دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
دوره ۱۶، شماره ۲۹، سال ۱۴۰۳، (۵۷-۶۶)

جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس همزیست دستگاه گوارش زنبورعسل (*Apis Mellifera*)

شهرزاد نسرین[۱]، مهدی مخبر[۲*]، علی هاشمی[۳]، شهین زمردی[۴]، شبنم پری‌چهره[۵]

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴- دانشیار بخش تحقیقات فنی و مهندسی، مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران
۵- بخش تحقیقات زنبورعسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱ **تاریخ پذیرش**: ۱۴۰۳/۷/۱۵
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22034/HBSJ.2024.365835.1165
رایانامه: m.mokhber@urmia.ac.ir

چکیده:

زنبورعسل حشره‌ی مفیدی است که نقش اساسی در گرده‌افشانی محصولات کشاورزی و حفظ اکوسیستم دارد، و از این طریق سهم قابل توجهی در امنیت غذایی و تولید ناخالص ملی کشورها دارد. با توجه به اینکه حفظ زنبورعسل در طبیعت و کمک به گرده‌افشانی از طریق زنبورعسل، صرفاً منوط بر اقتصادی بودن صنعت زنبورعسل و تمایل زنبورداران به پرورش این حشره است. بنابراین افزایش عملکردی تولید کلنی‌های زنبورعسل در کنار حفظ تنوع ژنتیکی، از اهداف اصلی اصلاحگران و سیاستگذاران حوزه زنبورعسل است. یکی از روش‌های متداول و پرکاربرد جهت حفظ زنبور در طبیعت و صنعت زنبورداری، افزایش عملکرد تولیدی و تولیدمثلی و در نهایت بهره‌وری زنبورعسل با توسعه‌ی روش‌های تغذیه‌ای دانش‌محور است. در این راستا، در پژوهش حاضر اقدام به جداسازی و شناسایی

باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌زیست دستگاه گوارش زنبورعسل شد. از این اطلاعات و ترکیبات میکروبی جدا شده می‌توان در تخمیر مکمل‌های غذایی تکمیلی زنبورعسل و کمک به قابلیت هضم غذاهای تولیدی مخصوص زنبورعسل استفاده کرد. هدف از پژوهش حاضر جداسازی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش زنبورهای عسل در مناطقی از استان‌های آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌شرقی و گیلان و بررسی شاخص‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها است. در این مقاله نحوه‌ی نمونه‌گیری، جداسازی جدایه‌های باکتری‌ها از دستگاه گوارش زنبور ارائه شده و باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش زنبور با استفاده از تست‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم، شناسایی و گروه‌بندی شدند. در نهایت تشخیص سویه‌های مورد نظر زیر میکروسکوپ، نحوه‌ی نگهداری و کشت آنها ارائه شده است. در این آزمایش با تعیین توالی کلنی از باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل، سویه‌های مختلف باکتری متعلق به گونه‌های Lactobacillus plantar-، Lactobacillus kunkeei، Lactobacillus apis، Enterococcus faecalis، و Ente-rococcus hirae از مناطق شمال (استان گیلان) و شمال‌غرب (آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی) ایران شناسایی شدند.

کلیدواژه: آپیس ملیفرا، پروبیوتیک، اسید لاکتیک، گرده‌افشانی

مقدمه

زنبورعسل حشره‌ای مفید است که نقش اساسی در گرده‌افشانی محصولات کشاورزی و حفظ اکوسیستم دارد و از این طریق سهم قابل توجهی در امنیت غذایی و تولید ناخالص ملی کشورها دارد. از این رو مطالعات صورت گرفته روی زنبورعسل ارزشمند هستند. با توجه به اطلاعات منتشره در خصوص اهمیت زنبورعسل در گرده‌افشانی، قطعاً زنبورعسل یکی از پایه‌های اصلی امنیت زیستی، مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز کشاورزی و محیط زیست پایدار است (Mokhber & Ghaffari, 2019). با توجه به اینکه حفظ زنبورعسل در طبیعت و کمک به گرده‌افشانی از طریق زنبورعسل، صرفاً منوط بر اقتصادی بودن صنعت زنبورعسل و تمایل زنبورداران به پرورش این حشره‌ی مفید است. بنابراین افزایش عملکردی تولید کلنی‌های زنبورعسل در کنار حفظ تنوع ژنتیکی، از اهداف اصلی اصلاحگران و سیاست‌گذاران حوزه زنبورعسل است (Lotfi *et al*., 2024). یکی از روش‌های متداول و پرکاربرد جهت حفظ زنبور در طبیعت و صنعت زنبورداری، افزایش عملکرد تولیدی و تولیدمثلی و نهایتا بهره‌وری زنبورعسل با توسعه‌ی روش‌های تغذیه‌ای دانش‌محور است (Nemati *et al*., 2022; Taghavi *et al*., 2022). در این راستا در پژوهش حاضر اقدام به جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌زیست دستگاه گوارش زنبورعسل شد (Moradi *et al*., 2022; Parichehreh *et al*., 2018). از این اطلاعات و ترکیبات میکروبی جدا شده می‌توان در تخمیر مکمل‌های غذایی تکمیلی زنبورعسل و کمک به قابلیت هضم غذاهای تولیدی مخصوص زنبور استفاده کرد (Nemati *et al*., 2022).

یکی از حوزه‌های مطالعاتی بخش زنبورعسل، مطالعه‌ی میکروارگانیسم‌های موجود در بدن و محصولات تولیدی زنبورعسل است. در دنیای حشرات، تعامل نزدیکی بین حشرات و میکروارگانیسم‌های مستقر در دستگاه گوارش، سلول‌ها یا اندام‌های تخصصی آنها وجود دارد. میکروارگانیسم‌های موجود در روده حیوانات می‌توانند با کمک به هضم غذا، سم‌زدایی مولکول‌های مضر، تامین مواد مغذی ضروری، محافظت در برابر پاتوژن‌ها و انگل‌ها و بهبود توسعه و ایمنی به میزبان خود کمک کنند (En-gel & Moran, 2013). روده‌ی حشره به‌عنوان اندامی با تنوع میکروبیولوژیکی بالا در نظر گرفته می‌شود که رشد پاتوژن‌ها به‌طور مؤثری توسط میکروبیوتای پروبیوتیک جلوگیری می‌شود. میکروبیوتای باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) به شیوه‌ی هم‌افزایی کار می‌کنند. آنها پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای آلی، آنزیم ها و باکتریوسین را به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی تولید می‌کنند (Aween *et al*., 2012).

میکروبیوتای مرتبط با زنبورعسل (*Apis mellifera* L.) پیچیده است که عمدتاً از مخمرها، باکتری‌های گرم مثبت (مانند لاکتوباسیلوس، باسیلوس، استرپتوکوک و کلستریدیوم) و باکتری‌های گرم منفی (آکروموباکتر، سیتروباکتر، انتروباکتر، اشریشیاکلی، فلاووباکتریوم، و کلستریوم) تشکیل شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک مخصوص زنبورعسل شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*)، لاکتوباسیلوس جانسونی (*Lactobacillus johnsonii*)، لاکتوباسیلوس برویس (*Lac-tobacillus brevis*)، لاکتوباسیلوس آپیس (*Lactobacillus apis*) و غیره می‌باشد که اثر بازدارنده‌ای بر پاتوژن‌های زنبورعسل دارند (Lamei *et al*., 2017). باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) نقش مهمی در بسیاری از زمینه‌های

متنوع بیوتکنولوژی مواد غذایی، تغذیه، سلامت و ایمنی با محافظت از آنها در برابر پاتوژن‌های زنبورعسل دارند. آنها نقش اساسی در تولید تمام محصولات لبنی و تولید بسیاری از غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری دیگر ایفا می‌کنند (Widyastuti & Febrisiantosa, 2014). باکتری‌های اسید لاکتیک از گروه‌های باکتریایی مهم در صنایع غذایی مانند محصولات لبنی محسوب می‌شوند. علاوه بر این، سایر سویه‌های LAB به‌عنوان میکروارگانیسم‌های غذایی ایمن یا پروبیوتیک‌ها در نظر گرفته می‌شوند و در تغذیه سلامت انسان و اقدامات مرتبط با سلامت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Aplevicz *et al.*, 2014). پروبیوتیک‌ها موجود در انسان و سایر حیوانات نقش مهمی در محافظت از میزبان از طریق تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی و القای پاسخ‌های ایمنی دارد. در این مطالعه یک پروتکل بهینه شده برای جداسازی و نگهداری باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌زیست دستگاه گوارش زنبورعسل اجرا و ارائه شد. نمونه‌ها تست شده از بخش‌های شمال و شمال‌غرب کشور تهیه شده بودند.

مواد و روش‌ها

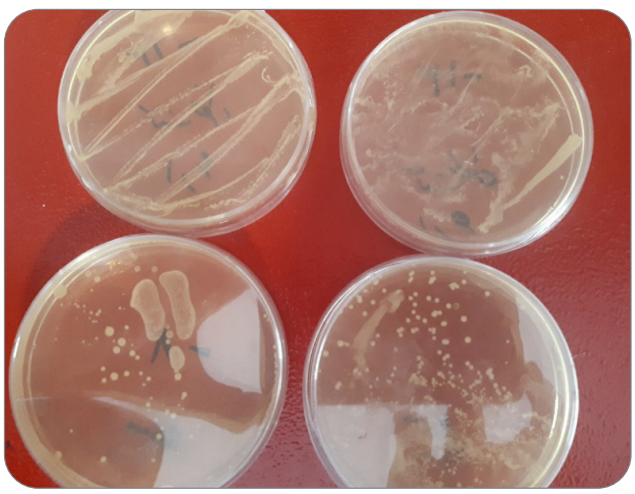
در این تحقیق تعداد ۱۴ نمونه زنبورعسل از سه استان آذربایجان غربی (هشت زنبورستان از شهرستان‌های ارومیه، خوی، میاندواب و پیرانشهر)، آذربایجان شرقی (چهار زنبورستان از شهرستان‌های مراغه و عجب شیر) و گیلان (دو زنبورستان از شهرستان‌های املش و تالش) تهیه شد. نمونه‌های زنبور تهیه شده، به‌صورت زنده به آزمایشگاه منتقل شدند. دستگاه گوارش ۳۰ عدد زنبورعسل از هر کلنی بر اساس روش Tajabadi و همکاران (۲۰۱۲) جداسازی شد.

کشت باکتری در محیط مایع

پس از خارج کردن دستگاه گوارش زنبورعسل و جدا کردن نیش آن، روده‌ها به داخل لوله‌های حاوی ۱۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی منتقل شد. جهت غنی سازی و رشد لاکتوباسیل‌ها، سرم فیزیولوژی حاوی دستگاه گوارش زنبورها به لوله‌های حاوی محیط MRS براث منتقل شد و مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بی‌هوازی انکوبه گردید.

کشت در محیط MRS آگار جهت به‌دست آوردن تک‌کلنی

از رقت‌های مختلف یک میلی‌لیتر از رقت‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط MRS آگار (شکل ۱) منتقل شده و به آرامی با میله‌ی شیشه‌ای L شکل در سطح پلیت پخش گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت شرایط بی‌هوازی انکوبه شد. برای به‌دست آوردن تک‌کلنی از پلیت‌های حاوی MRS آگار که باکتری‌ها به‌صورت تک‌کلنی رشد کرده باشند. مقداری از باکتری‌ها، با استفاده از آنس استریل، به‌صورت جداگانه برداشته و در پلیت‌های MRS آگار به‌فرم خطی کشت داده شدند. با توجه به اینکه باکتری‌های پروبیوتیک گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند. لذا جهت شناسایی و جداکردن باکتری‌های پروبیوتیک، تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم انجام شد.



شکل ۱ - نمونه‌ای از پلیت‌های کشت شده برای به‌دست آوردن تک‌کلنی

تست کاتالاز

آنزیم کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. پراکسید هیدروژن یک محصول متابولیک سمی برای باکتری‌هاست. اگر آب اکسیژنه در محیط تجمع یابد، برای برخی باکتری‌ها سمی و خطرناک است. اما باکتری‌های هوازی و غیرهوازی اختیاری با تولید آنزیم‌های کاتالاز موجب شکسته شدن H2O2 و آزادی مولکول اکسیژن می‌شوند و از مرگ رهایی می‌یابند. به‌عبارت دیگر، تولید کاتالاز توسط برخی از باکتری‌ها در حقیقت نوعی مکانیسم دفاعی برای آنها محسوب می‌شود. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن می‌شکند و در نتیجه حباب ایجاد می‌شود. اما اگر باکتری‌ها کاتالاز منفی باشند، حباب ایجاد نمی‌شود که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک کاتالاز منفی هستند.

جهت آزمایش کاتالاز ابتدا یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳ درصد را روی یک لام خشک و تمیز قرار داده و مقدار کمی از کشت خالص باکتری به آن اضافه شده و پخش گردید. سپس نمونه‌های باکتری از نظر آزاد شدن حباب‌های گاز اکسیژن مورد بررسی قرار گرفتند. آزاد شدن حباب‌های گاز نشان دهندهٔ وجود آنزیم کاتالاز در باکتری است که موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. در این مرحله باکتری‌های کاتالاز منفی انتخاب شده و عمل رنگ‌آمیزی روی آنها اعمال شد.

رنگ آمیزی به روش هوکر

با توجه به اینکه باکتری‌های اسید لاکتیک گرم مثبت هستند، در این مرحله رنگ‌آمیزی گرم بر روی تمام نمونه‌ها به‌صورت زیر انجام شد.

الف- تهیه گسترش و تثبیت کردن: ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی استریل روی لام قرار داده شده و سپس مقدار کمی از کلنی با استفاده از آنس یا لوپ استریل افزوده و ترکیب موجود تا حصول سوسپانسیون یکنواخت مخلوط شد. سپس لام در هوا خشک شده و برای فیکس کردن گسترش خشک شده لام‌ها ۲ تا ۳ بار از میان شعله عبور داده شدند.

ب - رنگ آمیزی با کریستال ویوله: در این مرحله مقداری رنگ کریستال ویوله با استفاده از قطره چکان به روی سطح گسترش میکروبی روی لام‌ها اضافه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان یک دقیقه جهت نفوذ رنگ به دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها، رنگ اضافی روی لام‌ها خالی و با استفاده از آب شیر با فشار کم شستشو داده شد.

ج-مرحله اضافه کردن محلول لوگل: چند قطره از محلول لوگل روی گسترش ریخته شده و پس از گذشت یک دقیقه محلول اضافی خالی و با آب شیر همانند مرحله قبل شستشو داده شد.

د- مرحله رنگ بری با استفاده از الکل- استون: برای رنگ‌بری از محلول رنگ بر الکل –استون بر روی گستره ریخته شده تا نمونه‌ها بی‌رنگ شود. این مرحله حدود ۳۰ ثانیه زمان لازم دارد. سپس لام‌ها به‌سرعت شستشو داده شدند.

ه-رنگ آمیزی با سافرانین: در این مرحله سطح گسترش با استفاده از رنگ ثانویه یعنی سافرانین پوشانیده و پس از ۳۰ ثانیه رنگ اضافی خالی و لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند.

و- خشک کردن: لام‌های رنگ آمیزی شده در وضعیت ایستاده در مجاورت هوا خشک شدند.

ز-مشاهده و بررسی لام‌های رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ: پس از قرار دادن یک قطره روغن صدر روی لام‌ها، نمونه‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

آنزیم کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. پراکسید هیدروژن یک محصول متابولیک سمی برای باکتری‌هاست. اگر آب اکسیژنه در محیط تجمع یابد، برای برخی باکتری‌ها سمی و خطرناک است. اما باکتری‌های هوازی و غیرهوازی اختیاری با تولید آنزیم های کاتالاز موجب شکسته شدن H2O2 و آزادی مولکول اکسیژن می‌شوند و از مرگ رهایی می‌یابند. به‌عبارت دیگر، تولید کاتالاز توسط برخی از باکتری‌ها در حقیقت نوعی مکانیسم دفاعی برای آنها محسوب می‌شود. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن می‌شکند و در نتیجه حباب ایجاد می‌شود. اما اگر باکتری‌ها کاتالاز منفی باشند، حباب ایجاد نمی‌شود که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک کاتالاز منفی هستند.

جهت آزمایش کاتالاز ابتدا یک قطره از پراکسید هیدروژن ۳ درصد را روی یک لام خشک و تمیز قرار داده و مقدار کمی از کشت خالص باکتری به آن اضافه شده و پخش گردید. سپس نمونه‌های باکتری از نظر آزاد شدن حباب‌های گاز اکسیژن مورد بررسی قرار گرفتند. آزاد شدن

حباب‌های گاز نشان دهندهٔ وجود آنزیم کاتالاز در باکتری است که موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. در این مرحله باکتری‌های کاتالاز منفی انتخاب شده و عمل رنگ‌آمیزی روی آنها اعمال شد.

تشخیص سویه های مورد نظر زیر میکروسکوپ

باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک باکتری‌های گرم مثبت و معمولا میله‌ای و کوکسی هستند که بدون هاگ و عمدتاً غیرمتحرك، پلی‌مرفیک می‌باشند. سپس باکتری‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک (نمونه های باکتری کاتالاز منفی و گرم مثبت هستند) بر اساس اطلاعات به دست آمده از روش رنگ آمیزی و تست کاتالاز شناسایی و جدا شدند. می‌توان از روش‌های مولکولی برای تعیین هویت نمونه‌های تعیین شده استفاده کرد.

نگهداری کشت باکتری

برای حفظ و نگهداری باکتری از محیط MRS براث حاوی ۱۸ درصد گلیسرول استفاده شد و سپس در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد (۲۰-℃) نگهداری شدند.

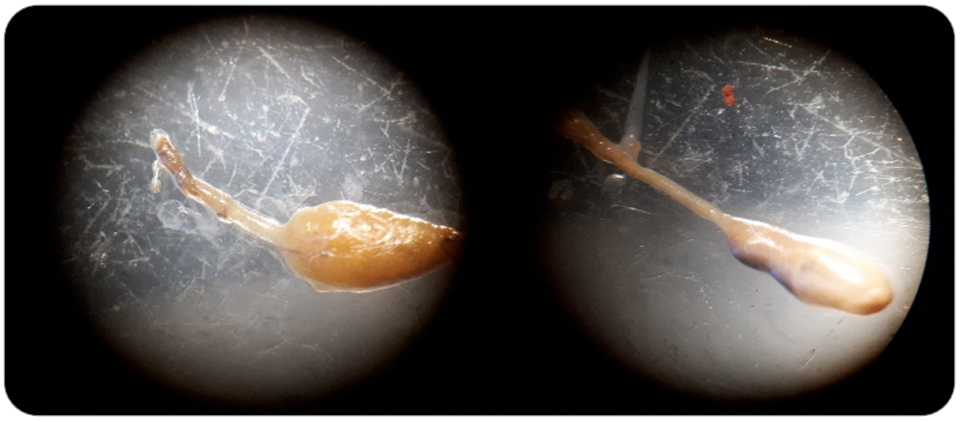
شناسایی نمونه های جداسازی شده

در این آزمایش نمونه های باکتری کاتالاز منفی و گرم مثبت برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA توسط کیت استخراج (QIAGENE) انجام شد. نمونه های DNA استخراج شده در ۱۵۰ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر و در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند. کیفیت DNA استخراجی توسط ژل الکترفورز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی موجود در دستگاه گوارش نمونه‌ها، جایگاه ژنی 16S rRNA آنها با استفاده از آغازگرهای 27F/149R ارائه شده توسط Chen و همکاران (۲۰۱۵) تکثیر شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR) از دستگاه موجود در آزمایشگاه ژنتیك موسسه تحقیقات علوم دامی کشور استفاده شد. شرایط واکنش PCR شامل واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و سپس سیکل اصلی با ۳۸ بار تکرار شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۵ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و در انتها تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از پایان یافتن زمان PCR برای مشاهده نتیجه کار از الکتروفورز با ژل آگاروز استفاده شد. تشخیص مولکولی کلنی‌ها با روش تعیین توالی اختصاصی ژن 16S rRNA انجام گرفت. پس از تکثیر قطعات ژنومی و تایید طول قطعات تکثیر شده، خالص‌سازی و توالی‌یابی قطعات تکثیر شده توسط شرکت بایونیر کره جنوبی انجام گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Chromas بررسی شد.

نتایج و بحث

دستگاه گوارش زنبورعسل دارای میکروارگانیسم‌های هم‌زیست است. بر اساس تحقیقات اخیر، میکروارگانیسم‌های مفیدی در زنبورعسل موجود است که در فعل و انفعالات بدن زنبورعسل شرکت دارند. در دهه اخیر نقش پروبیوتیک‌ها در زنبورعسل مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده که استقرار LAB در دستگاه گوارش زنبورعسل منجر به بهبود شرایط گوارش و غلبه بر جمعیت میکروب‌های بیماری‌زا در این حشره شده است. باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شده از زنبور به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیک انسانی و حیوانی اهمیت دارند. بنابراین تحقیقات در مورد حضور غالب لاکتوباسیل‌ها در دستگاه گوارش زنبورعسل جهت بهبود ایمنی و سلامت زنبور و همچنین تولید محصول عسل حاوی پروبیوتیک حائز اهمیت است. در این پژوهش استرین‌های LAB از دستگاه گوارش زنبورعسل کارگر جداسازی شدند.

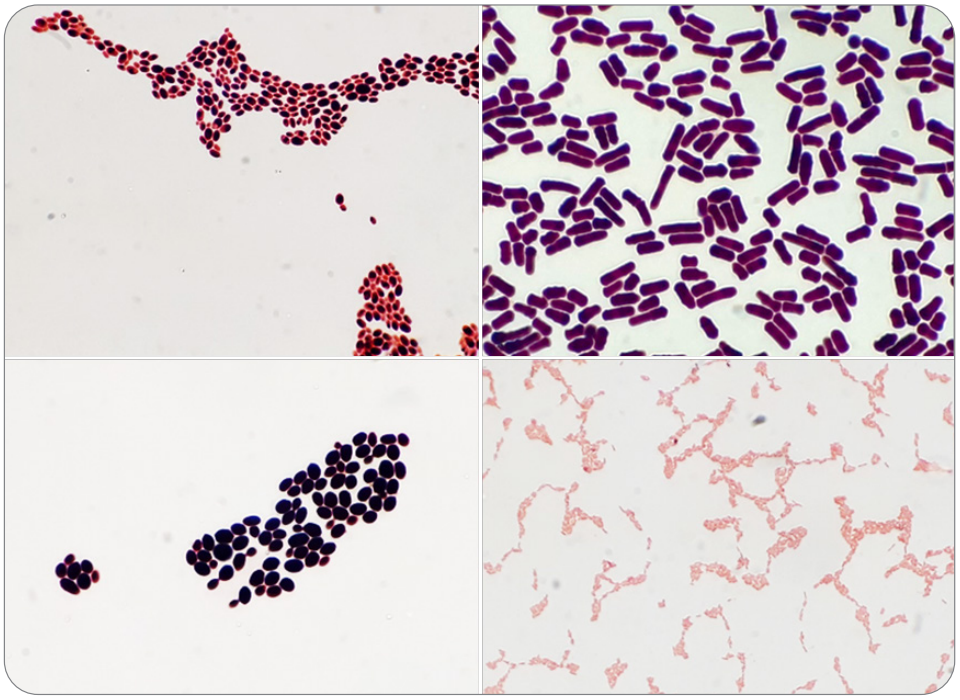
در این بررسی تعداد ۸ نمونه زنبورعسل کارگر از استان آذربایجان‌غربی (شهرستان‌های ارومیه، خوی، میاندواب و پیرانشهر)، ۴ نمونه از استان آذربایجان‌شرقی (شهرستان‌های مراغه و عجب شیر) و ۲ نمونه از استان گیلان (املش و تالش) تهیه گردید. نمونه‌ای از دستگاه گوارش زنبورهای عسل که در زیر بینوکولر خارج شده، در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲ - نمونه‌ای از دستگاه گوارش زنبورهای عسل در زیر بینوکولر

در این تحقیق اکثر باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش زنبورهای عسل مختلف گرم مثبت بودند. از ۱۴ نمونه‌ی دستگاه گوارش، حدود ۹۵ نوع کلنی در پلیت‌های حاوی MRS آگار مشاهده شد که پس از تهیه لام و رنگ آمیزی گرم، از ۹۵ کلنی، تعداد ۸۰ کلنی گرم مثبت بود که به‌صورت، دوتایی، زنجیره‌های کوتاه و یا مجتمع قرار گرفته بودند (شکل ۳).

در این خصوص Tajabadi و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که عمده‌ی باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل کوچک از گروه باکتری‌های گرم مثبت هستند. همچنین Tootiaie و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که عمده باکتری‌های جدا شده از روده‌ی زنبورعسل *Apis mellifera* گرم مثبت هستند. به طوری که از ۲۴ نمونه‌ی دستگاه گوارش زنبورعسل ۱۳۶ نوع کلنی در پلیت‌های حاوی MRS آگار مشاهده کردند که پس از تهیه لام و رنگ‌آمیزی گرم، از ۱۳۶ کلنی، ۸۷ جدایه باسیل‌های گرم مثبت بود که با نتایج این بررسی مطابقت دارد.



شکل ۳ - نمونه ای از باکتری های مشاهده شده زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰۰

تغییرات و شرایط آب و هوایی می‌تواند بر تنوع میکروارگانیسم های دستگاه گوارش حشرات از جمله زنبورعسل مؤثر باشد. Hroncova و همکاران (۲۰۱۵) تنوع میکروبی روده زنبورعسل را با توجه به شرایط زمانی و جغرافیایی مطالعه کردند و نشان دادند که میکروبیوتاهای جداسازی شده عمدتاً از گروه باکتری‌های گرم مثبت هستند. عادت تغذیه یکی از قوی ترین عوامل مؤثر در فلور حشرات است. تفاوت در منبع شهد در جنس باکتریایی و فلور معده زنبورعسل تأثیر دارد. همچنین فعالیت زنبوران عسل در کندو می تواند در لاکتوباسیل ها و سویه های باکتریایی دستگاه گوارش آنها اثر داشته باشد (Tajabadi *et al.*, 2013).

با توجه به اینکه باکتری‌های پروبیوتیک کاتالاز منفی هستند. لذا جهت شناسایی و جدا کردن باکتری‌های پروبیوتیک، تست کاتالاز انجام شد. آنزیم کاتالاز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود. پراکسید هیدروژن یک محصول متابولیک سمی برای باکتری‌هاست. اگر آب اکسیژنه در محیط تجمع یابد، برای برخی باکتری‌ها سمی و خطرناک است اما باکتری‌های هوازی و غیر هوازی اختیاری با تولید آنزیم های کاتالاز موجب شکسته شدن H_2O_2 و آزادی مولکول اکسیژن می شوند و از مرگ رهایی می یابند. به عبارت دیگر، تولید کاتالاز توسط برخی از باکتری‌ها درحقیقت نوعی مکانیسم دفاعی برای آنها محسوب می شود. آنزیم کاتالاز، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن می‌شکند در نتیجه حباب ایجاد می شود. اما اگر باکتری‌ها کاتالاز منفی باشند، حباب ایجاد نمی‌شود (شکل ۳) که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک کاتالاز منفی هستند.

در این آزمایش با تعیین توالی کلنی از باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل سویه‌های مختلف باکتری متعلق به گونه‌های kunkeei Lactobacillus، Lactobacillus plantarum، Lactobacillus apis، Enterococcus faecalis ، و Enterococcus hirae از مناطق شمال (استان گیلان) و شمالغرب (آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی) کشور شناسایی شدند. در مطالعه حاضر برای شناسایی تنوع باکتری‌های دستگاه گوارش زنبورعسل و روابط تبارزایی بین آنها از دو روش کشت و تعیین توالی ژن rRNA S16 استفاده شد.

در اکثر حیوانات، میکروفلور روده جذب مواد مغذی و عملکرد ایمنی را تسهیل می‌کند. لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم شناخته شده‌ترین اعضای LAB هستند که در دستگاه گوارش قرار دارند. گونه‌های لاکتوباسیلوس از نظر تجاری مهم هستند. زیرا به‌عنوان پروبیوتیک در طیف وسیعی از صنایع غذایی استفاده می شوند (Tajabadi *et al.*, 2011). اخیرا، تجزیه و تحلیل توالی ژن 16SrRNA مستقل از محیط کشت نیز استفاده شده است.

VaÂsquez و همکارانش (۲۰۱۲) گزارش کردند که نوع گونه‌های LAB موجود در محصول زنبورها، به تفاوت‌های جغرافیایی در توزیع زنبورها بستگی دارد و بسته به فصل می تواند تغییر کند. با این حال، آنها فرض کردند که این تفاوت ها منجر به تغییر در میکرو فلور محصول عسل می شود. علاوه بر این، آنها گزارش دادند که میکروب‌های خارجی را می‌توان به راحتی به دستگاه گوارش زنبورها همراه با شهد از طریق معده عسل آنها یا از طریق انتقال گرده به کلنی آنها وارد کرد.

نتیجه‌گیری کلی

زنبورعسل منبعی بسیار غنی و با ارزش از باکتری‌های پروبیوتیک به‌شمار می‌رود. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش زنبورعسل در چند منطقه از استان‌های آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌شرقی و گیلان و بررسی شاخص‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها است. در این پژوهش مراحل نمونه‌گیری، جداسازی جدایه‌های باکتری‌ها از دستگاه گوارش زنبورعسل با موفقیت انجام شده و باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش زنبور با استفاده از تست‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم شناسایی و گروه‌بندی شدند. همچنین سویه‌های مورد نظر زیر میکروسکوپ تشخیص داده شده و کشت‌ها تا زمان مورد نیاز نگهداری و در مراجعات بعدی با موفقیت بازیابی و تکثیر شدند. در این آزمایش با تعیین توالی کلنی از باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش زنبورعسل سویه‌های مختلف باکتری متعلق به گونه‌های kunkeei Lactobacillus، Lactobacillus plantarum، Lactobacillus apis، Enterococcus faecalis ، و Enterococcus hirae از زنبورستان‌های مناطق شمال (استان گیلان) و شمالغرب (آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی) کشور شناسایی شدند.

منبع ها:

1. Aplevicz, K. S., Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Dinon, A. Z. (2014). Isolation and characterization of lactic acid bacteria and yeasts from the Brazilian grape sourdough. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 50, pp 321-327.

2. Aween, M. M., Hassan, Z., Muhialdin, B. J., Noor, H. M., Eljamel, Y. A. (2012). Evaluation on antibacterial activity of Lactobacillus acidophilus strains isolated from honey. American Journal of Applied Sciences, 9(6), pp 807.

3. Chen, Y. L., Lee, C. C., Lin, Y. L., Yin, K. M., Ho, C. L., & Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. BMC bioinformatics, 16, 1-11.

4. Engel, P., Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects diversity in structure and function," FEMS Microbiology Reviews. 37(5), pp 699–735.

5. Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Mrazek, J., Bunesova, V., Rada, V. (2015). Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PloS one. 10(3), p.e0118707.

6. Lamei, S., Hu, Y. O., Olofsson, T. C., Andersson, A. F., Forsgren, E., Vásquez, A. (2017). Improvement of identification methods for honeybee specific Lactic Acid Bacteria; future approaches. PLoS One, 12(3), pp e0174614.

7. Lotfi, H., Mokhber, M., Hashemi, A. (2024). Investigation of Mrjp1 gene polymorphism in Iranian honeybee (*Apis Mellifera Meda*). The second national conference of agricultural sciences focusing on abiotic stresses, 2024-January-22, Payam Noor University (PNU), Urmia. (In Persian)

8. Mokhber, M., Ghaffari, M. (2019). Economic value of pollination services of honeybee and solutions to conserve apiculture industry. Honeybee Science Journal, 9(17), 12-16. (In Persian)

9. Moradi, A., Alipour, D., Tajabadi, N. (2022). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from bee gastrointestinal tract and their effect on some productive parameters of colonies. Iranian Journal of Animal Science, 53(2), 97-107.

10. Nemati, S., Mokhber, M., Ghaffari, M., Tahmasbi, G., Kalilvandi, H. (2022). The effect of fermented pollen supplements on the percentage of cell acceptance rate and royal jelly production in Iranian honey bees (*Apis mellifera meda*). Journal of Apicultural Research, 1-8.

11. 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, 430-438.

12. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M. Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L. (2011). Detection and identification of Lactobacillus bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee Apis dorsata. Apidologie, 42, pp 642-649.

13. Tajabadi, N., Mardan, M., Shuhaimi, M., Abdul Manap M. Y., Feizabadi, F. (2012). Weissella sp.Taj-Apis., a Novel lactic acid bacterium Isolated from Honey, First Iranian conferences, Kuala Lumpur, Malaysia: 100.

14. Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., Mustafa, S. (2013). Molecular identification of Lactobacillus spp. isolated from the honey comb of the honey bee (Apis dorsata) by 16S rRNA gene sequencing. Journal of Apicultural Research. 52(5), pp 235-241.

15. Taghavi, L., Mokhber, M., Ghaffari, M. Khalilvandi, H. (2022). Investigating the effect of different levels of linoleic acid on the population growth in Iranian honey bees. The 1st National Congress on the role of honeybees in food security and national development, Urmia, 6-11. (In Persian)

16. Tootiaie, S., Mojgani, N., Harzandi, N., Moharrami, M., Mokhberalsafa, L. (2022). Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Gut of Honeybees *Apis mellifera*. Iranian Journal of Animal Science Research, 14(1), pp 131-146. (In Persian)

17. VaÂsquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely L. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. PLoS One, 7(3), pp e33188.

18.Widyastuti, Y., Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. Food and Nutrition Sciences, 5, 435-442.

Isolation and identification of symbiotic Lactobacillus bacteria in the honeybee (*Apis Mellifera*) gastrointestinal tract

Shahrzad Nasrin[1], Mahdi Mokhber[2]*, Ali Hashemi[3], Shahin Zomorodi[4], Shabnam Parichehreh[5]

1- Graduated student (MS), Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran. (Corresponding author: m.mokhber@urmia.ac.ir)
3- Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Department of Engineering Research, West Azerbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Organization (AREEO), Urmia, Iran
5-Department of Honeybee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

DOI: 10.22034/HBSJ.2024.365835.1165

Abstract

The honeybee is a useful insect with high impact on agricultural products and the ecosystem pollination, then on food security and gross national product. Considering that keeping honeybees in nature and helping pollination through honeybees depends solely on the economic efficiency of the honeybee industry and the subsequent desire of beekeepers to raise it. Therefore, increasing the functional production of honeybee colonies, along with maintaining genetic diversity, is the main goals of genetic breeder and policy makers in the honeybee industry. One of the most common and widely used methods to preserve honeybees in nature and the beekeeping industry is to increase honeybee productive and reproductive performances by developing knowledge-based nutritional methods. In this regard, in the present study, isolation and identification of the symbiotic lactic acid bacteria in the honeybee's digestive system was carried out. This information and isolated microbial compounds can be used in the fermentation of complementary food supplements for honeybees to help the digestibility of produced foods for honeybees. The purpose of this study is to isolate beneficial bacteria from the digestive system of honeybees in the regions of West Azerbaijan, East Azerbaijan and Gilan provinces and to investigate the probiotic indicators of the isolates. Here, the sampling and isolation methods of the bacterial isolates from the bee's digestive system were presented, and the isolated bacteria were identified and grouped using catalase tests and gram staining. Finally, the identification of the desired strains by the microscope, maintain and cultivate was provided. In this study, different bacterial strains belonging to *Lactobacillus kunkeei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus apis, Enterococcus faecalis, and Eastern Enterococcus* species were identified by determining the sequenceing of bacteriaes that were isolated from the digestive duct of honeybees from north (Gilan province) and northwest (West-Azerbayjan and East-Azerbayjan provinces) of Iran.

Key words: *Apis mellifera*, probiotic, lactic acid, pollination

Corresponding Author: Mahdi Mokhber
Email: m.mokhber@urmia.ac.ir