فعالية الحيوية لمادة البروبولس ضد الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي في طوائف نحل العسل *Apis mellifera* L.

*عايد نعمة عويد الزبيدي محسن عبدالله كريم رضا صكب الجوراني**

الكلية التقنية المسيب/ هيئة التعليم العالي

*جامعة بغداد/كلية الزراعة**

المستخلص :-

في دراسه مختبريه اجريت في الكليه ألتقنيه/ المسيب في محافظة بابل عام ٢٠٠٥ لتقييم الفعاليه الحيويه لتراكيز مختلفه من المستخلصات المائيه والكحوليه والهكسانيه لمادة البروبولس التي جمعت من مناحل مختلفه من ثلاث محافظات مختلفه في غطائها النباتي (كربلاء ، بابل ، واسط) وبأستعمال طريقتيالأنتشار الحفر و الاقراص الورقيه ضد بكتريا *Melissoccus pluton* المسبب الرئيس لمرض تعفن الحضنه الاوربي وبكتريا *Bacillus alvei* و *B. letrosporus* المسببات الثانويه للمرض . اوضحت النتائج ان طريقة الانتشار بالحفر كانت ذات كفاءة عالية في تثبيط النمو البكتيري والذي انعكس على فعالية البروبولس في منعه للنمو البكتيري مقارنة بطريقة الاقراص الورقية . وان البروبولس بشكل عام ذو كفاءه عاليه في تثبيط النمو البكتيري وان المستخلص الكحولي كان الاكثر فعالية في التاثير وبمعدلات عامه لأقطار منع النمو بلغت ١٧.١٨ ، ١٧.٣٥ و ١٩.٧٠ ملم لكل من البكتريا *M. pluton* ، *B. alvei* و *B. Letrosporus* على التوالي . وفي مناطق جمع البروبولس الثلاث اعلاه على التوالي ايضا بينما كان المستخلص المائي الاقل فعالية في التاثير في نمو الانواع البكتيرية ايضا واظهر التركيز ٤٠ % لمستخلص البروبولس فعالية عالية في التاثير في نمو البكتريا مقارنة بالتراكيز الاخرى والتي كان التركيز ١ % اقلهما فعالية وتاثيرا. وكان للمستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % وبطريقة الانتشار بالحفر التاثير الافضل في منع النمو البكتيري عند تداخل نوع المستخلص والتركيز وطريقة الانتشار. ابدت مناطق جمع البروبولس دورا مهما في التأثيرفي كفاءة مستخلص البروبولس من خلال زيادة فعالية المركبات الفعاله التي يحتويها وحسب نوع النبات المجموع منه

وقد تفوق بروبولس منطقة كربلاء على على بروبولس مناطق بابل وواســط فــي التــأثيرفي الانواع البكتيريه .

*بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

مجلة البصرة للعلوم الزراعية ،المجلد 20 ،العدد 1، 2007

BIOACTIVITY OF PROPOLIS ON EUROPEAN FOUL-BROOD BACTERIA ON HONEYBEE COLONIES *APIS MELLIFERA* L.

Aied N. oueed — *Assist. Prof .* — ***Tech . College Al-Mussiab***

Mohsin A. Kareem — *Assist. Lec.* — ***Tech .Insitutet Al-Mussiab***

Rhidha S. Al- gorany — *Assist. Prof.* — ***Agric. College Bagh. Univ.***

SUMMARY

Laboratory experiments had been carried out in Technical college Al-Mussiab / Babylon during year 2005 to study bioactivity for different concentration form (aquneous ,alcohol and hexanic) extracts of propolis material collected from three areas in Iraq (Kerbala , Babylon and Wasit) which were different in their plant covering against some of bacterial types which cause European Full –brood (*Millisococcus pluton* , *Bacillus alvei* and *B. letrosporus*) which had been isolated from infected arched with disease and from same areas .Two methods of diffusion were used digging and paper discs methods . Results showed that diffusion method by digging was more efficient in test of bacterial inhibition which lead to increase the activity of both propolis extracts and honey toxin in bacterial growth prevention .And alcoholic propolis extracts appeared high efficacy generally in bacteria (*M. pluton , B. alvei and B. letrosporus*) with diameters average reached 17.18 , 17. 35 and 19.7 mm respectively in the regions (Kerbala , Babylon and Wasit) respectively too . While aqueous extracts was the less efficacy in bacterial growth . Propolis played a role in its efficacy by increasing active compounds which it contains in respect plant types which had been collected from . Kerbala area propolis had exceeded areas of Babylon and wasit in effect of bacterial types. On the

other hand 40 % con. appeared high effect compare with other con. While 1 % con. the less effective in these bacteria .

المقدمة :-

يعد نحل العسل *Apis mellifera* L. احد الكائنات الحيه التي تعيش على كوكب الارض جنبا الى جنب مع النباتات في معيشه ذات منفعه متبادله يمنحها النبات الغذاء (الرحيق وحبوب اللقاح) وتمنحه بالمقابل البقاء من خلال تلقيح الازهار . اهتم الانسان منذ القدم بتربية هذا المخلوق وادارته والحفاظ عليه من مختلف الافات والاعداء (8) . تعيش طائفة نحل العسل معيشه اجتماعيه تعاونيه يعمل فيها كل فرد باقصى جهد خدمة لصالح للطائفه من اجل الحصول على المتطلبات الضروريه للحياة والنمو والتكاثر والحفاظ على النوع (4) . تتعرض طائفة نحل العسل للاصابه بمختلف المسببات الممرضه (بكتريا ، فطريات و فايروسات) اضافة الى الافات الاخرى التي تفتك بها وتسبب خسائر اقتصاديه كبيره ويعد مرض تعفن الحضنه الاوربي احد اهم امراض النحل في العالم بشكل عام والعراق بشكل خاص ويتسبب عن البكتريا *Melissococus pluton* المسبب الرئيس للمرض وانواع بكتيريه اخرى مرافقه مثل البكتريا *Bacillus alvei* و *B. letrospourus* و *Bacterium eurydice* تنشط هذه المسببات في موسم فيض الرحيق ووفرة حبوب اللقاح حيث تصاب اليرقات بعمر ١-٢ يوم والتي تكون حساسه له في هذه المرحله وتموت عندما يصل عمرها الى ٤-٥ يوم او قد تموت في دور ما قبل العذراء بعد غلق العين السداسيه (17) . تساهم الشغالات السارحه في نقل المسببات المرضيه الى داخل الطوائف عند زيارتها الازهار لغرض جمع الغذاء والذي ينتشر بسرعه داخل الطائفه بواسطة الشغالات المنزليه وعادة لاتتأثر الشغالات بالمسبب المرضي ولاتكون حساسه له وذلك لاكتمال نمو اجهزتها الداخليه . (9 و 10) وعند موت اليرقات فأن النحل لايغطي العيون السداسيه التي يتحول لونها الى الرمادي البني ويميل لون اليرقة الى اللون كما يصدر من اليرقات الميتة رائحة كريهة تشبه رائحة الخميرة ويكون قوامها غير لزج ولكنها رخوة وعندما تكون الحضنة مغلقة فيمكن تمييز الاصابة من خلال اللون البني الداكن للغطاء ووجود ثقب في الوسط وبعد جفاف اليرقات فان بقاياها وقشورها لاتلتصق على جدران العين السداسية ويمكن ازالتها بسهولة من قبل الشغالات (16) . سجل او ظهور للمرض في

العراق عام ١٩٨٤ في محافظات المنطقة الشمالية (نينوى ، اربيل ، دهوك) ، (6) كما وجد ان نسبة الاصابة قد تصل في طوائف النحل في العراق الى ٨٤.٨ % (5) . من الطرق التي استخدمت للوقاية من المسبب الممرض هو تقوية طوائف النحل عن طريق تغذيتها على بدائل الغذاء من العسل وحبوب اللقاح في فترة شحة الغذاء ثم استخدمت المضادات الحيوية مثل *Oxytetracycline* و Dihydrostreptomycine و Kansmycin والتي تضاف بنسبة ٢ % الى المحاليل السكرية المعدة للتغذية كذلك استخدمت طريقة الطرد الصناعي للتقليل من خطر الاصابة بالمرض وفتح المجال للنحل لاستعادة نشاطه والتي استخدمت باسلوبين هما طريقة كوينبي التي تتخلص باعدام الحضنة المصابة وتعقيم اجزاء الخلية وانشاء خلية جديدة من النحل اليافع مع تزويد النحل باقراص جديدة (4) و طريقة شيرك المشابه للطريقة السابقة مع ادخال بعض التحسينات على طريقة اجراءها(20) ثم استخدمت في السنوات الاخيرة طرق اكثر امانا للبيئة وحفاظا على النحل وذلك باستخدام المستخلصات النباتية لمقاومة آفات النحل بشكل عام ومرض تعفن الحضنة الاوربي بشكل خاص منها استخدام مستخلص نبات الزعتر الذي اعطى نتائج ايجابية جيدة في الحد من انتشار المرض ومقاومته ،(5) كما استخدم زيت القرفه بنجاح ايضا في مكافحة مرض تعفن الحضنة الامريكي(1) ونظرا لقلة الدراسات حول استعمال مثل هذه المواد في مقاومة امراض النحل والتأثير السلبي لاستعمال المضادات الحيويه في المكافحه على طوائف النحل او العسل المنتج منها ولدفع هذا المحور الى الامام لغرض مكافحة امراض النحل وباستخدام مواد امينية و منتجه طبيعيا من قبل النحل اقترح هذا البحث الذي يهدف الى استخدام مادة صمغ النحل (البروبولس) وتقويم فعاليته ضد البكتريا المسببة للمرض والأنواع المرافقة لها .

المواد وطرائق العمل :-

نفذ البحث في مختبر المقاومة الاحيائية في الكلية التقنية المسيب لعام ٢٠٠٥، محافظة بابل .

اولا : عزل وتشخيص وتهيئة المستعمرات البكتيرية :-

جمعت اطارات مصابة بالمرض من مناحل في محافظات كربلاء ، بابل و أخرجت عدة يرقات مصابة تم التعرف عليها من خلال مظاهر الأصابه ألمتمثله بلونها الرمادي البني والقوام اللزج وذات الرائحة الكريهه التي تشبه رائحة الخميرة ووضعت على زجاجة ساعة نظيفة ومعقمة ثم مزقت اجسامها وسحقت الاجهزة الهضمية بعد اضافة قطرات من الماء المقطر والمعقم ونشرت بالابرة الناقلة المعقمة باللهب ثم أخذت قطرة من المعلق بواسطة الشراج الناقل ولقحت بها الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي السائل (Y SGS –Broth) والانابيب الحاوية على الوسط

الزراعي Nutrient broth والمحضرة سابقا وبمعدل ثلاث مكررات لكل منهما و حضنت الانابيب في الحاضنه وحسب الظروف الملائمه لنمو كل بكتريا وعلى درجة حراره ٣٥ م ولمدة ٣-٤ يوم (11) وبعد اخراج الانابيب المزروعه من الحاضنه والتي ظهرت فيها العكارة بالنسبه لانواع البكتريا *Bacillus sp.* والانابيب التي لم تظهر فيها العكاره والخاصه بالبكتريا *M. pluton* . اخذت قطرة من المعلق البكتيري وزرعت في الطبق الحاوي على الوسط الصلب Agar Nutrient وبطريقة التخطيط وحضنت على درجة حرارة ٣٥ م لمدة ١- ٢ يوم وبعد نمو البكتريا اخذت مسحه من المستعمرة ونشرت على شريحة زجاجية بعد اضافة قطرة من الماء المقطر والمعقم وتركت لتجف في الهواء ثم ثبتت بواسطة اللهب وبصبغة كرام وفحصت تحت المجهر لتحديد المستعمرات التي سيتم تنقيتها وبعد تحديدها اخذت من كل مستعمرة مسحه زرعت في طبق يحتوي على وسط غذائي صلب وبواسطة التخطيط ايضا وحضنت الاطباق هوائيا بالنسبة لأنواع جنس *Bacillus* ولاهوائيا بالنسبة للبكتريا *M. pluton* بعد ذلك فحصت العزلات مظهريا وفسلجيا وكيموحيويا للتاكد من نقاوتها ثم اعيدت العملية لأجل الحصول على عزلات نقية(18)حفظت بعدها العزلات في الثلاجة على درجة حرارة ٣٥ م لحين الاستعمال مع تجديدها شهريا وشخصت العزلات البكتيرية من خلال تحديد الصفات المورفولوجية والفسيولوجية والكيموحيوية حسب (12).

ثانيا :- جمع و تحضير مستخلصات البرولوس

جمعت عينات كافيه نظيفة من البروبولس يدويا من مناحل مختلفه في ثلاث محافظات هي كربلاء ، بابل و واسط كل على حده ووضعت في حاويات بعيدا عن الضوء والحرارة ولحين الاستعمال (3) وعملت من العينات المستلخصات التالية :-

١- المستخلص المائي للبروبولس.

اخذت ١٠غم من البروبولس الخام قطع الى قطع صغيرة ووضعت في دورق حجمي واضيف اليه ١٠٠ مل من الماء المقطر وترك لمدة ٥ ايام بعدها رج باستخدام جهاز الرجاج المغناطيسي لمدة ١٥ دقيقة وبعد الانتهاء من الاذابة رشح المحلول بواسطة قطعة من القماش للتخلص من الجزيئات الكبيرة ثم رشح المحلول بواسطة ورقة ترشيح نوع whatman N.0.1 جفف المستخلص بواسطة جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل ودرجة حرارة ٤٥م ثم وزن المستخلص ووضع فى حاويات نظيفة ومعقمه فى دافئ على درجة حرارة الغرفه ومظلم لحين الاستعمال . (13)

٢- المستخلص الكحولي للبروبولس .

اتبعت نفس الخطوات فى الطريقة السابقة عدا استخدام ١٠٠مل من الكحول الاثيلي كمذيب و بتركيز ٧٥% .

٣- المستخلص الهكساني للبروبولس

استعملت نفس الخطوات فى الطريقة السابقة عدا استخدام ١٠٠مل من مذيب الهكسان.

ولغرض تحضير التراكيز المستخدمة في الدراسة فقد اخذ ١ غم من مستخلص البروبولس واذيب في ٢.٥ مل ماء مقطر ومعقم لغرض الحصول على مستخلص مائي قياسي بتركيز ٤٠% ومن ثم حضرت التخافيف اللازمة للأختبار ١ ، ٥ ، ١٠ ، ٢٠ و ٤٠ % اما معاملة المقارنه فقد استخدم المذيب الذي استخدم في الاستخلاص فقط بالنسبه للمستخلص الكحولي والهكساني .(7) .

ثالثاً : - مقارنة تأثير مستخلص البروبولس مع تأثير المضاد الحيوي مختبريا .

اجري الاختبار لمقارنة التاثير التثبيطي لمستخلص البروبولس من جهة والمضاد الحيوي oxytetracycline من جهة اخرى في مسببات مرض تعفن الحضنة الاوربي الرئيسي والثانوية وبطريقة تحميل الاقراص الورقية حيث حملت بالتراكيز ١ ، ٥ ، ١٠ ، ٢٥ ، ٤٠ % لمستخلص البروبولس واستخدمت اقراص جاهزة من المضاد الحيوي oxytetracyclinel محمله ب ٣٠ ميكرو غرام / مل لغرض المقارنة في تثبيط المسببات البكتيرية للمرض واضيف ٠.١ مل من المعلقات البكتيرية لكل عزله الى الوسط الغذائي الخاص بكل نوع من الانواع البكتيريه ونشرت بالناشر الزجاجي وعملت ثلاثة مكررات ولكل تركيز مع قرص oxytetracycline للمقارنة ثم حضنت الاطباق هوائيا او لاهوائيا (حسب نوع العزلة) وتم حساب قطر منع التثبيط حول القرص بواسطة المسطره (15)

رابعاً :- دراسة تأثير الغطا ء النباتي على نوعية البروبولس المنتج

لغرض تحديد تأثير نوعية الغطا ء النباتي على نوعية البروبولس المنتج فقد اختيرت عدة مناحل مختلفه في ثلاث محافظات هي كربلا ء ، بابل و واسط تختلف في غطائها النباتي الشائع والذي يزوره النحل للحصول على الغذاء وجمع البروبولس ومن ثم تحديد التأثير في تثبيط النمو البكتيري للعزلات البكتيريه المختلفه .

التحليل الاحصائي :-

استخدم التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.) وجرى تحليل التباين للعوامل الداخلة في التجربه باستعمال اختبار الفرق المعنوي الاصغر (L.S.D.) تحت مستوى معنوية ٠.٠٠٥. (2) .**النتائج والمناقشة :-**

اولا :- تاثير المستخلصات المختلفه للبروبولس في بكتريا *M. pluton* ، *B. alvei* و *B. letrosporous*

تأثير مستخلص بروبولس منطقة كربلاء في انواع البكتريا المسبب لمرض تعفن الحضنة الاوربي.

اظهرت نتائج جدول (١) ان مستخلصات البروبولس المختلفة قد اعطت تاثيرا واضحا في منع نمو البكتريا *M. pluton* ولكنها تباينت حسب طريقة المعاملة ونوع المذيب والتركيز فقد تفوقت طريقة الحفر على طريقة الاقراص الورقية معنويا ولجميع المستخلصات في معدلات تثبيط النمو البكتيري والتي بلغت ١٣.٧٤ و ٨.٩٩ ملم على التوالي . كما تفوق المستخلص الكحولي معنويا ولكلا الطريقتين في معدل قطر تثبيط النمو البكتيري والذي بلغ ١٧.٨١ و ١٠.١٣ ملم لكل من طريقتي الحفر والاقراص الورقية على التوالي في حين كان المستخلص المائي اقلهما تاثير وبمعدلات بلغت ١٠.١ و ٧.١ على التوالي ايضا اما بالنسبة لتراكيز المستخلصات أعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ١٨.٦٣ ملم في حين اعطى التركيز ١% اقل معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ١٠.٠٦ ملم . وعن التداخل فيما بين المعاملات فقد كان المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠% الاكثر فعالية حيث بلغ قطر منطقة التثبيط ٢٢.٣ ملم كما ان المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠% وبطريقة الحفر كان الافضل في منع النمو البكتيري عند التداخل بين هذه العوامل الثلاث وبمعدل بلغ ٢٢.٣ ملم . يتضح من النتائج اعلاه ان تاثير المستخلصات هو حصيلة فعالية المذيب المستخدم في استخلاص المركبات الفعالة ومدى انتشار هذه المركبات خلال الوسط الزرعي وزيادة التركيز وان طريقة الحفر كانت الاكفأ في الانتشار واثبتت قدرة عالية في كفاءة تاثير المستخلصات لمنع نمو البكتريا . وهذا يتفق مع ما اشار اليه (14),(7) عند استخدامها لمستخلصات البروبولس في تثبيط نمو البكتيريا الممرضه للأنسان.

اما بالنسبة لتأثير مستخلص بروبولس منطقة كربلاء في بكتريا *B. alvei* المسبب الثانوي للمرض فقد اوضح جدول (١) ان هنالك حساسية واضحة لهذه البكتريا ولكافة مستخلصات

البروبولس تمثلت في زيادة ملحوضة في مديات منطقة التثبيط لنمو البكتريا والتي تباينت حسب طريقة الانتشار

والتركيز ونوع المستخلص فقد تفوقت طريقة الحفر على طريقة الانتشار بالاقراص الورقية وبشكل معنوي حيث بلغ المعدل العام لمنطقى التثبيط البكتيري ١٣.٠٦ و ٩.٩٢ ملم لكل من طريقتي الحفر والاقراص الورقية على التوالي. كما تفوق المستخلص الكحولي ولطريقتي الاختبار في معدلات اقطار مناطق تثبيط البكتريا حيث بلغ ١٥,٨٦ و ١١.٣ ملم في كل من طريقة الحفر والاقراص الورقية على التوالي ايضا وكذلك اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدلات منع النمو البكتيري بلغ ١٧.٥ في حين اعطى التركيز ١٠ % اقل معدل منع نمو للبكتريا بلغ ١١.٣٣ ملم وعن التداخل فيما بين التراكيزوالمستخلص والطريقه المستخدمه فقد تفوقت فعالية المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠% وبطريقة الانتشار بالحفر وبمعدل بلغ ٢١.٠ ملم وهذه النتائج تتفق مع مالاحضه(19) من ان مركب البروبولس يحتوي على تراكيز عالية من المواد الفينولية والفلافينية والراتنجات والزيوت الطيارة ومركبات اخرى تعطي جميعها فعالية تؤثر في نمو الاحياء المجهرية وخاصة البكتيرية منها . وعن مدى تاثير بروبولس منطقة كربلاء في بكتريا *B. letrosporus* المسبب الثانوي للمرض فقد اوضح جدول (١) ان المذيبات المستخدمة في استخلاص البروبولس قد اثرت بشكل عام في تثبيط نمو هذه البكتريا واظهرت طريقة الحفر تاثيرا معنويا عاليا في منع النمو البكتيري مقارنة بطريقة الاقراص الورقية ولجميع المستخلصات وبمعدل عام بلغ ١٣.٦٧ و ١١.٣٣ لكل منهما على التوالي واشار الجدول ايضا الى افضلية المستخلص الكحولي للبروبولس في التاثير في هذه البكتريا وتفوق معنويا في زيادة معدلات اقطار التثبيط البكتيري بلغت ١٦.٦ و ١٤.٨ ملم لكل من طريقة الحفر وطريقة الاقراص الورقية على التوالي وكذلك اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ٢٠.٧٦ ملم في حين اعطى التركيز ١ % اقل معدل لمنع النمو البكتيري وبلغ ٨.٢ ملم ولكلا طريقتي الانتشار وعن التداخل فيما بين العوامل الثلاثة فقد اظهر المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠ % ولطريقة الحفر تاثيرا فعالا في منع النمو البكتيري وبمعدل بلغ ٢٤.٠ملم .

٢- تاثير مستخلص بروبولس منطقة بابل في انواع البكتريا المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي .

اشار جدول (٢) الى ان تاثير مستخلص البروبولس الذي جمع من منطقة بابل في النمو البكتيري يعتمد على نوع المستخلص وطريقة الانتشار والتركيز اظهرت طريقة الحفر تاثيرا معنويا في تثبيط النمو البكتيري لبكتيريا *M. pluton* المسبب الرئيسي للمرض مقارنة بطريقة الانتشار بالاقراص الورقية وبمعدلات بلغت ١١.٢٧ و ٨.٦ ملم على التوالي وتفوق المستخلص الكحولي معنويا في تاثير نمو البكتيريا ولكلا طريقتي الانتشار بالحفر والاقراص الورقية وبمعدلات بلغت ١٥.٣ و ٩.٨ ملم لكل منهما على التوالي . وعلى نفس المنوال اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل في منع نمو بكتيري بلغ ١٤.٩٦ ملم بينما كان التركيز ١ % الأقل تاثير في منع النمو البكتيري وبمعدل ٩.٥ ملم وعن التداخل فيما بين طريق الانتشار ونوع المستخلص والتركيز فقد اعطى المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % ولطريقة الانتشار بالحفر اعلى معدل منع للنموالبكتيري بلغ ٢١.٣ ملم . وعن تاثير بروبولس منطقة بابل في منع النمو البكتيري لبكتريا *B. alvei* المسبب الثانوي للمرض فقد اوضح جدول (٢) عن وجود تباين في تاثير مستخلصات البروبولس في التاثيرفي هذه البكتريا وايضا حسب طريقة المعاملة ونوع المستخلص وتركيزه ابدت طريقة الحفر تفوقا معنويا على طريقة الاقراص الورقية في التاثير وبمعدل عام لمنطقة التثبيط البكتيري بلغ ١٢.١ و ١٠.٩ ملم لكل منهما على التوالي وان المستخلص الكحولي قد تفوق معنويا على بقية المستخلصات في مدى التاثيرحيث بلغ معدل قطر التثبيط البكتيري ١٧.٣ و ١٤.٦ ملم لكل من طريقتي الانتشار بالحفر والاقراص الورقية على التوالي وكذلك اظهر التركيز ٤٠ % افضلية واضحة في التاثير في تثبيط نمو البكتريا *B. alvei* وبقطر بلغ

١٦.٦ ملم في حين كان التركيز ١ % الأقل فعالية في التاثير واعطى معدل منع نمو بكتيري بلغ ٨ ،٧ ولطريقة الحفر ايضا.

من ناحية اخرى اظهرت بيانات جدول (٢) ان المذيبات التي استخدمت في استخلاص البروبولس قد اثرت بشكل عام في تثبيط نمو البكتيريا *B. letrosporus* واظهرت طريقة الحفر تأثيرا عالي المعنوية في منع نمو هذه البكتيريا مقارنة بطريقة الانتشار بالاقراص الورقية حيث بلغ المعدل العام لمنطقة التثبيط البكتيري بطريقة الحفر ولجميع المستخلصات ١٣.٧ ملم وبفارق معنوي عن طريقة الاقراص الورقية والتي كان معدل تثبيطها ١٢.٤ ملم .

وأشار الجدول كذلك الى افضلية المستخلص الكحولي للبروبولس في التاثير في هذه البكتريا حيث تفوق معنويا في زيادة معدلات اقطار التثبيط البكتيري والذي بلغ ١٩.١٧ و ١٨.٦ ملم لكل من طريقتي الانتشار بالحفر والاقراص الورقية على التوالي وبنفس الوقت اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ١٨.٥ ملم اما التداخل بين طريقة الانتشار ونوع المستخلص والتركيز فكان الافضل من بين جميع المعاملات هو المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠ % وبطريقة الحفر واعطى اعلى معدل قطر منع النمو البكتيري بلغ ٢٦.٦ ملم . ويمكن تفسير كفاءة مستخلصات البروبولس المختلفة في تثبيط نمو بكتريا *B. letrosporus* الى حساسية هذه البكتريا لمركبات البروبولس الفعالة وذات التاثير التثبيطي للأحياء المجهرية بشكل عام وخاصة الانواع البكتيرية من جنس *Bacillus* هذا من ناحيه ومن ناحية اخرى فان نوع المذيب المستخدم وصفاته الكيمياويه والطبيعيه لها تأثير ايضا في حساسية البكتريا لمستخلصات البروبولس.

٣- تاثير مستخلص بوربولس منطقة واسط في انواع البكتريا المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي.

اظهر جدول (٣) ان هنالك تباينا واضحا في القدرة التثبيطية لكافة مستخلصات البروبولس وباختلاف التراكيز وطريقة الاختبار في التاثير في بكتريا *M. pluton* فقد تفوقت طريقة الانتشار بالحفر في زيادة فعالية المستخلصات بحيث بلغ المعدل العام لقطر التثبيط البكتيري ٩.٢ ملم مقارنة بطريقة الاقراص الورقية والتي بلغ فيها المعدل ٨.٠ ملم وبفارق معنوي فيما بينهما. واشارت البيانات الى زيادة تاثير المستخلص الكحولي للبروبولس معنويا في تثبيط نمو هذه البكتيريا وبمعدلات بلغت ١١.٥

و ٨.٦ ملم لكل من طريقتي الحفر والاقراص الورقية على التوالي كما اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل لقطر منع النمو البكتيري بلغ ١٣.٧ ملم في حين لم يعط التركيز ١ % اي تاثير في تثبيط نمو البكتريا *M.pluton* مقارنة بمعاملة السيطرة ٦ ملم واظهر التداخل بين طريقة الانتشار ونوع المستخلص وتراكيزه تاثيرا واضحا في النمو البكتيري فقد كان المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠%

وبطريقة الحفر الافضل من خلال منطقة تثبيط بكتيرية بلغت ١٧.٦ ملم. وفي منطقة واسط ايضا بين جدول (٣) ان هنالك تاثيرا واضحا لطرق الانتشار في زيادة فعالية مستخلصات البروبولس في التاثير في تثبيط نمو البكتريا *B. alvei* فقد اظهرت طريقة الانتشار بالحفر

زيادة معنوية على طريقة الاقراص الورقية في هذا التاثير حيث كان المعدل العام في تثبيط النمو البكتيري ٩.٦ ملم لطريقة الحفر بينما كان ٨.٤ لطريقة الاقراص الورقية واوضحت النتائج كذلك عن وجود زيادة معنوية في تاثيرالمستخلص الكحولي في تثبيط النمو البكتيري لهذه البكتريا بلغ ٩.٦ و ٨.٩ ملم ولكلا الطريقتين الحفر والاقراص الورقية على التوالي مقارنة بالمستخلص المائي الذي كان الاقل تاثيرا وارتفع تاثير التركيز ٤٠ % للمستخلص الكحولي الى ١٥.٠ ملم في قطر منع النمو البكتيري واعطى التركيز ٥ % ادنى تاثير في منع النمو بلغ ٧.٠٠ ملم في حين لم يظهر التركيز ١ % اي تاثير معنوي قي تثبيط النمو البكتيري والذي بلغ ٦.١ ملم وهو مقارب لمعاملة السيطرة ٦ % كذلك اظهر المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % ولطريقة الحفر افضل تاثير في معاملات التداخل فقد اعطى معدل قطر منع النمو البكتيري بلغ ١٦.٦ ملم ولكلا الطريقتين ضد البكتريا *B. alvei* . من ناحية اخرى ابدت طريقة الحفر تفوقا معنويا على طريقة الاقراص الورقية في منع النمو البكتيري للبكتريا *B. letrosporus* وبمعدل عام بلغ ١٠.٩ ملم بطريقة الحفر مقارنة بـــ ٩.٣ ملم لطريقة الاقراص الورقية . جدول (٢) والذي اشار ايضا الى كفاءة المستخلص الكحولي في منع نمو هذه البكتيريا حيث اظهر تاثيرا عالي المعنوية وبمعدل قطر منع النمو البكتيري بلغ ١٥.٣ و ١٢.٧ ملم لكل من طريقتي الحفر والاقراص الورقية على التوالي بينما كان المستخلص المائي الأقل تاثير. وبين الجدول كذلك زيادة معنوية في معدلات اقطار التثبيط بزيادة تركيز المستخلص فقد اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل في التثبيط البكتيري بلغ ٥.٣ ملم بينما كان التركيز ١ % أقل معدل في التثبيط بلغ ٧.٨ ملم وعند تداخل هذه العوامل (نوع الطريقة ونوع المستخلص وتركيزه) فقد كان الافضل تاثيرا في كافة المعاملات هو المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠% وبطريقة الحفر وبمعدل تثبيطي عام ٢٢ ملم في حين لم يعطي المستخلص المائي وبالتركيز ١% و ٥% ولطريقة الاقراص الورقية اي تاثير في منع النمو البكتيري لبكتيريا *B. letrosporus* مقارنة بمعاملة السيطره ٦ ملم .وعلى ضوء النتائج التي تم الحصول عليها من هذه التجربه نستنتج ان طريقة الحفر المستخدمه في نشر مستخلصات البروبولس كانت الافضل والاكثر تأثيرا في منع النمو البكتيري للبكتري *M. B. alvei , pluton* و *B. Letrosporus* مقارنة بطريقة النشر بالاقراص الورقيه وان المستخلص الكحولي للبروبولس هو الاكثر فعالية وبشكل معنوي في منع النمو لهذه الانواع البكتيريه مقارنة بالمستخلصات الاخرى والتي كان اقلها تأثيرا المستخلص المائي . واظهر

التركيز ٤٠ % لهذا المستخلص افضل معدل منع نمو الانواع البكتيري مقارنة بالتراكيز الاقل والتي كان اوطأها تاثير التركيز ١ % ولكافة المستخلصات وبناء عليه يمكن التوحيد بأعتماد طريقة الانتشار بالحفر واستعمال المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % للبروبولس في ايـــة تجارب مستقبلية لهذا النوع من المعاملات .

ثانيا :- المقارنة بين تراكيز مختلفة من مستخلص البروبــولس مـــع المضـــاد الحيـــوي oxytetracycline في التاثير في نمو الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفــن الحضـــنة الاوربية .

اوضح جدول (٤) ان البروبولس كان اكثر فعالية في التاثير في تثبيط نمو الانواع البكتيريه *M. pluton* ، *B. alvei* و *B. Letrosporus* ومتفوقا بشكل معنوي على المضاد الحيوي oxytetracycline وان التركيز ٤٠ % منه كان الاكثر فعالية فـــي تثبـــيط نمـــو الانـــواع البكتيرية اعلاه مقارنة بتركيز ٣٠ mcg من المضاد الحيوي Oxytetracycline الذي لـــم يبدي اي تاثير تثبيطي في نمو البكتريا M . *pluton* مقارنة بـــالنوعين *B. alvei* و *B. Letrosporus*

جدول (٤) مقارنة تأثير تراكيز مختلفة من البروبولس مع المضاد الحيوي Oxytetracyclin في تثبيط نمو الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي .

التراكيز %	الانـــــــواع البــكتــيــريـــة					
	M. pluton		*B. alvei*		*B. letrosporus*	
	بروبولس	O.T.C mcg ٣٠	بروبولس	O.T.C. ٣٠ mcg	بروبولس	O.T.C. 30 mcg
٠	٦.٠٠	٦.٠٠	٦.٠٠	١٥.٣٠	٦.٠٠	٢١.٦٠
١	١٣.٦٠		١٠.٣٠		١٥.٠٠	
٥	١٩.٣٠		٢٠.٠٠		٢١.٠٠	
١٠	٢٠.٣٠		٢١.٦٠		٢٤.٠٠	
٢٠	٢١.٦٠		٢٢.٦٠		٢٦.٠٠	
٤٠	٢٢.٣٠		٢٣.٦٠		٢٦.٦٠	
المعدل	١٧.١٨	٦.٠٠	١٧.٣٥	١٥.٣٠	١٩.٧٦	٢١.٦٠

L.S.D. للتراكيز ٠.٥٤٣

L.S.D. للمواد **٠.٥٤٣**

L.S.D. للتداخل **٢.١٠٦**

ثالثا : – تاثير الغطاء النباتي في مناطق جمع البروبولس في تثبيط نمـــو البكتريـــا *M. pluton* ، *B. alvei* و*B. Letrosporus* المسبب لمرض تغفن الحضنة الاوربي .

بين شكل (١– أ) ان الكحول الاثيلي ٧٥ % كان الافضل في استخلاص مركبات البروبولس الفعال ضد بكتيريا *B. pluton* ولكافة المناطق والذي تفوق مستخلصه في معدل قطر منـــع النمو البكتيري الى معدل بلغ ١٤.٩ملم واظهرت النتائج ايضا تفوق البروبولس المجموع من منطقة كربلاء في التاثيرفي منع النمو البكتيري الى وبمعدل ١٣.٧ ملم ولكافة المستخلصات مقارنة بالمناطق الاخرى . اما بالنسبة للتداخل بين المناطق والمستخلصات ففي منطقة كربلاء فقد كان المستخلص الكحولي الاكثر فعالية في التاثير في منع النمـــو البكتيـــري وبمعـــدل ١٧.١٨ ملم . نستنتج من ذلك ان الغطاء النباتي المتنوع له دور مهم فـــي رفـــد مركبـــات البروبولس بمواد ذات اثر تثبيطي لكثير من الاحياء المجهرية حيث كان الغطاء النباتي الشائع والذي يزوره النحل لجمع البروبولس في منطقة كربلا ء هو السدر والحمضيات واليوكالبتوس واشجار من الفاكهه و بعض نباتات الادغال مقارنة بالمناطق الاخرى التي تفتقر الـــى هـــذه النباتات .

اما عن تاثير مناطق جمع البروبولس ضد البكتريا *B. alvei* فقد اوضح شكل (١– ب) التاثير العالي لمستخلص البروبولس الكحولي في تثبيط نمو هذه البكتريا واعطى معدل قطر منطقة التثبيط البكتيري ١٤.٥ ملم واظهر البروبولس المجموع من منطقة كـــربلاء تـــاثيرا معنويا في مديات مناطق التثبيط البكتيري بقطر ١٣.٠ ملم مقارنة بالمناطق الاخرى التـــي كانت الاقل تاثير في هذه البكتريا ولكن عند التداخل بين المناطق ونوع المستخلصات اظهر المستخلص الكحولي للبروبولس المجموع من منطقة بابل تفوقا واضحا في التاثير في منـــع النمو البكتيري لهذه البكتريا وبمعدل قطر بلغ ١٧.٣ ملم . ويمكن تفسير هذه النتـــائج بـــان لمركبات البروبولس تاثيرا في اغلب الانواع البكتيرية حيث تزداد فعاليتها تبعا لطبيعة البكتريا وحساسيتها وخاصة البكتريا من جنس *Bacillus* ومـــا لمركبـــات البروبـــولس الفلافونيـــة والفينولية والراتنجية والزيوت الطيارة والتربينات وهي مكونات ثانوية لها الاثـــر الكبيـــر والقابلية في التاثير في التضاد الحيوي البكتيري حسب ما اوضحه ((14) .

كما اوضحت بيانات شكل (١– جـــ) تاثير مستخلصات البربولس المختلفة بشكل كبير فـــي تثبيط نمو البكتريا *B. Letrosporus* مع وجود تباين حسب المنطقة ونوع المستخلص فقـــد تفوق المستخلص الكحولي معنويا وبمعدل قطر منع النمو البكتيري ١٧.٢ ملم هـــذا وكـــان

لمناطق جمع البروبولس تاثيرا واضحا في منع النمو البكتيري فقد اعطت منطقة بابل اعلى معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ١٣.٧ ملم

وبزيادة غير معنوية عن منطقة كربلاء كذلك اعطى المستخلص الكحولي لمنطقة بابل تفوقا معنويا في التاثيرفي تثبيط نمو البكتيريا وبمعدل ١٩.٧ ملم عند التداخل بين المناطق والمستخلصات ويرجع سبب التباين هنا الى تاثير المناطق في تفضيل النحل للأشجار والنباتات التي يزورها لجمع البروبولس وبالتالي الى اختلاف مكونات البروبولس المجموع وخاصة اشجار الكالبتوس والسدر و الحمضيات من جهة والى حساسية البكتريا لهذه المركبات من جهه اخرى . وعلى ضوء النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة تاثير الغطاء النباتي في المنطقة التي جمع منها النحل مادة البروبولس اتضح ان البروبولس الذي جمع من منطقة كربلاء كان الافضل تاثيرا عند عمل مستخلصات له ضد الانواع البكتيرية *M.pluton* و *B. alvei* و *B. Letrosporus* يليها منطقة بابل ثم منطقة واسط وهذا بالطبع يرجع الى نوعية الغطاء النباتي في كل منطقة خاصة النباتات التي يفضل النحل زيارتها لجمع هذه المادة وهو ما انعكس تاثير في منع نمو هذه الانواع البكتيرية عند عمل مستخلصات لها .

المصادر :-

١- الحجيمي ، كميلة ورد (٢٠٠٢) . دراسة بيئية لمرض تعفن الحضنة الامريكي على نحل العسل ومكافحته بأستخدام المستخلصات النباتية وطريقة الطرد الصناعي –رسالة ماجستير –كلية الزراعة – جامعة بغداد .

٢- الساهوكي ، مدحت وكريمة محمد وهيب (١٩٩٠) . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . دار الحكمة ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد . ٤٨٨ صفحة .

٣- العمار ، مهدي حسين (٢٠٠١) . تاثير فعالية مركبات البروبولس في نمو بعض انواع البكتريا الممرضة. رسالة ماجستير –كلية العلوم – جامعة الكوفة .

٤- المصري ، علي (١٩٨٦). مملكة نحل العسل ومنتجاتها و الامراض التي تصيبها ومعالجتها والوقاية منها دار الكتاب العربي –دمشق سوريا . ٣٠٩ صحفة

٥- الكناني ، محمد عبد الجليل (٢٠٠٠) دراسة مرض تعفن الحضنة الاوربي على نحل العسل ومكافحته بأستخدام المستخلصات النباتية . اطروحة دكتوراه كلية الزراعة – جامعة بغداد.

٦- الناجي ، لؤي كريم و محمد عمر محي الدين (١٩٨٦) تشخيص مرض تعفن الحضنة الاوربي في نحل العسل في القطر العراقي – المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو) . م٣ ع٢ . ١٣٩- ١٥٠ .

٧- النعمان ، اديبة يونس شريف . (١٩٩٨) . التاثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام – اطروحة دكتوراه . كلية العلوم – جامعة الموصل .

٨- يزبك ، رشيد (١٩٨١) . زيادة الانتاج الزراعي بتلقيح الازهار . مجلة نحل العسل (١) : ٤٣-٥٠ .

9- Bailey , L. (1981) . Honey bee pathology . Academic press , London , A.F.B Microbiology Letters. 20:271-281.

10- Bailey , L. and B.V. Ball (1991) Bacilly Larvae its cultivation in vitro and its growth in vivo. J. Gen. Microbial 20 : 711 – 717 .

11- Benson , H.J. (1979) . Microbiological Application . A Laboratory Manual in general Microbiology, WM. C. Brown company publishers Iawa U.S.A.

12 - Bergys manual of Determinative bacteriology (1994) 9th Williams & Wilkins , U.S.A.

13- Contari , G. (1987) . Process for the proplis extracts preparation. Apicolt. Mod. 78:147- 150.

14- Krell , R. (1996) , value – Added products from bee keeping – food and Agriculture organization of the united Nations (FAO) Roma P. 157- 193.

15- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) . (1984) . Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testing 3rd edn, Approved standard M2-A3 national committee for clinical laboratory standards , villarova PA. U.S.A.

16- Graham , J.M. Ed. (1992). The hive and the Honey bee. Dadant & sons, Hamiltion Illinios U.S.A. 1324 pp.

17- Shimanuki , H. (1988) high velocity electron beams for bee disease control . Amer. Bee. J. 128. 865 – 867.
18- Shimanuki , H. and G.E. Contwell. (1978) . Diagosis of Honey bee disease parasites. And Pests, Amer. Bee. USDA. Ars – NE 87 : 650 – 760.
19- Papay , V. (1987). Chemical and pharmacological study of proplis from various location. Acta pharmacy. Hung. 57:143-151.
20- Werner , V.D.O. and Jost , H. Dustmann (1997) . Efficient prophylactic measures against American Foulbrood by Bacteriological analysis of honey for spore contamination. Amer. Bee Jon. Mo. 8. pp. 603 – 605.