مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (8) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (8) 2013

تأثير بعض الزيوت العطرية في نمو البكتريا *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae* المسببة لمرض الحضنة الأميركي على نحل العسل العالمي .*Apis mellifera* L.

أحمد معتز بالله محمود*
الدكتور محمود أبو غرة **
الدكتور علي خالد البراقي ***

(تاريخ الإيداع 24 / 6 / 2013. قبل للنشر في 8 / 10 / 2013)

□ ملخّص □

تمت دراسة تأثير الزيوت العطرية لكل من نبات القرفة السيلانية *Cinnamomum zeylanicum*، وقشور ثمار الليمون الحامض *Citrus limonum*، ونبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في نمو بكتريا *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae* المسببة لمرض الحضنة الأميركي على نحل العسل العالمي *Apis mellifera* L.، في مختبرات كلية الزراعة–جامعة دمشق وذلك خلال عامي 2012–2013، للمساهمة في إعداد برنامج مكافحة متكاملة لمرض الحضنة الأميركي. استخلصت الزيوت العطرية من النباتات المدروسة بطريقة التقطير بالبخار، واختبر تأثير تراكيز من الزيوت العطرية بين 3.90625 و 500 ميكرو غرام/مل في نمو البكتريا *P. larvae* بطريقة الأقراص على بيئة مغذية صلبة في أطباق بتري. بينت النتائج أن بعض تراكيز الزيوت العطرية المستخدمة تثبّط نمو البكتريا *P. larvae*، حُدد أقل تركيز مثبّط لبكتريا *P. larvae* من الزيت العطري للقرفة السيلانية والليمون الحامض وإكليل الجبل على التوالي وهي: 31.25 ميكرو غرام/مل، 62.5 ميكرو غرام/مل، 125 ميكرو غرام/مل، من كل زيت عطري.

الكلمات المفتاحية: *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae*، نحل العسل العالمي، مرض الحضنة الأميركي، الزيوت العطرية؛ القرفة، الليمون، إكليل الجبل.

*طالب دراسات عليا (ماجستير)– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة دمشق– سورية.
** أستاذ مساعد– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة دمشق– سورية.
*** أستاذ مساعد– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة دمشق– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (35) العدد (8) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (35) No. (8) 2013

The Effect of Some Essential Oils on the Growth of Bacteria *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae* Causing American Foulbrood Disease to Honey Bees (*Apis mellifera* L.)

Ahmad Motaz Billah Mahmud*
Dr. Mahmud Abu Ghorra **
Dr. Ali Khaled Alburaki ***

(Received 24 / 6 / 2013. Accepted 8 / 10 /2013)

□ ABSTRACT □

The effect of some essential oils taken from *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limonum* and *Rosmarinus Officinalis* was investigated in relation to the growth of bacteria *Paenibacillus larvae* which causes American Foulbrood disease that affects world honey bees *Apis mellifera* L. The study was carried out in the laboratories of the Faculty of Agriculture, Damascus University from 2012 till 2013. This is in order to contribute to preparing an integrated pest management program for American Foulbrood disease. The oils were extracted from the plants using steam distillation. The effects of the concentrations of oils on the growth of *P. larvae* were tested between (3.90625 - 500 µg/ml) using agar disc diffusion in petri plates. Results showed that the essential oils used stop the growth of *P. larvae* in some of their concentrations. The minimal inhibitory concentrations which stop the growth of *P. larvae* of the oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Citrus limonum* and *Rosmarinus officinalis* were recorded at 31.25 µg/ml, 62.5 µg/ml, 125 µg/ml respectively.

Keywords: *Paenibacillus* (*Bacillus*) *larvae*, *Apis mellifera* L., American foulbrood, essential oils, *Cinnamomum*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis.*

***Postgraduate student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.**
****Assistant Professor, Specialized in Bacterial Plant Diseases, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.**
*****Assistant Professor, Specialized in Economical Insects (Bee Breeding), Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.**

مقدمة:

تسبب بكتريا *Paenibacillus larvae* مرض الحضنة الأميركي American foulbrood لحشرة نحل العسل العالمي *Apis mellifera* L. (Heyndrickx *et al.*, 1996)، وهي بكتريا متبوّغة موجبة الغرام. ينتشر هذا المرض في جميع القارات (Matheson, 1993)، وقد سُجِّل وجوده منذ فترة طويلة في بعض المحافظات السورية (محمود وزملاؤه، 2013). يُعدُّ مرض الحضنة الأميركي من أخطر الأمراض التي تصيب نحل العسل، إذ يؤدي في معظم الحالات إلى موت طائفة النحل. وتعد مكافحته صعبة جداً، لأن الحضنة الميتة تحمل مليارات الأبواغ التي تنتجها البكتريا، والتي تكون مصدراً للعدوى لفترة زمنية طويلة، فهي تحتفظ بحيويتها لعدة سنوات في معدات ومنتجات خلية النحل، لأنها مقاومة للظروف البيئية والحرارة والمواد الكيميائية (White, 1920; Hansen & Rasmussen, 1990; Shimanuki, 1997; Hansen & Brødsgaard, 1999).

الدارسة المرجعية:

صُنفت بكتريا *Paenibacillus larvae* سابقاً باسم *Bacillus larvae* (White, 1906)، ولكن عندما استعملت التقانات الجزيئية في تصنيف البكتريا أجريت تعديلات عديدة على تصنيف بعض أنواع الجنس *Bacillus*، اعتمدت هذه التعديلات على تسلسل المورثة 16S rRNA. أُدرجت نتيجة هذه التعديلات لبعض أنواع الجنس *Bacillus* ضمن جنس جديد باسم *Paenibacillus*، وكان من بين هذه الأنواع بكتريا *Bacillus larvae*، فأصبح تصنيفها باسم *Paenibacillus larvae* (Ash *et al.*, 1993).

تمنع بعض الدول مثل السويد معالجة مرض الحضنة الأميركي، وإنما يتم إعدام طوائف النحل العامرة المصابة، وكذلك الأدوات الملوثة، أو تنظيفها وتعقيمها. بينما يُسمح بالمعالجة في بلدان أخرى، و تُعدُّ التهوية الاصطناعية التقنية الرئيسة عالمياً في معالجة الطوائف المصابة، تتضمن هذه الطريقة نقل النحل البالغ من الخلايا المصابة إلى صندوق تربية خالٍ من المرض دون نقل الأقراص المصابة، يستهلك النحل العسل الملوث الموجود في معدة العسل خلال عدة أيام، ثم ينقل إلى صندوق تربية جديد (Shimanuki & Knox, 1997)، كما تستخدم الصادات الحيوية مثل أوكسي تتراسكلين oxytetracycline-HCl (OTC-HCL) ضمن شروط محددة في الدول التي تسمح باستخدام الصادات الحيوية في المعالجة؛ كالولايات المتحدة الأميركية. ولكن استخدام الصادات الحيوية أدى إلى مشاكل عدة ؛ منها ظهور سلالات مقاومة من بكتريا *P. larvae* (Miyagi *et al.*, 2000)، وكذلك مشكلة الأثر المتبقي من الصادات الحيوية في العسل ومنتجات الخلية الأخرى (Bogdanov, 2006).

دُرس تأثير بعض الزيوت العطرية النباتية في نمو بكتريا *P. larvae*، لما لهذه الزيوت من خصائص مضادة للأحياء الدقيقة، فتبيّن أن هناك تأثيراً مثبطاً لعدة زيوت عطرية في نمو بكتريا *P. larvae*، منها الزيوت العطرية لكل من نبات الزعتر *Thymus vulgaris*، ونبات عشبة الليمون *Cymbopogon citratus*، ونبات القرفة السيلانية *Cinnamomum zeylanicum*، وحُدد أقل تركيز مثبط من هذه الزيوت العطرية Minimal Inhibitory Concentration (MIC) لبكتريا *P. larvae* بأنه بين 100 إلى 150 ميكرو ليتر/ليتر، وبين 50 إلى 100 ميكرو ليتر/ليتر، و50 ميكرو غرام/مل من هذه الزيوت على التوالي (Alippi *et al.*, 1996; Gende *et al.*, 2009).

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لوجود مرض الحضنة الأميركي في بعض المحافظات السورية، ولما يسببه من خطر على تربية نحل العسل، وبسبب قدرة المرض على الانتشار السريع، أُجري هذا البحث كخطوة من خطوات المساهمة في إعداد برنامج مكافحة متكاملة لمرض الحضنة الأميركي؛ والحد من آثاره السلبية على تربية نحل العسل في سورية.

يهدف البحث إلى: دراسة تأثير الزيوت العطرية لكل من نبات القرفة السيلانية *C. zeylanicum*، وقشور ثمار الليمون الحامض *Citrus limonum*، ونبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في نمو بكتريا *P. larvae*.

طرائق البحث و مواده:

أجريت الدراسة خلال عامي 2012–2013، في مختبرات كلية الزراعة بجامعة دمشق؛ على النحو الآتي:

أ- استخلاص الزيوت العطرية من النباتات المدروسة:

استخلصت الزيوت العطرية من لحاء نبات القرفة السيلانية المجففة (تم شراؤها من السوق المحلية ولا يُعرف متى تم جمعها)، ومن قشور ثمرة الليمون الحامض الطازجة، ومن أوراق نبات إكليل الجبل المجففة، بتطبيق طريقة التقطير بالبخار (AOAC, 2000)، إذ طحنت كمية من المادة النباتية المراد استخلاص الزيت العطري منها، ووضعت في حوجلة الاستخلاص، ثم غمرت بالماء المقطر وسُخنت العينة حتى درجة الغليان لمدة تتراوح بين ساعتين إلى ثلاث ساعات؛ بعد ذلك تم الحصول على الزيت العطري في أنبوب خاص ضمن الجهاز. حفظت الزيوت العطرية على درجة حرارة 4 ^{o}م.

ب- بكتريا *P. larvae* المستخدمة في الدراسة:

العزلة المستخدمة من بكتريا *P. larvae* عزلت من خلية نحل محلية *A. mellifera* L.، من منطقة الغوطة الشرقية في محافظة ريف دمشق، وتم تعريف البكتريا في مختبرات كلية الزراعة–جامعة دمشق(محمود وزملاؤه، 2013)؛ بتطبيق تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)، باستخدام بادئات متخصصة لبكتريا *P. larvae* لتضخيم جزء من مورثة 16s rRNA. البادئات المستخدمة5’TCGAGCGGACCTTGTGTT3’PLeF: و PLeR: 5’CTATCTCAAAACCGGTCAGAG3’، الوزن الجزيئي لنواتج التضخيم المتوقعة 968 bp (Anon, 2008).

جـ- دراسة تأثير الزيوت العطرية للنباتات المدروسة في نمو بكتريا *P. larvae*:

استخدمت طريقة الأقراص على بيئة مغذية صلبة MYPGP agar ضمن أطباق بتري (Verpoorte *et al.* 1983)؛ بعد تحضير ثمان تراكيز من كل زيت عطري: (500، 250، 125، 62.5، 31.25، 15.625، 7.8125، 3.90625) ميكرو غرام/مل؛ وبعد ذلك تم حلّ الزيوت بالماء المعقم باستخدام عامل استحلاب (توين 20) تركيز 3%، ونشر1 مل تقريباً من معلق بكتريا *P. larvae* بتركيز ($2.5 * 10^{5}$) CFU/ml على كامل سطح الطبق البتري، ثم أضيفت التراكيز المحضرة من الزيوت العطرية بالإضافة إلى الشاهد (توين 20 تركيز 3% ضمن الماء المعقم) إلى الأقراص بمعدل 10 ميكرو ليتر/قرص؛ ووضعت الأقراص على سطح البيئة المغذية بعد تشربها للمعلق البكتيري بشكل تام وبمعدل أربع مكررات لكل معاملة؛ ثم تمّ تحضين الأطباق على درجة حرارة 36±1 ^{o}م لمدة (48–72) ساعة.

وأخيراً قياس نصف قطر تثبيط نمو بكتريا *P. larvae* لكل مكرر؛ وحساب متوسط نصف قطر التثبيط والخطأ المعياري لكل معاملة، وتحديد أقل تركيز مثبِّط من كل زيت عطري مستخدم للبكتريا المدروسة.

د- التحليل الإحصائي:

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS 17.0، إذ استخدم تحليل التباين الأحادي One Way ANOVA لاختبار وجود فروق معنوية بين تأثيرات التراكيز المطبّقة في نمو البكتريا *P. larvae* من كل زيت عطري على حده. واختبار Leven لفحص تجانس التباين، واختبار Dunnett C لفحص مصادر الفروق في أنصاف أقطار تثبيط البكتريا بين التراكيز المستخدمة من كل زيت عطري.

النتائج والمناقشة:

أ- نتائج دراسة تأثير زيت القرفة السيلانية العطري في نمو بكتريا *P. larvae*:

لم يؤثر الشاهد في نمو بكتريا *P. larvae*، في حين أظهر زيت القرفة السيلانية العطري تأثيراً مثبطاً في نمو البكتريا، وتبيّن من النتائج الموضّحة في الجدول(1) أن متوسط نصف قطر التثبيط تناسب طرداً مع ارتفاع التركيز.

الجدول(1): متوسطات أنصاف أقطار تثبيط زيت القرفة السيلانية العطري لبكتريا *P. larvae* (± خطأ الانحراف المعياري) (مم)*:

التراكيز (ميكروغرام/مل)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625
متوسط نصف قطر التثبيط للبكتريا *P. larvae*	43±0	43±0	20.25±2.462	15.67±1.333	3±0	0	0	0

تمثل كل قراءة N=4

*** ملاحظة $SX \pm \bar{X} = \bar{X} \pm S\bar{X}$ = أي أن $\bar{X}$ تعني = متوسط نصف قطر مستعمرة بكتريا *P. larvae* المثبط ± $S\bar{X}$ خطأ الانحراف المعياري.**

تبيّن باستخدام تحليل التباين الأحادي وجود فروق معنوية بين تأثير التراكيز المستخدمة من زيت القرفة السيلانية العطري في نمو بكتريا *P. larvae*؛ فقد بلغت قيمة F (280.702)، وهي دالّة إحصائياً على مستوى أقل من (5%). كما تبيّن عدم تجانس التباين باستخدام اختبار Levene، وباستخدام اختبار Dunnett C حُددت مصادر الفروق في أنصاف أقطار تثبيط البكتريا بين التراكيز المستخدمة؛ الجدول(2).

الجدول(2): مصادر الفروق بين تأثير تراكيز زيت القرفة السيلانية العطري في نمو بكتريا *P. larvae*، باستخدام اختبار Dunnett C:

التراكيز (ميكرو غرام/مل)			
250	500	125	* 500
	* 125		* 250
	* 62.5		62.5
	* 31.125		* 31.125
	الشاهد *		الشاهد *
62.5	* 500	31.25	* 500
	* 250		* 250
	125		* 125
	* 31.125		* 62.5
	الشاهد *		الشاهد *

***وجود فرق معنوي على مستوى أقل من (5%).**

يتبيّن أن التركيز 31.25 ميكرو غرام/مل كأقل تركيز مثبِّط من زيت القرفة السيلانية العطري لبكتريا *P. larvae*؛ وهذا يخالف ما توصل إليه Gende وزملاؤه عام (2009) من أن التركيز 50 ميكرو غرام/مل هو أقل تركيز مثبِّط للبكتريا المدروسة من هذا الزيت العطري، وقد يعود الاختلاف إلى اختلاف في سلالة بكتريا *P. larvae* المستخدمة في الدراسة أو إلى اختلاف في تركيب الزيت العطري المستخدم أو إلى اختلاف في الطريقة المستخدمة في الاختبار؛ إذ استخدم Gende وزملاؤه عام (2009) طريقة التخفيف في وسط سائل.

ب- نتائج دراسة تأثير زيت الليمون الحامض العطري في نمو بكتريا *P. larvae*:

أظهر زيت الليمون الحامض العطري تأثيراً مثبطاً في نمو بكتريا *P. larvae*؛ وتبيّن من النتائج الموضحة في الجدول(3) أن متوسط نصف قطر التثبيط تناسب طرداً مع ارتفاع التركيز.

الجدول(3): متوسطات أنصاف أقطار تثبيط زيت الليمون الحامض العطري لبكتريا *P. larvae* (± خطأ الانحراف المعياري) (مم)*:

التراكيز (ميكرو غرام/مل)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625
متوسط نصف قطر التثبيط للبكتريا *P. larvae*	5±0.408	4.25±0.25	3.625±0.125	3.25 ±0.25	2.25±0.75	0	0	0

تمثل كل قراءة N=4

*** ملاحظة $S\bar{X} \pm \bar{X}$ = أي أن $\bar{X}$ تعني = متوسط نصف قطر مستعمرة بكتريا *P. larvae* المثبط $\pm S\bar{X}$ خطأ الانحراف المعياري.**

تبيّن باستخدام تحليل التباين الأحادي وجود فروق معنوية بين تأثير التراكيز المستخدمة من زيت الليمون الحامض العطري في نمو بكتريا *P. larvae*، فقد بلغت قيمة F (38.923) وهي دالّة إحصائياً على مستوى أقل من (5%). كما تبيّن عدم تجانس التباين باستخدام اختبار Levene. وباستخدام اختبار Dunnett C حُددت مصادر الفروق في أنصاف أقطار تثبيط البكتريا بين التراكيز المستخدمة؛ الجدول(4).

الجدول(4): مصادر الفروق بين تأثير تراكيز زيت الليمون الحامض العطري في نمو بكتريا *P. larvae*، باستخدام اختبار Dunnett C:

التراكيز (ميكرو غرام/مل)			
250	500	125	500
	125		250
	62.5		62.5
	31.125		31.125
	الشاهد *		الشاهد *
62.5	500	31.25	500
	250		250
	125		125
	31.125		62.5
	الشاهد *		الشاهد

***وجود فرق معنوي على مستوى أقل من (5%).**

لم يُظهر التركيز 31.25 ميكرو غرام/مل من زيت الليمون الحامض العطري تأثيراً مثبطاً لبكتريا *P. larvae* في جميع المكررات، وتبيّن من نتائج اختبار Dunnett C عدم وجود فرق معنوي بين تأثير هذا التركيز وتأثير الشاهد على مستوى أقل من (5%)، لذلك لا يعدُّ هذا التركيز أقل تركيز مثبط من هذا الزيت لبكتريا *P. larvae*، إنما يعدُّ التركيز 62.5 ميكرو غرام/مل أقل تركيز مثبط من زيت الليمون الحامض العطري لبكتريا *P. larvae*، وهو تركيز مرتفع نسبياً بالمقارنة مع تأثير هذا الزيت العطري في أنواع بكتيرية أخرى، فقد كان التركيز 5 ميكرو غرام/مل أقل تركيز مثبط من زيت الليمون الحامض العطري بالنسبة إلى كل من بكتريا *Micrococcus flavus* وبكتريا *Bacillus subtilis*، و6 ميكرو غرام/مل بالنسبة إلى كل من بكتريا *Staphylococcus epidermidis*، وبكتريا *staphylococcus aureus*، و7 ميكرو غرام/مل بالنسبة إلى كل من بكتريا *Enterobacter cloacae*، وبكتريا *Proteus mirabilis* (Sokovic *et al.*, 2007)، يشير هذا الفرق إلى أن بكتريا *P. larvae* أكثر مقاومة لزيت الليمون الحامض العطري من أنواع بكتيرية أخرى.

جـ- نتائج دراسة تأثير زيت إكليل الجبل العطري في نمو بكتريا *P. larvae*:

أظهر زيت إكليل الجبل العطري تأثيراً مثبطاً في نمو بكتريا *P. larvae*، وتبيّن من النتائج الموضحة في الجدول(5) أن نصف قطر التثبيط تناسب طرداً مع ارتفاع التركيز.

تبيّن باستخدام تحليل التباين الأحادي وجود فروق معنوية بين تأثير التراكيز المستخدمة من زيت إكليل الجبل العطري في نمو بكتريا *P. larvae*، فقد بلغت قيمة F (35.721) وهي دالّة إحصائياً على مستوى أقل من (5%). كما تبيّن عدم تجانس التباين باستخدام اختبار Levene. وباستخدام اختبار Dunnett C حددت مصادر الفروق في أنصاف أقطار تثبيط البكتريا بين التراكيز المستخدمة؛ الجدول(6).

الجدول(5): متوسطات أنصاف أقطار تثبيط زيت إكليل الجبل العطري لبكتريا *P. larvae* (± خطأ الانحراف المعياري) (مم)*:

التراكيز (ميكرو غرام/مل)	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.90625
متوسط نصف قطر التثبيط للبكتريا *P. larvae*	16±2.38	5.25±0.25	3.167±0.1667	0	0	0	0	0

تمثل كل قراءة N=4

*** ملاحظة $\bar{X} \pm S\bar{X}$ = أي أن $\bar{X}$ تعني = متوسط نصف قطر مستعمرة بكتريا *P. larvae* المثبط ± $S\bar{X}$ خطأ الانحراف المعياري.**

الجدول(6): مصادر الفروق بين تأثير تراكيز زيت إكليل الجبل العطري في نمو بكتريا *P. larvae*، باستخدام اختبار Dunnett C:

التراكيز (ميكرو غرام/مل)					
500	* 250	250	* 500	125	* 500
	* 125		* 125		* 250
	الشاهد *		الشاهد *		الشاهد *

***وجود فرق معنوي على مستوى أقل من (5%).**

يتبيّن أن التركيز 125 ميكرو غرام/مل أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل العطري لبكتريا *P. larvae*، وهو تركيز مرتفع بالمقارنة مع تأثير هذا الزيت العطري في أنواع بكتيرية أخرى، فقد كان التركيز 15.6 ميكرو غرام/مل أقل تركيز مثبط من زيت إكليل الجبل العطري بالنسبة إلى بكتريا *Lactococcus garvieae* (Mahmoodi *et al.*, 2012)،

وأقل من 20 ميكرو ليتر/مل بالنسبة إلى بكتريا *Salmonella typhimurium* (Hammer *et al.*, 1999)، و0.2 ميكرو ليتر/مل بالنسبة إلى بكتريا *Bacillus cereus* (Chaibi *et al.*, 1997)، يشير هذا الفرق إلى أن بكتريا *P. larvae* أكثر مقاومة لزيت إكليل الجبل العطري من أنواع بكتيرية أخرى. كما أن هذا التركيز المرتفع نسبياً يجعل من الصعب متابعة التجارب على زيت إكليل الجبل العطري لدراسة تأثيره في أفراد خلية النحل، وفي نمو بكتريا *P. larvae* في الحقل، بسبب الحاجة إلى كميات كبيرة منه، أما متابعة التجارب على زيتي القرفة السيلانية والليمون الحامض العطريين فيبدو أمراً ممكناً، بسبب الانخفاض النسبي لأقل تركيز مثبط لبكتريا *P. larvae* لكل منهما.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات :

1- إن زيت القرفة السيلانية العطري يثبط نمو البكتريا *P. larvae* عند أقل تركيز (31.25 ميكرو غرام/مل).

2- إن زيت الليمون الحامض العطري يثبط نمو البكتريا *P. larvae* عند أقل تركيز (62.5 ميكرو غرام/مل).

3- إن زيت إكليل الجبل العطري يثبط نمو البكتريا *P. larvae* عند أقل تركيز (125 ميكرو غرام/مل).

التوصيات:

1- تطبيق المكافحة باستخدام زيت القرفة السيلانية وزيت الليمون العطريين على خلايا مصابة ضمن برنامج مكافحة متكامل؛ والتوسع في دراسة تأثير زيوت عطرية ومواد طبيعية أخرى في نمو بكتريا *P. larvae*.

2- دراسة تأثير الزيوت العطرية المؤثرة في نمو بكتريا *P. larvae* على سلوك أفراد خلية النحل، وعلى إنتاجيتها.

3- تحديد مكونات الزيوت العطرية المؤثرة في نمو بكتريا *P. larvae*، والمواد الفعالة في هذه الزيوت، ودراسة إمكانية تصنيعها تجارياً.

المراجع:

1. محمود، أحمد معتز بالله؛ أبو غرة، محمود؛ البراقي، علي خالد. *تشخيص مرض الحضنة الأميركي Paenibacillus larvae White في بعض المناحل السورية*. مجلة الكيمياء البيولوجية والعلوم البيئية. جمعية الكيمياء الزراعية وحماية البيئة مصر، المجلد 8، العدد 1، 2013، 225-264.
2. ALIPPI, A.M.; RINGUELET, A.J.; CERMELE, E.L.; RE, M.S.; HENNING C.P. *Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against Paenibacillus larvae, the Causal Agent of American Foulbrood Disease*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, United Kingdom & USA & Singapore & Australia, Vol. 4, 2, 1996, 9-16.
3. ANON**.** *American Foulbrood of Honey Bees*. OIE Terrestrial Manual International, 2008, 395-404.
4. AOAC. *official methods of analysis of AOAC international*, *17th edition*. USA, 2000.
5. ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. *Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test*. Antonie van Leeuwenhoek International, 64, 1993, 253-260.
6. BOGDAVOV, S. *Contaminants of bee products*. Apidologie France, 37, 2006, 1-18.

7. CHAIBI, A.; ABABOUCH, L.H.; BELAERI, K.; BOUCETTA, S.; BUSTA, F.F. *Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereus T and Clostridium botulinum 62A spores by essential oils.* Food Microbiology USA, 14, 1997, 161–174.
8. GENDE, L.B.; MAGGI, M.D.; DAMIANI, N; FRITZ, R.; EGUARAS, M.J.; FLORIS, I. *Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) essential oil.* Bulletin of Insectology Italy, Vol. 62, 1, 2009, 93-97.
9. HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RIELY, T.V. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Apidologie France, 86, 1999, 985– 990.
10. HANSEN, H. and BRODSGAARD, C.J. *American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control*. Bee World International, 80, 1999, 5-23.
11. HANSEN, H. and RASMUSSEN, B. *The sensitiveness of the foulbrood bacterium Bacillus larvae to heat treatment*. Gent Belgium, 1990, 146-148.
12. HEYNDRICKX, M.; VANDEMEULEBROEKE, K.; HOSTE, B.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; DEVOS, P.; LOGAN, N.A.; ALI, N.; BERKELEY, R.C.W. *Reclassificationof Paenibacillus (formerly Bacillus) pulvifaciens (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of Paenibacillus (formerly Bacillus) larvae (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of P. larvae, with emended descriptions of P. larvae as P. larvae subsp larvae and P. larvae subsp pulvifaciens*. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 1996, 270-279.
13. MAHMOODI A.; ROOMIANI, L.; SOLTANI, M; BASTI, A.A.; KAMALI, A.; TAHERI, S. *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from Rosmarinus officinalis, Zataria multiflora, Anethum graveolens and Eucalyptus globules*. Global Veterinaria International, Vol. 9, 1, 2012, 73-79.
14. MATHESON, A. *World bee health report*. Bee World International, 74, 1993, 176-212.
15. MIYAGI, T.; PENG, C.Y.S.; CHUANG, R.Y.; MUSSEN, E.C.; SPIVAK, M. S.; DOI, R.H. *Verification of oxytetracycline resistant American foulbrood pathogen Paenibacillus larvae in the United States*. Journal of Invertebrate Pathology USA, 75, 2000, 95-96.
16. SHIMANUKI, H. *Bacteria*, pp. 35-54. In: R.A. Morse and K. Flottum [eds.], *Honey Bee Pets, Predators, and Diseases*. 3 rd. A. I. Root Company, Medina, Ohio, USA, 1997, 718.
17. SHIMANUKI, H.; KNOX, D.A.; FURGALA, B.; CARON, D.M.; WILLIAMS, J.L. *Diseases and pests of honey bees*. Illinois USA, 1997, 1083-1151.
18. SOKOVIC, M.; MARIN, P.D.; BRKIC, D.; GRIENSVEN, L.J.L.D. *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria*. Food Global Science Books United Kingdom, Vol. 1, 1, 2007, x-y.
19. VERPOORTE, R; VAN BEEK, T.; THOMASSEN, P.; ANDEWEIL, J.; BAERHIM S.A. *Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apcynanceae and Loganianceae*. Ethnopharmacology USA, 8, 1983, 287-302.
20. WHITE, G.F. *American foulbrood.* Bureau of Entomology USA, 809, 1920, 54.
21. WHITE, G.F. *The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases*. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series USA, 1906, 14.