فاعلية الفطر *Baeuvaria bassiana* في تصنيع جسيمات الفضة النانوية وتأثيرها في بعض ادوار حشرة البق الدقيقي *Planococcus citri* (Risso), Pseudococcidae:Hemiptera

حازم عيدان الشمري* حمزة كاظم الزبيدي**

الملخص

نفذت هذه الدراسة لبحث إمكان تحضير جسيمات الفضة النانوية بواسطة المستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر *Baeuvaria bassiana* واختبار فاعليتها في بعض أدوار البق الدقيقي *Planococcus citri*. اثبتت النتائج انه بإمكان تحضير جسيمات الفضة النانوية بواسطة مستخلص الكتلة الحيوية للفطر المذكور. وقد بينت النتائج ان المستخلص المائي للفطر غني بالمواد المختزلة والمغلفة والمثبتة التي من شأنها المساهمة في تصنيع جسيمات الفضة النانوية. أوضحت صور المجهر الالكتروني الماسح ان جسيمات الفضة النانوية المتكونة ذات اشكال كروية ومربعة ومستطيلة، وقد تراوحت حجومها بين (80.11 – 157.01) نانومتر وبمعدل 99.3نانومتر. بينت اختبارات السمية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة انها ذات فاعلية جيدة في الادوار المختلفة للبق الدقيقي (البيض، حوريات العمر الاول والاناث البالغة)، إذ حقق استعمال جسيمات الفضة النانوية المحضرة بالتركيز 4250 جزء بالمليون اعلى نسباً للقتل بلغت 40.0، 68.0 و70.0 % لأدوار البق الدقيقي المذكورة آنفاً على التوالي بعد 72ساعة من المعاملة. كما بلغت قيم التركيز النصفي القاتل LC50 معدلاً مقداره 5305.27، 1816.35 و1397.66 جزء بالمليون على التوالي. وسجلت الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة مستخلص الكتلة الحيوية للفطر المذكور أعلى تأثيراً لها مقداره 90.88، 94.08% بعد 3 و7 أيام من المعاملة بالتركيز 4250 جزء بالمليون، فيما سجل أقل نسبة للفاعلية النسبية للجسيمات النانوية عند التركيز 510 جزء بالمليون إذ بلغت 62.75، 4.6% بعد 3 و7يوما على التوالي. وأوضحت النتائج إمكان استعمال جسيمات الفضة النانوية المحضرة في مكافحة حشرة البق الدقيقي هي طريقة واعدة تعتمد على النانو تكنولوجي في مكافحة الحشرات ويمكن ان تكون أحد عناصر الادارة المتكاملة للآفات في المستقبل القريب.

المقدمة

تعد حشرة البق الدقيقي *Planococcus citri* التابعة للعائلة Pseudococcidae من رتبة Hemiptera إحدى أهم الآفات الاقتصادية التي تصيب أشجار الحمضيات والعديد من العوائل النباتية الأخرى مسببة خسائر اقتصادية مهمة في العديد من دول العالم (13،218). تكمن أهمية الحشرة في قدرتها التكاثرية العالية وتنوع العوائل النباتية التي تصيبها ومقاومتها للمبيدات الكيميائية (3)، فضلاً عن مساهمتها في نقل بعض أمراض النبات الفيروسية (10). هيمن استعمال المبيدات على طرائق مكافحة الآفات بصورة عامة والحشرية بصورة خاصة منذ مطلع الخمسينات من القرن الماضي وذلك لما تتميز به من سرعة في القتل وسهولة الاستعمال الا انه وطوال أكثر من خمسين عاماً باتت آثار المبيدات السلبية على النظام البيئي برمته واضحة الأمر الذي دعى الى التفكير بطرائق جديدة آمنة وصديقة للبيئة. تعُد التقانة النانوية من اسرع التقانات انتشاراً على المستوى العالمي وقد اطلق عليها بالثورة التقنية القادمة في مختلف

جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الاول

وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد، العراق.

كلية الزراعة ،جامعة بغداد ، بغداد، العراق.

المجالات الصناعية والطبية والزراعية لما تتمتع به من ميزات كبيرة (16). اشتق مفهوم النانو تكنولوجي من كلمة (Nano) التي تعني بالقزم في اللغة اليونانية وفي الاصطلاح العلمي فان النانو يساوي واحد جزء بالبليون من المادة وعادة ما تكون الجسيمات بحجم النانو بين (1-100) نانومتر (7). تحتل التطبيقات الزراعية مرتبة متقدمة في سلم اولويات التقانة النانوية ويتوقع منها ان تحدث ثورة هائلة في مجال وقاية النبات من خلال الاعتماد على تكنولوجيا النانو في تحضير مستحضرات ومبيدات نانوية يمكن ان تقدم الحلول في مكافحة الآفات الزراعية وغيرها من التطبيقات التي قد تساهم في تقليل التلوث البيئي وتخفيض كلف التطبيقات (14،19). استعملت الكائنات الحية حقيقية النواة مثل الفطريات في تصنيع الجسيمات النانوية ، إذ اختبرت اعداد كثيرة منها تعود لأجناس وانواع مختلفة ثبت انها اداة جيدة في تصنيع الجسيمات النانوية خصوصاً جسيمات الفضة النانوية. فقد أمكن تصنيع جسيمات الفضة والذهب النانوية بواسطة الفطر ***Chrysoporium tropicum*** وبحجوم تراوحت من 20–50 نانومتراً وكذلك من 2–15 نانومتراً على التوالي (23). استعمل الفطر ***Aspergillus oryzae*** في تصنيع جسيمات الفضة النانوية (6) فضلاً عن الفطر ***Fusarium*** sp. في تصنيع جسيمات الفضة النانوية وبحجم يتراوح بين 12-20 نانومتراً (24). ومن هذا المنطلق فقد هدف هذا البحث الى بحث إمكان تصنيع جسيمات الفضة النانوية بطريقة بيولوجية تعتمد على المواد المختزلة الطبيعية الموجودة في مستخلص الكتلة الحيوية للفطر ***Baeuvaria bassiana*** واختبار فاعليتها في بعض ادوار حشرة البق الدقيقي ***P.citri*** كطريقة واعدة في مكافحة الآفات الحشرية.

المواد وطرائق البحث

أعداد المستعمرة المختبرية للبق الدقيقي *P.citri*

اتبعت طريقة التربية على نبوتات درنات البطاطا لغرض تربية البق الدقيقي ***P.citri*** المذكورة في Al- Ali طريقة (3) بعد ان احدثت عدوى صناعية لنبوتات البطاطا بالأدوار المختلفة للحشرة ووضعت عند ظروف غرفة التربية عند درجة حرارة 26 ± 2م ورطوبة نسبية من 55–60% ومدة إضاءة (ضوء: ظلام) 16: 8 ساعة .

تحضير المستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر *B. bassiana*

تم الحصول على عزلة نقية للفطر ***Baeuvaria bassiana*** من مركز الزراعة العضوية في وزارة الزراعة. نُشطت عزلة الفطر، إذ تمت تنميتها أولاً على الوسط الزرعي Potato dextrose agar (PDA) الصلب بعد تحضيره وصبه في اطباق معقمة ،ثم نقلت اليها فيما بعد اقراص من مستعمرة الفطر بواسطة مشرط حاد معقم ، حضنت الاطباق بعدها في الحاضنة الكهربائية عند درجة حرارة 25 ± 2م لمدة 96 ساعة. بعد ذلك تم إكثار الفطر المذكور على الوسط السائل Potato Sucrose (PS) الموضوع في دوارق زجاجية سعة 1000مل، إذ عملت اقراصاً بقطر5 ملم من المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الغذائي الصلب (PDA) م نقلت عند ظروف معقمة الى الدوارق الحاوية على الاوساط الغذائية السائلة (PS) ما ضيف قرصين لكل دورق. تم تحريك الدوارق قليلاً، ثم حضنت في الحاضنة الكهربائية المبردة عند درجة حرارة 25±2 م° لمدة 21 يوماً آخذين بنظر الاعتبار الرج اليومي للدوارق المذكورة. حصدت الكتلة الحيوية للفطر بعد 21يوماً من التحضين عند الظروف المذكورة عن طريق التصفية والترشيح باستعمال قمع بوخنر وبواسطة ورق الترشيح Watman رقم 1 جرى غسل الكتلة الحية للفطر بواسطة ماء مقطر ثلاث مرات ،ثم غسلت بواسطة ماء منزوع الأيونات ثلاث مرات ايضا لغرض التخلص من بقايا الوسط الغذائي. اخذ 20غم من الكتلة الحية ونقل الى دورق زجاجي سعة 500 مل يحتوي على 500 مل من ماء منزوع الأيونات. وضعت الدوارق في حاضنة كهربائية مبردة عند درجة حرارة 25±2م مع الرج اليومي لمدة 120ساعة. ولغرض الحصول على راشح الكتلة الحيوية

للفطر تمت تصفية وترشيح محلول الكتلة الحيوية باستعمال قمع بوخنر بواسطة ورق الترشيح Watman رقم 1 جمع مستخلص الكتلة الحيوية للفطر في دورق زجاجي ووضع في الحاضنة عند درجة حرارة 25±2 م° لحين الاستعمال.

تحضير دقائق الفضة النانوية بواسطة المستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر *B.bassiana*

حضرت جسيمات الفضة النانوية عن طريق تهيئة محلول 50 ملي مول من نترات الفضة ثم اخذ 100 مل من مستخلص الكتلة الحيوية للفطر واضيف الى دورق زجاجي سعة 1000 مل يحتوي على 900 مل من محلول نترات الفضة . نقل المحلول مع الرج ووضع في الحاضنة الكهربائية المظلمة عند درجة 25±2 م° لمدة 120ساعة مع الرج اليومي. تمت مراقبة المحلول في أثناء هذه المدة لملاحظة التغييرات اللونية التي تطرأ عليه والتي تدل على حدوث عملية الاختزال البيولوجي وتكون جسيمات الفضة النانوية. برد المحلول ووضع في دورق زجاجي محكم في ظروف الحاضنة الكهربائية المظلمة عند درجة حرارة 5±2م° ولحين الاستعمال.

دراسة بعض صفات جسيمات الفضة النانوية المحضرة

درست الصفات البصرية لجسيمات الفضة النانوية ومستخلص الكتلة الحيوية للفطر *B.bassiana* ونترات الفضة بواسطة جهاز التحليل بالأشعة فوق البنفسجية (UV-VIS spectrophotometer) نوع (Shimadzu) .حددت المجاميع الفعالة (Functional groups) التي يتكون منها مستخلص الفطر وجسيمات الفضة النانوية المحضرة والتي من الممكن ان تشترك وتعمل مواداً مختزلة ومغلفة ومثبتة لجسيمات الفضة النانوية بواسطة جهاز (FTIR) Fouriertransform infrared). اما الصفات التركيبية للجسيمات النانوية المتكونة من حيث الشكل والحجم فقد حددت بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscope (.SEM).

فاعلية جسيمات الفضة النانوية المحضرة في بعض ادوار البق الدقيقي *P.citri*

حضرت التراكيز (4250، 3060، 2040، 1020 و510) جزء بالمليون من جسيمات الفضة النانوية باستعمال الماء منزوع الايونات. عوملت بيوض وحوريات العمر الاول والاناث البالغة للبق الدقيقي المذكور بالتراكيز المذكورة بصورة منفصلة كل على حده عن طريق وضع 20 بيضة و10 حوريات عمر اول و 10بالغات على اوراق النارنج المعاملة بالتراكيز المذكورة بطريقة غمر الورقة ووضعها في طبق بتري بلاستيكي مغطى بأحكام وبواقع ثلاثة مكررات فيما عوملت المعاملة الضابطة بالماء منزوع الايونات فقط. وضعت الاطباق في غرفة التربية عند درجة حرارة 27± 2 م ورطوبة نسبية من 50-60 %، ومدة ضوء: ظلام (8:16) ساعة. سجلت نسب القتل لادوا البق الدقيقي بعد 24 ، 48و72 ساعة، فيما كانت بعد 120 ساعة لمعاملة البيوض لتجاوز مدة حضانة البيض بخصوص البيوض التي لم تفقس بعد 72 ساعة. صححت نسب القتل بواسطة معادلة Abbott (2).وحددت قيم التركيز النصفي القاتل LC50 بواسطة برنامج (Probit analysis) المقترح من قبل Chi (9). ولمقارنة تأثير المستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر المذكور ومحلول نترات الفضة في ادوار البق الدقيقي المذكورة أنفاً ،استعملت التراكيز التالية (200000، 400000، 600000 و800000) جزء بالمليون وعوملت ادوار البق الدقيقي واخذت القراءات بالطريقة نفسها المذكورة آنفا.

الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية ضد البق الدقيقي *P.citri*

جلبت 50 شتلة نارنج بعمر أكثر من سنة. ولغرض محاكاة ظروف البيوت المحمية نقلت الى أحد غرف التربية التابعة لوحدة بحوث المكافحة الإحيائية عند درجة حرارة 27±2 م ورطوبة نسبية من 55–60

%، ومدة ضوء: ظلام (8:16) ساعة.أحدثت للشتلات إصابة صناعية بالبق الدقيقي المذكور، إذ نقلت كتل بيض واطوار اخرى وزاحفات واناث بالغة. بعد الحصول على إصابات جيدة من البق الدقيقي ،نفذت تجربة رش الشتلات المصابة بدقائق الفضة النانوية لتراكيز. سجلت الكثافات العددية لحوريات البق الدقيقي (الزاحفات)/شتلة قبل عملية الرش، بعد ذلك جرى رش الشتلات بتراكيز الجسيمات النانوية (4250 ، 3060 ،2040، 1020 و510) جزء بالمليون بواسطة مرشة يدوية صغيرة بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز فيما عوملت المعاملة الضابطة بالماء المقطر فقط .اخذت القراءات بعد 3 و7 أيام من المعاملة وحسبت النسبة المئوية لفاعلية الجسيمات النانوية بواسطة معادلة Henderson وTilton (15) .

$$\%corrected = 100\left[1 - \frac{Ta \times Cb}{Tb \times Ca}\right]$$

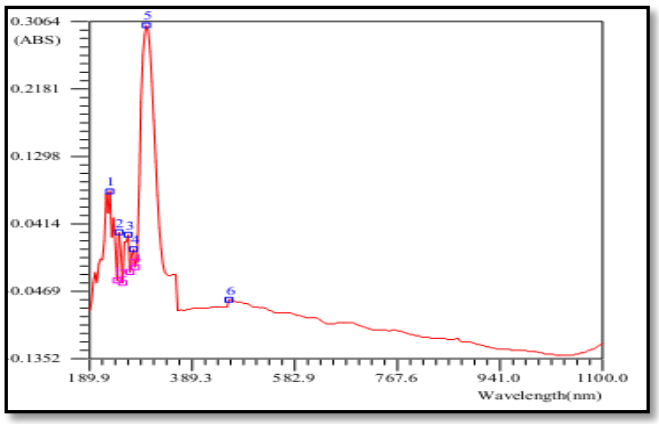
إذ ان : Ta = عدد الحشرات في المعاملة بعد المعاملة ؛ Cb = عدد الحشرات في المقارنة قبل المعاملة؛ Tb = عدد الحشرات في المعاملة قبل المعاملة ؛ Ca = عدد الحشرات في المقارنة بعد المعاملة.

استعمل التصميم تام التعشية (CRD) للتجارب ذات العامل الواحد فيما استعمل تصميم الألواح المنشقة المنشقة (Split Split plot) فيما يخص التجارب العاملية، وقورنت الفروق بين متوسطات المعاملات حسب قيمة اقل فرقاً معنوياً (L.S.D)عند مستوى احتمال 0.05 وحللت النتائج وفق البرنامج الإحصائي GenStat.7 .

النتائج والمناقشة

الصفات البصرية والطيفية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة

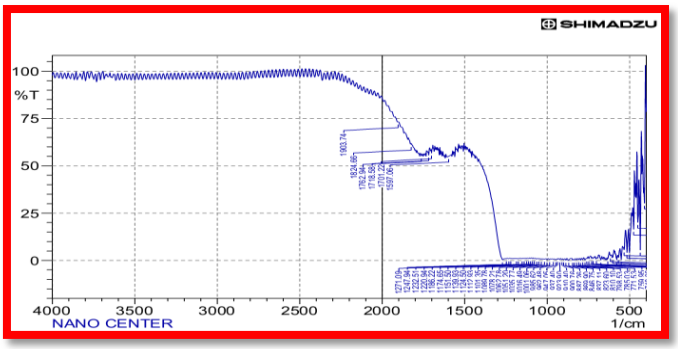
أدى إضافة المستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر *Baeuvaria bassiana* الى محلول نترات الفضة الى حدوث تفاعل تسبب بظهور تغييرات لونية استقرت الى اللون البني الغامق الأمر الذي يؤشر حدوث عملية اختزال بيولوجي لنترات الفضة وتحولها الى جسيمات نانوية بعد 120ساعة عند إضافة مستخلص الكتلة الحيوية للفطر المذكور عند درجة حرارة 25م°. قيست استثارة البلازمون السطحي لجسيمات الفضة النانوية في المحلول بواسطة جهاز التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية مسجلاً اعلى امتصاصاً عند طول موجي (300.77) نانومتر فضلاً عن قيم امتصاص عند طول موجي (459.28) نانومتر بخصوص جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص المائي للفطر *B. bassiana* (شكل 1). في دراسة مماثلة سجل اعلى امتصاصاً لجسيمات الفضة النانوية عند طول موجي 420 نانومتراً مما يشير الى تباين قمم الامتصاص تبعاً لحجم وشكل الجسيمات النانوية المتشكلة فضلاً عن اختلاف في فاعلية العوامل المختزلة الموجودة في مستخلص الكتلة الحيوية للفطر (7،11). نوقشت الآليات المحتملة لتصنيع الفضة النانوية بواسطة الفطريات الى اختزال ايونات الفضة وتكوين جسيمات نانوية، إذ ان ايونات الفضة تمسك على أسطح الخلايا الفطرية يتبعه اختزال الايونات بواسطة الانزيمات الموجودة في المنظومة الفطرية (17). كما ان الانزيمات المفرزة خارج الخلايا مثل (naphthoquinones وAnthraquinones) تسهل من عملية الاختزال كما هو الحال في الفطر *F.oxysporum*، إذ يعتقد ان الانزيم (nitrate reductase) يعتمد على (NADPH) في عمليات نقل (quinine) خارج الخلايا وهي المسؤولة عن تكوين الجسيمات النانوية (4).



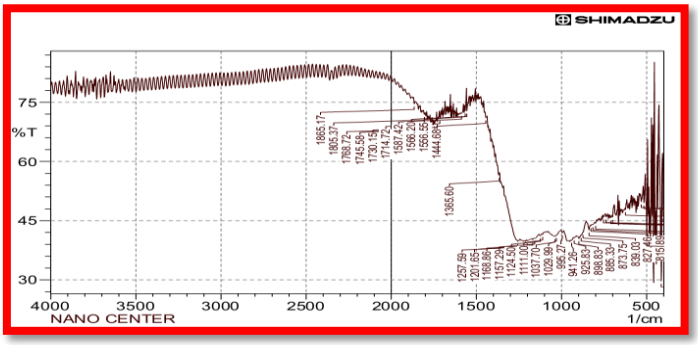
شكل 1: طيف الامتصاص لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص المائي للفطر *B .bassiana*

تحديد المجاميع الفعالة المساهمة في تحضير جسيمات الفضة النانوية

اثبت التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR للمستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر *B.bassiana* (شكل 2) الى وجود مجموعة الهاليد الكيل C-I، كما سجل التحليل الطيفي وجود مجاميع الكاربوكسيل O-H فضلاً عن وجود مناطق لمجموعة الالفا امين C-N كما ان للمركبات الاروماتية نصيب في مكونات المستخلص المائي ايضا، كما سجل التحليل الطيفي وجود مجاميع الأمين N-H ولوحظت قيم وحدات طاقة في مناطق الكيتونات C-C والالدهايدات C=O فضلاً عن مجاميع الايثرات والاسترات. وبين التحليل الطيفي لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة الفطر المذكور آنفاً شكل3 جود وحدات طاقة لمجموعة الهاليد الكيل بدرجة كبيرة، فضلاً عن مجاميع الأمين والكاربوكسيل التي تمثل البروتينات مما يشير الى عملها في عملية الاختزال البيولوجي لنترات الفضة وتحضير الجسيمات النانوية فضلاً عن عملها المغلف والمثبت وبالتالي منع الجسيمات النانوية من التكتل والتجمع .



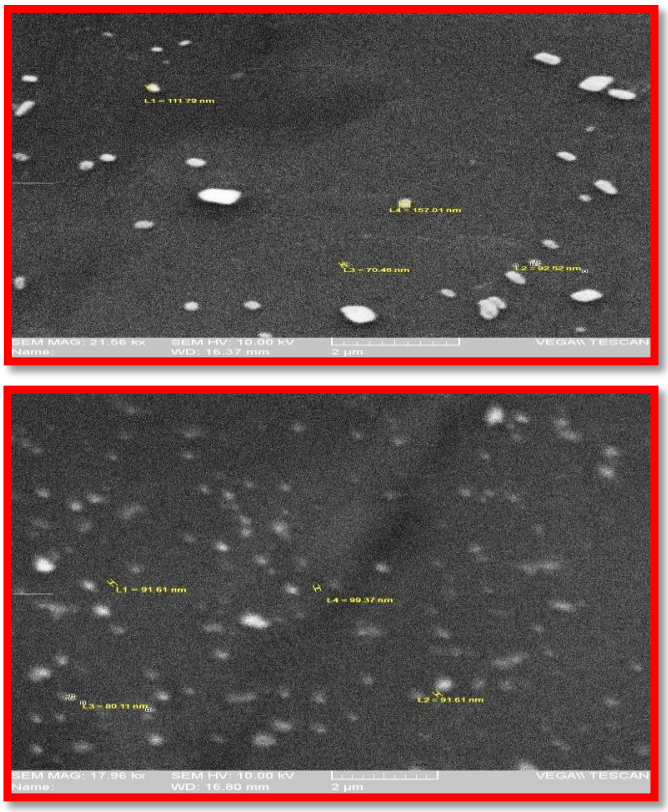
شكل 2 : التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR لمستخلص للفطر *B .bassiana*



شكل **3**: التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء **FTIR** لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص المائي للفطر ***B .bassiana***

تحديد شكل وحجم جسيمات الفضة النانوية المحضرة

أظهرت صور المجهر الالكتروني الماسح تكون جسيمات الفضة النانوية بأشكال واحجام مختلفة، فقد اوضحت الصور ان حجم الجسيمات النانوية المحضرة بواسطة مستخلص الكتلة الحيوية للفطر ***B.bassiana*** يتراوح بين **80.11–157.01**نانومتر وبمعدل **99.3**نانومتر وتميزت هذه الجسيمات بأشكال كروية ومستطيلة ومربعة شكل (**4**). تجدر الإشارة الى ان لشكل وحجم الجسيمات النانوية عملاً مهماً في تحديد الخواص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية لتلك الجسيمات.



شكل **4**: صور بالمجهر الالكتروني الماسح تظهر شكل وحجم جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة مستخلص الفطر ***B.bassiana***.

تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة في أدوار البق الدقيقي *P. citri*

تشير النتائج المدونة في الجدول (1، 2، 3) الى تباين تأثير جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص المائي للفطر *B.bassiana* في أدوار البق الدقيقي (البالغات، لحوريات) ،إذ بلغت اعلى نسباً للقتل التراكمية عند التركيز 4250 جزء بالمليون وكانت76.7، 68.0 على التوالي فيما كانت اقل نسباً للقتل التراكمية عند التركيز 510 جزء بالمليون وذلك بعد 72 ساعة من المعاملة ،و بلغت اعلى نسباً القتل بيوض الحشرة 40 %، وقد أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين التراكيز في إحداث نسب القتل عند مستوى احتمال 0.05 . بلغ التركيز النصفي القاتل المعدلات ومقدارها 1397.66، 1816.35و5305.27 جزء بالمليون على التوالي جدول 4. تتميز جسيمات الفضة النانوية بالقدرة على التداخل مع العديد من الفعاليات الحيوية للحشرة لما تتمتع به من قدرة على اختراق الغشاء البلازمي وتحطيم العديد من الجزيئات الحيوية مثل الإنزيمات فضلاً عن تخثر البروتينات وفقدان الغشاء البلازمي لوظيفته وبالتالي موت الخلايا (8). كما ان تعرض الحشرة لجسيمات الفضة النانوية يقلل من حركة اليرقات ويجعل جدار الجسم قوياً ومتصلباً كما يلاحظ انتفاخ الجسم الذي يصبح عجيني وهش وتحوله الى البني الداكن (1) وهي أعراض مشابهة تماماً لما تمت ملاحظته لبالغات وحوريات البق الدقيقي التي عوملت بالجسيمات النانوية المختلفة في الدراسة الحالية. يتضح مما تقدم أهمية جسيمات الفضة النانوية المحضرة بالطرائق البيولوجية في التأثير في البق الدقيقي وبذلك يمكن ان تكون أحد العوامل المهمة في برامج الإدارة المتكاملة للآفات.

جدول 1: فاعلية جسيمات الفضة النانوية في الإناث البالغة للبق ألدقيقي

التركيز ppm	% للقتل المصححة بعد		
	24 ساعة	48ساعة	72ساعة
4250	6.7	20.0	76. 7
3060	6.7	30.0	73.3
2040	0.0	3.3	70.0
1020	0.0	10.0	60.0
510	0.0	0.0	3.3
اقل فرق معنوي LSD 0.05	التركيز = 7.03	الزمن =5.45	النانو ×التركيز = 12.18

جدول 2: فاعلية جسيمات الفضة النانوية في حوريات العمر الأول للبق الدقيقي

التركيزppm	% للقتل ألمصححة بعد		
	24ساعة	48 ساعة	72ساعة
4250	46.67	69.0	68.0
3060	20.0	65.53	67.88
2040	17.0	31.04	57.13
1020	20.0	24.14	28.59
510	7.0	8.40	14.33
اقل فرق معنوي LSD 0.05	التركيز = 5.18	الزمن = 4.01	النانو ×التركيز = 8.97

جدول 3: فاعلية جسيمات الفضة النانوية المحضرة في بيض البق الدقيقي

التركيز (جزء بالمليون)	%للقتل المصححة بعد 120ساعة
4250	40.0
3060	43.36
2040	36.70
1020	35.0
510	10.0
المعدل	33.01
LSD 0.05	0.98

جدول 4: سمية جسيمات الفضة النانوية المحضرة لأدوار البق الدقيقي

أدوار البق الدقيقي المعاملة	التركيز القاتل (جزء بالمليون)		حدود الثقة	%95	معادلة خط الانحدار	χ^2
	LC50	LC90	أقل	أعلى		
البيض	5305.27	124927.07	1147.79	25234.2	Y=1.52+0.93X	6.40
الزاحفات	1816.35	8112.18	1605.179	2055.25	Y=-43 +1.97X	0.23
الاناث البالغة	1397.66	5723.84	617.6	3150.55	Y=-1.58+2.09X	12.12

فاعلية نترات الفضة والمستخلص المائي للفطر *B.bassiana* في بعض أدوار البق الدقيقي

تشير النتائج المدونة في جدول 5 انخفاض تأثير نترات الفضة والمستخلصات المائية للكتلة الحيوية للفطر *B.bassiana* في أدوار البق الدقيقي(البيض ،الحوريات والاناث البالغة) مقارنة بجسيمات الفضة النانوية، إذ حيث بلغت اعلى نسبة قتل عند المعاملة بنترات الفضة عند التركيز 800000 جزء بالمليون 13.56، 21.45 و 20.0% على التوالي فيما سجلت اقل نسباً للقتل عند التركيز 200000جزء بالمليون، بينما سجل اعلى نسباً لقتل أدوار البق الدقيقي المذكورة عند المعاملة بالمستخلص المائي للكتلة الحيوية للفطر المذكور عند التركيز 800000 جزء بالمليون ، إذ بلغت نسب القتل معدلاً مقداره 6.753، 0.000 و0.000 لبيض وحوريات العمر الأول للبق الدقيقي والإناث البالغة للبق الدقيقي على التوالي عند التركيز المذكور بينما سجلت اقل نسباً للقتل عند التركيز 200000 جزء بالمليون ،وقد أشارت النتائج الى تفوق نترات للفضة في التأثير في أدوار البق الدقيقي مقارنة بتأثير المستخلص المائي للفطر المذكور وبفارق معنوي عند مستوى احتمال 0.05. كما اوضحت النتائج تزايد معدلات نسب القتل بزيادة التركيز وبفارق معنوي. في دراسات مماثلة تفوق تأثير جسيمات الفضة النانوية على تأثير نترات الفضة والمستخلص المائي لنبات *Euphorbia prostrata* ضد حشرة سوسة الرز *S.oryzae*، إذ حقق التركيز 250 ملغم/كغم حبوب نسب قتل مقدارها 70.0% بعد 72ساعة من المعاملة بينما سبب المستخلص المائي للنبات المذكور ونترات الفضة بتركيز 1000 ملغم/لتر نسبتي قتل بلغتا 40 و37% على التوالي (20). كما ان التركيز 10 ملغم/لتر من جسيمات الفضة النانوية قد احدث نسب قتل 100% ليرقات الطور الرابع للبعوض فيما تطلب الأمر زيادة التركيز الى 50 ملغم/لتر من المستخلص المائي لنبات *Eclipa prostrate* لأحداث نسب قتل 83% مما يشير الى تفوق كبير للجسيمات النانوية (21).

جدو ل 5: فاعلية نترات الفضة و المستخلص المائي للفطر *B.bassiana* في بعض أدوار البق الدقيقي

نوع المعاملة	ppm التركيز	% للقتل ألمصححة		
		البيض	الحوريات	الإناث ألبالغة
نترات الفضة	800000	13.56	21.45	20.0
AgNo3	600000	16.88	17.77	20.0
	400000	11.8	14.33	3.36
	200000	1.70	7.17	0.0
المستخلص المائي	800000	6.753	0.000	0.000
للفطر *B.bassiana*	600000	3.437	0.000	0.000
	400000	6.787	0.000	0.000
	200000	1.660	9.130	0.000
اقل فرق معنوي 0.05 نوع المعاملة = 0.50 التركيز = 0.31 الدور = 0.37				
نوع المعاملة × التركيز = 0.69 نوع المعاملة × الدور = 0.74 نوع المعاملة × الدور × التركيز = 1.38				

الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية ضد البق الدقيقي *P.citri*

يتضح من النتائج المدونة في جدول6 تباين الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة المستخلص المائي للفطر *B .bassiana* في الكثافة السكانية لحوريات البق الدقيقي ، فقد بلغت اعلى معدلاً للفاعلية النسبية 90.88 % عند التركيز 4250 جزء بالمليون بعد ثلاثة ايام من المعاملة فيما بلغ اقل معدل للفاعلية النسبية عند التركيز 510 جزء بالمليون الذي بلغ معدلاً مقداره 62.75 % وذلك بعد ثلاثة ايام من المعاملة ، كما اوضحت النتائج ان الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة قد حافظت على نسبتها عند التراكيز المرتفعة بعد7 أيام، إذ بلغ اعلى معدلاً للفاعلية النسبية 94.08% عند التركيز 4250 جزء بالمليون فيما بلغ اقل معدلاً للفاعلية النسبية 4.66 % عند التركيز 510 جزء بالمليون . وكشفت النتائج تأثر الفاعلية النسبية للجسيمات النانوية في مرور الزمن بعد 3 و7 أيام على التوالي وبفارق معنوي عند مستوى احتمال 0.05، وقد يعزى انخفاض تأثيرها بعد 7 ايام في بقية التراكيز الى احتمالية فقدان الجسيمات النانوية الى خواصها المثالية التي من غير الممكن بقائها جسيمات نانوية بعد وصولها الى المحيط لفترة طويلة بسبب حدوث عملية التكتل والتجمع وبالتالي فقد خواصها النانوية والبيولوجية (12). يتضح مما تقدم ان اهمية جسيمات الفضة النانوية وفاعليتها الجيدة في قتل أدوار البق الدقيقي وبالتالي يمكن اعتمادها في برامج المكافحة المتكاملة للآفات.

جدول 6: الفاعلية النسبية لجسيمات الفضة النانوية المحضرة ضد البق الدقيقي *P.citri*

مصدر الجسيمات النانوية	التركيز(جزء بالمليون)	% للفاعلية النسبية	
		3 يوم	7يوم
جسيمات الفضة النانوية بوساطة مستخلص الفطر *B.bassiana*	4250	90.88	94.08
	3060	72.46	63.79
	2040	69.05	51.48
	1020	59.79	43.36
	510	62.75	4.66
اقل فرق معنوي 0.05	التركيز= 0.98	التركيز × الزمن = 1.14	الزمن = 0.39

المصادر

1- **Abduz. A. Z.; A. Bagavan; C. Kamaraj; G. Elango, A. Abdul Rahuman (2012). Efficacyof plant-mediated synthesized silver Nanoparticles against *Sitophilus oryzae.* J .Bio.pest.5: 95-102.**

2-**Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267.**

3- **Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, Senapati S, Khan MI, Kumar R,& Sastry M, (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* composite metal particles, and the atom to metal. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 28: 313-318.**

4-**Al-Ali, A. S. (1969).The breeding of *Planococcus citri* (Homoptera: Pseudococcidae) on sprouting potato. Proc. Roy. Ent. Soc. Lond, 44:45-47.**

5-**Banu, A. N. and C. Balasubramanian (2014). Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol* . RES.,113:2869-2877.**

6- **Bhattacharyya, A.; A. Bhaumik ; P. U. Rani; S. Mandal; and T. T.Epidi (2010). Nano-particles-A recent approach to insect pest control. African J. of Biotechnology, 9(24):3489-3493.**

7-**Bhimba, B.V.;Gurung; S. and U. Nandhini (2015).Silver nanoparticles synthesized from marine fungi *Aspergillus oryzae*. Int. J. Chem. Tech. Res., 7(1):68-72.**

8-**Chakravarthy, A. K.; A. Bhattacharyya; P. R. Shashank; T. Epidi; B. Doddabasappa and S. K. Mandal (2012). DNA-tagged nano gold: A new tool for the control of the armyworm, *Spodoptera litura* Fab. Lepidoptera: Noctuidae). African J. Biotechnology,11(38):9301-9295**

9-**Chi, H. (2015). omputer program for the probate analysis. http://140.120.197.173.Ecology/Download.**

10-**Cid, M.; S. Pereira;C. Cabaleiro and A. Segura (2010). Citrus Mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) Movement and Population Dynamics in an Arbor-Trained Vineyard. J. Econ. Entomol., 103(3):619 -630**

11-**Choudhary, R. S.; N. B. Bhamare and B. V. Mahure (2014). Bioreduction of Silver Nanoparticles Using Different Plant Extracts and Its Bioactivity against *E. coli* and *A. Niger*. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Sci.,7(7)1:07-11.**

12-**George,J. M. (2008). Silver nanoparticles:No threat to the environment. colloidal science Lab. Inc. https://www.purestcolloids.com**

13-**Goldasteh, S.; A. Talebi; Y. Fathipour; H. Ostovan; A. Zamani and R. V Shoushtari (2009). Effect of temperature on life history and population growth parameters of *Planococcus citri* (Homoptera, Pseudococcidae).**

14-**Ghormade,V.; M.V. Deshpande and K.M. Paknikar (2011). Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants.J. Biotech.Adv.,29:792-803.**

15- **Henderson,C.F. and E. W. Tilton (1955).Test with acaricides against brown wheat mite .J.Eco.Entomol.48:156- 161.**

16-**Lux, R. (2008). Nanomaterials State of theMarketQ3 2008: Stealth Success, Broad Impact. Report. https://portal.luxresearchinc.**

17-Mukherjee, P.; A. Ahmad; D. Mandal; S. Senapati; R. S. Sainkar; I. M. Khan; R. Parishcha; V.P. Ajaykumar; M. Alam; R. Kumar and M. Sastry (2001).Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelia matrix. A novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano Letters, 1(10):515-519.

18-Polat, F.; S. Ulgenturk and M. B. Kaydan (2008). Developmental biology of citrus mealybug,*Planococcus citri* (Risso), (Hemiptera: Pseudocccidae), on ornamental plants. pp. 177-184. In M. Branco, J. C. Franco, and C. Hodgson (eds.), Proceedings of the Xl international symposium on Scale Insect Studies, Lisbon, Portugal, 24-27 September 2007, Oeiras, Portugal. ISA Press, Lisbon, Portugal.

19-Ragaei, M. and A. H. Sabry (2014). Nanotechnology for insect pest control. International Journal of Science, Environment and Technology, 3(2):528 - 545.

20-Rajakumar, G.; A. Rahuman (2011). Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. Act. Trop., 118(3):196-203.

21-Rouhani, M.; M. Samih and A. S. Kalantari (2012). Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F. (Col.: Bruchidae). Journal of Entomological Research,4(4): 297-305.

22-Seabra, S. G.,(2013). Molecular evidence of polyandry in the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). PLoS ONE, 8(7) 68241.

23- Soni, N. and S. Prakash, S.(2012). "Fungal Mediated Nano Silver: An Effective Adulticide against Mosquito," Parasitology Res.,111(5):2091-2098.

24-Singh, A. K.; V. Rathod; D. Singh; S. Ninganagouda; P. Kulkarni; J. Mathew and H. Manzoor (2015). Bioactive Silver Nanoparticles from Endophytic Fungus *Fusarium* sp. Isolated from an Ethanomedicinal Plant Withania somnifera (Ashwagandha) and its Antibacterial Activity . International Journal of Nanomaterials and Biostructures,5(1):15-19.

EFFECTIVENESS OF ENTOMOPATHGENIC FUNGI *Beauveria bassiana* IN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR IMPACT ON SOME INSTARS OF CITRUS MEALYBUG *Planococcus citri (Risso)*, Pseudococcidae:Hemiptera

H. I. Al-Shammari* H. K. Al-Zubaidi**

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the possibility for preparing of Silver nanoparticle by the aqueous extract of Entomopathogenic fungi *Baeuvaria bassiana* biomass and to testing its effect on some of the instars of citrus mealybug. Results showed the possibility of preparing the silver nanoparticles by the biomass extract of this fungus. Results showed that the aqueous extract is rich in reducing, capping and stabilizer agents which will contributed to the manufacture of silver nanoparticles. scanning electron microscopes (SEM) images showed that the nanoparticles formed in spherical, square and rectangular shapes ranged in size from 80.11 to 157.01 nm as an average of 99.3 nm. toxicity tests of the prepared nanoparticles showed that they were very effective against different mealybug instars (eggs, 1st nymphs and adult females). Using of nanoparticles prepared with concentration of 4250 ppm was the highest mortality which were 40.0, 68.0 and 70.0% respectively after 72 hours of treatment. LC50 values were 5305.27,1816.35 and 1397.66 ppm respectively. Effectiveness efficiency of the nanoparticle prepared by the biomass extract of fungus at semi-field conditions was recorded at the highest rate effectiveness efficacy 90.88 and 94.08% after 3 and 7 days of treatment with a concentration of 4250 ppm. lowest effectiveness efficiency of nanoparticles at concentration was 510 ppm which were 62.75, 4.6% after 3 and 7 days respectively. also results revealed that using of silver nanoparticles prepared in the control of the citrus mealy bug was a new method that is based on. nanotechnology in pest control and can be a component of integrated pest management.

Part of Ph. D. for first author.

*** Ministry of Sci. and Tech., Baghdad, Iraq.**
****College of Agric., Baghdad, Iraq.**