فعالية القتل الحيوي لبعض السلالات التابعة للنوعين *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* على يرقات بعوض الكيوليكس من نوع *Culex pipiens*

اسراء غانم السماك ، باسمة احمد عبدالله

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٢٩ / ٥ /٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ٢٩ / ١٠ / ٢٠٠٨)

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص ودراسة قدرة النوعين الممرضين *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* على قتل يرقات بعوض الكيوليكس، اذ عزلت من اجواء وترب مختلفة في محافظة نينوى باستخدام وسط Nutrient Yeast Salts Medium Glucose (NYSMG) الذي يسمح بنمو اغلب التجمعات السبورية، تم انتقاء عزلات للنوع *B. sphaericus* مقاومة للستربتومايسين عند استخدام الوسط الانتقائي Nutrient Yeast Salts Medium Streptomycin(NYSMS) ومن حساب اعداد الخلايا النامية ومقارنة الوسطين اعلاه تبين ان الوسط (NYSMS) يختزل عدد السبورات النامية بنسبة تقارب (٨٠-٩٠%) لاغلب العينات. كذلك درست قدرة هذه العزلات على قتل يرقات البعوض من نوع *Culex pipiens* اوضحت النتائج ان عزلة واحدة من كلا النوعين انفي الذكر ومنها نوع السيطرة *B. thuringiensis* استطاعت قتل (١٠٠%) من يرقات البعوض خلال اليوم الاول من التحضين في درجة حرارة الغرفة (٣٠±٢)°م وعزلة واحدة تابعة للنوع *B.thuringiensis* استطاعت قتل (١٠٠%) خلال اليوم الثاني وان ثلاث عزلات من كلا النوعين انفي الذكر استطاعت قتل (١٠٠%) خلال اليوم الخامس وتسع عزلات تابعة للنوع *B. sphaericus* وثماني عزلات تابعة للنوع *B.thuringiensis* لم تحدث اية نسبة للقتل خلال فترة التحضين الى اليوم الخامس.

المقدمة

تمتاز معظم افراد النوع *B.sphaericus* بكونها هوائية إجبارية وذات فعالية ايضية تأكسدية حيث تستخدم الاحماض العضوية بدل الكاربوهيدرات كمصدر للكاربون والطاقة (2,1)، وتعطي نتائج سالبة لأغلب الصفات الكيمياحياتية والفسلجية والبيئية المستخدمة لتصنيف أفراد هذه العائلة، حيث أظهرت تحليلات تتابع نيوكليوتيدات الحامض النووي الرايبوزي (rRNA)، إن أفراد هذا النوع تمثل خطاً تطورياً منفصلا ضمن العائلة (3). إن أغلب سلالات هذا النوع نموذجية في تركيب متعدد الببتيد للجدران الخلوية ، حيث تحتوي على الحامض الأميني (Lysine أو Ornithine) بدلاً من (Meso-2,6-Diaminopimelate) النموذجية لجدران النوع *B.subtilis* والأنواع الأخرى البيضوية السبور (4). تستخدم تقنية تماثل الحامض النووي الديوكسي رايبوزي (DNA Homology) والهجرة الكهربائية للانزيمات واختبار السمية والتنميط بالعاثيات (Phage Typing) في تمييز اغلب افراد هذا النوع ذي الامراضية العالية ليرقات البعوض ، خاصة نوع Mansonia, Culex, Aedes (6,5,1). تستطيع سلالات *B.sphaericus* القاتلة للحشرات (Entomocidal) انتاج نوعين من السموم : سم ثنائي (Binary toxin-Btx) يتجمع بشكل بلورات صغيرة في الخلية الخضرية الأم خلال المراحل الاولية لتكوين السبورات، وهذه البلورات تضم كميات متساوية من كلا البروتينين (Kilo Dalton-KDa 51.4, 41.9)، حيث يشار اليها بسموم (KDa 42 ,51)، ولكل بروتين دور في قتل اليرقات، وتعمل كبروتينات مرتبطة تسمح بدخول بروتين (KDa-42) إلى خلايا المعدة الوسطية (Midgut) لمعدة اليرقة (7).

يشار إلى السلالات التي لها القدرة على تخليق السم الثنائي (Btx) عادة بالسلالات العالية السمية (8). أما النوع الثاني من السموم فيطلق علية سم البعوض (Mosquitocidal toxin-Mtx) الذي ينتج خلال طور النمو اللوغارتمي (Exponential-phase) ويقل إنتاجه عندما تدخل الخلايا طور الثبات (Stationary-phase) وهو لايعود الى (Btx).إن العديد من السلالات العالية السمية تنتج السم الثنائي (Btx) وسم (Mtx)، والبعض الاخر تنتج السم الثنائي فقط. (9)، بينما السلالات القليلة السمية تنتج (Mtx) فقط أو سم آخر (11,10).

تتميز أفراد النوع *B.thuringiensis* بانتشارها الواسع في التربة وامراضيتها ليرقات بعض الحشرات الضارة بالمحاصيل الاقتصادية والبعوض وليس لتواجدها في التربة علاقة بتواجد الحشرات (13,12). تنتج معظم افراد هذا النوع خليطاً من بلورات بروتينية سامة للحشرات خاصة تلك المضرة بالمحاصيل الاقتصادية والعائدة للرتب (حرشفية الأجنحة Lepidopteran ، ثنائية الاجنحة Dipteran ، غمدية الاجنحة Coleopteran) ويرقات البعوض والذباب الأسود (14) . لذلك يعد استخدام سموم الجراثيم في السيطرة الحياتية له علاقة بالناحية الاقتصادية والسيطرة على الامراض الخطرة على الانسان والحيوان مثل الملاريا والتهاب السحايا الدماغية وغيرها (17,16,15).

المواد وطرائق العمل

استخدمت أطباق اوساط الآكار المغذي الأعتيادي ووسط (NYSMG) ووسط (NYSMS) المحور وذلك بأضافة المضاد الحياتي الستربتوماسيين (100 مايكروغرام / لتر) بدل لكلوكوز والمحضر حسب طريقة (11)، وتم تعريضها لمدة نصف ساعة في اجواء المستشفيات، المختبرات وبيئات مختلفة أخرى. وحضنت في درجة حرارة (37)°م لمدة (18-24) ساعة.

كما أخذت عينات من ترب حدائق لمناطق مختلفة ومتباعدة في محافظة نينوى وتشمل (ترب مستشفيات، غابات، حافات نهر، مستنقعات وطين)، وعلى عمق حوالي (2-5) سم وتم تجفيفها في درجة حرارة (50)°م. حفظت العينات الجافة في الظلام في درجة حرارة الغرفة (22-25) °م، حضر تخافيف من هذه العينات وذلك بمقدار (10غم تربة / 90 سم^3 ماء حنفية

معقم)، مزجت بجهاز الخلط (Vortex-Mexed) لمدة 100 ثانية، وتمت بسترتها في درجة حرارة (80)° م لمدة (15) دقيقة. للحصول على اعداد الخلايا/سم^3 حيث تم اجراء تخافيف عشرية متتالية (Serial Dilution) وصولاً الى التخفيف 10^{-3}(10)، تم أخذ (1) سم^3 من التخافيف الأخيرة وزرعت بطريقة الصب بأستخدام وسط (NYSMS) ووسط (NYSMG) على التوالي. وحضنت في درجة حرارة (37 و50)°م لمدة (18-24) ساعة، لقحت العينات على وسط الآكار المغذي الأعتيادي (11). نقلت العزلات النقية الى موائل الآكار المغذي الأعتيادي. واجريت أختبارات التحري عليها بالأعتماد على موسوعة بيركي المقررة (19,18).

الفحص الحيويBioassys

تمت دراسة قدرة العزلات الواقعة ضمن عنقود النوع *B.thuringiensis* والنوع *B.sphaericus* على قتل يرقات البعوض من نوع *Culex pipiens*بأضافة معلق جرثومي ذي امتصاصية Absorbanse(0.5) عند طول موجي (600nm) نانوميتر وبعمر (18-48) ساعة الى انبوبتين تحوي كلّ منها على يرقات البعوض المذكورة اعلاه وهي في اطوار انسلاخ مختلفة مع أنبوبة سيطرة. وحضنت في درجة حرارة (± 2 30) °م. تم حساب اعداد اليرقات الميتة أي قدرة الجراثيم على القتل بعد (1-5) أيام من التحضين (11).

النتائج

عزلت سلالات تابعة لكل من النوعين *B.thuringiensis, B.sphaericus* عند استخدام الوسط (NYSMG) الذي يسمح بنمو أغلب التجمعات السبورية. وتم انتقاء عزلات للنوع *B.sphaericus* مقاومة للستربتومايسين عند استخدام الوسط الأنتقائي (NYSMS) ، ومن حساب اعداد الخلايا النامية ومقارنة الوسطين اعلاه تبين أن الوسط (NYSMS) يختزل عدد السبورات النامية بنسبة تقارب (85-90 %) لأغلب العينات.

كما تمت دراسة قدرة العزلات التابعة للنوعين *B.thuringiensis, B.sphaericus* على قتل يرقات البعوض. حيث أن عزلة واحدة من كلا النوعين آنفي الذكر ومنها نوع السيطرة *B.thuringiensis* استطاعت قتل 100% من يرقات البعوض خلال اليوم الأول من التحضين وعزلة واحدة تابعة للنوع *B.thuringiensis* استطاعت قتل أيضاً 100% خلال اليوم الثاني، وان ثلاث عزلات من كلا النوعين آنفي الذكر استطاعت قتل 100% خلال اليوم الخامس. تسع عزلات تابعة للنوع *B.sphaericus* وثماني عزلات تابعة للنوع *B.thuringiensis* لم تحدث أية نسبة للقتل خلال فترة التحضين إلى اليوم الخامس –كما موضح في الجدول.

الجدول يوضح نسبة القتل ليرقات البعوض من نوع *Culex pipens* لعزلات النوع *B.sphaericus* والنوع *B.thuringiensis* مقارنة بعزلات السيطرة.

عدد العزلات	النوع	نسبة القتل				
		اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	*اليوم الخامس*
	B. sphaericus					
3						%60
1						%60
3				%40		%100
1		%100				
9	لم يحدث أي قتل	---	---	---	---	---
	B.thuringiensis					
2					%60	
1						%60
3					%80	%100
1				%40		%40
1			%100			
1	سيطرة *B.thuringiensis*	%100				
8	لم يحدث أي قتل	---	---	---	---	---

المناقشة

اهتمت الدراسة بعزل النوعين *B.sphaericus* و*B.thuringiensis* لاهميتهما في القتل الحيوي ليرقات بعوض الكيوليكس، حيث استخدم الوسط الانتقائي (NYSMS) الحاوي على ستربتومايسين (١٠٠ µm/لتر من الوسط). لعزل النوع *B.sphaericus* المقاوم عادة لهذا المضاد، وقد تبين ان هذا الوسط الانتقائي مقارنة بالوسط (NYSMG) يختزل عدد السبورات النامية بمقدار (٨٥ــ٩٠%) لاغلب العينات، حيث يعد الستربتومايسين المضاد الشائع لعزل الانواع القاتلة ليرقات البعوض خاصةً، وهذا يتفق مع ما أشار أليه (11). وقد اهتمت الدراسة بفحص قدرة العزلات التابعة للنوعين *B.sphaericus* و*B.thuringiensis* على قتل يرقات البعوض ، حيث أن عملية القتل ليرقات البعوض لم تتم بنفس الكفاءة لجميع العزلات، اضافة الى بعض العزلات التي لم تستطيع احداث القتل. وهناك العديد من الاسباب التي ربما قد تفسر هذه الظاهرة ،منها أن هذه العزلات قد تفقد سميتها نتيجة الزرع المتكرر لها في المختبر كما اشار الى ذلك (١٢)، أو أن أنتاج السم القاتل لليرقات ليس ضرورياً لنموها

وأنتشارها في البيئة (١١)، أو ان هناك العديد من احتمالات تفسير انتاج بعض انواع هذه الجراثيم للبلورات البروتينية غير السمية منها :-

- قد تكون هذه البلورات قاتلة للحشرات عرضياً ولها وظيفة طبيعية أخرى، أو لم يدرس تخصصها للمضيف المناسب (٢٠).
- تحتاج معاملة حرارية لكي تصبح فعالة سمياً (٢١).
- تفقد البلورات المنتجة من قبل نفس الجراثيم طبيعتها السمية عند انتاجها مختبرياً وقد يعود هذا الى أختلاف ظروف التهوية والدالة الحامضية ودرجة الحرارة ووجود النترات وغيرها (٢٢).
- قد تصبح البلورات الجرثومية غير السمية فعالة نتيجة لحدوث الطفرات أوامتلاكها بلازميدات متعددة الشفرات Multiple Toxin Encoding (23).
- أن ثبوت البلورات غير السمية في المعدة الوسطى للحشرات من رتبة حرشفية الاجنحة (Lepidopteran) وثنائية الاجنحة (Dipteran) قد يعود لعدم ذوبانها أذ تتراوح الدالة الحامضية لمعدة الحشرات بين (٩,٥ ١٠,٥) PH (24).

أشار الباحثون (26,25) الى أن ميكانيكية القتل للبلورات البروتينية المنتجة من قبل النوعين *B.sphaericus B.thuringiensis*، تتضمن تجزئتها لتحرر السم الاولي (Protoxin) بعد تعرضها للظروف القاعدية في المعدة ثم تحولها الى الشكل الفعّال بعد تعرضها لانزيمات التحلل (Protease)، كما أن ستة اجزاء من هذه الوحدات السمية الفعّالة تنغرز في غشاء المعدة مؤدية الى تكوين فتحات سداسية الشكل في خلايا المعدة، وفقدان التوازن الازموزي والادينوسين ثلاثي الفوسفيت (Adenosine Tri Phosphate-ATP) وبالتالي تحلل الخلية وموتها، أن أنتاج هذين النوعين من البلورات البروتينية يحدث فقط في حالة تواجد البلازميد المسؤول عن انتاجها.

المصادر

1-Alexander, B.and Priest, F.G.(1990). Numerical classification of *Bacillus Sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. J.Gen. Microbiol., 136 : 367-376.

2-Russell, B.L., Jelley, S.A. and Yousten, A.A. (1989). Carbohydrate metabolism in the mosquito-pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. Appl. Environ. Microbiol., 55: 294 - 297.

3-Stackebrandt, E., Ludwig, W., Weizenegger, M., Dorn, S., Mcgill, T. H., Fox, G.E., Woese, C.R., Schubert, W. and Schleifer, K.H. (1987). Comparative 16s rRNA oligonucleotide analysis and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. J. Gen. Microbiol., 133: 2523 - 2529.

4-Bartlett, A.T.M. and White, P.J.(1985). Species of Bacillus that make avegetative peptidoglycan containing lysine lack diaminopimelate epimerase but have diaminopimelate dehydrogenase., J. Gen. Microbiol., 13: 2145 - 2152.

5-Carboulec, N.and Priest, F.G. (1989). Phentotypic characterization of some strains of *Bacillus sphaericus*. Lett. Appl. Microbiol., 9: 113 - 116.

6-Priest, F.G.,Goodfellow, M. and Todd, C. (1988). Anumerical classification of the genus Bacillus. J.Gen. Microbiol., 134: 1847 - 1882.

7-Oei, C., Hindley, J. and Berry, C. (1992). Binding of purified *Bacillus sphaericus* binary toxin and its deletion derivatives to *Culex quinque fascietus* gut elucidation of functional binding domains. J. Gen. Microbiol., 135: 1515 - 1526.

8-Priest, F.G., Ebdrup. L., Zahner, V. and Carter, P.E. (1997). Distirib-ution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol., 63(4): 1195 - 1198.

9-Liu, J.W., Hindley, J., Porter, A.G.and Priest, F.G. (1993). New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8 - Kilodalton mosquitocidal toxins. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2174 - 2176.

10-Charles, J. F., Nielsen, L. C. and Deleclus., A.(1996). *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action.Annu. Rev. Entomol.,41: 451 - 472.

11-Jahnz, U., Fitch, A. and Priest. F.G.(1996). Evaluation of an rRAN - targeted oligonucleotide probe for the detection of mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus* in soils: characterization of novel strains lacking toxin genes. J. FEMS. Microbiol. Eco., 20: 91-99.

12-Priest, F.G., Demuro, M.A. and Kaji, D.A. (1994). "Systematics of Insect Pathogenic Bacilli: uses in strain identification and isolation of novel pathogens". Plenum press, NewYork., pp. 275 - 296.

13-Gonzalez,J.M., Brown, B.J.and Carlton, B.C.(1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ-endotoxin among strains of *B.thuringiensis* and *B.cereus.* Proc. Natl.Acad. Sci., 79: 6951- 6955.

14-Rie, J.V., Jansens, S., Hofte, H., Degheele,D.and Mellaert, H.V. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol., 56(5): 1378 - 1385.

15-Benoit, T.G., Wilson, G.R. and Baugh, C.L.(1990). Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1.Lett. Appl. Microbiol., 10: 15 - 18.

16-Muthukumar, G. and Nickerson, K.W. (1987). The glycoprotein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates alectin like receptor in the larval mosquito gut. Appl. Environ. Microbiol., 53(11): 2650 - 2655.

17-Pfannenstiel, M.A., Couche, G.A., Ross, E.J. and Nickerson, K.W. (1986). Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* sub sp. *israelensis* crystalline toxin. Appl. Environ. Microbiol., 52(4): 644 - 649.

18-Holt, J.G., Krieg , N.R. Sneath , P.H. A., Staley , J.T. and Williams, S.T. (1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed. Williams and Wilkins comp., U.S.A. Baltimore.

19-Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.(1974). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed. the Williams & Wilkins company, Baltimore., pp. 529 - 252.

20-Martin, P.A.W. (1994). An icono clastic veiw of *Bacillus thuringiensis* ecology. Am. Entomol., 40: 85 - 90.
21-Du, C., Martin, P.A.W. and Nickerson, K.W.(1994). Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and non insecticdal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol., 60(10): 3847 - 3853.
22-Bhattacharya, M., Plantz, B.A., Swanson, K. and Nickerson, K.W. (1993). Nonenzymatic glycosylation of lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol., 59(8): 2666 - 2672.
23- Wu, D. and Federici, B.A. (1993). A20- Kilodalton protein preserres cell viability and promotes cyt A crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 175: 5276 - 5280.
24-Crickmore, N.and Ellar, D.J. (1992). Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned cry IIA δ.endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol., 6: 1533 - 1537.
25-Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (1996). "Microbiology". 3rd ed. Wm.C. Brown communication, Inc., Australlia. Oxford, England., pp. 313 - 391.
26-Pfannenstiel, M.A., Cray, W.C., Couche, G.A. and Nickerson, K.W.(1990). Toxicity of protease - resistant domains from the delta - endotoxin of *Bacillus thuringiensis* sub sp.*israelensis* in *Culex quinque fasciatus* and *Aedes aegypti* bioassays. Appl. Environ. Microbiol., 56(1): 162 - 166.

Bioinsecticide activity of some strains of Bacillus *sphaericus* & *B.thuringiensis* species on *Culex pipiens* larvaes

Essra G. Al-Sammak , Basima A. Abdulla
Dept. of Biology, College of Science, University of Mosul , Mosul , Iraq
(Received 29 / 5 / 2008 , Accepted 29 / 10 / 2008)

Abstract

The study included the isolation, identification and the ability of *B. sphaericus* and *B.thuringiensis* species to kill Culex larvaes. These isolates were obtained from different air and soil enviroment in Nenavah Governerate using Nutrient Yeast Salts Medium Glucose (NYSMG) enhances the growth of most of the Bacterial spores. Isolation of *B. sphaericus* species resistance to streptomycin was carided out using the Selective Media Nutrient Yeast Salts Medium Streptomycin (NYSMS). Comparing the two medium we conclude that the (NYSMS) reduced the numbers bacterial spores growth (85-90%) to most of the samples. We study the ability of isolates to kill *Culex pipiens* larvaes one isolate from the two species and control species *B.thuringiensis* could kill (100%) from culex larvaes during the first day of incubation time in the room temperature (30$\pm$2) °C and one isolate from the species *B.thuringiensis* could kill also (100%) during the second day and three isolates from two species could kill (100%) during the fifth day. Nine isolates from of *B. sphaericus* and eight isolate from *B.thuringiensis* could kill the larvae's during the fifth days of incubation time.