وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تقييم كفاءة فطر *penicillium* في مكافحة بعوض culexquinquefasiatus say

بحث مقدم الى

مجلس كلية العلوم جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة البكاليوريوس في علوم الحياة

من قبل الطالبة

التفات صالح محمد الحجامي

بأشراف

أ.م.د محمد رضا عنون الحسناوي

بسم الله الرحمن الرحيم

(يرفع الله الذين امنوا منكم والذين اوتوا العلم درجات والله بما تعلمون خبير)

صدق الله العظيم

سورة المجادلة

اية:11

الاهداء.....

الى من الهمني الحياة ربي سبحانه وتعالى. . . . . .

الى مدينة العلم وعلي بابها . . . . . .

الى مهد الحضارات ومنبع الابطال الى ارض سالت من اجلها دماء الشهداء الابطال . . . . . .

وطني العراق الغالي . . . . . .

الى من علمني لغة الحرف الاول في حياتي والذي بألامان اشعرني والى طريق الخير ارشدني الى الروح التي ما تزال

تسكنني واليه جزء مما زرع . . . . . ابي رحمه الله تعالى

الى نور عيني وجنة احلامي وملاكي في الحياة الى معنى الحب والحنان والتفاني والى بسمة الحياة وسر الوجود الى

من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي والى ملامح لهجتها الجنوبية وهي ترفع راحتيها تهتف

لنا بالدعاء الى اغلى الحبايب . . . . . امي الحبيبة رعاها الله تعالى

الى من علمني الصبر والوفاء الى منبع الشجاعة والاباء الى من كان لي عونا وسندا في هذه

الحياة . . . . . اخي العزيز

الى لوحتان من النقاء الى من وقفت معي . . . . . اخواتي

الى منبع السعادة والامل في حياتي . . . . . اخوتي

الشكر والتقدير.....

الهي لا يطيب الليل الا بشكرك ولايطيب النهار الا بطاعتك ولاتطيب اللحظات الا بذكرك ولاتطيب الاخرة الا بعفوك.

الحمد لله الذي وفقني الى ماانا فيه من فيض نعمه التي اسبغها علي حمدا يكون لحقه قضاء ولشكره اداء والى ثوابه مقربا ولحسن فريده موجبا والصلاة والسلام على اشرف الخلق محمد(صلى الله عليه واله وسلم).

كما ينبغي ان اقف مبجلا من ازرني وشد من عضدي على المضي في كتابة هذا البحث فأزجي فائق مودتي وشكري الى الدكتور(محمد رضا عنون) لاقتراحه فكرة البحث ومتابعته القيمة وملاحظاته المهمة وكرمه وسعة صدره وطيب نفسه وحسن صنيعته وسابغ فضله على البحث والباحثة متمنية له دوام التوفيق والازدهار في حياته العلمية والعملية.

واتقدم بالشكر الجزيل والعرفان الى عمادة كلية العلوم-جامعة القادسية ممثلة بالدكتور حبيب ونبيل شبر لما قده لي رعاية وتسهيلات عديدة بتوفير مستلزمات البحث. والشكر موصول الى جميع اساتذتي الافاضل في كلية العلوم-جامعة القادسية

ولايفوتني ان اسجل شكري الجزيل لاساتذتي الاجلاء واخص واخص منهم الست(ولاء ياس) لتعاونها معي ولماقدمت لي من مساعدة في تشخيص وتصنيف الفطريات.

الى من بعثوا في الامل اعزائي الاهل والاحبة اقدم لهم الشكر والامتنان وان يطيل اعمارهم على مساعدتهم اياي وتحملهم العبئ الاكبر اسأل الله ان يجعلهم ذخرا لي لمواصلة مسيرتي العلمية.

واخيرا الى كل من مد يد العون وساعدني في انجاز هذا البحث ولم يتسنى لي ذكر اسمه والى كل من سار معي بقدم او خط لي بقلم او وفاة لي بقسم اقدم خالص شكري وعميق امتناني وعرفاني له واسال الله ان يجزيهم عني بر الجزاء واوفره والله ولي التوفيق.....

الباحثة..

الخلاصة

استهدف البحث الحالي تقويم كفاءة فطر ال *penicillium* واستعماله عاملا حيويا في مكافحة بعوض (culexquinquefasiatus say)

اثرت تراكيزالمعلق الفطري ونواتج الايض الثانوية في بيرقات هذا النوع من البعوض. سجلت اعلى نسبة هلاك لليرقات 55.33% عند معاملة يرقات الطور الاول بتركيز 105 بوغ□مل من المعلق الفطري في حين كانت اوطأ نسبة هلاك عند التركيز بوغ□مل حوالي 34%.

اما بخصوص تأثير تراكيز النواتج الايضية الثانوية للفطر فقد بلغت اعلى نسبة هلاك لليرقات 61.66% عند التركيز 100% بعد 72 ساعة من المعاملة اما اوطأ نسبة هلاك لليرقات بلغت 35% عند التركيز 25% .

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

ان بعوض (culexquinquefaciatus say)

احد انواع البعوض المعروفة بنقلها لمسببات الامراض التي تفتك بحياة الانسان والحيوانات الاخرى ويكثر هذا النوع في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية (Womack ’1993) من العالم . حيث ينقل هذا النوع مسببات الامراض التالية منها الديدان الحنطية المسببة لداء الخيطيات اللمفاوي والفايروسات منها سانت لويس (cdcjume, 2007) وفايروس غرب النيل (nash etal,2001,) المسبب التهاب الدماغ وكذلك فايروس زيكا zika المسبب للحمى المعروفة ب zika fever (fernandesetal) كما وينقل ديدان الفيلاريا wuhereria (bancrofti) والتي يصاب بها الملايين من البشر حول العالم والتي تسبب مايعرف بداء الفيل وعرف كذلك بنقله طفيلي البلازموديوم plasmodinm relictumوالذي يسبب ملاريا الطيور (cirimotich etal , 2011) .

نظرا للاهمية الطبية لانواع البعوض كافة فقد اهتم العلماء بمكافحته منذ مئات السنين واستعملت مختلف المبيدات الحشرية الكيميائية الا ان هذه المبيدات سببت اضرارا بالانسان ومحيطه البيئي ومن جانب اخر اكتسبت هذه الحشرات المستهدفة القدرة على التكيف بسرعة مع المواد السامة وعلى البدء في تطوير مناعة ضدها (ibaraa and catero,2008).

اشارت منظمة الصحة العالمية (2013) who الى ان حوالي (23-25) من الاشخاص يصابون سنويا بسموم المبيدات وان مايقارب(20) الف شخص منهم يموتون سنويا (schmuterer,2002) لذلك دعت الحاجة لتطوير بدائل غير سامة وامنة للإنسان والحيوان تمثل احد طرائقها لمكافحة الحياتية المقصود بها تخفيض المجموعة السكانية للأفة او النوع الضار الى الحد الذي لايشكل معه ضررا للانسان او حيواناته او نشاطاته وذلك بواسطة انواع احيائية اخرى من الحشرات او الديدان الخيطية او البكتريا او الفطريات او غيرها وعدت الفطريات الممرضة للحشرات من العوامل المهمة وذلك لانتشارها وتواجدها الواسع في الطبيعة فضلا عن كونها غير مكلفة وتمتاز بتخصصها العالي لمواجهة افات محددة (rajeshetal ,2014; shiff, 2002)

يعد الفطرpencillium هو احد انواع الفطريات التي حققت نجاحا ملحوظا في مجال مكافحة البعوض وحيث يمتاز بكفاءة عالية في مقاومة البعوض وهو من اهم

الفطريات المستخدمة في المكافحة الحيوية حيث يمتلك سمية عالية تجاه البعوض وتعود هذه التسمية الى قدرة هذا الفطر على افراز سموم بقتل هذا النوع من البعوض.

وبالنظر للاهمية الطبية لبعوض cx.quinquefasciatus والتقصي عن وسائل جديدة لمكافحته حياتيا.

لذا استهدف البحث الحالي استخدام الفطرpencillium في مكافحة بعوض cx.quinquefasciatus وتقييم كفاءة هذا الفطر في مقاومة هذا النوع من البعوض بأستخدام تراكيز مختلفة من المعلق الفطري والراشح لهذا الفطر في الاطوار اليرقية الاربعة للبعوضة.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures review

بعوض cx.quinquefasciatus say

ينتمي البعوضcx.quinquefasciatus sayالى العويلة sub family:culici nae

من العائلة family:-culicidaeالتابعة لرتبة ثنائية الاجنحة diptera : order(ابو الحب,1979)ويسمى هذا النوع من البعوض بالبعوض المنزلي لصلته القريبة بالانسان .

وقد ذكر hill and Connelly (2013)اسماء مرادفة لبعوض cx.quinquefasciatus sayوهي :-

Cx .pungens wiedem ann, 1828

Cx .fatigans wiedem ann,1828

cx. auestuans wiedem ann ,1828

cx. acer walker , 1848

cx. cingulatus doleschall, 1856

دورة حياة البعوض:-

تضع انثى البعوض البالغة بيوضها في المياه الساكنة والغنية بالمواد العضوية مثل البرك والمستنقعات واماكن تصريف المياه(mosquito information website,2009)تكون تغذية الدور اليرقي بصورة رئيسية على المواد العضوية ويمر هذا الدور باربعة اطوار وعندما يوشك الطور الرابع على الانتهاء تتوقف عن التغذي وتتحول الى الدور العذراء اوماتعرف بالخادرة ثم تتحول الى البالغة ,وان الوقت اللازم لنموالاطوار الاربعة تحت الظروف الطبيعية يعتمد على درجة الحرارة ويعد بعوض cx.quinquefasciatusمن حشرات مختلفة التغذية حيث يتغذى ع اللبائن والطيور خلال الليل وان الذكور فقط تتغذى على السكريات , اما الاناث فتتغذى على الدم لانضاج البيوض وبعد ان تهضم وجبة الدم تتطور البيوض وبعد ذالك تختار الانثى مكانا ملائما لوضع البيض ,وبهذا تبدا دورة الحياة من جديد وتضع الانثى الواحدة مايقارب خمس قوارب بيض خلال حياتها(gerberg etl,1994)

الاهمية الطبية:-

يعد بعوض cx.quinquefasciatus ناقلارئيسيا للعديد من المرضات للانسان والحيوان فهو الناقل الرئيسي لعدة انواع من ديدان الملاريا brugiatimoria,b.malayi,wuchereria

Bancroftiالمسببة لداءالفيل .كما وانه ناقل لعدة انواع من الفايروسات والتي تسبب التهاب الدماغ ومنها :-

- فايروس riftvalley fever viruse
- فايروس غرب النيل west nile viruse
- فايروس ross viruse
- فايروس chikungunya
- ناقل رئيسي لفايروس sant louis encephalitis viruse حيث تزداد الاصابة بهذا الفايروس خلال فصل الربيع لان البعوض ينقله من الطيور
- فايروس التهاب الدماغ الياباني (Japanese encephalitis)
- zika viruse

(cdc jun,2007;foster and walker ,2002)

طرائق مكافحة البعوض:-

لغرض اختيار الطريقة الافضل لمكافحة البعوض يجب توفر الشروط الاتية(becker etal,2010)

- تقليل اعداد البعوض وذالك بمعاملته حيويا في امد طويل وباقل كلفة
- تقليل كمية المبيدات المستعملة في البيئة ضد البعوض
- اختيار طريقة لاتؤثر على الانسان او الحيوان اي الحفاظ على الصحة العامة
- تقدير نسب الكلفة والعائد المتوقع من طرائق المكافحة المعينة مع اخذ فكرة عن اختيار احسن الطرائق العلاجية .

وتتلخص طرائق المكافحة كالاتي:-

1-المكافحة الفيزيائية :-وتشمل هذه الطريقة :-

مكافحة الادوار غير البالغة باستعمال

1-النفط

يعد النفط ساما ليرقات البعوض حيث يشكل طبقة على سطح الماء يمنع البالغات من وضع البيوض (beehler and mulla,1996)

2- surface films and polystyrene

وهي عبارة عن شرائح سميكة مكونةمن مادة البولستيرين وتوضع على سطح الماءحيث تمنع البالغات من وضع البيض كما وتؤثر هذه الطريقة ايضا في العذاري واليرقات لانها لاتستطيع اختراق هذه الطبقة لاخذ الاوكسجين (garrett and white,1977).

3-lipartol

ان هذه المادة عبارة عن خليط من البارافين soy bean lecithin,paraffin مع سلاسل الكاربون والحاوية على12-14 ذرة كاربون .

ان المادة lecithinعبارة عن جزيئات كبيرة تحتوي على نهايات محبة للماء او كارهة للماء ترتبط بالانبوب التنفسي لليرقة او الابواق التنفسية في العذارى بحيث يسمح للماء بالدخول الى الانابيب اوالابواق ويؤدي الى قتلها حيث تقل كمية الاوكسجين المذاب ولزيادة فعالية هذه المادة يتم مزجها مع زيت فول الصويا .وتعد هذه الطريقة فعالة ضد الطور اليرقي الرابع والعذاري حيث يحصل هلاكها بعد ساعة من استعمال هذه التقنية

(beckeretal ,2010, schnetter and engler,1978)

4- monomolecular surface film (msf)

تتوفر تجاريا بشكل مادة غير ايونية nonionic productsوتعد هذه الطريقة فعالة لأنها تتكون من جزء ايوني حيث تنتشر هذه المادة بسرعة في الماء تمنع الادوار غير البالغة حيث تؤثر على القصبات التنفسية مسببة صدمة وما يعرف anoxia .(ali,2000)

5-polystyrene bead

في هذه التقنية يتم استعمال طبقات طافية من مادة البلاستيك سمكها1سم على سطح الماء حيث تمنع تنفس اليرقات وتكون غير قابلة للتحلل وذات امد طويل للمعاملة وعندما تتحد المادة العضوية diethylcarbamazine (Dec) مع هذه الطبقات تؤدي الى السيطرة على

النواقل بصورة اسرع بينما عند استعمالها لوحدها لاتعطي نتيجة قتل عالية (Curtis et al,2002)

مكافحة البالغات

هناك عدة طرائق لمكافحة البالغات منها الصيد الكثيف mass trapping لكن هذه الطريقة اصبحت محدودة الاستعمال يمكن تطوير هذه الطريقة وذلك بوسائل عدة او مجموعة من الاجهزة المتوفرة تجاريا مثل الضوء وثنائي اوكسيد الكاربون وبخار الماء والحرارة والاوكتينول وجميعها جاذب للبعوض (kline,2007).

ان استعمال المكافحة الفيزيائية لها فوائد عديدة منها ان البعوض يكون غير قادر على تطوير مقاومة ضدها على عكس المبيدات الكيميائية كما انها تساهم في مكافحة جميع ادوار البعوض البالغة وغير البالغة (becker etal,2010).

المكافحة الكيميائية chemical control:-

هناك اربع مجاميع للمبيدات الكيميائية

(becker etal,2010,zaim and jam bulingam,2007)

وهي :-

المبيد	تاثيرعلى البعوض
1-Chlorinated hydrocarbos	يؤثر على المعدة
2- organophosphate	له تاثيرعصبي مثبط لمادة ايستايل كولين استريز
3- car bamates	عصبي يثبط مادة ايستايل كولين استريز
4- pyrethroids	تاثير عصبي يؤثر على قنوات الصوديوم

لقد عدت هذه المكافحة الاكثر فعالية في القضاء على البعوض لأنها ذات تأثير سريع لكن ايضا نجمت عنها اضرار كثيرة نتيجة لاستعمالها المفرط والعشوائي مما ادى الى ظهور مقاومة في النواقل وتلوث للبيئة والسمية العالية للمركبات الكيميائية للانسان والحيوان والكلفة العالية لها فضلا عن بقاء هذه المبيدات في التربة والانسجة النباتية والحيوانية (rajeshetal,2014).

المكافحة الوراثية genetic control:-

هناك عدة طرق للمكافحة الوراثية لغرض السيطرة على البعوض ومنها استعمال الحشرات العقيمة او ماتسمى بالذكور العقيمة لان الذكور يمكن ان تعقم بسهولة وعند انطلاقها فأنها

تتزاوج مع اناث برية خصبة لاتعطي بيوضها العقيمة نسلا ومن ثم تؤدي تقليل ذريتها (helinskietal,2006). كما وتوجد هناك طريقة اخرى من طرق المكافحة الوراثية تتضمن استخدام هجائن عقيمة(sterile hybrids) تتضمن ادخال سلالات غريبة مما يشجع في التأثير على المجتمع حيث يتم تخريب السلالات وتحت النوع او الانواع القريبة قد يؤدي الى انتاج جيل هجين عقيم لكنه حيوي كما و بالإمكان تربية الهجائن العقيمة واطلاقها لأباده المجتمعات الطبيعية (catteruccia etal.2005) كما وهناك طريقة تتضمن نقل الكروموسومات عم طريق ازالة الصفات غير المرغوبة لبعض الحشرات مثل قابليتها على نقل مسببات الامراض وتسمى هذه الطريقة (franzet (ct) chromosomal translocational ,2006) تمتاز المكافحة الوراثية بالتخصص وبأنها لاتؤثر على الاحياء الاخرى غير المستهدفة كما في المكافحة الكيميائية كما انها غير مكلفة وتتزايد كفاءتها كلما انخفضت تمتاز المكافحة الوراثية بالتخصص وبأنها لاتؤثر على الاحياء الاخرى غير المستهدفة كما في المكافحة الكيمائية كما انها غير مكلفة اقتصاديا وتتزايد كفاءتها كلما انخفضت كثافة المجتمعات المستهدفة (becker etal. 2010)

المكافحة باستعمال منظمات النمو الحشرية

Insectgrowth regulator

تعرف منظمات النمو بأنها مبيدات حشرية من الجيل الثالث وهي مواد كيميائية تشبه في تركيبها الهرمونات الحشرية واحيانا تكون بقوة اكثر من(300) ضعف الهرمونات الاصلية وهي مواد فعالة للسيطرة على مختلف الافات الحشرية وكما تظهر فعالية عالية ضد البعوض(amalraj etal , 1988) وتوجد منها نوعان هما نظير هرمون الصبا(juvenile hormone analogs) الذي يتداخل مع عملية الانسلاخ والتي تؤدي الى انسلاخ مبكر كما قد يسبب تشوهات في الاجنحة والاعضاء التناسلية مثل وfenoxy carb(secccinietal ,2008) . اما النوع الاخر هو مثبطات تضيع الكايتين الذي يمنع تخليق الكايتين كما انه يمنع وضع البيوض مثل diflubenzuron (dimilin)(thavara etal,2007) ومن عيوب هذه الطريقة هو عدم وجود التخصص كما انها تكون فعالة في مراحل معينة من تطور الحشرة كما انها ضعيفة التاثير في البالغات عند رشدها(becker etal,2010)

المكافحة الحياتية biological control

تتلخص عوامل المكافحة الحيوية بما يلي: (kamared dine,2012)

1-الفطريات الممرضة للحشرات
مثل:
culicinimyces,beauveria,mentarhizium,lagenidium,entomophthra,coelomyces

حيث يكون تأثيرها في عادات التغذية وسلوك النواقل ومن ثم زيادة انتاج نواتج الايض الثانوي في التجويف الدموي للحشرات

2-البكتريا الممرضة للحشرات مثل, bacillus ,aceticacid,wmepop striain of , wolbachia,thuringiensis,bacteria(genusasaia) ويكون تأثيرها هذه الانواع بقتل الاطوار غير البالغة(اليرقات) حيث يؤثر في امعاء اليرقات عن طريق افراز السموم بروتينية

3- الاسماك مثل tilapia,cyprinuscaripoin,aphanius disbar,gambusia affinis,cyprinodntdae spp,catla,cirrhinus mrigala

4- الطفيليات مثل ,edhazardia aedis, vauraia culicis حيث تؤثر في الادوار غير البالغة (اليرقات والعذارى)والادوار البالغة اي المكافحة ذات الامد الطويل

5- الفايروسات مثل فايروس(dnvs) (densnucleosis viruses ordensoviruses) عمل على اختزال اعداد البعوض وذلك جينات ضد الطفيلي او يولد سموما داخل خلايا البعوض ضد الطفيليات.

6-الديدان الخيطية مثل ديدان romanomermis and romanomer misyiengari culicivorax حيث تعمل على تقليل اعداد البعوض عن طريق التأثير في السلوك التكاثري مما يؤدي للعقم وكذلك يقلل من معدلات الاصابة بالطفيليات

- الفطريات الممرضة للحشرات
تتوزع الفطريات الممرضة على اربع شعب هي البازيدية basidiomy cato والكيسية ascomy cota واللاقحية zygomy cota والناقصة deuteromy cota (samsonetal,1988)

شعبة الفطريات الكيسية: ascomy cota

تعد الفطريات الكيسية واسعة الانتشار في التربة والمياه ومترممة على بقايا النباتات ومن مميزاتها تكوين الابواغ الجنسية spores والتي تكون محمولة

بداخل كيس ascus ويحتوي كل كيس على 8 ابواغ يطلق عليها ascospores وتضم هذه الشعبة اصنافا عديدة اهمها صنف:- class : sordariomy cetes الذي يعرف سابقا بالفطريات القارورية pyrenomycetes ومن اهم الرتب التي تعود لهذا الصنف هي رتبة orderi hypcreales التي تضم اجناسا عديدة من الفطريات الممرضة للحشرات. حيث يسمى الطور اللاجنسي للفطر بال anamorph والطور الجنسي يعرف بال **telomorph**

فطر ال penicillium:-

ان تصنيف الفطر على وفق ماجاء به (ellisat al,2007)

Kingdom: fungi

Subkingdom:eumycotina

Phylum: Ascomycota

Class: eurotiomycetes

Order: eurotialas

Family: trichocomaceae

Genus: penicillium

الصفات التشخيصية للفطر ال *penicillium*

ان جنس البنسيليوم الذي يبدو انه ليس من اصل تطوري واحد قسم الى عدد من تحت اجناس (pitt,1980) تتميز انواع *penicillium* بتراكيبها

اللاجنسية التي تشبه الفرشاة . اما الحامل الكونيدي يكةن بسيطا او متفرغا وينتهي بتجمعات الفاليدات الدورقية تتكون الكونيدات في سلاسل جافة على الفاليدات حيث تكون الاحداث تكوينا هي الاقرب الى الفاليد. ان طبيعة تفرع الحامل الكونيدي تساعد في تقسيم الجنس الى تحت اجناس يمكن تمييز ثلاث انواع من التفرع:

1 - **احادي التفرع** **monverticillate**

وفيه يكون الحامل الكونيدي غير متفرع ويحمل مباشرة مجموعة من الفاليدات على قمة الساق

2 -ثنائي التفرع **biverticillate**

يمتلك الحامل الكونيدي مجموعة من الاذرع matula تحمل بدورها مجاميع من الفاليدات

3 -ثلاثي التفرع **terverticillate**

يمتلك الحامل الكونيدي مجموعة من الفروع(rami) تحمل بدورها مجاميع من الاذرع التي تحمل مجاميع من الفاليدات الاشكال التامة holomorph تشمل eupenicillium ,hamigera,talaromyces,trichocoma

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methds

المواد وطرائق العمل :- materials and methods

موقع جمع العينات:-

لقد تم اختيار بركتين لجمع يرقات البعوض في مدينة الديوانية حيث تقع الاولى في منطقة ام الخيل والثانية في قضاء الدغارة التابع لمدينة الديوانية حيث يكثر البعوض في تلك البركتين لكونها غنية بالمواد العضوية وبعد ان اجري فحص تمهيدي للمياه تم اخذ 10 عينات لتغطية المساحة المراد دراستها وتم الجمع كل اسبوعين من مواقع متباينة لكل بركة خلال المدة من شهر كانون الاول 2018 ولغاية شهر اب 2016 بواسطة مفرقة طويلة الذراع وتم وضع اليرقات والعذارى في عبوات بلاستيكية مثقبة الغطاء للسماح بدخول الهواء ونقلت الى المختبر وافرغت في احواض زجاجية وتم تزويدها بماء خالي من الكلور واضيف غذاء اليرقات (الخميرة) بمقدار 30 ملم لكل حوض وغطيت الاحواض بالتول (soni and prakash,2012)

<u>تشخيص ووصف الفطر:-</u>

تم تشخيص الفطر المعزول من البعوض المصابة مظهريا من خلال النمو الفطري ولون اليرقة وذلك بأخذ جزر صغير من النمو الفطري ووضعه على شريحة زجاجية مع وضع قطرة من صبغة المثيلين الزرقاء ثم وضع غطاء الشريحة وفحص تحت المجهر الضوئي وتم تشخيص الفطر بالاعتماد على المفتاح التصنيفي(ellis etal,2007) .

تم حساب النسبة المئوية لضهور الفطريات المعزولة بحسب المعادلات الاتية(الجبوري,2008)

النسبة المئوية لظهور=عدد مرات ضهور الفطر في العينات الكلية□عدد العينات الكلي×100

الاوساط الزراعية

الاوساط الزرعية المستعملة للتقصي عن الفطريات منها:

1 -وسط sda sabroud derxrose agar

يتكون هذا الوسط من :-

- ببتون peptone 10 غم
- دكستروز dextrose 40 غم
- اكار agar 15 غم

وقد تم تحضيره بأذابة المواد بحسب الكميات الموجودة اعلاه في لتر واحد من الماء المقطر المعقم في دورق زجاجي سعة 1000 مل وعقم الوسط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 وضغط 15 باوند انج لمدة 15 دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد ثم اضيف له مضاد حيوي chloramphenicol بمقداره 25 ملغم\ لتر ثم صب الوسط في اطباق بتري بقطر(9سم) وترك ليتصلب بعد ذلك لقحت الاطياف بالنمو الفطري بواسطة ناقل معقم وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م لمدة 168 ساعة

2 -وسط اكار البطاط ptato dextrose agar (pda) حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بإذابة 39 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر المعقم (Harrington.1992)

3 -وسط pepton yaest glucose (pyg) (fulley and jaworski,1987)

يتكون هذا الوسط من:-

- ببتون peptone 1.25 غم
- كلوكوز glucose 3 غم
- خلاصة الخميرة yeastextract 1.25 غم
- اكار agar 15 غم

وقد تم تحضير الوسط كما في الفقرة الاولى

4 -وسط خلاصة الخميرة yea yeast extrat agar(pereiretal,2009)

تم تحضيره بحسب الشركة المجهزة :-

- وسط خلاصة الخميرة yeast extrat agar 20غم
- ماء مقطر distilled 1000 مل

تحضير العالق الفطري لفطر penicillium تم تحضير المعلق وذلك بتنمية الفطر على pdb في دوارق زجاجية سعة كل منها 150 مل من الوسط وحضنت المزرعة بدرجة حرارة 25م لمدة 7 ايام وتم رجها بصورة يومية لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بواسطة قطعة من الشاش واخذ 1 مل من الراشح ووضع على شريحة عد كريات الدم الحمراء المصورة لعد الابواغ وذلك لتقدير عدد الابواغ لكل وحدة حجم حيث حسب عدد الابواغ في كل مربع من المربعات الاربعة الكبيرة الموجودة في اركان الشريحة بعد ذلك قسم عددها الكلي على اربعة للحصتل على معدل عدد من الابواغ في المربع الواحد ثم ضرب هذا الناتج في 1×10 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الابواغ في 1مل من المعلق الفطري . حيث تم الحصول على:-

a. تركيز 2×10

ولغرض الحصول على تركيز اقل طبقت المعادلة الاتية:-(lacey,1997)

الحجم(مل) المأخوذ من المعلق الرئيسي=التركيز المطلوب

تركيز المعلق الاصلي

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره وهكذا حضرت تراكيز: معلق بتركيز(

)

الاختبار الحيوي bioassay

الاختبار الحيوي في الاطوار اليرقية الاربعة:-

تم اخذ 40 يرقة من كل طور من الاطوار الاربعة لكل تركيز من تراكيز معلق الفطر وزعت على اربعة اوان ثلاثة منها حاوي على (100مل) من كل تركيز من تراكيز المعلق اما الرابع فيحتوي على ماء مقطر معقم فقط(معاملة السيطرة) لمدة دقيقتين ثم نقلت اليرقات المعاملة بفرشاة ناعمة الى اوان زجاجية سعة(250 مل) تحتوي ماء مقطر معقم اضيف اليه غذاء اليرقات بمقداره 10ملغم□مل بعد ذلك وضعت الاواني في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2 م وفترة ضوئية (d\l)14:10 ساعة ثم حسبت نسبة الهلاك بعد 72,120,24 ساعة (Sonia and parkash,2011)

تحضير نواتج الايض الثانوية الخام للفطر الpenicillium :-

تم تحضيروسط pdb وتوزيعه في دوارق سعة 250 مل بمقدار 150 مل للدورق. تم تلقيح الوسط بأقراص قطرها0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر 7 ايام حضنت الدوارق بدرجة25±2 م لمدة اسبوعين بعدها رشح بورقة ترشيح whatmanno.1 بقمع بخفر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء vacuum واعيد ترشيحه بأستعمال المرشح الدقيق miliporefilter(0.22m) لتعقيم نواتج الايض الثانوية من البكتريا الملوثة المحتمل وجودها وتن تحضير التحاقيق التالية , 25 ,50٪,75٪100٪) (singh and prakash,2010)

تأثير نواتج الايض الثانوية للخام للفطر الpenicillium :-

في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضةcx.quinquefasciatus لقد استعملت التراكيز المحضرة مسبقا من الفطر واتبعت نفس الطريقة المذكورة في فقرة الاختبار الحيوي في الاطوار اليرقية الاربعة, وتم حساب نسبة الهلاك يوميا ولمدة ثلاثة ايام وصححت قيم الهلاك بحسب معادلة orelland schieder(abbot,1925)

٪ الهلاك المصححة=نسبة المعادلة في الهلاك-نسبة الهلاك في السيطرة

100×نسبة الهلاك في السيطرة

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and discussion

الاختبار الحيوي في الاطوار اليرقية الاربعة:-

يبين جدول(1) تأثير تراكيز مختلفة لمعلق الفطر قيد البحث في يرقات بعوض cx.quinquefasciatus اذا اعطى الفطر **الpenicillium** عند التركيز بوغ\مل اعلى نسبة هلاك لليرقات فقد بلغت نسبة الهلاك للطور اليرقي الاول 55.33٪ بعد 120ساعة بينما بلغت نسبة الهلاك(القتل) عند التركيز 51,34٪ بينما انعدمت الهلاكات في معاملة السيطرة مما يؤكد وجود فروقات معنوية للتراكيز كافة فضلا عن العلاقة الطردية بين التركيز ونسب الهلاك وان هذه العلاقة بدات واضحة بين كلا من مدة التعريض ونسبة الهلاك للاطوار الاربعة حيث ازدادت نسب الهلاك مع ازدياد التركيز ونسبة التعريض عند استعمال هذا الفطر **الpenicillium** حيث بلغت نسبة القتل(55.33,46,42.66)٪ بعد 120,72,24 ساعة على التوالي بوغ\مل بينما سجلت نسبة القتل (34,31.66,28.66)٪ في المدة الزمنية نفسها عند التركيز 2×10 ان سبب الهلاك بزيادة التركيز يعود الى زيادة عدد الابواغ ومن ثم ازدياد الابواغ النامية عند مهاجمتها للمضيف فضلا عن اضعاف الجهاز المناعي للحشرة وذلك لان الجهاز المناعي للحشرة يستطيع الدفاع عن الجسم عندما يكون التركيز واطئ فقط اما عند التركيز العالية فقد تقل كفائته(scholete,etal,2003) كما ان نسب الهلاك تقل بزيادة عمر اليرقة يعود السبب الى ان النظام المناعي للاطوار اليرقية الاولى يكون غير مكتمل كما ان جدار الجسم يكون رقيقا نوعا ما مما يسهل اختراقها من قبل ابواغ الفطر(steinhause,1949) وقد اتفقت النتائج مع ما ذكره الجبوري(2007) حيث وصف العلاقة مابين تركيز الابواغ ونسب الهلاك بأنها طردية حيث كلما ازداد تركيز المعلق البوغي للفطر ارتفع معدل الهلاك وقد يعود السبب في ذلك الى زيادة عدد الابواغ (الوحدات الاساسية للاصابة الفطرية)

جدول(1) تأثير تراكيز مختلفة من معلق الفطر **الpenicillium**

نوع الفطر	الطور	التراكيزبوغ\مل	النسبة المئوية لهلاك الطوراليرقي بعد مرور ساعة		
			24	72	120
Penicillium	الاول	10×2	28.33	31.66	34
		10×2	34	38.56	51.34
		10×2	42.66	46	55.33
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	34.99	38.74	46.89
	الثاني	10×2	27.54	30.66	37
		10×2	21.33	32.23	40
		10×2	35	39.66	47
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	27.95	34.81	41.33
	الثالث	10×2	27.95	28.34	33
		10×2	28	30.66	38
		10×2	26	35	45.33
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	26.55	31.33	38.77
	الرابع	10×2	25.66	26.31	30
		10×2	23.61	25.6	36
		10×2	24.63	30	42
		السيطرة	0	0	0
		المعدل	24.63	27.30	36

تأثير نواتج الايض الثانوية الام لرواشح الفطر**Penicillium** في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضcx.quinquefasciatus يبن الجدول(2) تاثير تراكيز محتلفة من نواتج الخام للفطر**Penicillium** في الاطوار اليرقية الاربعة لبعوضcx.quinquefasciatus عند استعمال التركيز الاعلى من نواتج الايض الثانوية للفطر فقد بلغت نسبة الهلاك للطور اليرقي الاول بعد72 ساعة 61.66

بينما كانت نسبة الهلاك عند استعمال تراكيز اقل57.66 , كما اشارت النتائج الى اختلاف حساسية الاطوار اليرقية لتراكيز للنواتج الايضية الثانوية الخام للفطر فكان الطور الاول اكثر الاطوار حساسية لجميع تراكيز نواتج الايض الخام بينما اضهر الطور الرابع مقاومة لجميع التراكيز المستخدمة ويعود سبب ذلك الى قلة الكيوتكل ممايجعله اكثر عرضة للاصابة مقارنة بالطور الرابع وجانب اخر تتناسب نسبة القتل تناسبا طرديا مع كل من التراكيز ومدة التعريض اتفقت هذه النتائج مما حصل عليه grove (1980)and pople عندما استعملا تركيزه 20 ملغم رمل من المستخلص الخام للفطر(beauveran) الذي ينتجه فطرb.bassiana ضد يرقات aeeagypti حيث ادى الى هلاكها بنسبة 86% بعد مرور ساعة من مدة التعريض , وحصل weiser and (1988) matha على نسبة هلاك بلغت 100% عندما استعمل المستخلص الخام لمركب (tolpyin) المنتج من فطر tolypocadiumniveum بتركيز 100ملغم\لتر ضد يرقات كل من بعوضتي an.maculipennisو pipiens واكد(2006) vyaseetal ان نواتج الايض الثانوية للفطرgiganteeun. كانت اكثر تاثيرا على الاطوار اليرقية الثلاثة الاولى لبعوض an.stebhersi في حين كانت اقل تاثيرا في يرقات الطور الرابع اضاف(2007) vyase ان استعمال نواتج الفطر المذكور ضد يرقات الطور الاول لنوعي البعوض an.stebhersi و cx.quinquefasciatus ادى الى هلاكها جميعا بعد 24 ساعة وبالتركيز 2017 جزء بالمليون توصل (2010) singh and prakash الى ان يرقات an.stebhersi كانت اكثر حساسية لنواتج الايض الثانوية الخام للفطر b.bassiana من يرقات cx.quinquefasciatus وان تعريض يرقات الطور الاول لبعوض an.stebhersi cx.quinquefasciatus لنواتج الايض الثانوية الخام للفطر anisoplia بتركيز 100% فأن نسبة الهلاك بلغت 100% و96,66% على التوالي (المحنة ,2011) وحصلت الكرعاوي (2012) على نسب هلاك 100% ليرقات الطور الاول an.pulcharrhimus وكذلك و96,66% ليرقات cx.quinquefasciatusعندما استخدمت تركيز 100% من نواتج الايض الثانوية الخام لفطر l.lundbergii وكما اكدت المشكور(2014) ان نواتج

الايض الثانوية للفطرc.keratinphilum كانت اكثر تاثيرا على الاطوار اليرقية الثلاثة لبعوضcx.quinquefasciatus في حين كانت اقل تاثيرا على يرقات الطور الرابع في حين حصلت الغانمي(2016) عند استعمال نواتج الايض الثانوية الخام للفطر p.marneffe على اعلى نسبة هلاك للطور اليرقي الاول لبعوض cx.quinquefasciatus بلغت78,93% عند التركيز100% ان الكثير من الفطريات الممرضة للحشرات تسبب موت وضائفها بسرعة ويعود هذا الى امتلاك نواتج حيوية لها دور في الامراضية كما ان نواتج حيوية لها دور في الامراضية كما ان نواتج الايض الثانوية تتداخل مع الجهاز المناعي للحشرة وشلل حركتها وقلة التغذية كما تؤدي الى حدوث تغيرات في تراكيبها الانسجة ولهذا يحدث الموت السريع للحشرة(soni and prakash,2011)

جدول(2) تاثير تراكيز مختلفة من نواتج الايض الثانوية الخام للفطر penicillium في النسب المئوية لهلاك الاطوار اليرقية الاربعة لبعوض cx.quinquefasciatus

نوع الفطر		**النسبة المئوية لهلاك الاطوار اليرقية بعد مرور(ساعة)**		
الطور	التراكيز	24	48	72
الاول	25	28.66	33	35
	50	35	42.33	45.66
	75	43.56	51.66	57.66
	100	53.66	58.33	61.66
	السيطرة	0	0	0
الثاني	25	25.66	30.66	31.32
	50	28.66	39	41
	75	40.33	48	50
	100	48	52.33	56
	السيطرة	0	0	0
الثالث	25	21	25.33	29.33
	50	24	32.66	37.33
	75	31	43.33	45
	100	40.33	45.33	50.33
	السيطرة	0	0	0
الرابع	25	15	21.33	26
	50	20	28	34
	75	26.33	39	40
	100	36.62	42	46
	السيطرة	0	0	0

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

1 -ان فطر penicillium يصيب اليرقات في هذا النوع من البعوض ويؤدي الى خفض اعداد الحشرة

2 -اثرت تراكيز العالق الفطري في الاطوار اليرقية بصورة كبيرة وكان اكثر الاطوار هلاكا الطور الاول.

3 -اثرت تراكيز نواتج الايض الثانوية الخام بشكل ملحوظ حيث ارتفعت نسبة الهلاك بدرجة كبيرة

التوصيات

1-التقصي عن الفطريات الممرضة للبعوض والتي تصيب البعوض بصورة طبيعية وتقويم كفاءتها كعوامل مكافحة حيوية لنوع البعوض المدروس او الانواع الاخرى

2- استعمال نواتج الايض الثانوية في تصنيع مبيد فطري لغرض مكافحة البعوض

4 -التوصية بأستخدام الفطريات في المكافحة لكونها رخيصة الثمن وغير مكلفة.