وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة تأثير بكتريا *Bacillus thuringiensis* في خنافس الرز

بحث تقدم به الطالب عمار جبار حمود الى مجلس كلية

العلوم

وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس
في كلية العلوم

باشراف

م.م هناء رحمن لفته

1440هـ 2019م

بسم الله الرحمن الرحيم

(هُوَ الَّذِي أَنزَلَ مِنَ السَّمَاء مَاء لَّكُم مِّنْهُ شَرَابٌ وَمِنْهُ شَجَرٌ فِيهِ تُسِيمُونَ (10) يُنبِتُ لَكُم بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالأَعْنَابَ وَمِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (11))

صدق الله العلي العظيم

النحل / 10 - 11

الى من سير الله الحياة من اجلهم

(ائمتنا الطاهرين "ع")

الى من سقت دمائهم ارض العراق وتربته

(الشهداء)

الى الذي اوصاني ربي ببره

(والدي العزيز)

الى من يرفرف قلبها بالحب و الحنان و الدعاء لي

(والدتي العزيزة)

الى ينابيع الحياة و عطائها ونورها و نهجتها

(اخوتي و اخواتي)

الى شريكة حياتي

(زوجتي العزيزة)

الى كل من رفع يده بدعوة صادقة كانت سببا في

توفيقي

(فخرا و اعتزازا)

اليهم جميعا اهدي ثمرة جهدي

في نهاية المطاف بعد ان انبعث الثمار و حان القطاف لا

يسعني الا ان اشكر الله سبحانه و تعالى على ما اولاني

به من جليل نعمائه وعظيم سلطانه واحمده و استزيده من

فضله و جوده و احسانه على نعمه التي لا تحصى ومن تلك

النعم التي من الله علي اكمال هذا البحث والى الاستاذة

الفاضلة (د. هناء رحمن لفته) الذي علمتني كيفية البحث

و نورتني بالمعلومات المفيدة

اسدى الله الجميع الخير والفلاح

الخلاصة

تم أختبار تأثير بكتريا ***Bacillus thuringiensis*** على خنافس الرز (الحوريات و البالغات) حيث اوضحت النتائج ان المعلق البكتيري عند التركيز (3× 10^5 بوغ/ مل) قد اعطى اعلى نسبة للهلاك بالنسبة للحوريات حيث بلغت النسبة 70% عند تعرضها للابواغ السامة لمدة 72 ساعة , بينما بلغت أوطأ نسبة للهلاك 30% عند التركيز (3×

10^2 بوغ / مل) خلال 72 ساعة , اما بالنسبة لبالغات الخنافس فقد بلغت اعلى نسبة هلاك عند التركيز (3× 10^5 بوغ/مل) ولمدة 72 ساعة هي 55% بينما اقل نسبة هلاك عند التركيز (3× 10^2 بوغ/مل) للمدة نفسها قد بلغ 23%, حيث تبين مما تقدم ان تاثير بكتريا ***Bacillus thuringiensis*** على الحوريات اعلى من تاثيرها على البالغات فهذا يعني انها اكثر حساسية من البالغات ويرجع ذلك الى تعرض الحوريات للسموم اعلى من البالغات و كذلك سرعة النفاذية داخل الاغشية الخلوية للحوريات التي تسمح بمرور البلورات السمية داخلها حيث يؤدي ذلك الى شلل القناة الهضمية و اعصاب الحشرة و بالتالي يؤدي الى موتها بعدة مدة زمنية تتراوح بين 24 – 72 ساعة .

1- المقدمة

1-1 حشرة خنافس الرز (*Sitophilus oryzae*)

تعتبر خنافس الرز افة شائعة لجميع الحبوب المخزونة ومن ضمنها الرز فوجدت في اغلب المناطق التي يزرع فيها الرز , حيث تعد حشرة خنافس الرز (*Sitophilus*

oryzae) من المتغذيات الداخلية للعديد من الحبوب المخزونة بعد حصادها و المحتفظ بقشورها تضع الاناث بيضها بشكل مفرد او بشكل صفوف فوق السطح الخارجي للحبوب تحفر اليرقات حديثة الخروج في داخل الحبة وتقضي فترة تطورها لغاية الوصول الى طور البالغ[1] وعند بلوغها طور البالغة تعمل ثقب كبير للخروج وتظهر الحشرة البالغة من الحبوب , ان افضل طريقة لمقاومة هذا الافة هو مقاومة البالغات قبل بدء تكاثرها وانشاء مستعمرة لها على الحبوب او مقاومة اليرقات حديثة الخروج من البيضة قبل دخولها الى الحبوب تطبيق طريقة وقاية حماية الحبوب يعطينا فترة طويلة من الوقاية ضد البالغات واليرقات بالعمر الاول لحشرة الرز (*Sitophilus oryzae*) على الحبوب المخزونة , تؤثر بكتريا ***(Bacillus thuringiensis)*** على تحول الاطوار غير البالغة للحشرات من ضمنها حشرة الرز , حيث تعتبر بكتيريا ***(B. thuringiensis)*** من السموم الحشرية حيث تؤثر على البيض و الطور اليرقي للحشرات المنتجات المخزون ويوقف انتاج النسل في حشرة الرز.

ويعد الرز من المحاصيل المهمة اقتصاديا في اغلب دول جنوب شرق اسيا الصين اليابان و اجزاء من اوروبا والولايات المتحدة الامريكية و هناك اضرار اقتصادية من اصابة حشرة (*S. oryzae*) و الضرر الحقيقي هو فقدان وزن الحبوب وتلوث المنتجات ويخزن الرز عادتا على شكل شلب (رز غير مقشر) قبل ان تزال منة القشور وينظف للاستهلاك المباشر او الاستخدامات الاخرى وحبوب الرز الخشن لها صفات تختلف عن عديد من الحبوب الاخرى وتحتوي على حراشف و قنابة وعلى السيليكا او حامض السيليكا في الجزء الخارجي من القشور مما يزيد نسيج القشرة الخشن من التصاق البكتريا المثبطة بالقشرة الذي تستعمل في مقاومة (*S. oryzae*).

[1] Arbogast, R.T. 1991, Beetles; Coleoptera in: J.R. Gorham, Editor. Ecology and Management of Food Industry Pest. Association of Official Analytical Chemists. p.131-176.

صورة رقم (1) توضح خنفساء الرز

1-1-2 تصنيف حشرات خنافس الرز

الاسم العلمي **Sitophilus oryzae** :

Kingdom *: animals*

Phylum :*Arthropoda*

Subphylum: ***Mandibulata***

Class : ***Insecta***

Subclass : ***Pterygot***

Order*:* ***Coleoptera***

Suborder*:* ***Polyphaga***

Family: ***Curculionidae***

Type*:* ***Rice sousse***

2-1-2 دورة حياة خنافس الرز

تعيش الخنافس الكاملة مدة طويلة تتراوح بين 7-10 أشهر وتضع إناثها بيضها في حفر تصنعها بخرطومها في الحبوب ثم تغطيها بإفراز صمغي وتتراوح ما تضعه أنثى خنافس الرز(Sitophilus oryzae) 300-400 بيضة وتفقس البيض بعد عدة أيام إلى

يرقات عديمة الأرجل تتغذى داخل الحبة ثم تتحول داخلها بعد تمام نموها إلى عذراء داخل شرنقة , وعادة ما يعيش في أحد نصفي الحبه ويستهلك حوالي ربع مكوناته حتى وصوله إلى الطور الكامل , وتخرج الحشرة الكاملة بعد أن تصنع لها ثقباً تخرج منه وتبلغ مدة الجيل بن أربعة وسبعة أسابيع ، وللحشرة ما بين خمسة أجيال في السنة [2].

3-1-2 - وصف الحشرة

تتميز خنافس الرز بلونها البني المحمر مائل للسواد تقريبا و يوجد عليها أربع بقع حمراء فاتحة أو مائلة للاصفرار على الأجنحة الأمامية والصدر فيه ثغرة مستديرة الشكل, وكما تملك الخنافس خرطوم مستطيل يحوي في نهايته زوج من الفكوك العليا، يبلغ طول الخنافس 2.5 مم كما تملك خنافس الرز اجنحة خلفية تمكنها الطيران وهذا ما يميزها عن خنافس السوس الاخرى[3].

[2] رضوان محمد توفيق خفاجي , اساسيات تصنيف الحشرات ,ط1 , جامعة الجزيرة , 2010م , ص 185

[3] رضوان محمد توفيق خفاجي , اساسيات تصنيف الحشرات ,ط1 , جامعة الجزيرة , 2010م , ص 176

صورة رقم (2) توضح بيضة و حوريات وبالغات خنافس الرز

2-2 طرق مكافحة الخنافس

2-2-1 الطريقة الكيميائية

هناك طريقتان أساسيتان لمكافحة آفات الحبوب و المواد المخزونة كيميائيا ,المبيدات الحشرية بالملامسة (contact insecticides) والمدخنات (fumigants).

وعند مكافحة خنافس الرز تستعمل المبيدات الكيميائية بطرق عديدة و في صور مختلفة , ومن المهم استعمال المبيد في الصورة الصحيحة , وبالآلة المناسبة , حيث هناك عدة طرق لاستخدام المبيدات لمكافحة الخنافس منها [4]:

[4] اياد يوسف الحاج اسماعيل , الادارة المتكاملة للآفات الحشرية , قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة الموصل , العراق , 2009 , ص 65

1-1-2-2 المسحوقات الفعالة المخففة Active dusts

و تكون جاهزة للاستعمال مباشرة , ولا تحتاج الى تخفيف , يحتوي معظمها على 0.1 - 5 % مادة فعالة , و الباقي مادة حاملة او مخففة ,و يراعى الاحتفاظ بها جافة حيث ان كفاءة المبيد تتدهور بارتفاع الرطوبة بالإضافة الى صعوبة تعفيره بانتظام ,و تستخدم هذه المسحوقات في الحالات الآتية :

- الخلط المباشر مع حبوب الرز الحاوية على خنافس الرز.
- تعفير السطوح الخارجية لأكياس الحبوب أو عبوات المواد الغذائية ,لمنع الإصابات الجديدة.
- التعفير حول كومة الحبوب او المادة الغذائية لمنع زحف الخنافس إليها.

2-1-2-2 المركزات القابلة للاستحلاب Emulsifiable concentrates [5]

و هي مركزات تستحلب بتخفيفها بالماء قبل استعمالها رشا على الحبوب الحاوية على الخنافس حيث تستعمل لبالغات الخنافس اكثر من الحوريات لانها تصيب المناطق السطحية من الحبوب وقليلة النفاذية الى الحبوب التي تحوي الحوريات في وسطها .

3-1-2-2 الايروسولات و المضببات و مولدات الدخان Aeroslos,fogs and smoke generator

في الايروسول يخلط المبيد مع غاز (Freon) يبلغ قطر جزيئات المبيد 2-50 ميكرون ,و تبقى معلقة في الهواء فترة و تتأثر بحركة الهواء و تتخلل الشقوق و الفجوات و تترسب ببطء, ولابد من استعمالها في حيز مغلق.

[5] احمد لطفي عبد الاسلام , الافات الحشرية في مصر و البلاد العربية وطرق السيطرة عليها , ج2 , مج2 , المكتبة الاكاديمية للنشر و التوزيع ,جامعة الاسكندرية , مصر ,1993, ص 153.

و في المضببات يخلط مع المبيد زيت معدني خفيف و عن طريق الآلات خاصة تخرج جزيئات المبيد بالهواء المضغوط او بإسقاط المبيد على اسطوانة سريعة الدوران او مع هواء ساخن او غازات عادم ساخن او بخار يحيل المبيد إلى جزيئات متناهية الصغر تشبة الضباب.

أما مولدات الدخان فيخلط فيها المبيد مع مادة تولد الدخان بكثافة ند حرقها كالشموع و السكر ,او خليط من السكر و كلورات البوتاسيوم , ولهذه الأدخنة خصائص الايروسولات نفسها .

2-2-1-2 المدخنات Fumigants

و هى عبارة عن غازات او أبخرة تقتل الخنافس بعد وصولها إلى داخل جسم الحشرة عن طريق الجهاز التنفسي[6].

2-2-1-2-1 المبيدات الحشرية بالملامسة Contact insecticides

مواد لها القدرة على اختراق جلد الخنافس و الوصول إلي أنسجة الجسم لتقتلها بتأثيرها الكيميائي السام ,و الصالح من هذه المواد للاستخدام على المواد الغذائية المخزونة محدود العدد ,نتيجة لما قد تكسبه المادة المعاملة من رائحة معينة او طعم غريب ,و نتيجة للمتبقيات السامة التي تظل عالقة بها , وتخلط هذه المبيدات مع مواد حاملة او مخففة مثل بودرة التلك او الكاؤولين لضمان تجانس التوزيع ,و تستعمل عادة في معاملة الحبوب المعدة للتقاوي او للاستهلاك الآدمي و من أمثلتها :

1- مركبات البيريثرين: وهى غير سامة للإنسان , ولذلك تستعمل بأمان على المواد الغذائية , وتزداد سمية هذه المواد بإضافة مواد منشطة إليها مثل Piperonyl butoxid إلا أنها سريعة التحلل في الضوء ومن أمثلة المركبات البيريثرينية المستخدمة على

[6] بوابة أراضينا للزراعة والإنتاج الحيوانى , متاح على الموقع الالكتروني :
http://aradina.kenanaonline.com/posts/186640

الحبوب مادة بيرينون (Pyrenone) و تستخدم بنسبة جزء واحد/مليون جزء من الحبوب.

2- المركبات الكلورينية: ومن أمثلتها اللندين (Lindane) الذي يحتوي على ما لا يقل عن 99% مشابه جاما , و هو مبيد باللمس و يكون له تأثير خانق في الجو الحار .وهو غير ثابت لمدد طويلة.

3- المركبات الفسفورية العضوية: ومن أمثلتها الملاثيون و الاكتيليك ,و هو من المبيدات الآمنة يمتاز بسرعة تحلله، و يمكن استخدامه على الحبوب المعدة للاستهلاك البشري بشرط تقدير المتبقيات، ومقارنتها بالحد الآمن قبل طرحها للاستهلاك .

2-2-2 الطريقة الحيوية

وهي طريقة شائعة في مكافحة الحشرات الضارة والتي تسبب تلفا كبيرا في المحاصيل الزراعية وهي عبارة عن استعمال المراض التي تسببها الاحياء المجهرية الدقيقة او ما تنتجه تلك الاحياء من افرازات كردة فعل للمؤثر الخارجي [7].

تكون البكتريا و الرواشح و الفطريات هي من المسبب الرئيسي للامراض , حيث تكو هذه المسببات المرضية عبارة عن كائنات مجهرية دقيقة وموجده بصورة رئيسية و ثيرة في حياتنا اليومية كما يمكن ان تكون عاملا في تحديد اعداد الافات التي تصيب الحبوب و المحاصيل , كما عمل الانسان على استغلالها من خلال انتاجها بكميات كبيرة و

[7] حمزة كاظم الزبيدي , المقاومة الحيوية للافات , دار الكتب للطباعة و النشر , جامعة الموصل , 1992 , ص 440 .

توجهيها لخدمة مصالحه لمكافحة الحشرات الضارة كما وقد تبقى في الطبيعة في التربة او في اي مكان اخر لمكافحة الافات طبيعيا [8].

ان من المهم التعرف على اعراض الاصابة بهذه الكائنات نظرا لأهميتها في تقييم جودة وفعالية تلك الممرضات حيث ان الحشرات المريضة تظهر تغيرات في السلوك و قد يلاحظ على الحشرات المصابة مظاهر غير طبيعية مثل عدم تناسق حركات الجسم أو انحرافات في النمو مثل تأخره وعدم القدرة على الانسلاخ وصعوبة في الهضم وقلة في التغذية و اضطرابات تكاثرية منها انخفاض الخصوبة و قلة وضع البيض [9], كما تظهر تغيرات في لون الجسم وشكله و ظواهر أخرى مثل انكماشه وسهولة تحلله وتكسره .

1-2-2-2 مكافحة الخنافس بواسطة بكتريا *Bacillus thuringiensis*

تعد بكتيريا *Bacillus thuringiensis* بكتريا موجبة لصبغة غرام ، و تعيش في التربة ، وتستخدم عادتا كمبيد للآفات البيولوجية . تنتج بكتيريا *B. thuringiensis* العديد من سلالات بروتينات بلورية (شوائب بروتينية) ، تسمى السموم الداخلية ، والتي لها تأثير مبيد حشري قوي . وقد أدى ذلك إلى استخدامها كمبيدات حشرية ،

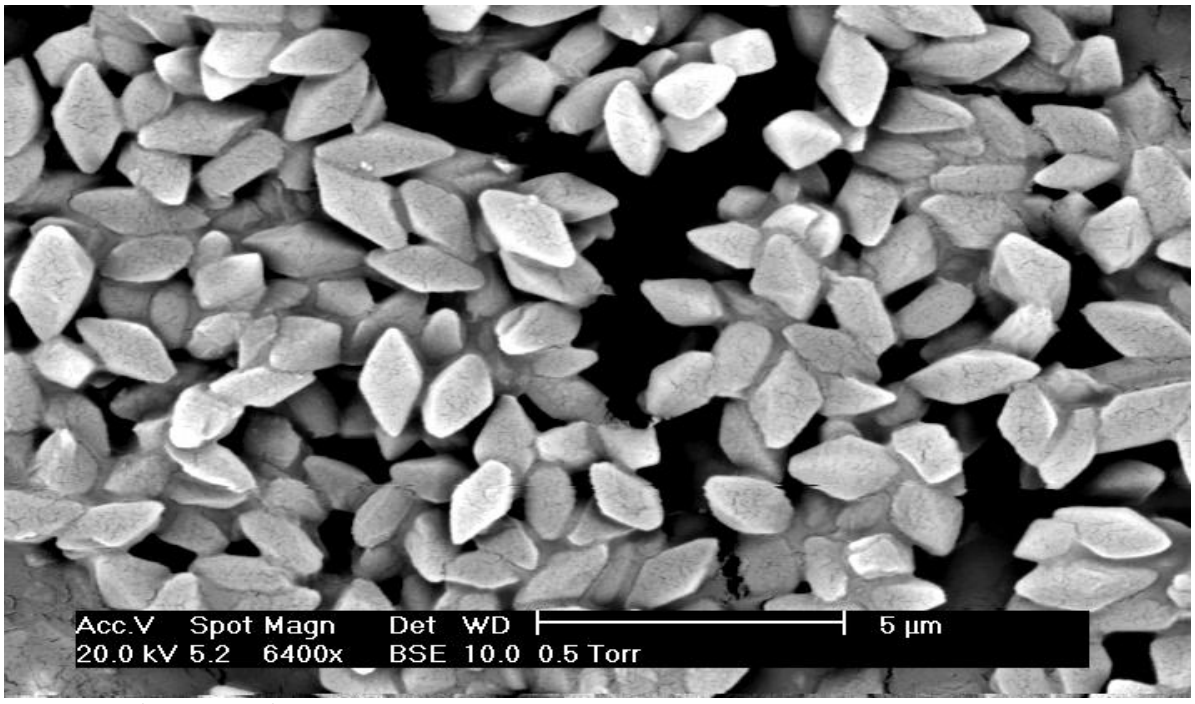
تم اكتشاف B. thuringiensis لأول مرة في عام 1901 من قبل عالم الأحياء الياباني إيشيواتاري شيجيتان في ديدان القز. وفي عام 1911 ، اكتشف عالم الأحياء المجهرية الألماني إرنست برلينر ذلك بشكل مستقل عندما عزله كسبب لمرض يدعى شلافشوت في يرقات عثة الدقيق في تورينجيا (ومن هنا جاءت تسميته "تورينجنس") وبكتريا *B. thuringiensis* هي بكتيريا عصوية يتراوح حجمها بين (0.5 × 1.2 ميكرون) إلى (2.5 × 10 ميكرون)، هوائية أو هوائية-لاهوائية اختيارياً وتستمد طاقتها من التنفس أو

[8] عبد الستار علي، فؤاد عبدالعزيز , اسس مكافحة الافات الزراعية , دار التقني للطباعة و النشر , وزارة التعليم العلي و البحث العلمي , مؤسسة المعاهد الفنية , 1986م , ص 23

[9] Federic ,B.A.(1995). The future of microbial insecticides as vector control agent .J.Amer.Mosq.cont.Ass.,11:160-268

التخمر، وتكون هذه البكتيريا قادرة على احاطة نفسها بغلاف يشبه الحوصلة يسمح لها بتحمل الظروف البيئية غير الملائمة [10],

تتكون بكتريا (*B . thuringiensis*) من جدار خلوي وهو عبارة عن هيكل على السطح الخارجي للخلية يشكل الحاجز الثاني بين البكتيريا والبيئة المحيطة بها ، وفي الوقت نفسه يحافظ على شكل الخليه ويتحمل الضغط الناتج عن الضغط الأزموزي في الخلية ,حيث يتكون جدار الخلية من أحماض التيكويك و أحماض التيكويك الدهنية و كذلك الببتيدوغليكان أو ما يعرف ب الميورين ، إن دور الأساسي الهيكل الخلوي هو الحفاظ على الشكل و تحمل الظغط الأزموزي و حماية البكتريا من المؤثرات الخارجية كما أن له خصائص مستضدة[11].



صورة رقم (3) توضح بكتريا ***(Bacillus thuringiensis)*** تحت المجهر الإلكتروني

[10] الشبكة العنكبوتية , الموسوعة الحرة , حشرة خنافس الرز.

[11] احمد عباس الجميلي , تاثير سمية بكتريا Bacillus thuringiensis على امراض النبات , رسالة ماجستير غير منشورة , جامعة الموصل , كلية العلوم , 2008 , ص 65

تتسبب البكتريا في نفوق مجاميع كثيرة من الحشرات بسبب السمية القاتلة التي تنتجها هذه البكتريا اذا ما توفرت لها الظروف الملائمة لنموها و انتشارها وخاصتا بكتريا *Bacillus thuringiensis* و تنتمي هذه البكتريا الى Enterobacteraceae وذلك لانها تخزن لفترات طويلة دون ان تفقد حيويتها وتعد بكتريا *B. thuringiensis* من اهم البكتريا التي تنتج البلورات السامة حسب التقسيم الذي وضعه Bucker سنة 1920 وهو تقسيم شائع بين البكتريا الممرضة للحشرات وقد تم تعديله من قبل Heimpl سنة 1967 وهي تكون منفصلة عن B. sphaericus و التي تكون غير حاملة لهذه البلورات السامة

عادة تصاب الحشرات بانواع مختلفة من البكتريا تقضي على مجاميع كبيرة منها خاصة عند توفر الظروف الملائمة لنموها وانتشارها ، تنتمي هذه الانواع الى الرتبة والعائلة Enterobacteraceae .وبصفة خاصة الى العائلة Bacteriales والتي تضم أهم الممرضات الحشرية بسبب امكانية خزنها لفترات Bacillaceae طويلة دون ان تفقد حيويتها ، ويعد التقسيم الشائع للبكتريا الممرضة للحشرات هو ذلك التقسيم الذي أعده Bucker سنة 1920 و عدله Heimpl سنة 1967 الذي عد البكتريا الحاملة للبلورات التي تتبع النوع *B. thuringiensis* والذي يجب ان يضل منفصلا عن النوع B. sphaericus غير الحاملة لها ، وقد استند هذا التقسيم على اساس التخصص للمضيف وامكانية تكوين السموم الداخلية و الابواغ [12].

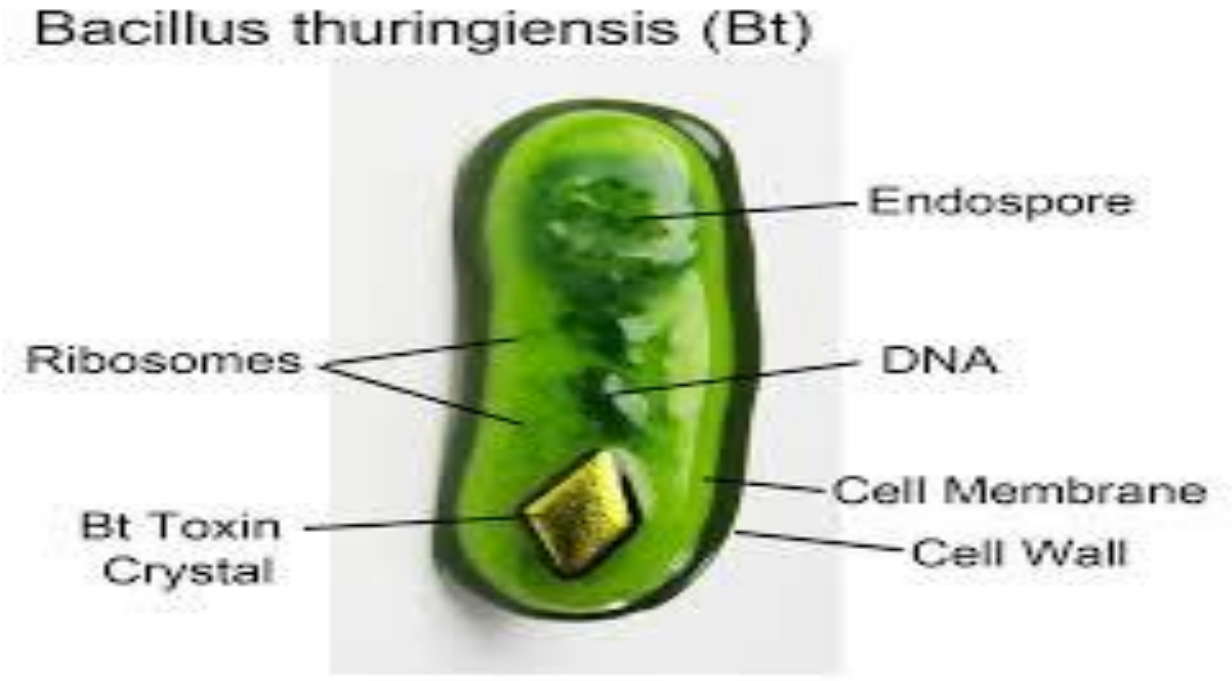
ان بعض انواع البكتريا دور مهم في مجال مكافحة الافات منها B. larvae و B. popiliae. و B. Lentimorbus [13] .

وتعد *B. thuringiensis* الاخيرة اهم الانواع واكثرها فاعلية واستعمالا فهي موجبة لصبغة كرام عصوية الشكل منتجة للأبواغ , وتتميز بقابليتها على تكوين بلورة بروتينية

[12] محمد فؤاد توفيق , المكافحة البايلوجية للافات الزراعية , المكتبة الاكاديمية , الدقي , القاهرة , ص 757.

[13] أبو الذهب .علم البكتيرات .دار المعارف –القاهرة , 1997 , ص87

ICP(protein crystal Insecticidal) , عند مرحلة تكوين السبور وذات اثر سام جدا لبعض الحشرات [14], تم عزلها اول مرة عام 1901 من يرقات عث الحرير Bombyx mori وقد سميت على اسم ا لعالم الذي وصفها اول مرة عام 1911وهو العالم الالماني Thuringe Berlinar الذي عزلها من يرقات فراشة الطحين Kuhniella Anagas



صورة رقم (4) تبين التراكيب الداخلية لبكتريا *B. thuringiensis*

[14] حمزة كاظم الزبيدي , المقاومة الحيوية للافات , دار الكتب للطباعة و النشر , جامعة الموصل , 1992 , ص 440.

3-2-2 ضراوة بكتريا *B. thuringiensis* المرضية [15]

تمتلك بكتريا *B.* thuringiensi اربع مركبات رئيسية سمية تنتجها في الخلايا او في المحيط الخارجي تؤهلها الى جعلها من اكثر الاحياء المجهرية سمية للحشرات **وهي :**

اولا : انزيم الفسفوليبيز C Phospholipase وكما يسمى ايضا بالألفا اكسوتوكسين (exotoxin. A) وهو المسؤول عن إهلاك العائل, كما تكفي ستة ميكرو غرامات منه لإحداث الجرعة المميتة لطور اليرقي الانسلاخي الخامس للدبور المنشاري

ثانيا :المركب السام الثاني هو بيتا اكسوتوكسين (exotoxin.β) وهو عبارة عن أجزاء متساوية من الأدنين و الرايبوز و الفسفور و الذي يعمل على وقف تخليق الحامض النووي للخنافس من خلال الاتحاد مع نواة الخلية في الخنافس .

ثالثا :كاما اكسوتوكسين (exotoxin.γ) ناتجة من إنزيم أو عدة إنزيمات غير معروفة إلى الآن حيث لم تتوصل الدراسات الى معرفة هذا الانزيم الذي يعمل على تخليق هذا المركب السام .

رابعا : سكما اندوتوكسين (endotoxin. Δ)

وهو مركب ذو سمية عالية يوجد في داخل الاجسام البلورية للخلية البكتيرية , يتحمل هذا المركب درجة الحرارة و يذوب في المحاليل القلوية , وطريقة عمل هذا المركب هو تنشيط Endotoxin في القناة الهضمية ذات الوسط القلوي في حوريات مستقيمة الأجنحة مطلقا المكونات السامة من الجسم البلوري الذي يسبب الشلل للقناة الهضمية في عدة دقائق من توجد هذا الجسم.

[15] احمد القناوي , البكتريا الممرضة للحشرات Entomopathogenic , متاح على الموقع الاكتروني : WWW. Iraqi dateplams.net

4-2-2 تصنيف بكتريا Bacillus thuringiensis

Kingdom: Eubacteria

Domain: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Bacillaceae

Geuns: Bacillus

Species: Bacillus thuringiensis

5-2-2 الية عمل السموم البكتيرية داخل الحشرة [16]

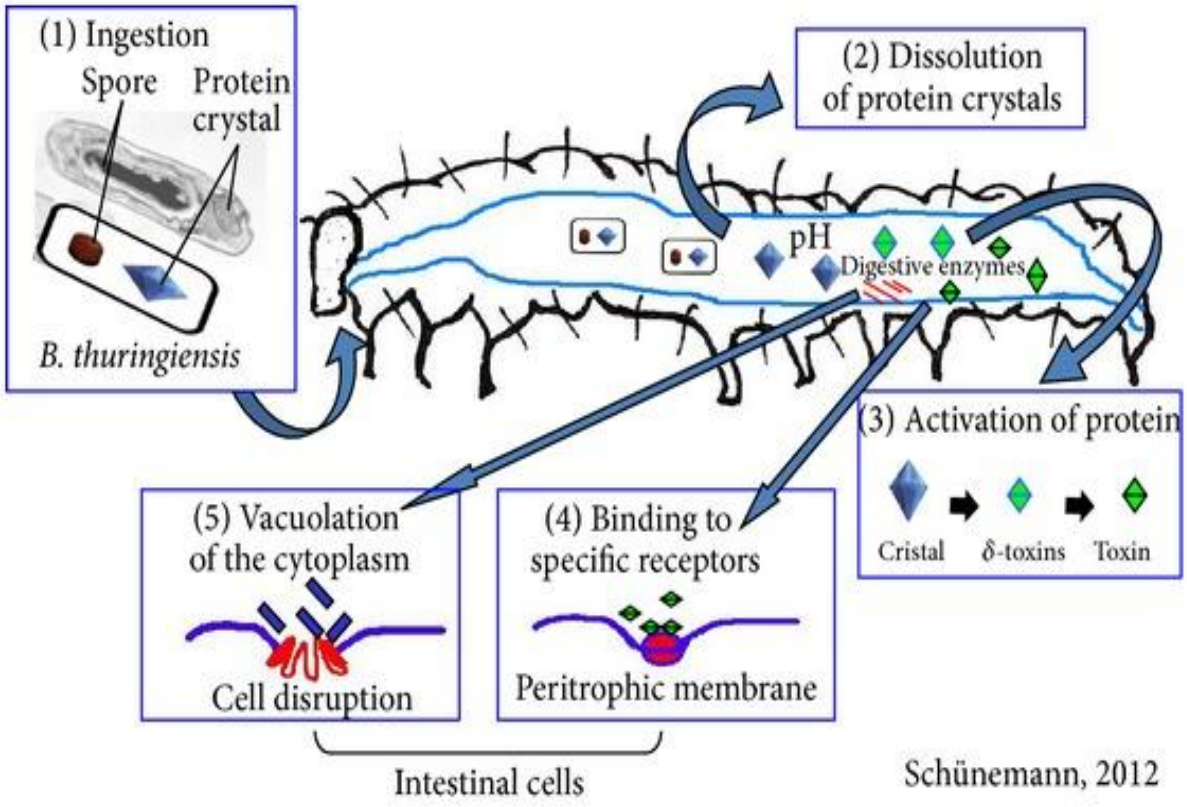
عندما تتناول الحشرة البكتريا الحاوية على السم البلوري الموجود مع الغذاء حيث يصل الى القناة الهضمية الوسطى للحشرة، و لكون الوسط الموجود داخل القناة الهضمية الوسطى قاعدي (pH8) فأن ذألك يودي ذوبان السم البلوري بفعل الأنزيمات الحالة للبروتين منتجا بذلك سماً ذا وزن جزيئي يتراوح بين 70-130 كيلو دالتون ، هذه السموم سوف ترتبط بمستقبلات خاصة موجودة على سطح الخلايا الطلائية .للبطانة الداخلية للقناة الهضمية في الحشرات الحساسة للبكتريا فينتج عن ذلك انفجار الخلايا بسبب انتفاخها و تمددها مما يؤدي الى موت الحشرة نتيجة لأحد الاليات التالية :

الأولى : سوف تتوقف الحشرة عن تناول الغذاء وبالتالي موتها جوعا نتيجة لحدوث شلل في القناة الهضمية بعد مرور 24 ساعة من تناولها للسموم البكتيرية من غير أن يحدث شلل عام للحشرة .

الثانية :يحدث شلل للقناة الهضمية و بسبب تحلل الخلايا يرتفع الرقم الهيدروجيني للدم نتيجة لعبور المواد القلوية الى القناة الهضمية الوسطى مما يؤدي الى شلل كامل للحشرة بعد مرور ساعة و احدة فقط .

الثالثة :موت الحشرة بعد دخول البكتريا الى قناتها الهضمية بيومين – اربعة ايام دون حصول شلل للقناة الهضمية.

[16] Schünemann, R.; Knaak, N. and Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of Bacillus thuringiensis toxins in the control of caterpillars and stink Bugs in soybean culture . ISRN.microbiology Hindawi publishing corporation .Article ID 135675,12pp



شكل رقم (1) يوضح الية تاثير بكتريا Bacillus thuringiensis في الخنافس

من خلال ما تقدم نلاحظ ان الية التاثير البكتريا على المضيف يعتمد على اربعة مقاييس و التي بتفاعلها مع القناة الهضمية الوسطى للحشرة هي التي تحدد التخصص للبروتين البلوري وهذه المقايس تتلخص بالاتي [17]:

[17] Zavala, L. E.; Pardo-Lopez, L.; Canton, P. C.; Gomez, I.; Soberon, M. and Alejandra, B. (2011). Domains π and π of Bacillus thuringiensis Cry1Ab Toxin Remain Exposed to the solvent after insertion of part Of Domain 1 into the membrane. J. Bio. Chem.,(21) :19109-19117

1- تخصص ارتباط المستقبل الغشائي

2- فاعلية التحلل.

3- تكوين الفجوات

4- كفاءة تحول البروتين قبل ان يكون ساما الى البروتين السام .

اعراض الاصابة ببكتريا **Bacillus thuringiensis**

1- بطئ الحركة

2- قله الشهية وعدم قابليتها للغذاء

3 - تغير لون الجسم حيث يصبح غامقا وذو ملمس ناعم ولا شكل له

4 - انخفاض وزن الحشرة

5- إذا انفجر جسم الحشرة خرجت منه رائحة كريهة

6- تيبس في جسم الحشرة .

6-2-2 العوامل المؤثرة في إمراضيه البكتريا *B. thuringiensis*

تعتمد ضراوة بكتريا ***B. thuringiensis*** على عدة عوامل عند اصابتها الى المضيف (الحشرة , اليرقات او البيوض) منها بيئة البكتريا و الحشرة وهناك عوامل طبيعية اخرى وهي[18] :

[18] Glare, T. and O´callaghan, M. (1998). Environmental and health impacts of Bacillus thuringiensis israelensis. Report for the Ministry of health .58p

1- درجات الحرارة حيث وجد ان الحرارة العالية تؤدي الى التقليل من كفاءة البكتريا في اصابة الحشرات

2- اشعة الشمس المباشرة تؤدي الى فقدان كفاءة البكتريا، لذا ينصح استعمال مستحضرات بكتريا ***B. thuringiensis*** في الليل لتجنب ضوء الشمس المباشر.

3- عمر المضيف ودرجة الاس الهيدروجيني للمضيف , كما يؤثر اعدادها المتزاحمة والمستقبلات في بطانة في حساسية البكتريا الممرضة للحشرات .

4- كمية الجرعة المعامل بها الحشرات .

3- المواد و طرق العمل

1-3 جمع الخنافس

تم جمع مجموعة من حوريات و بالغات خنافس الرز من كمية من الرز المصاب بالخنافس والتي تم جلبها من مخازن حبوب السايلو في محافظة الديوانية حيث تم جمع البالغات في قناني بلاستيكية سعة 1لتر و الحوريات في قناني سعة نصف لتر وتم وضع الرز لغرض تغذية الحشرة عليه و من ثم غلقت فوهة القنينة بقطعة من القماش التول ذو المسامات الكبيرة لغرض الحفاظ عليها والتنفس عن طريق المسامات الموجودة في القماش.

2-3 مصدر البكتريا

تم الحصول على عزلة بكتيرية من مختبر الحشرات من قبل الست هناء رحمن لفته

3-3 الاوساط الزرعية المستخدمة للبكتريا

3-3-1 وسط Nutrient agar

تم اذابه مكونات هذا الوسط بحسب الكميات الموصى بها 30 غرام في لتر من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعته (1 لتر) ثم عقم بجهاز الموصدة[19] في درجه حراره(122مئوية) وضغطه (1 جو) لمده (20 دقيقه) ثم ترك ليبرد ثم تم صبه في اطباق بتري و ترك الوسط ليتصلب بعد ذلك لقحت الاطباق بالنمو البكتيري من مزرعة البكتيريا وحضنه في درجه حراره 37م لمده (24 – 48 ساعه) .

[19] جهاز التعقيم (autoclave) هو خزان ضغط مكون من المعدن مصمم لتسخين المحاليل المائية فوق نقطة غليانها عند الضغط الجوي النظامي وذلك بهدف التعقيم. تم اختراعه من قبل شارل شمبرلند في عام 1879.

3- 4 تحضير المعلق البكتيري

بعد تحضير 150 مل من المرق المغذي ووضعه في دورق زجاجي سعه 250 مل ثم عقم في جهاز الموصدة ثم يترك ليبرد بعد ذلك لقح هذا الوسط الزرعي بالبكتيريا النامية على وسط الاكار المغذي بعمر(48 ساعه) بعد ذلك حضن الدورق في درجه حراره (37 مئوية) لمده (48 ساعه) ثم رشحت المزارع الناتجه في قطع من الشاش المعقم وحسب عدد المستعمرات في المعلق بطريقه العد المباشر في الاطباق وذلك بأخذ (1 مل) من المعلق البكتيري المخفف الى 10^6 لقحت به طباق الوسط البكتيري (الاكار المغذي) ثلاث مكررات وبعدها وضع الاطباق فى الحضانة على درجه (37 مئوية) لمده (24 ساعه). بعدها نحسب عدد المستعمرات الناميه في كل طبق و نستخرج معدل لثلاث اطباق مضروبة في مقلوب التخفيف حيث نحصل على معلق بتركيز 3×10^3 . وللحصول على التراكيز التالية (3×10^2 , 3×10^3 , 3×10^4 , 3×10^5 , 3 , 3×10^1) نحسب عدد المستعمرات النامية في الاطباق .

3- 5 الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتريا *B. thuringiensis* في نسبة هلاك حوريات وبالغات خنافس الرز :-

حضرت أربع مكررات ، حيث اخذت حوريات خنفساء الرز ووزعت كل منها وضعت في اربع اوان ثلاثة منها رشت ب (5 مل) من كل تركيز تراكيز المعلق البكتيري أما الرابع الذي يمثل معاملة السيطرة فترك بدون اضافة معلق بكتيري ، بعد ذلك حضنت المعاملات في درجة حرارة (37مئوية) وفترة ضوئية 15 : 35 (D\L) لمدة 24 – 48 – 72 ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك وصححت نسبة الهلاك .

كما تم تحظير أربع مكررات حيث اخذت بالغات خنافس الرز و وضعت في اربع اوان ثلاث منها رشت ب (5مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق البكتيري أما الرابع الذي يمثل معاملة السيطرة فترك بدون اضافة معلق بكتيري ، بعد ذلك حضنت المعاملات في درجة حرارة (37مئوية) وفترة ضوئية 15 : 35 (D\L) لمدة 24 – 48 – 72 ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك وصححت نسبة الهلاك .

صححت انسب المئوية للهالكات استناد الى المعادلة (Abbott)[20] والتي تنص على

النسبة المئوية للهلاك المصححة = (نسبة الهلاك في المعاملة - نسبة الهلاك في السيطرة / 100 - نسبة هلاك السيطرة) × 100.

[20] Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an.Insecticide. J.Econ. Entomol .,18 : 265- 267

4- النتائج و المناقشة :-

الاختبار الحيوي لمختلف تراكيز معلق البكتريا *B. thuringiensis* . التي توثر في معدلات نسبة هلاك حوريات وبالغات خنافس الرز .

4-1 تأثير بكتريا *B. thuringiensis* على الحوريات

عندما عرضت حوريات خنافس الرز الى ابواغ البكتريا *B. thuringiensis* بتركيز(3× 10^3 بوغ/مل) خلال 72 ساعة فكانت اوطئ نسبه هلاك فقد بلغت 30%

بينما قد بلغت اعلى نسبه للهلاك 70% عند التركيز (3× 10^5 بوغ/مل) خلال 72 ساعة . في حين عدم وجود نسبه للهلاك عند المعاملة بالماء المقطر .

4-2 تأثير بكتريا *B. thuringiensis* على البالغات

عند تعريض بالغات خنافس الرز الى ابواغ البكتريا *B. thuringiensis* فان نسبه الهلاك تكون قليله بالمقارنة مع الحوريات حيث بلغت اوطئ نسبه هلاك 23% عند التراكيز (3× 10^2 بوغ/مل) خلال 72 ساعة بينما بلغت اعلى نسبة للهلاك 55% عند التركيز (3× 10^5 بوغ/مل) خلال 72 ساعة وكما موضح في الجدول رقم (1) , إن سبب قلة تأثير البكتريا في البالغات قد يعود إلى قلة تعرض البالغات الى ابواغ بكتريا

B. thuringiensis إضافة إلى طريقة التغذية لان فعالية البكتريا لا تظهر الا عند وصولها إلى الأمعاء الوسطى ، إذ أن فرصة دخولها إلى أمعاء الحشرات البالغة تكون قليلة جدا بالمقارنة مع الحوريات [21].

من خلال النتائج الظاهرة وموت الحوريات و البالغات يتبين تاثير السموم القوية القادمة من البلورات الموجدة في بكتريا *B. thuringiensis* وعند دخولها مع الغذاء الى القناة الهضمية الوسطى حيث ترتبط هذه السموم بالمستقبلات الخاصة الموجودة ضمن لغشاء القناة الهضمية الوسطى فيدخل السم بداخل الغشاء مسببا ضعف الخلايا الطلائية وانتفاخها ثم انحلالها محدثا ثقوبا في الغشاء مما يسهل انتقال السبورات الى السائل الدموي للخنافس ويتسبب عنه تسمم الدم و كذلك حدوث شلل للقناة الهضمية الوسطى للحشرة و امتناعها عن تناول الطعام مما يؤدي الى قلة حركتها وتصلب أطرافها , ثم تغير اللون الى البني ثم الاسود بعد الموت ،أن هلاك الخنافس بفعل بكتريا *B. thuringiensis* قد يعود إلى أن البكتريا وجدت طريقها إلى داخل التجويف الدموي hemocoel لليرقات مسببة تسمم الدم septicemia و مؤدية إلى اسوداد الحوريات و الخنافس وموتها بفعل السموم التي تفرزها هذه البكتريا, و مؤثرة في الجهاز العصبي لليرقات و البالغات المصابة، أو أن سموم البكتريا قد أدت إلى حدوث خلل في الجهاز العصبي مؤدية إلى شلل في الأعضاء المسؤولة عن التغذي ومن ثم موت الحوريات من الجوع وهذا ويتفق مع اورده lacey [22] في أن معاملة يرقات فراشة اللهانة بطورها الثالث ببكتريا *B. thuringiensis kurstaki* أدى إلى ظهور أعراض إصابة وهي بطأ في الحركة, التوقف عن التغذية, الشلل العام, وتغير اللون إلى البني الغامق ثم الأسود،

[21] براء جليل سعيد , تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الجرثومية في السيطرة كلية العلوم –جامعة القادسية , 2014 .

[22] Lacey, A.L.; E. Riga; and W. Snyder. (2004). The potential for using insect specific pathogens for control of insect pest of potato . Journal of potato progress. vol. IV. no.1.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج (العميدي) [23] من خلال دراستهم للسيطرة الحيوية الفعالة لسلالات بكتيريا Bacillus thuringiensis على يرقات وبالغات ذبابة البحر المتوسط Ceratitis capitate اذ بلغت نسبة هلاك يرقات الطور الثالث المعاملة بسموم سلالات Bt A7 Bt M- Ag21.6 .

جدول رقم (1) تاثير تراكيز مختلفة من معلق بكتريا *B. thuringiensis* في يرقات و بالغات خنافس الرز

	التراكيز	النسبة المئوية للهلاك بعد مرور (ساعه)		
	بوغ / مل	24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
الطور	$10^2 \times 3$	%19	%20	% 30
اليرقات	$10^3 \times 3$	%17	%25	%40
	$10^4 \times 3$	%22	%35	% 47
	$10^5 \times 3$	%30	%45	%70
	Control	0	0	0
البالغات	$10^2 \times 3$	15	%20	%23
	$10^3 \times 3$	16	%20	%35

[23] بهاء حمدي العميدي , أستخدام البكتريا Bacillus cereus kurstaki في مكافحة فراشة اللهانة رسالة ماجستير في قسم علوم الحياة ،الأحياء المجهرية ،جامعة بغداد , 1990 ,

%44	%30	22	10^4 ×3	
%55	%40	26	10^5 ×3	
0	0	0	Control	

5- الاستنتاجات

1- تعتبر بكتريا *B. thuringiensis* البكترية المرضية للحشرات التي تستخدم لمكافحة انواع عديدة و خاصة الحشرات الاقتصادية لما لها دور فعال في مكافحتها .

2- تحتوي البكتريا على مجموعة من البلورات السمية التي تدخل الى القناة الهضمية لخنافس الرز والالتصاق ببطانة الاعماء وهي صفه تمتلكها بكتريا *B. thuringiensis* لا تمتلكها انواع اخرى من البكتريا نفسها .

3- تكون بكتريا *B. thuringiensis* قاتلة لحوريات الخنافس اكثر من البالغات و حسب التراكيز للمعلق البكتيري .

4- تقل فعالية السموم التي تطلقا البكتريا في البيئات الغير مناسبة مثل درجة الحرارة العلية و ضوء الشمس و التزاحم الغذائي لبالغات خنافس الرز .

6- المصادر

6-1 المصادر العربية

1. أبو الذهب .علم البكتيرات .دار المعارف –القاهرة , 1997 , ص87
2. احمد القناوي , البكتريا الممرضة للحشرات Entomopathogenic , متاح على الموقع الاكتروني : WWW. Iraqi dateplams.net
3. احمد عباس الجميلي , تاثير سمية بكتريا Bacillus thuringiensis على امراض النبات , رسالة ماجستير غير منشورة , جامعة الموصل , كلية العلوم , 2008 , ص 65
4. براء جليل سعيد , تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الجرثومية في السيطرة كلية العلوم –جامعة القادسية , 2014 .
5. بهاء حمدي العميدي , أستخدام البكتريا Bacillus cereus kurstaki في مكافحة فراشة اللهانة رسالة ماجستير في قسم علوم الحياة ،الأحياء المجهرية ،جامعة بغداد , 1990 ,

6. جهاز التعقيم (autoclave) هو خزان ضغط مكون من المعدن مصمم لتسخين المحاليل المائية فوق نقطة غليانها عند الضغط الجوي النظامي وذلك بهدف التعقيم. تم اختراعه من قبل شارل شمبرلند في عام 1879.
7. حمزة كاظم الزبيدي , المقاومة الحيوية للافات , دار الكتب للطباعة و النشر , جامعة الموصل , 1992 , ص 440 .
8. حمزة كاظم الزبيدي , المقاومة الحيوية للافات , دار الكتب للطباعة و النشر , جامعة الموصل , 1992 , ص 440.
9. رضوان محمد توفيق خفاجي , اساسيات تصنيف الحشرات ,ط1 , جامعة الجزيرة , 2010م , ص 185
10. رضوان محمد توفيق خفاجي , اساسيات تصنيف الحشرات ,ط1 , جامعة الجزيرة , 2010م , ص 176
11. الشبكة العنكبوتية , الموسوعة الحرة , حشرة خنافس الرز.
12. عبد الستار علي، فؤاد عبدالعزيز , اسس مكافحة الافات الزراعية , دار التقني للطباعة و النشر , وزارة التعليم العلي و البحث العلمي , مؤسسة المعاهد الفنية , 1986م , ص 23
13. محمد فؤاد توفيق , المكافحة البايلوجية للافات الزراعية , المكتبة الاكاديمية , الدقي , القاهرة , ص 757.
14. معن عبد العزيز شفيق , تاثير منظم النمو Pyriproxyfen على بيض و انتاجية الاناث البالغة لسوسة الرز , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية , العراق – بغداد , ص 27

2-6 المصادر الاجنبية

15- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an.Insecticide. J.Econ. Entomol .,18 : 265- 267

16- Arbogast, R.T. 1991, Beetles; Coleoptera in: J.R. Gorham, Editor. Ecology and Management of Food Industry Pest. .Association of Official Analytical Chemists. p.131-176

17- Federic ,B.A.(1995). The future of microbial insecticides as vector control agent .J.Amer.Mosq.cont.Ass.,11:160-268

18- Glare, T. and O´callaghan, M. (1998). Environmental and health impacts of Bacillus thuringiensis israelensis. Report for the Ministry of health .58p

19- Lacey, A.L.; E. Riga; and W. Snyder. (2004). The potential for using insect specific pathogens for control of insect pest of potato .. Journal of potato progress. vol. IV. no.1

20- Schünemann, R.; Knaak, N. and Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of Bacillus thuringiensis toxins in the control of caterpillars and stink Bugs in soybean culture .

21- ISRN.microbiology Hindawi publishing corporation .Article ID 135675,12pp

22- Zavala, L. E.; Pardo-Lopez, L.; Canton, P. C.; Gomez, I.; Soberon, M. and Alejandra, B. (2011). Domains π and π of Bacillus thuringiensis Cry1Ab Toxin Remain Exposed to the solvent after insertion of part Of Domain 1 into the membrane. J. Bio. Chem.,(21) :19109-19117