مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (4) / المجلد (17) : 2009

عزل و تشخيص الأنواع البكتيرية المسببة لمرض تعفن ألحضنه الأوربي في طوائف نحل العسل في العراق

محسن عبد الله كريم المسافر — المعهد التقني– المسيب

عايد نعمة عويد الزبيدي — الكلية التقنية–المسيب

رضا صكب الجوراني — كلية الزراعة–جامعة بغداد

الخلاصة

في سلسلة تجارب لتشخيص المسببات المرضية الرئيسية والثانوية لمرض تعفن ألحضنه الأوربي الذي يصيب طوائف نحل العسل في العراق و بالاعتماد على الصفات المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه وتحديد نسب تواجدها في أجزاء ألخليه . تبين أن المسبب الرئيسي للمرض هو البكتريا *Mellisococcus pluton* إضافة إلى أنواع بكتيرية أخرى مرافقه هي *Bacillus alvei* و *Bacillus letrosporus* التي تعد مسببات ثانوية للمرض. كانت المواصفات المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه لهذه العزلات مطابقة لتلك في السلالات القياسية. كما أظهرت النتائج إن نسب تواجد البكتريا *M. pluton* في بالغات النحل , اليرقات , العسل القريب من الحضنة , العسل المفروز ,حبوب اللقاح كانت 46.00 , 76.30 , 42.80 , 22.20, 23.80 % على التوالي ولم تتواجد في الشمع الطبيعي ,الأساسات الشمعية ألمحليه , الأساسات الشمعية ألمصنعه (ألنيوزلنديه) , الأساسات الشمعية ألمصنعه (الاسبانية) والأساسات الشمعية ألمصنعه (المصرية) بينما كانت نسب البكتريا *B. alvei* 58.70 , 66.60 , 61.90 , 39.60 , 33.30 , 17.40 , 16.60, 33.30 %على التوالي للأجزاء أعلاه ولم تتواجد في الأساسات الشمعية ألمصنعه (ألنيوزلنديه) والأساسات الشمعية ألمصنعه (المصرية) اما نسب تواجد و*B. letrosporus* في نفس الأجزاء فقد بلغت 34.90 , 55.50 , 31.70, 28.50 , 17.40, 9.5,0% على التوالي ولم تتواجد في الشمع الطبيعي ,الأساسات الشمعية ألمحليه , الأساسات الشمعية ألمصنعه (ألنيوزلنديه) , الأساسات الشمعية ألمصنعه (الاسبانية) والأساسات الشمعية ألمصنعه (المصرية). وأظهرت النتائج أن وجود المسبب المرضي البكتيري الرئيسي والأنواع البكتيريه المرافقة في طوائف النحل يكون بشكل متوافق مع بعضها وعدم تواجد البكتريا الرئيسيه *M. pluton* في عينات الشمع الطبيعي وفي عينات الأساسات الشمعية المحلية والمستوردة .

Abstract

Utilizing the morphological, physiological and biochemical characterizes, a series experiments were carried out to prescribe the primary and secondary bacteria causes Europian - Foul Brood in honeybee sects in Iraq and to find out their percentage in some hive parts. The results showed that the common causes of this disease was *Mellisococcus pluton* and some other bacteria (i.e.) *Bacillus alvei* and *B. letrosporus* as well. The characters of these secondary causes of the disease and the standard types of these bacteria were similar .Results on the other hand showed also that the percentage in adult , larva, honey next to brood , extract honey, pollen grains were 46.00 , 76.30 , 42.80 , 42.2 , 22.20 and 23.80.0% respectively and was not found in natural wax, local wax foundations and foreign manufactured wax foundations (i.e) Newzeland, Espanial and Egyptian. for the *M. pluton.* And 58.70 , 66.60 , 61.90 , 39.60 , 33.30 , 17.40 , 16.60 and 33.30 in adult , larva, honey next to brood , extract honey, pollen grains, natural wax, local wax foundations and foreign manufactured wax foundations(Espanial) respectively and was not found in foreign manufactured wax foundations(Newzeland and Egyptian) for *B. alvei* and were 34.90 , 55.50 , 31.70 , 28.50 , 17.40 and 9.50 in adult , larva, honey next to brood , extract honey, pollen grains and natural wax respectively and was not found in natural wax, local wax foundations and foreign manufactured wax foundations(Espanial , Newzeland and Egyptian) for *B. letrosporus* . The finding reply also that the presence of all these pathogens were compatible . *M.pluton* was not found in the natural wax samples and wax foundation of the local and the foreign wax foundations which were found free of *B . letrosporus* .

المقدمة

يعتبر مرض تعفن ألحضنه الأوربي من الإمراض البكتيرية الخطيرة التي تهدد حياة طوائف نحل العسل. وهو من أكثر الإمراض انتشارا في العالم . Shimanuki وجماعته (1993) يتسبب المرض عن البكتريا *Mellisococcus pluton* وهي المسبب الرئيسي له والتي تعود لعائلة Deinococceae وهي مكورات موجبه لصبغة كرام . تتكاثر هذه البكتريا داخل المعي الوسطي لليرقة ثم تخترق الخلايا الطلائيه إلى تجويف الجسم وتستمر بالنمو والتكاثر وتنتشر في جميع أنسجة الجسم وتسبب تحللها وتفسخها وتحول جسم اليرقة إلى قوام مائي لزج وخلال موت اليرقة تخرج البكتريا مع البراز وتلتصق على جدران أو في قاع العين السداسية أو على الاغطيه الشمعية إذ تبقى البكتريا لعدة سنوات في بقايا اليرقات الميتة لكون الشمع والعسل مواد حافظه لذلك يكون بقاء الخلايا البكتيرية فاعل لفترات طويلة . وهنالك أنواع بكتيرية إضافة إلى للبكتريا الرئيسية *M.pluton* وتتسبب في إحداث المرض وهي البكتريا *Bacillus alvei* وهي عصيات موجبه لصبغة كرام ومولده للسبورات. لهذه البكتريا القدرة على تحلل النشا والجيلاتين وتنتج جذر الاندول وعند تخمر سكر الكلوكوز تنتج حامضا. ولا تختزل النترات إلى نتريت و لكنها تحلل بيرو كسيد الهيدروجين إلى أوكسجين وماء . تعيش هذه البكتريا متطفلة في معي اليرقات وقد لا توجد بشكل دائمي داخل اليرقة ولكنها تبقى متوطنة قي الخلية لعدة سنوات في بقايا أجسام اليرقات الميتة وهي المسؤوله عن الرائحة الحامضيه للمرض والمتأتية من تحلل أجسام اليرقات Bailey و Ball (1991) و Smibert وKrieg (1994) والنوع الأخر من البكتريا المرافقة هي البكتريا *Bacillus letrospousr* وتسمى أيضا *B.ortheus* وهي بكتريا عصويه مكونه للسبورات وموجبه لصبغة كرام وتعتبر غير مهمة في تشخيص المرض . Shimanuki وآخرون (1993) وتختلف عن البكتريا السابقة في أنها تحرر حامض من سكرالكلوكوز وسكر المالتوز وهي تحلل الجيلاتين بصوره ضعيفة ولها القدرة على اختزال النترات الى نتريت Smibert وKrieg (1994) كما شخصت أنواع مرافقه أخرى من البكتريا مثل بكتريا *Bacterium eurydice* وجدت في الأمعاء الدقيقة حيث تكون حبوب اللقاح الطرية ملوثه بها. ومن الأنواع البكتيرية المرافقة التي شخصت بكتريا *Enterococcus faecalis* وهي بكتريا من المكورات المسبحيه ألموجبه لصبغة كرام وتشارك بكتريا *B. alvei* في إظهار الرائحة الحامضيه لأجسام اليرقات المتحللة Claus وBerkeley ,(1986) وقد تكون بشكل مزدوج أو سلاسل قصيرة تنمو على الوسط المغذي الصلب خلال يوم واحد ولا تتواجد بشكل دائمي مع بكتريا *M. pluton* . Shimanuki وجماعته (1993) لذلك يهدف البحث إلى تشخيص الأنواع البكتيرية الرئيسية والمرافقة المسببة لمرض تعفن لحضنه الأوربي وتحديد نسب تواجدها في بعض أجزاء الخلية في طوائف النحل في العراق .

المواد وطرائق العمل

تم جمع 21 إطار حضنه مصابه بالمرض واعتمادا على الإعراض المظهرية للأصابه من منحل(محمد مرعي) في قضاء المسيب م محافظة بابل خلال الفترة من نهاية شهر نيسان وبداية شهر حزيران موعد ظهور المرض في اغلب الناحل في هذه المنطقة . كما جمعت عينات مختلفة من العسل المفروز والعسل القريب من ألحضنه وبالغات النحل (شغالات سارحة وشغالات منزلية) واليرقات وحبوب اللقاح والشمع الطبيعي كذلك أخذت عينات من أساسات شمعيه مصنعه محليا و مستورده من مناشئ مختلفة (نيوزلنديه, اسبانية ومصريه) حفظت العينات في الثلاجة داخل أكياس من النايلون لحين الاستعمال. حضرت بعد ذلك الأوساط الزرعية الخاصة وحسب الأنواع البكتيرية حيث حضر الوسط السائل YSGS -Brooth

(Yeast extract Soluble starch Glucose and Sodum trioglycolate) والوسط الصلب (Yeas extract Soluble starch Glucoseand Sodum trioglycolate) YSGS-Agar الخاصان بتنمية البكتريا *M. pluton* والوسط المغذي الصلبNutrient Agar الخاص بتنمية البكتريا جنس *Bacillus* Shimanuki و Cantwell , (1978)

أولا:- زراعة الأنواع البكتيرية

أخرجت عدة يرقات من الإطارات المصابة ووضعت على زجاجة ساعة نظيفة ومعقمه , مزقت أجسام اليرقات بالملاقط وسحقت أجهزتها الهضمية مع عدة قطرات من الماء المقطر ونشرت بالا بره الناقلة ثم أخذت قطره من المعلق بواسطة الشراج الناقل ولقح بها الأنابيب الحاوية على الوسط ألزرعي وبثلاث مكررات لكل منهما مع أنبوبة السيطرة التي تركت بدون لقاح بكتيري (Benson, 1979) . وضعت الأنابيب الخاصة بالبكتريا *M. pluton* في حاويه زجاجية محكمة الغلق معها مادة Gas pack Envelope لتوفير الظروف اللاهوائيه داخل الحاوية إما الأنابيب الخاصة بأنواع البكتريا .Spp *Bacillus* فقد حضنت هوائيا ووضعت جميع الأنابيب في الحاضنة على درجة حرارة 35م5 ولمدة 3-4 أيام وبنفس العملية تم عمل معلق من بالغات النحل بعد تشريحها واستخراج جهازها الهضمي وكذلك لعينات العسل وحبوب اللقاح واليرقاتإما بالنسبة للشمع والأساسات الشمعية فقد وزن 5 غم من الشمع بعد تقطيعه إلى قطع صغيره وضعت في قنينة زجاجيه سعة 50مل تحوي ماء مقطر ومعقم بمقدار 20 مل وضعت في حمام مائي لحين ذوبان الشمع ثم أخذت قطره من المعلق وأكملت التجربة كما في أعلاه (Benson , 1979) . بعد إخراج الأنابيب المزروعة والتي ظهرت فيها العكاره بالنسبة لأنواع البكتيريا التي تعود للجنس *Bacillus* والتي لم تظهر فيها العكاره بالنسبة للبكتريا *M. pluton* دلاله على عدم وجود نمو بكتيري فيها . أخذت قطره من المعلق البكتيري من الأنابيب الحاوية على المسبب الثانوي *Bacillus* وزرعت على الوسط الزرعي الصلب وبطريقة التخطيط بعدها حضنت الإطباق على درجة حرارة 35م5 ولمدة 1-2 يوم , بعد نمو البكتريا في الأطباق أخذت مسحه من ا لمستعمرات البكتيرية المختلفة ونشرت على شريحة زجاجيه بعد إضافة قطره من الماء المقطر والمعقم تركت لتجف ثم ثبتت بواسطة اللهب وصبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر لتحديد المستعمرات التي سيتم تنقيتها والتي أخذت من كل منها مسحه زرعت في طبق يحتوي على وسط صلب وبطريقة التخطيط أيضا وحضنت الإطباق هوائيا أو لا هوائيا حسب نوع البكتريا بعد ذلك فحصت العزلات مظهريا و فسلجيا وكيموحيويا للتأكد من نقاوتها, كررت ألعمليه للحصول على عزلات نقيه Shimanuki و Cantwell , (1978) حفظت العزلات المزروعة على الأوساط الغذائية هوائيا ولا هوائيا في الثلاجة لحين الاستعمال مع تجديدها شهريا .

ثانيا:- تشخيص العزلات البكتيرية

تم تشخيص العزلات البكتيرية من خلال تحديد الصفات المورفولوجيه والفسيولوجية والكيموحيويه وحسب ما جاء Bergys , (1994). درست الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على الوسط الصلب من حيث الشكل والحواف والارتفاع والقطر واللون واللمعان كذلك جرى فحص ألمجهري لمعرفة شكل وحجم الخلايا من خلال استعمال صبغة كرام وصبغة المليكايت الخضراء لمعرفة شكل وموقع الابواغ لأنواع البكتريا من جنس *Bacillus* Claus و Berkeley (1986) .

إما الفحوصات الفسيولوجية والكيموحيويه للعزلات البكتيرية فقد أجريت حسب نوع البكتريا وكما يلي:

أ. البكتريا *M. pluton* درست الصفات التالية:-

1. النمو في الظروف الهوائية

لقحت الإطباق الحاوية على الوسط الصلب بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 3-4 يوم عدم ظهور النمو دلالة على عدم قدرة البكتريا على النمو في الظروف الهوائيه .

2. النمو في درجات حرارة مختلفة .

زرعت الإطباق الحاوية على الوسط الصلب بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجات حرارة مختلفة 25 ,30 ,35 ,40 م ولمدة 3-4 أيام واعتبرت نتيجة النمو موجبه عند ظهور نمو واضح.Norris وجماعته , (1981).

3. النمو في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني

حضرت أوساط مختلفة لقيم pH (5.5 ,6.5 و7.5) ووضعت في إطباق بتري ولقحت بالزرع البكتيري, حضنت لا هوائيا على درجات حرارة 35 م5 ولمدة 3-4 أيام . تعد النتيجة موجبه إذا ظهر نمو في الإطباق .

4. النمو بدون الحامض الاميني السيستين Cystein

حضرت إطباق حاويه على وسط خالي من السيستين ولقحت الإطباق بالزرع البكتيري وحضنت لا هوائيا على درجات حرارة 35 م5 ولمدة 3-4 أيام , ظهور النمو دلاله على قدرة البكتريا على النمو في وسط خالي من الحامض الاميني السيستين .

5.فحص تخمر السكريات

حضرت أنابيب حاويه على وسط السكريات سكروز, كلوكوز ,فركتوز ومانيتول ولقحت بالزرع البكتيري وحضنت لا هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 3-4 أيام . النتيجة موجبه عند تغير لون الكاشف إلى اللون الأصفر مع ظهور أو عدم ظهور غاز في أنبوبة درهام (Macfaddin, 1979)

6. النمو بوجود ملح الصفراء

حضر وسط يحتوي على 40% ملح الصفراء وزع في أنابيب اختبار لقحت بالزرع البكتيري وحضنت لا هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 3-4 أيام . النتيجة موجبه عند ظهور عكاره كثيفه في الأنابيب . (الداغستاني ,2002) .

ب. البكتريا *Bacillus Spp* درست الصفات التالية:-

1. النمو في الظروف اللاهوائيه

لقحت الأطباق الحاوية على الوسط الصلب بالزرع البكتيري وحضنت لا هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 48ساعه . ظهور النمو دلالة على قدرة البكتريا على النمو في الظروف اللاهوائيه اختياريا Norris وآخرون ,(1981).

2. النمو في درجات حرارة مختلفة .

زرعت الإطباق ألحاويه على الوسط الصلب بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجات حرارة مختلفة 5 , 10,30 ,40 ,50 م5 ولمدة 3-4 أيام واعتبرت نتيجة النمو موجبه عند ظهور نمو واضح حجازي, (1998).

3. النمو في قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني

حضرت أنابيب تحتوي على المرق المغذي وباس هيدروجيني 5.7 و 6.8 ثم لقحت بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجات حرارة 35 م5 ولمدة 2–5 أيام. تعد النتيجة موجبه إذا ظهرت العكاره في الوسط. Norris وجماعته , (1981).

4. فحص الكاتاليز

جرى الفحص للتحري عن وجود إنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيرو كسيد الهيدروجين إلى أوكسجين وماء . نقل جزء من المستعمرة النامية على الوسط المغذي الصلب إلى شريحة زجاجيه معقمه وأضيف لها 1–2 قطره من H2O2 تركيز 3% يعد تصاعد فقاعات غاز الأوكسجين نتيجة ايجابيه للاختبار . (الداغستاني ,2002) .

5.فحص تخمر السكريات

حضرت أنابيب حاويه على وسط السكريات سكروز, كلوكوز,فركتوز ومانيتول ولقحت بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجة حرارة 35 م5 لمدة 2–5 أيام . النتيجة موجبه عند تغير لون الكاشف إلى اللون الأصفر مع ظهور آو عدم ظهور غاز في أنبوبة درهام . (Macfaddin, 1979)

6.اختزال النترات

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختزال النترات بالزرع البكتيري للعزلات وحضنت لمدة 4–6 أيام بدرجة حراره 35 م 5 ثم أضيفت قطره من محلول هيدروكسي البوتاسيوم 40% وقطرتان من محلول الفانفثول 5% والمحلولان هما كاشفا الفوكس بروسكور.لاختزال النترات ولكل أنبوبه , ظهور اللون الحمر دلاله على ايجابية الاختبار.

7. انتاج الاندول

حضر وسط ماء البيبتون(باذابة 1 غم ببتون 0.5 غم NaCl في 100 مل ماء مقطر) لغرض الكشف عن جذر الاندول والناتج من تحلل الحامض الاميني تربتوفان حيث لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط ألزرعي البكتيري وحضنت لمدة 2–4 يوم وعلى درجة حرارة 35 م5 ثم أضيفت إلى كل أنبوبه عدة قطرات من كاشف كوفاك (حضر بإذابة 5 غم من P-dimethylaminobenzylaldehyde في 75 مل من الكحول الاثيلي ثم أضيف 36 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز إلى المزيج . (Macfaddin, 1979) .

8 . تحلل النشا

حضرت إطباق حاويه على وسط النشا الصلب (حضر بإضافة 2 غم من النشا إلى 100مل وسط مغذي صلب) Norris وآخرون ,(1981).حضنت هوائيا لمدة 2–4 يوم وعلى درجة حراره35 م5 بعد النمو غمر الطبق بمحلول كاشف اليود (حضر بإضافة 2 غم من ايوديد البوتاسيوم في 100 مل ماء مقطر ثم أذيب 1 غم من بلورات اليود في محلول ايوديد البوتاسيوم وأكمل الحجم إلى 300 مل بالماء المقطر(Brodshow , 1979)

9. تفكك التايروسين

خطط وسط التايروسين الصلب (حضر باضافة 0.5 غم من التيروسين الى 100 مل وسط مغذي صلب) بالزرع البكتيري وحضنت الإطباق هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 3–4 يوم ظهور هالة شفافة حول المستعمرات النامية يدل على تفكك الحامض الاميني التايروسين Claus و Berkeley (1986) .

10. تحلل الجلاتين

حضرت إطباق تحتوي على وسط الجلاتين (حضر بإذابة 4.4 غم جلاتين في 100 مل من الوسط المغذي الصلب. عدل الأس الهيدروجيني إلى 7. عقمت بالموصده . خططت الإطباق بالزرع البكتيري وحضنت هوائيا على درجة حرارة 35 م5 ولمدة 3 – 5 يوم ثم غمرت بمحلول كاشف فريزر لمدة 5 – 10 دقيقه . ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات دلاله على إنتاج انزيم الجيلاتينيز .Harrigan و McCamce , (1966)

11. فحص احمر المثيل– فوكس برو سكور

حضرت ثلاث مجاميع من أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط (MR-VP) (حضر الوسط المجهز من شركة Oxoid حسب التعليمات المبينة على العبوة) ولقحت بزرع البكتيري وحضنت هوائيا لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة 35م5 أضيفت للمجموعة الأولى 5 قطرات من كاشف احمر المثيل وعند تحول لون الوسط إلى الأحمر يدل على التحلل الكامل للسكر . وأضيف إلى أنابيب المجموعة الثانية 0.6 مل من كاشف الفا نفثول و0.2 مل من هيدروكسيد الصوديوم 40% عند تغير لون الوسط إلى الأحمر القرمزي بعد مرور 15 دقيقة دلالة على التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب الاستيل مثيل كاربينول . (الداغستاني, 2002) . اما أنابيب المجموعة الثالثة فقد تم قياس الأس الهيدروجيني لوسط النمو Claus و Berkeley (1986) .

12. تحلل الكازين .

هيئة ثلاث أنابيب تحتوي على الاكار بدرجة حرارة 45 م 5 بعدها وضع 1مل من الحليب المعقم في ثلاثة إطباق بتري ,صب الاكار المنصهر في كل طبق من الإطباق ثم تركت الإطباق ليتجمد الاكر لقحت بالزرع البكتيري وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 35 م 5 لمدة3–4 يوم . ظهور مناطق تحلل رائقة حول النمو البكتيري يدل على إفراز البكتيريا لأنزيم Protease المحلل للبروتين . (الداغستاني , 2002).

ثالثا :– تقدير نسب الإصابة البكتيرية المعزولة من العينات .

من خلال التحري عن المرض في المناحل الموجودة في مناطق مختلفة من العراق في محافظات (كربلاء , بابل وواسط) جمعت منها عينات و قدرت نسبة الإصابة في (البالغات الحاملة للمسبب المرضي, ألحضنه, العسل القريب من ألحضنه , العسل المفروز , حبوب اللقاح , الشمع الطبيعي والأساسات الشمعية المحلية والمستوردة).

التحليل الإحصائي

استخدم التحليل العشوائي الكامل .C.R.D وجرى تحليل التباين للعوامل الداخلة في التجربة تحت اختبار اقل فرق معنوي .L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 . الساهوكي وكريمة (1990)

النتائج والمناقشة

عزلت الأنواع المسببة للمرض من العينات التي جمعت سابقا واعتمد التشخيص على أساس الصفات ألمظهريه والفسيولوجي والكيموحيويه .

أولا:– المسببات البكتيري الرئيسية المسببة للمرض

شخصت عزله محليه أطلق عليها (M11) بين جدول(1) الصفات المظهرية والفسيولوجية لها والتي تتفق مع الصفات القياسية للبكتريا *M. pluton* حسب ما ورد في (1994,Bergys) وClaus و Berkeley . (1986)

1. الصفات المظهرية

ظهرت المستعمرة بحجم صغير ومرتفعه قليلا وبشكل محدب,قطر 1مل تقريبا ذات لون ابيض حليبي وملساء ولماع وذات حافات ملساء حادة. ألخليه البكتيريه ظهرت بشكل مفرد آو مزدوج آو على شكل سلاسل مختلفة الأطوال آو على شكل تجمعات غير متحركة , موجبه لصبغة كرام وغير مكونه للسبورات والخلية المفردة مكورة رمحيه الشكل ولا تقبل صبغة Acid Fast Strain وهذه النتائج تتفق مع Simbert وJrieg ,(1981) و Bailey و Ball (1991) و (الكناني ,2000)

2.الفحوص الفسيولوجية والكيموحيويه

ظهر إن البكتريا (M11) تنمو بشكل واضح في درجات الحرارة 30 – 35 م5 ولا تنمو بدرجة حرارة 40 م5 وتنمو برقم هيدروجيني بين 6.5 – 6.6 ولا تستطيع النمو في 5.5 و 7.5 كما إنها تنمو في ظروف لا هوائيه ولا تنمو في الظروف الهوائية ومخمره للسكريات الكلوكوز والفركتوز والسكروز ولا تنمو في الوسط الخالي من الحامض الاميني السيستين وتنمو بشكل ضعيف عند إضافة ملح الصفراء إلى الوسط الغذائي .

جدول (1) الفحوصات المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه للعزلة (M11) مقارنة مع ألعزله القياسية *M. pluton* حسب Bergys (1994)

نوع الفحص	ألعزله القياسية*M. pluton* *	ألعزله المحلية (M11)
1.الفحوصات المظهرية		
أ – المستعمرة		
الشكل	محببة تشبه القبة Domshape	محببة محدبة
اللون	ابيض حليبي	ابيض حليبي
اللمعان	لماعة	لماعة
الحافة	ملساء	ملساء
القطر	1ملم	1ملم
ب–الخلايا		
الشكل	مكورة مفردة أو مزدوجة	مكورة مفردة أو مزدوجة أو على شكل سلاسل أو متجمعة
السبورات	غير مكونة سبورات	غير مكونة سبورات
الحركة	عديمة الحركة	عديمة الحركة
صبغة جرام	موجبة لصبغة جرام	موجبة لصبغة جرام
صبغةِ Acid Fast Strain	Non Acid Fast Strain	Non Acid Fast Strain
2– الفحوصات الفسيولوجية		
النمو بدرجات حرارة		
25م	±	±
30م	+	+
35م	+	+
40م	±	±
النمو في الرقم الهيدروجيني		

5.5	–	–
6.5	+	+
7.5	–	–
النمو اللا هوائي	+	+
النمو الهوائي	–	–
النمو في ملح الصفراء	±	±
ب- الفحوصات الكيموحيوية		
تخمير السكريات		
الكلوكوز	+	+
الفركتوز	±	+
السكروز	+	+
النمو في وسط خالي من السستين	–	–

(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة (±) نتيجة ضعيفة

* Bergys (1994)

من خلال دراسة النتائج في جدول(1) ومقارنتها مع مواصفات ألعزله (M11) ومواصفات البكتريا *M. pluton* والمذكورة حسب المصادر المشار إليها سابقا شخصت البكتريا على أنها *M. pluton* (M11)

ثانيا: - . الأنواع البكتيرية المرافقة للبكتريا الرئيسية *M. pluton*

1. ألعزله BA18

وهي عزله محليه بين جدول (2) الصفات المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه والتي تتفق مع صفات ألعزله القياسية للبكتريا *B. alvei* حسب ما ورد في (Bergys, 1994) وClaus و Berkeley (1986)

أ- الصفات المظهرية

المستعمرة بيضاء اللون ناصعة ذات شكل دائري محدب متعرجة الحواف بقطر 1 – 2 ملم . إما الخلية البكتيرية فهي ذات شكل عصوي مفرده أو مزدوجة ومتحركة , موجبه لصبغة كرام ومكونه للسبورات حيث ظهرت السبورات بلون اخضر والخلية بلون احمر عند صباغتها بصبغة Spore strain وهذا يتفق مع وصف . الناجي ومحمد (1986) و(الكناني, 2000)

ب. الفحوصات الفسيولوجية والكيموحيويه

أظهرت نتائج الاختبارات في جدول (2) قدرة ألعزله على تحليل بيرو كسيد الهيدروجين في فحص الكاتاليز وأعطت نتيجة موجبه في تحليل النشا وضعيفة مع الجيلاتين كما أعطت نتيجة موجبه في اختبار جذر الاندول وسالبه في فحص احمر المثيل وموجبه في فحص الفوكس – بروسكور مما يدل على التحليل الجزئي للسكر وإنتاج مركب الاستيل مثيل كاربينول(Macfaddin, 1979) و(الكناني , 2000) . إما تفكك التايروسين فكانت النتيجة ضعيفة . وفي فحص تخمر السكريات كانت النتيجة موجبه لسكر الكلوكوز وسالبه لسكر المانيتول ولم تنتج البكتريا غازا في فحص إنتاج غاز من تخمر سكر الكلوكوز فكانت النتيجة سالبه . أظهرت ألعزله عدم قدرتها على اختزال النترات ولم تنمو البكتريا في وسط المرق المغذي ذي الرقم الهيدروجيني

5.7 بينما تمكنت من النمو في وسط المرق ذي الرقم الهيدروجيني 6.8 وكانت النتيجة موجبه لنمو البكتريا في الظروف اللا هوائيه ولم تنمو في درجات حرارة 10,5 و 50 م 5 حيث كانت ضعيفة النمو بدرجة حرارة 40 م5 بينما نمت بشكل جيد في درجة حرارة 30 م5

جدول (2) الفحوصات التشخيصية المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه لعزلة البكتريا (BA18) مقارنة مع صفات ألعزله القياسية للبكتريا *B. alvei* حسب (1994,Bergys) .

نوع الفحص	البكتريا القياسية *B. alvei* *	ألعزله المحلية (BA18)
1. الفحوصات المظهرية		
أ – المستعمرات		
الشكل	دائرة محدب	دائرة محدب
اللون	بيضاء	بيضاء
اللمعان	ناصحة	ناصحة
الحافه	متعرجة	متعرجة
ب – الخلايا		
الشكل	عصوي	عصوي قضيبي
السبورات	مكونة للسبورات	مكونة للسبورات
الحركه	متحركة	متحركة
صبغة كرام	(G + ve)	(G + ve)
2 .الفحوصات الفسيولوجية والكيموحيويه		
أ – الفحوصات الكيموحيويه		
فحص الكاتاليز	+	+
فحص الفوكس بروسكودر	+	±
انتاج حامض من : –		
سكر الكلوكوز	+	+
سكر المانيتول	-	-
تكون غازمن تخمرسكرالكلوكوز	-	-
تحلل الجيلاتين	+	±
تحلل النشا	+	+
تفكك التايروسين	±	±
اختزال النترات	-	-
تكون جذر الاندول	+	+
احمر المثيل	-	-
ب – الفحوصات الفسيولوجي		
النمو في وسط مغذي ذات رقم هيدروجيني		
5.7	±	-

6.8	+	+
النمو في الظروف الهوائية	+	+
النمو في درجات حرارة (م 5)		
5	-	-
10	-	-
30	+	+
40	+	+
50	-	-

(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة (±) نتيجة ضعيفة

*(Bergys ,1994)

ومن خلال مواصفات ألعزله BA18 جدول (2) ومقارنتها مع المواصفات القياسية للبكتريا *B. alvei* وحسب المصادر المذكورة سابقا يمكن تشخيص ألعزله على انها بكتريا *B. alvei* .

2 . ألعزله BL 36

وهي عزله محليه بين جدول (3) الصفات المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه والتي تتطابق مع المواصفات القياسية للبكتريا *B. letrosporus* حسب ما جاء عن (Bergys ,1994) وClaus و Berkeley (1986) .

أ – الصفات المظهرية

ظهرت المستعمرة بيضاء اللون ,دائرية محدبه وغير لماعه ذات حافات متموجة . إما الخلية البكتيرية ذات شكل عصوي قضيبي , متحركة وموجبه لصبغة كرام , مكونه للسبورات وهو ما يتفق مع Pinnock و Featherstone , (1984) و(الكناني ,2000).

ب – الفحوصات الفسيولوجية

أوضح جدول (3) إن البكتريا لها ألقدره على تحليل بيرو كسيد الهيدروجين في فحص الكاتاليز بينما كانت النتيجة ضعيفة في تحلل النشا وسالبه في تحلل الجلاتين وأعطت البكتريا نتيجة موجبه في فحص جذر الاندول وفي فحص احمر المثيل ونتيجة ضعيفة في فحص الفوكس بروسكور ونتيجة سالبه في فحص تفكك التايروسين وموجبه في فحص تخمر السكريات خاصة تخمر سكر الكلوكوز وان ألعزله لها ألقدره على اختزال النترات و البكتريا تنمو في الوسط المغذي ذي الرقم الهيدروجيني 6.8 ولا تنمو في الوسط المغذي ذي الرقم الهيدروجيني 5.7 وتمكنت من النمو في الظروف اللا هوائيه ولم تنمو في درجات الحرارة 5 , 10 و 50 م 5 ولكنها أعطت نموا واضحا في درجة حرارة 35 م 5 بينما أعطت نموا ضعيفا في درجة حرارة 40 م 5 وكذلك أعطت نتيجة موجبه عند تحلل الكازين.

جدول (3) الفحوصات التشخيصية المظهرية والفسيولوجية والكيموحيويه لعزلة البكتريا (BL36) مقارنة مع صفات ألعزله القياسية للبكتريا *B.letrosporus* وحسب ما جاء عن Bergys manual

نوع الفحص	البكتريا القياسية *B.letrosporus* *	ألعزله ألمحليه (BL36)

1. الفحوصات المظهرية		
أ – المستعمرات		
الشكل	دائرة محدب	دائرة محدب
اللون	بيضاء	بيضاء
اللمعان	ناصحة	ناصحة
الحافه	متعرجة	متعرجة
ب – الخلايا		
الشكل	عصوي قضيبي	عصوي قضيبي
السبورات	مكونة للسبورات	مكونة للسبورات
الحركه	متحركة	متحركة
صبغة كرام	(G + ve)	(G + ve)
2 .الفحوصات الفسيولوجي والكيموحيويه		
أ – الفحوصات الكيموحيويه		
فحص الكاتاليز	+	+
فحص الفوكس بروسكور	±	±
انتاج حامض من : –		
سكر الكلوكوز	+	+
سكر المانيتول	+	+
تكون غازمن تخمرسكرالكلوكوز	+	+
تحلل الجيلاتين	-	-
تحلل النشا	±	±
تفكك التايروسين	-	-
اختزال النترات	+	±
تكون جذر الاندول	+	+
احمر المثيل	±	±
ب – الفحوصات الفسيولوجية		
النمو في وسط مغذي ذات رقم هيدروجيني		
5.7	-	-
6.8	+	+
النمو في الظروف لا هوائيه	+	+
النمو في درجات حرارة مختلفة		
5م	-	-
10م	-	-
30م	+	+

40م	±	±
50م	-	-

(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة (±) نتيجة ضعيفة

(1994,Bergys)*

ثالثا : – نسب الاصابه بالبكتريا المعزولة من العينات

من خلال التحري عن المرض في العينات المأخوذة من المناحل المختلفة والتي عزلت منها الأنواع البكتيرية المسببة للمرض اتضح ما يلي : –

1. نسب البالغات الحاملة للمسبب المرضي

أوضح جدول (4) إن نسب بالغات النحل ألحامله للمسببات المرضية في المعي الوسطي للقناة الهضمية للحشرة كانت 46.0 , 58.7 و34.9% للبكتريا *B. alvei* , *M. pluto*n و *B. letrosporus* على التوالي . ورغم وجود هذه النسب إلا أنها لا تؤثر فيها كونها غير حساسة للاصابه بها ولكنها تساهم بشكل وأخر في نقل المسببات الممرضة إلى بقية أجزاء الخلية أو الخلايا الأخرى من خلال فضلاتها.

2 . نسب الاصابه بالحضنه

من خلال إلية نقل المسببات الممرضة فأن ألحضنه تصاب بالمرض لأنها حساسة للأصابه وأن نسبة تواجد هذه المسببات داخل المعي الوسطي لليرقات قد بلغت 76.3 , 66.6 و 55.5 % للبكتريا *B. ,M. pluton alvei* و *B. letrosporus* على التوالي .وهي تشكل نسب قتل عاليه لليرقات اليافعة بعمر 1 – 2 يوم . وان تواجد المسببات البكتيرية الثانوية *B. alvei* و *B. letrosporus* إلى جانب المسبب الرئيسي *M. pluton* ساهم بشكل فعال في تحلل المحتويات الداخلية لليرقات وإظهار الرائحة المميزة للمرض حيث توفر البكتريا ألرئيسيه *M. pluton* الظروف المناسبة لنشاطها وفعاليتها . (الكناني ,2000).

3 . نسب الاصابه في العسل القريب من ألحضنه

كانت نسب الاصابه في العسل في هذه المنطقة 42.6 , 61.9 و 31.7 % وللأنواع البكتيرية *pluton .M, B. alvei* و *B. letrosporus* على التوالي وان التواجد بهذه النسب قد يساهم في زيادة شدة الاصابه عند التغذية عليه .

4 . نسب الاصابه في العسل المفروز

كانت نسب تواجد الأنواع البكتيرية *B. alvei* , *M. pluton* و *B. letrosporus* في العسل المفروز 22.2 ,39.6 و 28.5 % على التوالي حيث اتضح من جدول (4) انخفاض نسبة تواجد المسبب الرئيسي في عينات العسل عن نسبة تواجد المسببات الثانوية الأخرى ويعزى ذلك إلى تكوين السبورات من قبل المسببات الثانوية والتي تعتبر الوسيلة المهمة للتكاثر وكون العسل ماده حافظه . ومن الجدير بالذكر إن تواجد البكتريا *M. pluton* في العسل ناتج من الطبيعة الفسلجيه لمعيشتها كونها تتحمل التراكيز العالية من السكريات . (الناجي , 1980) . إن اختبار عينات العسل بشكل دوري يعطي ملاحظه مبكرة عن وجود الاصابه رغم عدم ملاحظة الإعراض المرضية على ألطائفه مما يتسنى لمربي النحل من اتخاذ الإجراءات اللازمة للحد من المرض والوقاية منه قبل انتشاره وهي إجراءات معمول بها عالميا لإعطاء توقعات مبكرة حول ظهور الاصابه في دول أوربيه عديدة Brodsgaard و Hansen , (1999) .

5 . نسب الاصابه في حبوب اللقاح

شكلت نسبة العزلات للأنواع البكتيرية *B. alvei* , *M. pluton* و *B. letrosporus* 23.8 , 33.3 و 17.4 % على التوالي في عينات حبوب اللقاح المأخوذة جدول (4) .

6 . نسب الاصابه بالشمع الطبيعي

بلغت نسبة العزلات في عينات الشمع الطبيعي لكل من البكتريا *B. alvei* و *B. letrosporus* 17.4 و9.5 % على التوالي وهذا يعني إن التواجد البكتيري في الشمع اقتصر على المسببات الثانوية وربما يعزى ذلك إلى تكوينها للابواغ وتحملها درجات الحرارة إثناء صهر الشمع

7 . نسبة الاصابه بالأساسات الشمعية المحلية والمستوردة

أوضح جدول (4) إن تواجد البكتريا *B. alvei* في الاساسات الشمعية المحلية والاسبانية كان 16.6 و 33.3 % على التوالي لكل منهما و إن السبب في ذلك ربما يعود إلى إعادة تصنيع الأساسات الشمعية الملوثة والتي تحمل سبورات البكتريا المسببة للمرض حيث إن إعادة التصنيع لا تؤدي إلى قتل كامل للسبورات بل تبقى نسبه محدودة لا تتجاوز 4.3 % من السبورات الملوثة في الأساسات الشمعية (Gochnuer ,1981) .إن عملية عزل المسببات المرضية من الأساسات الشمعية يعد أمرا ضروريا لتلافي انتشار المرض في خلايا النحل كونها تعد جزءا مهما من الخلية وخاصة في موسم التكاثر وفيض الرحيق حيث تضاف أساسات جديدة وتقوم الشغالات المنزلية بنشر المسببات الممرضة عند قيامها بواجباتها داخل الخلية . مما تقدم اتضح إن المسببات موجودة وبشكل متوافق مع بعضها في حين لم توجد البكتريا الرئيسية *M. pluton* في عينات الشمع وان نسبة الإطارات ألحامله للمرض بلغت 80.95 % من مجموع الإطارات الكلي والبالغ 21 إطار وهذه النسبة تظهر بوضوح الانتشار الواسع لهذا المرض في المناحل العراقية وهذه النسب تتفق مع ما أشار إليه(الكناني ,2000 و(الحجيمي ,2002)

جدول (4) النسبة المئوية للاصابه بالبكتريا *B. alvei* , *M. pluton* و *B. letrosporus* للعزلات الماخوذه من عينات مختلفة من طائفة نحل العسل

نوع العينة	عدد العينات	*M. pluton*		*B. alvei*		*B. letrosporus*	
		عدد العزلات	% للعزلات	عدد	%	عدد	% للعزلات

			العزلات		للعزلات	العزلات	
بالغات نحل	63	29	%46	37	%58.7	22	%34.9
يرقات من ألحضنه	63	48	%76.3	42	%66.6	35	%55.5
عسل قريب من ألحضنه	63	27	%42.8	36	%61.9	20	%31.7
عسل مفروز	63	14	%22.2	25	%39.6	18	%28.5
حبوب لقاح	63	15	%23.8	21	%33.3	11	%17.4
شمع طبيعي	63	-	-	11	%17.4	6	%9.5
نسبة التلوث بالأساسات الشمعية ألمحليه والمستوردة							
أساسات شمعيه محليه	6	-	-	1	%16.6	-	-
أساسات شمعيه نيوزلنديه	6	-	-	-	-	-	-
أساسات شمعيه اسبانية	6	-	-	2	%33.3	-	-
أساسات شمعيه مصريه	6	-	-	-	-	-	-

المصادر

الكناني , محمد عبد الجليل (2000) . دراسة مرض تعفن ألحضنه الأوربي على نحل العسل ومكافحته باستخدام المستخلصات النباتية . أطروحة دكتوراه / كلية ألزراعه - جامعة بغداد

الحجيمي ,كميله ورد (2002) دراسة بيئيه لمرض تعفن ألحضنه الأمريكي على نحل العسل باستخدام المستخلصات النباتية وطريقة الطرد الصناعي– رسالة ماجستير, كلية ألزراعه جامعة بغداد .

الداغستاني , هاله . (2002) علم الإحياء ألمجهريه العملي . الطبعة الأولى ,كلية الزرقاء الجامعة– جامعة بلقاء التطبيقية . دار صفاء للنشر والتوزيع . عمان– الأردن 223 صفحه .

الساهوكي , مدحت وكريمه محمد وهيب ,(1990) تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب . دار ألحكمه , وزارة التعليم العالي والبحث العلمي م جامعة بغداد 488 صفحه .

حجازي , عصمت محمد. (1998) أفات وإمراض نحل العسل . منشأ ة المعارف بالأسكندريه , جمهورية مصر العربية . 472 صفحه .

الناجي , لؤي كريم و محمد عمر محي الدين . (1986) تشخيص مرض تعفن الحضن الأوربي في نحل العسل في القطر العراقي . المجلة العراقية للعلوم الزراعيه (زانكو) مجلد 3 عدد 2 صفحه 139– 150 .

Bailey, L and B.V. Ball .(1991) . *Bacillus larvae* its cultivation *in vitro* and its growth *in vivo* . J. Gen. Microbiol. 20 : 711 – 717 .

Benson, H. J.(1979) .Microbiological Application, laboratory Manual in General Microbiology, WM.C. Brown company publishers Iawa , U.S.A.

Bergys manual of Determinative bacteriology 91994) 9th Williams and Wilkins .U.S.A.

Brodshow, L.J. (1979). Laboratory Microbiology 3rd W.B. Saunclers Co. Philadelphia, S.A.

Brodsgaard, Camilla, J. and Hanson, H. (1999). Decontamination of bee hives containing spores of the Foul Brood Bacteriuma *Paenibacillus larvae*. Apiacta XXXIV, 26 – 32 .

Claus, D. and R.C.W. Berkely (1986) . Genus *Bacillus* Chon. In Bergys manual ((Systematic bacteriology)) (Peter H.A. Sneath et. Edc.) Williams and Wilkins Baltimore. 2 :1105 – 1139 .

Gochnuer , T. A. (1981) The distributed of Bacillus larvae spores in the environs of colonies infected with American foul brood disease. American Bee Journal Vol. 121 No. 5 pp 232 -332

Harrigan, W.F. and McCance M. E. (1966). Laboratory Methods in Microbiology academic press . London and New York pp. 201 – 212

Macfaddin, J. F. (1979) . Biochemical Test for the identification of Medical Bacteria. The Williams and Wilkins Co. U.S.A.

Norris, J.R.; Berkeley, R.C.W.; Longan, N.A. and Donnel, A.G. (1981) .The general *Bacillus* and spore *lactobacillus*. In the prokaryotes strn. M. P. stolp. J. Turper,H. G. Balows, a. and Schelgesm,H. G .(eds) Springer overlay Co., Berlin Heidelbrg, New York Vol. (2) 1711- 1772

Pinnock, D.E. and N.E. Featherstone (1984). Detection and quantification of Melissococcus pluton in honeybee colonies by means of enzyme linked-immino absorbent assay.J.ofApicultural Research23:168- 170

Shimanuki, H. and G. E. Cantwell (1979) Diagnosis of honey bee disease, parasites and pests . Ammer. Bee USDA. Ars- Ne. 67 : 650 - 760 .

Shimanuki, H.; D. A. Knox; B. Furgala; D.M. Caron and J.L. Williams (1993) .Diseases and pests of honeybees. In the hive and the honeybee Ed. By Graham,M. ; rodent and Sons Hamiliton , Illinois 1083 -1151 .

Smibert, R. and Jrieg, N.R. (1981). General characterization in (Manual ofmethods for bacteriology) pp. 410–443 . Gerhard Univ . R.G.E. Costlow, R.N. Nester, E.W. Wood,W.A. Krieg, N. R. and Phillips , G.B. (eds) .American Society for Microbiology ,Washinton.

Smibert, R. and Krieg N. (1994) Phenotypic testing . In methods for general and molecules bacteriology. (eds P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W. and N. Krieg) American society for Microbiology, Washington. D.C.