Identification of local isolates of the genus Bacillus and testing their effectiveness in the laboratory against the two-spotted spider mite Tetranychus urticae Koch.

Dr. Oumaima Naser*
Dr.Majeda Mufleh**
Lama Hassan***

(Received 15 / 4 / 2024. Accepted 3 / 9 /2024)

□ ABSTRACT □

Isolation of *Bacillus subtilis* from the local soil in Lattakia Governorate, the bacterial isolates were characterized by some characteristics based on their Gram staining, some biochemical properties and depending on the color characteristics on specific and selective cultures.

The isolates were tested against the Koch red two-spotted spider. *Tetranychus urticae*, under laboratory conditions, on stages (egg, nymph, and adult).

The results of the tests showed that the isolates had a significant effect on the egg stage, as the concentration of 10^7 cells / ml gave the highest mortality rate of 78 %, with a significant difference from the rest of the treatments. Mortality in other stages was (38−82) % for larvae, (37−80) % for nymphs of the first age, (37−78) % for nymphs of the second age, and (35−74) % for adult females.

The control mortality rates ranged between (0−7) % for larvae, (2−8) % for first-instar nymphs, (2-11) % for second-instar nymphs, (5-8) % and (4-6) % for adult females.

Keywords: red two-spotted spider, *Tetranychus urticae* Koch., *Bacillus subtilis*

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Professor,Higher Institute for Environmental research, Tishreen University, lattakia, Syria**
** **PhD , faculty of Agricultural Engineering ,Tishreen University, lattakia, Syria**
*** **PhD Student, Higher Institute for Environmental research, Tishreen University, lattakia, Syria**

تحديد أنواع عزلات محلية من الجنس واختبار فعاليتها مخبرياً في مكافحة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين ***Tetranychus urticae* Koch**. ***Bacillus***

د. اميمة ناصر*

د. ماجدة مفلح**

لمى حسن***

(تاريخ الإيداع 15 / 4 / 2024. قبل للنشر في 3 / 9 / 2024)

□ ملخّص □

تم تحديد عزلات من بكتريا النوع *Bacillus subtilis* من التربة المحلية في محافظة اللاذقية، تم جمع عينات التربة بتاريخ 3/9/2021 وتمييز العزلات البكتيرية ببعض الخصائص اعتماداً على تلوينها بطريقة غرام، وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية وتبعاً للخصائص اللونية على المستنبتات النوعية والانتقائية.

تم اختبار كفاءة العزلات في مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين .*Tetranychus urticae* Koch، وذلك ضمن ظروف المخبر، وذلك على أطوار (البيضة، الحورية والبالغة).

أظهرت نتائج الاختبارات أن العزلات لها تأثير ملحوظ في مرحلة البيضة، حيث أعطى التركيز 10^7خلية/ مل أعلى نسبة قتل بلغت % 78 بفرق معنوي عن بقية المعاملات. كانت معدلات القتل في المراحل الأخرى % (82–38) لليرقات، و% (80–37) لحوريات العمر الأول، و% (78–37) لحوريات العمر الثاني، و% (74–35) للإناث البالغة.

تراوحت معدلات وفيات الشاهد بين % (7–0) لليرقات و% (8–2) لحوريات العمر الأول و% (11–2) لحوريات العمر الثاني و% (8–5) و% (6–4) للإناث البالغة.

الكلمات المفتاحية: العنكبوت الأحمر ذي البقعتين، .*Tetranychus urticae* Koch، *Bacillus subtilis*

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY–NC–SA 04

* **استاذ ، المعهد العالي للبحوث البيئية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

** **دكتوراه، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

*** **طالبة دكتوراه، المعهد العالي للبحوث البيئية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

مقدمة:

يعد العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)، أكثر أنواع العناكب الحمراء تعداداً. (Bolland *et al.* 1998)

تصنيف *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Kingdom:
Animalia
Phylum:
Arthropoda
Class:
Arachnida
Order:
Acari
Family:
Tetranychidae
Genus:
Tetranychus
Species:
T. urticae
Subspecies:
T. urticae

يعود العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch لعائلة Tetranychidae ضمن رتبة Acari وهو من الآفات الاقتصادية الخطرة التي تصيب العديد من العوائل النباتية المختلفة ،كالعائلة الباذنجانية البقولية الخبازية، النجيلية، نباتات الزينة، أشجار الفاكهة، والأدغال ويسبب لها خسائر اقتصادية كبيرة إذ تقوم الافراد المتحركة للآفة بامتصاص العصارة النباتية من الاوراق ،والبراعم وإحداث تشوهات فيها، فضلاً عن تجمع الاتربة والغبار على الشبكة التي تنسجها ،مما يؤدي إلى عرقلة عملية التركيب الضوئي وقلة تكوين الاوراق الجديدة، والازهار، وجفاف الاجزاء المصابة وموتها .

بعد انقضاء فصل الشتاء، تهاجر الإناث إلى الحشائش والنباتات العشبية الأخرى، يعود الضرر المباشر للعنكبوت إلى ثقوب التغذية، حيث تصبح الأوراق متقطعة ثم تجف، إذا كانت الهجمات شرسة، قد يموت النبات. يتطور العنكبوت الأحمر ذو البقعتين أسرع ما يكون بين 23 و30 درجة مئوية، وفي رطوبة نسبية تقل عن 50% (Jeppson *et al*. 1975).

تتعلق خصوبة *T. urticae* بشكل خاص بعامل العمر، وتعتمد بشدة على عوامل أخرى مثل النبات المضيف، نوعية الغذاء، درجة الحرارة، حجم المستعمرة والكثافة. تتميز بالقدرة التكيفية، كما لوحظت الخصوبة العالية للإناث البالغات، مما يؤدي إلى زيادة عددية سريعة (Carey and Bradley, 1982).

تتطلب معاملات المكافحة التقليدية للعنكبوت الأحمر ذو البقعتين استخدام مبيدات حشرية واسعة النطاق والتي لا تكافح الآفة فحسب، وإنما تقضي على معظم أعدائها الحيوية، بما في ذلك العناكب المفترسة. وتسبب تطور سلالات من *T. urticae* مقاومة للمبيدات الحشرية بالإضافة إلى مشاكل الأثر المتبقي من المبيدات (Muir and Cranham; 1979).

ومن هنا تأتي أهمية المكافحة الحيوية للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين طريق عناكب فصيلة phytoseiidae، على سبيل المثال *Phytoseiulus persimilis* حيث يتم حالياً تربية حوالي 20 نوعاً من العناكب المفترسة على نطاق واسع وبيعها في جميع أنحاء العالم (Zhang, 2003).

أما بالنسبة للبكتيريا، فإن *Bacillus thuringiensis* Berliner هو عامل مكافحة معروف، ولكن هذا النوع ليس من مسببات الأمراض بالمعنى الدقيق للكلمة (van der Geest *et al.*, 2000)

لم يتم حتى الآن استخدام *Pseudomonas sp.* كعامل مكافحة حيوية للعناكب. ومع ذلك، فقد تم تحديد العدوى التي تسببت في إمراضية *T. urticae* على أنها *Pseudomonas aeruginosa*(Poinar and Poinar1998) وهذا مثال على الاهتمام المتزايد بمسببات أمراض العناكب، كما يتضح من العدد الكبير من المراجع حول هذا الموضوع (Poinar and Poinar 1998; van der Geest *et al.* 2000)، يوضح الشكلان (1و2) كل من أعراض الإصابة وشكل بالغة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch.

الشكل (1): العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch (المصري والأخرس، 2013.)

الشكل (2): أعراض الإصابة على نبات الفاصولياء نلاحظ ا لكثافة العددية للآفة و الإفراز الكثيف للغزل العنكبوتي (المصري والأخرس، 2013.)

دورة الحياة: (Fasulo *et al.*, 2009)

- تضع الأنثى البيض إفرادياً على السطح السفلي للأوراق ويبلغ عدده في المتوسط 150 بيضة، ثم تفقس اليرقات (ذات ثلاثة ازواج من الأرجل) بعد 3 – 4 ايام في الصيف، وتتغذى اليرقة مدة 2– 3 يوم على عصارة النبات ثم تسكن، بعد 24 ساعة تنسلخ وتتحول إلى الحورية الأولى (ذات أربعة ازواج من الأرجل) .
- بعد أن تتغذى الحورية الأولى لمدة يومين تتحول إلى الحورية الثانية التي تتغذى من 1–2 يوم ثم تتحول إلى الحيوان الكامل ذكر أو انثى.
- دورة الحياة في الصيف 8–15 يوم مدة حياة الأنثى صيفاً من15–20 يوم.

*عدد الأجيال: 28 جيل في السنة.

*الطور الضار: جميع الأطوار المتحركة (يرقة – حورية – حيوان كامل).

*العوائل: عوائل متعددة مثل الفول السوداني – السمسم – البرسيم – الفول.

محاصيل الخضر مثل القرعيات – البقوليات – الباذنجانيات – الخرشوف – السبانخ – الملوخية وأشجار الفاكهة مثل التين – الكمثرى والخوخ والمشمش وغيرها ونباتات الزينة مثل الورد والزهور والأسيجة مثل الدورنتا واللانتانا كما ينتشر على بعض النباتات المعمرة مثل الخروع وكثير من الحشائش. (المصري والأخرس، 2013.)

*ظروف انتشار الآفة: (Bolland *et al.* 1998)

- يزداد نشاط العنكبوت الأحمر عند وجود الأتربة وخشونة الأوراق مثل وجود البياض الدقيقي والجو الجاف والأوراق ذات الشعيرات غير الملساء وعند عطش النباتات.
- الأماكن الآمنة حول العروق الوسطية والبراعم وغيرها.

*مظهر الإصابة: تبدأ الإصابة بظهور بقع صفراء باهتة على السطح السفلي للأوراق تتحول تدريجياً إلى اللون المصفر ثم تصبح حمراء أو ضاربة إلى اللون البني أو بني محمر وفى النهاية يصبح لونها بني تقع هذه البقع بين العروق وحول العروق الوسطية.

- عند اشتداد الإصابة تلتحم تلك البقع لتغطي كل أو معظم السطح السفلي للأوراق المصابة.
- أما المسطح العلوي فتأخذ الورقة لون بنفسجي يتحول إلى اللون البني مع تقدم الإصابة وبذلك تجف وتذبل وتموت الأوراق وتسقط.
- قد ينقل العنكبوت من الأوراق إلى الثمار فيسبب لها بقع بنية مجربة مما يؤد إلى صغر حجمها ونشوه شكلها وقلة المحصول وخفض مواصفاته التسويقية.
- عمل نسيج عنكبوتي بين العروق أو بين الأوراق أو النباتات تتحرك عليه وتلتصق به الأتربة مما يعيق عمليات التنفس والتمثيل الضوئي للنباتات المصابة.

*مكان الإصابة والضرر : (Poinar and Poinar 1998; van der Geest *et al.* 2000)

على السطح السفلي للأوراق – بين فصوص الوريقات – حول العروق الوسطية والنسيج العنكبوتي يغطي كل الأوراق المصابة وقد يحيط بالبرعم ويسبب موت النبات وقلة المحصول.

Bacillus subtilis (العصوية الرقيقة)

العصوية الرقيقة هي بكتيريا هوائية إيجابية الجرام في التربة، وقد استخدمت على نطاق واسع لإنتاج البروتينات غير المتجانسة، فهي يفرز العديد من الإنزيمات، مما يمكّن البكتيريا من البقاء في بيئة متغيرة باستمرار. يتمتع هذا النوع وبعض أقاربه بقدرة ممتازة على إفراز البروتين، مما يجعلهم مضيفين مهمين لإنتاج البروتينات الطبية والإنزيمات الصناعية. لهذه الأسباب، تم استخدامه على نطاق واسع لإنتاج البروتينات غير المتجانسة. (su *et al.* 2020)

شدت بكتريا *Bacillus subtilis* انتباه الباحثين وذلك لإنتاجها الانزيمات، المضادات الحيوية والمواد الكيمياوية (Metabolites) كما أنها تتواجد وبكثرة في ماء الري والتربة وخاصة في محيط الجذور، وتنتج مدى واسع من المضادات الحيوية. (عمران وآخرون، 2015)

تم توفير سلالة جديدة من بكتيريا *Bacillus subtilis* التي تنتج مستقلباً يُظهر نشاطًا مبيدًا للآفات. يتضمن الاكتشاف أيضاً مستقلب قابل للاستخراج وقابل للذوبان في الماء وذو وزن جزيئي كبير (<10.000 دالتون) يتم إنتاجه بواسطة السلالة الجديدة من *Bacillus subtilis* التي تظهر نشاط مبيد حشري ضد ديدان ساق الذرة والحشرات والديدان الخيطية الأخرى. (Ramyabharathi *et al.*, 2018)

كما قيمت إحدى الدراسات فعالية *Bacillus subtilis* ضد العنكبوت الأحمر ذي البقعتين –موضوع الدراسة– الذي يصيب الباذنجان تحت ظروف المختبر، والبيت الزجاجي بتركيز 2.470×10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل، كما تم القيام بدراسة تأثيرها على العدو الحيوي المفترس *Phytoseius plumifer*، وصلت نسبة وفيات الآفة المستهدفة *T.urticae* تحت ظروف المختبر والدفيئة بعد ثلاثة أيام من المعاملة على التوالي (% 67.11, 72.22)، كما أظهر العنكبوت المفترس *P. plumifer* قدرة تحمل أعلى من *T. urticae* للمستحضر البكتيري. Al-Azzazy *et al.*, (2020)

أهمية البحث وأهدافه:

1- أهمية البحث:

✓ الأهمية البيئية: مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* الآفة الزراعية ذات المدى العوائلي الواسع بوسائل حيوية صديقة للبيئة.

✓ الأهمية الاقتصادية: تشكل هذه الدراسة أحد المساهمات للحصول على نواة منتج محلي –مبيد حيوي– قادر على تحقيق الاكتفاء الذاتي في سياق مجال استخدامه، وهو ما يعد مساهمة في تطبيق برنامج "إحلال بدائل المستوردات" الذي يستقطب اهتمام السياسة الحكومية على الصعيد الاقتصادي عن طريق التوجّه نحو المزيد من الاعتماد على الذات بهدف تخفيض الطلب على القطع الأجنبي الناجم عن الطلب على الاستيراد، وتأمين إنتاج عدد من المواد والسلع محلياً.

✓ الأهمية التطبيقية: الحصول على جراثيم معزولة محلياً من البيئة السورية وتصنيفها، وبالتحديد الجنس *Bacillus* ومقارنة فعاليتها مع سلالات تجارية، لقياس كفاءتها في مكافحة الآفة المستهدفة *، مخبرياً وحقلياً.

2- أهداف البحث:

❖ تحديد وتوصيف عزلات محلية من النوع البكتيري *Bacillus subtilis* .

❖ اختبار كفاءة هذه العزلات في السيطرة على الأكاروس الاحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* وتحديد نسب الموت لأفراده وأطواره مخبريا

طرائق البحث ومواده:

1- مكان الدراسة:

تم القيام بجمع عينات من نظم بيئية وزراعية مختلفة في المنطقة الساحلية شملت 4 مواقع في اللاذقية هي (دائرة المكافحة الحيوية في الهنادي– البصة – برج سلام – كسب)، تم جمع عينات التربة بتاريخ 3/9/2021 ، وتم القيام بالتحاليل المخبرية للتربة، الحصول على العزلات البكتيرية، وإجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية لها، في مخبر الأحياء الدقيقة – قسم الوقاية البيئية، في المعهد العالي لبحوث البيئة في جامعة تشرين، ثم اختبار فعاليتها في مكافحة العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً في مخبر الأكاروسات – دائرة المكافحة الحيوية – مديرية الزراعة – اللاذقية.

2- تحاليل التربة:

بعد جمع عينات التربة تم إجراء التحاليل المخبرية لمعرفة الخصائص الآتية: نسبة المادة العضوية بطريقة الترميد في مرمدة على درجة حرارة 550^0C لمدة ثلاث ساعات، ودرجة الحموضة pH بوساطة جهاز .pH-meter +

3- عزل البكتيريا:

تم تحديد وانتقاء جراثيم يتم عزلها من تربة البيئة المحلية، حيث تمت عملية الكشف عن الجراثيم وعزلها وتعريفها بناءً على الطرائق المعتمدة عالمياً، حيث تم أخذ 1غ من كل عينة تربة مركبة بعد حساب نسبة الرطوبة وأضيفت التربة إلى أنابيب اختبار تحتوي على 10 مل ماء مقطر معقم، أخذ من أنابيب الاختبار بعد خلطها جيداً 1 مل من كل معلق وأضيف إلى أنبوب اختبار يحوي 10 مل بيئة Nutrient Broth ثم تم نقل أنابيب الاختبار إلى الحاضنة وتحضينها بدرجة حرارة 30^0C لمدة 4 ساعات ثم تمت الزراعة بطريقة التخطيط من الوسط الزرعي وذلك بعد القيام بسلسلة التخفيف ثم تفريق المستعمرات النقية، بالإضافة لإعادة تفريق المستعمرات المختلطة بتكرار طريقة التخطيط، وتم تحديد الجراثيم المعزولة من خلال دراسة الصفات المزرعية (شكل المستعمرة –لونها– ملمسها) والصفات الشكلية (شكل الخلايا، أبعادها، صبغة غرام، الحركة). (Van Der Geest *et al*.,2000)

4- تحضير المستعمرة الدائمة للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae*:

تم زراعة نباتات فاصولياء داخل أصص بلاستيكية تحت ظروف المختبر ثم عدوى النباتات بأوراق فاصولياء مصابة بالعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* للحصول على مستعمرة دائمة من الآفة واستخدامها في التجارب اللاحقة.

5- تحضير تراكيز مختلفة من المعلق الجرثومي:

تم تحضير المعلق الجرثومي بطريقة التخفيف وذلك بقطع قرص من الوسط الغذائي الذي نمت عليه الجراثيم بقطر 0.5سم يحتوي على مستعمرة واحدة ليوضع في انبوب اختبار ملئ سابقاً بـ 9 مل ماء مقطر معقم، تم رج الأنبوب جيداً لمدة 3 دقائق ليصبح التخفيف 1/10بعدها تم أخذ 1 مل من هذا التخفيف وأضيف إلى أنبوب اختبار آخر يحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم تم القيام برجه أيضاً ليصبح التركيز 1/100وتم الاستمرار بالتخفيف حتى الحصول على التخفيفات $10^7$10,$10^6$10,$10^5$10,10^4 خلية / مل والتي استخدمت في التجارب اللاحقة. (الباهلي، 2010)

6- دراسة تأثير المعلقات الجرثومية بتراكيز مختلفة في أطوار العنكبوت الأحمر ذي البقعتين*Tetranychus urticae*

6-1- التأثير في البيوض:

استخدمت في هذه التجربة أقراص من وريقات فاصولياء سليمة بقطر 3 سم، وضع عليها 10 إناث بالغة من العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* ثم وضعت الأقراص داخل أطباق بتري بلاستيكية (9) سم حاوية على قطن معقم مرطب بالماء عند قاعدة الطبق، تم ترك البالغات لمدة 48 ساعة للسماح لها بوضع البيض بعدها تم رفع البالغات، وترك 10 بيوض على سطح كل قرص ورقي بعد إزالة البيوض الزائدة بواسطة فرشاة ناعمة ، تم رش الوريقات بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1 مل لكل مكرر ولكل تركيز على حدة وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة باستعمال محقنة طبية أما معاملة المقارنة فتم رشها بماء مقطر معقم ، ثم تم وضع الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 30 ± 2^0م ورطوبة نسبية 60%–70%وذلك بوضع 30غ من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مل ماء موضوع داخل اوعية التجفيف وتضبط النسبة المئوية للرطوبة باستخدام مقياس الرطوبة (Hygrometer) . (الباهلي، 2010)

تم تسجيل النسبة المئوية لقتل البيض (موت الاجنة) بعد 72 ساعة من الرش. وتصحيح القيم حسب معادلة Schneider وOrell. (الباهلي، 2010)

$$\% \text{ للهلاك المصححة} = \frac{\text{نسبة الموت في المعاملة} - \text{نسبة الموت في المقارنة}}{100 - \text{نسبة الموت في المقارنة}} \times 100$$

6-2- التأثير في الأطوار الحورية والبالغة:

تم وضع 10 أفراد متحركة من الطورين الحوري والبالغ كل على حدة على أقراص من وريقات فاصولياء سليمة بقطر 3 سم، توضع الوريقات داخل أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9 سم، ثم تمت معاملتها بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1مل لكل مكرر ثلاثة مكررات لكل معاملة، أما معاملة المقارنة فقد تم رشها بماء مقطر معقم فقط، استعملت محقنة طبية لغرض عملية الرش، ثم وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25±2^{0}م ورطوبة نسبية 70%-60، ثم تم حساب عدد الأفراد الحية المتبقية بعد 24,48,72ساعة من الرش.

تم تحويل القيم إلى نسبة مئوية للقتل، ثم تم تصحيحها حسب معادلة Schneider و Orell *كما في الفقرة السابقة (الباهلي، 2010)

7- التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات احصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (C.R.D.) حيث سيدرس فيه تأثير المعاملات على الصفات المدروسة (التأثير في نسبة قتل الأطوار المختلفة وفي معدل عدد البيض الموضوع من قبل البالغات المعاملة) ستختبر معنوية الفروق باستخدام اختبار Least significant (L.S.D) different.

النتائج والمناقشة:

1- تحاليل التربة:

جدول (1) نسبة المادة العضوية ودرجة الحموضة في العينات

العينة	المصدر	نسبة المادة العضوية	pH
A	الهنادي	45.21	6.4
B	الهنادي	47.06	6.5
C	البصة	52.36	6.6
D	البصة	48.12	6.4
E	برج اسلام	57.88	7.1
F	برج اسلام	61.03	7.3
G	كسب	34.22	6.8
H	كسب	37.67	6.4

وهنا يلاحظ أن نسب المادة العضوية عالية نسبياً، وهو أمر متوقع كون عينات التربة مأخوذة من ترب البيوت المحمية، التي تعامل بالسماد العضوي بشكل منتظم بناءاً على المعلومات المتحصل عليها من المزارعين أصحاب هذه البيوت.

2- عزل البكتيريا:

جدول (2) الصفات الشكلية للعزلات البكتيرية الثلاث حيث A عزلة

الخصائص المدروسة			
	A1	A2	A3
شكل الخلايا	عصوي-أحادي، ثنائي سلسلة/	عصوي-أحادي، ثنائي سلسلة/	عصوي-أحادي، ثنائي سلسلة/
العرضµm	1.0-1.2	0.8-0.9	0.8-1.2
الطولµm	3.0-5	2-6	2-5
صبغة غرام	+	+	+
الأبواغ	+	+	+
الحركية	+	+	+

جدول (3) الصفات البيوكيميائية للعزلات البكتيرية حيث A عزلة

الاختبار البيوكيميائي	A1	A2	A3
الحاجة للأوكسجين	+	+	+
الكاتلاز	+	+	+
الأوكسيداز	v	+	-
انحلال الدم	+	-	-
اليورياز	-	+	-
أحمر الميتيل	-	-	-
فوكس بروسكار	+	+	+
H_2S	-	+	-
إسالة الجيلاتين	+	+	+
خلات	+	-	+
الاندول	-	-	-
النترات	+	-	+
السترات	+	+	+
غليسيرول	+	-	+
الارجينين	-	+	+
الأورنيثين	-	-	-
إيسكولين	+	+	+
فينيل ألانين	-	+	-

وبناءً على النتائج الموضحة في الجداول تم تصنيف العزلات البكتيرية مرجعياً (Atlas, 2010) كما يلي:

A1: *Bacillus subtilis*
A2: *Bacillus thuringiensis*
A3: *Bacillus cereus*

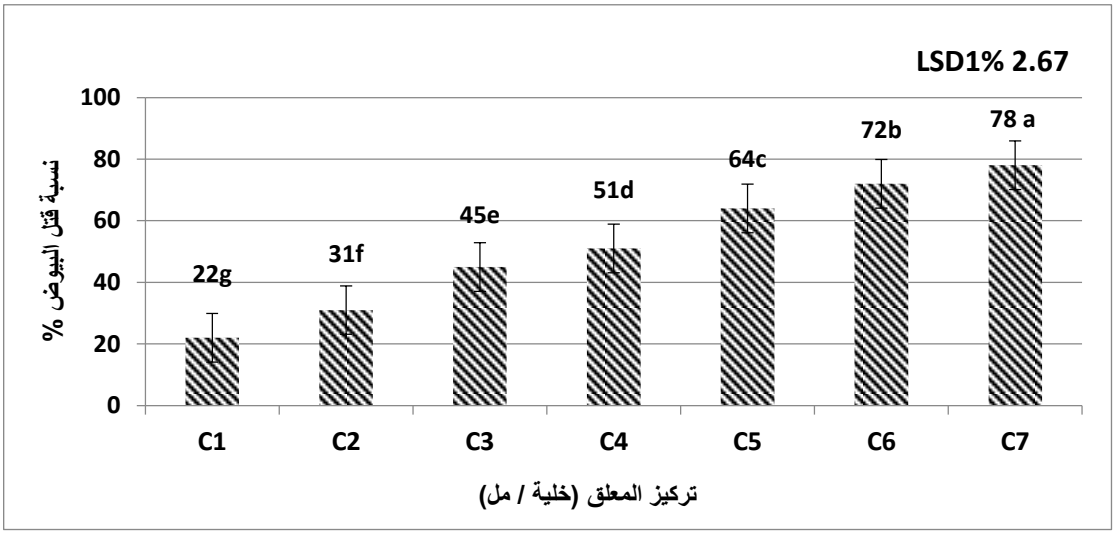
تم تخصيص هذا المقال لعرض نتائج اختبار فعالية أحد هذه العزلات ضد الآفة المستهدفة، وهي ***Bacillus subtilis***

3- اختبار فعالية البكتيريا *Bacillus subtilis* على العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* :

3-1- التأثير في البيوض:

جدول (4): تأثير المعلقات في البيوض بتراكيز مختلفة

تركيز المعلق (خلية /مل)	النسبة المئوية لقتل البيوض %
10^1	22g
10^2	31f
10^3	45e
10^4	51d
10^5	64c
10^6	72b
10^7	78a
LSD1%	2.67



الشكل (3) مخطط يوضح تأثير المعلقات في البيوض بتراكيز مختلفة

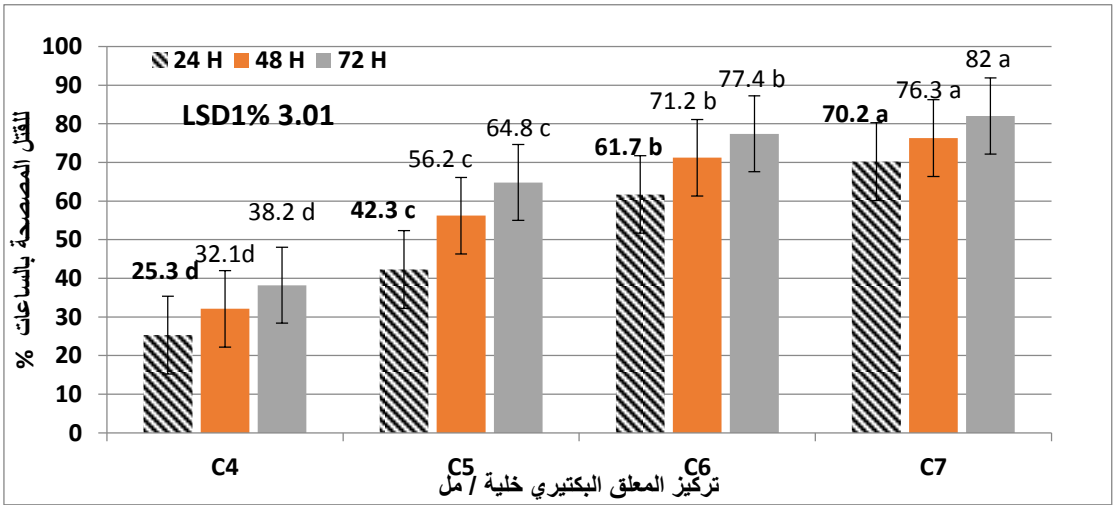
توضح النتائج المبينة في الشكل (3) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في دور البيضة ووجود فرق معنوي عالي بين المعاملات في إحداث نسبة قتل لطور البيضة اذ أعطى التركيز 10^7 خلية/ مل أعلى نسبة قتل بلغت % 78 بفرق معنوي عن بقية المعاملات في حين أعطى كل من التركيزين 10^1 خلية/ مل، 10^2خلية/ مل أقل نسبة قتل بلغت20% ، 31% على التوالي وبدون فرق معنوي فيما بينهما.

ويفسر قتل البيض لقدرة هذه البكتريا على إفراز الأنزيمات المحللة لجدار البيضة وصولاً الى الجنين وبالتالي قتله أو إحاطة هذه البكتريا بغلاف البيضة وبالتالي تكوين طبقة عازلة عن المحيط الخارجي وبذلك تمنع وصول الهواء الى الجنين فيموت اختناقاً.

3-2- التأثير في الحوريات:

جدول (5) تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. subtilis* في النسبة المئوية لقتل الحوريات

تراكيز المعلق البكتيري خلية/مل	% للقتل المصححة بالساعات		
	24	48	72
10^4	25.3 d	32.1 d	38.2d
10^5	42.3 c	56.2 c	64.8c
10^6	61.7 b	71.2 b	77.4b
10^7	70.2 a	76.3 a	82a
LSD1%	3.01	3.01	3.01



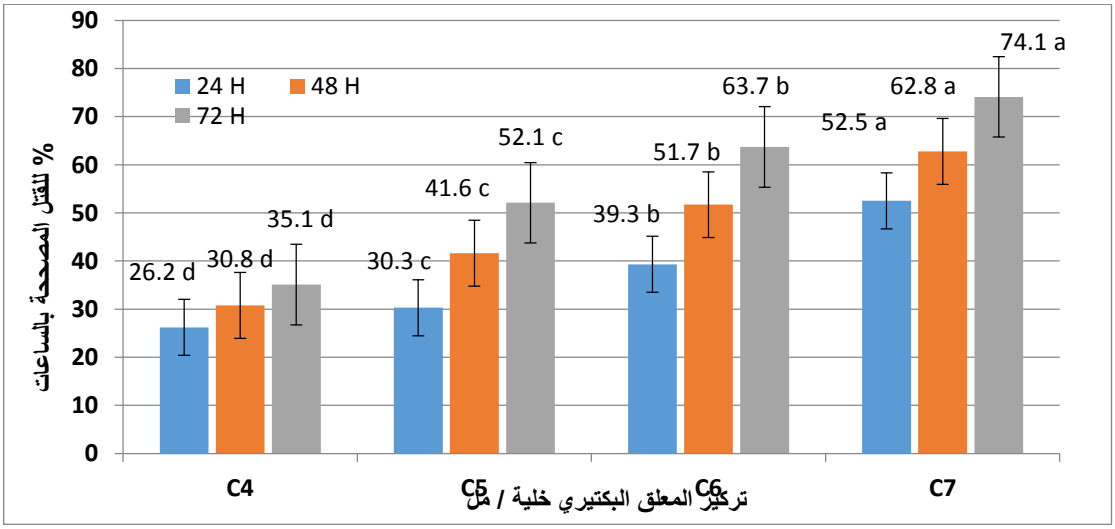
الشكل (4): تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. subtilis* في النسبة المئوية لقتل الحوريات

بينت النتائج الموضحة في الجدول (5) ، والشكل (4) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في الطور الحوري للعنكبوت الحمر ذي البقعتين، إذ أعطى المعلق البكتيري وبتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة قتل للطور الحوري بلغت 70.2%، بفرق معنوي عن بقية التراكيز بعد24 ساعة من المعاملة، أما بعد72 ساعة من المعاملة أعطى نسبة قتل بلغت 82%.

3-3- التأثير في البالغات:

جدول (6) تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. subtilis* في النسبة المئوية لقتل البالغات

تراكيز المعلق البكتيري خلية/مل	% للقتل المصححة بالساعات		
	24	48	72
10^4	26.2 d	30.8 d	35.1d
10^5	30.3 c	41.6 c	52.1c
10^6	39.3 b	51.7 b	63.7b
10^7	52.5 a	62.8 a	74.1a
LSD1%	2.54	3.01	3.01



الشكل (5) تأثير التركيزات المختلفة للمعلق البكتيري للبكتريا *B. subtilis* في النسبة المئوية لقتل البالغات

بينت النتائج الموضحة في الجدول (5) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في الطور الحوري للعنكبوت الحمر ذي البقعتين، إذ أعطى المعلق البكتيري وبتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة قتل للطور الحوري بلغت 52.5%، بفرق معنوي عن بقية التراكيز بعد24 ساعة من المعاملة، أما بعد72ساعة من المعاملة أعطى نسبة قتل بلغت 74.1%.

النتائج والمناقشة:

بينت نتائج الاختبارات تأثير المعلقات البكتيرية وبتراكيز مختلفة في أطوار (البيضة، الحورية، والبالغة) للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين، إذ أعطى المعلق البكتيري وبتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة قتل للأطوار (البيضة= 78%، الحوري = 70.2%، والبالغة= 74.1%) بفرق معنوي عن بقية التراكيز بعد 72 ساعة من المعاملة، وقد فسرت دراسة قام بها (Al-azzazy *et al.*,2020) هذا التأثير بقدرة البكتيريا المسببة للأمراض على اختراق جدار الجسم الرقيق، الأغشية بين الهياكل، أو من خلال فتحات الجسم.

حيث قامت هذه الدراسة بتقييم فعالية ثلاثة أنواع بكتيرية (*Acinetobacter sp.* تركيز $2.237x10^8$ خلية/مل و *Bacillus subtilis* تركيز 2.47×10^8 خلية/مل و *Bacillus qassimus* تركيز 3.320×10^8 خلية/مل) ضد العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* الذي يصيب الباذنجان تحت ظروف المختبر والبيت المحمي. بالإضافة إلى ذلك، تمت دراسة آثارها الجانبية على المفترس *Phytoseius plumifer* لوحظ أعلى معدل كفاءة في مكافحة الآفة المستهدفة *T. urticae* في نتائج تطبيق *Acinetobacter sp.* بعد ثلاثة أيام من العلاج، بلغت نسبة القتل من الآفة المستهدفة 87.15 % و77.29 % و72.22 % في ظروف المختبر على التوالي.

وهنا نلاحظ أن معدل القتل الناتجة عن استخدام *Bacillus subtilis* 77.29%، مقاربة له في دراستنا 74.1%، مع وجود اختلاف نعزوه لاختلاف ظروف التجربة واختلاف التركيز المستخدم.

كما تمت دراسة (Soliman,2021) لتقييم كفاءة ثلاث سلالات *بكتيرية Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *Lysinibacillus spaericus* ضد الإناث البالغة من *Tetranychus urticae* Koch باستخدام تقنيات الرش والغمس بتركيزات (10^1,10^3,10^5,10^7) خلية/مل، حيث سجلت *B. subtilis* زيادة في متوسط نسبة الوفيات لإناث *T. urticae* حيث بلغت 73.33±2.67 بتقنية الرش مقارنة بـ 41.25 ±2.08 بتقنية الغمر.

وهي نتيجة مقاربة أيضاً لنتيجة دراستنا، مع تفوق العزلة المستخدمة في دراستنا، ونعزو هذا التفوق لاختلاف العزلات، بالإضافة لاستخدام ظروف التجربة الأخرى.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- تم عزل ثلاث سلالات بكتيرية من التربة، بينت الصفات الشكلية والاختبارات البيوكيميائية أن العزلات الثلاث تنتمي للأنواع التالية:
  - ✓ A1: *Bacillus subtilis*
  - ✓ A2: *Bacillus thuringiensis*
  - ✓ A3: *Bacillus cereus*
- للسلالة *Bacillus subtilis* المعزولة محلياً كفاءة عالية في مكافحة الآفة المستهدفة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً، عند استخدامها كمعلق بكتيري بتركيز 10^7 خلية/مل.

التوصيات:

نوصي بما يلي:

-متابعة الأبحاث للتقصي عن وجود عزلات أخرى في مناطق وبيئات زراعية.

-اختبار العزلة من النوع *Bacillus subtilis* وتجريبها في الظروف الحقلية والتأكد من مدى فعاليتها.

References:

- الباهلي، حياة (2010). تأثير الجراثيم *Serratia marcescens* في بعض الجوانب الحياتية للحلم ذي البقعتين *Tetranychus urticae* (koch) (Tetranychidae:Acari). مجلة أبحاث البصرة.العدد 36. الجزء2. 15-10
- تويج، نبيل (2007). دراسة إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح الجراثيم *Bacillus thuringiensis* لمكافحة حشرة من الخوخ *Myzus persicae* (Sulzer) الأخضر. مجلة جامعة كربلاء، المجلد 3 العدد (11)

- الجمعية العامة للأمم المتحدة (2017). مجلس حقوق الإنسان. الدورة الرابعة والثلاثون. البند 3 من جدول العمال. تعزيز وحماية جميع حقوق الإنسان، المدنية والسياسية والاقتصادية والاجتماعية والثقافية، بما في ذلك الحق في التنمية. تقرير المقررة الخاصة المعنية بالحق في الغذاء. A/HRC/31/50. 2017.
- السالم،صقر؛ سراج،حسين 2005. المواد الكيميائية الخطرة على صحة الإنسان والبيئة. مرجع لطلاب المدارس والكليات والجامعات، منظمة الصحة العالمية WHO، المكتب الإقليمي لشرق المتوسط، المركز الإقليمي لأنشطة صحة البيئة، عمان- الأردن- WHO-EM/CEH/129/A 2005,.
- عبد، أحمد 2010. المكافحة الحيوية للفطر *Rhizoctonia solani* بواسطة الجراثيم *Pseudomonas fluorescens* في ظروف البيت الزجاجي . مجلة جامعة بابل للعلوم التطبيقية والصرفة. العدد 1. 2010
- عمران، محمد. حسوني،عادل. صكر، سيلان.هادي، عهد (2015). تأثير فعالية بكتريا *Bacillus subtilis* و*Pseudomonas florescens* في تثبيط فعل الفطر الممرض *Macrophomina phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحمي على الفاصوليا، مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية العدد1، المجلد 23، ص172-162
- المصري، يوسف؛ الأخرس، هدى 2013. مشروع إدارة حافرة أنفاق البندورة "توتا أبسولوتا"في الشرق الأدنى. دراسة مشروع تابعة لمنظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة FAO.النشرة الإخبارية لوقاية النبات في البلدان العربية والشرق الأدنى. العدد 6، كانون الأول/ ديسمبر. 2013
- مفلح، ماجدة؛ أحمد، محمد؛ حلوم، منذر (2014). الاستجابة الوظيفية والعددية للمفترس *Stethorus gilvifrons* عند تغذيته على كثافات مختلفة من بالغات الأكاروس العنكبوتي ذي البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً. المجلة السورية للبحوث الزراعية.المجلد1، العدد 1،2014.

• Al-Bahili, Hayat (2010). The effect of Serratia marcescens on some aspects of the life of the two-spotted mite Tetranychus urticae (koch) (Tetranychidae: Acari). Basra Research Journal. Issue 36. Part 2. 10-15

• Twig, Nabil (2007). Studying the possibility of producing a biological preparation from Bacillus thuringiensis vaccine to combat the green peach aphid, Myzus persicae (Sulzer). Karbala University Journal, Volume 3, Issue (11)

• United Nations General Assembly (2017). Human Rights Council. Thirty-fourth session. Item 3 of the work schedule. Promote and protect all human rights, civil, political, economic, social and cultural, including the right to development. Report of the Special Rapporteur on the right to food. A/HRC/31/50. 2017

• Al-Salem, Saqr; Siraj, Hussein 2005. Chemicals hazardous to human health and the environment. A reference for school, college and university students, World Health Organization (WHO), Regional Office for the Eastern Mediterranean, Regional Center for Environmental Health Activities, Amman - Jordan - WHO-EM/CEH/129/A 2005,.

• Abdel, Ahmed 2010. Biological control of the fungus Rhizoctonia solani by the spores Pseudomonas fluorescens in greenhouse conditions. Babylon University Journal of Applied and Pure Sciences. Issue 1. 2010

• Imran, Muhammad. Hassouni, Adel. Sakr, Ceylon. Hadi, Ahed (2015). The effect of the effectiveness of Bacillus subtilis and Pseudomonas florescens in inhibiting the action of the pathogenic fungus Macrophomina phaseolina that causes charcoal rot on beans, Babylon University Journal of Pure and Applied Sciences, Issue 1, Volume 23, pp. 162-172

• Al-Masry, Youssef; Al-Akhras, Hoda 2013. Tomato tunnel borer “Tuta absoluta” management project in the Near East. A project study of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Newsletter for plant protection in Arab countries and the Near East. Issue 6, December. 2013

• Mufleh, Magda; Ahmed, Muhammad; Halloum, Munther (2014). The functional and numerical response of the predator Stethorus gilvifrons when feeding on different densities of adults of the two-spotted spider mite Tetranychus urticae in a laboratory setting. Syrian Journal of Agricultural Research. Volume 1, Issue 1, 2014.

Al-Azzazy M. M. et al. (2020), *Biological effects of three bacterial species on Tetranychus urticae (Acari: Tetranychidae) infesting eggplant under laboratory and greenhouse conditions*. Acarologia 60(3): 587-594; DOI 10.24349/acarologia/20204390

Atlas,M. Ronald. (2020), Handbook of Microbiological Media Fourth Edition, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2009047096.

Fasulo, Thomas R; Denmark, H.A (2009); *common name: twospotted spider mite scientific name: Tetranychus urticae Koch (Arachnida: Acari: Tetranychidae)*, Entomology & Nematology | FDACS/DPI | EDIS, EENY-150

Haj Hammoud, Hammoud; Abdulghani, Abdulatif; Aden A., Aw-Hassan (2005). *A Socioeconomic Study of Integrated Sunn Pest Management on Wheat in Syria.* Monitoring, Evaluation & Learning. 05T08:54:17Z, 2005.

Ramyabharathi, SA; Meena, K. Sanka; Rajendran, L; Karthikeyan, G; Jonathan, E.i; Raguchander,T, *Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by Bacillus subtilis under protected cultivation*, Egyptian Journal of Biological Pest Control (2018) 28:21 DOI 10.1186/s41938-018-0027-2

Su, Yuan; Liu, Chuan; Fang, Huan; Zhang, Dawei. *Bacillus subtilis: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine*. Microb Cell Fac. (2020) 19:173.

VAN DER GEEST**,** L.P.S.**;** ELLIOT, S.L.; BREEUWER, J.A.J**;** BEERLING, E.A.M(2000). *Diseases of mites. Experimental and Applied Acarology* 24: 497–560, Netherlands, 2000.