

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus thuringiensis* من الترب العراقية واستخدامها ضد يرقات حشرة
عث التين *(Welker) Ephestia cautella*
Isolation and Identification of Bacterium *Bacillus thuringiensis* from Iraqi Soil and
It's Uses against Larvae of *Ephestia cautella* (Welker)

خلود عبد الاله محمد الخفاجي سميرة عودة خليوي* خميس حبيب مطلق صفاء عبد الرحيم محمود

صابرين عبد الهادي صالح

مركز التقانات الغذائية والاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا

*مركز مكافحة المتكاملة للآفات/ دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا

Khlood Abid-Alelah Alkhafaji

Samera Oda Khleoy*

Khamis H.M.

Safaa AbidAlrahem M.

Sabreen AbidAlhadi S.

Food and Biotechnology Center/ Agricultural Research Center/Ministry of Science and Technology

Agricultural Research Center/Ministry of Science and Technology*

Email: khloodalkhafaji@yahoo.com

الملخص

تعد حشرة عثة التين *(Welker) Ephestia cautella* احدى اهم الحشرات المخزنية التي تصيب يرقاتها التمور المخزونة لذا هدف البحث الى عزل بكتريا *Bacillus thuringiensis* من الترب المحلية وتشخيصها وغرلة العزلات ذات الكفاءة في المقاومة الاحيائية من يرقات حشرة عثة التين. عزلت 20 عذلة تعود الى جنس *Bacillus* من يرقات حشرة عثة التين المعاملة بعقاقير سبورات التربة وشخصت 8 عزلات بانها تعود لبكتريا *B. thuringiensis*. وقد تبين انها منتجة لانزيمات البروتيز والملاييز والجلاتينيز والهيموليسين وتتميز بقابليتها على تكوين الاغشية الحيوية وان 7 من العزلات المحلية تقاوم المضاد الحيوي البنسلين وظهرت عذلة واحدة مقاومة المضاد الحيوي الكلورامفينيكول وظهرت بقية العزلات حساسية تجاه الكلورامفينيكول والتتراسايكلين والناديكسيك اسيد والايونوكسين. بينت غرلة عزلات *B. thuringiensis* تفاوتت في نسب قتل يرقات حشرة عثة التين حيث اعطت العذلة المحلية *B. thuringiensis* KS3 نسبة قتل تصل الى 80 % من يرقات الحشرة مع اسودادها نتيجة فعالية السم البكتيري. وتبين ان التركيز القاتل النصفى هو 3.7 ملغم مل⁻¹ مقارنة مع 4.6 ملغم مل⁻¹ للعذلة التجارية كما اوضح نمط الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS نمطا من البروتينات مشابه لنمط بروتينات العذلة التجارية.

الكلمات مفتاحية: *Bacillus thuringiensis* ، مكافحة الاحيائية ، تشخيص ، عث التين .

Abstract

The fig moth *Ephestia cautella*(Welker) is one of the most insect that cause damage to the stored date, the aim of this research is to isolate *Bacillus thuringiensis* from Iraqi soil, screening of the most efficient biological control isolate against *Ephestia cautella* larvae. Twenty out isolates belong to *Bacillus spp.*, from pretreatment larvae of *E. cautella* by suspension of soil samples, 8 out of isolates identified as *B. thuringiensis* these 8 isolates appeared to be hydrolytic enzymes (protease, lipase, gelatinase and hemolysin) able to form biofilm. Seven isolates showed penicillin resistant and only one isolate was resisted chloramphenicol while all remaining isolates were sensitive for tetracycline, nalidexic acid and enoxane. Different range of their insecticidal percentage was found against larvae of *E. cantella* with appearance of darkening of their body. *B. thuringiensis* KS3 was the most efficient caused 80% killing, gave 3.7 mg ml⁻¹ of LC50 comparing with 4.6 mg ml⁻¹ for commercial *B. thuringiensis* kurstaki. SDS PAGE electrophoresis showed similar pattern of protein with the commercial strain.

Key word: *Bacillus thuringiensis*, biological control, identification, fig moth.

المقدمة

يعد استخدام المبيدات الحشرية الكيميائية احد اهم الاستراتيجيات في مكافحة الحشرات وزيادة انتاج المحاصيل الزراعية وتسبب هذه المبيدات بعض المشاكل منها تلوث التربة ومصادر المياه والمحاصيل نفسها ببقايا المبيدات مما يؤثر على التوازن البيئي الطبيعي في الحقول المعاملة اضافة الى التأثير السام والمطر لاغلب هذه المبيدات لذا لجأ العديد من الباحثين الى البحث عن مبيدات حشرية صديقة للبيئة وتطويرها لاستخدامها في مجال مكافحة الاحيائية [1]. ومن اهم الاحياء المجهرية المستخدمة في مجال مكافحة الاحيائية هي بكتريا *Bacillus thuringiensis* احد الانواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام والمكونة للسبورات الداخلية اضافة لانتاجها الى اجسام خارج سبورية parasporal inclusion والتي تتكون من بروتينات بلورية ذات اشكال مختلفة وتسمى بروتين كراي cry protein والذي يكون على انواع منها سموم دلنا الداخلية delta endotoxin ذي السمية العالية لاغلب يرقات حشرات رتبة حرشفية الاجنحة (Lepidoptera) ورتبة غمدية الاجنحة (Coleoptera) ورتبة ثنائية الاجنحة (Diptera) وبعض اللاقريات وعدم تأثيره على الحيوانات الحقلية والانسان [2، 3] مما اهل تلك البكتريا لاستخدامها في مجال انتاج وتطوير مبيدات للمكافحة الاحيائية ويسعى العاملون

في مجال مكافحة الاحيائية وبصورة مستمرة الى عزل عثر جديدة للنوع *B. thuringiensis* (B.t) وتحديد انواع السموم المنتجة لمعرفة مجموعة الحشرات الحساسة لعمل تلك السموم وتكون بكتريا *Bt* احد انجح المبيدات الاحيائية الحشرية حيث ان 95% من مبيعات المبيدات الاحيائية ذات الاصل الميكروبي تعود الى هذه البكتريا وبمبالغ تصل الى 100 مليون دولار [4,5]. تنتشر سبورات هذه البكتريا في التربة بصورة طبيعية وكذلك في المياه وسطوح النباتات والحشرات المصابة بها ومخلفات الحيوانات وقد تحتوي كل بيئة من بيئات العزل على عثر ذات صفات تختلف عن صفات عثر البكتريا الاخرى من حيث السموم المنتجة [6]. وقد تمكن الباحثين من عزل سبورات هذه البكتريا من مصادرها المختلفة باستخدام اوساط زرع انتخائية حيث استعمل [7] وسط الاسيتات في عزله لهذه البكتريا ومن الامور المهمة اضافة للحصول على العزلات الجديدة هو انتاجها لسموم حشرية جديدة لتوسيع اهداف المكافحة ولتلافي المقاومة المستحثة لدى الحشرات [6]. يهدف البحث الحالي الى عزل سبورات بكتريا *B. thuringiensis* من التربة العراقية وتطوير طريقة جديدة ذات فعالية بايولوجية ضد يرقات حشرة *E. cautella* (welker) وتقييم كفاءة هذه العزلات فيما بينها ومقارنة كفاءتها في انتاج السموم مقارنة مع العزلة التجارية *B. thuringiensis kurstaki*.

المواد وطرائق العمل

نماذج التربة

جمعت 24 نموذج تربة لحقول محاصيل الخضر المختلفة ومن عمق 5- 10 سنتيمتر من سطح التربة خلال شهر تشرين الاول لعام 2012 من مناطق مختلفة لمحافظة بغداد وكربلاء والموصل والبصرة وبواقع 7 و 9 و 4 و 4 نماذج على التوالي لكل محافظة ووضعت النماذج في اكياس بلاستيكية وحفظت في المختبر.

تغذية يرقات حشرة *Ephestia cautella* (welker)

حصل على يرقات حشرة عث التمر *Ephestia cautella* (welker) من مختبرات قسم المكافحة الاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية في وزارة العلوم والتكنولوجيا وغذيت اليرقات على وسط (81% جريش و 12% كليسيرين و 6% دبس و 1% خميرة) ونميت بدرجة حرارة 25°س. تم وزن 20 غرام من وسط التغذية ووضع في طبق بتري بلاستيكي ذي قطر 7 سم واستخدمت 20 يرقة في بداية طورها الثاني لكل طبق.

عزل بكتريا *B. thuringiensis*

حضن معلق التربة بوزن 10 غرامات من كل نموذج وعلق في 100 مل ماء مقطر معقم ومزج لمدة ساعتين بواسطة الحاضنة الهزازة وبدرجة حرارة 20°س. تمت معاملة العالق حراريا بدرجة 80°س لمدة 30 دقيقة لقتل الخلايا البكتيرية الخضرية وتنشيط سبورات بكتريا *Bacillus* [8].

أضيف 5 مل من المعلق المحضر الى 20 غرام وسط تغذية الحشرة ومزج الوسط جيدا للتجانس ثم اضيفت 20 يرقة في الطور الثاني الى سطح الطبق المعامل وحضنت بدرجة 25°س ولمدة 72 ساعة. حسبت اليرقات الميتة والحية في كل نموذج بعد 72 ساعة وجمعت اليرقات الميتة من كل معاملة لعزل سبورات بكتريا *B. thuringiensis* منها.

علقت الحشرات الميتة بواسطة وسط لوريا برتاني السائل (Lauria Bertani broth) ذي الاس الهيدروجيني 6.8 (ا) من تربتون و 0.5 % من مستخلص الخميرة و 1% من ملح الطعام النقي [9]. وحضنت الاوساط بدرجة 30°س ولمدة 48 ساعة و تمت معاملة المزارع البكتيرية بدرجة حرارة 80°س لمدة نصف ساعة لقتل الخلايا الخضرية وتنشيط السبورات. اخذت قطرة من المعلق البكتيري وخططت على سطح وسط لوريا برتاني الصلب للحصول على مستعمرات مفردة ومعزولة عن بعضها البعض. تم تسجيل اشكال واحجام المستعمرات وقورنت مع مزروع العزلة التجارية *B. thuringiensis kurstaki* (Rajan, India) وتم التقطت المستعمرات ذات الشكل القريب من العزلة التجارية وزرعت لغرض اكثارها.

تشخيص البكتريا

اعتمد الفحص المجهرى لشرائح مصبوعة بصبغة غرام لتحديد وجود السبورات وشكلها وموقعها في الخلية الام ووجود الاجسام خارج السبورية ومقارنتها مع العزلة التجارية. شخصت العزلات باعتماد بعض الفحوصات الفسلجية والزرعية استنادا على كتب التشخيص [10]. وقد شملت الفحوصات انتاج انزيمات الكاتاليز والاكسيداز والهيموليسين والاميليز والبروتيز والجلاتينيز واللايباز وفحص حركة البكتريا ونموها بتركيز مختلف من ملح الطعام والنمو بدرجات حرارة مختلفة.

تكوين الاغشية الحيوية لعزلات بكتريا *B. thuringiensis* المحلية

اعتمدت طريقتين مختلفتين في التحري عن تكوين الاغشية الحيوية، وكما هو موصوف من قبل [12,11,13] حيث حضر وسط نقيع القلب والدماغ المدعم بوساطة 1% سكروز ووزع في انابيب وبواقع 5 مل لكل انبوب، عقم الانابيب وبردت ولقحت بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 30°س لمدة 72 ساعة، تمت متابعة تكوين كتلة طافية من الخلايا على سطح المزروع البكتيري وهي دلالة على تكون الاغشية الحيوية البكتيرية وسجلت النتائج بانها موجبة او سالبة. واعتمدت الطريقة الثانية اضافة صبغة احمر الكونغو (0.8%) بعد تعقيمها بالفلتر الى وسط نقيع القلب والدماغ الصلب والمدعم بسكر السكروز وتركيز 1%، لقحت الاطباق بالبكتريا وحضنت بدرجة 30°س ولمدة 72 ساعة يعد تكون اللون الاسود البلوري على النمو البكتيري دلالة على تكون الاغشية الحيوية بينما يعد تلون النمو البكتيري بلون احمر دلالة على تكون اغشية مخاطية slime formation.

فحص مقاومة المضادات الحيوية

اعتمدت طريقة التناذر بالاكار باستخدام اقراص المضادات الحيوية ذات التراكيز الاتية (مكغم دسك¹): البنسلين (10) وتيتراسايكلين (30) وكلورامفينيكول (30) ونالديكسيك (30) ونياسين (30). زرعت العزلات البكتيرية على سطح وسط اكار مولير هنتون (Mueller Hinton agar) وحضنت الاطباق بدرجة 30°س لمدة 18 ساعة وقيست اقطار الهالات المتكونة حول النمو البكتيري لتسجل النتائج بانها مقاومة او حساسة.

فحص السمية وتكوين السبورات

زرعت العزلات البكتيرية على وسط لوريا برتاني وبدرجة حرارة 30س ولمدة 72 ساعة وباستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة دقيقة-التكوين السبورات وتحلل الخلايا الخضرية ثم نبذ 10 مل من المزروع البكتيري بسرعة 9700 دورة دقيقة-1 وعلق راسب مزيج السبورات البلورات-1 بواسطة الماء المقطر واضيف 3 مل من هذا المعلق كجرعة موحدة مفردة الى وسط تغذية الحشرات ومزج الوسط جيدا للجانسن ثم وضعت 20 يرقة في طورها الثاني على سطح الوسط وحضنت الاطباق لمدة 72 ساعة وحسبت اليرقات الميتة والحية وقورنت النتائج مع العزلة التجارية للمفاضلة بينها.

تركيز البروتين البلوري السام

قدر تركيز بروتين السم القاتل في مزروع البكتريا بعمر 72 ساعة من خلال النبذ المركزي بسرعة 4000 دورة دقيقة-1 للمزروع البكتيري ولمدة 10 دقائق وبظروف مبردة وذلك للتخلص من السبورات البكتيرية وكما جاء في [14]، اخذ رائق المزروع البكتيري ونبذ مركزيا بسرعة 10000 دورة دقيقة-1 ولمدة 10 دقائق، واذيب راسب بروتين البلورات الناتج في قعر الانبوب بواسطة محلول قاعدي NaOH ذي التركيز 0.5 نورمالي لاذابة البلورات السمية. اعتمد جهاز (Thermoscientific, nanodrop2000) في تقدير تركيز البروتين بعد التصفير على محلول القاعدة السابق. اختبرت العزلة *B. thuringiensis* KS3 بعد تقدير سمية العزلات البكتيرية وتركيز السم البلوري.

حساب التركيز القاتل ل 50% من اليرقات (LC50%)

تم اعتماد Fedrici وجماعته [5] في تحديد التركيز القاتل لعدد 50% من يرقات حشرة *E. cautella* مع اجراء بعض التحوير. حيث حضرت سلسلة تخافيف نصفية لمعلق مزيج السبورات/ البلورات للعزلة *B. thuringiensis* KS3 حيث احتوت التخافيف على التراكيز التالية 2 و 4 و 6 و 8 ملغم مل-1 من البروتين واضافتها الى 5 غرام وسط تربية ذي 20 يرقة طور ثاني ولثلاث مكررات لكل تركيز وحسبت اعداد اليرقات الميتة والحية بعد 72 ساعة وقورنت مع قتل تراكيز العزلة التجارية.

الترحيل الكهربائي لبروتين بلورات السم

درس نمط بروتين البلورات السمية باعتماد الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد ذي التركيز 10% وبظروف ماسخة للبروتين بوجود SDS باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي وبفولتية ثابتة 12 فولت سم-1 عند بداية الترحيل ثم 9 فولت سم-1 ثابتة حتى نهاية الترحيل الكهربائي، تم نزع الهلام من مكانه وتصبيغه بواسطة صبغة Coomassie brilliant blue R 250 وتمت ازالة الصبغة الزائدة من الهلام باستعمال محاليل ازالة الصبغة، وقد تمت مقارنة قطع البروتين الواضحة على الهلام للعزلة المحلية *B. thuringiensis* KS3 مع العزلة القياسية التجارية [6، 15].

التحليل الاحصائي

اجريت التجارب جميعها بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة واستخدم التحليل الاحصائي المنفرد ANOVA تحت مستوى نوعية 95% واعتمد اختبار LSD تحت مستوى نوعية 0.05 والانحراف المعياري SD لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية.

النتائج والمناقشة

بينت نتائج العزل الاولي لسبورات *B. thuringiensis* تواجدها في عدد من نماذج التربة المفحوصة وبكثافة متفاوتة حيث ادت المعاملة بمعلقات ثلاث ترب قتل 6 يرقات واعطا نموذجين قتل 5 يرقات بينما ادت اربع نماذج الى قتل يرقة مفردة واحدة وكان عدد اليرقات الميتة صفرا في ثلاثة نماذج تربة ويوضح جدول (1) مواقع نماذج التربة المفحوصة ونوعها وعدد اليرقات الحية والميتة في محاولة العزل الاولية لبكتريا *B. thuringiensis*.

جدول(1): العزل الاولي لبكتريا *B. thuringiensis* من نماذج ترب عراقية باستعمال الفحص الحيوي ليرقات حشرة *E. cautella*

المحافظة	عدد النماذج	رقم نموذج التربية	عدد يرقات الحشرة الميتة/ الحية
بغداد	7	2	19/1
		3	16/4
		4	17/3
		5	14/6
		8	14/6
		9	19/1
		20	17/3
		11	18/2
		12	15/5
		13	16/4
		14	16/4
		15	19/1
		16	17/3
		17	17/3
		18	17/3
		19	20/0
		1	19/1
		6	15/5
		7	17/3
		10	17/3
		16A	20/0
		16B	14/6
		16C	20/0
		16D	18/2
كربلاء	9		
موصل	4		
البصرة	4		

جمعت اليرقات المقتولة في كل نموذج وعلقت بوساطة وسط لوريا برتاني السائل وحضنت بدرجة 30°س لاحتواء هذه اليرقات على السبورات البكتيرية واعطى تخطيط المزروع البكتيري على وسط المرق المغذي الصلب ظهور شكلين او ثلاث اشكال من المستعمرات البكتيرية. امكن عزل 20 مستعمرة مفردة ذات لون ابيض او ابيض مصفر وحافات ملساء و سطح املس مرتفع قليلا عن سطح الاكار وهي ذات شكل مشابه او قريب من شكل مستعمرات العزلة التجارية *B. thuringiensis kurstaki* شكل (1).



شكل(1): شكل مستعمرات عزلة *B. thuringiensis* المحلية على وسط اكار المرق المغذي
أ= العزلة التجارية *B. thuringiensis kurstaki*، ب= العزلة المحلية *B. thuringiensis KS3*

تنتشر سبورات بكتريا الجنس *Bacillus* ومن بينها افراد النوع *B. thuringiensis* بصورة كبيرة في مختلف انواع الترب والعديد من البيئات الاخرى وذلك لمقاومتها للظروف البيئية المختلفة وقد امتازت الطريقة الحالية في عزل العثر الجديدة من بكتريا *B. thuringiensis* في انها تعتمد الفعالية الحيوية للعثر المعزولة ضد يرقات حشرة *E. cautella* وقابليتها على انتاج البروتينات السامة وهذا قد ادى الى تقليل عدد النماذج المستخدمة في العزلات اضافة للفعالية الحيوية للعزلات الجديدة حيث وجد ان بعض عزلات *B. thuringiensis* المعزولة من التربة تكون خالية من الفعالية الحيوية، كما ان الطريقة الحالية لا تحتاج الى مواد كيميائية كثيرة او اوساط زرعية متعددة كما هو الحال في الطرق المتبعة في عزل بكتريا *B. thuringiensis*. وقد تشابهت هذه الدراسة مع [8،16] في عزلها لعثر جديدة من *B. thuringiensis* من الترب السورية والمصرية على التوالي.

بين فحص تحليل الدم (انتاج الهيموليسين) ان 13 عزلة فقط هي محللة للدم وتمثل نسبة 65% من العزلات المنتخبة وان 7 عزلات غير محللة بنسبة 35%. واطهر فحص تحليل النشاء (انتاج انزيم الاميليز) وجود 11 عزلة محللة للنشاء من اصل 13 عزلة وان عزلتين فقط هي غير محللة قد تعود الى النوع *B. sphaericus* وهي تمثل 15.3% من العزلات المحللة للدم. بعد فحص تحليل الدم من الفحوصات الاولى الاساسية للانتخاب ولتشخيص *B. thuringiensis* الحالة للدم عن مثيلاتها والقريبة منها غير المحللة والتي تعود الى النوع *B. cereus* حيث تشمل مجموعة بكتريا *B. cereus* على ثلاثة انواع بكتيرية يمكن تفريق نوع عن الاخر بوساطة انتاج الهيموليسين. ويعد فحص انتاج الاميليز فحصا تفريقيا للنوع *B. thuringiensis* المنتج للانزيم عن النوع *B. sphaericus* غير المنتج للاميليز. اكدت اختبارات الكيمياء الحيوية والفحوصات المظهرية لاشكال الخلايا وموقع سبوراتها ونتاجها للجسام البلورية ان 8 عزلات فقط هي تعود للنوع *B. thuringiensis* وهي تمثل 61.5% من العزلات المحللة للدم ويوضح جدول (2) الفحوص الخاصة بتشخيص *B. thuringiensis*.

جدول(2): الفحوص التشخيصية المعتمدة في تشخيص عزلات *B. thuringiensis* المعزولة من التربة المحلية

الصفة التشخيصية العزلات	نتائج الاختبار							
	Bt kursta	KS3	KS16	KS16f	KS14	KS9	KS1	KS6
شكل الخلايا	+	+	+	+	+	+	+	+
وجود السبور	+	+	+	+	+	+	+	+
شكل السبور وموقعه	ب	ب	ب	ب	ب	ب	ب	ب
تكوين الاجسام خارج سبورية	+	+	+	+	+	+	+	+
الكاتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+
الاوكسيديز	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الدم	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الجلوتين	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الكازاين	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الدهون	+	-	+	-	+	+	+	+
تحلل النشاء	+	+	+	+	+	+	+	+
الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+
3% ملح طعام	+	+	+	+	+	+	+	+
5% ملح طعام	+	+	+	+	+	+	+	+
7% ملح طعام	+	+	+	+	+	+	+	+
10% ملح طعام	-	-	-	-	-	-	-	-

أ= عصوي، ب= اسطواني / طرفي

يلاحظ من الجدول السابق عزل بعض العترة ذات القابلية على انتاج انزيمات محللة في وقت واحد منها العزلة KS3 والعزلة KS14 و KS6 و KS12 حيث انتجت كل من انزيم البروتيز واللايباز والجلاتيناز والاميليز بالاضافة للهيمولايسين ويعطي انتاج هذه الانزيمات البكتريا قابلية تغذوية كبيرة تمكنها من استغلال مختلف المخلفات النباتية والحيوانية في سبيل تحليلها واستخدامها كمصادر للطاقة والنمو وزيادة احتمال بقائها وديمومتها في البيئات المختلفة. كما قد تعمل هذه الانزيمات المحللة على زيادة ضراوة هذه العزلات في قتل اليرقات الحساسة لها اضافة لانتاجها البلورات السمية. كما لوحظ ان 7 عزلات لبكتريا *B. thuringiensis* المحلية قد عزلت من تربة زراعية مختلفة لمحافظة بغداد (3 عزلات) و كربلاء (2 عزلة) وموصل (عزلة) والبصرة (عزلة) وان عزلة واحدة *B. thuringiensis* KS9 من تربة غير زراعية كما امتازت نماذج التربة في انها جمعت من مزارع عامة بعيدة عن استعمال المبيدات الحشرية الاحيائية حيث ليس هناك تاريخ لهذه المناطق في استعمالها لمبيدات احيائية تجارية وهذا قد يعطي دلالة على ان عزلات *B. thuringiensis* هي نبيت طبيعي للتربة العراقية وهذا يتوافق مع [17] الذي وجد ان 60% من عزلات *B. thuringiensis* معزولة من تربة زراعية لمنطقة الجاوم (السعودية).

اوضحت نتائج التحري عن قابلية عزلات *B. thuringiensis* لتكوين الاغشية الحيوية النضور تكتل طافي من الخلايا على شكل غشاء في اعلى انبوبة المزرعة البكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ المدعم بالسكر وز هذا دليل تكون الاغشية الحيوية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام، كما لوحظ تلون سطح المزروع البكتيري باللون الاسود وظهور لون احمر للعزلات البكتيرية دلالة على تكون الاغشية المخاطية وكما هو واضح في شكل (2). يختلف شكل تكون الاغشية الحيوية في الاوساط السائلة لمزارع بكتريا *B. thuringiensis* عن مثيلاته من البكتريا الموجبة لصبغة كرام حيث اشار [12] الى ظهور المزروع البكتيري بشكل حبيبات متجمعة بينما اوضح [11] ظهور المزروع بشكل طبقة ملتصقة على اسطح الزجاج بعد تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus*.



شكل(2): التحري عن تكوين الاغشية الحيوية لبكتريا *B. thuringiensis* المعزولة محليا وباستخدام وسط احمر الكونغو
أ = غير مكونة للاغشية الحيوية، ب = مكونة للاغشية الحيوية

يعد تشكيل البكتريا للاغشية الحيوية صفة بيئية مهمة للمساعدة على ديمومتها في البيئات المختلفة حيث تتحول البكتريا المفردة الى شكل متجمع على شكل طبقات تقيها من العوامل الخارجية وأشار [18] الى مساهمة الاغشية الحيوية في نجاح عملية التضاد البكتيري للاحياء المجهرية الاخرى مما يؤهلها في تطبيقات مكافحة الاحيائية البديلة عن استخدام المواد الكيميائية.

بين اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ظهور مقاومة من قبل سبع عزلات من العزلات البكتيرية لمضاد البنسلين ومقاومة عزلة واحدة لمضاد الكلورامفينيكول وحساسية كبيرة للمضادات الحيوية التتراسايكلين والكلورامفينيكول والناديكسك وايونكسان وظهر التحليل الاحصائي عزلات لبكتريا *B. thuringiensis* مقاومة لمضادات البنسلين والامبسلين وحساسيتها للعديد من مضادات الحياة الاخرى. ويوضح شكل (3) ظهور حالة شفافة خالية من النمو البكتيري حول قرص المضاد الحيوي كما ويعطي جدول (3) اقطار الهالات المتكونة حول قرص المضاد الحيوي.



شكل(3): فحص الحساسية للمضادات الحيوية

جدول (3): اقطار النمو لفحص الحساسية لعزلات *B. thuringiensis* المعزولة من التربة العراقية باستخدام اقراص المضادات الحيوية

اقراص المضاد الحيوي					العزلات البكتيرية
معدل قطر الهالة (مم) $\pm$ SD					
بنسلين	تتراسايكلين	كلورام فينكول	نالديكسك	انوكسان	
0 $\pm$ 0	0.68 $\pm$ 15	1.73 $\pm$ 15	0.571 $\pm$ 25	2.30 $\pm$ 30	KS3
1.2 $\pm$ 12	1.732 $\pm$ 31	2.309 $\pm$ 20	2.30 $\pm$ 20	2.40 $\pm$ 30	KS6
0 $\pm$ 0	2.31 $\pm$ 32	1.70 $\pm$ 27	2.90 $\pm$ 25	0.57 $\pm$ 35	KS12
0 $\pm$ 0	0.61 $\pm$ 31	0.58 $\pm$ 25	1.74 $\pm$ 31	1.15 $\pm$ 30	KS9
0 $\pm$ 0	2.88 $\pm$ 27	1.80 $\pm$ 27	2.30 $\pm$ 32	2.30 $\pm$ 30	KS14
0 $\pm$ 0	2.01 $\pm$ 12	0 $\pm$ 0	1.15 $\pm$ 22	0.58 $\pm$ 28	KS16B2
0 $\pm$ 0	0.58 $\pm$ 14	0.58 $\pm$ 25	3.46 $\pm$ 20	1.16 $\pm$ 30	KS16
0 $\pm$ 0	1.15 $\pm$ 12	1.15 $\pm$ 22	1.15 $\pm$ 30	1.15 $\pm$ 30	KS5
0 $\pm$ 0	2.3 $\pm$ 20	1.83 $\pm$ 30	2.905 $\pm$ 29	1.15 $\pm$ 30	Bt kurstaki
1.154	4.749	1.957	4.240	4.279	%0.05 تحت LSD

اظهر فحص السمية لجرعة واحدة من خليط السبورات البلورات¹ ان هناك تفاوتاً في القابلية السمية للعزلات المشخصة حيث اعطت العزلة *B. thuringiensis* KS3 اعلى نسبة قتل لليرقات وصلت الى 80% والتي اختلفت معنوياً عن العزلات المحلية جميعها اضافة الى العزلة التجارية كما لوحظ من جدول (4) ان نسبة القتل التي حققتها كل من العزلة KS14 والعزلة KS6 بلغت 55% و45% على التوالي مع عدم وجود فرق معنوي بينهما وقد اختلفت العزلتين معنوياً مع باقي عزلات الدراسة. في حين حققت العزلتين KS5 و KS9 اقل نسبة قتل وصلت الى 25% ولم تختلف معنوياً مع العزلات KS12 و KS16 و 16B2 والعزلة التجارية وفي هذا الصدد اشار [20] الى ان فعالية قتل يرقات الحشرات تعود بصورة رئيسية لوجود البلورات السامة بينما اوضح [21] لوجود فعل تآزري بين بلورات السم والسبورات ممثلة بالاغلفة السبوربية السامة في نجاح العزلات البكتيرية في مجال مكافحة الاحيائية.

جدول(4): فحص السمية لعزلات محلية من *B. thuringiensis* معزولة من التربة العراقية ومقارنتها مع العزلة التجارية *B. thuringiensis*

العزلة	النسبة المئوية لقتل اليرقات %	عدد السبورات مل ⁻¹	تركيز البروتين ملغم مل ⁻¹	<i>B. thuringiensis</i> . kurstaki
العزلة التجارية <i>Bt kurstaki</i>	30	⁷ 10×3	1.21	
<i>Bt KS3</i>	80	⁵ 10×3	0.925	
<i>Bt KS14</i>	55	⁵ 10×1	1.424	
<i>Bt KS6</i>	45	⁵ 10×3	1.271	
<i>Bt KS16</i>	30 ^أ	⁶ 10×2	1.271	
<i>Bt KS16B2</i>	30 ^{أب}	⁵ 10×3	0.952	
<i>Bt KS9</i>	25 ^{أب}	⁶ 10×6	0.845	
<i>Bt KS12</i>	30 ^{أب}	⁷ 10×6	1.833	
<i>Bt KS5</i>	25 ^{أب}	⁶ 10×2	1.008	

LSD تحت 0.05% = 6.9

أ = وجود فرق معنوي، أب = عدم وجود فرق معنوي

• تمت المقارنة اعتماداً على نسبة القتل للعزلة التجارية %

وقد لوحظ اسوداد يرقات الحشرات المقتولة مع ميل جسم اليرقة الى التحلل مقارنة مع يرقات ميتة بصورة طبيعية وهذه صفة مميزة لفعالية سموم دلتا المنتجة من قبل بكتريا *B. thuringiensis* شكل (4). تعتمد كفاءة عزل عتري جديدة من *B. thuringiensis* على عدد من العوامل منها كثافة تواجد البكتريا في التربة وانواع يرقات الحشرات الموجودة في محيط العينة المأخوذة وانواع المزروعات في منطقة العينة بالإضافة لتأثير بعض العوامل البيئية الأخرى مثل عمق العينة ودرجة الحرارة في فترة اخذ العينة ونسجة التربة ووجود الاوكسجين والرطوبة وتوافر المواد المغذية في التربة.

شكل(4) يرقات حشرة *E. cautella* معاملة بمزروع بكتريا *B. thuringiensis* KS3

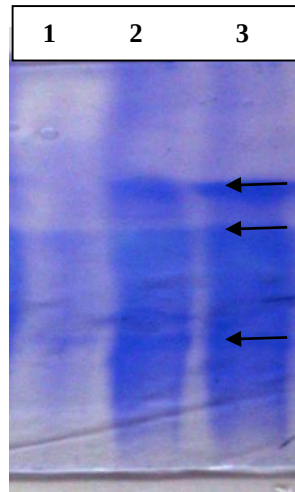
أ = يرقات معاملة بمزروع العزلة KS3، ب = يرقات السيطرة (ميتة بصورة طبيعية)

سجل قياس التركيز القاتل النصف مئوي LC50 للعزلة المحلية *B. thuringiensis* KS3. انخفض وصل الى 3.7 ملغم مل⁻¹ مقارنة مع التركيز 4.6 ملغم مل⁻¹ للعزلة التجارية *B. thuringiensis* kurstaki وكما هو موضح في جدول (5).

جدول(5): الجرعة القاتلة النصفية لعزلة *B. thuringiensis* KS3 ضد يرقات حشرة *E. cautella*

العزلة	LC50	Chi square(x2)	df
<i>B. thuringiensis</i> KS3	3.7	2.7	10
<i>B. thuringiensis</i> kurstaki	4.6	11.9	10

اظهر الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بظروف ماسخة للبروتين احتواء العزلة المحلية على نمط بروتينات مشابه للعزلة التجارية حيث تم تمييز اثنان من البروتينات كبيرة الحجم وبروتين اخر صغير الحجم وكما هو واضح في شكل (5). تنتج بكتريا *Bt* بعترها المختلفة العديد من البروتينات المختلفة الوزن الجزيئي والتي تكون السم البلوري والمسؤولة عن حصول التسمم وموت يرقات الحشرة فقد اشار [22] الى اعتماد تشخيص بروتينات كراي cry protein على اساس الوزن الجزيئي والذي يتراوح بين 65-274 كيلو دالتون وتتراوح اوزان cyt protein بين 21-25 كيلو دالتون.



شكل (5): نمط البروتين لمستخلص السم البلوري للعزلة المحلية *B. thuringiensis* KS3 (الترجيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل اميد بتركيز 10% وبظروف ماسخة للبروتين) 1= بروتينات قياسية، 2= مستخلص العزلة التجارية، 3= مستخلص العزلة المحلية

نستنتج مما تقدم امكانية تطبيق طريقة عزل عثر جديدة من بكتريا *B. thuringiensis* ذات فعالية بايولوجية باستخدام يرقات الحشرة المستهدفة في مكافحة البايولوجية، على الرغم من تشابه العزلة المحلية *B. thuringiensis* SK3 مع العزلة التجارية *B. thuringiensis* kurstaki لانها اظهرت فعالية حيوية اكبر من فعالية العزلة التجارية ضد يرقات حشرة عثة التين والتي كثيرا ما تصيب التمور المخزونة وقد تسبب اصابات للتمور وهي على النخيل في مواسمها.

References

1. Glazer, A. N. and Nikaido, H. (1995). Microbial insecticides, In: Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology, (W.H. Freeman and Company, New York), pp: 209-229.
2. Bravo, A., Gill, S. S. and Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
3. Palma, L., Hernández-Rodríguez, C. S., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., de Escudero, I. R., Escriche, B., Muñoz, D., Van Rie, J., Ferré, J. and Caballero, P. (2012). Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 78:7163-7165
4. Kaur, S. (2002). Potential for developing novel *Bacillus thuringiensis* strains and transgenic crops and their implications for Indian agriculture. *Agr Biotech Net* 4: 1-10.
5. Federici, B. A., Park, H. W. and Sakano, Y. (2006). Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. In: Inclusions in Prokaryotes (Ed. JM Shively), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 195-235.
6. Mendoza, G., Portillo, A., Arias, E., Ribas, R. M. and Olmos, J. (2012). New combination of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *Int. Microbio.* 15:209-216.
7. Travers, R. S., Martin, P. A. W. and Reichelderfer, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* species. *Appl Environ Microb.* 53: 1263-1266.
8. Hassan, A., Muhanad, H., Idris, E. and Hayat, M. (2011). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. *Turk J. Agric. For* 35: 421-431.
9. Devidas, P.C., Pandit, B. H. and Vitthalrao, P. S. (2014). Evaluation of different culture media for improvement in Bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against Larvae of *Aedes aegypti*. *The Scientific World Journal*. 2014: 1-6.
10. Claus, D. and Berkeley, R. C. (1986). Genus *Bacillus* in Bergeys manual of systematic bacteriology. (2): pp.1104- 1139. Ed. P.H.A. Sneath, Mair, N. S.; Sharpe, M.E. and Holt, J. G. Baltimore: Williams and Wilkins.
11. Bose, S., Khodke, M., Basak, S. and Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm production staphylococci: Need of the Hour. *J. Clin. Diagn. Res.* 3:1915- 1920.
12. Houry, R., Briandet, S. A. and Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiol.* 156: 1009-1018.
13. Gundogan, N. and Ataol, O. (2013). Biofilm, protease and lipase properties and antibiotic resistance profiles of Staphylococci isolated from various foods. *African J. of Microbiol.* 7(28): 3582-3588.
14. Somerville, H. J. and Hazel, V. P. (1975). An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. of General Microbiol.* 87: 359-369.

15. Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227. (5293): 680-685.
16. Mahmoud, M. M., Ismail, A. M., Amin, M. K., Fayed, A. H. and Mostafa, S. A. (2011). Isolation and identification of novel local isolates of *Bacillus thuringiensis* active against red palm weevil (RPW). *Egypt. J. Genet. Cytol.* (40): 337-350.
17. Assaedi, A. S. A., Osman, G. E. H. and Abulreesh, H. H. (2011). The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments. *Australian J. of Crop Science*, 5(10):1185-1190.
18. Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species (review). *J. of Bioscience and Bioengineering*, The Society for Biotechnology, Japan.
19. Fakruddin, M.d., Sarker, N., Morshed, A.M. and Noor, R. (2012). Protein profiling of *Bacillus thuringiensis* isolated from Agro-forest Soil in Bangladesh. *As. Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol* 20 (4): 139-145.
20. Ho"fte, H., and Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
21. Donovan, E.J., Brenda, O. and William, H.M. (1998). Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). *Cur. Microbiol.* (36): 278-282.
22. Renganathan, K., Rathinam, X., Danial, M. and Subramaniam, S. (2011). Quick isolation and characterization of novel *Bacillus thuringiensis* strains from mosquito breeding sites in Malaysia. *Emir. J. Food Agric.* 23 (01): 17-26.