مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 20 العدد 2 سنة 2015
سداد جاسم \نبراس محمد \ابتسام فريد ISSN 1997-2490

*تقويم كفاءة نوعي البكتريا *Bacillus sphaericus* و *B.thuringiensis var israelensis* في مكافحة بعوض *Culex quinquefasciatus Say* (*Diptera:Culicidae*)

تاريخ الاستلام : 2014/2/3 تاريخ القبول :2014/3/23

براء جليل سعيد محمد رضا عنون
جامعة القادسية / كلية العلوم / قسم علوم الحياة
*Email: Bah1990a@gmail.com
Email: Balhasnawy@yahoo.com

الخلاصة:

أستهدف البحث الحالي تقويم كفاءة نوعين من البكتريا *Bacillus sphaericus* و *B. thuringiensis var.israelensis* وأستعمالهما عاملاً حيوياً في مكافحة بعوض *Cx. quinquefasciatus*، أثرت تراكيز المعلقات البكتيرية ونواتج الأيض الثانوية في يرقات هذا النوع من البعوض، بينما لم يحدث اي هلاك لدور البيوض والعذارى والبالغات. سجلت اعلى نسبة هلاك لليرقات 93.33 % عند معاملة يرقات الطور الأول بتركيز 1×10^{6} بوغ/مل من المعلق البكتيري لبكتريا *B. sphaericus* ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك 66.66% عند تركيز 1×10^{3} بوغ/مل ، أما عند استعمال المعلق البكتيري لبكتريا *B. thuringiensis* فبلغت اعلى نسبة هلاك 90% عند معاملة يرقات الطور الأول بتركيز 3×10^{6} بوغ/مل بعد 120ساعة ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك 63.33% عند تركيز 3×10^{3} بوغ/مل في المدة نفسها، أما بخصوص تأثير تراكيز النواتج الأيضية الثانوية فقد بلغت أعلى نسبة هلاك لليرقات لكلا نوعي البكتريا المذكورة 96.66% عند تركيز 100%بعد 72ساعة من المعاملة أما اوطأ نسبة هلاك فبلغت لكلا النوعين 66.66% عند تركيز 25% وفي المده ذاتها.

الكلمات المفتاحية : بكتريا Bacill وبكتريا . Cx

Microbiology Classification QR 75-99.5

1.المقدمة:

يعد البعوض من أهم الحشرات الطبية والبيطرية فضلاً عن كونه يسبب الازعاج وأنعدام الراحة ويعد من النواقل الحيوية للعديد من المسببات الممرضة للأنسان والحيوان ومن بينها بعوض *Culex. quinquefasciatus* الذي يعد الناقل الرئيس لداء الفيلاريا في مناطق مختلفة من العالم (34) .

لقد أستخدم الباحثين عدة طرائق في مكافحة البعوض واعتمدو بشكل رئيسي عالمكافحة الكيماوية مما ادى الى ظهور مشاكل عديدة منها مقاومة الحشرات للمبيدات الكيماوية لامتلاكها بعض الانزيمات المزيلة للسموم ، وتأثير المبيدات على الأعداء الحيوية والتأثير التراكمي للمبيدات في صحة الانسان وتلويث البيئة بالاضافة الى زيادة تكاليف الانتاج (21) ، مما دفع الباحثين على أتباع طرائق اخرى كالمكافحة الحيوية ولعل استخدام الأحياء المجهرية من أشهر الطرائق في مكافحة الحشرات ومن بينها البكتريا التي حققت نجاحا ملحوظاً في مجال مكافحة البعوض (7)، أن كلا نوعي البكتريا *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* تمتازان بكفائتهما العالية في مقاومة البعوض فقد ذكر (9) انهما من اهم انواع البكتريا المستخدمه في المكافحة الحيوية حيث يمتلكان سميه عاليه تجاه البعوض وتعود هذه السمية بكون *B. thuringiensis* تمتلك البلورة بروتينية ذات الأثر السام جداً لبعض انواع الحشرات (4) اما سمية *B. sphaericus* تعود الى انتاجها نوعين من السموم (Btx) و (Mtx) (32)، ولم يذكر استخدام هذه الانواع سابقاً في مكافحة بعوض *Cx. quinquefasiatus* ، ولكون هذا النوع من البعوض الناقل الرئيسي لداء الفيلاريا في انحاء مختلفة من العالم فقد استهدفت الدراسة أستخدام نوعي البكتريا المذكورين في مكافحة هذا النوع من البعوض في المختبر بأستخدام تراكيز مختلفة من المعلق البكتيري لكلا النوعين ونواتج الايض الثانوية الخام في جميع أدوار حياة البعوضة.

***البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني .**

2.المواد وطرائق العمل:

2–1: أعداد المزرعة الدائمية لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

جمعت مختلف الاطوار اليرقية لبعوضة *Cx. quinquefasciatus* من أحد اماكن تصريف المياه والبرك والمستنقعات في مدينة الديوانية خلال شهر تشرين الثاني لعام 2012 ، بوساطة مغرفة طويلة الذراع ووضعت في قناني بلاستيكية ذات غطاء ونقلت الى المختبر ، وأفرغت في احواض زجاجية (30×20) سم زودت بماء خالٍ من الكلور أضيفت له عليقة الفئران المطحونة المكونة من (الذرة الصفراء والحنطة والرز والبروتين) بنسبة (1:1:1:0.25) بمقدار 2غرام لكل حوض لتغذية اليرقات وغطيت الاحواض بقماش التول . ولغرض الحصول على مزرعة دائمية نقية نقلت العذارى المتكونة حديثاً لبعوضة *Cx.quinquefasciatus* بوساطة قطارة عريضة الفوهة الى اوانٍ بلاستيكية أودعت في قفص مكعب الشكل طول ضلعه (70) سم مغلف بقماش التول ، ووضعت بداخل القفص أطباق بتري تحوي قطناً مشبعاً بمحلول سكري 10% لغرض تغذية البالغات . وتم تشخيصها حسب الصفات التصنيفية الواردة في المفاتيح التصنيفية (6 , 8) وذلك بواسطة اعداد شرائح للبالغات وتم تأكيد التشخيص من قبل الاستاذ المساعد الدكتورة غيداءعباس / كلية الطب البيطري / جامعة القادسية على أنها *Cx. quinquefasciatus* . وللحصول على قوارب البيض أتبعت طريقة (24). ولغرض تهيأة الاعداد الكافية من كل طور يرقي والعذارى والبالغات فقد عزلت أعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الاول أما الطور الثاني والثالث والرابع فقد هيأ كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبق وضعها في انابيب التربية فرادى ومراقبتها لحين الانسلاخ ووصولها للطور المطلوب.

2–2: الأوساط الزرعية لكلا نوعي البكتريا *B. thuringiensis israelensis* و *B. sphaericus*

استخدم الوسط الزرعي Nutrient agar (33) حيث أذيبت مكونات هذا الوسط بحسب الكميات الموصى بها 28 غم في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعة 1 لتر وعقم بجهاز الموصدة Autoclave على درجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند/ انج^2 لمدة 20 دقيقة ثم صب الوسط في اطباق بتري بقطر 9 سم وترك ليتصلب ، بعد ذلك لقحت الاطباق بالنمو البكتيري من مزرعة البكتريا وحضنت بدرجة حرارة 35 مْ لمدة (24-48) ساعة، كما استعمل المرق المغذيNutrient broth لغرض اكثار البكتريا وتم تحضيرهُ بوضع 13 غم/ لتر من الماء المقطر وعقم بعدها بجهاز الموصدة.

2–3: مصادر البكتريا *B. israelensis* و *B. thuringiensis* و *B. sphaericus*

تم الحصول على البكتريا *B. israelensis thuringiensis* من قبل الاستاذ الدكتور سعدي محمد هلال / قسم علوم الحياة للبنات/ جامعة بابل. أما بكتريا *B. sphaericus* فتم الحصول عليها من الدكتور أحمد درويش /كلية طب الأسنان/ جامعة واسط.

2–3–1 حفظ عزلات البكتريا :

هيأت انابيب اختبار سعة 15 مل حاوية على الوسط الزرعي Nutrient agar ووضعت بشكل مائل وبعد التصلب لقحت هذه الانابيب بطريقة التخطيط بوساطة ناقل معقم بأخذ جزء من المستعمرات البكتيرية لكلا النوعين ، ثم حضنت هذه الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 48 ساعة بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 مْ (1) .

2–4 تحضير المعلق البكتيري :

2–4–1 : تحضير معلق البكتريا *B. israelensis thuringiensis*

حضر (150 مل) من المرق المغذي ووضع في دورق زجاجي سعة (250 مل) ، عقم بجهاز الموصدة وترك ليبرد بعد ذلك لقح بالبكتريا النامية على وسط الاكار المغذي بعمر 48 ساعة ، بعد ذلك حضن الدورق في درجة حرارة 35 م^o لمدة 48 ساعة ثم رشحت المزرعة الناتجة بقطع من الشاش المعقم وحسب عدد المستعمرات في المعلق بطريقة العد المباشر في الأطباق بأخذ (1مل) من المعلق المخفف الى (10^7) ولقحت بهِ أطباق الوسط البكتيري (الاكار المغذي) بثلاث مكررات ، وبعد وضع الاطباق في الحاضنة على درجة 35 م^o لمدة 24 ساعة حسبت عدد المستعمرات النامية في كل طبق واستخرج معدلها لثلاث أطباق وضرب في مقلوب التخفيف حيث تم الحصول على معلق بتركيز (3×10^7 بوغ / مل) وللحصول على تركيز اقل فقد طبقت المعادلة الاتية (20) :-

الحجم (مل) المأخوذ من المعلق الاصلي = التركيز المطلوب / تركيز المعلق الاصلي

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق الذي نرغب بالحصول عليه، وهكذا حضرت التراكيز. (3×10^6 و 3×10^5 و3×10^4 و 3×10^3) بوغ / مل .

2–4–2 : تحضير معلق البكتيريا *B. sphaericus*

أتبعت الطريقة نفسها في تحضير معلق بكتريا *B. thuringiensis* بأخذ 1 مل من المعلق المخفف الى (10^7) ولقحت به أطباق الأكار المغذي وتم الحصول على معلق بتركيز (1×10^7 بوغ / مل) وللحصول على تراكيز (1×10^6 و 1×10^5 و 1×10^4 و 1×10^3) بوغ / مل وأتبعت الطريقة نفسها في فقرة (2 –4 –1) (1، 7) .

2–5 الإختبار الحيوي Bioassay :

2–5–1 : الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلقات البكتريا *B. thuringiensis* و *B. sphaericus* في مختلف ادوار حياة البعوضه *Cx. quinquefasciatms*

2-5-1-1: الإختبار الحيوي في البيض

اخذ قارب البيض بعمر 24 ساعة بعد ان وضعته احدى اناث *Cx. quinquefasciatus* المتغذية على الدم

بوساطة فرشاة ناعمة لكل مكرر ووضع في اناء بلاستيكي سعة 250 مل يحتوي على 100 مل من كل تركيز من تراكيز معلقات البكتريا ، كما رش البيض سطحيا بالتركيز نفسه الذي وضع فيه بوساطة مرشة يدوية وبمقدار 5 مل لكل مكرر من ارتفاع 15 سم تقريباً لضمان تعريض كل البيض للمعلق الفطري ،كررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز أما معاملة السيطرة فقد رشت بالماء المقطر المعقم فقط. تم مراقبة البيض لحين الفقس وحسبت نسبة الهلاك (30). وصححت القيم بحسب معادلة Orell and Schneider (5)

دقيقتين ثم نقلت اليرقات المعاملة بوساطة فرشاة ناعمة إلى أوان زجاجية سعة (250 مل) تحوي ماءً مقطراً معقماً اضيف اليه غذاء اليرقات بمقدار 10 ملغم / سم^3 ثم تحضن في الظروف المناسبة (13) ، وتحسب نسبة الهلاك يومياً ولمدة 5 أيام (27) وصححت القيم كما في الفقرة (2-5-1-1) .

2-5-1-3: الأختبار الحيوي في دور العذراء

عزلت العذارى بعد إنسلاخ عدد كافٍ من يرقات الطور الرابع وبعدد مماثل لما أستخدم في تجربة الأطوار اليرقية وطبقت طريقة الاختبار نفسها في الفقرة (2–5– 1– 2) بإستثناء عدم إضافة العليقة ومراعاة تغطية أواني المعاملات بقماش التول تحسباً لظهور البالغات وحسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 3 أيام (13) ، وصححت القيم كما في الفقرة (2–5–1–1) .

2-5-1-4 : الأختبار الحيوي في البالغات

أخذت أعداد كافية من العذارى من المزرعة الدائمية ووضعت فرادى في أنابيب سعة (1 لتر) وأغلقت بقطعة من القطن ، حتى تحولها الى بالغات ، وزعت 10 بالغات كل من الذكور والأناث الحديثة البزوغ على انفراد في بيكرات زجاجية سعة (1 لتر) ورشت البيكرات بمقدار (5 مل) من كل تركيز من تراكيز المعلقات البكتيرية بوساطة مرشة يدوية من أرتفاع (15 سم) تقريباً بينما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم ، نقلت البالغات المعاملة الى بيكرات زجاجية سعة كل منها 1 لتر داخل كل منها قطنة مشبعة بمحلول سكري (10%) وضعت في طبق بتري و كررت هذهِ التجربة ثلاث مرات لكل تركيز من تراكيز المعلقات البكتيرية ومثلها لمعاملة السيطرة (16)، بعدها حضنت بيكرات المعاملة في الظروف ملائمة (27) .حسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 7 أيام وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (2–5–1–1) .

2–5–2 : تحضير نواتج الأيض الثانوية الخام للبكتريا *B. thuringiensis israelensis* و *B. sphaericus*

حضر المرق المغذي ووضع (100 مل) منهُ في دورقين زجاجين سعة كل منهما 250 مل وعقما بجهاز الموصدة ثم تركا بعد ذلك ليبردان ولقح الوسط الأول بقرص (0.5 سم) من مزرعة بكتريا

% الهلاك المصححة =
نسبة الهلاك في المعاملة - نسبة الهلاك في السيطرة
100 - نسبة الهلاك في السيطرة
× 100

2-5-2-1: الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة

أخذت 40 يرقة من كل طور من الأطوار الأربعة والتي (هيأت عن طريق عزل يرقات الطور الذي سبقه في أنابيب التربية لحين الأنسلاخ ووصولها الى الطور المطلوب) لكل تركيز ووزعت على أربع أوانٍ ثلاث يحتوي كلٌ منها على (200 مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق البكتيري أما الرابع فيحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) وتركت لمدة *B.thuringienesis* والوسط الثاني ببكتريا *B.sphaericus* وحضن الدوارقان في الحاضنه بدرجة 35م^o لمدة 48 ساعة ، رشحت المزرعتين الناتجتين بورق ترشيح معقم Whatman No. 1 ونقلت بعد ذلك الى جهاز الطرد المركزي بسرعة (5000 RPM) لمدة عشر دقائق مع مراعاة أن تكون الأنابيب باردة جداً لتلافي أرتفاع درجات الحرارة بسبب الدوران السريع (19) .أعيدت العملية مرة أخرى بعد نقل الراشحين الى أنابيب أخرى وكلاً على حدة، وللتأكد من أن النمو البكتيري أنفصل ولم يبق الا الراشح ، أخذ 1 مل من راشح بكتريا *B. thuringienesis* و 1مل من راشح بكتريا *B. sphaericus* وزرع كل منهما على حدة في طبق بتري بقطر (9 سم) يحتوي على وسط الأكار المغذي بمعدل (20مل) وحضنا بدرجة حرارة 35 م^o لمدة 48 ساعة وحضرت التراكيز (25% ، 50% ، 75% ، 100%) لكلا الراشحين.

2-5-2-1 : تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام (الراشح) لبكتريا *B. thuringiensis* var *israelensis* في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوضه *Cx.quinquefasciatus*

أستخدمت التراكيز المحضرة (25% ، 50% ، 75% ، 100%) واتبعت الطريقة ذاتها في الفقرة (2 – 5 – 1 – 2) (25) حسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 3 أيام ، وصححت قيم الهلاك كما في الفقرة (2 –5 – 1 – 1).

2-5-2-2 : تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام (الراشح) لبكتريا *B.sphaericus* في الأطوار اليرقية الأربعة لبعوضه *Cx.quinquefasciatus*

أستخدمت التراكيز المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة ذاتها في الفقرة السابقة (25) وحسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 3 أيام ، وصححت القيم كما في الفقرة (2 – 5 – 1 – 1).

2 –6: التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات على وفق تصميم التجربة العاملية Completely Randomized Design (C.R.D) ، وصححت النسبة المئوية للهلاك على وفق معادلة Orell and Shneider (5) وأستعمل اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D) في تشخيص الفروقات الأحصائية بين المعاملات (3).

3.النتائج والمناقشة:

3–1 الإختبار الحيوي لمختلف تراكيز المعلقات البكتيرية *B. thuringiensis israelensis* و *B. sphaericus*في مختلف ادوار حياة بعوض *Cx. quinquefasciatus* :

3-1-1: الاختبار الحيوي في البيوض والعذارى والبالغات

يشير الجدول (3-1) عدم وجود أي تاثير للتراكيز المختلفة من المعلق البكتيري في بيوض وعذارى وبالغات بعوضة *Cx.quinquefasciatus* . اتفقت النتائج الحالية مع ما وجده (28) عندما عامل بيوض *Ae.aegypti* بأبواغ البكتريا *israelensis B.thuringiensis* حيث لم تحصل اية نسبة للهلاك. كما أكد (15) ان البكتريا لا تؤثر على البيوض لان اساس عملها يحدث داخل معدة الحشرة. كما أتفقت هذه النتائج مع ماوجدتها (7) عند معاملة بيوض نوعي من البعوض *An.pulcharrhimus* و*Cx.quinquefasciatus* حيث وجدت ان أبواغ بكتريا *B.thuringiensis israelensis* لم تحدث اية نسبة للهلاك. اما بخصوص العذارى فقد أتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه (18) عندما عرض عذارى بعوضة *An.gambiae* لأبواغ بكتريا *B.thuringiensis var israeliensis* حيث كانت نسبة هلاكها 1% ، ولم تسبب هذه البكتريا اية نسبة للهلاك عند تعريضها لعذارى *Chrysoperla carena* ، وقد أشار (15) أن سبب عدم تأثير البكتريا في العذارى ألى أن العذارى لا تتغذى. وفيما يخص البالغات فقد أتفقت هذه النتائج مع ماوجد (29) عندما عرض بالغات *Ae.aegypti* لابواغ البكتريا المذكورة بتركيز 2.5×10^{6} بوغ/مل لم تحدث اية نسبة للهلاك. كما تشابهت هذه النتائج مع (7) عندما عرض بالغات بعوضتي *An.pulcharrhimus* و *Cx.quinquefasciatus* بأبواغ بكتريا *israelensis B.thuringiensis* حيث كانت نسبة هلاك بعوض الأنوفلس 33.33% بتركيز 2×10^{7} بوغ/مل ، أما بعوض الكيوليكس فلم تحدث فيه اية نسبة للهلاك. وأشار (14) أن سبب عدم تأثير البكتريا في البالغات قد يعود الى قلة تعرض البالغات لها أضافة الى طريقتها في التغذية لان فعالية البكتريا لاتظهر الا عند وصولها الى الامعاء الوسطى، اذ ان فرصة دخولها الى امعاء الحشرات البالغة تكون قليلة جدا بالمقارنة مع اليرقات .

جدول (3 - 1) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات البكتريا *B. thuringiensis israelensis* في بيوض وعذارى وبالغات بعوضة *C x.quinquefasciatus*

التراكيز بوغ / مل		النسبة المئوية للهلاك في (الساعة)			
		24	48	72	
البيوض	3×10	0.00	0.00	0.00	
	4×10	0.00	0.00	0.00	
	5×10	0.00	0.00	0.00	
	6×10	0.00	0.00	0.00	
	Control	0.00	0.00	0.00	
العذارى	3×10	0.00	0.00	0.00	
	4×10	0.00	0.00	0.00	
	5×10	0.00	0.00	0.00	
	6×10	0.00	0.00	0.00	
	Control	0.00	0.00	0.00	
البالغات		24	72	120	168
	3×10	0.00	0.00	0.00	0.00
	4×10	0.00	0.00	0.00	0.00
	5×10	0.00	0.00	0.00	0.00
	6×10	0.00	0.00	0.00	0.00
	Control	0.00	0.00	0.00	0.00

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 حول تأثير تداخل تراكيز معلقات بكتريا *B. thuringiensis* في نسب هلاك البيوض والعذارى والبالغات = 0.00

3-1-2: الإختبار الحيوي للاطوار اليرقية الاربعة :

يشير جدول (3 – 2) الى تأثير تراكيز مختلفة من معلقات بكتريا *B. sphaericus* حيث سجلت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 1×10^{6} بوغ/مل والتي بلغت 93.33% ليرقات الطور الأول بعد 120 ساعة بينما سجلت أوطأ نسبة للهلاك 66.66% عند التركيز 10^{3}

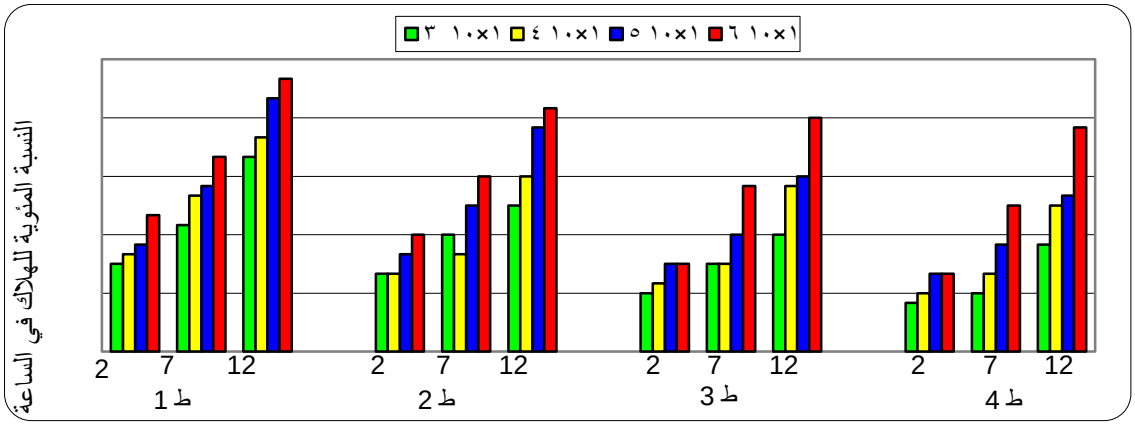
1× بوغ/مل وفي نفس المدة من المعاملة . ويعبر الشكل (3-1) الى حساسية الأطوار اليرقية لمعلق هذا النوع من البكتريا .وقد أتفقت هذه النتائج الحالية مع ماحصل عليه (26) عندما عرض يرقات بعوضة *Cx. stigmatosoma* بأبواغ بكتريا *B. sphaericus* حيث أدت الى هلاكها بنسبة 100% عند تركيز 2 ×10^7 بوغ/مل . كما ذكر (18) ان نسبة هلاك يرقات بعوضة *An.gambiae* حيث بلغت 88% عند تعريضها لابواغ البكتريا المذكورة. أما بخصوص تأثير تراكيز المعلق البكتيري لبكتريا *B. israelensi thuringiensis* فيوضح الجدول (3 – 3) أن اعلى نسبة هلاك ليرقات الطور الأول بلغت 90% عند تركيز 3× 10^6 بوغ/مل بعد 120 ساعة من المعاملة، في حين بلغت أوطأ نسبة لهلاك الطور الأول 63.33% عند تركيز
3 ×10^3 بوغ/مل كما يعبر شكل (3-2) عن حساسية الأطوار اليرقية لمعلق بكتريا *B. israelensis thuringiensis* لقد أتفقت هذه النتائج مع (17) عندما عرض يرقات الطور الأول للبعوضة قيد البحث لبكتريا *B. thuringiensis* حيث حصل على نسبة هلاك بلغت 90.8% بعد 48 ساعة عند تركيز 2.5 × 10^4 بوغ/مل. أما بخصوص حساسية الأطوار فقد أتفقت النتائج الحالية مع ماحصل عليه (13) عندما وصف العلاقة بين الاطوار اليرقية للبعوض ونسبة الهلاك بأنها تقل كلما تقدم عمر الطور ، حيث ذكر نسبة هلاك الطور الثالث بلغت 95% والرابع بنسبة 91% عند معاملتها بمعلق البكتريا المذكورة بتركيز 3 × 10^8 بوغ/مل ويرجع سبب ذلك الى أن الأطوار المتقدمة في العمر تبدي نمطاً من المناعة يعرف بمناعة البلوغ (2). كما بين (22) ان اليرقة المصابة تتوقف عن التغذية عندما يبدا السم بتحليل خلاياها وتموت الحشرة بعد مرور عدة ايام ، ويعود السبب في هلاك اليرقات بعدة ايام هو ان البكتريا تتطلب وقتا كافيا حتى تصل الى معدة الحشرة وتطلق السم، حيث ان البكتريا تتكاثر عند دخولها في احشاء الحشرة وهذا يستغرق وقت لوصول البكتريا الى الاعداد المناسبة لاحداث القتل.

جدول (3 - 2) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات البكتريا *B. sphaericus* في الأطوار اليرقية الاربعة لبعوضة *Cx.quinquefasciatus*

الطور	التراكيز بوغ/مل	النسبة المؤية للهلاك في (الساعة)		
		24	72	120
الأول	1×10^3	30.00	43.33	66.66
	1×10^4	33.33	53.33	73.33
	1×10^5	36.66	56.66	86.66
	1×10^6	46.66	66.66	93.33
	Control	0	0	0
الثاني	1×10^3	26.66	40.00	50.00
	1×10^4	26.66	33.33	60.00
	1×10^5	33.33	50.00	76.66
	1×10^6	40.00	60.00	83.33
	Control	0	0	0
الثالث	1×10^3	20.00	30.00	40.00
	1×10^4	23.33	30.00	56.66
	1×10^5	30.00	40.00	60.00
	1×10^6	30.00	56.66	80.00
	Control	0	0	0
الرابع	1×10^3	16.66	20.00	36.66
	1×10^4	20.00	26.66	50.00
	1×10^5	26.66	36.66	53.33
	1×10^6	26.66	50.00	76.66

	Control	0	0	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للأطوار اليرقية=2.27 ، للتراكيز=2.27، للزمن=1.96، للتداخل بين جميع العوامل=7.7



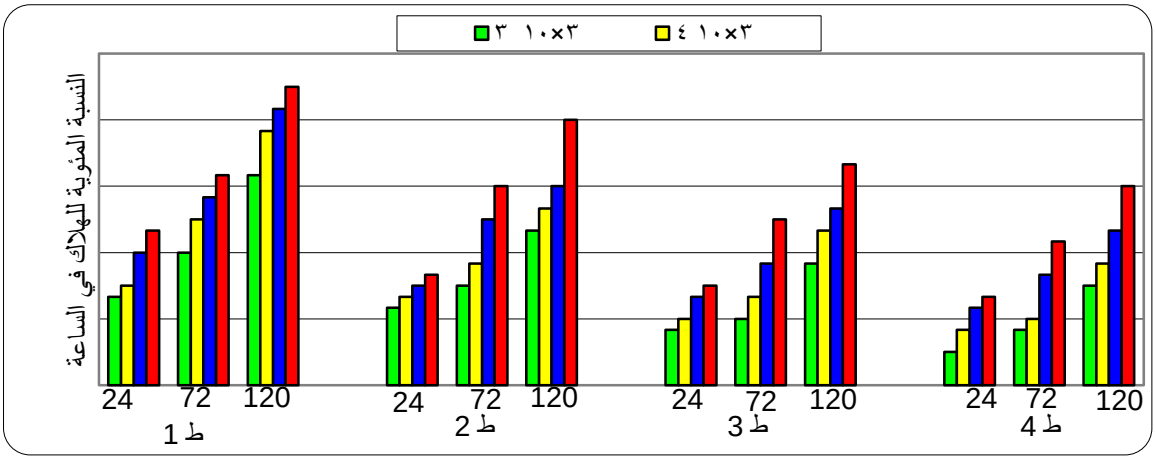
شكل (3 - 1) حساسية الاطوار اليرقية الاربعة لمعلق بكتريا *B. sphaericus*
ط1= الطور الأول، ط2= الطور الثاني، ط3= الطور الثالث، ط4= الطور الرابع

جدول (3 - 3) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات البكتريا *B. thuringiensis israelensis* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضة *Cx.quinquefasciatus*

الطور	التراكيز بوغ/مل	النسبة المئوية للهلاك في (الساعة)		
		24	72	120
الأول	3×10^3	26.66	40.00	63.33
	3×10^4	30.00	50.00	76.66
	3×10^5	40.00	56.66	83.33
	3×10^6	46.66	63.33	90.00
	Control	0	0	0
الثاني	3×10^3	23.33	30.00	46.66
	3×10^4	26.66	36.66	53.33
	3×10^5	30.00	50.00	60.00
	3×10^6	33.33	60.00	80.00
	Control	0	0	0
الثالث	3×10^3	16.66	20.00	36.66
	3×10^4	20.00	26.66	46.66
	3×10^5	26.66	36.66	53.33
	3×10^6	30.00	50.00	66.66
	Control	0	0	0
الرابع	3×10^3	10.00	16.66	30.00
	3×10^4	16.66	20.00	36.66
	3×10^5	23.33	33.33	46.66
	3×10^6	26.66	43.33	60.00

	Control	0	0	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للأطوار اليرقية=2.03 ، للتراكيز=2.03، للزمن=1.7، للتداخل بين جميع العوامل=7.7



شكل (3 - 2) حساسية الاطوار اليرقية الاربعة لمعلق البكتريا *B. thuringiensis israelensis*
ط1= الطور الأول، ط2= الطور الثاني، ط3= الطور الثالث، ط4= الطور الرابع

3–2 الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز نواتج الأيض الثانوية الخام لنوعين من البكتريا *B. sphaericus* و *B.thuringiensis israelensis*

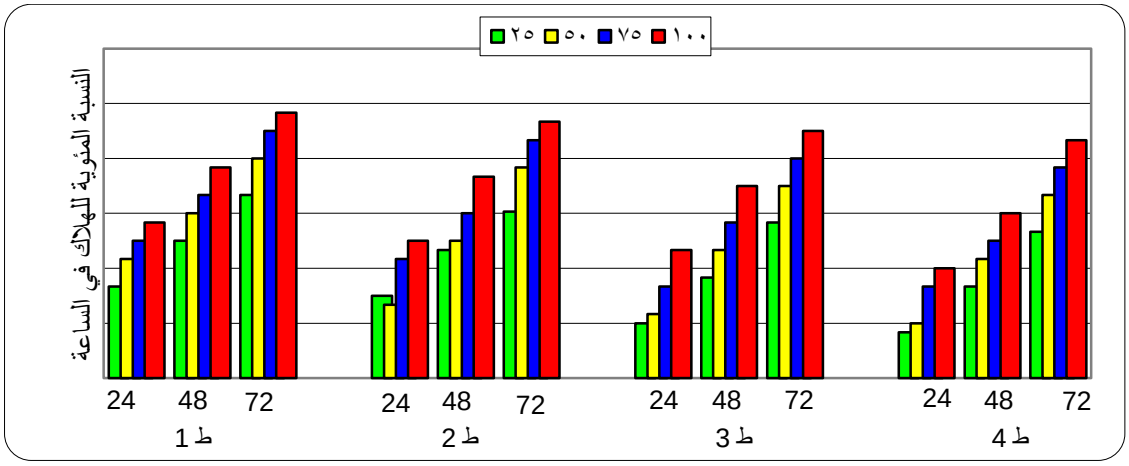
3–2–1 تأثير نواتج الايض الثانوية الخام لكل من بكتريا *B. thuringiensis israelensis* و *B. sphaericus* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوض *Cx. quinquefasciatus*

يشير الجدول (3 - 4) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام لبكتريا *B. sphaericus* في يرقات بعوضة*Cx. quinquefasciatus* ، حيث سبب التركيز 100% هلاك اليرقات بنسبة 96.66% بعد 72 ساعة ، بينما سجل التركيز 25% اوطأ نسبة هلاك حيث بلغت 66.66% ، وأن العلاقة طردية مابين التركيز ونسبة الهلاك من جهة ومدة التعريض من جهة اخرى، حيث أن تركيز 100% سبب نسبة هلاك الطور الأول 56.66 بعد 24 ساعة وارتفعت نسبة الهلاك الى 96.66% بعد 72 ساعة من مدة التعريض ويتضح من ذلك الشكل (3- 3). واتفقت هذه النتائج مع ماوجده (31) عندما عرض يرقات البعوضة قيد البحث لنواتج الأيض الثانوية الخام لبكتريا *B. sphaericus* بتركيز 0.5ملغرام/لتر حيث سببت هلاكها بنسبة بلغت 9 ± 85.5% بعد 48 ساعة. كما حصل (12) على نسبة هلاك انحصرت بين 50 – 90% عندما عرض يرقات الطور الثاني لبعوض *Cx. pipiens* لنواتج الايض الثانوية الخام للبكتريا المذكورة بعد 48 ساعة. وفيما يخص بكتريا *B.thuringiensis israelensis* فقد بين الجدول (3 - 5) أن نسبة الهلاك اليرقات مشابهه لما حصل مع النوع الاول من البكتريا وهي 96.66% حيث كانت اعلى نسبة للهلاك و 66.66% مثلت اوطأ نسبة للهلاك، كما ان العلاقة مابين التركيز ونسبة الهلاك مشابهه لما حدث مع تأثير نواتج الايض الثانوية الخام لبكتريا *B. sphaericus* .اما حساسية الاطوار فتمثل في شكل (3-4) وأتفقت النتائج الحالية مع ماوجده (23) عندما عاملا يرقات الذباب المنزلي *M.domestica* براشح البكتريا *B. thuringiensis* بتركيز 5 ملغم/لتر حيث ادى الى هلاكها جميعاً ، كما حصل (11) على نسبة هلاك بلغت 100% عند معاملة يرقات *Cx.quinquefasciatus* بنواتج الايض الثانوية الخام للبكتريا نفسها. أن أساس تأثير *B.thuringiensis israelensis* في الحشرات هو وجود المادة السامة في البلورة البروتينية ، اما (4) فوضح ان التسمم لايقتصر على البلورة البروتينية وحدها وانما يرجع الى وجود مواد أخرى تنتجها العصية البكتيرية حيث وجد (23) بأن بكتريا *B.thuringiensis israelensis* تنتج مواد سامة اخرى اضافة الى البلورة البروتينية حيث تمتاز هذه المواد بكونها مقاومة للحرارة ولها القدرة على الذوبان في الماء ويمكن فصلها وهذه المواد تتكون بصورة منفصلة عن البلورة وانزيم Lethicinase الذي تفرزه البكتريا وعندما تحقن الحشرات بهذه المواد فانها تموت حالا. أما بكتريا *B. sphaericus* فأن تأثيرها يعود الى انتاجها نوعين من السموم نوعين من السموم الأول يعرف بالسم الثنائي (Binary toxin) والثاني يطلق عليه بسم البعوض (Mosquitocidal toxin) (32 ، 10).

جدول (3 - 5) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام لبكتريا *B. sphaericus* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

الطور	التراكيز %	النسبة المئوية للهلاك في الساعة		
		24	48	72
الأول	25	33.33	50.00	66.66
	50	43.33	60.00	80.00
	75	50.00	66.66	90.00
	100	56.66	76.66	96.66
	control	0	0	0
الثاني	25	30.00	46.66	60.00
	50	26.66	50.00	76.66
	75	43.33	60.00	86.66
	100	50.00	73.33	93.33
	control	0	0	0
الثالث	25	20.00	36.66	56.66
	50	23.33	46.66	70.00
	75	33.33	56.66	80.00
	100	46.66	70.00	90.00
	control	0	0	0
الرابع	25	16.66	33.33	53.33
	50	20.00	43.33	66.66
	75	33.33	50.00	76.66
	100	40.00	60.00	86.66
	control	0	0	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للأطوار اليرقية=1.3 ، للتراكيز=1.3، للزمن=1.14، للتداخل بين جميع العوامل=4.5

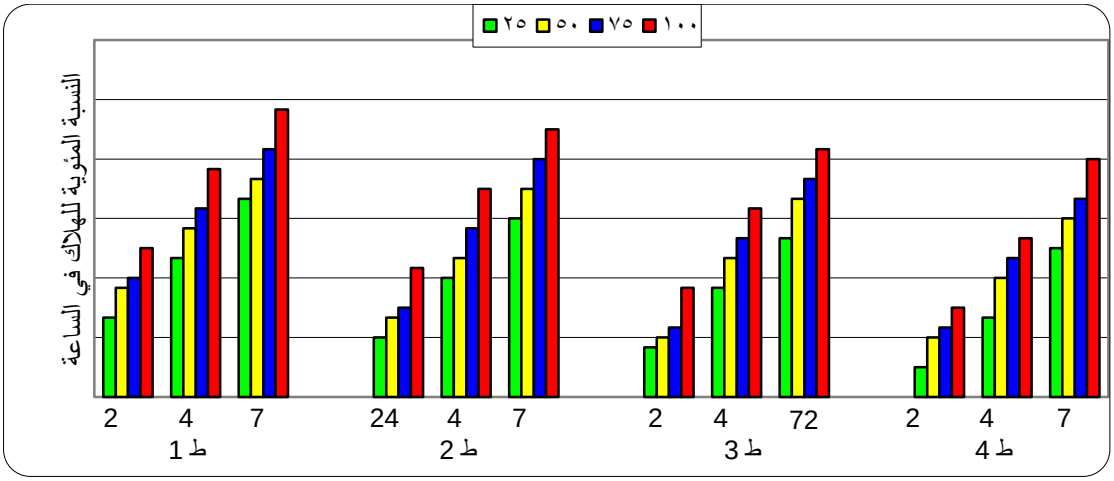


شكل (3 - 3) حساسية الاطوار اليرقية الاربعة لنواتج الأيضية الثانوية الخام لبكتريا *B. sphaericus*
ط1= الطور الأول، ط2= الطور الثاني، ط3= الطور الثالث، ط4= الطور الرابع

جدول (3 - 6) تأثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام لبكتريا *B. thuringiensis* *israelensis* في الأطوار اليرقية الاربعة لبعوضة *Cx. quinquefasciatus*

الطور	التراكيز%	النسبة المئوية للهلاك في الساعة		
		24	48	72
الأول	25	26.66	46.66	66.66
	50	36.66	56.66	73.33
	75	40.00	63.33	83.33
	100	50.00	76.66	96.66
	control	0	0	0
الثاني	25	20.00	40.00	60.00
	50	26.66	46.66	70.00
	75	30.00	56.66	80.00
	100	43.33	70.00	90.00
	control	0	0	0
الثالث	25	16.66	36.66	53.33
	50	20.00	46.66	66.66
	75	23.33	53.33	73.33
	100	36.66	63.33	83.33
	control	0	0	0
الرابع	25	10.00	26.66	50.00
	50	20.00	40.00	60.00
	75	23.33	46.66	66.66
	100	30.00	53.33	80.00
	control	0	0	0

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للأطوار اليرقية=1.12 ، للتراكيز=1.12، للزمن=0.97، للتداخل بين جميع العوامل=3.9



شكل (3 - 2) حساسية الاطوار اليرقية الاربعة لنواتج الأيضية الثانوية الخام لبكتريا *B. israelensis* *thuringiensis*

ط1= الطور الأول، ط2= الطور الثاني، ط3= الطور الثالث، ط4= الطور الرابع

المصادر:

1. الامارة ، محمد صبري جبر . 2009 . تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية في بعض اوجه حياتية حشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) *Trogoderma granarim* (*Everts*) . رسالة ماجستير كلية الزراعة/ جامعة البصرة . 107 صفحة.
2. توفيق ، محمد فؤاد . 1997 . المكافحة البايولوجية للآفات الزراعية . المكتبة الاكاديمية . الدقي . القاهرة . 707 صفحة .
3. الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز محمد . 2000 . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . الطبعة الثانية 488 صفحة.
4. الزبيدي ، حمزة كاظم . 1992 . المقاومة الحيوية للآفات . دار الكتب للطباعة والنشر ، الموصل .العراق . 440 صفحة .
5. شعبان ، عواد والملاح ، نزار مصطفى . 1993 . المبيدات .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . 520 صفحة .
6. عبد القادر ، أياد عبد الوهاب . 2000 . دراسة تصنيفية لعائلة البعوض (*Diptera : Culicidae*) في محافظة البصرة . اطروحة دكتوراه . علوم حياة جامعة البصرة .
7. الكرعاوي ، رحمن لفته . 2012 . دراسة مختبرية لكفاءة بعض طرائق السيطرة في نوعين من البعوض دراسة مختبرية لكفاءة بعض طرائق السيطرة في نوعين من البعوض (*Diptera* : *Culicidae*) في محافظة الديوانية . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة القادسية .

8. Abul-hab , J.K. 1968 . Larval of *culicine* mosquitoes of Iraq with akey for their Identification . Bull.End – Dis . Baghdad . X(1 – 4) : 23 .
9. Armengol, G., Hernandez, J., Velez, J.G., Orduz, S. (2006): Long lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* control. Journal of Economic Entomology 99, 1590-1595.
10. Broadwell, A.H., Baumann, P.,1987. Proteolysis in the gut of mosquito larva results in further activation of the *Bacillus sphaericus toxin.* App.Environ. Microbial. 53, 1333–1337.
11. Crickomore , N. ; Zeigler , D.R. ; Schnepf , E. ; ran , J. ; Lerclus , D. ; Baum , J. ; Bravo , A. and Dean , D.H. 1998 . *Bcillus thruringiensis* toxin nomenclature . microbiology and molecular Biology Reviews , 62 (3) : 807 – 813 .
12. El- Bendary , M.A. 1999 . Growth physiology and production of mosquitocidal toxins from *Bacillus sphaericus* . J. Agric . Sci. mansoura Univ 27 : 1231 – 1246 .
13. Fillinger , U. , Bart , G.J ; Knols , B.G. and Becker , N. 2003 .Efficacy and efficiency of *Bacillus thuringiensis var* . *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulation against Afrotropical *anophelines* in Western Kenya . Tropical medicine and International health , Vol . 7 :122 -134 .
14. Harris , D .L . 2006 . Insect Khapra beetel *Trogoderma granarium* (Everts) (*Colioptera* : *Dermastidae*) . University of Florida . USA . http : // creatures . ifas . ufl . edu .
15. Hilbeck , A. ; Baumgartner , M. Fried , P.M. and Bigler , F. 1998 . Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn – fed prey on mortality and development tim of immature *Chrysoperla carena* (*Neuroptera : Chrysopidae*) . En. Viron Entomol , 27 : 480 – 487 .
16. Indrasith , L.S. ; Suzuki , N. ; Ogiwara , k. ; Asano , S. and Hori , H. 1992 . Activited

stable substance toxic for insect . Can Jour . Microbiol . 5 : 161 – 165 .

24. Mehdi , N.S. and Mohsen , Z.H. 1989 . Effect of insect growth inhibitor lsystin on *Culex*

quinquefasciatus Say. (*Diptera* : *Culicidae*) . Insect Appl. 10(1) : 29 – 33 .

25. Misch , D.W. ; Burnside , D.F. and Cecil , T.L. 1992 . Anovel bioassay system for evaluating the toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquito Larva J. Invert . pathol . 59 : 286 – 289 .

26. Mulla , M.S. 1991 . Insect growth regulator for the control of mosquito pest and disease vectors. Chinese J. Entomol . Spec. Publ. 6 : 81 – 91 .

27. Nadeau, M.P. and Boisvert, J.L. 1994. Larvicidal activity of the entomopathogenic fungus

Tolypocladium cylindrosporum (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the mosquito *Aedes triseriatus* and the black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simulidae) . J. Am. Mosq.Control Assoc.10: 487-491.

28. Packer , M.J. and Corbet , P.S. 1989 . Size variation and reproductive success of femal *Aedes punctor* (*Diptera : Culicidae*) Ecol. Entomol . , 14 : 297 – 309.

29. Saitoh , H. ; Higuchi , K. and Mizuki , E. 1998 . Larvicidal activity of Japanese *Bacillus*

thuringiesis against *Anopheles stephensi* . Medical and Veterinary Entomology . 12 : 98 – 102.

30. Santos , S.K. ; Melo – Santos , M.A.V. ; Regis , L. and Al-buquerue , C.M.R. 2003 . Field

Insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* killed adult house flies . Lett. Appl.

Microbiol . 14 : 174 – 177 .

17. killeen , G.F. , Mchenzie , F.E. ; Foy , B.D. ; Schieffelin , C. ; Billingsley , P.F. and Beier , J.C. 2009 . The poteintial impact of. integrated malaria transmission control on entomologic inculation rate in highly endmic areas . Am J. Med. Hyg. (62) : 545 – 551 .

18. Kruger , S.R. ; Nechols , J.R. and Romoska , W.A. 1991 . Infection of chinch bug, *Blissius leucopterus* (*Hemiptera:Lygaidae*) adults from *Beauveria bassiana* (*Deuteromycotina : Hyphomycetes*) Conidia in soil under controlled temperature and moisture conditions . J. Inv. Pathol . 58 : 19–26.

19. Kurbanoglu , E.B. and Algur , O.F. 2006 . Use of ram horn hydrolysis as peptone for bacterial growth , Turk. J. Biol . 26 : 115 – 123 .

20. Lacey, L.A. 1997. Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques). Academic Press. Sadiego.London.Boston.408pp.

21. Loc, N.T. and Chi, V.T.B. 2005. Efficacy of some new isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against rice earhead bug , *Leptocorisa acuta*. Omonrice.13:69-75.

22. Martin , J.C. and Wagih , K. 2005 . *Thaumetopoea pityocampa* biology complex parasitize of protection in forest . Inra . France . 63 pp .

23. McConnel , E. and Richard . 1959 . The production by *Bacillus thuringiensis Berliner* of heat

32. Thanabalu, T., Hindly, J.,Jackson., Jackson – Yap, J., and Berry, C. 1991 cloning, sequencing, and expression of agene encoding a100-kilo Dalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SISII-1.Bacteriol.,173, 2776 – 2785.

33. W.H.O. 1985 . Informal consultation the development of *Bacillus sphaericus* as amicrobial Larricide . Geneva . UNDP. 24 P.

34. WHO. 2007. Global plan to combat neglected tropical disease.

evaluation of ovitraps consociated with grass infusion and *Bacillus thuringiensis israelensis* to determine the oviposition rat of *Aedes aegypti* . Dengue Bull . 27 : 156 – 162 .

31. Seleena , P. ; Lee , H.L. and Chiang , Y.F. 1999 . Compatibility of *Bacillus thuringiensis*

serovar israelensis and chemical insecticides for the control of *Aedes* mosquitos . J. Vector Ecol

. 24 23 – 216.

*Evaluation the efficacy of two varieties of bacteria *Bacillus sphaericus ,Bacillus thuringiensis var. israelensis* On the control of mosquito *Culex quinquefasciatus Say* (*Diptera:Culicidae*)

Receved : 3/2/2014 **Accepted : 23/3/2014**

Baraa Jalil saeed **Mohamed Redah Anoon**
University of Al –Qadisiya
Biology Sciences Department
College of Science
Email: Bah1990a@gmail.com
Email: Balhasnawy@yahoo.com

Abstract:

the current research evaluation the efficacy of two varietes of bacteria *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis* and using vital factor to struggle mosquitoe *Cx. quinquefasciatus*, due to the impact of concentration of bacterial suspended and secondary metabolites in the larvae of mosquito of varieties, while there was no any destruction to the role of eggs and pupae and adults. Which recorded the higher rate of destruction for the larva 93.33% when treating the larva the first instar with concentration 1×10^6 spore / ml of bacterial suspension of *Bacillus sphaericus*, while the the lower rate of destruction 66.66% concentration of 1×10^3 spore/ml of bacterial suspension of *Bacillus thuringiensis israelensis* while the highest rate of destruction 90% while treating the first instar larvae concentrating of 3×10^6 spore/ml after 120 hours, while the lower rate of destruction 63.33% at the concentration 3×10^3 spore/ml at same period, for the respect of the effect of the concentration of secondary metabolic products the highest rate of destraction for the larvae of both species of bacteria mentioned 96.66% at the concentration of 100% after 72 hours of treatment, the lower rate of destruction reach for both species 66.66% at the concentration 25% in same period

Key Words: B.thuringiensis israelensis ,Bacillus sphaericur , Cx.quinquefasciatus

***The Research is apart of on M.Sc. thesis in the case of the First researcher**