مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (2) 2012
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (2) 2012

توصيف عزلات Bacillus thuringiensis المعزولة من التربة السورية واختبار فاعليتها ضد يرقات فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae)

الدكتور محمد أحمد*
الدكتورعيسى كبيبو**
مايسة مهيار***

(تاريخ الإيداع 11 / 1 / 2011. قبل للنشر في 4 / 4 / 2012)

□ ملخّص □

جرى البحث على ترب بعض النظم الطبيعية والزراعية في سوريا للبكتريا الممرضة للحشرات Bacillus thuringiensis. تبين من خلال فحص المستعمرات البكتيرية بالإعتماد على الشكل المورفولوجي للبلورات والاختبارات الكيميائية الحيوية أن 97% من العزلات تابعة لبكتيريا B. thuringiensis، مما يشير إلى أن بكتيريا B. thuringiensis متوافرة بغزارة في الترب السورية المدروسة. صنفت 219 عزلة من بكتيريا B. thuringiensis الى 8 تحت أنواع بمساعدة الاختبارات البيوكيميائية وهي: تحت نوع B. thuringiensis subsp. kurstaki وكان الأكثر شيوعا". وتحت الأنواع: biotype 9، thuringiensis، kenyae، sotto، dendrolimus، like- finitimus و pakistani. وجد أن 192عزلة (88%) من أصل 219 عزلة سامة للعمر اليرقي الثالث لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط Ephestia kuehniella، أعطت 50 عزلة منها نسبة قتل أعلى من 50 %. كما أظهرت النتائج أن فاعلية العزلات التي تحتوي على بلورات ذات شكل معين bipyramidal أعلى من فاعلية العزلات المحتوية على بلورات كروية الشكل.

الكلمات المفتاحية: عزلات Bacillus thuringiensis– البلورات البروتينية– الإختبارات البيوكيميائية– فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط .

*أستاذ – قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
**أستاذ – قسم علوم التربة والمياه – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
***طالبة دكتوراه – قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (34) العدد (2) 2012 Tishreen
University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (34) No. (2) 2012

CHARACTERIZATION OF BACILLUS THURINGIENSIS STRAINS FROM SYRIAN SOILS AND THEIR TOXICITY AGAINST MEDITERRANEAN FLOUR MOTH, EPHESTIA KUEHNIELLA (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Dr.Mohammad Ahmad[*]
Dr. Eisa Kebebo[**]
Dr.Maysa Meihiar[***]

(Received 11 / 11 / 2011. Accepted 9 / 5 /2012)

□ ABSTRACT □

The occurrence of entomopathogenic bacterium Bacillus thuringiensis was investigated for some natural ecosystems in Syrian coastal plain soils. In the present study, B. thuringiensis was found in all tested ecosystems in Syria. Among the examined colonies based on crystal protein formation and biochemical tests, the proportion identified as B. thuringiensis was 97%, that indicate that B. thuringiensis was highly abundant in Syrian soils. Tow hundred and nineteen strains were found belonging to eight biochemical types with B. thuringiensis subsp. kurstaki being the most common. The other biochemical types were referable to biotype 9, thuringiensis, kenyae, sotto, dendrolimus, like- finitimus and pakistani. Of the 219 strains 192 (88%) were toxic to the third instar larvae of Ephestia kuehniella, where 50 isolates caused more than 50% mortality. The frequency of toxicity was greater in strains that produced bipyramidal parasporal crystals rather than strains produced spherical crystals.

Keywords: Bacillus thuringiensis strains,crystal proteins,biochemical tests, Mediterranean flour moth.

[*] **Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria**
[**] **Professor, Department of Pedelogy and Hydrology, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria**
[***] **Postgraduate student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تمتاز بكتيريا Bacillus thuringiensis بإنتاج البلورات البروتينية السامة الفعالة ضد رتب مختلفة من الحشرات ومنها: حرشفية وثنائية وغمدية الأجنحة (Feitelson, 1993; Lu et al., 1994; Balaraman, 2005). توجد هذه البكتيريا غالباً في التربة والمواد المخزونة وبقايا الحبوب ويرقات الحشرات الميتة (Delucca et al., 1982; Ohba and Aizawa, 1986a; Martin and Travers, 1989; Bernhard et al., 1997). كما أثبت الباحثان Smith and Couche (1991) وجود بكتيريا B. thuringiensis بشكل طبيعي على سطح النباتات.

عزلت بكتيريا B. thuringiensis لأول مرة من دودة القز عام 1901م من قبل العالم Ishiwata في اليابان وسميت ببكتيريا Bacillus Sotto (Ishiwata, 1901). أما الآن فصنفت ببكتيريا B. thuringiensis تحت نوع sotto. ثم عزلت بكتيريا B. thuringiensis للمرة الثانية من يرقات حشرة فراشة الطحين Anagasta kuehniella في ألمانيا من قبل العالم Berliner عام 1911م كما أثبت وجود البلورات البروتينية والتي تمتاز بفاعليتها السامة ضد الحشرات (Berliner, 1915; Delucca et al., 1981). ومنذ ذلك الوقت تم الحصول على عزلات جديدة مختلفة صنفت إلى تحت أنواع بالاعتماد على الأنتيجينات السوطية (Flageller antigenicity) (De Barjac and Frachon, 1990) والاختبارات الكيميائية الحيوية (Biochemical tests) والتي تشكل قاعدة أساسية في علم التصنيف Taxonomy ومن خلالها يتم تحديد وظيفة الأنزيمات في الخلايا البكتيرية (Martin and Travers, 1989 ; Norris and Burges, 1965). تعتبر B. thuringiensis subsp. kurstaki من أهم تحت الأنواع التي صنفت والتي تستخدم بشكل واسع في مستحضرات المبيدات الحيوية الحشرية التجارية وذلك لفاعليتها على مدى واسع من الآفات الحشرية للمزروعات والغابات بالإضافة إلى أنها أكثر تحت الأنواع تواجداً في التربة (Martin and Travers, 1989).

تم تصنيف البلورات البروتينية (Cry proteins) إلى الأنواع البروتينية التالية: CryI، CryII ، CryIII ، CryIV، CryV بالإعتماد على تخصصها في فاعليتها على العائل (حرشفية الأجنحة، حرشفية وثنائية الأجنحة، غمدية الأجنحة، ثنائية الأجنحة، والنيماتودا) على التوالي، وعلى درجة التشابه في سلسلة الأحماض الأمينية Amino acid homology (Höfte and Whiteley, 1989; Ceron et al., 1995). تنقسم مجموعة البلورات البروتينية CryI السامة لحشرات حرشفية الأجنحة إلى 10 مجموعات وكل تحت مجموعة تمتلك فاعلية خاصة تجاه حشرات معينة تابعة لرتبة حرشفية الأجنحة (Brizzard and Whiteley, 1988; Chambers et al., 1991). أما بالنسبة لمجموعة البلورات البروتينية CryIII فقد قسمت إلى 5 تحت مجموعات والخاصة بفاعليتها السامة ضد الحشرات التابعة لرتبة غمدية الأجنحة (Donovan et al., 1992).

أستخدمت عدة طرق لتعريف العزلات المختلفة والجديدة من بكتيريا B. thuringiensis منها: الإختبارات البيوكميائية، مدى فاعليتها على الحشرات، الشكل المورفولوجي للبلورات، وتحليل البروتين باستخدام SDS-PAGE، تفاعل البلمرة المتسلسل للبوليميراز (PCR)، علم الأمصال (Ferrandis et al., 1999).

أهمية البحث وأهدافه:

تركزت الدراسات السابقة في عدة أبحاث حول عزل سلالات محلية من بكتيريا B. thuringiensis من أجل تأسيس مجموعة متكاملة من عزلات بكتيريا B. thuringiensis في أنحاء العالم والتي تختلف بإختلاف المناطق التي عزلت منها. فلذلك يعد الهدف الأساسي من هذا البحث هو تعريف وتحديد تحت الأنواع للعزلات المحلية من بكتيريا B. thuringiensis والتي تم الحصول عليها أثناء القيام بعملية المسح في النظم البيئية الزراعية المختلفة في سورية في الدراسة السابقة (أحمد وآخرون، 2011) ودراسة التنوع الحيوي biodiversity لهذه العزلات باستخدام: اشكال البلورات، الاختبارات البيوكيميائية، وتقييم فاعلية العزلات ضد العمر اليرقي الثالث لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط Ephestia kuehniella بهدف الحصول على عزلات محلية أكثر كفاءة في مكافحة الآفات الحشرية من العزلات المستوردة.

طرائق البحث و مواده:

جمع عينات التربة:

جمعت 33 عينة تربة (10غم من كل عينة تربة أخذت على عمق 2-5 سم تحت سطح التربة) ووضعت في أكياس بلاستيك من 20 منطقة مختلفة، تتضمن : 14 عينة تربة جمعت من مناطق زراعية، 9 عينات تربة جمعت من الغابات، 4 عينات تربة من الشاطئ، 2 عينة تربة من المناطق الطبيعية غير مزروعة و4 عينات تربة من المناطق الداخلية الجافة، ثم نقلت الى مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الزراعة – جامعة تشرين وحفظت في البراد على درجة حرارة 4م° لحين عزل بكتيريا B. thuringiensis منها.

عزل بكتيريا B. thuringiensis من التربة:

عزلت بكتيريا B. thuringiensis باستخدام الطريقة التي وصفت من قبل الباحثين Ohba and Aizawa. (1986a). أخذ 1 غم من كل عينة تربة مركبة ووضعت عينات التربة في 10 مل ماء مقطر معقم في أنابيب اختبار وخلطت جيدا" باستخدام هزاز الأنابيب Vortex mixture لمدة دقيقة. وتركت لمدة دقيقتين حتى تترسب المادة الصلبة. ثم سخنت على درجة حرارة 80م° لمدة 30 دقيقة في حمام مائي لقتل الكائنات الحية الدقيقة غير المكونة للأبواغ. أخذ 0.1 مل من كل معلق بكتيري وخفف باستخدام التخفيفات العشرية وزرع في بيئة غذائية Nutrient agar وحضن على درجة حرارة 30م° لمدة 24 ساعة.

استخدمت طريقة أسيتات الصوديوم لعزل بكتيريا B. thuringiensis عن البكتيريا الأخرى المكونة للأبواغ (Travers et al., 1987). تمت إضافة 1مل من كل معلق بكتيري الى 10 مل من البيئة الغذائية Luria Bertani (LB) والتي تحتوي على 0.25 M أسيتات الصوديوم لمنع نمو أبواغ B. thuringiensis حصرا" ثم حضنت على درجة حرارة 30م° لمدة 4 ساعات وسخنت على درجة حرارة 80م° لمدة 3 دقائق للقضاء على أنواع البكتيريا الأخرى المكونة للأبواغ التي نمت خلال تحضينها. خفف المعلق البكتيري تخفيفات عشرية وزرع 0.1 مل منه على البيئة الغذائية T3. ثم حضنت الأطباق المعداة على درجة حرارة 30م° لمدة 48 ساعة. بالإعتماد على شكل المستعمرات البكتيرية تم انتقاء المستعمرات البكتيرية التي تشبه بالشكل الظاهري بكتيريا B. thuringiensis للكشف عن وجود الأبواغ والبلورات المميزة لهذه البكتيريا.

توصيف العزلات البكتيرية:

شخصت العزلات البكتيرية بالطرق التالية:

1- الاختبارات المورفولوجية

تم استخدام صبغة Carbol fuchsin (Stahly et al., 1992) للكشف عن وجود الأبواغ والبلورات لدى العزلات البكتيرية المختلفة بعمر 7 أيام والتي تشبه بالشكل الظاهري بكتيريا B. thuringiensis ثم فحصت باستخدام المجهر الضوئي Light microscope ومجهر Phase contrast microscope ، فوجود هذه البلورات يدل على أن هذه البكتيريا تابعة للنوع B. thuringiensis.

2- المجهر الالكتروني Scanning electron microscope

تم اختيار بعض العزلات B. thuringiensis للكشف عن وجود البلورات البروتينية بواسطة المجهر الالكتروني في الجامعة الأردنية، استخدم الطرد المركزي للمعلق البكتيري الذي يحتوي على خليط من الأبواغ والبلورات بسرعة 5000 (دورة في الدقيقة) لمدة 15 دقيقة بالمثفلة. ثم غسلت الكتلة المترسبة الناتجة عن الطرد المركزي في 2 مل ماء مقطر معقم ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 (دورة في الدقيقة) لمدة 5 دقائق وكررت العملية مرتين وذلك لفصل البلورات والأبواغ عن باقي مكونات الخلية (Obeidat et al., 2004))، ثم جفف المعلق البكتيري على شريحة الألمنيوم، وبعد ذلك طلي بطبقة من البلاتينيوم لمدة 3 دقائق ومن ثم تم الفحص باستخدام المجهر الالكتروني Scanning electron microscope Inspect F- 50 بتكبير x10000 وجهد كهربائي 3 kV.

3- الاختبارات الكيميائية الحيوية

تم تحديد تحت الأنواع للعزلات البكتيرية B. thuringiensis في هذه الدراسة باستخدام الاختبارات الكيميائية الحيوية التالية:(Norris and Burges, and Travers, 1989; De Barjac and Frachon, 1990). 1965;Martinحيث تم تربية العزلات البكتيرية على بيئة غذائية Nutrient agar ثم حضنت في درجة حرارة 30م° لمدة 24 ساعة. استخدم خمسة عشر اختباراً بيوكميائياً لتشخيص العزلات البكتيرية ومقارنتها مع العزلة القياسية (هي عبارة عن بكتيريا B. thuringiensis subsp kurstaki مستوردة من مختبرات Abbott من أميركا).

تربية فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella:

وضع 0.2غ من بيوض فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط على البيئة الغذائية التي تتكون من1كغم من سميد القمح مضاف إليه 5غ من مستخلص الخميرة في أطباق بلاستيكية، ووضعت الأطباق ضمن قفص تربية الحشرات (40سم ×40سم × 40سم) مغطاة بقطعة من القماش الأسود وحضن في درجة حرارة 25 ± 1م° لمدة 21 يوم، تقضي خلالها الحشرة عملية حضانة البيوض والأطوار اليرقية الثلاثة الأولى. جمع العمر اليرقي الثالث ليرقات الحشرة لاستخدامها في التقييم الحيوي للعزلات البكتيرية وتركت باقي اليرقات لتكمل دورة حياة الحشرة للحصول على بالغات واستكمال عملية التربية . تم الحصول على بيض فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط من مركز تربية الحشرة التابع لمركز اللاذقية لتربية الأعداء الحيوية وتطبيقاتها في الهنادي.

تقييم فاعلية العزلات البكتيرية B. thuringiensis: (التقييم الحيوي):

تم تقييم فاعلية جميع العزلات البكتيرية B. thuringiensis المختلفة ضد العمر اليرقي الثالث لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط. حيث زرعت العزلات البكتيرية على بيئة غذائية T3 لمدة 7 أيام في درجة حرارة 30م°. أخذ

1غم من الفول السوداني ونقع في 10 مل من المعلق البكتيري لكل عزلة لمدة 5 دقائق، ثم جفف ووضع في داخل أطباق بتري صغيرة قطرها 5سم، حيث وضعت 5 يرقات في كل طبق، وكررت كل عزلة 4 مرات، ثم حضنت في درجة حرارة 25م°±1 لمدة 72 ساعة. حسبت نسبة القتل لليرقات بعد 72 ساعة باستخدام معادلة أبوت Abbott formula (Abbott, 1925). وقورنت بنسبة القتل لليرقات الناتجة عن نقع الفول السوداني بالعزلة القياسية B. thuringiensis subsp. kurstaki وبالماء المقطر المعقم للشاهد كبديل عن العزلات البكتيرية المحلية B. thuringiensis (Obeidat et al., 2004).

النتائج والمناقشة:

تم تشخيص 219 عزلة من أصل 225 عزلة على أنها تابعة لبكتيريا B. thuringiensis باستخدام الفحص المجهري للكشف عن وجود أشكال البلورات البروتينية المختلفة وباستخدام الاختبارات البيوكيميائية جدول (1). تبين من خلال فحص المستعمرات البكتيرية أن 97% من العزلات التي عزلت من عينات التربة التي جمعت من نظم بيئية وزراعية مختلفة في سورية تحتوي على البلورات البروتينية، وهي نسبة مرتفعة إذا ما قورنت مع ما وجد الباحثان Martin and Travers (1989) اللذان أثبتا وجود بكتيريا B. thuringiensis في 85% من عينات التربة في شرق آسيا، وفي كندا أثبت(Morris et al., 1998) وجود B. thuringiensis في التربة بنسبة 26−39% ، أما في الأردن فقد أثبت(Obeidat et al., 2000) وجود B. thuringiensis بنسبة 63% وهذا يعكس التغير الطبيعي في تعداد البكتيريا في المناطق المختلفة والعينات التي عزلت منها البكتيريا (Meadows et al., 1992). ويؤكد أن التربة هي البيئة الطبيعية التي تتواجد فيها بكتيريا B. thuringiensis كما أثبتت في الدراسة السابقة (Dulmage and Aizawa, 1982)، وأنها توجد في جميع النظم البيئية والزراعية وجميع أنواع الترب (Martin and Travers, 1989). وبشكل عام يفسر انتشارها في جميع أنحاء العالم لإنتاجها الأبواغ التي تستطيع أن تقاوم الظروف غير الملائمة من ارتفاع في درجة الحرارة والجفاف (Petras and Casida, 1985).

وقد صنفت 219 عزلة إلى8 تحت أنواع باستخدام الاختبارات الكيميائية الحيوية التالية(Travers et al 1989) (جدول 1):

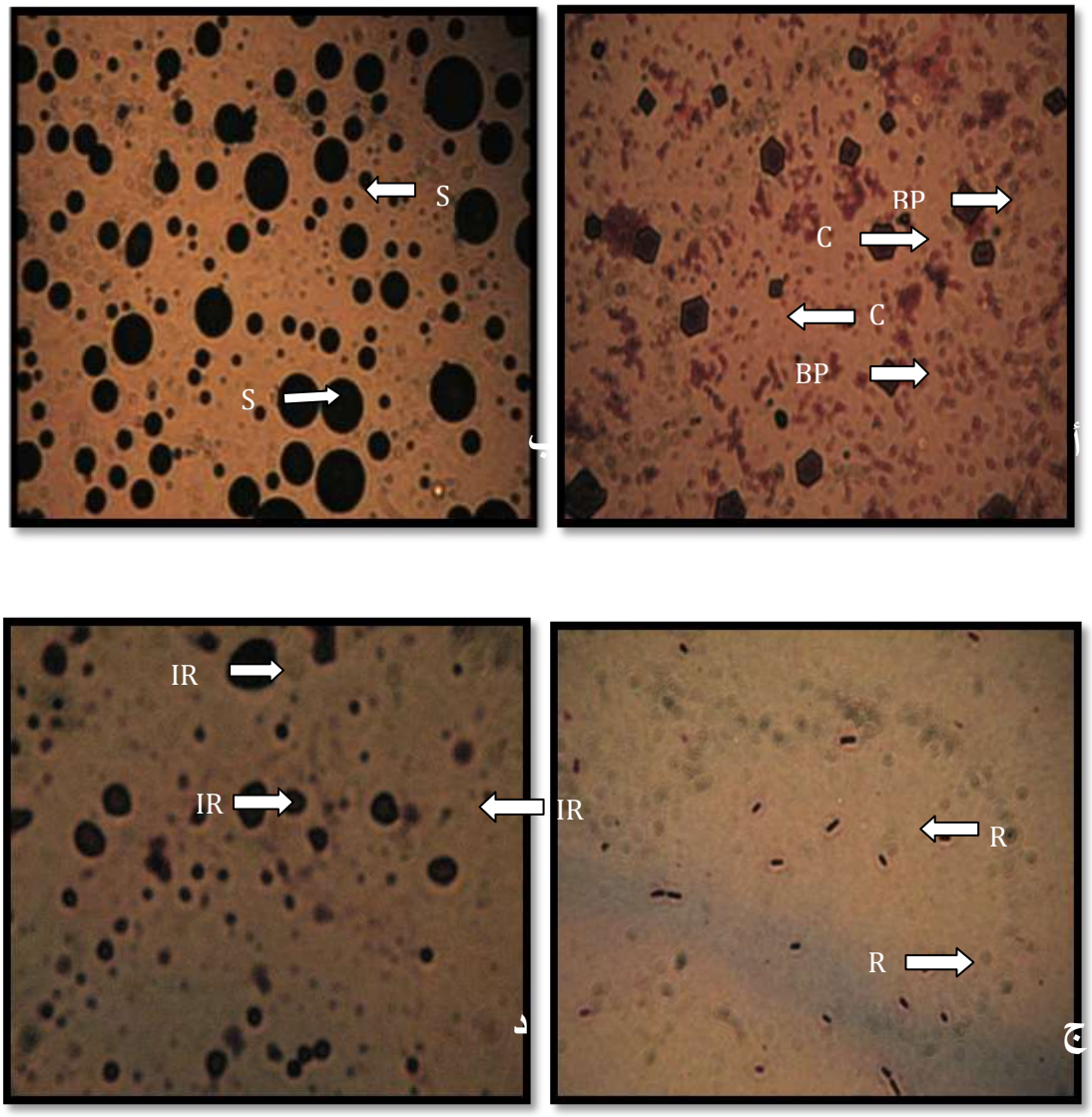
اختبار تحلل الإسكولين (Hydrolysis of esculin)، اختبار تحلل النشا (Starch hydrolysis test)، اختبار الكاتاليز (Catalase test)، إختبار الحركة (Motility media test)، إختبار إختزال النترات (reduction test Nitrate)، اختبار مقاومة اللايزوزيم(Lysozyme-resistant test)،اختبار اليوريز (Urease test)، اختبار انتاج انزيم ليسيثينيز (Lecithinase production test)، اختبار تخمر المانيتول(Manitol salt agar media)، اختبار التنفس الهوائي واللاهوائي (Oxidative /Fermentative test). اختبار إنتاج الأحماض من الكربوهيدرات (Acid production from carbohydrate: Glucose, Mannose, Sucrose, Salicin)، اختبار استخدام سيتريت (Citrate utilization). (+ تفاعل ايجابي ، − تفاعل سلبي)

Biochemical type (described subspecies)	kurstaki	thuringiensis	. kenyae	.sotto	dendrolimus	pakistani	biotype (9)	(Like-finitimus)
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+

OF test	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility Media test	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysozyme-resistant test	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol salt agar media	+	-	-	-	-	-	-	-
Urease test	+	-	+	-	-	-	-	-
Nitrate Reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	+	+	+	+	-
Lecithinase production	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	-	+
Acid production from Sucrose	-	+	-	+	-	+	+	+
Acid production from Mannose	-	+	-	-	-	-	+	-
Acid production from Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production from Salicin	+	+	+	-	-	+	+	+

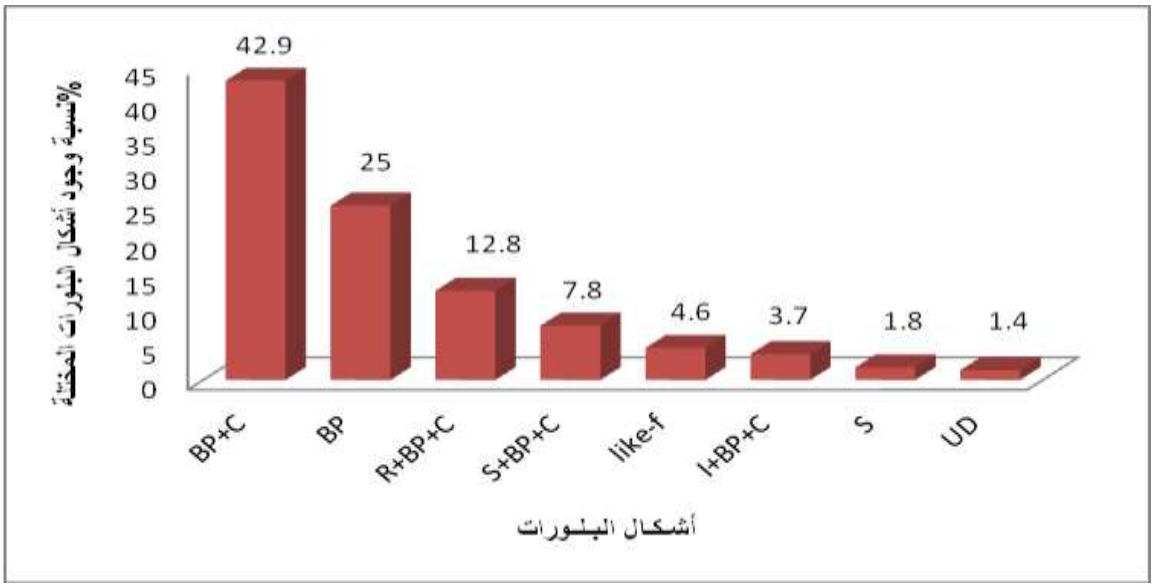
جدول(1): نتائج الإختبارات البيوكيميائية للعزلات المختلفة لتحديد الأنماط البيوكيميائية أو تحت النوع لبكتيريا B. thuringiensis

أوضحت النتائج أن 78 عزلة من أصل 219 عزلة تم تشخيصها على أنها بكتيريا B. thuringiensis subsp. kurstaki وتحت النوع البيوكيميائي 9 والتي تنتج بلورات على شكل (معين) وعلى شكل (مكعب) شكل (1- أ) بالإضافة إلى أن 55 عزلة شخصت على أنها تابعة لتحت الأنوع التالية: kenyae، thuringiensis ، sotto ، dendrolimus والتي تنتج بلورات على شكل (معين)، و 4 عزلات عرفت على أنها تابعة لتحت النوع pakistani والتي تنتج بلورات على شكل (كروي) شكل (1- ب)، وشخصت 10 عزلات على أنها تشبه تحت نوع finitimus -like والتي تمتاز بإلتصاق البلورات بالأبواغ. أما 72 عزلة المتبقية فهي غير معرفة حيث تتضمن: 28 عزلة وجد أنها منتجة للبلورات ذات شكل (مستطيل ومعين ومكعب) شكل (1- ج) و 17 عزلة تنتج بلورات ذات شكل (كروي ومعين ومكعب) و 8 عزلات تنتج بلورات ذات شكل (غير منتظم ومعين ومكعب) (1- د) و 16 عزلة تبين أنها منتجة للبلورات ذات شكل (معين ومكعب) أما العزلات الثلاث المتبقية فلم يحدد شكل البلورات فيها.



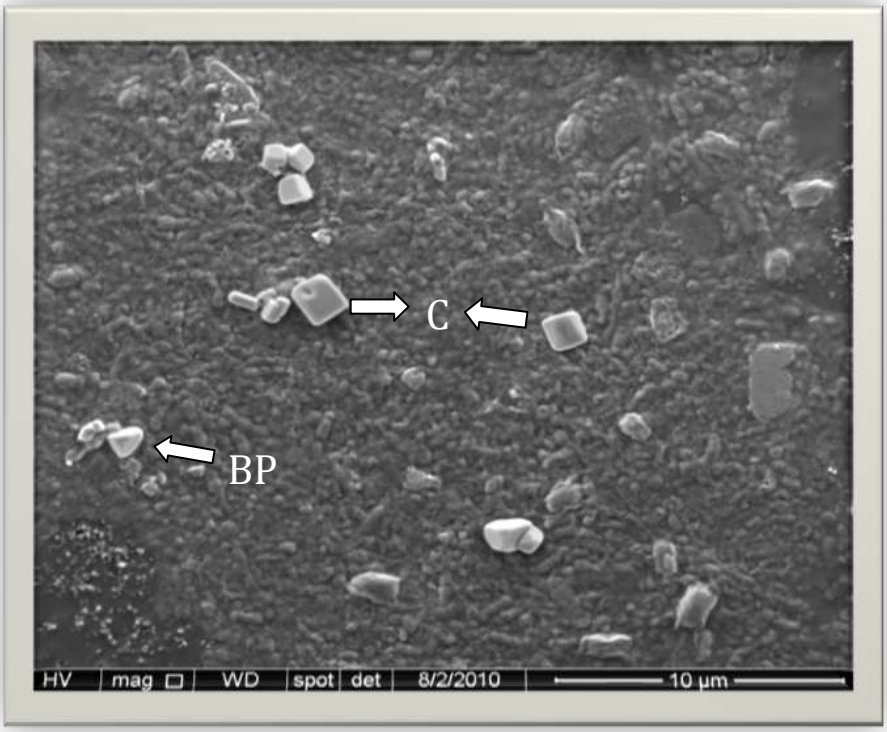
شكل (1): أشكال البلورات المختلفة للعزلات البكتيرية B. thuringiensis المعزولة من التربة باستخدام المجهر phase contrast microscope بتكبير (x1000). Bipyramidal :BP (معين)، Cuboidal :C (مكعب)، Spherical :S (كروي)، R: rectangular (مستطيل)، IR: : Irrigular (غير منتظم) .

وكما هو موضح في الشكل 2 نستنتج تواجد سبعة أشكال من البلورات البروتينية وبنسب مختلفة، حيث وجد أن 42.9% من العزلات تنتج نوعين من البلورات تظهر على شكل (معين ومكعب) وهي الأكثر شيوعا" في البيئة السورية. أما بالنسبة لأشكال البلورات الأخرى فوجد أن العزلات التي تكون البلورات على شكل (معين) تشكل نسبة 25%، والعزلات التي تكون البلورات ذات الأشكال (مستطيل ومعين ومكعب) تشكل 12.8%، والعزلات المكونة للبلورات ذات شكل (كروي ومعين ومكعب) تشكل 7.8%، والعزلات التي تلتصق فيها البلورات بالأبواغ تشكل 4.6%، أما بالنسبة للعزلات المكونة للبلورات ذات شكل (غير منتظم ومعين ومكعب) فتشكل 3.7%، والعزلات المكونة للبلورات ذات شكل (كروي) تشكل1.8% والعزلات المحتوية على(بلورات غير معرفة) تشكل نسبة 1.4%.

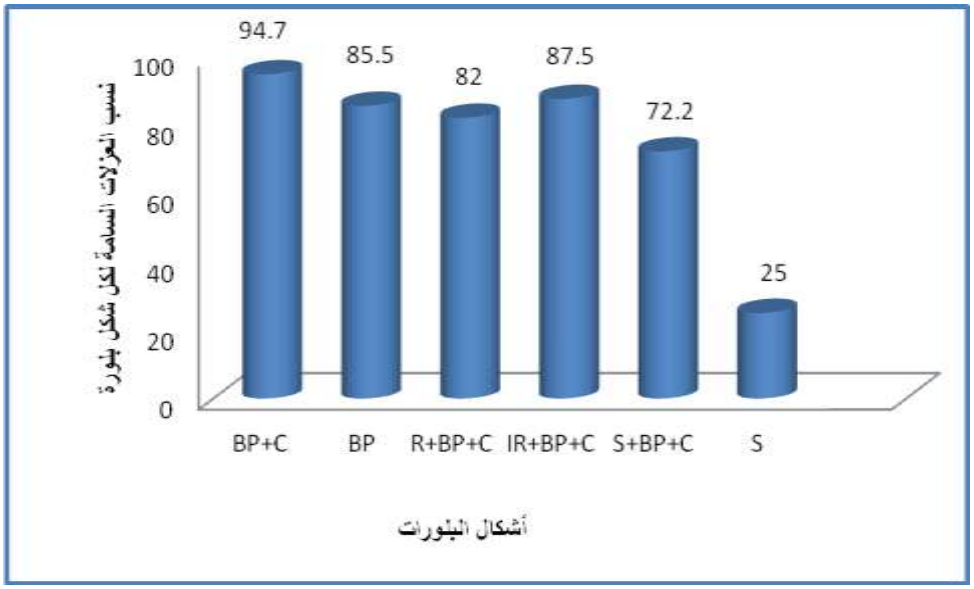


شكل (2): النسبة المئوية لوجود أشكال البلورات المختلفة لعزلات البكتيريا B. thuringiensis المعزولة من التربة السورية Like- finitimus :like-f(البلوراتملتصقة بالأبواغ)،Undefined:UD (غيرمعرفة).

أظهرت نتائج التقييم الحيوي سمية 192 عزلة للعمر اليرقي الثالث لحشرة E. kuehniella جدول (3). تراوحت نسبة القتل للحشرة ما بين 5–95% وكانت أعلى نسبة قتل 95% لسلالة سامة عزلت من تربة حقل مزروع بأشجار الزيتون في القرداحة، ثم نسبة القتل 90% لسلالة عزلت من حقل مزروع بالكوسا في بانياس. وتبين أن العزلتان تنتجان نوعين من البلورات وهما: (المعين والمكعب) كما يظهر في شكل (3). أما في الجانب الآخر وجد أن نسبة القتل للعزلة القياسية B. thuringiensis subsp. kurstaki التي تستخدم كمرجع هي 53% وهي أقل من نسبة القتل الناتجة عن العزلات المحلية، بينما لوحظ موت يرقة واحدة للحشرة في الشاهد. علاوة على ذلك، تشكل عدد العزلات السامة المنتجة للبلورات على شكل (معين ومكعب) 94.7% مقارنة مع عدد العزلات غير السامة المكونة لهذه البلورات، وتبين أن عدد العزلات السامة المكونة للبلورات ذات الشكل (المعين) 85.5%، والمكونة للبلورات ذات الأشكال (المستطيلة والمعينة والمكعبة) 82%، والمكونة للبلورات ذات الأشكال (الكروية والمعينة والمكعبة) 72.2%، والمكونة لبلورات (غير منتظمة ومعينة ومكعبة) الشكل 87.5% وهي أعلى إذا ما قورنت مع عدد العزلات المنتجة للبلورات (كروية) الشكل 25% (شكل 4).

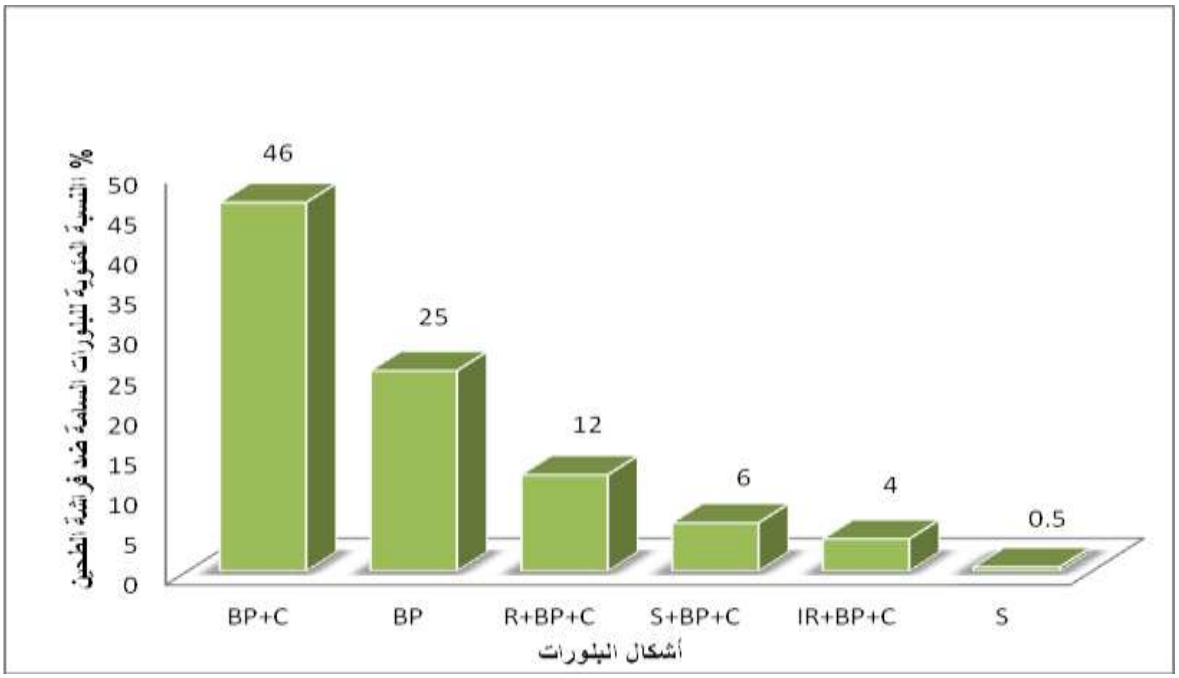


شكل (3): ظهور البلورات الناتجة عن العزلة البكتيرية B. thuringiensis الأكثر سمية لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella باستخدام المجهر الالكتروني بتكبير x10000. BP: bipyramidal (معين) ، C: cuboidal (مكعب).



شكل (4): النسبة المئوية لعزلات B. thuringiensis السامة للعمر اليرقي الثالث لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella الى عدد العزلات B. thuringiensis لأشكال البلورات.

ويبلغ عدد عزلات B. thuringiensis السامة المنتجة للبلورات 192 عزلة (88%) من أصل 219 عزلة حيث تتضمن: 46% (89 عزلة) تنتج بلورات ذات شكل (معين ومكعب)، و25% (47 عزلة) تنتج بلورات ذات شكل (معين)، و12% (23 عزلة) تنتج بلورات (مستطيل ومعين ومكعب)، 6% (12 عزلة) تنتج بلورات ذات شكل (كروي ومعين ومكعب)، و4% (7 عزلات) تنتج بلورات ذات شكل (غير منتظم ومعين ومكعب)، بينما عزلة واحدة فقط 0.5% تنتج بلورات ذات شكل (كروي) وجدت سامة ليرقات فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط (شكل 5).



شكل (5): تكرار أشكال البلورات المختلفة لعزلات B. thuringiensis السامة ضد فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella.

توضح النتائج أن معظم العزلات المحلية السامة المعزولة من التربة السورية تنتج نوعين من البلورات المعينة والمكعبة ثم العزلات المنتجة للبلورات ذات الشكل المعين والعزلات المنتجة للبلورات ذات الشكل المستطيل والمعين والمكعب، والعزلات المنتجة للبلورات ذات الشكل الكروي والمعين والمكعب، والعزلات المنتجة للبلورات ذات الشكل غير المنتظم والمعين والمكعب أكثر من العزلات المنتجة للأشكال الأخرى من البلورات. ووجود هذه العلاقة ما بين أشكال البلورات وسميتها أثبت من قبل الباحثين (Ohba and Aizawa 1986b) واللذين أوجدا علاقة ما بين أشكال البلورات وسميتها، فالبلورات ذات الشكل المعين وجد أنها أكثر سمية للحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة Lepidoptera كما أثبتت الدراسات الأخرى هذه العلاقة (Martin and Travers, 1989; Karamanlidou et al., 1991; Meadows et al., 1992). كذلك أظهرت دراسة في الأردن أن العزلات المنتجة للبلورات ذات شكل (المعين والمكعب) بالإضافة للعزلات المنتجة للبلورات ذات الشكل المعين سامة جدا" لحشرة فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella (Obeidat et al. 2004).

ومن خلال إجراء مسح لعزلات B. thuringiensis في التربة ودراسة الاختلافات البيوكميائية والشكل المورفولوجي للبلورات ومدى سمية العزلات، تبين أنها غالبا" ما تختلف من موقع لآخر وكذلك تختلف من عينة لأخرى لنفس الموقع (جدول 2، 3). وهذا يظهر التنوع الحيوي في عزلات B. thuringiensis في الموقع الواحد

(Meadows et al., 1992). كما بينت النتائج أن معظم عزلات B. thuringiensis التي تم الحصول عليها من النظم البيئية المختلفة تابعة لتحت الأنواع الشائعة وأنها سامة للحشرات. وتبين أن تحت النوع B. thuringiensis subsp. kurstaki هو الأكثر شيوعا" حيث وجد في جميع النظم البيئية المختلفة في سورية وهذا ما أشار إليه الباحثان Martin(1989) و Travers أن B. thuringiensis subsp. kurstaki أكثر تحت الأنواع انتشارا" في آسيا. وأن B. thuringiensis subsp. israelensis الأكثر تحت الأنواع انتشارا" في الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا، كما أثبتا أن تحت الأنواع البيوكميائية لبكتيريا B. thuringiensis يمكن عزلها من كل مكان في العالم.

وقد وجدت عزلات B. thuringiensis السامة للحشرات في جميع النظم البيئية المختلفة، ولكن أكثر العزلات سمية جمعت من المناطق الزراعية والتي تعتبر البيئة المناسبة لوجود الحشرات التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة (Martin and Travers, 1989; Meadows et al., 1992). وقد ظهر أن بعض العزلات المحلية المعزولة من البيئة السورية أكثر سمية من العزلة القياسية وبالتالي قد تكون أكثر كفاءة عند استخدامها في مكافحة الحشرات الاقتصادية الهامة في سورية. علاوة على ذلك، وجدت 12% من العزلات التي تمت دراسة مدى فاعليتها ضد الحشرات أنها غير سامة لفراشة طحين البحر الأبيض المتوسط E. kuehniella وهذا يدل على أن هذه العزلات ممكن أن تكون سامة لحشرات أو كائنات حية أخرى ومن الممكن أن تكون لها خصائص ووظائف أخرى ليس لها علاقة بسميتها للحشرات (Ohba et al., 2009).

الاستنتاجات والتوصيات:

يعدّ هذا البحث الأول من نوعه، فيما يتعلق بتعريف B. thuringiensis، ومقارنة العزلات المحلية المعزولة من التربة السورية من خلال دراسة أشكال البلورات، والاختبارات البيوكيميائية، وسمية العزلات البكتيرية. مما يدل على التنوع الحيوي(Biodiversity)في سلالات B. thuringiensis المعزولة من النظم البيئية والزراعية المختلفة من موقع لآخر وفي نفس الموقع. بالإضافة إلى أن هذه الدراسة تزودنا بمعلومات قيمة حول سمية بعض عزلات B. thuringiensis المحلية، وفاعليتها، حيث تفوقت في قدرتها الإمراضية ضد فراشة طحين البحر الأبيض المتوسط على العزلات المستوردة أحياناً. وهذه المعلومات حول فاعلية العزلات الجديدة على الحشرات أمر مهم في مجال التصنيع لأن استخدام المنتجات الحيوية التجارية لبكتيريا B. thuringiensis كبديل عن المبيدات الكيميائية ينمو بشكل سريع.

جدول (2): تصنيف عزلات بكتيريا B. thuringiensis المعزولة من النظم البيئية المختلفة بإستخدام الإختبارات البيوكيميائية وأشكال البلورات المختلفة.

النظم البيئية	المواقع	رقم عينة التربة	عدد المستعمرات البكتيرية B. thuringiensis	تحت النوع	أشكال البلورات*
غابات	غابات الفرلق	1	22	kurstaki, type 9	BP+C
		2	21	thuringiensis, kenyae	BP
		3	15	dendrolimus, sotto,	BP
				untypable	IR+BP+C
				untypable	R+ BP+C

BP+C BP S+ BP+C R+ BP+C	kurstaki sotto,thuringiensis untypable untypable	9	4	مشقيتا	غابات
BP+C BP S S+ BP+C R+ BP+C	kurstaki thuringiensis pakistani untypable untypable	10 4	5 6	غابات مريج	غابات
BP+C - BP+C R+ BP+C	kurstaki, type 9 like-finitimus untypable untypable	5 2 4	7 8 9	شلالات حزيرين	غابات
BP -	sotto like-finitimus	6	10	أم الطيور	حمضيات
BP+C BP S S+ BP+C R+ BP+C	kurstaki kenyae pakistani untypable untypable	8	11	صلنفة	كرز
BP+C BP IR+ BP+C S+ BP+C R+ BP+C	kurstaki sotto, thuringiensis untypable untypable untypable	8 8	12 13	دورين	تفاح جوز
BP+C BP+C R+ BP+C	kursaki untypable untypable	2 1	14 15	قبر العبد	دراق
BP+C BP IR+ BP+C R+ BP+C	kurstaki sotto untypable untypable	9	16	دمسرخو	زيتون
BP+C - BP+C IR+ BP+C R+ BP+C	kurstaki like-finitimus untypable untypable untypable	9 3 1	17 18 19	القرداحة	زيتون فول أخضر
BP+C BP - BP+C S+BP+C R+BP+C	kurstaki, type 9 thuringiensis like-finitimus untypable untypable untypable	8 8	20 21	بانياس	كوسا بندورة
BP+C BP BP - S+BP+C	kurstaki sotto, kenyae dendrolimuus like-finitimus untypable	10	22	جبلة	قمح
- BP+C S+BP+C R+BP+C	like-finitimus untypable untypable untypable	5	23	جامعة تشرين	نبتات زينة

نباتات طبيعية	الحفة	24	8	kurstaki sotto untypable untypable	BP+C BP S+BP+C IR +BP+C
أعشاب	المدينة الرياضية	25	5	kurstaki sotto, dendrolimuus pkistani	BP+C BP S
شاطئ	شاطئ جبلة	26	6	kurstaki pakistani untypable untypable	BP+C S BP+C R+ BP+C
شاطئ	شاطئ اللاذقية	27 28	2 2	kurstaki untypable untypable	BP+C BP+C R+ BP+C
شاطئ	الشاطئ الأزرق	29	2	untypable	R+BP+C
تربة جافة	النبك	30 31	4 4	kurstaki thuringiensis, sotto untypable	BP+C BP IR +BP+C
تربة جافة	درعا	32 33	4 4	kurstaki kenyae, dendrolimus untypable	BP+C BP S+ BP+C

*** أشكال البلورات: Bp: معين، C: مكعب، S: كروي R: مستطيل، IR: غير منتظم.**

جدول (3): مدى فاعلية عزلات B. thuringiensis المعزولة من الترب السورية ضد يرقات فراشة طحين بحر الأبيض المتوسط E. kuehniella.

الموقع	المحصول	نسبة القتل%																		
		5•	11	16	21	26	32	37	42	47	53	58	63	68	74	79	84	90	95
فرلق	غابات			6**	5	3	4	1	5		6	3	6	3	9	2	5		
مشقيتا	غابات	5	2	1															
مريج	غابات	1	1		2	3	1			1									
حزيرين	غابات	1	4	1	1	2							1			1			
جبلة	قمح		2	1				3	2								1		
أم الطيور	حمضيات		1	1	3		1												
قبر العبد	دراق				1					1			1						
دورين	تفاح	1	1	2	1	1													
دورين	جوز	2		2		1		1											
صلنفة	كرز	2	1		1			1		1							1		
دمسرخو	زيتون			3		1		1				1							
القرداحة	زيتون	3	1			1			1		1	1							1
القرداحة	فول			1								1				1	1		
بانياس	كوسا	1	1		1			1				1						1	
بانياس	بندورة	3	2	1															

جامعة تشرين	نباتات زينة	1	1	1	1	1													
الحفة	نباتات طبيعية	1	2		2	1	2							1					
المدينة الرياضية	أعشاب	3													1				
شاطئ اللاذقية	شاطئ		2	1															
شاطئ جبلة	شاطئ		2	1		1	2												
الشاطئ الأزرق	شاطئ	1		1															
النبك	أراضي جافة	2		2	2	1		1											
درعا	أراضي جافة		2	1															
B.t.k. ***									2										
مجموع عدد العزلات	192	27	25	26	22	16	6	9	8	3	8	8	7	8	10	4	8	1	1

- **نسبة القتل ** عدد العزلات السامة *** *B.t.k.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

المراجع:

1. أحمد، محمد. كبيبو، عيسى. مهيار، مايسة. *إنتشار وتوزع* بكتيريا Bacillus Berliner thuringiensis *في ترب نظم بيئية وزراعية مختلفة في سورية*. 2011، قبلت للنشر في مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية.
2. abbott, w.s. a method of computing effectiveness of an insecticide. j. econ. entomol., vol. 18, 1925, 265-267.
3. balaraman, k. occurrence and diversity of mosquitocidal strains of bacillus thuringiensis. j. vect. borne. dis., vol. 42, 2005, 81-86.
4. berliner, e. uber die schlaffscuht der mehlmotrnraupe (ephestia kuehniella, zell.) ihren erreger, bacillus thuringiensis n. sp. z. angew. enotomol., vol. 2, 1915, 29- 56.
5. bernhard, k., p. jarret, m. meadows, j. butt, d.j. ellism, g.m. roberts, s. pauli, p. rodgers and h.d. burges. natural isolates of bacillus thuringiensis: world wide distribution, characterization, and activity against insect pests. appl. environ. microbiol., vol. 70, 1997, 59-68.
6. brizard, b. and h. whiteley. nucleotide sequence of additional crystal protein gene cloned from bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis. nucleic acids res., vol: 16, 1988, 2733.
7. ceron, j., a. ortiz, r. quintero, l. guereca and a. bravo. specific pcr primers directed to identify cryi and cryiii genes within a bacillus thuringiensis strain collection. appl. environ. microbiol., vol. 61(11), 1995, 3826-3831.

8. chambers, j., a. jelen, m. p. gilbert, t. b. johnson and c. gawron-burke. isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from bacillus thuringiensis subsp. aizawai. j. bacteriol., vol. 173, 1991, 3966.
9. debarjac, h. and e. frachon. classification of bacillus thuringiensis strains. entomophaga, vol. 2, 1990, 233-240.
10. delucca, a. j., m. s. palmgren and a. ciegler. bacillus thuringiensis in grain elevator dusts. can. j. microbiol., vol. 28, 1982. 452-456.
11. delucca, a.j., j.g. simonson and a. d. larson. bacillus thuringiensis distribution in soils of the united states., can. j. microbiol., vol. 27, 1981, 865-870.
12. donovan, r., m. rupar, a. slaney, t. malvar, c. gawron-burke and t. johnson. characterization of two genes encoding bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins toxic to coleoptera species. appl. environ. microbiol., vol. 58, 1992, 3921-3927.
13. dulmage, h.t. and k. aizawa. distribution of bacillus thuringiensis in nature. in: microbial and viral pesticides. edited by e. kurstak, marcel dekker, new york, usa, 1982, pp. 209- 237.
14. feitelson, j. the bacillus thuringiensis family tree. in: advanced engineered pesticides. edited by l. kim, marcel dekker, new york, usa, 1993, pp. 63-72.
15. ferrandis, m.d., r. andrew, m. porcar, j. iriate, v. cosmao-dumanoir, m.m. lecadet, p. caballero and j. ferre. chracterization of bacillus thuringiensis serovar bolivia (serotype h63), a novel serovar isolated from the bolivian high valleys. lett. appl.microbiol., vol. 28, 1999, 440-444.
16. hofte, h. and whitely, h. r. 1989. insecticideal crystal proteins of bacillus thuringiensis. microbiol. rev. 53: 242-255.
17. ishiwata, s. on a kind of severe flasherie (sotto disease). dainihon sanshi kaiho, vol. 9, 1901, 1-5 (in japanese).
18. karamanlidou, g., a. lambropoulos, s. koliais, t. manousis, d. ellar and c. kastritsis. toxicity of bacillus thuringiensis to laboratory populations of the olive fruit fly (dacus oleae). appl. environ. microbiol., vol. 57, 1991, 2277-2282.
19. lu, h., f. rajamahan and d. dean. identification of amino acid residues of bacillus thuringiensis of δ-endotoxin cryiaa associated with membrane binding and toxicity to bombyx mori. j. of bacteriol. vol. 176, 1994, 5554-5559.
20. martin, p. and r. travers. worldwide abundance and distribution of bacillus thuringiensis isolates. appl. environ. microbiol., vol. 55, 1989, 2437-2442.
21. meadows, m., d. ellis, j. butt, p. jarrett and h. burges. distribution, frequency, and diversity of bacillus thuringiensis an animal feed mill. appl. environ. microbiol., vol. 58, 1992, 1344-1350.
22. morris, o.n., v. converse and p. kanagaratnam. isolation, characterization, and culture of bacillus thuringiensis from soil and dust from grain storage bines and their toxicity for mamestra configurata (lepidoptera: noctuidae).
can. entomol., vol. 130, 1998 515-537.
23. norris, j.r. and h.d. burges. the identification of bacillus thuringiensis. entomophaga, vol. 1, 1965, 41-74.
24. obeidat, m., f. al-momani and i. saadoun. diversity of bacillus thuringiensis in different habitats of northern jordan. j. basic microbiol.,vol. 40, 2000, 385- 388
25. ohba, m. and k. aizawa. distribution of bacillus thuringiensis in soils of japan. j. of inverteb. pathol., vol. 47, 1986a, 277-282.
26. ohba, m. and k., aizawa. insect toxicity of bacillus thuringiensis isolated from soils of japan. j. of inverteb. pathol. vol. 47, 1986b, 12-20.

27. ohba, m., e. mizuki and a.uemori. parasporin, a new anticancer protein group from bacillus thuringiensis. 2009. websites: (http://www.ar.iiarjournals.org/427.full).

28. petras, s.f. and l.e. casida. survival of bacillus thuringiensis spores in the soil. appl. enviorn. microbiol., vol. 50, 1985, 1495-1501.

29. smith, r. and g. couche, the phylloplane as a source of bacillus thuringiensis variants. appl. enviorn. microbiol., vol. 57, 1991, 311-315.

30. stahly, d., r. andrews and a. yousten,. the genus bacillus insect pathogens. in: the prokaryotes .edited by a. balows, h. truper, m. dworkin, w. k. harder, schleifer., spinger-verlag, new york, usa, 1992, pp. 1697-1744.

31. travers, r., p. martin, and c.reichelderfer, selective process for efficient isolation of soils bacillus spp. appl. envioron. microbiol,. vol. 53, 1987, 1262-1263.