Isolation of local samples of *Bacillus thuringiensis* and testing its effectiveness in the laboratory against the red two-spotted spider *Tetranychus urticae* Koch.

Dr. Omiema Nasser*
Dr. Majida mefleh**
Lama hasan***

(Received 8 / 8 / 2023. Accepted 5 / 11 / 2023)

□ ABSTRACT □

Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the local soil in Lattakia Governorate, the bacterial isolate was characterized by some characteristics based on their Gram staining, some biochemical properties and depending on the color characteristics on specific and selective cultures.
The isolate were tested against the Koch red two-spotted spider. *Tetranychus urticae*, under laboratory conditions, on stages (egg, nymph, and adult).
The results of the tests showed that the isolate had a significant effect on the egg stage, as the concentration of 10^7 cells / ml gave the highest mortality rate of 82%, with a significant difference from the rest of the treatments. Mortality in other stages was (43-92) % for larvae, (47-95) % for nymphs of the first age, (56-90) % for nymphs of the second age, and (44-91) % for adult females.
The control mortality rates ranged between (0-5) % for larvae, (1-8) % for first-instar nymphs, (3-11) % for second-instar nymphs, (4-7) % and (4-7) % for adult females.

Keywords: red two-spotted spider, *Tetranychus urticae* Koch., *Bacillus thuringiensis*

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

*Professor -Department of Environmental Prevention (Microbiology) – Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Latakia- Syria.
**General Authority for Agricultural Scientific Research - Syria.
***Postgraduate Student (Phd) -Department of Environmental Prevention– Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Latakia- Syria.

عزل عينات محلية لبكتريا *Bacillus thuringiensis* واختبار فعاليتها مخبرياً في مكافحة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch.

د. أميمة ناصر*

د. ماجدة مفلح**

لمى حسن***

(تاريخ الإيداع 8 / 8 / 2023. قبل للنشر في 5 / 11 / 2023)

□ ملخّص □

عزل بكتريا من جنس *Bacillus thuringiensis* من التربة المحلية في محافظة اللاذقية، تم تمييز العزلة البكتيرية ببعض الخصائص اعتماداً على تلوينها بطريقة غرام، وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية وتبعاً للخصائص اللونية على المستنبتات النوعية والانتقائية.

تم اختبار كفاءة العزلة في مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* Koch.، وذلك ضمن ظروف المخبر، وذلك على أطوار (البيضة، الحورية والبالغة).

أظهرت نتائج الاختبارات أن العزلة لها تأثير ملحوظ في مرحلة البيضة، حيث أعطى التركيز 10^7خلية/ مل أعلى نسبة هلاك بلغت % 82 بفرق معنوي عن بقية المعاملات. كان النفوق في المراحل الأخرى (43–92) % لليرقات، و(47–95) % لحوريات العمر الأول، و(56–90) % لحوريات العمر الثاني و(44–91) % للإناث البالغة.

تراوحت معدلات وفيات الشاهد بين (0–5) % لليرقات و(1–8) % لحوريات العمر الأول و(3–11) % لحوريات العمر الثاني و(4–7) % و(4–7) % للإناث البالغة.

الكلمات المفتاحية: العنكبوت الأحمر ذي البقعتين، *Tetranychus urticae* Koch.، *Bacillus thuringiensis*

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY–NC–SA 04

*أستاذ – قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

** الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – سورية.

***طالبة دكتوراه– قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

مقدمة:

تعرف الإدارة المتكاملة للآفات بأنها استخدام كل التقنيات المتاحة لإنتاج محصول زراعي سليم يحوي متبقيات مبيدات منخفضة إلى أدنى نسبة، مع المحافظة على التوازن الموجود في عناصر البيئة المتمثلة بالحشرات المفيدة والإنسان والتربة والمياه .

يمكن تلخيص طرائق الإدارة المتكاملة للآفات بالآتي :الطرائق الزراعية، الطرائق الحيوية، الطرائق الوراثية، والطرائق الكيميائية وتعد المبيدات الكيميائية الحشرية التي يتم الاعتماد عليها بشكل أساسي مركبات سامة، ولها أضرار كبيرة وخطيرة صحياً وبيئياً؛ إن لم يكن هناك دقة في اختيار أنواعها ووعي كامل لكيفية استعمالها، إذ يؤدي ذلك إلى ظهور سلالات الآفات الحشرية المقاومة للمبيدات، مما يفاقم المشكلة ويشكل ضرراً على البيئة، ويحدث خللاً في التوازن البيئي .

يسبب الإفراط العشوائي في استخدام المبيدات القضاء على الكثير من الأعداء الطبيعيةّ للآفات الزراعي، مما أدى إلى ظهور آفاتّ حشرية ضارة كانت تعد ثانوية في مرحلة سابقة (كالمن)، وزادت خطورة هذه الحشرات نتيجة للخلل الذي أصاب التوازن البيئي الطبيعي الناتج بحد ذاته عن القضاء على مختلف الحشرات النافعة مثل المفترسات والطفيليات الحشرية. **[1]**

لقد شجع النجاح الذي حققته المبيدات الحديثة العلماء على الاعتقاد بأن هناك مجالاً واسعاً لإبادة العديد من الآفات الحشرية، والحد من انتشار الكثير من الأمراض التي تنقلها، ولكن لم يستمر هذا النجاح كثيراً حيث جابهت العلماء مشكلتان لم تكونا بالحسبان إحداهما نشوء مقاومة عند الحشرات، والثانية تلوث البيئة بهذه المواد الكيميائية المصنعة جعلت المشكلة الأولى من الصعب القضاء على الحشرات و أثارت المشكلة الثانية الاستهجان لاسيما لأصدقاء البيئة لذلك كان الحل الأمثل لهاتين المشكلتين هو اللجوء إلى بدائل أخرى، كاستخدام الكائنات الممرضة والتي تشكل نوعاً من المكافحة الحيوية، إذ تعاني الحشرات من الإصابة بأمراض تسببها كائنات حية دقيقة وقد تؤدي هذه الإصابة إلى حدوث نسب نفوق عالية في مجتمع الحشرة وتشمل هذه الكائنات الرواشح والجراثيم والفطريات لذا فقد تم اللجوء إلى استخدام مثل هذه الكائنات في القضاء على بعض الآفات الحشرية، لا سيما وأن العديد منها تكون ذات تأثير متخصص وطبيعية غير مؤثرة في البيئة، وقد أمكن إنتاج بعضها تجارياً كبدائل عن المبيدات الكيميائية وهذا ما يعرف بالمكافحة الجرثومية Microbial control**.** [2]

أهم أضرار المبيدات الكيميائية الزراعية:

1. أضرار صحية للإنسان: فالتسمم الحاد الناتج عن المبيدات مشكلة منتشرة بشكل كبير، حيث يبلغ عدد الحالات التقريبي في العالم حوالي 1−3 مليون/سنة، حيث ارتفع عدد المتضررين من هذه المبيدات بنسبة 1−9% من الحالات التي تقدمت للعلاج، كما يؤدي التعرض المزمن إلى مشاكل تناسلية، وازدياد خطر السرطان، وتأثيرات متأخرة على الأعصاب، وعلى المناعة. [3]

2. تأثيرات بيئية: يتسع مداها ليشمل تلوث الهواء، التربة، المسطحات المائية والمياه الجوفية.

فيصبح الهواء ملوثاً بالمبيدات نتيجة لعمليات الرش، وقد يسبب تبخر القطرات خلال عمليات رش المبيدات المستحلبة إلى تشكيل جزيئات صغيرة قابلة للحمل لمسافات بعيدة بواسطة التيارات الهوائية، كما يسقط قسم كبير من المبيدات المرشوشة على التربة، وتبقى بعض المبيدات المرشوشة في التربة لسنوات كمركبات الكلورين العضوي، وقد تتلوث المياه نتيجة طرح المبيدات الزائدة بعد عمليات الرش أو تسرب المبيدات أثناء عملية تشكيلها، أومن خلال طرح المبيدات في الأنهار والبرك للسيطرة على الأعشاب المائية.[3]

3. أثر اقتصادي: يتمثل بتكلفتها العالية سواء كانت مباشرة عبر شرائها، أو غير مباشرة عبر الإنفاق على معالجة أضرار استخدامها غير المرشد على الصحة و البيئة، فعلى سبيل المثال قدرت المساحات المصابة بحشرة السونة بـ (235) ألف هكتار في عام 2003، أي حوالي (15%) من إجمالي المساحة المزروعة بالقمح، وتركزت الإصابة في محافظات الحسكة حلب وادلب، حيث بلغت المساحات المصابة فيها (233) ألف هكتار، وبلغت المساحة التي تمت مكافحتها حوالي (231) ألف هكتار، وقد كانت كلفة الرش تقريباً (500) ل.س/هكتار وبكلفة إجمالية وصلت إلى حوالي (116) مليون ليرة سورية عام (2003). [4]

4. يؤدي الاستخدام المفرط للمبيدات وسوء استعمالها إلى فقدان التنوع الحيوي والبيولوجي وتدمير أنواع الحشرات المفيدة التي تشكل أضداد طبيعية للآفات. [5]

5. قد تتراكم مبيدات الآفات أيضاً تراكماً أحيائياً في الحيوانات الزراعية عن طريق العلف الملوث. [5]

6. يؤدي الاستخدام المتكرر للمبيدات الزراعية إلى عدم جدوى استخدامها بسبب ظهور سلالات مقاومة في العديد من الآفات الزراعية المستهدفة من قبلها لا بل قد تشكل محفزاً لمضاعفة كثافة هذه الآفات. [6]

العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch

يعود العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch لعائلة Tetranychidae ضمن رتبة Acari وهو من الآفات الاقتصادية الخطرة التي تصيب العديد من العوائل النباتية المختلفة ،كالعائلة الباذنجانية البقولية، الخبازية، النجيلية، نباتات الزينة، أشجار الفاكهة، والأدغال ويسبب لها خسائر اقتصادية كبيرة إذ تقوم الافراد المتحركة للآفة بامتصاص العصارة النباتية من الاوراق ،والبراعم وإحداث تشوهات فيها ،فضلاً عن تجمع الاتربة والغبار على الشبكة التي تنسجها ،مما يؤدي إلى عرقلة عملية التركيب الضوئي وقلة تكوين الاوراق الجديدة ، والازهار، وجفاف الاجزاء المصابة وموتها .استخدمت عدة اساليب لمكافحة هذه الآفة، وكان على رأسها المبيدات الكيميائية إلا أن الاستخدام الخاطئ والمفرط لها نجم عنه العديد من التأثيرات السلبية الضارة في النظام البيئي، كاختفاء بعض الاعداء الطبيعية كالمفترسات والطفيليات وظهور سلالات مقاومة لفعل المبيد فضلا عن تلوث البيئة.

الشكل (1): العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch

الشكل (2): أعراض الإصابة

مما دفع الجهات البحثية للتفكير بطرائق بديلة للمكافحة الكيميائية فبرزت المكافحة الحيوية كأحد الطرائق الآمنة والرائدة في هذا المجال كاستخدام الفطريات والجراثيم. [7]

يشهد المجتمع العلمي الذي يعمل في مجال أمراض الحشرات اهتمامًا أكاديميًا وصناعيًا متزايدًا باكتشاف وتطوير مبيدات حشرية جديدة كأدوات صديقة للبيئة لمكافحة الآفات ليتم دمجها، معًا أو تناوبًا، مع المواد الكيميائية في برامج إدارة الآفات. في هذا السياق العلمي، تشير بيانات السوق إلى نمو كبير في قطاع المبيدات الحيوية. [8]

دورة الحياة: [9]

- تضع الأنثى البيض فردياً على أسطح السفلي للأوراق ويبلغ في المتوسط 150 بيضة.
- تفقس اليرقات (ذات ثلاثة ازواج من الأرجل) بعد 3 – 4 ايام في الصيف.
- تتغذى اليرقة مدة 2– 3 يوم على عصارة النبات ثم تسكن.
- بعد 24 ساعة تنسلخ وتتحول إلى الحورية الأولى (ذات أربعة ازواج من الأرجل) .
- بعد أن تتغذى الحورية الأولى لمدة يومين تتحول الحورية الثانية التي تتغذى من 1–2 يوم ثم تتحول إلى الحيوان الكامل ذكر أو انثى.
- دورة الحياة في الصيف 8–15 يوم مدة حياة الأنثى في الصيف من15–20 يوم.

*عدد الأجيال: 28 جيل في السنة.

*الطور الضار: جميع الأطوار المتحركة (يرقة – حورية – حيوان كامل).

*العوائل: عوائل متعددة مثل الفول السوداني – السمسم – البرسيم – الفول.

محاصيل الخضر مثل القرعيات – البقوليات – الباذنجانيات – الخرشوف – السبانخ – الملوخية وأشجار الفاكهة مثل التين – الكمثرى والخوخ والمشمش وغيرها ونباتات الزينة مثل الورد والزهور والأسيجة مثل الدورنتا واللانتانا كما ينتشر بعض النباتات المعمرة مثل الخروع وكثير من الحشائش.

*ظروف انتشار الآفة:

- يزداد نشاط العنكبوت الأحمر عند وجود الأتربة وخشونة الأوراق مثل وجود البياض الدقيقي والجو الجاف والأوراق ذات الشعيرات غير الملساء وعند عطش النباتات.
- الأماكن الآمنة حول العروق الوسطية والبراعم وغيرها.

*مظهر الإصابة: تبدأ الإصابة بظهور بقع صفراء باهتة على السطح السفلي للأوراق تتحول تدريجياً إلى اللون المصفر ثم تصبح حمراء أو ضاربة إلى اللون البني أو بني محمر وفى النهاية يصبح لونها بني تقع هذه البقع بين العروق وحول العروق الوسطية.

- عند اشتداد الإصابة تلتحم تلك البقع لتغطي كل أو معظم السطح السفلي للأوراق المصابة.
- أما المسطح العلوي فتأخذ الورقة لون بنفسجي يتحول إلى اللون البني مع تقدم الإصابة وبذلك تجف وتذبل وتموت الأوراق وتسقط.
- قد ينقل العنكبوت من الأوراق إلى الثمار فيسبب لها بقع بنية مجربة مما يؤد إلى صغر حجمها ونشوه شكلها وقلة المحصول وخفض مواصفاته التسويقية.
- عمل نسيج عنكبوتي بين العروق أو بين الأوراق أو النباتات تتحرك عليه وتلتصق به الأتربة مما يعيق عمليات التنفس والتمثيل الضوئي للنباتات المصابة.

***مكان الإصابة والضرر :**

على السطح السفلي للأوراق – بين فصوص الوريقات – حول العروق الوسطية والنسيج العنكبوتي يغطي كل الأوراق المصابة وقد يحيط بالبرعم وموت النبات وقلة المحصول.

جراثيم *Bacillus thuringiensis* (العصوية التورنجية)

تعد جراثيم ***Bacillus thuringiensis*** من أهم أنواع الجراثيم التي استخدمت في مجال المكافحة الحيوية التي يطلق عليها باختصار Bt ، وتم اكتشافها في عام ١٩١١ م بواسطة العالم الألماني Ernst Berliner عند إصابتها لحشرة فراشة دقيق البحر الأبيض المتوسط أو فراشة الطحين ،حيث تتغذى اليرقات على الدقيق وتعرف الحشرة باسم ***Ephestia kuehniella*** وسميت جراثيم ***Bacillus thuringiensis*** وذلك تخليداً لاسم مقاطعة ألمانية تسمى Thuringiensis ولا تختلف Bt عن بقية أنواع جنس *Bacillus* فهي موجبة لصبغة Gram، عصوية الشكل، مكونة للأبواغ ما عدا قابليتها على إنتاج البلورات البروتينية أو ما يعرف بالذيفان الداخلي Crystal protiens * خلال مرحلة تكوين الأبواغ والتي تكون مسؤولة عن صفة السمية للحشرات، ونتيجة لامتلاكها هذه الخاصية ركزت البحوث حول هذا النوع الجرثومي لأجل استخدامها في مجال السيطرة الحيوية بوصفها مبيداً للآفات الزراعية.

وتمت دراسة فعالية البلورات البروتينية Crystal protiens والتي تسمى أيضاً السموم الداخلية من نوع دلتا Endotoxin δ

أنتجت العديد من الشركات في بلدان العالم مثل أمريكا والصين وروسيا مستحضرات تجارية لهذه الجراثيم، حيث وافقت وكالة حماية البيئة الأمريكية على تسجيل أكثر من مائة وتسعون مستحضر تجارى لها منذ عام ١٩٦١ م. حيث تتميز هذه الجراثيم بقدرتها على تكوين بلورات سامة بداخلها، هذه البلورات فعالة في القضاء على الكثير من الآفات الحشرية التي تصيب العديد من المحاصيل الزراعية.

تتواجد جراثيم الـ Bt في البيئة الزراعية طبيعياً لذا فانه لا توجد مخاطر على الإنسان والحيوان أو البيئة بوجه عام نتيجة استخدامها في عمليات المكافحة، وعلى ذلك فهي تستخدم في الزراعات العضوية والنظيفة.[10]

أهمية البحث وأهدافه:

– أهمية البحث:

✓ الأهمية البيئية: مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* الآفة الزراعية ذات المدى العوائلي الواسع بوسائل حيوية صديقة للبيئة.

✓ الأهمية الاقتصادية: الحصول على نواة منتج محلي –مبيد حيوي– قادر على تحقيق الاكتفاء الذاتي في سياق مجال استخدامه، وهو ما يعد مساهمة في تطبيق برنامج "إحلال بدائل المستوردات" الذي يستقطب اهتمام السياسة الحكومية على الصعيد الاقتصادي عن طريق التوجّه نحو المزيد من الاعتماد على الذات بهدف تخفيض الطلب على القطع الأجنبي الناجم عن الطلب على الاستيراد، وتأمين إنتاج عدد من المواد والسلع محلياً.

✓ الأهمية التطبيقية: الحصول على جراثيم معزولة محلياً من البيئة السورية وتصنيفها، ومقارنة فعاليتها مع سلالات تجارية، لقياس كفاءتها في مكافحة الآفة المستهدفة *، مخبرياً وحقلياً.

- أهداف البحث:

عزل وتنميط بعض الجراثيم المحلية من التربة في محافظة اللاذقية.

تحديد جراثيم قادرة على إحداث التأثير السام لمختلف أطوار الآفة المستهدفة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* وانتقاء الأكثر كفاءة لتحضير مستحضر مبيد حيوي.

طرائق البحث ومواده:

- مكان الدراسة:

تم القيام بجمع عينات من نظم بيئية وزراعية مختلفة في المنطقة الساحلية شملت 4 مواقع في اللاذقية هي (دائرة المكافحة الحيوية في الهنادي- البصة – برج سلام – كسب)، وتم القيام بالتحاليل المخبرية للتربة، الحصول على العزلات البكتيرية، وإجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية لها، في مخبر الأحياء الدقيقة – قسم الوقاية البيئية، في المعهد العالي لبحوث البيئة في جامعة تشرين، ثم اختبار فعاليتها في مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً في مخبر الأكاروسات – دائرة المكافحة الحيوية – مديرية الزراعة – اللاذقية.

- تحاليل التربة:

بعد جمع عينات التربة تم إجراء التحاليل المخبرية لمعرفة الخصائص الآتية: نسبة المادة العضوية بطريقة الترميد في مرمدة على درجة حرارة 550^0C لمدة ثلاث ساعات، ودرجة الحموضة pH بوساطة جهاز pH-meter. +

- عزل البكتيريا:

تم تحديد وانتقاء جراثيم يتم عزلها من تربة البيئة المحلية، حيث تمت عملية الكشف عن الجراثيم وعزلها وتنميطها بناءً على الطرائق المعتمدة عالمياً، حيث تم أخذ **1غ** من كل عينة تربة مركبة بعد حساب نسبة الرطوبة وأضيفت التربة إلى أنابيب اختبار تحتوي على **10 مل ماء مقطر معقم**، أخذ من أنابيب الاختبار بعد خلطها جيداً 1 مل من كل معلق وأضيف إلى أنبوب اختبار يحوي **10 مل بيئة Nutrient Broth** ثم تم نقل أنابيب الاختبار إلى الحاضنة وتحضينها بدرجة حرارة **30^0C لمدة 4 ساعات** ثم تمت الزراعة بطريقة التخطيط من الوسط الزرعي وذلك بعد القيام بسلسلة التخفيف ثم تفريق المستعمرات النقية، بالإضافة لإعادة تفريق المستعمرات المختلطة بتكرار طريقة التخطيط، وتم تحديد الجراثيم المعزولة من خلال دراسة الصفات **المزرعية** (شكل المستعمرة –لونها- ملمسها) والصفات **الشكلية** (شكل الخلايا، أبعادها، صبغة غرام، الحركة). [10]

- تحضير المستعمرة الدائمة للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae*:

تم زراعة نباتات فاصولياء داخل أصص بلاستيكية تحت ظروف المختبر ثم عدوى النباتات بأوراق فاصولياء مصابة بالعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* للحصول على مستعمرة دائمة من الآفة واستخدامها في التجارب اللاحقة.

- تحضير تراكيز مختلفة من المعلق الجرثومي:

تم تحضير المعلق الجرثومي بطريقة التخفيف وذلك بقطع قرص من الوسط الغذائي الذي نمت عليه الجراثيم بقطر 0.5سم حاوي على مستعمرة واحدة ليوضع في انبوب اختبار ملئ سابقاً بـ 9 مل ماء مقطر معقم، تم رج الأنبوب جيداً لمدة 3 دقائق ليصبح التخفيف 1/10 بعدها تم أخذ 1 مل من هذا التخفيف وأضيف إلى أنبوب اختبار آخر

يحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم تم القيام برجه أيضاً ليصبح التركيز 1/100 وتم الاستمرار بالتخفيف حتى الحصول على التخفيفات 10^{4}، 10^{5}، 10^{6}، 10^{7} خلية / مل والتي استخدمت في التجارب اللاحقة. [7]

- دراسة تأثير المعلقات الجرثومية بتراكيز مختلفة في أطوار العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae*

- التأثير في البيوض:

استخدمت في هذه التجربة أقراص من وريقات فاصولياء سليمة بقطر 3 سم، وضع عليها 10 إناث بالغة من العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* ثم وضعت الأقراص داخل أطباق بتري بلاستيكية (9) سم حاوية على قطن معقم مرطب بالماء عند قاعدة الطبق، تم ترك البالغات لمدة 48 ساعة للسماح لها بوضع البيض بعدها تم رفع البالغات، وترك 10 بيوض على سطح كل قرص ورقي بعد إزالة البيوض الزائدة بواسطة فرشاة ناعمة ، تم رش الوريقات بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1 مل لكل مكرر ولكل تركيز على حدة وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة باستعمال محقنة طبية أما معاملة المقارنة فتم رشها بماء مقطر معقم ، ثم تم وضع الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 30 ± 2^{0}م ورطوبة نسبية 70-60% وذلك بوضع 30غ من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مل ماء موضوع داخل اوعية التجفيف وتضبط النسبة المئوية للرطوبة باستخدام مقياس الرطوبة (Hygrometer) .[7].

تم تسجيل النسبة المئوية لهلاك البيض (موت الأجنة) بعد 72 ساعة من الرش وتحدد عبر أخذ المتوسط الحسابي لعدد البيوض التي لم تفقس بعد انقضاء المدة في كل مكرر. وتصحيح القيم حسب معادلة Schneider وOrell.

$$\% \text{ للهلاك المصححة} = \frac{\text{نسبة الموت في المعاملة} - \text{نسبة الموت في المقارنة}}{100 - \text{نسبة الموت في المقارنة}} \times 100$$

- التأثير في الأطوار الحورية والبالغة:

تم وضع 10 أفراد متحركة من الطورين الحوري والبالغ كل على حدة على أقراص من وريقات فاصولياء سليمة بقطر 3 سم، توضع الوريقات داخل أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9 سم، ثم تمت معاملتها بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1مل لكل مكرر، حيث تتألف كل معاملة من ثلاثة مكررات، أما معاملة المقارنة فقد تم رشها بماء مقطر معقم فقط، استعملت محقنة طبية لغرض عملية الرش، ثم وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25 ± 2^{0}م ورطوبة نسبية 70-60%، ثم تم حساب عدد الأفراد الحية المتبقية بعد 72 ،48 ،24 ساعة من الرش.

تم تحويل القيم إلى نسبة مئوية للقتل، ثم تم تصحيحها حسب معادلة Schneider و Orell *كما في الفقرة السابقة [7]

النتائج والمناقشة:

- تحاليل التربة:

وتبرز أهمية هذه التحاليل في بيان بعض الخواص الكيميائية لبيئة عزل البكتيريا، مما يساهم في تحديد الظروف المناسبة لإكثارها واستخدامها في حال إثبات كفاءتها في مكافحة الآفة المستهدفة.

جدول (1) نسبة المادة العضوية ودرجة الحموضة في العينات

العينة	المصدر	نسبة المادة العضوية	pH
A	الهنادي	45.21	6.4
B	الهنادي	47.06	6.5
C	البصة	52.36	6.6
D	البصة	48.12	6.4
E	برج اسلام	57.88	7.1
F	برج اسلام	61.03	7.3
G	كسب	34.22	6.8
H	كسب	37.67	6.4

- عزل البكتيريا:

جدول (2) الصفات الشكلية للعزلات الجرثومية

الخصائص المدروسة	A1	A2	A3
شكل الخلايا	عصوي–أحادي، ثنائي/ سلسلة	عصوي–أحادي، ثنائي/ سلسلة	عصوي–أحادي، ثنائي/ سلسلة
العرض µm	1.0–1.2	0.9–0.8	1.2–0.8
الطول µm	3.0–5	2–6	2–5
صبغة غرام	+	+	+
الأبواغ	+	+	+
الحركية	+	+	+

جدول (3) الصفات البيوكيميائية للعزلات الجرثومية

الاختبار البيوكيميائي	A1	A2	A3
الحاجة للأوكسجين	+	+	+
الكاتلاز	+	+	+
الأوكسيداز	v	+	–
انحلال الدم	+	–	–
اليورياز	–	+	–
أحمر الميتيل	–	–	–
فوكس بروسكار	+	+	+
H_2S	–	+	–
إسالة الجيلاتين	+	+	+
خلات	+	–	+
الاندول	–	–	–
النترات	+	–	+
السترات	+	+	+
غليسيرول	+	–	+
الارجينين	–	+	+

الأورنيثين	–	–	–
إيسكولين	+	+	+
فينيل ألانين	–	+	–

وبناءً على النتائج الموضحة في الجداول تم تصنيف العزلات البكتيرية كما يلي:

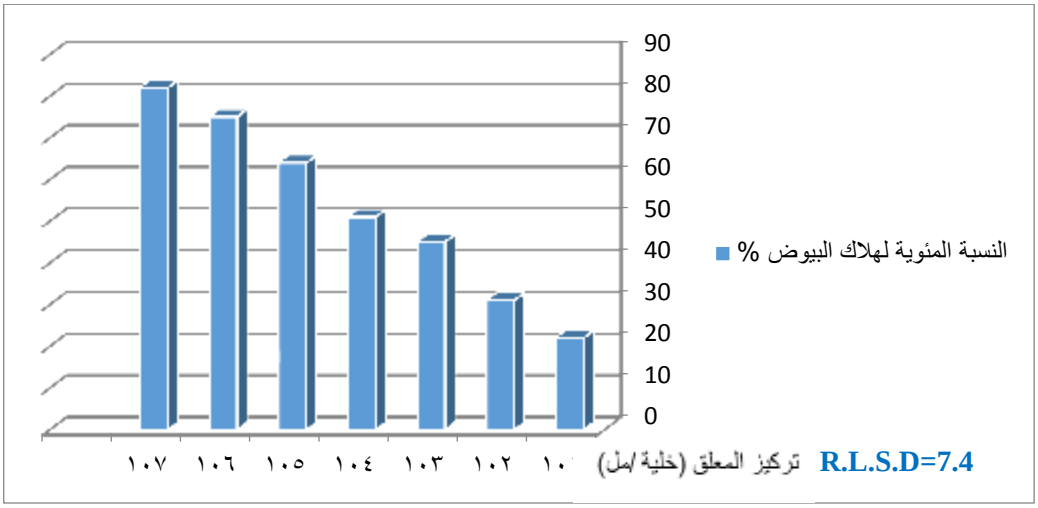
A1: *Bacillus subtilis*

A2: *Bacillus thuringiensis*

A3: *Bacillus cereus*

–اختبار فعالية البكتيريا *Bacillus thuringiensis* على العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* :

–التأثير في البيوض:



الشكل (3) مخطط يوضح تأثير المعلقات في البيوض بتراكيز مختلفة

توضح النتائج المبينة في الشكل (1) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في دور البيضة ووجود فرق معنوي عالي بين المعاملات في إحداث نسبة هلاك لطور البيضة اذ أعطى التركيز 10^7 خلية/ مل أعلى نسبة هلاك بلغت 82 % بفرق معنوي عن بقية المعاملات في حين أعطى كل من التركيزين 10^1 خلية/ مل، 10^2خلية/ مل – تم حساب التراكيز باستخدام طريقة التخفيف المتسلسل– أقل نسبة هلاك بلغت22% ، 31% على التوالي وبدون فرق معنوي فيما بينهما.

ويفسر هلاك البيض لقدرة هذه البكتريا على إفراز الأنزيمات المحللة لجدار البيضة وصولاً الى الجنين وبالتالي هلاكه أو إحاطة هذه البكتريا بغلاف البيضة وبالتالي تكوين طبقة عازلة عن المحيط الخارجي وبذلك تمنع وصول الهواء الى الجنين فيموت اختناقاً. [11]

– التأثير في الحوريات:

جدول (4) تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. thuringiensis* في النسبة المئوية لنفوق حوريات العنكبوت الأحمر ذي البقعتين

تراكيز المعلق البكتيري خلية/مل	% للقتل المصححة بالساعات		
	24	48	72
10^4	56.8	60.1	68.2
10^5	72.3	76.2	77.9

10^6	81.7	84.2	86.4
10^7	95.2	96.3	98.8
R.L.S.D 0.01	5.4	11.6	12.1

بينت النتائج الموضحة في الجدول (4) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في الطور الحوري للعنكبوت الحمر ذي البقعتين، إذ أعطى المعلق البكتيري وبتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة هلاك للطور الحوري بلغت95.2%، بفرق معنوي عن بقية التراكيز بعد24ساعة من المعاملة، أما بعد72ساعة من المعاملة أعطى نسبة هلاك بلغت 98.8%.

- التأثير في البالغات:

جدول (5) تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. thuringiensis* في النسبة المئوية لهلاك البالغات

تراكيز المعلق البكتيري خلية/مل	% للقتل المصححة بالساعات		
	24	48	72
10^4	51.2	58.4	64.3
10^5	70.3	74.4	77
10^6	79	82.3	85.2
10^7	90.1	94.2	96
R.L.S.D 0.01	12.4	8.3	9.4

بينت النتائج الموضحة في الجدول (5) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في الطور الحوري للعنكبوت الحمر ذي البقعتين، إذ أعطى المعلق البكتيري وبتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة هلاك للطور الحوري بلغت90.1%، بفرق معنوي عن بقية التراكيز بعد24ساعة من المعاملة، أما بعد72ساعة من المعاملة أعطى نسبة هلاك بلغت 96%.

ويفسر الهلاك نتيجة التأثير السمي الذي تحدثه بكتيريا Bacillus *thuringiensis* نتيجة إفرازها لذيفانات البروتينات الكريستالية التي تم ذكرها في مقدمة المقال.*

الاستنتاجات والتوصيات:

- تم عزل ثلاث سلالات بكتيرية من التربة، بينت الصفات الشكلية والاختبارات البيوكيميائية أن السلالات المعزولة هي:
  - ✓ A1: *Bacillus subtilis*
  - ✓ A2: *Bacillus thuringiensis*
  - ✓ A3: *Bacillus cereus*
- للسلالة Bacillus *thuringiensis* المعزولة محلياً كفاءة عالية في مكافحة الآفة المستهدفة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً، عند استخدامها كمعلق بكتيري بتركيز 10^7 خلية/مل.

نوصي بمتابعة الدراسات في هذا المجال وازدياد النشاط البحثي، والتوجه حول تفسير آليات النشاط الحيوية لهذه السلالات الجرثومية المعزولة من التربة المحلية ضد الآفة المستهدفة.

References:

[1] المصري، يوسف؛ الأخرس، هدى 2013. مشروع إدارة حافرة أنفاق البندورة "توتا أبسولوتا" في الشرق الأدنى. دراسة مشروع تابعة لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة FAO.النشرة الإخبارية لوقاية النبات في البلدان العربية والشرق الأدنى. العدد 6، كانون الأول/ ديسمبر. 2013

1- Al-Masry, Youssef; Al-Akhras, Hoda 2013. Tomato tunnel borer "Tuta absoluta" management project in the Near East. A project study of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Newsletter for plant protection in Arab countries and the Near East. Issue 6, December. 2013

[2] عبد، أحمد 2010. المكافحة الحيوية للفطر *Rhizoctonia solani* بواسطة الجراثيم *Pseudomonas fluorescens* في ظروف البيت الزجاجي . مجلة جامعة بابل للعلوم التطبيقية والصرفة. العدد 1. 2010

2- Abdel, Ahmed 2010. Biological control of the fungus Rhizoctonia solani by the spores Pseudomonas fluorescens in greenhouse conditions. Babylon University Journal of Applied and Pure Sciences. Issue 1. 2010

[3] السالم،صقر؛ سراج،حسين 2005. المواد الكيميائية الخطرة على صحة الإنسان والبيئة. مرجع لطلاب المدارس والكليات والجامعات، منظمة الصحة العالمية WHO، المكتب الإقليمي لشرق المتوسط، المركز الإقليمي لأنشطة صحة البيئة، عمان– الأردن– WHO–EM/CEH/129/A, 2005.

3- Al-Salem, Saqr; Siraj, Hussein 2005. Chemicals hazardous to human health and the environment. A reference for school, college and university students, World Health Organization (WHO), Regional Office for the Eastern Mediterranean, Regional Center for Environmental Health Activities, Amman - Jordan - WHO-EM/CEH/129/A 2005.،

4- Haj Hammoud, Hammoud; Abdulghani, Abdulatif; Aden A., Aw-Hassan (2005). *A Socioeconomic Study of Integrated Sunn Pest Management on Wheat in Syria.* Monitoring, Evaluation & Learning. 05T08:54:17Z, 2005.

[5] الجمعية العامة للأمم المتحدة (2017). مجلس حقوق الإنسان. الدورة الرابعة والثلاثون.البند 3 من جدول العمال. تعزيز وحماية جميع حقوق الإنسان، المدنية والسياسية والاقتصادية والاجتماعية والثقافية، بما في ذلك الحق في التنمية. تقرير المقررة الخاصة المعنية بالحق في الغذاء. A/HRC/31/50. 2017.

5- United Nations General Assembly (2017). Human Rights Council. Thirty-fourth session. Item 3 of the agenda. Promote and protect all human rights, civil, political, economic, social and cultural, including the right to development. Report of the Special Rapporteur on the right to food. A/HRC/31/50. 2017.

[6] تويج، نبيل (2007). دراسة إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح الجراثيم *Bacillus thuringiensis* لمكافحة حشرة من الخوخ *Myzus persicae* (Sulzer) الأخضر. مجلة جامعة كربلاء، المجلد 3 العدد (11)

6- Twig, Nabil (2007). Studying the possibility of producing a biological preparation from Bacillus thuringiensis vaccine to combat the green peach aphid, Myzus persicae (Sulzer). Karbala University Journal, Volume 3, Issue (11(

[7] الباهلي، حياة (2010). تأثير الجراثيم *Serratia marcescens* في بعض الجوانب الحياتية للحلم ذي البقعتين *Tetranychus urticae* (koch) (Tetranychidae:Acari).مجلة أبحاث البصرة.العدد 36. الجزء2. 15–10

7 -Al-Bahili, Hayat (2010). The effect of Serratia marcescens on some aspects of the life of the two-spotted mite Tetranychus urticae (koch) (Tetranychidae: Acari). Basra Research Journal. Issue 36. Part 2. 10-15

[8] مفلح، ماجدة؛ أحمد، محمد؛ حلوم، منذر (2014). الاستجابة الوظيفية والعددية للمفترس *Stethorus gilvifrons* عند تغذيته على كثافات مختلفة من بالغات الأكاروس العنكبوتي ذي البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً . المجلة السورية للبحوث الزراعية.المجلد1، العدد 1،2014.

8 -Mufleh, Magda; Ahmed, Muhammad; Halloum, Munther (2014). The functional and numerical response of the predator Stethorus gilvifrons when feeding on different densities of adults of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae in a laboratory setting. Syrian Journal of Agricultural Research. Volume 1, Issue 1, 2014.

9- Fasulo, Thomas R; Denmark, H.A (2009); *common name: twospotted spider mite scientific name: Tetranychus urticae Koch (Arachnida: Acari: Tetranychidae)*, Entomology & Nematology | FDACS/DPI | EDIS, EENY-150

10- VAN DER GEEST**,** L.P.S.**;** ELLIOT, S.L.; BREEUWER, J.A.J**;** BEERLING, E.A.M(2000). *Diseases of mites. Experimental and Applied Acarology* 24: 497–560, Netherlands, 2000.

11- Elsharkawy, M.M.;Almasoud, M.; Alsulaiman, Y.M.;Baeshen, R.S.;Elshazly, H.; Kadi,R.H.; Hassan, M.M.; Shawer, R.*Efficiency of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus against Rhynchophorusferrugineus*. Insects 2022, 13, 905.