

تأثير عزلات البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* والبكتيريا المحلية *Bacillus thuringiensis tenebrionis* وجسيمات الفضة النانوية المُحضرة حيوياً في فاعلية أنزيم السيليلوليز في الجهاز الهضمي لشغالات الأرضة *Microcerotermes diversus* Silv.

شيماء حميد كامل^{1*}، راضي فاضل الجصاني² وحازم عيدان الشمري³

(1) قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد، العراق؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية علوم الهندسة الزراعية، جامعة بغداد، العراق؛

(3) مركز مكافحة المتكاملة، دائرة البحوث الزراعية، وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد، العراق.

*البريد الإلكتروني للباحث المراسل: shaimaa.h@sc.uobaghdad.edu.iq

الملخص

كامل، شيماء حميد، راضي فاضل الجصاني وحازم عيدان الشمري. 2022. تأثير عزلات البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* والبكتيريا المحلية *Bacillus thuringiensis tenebrionis* وجسيمات الفضة النانوية المُحضرة حيوياً في فاعلية أنزيم السيليلوليز في الجهاز الهضمي لشغالات الأرضة *Microcerotermes diversus* Silv. مجلة وقاية النبات العربية، 40(4): 315-324. <https://doi.org/10.22268/AJPP-40.4.315324>

هدفت هذه الدراسة إلى اختبار تأثير عزلات محلية مختلفة من البكتيريا *P. fluorescens* و *B. t. tenebrionis* وجسيمات الفضة النانوية المُحضرة بالطرائق الحيوية/البيولوجية في فاعلية أنزيم السيليلوليز الموجود في الجهاز الهضمي الوسطى لشغالات الأرضة، ودوره في تحرير الجلوكوز. استخدمت 3 عزلات محلية من البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من حشرات الأرضة والجراد والصرصار الأمريكي، وعزلة تجارية، فضلاً عن العزلة المحلية للبكتيريا *B.t. tenebrionis*، كما استخدمت جسيمات الفضة النانوية المُحضرة بواسطة العزلات البكتيرية. حُدثت خواص ومواصفات جسيمات الفضة النانوية المُحضرة بواسطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية، ومطياف الأشعة تحت الحمراء، وإنحراف/حيود الأشعة السينية، والمجهر الإلكتروني الماسح. أظهرت نتائج التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية أن أعلى امتصاص لجسيمات الفضة النانوية المتكونة بواسطة العزلات البكتيرية *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة والعزلة التجارية لبكتيريا *P. fluorescens* والعزلة المحلية لبكتيريا *B.t. tenebrionis* قد كان عند طول الموجة 385، 324 و324 نانومتراً، على التوالي. وبين التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR أن مجموعات الكيتون والأمين والألكان والكحول هي من المجموع التي اشتركت في عمليات اختزال أيونات الفضة وتحويلها إلى فضة نانوية. كما أوضحت صور المجهر الإلكتروني الماسح أن قطر الجسيمات قد بلغ معدلاً قدره 32.43، 63.19 و57.62 نانومتراً لجسيمات الفضة النانوية المُحضرة بواسطة العزلات البكتيرية *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة والعزلة التجارية للبكتيريا *P. fluorescens* والعزلة المحلية لبكتيريا *B.t. tenebrionis*، على التوالي. كما أشارت نتائج الدراسة إلى انخفاض تراكيز سكر الجلوكوز المتحرر في الجهاز الهضمي لشغالات الأرضة بتأثير جميع المعاملات مع تقدم زمن المعاملة، إذ سجل أقل تركيز للسكر المتحرر ولجميع المعاملات والذي تراوح ما بين 0.037 و0.245 مغ/مل بعد 72 ساعة فقط عند المعاملة بجسيمات الفضة النانوية المُحضرة وعند المعاملة بالعزلة البكتيرية *B.t. tenebrionis*، على التوالي. فيما حافظت معاملة المقارنة على معدلات مرتفعة للسكر المتحرر، والتي بلغت 2.33 مغ/مل بعد 72 ساعة. لوحظ أن العزلة المحلية لبكتيريا *B. t. tenebrionis* كانت الأفضل مقارنةً ببقية العزلات في تأثيرها على الأنزيم، إذ أدت إلى نسب تثبيط بلغت 71.42%، كما تفوقت جسيمات الفضة النانوية المُحضرة بواسطة العزلة التجارية لبكتيريا *P. fluorescens* في تثبيط فاعلية الأنزيم بنسبة بلغت 78.57%. خلصت مجمل النتائج إلى أهمية العزلات البكتيرية وجسيمات الفضة النانوية في استهداف حشرة الأرضة عن طريق تعطيل وتثبيط النظام الأنزيمي في جهازها الهضمي، وبالتالي يمكن استخدامها في برامج الإدارة المتكاملة لهذه الحشرة.

كلمات مفتاحية: *Bacillus thuringiensis tenebrionis*، *Pseudomonas fluorescens*، جسيمات الفضة النانوية، *Microcerotermes diversus*.

المقدمة

الإستوائية، إذ تعيش في طوائف مكونة من آلاف الأفراد (Arab et al., 2005). تسبب الأرضة خسائر اقتصادية وخصوصاً في المنازل الخشبية، الخشب، التربة، الأوراق والمنتجات المصنوعة من الخشب (Ahmed & Qasim, 2011). تعد حشرة الأرضة من أهم المتغذيات على الأخشاب

تعد حشرة الأرضة (*Microcerotermes diversus*) من الحشرات الاجتماعية ذات الأهمية الاقتصادية في المناطق الإستوائية وشبه

سبق وصفها (Lacey, 2012) مع بعض التحويلات. جُمعت الحشرات المذكورة من أشجار السدر المصابة ومن البيوت الزجاجية والمجاري، واختير منها تلك الأفراد الخاملة وقليلة الحركة، عَمَّت بالكحول الإيثيلي بتركيز 70%، وجففت، ثم قُطعت أطراف الأرجل والأجنحة واللوامس، وسحقت بعدها في هاون خزفي يحتوي على 10 مل ماء مقطر. رُشَّح المحلول الناتج من الهرس باستعمال شاش طبي. وبغرض زراعة مستخلص الحشرة على وسط غذائي، أُجريت سلسلة من التخفيفات العشرية بدءاً من 10^{-1} وحتى 10^{-6} ، ثم وُزعت على 18 طبق بتري معقم، قطره 9 سم وعمقه 12 مم، بمعدل 3 مكررات لكل تخفيف. أُضيفت لكل طبق كمية من الوسط الزرعي King B، من إنتاج شركة Hi Media Laboratories، الهند. زُرعت التخفيفات في الوسط الزرعي بطريقة التخطيط، ثم حُصّنت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 48 ساعة، وجرى متابعة نمو العزلات البكتيرية. شُخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية والبيوكيميائية (Holt et al., 1994). في حين استخدم المستحضر التجاري للبكتيريا *P. fluorescens* (RAKSHAK)، والعزلة المحلية للبكتيريا *B. t. tenebrionis* المعزولة من حفار ساق النخيل ذو القرون الطويلة (*Jebusaea hamerschmidti*) التي سبق تأكيد تشخيصها مظهرياً وجزيئياً (Al-Saadi, 2019). حُصّرت المعلقات البكتيرية على الوسط المغذي السائل، ولكل عزلة على حدة، وحُصّنت المزارع البكتيرية عند درجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 48 ساعة، واعتمدت طريقة الصب في الأطباق لحساب عدد المستعمرات البكتيرية عن طريق تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية، وبعد تحضير الأطباق عند درجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 48 ساعة. تمَّ عدّ مستعمرات البكتيريا النامية عن طريق اعتماد التخفيفات التي تراوح عدد المستعمرات فيها ما بين 30-300 مستعمرة، ولحساب عدد وحدات تكوين المستعمرة Colony-forming unit (CFU) باستخدام معادلة Lacey (2012) كما يلي:

$$\text{وحدة تكوين المستعمرة (التركيز)/مل} = \frac{\text{معدل عدد المستعمرات} \times \text{مقلوب التخفيف}}{\text{حجم العينة}}$$

وعلى أساس حساب وحدة تكوين المستعمرة لكل عزلة، تم تحضير ثلاثة تراكيز من عزلات البكتيريا المحلية *P. fluorescens* لاستخدامها في خطوات البحث اللاحقة. ويهدف الحصول على مستعمرات نشطة من البكتيريا *P. fluorescens* التجارية، أخذ 1 غ من المسحوق البكتيري وأضيف إليه 9 مل ماء مقطر معقم، ثم زرعت على 3 أطباق بتري معقمة تحوي الوسط الصلب King B، وحُصّنت بعدها عند درجة حرارة $27 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 48 ساعة، ثم أُتبعَت الخطوات نفسها المذكورة أعلاه لتحضير تراكيز العزلات. كما نُصِّت مستعمرة نقية من البكتيريا

ويعدّ السيليلوز المكوّن الرئيسي لهذه الأخشاب (Lynd et al., 2002) وتعتمد الأرضة على البكتيريا والبروتوزوا التكافلية لتحليل السيليلوز لإنتاج الجلوكوز (Klyosov, 1990)، لهذا اتجهت كثير من دول العالم إلى البحث عن استراتيجيات جديدة صديقة للبيئة في مكافحة الأرضة، وذلك عن طريق استهداف الأحياء التعايشية من بروتوزوا وبكتيريا مسؤولة عن إنتاج الأنزيمات اللازمة لتحلل السيليلوز إلى مواد أبسط تستفيد منها الحشرة، وبالتالي يمكن أن تكون إحدى الطرائق الواعدة في مكافحة الأرضة (Coutinho-Abreu et al., 2010؛ Husseneder et al., 2010). أثبتت العديد من مسببات البكتيرية الممرضة فاعليتها في مكافحة الأرضة، مثل أنواع البكتيريا التابعة للعائلة Bacillaceae ومنها سلالات البكتيريا *Bacillus thuringiensis* التي جذبت الاهتمام، وأصبحت تمثل 90% من سوق المبيدات الحيوية في العالم (Jayaraj, 1986؛ Chattopadhyay & Banerje, 2018)؛ فضلاً عن أهمية الأنواع التابعة للعائلة Pseudomonadaceae مثل البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* التي لها تأثيرات قاتلة ضدّ العديد من الحشرات (Flury et al., 2017). كما استخدمت النقانة النانوية كأحد الاستراتيجيات الواعدة في مكافحة الأرضة، والتي تعتمد على فاعلية المواد المتناهية بالصغر 1-100 نانومتراً (Adhikari et al., 2013). إنّ استخدام المستحضرات النانوية في مكافحة الأرضة يقدّم جيلاً جديداً من المواد صديقة البيئة والكفوءة في مكافحة الأرضة وحماية الأخشاب وتقليل التلوث البيئي (Borges et al., 2018). تُحدث جسيمات الفضة النانوية تأثيرات سامة وقاتلة لحشرة الأرضة (Iqtedar et al., 2020)، وكذلك تأثيرات طاردة وممانعة للتغذية، فضلاً عن دورها في تثبيط الأنزيمات في الجهاز الهضمي للأرضة (Mishra et al., 2021). إنّ استخدام البكتيريا ومنتجاتها الثانوية من الطرائق المهمة في تحضير المواد النانوية عن طريق مشاركة للبكتيريا ومنتجاتها الثانوية كعوامل مختزلة ومغلّفة ومثبّثة لتحضير تلك المواد (Huang et al., 2007؛ Vinay et al., 2018).

ومن هذا المنطلق، ونظراً لأهمية مسببات البكتيرية الممرضة *Bacillus thuringiensis* و *Pseudomonas fluorescens* و *tenebrionis* وجسيمات الفضة النانوية في مكافحة الأرضة، وللدور المهمّ للأنزيمات في حياة الأرضة، فقد نفّذت هذه الدراسة بهدف اختبار تأثير المعاملات المختلفة في فاعلية أنزيم السيليلوليز.

مواد البحث وطرائقه

إعداد المستعمرة البكتيرية

لعزل البكتيريا *P. fluorescens* من حشرات مختلفة، شملت الأرضة (*M. diversus*)، الجراد (*Schistocerca gregaria*) والصرصار الأمريكي (*Periplaneta americana*)، كل على حدة، أُتبعَت طريقة

جُمع بعدها مسحوق الفضة النانوية وحفظ في الحاضنة الكهربائية في قوارير زجاجية معتمة عند درجة حرارة 25 ± 2 °س لحين الاستعمال (John et al., 2020).

تحديد بعض صفات جسيمات الفضة النانوية المُحضرة

بغرض تحديد الصفات البصرية والطيافية لجسيمات الفضة النانوية المُحضرة، فضلاً عن المعلق البكتيري ونواتر الفضة، استخدم التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية (Oza et al., 2012)، فيما تمّ تحديد المجاميع الوظيفية التي يتكون منها رائق المعلق البكتيري فضلاً عن المجاميع الوظيفية التي اشتركت في عملية الاختزال الحيوي لتغليف وتثبيت جسيمات الفضة النانوية، وذلك باستخدام جهاز التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR عند طول موجة ما بين 400-4000 نانومتر (Syed et al., 2016). كما تمّ تحديد الصفات التركيبية والسطحية وقطر الجسيمات بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح، فضلاً عن تحديد عناصر ونقاوة العينة باستخدام جهاز الأشعة السينية المشعّات للطاقة والملحق بالمجهر الإلكتروني الماسح (Al-Shammari et al., 2020)، وتمّ تحديد الحجم البلوري للجسيمات بواسطة إنحراف/حيود الأشعة السينية (Cullity & Stock, 2001؛ Thuy et al., 2021).

استخلاص وتنقية أنزيم السيلوليز

نُقلت شغالات حشرة الأرضة إلى أطباق بتري تحتوي على وسط السيلولوز المُصلَّب بالأجار والمعامل بتركيز من معلق البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من الأرضة والجراد والصرصار الأمريكي والعزلة التجارية بتركيز 10×15^9 وحدة مستعمرية/مل، والعزلة المحلية *B. t. tenrbrionis* بتركيز 10×15^7 وحدة مستعمرية/مل، وجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة العزلات البكتيرية *P. fluorescens* المعزولة من الأرضة، والعزلة التجارية والعزلة المحلية *B. t. tenrbrionis* بتركيز 600 جزء بالمليون، فضلاً عن معاملة الشاهد (ماء مقطر فقط). وبعد 24، 48 و72 ساعة من المعاملة، جُمعت الشغالات الباقية على قيد الحياة ووضعت في الكحول الإيثيلي 80% لمدة دقيقة واحدة لتعقيمها، ثم استخرج الجهاز الهضمي من شغالات الأرضة، ووضع في محلول فوسفات البوتاسيوم المنظّم، وسحق الجهاز الهضمي ووضع في الكحول الإيثيلي 80% لمدة 72 ساعة لحين استخلاص الأنزيم، وتمّ حفظها في الثلجة عند درجة حرارة 4°س لحين إجراء الفحص. أخذت 50 قناة هضمية وسطى لكل مكرر، ووضعت في أنبوبة اختبار سعة 35 مل تحوي على محلول فوسفات البوتاسيوم المنظم بتركيز 0.01 مولر ودرجة حموضة 7، وتمّ مزجه بشكل جيد باستعمال قضيب زجاجي، وأُخضع المحلول للتردد المركزي المبرد عند درجة حرارة 4°س لمدة 30 دقيقة وبسرعة 4500 دورة/دقيقة، أُخذ بعدها الرائق لحساب فاعلية الأنزيم.

Bacillus thuringiensis tenebrionis على الوسط السائل، ثمّ حُصّنت عند درجة حرارة 30 ± 2 °س لمدة 48 ساعة؛ كما جرى وفق الطريقة نفسها أعلاه تحضير 3 تراكيز من المعلقات البكتيرية واستخدمت في خطوات البحث اللاحقة.

تحضير جسيمات الفضة النانوية بواسطة العزلات البكتيرية المختلفة

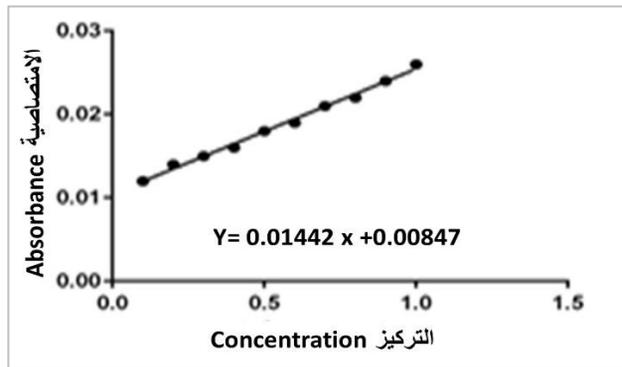
تحضير رائق (الجزء الطافي) العزلات البكتيرية

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Syed et al. (2016) مع بعض التعديلات، حيث حُصّر رائق (الجزء الطافي Supernatant) من لقاح البكتيريا *P. fluorescens* عن طريق تنمية البكتيريا على الوسط السائل broth Nutrient، وذلك بأخذ مسحات من البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة، ثمّ التحضين عند درجة حرارة 28 ± 2 °س لمدة 48 ساعة. وبعد انتهاء مدة التحضين، أُخضع المعلق البكتيري للتردد المركزي بسرعة 4500 دورة بالدقيقة ولمدة 30 دقيقة، بعدها أُهمل الجزء الراسب وجُمع الرائق في دورق معقم بهدف استعماله في تحضير جسيمات الفضة النانوية. كُزرت العملية ذاتها في تحضير رائق المعلق البكتيري للعزلة التجارية *P. fluorescens*، بينما اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (Banu & Balasubramanian) (2014) في تحضير رائق العزلة المحلية *B. t. tenebrionis*، إذ نُميت البكتيريا على الوسط السائل، ثم اعتمدت الخطوات السابقة نفسها التي تمّ اتباعها مع *P. fluorescens*.

تحضير جسيمات الفضة النانوية

بغرض الحصول على جسيمات الفضة النانوية، تمّت إضافة 100 مل من رائق المعلق البكتيري للعزلة *P. fluorescens* المعزولة من الأرضة ومن العزلة التجارية فضلاً عن العزلة *B. t. tenebrionis*، كل على حدة، إلى 900 مل من محلول نترات الفضة تركيز 10 مل مول، مع ضبط درجة الحموضة للمواد المتفاعلة عند 8.38. نُقل المحلول ووضع في حاضنة عند درجة حرارة $28-30$ °س لمدة 48 ساعة مع الرجّ. تمّت مراقبة المحلول خلال هذه الفترة لملاحظة التغيرات اللونية التي تطرأ عليه، والتي تدلّ على حدوث عملية اختزال حيوي/بيولوجي من خلال تغيير لون المحلول من الأصفر إلى البني وتكوّن جسيمات الفضة النانوية، مع مراعاة أن تتمّ هذه العملية بعيداً عن الضوء (Syed et al., 2016) وبغية الحصول على جسيمات نانوية على هيئة مسحوق أكثر نقاوة، تمّ أخذ المحاليل النانوية المُحضرة وأُخضعت للتردد المركزي عند سرعة دوران 4500 دورة بالدقيقة لمدة ساعة واحدة عند حرارة 10 °س. أُخذ الجزء الراسب وأضيف إليه 5 مل ماء منزوع الأيونات في أنبوب اختبار، وأُخضع للتردد المركزي. كُزرت هذه العملية ثلاث مرّات، ثمّ جُمع الراسب وجُفّف في فرن كهربائي عند درجة حرارة 100 °س لمدة 1-2 ساعة،

المعاملات باستعمال أقل فرق معنوي عند مستوى إحتمال 5%، وحلّت البيانات باستخدام البرنامج الاحصائي Genstat 12.



شكل 1. العلاقة بين تركيز السكر القياسي والامتصاصية عند طول موجة 540 نانومتراً.

Figure 1. The relationship between standard glucose concentration and absorbance at 540 nm wave length.

النتائج والمناقشة

الاختزال الحيوي لنترات الفضة وتكوين جسيمات الفضة النانوية

أدت إضافة رائق اللقاح البكتيري للعضلات البكتيرية إلى حدوث تغيرات لونية استقرت عند اللون البني الغامق، والذي يدل على حدوث عملية اختزال حيوي لأيونات الفضة وتكوين جسيمات الفضة النانوية. أظهر التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية أن أعلى امتصاص لجسيمات الفضة النانوية المتكونة بواسطة العضلات البكتيرية *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة، والعزلة التجارية لبكتيريا *P. fluorescens*، والعزلة المحلية لبكتيريا *B. t. tenebrionis* قد تحقق عند طول الموجة 385 و 324 نانومتراً على التوالي (شكل A-2)، في حين بلغ أعلى امتصاص لرائق العضلات البكتيرية المذكورة عند طول الموجة 249، 250، 239 نانومتراً (شكل E-2، D-2 و F-2)، على التوالي. بينما سُجّل أعلى امتصاص لنترات الفضة عند طول الموجة 213 نانومتراً (شكل G-2). إن ميكانيكية تكوين جسيمات الفضة النانوية يتضمن وفرة العديد من العوامل المختزلة المانحة للإلكترونات والموجودة في رائق اللقاح البكتيري، مثل الأنزيمات والبروتينات وغيرها من المنتجات الثانوية التي لها القدرة على وهب الإلكترونات وتحويل أيونات الفضة إلى ذرات والتي تتجمع فيما بعد لتكوين جسيمات فضة نانوية بوجود أنزيم اختزال النترات (Nitrate reductase) الذي يحول النترات (Nitrate) إلى نترت (Nitrite)، ويؤدي هذا التحول إلى انتقال الإلكترونات إلى أيونات الفضة وتحويلها إلى فضة نانوية، وفي هذا المجال، أشار Pradhan (2013) إلى وجود هذه الآلية عند العديد من أنواع البكتيريا مثل *B. licheniform*.

استعمل الجلوكوز لتحضير المنحنى القياسي وفقاً لطريقة Miller (1959)، وذلك عن طريق إذابة 0.1 غ من الجلوكوز في كمية من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، ثم حُضرت 10 تراكيز من الجلوكوز (0.1-1 مغ/مل). أضيف لكل أنبوبة 1 مل من محلول 3,5-Dinitro salicylic Acid (DNS)، تم غلي المحلول في الأنابيب في حمام مائي لمدة 5 دقائق، ثم بُردت مباشرةً وأضيف لها 5 مل من الماء منزوع الأيونات مع مراعاة رجّها جيداً، وتم قياس الامتصاصية باستعمال جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 540 نانومتراً، وبذلك تم الحصول على المنحنى القياسي للجلوكوز الذي يمثل العلاقة الخطية بين قيم الامتصاصية وتركيز الجلوكوز.

طريقة قياس فاعلية الأنزيم والنسبة المئوية للتثبيط

وضع 500 ميكرو لتر من محلول الأنزيم (الطبقة العليا) في أنبوبة اختبار سعة 7 مل، وأضيف إليه 500 ميكرو لتر من مادة التفاعل المحلول المنظم، ومُزج الخليط جيداً، ثم وضعت الأنبوبة في الحاضنة عند درجة حرارة 50°س لمدة 30 دقيقة، وتمت إضافة 1.5 مل DNS، الذي يتفاعل مع السكريات المختزلة والجزئيات المختزلة الأخرى لتكوين حمض 3-أمينو-5-نيتروساليسيليك، والذي يمتص الضوء بقوة عند طول موجة 540 نانومتراً. وبغرض إيقاف التفاعل، وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم نقلت مباشرةً إلى حمام مائي مبرد. تمت قراءة الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي بطول موجي 540 نانومتراً. تم حساب تركيز الجلوكوز المتحرر بالاعتماد على معادلة الخط المستقيم $Y=0.01442X+0.00847$ ، حيث تمثل Y الامتصاصية عند طول موجي 450 نانومتراً؛ ويمثل X تركيز سكر الجلوكوز (مغ/مل) وتم الحصول عليه من المنحنى القياسي للجلوكوز (شكل 1)، ويشير هذا إلى فاعلية أنزيم السيليلوليز الموجود في الجهاز الهضمي لشغالات الأرضة، كما حُسبت النسبة المئوية لتثبيط الأنزيم وفقاً لدراسة سابقة (Attaullah et al., 2019) باستعمال المعادلة التالية:

$$\% \text{ لتثبيط الأنزيم} = 100 \times \frac{\text{الامتصاصية في الشاهد (المقارنة)} - \text{الامتصاصية في المعاملة}}{\text{الامتصاصية في الشاهد (المقارنة)}}$$

التحليل الاحصائي

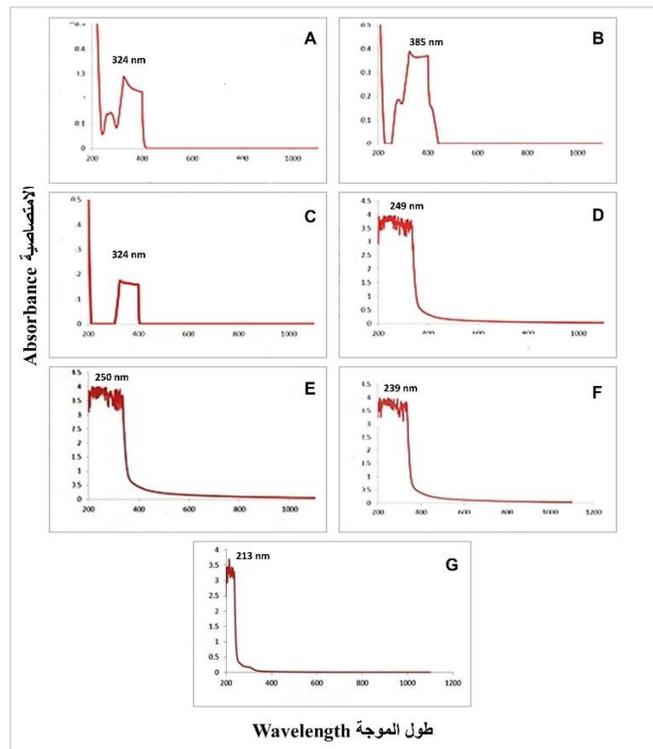
حلّت نتائج البحث احصائياً بعد تنفيذ تجارب عاملية Factorial experiments وفق التصميم العشوائي الكامل Completely randomized design (CRD)، وقورنت الفروقات بين متوسطات

الفضة النانوية وتغليفها وتثبيتها (شكل 3-A). في حين بين التحليل الطيفي (FTIR) لرائق المعلق البكتيري للعزلة التجارية *P. fluorescens* وجود قمم عند المناطق 1656، 2105 و 3500 سم⁻¹، والتي تمثل مجموعة كيتون C=O ومجموعة الألكاين C≡C ومجموعة أمين N-H في الرائق، فيما أظهرت قمماً عند المناطق 1663، 2015 و 3500 سم⁻¹، والتي تمثل مجموعة كيتون C=O ومجموعة الألكاين C≡C ومجموعة الكحول O-H، وهي المجاميع الوظيفية التي اشتركت في عملية تكوين جسيمات الفضة النانوية وتغليفها وتثبيتها (شكل 3-B). أظهر التحليل الطيفي (FTIR) لرائق المعلق البكتيري لعزلة البكتيريا *B.t.tenebrionis* وجود قمم عند المناطق 1528، 1150، 2929 و 3452 سم⁻¹، والتي تمثل مجموعة أمين C-N ومجموعة نيترو N=O ومجموعة ألكان C-H، ومجموعة الكحول O-H في الرائق، فيما سجلت القمم عند المناطق 1168، 1673، 2930، و 3489 سم⁻¹، والتي تمثل المجاميع الوظيفية مجموعة أمين C-N ومجموعة ألكين C-C ومجموعة ألكان C-H ومجموعة الكحول O-H التي اشتركت في عملية تكوين جسيمات الفضة النانوية وتغليفها (شكل 3-C).

وفي دراسات مماثلة، وجد أن مجاميع الأميدات والأمين والبروتين والكاربونيل هي من المجاميع الرئيسية التي اشتركت في عمليات اختزال وتثبيت وتغليف جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة البكتيريا *Pseudomonas areuginosa* (Jeevan et al., 2012). يتضح مما تقدم أن رائق اللقاح البكتيري لأنواع البكتيريا الثلاثة غني جداً بالمركبات الطبيعية مثل الأنزيمات والبروتينات، والتي يمكن أن تخدم كعوامل مختزلة طبيعية تستخدم في اختزال أيونات الفضة وتحويلها إلى فضة نانوية بصورة طبيعية، فضلاً عن تغليفها وتثبيتها.

تحديد شكل وحجم جسيمات الفضة النانوية المحضرة

أظهرت صور المجهر الإلكتروني الماسح (شكل 4-A) أن جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة والعزلة التجارية والعزلة المحلية للبكتيريا *B. t. tenebrionis* ذات شكل كروي غير منتظم. بلغ قطر الجسيمات معدلاً قدره 32.43، 63.19 و 57.62 نانومتراً، على التوالي (شكل 4-A، 4-C و 4-E)، فيما أظهرت نتائج فحص EDX أن نسبة جسيمات الفضة النانوية كانت 77.17، 81.09 و 82.30%، على التوالي، الأمر الذي يعكس الحصول على نقاوة جيدة لجسيمات الفضة المحضرة بواسطة عزلات البكتيريا (شكل 4-B، 4-D و 4-F)، إن تباين أقطار جسيمات الفضة النانوية يعود إلى اختلاف نوع البكتيريا المستخدمة في تحضيرها، الذي يؤدي إلى تنوع واختلاف المركبات الثانوية المنتجة واختلاف كفاءتها في عمليات اختزال وتغليف وتثبيت جسيمات الفضة النانوية، وهذا ما أشير إليه سابقاً

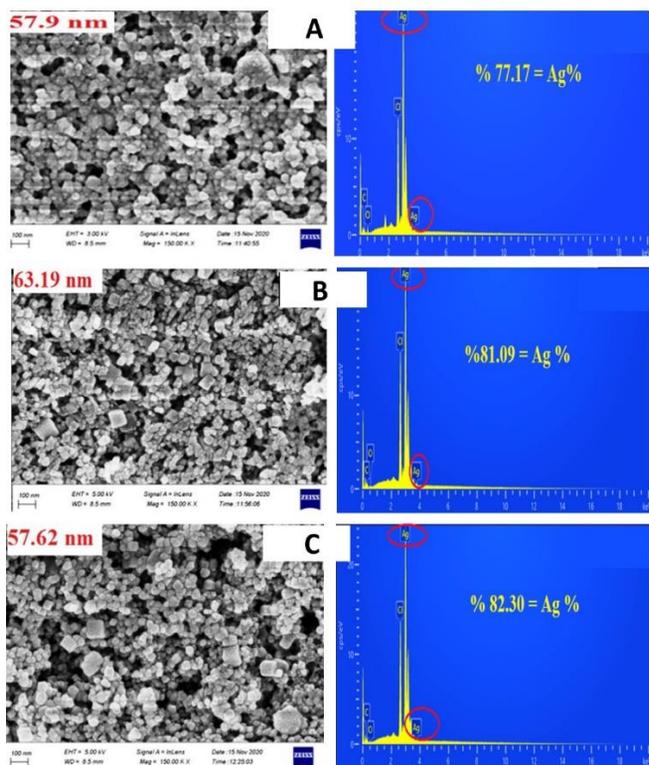


شكل 2. طيف الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية : لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة: (A) البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة، (B) البكتيريا التجارية *P. fluorescens*، (C) البكتيريا *B. t. tenebrionis*، (D) طيف الامتصاص لمعلق البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من الأرضة، (E) طيف الامتصاص لمعلق البكتيريا التجارية *P. fluorescens*، (F) طيف الامتصاص للفاح البكتيريا *B. t. tenebrionis*، (G) طيف الامتصاص لنترات الفضة.

Figure 2. Ultraviolet absorption spectrum for silver nanoparticles prepared by: (A) *P. fluorescens* isolated from termites, (B) commercial *P. fluorescens*, (C) *B. t. tenebrionis*, (D) absorption spectrum of *P. fluorescens* supernatant isolated from Termite, (E) absorption spectrum of commercial *P. fluorescens* supernatant, (F) absorption spectrum of *B.t. tenebrionis* supernatant, (G) absorption spectrum for silver nitrate.

تحديد المجاميع الوظيفية المساهمة في عمليات الاختزال وتكوين جسيمات الفضة النانوية

لقد أظهر التحليل الطيفي (FTIR) لرائق المعلق البكتيري للبكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة العديد من قمم وحدات الطاقة، حيث سجلت قمم عند المناطق: 2980، 2385، 1678، 1150 و 3783 سم⁻¹، والتي تمثل مجموعة أمين C-N، ومجموعة كيتون C=O ومجموعة ألكاين C≡C ومجموعة ألكان C-H ومجموعة الكحول O-H؛ أما في جسيمات الفضة فقد ظهرت القمم عند المناطق 1151، 1670، 2939 و 3822 سم⁻¹، والتي تمثل مجموعة أمين C-N ومجموعة كيتون C=O ومجموعة ألكان C-H ومجموعة الكحول O-H، وهي المجاميع الوظيفية التي اشتركت في عملية تكوين جسيمات



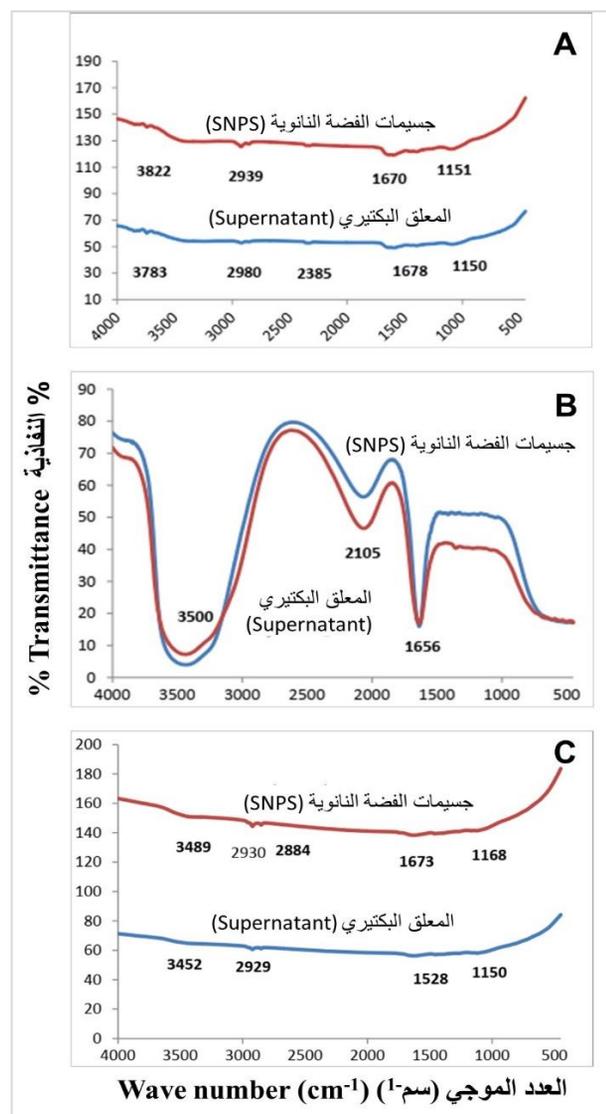
شكل 4. نقاوة جسيمات الفضة النانوية المحددة بواسطة فحص EDX (اليمين)، وشكل وحجم جسيمات الفضة النانوية بواسطة SEM (اليسار)، المحضرة بواسطة: (A) البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرض، (B) العزلة التجارية للبكتيريا *P. fluorescens*، (C) البكتيريا المحلية *B. t. tenebrionis*.

Figure 4. Purity of silver nanoparticles determined by EDX (Right), shape and size of silver nanoparticles by SEM (Left), assay prepared by: (A) *P. fluorescens* isolated from termites, (B) commercial isolate of *P. fluorescens* bacteria, (C) local bacteria *B. t. tenebrionis*.

تحديد الحجم البلوري لجسيمات الفضة النانوية المحضرة

أظهرت نتائج فحص إنحراف/حيود الأشعة السينية وجود عدة قمم وعدة زوايا تمثل زاوية براك: 54.842، 46.250، 32.258، 27.860، 57.462، 67.483، 74.656 و 76.764، فيما بلغ منتصف عرض القمة (FWHM): 0.271، 0.322، 0.367، 0.308، 0.338، 0.171 و 0.078 و 0.329، وبلغ معدل الحجم البلوري لجسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من الأرض 45.73 نانومتراً (شكل 5-A). كما أظهر فحص جسيمات الفضة المحضرة بواسطة العزلة التجارية للبكتيريا *P. fluorescens* وجود عدة قمم وزوايا، فقد بلغت زاوية براغ: 27.901، 32.302، 46.255، 54.853، 57.501، 67.631، 74.512 و 76.887 (شكل 5-B). بينما أظهر فحص جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة البكتيريا *B.t.tenbrionis* ظهور عدة قمم عند الزوايا: 27.953، 32.397

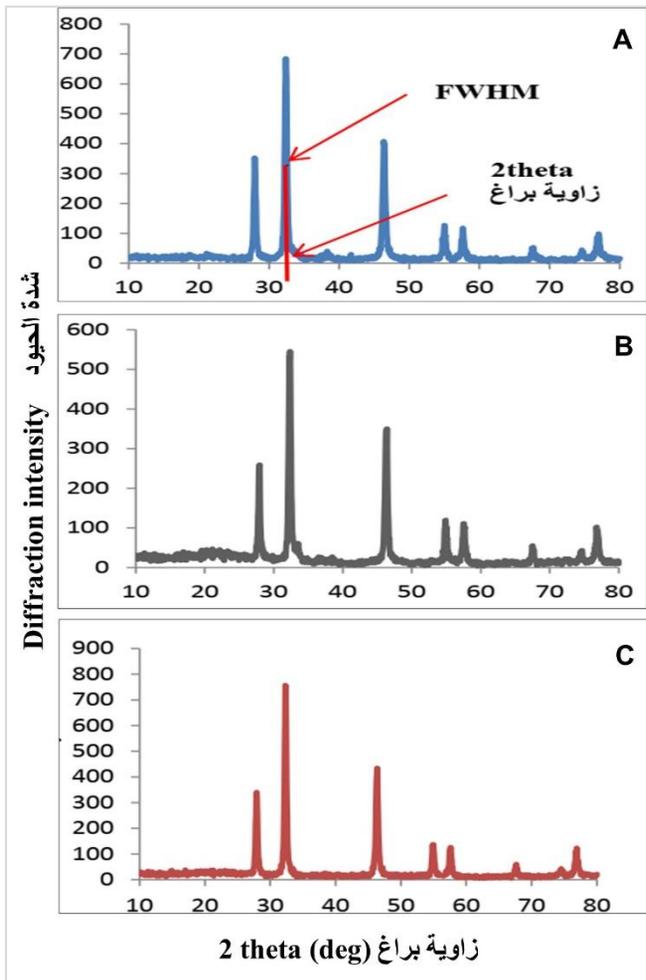
(Khodashenas & Ghorbani, 2015). أظهرت دراسات مماثلة أن قطر جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة بكتيريا *B. t* تراوح ما بين 43.52-142.97 نانومتراً (Banu & Balasubramanian, 2014)؛ كما أشار John *et al.* (2020) بأن قطر جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة أحد أنواع البكتيريا *Pseudomonas* المعزولة من البروتوزوا قد بلغ 50 نانومتراً. يتضح مما تقدم أهمية العزلات البكتيرية ومنتجاتها الثانوية في تحضير جسيمات ذات نقاوة عالية بطريقة صديقة للبيئة وذات مواصفات حجمية قياسية، الأمر الذي يبين كفاءة هذه العزلات في عملية التحضير والتصنيع.



شكل 3. المجاميع الوظيفية المساهمة في تحضير جسيمات الفضة النانوية بواسطة: (A) البكتيريا *P. fluorescens* المعزولة من الأرض، (B) البكتيريا التجارية *P. fluorescens* المحلية (C) البكتيريا المحلية *B. t. tenebrionis*

Figure 3. The functional groups contributed to the preparation of silver nanoparticles by: (A) *P. fluorescens* isolated from termites, (B) commercial formulation for bacteria *P. fluorescens*, (C) local bacteria *B. t. tenebrionis*.

انخفاض النشاط الأنزيمي يعود إلى سمية جسيمات الفضة النانوية للأحياء التكافلية مثل البكتيريا والبروتوزوا وموتها في الجهاز الهضمي للأرضة، الأمر الذي يؤدي إلى انعدام وجود السيليلوليز المسؤول عن هضم السيليلوز وتحويله إلى سكر، وقد يحدث تداخل بين جسيمات الفضة النانوية والأنزيم أو الركيزة التي يعمل عليها الأنزيم، حيث تؤثر على الأنزيم من خلال الارتباط بمواقع معينة على الأنزيم فيتوقف الأنزيم عن العمل، أو ترتبط الفضة النانوية بمواقع معينة على الركيزة مما يؤدي إلى إيقاف عمل الأنزيم (Dorau et al., 2004)؛ (Mishra et al., 2021).



شكل 5. حيود الأشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المُحضَّرة بواسطة: (A) *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة، (B) البكتيريا التجارية *P. fluorescens*، (C) *B. t. tenebrionis*.
Figure 5. X-ray diffraction of silver nanoparticles prepared by: (A) *P. fluorescens* isolated from termites, (B) commercial bacteria *P. fluorescens*, (C) *B. t. tenebrionis*.

38.242، 46.354، 54.996، 57.607، 67.461 و 76.760، في حين بلغ منتصف عرض القمة (FWHM): 0.300، 0.354، 0.143، 0.362، 0.333، 0.332، 0.318 و 0.362، وبلغ معدل الحجم البلوري 32.08 (شكل C-5).

تأثير العزلات البكتيرية المختلفة وجسيمات الفضة النانوية على فاعلية أنزيم السيليلوليز

أشارت النتائج (الجدول 1 و 2) أن جميع سلالات البكتيريا وجسيمات الفضة النانوية قد أثرت على تركيز سكر الجلوكوز المتحرر وعلى نسب تثبيط الأنزيم بشكل متفاوت، وازداد هذا التأثير بتقدم زمن المعاملة، حيث تفوقت جسيمات الفضة النانوية في تأثيرها على تركيز سكر الجلوكوز المتحرر ونسب التثبيط الأنزيمي على السلالات البكتيرية المختلفة وبفروقات احصائية معنوية، إذ بلغت نسبة الجلوكوز المتحرر 0.245، 0.037 و 0.175 مل/مغ، وبلغت نسب التثبيط لأنزيم السيليلوليز 71.42، 78.57 و 73.80% عند المعاملة بجسيمات الفضة النانوية المُحضَّرة بواسطة العزلة *P. fluorescens* المعزولة من حشرة الأرضة، والعزلة التجارية، وعزلة *B. t. tenebrionis*، على التوالي. بينما بلغ تركيز سكر الجلوكوز المتحرر 0.522، 0.453، 0.314، 0.730 و 0.245 مل/مغ، وبلغت نسب التثبيط 64.28، 69.05 و 54.67%، عند المعاملة بالعزلة *P. fluorescens* التجارية المعزولة من حشرة الأرضة، الجراد، الصرصار الأمريكي، التجارية والعزلة المحلية *B. t. tenebrionis*، على التوالي، بعد 72 ساعة من المعاملة. اتضح من النتائج بأن العزلة المحلية للبكتيريا *B. t. tenebrionis* كانت الأفضل في التأثير على الأنزيم قياساً ببقايا العزلات، إذ أحدثت نسب تثبيط بلغت 71.42%؛ كما تفوقت جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة العزلة التجارية على بقية جسيمات الفضة النانوية المُحضَّرة في التأثير على فاعلية الأنزيم من خلال ارتفاع نسب التثبيط.

أشارت نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروق معنوية ما بين معدلات المعاملات المختلفة، مع ملاحظة أن جسيمات الفضة النانوية المحضرة بواسطة العزلات البكتيرية المختلفة كانت الأفضل في نسب تثبيط أنزيم السيليلوليز مقارنة بتأثير العزلات البكتيرية المختلفة وبفارق معنوي. كما أوضحت النتائج ارتفاع نسب تثبيط أنزيم السيليلوليز مع مرور الزمن وبفارق معنوي؛ في حين أثر التداخل بين العوامل المدروسة وبشكل كبير في نسب تثبيط الأنزيم وبفارق معنوي أيضاً. يعتقد أن

جدول 1. تركيز سكر الجلوكوز المتحرر في الجهاز الهضمي لشغالات الأرضة *Microcerotermes diversus* عند المعاملات المختلفة من عزلات البكتيريا *P. fluorescens* والبكتيريا *B.t. tenbrionis* وجسيمات الفضة النانوية المُحضَّرة حيوياً.

Table 2. The concentration of glucose liberated in the digestive system of termite workers *Microcerotermes diversus* at different treatments of the isolates of *P. fluorescens* and *B.t. tenbrionis* and biologically prepared silver nanoparticles.

معدل المعاملات Mean of treatment	تركيز سكر الجلوكوز المتحرر مغ/مل بعد Concentration of released glucose in mg/ml after			التركيز Concentration	المعاملة Treatment
	72 ساعة 72 h	48 ساعة 48 h	24 ساعة 24 h		
0.869	0.522	0.940	1.146	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Termite
0.776	0.453	0.800	1.077	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Locust
0.823	0.314	0.869	1.285	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Cockroach
0.823	0.730	0.800	0.938	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Commercial
0.707	0.245	0.730	1.146	⁷ 10×15 cfu/ml	<i>B.tt</i>
0.638	0.245	0.592	1.077	600 mg/L	<i>P.f.</i> -AgNPS Termite
0.245	0.037	0.245	0.453	600 mg/L	<i>P.f.</i> -AgNPS Commercial
0.430	0.175	0.314	0.800	600 mg/L	<i>B.tt</i> -AgSNPS
2.210	2.325	2.603	1.701		Control
	0.561	0.877	1.069		Time mean

أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05 لكل من المعاملة = 0.098، الوقت = 0.056، المعاملة × الوقت = 0.169
LSD_{0.05} for Treatment= 0.098, Time = 0.056, Treatment × Time = 0.169

جدول 2. النسبة المئوية لتثبيط أنزيم السيليلوليز في الجهاز الهضمي لحشرة الأرضة عند معاملات مختلفة من عزلات البكتيريا *P. fluorescens* والبكتيريا *B.t. tenbrionis* وجسيمات الفضة النانوية المُحضَّرة حيوياً.

Table 2. Percentage of cellulase inhibition in the digestive system of termites at different treatments of *P. fluorescens* and *B.t. tenbrionis* isolates. and biologically prepared silver nanoparticles

معدل المعاملات Mean of treatment	% لتثبيط أنزيم السيليلوليز بعد % inhibit of cellulase enzyme after			التركيز Concentration	المعاملة Treatment
	72 ساعة 72 h	48 ساعة 48 h	24 ساعة 24 h		
46.10	61.90	52.17	24.24	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Termite
49.26	64.28	56.24	27.27	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Locust
47.19	69.05	54.35	18.18	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Cockroach
48.20	54.76	56.52	33.33	⁹ 10×15 cfu/ml	<i>P.f.</i> Commercial
52.56	71.42	62.02	24.24	⁷ 10×15 cfu/ml	<i>B.tt</i>
53.56	71.42	63.04	27.27	600 mg/L	<i>P.f.</i> -AgNPS Termite
69.01	78.57	73.91	54.54	600 mg/L	<i>P.f.</i> -AgNPS Commercial
61.64	73.80	71.73	39.39	600 mg/L	<i>B.tt</i> -AgSNPS
	68.15	61.25	31.06		Time mean

أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال 0.05 لكل من المعاملة = 2.55، الوقت = 1.56، المعاملة × الوقت = 4.41
LSD_{0.05} for Treatment= 2.55, Time = 1.56, Treatment × Time = 4.41

عن طريق التأثير في مجتمع الأحياء التعايشية من خلال التضاد الحيوي المتمثل بإنتاج مضادات حيوية وأنزيمات محللة وسموم، مثل سيانيد الهيدروجين، وبلورات بروتينية، والتي تؤدي إلى قتل مجتمعات الأحياء التعايشية وتقليل عددها، وبالتالي يقل إنتاج الأنزيمات وتتأثر فاعليتها فتموت الحشرات جوعاً (Simoes et al., 2008؛ Sivasakthi et al., 2014).

وفي نتائج مماثلة، أوضح Kantrao et al. (2017) بأن جسيمات الفضة النانوية تعمل على تثبيط فاعلية أنزيم البروتيز Protease كنتيجة لارتباط جسيمات الفضة النانوية بمواقع عديدة في الركيزة فضلاً عن ارتباطها في مواقع عديدة للأنزيم، وبالتالي فشل أي ركيزة في الارتباط بالأنزيم. فيما قد تؤثر أنواع البكتيريا الممرضة مثل *P. fluorescens* و *B. t. tenbrionis* على النشاط الأنزيمي في الجهاز الهضمي للارضة

Abstract

Kamel, S.H., R.F. Al-Jassani and H.A. Al-Shammari. 2022. Effects of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis tenebrionis* Isolates and Biologically Synthesized Silver Nanoparticles on Cellulase Enzyme Activity in Workers' Digestive System of the Termite *Microcerotermes diversus* Silv. Arab Journal of Plant Protection, 40(4): 315-324. <https://doi.org/10.22268/AJPP-40.4.315324>

The purpose of this study was to investigate the effect of different bacterial isolates of *P. fluorescens* and *B. t. tenebrionis* and silver nanoparticles on the activity of the cellulase enzyme in termites' middle digestive system and its role in glucose release by treating cellulose media with bacterial strains and nanoparticles. Ultraviolet spectroscopy results revealed that silver nanoparticles synthesized by *P. fluorescens* isolated from termites, commercial *P. fluorescens*, and local *B.t. tenbrionis* had the highest absorption at 385, 324, and 324 nm wave length, respectively. Infrared spectroscopy (FTIR) revealed that ketons, amines, alkanes, and alcohols were among the groups that contributed to silver ions reduction, capping and stabilizing nanoparticles. The particle diameters were measured using a scanning electron microscope (SEM) and found to be on average 32.43, 63.19, and 57.62 nm. The highest concentration of liberated glucose was recorded after 24 hours, which ranged between 0.453 and 1.285 mg/ml when treated with silver nanoparticles prepared from a commercial isolate of *P. fluorescens* bacteria and when treated with a bacterial isolate *P. fluorescens*, respectively. Only when treated with synthesized silver nanoparticles and when treated with commercial *P. fluorescens* isolates did the lowest concentrations of liberated sugar reached between 0.037 and 0.730 mg/ml after 72 hours, respectively. The high quantity of liberated sugar in the control treatment was constant, reaching 1.70 and 2.33 mg/ml after 24 and 72 hours, respectively. In addition to the variation in cellulase enzyme inhibition rates in termite digestive systems due to the effect of different treatments, it was discovered that the local isolate of *B. t. tenbrionis* was better than the rest of the isolates in affecting the enzyme, causing inhibition rates of 71.42%. Furthermore, silver nanoparticles synthesized from a commercial isolate of *P. fluorescens* outperformed other treatments in inhibiting enzyme activity, with an inhibition rate of 78.57% .

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis tenebrionis*, silver nanoparticles, *Microcerotermes diversus*.

Affiliation of authors: S.H. Kamel^{1*}, R. F. Al-Jassani² and H. A. Al-Shammari³. (1) Biotechnology Department, Faculty of Sciences, University of Baghdad, Iraq, (2) Plant Protection Department, Faculty of Agricultural Engineering, University of Baghdad, Iraq, (3) Integrated Pest Management Center, Agricultural Research Division, Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq. *Email address of corresponding author: shaimaa.h@sc.uobaghdad.edu.iq

References

المراجع

- Adhikari, U., A. Ghosh and G. Chandra. 2013. Nanoparticles of herbal origin: a recent eco-friendly trend in mosquito control. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(2): 167-168. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60065-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60065-1)
- Ahmed, S and M. Qasim. 2011. Foraging and chemical control of subterranean termites in farm buildings in Faisalabad, Pakistan. Pakistan Journal of Life and Social Sciences, 9(1): 58-62.
- Al-Saadi, H.M.L. 2019. Evaluation of some elements of integrated management to control the pest *Jebusaea hamerschmidti* (Coleoptera: Cerambycidae) in central Iraq. Ph. D. thesis, Faculty of Agriculture, Baghdad University. 152 pp.
- AL-Shammari, H.I., H.S. Hussain, S.H. Kamel, M.I. Humadi and H.K. Jasim. 2020. Effect of Gamma irradiation in biosynthesis of silver nanoparticles by date palm fronds *Phoenix dactylifera* L.. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science, 11(1) :16-23. <https://doi.org/10.33887/rjpbcs/2020.11.1.4>
- Arab, A., A.M. Costa-Leonardo, F.E. Casarin, A.C. Guaraldo and R.C. Chaves. 2005. Foraging activity and demographic patterns of two termite species (Isoptera: Rhinotermitidae) living in urban landscapes in Southeastern Brazil. European Journal of Entomology, 102(4): 691-697. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.098>
- Attaullah, M., K. Zahoor, M.A. Zahoor, M.S. Mubarik, H. Rizvi, H.N. Majeed, M. Zulhussnain, K. Ranian, K. Sultana, M. Imran and S. Qamer. 2019. Insecticidal, biological and biochemical response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to some indigenous weed plant extracts. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(1): 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.009>
- Banu, A.N. and C. Balasubramanian. 2014. Myco-synthesis of silver nanoparticles using *Beauveria bassiana* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, 113(8): 311-316. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3948-z>
- Borges, C.C., G.H.D. Tonoli, T.M. Cruz, P.J. Duarte and T.A. Junqueira. 2018. Nanoparticles-based wood preservatives: the next generation of wood protection?. CERNE, 24(4): 397-407. <https://doi.org/10.1590/01047760201824042531>
- Chattopadhyay, P. and G. Banerjee, 2018. Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. 3 Biotech, 8(4):201. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1223-1>
- Coutinho-Abreu, I.V., K.Y. Zhu and M. Ramalho-Ortigao. 2010. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges. Parasitology International, 59(1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.002>
- Cullity, B.D. and S.R. Stock .2001. Elements of x-ray Diffraction, Third Edition. Prentice Hall. USA. 569 pp.
- Dorau, B., R. Arango and F. Green. 2004. An investigation into the potential of ionic silver as a wood preservative. Pages 133-145. In: Proceedings of the Wood frame Housing Durability and Disaster Issues Conference. October 4-6, 2004 Las Vegas, Nevada, USA.
- Flury, V.P., M. Péchy-Tarr, N. Aellen, F. Dennert, N. Hofer, K.P. Kupferschmied, P. Kupferschmied, Z. Metla, Z. Ma, S. Siegfried, S. de Weert, G.

- Bloemberg, M. Höfte, C.J. Keel and M. Maurhofer.** 2017. Antimicrobial and insecticidal: cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. *Frontiers in Microbiology*, 8: 100.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00100>
- Huang, J., Q. Li, D. Sun, Y. Lu, Y. Su, X. Yang, H. Wang, Y. Wang, W. Shao, N. He, J. Hong and C. Chen.** 2007. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10): 105104-105114.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>
- Husseneder, C., A. Sethi, L. Foil and J. Delatte.** 2010. Testing protozoacidal activity of ligand-lytic peptides against termite gut protozoa in vitro (protozoa culture) and in vivo (microinjection into termite hindgut). *Journal of Visualized Experiments*, 46: 2190-2195.
<https://doi.org/10.3791/2190>
- Iqtedar, M., N. Mirza, A. Aihetasham, S. Iftikhar, A. Kaleem and R. Abdullah.** 2020. Termiticidal activity of mycosynthesized silver nanoparticles from *Aspergillus fumigatus* BTCB15. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19(3): 1201-1211.
<https://doi.org/10.24275/rmiq/bio1022>
- Jayaraj, S.** 1986. Role of insect pathogens in plant protection. In: *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 1: 91-107.
- Jeevan, P., K. Ramya and A.E. Rena.** 2012. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Biotechnology*, 11: 72-76.
- John, M.S., J.A. Negroth, K.P. Ramasamy, A. Mancini, G. Giuli, A. Natalello, P. Ballarini and S. Pucciarelli.** 2020. Synthesis of bioactive silver nanoparticles by a *Pseudomonas* strain associated with the antarctic psychrophilic protozoon *Euplotes focardii*. *Marine Drugs*, 18(1): 38. <https://doi.org/10.3390/md18010038>
- Kantrao, S., M.A. Ravindra, S.M.D. Akbar, P.D.K. Jayanthi and A. Venkataraman.** 2017. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on growth and development of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): interaction with midgut protease. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2): 583-89.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.03.018>
- Khodashenas, B. and H.R. Ghorbani.** 2015. Evaluation of the effective factors on size and anti-bacterial properties of biosynthesized silver nanoparticles. *International Journal of Nano Dimension*, 6: 111-127.
- Klyosov, A.A.** 1990. Trends in Biochemistry and Enzymology of cellulose degradation. *Journal of Biochemistry*, 29(47): 10577-10585.
<https://doi.org/10.1021/bi00499a001>
- Lacey, L.A.** 2012. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Second edition, Elsevier Ltd. Printed and bound in Great Britain. 484 pp.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer, W.H. Zyl and L.S. Preforius.** 2002. *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mishra, S., W. Wang, I.P. de Oliveira, A.J. Atapattu, S.W. Xia, R. Grillo and X. Yang .** 2021. Interaction mechanism of plant-based nanoarchitected materials with digestive enzymes of termites as target for pest control: Evidence from molecular docking simulation and in vitro studies. *Journal of Hazardous Materials*, 403:123840.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123840>
- Oza, G., S. Pandey, R. Shah and M. Sharon.** 2012. Extracellular fabrication of silver nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial assay. *Advances in Applied Science Research*, 3(3): 1776-1783.
- Pradhan, S.** 2013. Comparative analysis of silver nanoparticles prepared from different plant extracts (*Hibiscus rosa sinensis*, *Moringa oleifera*, *Acorus calamus*, *Cucurbita maxima*, *Azadirachta indica*) through green synthesis method. M. Sc. Thesis, National Institute of Technology, Rourkela. 73 pp.
- Simões, M., L.C. Simões, M.O. Pereira and M.J. Vieira.** 2008. Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms. *Biofouling*, 24(5): 339-349.
<https://doi.org/10.1080/08927010802239154>
- Sivasakthi, S., G. Usharani and P. Saranraj.** 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16): 1265-1277.
<https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7914>
- Syed, B., M.N. Nagendra Prasad, B.L. Dhananjaya, K.M. Kumar, S. Yallappa and S. Satish.** 2016. Synthesis of silver nanoparticles by endosymbiont *Pseudomonas fluorescens* CA 417 and their bactericidal activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 95: 128-136.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.10.004>
- Thuy, N.T.T., L.H. Huy, T.T. Vy, N.T.T. Tam, B.T.L. Thanh and N.T.M. Lan.** 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract for preparation of CMC/PVA nanocomposite film. *Journal of Renewable Materials*, 9(8): 1393-1411.
<https://doi.org/10.32604/jrm.2021.015772>
- Vinay, J.U., V.B. Nargund, S. Jahagirdhar, R.R. Patil and R.V. Hegde.** 2018. Green synthesis of zinc nanoparticles using *Pseudomonas fluorescens* extract and their antibacterial activity against *Xanthomonas* spp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10): 1280-1291.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.144>