وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

تأثير بكتيريا *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (*Bti*)

في بعض الجوانب الحياتية لبعوض الكيولكس *Culex* spp.

بحث مقدم إلى مجلس كلية العلوم - قسم علوم الحياة

جامعة القادسية

من قبل الطالبة

إيمان تركي حاشوش الفتلاوي

كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

محمد رضا عنون

٢٠١٥ -٢٠١٦

الأهداء

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين

»سيدنا محمد صلى الله عليه وآله «

إلى من كلله الله بالهيبة و الوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار..

إلى من أحمل أسمه بكل افتخار..

والدي العزيز

إلى ملاكي في الحياة.. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان و التفاني..

إلى بسمة الحياة وسر الوجود.. إلى من كان دعائها سر نجاحي و حنانها بلسم جراحي.. إلى أغلى الحبايب...

أمي الحبيبة

إلى من أشد بهم أزري.. إلى الذين جعلوا الماضي جميلاً و الحاضر أحلى..إلى مصدر سعادتي ..

أخوتي و أختي

وإلى كل من مد لي يد العون أهدي جهدي المتواضع

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَن يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا فَأَمَّا الَّذِينَ

آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِن رَّبِّهِمْ وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا

أَرَادَ اللَّهُ بِهَٰذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا

الْفَاسِقِينَ

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة الآية (٢٦)

الخلاصة :

تضمن البحث دراسة تأثير بكتيريا *Bacillus thuringiensis israelensis* على بعض أجناس بعوض *Culex spp.* في بعض الجوانب الحياتية له ، و أمكن خلال البحث اختبار كفاءة هذه البكتيريا في المكافحة الحيوية لأجناس بعوض *Culex* ،و قد تم التوصل إلى ما يلي :

١- عند معاملة الأطوار اليرقية المختلفة لبعوض *Cx.pipiens* بتراكيز مختلفة من المعلق البكتيري لبكتيريا *B.thuringiensis* var. *israelensis* أقتصر تأثيره على اليرقات ولم يؤثر على البيوض فقد سجلت اعلى نسبة هلاك ٩٠% و ٨٠% و ٦٦,٦٦% و ٦٠% عند معاملة الاطوار اليرقية على الترتيب بمعلق هذه البكتيريا عند التركيز ٣×١٠^{٢} بوغ /مل

٢- أظهرت النتائج بأن الأطوار اليرقية الأولى والثانية أكثر تحسسا" للمبيد الحيوي من الأطوار اليرقية الثالثة والرابعة .

٣- أن التركيز المستخدم يسبب هلاك اليرقات في جميع الأطوار حيث يعمل على شل حركة اليرقة عند دخولها القناة الهضمية الوسطى للبعوض و بالتالي يسبب موتها . أما البيوض والعذارى و البالغات فلم يؤثر عليها .

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

تأثير بكتيريا (*Bti*) *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

في بعض الجوانب الحياتية لبعوض الكيولكس *Culex* spp.

بحث مقدم إلى مجلس كلية العلوم - قسم علوم الحياة

جامعة القادسية

من قبل الطالبة

إيمان تركي حاشوش الفتلاوي

كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

محمد رضا عنون

٢٠١٥ -٢٠١٦

الأهداء

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين

»سيدنا محمد صلى الله عليه وآله «

إلى من كلله الله بالهيبة و الوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار..
إلى من أحمل أسمه بكل افتخار..
والدي العزيز
إلى ملاكي في الحياة.. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان و التفاني..
إلى بسمة الحياة وسر الوجود.. إلى من كان دعائها سر نجاحي و حنانها بلسم جراحي.. إلى أغلى الحبايب...
أمي الحبيبة

إلى من أشد بهم أزري.. إلى الذين جعلوا الماضي جميلاً و الحاضر أحلى..إلى مصدر سعادتي ..

أخوتي و أختي

وإلى كل من مد لي يد العون أهدي جهدي المتواضع

بسم الله الرحمن الرحيم

إن الله لا يستحيي أن يضرب مثلا ما بعوضة فما فوقها فأما الذين آمنوا فيعلمون أنه الحق من ربهم وأما الذين كفروا فيقولون ماذا أراد الله بهذا مثلا يضل به كثيرا ويهدي به كثيرا وما يضل به إلا الفاسقين

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة الآية (٢٦)

الخلاصة :

تضمن البحث دراسة تأثير بكتيريا *Bacillus thuringiensis israelensis* على بعض أجناس بعوض *Culex spp.* في بعض الجوانب الحياتية له ، و أمكن خلال البحث اختبار كفاءة هذه البكتيريا في المكافحة الحيوية لأجناس بعوض *Culex* ،و قد تم التوصل إلى ما يلي :

٤- عند معاملة الأطوار اليرقية المختلفة لبعوض *Cx.pipiens* بتراكيز مختلفة من المعلق البكتيري لبكتيريا *B.thuringiensis* var. *israelensis* أقتصر تأثيره على اليرقات ولم يؤثر على البيوض فقد سجلت اعلى نسبة هلاك ٩٠% و ٨٠% و ٦٦,٦٦% و ٦٠% عند معاملة الاطوار اليرقية على الترتيب بمعلق هذه البكتيريا عند التركيز ٣×١٠^{٢} بوغ /مل

٥- أظهرت النتائج بأن الأطوار اليرقية الأولى والثانية أكثر تحسسا" للمبيد الحيوي من الأطوار اليرقية الثالثة والرابعة .

٦- أن التركيز المستخدم يسبب هلاك اليرقات في جميع الأطوار حيث يعمل على شل حركة اليرقة عند دخولها القناة الهضمية الوسطى للبعوض و بالتالي يسبب موتها . أما البيوض والعذارى و البالغات فلم يؤثر عليها .

المحتويات :

التسلسل	العنوان	الصفحة
١	**المقدمة**	١
٢	**استعراض المراجع**	٣
٢- ١	البعوض	٣
٢-١-١	دورة حياة البعوض	٧
٢-١-٢	تغذية البعوض	١٦

٢-١-٣	العلاج	١٦
٢-٢	طرائق المكافحة	١٦
٢-٢-١	المكافحة الكيميائية	١٦
٢-٢-٢	المكافحة الحيوية	٢٠
٢-٣	البكتيريا *B.thuringiensis*	٢٧
٢-٣-١	تصنيف البكتيريا	٢٨
٢-٣-٢	صفات البكتيريا	٢٨
٢-٣-٣	القدرة الأمراضية للبكتيريا	٣١
٢-٣-٤	مراحل تكون البلورات السامة داخل البكتيريا *B.thuringiensis*	٣٢
٢-٣-٥	آلية إصابة البكتيريا *Bacillus thuringiensis*	٣٤
٢-٣-٦	العوامل المؤثرة على الإصابات البكتيرية	٣٥
٢-٣-٧	مظاهر الإصابة التي تحدثها بكتيريا *Bt* على الحشرات المصابة	٣٦
٢-٣-٨	المستحضرات البكتيرية	٣٦
٢-٣-٩	قابلية المستحضرات البكتيرية للنوع *Bacillus thuringiensis* للخلط مع المبيدات الحشرية	٣٦
٢-٣-١٠	مميزات المستحضرات الميكروبية	٣٧
٢-٣-١١	عيوب المستحضرات البكتيرية	٣٧
٢-٣-١٢	حساسية الحشرات للبكتيريا	٣٧
٢-٢-٣	المكافحة باستعمال منظمات النمو الحشرية Insect growth regulators	٣٨
٢-٢-٤	المكافحة الوراثية	٣٩
٢-٢-٥	المكافحة بطريقة الهرمونات الحشرية	٤١
٣	**المواد و طرائق العمل**	٤٢
٣-١	الأوساط الزرعية للبكتيريا	٤٢
٣-٢	مصدر البكتيريا *B.thuringiensis*	٤٢
٣-٣	حفظ عزلة البكتيريا *B.thuringiensis*	٤٢

٤-٣	تحضير المعلق البكتيري	٤٢
٥-٣	الاختبار الحيوي	٤٣
١-٥-٣	الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتيريا *B.thuringiensis* في نسب هلاك الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Culex pipiens*	4٣
٦-٣	التحليل الأحصائي	4٣
٤	**النتائج و المناقشة**	٤٤
١-٤	الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتيريا ***B. thuringiensis israelensis*** التي تؤثر في معدلات نسب الهلاك في مختلف أدوار حياة بعوض ***Cx.pipiens***	٤٤
١-١-٤	الأختبار الحيوي في البيوض و العذارى و البالغات	٤٤
١-٢-٤	الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة	4٤

قائمة الأشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
١	أنثى بعوض *Culex pipiens*	٥
2	أجزاء جسم البعوض *Culex pipiens*	6
3	دورة الحياة عند البعوض *Culex*	8
4	طريقة وضع البيض عند البعوض	10
5	الأختلاف في شكل البيضة لأنواع البعوض الثلاثة *Culex , Anopheles , Aedes*	11
6	يرقة بعوض *Culex*	13
7	الأختلاف بين يرقات بعوض *Culex , Anopheles , Aedes*	13

8	عذراء بعوض *Culex*	15
9	شكل بكتيريا *Bacillus thuringiensis*	29
10	دورة حياة بكتيريا *Bacillus thuringiensis* و مراحل تكون البلورات السامة و تأثيرها داخل جسم اليرقة	30
11	السبورات Spore و البلورات السامة Crystal	31
12	البلورات السامة و السبورات تحت المجهر	31
13	القدرة الأمراضية للبكتيريا	33
14	مراحل تكون البلورات السامة داخل بكتيريا *B.thuringinsis*	34
15	آلية إصابة البكتيريا *B.thuringiensis* الحشرات	35
16	Spore and Crystal toxin	36

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
١	تأثير تراكيز مختلفة من معلقات البكتيريا *B.thuringiensis* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوض *Cx.pipiens*	45

المقدمـــــــــــــــــة

يعتبر البعوض من النواقل الحيوية Vector للعديد من المسببات الممرضة للإنسان و الحيوان منها فايروس غرب النيل West Nile Virus و فايروسات السحايا Encephalitis Virus و فايروس حمى الضنك Dengue fever و فيروس حمى الوادي المتصدع Rift Valley Fever والحمى الصفراءYellow Fever بالإضافة إلى نقلها طفيليات الفيلاريا المسببة لداء الفلاريا Filariasis و طفيليات البلازموديوم المسببة لداء البرداء (الملاريا) ، فضلا عما يسببه البعوض من إزعاج و انعدام الراحة و امتصاص الدم من مختلف المضائف . و من بين أنواع البعوض الناقل لأغلب لهذه المسببات الممرضة هو البعوض المنزلي *Cx. pipiens* ذات الانتشار العالمي الواسع و الذي وجد بأنه يتغذى على مدى واسع من الحيوانات الثديية و الطيور بالإضافة إلى الإنسان فقد أشار Magnarelli(١٩٧٧) بأن هذا النوع من أنواع البعوض قد اظهر ميلا للتغذية على دم الطيور أي انه محب للطيور Ornithophilic و انه مسؤول عن نقل فيروس غرب النيل WNV في الولايات المتحدة الأمريكية و مع ذلك فإن Buescher and Bickely (١٩٧٩) قد ذكروا بأن بعوض الكيولكس *Culex* يميل للتغذية على الثدييات أيضا بجانب الطيور ، (Mulla ,1991 ؛ هلال وحسين, ٢٠١٣ ؛Roger , Ben- ؛ Aissaoui, Boudjelida,2014 ؛ Zulf.,2014 ؛ Laurence, Christophe . (Dov,2014

و أيضا هنالك نوع آخر من البعوض مثل بعوض ***Anopheles pulcharrhimus*** الذي يكون ناقلا ثانويا للملاريا في مناطق انتشاره في وسط و جنوب العراق ، و يصبح ناقلا رئيساً لها في المناطق التي تنخفض فيها أعداد النوع ***Anopheles stephensi Liston*** . حيث يصاب به أكثر من ٣٠٠ مليون شخص فضلاً عن مليون حالة وفاة لكل سنة في العالم بمرض الملاريا ، و لذلك حظي البعوض بإهتمام متزايد و مستمر من لدن الباحثين و خاصة في جانب المقاومة . و قد تم استخدام طرق عديدة لمقاومة البعوض ، و من هذه الطرق هي الطريقة الكيميائية التي تعتبر من أكثر طرق المقاومة شيوعا حيث استعملت عدد من المبيدات الكيميائية مثل مبيد DDT و مبيدات الفسفور العضوية و التي ساهمت في الحد من أضرار البعوض في مناطق عدة في العالم . و أن كثرة الأستخدام الخاطئ و المفرط لهذه المبيدات قد أدى إلى مشاكل عديدة منها مقاومة الحشرات لهذه المبيدات الكيمياوية و التأثيرات السامة في الأحياء و تلوث البيئة (Lepe and Suero ؛ Achille,Christophe and Yilian, 2010 ؛ الكرعاوي ٢٠١٢). و تمتاز المبيدات البايروثرويدية المصنعة بانخفاض جرعتها اللازمة لمكافحة الآفات و تأثيرها في أنواع كثيرة من الحشرات ، كما أن سميتها للإنسان و الحيوان تكون منخفضة جدا (العادل و عبد) . بالإضافة إلى المقاومة الكيميائية قد تم التوجه إلى طرق أخرى للمقاومة منها المقاومة الحيوية باستخدام الأحياء المجهرية الممرضة للحشرات .

تعتبر الأحياء المجهرية الممرضة للحشرات هي من أكثر الأعداء المستعملة في مقاومة البعوض ، و تعتبر بكتيريا ***Bacillus thuringiensis*** , ***Bacillus popilliae***, ***Bacillus sphaericus*** , ***Bacillus lentimorbus*** من أكثر الأنواع أهمية في مجال مقاومة الحشرات ، و أن النوع ***Bacillus thuringiensis*** و سلالاته المختلفة مثل ***israelensis*** , ***aizawi*** , ***kurstaki*** من أهم السلالات التي تستخدم في المكافحة الحيوية للآفات . و يتميز النوع ***Bacillus thuringiensis*** بأنها تنمو على بيئات صناعية صلبة أو سائلة و بالتالي أمكن أنتاجها بكميات كبيرة في شكل مساحيق قابلة للبلل W.P أو مستحلبات أو مساحيق للتعفير . و تمتاز كذلك بأنها تفرز مادة سامة بشكل أجسام بلورية **Crystals** تؤثر على القناة الهضمية للحشرات ، حيث تذوب هذه الأجسام البلورية في الوسط القلوي و تكون PH=٨ و عند تناول اليرقة لغذاء ملوث بهذا الجسم البلوري سوف يذوب داخل فراغ القناة الهضمية و يسبب تلف للخلايا الطلائية ، و يسبب تسمم دم الحشرة و يسبب الشلل لها و كذلك تصبح غير قادرة على تناول الغذاء و بذلك يكمل موت اليرقة المصابة . (Mulla , 1991 ؛ Achille , Christophe and Yilian ,2010؛ القناوي ٢٠١١ ؛ Zulf., ٢٠١٤ ؛ Martin and Mhango 2014) . لقد تناولت الدراسات السابقة في العراق حول مكافحة البعوض استعمال الأسماك المفترسة (عبد القادر,١٩٩٤) و المبيدات الكيميائية (خلف وآخرون، ٢٠٠٤) . و قد أجريت سلسلة من الدراسات الميدانية في مدينة الحلة حول بعوض الكيولكس *Culex* و تحديد العوائل الفقارية التي يتغذى

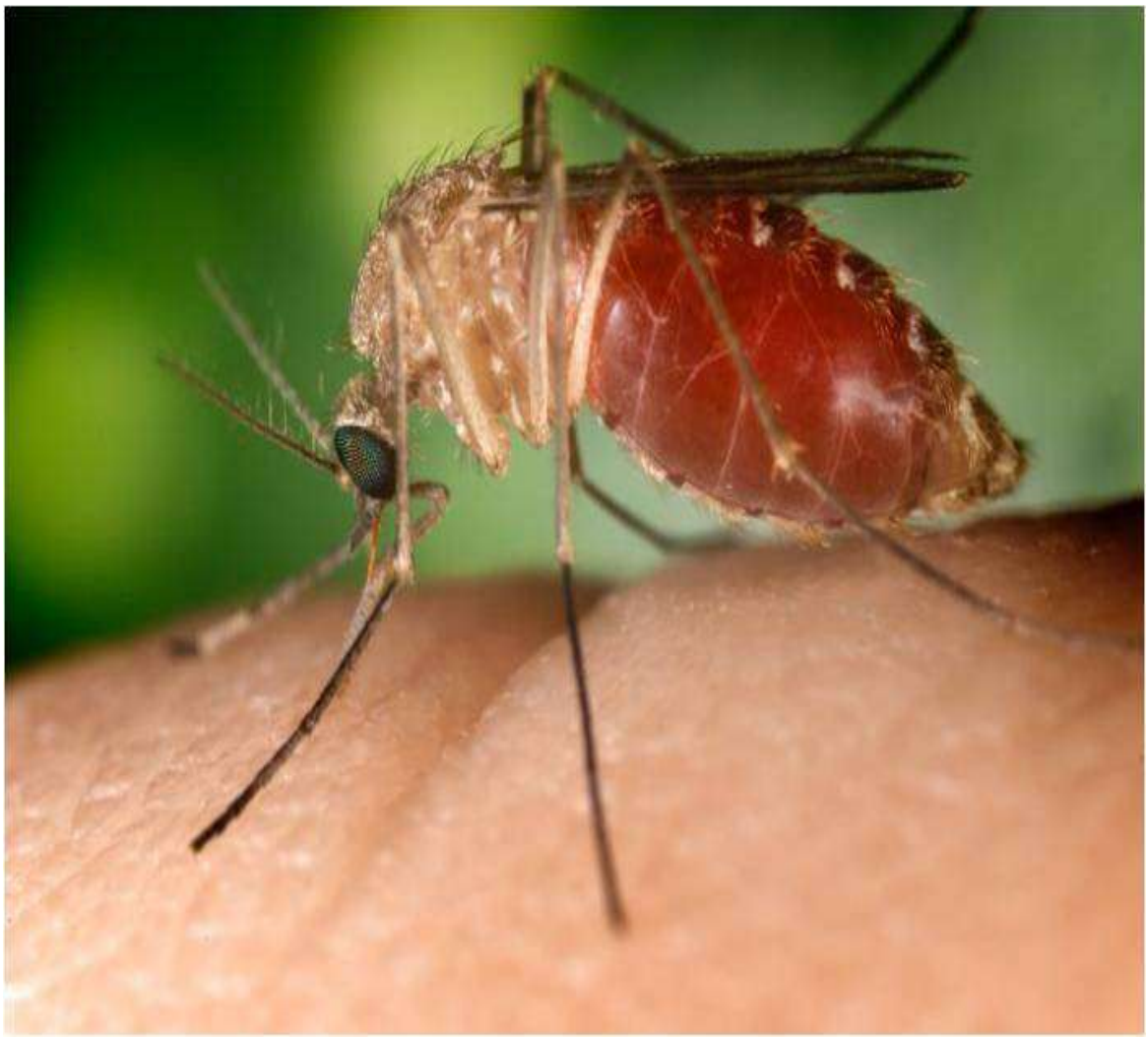
عليها البعوض (هلال و حسين ,٢٠١٣) . و الهدف من هذا البحث هو لتقويم المكافحة الحيوية المستخدمة للقضاء على البعوض و التي تتضمن استخدام بكتيريا ***Bacillus thuringinensis israelensis*** لمكافحة البعوض و ذلك بعمل اختبار حيوي لراشح و معلق بكتيري و دراسة تأثير كل منهما على الأطوار الأربعة لبعوض الكيولكس *Culex spp.* .

٢-استعراض المراجع

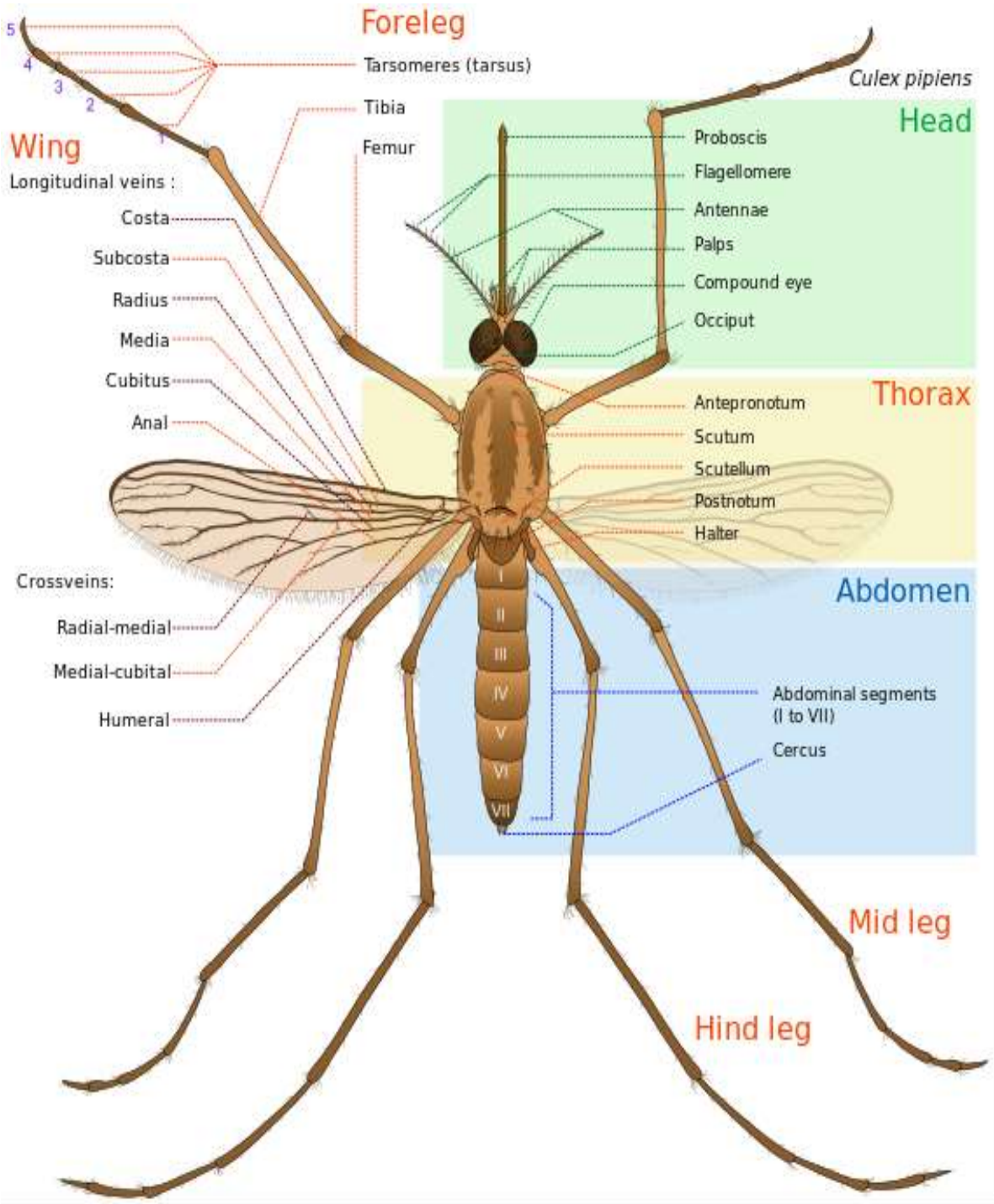
٢-١-البعوض

بعوض الكيولكس *Culex* من شعبة المفصليات Phylum Arthropoda صنف الحشرات سداسية الأرجل Class Insecta من الحشرات ذوات الأجنحة من رتبة ثنائية الأجنحة Order: Diptera و يعود إلى العويلة Culicinae و الذي يعود إلى العائلة Culicidae حيث يعتبر البعوض mosquito العدو الأول للإنسان حيث يعمل على نقل العديد من الأمراض الخطيرة مثل الحمى الصفراء و الملاريا و حمى النيل الغربي و غيرها و التي تشكل في مجملها تهديدا للإنسان و البيئة المحيطة فيه . كما يوجد بعض الأنواع الخطيرة من بعوضة الكيولكس مثل كيولكس ببينس *Culex pipnies* التي تعتبر الناقل الرئيسي لبعض أنواع فيروس السحايا و تنتشر في العديد من دول العالم و كيولكس تراسيلس ***Culex tarasalis*** المسؤولة عن نشر مرض حمى النيل الغربي في الولايات المتحدة الأمريكية عام 1999 ، (أبو الحب ١٩٧٨) . و قد ذكر أن ٥٦٠ نوع تم وصفه و التي تسبب مرض الفلاريا للأنسان (Miller , Crabtree and Savage , 1996) . و قد تم التعرف تصنيفياً على ٢٥ تحت جنس و ٧١٥ نوع تابعة لجنس الكيولكس المعروف بالبعوض العادي في العالم ، منها ٣٤ نوعا منتشراً في آسيا و شمال أفريقيا. يضم بعوض الكيولكس الأنواع التالية : ***Cx.pipiens , Cx.laticinctus , Cx.salinarus ,Cx.antennatus, Cx.tritaeniorhynchus, Cx.thieleri , Cx.quinquefasciatu ,Cx.perexiguus*** (عرجون ٢٠١١.) و ***Cx.vagans ،Cx.australicus , Cx.torrentin Martini,Wiedemann*** (Dehghan ,*et al.* , 2014)). إن بعوض ***Cx. quinquefasciatus*** ينتشر في العراق بكثرة لاسيما في المنطقتين الوسطى و الجنوبية و يتوافر في المدينة أكثر منه في الريف لأنه من الأنواع المحُبة للإنسان و يعيش بالقرب منه مما حدا ببعض الباحثين بتسميته بالبعوضة المنزلية House Mosquito . و قد تم الإشارة إلى إن البعوض يتكاثر في البرك المائية المفتوحة و المياه الراكدة أو في المياه ذات المحتوى المعتدل من

المواد العضوية ، و أيضاً يوجد في مياه المجاري الثقيلة و التي احتوت على نسبة عالية من النتروجين ١٢,٥ – ١٧,٦ ملغم/لتر و ينعدم فيها الأوكسجين و أن تفضيل هذا النوع من البعوض لمياه المجاري الحاوية على تراكيز عالية من النتروجين قد يكون السبب الذي جعل هذا النوع قريباُ من مناطق سكن الإنسان ، حيث يسبب الإزعاج و الضرر من جراء خسارة الدم و الحكة و الحساسية و نقل العديد من المسببات المرضية ، و قد أشار James and Harwood (١٩٦٩) إلى أن فيروس *Chikungunya* الذي يسبب آلام مفاصل حادة في الإنسان قد تم عزله في أفريقيا و تايلند من بعوض *Cx.quinquefasciatus* ،فضلا عن عزل فيروس التهاب الدماغ الغربي***Western encephalitis*** من النوع المذكور . و ذكر أبو الحب ١٩٧٩ أن هذه الحشرة تعد ناقلة للديدان الخيطية ، أما في العراق فإنه لم يُسجل أن *Cx.quinquefasciatus* ناقلا لمسببات الأمراض إلا أنها سُجلت في العديد من بلدان العالم ناقلا لعدد من الطفيليات و مختلف الرواشح . و أيضا بعوض الأنوفلس ***Anopheles pulcharrhimus*** العائد إلى العويلة Subfamily: ***Anophelinae*** و الذي يعود إلى العائلة ***Culicidae*** التابعة إلى رتبة ثنائية الأجنحة **Order : Diptera** و الذي ينتشر بشكل واسع في وسط و جنوب العراق و ليس في الشمال ، و يتكاثر فصليا في كل أنواع المستنقعات التي ينمو فيها القصب و الأعشاب و في عيون الماء بطئ الجريان ، توجد اليرقات خلال الربيع و الصيف و تتدنى كثافتها في بقية الأشهر . و ذكر مهنة و حسن (٢٠٠٣) أن البالغات تستريح داخل المنازل و الإسطبلات و تتأثر بالحرارة و الجفاف لذلك تقل أعدادها في شهري تموز و آب ،(الكرعاوي ٢٠١٢) . و قد أجريت عملية مسح لأنواع البعوض و منها بعوض ***Cx.pipiens*** في ستة قرى في محافظة القادسية المجاورة لمحافظة بابل ، و تشير النتائج التي أجريت في مركز مدينة الحلة أن فترة نشاط بعوض ***Cx.pipiens*** تبدأ من الفترة الممتدة بين شهر أيلول إلى شهر مايس و أن أعلى ذروة للنشاط كانت خلال شهر آذار و لم يُسجل أي نشاط ملحوظ خلال أشهر الصيف الحارة (حزيران و تموز وآب) ، و إن السبب في عدم النشاط يرجع إلى ارتفاع درجات الحرارة فوق معدلاتها الطبيعية خلال تلك الفترة، حيث بلغت درجات الحرارة العظمى في بعض الأيام لأكثر من ٥١ م ، و درجات الحرارة الصغرى حوالي ٣٢ م ، و قد تكون درجات الحرارة هذه مع وجود كتلة من الهواء الجاف سواء خلال النهار أو الليل غير ملائمة لتواجد و نمو و تكاثر هذا النوع من البعوض ، حيث تضع البعوضة بيوضها في مواطن بيئية متنوعة كالتجمعات الأرضية للماء مثل الأحواض والبرك الصغيرة الموحلة و القنوات و حفر الأمداد و حقول الرز و المياه الغير صالحة للشرب و غيرها . (هلال و حسين ٢٠١٣) .



شكل رقم (١) أنثى البعوض *Culex pipiens*

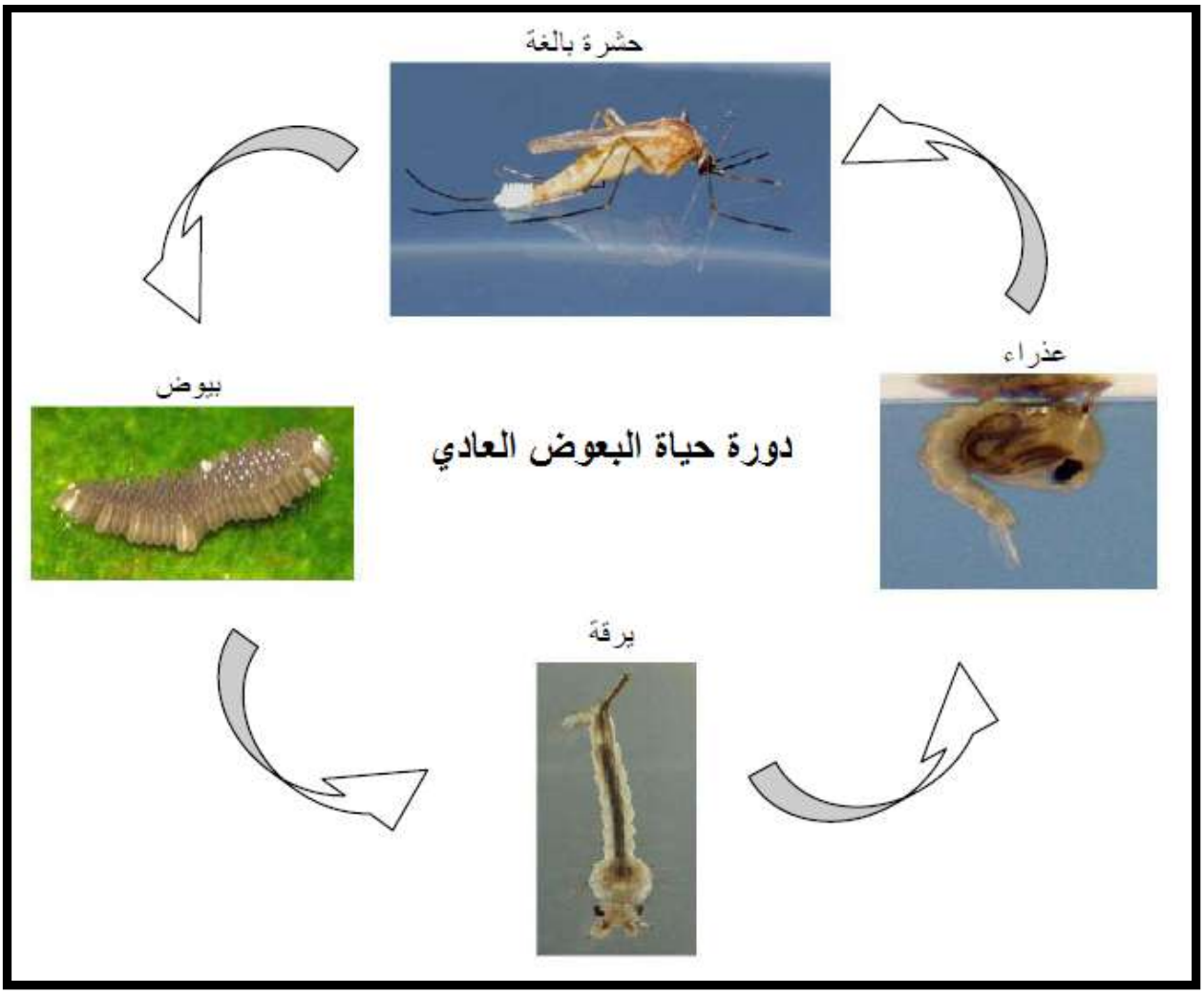


شكل رقم (٢) يوضح أجزاء جسم البعوض *Culex pipiens*

٢-١-١-دورة حياة البعوض

يعتبر **Hook** عام ١٦٦٥ م أول من وصف مراحل التحول الشكلي في حياة البعوض كحشرات كاملة التطور و تعيش أطوارها غير البالغة (**بيضة - يرقة – عذراء**) في بيئات مائية ، في حين توجد الأطوار البالغة (الكاملة) في بيئات أرضية ، و يرجع تخصص انتشار الأطوار غير الكاملة في البيئات المائية إلى تفضيل الأنثى لوضع بيضها في بيئة معينة دون غيرها ، و قد يرتبط ذلك بعوامل وراثية يحددها الانتخاب الطبيعي (Natural Selection) . و قد أظهرت بعض الدراسات أن الإناث تنجذب انجذاباُ كيميائيا على بيئة التوالد لتضع بيضها فيها و تستخدم الإناث أرجلها الخلفية الحاملة لمستقبلات كيميائية (Chemorecpter) في تمييز و انتخاب البيئة المناسبة لوضع البيض . و قد وجد أن يرقات النوع ***Cx.salinarus*** تعيش بأعداد هائلة في مستنقعات المياه الآسنة أو قليلة الملوحة ، و تفضل يرقات النوع ***Cx.pipiens*** الماء الملوث عن غيره من أنواع المياه ، لذلك تعتبر يرقات أنواع البعوض العادي مؤشراً للتلوث البيئي و تعتبر يرقات بعض الأنواع مهمة في المكافحة الحيوية ليرقات أنواع أخرى .

تبدأ دورة الحياة بتلقيح الذكر الناضج جنسيا للأنثى مرة واحدة طيلة حياتها و يتم تلقيح الأنثى بعد بزوغها من طور العذراء مباشرةً (**تبزغ الذكور قبل الإناث لذلك تسبقها في النضج الجنسي**) ، و تودع النطاف في الحويصليين المنويين الملحقين (Spermathecae) بجهاز التكاثر الأنثوي ثم تخصب هذه النطاف البويضات طيلة حياة الأنثى ، و تتكرر الدورة الجنسية لإناث البعوض عدة مرات خلال حياتها ، و تشمل هذه الدورة **مرحلة التغذية الدموية** (لضرورة المواد البروتينية في تطور البيض الملقح) و **مرحلة وضع البيض** ، و لكن تستطيع إناث بعض الأنواع أن تضع بيوضها دون أن تأخذ وجبة دموية لأنها اختزنت كمية كبيرة من البروتينات في المرحلة اليرقية مثل تحت النوع Subspecies : ***Cx.pipiens molestus*** و تتغذى على المواد السكرية كمصدر أساسي تستمد منه طاقتها ، (عرجون ٢٠١١).



شكل رقم (٣) دورة الحياة عند البعوض *Culex*

١-البيوض: The Egg

البيوض عادة ما تكون أسطوانية أو مستطيلة ، صغيرة و يبلغ طولها حوالي ١ ملم ، و البيض له لون أبيض عندما تطرحه الأنثى و يصبح بني اللون مع مرور الوقت ، و يوضع البيض بشكل عمودي على سطح الماء بشكل مجاميع مشكلة قاربا يتكون من حوالي ٣٠٠ بيضة بدون أي مادة لاصقة . و تتكون قشرة البيضة من طبقتين لهما بعض الخصائص الوظيفية ، و هما :

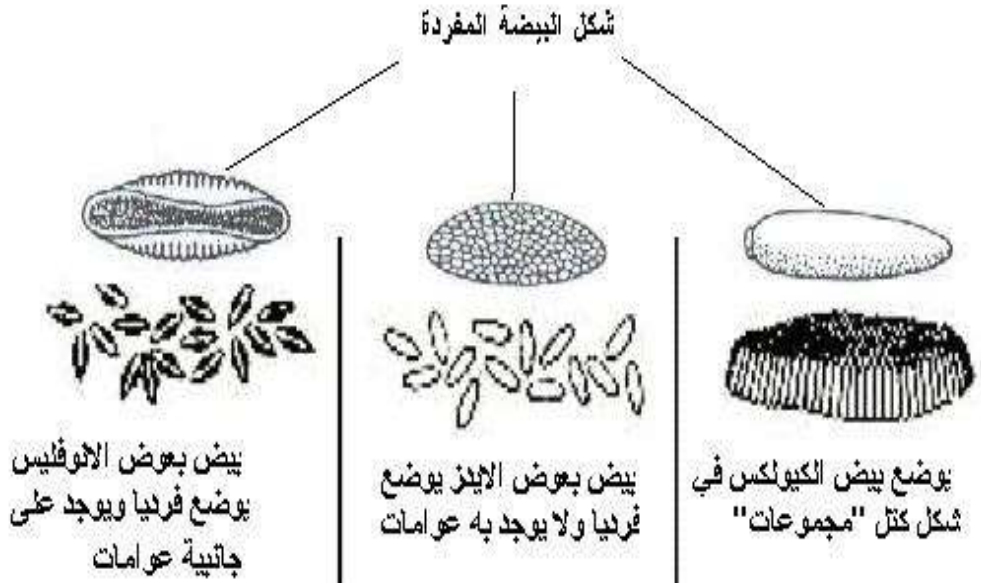
١- طبقة خارجية تسمى Exochorion : و هي طبقة رقيقة جدا و سهلة التلف ونحت سطحها نحتا دقيقا توجد عليها بعض النتوءات و تمتلك هذه الطبقة فراغات هوائية تسهل طفوها على سطح الماء .

٢- طبقة داخلية تسمى Endochorion : و هذه الطبقة تكون أكثر ثخانة من الطبقة الخارجية و غير نفوذه للماء و تمتاز بصلابتها و يتحكم تركيبها الليفي في ميكانيكية تبادل الغاز إضافة إلى أنه مسؤول عن الحماية الميكانيكية للبيضة .

تضع الإناث البيض في أماكن ذات ظروف بيئية ملائمة تسمح بتطور اليرقات بعد الفقس ، و مع أن بيض البعوض أثقل من الماء إلا أنه يطفو فوق السطح نتيجة لوجود فراغات هوائية في الطبقة الخارجية له ، و يعد مكان و نموذج ترتيب البيض على سطح الماء صفة تصنيفية هامة للتمييز بين أجناس عائلة البعوض و هي ناتجة عن تكيف هذه الأجناس مع الظروف البيئية الملائمة لحالتها الفسيولوجية ، فهي إما أن تكون مفردة على سطح الماء بشكل مفرد مثل الجنس ***Aedes*** و الجنس ***Anopheles*** أو على هيئة كتلة بيوض متراصة و متلاصقة مشكلة ما يشبه القارب المقعر من الأعلى و يسمى **القارب البيضي** ، كما عند الأجناس ***Uranotaenia , Culiseta , Culex*** و يبقى القارب لمدة يومين أو ثلاثة أيام ينكسر بعدها و يتحرر منه البيض و تقدر كمية البيض بحوالي ٣٠٠ بيضة أو أكثر في كل قارب بيضي ، و يكون السطح الخارجي الخلفي لكل بيضة كارهاً للماء ، أما السطح الأمامي اللامس للماء فيكون محبا للماء لذلك تبقى البيضة طافية في وضع عمودي على سطح الماء و يختلف مكان وضع البيض باختلاف أجناس العائلة فقد يوضع البيض أسفل سطح الماء على أوراق النباتات المائية كما في أنواع الجنس ***Mansonia*** أو قد يوضع البيض قريبا من مصادر المياه بحيث تتمكن اليرقات حديثة الفقس من الوصول للماء أو قد يوضع البيض على أرض جافة أو أماكن معرضة للغمر بمياه المد و الجزر أو مياه الأمطار و الفيضانات و قد يدفن البيض في بعض المناطق الثلجية تحت الجليد خلال فصل الشتاء و يفقس مع ذوبان الجليد في الربيع .

تضع إناث بعوض الكيولكس *Culex* بيوضها بشكل قارب على سطح الماء و يفقس البيض بعد يومين أو ثلاثة أيام و تختلف فترة طور البيضة حسب درجات الحرارة إذ تزداد الفترة عند انخفاض درجة الحرارة ، (أبو الحب ، ١٩٧٨ ؛ عرجون ، ٢٠١١).

شكل رقم(٤) يوضح طريقة وضع البيض عند البعوض



شكل رقم (٥) يوضح الإختلاف في شكل البيضة لأنواع البعوض الثلاثة

٢-اليرقة :The Larva

تعرف يرقة البعوض بإسم اليرقة الملتوية (Wriggler) و تتميز عن باقي يرقات حشرات ثنائية الأجنحة بالصفات التالية :

١-رأسها كامل التكوين .

٢-تلتحم الحلقات الصدرية مع بعضها و هي أثخن من بقية أجزاء الجسم .

٣-تغيب الأرجل لديها .

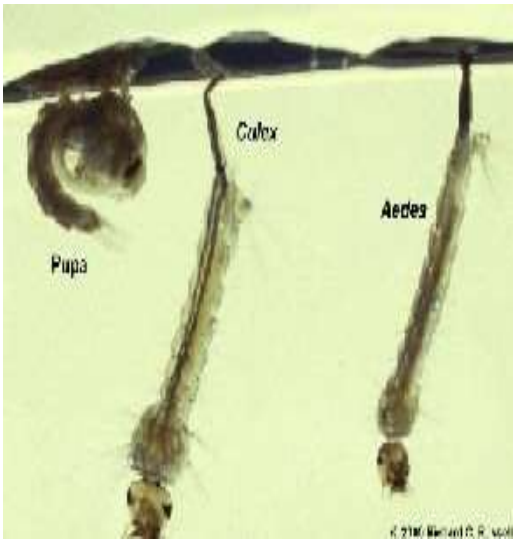
٤-تحمل شفعا واحدا فقط من الثغور التنفسية الفعالة وظيفيا و التي تقع ظهريا على الحلقة البطنية الثامنة .

يتركب جسم اليرقة من ثلاث مناطق هي : **الرأس و الصدر و البطن** و يحمل الجسم مجموعة من الشعيرات على نظام و ترتيب ثابت ذات أهمية تصنيفية . طول رأس اليرقة أكبر من عرضه و يحمل أجزاء فم قارضة تتموضع في أسفله ، و يوجد على جانبي الرأس قرنا استشعار يتركب كل منهما من عقلة واحدة مزودة ببعض الشعيرات الحسية ، و شفع من العيون المركبة غير فعالة وظيفيا و

يوجد خلفها شفع من العيون البسيطة المساعدة ترى بها اليرقة . صدر اليرقة أعرض من الرأس و البطن و يتكون من ثلاث حلقات ملتحمة لا يمكن تميزها عن بعضها بعضًا و تحمل كل منها شعيرات حسية بسيطة التركيب و لا يحمل الصدر أي أرجل و توجد آثار خارجية للأجنحة .

البطن : تخصصت الحلقة البطنية الثامنة لتحمل أنبوبًا تنفسيًا طويل و تحمل الحلقة البطنية التاسعة أربع حليمات شرجية لتنظيم الضغط كما قد تحاط الحلقة التاسعة بغطاء كايتيني سميك يعرف بالسرج (Saddle) ، و يمر الطور اليرقي بأربعة أعمار يرقية تنسلخ اليرقة في نهاية كل عمر و تزداد حجمًا و في نهاية العمر الرابع تنسلخ اليرقة مرة أخرى لتصبح عذراء . و تتراوح الفترة الزمنية لاكتمال الطور اليرقي من ٥- ١٠ أيام و تمتد لوقت أطول في درجات حرارة منخفضة أو في ظروف نقص الغذاء ، (عرجون , ٢٠١١) . و تكون اليرقة ذات سيفون طويل ورفيع و لكن قد توجد بعض الأنواع ذات سيفون قصير وغليظ ، دائما يوجد أكثر من زوج واحد من الحزم الشعرية على السيفون و كلها بعيدة عن قاعدة السيفون . و الحزم الشعرية قد تكون قصيرة و تتكون من عدد قليل من الشعيرات البسيطة . عادة الصدر و الأرجل و الأجنحة تكون مغطاة بالحراشف السمراء أو البنية . البطن تغطية حراشف بنية أو سوداء ، و قد توجد بعض الحراشف البيضاء عليها ، (أبو الحب ١٩٧٨).

شكل رقم(٦) يرقة بعوض *Culex*



شكل رقم (٧) يوضح الأختلاف بين يرقات بعوض *Culex* و *Anopheles* و *Aedes*

٣-العذراء: The Pupa

عند تحول العمر اليرقي الرابع إلى عذراء تأخذ هذه اليرقة وضعًا أفقيًا عند سطح الماء ثم تنشق القشرة الكايتينية القديمة (Cuticle) و تسمى هذه القشرة بعد فضها بالسلاخة (Exuvium) ، و تنبثق منه العذراء و التي تشبه حرف (و) و يتألف جسمها من جزء أمامي و جزء خلفي . يتكون الجزء الأمامي من الرأس الصدري (Cephalothorax) و يضم مجموعة زوائد (أجزاء الفم و قرون الإستشعار و الأرجل و الأجنحة) ملتصقة بواسطة سائل الانسلاخ (Ecdysial fluid) مكونة ستارا (Shield) على جبهة الرأس و جوانب الجسم ، و يحوي الرأس الصدري فقاعة هوائية (Air space) تجعل العذراء أخف من الماء فتطفو على السطح تلقائيا . تتعلق العذراء بسطح الماء بواسطة شفع من الأقماع التنفسية (Respiratory trumpets) اسطوانية الشكل (ذو أهمية تصنيفية) و تمتد لأعلى فوق القشرة الكايتينية السطحية (Cuticle) للصدر و تبرز فوق سطح الماء للحصول على الهواء الجوي يعرف الجزء الخلفي بالبطن المكون من ثماني حلقات واضحة حرة الحركة و تحمل حلقة البطن الأولى شفع من الشعيرات تسمى شعيرات الطفو ، و تحمل كل حلقة من الحلقات البطنية شفع من شعيرات تسمى الشعيرات القمية و تخرج من طرف الحلقات البطنية أما الحلقة التاسعة فهي غشائية مختزلة و تنتهي بشفع من المجاديف (Paddles) و من الجدير ذكره بأنه توجد كل أعضاء

الحشرة الكاملة عند العذراء لكنها في حالة غير مكتملة النمو ، طور العذراء طور غير متغذي ليس له فتحة فم ، و ما تتميز به العذراء عن باقي عذارى الحشرات بأنها متحركة و نشيطة فهي تصعد كثيرًا لسطح الماء و تثبت نفسها في موقعها بواسطة الأبواق التنفسية و شعيرات الطفو لكنها حساسة جدًا لأي تأثير ميكانيكي يطرأ على سطح الماء فتغوص بسرعة هاربة إلى داخل الماء بمساعدة كل من حركات البطن القوية و المجدافين مع تحريك الأبواق التنفسية للخلف فينتج عن ذلك حركتي غطس و شقلبة و من هنا اكتسبت اسمها الشائع بالبهلوانيات (Tumblers) و بمجرد توقفها عن الحركة فإنها تصعد تلقائيًا و ببطء إلى سطح الماء مرة أخرى ، إن طور العذراء قصير يمتد من ٣ – ٤ أيام بحسب درجة الحرارة و هو طور مؤقت ، (عرجون ٢٠١١).

شكل رقم (٨) عذراء بعوض *Culex*

٤-البالغة أو الكاملة The Adult:

عند بدء عملية البزوغ أو عملية الانبثاق تأخذ بطن العذراء وضعًا أفقيًا موازيًا لسطح الماء ثم يحدث كسر لقواعد بوقي التنفس فينفصلان عن الجهاز القصبي الداخلي مما يسمح بتسرب كمية قليلة

من الهواء (القشرة السطحية للعذراء سميكة و غير نفوذه للماء) إلى الفراغ الموجود ما بين القشرة الكايتينية السطحية القديمة (Cuticle) للعذراء و الحشرة الكاملة فيرتفع ضغط الهواء الداخلي مما يزيد من طفو العذراء و يساعد انشقاق تلك القشرة القديمة على طول الخط المتوسط الظهري لمنطقة الرأس الصدري مما يؤدي إلى بروز صدر الحشرة الكاملة و الذي يبدو جافًا ثم تبدأ البعوضة بسحب رأسها و زوائدها و يتوالى خروج باقي الجسم و الأجنحة و الأرجل ، (عرجون ٢٠١١) . و لا توجد نقوش و زخرفة على البالغات ، و نهاية بطن الإناث ليست مستدقة بل عريضة النهاية . مخالب جميع الأمشاط بسيطة و صغيرة جدا في الأرجل الخلفية و كل الأمشاط ذات وسادة لحمية ناعمة . توجد حافة حرشفية على الأجنحة و لا توجد شويكات خلف أو في منطقة فتحة التنفس الصدرية ، (أبو الحب ١٩٧٨).

٢-١-٢- تغذية بعوض الكيولكس

و تمتاز بعوضة الكيولكس *Culex* بأنها تتغذى على الدم و غالبا ما تهاجم أثناء الليل فتقوم بلدغ الضحية في الأجزاء المكشوفة مثل الساقين و الذراعين خاصة الفئات ذات المناعة المنخفضة مثل الأطفال و كبار السن التي غالبا ما تتسبب بتورم الأطراف لديهم ، هذا و ينتج عن هذه اللدغات أعراض تحسسيه مثل احمرار الجلد و تورم المنطقة المصابة و ارتفاع في درجة الحرارة و قد تكون الإصابة شديدة مما يؤدي إلى تشوهات جلدية يصعب شفائها . و تعمل البعوضة على نقل الأمراض من خلال تكرار عملية مص الدم من شخص إلى آخر فيختلط لعاب البعوضة بدم الملدوغ الذي غالبا ما يتم أثناء الليل.

٢-١-٣-العلاج

و بالنسبة لعلاج لدغات بعوضة الكيولكس غالبا ما يكون بأخذ مضادات الهستامين أما بالحقن أو تناول الأقراص عن طريق الفم و ذلك لتقليل آثار التفاعل التحسسي الناتج عن سمومها و استعمال خافضات الحرارة و مسكنات الألم و العلاجات الموضعية في مكان اللدغة.

٢-٢-طرائق المكافحة

٢-٢-١- المكافحة الكيميائية :

استعملت الكيمياويات غير العضوية للقضاء على الآفات بدرجة كبيرة مثل الرصاص و الزرنيخ و ذلك قبل الحرب العالمية الثانية ، و كذلك استعملت بعض الكيمياويات العضوية المستخرجة من النباتات مثل النيكوتين و البايرثروم و الروتيتون و لكن استعمالها كان محدوداً بسبب تكاليف إنتاجها العالية ،(إسماعيل, ٢٠٠٩) . و منذ بداية اكتشاف هذه المبيدات العضوية و لغاية الآن فإن الأنظار تتجه إليها عند الحاجة للمكافحة و ذلك لسرعة تأثيرها و سهولة استعمالها رغم التحذيرات من خطرها ، و قد أخذت برامج السيطرة على البعوض باستعمال هذه المبيدات التي تعود إلى مجاميع كيمياوية مختلفة مجالا واسعا في مكافحة أدواره المختلفة ، ففي مجال المركبات اللاعضوية استعملت مادة أخضر باريس Paris green في مكافحة يرقات البعوض ، و فيما يخص المركبات العضوية التي استعملت في هذا المجال هي الزيوت البترولية ، (العادل و عبد ، ١٩٧٩) . و ذكر جرجيس (١٩٨٧) أن المشتقات النفطية كالنفط الأسود و الأبيض و زيت الديزل استعملت رشاً لسنوات عدة على المسطحات المائية لقتل الأدوار المائية للبعوض . و قد أشار كلُ من Mohsen and Mehdi (1988) إلى كفاءة استعمال مشتقات البترول في مكافحة يرقات الطور اليرقي الرابع لبعوض ***Cx. quinquefasiatus*** . و باكتشاف الهيدروكاربونات المكلورة بدأ عهد جديد في استعمال المواد الكيمياوية في المكافحة . إذ إن اكتشاف مركب **DDT** الذي هو مركبات عضوية كلورنية و الذي استعمل عام ١٩٤٠ في مكافحة يرقات و بالغات البعوض حيث ساهم في القضاء على الملاريا في مناطق عدة من العالم ، ثم اتجهت الأنظار نحو المبيدات العضوية الفسفورية (يطلق عليها اسم سموم عصبية) لكونها ذات مواصفات أفضل مقارنة بالمبيدات التي ظهرت مسبقا و من أمثلتها البارثيون و الملاثيون و هي مبيدات سهلة التحلل بل و يستخدم الكثير منها في القضاء على الحشرات المنزلية و لكنه ثبت أن أهم مواصفات هذه المواد هي تأثيرها المتبقي طويل الأمد ، ولكن بمرور الزمن و نتيجة الاستعمال المتكرر و عدم إتباع الأسلوب العلمي في التطبيق أدى إلى ظهور العديد من المشاكل و منها ثبات المركبات الناتجة من تحلل هذه المركبات هي مواد سامة و أعلى سمية من المبيد الأم بل و قد تحللها البكتيريا لمواد مسببة للسرطان مثل مركبات الأنلين ، و إن ثبات هذه المواد في التربة و أنسجة الحيوان و النبات أي إنها تبقى مؤثرة و سامة و لا تتأثر أو تتحلل بسرعة فضلاً عن ظهور المقاومة في بعض الحشرات لاسيما البعوض لعدد من هذه المبيدات الكيميائية ، (الكرعاوي, ٢٠١٢).و قد ذكر Subra (1983) أنه تم تسجيل أكثر من ٥٠ نوعاً من مجموع أنواع العويلة ***Anophelinae*** و ١٩ نوعاً من أنواع العويلة ***Culicinae*** مقاوماً للعديد من المبيدات العضوية و أكثر هذه الأنواع هي ناقلات مهمة للعديد من الأمراض التي تصيب الإنسان . كما أشار سيرفس

(١٩٨٤) أن بعوض ***Cx.pipiens*** أظهر في العديد من المناطق مقاومة للمبيدات الحشرية الفسفورية العضوية و هذا من شأنه أن يحدد استعمال هذه المبيدات . لذلك أوقفت منظمة الصحة العالمية WHOاستعمال مثل هذه المواد بوصفها مبيدات ليرقات البعوض . و وجد Sorokin et al. (1991) أن بعوض ***An.pulcharrhimus*** و ***An.stephensi*** اظهرا مقاومة عالية لمبيدات **DDT** و الملاثيون . و قد أوضح (Chander *et al* 1997) أن بعوض *Cx.quinquefasciatus* قد يمتلك مقاومة للمبيدات الفسفورية . لذلك اتجهت الأنظار نحو المبيدات العضوية الباروثرويدية و هي مركبات من أصل نباتي و هي من المركبات الحديثة لما لهذه المبيدات من فعالية مؤثرة ضد الآفة الحشرية فضلا عن سرعة تحللها و تستخدم بكثرة لسميتها الاختيارية و إن كان من عيوب هذه المركبات ظهور نظائر كثيرة للمركب الواحد مما يؤدي لحدوث تأثيرات جانبية و انخفاض الاختيارية . حيث ذكر Mohsen *et al* . (1989) أن البيروثرويدات أكثر سمية ضد يرقات الطور الرابع و عذارى *Cx.quinquefasciatus* من المبيدات الفسفورية و هذه الأخيرة كانت أكثر سمية من مركب **DDT.** و وجد Hougard *et al* . (2002) أن المبيدات البيروثرويدية ذات فعالية عالية ضد بعوض *An.gambiae* و *Cx.quinquefasciatus* . و قد عد مبيد Alpha-cypermethrin من المبيدات البيروثرويدية التي امتازت بكفاءة عالية في مجال مكافحة البعوض، يشابه في تركيبه الكيميائي للبايرثرين الذي يستخرج من الأزهار الجافة لنبات الداودي *Crysanthium cenirifedium* حيث أن تأثيره الابادي سريع جداً حيث يحدث ما يعرف بالصدمة العصبية Nock down و يعمل بالملامسة أو عن طريق الجهاز الهضمي . و في بحث أجراه عبيس و آخرون (١٩٨٧) استعمل فيه ثلاث مبيدات بيروثرويدية هي السوماسيدين و الدلتامثرين و مبيد السايبرمثرين و أوضحت النتائج أن يرقات العمر الثالث كانت أكثر حساسية للمبيدات من العمر اليرقي السادس لعثة الطحين الهندية ، و كما أشار الرهوي (٢٠٠٠) إلى إن المبيد المذكور فعال جدا ضد يرقات الطورين الثاني و الرابع لبعوض *Cx.pipiens* و يؤدي إلى تثبيط بزوغ البالغات بنسبة ١٠٠% و ذلك عند استعماله بتراكيز ٠,٠١ و ٠,٠٠١ و ٠,٠٠٠١ ملغم / لتر، (الكرعاوي ٢٠١٢) . و إن مركبات السيكلوداين و التوكسافين هي مركبات شديدة الثبات في البيئة ، فالبرغم من منع استخدامها منذ الستينيات إلا أن العاملين في مجال تحليل المبيدات في البيئة و الهيئات العالمية تسجل يوميا وجود تركيزات من هذه المركبات في جميع أنحاء العالم ، و أن كانت هذه التركيزات تقل و لكن بصورة بطيئة جدا . كما أن التركيز الموجود في الأسماك يصل إلى ١٠٠٠ – ١٠,٠٠٠ ضع ما يوجد في الماء المحيط نتيجة ظاهرة تسمى بالتراكم الحيوي Bioaccumulation داخل أجسام الأسماك و التراكم الحيوي يأتي

من عنصرين أولا التسلسل أو السلسلة الغذائية ثم قدرة الكائن على تركيز هذه المركبات الضارة داخل أنسجته المختلفة . و قد ثبت تورط بعض دول أوروبا و أمريكا اللاتينية في تصنيع مثل هذه المركبات إلى الآن و لكن تحت أسماء مكودة و ليست أسماء معروفة ، و لا يذكر التركيب الكيميائي الدقيق على العبوات . و المركبات العضوية الكرباماتية و هي مركبات لها درجة عالية من الثبات في البيئة و يقع تحتها الكثير من مبيدات الحشائش . و قد أثبتت التجارب و الأبحاث أن هذه الكيماويات المستخدمة لها تأثير ضار على البيئة و على صحة الإنسان في المدى الطويل حيث اتضح أن هذه الكيمياويات غير قابلة للتلاشي بيولوجياً أي أنها تبقى في الجسم البشري بأعراض و أمراض مؤجلة لأن نتائجها السيئة لا تظهر على الإنسان إلا بعد زمن طويل مثل الأعراض السرطانية التي تظهر فجأة و في أعمار متأخرة عند بعض الناس إنها أشبه بالقنابل الموقوتة في الجسم البشري و قد أدى ذلك إلى ظهور علم من العلوم الطبية يعرف باسم **السرطان البيئى** . إن المبيدات الحشرية كان الغرض من اكتشافها في أول الأمر لمكافحة الآفات الزراعية مع مراعاة شروط التعامل معها عند عملية الرش و مراعاة مقاييس استخدامها ، إلا أن العشوائية التي يتبعها الفلاحون هي ما أدت إلى أضرارها و خطورتها إذ أنهم لا يراعون في المقاييس العلمية أو الفنية في رش كميات المبيدات ومدى ارتفاع نسبة السمية فيها و كذا عدم مراعاة فترة الأمان التي يجب إتباعها ثم يكون جني المحصول. فقد اتجهت بلدان أمريكا و أوربا و غيرها إلى منع استيرادها و استخدامها و لكن بعض هذه البلدان يعمل على تصديرها إلى البلدان النامية في الوقت الذي تُحرم استخدامها في بلدانهم . تعتبر بلادنا العربية من البلدان التي تستهلك أنواع عديدة و متعددة من هذه المبيدات و الكيماويات و الصبغات بكميات كبيرة بل إن استخدامها يزداد يوم بعد يوم . و لعل نزعة الربح السريع و الوفير عند الكثيرين وراء تحويل العديد من المزارع إلى حقول تضخ بالكيماويات المتعددة و الخطيرة. و من المشاكل التي تسببها هذه المبيدات في البيئة هي تلويث البيئة و تطور الحشرات لتصبح قادرة على مقاومة المبيدات ، إن تراكم المبيدات الحشرية أيضا يسبب خللا فادحاً في النظام البيئي و يؤثر سلباً على الإنسان . كما أن هناك العديد من المبيدات الحشرية التي تعمل على أمد قصير هناك بعض الأنواع الأخرى التي يبقى مفعولها سرمداً لا (ينتهي) لذلك هناك خوف من حدوث كوارث في الطبيعة من جراء هذه الأنواع الأخيرة . أحد المشاكل الأخرى التي تسببها هذه المبيدات أنها تنساب مع مياه الصرف عندما ترش على المحاصيل الزراعية و كذلك تلوث مياه الترع و القنوات التي تُغسل فيها معدات الرش و ألاته و يؤدى ذلك إلى قتل الأسماك و الكائنات البحرية كما يؤدي إلى نفوق الماشية و الحيوانات التي تشرب من مياه الترع و القنوات الملوثة بهذه المبيدات ، و لعل المأساة التي حدثت في العراق عامي ١٩٧١ – ١٩٧٢ م أوضح

دليل على ذلك حين تم استخدام نوع من المبيدات الحشرية المحتوية على الزئبق مما أدى إلى دخول حوالي ٦٠٠٠ شخص إلى المستشفى و مات منهم ٥٠٠ شخص و من المشكلات الأخرى التي تسببها المبيدات و من أشهرها مادة **DDT** أنها ذات تأثير قاتل على البكتريا الموجودة في التربة و التي تقوم بتحليل المواد العضوية إلى مركبات كيميائية بسيطة يمتصها النبات و بالتالي تقل خصوبة التربة على مر الزمن مع استمرار استخدام هذه المبيدات التي تؤدي إلى تواجد حشرات قوية لا تبقي و لا تذر أي نبات أخضر إذا هاجمته أو داهمته . إن مادة **DDT** تتسرب إلى جسم الإنسان خلال الغذاء الذي يأتيه من النباتات و الخضروات و يتركز هذا المبيد في الطبقات الدهنية بجسم الإنسان الذي إذا حاول التخلص منها أدت إلى التسمم بهذا المبيد و تتركز خطورة هذه المادة في بقائها بالتربة الزراعية لفترة طويلة من الزمن دون أن تتحلل. و من أضرار المبيدات على الإنسان و التي تعتبر من أشهر المبيدات الحشرية التي تضر بصحة الإنسان تلك المحتوية على مركبات الزئبق و لقد سمي المرض الناتج عن التسمم بالزئبق بمرض (المينا ماتا) و ذلك نسبة إلى منطقة خليج (مينا ماتا) باليابان و التي ظهر فيها هذا المرض لأول مرة عام ١٩٥٣ م و ذلك كنتيجة لتلوث المياه المستخدمة في ري الأراضي الزراعية بمخلفات تحتوى على مركبات الزئبق السامة الناتجة من أحد المصانع و حتى لو كان بكميات صغيرة على جسم الإنسان حيث ترتخي العضلات و تتلف خلايا المخ و تفقد العين بصرها و قد تؤدي إلى الموت ، كما تؤثر على الجنين في بطن أمه ، (إبراهيم ٢٠٠٨).

٢-٢-٢- المكافحة الحيوية : و تشمل استعمال :

١-المفترسات Predatores :

و أن افتراس البعوض في أطواره الأربعة (البيضة ، اليرقة ، العذراء و الحشرة الكاملة) بواسطة مفصليات الأرجل و المفترسات الأخرى جزء أساسي و مهم للقضاء عليها و تقليل كثافتها العددية و يعد طوري اليرقة و العذراء الأكثر تعرضًا للافتراس ، (العمرو ٢٠٠٥) . و هي عادة تكون أكبر من الفريسة و أنشط و تقضي على الفريسة بسرعة قد تستعملها كلها أو قسما منها . و هذه هي أنواعها :

أ-مفترسات البالغات :هناك كثير من الحشرات التي تفترس بالغات البعوض و غيرها من الحشرات الطبية الصغيرة مثل :

١ -**ذبابة العائلة (Anthomyidae)** : و هي تعيش دائما متزحلقة فوق سطح الماء و تصطاد البعوض و غيره .

٢ -**الرعاشات (Odonata) :** و هي حشرات كبيرة و قوية تمسك بالحشرات الطائرة وتفترسها لذلك تراها تحوم بالقرب من محلات التوالد .

٣ -**بعض أنواع البرغش الكبيرة الحجم :** و التي كنهها الافتراس *Culicoides spp.* .

٤ -**العناكب الحقيقية True spiders.**

٥ -**الحلم الذي تمص السائل الدموي Blood-Sucking Mites.**

و ليس من السهل استعمال مفترسات البالغات لأن من الصعب تداولها و الاعتماد عليها و تكثيرها و نقلها .

ب -مفترسات اليرقات :

١ -النباتات المائية Aquatic plants

٢ -الحيوانات من شعبة الجوفيات مثل الهايدراCoelentrata.

٣ -الحشرات .. من الخنافس و البق و الرعاشات في أدوارها المائية..بل و حتى يرقات بعض أنواع البعوض الكبيرة تكون مفترسة ليرقات الأنواع الصغيرة . و أهم أنواع البق المفترس هي أنواع البق المتزحلق (Gerris) و التي تفترس يرقات و بالغات البعوض .

٤ -الحيوانات الفقرية : من المفترسات المهمة و التي أمكن استعمالها بنجاح و الاستفادة منها لاسيما في البعوض و أهمها الضفادع (لاسيما في محلات التكاثر الصغيرة و الضحلة) و الأسماك و

هي تعتبر من أهم المفترسات قاطبة و قد أمكن تكثيرها و نقلها و استعمالها بمحلات كثيرة ، (أبو الحب ١٩٧٨). **ومن أهم المفترسات هي :**

أ – **الأسماك Fish :** تعد الأسماك من أكثر المفترسات الشائعة ليرقات البعوض ، فقد استعملت أنواع من أجناس مختلفة في مجال المكافحة الحيوية و بالرغم من وجود ١٥ نوعا تعود لعدة أجناس من الأسماك المفترسة إلا أن تحت النوعين ***Gambusia affinis affinis*** و ***G.affinis holobrookii*** يشار إليهما بصورة شائعة (سمك البعوض) قد استعملا على نطاق واسع من أي نوع آخر حيث أثبتت فاعليتها في بعض المناطق ، و هذا النوع الصغير الحجم متباين الجنسين و يعيش و يتغذى دائما على سطح الماء لذلك فهو مناسب جدا لافتراس و اصطياد يرقات بعوض الأنوفلس ، و من السهل أن يتكاثر حتى في المحلات المحصورة كما أنه يتحمل التداول و النقل و هو ليس سهل الاقتناص من قبل المفترسات الأخرى و كذلك فهو ليس بالسمك الكبير ليطمع فيه الإنسان و يصطاده ، (أبو الحب ١٩٧٨ ؛ الكرعاوي ٢٠١٢) . و أيضا توجد بعض قشريات الماء ذات الذيل مثل *Triops longicaudatus* و التي تظهر في وقت مبكر بعد حدوث الفيضانات ، (العمرو ، ٢٠٠٥).

ب – الحشرات Insecta

توجد أنواع عديدة من الحشرات المفترسة للبعوض ، و ذكر Service (1967) أن هناك حشرات مائية مفترسة للبعوض *Microvelia cavicola* و (***family : Vallidae***) ***Paravilia myersi***.وأشار جرجيس و أمين (١٩٨٧) إلى استعمال البعوض ***Toxorhynchites*** التابع إلى العويلة ***Toxorhynchitinae*** في مجال مقاومة البعوض. كما أن حوريات الرعاشات***Sympetrum striolum*** من رتيبة (**Suborder : Anisoptera**)و حوريات ***Coenagrion puella*** و ***Ischanura elegans*** من رتيبة **(Suborder : Zygoptera)**تكون ذات قابلية افتراسية عالية ليرقات البعوض . و تعد حشرة ***Notonecta undulate*** من رتبة **(Order : Hemiptera)** من المفترسات المهمة ليرقات الطور الثاني من البعوض ، (الكرعاوي ٢٠١٢). كما أن بعض يرقات بعوض الكيولكس مثل ***Cx.halifaxi , Cx. Tigripes*** تفترس يرقات بعوض الأنوفلس إذا وجدت معها في نفس بيئات التكاثر. كما وجد أن يرقات البعوض من جنس *Toxorhynchites* و التي تتميز إناثه بعدم حاجتها للدم عند وضع

البيض (أي إنها لا تلدغ مطلقا) بمثابة مفترسات قوية و نشطة ضد يرقات البعوض خاصة بعوض *Aedes* ، و إن الكفاءة الأفتراسية التي قام بها فرغل عام (١٩٧٩) م في مدينة أسيوط بتجارب معملية لدراسة كفاءة الطور اليرقي الاخير لخنفساء *Cybister sp.* في افتراس يرقات العمر الرابع لبعوض الكيولكس *Culex* حيث بلغ متوسط افتراسها ٣٢،٤ يرقة / يوم . وفي دراسة معملية لرصد تأثير سبعة أنواع من المفترسات ليرقات البعوض في العراق قام بها Ouda, *et al.* (1986) حيث تمت دراسة فعالية الطور البالغ لخنافس الماء من نوع *R. suturellus* من عائلة Dytiscidae ضد الطور الثالث للبعوض من نوع *Cx. quinquefasciatus* حيث وجد أن للمفترس تأثير مرتفع للقتل على يرقات البعوض. و قد واجه الباحثون صعوبة في تربية المفترس معمليًا كانت الخنافس من نوع *A. sardea* من عائلة Notonectidae أكثر فاعلية كمفترس بسبب طول فترة بقاءها ، كثافة عشائرها حقليًا وسلوكها المتميز في التغذية بشكل خاص على يرقات البعوض، لذلك فقد يكون احتمالية نجاحها في المكافحة الحيوية ضد يرقات البعوض أعلى من الأنواع المختبرة الأخرى و هي الرعاشات من نوع *I.evansi* من عائلة Coenagrionidae و النوع *Anax* sp. من عائلة Aeshnidae و النوع *Dipiacodes lefebvrii* من عائلة Libellulidae و النوع *Servilia erythrae* من عائلة Crocothemidae و بق الماء *Neps* sp. من عائلة Nepidae . و في دراسة لمفترسات أخرى ضد يرقات بعوض *Cx. quinquefasciatus* بواسطة بق الماء *Microvelia pulchella* من عائلة Veliidae و التي قام بها Miura and Takahashi (1988) كانت البالغات لهذا النوع من البق المائي لها قدرة عالية على افتراس تلك اليرقات و البقاء و التكاثر عليها حيث كانت هي المصدر الوحيد كغذاء للمفترس . و في دراسة معملية أخرى قام بها (١٩٩٠ Tawfik, *et al.*) على بق الماء *Sigara selecta* من عائلة Corixidae لعينات جمعت من منطقة الفيوم و بني سويف في مصر أظهرت الدراسة فاعلية البالغات والحوريات في مختلف أطوارها في الأفتراس وازدياد معدل استهلاكها ليرقات بعوض *Cx. pipiens* .و في دراسة معملية للجهد الإفتراسي لحوريات وبالغات بق الماء *Diplonychus indicus* من عائلة Belostomatidae في منطقة ماديورا بالهند قام بها Prabakaran (1992) تم خلالها تقدير الجهد الإفتراسي لحوريات العمر الثالث ، الرابع ، الخامس و للبالغات (الذكور و الإناث) ضد الأعمار اليرقية المختلفة لبعوض *Cx. quinquefasciatus* و *Anopheles stephensi* حيث أظهرت هذه الدراسة فاعلية البق المائي و كفاءته العالية في القضاء على يرقات نوعي البعوض السابقين ، (العمرو ٢٠٠٥). و في دراسة معملية في مدينة أسيوط بمصر لدراسة الكفاءة الإفتراسية لحوريات الرعاش الصغير من

عائلة Agrionidae على افتراس يرقات الطور الرابع لبعوض الكيولكس *Culex* حيث كان معدل استهلاكها بمتوسط ١٧ يرقة /يوم أما حوريات الرعاش الكبير من عائلة Corduliidae في طورها الأخير فقد اختلف معدل استهلاكها باختلاف شهور السنة حيث تراوح الاستهلاك بين ٦,١٨ يرقة / يوم في مايو إلى ٣٣ يرقة /يوم في سبتمبر ، و بالنسبة لحوريات الطور الثاني فان متوسط استهلاكها تراوح بين ٤,٢٢ يرقة /يوم في يوليو إلى ٨٣,٢٥ يرقة /يوم في أغسطس أما حوريات الرعاش الكبير في طورها الأخير من عائلة Aeschinidae فقد تراوح معدل استهلاكها بين ٢٠- ١٠٠ يرقة /يوم من الطور الرابع لبعوض*Culex* بمتوسط ٤٧,٦٧ يرقة /يوم بينما تراوح استهلاكها من الطور اليرقي الثاني ما بين ٧٥- ١٥٠بمتوسط ٥,١١١ يرقة /يوم، (العمرو ٢٠٠٥).

ج-الطيور :

حيث لوحظ افتراس بالغات البعوض بواسطة *Apus apus* و طير السنونو *Hirundo rustica* ، (الكرعاوي ،٢٠١٢).

٢-الديدان الثعبانية الممرضة للحشرات Entomopathogenic Nematode

مثل *Octomyomermis muspratti* و *Culicimermis schakhovii* و *Hydromemis churchiliensis* ، (الكرعاوي ٢٠١٢).

٣- المسببات المرضية للحشرات Insect pathogens

وتشمل : الفيروسات ، البكتريا ، الفطريات ، البروتوزوا و النيمانودا

Viruses , Bacteria , Fungi , protozoa and nematodes

تتأثر الحشرات بالأمراض التي تسببها الكائنات المذكورة سابقاً و تتراوح أعدادها بين (١٥٠٠ - ٢٠٠٠) سبب تم تشخيصه و قد وضع للمكافحة المسمى المكافحة الميكروبية Microbial control (الجرثومية) ، لقد سجل أول نجاح لهذا النوع من المكافحة في بدايات الثلاثينيات من القرن العشرين في كثرًا للذبابة المنشارية على السرو التي تسببت أضرار جسيمة للغابات و قد أخضعت للمكافحة الفعالة بواسطة فيروسات موجودة في الطبيعة جلبت بطريق الصدفة من أوربا خلال استيراد طفيليات هذه الحشرة. أن أمراض الحشرات بشكل عام تعتمد على كثافة الآفات وغالباً ما يظهر المرض بشكل قليل في الطبيعة و لكن عند تربية الحشرات صناعياً قد تظهر بشدة بالغة ، (إسماعيل ٢٠٠٩).

أ-الفايروسات Virusis :

تتأثر الحشرات بسبعة أنواع من الفيروسات و هي متميزة في حجمها و شكلها إلا أن منظمة الصحة العالمية WHO و منظمة الأغذية و الزراعة الدولية FAO أوصت أن واحد فقط هو Baculoviruses هو من عوامل ذات التأثير المبيدي للآفات و مأمون بعدم إصابة الحيوانات أو النباتات و من احد الفيروسات للمجموعة السابقة تركزت الدراسات على الفيروسات متعددة الأوجه النووية Nuclear polyheadrasis viruses (NPV) هي فيروسات نشطة عالية التخصص تحتوي على كتلة بروتينية واقية تمكنها في حالة عدم التعرض للأشعة فوق البنفسجية UV من العيش لعدة من السنين في البيئة الطبيعية. تهاجم فيروسات NPV أنواع يرقات مرشطية الأجنحة و لم يظهر مقاومة ضد هذه الفيروسات من قبل الحشرات المصابة بعد مضي (١٢) سنة من استعمالها ضد حشرات القطن في أمريكا. و قد ظهرت في الأسواق حديثاً مبيدات الحشرات الفيروسية مثل مبيد فيرون Viron إلا أن هذه المنتجات لها فعالية اقل بكثير عنها تحت ظروف الفحص المختبري.إن أهم عوامل صعوبة استخدام فيروسات NPV تكمن في أنها تعتمد على أنسجة حية من الحشرات بتربيتها صناعياً على الأغذية البديلة أو الطبيعية . و هنالك صعوبة أخرى هي أن استخدام الفيروسات يلزمها فترة حضانة تصل من (١٠-٢٠) يوم خلال هذا الوقت قد تستطيع الآفة أحداث أضرار كبيرة على المحاصيل المصابة و لكن يمكن ضمن أطار المكافحة المتكاملة استخدام الطفيليات و المفترسات التي تهاجم فوراً مع المبيدات الفيروسية التي قد تتأخر في تأثيرها على الآفات و بشكل عام فان كل المسببات المرضية للحشرات تعتبر مرشحة ممتازة لتطوير مبيدات حشرات ميكروبية آمنة و فعالة و لها مستقبل في إدارة مكافحة عديد من الآفات ، (إسماعيل ٢٠٠٩). و قد أشار Weiser and Matha (1991) أن هذه الفيروسات القوس قزحية ذات كفاءة عالية في مقاومة الأطوار اليرقية للبعوض . و ذكر Yadav (2009) أن الفيروسات التي تعود إلى المجاميع التالية *Adenonucleovirusis* و *Nucheopolyhydrosis* و *Iridoviruses* استعملت في مكافحة يرقات و بالغات البعوض ، (الكرعاوي ٢٠١٢).

ب-البكتيريا Bacteria :

تسبب مختلف الأحياء المجهرية أمراضا متنوعة للحشرات ، و أن الأكثر شيوعاً في مجال المكافحة هي تلك التي تسبب الأوبئة (Epizootics) و التي تظهر قدرة عالية عند استعمالها لمكافحة

يرقات البعوض . حازت بكتريا من نوع *Bacillus* المكونة للسبورات على اهتمام كبير في السنين الأخيرة كبدائل أو مساعدة للمبيدات الكيمياوية أن النوع *Bacillus thuringiensis* اختبر على مدى واسع من الحشرات مختبرياً و في الحقل و أن اغلب الحشرات المتأثرة بها تعود إلى **رتبة حرشفية الأجنحة و ذات الجناحين** مع بعض الحشرات الأخرى بشكل محدد . أن الحساسية للمسبب المرضي هذا تعود إلى إنها تنتج جسماً برونزياً شبيه بالسبورات Parasporal و هو سم داخلي Endotoxin سام ليرقات حرشفية الأجنحة يؤدي التعرض له في دقائق إلى شلل أمعاء هذه الحشرات مما يؤدي إلى توقفها عن التغذية و هذه البكتريا أمينة جداً و ليس لها تأثير على الحشرات النافعة أو الإنسان و يسوق الآن مبيد بكتيري للحشرات يدعى بايوترول Biotrol و يستخدم بنجاح ضد **دودة براعم التبغ ، حفار ساق قصب السكر ، دودة أوراق اللهانة** و غيرها . و كذلك بكتيريا *Bacillus sphaericus* المستخدمة في مجال المكافحة الحيوية ضد البعوض ، (إسماعيل ، ٢٠٠٩ ؛ الكرعاوي ،٢٠١٢).

ج-الفطريات Fungi :

تتوزع الفطريات الممرضة للحشرات على أربع شعب هي البازيدية *Basidiomycota* و الكيسية *Ascomycota* و اللاقحية *Zygomycota* و الناقصة *Deuteromycota* ، (الكرعاوي ٢٠١٢) . هنالك عدد هائل من الفطريات تصيب و تقتل الحشرات في الطبيعة أن أهمها *Beauveria* الذي يسبب مرض المسكلادرين Muscardine **لديدان الحرير** هو فطري عالي الانتشار و يعيش في الترب الرطبة و سجل أصابتها العديد من الحشرات مثل **الخنافس الأرضية** و كذلك ضد **خنفساء كدلورادو** ذات الأضرار الشديدة على البطاطا في أمريكا أن الفطر *Entomophthora* معروف لمكافحته **للذباب المنزلي** في نهاية الصيف . تخضع الفطريات مباشرة للتنظيم بواسطة العوامل الفيزياوية في البيئة و قد تتطلب ظروف مثالية مثل الرطوبة المناسبة حتى تسبب موت العائل لذا لا يمكن الاعتماد عليها للاستعمال الحقلي عموماً و هي ذات قيمة فنية محدودة عند استخدامها كعوامل لمكافحة الآفات ، (إسماعيل ٢٠٠٩).

د- الابتدائيات او البروتوزوا Protozoa :

و من أهمها جنس *Nosema* الذي يسبب مرض البيبرني Pebrine **لدودة القز** و قد جرب ضد عديد من أنواع **حشرات حرشفية الأجنحة** و نجح استخدامه مخلوطاً مع النخالة لمكافحة **الجراد** لأكثر من (١٠٠٠) من الأراضي ، إن الأبتدائيات كمسببات مرضية للحشرات ليست عالية

النشاط تحت ظروف الحقل و هنالك شك حول إمكانية تسويقها تجارياً لمكافحة الآفات و مع ذلك فقد تؤثر الأبتدائيات في عمليات حيوية في الحشرات بجعلها حاسة للأنواع الأخرى من المكافحة الطبيعية ، (إسماعيل , ٢٠٠٩).

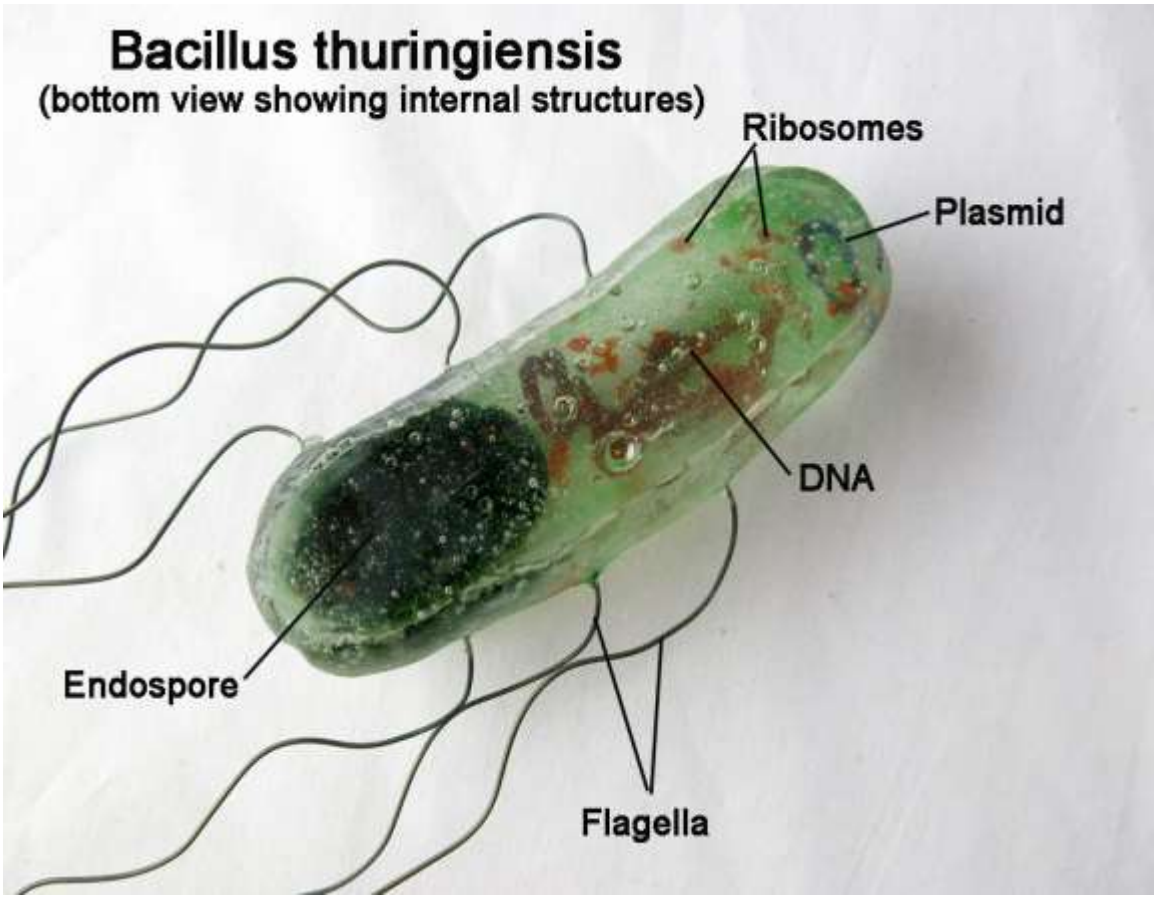
ه- النيماتودا Nematodes :

كشفت البحوث إن بعض أنواع النيماتودا ذات تأثير كبير على الحشرات التي تصيبها حين تتواجد في جوف الجسم متغذية و متكاثرة كما في بعض النيماتودا التي تصيب البعوض وهي سهلة التربيص السهلة الخزن و سهلة الرش و ليس لها حساسية تجاه المبيدات إذا ما استعملت معاً و لها إمكانية التنقل في التربة و يستخدم المبيد التجاري فيها سكيتردوم Skeeter Doom ، (إسماعيل , ٢٠٠٩) .

٢-٣ بكتيريا *Bacillus thuringiensis*

٢-٣-١- تصنيف البكتيريا *Bacillus thuringiensis* :

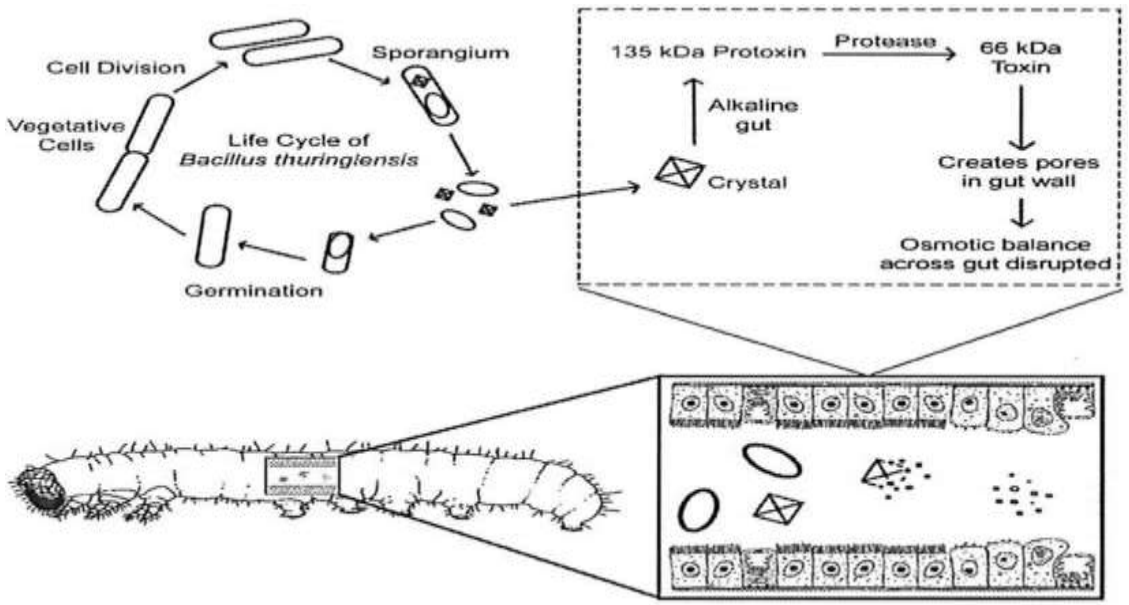
تعتبر بكتيريا *Bacillus thuringiensis* التي تعود مملكة البكتيريا الحقيقية Eubacteria و إلى Bacteria و إلى شعبة Firmicutes و إلى صنف Bacilli و إلى رتبة Bacillales و إلى عائلة Bacillaceae و إلى جنس *Bacillus* . و تضم بكتيريا *Bacillus thuringiensis* سلالات مختلفة مثل *israelensis , aizawi , kurstaki* التي تعتبر من أهم السلالات التي تستخدم في المكافحة الحيوية للآفات ، (القناوي ٢٠١١) .



شكل رقم (٩) يوضح شكل بكتيريا *Bacillus thuringiensis*

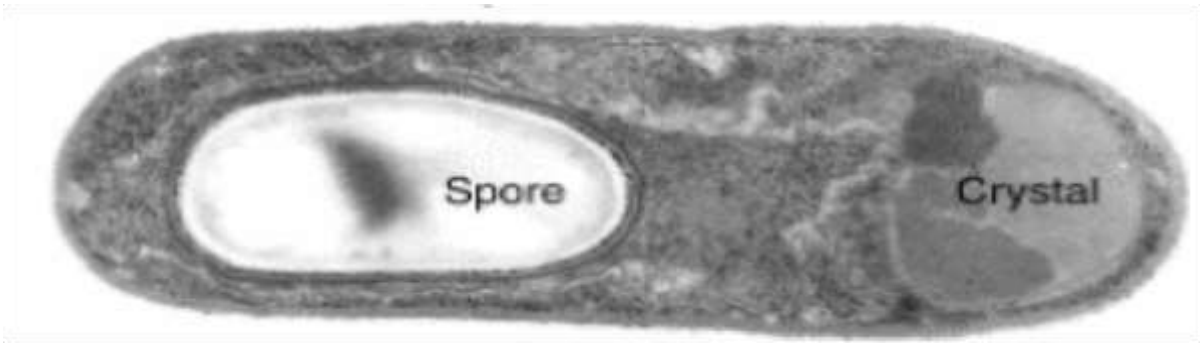
٢-٣-٢- صفات بكتيريا *Bacillus thuringiensis*

بكتيريا *B.thuringiensis* لا تختلف عن بقية أنواع جنس *Bacillus* فهي موجبة لصبغة غرام ، عصوية الشكل مكونة للأبواغ ماعدا قابليتها على إنتاج البلورات البروتينية أو ما يعرف بالذيفان الداخلي (Cry endotoxin) خلال مرحلة تكوين الابواغ و التي تكون مسؤولة عن صفة السمية للحشرات، و نتيجة لامتلاكها هذه الخاصية ركزت البحوث حول هذا النوع البكتيري لأجل استخدامها في مجال السيطرة البايلوجية بوصفها مبيدا للآفات الزراعية ، إذ أصبحت تمثل 90 % من المبيدات الحشرية المستخدمة في الولايات المتحدة الأمريكية نظرا لعدم وجود أي تأثير سام لها على الخلايا الحيوانية و في السنين الأخيرة برزت بحوث حول قدرة البلورات البروتينية المنتجة من سلالات مختلفة من بكتيريا *B.thuringiensis* على القتل التفضيلي للخلايا السرطانية . تمتلك غالبية الأنماط المصلية العائدة لبكتريا *thuringiensis* عوامل خارج كروموسومية تختلف بأعدادها و أوزانها الجزيئية من نمط مصلي لأخر .



شكل رقم (١٠) يوضح دورة حياة بكتيريا *Bacillus thuringiensis* و مراحل تكون البلورات السامة و تأثيرها داخل جسم اليرقة .

إن الصفة المشتركة بين الأنماط المصلية لبكتيريا *B.thuringiensis* هي وجود ترتيب بلازميدي معقد إذ يكون الاختلاف في عدد و حجم تلك فيكون التغاير كبير بالوزن الجزيئي (١,٤ - ١٨٠) و كذلك عددها يتراوح بين ١– ٨ ، إذ أشارت دراسة إلى امتلاك تحت نوع *B.thuringiensis* subsp. *israelensis* نسق بلازميدي معقد مكون من ثمانية بلازميدات بأوزان جزيئية مختلفة هي ٣,٣ , ٤,٢ , ٤,٩ , ١٠,٦ , ٦٨, ٧٥, ١٠٥, ١٣٥ MD ، و يمكن أن يكون أكثر من ثمانية بلازميدات . إن العديد من الجينات المشفرة للبلورات البروتينية تكون بلازميدية المنشأ كما إن بعضها كروموسومية المنشأ . و تكون هذه الجينات محمولة على بلازميدات كبيرة 40- ١٥٠ MD و بالتالي فأن غالبية هذه البلازميدات هي بلازميدات إقترانية Conjugative (Plasmids)،(Mulla,1991 ؛ Lepe and Suero ؛ جعفر وآخرون ٢٠١٣).



شكل رقم (١١) يوضح السبورات Spore و البلورات السامة Crystal

عدت سلالة البكتيريا *Bacillus thuringiensis var. israelensis* ذات فعالية عالية ضد يرقات البعوض و الذباب الأسود ،و إن تعريض يرقات ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* لهذه البكتيريا أدت إلى نسبة هلاك انحصرت بين ٣٨- ٤٥ % . و أوضحت الدراسة التي أجراها Ragni *et al.*(1996) إن سلالة البكتيريا المذكورة سببت نسبة هلاك انحصرت بين ٥٠ - ٦٥ % ليرقات *Aedes aegypti* ، و في جنوب البرازيل عزلت البكتيريا من التربة و استعملت في مكافحة البعوض ، (الكرعاوي، ٢٠١٢).

شكل رقم (١٢) يوضح البلورات السامة و السبورات تحت المجهر

٢-٣-٣- القدرة الأمراضية للبكتيريا *B.thuringiensis* :

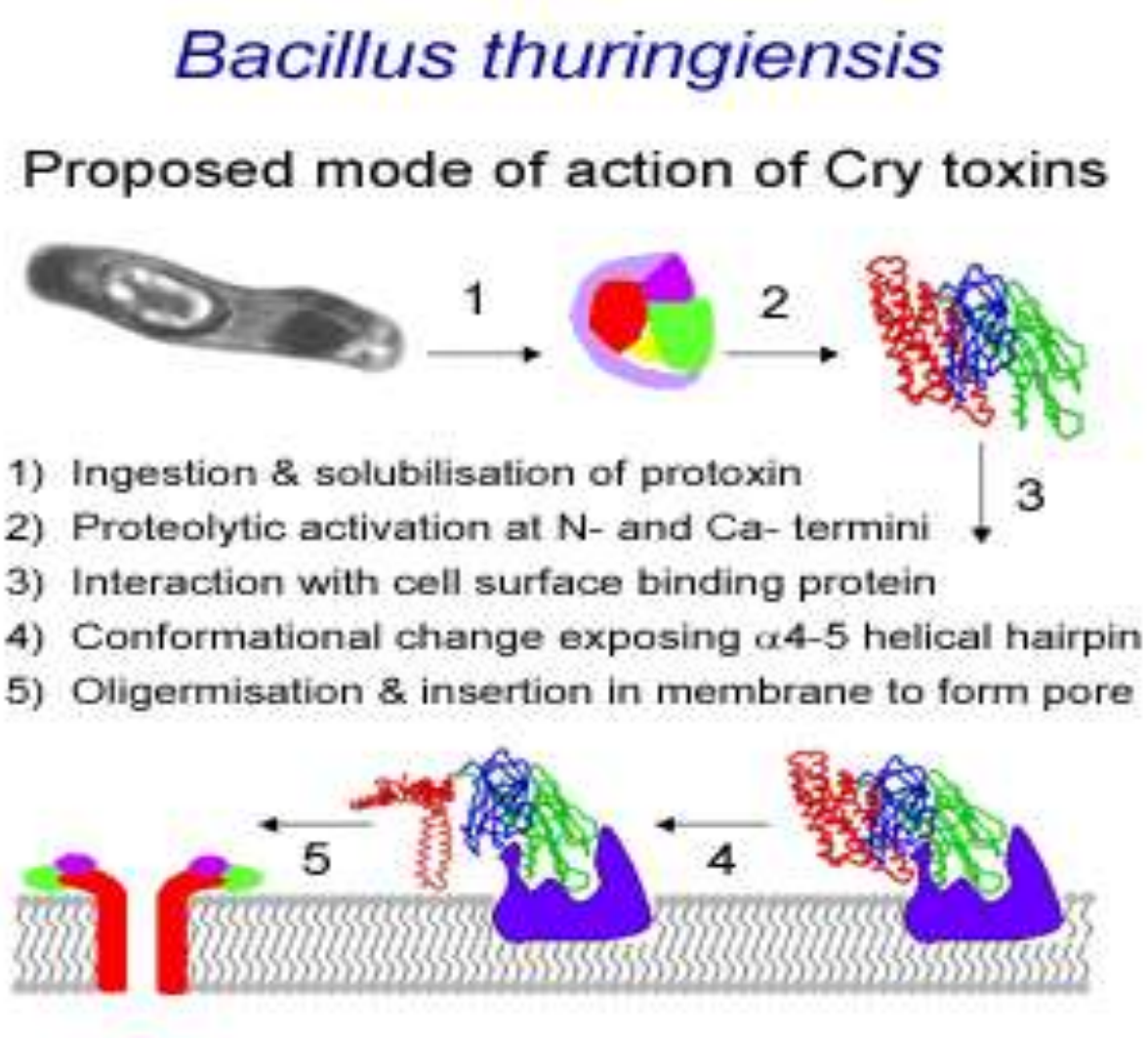
تنشأ القدرة الإمراضية للبكتيريا *Bacillus thuringiensis* من أربعة مركبات سامة تتواجد في خلاياها أو في وسط تضاعفها :

أولا : إنزيم الفوسفوليبيز Phospholipase C = Lecithinase C و هو المسؤول عن إهلاك العائل إذ تكفي ثلاث ميكروغرامات منه لإحداث الجرعة النصف مميتة **LC 50** للطور اليرقي الأنسلاخي الخامس للدبور المنشاري ويشار إلى هذا الأنزيم **بالالفا اكسوتوكسين (*B.t.* α. exotoxin) .**

ثانيا : المركب السام الثاني هو **بيتا اكسوتوكسين (*B.t.*β.exotoxin)** حيث وجد انه يتكون من أجزاء متساوية من الأدنين و الرايبوز و الفسفور و يوقف تخليق الحامض النووي .

ثالثا : كاما اكسوتوكسين (*B.t.* γ.exotoxin) من إنزيم أو عدة إنزيمات غير معروفة إلى الآن .

رابعا : سكما اندوتوكسين (*B.t.*δ. endotoxin) بداخل الجسم البلوري للخلية البكتيرية يتحمل هذا المركب درجة الحرارة و يذوب في المحاليل القلوية .إذ ينشط هذا Endotoxin في القناة الهضمية ذات الوسط القلوي في يرقات حرشفية الأجنحة مطلقا المكونات السامة من الجسم البلوري الذي يسبب الشلل للقناة الهضمية في عدة دقائق من توجد هذا الجسم ، (القناوي , ٢٠١١) .



شكل رقم (١٣) يوضح القدرة الأمراضية للبكتيريا

٢-٣-٤- مراحل تكون البلورات السامة داخل البكتيريا *B.thuringiensis* :

البلورات السامة عبارة عن أجسام بروتينية تكونها البكتيريا داخل الجدار الخلوي خلال ١٢ ساعة تقريبا من الانقسام الثنائي للخلايا وهي عبارة عن دلتا إندوتوكسن ذات وزن جزيئي مرتفع .وهي إما على شكل هرمي أو معين أو مسطحة غير منتظمة تتكون بالتزامن مع تكون الجراثيم داخل الخلية البكتيرية.

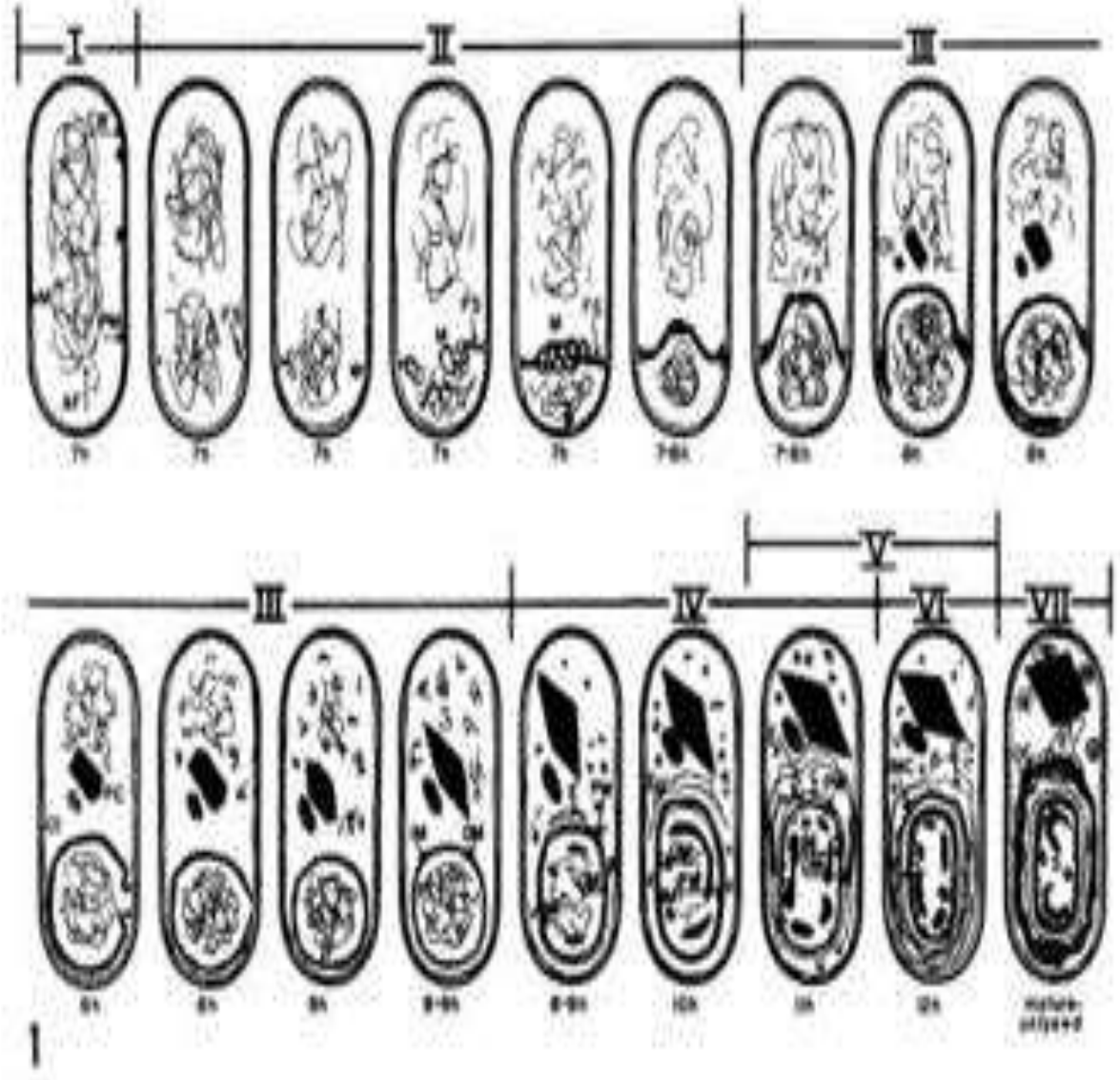
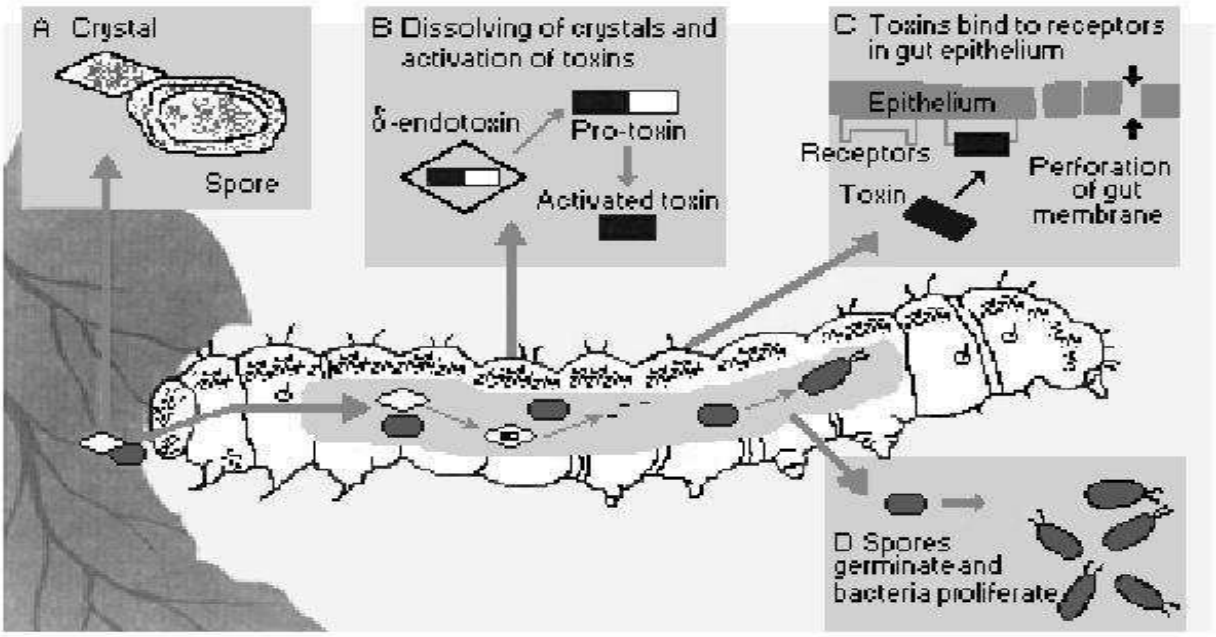


FIG. 1. *Diagramatic scheme of sporulation in B. thuringiensis. Abbreviations: M, mesosome; CW, cell wall; PM, plasma membrane; AF, axial filament; FS, forespore septum; IF, incipient forespore; OI, ovoid inclusion; PC, parasporal crystal; F, forespore; IM, inner membrane; OM, outer membrane; PW, primordial cell wall; E, exosporium; LC, lamellar spore coat; OC, outer spore coat; C, cortex; IMC, incorporated mother cell cytoplasm; S, mature spore in an unlysed sporangium.*

شكل رقم (١٤) مراحل تكون البلورات السامة داخل بكتيريا *B.thuringinsis*

٢-٣-٥- آلية إصابة البكتيريا *Bacillus thuringiensis* :

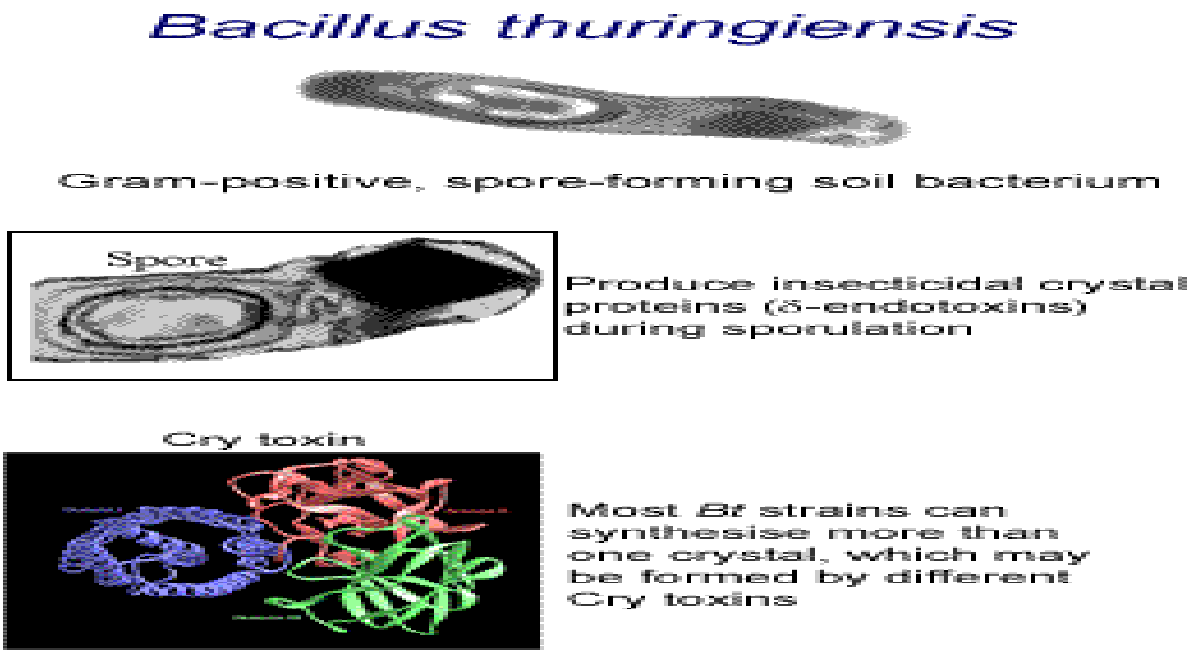
يوجد من هذا النوع من البكتريا سلالات تمرض يرقات بعض أنواع حرشفية الأجنحة *aizawi* , kurstaki و سلالات تمرض يرقات البعوض مثل *israelensis* و سلالات أخرى تمرض بعض أنواع غمدية الأجنحة . و يصل أعداد الأنواع المختلفة التي يمكن أن تكافح باستخدام مستحضرات الميكروب *Bacillus thuringiensis* و سلالاته إلى حوالي ٣٠ نوعا من الحشرات معظمها من رتبة حرشفية الأجنحة ، غير أن درجة حساسية هذه الأنواع للإصابة و التأثير بالميكروب تتراوح بين المتوسط و عالي الحساسية . و قد وجد من نتائج الدراسات و البحوث أن الخلية الخضرية لهذا الميكروب أثناء نموها في أنها تقوم بإفراز مادة سامة تسمى Exotoxin و هي مادة سامة لكثير من الأنواع و غير متخصصة و غير مرغوب تواجدها بالمستحضرات التجارية لذلك تختار السلالات من الميكروب التي لا تفرز هذه المادة أو تفرزها بدرجة قليلة جدا مثل السلالة *B.t.var.kurstaki* .



شكل رقم (١٥) آلية إصابة البكتيريا *B.thuringiensis* الحشرات

و عند تحول الخلية الخضرية إلى طور الجرثومة تكون بجوار الجرثومة داخل الخلية الأم الحاوية على الجرثومة جسم بلوري يسمى endotoxin و هو يتكون من مجموعات من الأحماض الامينية ذات أثر سام على الخلايا الطلائية للقناة الهضمية الوسطى لكثير من يرقات حرشفية الأجنحة ، و هذا الجسم البلوري قابل للذوبان في الوسط القلوي حوالي PH=8 و لذلك عند تناول اليرقات لغذاء

ملوث بهذا الجسم البلوري ، يذوب داخل القناة الهضمية الوسطى و يسبب تلف للخلايا الطلائية ، و تنفصل عن بعضها البعض وعن الغشاء القاعدي الذي تركز عليه و بذلك ينفذ جزء منه إلى دم الحشرة و يسبب الشلل لها فضلا على إنها تصبح غير قادرة على تناول الغذاء أو القيام بعملية الهضم لتلف الخلايا الطلائية المبطنة لجدار القناة الهضمية الوسطى . بالإضافة إلى ذلك فإن جراثيم الميكروب قد تنبت داخل القناة الهضمية للحشرة أو تنفذ إلى داخل فراغ الجسم حيث تنبت إلى خلايا خضرية تنقسم بسرعة في دم الحشرة و الذي يعتبر الوسط الملائم لنموها فيحدث تسمم بكتيري يكمل موت اليرقة المصابة بالتأكيد ، (القناوي , ٢٠١١) .



شكل رقم (١٦) يوضح Spore and Crystal toxin

٢-٣-٦- العوامل المؤثرة على الإصابات البكتيرية :

لابد من توافر ظروف خاصة كي تتم إصابة الحشرة بالأمراض البكتيرية الإجبارية . فالمرض اللبني Milky disease الناجم عن أنواع من جنس *Bacillus* لا يحدث إلا لأنواع من الحشرات تتبع عائلة الجعال ، كما ترتبط الإصابة بالمرض البكتيري المتسبب عن النوع *Bacillus thuringiensis* غالبا بالحشرات حرشفية الأجنحة و خاصة تلك التي تتراوح درجة الايون الهيدروجيني بقناتها الهضمية PH=10.5- 9 . و تؤثر بعض العوامل غير الحيوية على فاعلية الممرضات البكتيرية إذ تضر الأشعة فوق البنفسجية بجراثيم و بلورات البكتيريا . كما تلعب الحرارة

و الرطوبة دورا هاما في فاعلية هذا النوع من البكتيريا ، و تؤثر ظروف وسط الانتشار في نشاط الممرضات البكتيرية الكامنة فالانخفاض في درجات الحرارة و التجويع والتزاحم بين أفراد العائل تشكل عوامل تدفع بارتفاع حساسية الممرضات بالبيئة ، (القناوي , ٢٠١١) .

٢-٣-٧-مظاهر الإصابة التي تحدثها بكتيريا Bt على الحشرات المصابة

١.قلة نشاط الحشرة وعدم قابليتها للغذاء وضعف شهيتها

٢ .بعد الموت يتلون جسم الحشرة باللون البني أو الأسود.

٣. .ينتفخ جسم الحشرة ويكون رخو القوام.

٤. إذا انفجر جسم الحشرة خرجت منه رائحة كريهة.

٢-٣-٨- المستحضرات البكتيرية :

تكون بشكل مساحيق قابلة للبلل و للتعفير أو مستحلبات تتكون من حوالي ٤% مادة فعالة (الأجسام البلورية فقط أو الأجسام البلورية + الجراثيم) و الباقي (٩٦ %) من مواد حاملة و ناشرة و مبللة و لذلك يسهل استخدام المستحضرات البكتيرية رشاً أو تعفيرا على النباتات و بنفس آلات الرش العادية . و المساحيق القابلة للبلل أو للتعفير تتحمل التخزين لمدة عامين على درجة الحرارة العادية ، (القناوي , ٢٠١١).

٢-٣-٩-قابلية المستحضرات البكتيرية للنوع *Bacillus thuringiensis* للخلط مع المبيدات الحشرية :

يمكن خلط المستحضرات البكتيرية للنوع *B. thuringiensis* مع معظم المبيدات الحشرية دون أن يتأثر الميكروب الممرض بذلك أو يفقد الجسم البلوري خواصه . فيما عدا المبيدات التي تعتمد في تركيبها على أملاح المعادن الثقيلة مثل النحاس و الزئبق و كذلك الكبريت و الزرنيخ و غيرها مما يستخدم في مكافحة البكتيريا الممرضة للنبات أو الفطريات الممرضة للنبات ، (القناوي , ٢٠١١) .

٢-٣-١٠- مميزات المستحضرات الميكروبية :

١- آمنه للإنسان و الحيوان و الحشرات النافعة لم تتأثر أي من المفترسات و الطفيليات بالمستحضرات البكتيرية .

٢- زيادة مدى الأمان في استخدام هذه الكائنات على الأعداء الطبيعية

٣- إعادة فرصة المحافظة على التوازن الطبيعي بين الآفة و أعدائها الحيوية

٤- ليس لها فترة أمان بعد الرش

٥- يستمر الأثر الباقي فترات طويلة حيث تؤثر عقب الأجيال المتعاقبة حيث تؤدي الى خفض الكفاءة التناسلية لإناث الحشرات .

٦- عدم وجود ظاهرة مقاومة الحشرات للميكروب حيث لا تكون الحشرة مناعة ضدها مثل المبيدات الكيمياوية .

٧- قابلة للخلط مع المبيدات الكيمياوية و المسببات المرضية الأخرى ، (القناوي , ٢٠١١).

٢-٣-١١-عيوب المستحضرات البكتيرية :

١- تتأثر بالظروف البيئية مثل أشعة الشمس .

٢- لا تعطي تأثير فوري مثل المبيدات الكيمياوية

٣- تحتاج تقنية عالية من قبل القائمين بها عند الأستخدام

٤- تكلفة صناعتها عالية بالمقارنة بالمبيدات الكيمياوية

٢-٣-١٢- حساسية الحشرات للبكتيريا :

توجد بعض العوامل التي تؤثر على حساسية الحشرات للإصابة بالبكتيريا :

١- درجة حموضة معدة الحشرات

٢- وجود مستقبلات على جدر الأمعاء ، (القناوي ,٢٠١١) .

٢-٢-٣- المكافحة باستعمال منظمات النمو الحشرية : Insect growth regulators

إن منظمات النمو الحشرية هي مواد كيمياوية تتداخل مع بعض الأنظمة الوظيفية في الحشرات ، مما يؤثر على نموها و تطورها و تكاثرها دون غيرها من الكائنات الحية و علية فهي ذات تخصص نوعي ، وقد أطلق عليها مبيدات الجيل الثالث .وتمتاز هذه المواد بكونها تؤثر بتراكيز واطئة جدا تصل إلى اقل من ١ مايكرو غرام / لتر و ذات فعالية عالية في هلاك الحشرات المعاملة و هذه ميزة مهمة من الناحية البيئية و الاقتصادية ، يوجد هناك نوعين من منظمات النمو هي نظير هرمون الصبا Juvenil hormone analogue الذي يتداخل مع عملية الانسلاخ و يؤدي إلى انسلاخ مبكر . و النوع الأخر هي مثبطات تخليق الكايتين Chitin synthesis inhibitors و التي أبدت مستوى

عاليا من الفعالية في الحد من تكاثر و انتشار الحشرات و منها البعوض من خلال قدرتها على تثبيط النمو الجنيني داخل البيض كما تعمل على إعاقة نمو و انسلاخ اليرقات بالإضافة إلى حدوث تشوهات متعددة في الأطوار اليرقية و ظهور أطوار وسطية تجمع بين صفات اليرقة و العذراء أو تؤدي إلى خفض قدرته التناسلية ، (الكرعاوي ٢٠١٢). وجد Waever and Begley (1982) أن استعمال مثبط تكوين الكايتين Baysir كطعوم في معاملة بالغات الذباب المنزلي أدى إلى انخفاض حاد في نسبة فقس البيض . إن مثبط تكوين الكايتين Cyromyzine سبب تشوهات مظهرية عديدة في بعوض *Cx.quinquefasiatus* عند معاملة يرقات الطور الرابع . إن غالبية مثبطات تكوين الكايتين تعود إلى المجموعة الكيميائية Benzoyl Phenyl ureas . يعد الكايتين من أهم مكونات جدار الجسم و هو عبارة عن سلسلة من وحدات N-acytylglucos amine (NAGA) . و يتركز وجود الكايتين في طبقة الكيوتكل الداخلية ، يبدأ تكوين الكايتين من سكر الكلوكوز إذ يمر بمراحل مختلفة و إن المرحلة الأخيرة لتكوين الكايتين هي مرحلة البلمرة Polymerization وفي هذه المرحلة يبدأ عمل إنزيم Chitin synthetase إذ أن وظيفة هذا الأنزيم إضافة NAGA إلى نهاية سلسلة الكايتين لحين اكتمالها ، و إن إضافة مثبطات تكوين الكايتين تعمل بصورة رئيسة في هذه الخطوة (Mulla, 1991). يمتاز مثبط تكوين الكايتين Dimlin بفعاليته في السيطرة على آفات حشرية مختلفة و منها البعوض ، و وجد Arias and Mulla (1975) أن معاملة يرقات الطور الرابع لبعوض *Culex tarsalis coquillett* بتركيز ٠,٤ مايكرو غرام / لتر من مثبط تكوين الكايتين TH-6040 أدى إلى انخفاض معدل إنتاجية البيض بنسبة ٤٣% . و ذكر Mulla and Darwazeh (1976) أن منظم النمو Dimilin اظهر فعالية عالية ضد يرقات و عذارى بعوض *Culex , Anopheles* .و أشار Wegorek (1976) إلى أن معاملة العمرين اليرقيين الثاني و الثالث لحشرة *Agrotis segetum* (Schiff) بتركيز ٠,٥ جزء بالمليون من منظم النمو المذكور سبب نسبة هلاك بلغت٦٤,٤ و ٦٥,٢ % على التوالي . و قد اعتقد بأنه يؤثر في تخليق الكايتين في الغشاء حول الغذاء للقناة الهضمية الوسطى ويؤدي إلى إرباك في وظائفه مما يؤدي إلى موت اليرقات . و وجد Mohsen *et al* . (1988) إن مثبط تخليق الكايتين المذكور كان فعالا بتراكيز ٠,١- ٠,٠١ ملغم / لتر عند معاملة يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx.quinquefasciatus* .و ذكر العيسى (١٩٩٩) إن مثبط تكوين الكايتين المذكور احدث تشوهات مظهرية عديدة عند معاملة يرقات بعوض *Cx.pipiens* و تمثلت هذه التشوهات بفشل الانسلاخ و التصاق غلاف العذراء بأجزاء من الأجنحة و الأرجل . و قد وجد أن مثبط تكوين الكايتين قيد الدراسة بتركيز ٠,٠٠٨ غم / لتر سبب تثبيط نسبة بزوغ بعوض *Cx.*

Quinquefasciatus إلى ٥٠ % خلال ٧ إلى ٩ أسابيع . كما حقق استعمال مثبط تكوين الكايتين المذكور نجاحا ملحوظا في مكافحة الذبابة المنزلية *M.domestica* . و أن نسبة هلاك يرقات الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* بلغت ٨٤ % عند تعريضها لمنظم النمو المذكور بتركيز ٠,٤ مل / لتر ، (الكرعاوي ٢٠١٢) .

٢-٢-٤-المكافحة الوراثية Genetic control :

هذا النوع حديث نسبياً ويتضمن استخدام الآفات الضعيفة وراثياً لتحديد تكاثر أنواعها و بقائها في مجتمعاتها الطبيعية مثل هذه الآفات تنتج كميات كبيرة في المختبر وتطلق خلال المجتمعات البرية في الحقل للتزاوج مع الحشرات الاعتيادية والتي سوف لا تنتج أفراد جديدة أو تؤدي إلى عدم صلاحية ذريتها(مثل العقم) الفشل في التأقلم مع البيئة بصورة جيدة ، (إسماعيل ٢٠٠٩) . و المكافحة الحيوية تتم عن طريق التلاعب بتكوين الجينات التي تسيطر على فعاليات معينة في الكائن الحي بحيث يمكن تغيير هذه الفعاليات إلى ما يفيد في المكافحة مثل تشجيع الجينات المانعة لإنماء مسبب المرض الذي تأخذه المفصليات الناقلة أو الجينات التي تسيطر على انتشار المفصليات أو التفضيل الغذائي و الملجأ . و من هذه الطرق هي طريقة اعقام الذكور من الطرق التي أثبتت جدارتها اعقام ذكور البعوض وذباب النبر بتعريض الخادرات للإشعاع الذري بجرع كافية لأحداث الضرر بالحيامن بحيث لا يمكنها إخصاب البيضة ولكن في الوقت نفسه يقوم الذكر بعملية التفتيش عن الأنثى والتزاوج معها في الحقل . لقد استعملت هذه الطريقة بتوزيع وتحرير الملايين من الذكور العقيمة للحقل مما ينتج عنه الإبادة التامة لبعض الأنواع من البعوض الكيولكس و الأنوفيلس ولذبابة النبر الأمريكية ، (أبو الحب ١٩٧٨) . ومن الطرق الأخرى المستخدمة في المكافحة الوراثية هي طريقة **انتقال الكروموسومات** أو ما يسمى **بالحمل الوراثي أو التقنية الحياتية Chromusomal translocation or genetic load or biotechnology** ، أن الترتيب الطبيعي للكروموسومات يمكن أن يكسر بواسطة الأشعة أو بالمعاملة بالكيمياويات كما سبق الشرح ، غير إن إعادة الترتيب غير الطبيعي أو الانتقال لا يسبب العقم اعتيادياً ومع ذلك فان قابلية الإخصاب للحشرات تقل إلى درجات متفاوتة ولكن السلالة قد تتحمل عمليات الانتقال ولكن من المحتمل أن يكون الفرد عقيماً عندما يتزاوج بحشرات أخرى . أن السلالات المتنقلة تقل خصوبتها وتتعلق درجة العقم بعدد الانتقالات ومع ذلك قد يمكن تربيتها في المختبر بصعوبة إلا أنها في الحقل تتعرض للتزاوج مع السلالات الطبيعية و يكون الجيل الناتج منها عقيماً كلياً . لقد اقترح أن هنالك بعض الجينات مثل الحساسية للمبيدات يمكن نقلها إلى المجتمعات الطبيعية بواسطة أطلاق

حشرات مرباة في المختبر فإذا كان عددها أكثر من المجتمع الطبيعي و بنفس الحيوية فإنها ستسود و ينتج عن ذلك جعل المجتمعات الحشرية المعاملة عرضة للشكل التقليدي في المكافحة بالمبيدات و إزالة الصفات السيئة لبعض الآفات مثل قابليتها على نقل مسببات الأمراض و كذلك إدخال صفات التدهور من زيادة أعداد الذكور أو تقليل من طول العمر أو إنتاجها من البيض قليلاً وهكذا ، و إن استخدام هذه الطريقة يتطلب المعرفة الجيدة عن وراثة الأنواع المعينة من الآفات و هذا ما تحقق في رتبة ذات الجناحين فقط ، (إسماعيل ٢٠٠٩) . و أيضا من طرق المكافحة الوراثية هي طريقة **عقم الهجائن Hybrid sterility** بعض السلالات لأنواع من الآفات أظهرت قابلية عدم التوافق المتبادل و البيض الناتج عن مثل هذه التزاوجات غير مخصب وبذلك يكون إدخال سلالات غريبة قد يشجع في التأثر على المجتمع إن تضريب السلالات و تحت الأنواع أو الأنواع القريبة عادة يؤدي إلى إنتاج جيل هجين عقيم لكنه حيوي يمكن تربية الهجائن العقيمة و أطلاقها لإبادة المجتمعات الطبيعية . و كذلك هذه الطريقة هي من طرق المكافحة الوراثية و هي طريقة **عدم التطابق السايتوبلازمي Cytoplasmic incompatibility** وهي حالة تظهر عند تقريب مجتمعي من نفس النوع فيتم تلقيحاً ولكن دون إخصاب أو قد يحصل الإخصاب ولكن الأجنة تفشل جزئياً في التطور وذلك بسبب عدم مقدرة دخول الحيوان المنوي في سايتوبلازم البيضة مما يسبب عدم الالتحام الحقيقي بين نواة الحيوان المنوي وبين البيضة. درست هذه الحالة في بعوض الكيولكس *Culex sp* فأطلقت ذكور من سلالة غير مطابقة للتزاوج مع سلالات أخرى والنسل الناتج منها يكون ذو أفراد قليلة جداً إن إطلاق الذكور لأنها لا تعض ولا تنقل الأمراض وقد تتزاوج مرات عديدة . و أن مستقبل هذه المكافحة بالرغم من الصعوبات و المعوقات المصاحبة لاستخدام هذه المكافحة إلا أنها لها نجاحات و برامج واسعة حاليا في اليابان لإبادة **ذباب البطيخ والدودة اللولبية** في المكسيك وكذلك **ذباب فاكهة البحر المتوسط .** إن المكافحة الوراثية متخصصة وليس لها تأثيرات غير مرغوبة على الأحياء الأخرى غير المستهدفة كما في المبيدات وهذه الطريقة على المدى البعيد ذات توفير اقتصادي عالي ، (إسماعيل ٢٠٠٩) .

٢-٢-٥-المكافحة بطريقة الهرمونات الحشرية

الهرمونات هي مواد كيمياوية لها أهمية في عمليات التحول و الانسلاخ و تكوين الكيوتكل الجديد ، كما إن لها تأثيرات أخرى خاصة في مجال التكاثر إذ وجد أن لها تأثيرا مباشرا في نمو المبايض و نضج البويضات . لقد بذلت جهودا كبيرة في تصنيع هذه الهرمونات و أطلق عليها بالهرمونات المصنعة و استعمالها في مجال مقاومة الحشرات . و ذكر (Lafont and Wilson

(1996 أن هذه المواد امتازت بثباتيه عالية نوعا ما و انتخابية عالية جدا على الأنواع المهمة في المكافحة ، و لغاية الآن تعد غير سامة للثدييات و الطيور و الأسماك ، (الكرعاوي ٢٠١٢) .

٣-المواد و طرائق العمل :

٣-١-الأوساط الزرعية للبكتيريا *Bacillus thuringiensis*

١- وسط الأكار المغذي Nutrient agar:

أذيبت مكونات هذا الوسط بحسب الكميات الموصى بها (٢٨) غم في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعة ١ لتر و عقم بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١° م و ضغط ١ جو لمدة ٢٠ دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد ثم صب الوسط في أطباق بتري بقطر ٩ سم و ترك الوسط ليتصلب ، بعد ذلك لقحت الأطباق بالنمو البكتيري من مزرعة البكتيريا و حضنت بدرجة حرارة٣٥° م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ، (الكرعاوي , ٢٠١٢ ؛ المشكور؛الحميداني , ٢٠١٤) .

٢- وسط المرق المغذي Nutrient broth :

يستعمل هذا الوسط لغرض إكثار البكتيريا من خلال تنميتها عليه ، و قد تم تحضير هذا الوسط حسب توصيات الشركة المنتجة و ذلك بأخذ ٣,٢ غم منه و أضافته إلى ٢٥٠ مل ماء معقم ، بعدها عقم الوسط الزرعي المحضر في دورق زجاجي نظيف ربع لتر بجهاز الموصدة Autoclave و بدرجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١ جو لمدة ٢٠ دقيقة ، (الكرعاوي , ٢٠١٢ ؛ المشكور؛ الحميداني , ٢٠١٤).

٣-٢-مصدر البكتيريا *Bacillus thuringiensis*

تم الحصول على مزرعة البكتيريا *Bacillus thuringiensis israelensis* من قبل الأستاذ الدكتور حسام الدين عبد الله / كلية الزراعة / جامعة بغداد .

٣-٣-حفظ عزلة البكتيريا *B.thuringiensis*

حضر وسط (Nutrient agar) و صب في أنابيب اختبار سعة ١٥ مل و وضعت بشكل مائل و بعد التصلب لقحت الأنابيب بطريقة التخطيط Streaking بوساطة ناقل معقم بأخذ جزء من المستعمرات البكتيرية . و وضعت الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٥° م لمدة يومين . و بعدها حفظت تلك الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة٤° م ، (الكرعاوي , ٢٠١٢) .

٣-٤- تحضير المعلق البكتيري

بعد تحضير ١٥٠ مل من المرق المغذي (Nutrient broth) و وضعه في دورق زجاجي سعة ٢٥٠ مل ، ثم عقم بجهاز الموصدة ثم ترك ليبرد بعد ذلك لقح هذا الوسط الزرعي بالبكتيريا النامية على وسط الأكار المغذي بعمر ٤٨ ساعة ، بعد ذلك حضن الدورق في درجة حرارة ٣٥° م لمدة ٤٨ ساعة ثم رشحت المزرعة الناتجة بقطع من الشاش المعقم و حسب عدد المستعمرات في المعلق بطريقة العد المباشر في الأطباق و ذلك بأخذ ١ مل من المعلق البكتيري المخفف إلى (10^{-6}) و لقحت به اطباق الوسط البكتيري (الأكار المغذي) بثلاث مكررات و بعد وضع الاطباق في الحاضنة على درجة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة حسبت عدد المستعمرات النامية في كل طبق و استخرج معدلها لثلاث أطباق وضرب في مقلوب التخفيف حيث تم الحصول على معلق بتركيز (3×10^{-6} بوغ/مل) للحصول على التراكيز التالية (3×10^{-5} و 3×10^{-4} و 3×10^{-3} و 3×10^{-2}) بوغ /مل حساب المستعمرات النامية في الأطباق و استخراج كثافة البكتيريا حسب المعادلة و كالآتي :

عدد المستعمرات في ١ مل من المعلق البكتيري = معدل عدد المستعمرات النامية في الأطباق × مقلوب التخفيف .

٣-٥- الأختبار الحيوي

٣-٥-١-الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتيريا *B.thuringiensis* في نسب هلاك الأطوار اليرقية الأربعة لبعوض *Culex pipiens*.

حضرت أربع مكررات ، حيث اخذت اليرقات من كل طور من الاطوار الاربعة لكل تركيز ووزعت على اربع اوان ثلاث يحتوي كل منها على (١٠٠ مل) ماء مقطر معقم مزود ب (١٠ ملغم / اناء) غذاء يرقات معقم أضيف إليه (٢٠٠ مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق البكتيري أما الرابع الذي يمثل معاملة السيطرة فترك بدون اضافة المعلق ، بعد ذلك حضنت المعاملات في درجة حرارة ٣٥±٢ مْ وفترة ضوئية ١٠: ١٤ (L/D) ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك لمدة ١٢٠ ساعة وصححت قيم الهلاك

% الهلاك المصححة =نسبة الهلاك في المعاملة – نسبة الهلاك في السيطرة / ١٠٠- نسبة الهلاك في السيطرة × ١٠٠

٣-٦-التحليل الاحصائي

صممت التجارب المختبرية على وفق تصميم التجربة العاملية (Factorial experiment) وفق التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D) واستعمل اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference(L.S.D) في تشخيص الفروقات الاحصائية بين المعاملات تحت مستوى معنوية (٠,٠٥) (المشكور , ٢٠١٤).

النتائج و المناقشة :

٤-١-الأختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتيريا *B. thuringiensis israelensis* التي تؤثر في معدلات نسب الهلاك في مختلف أدوار حياة بعوض *Cx.pipiens*

٤-١-١-الإختبار الحيوي في البيوض و العذارى و البالغات:

عدم وجود أي تأثير للتراكيز المختلفة من المعلق البكتيري في بيوض و عذارى و بالغات بعوضة *Cx.pipiens* ، (الحميداني , ٢٠١٤) كما أكد Hilbech *et al.* (1998) أن البكتيريا لا تؤثر على البيوض لأن أساس عملها يحدث داخل معدة الحشرة . كما اتفقت هذه النتائج مع ما وجدته الكرعاوي) (2012عند معاملة بيوض نوعي من البعوض *An.pulcharrhimus* و *Cx.quinquefasciatus* حيث وجدت أن أبواغ بكتيريا *B.thurigiensis* لم تحدث أية نسبة للهلاك ، (المشكور,٢٠١٤).

أما بخصوص العذارى فقد اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Kruger *et al.* (1991) عندما عرض عذارى بعوضة *An.gambiae* لأبواغ بكتيريا *B.thuringiensis var. israelensis* حيث كانت نسبة هلاكها 1% ، و لم تسبب هذه البكتيريا أية نسبة للهلاك عند تعريضها لعذارى *Chrysoperla carena*، و قد أشار Hilbeck *et al.* (1998) أن سبب عدم تأثير البكتيريا في العذارى إلى أن العذارى لا تتغذى ، (المشكور , ٢٠١٤).

و فيما يخص البالغات فقد أتفقت هذه النتائج مع ما وجده Saitoh *et al.* (1998) عندما عرض بالغات *Ae.aegypti* لابواغ البكتيريا المذكورة بتركيز $10^6 \times 2.5$ بوغ/ مل لم تحدث أية نسبة للهلاك . كما تشابهت هذه النتائج مع الكرعاوي (2012) عندما عرضت بالغات *An.pulcharrhimus* و *Cx.quinquefasciatus*لابواغ بكتيريا *B.thuringiensis* حيث كانت نسبة هلاك بعوض الانوفلس 33.33% بتركيز $10^7 \times 2$ بوغ / مل ، أما بعوض الكيولكس فلم تحدث فيه أية نسبة للهلاك ، إن سبب عدم تأثير البكتيريا في البالغات قد يعود إلى قلة تعرض البالغات لها إضافة إلى طريقها في التغذية لأن فعالية البكتيريا لا تظهر إلا عند وصولها إلى الأمعاء الوسطى ، إذ أن فرصة دخولها إلى أمعاء الحشرات البالغة تكون قليلة جداً بالمقارنة مع اليرقات ،(المشكور ,٢٠١٤).

٤-١-٢-الأختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الأربعة

إن تأثير تراكيز مختلفة من المعلق البكتيري لبكتيريا *B.thurigiensis israelensis* يشير إلى أن أعلى نسبة هلاك للطور الأول بلغت ٩٠% عند تركيز ٣×١٠^٥ بوغ /مل بعد ١٢٠ ساعة من المعاملة ، في حين بلغت أوطأ نسبة هلاك لبعوض *Cx. pipiens* قد وصلت إلى ٥٠% عند التركيز ٣× ١٠^٢ بوغ/مل . ومن خلال الجدول التالي يبين نسبة الهلاك

جدول(٤-١) تأثير تراكيز مختلفة من معلقات الكتيريا *B.thuringiensis* في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوض *Cx,pipiens*

الطور	التراكيز بوغ/مل	النسبة المئوية للهلاك بعد مرور (الساعة)		
		٢٤	٧٢	١٠٠
الأول	٣ × ١٠^{٢}	٢٦,٦٦	٤٠,٠٠	٦٣,٠٠
	٣ ×١٠ ^{٣}	٣٠,٠٠	٥٠,٠٠	٧٦,٦٦
	٣ × ١٠^{٤}	٤٠,٠٠	٥٦,٦٦	٨٣,٣٣
	٣ ×١٠^{٥}	٤٦,٦٦	٦٣,٠٠	٩٠,٠٠
	control	0	0	0
الثاني	٣×١٠^{٢}	٢٣,٣٣	٣٠,٠٠	٤٦,٦٦
	٣×١٠^{٣}	٢٦,٦٦	٣٦,٦٦	٥٣,٣٣
	٣×١٠^{٤}	٣٠,٠٠	٥٠,٠٠	٦٠,٠٠
	٣×١٠^{٥}	٣٣,٣٣	٦٠,٠٠	٨٠,٠٠
	control	٠	٠	٠
الثالث	٣×١٠^{٢}	١٦,٦٦	٢٠,٠٠	٣٦,٦٦
	٣ ×١٠ ^{٣}	٢٠,٠٠	٢٦,٦٦	٤٦,٦٦
	٣×١٠^{٤}	٢٦,٦٦	٣٦,٦٦	٥٣,٣٣
	٣×١٠^{٥}	٣٠,٠٠	٥٠,٠٠	٦٦,٦٦
	control	٠	٠	٠
الرابع	٣×١٠^{٢}	١٠,٠٠	١٦,٦٦	٣٠,٠٠
	٣×١٠^{٣}	١٦,٦٦	٢٠,٠٠	٣٦,٦٦
	٣×١٠^{٤}	٢٣,٣٣	٣٣,٣٣	٤٦,٦٦
	٣×١٠^{٥}	٢٦,٦٦	٤٣,٣٣	٦٠,٠٠
	control	٠	٠	٠

الأستنتاجات و التوصيات :

الأستنتاجات :

١- أن بكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* تصيب يرقات البعوض وتسبب موت اليرقة.

٢- أثرت تراكيز المعلق البكتيري تأثيرا واضحا في مختلف أدوار حياة بعوض *Cx.pipiens* ولكن بصورة متباينة فقد أبدت البيوض و العذارى مقاومة ملحوظة ، بينما هلكت اليرقات و البالغات بنسبة أكبر .

٣- مقدرة البكتيريا *Bacillus thuringiensis* على النمو في الأوساط الحاوية على المبيدات المنتخبة .

٤-لم تؤثر تراكيز المعلق البكتيري في البيوض و العذارى و البالغات ، بينما كان تأثيرها واضحاً في اليرقات .

التوصيات :

أجراء دراسة تفصيلية على البكتيريا *B.thuringiensis* و تقدير أمكانية استعماله في المقاومة الحيوية لأنواع أخرى من البعوض .

المصادر..... References

المصادر بالعربية :

أبو الحب ، جليل كريم . ١٩٧٨ . الحشرات الناقلة للأمراض . كلية الزراعة – جامعة بغداد .

أبو الحب ، جليل كريم . ١٩٧٩ . الحشرات الطبية و البيطرية في العراق ، (القسم النظري) . كلية الزراعة - جامعة بغداد .

العادل ، خالد محمد و عبد ، مولود كامل . ١٩٧٩ . المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . دار الكتب للطباعة و النشر . جامعة بغداد .

الحميداني . هند صالح محميد . ٢٠١٤ . تأثير بعض العوامل الكيميائية و الفيزيائية في كفاءة البكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* و منظم النمو Genterol و المبيد الفسفوري العضوي Temephos ضد الأدوار غير البالغة لبعوض *Culex pipiens L.* (Diptera : Culicidae) . رسالة ماجستير . كلية العلوم للبنات . جامعة بابل .

الرهوي ، حسن محمد حسن . ٢٠٠٠ . تأثير مبيد بايروثرويدي و منظم نمو حشري و بعض مستخلصات النيم في بعض أدوار البعوض *Culex pipiens L.* (Diptera : Culicidae) . رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

العمرو . سليمان عبد الرحمن . ٢٠٠٥ . دراسة مفترسات البعوض المائية و تقييم كفاءتها الإفتراسية على يرقات و عذارى بعوض ***Culex quinquefasciatus*** Say , 1823 في منطقة الرياض .

إسماعيل . أياد يوسف الحاج . ٢٠٠٩ . الإدارة المتكاملة للآفات الحشرية . كلية التربية – جامعة الموصل .

القناوي . أحمد . ٢٠١١ . البكتيريا الممرضة للحشرات . ماجستير المكافحة المتكاملة – معهد البحر المتوسط للزراعة – باري – ايطاليا .

الكرعاوي . هناء رحمن لفتة . ٢٠١٢ . دراسة مختبرية لكفاءة بعض طرائق السيطرة في نوعين من البعوض . رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة القادسية .

المشكور ، براء جليل سعيد . ٢٠١٤ . تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الجرثومية في السيطرة على البعوض Culex quinquefasciatus (Diptera : culicidae) . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة القادسية .

هلال و حسين ، سعدي محمد هلال و حنين مهدي حسين ، ٢٠١٣ . أنماط التغذية الدموية لبعوض *Culex pipiens L.* (Diptera : Culicidae) على عوائل فقارية مختلفة في مركز مدينة الحلة / العراق . كلية العلوم للبنات . جامعة بابل . مجلة جامعة بابل . العدد (٧) / المجلد (٢١) .

خلف ، جنان مالك و عبد الوهاب ، أياد عبد القادر و نبيان ، ليلى عبد الرحيم . ٢٠٠٤ . المكافحة الإحيائية و الكيميائية ليرقات و بالغات البعوض *Culex quinquefasciatus Say* (Diptera : Culicidae) مختبرياً . مجلة البصرة للعلوم . ٢٢ (١) : ٤٦-٦٢ .

جرجيس ، سالم جميل و أمين ، عادل حسن . ١٩٨٧ . الحشرات و العنكبوتيات الطبية و البيطرية . كلية الزراعة و الغابات . جامعة الموصل . ٢٥٥- ٢٦٢ صفحة .

عبد القادر ، أياد عبد الوهاب . ١٩٩٤ . يرقات البعوض في البصرة و دور بعض الأسماك المفترسة في مكافحتها . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة البصرة . ٩١ صفحة .

عبيس ، حمزة كاظم و عواد ، شعبان داود و سليمان أرديني و طه ، نزار مصطفى . ١٩٨٧ . دراسات على دودة ثمار الفستق (عثة الطحين الهندية) مع طرق مكافحتها باستخدام مبيدات البايروثرويد . مجلة الرافدين المجلد (١٩) العدد١ : ٢٢١ – ٢٣٣ .

العيسى ، رافد عباس علي . ١٩٩٩ . تأثير منظمي النمو (Methoprine) Altosid و (Iufenuron) Match على حياتية بعوض *Culex molestus* و *Culex quinquefasciatus* . رسالة ماجستير كلية الزراعة . جامعة بغداد .

مهنة ، فلاح لعيبي و حسن ، عبد الجليل ناجي . ٢٠٠٣ . نواقل الملاريا دليل الاكتشافات و السيطرة . مركز السيطرة على الأمراض الانتقالية . العراق . مكتب النخبة للطباعة .

سيرفس ٦ م و . ١٩٨٤ . المرشد إلى علم الحشرات الطبية . ترجمة علي محمد سليط ، زهير يونس الصفار و رياض أحمد العراقي . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . جامعة الموصل .

فرغل ، أحمد إبراهيم . ١٩٧٩ . اتجاهات حديثة في مكافحة بعوض الكيوليسيني . رسالة دكتوراه مقدمة إلى كلية الزراعة – جامعة أسيوط ، ١٤٢ ص .

عرجون ، درية محمود بكري . ٢٠١١ . A contribution to the study of *Culex spp*. (Diptera : Culicidae) distribution in the north of Aleppo . جامعة حلب . رسالة ماجستير.

إبراهيم ، نيفين عبد الغني محمد إبراهيم . ٢٠٠٨ . علاقة المبيدات الحشرية بالبيئة و الإنسان . باحث بمعهد بحوث صحة الحيوان – قسم الباثولوجي – معمل بيطري أسيوط . مجلة أسيوط للدراسات البيئية . العدد ٣٢ .

جعفر ، محمد عادل و عبد الكريم عبد الرزاق القزاز ، علي صادق محمد . ٢٠١٣ . دور البلازميدات في إنتاج البلورات البروتينية في بكتيريا *Bacillus thuringiensis* المعزولة محلياً . قسم التقنيات الإحيائية – كلية العلوم – جامعة بغداد – العراق . المجلة العراقية للعلوم . المجلد ٥٤ . العدد ٢ . الصفحة ٣٠١ – ٣٠٦ .

المصادر باللغة الأنكليزية

Achille , G.N. ; Houssou S. C. ; Li Y. 2010 . Effect of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (H – 14) on *Culex* , *Aedes* and *Anopheles* larvae (Cotonou ; Benin) . stem cell.

Aïssaoui , Linda and H. Boudjelida . 2014 . Larvicidal activity and influence of *Bacillus thuringiensis* (Vectobac G) , on longevity and fecundity of mosquito species . Pelagia Research Library . Europ. J. of Experi. Bio., 4(1) : 104- 109 . ***Available online at (www.pelagiaresearchlibrary.com)***

Arias , J.R. and Mulla , M.S.1975 . Morphogentic aberrations induced by ajavenile hormone analogue in the mosquito *Culex trasalis* (Diptera : Culicidae) . J. Med. Entomol . 12: 309 – 316 .

Ben- Dov , Eita . 2014 . *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins . Department of Life Sci. Achva Academic College .*toxin* ISSN 2072-6651.(www.mdpi.com/journal/toxins)

Buescher , M. D. and Bickley W. E. 1979 . The second blood meal of the northern house mosquite : bird vs> human blood . Mosq. News. 39 : -96 .

Chander , F. ; Darrit , F. ; Doannio , J.M.C. ; Riviere , F. ; Pasteur , N. and Guillet , P. 1997 . Distribution of organophosphate and carbomate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae) in west African . J. Med. Entomol . 34 : 664- 671 .

Dehghan , Hossein ; Seyed H. M. Kazemi ; J. Sadraei ; H. Soleimani . 2014 . The Ecological Aspects of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) in Central Iran . J. Arthropod – Borne Dis . 8 (1) : 35 – 42.

Hougard , J.M. ; Zaim , S.D. ; Gillet , P. and Bifenthrin . 2002 . Ausful pyrothroid insecticide for treatment of mosquito nets . Journal of medical Entomology , 15 : 12 – 105 .

James , M.T. and Harwood , R.F. 1969 . Herms medical entomology 6th Ed. Acadmic press , New Yourk and London . 348 pp .

Lafont , R. and Wilson , I. 1996 . The ecdyson hand book chromatographic society , Nottingham , UK , 2th Ed

Laurence , Després ; L. Christophe and F. Roger . Using the Bio- Insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in Mosquito Control . *[1]Laboratoire d'Ecologie Alpine , UMR CNRS 5553 , Grenoble . [2]Entente Interdépartementale de Démoustication , Montpellier .[3]UMR 17 , Cirad , Campus International de Baillarguet , Montpellier France* .(www.intechopen.com) .

Lepe , Mario R. , Montserrat R.S. Biological Control of Mosquito Larvae by Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis . *1Instituto Tecnológico de Veracruz, UNIDA, Veracruz . 2Université de Haufe-Alsace, LVBE EA-3991, Colmar, [1] Mexico, [2]France.* (www.intechopen.com)

Service , M.W. 1967 . *Tachydromia spp*. (Diptera : Empididae) as predators of adult *anophelinae* mosquitoes . Entomologists Monthy magazine . 104 : 250 – 251 .

Mohsen , Z.H. and Mehdi , N.S. 1988 . The efficacy of Arosurl and MSF and peteroleum oils GB – 1111 and GB – 1356 against *Culex quinquefasciatus Say* . (Diptera : Culicidae) . Insect Sci . Appl . 10 : 33 – 219 .

Mohsen , Z.H. ; Ouda , N.A. ; Mehdi , N.S. ; Zaiya , H.H. and Al-Chalabi , B.M. 1989 . Toxicity of Various Larvicides and Formulation against Larva and pupae of *Culex quinquefasciatus* and other non target arthropods proc. Sci. Conf . , Baghdad (2) : 113 – 115 .

Mulla , M.S. and Darwazeh , H.A. 1976 . The IGR Dimlin and its Formulation against mosquitoes . J.Econ . Entomol . 64 (3) : 304 – 312 .

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

Mulla , M.S. 1991 . Biological Control of Mosquitoes with Entomopathogenic Bacteria . Chinese J. Entomol . Spec. Publ. No. 6 .

Miura , T . and Takahashi , R. 1988 . Predation of *Microvelia pulchella* (Hemiptera: Veliidae) on Mosquito Larvae. *J.* of the American Mosquito Control Assoc . , 4 (1) : 91 – 93 .

Miller , B. R. , M. B. Crabtree and H. M. Savage . 1996 . Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species , including the Culex pipiens complex , inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA . Insect Molecular Biology . 5 (2) : 93- 107 .

Martin , Chiumia and C. Mhango . 2014 . Efficacy of *Bacillus thuringiensis var. israelinsis* (*Bti*) on *Culex* and *Anopheline* mosquito larvae in Zomba .Malawi J. of Sci. and Tec. Vol. (10) : ISSUE 1 .

Magnarelli , L. A. 1977 . Host feeding patterin of Connecticut mosquitoes (Diptera : Culicidae) . Am J. Trop. Med . Hyg. 26 : 547 – 552 .

Prabakaran , V. 1992 . Predatory Potential of *Diplonychus indicus* (Hemiptera : Belostomatidae) on Mosquito Larva . J. Ecobiol . , 4 (3) : 169 – 175.

Tawfik , M. F. , El- Borollosy , F.M. , Hemeida , I. A. and Agamy , E. 1990 . The Life History of *Sigara Selecta* (Fieber) (Hemiptera : *Corixidae*) . *Bull – de – la – Societe – Entomologyique - d´ Egypte ,* 69 : 315 – 325 .

Sorkin , M.N. ; Adamishina , T.A. ; Stepuov , A.P. ; Ivanova , V.L. and Evmishev , I.U.V. 1991 . The seasonal changes in the resistance and irritability to insecticides malaria mosquito in karakalpakia . Med. Pavazitol Mos. 4 : 9 – 12 .

Subra , R. 1983 . Biology and control of *Culex pipiens quinquefasiatrus Say* (Diptera : *Culicidae*) with special reference to Africo Insect . Sci . Appli 1 : 314 – 338 .

Weaver , J.E. and Begle , W. 1982 . Laboratory evaluation of Bay sir – 8514 against the *House fly* (Diptera : *Muscidae*) . effect on immature stages and adult sterility . J. Econ . Entomol. 75 : 657 – 661 .

Wegorek , W. 1976 . Laboratory experiments with Dimlin Wp 25 against Larvae of *Agrotis segetum* (Schiff) and memstra brassicae , L. Bull . De. Academel . Polonai – SE – Des –Sci – Scrie – des sciences Biologques – q : 509 – 515 .

Weiser , J. and Matha , V. 1988 . Tolypin , anew insecticidal metabolite of fungi of the genus *Tolypocladium* . Journal of the invertebrate pathology 51 : 94 – 96 .

Yadav , J.S. 2009 . Centere for bioinformatics vector control . Environmental information system . India . 1-5 .

Zulfaidah , P.G. and N. Nakagoshi . 2014 . Safe Strategy to Control Mosquito: The Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolated Indigenously from East Java as a Natural Agents of Mosquito: *Aedes aegypti* . *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3 (2) : 179 – 197 .