



## بررسی تأثیر عصاره الکلی آویشن روی انگل نوزما در زنبورعسل

۲۴

### مصطفی مرادی<sup>۱</sup>

۱- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی، آذربایجان غربی، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۹۷ / تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۹۷

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/hbsj.2019.116829.1059

رایانامه: m.moradi@rvsri.ir



### چکیده:

اختیار گروه‌ها (به غیر از گروه کنترل مثبت) قرار داده شد. روزانه میزان تلفات تمام گروه‌ها و تعداد اسپوره‌های نوزما موجود در دستگاه گوارش آنها شمارش گردید. نتایج نشان داد که عصاره الکلی آویشن بر تکثیر اسپور نوزما تأثیر داشته و در تعداد اسپوره‌های گروه‌های مختلف با گروه کنترل مثبت تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ) بطوریکه میانگین تعداد اسپور نوزما در گروه کنترل منفی (عاری از نوزما) صفر، در کنترل مثبت (نوزما بدون دارو):  $29/034$  میلیون، در گروه  $50/0$  mg/ml آویشن  $7/49$  میلیون، در گروه  $1$  mg/ml آویشن  $0/75$  میلیون، در گروه  $3/61$  میلیون، در گروه  $50/1$  mg/ml آویشن  $3/55$  میلیون، در گروه  $3/708$  میلیون، در گروه  $50/1$  mg/ml آویشن  $3/55$  میلیون،

اثر عصاره الکلی آویشن روی انگل نوزما در زنبورعسل مورد بررسی قرار گرفت. از گیاه آویشن عصاره الکلی استخراج گردید. زنبوران هم سن عاری از نوزما را در گروه‌های  $30$  تایی در قفسهای چوبی و در دمای  $26$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $60$  الی  $70$  درصد نگهداری شدند.  $8$  گروه تیمار و شاهد با  $3$  تکرار انتخاب شدند. به هر زنبور  $20000$  عدد اسپور نوزما به همراه شربت شکر خورانده شد و  $0/5$ ،  $1/5$ ،  $1$ ،  $2$  میلی گرم عصاره الکلی آویشن و  $1$  میلی گرم داروی فوماژیلین در میلی لیتر را به همراه شربت شکر در





یاخته ای آویشن ایرانی روی *Entamoeba histolytica* پیشنهاد نموده اند که عصاره های گیاه آویشن روی تک *Entamoeba histolytica* مؤثر می باشد. Machado و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مشخص نموده اند که اسانس روغنی دارای اثرات ضد زیاردیائی بوده و می توان در درمان موارد بیماری ناشی از *G. lamblia* بکار برد. همچنین Santoro و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داده اند که اسانس روغنی گیاه آویشن دارای اثر کشندگی روی تک یاخته تریپانوزماکروزی است و ماده مؤثره تیمول مهمترین نقش را در این خاصیت دارد.

در رابطه با اثرات گیاهان داروئی در کنترل و درمان بیماریهای زنبورعسل بررسیهای معدودی انجام گرفته است و بیشتر تحقیقات روی اثرات ضدباکتریائی و ضد مایتی این گیاهان روی بیماریهای باکتریائی و مایتیهای آفت کلنی های زنبورعسل بوده است، بطوریکه Imdorf و همکارانش در سال ۱۹۹۵ اثر سمیت تیمول و کافور، منتول و اکالیپتول را روی مایت واروآ و زنبورعسل مورد بررسی قرار داده اند و بعد از انجام آزمایشات لازم مشاهده شده است که هیچ تفاوت معنی داری بین تلفات زنبوران بالغ در گروه های تحت درمان و گروه های کنترل وجود ندارد.

لذا نتیجه گیری نموده اند که با توجه به سالم بودن این عصاره ها و اثرات درمانی آنها روی مایت واروآ، دو عصاره حاصل از آویشن *T. minuta* و گیاه *Heterotheca latifolia* می توانند در برنامه مبارزه با واروآ در کلنی های زنبورعسل مورد استفاده قرار گیرند. در بررسی دیگری توسط Ebert و همکارانش در سال ۲۰۰۷ سالم بودن تعداد زیادی از عصاره های گیاهان داروئی از جمله آویشن در زنبورعسل مورد مطالعه قرار گرفته و بعد از مصرف خوراکی این عصاره ها هیچ گونه تلفات غیر معمولی در زنبوران بالغ مشاهده نشده است لذا پیشنهاد نموده اند که این فرآورده ها را می توان براحتی در کلنی های زنبورعسل مصرف نمود. اثرات ضد انگلی گیاهان داروئی طی چند سال اخیر توجه محققین را به خود جلب نمود است، بطوریکه Lara Maistrello و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات برخی از ترکیبات طبیعی از جمله تیمول که عصاره گیاه آویشن می باشد روی انگل نوزما مورد مطالعه قرار داده و مشاهده نموده اند که هیچکدام از آنها اثر سمی روی زنبورعسل نداشته و از سوی دیگر دارای اثر ضد نوزمائی بالایی بوده اند. Cecilia Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر تیمول و *resveratrol* را روی انگل نوزما سرانا بررسی نموده و مشاهده کرده اند که میزان اسپور بسیار کاهش می

در گروه ۲ mg/ml آویشن ۲/۶۹ میلیون و در گروه mg/ml ۲ فوماژیلین ۰/۸۵ میلیون اسپور در میلی لیتر محتویات روده زنبورها وجود داشت. نتایج این بررسی نشان می دهد که نوزما نسبت به عصاره الکلی آویشن حساسیت بالائی دارد و می توان با بررسی های بیشتر، آنرا در درمان و کنترل بیماری نوزموزیس بکار برد.

**واژه های کلیدی:** زنبورعسل، گیاه آویشن، عصاره الکلی، نوزما

#### مقدمه

انگل نوزما عامل بیماری نوزموزیس یکی از بیماریهای مهلک زنبورعسل بوده و هر ساله باعث بروز تلفات در تعداد بسیار زیادی از کلنی های زنبورعسل ایران (مرادی و همکاران، ۱۳۸۷؛ رزم آرائی و همکاران، ۱۳۸۷). و سایر کشورها شده و خسارت زیادی به صنعت زنبورداری وارد می آورد (Fries Ingermar, 1988). در حال حاضر تنها داروی مؤثر بر تک یاخته نوزما داروی فوماژیلین Fumagillin است که علاوه بر هزینه های زیاد برای زنبورداران، امکان بروز مقاومت در برابر آن زیاد بوده و احتمالاً در آینده بر این تک یاخته مؤثر نباشد (Cecilia Costa et al., 2010)، لذا محققین در پی یافتن روشهای جدید مبارزه و کنترل بیماری نوزموزیس در زنبورستانها می باشند. یکی از مهمترین عوامل ضد میکروبی در پزشکی و دامپزشکی گیاهان داروئی است که در سالیان اخیر مورد توجه محققین واقع شده و در بررسیهای مختلف نتایج قابل توجهی بدست آمده است (آزادبخت محمد و آزادبخت مسعود، ۱۳۸۷).

یکی از گیاهان داروئی که در بررسیهای مختلف تأثیر چشمگیری روی عوامل بیماریزای انسانی و دامی داشته است و در مواردی به عنوان دارو مورد استفاده قرار می گیرد گیاه آویشن است. این گیاه با توجه به ترکیبات داروئی موجود در آن دارای خواص ضد باکتریائی، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد انگلی می باشد. در مورد خواص ضد انگل ای آن بررسیهای متعددی انجام گرفته است که نتایج قابل توجهی حاصل شده است، بطوری که رحیم بحری نجفی و همکاران در یک بررسی اثر اسانس گیاهان آویشن باریک (*Thymus vul-* *garris*)، آویشن پهن (*Zataria multiflora*)، مورد *Myrtus communis* و آنگوزه (*Ferula asa feotida*) ورزین آنگوزه بر روی کیستهای زیاردیایا قرار داده اند و مشاهده نموده اند که آویشن موجب نابودی حدود ۹۵ درصد از کیستهای این انگل شده است (بهنیا و همکاران، ۲۰۰۸) با مطالعه اثرات ضد تک





یک قفس چوبی با یک سمت تور فلزی و سمت دیگر طلق پلاستیکی کشوئی طراحی و ساخته شد. سپس یکی از قابهای نوزادان سر پوشیده (شفیره) زنبورعسل را به داخل آن انتقال داده و به آزمایشگاه منتقل گردید و بلافاصله در داخل انکوباتور ۳۳ درجه سانتی گراد و رطوبت ۶۰ الی ۷۰ درصد قرار داده شد تا زنبوران جوان در عرض چند روز متولد شدند.

## ۲. نگهداری و تغذیه زنبوران بالغ در انکوباتور

برای نگهداری زنبوران متولد شده در انکوباتور، ابتدا تعدادی قفس چوبی کوچک به ابعاد ۸ × ۱۰ × ۱۰ سانتی متر که یک سمت آنها واجد تور فلزی و سمت دیگر واجد طلق پلاستیکی کشوئی بود طراحی و ساخته شد و در سقف آنها سوراخی برای اتصال سرنگ پلاستیکی جهت تغذیه زنبورها تعبیه گردید. سپس زنبورهای بالغ به تعداد ۳۰ عدد به هر قفس منتقل گردید و در داخل انکوباتور ۳۳ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (تصویر شماره ۱).



شکل ۱) قفسهای نگهداری زنبوران بالغ در داخل انکوباتور

معینی از آن را وزن نموده و در مقدار کمی اتانول ۲۰ درصد حل نموده و سپس در میزان مشخص شربت شکر حل نموده و در اختیار گروه های مختلف قرار داده شد.

۵. جداسازی و تخلیص اسپور نوزما و تعیین میزان مورد نیاز برای خوراندن به زنبورها:

اسپورهای مورد نیاز برای آلوده کردن هر یک از گروه های تحت درمان از نمونه های زنبور بالغ آلوده به نوزما از تعدادی از زنبورستانهای آلوده بدست آمد. این کار به این شکل انجام گرفت که به ازاء هر یک عدد زنبور آلوده یک میلی لیتر آب مقطر استریل را در هاون چینی ریخته و ناحیه شکم زنبورها را جداسازی نموده و در داخل آب مقطر انداخته و با استفاده از دسته هاون هموژن یکنواختی را از آن تهیه نموده و با استفاده از پارچه کتانی ریز بافت آنرا صاف نموده و محلول صاف شده را در داخل لوله آزمایش ریخته و با سانتریفوژ ۱۵۰۰ دور در

یابد. با توجه به بررسیهای صورت گرفته و نتایج حاصله و اهمیت بیماریهای زنبورعسل بویژه بیماری نوزما و لزوم یافتن روشهای درمانی سالم برای زنبورعسل و مصرف کنندگان فرآورده های آن، در این بررسی اثرات ضد انگلی عصاره الکلی گیاه آویشن روی نوزما در زنبوران بالغ مورد مطالعه قرار گرفته است.

## مواد و روشها :

### مواد و لوازم مورد استفاده :

۱. انتخاب زنبوران بالغ هم سن و عاری از انگل نوزما برای تهیه زنبوران بالغ هم سن ابتدا چند کلنی زنبورعسل عاری از انگل نوزما و علائم بیماری نوزموزیس تهیه گردید و در محوطه محل آزمایشگاه نگهداری شدند. سپس برای نگهداری شفیره ها و تولد زنبوران هم سن در انکوباتور،

۳. عصاره گیری از گیاه آویشن :

گیاه تازه آویشن را از یکی از عطاریهای معتبر تهیه نموده و در آزمایشگاه به شکل زیر از آن عصاره گیری به عمل آمد. ابتدا با استفاده از آسیاب برقی ۲۰۰ گرم از آن را پودر نموده و در ۱ لیتر الکل اتانول ۹۸ درصد حل نموده و به مدت چند شبانه روز در دمای اتاق قرار داده و هر چند ساعت یکبار آنرا تکان داده تا به خوبی حل شود سپس مخلوط مذکور را از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ گذرانده و عصاره خالص تهیه گردید. عصاره بدست آمده را در انکوباتور ۴۰ درجه قرار داده تا الکل آن تبخیر گردد و عصاره خالص خشک بدست آید.

۴. تهیه غلظت های مختلف از عصاره خشک آویشن :

بعد از تهیه عصاره الکلی خشک در داخل پلیتهای شیشه ای، آن را با استفاده از تیغه اسکالپل استریل خراشیده و جمع آوری گردید و سپس با استفاده از ترازوی دیجیتالی میزان





دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نموده تا اسپورهای نوزما ته نشین شده و براحتی جداسازی و تخلیص گردند. بعد از سانتریفوژ مقدار کمی از محلول روئی همراه با رسوب ته نشین شده را نگهداشته و محلول روئی دور ریخته شد. سپس با استفاده از لام نئوبار میزان اسپور موجود در هر میلی لیتر محلول حاوی نوزما شمارش گردید. محلول حاوی نوزما را با استفاده از شربت شکر ۱+۱ (۱ قسمت شکر و ۱ قسمت آب) به اندازه ای رقیق نموده تا به همراه شربت شکر به هر زنبور ۲۰۰۰۰ عدد اسپور نوزما برسد.

۶. گروه بندی زنبورهای تحت درمان

با توجه به دوز درمانی داروی فوماژیلین که ۱ میلی گرم در میلی لیتر است، غلظتهای ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم از عصاره الکلی آویشن تهیه گردید و به همراه شربت شکر ۱+۲ بصورت روزانه در اختیار گروه های مختلف زنبورها قرار داده شد. داروی فوماژیلین همانند عصاره های آویشن در داخل شربت شکر به گروه مورد نظر داده شد. گروه ها به شکل زیر و برای هر گروه ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

گروه ۱: ۵ mg/ml عصاره آویشن

گروه ۲: 75/0 mg/ml عصاره آویشن

گروه ۳: 1 mg/ml میلی گرم عصاره آویشن

گروه ۴: 5/1 mg/ml میلی گرم عصاره آویشن

گروه ۵: 2 mg/ml میلی گرم عصاره آویشن

گروه ۶: 1 mg/ml میلی گرم داروی فوماژیلین

گروه ۷ (کنترل مثبت): واجد نوزما فاقد آویشن و فوماژیلین

گروه ۸ (کنترل منفی): فاقد نوزما و آویشن و فوماژیلین

۷. آلوده کردن هر يك از گروه ها با اسپور نوزما

هر کدام از گروه ها از ۳۰ عدد زنبور بالغ تشکیل شده که بعد از قرار گرفتن در داخل قفسها در داخل انکوباتور ۳۳ درجه و رطوبت ۶۰ الی ۷۰ درصد قرار داده شدند و به مدت چند ساعت بدون غذا نگهداری شدند تا گرسنه شده و شربت شکر حاوی اسپور نوزما را بسرعت خورده و میزان اسپور لازم را دریافت دارند، لذا با توجه به بررسیهای قبلی که هر عدد زنبور در ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر شربت شکر را خواهد خورد به هر گروه ۶۰۰ میکرولیتر شربت شکر ۱+۲ (۲ قسمت شکر و ۱ قسمت آب) حاوی ۶۰۰ هزار عدد اسپور نوزما در داخل سرنگهای پلاستیکی داده شد تا به هر زنبور حدود ۲۰۰۰۰ عدد اسپور برسد.

۸. بررسی وضعیت گروه های مختلف

بعد از آماده نمودن تمام گروه ها، آنها را در انکوباتور قرار داده و روزانه مورد بازدید قرار گرفته و میزان تلفات هر يك

از آنها بررسی شده و بصورت هفتگی ثبت می گردید. بعد از شمارش تعداد تلفات هر گروه، تك تك زنبورهای تلف شده از نظر میزان آلودگی با اسپور نوزما مورد بررسی قرار می گرفتند. بدین صورت که با استفاده از پنس کوچک ناحیه شکم زنبوران تلف شده را جداسازی نموده و در داخل هاون چینی قرار داده و به ازاء هر زنبور ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه می گردید و با استفاده از دسته هاون هموژنی از آنها تهیه نموده و بعد از جداسازی قطعات بزرگتر و صاف نمودن محلول حاصله، با استفاده از سمپلر استریل میزان معینی از محلول را برداشته و روی لام نئوبار قرار داده و با استفاده از عدسی ۴۰ میکروسکوپ نوری تعداد اسپورهای نوزمای موجود در هر لام را شمارش نموده و در نهایت تعداد اسپورهای موجود در هر زنبور بالغ بدست می آمد. در نهایت میانگین تعداد اسپورهای موجود در زنبوران تلف شده در هر هفته ثبت می گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: بعد از پایان بررسی و جمع بندی نتایج با استفاده از برنامه spss نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

### بررسی آمار بدست آمده:

در بررسی لوله گوارشی هر يك از زنبورهای تلف شده از هر گروه میزان متفاوتی از اسپور نوزما مشاهده می گردید و در برخی از آنها هیچ اسپوری مشاهده نمی شد که در جداول شماره ۱ ارائه شده است. از سوی دیگر با توجه به اینکه در بیماری نوزموزیس تلفات زنبورهای بالغ یکی از عوارض بیماری است لذا تلفات در گروه های مختلف با هم مقایسه شده و در جدول شماره ۱ ارائه شده است. بطوریکه ملاحظه می شود در همه گروه ها در هفته اول تلفاتی مشاهده نشده است به غیر از اینکه در گروه ۲ در اواخر هفته اول تعداد ۹ عدد زنبور در سه تکرار (۱۰ درصد کل) تلف گردیدند که با توجه به عدم مشاهده تعداد زیاد اسپور نوزما در آنها، علت مرگ، نمی تواند انگل نوزما باشد. اما تلفات گروه های تحت درمان با آویشن و گروه کنترل مثبت نسبت به گروه فوماژیلین بسیار چشمگیر است. بطوریکه میزان تلفات در این گروه ها در سه هفته اول آزمایش بطور متوسط بیش از ۳۰ درصد بوده است ولی در گروه فوماژیلین در عرض ۳ هفته اول حدود ۱۶ درصد از زنبورها تلف شده اند که در مقایسه با سایر گروه ها میزان بسیار کمتری بوده و تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) است. طول عمر گروه های مختلف تا پایان دوره هم مورد توجه قرار گرفتند بطوریکه به غیر از گروه ۵، زنبورهای سایر گروه ها





در عرض ۵ هفته تلف شدند ولی تعدادی از زنبورهای گروه ۵ تا نوزمای موجود با سایر گروه ها تفاوت معنی داری ( $P < 0.05$ ) اواسط هفته ششم هم زنده ماندند و از نظر میزان اسپورهای داشتند.

جدول (۱) میانگین تعداد تلفات زنبورهای بالغ در گروه های مختلف تحت آزمایش در طی دوره آزمایش. داده های ارائه شده میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار می باشد

میانگین تعداد تلفات زنبورها در گروه های مختلف							
گروه	مشخصات گروه ها	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
۱	عصاره آویشن ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر میانگین	۰	۱۹/۳۳ $\pm$ ۷/۲۷	۲۴ $\pm$ ۸/۱۶	۲۸ $\pm$ ۱/۴۱	۱۹ $\pm$ ۸/۱۶	۰
۲	عصاره آویشن ۰/۷۵ میلی گرم در میلی لیتر	۸ $\pm$ ۸/۱۶	۲۲/۳۳ $\pm$ ۱/۶۹	۱۶/۶۶ $\pm$ ۱/۲۴۶	۳۸/۶۶ $\pm$ ۴/۷۱	۱۴ $\pm$ ۸/۱۶	۰
۳	عصاره آویشن ۱ میلی گرم در میلی لیتر	۰	۹ $\pm$ ۸/۱۶	۲۱ $\pm$ ۲/۱۶۰	۲۹/۶۶ $\pm$ ۴/۷۱	۳۰ $\pm$ ۸/۱۶	۰
۴	عصاره آویشن ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر	۰	۲۰/۳۳ $\pm$ ۷/۶۷	۸/۶۶ $\pm$ ۱/۸۶۲	۲۲/۶۶ $\pm$ ۱/۶۹۹	۳۵ $\pm$ ۳/۷۴۱	-
۵	عصاره آویشن ۲ میلی گرم در میلی لیتر	۰	۱۴/۶۶ $\pm$ ۴/۷۱	۲۸/۳۳ $\pm$ ۲/۰۵۸	۱۹ $\pm$ ۸/۱۶	۱۷/۳۳ $\pm$ ۴/۷۱	۱۲ $\pm$ ۸/۱۶
۶	فوماژیلین (۱ میلی گرم در میلی لیتر)	۰	۰	۲۰ $\pm$ ۸/۱۶	۲۵/۳۳ $\pm$ ۱/۲۴۷	۴۶/۶۶ $\pm$ ۲/۵۱۵	-
۷	کنترل مثبت (حاوی نوزما بدون دارو)	۰	۵ $\pm$ ۸/۱۶	۲۰ $\pm$ ۸/۱۶	۲۵/۳۳ $\pm$ ۱/۲۴۷	۳۹ $\pm$ ۱/۶۳۲	-
۸	کنترل منفی (بدون نوزما)	۰	۳/۶۶ $\pm$ ۱/۶۹۹	۲۹ $\pm$ ۸/۱۶	۲۲ $\pm$ ۸/۱۶	۳۵ $\pm$ ۲/۱۶۰	-

تعداد اسپورهای نوزما در گروه های مختلف تفاوت زیادی با هم داشتند. اما بیشترین تفاوت در بین گروه کنترل مثبت و کنترل منفی و داروی فوماژیلین و گروه ۵ مشاهده گردید، بطوریکه در جداول شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است، در گروه کنترل مثبت میانگین تعداد اسپورهای شمارش شده از لوله گوارشی زنبوران تلف شده ۲۹/۰۳۴ میلیون اسپور، در گروه فوماژیلین ۰/۸۵ میلیون اسپور و در گروه کنترل منفی

تعداد اسپورهای نوزما مشاهده نگردید و در گروه ۵، ۲/۶۹ میلیون اسپور مشاهده شد که در مقایسه با گروه کنترل مثبت بسیار کمتر است. البته سایر گروه ها هم در مقایسه با گروه کنترل مثبت تفاوت چشمگیری داشتند و میزان اسپور آنها در مقایسه با این گروه بسیار پائینتر بود ( $P < 0.05$ ) ولی از نظر آماری تفاوت بین میزان اسپور در تمام گروه های تحت درمان با آویشن معنی دار نبود. ( $P < 0.05$ )

جدول (۲) میانگین تعداد (میلیون) اسپور موجود در لوله گوارشی گروه های مختلف زنبور عسل در هفته های مختلف آزمایش. داده های ارائه شده میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار می باشد.

میانگین تعداد تلفات زنبورها در گروه های مختلف					
گروه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم
۱	۰	۳/۳۳ $\pm$ ۲/۳۴ <sup>a</sup>	۳/۱۶۲ $\pm$ ۲/۲۸ <sup>a</sup>	۱۱ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>a</sup>	۲۰ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>a</sup>
۲	۰/۰۲۴ $\pm$ ۰/۰۰۷	۱/۳۸ $\pm$ ۲/۵۴ <sup>b</sup>	۶/۶۶ $\pm$ ۱/۲۴۶ <sup>b</sup>	۳ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>b</sup>	۷ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>b</sup>
۳	۰	۳/۶۶ $\pm$ ۲/۳۴ <sup>a</sup>	۳/۲ $\pm$ ۱/۴۱ <sup>a</sup>	۳/۶۸ $\pm$ ۱/۴۲ <sup>b</sup>	۸ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>b</sup>
۴	۰	۳ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۷ $\pm$ ۱/۶۱ <sup>c</sup>	۵/۰۶۶ $\pm$ ۳/۸۲ <sup>c</sup>	۶ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>c</sup>
۵	۰	۱/۸ $\pm$ ۲/۵۶ <sup>b</sup>	۲/۶۹ $\pm$ ۲/۲۰ <sup>d</sup>	۳ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>b</sup>	۶ $\pm$ ۸/۱۶ <sup>c</sup>
۶	۰	۰	۰/۰۲۳ $\pm$ ۰/۰۰۲ <sup>e</sup>	۰/۰۱۹ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>d</sup>	۰/۳۸۳ $\pm$ ۰/۰۲۳ <sup>d</sup>
۷	۰	۲۳/۳۳ $\pm$ ۲/۳۵ <sup>c</sup>	۳۳/۳۳ $\pm$ ۲/۳۵ <sup>f</sup>	۴۰/۱۸ $\pm$ ۲/۷۸ <sup>e</sup>	۴۸/۳۳ $\pm$ ۲/۳۵ <sup>e</sup>
۸	۰	۰	۰	۰	۰

\*حروف کوچک متفاوت هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها می باشد ( $p < 0.05$ ).





جدول ۳) میانگین تعداد اسپور موجود در لوله گوارشی گروه های مختلف زنبور عسل در طول دوره آزمایش (پنج هفته). داده های ارائه شده میانگین  $\pm$  انحراف معیار سه تکرار می باشد.

گروه ها	میانگین تعداد اسپور (میلیون در میلی لیتر)
۱	$7/49 \pm 7/22 a^*$
۲	$3/61 \pm 2/43 a$
۳	$3/70.8 \pm 2/54 a$
۴	$3/55 \pm 1/31 a$
۵	$2/69 \pm 1/95 a$
۶	$1085 \pm 148 b$
۷	$29034 \pm 196 c$
۸	.

\*حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین گروه ها می باشد ( $p < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه گیری:

در این بررسی تأثیر عصاره الکلی گیاه آویشن بر انگل نوزما عامل بیماری نوزموزیس زنبورعسل در مقایسه با داروی فوماژیلین مورد ارزیابی قرار گرفته است. عصاره الکلی گیاه آویشن در تمام رفتهای در نظر گرفته شده در مقایسه با گروه کنترل مثبت اثر چشمگیری روی انگل نوزما داشته است و شمارش صورت گرفته در روزهای پایانی بررسی نشان می دهد که میزان اسپور در مقایسه با گروه شاهد کاهش بسیار زیادی دارد. از سوی دیگر حتی حدود ۱۳ درصد از زنبوران دریافت کننده ۲ میلی گرم عصاره آویشن تا اواسط هفته ششم هم زنده مانده و تعداد اسپور موجود در لوله گوارشی آنها کمتر از ۱۰۰ هزار اسپور بوده است در حالی زنبوران گروه کنترل مثبت در اوایل هفته پنجم از بین رفته و لوله گوارشی آنها مملو از اسپورهای نوزما بود بطوریکه در تعدادی از آنها بیش از ۵۰ میلیون اسپور شمارش گردید.

گرچه در این بررسی تنها از عصاره الکلی گیاه آویشن استفاده شده است ولی نتایج حاصل از آن مشابه نتایج حاصل از بررسی صورت گرفته توسط Cecilia Costa و همکارانش است که تعداد اسپورهای شمارش در دو گروه تیمول و شاهد مثبت تفاوت بسیار معنی داری با هم داشته اند. تفاوت نتایج این دو بررسی احتمالاً ناشی از میزان حساسیت سویه های

انگل استفاده شده در دو بررسی باشد. در بررسی حاضر میزان تلفات زنبورهای گروه کنترل منفی و گروه های آویشن تفاوت زیادی با هم ندارند و به نظر نمی رسد که عصاره آویشن باعث مرگ زنبورهای تحت درمان شده باشد بطوریکه تعدادی از زنبوران دریافت کننده ۲ میلی گرم در میلی لیتر آویشن حتی تا اواسط هفته ششم هم زنده ماندند در حالیکه زنبوران کنترل منفی و دریافت کننده فوماژیلین در پایان هفته پنجم تلف شدند. این امر نشان می دهد که احتمالاً عصاره آویشن باعث افزایش طول عمر زنبوران گردد. این موضوع نیاز به بررسی بیشتر دارد. در رابطه با سالم بودن تیمول در یک بررسی Imdorf و همکارانش (۱۹۹۵) دریافتند که تفاوت معنی داری بین تلفات زنبوران بالغ در گروه های تحت درمان و گروه های کنترل وجود ندارد. Ebert و همکارانش (۲۰۰۷) هم سالم بودن تعداد زیادی از عصاره های گیاهان داروئی از جمله آویشن در زنبورعسل را نشان داده اند.

در بررسیهایی که توسط سایر محققین صورت گرفته است عصاره های گیاه آویشن روی عوامل بیماریزای انسان از جمله انگل ها، باکتریهای مختلف و قارچها و ویروسها مؤثر بوده است و عصاره گیاه آویشن در بسیاری از داروهای انسانی بکار می رود. در زمینه بیماریهای زنبورعسل از عصاره گیاه آویشن در کنترل آفات آن از جمله مایت واروا استفاده وسیعی صورت گرفته و در حال حاضر داروهای مختلفی از جمله هایوکلین، تیمول، واروسید حاوی ترکیبات حاصل از آویشن می باشند و نقش زیادی در کنترل واروا دارند. ولی در زمینه بیماری نوزموزیس بررسی های معدودی انجام گرفته است. Cecilia Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ تیمول را به میزان ppm ۱۰۰ در خمیر شیرین و شربت شکر در اختیار زنبوران بالغ قرار داده و ۲۵ روز بعد از شروع آزمایش میزان اسپور موجود در روده زنبوران تحت درمان را شمارش نموده و مشاهده کرده اند که میزان اسپور بسیار کاهش یافته و به حدود ۶۰ میلیون عدد اسپور در هر زنبور رسیده است در حالی که در گروه کنترل این میزان به ۱۳۸ میلیون در زنبور رسیده بود. از سوی دیگر گروه تحت درمان تیمول نسبت به گروه کنترل حدود ۵ روز بیشتر عمر نمودند (۲۵ روز در مقایسه با ۲۰ روز). بهنیا و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مطالعه اثرات ضد تک یاخته ای آویشن ایرانی روی *Entamoeba histolytica* دریافتند که MIC عصاره های هیدروالکلیک و هگزانیک و روغن اسانس گیاه آویشن بر روی این تک یاخته بعد از ۲۴ ساعت به ترتیب ۴،۴ و ۰/۷ میلی گرم در میلی لیتر می باشد.





روشهای مبارزه با بیماری نوزموزیس در زنبورعسل بکار رود و در صورت اثبات سالم بودن آن برای رده های مختلف سنی زنبورعسل و عدم تأثیر منفی روی مصرف کنندگان فرآورده های آن، در داروهای ضد نوزما بکار رود. البته برای رسیدن به این هدف بررسیهای زیر باید انجام پذیرد:

۱. سمیت غلظتهای مختلف عصاره آویشن در رده های سنی زنبورعسل مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.
۲. اثرات ضد نوزمائی اسانس روغنی آویشن با عصاره الکلی و آبی آن مقایسه گردد و میزان سالم بودن هر کدام از آنها برای زنبورعسل سنجیده شود.
۳. مشابه این بررسی در کلنی های زنبورعسل در شرایط آب و هوایی مختلف انجام پذیرد.
۴. بررسی بیشتری روی اثرات عصاره آویشن روی سایر عوامل بیماریزای زنبورعسل صورت پذیرد.

در بررسی Machado و همکاران اسانس روغنی آویشن با غلظت های ۲۵۷-۷۱ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثرات ضد ژیاوردیائی بوده است. همچنین در بررسی Santoro و همکارانش در سال ۲۰۰۷ اسانس روغنی گیاه آویشن در غلظت ۵۳ و ۶۲ میکروگرم در میلی لیتر دارای اثر کشندگی روی تک یاخته ترپانوزماکروزی است و ذکر کرده اند که ماده مؤثره تیمول مهمترین نقش را در این خاصیت دارد. در این بررسی عصاره آویشن در مقایسه با داروی فوماژیلین از میزان تأثیر کمتری برخوردار بوده است ولی با توجه به عدم تأثیر منفی روی زنبورعسل و امکان عدم باقی مانده مضر آن در فرآورده های زنبورعسل می تواند طی بررسیهای بیشتر به عنوان جایگزین برای داروهای شیمیائی استفاده گردد. با توجه به نتایج بررسیهای دیگران و این بررسی به نظر می رسد که عصاره گیاه آویشن می تواند به عنوان یکی از

#### منبع ها:

- آزادبخت، م.، آزادبخت، م. ۱۳۸۷. داروهای گیاهی ضد تک یاخته شایع. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران دوره ۱۸، شماره ۶۷، صفحه ۱۱۸-۱۳۲.
- بحری نجفی، ر.، معتضدیان، م. ح. آزادبخت، م. ۱۳۸۷. مطالعه اثر اسانس تعدادی از گیاهان داروئی بر روی آیست ژبارلامبلیا در مقایسه با مترونیدازول در *research.ui.ac.ir: in vitro*.
- بنیادیان، ک. ۱۳۸۷. مطالعه تأثیر روغنهای فرار برخی گیاهان (پونه، نعنای، ترخان، زیره و آویشن) بر روی باکتریهای *E.coli* و *S.aureus* در محیط کشت مایع.
- رزم آرای، ن.، بابایی، ح.، مرادی، م.، محرمی، م.، خلیلی، ایراج.، فروغی، لعیلا. ۱۳۸۷. بررسی وضعیت آلودگی زنبورستانهای استان آذربایجان شرقی به مایت *Varroa destructor* و انگل *Nosem apis* در بهار ۱۳۸۶. ششمین همایش سراسری انگل شناسی، کرج، ۹ تا ۱۳ خرداد ۱۳۸۷.
- رهنما، ک.، منتظرنیا، ب.، همتی، خ. ۱۳۸۷. بررسی اثرات ضد قارچی چند عصاره گیاهان داروئی در کاهش رشد قارچ عامل پوسیدگی ذغالی سویا در شرایط آزمایشگاه. مجله گیاهپزشک و غذا، دوره ۲، شماره ۳. صفحه ۵۶-۴۲.
- محمد پور، ق.، مجد، ا.، نژادستاری، ط.، مهرابیان، ص.، حسین زاده، ک. ا. ۱۳۸۹. بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس گونه هایی از سه جنس آویشن (*Thyme*) و دو اکوتیپ کاکوتی و گونه مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*). مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، سال ۲۰، شماره ۷۸/۱. ۱۲۰-۱۱۱.
- مرادی، م. ۱۳۸۷. بررسی آلودگی زنبورستانهای استان گیلان با انگل *Nosem apis*. ششمین همایش سراسری انگل شناسی، کرج، ۹ تا ۱۳ خرداد ۱۳۸۷.
- موسوی، م. ح.، آخوندزاده بستنی، ا.، میثاقی، ع.، جباری خامنه، ح.، گیتی، ک.، زهرایی صالحی، ت. ۱۳۸۸. بررسی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر روی میزان رشد سالمونلا تیفی موریوم در سوپ جوتجارتی. فصلنامه گیاهان داروئی، سال نهم، دوره ۲، شماره ۳۴، صفحه ۱۰۹-۱۱۶.
- مهدوی عرب، ن.، عبادی، ر.، حاتمی، ب.، طالبی جهرمی، خ. ۱۳۸۶. بررسی اثر حشره کشی عصاره برخی از گیاههای روی سوسک چهار نقطه ای حبوبات در آزمایشگاه و کرم برگخوار چغندر قند در گلخانه. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. دوره ۱۱. شماره ۴۲. صفحه ۲۲۱-۲۳۴.





یادگار، ع.، ستاری، م.، بیگدلی، م.، بختیاری، ف. ۱۳۸۸. بررسی و مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی برگ، گل و ریشه آویشن شیرازی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین. فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم، دوره ۱. شماره ۳۳. صفحه ۵۵-۶۵.

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, 417–427.

Behnia, M., Haghghi, A., Komeylizadeh, H., Seyyed Tabae, J., Abadi, A. 2008. Inhibitory Effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in Vitro Growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean J. Parasitol.*, 46 (3): 153-156.

Cecilia, C., Marco, L., Lara, M. 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera*) in laboratory conditions. *Apidologie*, 41(1): 141–150.

Chiesa, F. 1991. Effective control of *varroa* using powdered thymol. *Apidologie*, 22 (1):135–145.

Ebert, T.A., Kevan, P.G., Bishop, B.L., Kevan, S.D., Downer, R.A. 2007. Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.*, 46 (1): 220–224.

Fries, I. 1988. Infectivity and Multilication of *Nosema apis*. in the Ventriculus of the Honey bee. *Apidologie*, 19 (3): 319-328.

Imdorf, A., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Bachofen, B., Beretta, C. 1995. Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera*. in a laboratory test. *Apidologie*. 26 (1): 27–31.

Giovanna, M, Mauro, C., Franco, M., Anna, G. 2008. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 39 (1): 436–445.

Machado, M., Dinis, AM., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custódio, JB., Sousa Mdo, C. 2010. Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitol Res.*, 106 (5):1205-15.

Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Martínez Salvador, A., Garrido-Bailón E., Hige, M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (1): 6331–6338.

Santoro, GF., das Graças Cardoso, M., Guimarães, LG., Salgado, AP., Menna-Barreto, RF., Soares, MJ. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.*, 100 (4):783-90.







## Survey of *Thymus vulgaris* ethanolic effects on the *Nosema* parasite in honeybee



**M. Moradi<sup>1</sup>**

1- Member of Board Scientific Agriculture Research Center and Nature Resource West Azarbaijan, West Azarbaijan, Iran

DOI: 10.22092/hbsj.2019.121333.1062

۳۲

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of *Thymus vulgaris* ethanolic extract on the development of *Nosema* parasite in honeybee. Emerging bees from a *Nosema*-free colony inoculated with 20000 spores of *Nosema*/bee with sucrose syrup. The experimental groups fed syrup prepared with *Thymus vulgaris* ethanolic extract in different concentrations (0.50, 0.75, 1, 1.50 and 2 mg/ml). All groups placed in cages, and kept in an incubator at 33°C and 60-70% RH. Infection levels were monitored over 6 weeks by removal death bees and dissection of them. After 6 weeks bees fed with different concentration of *Thymus* extracts had significantly lower levels of infection (2-7 million spores/bee) compared to control bees (20- 70 million spores/bee). Result of this study showed that *Thymus vulgaris* ethanolic extract appears to be promising in the treatment or control of *Nosema* infection in honeybee colonies.

**Key words:** Honeybee, *Thymus vulgaris*, Ethanolic extract, *Nosema*

**Corresponding Author:** M. Moradi

**Email:** m.moradi@rvsri.ir

