Bioactivity of Bee Venom on European Foul – Brood Bacteria

A.N. Oueed Al- Zubadi, M. A. Kareem Al- Musafer, *R S . Al-Jorany

Technical Colleg, Al-Mussiab , Foundation of Technical. Education
***College of Agriculture, University of Baghdad**

Abstract

Laboratory experiments were carried out in Technical college AL- Mussiab / Babylon during 2005 to study bioactivity of different concentration from (aqueous , alcohol and hexane) extracts of bee venom collected from different workers of bees against some bacterial types that cause European Foul – brood *Melissococcus plutom* , *Bacillus alvei* and *B. letrosporus* which had been isolated from infected arched with disease . Two diffusion methods (digging and paper discs) were followed for the extraction of the venom . Results showed that digging diffusion method was more efficient for test of bacterial inhibition which led to increase the activity of bee venom extract with general average 7.90 , 8.85 and 8.19 on *M. pluton, B. alvei* and *B. letrosporus*. Alcoholic bee venom extract showed high efficiency in inhibition for the same bacterial species above by digging method too with diameters average 8.15 ,9.76 and 10.59 mm respectively . while aqueous extract was the less efficient in bacterial growth of these bacterial species that reached 7.26 , 7.70 and 6.26 mm respectively in paper discs method compared with control 6.00 mm. On the other hand 40% concentration of bee venom showed high effect of bacterial growth for *M.pluton , B. alvei* and *B. letrosporus* with averages 10.60 , 15.60 and 15.60 mm respectively while 1% concentration had no effect in growth of these bacteria compared with control treatment 6.00 mm .Ther is an interaction between the diffusion method, concentration and the kind of the extract . The results reflected that Alcoholic extract at 40% con. by digging method gave a higher inhibition of growth 10.60 , 15.60 and 15.60 mm in *M. pluton , B. alvei* and *B. letrosporus* respectively. 40% con. of bee venom compounds however was more effective for bacterial species compared with Oxytetracyclin antibiotic that was very effective in *B. alvei* and *B. letrosporus* and less effective in *M. pluton* bacteria .

الفعالية الحيوية لسم النحل ضد الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي

عايد نعمه عويد الزبيدي ،محسن عبد الله كريم،رضا صكب الجوراني*
الكلية التقنية ، المسيب ، هيئة التعليم التقني
*** كلية الزراعة، جامعة بغداد**

الخلاصة

في دراسة مختبرية اجريت في الكلية التقنية المسيب في محافظة بابل عام ٢٠٠٥ لتقييم الفعالية الحيوية لتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية والكحولية والهكسانية لمادة سم النحل وبأستعمال طريقتي انتشارهما طريقة الحفر، وطريقة الاقراص الورقية ضد بكتريا *Melissococcus pluton* المسبب الرئيس لمرض تعفن الحضنة الاوربي وبكتريا *Bacillus alvei* و *B. letrosporus* المسببان الثانويان له التي عزلت من اطارات مصابة بالمرض . اوضحت النتائج ان طريقة الانتشار بالحفر قد اثرت معنويا في فعالية جميع المستخلصات من خلال اتساع مديات التثبيط التي بلغت٧,٩٠ ، ٨,٨٥ ، و ٨,١٩ ملم وفي نمو البكتريا *M. pluton* ، *B. alvei* و *B. letrosporus* . على التوالي . واظهر المستخلص الكحولي تفوقا معنويا في معدلات التثبيط البكتيري التي بلغت ٨,١٥ ، ٩,٧٦ و١٠,٥٩ ملم لكل من الانواع البكتيرية اعلاه على التوالي ولطريقة الحفرايضا . في حين اعطى المستخلص المائي اقل تأثير في نمو البكتريا بلغ ٧,٢٦ ، ٧,٧٠ و ٦,٢٦ ملم و في طريقة الاقراص الورقيه مقارنة بمعاملة السيطرة ٦,٠٠ ملم . واعطى التركيز ٤٠% من المستخلص الكحولي اعلى معدلات للتثبيط في نمو الانواع البكتيرية *M. pluton* , *B.* alvei و B. letrosporus التي بلغت ١٠,٦٠ ، 15.60 و ١٥,٦٠ ملم على التوالي وعند استعمال طريقة الحفر وبفروقات معنوية عن اقطار التثبيط بالتراكيز الاخرى. في حين لم يعط التركيز ١% اي تأثير في نمو الانواع البكتيريه اعلاه مقارنة بمعاملة السيطره ٦,٠٠ ملم ايضا . وعن التداخل بين طريقة الانتشار والتركيز المستعمل ونوع المستخلص فقد اعطى المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠% وبطريقة الحفر اعلى معدلات في التثبيط البكتيري التي بلغت ١٠,٦٠ ، ١٥,٦٠ و ١٥,٦٠ ملم في الانواع البكتيرية *M. pluton* ، *B. alvei* و *B. letrosporus* على التوالي ايضا . واظهر التركيز ٤٠% من سم النحل فعالية في تثبيط نمو الانواع البكتيرية الثلاث مقارنة بالمضاد الحيوي Oxytetracyclin الذي اظهر تأثيرا في نوعي البكتريا *B. alvei* و *B. letrosporus* اكثر مما هو عليه في البكتريا *M. pluton* اذ لم يبد المضاد الحيوي اي تأثير تثبيطي ضدها.

---

* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة

نحل العسل *Apis mellifera L.* احد اهم الحشرات الاجتماعية التي اهتم الانسان بتربيتها منذ اقدم العصور مستفيداً من منتجاته بوصفها موادا طبية وعلاجية . وفي عالمنا اليوم نجد ان تربية النحل من المهن الزراعية المهمة في كثير من البلدان التي وصلت الى درجة عالية من التقدم ، وهي حشرة اجتماعية تعيش بشكل طائفة تتألف من ملكة وذكور وشغالات تعيش جنباً الى جنب مع النباتات على سطح الكره الارضيه وبمنفعة متبادلة اذ تمنحها النبات الغذاء وتمنحه بالمقابل البقاء والحفاظ على النوع من خلال اتمام عملية تلقيح الازهار (١) . تتعرض طوائف نحل العسل سنوياً الى الكثير من الهلاكات بسبب اصابتها بآفات النحل المختلفة ،مثل الافات الحيوانية او مسببات الامراض من الاحياء المجهرية مثل البكتريا، والفايروسات، والفطريات (٢) . يعد مرض تعفن الحضنة الاوربي واحدا من اهم هذه الامراض التي تقتل طوائف النحل مسببة خسائر فادحة اذ يصيب المسبب اليرقات الحديثة العمر(١– ٢ يوم) التي تموت بعد ان يصل عمرها (٤ – ٥ ايام) او قد تموت في دور ما قبل العذراء بعد غلق العين السداسية . يتسبب المرض عن البكتريا *Melissococus pluton* وهي المسبب الرئيس والبكتريا *Bacillus alvei* و *B. letrosporus* وهما المسببان المرافقان للمرض (٣) و (٤) . تنشط هذه المسببات في موسم تكاثر النحل وعند شحة مصادر الغذاء في الحقل اذ يكون المسبب متوطناً واحتمال اصابة الطوائف به واردة عند ملائمة الظروف البيئيه وقلة مصادر الغذاء وانخفاض الكثافة النحليه في الطائفه يصاحبها الادارة غير الجيدة للنحال . (٥) . من اعراض الاصابة موت اليرقات وتغير لونها ووجود ثقوب في وسط العين السداسية واخيراً جفاف اليرقة وظهورها بشكل قشور لاتلتصق بالعين السداسية فضلا عن ان اليرقات المريضة يصدر عنها رائحة كريهة تشبة رائحة الخميرة (٦) . سجل اول ظهور للمرض في العراق عام ١٩٨٤ في مناحل المنطقة الشمالية (نينوى، اربيل و دهوك) (٧) وان الاصابة به قد تصل الى ٨٤,٤ % (٨) . ان تغذية طوائف نحل العسل الضعيفة وتجاوز شحة الغذاء بالتغذية الصناعية على بدائل ومكملات العسل وحبوب اللقاح واحده من الطراق الفعالة للوقاية من الاصابة بالمرض الذي يعالج عند ظهوره باستعمال المضادات الحيوية، مثل Terramycine و Oxytetracyclin على الرغم من المشاكل التي تسببها هذه المضادات عن طريق انتقالها عبر السلاسل الغذائية الى المستهلك (٩) و (١٠) . كما استعملت طريقة الطرد الصناعي للتقليل من خطر المرض وفتح المجال امام النحل لأستعادة نشاطه (١١) و(١٢) . وفي السنوات الاخيرة استعملت المستخلصات النباتية لمقاومة المسبب المرضي واثبتت نجاحها في الحد من انتشاره فضلا عن كونها امينية بيئياً وغير مضرة بالصحة العامة (٨) الذي استعمل مستخلص نبات الزعتر في مكافحة مسببات المرض واعطى نتائج مشجعة واستعملت (١٣) زيت القرفة بنجاح لمقاومة مسبب مرض تعفن الحضنة الامريكي واثبت كفاية عالية في الحد من نمو المسبب الممرض . ونظراً لانتشار المرض في العراق وقلة الدراسات عن كيفية مقاومته بطراق علمية حديثة بدلاً من الطراق التقليدية الشائعة الاستعمال ولاعطاء فرصا لمقاومة مسببات المرض ببعض المواد المنتجة طبيعيا من النحل فقد اقترح هذا البحث الذي يهدف الى دراسة الفعالية الحيوية لسم النحل في المسببات البكتيرية المسببة له .

المواد وطرائق العمل

نفذ البحث في مختبر المقاومة الاحيائية في الكلية التقنية المسيب عام ٢٠٠٥ / محافظة بابل.

أولاً : عزل وتشخيص وتهيئة المستعمرات البكتيرية

جمعت اطارات مصابة بالمرض من مناحل مختلفة واعتمادا على الاعراض المظهرية للأصابة . اخرجت عدة يرقات مصابة 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 بوساطة الشراج

الناقل ولقحت بها الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي السائل (Y SGS – Broth) لعزل البكتريا *M.pluton* والانابيب الحاوية على الوسط الزراعي Nutrient Broth والخاص بتنمية أنواع البكتريا *Bacillus* والمحضرة سابقا وبمعدل ثلاث مكررات لكل منهما و حضنت الانابيب في الحاضنة وحسب الظروف الملائمة لنمو كل بكتريا وعلى درجة حراره ٣٥ م مدة (٣-٤ ايام) . (١٤) وبعد اخراج الانابيب المزروعة من الحاضنة التي ظهرت فيها العكارة بالنسبة لانواع البكتريا *Bacillus sp.* والانابيب التي لم تظهر فيها العكارة والخاصه بالبكتريا *M.pluton* . اخذت قطرة من المعلق البكتيري وزرعت في الطبق الحاوي على الوسط الصلب Nutrient Agar وبطريقة التخطيط وحضنت على درجة حرارة ٣٥ م مدة ١- ٢ يوم وبعد نمو البكتريا اخذت مسحة من المستعمرة ونشرت على شريحة زجاجية بعد اضافة قطرة من الماء المقطر والمعقم وتركت لتجف في الهواء ثم ثبتت بوساطة اللهب وبصبغة كرام وفحصت تحت المجهر لتحديد المستعمرات التي سيتم تنقيتها وبعد تحديدها اخذت من كل مستعمرة مسحة زرعت في طبق يحتوي على وسط صلب وبوساطة التخطيط ايضا وحضنت الاطباق هوائيا بالنسبة الى أنواع جنس *Bacillus* ولاهوائيا بالنسبة الى البكتريا *M. pluton* بعد ذلك فحصت العزلات مظهريا وفسلجيا وكيموحيويا لتأكيد نقاوتها ثم اعيدت العملية لأجل الحصول على عزلات نقية (١٥) حفظت العزلات بعد ذلك في الثلاجة على درجة حرارة ٣٥ْ م لحين الاستعمال مع تجديدها شهرياً وشخصت العزلات البكتيرية من خلال تحديد الصفات المورفولوجية والفسيولوجية والكيموحيوية حسب (١٦)

ثانياً : جمع وتحضير مستخلصات سم النحل

يتم تكوين وافراز سم النحل في شغالة النحل من زوج من غدد السم المتحورة عن الغدد الزائدة ويتم تخزينه في كيس السم الذي يفرغ محتوياته عند الحاجة في قاعدة الة اللسع، وان احدى الغدتين هي الغدة الحامضية التي تفرز حامض الهستامين والثانية قاعدة كيمياوية (٧) و (١٨) . تم

استخلاص السم بطرائق عديدة منها وضع الشغالات بوعاء زجاجي نظيف مغطى بورقة ترشيح مبللة بالايثر فتخدر النحل وسال السم على جدران الاناء وقاعه فجمع ثم جفف. او قد تم مسك الشغالة بملقط من الصدر اوالاجنحه فعند محاولتها اللسع ظهرت قطرة من السم على طرف الة اللسع التي امكن استقبالها على شريحه زجاجية او غمس الة اللسع في انبوبة اختبار بها ماء مقطر. كما استخدم وعاء زجاجي ذي فوهة واسعة شد عليها غشاء رقيق من جلد حيواني وارغمت الشغالة على لدغ الغشاء فتنفصل الة اللسع ويتسرب السم منها تدريجيا الى الماء فيجمع ويستخرج منه السم (١١) . وضع السم في حاويات نظيفة ومعقمة وخزن في الثلاجة لحين الاستعمال وعمل المستخلصات الاتية:-

١. المستخلص المائي لسم النحل

اخذ ٠,٧٢ غم من سم النحل واذيب في ٧,٢ مل من الماء المقطر والمعقم ورج بوساطة جهاز الرج المغناطيسي مدة ١٥ دقيقه وبعد الانتهاء من عملية الاذابة رشح المحلول بوساطة قطعة نظيفة ومن ثم رشح المحلول بوساطة ورقة الترشيح نوع (Whatman No. 1) ثم اجريت عملية استخلاص المحلول وتجفيفه بوساطة جهاز المبخر الدوار تحت ضغط مخلخل ودرجة حرارة ٤٥ م ثم وزن المستخلص ووضع في حاويات نظيفة ومعقمة في مكان دافيء ومظلم لحين الاستعمال .

٢. المستخلص الكحولي لسم النحل

استخدمت الخطوات نفسها في الفقرة (١) اعلاه عدا استعمال ٧,٢ مل من الكحول الاثيلي لأذابة سم النحل

٣ . المستخلص الهكساني لسم النحل

استخدمت الخطوات نفسها في الفقرة (١) اعلاه عدا استعمال ٧,٢ ملم من الهكسان مذيبا لسم النحل .

ثالثا :- تحضير تراكيز مختلفه من المستخلص (المائي ، الكحولي و الهكساني) لسم النحل

لتحضير التراكيز المستعملة في الدراسه اخذ ٠,٢٥ غم من سم النحل واذيب في ١,٢ مل من الماء المقطر والمعقم او المذيب للحصول على مستخلص قياسي بتركيز ٤٠ % وبعدها حضرت التراكيز (١، ٥، ١٠، ٢٠ و ٤٠ %) اللازمة للاختبار اما معاملة المقارنه فقد استعمل فيها المذيب الذي استعمل في الاستخلاص فقط . (١٨) .

رابعا :- مقارنة تأثير مستخلص سم النحل مع تأثير المضاد الحيوي Oxytetracyclin مختبريا

اجري الاختبار لمقارنة التاثير التثبيطي لمستخلص سم النحل من جهة و المضاد الحيوي Oxytetracyclin من جهة اخرى في مسببات مرض تعفن الحضنة الاوربي وبطريقة تحميـــل الأقراص الورقية التي حملت بالتراكيز (١ ، ٥ ، ١٠ ، ٢٠ و ٤٠ %) مـن المسـتخلص الكحـولي لسـم النحـل واسـتعملت اقـراص جـاهزة مـن المضـاد الحيـوي Oxytetracyclin محمله بـ (٣٠ ميكروغرام / مل) لغرض المقارنة في تثبيط المسببات البكتيرية للمرض واضيف ٠,١ مل من المعلقات البكتيرية من كل عزلة الى الوسط الغذائي الخاص بكل نوع من الانواع البكتيرية ونشرت بالناشر الزجاجي وعملت ثلاث مكررات لكل تركيز مع قرص Oxytetracyclin للمقارنه ثم حضنت الاطباق هوائيا ولاهوائيا وحسب نوع العزلة وتم حساب قطر منع النمو حول القرص بوساطة المسطرة . (١٩).

التحليل الاحصائي

استعمل التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.) في تصميم التجارب وجرى تحليل التباين للعوامل الداخلة في التجربة بأستعمال اختبار الفرق المعنوي الاصغر(L.S.D.) . تحت مستوى معنوية ٠,٠٥ %
(٢٠) .

النتائج والمناقشة

أولا :- تاثير مستخلصات سم النحل في الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي

١- البكتريا *M. pluton*

دلت نتائج جدول(١) فعالية مستخلصات سم النحل بشكل عام في التاثير في نمو البكتريا *M. pluton* متناوبة في التاثير تبعا لنوع المذيب وطريقة الانتشار المستخدمة . فقد اثرت طريقة الحفر معنويا في فعالية جميع المستخلصات من خلال اتساع مديات مناطق التثبيط التي كانت ٧,٨٦ ، ٨,١٥ ، ٧,٧١ ملم مقارنة مع المعدلات في طريقة الاقراص الورقية التي بلغت ٧,٢٦ ، ٨,١٥ و ٧,٥٣ ملم لكل من المستخلص المائي والكحولي والهكساني على التوالي . كما اظهرت طريقة الحفر تفوقا معنويا في المعدل العام لمديات التثبيط الذي بلغ ٧,٩٠ ملم مقارنة بطريقة الاقراص الورقية التي بلغ المعدل العام لها ٧,٦١ ملم .

واظهرت النتائج تفوق المستخلص الكحولي في التاثير في منع النمو البكتيري وبمعدل قطر بلغ ٨,١٥ ملم ولكلا الطريقتين، في حين اعطى المستخلص المائي اقل معدل بلغ ٧,٢٦ ملم في طريقة الاقراص الورقية . واظهرت زيادة تراكيز المستخلصات كافة تاثيرا واضحا في زيادة معدلات اقطار التثبيط البكتيري ولكلا الطريقتين، اذ اعطى التركيز ٥ % اقل معدل للتثبيط البكتيري بلغ ٧,٧٦ ملم في طريقة الحفر، بينما اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل للتثبيط البكتيري بلغ ١٠,٠٦ ملم ولطريقة الحفرايضا في حين لم يعط التركيز ١ % اي تاثير في منع النمو البكتيري مقارنة مع معاملة السيطرة ٦,٠٠ ملم ولكلا الطريقتين ايضا .

واوضحت نتائج التداخل بين التراكيز والمستخلصات ان المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠ % هو الاكثر فعالية في اختبار منع النمو البكتيري بمعدل قطر ١٠,٠٠ ملم في طريقة الاقراص الورقية وهو الاكثر فعالية ايضا في طريقة الحفر اذ اعطى معدل قطر منع النمو البكتيري ١٠,٦٠ ملم . اما بالنسبة الى التداخل بين الطريقة والتراكيز والمستخلصات فكان المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠ % هو الافضل من
بينها وبطريقة الحفر بقطر بلغ ١٠,٦٠ ملم . من واقع البيانات يمكن تفسير فعالية سم النحل في التثبيط البكتيري الى الخواص التي يتميز بها،اذ يحتوي على مركبات تشكل نسبة عالية التي غالبا ماتعزى الى وجود فوسفات المنغنيز الموجودة بنسبة ٠,٤ % من وزنه الصافي والى الكبريت والكالسيوم والهستامين وكميات من البروتين والزيوت الطيارةحسب ماشار اليه (٢١) .

٢- البكتريا *B. alvei*

بين جدول (١) كفاية طريقة الانتشار بوساطة الحفر في التاثير في منع النمو البكتيري لهذه البكتريا مما انعكس ذلك على زيادة مديات التاثير لكل من المستخلصات والتراكيز في التثبيط البكتيري . فقد تفوقت طريقة الحفر معنويا المستخلصات كافة من خلال معدلات منع النمو البكتيري التي بلغت ٨,١٥ ، ٩,٧٦ ، ٨،٩٥ ملم مقارنة مع المعدلات في طريقة الاقراص الورقية التي كانت ٧,٧٠ ، ٨,٣١ و ٧,٨١ ملم ولكل من المستخلص المائي والكحولي والهكساني وللطريقتين على التوالي . واظهرت طريقة الحفر تأثيرا عاليا من خلال معدل منع النمو البكتيري الذي بلغ لها ٨,٨٥ ملم وبفرق معنوي عن طريقة الاقراص الورقية التي كان معدلها العام ٧,٩٤ ملم وبين الجدول ايضا ان للمستخلص الكحولي تأثيرا معنويا في التثبيط البكتيري ولكلا الطريقتين ،اذ اعطى معدلات ٨,٣١ و٩,٧٦ ملم على التوالي في حين اختلفت المستخلصات الاخرى في تأثيرها فقد اعطى المستخلص المائي اقل تأثيرا وبمعدل قطر بلغ ٧,٧٠ و ٨,١٥ ملم على التوالي ولكلا الطريقتين ايضا .

اما بالنسبه الى زيادة تراكيزالمستخلصات فقد اظهرت التراكيز العالية تأثيرا واضحا في منع النمو البكتيري فقد كان التأثير عند التركيز ١٠% قليلا الذي اعطى اقل معدل لقطر منع النمو البكتيري بلغ ٩,٧٣ ملم ، بينما اعطى التركيز ٤٠% اعلى معدل لمنع النمو البكتيري ١٣,٣٠ ملم ، في حين لم يعط كل من التركيزين ١% و٥% اي تأثير في منع النمو البكتيري اذ تطابقت معدلاتهما مع معاملة السيطرة ٦,٠٠ ملم ولكلا الطريقتين . وفي معاملة التداخل بين التركيز والمستخلصات كان المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠% ولكل من طريقة الاقراص الورقية والحفر متفوقا معنويا في التأثير في منع النمو البكتيري من خلال معدلات التثبيط التي بلغت ١١,٠٠ و ١٥,٦٠ ملم على التوالي كما اظهر التداخل بين الطريقة والتراكيز والمستخلصات الى تفوق المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠% وبطريقة الحفر وبقطر ١٥,٦٠
ملم . فسرت النتائج الى حساسية البكتريا *B. alvei* لمركبات سم النحل التثبيطية ولاسيما في التراكيز العالية وسهولة انتشار هذه المركبات تبعا لطريقة الانتشار المستعملة في الاختبار .

٣ . البكتريا *B. letrosporus*

من خلال بيانات جدول (١) اتضح بأن مستخلصات سم النحل ساهمت وبشكل فعال في تثبيط نمو البكتريا *B. letrosporus* وقد اختلف تأثير المستخلصات تبعاً لطريقة الاختبار والمذيب المستخدم في الاستخلاص وزيادة التركيز ،اذ كان لطريقة الحفر تاثيرا واضحا في منع النمو البكتيري ولكل من المستخلص المائي والكحولي والهكساني ، اذ اعطت معدلات منع النمو البكتيري لها ٦,٤٣ ، ١٠,٥٨ ، ٧,٥٨ ملم على التوالي وبفروقات معنوية مقارنة مع طريقة الاقراص الورقية والمستخلصات نفسها اذ بلغت معدلاتها ٦,٢٦ ، ٧,١٥ ، ٦,٥٥ ملم على التوالي . كما بلغ المعدل العام لتثبيط النمو البكتيري بطريقة الحفر لجميع المستخلصات ولجميع التراكيز المستخدمة ٨,١٩ ملم الذي تفوق معنويا على طريقة الاقراص الورقية اذ كان المعدل العام ٦,٦٥ ملم . اما بالنسبة الى المذيبات المستعمله في

الاستخلاص فقد كان الكحول الاثيلي هو الافضل في فصل مركبات سم النحل الفعالة في التثبيط البكتيري فقد تفوق المستخلص الكحولي معنويا في معدل قطر منطقة تثبيط النمو البكتيري اذ كان ٧,١٥ ، ١٠,٥٨ ملم ولكل من طريقة الاقراص الورقية والحفر على التوالي . كما اظهرت زيادة تراكيز جميع المستخلصات المائية والكحولية والهكسانية الى زيادة معدلات تثبيط النمو البكتيري ولكلا الطريقتين ، اذ بدأ التاثير بالتركيز ٥ % و باقل معدل ٧,٢، في حين اعطى التركيز ٤٠ % اعلى معدل لمنع النمو البكتيري بلغ ١٠,٩٦ ملم بينما لم يعط التركيز ١ % اي تاثير في منع النمو البكتيري ولكلا الطريقتين ايضا اذ تساوت معدلاته مع معاملة المقارنة ٦,٠٠ ملم . وفي معاملة التداخل بين التراكيز والمستخلصات كان المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % وبطريقة الاقراص الورقية هو الاكثر فعالية في التثبيط البكتيري بقطر ٩,٠٠ ملم اما في طريقة الحفر كان المستخلص الكحولي هو الاكثر فعالية ايضا ، اذ كان قطر منطقة التثبيط البكتيري بقطر ١٥,٦٠ ملم واظهر التداخل بين الطريقة والتراكيز والمستخلصات تفوق المستخلص الكحولي وبتركيز ٤٠ % وفي جميع معاملات التداخل وبقطر تثبيطي ١٥,٦ ملم وبطريقة الحفر . ومن خلال البيانات في جدول (٢) يمكننا تفسير كفاية طريقة الانتشار بوساطة الحفر الى زيادة المساحة السطحية للحفرة بحيث تساهم في زيادة انتشار المستخلصات الحاوية على مركبات سم النحل اذا ماقورنت بطريقة الاقراص الورقية كما ان لزيادة التركيز اثرا في المركبات الفعالة ومن ثم كفايتها في التثبيط مقارنة بالتراكيز القليلة .

ثانيا :- **المقارنة بين تراكيز مختلفة من سم النحل مع المضاد الحيوي Oxytetracycline في التأثير في تثبيط نمو الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي**

اوضح جدول (٢) ان لسم النحل تأثيرا في نمو الانواع البكتيرية الثلاثة المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي *M. pluton* و *B. alvei* و *B. letrosporus* مقارنة مع المضاد الحيوي Oxytetracycline ولكن بدرجات متفاوتة حسب نوع البكتريا فقد كان لسم النحل تأثيرا معنويا في البكتريا *M. pluton* وبقطر منع للنمو البكتيري بلغ ٨,١٥ ملم مقارنة مع المضاد الحيوي

Oxytetracycline اذ اعطى معدل ٦,٠٠ ملم الذي كان اكثر تأثيرا في النوعين الاخرين من البكتريا *B. alvei* و *B. letrosporus* والذي كان معدل تثبيطه لهما ١٥,٣٠ و ٢١,٦٠ ملم على التوالي، بينما كان معدل تثبيط سم النحل لهذين النوعين من البكتري ٩,٧٦ و١٠,٥٨ ملم على التوالي واظهر التركيز ٤٠%من سم النحل فعالية عالية في تثبيط نمو الانواع السابقة من البكتريا جدول (٢)

المصادر

١- البنبي ، محمد علي (١٩٨٩) نحل العسل ومنتجاته . دار المعارف ج. م. ع. ، ٣٧٨ صفحه .

٢- الزبيدي ، مجيد محسن . (١٩٩١) . آفات نحل العسل . مطبعة جامعة الموصل ، (١٦٨) صفحة.

3-Pinnock , D. E. and Featherstone ,N. E. (1984) immuno absorbent assay. J. Api.Cultural Research 23 : 168 – 170 .

4- Bailey , L. and Ball B. V. (1991) Bacillus larvae J. Gen. Microbiol. 20 : 711 – 717 .

5- Shimanuki , H. ; Knox D.A. and Herbert , F. W. (1970) . . J. Eco . Entomol. 63. 1062 – 1063 .

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

٧- 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) . ٣ (٢): 139- ١٥٠.

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

9- Warhurat , P. and Goebel, R . (1995) . The beebook information series Q . 194066 Department of primary industries Queens land.

10- ALadin , A .S. Wan. ; Yousif , Z. and Abo, M.B. Ch. (1993) . Guide to chemotherapy laxis in bacterial infections non communicable Disease . Eastern Meditierranean Regional Office , Alexanderia , Egypt .

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

12- Werner , V.D.O. and Jost, H. Dustmann (1997) . Amer. Bee Jon. Mo. 8: 603 – 605

١٣- 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 .

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

15- Shimanuki , H. and Cantwell, G.E. (1987). Bee USDA .Ars – NE 87 : 650 – 760

16- Bergys manual of determinative bacteriology (1994) 9th Williams&Wilkins U.S.A.

١٧- الجوراني ، رضا صكب ; غفوري ياس ; عز الدين حسين وعبد العزيز ابراهيم ياس .
(١٩٩٠) . الحشرات النافعة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – هيئة التعليم التقني – مطبعة دار الحكمة – بغداد . ٤٨٣ صفحة .

١٨- 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 .

19- 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.

٢٠- الراوي ، خاشع محمد و خلف الله ، عبد العزيز . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مطابع مؤسسة دار الكتب للطباعه والنشر . جامعة الموصل ، ٤٨٨ صفحه . العراق.

٢١- الباشا ، محمد خليل . (١٩٨٣) . الموسوعة في علم النحل – الطبعة الاولى – الدار العربية للموسوعات بيروت – لبنان (٤٤٩) . صفحة .

جدول (٢) المقارنة بين تراكيز مختلفة من سم النحل مع المضاد الحيوي Oxytetracyclin في التاثير في تثبيط نمو الانواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن الحضنة الاوربي .

التراكيز %	الانـواع البكتيرية					
	M. pluton		B. alvei		B. letrosporus	
	سم النحل mcg	O.T.C mcg ٣٠	سم النحل mcg	O.T.C. ٣٠ mcg	سم النحل mcg	O.T.C. 30 mcg
٠	٦,٠٠		٦,٠٠		٦,٠٠	
١	٦,٠٠		٦,٠٠		٦,٠٠	
٥	٨,٠٠		٦,٠٠		٩,٣٠	٢١,٦٠
١٠	٩,٠٠	٦,٠٠	١٠,٠٠	١٥,٣٠	١٢,٣٠	
٢٠	٩,٣٠		١٥,٠٠		١٤,٣٠	
٤٠	١٠,٦٠		١٥,٦٠		١٨٥,٦٠	
المعدل	٨,١٥	٦,٠٠	٩,٧٦	١٥,٣٠	١٠,٥٨	٢١,٦٠

L.S.D. للتراكيز ٠,٥٤٣

L.S.D. المقارنة ٠,٥٤٣

L.S.D. للتداخل بين التراكيز ومعاملات المقارنة ٢,١٠٦

جدول (1) تاثير المستخلص المائي والكحولي والهكساني لسم النحل في تثبيط نمو البكتريا *luton*

التركيز %	معدلات اقطار تثبيط النمو لبكتريا *M.pluton* (ملم)								معدلات اقطار تثبيط النمو لبكتريا *B. alvei* (ملم)							
	طر يقة الاقراص الورقية				طريقة الحفر				طر يقة الاقراص الورقية				طريقة الحفر			
	م* المائي	م* الكحولي	م* الهكساني	المعدل	م* المائي	م* الكحولي	م* الهكساني	المعدل	م* المائي	م* الكحولي	م* الهكساني	المعدل	م* المائي	م* الكحول ي	م* الهكساني	
0	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	
1	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	
5	7.00	8.60	7.30	7.63	8.00	8.00	7.00	7.76	6.00	6.60	6.00	6.20	6.00	6.00	6.00	
10	7.60	9.00	8.00	8.20	8.60	9.00	8.00	8.53	8.60	10.00	8.60	9.06	9.60	10.0	9.60	
20	8.00	9.30	8.30	8.53	9.00	9.30	9.00	9.10	9.60	10.30	10.00	9.96	10.0	15.0	11.30	
40	9.00	10.00	9.00	9.33	9.60	10.60	10.00	10.06	10.00	11.00	10.30	10.43	11.3	15.6	13.00	
المعدل	7.26	8.15	7.53	7.61	7.86	8.15	7.71	7.90	7.7	8.31	7.81	17.94	8.15	9.76	8.95	

- قيم النتائج تمثل معدل ثلاث مكررات (اطباق)
- قرص السيطرة بقطر (6) ملم (استخدم بعد التعقيم بالموصودة)
- LSD للمستخلصات 0.142
- LSD للتراكيز 0.201
- LSD للتداخل بين التراكيز والمستخلصات 0.348
- LSD للطريقة 0.116
- LSD للتداخل بين الطريقة والمستخلصات 0.248
- LSD للتداخل بين الطريقة والتراكيز 0.201
- LSD للتداخل بين الطريقة والتراكيز والمستخلصات 0.492

- قيم النتائج تمثل معدل ثلاث مكررات (اطباق)
- قرص السيطرة بقطر (6) ملم (استخدام التعقيم بالم
- LSD للمستخلصات
- LSD للتراكيز
- LSD للتداخل بين التراكيز والمستخلصات
- للطريقة
- LSD للتداخل بين الطريقة والمستخلصات
- LSD للتداخل بين الطريقة والتراكيز
- LSD للتداخل بين الطريقة والتراكيز والمستخلصات