دراسات كيميائية حيوية وبيولوجية على بعض المبيدات الحشرية الميكروبية

رسالة مقدمه من

عبد المنعم صـادق حسـن

بكالوريوس العلوم الزراعية(أراضي)-١٩٨٥
ماجستير العلوم الزراعية(كيمياء)-١٩٩٢

كجزء من متطلبات الحصول على درجة
دكتوراه الفلسفة فى العلوم الزراعية(كيمياء حيوية)

قسم الكيمياء الحيوية
كلية الزراعة بالفيوم
جامعة القاهرة

٢٠٠٣

الملخص العربي

دراسات كيميائية حيوية وبيولوجية علي بعض المبيدات الحشرية الميكروبية

نظـرا لخطـورة اسـتخدام مبيـدات الآفـات الحشـرية الكيميائيـة علـي صـحة الإنسـان والحيوان، وزيادة مقاومة الحشرات لهذه المبيدات، مما أدى إلي تفاقم خطورة هذه الحشرات، وزيادة خطورة حشرات أخرى كانت تعتبر آفات ثانوية. الأمر الذي أدى إلى الحاجة الملحة الي البحث عن بدائل فعالة وآمنة من المصادر الطبيعية لحماية المحاصيل الاقتصادية من الأضرار التي تسببها الاصابة بالحشرات. وتعتبر بكتيريا باسيللس ثورنجينسز من اكثر الميكروبات نجاحا في مجال المكافحة البيولوجية للآفات الحشرية نظرا لسهولة إكثارها ومقاومة جراثيمها للظروف البيئية غير الملائمة

لذلك استهدف هذا البحث دراسة عزل بكتيريا باسيلس ثورنجينسز من التربة المصرية، ودراسة خصائص العزلات ذات الفعالية المبيدة لدودة ورق القطن باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية والطرق الكيميائية الحيوية وأيضا دراسة خصائص البروتينات الفعالة بعد فصلها وتنقيتها، وكذلك التعرف علي وجود الجينات المسئولة عن البروتينات الفعالة في DNA هذه العزلات البكتيرية.

وقد أوضحت النتائج ما يلي:

١- **بالنسبة لعزل بكتيريا باسيلس ثورنجينسز من التربة المصرية**: تم جمع عينات تربة من مختلف أنواع الأراضي في محافظتي الفيوم وكفر الشيخ. وقد خضعت هذه العينات لدراسة تواجد ميكروب باسيللس ثورنجينسز بواسطة اتباع طريقة تر افرز وآخرين (١٩٨٧) لعزل وتصنيف هذا الميكروب، وقد وجد أن ١٩ عينة تربة من ضمن العينات التي تم جمعها قد احتوت علي هذا النوع من البكتيريا وبإجراء اختبارات السمية علي يرقات العمر الثالث لدودة ورق القطن الكبرى لدراسة سمية السلالات المعزولة عليها، أظهرت النتائج أن النشاط السمي القاتل يعتمد بدرجة كبيرة علي سلالة الباسيللس ثورنجينسز المستخدمة ، حيث تراوحت درجة السمية بين ٨%-٨٣% عند تركيز ٥٠٠ ملليجرام/ لتر. وبناءا علي ذلك فقد تم اختيار العزلات Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4 للمزيد من الدراسة وذلك لنشاطهم السمي العالي.

٢- **التفرقة بين العزلات البكتيرية من حيث:**

أ-الخواص المورفولوجية والفسيولوجية

أوضحت نتائج الدراسة المورفولوجية والفسيولوجية أن خواص البلورات السامة لهذه العزلات الأربع Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4 تفاوتت فيما بينها من ناحية الشكل، حيث تميزت العزلة (Fay4) بوجود بلورات ذات شكل معيني فقط بينما احتوت العزلات الأخرى Fay1, Fay2, Kfr1, علي أكثر من نوع من البلورات السامة **حيث** احتوت علي بلورات ذات شكل بيضاوي بالإضافة الي الشكل المعيني.كما وجد أن هذه العزلات تميزت بقدرتها علي إنتاج الأحماض من الجلوكوز أوالجلاكتوز الموجود في بيئة النمو، وكذلك القدرة علي تحليل الكازين والنشا بالإضافة الي المقدرة علي النمو في وجود ٧% كلوريد الصوديوم. الا أن هذه العزلات الأربعة افتقدت القدرة علي إنتاج الأحماض من المنيتول أوالزيلوز.

ب- <u>التفرقة بين العزلات باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية:</u>

نظرا لصعوبة التفرقة بين العزلات الأربع بواسطة الطرق الفسيولوجية حيث أعطت العزلات الأربعة نفس النتائج ، لذا تم اللجوء الي الطرق الكيميائية الحيوية وتقنيات البيولوجية الجزيئية للتفرقة بينها حيث تم في هذه الدراسة مقارنة مكونات المحتوي البروتيني للخلايا الخضرية والمتجرثمة و كذلك الاختلاف في المحتوى من البلازميدات والتكبير العشوائي للـDNA بواسطة تقنية الـPCR، بالإضافة الي الطرق المناعية **وقد أظهرت الدراسة النتائج التالية:**

١) <u>مكونات المحتوى البروتيني للخلايا الخضرية والمتجرثمة:</u>

تم دراسة مكونات المحتوي البروتيني للخلايا الخضرية والمتجرثمة للعزلات Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4 النامية تحت نفس الظروف عن طريق التفريد الكهربي باستخدام جيل البولي اكرلاميد، وفي وجود مادة الـ SDS . وقد أظهرت النتائج أنه باتباع هذه التقنية يمكن التفرقة بين العزلات الأربعة حيث أمكن تقسيم العزلات الأربعة الي ٣ أنماط تتضمن Fay1, Fay4 , (Fay2 = Kfr1) كما ظهر من خلال دراسة المحتوي البروتيني وجود البر وتينات ذات الأوزان الجزيئية 65 kDa, و 130 kDa والمسئولة عن النشاط الإبادى لسلالات الباسيللس ثورنجنيسز .

٢) <u>الاختلاف في المحتوى من البلازميدات والتكبير العشوائي للـ DNA بواسطة الـ PCR</u>

أظهرت دراسات المحتوي البلازميدي وكذلك التكبير العشوائي للـ DNA أيضا وجود اختلاف بين العزلات تحت الدراسة وقد تطابقت نتائج هذه الدراسات مع تلك المتحصل عليها من دراسة التفريد الكهربي للبروتينات من حيث تقسيم العزلات Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4

الي نفس الأنماط التقسيمية Fay1, (Fay2 = Kfr1) , Fay4 مما يشير الي أن هذه التقنيات يمكن استخدامها بنجاح في التفرقة بين السلالات البكتيرية.

٣) التفرقة بين العزلات بواسطة الطرق المناعية:

تم إجراء تفرقة بين العزلات Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4 بواسطة طريقة الالكترلوني باستخدام أجسام مناعية مضادة للبروتين السام للحشرات حرشفية الأجنحة والمستخلص من السلالة البكتيرية القياسية *B.t. kurstaki*. وقد بينت الدراسة وجود اختلافات في أنماط الترسيب بين العزلات الأربع مما يعكس وجود اختلافات في التركيب الوراثي، وهذه الاختلافات قد وجدت بغض النظر عن احتواء السلالات البكتيرية علي نفس النشاط الإبادي ضد الحشرات المختلفة.

٣- فصل وتنقية البروتين السام ليرقات دودة ورق القطن من العزلة Fay1:

أمكن في هذه الدراسة التوصل الي طريقة سهلة لتنقية البروتين 65 kDa من مخلوط الجراثيم والبلورات عن طريق إذابة هذا البروتين في وسط قلوي ، ثم الترسيب بواسطة خفض درجة الـ pH للمحلول الي نقطة التعادل الكهربي باستخدام حامض الهيدروكلوريك. وقد اتضح من خلال هذه الطريقة أن البروتين المتحصل عليه بصوره عالية النقاوة وبالتالي لا يلزم اللجوء الي استخدام أي طرق إضافية لتنقيته.كما تم خلال هذه الدراسة أيضا الاستفادة من أحد مخلفات صناعة الألبان (permeate) كبديل للاكتوز في ترسيب الجراثيم والبلورات للعزلات تحت الدراسة والحصول عليها في صورة بودرة يمكن إضافة بعض المواد الناشرة إليها واستخدامها كمبيد بيولوجي.

٤- التعرف علي وجود الجينات المسئولة عن البروتينات ذات النشاط الابادي في العزلات تحت الدراسة بواسطة تفاعل إنزيم البوليمريز المتسلسل (PCR):

تم اختبار العزلات Fay1, Fay2, Kfr1, Fay4 لدراسة وجود الجينات المسئولة عن السمية ضد يرقات حرشفية الأجنحة، وذات الجناحين وغمدية الأجنحة باستخدام طريقة التفاعل المتسلسل لإنزيم البوليمربز. وقد أشارت النتائج الي تواجد جين Cry A(b) المسئول عن السمية ضد يرقات رتبة حرشفية الأجنحة في جميع العزلات المختبرة مما يدل علي توافقها التام مع البادئ المستخدم والخاص بهذا الجين، وقد توافقت هذه النتائج أيضا مع نتائج اختبار السمية في حالة العزلات الأربعة تحت الدراسة

أما بالنسبة لجين CryIV المسئول عن السمية لرتبة ذات الجناحين فقد تواجد في حالة العزلات Fay1, Fay2, Kfr1, بينما تواجد جين CryIII A المسئول عن السمية ضد رتبة

غمدية الأجنحة في حالة العز لتين Fay1, , Fay4 إلا أن هذه النتيجة لا يمكن مقارنتها باختبار السمية، حيث لم تختبر العزلات ضد حشرات رتبة غمدية الأجنحة وثنائية الأجنحة في هذه الدراسة.