورها و تولید کلنی با کاهش تولید عسل به میزان ۵ الی ۳۷ درصد گردد (۱۵). بیماری نوزاد گچی در حال حاضر در کلنی‌های زنبور عسل سراسر دنیا یافت می‌شود و نشانه‌های وجود دارد که در سالیان اخیر میزان شیوع آن افزایش یافته است (۱۶). بیماری نوزاد گچی در زنبوران عسل در ابتدای سال ۱۹۰۰ تشخیص داده شد و تا آخر نیمه دوم قرن بیستم بطور وسیعی در خارج از اروپا مشاهده نگردیده بود (۲).

عامل بیماری نوزاد گچی قارچ *آسکوسفر* \ *آپیس* *Ascospaera apis* است که یک قارچ هتروتالیک می‌باشد، بدین معنی که اسپورها تولید دو نوع میسلیم متفاوت می‌کنند که به همدیگر وصل می‌شوند. اسپورها در داخل توده‌های کروی شکل در داخل کیست‌های اسپوری (اجسام میوه‌ای) قهوه‌ای تیره سبز رنگ که حدوداً ۶۰ نانومتر قطر دارند، تشکیل می‌شوند. اسپورها بسیار مقاوم بوده و حداقل ۱۵ سال عفونت‌زا باقی می‌مانند. لاروهای زنبور اسپورهای قارچ *آسکوسفر* \ *آپیس* را همراه با غذا می‌بلعند. اسپورها جوانه زده و میسلیم‌ها در داخل محوطه ی روده، بویژه در انتهای روده (کور)، شروع به رشد می‌کنند. سپس میسلیم‌ها به داخل دیواره‌ی روده لارو نفوذ کرده و نهایتاً انتهای روده را سوراخ می‌کنند. غالباً ناحیه سر بدون آسیب باقی می‌ماند. هنگام بروز این اتفاقات، اجسام



مقداری از آنرا در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت سابروگستروز آگار پخش نموده و به مدت حداقل ۵ شبانه روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و شرایط بی‌هوایی قرار داده تا کلنی‌های سفید رنگ قارچ ظاهر شوند سپس پلیت‌ها را در شرایط هوایی قرار داده تا اسپورهای قارچ تشکیل شوند. بعد از ظاهر شدن اسپورها سطح پلیت‌ها را با مقداری آب معمولی یا سرم فیزیولوژی استریل پوشانده و با استفاده از پپیت پاستور کچ یا آس حلقوی، سطح کلنی‌های قارچ را خراش داده تا اسپورها در آب یا سرم فیزیولوژی وارد شوند. بعد از جدا شدن اسپورهای قارچ از میسیلیوم‌های آن، مایع حاصله را با استفاده از سرنگ استریل جمع‌آوری نموده و در لوله‌های آزمایش استریل ریخته و تا زمان بررسی‌های بعدی در یخچال نگهداری شدند (۱).

**باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB):** در این بررسی از باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC NO ۱۶۴۳) و لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC NO ۱۶۰۸) و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (PTCC NO ۱۶۴۴) استفاده گردید. این باکتری‌ها را بصورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه نموده و طبق دستورالعمل، برای فعال نمودن آن‌ها از محیط کشت MRS استفاده گردید و پلیت‌ها و لوله‌های حاوی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را در شرایط بی‌هوایی و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط هوایی و دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت قرار داده شدند (۸). سپس از محتویات لوله‌ها کشت مجدد تهیه نموده و در شرایط لازم قرار داده تا از میزان رشد طبیعی باکتری‌ها اطمینان حاصل گردد.

#### بررسی اثرات ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ

آسکوسفرایس: برای اینکار از روش‌های زیر استفاده گردید:

##### ۱. روش Overlay assay

در این روش ابتدا باکتری‌های اسیدلاکتیک را بصورت دو خط موازی به فاصله ۱ cm از هم در سطح محیط کشت MRS آگار کشت داده و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و شرایط بی‌هوایی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا رشد کامل نمایند. سپس مقدار ۱ ml از محلول اسپورهای قارچ آسکوسفرایس که به روش فوق جمع‌آوری گردیده است را در ۱۰ ml محیط کشت سابروگستروز آگار نرم (دمای  $45^{\circ}\text{C}$ ) ریخته و بصورت یکنواخت در آورده و در سطح پلیت‌های واجد باکتری‌های اسیدلاکتیک ریخته و مدتی صبر گردید تا محیط منعقد گردد سپس به مدت ۵ شبانه روز در شرایط بی‌هوایی و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده و هر ۲۴ ساعت میزان رشد کلنی‌های قارچ آسکوسفرایس اندازه‌گیری شد. میزان رشد قارچ نسبت به سطح کل پلیت سنجیده شد. معیار سنجش به شکل زیر بوده است (۲۵).

= عدم مشاهده مهار رشد

+ = عدم رشد قارچ در ۰/۱ الی ۳ درصد سطح پلیت

++ = عدم رشد قارچ در ۳ الی ۸ درصد سطح پلیت

+++ = عدم رشد قارچ در بیش از ۸ درصد سطح پلیت

استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک یا پروبیوتیک‌ها در کنترل و درمان بیماری‌های انسان و دام یکی از روش‌های میانبر است که با توجه به سالم بودن برای مصرف کنندگان و حضور آن‌ها به عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و دام بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. بررسی‌های مختلف نشان داده است که این باکتری‌ها دارای اثرات ضدباکتریایی، ضد قارچی (۲۵) و ضد انگلی زیادی می‌باشند و در صورت رعایت اصول لازم، می‌توانند حتی به عنوان دارو هم مورد استفاده قرار گیرند. استفاده از این باکتری‌ها در صنعت زنبورداری سابقه زیادی ندارد و تنها چند بررسی ابتدائی نشان داده‌اند که باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده از زنبوران عسل دارای اثرات چشمگیری روی عوامل بیماری‌زای باکتریایی آن از جمله باکتری پنی باسیلوس لاروا عامل بیماری لوک آمیکائی می‌باشند و در صورت اضافه کردن به غذای نوزادان زنبور عسل می‌توانند مانع از رشد باکتری مذکور و بروز علائم بیماری گردند (۳۱، ۱۱، ۸، ۶).

در مورد اثر ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ آسکوسفرایس بررسی‌های معدودی انجام گرفته است. Sabaté و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ تعدادی از باکتری‌های همزیست در دستگاه گوارش زنبور عسل را مورد بررسی قرار داده‌اند که دارای اثرات ضد قارچی روی آسکوسفرایس می‌باشند. همچنین Mohamed O. M. Omar و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثرات آنتی‌گونیستی برخی از باکتری‌ها از جمله باسیلوس‌های جداسازی شده از روده زنبوران بالغ بر روی این قارچ را بررسی و مشخص نموده‌اند که باکتری *B. subtilis* دارای بیشترین اثر ضدقارچی روی آن است.

با توجه به اثرات ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ‌های مختلف و اهمیت پرداختن به روش‌های درمانی جدید و سالم در کلنی‌های زنبور عسل، تصمیم گرفته شد اثر ضد قارچی باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم روی قارچ آسکوسفرایس عامل بیماری نوزاد گچی زنبور عسل مورد ارزیابی قرار گیرد و شرایط امکان بررسی‌های بیشتری روی اثرات درمانی این باکتری‌ها، سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها روی عوامل بیماری‌زای نوزادان زنبور عسل در داخل کلنی‌های زنبور عسل فراهم نموده و در نهایت بتوان با تقویت فلور باکتریایی زنبور عسل بیماری‌های میکروبی آن را کنترل یا درمان نمود.

## مواد و روش کار

**قارچ آسکوسفرایس:** ابتدا نمونه‌های از لاروهای گچی شده زنبور عسل که از زنبورستانهای شمال کشور جمع‌آوری گردیده و در بخش تحقیقات بیماری‌های زنبور عسل و کرم ابریشم موسسه رازی مورد بررسی و تأیید قرار گرفته بودند تهیه شد. برای کشت و جداسازی قارچ آسکوسفرایس لاروهای گچی شده را در شرایط استریل بصورت پودر در آورده و



محلول مایه اسپور قارچ را در داخل ۲۰ ml از محیط کشت سابروگستروز آگار نرم (۴۵°C) ریخته و بطور یکنواخت حل نموده و در پلیت‌های شیشه‌ای ریخته و مدتی صبر نموده تا بطور کامل منعقد و سفت گردد. سپس با استفاده از پانچر چاهک‌هایی را در سطح آگار ایجاد نموده و ۱۰۰ μl از مایع روئی فاقد سلول باکتری‌های اسید لاکتیک را در چاهک‌ها آگار ریخته و مدتی صبر نموده تا جذب محیط شوند. سپس پلیت‌ها را در دمای ۲۵°C و شرایط بی‌هوایی به مدت ۵ شبانه روز قرار داده تا قارچ آسکوسفرایس رشد نماید. بعد از این مدت قطره‌اله ممانعت از رشد اطراف چاهک‌ها با استفاده از خط کش اندازه گیری گردید.

### نتایج

**pH مایع روئی عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوس‌ها: pH مایع روئی عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوس‌ها در جدول ۱ ذکر شده اند.** همچنانکه در جدول مشاهده می‌شود pH مایعات روئی عاری از سلول و همچنین محلول حاوی باکتری‌های کاملاً رشد کرده در محدوده اسیدی می‌باشند ولی pH محیط کشت سابروگستروز آگار ۶ بوده و قارچ آسکوسفرایس در این محدوده قابل رشد است.

**pH محیط‌هایی کشت مورد استفاده:** برای بررسی اثرات احتمالی تغییرات pH حاصل از رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ مذکور تصمیم گرفته شد که pH محیط‌هایی کشت قارچ و لاکتوباسیلوس‌ها در دمای ۲۰°C اندازه گیری شود. هدف از این کار این بود که مشخص شود که قارچ آسکوسفرایس در چه محدوده‌ای از pH رشد می‌نماید و زمانی که باکتری‌های اسیدلاکتیک رشد نموده و pH محیط به حدود ۴ می‌رسد آیا قارچ مذکور قادر به رشد خواهد بود.

**روش Overlay assay:** نتایج حاصل از این روش در جدول شماره ۳ ذکر شده است. همچنانکه مشاهده می‌شود دو باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در اطراف دو خط موازی کشت مانع از رشد قارچ آسکوسفرایس گردیده‌اند ولی با توجه به معیار تأثیر باکتری‌ها روی قارچ‌ها به این روش این میزان تأثیر چشمگیر نبوده و در حد عدم تأثیر در نظر گرفته می‌شود و باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم مانع از رشد قارچ آسکوسفرایس نگردید.

**روش Confrontation Assay:** بعد از اینکه پلیت‌ها به شیوه‌ای که ذکر شد آماده گردید و به مدت ۵ شبانه روز در شرایط بی‌هوایی و دمای ۲۵°C قرار داده شد، میزان رشد قارچ مذکور در مقایسه با گروه‌های کنترل ارزیابی گردید. بدینصورت که اگر قارچ رشد نموده و تشکیل آسک‌ها را بدهد نتیجه منفی، اگر قارچ رشد نموده ولی آسک‌ها تشکیل نشوند + و اگر در سطح پلیت هیچگونه پرگنه‌ای از قارچ مشاهده نشود ++ در نظر گرفته می‌شود. همچنانکه در جدول ۴ مشاهده می‌شود باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مانع از رشد

۲. روش Confrontation Assay: در این روش ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک به شکل دو نوار موازی به فاصله ۱ cm در سطح محیط کشت MRS آگار کشت داده و در شرایط مناسب به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند، بعد از رشد باکتری‌های اسید لاکتیک، با استفاده از اسکالپل یا آنس نوک تیز به اندازه ۲۵mm از کلنی قارچ آسکوسفرایس را برداشته و در وسط دو خط باکتری‌های اسید لاکتیک قرار داده و به مدت ۵ شبانه روز در شرایط بی‌هوایی و دمای ۲۵°C قرار داده شد بعد از این مدت پلیت‌ها بررسی شد و میزان رشد قارچ مذکور در مقایسه با گروه‌های کنترل سنجیده شد (۳).

۳. روش Agar Spot: در این روش ابتدا باکتری‌های اسیدلاکتیک را بصورت نقطه‌ای در سطح محیط کشت MRS آگار کشت داده و در شرایط مناسب به مدت ۲۴ ساعت قرار داده تا رشد نمایند سپس ۱ ml از مایه اسپور قارچ را در ۱۰ ml محیط کشت سابروگستروز آگار نرم ریخته و به هم زده تا بطور یکنواخت حل گردد و سپس به آرامی روی لکه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک ریخته و مدت نیم ساعت صبر نموده تا منعقد گردد. سپس پلیت‌ها را در دمای ۲۵°C و شرایط بی‌هوایی قرار داده و ۲۲ ساعت بعد از کشت قطره‌اله ممانعت از رشد قارچ در اطراف لکه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک اندازه گیری شد.

۴. روش کشت توأم Simultaneous Inoculation: در این روش ابتدا باکتری‌های اسیدلاکتیک را به میزان ۱۰۶ CFU/mL در محیط کشت MRS آگار نرم مخلوط نموده و بعد از مخلوط شدن یکنواخت و منعقد شدن محیط کشت، قارچ آسکوسفرایس را در مرکز پلیت‌های مذکور کشت داده و در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده و بعد از این مدت قطر کلنی‌های قارچ سطح محیط کشت را در گروه‌های کنترل و تیمار اندازه گیری نموده و با هم مقایسه گردید (۳۳).

۵. تهیه محلول روئی عاری از سلول (CFC) باکتری‌های اسید لاکتیک: برای تهیه محلول روئی عاری از سلول (Cell Free Culture Supernatant) باکتری‌های اسید لاکتیک، آن‌ها را در محیط برات کشت داده و بعد از ۲۴ ساعت که باکتری‌ها بطور کامل رشد نمودند محتویات لوله‌ها را در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و مایع روئی را از فیلترهای استریل ۲۲ μm عبور داده تا سلول‌های باکتری و قطعات باقی مانده آن‌ها جداسازی گردد. مایع صاف شده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (۱۳).

۶. اندازه گیری pH مایع روئی عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوسه: با استفاده از دستگاه pH متر pH مایع روئی عاری از سلول لاکتوباسیلوس‌ها را در دمای ۲۰°C اندازه گیری شد که در جدول شماره ذکر شده اند

۷. بررسی اثرات ضد قارچی مایع روئی عاری از سلول لاکتوباسیلوس‌ها روی قارچ آسکوسفرایس: برای اینکار ابتدا ۱ ml از



باکتری‌های اسیدلاکتیک در سطح پلیت‌ها حدود ۵ mm می‌باشد لذا در حین اندازه‌گیری قطر‌ها ممانعت از رشد در اطراف لکه‌ها اندازه آن‌ها هم جزو‌ها ممانعت از رشد در نظر گرفته می‌شود. همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود قطر‌ها ممانعت از رشد اطراف لکه‌های باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ابتدا بیشتر از ۵ mm می‌باشد که بتدریج این میزان کمتر شده و در روزهای آخر بررسی در لاکتوباسیلوس کازئی به ۵ mm رسیده و در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به طور کامل از بین می‌رود و قارچ سطح لکه‌های باکتری را هم می‌پوشاند. باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم تأثیر زیادی در مهار رشد قارچ آسکوسفرا آیس نداشت و از روز دوم بررسی سطح پلیت و لکه‌های باکتری توسط قارچ پوشیده شد. این نتایج نشان می‌دهد که باکتری‌های اسیدلاکتیک استفاده شده دارای اثر مهار روی رشد قارچ آسکوسفرا آیس می‌باشند ولی این اثر به تدریج از بین رفته و قارچ در نهایت رشد کامل خواهد داشت. اما باکتری لاکتوباسیلوس کازئی طی مدت بررسی در محل لکه رشد مانع از رشد قارچ گردید.

**مایع روئی عاری از باکتری (CFS):** مایع روئی هیچکدام از باکتری‌های اسیدلاکتیک تأثیری در مهار رشد قارچ آسکوسفرا آیس نداشتند.

## بحث

با توجه به نقش بسیار مهم زنبور عسل در اکوسیستم‌های گیاهی و جانوری، گرده افشانی و تکثیر و تولید بسیاری از گیاهان و درختان، افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی و استفاده وسیع از محصولات آن به عنوان غذا، دارو و مواد آرایشی و صنعتی و تأثیر بسیار بالائی که در افزایش بهره‌وری اقتصاد کشاورزی کشورها دارد، پرداختن به تهدیداتی از جمله عوامل بیماریزا و آفات و شکارچیان که زندگی زنبور عسل و نهایتاً صنعت زنبورداری کشور را با مخاطره مواجه می‌سازند، از اولویت ویژه‌ای برخوردار بوده و محققین باید از روش‌های مختلف در جهت مبارزه و کنترل این عوامل بهره‌جسته و میزان تلفات کلنی‌های زنبور عسل را کاهش دهند و از سوی دیگر مواد و روش‌های مورد استفاده در کلنی‌های زنبور عسل علاوه بر سالم بودن برای زنبورها، فاقد کمترین اثر سوء در مصرف کنندگان محصولات زنبور عسل باشند. در حال حاضر مؤثرترین روش مبارزه با عوامل بیماریزای زنبور عسل مواد شیمیائی و داروهای مختلف است که علی‌رغم تأثیر نسبی روی آن‌ها موجب بروز مشکلاتی از جمله بروز سوبه‌های مقاوم عوامل بیماریزا در مقابل داروها و ورود مواد شیمیائی به داخل فرآورده‌های کلنی‌ها و بروز عوارض ناخواسته در مصرف کنندگان آن‌ها می‌گردند. یکی از روش‌های جدید و مؤثر در مبارزه با عوامل بیماریزای انسان و دام استفاده از فرآورده‌های طبیعی است که طی بررسی‌های مختلف سالم بودن تعدادی از آن‌ها به اثبات رسیده و در حال مصرف در انسان و دام می‌باشند. پروبیوتیک‌ها و باکتری‌های اسیدلاکتیک طی بررسی‌های مختلف

جدول ۱. pH محلول روئی عاری از سلول باکتری‌های اسیدلاکتیک در دمای ۲۰°C.

نوع CFS	pH
لاکتوباسیلوس کازئی	۴/۱۰
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۴/۱۵
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۴/۹۴

جدول ۲. pH محیط‌های کشت MRS, SDA قبل از کشت باکتری و قارچ در دمای ۲۰°C.

نوع محیط	pH
SDA	۶/۷۰
MRS	۶/۲۰

جدول ۳. فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه قارچ آسکوسفرا آیس در روش Overlay assay. - = عدم مشاهده مهار رشد، + = عدم رشد قارچ در ۱/۰ الی ۳ درصد سطح پلیت، +++ = عدم رشد قارچ در ۳ الی ۸ درصد سطح پلیت، ++++ = عدم رشد قارچ در بیش از ۸ درصد سطح پلیت

باکتری اسیدلاکتیک	میزان تأثیر
لاکتوباسیلوس کازئی	++
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	++
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	-

جدول ۴. فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه قارچ آسکوسفرا آیس در روش Confrontation Assay. - = عدم مهار رشد قارچ، + = عدم تشکیل آسک‌ها، ++ = عدم رشد میسلیوم و عدم تشکیل آسک‌ها.

باکتری اسیدلاکتیک	میزان تأثیر
لاکتوباسیلوس کازئی	+
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	+
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	-

جدول ۵. اثر ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه قارچ آسکوسفرا آیس در روش Agar Spot.

باکتری اسیدلاکتیک	قطر‌ها ممانعت از رشد (mm)					
	زمان مشاهده (Hr)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۰	۸	۶	۶	۵	۵
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۷	۶	۵	۳	۰	۰
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم	۵	۰	۰	۰	۰	۰

میسلیوم‌های قارچ آسکوسفرا آیس نشده‌اند ولی حتی بعد از چندین روز هم از تشکیل آسک‌ها ممانعت به عمل آورده و سطح پلیت فقط پوشیده از میسلیوم‌های سفید رنگ قارچ بود. باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم تأثیری روی رشد قارچ آسکوسفرا آیس نداشت.

**روش Agar Spot:** ۵ روز بعد از اینکه پلیت‌ها در شرایط بی‌هوایی و دمای ۲۵°C قرار داده شد هر ۲۴ ساعت یکبار آن‌ها را مورد مشاهده قرار داده و قطر‌ها ممانعت از رشد اطراف لکه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک اندازه‌گیری می‌شد و اینکار به مدت ۱۴۴ ساعت ادامه پیدا کرد. نتایج در **جدول ۱۰** ذکر شده‌اند. با توجه به اینکه قطر لکه حاصل از کشت و رشد



لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مانع از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس می‌شود. Matei و Cornea در سال ۲۰۱۴ با بررسی اثر ضد قارچی ۲۷ سویه از باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ آلترناریا سولانی و پنی سیلیوم دیجیتال‌توم عامل بیماریزای گیاهان با استفاده از روش Overlay متوجه شدند که ۱۱ سویه از باکتری‌های آزمایش شده دارای اثرات ضد قارچی روی این عوامل می‌باشند. Verdenelli و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های *L. rhamnosus* و *L. paracasei* جداسازی شده از مدفوع انسان روی مخمر *C. albicans* ATCC ۱۰۲۹۱ متوجه شدند که این باکتری‌ها به میزان بسیار زیادی موجب مهار رشد این مخمر می‌شوند. Coloretto Fabio و همکاران در سال ۲۰۰۷ با جداسازی ۶۵ سویه از قارچ‌های مختلف از سالامی گوشت و بررسی اثرات ضد قارچی آن‌ها متوجه شدند که ۱۰ سویه دارای اثرات ضد قارچی بر علیه قارچ‌هایی از جمله آسپرژیلوس و پنی سیلیوم بوده و مؤثرترین ترکیبات ضد قارچی این باکتری‌ها که در مرحله اول رشد آزاد می‌شوند فنیل لاکتات و هیدروکسی فنیل لاکتات می‌باشند. از سوی دیگر تمام سویه‌ها در مرحله نهائی رشد ترکیبات فعال پپتیدی آزاد نموده اند.

Ergin, K و همکاران در سال ۲۰۱۰ با جداسازی ۳۰ جدایه لاکتوباسیلوس از مدفوع کودکان ۵ الی ۱۵ ساله و همچنین جداسازی ۵۰ جدایه کاندیدا از خون، اثر ضد قارچی لاکتوباسیلوس‌ها را روی قارچ کاندیدا مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این باکتری‌ها دارای اثر ضد قارچی زیادی روی مخمرهای *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. famata* and *C. guilliermondii* می‌باشند. Muñoz, R و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر ضد قارچی باکتری‌های *Lactobacillus fermentum*، *Lactobacillus rhamnosus* و *Saccharomyces cerevisiae* علیه قارچ *Aspergillus nomius* VSC ۲۳ مولد مایکوتوکسین را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این باکتری‌ها به میزان بسیار زیادی مانع از رشد قارچ مذکور می‌شوند.

Magnusson, J و همکاران در سال ۲۰۰۳ بررسی جامعی را روی اثر ضد قارچی ۱۲۰۰ جدایه مختلف از باکتری‌های اسیدلاکتیک روی قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس و تعدادی دیگر از قارچ‌ها انجام داده و متوجه شده‌اند که ۱۰ درصد از جدایه‌ها دارای فعالیت مهارتی و ۴ درصد از آن‌ها اثر بسیار قوی روی قارچ مذکور دارند. بیشترین فعالیت ضد قارچی مربوط به باکتری *Lactobacillus coryniformis* بوده است. S. M. Schwenninger و همکاران در سال ۲۰۰۵ با جداسازی ۱۴۲۴ جدایه از باکتری‌های اسیدلاکتیک از مواد غذایی مختلفی از جمله شیر خام، ماست، پنیر و دوغ اثر ضد قارچی آن‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند و در نهایت متوجه شده‌اند که ۸۲ جدایه دارای بیشترین اثرات ضد قارچی بر علیه قارچ‌هایی از جمله کاندیدا و پنی سیلیوم می‌باشند. از بین باکتری‌های اسیدلاکتیک جداسازی شده ۲۵ درصد آن‌ها مربوط به گروه لاکتوباسیلوس

نقش بسیار مهمی در کنترل و مبارزه با بیماری‌های دامی و انسانی داشته و در مواردی به عنوان دارو و مکمل دارویی در اختیار مصرف کنندگان قرار می‌گیرند و بتدریج جایگاه ویژه‌ای در فارماکوپه‌های پزشکی و دامپزشکی باز کرده و هر روز دامنه مصرف آن‌ها گسترده تر می‌شود. در سالیان اخیر توجه زیادی به امکان استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها در کلنی‌های زنبور عسل به عنوان روشی برای کنترل و مبارزه با بسیاری از عوامل بیماریزا و همچنین مکمل رشد زنبور عسل شده است و در بسیاری از تحقیقات اقدام به جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از زنبور عسل و بررسی نقش آن‌ها در مهار رشد عوامل بیماریزا نموده‌اند و نتایج قابل توجهی را بدست آورده اند.

در این بررسی که برای اولین بار در ایران اثرات ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه عوامل بیماری‌های قارچی زنبور عسل مورد مطالعه قرار گرفته است باکتری‌های لاکتوباسیلوس کلانی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیلوباکتریوم بیفیدوم باعث مهار رشد قارچ آسکوسفر\آپیس عامل بیماریزای نوزاد گچی زنبور عسل در محیط کشت شده اند. گرچه این میزان مهار رشد نسبت به اثر داروهای ضد قارچی ناچیز است ولی نشان می‌دهد که باکتری‌های اسید لاکتیک قادر به رشد قارچ مذکور بوده و با بررسی‌های بیشتر روی سایر باکتری‌های اسیدلاکتیک و پروبیوتیک‌ها شاید بتوان به باکتری‌هایی دست یافت که دارای اثرات بیشتری بوده و در صورت دارا بودن شرایط پروبیوتیکی بتوان به عنوان مکمل‌های دارویی یا غذائی در کلنی‌های زنبور عسل مورد استفاده قرار داد.

بیشتر محققین مکانیسم اثر باکتری‌های اسیدلاکتیک روی سایر میکروارگانیسم‌ها اثرات ضد باکتریائی متابولیت‌های حاصل از آن‌ها می‌دانند. متابولیت‌ها شامل مواد ضد میکروبی با وزن کم از جمله اسیدهای آلی اسید استیک و اسید لاکتیک، هیدروژن پروکسید، دی استیل، استالید، استوئین، دی اکسید کربن، رتوترین، رتوترسیکلین و مواد ضد میکروبی با وزن زیاد از جمله باکتریوسین‌ها می‌باشند که هر کدام از این مواد با اثرات مختلف موجب نابودی یا کاهش رشد عوامل بیماریزا می‌گردند. در رابطه با باکتری‌های اسپور دار 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. Laitila و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده‌اند که سویه‌های *Lactobacillus plantarum* دارای اثرات ضد قارچی بر علیه سویه‌های مختلف قارچ *Fusarium* می‌باشند. همچنین Nora Laref و Bettache Guessas در سال ۲۰۱۳ با بررسی اثرات ضد قارچی ۵۴ سویه باکتری اسیدلاکتیک از جمله لاکتوباسیلوس پلانتریوم روی قارچ‌های مختلف مشخص کرده‌اند که این باکتری‌ها روی قارچ‌های *Aspergillus spp.*, *Fusarium roseum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.* and *Stemphylium spp.* دارای اثرات مهارتی می‌باشند. Collins و Hardt در سال ۱۹۸۰ نشان دادند که باکتری



## References

1. Aronstein, K., Hayes, G. (2004). Antimicrobial activity of allicin against honeybee pathogens. *J Apicult Res*, 43, 57-59. <https://doi.org/10.1080/0218839.2004.11101111>
2. Bailey, L., Ball, B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK. p. 53-63; p154-158.
3. Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., Mach, R. L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol systemic disease resistance both antagonism and induction of plant agent *Trichoderma atroviride* to enhance. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3959-3965. <https://doi.org/10.1128/aem.71.7.3959-3965.2005> PMID: 16000810
4. Collins, E. B., Hardt, P. (1980). Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci*, 63, 830-832. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83013-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83013-X) PMID: 6771309
5. Ergin, K., Şener, T., Belgin, E. (2010). Antifungal effects of *Lactobacillus* Spp. bacteria on candida yeast. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 6, 1061-1064.
6. Evans, J. D., Armstrong, T. N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecol*, 6, 4-12. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-4> PMID: 16551367
7. Coloretto, F. (2007). Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *Fems Microbiol Lett*, 271, 245-250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00723.x>
8. Forsgren, E., Olofsson, Tc., Va'Squez, A., Fries, I. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie*, 41, 99-108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>
9. Frazier, M., Mullin, C., Frazier, J., Ashcraft, S. (2008). What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, 148, 521-523.
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. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2009.08.002>

کازئی از جمله *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* بوده اند. بر اساس بررسی‌های sabate و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ تعدادی از باکتری‌های همزیست در دستگاه گوارش زنبور عسل دارای اثرات ضد قارچی روی آسکوسفرا آیس بوده اند. همچنین بررسی‌های Mohamed O. M. Omar و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده است که برخی از باکتری‌ها از جمله باسیلوس‌های جداسازی شده از رود زنبوران بالغ دارای اثرات آنتی‌گونیستی بر روی قارچ آسکوسفرا آیس بوده و باکتری *B. subtilis* دارای بیشترین اثر ضد قارچی است. در این بررسی مشخص گردید که باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای اثر نسبی روی کنترل رشد قارچ آسکوسفرا آیس عامل بیماری نوزاد گچی زنبور عسل در محیط کشت می‌باشند و بیانگر این مسئله است که این باکتری‌ها دارای اثرات بالقوه‌ای می‌باشند که می‌تواند آن‌ها را به عنوان کاندیدهای پروبیوتیک‌ها در درمان و کنترل بیماری‌های قارچی زنبور عسل مطرح نماید. ولی آنچه که باید در استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک یا پروبیوتیک‌ها در کلنی‌های زنبور عسل مورد توجه قرار گیرد مقاومت این باکتری‌ها در برابر ژله روبال، عسل و گرده گل مورد مصرف زنبوران عسل، عدم تأثیر منفی این باکتری‌ها بر روی سلامتی نوزادان و زنبوران بالغ، واکنش منفی بین این باکتری‌ها و فلور طبیعی دستگاه گوارش زنبوران عسل و مقاوم بودن آن‌ها در برابر واکنش‌های ایمنی نوزادان یا زنبوران بالغ می‌باشد، بطوریکه بسیاری از عوامل میکروبی قادر به رشد در داخل مواد غذایی مورد مصرف زنبور عسل نبوده و براحتی از بین می‌روند (اطلاعات منتشر نشده). همچنین سیستم ایمنی زنبور عسل بسیاری از عوامل میکروبی را از بین برده و مجال رشد در داخل بدن آنرا پیدا نمی‌کنند. لذا در بررسی‌های مشابه باید این موضوعات در نظر گرفته شده و بعد از حصول نتایج در محیط کشت یا آزمایشگاه، بررسی‌های زیستی در داخل کلنی‌ها یا نمونه‌های داخل آزمایشگاهی صورت گرفته و در نهایت عواملی به عنوان کنترل زیستی بیماری‌های زنبور عسل انتخاب شوند که هم در مقابل عوامل ضد میکروبی مواد غذایی یا سیستم ایمنی زنبور عسل مقاومت لازم را داشته و هم اثرات منفی زیادی روی سلامتی زنبور نداشته باشند.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و همکاران بخش تحقیقات بیماری‌های زنبور عسل و کرم ابریشم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج بواسطه همکاری در تهیه برخی مواد این بررسی تشکر و قدردانی می‌شود.

## تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.



- [org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014)
11. Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x>
  12. Gliński, Z., Chmielewski, M. (1996). Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 40, 2, 165-173.
  13. Imani Fooladi, A. A., Chavoshi Forooshai, M., Saffarian, P., Mehrab, R. (2014). Antimicrobial effects of four lactobacilli strains isolated from yoghurt against *Escherichia Coli* O157:H7. *J Food Saf*, 34, 150-160. <https://doi.org/10.1111/jfs.12108>
  14. Heath, LAF. (1982a). Development of chalk brood in a honey bee colony: a review. *Bee World*, 63, 119-130. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1982.11097876>
  15. Heath, LAF. (1982b). Chalk brood pathogens: a review. *Bee World*, 63, 130-135.
  16. Heath, LAF. (1985). Occurrence and distribution of chalk brood disease of honeybees. *Bee World*, 66, 9-15.
  17. Heath, LAF. Gaze, BM. (1987). Carbon dioxide activation of spores of the Chalkbrood Fungus *Ascosphaera apis*. *J Apic Res*, 26, 243-246.
  18. Herbert Jr, EW. Chitwood, DJ., Shimanuki, H. (1985). New compounds with potential for the control of chalkbrood. *American Bee Journal*, 125, 430-431.
  19. Herbert Jr, EW. Chitwood, W., Shimanuki, H. (1986). The effect of a candidate compound on Chalkbrood disease in New Jersey. *American Bee Journal*, 126, 258-259.
  20. Hornitzky, M. (2001). Literature Review of Chalkbrood. A report for the RIRDC. Publication No. 01/150. Kingston, ACT, AU.
  21. Hornitzky, M. A. Z., Willis, P. A. (1983). Gamma radiation inactivation of bacillus larvae to control American foul brood. *J Apic Res*, 22, 196-199. <https://doi.org/10.1080/00218839.1983.11100587>
  22. Klein, A. M., Vaissiere, B.E., Cane, J. H., Stefan-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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
  23. Laitila, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J Appl Microbiol*, 93, 566-576. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01731.x>
  24. Li, J., Zheng, Z., Hong, S., Qi, X., Liang, Q. (2012). Isolation and identification of an antagonistic bacterial strain against *Ascosphaera apis* from honey bee larvae infected with chalkbrood disease. *Scientia Agricultural Sinica*, 5, 5-20.
  25. Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 219, 129-135. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(02)01207-7)
  26. Matei, A., Cornea, C. P. (2014). Antifungal activity of some lactic acid bacteria isolated from materials of vegetal origin. *Sci Bull Series f Biotechnologies*, 18, 42-47.
  27. Mohamed, O. M. Omar. (2014). Antagonistic effect of gut bacteria in the hybrid carniolan honey bee, *Apis Mellifera carnica*, against *Ascosphaera Apis*, the causal organism of Chalkbrood disease. *J Apic Sci*, 58, 1-10. <https://doi.org/10.2478/jas-2014-0002>
  28. 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. <https://doi.org/10.1051/apido/2010010>
  29. Morse, R. A., Calderone, N. W. (2000). The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Culture*, 128, 1-15.
  30. Mourad, A. K., Zaghoul, O. A., Kady, E. L., Nemat, F. M., Morsy, M. E. (2005). A novel approach for the management of the chalkbrood disease infesting honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Egypt. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 70(4), 601-611.
  31. Mrazek, J., Strosova, L., Fliegerova, K., Kott,





- T., Kopecny, J.(2008). Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol*, 53, 229-233. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0032-z>
32. Muñoz R, M. E., Arena, J.Silva., González, S. N. (2010). Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* Vsc 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Braz J Microbiol*, 41, 1019-1026.
33. Nelson, DL., Gochnauer, TA. (1982). Field and laboratory studies on chalkbrood disease of honey bees. *American Bee Journal*, 122, 29-34.
34. Nora, L., Bettache, G. (2013). Antifungal Activity Of Newly Isolates of lactic acid bacteria. *Innov Rom Food Biotechnol*, 13, 80-88. (3218) Galati University Press ISSN (P) 1843-6099 ISSN (L) 1843-6099.
35. Schwenninger. (2005). Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* Sm20, Sm29, And Sm63 and molecular typing of the strains. *J Food Prot*, 68(1), 111-119.
36. Spivak, M., Downey, DL. (1998). Field assays for hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera:Apidae). *J Econ Entomol*, 91(1), 64-70.
37. Van, E. D., Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol*, 103, 80-95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>
38. Verdenelli, Mc. Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., Cresci, A. (2009). Probiotic properties of *Lactobacillus Rhamnosus* and *lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur J Nutr*, 48, 355-363. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0021-2>
39. Winston, M. (1995). We need alternatives. Pesticide resistance. *Bee Culture*, 123(7), 389-390.
40. Wood, M. (1998). Microbes help bees battle chalkbrood. *J Econ Entomol*, 46(8), 16- 17.



## Antifungal Effects of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the *Ascospaharea apis* Causative Agent of Honey bee Chalkbrood Disease

Mostafa Moradi<sup>1</sup>, Abdolghafar Ownagh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Agriculture and Natural Resources of West Azerbaijan, Urmia, Iran

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received 5 December 2018, Accepted 27 February 2019)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Honey bee Chalkbrood disease is a fungal disease that is distributed in apiaries in the north provinces of Iran. Chalkbrood causative agent is *Ascospaharea apis* that can survive in colonies products for many years. Many chemical materials are used for control of Chalkbrood disease in honeybee colonies that can make some problems in honeybee consumer products, so that survival of safe material and methods for honeybee colonies treatments is a important aim in honeybee research field.

**OBJECTIVES:** In this study antifungal effects of the *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the *Ascospaharea apis* causative agent of honey bee Chalkbrood disease is examined.

**METHODS:** Simultaneous inoculation, Agar spot, Confrontation assay, Overlay assay methods are used. LABs are cultured in MRS and *A.apis* is cultured in SDA media.

**RESULTS:** *L.casei* and *L.acidophilus* had moderate effects on the *A.apis* growth, but *B.bifidum* and LABs cell free supernatants(CFS) could not inhibit growth of this fungi.

**CONCLUSIONS:** Results of this survey show that LABs have antifungal activities on the honey bee Chalkbrood disease agent in culture medium and may be used as an alternative method for control of this disease in the honeybee colonies.

### Keyword:

Honey bee, Lactic acid bacteria, Chalkbrood disease, *Ascospaharea apis*, Antifungal activities

### Figure Legends and Table Captions

Table 1. Supernatant pH of lactic acid bacteria in 20 °C.

Table 2. MRS and SDA culture media pH in 20 °C.

Table 3. Antifungal activities of lactic acid bacteria on the *Ascospaharea apis* in Overlay assay method.

Table 4. Antifungal activities of lactic acid bacteria on the *Ascospaharea apis* in Confrontation method.

Table 5. Antifungal activities of lactic acid bacteria on the *Ascospaharea apis* in agar spot method.

