# عزل وتشخيص فطر *Trichoderma* spp. من ترب محلية ، وتقييم مقدرتها على حلمأة السيليلوز

(1) صباح يازجي (2) أنور الحاج علي

(2)(1) أستاذ مساعد ، كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية ، جامعة دمشق سوريا.

## الملخص

تم عزل وتشخيص فطر من جنس *Trichoderma* من ترب محلية سورية، و اختبرت لمعرفة مدى قدرته على إنتاج إنزيمات السيللولاز ، وذلك بعد تنميتها على وسط آغار CMC بنسبة 1% ودرجة حرارة 26 °م مدة يومين ، و خمسة أيام ، ثم قيس مقدار تحلل السيللولوز بالاعتماد على قطر الهالة الشفافة (بالسم) باستخدام صبغة أحمر كونغو. أثبتت الدراسة أن العزلات A5 ، A2 ، A7 ، B8 و C6 ذات مستوى فاعلية جيدة مقارنة ببقية العزلات . صنفت العزلات بطريقة استخدام تقانة PCR، وتبين بأنها تابعة لنوعين هما ***Trichoderma harzianum*** ***Rifai*** و ***Trichoderma viride Pers*** . وتفوقت العزلة A5 من محافظة طرطوس بقطر بلغ متوسطه 7.1 سم، مما يوضح أهمية هذه العزلة في إنتاج السيللولاز، و إمكانية التحكم بظروف تنميتها و تطوير إنتاجها.

**الكلمات مفتاحية:** عزل ، تشخيص ، *Trichoderma spp.* ، السيللولاز ، أحمر كونغو، PCR.

## المقدمـة

يعتبر السيللوز المكون الهيكلي الأساسي لجدران خلايا معظم النباتات بالاشتراك مع البكتين واللجنين،ويشكل فيها نسبة مقدارها ما بين40% إلى50% (Gamal et. al.,2007 ). ويتكون السيللوز بشكل أساسي من وحدات كثيرة من سكر الغلوكوز الناتجة عن التمثيل الضوئي والمرتبطة مع بعضها البعض بروابط من نوع β (1-4 ) الغليكوزيدية .

يعد السيللوز حالياً" مصدراً" رخيصاً" لتوريد المواد الخام نظراً" لوفرته وازدياد الطلب على الطاقة والغذاء، وخاصة استغلال موارد الكتلة الحيوية المتجددة كمصدر للمواد الكيميائية والوقود السائل (Mandels, 1982) (Sun, et. al., 2007) ، إلا أن إحدى الصعوبات التي حالت دون التقدم في هذا المجال ، هي صعوبة الحصول على الإنزيمات القادرة على حلمأة السيللوز، وإنتاج الغلوكوز بفترة قصيرة وبتكلفة معقولة، لذلك استخدمت الأحياء الدقيقة التي لها قدرة على تحلل السيللوز كبديل محتمل لحل تلك الصعوبات Shankar and ) Mulimani, 2007) (Kocher et. al, 2008). وقد تمكن الباحثون من تطبيقها في مجالات تغذية الحيوان(Chesson,1987) وصناعات عجينة الورق وتبيضها( Wong and Sadller,1992 ) و الغزل والنسيج (Godfry,1996) و إنتاج العصائر والمولت ( Mantyla et al.,1998 ) و الكحول أوالوقود الحيوي (Yu and Zhang, 2004 ) .

تعد الفطريات من أهم الكائنات الحية القادرة على النمو السريع في ظروف هوائية قادرة على حلمأة السيللوز بأنزيمات السيلولاز مقارنة مع الجراثيم والخمائر، حيث تتمكن تلك الفطور من إنتاج معقد إنزيمي يتألف من تشارك ثلاثة إنزيمات(Guillermo et.al., 2003 ) مختلفة في تفكيك السيللوز وهي:

1. 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase ( endoglucanase; EC3.2.1.4)
2. 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase ( exoglucanase; EC3.2.1.91)
3. β -D-glucoside glucohydrlase (β-glucosidase; EC 3.2.1.21)

يعتبر جنس فطر *Trichoderma* من الأجناس الهامة تجارياً" لإنتاج معقد إنزيمات تحلل السيللوز باستخدام تقنية تخمير المزارع المغمورة والمتميزة إلى حد ما بقلة تكاليفها الكلية مقارنة بطريقة الاختمارات الصلبة (الخفاجي،1990) ، (Hermandez et. al.,2006) ،Gamal et. al.,2007 ).

يكشف النشاط الأنزيمي المحلل للسيللوز بواسطة الأحياء الدقيقة ،أو طريقة الكاشف حمض ثنائي نيترو الصفصاف (DNS ) لتقدير الغلوكوز المتحرر ، أو استخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي HPLC لمعرفة تحلل السيللوز إلى مكونات أبسط مثل الديكستريات والمالتوز والغلوكوز.إلا أن هذه الطرائق السابقة كانت مكلفة وغير دقيقة على حد سواء، ولتفادي ذلك استخدمت طريقة الصبغ بأحمر الكونغو لما لهذه التقانة من مميزات إيجابية كالدقة والسرعة وقلة التكاليف. حيث أثبتت الدراسات أن أحمر الكونغو يوفر طريقة وصفية سريعة، وتعطي نتائج مباشرة، و دقيقة للتحري عن مستعمرات الفطور المنتجة لإنزيم للسيلولاز (Teather and Wood,1982 ) ، (Yu and Zhang, 2004 )،

## هدف البحث

هدف البحث إلى عزل وتشخيص فطريات *Trichoderma spp.* من ترب محلية سورية محددة بثلاث محافظات ( اللاذقية، وطرطوس، وادلب) وبواقع ثماني عينات عشوائية لكل محافظة من أجل اختيار الأفضل منها إنتاجا" لأنزيم السيللولاز بواسطة استخدام أحمر الكونغو وتصنيفها بواسطة تقانة PCR.

## مواد البحث وطرائقه

**1 - جمع العينات:**

جمعت بشكل عشوائي ثماني عينات تربة من محافظات طرطوس ، واللاذقية ، و إدلب وبوزن 200 غرام لكل عينة من البيوت المحمية المزروعة بالبندورة ، وعلى عمق 20سم، والتي لم تُستخدم فيها المبيدات الحيوية ، والتي تحوي على أنواع مختلفة من فطريات *Trichoderma spp.* ، وذلك خلال الفترة ما بين 2008 و 2009 م. حفظت العينات في مكان مظلم وبارد بعد مزجها وتجفيفها بحرارة الغرفة وطحنها في عبوات لدائنية سعة 500غرام لإجراء عملية العزل، والغربلة عليها لاحقا في مخابر الثقافة الحيوية بالتعاون مع قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة.

**2- الأوساط الغذائية المستخدمة:**

**- أغار البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Agar:**

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 39 غرام من الوسط في لتر من الماء المقطر و بعد ضبط درجة الحموضة PH على 6.6 ، وزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق ، ثم عقمت الدوارق على درجة 121 °م ، ثم بردت الدوارق لدرجة حرارة5± 40 م° و صبت في أطباق بتري معقمة ذات قطر 8 سم بعد إضافة المضاد الحيوي الستربتومايسين بتركيز $5X10^{-2}$ وحدة دولية في اللتر للحد من نمو البكتريا قبل تصلبه .

**- وسط اختبار الفعالية السيليلوزية Carboxy Methyl Cellulose ( CMC ) :**

بتحضير الوسط وفق طريقة ( Mandels , 1982 ) و يتكون من ( غ / ل ): 0.3 $COCl_2$, 0.016 ، $(NH4)_2SO_4$ ,1.4, $KH_2po_4$ ,2 , $CaCl_2$ ،0.3 ،$MgCl_2H_20$ 0.3 , $MnSO_4.H_2O$, 0.014 , $ZnCl_2.H_2O$, 0.005 , $FeSO_4.7H_2O$ , 0.002 Urea ،والمضاف إليها 1% من CMC ( كمصدر وحيد للفحم والطاقة ) و أجار بنسبة 1.5% . ولقحت أطباق بتري (بقطر 8سم) التي تحوي على وسط أغار CMC 1% بقطعة أغار بقطر 7 مم مأخوذة من وسط مستعمرة الفطر النامي على الوسط الغذائي PDA بواسطة الثاقب الفليني و بعمر 3 أيام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 26 °م لمدة يومين و خمسة أيام و بواقع خمسة مكررات . و أجريت المقارنة و ذلك بترك طبقين من دون تلقيح بالفطر لكل مكرر .

**3 - تحضير التربة وعزل الفطر *Trichoderma* spp**

استخدمت طريقة نثر التربة و ذلك بأخذ 0.5 غرام من عينة التربة بعد مزجها جيدا" و تجفيفها هوائيا" و طحنها و من ثم نثرها فوق الوسط (أغار دكستروز البطاطا ) في أطباق بتري , و حضنت الأطباق ( خمسة أطباق لكل عينة ) على درجة حرارة 25 °م بعد إغلاقها بشريط شمعي لاصق وبظلام مستمر لمدة أسبوع مع الفحص يوميا" بعد اليوم الثالث.

**4- تشخيص عزلات الفطر شكليا"**

تم تعريف الفطريات استنادا إلى الصفات المزرعية ( دائرية, شعاعيه , مكورة , الخ) والشكل الظاهري للمزارع الفطرية(هوائي,كثيف, قطني,زغبي,الخ) وشكل الحوامل البوغية وصفات الأبواغ (الشكل, الحجم, اللون والتزينات) حسب ( Samuel ,1999).

**5- الكشف عن تحلل السيليلوز وإنتاج الأنزيمات**

لقحت أطباق بتري التي تحوي على وسط أجار CMC بنسبة 1% بقطعة أغار بقطر 7 مم مأخوذة من المزارع الفطرية النامية على بيئة أغار الدكستروز و البطاطا (PDA ) وبعمر (3) أيام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة1 ±26 م° لمدة يومين وخمسة أيام وبواقع خمسة مكررات لكل عينة وطبقين بدون تلقيح كشاهد لكل مكرر. ثم قيس نصف قطر الهالة الشفافة من السيليلوز المتحلل باستخدام محلول صبغة أحمر الكونغو بنسبة1% ، والمغمورة فوق كل طبق لمدة 15 دقيقة وبعد سكب الصبغة طوفت بمحلول 1 نظامي من كلور الصوديوم لمدة 15 دقيقة ثم أوقف نمو الفطريات بإضافة 1 نظامي من حمض كلور الماء ، وقيس نصف قطر الهالة الشفافة باستخدام مقياس بيكاليبس الرقمي بالسم ( Yu and Zhang,2004) .

**6- التشخيص الجزيئي**

باستخدام تقانة سلسلة تفاعل البوليميريز( PCR ) ، والتي تعتمد على استخلاص الأحماض النووية CTAB حسب(Doyle et. al.,1987) و تقدير تركيز و نقاوة حمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين(DNA) باستخدام المطياف الضوئي عند طول موجة 260 نانوميتر. أما تقانة التضخيم العشوائي لسلسلة (DNA) فقد تمت بالرحلان الكهربائي ، ثم التلوين و التصوير باستخدام جهاز وحدة كشف حزم DNA بأشعة UV.

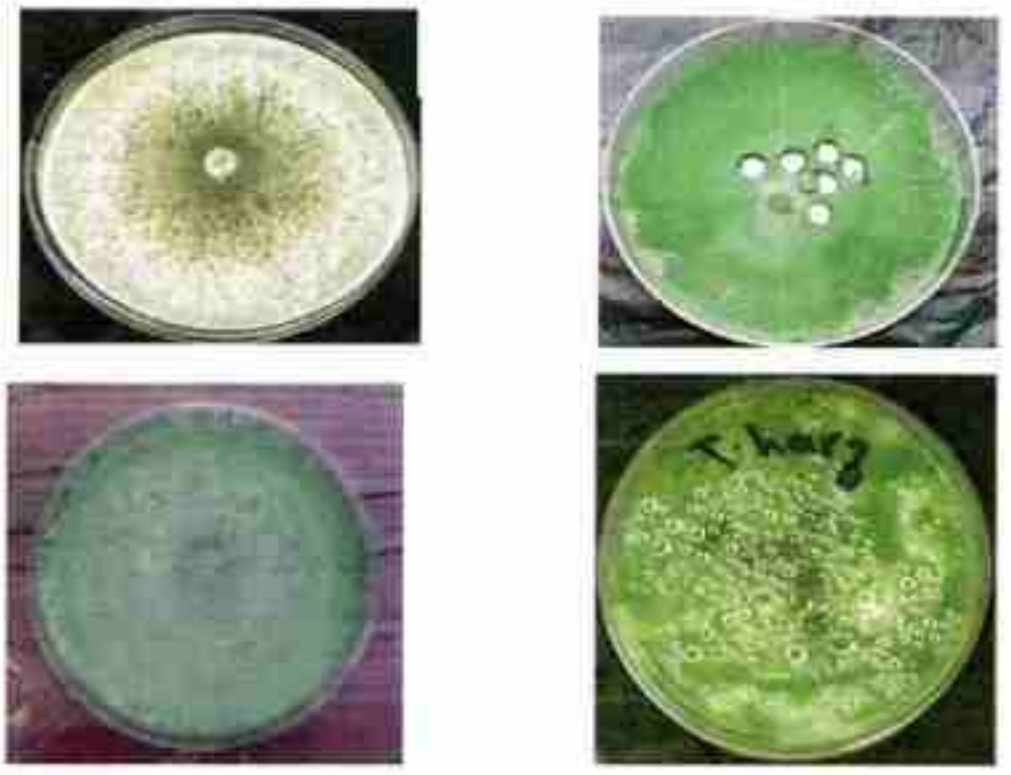
**7- التحليل الإحصائي**

أجري التحليل الإحصائي للبيانات بإيجاد المتوسط الحسابي والانحراف المعياري حسب SPSS15 بواسطة الحاسوب الأكتروني, كما تمت مقارنة متوسطات العزلات المأخوذة من بعض المحافظات لتحديد أفضلها حسب ( Russel,1991).

## النتائج والمناقشة

### تشخيص عزلات الفطر

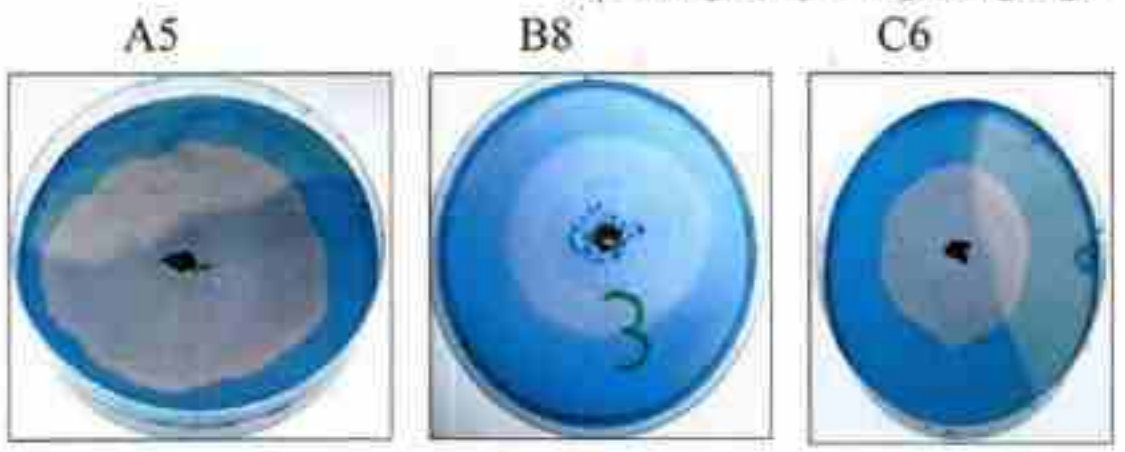
بينت نتائج فحص العزلات الفطرية التي نمت بسرعة بعد 5 أيام من التحضين على درجة حرارة 25م° على وسط أغار البطاطا و الدكستروز PDA مشكلة ابواغا" خشنة أو ملساء ذات لون أخضر أو أصفر بأبعاد يتراوح طولها ما بين 3.6-4.8 µm وعرضها 3.5- 4.5 µm، والمشيجة مقسمة عليها حوامل كونيدية مشكلة فياليدات فردية أو متجمعة و يبرز منها رويسات غزيرة لزجة ورطبة كما هو موضح بشكل (1) لنمو مزارع الفطرالمعزولة ، ومظهر المشيجة، والأبواغ ،وهذا يتفق مع ما توصل إليه كل من(Domsch et. al.1993 ) و(Samuel ,1999) .



الشكل (1 ) نمو مزارع الفطر المعزولة ومظهر المشيجة والأبواغ

1- الكشف عن تحلل السيللوز وإنتاج إنزيم السيلولاز:

يبين الجدول (1) العزلات وعددها 24 عزلة مع قطر الهالة خلال التحضين ليومين و خمسة أيام على وسط CMC 1%، حيث لوحظ بأن قطر الهالة كان متفاوتا" بين المحافظات، حيث أبدت عزلات طرطوس زيادة في قطر الهالة بعد خمسة أيام من الحضن وبلغت أقطارها 7.1 ، 5.8 و5.2 سم لكل من العزلات A5، A2 A7و على التوالي ، وبلغ قطر المتوسط العام لتلك العزلات1.08±5.04 سم بعد التحضين في فترة خمسة أيام ، بينما كانت قيم المتوسط العام لقطر عزلات اللاذقية متوسطة بمقدار0.73±4.74 سم ، حيث تفوقت العزلة B8 بمقدار 6.4 سم على بقية المجموعة نفسها ، أما عزلات إدلب ، فكانت بقيم أدنى من غيرها وبمتوسط عام بلغ 0.72±3.85 سم ، وكانت العزلة C6 متفوقة على العزلات الأخرى من نفس المجموعة نفسها بقطر 4.9 سم .



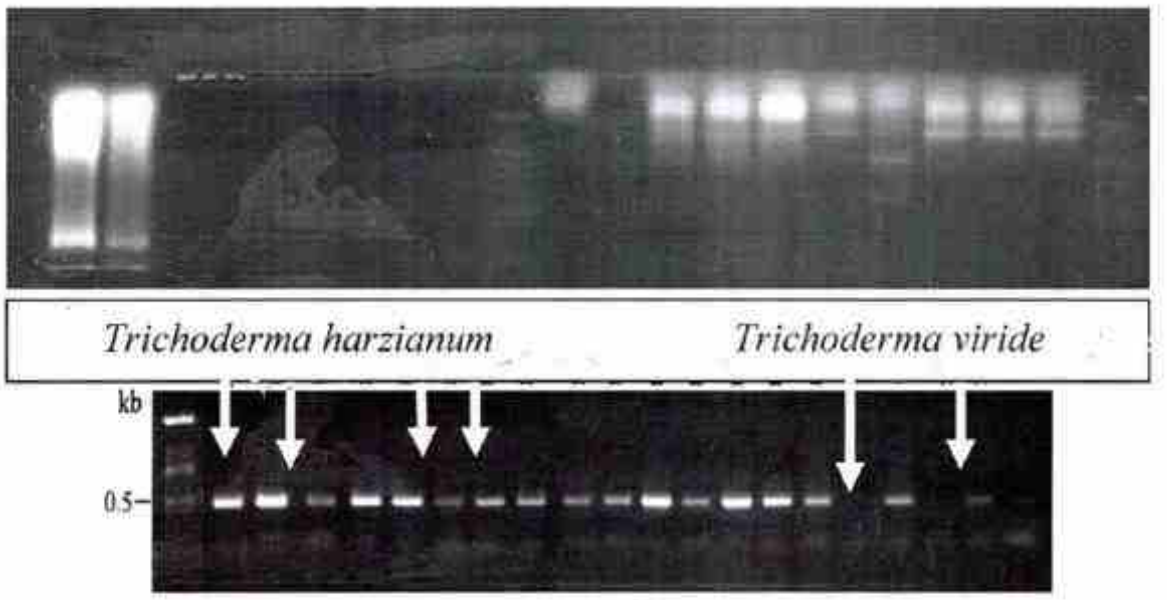

شكل (2 ) يوضح الهالة الشفافة في اطباق أغار( CMC) الملقحة بالفطر *Trichoderma spp.* والمصبوغة بأحمر كونغو، والمثبتة بمحلول حمض كلور الماء (1) نظامي

تشير هذه النتائج إلى وجود اختلافات واضحة في كفاءة العزلات المختلفة على إنتاج إنزيم السيلولاز ويعزى هذا التباين إلى الاختلافات الوراثية فيما بينها ، فمزارع الأحياء الدقيقة وإن انتمت إلى المجموعة نفسها تتباين وراثيا" في خصائص نموها وفعاليتها الأيضية ( Elander and Chang,1979 )، ولاسيما بين المزارع، والعزلات التي تنتمي إلى الجنس والنوع ذاتهما، بل قد يكون تابعا" عن استجابة العزلات للظروف البيئية . فالبناء الوراثي بقدر ما يتصف بالثبات ، فإنه يتميز بالمقابل بمرونة مذهلة في الاستجابة للتغيرات البيئية ، أي أن البيئة تؤثر جذريا" في التعبير عن الصفات المظهرية للمورثات ، وقد لوحظ هذا التباين في دراسات (Sazci et. al,1986) و (Carle-urioste et. al., 2002 )خلال تحريبهم عن قدرة عزلات فطر *Trichoderma* ماخوذة من مركز *Marmara* للبحث العلمي، حيث بينت نتائجهم أنه بعد التحضين لمدة يومين كان أقل قطر للهالة الشفافة1 سم و أعلى قطر 2.5 سم . أما بعد التحضين لخمسة أيام ، فكان أقل قطر للهالة الشفافة 2.4 سم في عزلة ادلب (C2 ) و أعلى قطر 7.1 سم في عزلة طرطوس (A5) ، وبالتالي أبدت جميع عزلات القطر المحلية قدرة متفاوتة في إنتاج إنزيمات السيلولاز في أطباق أغار CMC خلال5 أيام من الحضن .

أما التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر باستخدام PCR فالجدول ( 2 ) يبين المرنسات الرنيسة المستخدمة لتميز بين الأنواع والشكل (3 ) يبن تلوين وتصوير وحدة كشف حزم DNA بأشعة UV حيث عرف منها نوعين هما *Trichoderma harzianum Rifai* و *Trichoderma viride* Pers ،وهذا يتوافق مع ما توصل إليه( Miyazaki, et. al.,2009 ) بحصوله على نوع فطر *Trichoderma harzianum Rifai* المسبب لمرض الفطر المأكول بلون أخضر بعد حصاده وذلك بالاعتماد على المرنسات المذكورة . أما النوع الثالث من الفطر فلم يتم التعرف عليه بسبب عدم توفر المرنسات الخاصة به .

**الجدول(2) يبين المرنسات الرنيسة المستخدمة للتميز بين أنواع جنس *Trichoderma***

| Code | Sequence | MW (g/mol) | nmol | Con (µ.M) |
|---|---|---|---|---|
| 285/1 | CGGTGACATCTGAAAAGTCGTG | 6799 | 38.1 | 381 |
| 285/2 | TGTCACCCGTTCGGATCATCCG | 6662 | 25.2 | 252 |




الشكل( 3) يبن تلوين وتصوير وحدة كشف حزم DNA بأشعة UV

## المراجع


1. **الخفاجي** ؛زهرة محمود (1990 ). **التقنية الحيوية** . مطابع دار الحكمة للطباعة و النشر ،جامعة بغداد، العراق .

2. **CHESSON, A., (1987)- Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. Recent advances in animal nutrition**. London: Butterworth. 71– 89.

3. **CARLE-URIOSTE, J. C., ESCOBAR-VERA, J., El-GOGARY, S., HENRIQUE-SILVA, F., TORIGOI, E., CRIVELLARO, O., HERRERRA-ESTRELA, A., El-DORRY, H. (2002)- Cellulase Induction in Trichoderma reesei by Cellulose Requires Its Own Basal Expression**. *Journal of Biotechnological Chemistry*, (272), 10169-10174.

4. **DOMSCH, K. H., GAMS, W. and ANDERSON, T. H. (1993)- Compendium of soil fungi**. Academic Press, London, England: 794-809.

5. **DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L.(1987)-A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue** .Photochemical Bulletin , (19) 11-15.

6. **ELANDER, R. P. and CHANG, L.T. (1979)- Microbial Culture Selection. In Microbiai Technology**. Academic press. New York.63-70.

7. **GAMAL, M.A., SHABANA, Y. M, ISMAL, A.E., RASHAD,Y.M.. (2007)-*Trichoderma harzianum*:A bio-control agent against bipolaris oryzae**. Mycopathology, ( 164): 81-89.

8. **GODFRY, T. and Smith. W. (1996)-Textiles In Industrial enzymology**, 2nd ed. London: Macmillan Press, 360–371.

9. **HERMNANDEZ, M., RODRIGUEZ, M., GUERRA, N. and ROSES, R. (2006)-Amylase by Aspegillus niger in submerged cultivation on tow wastes from food** . Industries journal of food engineering. **73** (1):93-100.

10. **KOCHER, G. S., KALRA, K. L and BANTA, G., ( 2008)-Optimization of cellulase production by submerged fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum.*** Rut-C 8230. International Journal of Microbiology, 5-12.

11. **Mandels, M.(1982)-Cellulases**. Annual Reports on Fermentation Processes (5),35–79.

12. **MANTYLA, A., PALOHEIMO, M. and SUOMINEN, P. (1998)- Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei.*** In: Harman GF, Kubicek CP, editors. *Trichoderma & Gliocladium*—Enzymes, biological control and commercial applications, ( 2nd. ed) Taylor & Francis, Ltd. London: 291–309.

13. **MIYAZAKI, K . TSUCHIYA ,Y. and OKUDA, T. (2009)-Specific PCR assays for the detection of Trichoderma harzianum causing green mold disease during mushroom Cultivation**. Mycoscience **50**:94–99.

14. **SAMUEL, G. J. (1999)- *Trichoderma*:** a review of biology and systematic of the genus. Mycol Res;100:923–35.

15. **SHANKAR, S.K., MULIMANI, V.H. (2007) -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation**. Bio-resource Technology. 98: 958–961.

16. **SAZCI, A., RADFORD, A. and ERENLER , K. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicyclic acid reagent method**. Journal of Applied Bacteriology **61:** 559-562.

17. **SUN, H.Y., GE, X.Y., ZHANG, W.G.. (2007)- Production of a novel raw-starch digesting gluco amylase by *Penicillium* spp. X-1 under solid state fermentation and its use in direct hydrolysis of raw starch**. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23: 603–613.

18. **TEATHER, R. M. and WOOD, P. J.( 1982)- Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen**. Applied and Environmental Microbiology **43**, 777–7o0.

19. **RUSSEL, F. (1991)-MASTATC. Director crop and soil sciences department**. (version 2.10) Michigan State Uni. USA.

20. **YU, Z. and ZHANG, H. (2004). "Ethanol fermentation of acid hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae***" Bio-resource Technology **93**: 199-204.

21. **WONG. K. Y. and SADDLER, J. N. (1992). *Trichoderma* xylanases, their properties and applications**. In: Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA, Voragen AGJ, editors. Xylans and xylanases. Progress in Biotechnology. Elsevier, 7: 171–186.

R. j. of Al-Furat univ. Ground Science Series V: 2010

# Isolation and Identification of *Trichoderma* spp. from Syrian soils and evaluation its ability to hydrolyze the cellulose

[(1)] Yazaji, Sabah [(2)] AlhajAli, Anwar

[(1)(2)] Assistant Prof., Faculty of Agriculture, Food Science Department .Damascus University. Syria.

## ABSTRACT

Isolation and identification of the fungus *Trichoderma spp.* were screened from local Syrian soil samples to determine the ability to produce cellulase enzymes by dye Congo red and PCR technique. The isolates were cultured on 1% CMC agar and incubated at 26 C° for 2 days and 5 days, then the activity of cellulase enzymes were measured by the zone diameter in cms . The results showed that isolates A5, A2,A7,B8 and C6 had the higher level of clear zone around the colonies compared to the others and the control. The classification of these isolates by PCR technique reveal that they were ***Trichoderma harzianum Rifai*** and ***Trichoderma viride Pers***. The isolate A5 from Tartous showed the highest level with the average zone of 7.1 cm, which illustrates the importance of A5 in the production of cellulase enzymes.

**Keywords:** Isolation , Identification , Trichoderma spp. , cellulase, Congo red, PCR.

[(1)(2)] Food Science Department P. O. Box 30621.Damascus University. Syria