معالجة مرض تعفن الحضنة الأمريكي على نحل العسل بأستعمال المستخلص الكحولي لنبات الزعتر ومادة الثايمول المستخلصة منه

رضا صكب الجوراني
محمد عبد الجليل الكناني
قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة بغداد
علاء شريف عباس
كلية المأمون الجامعة / بغداد

استلم البحث في : 1 تشرين الأول 2001 ، قبل البحث في : 7 آذار 2002

الخلاصة

أختبر تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر *Thymbra spicata* L في نمو بكتريا *Paenibacillus larvae larvae* المسببة لمرض تعفن الحضنة الأمريكي American Foul Brood(AFB) على نحل العسل وبتراكيز مختلفة وبطريقتي التحميل على الأقراص الورقية والخلط مع الوسط الزرعي، ووجد أن التركيز 3000 مايكروغرام / قرص و 3000 مايكروغرام / مل هي المثبطة لنمو البكتريا ولكلا الطريقتين على التتابع . حددت المادة الفعالة في المستخلص الخام بطريقة كروماتوكرافي الصفائح الرقيقة (TLC) ووجد أنها مادة الثايمول(Thymol) وأختبر تأثيرها في البكتريا بطريقة التحميل على الأقراص الورقية ووجد أن التركيز 1000 مايكروغرام / قرص هو الفعال في قتل البكتريا . أختبر تأثير المستخلص الكحولي ومادة الثايمول المعزولة منه في خلايا مصابة بمرض تعفن الحضنة الأمريكي عند طريق خلطه مع المحلول السكري وبتركيز 3000، مايكروغرام / مل ورش على الأطارات المصابة داخل خلايا نحل العسل وأعطت نتائجا جيدة إذ قضي على المرض بعد مرور 21 يوماً من بدء المعالجة بمادة الثايمول في حين أختفى المرض بعد مرور 27 يوماً من بدء المعالجة بالمستخلص الكحولي لنبات الزعتر .

الكلمات المفتاحية : مرض تعفن الحضنة الأمريكي ، الثايمول ، الزعتر.

المقدمة

يعد مرض تعفن الحضنة الأمريكي من أخطر الأمراض التي تصيب حضنة نحل العسل ويتسبب في ضعف الطوائف ومن ثم موتها . المسبب لهذا المرض بكتريا Paenibacillus larvae larvae، وهي بكتريا عصوية موجبة لصبغة كرام مكونة السبورات . تمكث سبورات البكتريا في طوائف نحل العسل وتحافظ على حيويتها مده طويلة قد تصل إلى 50 عاماً عند عدم ملائمة الظروف للنمو [1] . يدخل المسبب المرضي إلى جسم اليرقة عن طريق الغذاء المقدم لها من الشغالات ، وتكون اليرقات التي بعمر 1-2 يوم حساسة للإصابة . تتكاثر الخلايا البكترية داخل جسم اليرقة وتنتشر في جسمها وتؤدي إلى موتها وتحلل أنسجتها وتحويلها إلى قوام مائي لزج [2] . هذه البكتريا سريعة الأنتشار داخل الخلية وبين الخلايا [3] . إن الأجراءات المتبعة لمعالجة هذا المرض الخطير في معظم دول العالم هو حرق الخلايا المصابة بما فيها من حشرات وأجزاء خشبية ولهذا فأن الخسارة الناتجة من هذا المرض تكون كبيرة حتى في حالة المعالجة [2] ، كذلك تستعمل المضادات الحيوية ولاسيما الأوكسي تتراسايكلين (Oxytetracycline) لمعالجة المرض إلا أن هذه المضادات لا تقضي على السبورات ولكنها تمنع نمو الخلايا الخضرية للبكتريا [4] . يهدف البحث إلى إيجاد طريقة فعالة في معالجة هذا المرض بالاستفادة من النباتات الطبيعية التي تنمو محلياً لتكون بديلاً من الأجراءات المتبعة .

أختير نبات الزعتر Thmbra spicata لأحتوائه على مواد فينولية وقلويدية لها تأثير في بعض الكائنات المجهرية،مثل الفطريات الموجودة في التربة والممرضة للنبات مثل فطر Fusarium monilifrom، و Rhizoctonia soloni، وبعض الأنواع البكتيرية، مثل بكتريا العنقوديات Staphyllococci، وبكتريا Escherichia coli [5]، وبكتريا Melissococcus pluton المسبب لمرض تعفن الحضنة الأوربي على نحل العسل [6] .

مواد وطرائق العمل

الأستخلاص

جمعت نباتات الزعتر من منطقة زاويته / محافظة دهوك ، و نقلت إلى المختبر وفرشت على فرشة من النايلون تحت درجة حرارة الغرفة وقلبت باستمرار منعاً للتعفن حتى الجفاف ، بعدها قطعت وسحقت بوساطة طاحونة كهربائية وغربلت بغرابيل سعة 50 مش (50 mesh) ، أستعملت طريقة Gul وآخرون [7] لتحضير المستخلص الكحولي إذ وزن 200 غم من المسحوق النباتي ووضع في دورق زجاجي سعته 1000 مل ثم أضيف 400 مل من الكحول الأثيلي تركيز 95% ، رج الدورق بوساطة رجاج كهربائي لمدة 24 ساعة ثم رشح المستخلص من خلال ورق ترشيح (Watman No. 2) بأستعمال قمع بوخنر وركز الراشح بوساطة المبخر الفراغي الدوار (Rotary evaporator with vacuum). حفظ المستخلص الخام في قناني زجاجية محكمة الغلق وتحت التجميد لحين الأستعمال.

العزلات البكتيرية

أستعملت عزلات بكتيرية محلية لبكتريا *P. larvae larvae* تم الحصول عليها من منحل الزوراء ممحافظة بغداد وعزلت وشخصت في قسم وقاية النبات –كلية الزراعة – جامعة بغداد.

أختبار تأثير المستخلص الكحولي الخام على البكتريا مختبرياً

أختبرت فعالية المستخلص الكحولي الخام لنبات الزعتر على البكتريا مختبرياً بأستعمال طريقة التحميل على الأقراص الورقية ، أذ حملت هذه الأقراص بالتراكيز 500 ، 1000 ، 1250 ، 3000 مايكروغرام / قرص . زرعت البكتريا (وهي على شكل معلق) أولاً على الوسط Nutrient broth ثم على الوسط الزرعي المناسب لنموها والمسمى Brain Heart Infusion Thiamin (BHIT) بطريقة النشر . وضعت الأقراص الورقية المحملة بالتراكيز أعلاه على الأطباق (3قرص في كل طبق) وبواقع 2 طبق لكل تركيز . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 48 ساعة ثم قيست أقطار مناطق التثبيط حول الأقراص (Inhibition zone) لتحديد التركيز الفعال . كذلك أختبر تأثير المستخلص بطريقة الخلط مع الوسط الزرعي ، إذ أستعملت طريقة التخفيف بالأطباق (Plate dilution technique) حيث حضرت التراكيز 250 ، 500 ، 1000 ، 1250 و3000 مايكروغرام / مل وخلط كل تركيز على حده مع الوسط الزرعي الصلب بعد تعقيمه، وزرعت البكتريا في الأطباق بطريقة النشر بواقع 2 طبق لكل تركيزفضلا"عن معاملة المقارنة . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 48 ساعة وحسبت النسبة المئوية للنمو مقارنة مع أطباق السيطرة وحدد التركيز الفعال على أساس عدم ظهور أي مستعمرة وعدم حصول نمو البكتريا [4] .

تحديد المادة الفعالة المؤثرة في نمو البكتريا

حددت المادة الفعالة بالأعتماد على نسبة وجودها في المستخلص الكحولي ، إذ أشارت البحوث السابقة إلى وجود مادة الثايمول وهي مادة فينولية وتوجد بنسبة تصل إلى 55% مع الزيوت العطرية [6] . أستعملت طريقة Abo – Basha et al. (1995) [8] لتشخيص وتنقية الثايمول في المستخلص الكحولي الخام ، إذ أستعملت رقائق بلاستيكية نوع (Emerck, F254) مطلية بطبقة من أوكسيد الألمنيوم مع مادة مضيئة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية . وضع مستخلص الزعتر ومادة الثايمول القياسية (تم الحصول عليها من الهيئة العامة لوقاية المزروعات / وزارة الزراعة) على مسافة 2 سم من

الحافة السفلية للرقيقة ، وأستعمل محلول الفصل المكون من Isopropyl ether : Benzene وبنسبة1: 1. ترك محلول الفصل يرتفع إلى 17 سم ، ثم رفعت الرقائق وتركت لتجف في الهواء . فحصت تحت مصدر للأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 245 –300 نانومتير لتحديد البقع المفصولة ، حسبت قيم RF للمركبات المفصولة وقورنت بقيم RF للمركب القياسي .

أستخلاص الثايمول

أستخلص الثايمول من خلال البقع المفصولة على ألواح الطبقة الرقيقة (TLC) والتي أعطت قيم RF مقاربة لقيم RF للثايمول القياس ، جمع ما تم قشطه في أنبوبة أختبار وأضيف إليه كلوروفورم لغرض إذابته وفصله عن المسحوق ، رجت الأنبوبة برجاج كهربائي لمدة نصف ساعة ثم رسب المسحوق في قعر الأنبوبة بعملية الطرد المركزي . بخر الكلوروفورم (الحاوي على الثايمول) بوساطة جهاز المبخر الفراغي الدوار الحصول على الثايمول النقي .أختبر الثايمول المستخلص على العزلات البكتيرية مختبرياً بطريقة التحميل على الأقراص الورقية بالتراكيز 250 ، 500 ، 1000 ، 1250 مايكروغرام / قرص للتأكد من تأثيره على نمو البكتريا .

أختبار مستخلص الزعتر الخام ومادة الثايمول على خلايا النحل المصابة بالمرض

أجرى الأختبار على مجموعتين من الخلايا المصابة ، كل مجموعة مكونة من 3 خلايا ، مع خلية مصابة أخرى تركت بدون معاملة كخلية مقارنة ، رشت المجموعة الأولى بمحلول سكري تركيزه 2 سكر : 1 ماء مخلوط معه مستخلص الزعتر الخام بتركيز 3000 مايكروغرام / مل (وهو التركيز الذي أعطى فعالية في المختبر) .رشت كل خلية بـ 500 مل منه شمل الرش وجهي كل أطار وقاعدة الخلية والمتبقي رش على الحشرات العالقة الموجودة داخل الخلية وذلك لضمان وصول العلاج إلى جميع أفراد الطائفة . كررت العملية 3 مرات بين مرة وأخرى 5 أيام . في حين رشت المجموعة الثانية بنفس الطريقة بمحلول سكري حامل لمادة الثايمول المستخلصة بتركيز 1000 مايكروغرام/ مل . تركت خلية المقارنة بدون معالجة لمقارنة تأثير ذلك على الخلايا المعاملة من خلال حساب عدد الأنجات المربعة التي فيها الأصابة والمأخوذة عشوائياً بأستخدام الأطاري الزجاجي المقسم إلى أنجات مربعة (Frame count) . سجلت البيانات والملاحظات وإنخفاض نسب الإصابة كل ثلاثة أيام رافق ذلك أخذ عينات من اليرقات والعسل والأغطية الشمعية وزراعتها مختبرياً للكشف عن وجود المسبب المرضي .

النتائج والمناقشة

أختبار **فعالية مستخلص الزعتر الخام ومادة الثايمول القياسية على البكتريا مختبرياً**

أ – أختبار التحميل على الأقراص الورقية

أظهرت النتائج (جدول 1) أن المستخلص الخام لم يكن له تأثير تثبيطي معنوي بالتراكيز 500 و 1000مايكروغرام/ قرص على البكتريا ، إذ لم تظهر أية منطقة تثبيط حول الأقراص الحاملة لهذه التراكيز ، بينما ظهر التأثير في التركيزين 1250و 3000 مايكروغرام / قرص فقد كان قطر منطقة التثبيط 9 و 16 ملم على الترتيب.ظهر من خلال التحليل الأحصائي وجود فرق معنوي على مستوى 0.05 بين التركيزين 1250 و 3000 مايكروغرام / قرص ، ولذا يعد هذا التركيز هو الفعال ضد هذه البكتريا ، أما في أختبار الثايمول فلم يظهر تأثير بالتركيز 250 مايكروغرام / قرص وبدأ التأثير التثبيطي يظهر بالتركيز 500 مايكروغرام / قرص حيث كان قطر منطقة التثبيط 20 ملم ، وإزداد تأثير هذه المادة بأزدياد التركيز حيث كانت أقطار مناطق التثبيط للتركيزين 1000 و 1250 مايكروغرام / قرص 32 و 33 ملم على الترتيب.أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فروق معنوية على مستوى 0.05 بين التركيز 500 و1000 مايكروغرام / قرص وعدم وجود فروق معنوية بين التركيزين 1000 و 1250 مايكروغرام / قرص وأن التركيز 1000 مايكروغرام/ قرص هو التركيز الفعال ضد البكتريا .

ب – أختبار إضافة تراكيز مختلفة من المستخلص الخام إلى الوسط الزرعي

أظهرت النتائج (جدول 2) أن التركيز 250 مايكروغرام / مل ليس له تأثير تثبيطي حيث ظهر على سطح الطبق الحامل لهذا التركيز 2757 مستعمرة أي بنسبة نمو 50.1% مقارنة مع طبق المقارنة وهي نسبة عالية جداً مما يدل على عدم وجود أي تأثير تثبيطي لهذا التركيز على البكتريا . في حين كان عدد المستعمرات في التركيز 500 مايكروغرام / مل 921 مستعمرة وبنسبة مئوية للنمو 16.7% وهي أيضاً نسبة عالية إلا أنها أقل من التركيز الأول ومن هذا التركيز بدأ يظهر التأثير التثبيطي للمستخلص على النمو البكتيري . أما في التركيز 1000 مايكروغرام / مل فقد ظهرت 275 مستعمرة وبنسبة نمو 5% وفي التركيز 1250 مايكروغرام / مل ظهرت 113 مستعمرية وبنسبة نمو 2.05% . في حين لم تظهر أي مستعمرة بالتركيز 3000 مايكروغرام / مل ولجميع الأطباق الحاملة لهذا التركيز مما يدل على أن تركيز مستخلص الزعتر المثبط للبكتريا هو 3000 مايكروغرام / مل .

جـ - أختبار معالجة الخلايا المصابة بالمرض بمستخلص الزعتر الخام ومادة الثايمول

أظهرت النتائج(شكل 1) أن مادة الثايمول أعطت نتائج إيجابية وسريعة في القضاء على المرض ، حيث أنتهى المرض من الخلايا المصابة بعد مرور 21 يوم من بدأ المعالجة ، إذ أختفت الأعراض المرضية ولم يعزل المسبب المرضي في الفحص المختبري الأخير من العينات المأخوذة من هذه الخلايا ، في حين أختفى المرض من الخلايا بعد مرور 27 يوم عند

معاملتها بمستخلص التركيز الخام . ومن هذا يتضح أن للثايمول تأثير فعال وسريع في معالجة هذا المرض الخطير،، وأن أستعماله سيؤدي إلى التقليل من الخسائر الأقتصادية المتسببة عن أحراق الخلايا المصابة فضلاً" عن الأبتعاد عن أستعمال المضادات الحيوية التي لها تأثير سلبي على المستهلك عند تناوله لمنتجات النحل الحاوية على بقايا المضادات الحيوية المستعملة في المعالجة ، كما أنها طريقة غير فعالة في القضاء على هذا المرض بل أيقافه مؤقتا" [7] .

المصادر

1 – Ellis . J . D. and Munn . P . A .(2005) The World wide health status bees . Bee world 4. 88 – 101 .
2 – Evans . J . D .(2004) Transcription immune responses by honey bee lorvae during invasion by the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* .J. Invertebr Pathd . 85. 105 – 111 .
3 – Generch .E.; Forsgren .E.; pentikainen .J.; Ashiralieva .A.; Rauch .S.; Kilwinski .J.and Fries ,I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. Palvitaciens and *Peanibacillus larvae* subsp larvae as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation .Int.J. sys. Evol. Microbial . 56. 501 – 511 .
4 – Forsgren .E. ;Olofsson .T.C. ;Vasques .A. and Fries .I. 2009. Novel lactic acid bacteria inhibiting Paenibacillus larvae in honey bee larvae . Apidologic 41. 99 – 108 .
5 – Aladin .A.S.; Awan Yousif , Z. and Abou, M.B.ch. (1993) Quide to chemo theropy laxis in bacterial in fections Non – Communicable Disease. Eastern Mediterranean Regional office , Alexanderia . Egypt.
6 – الكناني ، محمد عبد الجليل (2000) دراسة مرض الحضنة الأوربي على نحل العسل في العراق ومكافحته بأستخدام المستخلصات النباتية . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .
7 – Gul, H.; Choudhry , M.l.; Farooq M.and Jan, R. (1988) Prelimirory studies on antimicrobio of common wood of pakiston and their extractive . Pakistan J. Forestry . 38 (3) : 167 – 173 .
8 – Abou – Basha , L.I.; Rashid , M.S. and Aboul – Enein, H.Y. (1995) The assay of Thymoquinone in black seed oil (Nigello Sativa L) and identification of dithymoquinone and Thymol .J. Liquid chromatography . 18 (1) : 105 – 115 .
9 – Clouse ,E.P.; Tyler , V.E. and Brady, L.P. (1970) The laboratory diagncosis of honey bee disease . Amer . bee .J. 129 : 128 – 138 .

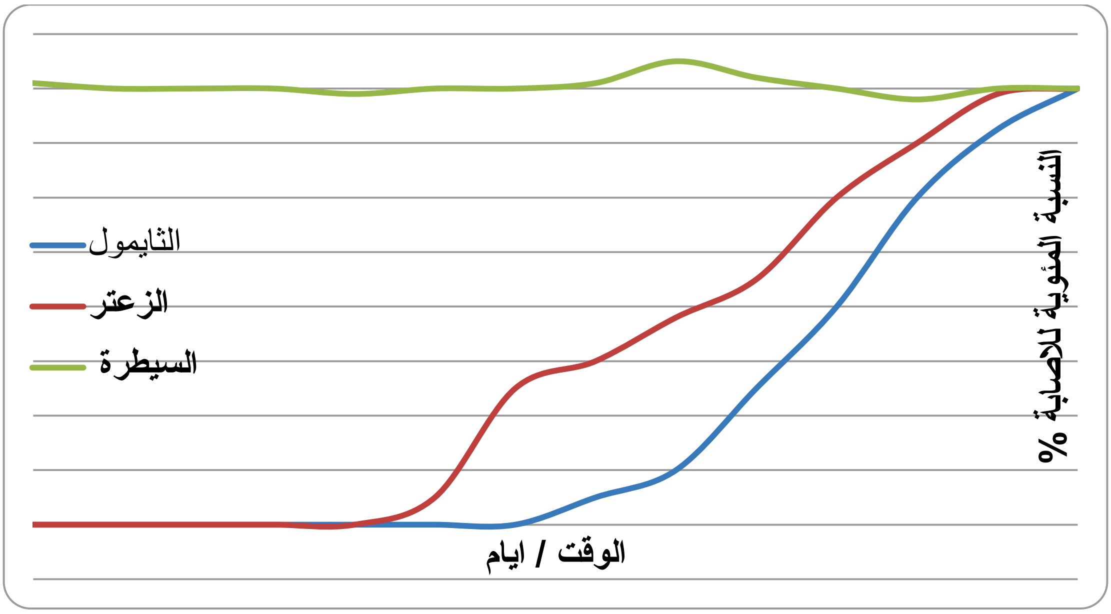
جدول (1) : تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الخام ومادة الثايمول في نمو البكتريا بطريقة التحميل على الأقراص الورقية

المادة	التركيز مايكروغرام / قرص				
	250	500	1000	1250	3000
المستخلص الخام	-	0	0	9	16
الثايمول	0	20	32	33	-

LSD 0.05 للمستخلص الخام 1.78. لمادة الثايمول 2.81

جدول (2) : تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الخام المضافة إلى الوسط الزرعي في نمو البكتريا

250 مايكروغرام/قرص		500 مايكروغرام/قرص		1000 مايكروغرام/قرص		1250 مايكروغرام/قرص		3000 مايكروغرام/قرص		Control
عدد المستعمرات	% للنمو	عدد المستعمرات	% للنمو	عدد المستعمرات	% للنمو	عدد المستعمرات	% للنمو	عدد المستعمرات	% للنمو	
2757	%50.1	921	%16.5	275	%65.0	113	%2.05	0	%0	5500



شكل (1) : تأثير المعالجة بأستعمال المستخلص الخام ومادة الثايمول على الخلاية المصابة بالمرض.

Control of American Foul Brood Disease (AFB) in Honey Bee Using Thyme Extracts and Thymol

Ridha S. AL – Jorany
Mohammed A.J. AL – Kinani
Department of plant protection/ Collage of Agriculture/University of Baghdad
Alaa S. Abbas
AL – Ma'mmon University Collage

Received in : 1 October 2001, Accepted in : 7 March 2002

Abstract

Ethanolic extracts of Thyme (*Thymbra spicata*) were tested for their inhibitory action on *Paenibacillus larvae* the causative agent of American foul brood with different concentration by using disc assay and mixed with culture media . Results showd that 3000mg / disc and 3000 mg / ml was the effective concentroation for the both methods .Thymol was isolated by using TLC technique . The effective concentration of thymol on growth of bacteria was 1000 mg / disc .

Thymol and crude extracts of thyme 3000 mg / ml were tested on infected hives by mixed with sugar solution . The symptoms of AFB disease was full disappearance within 21 , 27 days after treatment with thymol and thyme extracts respectively .

Key wordes : AFB , Thyme , Thymol , *Paenibacillus larvae*