وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم / البيئة

تقييم تأثير جزيئات الفضة المخلقة حيوياً بواسطة الفطر الممرض للحشرات Entomophthora muscae على الأطوار اليرقية لحشرة الذبابة المنزلية Musca domestica

بحث مقدم الى :

مجلس كلية العلوم / قسم البيئة كجزء من متطلبات نيل شهادة بكالوريوس علوم / علوم بيئة

من قبل الطالب:

علي جليل عباس ألعوادي

بأشراف :

م . م حسين رياض محمود الملا

كلمة شكر

الحمد والشكر لله رب العالمين على النعم الكثيرة التي من بها علي والصلاة والسلام على سيدنا محمد

وعلى اله واصحابه ومن دعا بدعوته الى يوم الدين .

يسرني ان اتقدم بالشكر والتقدير للأستاذ المشرف لتفضله بالأشراف على البحث ومتابعته المستمرة التي

ساعد باخراجه بشكله الحالي ولايفوتني ان اتقدم بالشكر الى اساتذتي في قسم علوم البيئة لما قدموه من

معرفة علمية واخيرا شكري وتقديري الى جميع من ساعدني في اعداد هذا البحث وفاتني ذكر اسمه

علي جليل العوادي

بسم الله الرحمن الرحيم

وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ ۖ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا ﴿٨٥﴾

صدق الله العظيم

سورة الاسراء

الآية (٨٥)

الاهداء

الى من غرسا الايمان والحق وحب الخير في اعماق نفسي يامن تعجز عن وصفهم الكلمات وكل الكلمات . . . . . .امي وابي حبا وتقديراً والى اخوتي محبة واعتزاز . الى كل من قدم لي النصح والعون. . . . . .عرفانا واحتراماً

الخلاصة

هدف البحث الى اختبار التاثير السمي لجسيمات الفضة الحيوية التي ينتجها الفطر *E.muscae*, اذ اوضحت النتائج بان لهذا الفطر القابلية على تخليق جسيمات الفضة وهذا ماكدته اختبارات تغير لون الراشح الخلوي في محلول التفاعل, اذتغير لون المحلول من عديم اللون الى الاصفر عند مزجه مع نترات الفضة واختبار الامتصاصية باستخدام جهاز المطياف ذو الاشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectrophotometer عند طول موجي 420 نانوميتر. واضهرت نتائج الاختبارات الحيوية بان لهذه الجسيمات سمية عالية تجاه الاطوار اليرقية لحشرة الذبابة المنزلية*Musca domestica* .كانت يرقات الطور الاول هي الاكثر تاثرا بنسبة هلاك تراوحت بين(٩٥و١٠٠)% في جميع التراكيز المختبرة.وبلغت اوطا نسبة هلاك(٦٠و٧٥و٨٣و٩٥و١٠٠)% ضد يرقات الطور الثالث عند التراكيز(٢و٤و٦و٨و١٠)ملغم/لتر على التتالي بعد24ساعة من المعاملة ,في حين حققت التراكيز المذكورة اعلاه اقصى نسبة هلاك(٧٠و٧٨و٨٩و٩٧و١٠٠)% بالتعاقب ضد يرقات الطور الثاني في نفس الفترة الزمنية. ممايشير الى امكانية استخدام جزيئات الفضة المتكونة في مكافحة حشرة الذبابة المنزلية.

المقدمة Introduction

اكتسبت الذبابة المنزلية*Musca domestica* اهمية بالغة من الناحية الطبية والبيطرية بسبب انتشارها الواسع على مقربة من اماكن عيش الانسان وحقول الدواجن وحقول تربية الماشية نضرا لما توفره تللك البيئات من ظروف ملائمة لنموها وتكاثرها**(20)**.اثبتت العديد من الدراسات بان الذبابة المنزلية الناقل الرئيس لعدد كبير من مسببات الأمراض Pathogens منها البكتريا **(14)**والفيروسات **(13)**والفطريات الجلدية**(2)** والريكتسيا **(7)**والديدان الطفيلية**(٦)**.تلعب المبيدات الكيمائية دورا هاما في مكافحة الحشرات واستخدمت بشكل كبير منذ اكتشاف الدي دي تي في مكافحة العديد من الحشرات ولكن في السنوات الأخيرة أبدت هذه الحشرة مقاومة كبيرة تجاه كافة أنواع المبيدات الحشرية الكيميائية المستخدمة واثبتت العديد من الدراسات بان هذه المبيدات غير صديقة للبيئة بسبب تراكمها وعدم تحللها في التربة الأمر الذي يسبب انتقالها عبر السلسلة الغذائية**.(11,19)**اتجهت أنضار الباحثين الى استخدام طرق آمنة بيئياً, اذ استخدمت الفطريات الممرضة للحشرات كعوامل مكافحة حيوية ضد الآفات الحشرية الطبية والاقتصادية وأثبتت هذه الفطريات نجاحات متفاوتة الا انها تحتاج إلى ظروف بيئية ملائمة لكي تتمكن من إصابة وقتل الحشرات علاوة على ذلاك فانها تستغرق فترة زمنية طويلة لكي تقتل الحشرة الهدف تتراوح مابين 7-3 ايام **(23)** .اضطر العلماء الى البحث عن طرق وتقنيات أخرى أكثر فعالية لمكافحة هذه الحشرات وكانت تقنية الجزيئات المتناهية في الصغر(النانوتكنلوجيNanotechnology)من بين أكثر التقنيات وأدقها استخداما في العديد من مجالات العلوم المختلفة **(4)**, اذ تمتاز العديد من الأحياء المجهرية ومنها الفطريات بالتخليق الحيوي Biosynthesis للجزيئات المتناهية في الصغر كجزيئات الفضة والذهب **(18)**Silver and gold nanoparticles استخدمت العديد من الفطريات لإنتاج جسيمات الفضة اذ اثبتت العديد من الدراسات إلى إن هذه الفطريات غير خطرة على البيئة ومصدر متجدد يمكن إن يستخدم كعامل اختزال فعال لتخليق جسيمات الفضة وهذا الاختزال الحيوي للمعادن يمكن استخدامه لإنتاج جسيمات المعدن ذات السمية العالية تجاه الآفات الحشرية ومن هذه الفطريات*verticillum* **(15)** و *Fusarium***(1,24)** و *Aspergillus* **(12)** و *Beauveria* **(١٦)** و *Trichoderma***(٢٢)**.هدفت هذه الدراسة الى تقيم تاثير جسيمات الفضة المخلقة حيويا من قبل الفطر الممرض للحشرات *E.muscae* على يرقات حشرة الذبابة المنزلية**.**

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص الفطر

عزل الفطر من بالغات الذبابة المنزلية المصابة,إذ وضع الذباب بعد تعقيمه على الوسط الزرعي Entomophthora complete medium(ECM)المضاف إليه المضاد الحيوي Streptomycin(1 ملغم/مل)وحضنت الأطباق بدرجة حرارة27 م لمدة سبعة أيام وبعد عملية الحضن نقلت مستعمرات من الفطر الى وسط ECM جديد لغرض الحصول على مزرعة نقية وشخص الفطر مظهريا ومجهريا بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية(٥) وتم تاكيد تشخيص الفطر من قبل الدكتورة سولاف حامد تيموز جامعة القادسية/كلية العلوم.

التخليق الحيوي لجسيمات الفضة AgNPS

تحضير الراشح الخلوي

نقلت مستعمرة من الفطر *E.muscae* الى دورق زجاجي سعته500 مل حاوي على وسط زرعي سائل مكون من فوسفات البوتاسيوم KH2PO4 (٧غم/مل)

وكبريتات المغنسيوم المائية Mgso4.7H20(٢غم/مل)

و كبريتات الامونيوم المائيةSO2(NH4) (اغم/مل)

وسكر الكلكوز(٦غم/مل)

وخلاصة الخميرة (اغم/مل)

حضنت الدوارق في شيكر(Shaker) لمدة ثلاثة ايام وبدرجة حرارة25 م وبسرعة 150 دورة/دقيقة.رشح الوسط باستخدام ورقة ترشيح What man NO.1 وغسلت الكتلة الحيوية بالماء المقطر لغرض ازالة مكونات الوسط المتبقية. اخذ20 غم من الكتلة الحيوية ووضع داخل دورق زجاجي سعة500 مل يحتوي على ماء مقطر وحضن بنفس الظروف والسرعة السابقة وبعد انتهاء عملية الحضن رشح باستخدام ورقة ترشيح وتم الحصول على الراشح الخلوي والذي سيتم استخدامه في انتاج جسيمات الفضة النانوية(١٥)

تخليق جسيمات الفضة

اخذ50 مل من محلول نترات الفضة ذو حجم1 ملي مول ومزج مع50 مل من الراشح الخلوي داخل دورق زجاجي سعته250 مل وحضن بدرجة حرارة25 م لمدة120 ساعة وبسرعة 150 دورة/دقيقة) السيطرة يحتوي على الراشح الخلوي فقط وبدون اضافة ايونات الفضة.(بعد انتهاء عملية الحضن لوحظ تغير اللون داخل الدورق من عديم اللون الى الاصفر نتيجة تكون جسيمات الفضة. اغلقت الدوارق باحكام وحفضت بدرجة حرارة الغرفة(٨)

تشخيص جسيمات الفضة

يعد استخدام جهاز المطياف الضوئي ذو الاشعة فوق البنفسجية Ultra-violet spectrophotometer من اهم الخطوات المتبعة للتاكد من تكون جسيمات الفضة في المحلول المائي. اذ تم التأكد من اختزال ايونات الفضة من قبل الفطر وذلك بسحب1 مل من الرائق وقيست الامتصاصية عند طول موجي-400 600نانوميتر(25)

تربية الحشرة

جمعت أعدادا من بالغات الذبابة المنزلية ووضعت في أقفاص تربية صممت على شكل متوازي مستطيلات(40×35×40)سم قاعدته خشبية وغطيت أوجهه كافة بقماش التول عدا سطحه العلوي غطي بالزجاج . غذيت البالغات باستعمال القطن المبلل بالماء ومسحوق الحليب في أطباق بتري وبمعدل طبقين لكل قفص **.(10)** جمعت البيوض ونقلت إلى أواني زجاجية حاوية على وسط صناعي لتربية اليرقات مكون من60غم سماد حيواني و10غم سكر شعير و5غم خميرة .أودعت في أقفاص تربية أخرى وتم متابعتها وصولاً إلى الدور الكامل وهكذا نقيت المزرعة لثلاثة أجيال قبل إجراء التجارب.تم تشخيص الحشرات في مركز بحوث وتحف التاريخ الطبيعي/ جامعة بغداد

الاختبار الحيوي لجسيمات الفضة

انجز الاختبار الحيوي باستخدام جسيمات الفضة المخلقة من قبل الفطر الممرض للحشرات *E.muscae* ضد الاطوار اليرقية اعتماداً على طريقة منظمة الصحة العالمية **(30)** اذ وضعت اليرقات في بيكر زجاجي سعة 250مل وبواقع ثلاث مكررات لكل طور و20يرقة لكل مكرر , وعوملت بالتراكيز المختلفة كل على حده .اغلقت الدوارق بقماش الشاش وحفظت بدرجة حرارة27 م و 75%رطوبة نسبية وحسبت نسبة العلاك بعد 24ساعة من المعاملة وصححت القيم حسب معادلة Orell and shneider

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطر

تم في هذه الدراسة عزل الفطر *E.muscae* على الوسط الزرعي ECM الذي يعد من اشهر الاوساط المستخدمة لعزل الفطريات الممرضة للحشرات والعائدة الى رتبة *Entomophthorales*وشخص مجهريا (الشكل١) ويظهر الغزل الفطري ميلا لتكوين حواجز بين الخلايا فعند نمو الجرثومة فانها تعطي انبوب انبات سرعان مايظهر فيه حواجز عرضية تقسم الخيط الفطري الى اجزاء وحيدة النواة او عديدة الانوية قد تتقطع الخيوط الفطرية الى قطع عديدة تسمى بالاجسام الخيطية الفطرية ,hyphal bodies تكون الحوامل الكونيدية متفرعة والكونيدة وحيدة ممكن تميزها على جسم الحشرة بشكل هالة بيضاء تحيط بالذبابة الميتة وهذه الهالة عبارة عن عددكبير من الجراثيم الكونيدية ويمتاز بوجود ظاهرة القذف القوي للكونيدات من قبل الحوامل الكونيدية. استخدم مستخلص الخيوط الفطرية كمادة بادئة لاختزال ايونات الفضة الى جزيئات الفضة المتناهية في الصغر Em-AgNPs لمعرفة فعاليتها السمية على يرقات الذبابة المنزلية.

شكل (1) صورة مجهرية للفطر *E.muscae*

تشخيص جسيمات الفضة

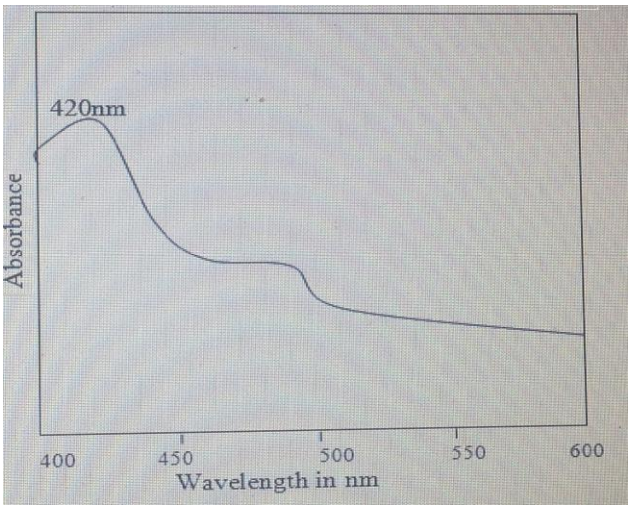
توضح النتائج في الشكل(2)تغير لون الراشح الخلوي للفطر الممرض للحشرات *E.muscae* من عديم اللون الى اللون الاصفر بعد72 ساعة من اضافة نترات الفضة اليه. ان تغير اللون هو دليل على تكون جسيمات الفضة المتناهية في الصغر داخل المحلول بينما لم يظهر اي تغير في لون المحلول في معاملة السيطرة **(28).**وتم تاكيد انتاج جسيمات الفضة باستخدام جهاز المطياف الضوئي ذو الاشعة فوق البنفسجة UV-Visible spectrophotometerالشكل (3)عند طول موجي420 نانوميتر. تطابقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه **(15)** اذ لاحضو تغير لون محلول الراشح الخلوي للفطر الممرض للحشرات *Verticillum* من عديم اللون الى الاصفر عند اضافة AgNO3 نتيجة لتكون جسيمات الفضة واكدو ذلك

باستخدام جهاز المطياف الضوئي ذو الاشعة فوق البنفسجية عند طول موجي480 نانوميتر.وذكر **(3)** ان راشح الفطر *Aspergillus fumigatus* تغير لونه من عديم اللون الى اللون المصفر بعد72ساعة من اضافة نترات الفضة اليه وحصلو على اعلى امتصاصية عند طول موجي420 نانوميتر ممايشير الى تكون جسيمات الفضة في المحلول الخلوي.

ان تكون جسيمات الفضة غيرت من لون راشح الفطر *Trichoderma* الى اللون الاصفر بعد ثلاث ايام من الحضن **(29)** وهذا ماذكره **(26)** عند تقيمهم لتاثير جسيمات الفضة المخلقة حيويا بواسطة الفطر *Aspergillus niger*ضد يرقات البعوض الناقل لحمى الضنك.

شكل (2)يوضح انتاج جسيمات الفضة

A-الراشح الخلوي قبل اضافة ايونات الفضةB- الراشح الخلوي بعد الاضافة



شكل (3)يوضح اختزال ايونات الفضة بواسطة الفطر *E.muscae*الى جزيئات الفضة المتناهية في الصغر عند طول موجي 420نانوميتر

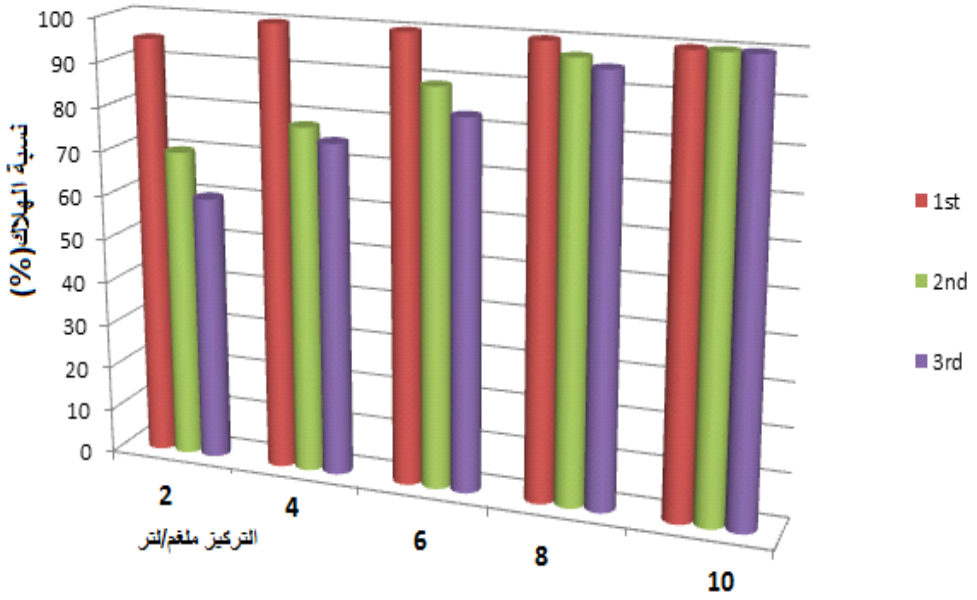
الاختبار الحيويBioassay

١. ركز العديد من الباحثين على استخدام الجزيئات المتناهية في الصغر Naoparticles ضد الحشرات ودورها الكامن في ادارة الافات الحشرية واوضحت النتائج بانه يمكن استخدام جسيمات الفضة التي تخلقها الفطريات الممرضة للحشرات كعامل مكافحة حيوية فعال وصديق للبيئة, اذ كان لهذه الجسيمات تاثيراً كبيرا وسريع على الاطوار اليرقية(**4**). توضح النتائج في الشكل (4)تاثير تراكيز مختلفة من جسيمات الفضة المتناهية في الصغر والمخلقة حيويا من قبل الفطر *E.muscae* على يرقات الطور الاول والثاني والثالث للذبابة المنزلية بعد يوم كامل من المعاملة.اذ بلغت نسبة الهلاك للاطوار اليرقية(95و70و% 60) بالتعاقب عند التركيز2 ملغم/لتر بعد 24 ساعة من المعاملة. بينما حقق التركيز10 ملغم/لترا على الهلاكات من بين جميع التراكيز المستخدمة بنسبة هلاك بلغت 100%لاطوار اليرقية الثلاثة. جاءت نتائج التركيز8 ملغم/لتر مقاربة له, اذ بلغت نسبة الهلاك (100و97و95) % للطور اليرقي الاول والثاني والثالث على التتالي. بينما وصلت نسبة الهلاك الى (١٠٠و٧٨و٧٦) و(١٠٠و٧٩و٨٣)%للاطوار اليرقية الثلاث عند التركيزين(٤و٦)ملغم/لتر على التتالي .اذ لوحظ انه بزيادة التركيز ترتفع نسبة الهلاك.

درس(**21**) تاثير جسيمات الفضة المخلقة حيويا بواسطة الفطر *lunatus Cochilibolus*على يرقات نوعين من البعوض هما *Ae.agypti* و *Anophles stephensi*وواضحت النتائج التي توصولو اليها بان لجسيمات الفضة المخلقة بواسطة هذا الفطر تاثير سمي عال على يرقات البعوض بعد24 ساعة من المعاملة.استخدم (**27**)حوالي2 ملغم/لتر من جسيمات الفضة للفطر *A.niger* لمكافحة يرقات ثلاث انواع من البعوض هي *An.stephensi*و *Ae.aegypti*و, *Cx.quinquefasciatus*اذ بلغت نسبة الهلاك ليرقات الطور الاول 100%و75% و100%على التتالي بعد ساعة واحد من المعاملة. اختبر(**16**) تاثير خمسة تراكيز من جسيمات الفضة التي خلقها البكتريا الممرضة للحشرات *Bacillus thuringensis* لمكافحة يرقات الطور الثالث لبعوض الناقل لحمى الضنك *A.aegypti* هي 0.03 و 0.06و 0.09و 0.12و 0.15جزء بالمليون بنسبة هلاك بلغت(6 و13و20و39و56)%على التتالي بعد ساعة واحدة من المعاملة. ذكر (**17**) ان جسيمات الفضة المخلقة حيويا للفطر الممرض للحشرات *B.bassiana* أظهرت سمية عالية تجاه الاطوار

اليرقية الاربعة لبعوض, *Ae.aegypti* اذ بلغت نسبة الهلاك86% و 83%ليرقات الطور الثالث والرابع عند التركيز1ملغم/لتر بعد24 ساعة من المعاملة

.



شكل (4) يوضح نسب هلاك الاطوار اليرقية للذبابة المنزلية المعاملة بتراكيز مختلفة من جسيمات الفضة المخلقة حيويا بوساطة الفطر *E.muscae*

References

1-**Anitha T, and Palanivelu P(2011).** Synthesis and Structural Characterization of Polydisperse Silver and Multidisha- ped Gold Nanoparticles Using Fusarium Oxysporum MT- CC 284, *Digest Journal of Nanomateials and Biostruc-ture*, Vol. 6, No. 4 , pp. . 1587-1595

2- **Banjo A.D, Lawal O.A, Adeduji, O.O (2005)**. Bacteria and fungi isolated from house fly *Musca domestica* L. larvae. Afr. J. Biotechnol. 4(8): 780-784.

3-**Bhainsa CK, D'Souza FS (2006).** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus. ColloidsSurf B 47:160–164

4-**Bhattacharyya A, Bhaumik A, Usha RP, Mandal S, Epidi TT (2010).** Nano- particles a recent approach to insect pest control. Afr J Biotechnol 9:3489–3493.

5- **Burgess, K A(1997)**. Identification of Fungi. Manual of Techniques in Insect Pathology(L.Lacey, Ed.), pp. 153-187. Academic Press.1150pp.

6- **DipeoluO.O(1977).** Field and laboratory investigation in to the role of the Musca species in The transmission of intestinal parasitic cysts and eggs in Nigeria J. Epidem.microbiol. 21:209 – 214

7-**Grubel P, Hoffman JS, Chong FK, Burstein NA, Mepani C,Cave DR.(1997).** Vector potential of houseflies (*Musca domestica*)for *Helicobacter pylori*. Journal of Clinical Microbiology; 35(6):1300-1303.

8-**Hucko M(1984).** The role of house fly *Musca domestica* L. in the transmission of *Coxiella Burnettii* . Folia parasitologica (prata) , 31: 177 – 181 .

9-**Ingle AP, Gade AK, Pierrat S, Sconnichsen C, Rai MK (2008).** Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium acuminatum and its activity against some human pathogenic bacteria.Curr Nanosci 4:141–144.

10-**Keller S, Kalsbeek, V, Eilenberg J(1999).** Redescription of Entomophthora muscae (Cohn) Fresenius. Sydowia 51, 197–209.

11-**Khan HAA, Shad SA, Akram W(2013)**. Resistance to newchemical insecticides in the Housefly (*Musca domestica)*from dairies in Punjab, Pakistan. Parasitol Resistance 9:18 .
.

12-**Li G, He D, Qian Y, Guan B, Gao S, Cui Y, K. Yo-koyama , L. Wang(2012**). Fungus Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus, In-ternational Journal of Molecular Sciences*, Vol. 13, No. 1, pp. 466-476.

13-**Lietze VU, Salem TZ, Prompiboon P, Boucias DG(2010)**. Tissue tropism of the *Musca domestica* salivary gland hypertrophy virus. Virus Research; 155:20-27.

14- **Mian LS, Maag H, Tacal JV(2002)**. Isolation of Salmonella from muscoid flies at commercial animal establishment in SanBernardino County, California, Journal of Vector Ecology; 27:82-85.
15- **Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D (2001).** Bioreduction of AuCl4−ions by the fungus, Verticillium sp. and surface trapping of thegold nano- particles formed. Angew Chem Int Ed Engl 40(19):3585–3588.

16-**Najitha Banu A, Balasubramanian C, Vinayaga Moorthi P (2014).** Biosynthesis of silver nanoparticles using Bacillus thuringiensis against dengue vector, Aedes aegypti (Diptera: Culicidae).Parasitol Res 113:311–316.

17-**Najitha Banu A, Balasubramanian C(2014).** Biosynthesisof silver nanoparticles using Beauveria thuringiensisag bassiana against dengue vector, Aedes aegypti (Diptera: Culicidae).Parasitol Res 113:311–316.

18- **Patil H, Borse, Patil U. K,H. M. Patil(2011).** Synthesis of Silver Nanoparticles by Microbial Method and Their Characterization, *Archives of Physics Research*, Vol. 2, No. 3, pp. 153-158.

19- **Perry AS(1958)**. Factors associated with DDT resistance in theHousefly *Musca domestica*. Proceedings of 10th International Congress of Entomology; 2:157-172.

20-**Rahual P(2013)**. Effect of*Curcumalonga* (Tumeric) onbiochemical aspects ofHousefly *Muscadomestica* (Diptera: Muscidae). International Journal of Scientific and Research Publicastions; 3(5):1-3.

21- **Salunkhe RB, Patil SV, Salunke BK (2011)**. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized using fungus, Cochliobolus lunatusagainst Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) and Anopheles stephensiListon (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 109:823–831.

22-**Singh P, Raja B(2011)**. Biological Synthesis and Char-acterization of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Trichoderma harzianum*," *Asian Journal of Experimental Biology and Science*, Vol. 2, No. 4, pp. 600-605.

23-**Six DL, Mullens BA(1996)**. Seasonal prevalence of*Entomophthora muscae* and introductionof *Entomophthoraschizophorae* (Zygomycotina: Entomophthorales) in *Muscadomestica* (Diptera: Muscidae) populations on California dairies. Biological Control; 6:315-323.

24-**Sonal BS, Swapnil C, Gaikwad K, Gade AK, Mahendra R (2013)**. Rapid synthesis of silver nanoparticles from Fusarium oxysporum byoptimizing physicocultural conditions. Sci World J 1–12.

25-**Soni N, Prakash S (2012).** Efficacy of fungus mediated silver and gold nanoparticles against Aedes aegypti larvae. Parasitol Res 110(1):175–184.

26-**Soni N, Prakash S (2013)**. Possible mosquito control by silver nanoparticles synthesized by soil fungus (Aspergillus niger 2587). AdvNanoparticles 2:125–132.

27-**Soni N, Prakash S(2011)**. Factors Affecting the Geometry of Silver Nanoparticles Synthesis in *Chrysosporium tro- picum* and *Fusarium oxysporum*, *American Journal of Nanotechnology*, Vol. 2, No. 1 , pp. 112-121.

28-**Subarani S, Sabhanayakam, C. Kamaraj(2012)**. Studies on the Impact of Biosynthesized Silver Nanoparticles (AgNPs) in Relation to Malaria and Filariasis Vector Control aga- inst *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefas- ciatus* Say (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, Vol. 112, No. 2, , pp. 487-499.

29-**Vahabi K, Mansoori G. A, S. Karimi(2011).** Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma ressei*," *Inscience Journal*, Vol. 1, No. 1, pp. 65-79.

30-**WHO (2005)**. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13