عزل الفطريات المصاحبة لحشرة الصرصر الأمريكي *Americana Periplaneta L.* واستعمال معلقاتها الجرثومية في مقاومته حيوياً

أ.م. د. صلاح مهدي البدر
كلية العلوم التطبيقية– جامعة ذمار
salahalbader@yahoo.com
د. مهند خلف محمد أمين
كلية العلوم – جامعة البصرة
د. علاء صبيح عبد الجبار
كلية الزراعة – جامعة البصرة

ABSTRACT:

In Basrah province/Iraq, 1500 american cockroach (*Periplaneta americana L.*) was collected from their natural habitat. The samples include live, death adults and larvae ,looking after insects that showed abnormal features such as slow movement ,short and winding appendages, and irregular wings.

Fourteen fungal isolates was identified from the insects, they include :
Aspergillus flavus ; A.terreus ; A.restrictus ; A.wentii ; A.niger; Penicillium sp. ; Mucor hemalis ; Rhizopus sp. ;Geotricum candidum; Chaetomium hispanicum; Myceliophthora frggusa; Paecelomyces variotii; Scopulariopsis flava; Fusarium sp. .

Aspergillus flavus showed the highest occurrence, while the lowest is M.frggusa in 21% and 2.6% respectively.

To get healthy insects, a growth boxes was prepared for growth and reproduction of insects necessary to farther experiments.

Water spore suspensions were prepared for each fungal isolate. The suspension was spread on first larval stage , sixth larval stage and adult insects. *A.restrictus* spore suspension showed the highest percentage of death (96.6%) in first larval stage and (63%) in both sixth larval stage and adult insects. From the other side , *Rhizopus sp.* suspension caused (3.3%) death percentage ,without significant differences from the control.

الخلاصة :

أجريت الدراسة في محافظة البصـــرة/ العـــراق حيـــث جمعـــت **1500** حشـــرة صرصـــر أمريكي.*Periplaneta americana L* حية وميتة وحورياته من بيئتها وروعي جمع تلكم الحشـــرات التي بدا عليها مظاهر غير طبيعية كبطء الحركة وقصر وتعرج قرون الاستشعار وعدم انتظام وتساوي الأجنحة.

عزل من الحشرات أربع عشر عزلة فطرية تعود للأنواع :

Aspergillus flavus و *A.terreus* و *A.restrictus* و *A.wentii* و *A.niger* و *Penicellium spp.* و *Mucor hemalis* و *Rhizopus sp.* و *Geotricum candidum* و *Chaetomium hispanicum* و *Myceliophthora frggusa* و *Paecilomyces variotii* و *Scopulariopsis flava* و *Fusarium sp.* . وكان *A. flavus* أعلى الفطريات ظهوراً في العينات وأدناها الفطر *M.variotii* وبنسبتي **21** % و**2,6**% على التوالي.

تم تربية وإكثار الحشرات في صناديق تربية خاصة للحصول على حشرات سليمة لاستعمالها في تجربة المعلقات الجرثومية.

حُضرت المعلقات الجرثومية المائية لهذه الفطريات ورشت بها حوريات الطور الأول وحوريات الطور السادس والبالغات وكان معلق الفطر *A.restrictus* أعلاها تأثيرا وبنسبة قتـــل **96,6** % في المعاملة الأولى **63,3** % في المعاملة الثانية. فيما كانت عزلة الفطر *Rhizopus sp.* أدنى الفطريات فاعلية في القتل وبنسبة قتل **3,3**% ومن دون فرق معنوي عن معاملة السيطرة.

المقدمة:

يعد الصرصر الأمريكي *Periplaneta Americana L.* من الحشرات الواسعة الانتشار عالمياً ويكثر تواجده في البيئات الحارة والدافئة وهو يسبب أضرارا صحية للإنسان بتواجده معه في مكان عيشه أو نقله للمسببات المرضية من بيئتها حيث تنمو وتتكاثر الحشرة داخل مجاري الصرف الصحي ، وتزداد أهمية الحشرة الصحية كلما تدهور وتدنى مستوى النظافة العامة والخدمات البلدية للتجمعات السكنية والمصالح العامة وخصوصا المستشفيات.

أظهرت الدراسات ان الصرصر الأمريكي ينقل ثلاثون نوعاً من البكتريا وكان 54% منها مرضيا (Cloares , et al. 1992) ، وفضلاً عن ذلك فقد بينت الدراسات ان الحشرة واسطة لنقل بكتريا الديزنتري والجذام وأنواع *Staphylococcus areus* و*Pseudomonas klebesilla* وبيوض ديدان تصيب الإنسان *Schistosoma* و *Ascaris* و *Tania saginate* كما تنقل الأوالي *Entamoeba histolotica* و*Giaridia spp.* و *Toxoplasma sp.* وكذلك فيروسات شلل الأطفال والتهاب الكبد (Fotedar et al. 1993 Oothuman et al. 1989 ; Foteder et al. 1989 ; Roth و Willis) كذلك يسبب الصرصر الأمريكي الحساسية والربو للأشخاص المهيئين atopic عند استنشاقهم روائح براز الحشرة أو بقاياها أو الأغذية الملوثة بها (Rumana , 1980). ان مما يزيد من الاضرار الصحية المحتملة لهذه الحشرة هو تفضيلها العيش والتواجد في المطابخ (Apiwat et al, 2001).

سجل ما يقارب 700 نوع فطري لغاية عام 2000 كممرضات للحشرات كان معظمها من الممرضات الحقيقية وبعض هذه الفطريات اختياري الامراضية facultative pathogen كالجنسين *Aspergillus* و *Fusarium* (Richard , 2000)

أجريت في السنوات الأخيرة العديد من الدراسات لاستعمال الفطريات في المقاومة الحيوية للحشرات وتم في هذه الدراسات الاهتمام بالفطريات المصاحبة لتلك الحشرات

أو المتواجدة معها في نفس البيئـــة (Myjiid et al.1990 ; Feng et al. 1990 ; Shah, 1994 ; Moreira et al. 1996) ومن الدراسات على حشرة الصرصر الأمريكي تلـــك التي أجرتها Verrett et al. 1987 حيث تم عزل نوع جديد من خمـــيرة *Candida* وبينت أمراضيتها للحشرة وقدرتها على التكاثر السريع والمستمر داخلها.

تأتي هذه الدراسة حلقة في سلسلة الدراسات لمسح الفطريات في البيئات المختلفة في مدينة البصرة/ العراق ، وبيان أمكانية توظيفها في المجالات التطبيقية ، إذ يمكن استعمال الفطريات المعزولة من الحشرة قيد الدراسة في مكافحتها حيويا وهو التطبيق الذي يلقى دعماً عالمياً لتقليل مخاطر التلوث البيئي الذي تسببه المبيدات الكيمياوية.

المواد وطرائق العمل :

1- جمع الحشرات وتربيتها :

جمعت مائتي حشرة صرصر أمريكي من أماكن تواجدها الطبيعي في المجاري الرئيسة لمياه الصرف الصحي في حي الخليج العربي/ محافظة البصرة / العراق وربيت هذه الحشرات مختبريا في صناديق خشبية أبعادها 30×30×60 سم أعدت لهذا الغرض ، فرشت قاعدة الصندوق بسماد بقري تم تعقيمـــــه بالموصدة autoclave وغطيّ بورق سميك وتم ترطيب البيئة دوريا (Edwin et al.1987) أما الحشرات التي جمعت لعزل الفطريات منها فقد تم صيدها باستعمال ورق سميك (25سم^2) مطلي بمادة لاصقة نوع kol-rat وبلغ عددها 1500 حشرة وتم التعامل مع الحشرات المشوهة النمو والتي لا تماثل الحشرات الطبيعية في شكل وطول الأجنحة وقرون الاستشعار (Archbold et al. 1986) .

2- عزل الفطريات وحفظها:

غسلت الحشرات بالماء الجاري وعقمت سطحيا بمحلـــول 10% هايبوكلوريـــد الصوديوم ولمدة خمسة دقائق، بعدها قطعت الحشرة الواحدة إلى عدة قطع وزرعت القطع

لكل حشرتين في طبق زرعي (قطر 9 سم) يحتوي على الوسط الزرعي آكـــر البطاطـــا والدكستروز potato dextrose agar (PDA) . تم التحضير والعمـــل في ظـــروف التعقيم المعتمدة وروعي تجنب التلوث الهوائي حيث تم العمل داخل غرفة العزل المجهري المعقمة سلفاً.

حضنت الأطباق الزرعية بدرجة حرارة 25 مئوي (~2) وعند نمو الفطريـــات علـــى قطع الحشرات أو حولها تم العزل والتشخيص لها وبحسب المفاتيح التصـــنيفية المعتمـــدة (Domsch et al. 1980 ; Ellis 1976 ; Raper et al 1965; Samson et al. 1988) . نقيت الفطريات على الوسط الغذائي نفسه وحفظت المستعمرات النقية علـــى وســـط زرعي مائل slant في أنابيب اختبار universal وخزنت في داخـــل الثلاجـــة لحـــين الاستعمال و كما تم حفظ المزارع الفطرية النقية على أجسام الحشرات حيث عقمـــت مجموعات من الحشرات ووضعت كل ثلاث منها في أنبوبة الاختبار ولقحـــت بـــالفطر المنقى ثم حضنت بدرجة حرارة 25مئوي وبعد ظهور النمو الفطـــري عليهـــا أعيـــد فحصها وخزنت الأنابيب المطابقة للعزلات الأصـــلية في الثلاجـــة لحـــين الاســـتعمال .(Bateman , 1997)

3- تحضير المعلق الجرثومي:

أخذت ثلاث مجاميع من حوريات الصرصر الأمريكي بعد ثلاثة أيام من الفقـــس وبواقع عشرة حشرات لكل مجموعة وتم رشها بـــ (5 مل) من المعلق الجرثومي المـــائي لكل فطر وبتركيز 11 × (10) ^{8} جرثومة / مل والتي ضبطت باستعمال شـــريحة العـــد Haemocytometer كما رشت مجموعة السيطرة بـــ (5 مل) من الماء المقطر المعقم.

وضعت كل مجموعة في قنينة تربية فرشت قاعدتها بـــورق ترشـــيح Whatman رقم/1 ، ووضع معها قطعة قطن مبللة بالماء وبعض قطع مـــن الطعـــام المحضـــر ســـلفاً واستمرت التغذية يومياً. تم حضن القناني بدرجة حرارة 30 مئـــوي (~2) . ســـجلت أعداد الحشرات الميتة وتم تنظيف القناني من الحشـــرات الميتـــة والفضـــلات وجلـــود

الانسلاخ يومياً (Prior ,1997) كذلك تم معاملة حوريات الطور السادس بعمر 3 أيام بعد الانسلاخ الخامس والبالغات بعد 3 أيام من الانسلاخ الحادي عشر بذات الطريقة السابقة وقد اعتمدت ثلاث مكررات لكل معاملة وتم تحليل جميع النتائج إحصائيا باستخدام الحاسوب وتطبيق نظام Mintab .

النتائج والمناقشة:

1. العزلات الفطرية :

تم عزل وتشخيص 14 نوعاً فطرياً(جدول–1) وكانت نسب تكرراها متباينة فأعلاها نسبة الفطر *A. flavus* وبتكرار 21% فيما سجل النوعين *Penicillium sp.* و *Mucor sp.* نسبة متوسطة ومتقاربة من بعضهما (12,6% و 12,3%) على التوالي ، أما أدنى العزلات تكراراً فكانت للفطر *Rhizopus sp.* (2,2%).

جدول/1 – الفطريات المعزولة من حشرات الصرصر الأمريكي والنسب المئوية لترددها .

التسلسل	الفطـــــر	التردد %
1	*Aspergillus flavus*	21
2	*Penicillium spp.*	12.6
3	*Mucor spp.*	12.3
4	*A. restrictus*	6.8
5	*Fusarium sp.*	5.93
6	*A. niger*	5.3
7	*Scopulariopsis flava*	5.3
8	*Geotricum candidum*	5.2
9	*Chaetomium hispanicum*	5.0
10	*A. terreus*	4.6
11	*Paecilomyces variotii*	3.53
12	*A. wentii*	3.3
13	*Myccelioptho*ra *frggusa*	2.6
14	*Rhizopus sp.*	2.2
15	*Sterile mucelium*	4.3

يعد الفطر *A. flavus* من الفطريات العالمية الانتشار والمتنوع البيئات وقد عزل من التربة المالحة في العراق والكويت (Al-Bader and Abdullah , 1990) و (Domsch et al.1989) ، كما عزل من تربة الحقول الزراعية المعاملة بمخلفات مجاري الصرف الصحي (Domsch et al. 1989) . إن تواجد الفطر في مثل هذه البيئات المتطرفة يفسر ظهوره بتكرار عالي في بيئة المجاري وبالتالي على أجسام حشرات الصرصر التي تعيش وتتجول في هذه البيئة و كذلك فأن الفطر سبق وعزل من حشرة حفار ساق الذرة مما يدل على قابليته في النمو والتغذية على أجسام الحشرات Domsch et al. 1989) .

أما الفطر *Rhizopus sp.* فأن تكراره الأقل بين الأنواع المعزولة في الدراسة قد يعود إلى كونه من الفطريات المعتمدة أساساً على الكربوهيدرات البسيطة في تغذيتها والتي يقل وجودها في بيئة المجاري ، كما إن الفطر ذو قابلية تنافس ضعيفة.

2. تأثير المعلق الفطري في حوريات الطور الأول :

وجد من الدراسة إن معلقي الفطرين *A.restrictus* و *M. himalis* قد سببا أعلى نسبة قتل خلال الأسبوع الأول من المعاملة ، إذ بلغ 96,6 % لكليهما وبفرق عالي المعنوية عن بقية العزلات ومع مرور الوقت استمر التأثير القاتل للفطر *A. restrictus* حتى بلغ 100% في نهاية الأسبوع الثاني فيما بقيت نسبة القتل ثابتة للفطر *M. hemalis* .

إن نتائج الأسبوع الثاني بينت زيادة نسبة القتل في معاملة الفطرين *A. niger* و *Myceliophthora frggusa* حيث بلغت 96,6 % ، فيما كانت أدنى الفطريات فاعلية في القتل *Rhizopus sp.* وبنسبة قتل 3,3 % ومن دون فرق معنوي عن معاملة السيطرة.

3. تأثير المعلق الفطري في حوريات الطور السادس والبالغات

أظهرت النتائج إن أعلى معدل نسبة قتل للحوريات كانت في معاملة الفطر *A. restrictus* إذ بلغ 63.6 % تليه الفطريات *A. flavus* و *A.niger*

و *Paecilomyces variotii* و *Mucor hemalis* وكان معدل القتل لهما 60 و 56.6 و 53.3 % على التوالي ولم تختلف هذه المعاملات معنويا فيما بينها لكنها اختلفت بفروق عالية المعنوية عن معاملة المقارنة التي بلغت 6.6 %.

لقد كان الفطر *A. restrictus* الأشد فتكاً بالحشرات البالغة من بين الفطريات المختبرة وبنسبة قتل 53.3 % وتميزت معاملته معنوياً عن باقي المعاملات ، تلاها معاملة الفطين *A.flavus* و *P.varioii* اللتان بلغ معدل نسبة القتل فيهما 46.6 % واختلفتا كذلك عن باقي الفطريات بفرق عالي المعنوية. لقد كانت النسبة في معاملة السيطرة 6.6 % وتساوت معها معاملة الفطر *Rhizopus sp.* .

إن هذه النتائج تتفق مع ما ذكره Mujeed & Kenneth (1990) و Moore et al. (1990) و Prior (1997) في اختلاف تأثير الفطريات المعزولة من أطوار مختلفة من الحشرة في شدة إصابتها وفي فعالية القتل على الأطوار المختلفة. وقد يرجع السبب في طول الفترة اللازمة للقتل وقلة أعداد الحشرات مقارنة بالتجربة السابقة إلى زيادة سمك طبقة الكيوتكل للطورين ألحوري السادس والبالغات بشكل خاص (Cornwell , 1968) وكذلك زيادة عدد الخلايا المناعية أو الدفاعية . وبسبب طول مدة التغذية حتى وصول الحشرات إلى هذين الطورين فأن فرص أوفر وخاصة للبالغات منها لتخزين الدهون في الأجسام الدهنية ، إذ تلعب الدهون دوراً في تثبيط الفطريات داخل جسم الحشرة وان الأحماض الدهنية ذات السلاسل القصيرة (6 -12 ذرة كربون) هي المسئولة عن عملية التثبيط (Ten ,1978; Grula , 1982 & Smith ; Satio & Aoki 1983) ، إن اكتمال نمو الأجنحة الأمامية الجلدية في البالغات التي تعمل كدرع واق لها يحجز المعلق الجرثومي ويمنع وصوله إلى الفتحات الجسمية تحته.

المصادر

1. **Cloares, A.Rivault, C.Fontaine, F. and leguyader ,A. 1992. Cockroaches. As carrier of bacteria in multi family dwelling , Epidemiol. Infect, 109 (3) : 483-490.**
2. **Oothum P. ; Jeffery,J. ; Aziz, AH. ; Abu-Baker ,E. and Jegathesan ,M. (1989). Bacterial pathogen isolated from Cockroach traped from pacdiatric words in peninsular Malaysis.Trans.R.Soc.Trop.Med. Hyg. 83(1) : 133-135.**
3. **Fotedar ,R. ; Banerjee , U.and Shiwas , UB.1993. Vector potential of the German cockroach in distemination of Pseudomonas aeroginosa. J.Hosp. Infect. 23(1) :559.**
4. **Fotedar,R. ; Nayar, E. ; Samantrag, j.C. ; Shiwas , UB ; Banerjee , U. ; Dogra, V. and Kumar, A. 1989 . Cockroaches as vector of pathgenic bacteria. J. Commun .Dis. ,21 (4) : 318-322.**
5. **Roth, L.M. and Willis, E.R. 1957 . the medical and vertenary importance of cockroaches. Smithsonian Misc.Collect. 134 (10) : 1-147(c.f. Corenwell , P.B.1968).**
6. **Rumana, Rao-KV. ; Rahim,M.A. ; Jend, S.C. and Das,H. 1980.Skin test. Reactivity to local allergensim brochial asthma. Indian J. Traber 27(2) : 66-72.**
7. **Apiwat Tawatsin ;Usavadee Thavara; Jakkawarn Chompoosr; Wichai Kong Ngamsuk ; Chitti Chansang ; and Supol Paosriwong . 2001. Journal of Vector Ecology : 26(2).**
8. **Richard , j.Milner. 2000 . Biocontrol news and information vol. 21. no.(2)**
9. **Fing, M.G ; Johnson, J.B. and Kish, L.P.1990. Survey of entomopathogenic fungi naturally infecting cereal aphids of irrigated grain Crops in South Western Idaho.Environ.Entomol.19:1534-1542 .**
10. **Myjeed,H. Zabor and Kenneth Grace , J. 1990 Fungi associated with the subterranean termite Eticulitermes flavips in Ontario . Mycology 82(3) : 289-294.**
11. **Moreira, MAB. ; Magalhaes, BP. ; Valadores,MCC ; and Chagas, MCM.1996. Occurrence of metarhizium fiavoviride (Hyphomycetes) on Schistocerca palleus (Orthroptera) in Rio grand do norts, barazil Anais da sociedu de entomologica do brazil 25 :359-361.**
12. **Verret, JM. ; Gree, KB. ; Gamble, LM. ; and Crochen, FC. 1987. Ahemocolic Candida parasite of the American cockroach . J. E. Con. Ent.80:1250-1212.**

13. **Edwin, H . Archbold ; Michael, K. Rust and Donald, A. Reieson. 1987. Comparative life history cockroaches Blattella germanica.Ann. Entomol Soc. Am. 80:571-577.**

14. **Archbold, E.F. ; Rust,M.K. Reievsori, A.D. and Atkinson,K.D. 1986. Characterization of a yeast infection in the American cockroach . Enuiron. Entomol . 15: 221-226.**

15. **Samson,A.R.; Evans,C.;and Latge ,J. 1988. Atlas of Entomopathogenic fungi . Printed in the Netherland , New York 187 p.**

16. **Raper, K,H. and Fennel, D.I. , 1965. The Genus Aspergillus . William and Wilkins Baltimore. 686 pp.**

17. **Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes .Commonw. Mycol.Inst. Kew. Surrey. England.**

18. **Domasch, K.H. ; Gams, W. and Enderson, T. 1980. Compenedium of Soil fungi . vol. 1. Academic press, London.**

19. **Bateman, R.P. 1997. Development of a mycoisectiside for control of Locusts and grosshoppers. Outlook on Agriculture,26(1):13-18.**

20. **Prior, C. 1997. Suscptability of target acridoidis and non target organisms to Metarhizium anisoplea and M.flavoviride. Inver. Path . 20:115- 117.**

21. **Al-Bader,S.M. and Abdullah,S.K.1990. On the thermophilic mycoflora of Iraqi soils. SYDOWIA (41).**

22. **Moore, D.; Reed, M. ; Le Patourel, G. ; Abraham, Y.J. and Prior,C.1992. Reduction of feeding by the desert locust Schistosoma gregaria after infection with Metarhizium flavoviride.J.Inver.Path.60. 304-307.**

23. **Cornwell,P.B.1968. The cockroach. Vol. 1. Hutchinson. London, Anchor Press, 391 p.**

24. **Ten, J.S. 1978. Toxicity of short-chain fatty acids and alcohols towards Cladosporium resinae.App. Microbiol 28; 840-844.**

25. **Smith, R.J. and Grula,E.A. 1982.Toxic components on the larval surface of the corn earworm(Heliothis zea) and their effects on germination of Beauveeria bassiana. J. Invert. Path.39:15-23.**

26. **Saito, T. and Aoki, J. 1983. Toxicity of free fatty acids on the larval surface of two lepidopterous insects towards Beauveria bassiana and Paecilomyces fumosoroseus. App.Ent. Zool.12:225-233.**