تأثير العزلات المحلية من بكتريا *Bacillus thuringiensis* في يرقات العمر الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens*

عماد احمد محمود حسام الدين عبد الله محمد دعاء حقي اسماعيل

جامعة بغداد/كلية العلوم للبنات

الملخص

درس تاثير ثلاث تراكيز من بكتريا ***Bacillus thuringiensis*** عزلة محافظة الانبار BtAN بالتراكيز(10^1x7.35 ، 10^2x7.35 ، 10^5x7.35) وعزلة محافظة السليمانية BtSU بالتراكيز (10^1x5.6 ، 10^2x5.6 ، 10^5x5.6) ml/CFU وعزلة محافظة بغداد BtBA بالتراكيز (10^1x3.56، 10^2x3.56 ، 10^5x3.56) ml/CFU ومقارنتها مع العزلة القياسية العالمية *Bacillus thuringiensis israelensis* بالتراكيز (10^1x4.85 ، 10^2x4.85، 10^5x4.85) ml/CFU على يرقات العمر الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وبلغت نسبة الهلاك 100% لجميع تراكيز العزلة القياسية Bti بينما بلغت نسبة الهلاك 65% بتركيز 10^5x7.35 ml/CFU لعزلة الانبار BtAN وبلغت نسبة الهلاك في عزلة السليمانية 50% بتركيز 10^5x5.6 ml/CFU بينما لم تعطي عزلة BtBA اي نسبة هلاك .

EFFECTS OF SELECTED LOCAL STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IN THE FOURTH INSTAR LARVAE OF THE MOSQUITO *CULEX PIPIENS PIPIENS*

Emad Ahmed Mahmood **Hussam El-Dien Abdulla**

Doaa Hakki Ismal

ABSTRACT

Studied the the effect of three concentrations of Al-nbar province isolation BtAN in concentrations (10^1 x7.35, 10^2 x7.35, 10^5 x7.35) and the al-Sulaymaniyah province isolation BtSU in concentrations (10^1 x5.6, 10^2 x5.6, 10^5 x5.6) ml / CFU and Baghdad province isolation BtBA in concentrations (10^1 x3.56, 10^2 x3.56, 10^5 x3.56) ml / CFU were studied and compared with universall standard isolation *Bacillus thuringiensis israelensis* in concentrations (10^1 x4.85, 10^2 x4.85, 10^5 x4.85) ml / CFU on fourth instar larvae of the mosquito *Culex pipiens pipiens* and the ratio of mortality was100% for all concentrations of standard Bti isolation while the mortality ratio was 65% in concentration 10^5 x7.35 ml / CFU in isolation of Anbar BtAN in addition mortality ratio in isolation of Sulaymaniyah was 50% in concentration 10^5 x5.6 ml / CFU while isolation BtBA did not give any rate of mortality.

المقدمة

أقيم البحث الموسوم في مختبرات قسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد وهدفت هذه الدراسة لاستخدام احد طرق المكافحة الحيوية والمعتمدة بأستعمال عزلات بكتيرية معزولة محليا من بيئات عراقية مختلفة من الـ *Bacillus thuringiensis* ومقارنتها مع عزلة قياسية مستوردة *Bacillus thuringiensis var israelensis* لمكافحة الطور اليرقي الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وذلك من خلال معرفة تأثير العزلة القياسية لبكتريا *Bacillus thuringiensis var israelensis* بالتراكيز(10^1x4.85 ، 10^2x4.85، 10^5x4.85) ml/CFU ومقارنتها مع العزلات المحلية الانبار BtAN بالتراكيز(10^1x7.35 ، 10^2x7.35 ، 10^5x7.35) ml/CFU وعزلة السليمانية BtSU بالتراكيز (10^1x5.6 ، 10^2x5.6 ، 10^5x5.6) ml/CFU وعزلة بغداد BtBA بالتراكيز (10^1x3.56، 10^2x3.56 ، 10^5x3.56) ml/CFU على الدور اليرقي الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وكذلك دراسة التأثير التراكمي.

يعد البعوض من الحشرات المهمة طبيا وبيطريا لذلك وضعت برامج خاصة لمكافحته في انحاء مختلفة من العالم بطرائق متعددة ومتداخلة مثل ردم البرك والمستنقعات او تجفيفها و التخلص من اماكن توالد البعوض وازالة الحشائش النامية والطافية في المجاري المائية؛ واستعمال المواد الطاردة على شكل دهانا على الايدي والارجل مثل indalone او زيت

جوز الهند وثاني مثيل النفثالين مع تجنب ملامستها للعين ،مكافحة الاطوار المائية برش الزيوت المعدنية (زيت البترول او الديزل) على المسطحات المائية بهدف منع اليرقات والعذارى من التنفس مثل اخضر باريس (المادة الفعالة اسيتو ارسينات النحاس – بودرة خضراء غير قابلة للذوبان في الماء) المبيد يطفو على سطح الماء يكون طبقة سامة لقتل يرقات بعوض الانوفيليس فقط وهناك بعض الانواع من البعوض لاتتاثر بهذا المبيد؛ غير ضار بالحيوانات والاسماك ويمكن معالجة المياه لتكون صالحة للشرب (أبو الحب،1979).

ازدادت في الاونة الاخيرة ظهور مقاومة الحشرات المسببه للامراض للمبيدات الكيميائية بسبب تكرار استعمالها على مدى سنين طويلة ولما لها من تاثير ضار على البيئة والانسان لذلك تم اللجوء الى الطرق البايولوجية واستحداث انواع جديدة من المبيدات لمقاومة هذه الحشرات منها بكتريا *Bacillus thuringiensis* حيث تكون امينه لأنواع الكائنات الحية غير المستهدفة ولصحة الانسان (Hribar،2005).

بكتريا لاهوائية أختيارية تنتمي الى عائلة Bacillaceae، موجبة لصبغة كرام، مكونة للابواغ، منتجة للاجسام البلورية خلال عملية التبويغ، حيث تكون هذه الاجسام مجاورة للسبور الداخلي، متحركة بواسطة سوط طرفي وتنمو بشكل سلاسل،ان اهم صفة مميزة لبكتريا الـ *Bacillus thuringiensis* هو انتاج بروتينات بلورية crystal proteins او مايسمى بالسم الداخلي دلتا delta endo toxin والتي تعزى اليها التاثيرات السمية على يرقات الحشرات مما ادى الى استخدام هذه البكتيريا في المكافحة الحيوية لحشرات حرشفية الاجنحة *Lepidoptera* (Bukhari and Shakoori،2010). تاثير بكتريا الـ Bti على يرقات ثنائية الاجنحة يبدا من ابتلاع اليرقة للبلورات السمية وصولا الى المعدة ثم ذوبان هذه البلورات في الوسط القاعدي للمعدة بواسطة انزيم الـ protease، وبعد ذوبان وتحرر هذه السموم فانها سوف ترتبط بمستقبلات جدار المعدة محدثة خللا في التوازن الازموزي وضررا كبيرا في الطبقة الطلائية لجدار المعدة مسببة موت اليرقة،من المعروف ان هذه السموم لا تذوب الا في وسط قاعدي pH (10-8)، ومن الاضرار التي تتسبب بها هذه السموم ايضا هي تحلل اجزاء من فم الحشرة مما يمنع الحشرة من التغذي الذي يؤدي الى موت الحشرة بعد بضع ساعات الى ايام و انها تحلل جدار المعدة مما يؤدي الى تسمم الحشرة وموتها. وتعرف هذه السموم بـالسم البلوري القاتل للحشرات (insecticidal crystal protein ICP)(Reardon *et al*.،1994). اجرى Koerger *et al*. (1995) دراسة على مدى فعالية بكتريا الـ *Bacillus thuringensis Var israelensis* وقابلية وفترة بقائها في الطبيعة وبقاء تاثيرها على يرقات بعوض الانوفلس في عدة مناطق منها الاكوادور والامازون، حيث ثبتت فعالية الـ Bti العالية ضد يرقات بعوض الانوفلس، حيث استمر هذا التاثير لمدة 7 ايام في الاكوادور. اما في الامازون فقد استمر التاثير لمدة 10 ايام وكانت نسبة القتل خلالها قد وصلت الى 70 % لذا اثبتت بكتريا الـ Bti انها من اهم عوامل المكافحة الاحيائية للسيطرة على البعوض الناقل لمرض الملاريا.استخدم نوعين من بكتريا *Bacillus Sphaericus 2362* هما *Bcillus* و *Bacillus thuringiensis Var israelensis* ضد بعوض *Culex quinquefasciatus* وعوملت البرك المملوءة بمياه الامطار والحفر باستخدام بكتريا *Bacillus spheracus* 2362 بمعدل 3.0 غم / م^2 ونسبة القتل كانت بمعدل 99 % وذلك لمدة 28 يوم، اما عند استخدام نفس الجرعة من بكتريا Bti فقد اعطت نسبة قتل 95 % في 8 الى 14 يوم (Skovmand and Sanogo،1999). درس صالح (2013) تأثير تراكيز مختلفة من بكتريا *Bacillus thuringiensis var isrselensis* (0.005 ، 0.01 ، 0.02 ،0.03 ، 0.04) جزء بالمليون على يرقات العمر الثالث لبعوض *Culex quinquefasciatus* عوملت اليرقات بعد نصف ساعة وثلاث ساعات وحسبت نسبة القتل وتدل النتائج ان اعلى نسبة قتل كانت بالتركيزين (0.03 ، 0.04) جزء بالمليون حيث بلغت نسبة القتل بعد نصف ساعة 100% وبلغات نسبة القتل 100% بعد ثلاث ساعات بالتراكيز (0.02 ،0.03 ، 0.04) جزء بالمليون .

المواد وطرائق العمل

تربية البعوض

استخدمت خلال الدراسة سلالة مختبرية هي *Culex pipiens pipiens*والتي تم الحصول عليها من مركز السيطرة على الامراض الانتقاليه التابعة لوزارة الصحة والبيئة وتم تأكيد تشخيص عينات الدراسة من قبل متحف التاريخ الطبيعي .وضعت الادوار غير البالغة في اواني بلاستيكية نبيذة سعة 500 مل وملئت ب400 مل من الماء المقطر(Kalyvanasundaram and Sivagnaname، 2004).وضعت اواني التربية في اقفاص تربية خشبية ذات ابعاد 50×50×50 سم ذات قاعدة خشبية والاطراف مغلقه بمشبك معدني ومغطى بقطعة قماش من احد الجوانب وتم نقل اقفاص التربية في داخل غرفة معزولة وضبطت درجة حرارتها 27م ±2 واضاءة 10 ساعات وفترة ظلام 14 ساعة .غذيت اليرقات بأضافة 1.5غم من عليقة الفئران بعد طحنه الى شكل مسحوق مكون من (21.5% ذرة صفراء،20.8 % شعير ،12.2% كسبة فول الصويا ، 3% خلاصة اللحم ،6% مسحوق السمك (Zayia and Al- Faisal، 1986) أستبدل ماء التربية كل 3 أو 4 ايام وأزالة قشور الانسلاخ بواسطة ماصة وتم التخلص من الطبقه المتعفنة المتكونة اثناء هذه الفترة وذلك لمنع حصول تعفن وتلف ماء التربية (Al- Sharook *et al.*،1991). لغرض الحصول على البالغات تعزل العذارى في اواني بلاستيكية نبيذة سعة 500 مل تحتوى على 400 مل ماء مقطر. غذيت الذكور والاناث الحديثة البزوغ بوضع قطنه مشبعة بمحلول سكري تركيز 10% في طبق بلاستيكي وذلك لغرض الحصول على الطاقة اللازمة للطيران (Service ،1993).وللحصول على البيض تغذى البالغات من الاناث على وجبة دم وذلك بوضع حمامة منزوعة ريش الصدر على سطح القفص بعد ربط اجنحتها وارجلها عليه طوال الليل. بعد مرور 2-3 ايام جمعت قوارب البيض في اواني بلاستيكية سعة 500 مل تحتوي 400 مل ماء مقطر لغرض الحصول على اليرقات

واكثار المستعمرة مع تلافي تحريك القارب تجنبا لتكسر وتفتت البيض (Mehdi and Mohsen،1989)

تنشيط البكتريا

تم الحصول على العزلات البكتيرية المحلية من مختبرات كلية الزراعة / قسم وقاية النبات/جامعة بغداد، حيث اخذت ثلاث عزلات هي عزلة الانبار(BtAN) وعزلة السليمانية (BtSL) وعزلة بغداد (BtBA)،أما العزلة القياسية (Bti) فقد حصل عليها من شركة المشرق لتطوير البيئة والزراعة على شكل معلق بكتيري بأسم تجاري (Antrol) المنتج من قبل شركة Russel-IPM في بريطانيا.

نشطت البكتريا في مختبرات كلية الطب الجامعة العراقية ، وضع واحد مل من المعلق البكتيري للعزلات في انابيب اختبار سعة 10مل وأضيف اليها 9مل من الوسط المغذي السائل المحضر مسبقا حسب توصيات الشركة المصنعة وضعت في حمام مائي على درجة حرارة 70مْ لمدة 10 دقائق (لقتل جميع الفطريات والبكتريا ماعدا بكتريا Bacillus thuringiensis للتخلص من اي تلوث(Kitnamorti *et al.*،2001) .

حضر الوسط المغذي Nutrient Agar حسب توصيات الشركة المصنعة بأستخدام 28 غرام من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ثم عقم بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة ثم ترك ليبرد وبعدها صب في اطباق بتري ، زرعت العزلات المحلية بطريقة التخطيط بواسطة Loop معقم و حضنت بدرجة حرارة 30مْ لمدة 24 ساعة وحصل على النمو البكتيري للعزلات المحلية بصورة نقية.

اما العزلة القياسية لبكتريا Bti فقد اخذ واحد مل من المعلق البكتيري واضيف الى 9 مل من ماء الببتون المحضر مسبقا حسب توصيات الشركة المصنعة وزرع في اطباق بتري تحتوي على الوسط المغذي Nutrient Agar وحضنت بدرجة حرارة 30مْ ±2 لمدة 24 ساعة حيث لوحظ النمو البكتيري للعزلة القياسية .

تحضير التراكيز البكتيرية

حضر المعلق البكتيري لبكتريا *Bacillus thuringiensis var israelensis* والبكتريا المعزولة محليا BtAN و BtSL بالتراكيز 10^1، 10^2، 10^5 CFU/ ml باضافة 5مل من محلول ملحي بتركيز 0.9% الى المزرعة البكتيرية وتم فصل النمو البكتيري بواسطة حاصدة معقمة على شكل حرف (L) وسحب بواسطة محقنة طبية نبيذة بعد نزع الجزء المعدني ثم رشح المعلق من خلال طبقتين من الشاش المثبت على قمع زجاجي بعد اضافة 5 مل اخرى من المحلول الملحي المعقم لضمان نزول جميع البكتريا وازالة بقايا البيئة الغذائية وجمع العالق البكتيري في دورق زجاجي مخروطي سعة 100مل ومنه يتم الحصول على العالق البكتيري الاساس (Bacterial stock suspention) وحضرت التراكيز البكتيرية في 8 انابيب اختبارمعقمة سعة 10 مل وتعلم من 8-1 و وضع في كل انبوب 9 مل من المحلول الملحي بتركيز 0.9% وسحب 1مل من العالق البكتيري الاساس المحضر مسبقا بواسطة الماصة (Micropipet) واضيف الى انبوبة الأختبار رقم 2 وبذلك تكون التركيز 10^8 وسحب من الانبوبة رقم (2) 1 مل واضيف الى الانبوبة رقم (3) فتكون التركيز رقم 10^7 استمرتحضير التراكيز في الانابيب المتبقية وصولا للتركيز رقم 10^1 وبذلك تم الحصول على التراكيز المطلوبة للتجارب هي 10^1 ،10^2، 10^5(Lacey،1997).

حسب طريقة (Clark ،1965) بعد ان حضرت التراكيز المطلوبة حضر الوسط المغذي Nutrient agar حسب توصيات الشركة المصنعة بأذابة 28 غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ويعقم بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121م وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة وبعد ذلك يصب في اطباق بتري وترك ليتصلب.ينقل 2 مايكروليتر من التراكيز المطلوبة بواسطة المايكروبايبت ونشر بأستخدام قضيب زجاجي على شكل حرف (L) معقمة وحضنت بدرجة حرارة 30مْ ± 2 لمدة 24 ساعة . بعد التأكد من نمو العزلات يتم حساب عدد المستعمرات البكتيرية النامية في الطبق حسب طريقة (Lacey،1997)

تحضير المعلق البكتيري

بعد اجراء العد للمستعمرات البكتيرية للعزلة القياسية Bti والعزلات المحلية BtSL، BtAN حضنت الاطباق في درجة حرارة 30مْ ±2 وبعدها اضيف 5 مل من محلول دارئ ملح الفوسفات (PBS) PH 7.2 للمستعمرات البكتيرية النامية على الوسط المغذي Nutrient agar وحصدت البكتريا كما مذكور في الفقرة (3)، ونقلت الى انابيب معقمة وحفظت في الثلاجة لحين استخدامها (Thiery،1997)

دراسة تاثير التراكيز المختلفة من بكتريا *Bacillus thuringiensis* في يرقات الطور الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وتطورها

درست تاثير 3 تراكيز من بكتريا *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (10^1x 4.85 ، 4.85 ml /CFU (10^5x4.85 ، 10^2 x والعزلات المحلية الانبارBtAN بالتراكيز (10^1 x 7.35، 10^2 x7.35، x7.35 ml /CFU (10^5 والسليمانية BtSU بالتراكيز (10^1 x 5.6 ، 10^2 x 5.6 ml /CFU (10^5 x 5.6 وبغداد BtBA بالتراكيز (10^1 x 3.56، 10^2 x 3.56 ، /CFU(10^5 x3.56 ml على يرقات الطورالرابع اذ اخذت 20 يرقة وضعت في اناء نبيذي سعة 250 مل وضع فيه 150 مل من الماء المقطر فضلا عن اضافة 0.5 مل مادة Tween 20 بتركيز 0.02% و 3 مل من كل تركيز من معلق البكتريا مع اضافة 1.5 غم من عليقة الفئران لغرض تغذية اليرقات كررت التجربة باربع مكررات لكل تركيز اضافة الى معاملة السيطرة فقد اضيف لها 0.5 مل فقط من مادة Tween 20 .وسجلت النتائج بعد 24 ، 48 ، 72 ساعة من المعاملة أذ تم مراقبة عدد اليرقات الميتة للطور اليرقي الرابع والمدة الزمنية اللازمة لهلاك اليرقات (Ishii and Ohba,1993).

دراسة تاثير التراكيز المختلفة من بكتريا *Bacillus thuringiensis* في يرقات الطور الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وتطورها:

أعيد تطبيق الفقرة السابقة على اليرقات أذ سجلت مدة الطور اليرقي ونسبة هلاك اليرقات ومدة الدور العذري ونسبة الهلاك مع تسجيل نسبة بزوغ البالغات الطبيعية والمشوهة من الذكور والاناث ومعدل طول فترة حياة الحشرة البالغة وانتاجيتها .

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات باستعمال البرنامج Statistical SAS– Analysis System (SAS،2012) لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي (Least significant difference-LSD) عند مستوى اختبار 0.05.

النتائج والمناقشة

وضح الجدول (1) ان نسب الهلاك بلغت 100% بعد 24 ساعة باستخدام بكتريا Bti بالتركيزين(10^2x4.85، 10^5x4.85) ml/CFU بينما بلغت نسبة الهلاك 90 % بالتركيز 10^1x4.85 ml/CFU بعد 24 ساعة واصبحت 10% بعد 48 ساعة من التجربة لنفس العزلة، وبلغت نسبة الهلاك بأستخدام عزلة الانبار BtAN 65% بالتركيز الاعلى 10^5x7.35 ml/CFU بعد 48 ساعة من التجربة بينما بلغت نسبة الهلاك بالتركيزين (10^1x7.35، 10^2x7.35) ml/CFU (10 ، 40)% على التوالي لنفس العزلة ايضا بعد 48 ساعة من التجربة.

بأستعمال عزلة السليمانية BtSU بالتراكيز(10^1x5.6، 10^2x5.6 ، 10^5x5.6) ml/CFU بلغت نسب الهلاك (35,25,5)% على التوالي بعد 48 ساعة من التجربة ثم اصبحت نسب الهلاك لنفس التراكيز بعد 72 ساعة من التجربة (5 ، 10 ،15)% على التوالي لنفس العزلة ، بينما لم تعطي عزلة BtBA اي نسبة هلاك باستخدام اي من تراكيزها. التحليل الاحصائي أوضح وجود فروق معنوية بين التراكيز بعد 24 و48 ساعة من المعاملة. اظهرت النتائج لتأثير السلالات المختلفة من بكتريا *Bt* على الاطوار اليرقية لبعوض *Culex pipiens pipiens*ان التاثير يزداد بازدياد التركيز فكلما ارتفع التركيز زادت نسبة الهلاك وبتاثير عامل الوقت فهناك علاقة طردية بين عامل الوقت وتاثير البكتريا حيث كلما أزداد الوقت ازدادت نسبة القتل.

ذكر Aodeh and al-salihi (2014) ان نسبة القتل بلغت 100% خلال 48 ساعة من التجربة بتركيز x6.25 10^{11} سبور/مل عند استخدام بكتريا *Bti* ضد بعوض *Culex pipiens*، كما وجدت الحسناوي (2014) ان نسب هلاك يرقات بعوض *Culex molestus* باستخدام بكتريا *Bti* بتركيز x3 ml/CFU10^7 بلغت 90 % بعد 72 ساعة من وقت التجربة بينما أتفقت النتائج مع ما جاء به and shoba Jayapriya (2014) باستخدام تراكيز مختلفة من بكتريا Bti (0.5 ، 1.0 ، 15، 20 ، 25، 30) جزء بالمليون حيث بلغت نسبة الهلاك للطور الرابع 100% بتركيز 30 جزء بالمليون بعد 24 ساعة ضد بعوض *Culex quiquefasciatus* ،كما ذكر Achill *et al* (2010) ان بكتريا Bti اعطت نسب هلاك بلغت 100% بعد 6 ساعات من التجربة ضد يرقات الطور الرابع لبعوض *Culex sp* بتركيز 10ملغم /لتر.

اظهرت نتائج جدول(2) ان اعلى نسبة هلاك كانت 100% للعزلة القياسية Bti لجميع التراكيز(10^1x4.85 ، 10^2x4.85، 10^5x4.85) ml/CFU بينما كانت اقل نسبة هلاك 10% بتركيز 10^1X7.35 ml/CFU لعزلة الانبار وتركيز10^1X5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية مقارنة بمعاملة السيطرة فقد بلغت نسبة الهلاك 0% واكدت نتائج التحليل الاحصائي بوجود فروق معنوية على نسب هلاك الطور اليرقي الرابع، وتراوحت مدة الطور اليرقي الرابع من 2-3 ايام مقارنة بالسيطرة فقد بلغت 3 ايام واكدت نتائج التحليل الاحصائي بعدم وجود فروق معنوية لمدة الطور اليرقي الرابع .

بلغت اعلى نسبة هلاك للطور العذري 10% بتركيز10^5X7.35 ml/CFU لعزلة الانبار وبتركيز10^5x5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية وبلغت نسبة هلاك 5% بتركيز 10^2X7.35 ml/CFU في عزلة الانبار ولم تعطي التراكيز الاخرى اي نسب هلاك مقارنة بمعاملة السيطرة فقد بلغت 0% وأكدت نتائج التحليل الاحصائي بوجود فروق معنوية لنسب هلاك الدور العذري بينما لم تظهر اي فروق معنوية لمدة الطور العذري حيث كانت مدة الطور العذري بين 5-6 ايام .

بلغت اعلى نسبة بزوغ للبالغات من الذكور 50 % للتركيز 10^1X5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية بينما بلغت اقل نسبة بزوغ 20 % بتركيز 10^5x5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية ايضا مقارنة بمعاملة السيطرة فقد بلغت 55% ، وبلغت اعلى نسبة بزوغ للبالغات الاناث 45% بتركيز 10^1X7.35 ml/CFU لعزلة الانبار واقل نسبة بزوغ بلغت 5% بتركيز10^5x5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية مقارنة بمعاملة السيطرة بلغت 45% واكدت نتائج التحليل الاحصائ بوجود فروق معنوية في نسب بزوغ البالغات من الذكور والاناث وكذلك في معدل عمر البالغات حيث تراوحت فترة حياة البالغات الذكور بين 5-9 ايام مقارنة بمعاملة السيطرة فقد بلغت 13 يوم اما الاناث فتراوحت فترة حياتها بين 3-11 يوم مقارنة بالسيطرة فقد بلغت فترة حياتها 12 يوم.

بلغ اعلى معدل انتاج للبيض 102 بيضة بتركيز 10^1X5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية بينما لميظهر اي معدل انتاج بالتراكيز(10^2X7.35 ، 10^5X7.35) ml/CFU لعزلة الانبار وبتركيز10^5x5.6 ml/CFU لعزلة السليمانية مقارنة بمعاملة السيطرة فقد بلغ معدل انتاج البيض 124 بيضة وهذا ما اكدته نتائج التحليل الاحصائي بوجود فروق معنوية على معدل انتاج البيض .

ان نتائج الجدول تشير الى ان لبكتريا Bti والعزلتين المحليتين الانبار BtAN والسليمانية BtSU لها تأثيرات

تراكمية على دورة حياة البعوض حيث لا يقتصر القتل على يرقات الطور المعامل بل يتبعه الى الاطوار والادوار اللاحقة ويقلل تأثير السم قدرة اليرقات والعذرى والبالغات من فرص النجاة نتيجة تراكم السم في داخلها وأمتناع اليرقات عن التغذية فضلا عن أطالة فترة حياتها أما العذارى فأنها لاتستطيع الوصول الى دور البالغه حيث انها تهلك في منتصف عملية التحول،ويظهر تأثير السم على البالغات حيث انها تقصر من فترة حياتها وتقلل من فرصة التزاوج وانتاج البيض ويلاحظ التاثير التراكمي للبكتريا عند استخدام التراكيز العالية لها واتفقت النتائج مع ما جاء به كل من (صالح والبندر،2013) واتفقت أيضا مع (الحمداني،2014).

الجدول(1) تأثير العزلة القياسية *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* والعزلات المحلية BtAN و BtSu و BtBA على نسبة هلاك الطور اليرقي الرابع لبعوض *Culex Pipiens. Pipiens* .

عزلات البكتريا	التركيز ml/CFU	النسبة المئوية للهلاك % / ساعة			التأثير التراكمي خلال 72 ساعة %	قيمة LSD
		24	48	72		
Bti	10^1 x 4.58	90	10	0	100	* 13.86
	10^2 x 4.58	100	0	0	100	* 15.00
	10^5 x 4.58	100	0	0	100	* 15.00
BtAN	10^1 x 7.35	0	10	0	10	* 4.79
	10^2 x 7.35	0	40	0	40	* 7.52
	10^5 x 7.35	0	65	0	65	* 9.56
BtSU	10^1 x 5.6	0	5	5	10	NS 5.00
	10^2 x 5.6	0	25	10	35	* 7.16
	10^5 x 5.6	0	35	15	50	* 7.48
BtBA	10^1 x 3.56	0	0	0	0	NS 0.0
	10^2 x 3.56	0	0	0	0	NS 0.0
	10^5 x 3.56	0	0	0	0	NS 0.0
Control		0	0	0	0	NS 0.0
قيمة LSD	---	*15.36	*9.72	*5.28	* 15.73	---

* (P≤0.05).

الجدول(2) تأثير العزلة القياسية *Bti* وسلالات البكتريا المعزولة محليا Bt.AN و Bt.SU على يرقات الطور الرابع لبعوض *Culex pipiens pipiens* وتطورها.

عزلات البكتريا	التركيز Ml/CFU	نسبة هلاك اليرقات %	مدة الطور اليرقي الرابع (يوم)	نسبة هلاك العذارى %	مدة الدور العذري (يوم)	نسبة بزوغ الكاملات%		معدل عمر الكاملات		معدل انتاج البيض
						ذكور	اناث	ذكور	اناث	
Bti	10^1x4.85	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	10^2x4.85	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	10^5x4.85	100	-	-	-	-	-	-	-	-
BtAN	10^1X7.35	10	0.05± 3	0± 0	0.04± 5	40	45	7 0.16±	10 0.52±	92 4.9±
	10^2X7.35	40	0.05± 3	5 0.07±	0.06± 5	25	35	5 0.11±	9 0.41±	0± 0
	10^5X7.35	45	0.07± 3	10 0.32±	0.06± 6	30	15	7 0.25±	5 0.07±	0± 0
BtSU	10^1X5.6	10	0.03± 2	0± 0	0.07± 5	50	40	9 0.47±	11 0.37±	102 7.2±
	10^2x5.6	40	0.03± 2	0± 0	0.06± 5	25	35	6 0.29±	9 0.32±	97 5.9±
	10^5x5.6	65	0.05± 3	10 0.41±	0.06± 5	20	5	6 0.23±	3 0.05±	0± 0
Control		0	0.05± 3	0± 0	0.08± 5	55	45	13 0.17±	12 0.46±	124 9.4±
قيمة LSD	---	15.61 *	NS 2.06	* 4.75	2.27 NS	9.68 *	* 8.33	3.62 *	* 3.08	23.94 *

* ($P\leq0.05$)، NS: غير معنوي.

المصادر

ابو الحب، جليل كريم. 1979. الحشرات الطبية والبيطرية في العراق (القسم النظري). مطبعة بغداد. ص 450.

الحسناوي، فضيل، نورس.(2014). التاثير الاحيائي لسلالتين من البكتريا *Bacillus thuringensis* ومنظم النمو Applaud ومبيد Abte في السيطرة على بعوض *Culex molestus* (Diptera Culicidae:) في محافظة كربلاء. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة كربلاء.

الحمداني، محيميد، هند صالح.(2014). تاثير بعض العوامل الكيميائية والفيزيائية في كفاءة البكتريا *Bacillus thuringensis var Israelensis* ومنظم النمو Gentrol والمبيد الفسفوري العضويTemphos ضد الادوار غير البالغة

لبعوض *Culex pipiens L*.رسالة ماجستير، كلية العلوم للبنات،جامعة بابل

صالح،حسام الدين عبد الله محمد و البندر،ايناس حاتم كريم.(2013) . التقييم الحقلي لسلالات بكتريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة محليا ضد يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus*. المجلة العربية للعلوم التطبيقية. 28(6ب):111-118 .

صالح، حسام الدين عبدالله محمد.(2013). تاثير تركيزات مختلفة من بكتريا*Bacillus thuringensis israelensis* على يرقات العمر الثالث لبعوض*Culexquinq uefasciatus* مختبريا.المجلة العربية للعلوم التطبيقية. 28 (9) :187 193

Achill, G. N.; Houssou, S. and Yilian, L.(2010). Effect of *Bacillus thuringensis israelnesis* (H-14) on *Culex*, *Aedes* and *Anopheles* larvae (Coton; Benin). Journal of Stem Cell.1 (1), : 60 –68.

Al- Faisal, A. Hand Zayia, H. H. 1986. Effect of deferent temperatures on some variance biological aspect of *culex pipiens quinquefasciatus.* Say. J. Biol. Sci. Res. Baghdad. 71 (1), pp 69 – 76.

Al- Sharook, Z; Balan, K.; Jiang, Y.; Rembold, H. 1991. Insect growth inhibitors from two tropical miliaceae effect of crude extract on mosquito larvae. J. App. Ent 111: 424 – 439.

Aodeh, Z. A. and Al- Salihi, M. A. Shafeek.(2014). Biological Control of the Larval Mosquito *Culex pipiens say* using bio Pesticide *Bacillus thuringensis israelnesis* and growth regulator Dimilin, International Journal Innovation Applied studies. ISSN . 7, (1): 134 – 145.

Bukhari, D. A. and shakoori,AR. (2010). Isolation and molecular characterization of cry 4 harbouring *bacillus thuringensis* isolates from Pakistan and mosquito cidal activity of their spores and total proteins. School of biological science. Pakistan. J, 42 (1) : 1 – 15.

Clark, E. E. 1965. Agar plats method for total microbial C. F. Black method of soil analysis part 2 publisher madeson. Wisconsin, USA. 1572 p.

Hribar, J. Lawrence. 2005. Relative abundance of mosquito species (diptera: culicidae) on big pine key, Florida, USA. Jornal of vector ecology. Volume. 30, (no. 2) p. 322 – 327.

Ishii, T. and Ohba, M.(1993). Diversity of *Bacillus thuringensis* environmental isolates showing larvicidal activity specific for mosquito. Journal of general microbiology ,139: 2849 – 2854.

Jayapriya ,G. and Gricilda, F. S. (2014). Evaluation of *Gambusia Affinis* and *Bacillus thuringensis var israelnesis* as *Culexquin quefasciatus* Control Agent. Journal of Entomology and Zoology Studies. 2 (3): 121–125.

Kitnamorti, Thanalecthume; Xavier, Rathinam and Sreeraman Subramaniam. 2011. Novel isolation and characterization techniques area in Cameron high lands Malaysia African journal of microbiology research. Vol, 5 (20), pp. 3343 – 3350.

Kroeger, A.; Horstick, O.; Riedl, C.; Kaiser, A.and Bccker, N.(1995). The potential for Malaria control with biological larvicide *Bacillus thuringensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador: Acta Trop, 60 (1): 47 – 57.

Lacey, L. A. 1997. Manual of technique in insect pathology (biologicalte chniques). Academic press. San Diego – London – Boston. 408 pp.

Mohsen, Z. H. and Mehdi, N. S. 1989. Effect of insect growth inhibition system on *Culex quinquefasciatus say*. (Diptra: Culicidae). J. insect. Sci. appli. 10 (1), pp 29 – 33.

Reardon, R. N.; Dubois and W. Mclane. (1994). *Bacillus thuringensis* for *Managing gypsy* moth. National center of forest health management. Forest service. USDA. FHM – NC – 01 – 94.

SAS. 2012. Statical Analysis System User's Guide. Statical. Version 9. 1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N. C. USA.

rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organism. J. mem inst. Oswaldocruz. 99 (1): 115 – 118.

Thiery I., Frachon E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomophogenic bacteria, pp. 55 – 73 in A. L. Lacey (ED): manual of techniques in insect pathology. Academic press.

Service, M. W. 1993. Mosquito (culicidae) chapter 5 cited in medical insect and arachinial. Edited by Richard, D-plan and Roger. W. C. Rossky. Published by chapman and Hall 15 B, p. 422.

Sivagnaname. Nand Kalyvanasundaram. M. 2004. Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlanta monophylla* (family: