تأثير المعاملة بالمبيد الكيميائي البينوميل وسماد اليوريا على فعالية ونمو الفطر *Aspergillus niger* تحت ظروف مختبرية

زينة هادي عبيد
كلية العلوم– جامعة بابل

الخلاصة

نفذت تجربة مختبرية لدراسة تأثير مادتي سماد اليوريا والمبيد الكيمياوي البينوميل على فعالية ونمو الفطر *Aspergillus niger* المعزول من نبات ذرة مصاب إذ استخدمت سلسة تراكيز لسماد اليوريا (0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2) غم/ لتر والمبيد الكيمياوي البينوميل (0.03, 0.06, 0.125, 0.25) غم/ لتر. بينت النتائج المختبرية إن المعاملة بالبينوميل أدت إلى زيادة معنوية كبيرة (عند مستوى معنوية 0.05) في نسب تثبيط نمو الفطر *A. niger* بزيادة التركيز المستخدم إذ بلغت 100% عند استعمال التركيز 0.25غم/ لتر, كذلك أظهرت المعاملة بمادة اليوريا تثبيطا معنويا لمعدلات نمو الفطر بزيادة التركيز المستخدم وخصوصا عند التركيز 2غم/ لتر بنسبة تثبيط 84%. ولغرض الوقوف بصورة مفصلة عن تأثير هذه المعاملات الكيمياوية على حاصل الذرة الصفراء من خلال نسب الإصابة والتلوث لهذه البذور ومدى تأثرها بالمعاملات الكيمياوية أظهرت نتائج التجربة الخزنية لبذور الذرة الملوثة بالفطر *A. niger* حصول انخفاض معنوي كبير في نسب الإصابة والتلوث بالفطر *A. niger* للبذور المعاملة بالمبيد الكيميائي البينوميل (5 غم مبيد لكل كغم من حبوب الذرة الصفراء بناءا على تجارب سابقة) إذ بلغت نسبة الإصابة 6% في حين بلغت نسبة التلوث بالفطر 0%. وأعطت المعاملة بمادة اليوريا اختلاف واضح في التأثير على نسب الإصابة والتلوث للبذورالمعاملة بالفطر *A. niger* باختلاف التراكيز المستخدمة (2.5, 5, 7.5) % ة فقد لوحظ حصول زيادة معنوية في نسب الإصابة والتلوث للبذور بلغت 26% و73% على التوالي عند استعمال التركيز 2.5% بينما انخفضت هذه النسب معنويا مقارنة بالسيطرة عند زيادة تركيز مادة اليوريا في البذور وصولا إلى التركيز 7.5% إذ أعطت نسبة إصابة 6% ونسبة تلوث 33%.

فضلا عن ذلك تم دراسة تأثير هذه المعاملات الكيمياوية على انتاجية الفطر لإنزيم السليليز , وبعد تحديد الظروف المثلى للإنتاج من فترة زمنية وأفضل معاملة فيزيوكيميائية للمصدر الكربوني وأفضل تركيز وأفضل درجة حرارة ورقم هيدروجيني للوسط أضيفت تراكيز مختلفة (0.125, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2)غم/لتر من سماد اليوريا إلى وسط الإنتاج الإنزيمي لبيان تأثيرها على مستوى الإنتاج الإنزيمي بدلالة الفعالية الإنزيمية مقدرة بوحدة/مل فقد بينت النتائج إن مستوى إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* بدأ بتزايد مستمر وصولا إلى التركيز 0.5 غم/ لتر حيث بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.097 وحدة/ مل مقارنة بالفعالية الإنزيمية للسيطرة (وسط مندل الطبيعي والذي تدخل فيه اليوريا كأحد مكوناته بتركيز0.03غم/لتر) إذ بلغت 0.092 وحدة / مل غير ان الفعالية الإنزيمية انخفضت معنويا الى 0.05 وحدة / مل مقارنة بالسيطرة الخالية على مادة اليوريا أو سمادها ، كما انخفضت الفعالية الإنزيمية معنويا بزيادة التركيز عن 0.5 غم / لتر لتصل إلى أدنى مستوى لها عند التركيز 2 غم / لتر. اما بالنسبة لتاثير مبيد البينوميل على انتاج انزيم السليليز من الفطر *A. niger* فقد بينت نتائج التجربة تباين واضح وغير متوقع في تأثير مبيد البينوميل (باستعمال التراكيز السابقة) على إنتاجية الفطر *A. niger* لإنزيم السليليز إذ أدت التراكيز الواطئة من المبيد (0.03 غم/مل) إلى زيادة غير معنوية بإنتاج الإنزيم بلغت 0.099 وحدة/ مل مقارنة بالسيطرة (0.087 وحدة/مل) وبزيادة التركيز إلى 0.06 غم/ لتر انخفضت الفعالية الإنزيمية بصورة غير معنوية لتصل إلى 0.081وحدة/مل إلا إنها عادت لتزداد غير معنويا بزيادة التركيز إلى 0.125 غم/مل لتصل إلى 0.089 وحدة/مل ثم انخفضت إلى مستوى السيطرة عند التركيز 0.25 غم/لتر.

Abstract

Laboratory experiment achieved to study the effect of two chemicals compound benomyl fungicide (0.03, 0.06, 0.125, 0.25) gm/ liter and urea (0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2) gm/ liter on growth and activity of *Aspergillus niger* isolated from infected grain of corn. The result of these experiments showed that significant inhibition (at level p>0.05) of fungal growth at 0.25gm/ liter of benomyl and at 2gm/ liter of urea were 100% and 84% respectively. in order to demonstrate further effect of chemicals on corn yield , the infecting and contaminating ratio of cereal corn were investigated through storage experiment of cereal corn and the result had cleared significant reducing of these ratio with benomyl (5gm/ kg cereal depending on pervious experiment) by 6% for infecting ratio and 0% for contaminating while urea revealed different effect with different concentrations (2.5, 5, 7.5)% , there was significant increasing of two ratio at 2.5% concentration which were 26% for infecting and 73% for contaminating while there was significant reducing for both ratio with increasing the concentration up to 7.5% which was 6% for infecting and 33% for contaminating. The ability of fungal production of

cellulase was determined of optimal conditions were of incubation period, physicochemical treatment of carbon source and its concentration, temperature and pH. serial of the same concentrations of benomyl and urea (0.125, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 105, 2)gm/ liter were amended in Mandels medium for cellulase production , Further increased of enzyme activity at 0.5 gm/liter of urea was 0.097 unit/ ml comparing with natural mandels medium but comparing with control (mandels medium without urea) the enzyme activity was reduced. The result revealed significant reduction of cellulase production higher than 0.5% concentration of urea by 0.021 unit/ ml at 2 gm/ liter cocentration. Fungicide benomyl revealed unexpected data of enzyme production , the lower concentration (0.03 gm/ liter) showed that non significant increasing of cellulase production while the concentration 0.06 gm/ liter revealed non significant reduction, the activity was equal to control in concentration 0.25 gm/ liter which was 0.087 unit/ ml .

المقدمة

تعد بذور الذرة الصفراء حساسة بصورة كبيرة للإصابة لعدد من فطريات التربة ومنها على وجه الخصوص الفطر *Aspergillus niger* عند زراعتها في أجواء رطبة أو عند الخزن في ظروف غير جيدة من تهوية ورطوبة أو تعرضها لخدوش او جروح اثناء عملية الخزن او مايعرف بأمراض مابعد الحصاد (Agrios, 1997; Smith, 2004).

لغرض حماية البذور من خطر الإصابة بالفطريات استعملت طريقة التعفير بصورة واسعة إذ إنها تحمي البذور المخزونة من خطر الإصابة وعلى وجه الخصوص من فطريات التعفن و ما يعرف بلفحة البذور، واستعملت العديد من المواد الكيمياوية في عمليات التعفير ومنها المبيدات الفطرية فضلا عن بقية المواد الكيمياوية المستخدمة في وقاية النبات (نيرجارد، 1965). تضاف المواد الكيمياوية إلى البذور بهيئة مسحوق أو بعد مزجها بالماء لغرض حماية البذرة والبادرات الناتجة من الإصابة بالطفيليات المتواجدة في التربة، وتشير المصادر إلى ان الطريقة المثلى لمكافحة الممرضات النباتية هي باستعمال المبيدات الفطرية الجهازية إذ تتم مهاجمة الكائن الممرض في موقع دخوله، أو بدء نشاطه على النبات، كما تقلل من أخطار تلوث البيئة الناتج من التطبيق العام المتكرر للمبيدات الفطرية غير الجهازية، وأحد أهم هذه المبيدات هو المبيد الفطري البينوميل وهو من مجموعة الـ Benzimidazoles الذي قدم في عام 1968 م ولقي رواجاً كبير كمبيد فطري جهازي ضد مدى واسع من الأمراض. للبينوميل طيف واسع من النشاط السمي ضد الفطريات ومنها السكليروتينيا والبوترايتس والرايزوكتونيا وكذلك أمراض البياض الدقيقي وجرب التفاح (وير، 2003).

أشار أبو شبع (2003) إلى ان استعمال اليوريا كمصدر للأمونيا وبتركيز 8% أدى إلى خفض إصابة بذور الذرة الصفراء بالفطرين *A. flavus* و *A. niger* إلى 66% لكليهما مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 100%، كما وجد (حسين، 2000) إن تعفير عرانيص الذرة الصفراء الملقحة اصطناعيا بالفطر *Aspergillus flavus* باليوريا أدى إلى انخفاض معنوي لنسب الإصابة على العرانيص.

يمثل السليلوز 40-50% من مكونات النبات كما يتواجد في معظم المواد العضوية على الأرض (Omojasola and Jilani,2008). مصدر المكون الأساسي للجدار الخلوي للخلايا النباتية وبعض المجاميع الفطرية، وهو عبارة عن سكريات متعددة متماثلة (Homo poly saccharide) تحتوي على وحدات من سكر D-glucose يصل عددها إلى أكثر من 14000 وحدة (Korish, 2003) ترتبط مع بعضها بأكثر من 100 أصرة من نوع β-1,4-Glucoside لتكون سلاسل بوليمرية خطية وتأتي أهمية السليلوز كونه كثيرا ما يمثل مصدر للطاقة (Coral *et al.*, 2002). يهاجم الفطر *A. niger* جدران الخلايا النباتية الغنية بالسليلوز من خلال إفرازه لإنزيم السليليز والذي ينتمي إلى مجموعة أنزيمات التحلل المائي للأصرة الكلايكوسدية (O-glucosidehydrolaseEC.3.21) وهي مجموعة أنزيمية واسعة الانتشار قادرة على تحليل الآصرة

الكلايكوسدية بين اثنين أو أكثر من الكاربوهيدرات أو بين جزء كاربوهيدراتي وجزء غير كاربوهيدراتي (Onsori *et al.*, 2005).

يتم تحليل السليلوز إلى كلوكوز وبعض السكريات الأقل تعقيدا من خلال مجموعة أنزيمات تعرف بأنزيمات السليليز (Chellapandi&jani,2008) وتشمل ثلاث أنزيمات رئيسية (Mullings,1985) هي :

1- Endo-1,4-β-D-glucanase(1,4-β-D-glucangulcanohydrolase Ec. 3. 2. 1. 4) .
2- Exo-1,4-β-D- glucanase(1,4-β-D-glucangulcancellobiohydrolase Ec. 3. 2. 1. 91) (1,4-B-D-glucangulcancellobiohydrolase Ec.3.2.1.74).
3- β-glycosidase(cellobiose or β-d- glycosidase glycohydrolase Ec.3.2.1.21)

ويعرف Endo-1,4-β-D-glucanse أيضا باسم CMCase، بينما يعرف أنزيم Exo-−D-glucanase 1,4-β باسم Avicelase (Soundar & Chandra,1988) وتقوم هذه الأنزيمات بتكملة عمل بعضها البعض لتحليل سليلوز إلى كلوكوز.

المواد وطرائق العمل

المحاليل والكواشف

محلول مادة التفاعل كاربوكسي مثيل السليلوز

حضر بإذابة 1 غم من مادة CMC في كمية من محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني (5) مع التحريك باستعمال المحرك المغناطيسي ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالمحلول الدارئ نفسه (Mandels *et al.*, 1974). حضر المحلول قبل الاستعمال مباشرة واستعمل لتقدير فعالية الأنزيم.

كاشف (DNS) 3,5 Dinitrosalicylic acid

حضر هذا الكاشف حسب طريقة المتبعة من قبل (Miller,1959).

محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني (5)

ويتكون من محلول خلات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار وحامض الخليك بتركيز 0.2 مولار (Gomori, 1955).

محلول هيدروكسيد الصوديوم

حضرت تراكيز مختلفة من محلول هيدروكسيد الصوديوم شملت (0.5, 0.3, 0.1) مولاري واستعملت لغرض المعاملات الكيمياوية لكوالح الذرة المطحونة.

محلول حامض الهيدروكلوريك

حضرت تراكيز مختلفة من محلول حامض الهيدروليك شملت (0.75, 0.5, 0.25) مولاري واستعملت لغرض المعاملات الكيمياوية لكوالح الذرة المطحونة .

المعاملات الكيمو – فيزيائية للمصدر الكربوني (كوالح الذرة الصفراء المطحونة)

تمت معاملة كوالح الذرة الصفراء المطحونة تحت ظروف معينة من تراكيز المواد الكيميائية والمعاملة الحرارية بالحمام المائي لفترات زمنية مختلفة وكالآتي:

جدول (1) تراكيز المواد الكيميائية والمعاملة الحرارية بالحمام المائي لفترات زمنية مختلفة

تسلسل المعاملة	المادة	التركيز (مولاري)	درجة الحرارة مْ	زمن المعاملة دقيقة
1	HCL	0.75	100	60
2	HCL	0.5	100	60
3	HCL	0.25	100	60
4	NaOH	0.1	100	60
5	NaOH	0.3	100	60
6	NaOH	0.5	100	60
7	NaOH	0.1	–	30
8	NaOH	0.1	–	60
9	NaOH	0.1	100	30
10	NaOH	0.1	100	60
11	NaOH	0.1	100	90
12	NaOH	0.1	100	120
13	NaOH	0.1	100	150
14	NaOH	0.1	100	180
15	سيطرة بدون معاملة	–	–	–

الأوساط الزرعية المستعملة

وسط Potato Dextrose Agar

ويتكون هذا الوسط من:

1. مستخلص البطاطا (200 غم / لتر ماء مقطر) .
2. دكستروز (20 غم/ لتر) .
3. أكار (20 غم/ لتر) .
4. ماء مقطر (1000 مل). (Koneman *et al.*, 1979).

وسط إنتاج إنزيم السليليز Mandles medium

حضر الوسط وفق طريقة (Acharya *et al.*,2008) ويتكون من 0.3غم/لتر كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و2غم/لتر فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و0.3غم/لتر كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ و1.4غم/لتر كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و 0.3غم/لتر يوريا و1غم/لتر protease peptone و 5 ملغم/لتر كبريتات الحديد المائية $FeSO_4.7H_2O$ و1.6 ملغم/لتر كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ و1.4 ملغم/لتر كبريتات الزنك $ZnSO_4$ و 2 ملغم/لتر كلوريد الكوبلت CoCl ويجهز الوسط بمصدر كاربوني (كوالح الذرة الصفراء) وبنسبة 1%.

عقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة، كما أضيف المضاد الحيوي الـ Chloramphenicol إلى الأوساط بنسبة 0.25غم/لتر لغرض منع نمو البكتريا.

طرائق العمل

الفحص المباشر للأجزاء النباتية المصابة

أجريت عملية الفحص المباشر للأجزاء النباتية (الذرة الصفراء) التي ظهرت عليها أعراض الإصابة وذلك بتقطيعها من مناطق مختلفة إلى قطع صغيرة ووضعها على شريحة زجاجية تحوي قطرة من محلول اللاكتوفينول الأصفر وبعد وضع غطاء الشريحة فحصت تحت المجهر المركب لملاحظة أجزاء الفطر الخضرية والتكاثرية. تم الاستعانة بالمفاتيح التصنيفية لغرض التعرف على الفطر (Moubasher,1993; Moubasher and Moustafa,1972; Barnett and Hunter, 1972).

عزل وتشخيص الفطر *A. niger*

تم عزل الفطر من الأجزاء النباتية المختلفة لنبات الذرة (جذور، سيقان، عرنوص الذرة) والتي ظهرت عليها أعراض الإصابة، إذ قطعت الأجزاء النباتية إلى قطع صغيرة طولها 0.5 سم فضلا عن غسل الجذور النباتية قبل التقطيع، ثم عقمت بمحلول هيبوكلورات الصوديوم بتركيز 3.5 % لمدة دقيقة واحدة وبعد غسلها بالماء المعقم ثلاث مرات وضعت في أطباق بتري حاوية على الوسط PDA بواقع ثلاثة قطع لكل طبق ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ لمدة أربعة أيام وبعد انتهاء مدة الحضن نقيت عزلة الفطر باستعمال وسط الـ PDA وجرى تشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات والصفات المجهرية وتم الاستعانة بالمفاتيح التصنيفية لهذا الغرض (Moubasher,1993; Moubasher and Moustafa,1972; Barnett and Hunter, 1972).

اختبار كفاءة بعض المواد الكيمياوية في تثبيط نمو للفطر *A. niger*

1. اليوريا

حضر الوسط الزرعي PDA في سبعة دوارق زجاجية سعة الواحد 250 مل وبواقع 100 مل لكل وسط، عقمت الدوارق بالأوتوكليف ثم أخرجت الدوارق وأضيف لستة منها مادة اليوريا وحسب التراكيز التالية (2, 1.5, 1, 0.5, 0.25, 0.125) غم/ لتر وترك الدورق السابع بدون اضافة كمعاملة سيطرة. صبت محتويات الدوارق في اطباق بتري قطر الواحد 9 سم وبواقع ثلاثة مكررات لكل دورق وبعد تصلب الوسط لقح مركز كل طبق بقرص قطره 5 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة للفطر *Aspergillus niger* وبعمر أربعة أيام، بعدها حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ ولمدة أربعة أيام وتم قياس النمو القطري بأخذ معدل قطرين متعامدين لمستعمرة الفطر يمران بمركز القرص كل 24 ساعة حتى نهاية مدة الحضن (الربيعي، 2007).

2. مبيد البينوميل

حضر الوسط الزرعي PDA في خمسة دوارق زجاجية سعة الواحد 250 مل وبواقع 100 مل لكل وسط، عقمت الدوارق بالأوتوكليف ثم أخرجت الدوارق وأضيف لأربعة منها مادة مبيد البنوميل وحسب التراكيز التالية (0.25, 0.125, 0.06, 0.03) غم/ لتر وترك الدورق الخامس بدون اضافة كمعاملة سيطرة.

صبت محتويات الدوارق في اطباق بتري قطر الواحد 9 سم وبواقع ثلاثة مكررات لكل دورق وبعد تصلب الوسط لقح مركز كل طبق بقرص قطره 5 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة للفطر *Aspergillus niger* وبعمر أربعة أيام، بعدها حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 مْ ولمدة أربعة أيام وتم قياس النمو القطري بأخذ معدل قطرين متعامدين لمستعمرة الفطر يمران بمركز القرص كل 24 ساعة حتى نهاية مدة الحضن (الربيعي, 2007).

التجربة الخزنية

تحضير العالق الفطري

تم تنمية الفطر في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA وذلك بأخذ قرص قطره 5 ملم من حافة المستعمرة النامية للفطر وبعمر أربعة أيام، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ±2 مْ ولمدة أربعة أيام. بعدها غسلت المستعمرة الفطرية باستعمال 25 مل ماء مقطر معقم لكل طبق واستعمل العالق الناتج في معاملة البذور (الخلخالي, 2005).

معاملة البذور بطريقة التعفير بالمبيد الكيمياوي البينوميل

على ضوء نتائج التجارب المختبرية السابقة لتقييم كفاءة المبيد الفطري البينوميل في تثبيط نمو الفطر *Aspergillus niger*، تمت معاملة البذور(حبوب الذرة الصفراء) بالمبيد الكيمياوي وبواقع 5 غم مبيد لكل كغم (بناءا على تجارب سابقة) من حبوب الذرة الصفراء وذلك بعد تلويث الحبوب بعالق الفطر بواقع 25 مل عالق فطري لكل كغم من الحبوب، بعدها قسمت الحبوب إلى أربعة أقسام متساوية وضع كل منها في كيس بولي اثلين، فضلا عن إجراء معاملة مقارنة وذلك بمعاملة الحبوب بالعالق الفطري فقط وبواقع أربعة مكررات. كما أجريت معاملة سيطرة وذلك بأخذ كغم من الحبوب وبدون أية معاملة وتقسيمه إلى أربعة أقسام وزعت في أربعة أكياس من البولي أثلين . حضنت الأكياس جميعها في درجة حرارة المختبر لمدة شهرين، بعدها أخذ من كل كيس مجموعة من الحبوب وبصورة عشوائية وزرعت بعد تعقيمها على وسط أل PDA بواقع خمسة حبوب لكل طبق كما زرعت حبوب أخرى بدون تعقيم وبنفس العدد لكل طبق وبواقع أربعة مكررات لكل معاملة.

حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 مْ لمدة خمسة أيام. سجلت النتائج وذلك بحساب نسبة الإصابة للبذور المعقمة ونسبة التلوث للحبوب الغير معقمة كما حسبت نسبة الإنبات للبذور جميعها ولكافة المعاملات وكالآتي: (أبو شبع, 2003)

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد البذور المصابة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

$$\text{نسبة التلوث} = \frac{\text{نسبة البذور الملوثة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

$$\text{نسبة الإنبات} = \frac{\text{نسبة البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

معاملة البذور بطريقة التعفير بمادة اليوريا

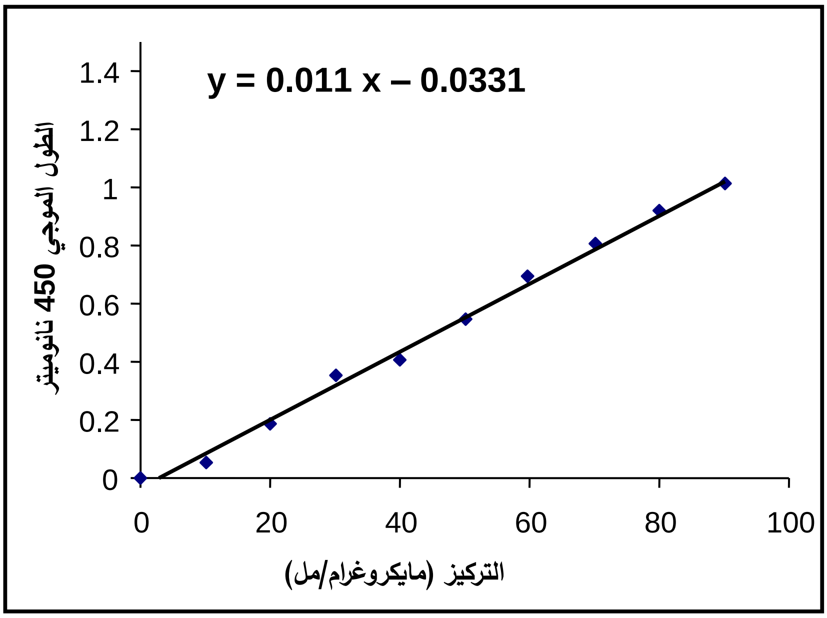
أجريت نفس الخطوات السابقة باستثناء إضافة 25 مل من محلول مادة اليوريا لكل كغم من الحبوب بدلا من المبيد الفطري وبالتركيز (2.5 ,5 ,7.5) % .

تقدير السكريات المختزلة والمنحنى القياسي لسكر الـ D-glucose

استعمل السكر D-glucose كمادة قياسية لعمل المنحنى القياسي للسكريات المختزلة إذ تم إذابة 100 ملغم من سكر الـ D-glucose في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر لنحصل على تركيز 1 ملغم/مل والذي يمثل محلول A. بعدها أخذ 10 مل من محلول A وأكمل الحجم إلى 100 مل ماء مقطر لنحصل على تركيز 0.1 ملغم/مل (100 مايكرو غرام/مل) لاستعماله كمحلول خزين (stock solution).

حضرت سلسلة من التراكيز من المحلول الخزين (stock solution) هي 10 و20 و30 و40 و50 و60 و70 و80 و90 مايكرو غرام/مل وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز.

ولتحديد مقدار السكريات المختزلة في المحاليل اتبعت طريقة (Miller,1959) .



شكل (1) المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز

قياس الفعالية الإنزيمية للسليليز

يعتمد مبدأ قياس الفعالية الإنزيمية للسليليز على مقدار سكر الكلوكوز المتحرر المختزل الناتج من التحلل الإنزيمي للكاربوكسي مثيل سليلوز وعبر عن الفعالية الإنزيمية لل Endoglucanase بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومول واحد من السكريات المختزلة تحت ظروف القياس في 1 مل من الراشح الإنزيمي (Tweddell *et al.*, 1994).

ولتحديد الفعالية الإنزيمية للسليليز اتبعت الطريقة المعتمدة من (Miller, 1959) وتتلخص بإضافة 0.5 مل من الراشح الإنزيمي الخام المفصول بالنبذ المركزي بسرعة 3000 rpm لمدة عشرة دقائق إلى 0.5 مل من محلول CMC 1% في أنبوبة اختبار، حضن المزيج بدرجة حرارة 40 مْ في حمام مائي لمدة نصف ساعة وأضيف 3 ml من محلول الكاشف 3,5 Dinitrosalicylic acid (DNS) ووضع المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 100 مْ لمدة عشرة دقائق لإيقاف التفاعل وبعد التبريد قدرت الفعالية الإنزيمية بدلالة السكريات المختزلة على طول موجي 540 نانوميتر ولتصفير الجهاز استعمل الإنزيم المقتول حرارياً والذي أجريت عليه المعاملات السابقة.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم السليليز

جرت دراسة تأثير بعض العوامل وهي مدة الحضن والمصدر الكربوني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والتهوية في إنتاج السليليز للفطر A.niger النامي على الوسط المعدني Mandles medium إذ ثبتت بقية العوامل باستثناء العامل المدروس ولقح وسط الإنتاج بأقراص مأخوذة من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* النامي في الوسط PDA وبعمر أربعة أيام وبواقع قرص واحد قطره 8 ملم لكل 10 مل من وسط الإنتاج، فصل الغزل الفطري وبقايا المصادر الكاربونية والمواد غير المتحللة باستعمال النبذ المركزي بدرجة حرارة 4 مْ وبسرعة 5000xg ولمدة عشر دقائق، مرر الرائق خلال ورق ترشيح نوعه 0.45 Milipore filter واستعمل الرائق مستخلصاً خاماً وقدرت الإنتاجية بدلالة وحدة/مل (Acharya *et al.*, 2008).

1. مدة الحضن

تم اختبار مدة حضن الفطر *A. niger* الأمثل لإنتاج الإنزيم على كوالح الذرة الصفراء المطحونة والمضافة إلى الوسط المعدني Mandles medium بنسبة 1% (w/v) وعدلت قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 5 باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ ولقح وسط الإنتاج كما وصف سابقا وأجريت عملية القياس وقدرت الفعالية الإنزيمية كل 24 ساعة حتى نهاية مدة الحضن كما ذكر سابقا.

2. المعاملات الكيمو – فيزيائية للمصدر الكربوني

تم دراسة تأثير تراكيز مختلفة لبعض المعاملات الكيمياوية وهي الـ NaOH وال HCL على كوالح الذرة الصفراء والمطحونة وبدرجات حرارية وفترات زمنية مختلفة وحسب الجدول (1) إذ تم إضافة الكوالح بعد المعاملة إلى الوسط المعدني Mandles medium بنسبة 1% (w/v) وعدلت قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 5 باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ. لقح الوسط بأقراص الفطر A. niger وحضنت المزارع وقدرت الفعالية الإنزيمية كما ذكر سابقا.

3. الرقم الهيدروجيني

حضر وسط إنتاج الإنزيم Mandles medium الحاوي على كوالح الذرة الصفراء المطحونة والمعاملة قاعديا وبتركيز 0.1 مولاري لمدة نصف ساعة بدون حرارة وبنسبة 1% كمصدر وحيد للكربون وبأرقام هيدروجينية تراوحت مابين 4-8 باستعمال محلول الفوسفات الدارئ بأرقام هيدروجينية 6 و7 و8 ومحلول خلات الصوديوم الدارئ بأرقام هيدروجينية 4 و5 ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *A. niger* وحضنت المزارع الفطرية وقدرت الفعالية الإنزيمية كما ذكر سابقا.

4. درجة الحرارة

حضر وسط إنتاج الإنزيم وكما في الفقرة أعلاه وبرقم هيدروجيني 6 ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *A. niger* وحضنت المزارع بدرجات حرارية مختلفة 15 و20 و25 و30 و35 و40 مْ وبواقع ثلاثة مكررات، وقدرت الفعالية الإنزيمية.

5. تركيز المصدر الكربوني

حضر وسط الإنتاج بنفس الطريقة السابقة باستثناء استعمال التراكيز (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3)% من المصدر الكربوني (كوالح الذرة الصفراء المطحونة والمعاملة) ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *A. niger* وحضنت المزارع الفطرية بدرجة حرارة 35 مْ واتبعت نفس الطريقة السابقة في القياس وقدرت الفعالية الإنزيمية.

4.5.3.2 تأثير المعاملات الكيمياوية في إنتاج انزيم السليليز من الفطر *A. niger*

1. اليوريا

استعملت تراكيز مختلفة (0.125, 0.25, 0.3, 0.5, 1, 1.5, 2) غم / لتر من سماد اليوريا في وسط الإنتاج الإنزيمي فضلا عن معاملتي السيطرة وهما وسط مندل خال من اليوريا ووسط مندل كامل نسبة اليوريا فيه 0.3 غم/ لتر وأجريت عملية الحضن والقياس كما ذكر سابقا.

2. مبيد البينوميل

استعملت تراكيز مختلفة (0.025 , 0.0125 , 0.06 , 0.03) غم / لتر من المبيد الكيميائي البينوميل في وسط الإنتاج فضلا عن معاملة سيطرة تتضمن وسط مندل خال تماما من المبيد وأجريت عملية الحضن والقياس كما ذكر سابقا.

6.3.2 التحليل الإحصائي

حللت نتائج التجارب وفق نموذج التجارب العاملية بتصميم تام التعشية Factorial experiments with completely randomized design وقد استعمل اختبار أقل فرق معنوي (L.S.D.) Least Significant Difference تحت مستوى 0.05 لبيان معنوية النتائج (الراوي وخلف الله، 1980).

النتائج والمناقشة

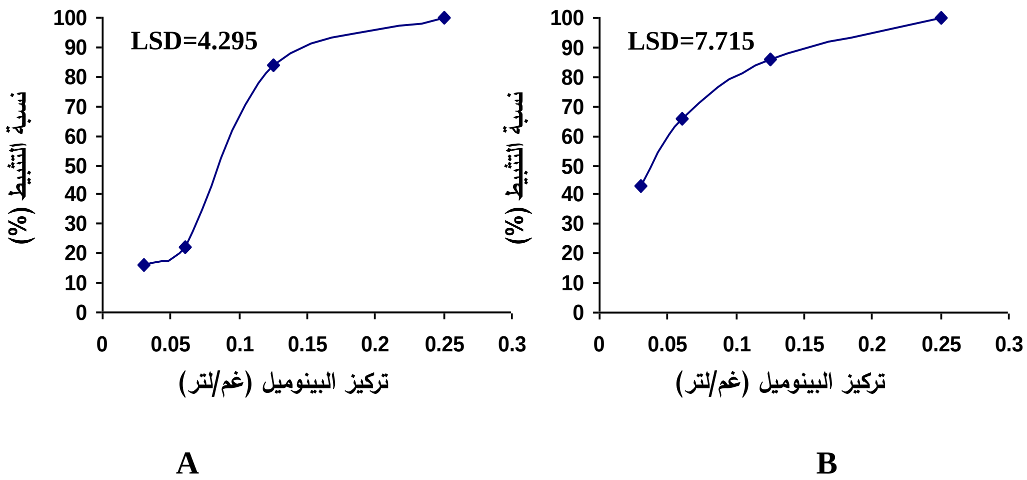
تأثير المبيد الكيمياوي البينوميل في معدلات نمو الفطر *A. nigar*

أظهرت النتائج (شكل 2) حصول زيادة معنوية في نسب التثبيط في نمو الفطر *A. niger* المعامل بالمبيد الكيمياوي بينوميل بزيادة التركيز المستخدم بلغت اقصاها عند التركيز 0.25 غم/ لتر إذ بلغت نسبة التثبيط 100% . كما ان التركيز نفسه اعطى اعلى نسبة تثبيط لمنطقة التسوبر لمستعمرات الفطر وبفارق معنوي كبير ما بين التراكيز المستخدمة . الكاربيندازيم هو الجزء النشط لمركب البينوميل ويتحول البينوميل إلى مثيل 2 بنزايميدازول كربامت (Methyl -2-benzimidazol carbamate " MBC") الذي أطلق عليه مؤخرا كربندازيم، تسبب نواتج تمثيل هذه المركبات تدمير الشكل الخارجي للجراثيم النامية وربما تعمل على تثبيط تخليق الـ DNA أو تتداخل في بعض الجوانب ذات العلاقة بانقسام الخلية أو النواة وعموما تثبط البنزيميدوزولات والتي يعود لها البينوميل كلا من ألفا وبيتا تيوبيولين (α and β tubulin) (وير ، 2003).

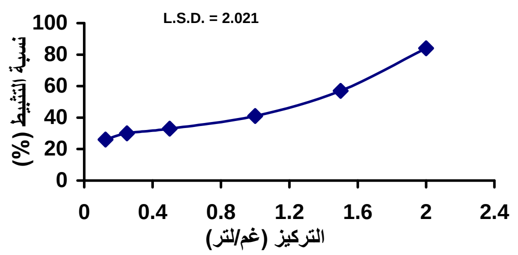
إن هذه النتائج تتفق مع ما أشار إليه (Kummuang, 1997) إلى أن المبيد يعمل ضد عدد من الفطريات الممرضة. إن معدل تثبيط النمو الشعاعي لعدد من الفطريات الممرضة يكون خطي بزيادة تركيز البينوميل و zineb (Abo Ellil and Sharaf, 2003).

تأثير مادة اليوريا في معدلات نمو الفطر *A. niger*

بينت نتائج التجربة (شكل 3) حصول زيادة معنوية في نسب التثبيط للنمو الشعاعي لمستعمرات الفطر *A. niger* المعاملة بمادة اليوريا بزيادة التركيز المستخدم ولكن بنسب مختلفة فالتركيز 2غم/ لتر أعطى أعلى نسبة تثبيط بلغت 84% إلا إنها انخفضت تقريبا إلى النصف عند استعمال التركيز 1غم/ لتر وأعطى التركيز 0.125 غم/لتر اقل نسبة تثبيط بلغت 26% إن السبب في اختلاف قدرة اليوريا على تثبيط نمو الفطر قد يعود إلى إن مادة اليوريا أثناء تحللها في الوسط تعطي مواد ذات سمية تزداد بزيادة تركيزها مثل مادة الامونيا والتي أثبتت سميتها للفطريات وخصوصاً عند التراكيز العالية (Hammond,1991; Piva *et al.*,1995) كما أكد الحساوي والجبوري (1982) بأنه عند استبدال ثلاث ذرات من الهيدروجين في جزئية اليوريا بعناصر أو مجموعات أخرى مثل مجموعة فنيل (phenyl group) أو مجموعة مثيل (methyl group) أو مجموعة فينوكسي (phenoxy group) تصبح اليوريا مادة شديدة السمية ومثل هذه التغيرات في تركيب مادة اليوريا يمكن ان يحصل عند تفاعلها مع مكونات الوسط الزرعي أو الماء وبهذا تتحول اليوريا إلى مادة ذات سمية يعيق نمو الفطر.



شكل (2) تأثير المبيد الكيمياوي بينوميل في تثبيط (A) النمو و(B) التسوير للفطر *Aspergillus niger* النامي في الوسط PDA بدرجة حرارة 25 مْ ولمدة أربعة أيام



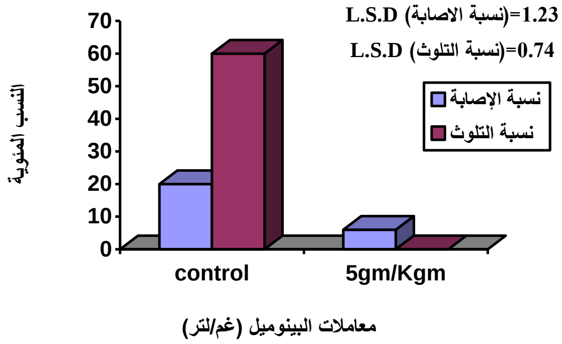
شكل (3) تأثير مادة اليوريا في تثبيط نمو الفطر *A. niger* النامي في الوسط PDA بدرجة حرارة 25 مْ ولمدة أربعة أيام

التجربة الخزنية

تاثير المبيد الكيمياوي البينوميل على نسب الإصابة والتلوث للبذور الملوثة بالفطر *A. niger*

أظهرت نتائج الشكل (4) حصول انخفاض معنوي كبير في نسب الإصابة والتلوث بالفطر *A. niger* للبذور المعاملة بالمبيد الكيمياوي البينوميل إذ بلغت نسبة الإصابة 6 % بينما بلغت نسبة التلوث 0 % عند استعمال التركيز 5 غم بينوميل/ كغم حبوب.

ان هذا التأثير للمبيد الكيمياوي في نسب الإصابة التلوث قد يعود إلى تأثير المبيد على حيوية الفطر من خلال منعه من التغلغل داخل نسيج البذرة وإحداث الإصابة فيها وتشير المصادر إلى أن المبيدات الفطرية الجهازية هي الطريقة المثلى لمكافحة الممرضات النباتية إذ تتم مهاجمة الكائن الممرض في موقع دخوله، أو بدء نشاطه على النبات (وير ،2003) كما تشير الدراسات إلى إن المبيدات الكيمياوية تعمل على الإخلال في تكوين التراكيب البنائية للفطر فضلا عن الإضرار بخلاياه فقد ذكر بأن المادة الفعالة للمبيد على Benzimidozole) الموجودة في benomyle تؤثر على الانيبيبات الدقيقة وهي المكون الأساسي في جدار الفطريات والتي لها دور أيضا ضمن مراحل الانقسام الاختزالي الاعتيادي (Chiocchio *et al.*, 2000; Corbett *et al.*, 1984; Davidse, 1986; 1987).

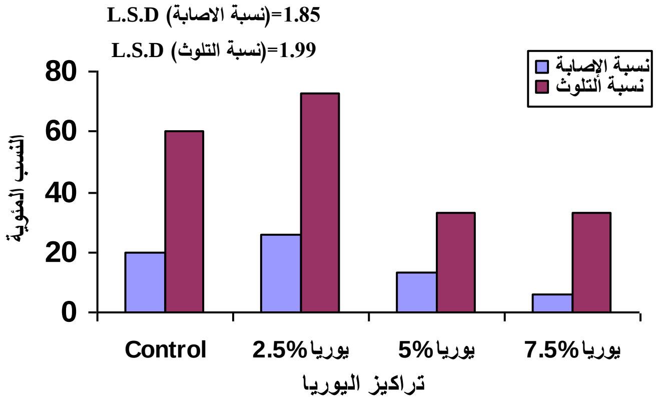


شكل (4) تأثير المبيد الكيمياوي البينوميل على نسب الإصابة والتلوث في البذور المعاملة بالفطر *A. niger*

تأثير مادة اليوريا في نسب الإصابة والتلوث للبذور الملوثة بالفطر *A. niger*

أظهرت نتائج إضافة مادة اليوريا (شكل 5) ظهور اختلاف واضح في نسب الإصابة والتلوث بالفطر *A. niger* للبذور المعاملة بمادة اليوريا باختلاف التراكيز المستخدمة، فقد لوحظ حصول زيادة معنوية في نسب الإصابة والتلوث للبذور بلغت 26% و73% على التوالي عند استعمال التركيز 2.5% بينما انخفضت هذه النسب معنوياً مقارنة بالسيطرة عند زيادة تركيز اليوريا في البذور وصولاً إلى التركيز 7.5% اذ اعطى نسبة إصابة 6% وبنسبة تلوث 33%. كما بين الشكل بان نسبة تلوث البذور بالفطر لم تسجل فرقاً معنويا ما بين التركيزين 5 و7.5 % فقد ظلت النسبة على حالها 33% بدون تغير .

استعملت اليوريا في السيطرة على نمو الفطريات وسمومها في الأغذية فقد لوحظ بان معاملة عرانيص الذرة الصفراء الملقحة صناعياً بالفطر *A. Flavus* باليوريا أدى إلى انخفاض معنوي في نسبة الإصابة على العرانيص (حسين، 2000) وأشار (Brekk *et al.*, 1979) إلى إن زيادة وضع الامونيا على الذرة الصفراء ذات المحتوى الرطوبي 17.6% والتي تحتوي على 100 مايكروغرام /غرام من الافلاتوكسين B وتخزينها لمدة 14 يوم أدى إلى تقليل كمية السم فيها إلى 2 مايكروغرام /غرام.

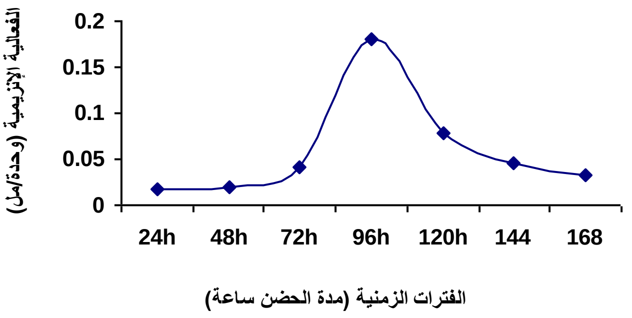


شكل (5) تأثير مادة اليوريا في نسب الإصابة والتلوث للبذور المعاملة بالفطر *A. niger*

الظروف المثلى لإنتاج انزيم السليليز

1. مدة الحضن

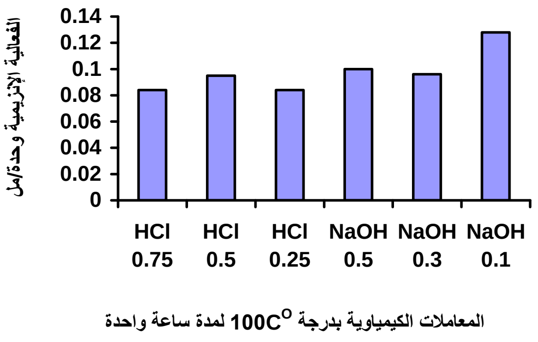
بينت نتائج التجربة (شكل 6) بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان بعد اليوم الرابع من الحضن في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 5 وفي درجة حرارة 25 مْ ثم أخذ مستواه بالانخفاض بزيادة مدة الحضن. أن مستوى إنتاج الإنزيم يقل بزيادة مدة الحضن نتيجة لعدة عوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الإنتاج تؤثر في مستوى إنتاج الإنزيم وفعاليته ومنها أن إنزيم السليليز يعد من الإنزيمات المستحثة لذا فإن معدل إنتاجه يقل أو يتوقف عند تجمع النواتج النهائية لعمل الإنزيم (Mach *et al.*, 1999).



شكل (6) تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A.niger* النامي في وسط Mandels برقم هيدروجيني 5 وبدرجة حرارة 25مْ

2. المعاملات الكيمو – فيزيائية للمصدر الكربوني (كوالح الذرة الصفراء المطحونة)

بينت نتائج التجربة شكل (7) إن أفضل معاملة كيمياوية عند درجة حرارة 100 مْ لمدة ساعة واحدة لكوالح الذرة الصفراء المطحونة كمصدر وحيد للكربون في وسط إنتاج الإنزيم كانت المعاملة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 مولاري تلاه التركيز 0.5 مولاري فيما انخفضت الفعالية الإنزيمية عند استعمال حامض الهيدروكلوريك بتراكيزه المختلفة بنفس الدرجة الحرارية والفترة الزمنية. وعند اختبار تأثير وجود الحرارة (100مْ) وعدم وجودها باستعمال القاعدة (NaOH) بتركيز 0.1 مولاري وعلى فترات زمنية مختلفة أعطت المعاملة بدون حرارة لمدة نصف ساعة أعلى فعالية إنزيمية مقارنة بالسيطرة (بدون أي معاملة) وقد بلغت 0.096 وحدة/ مل لتنخفض بعدها الفعالية الإنزيمية إلى أدنى مستوياتها باستعمال الحرارة لمدة ثلاثة ساعات.

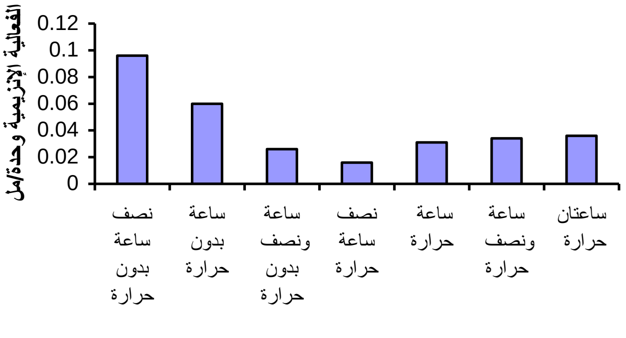


شكل (7) تأثير المعاملات الكيمياوية للمصدر الكربوني على إنتاجية إنزيم السليليز للفطر *A.niger* النامي في وسط Mandels برقم هيدروجيني 5 وبدرجة حرارة 25مْ ولمدة أربعة أيام

إن تأثير المعاملة الكيماوية بالحوامض والقواعد ذات تركيز يصل إلى 0.5 مولاري يزيد ناتج السكريات المختزلة من المخلف السيليلوزي بنسبة (4-3) مرات حيث تعمل القواعد مثل NaOH على تقليل درجة التبلمر

التي تقلل من درجة تعقيد المواد السيليلوزية لغرض سهولة المهاجمة الأنزيمية كما تعمل على إذابة جزء كبير من أشباه السيليلوز واللكنين (Chahal ,1985) واستعمل(Damisa *et al.*, 2008) كل من كوالح الذرة (Corn cob) وتبن الذرة (Corn straw) وقصب السكر(Bagasse) واثبت أن قصب السكر المعامل بهيدروكسيد الصوديوم (NaOH) هو الأفضل في أنتاج السليليز.

إن مصطلح المعاملة الأولية Pretreatment يستعمل بشكل واسع في عملية التحويل والذي يشير إلى خطوة عملية تتحول فيها الكتلة اللكنوسليلوزية من شكلها الطبيعي إلى شكل يلائم أنظمة السليليز ويجعلها مؤثرة .وفي الحقيقة إن ما يصعب مهمة أنزيم السليليز في تحليل المواد السليلوزية بنسبة عالية هو إن معظم الأواصر ألبيتا– كلايكوسيدية في المواد اللكنوسليلوزية الطبيعية لا يمكن أن تهاجم من قبل أنزيمات السليليز بسبب صغر حجم الفتحات الموجودة في الكتلة السليلوزية فضلاً عن عدم حدوث الارتباط بين الأنزيم ومادة التفاعل، كما أن السليلوز الموجود في المواد الطبيعية يكون مرتبطاً مع أشباه السليلوز ومع سكريات عديدة ذات تراكيب أخرى، وكذلك تكون الليفيات الصغيرة الغنية بالكاربوهيدرات محاطة باللكنين ، لذلك يتم اللجوء إلى بعض المعاملات الأولية كالمعاملة بالبخار والمعاملة الكيمائية وهي الأكثر استعمالا إذ أن المعاملة الكيمائية لمواد اللكنوسليلوزية تسبب انتفاخ (Swelling) يؤدي إلى زيادة المساحة السطحية وتقليل درجة البلمرة والتبلور (Crystallinity) وكذلك يساعد على فصل الروابط التركيبية بين اللكنين و الكاربوهيدرات فضلا عن ذلك فانه يؤدي إلى زيادة التحليل (Ravindra & Bhaathi, 2006) و إن المعاملة الكيميائية تعد ضرورية لإزالة اللكنين (Omojasola&Jilani.,2008) فضلا عن ذلك فقد تستعمل عمليات أخرى كالتحلل والطحن إذ أن عملية الطحن تقلل من الخاصية البلورية للسليلوز وتسمح للماء والأنزيم باختراق الألياف كما تزيد من المساحة السطحية المعرضة للإنزيم (Andren *et al.*,1975 ; خضير، 2007).

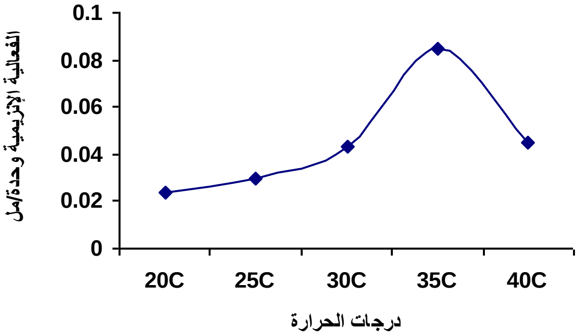


شكل (8) المعاملات الحرارية على إنتاجية إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* النامي في وسط Mandels برقم هيدروجيني 5 وبدرجة حرارة 25مْ ولمدة أربعة أيام عند استعمال 0.1 مولاري NaOH مع الحرارة وبدونها وبأوقات مختلفة للمصدر الكاربوني

3. درجة الحرارة

يبين الشكل (9) إن درجة حرارة الحضن 35مْ كانت أفضل درجة حرارية لإنتاج إنزيم السليليز في وسط إنتاج الإنزيم والحاوي على كوالح ذرة مطحونة ومعاملة بهيدروكسيد الصوديوم (0.1 مولاري) لمدة نصف ساعة وبدون حرارة في حين انخفض مستوى الإنتاج الإنزيمي تقريبا إلى النصف في باقي الدرجات الحرارية ليصل إلى أدنى مستوى له عند درجة حرارة 20مْ . إن هذه النتائج تراوحت مابين نتائج عدة دراسات أجريت على إنزيم السليليز المنتج من الفطر *A. niger* فقد كانت درجة حرارة 40 مْ هي أفضل درجة حرارية للفطر *A.*

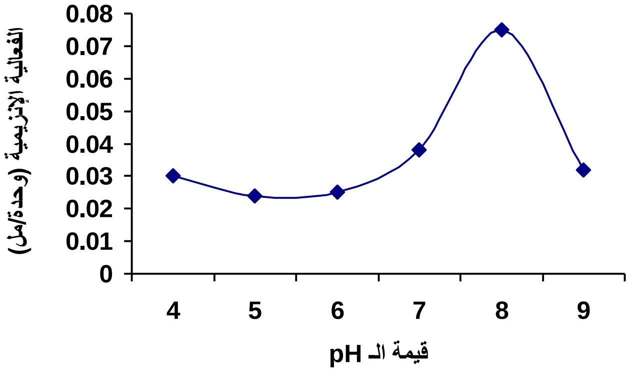
niger والنـــامي علـــى وســـط معـــدني حـــاوي علـــى قشـــور الأنانـــاس كمصـــدر وحيـــد للكربـــون (Omojasola,et.al,2008) و28مْ هي افضل درجة حراري لإنتاج الإنزيم للفطر النامي على وسط معدني حاوي على نشارة الخشب كمصدر وحيد للكربون (Acharya, *et al.*,2008)، إما العاني (2005) فقد بين أن درجة الحرارة 30ْ م هي المثلى لإنتاج السليليز من فطر *Aspergillus sp.* . تؤثر درجة الحرارة بصورة كبيرة في إنتاج الإنزيمات وقد يحدث تشابه بين درجات الحرارة المثلى للنمو ودرجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم كما أن الحد الحراري الأقصى للنمو يعتمد ويتحدد بنوع الإنزيمات أو مدى تأثير البروتينات داخل الخلية بالحرارة إذ أن الانخفاض السريع في معدل سرعة النمو عند رفع درجة الحرارة أكثر من المثلى يأتي نتيجة لفقدان الإنزيم المسيطر على سرعة النمو لطبيعته بفعل الدنتره (Denaturation) وربما إنزيمات أخرى (المظفر، 1983 ;Janson and Ryden, 1998)، ويؤثر ارتفاع وانخفاض درجة الحرارة في أكثر من عامل له علاقة بالنمو ونشاط الكائن الحي كرطوبة الوسط وكمية الأوكسجين الذائبة فيه والطاقة الحركية للجزيئات هذا فضلاً عن حموضة الوسط التي تنعكس على سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها للمركبات الأيضية الأولية التي من أبرزها الإنزيمات (السعد، 1990 ;Chaplin and Bucke, 1990).



شكل (9) تأثير درجة الحرارة على إنتاجية إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* والنامي في وسط Mandels (الحاوي على كوالح ذرة صفراء مطحونة ومعاملة بهيدروكسيد الصوديوم 0.1 مولاري لمدة ساعة واحدة بدون حرارة كمصدر للكاربون) وبرقم هيدروجيني 5 ولمدة أربعة أيام

4. الرقم الهيدروجيني

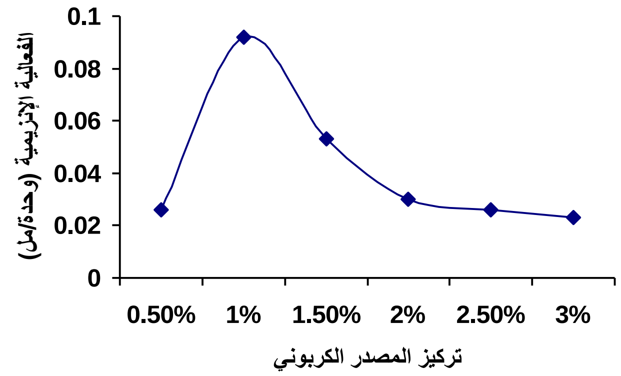
بينت نتائج التجربة (شكل 10) إن الرقم الهيدروجيني 8 هو الأمثل لإنتاج إنزيم السليليز للفطر عند الحضن بدرجة حرارة 35 مْ باستعمال كوالح الذرة المطحونة (المعاملة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري وبدون حرارة لمدة نصف ساعة)، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 0.075 وحدة/ مل فيما إنخفضت الفعالية الإنزيمية عند باقي الأرقام الهيدروجينية لتصل إلى أدنى مستوى لها عند الرقم الهيدروجيني 5 فقد وصلت الفعالية الإنزيمية عنده 0.024 وحدة/ مل. تؤثر حموضة الوسط في عمل الجينات المسؤولة عن تخليق الإنزيم وذلك لكونه من الإنزيمات المستحثة التي يتأثر تخليقها بالإجهاد الفسيولوجي للوسط ودرجة تأين المواد الغذائية فيه (Kubicek *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 1999).



شكل (10) تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* النامي في وسط Mandels (الحاوي على كوالح ذرة صفراء مطحونة ومعاملة بـ 0.1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم لمدة نصف ساعة بدون حرارة كمصدر للكاربون) بدرجة حرارة 35مْ ولمدة أربعة أيام

5. تركيز المصدر الكربوني

أما بالنسبة لتأثير تركيز المصدر الكربوني فقد أعطى التركيز 1% أعلى فعالية إنزيمية في وسط الإنتاج بلغت 0.092 وحدة/ مل في حين نلاحظ انخفاض في الفعالية الإنزيمية عند زيادة التركيز عن هذا المستوى لتصل إلى أقل مستوى لها عند التركيز 3% فقد بلغت 0.023 وحدة /مل (شكل 11). يعد المصدر الكاربوني عنصر مهم وحيوي ومن المصادر الأساسية لنمو الأحياء المجهرية لكونه يلعب دورا كبيرا يتمثل ببناء الخلايا وتكاثرها من جهة وكونه مصدر للطاقة من جهة أخرى (الدليمي، 2002).



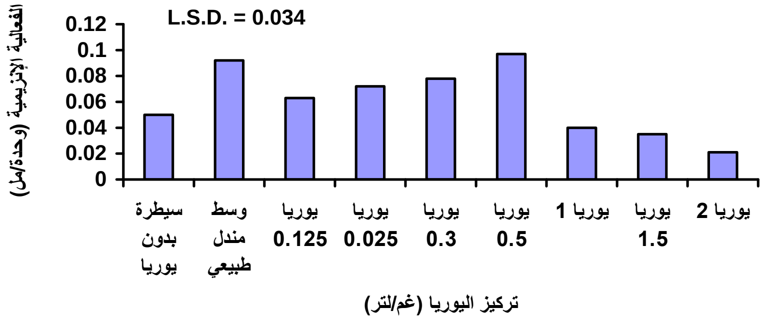
شكل (11) تأثير تركيز المصدر الكربوني على إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* بعد تنميته على وسط Mandels وبرقم هيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 35مْ ولمدة أربعة أيام

إن هذه النتائج تتفق مع بعض الدراسات فقد استعملت العديد من المصادر الكاربونية لإنتاج السليليز تجاريا حيث استعمل Ariffin *et al.*,(2006) الكاربوكسي مثيل السليلوز (CMC) وبتركيز 1% لإنتاج السليليز و ذكر Nipa *et al.*(2006) إن التركيز الأمثل من المادة الأساس (CMC) لإنتاج السليليز (CMCase) من الفطر *A.humicola* كان10 غم /لتر.أما (خضير، 2007) فقد بين أن التركيز 20 غم/لتر يعد التركيز الأمثل لإنتاج السليليز من الفطر *T.viride* باستعمال الكاربوكسي مثيل السليلوز كمصدر للكربون. وذكرت (الزبيدي، 2006) بأن هناك زيادة تدريجية في الفعالية الأنزيمية بزيادة نسبة المخلف السليلوزي (مخلفات

الذرة كمصدر كربوني) حتى بلغت الذروة عند نسبة(5%) ثم بدأت الفعالية الأنزيمية بالانخفاض حتى بلغت أدنى مستوى عند نسبة(10%)

6. تأثير المعاملة بمادة سماد اليوريا على إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger*

نلاحظ من الشكل (12) إن مستوى إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* بتزايد مستمر وصولا إلى التركيز 0.5 غم/ لتر حيث بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.097 وحدة/ مل مقارنة بالفعالية الإنزيمية للسيطرة وهي وسط مندل الطبيعي والذي تدخل فيه اليوريا كأحد مكوناته بتركيز0.03 غم/ لتر إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 0.092 وحدة / مل غير انه بالمقارنة بالسيطرة الغير حاوية على مادة اليوريا أو سمادها سجلت الفعالية الإنزيمية انخفاضا معنويا فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 0.05 وحدة / مل، كما نلاحظ من الشكل بأن الفعالية الإنزيمية قد بدأت بالانخفاض معنويا بزيادة التركيز عن 0.5 غم / لتر لتصل إلى أدنى مستوى لها عند التركيز 2 غم / لتر إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 0.021 وحدة/ مل . استعملت اليوريا (Urea) و الببتون (Peptone) وكبريتات الأمونيوم $((NH_4)_2SO_4)$ من قبل Acharya *et al.*,2008 كمصدر للنتروجين في عملية التخمير لإنتاج الأنزيمات الميكروبية، وذلك لكونها تدخل في تركيب الأحماض الأمنية التي تعد الوحدة الأساسية البنائية للبروتينات والأنزيمات الميكروبية (ساجدي والباقر،1987) وتتباين المصادر النيتروجنية المستعملة لإنتاج السليليز من الأحياء المجهرية بين العضوية والغير العضوية . إلا مادة اليوريا بزيادة تركيزها في الوسط تعطي مواد ذات سمية مثل مادة الامونيا والتي أثبتت سميتها للفطريات وخصوصاً عند التراكيز العالية (Piva,1991; Hammound,1995).

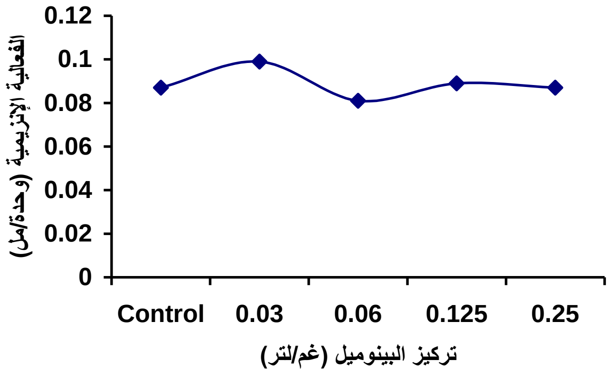


شكل (12) تأثير المعاملة بمادة سماد اليوريا على إنتاج إنزيم السليليز من الفطر *A. niger* والنامي على وسط Mandels الحاوي على مصدر كاربوني بتركيز 1% برقم هيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 35مْ ولمدة أربعة أيام

7. تأثير مبيد البينوميل على إنتاجية الفطر *A. niger* لإنزيم السليليز

بينت نتائج التجربة (شكل 13) تباين واضح في تأثير مبيد البينوميل على إنتاجية الفطر *A. niger* لإنزيم السليليز إذ نلاحظ بأن التراكيز الواطئة من المبيد (0.03 غم / مل) أدت إلى زيادة غير معنوية بإنتاج الإنزيم مقارنة بالسيطرة إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 0.099 وحدة/ مل وبزيادة التركيز انخفضت الفعالية الإنزيمية بصورة غير معنوية لتصل إلى 0.081 وحدة/ مل مقارنة بالسيطرة إلا إنها عادت لتزداد غير معنويا بزيادة التركيز إلى 0.125 غم/ مل لتصل إلى 0.089 وحدة / مل ثم انخفضت إلى مستوى السيطرة (0.087) عند التركيز o.25 غم / لتر. إن هذه النتائج جاءت مقاربة من حيث المبدأ لما وجده الـ (EL-Katatny *et a.l,* 2004) عند اختبار تأثير مبيد البينوميل على إنتاجية الفطر *Trichoderma harzianum* لإنزيم الكايتينيز

والكلوكانيز إذ ان التراكيز الواطئة لم تؤثر معنويا على إنتاجية الإنزيم فضلا عن كون التراكيز العالية (7 and 10µg/ml) شجعت معنويا في زيادة إنتاج الإنزيم على الرغم من كون الفطر حساس لتأثير المبيد عند نموه في وسط حاوي على مبيد البينوميل في التراكيز التي هي أعلى من 2µgl ml، وبين (Peterbauer *et al.*1992) بأن مبيد البينوميل عند التركيز 2 µg/ml قد أدى إلى تثبيط متساو لنمو الفطرين *T. harzianum* و *T. reesei* غير ان التراكيز (0.2-0.5 µg/ ml) قد شجعت على النمو وحفزت إنتاج الإنزيم لكلا الفطرين .



شكل (13) تأثير مبيد البينوميل على إنتاجية الفطر *A. niger* لإنزيم السليليز النامي على وسط Mandels الحاوي على مصدر كاربوني بتركيز 1% برقم هيدروجيني 8 وبدرجة حرارة 35مْ ولمدة أربعة أيام

المصادر

أبو شبع، رائد علي حسين (2003). دور التأثير السمي للأفلاتوكسينات التي يفرزها *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* على بعض أنسجة الفأر الأبيض وإمكانية حماية حاصل الذرة الصفراء من الإصابة بهما. رسالة ماجستير – كلية العلوم– جامعة الكوفة.

الحساوي، غانم سعد الله وباقر عبد خلف الجبوري (1982). الأدغال وطرق مكافحتها. دار الكتب للطباعة والنشر– جامعة الموصل. صفحة 195.

حسين، حليمة صغير (2000). استعمال اليوريا في مقاومة فطريات مابعد الجني وسمومها على الذرة الصفراء المخزونة. إطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد.

خضير , محمد ياسين (2007). تقييم القدرة الإحيائية لإنتاج أنزيم (Cellulases) من عزلات محلية من الفطر Trichoderma وقياس فعاليته تطبيقيا في تحليل المخلفات النباتية.رسالة ماجستير– كلية العلوم –الجامعة المستنصرية.

الخلخالي، هدى جميل باقر (2005). تقييم كفاءة بعض المعاملات الكيمياوية والحيوية في حماية حاصل البطاطا من الإصابة بالفطر *Fusarium solani* وتأثير راشحه في بعض المعايير الفسلجية والكيموحيوية للدم في ذكور الجرذان. رسالة ماجستير – كلية العلوم –جامعة الكوفة.

الدليمي، خلف صوفي داوود 2002 الإنزيمات المايكروبية والتقانات الحيوية. جامعة فيلادلفيا– الأردن.

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله. 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مطبعة مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. صفحة 488.

الربيعي، عبير فوزي.(2007). التاثيرات السمية للفطرين *Penicillium italicum* و *Penicillium digitat* في بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية والنسيجية لذكور الجرذ الابيض وامكانية السيطرة عليها في المخزن اطروحة دكتوراه كلية العلوم – جامعة بابل.

الزبيدي , بان موسى حسن (2006). كفاءة بعض الأنواع الفطرية المعزولة من ترب محافظة كربلاء في تحليل مخلفات الذرة الصفراء وشرش اللبن. رسالة ماجستير– كلية التربية– جامعة كربلاء.

ساجدي، عادل جورج والباقر، علاء يحيى (1987) . المايكروبايولوجي الصناعي (الجزء الأول) . أساسيات التخمرات الصناعية . مطبعة جامعة البصرة .

السعد، مها رؤوف 1990. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. مطابع التعليم العالي في الموصل. جامعة بغداد. 400 صفحة.

العاني، أسوان حمدا لله عبود البيار (2005) . أنتاج السليوليزات من *Aspergillus sp.* المعزول محليا ودراسة بعض خصائصها واستعمالاتها التطبيقية. أطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .

المظفر، سامي عبد الهادي. 1983. حركيات الإنزيمات الجزء الثاني. مطبعة الخلود – بغداد.

نيرجارد . (1965) . كتاب امراض البذور . مترجم . ج2 . منشورات جامعة عمر المختار، البيضاء .

وير، جورج . (2003) . كتاب مبيدات الافات . مترجم . جامعة الملك سعود، النشر العلمي والمطابع .

Abo Ellil, A. H. and Sharaf, E. F. (2003). Growth, morphological alterations and adaptation of some plant pathogenic fungi to Benlate and Zineb. A new look. J. of Biological Sciences 3(3): 271-281.

Acharya, P.B., Acharya, D.K. and Modi, H.A. (2008). Optimization for cellulase production by Aspergillus niger using saw dust as substrate. African J. of Biotech. 7(22),pp4147-4152.

Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. 4th ed. Academic Press. London. pp: 150-203.

Andren, R. K. ; Mandels, M. H. and Medeiros, J. E. (1975). Productio of sugars from waste Cellulose by enzymatic hydrolysis ; 28: 205 - 219.

Ariffin, H. ; Abdullah, N. ; Umi Kalsom, M. S.; Shirai, Y. and Hassan, M. A. (2006). Production and Characterization of Cellulase by *Bacillus Pumilus* EB3. International Journal *of* Engineering and Technology, 3(1): 47-53.

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. ed. Burgess Publishing Company.

Brekk, O.L., Peplinski, A.S., Nofsige, G.W., Conway, H.F., String- Fellow, A.C., Montgamery, R.R., Sohus, V.E. and Bagley, E.B.(1997). Aflatoxin in- activation in corn by ammonia gas. Field Trial, Transactions of the ASAE ,22: 425-432

Chahal , D.S . and Gray , W. D. (1968) . Growth of Selected cellulolytic fungi on wood pulp ; Botanical bulletin of Academic Sinica. PP : 584 – 593.

Chahal D.S. (1985) . Application Environment . microbiol ; 49 : 205 .

Chaplin, M. and Bucke, C. (1990). Enzyme Technology. Cambridge University Press. pp: 12-21.

Chellapandi, P. and Jani, H.M. (2008). Production of Endoglucanase by the native strains of *Strptomyces* isolates in submerged fermentation. Bra. J. Microbiol. 39: 122-127.

Chiocchio, V., Venedikian, N. , Martinez, E.A., Menendes, A., Ocampo, A.J. and Godeas, A. (2000). Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. Internatl. Micobiol., 3: 173-175.

Coral, G.; Arikan , B.;Unaldi, M.N. and Guvenmes, H. (2002). Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type Strain. Turk. J. Biol. 26: 209-213.

Corbett, J.R., Wright, K. and Billie, A.C. (1984). Compounds interfering with cell division ,in the Brochemical mode of action of pesticides. 2nd ed., Academic Press, London.

Damisa , D. ;Ameh , J. B. and Umoh ,V. J. (2008) . Effect of chemical pretreatment of some lignocellulosic wastes on the recovery of cellulase from *Aspergillus niger* AH3 mutant. African Journal of Biotechnology 7 (14): 2444-2450.

Davidse, L.G. (1986). Benzimidazole fungicide mechanism of action and biological impact. Ann. Rev. Phytopathol. Pp: 24- 43.

Davidse, L.G.(1987). Biochemical aspects of benzimidazole fungicides- action and resistance. In: Modern selective fungicides- properties, Application mechanism of action, Lyr, H. (ed.) Longman london.

El-Katatny. M.S., EL- Komy, H.M., Shaban, G.M.,Hetta, A.M.A. and EL- Katatny, M.H. (2004). Effect of benomyl on chitinase and β-1,3- glucanase production by free and alginate encapsulated *Trichoderma harzianum*. Food Technol. Biotechnol. 42 (2) 83-88.

Gomori, G. (1955). Preparation of buffer for use in enzymes studies, In Methods in enzymology. In (ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) Academic press. New York. Vol. 1

Hammond , W. C. (1991). Techniques used to ammoniate aflatoxin contaminated corn in the field. Aflatoxin in corn new perspectives, North Regional Research publication 329, Research Bulletin 599, lowa state University ,pp. 377-382.

Janson, J.C. and Ryden, L. (1998). Protein purification-principles, High-resolution methods, and application. 2nd ed. A John Wiley and Sons, Inc. publication. New York.

Koneman, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.E. (1979). Practical laboratory mycology. 2nd ed. The Williams and Wilkins Co., USA, pp: 165-167.

Korish , M. (2003) . Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast Isolate. Ph. D. Thesis submitted to Johannes Gutenberg-University Mainz.

Kubicek, C.P.; Mach, R.L.; Peter baner, C.K. and Lorito, M. (2001) *Trichoderma* from genes to biocontrol. J. of Plant Pathol., 83: 11-23.

Kummuang, N. (1997). Effect of some fungicides on mycorrhizae in ground orchids. Agric. J. 25: 139-145.

Mach, R.L.; Perter bauer, C.K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S.L.; Zeilinger, S.; Kullnig, L.M.; Lorito, M. and Kubicek, C.P. (1999). Expression of two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzixnum* p1) is triggered by different regulatory signals. Appl. and Environ. Microbiol., 65: 1858-1863.

Mach, R.L.; Perter bauer, C.K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S.L.; Zeilinger, S.; Kullnig, L.M.; Lorito, M. and Kubicek, C.P. (1999). Expression of two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzixnum* p1) is triggered by different regulatory signals. Appl. and Environ. Microbiol., 65: 1858-1863.

Mandels, M. (1974). Production and applications of cellulase. Laboratory Procedures Handook.

Miller, GL (1959). Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5: 193-219.

Moubasher, A.H. & Moustafa, A.F. (1972). Aspergillus egyptiacus sp. Nov. Egyptian J. Bot., 17, 135-149.

Moubasher, A.H. (1993). Soil fungi in Qatar and other Arab contries. Published by the Center for scientific and Applied Research. University of Qatar, Qatar.

Mullings , R. (1985) . Measurement of saccharification by Enzyme Microb. Technol. 7: 586-591.New York: John Wiley and Sons. ISBN 471-05743-6.

Nipa , N. M.; Sultana , S. and Hakim , A. M. (2006). Induction of cellulase bios-mthesis by cellobiose octaacetate in *Aspergillus humicola*. Bangladesh.J.Microbio.23:174-176.

Omojasola**,** P .F. and Jilani , O. P.(2008). Cellulase production by some fungi cultured on pineapple waste. Nature and Science, 6(2).

Omojasola**,** P .F. and Jilani, O. P.(2008). Cellulase Production by

Onsori, H. ; Zamani, M. R. ; Motallebi, M. and Zarghami, N. (2005). Identification of over produce strain of endo-β-1,4- Glucanase. In *Aspergillus species*:characterization of crude Carboxymethyl cellulase. Afr. J. Biotechnol. 4(1): 26-30.

Peterbaure, C.K., Heidenreich, R.T. and Kubicek, C.P.(1992). Can. J. Microbiol.1292-1297.

Piva, G., FP, F., Galvano, R. D. , Dietry, A., Apm, A. and Piva, R. D.(1995). Detoxification methods of aflatoxins .Ann. review. Nutition Research, 15: 767-776.

Ravindra, P. and Bharathi , (2006) .Preiereatment studies of rice bran for the effective production of cellulase . African journal of biotechnology 5:1253-1264.

Smith, K. (2004). Corn disease management in Ohio: Ear and Kernel rot. Ohio state University Extension.

Sounder, S. & Chandra, T. S.(1988).Production of cellulase and detection of Avicel.adsorbing Carboxymethyl cellulase from amesophilic fungus *Humicula grisea Fb*.Enzyme and Microb.Technol.10:368-373.

Trichoderma longi, *Aspergillus nigar* and Saccharomyc *cerevisae* Cultured on Wast Materials from orange. Pakistan Journal of Biological sciences. 1-6.

Tweddell, R.J.; Jabaji-Hare, S.H. and Charest, P.M. (1994). Production of chitinase and *B*-1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Appl. and Environ. Microbiol., 60: 489-495.