عزل البكتريا Bt الممرضة للحشرات من منطقة دير الزور و تقييم فاعليتها الحيوية

د. جمال العبد الله الحمادة
جامعة الفرات – كلية الزراعة– قسم وقاية النبات

الملخص

أجري هذا البحث في مخابر كلية الزراعة في دير الزور و مخابر معهد الأبحاث العلمية للميكروبيولوجيا الزراعية في مدينة سانت بطرس بورغ في عام 2009، لدراسة إمكانية الحصول على عزلات من البكتريا Bt الممرضة للحشرات من منطقة دير الزور و تقييم فاعليتها الحيوية.

تم أخذ 14 عينة من التربة و الحشرات الميتة و الحية من حقول مختلفة في محافظة دير الزور، فمن 2000 عزلة تم اختيار 56 عزلة بناءاً على الصفات المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية والشبيهة بالنوع *Bacillus thuringiensis*.

حيث تبين نتيجة الدراسات المورفولوجية، الفيزيوبيوكيميائية، الجزيئية والسمية للحشرات أن 9 عزلات أظهرت توافقاً تاماً مع السلالات البكتيرية التابعة للنوع *Bacillus thuringensis*، و توزعت كما يلي:

العزلات (1، 2، 9، 31) تنتمي إلى BTH1 و العزلات (5، 19) تنتمي إلى BTH3a3b وجميعها ذات فعالية عالية في قتل يرقات فراشة الطحين (*Ephestia kuehiella*) وخنفساء البطاطا (*Leptinotarsa decemlineata*).

أما العزلات (27، 28، 34) تنتمي إلى BTH14 وهي ذات فعالية في قتل يرقات البعوض *Aedes aegypti*.

الكلمات المفتاحية : بكتريا Bt ، دراسة جزيئية ، فراشة الطحين ، خنفساء البطاطا .

ورد البحث في 2010/5/21، قبل للنشر في 2010/6/13

المقدمة Introduction :

تمتلك البكتريا العصوية جنس *Bacillus* انتشاراً واسعاً في الطبيعة حيث لأن بعض السلالات تستطيع النمو على درجة حرارة أقل من 5 C° وأبواغها على 40 C° وتتحمل درجة حرارة تسخين 102C° (Chatterjee et al., 2007).

يتم عزل غالبية أنواع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* من أنواع التربة المختلفة و يؤثر في تعداد هذه البكتريا في التربة الغطاء النباتي و وجود الأسمدة و خاصة العضوية منها إضافة إلى تأثير العوامل المناخية و أهمها درجة الحرارة، الرطوبة، الإشعاع الشمسي. (Naresh et al., 2007)

أكد العلماء في الماضي أن المصدر الأساسي للبكتريا الممرضة للحشرات والمصنعة للكريستال هو الحشرات المريضة أو الميتة بالطبيعة ولكن بينت الأبحاث الحديثة أن هذه البكتريا توجد في كل مكان بالتربة، على النبات و في الحشرات الميتة والحية وأماكن معيشتها، ويبقى سؤال تواجدها وتأثيرها على الحشرات والبيئة المحيطة مجال للبحث .(Патыка и др., 2007)، حيث تم عزلها في أماكن مختلفة على الرغم من عدم وجود العائل الحشري لهذه السلالة أو تلك وانتشاره، على سبيل المثال BTH1 تم عزلها في الولايات المتحدة الأمريكية والاتحاد السوفياتي سابقاً وتشيكوسلوفاكيا، BTH14 في الباكستان وهنغاريا وروسيا، BTH10 في القفقاز وألمانيا (Кандыбин и др., 2009).

بينت أعمال الباحثين من دول مختلفة في الآونة الأخيرة أن تعداد السلالات المختلفة للنوع *B. thuringiensis* تضاعف عدة مرات حيث تجاوز عددها في الوقت الراهن عن 70 سلالة تستخدم غالبيتها بشكل واسع في التطبيق العملي للسيطرة على تعداد الحشرات الضارة(Raimondo et al., 2003).

تمتاز هذه السلالات من أنواع البكتريا الأخرى الممرضة للحشرات بأنها إضافة إلى تشكيل الأبواغ، تشكل سموم أخرى مثل الأندوتوكسين و الأيكزوتوكسين وهي ذات طيف واسع التأثير في الحشرات الضارة و لا تؤثر في الحشرات النافعة والحيوانات

ذات الدم الحار والإنسان. (Levin, 2007; Imre et.al, 2005; Rosenquist et al, 2005)

تعتبر هذه الميزات دافع كبير لاستخدامها في حماية النبات من الآفات الضارة.(Donovan et. al, 2009; Bradley et al, 1995) حيث تتوزع جميع السلالات المختلفة للنوع *B. thuringiensis* في ثلاث مجموعات تختلف فيما بينها بطيف وشدة سميتها للحشرات. المجموعة الأولى للسيطرة على تعداد حشرات حرشفية الأجنحة *Lepidoptera* والثانية للسيطرة على غمدية الأجنحة *Coleoptera* والثالثة للسيطرة على حشرات ذات الجناحين *Diptera*. (Moellenbek et al, 2001;Sayyed et al, 2001; Estruch et al,1996)

امتلاك البكتريا *B. thuringiensis* للخواص والمزايا التي ذكرت سابقاً أعطاها أهمية تطبيقية كبيرة حيث تحتل مستحضراتها الصدارة بين المستحضرات الميكروبيولوجيا المستخدمة في وقاية النبات و تشكل 90% من اجمالي المستحضرات الميكروبيولوجيا المختلفة.(Lambert et.al, 1992; Кандыбин и др., 2006)

هذه الحالة في العالم أوجدت فكرة محاولة تصنيع مبيدات حيوية على أساس هذه البكتريا في سوريا واستخدامها في مكافحة الآفات، ولتحقيق ذلك لا بد أولاً من عزل البكتريا محلياً وتقييمها حيوياً.

الأهمية العلمية للبحث:The scientific importance of the research

تعريف عزلات بكتيرية محلية ممرضة للحشرات وذات فاعلية حيوية للسيطرة عليها لكي تشكل مادة أساسية لتصنيع مبيدات حيوية لما لها من أهمية في السيطرة على الآفات ودورها الكبير في برامج المكافحة المتكاملة والمحافظة على البيئة وأمانها لذوات الدم الحار و الإنسان.

المواد وطرائق البحث: Materials and Methods

تم جمع عينات من حقول مزروعة بنباتات مختلفة ومن حقول بور في منطقة دير الزور وكذلك تم جمع عينات مختلفة من الحشرات الميتة و المريضة في نفس المناطق.

وضعت عينات التربة في فلاكونات معقمة سعة /10/مل وذلك بمعدل 1غ من كل عينة ثم تم إضافة /5/ مل ماء معقم لكل منها مع عملية رج ومزج لمدة دقيقة واحدة بعدها تم نقل قطرة من المعلق بواسطة ماصة إلى طبق بتري يحتوي وسطاً غذائياً (أجار مرق اللحم). وباستخدام طريقة الأطباق المنتشرة تمت زراعة الطبق الثاني والثالث أما عينات الحشرات فجرى في البداية تعقيمها ثم سحقها بجفنة خزفية ونقل المسحوق إلى أنبوب اختبار يحتوي /5/ مل ماء مقطر يلي ذلك عملية رج المعلق لمدة دقيقتين وتجري عملية الزراعة بنقل قطرة من المعلق إلى طبق بتري يحتوي وسطاً غذائياً آجار مرق اللحم وباستخدام طريقة الأطباق المنتشرة تمت زراعة الطبق الثاني والثالث.

حضنت الأطباق على درجة حرارة 28 –30 C ° ، وفي اليوم الخامس تم التعرف إلى المستعمرات النامية من خلال الصفات المورفولوجية القريبة لصفات مجموعة Bt و زراعتها بطريقة الأطباق المخطوطة (مصور رقم 1) حيث قسم كل طبق بتري إلى ثمانية حقول ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 28–30 C ° لمدة خمس أيام. بعدها تمت الدراسة المجهرية عن طريق تحضير شرائح وصبغها بطريقة سميرنوف (Smirnoff, 1965) واستخدام صبغة اسود الإنيلين.

مصور رقم (1) الزراعة في الأطباق المخطوطة.

تم تعريف البكتيريا (*B. thuringiensis*)على مستوى اختلاف السلالات ضمن النوع الواحد وفق مخطط تصنيف سلالات البكتيريا Bt الذي استخدمه العلماء (Lysenko,1985 ، De BarjaC and Frachon,1990) والمعتمد على دراسة الصفات الفيزيوبيوكيميائية للبكتيريا Bt. حيث استخدمت أقراص كواشف من ورق كروموتوغرافي تحتوي مستخلصاً محدود الكمية من الكاشف (النشا، السكروز، جليكوزيد، ساليتسن، مانوز)، واختبار استخدام الكربون، واختبار تفاعل استيل ميثل كاربونيل، تشكيل ليسيثيتوز(الدهن)، تشكيل البقع، واللون أو الصبغات، والايكزوتوكسين. كما تم التأكد من تعريف السلالات ضمن النوع Bt من خلال الدراسة الجزيئية للسلالات باستخدام جهاز PCR و تقانة RAPD (Rapid Amplifcation Polymorphic DNA) طريقة التغيير في شكل الحمض النووي المنقوص الأوكسجين /DNA/ المستكثر عشوائياً(Zhang ,1998).

تم الحصول على DNA العزلات المدروسة عن طريق استخدام بوفير CTAB ولكثاره باستخدام برايمرات ذات ترتيب أو تعاقب نوكليوتيدات عشوائي بطول عشرة نوكليوتيدات، انتاج شركة:(Oreon Technologies. (Alameda, CA حيث كانت البرايمرات المستخدمة هي:

OPA-10(5^1-GTGATCGCAG-3^1)
OPA-09(5^1- GGGTAACGCC - 3^1)
OPI-09 (5^1 - TGGAGAGCAG - 3^1).

التحليل الإحصائي للنتائج من أجل رسم شجرة القرابة الوراثية للعزلات المدروسة اعتمد على وجود DNA وماركر العزلات فعند وجوده يأخذ رقم (1) وعدم وجوده يأخذ رقم (0) ورسم الشجرة بالإعتماد على برنامج و TreeCon و استخدام طريقة UPGMA.(Vande peer et al 1994).

اختبار انتاجية العزلات:

تم على بيئة سائلة (وسط غذائي سائل) و إجراء تخفيفات للبكتيريا النامية وزراعتها في أطباق بتري بطريقة الأطباق المنتشرة والتحضين على درجة 28- 30C° لمدة خمس أيام من ثم عد المستعمرات النامية.

اختبار الفاعلية البيولوجية للعزلات :

تم من خلال تحديد- LC50 - التركيز الذي يؤدي إلى قتل 50% من أفراد التجربة (يرقات فراشة الطحين *Ephestia kuehiella*، يرقات خنفساء البطاطا *Leptinotarsa decemlineata*) وذلك باستخدام معادلة(Abbot,1925) لتحديد النسب المئوية لموت الأفراد

$$X = M0 - Mk / 100 - Mk \times 100$$

M0 :عدد الأفراد الميتة في المعاملة

Mk :عدد الأفراد الميتة في الشاهد

ومن ثم حساب التركيز الذي يؤدي إلى قتل 50% من أفراد التجربة حسب معادلة Kerber : $Lg\ LC50 = Lg\ CM - \alpha\ (\sum X - 0.5)$

حيث CM : أكبر تركيز مستخدم في التجربة.

α: لوغاريتم العلاقة النسبية بين التركيز والتركيز الذي يليه (نسبة التخفيف بين التراكيز)

$\sum X$: مجموع النسب المئوية للأفراد الميتة

أما تحديد محتوى العزلات من الايكزوتوكسين فتم عن طريق التجارب على يرقات الذباب المنزلي *Muska domestica* و تحديد فاعليته تم من خلال التجربة على يرقات العمر الرابع لحشرة البعوض *Aedes aegypti* حسب توصيات منظمة الصحة العالمية.

النتائج والمناقشة: Results and discussion

تم نمو/2000/ مستعمرة اخترنا منها/56/ مستعمرة لونها ابيض كريمي مع سطح قليل الخشونة معتمة وهي مواصفات البكتريا Bt مصور (2).

مصور رقم (2) مستعمرات لكائنات دقيقة مختلفة

بعدها تم تحديد وتعريف /9/ عزلات وذلك من خلال الفحص الميكروسكوبي والتأكد من وجود الايندوتوكسين وشكل البوغة، حيث كانت الأبواغ رقيقة الجدران واهليلجية الشكل، أبعادها:

0.8 × 1.3 – 1.1 -0.9MKM أما الجسم الكريستالي (الايندوتوكسين) كان عند العزلات (1,2,9,31) ذو شكل معين مع نهايات منفرجة وأبعاده

0.5 ×1.2 – 3.5 -2.3MKM

اما عند العزلات (5,19) كان بشكل معين مع نهايات ممتدة وأبعاده:

0.5 ×1.0 – 2.9 -2.2MKM

وعند العزلات (27,28,34) كان شكل الجسم الكريستالي غير منتظم وأبعاده :

0.5×1.2-1.4MKM – 0.4 كما هو موضح بالجدول رقم (1).

جدول /1/ : شكل الجسم الكريستالي (الإندو توكسين) للعزلات *B.t*

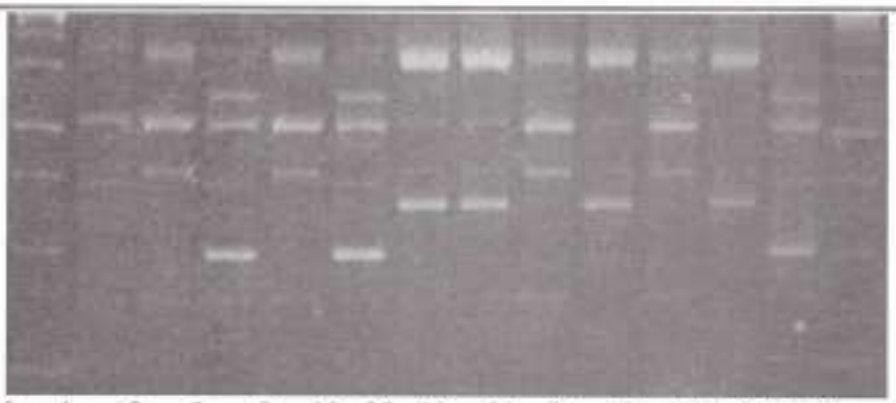
رقم العزلة	مكان العزل	شكل الكريستال (الإندو توكسين)
1	حقل مزروع باذنجان	معين مع نهايات منفرجة
2	حقل مزروع باذنجان	معين مع نهايات منفرجة
5	حشرة أبو دقيق الكرنب	معين مع نهايات ممتدة
9	حشرة من فصيلة*Scarabaidae*	معين مع نهايات منفرجة
19	الدبور الشرقي	معين مع نهايات ممتدة
27	حقل مرج	كريستالي غير منتظم
28	حقل مرج	كريستالي غير منتظم
31	حقل مزروع قمح	معين مع نهايات منفرجة
34	حقل مرج	كريستالي غير منتظم

أما نتائج الدراسة البيوكيميائية والفيزيائية للتميز بين العزلات وتحديد الأنواع التي تنتمي إليها العزلات المدروسة فاعتمدت على ما يلي : تشكيل اسيتيل ميتيل كاربونيل، تحلل ماني للنشاء، تحليل الكربوهيدرات، تشكل أنزيمات تحلل البروتين ،تشكيل الدهن،تحليل ساليسين (جليكوزيد)، سكروز، مانوز، وقدرتها على تشكيل الأيكزوتوكسين وطبقة رائقة على بيئة مرق اللحم فهي معروضة في الجدول رقم /2/.

جدول رقم (2) الخواص الفيزيوبيوكيميائية لعزلات البكتريا Bt

رقم العزلة	تشكيل				[illegible]	استخدام				[illegible]	[illegible]
	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]		
1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BTH_1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
19	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
BTH[illegible]	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
27	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
28	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
34	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
BTH[illegible]	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+

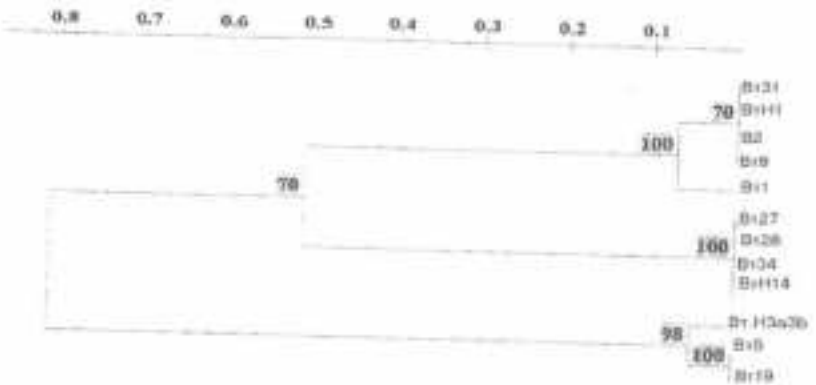
للتأكد من نتائج الدراسة الفيزيوبيوكيميائية تم إجراء دراسة وراثية (جزيئية للعزلات) وذلك عن طريق استخلاص DNA العزلات وإكثاره عشوائياً باستخدام جهاز PCR و تقانة RAPD لرسم شجيرة القرابة الوراثية اعتماداً على استخدام برنامج TreeCon حيث كانت النتائج متطابقة تماماً بين الدراستين. ويبين المصور رقم (3) منتجات تضاعف DNA عزلات البكترياBt مع البرايمرOPA-9 وتوافق توزعها كما هو في الدراسة الفيزيوبيوكيميائية.



M 1 2 5 9 19 27 28 31 34 H1 H14 3a3b M

مصور رقم (3) منتجات تضاعف DNA عزلات البكتريا Bt مع برايمر OPA-9.

يؤكد المصور رقم (4) توزع العزلات تماماً كما جاء في الدراسة الفيزيوبيوكيميائية والمورفولوجية والميكروسكوبية،حيث يلاحظ من المصور رقم (4) أن العزلات (1، 2، 9، 31) تنتمي إلى BtH1 و العزلات (5، 19) تنتمي إلى BtH3a3b أما العزلات (27، 28، 34) تنتمي إلى BtH14، وتتفق هذه الدراسة مع دراسة (Adelaida et al ,2003) عندما استخدمت تقانة RAPD بنجاح لتصنيف سلالات مختلفة للبكتريا Bt.



مصور رقم (4) الشجرة الوراثية لقرابة عزلات البكتريا Bt.

أما إنتاجية العزلات فتم تحديدها من خلال استخدام أوساط غذائية مختلفة جدول/3/ حيث تبين أن إنتاجية السلالات التابعة لـ: BtH3a3b - BtH1 كانت

حوالي 1.45-2.58 مليار بوغة/ مل أما إنتاجية السلالات التابعة BtH14 فكانت مابين 2.62-3.12 مليار بوغة/مل ، وهذا قريب من إنتاجية الشاهد.

جدول/3/:إنتاجية عزلات Bt على وسط غذائي من الخميرة و السكريات:

رقم العزلة	تركيز الأبواغ مليار/ مل وسط غذائي من البيئة رقم:		
	3	10	11
1	1.8	2.14	1.6
2	1.5	1.45	1.96
9	1.8	2.32	2.0
31	1.95	2.58	1.8
BtH_1 800	2.45	2.75	2.67
5	-	1.7	1.6
19	-	1.5	1.82
BtH_{3a3b}	-	1.8	1.9
27	-	2.62	-
28	-	2.84	-
34	-	3.12	-
BtH_{14} 7-1/23	-	3.35	-

تم تحديد الفعالية الحيوية للايكزوتوكسين الذي تنتجه السلالات التابعة لـــBtH1 عن طريق تحضير أربع تخفيفات(1:4,1:8,1:16,1:32) واستخدم كل تخفيف بثلاثة مكررات في معاملة غذاء يرقات الذباب المنزلي بعمر ثلاثة أيام أما الشاهد فتم معاملته

بالماء المقطر، ووضعت كل المعادلات في الحاضنة على درجة حرارة 28 C° وفي اليوم الخامس تم حساب تعداد الذباب الميت وفق المعادلة التالية: X=K-B/K × 100

K : تعداد الذباب الطائر بالشاهد.

B : تعداد الذباب الطائر بالمعاملة.

تبين نتيجة الدراسة أن العزلات (31،9،2،1) تحتوي الايكزوتوكسين وكانت الـ LC50 ليرقات الذباب المنزلي مابين 5.8-3.76 ميكروليتر/غرام غذاء وهي لاتقل فعالية عن سلالة الشاهد (BtH1-800) المحفوظة في متحف معهد الأبحاث العلمية للميكروبيولوجيا الزراعية في مدينة سانت بطرس بورغ كما هو موضح في الجدول رقم /4/.

جدول رقم /4/: سمية ايكزوتوكسين عزلات BtH_1 لحشرة الذباب المنزلي:

رقم العزلة	تخفيف البكتريا النامية بالوسط الغذائي السائل	ميكرو ليتر / غ غذاء	% لموت الذباب المنزلي	LC50 ميكروليتر/غ غذاء
1	1:4 1:8 1:16 1:32	25.0 12.5 6.25 3.12	96.0 88.0 60.0 4.0	4.9
2	1:4 1:8 1:16 1:32	25.0 12.5 6.25 3.12	90.0 72.5 55.0 40.0	5.93
9	1:4 1:8 1:16 1:32	25.0 12.5 6.25 3.12	92.0 69.8 47.6 32.3	5.8
31	1:4 1:8 1:16 1:32	25.0 12.5 6.25 3.12	100 86.3 80.4 57.9	3.76
$BtH_1$800	1:4 1:8 1:16 1:32	25.0 12.5 6.25 3.12	100 100 81.9 71.9	3.04

أما تحديد الفعالية الحيوية للعزلات (27,28,34) التابعة للنوع Bt14 فكان عن طريق تحضير أربعة تخفيفات من المعلق البكتيري لكل سلالة وهي . 0.0005% 0.00006 % , 0.000125 % , 0.00025 % تم دراسة كل تخفيف في أربعة مكررات يحتوي كل مكرر 25 يرقة بالعمر الرابع من البعوض في طبق بتري كما تم إضافة 50 مل لكل مكرر ووضعت جميع الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 28 C° ثم تم حساب عدد اليرقات الميتة بعد 24 ساعة وحساب LC50 حسب معادلة: Kerber ، ويوضح الجدول رقم (5) أن قيمة LC50 لهذه العزلات تراوحت من 0.24 % – 0.17 وهي قريبة جداً من قيمته في سلالة الشاهد.

جدول رقم /5/ : فعالية عزلات BtH_{14} إزاء يرقات البعوض *Aedes aegypti*

رقم العزلة	تركيز البكتريا الناشئة بالوسط الغذائي السائل. 10^{-1}%	عدد يرقات العمر الرابع الميتة خلال 24 ساعة	LC 50. 10^{-1}%
27	0.5 0.25 0.125 0.06	88 40 24 4	0.24
28	0.5 0.25 0.125 0.06	92 62 20 6	0.20
34	0.5 0.25 0.125 0.06	100 70 32 10	0.17
BtH_{14}	0.5 0.25 0.125 0.06	100 78 36 12	0.15

من خلال النتائج تبين أن العزلات من الأراضي السورية لم تكن اقل فاعلية من السلالات الموجودة في متحف معهد الأبحاث العلمية للميكروبيولوجية الزراعية

(سانت بطرس بورغ) حيث تم تحديد قيمة LC50 للعزلات (1،2،9،31) على يرقات خنفساء البطاطا وتراوحت قيمته بين(0.29 – 0.23)% بينما عند الشاهد كانت قيمته(0.2 %) كما هو موضح بالجدول رقم /6/ .

جدول رقم/6/:فعالية عزلات BtH_1 إزاء يرقات العمر الثاني لحشرة خنفساء البطاطا

رقم العزلة	تركيز البكتريا النامية بالوسط الغذائي السائل %	% لموت يرقات العمر الثاني خلال أيام التجربة 4	7	LC_{50} %
1	10.0 2.0 0.4	60 52 36	100 98 82	0.23
2	10.0 2.0 0.4	52 36 16	100 92 68	0.29
9	10.0 2.0 0.4	56 44 28	100 100 74	0.27
31	10.0 2.0 0.4	52 44 32	100 100 80	0.24
$BtH_1$800	10.0 2.0 0.4	64 52 40	100 100 92	0.20

وكذلك الأمر بالنسبة لفعاليــة العــزلات(1، 2، 9، 31) التابعــة لـــ BtH1 والعزلات (5، 19) التابعة لــBtH3a3b المدروسة ضد يرقات فراشة الطحــين حيــث تراوحت قيمة LC50 لها مابين % 0.65-0.91 ولم تكن اقل فعالية من سلالات الشــاهد كما هو موضح بالجدول رقم /7/ .

جدول رقم /7/: حساسية يرقات فراشة الطحين لعزلات البكتريا التابعة لـ BtH_1 و BtH_{3a3b}

رقم العزلة	تركيز البكتريا النامية بالوسط الغذائي السائل %	% لموت يرقات العمر الثاني خلال أيام التجربة		LC_{50} %
		7	10	
Bt H_1				
1	1.0 0.5 0.25	46.7 23.7 3.33	65.1 31.2 8.4	0.69
2	1.0 0.5 0.25	46.7 20.0 0	72.0 28.0 0	0.71
9	1.0 0.5 0.25	50.0 26.7 6.7	56.8 31.4 6.7	0.74
31	1.0 0.5 0.25	33.2 20.0 3.3	45.9 26.7 8.4	0.81
BtH_1 800	1.0 0.5 0.25	53.4 23.7 6.6	66.8 37.9 13.3	0.65
BtH_{3a3b}				
5	1.0 0.5 0.25	33.2 16.7 0	54.9 19.6 0	0.84
19	1.0 0.5 0.25	23.4 13.3 0	39.2 15.8 8.4	0.91
BtH_{3a3b}	1.0 0.5 0.25	23.4 16.7 0	40.3 24.0 0	0.89

الاستنتاجات: Conclusions

تسمح نتائج البحث أن نؤكد أن بكيتريا:

Bacillu thuringiensis واسعة الانتشار في مناطق وبلدان كثيرة مختلفة.

حيث تم عزل العزلات التالية من أراضي منطقة دير الزور وحقولها:

أولاً: (31،9،2،1) وهي تنتمي إلى السلالة BtH1

ثانياً: (34،28،27) وهي تنتمي إلى السلالة BtH14

ثالثاً :(19،5) وهي تنتمي إلى السلالة BtH3a3b.

1. شكلت العزلة رقم /34/أعلى إنتاجية بين جميع العزلات المدروسة فكانت إنتاجيتها 3.1 مليار بوغة/مل.

2. تبين أن العزلات (31،9،2،1) التي تنتمي لـــBtH1 تحتوي الايكزوتوكسين بحدود 3.76- 5.93% .

3. العزلات (34،28،27) لم تكن أقل فعالية من السلالة الشاهدBtH14 في قتل يرقات البعوض Aedes aegypti .

4. أثبتت العزلات (31،9،2،1)التي تنتمي BtH1 فعالية في قتل يرقات العمر الثاني لحشرة خنفساء البطاطا.

5. أظهرت العزلات (19،5) BtH3a3b والعزلات (31،9،2،1) التي تنتمي لـــ BtH1 فعالة ضد يرقات فراشة الطحين.

التوصيات:Recommendations

*- يمكن أن تكون العزلات التي حصلنا عليها مادة أولية لتصنيع المبيـــدات الحيويـــة بنجاح وفعالة في السيطرة على الحشرات الضارة.

*- يمكن رفع فعالية هذه العزلات ضد الحشرات عن طريق الانتخاب والاختيار لأفضل وسط غذائي وشروط لتنميتها.

المراجع:

1. Кандыбин Н.В., Патыка В.Ф., 2009,Ермолова В.П., Патыка Т.Н. **Микробиоконтроль численности насекомых и его доминанта Bacillus thuringiensis** // Инновационный центр защиты растений, С.-Петербург-Пушкин, 244 с.
2. Кандыбин Н.В. 2006**Фундаментальные и прикладные исследования микробиометода защиты растений от вредителей. Состояние и перспективы** // Биологическая защита растений - основа стабилизации агроэкосистем. Материалы конференции, , с. 32-44.
3. Патыка В.Ф., Патыка Т.Н. 2007,**Экология Bacillus thuringiensis. Ин-т микробиологии и вирусологии им.** Д.К.Заболотного НАНУ, Киев, 216 с.
4. ABBOTT, W.S. 1925,**A method for computing the effectiveness of an insecticide** // J. Econ. Entomol., 18, с. 265-267.
5. ADELAIDA M., GAVIRIA RIVERA, FERGUS G. PRIEST, 2003, **Molecular typing of Bacillus thuringiensis Serovars by RAPD-PCR** // *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 2, p. 254-261.
6. BRADLEY D., HARKEY M.A., KIM M.K., BIEVER D., BAUER L..S. 1995,**The insecticidal Cry1B protein of Bacillus thuringiensis has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae** // *J. of Invertebrate Pathology*, 65, p. 162-173.
7. CHATTERJEE S.N., BHATTACHARYA T., DANGAR T.K., CHANDRA G. 2007, **Ecology and diversity of Bacillus thuringiensis in soil environment** // *African J. of Biotechnology*, 6 (13), p. 1587-1591.
8. DE BARJAC H. 1990, FRACHON E. **Classification of Bacillus thuringiensis strains** // Entomophaga, 35, p. 233-240.
9. DONOVAN W.P., DONOVAN J.C, ENGLEMAN J.T. 2001,**Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of Bacillus thuringiensis towards Agrotis ipsilon and Spodoptera exigua** // *J. of Invertebrate Pathology*, 78, p. 45-51.
10. ESTRUCH J.J., WARREN G.W., MULLINS M.A., NYE G.J., CRAIG J.A., KOZIEL M.G. 1996,**Vip3A a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects** // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 93, p. 5389-5394.

11. IMRE S. 2005.**Otvos, Holly Armstrong, Nicholas Conder // Safety of Bacillus thuringiensis var. kurstaki Applications for Insect Control to Humans and Large Mammals** // 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact. Victoria BC,
12. LAMBERT B. 1992, **Peferoen M. Insecticidal promise of Bacillus thuringiemis** // *Bioscience*, 42, p. 112-122.
13. LEVIN D.B. 2007, **Human Health Impact Assessment after Bt Exposures**, p. 61-63 // Côté J.C., Otvos I.S., Schwartz J.L., and Vincent C. (ed.). Proceeding of the 6th Pacific Conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its Environmental Impact. Érudit, Montréal, 140 p.
14. LYSENKO O. 1963.**The taxonomy of entomogenous bacteria** // Insect Pathology, I (Steinhaus E.A. ed.), New York, Acad. Press,
15. LYSENKO O. 1985,**Nonsporeforming bacteria pathogenic to insect: incidence and mechanisms** // Am. Rev. Microbiol. 39, p. 217-224.
16. MOELLENBECK D.J., PETERS M.L., BING J.W., ROUSE J.R., HIGGINS L.S., SIMS L. et al. 2001,**Insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis protect corn from corn rootworms** // *Nature Biotechnology*, 19, p. 668-672.
17. NARESH ARORA, NEEMA AGRAWAL, VIMALA YERRAMILLI, RAJK BHATNAGAR , 2007, **Biology and application of Bacillus thuringiensis in Integrated Pest Management** // General Concepts in Integrated Pest and Disease Management. Springerp. 227-244.
18. RAIMONDO S., PAULEY T.K., BUTLER L. 2003, **Potential impacts of bacillus thuringiensis v ar. kurstaki on five salamander species in West Virginia** // Northeastern Naturalist, 10(1), p. 25-38.
19. ROSENQUIST H., SMIDT L., ANDERSEN S.R., JENSEN G.B., WILCKS A. 2005, **Occurrence and significance of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis in ready-to-eat food** // FEMS Microbiology Letters, 250, 1, p. 129-136.
20. SAYYED A.H., CRICKMORE N., WRIGHT D.J. 2001,**CytIAa from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis is toxix to the diamond back moth, Plutella xylostella, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain** // Applied and Environmental Microbiology, 67, p. 5859-5861.

21. SMIRNOFF U.A. 1965,**The formation of crystals in Bacillus thuringiensis var. Thuringiensis Berliner before sporulation of low temperature inculcation** // *J. of Insect pathology*, 5, 2, p. 242-250.
22. VAN DE PEER Y., DE WACHTER Y. TREECON 1994,**for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment** // Comput. Appiic. Biosci., 10, p. 669-870.
23. YOON J-M., KIM G-W. 2001, **Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish Silurus asotus** // Indian Academy of Sciences, 26, p. 641-647.
24. ZHANG YU-PING. 1998,**A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay** // *J. of virological Methods*, 71, p. 45-50.

Isolation of Enthomopathogenic Bacteria *(Bacillus thuringiensis)* from Deir- Ezzor Area and Evaluation of its Biological Efficiency.

Al Hummada AlAbdalla Jamal
Department of plant protection, Agronomy faculty,
University Alfurat, Syrian Arab Republic.

Abstract

This research was conduct in the laboratories of Agriculture Faculty in Deir Ezzor and Laboratory Scientific Research Institute for Agricultural Microbiology in St. Petersburg in 2009, to Isolation of Enthomopathogenic Bacteria (*Bacillus thuringiensis*) from Deir- Ezzor Area and Evaluation of its Biological Efficiency It has taken 14 samples from soil, Live and dead insects from different fields in Deir Ezzor From 2000 isolations 56 isolations was selected based on morphological characteristics of bacterial colonies and attributes like type *Bacillus thuringiensis*. the result showed that of the morphological, cultural, physiological, biochemical, genetical and entomocidal study, that these properties of these 9 isolations is presented total identity of the strains under question of the referent *Bacillus thuringensis*.

It is distributed as follows: isolations (31, 9 , 2 , 1) are related to BtH1 ;isolations (19 ,5) BtH3a3b, all of them are effective in killing larvae of the flour moth (*Ephestia kuehiella*)and potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*.), but isolations (27 , 28 , 34) are related to BtH14 , and they are effective in killing mosquito larvae *Aedaes aegupti* .

Key words: bacteria Bt, Molecular study , flour moth, potato beetle.

Received 21 /5/2010
Accepted 13 /6/2010