دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
جلد۹، شماره ۱۷، سال ۱۳۹۷، (۲-۱۱)

استراتژی های طبیعی برای کنترل باکتری *Paenibacillus larvae* عامل بیماری لوک آمریکایی

مهرنوش نکویی[۱]، **چمران همتی**[۱]،**شبنم پری‌چهره**[۲]

۱-گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲- بخش زنبور عسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: مهرماه ۹۷/ **تاریخ پذیرش**: آذرماه۹۷

شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/hbsj.2018.123512.1067

رایانامه: chamran.hemmati@gmail.com

چکیده:

بیماری لوک آمریکایی یک بیماری باکتریایی شدید است که لاروهای زنبورعسل *Apis mellifera* را بیمار می کند. عامل این بیماری باکتری تشکیل دهنده اسپوری به نام *Paenibacillus larvae* است. استفاده از آنتی بیوتیک ها برای کنترل بیماری لوک آمریکایی باعث ایجاد شدن استرین های مقاوم و باقی مانده این آنتی بیوتیک ها در محصولات کندو می شود. در حال حاضر، آنتی-بیوتیک ها در چندین کشور به طور خیلی جدی ممنوع شده است و کلنی هایی که آنتی بیوتیک مصرف می کنند باید سوزانده شوند. بنابراین، توسعه روش های جایگزین برای کنترل و جلوگیری از گسترش بیماری لوک آمریکایی ضروری به نظر می رسد. در همین رابطه، چندین استراتژی طبیعی بر پایه کاربرد اسانس های گیاهی، ترکیبات گیاهی، بره موم، ژل رویال، باکتری ها، و باکتریوسین ها در محیط های *in vitro* و *in vivo* برای جلوگیری از گسترش و کنترل بیماری مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مقاله، داده های آزمایشگاهی از این مطالعات مرور و بحث می شود که می تواند نکته جدیدی برای مطالعات آینده در شرایط طبیعی را فراهم آورد.

واژه های کلیدی: باکتری *Paenibacillus larvae*، بیماری لوک آمریکایی، زنبور عسل، ترکیبات طبیعی

مقدمه:

بیماری لوک آمریکایی مهمترین بیماری زنبورعسل است که تقریباً پراکنش جهانی دارد. این بیماری فقط لاروهای آلوده را از بین می برد امّا، اگر مورد درمان قرار نگیرد، باعث از بین رفتن کل کندو می شود. این بیماری به عنوان بیماری مسری و واگیردار شناخته می شود، بنابراین، یک بیماری خطرناک در کل دنیا می تواند باشد (Djukic *et al*., 2014). عامل بیماری لوک آمریکایی یک باکتری گرم مثبت تاژک دار است که مهمترین ویژگی این باکتری تولید اندوسپور بسیار مقاوم است. این پاتوژن پرورش کندو را در مرحله لاروی یا شفیرگی تحت تاثیر قرار می دهد (Generesch *et al*., 2006) و اسپور این باکتری باعث ایجاد بیماری می شود. لاروهای زنبور عسل تا ۳۶ ساعت بعد از تفریخ تخم به این باکتری بیشترین حساسیت دارند (Ashiralieva & Generesch 2006) و در واقع ۱۰ اسپور نیاز است تا لارو ۲۴ ساعته را بیمار کند. امّا، در مراحل بعدی رشد لارو، به تعداد اسپورهای بیش تری نیاز است تا لارو آلوده شود (Generesch *et al*., 2006). آلودگی از طریق تغذیه که توسط زنبوران کارگر (پرستار) انجام می شود اتفاق می افتد.

اسپورها در معده لاور جوانه می زنند و در عرض چند روز به شدت تکثیر می یابند. در مراحل بعد، باکتری به ماتریکس دورغذایی[1] می رسد و وارد سلول های اپیدرمی می شود و تولید عفونت می کند و درنهایت باعث مرگ لارو می شود. در آخرین مرحله، لاشه های زنبور توسط سلول های رویشی باکتریایی هضم می شود و به پولک های خشک که حاوی میلیون ها اسپور باکتری است، تبدیل می شوند (Djukic *et al*., 2014). علائم آشکار بیماری در کلنی شامل بستن نامنظم سلول ها (که باعث به وجود آمدن سلول های بسته و باز پراکنده می شود)، سلول های تیره، فرورفته ،در اغلب موارد پوشش سوراخ که بوی ماهی گندیده و باقی مانده چسب ناک قهوه ای (وقتی با چوب کبریت به بیرون کشیده می شود، مثل نخ کشیده می شود) و در نهایت، باقی مانده لارو به صورت پولک سخت در انتهای سلول باقی می ماند. تشخیص سنتی بیماری لوک آمریکایی بر پایه مشاهده چنین علائم کلینیکی در کندو و کشت مواد آلوده کندو بوده است (De Graaf *et al*., 2006).

مقاومت اسپورهای باکتری مهم ترین مساله برای کنترل و پیش گیری بیماری لوک آمریکایی است چون که این اسپور می تواند تا ۳۵ سال در عسل و یا در لوازم زنبورداری زنده بماند و مشخص شده است که این اسپور به دمای بالا و ضدعفونی کننده هایی که علیه آن ها استفاده می شود، مقاومت بالایی دارند. اغلب تیمارها بر اساس استفاده از آنتی بیوتیک های با طیف اثر وسیع بوده است که در اغلب موارد از آنتی بیوتیک های اکسی تتراسایکلین هیدروکلراید و سولفاتیازول برای جلوگیری از رشد باکتری به طور وسیع و مداوم استفاده شده است، امّا، استفاده و سوءمصرف این آنتی بیوتیک ها در دهه های قبل، باعث ظهور استرین های مقاوم و باقی مانده آنتی بیوتیک که باعث آلودگی محصولات کندو می شود. به این دلیل، استفاده از آنتی بیوتیک ها برای کنترل و پیشگیری بیماری لوک آمریکایی، در چندین کشور ممنوع شده است و کندوهایی که با آنتی بیوتیک تیمار می شوند سوزانده می شوند(Mutinelli 2003). این عمل یک راه حل قوی امّا پرهزینه برای زنبورداران است و هم چنین نمی تواند به عنوان روشی برای پیشگیری از بیماری لوک آمریکایی باشد(Kochansky *et al*., 2001). در این رابطه، توسعه روش های موثر و جایگزین برای پیشگیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی ضروری به نظر می رسد. در این روش ها نیز باید مواردی همچون پدیده بروز باکتری های مقاوم را در نظر بگیرد و هم چنین قوانین سخت گیرانه اتحادیه اروپا و کنسرسیوم سبز را برآورده کند. در مقاله حاضر، مطالعاتی که روی توسعه استراتژی های طبیعی مثل استفاده از اسانس های گیاهی، ترکیبات گیاهی، بره موم، ژل رویال، باکتری ها و باکتریوسین ها برای پیش گیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی تاکنون انجام شده است، را ارائه می دهد.

۲- ترکیبات طبیعی برای پیش گیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی

۲-۱- اسانس های گیاهی

اسانس های گیاهی ترکیبات فرّار طبیعی و محصولات مرکبی هستند که به عنوان متابولیت های ثانویه از گیاهان معطر که اثرات درمانی فراوانی (ضدسرطان، ضد التهاب، دورکننده حشرات، ضد میکروب، ضد ویروس و آنتی اکسیدان) دارند، به دست می آیند. از آنجایی که اسانس های گیاهی مواضع هدف زیادی در یک زمان دارند، هیچ موردی از مقاومت یا سازگاری به این ترکیبات گزارش نشده است. چندین اسانس گیاهی در محیط *in vivo* و *in vitro*

1- Peritrophic matrix

برای کنترل باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی و هم چنین اثر سمیت حاد برای زنبور عسل مورد ارزیابی قرار گرفته است (Alonso-Salces *et al*., 2017).

۲-۲- آزمایشات سمیت روی زنبور عسل

زمانی که اسانس های گیاهانی مثل پرتقال، دارچین، زیره سبز، میخک هندی، آویشن و شاه پسند به همراه آب شکر در غلظت های مختلف به زنبور خورانده شد، برای افراد بالغ زنبورعسل سمیت نداشته است (Gende *et al*., 2009). اسانس های گیاهی علف-لیمو، آویشن و ریحان و همچنین مخلوط اسانس های علف-لیمو و و آویشن (به نسبت v/v 50/50) برای افراد بالغ سمیت متوسط داشت، اما مخلوط اسانس های علف لیمو، آویشن وگشنیز با نسبت (v/v/v 33.3:33.3:33.3) نمودار معکوس مرگ ومیر را ارائه داد به این معنی که مرگ و میر در دزهای پایین تر بیشتر است. این مساله این حقیقت را بیان می کند که زنبورها کیک زنبور آغشته به دزهای بالای اسانس گیاهی گشنیز را مصرف نمی کنند (Albo *et al*., 2008). زمانی که محلولی حاوی مقدار مشخصی از اسانس روی گروهی از زنبورها اسپری شد، مشخص شد که اسانس های جعفری مکزیکی، وگل اشرفی برای افراد بالغ زنبور عسل سمیت نداشت (Santos *et al*., 2012). در حالی که، اسانس گیاه درخت چای باعث مرگ افراد تحت تیمار بعد از گذشت ۷ روز شد. با این وجود، استفاده از نانوذرات اسانس درخت چای روی زنبور عسل اثر سمی نداشت (Santos *et al*., 2014). اسانس های گیاهان اکالیپتوس و رزماری و نانوامولسیون اسانس گیاه *Carapa officinals* برای افراد بالغ کارگر زنبورعسل سمی نبود زمانی که زنبورها کاملاً در معرض این اسانس ها قرار داشتند. نانوامولسیون *C. guianensis* روی لاروها و افراد بالغ زنبور اثر سمی داشت درحالی که نانوامولسیون *C. officinalis* یک اثر سمیت بسیار خفیف روی لاروهای زنبور عسل داشت (de Almeida *et al*., 2015).

۲-۳- آزمایشات *in vitro* برای کنترل بیماری لوک آمریکایی

تیمار کلنی های آلوده با اسانس *C. zeylanicum* به روش مدیریت سیستمی باعث پیش گیری و کنترل بیماری لوک آمریکایی شد (Gende *et al*., 2009). اسانس های آویشن، علف-لیمو، مرزنگوش و مرزه به تنهایی و مخلوط با همدیگر روی بخش مرکزی آلوده مصنوعی تست شده است اما هیچ اثر درمانی روی بیماری مشاهده نشده است (Albo *et al*., 2003).

۳- ترکیبات گیاهی

چندین ترکیب گیاهی در محیط *in vitro* برای کنترل عامل بیماری لوک امریکایی و همچنین سمیت حاد این ترکیبات روی زنبور عسل مورد ارزیابی قرار گرفته است(Alonso-Sances *et al*., 2017).

۳-۱- آزمایشات *in vitro* برای کنترل باکتری *P. larvae*

فعالیت آنتی میکروبی چندین ترکیب گیاهی مختلف *Flourensia riparia, F. fiebrigii* و *F. tortuosa* علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی مورد ارزیابی قرار گرفته است. عصاره های کلروفرم، اتیل اتر و هگزان در غلظت های مختلف (۱۰۰ تا ۵۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نشان دادند که خاصیت بازدارندگی رشد دارند (Reyes *et al*., 2013). عصاره های دی-کلرومتان و متانول از گونه های مختلف گل راعی نشان داد که حتی اگر به میزان ۲۵ میکروگرم مورد استفاده قرار گیرد، فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری عامل بیماری لوک دارد. فعالیت ضد میکروبی عصاره خام آبی درختان چریش و پنج انگشت هندی علیه باکتری عامل بیماری لوک نشان داد که وابسته به دز است که منطقه بازدارنده برای گیاه پنج انگشتی هندی بیش تر از درخت چریش بود(Anjum *et al*., 2015). عصاره اتیل اتری و کلروفرمی گیاه *F. riparia* و عصاره اتیل اتری گیاه *F. fiebrigi* باعث ممانعت از رشد باکتری عامل بیماری شد (Reyes *et al*., 2013). عصاره های آبی گیاهان دیگر نیز باعث ممانعت از رشد باکتری *P. larvae* شد. کمترین غلظت بازدارندگی[2] برای عصاره هگزانی گیاه *A. satureioides* از ۱۶ تا ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود (Sabate *et al*., 2012). در پژوهشی دیگر عصاره های هگزانی، بنزنی، اتیل اتر و اتیل استات گیاه *A. satureioides* برای کمترین غلظت بازدارندگی به ترتیب میزان ۶۰، ۱۳۱، ۷۷۳ و ۶۵۴۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. کمترین غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گیاه *Melia azedarach* به میزان ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

۳-۲- آزمایشات سمیت برای زنبور عسل

عصاره های متانول-دی کلرومتان که در محیط خشک تدخین و در *DMSO* پنج درصد محلول شده بود، تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر هر زنبور اثر سمی نداشت. عصاره خام گیاه *S. buxifolia* که با نسبت حجمی ۷:۳ با اتانول و آب به دست

2- Minimum inhibitory concentration

آمده بود و با بخشی از *n-butanol*، اتیل استات، وکلرومتان و دوباره در *DMSO* برای رسیدن به غلظت های نهایی ۵۰، ۲۵، ۶،۲۵ و ۱،۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر رسیده بود، روی زنبور عسل اسپری شد.

هیچ اثر سمی بعد از گذشت ۱۵ روز از اعمال تیمار روی زنبور عسل مشاهده نشد. به همین نحو، هیچ اثر سمی برای عصاره خام گیاه *N. officinalis* بعد از گذشت ۱۵ روز از تیمار مشاهده نشد. به هر حال، برخی مرگ ومیرهای زنبور عسل در طول سه روز اول اعمال تیمار عصاره اتیل استات *C. officinalis* و *C. domestica* مشاهده می شود. برای آنالیز اثر عصاره کلروفرم و اتیل اتر گیاه *F. fiebrigii* روی زنبورعسل بالغ، آزمون در معرض بودن کامل انجام شد. این عصاره ها، در اتانول ۹۶ درصد دوباره حل شد و هیچ اثر کشندگی برای زنبورهای در معرض عصاره در شرایط *in vitro* حتی در بالاترین غلظت های مورد مطالعه، مشاهده نشد (Reyes *et al*., 2013).

۴- بره موم

بره موم ترکیبی طبیعی است که توسط زنبورعسل از رزین گیاه ساخته می شود تا با آن سلول های کندو و ورودی کندو را بپوشاند. این ترکیب از مخلوط مواد مختلف از ترکیبات شیمیایی مختلف (۸۰ تا ۱۳۰ نوع ماده) تشکیل شده است که مهم ترین ترکیب آن پلی فنل ها (فلاونوئید و اسیدهای فنولیک)، ترپنوئید، استروئید و آمینواسیدها است که غلظت این ترکیبات با توجه به منطقه جغرافیایی و گیاهان موجود در آن منطقه متفاوت است (Burdock 1998). چندین خاصیت آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضد ویروسی، ترکیبات محافظت کننده کبد و ضد التهابی از بره موم گزارش شده است (Alonso-Salces *et al*., 2017). در این زمینه، چندین گزارش مبنی بر استفاده از بره موم مناطق جغرافیایی مختلف علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی وجود دارد(Alonso-Salces *et al*., 2017).

۴-۱- آزمایشات *in vitro* برای کنترل باکتری عامل بیماری لوک آمریکائی

Mlagand & Sulimanovic (1982) بره موم از کشور یوگوسلاوی را علیه این باکتری تست کردند و مشخص شد که عصاره ۵٪ و ۱۰٪ بره موم باعث توقف رشد باکتری عامل بیماری می شود. عصاره اتانولی بره موم کندوهای عسل منطقه *Uruguayan* نشان داد که باعث ایجاد توقف رشد در باکتری مورد نظر می شود. بره موم برزیلی که از گیاهان *Baccharis dracunculifolia* و *Veronia polyanthes* و هم چنین بره موم در شمال آمریکا از گیاه *Populous spp*. نیز چنین نتایجی را در بر داشت.

این بره موم ها عملکردی شبیه به آنتی بیوتیک ونکومیسین داشتند اما میزان مصرف آنتی بیوتیک ۳۰ میکروگرم مورد نیاز است اما باید ۹ میلی گرم از بره موم مورد استفاده قرار گیرد (Bastos *et al*., 2008). عصاره اتانولی بره موم از رومانی (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) نیز رشد باکتری عامل بیماری را متوقف کرد که این اثر به دلیل حضور فلاون ها، فلاونونل ها، فلاونون ها و دی هیدرووفلاونول بود. (Bilik-ova *et al*., 2013) بره موم از درخت صنوبر در بلغارستان را مورد مطالعه قرار داد و عصاره اتانولی را روی باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی آزمایش کرد. در این پژوهش مشخص شد که ۱۰۰ میکروگرم از عصاره بره موم نیاز است تا اثری شبیه به استفاده از ۱۰ میلی گرم آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین هیدروکلراید مشاهده شود.

(Boonasi *et al*., 2014) عصاره های متانولی، دی کلرومتان و هگزان از بره موم تایلند را مورد آزمایش قرار داد و مشخص شد که فقط عصاره متانولی (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) دارای خاصیت ضد میکروبی است که به خاطر ماده کاردانول (ترکیب فنولی از گیاهان خانواده *Anacardiacea*) است. Lindenfelser (1986) ۱۵ بره موم از ایالات متحده آمریکا را روی باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی مورد آزمایش قرار داد و کمترین میزان بازدارندگی را اندازه گیری کرد. همه نمونه ها سطح مشابهی را نشان دادند و مشخص شد که ترکیبات با غلظت کمتر از ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین میزان بازدارندگی را دارند. اغلب عصاره های اتانولی از بره موم های جمع آوری شده از آمریکا باعث ممانعت از رشد باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی می شود (Wilson *et al*., 2015).

۴-۲- آزمایشات سمیت برای زنبور عسل

سمیت حاد گوارشی از چندین بره موم روی زنبورهای عسل بالغ مورد آزمایش قرار گرفته است (Alonso-Salces *et al*., 2017). عصاره اتانولی بره موم از کشور اروگوئه برای زنبورعسل در غلظت ۵۰ درصد سمیت نداشت (Antunez *et al*., 2008).

در مقابل، عصاره اتانولی بره موم از شانه قدیمی مصری (LC_{50} = 1.404) نسبت به بره موم مصری (LC_{50} = 8.22) و چینی (LC_{50} = 15.04) سمیت بیشتری داشت.

۴-۳- مطالعات صحرایی و آزمایشات *vivo* برای

کنترل بیماری لوک آمریکایی

مطالعات صحرایی با استفاده از سیستم و اسپری کردن مورد آزمون قرار گرفته است. Lindenfelser (1968) نشان داد که علی رغم این که بره موم جمع آوری شده از شمال آمریکا در محیط آزمایشگاه خاصیت ضد میکروبی نشان داده است، اما روی کندوهای آلوده زنبورعسل موثر واقع نشده است. زمانی که زنبورها با بره موم که درعسل به غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شده بود، تغذیه شدند، آلودگی جدید مادامی که این تیمار در حال انجام بود مشاهده نشد، امّا زمانی که تیمار قطع شد، بیماری دوباره ظاهر گشت. این ترکیب روی زنبورهای بالغ سمیت نداشت هرچند که کارگرهای تازه بالغ شده بد شکل، مشاهده شد. کارایی بره موم های چینی و مصری با موم های قدیمی برای کنترل بیماری لوک آمریکایی روی کندوهای نژاد کارنیولان که به طور مصنوعی آلوده شده بودند مورد آزمون قرار گرفت. اضافه کردن ۰،۰۵ درصد از بره موم مصری به غذا اثر بسیار معنی دار و مثبتی بر جلوگیری رشد باکتری عامل بیماری لوک آمریکائی داشت؛ به طوری که باعث کاهش ۱۰۰ درصدی باکتری شد. این اثر شبیه زمانی بود که آنتی بیوتیک تیلوزین به میزان ۲۰۰ میلی گرم مورد استفاده قرار می گیرد. اثر عصاره بره موم چینی و بره موم مصری از موم قدیمی در غلظت های ۰،۰۱ ، ۰،۰۰۵ و ۰،۰۰۲۵ درصد اثر بسیار معنی داری نسبت به کلنی های تیمار نشده داشت(Kamel *et al*., 2013). در یک مورد دیگر، در کندویی در اروگوئه که در سال قبل بیماری لوک امریکایی داشت (علائم کلینیکی نداشت) با عصاره اتانولی بره موم (۶ درصد) محلول پاشی و هم چنین تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲۱ و ۴۲ روز از اعمال تیمار، تعداد اسپورهای باکتری عامل بیماری در هر گرم عسل به طور معنی داری کمتر از کلنی های تیمار نشده بود (Antunez *et al*., 2008).

۵- ژل رویال

ژل رویال یا ژله لاروی رژیم غذایی لاروی ملکه و لارو کارگر زنبورعسل است که توسط غده های آرواره ای و هیپوفارینکس ترشح می شود. ماده اصلی ژل رویال شامل کربوهیدرات ها، پپتیدها، پروتئین ها، چربی، و ترکیبات با وزن مولکولی کم هستند (Bogdanov 2011). پروتئین های با وزن مولکولی کم و پپتیدهای ژل رویال به نظر می رسد که نقش دفاع از زنبورعسل را علیه پاتوژن های زنبورعسل بازی می کنند. اولین ترکیب آنتی بیوتیکی شناسایی شده در ژل رویال یک اسید چرب 10-hydroxy-Δ2-decenoic acid بود. بعد از آن، یک پروتئین ضد باکتریایی به نام رویالیسین (در حال حاضر به نام defensin1 می شناسند) در ژل رویال یافت شد. رویالیسین خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری های گرم مثبت در غلظت پایین دارد اما علیه باکتری های گرم منفی اثری ندارد. مشخص شده است که ژل رویال خاصیت ضد باکتریایی، تنظیم کننده سیستم ایمنی، ضد تومور، ضد التهاب، فعالیت کننده تولید مثل، ضد ویروس و آنتی اکسیدانی دارد. به طور اختصاصی، فعالیت ضد میکروبی ژل رویال از مناطق مختلف جغرافیایی علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی در منابع مختلف گزارش شده است (Alonso-Salces *et al*., 2017).

استفاده از ژل رویال برای کنترل باکتری عامل بیماری لوک برای اولین بار توسط (Hornitzky *et al*., 1998) مشاهده شد. سپس، گزارش شد که رویالیسین تخلیص شده حتی در غلظت های کم (۵،۴ میکروگرم بر میلی لیتر) اثر بازدارندگی روی پاتوژن ها دارد. پروتئین های دیگر که در ژل رویال یافت می شود، Apalbumin است. بیشترین ماده ای که در ژل رویال حضور دارند (Apalbumin-2 و Apal-bumin-2a) تخلیص شده است و فعالیت آن ها علیه باکتری عامل بیماری لوک در محیط کشت مایع مورد ارزیابی قرار گرفته است. Apalbumin-2a به میزان ۱۸،۶ میکرومولار رشد باکتری را مثل آنتی بیوتیک اکسی-تتراسایکلین هیدروکلراید ممانعت می کند در حالی که Apalbumin-2 هیچ فعالیت ضدباکتریایی ندارد. آنالیز ترکیبات ژل رویال از دو کندوی متفاوت که یکی از آن ها بیماری لوک مشاهده شده بود نشان داد که پپتیدهای ضد میکروبی در دو کندو متفاوت است. اغلب کلنی هایی که به بیماری لوک آمریکایی آلوده بودند، میزان رویالیسین بیشتری نسبت به کندوهای سالم تولید می کنند. این نتایج نشان می دهد که تفاوت در میزان پپتیدها به تنوع ژنتیکی بین کلنی ها مربوط می شود. هرچند، این احتمال نیز وجود دارد که حضور باکتری می تواند میزان رویالیسین را در ژل رویال تحت تاثیر قرار دهد (Bachanova *et al*., 2002).

۶- باکتری ها و باکتریوسین ها

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که اگر به میزان کافی مصرف شوند می توانند سلامتی را برای میزبان به ارمغان بیاورند. این میکروارگانیسم ها باید یک سری

شرایط را با هم داشته باشند: توانایی چسبیدن به سلول، از بین بردن و یا کاهش دادن چسبندگی پاتوژن، بقا و چند برابر شدن و تولید اسید، هیدروژن پروکسید و آنتاگونیست های باکتریوسین برای جلوگیری از رشد پاتوژن ها. هم چنین، مهم است که میکروارگانیسم ها ایمن و غیر مهاجم باشند و سرطان زا و بیماری زا نباشند. یک پیشنهاد این است که میکروارگانیسم ها از همان میزبانی که قرار است تیمار علیه آن اجرا شود، جدا شده و تخلیص شود. زنبورهای عسل میکروبیوم بسیار قوی دارند که می توانند منبع مناسبی از پروبیوتیک ها باشد. باکتری های لاکتیک اسید در معده زنبورهای عسل یافت می شوند و مشخص شده است که میزبانشان را از طریق تولید متابولیت های ضد میکروبی مثل اسیدهای آلی، هیدروژن پروکسید، و پپتیدهای ضدمیکروبی و هم چنین تعدیل در سیستم ایمنی حشرات کمک می کنند (Parichehre *et al*., 2017). بسیاری از این باکتری های مفید در افراد بالغ زنبورعسل، لاروها، تولیدات کندو مثل گرده و عسل می باشند. باکتریوسین ها ترکیبات سنتزشده ریبوزومی باکتری ها، پپتیدهای برون سلولی و پروتئین هایی با فعالیت ضد باکتریایی که اغلب روی گونه های باکتری های نزدیک به باکتری های تولیدکننده فعالیت دارند، است. باکتری ها و باکتریوسین ها نیز برای کنترل باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی مطالعه شده اند (Alonso-Salces *et al*., 2017).

۶-۱- مطالعات *in vitro* برای کنترل باکتری عامل بیماری

ایزوله باکتری هایی که از معده لاروها و یا افراد بالغ به دست آمده است متعلق به جنس های *Brevibacillus, Stenotrophomonas, Bacillus, Acinetobacter, Lactobacillus* و *Bifidobacterium* است که فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی نشان داده اند. اثبات شده است که بسیاری از این ایزوله ها که تولید سورفاکتین (آنتی-بیوتیک با اثر ضدتوموری و ضدویروسی) می کنند (Sabate *et al*., 2009). میکروارگانیسم های *Escherichia coli, Providencia alcalifaciens,) Splingomonas melonis, Bacillus subtilis* و *Weissella*) که از معده زنبورعسل بزرگ *Apis carana japonica* جدا شده است، دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی دارد (Yoshiyama *et al*., 2013). ایزوله هایی از گونه های مختلف باکتری های هوازی تولید کننده اسپور که از نمونه های عسل و شان نوزادان جدا شده است، دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه باکتری لوک آمریکایی بوده است. ده استرین تولیدکننده اسپور هوازی شامل *Bacillus subtilis, Bacillus umilus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, B. cereus* و *Brevibacillus laterosporus* می باشد. علاوه بر فعالیت سلول های باکتریایی، فاز رویی [3] لوله های آزمایشگاهی فاقد باکتری از باکتری های *Lactobacillus acidophilus, L. crispatas* و *L. jonsonii* که از معده زنبوران کارگر به دست می آید، نیز فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری عامل بیماری نشان داده است. فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری عامل بیماری از فاز روئی فاقد سلول باکتری از گونه *B. thuringiensis subsp. Entomocidus* و ماده انتوموسین ۱۱۰[4] (باکتریوسین که از گونه مشابه *Bacillus* جدا شده است) مورد آزمون قرار گرفت و مشخص شد که فعالیت بازدارندگی علیه ۱۷ استرین از باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی را دارد. با توجه به عصاره فاز روئی بدون سلول باکتری از ۳۶ ایزوله *Enterococcus*، بیست ایزوله دارای قدرت بازدارندگی قوی بود اما ۱۶ ایزوله در حد متوسط بازدارندگی داشت. علاوه بر این ها، باکتری های خاک نیز منبع مناسبی از میکروارگانیسم هایی است که فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری لوک آمریکایی دارد. (Nguyen & kim (2015 وجود فعالیت ضدمیکروبی قوی باکتری *Bacillus polymachus* و *Streptomyces polymachus* روی باکتری عامل بیماری لوک امریکایی را اثبات کردند. هم چنین، ماده ضدمیکروبی که توسط باکتری *B. amyloliquefaciens* تولید می شود نیز دارای خاصیت ضد میکروبی علیه اسپورها و سلول های رویشی باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی دارد.

۶-۲- آزمایشات سمیت برای زنبور عسل

سمیت باکتری ها و باکتریوسین ها روی زنبور عسل از روش سیستمی مورد آزمون قرار گرفته است. غذای لاروی که با فاکتور ضدمیکروبی خام و خالص شده باکتری *B. amyloliquefaciens* مورد آزمون قرار گرفت. لاروهای زنبورعسل ۲۵ درصد مرگ-ومیر داشتند در حالی که مرگ و میر در گروه شاهد ۱۵ درصد بود. در آزمایشات در معرض سم بودن، لاروهای زنبور عسل با مخلوطی از باکتری های *Lactobacillus kunkeii, Lactobacillus sp. , Bifidiobacterium asteroids* و *Bifidobacterium*

3- Supernatant

4- Entomocin

coryneforme تغذیه شدند. اثر کلی اضافه کردن باکتری های اسید لاکتیک به غذای لاروی باعث کاهش معنی دار در لاروهای آلوده شد(Forsgen *et al.*, 2010).

۷- بحث و نتیجه گیری

با توجه به اثرات منفی باکتری *P. larvae* روی کلنی های زنبورعسل و بازگشت به روش های قدیمی و سنتی برای کنترل بیماری لوک آمریکایی، توسعه روش های جایگزین و موثر برای کنترل و پیشگیری بیماری ضروری است. در بین استراتژی های طبیعی که در چند سال اخیر توسعه پیدا کرده است، استفاده از اسانس های گیاهی یک روش بسیار مطمئن و قابل قبول بوده است. اسانس دارچین بهترین ویژگی یک ترکیب طبیعی را برای کنترل دارد که نشان می دهد بیشترین اثر ضد میکروبی نیز دارد که اثر کنترل خوبی علیه بیماری لوک آمریکایی دارد و هم چنین سمیت برای زنبور عسل بالغ ندارد، اگرچه سمیت آن برای لاروهای زنبورعسل باید مورد آزمون قرار گیرد. نانوامولسیون اسانس گیاه همیشه بهار *C. officinalis* نیز خاصیت ضدمیکروبی بالایی علیه باکتری عامل بیماری لوک آمریکایی دارد و سمیت کمی روی لاروهای زنبور دارد؛ از این رو پیشنهاد شده است که به عنوان یک روش جایگزین علیه بیماری لوک آمریکایی مورد استفاده قرار گیرد. به علاوه، نانوامولسیون ها می توانند اثر بخشی اسانس های گیاهی را تقویت کنند و از میزان فراریت اسانس ها بکاهند. اگر اسانس ها با دیگر مواد فعال مثل ترکیبات گیاهی، ترکیبات طبیعی فردی، یا دیگر اسانس ها و یا ترکیبات مهم اسانس ها ترکیب شوند، کارایی تیمارها افزایش می یابد.

هم چنین، بره موم و ژل رویال و پروتئین ژل رویال، رویالیسین و apalbumin-2a در محیط *in vitro* فعالیت بازدارندگی رشد علیه باکتری عامل بیماری نشان داده است؛ بنابراین مطالعات آینده باید روی نقش این ترکیبات در محافظت از لاروهای زنبور علیه باکتری عامل بیماری متمرکز شود. علاوه بر این، پروبیوتیک ها می توانند سلامت زنبورعسل را بهبود ببخشند در واقع چندین باکتری که از زنبورها و کندو جدا شده-اند نشان داده اند که دارای فعالیت بازدارندگی رشد برای باکتری عامل بیماری هستند و استفاده خوراکی از مخلوط باکتری های اسید لاکتیک برای غذای لاروها باعث کاهش معنی دار در تعداد لاروهای آلوده می شود.

علی رغم همه این پیشرفت ها در استراتژی های جایگزین طبیعی برای مبارزه با بیماری لوک آمریکایی، این حقیقت که باکتری عامل بیماری یک باکتری تولیدکننده اسپور است مهم ترین دلیل محدودیت برای درمان بیماری در حال حاضر است، چون که اندوسپور این باکتری بسیار مقاوم است. برخی از ترکیبات طبیعی مطالعه شده مثل اسانس گیاه دارچین، برخی عصاره های اتانولی بره موم، هایپرفورین و یک ترکیب تولید شده توسط باکتری *B. amyloliquefaciens* دارای فعالیت آنتی میکروبی علیه باکتری عامل بیماری است و دارای فعالیت اسپورکشی هستند. هرچند که هیچ کدام از این ترکیبات باعث ریشه کنی بیماری لوک آمریکایی در کندو نشده است.

تحقیقات انجام شده روی فعالیت ضد میکروبی ترکیبات طبیعی علیه بیماری لوک و همچنین سمیت این ترکیبات روی زنبور عسل در محیط *in vivo* و *in vitro* در این مقاله مورد بحث قرار گرفت. با توجه به این که لاروهای زنبور عسل هدف اصلی بیماری لوک آمریکایی هستند، مطالعات آینده باید روی مطالعه ترکیباتی که روی بیماری موثرند و روی زنبوروهای بالغ ولارو اثر سمیت ندارند، متمرکز شود و هم چنین، مطالعات آینده روی پراکنش و اثرات این ترکیبات روی کندو، زنبورهای بالغ، لاروها، عسل، ژل رویال و دیگر تولیدات کندو ضروری است تا اثرات دارویی و دینامیک دارویی این ترکیبات در کندو مشخص شود. هم-چنین، تحقیقات روی کارایی این ترکیبات ضد میکروبی در شرایط مزرعه باخاصیت اسپورکشی باید انجام شود تا از گسترش بیماری لوک آمریکایی جلوگیری کند. توسعه روش های رسیدن این ترکیبات طبیعی به درون کندو و دریافت توسط زنبور در تیماری های *in vivo* و پیشگیری از بیماری یک موضوع مهم دیگر است که نیاز به مطالعات بیشتری در آینده دارد تا این ترکیبات و استراتژی های طبیعی در شرایط طبیعی استفاده شوند.

منبع ها:

Albo, G. N., Henning, C., Ringuelet, J., Reynaldi, F. J., De Giusti, M. R., & Alippi, A. M. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. Apidologie, 34 (5): 417-427.

Albo, G. N., Reynaldi, F. J., Yordáz, M., & Henning, C. 2008. Toxicidad de aceites esenciales con efecto fungistático sobre Ascosphaera apis en larvas y adultos de *Apis mellifera*. Veterinaria Cuyana, 1, 16-22.

Alonso-Salces, R. M., Cugnata, N. M., Guaspari, E., Pellegrini, M. C., Aubone, I., De Piano, F. G., ... & Fuselli, S. R. 2017. Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in honey bees: a review. Apidologie, 48 (3): 387-400.

Ashiralieva, A., & Genersch, E. 2006. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees–a review. Apidologie, 37 (4): 411-420.

Ashiralieva, A., & Genersch, E. 2006. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees–a review. Apidologie, 37 (4): 411-420.

Bachanová, K., Klaudiny, J., Kopernický, J., & Šimúth, J. 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. Apidologie, 33 (3): 259-269.

Bastos, E. M. A., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., & Spivak, M. 2008. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology, 97 (3): 273-281.

Bogdanov, S. 2011. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. Lipids, 3 (8): 8-19.

Boonsai, P., Phuwapraisirisan, P., & Chanchao, C. 2014. Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. International journal of medical sciences, 11 (4): 327.

Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food and Chemical toxicology, 36 (4): 347-363.

Almeida Vaucher, R., Giongo, J. L., Bolzan, L. P., Côrrea, M. S., Fausto, V. P., dos Santos Alves, C. F., ... & Brandelli, A. 2015. Antimicrobial activity of nanostructured Amazonian oils against Paenibacillus species and their toxicity on larvae and adult worker bees. Journal of Asia-Pacific Entomology, 18 (2): 205-210.

De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., ... & Tomkies, V. 2006. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. Letters in applied microbiology, 43 (6): 583-590.

Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., ... & Daniel, R. 2014. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One, 9 (3): e90914.

Forsgren, E., Olofsson, T. C., Váasquez, A., & Fries, I. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. Apidologie, 41 (1): 99-108.

Gende, L. B., Maggi, M. D., Fritz, R., Eguaras, M. J., Bailac, P. N., & Ponzi, M. I. 2009. Antimicrobial activity of Pimpinella anisum and Foeniculum vulgare essential oils against *Paenibacillus larvae*. Journal of Essential Oil Research, 21 (1): 91-93.

Hornitzky, M. A. 1998. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subs*P. larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. Journal of apicultural research, 37 (4): 267-271.

Kamel, A. A., Moustafa, A. A., & Nafea, E. A. 2013. Propolis as a natural antibiotic to control American foulbrood disease in honey bee colonies. Afr. J. Agric. Res, 8 (23): 3047-3062.

Kochansky, J., Knox, D. A., Feldlaufer, M., & Pettis, J. S. 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and-resistant *Paenibacillus larvae*. Apidologie, 32 (3): 215-222.

Lindenfelser, L. A. 1968. Invivo activity of propolis against Bacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 12 (1): 129-131.

Mutinelli, F. 2003. European legislation governing the authorization of veterinary medicinal products with particular reference to the use of drugs for the control of honey bee diseases. Apiacta, 38: 156-168.

Nguyen, T. M., & Kim, J. 2015. *Bacillus* polymachus sp. nov., with a broad range of antibacterial activity, isolated from forest topsoil samples by using a modified culture method. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65 (2): 704-709.

Parichehreh, S., Tahmasbi, G., Sarafrazi, A., Imani, S., & Tajabadi, N. 2018. Isolation and identification of *Lactobacillus bacteria* found in the gastrointestinal tract of the dwarf honey bee, *Apis florea Fabricius*, 1973 (Hymenoptera: Apidae). Apidologie, 49 (3): 430-438.

Reyes, M. G., Torres, M. J., Maggi, M. D., Marioli, J. M., Gil, R. R., Sosa, V. E., ... & Audisio, M. C. 2013. In vitro inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from Flourensia spp. Industrial crops and products, 50:758-763.

Sabaté, D. C., Carrillo, L., & Audisio, M. C. 2009. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus* subtilis isolated from honeybee gut and honey samples. Research in Microbiology, 160 (3): 193-199.

Santos, R. C. V., dos Santos Alves, C. F., Schneider, T., Lopes, L. Q. S., Aurich, C., Giongo, J. L., ... & de Almeida Vaucher, R. 2012. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. Journal of invertebrate pathology, 109 (3): 265-268.

Santos, R. C. V., Lopes, L. Q. S., dos Santos Alves, C. F., Fausto, V. P., Pizzutti, K., Barboza, V., ... & Morinaga, Y. 2014. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. Journal of Asia-Pacific Entomology, 17 (3): 343-347.

Wilson, M. B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G., & Cohen, J. D. 2015. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Journal of invertebrate pathology, 124: 44-50

Natural strategies for the control of *Paenibacillus larvae* ، the causative agent of American foulbrood in honey bees

M. Nikooei[1], CH. Hemmati[1],Shasbnam Parichehreh[2]

1- Department of Agriculture, Minab Higher Education Institute, Hormozgan University, BandarAbbas. Iran

2- Department of Honeybee،Animal Science Research Institue of Iran،Agricultural Research Education and Extension Organization،Karaj،Iran

DOI: 10.22092/hbsj.2018.123512.1067

Abstract

American foulbrood)AFB(is a severe bacterial disease that affects larvae of honey bees)*Apis mellifera*(. The causative agent of AFB is the spore-forming bacteria *Paenibacillus larvae*. The use of antibiotics for the control of AFB has led to the appearance of resistant bacterial strains and residues in beehive products. Nowadays, antibiotics are legally banned in several countries, and the affected colonies have to be destroyed by burning the hives. Therefore, the development of alternative methods for the control and prevention of AFB is necessary. In this context, different natural strategies based on the application of essential oils, plant extracts, propolis, royal jelly, bacteria, and bacteriocines, have been studied *in vitro* and *in vivo* for the prevention and control of *P. larvae*. The experimental data achieved from these studies are reviewed and discussed in the present review, which intend to be a starting point for future research in the field.

Key words: *Paenibacillus larvae,* American foulbrood*,* Honeybee*,* Natural Products

Corresponding Author: Ch. Hemmati

Email: chamran.hemmati@gmail.com