تصنيع مستحضرحيوي من بكتريا *Bacillus thuringiensis* ضد يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say*

د.حسام الدين عبدالله محمد
كلية الزراعة /قسم وقاية النبات / جامعة بغداد

م.م. ايناس حاتم كريم
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تصنيع مستحضر حيوي من بكتريا Bacillus thuringiensi ضد بعوض Culex quinquefasciatus Say ، تم استخدام النشأ الذرة كوسط حامل للبكتريا وبعد تحضير المستحضر تم استخدام الجرع (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 غم\ لتر) واظهرت النتائج ان الجرع (0.5 ، 1 ، 2 غم\ لتر) لم تظهر اي فعالية ضد يرقات البعوض لذا كانت نسبة القتل 0 % ، اما الجرعة 3غم فكانت النتائج خلال 24 ساعة 0 % اما خلال 48 ساعة فكانت نسبة القتل 2 % وخلال 72 ساعة 6.00 % ، اما عند استخدام 4 غم من المستحضر فقد كانت النتائج خلال 24 بلغت نسبة القتل 28.00 % وخلال 48 ساعة بلغت نسبة القتل 52.00 % وبلغت نسبة القتل خلال 72 ساعة 20.00 % ، اما معاملة المقارنة فقد كانت نسبة القتل خلال القراءات الثلاث 0 % .

اختبرالمستحضر بعد فترة خزن اربعة اشهر في الثلاجة حيث تم استخدام الجرع (4،6غم /لتر) نلاحظ نسبة القتل خلال 24 ساعة عند استخدام الجرعة 4 غم \ لتر بلغت 13.0% ، اما عند استخدام الجرعة 6 غم \ لتربلغت نسبة القتل 26% ، وخلال 48 ساعة بلغت نسبة القتل بأستخدام الجرعة 4 غم 41.0% وبأستخدام الجرعة 6 غم بلغت نسبة القتل 46.0% ، اما بعد 72 ساعة بلغت نسبة القتل بالجرعة 4 غم 45% وبأستخدام الجرعة 6 غم بلغت نسبة القتل 26% اما معاملة المقارنة اعطت نسبة القتل صفر% .

producing bio-preparation of the bacteria Bacillus thuringiensis against larvae of the mosquito Culex quinquefasciatus Say

Hussam Al-Din Abdullah
College of Agriculture_ Plant Protectio
University of Baghdad

Enas Hatem Kareem
College of Veterinary Medicine
University of Baghdad

Abstract

This study aimed to produce antibiotic from the bacteria Bacillus thuringiensi on the mosquito spp Culex quinquefasciatus Say by using Corn starch as a medium for bacteria holder and after preparing the product has been used potions (0.5, 1, 2, 3,4) gm/L.

The results show that the concentration (0.5, 1, 2) gm/L didn't show significant differences against the mosquito larvae and the lethal dose percentage were 0%. While the concentration 3 gm/L didn't show significant differences after 24 hour while 2%, 6% after 48 and 72 hours respectively.

However results showed that media concentration with 4 gm/L lethal dose percentage 28% , 52% and 20% after 24, 48 and 72 hours respectively. While the treated group the lethal percentage were 0% during the different period.

After four months of storage the preparation in the refrigerator the dose (4, 6) gm/L were used the lethal percentage were 13.0% after 24 hours when 4 gm used while it reach 26% when using concentration 6 gm/L; after 48 hours the lethal percentage were 26% with the concentration 4 gm. And the lethal percentage were 41.0% when the concentration dose was 4 gm .

Using a dose of 6 gm the lethal percentage were 46.0%, but after 72 hours, the percentage of lethal percentage 4 gm of 45% using the dose 6 g lethal percentage reached 26% either treatment comparison gave the lethal percentage zero%.

المقدمة

تعاني معظم دول العالم من الآفات ذات الأهمية الطبية والبيطرية Medically and Veterinary Important Pests لاسيما الناقلة منها للعديد من الأمراض و الأوبئة الخطرة المشتركة بين الآنسان والحيوان.

يعد البعوض Mosquitoes من الحشرات المهمة طبياً وبيطرياً لذلك وضعت برامج خاصة لمكافحته في أنحاء مختلفة من العالم بطرائق متعددة ، لم تعد الأساليب المعروفة في مكافحة الآفات ومنها المبيدات الزراعية مجدية في الحد من أضرار هذه الآفات بسبب ظهور سلالات مقاومة منها وكذلك زيادة تكاليف المبيدات الزراعية فضلاً عن كونها مصدر لتلويث البيئة لذلك لا بدايجاد مواد طبيعية في البيئة تستخدم لمكافحة البعوض (Hardin و Jackson، 2009).

نلاحظ في الآونة الأخيرة لجأ المختصون الى تفعيل مبدأ المكافحة البيولوجية وتطويرها أذ تعد بكتريا *Bacillus thuringiensi* من اهم الانواع المستخدمة لمكافحة البعوض لا سيما وانها موجودة بشكل طبيعي في جميع انحاء العالم في التربة والبيئات المائية عزل من قبل. من يرقات البعوض في ولاية كاليفورنيا ، كما وجد عدة عزلات من هذه البكتريا اذ شخصت في معهد باستور وقد اثبتت كفاءتها في مكافحة البعوض لذا ظهر العديد من المنتجات التجارية للهذه البكتريا (Connelly و Carlson ، 2009) .

هدفت هذه الدراسة لمعرفة تأثير البكتريا المصنعة حيويا على نسب القتل يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say* ومعرفة نسبة القتل بعد خزن اربعة اشهر للمستحضر الحيوي وتقييمه حيويا على يرقات بعوض النوع المذكور .

المواد والطرائق

تصنيع مستحضر

اختبرت عزلة محلية حصلت عليها من دراسة دكتوراه سابقه (د.جاسر محمد جميل) اجريت في قسم وقاية النبات كلية الزراعة /جامعة بغداد من محافظة الانبار للغرض تصنيع مستحضر تجاري من هذه البكتريا واختبارها على يرقات بعوض Culex quinquefasciatus :.

صنع المستحضر البكتيري على وفق الخطوات الاتية (McGuire، 1996; Guerra واخرون ، 1996) :

1 _ تنمية البكتريا حضر المرق المغذي الملائم للبكتريا *Bacillus thuringiensis* وهو Nutrient broth بواقع 13 غم لكل لتر ماء معقم يعقم بجهاز الموصدة (Autocleave) عند درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة وبعد تحضير يلقح بعزلة المحلية عزلة الانبار تحضن بالحاضنة على درجة حرارة 7 3 مْ ± 2 لمدة 48 ساعة .

2 _ ترسيب الكتلة الحيوية Biomass للاحياء المجهرية . نفذت هذه الخطوة بعد نقل المرق السائل الى انابيب اختبار ووضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 30 دقيقة ، تترسب الخلايا الميكروبية بقعر الانابيب اخذت الكتلة الحيوية.

3 _ اضافة النشأ الذرة الى البكتريا لغرض زيادة الحجم استعمل لكل واحد غم من البكتريا اضيف 10 غم من النشأ مزج البكتريا مع النشأ الذرة وتوضع بالحاضنة بدرجة حرارة 37مْ ± 2 لمدة 24 ساعة .

4 _ اضيف مرة اخرى نشأ الذرة بمعدل اغم من البكتريا الى 100 غم من النشأ ويوضع بالحاضنة على درجة حرارة 30 مْ ± 2 .

5 _ سحقت وخلطت المكونات حتى تجانس المزيج النهائي .

6 _ العد المايكروبي ، و استعملت طريقة التنقيط (Mailsو Misria، 1932) اخذ غرام واحد من المستحضر واذابته ب 9 غم من ماء البيتون واجراء التجفيف العشري حضرت اطباق بتري حاوية على وسط المغذي Nutrient ager

وضعت خمس قطرات بصورة متعامدة وضعت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 ± 2 مْ لمدة 24 ساعة وبعد التأكد من نمو يحسب عدد المستعمرات النامية في كل قطرة طبقت المعادلة التي ذكرت في فقرة عد البكتريا ، و وجد ان عدد المستعمرات في الغرام الواحد من المستحضر هو 1.79 × 10^7 \ CFU . gm

جمع وتربية بعوض *Culex quinquefasciatus Say*

جمعت قوارب بيض البعوض من احواض المتروكة في كلية الزراعة / ابو غريب خلال شهر ايلول عام 2011 بأستعمال وعاء معدني وصل بذراع خشبي طويل للوصول الى سطح الماء للحصول على الادوار المائية للبعوض (بيض ،يرقات ،عذارى) عزلت قوارب البيض بأستعمال فرشاة ناعمة ونقلت الى احواض زجاجيةاعدت لهذا الغرض ابعاده (10× 10× 10سم) بسعة 1 لتر من ماء حنفية متروك لمدة (72) ساعة (Sivagnanme و Kalyanasundaram ، 2004) وضعت اواني التربية في الحاضنة بدرجة حرارة 27 مْ واضاءة 12 ساعة يومياً. وبعد فقس البيوض غذيت اليرقات بأستخدام عليقة اسماك تتكون (بروتين 35 %، دهون 2.5 %، الياف 2.5 %، كالسيوم 2 _0.9 %، فوسفات 0.8 _ 1.8 %) ولغرض تلافي حصول تعفن في ماء التربية فقد استبدل الماء كل ثلاثة او اربعة ايام اثناء هذه المدة ازيلت الطبقة السطحية المتعفنة بواسطة قطعة من القطن (العيسى 2006). للحصول على البالغات وضعت العذارى المتحولة في وعاء بلاستيكي نبيذي سعة 500 مل يحتوي على 400 مل ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة لغرض التخلص من بقايا كلور التعقيم ووضعت الاواني داخل اقفاص تربية ذات ابعاد (30× 30 × 30) مغلق بالمشبك المعدني من اربعة جوانب ومغطى بقطعة قماش اسطوانية من احد الجوانب والقاعدة من الخشب و وضعت الاقفاص بالحاضنة بدرجة حرارة 27 ± 2مْ واضاءة 12 ساعة يومياً، بعد بزوغ البالغات غذيت الذكور باستخدام قطعة قطن مشبعة بمحلول سكري بتركيز 10 % وضعت في طبق زجاجي داخل القفص، اما الاناث غذيت باستخدام حمامة (Pigeon) اذ نزع الريش منها من منطقة الصدرووضعت الحمامة فوق القفص بعد ربط اجنحتها وارجلها طوال الليل (Over night) بحيث تتمكن الاناث من الحصول على وجبة الدم بسهولة. وبعد مرور 2_ 3 يوم جمعت قوارب البيض (Egg rafts) الموضوعة من قبل الاناث المتغذية على الدم نقلت القوارب بواسطة فرشاة ناعمة الى الاحواض الزجاجية النظيفة محتوية على الماء المتروك 72 ساعة مع مراعاة عدم تحريك القارب لتلافي تفككه وتكسره. بعد الفقس اخذت اليرقات وشخصت، ربيت المستعمرة لأكثر من خمسة اجيال لبدء بأجراء المعاملات لغرض التخلص من بقايا المبيدات الكيمياوية والاحيائية المستخدمة في مكافحتها (العادل 2006).

تأثير المستحضر المصنع على يرقات للبعوض *Culex quinquefasciatus Say*:

اخذت 20 يرقة بأعمار يرقية مختلفة وضعت في وعاء بلاستيكي سعة 2 لتر تم وضع (واحد لتر) من ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة مع وضع 1.5 غم من عليقة الاسماك لتغذية اليرقات جربت عدة كميات للوصول الى كمية الفعالة للمكافحة اليرقات ، واستخدم (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4 غم\ لتر) من المستحضر عزلة الانبار BtAN كررت التجربة ثلاث مكررات لكل معاملة ، اما معاملة السيطرة فقد عوملت بأضافة النشأ غير المعامل بالأوزان نفسها المذكورة وكررت التجربة ثلاث مرات غطيت الاواني بقطعة من قماش التول ، وتم اخذ القراءات بعد 24 ساعة و48 ساعة و72 ساعة روقبت اليرقات الميتة والمدة الزمنية لهلاك اليرقات.

تأثير المستحضر المصنع على يرقات البعوض *Culex quinquefasciatus Say* بعد فترة خزن اربعة اشهر :

بعد تصنيع المستحضر خزن لمدة 4 اشهر في الثلاجة بدرجة حرارة (8 ± 2) قيم على يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say* حيث اعيد العد الميكروبي للمستحضر بأستخدام طريقة التنقيط (Mails وMisria ، 1932) اخذ غرام واحد من المستحضر واذابته ب 9 غم من ماء الببتون واجراء التجفيف العشري حضرت اطباق بتري حاوية على وسط المغذي Nutrient ager وضعت خمس قطرات بصورة متعامدة وضعت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 ± 2 مْ لمدة 24 ساعة وبعد التأكد من نمو حسب عدد المستعمرات النامية في كل قطرة طبقت المعادلة حيث وجد ان العدد المستعمرات في الغرام الواحد من المستحضر هو 1.83 × 10^7 \CFU . ml

اجري التقييم الحيوي للمستحضر حيث اخذ 20 يرقة وضعت بأناء بلاستيكي سعة 2 لتر تم وضع (1 لتر) من ماء حنفية متروك لمدة 72 ساعة اذ استعملت التراكيز (4 ، 6 غم \ لتر) من المستحضر المصنع كررت التجربة ثلاث مرات لكل معاملة ، اما معاملة المقارنة فقد عوملت بأضافة كمية المستحضر نفسها بأضافة نشأ غير معامل وكررت التجربة ثلاث مرات ايضاً غطيت الاواني بقطعة من قماش التول ، اخذت القراءات بعد 24 ، 48 ، 72 ساعة حيث تم حساب نسبة المئوية لليرقات الميتة والمدة الزمنية لهلاك اليرقات.

التحليل الاحصائي :

حللت التجارب المختبرية بكونها تجارب عاملية على وفق التصميم العشوائي الكامل التعشية (C .R .D). اما التجربة الحقلية فحللت بكونها تجربة عاملية على وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (R .C .B .D) . اختبرت النتائج بأستعمال اقل فرق معنوي (L .S .D) . وعند مستوى احتمال (0.05) (الراوي ، 2000) .

النتائج والمناقشة

تقييم المستحضر الحيوي المصنع على يرقات البعوض *Culex quinquefasciatus Say* :

جدول (1) يوضح الجرع الفعالة ضد يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say* وتشير النتائج الى ان الجرع (0.5 ، 1 ، 2 غم\ لتر) لم تظهر اي فعالية ضد يرقات البعوض لذا كانت نسبة القتل 0 % ، اما الجرعة 3غم فكانت النتائج خلال 24 ساعة 0 % اما خلال 48 ساعة فكانت نسبة القتل 2 % وخلال 72 ساعة 6.00 % ، اما عند استخدام 4 غم من المستحضر فقد كانت النتائج خلال 24 بلغت نسبة القتل 28.00 % وخلال 48 ساعة بلغت نسبة القتل 52.00 % وبلغت نسبة القتل خلال 72 ساعة 20.00 % ، اما معاملة المقارنة فقد كانت نسبة القتل خلال القراءات الثلاث 0 % .

وجد Nartey واخرون (2013) عند استخدام مستحضر من بكتريا Bti ضد يرقات البعوض Anophilus حيث استعملت عدة تراكيز للوصول للتركيز القاتل فظهر عند استخدام التركيز 0.026 ملغم / لتر نسبة قتل 50% ، وعند استخدام التركيز 0.136 ملغم/ لتر اعطى نسبة قتل 95% من يرقات البعوض .

وجد Ejiofor و Okafor (1991) انه بأستخدام المستحضر الحيوي السائل من بكتريا Bti وتجربته حيوياًعلى يرقات البعوض حيث استطاع ان يخفض تعداد اليرقات البعوض بمعدل يتراوح 87.5 - 100 % ، ويتفق مع ما وصل اليه Mulla واخرون (1988) من المستحضر من بكتريا Bacillus sphaericus حيث وجدوا عند تطبيقه حيوياً على يرقات البعوض *Culex quinquefasciatus Say* حيث بلغت نسبة القتل بمعدل يتراوح 91 _ 98 % .

جدول (1).تأثير التراكيز المختلفة للمستحضر البكتيري في النسبة المئوية للقتل في يرقات البعوض Culex quinquefasciatus Say

الوقت / المعاملة	24	48	72	المجموع الكلي لنسب المئوية للقتل
0.5 غرام	b0.00A	b0.00A	c0.00A	0.00
1 غرام	b0.00A	b0.00A	c0.00A	0.00
2	b0.00A	b0.00A	c0.00A	0.00
3	b0.00B	b0.02AB	b6.00A	6.00
4	a B 28.00	A49.00 a	a20.00C	97.00
المقارنة	b0.00A	b0.00A	c0.00A	0.00

$LSD_{EXT} = 6.12$

$LCD_{TIME} = 7.5$

$LSD_{EXT,TIME} = 10.60$

- الحروف الانكليزيةالصغيرة تدل على وجود اختلافات معنوية بين المستحضروالسيطرة (0.05)
- الحروف الانكليزية الكبيرة تدل على وجود اختلافات معنوية بين الاوقات للمستحضر ($P \leq 0.05$)

تقييم الحيوي للمستحضر المصنع على يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say* بعد فترة خزن اربعة اشهر :

تشير نتائج الواردة في الجدول (2) الى كفاءة المستحضر المصنع بعد مدة خزن 4 اشهر حيث بينت الى حدوث نسبة قتل عالية في يرقات البعوض اثناء التقييم الحيوي للمستحضر بأستخدام جرع 4 غم ، 6 غم .

نلاحظ نسبة القتل خلال 24 ساعة عند استخدام الجرعة 4 غم \ لتر بلغت 13.0% ، اما عند استخدام الجرعة 6 غم \ لتربلغت نسبة القتل 26% ، وخلال 48 ساعة بلغت نسبة القتل بأستخدام الجرعة 4 غم 41.0% وبأستخدام الجرعة 6 غم بلغت نسبة القتل 46.0% ، اما خلال القراءة الثالثة بعد 72 ساعة بلغت نسبة القتل بالجرعة 4 غم 45% وبأستخدام الجرعة 6 غم بلغت نسبة القتل 26% اما معاملة المقارنة اعطت نسبة الموت الطبيعي 0% .

جدول (2) تأثير الخزن على فعالية بعض التراكيز للمستحضر في قتل يرقات بعوض *Culex quinquefasciatus Say*

الوقت / المعاملة	24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة	المجوع الكلي لنسب المئوية للقتل
4 غرام	b13.00B	a41.00A	a40.00A	94.00
6 غرام	a26.00B	a46.00A	b26.00B	98.00
المقارنة	c0.00A	b0.00A	c0.00A	0.00

$LSD_{EXT} = 2.10$

$LCD_{TIME} = 3.5$

$LSD_{EXT,TIME} = 6.20$

الحروف الكبيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P < 0.05$)

الحروف الصغيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P < 0.05$)

المصادر العربية

العادل ، خالد محمد . 2006 . مبيدات الافات مفاهيم اساسية ودورها في المجالين الزراعي والصحي . الطبعة الاولى ، كلية الزراعة _ جامعة الموصل . العراق . 422 صفحة .

العيسى ، رافد عباس علي . 1999 . تأثيربعض منظمات النمو الحشرية في تثبيط القابلية التكاثرية لبعوض Culex quninquefasciatus Say . رسالة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

الراوي ، خاشع . 2000 . المدخل الى علم الاحصاء . جامعة بغداد . الطبعة الثانية . 456 صفحة .

قث

المصادر الانكليزية

Connelly , C . R. and D . B. Carlson (Eds.) . 2009 . Florida Coordinating Council on Mosquito Control . Florida Mosquito Control : The State of the mission as defined by Mosquito Controllers , regulators , and environmental managers . Vero Beach FL : University of Florida medical Entomology Laboratory . pp. 259 .

Ejiofor AO. ; Okafor N . 1991 . Formulation of flowable Liquid Concentrate Bacillus

blood . The Journal of hygiene 38 (6) :732 - 49 .

Mulla , MS . Darwazeh HA . Tietze NS . 1988 . Efficacy of Bacillus sphaericus 2362 formulations against floodwater mosquitoes . Journal Am mosquito Control Assoc . 4 (2) : 172 – 4 .

Narty R; Owusu E; Baffour S;Annan A; Oppong S; Backer N . 2013 . Use of Bacillus thuringiensis Var israelensis as aviable Optionia an Integrated Malaria vector Control programme in the Kumasi Metropolis , Ghana . Parasit Vector , 22: 6(1) : 116.

Sivagnaname , N. and Kalyanasundaram , M . 2004 . Laboratory Evaluation of methanolic extract of Atlantia monophlla (Family : Rutaceae) against immature stages of mosquito and Non – target organisms . J. Mem . Inst. Oswaldocruz . 99 (1) : 115- 118 .

thuringiensis serotype H-14 spores and crystals as mosquito Larvicide . Journal Appl Bacteriol . 71 (3) : 202- 6 .

Guerra , P.T; McGuire , M.R. ; Roldan , H.A ; Wong , L.G ; Shasha, B.S. and . Vega, F.E. 1996. Sprayable Granule Formulations for Bacillus thuringiensis . J.Econ . Entomol . 89(6):1424_1430.

Hardin, J . and . Jackson , L.C. 2009 . Applications of natural Products in the Control of Mosquito _ Transmitted diseases . African Journal of Bio technology , Vol . 8(25) , pp. 7373 _ 7378 .

McGuir , Michael . 1996 . Recent Advances in Formulating Bt and Other Microbials for Insect Control . Entomology Intrenationl Congress .

Miles , AA.; Misra , SS, Irwin , JO. 1932 . The Estimation of the Bactericidal power of the