التأثير التطفيري للكابتان والتولكلوفوس–مثيل في فطر *Trichoderma viride* وإنتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة

رغد نبهان العزو و رياض خليل البرهاوي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، جمهورية العراق

(تاريخ الاستلام: / /٢٠٠٧ ، تاريخ القبول: / / ٢٠٠٧)

الملخص

اجري البحث بهدف الحصول على عزلة فطرية كفوءة في انتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة بوساطة عزلة محلية من فطر *Trichoderma viride* بفعل التأثير التطفيري لمبيدي الفطريات الكابتان والتولكلوفوس–مثيل .

لم يحصل على عزلة طافرة بفعل مبيد الكابتان بسبب تأثيره القاتل بكافة تراكيزه ولجميع تراكيز العالق البوغي المستخدمة ، في حين لوحظ ان لمبيد التولكلوفوس–مثيل تأثيراً تطفيرياً واضحاً على عزلة الفطر الأبوية وبالتركيز ٢,٥ ملغم مادة فعالة / مل وسط قياسي ، والتي ابدت فيه العزلة الابوية تغيرات مورفولوجية واضحة شملت تبدلات في كل من شكل المستعمرة ولونها وقابليتها على النمو وانتاج الابواغ فضلاً عن التغيرات الدقيقة للغزول الفطرية .

تم اجراء اختبار نوعي لمعرفة كفاءة العزلة الجديدة الطافرة في انتاج انزيم السليوليز في الاوساط الصلبة، كما اجري اختبار كمي بأستخدام الاوساط السائلة لتحديد كفاءة العزلة في انتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة اذ حققت فعالية نوعية لانزيم السليوليز قدّرت بـ (٧,١٥٨) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين ونسبة ٣٧,٦٨٩% بروتين في الوزن الجاف .

المقدمة

يعد فطر *Trichoderma viride* اكثر انواع جنس *Trichoderma* اهمية في انتاج انزيم السليوليز Cellulase مما يعطيه كفاءة القدرة على تحليل السليلوز الذي يعد أكثر البوليمرات الحيوية Biopolymers توفراً وتجدداً ، وهو من أهم مخزونات الطاقة على سطح الكرة الأرضية [١٣،٨] ، اذ ان الاستغلال لهذه المركبات السليلوزية عن طريق العمليات البايولوجية سيكون مفتاحاً مهماً للقضاء على نقص الغذاء والوقود في المستقبل القريب بسبب الزيادة في الكثافة السكانية [١٩،٢٦] ، لذلك يعد التحلل الأنزيمي للسليلوز واحداً من أكثر التطورات المثيرة في هندسة الأنزيمات [٣٦] .

وقد كان هدف العديد من الباحثين تطوير إنتاج السليوليز بوساطة عزلات من الفطر *T.viride* وذلك بثلاث طرائق للحصول على إنتاج عال منه وهي اختيار السلالة الجيدة ومطفراتها والظروف المثلى لعمل السلالة والسيطرة على ظروف التخمر لإنتاج الأنزيم [٣١] . وقد تم استخدام برامج التطفير الوراثي في التقنيات الحيوية Biotechnology لكونها الطريق الرئيس في الحصول على سلالات ذات إنتاجية عالية . فقد حققت عملية التطفير الوراثي زيادة في إنتاج الأنزيمات والمضادات الحيوية والأحماض العضوية لأنواع الأجناس *Trichoderma* و *Cephalosporium* و *Aspergillus* و *Penicillium* ، فضلاً عن زيادة في إنتاجية الأحياء المجهرية الصناعية الحديثة الأخرى [١٣،١٤،٥] . لذا احتلت الطفرة الوراثية أهمية خاصة كونها المصدر الاساسي لجميع التغيرات الوراثية والتي تحدث في الجينات Genoms نتيجة عوامل مختلفة مؤثرة في جزيئة الـ DNA وفي تتابع القواعد النيتروجينية ، وقد تصل هذه التغيرات الى مناطق كبيرة من كروموسوم الفطر[٢٠،٣] .

وتكون المطفرات الكيميائية أكثر أهميةً من الاشعاع من حيث تأثيرها واحداثها للخلل الوراثي Inherited defect [٩] ، إذ تمتلك بعض المواد الكيميائية نزعة شديدة لتوليد الطفرات وذلك لقدرتها على إحداث تغيرات دائمية في جزيئة الـ DNA خلال تفاعلها مع القواعد النيتروجينية ، إذ ينصب تأثيرها على تحويل قاعدة نيتروجينية الى قاعدة أخرى أو تحوير صفات الارتباط التي تمتازبها القواعد النيروجينية على نحو يتسبب في تغيير قوى الارتباط لقاعدة أخرى [٢٥] . لذا يهدف البحث الى الحصول على عزلة طافرة بفعل تأثير مبيدي الفطريات الكابتان والتولكلوفوس–مثيل ومقارنتها مع عزلة الفطر الابوية *T. viride* من حيث قابليتها على النمو وانتاج انزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة .

المواد وطرائق البحث

١ – الفطر المستخدم

أجريت جميع التجارب باستخدام عزلة محلية من فطر *Trichoderma viride* والتي تم الحصول عليها من الدكتور نديم احمد رمضان في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل .

٢ – الأوساط الزرعية

أ. وسط مستخلص البطاطا والسكروز والاكار Potato Sucrose Agar

كان الغرض من استخدام هذا الوسط حفظ الفطر وتنشيطه ، وقد حضر من مستخلص ٢٠٠غم من البطاطا و٢٠غم من السكروز و٢٠غم من الأكار ثم اكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر ، وبعد تحضيره ضبط الأس الهيدروجيني عند 6.0، وعقم بوساطة جهاز المعقام Autoclave من شركة Gallenkamp الإنكليزية عند الضغط 1 كغم / سم^2 ودرجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة وظروف التعقيم هذه كانت هي نفسها لجميع التجارب التي اجريت في هذا البحث [١] .

ب. الوسط القياسي Standard medium

أجريت جميع التجارب باستخدام هذا الوسط ، والذي تركب من المكونات التالية (غم / لتر ماء مقطر) : فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين ٢,٠ و كبريتات الامونيوم ١,٤ وكلوريد الكالسيوم ٠,٣ وكبريتات المغنيسيوم المائية ٠,٣ وكبريتات النحاس المائية ٠,٠٠٥ وكبريتات الخارصين المائية ٠,٠٠١٤ وكبريتات المنغنيز المائية ٠,٠٠١٦ وكلوريد الكوبلت ٠,٠٠٢ وبنتون ٠,٧٥ وأكار ٢٠ ويوريا ٠,٣ ، وبعد تحضيره تم ضبط الأس الهيدروجيني عند 5.5 ، وعقم الوسط وبعد ذلك أضيفت اليوريا

[٢٣] وكانت الغاية من استخدام هذا الوسط لأغراض التفريق فضلا عن ملاحظة التغيرات المورفولوجية للمستعمرات والفحص المجهري .

٣- اختبار نقاوة المزرعة

قبل البدء بكل تجربة ، تم اختبار نقاوة المزرعة وخلوها من الكائنات الملوثة الأخرى بملاحظة نمو الفطر على الوسط الزرعي القياسي وإجراء فحص مجهري اعتمادا على الشكل الظاهري للفطر .

٤- ضبط وقياس الأس الهيدروجيني

ضبط الأس الهيدروجيني لجميع أنواع الأوساط الزرعية التي استخدمت في هذا البحث عند تحضير الوسط أي الأس الهيدروجيني الأولي Initial pH ، أو قياس الأس الهيدروجيني النهائي في نهاية التجربة Final pH بوساطة جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH – meter من نوع Hanna Instruments, USA . وتم ضبط الجهاز باستخدام محلولي التنظيم ذوي الأس الهيدروجيني القياسي 4 و 7 ، واستخدم محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 ع وحامض الهيدروكلوريك 1 ع لضبط الأس الهيدروجيني المطلوب .

٥- تحضير العالق البوغي

حضر العالق البوغي تحت ظروف معقمة بإضافة 10 مل من الماء المقطر الى المزرعة الفطرية النامية في قنينة زجاجية حاوية على الوسط الزرعي القياسي ، بعدها تم رج القنينة الزجاجية للحصول على الابواغ ، ثم رشح العالق الناتج من خلال قطعة شاش وجمع الراشح في دورق ، ثم أجري التخفيف المطلوب للوصول الى تركيز العالق البوغي 7×10^4 بوغ / مل الذي استخدم في جميع التجارب بالأستعانة بشريحة عد الخلايا Haemocytometer . ويمثل هذا الراشح العالق البوغي غير المخفف أو ما يعبر عنه بالعالق ذي التركيز ١٠^٠ [٣٤،٣٥] ومن هذا العالق تم تحضير عدة تراكيز متسلسلة (10^1 و١٠^٢ و١٠^٣ و١٠^٤ و١٠^٥) لتعطي عدداً مناسباً من المستعمرات بحيث يمكن عدها دون لبس ، وتم حساب عدد المستعمرات النامية في كل طبق وفي ضوء ذلك استخرجت النسبة المئوية للقتل.

٦- المبيد الفطري الكابتان Captan (CAP)

استخدم المبيد الفطري Captan (Orthocide) المجهز من قبل شركة فابكو الاردنية Vapco / Jordan والحاوي على المادة الفعالة Captan وبتركيز 50 % وذلك للحصول على طافرات جينية امامية مقاومة للفطر *T.viride*. وحضر محلول خزين متجانس للمبيد وغلف بورق الالمنيوم للحفاظ عليه بعيدا عن الضوء واستخدم آنياً ، بعدها نقلت حجوم مختلفة منه الى أطباق بتري معقمة للحصول على 20 مل من الوسط الزرعي القياسي وبالتالي تم الحصول على التراكيز (0.025 و0.05 و0.1 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 و0.75 و1.0 و1.25 و1.5 و2.0 و2.5) ملغم مادة فعالة/ مل وسط قياسي ، وبعد تصلبه تم عمل عدة تراكيز متدرجة من العالق البوغي (١٠^١ و10^2 و١٠^٣ و10^4 و١٠^٥) لحين الوصول الى التركيز الذي يعطي أقل عدد من المستعمرات على الوسط الزرعي القياسي من دون تداخل نموها وبوساطة ماصة معقمة تم أخذ 0.1 مل منه وتم نشره على سطح الوسط القياسي بصورة متجانسة ، كما لقحت أطباق حاوية على نفس الكمية من الوسط القياسي عدا خلوه من المبيد كمعاملة مقارنة وبمعدل ثلاث مكررات للمعاملة ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة28 ± 1 مْ ولمدة 5 ايام للحصول على مستعمرات منفردة بحيث يمكن عدها دون لبس [٤] .

٧- المبيد الفطري التولكلوفوس – مثيل Tolclofos-methyl (TOL)

استخدم المبيد الفطري Tolclofos-methyl(Rizolex) المجهز من قبل شركة Sumitomo Chemical/Japan والحاوي على المادة الفعالة Tolclofos-methyl وبتركيز 50 % ، وحضر محلول خزين للمبيد وغلف بورق الالمنيوم ، بعدها تم نقل حجوم مختلفة من المحلول الخزين الى أطباق بتري معقمة للحصول على 20 مل من الوسط الزرعي القياسي وبالتالي تم الحصول على التراكيز (2.5 و5.0 و7.5 و10.0 و12.5) ملغم / مل وسط قياسي ، بعدها اتبعت نفس الخطوات المذكورة سابقا .

٨- أقلمة العزلة الطافرة

تمت أقلمة العزلة الطافرة الناتجة من الفطر *T.viride* وذلك بنشر العالق البوغي لهذه العزلة في أطباق بتري تحتوي على الوسط الزرعي القياسي الحاوي على نفس التركيز المؤثر من المبيد الذي ظهر به التأثير المطفر وكررت العملية خمس مرات وبفترة تحضين 5 ايام لكل مرة وعند درجة حرارة 28 ± 1 مْ [٤] المحورة .

٩- استقرارية العزلة الطافرة

لغرض معرفة مدى ثبات الصفة المستحدثة في العزلة الطافرة الناتجة من الفطر *T.viride* ؛ نشر العالق البوغي لهذه العزلة في الوسط الزرعي القياسي الخالي من المبيد وكررت العملية خمس مرات وبفترة تحضين 5 ايام لكل مرة وعند درجة حرارة 28 ± 1 مْ .

١٠-تشخيص التغيرات الحاصلة للعزلة الطافرة

شخصت التغيرات المورفولوجية التي طرأت على الفطر جراء استخدام مبيد التولكلوفوس–مثيل وذلك باستخدام طريقة Slide Culture Technique [٧] وأكد التشخيص من قبل الدكتور نديم احمد رمضان . وقد تم احتساب دقة الصور Resolution الماخوذة بوساطة الكاميرا الالكترونية نوع Mercury وذلك بمعالجتها ببرنامج S–spline من شركة Shortcut والحصول على الدقة محسوبة بـ Pixel .

١١- تسمية العزلة الطافرة

سميت العزلة الطافرة وذلك بإعطاءها رمزاً أولياً يتكون من الحروف الإنكليزية الثلاثة الأولى الكبيرة من اسم الصفة التي تدل عليها وهي المقاومة للمبيد المستخدم ثم اتبعت بالتركيز ذات التاثير التطفيري ضمن الجدول ذات العلاقة.

١٢- دراسة النشاط الأنزيمي

أجري اختبار نوعي Qualitative test باستخدام أوساط الزرع الصلبة الخاصة للكشف عن كفاءة عزلة الفطر الطافرة الناتجة من الفطر *T.viride* في إنتاج أنزيم السليوليز Cellulase ، وقد تم باعتماد الطرقتين الآتيتين :

١.الكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز باستخدام كاشف يود – حامض الهيدروكلوريك HCl-Iodin

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل [٣٧] لتحضير الوسط الزرعي الخاص بهذا الاختبار ، والذي تكون من المواد التالية (غم / لتر) : كبريتات

الامونيـوم ١,٤ وفوسـفات البوتاسـيوم ثنـائي الهيـدروجين ٢,٠ وفوسـفات المغنيسيوم المائيـة ٠,٣ وكلوريـد الكالسيوم المـائي ٠,٣ وملـح الصـوديوم لكاربوكسي مثيل السليلوز Carboxy Methyl Cellulose- Na salt (CMC-Na) ١٠ وبتـون ١,٠ وبوريـا ٠,٣ واكـار ٢٠ . فقد تمـت إذابـة الملح CMC-Na باستخدام محرك مغناطيسي Magnetic stirrer مع رفـع درجـة حرارة المـزيج ثم اضـيفت بقيـة المكونـات تـدريجياً مـع التحريـك المستمر وضـبط الأس الهيـدروجيني عنـد 6.0 ، وعقم الوسـط وبعـد ذلـك اضيفت اليوريا ثم صب الوسط في أطباق بتري ، وللكشف عن إنتاج أنزيم السـليوليز أخـذ اللقـاح الفطـري بحجـم متسـاوٍ مـن مـزارع نقيـة فتيـة وذلـك باستخدام ثاقبة فلين Cork borer بقطر 5 ملم نقل اللقاح باستخدام ابرة التلقيح Needle لأطباق الوسط الزرعي بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 28 ± 1 مْ ولمدة 5 أيام . يستدل على إنتاج الأنزيم باستخدام الكاشف يود- حامض الهيدروكلوريكHCl-Iodin والذي تم تركيبه من 100 مل HCl 0.1 ع + 500 مل (1% I وزن / حجم + 2% KI وزن / حجم) اذ أضيف محلول الكاشف الى الطبق الحاوي على المستعمرة الفطرية وترك لعشرة دقائق ثم سكب المحلول وترك الطبق لـدقائق ، ان ملاحظـة ظهـور هالـة فاتحـة اللـون حـول المسـتعمرة الفطرية دلالة على تحول الكاربوهيدرات المعقدة الى سكريات بسيطة .

٢. الكشـف عـن إنتـاج أنـزيم السـليوليز بـدون اسـتخدام كاشـف يـود – حامض الهيدروكلوريك

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل [١٢] للكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز وبـدون اسـتخدام كاشـف يـود- حـامض الهيـدروكلوريك باسـتخدام وسـط الكاربوكسي مثيل سليلوز Carboxy methyl cellulose medium ، وتركب الوسط من المكونات الآتية (غم / لتر) : نترات الصوديوم ٢,٠ وفوسفات البوتاسيوم احاديـة الهيدروجين ١,٠ وكبريتات المغنيسيوم المائية ٠,٥ وكلوريـد البوتاسـيوم ٠,٥ وكبريتـات الحديـديك ٠,٠١ وملـح CMC-Na ١٠ واكـار ٢٠ ، فقـد تمـت إذابـة الملـح CMC-Na وضـبط الأس الهيـدروجيني بـنفس الطريقـة السـابقة ، وتـم الأسـتدلال علـى إنتـاج الأنـزيم بملاحظـة ظهـور هالـة فاتحـة اللـون حـول المسـتعمرة الفطريـة والتـي أمكـن ملاحظتها بعد مرور يومين من التحضين عند درجة حرارة 28 ± 1 مْ . كمـا أن ظهـور الهالـة الرائقـة حـول المسـتعمرة الفطريـة تـدلّ علـى تحـول الكاربوهيدرات المعقدة الى سكريات بسيطة . واستمرت فترة التحضين لمدة 5 ايـام ، بعـدها تـم إخـراج الأطبـاق مـن الحاضـنة وقـيس قطـر المسـتعمرة الفطرية النامية وقطر هالة التحلل المتكونة للتفريق بين قابلية العزلة الطافرة على إنتاج أنزيم السليوليز مقارنة مع العزلة الأبوية وبيان العزلة الأكفأ في إنتاج هذا الأنزيم وتم ذلك باستخدام المعادلة الآتية:

كفاءة الفطر على انتاج السليوليز =

١٢- الوسط الغذائي الخاص لإجراء الاختبار الكمي Quantitative test لبيان إنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة .

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل [٢٣] لتحضير الوسط الغذائي الخاص بهـذا الاختبـار والـذي تكـون ممـا يـأتي (غـم / لتـر) : كبريتـات الامونيـوم ١,٤ وفوسـفات البوتاسـيوم ثنائيـة الهيدروجين ٢,٠ وبوريا ٠,٣ وكلوريد الكالسيوم ٠,٣ وكبريتات المغنيسيوم المائيـة ٠,٣ وبتون ١,٠ وسليلوز ١٠ و Tween 20 ٢ مل وكبريتات الحديديك المائية ٠,٠٠٥ وكبريتات المنغنيز المائية ٠,٠٠١٦ وكبريتات الخارصين المائية ٠,٠٠١٤ وكلوريد الكوبلت ٠,٠٠٢ ، تمت إذابة جميع المكونات عدا السليلوز بالماء المقطر ، وضبط الأس الهيدروجيني عند 6.0 بعدها وزع الوسط في دوارق مخروطية حجم 250 مل بمقدار 50 مل لكل دورق ، كل دورق حاوي على 0.5 غم من السليلوز . سدت الدوارق باحكام بسدادات قطنية وغلفت بورق الالمنيوم ثم عقمت بجهاز المعقام ، بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت بعالق ابواغ الفطر المحضر بعمر أسبوع وبتركيز 7×10^4 بوغ / مل ، ثم وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 28 ± 1 مْ ولمدة أسبوع ، بعدها سحبت الدوارق من الحاضنة وتم تسجيل الأس الهيدروجيني النهائي وقدرت الكتلة الحيوية وفعالية انزيم السليوليز مقّدراً بالفعالية النوعية للانزيم كما قدرت كمية البروتين .

١٣- طرائق التحليل

أ. تقدير الوزن الجاف

بعد انتهاء فترة التحضين المحددة سحبت الدوارق من الحاضنة ثم أجريت عملية الترشيح للوسط الغذائي باستخدام ورقة ترشيح مجففة وموزونة مسبقا من نوع (Whatman No. 1) مثبتة على قمع بخنر Bukhner funnel المجهز بمفرغ هوائي كهربائي (Cedarburg Wl. USA) ثم جففت في فرن كهربائي عند درجة 70 مْ ولمدة 24 ساعة بعدها تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزن بين الكتلتين باستخدام ميزان حساس (Shimadzu AW 320) .

ب. قياس فعالية أنزيم السليوليز

تم قياس فعالية أنزيم السليوليز اعتماداً على قياس أحد نواتج التفاعل وهو سكر الكلوكوز D-glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب الطريقة الموصوفة من قبل [٢٣] طريقة Filter paper assay ، وقد أستخدمت وحدة مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين لتقدير الفعالية النوعية للانزيم ، وتم العمل بأخذ 0.5 مل من الراشح في انبوبة اختبار حجم 18 مل وأضيف اليها 1 مل من المحلول المنظم (Na-citrate buffer) pH4.8 والذي حضر باذابة ٢٥ غم من سترات الصوديوم في ٢٥٠ مل ماء مقطر ، وغمر بالمزيج شريط من ورقة الترشيح (Whatman No. 1) بطول 1 × 6 سم زنة 50 ملغم تقريباً ، ثم حضنت لمدة ساعة واحدة بدرجة 50 مْ ، بعدها أضيف لكل أنبوبة اختبار 3 مل من كاشف 3 , 5 Dinitrosalicylic acid (DNS) والذي تركب من المواد الآتية (غم / ٥٠٠مل ماء مقطر) : ترتـرات الصـوديوم والبوتاسـيوم ١٥٠ وحـامض Dinitrosalicylic acid ٥,٠ وهيدروكسيد الصوديوم ٢ع ١٠٠ مل . بعد ذلك وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق ثم قدرت كمية سكر الكلوكوز المتحرر. حضرت أنبوبة اختبار كمعاملة مقارنة Blank غير حاوية على ورقة الترشيح ، بعد اكتمال التفاعل قيست الكثافة الضوئية عند الطول الموجي 550 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spect1rophotometer من طراز Spectronic 20 Bauchan lamb من شركة Gallenkamp ، وتم حساب تركيز سكر

الكلوكوز المتحرر بالاعتماد على المنحني القياسي المحضر باستخدام سكر الكلوكوز بوصفه سكراً قياسياً .

ج. استخلاص وتقدير البروتين

قدرت كمية البروتين في الوزن الجاف باستخدام طريقة [١٧] وتضمنت الطريقة تفاعل البروتين مع الكاشف المستخدم وهو كاشف الفولن - Folin ciocalteu's reagent المنشط بعنصر البروم وتركب الكاشف من المواد التالية (غم / ٧٠٠ مل) : تنكستات الصوديوم ١٠٠ وصوديوم مولبديت ٢٥ وسلفات الليثيوم ١٥٠ وحامض الفسفوريك ٥٠ مل وحامض الهيدروكلوريك ١٠٠ مل وماء البروم ٣ مل، وتكون هذا الكاشف أساسا من مزيج من محلول حامض الفوسفوتنكستك أو الفوسفومولبيديك المختزل بوساطة الاحماض الامينية الى أزرق المولبدينم ، فقد تم قياسه لونياً باستخدام جهاز المطياف الضوئي وذلك عند الطول الموجي 750 نانوميتر ، وتختلف شدة اللون الأزرق الناتج من اختزال الاحماض الامينية لكاشف الفولن باختلاف كمية هذه الاحماض وبالاخص التايروسين والتربتوفان التي توجد في الراشح الانزيمي .

١. استخلاص البروتين

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل [١٧] والتي تعتمد في الأساس على ترسيب البروتينات من النموذج باستخدام ثالث كلوريد الخليك Trichloro acetic acid(TCA) ومن ثم استخلاص البروتينات بوساطة محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH 1 ع . اذ تم تقدير المحتوى البروتيني الكلي في الوزن الجاف بأخذ مقدار معين 0.1 غم منه واضيف إليه 5 مل من محلول TCA والذي حضر باذابة ٥,٠ غم من TCA في ١٠٠ مل ماء مقطر ، وسحقت بشكل جيد باستخدام هاون خزفي ، وضع المزيج في انبوبة اختبار للطرد المركزي وفصل الراسب عن الراشح بإجراء عملية الترسيب باستخدام جهاز الطرد المركزي Centrifuge من شركة MSE LTD بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة خمس دقائق واعيدت عملية غسل الراسب بمحلول 5% TCA ثم اضيف محلول هيدروكسيد الصوديوم1 ع الى الراسب ومزج جيدا وترك بدرجة 4 مْ لمدة 24 ساعة لإذابة البروتينات بشكل كامل . وبعد اكتمال عملية الذوبان فصل الراشح عن الراسب وأخذ الراشح وأكمل الى حجم قياسي بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 1 ع .

٢. تقدير كمية البروتين

لأجل تقدير كمية البروتين في الراشح الأنزيمي أخذ 0.1 مل من الراشح ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف إليه 0.4 مل من الماء المقطر و 0.5 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 1 ع ، وبعد ذلك اضيف 5 مل من كاشف C الى أنبوبة الاختبار الحاوية على المحاليل المذكورة سابقا مع مراعاة المزج الجيد ثم تركت لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 25 مْ ثم اضيف 0.5 مل من كاشف الفولن ومزج جيداً وترك لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة . للمقارنة حضرت أنبوبة اختبار قياسية بنفس الطريقة السابقة مع استبدال كمية الراشح بالماء المقطر ، قيست الكثافة الضوئية عند الطول الموجي 750 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

١٤- حفظ العزلة الطافرة وإدامتها

الحفظ لمدة قصيرة (أسبوع الى ثلاثة أسابيع)

أ. نميت العزلة الطافرة على وسط مستخلص البطاطا والسكروز والاكار (PSA) المائل لمدة أسبوع ، بعدها حفظت في الثلاجة عند درجة 4 مْ وتم تجديد المزارع كل اسبوعين.

ب. نميت العزلة الطافرة على الوسط الحاوي على نفس التركيز المؤثر من المبيد .

الحفظ لمدة طويلة (2 – 6 أشهر)

نميت العزلة الطافرة في قنانٍ زجاجية حاوية على وسط PSA المائل لمدة أسبوع وبعد ذلك غطيت بطبقة من زيت معدني Mineral oil بسمك 1 سم وحفظت بالثلاجة عند درجة 4 مْ لحين الاستخدام [١] .

الحفظ لسنوات طويلة

أ. مزارع السليكاجيل Silica gel cultures

تم تحضير عالق بوغي للعزلة الطافرة في حليب الفرز Skimmed milk ، ثم اضيف اليه سليكا جيل لا مائية Anhydrous silica gel ثم تركت لتجف لمدة 14 يوم في القناني المفتوحة ، وبعد جفافها غلقت القناني بإحكام ، وحفظت بدرجة حرارة الغرفة [١] .

ب. مزارع التربة Soil cultures

تم تحضير عالق بوغي للعزلة الطافرة ومن ثم اضيف الى قنانٍ زجاجية حاوية على تربة معقمة لثلاث مرات وحفظت بدرجة حرارة 28 ± 1 مْ ولمدة 5 ايام [١] .

١٥- التحليل الإحصائي

أجريت تجربة عاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Random Design (C.R.D.) وحللت النتائج إحصائياً واختبرت باستخدام طريقة دنكن Duncan method [٢٩] لمعرفة ما اذا كان هنالك فرق معنوي بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 للتجارب التي تم إجراؤها.

النتائج والمناقشة

عدت عزلة الفطر المحلية *T.viride* عزلة أبوية في جميع الاختبارات التي اجريت إذ استخدمت بتركيز 7×10^4 بوغ / مل ، ومن خلال تطبيق المعادلة ح١ × ت١ = ح٢ × ت٢ تم التوصل إلى اعداد الابواغ المتوقعة لكل تركيز من تراكيز العالق البوغي لهذه العزلة ، الجدول (1) . وقد تم حساب العدد الحي للأبواغ النامية وذلك بنشر 0.1 مل من العالق البوغي لهذه العزلة في أطباق حاوية على الوسط الزرعي القياسي وفي جميع التراكيز لحين الوصول إلى التركيز الذي اعطى مستعمرة واحدة فقط وهو التركيز ($10^{-٥}$) ، في حين اعطت التراكيز الأخرى مستعمرات كثيفة ومتداخلة لا يمكن حصرها ، وقد تميزت هذه المستعمرات باللون الاخضر والاخضر الفاتح على الوسط القياسي ، أما بالفحص المجهري فقد تبين انها قد نمت بشكل أبواغ اعتيادية موزعة على الحامل البوغي المتفرع ، الشكل (١) .

الجدول (١) : أعداد الابواغ المتوقعة للعزلة الأبوية *T.viride*

تراكيز العالق البوغي	اعداد الابواغ المتوقعة
$10^{-١}$	٧٧٧٧,٧٠٠
$10^{-٢}$	٨٦٤,١٩٠
$10^{-٣}$	٩٦,٠٢١

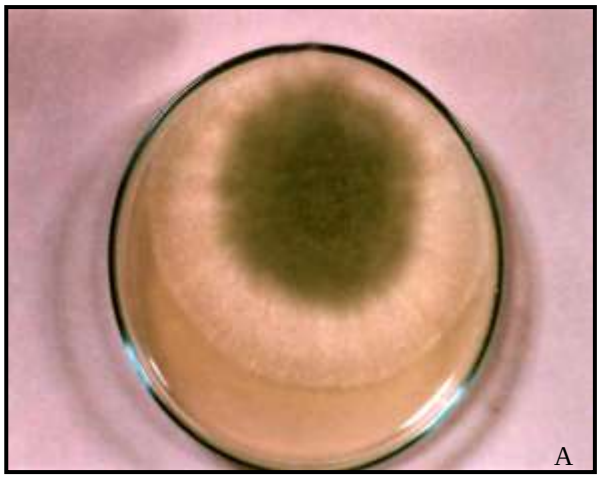
10^{-4}	١٠,٦٦٠
10^{-5}	١,١٨٥

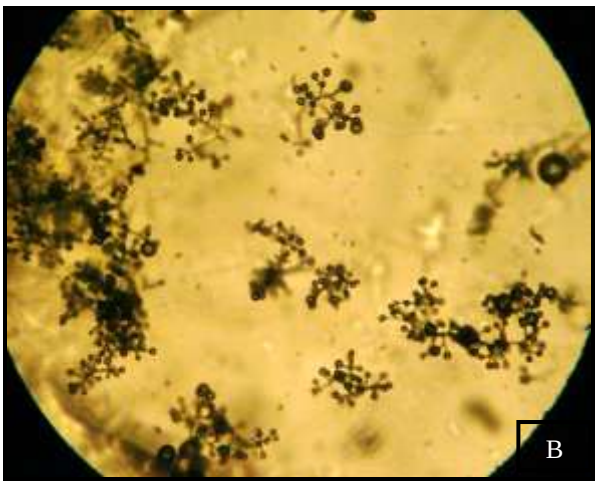
الأثر الطفري للمبيدات

تـم اختبـار تـأثير تراكيـز متصـاعدة مـن مبيـدي الفطريـات الكابتـان والتولكلوفوس–مثيل فـي عزلـة الفطـر *T.viride* (العزلـة الأبويـة) مـن حيث نموها وإنتاجها للأبواغ فضـلا عن التغيرات المورفولوجية المصاحبة لتأثير المبيد . وقد كانت لكل واحد من هذين المبيدين التراكيز الخاصة به ، إذ ربما يكون لهذه التراكيز تـأثير تطفيري فـي حـال تفاعلها مـع المـادة الوراثية للكائن المستخدم مع توافر الظروف الملائمة لحصول الطفرة .

وقد خضعت العزلة الأبوية تحت نفس الظروف في هذا الاختبار من حيث وسط النمو ودرجة حرارة التحضين وفترته ما عدا معاملة العزلة الأبوية بمبيد الكابتان Captan والتي أرتأينا زيادة فترة التحضين إلى ١٠ أيام لأننا لم نلاحظ أي نمو خلال فترة التحضين المحددة التي اعتمدنا عليها وهي ٥ ايام ؛ إذ أكد Al-Saqur (١٩٧٦) بـأن طفرات ال *Neurospora crassa* المستحثة بفعل المطفرات الكيميائية و UVc تستغرق فترة زمنية معينة لكي تستقر وتثبت الطفرة وتظهر نمواً جيداً .

وتشير الدراسات إلى ان المبيدات وبشكل عام ضعيفة الأثر الطفري في مختلف الانظمة الاختبارية [٢٨] . وقد صنفت المبيدات إلى ثلاثة أصناف : غير مطفرة ومطفرة مباشرة أي يظهر أثرها الطفري عند وصولها إلى الـ DNA في الخلية ومطفرة غير مباشرة أو متخفية تحتاج إلى تنشيط أيضي أو تفاعل مع مادة كيميائية اخرى كي يظهر أثرها الطفري [١٠،٢٤] .





الشكل (١) : العزلة الأبوية *T.viride*

A : المستعمرة الابوية للفطر *T.viride* النامية على الوسط الزرعي القياسي .

B: صورة بالمجهر توضح الأبواغ الاعتيادية .

دقة الصورة ٧٢ بكسل / انج .

تأثير تراكيز مختلفة من مبيدي الفطريات الكابتان والتولكلوفوس–مثيل في عزلة محلية من فطر *T.viride*

لقد تم اختبار تأثير تراكيز مختلفة من مبيدي الكابتان والتولكلوفوس–مثيل على العزلة الأبوية قيد الدراسة وذلك بنشر ٠,١ مل من التراكيز (10^{-1} و 10^{-2} و 10^{-3} و 10^{-4} و 10^{-5}) العائدة للعالق البوغي لهذه العزلة في أطباق حاوية على الوسط الزرعي القياسي والمضاف اليه تراكيز متصاعدة من كل مبيد ، ففي هذه الطريقة تترك الأبواغ لكي تنبت وينمو الغزل الفطري على وسط النمو الحاوي على المبيد ، وبذلك سوف يتوفر الوقت الكافي لأنزيمات النمو الخضري كي تفعل فعلها في تأييض المبيد وإنتاج مركبات وسطية أو نهائية منه وقد تكون هذه المركبات مطفرة أي انها تكون أكثر كفاءةً من المبيد نفسه في التفاعل مع الـ DNA ، وقد لوحظ أثر أنزيمات النمو الخضري في زيادة فعالية المطفرات الكيميائية في الفطر *Neurospora crassa* [٣٠] ، وقد تم حساب متوسط العدد الحي للمستعمرات النامية ومنه تم استخراج النسب المئوية للقتل لتحديد مدى الاختزال في عدد الأبواغ نتيجة سمية المواد الكيميائية المستخدمة .

وقد وجد من خلال هذه الاختبارات أن عزلة الفطر الأبوية كانت حساسة جداً للمبيد الكابتان Captan بكافة التراكيز المستخدمة للمبيد(٠,٠٢٥ و٠,٠٥ و٠,١ و٠,٢ و٠,٣ و٠,٤ و٠,٥ و٠,٧٥ و١,٠ و١,٢٥ و١,٥ و٢,٠ و٢,٥) ملغم / مل ، بحيث لم يلاحظ أي نمو في جميع تراكيز العالق البوغي ابتداءً من التركيز 10^{-1} ولغاية 10^{-5} ولفترة تحضين استغرقت ١٠ ايام ، وكانت النتيجة متطابقة عند تكرار التجربة عدة مرات ، وقد تم إثبات ان لهذا المبيد تأثيراً ساماً قاتلاً للعزلة الأبوية وليس له أي تأثير تطفيري .

ويعزى التأثير السام للمبيد إلى طبيعة عمله ، فالمبيد الفطري Captan هو من مركبات الكبريت الحلقية العضوية التي تكّون مادة الثايوفوسجين Thiophosgen والتي يكون لها تأثير سام عن طريق ارتباطها بالمركبات الحاوية على مجموعة الثايول SH-Group في الخلية الفطرية مما تؤدي

إلى توقف نشاط عدد كبير من الأنزيمات الحيوية نتيجة لتفاعل المبيد معها [١٨] فضلا عن تأثير المبيد في الصناعة الحيوية للمركبات الاساسية في الخلية مثل الحامض النووي الـ DNA والـ RNA والبروتين بحيث يؤدي إلى تثبيطها [١٦] ، والنتيجة التي تم الحصول عليها فيما يخص هذا المبيد جاءت غير متوافقة لما ذكره Vigfusson و Vyse (١٩٨٠) بان مبيد Captan من العوامل المطفرة القوية والمؤثرة في انيبيبات المغزل Microtubules نتيجة لتأثيرها في الانقسام الميوزي Meoisis والمايتوزي Mitosis في الخلية الفطرية ، وقد تعزى النتيجة المستحصلة الى كون التراكيز المستخدمة عالية جداً وذات تأثيرات سامة من المادة بحيث ادت إلى تدمير جهاز الاصلاح نفسه أو قد تؤدي إلى احداث اعداد كبيرة من الأعطاب في المادة الوراثية DNA بحيث ان جهاز الاصلاح يعجز عن اصلاح هذه الاعطاب كلها .

تشير النتائج الموضحة في الجدول (٢) قدرة العزلة الأبوية قيد الدراسة على مقاومة التراكيز (٢,٥ و ٥,٠ و ٧,٥ و ١٠,٠ و ١٢,٥) ملغم من المبيد الفطري Tolclofos-methyl لكل مل من الوسط القياسي ، ومن خلال المشاهدة العيانية للمستعمرات النامية على مختلف تراكيز المبيد لوحظ حصول تبدلات مورفولوجية مصاحبة لصفة المقاومة للمبيد شملت تغيراً في كل من شكل المستعمرة النامية ولونها وقابليتها على النمو مقارنة بنموها على الوسط الزرعي الخالي من المبيد (العزلة الأبوية) . ولكن ما تبين ملاحظته ان استخدام المبيد Tolclofos-methyl بتركيز ٢,٥ ملغم لكل مل من وسط النمو قد اعطى مستعمرات واضحة وذات هايفات قوية ومحددة الشكل (٢) ، في حين لوحظ انه بزيادة تراكيز المبيد تم الحصول على مستعمرات ذات هايفات ضعيفة . وعلى هذا الاساس اخذت المستعمرات النامية على التركيز ٢,٥ ملغم / مل والتي اعتبرت مستعمرات طافرة وتمت اقلمتها وبالطريقة التي ذكرت سابقا، وبعد ذلك تمت تنميتها عدة مرات على وسط زرعي خالٍ من المبيد وذلك للتأكد من أن الطفرة الوراثية قد حدثت في الـ DNA وليست تغيراً فسيولوجياً في الخلية ، ثم بعد ذلك شخصت فتبين بانها قد اختلفت عن العزلة الأبوية من حيث نموها بشكل أبواغ كلاميدية طرفية دائرية الشكل وصولجانية وبعدد هائل ، وقد رمز لها بالرمز $TOL_{2.5}$ ، الشكل (٢) . واعتبرت هذه العزلة طافرة واجريت عليها دراسة من حيث قابليتها على إنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة في اوساط زرعية صلبة وسائلة وكما سيوضح لاحقاً .

وقد لوحظ ان متوسط اعداد المستعمرات النامية قد أخذت بالتناقص التدريجي باستمرار زيادة تراكيز المبيد ، كما ازدادت النسبة المئوية للأبواغ المقتولة بازدياد هذه التراكيز ، الجدول (٢) .

وقد جاءت النتائج غير متفقة مع ما ذكره Tomlin (١٩٩٧) و Schmiedeknecht واخرون (١٩٩٨) من ان المبيد الفطري Tolclofos-methyl يؤثر بشكل رئيس في الفطريات الناقصة مثل *Rhizoctonia solani* و *Fusarium* ، كما لا تتفق مع ما توصل اليه الحيالي (٢٠٠٥) من الحصول على مستعمرات ذات هايفات ضعيفة عند معاملة السلالتين الأبويتين A76 و AZG_{131} من الفطر *Aspergillus amstelodami* بالتركيز 60 مايكروغرام/مل من المبيد Tolclofos-methyl (Rizolex) في حين ان التركيز 90 مايكروغرام قد ثبط نمو السلالتين وبشكل كامل .

وعلى الرغم من عدم معرفة السبب الحقيقي لقدرة عزلة الفطر الأبوية لمقاومة التراكيز العالية من المبيد Tolclofos-methyl مقارنة بالانواع الفطرية الاخرى فانه يمكن القول ان هناك فروقات بين الأنواع المختلفة Different species في قدرتها على التعامل مع المواد السامة للخلايا .

كفاءة العزلة الطافرة لإنتاج أنزيم السليوليز Cellulase باستخدام كاشف يود – حامض الهيدروكلوريك Iodin - HCl أو بدونه

لغرض التعرف على كفاءة العزلة الطافرة لانتاج انزيم السليوليز استخدم الوسط الزرعي الصلب المحتوي على مادة الكاربوكسي مثيل السليلوز CMC ، ويعتبر ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دليلاً على تحلل هذه المادة بوساطة أنزيم السليوليز المفرز من قبل عزلة الفطر [٢٠] . ولقد كشف عن كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز وكما موضح في الجدول (٣) ، إذ لوحظ أن العزلة الطافرة $TOL_{2.5}$ مع العزلة الأبوية *T.viride* قد أعطت كشفاً موجباً بقدرتها على إنتاج الأنزيم مع وجود اختلافات واضحة بينها في هذه الكفاءة اذ ان العزلة الطافرة قد ازداد نشاطها الانزيمي مقارنة مع العزلة الابوية اذ اظهرت نشاطا انزيميا متميزا (++) ، الشكل (٣) . وكان ذلك في الطريقة الاولى وبشكل عام ، اما في الطريقة الثانية فقد لوحظ حدوث اختلاف في النسب المتحققة وكما يأتي :

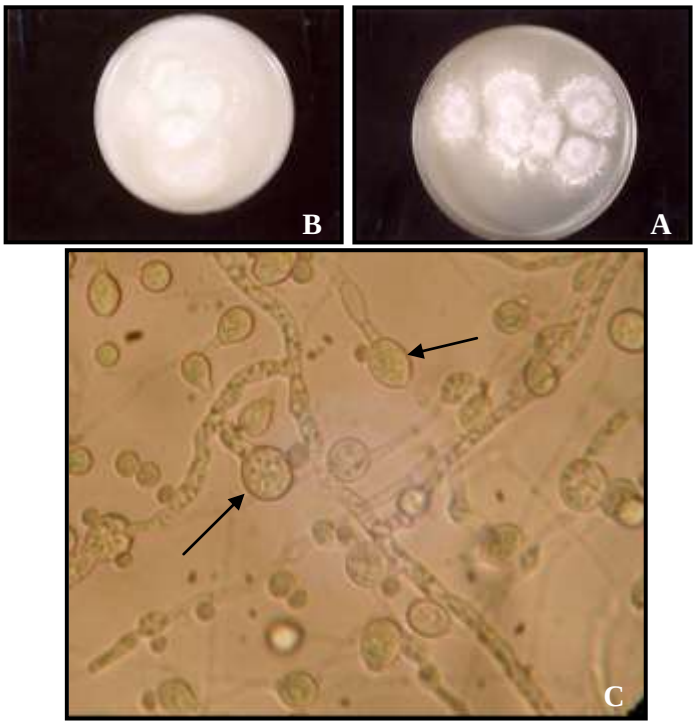
٧,٧٥١ و ٥,٣٢٧ وعلى التوالي وباستخدام كلتا الطريقتين للكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز طريقة Yeoh واخرون (١٩٨٥) وطريقة Hankin و Anagnostakis (١٩٧٧) إذ كانت النتائج متماثلة في كلتا الطريقتين .

وبصورة عامة نلاحظ وجود علاقة طردية بين قطر هالة التحلل وكفاءة العزلة في إنتاج الأنزيم فكلما ازدادت قدرة العزلة على إنتاج أنزيم السليوليز ازداد قطر هالة التحلل . وغالباً ما تستخدم طريقة الوسط الصلب الحاوي على مادة الـ CMC وهي المادة السليلوزية الذائبة في الماء في الكشف النوعي عن أنزيم السليوليز [١١،٢٢] .

وعلى ضوء النتائج السابقة اتضح ان العزلة الطافرة كانت متميزة في انتاجيتها للانزيم ويعود ذلك لكون الضرر المتسبب عن مبيد التولكلوفوس-مثيل في الـ DNA كبيراً جداً وانعكس ذلك على إنتاجيتها للأنزيم . فقد ذكر De Serries (١٩٨٢) ان المواد الكيميائية التي تسلك سلوك المطفرات قد تكون اكثر اهمية واحداثا للخلل الوراثي والتغيرات الدائمية في جزيئة الـ DNA من الاشعاع .

الجدول (٢) تاثير تراكيز مختلفة من المبيد الفطري Tolclofos-methyl في متوسط اعداد المستعمرات للعزلة الابوية *T.viride*

تراكيز المبيد (ملغم/مل)	متوسط اعداد المستعمرات النامية في تركيز العالق البوغي ١٠^٢ بوغ / مل	%للأبواغ المقتولة	متوسط أعداد المستعمرات النامية في تركيز العالق البوغي ١٠^٣ بوغ / مل	%للأبواغ المقتولة	متوسط اعداد المستعمرات النامية في تركيز العالق البوغي ١٠^٤ بوغ / مل	%للأبواغ المقتولة	متوسط اعداد المستعمرات النامية في تركيز العالق البوغي ١٠^٥ بوغ / مل	%للأبواغ المقتولة	
٢,٥	١٢,٦٦٦ (٢,٥١)	٩٨,٥٣٤	٦,٣٣٣ (٢,٠٨)	٩٣,٤٠٤	٥,٦٦٦ (٠,٥٧)	٤٦,٨٤٨	٠*	١٠٠	$TOL_{2.5}$
٥,٠	١٠,٠ (٢,٠)	٩٨,٨٤٢	٥,٠ (2.0)	٩٤,٧٩٢	٤,٦٦٦ (١,٥٢)	٥٦,٢٢٨	٠	١٠٠	
٧,٥	٩,٣٣٣ (٠,٥٧)	٩٨,٩٢٠	٤,٦٦٦ (١,٥٢)	٩٥,١٤٠	٣,٦٦٦ (١,٥٢)	٦٥,٦٠٩	٠	١٠٠	
١٠,٠	٨,٦٦٦ (٢,٠٨)	٩٨,٩٩٧	٤,٣٣٣ (٠,٥٧)	٩٥,٤٨٧	٣,٣٣٣ (١,٥٢)	٦٨,٧٣٣	٠	١٠٠	
١٢,٥	٦,٦٦٦ (١,٥٢)	٩٩,٢٢٨	٢,٣٣٣ (٠,٥٧)	٩٧,٥٧٠	١,٦٦٦ (١,١٥)	٨٤,٣٧١	٠	١٠٠	



الشكل (٢) : العزلة الناتجة من المبيد الفطري Tolclofos-methyl ($TOL_{2.5}$)

A : نمو المستعمرات المقاومة للمبيد على الوسط القياسي الحاوي على تركيز المبيد(٢,٥ ملغم / مل) .

B : نمو مستعمرات ذات هايفات ضعيفة على الوسط القياسي الحاوي على تركيز المبيد (١٠,٠ ملغم / مل) .

C : صورة بالمجهر توضح طبيعة الأبواغ الكلاميدية . دقة الصورة ١٩٠ بكسل / انج .

الجدول (٣) : كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز Cellulase باستخدام طريقة الاوساط الصلبة

عزلات الفطر	الكشف عن إنتاج أنزيم السليوليز *

	باستخدام كاشف الايودين **	بدون استخدام كاشف الايودين ***
العزلة الأبوية *T. viride*	+	٥,٣٢٧ (٠,٠١٤)
$TOL_{2.5}$	++	٧,٧٥١ (٠,٠٢٠)

– كل قيمة تمثل معدلاً لثلاث مكررات ، والقيم بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري (±SD) .

+ يمثل كفاءة العزلة لإنتاج أنزيم السليوليز ، وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (٢,٥–٤,٠) ملم .

++ يمثل كفاءة العزلة لإنتاج أنزيم السليوليز ، وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر اكثر من (٤,٠) ملم .

** طريقة Yeoh وآخرون (١٩٨٥) .

*** طريقة Hankin و Anagnostakis (١٩٧٧) .

الشكل (٣) : إنتاج أنزيم السليوليز من قبل عزلات الفطر *T. viride*

A : العزلة الابوية *T.viride*

B : العزلة الطافرة $TOL_{2.5}$ الناتجة من المبيد الفطري Tolclofos-methyl (٢,٥ ملغم / مل)

كفاءة العزلة الطافرة لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة باستخدام الوسط السائل

أظهرت نتائج دراسة كفاءة عزلة الفطر الطافرة الناتجة بعد معاملتها بمبيد التولكلوفوس–مثيل أن هناك تبايناً معنوياً واضحاً بين هذه العزلة في معدلات نموها وكفاءتها لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة مقارنة مع العزلة الأبوية *T.viride* ، فقد تباينت عزلات الفطر في مقدار الوزن الجاف وهو تعبير عن الكتلة الحيوية للعزلة + بقايا السليلوز معنوياً وبشكل عام ، اذ تحقق اعلى وزن جاف (٠,٦٧٢) غم / ١٠٠ مل بالنسبة للعزلة الطافرة $TOL_{2.5}$ مقارنة مع العزلة الابوية (٠,١٧٨) غم / ١٠٠ مل .

أما بالنسبة للأس الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي فقد لوحظ فروقات معنوية في عزلات الفطر عن الأس الهيدروجيني الابتدائي 6.0 ، الجدول (4) . بصورة عامة فقد لوحظ ان قيم الاس الهيدروجيني النهائي قد ارتفعت عن الاس الهيدروجيني الابتدائي ، اذ ان اعلى قيمة معنوية للاس الهيدروجيني النهائي قد بلغت (٧,٤٩٣) وذلك مع العزلة الطافرة مقارنة مع العزلة الابوية *T.viride* (٧,٠٣٨).

أما فيما يتعلق بإنتاج العزلة لبروتين الخلية الواحدة فمن الواضح وجود فروقات معنوية فيما بينها في قدرتها على إنتاج البروتين ، إذ بلغ أعلى نسبة للبروتين في الوزن الجاف للعزلة الطافرة $TOL_{2.5}$ (37.689 %) .

أما العزلة الأبوية *T.viride* فكانت تحوي أقل نسبة بروتين في وزنها الجاف (23.774 %) .

أما بالنسبة للنشاط الأنزيمي لعزلة الفطر في إنتاج أنزيم السليوليز فقد لوحظ وجود فروقات بينها في إنتاج الأنزيم بالمقارنة مع العزلة الأبوية ، الجدول (4) ولقد جاءت النتائج التي تم الحصول عليها مطابقة لنتائج الوسط الصلب لكفاءة هذه العزلات في إنتاج أنزيم السليوليز ، اذ حققت العزلة الطافرة اقصى انتاج لانزيم السليوليز مقدرا بالفعالية النوعية للانزيم بلغت (٧,١٥٨) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين ، اما العزلة الابوية كانت ذات نشاط انزيمي اقل حيث كانت قيمة الفعالية النوعية للانزيم (٥,٠١٤) مايكرومول / دقيقة / ملغم بروتين .

وتعزى النتائج المستحصلة الى وجود اختلاف بين قدرة هذه العزلة على استغلال الوسط الزرعي ومدى ملائمة الأس الهيدروجيني للوسط الغذائي لهذه العزلة وهذا مما أثر في كفاءتها لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة ، لذلك فان عملية إنتاج أنزيم السليوليز تختلف باختلاف العزلة الفطرية الطافرة التي تم الحصول عليها من العزلة الأبوية وهذا ما أكده Mandelsو اخرون (١٩٧٦) ، كما أن ظروف الوسط الزرعي وعوامل النمو المختلفة تختلف من عزلة الى أخرى فالأس الهيدروجيني الابتدائي له دور فعال في عملية إنتاج أنزيم السليوليز ، وإن الأس الهيدروجيني الذي يكون ملائماً لعزلة معينة قد يكون غير ملائم لعزلة أخرى . كما أن فترة التحضين اللازمة لإنتاج أنزيم السليوليز تختلف أيضا باختلاف عزلات

الفطر واختلاف ظروف التخمر تؤدي الى تباين عزلات الفطر في كفاءة إنتاجها من أنزيم السليوليز قد تكون غير ملائمة لعزلة أخرى . إنتاجها [١٥،٣٨] . اذ أن الظروف الملائمة لعزلة معينة لرفع كفاءة

الجدول (٤) : كفاءة عزلات الفطر لإنتاج أنزيم السليوليز وبروتين الخلية الواحدة باستخدام الوسط السائل

عزلات الفطر	الوزن الجاف (غم / ١٠٠ مل)	الاس الهيدروجيني النهائي	% للبروتين في الوزن الجاف	الفعالية النوعية للأنزيم (مايكرومول/دقيقة / ملغم روتين)
العزلة الابوية *T. viride*	0.178 b(0.018)	7.038 b(0.042)	23.774 b(0.191)	5.014 b(0.011)
$TOL_{2.5}$	0.672 a (0.012)	7.493 a (0.011)	37.689 a (0.224)	7.158 a (0.015)

- القيم المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال ٠,٠٥ حسب اختبار دنكن متعدد المدى ، وكل قيمة هي معدل لثلاث مكررات ، والقيم بين الاقواس تمثل الانحراف المعياري (±SD) .

– فترة التحضين ٧ ايام ، تركيز السليلوز ١٠ غم / لتر ، والأس الهيدروجيني الابتدائي ٦,٠ ، ودرجة حرارة التحضين ٢٨ ± ١° م ، ومدة التحضين للنشاط الأنزيمي ٦٠ دقيقة ، وحجم المستخلص الفطري ٠,٥ مل .

المصادر

١–أحمد ، محمد علي ومحمد عبد الرزاق النواوي (1999). الفطريات الصناعية. الطبعة الأولى ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر. 624 صفحة.

٢– الحيالي ، فادية موفق محمد (2005). وراثة المقاومة لبعض المبيدات الفطرية في الفطر *Aspergillus amstelodami* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق.

٣– الزبير ، مفاخر عبد السلام وفائز عزيز العاني وباسل كامل دلالي (1991). تأثير التطفير الوراثي وبعض الظروف الزرعية في إنتاج حامض الستريك من سلالة محلية للفطر *Aspergillus niger*. مجلة زراعة الرافدين ، 23 – 139.

٤– طه ، خالد حسن (2005). دراسات عن الفطر ترايكوديرما في العراق : إنتاج طرزاً حيوية جديدة من ترايكوديرما متحملة للبينوميل باستخدام أشعة كاما. المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو). 8 (1) : 74 – 86.

٥– العاني ، فائز عزيز (1993). التكنولوجيا الحيوية. دار الكتب للطباعة والنشر ، مطبعة جامعة الموصل ، الموصل ، العراق. 292 صفحة.

6- Al–Saqur, A. M. (1976). A study of neutral and induced resistance to surface–active drugs in *Neurospora crassa*. Athsubm. towards the Degree of Philosophy Doctor. Dept. Gen. Univ. Abrdeen.

7- Aneja, K. R. (2003). Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology.4thed., New Age International (P) Limited publishers, pp. 83 – 88.

8- Bhat, M. K. and Bhat, S. (1997). Cellulase degrading enzyme and their potential industrial applications : In Biotechnology Advances, Elsevier Science Inc. U. S. A., 15 (3,4): 583 – 620.

9- De Serries, F. J. (1982). Some Aspects of Chemical Mutagensis and Human Population Monitoring. An overview. In Chemical Mutagensis and Human Population Monitoring, In K. C. Bora; G. P. Douglus, and E. R. Nestman (eds.). Oxford, Elsevers Biomedical, U.K. pp. 107 – 110.

10- Epstein, S. S. and Legator, M. S. (1971). The Mutagenicity of Pesticides Concepts and Evaluations, MLT Press. Cambridge., U.K.

11- Ewad, M. J. S. ; Al – Tai, A. M. ; Abdul – Nour, B. A. ; Al – Attiyah, S. S. and Baban, R. S. (1989). Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraqi soils : III. Detection and quantitative assay of cellulose production by actinomycetes using congo red staining of substrate. J. Biol. Sci. Res., 20: 241 – 254.

12- Hankin, L. and Anagnostakis, S. L. (1977). Solid media containing carboxy methyl cellulose to detect Cx – cellulase activity of micro–organisms. J. Gen. Microbiol., 98 : 109 – 115.

13- Hao, X.C.; Yu, X.B. and Yan, Z.L. (2006). Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma ressei* WX-112 using response surface methodology. Food Technol. Biotechnol., 44: 89-94.

14- Kotchoni, O. S. ; Shonukan, O. O. and Gachomo, W. E. (2003).*Bacillus pumilus* BpCRI6, a promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. African Journal of Biotechnol., 2: 140 – 146.

15- Kurosawa, K. ; Hosoguchi, M. ; Hariantono, J. ; Sasaki, H. and Takao, S. (1989). Degradation of tough materials by cellulase from *Corticium rolfsii*. Agric. Biol. Chem., 53: 921 – 937.

16- Lal, R. and Saxena, D. M. (1980). Pesticides and microorganisms. Pest. Rev., 78: 49 – 79.

17- Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurements with the folin phenol-reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265 – 275.

18- Lukens, R. J. and Sisler, H. D. (1958). Chemical reaction involved in the fungitoxicity of captan. Phytopathology, 48 : 235 – 244.

19- Lynd, L. R. ; Weimer, P. J. ; Van Zyl, W. H. and Pretoeius, I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Rev., 66: 506 – 577.
20- Madigan, M. T.; Martinko, J. M. and Parker,J.(2003). Biology of Microorganisms. 10th ed., Prentice Hall, U. S. A., 576 pp.
21- Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulase. Biotechnol and Bioeng. Symp., 5 : 81 – 105.
22- Mandels, M. ; Andreotti, R. and Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulose. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6 : 21–33.
23- Mandels, M. and Sternberg, D. (1976). Recent advances in cellulase technology. J. Ferment. Technol., 54: 267 – 286.
24- Moutschen, J. (1985). Introduction to Genetic Toxicology, John Wiley and Sons chichester.
25- Muller, R. F. and Young, I. D. (1998). Element of Medical Genetics. Harcourt Brace and Co., Honk Kong. 329pp.
26- Ohmiya, k. ; Sakka, K. ; Karita, S. and Kimura, T. (1997). Structure of Cellulase and Their Applications : In Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol. 14, Intercept Limited, Andover, England, U.K. 423 pp.
27- Schmiedeknecht, G. ; Bochow, H. and Junge, H. (1998). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent II, biological control of Potato diseases. Phytopathology, Z., 105: 349 – 386.
28- Shirasue, Y. ; Moriya, M. ; Tezuka, H. ; Termato, S. ; Ohata, T. and Inoue, T. (1984). Mutagenicity of pesticides environmental Science Res., 11 : 617 – 624.
29- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980). Principles and Procedures of Statistics. 2nd ed., McGraw – Hill Company, Inc., London, U.K., 481 pp.
30- Sugimora, T.; Kawachi, T. and Matsushima, T. (1977). A critical Review of Submmalion System for Mutagen Detection. In Progress in Genetic Toxicology, In D. Scott; B. R. Bridges, and F.H.Sobels. Biomedical Press, U.K., pp. 125 – 140.
31- Tanaka, M. and Matsuno, R. (1985). Conversion of lignocellulosic materials of SCP recent development and problems. Enzyme Microb. Technol. 7: 23-31.
32- Tomlin, C. (1997). The Pesticide Manual. Farnham : British Crop Protection Council Cambridge : Royal society of chemistry.
33- Vigfusson, N. V. and Vyse, E. R. (1980). " The effect of the pesticides, dexon, captan, and round up, on sister – chromatid exchanges in human lymphocytes on vitro " Mutat. Res. , 79 : 53 – 57.
34- William, S. M. ; Wold and Isamu Suzuki (1976a). The citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: regulation by zinc of growth and acidogenesis, Can. J. Microbiol., 22 : 1083 – 1092.
35- William, S. M. ; Wold and Isamu Suzuki. (1976 b). Regulation by zinc and adenosine 3, 5 – cyclic monophosphate of grwth and citric acid accumulation in *A. niger*. Can. J. Microbiol., 22 : 1093 – 1101.
36- Wiseman, A. (1985). Handbook of Enzyme Biotechnology. 2thed., Eills Horwood Limited, New York, U.S.A., 457 pp.
37- Yeoh, H. H. ; Khew, E. and Lin, G. (1985). A simple method for screening cellulytic fungi. Mycologia, 77 : 161 – 162.
38- Yoshigi, N. ; Taniguchi, H. and Sasaki, T. (1988). Purification and properties of a new endo – cellulase from *Robillarda* sp. Y. 20. Agric. Biol Chem., 52: 1389 – 1396.

The Mutation Effect of Captan and Tolclofos-methyl in the Fungus *Trichoderma viride* For the Production of Cellulase and Single Cell Protein

Raghad Nabhan Al-Azzo & Riyadh Khalil Al-Barhawi
Department of Biology, College of Science, University of Mosul, Mosul, Iraq
(Received / / 2007, Accepted / / 2008)

Abstract

This study was conducted aiming to obtain an efficient fungal isolate in cellulase and single cell protein production from a local isolate *Trichoderma viride* by the mutation effect of Captan and Tolclofos-methyl.

It was found that Captan has a lethal effect on the isolate at all concentrations of the fungicide and spores suspension used, at the same time it was found that Tolclofos-methyl has an obvious mutational effect on the parental isolate at the concentration 2.5 mg active material/ml of standard medium, the parental isolate showed clear morphological changes in colony shapes, colors, ability for growth in addition to the profound changes in fungal mycelia which was confirmed by the application of slide culture technique.

A qualitative and quantitative tests have been carried out to explore the efficiency of the new mutant for cellulase and single cell protein production in solid and liquid media, it achieved cellulase specific activity and single cell protein (7.158 micromole/min/mgm protein and 37.689 % protein in dry weight) respectively.