"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2023.1964566.1376**

A comparative study of the frequency and intensity of nosemosis based on individual and composite samples of live bees in the apiaries of the cities of East Azerbaijan province

Imani Baran, A.[1*], Hamidiam, Gh.[2]

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author's email: a.imani@tabrizu.ac.ir
(Received: 2022\9\10 Accepted: 2022\12\20)

Abstract

Due to the lack of an international standard method to determine the frequency, prevalence and intensity of nosemosis, the researchers are still using individual or composite sampling methods. This study was aimed to compare the frequency and intensity of nosemosis based on the above mentioned methods in the apiaries of East Azerbaijan province. To this end, 5 apiaries from 5 cities of East Azerbaijan province were randomly selected. Three hives from each apiary and 10 bees from each hive (equally from inside and outside) were sampled. To determine the frequency, the spore presence in the samples was evaluated. To determine the intensity, the spore count in one bee was calculated in the individual samples and mean spore count per bee in the composite samples. In both methods, 100% frequency was obtained for all samples. To compare infection intensity in both sampling methods, one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used. To compare the results of two methods, generally, and also in each city, separately, independent *T*-test was used. In both methods, the highest intensity was related to samples from Tabriz ($p<0.05$). However, in the individual sampling method, the infection intensity in Osku samples was significantly lower ($p<0.001$). Also, in comparison of the two sampling methods, there was generally no statistical difference between the sampling methods and even in one city ($p>0.05$). In individual samples, overall, the intensity was higher in bees outside of the hive. Based on the average results, the intensity of nosemosis in composite samples was much higher than individual samples.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Composite sampling, Frequency, Individual sampling, Intensity, Nosemosis.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1964566.1376

بررسی مقایسه‌ای فراوانی و شدت نوزموزیس بر اساس نمونه‌های تکی و ترکیبی زنبورهای زنده در زنبورستان‌های شهرستان‌های استان آذربایجان‌شرقی

عباس ایمانی‌باران[1*]، غلامرضا حمیدیان[2]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: a.imani@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۹ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۹/۲۹)

چکیده

به‌دلیل نبود یک روش استاندارد بین‌المللی برای تعیین فراوانی، شیوع و شدت نوزموزیس، هنوز از روش‌های نمونه‌برداری تکی یا ترکیبی استفاده می‌کنند. هدف از انجام مطالعهٔ حاضر، بررسی مقایسه‌ای فراوانی و شدت نوزموزیس بر اساس روش‌های فوق در زنبورستان‌های استان آذربایجان‌شرقی بود. بدین منظور، به‌طور تصادفی ۵ زنبورستان واقع در ۵ شهرستان استان آذربایجان‌شرقی انتخاب شدند. تعداد ۳ کندو از هر زنبورستان و ۱۰ زنبور از هر کندو (به‌طور مساوی از داخل و خارج کندو) برای هر روش نمونه‌برداری جمع‌آوری شدند. برای تعیین فراوانی، وجود اسپور در نمونه‌ها ارزیابی شد. برای تعیین شدت، در نمونه‌های تکی تعداد اسپور در یک زنبور و در نمونه‌های ترکیبی میانگین تعداد اسپور به‌ازای هر زنبور محاسبه شد. در هر ۲ روش، فراوانی ۱۰۰ درصد برای تمام نمونه‌ها به‌دست آمد. برای مقایسه شدت آلودگی در شهرستان‌ها در هر ۲ روش نمونه‌برداری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی استفاده شد. برای مقایسه نتایج حاصله در ۲ روش، به‌طورکلی و هم به‌طور جداگانه در هر شهرستان، از آزمون *t* مستقل استفاده گردید. در هر ۲ روش بیش‌ترین شدت نوزموزیس مربوط به نمونه‌های تبریز بود ($p<۰/۰۵$)، ولی در روش نمونه‌برداری تکی، شدت آلودگی در نمونه‌های اسکو به‌طور معنی‌داری پایین بود ($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین در مقایسه ۲ روش نمونه‌برداری، از نظر آماری تفاوتی بین روش نمونه‌برداری در کل و حتی در یک شهرستان وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). در نمونه‌های تکی، در مجموع، شدت بیماری در زنبورهای خارج از کندو بیش‌تر بود. بر اساس میانگین حاصله، شدت نوزموزیس در نمونه‌های ترکیبی، به‌مراتب بیشتر از نمونه‌های تکی بود.

کلیدواژه‌ها: نوزموزیس، نمونه‌برداری تکی، نمونه‌برداری ترکیبی، فراوانی، شدت.

مقدمه

بدون شک زنبور عسل یکی از محبوب‌ترین و مفیدترین مخلوقات عالم است. این حشره شگفت‌انگیز از ابتدای خلقت، در تغذیه بشر نقش به‌سزایی ایفاء کرده‌است. شیوهٔ زندگی، رفتار و انضباط اجتماعی زنبور عسل الگوی منحصر به‌فرد برای جوامع بشری در تمام دوران‌های زندگی محسوب می‌شود. زنبور عسل مهم‌ترین و قهارترین گرده‌افشان در طبیعت می‌باشد. فرآورده‌های مختلف زنبور عسل تماماً شفابخش هستند. عسل، گرده و بره‌موم دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی هستند و لذا این فرآورده‌های ارزشمند، قرن‌هاست که در طب سنتی به‌طور فراوان استفاده می‌شوند. هم‌چنین بر پایهٔ بررسی‌های انجام‌یافته، تمام تولیدات زنبورعسل، دارای خواص ضد میکروارگانیسمی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی هستند. در حال حاضر در طب سنتی، از فرآورده‌های فوق برای درمان انواع آسیب‌ها، مشکلات و بیماری‌های موضعی و عمومی انسان و دام‌ها استفاده می‌شود (Choobkar *et al.*, 2014; Anzabi and Shaghaghi, 2015). علی‌رغم تمام فواید ذکرشده و چه بسا فواید ناگفته، ولی این حشرهٔ سودمند برای تمام مخلوقات عالم، دائماً در معرض انواع تهدیدهای بیولوژیک و غیربیولوژیک قرار دارد. یکی از مهم‌ترین تهدیدها برای زنبورعسل، ابتلاء به بیماری نوزموزیس ناشی از تک‌یاختهٔ نوزما می‌باشد. تک‌یاختهٔ نوزما جنسی متعلق به شاخهٔ (Phylum) میکروسپوریدیا است. گونه‌های این میکروسپوریدیای فرصت‌طلب و کاملاً تکامل‌یافته، به‌شکل انگل داخل‌سلولی اجباری زندگی می‌کنند. *نوزما آپیس* و *نوزما سرانه*، گونه‌های بیماری‌زای کاملاً شناخته‌شده برای زنبوران عسل هستند (Chen *et al.*, 2009). اخیراً یک میکروسپوریدیای جدید، به نام *نوزما نئومانی* (*Nosema neumanni*)، در زنبورهای عسل اوگاندا شناسایی شده‌است، ولی دامنهٔ انتشار و اثرات آن بر روی زنبور میزبان، هنوز ناشناخته است (Cilia *et al.*, 2019). *نوزما آپیس* و *نوزما سرانه* گونه‌های اختصاصی زنبورهای بالغ هستند و با تخریب سلول‌های پوششی دستگاه گوارش میزبان‌های خود، باعث نوزموزیس می‌شوند (Higes *et al.*, 2007; Fries, 2010; Papini *et al.*, 2017). نوزموزیس یکی از مهم‌ترین و جدی‌ترین تهدیدات برای پرورش زنبور عسل در دنیاست (Porrini *et al.*, 2020) و خسارات شدید اقتصادی را از طریق اثرات منفی بر بیولوژی، فیزیولوژی، بیوشیمی، ایمونولوژی و رفتارهای وراثتی جمعیت زنبورهای موجود در یک کلنی برجای می‌گذارد (Botias *et al.*, 2013; Papini *et al.*, 2017).

تا چند سال پیش تصور بر این بود که *نوزما آپیس* تنها گونه‌ای است که باعث نوزموزیس در زنبور عسل اروپایی (*Apis mellifera*) می‌شود، ولی اخیراً مشخص شده‌است که *نوزما سرانه* قادر به آلوده کردن *آپیس ملیفرا* در سایر نقاط دنیاست (Wang *et al.*, 2019). از نظر منشأ جداسازی، *نوزما آپیس* و *نوزما سرانه* به‌ترتیب از *آپیس ملیفرا* و *آپیس سرانا* (زنبور عسل آسیایی) گزارش شده‌اند، ولی آزمایشات اولیهٔ آلوده‌سازی متقاطع، نشان داده‌است که *نوزما آپیس* و *نوزما سرانه* به‌ترتیب قادر به آلوده‌سازی موفقیت‌آمیز *آپیس سرانا* و *آپیس ملیفرا* هستند (Gisder *et al.*, 2010). به‌نظر می‌رسد آلودگی *آپیس ملیفرا* با *نوزما سرانه* در سال‌های اخیر در دنیا شایع شده‌است (Teixeira *et al.*, 2013)،

در حالی‌که *نوزما آپیس* دارای شیوع پایینی در کلنی‌های *آپیس ملیفرا* در خیلی از کشورهای دنیاست (Özkirim *et al.*, 2019). در حال حاضر *نوزما سرانه* با شیوع بالا در دنیا، یک تهدید جدی و ناگهانی، هم برای شکل انفرادی زنبورها و هم کلنی‌های آن‌ها محسوب می‌شود (Cilia *et al.*, 2019; Osteroverkhova *et al.*, 2020). *نوزما آپیس* عمدتاً در فصول بهار و پاییز شایع‌تر است، در حالی که *نوزما سرانه* در تمام فصول در کلنی‌های آلوده مشاهده می‌شود (Meana *et al.*, 2010).

تشخیص نوزموزیس در زنبورهای عسل زندهٔ آلوده به‌طور روتین براساس مشاهدهٔ اسپورهای نوزما در زیر میکروسکوپ نوری انجام می‌شود (Meana *et al.*, 2010). در نوزموزیس ناشی از *نوزما آپیس* معمولاً برای تعیین میزان آلودگی در کلنی، از مقدار میانگین تعداد اسپور به ازای زنبور استفاده شده (Furgala and Hyser, 1969) و یک ارتباط نزدیک بین تعداد اسپور و شدت آلودگی در خصوص این بیماری برقرار شده‌است (Cornejo and Rossi, 1975) و این شاخص برای ارزیابی لزوم درمان کلنی‌های درگیر، مدنظر قرار گرفته‌است (Sota and Bacci, 2004). با این وجود، به اعتقاد برخی پژوهش‌گران بین تعداد اسپور و وضعیت سلامتی کلنی ممکن است ارتباط چندانی وجود نداشته باشد (Doull, 1965; El-Shemy and Pickard, 1989). در واقع، در شرایط فیلدی تعداد اسپور مستقیماً با بار انگلی و وضعیت سلامتی تمام کلنی‌هایی که به‌طور طبیعی با *نوزما سرانه* آلوده می‌شوند، ارتباط ندارد (Higes *et al.*, 2008). علاوه بر اختلاف نظر فوق، هنوز به‌دلیل نبود یک روش استاندارد واحد و معتبر بین‌المللی برای اندازه‌گیری شیوع و شدت نوزموزیس، مشاهده می‌شود که عده‌ای در بررسی خود آزمایش نمونه‌های تکی (Bailey, 1954, 1955, 1959; Longridge, 1961; Fries *et al.*, 1984; Pickard and El-Shemy, 1989; Paxton *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008; Traver and Fell, 2011; Mulholland *et al.*, 2012; Smart and Sheppard, 2012) و عده‌ای هم آزمایش نمونه‌های ترکیبی زنبورهای زنده (Gochnauer and Fumidil, 1957; Doull and Cellier, 1961; Doull and Eckert, 1962; L'Arrivee, 1963; Doull, 1965; Contwell, 1970; Chauzat *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2010; Meana *et al.*, 2010; Papini *et al.*, 2017; Özkirim *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019) را برای ارزیابی شیوع و شدت نوزموزیس ناشی از *نوزما آپیس* یا *نوزما سرانه* استفاده کرده‌اند.

از زمان کشف نوزما اهمیت نوزموزیس به‌عنوان یک آفت جدی بالقوه برای زنبورهای عسل مشخص شده است، ولی همیشه به اقدامات مدیریتی برای پیشگیری و کنترل بیماری توجه کافی نشده‌است. این بی‌توجهی ممکن است تا حدودی به‌دلیل تفاوت در شیوع بیماری در نواحی مختلف دنیا و تغییرات فصلی در شدت آلودگی باشد. در مناطق معتدل، شیوع بیماری در بین نواحی، سال‌ها و همین‌طور بین زنبورستان‌ها و کلنی‌های زنبورستان‌ها، متفاوت نشان داده شده‌است. همچنین شدت آلودگی ناشی از هر ۲ گونه نوزما نیز به‌طور چشم‌گیر در طول یک سال و بین سال‌های متوالی، متفاوت گزارش شده‌است (Mulholland *et al.*, 2012).

لذا با توجه به اهمیت موارد ذکر شده، هدف از انجام مطالعهٔ حاضر، بررسی مقایسه‌ای فراوانی و شدت نوزموزیس بر پایهٔ بررسی نمونه‌های زندهٔ تکی و ترکیبی زنبورهای بالغ در زنبورستان‌های شهرستان‌های مختلف استان آذربایجان‌شرقی به منظور تعیین تفاوت‌ها و تشابهات موجود در ۲ روش فوق و مقایسه نتایج

به‌دست‌آمده با روش‌های مشابه به‌کار گرفته‌شده توسط محققان در کشورهای دیگر بود.

مواد و روش‌ها

- **نمونه‌برداری**: برای انجام این مطالعهٔ مقطعی، در ابتدای سال ۱۳۹۷ اطلاعات اساسی مربوط به زنبورستان‌های فعال استان آذربایجان‌شرقی از مدیریت جهاد کشاورزی استان دریافت شد. سپس در طول خرداد ماه همان سال، تعداد ۵ زنبورستان واقع در شهرستان‌های اهر، سراب، تبریز، اسکو و مراغه برای نمونه‌برداری انتخاب شدند (جدول ۱). بدین منظور به‌طور تصادفی ۳ کندو از هر زنبورستان برای نمونه‌برداری در نظر گرفته شدند. به‌طور یکسان (قبل از ساعت ۹ صبح) از هر کندو ۱۰ زنبور زندهٔ بالغ برای نمونهٔ ترکیبی (به عنوان یک نمونه) و ۱۰ زنبور برای نمونه‌های تکی جمع‌آوری شدند، به این ترتیب که از ۱۰ زنبور، ۵ زنبور از خارج کندو (پس از بستن ورودی کندو) و ۵ زنبور از داخل کندو جمع‌آوری شدند. نمونه‌های ترکیبی مربوط به هر کندو به‌طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار گرفته و درب پاکت‌ها با میخکوب بسته شدند. همین‌طور، نمونه‌های تکی هر کندو به‌طور جداگانه در قوطی‌های پلاستیکی درب‌دار قرار داده‌شدند. با شماره‌گذاری ظروف نمونه، اطلاعات مربوط به هر نمونه در دفترچهٔ یادداشت ثبت شده و نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل گردیدند.

لازم به ذکر است که در زمان نمونه‌برداری، مشاهدات ظاهری از وضعیت سلامتی و بهداشتی هر کندوی نمونه‌برداری‌شده و بقیه کندوها هم نشان داد که تمامی کلنی‌های زنبورستان‌ها به لحاظ جمعیت و عملکرد در وضعیت مطلوبی قرار داشتند و آثاری از علائم واضح نوزموزیس در هیچ‌کدام از کلنی‌ها مشاهده نشد. همچنین در حین نمونه‌برداری، از زنبورداران یک‌سری سوالات مدیریتی به‌عمل می‌آمد که در پاسخ‌های زنبورداران هم مشخص گردید که درمانی علیه نوزموزیس معمولاً انجام نمی‌گرفت.

جدول ۱- مشخصات زنبورستان‌های نمونه‌برداری‌شده در استان آذربایجانشرقی

ردیف	نام شهرستان (موقعیت)	مختصات جغرافیایی	وضعیت جغرافیایی	تعداد نمونه (ترکیبی + تکی)
۱	اهر (شمال)	38° 58' N, 47° 25' E	کوهستانی	۳ + ۳۰
۲	سراب (شرق)	37° 94' N, 47° 53' E	کوهستانی	۳ + ۳۰
۳	تبریز (مرکز)	38° 10' N, 46° 27' E	دشت	۳ + ۳۰
۴	اسکو (غرب)	37° 95' N, 45° 79' E	کوهستانی	۳ + ۳۰
۵	مراغه (جنوب)	37° 44' N, 46° 41' E	دشت	۳ + ۳۰
مجموع				۱۵ + ۱۵۰

- **بررسی میکروسکوپیک نمونه‌ها برای ارزیابی فراوانی و شدت نوزموزیس**: برای نمونه‌های ترکیبی، قسمت شکمی ۱۰ زنبور به‌طور کامل جداسازی و همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر (۱ میلی‌لیتر به ازای هر زنبور)، در یک هاون کوچک کاملاً له شدند. برای جداسازی بقایای بافتی، محلول یکنواخت‌شده به درون

یک بشر کوچک صاف شد. سپس برای تشخیص وجود آلودگی انگلی، یک قطره از محلول مذکور روی لام قرار داده‌شده و پس از پوشاندن با لامل، در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX50, Japan) بررسی می‌شد. درادامه برای تعیین شدت آلودگی از یک لام هموسیتومتر (HBG, Germany) برای شمارش اسپور استفاده شد. به این ترتیب که محلول صاف شده مرحله قبل، ابتدا با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (BH-1200, Behdad, Iran) به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی حاصله، تخلیه گردید. سپس رسوب حاصله، با استفاده از مقدار ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر، به صورت محلولی همگن تبدیل شد. با استفاده از یک میکروپیپت، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول مذکور برداشته و از زیر دو طرف لامل قراردادهشده بر روی لام هموسیتومتر، به داخل گودی آن به‌نحوی تخلیه می‌گردید که کاملاً در زیر لامل پخش شود. بدین نحو، پس از ۲ دقیقه انتظار، اسپورها در زیر میکروسکوپ نوری رویت می‌شدند (Fries *et al.*, 2013). در نهایت تعداد اسپور به ازای هر زنبور برای تعیین شدت نوزموزیس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Cantwell, 1970):

تعداد اسپور شمارش شده × ۵ × ۱۰^۴

در خصوص نمونه‌های تکی هم مشابه با روش فوق اقدام گردید، با این تفاوت که در مرحلهٔ اول، قسمت شکمی هر زنبور با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و هاون له می‌گردید و پس از صاف کردن محلول همگن، برای تعیین شدت آلودگی، باز هم محلول با استفاده از آب مقطر، به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر رسانده می‌شد.

- **تحلیل آماری داده‌ها:** در هر ۲ روش نمونه‌برداری تکی و ترکیبی، شدت نوزموزیس برای نمونه‌های هر شهرستان به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد از میانگین (mean±SEM) محاسبه شد. در ابتدا نرمال‌بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار هستند. بنابراین برای مقایسه شدت آلودگی در شهرستان‌های مختلف در هر ۲ روش نمونه‌برداری، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی یا پس‌آزمون توکی (Tukey's post hoc test) استفاده شد. برای مقایسه نتایج ۲ روش مختلف، به‌طور کلی و هم‌چنین به‌طور جداگانه در هر شهرستان، از آزمون *t* مستقل (Independent *t*-test) استفاده گردید. سطح معنی‌داری هم $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های تکی و ترکیبی به منظور ارزیابی فراوانی نوزموزیس در زنبورستان‌های استان آذربایجان‌شرقی، مشخص گردید که تمام نمونه‌ها کمابیش اسپورهای نوزما را، در کمترین و بیشترین تعداد، دارا هستند (فراوانی ۱۰۰ درصد). در ارزیابی شدت نوزموزیس هم، در نمونه‌های ترکیبی، تعداد اسپور به ازای هر زنبور از ۲/۲۵×۱۰^۶ (نمونه‌های اسکو) تا ۱۲/۱×۱۰^۶ (نمونه‌های تبریز) متغیر بود و در واقع بیشترین و کمترین شدت آلودگی، به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های تبریز و اسکو بودند. شدت آلودگی در نمونه‌های مربوط به شهرستان‌های اهر، سراب و مراغه تقریباً شرایط مشابهی داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد اسپور در نمونه‌های ترکیبی زنبور به تفکیک زنبورستان‌های مربوط به ۵ شهرستان استان آذربایجانشرقی*

نام شهرستان	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	میانگین± انحراف استاندارد
اهر	۷/۲۵	۵/۵	۶/۱	۶/۲۸ ± ۰/۵۱[a]
سراب	۷/۱	۳/۱۵	۵/۲۵	۵/۱۶۷ ± ۰/۱۱۴[a]
تبریز	۸/۶	۱۲/۱	۹/۹۵	۱۰/۲۱۷ ± ۰/۱۰۱[b]
اسکو	۳/۰۵	۲/۲۵	۲/۴	۲/۵۶۷ ± ۰/۲۴[a]
مراغه	۷/۲	۴/۳۵	۶/۷۵	۶/۱ ± ۰/۸۸[a]

* اعداد داخل جدول به میلیون می‌باشند ($\times 10^6$).

a,b,.. : حروف نامشابه، وجود اختلاف آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند ($p<0/05$).

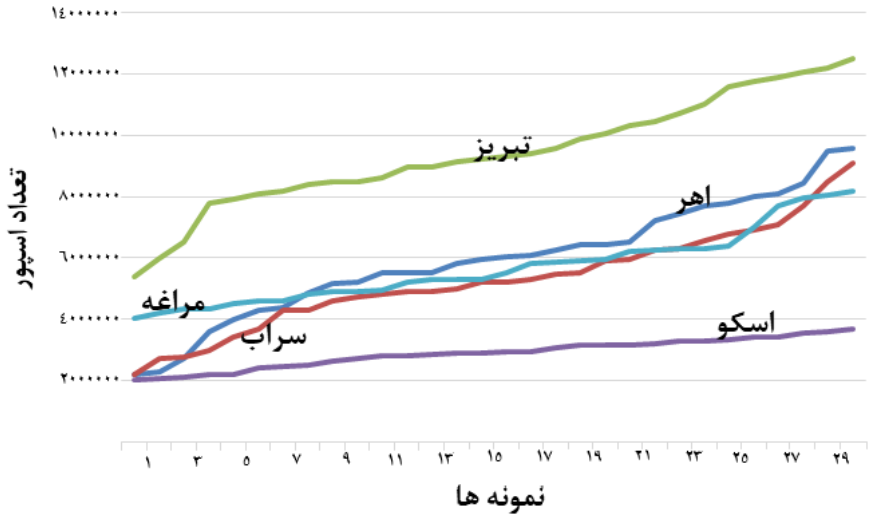
در نمونه‌های تکی تعداد اسپور به ازای یک زنبور از $2/05\times10^6$ (نمونه‌های اسکو) تا $12/5\times10^6$ (نمونه‌های تبریز) متغیر بود. مشابه با نتایج مربوط به نمونه‌های ترکیبی، بیشترین و کمترین شدت آلودگی در نمونه‌های تکی نیز به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های تبریز و اسکو بودند و در نمونه‌های مربوط به شهرستان‌های اهر، سراب و مراغه مقادیر شدت تقریباً مشابه بودند (جدول ۳ و نمودار ۱). همچنین در مجموع، در نمونه‌های تکی شدت آلودگی در زنبورهای کارگر جمع‌آوری‌شده از خارج کندو، به‌طور قابل توجهی بیشتر بود (نمونه‌های ۶ تا ۱۰ در جدول ۳).

جدول ۳- تعداد اسپور در هر نمونهٔ تکی زنبور به تفکیک زنبورستان‌های مربوط به پنج شهرستان استان آذربایجانشرقی*

نام شهرستان	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	نمونه ۶	نمونه ۷	نمونه ۸	نمونه ۹	نمونه ۱۰	میانگین± انحراف استاندارد
اهر ۱	۵/۸	۵/۱۵	۶/۵	۶/۱	۲/۳	۴	۵/۵	۷/۴۵	۸	۹/۵	۵/۹۶ ± ۰/۳۵[b]
اهر ۲	۶/۲۵	۵/۹۵	۶/۰۵	۸/۱	۳/۹	۷/۷	۴/۳	۵/۵	۷/۲	۲/۲	
اهر ۳	۵/۲	۶/۴۵	۷/۸	۹/۶	۴/۴	۸/۴۵	۲/۷	۵/۵	۴/۸۵	۶/۴۵	
سراب ۱	۳/۴	۴/۶	۲/۷۵	۵/۲	۶/۹	۶/۵۵	۵/۹۵	۵/۳	۷/۱	۵/۵	۵/۳ ± ۰/۳[b]
سراب ۲	۲/۷	۳/۷	۴/۳	۵	۴/۸	۵/۴۵	۴/۳	۶/۸	۶/۲۵	۷/۷	
سراب ۳	۵/۲	۳	۲/۲	۴/۹	۵/۹	۴/۷۵	۶/۳	۴/۹	۸/۵	۹/۱	
تبریز ۱	۹/۱۵	۸/۵	۸/۴	۷/۹	۶/۵	۸/۶	۹/۳	۸/۹۵	۹/۹	۱۰/۰۵	۹/۴۳ ± ۰/۳۳[c]
تبریز ۲	۸/۵	۹/۲۵	۹/۶	۷/۸	۸/۹۵	۱۲/۵	۱۱/۹۵	۱۰/۷	۱۱/۶	۱۰/۳	
تبریز ۳	۶	۸/۲	۵/۴	۱۱	۸/۱	۹/۴	۱۲/۲	۱۱/۷	۱۰/۴۵	۱۲/۰۵	
اسکو ۱	۲/۰۵	۲/۴	۳/۲	۲/۲	۲/۸	۳/۱۵	۲/۹	۳/۴	۳/۷	۳/۵۵	۲/۸۹ ± ۰/۰۹[a]
اسکو ۲	۳/۳	۲	۲/۵	۲/۱	۲/۴۵	۲/۸۵	۳/۶	۲/۹۵	۳/۳۵	۳/۱۵	
اسکو ۳	۲/۶۵	۳/۰۵	۲/۲	۲/۹۵	۲/۷	۲/۸	۳/۴	۳/۱۵	۲/۹	۳/۳	
مراغه ۱	۴/۲	۴/۶	۴/۳۵	۴/۹	۵/۲	۶/۳	۵/۸۵	۵/۸	۶/۴	۵/۹۵	۵/۶۹ ± ۰/۲۲[b]
مراغه ۲	۵/۳	۴/۹۵	۵/۵	۵/۳	۴/۶	۷	۶/۳	۵/۹	۴/۳۵	۸/۲	
مراغه ۳	۴/۵	۶/۲۵	۵/۳	۴/۰۵	۴/۹	۴/۸	۷/۹۵	۶/۲	۸/۰۵	۷/۷	

* اعداد داخل جدول به میلیون می‌باشند ($\times 10^6$)

a,b,.. حروف نامشابه، وجود اختلاف آماری معنی‌دار را نشان می‌دهند ($p<0/05$).



نمودار ۱- مقادیر شدت نوزموزیس در نمونه‌های تکی (از کمترین به بیشترین مقدار)

از طرف دیگر با محاسبه و مقایسهٔ میانگین‌های نهایی شدت نوزموزیس در نمونه‌های تکی و ترکیبی، مشخص گردید که تا حدودی شدت آلودگی در نمونه‌های ترکیبی (اهر، تبریز و مراغه) نسبت به نمونه‌های تکی، اندکی بالاتر بود (جداول ۲ و ۳).

همچنین نتایج آنالیز آماری مشخص کرد که در روش نمونه‌برداری ترکیبی، شدت آلودگی در تبریز در مقایسه با بقیه شهرستان‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (مقادیر معنی‌داری تبریز در مقایسه با اهر p=۰/۰۴۶، تبریز در مقایسه با سراب p=۰/۰۱۱، تبریز در مقایسه با اسکو p=۰/۰۰۱ و تبریز در مقایسه با مراغه p=۰/۰۳۶).

در روش نمونه‌برداری تکی هم شدت آلودگی در تبریز در مقایسه با بقیه شهرستان‌ها به‌طور معنی‌داری بالا بود (مقادیر معنی‌داری در همه موارد p<۰/۰۰۱)، در حالی که در این روش، شدت آلودگی در اسکو به‌طور معنی‌داری پایین بود (مقادیر معنی‌داری در همه موارد p<۰/۰۰۱). همچنین در مقایسه ۲ روش نمونه‌برداری، از نظر آماری تفاوتی بین روش نمونه‌برداری در کل و حتی در یک شهرستان وجود نداشت (p>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

از دهۀ ۱۹۹۰ تاکنون، مطالعات در کشورهای مختلف مقادیر متفاوتی از شیوع نوزموزیس را برحسب مناطق و سال‌ها گزارش کرده‌اند (Mulholland *et al.*, 2012). در مطالعۀ حاضر، میزان فراوانی نوزموزیس در بین نمونه‌ها در هر دو روش نمونه‌برداری تکی و ترکیبی در تمام شهرستان‌های استان آذربایجان‌شرقی، ۱۰۰ درصد بود. این نتیجه تا حدودی تأمل برانگیز است و شاید علت آن بدلیل تعداد پایین نمونه‌های مورد مطالعه در قالب یک بررسی مقطعی باشد و تأیید این نتیجه مستلزم یک مطالعۀ مشابه جامع با آنالیز تعداد بیشتری نمونه از زنبورستان‌های تمام شهرستان‌های استان آذربایجان‌شرقی در یک دورۀ بررسی طولانی مدت می‌باشد، تا شیوع واقعی نوزموزیس به‌دست آید.

از طرف دیگر در مطالعه حاضر هر چند به لحاظ آماری تفاوت‌هایی در شدت نوزموزیس در برخی شهرستان‌ها در مقایسه با شهرستان‌های دیگر (ترکیبی در تبریز، تکی در تبریز و اسکو) مشاهده شد، ولی در کلّ اختلاف آماری در شدت نوزموزیس در بیشتر شهرستان‌ها، با در نظر گرفتن نمونه‌های مربوط به دو روش نمونه‌برداری تکی و ترکیبی، مشاهده نشد. نتیجهٔ قابل توجه در مطالعهٔ حاضر، نبود اختلاف آماری بین شدت نوزموزیس در دو روش نمونه‌برداری تکی و ترکیبی در کل زنبورستان‌ها و حتی در زنبورستان‌های یک شهرستان بود، هر چند در نمونه‌های سه شهرستان (اهر، تبریز و مراغه) به لحاظ عددی میانگین تعداد اسپور در نمونه‌های ترکیبی (جدول ۲) بیشتر از نمونه‌های تکی بود. تأیید این یافته نیز مستلزم مطالعات جامع می‌باشد. در این ارتباط برخی محققان معتقدند که شمارش اسپور یک شاخص معتبر برای تعیین شدت نوزموزیس می‌باشد (Hamiduzzaman *et al.*, 2010; Copley *et al.*, 2012). برعکس مانا و همکاران اظهار کرده‌اند که تحت شرایط فیلدی میانگین تعداد اسپور ارتباط مستقیمی با شدت نوزموزیس در کل کلنی ندارد، چون نتایج ممکن است به‌واسطهٔ زمان، محل نمونه‌برداری و نوع زنبورها دستخوش تغییر شود (Meana *et al.*, 2010). هم‌چنین هیگز و همکاران نشان داده‌اند که تعداد اسپور با وضعیت سلامتی کلنی‌های به‌طور طبیعی آلوده، ارتباط ندارد (Higes *et al.*, 2008).

در عین حال، بدلیل نبود یک استاندارد واحد بین‌المللی برای تعیین شدت نوزموزیس در دنیا، عده‌ای روش نمونه‌برداری تکی و عده‌ای دیگر روش نمونه‌برداری ترکیبی را براساس شرایط حاکم بر مطالعهٔ خود (از جمله تعداد زنبور، تعداد کلنی، زمان نمونه‌برداری و هزینه‌های آنالیز نمونه‌ها) انتخاب کرده‌اند و علی‌رغم استفاده وسیع از روش نمونه‌برداری ترکیبی و استفادهٔ محدود از روش نمونه‌برداری تکی، محققان زیادی به این نتیجه رسیده‌اند که آزمایش زنبورها به‌صورت تک‌تک (روش نمونه‌برداری تکی) برای تعیین وجود، عدم وجود و شدت آلودگی خیلی دقیق‌تر از نمونه‌برداری ترکیبی برای اندازه گیری میانگین تعداد اسپور به ازای هر زنبور می‌باشد، ولی روش نمونه‌برداری تکی و در نتیجه آنالیز تک‌تک زنبورها مستلزم صرف زمان زیادی است، بنابراین روش نمونه‌برداری ترکیبی خیلی مناسب برای نمونه‌برداری‌های بزرگ و وسیع می‌باشد. البته این در حالی است که در روش نمونه‌برداری تکی درصد زنبورهای آلوده در یک کلنی و شدت آلودگی در هر کدام از زنبورها مشخص می‌شود. بنابراین، تفاوت در شدت آلودگی بین زنبورها و انتشار نامتوازن آلودگی در سرتاسر کلنی‌ها، ارزیابی دقیق شدت آلودگی در هر کلنی و تصمیم‌گیری نهایی برای درمان را پیچیده‌تر می‌سازند (Pickard and El-Shemy, 1989; Mulholland *et al.*, 2012)، از طرفی هم در روش نمونه‌برداری ترکیبی برای تعیین شدت آلودگی در هر کلنی ممکن است در هر نمونهٔ ترکیبی تنها تعداد معدودی زنبور با تعداد بالای اسپور موجود باشد، بنابراین روش نمونه‌برداری ترکیبی الگوی نادرستی از وضعیت شدت آلودگی در یک کلنی و در نهایت در یک مزرعه را فراهم می‌سازد (Smart and Sheppard, 2012).

در روش نمونه‌برداری تکی در مطالعهٔ حاضر، نمونه‌های جمع‌آوری شده از خارج کندو تعداد بالای اسپور به ازای یک زنبور را از خود نشان دادند (جدول ۳). این یافته با نتایج برخی مطالعات هم‌خوانی دارد، که در آن‌ها توصیه شده از زنبورهای بالغ باید نمونه‌برداری شود و جمع‌آوری زنبورهای کارگر (Forager) از جلوی ورودی مسدودشدهٔ کندو معتبرترین منبع نمونه‌برداری برای بررسی متغیرهای مربوط به نوزموزیس می‌باشد (L'Arrivee, 1963; Doull, 1965; Meana *et al.*, 2010). همچنین عقیده براین است که نسبت میانگین زنبورهای آلوده ممکن است روش مطمئن‌تری برای پی بردن به وضعیت سلامتی و بهداشتی کندو باشد (Doull, 1965; El-Shemy and Pickard, 1989; Higes *et al.*, 2008). با این وجود، تراور و همکاران برای برآورد شدت آلودگی در کلنی، زنبورهای داخل کندو را آزمایش کردند، با این استدلال که زنبورهای کارگر خارج از کندو در طول زمستان وجود ندارند و فقط در حدود ۲۵ درصد از جمعیت کلنی را در ماه‌های گرم سال تشکیل می‌دهند (Traver *et al.*, 2012). اسمارت و شپارد اگرچه در مطالعه خود از روش ترکیبی استفاده کرده‌اند، اما این محققان نیز نشان داده‌اند که شدت آلودگی در زنبورهای کارگر خارج از کندو به‌طور معنی‌داری بیشتر از زنبورهای داخل کندو بود (Smart and Sheppard, 2012).

بطور کلی به‌نظر می‌رسد مقادیر مختلف ثبت شده در مورد شیوع نوزموزیس، ممکن است بدلیل تفاوت در تعداد نمونه‌های آزمایش شده، نوع مطالعه (نمونهٔ تکی، ترکیبی، در سطح کلنی، در سطح مزرعه یا منطقه)، زمان مطالعه، زمان و روش نمونه‌برداری، خصوصیات اقلیمی و جغرافیایی، روش‌های تشخیصی و آنالیز داده‌ها، روش‌های مدیریتی، ژنوتیپ زنبورها، هاپلوتیپ انگل‌ها، واکنش متقابل میزبان-انگل-محیط و سایر عوامل زیستی و غیرزیستی باشند (Emsen *et al.*, 2016; Ostroverkhova *et al.*, 2020; Porrini *et al.*, 2020).

در طی مطالعهٔ حاضر مشخص شد که هیچ اختلافی بین دو روش نمونه‌برداری تکی و ترکیبی برای تعیین شدت نوزموزیس وجود ندارد. تاکنون دلیل علمی قانع‌کننده‌ای هم برای برتری یک روش بر روش دیگر در بررسی متغیرهای مربوط به بیماری نوزموزیس ارائه نشده‌است. بنابراین با توجه به اهمیت بیماری نوزموزیس که بنام «مرگ خاموش» شناخته می‌شود و کابوسی برای پرورش دهندگان زنبور عسل در دنیا تلقی می‌شود، ضرورت دارد ارگان‌های ذیربط در خصوص روش‌های استاندارد معتبر و مورد اطمینان برای تعیین واقعی شیوع و شدت آلودگی در زنبور، کلنی و مزرعه، تصمیمات جدی و اساسی اتخاذ نمایند.

سپاسگزاری

نویسندگان از مدیریت جهاد کشاورزی استان آذربایجان‌شرقی به خاطر مساعدت در تأمین اطلاعات مربوط به زنبورستان‌های استان قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

- Anzabi, Y. and Shaghaghi, S. (2015). In vitro evaluation of antibacterial properties of propolis alcoholic extract on bovine mastitis isolates. Veterinary Clinical Pathology, 9(34): 117-129. [In Persian]
- Bailey, L. (1954). The control of nosema disease. Bee World, 35(6): 111-113.
- Bailey, L. (1955). The epidemiology and control of nosema disease of the honey bee. Annals of Applied Biology, 43(1-2): 379-389.
- Bailey, L. (1959). The natural mechanism of suppression of *Nosema apis* in enzootically infected colonies of the honey bee, *Apis mellifera Linnaeus*. Journal of Insect Pathology, 1(4): 347-350.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A. and Higes, M. (2013). Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. Veterinary Research, 44(25):1-14.
- Cantwell, G.E. (1970). Standard methods for counting Nosema spores. American Bee Journal, 110: 222-223.
- Chauzat, M.P., Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Cougoule, N. and Faucon, J.P. (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. Journal of Apicultural Research, 46(2): 127-128.
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L. and Boncristiani, H. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 101(3): 204-209.
- Choobkar, N., Sari, A., Bolandnazar, A.R., Heshmati, H., Mohammadi, F., Shahbazian, N., *et al*. (2014). The effect of different concentrations of bee propolis on skin wound healing and immune response and survival of Common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(28): 300-312. [In Persian]
- Cilia, G., Sagona, S., Giusti, M., dos Santos, P.E.J., Nanetti, A. and Felicioli, A. (2019). *Nosema ceranae* infection in honeybee samples from Tuscanian Archipelago (Central Italy) investigated by two qPCR methods. Saudi Journal of Biology Sciences, 26(7): 1553-1556.
- Copley, T.R., Giovenazzo, P. and Jabaji, S.H. (2012). Detection of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybee bottom scraps and frass in naturally infected hives. Apidologie, 43: 753-760.
- Doull, K.M. (1965). The effects of time of day and method of sampling on the determination of nosema disease in beehives. Journal of Invertebrate Pathology, 7(1): 1-4.
- Doull, K.M. and Eckert, J.E. (1962). A survey of the incidence of Nosema disease in California. Journal of Economic Entomology, 55(3): 313-317.
- Doull, K.M. and Cellier, K.M. (1961) A survey of the incidence of Nosema disease (Nosema apis Zander) in honey bees in South Australia. Journal of Insect Pathology 3(3): 280-288.
- Emsen, B., Guzman-Novoa, E., Hamiduzzaman, M.M., Eccles, L., Lacey, B., Ruiz-Pérez, R.A., *et al* (2016). Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. Parasitology Research, 115(1): 175-181.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology, 103: 73-79.
- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y.P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., *et al*. (2013). Standard methods for Nosema research. Journal of Apicultural Research, 52(1):1-28.
- Fries, I., Ekbohm, G. and Villumstad, E. (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. Journal of Apicultural Research, 23(2): 102-105.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, N., Frielitz, M.C., Linde, A. and Genersch, E. (2010). Five-Year cohort study of Nosema spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? Applied Environmental Microbiology, 76(9): 3032-3038.
- Gochnauer, T.A. and Fumidil, B. (1957). Nosema control in wintering colonies. Glean. Bee Culture, 85: 528-529.

- Hamiduzzaman, M.M., Guzmán-Novoa, E. and Goodwin, P.H. (2010). A multiplex PCR assay to diagnose and quantify Nosema infections in honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathololology, 105(2): 151-155.
- Higes, M., García-Palenci, P., Martín-Hernández, R. and Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honey bees with the microsporidia *Nosema ceranae*. Journal of Invertebrate Pathology, 94(3): 211-217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., *et al*. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environmental Microbiology, 10(1): 2659-2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R. and Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie, 41(3): 375-392.
- Langridge, D.F. (1961). Nosema disease of the honeybee and some investigations into its control in Victoria, Australia. Bee World, 42(2): 36-40.
- L'Arrivee, J.C.M. (1963). Comparison of composite versus individual bee sampling for *Nosema apis* Zander. Journal of Insect Pathology, 5(4): 349-355.
- Meana, A., Martín-Hernández, R. and Higes, M. (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. Journal of Apicultural Research, 49(2): 212-214.
- Mulholland, G.E., Traver, B.E., Johnson, N.G. and Fell, R.D. (2012). Individual variability of *Nosema ceranae* infections in Apis mellifera colonies. Insects, 3(4): 1143-1155.
- Ostroverkhova, N.V., Konusova, O.L., Kucher, A.N., Kireeva, T.N. and Rosseykina, S.A. (2020). Prevalence of the microsporidian Nosema spp. in honey bee populations (*Apis mellifera*) in some ecological regions of north Asia. Veterinary Sciences, 7(3): 111.
- Özkırım, A., Schiesser, A. and Keskin, N. (2019). Dynamics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* co-infection seasonally in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Apicultral Sciences, 63(1): 41-48.
- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G., *et al*. (2017). Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in central Italy. Saudi Journal of Biolology Sciences, 24(5): 979-982.
- Paxton, R.J., Klee, J. and Korpela, S. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie, 38(6): 558-565.
- Pickard, R.S. and El-Shemy, A.A.M. (1989). Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. Journal of Apicultural Research, 28(2): 93-100.
- Porrini, L.P., Porrini, M.P., Garrido, M.P., Müller, F., Arrascaeta, L., Iriarte, P.J.F., *et al*. (2020). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates obtained from various *Apis mellifera* morphotypes. Entomologia Experimentalis et Applicata, 168(4): 286-294.
- Sharma, D., Katna, S., Sharma, R., Rana, B.S., Sharma, H.K., Bhardwaj, V., *et al*. (2019). First detection of *Nosema ceranae* infecting *Apis mellifera* in India. Journal of Apicultral Sciences, 63(1):165-170.
- Smart, M.D. and Sheppard, W.S. (2012). *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology, 109(1): 148-151.
- Teixeira, E.W., dos Santos, L.G., Sattler, A., Message, D., Alves, M., Martins, M.F., *et al*. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 114(3): 250-254.
- Traver, B.E. and Fell, R.D. (2011). Prevalence and infection intensity of Nosema in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. Journal of Invertebrate Pathology, 107(1): 43-49.
- Traver, B.E., Williams, M.R. and Fell, R.D. (2012). Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. Journal of Invertebrate Pathology, 109(2): 187-193.

- Wang, Q., Dai, P., Guzmán-Novoa, E., Wu, Y., Hou, C. and Diao, Q. (2019). *Nosema ceranae*, the most common microsporidium infecting *Apis mellifera* in the main beekeeping regions of China since at least 2005. Journal of Apicultural Research, 58(4): 562-566.