تقييم الفاعلية المضادة للبكتريا للمستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي في الزجاج على بعض المسببات البكتيرية لمرضي التهاب الضرع وذات الرئة في الأبقار

علاء كامل محمود السلماني وابتسام قاسم حسن [1]
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

تعد مستخلصات البروبولس من المواد الحيوية المهمة التي يمكن الاستفادة منها للتغلب على ظاهرة انخفاض فاعلية بعض أنواع الأدوية ومنها المضادات الحياتية في معالجة الكثير من الحالات المرضية. تناولت الدراسة الفاعلية الحيوية للتراكيز المختلفة من المستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي ضد ثلاثة أنواع بكتيرية عزلت وشخصت من أبقار مصابة بالتهاب الضرع وذات الرئة في فرع الطب الباطني والوقائي/ كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد. أجريت اختبارات التثبيط الحيوي لمستخلص البروبولس ضد البكتريا المدروسة وفقاً لتقنيتي الانتشار بواسطة الحفر والأقراص الورقية. وشملت البكتريا المعزولة كل من *Stapylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae*. أوضحت نتائج طريقة الحفر بأن التركيز 5 ملغم/ مل للمستخلص الكحولي للبروبولس العراقي هو الأكثر فاعلية في تثبيط النمو البكتيري لجراثيم *Staph. aureus* ، *E. coli* و *K. pneumoniae* . إذ بلغت أقطار مناطق التثبيط 22.30، 20.00 و19.30 ملم على التوالي. كما تساوى تأثيره التثبيطي لـ *E. coli* و *K. pneumoniae* إحصائياً مع تأثير المضاد الحياتي جنتامايسين تركيز 0.1 ملغم، فيما تفوق تأثيره التثبيطي للبكتريا *Staph. aureus* معنوياً على جنتامايسين. كما أشارت النتائج تفوق تراكيز المستخلص الإيثانولي للبروبولس من 2-5 ملغم/ مل بطريقة الانتشار بالاقراص الورقية على معاملة المقارنة في تثبيط جميع الجراثيم المختبرة.

Evaluation of the antibacterial activity of ethanol extract of Iraqi propolis in vitro on some pathogenic bacteria causing mastitis and pneumonia in cows

A. K. M. Al- Salmani and I. Q. Hassan
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

Abstract

Propolis extracts have biological importance which can be utilized to overcome the dropped efficiency of some medicines such as antibiotics. This study included the biological activity of different concentrations of ethanol extract of Iraqi propolis against three species of bacteria, which have been isolated and identified from cows infected with mastitis and pneumonia in the Department of Veterinary Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad. The identified bacteria included *Staphylococcus aureues*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia.* Results showed that ethanol extract of Iraqi propolis at concentration of 5 mg/ ml was more active to inhibit the growth of *Staph. aureus* , *E. coli* and *K. pneumonia* by agar diffusion technique. Wherein, inhibition zone diameters attained 22.30, 20.0 and 19.30 mm respectively. The inhibition caused by the concentration of 5 mg/ml of propolis

[1] البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول.

against *E. coli and K. pneumoniae* was significantly equal with the 0.1 mg of gentamycin. While the growth of *Staph. Aureus* have been inhibited by the eraqi propolis conce tration of 5 mg/ ml and was statistically surpassed the 0.1 mg gentamycin, inhibition. Statistically the concentrations of 2-5 mg/ml of propolis were superior to inhibit the growth of all studied bacteria by agar diffusion technique in comparing with control treatment.

المقدمة

يعد كل من مرضي التهاب الضرع وذات الرئة من الأمراض المهمة التي تؤثر في سلامة وانتاجية الأبقار لسعة انتشارهما وللخسائر الناجمة عنهما. ونظراً للإستخدام العشوائي للمضادات الحياتية في الآونة الأخيرة فقد انتشر العديد من العزلات الجرثومية المقاومة لأغلب هذه المضادات. فضلاً عن مسؤلية المضادات الحياتية في احداث العديد من التأثيرات السلبية غير المتوقعة لاسيما إذا استعملت بجرعات عالية و تكرار غير مبرر . لذلك لجأ بعض الباحثين لايجاد بدائل لهذه العقاقير، ومن هذه العقاقير مستخلصات البروبولس (العكبر) التي أثبتت فعاليتها في تثبيط نشاط كم هائل من الجراثيم المرضية للانسان والحيوان فضلاً عن معالجتها للالتهابات والجروح لاحتوائها على العديد من المواد الفعالة بايولوجياً كالفلافونويدات والقلويدات وغيرها (1، 2، 3، 4، 5، 6). والبروبولس هو مادة صمغية ذات تركيب معقد تجمعه عاملات نحل العسل *Apis mellifera* من بعض النباتات ويخلط مع ماتفرزه الغدد تحت البلعومية لهذه العاملات من انزيمات ومقداربسيط من الشمع وحبوب اللقاح (7). يعد البروبولس من المواد المطهرة في الخلية (8). للبروبولس تركيب كيميائي معقد اعتماداً على تنوع النباتات التي يجمع منها وعلى المناطق الجغرافية المزروعة فيها تلك النباتات (9، 10، 11، 12). تتباين الفعالية البايولوجية لمستخلصات البروبولس وفقاً للمنشأها النباتي (13، 14، 15، 16). امتاز المستخلص الإيثانولي للبروبولس في تأثيره المتخصص في بعض الأمراض الفايروسية والبكتيرية والفطرية الخطرة على الإنسان والحيوان، ومن مميزات العلاج بالأدوية الحاوية على البروبولس عدم تطوير المقاومة ضده من قبل الممرضات المذكوره. وهذا يعني امكانية استعمال العلاج بالبروبولس بشكل مستمر على خلاف المضادات الحياتية كالبنسلين والأمبيسيلين والأموكسيلين وسواها التي تتصف بمحدودية فعاليتها ولحصول مقاومه تدريجية ضدها ومن ثم تطور المناعة البكتيرية لها (17، 18). ونظراً للدراسات المحدودة في الكشف عن فاعلية البروبولس في ميدان الطب البيطري عموماً والتأثير في مسببات الأمراض الحيوانية الشائعة في العراق بشكل خاص شملت دراستنا تقويم الفاعلية ال مضادة للبكتريا للمستخلص الإيثانولي للبروبولس في الزجاج In vitro ضد بعض المسببات البكتيرية المعزولة من بعض الحالات المرضية التي تصيب الأبقار مثل التهاب الضرع وذات الرئة باستعمال طريقتي الأقراص الورقية والحفر واجراء الإختبارات الكمية وفحص الحساسية للمضادات الحياتية مثل الجنتامايسن والميثيبريم والأمبسيلين.

المواد وطرائق العمل

- **جمع البروبولس:** تم الحصول على البروبولس من منحل أهلي في بغداد/ الرضوانية ، تم تنظيفه مما علق بها من شوائب ومن ثم طحن باستعمال المطحنة الكهربائية. حفظ الناتج في عبوات زجاجية معقمة ومعتمة ومحكمة الغلق في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.
- **تحضير المستخلص الإيثانولي:** حضر المستخلص الإيثانولي في مختبرات فرع الطب الباطني والوقائي ،كلية الطب البيطري، جامعة بغداد حسب طريقة Krell (19) وفيها مزج 20 غم من البروبولس النقي مع 200 مل من الكحول الإيثانولي بتركيز 75% ووضع في دورق حجمي وترك لمدة خمسة أيام بدرجة حرارة الغرفة مع الرج اليومي لعدة دقائق، بعدها رج باستعمال الرجاج المغناطيسي لمدة 15 دقيقة. وبعد انتهاء عملية الذوبان

رشح المحلول الناتج بوساطة قطعة نظيفة من قماش الململ للتخلص من المكونات غير المذابة بعدها رشح المحلول الناتج بوساطة ورقة ترشيح نوع Whatman No 1. ثم أجريت عملية تبخير الكحول من المحلول المترشح وذلك بوضع الراش ح في الفرن وضبط درجة الحرارة عند 45 م لمدة ساعتين. بعدها تخلفت من المحلول المجفف مادة صلبة تم حساب وزنها الصافي 2.46 غم ووضعت في أنبوبة زجاجية معتمة ومعقمة و سجل عليها البيانات الدالة على نوع المنتج ووزنه وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال.

- **تحضير التراكيز المستعملة في الدراسة :** أخذ 1 غم من المستخلص الناتج وأذيب بشكل تام في 10 مل من المذيب العضوي داي مثيل سلفوكسايد للحصول على محلول قياسي تركيزه 0.1 غم/ مل (وزن/ حجم) ومن هذا المحلول حضرت تراكيز مخففة 1، 2، 3، 4 و 5 ملغم/ مل لاستعمالها في معاملة تثبيط البكتريا المدروسة وفقاً لمعادلة التخافيف.
- **الاختبارات النوعية للبروبولس :** لغرض اختبار تأثير مستخلص البروبولس على البكتيريا المسببة لمرضي التهاب الضرع والتهاب الرئة في الأبقار صممت تجربة تامة التعشية CRD ضمت ست معاملات (خمس تراكيز لمستخلص البروبولس هي 1، 2، 3، 4 و5 غم/مل ومعاملة مقارنة) وكررت كل معاملة ثلاث مرات أستعملت فيها طريقتا الأقراص الورقية وطريقة الحفر 6 ملم.
- **طريقة الأقراص الورقية:** بعد تحضير محاليل التراكيز الخمسة للمستخلص الإيثانولي للبروبولس حملت ثلاثة أقراص معقمة (نوع Whatman No3) بمحلول كل تركيز من التراكيز السابقة مع معاملة أخرى شملت المذيب العضوي داي مثيل سلفوكسايد (المقارنة) بواسطة الماصة الدقيقة ثم تركت لتجف في المختبر تحت ظروف التعقيم. حضرت الأطباق الحاوية على عزلات منفردة لكل بكتريا من الأنواع المسببة للمرضين السابقين والمزروعة على وسط موللر–هنتون ووزعت عليها الأقراص المحملة بحيث ضم كل طبق مكررات لمعاملة واحدة وبين قرص وآخر مسافة مناسبة وبعيدة عن أطراف الطبق ومن ثم نقلت إلى الحاضنة تحت درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة بعدها قيست أقطار مناطق تثبيط النمو البكتيري بالمسطرة. وبنفس التقنية أستعملت المضادات الحياتية بشكل أقراص جاهز ة وهي جنتامايسين 0.1 وميثيبريم 0.025 وأمبيسلين 0.03 ملغم وكرر كل مضاد حياتي ثلاث مرات.
- **طريقة الحفر:** أجريت ذات الخطوات في الفقرة السابقة ما عدا عمل ثلاث حفر بقطر 6 ملم في الوسط الزرعي وأفرغت فيها قطرة من كل محلول من المحاليل المعاملات السابقة وبنفس المكررات بدلاً من وضع الأقراص الورقية.
- **التحليل الإحصائي:** خضعت النتائج لتحليل التباين واستعمال اختبار أقل فرق معنوي لتقويم الفروق الاحصائية فيما بين المعاملات المختلفة وفقاً لـ Snedecor and Cochran (20).

النتائج والمناقشة

تظهر النتائج في الجدول 1 وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$) بين تراكيز المستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي وبين معاملة المقارنة (0 ملغم/ مل) في تأثيرها في البكتريا *Staph. aureus* ولكلا طريقتي الاختبار. كما أشارت البيانات إلى تفوق التركيزين 4 و5 ملغم/مل في تثبيط النوع أعلاه من البكتريا والبالغة أقطار دوائر تثبيطهما 13.30 و13.11 ملم على التوالي بطريقة الأقراص الورقية و21.03 و22.30 ملم على التوالي بطريقة الحفر على التراكيز 1، 2، 3 ملغم/ مل والبالغة أقطار تثبيطها 9.30 ,10.30 ,11.30 ملم على التوالي بطريقة الأقراص الورقية. ولوحظ أيضاً تفوق التركيزين 4 و5 ملغم/ مل للبروبولس في تثبيط البكتريا العنقودية والبالغ أقطار دوائر تثبيطهما 21.03 و22.30 ملم على التوالي بطريقة الحفر على التراكيز 1 ,2 ,3 ملغم/ مل والبالغة أقطار تثبيطها

18.30 ,20.10 ,20.43 ملم على التوالي. وفيما يخص اختبار تثبيط هذه البكتريا بطريقة الأقراص الورقية لم يسجل فرق معنوي بين التركيزين 4 و5 ملغم/ مل. كما يتضح من بيانات الجدول انتفاء الفرق المعنوي في مقدار قطري دائرتي تثبيط نمو البكتريا المختبرة بطريقة الحفر بين التركيزين 2 و3 ملغم/ مل للمستخلص الإيثانولي والبالغان 20.10 و20.43 ملم على التوالي. ويعزى التأثير المثبط لمستخلص البروبولس إلى قابليته في تثبيط عملية انقسام الخلية البكتيرية بصورة غير مباشرة وذلك من خلال تثبيط عملية تضاعف DNA (21). وعند مقارنة مستوى تثبيط مستخلص البروبولس للبكتريا المختبرة مع مستوى تثبيط المضادات الحياتية المشار إليها في الجدول 2 لوحظ أن المضاد الحياتي أمبيسيلين 0.03 ملغم لم يؤد إلى أي تثبيط يذكر، إذ تفوقت جميع تراكيز البروبولس إحصائياً عليه. ويعزى السبب في ذلك إلى المقاومة الكيموحياتية التي تبديها البكتريا ضد بعض المضادات الحياتية (22). فيما تفوق قطرا منطقتي تثبيط كل من ميثيبريم وجنتامايسين بمقدار 21 ملم لكليهما إحصائياً على أقطار مناطق تثبيط مستخلص البروبولس بطريقة الأقراص الورقية ولجميع التراكيز. لكن لم يختلف قطرا منطقتي تثبيط هذين المضادين الحياتيين معنوياً عن قطر تثبيط مستخلص البروبولس بتركيز 4 ملغم/ مل بطريقة الحفر، فضلاً عن تفوق قطر تثبيط مستخلص البروبولس بتركيز 5 ملغم/ مل بطريقة الحفر والبالغ 22.30 ملم معنوياً على قطري تثبيط المضادين الحياتيين ميثيريم وجنتامايسين.

جدول (1) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي في البكتريا *Staphylococcus aureus* بطريقتي الأقراص الورقية والحفر ومقارنتها مع المضادات الحياتية

تراكيز المستخلص الإيثانولي للبروبولس (ملغم/ مل)	قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الأقراص الورقية		قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الحفر		المضادات الحياتية	قطر منطقة التثبيط (مام) بطريقة الأقراص الورقية	
	SE±	المعدل	SE±	المعدل		SE±	المعدل
0	0.33	6.30 a	0.33	6.30 a	أمبيسيلين 0.03 ملغم	---	6.30 a
1	0.33	9.30 b	0.15	18.30 b	ميثيبريم 0.025ملغم	0.17	21.0 b
2	0.33	10.30 c	0.05	20.10 c	جنتامايسين 0.1 ملغم	0.03	21.0 b
3	0.33	11.30 d	0.03	20.43 cd			
4	0.33	13.30 e	0.03	21.03 d			
5	0.33	13.11 e	0.03	22.30 e			

المعدلات المتبوعة بحروف هجائية متشابهة في كل عمود غير مختلفة معنوياً وفقاً لاختبار أقل فرق معنوي (LSD) بمستوى احتمال 0.05

وفيما يتعلق بتأثير التراكيز المختبرة لمستخلص البروبولس في البكتريا *E. coli* أوضحت بيانات الجدول 2 تفوق جميع هذه التراكيز إحصائيا ($P<0.05$) على معاملة المقارنة ولكلا طريقتي الاختبار. وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي تفوق التركيز 3 ملغم/ مل بطريقة الأقراص الورقية على بقية تراكيز المستخلص المدروس، إذ بلغ قطر منطقة تثبيط نمو هذه الجرثومة 7.50 ملم. فيما لم يكن بين هذا التركيز وبين التركيزين 4 و5 ملغم/ مل والبالغ قطرا تثبيطهما 7.10 و7.20 ملم فرق معنوي. أما أفضل قيمة تثبيطية ذات مدلول احصائي ضد البكتريا *E. coli* من قبل المستخلص الإيثانولي للبروبولس وبطريقة الحفر فقد أظهرها التركيز 5 ملغم/ مل إذ وصل قطر منطقة التثبيط 20.0 ملم. فضلاً عن ذلك أظهرت بيانات التحليل الإحصائي تفوق معنوي ($P<0.05$) لطريقة الحفر على

طريقة الأقراص الورقية لجميع التراكيز المستعملة. وجاءت هذه النتائج متطابقة وما أكده (23) اللذان قوما الفعالية التثبيطية لعينتين من البروبولس المصري (الإسماعيلية والساف) ووجدا إن عينة البروبولس من منطقة الإسماعيلية كانت ذات فعالية عالية ضد جرثومة *E. coli*. وعند مقارنة مستوى تثبيط مستخلص البروبولس للبكتريا المختبرة مع مستوى تثبيط المضادات الحياتية المشار إليها في الجدول 2 لوحظ أن المضاد الحياتي أمبيسيلين بجرعة 0.03 ملغم لم يؤد إلى تثبيط يذكر، إذ تفوقت عليه معنوياً جميع تراكيز مستخلص البروبولس. وعلى غرار ذلك أكدت نتائج Yaghoubi. وجماعته (24) بأن المستخلص الكحولي للبروبولس الإيراني بتركيز 67 ملغم/ مل أعطى مفعولاً تثبيطياً أعلى من المضاد الحياتي أمبيسيلين في جراثيم *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* و *Bacillus cereus*. فيما تفوق قطر منطقة تثبيط كل من ميثيبريم 0.025 ملغم وجنتامايسين 0.1 ملغم بمقدار 11.0 و20.40 ملم على التوالي على أقطار مناطق تثبيط مستخلص البروبولس بطريقة الأقراص الورقية ولجميع التراكيز. لكن تفوقت جميع تراكيز مستخلص البروبولس على ميثيبريم 0.025 ملغم والبالغ 11.0 ملم معنوياً (P<0.05) بطريقة الحفر. فيما تفوق قطر منطقة تثبيط جنتامايسين 0.1 ملغم والبالغ 20.40 ملم إحصائياً على التراكيز 1-4 ملغم/ مل لمستخلص البروبولس بطريقة الحفر. أما قطر تثبيط التركيز 5 ملغم/ مل لمستخلص البروبولس بطريقة الحفر والبالغ 20.0 مل فلم يختلف إحصائياً عن قطر تثبيط المضاد الحياتي جنتامايسين 0.1 ملغم. ومن معطيات الجدول 3 الخاصة بتأثير المستخلص المدروس في تثبيط البكتريا *K. pneumoniae* لوحظ تفوق معنوي (P<0.05) لجميع التراكيز المستعملة على معاملة المقارنة ولكلا طريقتي الاختبار. وأثبتت بيانات التحليل الإحصائي انتفاء الفرق المعنوي فيما بين قطري تثبيط التركيزين 1 و2 ملغم/ مل والبالغين 7.30 و7.53 ملم على التوالي. فيما كان قطرا 8.30 ملم تثبيط التركيزين 4 و5 ملغم/ مل بطريقة الأقراص الورقية متفوقان معنوياً على أقطار تثبيط بقية التراكيز. وأكدت بيانات هذا الجدول إن قطر تثبيط التركيز 5 ملغم/ مل للمستخلص الإيثانولي للبروبولس بطريقة الحفر 19.30 ملم قد تفوق معنوياً (P<0.05) على جميع أقطار مناطق التثبيط الأخرى سواءً بطريقة الأقراص أو الحفر. وعند تقدير ال فعالية التثبيطية للمستخلص المدروس على البكتريا *K. pneumoniae* مع الفعالية التثبيطية المضادات الحياتية (الأمبسيلين والميثيبريم والجنتامايسين) لوحظ سلبية تثبيط الأمبيسيلين 0.03 ملغم، إذ تفوقت عليه جميع تراكيز البروبولس ولكلا طريقتي الاختبار. فيما تفوق قطر منطقة تثبيط ميثيبريم 0.025 ملغم والبالغ 12.0 ملم على أقطار مناطق تثبيط جميع تراكيز المستخلص ال مختبر بطريقة الأقراص الورقية، لكنها ظهر نقصاً معنوياً عن أقطار تثبيط كل التراكيز بطريقة الحفر. أما المضاد الحياتي جنتامايسين 0.1 ملغم فكان قطر منطقة تثبيطه 19.04 ملم أظهر تفوقاً معنوياً (P<0.05) ليس على المضادين الحياتيين الآخرين فحسب وإنما على أقطار جميع تراكيز البروبولس ولكلا طريقتي الاختبار عدا التركيز 5 ملغم/ مل بطريقة الحفر والبالغ 19.30 ملم إذ لا فرق معنوي بينهما . لقد عزى كثير من الباحثين الفاعلية المضادة للجراثيم التي تمتاز بها مستخلصات البروبولس إلى مختلف المركبات الكيميائية الموجودة في هذا المنتوج الذي يجمعه نحل العسل من مختلف المصادر النباتية، فقد أكد Bankova وجماعته (25) احتواء البروبولس الأوربي على Flavanones و Flavones فضلاً عن الأحماض الفينولية وأستراتها، في حين ذكر Banskota وجماعته (26) احتواء البروبولس البرازيلي على Prenylated p- coumaric acids و Laabdane diterpenes، فيما أكدت نتائج المحنة (6) إن البروبولس العراقي احتوى على الفلافونويدات والفينولات والراتينات والتربينات. واستناداً للنتائج المتحققة في اختبار الفاعلية التثبيطية للبكتريا المدروسة ظهر للمستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي فعل مثبط متباين حسب التراكيز المستعملة ونوع البكتريا المختبرة وطريقة الاختبار. وقد أتاحت تقنية الحفر إظهار

فاعلية تثبيط للتراكيز المستعملة أفضل من طريقة الأقراص الورقية، لذلك نوصي باعتمادها مستقبلاً في مثل هكذا اختبارات.

جدول (2) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي في البكتريا *E. coli* بطريقتي الأقراص الورقية والحفر ومقارنتها مع المضادات الحياتية

التراكيز (ملغم/ مل)	قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الأقراص الورقية		قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الحفر		المضادات الحياتية	قطر منطقة التثبيط (مام) بطريقة الأقراص الورقية	
	SE±	المعدل	SE±	المعدل		SE±	المعدل
0	0.33	6.30 a	0.33	6.30 a	أمبيسيلين 0.03 ملغم	---	6.30 a
1	0.33	6.83 b	0.33	15.10 b	ميثيبريم 0.025 ملغم	0.12	11.0 b
2	0.33	6.90 b	0.33	16.30 c	جنتامايسين 0.1 ملغم	0.2	20.40 c
3	0.33	7.50 c	0.33	17.0 d			
4	0.33	7.10 b	0.33	19.30 e			
5	0.33	7.20 b	0.33	20.0 f			

المعدلات المتبوعة بحروف هجائية متشابهة في كل عمود غير مختلفة معنوياً وفقاً لاختبار أقل فرق معنوي (LSD) بمستوى احتمال 0.05

جدول (3) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الإيثانولي للبروبولس العراقي في البكتريا *K. pneumoniae* بطريقتي الأقراص الورقية والحفر ومقارنتها مع المضادات الحياتية

التراكيز (ملغم/ مل)	قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الأقراص الورقية		قطر منطقة التثبيط (ملم) بطريقة الحفر		المضادات الحياتية	قطر منطقة التثبيط (مام) بطريقة الأقراص الورقية	
	SE±	المعدل	SE±	المعدل		SE±	المعدل
0	0.33	6.30 a	0.33	6.30 a	أمبيسيلين 0.03 ملغم	—	6.30 a
1	0.33	7.30 b	0.33	15.33 b	ميثيبريم 0.025 ملغم	0.03	12.0 b
2	0.33	7.53 bc	0.33	15.50 b	جنتامايسين 0.1 ملغم	0.12	19.04 c
3	0.33	7.87cd	0.33	16.30 c			
4	0.33	8.30 d	0.33	18.30 d			
5	0.33	8.30 d	0.33	19.30 e			

المعدلات المتبوعة بحروف هجائية متشابهة في كل عمود غير مختلفة معنوياً وفقاً لاختبار أقل فرق معنوي (LSD) بمستوى احتمال 0.05

المصادر

1. Krol, W.; Scheller, S.; Shani, J.; Pietsz & Czuba, Z. (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotic on the growth of *staphylococcus aureus*. Arzneimittel-Forschung, 43: 607-609
2. Kujumgiev, A.; Tsvetkova I.; Serkedjieva, Y.; Bankova V.; Christov, R. & Popov**,** S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. of Ethnopharmacol., 64: 235-240.
3. Koo, H.; Gomesa, B. P. F. A.; Rosalena, P. L.; Ambrosanoa, G. M. B.; Parkb, Y. K. & Curya, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Archives of Oral Biol., 45:141-148.
4. Banskota, A. H., Tezuka, Y. & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother. Res., 15**:** 561–571.
5. Kabala-Dzik, A.; Szaflarska-Stojko, E.; Wojtyczka, R.; Stojko, A.; Stojko, F. & Pacha, J. (2003). Comparative studies on the antimicrobial activity of propolis balsam and silver sulphadiazine appliedto burn wounds in pigs. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 47: 541- 545.
6. المحنة، علي محمد غازي. (2004). دراسة فاعلية خلاصة مادة البروبولس الكحولي المحلي في علاج الجروح الخارجية المخمجة تجريبياً ببعض الجراثيم والفطريات الممرضة في الفئران. رسالة ماجستير في علوم الأدوية والسموم، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
7. Crane, E. (1990). Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources. Comstock Pub Assoc. P. 640.
8. Graham, J. M. (1993). The hive and the honey bee. Daddant and Sons, Hamilton, Illinois, P. 1324.
9. Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Giuseppina Negri, G. & Dejair Message, D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evid Based Complement Alternat Med., 2: 33–38.
10. Silici, S. & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J. of Ethnopharmacol.,99: 69-73.
11. Kelly Salomão, K.; Pereira, P. R. S.; Leila, C.; Campos, L. C.; Borba, C. M.; Pedro, H.; Cabello, P. H.; Marcucci, M. C.; Solange, L. & de Castro, S. L. (2008). Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Evidence-based Compl. and Alt. Medicine, 5: 317-324.
12. Syamsudin, O.; Wiryowidagdo, S.; Simanjuntak, P. & Heffen, W. L. (2009). Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. Am. J. of Biochem. and Biotech., 5 (4): 180-183.
13. Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A. & Stringheta, P. C**.** (2008). Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. Evidence-based Compl. and Alt. Medicine, 7: 307-315.
14. Sawaya, A. C. H. F.; Souza, K. S.; Marcucci, M. C.; Cunha, I. B. S. & Shimizu, M. T. (2004). Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. Braz. J. Microbiol., 35: 104-109.
15. Marcucci, M. C. & Bankova, V. S. (1999). Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. Curr. Phytochem., 2: 115-123.
16. Park, Y. K.; Alencar, S. M. & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J. Agric. Food Chem., 50: 2502-2506.
17. Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. Science, 257: 1064-1072.

18. Klugman, K. P. (1996). The clinical relevance of in-vitro resistance to penicillin, ampicillin, amoxycillin, and alternative agents for the treatment of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis.* J. Antimicrob Chemother, 38 (Suppl A): 133-140.
19. Krell, R. (1996). Value-added products from bee keeping. FAO Agricultural Services Bulletin 124. P. 421.
20. Snedecor, G. W. & Cochran, W. G. (1968). Statistical Methods.6th. ed., Iowa State University Press, Ames Iowa. P. 593.
21. Takaisi-Kikuni, N. B. & Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial actions of a defined propolis provenance. Planta Med., 60: 222-227.
22. Gentilini, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M. & De Gregorio, O. (2000). Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Argentina. J. Dairy Sci., 83: 1224-1227.
23. Hegazi, A. G. & Abd El Hady, F. K. (2000). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. Z. Naturforsch., 57c**:** 395-402.
24. Yaghoubi, S. M. J.; Ghorbani, G. R.; Soleimanianzad, S. & Satari, R. (2007). Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. DARU, 15: 45-48.
25. Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S. & Sabatini, A. G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Z. Naturforsch., 57c: 530-533.
26. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I. & Kadota, Sh. (1998). Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. J. Nat. Prod., 61: 896–900.