MENOUFIA JOURNAL OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	Biochemical effects of some plant extracts on combating some common honeybee diseases in Menoufia governorate
Name of Applicant	**:**	Elham Abdelrahman Gomaa Basiouny
Scientific Degree	**:**	M.Sc.
Department	**:**	Biochemisty
Field of study	**:**	Agricultural Chemistry
Date of Conferment	**:**	Jun. 14, 2023

Supervision Committee:

- Dr. M. M. Abozid : Prof. of Biochemisty, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. A. A. A. Abdelaal: Prof. of Economic Entomology, Fac. of Agric., Menoufia Univ
- Dr. M. M. S. Asker : Prof. of Microbial Biotechnology, Fac. of Agric., Menoufia Univ

ABSTRACT: Bees play a vital role in pollinating different plants, which will greatly contribute to the development of plant wealth. They also produce honey, which is one of the most important natural foods that are characterized by many nutritional benefits, as well as many benefits to human health, strengthening immunity and resistance to many diseases. Therefore, diseases affecting bees represent major challenges in the field of agriculture in general and the field of bees particularly.

The AFB and EFB diseases are the most affecting disorders of bees and the most destructive to the hives. So that, searching for new ways to resist them is of a great interest at the Egyptian agricultural sector without resorting to antibiotics.

To suppress the activity of *P. larvae*, the causative agent of AFB, we applied four different experiments as follow:

1) Evaluation of the antioxidant activity of basil, thyme, lemongrass, and peppermint via *in vitro* studies
2) Estimation of the antimicrobial activity of the studied EOs
3) Field experiment
4) *In silico* analysis for the proteome of *P. larvae* to find potential drug targets.

To conclude, we ended with the following findings:

I. GC/MS analysis of tested EOs showed that the major
II. By analyzing the antioxidant activity of the studied EOs
III. The evaluation of the antimicrobial activity of tested EOs came out with the following points:
IV. Field experiment

The results of infection with different isolates showed that there were only two isolates which caused different pathological symptoms of bee brood in the hive, therefore we named them M1 and M2. To further deepen our knowledge about these two isolates, we performed molecular biology and field antimicrobial studies to have the following:

a. The partial sequence analysis of the 16S rRNA gene from the isolates showed that the bacterial isolate *P. larvae* X and P showed most closely relation with identity of 99.90% with both strains PL 35 and PL 324, while the identity was 99.66, 98.80, 98.79, 98.44, 98.40, 98.39, 98.36, 98.18% with PL strains 9, 87, 38, 12, 17, 96, 76, 34 respectively.

V. Usage of computational tools against *P. larvae*

A reverse vaccinology protocol has been executed on the *P. larvae* proteome (26603 proteins) to find potential drug targets to end with 3 probable candidates which can be described as essential, non-homologous, virulent factors, cytoplasmic or cytoplasmic membrane proteins.

Finally, we can say that the tested EOs (basil, thyme, peppermint and lemongrass) are promising agents against the *P. larvae* based on their antioxidant and antibacterial activities either at the laboratory or at the field. In the near future, we aim to screen the bioactive compounds libraries against the three probable drug targets at the *P. larvae* using molecular docking to tackle the damaging effects of this pathogen.

Key words: Essential Oils. Antioxidant activity, honeybees, American foulbrood, European foulbrood, Paenibacillus larvae. antibiotic resistance.

عنوان الرسالة: التأثيرات البيوكيميائية لبعض المستخلصات النباتية علي مكافحة بعض أمراض نحل العسل الشائعة بمحافظة المنوفية
اسم الباحث : الهام عبد الرحمن جمعه بسيوني
الدرجة العلمية: ماجستير فى العلوم الزراعية
القسم العلمى : الكيمياء الحيوية الزراعية
تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٣/٦/١٤
لجنة الإشراف: أ.د/ مدحت مصطفى ابوزيـــــــد أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة المنوفية
أ.د/ احمد عبدالقوى احمد عبدالعال استاذ الحشرات الاقتصادية – كلية الزراعة – جامعة المنوفية
أ.د/ .محسن سليم عسكـــــــــر استاذ التكنولوجيا الحيوية الميكروبية المركز القومى للبحوث

الملخص العربي

يلعب النحل دورًا مهماً في تلقيح العديد من النباتات المختلفة، مما يساهم بشكل كبير في تنمية الثروة النباتية. كما أنه ينتج عسل النحل والذي يعتبر من أهم الأطعمة الطبيعية التي تتميز بالعديد من الفوائد الغذائية، فضلاً عن العديد من الفوائد الصحية للإنسان وتقوية المناعة ومقاومة العديد من الأمراض. لذلك فإن الأمراض التي تصيب النحل تمثل تحديات كبيرة في مجال الزراعة بشكل عام وفي مجال النحل بشكل خاص.

تعتبر أمراض تعفن الحضنة الأمريكي والأوروبي من أكثر الأمراض التي تصيب النحل وتدمر خلاياه. لذلك فإن البحث عن طرق بيولوجية جديدة لمقاومة مثل هذه الأمراض له أهمية كبيرة في القطاع الزراعي المصري دون اللجوء إلى استخدام المضادات الحيوية. ولذلك فإن هدف هذه الدراسة لتثبيط نشاط بكتريا الـ *Paenibacillus larvae* العامل المسبب لمرض تعفن الحضنة الأمريكي تم عمل ما يلي:

١) تم اختيار أربع زيوت عطرية هي الزيوت العطرية لكلاً من الريحان، والزعتر، وحشيشة الليمون، والنعناع وعمل تحليل GC-MS لمعرفة أهم المكونات الكيميائية لهذه الزيوت

٢) تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت معملياً باستخدام طريقتي الـ FRAP والـ DPPH بعد تقدير المحتوي الكلي للمركبات الفينولية في هذه الزيوت العطرية كمكافئات لحامض الجاليك (µGAE/mg)

٣) تقييم النشاط المضاد للميكروبات لهذه الزيوت المستخدمة وتم ذلك عن طريق:

- عزل البكتيريا من الحضنة والتعرف عليها:
- دراسة تأثير الزيوت العطرية لكلاً من الريحان، والزعتر، وحشيشة الليمون، والنعناع على الـ ١٣ عزلة:

٤) التجربة الحقلية:

- أظهرت نتائج الإصابة بالعزلات المختلفة أن هناك عزلتين فقط تسببتا في اظهار نفس الأعراض المرضية المختلفة لحضنة النحل في الخلية وسميت بـ M_1 و M_2، وللتعرف أكثر علي هاتين العزلتين تم عمل تحليلات بيولوجية للجين S rRNA١٦ ودراسات حقلية كمضادات ميكروبية والتي من خلالها:

- أوضح تحليل التتابع الجزئي للجين S rRNA١٦ من العزلات أن العزلة البكتيرية ليرقات *Paenibacillus larvae X and P* أظهرت ارتباطًا وثيقًا بنسبة تماثل ٩٩,٩٠٪ مع كلا السلالتين PL ٣٥ و PL ٣٢٤، بينما كانت نسبة التماثل ٩٩,٦٦٪، ٩٨,٨٠٪، ٩٨,٧٩٪، ٩٨,٤٤٪، ٩٨,٤٠٪، ٩٨,٣٩٪، ٩٨,٣٦٪، ٩٨,١٨٪ مع سلالات الـPL رقم ٩ ، ٨٧ ، ٣٨ ، ١٢ ، ١٧ ، ٩٦ ، ٧٦ ، ٣٤ على التوالي.

٥) التعرف على المستقبلات العلاجية الحديثة للمسبب الرئيسي لمرض تعفن الحضنة الامريكي لنحل العسل

- تم تنفيذ بروتوكول لقاح عكسي على بروتين *P. larvae*. بروتينات اليرقات (٢٦٦٠٣ بروتين) للعثور على أهداف دوائية محتملة تنتهي بثلاثة مرشحين محتملين يمكن وصفهم على أنهم عوامل أساسية ، غير متماثلة ، خبيثة ، بروتينات غشاء هيولي أو حشوي..

أخيرًا يمكننا القول أن الزيوت العطريه المختبرة (الريحان والزعتر والنعناع وحشيشة الليمون) هي عوامل واعدة ضد *P. larvae*. في المستقبل القريب، نهدف إلى فحص مكتبات المركبات النشطة بيولوجيًا مقابل الأهداف الثلاثة المحتملة لهذه المضادات الميكروبية في *P. larvae* باستخدام الالتحام الجزيئي لمعالجة الآثار الضارة لهذا العامل الممرض.