# Enzymes and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Eucalyptus Camaldulensis*

# فحص الانزيمات والخواص الكيميائية للفطريات المستنبتة المعزولة من اليوكالبتوس*Eucalyptus Camaldulensis*

انتظار جبار محمد العيداني سراب فاضل حسين
جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

**الخلاصة**

هدفت الدراسة الحالية إلى دراسة وتقييم كفاءه الفطريات المستنبته المعزولة من اوراق اليوكالبتوس في إنتاج عدد من الانزيمات خارج الخلوية ، اضافة الى ذلك تم دراسة الخواص الكيميائية للمستخلصات الفطرية المعزولة. اظهرت النتائج ان الفطريات المستنبته *Penicillium sp.* ، *A. niger* ، *A. flavus*، *Alternaria sp.*، *Cladosporium sp.* المعزولة من اوراق اليوكالبتوس ان جميعها كانت فعالة على أفراز انزيم الأميليز ولكن بدرجات متفاوته ، حيث كان قطر الهالة الشفافة لعزلة الفطر*A. niger* شديدة الفعالية اذ تراوح القطر60 ملم ، تلاها عزلة الفطر*Cladosporium sp.* حيث تراوح قطر الهالة الشفافة 32 ملم ، اما بقية العزلات *A. flavus* ،*Penicillium sp.* و*Alternaria sp.* فان جميعها كانت فعالة حيث كان قطر الهالة الشفافة 30،،25 و22 ملم على التوالي .

كما أظهرت الأنواع الفطرية فعالية عالية في إنتاج انزيم البروتييز، وبعد حساب قطر المستعمرة وجد ان عزلات *A. flavus* ، *A. niger* و *Penicillium sp.* لها قابلية عالية على انتاج هذا الانزيم حيث تراوح قطر المستعمرة 67،55 و43 ملم على التوالي ، في حين عزلات *Alternaria sp.* و*Cladosporium sp.* فكانت هي الاخرى قادرة على افراز هذا الانزيم ولكن بكفاءة أقل حيث تراوح قطر المستعمرة 27 و25 ملم على التوالي . في حين اظهرت النتائج عدم قدرة الفطريات المستنبتة على انتاج الانزيم اللاكيز .اما عند الكشف عن انزيم اللاييزفلم تعطي جميع الانواع المختبرة كشفا" موجبا" تجاه هذا الانزيم فقط كانت عزلات *A. flavus* ، *A. niger* و *Penicillium sp.* لها قابلية عالية على انتاج هذا الانزيم .

بينت النتائج بأستعمال كواشف كيميائية متعددة أن المستخلصات الفطرية حاوية على العديد من المركبات الفعالة ، إذ احتوى مستخلص الفطر *A. niger* على القلويدات و التانينات و الصابونينات والكلايكوسيدات و الفلافونيدات والفينولات والستروييد ، اما مستخلص الفطر *A. flavus* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ما عدا الكلايكوسيدات والفينولات والستروييد ، في حين ان مستخلص الفطر *Penicillium sp.* احتوى على التانينات و الصابونينات و الفلافونيدات و لم يحتوي على القلويدات والكلايكوسيدات والفينولات والستروييد ،واحتوى مستخلص الفطر *Cladosporum sp.* على القلويدات و التانينات و الصابونينات مع عدم وجود الكلايكوسيدات و الفلافونيدات والفينولات والستروييد ، اما مستخلص الفطر*Alternaria sp.* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ما عدا القلويدات والفينولات والستروييد .

## Abstract

The present study aimed to study and evaluate the efficiency of endophytic fungi isolated from eucalyptus leaves in the production of a number of enzymes outside the cell , in addition to that has been the study of the chemical properties of the extracts of fungal isolates. The results showed the endophytic fungi *Penicillium sp. A. niger, A.flavus,، Alternaria sp.، Cladosporium sp.* isolated from eucalyptus leaves that were all effective on the enzyme amylase, but to varying degrees ، the diameter of transparent halo around *A. niger* fungal colony highly effective as it ranged Distance 60 mm , followed by isolation of fungus *Cladosporium sp*., Where diameter of transparent halo 32 mm, while the rest of the isolates *A. flavus,. Penicillium sp* and *Alternaria sp*. Van were all effective as diameter was transparent halo 30, 25 and 22 mm respectively .

The fungal species showed high effectiveness in the production of the enzyme protease, after diameter account colony found that the isolates of *A. flavus, A. niger* and *Penicillium sp.* its portability high on the production of this enzyme ranging diameter colony 67.55 and 43 mm respectively, while isolates *Alternaria sp*. And. *Cladosporium sp*. was the other is capable of secretion of this enzyme, but less efficiently ranging colony diameter 27 and 25 mm, respectively. While the results showed the inability of the endophytic fungi to produce the enzyme in laccase .

But when it detects an enzyme lipase did not give all species tested revealing positive toward

this enzyme was only isolates *A. flavus, A. niger* and *Penicillium sp.* have a high affinity to the production of this enzyme .

Results of using different chemical reagents appeared that fungal extracts contained many active compounds. The fungus of *A. niger* had contained alkaloids, tannins, saponins , glycosides, flavonoids, Phenols and steriod . Meanwhile *A. flavus*

contained all active compounds except glycosides, Phenols and steriod . while

*Penicillium sp.* had contained tannins, saponins and flavonoids but did not contain alkaloids , glycosides, Phenols and steriod . Meanwhile *Cladosporum sp.* had contained alkaloids, tannins and saponins , while it does not contain glycosides, flavonoids, Phenols and steroid . Meanwhile *Alternaria sp*. contained all active compounds except alkaloids , Phenols and steriod .

## المقدمة

الفطريات المستنبتة هي الميكروبات الموجودة في الأنسجة النباتية الحية دون أن تسبب أي ضرر واضح للمضيف النبات[1] . أوهي مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تنمو داخل أنسجة النباتات العليا دون أن تسبب أعراض على النباتات التي تعيش فيها ، وأثبتت أنها مصادر غنية من المنتجات الطبيعية النشطة بيولوجيا [2]، وقد تم تحديد الفطريات المستنبتة أول مرة من قبل العالم فريمان في عام 1904 حيث تم تم عزلها من نبات *Lolium persicum* [3] . وهي موجودة في جميع الأنواع النباتية تقريبا وقد تم الاعتراف بها باعتبارها مصدرا جديد للمركبات الدوائية [4] . وفي السنوات الاخيرة ازداد الاهتمام بدراسة الفطريات المستنبتة على نطاق واسع لقدرتها على إنتاج مواد ايضية ثانوية رائدة وفعالة لها فعاليات احيائية وانشطه بايلوجيه متعددة منها مضادات السرطان ومضاد للفطريات [5، 6، 7]، مضاد للجراثيم ، مضاد للفيروسات ، مواد مضادة للأكسدة ، مضاد السكري [8،9 ] ، كما وتلقت اهتماما كبيرا بعد أن تم العثورعليها لحماية المضيف ضد الحشرات والآفات و مسببات الأمراض عن طريق إفراز المركبات الثانوية النشطة بيولوجيا [10 ،11]. تشير بعض التقارير الى أن بعض الفطريات المستنبتة تنتج أكثر من اثني عشر مواد ايضية مماثلة لتلك التي تنتجها النباتات العائلة ، بما في ذلك القلويدات، الفلافونيدات، الصابونينات، الببتيدات، حوامض فينولية، وتربينات وغيرها من المركبات الفعالة والمنشطات [12،13،14].

الإنزيمات مواد عضوية ذات طبيعة بروتينية تصنعها الخلايا الحية لتقوم بدور الوسيط في التفاعلات الكيميائية الحيوية دون أن يطرأ عليها أي تغيير في أثناء التفاعل الكيميائي[15]، والفطريات المستنبتة تنتج انزيمات خارج خلوية كآلية مقاومة ضد الغزو المسبب للأمراض والحصول على التغذية من المضيف وتشمل هذه الانزيمات cellulases , lipases laccase و pectinases[16] ، ويعد Laccases من الانزيمات المهمة التي تشارك النبات في مقاومه الفطريات المرضية [17] . كما تدخل الانزيمات في العديد من المجالات الصناعية الكبيرة منها في تصنيع المنظفات ، المشروبات و المواد الغذائية والمنسوجات ، الأعلاف الحيوانية ، الخبز ، واللب والورق ، الجلود و المنتجات الكيماوية و الطبية الحيوية [18،19] .

لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى إيجاد مصادر جديدة للأنزيمات وذلك من خلال فحص الفطريات المستنبتة المعزولة من اوراق اليوكالبتوس على قابليتها على إنتاج عدد من الإنزيمات المهمة ولفهم دورها الوظيفي في النبات المضيف وكذلك بعض المركبات الثانوية أو المواد الكيميائية التي قد تكون مسؤولة عن الدور الوظيفية المتنوعة لهذا النبات.

## المواد وطرائق العمل

### عينات الفطريات المستنبتة :

تم الحصول على عزلات الفطريات المستنبتة من خلال تجارب سابقة لنفس الباحث ،حيث تم اخذ أوراق نبات اليوكالبتوس *Eucalyptus Camaldulensis* سليمة وغير مظهرة للأعراض المرضية من الحدائق العامة لمحافظة كربلاء ، جُمعت العينات في أكياس بلاستيكية نظيفة ونقلت إلى المختبر لغرض عزل الفطريات منها في يوم الجمع نفسه.

أتبعت طريقة[20 ] في ذلك إذ تم غسل عينات الأوراق والأغصان بكمية وافرة من ماء الحنفية لإزالة الأتربة والغبار ثم قطعت الأوراق إلى قطع صغيرة 0.5-1 سم بواسطة المقص وعقمت بالكحول الاثيلي 75% لمدة دقيقة واحدة، ثم غمرت بعد ذلك في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2.5 % لمدة 4 دقائق، بعدها عقمت بالكحول الأثيلي بتركيز 75% لمدة 30 ثانية، ثم غُسلت 3 مرات بالماء المقطر المعقم وجففت بواسطة أوراق ترشيح معقمة.

زُرعت القطع في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي دكستروز البطاطا الصلب Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمضاف له المضاد الحيوي كلورامفينكول Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/لتر قبل التصلب ، وزعت 5 قطع من أجزاء النبات لكل طبق بأبعاد متجانسة ،ثم وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 27 ±2 مْ ولمدة 7 ايام مع مراقبة نمو المستعمرات يومياً. نقيت المزارع الفطرية بنقلها على وسط PDA وتم تشخيص الفطريات بواسطة الاستخدام المباشر للمجهر الضوئي وعلى شرائح زجاجية باستعمال محلول اللاكتوفينول وبالاستعانة بالمفاتيح التصنيفية [21،22، 23 ].

**دراسة الفعالية الإنزيمية للأنواع المعزولة**

تم فحص الفعالية الانزيمية خارج الخلوية للعزلات النقية التابعة للفطريات المستنبتة وذلك على أوساط صلبة خاصة للتحري عن قدرتها لإنتاج هذه الانزيمات ، حيث تم اخذ لقاحة من المزارع النقية بواسطة ثاقب فليني 1 ملم ووضع القرص في مركز الاطباق الحاوية على الاوساط الزرعية الخاصة بالانزيمات وبواقع ثلاث مكررات لكل نوع فطري ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 27 ±2 مْ لمدة تراوحت ما بين (3-5) ايام، وبعد ذلك تم الكشف عن الانزيمات وكما يلي:-

**وسط انتاج انزيم الأمليز Amylase Product**

حضر الوسط من المواد التالية: -

كلوكوز Glucose 1غم،مستخلص الفطرYeast extract 0.1 غم، ببتون eptone 0.5 غم، اكار Agar18غم، ماء مقطر distilled water 1لتر، اذيبت المكونات في الماء المقطر ثم عقم الوسط وصب في اطباق بتري ، ويتم التحري عن قدرة الفطر على افراز انزيم الاملیز باستخدام كاشف ايوديد البوتاسيوم KI . حيث يضاف الكاشف للاطباق وترك لمدة 5 دقائق ثم يسكب ، ويتم التحري عن تكون هالة صفراء حول المستعمرة الفطرية للعزلة المنتجة لإنزيم الأميليز ويقاس نشاط العزلات في أنتاج الإنزيم بقياس عرض الهالة بوحدة المليمتر [16] .

**وسط انتاج إنزيم البروتيز Protease Product**

حضر الوسط من المواد التالية: -

$CaCl_2$ 0.1% ، $KH_2PO_4$ 0.7 % ، $K_2HPO_4$ 0.4% ، $MgSO_4.7H_2O$ 0.01% ، Glucose 1% و casein 1% ، تم تعقيم الوسط بدرجة 121°م وضغط 1 بار لمدة 15 دقيقة ماعدا وسط الحليب المقشود الذي عقم لمدة 5 دقائق ، يتم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج إنزيم البروتيز باستخدام كاشف محلول الكازائين (0.5 %) الذي حضر من اذابة 0.5 غم من الكازائين في 90 مل من محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 0.2M و سخن بدرجة 80°م لحين ذوبان الكازائين عدل الاس الهيدروجيني الى 6 بإضافة بضع قطرات من محلول NaOH بتركيز0.5M وأكمل الحجم إلى 100 مل . ثم كشف عن تحلل البروتين (الكازائين في الحليب ) عند ظهور هالة شفافة حول المستعمرات الفطرية [24].

**وسط انتاج انزيم اللاكيز Laccase Product**

حضر الوسط من المواد التالية: -

كلوكوز Glucose 1غم ،مستخلص الفطرYeast extract 0.1 غم ،ببتون Peptone 0.5 غم ،Agar 18غم، ماء مقطر distilled water1لتر،α-napthol 0.05 غم ، اذيبت المكونات في الماء المقطر ثم عقم الوسط وصب في اطباق بتري، ويتم التحري على انتاج الانزيم عن طريق تحول الوسط من عديم اللون إلى اللون الأزرق نظرا" لأكسدة 1 - napthol بواسطة انزيم اللاكيز[16] .

**وسط انتاج إنزيم اللايبيز Lipase Product**

حضر الوسط من المواد التالية: -

ببتون Peptone 10غم ، NaCl 5غم ،CaCl. 2H2O 0.1غم ، اكارAgar 18غم، ماء مقطرdistilled water 1لترو 20 tween 10 مل كمادة أساس . عقمت مادةTween20 بصورة منفصلة وبنفس طريقة تعقيم الأوساط الزرعية وبردت ثم أضيفت إلى بقية مدونات الوسط المعقم بمقدار 1 مل لكل 100مل وسط زرعي يتم التحري عن قدرة الفطر على أنتاج إنزيم اللايبيز من خلال تكون راسب ابيض تحت المستعمرة
أو بلورات بيضاء تحيط بالمستعمرة [16].

**تحضير الرواشح الخام للفطريات**

حضرت الرواشح الخام للفطريات من خلال تهيئة دوارق زجاجية سعة 250 مل يحوي كل منها على 100 مل من الوسط الغذائي السائل Potato Dextrose Broth ، لقح كل دورق بقرص قطر 5 سم من حافة مستعمرة الفطريات النامية بعمر 5 ايام في الوسط الغذائي PDA . حضنت الدوارق بدرجة حرارة 27 ± 2 °م لمدة 21 يوم مع مراعاة رج الدوارق يوميا". و بعد انتهاء مدة الحضن فصل الغزل الفطري باستخدام اوراق الترشيح Whatman No. 1 و بعد ذلك تم امرار راشح كل فطر على حدة من خلال مرشح الـ Millipore (0. 45 مايكروميتر) مجهزة من شركة Sartorius Stedim Biotech - Germany ، بعدها وضعت رواشح الفطريات في قمع الفصل كل منها على حدة و اضيف اليه محلول خلات الاثيل بحجم مساوي لحجم الراشح (1: 1) ثم رج قمع الفصل جيدا لحين تكون طبقتين ، بعدها جمع المستخلص المتبقي (الطبقة السفلى) وجفف بدرجةحرارة 40 °م باستعمال حمام مائي لغرض الحصول على حجم 5 مل من الحجم الاصلي للمستخلص ثم حفظ المستخلص في اوعية زجاجية محكمة الاغلاق نظيفة و معقمة و مغلفة بطبقة من الالمنيوم ثم وضعت في الثلاجة لحين الاستعمال [25] .

**الكشف عن بعض المجاميع الفعالة للمستخلصات الفطرية**

اجريت مجموعة من الكشوفات النوعية و ذلك للتعرف على المكونات الكيميائية الاساسية او المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات ، إذ تم الكشف عن وجود القلويدات ، التانينات ، الصابونينات ، الكلايكوسيدات ، الفلافونيدات ، الكاربوهيدرات ، الفينولات وكالآتي :

**أ. الكشف عن القلويدات Alkaloids**

تم الكشف عن القلويدات عن طريق استخدام كاشف واكنر Wagner reagent ، حيث حضر هذا الكاشف بإذابة 1.3 غم من اليود مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر، ثم اضيف اليه المستخلص النباتي فاذا تكون راسب بني دل ذلك على وجود القلويدات [26 ] .

**ب. الكشف عن التانينات Tannins**

تم الكشف عن التانينات وذلك باستخدام كشف خلات الرصاص Lead Acetate Test ، وحضر المحلول بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر ، ثم اضيفت عدة قطرات منه الى انبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص الفطري . ان تكون راسب ابيض هلامي القوام يدل على وجود التانينات [27 ] .

**ج. الكشف عن الصابونينات Saponins**

تم تحضير محلول مائي من المستخلصات الجافة للفطريات و وضعت في انبوبة اختبار و رجت بشدة ، ان تكون رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة دليل على وجود الصابونينات [26 ] .

**د. الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides**

تم الكشف عن وجود الكلايكوسيدات باستخدام كاشف موليش Molish Reagent الذي حضر استنادا الى ما ذكره [28] من خلال اخذ 2 مل من المستخلص المراد اختباره و اضيفت اليه قطرتان من محلول α-naphthol ورج المحلول جيدا ، ثم مسكت الانبوبة بشكل مائل واضيفت 2 مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات على جدار الانبوبة لحين ظهور طبقتين و طبقة بنفسجية اللون تفصل بين الطبقتين دليل على وجود المواد الكلايكوسيدية .

**ه . الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids**

اذيب 1 مل من المستخلص في 1 مل من حامض الكبريتيك المركز ، فظهور اللون الاصفر الداكن دليل على ان الكشف ايجابي[29] .

**و. الكشف عن الفينولات Phenols**

تم استخدام كاشف كلوريد الحديديك Ferric Chloride Reagent ، وحضر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 100 مل من الماء المقطر ، رطبت ورقة ترشيح بالراشح الفطري ، ثم اضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك و تم تعريض الورقة الى بخار الامونيا ، ان ظهور اللون الازرق دليل على وجود الفينولات [30 ].

**ز. الكشف عن الستروييد Steroids**

تم اخذ 1مل من المستخلص المراد اختباره واضيفت اليه 3 قطرات من محلول acetic anhydride وقطرة واحدة من حامض الكبريتيك المركز. فان ظهور اللون البني دليل على ان الكشف ايجابي [31] .

## النتائج والمناقشة

اوضحت نتائج عزل وتشخيص الفطريات المستنبتة من اوراق نبات اليوكالبتوس الحصول على العزلات التالية *Penicillium sp.* ، *A. niger* ، *A. flavus* ، *Alternaria sp.* ، *Cladosporium sp.*

**الكشف عن قابلية الفطريات المستنبتة على افراز انزيم Amylase**

اظهرت نتائج الاختبار في الجدول(1)، قدرة عزلات الفطريات المستنبتة على افراز هذا الانزيم ولكن بنشاطات متفاوته والموضحة بالشكل (1)، وبعد حساب قطر المستعمرة وجد ان عزلة الفطر*A. niger* كانت شديدة الفعالية اذ كان قطر الهالة الشفافة 60 ملم ، تلاها عزلة الفطر*Cladosporium sp.* حيث تراوح قطر الهالة الشفافة 32 ملم ، اما بقية العزلات*A. flavus* ، *Penicillium sp.* و*Alternaria sp.* فان جميعها كانت فعالة حيث كان قطر الهالة الشفافة 30،،25 و22 ملم على التوالي . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه [32 ] حيث وجد ان جميع العزلات الفطرية المعزولة من اوراق نبات *Lantana camara* Linn. تمتلك قابلية عالية على انتاج انزيم الاميليز ، وكذلك تتفق مع ما ذكر [33] في أن كل الفطريات المستنبتة قادرة على تحليل النشا كما اشارالى ان انزيم الاميليز تستخدمه الفطريات كمصدر للطاقة ، لذلك فعند تنمية الفطريات المستنبتة يجب توفر النشا في الوسط كمصدر من مصادر الطاقة .

**الكشف عن قابلية الفطريات المستنبتة على افراز انزيم Protease.**

أظهرت نتائج اختبار فعالية الفطريات المستنبتة في تحلل البروتين على وسط أكار – الحليب المقشود ،ان جميعها كانت فعالة حيث كان قطر الهالة الشفافة اكبر من 15 ملم مما يدل على انها شديدة الفعالية الشكل (2) . وبعد حساب قطر المستعمرة وجد ان عزلات *A. flavus* ، *A. niger* و *Penicillium sp.* لها قابلية عالية على انتاج هذا الانزيم حيث تراوح قطر المستعمرة 67، 55و43 ملم على التوالي ، في حين عزلات *Alternaria sp.* و*Cladosporium sp.* فكانت هي الاخرى قادرة على افراز هذا الانزيم ولكن بكفاءة أقل حيث تراوح قطر المستعمرة 27 و25 ملم على التوالي الجدول (1) . هذه النتيجة تتفق مع ما أشار(34) اذ

وجدوا أن كل عزلات الفطريات المستنبته المعزولة من مجموعة من النباتات الطبية قادرة على افراز انزيم البروتيز، كما وجد [35] ان الفطريات المستنبته المعزوله من نبات *Ocimum sanctum* تنتج انزيم البروتيز والذي يستخدم في التطبيقات السريرية خاصة في العلاجات مثل مرض السكري.

**الكشف عن قابلية الفطريات المستنبتة على افراز انزيم Laccase** .

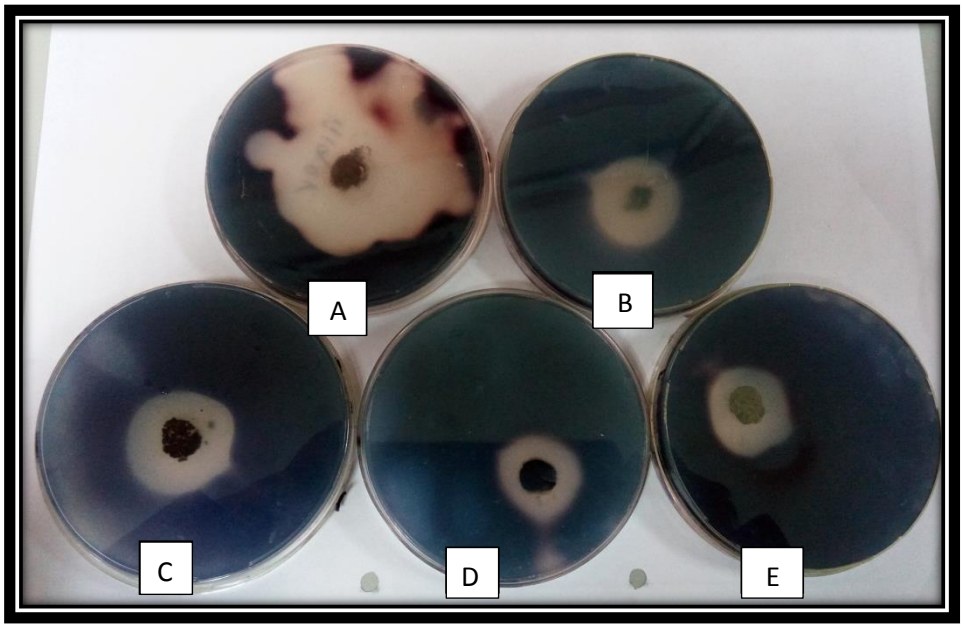
أوضحت النتائج المبينة في الجدول (1) عدم قدرة الفطريات المستنبتة على انتاج هذا الانزيم الشكل (3) ، تتفق نتائج هذه الدراسة مع [16] و[36] بان عدد قليل جدا" من الفطريات المستنبتة قادرة على انتاج انزيم اللاكيز ، وان انتاج انزيم اللاكيز يتم عن طريق الفطريات النامية في خشب الجذورمثل *Trametes versicolor* ، *T.villosa* وغيرها و هي المسؤولة عن إزالة الفينول السام من الوسط الذي نمت فيه هذه الفطريات تحت الظروف العادية [37] .

**الكشف عن قابلية الفطريات المستنبتة على افراز انزيم Lipase**

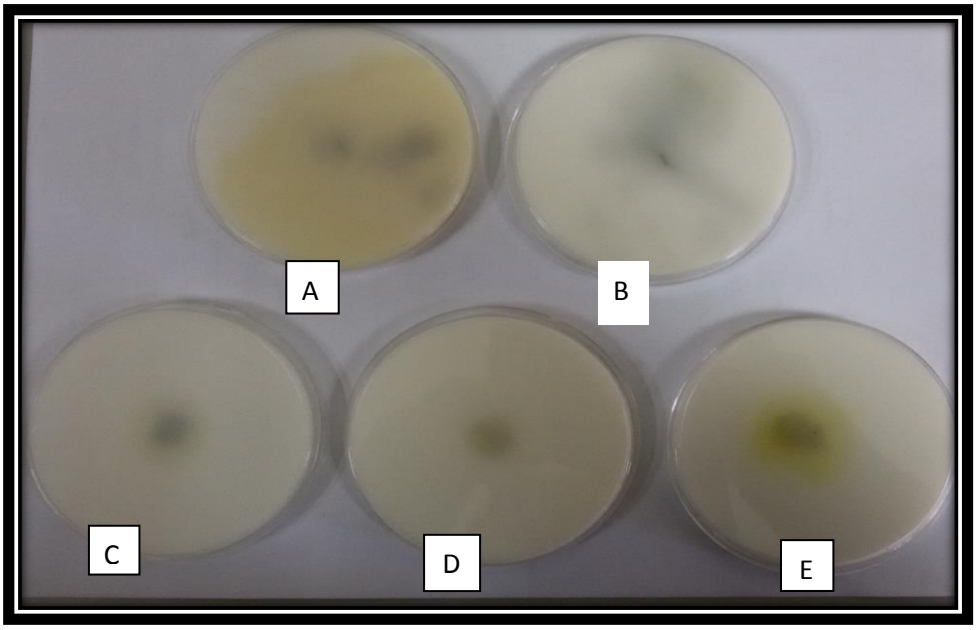
أوضحت النتائج المبينة في الجدول (1) والشكل (4) عدم قدرة جميع الفطريات المستنبتة على انتاج انزيم اللايبيزفقط عزلات *A. flavus* ، *A. niger* و *Penicillium sp.* كانت لها قابلية عالية على انتاج هذا الانزيم حيث كان الكشف موجبا" وذلك من خلال ظهور بلورات بيضاء تحيط بالمستعمرة ، في حين عزلات*Alternaria sp.* و*Cladosporium sp.* فكانت غير منتجة لانزيم اللايبيز ربما يعود السبب أحيانا الى قصر مدة الحضانة حيث ان بعض الفطريات تحتاج مدة 41 يوم على الأقل لتعطي كشفا" موجبا" للدهون[38] .

جدول(1) فعالية الفطريات المستنبتة في انتاج الانزيمات خارج الخلوية

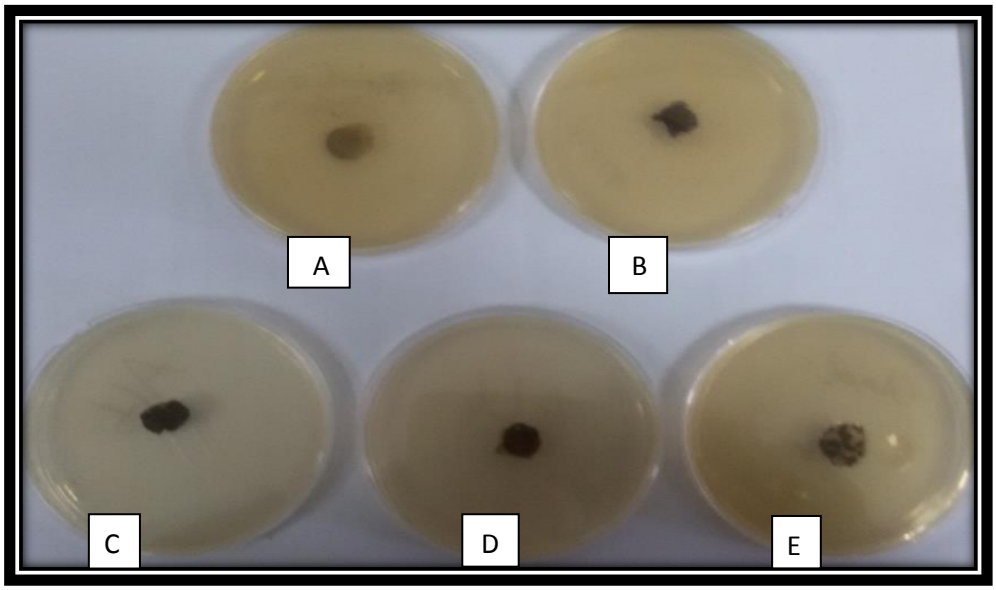
| العزلات الفطرية | انزيم الاميليز | | إنزيم البروتيز | | انزيم اللاكيز | | انزيم اللايبيز |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | فعالية الانزيم | قطر الهالة الشفافة (mm) | فعالية الانزيم | قطر الهالة الشفافة (mm) | فعالية الانزيم | قطر الهالة الشفافة (mm) | فعالية الانزيم |
| *Penicillium sp.* | + | 25 | + | 43 | - | 0 | + |
| *A. niger* | + | 60 | + | 55 | - | 0 | + |
| *A. flavus* | + | 30 | + | 67 | - | 0 | + |
| *Alternaria sp.* | + | 22 | + | 27 | - | 0 | - |
| *Cladosporium sp.* | + | 32 | + | 25 | - | 0 | - |



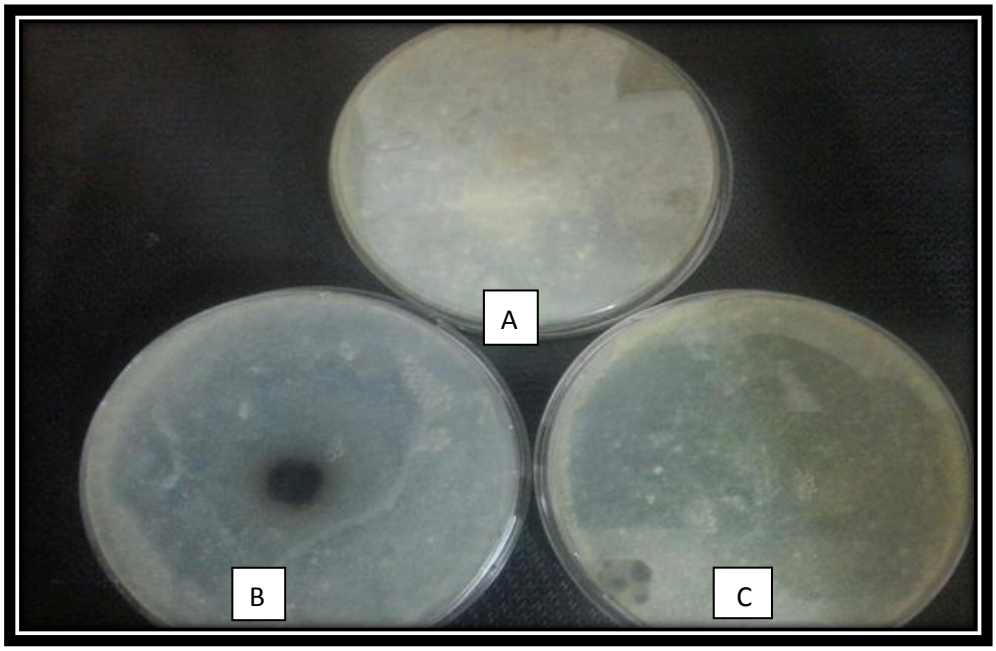

شكل(1) فعالية انزيم الاملیز للعزلات الفطرية
A- *Aspergillus flavus* B- *Aspergillus niger* C- *Alternaria sp.*
D- *Cladosporium sp.* E- *Penicillium sp.*




شكل(2) فعالية انزيم البروتيز للعزلات الفطرية
A- *Aspergillus flavus* B- *Aspergillus niger* C- *Alternaria sp.*
D- *Cladosporium sp.* E- *Penicillium sp.*




شكل(3) فعالية انزيم اللاكيز للعزلات الفطرية
A- *Aspergillus flavus* B- *Aspergillus niger* C- *Alternaria sp.*
D- *Cladosporium sp.* E- *Penicillium sp.*




شكل(4) فعالية انزيم اللاييز للعزلات الفطرية المنتجة
A- *Aspergillus flavus* B- *Aspergillus niger* C- *Penicillium sp.*

**المجاميع الفعالة للرواشح الفطرية**

في ضوء نتائج الدراسة الحالية عن الفعالية التثبيطية للمستخلصات الفطرية باستخدام خلات الاثيل للفطريات المشمولة بالدراسة فقد جرى التحري عن محتواها من المركبات الفعالة باستعمال بعض الكواشف الكيميائية المختلفة ، اذ اظهرت الكشوفات الكيميائية ان الفطريات المدروسة تحتوي عددا من المكونات الفعالة كما في الجدول (2) ، إذ احتوى مستخلص الفطر *A. niger* على القلويدات و التانينات و الصابونينات والكلايكوسيدات و الفلافونيدات والفينولات والستروويد ، اما مستخلص الفطر *A. flavus* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ما عدا والكلايكوسيدات والفينولات والستروويد ،

في حين ان مستخلص الفطر*Penicillium sp.* احتوى على التانينات والصابونينات و الفلافونيدات و لم يحتوي على القلويدات والكلايكوسيدات والفينولات والستروويد، و احتوى مستخلص الفطر *Cladosporum* على القلويدات و التانينات و الصابونينات مع عدم وجود الكلايكوسيدات و الفلافونيدات والفينولات والستروويد، اما مستخلص الفطر*Alternaria* فقد احتوى على جميع المكونات الفعالة ما عدا القلويدات والفينولات والستروويد ، تتفق نتائج هذه الدراسة مع عدد من الدراسات التي تشير بان الفطريات المستنبتة تحتوي على العديد من المركبات الكيميائية منها الصابونينات والتانينات والستروويد[39]،مركبات الفينولات (40) ، القلويدات والفلافونيدات والستروويد [41] .واشارت دراسة [42] إن احتواء الفطريات المستنبتة على المركبات الكيميائية يدل على قدرتها على توفير نشاط مضادات للميكروبات .

الجدول (2) نتائج الكشوفات الكيميائية للمستخلصات الفطرية

| *Alternaria Sp.* | *Cladosporum Sp.* | *Penicillium sp.* | *A . flavus* | *A . Niger* | الكشوفات النوعية |
|---|---|---|---|---|---|
| - | + | - | + | + | الكشف عن القلويدات |
| + | + | + | + | + | الكشف عن التانينات |
| + | + | + | + | + | الكشف عن الصابونينات |
| + | - | - | _ | + | الكشف عن الكلايكوسيدات |
| + | _ | + | + | + | الكشف عن الفلافونيدات |
| _ | _ | _ | _ | + | الكشف عن الفينولات |
| _ | _ | _ | _ | + | الستروويد |

**المصادر**


1- Petrini, O., in: Andrews, J.H., Hiran S.S., (Eds.).(1991). Microbial Ecology of Leaves, Springer Verlag, New York, USA.
2- Stone JK;Bacon CWand White JF. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds.), Microbial endophytes, Marcel Dekker Inc., New York, 3-29.
3- Bacon, C.W., and White, J.F. (2000) . Microbial endophytes. Marcel Decker, Inc., New York.
4- Tan, R. X. and Zou, W. X. .(2001). " Endophytes: a rich source of functional metabolites", *Nat. Prod. Rep*, Vol. 18, pp. 448-459.
5- Geris dos Santos RM; Rodrigues-Fo E; Rocha WCand Teixeira MFS. (2003) . Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J Microbiol Biotechnol.*,19: 767–770.
6- Ding G; Liu SC; Guo LD; Zhou YG and Che YS.(2007). Antifungal Metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. *J Nat Prod.*, 23: 1–4.
7- Wu B; Wu LC; Ruan LG; Ge M and Chen DJ. (2009).Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPCC 480097. *Curr Microbiol.* 8344-8345.
8- Sanchez Marquez, S.; Bills, G. F. and Zabalgogeazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Divers., 27: 171-195.
9- Suryanarayanan, T. S.; Venkatachalam, A.; Thirunavukkarasu, N.; Ravishankar, J. P.; Doble, M. and Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macroalgae from the *Tamilnadu coasti*: distribution, diversity and biotechnological. Botanica Marina, 53: 457-468.
10- Weber J. (1981). "A natural control of Dutch elm disease," *Nature*, London, Vol . 292, pp. 449-451.
11- Malinowski D P and D P Belesky. (2006) . "Ecological importance of *Neotyphodium* spp. Grass endophytes in agroecosystems", *Grassland Science*, Vol. 52, No .1, pp. 23-28.
12 - Strobel, G. and B. Daisy.( 2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology, 67 (4): 491–502.
13-- Li, H.-Y. and L. Liu. (2004). Recent advances on bioactive compounds producing endophytes. Nat. Prod. Res. Dev. 16: 482-485.
14- Wang, L.-J.; X.-S. Yang and X.-S. He..( 2007). Screening of antibacterial strains from endophytic fungi in ginkgo leaves. Sichuan Food Ferment. 4: 34-36. [in Chinese with English abstract]
15- Schallmey, M.; A. Singh and O. Wared. (2004). Developments in the use of Bacillus Species for Industrial Production. Canadian Journal of Microbiology, 50 : 1- 1.
16- Sunitha,V.H.,D.Nirmala Devi and C.Srinivas .(2013).Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. World Journal of Agricultural Sciences 9 (1) 01-09.
17- Higuchi T.(2004). Microbial degradation of lignin, role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. Proceedings of Japan Academy. B80: 204–214.
18- Bennett, J.W.(1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. J. Biotechnol., 66, 101-107.
19- Dekker, M.(2003). *Handbook of Fungal Biotechnology*. Dilip K. Arora ed., 2New York, 600p.
20- Chhetri, B. K.; Maharjan, S. and Budhathoki, U. (2013). Endophytic fungi associated with twigs of *Buddle asiaticalour*. J. Sci. Engin. and Technol., 9(1): 90-95.
21- Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycites Kew: Common wealth mycological institute: 608.
22- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi: 3rd edition, Burgess Publishing Company: 273.
23- Raper , K.B. and Fennell , D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams and Wiking Co. , Battimor. 686 pp.
24- Bilinsk, E.A. (1987). Proteinases and beer production. Appl. Environ. Microbiol., 53: 495-499.

25-Radji M, Sumiati A, Rachmayani R, Elya B. (2011). Isolation of fungal endophytes from Garcinia mangostana and their antibacterial activity. Afric J. Biotech 1: 103-107.
26- Harbone JB,.( 1994). Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third edition. Chapman and Hall. London. 150 p.
27- Ahmed,M. ; Nazil,S. and Anwar,M. (1989) . Studies on tannins from bark of *Pinus roxburghii* . J. Chem. Soc. Pakistan ., 11 : 213 – 217 .
28- Sheikly, M. A., Abdeljalil F. H.and Azzawi, H. F. (1993). Practical Life Chemistry, Mustansiriya University.
29- Al-Khazragi, S. M.(1991). Biopharmacological study of *Artemisia herbaalba*. M. Sc. Thesis. Baghdad University.
30- Adedayo, O. ; Anderson, W. ; Young, M. ; Sncickus, V. ; Patil, P. and Kolawole, D.(2001). Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower. *Pharacut. Biol*. 39:1-5.
31-Bandoni AL, Mendiondo ME, Rondina RVD, Coussio JD. (1976). Survey of Argentine medicinal plants, folklore and Phytochemical screening II. Econ. Bot., 30: 161-185.
32- Sanjeeb K, Gaurav K, Loganathan K, Kokati V. and Bhaskara R.(2013).A review on medicinal properties of *Lantana camara* Linn. Research J. Pharm. and Tech. 5(6):711-715.
33- Jayasinghe C and Wettasinghe J. (1998). Cultural characteristics and reproductive morphology of Geotrichum sp.: A guide to distinguish Geotrichum from *Rigidoporus microporus*. Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka. 81, 23-28.
34- Mohini. G. Patil, Jyoti. Pagare, Sucheta. N. Patil And Amanpreet. K. Sidhu.(2015). Extracellular Enzymatic Activities of Endophytic Fungi Isolated from Various Medicinal Plants. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* .4(3): 1035-1042.
35- Pavithra.N,L.Sathish,K.Ananda. (2012). Antimicrobial and Enzyme Activity of Endophytic Fungi Isolated from Tulsi. Journal of Pharmaceutical And Biomedical Sciences,16(12).
36- Panuthai T, Sihanonth P, Piapukiew J, Sooksai S, Sangvanich P.(2012).Karnchanatat, African Journal of Microbiology Research. 6.(11): 2622-2638.
37- Pragathi D, Vijaya T, MouliK C, Anitha D.(2013). Diversity of fungal endophytes and their bioactive metabolites from endemic plants of Tirumala hills- Seshachalam biosphere reserve. African Journal of Biotechnology. 12 (27): 4317-4323.
38- Abdel-Raheem, A. & Shearer, C.A.(2002). Extacellular enzyme production by fresh water ascomycetes. Fungal Diversity, 11:1-19 .
39- Khanna VG, Kannabiran K. (2008). Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*.World J. Microbiol. Biotechnol., 24(11): 2737-2740.
40- Pelczar MJ, Chan, ECS, Krieg NR. (1988). Control of microorganisms,the control of microorganisms by physical agents. Microbiology, 469: 509.
41-Kamarian R, Ghasemlou F. (2013). Screening of total phenol and flavonoid content, antioxidant and antibacterial activities of the methanolic extracts of three Silene species from Iran. Inter J. Agric.and Crop Sci. 5: 305-312.
42- Bhardwaj A, Sharma D, Jodan N, Agrawal PK.(2015). Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus rouxburghii*. Arch Clin Microbiol. 6(3):1-9.