مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٢) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (2) 2024

عزل بعض الأنواع البكتيرية من ترب محلية واختبار فعالية بكتريا *Pseudomonas putida* ضد العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* Koch. مخبرياً

أ. د. أميمة ناصر*

د. ماجدة مفلح***

م. لمى محمد حسن***

(تاريخ الإيداع ١/٤/ ٢٠٢٤ – تاريخ النشر ٢٧/٦/٢٠٢٤)

□ ملخّص □

عزلت بكتيريا من نوع *Pseudomonas putida* بالإضافة إلى بعض الأنواع البكتيرية الأخرى مثل *Bacillus subtilis* و *Streptococcus adjacens* وغيرها من ترب محلية في محافظة اللاذقية في الجمهورية العربية السورية. تم تمييز العزلات البكتيرية تبعاً لبعض الخصائص المعتمدة على صبغة غرام Gram's staining وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية وتبعاً للخصائص اللونية على المستنبتات النوعية والانتقائية، تنتهي بتحليل PCR.

تم اختبار كفاءة عزلة *Pseudomonas putida* ضد العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً، على أطوار (البيضة، الحورية، والبالغة)، أظهرت نتائج الاختبار أن العزلة كان لها تأثيراً ملحوظاً في طور البيضة، حيث أعطى التركيز 10^7 خلية/ مل أعلى نسبة للوفاة والتي بلغت 82%، مع اختلاف معنوي عن بقية المعاملات. وكانت نسبة النفوق في المراحل الأخرى (92–43) % لليرقات، (95–47) % لحوريات الطور الأول، (90–56) % لحوريات الطور الثاني و (91–44) % للإناث البالغة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas putida*، *Bacillus subtilis*، *Streptococcus adjacens* ، *Tetranychus urticae*، تحليل PCR، فعالية حيوية.

* أستاذ – قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

** المدير العام للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية سابقاً – سورية.

***طالبة دكتوراه– قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين–اللاذقية–سورية.

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٢) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (2) 2024

Isolation of some bacterial species from local soil and testing the effectiveness of *Pseudomonas putida* against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch in the laboratory

Prof. Dr. Omiema Nasser*

Dr.Majida mefleh**

Lama hasan***

(Received 1/4/2024.Accepted 27/6/2024)

□ABSTRACT □

Pseudomonas putida bacteria were isolated in addition to some other bacterial species such as Bacillus subtilis and *Streptococcus adjacens* and others from local soils in Lattakia (Syria). The bacterial isolates were distinguished according to some characteristics based on Gram's staining some biochemical characteristics and according to the color characteristics on specific and selective cultures, ending with PCR analysis. The efficiency of *Pseudomonas putida* isolate was tested against the red two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*, under laboratory conditions, on the stages (egg, nymph, and adult).

The test results showed that the isolate had a noticeable effect on the egg stage, where the concentration of 10^{7} cells/ml gave the highest mortality rate, which reached 82%, with a significant difference from the rest of the treatments. The mortality rate in the other stages was (43-92) % for larvae, (47-95) % for first-stage nymphs, (56-90) % for second-stage nymphs and (44-91)% for adult females.

Keywords: *Pseudomonas putida, Bacillus subtilis***,** *Streptococcus adjacens***,** *Tetranychus urticae***,** PCR analysis, Vital effectiveness.

*Peofessor in Department of Environmental Prevention (Microbiology) – Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Latakia- Syria.

**Former General Director of the General Authority for Agricultural Scientific Research – Syria

***Phd Student in Department of Environmental Prevention– Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Latakia- Syria.

١- 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 Berliner *Bacillus thuringiensis* 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 Poinar and) *Pseudomonas aeruginosa*(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).

Pseudomonas putida Trevisan **–موضوع هذه الدراسة– هي بكتريا** سالبة الغرام، عصوية، رمية(Anzai *et al.* 2000) تتميز بعملية التمثيل الغذائي المتنوعة لديها، بما في ذلك القدرة على تحليل المذيبات العضوية مثل التولوين ومركبات زيت النفثالين والستايرين (Marques and Ramos 1993)

تم في هذ البحث، تمت دراسة إمكانيات *P. putida* كعامل مكافحة بيولوجية من خلال تأثيره على معدل الوفيات، وتفقيس البيض.

المسح الأدبي (الدراسات السابقة):

أظهرت *Pseudomonas putida* أيضاً خصائص محتملة للمكافحة الحيوية، كمضاد فعال لتثبيط الأمراض الفطرية التي تصيب النباتات مثل *Fusarium* و*Pythium* في دراسة Amer and Utkhede (2000).

بالإضافة إلى ذلك بين Aksoy and Mennan (2004) تأثيرات الفلورسنت *Pseudomonas sp.* ضد الديدان الخيطية.

كما أثبتت دراسة قام بها Kumar *et al.* (2011) فعالية *Pseudomonas putida* ضد العنكبوت الأحمر الذي يصيب أوراق القهوة *Oligonychus cofeae*.

وأوضحت الدراسة التي قام بها Qessaoui *et al.* (2017) تأثير استخدام *Pseudomonas putida* في إنتاج الكيتيناز وHCN (سيانيد الهيدروجين) عند العنكبوت الأحمر ذي البقعتين، حيث وصلت نسبة الموت إلى 71 % بعد 48 ساعة من استخدام التركيز 10^{10} خلية/مل معلق بكتيري.

2-المشكلة البحثية:

تتجلى مشكلة البحث في المحاور الأربعة التالية:

• التوجه الحالي نحو تطوير دعم برامج المكافحة المتكاملة في الجمهورية العربية السورية وعلى وجه الخصوص المكافحة الحيوية بشكل يترافق مع الحد من استخدام المبيدات الكيميائية السامة.

• زيادة استخدام مبيدات الآفات وبشكل عشوائي في العديد من المناطق في القطر السوري نتيجة قلة الوعي والتشخيص الخاطئ غالباً، مما يترتب عليه تبعات سلبية على البيئة (هواء، تربة، مياه).

• زيادة انتشار الأمراض وخاصة السرطانية منها نتيجة الاستخدام الزائد للمبيدات الكيميائية واستهلاك الأغذية المعاملة بها، خاصة مع عدم وجود رقابة على القطاف الذي يجب أن يكون خلال فترة الأمان من متبقيات المبيد.

• صعوبة استيراد المبيدات الحيوية المكونة من الممرضات الحشرية والأكاروسية نتيجة الحصار والظروف الاقتصادية الصعبة السائدة في القطر، بالإضافة إلى ارتفاع كلفتها نسبياً حتى لو توفرت.

ويركز هذا البحث على العوامل الممرضة كعنصر هام من عناصر المكافحة الحيوية كتطبيق عملي مخبري وعلى وجه الخصوص البكتريا، كـ *Pseudomonas putida* Trevisan -موضوع هذه الدراسة-، حيث تم دراسة إمكانية استخدام هذا النوع كعامل مكافحة بيولوجية من خلال تحديد تأثيره في معدل الوفيات وتفقيس البيض.

3-البحث وطرائقه:

3- 1- مكان الدراسة:

تم جمع عينات التربة من أنظمة بيئية وزراعية مختلفة في المنطقة الساحلية السورية، منها 4 مواقع في اللاذقية: (قسم المكافحة البيولوجية في الهنادي – البصة – برج الإسلام – كسب). تم إجراء التحاليل المخبرية للترب والحصول على العزلات البكتيرية منها وإجراء الاختبارات الكيموحيوية لها، (في مختبر الأحياء الدقيقة – قسم حماية البيئة)، في المعهد العالي لبحوث البيئة في جامعة تشرين، ثم تم اختبار فعاليتها في مكافحة العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* مخبرياً في مختبر الأحياء الدقيقة – قسم المكافحة البيولوجية – مديرية الزراعة – اللاذقية، تم القيام بتحاليل PCR في الهيئة العامة للطاقة الذرية.

3- 2- تحليل التربة:

بعد جمع عينات التربة، أجريت التحاليل المخبرية لتحديد الخصائص التالية: نسبة المادة العضوية بالحرق في محرقة عند درجة حرارة 5500 درجة مئوية لمدة ثلاث ساعات، ودرجة الحموضة pHباستخدام جهاز قياس الرقم الهيدروجيني.

3- 3- عزل البكتيريا:

عزلت البكتيريا المدروسة من ترب محلية وقد تمت عملية الكشف عنها وعزلها وتنميطها الجيني بناءً على الطرائق المعتمدة عالميًا، وذلك بأخذ 1 جرام من كل عينة تربة مجمعة بعد حساب محتوى الرطوبة، وأضيفت التربة إلى أنابيب اختبار تحتوي على 10 مل من الماء المقطر المعقم. بعد خلطهم جيدًا، أخذ 1 مل من كل معلق من أنابيب الاختبار وأضيف إلى أنبوب اختبار يحتوي على 10 مل من المرق المغذي، ثم نقلت أنابيب الاختبار إلى الحاضنة وحضنت عند درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة 4 ساعات. ثم تمت الزراعة باستخدام طريقة التخطيط من الأنابيب سابقة الذكر، بعد إجراء سلسلة التخفيف. ثم تم تفريق المستعمرات النقية بالإضافة إلى إعادة تشتيت المستعمرات المختلطة بتكرار طريقة التخطيط وتم التعرف على البكتيريا المعزولة من خلال دراسة الخصائص المورفولوجية

للمستعمرات (شكل المستعمرة – اللون – الملمس) والدراسة المجهرية (شكل الخلية، أبعادها، صبغة جرام، حركة) (Van Der Geest *et al.*,2000) وبعض الاختبارات الكيميائية الحيوية المتعلقة بتخمير السكاكر، تحليل اليوريا، اختبارات الحركة، الأوكسيداز، الكاتالاز، النمو في درجات حرارة مختلفة، تشكيل الأبواغ .. وغيرها.

3-3 -1- تقنية تفاعل البوليميراز PCR المتسلسل: (Rajalakshmi, 2017)

الجدول1 : خطوات تقنية PCR

Steps		Temperature °C	Time
Initial denaturation		95	3 min
35 cycle	Denaturation	95	30 sec
	Annealing	53-58	45 sec
	Extension	72	1 min
Final extension		72	10 min
Hold		4	∞ min

3-3-2-السلسلة: (Rajalakshmi, 2017)

تنقية نتاجات الـ PCR:

بعدما أُخذ 5 مل من نتاج الـ PCR للعزلات البكتيريةالإيجابية لمورثة الـ *16S rDNA* وتم تحليلها على هلامة الآغاروز 1.5% لإثبات نجاح التضخيم لمورثة الـ *16S DNA*. أُخِذَ 20 مل من نتاج الـ PCR المُرَّحل سابقاً ومن ثم تمت تنقيته بواسطة طاقم تنقية الـ DNA.

5,5,2 سَلْسَلْة مورثة الـ *16S rDNA* والربط :

* تم إدخال 500 ng/µl من شدفة الـ DNA (*16S rDNA*) المضخمة في تفاعل السلسلة.
* أضيف 5 mM من زوج المرئسات السابق للسَلْسَلْة، المذكورة في الجدول أعلاه.
* أضيف الماء المقطر، بحيث يصبح الحجم النهائي للتفاعل 8 µl.
* قراءة النتائج باستخدام جهاز تحديد سمات الدنا genetic analyzer.

رُبِطت التسلسلات بواسطة موقع المحرِّر البيولوجي للبرامج (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)، وتم تقييم التحديد من خلال التحقق من التسلسلات الموجودة وذلك باستعمال BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

3-4- تحضير المستعمرة الدائمة للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae*:

تم زراعة نبات الفاصولياء داخل أصص بلاستيكية تحت ظروف المختبر ثم تم عدوى النباتات بأوراق فاصولياء مصابة بالعنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae* للحصول على مستعمرة دائمة من الآفة واستخدامها في التجارب اللاحقة (Mahmoud *et al.*, 2020)

3-5- تحضير تراكيز مختلفة من المعلق الجرثومي:

حضر المعلق الجرثومي بطريقة التخفيف وذلك بقطع قرص من الوسط الغذائي الذي نمت عليه الجراثيم بقطر 0.5 سم يحتوي على مستعمرة واحدة ليوضع في انبوب اختبار ملئ بـ 9 مل ماء مقطر معقم بشكل مسبق، ليرج 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 1/100 ثم الاستمرار بالتخفيف حتى الحصول على التخفيفات 10^4,10^5,10^6,10^7 خلية / مل والتي استخدمت في التجارب اللاحقة. (الباهلي، 2010)

3-6- دراسة تأثير المعلقات الجرثومية بتراكيز مختلفة في أطوار العنكبوت الأحمر ذي البقعتين *Tetranychus urticae*

3-8-1- 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. تركت 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، رشت الوريقات بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1 مل لكل مكرر ولكل تركيز على حدة وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة باستعمال محقنة طبية، أما معاملة الشاهد فتم رشها بماء مقطر معقم. وضعت 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 وضبطت الرطوبة باستخدام مقياس خاص لها (Hygrometer) (الباهلي، 2010)

سجلت النسب المئوية لهلاك البيض (موت الاجنة) بعد 72 ساعة من الرش. وصححت القيم حسب معادلة Schneider وOrell (الباهلي، 2010) .

%للهلاك الناتجة= (نسبة الموت في المعاملة – نسبة الموت في الشاهد) / (100– نسبة الموت في الشاهد) x 100

3-6-2- 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، وضعت الوريقات داخل أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9 سم، وعوملت بالمعلق الجرثومي وبمقدار 1مل لكل مكرر و(ثلاثة مكررات لكل معاملة)، أما معاملة الشاهد فقد تم رشها بماء مقطر معقم فقط، استعملت محقنة طبية لغرض عملية الرش، ثم وضعت الأطباق في حاضنة على درجة حرارة 25 ± 2^0م ورطوبة نسبية 60-70%ز تم حساب عدد الأفراد الحية المتبقية بعد 24,48,72ساعة من الرش.

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

النسبة المئوية المصححة للموت =
معدل الوفيات في المعاملة - معدل الوفيات في الشاهد المقارن / 100 - معدل الوفيات في الشاهد المقارن * 100

4-النتائج والمناقشة:

4-1 -تحليل الترب:

تبرز أهمية هذه التحاليل في بيان بعض الخواص الكيميائية لبيئة عزل البكتيريا مما يساهم في تحديد الظروف المناسبة لتكاثرها واستخدامها في حال ثبت فعاليتها في مكافحة الآفة المستهدفة.

جدول (2) نسبة المادة العضوية ودرجة الحموضة في الترب

العينة	المصدر	النسبة المئوية للمادة العضوية%	pH
A	اللاذقية – الهنادي	45.21	6.4
B	اللاذقية – الهنادي	47.06	6.5
C	اللاذقية– البصة	52.63	6.6
D	اللاذقية – البصة	48.12	6.4
E	اللاذقية – برج سلام	57.88	7.1
F	اللاذقية – برج سلام	61.03	7.3
G	اللاذقية – كسب	34.22	6.8
H	اللاذقية – كسب	37.67	6.4

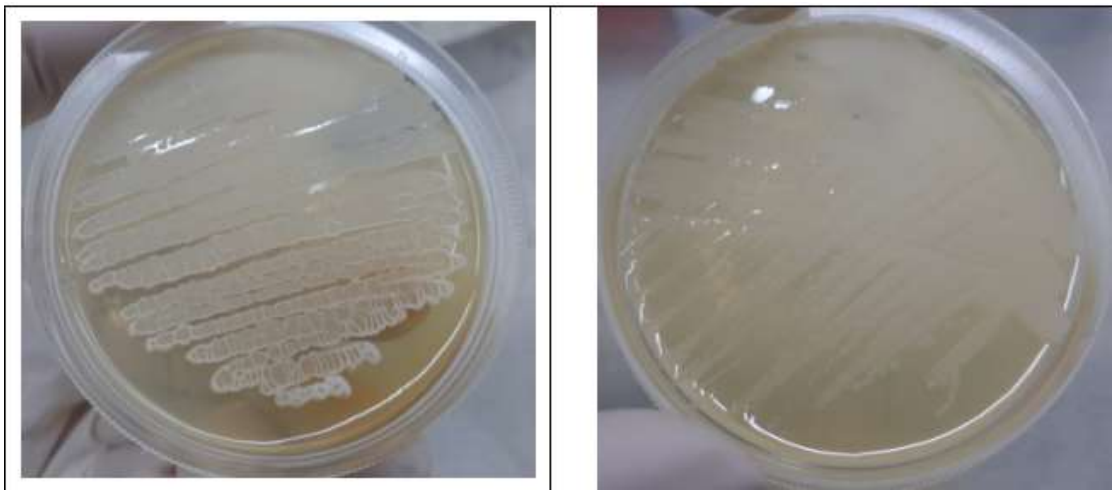
وهنا يلاحظ أن نسب المادة العضوية عالية نسبياً، وهو أمر متوقع كون عينات الترب مأخوذة من ترب البيوت المحمية، التي تعامل بالسماد العضوي بشكل منتظم بناءاً على المعلومات المتوفرة من المزارعين أصحاب هذه البيوت.

4-2 - عزل البكتيريا:

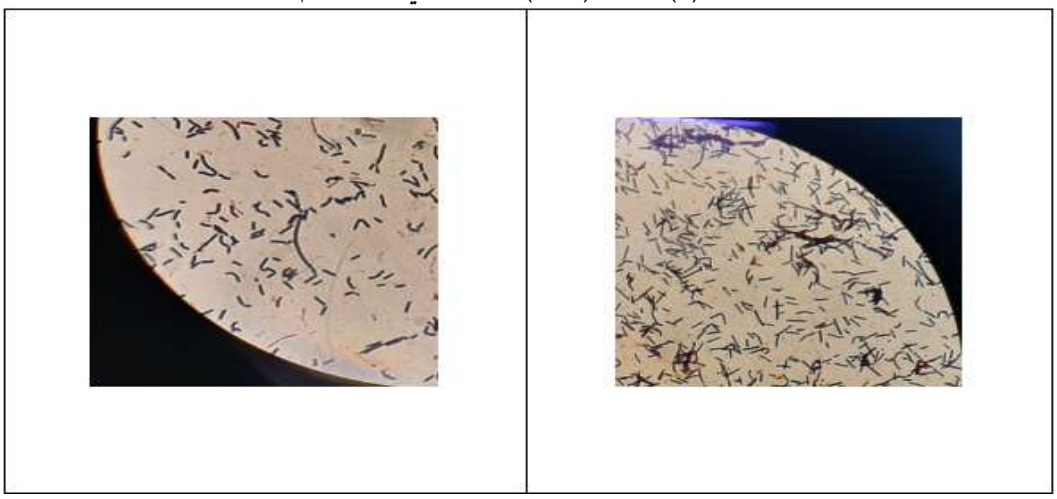
زرعت العينات على أوساط نمو عامة وانتقائية وتم إجراء صبغة غرام. وكانت النتائج على النحو التالي:

جدول (2) الأنواع البكتيرية وفقاً للاستنبات على أوساط مختلفة وطريقة صبغة غرام

	منمي عام	وسط EMB	وسط MSA	تلوين غرام	التوصيف الأولي
1	مستعمرات كبيرة ذات حواف غير منتظمة	لا يوجد نمو	Yellow(mannitol+)	عصيات إيجابية غرام	*Bacillus subtilis*
2	مستعمرات كبيرة ذات حواف منتظمة شمعية	لا يوجد نمو	Pink(mannitol–)	عصيات إيجابية غرام	*Bacillus cereus*
3	مستعمرات كبيرة ذات هالة (الطبق المرسل)	–	–	عصيات سلبية غرام	*Pseudomonas*
4	مستعمرات صغيرة ذات لون أصفر	–	–	مكورات إيجابية غرام، مفردة، ثنائية، سلاسل قصيرة	*Streptococcus*
5	مستعمرات كبيرة ذات حواف منتظمة مع صعوبة أخذ المستعمرات من الوسط، جافة جداً	–	–	عصيات إيجابية غرام طويلة جداً	*Bacillus*



الشكل (1) العينات (1 و2) المزروعة في الوسط العام



الشكل (2): صور العينات (1 و2) تحت المجهر بعد صبغة جرام

أما بالنسبة للاختبارات الكيميائية الحيوية فقد كانت النتائج على الشكل الآتي:

الجدول (4): الاختبارات الكيميائية الحيوية للعينة 1 (*Bacillus Subtilis*)

Sample (1) *Bacillus Subtilis*									
Motility	Hemoly	Esculin	Gelatin	Starch	Catalase	Oxidase	Urea	Arginine	Ornithine
+	+	+	+	+	+	±	−	−	−
Indole	Citrate	Nitrate	VP	Arabino	Cellobio	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	Mannitol	Mannose	Maltose	Raffinos	Sorbitol	Sucrose	Trehalos	Xylose	
+	+		+	+	+	+	+	+	

Para-central/central spore: + Sub-terminal/terminal spore: − Swelling the sporangium: −

Growth at 45°C: + Growth at 65°C: − Growth at PH 5.7: + Growth in 7% NaCl: +

الجدول (5): الاختبارات الكيميائية الحيوية للعينة 2 (*Bacillus cereus*)

Sample(2) *Bacillus cereus*									
Motility	Hemoly	Esculin	Gelatin	Starch	Catalase	Oxidase	Urea	Arginine	Ornithine
+	+	+	+	+	+	−	±	+	−
Indole	Citrate	Nitrate	VP	Arabino	Cellobio	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
−	+	+	+	−	+	+	+	+	−
Lactose	Mannitol	Mannose	Maltose	Raffinos	Sorbitol	Sucrose	Trehalos	Xylose	
−	−		+	−	−	+	+	−	

Para−central/central spore: + Sub−terminal/terminal spore: − Swelling the sporangium: −

Growth at 45°C: + Growth at 65°C: − Growth at PH 5.7: + Growth in 7% NaCl: +

الجدول (6): الاختبارات الكيميائية الحيوية للعينة 3 (*Pseudomonas putida*)

Sample(3) *Pseudomonas putida*									
Motility	Hemoly	Fluorens	Arginine	H2S	Indole	Nitrate	Ornithine	Esuline	Gelatine
+	−	+	+	−	−	−		−	−
Catalase	Urea	Oxidase	Acetate	Arabino	Citrate	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
+	−	+	+	+	+	+	+	+	−
Maltose	Mannos	Mannitol	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Starch		
−	−	−	−	−	−	−	−		

Growth at 4°C: + Growth at 41°C: − Growth on MacConkey: +

الجدول (7): الاختبارات الكيميائية الحيوية للعينة 4 (*Granulicatella adiacens*)

Sample(4) *Streptococcus adjacens (Granulicatella adiacens)*									
α−hemo	β−hemo	Aerobic	5% CO2	An−aerob	VP	Esculin	Arginine	Urea	Arabiono
+	−	+	+	+	−	−	−	−	−
Dulcitol	Fructose	Galacto	Glucose	Glycerol	Inositol	Lactose	Mannitol	Mannos	Raffinos
+	−	−	+	+	−	−	−	−	−
Sorbitol	Sucrose	Trehalos							
−	+	−							

Growth at 10°C: − Growth at 45°C: − Growth in 6.5% NaCl: −

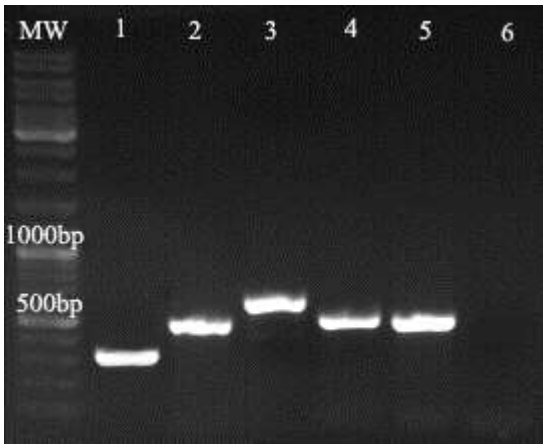
الجدول (8): الاختبارات الكيميائية الحيوية للعينة 5 (*Alkalihalobacillus clausii*)

Sample(5) *Bacillus clausii (Alkalihalobacillus clausii)*									
Motility	Hemoly	Esculin	Gelatin	Starch	Catalase	Oxidase	Urea	Arginine	Ornithine
+	+		+	+	+	+			
Indole	Citrate	Nitrate	VP	Arabino	Cellobio	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
Lactose	Mannitol	Mannose	Maltose	Raffinos	Sorbitol	Sucrose	Trehalos	Xylose	

Spore: +

Growth at 45°C: + Growth at PH 5.7: − Growth in 7% NaCl: +

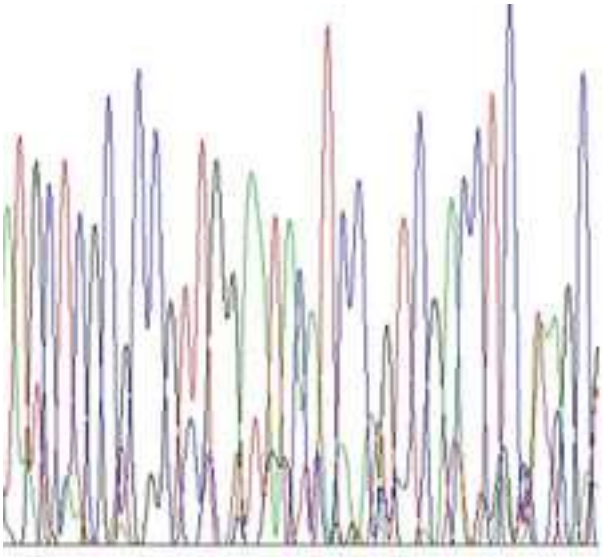
نتائج البيولوجيا الجزيئية:



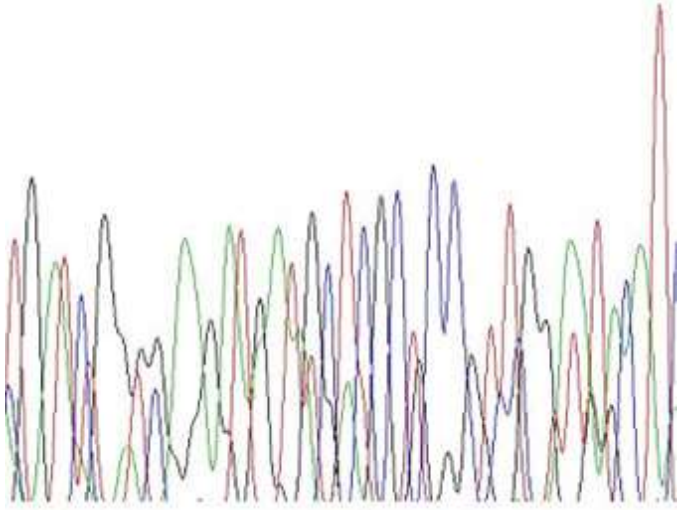
الشكل (3): المسار MW: واسم جزيئي معياري، المسار 1: *B. subtilis*، المسار 2: *B. cereus*، المسار 3: *P. putida*، المسار 4: *S. adjacens*، المسار 5: *B. clausii*، المسار 6: شاهد سلبي (بدون DNA).

نتائج السلسلة:

أجريت سلسلة ما يقارب 500 bp من شدفة مورثة *16S rDNA* (بطول 545 bp) بين عزلات *S. adjacens* أو *B. clausii* (المعزولة بمخابرنا) وسلالات *S. adjacens* أو *B. clausii* العيارية. تمت محاذاة التسلسلات المورثية لـ *16s rDNA* بواسطة برنامج BioEdit و BLAST. واكْتُشِفَ وجود تشابه بنسبة 99% و98% بين *S. adjacens* أو *B. clausii* المحلية والعيارية على التوالي، ويوضِّح تسلسل مورثة *rDNA* 16s وجودَ تماثل homology بين هذه الأنواع.



الشكل(4) :جزء من ناتج سلسلة شدفة الـ *16S rDNA* من *Streptococcus adjacens*



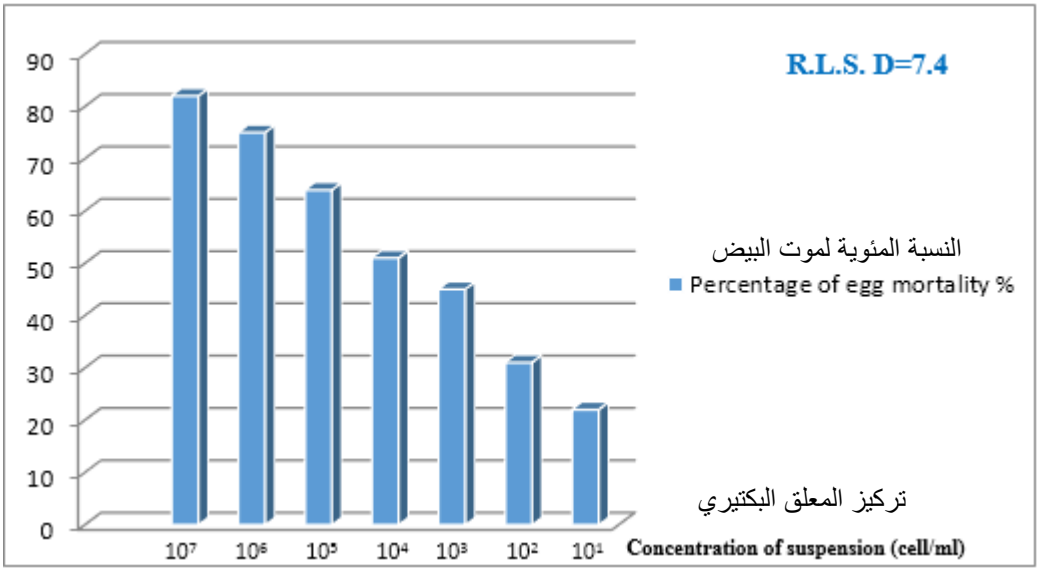
الشكل(5) : جزء من ناتج سلسلة شدفة الـ *16S rDNA* من *Bacillus clausii*

الجدول(9): نتائج السلسلة

Bacteria	Sequence 3`-5`	Gene	Size (pb)	Tm °C
Bacillus subtilis	TCTGCTCGTGAACGGTGCT	*gyrA*	300	53
	TTTCGCCTTATTTACTTGG			
Bacillus cereus	TGCAACTGTATTAGCACAAGCT	*groEL*	533	55
	TACCACGAAGTTTGTTCACTACT			
Pseudomonas putida	TCACCTCCGAGGAAACCAGCTTG	*gyrB*	676	58
	TCTGTTGTGAACGCCCTGTC			
Streptococcus adjacens	GTGCCTAATACATGCAAGTC	*16sS rDNA*	545	55
	CTTTACGCCCAATAATTCC			
Bacillus clausii	GTGCCTAATACATGCAAGTC	*16sS rDNA*	545	55
	CTTTACGCCCAATAATTCC			

3-4 - اختبار فعالية بكتيريا *Pseudomonas putida* ضد العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae*:

3-4 -1- التأثير في البيوض:



الشكل (6): رسم بياني يوضح تأثير المعلقات في البيض بتراكيز مختلفة

توضح النتائج المبينة في الشكل (6) تأثير المعلق البكتيري وبتراكيز مختلفة في طور البيضة ووجود فرق معنوي عالي بين المعاملات في إحداث نسبة موت لطور البيضة اذ أعطى التركيز 10^7خلية/ مل أعلى نسبة موت بلغت 85% بفرق معنوي عن بقية المعاملات في حين أعطى كل من التركيزين10^1 خلية/ مل، 10^2خلية/ مل أقل نسبة موت بلغت22% ، 31% على التوالي وبدون فرق معنوي فيما بينهما.

ويفسر موت البيض لقدرة هذه البكتريا على إفراز الأنزيمات المحللة لجدار البيضة وصولاً الى الجنين وبالتالي موته أو إحاطة هذه البكتريا بغلاف البيضة وبالتالي تكوين طبقة عازلة عن المحيط الخارجي وبذلك تمنع وصول الهواء الى الجنين فيموت اختناقاً. (Al-Azzazy *et al.*, 2020)

3-4 -2- التأثير في الحوريات:

جدول (10) تأثير تراكيز مختلفة من المعلق البكتيري لبكتيريا *Pseudomonas putida* في نسبة هلاك حوريات العنكبوت الحمراء ذات البقعتين

تركيز المعلق البكتيري خلية /مل	النسبة المئوية المصححة لموت الحوريات % خلال فترات مختلفة		
	24 ساعة	48 ساعة	72ساعة
10^4	56.8	60.1	68.2
10^5	72.3	76.2	77.9
10^6	81.7	84.2	86.4
10^7	95.2	96.3	98.8
R.L.S.D 0.01	5.4	11.6	12.1

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (10) تأثير المعلق البكتيري بتراكيز مختلفة في الطور الحوري للعنكبوت الأحمر ذو البقعتين، حيث أعطى المعلق البكتيري بتركيز 10^7 خلية/ مل أعلى نسبة موت في المرحلة الحورية بلغت

95.2%، مع اختلاف معنوي عن بقية التراكيز بعد 24 ساعة من المعاملة، وبعد 72 ساعة من المعاملة أعطت نسبة موت 98.8%.

في مقارنة مع الدراسة التي قام بها Sorokan, Antonina *et al.* (2023)، تأثير *Bacillus cereus* المرتبط بالنبات كعوامل للمكافحة الحيوية، كانت السلالة البكتيرية المستخدمة في الدراسة متفوقة في نتائجها، على نتائج استخدام النوع نفسه في المعاملة المطبقة في دراستنا حيث حققت المعاملة نسبة موت مصححة بالساعات 96% بعد 72 ساعة من المعاملة عند استخدام الرش بمعلق بكتيري بتركيز $10^{(6)}$ بكتيرية/مل، في حين حقق الرش بمعلق بكتيري بتركيز $10^{(7)}$ خلية بكتيرية/مل، نسبة موت مصححة بالساعات 92% بعد 72 ساعة من المعاملة، ويعزو الباحثون هذا الاختلاف في النتائج لاختلاف السلالات المستخدمة في الدراستين، بالإضافة لاختلاف ظروف العمل المخبري التي انعكست على النتائج.

4-3 -3- التأثير على البالغات:

جدول (11) تأثير التراكيز المختلفة للمعلق البكتيري لبكتيريا *Pseudomonas putida* على نسبة الموت للبالغات

تركيز المعلق البكتيري	النسبة المئوية المصححة لموت الحوريات % خلال فترات مختلفة		
خلية /مل	24 ساعة	48 ساعة	72ساعة
10^4	51.2	58.4	64.3
10^5	70.3	74.4	77
10^6	79	82.3	85.2
10^7	90.1	94.2	96
R.L.S.D 0.01	12.4	8.3	9.4

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (11) تأثير المعلق البكتيري بتراكيز مختلفة في طور البالغة للعنكبوت الأحمر ذي البقعتين. أعطى المعلق البكتيري بتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة موت للبالغات بلغت 90.1% مع اختلاف معنوي عن بقية التراكيز بعد 24 ساعة من المعاملة. وبعد 72 ساعة من المعاملة أعطت نسبة موت 96%.

في مقارنة مع الدراسة التي قام بها Al-Azzazy, Mahmoud *et al.*, (2020)، والتي تناولت التأثيرات البيولوجية لثلاثة أنواع بكتيرية على بكتيريا *Tetranychus urticae* التي تصيب الباذنجان تحت ظروف المختبر والدفيئة، لوحظ تفوق النوع البكتيري المستخدم في دراستنا والذي حقق نسبة موت مصححة بالساعات 91% بعد 72 ساعة من المعاملة، عند المعاملة بالرش بمعلق تركيزه $10^{(7)}$ خلية بكتيرية/مل، على الأنواع البكتيرية الثلاث المستخدمة في الدراسة ، *Acinetobacter sp*، *Bacillus subtilis*، و *Bacillus qassimus*، التي حققت عند المعاملة بالرش بمعلق تركيزه $10^{(8)}$ خلية بكتيرية/مل، نسب موت مصححة بالساعات، (70.74% ,67.11%,72.22%) بعد 3أيام من المعاملة.

5- الاستنتاجات:

- تتمتع سلالة *Pseudomonas putida* المعزولة محلياً بكفاءة عالية في مكافحة الآفة المستهدفة وهي العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* في المختبر عند استخدامها كمعلق بكتيري بتركيز 10^7خلية/مل.
- أعطى التركيز 10^7خلية/ مل أعلى نسبة موت بلغت 85% عند اختبار فعاليتها في مكافحة بيوض العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae*.
- أعطى المعلق البكتيري بتركيز 10^7 خلية/ مل أعلى نسبة موت في المرحلة الحورية بلغت 95.2% عند اختبار فعاليتها في مكافحة بيوض العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae*.
- أعطى المعلق البكتيري بتركيز 10^7 خلية/مل أعلى نسبة موت للبالغات بلغت 90.1% عند اختبار فعاليتها في مكافحة بيوض العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae*.

6- التوصيات:

بناءً على الاستنتاجات التي وصلت إليها الدراسة يمكن التوصية بما يلي:

- امتداد التجارب والأبحاث حول فعالية تأثير بكتريا *Pseudomonas putida* على العنكبوت الأحمر ذو البقعتين *Tetranychus urticae* في الحقل.
- التوجه حول تفسير آليات النشاط الحيوية لهذه السلالات الجرثومية المعزولة من التربة المحلية ضد الآفة المستهدفة.
- تشجيع وتحفيز الدراسات والأبحاث في مجال المكافحة الحيوية والتنمية المستدامة.

المراجع:

الباهلي، حياة (2010). تأثير الجراثيم *Serratia marcescens* في بعض الجوانب الحياتية للحلم ذي البقعتين (Tetranychidae:Acari) (koch) *Tetranychus urticae*.مجلة أبحاث البصرة.العدد 36. الجزء2. 10-15

Aksoy HM, Mennan S (2004) *Biological control of Heterodera cruciferae (Tylenchida: Heteroderidae) Franklin 1945 with Fluorescent Pseudomonas* spp. J Phytopathol 152(8):514–518

Amer GA, Utkhede RS (2000) *Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber*. Can J Microbiol 46(9):809–816

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (2000) *Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence*. Int J Syst Evol Microbiol 50(4):1563–1589

Askary H, Carrieare Y, Bealanger RR, Brodeur J (1998) *Pathogenicity of the fungus Verticillium lecanii to aphids and powdery mildew. Bio*control Sci Technol 8:23–32

Azzazy, S., et al., 2021. *A critical review on the impact of built environment on users' measured brain activity.* Architect. Sci. Rev. 64 (4), 319e335.

Bolland HR, Gutierrez J, Flechtmann CHW (1998) *World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae).* Brill Academic Publishers, Leiden

Carey JR, Bradley JW (1982) Developmental *rates, vital schedules, sex-ratios and life tables for Tetrany-chus urticae, T. turkestani and* T. pacificus (Acarina: Tetranychidae) on cotton. Acarologia 23:333– 345

Jeppson LR, Keifer HH, Baker EW (1975) *Mites injurious to economic plants. University of California Pres*,Berkeley

Mahmoud, M Al-Azzazy; Abdullah, S Al- sohima; Carl E Yoderc (2020) Biological ef- fects of three bacterial species on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) infesting egg- plant under laboratory and greenhouse condi- tions. Acarologia 60, 587-594

Marques S, Ramos JL (1993) *Transcriptional control of the Pseudomonas putida TOL plasmid catabolic pathway*s. Mol Microbiol 9(5):923–929

Muir RC, Cranham JE (1979) *Resistance to pesticides in damson—hop aphid and red spider mite on English hops*. Proc Br Crop Prot Conf 1:161–167

Poinar GO, Poinar R (1998) *Parasites and pathogens of mites*. Annu Rev Entomol 43:449–469

Rajalakshmi (2017*), DIFFERENT TYPES OF PCR TECHNIQUES AND ITS APPLICATIONS, IJPCB*S 2017, 7(3), 285-292

Scher FM, Baker R (1982) *Effect of Pseudomonas putida and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. Phytopathology 72:567–1573*

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.

Zhang Z-Q (2003*) Mites of greenhouses: identification, biology and control*. CAB International, Oxon, UK