عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus thuringiensis* من الترب العراقية واستخدامها ضد يرقات حشرة عث التين *Ephestia cautella*(Welker)

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 مطلك صفاء عبد الرحيم محمود
صابرين عبد الهادي صالح
مركز التقانات الغذائية والاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا
*مركز المكافحة المتكاملة للافات/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 *Ephestia cautella* (Welker) احدى اهم الحشرات المخزنية التي تصيب يرقاتها التمور المخزونة لذا هدف البحث الى عزل بكتريا *Bacillus thuringiensis* من الترب المحلية وتشخيصها وغربلة العزلات ذات الكفاءة في المقاومة الاحيائية من يرقات حشرة عثة التين. عزلت 20 عزلة تعود الى جنس *Bacillus* من يرقات حشرة عثة التين المعاملة بعالق سبورات التربة وشخصت 8 عزلات بانها تعود لبكتريا *B. thuringiensis*. وقد تبين انها منتجة لانزيمات البروتيز واللايبيز والجيلاتينيز والهيمولايسين وتتميز بقابليتها على تكوين الاغشية الحيوية وان 7 من العزلات المحلية تقاوم المضاد الحيوي البنسلين واظهرت عزلة واحدة مقاومة المضاد الحيوي الكلورامفينكول واظهرت بقية العزلات حساسية تجاه الكلورامفينكول والتتراسايكلين والناليديكسيك اسيد والاينوكسين. بينت غربلة عزلات *B. thuringiensis* تفاوت في نسب قتل يرقات حشرة عث التين حيث اعطت العزلة المحلية *B. thuringiensis* KS3 نسبة قتل تصل الى 80 % من يرقات الحشرة مع اسودادها نتيجة فعالية السم البكتيري. وتبين ان التركيز القاتل النصفي هو 3.7 ملغم مل$^{-1}$ مقارنة مع 4.6 ملغم مل$^{-1}$ للعزلة التجارية كما اوضح نمط الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS نمطا من البروتينات مشابه لنمط بروتينات العزلة التجارية.

الكلمات مفتاحية : *thuringiensisBacillus* ، المكافحة 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. thuringienisis* 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 والمطفر لاغلب هذه المبيدات لذا لجأ العديد من الباحثين الى البحث عن مبيدات حشرية صديقة للبيئة وتطويرها لاستخدامها في مجال المكافحة الاحيائية [1]. ومن اهم الاحياء المجهرية المستخدمة في مجال المكافحة 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 دلتا الداخلية delta endotoxin ذي السمية العالية لاغلب يرقات حشرات رتبة حرشفية الاجنحة (Lepidoptera) ورتبة غمدية الاجنحة (Coleoptera) ورتبة ثنائية الاجنحة (Diptera) وبعض اللافقريات وعدم تأثيره على الحيوانات الحقلية والانسان [2، 3] مما اهل تلك البكتريا لاستخدامها في مجال انتاج وتطوير مبيدات للمكافحة الاحيائية ويسعى العاملون

في مجال المكافحة الاحيائية وبصورة مستمرة الى عزل عتر 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 عتر ذات صفات تختلف عن صفات عتر البيئات الاخرى من حيث السموم المنتجة [6]. وقد تمكن الباحثين من عزل سبورات هذه البكتريا من مصادرها المختلفة باستخدام اوساط زرعية انتخابية 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 (welker) *E. cautella* 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 الخضرالمختلفة ومن عمق 5- 10 سنتمتر من سطح التربة خلال شهر تشرين الاول لعام 2012 من مناطق مختلفة لمحافظات بغداد وكربلاء والموصل والبصرة وبواقع 7 و9 و4 و4 نماذج على التوالي لكل محافظة ووضعت النماذج في اكياس بلاستيكية وحفظت في المختبر.

تغذية يرقات حشرة(welker)*Ephestia cautella*

حصل على يرقات حشرة عث التمور(welker) *Ephestia cautella* من مختبرات قسم المكافحة الاحيائية/ دائرة البحوث الزراعية في وزارة العلوم والتكنولوجيا وغذيت اليرقات على وسط (81% جريش و 12% كليسيرين و6% دبس و1%خميرة) ونميت بدرجة حرارة 25م°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 20م°س.تمت معاملة العالق حراريا بدرجة 80 م°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 م°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 بوساطة وسط لوريا برتاني السائل (Lauria Bertani broth) ذي الاس الهيدروجيني6.8 (1% من تربتون و 0.5 % من مستخلص الخميرة و1%من ملح الطعام النقي) [9]. وحضنت الاوساط بدرجة 30م°س ولمدة 48 ساعة وتمت معاملة المزارع البكتيرية بدرجة حرارة 80 م°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. thuringeinsis* kurstaki (Rajan, India) وثم التقطت المستعمرات ذات الشكل القريب من العزلة التجارية وزرعت لغرض اكثارها.

تشخيص البكتريا

اعتمد الفحص المجهري لشرائح مصبوغة 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 والاوكسيديز والهيمولايسين والاميليز والبروتييز والجلاتينيز واللايبيز وفحص حركة البكتريا ونموها بتراكيز مختلفة 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[11،12،13] حيث حضر وسط نقيع القلب والدماغ المدعم بوساطة 1% سكروز ووزع في انابيب وبواقع 5 مل لكل انبوب، عقمت الانابيب وبردت ولقحت بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 30 م°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 بالفلترة الى وسط نقيع القلب والدماغ الصلب والمدعم بسكر السكروز وبتركيز 1%، لقحت الاطباق بالبكتريا وحضنت بدرجة 30م°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 التنافذ بالاكار باستخدام اقراص المضادات الحيوية ذات التراكيز الاتية (مكغم دسك$^{-1}$): البنسلين (10) وتتيتراسايكلين (30) وكلورامفينكول (30) ونالديكسيك (30) ونياسين (30). زرعت العزلات البكتيرية على سطح وسط اكار موليرهنتون (Mueller Hinton agar) وحضنت الاطباق بدرجة 30 م°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-1لتكوين 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 للتجانس 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

قدرتركيز 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-1ولمدة 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. اختيرت 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 و4 و6 و8 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-1عند 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. thurungiensis* 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.

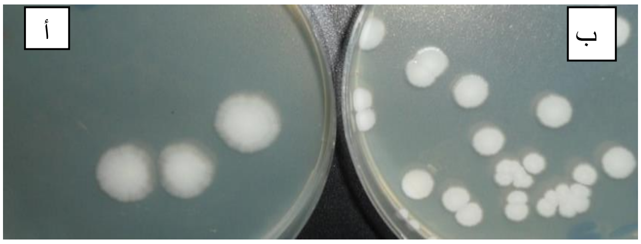
النتائج والمناقشة

بينت نتائج العزل الاولي لسبورات *B. thurngiensis* 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 التربة	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
كربلاء	9	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
موصل	4	1	19/1
		6	15/5
		7	17/3
		10	17/3
البصرة	4	16A	20/0
		16B	14/6
		16C	20/0
		16D	18/2

جمعت اليرقات المقتولة في كل نموذج وعلقت بوساطة وسط لوريا برتاني السائل وحضنت بدرجة 30س°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 وسطح 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* المعزولة محليا 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 العتر الجديدة من بكتريا *B. thuringiensis* في انها تعتمد الفعالية الحيوية للعتر 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[16،8] في عزلهما لعتر جديدة من *B. thuringiensis* من الترب السورية والمصرية على التوالي.

بين فحص تحلل الدم (انتاج الهيمولايسين) ان 13 عزلة فقط هي محللة للدم وتمثل نسبة 65% من العزلات المنتخبة وان 7 عزلات غير محللة بنسبة 35%. واظهر فحص تحلل 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. يعد فحص تحلل الدم من الفحوصات الاولية 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 الهيمولايسين. 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 وانتاجها للاجسام 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*.

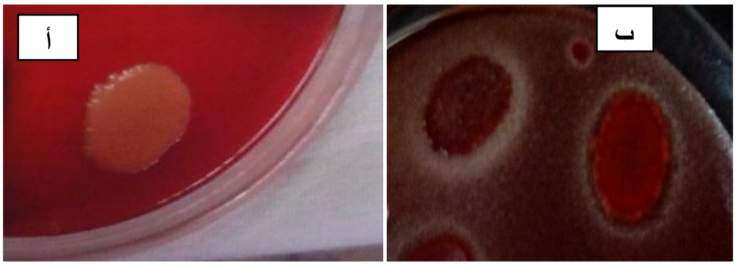
جدول(2): الفحوص التشخيصية المعتمدة في تشخيص عزلات *B. thuringiensis* المعزولة من الترب المحلية

الصفة التشخيصية	نتائج الاختبار								
العزلات	KS3	KS6	KS1	KS9	KS14	KS16B	KS16	KS5	Bt kurstal
شكل الخلايا	أ	أ	أ	أ	أ	أ	أ	أ	أ
وجود السبور	+	+	+	+	+	+	+	+	+
شكل السبور وموقعه	ب	ب	ب	ب	ب	ب	ب	ب	ب
تكوين الاجسام خارج سبورية	+	+	+	+	+	+	+	+	+
الكاتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
الاوكسيديز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الدم	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الجلاتين	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحلل الكازايين	+	+	+	+	+	+	+	+	+
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 العتر ذات القابلية على انتاج انزيمات محللة في وقت واحد منها العزلة KS3 والعزلة KS14 وKS12 وKS6 حيث انتجت كل من انزيم البروتييز واللايبيز والجلاتينيز 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 7عزلات لبكتريا *B. thuringiensis* المحلية قد عزلت من ترب زراعية مختلفة لمحافظات بغداد (3 عزلات) وكربلاء(2 عزلة) وموصل(عزلة) والبصرة(عزلة) وان عزلة واحدة *B. thuringiensis* KS9 من ترب غير زراعية كما امتازت نماذج الترب 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 للترب العراقية وهذا يتوافق مع [17] الذي وجد ان 60% من عزلات *B. thuringiensis* معزولة من ترب زراعية لمنطقة الجاموم (السعودية).

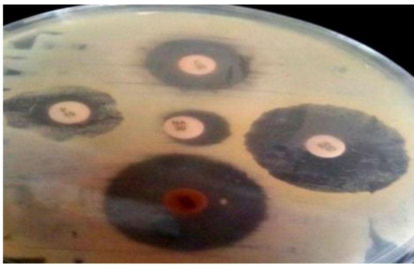
اوضحت نتائج التحري عن قابلية عزلات *B. thuringiensis* لتكوين الاغشية الحيوية الظهور تكتل طافي من الخلايا على شكل غشاء في اعلى انبوبة المزرعة البكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ المدعم بالسكروز وهذا دليل تكون الاغشية الحيوية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام، كما لوحظ تلون سطح المزروع البكتيري باللون الاسود 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 *Staphyloccocus aureus*.



شكل(2): التحري عن تكوين الاغشية الحيوية لبكتريا *B. thuringeinsis* 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 واشار [18] الى مساهمة الاغشية الحيوية في نجاح عملية التضاد البكتيري للاحياء المجهرية الاخرى مما يؤهلها في تطبيقات المكافحة 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 الكلورامفينكول وحساسية كبيرة للمضادات الحيوية التتراسايكلين والكلورامفينكول والناليديكسك واينوكسان واظهر التحليل الاحصائي عزلات لبكتريا *B. thuringiensis* مقاومة لمضادات البنسلين والامبسلين وحساسيتها للعديد من مضادات الحياة الاخرى. ويوضح شكل (3) ظهور هالة 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 الترب العراقية باستخدام اقراص المضادات الحيوية

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

اظهر فحص السمية لجرعة واحدة من خليط السبورات البلورات-1 ان هناك تفاوتا في القابلية السمية للعزلات المشخصة حيث اعطت العزلة *B. thuringiensis* KS3. اعلى نسبة قتل لليرقات وصلت الى 80% والتي اختلفت معنويا 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 معنويا مع باقي عزلات الدراسة. في حين حققت العزلتين KS9 و KS5 اقل نسبة قتل وصلت الى 25% ولم تختلف معنويا مع العزلات KS12 وKS16 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 تأزري بين بلورات السم والسبورات ممثلة بالاغلفة السبورية السامة في نجاح العزلات البكتيرية في مجال المكافحة الاحيائية.

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

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

LSD تحت 0.05%= 6.9

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

- **تمت المقارنة اعتمادا 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 عتر 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 بالاضافة لتاثير بعض العوامل البيئية الاخرى مثل عمق العينة ودرجة الحرارة في فترة اخذ العينة ونسجة التربة ووجود الاوكسجين والرطوبة وتوافر المواد المغذية في التربة.

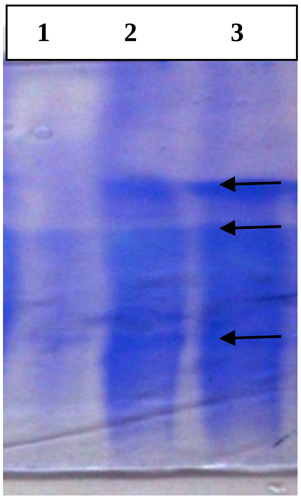
شكل(4) يرقات حشرة *E. cautella* معاملة بمزروع بكتريا *B. thuringiensis* KS3
أ= يرقات معاملة بمزروع العزلة.KS3، ب= يرقات السيطرة (ميتة بصورة طبيعية)

سجل قياس التركيز القاتل النصف مئوي LC50 للعزلة المحلية.*B. thuringiensis* KS3 انخفاض 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 KS3 *B. thuringiensis* ضد يرقات حشرة *E. cautella*

العزلة	LC50	Chi square(x2)	df
***B. thuringeinsis*KS3**	**3.7**	**2.7**	**10**
***B. thuringeinsis* kurstaki**	**4.6**	**11.9**	**10**

اظهر الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد 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 بين65-274 كيلو دالتون وتتراوح اوزان cyt protein بين 21-25 كيلو دالتون.



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

نستنتج مما تقدم امكانية تطبيق طريقة عزل جديدة من بكتريا *B. thuringiensis* ذات فعالية بايولوجية باستخدام يرقات الحشرة المستهدفة في المكافحة البايولوجية، على الرغم من تشابه العزلة المحلية SK3 *B. thuringiensis* مع العزلة التجارية *B thuringiensis* kurstaki الا انها 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 proteinsfrom *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. Assaeedi, 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.

.