نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۱، تابستان ۱۳۹۰

جداسازی و شناسائی عوامل بیماری های قارچی زنبورعسل در استان آذربایجان غربی

● مصطفی مرادی
عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی (نویسنده مسئول)
● مجتبی محرمی
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۶۶۵۶۱۵۴
Email: m.moradi@rvsri.ir

چکیده

این بررسی در سطح زنبورستان های استان آذربایجان غربی در سه فصل بهار، تابستان و پائیز سال ۱۳۸۱ انجام گرفته است که از میان شهرستان های استان ۵ شهرستان بطور کاملاً تصادفی انتخاب شده و از میان زنبورستان های هر شهرستان ۸ زنبورستان و در هر زنبورستان از ۵ کلنی، نمونه های زنبور بالغ، لارو و شفیره، گرده گل و عسل در شرایط تمیز در ظروف نمونه برداری جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردیده است (در مجموع تعداد ۲۰۰۰ نمونه از زنبورستان های تعیین شده، جمع آوری گردید). در آزمایشگاه بعد از آماده سازی نمونه ها، آنها را در محیط کشت سابرودگستروز آگار کشت داده و بعد از چند روز نتایج حاصل از کشت نمونه ها ثبت گردیده است. در طول سه فصل نمونه برداری هیچ موردی از قارچ *Ascosphera apis*، عامل بیماری نوزاد گچی زنبورعسل، جداسازی نگردید. ولی قارچ های *A. flavus* و *A.fumigatus*، عوامل بیماری نوزاد سنگی، در سه فصل نمونه برداری به ترتیب به میزان ۴/۲۹ درصد و ۲/۰۴ درصد جداسازی گردیدند. این میزان آلودگی بر اساس کلنی های بازدید شده برای قارچ *Aspergillus flavus* ۱۷/۱۶درصد و برای قارچ *A.fumigatus* ۶/۸۳ درصد بوده است و نهایتاً از کل ۱۰۰ زنبورستان بررسی شده در سه فصل نمونه برداری جمعاً از ۷۷ زنبورستان(۷۷ درصد) قارچ *A. flavus* و از ۳۰ زنبورستان (۳۰ درصد) قارچ *A.fumigatus* جداسازی گردیده است.

کلمات کلیدی: *Ascosphaera apis, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus*، زنبور عسل، آذربایجان غربی، بیماری های قارچی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 91 pp: 59-67

Isolation and identification of Honey bee diseases fungal agents in West Azarbajan province apiaries

By: Mostafa Moradi and Mojtaba Moharami, Hesarak, Karaj, Iran, Razi Vaccine and Serum Research Institute

A study conducted to Isolation and identification of Honey bee diseases fungal agents in Iran West Azarbaijan province apiaries. We collected 2000 samples (Adult honeybee, brood, honey and pollen) of 200 apiaries in three seasons (spring, summer and autumn). Samples prepared and cultivated in SDA medium. Finally, Ascosphaera apis, causative agent of Chalk brood disease, didn't isolate of any apiaries, but 4.29 of samples was contaminated with Aspergillus flavus and 2.04 present of them was contaminated with Aspergillus fumigatus, causative agents of Stone-brood disease.

Key words: *Ascosphaera apis, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus*, Honeybee, Fungal diseases, West Azarbaijan and Iran.

مقدمه

دو بیماری قارچی نوزاد گچی و نوزاد سنگی در زنبورعسل از اهمیت خاصی برخوردارند. این دو بیماری دارای علائم مشخصی در کلنی های زنبورعسل بوده و گاهی تلفات شدیدی را در آنها ایجاد نموده و خسارت زیادی به زنبورداران وارد می آورند و در اکثر نقاط جهان به عنوان دو بیماری مهم زنبورداری ها مورد توجه قرار گرفته اند.

بیماری نوزاد گچی برای اولین بار در سال ۱۹۱۳ توسط ماسن از آلمان توصیف گردید بعدها عامل آن قارچ هتروتالیک *A.apis* تشخیص داده شد و مشخص گردید که تنها در نوزادان زنبور عسل باعث ایجاد بیماری می گردد و در زنبوران بالغ، علی رغم ایجاد آلودگی، هیچ گونه عارضه و علائمی ایجاد نمی کند (Bailey و Ball، ۱۹۹۱).

لارو زنبورعسل از دو طریق گوارشی و جلدی با این قارچ آلوده می شود. در راه گوارشی زمانی که لارو زنبور اسپورهای قارچ را از طریق غذا توسط زنبوران پرستار دریافت می کند (Heath و Gaze، ۱۹۸۷)، اسپورها در داخل روده آن جوانه زده و میسیلیوم های قارچ ظاهر می شوند و بتدریج در دیواره روده میانی نوزاد نفوذ کرده و کم کم خود را به سطح بدن رسانده و به علت رشد زیاد میسیلیوم ها سطح بدن نوزاد بطور کامل پوشیده می گردد که ابتدا به صورت توده ای کرکی یا پنبه ای در آمده و بتدریج خشک شده و به صورت توده ای گچی شکل در می آید که می تواند به دو رنگ سفید و خاکستری متمایل به سیاه باشد. تفاوت این دو رنگ به دلیل دو نوع تولید مثل در قارچ است بدین معنی که در صورت تولید مثل جنسی و ترکیب دو تالک نر (-) و ماده (+)، آسکوسپورهای خاکستری رنگ ایجاد شده و لارو مومیائی شده به رنگ خاکستری متمایل به سیاه دیده می شود. در تولید غیر جنسی چون تنها یک سویه (نر یا ماده) در آلودگی لارو نقش دارند و تولید مثل جنسی صورت نمی گیرد، لارو مومیائی شده سفید رنگ خواهد بود (Maurizio، ۱۹۳۴).

در آلودگی از طریق جلدی، اسپور قارچ مذکور در سطح بدن لارو جوانه زده و با فرستادن میسیلیوم ها به داخل بدن باعث مرگ نوزاد شده و با رشد میسیلیوم ها در سطح بدن لارو به صورت توده ای گچی شکل در می آید (Bailey و Ball، ۱۹۹۱).

قارچ *Ascosphera apis* در محدوده حرارتی ۲۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد (با اپتیموم ۳۱ و ۳۵ درجه) به خوبی رشد می کند که این محدوده حرارتی دقیقاً حرارت منطقه پرورش نوزاد در داخل کلنی زنبورعسل است. از طرف دیگر قارچ در محدوده pH ۷/۸-۵ (دقیقاً برابر با pH همولنف و محتویات روده لارو زنبور) به خوبی رشد می کند و در pH های پائین تر مثلاً pH عسل، گرده گل و غذای نوزادان به کندی رشد می کند. لذا این قارچ برای زندگی در لارو زنبورعسل اختصاص یافته است (Maurizio، ۱۹۳۴)..

هر نوزادی که در اثر بیماری نوزاد گچی تلف می شود در حدود ۸ ۱۰ الی ۱۰۹ اسپور قارچ *A.apis* تولید خواهد کرد که بیشتر این تعداد توسط زنبوران پرستار در حین نظافت قاب ها به بیرون از کلنی انتقال داده می شوند ولی تعدادی از آنها در روی قاب ها باقی مانده و باعث آلودگی نسل های بعدی خواهند شد (Koenig و همکاران ۱۹۸۶). قارچ *A.apis* نسبت به شرایط نامساعد محیطی مقاوم بوده و مدت های مدیدی در محیط های زنبورداری به صورت غیر فعال زنده مانده و به محض فراهم شدن شرایط، مجدداً رشد کرده و سیکل زندگی خود را تکرار می کند. این قارچ در حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد مرطوب به مدت یک ماه و در حرارت اتاق حداقل ۶ ماه و در حرارت ۱۲-۱ درجه سانتی گراد به مدت یک سال و در داخل گرده گل حداقل ۱۲ ماه زنده باقی می ماند. در نتیجه با توجه به حرارت محل نگهداری وسایل زنبورداری، قارچ *A.apis* مدت های طولانی روی لوازم و وسایل زنبورداری زنده مانده و به عنوان یک منبع آلودگی عمل می کند. قارچ *A.apis* در شرایط آزمایشگاهی روی محیط های کشت قارچی از جمله سابرودکستروز آگار بخوبی رشد می کند و برای تحریک جوانه زدن اسپور در این محیط ها، باید ۲۴ ساعت اول در محیط فاقد اکسیژن یا در مجاورت CO_2 در حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گیرد. ولی ثابت شده است که در میسیلیوم های قارچ تنها تحت شرایط هوازی رشد می کنند (Heath. L. A. F، ۱۹۸۲).

برای تشخیص بیماری نوزاد گچی در کلنی های زنبورعسل از روش های مختلفی از جمله کشت نمونه های مشکوک در محیط کشت سابرودکستروز آگار(Bailey & Ball، ۱۹۹۱) و استفاده از روش های مولکولی (PCR) استفاده می شود (Anderson و همکاران ۱۹۹۸).

بیماری نوزاد گچی در اکثر نقاط جهان گزارش شده است

(Heath. L.A.F، ۱۹۸۵). این بیماری در بیشتر کشورهای جهان که در مناطق معتدل نیمکره شمالی زمین قرار گرفته اند مشاهده می شود (Michael Hornitzky، ۲۰۰۱). ولی تابحال گزارش مستندی در مورد شیوع و پراکندگی بیماری نوزاد گچی در زنبورستان های ایران وجود ندارد.

بیماری قارچی نوزاد سنگی (Stone-brood) برای اولین بار توسط Masson در سال ۱۹۰۶ در آلمان توصیف گردید و از نقاط دیگر جهان هم گزارشاتی مبنی بر حضور آن وجود دارد (Roger A. Morse، ۱۹۸۰). عامل این بیماری در درجه اول قارچ آسپرژیلوس فلاووس (*Aspergillus flavus*) و در درجه بعد آسپرژیلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) است که علاوه بر نوزاد زنبور می توانند زنبوران بالغ را هم آلوده و بیمار نمایند. این قارچ ها جزو قارچ های ساپروفیت بوده و باعث ایجاد بیماری در گیاهان، حیوانات و انسان می شوند و با توجه به شرایط رشدشان در همه جا پراکنده اند (Bailey، ۱۹۹۱).

لارو زنبورعسل از طریق گوارشی و جلدی با اسپورهای این قارچ ها آلوده می شود. اسپورها در داخل یا سطح بدن جوانه زده و میسیلیوم های قارچ به بافت های اطراف نفوذ کرده و کل بدن را می پوشانند. بعضی از میسیلیوم ها به دیواره های مومی سلول های شان نفوذ کرده و در نتیجه لاروهای مومیائی شده بطور محکم به دیواره های سلول چسبیده و به راحتی کنده نمی شوند. تلفات ناشی از این قارچ ها چندان زیاد نبوده و احتمالاً شرایطی از جمله ضعف کلنی ها و حساس بودن لاروها و زنبوران بالغ، در بروز بیماری و شدت تلفات نقش داشته باشند (Bailey، ۱۹۹۱).

آنچه که در رابطه با بیماری نوزاد سنگی زنبورعسل حائز اهمیت است و باید به دقت مورد توجه قرار گیرد آلودگی فراورده های زنبورعسل با این قارچ ها بخصوص سموم قارچی آنهاست، چرا که آسپرژیلوس ها بخصوص *A.flavus* تولید سموم قارچی متعددی می کند که در صورت آلودگی مواد غذائی با آنها سلامت انسانی را به مخاطره می اندازد. در نتیجه حضور این قارچ ها در داخل کلنی های زنبورعسل از نظر بهداشت انسانی بسیار مهم تر از تلفات ناشی از آنها در زنبورعسل است. تا بحال بررسی جامعی روی بیماری های قارچی زنبورعسل در زنبورستان های مناطق مختلف کشور انجام نگرفته است و مواردی که از مناطق شمالی کشور گزارش می شده اند بیشتر به صورت شفاهی بوده و در بررسی های آزمایشگاهی و تحقیقاتی به اثبات نرسیده اند. با توجه به اهمیت قارچ ها در بهداشت انسان و فراورده های دامی بخصوص فراورده های زنبورعسل، انجام یک بررسی روی بیماری های قارچی و عوامل قارچی آلوده کننده فراورده های زنبورعسل از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و باید در سطح زنبورستان های مناطق مختلف کشور انجام پذیرد. این بررسی برای رسیدن به این هدف و مشخص نمودن وضعیت آلودگی کلنی های زنبورعسل استان آذربایجان غربی انجام گرفته است.

مواد و روش ها

روش نمونه گیری

در این بررسی از روش نمونه گیری خوشه ای چند مرحله ای-تصادفی استفاده شد. به این صورت که با توجه به گزارشاتی از سایر کشورها که حداکثر میزان شیوع بیماری های قارچی زنبورعسل را در حدود ۱۵ درصد گزارش نموده اند، با استفاده از فرمول استاندارد تعین تعداد نمونه و با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵ درصد و دقت ۷۰ درصد تعداد ۱۰۰ کلنی در هر فصل انتخاب گردید که با توجه به روش نمونه برداری خوشه ای از ضریب اصلاح ۲ استفاده گردید. لذا حجم نمونه لازم در این مطالعه ۲۰۰ کلنی در هر فصل در نظر گرفته شد.

انتخاب نمونه ها در سطح استان به این صورت انجام گرفته که در هر فصل (بهار، تابستان و پائیز) از میان شهرستان های استان آذربایجان غربی ۵ شهرستان و از میان زنبورستان های هر شهرستان ۸ زنبورستان و در هر زنبورستان ۵ کلنی را بطور کاملاً تصادفی انتخاب کرده و از هر کلنی حدود ۳۰ عدد زنبوربالغ، ۲۰ عدد لارو و شفیره، ۱۰ گرم عسل و ۵×۵ سانتی متر از سلول های مومی حاوی گرده گل را در

جدول ۱- توزیع فراوانی مطلق و نسبی کل نمونه های مورد آزمایش بر حسب شهرستان در استان آذربایجان غربی

ردیف	نام شهرستان	نمونه	
		تعداد نمونه	درصد
۱	ارومیه	۴۰۰	٪ ۲۰
۲	خوی	۴۰۰	٪ ۲۰
۳	سلماس	۳۲۰	٪ ۱۶
۴	میاندوآب	۳۲۰	٪ ۱۶
۵	اشنویه	۴۰۰	۲۰
۶	پیرانشهر	۸۰	٪۴
۷	نقده	۸۰	٪۴
جمع		۲۰۰۰	٪۱۰۰

ظروف پلاستیکی استریل و در شرایط نسبتاً تمیز برداشت نموده و به آزمایشگاه انتقال داده می شد. شهرستان های مورد نظر و تعداد نمونه های اخذ شده از آنها در سه فصل نمونه گیری در جدول ۱ ذکر شده اند. البته قبل از نمونه برداری از کلنی ها، یک فرم پرسشنامه ای را از اطلاعات زنبوردار در رابطه با وضع بیماری های قارچی و سایر بیماری ها و درمان آنها پر می شد.

روش آزمایش

آماده سازی محیط های کشت قارچی

در این بررسی از محیط کشت قارچی سابرودکستروز آگار (SDA) استفاده گردید که به دو صورت زیر تهیه می شد:

۱- سابرودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (برای رشد کل قارچ های موجود در نمونه ها و جلوگیری از رشد باکتری ها)، برای تهیه این محیط به این شکل عمل گردید: مواد لازم برای تهیه یک لیتر محیط کشت را در آب مقطر استریل حل نموده و برای شفاف نمودن آن را در حرارت مرطوب قرار داده تا به جوش آمده و بتدریج شفاف گردد. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. بعد از استریل شدن، کلرامفنیکل را به میزان معین در اتر حل نموده و با رعایت شرایط لازم و اصول ایمنی، به محیط گرم اضافه گردید.

۲- سابرودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل و سیکلوهیگزامید (برای رشد قارچ آسکوسفرا آپیس و جلوگیری از رشد قارچ های ساپروفیت و باکتری ها)، این محیط هم به شکل محیط قبل تهیه گردید و بعد از اضافه نمودن کلرامفنیکل، سیکلوهیگزامید را به میزان معین در استون حل نموده و به محیط گرم اضافه گردید.

محیط های کشت فوق الذکر را بعد از تهیه و خنک نمودن تا دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، در پلیت های شیشه ای استریل تقسیم نموده و تا زمان کشت نمونه ها در داخل یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند.

نحوه کشت نمونه ها

۱- زنبور بالغ: بعد از بیهوش نمودن و کشتن زنبورها با پنبه آغشته به اتر در داخل ظروف نمونه گیری، لوله گوارشی آنها را با استفاده از پنس کوچک بیرون آورده و در داخل یک ظرف دیگر قرار داده و با آب مقطر استریل چند بار شستشو داده می شدند. سپس با استفاده از سرم فیزیولوژی ۰/۸۵ درصد استریل از لوله های گوارشی هموژنی تهیه می شد و در زیر لامینار هود و در کنار شعله و با رعایت شرایط نسبتاً استریل با استفاده از یک آنس نوک گرد قطراتی از هموژن تهیه شده را در سطح محیط های کشت فوق الذکر موجود در پلیت های شیشه ای قرار داده و به صورت یکنواخت پخش می گردیدند و روی پلیت ها کد شهرستان، زنبورستان و کلنی های نمونه برداری شده نوشته می شدند.

۲- لارو و شفیره: نمونه های لارو و شفیره را بعد از بیرون آوردن از ظروف نمونه گیری، در داخل یک هاون چینی استریل قرار داده و با استفاده از آب مقطر استریل از آنها هموژنی تهیه نموده و به شیوه نمونه های زنبوربالغ کشت داده می شدند و کد شهرستان، زنبورستان و کلنی نمونه برداری شده را روی پلیت ها ثبت می گردید.

۳- عسل: نمونه های عسل را صاف نموده و در داخل ظرف استریل دیگری ریخته می شدند سپس یک گرم از آنها را به ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل موجود در یک لوله آزمایش اضافه نموده و با استفاده از دستگاه همزن برقی به مدت چند دقیقه به هم زده تا به صورت محلول کاملاً یکنواختی در آید و سپس طبق روش ذکر شده برای نمونه های زنبوربالغ و لارو و شفیره در سطح محیط های کشت، کشت داده می شدند.

۴- گرده گل: نمونه های گرده گل را با استفاده از پنس استریل از داخل سلول های موم بیرون آورده و در داخل یک ظرف استریل ریخته می شدند سپس یک گرم از آنها را در حدود ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نموده و با استفاده از دستگاه همزن برقی به صورت هموژن در آورده می شدند و سپس طبق روش های فوق الذکر در سطح محیط کشت، کشت داده می شدند.

انکوباسیون نمونه ها

۱- پلیت های حاوی محیط سابرودکستروز آگار واجد کلرامفنیکل را به مدت ۵ روز در داخل انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده و روزانه مورد بازدید قرار می گرفتند و قارچ هائی که در سطح محیط ها رشد کرده بودند را ثبت نموده و پلیت ها بعد از ۵ روز حذف می شدند.

۲- پلیت های حاوی سابرودکستروز آگار واجد کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید را برای تحریک جوانه زدن اسپورهای قارچ *A.apis* به مدت ۲۴ ساعت در داخل جار بی هوازی و در حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد قرار می دادیم. بعد از این مدت پلیت ها را از داخل جار بی هوازی در آورده و به انکوباتور ۲۵ درجه منتقل نموده تا مراحل رشد قارچ *A.apis* تکمیل گردد. این پلیت ها را هم بطور روزانه مورد مشاهده قرار داده و در صورت رشد قارچ *A.apis* در جداول مربوطه ثبت می شدند. چون قارچ *A.apis* به کندی رشد می کند لذا برای حصول اطمینان از وجود یا عدم وجود آن، پلیت های مورد نظر را حداقل تا ۳ هفته در داخل انکوباتور نگه داشته و بعد از این مدت حذف می شدند.

تشخیص قارچ های رشد کرده

بعد از انکوباسیون نمونه ها، پلیت ها را روزانه مورد مشاهده قرار داده و قارچ های رشد کرده و تعداد پرگنه های آنها در جداول مربوطه ثبت می شدند. از قارچ هائی که از نظر ماکروسکوپیک و شکل پرگنه ها قابل تشخیص نبودند لام میکروسکوپی تهیه کرده و با رنگ کاتن بلو رنگ آمیزی نموده و خصوصیات مورفولوژیکی آنها را در زیر میکروسکوپ مورد مشاهده قرار داده و تشخیص نهائی داده می شد. در صورت عدم تشخیص قارچ ها با این روش، از روش کشت روی لام (Slide culture) استفاده نموده و بعد از رشد لازم، طبق دستورالعمل های موجود تشخیص داده می شدند.

نتایج

طی سه فصل نمونه برداری، جمعاً از هرکدام از نمونه ها تعداد ۵۰۰ نمونه جمع آوری گردید و بعد از مراحل کشت تشخیص های لازم داده شدند.

در جدول ۴-۲ توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ های بیماریزای زنبورعسل (قارچ *Aspergillus flavus*، *A.apis* و *Aspergillus fumigatus*) بر حسب نوع قارچ، نوع نمونه و فصل نمونه برداری ذکر شده اند. بطوری که مشاهده می شود هیچ موردی از قارچ *A.apis* در میان نمونه ها وجود نداشته است. ولی قارچ *Aspergillus flavus* در فصل بهار به میزان ۴/۳ درصد و در فصل تابستان به میزان ۵/۵ درصد و در فصل پائیز به میزان ۳/۲۵ درصد و قارچ *Asp.fumigaus* در فصل بهار به میزان ۲/۲۵ درصد و در فصل تابستان به میزان ۸۸/ درصد و در فصل پائیز به میزان ۲ درصد از نمونه ها جداسازی گردیده اند.

در جدول شماره ۵ توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ های بیماری زای زنبورعسل به نسبت کلنی های نمونه برداری شده ذکر شده است که در فصل بهار از ۲۰۰ کلنی نمونه برداری شده در سطح استان، هیچ کدام از کلنی ها آلوده به قارچ *A.apis* نبوده اند ولی ۱۶/۵ درصد آنها آلوده به قارچ *Aspergillus flavus* و ۹ درصد آنها آلوده به قارچ *Asp.fumigaus* بوده اند و در فصل تابستان در میان ۲۰۰ کلنی نمونه برداری شده هیچ موردی از قارچ *A.apis* مشاهده نشده است ولی قارچ *Aspergillus flavus* در ۲۲ درصد آنها و قارچ *Asp. fumigaus* در ۳/۵ درصد آنها جداسازی شده است. در فصل پائیز با توجه به برودت هوای زود هنگام در استان آذربایجان غربی و عدم امکان

جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ های بیماری زای جدا شده از زنبورستان های استان آذربایجان غربی بر حسب نوع قارچ و نوع نمونه در فصل بهار سال ۱۳۸۱

وضعیت آلودگی		+						–		جمع
		A.apis		*Asp.falvus*		*Asp.fumigatus*				
نوع قارچ		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
نوع نمونه	زنبور بالغ	۰	۰	۲	۱	۱	۰/۵	۱۹۷	۹۸/۵	۲۰۰
	لارو و شفیره	۰	۰	۷	۳/۵	۲	۱	۱۹۱	۹۵/۵	۲۰۰
	گرده گل	۰	۰	۱۸	۹	۱۴	۷	۱۶۸	۸۴	۲۰۰
	عسل	۰	۰	۶	۳	۱	/۵	۱۹۳	۹۶/۵	۲۰۰
جمع		۰	۰	۳۳	۴/۱۳	۱۸	۲/۲۵	۷۴۹	۹۳/۶	۸۰۰

جدول ۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ های بیماری زای جدا شده از زنبورستان های استان آذربایجان غربی بر حسب نوع قارچ و نوع نمونه در فصل تابستان سال ۱۳۸۱

وضعیت آلودگی		+						–		جمع
		A.apis		*Asp.falvus*		*Asp.fumigatus*				
نوع قارچ		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
نوع نمونه	زنبور بالغ	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۰۰	۱۰۰	۲۰۰
	لارو و شفیره	۰	۰	۱۱	۵/۵	۰	۰	۱۸۹	۹۴/۵	۲۰۰
	گرده گل	۰	۰	۲۶	۱۳	۷	۳/۵	۱۶۷	۸۳/۵	۲۰۰
	عسل	۰	۰	۷	۳/۵	۰	۰	۱۹۳	۹۶/۵	۲۰۰
جمع		۰	۰	۴۴	۵/۵	۷	/۸۸	۷۴۹	۹۳/۶	۸۰۰

جدول ۴- توزیع فراوانی مطلق و نسبی قارچ های بیماریزای جدا شده از زنبورستان های استان آذربایجان غربی بر حسب نوع قارچ و نوع نمونه در فصل پائیز سال ۱۳۸۱

وضعیت آلودگی		+						−		جمع
		A.apis		*Asp.falvus*		*Asp.fumigatus*		تعداد	درصد	
نوع قارچ		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد			
نوع نمونه	زنبوربالغ	۰	۰	۰	۰	۳	۳	۹۷	۹۷	۱۰۰
	لارو و شفیره	۰	۰	۳	۳	۱	۱	۹۶	۹۶	۱۰۰
	گرده گل	۰	۰	۱۰	۱۰	۴	۴	۸۶	۸۶	۱۰۰
	عسل	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
جمع		۰	۰	۱۳	۳/۲۵	۸	۲	۳۷۹	۹۴/۷۵	۴۰۰

جدول ۵- توزیع فراوانی مطلق و نسبی آلودگی به قارچ های بیماری زای جداسازی شده از زنبورستان های استان آذربایجان غربی بر حسب کلنی های نمونه برداری شده در سه فصل بهار، تابستان و پائیز سال ۱۳۸۱

فصل	تعداد کلنی های بررسی شده	قارچ های جداسازی شده	کلنی های آلوده	
			تعداد	درصد
بهار	۲۰۰	*A.apis*	۰	۰
		Asp.falvus	۳۳	۱۶/۵
		Asp.fumigatus	۱۸	۹
تابستان	۲۰۰	*A.apis*	۰	۰
		Asp.falvus	۴۴	۲۲
		Asp.fumigatus	۷	۳/۵
پائیز	۱۰۰	*A.apis*	۰	۰
		Asp.falvus	۱۳	۱۳
		Asp.fumigatus	۸	۸
مجموع	۵۰۰		۱۲۳	۲۴/۶

نمونــه برداری از تعــداد کلنی های تعیین شده، حداکثــر از ۱۰۰ کلنی نمونــه برداری به عمل آمد که در میــان این کلنی ها هم هیچ موردی از قارچ *A.apis* جداســازی نگردید و قارچ های *Aspergillus flavus* و *Asp.fumigaus* بــه ترتیــب در ۱۳ درصــد و ۸ درصــد کلنــی ها ی نمونه برداری شده جداسازی گردیدند.

در طول ســه فصل نمونه برداری، در میان ۱۰۰ زنبورســتان انتخاب شده در شهرســتان های مختلف اســتان هیچ مــوردی از قارچ *A.apis* مشــاهده نگردیده اســت. ولــی قــارچ هــای *Aspergillus flavus* و *Asp.fumigaus* بــه ترتیب در ۷۷ درصد و ۳۰ درصد زنبورســتان ها جدا سازی گردیده اند.

بحث

قارچ *A.apis* برای اولین بار در ســال ۱۹۱۳ توسط ماسن تشخیص داده شد. چرخه زندگی این قارچ توسط اسپیلتویر در سال ۱۹۵۵ توصیف گردید و ایشــان هم این قارچ را آسکوســفرا نامید. اسپور قارچ آسکوسفرا آپیــس به مدت حد اقل ۱۵ســال زنده باقی می مانــد(Aronstein و Murray, ۲۰۱۰; Jensen و همکاران ۲۰۰۹).

بیمــاری نوزاد گچی در تمام کشــورهای مدیترانه ای اتفاق می افتد ولــی تا ســال ۱۹۸۸ از کشــورهای پرتقــال، آلجزایر، آلبانــی و مراکش گزارش نشــده است، بطوری که تا ســال ۱۹۶۸ آنرا یک بیماری اروپائی می دانســتند اما در ســال ۱۹۷۱ آنــرا از نظر اقتصــادی در آمریکا مهم دانســتند. ولی در حال حاضر این بیماری گســترش جهانــی دارد. قارچ آسکوســفرا آپیس بندرت یــک کلنی را از پای در مــی آورد ولی از بین رفتن لاروها منجر به کاهش تعداد زنبوران بالغ شده و نهایتاً میزان تولید عســل و گرده یک کلنی کاهش خواهد یافت. گاهی موارد بســیار حادی از بیماری گزارش شده اســت که منجر به از بین رفتن کلنی شده اســت اما این موارد بســیار غیر معمولند. عوامل متعــددی را در شیوع و شدت بیماری دخیل دانســته اند مهمترین عامل مؤثر در بروز بیماری چائیدن نــوزادان ســرپوشیده می دانند. از عوامل دیگر مؤثــر در بروز بیماری می توان به رطوبت، تضعیف کلنی در اثر عوامل بیماریزا و آفات دیگر از جمله ویروس ها، واروآ یا بیماری های لوک و کاهش نســبت زنبوران پرســتار به نــوزادان و رفتار بهداشتــی ضعیف زنبوران پرســتار کلنی اشاره نمود (Puerta و همکاران ۲۰۰۱).

مشــخص شــده که در یــک کلنی که میــزان آلودگی کمتــر از ۱۲ درصد اســت بیماری نوزاد گچی با استفاده از روش های معمول بازدید از کلنی ها تشخیص داده نخواهد شد. در حالی که در صورت آلودگی بیشتر نوزادان بیماری بســرعت شیوع پیدا کرده و کلنی بشــدت ضعیف شده و حتی امکان نابودی آن هم وجود دارد (De Jong, D. ۱۹۷۶).

در طــی اجرای این بررســی عامــل بیماری نوزاد گچــی یعنی قارچ *A.apis* از کلنی های مورد بررســی جداســازی نگردیــد و هیچ موردی از بیماری مذکور مشــاهده نشــد و از طرف دیگر اکثر زنبورداران مناطق مــورد مطالعه اطلاع زیادی از بیماری نوزاد گچی نداشتند و یا اینکه اصلاً آن را نمــی شناختند. لــذا نتیجه گیری می شود کــه احتمالاً عامل این بیمــاری در اســتان آذربایجان غربی وجود نداشته یــا اینکه میزان آن به اندازه ای نیست که علائم بیماری را ایجاد نموده یا در در داخل آزمایشگاه جداسازی گردد.

در بررسی های انجام گرفته در سایر کشورها به نتایج مختلفی دست یافته اند بطوری که در یک گزارش از آفریقای جنوبی اشاره شده است که حضور بیماری نوزاد گچی تا سال ۱۹۹۹ در این کشور اثبات نشده بود. در بررسی هائی که توسط سایر محققین انجام گرفته است بیشتر روی موارد مشکوک به بیماری بوده است یعنی در کلنی هائی انجام گرفته است که نوزادان تلف شده ای مشــابه با بیماری نوزاد گچی وجود داشته است لذا امکان جداسازی قارچ از نمونه هائی که در اثر آن تلف شده اند بطور قابل ملاحظه ای زیاد بوده و به میزان بســیار زیاد در روی محیط کشــت رشد نموده است. ولی در این بررسی از نمونه های مختلف داخل کلنی ها تنها قارچ عامل بیماری جســتجو شده است که با توجه به عواملی که در بروز بیمــاری نقش دارند مشــاهده موارد بیماری بســیار ضعیف بوده و امکان رشد قارچ در ســطح محیط کشــت وجود نداشته است. ولی با استفاده از روش هــای مولکولــی می توان موارد زیادی از قــارچ عامل بیماری را در محتویــات کلنی ها جســتجو نمود، بطوریکه در یک بررســی در کشــور ژاپــن بــا اســتفاده از روش PCR از تعــداد ۱۱۲ کلنی بررســی شده از تعــداد ۲۷ کلنی (۲۴/۱ درصــد) قارچ *A.apis* را جداســازی نموده اند (Mikio Yoshiyama و Kiyoshi Kimura ۲۰۱۰)

در یک بررســی در کشــور ترکیه ذکر شده که بیمــاری نوزاد گچی بــرای اولین بــار در ســال ۱۹۸۸ شناســائی شده اســت و در عرض دو ماه بعد از کشــف آن در ۹ اســتان این کشور تشــخیص داده شده است (Ertag و همکاران ۱۹۹۳). در گزارشی که توسط دانشگاه امپریال لندن در سال ۲۰۰۸ در رابطه با بهداشت زنبورعسل در انگلیس و ولز ارائه شده اســت اشاره ای به حضور بیماری های قارچی در این ســال نشــده است (Imperial College، ۲۰۰۸). در گزارشــی از اونتاریــوی کانــادا ذکر شده است که در سال ۲۰۰۶ از تعداد ۸۶۹۴ کلنی ۲/۳۸ درصد آنها واجد بیماری نوزاد گچی بوده اند (Omafra,۲۰۰۶)

در ادامه به دلایل احتمالی عدم وجود این بیماری در استان آذربایجان غربی اشاره می گردد:

عدم وجودعامل بیماری در زنبورستان های استان، عدم شرایط آب و هوای مناسب رشد قارچ، عدم ارتباط مستقیم و مراوده وسایل و ملزومات زنبورداری بین اســتان آذربایجان غربی و اســتان های شمالی کشور که بیمــاری نوزاد گچی در آنهــا وجود دارد، عدم خرید وســایل و ملزومات زنبورداری از کشــورهای همســایه غربی از جمله ترکیه که بیماری نوزاد گچی در آنجا اثبات شده است.

به هر حال با توجه به نتایج بررسی های مختلف مشخص شده است کــه اگر عامل بیمــاری نوزاد گچی در منطقه ای هــم وجود داشته باشد عوامل متعددی ضروری اســت تا این که بیماری به صورت بالینی خود را نشان دهد که در پائین به تعدادی از آنها اشاره می شود:

تهویــه نامطلــوب (پوشانــدن کلنی هــا با پوشش های پلاســتیکی غیرقابل نفوذ هو و احتباس رطوبت زیاد در داخل کلنی ها)، رطوبت بیش از حد منطقه نگهداری کلنی ها، دمای مناسب رشد قارچ ها (۱۵ الی ۳۷ درجه سانتی گراد)، کاهش نسبت زنبور بالغ به نوزادان داخل کلنی (عدم نظافت کافی داخل کلنی و پرســتاری نــوزادان)، ناقص پر شدن کلنی ها در فصل زمســتان (ایجاد مکان مناســب برای رشد قارچ ها)، خالی شدن

سریع کلنی و شان ها و عدم نظافت دقیق آنها (در زمان بچه دادن زیاد کلنی ها)، تلاقی های خویشاوندی (افزایش حساسیت به بیماری ها و تضعیف رفتارهای بهداشتی کلنی ها)، کلنی های ضعیف (عدم نظافت و پرستاری کافی)، عوامل وراثتی (استعداد ابتلا به بیماری ها)، بیماری های تضعیف کننده کلنی ها (بیماری های باکتریائی، انگل های داخلی و خارجی، کمبودهای تغذیه ای)، مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها (بهم زدن فلور قارچی – باکتریائی دستگاه گوارش زنبورها و رشد آسان قارچ ها)، محیط های اسیدی (آلودگی هوا با آلاینده های اسیدی)، کلنی های با قاب ثابت (عدم برداشت و اصلاح آنها)، مدیریت نامناسب و غیر صحیح زنبورستان، مصرف علف کش ها و بعضی از سموم حشره کش (افزایش استعداد ابتلا زنبورها به عفونت های قارچی) و انواع تنش ها و استرس ها.

بیماری نوزاد سنگی

بیماری نوزاد سنگی در اروپا و آمریکای شمالی بخوبی شناخته شده است. آلودگی لاروها با قارچ آسپرژیلوس فلاووس از ونزوئلا گزارش شده است (استیسکال، ۱۹۵۸). این بیماری در بریتانیا برعکس حضور رایج قارچ و شرایط جوی مرطوب، که معمولاً اعتقاد بر این است که عفونتهای قارچی فراوان باشند، نادر است. احتمالاً قارچ بطور معمول در زنبورها رشد نمی کند و تنها زمانی این اتفاق می افتد که زنبورها توسط سایر عوامل تضعیف شده باشند. در طی این بررسی عوامل بیماری نوزاد سنگی یعنی قارچ های *A.flavus* و *A.fumigatus* به ترتیب از ۱۳/۸ درصد و ۶/۸ درصد کلنی های بررسی شده جداسازی گردیدند. قارچ *A.flavus* از ۷۷ درصد زنبورستان ها و قارچ ها *A.fumigatus* از ۳۰ درصد آنها جداسازی گردید. علی رغم این میزان آلودگی زنبورستان ها، هیچ موردی از بیماری به صورت بالینی در کلنی ها مشاهده نگردید و قریب به اتفاق زنبورداران مناطق مورد بررسی اطلاع زیادی از بیماری نداشته و تا بحال هیچ موردی از آن را مشاهده نکرده بودند. جداسازی عوامل بیماری نوزاد سنگی در کلنی ها و عدم مشاهده بیماری به صورت بالینی در این استان را می توان به شرح زیر مورد بحث قرار داد: این عوامل در محیط اطراف و روی وسایل و ملزومات زنبورداری و گیاهان و درختان به صورت ساپروفیت وجود داشته و از راه های مختلف وارد کلنی ها شده و در روی محتویات آن به صورت نهفته باقی می مانند. میزان اسپور این قارچ ها در داخل غذای زنبورعسل به اندازه ای نیست که باعث بروز علائم بیماری گردد. خاصیت آنتاگونیستی برخی از قارچ ها و باکتری های موجود در داخل دستگاه گوارش زنبورعسل اثرات بیماریزائی این قارچ ها را کم کرده و مانع بروز بیماری می گردند. زنبوران پرستار و نظافت گر کلنی ها لاروهای احتمالاً تلف شده را سریعاً برداشته و مانع گسترش بیماری و مشاهده شکل بالینی آن می شوند. بطوری که در بررسی های مختلف نشان داده شده است که زنبوران عسل در مقابل بسیاری از بیماری ها دارای رفتار بهداشتی مناسبی بوده و در صورت پائین بودن میزان شیوع و شدت بیماری قادرند بیماری را کنترل نمایند. (Rothenbuhler, ۱۹۶۴; Bailey و Ball, ۱۹۹۱; Spivak و Gilliam, ۱۹۹۳; Spivak و Downey, ۱۹۹۸ و Oldroyd, ۱۹۹۶)

حضور قارچ های بیماری زا در داخل کلنی ها تنها شرط بروز بیماری نبوده و شرایط و عوامل متعددی برای اینکار لازم است که به تعدادی از آنها در مورد بیماری نوزاد گچی اشاره شد. بطوری که مشخص شده است که برای بروز بیماری باید دمای منطقه پرورش نوزادان به میزان مشخصی کاهش بیابد به گونه ای که اگر نوزادان سر پوشیده به مدت چند ساعت چائیده شوند بسیار مستعد ابتلاء به این بیماری می گردند که این اتفاق در ابتدای فصل بهار بسیار اتفاق می افتد، چرا که در این مواقع گاهی دمای محیط دچار نوسان شده و زمانی که دمای منطقه نوزادان به ۲۵ درجه برسد مستعد ابتلاء به بیماری می گردند.از سوی دیگر با توجه به اینکه نوزادان نر در حاشیه قاب ها قرار دارند لذا استعداد بیشتری نسبت به نوزادان کارگر در ابتلاء به بیماری دارند. علاوه بر این عوامل متعدد دیگری از جمله میزان جمعیت کلنی ها هم در بروز بیماری نقش بسزائی دارند چرا که هر چقدر تعداد زنبوران پرستار و نظافت گر کمتر باشند قابها کمتر نظافت شده و امکان بقا آلودگی بیشتر است همچنین منطقه نوزادان کمتر پوشیده شده و نوزادان نسبت به حالت عادی بیشتر چائیده و مستعد ابتلاء به بیماری می گردند.

(Maurizio, ۱۹۳۴; Koenig و همکاران ۱۹۸۷; Bailey و Ball, ۱۹۹۱; Pederson, ۱۹۷۶ و Bailey, ۱۹۶۷)

در این بررسی گرچه قارچ های عامل بیماری نوزاد سنگی جداسازی گردیدند ولی احتمالاً شرایط محیطی و فیزیولوژیکی کلنی های بررسی شده مساعد رشد قارچ ها و بروز بیماری نبوده و بیماری مشاهده نمی شود. در یک بررسی که به صورت تجربی کلنی های زنبورعسل را با قارچ های عامل بیماری نوزاد سنگی آلوده کرده بودند هیچ موردی از بیماری مشاهده نگردید و نتیجه گیری شده بود که احتمالاً تنش ها و استرس ها و شرایط نامناسب موجب افزایش حساسیت زنبوران به بیماری می گردد (Roger, A. Morse، ۱۹۸۰). به هر حال علی رغم عدم مشاهده بیماری نوزاد سنگی در زنبورستان های استان آذربایجان غربی، نمی توان از خطرات احتمالی آن در امان بود چرا که عوامل این بیماری در تعداد زیادی از زنبورستان ها یافت شده و در صورت مساعد شدن شرایط رشد، خطرات زیادی به دنبال خواهند داشت و از طرف دیگر وجود این قارچ ها در فراورده های زنبورعسل بهداشت انسانی را به مخاطره می اندازند. بطوریکه علاوه بر ایجاد بیماری های مختلف در انسان بطور مستقیم، با تولید سموم قارچی (آفلاتوکسین ها) باعث به مخاطره انداختن سلامتی انسان می گردند و از طریق غیر مصرفی نمودن فراورده های آلوده زنبورعسل برای انسان، خسارات زیادی به صنعت و اقتصادی زنبورداری وارد می آورند. لذا نتایج حاصل از این بررسی می تواند هشداری برای زنبورداران در جهت رعایت اصول صحیح زنبورداری و جلوگیری از فراهم آوردن شرایط مساعد رشد قارچ ها در داخل کلنی ها و برای تولید کنندگان و مصرف کنندگان فراورده های مختلف زنبورعسل در جهت عدم تولید و بسته بندی و مصرف فراورده های زنبورعسل بدون توجه به آلودگی های قارچی آنها باشد.

پیشنهادات

با توجه به اینکه عوامل بیماری نوزاد سنگی در سطح زنبورستان های استان آذربایجان غربی به میزان قابل توجهی جداسازی گردیده اند و همچنین قارچ های ساپروفیت و حتی بیماری زای انسان از

تعدادی از نمونه ها جداسازی شده اند که اولاً امکان شیوع بیماری نوزاد سنگی در این استان تحت شرایط مساعد رشد عوامل آن وجود داشته و ثانیاً آلودگی فراورده های زنبورعسل (بخصوص گرده و عسل) که اکثراً به صورت خام و پالایش نشده مصرف می شوند، می تواند برای بهداشت انسانی خطراتی به دنبال داشته باشند، در ادامه پیشنهاداتی در رابطه با اصول بهداشت کلنی ها و استحصال و نگهداری فراورده های زنبورعسل ارائه شده اند:

۱- از پوشاندن کلنی ها با پوشش های پلاستیکی غیر قابل نفوذ هوا و رطوبت جداً خودداری شود.

۲- از قرار دادن کلنی ها در مکان های مرطوب و فاقد تهویه مناسب خودداری شود.

۳- از تهیه شربت شکر با آب های آلوده و غیر قابل شرب خودداری شود.

۴- از مصرف آنتی بیوتیک ها به میزان زیاد و بدون مشورت با مسؤلین خودداری شود.

۵- قاب های گرده گل ذخیره ای در جای خشک و خنک نگهداری شوند.

۶- قاب های عسل را قبل از اینکه درب کل سلول های حاوی عسل با موم پوشیده شود از داخل کلنی بیرون نیاورده و عسل آنها استحصال نگردد.

۷- عسل های انباری در جای خشک و خنک و بدور از نور مستقیم آفتاب نگهداری شوند.

۸- در صورت نگهداری عسل های صاف شده به مدت طولانی، باید با رعایت اصول صحیح پاستوریزه شوند.

۹- از خرید و فروش قاب های مومی، کلنی ها ی مستعمل ضد عفونی نشده، وسایل زنبورداری سایر زنبورستان ها خودداری شود.

۱۰- گرده گل استحصال شده را بخوبی خشک کرده و به شیوه صحیح بسته بندی شود.

۱۱- کلنی ها ی خالی قبل از استفاده مجدد با شعله یا مواد ضد عفونی کننده رایج و سالم، ضد عفونی شوند.

منابع مورد استفاده

1- Anderson DL, Gibson NL, Gibbs AJ. (1998) Identification and phylogeny of the spore-cyst fungi (Ascosphaerales: Ascomycetes). *Mycol. Res.* 102: 541-547.

2- Aronstein KA, Murray KD (2010) Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103:S20–S29

3- Bailey L; Ball BV. (1991) *Honey Bee Pathology.* Academic Press, London, p53-63; p154-158.

4- Bailey, L (1967) *The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus Ascosphaera apis, for larvae of the honey bee, Apis mellifera.* In Proceedings of the International Cooloquium on Insect Pathology and Microbial Control (P.A. vab der Laan, Ed pp. 162-167. North-Holland, Amsterdam.

5- Bradbear,N.(1988). The world distribution of major honeybee diseases and pest. *Bee World*., 69: 15-39

6- De Jong, D. (1976). Experimental enhancement of Chalkbrood infection. *Bee World.*, 57:114-115.

7- Ertag TUTKUN, Salih MADEN, Ahmet lNCIand Bahri YILMAZ (1993).General situation of ohalkbrood disease in honeybees in Turkey. *Turk. entomol. derg*., , 17 (2) : 65~68

8- Heath LAF. (1985) Occurrence and distribution of Chalk brood disease of honeybees. *Bee World* 66:9-15.

9- Heath, LAF; Gaze, BM. (1987) Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis. Journal of Apicultural Research* 26: 243-246.

10- Heath LAF. (1982b) Chalk brood pathogens: a review. *Bee World* 63: 130-135.

11- Imperial College (2008) *Honeybee health(risks) in England and Wales.* Report to the National Audit Office by Imperial College Consultants Limited. www.nao.org.uk/idoc.ashx

12- Jensen AB, James RR, Eilenberg J (2009) Long-term storage of *Ascosphaera aggregata* and *A apis,* pathogens of the leafcutting bee (Megachile rotundata) and the honey bee (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 101:157–160

13- Koenig, JP; Boush, GM; Erickson Jr, EH. (1986) Effect of type of brood comb on Chalk brood disease in honeybe colonies. *Journal of Apicultural Research* 25: 58-62.

14- Maurizio, A (1934) (Uber die Kaltbrut (Pericystis-Mykose) der Bienen Archive fur Bienenkunde 15:165-193.

15- Michael Hornitzky (2001) Literature review of chalkbrood, a fungal disease of honeybees. http://www.rirdc.gov.au

16- Mikio Yoshiyama and Kiyoshi Kimura (2010) Presence of *Ascosphaera apis*, the causative agent of chalkbrood disease, in honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Japan. The *Japanese Society of Applied Entomology and Zoology*

17- Oldroyd, BP. (1996) Evaluation of Australian commercial honey bees for hygienic behaviour, a critical character for tolerance to chalkbrood. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 36(6):625-629.

18- Omafra (2006) 2006 *Provincial Apiarist Annual Report,* Ontario Minstry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

19- Pederson, K (1976) [Chalk brood: possible methods of control, and the effect of additional heat] *Birkteren* 92: 18-22.

20- Roger A, Morse (1980). *Honey Bee Pests*, Predators and Diseases

21- Rotenbuhler, WC. (1964) Behaviour genetics of nest cleaning honeybees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease killed brood. *American Zoologist* 21: 313-317.

22- Spivak M; Downey DL. (1998) Field assays for hygienic behaviour in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*. 91: 1, 64-70.