تأثير الأس الهيدروجيني pH ودرجات الحرارة في الفعالية الأنزيمية الخارج خلوية لأنزيم البروتيز مختبرياً في الفطريات الصائدة للنيماتود

كاظم جاسم حمادي[1] علي عبدالواحد قاسم[2] حسن غانم النصراوي[3]
[1] قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة البصرة
[2] قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة ميسان
[3] هيئة التعليم التقني / المعهد التقني / العمارة

ISSN –1817–2695
((الاستلام 2007/8/7 ، القبول 2008/4/23))

الخلاصة Summary

تم في هذهِ الدراسة معرفة تأثير قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة في النمو الشعاعي وفي الفعالية الأنزيمية للبروتيز المفرز في الأوساط الزرعية الصلبة لستة أنواع من الفطريات الصائدة للنيماتود هي *Arthrobotrys anchonia* و *A.dactyloides* و *A.oligospora* و *Dactylella brochopaga* و *Dactyleria pyriformic* و *Monacrosporium eudermatum* . وقد أختلف نمو هذهِ الفطريات وفعاليتها الأنزيمية خارج خلوية (Extracellular Enzymes) من نوع إلى أخر باختلاف قيمة الأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة . لوحظ أن الفطر *A.oligospora* أظهر أعلى معدل نمو في جميع قيم الـــ pH تلاه الفطر *M.eudermatum* بينما أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو ، تلاهُ الفطر *A.anchonia* .ولوحظ أن جميع الفطريات أعطت أكبر نمو عند قيمة الأس الهيدروجيني 7.5 تلتها القيمة 7 ، وظهر أقل نمو عند pH = 8.5 في حين لم يظهر أي نمو لهذهِ الفطريات في القيمة 6 . وأظهر الفطر *A.oligospora* أكبر فعالية أنزيمية مقدرة بقياس قطر الهالة الشفافة حول المستعمرة النامية تلاهُ الفطر *M.eudermatum* ، بينما أقل فعالية أنزيمية ظهرت في *D.pyriformic*. وكما لوحظ أن أفضل فعالية أنزيمية ظهرت في الفطريات عند قيمة الـــ pH = 7.5 ، تلتها القيمة 7 ، بينما لم تظهر أي فعالية أنزيمية عند قيمتي الأس الهيدروجيني 6 و 8.5 بينت الدراسة أن الفطر *M.eudermatum* أظهر أعلى معدل نمو في جميع قيم درجات الحرارة المختبرة تلاهُ الفطر *A.oligospora* بينما أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو ، وأختلف النمو الخضري لبقية الفطريات بصورة واضحة . وكانت درجة الحرارة المثلى التي ظهر عندها أفضل نمو لجميع الفطريات المختبرة هي الدرجة 25 مْ تلتها الدرجة 30 مْ ، في حين كان أقل نمو لهذهِ الفطريات ظهر في درجة الحرارة 40 مْ تلتها الدرجة 15 مْ . ولوحظ أن الفطر *A.oligospora* أعطى أكبر فعالية أنزيمية تلاهُ الفطر *M.eudermatum* بينما كانت أقل فعالية أنزيمية ظهرت في *D.brochopaga* عند نموها في درجات الحرارة المختبرة ، وكما لوحظ أن أفضل فعالية أنزيمية ظهرت في الفطريات عند درجة الحرارة 30 مْ ، تلتها درجته الحرارة 25 مْ أما عند درجتي الحرارة 15 مْ و 40 مْ فلم تعط جميع الفطريات أي فعالية أنزيمية . ولوحظ أن الفطر *A.oligospora* هو الفطر الأكثر نمواً وأنتاجاً لأنزيم البروتير عند قيمة الـــ pH = 7.5 (القيمة المثلى) وفي درجة الحرارة المثلى وهي 25 مْ .

Keywords : Nematode -trapping fungi , protease , pH , temperature , Extracellular enzymic activity.

المقدمة Introduction

تُعدّ الفطريات المهلكة للنيماتود من الكائنات المستوطنة في التربة Soil Inhabitants والتي تنتشر في معظم بقاع العالم من المناطق الاستوائية حتى المناطق القطبية وهذه الفطريات تمتلك القدرة على مهاجمة النيماتود الحية واصطيادها وقتلها وهضم محتوياتها وفي أطوار حياتها جميعها [1 ، 2) ، حيث تُعدّ أعداء طبيعية للنيماتود يمكن استعمالها بوصفها عوامل سيطرة حيوية ضد النيماتود المتطفلة على النباتات والحيوانات على حد سواء[3 ، 4 ، 5]. وتقوم هذهِ الفطريات خلال اصطياد النيماتود باختراق جدارها وهضم محتوياتها الداخلية ، وأن ميكانيكية الاختراق يعتقد أنها تحصل بوسائل ميكانيكية وأنزيمية [6] ، من المعروف أن جدار النيماتود يتألف من الكيوتكل والذي يتركب من البروتين (الكولاجين) مع كميات قليلة من الدهون والكاربوهيدرات . بعد

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

حدوث الالتصاق بين أدوات الاصطياد في هذه الفطريات وبين النيماتود يكون الفطر أنبوب اختراق Penetration Tube لاختراق جدار النيماتود [3 ، 7] . ولوحظ أن أنبوب الاختراق يحتوي على أجسام كثيفة Dense Bodies يوجد داخلها مواد غذائية وأنزيمات محللة [8 ، 9] . إن الفطريات المهلكة للنيماتود لها القدرة على أنتاج أنزيمات عديدة وبكميات تكفي لاختراق النيماتود ، ومن أهم الأنزيمات التي تفرزها هذه الفطريات هو أنزيم البروتيز Protease الذي يكون مشابه لأنزيم البروتيز الذي تفرزهُ الفطريات المتطفلة على الحشرات [10 ، 11 ، 12 ، 13 ، 14]

المواد وطرق العمل Material and Methods

اختيرت ستة أنواع من الفطريات الصائدة للنيماتود(*) هي *Arthrobotrys anchonia* و *A.dactyloides* و *A.oligospora* و *Dactylella brochopaga* و *Dactyleria pyriformic* و *Monacrosporium eudermatum* لقياس قابليتها على إفراز أنزيم البروتيز على الأوساط الزرعية الصلبة تحت تأثير قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة ومن ثم قياس فعاليتها الأنزيمية ، نميت هذهِ الفطريات على الوسط الزرعي الذي وصفه الباحثان [15] للكشف عن أنزيم البروتيز ، يتكون هذا الوسط من : 20 غم Nutrient Agar ، 0.8 % Gelatin ، 8 % محلول الجيلاتين . عقم الوسط بصورة منفصلة عن محلول الجيلاتين 8 % الذي عقم على حده في جهاز الموصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند \ انج^2 لمدة 20 دقيقة ، وبعد انخفاض درجتي حرارتهما إلى ما قبل التصلب أضيف محلول الجيلاتين وبنسبة 5

الأطباق الحاوية على وسط الاختبار Test Medium الخاص بالأنزيم بأقراص قطرها 5 ملم أخذت من المزارع الفتية للفطريات المختبرة ووضع بشكل مقلوب ، وبعد تلقيح الوسط حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±1 مْ . وقد حددت الفعالية الأنزيمية بعد 7 أيام من الحضن وذلك بقياس قطر الهالة الشفافة Clear Zone (بوحدات المليمتر) المتكونة حول المستعمرة .

1– تأثير الأس الهيدروجيني

حضرت أطباق زجاجية حاوية على هذا الوسط وبقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني هي 6 ، 6.5 ، 7 ، 7.5 ، 8 ، 8.5 ، أستخدم حامض الهيدروكلوريك HCl تركيز 5 % و هيدروكسيد الصوديوم 5 % للحصول على قيمة الـــ pH المطلوبة ، لقحت

2– تأثير درجات الحرارة

حضرت أطباق زجاجية حاوية على نفس الوسط في أعلاه وبقيمة pH = 7.5 وحضنت بدرجات حرارة 15 ، 20 ، 25 ، 30 ، 35 ، 40 مْ ، ولقحت الأطباق وقيست الفعالية الأنزيمية كما ذكر في دراسة الأس الهيدروجيني .

. لوحظ أن اختلاف الفعالية الأنزيمية في بعض الفطريات له علاقة بدرجة الحرارة والأس الهيدروجيني وأي تغيير في هذه العوامل سيؤثر على أستقرارية الأنزيم ويحدد ويثبط أنتاجهِ [15 ، 16] . أجريت دراسات عديدة حول تأثير بعض العوامل (مثل درجة الحرارة والأس الهيدروجيني) على أنتاج الأنزيمات في مختلف المجاميع الفطرية ، ولكن لم يدرس تأثير هذين العاملين على الفطريات المهلكة للنيماتود ، لذلك تحاول هذه الدراسة معرفة تأثير الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة في الفعالية الأنزيمية لأنزيم البروتيز الذي تفرزهُ هذهِ الفطريات على الأوساط الصلبة

(*) تم الحصول على هذه العزلات من الباحث الدكتور علي عبدالواحدقاسم كعزلات معتمدة في أطروحة الدكتوراه .

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

اختير التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Desing (CRD) وتجارب ثنائية العامل ، تضمّن العامل الأول الفطريات ، والعامل الثاني درجات الحرارة أو قيم الأس الهيدروجيني ، وقورنت المتوسطات الحسابية باستخدام اختبار أقل فرق معنوي المعدل Revised Least Significant Difference (RLSD) تحت مستوى ثقة ($P < 0.05$) [17] .

النتائج Results

أشارت نتائج هذهِ الدراسة إلى أن نمو الفطريات الصائدة للنيماتود وفعاليتها الأنزيمية خارج خلوية (Extracellular Enzymes) قد أختلف من نوع إلى أخر باختلاف قيمة الأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة عند نموها على وسط اختبار أنزيم البروتيز ، وأن معدلات نموها و قيم فعاليتها الأنزيمية اختلفت حتى في القيمة الواحدة من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة الواحدة ، وكان هذا واضحاً عند مقارنة أقطار المستعمرات النامية وقيم الفعالية الأنزيمية (قطر الهالة الشفافة) .

تأثير قيم الأس الهيدروجيني في نمو الفطريات

عند دراسة تأثير قيم الأس الهيدروجيني المختلفة على نمو الفطريات المختبرة ، لوحظ أن الفطر *A.oligospora* أظهر أعلى معدل نمو في جميع القيم إذ بلغ قطر المستعمرة 25.7 ملم تلاهُ الفطر *M.eudermatum* (25.2 ملم) ، بينما أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو بلغ 11.1 ملم ، وتوزع نمو بقية الفطريات بين هذين المعدلين (جدول 1) . لوحظ أن جميع الفطريات أعطت أكبر نمو عند قيمة الأس الهيدروجيني 7.5 تلتها القيمة 7 ، وظهر أقل نمو عند pH = 8.5 في حين لم يظهر أي نمو لهذهِ الفطريات في القيمة 6 .

جدول 1 :تأثير قيم مختلفة من الدالة الحامضية (pH) على أقطار مستعمرات(ملم)

الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة

الفطريات Fungal Species	قيمة الدالة الحامضية (pH)						المعدل (للفطريات)
	6	6.5	7	7.5	8	8.5	
A.anchonia	0	10*	24.7	42	18.7	6	16.9
A.dactyloides	0	20	31	41.7	25.7	10	21.4
A.oligospora	0	18	41	60.3	28.3	6.3	25.7
D.brochopaga	0	14.7	32.7	54.3	23.3	0	20.8
D.pyriformic	0	0	14.7	32.7	19.3	0	11.1
M.eudermatum	0	10	27.7	66.3	34.7	12.3	25.2
المعدل	0	12.1	28.6	49.6	25	5.8	

قيمة اقل فرق معنوي معدل	R.L.S.D.
للفطريات	1.45
درجات الحرارة	1.45
للتداخل	3.56

* الأرقام تمثل معدل ثلاث مكررات

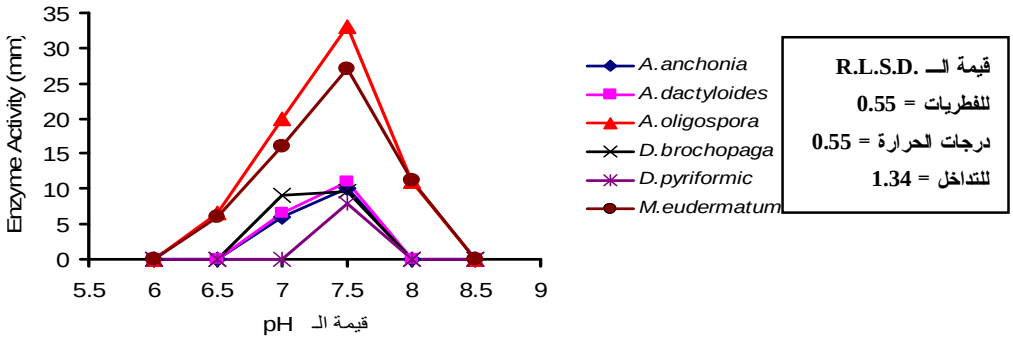
بينت الدراسة أن الفطر*M.eudermatum* أظهر أعلى معدل نمو عند قيمة الأس الهيدروجيني 7.5 بلغ 66.3 ملم تلاهُ الفطر*A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 60.3 ملم ، أما الفطر *D.pyriformic* فقد أظهر أقل معدل نمو بلغ 32.7 ملم عند نفس القيمة تلاهُ الفطر *A.dactyloides* 41.7 ملم . أما عند القيمة 7 من قيم الأس الهيدروجيني فلوحظ أن أفضل نمو ظهر في الفطر *A.oligospora* بلغ 41 ملم ، تلاه الفطر *D.brochopaga* بمعدل نمو بلغ 32.7 ملم ، أما بقية الفطريات فقد أعطت معدلات نمو مختلفة . أظهر الفطر *M.eudermatum* أعلى نمو عند قيمة الأس الهيدروجيني 8 بلغ 34.7 ملم ، تلاه الفطر*A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 28.3 ملم ، أما أقل نمو فقد ظهر في الفطرين *A.anchonia* و *D.pyriformic* بلغ 18.7 ملم و19.3 ملم لكل

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

منهما على التوالي . ولوحظ إن جميع الفطريات لم تظهر أي نمو عند قيمة الأس الهيدروجيني 6 ، بينما أظهرت جميع الفطريات نمواً شعاعياً مختلفاً عند قيمة الأس الهيدروجيني 8.5 عدا الفطرين *D.brochopaga* و *D.pyriformic* إذ لم يعطيا أي نمو .ويبين الجدول 1 أيضاً أن قيم الأس الهيدروجيني المختلفة كان لها تأثير مختلف على نمو الفطريات ، فبعض الفطريات كان نموها جيداً عندما تنمو في pH أكبر قليلاً من 7.5 و نمو البعض الأخر غير جيد عندما تنمو في pH أقل من هذهِ القيمة بقليل وهذا يلاحظ في الفطرين *D.pyriformic* و *M.eudermatum* ، والعكس من ذلك في بقية الفطريات ، ولكن بصورة عامة أنخفض أو لم يظهر نمواً لجميع الفطريات المختبرة عند قيم pH أكبر من 8.5 أو أقل من 6.5 .يتضح من الجدول نفسهُ اختلاف الفطريات في معدلات نموها إذ أتضح بأن لنوع الفطر تأثيراً معنوياً عالياً ($P<0.05$) على نمو مستعمرات الفطريات النامية على وسط اختبار أنزيم البروتيز ، وأتضح بأن أعلى نمو لهذهِ المستعمرات كان للفطرين *A.oligospora* و *M.eudermatum* وبفارق معنوي عالٍ مع بقية الأنواع ودون فارق معنوي بينهما ، بينما أعطى الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو وبفارق معنوي عالٍ مع بقية الأنواع . من جهة أخرى أشار التحليل الإحصائي أن لقيمة الأس الهيدروجيني تأثيراً عالي المعنوية على نمو المستعمرات الفطرية ، فكانت القيمة 7.5 هي المثلى لظهور أفضل نمو خضري للفطريات المختبرة وبفارق معنوي عالٍ مع بقية القيم ، تلتها القيمة 7 ، أما القيمة 6 فهي التي ظهر فيها أقل نمو لهذهِ الفطريات (جدول 1) .

تأثير قيم الأس الهيدروجيني في الفعالية الإنزيمية

يبين الشكل 1 تأثير قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني (pH) على الفعالية الأنزيمية للفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة ، فنلاحظ أن قيم هذهِ الفعالية قد اختلفت تبعا لنوع الفطر و لقيمة الأس الهيدروجيني التي نميَّ عليها الفطر . فنلاحظ أن الفطر *A.oligospora* أعطى أكبر فعالية أنزيمية بلغت 11.78 ملم تلاهُ الفطر *M.eudermatum* وبفعالية أنزيمية بلغت 10 ملم ، بينما كانت أقل فعالية أنزيمية ظهرت في *D.pyriformic* بلغت 1.33 ملم . وكما لوحظ أن أفضل فعالية أنزيمية ظهرت في الفطريات عند قيمة الـ pH = 7.5 بلغت 16.44 ملم ، تلتها القيمة 7 وبفعالية أنزيمية بلغت 9.61 ملم ، بينما لم تظهر أي فعالية أنزيمية عند قيمتي الأس الهيدروجيني 6 و 8.5 . وعند مقارنة الفعالية الأنزيمية للفطريات عند قيمتي الأس الهيدروجيني 7.5 و 7 نلاحظ أن الفطر *A.oligospora* أعطى أفضل فعالية أنزيمية بلغت 33 ملم و 20 ملم (لكل قيمة على التوالي) ، تلاه الفطر *M.eudermatum* بفعالية بلغت 27 ملم و 16 ملم (لكل قيمة على التوالي) ، في حين أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل فعالية أنزيمية عند هذهِ القيمة بلغت 8 ملم و0 ملم (لكل قيمة على التوالي) . وأظهرت الدراسة أيضاً بأن جميع الفطريات المختبرة لم تعط أي فعالية أنزيمية عند قيمتي الأس الهيدروجيني 6 و 8.5 . (شكل 1) .



شكل 1 : تأثير الدالة الحامضية (pH) على الفعالية الأنزيمية للفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة

تأثير درجات الحرارة في نمو الفطريات

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

وبينت الدراسة الحالية أن تأثير درجات الحرارة المختلفة على النمو الشعاعي للفطريات قد أختلف كثيراً فالفطر *M.eudermatum* أظهر أعلى معدل نمو في جميع القيم بلغ 30.2 ملم تلاه الفطر *A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 28.9 ملم ، بينما أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو بلغ 14.1 ملم تلاهُ الفطر*A.dactyloides* (19.1 ملم) بينما أختلف النمو الخضري لبقية الفطريات بصورة واضحة . وكانت درجة الحرارة المثلى والتي ظهر عندها أفضل نمو لجميع الفطريات المختبرة هي الدرجة 25 مْ تلتها الدرجة 30 مْ ، في حين كان أقل نمو لهذهِ الفطريات ظهر في درجة الحرارة 40 مْ (1.4 ملم) تلتها الدرجة 15 م بمعدل نمو بلغ (5.1 ملم) (جدول 2) ويشير جدول 2 إلى أن الفطر*M.eudermatum* أظهر أعلى معدل نمو عند درجة الحرارة 25 مْ 66.3 ملم تلاهُ الفطر*A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 60.3 ملم ، أما الفطر *D.pyriformic* فقد أظهر أقل معدل نمو بلغ 32.7 ملم عند نفس درجة الحرارة تلاهُ الفطر *A.dactyloides* 41.7 ملم . أما عند درجة الحرارة 30 مْ لوحظ أن أفضل نمو ظهر في الفطر *M.eudermatum* بلغ 42.7 ملم ، تلاه الفطر *A.oligospora* بمعدل نمو بلغ 41 ملم ، بينما أظهر الفطر *D.pyriformic* أقل نمو خضري بلغ 21.7 ملم ، أما بقية الفطريات فقد أعطت معدلات نمو مختلفة . أظهر الفطر *A.oligospora* أعلى نمو عند درجة الحرارة 20 مْ بلغ 46.3 ملم ، تلاه الفطر*M.eudermatum* بمعدل نمو بلغ 42.3 ملم ، أما أقل نمو فقد ظهر في الفطرين *D.pyriformic* و *A.dactyloides* بلغ 19 ملم و21.3 ملم لكل منهما على التوالي . ولوحظ أن جميع الفطريات المختبرة لم تعط نمو عند درجة الحرارة 40 مْ عدا الفطرين *M.eudermatum* و *A.anchonia* (جدول 2) .

جدول 2 :تأثير قيم مختلفة من درجات الحرارة على أقطار مستعمرات(ملم)

الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة

Fungal Species	درجات الحرارة مْ						المعدل (التكرارات)
	15	20	25	30	35	40	
A.anchonia	7*	30	42	31.7	14.3	4	21.5
A.dactyloides	2	21.3	41.7	31	18.3	0	19.1
A.oligospora	8.7	46.3	60.3	41	17.3	0	28.9
D.brochopaga	0	26	54.3	35	23.3	0	23.1
D.pyriformic	0	19	32.7	21.7	11	0	14.1
M.eudermatum	12.7	42.3	66.3	42.7	12.7	4.3	30.2
المعدل	5.1	30.8	49.6	33.8	16.2	1.4	

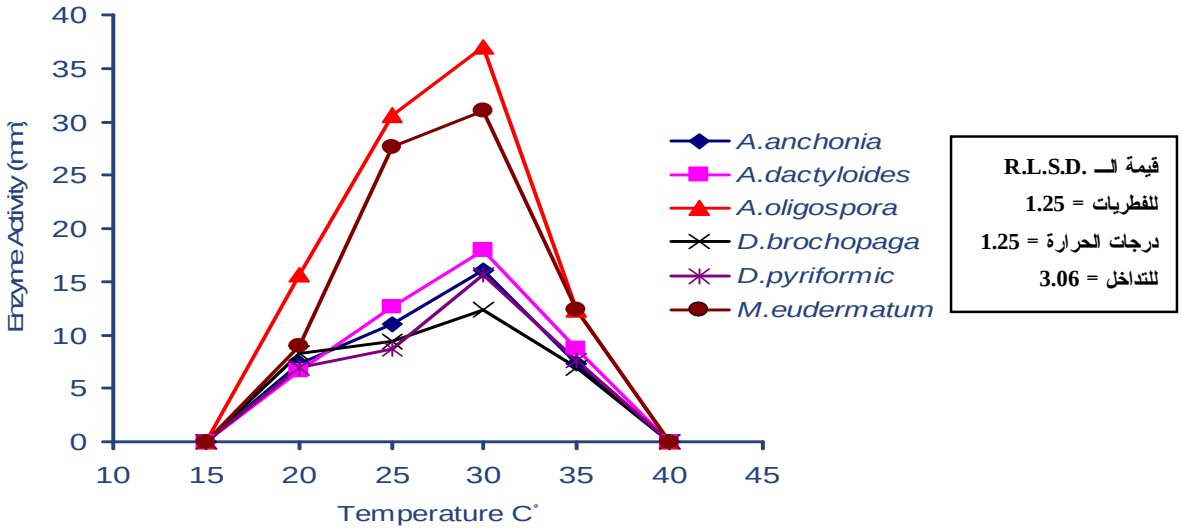
قيمة اقل فرق معنوي معدل	R.L.S.D.
للفطريات	1.86
درجات الحرارة	1.86
للتداخل	4.56

* الأرقام تمثل معدل ثلاث مكررات

وباستخدام التحليل الإحصائي لوحظ بأن أعلى نمو للفطريات المختبرة ظهر في الفطرين *M.eudermatum* و *A.oligospora* وبفارق معنوي عال مع بقية الأنواع وبدون فارق معنوي بينهما ، بينما أعطى الفطر *D.pyriformic* أقل معدل نمو وبفارق معنوي عال مع بقية الأنواع . من جهة أخرى أشار التحليل الإحصائي أيضاً أن لدرجة الحرارة تأثيراً عالي المعنوية على نمو المستعمرات الفطرية ، فكانت درجة الحرارة 25 مْ هي المثلى لظهور أفضل نمو خضري للفطريات المختبرة وبفارق معنوي عال مع بقية درجات الحرارة ، تلتها درجة الحرارة 30 مْ ، أما درجة الحرارة 40 مْ فهي التي ظهر فيها أقل نمو لهذهِ الفطريات (جدول 2) . وعند دراسة تأثير درجات الحرارة على الفعالية الأنزيمية للفطريات المختبرة ، فنلاحظ أن قيم هذهِ الفعالية قد اختلفت تبعا لنوع الفطر و لدرجة الحرارة التي نميَّ عليها الفطر . فنلاحظ أن الفطر *A.oligospora* أعطى أكبر فعالية أنزيمية بلغت 15.94 ملم تلاهُ الفطر *M.eudermatum* وبفعالية أنزيمية بلغت 13.33 ملم ، بينما كانت أقل فعالية أنزيمية ظهرت في *D.brochopaga* بلغت 6.16 ملم . وكما لوحظ أن أفضل فعالية أنزيمية ظهرت في الفطريات عند درجة الحرارة 30 مْ بلغت 21.66 ملم ، تلتها

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

درجة الحرارة 25 مْ بلغت 16.66 ملم ، أما عند درجتي الحرارة 15 مْ و 40 مْ فلم تعط جميع الفطريات أي فعالية أنزيمية (الشكل 2) .



شكل 2 : تأثير قيم مختلفة من درجات الحرارة على الفعالية الأنزيمية للفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة

عند مقارنة الفعالية الأنزيمية للفطريات عند درجة الحرارة 30 مْ نلاحظ أن الفطر *A.oligospora* أعطى أفضل فعالية أنزيمية بلغت 37 ملم ، تلاه الفطر *M.eudermatum* بفعالية بلغت 31 ملم ، في حين أظهر الفطر *D.brochopaga* أقل فعالية أنزيمية عند تلك الدرجة بلغت 12.33 ملم . ويبين الشكل 2 أن الفطر *A.oligospora* أظهر أفضل فعالية أنزيمية بلغت 30.6 ملم ، وأشارت الدراسة أيضاً إلى أن جميع الفطريات المختبرة لم تعط أي فعالية أنزيمية عند درجتي الحرارة 15 مْ و 40 مْ (شكل 2) .

المناقشة Discussion

من أجل الكشف عن النشاط الأنزيمي للفطريات الصائدة المختبرة استعملت الأوساط الصلبة التي تسمح بالكشف عن الفعالية الأنزيمية خارج خلوية Extracellular enzymes . فلوحظ أن معظم الفطريات المختبرة أظهرت فعالية واضحةَ في إفراز أنزيم البروتيز أنها تملك قابلية على تحليل البروتين (الجيلاتين) Proteolytic ، وهذا ما أشارت إليهِ دراسات سابقة [3 ، 13 ، 18 ، 19] .

وقد أكد الباحث (10) أن الفطريات المهلكة للنيماتود تقوم بإفراز البروتيز وهو الأنزيم الذي يعمل على اختراق جدار النيماتود الذي يتألف من مادة الكيوتكل الذي يتكون بصورة رئيسة من البروتين وهو الكولاجين (Collagen) مع كميات قليلة من الدهون والكاربوهيدرات. ، وأن أنزيم البروتيز تفرزه غالبية الفطريات الصائدة وبعض الفطريات المتطفلة داخليا والمتطفلة على البيوض خارج الخلايا ، وأن دور الأنزيمات الأخرى التي تفرزها هذه الفطريات تعمل على تحليل محتويات النيماتود الداخلية وهضمها [3 ، 10 ، 19 ، 20 ، 21] ، وهذا يتفق مع نتائج هذه الدراسة فقد لوحظ أن الفطريات الصائدة للنيماتود المختبرة جميعها لها القدرة علي إفراز أنزيم البروتيز الخارج خلوي . أشارت الدراسة إلى أن الفطريات المختبرة قد أختلف نموها الخضري وقطر مستعمراتها وفعالياتها الأنزيمية باختلاف نوع الفطر وقيمة كل من الأس الهيدروجيني و درجة الحرارة ، وهذا ما أشارت إليهِ دراسات سابقة التي أكدت على أن لقيمة الأس الهيدروجيني و درجة الحرارة تأثيراً كبيراً على النمو الشعاعي و الفعالية الأنزيمية، ولوحظ أن بعض الفطريات لم تظهر أي نشاط أنزيمي أو أظهرت نشاطاً أنزيمياً قليلاً بالرغم من أنها أعطت نمواً شعاعياً ، أي لا توجد علاقة ما بين معدل النمو الفطري (قطر المستعمرة) وبين أنتاج أنزيمات التحلل (قطر المنطقة الشفافة) ، ويعتقد أن سبب عدم ظهور نشاط أنزيمي لبعض الفطريات هو أما لعدم قدرتها على

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

أنتاج ذلك الأنـــزيم ، أو أنهـــا تفـــرزهُ داخليـــا Endocellular Enzymes أو بسبب عدم وجود مواقع لارتباط جزيئـــات ذلـــك الأنزيم على الجدار الخلوي ، أو باختلاف العزلة الفطرية أو نتيجة تأثير بعض العوامل البيئية (درجة الحرارة والأس الهيدروجيني)(15 ، 19 ، 22) دراسات عديدة أشارت إلى أن الغالبية العظمى من الفطريات المهلكة للنيماتود تظهر أفضل نمو تحت درجة حرارة 25 مْ وأن درجة حرارة 40 مْ مثبطة لنموها ، وأن بعضها يظهر نمواً قليلا تحت درجة 15 مْ [19 ، 23 ، 24 ، 25] وكذلك أن معظم الفطريات المهلكة للنيماتود أعطت أفضل نمـــو عنـــد الأس الهيدروجيني المحصور بين (5.5–7) وهذا ما يتفق مع نتـــائج هذهِ الدراسة .لوحظ في الدراسة الحاليـــة أن الفعاليـــة الأنزيميـــة للفطريات قـــد أختلـــف بـــاختلاف الفطريـــات واخـــتلاف الأس الهيدروجيني و درجة الحرارة فكانت أفضل فعالية أنزيمية ظهرت في pH = 7.5 وبدرجة حرارة 30 مْ وهذا ما أكدت علية عـــدة دراسات أشارت إلى أن أفضل فعالية لأنزيم البروتيز كان بدرجة حرارة 29 مْ و pH = 7.4 وأن لقيم الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة تأثيراً واضحاً على الفعالية الأنزيمية للفطريـــات وأن أي تغير في أي من هذه العوامل سيؤثر على أستقرارية أو تثبيط إنتاج هذا الأنزيم [16 ، 19] .

واختلفت قابلية هذهِ الفطريات في أنتاج إنزيم البروتيز فبعـــضها أظهرت فعالية أنزيمية جيدة في pH أقل قليلاً من7.5 والـــبعض الأخر أظهرت العكس ، وهذهِ النتيجة ظهرت أيضا عند دراســـة تأثير درجة الحرارة ، وهذا ما أشار إليه بعض الباحثين الذين أكدوا على اختلاف كمية الأنزيمات التي تفرزها تلك الفطريات ، فلوحظ أن عزلات النوع الواحد تختلف في قابليتها الأفتراسية وفعاليتهـــا الأنزيمية ، ويعزي بعض الباحثين سبب هذا الاختلاف إلى وجود بعض الاختلافات الجينيـــة (Genetic variability) بـــين تلـــك العزلات الناتجة من اختلاف مواقع جمعها (26 ، 27 ، 28 ، 29) وأشار [30] إلى أن فعالية معظم الأنزيمات تنخفض عند pH أقل من 6 ولا توجد أي فعالية أنزيمية عند pH = 2 وأن قيمة الـــ pH المثلى تختلف باختلاف الأنواع وتكون جيدة فـــي المحـــيط المتعادل . و ذكر [31] أن أفضل فعالية لأنزيم البروتيز كانت محصورة ما بين (7 – 8) وأبعد من ذلـــك لـــوحظ وجـــود هـــذا الاختلاف ضمن عزلات النوع الواحد [27 ، 32 ، 33 ، 34] .

References المصادر

1. Jansson, H-B. and Lopez-Llorca , L.V. Biology of Nematophagous fungi. In: Mycology: Trichomycetes, other Fungal Groups and Mushrooms (JK Misra & BW Horn, eds.) . Science Publishers, Enfield . pp. 145-173 . (2001).
2. Barron ,G.L. Predatory fungi , wood decay, and the carbon cycle .Biodiversity , 4: 3 - 9.(2003) .
3. Jansson, H-B., Tunlid, A. and Nordbring-Hertz, B. Nematodes In : Fungal Biotechnology (T.Anke, ed.). Chapman & Hall, Weinheim. Pp. 38-50. (1997).
4. Jansson, H-B, Persson, C. and Odeslius , R. Growth and capture activities of nematophagous Fungi in soil visualized by low temperature scanning electron microscopy. Mycologia. 92(1) : 10 – 15.(2000)
5. Nordbring –Hertz, B., Jansson, H-B. and Tunlid, A. Nematophagous fungi . In:Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd.,Basingstoke. P:10. (2002)
6. Dijksterhuis,J.,Veenhuis,M.,V.Harder. and Nordbring –Hertz, B. Nemato-phagous fungi:Physiological aspects and structurefnction relationships Advances in Microb.Physiol. 36:111-143 . (1994).
7. Veenhuis, M. Nordbring-Hertz, B. and Harder, W. An electron microscopial analysis capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora.* Antonie Leeuwehook. J. 51: 385 – 398 . (1985).
8. Jansson, H.-B. and Nordbring-Hertz, B. Infection mechanisms in the fungus-nematode system .In :Diseases of nematodes, (eds. Poinar, G. O. and Jansson , H.-B.) Roca Raton CRC Press. V.II pp. 59 – 72.(1988) .
9. Dijksterhuis,J.,Veenhuis,M.and Harder,V. Conidia of Nematphagous fungus *Drechmeria coniospora* adhere to but barely infect *Acrobeloides buesschilli* FEMS microbiol. letters.113:183-188.(1993).
10. Schenk,S., Chase,T., Rosenzweig,W.D.and Parmer, D.Collagenase production by nematode-trapping fungi . Appl. Environ. Microbiol. 40 : 567 – 570.(1980).
11. Tunlid,A. and Jansson, S. Protease and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* . Appl. Environ. Microbiol. 57 : 2868 – 2872 . (1991).

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

Soil Biol. Biochem . 17 : 449 – 507 . (1985) .

24. Kasim. A.A. A study of nematophagous fungi in soil of southern Iraq . M. Sc. thesis, Basrah University. Pp : 101.(1997) .
25. Olivares-Bernabeu , C. and Lopez-Llorca , L.V. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Rev.lberoam Micol. 19: 104–110. (2002) .
26. Jansson, H-B. Adhesion to nematodes of conidia from nematophagous Fungus *Drechmeria coniospora* .J. Microbiol. 139 : 1899 – 1906 . (1993) .
27. Tedford,E.C. , Jaffee, B. and Muldoon, A. F.Variability among of the isolates nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* Mycol.Res. 98(10): 1127-1136 .(1994).
28. Ahman, J.,Ek, B. , Rask, L. and Tunlid, A. Sequence analysis and regulation of a cuticle degrading serine protease from Nematophagous Fungus *Arthrobotrys oligospora* .Microbiology . 142: 1605 – 1616 . (1996).
29. Morton, C.O. , Hirsch, P.R. , Peberdy,J.P. and Kerry,B.R. Coloning of and Genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* . Mycological Research , 107: 38 – 46 . (2003) .
30. Jakucs, E. , Racz, I. And Lasztity, D. Some characteristics and purification of the *Ganoderma lucidum* cellulose system . Acta Microbiol. Immun. Hung. 41(1) : 23 – 31 . (1994) .
31. De Marco, J.L. and Felix, C. R. Characterization of protease produced by a *Trichoderma harzinum* isolate which controls cocoa plant witches´ broom Disease . BMC Biochemistry 3 : 3 – 9 . (2002) .
32. St Leger, R.J. , Nelson, J.O. , and Screen, S.E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity . Microbiology. 145 : 2691 – 2699 . (1999) .
33. Alves , M.H. , de Campos-Takaki, G.M. Okada, K. , Pessoa, I.H.F. and Milanez, A.I Detection of extracellular protease in *Mucor* species . Rev. Iberoam Micol. 22 : 114 – 117 . (2005) .
34. Essien, J. P. , Ekpo, M.A. and Brooks, A.A.Mycotoxigenic and proteolytic potential of moulds associated with

12. Tunlid, A. , Rosen,S. , EK,B. and Rask, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* . Microbiology . 140 : 1687 – 1695 . (1994) .
13. Lopez-Llorca,L.V. , Fernandez-Chocomell,I. and Ferrandis,E. Effect of heavy metals on growth isolation and proteolytic activity of the nematophagous fungus *Virticillium suchlasporium* . Revista Iberoamerica de Micologia, 13 : 93 - 96 .(1996)
14. Segers,R.S., Butt,T.M.,Carder,J.H. , Keen, J., Kerry,B.R. and Peferdy, J.F. The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants : Distribution and variation. Mycolo. Res. 103 : 395 - 402 . (1999) .
15. Hankin,L. and Anagnostakis,S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia.67:597-607.(1975).
16. Muhsin,T.M., Aubaid,A.H and Al.Duboon, A. A.Extracellular enzyme ctivities of dermatophyte and yeast isolates on solid media. Mycoses . 40 : 465 – 469.(1975).

17 . الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ، عبد العزيز محمد ، تصميم وتحليل التجارب الزراعية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، 350 صفحة .(1980).

18. Howard, D.Fungi pathogenic for human and animals . pathogenicity and Detection . Maecel Dekker, USA . Pp : 543 .(1983).
19. Lopez-Llorca,L.V. and Carbonell,T.Characterization of Spanish of *Virticillium lecanii* .Rev. Iberoam Micol.16 : 136-142 . (1999).
20. Dackman,C. , Chet, I. and Nordbring-Hertz,H.. Fungal Parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity FEMS. Microbial Ecol. 62:201-208 . (1989)
21. Lopez-Llorca, L.V. Purification and properties of extracellular protease produced by the nematophagous fungus *Virticillium suchlasporium* . Can. J. Microbiol, 36 : 530 – 537 . (1990).
22. Eveleigh , D. E. Cellulase : a prespective . Phil. Trans. R. Soc. Lond. 321 : 435 – 447 . (1987).
23. Gray, N.F. Ecology of nematophagous fungi : effect of soil moisture , orgaic matter , pH and nematode density on distribution .

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

smoked shark fish (*Chlamydoselachus anguincus*) . J. Appl. Environ. Mgt. 9(3) : 53 – 57 . (2005).

In Vitro Influence of pH and Temperature on Extracellular Enzymic Activity of Protease in Nematode-Trapping Fungi

K. J. Hammadi[1] , Ali A. Kasim[2] and H.G.Al-Nasrawi[3]

[1] Department Biology ,College of Education , Basrah Univ.

[2] Department Biology ,College of Education , Misan Univ.

[3] Foundation of Technical Education- Amarah Technical Institute

Abstract

In the present study influence of pH and temperature on extracellular enzymic activity of protease on solid media were tested of six species of nematode -trapping fungi (*Arthrobotrus anchonia* , *A.dactyloides* , *A.oligospora* , *Dactylella brochopaga* , *Dactyleria pyriformic* , *Monacrosporium eudermatum*) . The extracellular enzymic activity of protease were varied according to fungal species and the value of pH and temperature . *A.oligospora* produced high vegetative growth in all pH values , followed by *M.eudermatum* , whereas *D.pyriformic* showed a low vegetative growth followed by *A.anchonia* . Nevertheless, all tested fungi showed a high vegetative growth at pH = 7.5 , followed by value 7 , whereas it's growth was weak at pH = 8.5 , no vegetative growth showed at pH = 6 .

A.oligospora showed a high enzymic activity followed by *M.eudermatum* , a low enzymic activity was appeared in *D.pyriformic* . A best enzymic activity in the tested fungi produced at pH = 7.5 , followed by pH = 7 , while all tested fungi were never showed enzymic activity in pH = 6 and 8.5 .

This Study showed that the *M.eudermatum* produced a highest growth rate in all tested temperature degrees , followed by *A.oligospora* , whereas *D.pyriformic* showed lowest growth rate , the vegetative growth in other tested fungi were varied

However, the optimum temperature for vegetative growth of all tested fungi was 25 C° , followed by 30 C° , while the lowest vegetative growth was appeared at 40C° followed by 15C° . The high activity of protease showed in *A.oligospora* , followed by *M.eudermatum* , the low activity revealed in *D.brochopaga*, in tested temperature degrees . the 30C° showed a high enzymic activity . followed by 25C° , on the contrary , no enzymic activity appeared in all tested fungi in both 15C° and 40C° .

Keywords: Nematode -trapping fungi , protease , pH , temperature , extracellular enzymic activity.

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com