وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

إنتاج وتوصيف أنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *Metarhizium anisopliae* كعامل من عوامل السيطرة الحيوية تجاه عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*

اطروحة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

علوم الحياة / علم الحيوان (المقاومة الأحيائية)

من قبل

منى ابراهيم جاسم الموسوي

(ماجستير علوم حياة / علم الحيوان)

إشراف

أ.م. د. محمد رضا عنون

جمادى ثان ١٤٣٦ هـ اذار 2015 م

﴿ إِنَّ فِي ٱخْتِلَٰفِ ٱلَّيْلِ وَٱلنَّهَارِ وَمَا خَلَقَ ٱللَّهُ فِي ٱلسَّمَٰوَٰتِ وَٱلْأَرْضِ لَءَايَٰتٍ لِّقَوْمٍ يَتَّقُونَ ﴾

صدق الله العلي العظيم

﴿ سورة يونس - الآية ٦ ﴾

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

﴿أبو الفضل العباس عليه السلام﴾

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي .....رحمه الله

والدتي الغالية .....أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين ....حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام المحن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي .....حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب .....حباً وأكراماً

منى

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

(أبو الفضل العباس عليه السلام)

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي ....رحمه الله

والدتي الغالية ....أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين ....حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام الحزن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي ....حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب علي...............حباً وأكراماً

منى

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

(أبو الفضل العباس عليه السلام)

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي ....رحمه الله

والدتي الغالية ....أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين ....حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام الحزن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي ....حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب علي ....حباً وأكراماً

منى

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

أبو الفضل العباس عليه السلام

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي . . . . . رحمه الله

والدتي الغالية . . . . . أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين . . . . حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام المحن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي . . . . . حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب علي . . . . . حباً وأكراماً

منى

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

﴿أبو الفضل العباس عليه السلام﴾

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي .....رحمه الله

والدتي الغالية .....أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين ....حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام المحن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي .....حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب علي.....حباً وأكراماً

منى

الإهداء

إلى الذي أبى الفضل إلا أن يكون له أبا

﴿ابو الفضل العباس عليه السلام﴾

إلى من أوصاني الله بهما براً واحتراماً

والدي الغالي .....رحمه الله

والدتي الغالية .....أطال الله بعمرها

إلى من أشركهم في أمري واشد بهم أزري

اختي واخوتي الأعزاء والاقربين ....حبا واعتزازا

إلى من شاطرني أيام المحن وتعلمت منه معنى الوفاء

زوجي .....حباً واحتراما ووفاء

إلى فلذة كبدي وقرة عيني وأملي وبسمتي

ولدي الحبيب علي.....حباً وأكراماً

منى

﴿ شكر وتقدير ﴾

الحمد لله الواحد الاحد الفرد الصمد الذي لم يكن له ند ولا ولد والصلاة والسلام على اشرف الانبياء والمرسلين وعلى آله الطيبين الطاهرين . يلزمني الواجب وانا انهي اطروحتي ان اتقدم بشكري وتقديري الى استاذي الفاضل الدكتور محمد رضا عنون لاقتراحه موضوع البحث والاشراف عليه وفقه الله العزيز الجليل وسدد خطاه .

كما يطيب لي ان اسجل شكري لعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة فيها لما ابدوه لي من تسهيلات ومتابعة سير البحث و اتمامه . والشكر واصل الى رئاسة قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة كربلاء لتسهيل اجراء التجارب الخاصة بمجال الأنزيمات في مختبراتهم واخص بالذكر الدكتور علي عبد الكاظم لما قدمه لي من معلومات ومساعدة واشراف مباشر على اجراء تجاربي جزاه الله عني خيراً ووفقه لما يحبه ويرضاه انه سميع الدعاء .

كما لا يفوتني ان اشكر الدكتور ثائر طه في كلية التربية للبنات /جامعة الكوفة لمنحي المزرعة الخاصة بحشرة عثة الشمع الكبرى واشكر زميلي الدكتور نصير مرزه حمزه لمساندته لي في جميع مراحل اعداد الأطروحة والسيد احسان الطالقاني لأجرائه التحليلات الإحصائية الخاصة بالدراسة والسيدة حوراء النداوي لمساعدتها في انجاز الطباعة والسيدة هبة جبار لمساعدتها في رسم بعض الأشكال . واخيرا اسجل شكري لزميلتي مريم جبار وسرور محمد علي في الدراسات العليا لمساعدتهم وتوفيرهم بعض المصادر العلمية ولكل من مد لي يد العون ولم يذكر اسمه ، والله الموفق انه سميع الدعاء .

منى

الخلاصة

أشتمل البحث الحالي على محورين أساسين تمثل الأول بتقييم كفاءة عزلة محلية للفطر *Metarhizium anisopliae* في مكافحة عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* بأستعمال معلق وراشح الفطر المذكور ، وفي المحور الثاني تم أنتاج و توصيف انزيم البروتييز القاعدي كعامل من عوامل الضراوة من هذه العزلة وتم التوصل الى النتائج الأتية :-

1- وجد أن للمعلق البوغي تأثيرا في ادوار حياة عثة الشمع الكبرى ، فقد بلغت أعلى نسبة هلاك للبيوض 62.88 % عند معاملتها بالتركيز 1× 10^7 بوغ\مل. بينما بلغت أقل نسبة هلاك 31.78 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل، أما بالنسبة لليرقات فقد كانت أعلى نسبة هلاك (100 و 96.99 و 90.97)% ليرقات الطور الأول والرابع والسابع على التوالي بعد 120 ساعة عند التركيز 1× 10^7 بوغ/مل وكانت قيم الجرع الأوطأ هي (62.90 و 58.88 و 50.86) % للأطوار المذكورة وعلى نفس الترتيب عند التركيز 1× 10^4 بوغ/ مل بعد مرورالمدة ذاتها .أما بخصوص العذارى فقد سجلت أعلى نسبة هلاك 54.89 % عند التركيز1× 10^7 بوغ/مل واوطأ نسبة هلاك 36.85 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل. وبالنسبة للبالغات فقد سببت المعاملة بالتركيز الأعلى أقصى نسب هلاك(69.95 و 63.94) % للذكور والأناث على التوالي خلال 168 ساعة. بينما كانت أدنى نسبة هلاك (41.91 و 43.91) % للذكور والأناث على التوالي عند معاملتها بالتركيز 1×10^4 بوغ / مل وبالمدة ذاتها .

وجد أن لراشح المزرعة تأثيرا في ادوار حياة العثة ايضاً ، اذ سبب التركيز 100% أقصى نسبة هلاك في البيوض بلغت 60.91 % ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت 26.82 % . وعند التركيز 100% هلك (100 و 97 و 91.99) % من يرقات الطور الأول والرابع والسابع على التوالي خلال 72 ساعة . وانخفضت نسبة الهلاك إلى (67.96 و 64.96 و 54.95) % للأطوار المذكورة وعلى نفس الترتيب عند التركيز 25% بعد مرور المدة ذاتها.اما بخصوص العذارى فقد كانت نسبة الهلاك 50.96 % عند التركيز 100 % و 32.95 % عند التركيز 25 % . أما البالغات فقد أوضحت النتائج أن أعلى نسبة هلاك كانت (68.90 و 58.98) % للذكور والأناث على التوالي بعد 72 ساعة عند التركيز 100% ، في حين كانت اوطأ نسبة هلاك (37.98 و 32.97)% للذكور والأناث على التوالي وبالمدة نفسها عند التركيز 25%.

2- في تجارب التحري عن عوامل الضراوة للفطر المذكور اظهرت العزلة الفطرية قدرة على انتاج انزيمات البروتييز والكايتنيز واللايبيز فضلاً عن بعض مضادات الأحياء المجهرية . و وجد أن أقصى انتاجية كانت لأنزيم البروتييز في وسط الحد الأدنى المدعم بالكازائين اذ بلغت الفعالية النوعية 41.12 وحدة/ ملغم بروتين .أما فيما يخص انتاج بعض مضادات الأحياء المجهرية فقد وجد أن أكبر قطر للتثبيط هو 5.3 ملم لمضاد الأحياء المجهرية المأخوذ من وسط انتاج مضادات الأحياء المجهرية وضد بكتريا *S. aureus* .

3- درس أنزيم البروتييز كعامل ضراوة بالتفصيل ، فوجد أن الظروف المثلى لإنتاج انزيم البروتيز تتمثل بعصير التمر بنسبة 0.05 % المدعم بـ 0.5 % من الجيلاتين برقم هيدروجيني ابتدائي 5.5 وحجم لقاح مقداره 16% ، في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 100 دورة / دقيقة ولمدة 72 ساعة .

تم تنقية الإنزيم جزئياً وقد إشتملت خطوات التنقية على الترسيب بالايثانول (60) % ثم التبادل الأيوني بطريقة الوجبة باستعمال المبادل DEAE-Cellulose ثم بالترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-150 ، اذ حققت الخطوة الأخيرة عدد مرات تنقية بلغ 28.726 مرة بحصيلة إنزيمية 11.97 % .

وعند توصيف الإنزيم ، أظهرت النتائج ما يأتي :

A- أن قيم ثابت ميكالس (K_m) للأنزيم تبلغ (0.178 و0.179 و0.182) ملي مولر حيال الجيلاتين و البومين المصل البقري و الكازائين كمواد تفاعل و على التوالي . في حين بلغت قيم السرعة القصوى (V_{max}) (0.465 و0.339 و0.364) ملغم / مل . دقيقة حيال البروتينات الثلاثة المستخدمة في الدراسة و على التوالي أيضاً .

B-كان الرقم الهيدروجيني 8.0 هو الأمثل لفعالية الإنزيم ، في حين تراوح الرقم الهيدروجيني للثبات بين (7.0 و 9.0) .

C-أظهر الإنزيم ثباتاً حرارياً بين (20- 30) مْ لمدة 30 دقيقة .

D-تباين تأثير الأيونات المعدنية والمواد الكيمياوية المستخدمة في هذه الدراسة في فعالية الإنزيم، إذ أدى استعمال مادة الـ PMSF بالتركيز (5) ملي مولر إلى تثبيط فعالية الإنزيم بالكامل مما يدل على أن الإنزيم يعود إلى مجموعة البروتييز السيريني ، بينما كان لكلوريد الحديدوز ($FeCl_2$) تأثيراً حاثاً في فعالية الإنزيم .

المختصرات الواردة في الرسالة

Bsa	Bovine serum albumin
DEAE-Cellulose	Diethyl amino ethyl-cellulose
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EPF	Entomopathogenic fungi
GlcNAc	N-acetylglucosamine
IAA	Iodoacetamide
K_m	Michaelis-Menten Constant
PDA	Potato dextrose agar
PMSF	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
pNP	p-Nitrophenol
pNP-GlcNAc	p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide
TCA	Tri chloro acetic acid
V_{max}	Maximum velocity

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	أ- ب
1	الفصل الاول / المقدمة	2-1
2	الفصل الثاني / أستعراض المراجع	42-3
1-2	**عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (GWM) Greater wax moth**	3
1-1-2	تصنيف وحياتية عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* L.	4-3
2-1-2	الأهمية الاقتصادية للحشرة وطرق مكافحتها	12-4
2-2	الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic Fungi, EPF)	13-12
3-2	الجنس *Metarhizium*	15-13
4-2	الفطر *M. anisopliae*	16-15
5-2	النظام الانزيمي في الفطريات	16
1-5-2	انزيم البروتييز	18-16
2-5-2	إنزيم الكايتنيز	20-19
3-5-2	إنزيم اللاييز	21-20
4- 5-2	السموم Toxines	25-22
6-2	الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*	25
1-6-2	تأثير المصدر الكاربوني	26-25
2-6-2	تأثير المصدر النايتروجيني وتركيزه	28-26
3-6-2	تأثير مدة الحضن	29-28
4-6-2	تأثير درجة الحرارة	30-29
5-6-2	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج	30
6-6-2	تأثير حجم اللقاح	31
7-6-2	تأثير سرعة الرج	32-31
8-6-2	تأثير الأملاح المعدنية	33-32
7-2	تنقية إنزيم البروتييز	36-33

التسلسل	الموضوع	الصفحة
2-8	توصيف إنزيم البروتييز	36
1-8-2	تعيين قيم ثابت ميكالس(Km) والسرعة القصوى (Vmax)	37-36
2-8-2	تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل	38
3-8-2	تأثير درجة الحرارة في ثبات الأنزيم	39 -38
4-8-2	تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الأنزيم	40 - 39
5-8-2	تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم	41 -40
6-8-2	تأثير بعض الأيونات والمواد الكيميائية في فعالية الأنزيم	42-41
3	**المـواد و طـرائق العمـل**	72-43
1-3	المواد والأجهزة المستخدمة	43
1-1-3	المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها	43
2-1-3	الأجهزة المستخدمة و الشركات المصنعة لها	44
2-3	طرائق العمل	45
1-2-3	التأثير الحيوي للفطر *M. anisopliae* في ادوار حشرة دودة الشمع الكبرى *G. mellonella*	45
1-1-2-3	إعداد مستعمرة دودة الشمع الكبرى(L.) *G. mellonella*	45
2-1-2-3	العزلة الفطرية المستعملة في الدراسة	45
3-1-2-3	تحضير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae*	46
4-1-2-3	تحضير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae*	46
5-1-2-3	الاختبار الحيوي Bioassay	47
A	**الاختبار الحيوي للمعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	47
1	الاختبار الحيوي في البيوض	47
2	الاختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الثلاثة	47
3	الاختبار الحيوي في دور العذراء	47
4	الاختبار الحيوي في البالغات	48

التسلسل	الموضوع	الصفحة
B	الاختبار الحيوي لراشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*	48
1	تاثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في البيوض	48
2	تاثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في الأطوار اليرقية الثلاثة	48
3	تاثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في دور العذراء	48
4	**تأثير نواتج الأيض الثانوية الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات عثة الشمع**	49
2-2-3	التحري عن عوامل الضراوة للفطر*M. anisopliae*	49
3-2-3	تحضير اللقاح (البذرة) Seed Calture	49
4-2-3	الأوساط الإنتاجية المستعملة	49
5-2-3	التحري عن الأنزيمات ومضادات الأحياء المجهرية المنتجة من الفطر *M. anisopliae*	50
1- **5-2-3**	التحري عن انزيم البروتييز	53-50
2- **5-2-3**	تقدير البروتين	52
3- **5-2-3**	تقدير فعالية انزيم الكايتنيز	56-53
4- **5-2-3**	تقدير فعالية انزيم اللاييز	57-56
5- 5-2-3	التحري عن انتاج المضادات الحيوية المنتجة من الفطر *M.anisopliae*	58-57
6-2-3	تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*	59
1-**6-2-3**	المصدر الكاربوني وتركيزه	61-59
2-**6-2-3**	تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه	62
3-**6-2-3**	تأثير درجة الحرارة	62
4-**6-2-3**	تأثير سرعة الرج	62
5-**6-2-3**	تأثير حجم اللقاح	62
6-**6-2-3**	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	62
7-**6-2-3**	تأثير مدة الحضن	63
8-**6-2-3**	تأثير نوع الأملاح المعدنية وتركيزها	63
7-2-3	تنقية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر*M.anisopliae*	66-63

التسلسل	الموضوع	الصفحة
3-2-8	توصيف إنزيم البروتييز	66
3-2-8-1	تقدير الثوابت الحركية للإنزيم	66
3-2-8-2	تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل	67
3-2-8-3	تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز	68
3-2-8-4	تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم البروتييز	70-68
3-2-8-5	تقدير الثبات الحراري للإنزيم	70
3-2-8-6	تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم	72-70
3-2-9	التحليل الإحصائي	72
4	**النتائج والمناقشة**	**137-73**
4 -1	**الاختبار الحيوي للمعلق البوغي وراشح مزرعة الفطر *M. anisopliae* في مختلف ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella***	73
4-1-1	**الاختبار الحيوي في البيوض**	73
4-1-2	**الاختبار الحيوي للأطوار اليرقية الثلاثة**	75
4-1-3	**الاختبار الحيوي في دور العذراء**	82
4-1-4	**الاختبار الحيوي في البالغات**	85
4-2	**التحري عن الأنزيمات ومضادات الأحياء المجهرية المنتجة من الفطر *M. anisopliae***	89
4-3	**تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae***	95
1	**تأثير تركيز المصدر الكاربوني**	95
2	**تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه**	97
3	**تأثير مدة الحضن**	101
4	**تأثير درجة الحرارة**	104
5	**تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي**	106
6	**تأثير حجم اللقاح**	109
7	**تأثير سرعة الرج**	111

التسلسل	الموضوع	الصفحة
8	**تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها**	113
4-4	**التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز**	116
1	الترسيب بالكحول الأثيلي	118
2	**كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (طريقة الوجبة)**	120
3	**الترشيح الهلامي**	122
5-4	**توصيف إنزيم البروتييز**	124
1	**الثوابت الحركية للإنزيم [ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max})]**	124
2	تخصص الإنزيم حيال مواد تفاعل مختلفة	125
3	الثبات الحراري للإنزيم	128
4	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم	130
5	الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم	132
6	تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيمائية في فعالية الإنزيم	134
	الاستنتاجات والتوصيات	138
	المصادر	179 -139
	الخلاصة باللغة الانكليزية	A-B

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	**تأثير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	74
2	**تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	74
3	**تأثير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في الاطوار اليرقية الثلاث لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	77

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
4	**تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في الاطوار اليرقية الثلاث لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	79
5	**تأثير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في دور العذراء لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	83
6	**تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام في دور العذراء لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	83
7	**تأثير المعلق البوغي للفطر في دور البالغات لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	86
8	**تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام في بالغات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella***	86
9	التحري عن الانزيمات في الفطر *M.anisopliae*	93
10	التحري عن المضاد الحيوي في الفطر *M.anisopliae*	95
11	**خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae***	119
12	**الثوابت الحركية والفعالية النسبية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *M. anisopliae* حيال مواد تفاعل مختلفة**	128
13	**تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *M. anasopliae***	135

قائمة المخططات

رقم المخطط	العنوان	الصفحة
1	**تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae***	117

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد	53
2	المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP)	55
3	المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز (السكريات المختزلة) بطريقة (3,5 Dinitro salicylic acid,DNSA).	61
4	استعداد الأطوار اليرقية الثلاث للمعلق البوغي للفطر *M. anisopliae*	77
5	استعداد الاطوار اليرقية الثلاثة لتراكيز راشح المزرعة للفطر *M. anisopliae*	79
6	استعداد ذكور واناث عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* لتراكيز المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae*	86
7	استعداد ذكور واناث عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* لتراكيز راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae*	87
8	تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	97
9	تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	98
10	تأثير تركيز الجيلاتين في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*	99
11	تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم البروتييز من *الفطر M.anisopliae*	102
12	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	105
13	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	107
14	تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	111
15	تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*	112
16	تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*	114
17	تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. Anisopliae*	115

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
123	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر ***M.anisopliae*** بإستخدام عمود **Sephadex G -150** بأبعاد (1.4× 80) سم والذي تمت موازنته بمحلول منظم الترس (0.02 مولر ، برقم هيدروجيني 8.0) بسرعة جريان 20 مللتر / دقيقة وبواقع 4 مل / جزء	18
124	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M.anisopliae*** بإستخدام الكازائين مادة تفاعل.	19
126	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae*** باستخدام الجيلاتين مادة تفاعل.	20
126	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae*** باستخدام البومين المصل البقري مادة تفاعل	21
129	الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae***	22
131	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae***	23
132	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae***	24

قائمة الصور

الصفحة	العنوان	رقم الصورة
80	تأثير معاملات الفطر ***M. anisopliae*** في يرقات عثة الشمع الكبرى ***G. mellonella***	1
84	تأثير معاملات الفطر ***M. anisopliae*** في عذارى عثة الشمع الكبرى ***G. mellonella***	2

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة

يصاب النحل داخل الخلايا وخارجها بكثير من الآفات الحشرية وتعد عثة الشمع الكـــبرى *Galleria mellonella* (L.) ذات الأنتشار العالمي والعائدة لعائلة Pyralidae من الآفات الاقتصادية الدائمة والمهمة التي تهاجم أقراص الشمع وحبوب اللقاح داخل خلايا نحل العسل وفي المخزن ، ويزداد خطر الإصابة بعثة الشمع في نهاية موسم العسل وخزن إطارات الشمع استعدادا للموسم المقبل ويتكبد النحالون في جميع إنحاء العالم خسائر اقتصادية كبيرة نتيجة لمهاجمة عثة الشمع للإطارات المخزونة ومستعمرات النحل الضعيفة . (Warhust and Goebel, 1995)

ان المكافحة الكيميائية من اكثر الطرائق استعمالاً في مكافحة هذه الآفة ويتطلب ذلك عناية وترتيباً خاصاً لئلا تصل هذه المبيدات الى العسل ، ومن هذه المبيدات بروميد المثيل وفوسفات الألمنيوم وسيانيد الكالسيوم (Goodman *etal*., 1990) .

ونظراً إلى مساوئ المبيدات الكيميائية كتأثيراتها السمية في نحل العسل وغيرها من الحشرات المفيدة فضلا عن ظهور صفة المقاومة ولأكثر من (٦٠٠) نوع من الآفات الحشرية ضد مختلف المبيدات الكيميائية فأنه إيجاد البدائل المناسبة لمكافحة هذه الآفات أو على الأقل دعم وسائل المكافحة الكيميائية بوسائل أخرى تؤدي إلى الترشيد من استهلاك المبيدات الكيميائية وتقليل تأثيراتها السلبية (Ambethgar ,2009 ; Hasan *et al*. ,2013).

لذا أصبحت عوامل المقاومة الحيوية من اكثر عوامل الجذب لدى الباحثين للسعي في تطويرها واستعمالها في مجال السيطرة المتكاملة للآفات ، الاّ أن الفطريات الممرضة للحشرات Entomopathogenic fungi (EPF) تعد من اهم هذه العوامل لعدة اسباب منها سهولة اطلاقها الى الطبيعة ، وسهولة فرملتها ، والعدد الكبير من السلالات الممرضة المعروفة منها فضلا عن سهولة تطبيق تقنيات الهندسة الوراثية عليها . (Khan *etal*.,2012a)

يعد الفطر *M. anisopliae* من شعبة Ascomycota من اهم الفطريات المستعملة في المقاومة الحيوية كونه من الفطريات الآمنة غير الملوثة للبيئة ويمكن استعماله كبديل للمبيدات الكيميائية بكفاءة ، وله القدرة على اصابة عدد واسع من الافات الحشرية تقدر بـ ٢٠٠ نوعاً تعود الى ٥٠ عائلة حشرية فضلاً عن اصابته للقراد والحلم (Samuels *et al*., 1989).

يهاجم الفطر مضائفه عن طريق ملامسة ابواغه للسطح الخارجي لجدار أجسامها واختراقه من خلال افرازه لأنزيمات التحلل المائي مثل البروتييز والكايتنيز واللايبيز فضلا عن افرازه لسموم الدستروكسين والفيردوكسين داخل اجسام مضائفه محدثا القتل فيها (Charnley , 2003) .

و نظراً لعدم وجود دراسات سابقة في العراق لبيان كفاءة الفطر *M. anisopliae* كأحد الوسائل الحيوية الآمنة و البديلة عن المبيدات الكيميائية في مكافحة ادوار حياة عثة الشمع الكبرى ، وكذلك لعدم وجود دراسة سابقة في توصيف عوامل الضراوة لهذا الفطر وعزلها وتنقيتها فقد تم ولأول مرة في القطر اجراء هذه الدراسة وتضمنت المحاور التالية :-

١- الأختبار الحيوي لتراكيز مختلفة من المعلق البوغي للفطر في ادوار حياة الحشرة (بيضة و يرقة و عذراء و بالغة) .

٢- الأختبار الحيوي لتراكيز مختلفة من راشح مزرعة الفطر في ادوار حياة الحشرة .

٣- التحري عن عوامل الضراوة وتحديد العامل الأقوى (الأكفأ) منها ، فضلاً عن التحري عن بعض مضادات الأحياء المجهرية .

٤- تحديد الظروف المثلى لإنتاج عامل الضراوة الأقوى (الأكفأ) فضلاً عن تنقيته بالطرائق المتاحة وتوصيفه .

الفصل الثاني

استعراض المراجع
Literatures Review

استعراض المراجع

1-2 عثة الشمع الكبرى(GWM) Greater wax moth *Galleria mellonella*

1-1-2- تصنيف وحياتية عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* L.

تصنف عثة الشمع الكبرى Greater wax moth (GWM) ضمن المجموعة التصنيفية Microlepidoptera التي تضم عوائل العث الصغير التي يكون طول أجنحتها اقل من 20 ملم ، ويبلغ طول أجنحة بالغات عثة الشمع (10- 14 و 13- 16) ملم في كل من الذكور والإناث على التوالي (Shimanuki ,1981; Powell and Opler , 2009)

وقد اشار كل من (Powell and Opler , 2009) الى السلم التصنيفي لهذه العثة وهو كما يلي :

Kingdom :- Animalia

Phylum :- Arthropoda

Class:- Insecta

Order :- Lepidoptera

Notaxon : - Moths

Superfamily : - Pyraloidea

Family : Pyrallidae (Pyrallid Moths)

Subfamily : - Galleriinae

Trib:- Galleriini

Genus: - *Galleria*

Species : *mellonella*

تضع الأنثى بيضاً زيتوني الشكل طوله 0.5 ملم ذا لون أبيض محمر بشكل دفعات تضم كل دفعة 50-150 بيضة تفرزها مع بعضها البعض لكي تلتصق بقوة وثبات على السطوح الموضوعة عليها وتقوم الأنثى بوضع البيض في الأخاديد والفجوات بهدف منع وصول النحل إليه وتدميره ، يصل عدد البيض للأنثى الواحدة من 400- 1800 بيضة خلال 15 يوم ، يفقس البيض خلال 5-8 أيام عند درجة الحرارة 24- 27 مْ وتزداد مدة الحضن عندما تنخفض درجة الحرارة لتصل إلى 35 يوم عند درجة الحرارة 10- 16 مْ . (Shimanuki,1981; Charriere and Imdorf, 1999)

بعد فقس البيض تبحث اليرقة الفاقسة عن الشمع لغرض التغذية وبناء الأنفاق الحريرية ، ان غذاء اليرقة يعتمد بشكل رئيسي على الشوائب الموجودة في الشمع مثل شرانق النحل وغبار الطلع إذ تفضل الشمع الداكن ولا يمكنها ان تعيش على الشمع النقي أو على الأقراص التي لم يتم استعمالها في تربية حضنة النحل ، تكون درجة الحرارة داخل الأنفاق التي تعملها اليرقات أعلى من درجة الحرارة الخارجية وذلك نتيجة للدفء الايضي وبالتالي ستزداد سرعة نموها (البنبي،1994 ; Morse , 1978) .

ان مدة التطور اليرقي تستغرق 28 يوم الى 6 أشهر وذلك اعتمادا على درجات الحرارة وتوفر الغذاء اذ ان درجة الحرارة المثالية للنمو تبلغ (29- 35) مْ ، ويتوقف النمو عند درجة الحرارة الأقل من 5 مْ ، ان طول اليرقة الفاقسة حديثاً يبلغ1 ملم ويصل إلى 2.5 ملم بعد أسبوع و30 ملم بعد إكمال نموها (خنبش و عوشان 1997 , Charriere and Imdorf,1999)

يتضاعف وزن اليرقات يومياً خلال الأيام العشر الأولى من حياتها وفي اليوم الثامن عشر والتاسع عشر تتحرك اليرقات إلى الإطارات الخارجية الخشبية لتقوم بحفر خشب هذه الإطارات وتغزل شرانقها استعداداً للدخول في دور العذراء ، اذ تستمر فترة الدور العذري7-8 أيام وقد تصل إلى أربعة أشهر في فصل الشتاء (Shimanuki, 1981; Graham , 2003) .

يتميز لون البالغات عموماً بين اللون الرمادي والبني وطولها 1.9 سم وعند نشر الجناحين يكون طولها ما بين (2.5-3.1) سم. تكون الذكور انحف وأقل وزناً من الإناث ويمكن تمييز الذكور عن الإناث من خلال النظر للحافة الخارجية للجناح الأمامي إذ تكون الحافة أكثر تقعراً في الذكور مما في الإناث ، فضلا عن ان الجهة الأمامية للرأس عند الذكور تكون ذات شكل دائري بينما تتميز الإناث بوجود خطم في مقدمة رأسها ، وتتباين بالغات عثة الشمع كثيراً في اللون والحجم و يعود ذلك لاختلاف الغذاء أثناء فترة اليرقة فضلا عن اختلاف طول فترة التطور، اذ يصل عمر البالغات إلى 3 أسابيع والإناث تبدأ بوضع البيض بعد التزاوج (Shimanuki , 1981; Tew,2001) .

2-1-2- الأهمية الاقتصادية للحشرة وطرائق مكافحتها

يعد الشمع من أكثر منتجات نحل العسل فائدة إذ يستعمل في الصناعات الصيدلانية وفي مجال طب الأسنان ومواد التجميل ، يكون الشمع عرضة للكثير من الآفات وذلك لكونه يحتوي على العديد من المغذيات و حبوب اللقاح والعسل (Ebadi,1975) وتعد عثة الشمع الكبرى من أهم الآفات التي تهاجم الإطارات الشمعية في خلايا النحل أو في المخازن وتؤدي إلى هلاك أعداد

كبيرة من طوائف النحل سنوياً في العديد من أماكن تربيته ، وتسبب خسارة تقدر بملايين الدولارات سنوياً (Burges , 1978; Caron , 1992 ; Coggshall, 1995)

تتغذى اليرقات على الشمع وتقوم بحفر الأنفاق في الجدار الفاصل بين طبقتي العيون السداسية خاصة إذا كانت مصنوعة من الشمع القديم ، فيتلف بيض النحل وتموت يرقاته عند تخريب العيون السداسية ، كما تسبب الخيوط الحريرية التي تنسجها يرقات العثة إعاقة لحركة شغالات النحل من جهة وعدم الوصول إلى ما بين هذه الخيوط من بيض ويرقات للتخلص منها من جهة أخرى (رمال،2005) ، كما ان كتل البراز التي تخلفها هذه اليرقات تسبب خطراً على خلية النحل بسبب احتوائها للعديد من المسببات المرضية للنحل وأن أغلب الخلايا المصابة بهذه العثة يصاحبها تعفن الحضنة بسبب براز الحشرة الحاوي على المسبب المرضي البكتيري *Paenibacillus larvae* ، وتعد هذه البكتريا المسبب لأهم وأخطر مرض يصيب ذرية نحل العسل والمعروف باسم تعفن الحضنة الأمريكي(American Foul Brood (AFB إذ تستطيع هذه البكتريا الموجبة لصبغة كرام ان تنتج أبواغاً مغطاة بسبعة أغطية وتستطيع ان تعيش لمدة 30-50 سنة ; (Bakhiet and Stahly, 1985; Charriere and Imdorf ,1999 . Ashiralieva and Genersch,2006 ; Genersch *et al*., 2006)

نتيجة لهذه الأضرار الاقتصادية التي تسببها عثة الشمع لذا وجب مكافحتها وإيجاد الوسائل الناجعة في السيطرة عليها (Burges, 1978) .

1- الطرائق الكيميائية

اتجهت الأنظار في بادئ الأمر إلى استعمال الطرائق الكيميائية في المكافحة إذ استعملت طريقة التبخير بالمواد الكيميائية ومنها استعمال غاز (CO_2) بتركيز 97% ولمدة 5 ساعات في مخزن محكم الغلق سبب نسبة قتل وصلت إلى100% ولجميع أدوار الحشرة .(Cantwell *et al*., 1972)

أما استعمال مادة Ethylene oxide (ETO) بتركيز 18 ملغم/ لتر ماء لتعقيم إطارات الخلية المصابة بتعفن الحضنة الأمريكي (AFB) في المخزن فقد أدت بالنهاية إلى قتل عثة الشمع الكبرى بنسبة تصل إلى 100% في مدة أقل من نصف ساعة (Cantwell *et al*.,1975) .

كما ان استعمال الكبريت في مكافحة عثة الشمع الكبرى قد أعطت نسب قتل وصلت إلى 100% لجميع أدوار الحشرة عدا البيض على الإطارات المخزونة المصابة بهذه الآفة وذلك بحرق2 كغم

من الكبريت في مخزن أبعاده 2 ×5×3 م. كما يجب ان تعاد هذه العملية بعد مرور 10 -15 يوم لقتل اليرقات الفاقسة من البيض الموضوع (Szabo and Heikel,1987).

تستعمل مواد كيميائية مبخرة أخرى في المكافحة مثل Aluminum phosphide (Phostoxin) ومادة Paradichlorobenzene (PDCB) التي تستعمل بشكل واسع في مقاومة هذه الآفة إذ تعمل على قتل جميع أدوار الحشرة عدا البيض الذي لا يتأثر بها لذلك يجب استعمال هذه المادة لأكثر من مرة وذلك يعني تراكم المتبقيات الكيميائية السامة في العسل والشمع في الإطارات المعاملة بهذه المادة ، ونتيجة لتراكم هذه المتبقيات فضلاً عن تطور المقاومة لدى عثة الشمع الكبرى ضد المبيدات الحشرية (Goodman *et al*., 1990; Colter, 1994) لذلك اتجهت الأنظار إلى استعمال الطرائق البديلة والناجحة كالمكافحة الفيزيائية والحيوية.

2- الطرائق الفيزيائية

من الطرائق الفيزيائية المستعملة هي التبريد الصناعي وذلك بخزن الإطارات على درجة حرارة -7 مْ ولمدة ثلاث ساعات أو الخزن على درجة حرارة -15مْ لمدة ساعتين (Cantwell and Smith ,1970).

أكد Burges (1978) ان خزن الإطارات على درجة حرارة ما بين (0-17) مْ لعدة ساعات ولبضعة أيام سوف يقتل جميع أدوار الحشرة وبدون إحداث أي ضرر بالإطارات المخزونة، وان تحديد درجة الحرارة القاتلة تعتمد على كمية الإطارات المخزونة وحجم المخزن.

كما ان درجات الحرارة المرتفعة تعد طريقة فعالة أخرى ضد هذه الآفة فالطريقة المثلى للخزن هي على درجة حرارة 45 مْ ولمدة 80 دقيقة كافية لتطهير الإطارات ولا يمكن استعمال الدرجات الحرارية العالية لكونها تذيب شمع الإطارات (Warhust and Goebel,1995).

وقد بَّين كل من Morse (1997) و Flottum انه لا يمكن استعمال درجة حرارة أعلى من 49 مْ في خزن إطارات الشمع إذ ان تعريض الإطارات لدرجة 49 مْ ولمدة 40 دقيقة فقط تكون كافية لقتل جميع أدوار عثة الشمع الكبرى.

ليست درجة الحرارة هي الطريقة الفيزيائية الوحيدة المستعملة اذ يعد استعمال الأشعة المؤينة من الطرائق الناجحة والفعالة في القضاء على الآفة .

إذ بين Flint و Merkel (1983)ان استعمال عدة جرعات من أشعة گاما تراوحت من 0-40 كيلو غري قد أثرت على نسبة فقس البيض والسلوك التنافسي التزاوجي للذكور المشعة لعثة الشمع الكبرى.

وقد أكد التميمي (1998) ان تعريض الطور اليرقي السابع لعثة الشمع الكبرى لجرعة 0.15 كيلوغري قد أعطى نسبة قتل 100% ، كما ان تعريض البالغات (إناثاً و ذكوراً) بعمر 24 ساعة للجرع (0.10 و 0.15 و 0.20) كيلوغري قد أدت إلى العقم الموروث فيها عند تزاوجها مع بالغات غير مشعة ، كما ان نسبة الإطلاق (1:1:5) (ذكور مشعة : ذكور سليمة: إناث سليمة) كانت أفضل النسب للتنافس التزاوجي للذكور المشعة بجرعة 0.20 كيلوغري إذ أدت هذه الجرعة إلى خفض نسبة إصابة الإطارات الشمعية المخزونة إلى 20% .

كما استعمل Jafari و جماعته (2010) تقنية الذكور العقيمة Male Sterile Technique (MST) باستعمال أشعــة گامــا إذ وجـد ان تعريض العذارى الذكور لعثة الشمع إلى جرعة 350 غراي وبنسبة إطلاق (1:1:4) (ذكور مشعة: ذكور سليمة: إناث سليمة) قد أدى إلى خفض نسب فقس بيض عثة الشمع الكبرى وكذلك خفض نسب تحول اليرقات إلى عذارى.

3- المستخلصات النباتية

لم يقتصر الباحثون على استعمال الطرائق الكيميائية والفيزيائية في مكافحة عثة الشمع الكبرى بل لجئوا إلى استعمال المستخلصات النباتية كواحدة من البدائل الطبيعية الآمنة عن المبيدات الكيميائية .

لاحظ الجوراني (1991) ان مستخلص الأيثر البترولي لنبات الآس *Myrtus communis*(L.) (Myrtales : Myrtaceae) المزروع والبري قد أدى إلى تقليل نسبة فقس بيض عثة الشمع الكبرى عند معاملة البيض سطحياً وبتراكيز مختلفة من مستخلصي النباتين ، وبينت نتائج معاملة غذاء يرقات الطور الأول والثالث تثبيط النمو اليرقي وزيادة الفترة التي تتطلبها اليرقات لإكمال نموها اليرقي وان يرقات الطور الأول أكثر حساسية من يرقات الطور الثالث ، وهناك علاقة طردية بين تراكيز كلا المستخلصين ونسبة هلاك اليرقات من الطور اليرقي الخامس ولم يلاحظ أي تأثير على مدة دور العذراء في حين لوحظ تأثير كلا المستخلصين على معدل طول عمر البالغة وعلى انتاجيتها من البيض. كما ان هناك علاقة عكسية بين التراكيز المستعملة والبيض الموضوع.

كما وجد عبد الجبار (2001) ان المستخلص الهكساني (الزيتي) لنبات اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh) أدى إلى خفض نسبة فقس بيض عثة الشمع الكبرى إلى (1.33-7) % عند معاملة البيض سطحياً مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت نسبة فقس البيض بها 91.66 % ، أما معاملة يرقات الطور الخامس فلم تتأثر نسبة بقائها بعد معاملتها بالمستخلص الكحولي لنبات اليوكالبتوس بينما أدت معاملة هذه اليرقات بتركيز 10% من المستخلص الزيتي إلى خفض نسبة بقائها إلى 50% في حين كانت نسبة بقاء يرقات معاملة السيطرة 100% .

في حين بين صبر وآخرون (2004) ان المستخلص الكحولي لأوراق وثمار نبات اليوكالبتوس أدى إلى خفض نسبة فقس بيض عثة الشمع الكبرى إلى(7-8)% عند معاملة البيض سطحياً بعمر 24 ساعة بالتراكيز 1 و 5 و 10% مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت نسبة فقس البيض بها 91.66% أما معاملة يرقات الطور الثالث فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي في نسبة بقاء اليرقات إذ بلغت 60-66.66 % ولنفس التراكيز أعلاه في حين كانت نسبة بقاء يرقات معاملة السيطرة 96.66%.

أشار الوائلي (2013) في نتائجها إلى ان مستخلص الكحول الأثيلي والماء البارد لثمار نبات السبحبح قد تفوق في تأثيره على بيض و يرقات وعذارى عثة الشمع الكبرى مقارنة بمستخلص أوراق نبات السبحبح . كما ان المستخلص الكحولي الأثيلي والماء البارد للثمار والأوراق قد أثر سلباً في إنتاجية البالغات ، كما بينت ان نتائج تحديد الأدوار الأكثر حساسية لمستخلص الكحول الأثيلي والماء البارد لثمار وأوراق نبات السبحبح من خلال حساب قيم LC_{50} كانت تشير إلى ان البيض بعمر 24 ساعة والطور اليرقي الأول هما أكثر الأدوار تحسساً تجاه المستخلصات مقارنة بكل أدوار الحياة الأخرى للحشرة.

4- منظمات النمو الحشرية

وبعيداً عن المستخلصات النباتية فقد فضل بعض الباحثين استعمال منظمات النمو الحشرية Insect growth Regulators (IGRs) أو مثبطات التطور الحشرية Insect Developmental Inhibitors(IDIs) ومنها مثبط تكوين الكايتين Matcho50EC في مكافحة عثة الشمع الكبرى فقد استعمل Unsal وجماعته (2004) ثلاثة تراكيز هي 250 و 500 و 1000 جزء بالمليون من مثبط تكوين الكايتين Diflubenzuron الذي يعود لنفس مجموعة مثبط تكوين الكايتين Matcho5oEc في الغذاء المقدم للطور الخامس لعثة الشمع

الكبرى وقد بينت النتائج ان جميع التراكيز أثرت على الجليد المترسب (Cuticle) مسببة تمزقه وقلة سمكه بمقدار 50% بعد 3.5 يوم من المعاملة مقارنة بمعاملة السيطرة .

أما تقي (2007) فقد أشار إلى ان مثبط تكوين الكايتين $Match_{050EC}$ قد أثر معنوياً في نسب فقس بيض عثة الشمع الكبرى لتصل النسبة المئوية للفقس إلى صفر % ، كما كان تأثير هذا المثبط على الأطوار اليرقية الثلاث الأولى تأثيراً إبادياً إذ كانت النسبة المئوية للقتل 100% بعد مرور يوم واحد وقبل حدوث عملية الانسلاخ ، أما الأطوار اليرقية المتأخرة (من الرابع وحتى السابع) نلاحظ أنها أقل حساسية وان عملية الموت تحدث بعد عملية الانسلاخ مما يدل على ان للمثبط فعلاً تثبيطياً مقارنة بفعله الإبادي تجاه الأطوار الثلاث الأولى ، كما أثر المثبط على العذارى إذ سبب قتل 50% من العذارى وان البالغات البازغة من العذارى المتبقية كان نصفها مشوهاً، بينما وضعت النسبة الأخرى من البالغات أعداداً قليلة من البيض لم يفقس الا نسبة قليلة منه واليرقات الفاقسة ماتت جميعها ولم تستطع ان تكمل دورة حياتها نتيجة تأثرها بالمثبط الذي انتقل إليها عن طريق مبايض البالغات الناتجة من العذارى المعاملة . كما اثبت المثبط فعاليته في القضاء على بالغات الحشرة المتغذية على محلول سكري 10% ملوث بالمثبط قبل ان تضع بيضها.

5- الطرائق الحيوية

أما بالنسبة إلى الطرائق الأحيائية في مكافحة عثة الشمع الكبرى فتعد من الطرائق التطبيقية المهمة وذلك للحفاظ على نحل العسل ومنتجاته والشمع المخزون من السلبيات المسجلة للمواد الكيميائية المستعملة في مكافحة الحشرة والمتمثلة بالتسمم والتلوث .

تعد يرقات عثة الشمع الكبرى من العوائل الطبيعية لفيروس (GmDNV) وهو من الفيروسات الكثيفة (Densonucleosis Virus) وهو يستعمل بنجاح في المكافحة الحيوية ضد هذه الآفة (Gross *et al*., 1990 ; Tal and Attathom, 1993).

استعمل كل من Cantwell and Lehnert (1979) السلالة البكتيرية (HD209) لبكتريا *Bacillus thuringiensis*(Berliner) في حماية الشمع المخزون وقد حصلا على نتائج ناجحة وجيدة في مجال مكافحة هذه الآفة ، أما حقلياً فقد اختبرا جرعتين (200 و400) ملغم بشكل مسحوق ممزوج مع الماء (محلول معلق) وقد سببت الجرعة العالية نسبة قتل بلغت 96-100% أما الجرعة الواطئة فقد أعطت نسبة قتل ما بين 89-99 % مع تلف طفيف في الإطارات

الشمعية لكلا الجرعتين بالمقارنة مع الإطارات الشمعية غير المعاملة التي حصل فيها تلف كلي نتيجة الإصابة الشديدة بعد ستة أسابيع من معاملة الإطارات.

عامل تقي (2007) أدوار عثة الشمع الكبرى بمعاملتين للبكتريا *B.thurinigiensis* احدهما تجاري والآخر محلي وقد أثرتا معنويا على النسبة المئوية لفقس البيض . وقد تميز الطور اليرقي الثاني بأنه أكثر الأطوار حساسية تجاه معاملتي البكتريا إذ كانت الفترة الزمنية لتحقيق قتل 100% قصيرة جداً مقارنة بالأطوار اليرقية الأخرى فيما لاحظ ان اليرقات بدأت تقل حساسيتها كلما تقدم عمرها ، كما ان العذارى والبالغات الناتجة من معاملة يرقات الطور السابع كانت أقل حجماً وظهر عليها التشوه مقارنة بالعذارى والبالغات الناتجة من يرقات سليمة ، كما ان نسبة بزوغ البالغات السليمة من العذارى المعاملة بالبكتريا انخفضت إلى (50- 75) % وان معدل عدد البيض الموضوع والنسبة المئوية للفقس للجيلين الأول والثاني كان أقل مقارنة بمعاملة المقارنة . ولاحظ ان البالغات التي تغذت على محلول سكري 10% ملوث بالبكتريا قد تأثرت من خلال وضع كمية أقل من البيض للجيلين الأول والثاني وان نسبة الفقس كانت منخفضة مقارنة بمعاملة المقارنة .

بيَّن كريم (2011) ان معاملة الإطارات الشمعية ببكتريا *B.thuringiensis* قد قللت من عدد الأنفاق إلى 2.5 نفق وبمعدل طول 5.20 سم وكان معدل عدد اليرقات الميتة 11.83 يرقة من مجموع (15) يرقة.

يوجد هناك مسبب مرضي آخر لعثة الشمع الكبرى هو نوع من البروتوزوا يسمى *Coelogregarina ephestiae* يسبب عدوى مميتة لهذه الحشرة في أوربا . (Raw, 1954)

كما ان هناك بعض أنواع النيماتودا التابعة لعائلة Steinernematidae بإمكانها قتل يرقات

عثة الشمع الكبرى على درجة حرارة 7 مْ (Mracek *etal*., 1997)

كما بيَّن كريم (2011) ان للنيماتودا *Steinernema carpocapsae* تأثير كبير في الدور اليرقي لعثة الشمع الكبرى إذ كانت النسبة المئوية لموت اليرقات 42.02%.

وفي اختيار سمية الفطريات على عثة الشمع الكبرى فقد بيَّن Klingen وجماعته (2002) ان العزلة الفطرية (ARSEF5520) للفطر *M. anisopliae* والتي استعملت بتركيز 3.6×10^{6} بوغ/ مل قد سببت نسبة قتل 100% ليرقات عثة الشمع الكبرى أما عزلة الفطر

Tolypocladium cylindrosporum فقد تسببت بقتل يرقات عثة الشمع الكبرى بنسبة 36%.

كما ان الفطر *Nomuraea rileyi* والمعزول من يرقات عثة الشمع الكبرى المصابة به بشكل طبيعي قد أثر على الدور اليرقي إذ كانت النسبة المئوية لقتل اليرقات هي 56.07 % (كريم، 2011).

أختار Hussein وجماعته (2012) من بين 90 عزلة للفطر*Beauveria bassiana* و 15 عزلة للفطر *M. anisopliae* ثلاث عزلات هي الأكثر ضراوة لحشرة عثة الشمع الكبرى ، عزلتان للفطر *B.bassiana* هما BbaAUMC3076 و BbaAUMC3263 وعزلة للفطر *M.anisopliae* هي ManAUM3085 وقد أعطت جميعها نسبة قتل 100% ليرقات العمر الرابع لعثة الشمع الكبرى عند التراكيز (5.5×10^6 و5.86×10^5 و4.8×10^6) بوغ / مل على التوالي.

يوجد لعثة الشمع الكبرى العديد من الأعداء الحيوية من الطفيليات ومنها الطفيلي *Apanteles galleriae* (Wilkinson) (Hymenoptera: Braconidae) وهو من الأعداء الطبيعية المتخصصة لحشرتي الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) وعثة الشمع الصغرى (*Achroia grisella*(Fabricius) (Lepidoptera: pyralidae إذ وجد ان نسبة تطفله على الطور اليرقي الخامس للحشرة الأولى كانت 64 % بينما كانت نسبة تطفله على الطور اليرقي الخامس للحشرة الثانية 63.5 % (Zacarin *etal*.,2004).

أما الطفيلي *Bracon hebetor* (say)(Hymenoptera: Braconidae) فهو يفضل في تطفله الطور اليرقي السابع لعثة الشمع الكبرى وان النسبة الجنسية للطفيلي كانت تميل لإنتاج الإناث المخصبة بكثرة عند درجة حرارة 26± 2مْ ورطوبة نسبة 60 ± 5% . (Gunduz and Gulel,2005) .

بينما الطفيلي .*Trichogramma* spp فهو يفضل بيض عثة الشمع الكبرى إذ يعمل على التقليل من أعداد البيض الفاقس بشكل ملحوظ حتى عند الإصابة الشديدة بعِثَّة الشمع الكبرى في حين لم يلاحظ أي تطفل له على بقية أدوار الحشرة (Bollhalder,1999)أما المتطفل من عائلة Ichneumonidae فهو يفضل الأطوار اليرقية الأخيرة لعثة الشمع الكبرى أكثر من الأطوار اليرقية المبكرة . (تقي ، 2007) .

هناك بعض أنواع المفترسات التي تهاجم عثة الشمع الكبرى مثل بعض أنواع النمل المفترس التابع لرتبة Hymenoptera وعائلة Formicidae ومنها المفترس(Fabricius) *Pheidole megacephala* الذي يعد كمفترس متخصص بافتراس الأطـوار داخل الشـرنقـة لـعثة الشمع الكـــبرى (Morse and Flottum, 1997) .

وفي جنوب الولايات المتحدة الأمريكية يعمل النحالون على تعريض الخلايا الحاوية على الإطارات المصابة المخزونة إلى النمل *Solenopsis invicta*(Buren) المعروف بالنمل الناري الأحمر Red fire ant لمدة يوم أو اكثر لغرض القضاء على الأطوار غير البالغة لعثة الشمع الكبرى حتى داخل الخلايا الضعيفة.(Graham,2003)

سجل تقي (2007) ولأول مرة في العراق المفترس *Xylocoris flavipes*(Reuter) (Himeptera : Anthocoridae) إذ شوهـدت بالغـــات وحوريات هذا المفترس تقوم بافتراس جميع أدوار عثة الشمع الكبرى عدا البالغات داخل المختبر ، إلا انه كانت تفضل في افتراسها البيض والأطوار اليرقية الأولى.

2-2 الفطريات الممرضة للحشرات Entomopathogenic fungi (EPF)

تحتل الفطريات الممرضة للحشرات مكانة خاصة في مجال المكافحة الجرثومية لكونها عوامل فعالة في تنظيم المجتمعات الحشرية وتعد بدائل واعدة للمبيدات الكيميائية بسبب التخصص العالي لمضائفها وسهولة انتاجها بكميات كبيرة فضلا عن احداثها القتل في مضائفها عن طريق الملامسة لذا تعد المجموعة الوحيدة من عوامل المكافحة الجرثومية التي تكون فعالة ضد الحشرات الماصة للعصارة النباتية والحيوانية والحشرات التابعة لرتبة غمدية الأجنحة والتي لم يحدد اصابتها لحد الان بأي من الامراض البكتيرية والفايروسية (Roberts,1989 ; Charnley,2003;Shahid *etal*.,2012)

ويقدر عدد انواعها بـ 750 نوع تعود الى 85 جنس وغالبا ماتكون من صنف الفطريات الناقصة Hyphomycetes وفطريات Entomophthorales . (Samson *et al*.1988; McCoy *etal*.,1988)

ومن أهم هذه الأنواع التي أمكن توظيفها بنجاح للقضاء على مختلف الآفات الحشرية وفي مختلف الأنظمة البيئية (*Verticillium leecanii , Baeuveria bassiana, Metarhizium anisopliae , Ashersonia aleyrodis , Hirsutella thompsonii ,Paecilomyces lilacinus*) (McCoy &Tigano-Milani ,1992;Zayed,2003; Ambethgar ,2009) .

استعمل 25 نوع من الفطريات الممرضة للحشرات في صناعة المبيدات الحيوية (Biopesticides) ومتوفرة بشكل مستحضرات تجارية في الاسواق مثل Laginex و Mycotrol و O-Naturalis (McCoy and Tigano-Milani,1992; Khetan,2001; Scholte *et al*.,2004) .

تمتاز الفطريات الممرضة للحشرات عن باقي المسببات المرضية الجرثومية ببعض المميزات هي 1- آلية الدخول الى المضائف:- اذ ان لها القدرة على اختراق عوائلها اما عن طريق جدار الجسم من خلال افرازها للانزيمات المحللة كانزيم البروتييز واللايبييز والكايتينيز (Charnley,2003) او عن طريق القناة الهضمية و الفتحات التنفسية (Theunis,1997) فضلا عن الجروح التي تصيب هذه المضائف (Madelin,1963).

2- كما يمتاز بعضها بأن له مدى واسع من المضائف الحشرية مثل *B. bassiana* و *M. anisopliae* والبعض منها متخصص بمضيف معين (Thungrabeab & Tongma ,2007)

3- لها القدرة على اصابة المراحل العمرية للحشرة جميعها ابتداءا من دور البيضة حتى البالغات وذلك بسبب قدرتها على افراز الانزيمات المحللة والدخول عن طريق الكيوتكل (Charnley,2003)

4- ويتمكن بعضها من الاستمرار في الحياة على الرغم من فقدانها عوائلها اذ تعيش مترممة في التربة كالفطر *M. anisopliae* (Muller-kogler and Stein,1976).

5- انتاج السلالات المحسنة لها عن طريق التحكم بجيناتها باستعمال التقنيات الوراثية ، ودراسة الاختلافات في التركيب الجيني مابين نويعات النوع الواحد لاختيار النويع الاكفأ في مجال المقاومة الجرثومية (Tangthirasunun *et al*.,2010 ; Roberts,1989) .

3-2 الجنس *Metarhizium*

يعد الجنس *Metarhizium* واحدا من اكثر الفطريات الممرضة للحشرات قدرة على مهاجمة مظائفها منتجة سلسلة من مواد الايض الفعالة بايولوجيا (Chanbary *et al*.,2009) ، وينتشر في كافة انحاء العالم ويتواجد طبيعيا في التربة ويعد من الفطريات الممرضة لكل من الحشرات والمفصليات الاخرى كالحلم mites والقراد Ticks (Roberts and St.leger,2004) .

اول من وصف وشخص هذا الفطر هو العالم الروسي Elie Metschnikoff عام 1879 اذ عزله من خنافس الحنطة *Anisoplia austriaca* ثم اقترح استعماله كأحد العوامل الجرثومية الممرضة للحشرات(Zimmermann *et al*.,1995; Cloyd,1999)

ويُصَنَف الفطر حديثاً كالأتي :-

Kingdom: Fungi

Subkingdom:Dikarya

Phylum:Ascomycota

Class:Sordariomycetes

Order:Hypocreales

Family:Clavicipitaceae

Genus:*Metarhizium*

(Sung *et al*.,2007)

ميز Bischoff وجماعته (2009) وبالاعتماد على الجانب الوراثي المتقدم تسعة انواع لهذا الجنس هي 1- *M. anisopliae* var. *anisopliae* ، 2- *M.guizhouense* واسمه المرادف *M.taii* ، 3- *M. pingshaense* ، 4- *M. acridum* (المعروف سابقا كنويع تابع *M. anisopliae* var. *major*) ، 5- *M.majus* (المعروف سابقا *M. anisopliae*) ، 6- *M. robertsii* ، 7- *M. globosum* ، 8- *M. brunneum* ، 9- *M. lepidiotae*

ينمو الفطر *Metarhizium* على اوساط زرعية انتاجية مختلفة (Hoe *et al*.,2009) وتنمو جميع عزلات الفطر بشكل مستعمرات دائرية ذات غزول فطرية بيضاء اللون (Tanada and Kaya,1993) وتكون الأبواغ ذات لون اخضر زيتوني عصوية الشكل لذلك يسمى الفطر بفطر الموسكاردين الاخضر ، و كما تشير المصادر الى تباين الوان الأبواغ وشكلها ،اعتمادا على سلالات هذا الجنس وتنحصر الوانها باللون الابيض والاصفر والبني والاخضر(Tanada and Kaya,1993;Tangthirasunun *et al*.,2010) .

ويفرز الفطر *Metarhizium* العديد من الانزيمات كاللايبيز والبروتييز والكايتنيز والسموم في اوساطه الزرعية لذا انتج منه 47 نوع مختلف من المبيدات الفطرية تستخدم تجاريا في جميع مناطق العالم (Faria and Wraight,2007) .

4-2 الفطر *M. anisopliae*

من اكثر انواع الفطريات الممرضة للحشرات دراسة وتطبيقا وله اهميـــة كبيرة كعامـل سيطـرة حيويـــة بسـبب انتشـاره الجغرافي الواسع وامراضيته العالية واصابته لمدى واسع من الآفات الحشرية وهو من الانواع التي تسبب وبائية (Epizootics) في مجتمعات الآفات التي تصيبها اذ ان تأثيراته القاتلة تبقى لأطول مدة ممكنة (Zimmermann, 1993 ; Liu *et al.*,2007) كما يمكن خلطه مع المبيدات الحشرية الانتخابية لتقليل استعمال المبيد ات الكيميائية (Toriello *et al.*,2006) .

تحدث الإصابة بالفطر *M. anisopliae* بوساطة ابواغ فطرية لاجنسية وحيدة النواة وتشمل اربع مراحل هي التصاق البوغ بالمضيف ثم الانبات واختراق الكيوتكل يليه النمو والتكاثر داخل المضيف ثم اعادة نشوء الأبواغ من المضيف (Humber,1997) . استعمل الفطر كثيرا في مكافحة الآفات الحشرية من غمدية الأجنحة والأرضة والجراد وSpittlebugs (Zimmermann, 1993) اذ استعمل في مكافحة كل من خنفساء فاكهة الخوخ *Conotrachelus nenuphar* (Tedders *et al.*,1982) و سوسة الموز *Cosmopolites sordidus* (Kaaya *et al.*,1993) ، وايضاً استعمل في السيطرة على حشرات ثنائية الأجنحة Diptera اذ بينت الدراسات المختبرية أن تعريض ذبابة القرن (hornfly) *Haematobia irritans* لهذا الفطر أدى إلى هلاكات عالية في كل من البيوض والعذارى والبالغات (Angel-Sahagun *et al.*,2005) وبين Mahmoud (2009) ان الفطر سبب نسب هلاك عالية لبالغات ذبابة فاكهة الزيتون *Bactrocera oleae* ، واستعمل المحنة (2011) كل من العالق والراشح للفطر ووجد ان تراكيز المعلق البوغي قد أثرت في جميع ادوار حياة بعوضتي *An.stephensi* و*Cx.quinquefasciatus* ، وقد سجلت أعلى نسبة هلاك 100% و 93.33% عند معاملة يرقات الطور الأول لكلا النوعين على التوالي بالتركيز 2×10^5 بوغ / مل في حين اثر الراشح في كل من دوري اليرقة والبالغات وبلغت أعلى نسبة هلاك 100% لبالغات *An. stephensi* و 96.66% للنوع *Cx. quinquefasciatus* عند التركيز 100% خلال 72 ساعة ، كما أكد الياسري (2014) ان تراكيز المعلق البوغي قد أثرت في جميع ادوار حياة

الذبابة المنزلية *Musca domestica* وبلغت اقصى نسبة هلاك 96.66 % للذكور و93.33 % للأناث عند التركيز 2×10^6 بوغ / مل كما اثر الراشح في كل من دوري اليرقة والبالغات اذ بلغت أعلى نسبة هلاك 100% ليرقات الطور الأول عند التركيز 100% بعد 72 ساعة من المعاملة وكانت النسبة نفسها للبالغات الذكور بينما بلغت للأناث 96.66 % عند نفس التركيز والمدة الزمنية . ولم يقتصر استعمال الفطر في مكافحة الحشرات بل استعمل في مكافحة القراد والحلم اذ تم مكافحة أنواع عديدة من بالغات القراد مثل *Amblyomma variegatum* و *Rhipicephalus appendiculatus* (Kaaya and Hassan, 2000) و كما استعمل في مكافحة حلم *Varroa destructor* في مستعمرات نحل العسل اذ وصلت اقصى نسب الهلاك بعد 3-4 أيام من التعرض للأبواغ (Lambert,2003) ،

كما تشير بعض البحوث الى تفوق الفطر *M. anisopliae* في احداث الاصابة على غيره من الفطريات مثل الفطر *Beauveria bassiana* اذ وجد Jonason وجماعته (2005) تفوق فطر *M. anisopliae* على الفطر *B. bassiana* في السيطرة على يرقات الحشرة *Tetanops myopaeformis* التي تسبب اضرارا في جذور قصب السكر .وتفوق الفطر *M.anisopliae* DAT F-001 على الفطر *M. flavoviride* والفطر *B. bassiana* في احداث هلاكات في يرقات وبالغات الافة الحشرية المتغذية على جذور المحاصيل الحقلية *Adoryphorus couloni* واختزال عدد البيض الموضوع من قبلها (Rath *et al*.,1995).

2-5 النظام الأنزيمي في الفطريات

2-5-1 انزيم البروتييز :- يعد انزيم البروتييز من اقدم الانزيمات المعروفة وهو انزيم واسع الانتشار بالطبيعة وتعد الكائنات الحية المجهرية من المصادر المفضلة في انتاج هذا الانزيم بسبب سرعة نموها ومساحة نموها المحدودة وسهولة التلاعب الجيني في تركيبها الوراثي (Raju *et al*. ,1994 ; Naidu,2011) .

يعود انزيم البروتييز الى صنف مهم من الانزيمات تعرف بانزيمات التحلل المائي والمحفزة لتميؤ البروتينات (Hussain *et al*.,2010) اذ يعمل انزيم البروتييز على التحلل المائي للبروتينات ليجزئها الى ببتيدات قصيرة واحماض امينية حرة و تبدي العديد من انزيمات البروتييز خصوصية اتجاه مجموعة من البروتينات (كمادة تفاعل) وبعضها الاخر يكون اكثر

تخصصا اذ تكون متخصصة بالبروتينات الصغيرة ذات الاصرة الببتيدية القصيرة او حتى ثنائية الببتيد Dipeptides (Smith *et al*.,1997).

ويتم تصنيف انزيم البروتييز اعتمادا على الموقع الذي يعمل عليه الى (Rao *et al*.,1998;Verma *et al*.,2011)

Exopeptidases:- وهي الانزيمات التي تشطر الآصرة الببتيدية القريبة من النهاية الكاربوكسيلية او الامينية .

Endopeptidase:- وهي الانزيمات التي تشطر الآصرة الببتيدية البعيدة من النهاية الكاربوكسيلية او الامينية .

وتقسم مجموعة Exopeptidases اعتمادا على موقع الآصرة التي يعمل عليها الانزيم الى :-

Aminopeptidase:- وهي التي تعمل على النهاية الامينية من سلسلة متعددة الببتيد وتحرر ثمالات الاحماض الامينية المفردة او الببتيدات الثنائية او الثلاثية .

Carboxypeptidase :- وهي التي تعمل على النهاية الكاربوكسلية من سلسلة متعددة الببتيد وتحرر احماض امينية مفردة او ثنائية الببتيد.

وتقسم مجموعة Carboxypeptidase الى ثلاثة مجاميع رئيسة هي serine Carboxypeptidase و MetalloCarboxypeptidase و Cystine Carboxypeptidase اما مجموعة Endopeptidase فيتم تقسيمها الى اربع مجاميع اعتمادا على تركيب الموقع الفعال لها وهذه المجاميع هي (Rao *et al*.,1998) :-

Serine protease (EC3.4.21):- وهي التي تتميز بوجود الحامض الاميني Serine في الموقع الفعال وتكون هذه المجموعة متنوعة وواسعة الانتشار في الفايروسات والبكتريا وحقيقية النواة .

Cysteine/thiol protease(EC3.4.22) :- يعتمد هذا الانزيم على وجود الحامض الاميني Cysteine و Histidine في الموقع الفعال ، ويوجد هذا الانزيم في كل من الخلايا حقيقة النواة وبدائية النواة.

Aspartic protease(EC 3.4.23):- ويعرف عادة بالبروتييز الحامضي ، وتعتمد فعاليته التحفيزية على وجود الحامض الاميني Aspartic في الموقع الفعال وتبلغ اعلى فعالية لهذا الانزيم عند درجة حموضة (pH 4-3).

Metallo protease (EC3.4.24) :- يعد هذا النوع الاكثر تنوعا في فعاليته التحفيزية اذ انه يحتاج في عمله الى وجود ايون معدني ثنائي التكافؤ. وهذا النوع من الانزيمات يكون ذو مصادر متنوعة مثل انزيم الكولاجينيز Collgenase في الكائنات الراقية ،والسموم التي تحدث النزف الموجودة في سم الافعى ،وThermolysine المفرز من البكتريا .

وهنالك نوعين من انزيمات البروتييز تم التعرف اليها ووصفها منذ وقت قريب وهما :-

Theronine protease:- تم التعرف عليه ووصفه عام 1995 وهو يحوي على الحامض الاميني Theronine (Thr) ضمن الموقع الفعال ، وتعد انزيماته العامل المساعد للمعقد البروتيني المعروف بـ Proteasome الموجودة داخل جميع الكائنات حقيقة النواة و Archaea (وهي مجموعة من الاحياء الدقيقة التي لاتحتوي على نواة او اعضاء محاطة بأغشية ضمن خلاياها) وبعض انواع البكتريا .

Glutamic acid protease:- تم وصفه عام (2004) م وهو مجموعة من الانزيمات المحللة للبروتين تتواجد بصورة رئيسة في الفطريات تتميز بأستخدامها لزوج من الاحماض الامينية في فعلها التحفيزي وهما Gln و Glu (Yike,2011) .

ويقسم البروتييز ايضا اعتمادا على مدى الرقم الهيدروجيني pH الامثل لعمل الانزيم الى

1- حامضي Acid والمدى الامثل له من الرقم الهيدروجيني هو (2.0-5.0) (Haq *etal*.,2006). وينتج بشكل رئيسي من الفطريات .

2- متعادل Natural والرقم الهيدروجيني له هو(7.0) او مايكون قريب عليه ويوجد بصورة رئيسة في النبات (اصله نباتي) ولكن بعض البكتريا والفطريات ممكن ان تنتج مثل هذا الانزيم (Haq and Mukhtar,2005).

3- القاعدي Alkaline:- والمدى الامثل له من الرقم الهيدروجيني هو(8.0- 11.0) وينتجه كل من البكتريا والفطريات (Rao *et al*.,1998).

2-5-2 إنزيم الكايتنيز

إنزيم الكايتنيز هو أي أنزيم يحفز انشطار الكايتين و يعمل على التحلل المائي للأواصر الكلايكوسيدية (β-linked-1,4) في الكايتين لتحوله إلى نواتج ذات اوزان جزيئية واطئة (Graham and Sticklen,1994 ; Annamalia *etal*. , 2011) ، و الكايتين عبارة عن سكر متعدد غير متفرع وغير ذائب أبيض اللون صلب وغير مطاط مكون من وحدات سكر متجانسة من سكر N-acetyl - D- glucosamine (GLCNAC) مرتبطة مع بعضها بأواصر كلايكوسيدية نوع.(β-linked-1,4) (Dutta *etal*.,2004; Dhar and Kuar,2010)

ويعد ثاني أهم السكريات المتعددة الموجودة في الطبيعة بعد السيليلوز كما يعتقد في الغالب انه مشتق من تركيب السليلوز إذ يحتوي التركيب ذاته عدا انه يمتلك مجموعةالاسيتاميد (-NHCOCH3)عند موقع ذرة الكاربون الثانية (Dutta *etal*.,2004) وقد أظهرت الدراسات باستعمال أشعة X ان الكايتين يتكون من ثلاثة أشكال ∝-chitins و β- chitins و γ-chitins والتي تختلف فيما بينها في ترتيب السلاسل الجزيئية الموجودة في تركيبه البلوري . ويعد النوع الأول الأكثر شيوعاً وثبوتيةً بسبب شكل السلاسل غير المتوازية فيه والذي يعطي قوة للآواصر الهيدروجينية ويتواجد في كيوتكل الحشرات بنسبة 20 % (Bhagya *et al*. ,2010) وكذلك يتواجد في قشرة السرطان (Crabs) والروبيان (Shrimps) ، اما النوع الثاني فهو نادر تقريباً ويكون أقل ثباتاً بسبب شكل السلاسل المتوازية فيه إذ تعطي قوة ارتباط ضعيفة ما بين جزيئات السكر ويتواجد في الهياكل الخارجية للدايتومات ، وبالنسبة للنوع الأخير فيتكون من اتحاد سلاسل غير متوازية مع سلاسل متوازية (Stawski *et al*. ,2008 ; Dahiya *et al*. ,2006) .

ينتج الكايتنيز في مدى واسع من الكائنات الحية تشمل الفيروسات و البكتريا و الفطريات والحشرات و النباتات والحيوانات . ودوره يختلف بأختلاف الكائن الحي (Matsumoto,2006 ; Duo-chuan,2005).ففي الفطريات يعمل على التحلل الذاتي و التغذية وانقسام الخلية (Adams,2004) فضلا عن دوره في عملية تطفل الفطريات الممرضة على مضائفها (Haran *etal*.,1995) .

ويصنف انزيم الكايتنيز إلى فئتين رئيسيتين اعتماداً على آلية عملها وهما :

(1) Endochitinase (EC3.2.1.14) يقوم هذا الإنزيم بشطر الأواصر الكلايكوسيدية في الكايتين بصورة عشوائية عند المواقع الداخلية ليعطي وحدات من سكر N-acetyl-D-glucoseamine واطئة الوزن الجزيئي وقابلة للذوبان مثل diacetylchitobiose, chitotetraose, Chitotriose .

(2) Exochitinase : - ويتم تقسميه إلى فئتين فرعيتين هما :

(A) Chitobiosidases (EC3.2.1.29) or Chitin-1,4-β-chitobiosidases

والذي يحفز الإطلاق المتكرر لسكر diacetylchitobiose عند النهاية غير المختزلة لسلاسل الكايتين معطية بذلك فقط سكر diacetylchitobiose دون ان تعطي أي من السكريات الأحادية أو قليلة السكريات oligosaccarides.

(B) chitobiases or β -(1,4)-N-acetyl-glucosaminidases (EC3.2.1.30)

يعمل هذا الإنزيم على شطر سكر diacetylchitobiose وبوليمرات الكايتين العالية التي تتضمن Chitotriose و chitotetraose إلى وحدات من GlcNAc و كذلك يقوم هذا الأنزيم بشطر المادة الملونة pNP -GlcNAc ومادة p-nitrophenyl-N-acetyl β-D-galactosaminide لتحرير pNP وشطر سكر 4-MU-GlcNAc لتحرير 4-MU

. (Graham and Sticklen,1994; Dahiya *etal*.,2006)

3-5-2 إنزيم اللايبيز

يعد انزيم اللايبيز أو ما يسمى (Triacylglycerol acylhydrolases (EC3.1.1.3 من الإنزيمات التي تمتلك مجال واسع في تطبيقات التقنيات الحياتية (Ghosh *et al*.,1996).

وان انزيم اللايبيز المفرز من قبل الفطريات يعد مصدراً جيداً نظراً لسهولة الحصول عليه ورخص ثمنه ويدخل في العديد من المجالات الصناعية (Beys da Silva *et al*.,2005;Hassan *et al*.,2006) فضلاً عن ان اللايبيز المفرز من قبل الفطريات الممرضة للحشرات يأخذ دوراً مهماً في عملية إصابة المضيف إذ أن الطبقة الدهنية الموجودة في الكيوتكل السطحي تمثل الحاجز والعائق الأول أمام الممرضات فيقوم اللايبيز المفرز من قبلها بالتحلل المائي للأواصر الاسترية الموجودة في الدهون والبروتينات

الدهنية والطبقة الشمعية وتحرير الأحماض الدهنية الحرة وبذلك تسهم بالتصاق الممرضات بمضائفها (Ali *et al*.,2010 ; Hasan *et al*.,2013).

بدأ الاهتمام بدراسة إنزيم اللايبيز المفرز من قبل الفطريات أوائل عام 1950 م (Ghosh *et al*.,1996) واستمرت الدراسات المتعلقة بهذا الإنزيم وبالذات المفرز من الفطريات الممرضة للحشرات ، فقد قدرت فعالية إنزيم اللايبيز للفطر الممرض *Verticillium lecanii* وعند درجات حموضة مختلفة (Hasan *et al*.,2013) وكذلك اختبرت امراضية إنزيمات ستة من الفطريات الممرضة ثلاث عزلات لفطر *Beauveria bassiana* وثلاث عزلات للفطر *Verticillinn lecanii* ضد الآفة الاقتصادية المعروفة بـ مَّنْ الخوخ الأخضر ووجد ان إنزيم اللايبيز المفرز من قبل هذه الفطريات أكثر أمراضية وتأثيراً مقارنة بإنزيمي البرونييز والكايتنيز (Khan *et al*.,2012 b) .

كما درس كل من(Hegedus and khachatourians (1988 تأثير مادة زيت الزيتون في إنتاج الإنزيم وكذلك تأثير الآيونات المعدنية ثنائية التكافؤ على فعاليته .

كذلك تم دراسة تأثير المادة المطفرة 8-Methoxypsoraicn والاشعة فوق البنفسجية في إنتاج اللايبيز من الفطر *M.anisopliae* اذ وجد ان السلالة المطفرة كانت أكثر إنتاجا لإنزيم اللايبيز مقارنةً بالسلالة الأصلية (Da Silva *et al*.,1989) .

كما درس Ali وجماعته (2009) تأثير بعض أنواع الزيوت والآيونات ودرجات الحموضة على إنتاج إنزيم اللايبيز المفرز من الفطر *M.anisopliae* ، وبيَّن Beys da Silva وجماعته (2010) أهمـية أنزيم اللايبـيز في اختراق المضيف وزيادة عمليـة الإصـابة بالنسبة للفطر *M. anisopliae* إذ بيَّن ذلك اولاً باستعمال أبواغ الفطر في مهاجمة قراد الماشية *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* وأوضح أثر إنزيم اللايبيز في زيادة مهاجمة أبواغ الفطر للعائل ثم بعد ذلك استعمال مثبط لإنزيم اللايبيز ebelactone B وعامل به الأبواغ فلاحظ ان الأبواغ المعاملة والموجودة على القراد لم تستطع ان تكون أنبوب الإنبات (germinate tube) وبالتالي لم تستطع ان تقوم بمهاجمة العائل.

ان إنزيم اللايبيز المفرز من الفطر *M. anisoplae* تتغير فاعليته بحسب طبيعة مكونات جدار جسم العائل الذي يهاجمه بحسب الدراسة التي قام بها Beys da Sliva وجماعته (2010) إذ قامت بتجهيز الوسط المغذي للفطر بمصادر كربون متعددة فلاحظت اختلاف في كمية إنزيم اللايبيز المفرز من قبل الفطر باختلاف المصادر الكربونية المغذية لوسط الإنتاج.

4-5-2 السموم Toxins

السموم في الغالب مركبات ناتجة من عمليات الأيض الثانوي (Secondary Metabolism) (Graniti,1972) وتتطور بشكل جيد في النباتات الراقية والفطريات (Vining,1990) . ويعرف علماء الأحياء المجهرية السموم على أنها مركبات بروتينية ذات اوزان جزيئية عالية تسبب أضراراً في الكائنات الحية عندما تفرز من قبل الممرضات التي تصيبها (Roberts,1980) . أما علماء النبات فيعرفون السموم على أنها مركبات بروتينية ذات اوزان جزيئية واطئة وهي فعالة بايولوجياً عند التراكيز الواطئة (Graniti,1972).

ان السموم التي تفرزها الفطريات تكون ذات وظائف عدة منها إحداث التسمم في العائل والذي يؤدي إلى موته في النهاية والتثبيط المناعي لدفاعات العائل المناعية والتغلب عليها وتعد كمضادات حيوية لتثبيط منافسة الممرضات الأخرى من الأحياء المجهرية وبالأخص الممرضات الفطرية، وتمتلك الفطريات الممرضة من الفطريات الناقصة Deuteromycetes والفطريات الكيسية Ascomycete القابلية على إصابة مدى واسع من العوائل والسرعة في قتل تلك العوائل نتيجة لنمو الفطر داخل العائل في السائل اللمفي الدموي وإفرازه للسموم التي تعمل على اختزال فعاليته واحداث الشلل فيه فضلاً عن قلة تغذيته (Charnley,2003) .

هنالك تنوع كبير في المركبات السمية المنتجة من قبل الفطريات الممرضة للحشرات منها مركبات غير بروتينية تفرز من قبل الفطر *M.anisopliae* والتي يمكن إدراجها ضمن الجدول التالي :

التسلسل	اسم المركب	التركيب الكيميائي	التأثير	المصدر
1	Swainsonine	Indolizine alkaloid	α- Mannosidase inhibitor	Tamerler *etal*., (1998)
2	Viridoxins	Diterpene derivaives of polysubstitutedy-Ɣ-pyrones	Insecticidal	Gupta *etal*.(1993a)
3	Helvolic acid	Triterpenoid	Antibiotic	Turner and Aldridge (1983)
4	cytochalasins.	Perhydroindole with a macro cyclic ring	Inhabit cell movement	Aldridge and Turner(1969)

يعد المركب الناتج من المستخلص الكحولي الايثانولي لغزل الفطر *M.anisopliae* var.*fluvoviride* والذي يسمى بـ viridoxins من أكثر المواد غير البروتينية جذباً في مجال المكافحة الحيوية للحشرات إذ استعمل في مكافحة خنفساء كلورادو *Leptinotarsa decemlineata* . ووجد ان هذا المركب شديد الشبه بالمركبين Colletochin و Colletotrichin المنتجة من قبل ممرض النبات *Colletotrichum nicotianae* (Gupta *et al*.,1993a) .

ووجد ان لمركب Cytochalasins والمعزول لأول مرة من الفطر *M. anisopliae* عام (1969) دور أخر غير تثبيط حركة الخلية هو اختزال عملية البلعمة الخلوية وانتشار خلايا الدم في يرقات عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonela* وبذلك تتداخل مع الاستجابة المناعية للمضيف وتلعب دور مهم في الإصابة الفطرية (Vilcinskas *et al*.,1997b,c).

كما ان هناك سموم تكون عبارة عن مركبات بروتينة مثل مركب Hydrophobin المفرز من قبل الفطر *M.anisopliae* والذي يعد كمبيد حشري Insecticidal (St.leger *et al*.,1992c)

كذلك يفرز الفطر *M.anisopliae* مجموعة من السموم ذات التركيب الببتيدي الحلقي والتي تعرف بالدستروكسين (DTX) وشخص لحد الآن ضمن مزرعة هذا الفطر 30 نوع مختلف من هذه السموم ، إلا ان التركيب الأساسي لهذه السموم يتألف من خمسة أحماض أمينية مرتبطة مع حامض هايدروكسي Hydroxy acid (kodaria,1961; Suzuki and Tamura,1972;Gupta *et al*.,1989; Jegorov *et al*., 1998)

تفرز الفطريات سموم الدستروكسين خلال النمو النشط لها (Amiri - Besheli *etal*.,2000) ويفرز الفطر *M. anisopliae* أنواع من سموم الدستروكسين مثل نوع A و B و E .

يتسبب سم الدستروكسين المفرز من الفطر *M.anisopliae* بامراضية الحشرات سواء كان تعرض الحشرات له بالملامسة أو بالابتلاع أو الحقن اذ انه يسبب ازالة قطبية الغشاء الخلوي من خلال فتح قنوات الكالسيوم (Amiri *et al*.,1999; Poprawski *et al*.,1994) ، ووجد ان حقن الجرعة النصف قاتلة من الدستروكسين A في حشرات الدروسوفيلا يسبب قمع تعبير الجين المشفر لصنع الببتيدات المضادة للميكروبات وبالتالي يتسبب بموت حشرات الدروسوفيلا بمجرد إصابتها بالبكتريا غير المؤذية من *E.coli* (Molnár *etal*.,2010) .

كما وجد ان حقن الدستروكسين في يرقات حرشفية الأجنحة وبالغات ثنائية الأجنحة تسبب فوراً شللاً عضلياً تكززياً (tetanic muscular paralysis) يعقبه ترهل في العضلات وان الجرع العالية من الدستروكسين تكون قاتلة (kodaira,1961;Roberts,1966b;Samules *etal*.,1988a,b,c)

كما ان للدستروكسين مدى واسع من التأثيرات في الحشرات منها تثبيط إفراز سائل أنابيب مالبيجي في الجراد الصحراوي *Schistocerca gregaria* (James *etal*.,1993) . وتثبيط إفراز سترويدات الانسلاخ من الغدد الصدرية لحشرة *Manduca Sexta* (Sloman and Reynolds,1993)، كما ان الجرع القليلة من الدستروكسين له تأثيرات مرضية في خلايا القناة الوسطى وانابيب مالبيجي سواء كان خارج جسم الحشرات أو في داخل جسم الحشرات مثل ظهور التجاويف في السايتوبلازم والذي يسبب توسع في الشبكة الاندوبلازمية الداخلية ، وظهور الحويصلات على الزغيبات الدقيقة وتجمع الكروماتين في النوية (Quiot *et al*.,1985 ; Dumas *et al*.;1995) أيضاً يسبب الدستروكسين تثبيط تضاعف الخلايا من خلال تأثيره على بناء الأحماض النووية DNA و RNA (Quiot *et al*.,1980;Yeh *etal*.,1996) .

وتجدر الإشارة إلى ان ليس جميع عزلات الفطر *M. anisopliae* يمكنها إنتاج سموم الدستروكسين فبعضها ينتج كميات قليلة أو لا ينتج هذه السموم وهذا لوحظ في كل من *M. anisopliae* var. *majus* و *M. anisopliae* var. *acridum* (Kaijian and Roberts,1986;Kershaw *etal*.,1999) ، كما ان إنتاج الدستروكسين لا يتأثر بشكل كبير بمكونات الوسط وان إنتاجه ليس شرطاً للأمراضية (Roberts,1966a;Jegorov *et al*.,1989) .

فضلا عن السموم التي تعد من نواتج الأيض الثانوي عدَّ الباحثون بعض الأنزيمات مثل إنزيم البروتييز المفرز من الفطريات الممرضة وبعض الإنزيمات الأخرى كالفوسفولايبيز مواد سامة (Toxins) لما لها من دور فعال في الإصابة الفطرية وقتل المضيف. اذ برهن لأول مرة العالم Kucera (1981) على ان إنزيم البروتييز المفرز من الفطر *M. anisopliae* والمنقى جزئياً له تأثيرات سمية حين تم حقنه في يرقات عثة الشمع الكبرى.

كما اكد الباحثين Vilcinskas and Wedde (1997a) و Griesch وجماعته (2000) و Griesch and Vilcinskas (1998) على ان انزيم البروتيز المفرز من قبل

M. anisopliae والفطر *B. bassiana* يقوم بفصل وإضعاف ارتباط الهيكل الخلوي بل وحتى تكوينه وكذلك يثبط عملية البلعمة الخلوية (phagocytosis) للخلايا البلازمية في حشرة *Galleria mellonella*.

6-2 الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

يتميز كل كائن مجهري وحتى سلالاته باختلافها عن بعضها البعض في ظروفها البيئية لتحقيق الإنتاجية القصوى من الإنزيمات (Kumar and Takagi , 1999) ، وان القواعد العامة التي تتحكم بالظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز المايكروبي تتأثر بالعديد من العوامل منها درجة حرارة الوسط الزرعي وتأثير سرعة الرج والتهوية والرقم الهيدروجيني للوسط (pH) وحجم اللقاح ومصدر الكاربون وتركيزه ومصدر النايتروجين العضوي واللاعضوي وغيرها، وان معرفة هذه العوامل (وبالأخص عاملي الرقم الهيدروجيني والحرارة) مهمة لتحفيز وتطوير وتحسين الظروف المزرعية لتحقيق الإنتاجية القصوى لانزيم البروتييز (Hesseltine , 1972; Wang and Shih, 1999 ;Rahman *et al*.,2005;Rani,*et al*.;2012)

2-6-1- تأثير المصدر الكاربوني

تعد المصادر الكاربونية ضرورية لحياة الخلايا الحية بصورة عامة إذ تصل نسبة الكاربون الى 50% من الوزن الجاف للخلايا (الخفاجي، 1990)، ويؤدي الكاربون وظيفتين أساسيتين في فسلجة الفطريات هما أولًا تجهيز الكربون الضروري لتصنيع المكونات الأساسية مثل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض النووية ، وثانيًا أكسدة هذه المركبات لتجهيز مصدرًا للطاقة للوظائف الخاصة في حياة الفطريات(Garraway and Evans,1984) فضلا عن كون المصادر الكاربونية مصدر للتزود بالأوكسجين أو الهيدروجين (Zabriskie *et al*.,1980 ; Mehta *et al*.2012)

استعملت مصادر كاربونية في إنتاج إنزيم البروتييز من أحياء مجهرية مختلفة ، ففي الدراسة التي أجراها Braga وجماعته سنة (1999) وجد ان الوسط الذي استعمل فيه الكازائين كمصدر كاربوني أفضل من الوسط الذي يحوي كلوكوز في إنتاج أنزيم البروتييز من سلالتين للفطر *M. anisopliae* var . *anisopliae* .

بينما لوحظت أعلى فعالية لإنزيم البروتييز (Pr1) و (Pr2) من الفطر المذكور باستعمال 1% من كل من الكلوكوز و كيوتكل العث الماسي كمصدر كاربوني (Ali *et al*.,2011) ، وحصلت

العبادي (2012) على أعلى انتاجية لانزيم البروتيز من الفطر *B. bassiana* وبفعالية نوعية بلغت 638.2 وحدة/ ملغم بروتين باستعمال 1.5% من خميرة الخبز كمصدر كاربوني.

وكان الكلوكوز الأفضل لإنتاج البروتييز القاعدي من الفطر *Aspergillus clavatus* (Tremacoldi and Carmona , 2005) ، وحصل Ire وجماعته عام 2011 على نفس النتيجة إذ كان الكلوكلوز الأفضل لإنتاج البروتييز من الفطر *Aspergillus carbonarius* .

وفي دراسة أخرى وجد ان استعمال الفركتوز كمصدر كاربوني كان الأفضل في إعطاء أعلى إنتاجية للبروتييز من الفطر المطفر وراثيًا *A. flavus* AS2 (Rani *et al*.,2012) وبالنسبة للفطر *Rhizopus microsporus* والمُنَمى على وسط نخالة الرز وجد ان اضافة الكازائين كمصدر كاربوني قد حفز الفطر على إعطاء إنتاجية للبروتييز المتعادل (Sumantha *etal*., 2006 b)

أما البكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilus* و *E.coli* و *Serratia marscens* والمعزولة جمعيها من التربة فقد وجد ان الكلوكوز هو الأفضل لإنتاج البروتييز القاعدي من هذه الأنواع المذكورة (Palsaniya *et al*.,2012) .

2-6-2- تأثير المصدر النايتروجيني وتركيزه

النايتروجين من العناصر المهمة التي يحتاجها الكثير من الأحياء المجهرية خلال عملية التخمر لبناء البروتين (Carlile *et al*., 2001) .

يعد النتروجين مصدرًا ضروريًا للنمو والتطور الفطري ، فالفطريات تحتاج إليه لصنع مختلف المكونات الخلوية الضرورية والتي تشمل الأحماض الأمينية والبروتينات والأحماض النووية والكايتين ومختلف الفيتامينات ، وان اغلب الفطريات قادرة على استغلال النتروجين غير العضوي البسيط بالإضافة الى المصادر العضوية كالأحماض الأمينية.

تكون مصادر النتروجين في الطبيعة على نوعين : أما لا عضوية مثل النتروجين الجوي وأملاح الأمونيوم والنترات أو تكون مصادر عضوية مثل الحوامض الأمينية والبروتينات ومشتقاتها (الخفاجي، 1990) .

يتأثر كثيرًا إنتاج البروتييز في الفطريات بوجود المصادر الكاربونية والنتروجينية، فيكون إنتاجه قليلًا إذا نمت الفطريات على وسط غني بالنتروجين ولكنه يفتقر الى الكربوهيدرات ويكون إنتاجه غزيرًا في حالة توفر المصادر الكاربونية وقلة أو انعدام المصادر النتروجينية المعدنية . (Eaton and Ayres,2002)

بيَّنت العديد من الدراسات ان هنالك تباينًا في تأثير نوع المصدر النتروجيني في إنتاج إنزيم البروتييز من الأحياء المجهرية ، ففي دراسة أجراها Braga وجماعته (1999) وجد ان الإنتاج الغزير لإنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* يكون باستعمال الكازائين Casien كمصدر نايتروجيني وكاربوني في نفس الوقت.

بينما أوضح Dhar و Kaur (2010) ، بأن الوسط الحاوي على الكازائين 1% لم يحث الفطر المذكورعلى إنتاج البروتييز بنوعيه Pr1 و Pr2 وان الوسط الحاوي على الكايتين الغروي2 % كمصدر نايتروجيني وكاربوني كان الأفضل في إنتاج هذين الأنزيمين.

بيَّنت العبادي (2012) ان المصدر النايتروجيني الأكفأ في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* هو كبريتات الأمونيوم وبفعالية نوعية بلغت 676.47 وحدة/ ملغم بروتين.

أما الفطر *A. flavus* فكانت أعلى إنتاجية له من أنزيم البروتييز عندما زود الوسط المغذي له بنترات البوتاسيوم KNO3 بنسبة 3% كمصدر نيتروجيني لا عضوي . (Muthulakshmi *et al.*, 2011)

وكان للفطر *A. clavatus* أعلى انتاجية للأنزيم عندما زود بالكازائين كمصدر نتيروجيني عضوي وبنسبة 1% (Tremacoldi and Carmona , 2005)

بينما كانت كبريتات الأمونيوم هي المصدر النتروجيني الأكفأ في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *A. niger* (Devi *et al.*, 2008).

ووجد Haq وجماعته (2008) ان الببتون كان المصدر الأكفأ في إنتاج البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* .

أكد Ire وجماعته (2011) ان طحين فول الصويا هو المصدر النايتروجيني الأفضل في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *A. carbonarius* .

أما الفطر الطبي *Pleurotus sajor-caju* فكان المصدر النتروجيني الأفضل في حثه على إنتاج إنزيم البروتييز هو نترات الأمونيوم بنسبة 0.8% (Ravikumar *et al*.,2012) .

وكان أيضًا لطحين فول الصويا المدعم بالكازائين كمصدر نتروجيني الدور الأكبر في تحفيز الفطر الطافر *A. flavus* AS2 على إنتاج إنزيم البروتييز (Rani *et al*.,2012) .

حصل Haritha وجماعته (2011) على أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المفرز من البكتريا البحرية Streptomyces carpaticus عندما زود الوسط المغذي بمصدرين للنتروجين احدهما عضوي هو طحين فول الصويا والأخر لا عضوي هو كبريتات الأمونيوم.

2-6-3- تأثير مدة الحضن

توجد علاقة وثيقة ما بين إنتاج الإنزيمات المايكروبية ومدة الحضن وذلك لوجود ترابط ما بين بناء الإنزيمات ونمو الخلايا . إلا أنه لا توجد مدة حضن مثلى لإنتاج الانزيمات إذ إنها تختلف بإختلاف نوع الوسط الزرعي .(Rustiguel, 2012 ; Ito *et al*., 2007 ; Kaur *et al*., 1998) .

لاحظ Dhar و Kaur (2010) أن أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المفرز من قبل أربعة عزلات للفطر *M. anisopliae* كانت خلال 4-6 يوم من بداية الحضن.

وذكر Tiago وجماعته (2002) ان الإنتاجية القصوى لإنزيم البروتييز بنوعيه Pr1 و Pr2 كانت بعد 48 ساعة من حضن الفطر *M. flavoviride* و بأستعمال كيوتكل الجرادة *Schistocera pallens* في حال إنتاج انزيم Pr1 وباستعمال وسط الحد الأدنى المدعم بالنترات في حال إنتاج انزيم Pr2.

وكانت مدة حضن 5 أيام كافية لإنتاج البروتييز بنوعيه المذكورين من الفطر *M. anisopliae* IF28.2 و بأستعمال كيوتكل العث ذو الظهر الماسي (Ali *et al*.,2011) .

وأشار Rao وجماعته (2006) الى ان إنتاج إنزيم البروتييز الخارج خلوي من الفطر *B. bassiana* وصل أعلى مستوى بعد سبعة أيام من تنمية الفطر و بأستعمال الوسط الحاوي

على 0.72% من مسحوق قشرة الروبيان و 0.60% من مسحوق الصويا و 0.19% سكروز و 0.68% خلاصة الخميرة.

في حين لوحظ أعلى فعالية لإنزيم البروتييز القاعدي بعد 6 أيام من حضن الفطر *A. clavatus* (Tremacoldi and Carmona , 2005).

أما الفطر *A. carbonarius* فسجل أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز بعد 9 أيام من بداية الحضن و بأستعمال تخمرات الحالة شبه المغمورة (Submerged fermentation) (Ire *et al*, 2011) .

وأشار Sumantha وجماعته (2006a) الـــى ان إنتـــاج البروتييز المتعادل من الفطر *Rhizopus* sp. وصل أعلى مستوى له بعد 3 أيام من تنمية الفطر .

2-6-4- تأثير درجة الحرارة

تعد درجة الحرارة من العوامل المهمة ذات التأثير المسيطر على نمو الأحياء المجهرية وبالأخص الفطريات . كما أنها تؤثر في معظم النشاطات الأيضية للأحياء المجهرية خصوصًا النشاطات الأنزيمية في الخلية من خلال تأثيرها على الصفات الفيزيائية للغشاء الخلوي، هذا وان درجات الحرارة الملائمة لنمو الكائن المجهري قد تختلف عن درجات الحرارة الملائمة لإنتاج الإنزيمات من قبلها إذ تكون في بعض الأحيان درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن المجهري أعلى من درجة الحرارة المثلى لإنتاجه للأنزيم (Soundarapandian and Chandra , 2007; Ustariz *et al*.,2008) وان لدرجة الحرارة دور مهم في تنشيط أو تثبيط الإنزيمات فلكل إنزيم درجة حرارة مثلى يبلغ عندها الذروة في فعاليته (Abu sayem *et al*.,2006) .

أكد Samarntarn وجماعته (1999) ان الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *A. oryzae* UI521 كانت 45 مْ ، بينما استعمل Tiago وجماعته (2002) درجة الحرارة 28 مْ في حضن الوسط الزرعي لإنتاج الانزيمين Pr1 و Pr2 من قبل الفطر *M. flavoviride* ، وكانت تلك الدرجة الحرارية المستعملة في حضن الوسط الزرعي لإنتاج الانزيمين Pr1 و Pr2 من الفطر *M. anisopliae* (Dhar and Kaur,2010) ، بيَّن Ali وجماعته (2011) ان الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الانزيمين Pr1 و Pr2 من الفطر *M. anisopliae* كانت 35 مْ .

وفي دراسة أخرى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *A. tamarii* [EF661565.1] كانت الدرجة الحرارية التي تحقق فيها أقصى إنتاج للإنزيم هي 60مْ (Sharma and De , 2011) .

2-6-5- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج

يمتلك الرقم الهيدروجيني تأثيرًا فاعلًا في نمو الأحياء المجهرية وإنتاجها للإنزيمات ، فالرقم الهيدروجيني الأمثل ضروري للنمو الطبيعي وإنتاج الأبواغ في الفطريات وبصورة عامة تنقسم الفطريات الى قسمين من حيث تأثرها بالرقم الهيدروجيني فقسم منها يمتلك مدى واسع من الرقم الهيدروجيني الأمثل لنموه والقسم الآخر يقتصر نموه على مدى ضيق من الرقم الهيدروجيني (Prosser and Tough, 1991)

ويؤثر الرقم الهيدروجيني للوسط على إنتاج إنزيم البروتييز القاعدي وذلك من خلال تأثيره التنظيمي في التداخل مابين التفاعلات الأيضية وآلية التعبير الجيني ، ويساعد التحكم بالرقم الهيدروجيني للوسط في تنظيم التعبير الجيني للعديد من الجينات مما يؤدي الى الحصول على إنتاجية عالية للبروتين (Wang *et al*.,2005; Patil and Chaudhari, 2013).

قام Dhar و Kaur (2010) بحضن الفطر *M. anisopliae* على وسط إنتاجي ذو رقم هيدروجيني8 لغرض إنتاج الانزيمين Pr1 و Pr2 . بينما انتج الفطر *M. anisopliae* كل من الإنزيمين المذكورين عندما حضن على الوسط الإنتاجي وبرقم هيدروجيني ابتدائي 5.4 (Ali *et al*.,2011)

سجل Kucera (1981) أعلى فعالية لإنزيم البروتييز السام المفرز من الفطر *M.anisopliae* عند الرقم الهيدروجيني 5.5 وباستعمال وسط الإنتاج ذو الرقم الهيدروجيني 6 .

حقق الفطر *A. oryzae* UI521 اعلى فعالية لأنزيم البروتييز القاعدي عند مدى رقم هيدروجيني 8- 9 (Samarntarn *et al*.,1999) .

وحصل Abdul Rauf وجماعته (2010) على أعلى فعالية لإنزيم البروتييز الحامضي عندما تم تنمية الفطر *R. oligosporus* على وسط إنتاجي ذو رقم هيدروجيني 3 .

2-6-6 تأثير حجم اللقاح

ان لحجم اللقاح تأثير مهم في إنتاج وبناء الإنزيمات إذ انه من العوامل الحيوية التي تحدد إنتاج الكتلة الحيوية في التخمر وأن تحقيق التوازن بين انتشار الكتلة الحيوية وتوفر المواد الغذائية والأوكسجين الذائب سوف يعطي إنتاجية عالية للأنزيم لذا أصبح من الأساسيات تثبيت حجم اللقاح الأمثل لكل كائن مجهري بغض النظر عن مدة الحضن ، ولابد من الإشارة الى ان حجم اللقاح يختلف اعتماداً على نوع وسلالة الكائن المجهري وطبيعة عملية التخمر. (Nigam, 1990; Abdul- Rauf *et al.*, 2010; Patil and Chaudhari,2013)

تم استعمال حجوم لقاح مختلفة في إنتاج إنزيم البروتييز من الأحياء المجهرية فقد تم استعمال حجم لقاح مقدار 1×10^6 بوغ/ مل لإنتاج انزيمي البروتييز Pr1 و Pr2 من الفطر *M.anisopliae* . (Dhar and Kaur,2010; Ali *et al*.,2011)

أما Tiago وجماعته (2002) فقد استعملوا حجم لقاح مقداره 3×10^6 بوغ/ مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. flavoviride* ، واستطاع Abdul Rauf وجماعته (2010) من إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Rhizopus oligosporus* بأستعمال حجم لقاح مقداره 1% فقط .

أنتجت العزلة البرازيلية من الفطر *B. bassiana* إنزيم البروتييز الخارجي باستعمال الوسط الزرعي الملائم لها والملقح بلقاح حجم 1×10^8 بوغ /مل (Ito *et al*.,2007) .

وتمكن Shankar وجماعته (2011) ان ينتج إنزيم البروتييز من الفطر المذكور باستعمال حجم لقاح 10% .

وبالنسبة للبكتريا *B. circulans* MTCC7942 استطاعت ان تنمو وتعطي أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز عند حجم لقاح مقداره 6 % بعد 48 ساعة من بداية حضنها . (Patil and Chaudhari,2013)

2-6-7 تأثير سرعة الرج

لزيادة إنتاج إنزيم البروتييز من الضروري تزويد الأحياء المجهرية بالأوكسجين الذائب لكونه من العوامل المحددة للنمو وتخليق الإنزيم إذ يعمل في بعض الأحياء بتغيرات أساسية في فعالياتها الحيوية فهو أما ان يكون محفزًا للأنزيمات أو مثبطًا لها ، وتعمل سرعة الرج على تحسين توزيع المواد الغذائية في الوسط وزيادة كميات الأوكسجين الذائب من خلال مزج

مكونـــــــــــــــــــــات الوســـــــــــــــــــــــط

(السعد، 1980؛ Patil and Chaudhari,2013; Kumar and Takagi,1999) .

تعد طريقة استعمال الحاضنة الهزازة حلًا نموذجيًا إذ انه يقوم بتوزيع مكونات الوسط في كل اتجاه ويزداد معدل نمو الخلايا ووجد ان تغير سرعة الرج تؤثر في درجة المزج في الدوارق المهتزة (Bohlmann *et al*.,1998).

استعملت سرع مختلفة تتناسب والأحياء المجهرية المنتجة للأنزيمات اذ استعمل Braga وجماعته (1999) سرعة الرج 150 دورة/ دقيقة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* .

أما Dhar و Kaur (2010) فقد استعملا سرعة الرج 180 دورة/ دقيقة لإنتاج إنزيم البروتييز بنوعيه Pr1 و Pr2 من الفطر *M. anisopliae* .

وأنتج الأنزيم من نفس الفطر أعلاه بأستعمال سرعة رج 200 دورة/ دقيقة (Prakash and padmaja ,2012) .

أما بالنسبة للفطر *B. bassaina* فقد استعملت سرعة الرج 150 دورة/ دقيقة لإنتاج أعلى فعالية لإنزيم البروتييز(Rao *et al*.,2006) .

وكانت سرعة الرج 120 دورة/ دقيقة هي الأفضل في تحقيق أعلى فعالية انزيمية لإنزيم البروتييز القاعدي المفرز من البكتريا *Bacillus licheniformis* MZK03 (Abu Sayem *et al*.,2006) .

8-7-2 تأثير الأملاح المعدنية

تعد الأملاح أحد العوامل المهمة في تنمية الأحياء المجهرية وبالتالي تؤثر في إنتاجها للأنزيمات (Rustiguel *et al*., 2012) إذ ان وظيفة هذه المعادن في فعاليات الأيض تكون بصورة رئيسية كمنشطات للأنزيمات كما أنها تعمل على زيادة ثباتية بعض الأنزيمات مثل البروتييز. فضلاً عن كونها محاليل منظمة تساعد في المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط ويمكن إضافتها للأوساط الزرعية على شكل أيونات موجبة لأملاح غير عضوية مثل Fe^{+2} و Mg^{+2} و Mn^{+2} وCo^{+2} وغيرها ، ان الحاجة الى هذه المعادن وتراكيزها تختلف من كائـــن

مجهري لآخر إذ انه من المعروف عنها قد تعوض أو تتضاد أو تسرع من عمل بعضها البعض (السعد ،1980 ؛ Kumar and Takagi,1999 ;Sevinc and Demirkan ,2011; Tambekar and Tambekar,2011) .

استعمل كل من Dhar و Kaur (2010) 0.1 % فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 0.05% كبريتات المغنسيوم و 0.05% كلوريد الصوديوم في الوسط المنتج لإنزيم البروتييز Pr1 و ؛ Pr2 من الفطر *M. anisopliae* .

استعمل 2 غم من كبريتات الأمونيوم NH4SO4 و 0.3 غم من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4 و 0.5 كلوريد الصوديوم NaCl و0.5 غم كبريتات المغنسيوم MgSO4 و 0.2 غم فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 و 0.1غم من كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ في الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييز الحامضي من الفطر *R. oligosporus* (Abdul Rauf *et al*., 2010) .

أما أنزيم البروتييز المنتج من الفطر *A. carbonarius* فقد وصل الى أعلى مستوى لإنتاجه حينما استعملت أملاح كبريتات الحديدوز $FeSO_4$ وكلوريد الصوديوم NaCl وبنسبة 0.04% و 0.1% على التوالي في وسطه الإنتاجي(Ire *et al*.,2011) .

أما عمران وجماعته (2006) فقد استعمل المحلول الملحي المتكون من 0.5% فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و 0.05% كبريتات الحديدوز و 0.5% كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ في الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييز القاعدي من بكتريا *B. firmus* .

وبالنسبة للبكتريا *Bacillus* sp. N-40 فقد استعملت لإنتاج إنزيم البروتييز ودراسة صفاته بعد حضنها في اثنان من الأوساط الإنتاجية احدها يحوي على أملاح كبريتات المغنسيوم MgSO4 وبنسبة 0.01% وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ وبنسبة 0.01% وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين بنسبة 0.05% والأخر يحوي على كلوريد المغنسيوم بنسبة 0.02% وكلوريد الكالسيوم CaCl2 بنسبة 0.04% (Sevinc and Dermirkan, 2011) .

7-2 تنقية إنزيم البروتييز

أشارت العديد من الدراسات الى ضرورة عزل وتنقية مختلف الإنزيمات من اجل دراستها بصورة صحيحة لتوصيفها بشكل كامل أو لإنتاجها لأغراض تجارية أو تحديد تتابع الأحماض الأمينية والتركيب ثلاثي الأبعاد للأنزيم (Saxena *et al*., 2003 ; Dako *et al*., 2012) .

وتعتمد عملية التنقية لإنزيم معين على الخواص الكيموحيوية والفيزيائية للأنزيم ومنها الاختلاف في الوزن الجزيئي وكثافة الشحنة وتوزيعها وذائبية الأنزيم وتخصصه للارتباط بمجموعة معينة والاختلاف في الثبات تجاه درجة الحرارة (Burgess,2008).

وتنقية الإنزيمات عبارة عن سلسلة متتابعة من الطرائق الغرض منها فصل بروتين الإنزيم عن بقية بروتينات المستخلص الإنزيمي الخام وذلك لأجل الحصول على حصيلة عالية (High recovery) وناتج عالي النقاوة (Highly purified end product) فضلا عن تحقيق الإنتاجية التكرارية (reproducibility) . وان طرائق الفصل المستعملة في التنقية تعتمد إما على الحجم متمثلة بطرائق الطرد المركزي (Ultra centrifugation) والفرز الغشائي (Dialysis) والترشيح الهلامي (Gel permeation chromatography) ، أو تعتمد على الشحنة كما في التبادل الآيوني (Ion exchange chromatography) ، أو الألفة (Affinity chromatography)) ، كما توجد طرائق أخرى للفصل كالترسيب بالأملاح والمذيبات العضوية مثل كبريتات الأمونيوم والاسيتون والايثانول (Holme and Peck , 1998;Sumantha *et al.*, 2006a; Ali *et al.*, 2010) .

تتحقق التنقية عبر مجموعة من الخطوات المتدرجة والمدروسة والتي يفترض ان تزداد خلالها الفعالية النوعية للإنزيم في كل خطوة ، ولا يفترض ان تكون هذه الخطوات ضمن ترتيب ثابت ولكن تبدأ بالترسيب بالمذيبات العضوية (الكحول الاثيلي والاسيتون) أو بالأملاح (كبريتات الأمونيوم) أو التركيز بالتجفيد أو الترشيح الفائق وذلك للتخلص من أكبر كمية ممكنة من الماء الموجود ضمن المستخلص الإنزيمي الخام ومن ثم تقليص حجمه ورفع كفاءة التنقية (دلالي ، 1983 ؛ Kornberg ,1990) .

استعملت العديد من الطرائق في تنقية إنزيمات البروتييز من الأحياء المجهرية المنتجة لها . فقد قام Bhagya وجماعته (2010) بتنقية إنزيم البروتييز بنوعيه Pr1 و Pr2 المنتج من الفطرين *M. anisopliae* و الفطر *B. bassiana* بوساطة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 90% ثم باستعمال الديلزة لتصبح عدد مرات تنقية الانزيمين 2.0 مرة .

اما انزيم البروتييز الحامضي من الفطر *Mucor pusillus* فقد نقي بسلسلة من الخطوات المتتالية كان أولها الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 85% ثم الترسيب بالكحول الأثيلي أعقبها التجزئة خلال عمود الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-75 وأخيرًا كروماتوغرافـيا التبـادل الأيوني بأستعمال المبادل

DEAE- Sephadex A-50 وتم الحصول من الخطوة الأخيرة على حصيلة إنزيمية مقدارها %55 (Somkuti and Babel,1968) .

أعطت خطوات عملية تنقية إنزيم البروتييز الحامضي من الفطر *A. oryzae* حصيلة انزيمية مقدارها 9 % وذلك بعد ان مر الإنزيم بالترسيب بالاسيتون وبنسبة إشباع بلغت ما يقارب 1.0% بعد التجزئة بكبريتات الأمونيوم ، ثم كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بأستعمال المبادل P.cellulose وبعدها كروماتوكرافيا التبادل الأيوني بأستعمال المبادل DEAD- cellulose (Davidson *et al.*,1975) .

أما Shimizu وجماعته (1992) فقد عملوا على تنقية إنزيم البروتييز ممن الفطر *B.bassiana* F18 بخطوات متعاقبة بدأت بالترسيب بكبريتات الأمونيوم ثم التبادل الأيوني خلال عمود CM-Toyopearl وبعدها بالترشيح الهلامي خلال عمود Sephacryl S-100 ليحصلوا على عدد مرات تنقية مقدارها 87.1 مرة بحصيلة انزيمية 20.5% .

وقد أعطت عملية تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harizanum* حصيلة إنزيمية مقدارها 27% وعدد مرات تنقية بلغت 4.06 مرة وذلك بعد ان استعملت طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 60% ثم طريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي خلال عمود الفصل Phenyl- sepharose (Demarco and Felix,2002) .

تمكن Benito وجماعته (2002) من استعمال عدة خطوات لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* اشتملت على الترسيب بكبريتات الأمونيوم وكروماتوكرافيا التبادل الآيوني والترشيح الهلامي وكروماتوكرافيا الطبقة السائلة عالية الكفاءة(HPLC) ليحصل على الانزيم بوزن جزيئي مقداره 35 كيلو دالتون.

أما بكتريا *Streptomyces microflarus* المعزولة من التربة فقد تم تنقية أنزيم البروتييز المتعادل منها بطريقة الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم بطريقة الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-75 لتصل عدد مرات التنقية الى 30.63 مرة . (Rifaat *et al.*,2005) .

قام Gaur وجماعته (2010) بتنقية إنزيم البروتييز المنتج من بكتريا *Pseudomonas themaerum* بخطوتين الأولى باستعمال الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 60% والثانية كانت طريقة كروماتوكرافيا التبادل الآيوني باستعمال المبادل DEAD- cellulose وقد حصل على عدد مرات تنقية بلغت 9.3 مرة.

وحصل Ire وجماعته عام (2011) على عدد مرات تنقية بلغت (10) مرات وفعالية نوعية مقدارها 485.47 وحدة/ ملغم بروتين وحصيلة قدرت بـ 10.3% عن تنقيتهم لإنزيم البروتييز الحامضي المنتج من الفطر *A. carbonarius* وقد تضمنت عملية التنقية أربع خطوات بدأت بالديلزة باستعمال 4 مولاري سكروز ثم كروماتوكرافيا التبادل الآيوني خلال عمود الفصل Q.Sepharose أعقبها كروماتوكرافي التآثر الهايدروفوبي خلال عمود PhenylSepharose Cl-4B وأخيرًا الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-100 .

استعمل كل من Sharma و De (2011) طريقة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 75% وطريقة الكروماتوكرافيا باستعمال المبادل CM-cellulose لتنقية إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *A. tamarii* [EF661565.1] وليحصلا على عدد مرات تنقية بلغت26 مرة وحصيلة إنزيمية بلغت 50%.

2- 8 توصيف إنزيم البروتييز

2-8-1 تعيين قيم ثابت ميكالس(K_m) والسرعة القصوى (V_{max})

ان من الأمور المهمة بالنسبة للتفاعلات الأنزيمية هو دراسة الثوابت الحركية الخاصة بها ، ويعد ثابت ميكالس (K_m) Michaelis constant واحد من الثوابت الحركية المميزة للأنزيم ومادة التفاعل ويعرف بأنه تركيز مادة التفاعل التي تصل عندها سرعة التفاعل الى نصف السرعة العظمى ويعبر عنه بوحدات التركيز . ولتعيين قيمته أهمية كبيرة وذلك لأسباب عدة يمكن إدراجها بما يأتي . (الداودي، 1991) .

1- تعطي قيمة K_m القدرة على معرفة القيمة التقريبية لمستوى مادة التفاعل (المادة الأساس) داخل الخلية.

2- يعّبر ثابت ميكالس عن الملائمة النسبية لمواد بديلة لتكون مواد أساس للأنزيم.

3 - بما أن K_m مقدار ثابت لإنزيم معين لذا فأن القيمة الرقمية له تعد وسيلة للمقارنة بين الأنزيمات من مختلف الكائنات الحية أو حتى بين الأنزيمات من الأنسجة المختلفة للكائن الحي نفسه.

4- يعد التغير في قيم K_m بسبب المواد العضيدة طريقة لتنظيم فعالية الأنزيم.

5- عندما يتم التعرف على قيمة K_m يصبح بالإمكان السيطرة على ظروف التجربة.

وتعبر قيمة ثابت ميكالس عن ألفة الأنزيم تجاه مادة التفاعل فالأنزيمات التي لها قيمة K_m واطئة (أي الألفة نحو المادة كبيرة) تبدي نشاطًا أعلى من تلك التي لها قيمة K_m عالية. (Holme and Peck, 1998) .

أما فيما يتعلق بالسرعة القصوى (V_{max}) فتعرف بأنها أقصى سرعة يصل إليها التفاعل في الظروف التي يجرى فيها التفاعل ، وترتبط قيمة (V_{max}) بكمية الإنزيم المستعملة (Segel, 1976) .

قام العديد من الباحثين بدراسة الثوابت الحركية لأنزيمات البروتييز المنتجة من مختلف الأحياء المجهرية ، فقد وجد Barata وجماعته (2002) ان قيمتي K_m و V_{max} بلغت 0.16 ملي مول و 0.60 مايكرومول (دقيقة. ملغم)$^{-1}$ على التوالي لإنزيم البروتييز التربسيني Trypsin - like protease والمنقى من الفطر *Fusarium oxysporum* وباستعمال (Benzoyl-Arginyl-p-NitroAmide, BApNA) كمادة تفاعل.

وباستعمال الببتيد Suc-$(Ala)_2$-Pro-Phe-pNA كمادة تفاعل وجد ان قيمة ثابت ميكالس K_m لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Clonostachys rosea* بلغت 1.45 ملي مولر (Zhao *et al*.,2005) .

وبالنسبة لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria* sp. فقد وجد ان قيمة V_{max} تساوي 29.67 وحدة/ مل وقيمة K_m تساوي 5.1 ملغم/مل وباستعمال الكازائين كمادة تفاعل (Shankar *et al*., 2011).

وبلغت قيمة كل من K_m و V_{max} (2.6 و19.9) ملغم/ دقيقة ،على التوالي وباستعمال الكازائين كمادة تفاعل في الدراسة التي قام بها Sumantha وجماعته (2006 b) لتوصيف إنزيم البروتييز المنقى جزئيًا من الفطر *R. microsporum* ، ففي بحث قام به Muthulakshmi وجماعته (2011) لتوصيف إنزيم البروتييز من الفطر *A. flavus* بلغت قيمة K_m 0.6 ملغم/مل و V_{max} 60 وحدة / ملغم على التوالي وذلك باستعمال مادة نخالة الحنطة كمادة تفاعل.

2-8-2 تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل

تعد دراسة التخصص الإنزيمي واحدًا من الأهداف المهمة التي تقوم عليها الأبحاث العلمية الخاصة بالأنزيمات وذلك لما له من أهمية في مجال تطبيقه في المجال الصناعي (Muthulakshmi *etal*., 2011) .

أن درجة التخصص التي تبديها الأنزيمات مع مواد التفاعل (الأساس) تكون متفاوتة ، إذ ان هناك إنزيمات تكون فعالة مع مادة تفاعل واحدة أو عدد محدد من مواد تفاعل معينة بينما هنالك إنزيمات تتفاعل مع مدى واسع من مواد التفاعل، ويبدي إنزيم البروتييز القاعدي مدى واسع من التخصص تجاه مواد التفاعل المختلفة سواء كانت طبيعية أو صناعية (فليح ، 1987 ؛ Nirmal *et al*.,2011) أبدى إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* F18 فعالية ضعيفة حيال بروتين الفايبرينوجين والكلوبيولين وكانت أعلى فعالية له حيال بروتين الايلاستين يليه الكازائين والبومين المصل البقري (Shimizu *et al*.,1992) .

وأوضح Zhao وجماعته (2005) ان لأنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Clonostachys rosea* القابلية على تحليل الكازائين والجيلاتين والـ Azocoll والببتيد Suc-Ala- Ala- Pro- Phe- pNA إضافة الى كيوكتل النيماتودا .

وفي دراسة لتوصيف إنزيم البروتييز السيريني والمنقى من الفطر *Monacrosporium cystosporium* بين Yang وجماعته (2008) ان الإنزيم أبدى تخصصية عالية وأحيانًا ضعيفة تجاه بعض البروتينات الطبيعية والببتيدات المتعددة اذ بلغت الفعالية النسبية حيال الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري والكولاجين والكولاجين الممسوخ وكيوتكل النيماتودا (1.0و 17.7 و 81.8 و 3.8 و 23.5و 8.1)% على التوالي ، أما عن بيان تخصصيته تجاه بعض الببيدات المتعددة فقد بلغت الفعالية النسبية تجاه الببيتيد Suc-Ala- Ala- Pro- Phe- pNA والببيتيد Suc- Ala - Ala - Pro -Leu - pNA والببتيد Suc- Gly- Gly- Phe- pNA (100 و63 و 0.8)% على التوالي.

3-8-2 تأثير درجة الحرارة في ثبات الأنزيم

تمتلك درجة الحرارة دورًا مهماً في تنشيط أو تثبيط الإنزيمات وتزداد الفعالية الأنزيمية كلما

ازدادت درجة حرارة التفاعل وقد تصل في بعض الأحيان الى الدرجة الحرارية التي تسبب تغير الحالة الطبيعية للأنزيم (denaturation) (Abu Sayem *et al.*,2006; Bisswanger,2008) .

يمتلك كل إنزيم درجة حرارة مثلى لأقصى فعالية له ، وان الثبات الحراري للأنزيم يعتمد على عوامل عدة منها طبيعة بروتين الأنزيم والفترة الزمنية للحضن وتركيز المادة الأساس وألفة الأنزيم للتداخل مع المادة الأساس والرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم ووجود المنشطات والمثبطات (Whitaker, 1972; Fullbrook, 1983; Abu Sayem *et al*.,2006) .

أشار Yang وجماعته (2008) ان إنزيم البروتييز المفرز والمنقى من الفطر *Monacrosporium cystosporium* احتفظ بأعلى فعالية له عند درجة 56مْ ولأكثر من 30 دقيقة ثم بدأ بالانخفاض التدريجي الى ان فقد كامل فعاليته عند درجات الحرارة الأعلى من 70مْ وخلال 30 دقيقة فقط. كما بين Merheb-Dini وجماعته (2009) ان إنزيم البروتييز المنتج من الفطر*Thermoascus auranticus* كان ثابتًا حراريًا لغاية 65 مْ ولمدة ساعة إذ احتفظ بأكثر من 75% من فعاليته.

وجد Muthulakshmi وجماعته (2011) ان درجة الحرارة المثلى لثبات إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *A. flavus* كانت 50 مْ .

احتفظ إنزيم البروتييز السيريني المنقى من البكتريا *B. subtilis* PE-11 بكامل فعاليته ولأكثر من 350 دقيقة عند درجة حرارة 60 مْ ثم بدأ بالانخفاض التدريجي حتى فقد كامل فعاليته عند درجة حرارة 80 مْ وخلال 100 دقيقة من الحضن (Adinarayana *et al*.,2003) .

4-8-2 تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الأنزيم

يوجد لكل إنزيم رقم هيدروجيني يدعى الرقم الهيدروجيني الأمثل والذي تكون عنده فعالية الإنزيم بدرجتها القصوى والذي يعتمد على القوة الأيونية ونوع المحلول ودرجة الحرارة وتركيز كل من مادة التفاعل والمرافق الإنزيمي Coenzyme (دلالي ، 1986 ؛ Aehle, 2004) ان أي تغير في الرقم الهيدروجيني سوف يؤثر تأثيرًا كبيرًا على الصفات الآيونية للمجاميع الأمينية والكاريوكسيلية الموجودة في جزيئة بروتين الأنزيم وبالتالي سوف تؤثر على الموقع أو المواقع الفعالة للأنزيم وكذلك على هيئة وشكل البروتين هذا بالإضافة الى ان القيم العالية أو الواطئة

نوعًا ما للرقم الهيدروجيني سوف تؤدي الى مسخ بروتين الأنزيم ومن ثم الإقلال من فعاليته (دلالي، 1986).

أشار Yang وجماعته (2005) الى ان الفعالية المثلى لأنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Lecanicillium psalliotae* كانت عند الرقم الهيدروجيني 10 ، في حين بلغت عند الرقم الهيدروجيني 8.5 أعلى فعالية لأنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* (Bidochka and Khachatourians,1987) .

ان الفعالية المثلى لإنزيم البروتييز المنتج والمنقى من الفطـريـــات *Trichoderma harzianum* (DeMacro and felix,2002) و *Fusarium oxysporum* var. *lini* (Barata *etal*.,2002) و *Dactylellina varietas* (Yang *etal*.,2007a) و *Trichoderma ressei* QM9414 (Dienes *etal*.,2007) و *B. bassiana* (Namasivayam *etal*.,2010) على التوالي كانت عند الرقم الهيدروجيني 8 .

وكان الرقم الهيدروجيني 10 هو الأمثل ليبلغ عنده إنزيم البروتييز القاعدي المنتج والمنقى من بكتريا *B. subtilis* أقصى فعالية له (Ahmed *et al*.,2011) .

2-8-5 تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم

يعد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم من الصفات المهمة لأي إنزيم إذ يعتمد هذا الرقم لأنزيم معين على عوامل عدة منها درجة الحرارة والقوة الأيونية والطبيعة الكيميائية للمحلول المنظم وتركيز كل من مادة التفاعل والإنزيم والطبيعة الكيميائية للمحلول المنظم وتركيز كل من مادة التفاعل والإنزيم بالإضافة الى تراكيز المنشطات والمثبطات و المواد الحافظة مثل (الكلسيرين ومركبات السلفهايدريل) (الداودي 1991;Segel, 1976) .

بين Hattori وجماعته (2005) ان إنزيم البروتييز (Trypsin like- protease) المنقى من الفطر *Cordyceps militaris* كان ثابتًا عند رقم هيدروجيني ينحصر بين (8.5-12) أما إنزيم البروتييز الحامضي المنقى من الفطر *A. carbonarius* فكان ثابتًا بالظروف الحامضية عند رقم هيدروجيني 3 واحتفظ بـ (93 و 85 و 92 و 84) % من فعاليته النسبية عند الرقم الهيدروجيني (2 و 10 و11و 12) على التوالي .

اما Wang وجماعته (2009) فقد اكد ان الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Hirsutella rhossiliensis* يقع ضمن المدى (5–6) عند حضنه لمدة 120 دقيقة ولكنه يحتفظ فقط بـ 20 % من فعاليته عند الرقمين الهيدروجينين 4 و7 عند حضنه لنفس المدة. ذكر Almas وجماعته (2009) ان إنزيم البروتييز المنقى من بكتريا *Bacillus* strain SAL1 كان ثابتًا عند رقم هيدروجيني ينحصر بين 7- 10 ولمدة ساعة .

6-8-2 تأثير بعض الأيونات والمواد الكيميائية في فعالية الأنزيم

لكي تؤدي الإنزيمات نشاطها الحفزي تحتاج الكثير منها الى وجود أيونات معدنية والتي تعمل معظمها كمرافقات إنزيمية cofactors أو مجاميع تعويضية متصلة prosthetic groups (Singh *et al*., 2007a) .

وتعمل بعض الأيونات كمواد مثبطة لعمل الإنزيم ، وتعد دراسة مثبطات الإنزيم ذات أهمية كبيرة كونها تعطي الفهم الدقيق عن طبيعة الإنزيم ومتطلباته للعوامل المساعدة وطبيعة الموقع الفعال (Usharani and Muthuraj , 2010 ; Barreh ,1977) .

وجد كل من Sharma و De (2011) ان إنزيم البروتييز القاعدي المنقى من الفطر *A. tamarii* [EF661565.1] يثبط بشدة بوجود مادة PMSF وكل من أيونات الزئبق Hg^{+2} والكوبلت Co^{+2} و الكالسيوم Ca^{+2} في حين كان لأيوني الخارصين Zn^{+2} والمغنسيوم Mg^{+2} تأثيرًا حاثًا للأنزيم عند التركيز 5 ملي مولر إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 120% و 130% على التوالي.

وفي دراسة لتأثير بعض الأيونات المعدنية والمثبطات عند التركيز 5 ملي مولر وجد ان إنزيم البروتييز القاعدي المفرز والمنقى من الفطر *A. niger* يثبط بوجود كل من أيونات النحاس Cu^{+2} والزئبق Hg^{+2} والزنك Zn^{+2} والكوبلت Co^{+2} ومادة PMSF واليوريا و المركابتوايثانول والصوديوم آزايد ، في حين كان لأيون الكالسيوم تأثيرًا حاثًا للأنزيم اذ بلغت الفعالية الإنزيمية 105.3% (Devi *et al*.,2008) .

وفي دراسة أخرى لخصائص إنزيم البروتييز الحامضي والمنقى من الفطر *A. carbonarius* وجد Ire وجماعته (2011) ان لأيونات البوتاسيوم K^{+1} والباريوم Ba^{+2} تأثيرًا حاثًا طفيفًا في الفعالية الأنزيمية بينما كان لأيوني الكالسيوم Ca^{+2} والزنك Zn^{+2} تأثيرًا حاثًا متوسطًا بنسبة 14.28% وكان لأيوني الحديدوز Fe^{+2} والنحاس Cu^{+2} تأثيرًا حاثًا قويًا إذ بلغت الفعالية النسبية

357% و 250% على التوالي وكان لأيون المنغنيز التأثير الحاث الأقوى إذ بلغت الفعالية النسبية 971.43 % .ولم يكن لأيوني المغنسيوم Mg^{+2} والسترانتيوم Sr^{+2} أي تأثير يذكر على الفعالية الإنزيمية عند التركيز 5 ملي مولر. بينما كان لأيونات الصوديوم Na^{+1} والكوبلت Co^{+2} والزئبق Hg^{+2} تأثيرًا تثبيطيًا في الفعالية الإنزيمية وبنسبة (15و 5.44و39.71)% على التوالي.

أشار Sumantha وجماعته (2006 b) الى ان إنزيم البروتييز المنقى جزئيًا من الفطر *R. microsporum* NRRL3671 يتحفز تحفيزًا قويًا بوجود كبريتات المنغنيز مما يدل انه بروتييز معدني يتطلب وجود أيون المنغنيز Mn^{+2} لنشاطه الحفزي ، كذلك وجد ان هذا الإنزيم يثبط ويفقد كامل فعاليته بوجود 0.1 مول/ لتر من الـ DTT وكبريتات الحديد.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1-3 المواد والأجهزة والأدوات المستعملة

1-1-3 المواد الكيميائية المستعملة والشركات المصنعة لها

اسم المادة	الشركة المصنعة
الكلوكوز ($C_6H_{12}O_6$)	AFCO / India
المركابتوايثانول وكاربونات الصوديوم (Na_2CO_3) والكلوروفورم	BDH
كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) و كلوريد الامونيوم (NH_4Cl) وحامض البوريك (H_3BO_3) وكبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) و كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) و كلوريد المنغنيز($MnCl_2$) والـEDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) واليوريا (Urea) وترترات الصوديوم البوتاسيوم	CARLO ERBA
مادة بارانيتروفينول (pNP)	Fluka-UK
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) والترس القاعدي (Tris-base) والـPMSF ($C_7H_7ClO_2S$)	Fluka-Switzerland
حامض الهيدروكلوريك (HCl)	GFS-chemicals-Germany
حامض الخليك الثلجي (CH_3COOH) و حامض الفسفوريك (H_3PO_4) و الايثانول المطلق (C_2H_5OH)	HAZARD-UK
أكار ديكستروز البطاطا(PDA) وألبومين المصل البقري(BSA) والببتون (Pepton) ومستخلص الخميرة (Yeast extract) والجيلاتين (Gelatin) وكلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) والـ Iodoacetamide (C_2H_4INO) ومادة p -Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide ($C_{14}H_{18}N_2O_8$) و زيت الزيتون Olive Oil و Mannitol Salt agar و Nutrient broth وتوين 80	HIMEDIA / India
المبادل DEAE-Cellulose	Pharmacia / Sweden
الهلام Sephadex G-150	Pharmacia / Sweden
Trichloroacetic acid ثلاثي كلورو حامض الخليك ($C_2HCl_3O_2$)	Sd fine-Chem limited / Mumbai
صبغة الكوماسي الزرقاء(Coomasie Brilliant Blue G-250)	SIGMA-ALDRICH
هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و كلوريد الصوديوم (NaCl)	THOMAS BAKER
الكازائين (Casein)	WINLAB-LIMITED-UK

2-1-3 الأجهزة المستعملة و الشركات المصنعة لها

اسم الجهاز	الشركة المصنعة
جهاز المطياف الضوئي ذو الأشعة المرئية – فوق البنفسجية (UV-Visible Spectrophotometer)	Chromtech- Taiwan
حاضنة (Incubator)	Fisher Scientific-Germany
جهاز تقطير (Distiller)	GFL-Germany
حمام مائي مبرد بالماء الدائر (Cooling Circulating Water Bath)	HAAKE -Germany
جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	Hettich-Germany
جهاز طرد مركزي مبرد (Cooling Centrifuge)	Hettich-Germany
ماصات دقيقة (Micropipettes)	Human-Germany
مضخة تفريغ (Vacuum pump)	Japan
هود بايولوجي (Laminar flow cabinet)	Jeio-Tech-Korea
حمام مائي هزاز (Reciprocal Shaker Water Bath)	Julabo SW23-Germany
حاضنة هزازة (Shaker Incubator)	Labtech-Korea
جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Hot-Plate Magnetic Stirrer)	Labtech-Korea
ثلاجة (Refrigerator)	LG-Korea
شريحة العد المجهري (Haemocytometer)	Marienfeld-Germany
جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	Mauritius-Germany
مجهر ضوئي (Microscope)	Motic-Germany
ميزان حساس (Sensitive Balance)	Sartorius-Germany
حمام مائي (Water Bath)	Tafesa-Germany
جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)	Tudor-Korea
مؤصدة (Autoclave)	YX-280B-China

3-2 طرائق العمل

3-2-1 التأثير الحيوي للفطر *M. anisopliae* في أدوار حياة حشرة دودة الشمع الكبرى *G. mellonella*

3-2-1-1 إعداد مستعمرة دودة الشمع الكبرى(L.) *G. mellonella*

جمعت مختلف الأطوار اليرقية لدودة الشمع الكبرى فضلا عن بالغاتها من مزارع التربية المهيأة لها في مختبر الحشرات في كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة . جمعت اليرقات بوساطة ملقط ووضعت في قناني التربية وهي قناني بلاستيكية بحجم 800 سم^{3}مغطاة بقماش التول ومزودة بقطع من شمع نحل داكن عقم بوساطة التبريد بعد وضعه في المجمدة لمدة (3) ايام على درجة حرارة (- 7 م°) لغرض تغذية اليرقات (تقي ، 2007 ؛ كريم ، 2011). ثم نقلت الى المختبر و تم مراقبتها لحين التعذر. ولغرض الحصول على مزرعة دائمية نقية نقلت العذارى الحديثة .ووضعت في اطباق بتري مفتوحة ووضعت داخل قفص خشبي أبعاده 30 × 30 × 30 سم قاعدة القفص من الخشب وواجهته الأمامية من قماش التول فيما بقية الواجهات صنعت من السلك المشبك. تم مراقبة العذارى لحين خروج البالغات ثم وضع في سقف القفص قطع من القطن المشبع بمحلول سكري 10 % لتغذية البالغات وتحفيزها لوضع البيض. ووضع داخل القفص قطع من الورق المقوى لغرض وضع البيض عليها ، جمع البيض كل 24 ساعة لغرض اجراء التجارب اللاحقة عليه ، ولغرض تهيئة الأعداد الكافية من كل طور يرقي فقد عزلت اعداد كافية من البيوض للحصول على الطور اليرقي الأول اما الطورين الرابع والسابع فقد هيأ كل منها للتجربة وذلك بعزل أعداد كافية من يرقات الطور الذي سبقه ووضعها في قناني التربية ومراقبتها لحين الانسلاخ ووصولها الطور المطلوب للتجربة ، وللحصول على الدور العذري فقد عزلت اعداد كافية من يرقات الطور السابع في قناني التربية وتم مراقبتها لحين التعذر واخذت الاعداد الكافية لاجراء التجارب في حين تركت الأخرى لأكمال دور العذراء وخروج البالغات الفتية والتي جمعت لغرض اجراء التجارب عليها ايضا.

3-2-1-2 العزلة الفطرية المستعملة في البحث

استعملت في هذا البحث عزلة من الفطر *Metarhizium anisopliae* تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية ونشطت العزلة على الوسط الزرعي اكار دكستروز البطاطا (Potato Dextrose Agar, PDA) ذي الرقم الهيدروجيني 5.6 على درجة حرارة 28 مْ ولمدة 7 – 10 ايام .

3-1-2-3 تحضير المعلق البوغي للفطر *M.anisopliae*

حضر المعلق البوغي بتنمية الفطر على وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB) في دورق زجاجي سعته 250 مل بمقدار 150 مل من الوسط المستعمل . حضنت المزرعة بدرجة حرارة 25مْ لمدة 7 أيام وكانت ترج يومياً لتوزيع النمو الفطري ثم رشحت بوساطة قطعة من الشاش ، اخذ 1 مل من الراشح ووضع على شريحة عد كريات الدم الحمر المحورة Improved Neubauer Haemocytometer لتقدير عدد الأبواغ لكل وحدة حجم حيث حُسب عدد الأبواغ في كل مربع من المربعات الأربعة الكبيرة الموجودة في أركان الشريحة ، بعد ذلك قُسم عددها الكلي على أربعة للحصول على معدل الأبواغ في المربع الواحد ، ثم ضُرب هذا الناتج في 1×10^4 (عامل التحويل للحجم) للحصول على عدد الأبواغ في 1مل من المعلق البوغي . حيث تم الحصول على تركيز 1×10^7 (بوغ/مل) (Goettel and Inglis,1997) ولغرض الحصول على تركيز اقل من ذلك طبقت المعادلة الآتية (Lacey,1997) :

$$\text{الحجم (مل) المأخوذ من المعلق الأساسي} = \frac{\text{التركيز المطلوب}}{\text{تركيز المعلق الأساسي}}$$

ثم يضرب الناتج في حجم المعلق المطلوب تحضيره ، فمثلاً للحصول على 100 مل من المعلق بتركيز 1×10^6 نطبق المعادلة .

$$\text{حجم (مل) المأخوذ من المعلق الأساسي} = \frac{^6 10\times1}{^7 10\times1} = 0.1 \times 100 = 10 \text{ مل.}$$

وعليه يؤخذ 10 مل من المعلق الأساسي ويضاف إليه 90 مل ماء مقطر معقم لإكماله إلى 100 مل للحصول على تركيز 1×10^6 بوغ/مل ، ثم أضيفت بضع قطرات من Tween 80 كمادة ناشرة وهكذا حُضرت التراكيز (1×10^4 و 1×10^5).

4-1-2-3 تحضير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae*

حضر وسط Sabouraud Dextrose Broth (SDB) ووزع في دوارق سعة 250 مل بمقدار 150 مل للدورق ولقح الوسط بأقراص قطرها 0.5 سم من مزرعة الفطر بعمر 7 أيام . حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 مْ لمدة أسبوعين بعدها تم الترشيح باستخدام ورقة ترشيح Whatman (No.1) بقمع بخنر وبمساعدة جهاز تفريغ الهواء و اعيد الترشيح باستخدام المرشح الدقيق 0.22 µ لتعقيم راشح المزرعة من البكتريا الملوثة والفايروسات وعدَّ الراشح بتركيز 100% وحضرت منه التخافيف 25% و 50% و 75% . (Singh and Prakash,2010)

5-1-2-3 الاختبار الحيوي Bioassay

A - الاختبارات الحيوية للمعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

1- الاختبار الحيوي في البيوض

أخذ البيض بعمر 24 ساعة بعد أن وضعته إناث دودة الشمع الكبرى بعدد 100 بيضة لكل مكرر بعد ان تم حساب عدد البيض تحت المجهر ووضعت القطع الكارتونية الحاوية على البيض في أطباق بتري قطر 9 سم ، رشت البيوض بـ 5 مل من كل تركيز من تراكيز المعلق البوغي بوساطة مرشة يدوية نظيفة من ارتفاع 15 سم تقريباً. كررت التجربة ثلاث مرات لكل تركيز .أما معاملة السيطرة التي تحتوي على بيوض فقد رشت بالماء المقطر المعقم . تم مراقبة البيض لحين الفقس ، وحسبت نسبة الهلاك .

2- الاختبار الحيوي في الأطوار اليرقية الثلاثة

لدراسة التأثير الحيوي لمعلق الفطر في الأطوار اليرقية الثلاثة (الاول والرابع والسابع)، أخذت 40 يرقة من كل طور من الأطوار الثلاثة ولكل تركيز بصورة منفصلة (كلاً على حدة) ووزعت على خمسة من اطباق بتري ، أربعة منها تحتوي على 20 مل من كل تركيز من تراكيز المعلق أما الخامسة فتحتوي على ماء مقطر معقم فقط (معاملة السيطرة) ولمدة دقيقة عدا يرقات الطور الأول فقد تم رشها كما في معاملة البيض . ثم نقلت يرقات الطور الاول المعاملة فقط بوساطة فرشاة ناعمة إلى اطباق بتري بقطر 9 سم تحوي غذاء يرقات معقم (قطع من الشمع) اما يرقات الطور الرابع والسابع فقد تم نقلها الى قناني بلاستيكية معقمة ومزودة بقطع الشمع للتغذية ، حضنت الأطباق الحاوية على اليرقات المعاملة في الحاضنة بدرجة 25 $\pm$ 2 مْ وفترة ضوئية (L/D) 14:10 . ثم حُسبت نسبة الهلاك خلال 24و72و120 ساعة من المعاملة (Skrobek *et al*,2008) وصُححت القيم بحسب معادلة Orell and Shneider (شعبان والملاح، 1993)

$$\% \text{ الهلاك المصححة} = \frac{\text{نسبة الهلاك في المعاملة} - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}}{\mathbf{100} - \text{نسبة الهلاك في السيطرة}} \times 100$$

3- الاختبار الحيوي في دور العذراء

عزلت عذارى بعد انسلاخ عدد كاف من يرقات الطور السابع وبعدد مساوٍ لما أستعمل في تجربة الأطوار اليرقية كما طبقت طريقة الاختبار ذاتها في الفقرة **2** بأستثناء عدم إضافة الغذاء

ومراعاة تغطية قناني المعاملات بقماش التول تحسباً لظهور البالغات ، تم مراقبة العذارى لحين تحولها الى بالغات وحسبت نسبة الهلاك . وصححت القيم كما في الفقرة **2** .

4- الاختبار الحيوي في البالغات

أخذت أعداد كافية من العذارى من المزرعة الدائمية ووضعت في قناني سعة 800 سم^{3}مغطاة فوهتها بقماش التول ، حتى تحولها إلى بالغات . وزعت (10 بالغات) من الذكور والإناث في قناني بلاستيكية سعة 800 سم ^{3} مغطاة بقطعة من قماش التول ورش كل مكرر بمرشة يدوية من ارتفاع 15 سم تقريباً بعد عمل ثقب يسمح برش المعلق البوغي ومن ثم يتم اغلاقه ثانياً بعد انتهاء الرش فيما رشت معاملة السيطرة بالماء المقطر المعقم . نقلت البالغات المعاملة إلى قناني بلاستيكية سعة 800 سم^{3}مغطاة بقماش التول ووضع في اعلاها قطنة مشبعة بمحلول سكري 10% ، كررت هذه التجربة ثلاث مرات لكل تركيز ومثلها لمعاملة السيطرة . حضنت القناني في الظروف نفسها المارة الذكر في الفقرة **(2)** . حُسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 7 ايام . صُححت قيم الهلاك كما في الفقرة سابقة الذكر.

B – الاختبارات الحيوية لراشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في ادوار حياة عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

1- تأثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في البيوض

أستعملت التخافيف المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (**1** من الفقرة A) .

2 - تأثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في الأطوار اليرقية الثلاثة

أستعملت التخافيف المحضرة مسبقاً واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (**2** من الفقرة A) حُسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة 3 ايام ، وصُححت قيم الهلاك كما في الفقرة آنفة الذكر.

3 - تأثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في دور العذراء

أستعملت التخافيف المحضرة في الفقرة 3-2-1-4 واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (**3** من الفقرة A) .

4- تأثير راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات عثة الشمع

أستعملت التخافيف المحضرة واتبعت الطريقة نفسها المذكورة في الفقرة (**4** من الفقرة A) حُسبت نسبة الهلاك يومياً ولمدة ثلاثة أيام ، وصُححت قيم الهلاك بالطريقة نفسها أيضاً.

3-2-2 التحري عن عوامل الضراوة للفطر*M. anisopliae*

تم التحري عن أهم عوامل الضراوة المنتجة من الفطر *M. anisopliae* والتي يستخدمها الفطر عادة في اصابة الحشرة ، وشملت إنزيمات البروتييز واللايبيز والكايتينيز فضلا عن بعض مضادات الاحياء المجهرية . وقد استلزم ذلك تحضير اوساط انتاجية مختلفة معقمة ، وجرت آلية انتاج هذه العوامل بأن تم تلقيح وسط الانتاج باللقاح المتحصل عليه في الخطوة التالية (البذرة) بنسبة مقدارها 6 % من حجم الوسط وتم الحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة / دقيقة و بدرجة حرارة 28 مْ لمدة 72 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضن يتم ترشيح الوسط لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الذي تم أستخدامه في تقدير عوامل الضراوة المراد دراستها فضلا عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية لعوامل الضراوة الانزيمية اذ ان الفعالية النوعية اعتمدت مقياسا لتحديد افضل انتاج من هذه الأنزيمات .

3-2-3 تحضير اللقاح (البذرة) Seed Culture

لتحضير وسط اللقاح « البذرة » أستعمل كل من الكلوكوز والببتون وخميرة الخبز حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Dhar & Kaur (2010 مع بعض التحوير وذلك بإذابة 2 غم كلوكوز و1 غم ببتون و 1 غم مستخلص الخميرة في كمية من الماء المقطر، وبعد إتمام الأذابة أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، وتم تعقيمه بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15دقيقة . لقح الوسط المحضر أعلاه بقرص واحد من عزلة الفطر *M. anisopliae* [يحتوي القرص الواحد على 1 × 10^7 سبور/ مل من الوسط ، إذ تم حساب عدد السبورات باستخدام شريحة العد المجهري (Haemocytometer)] وحضن الوسط في الحاضنة المبردة الهزازة بسرعة رج 150 دورة/ دقيقة وعلى درجة حرارة 28 مْ لمدة 72 ساعة .

3-2-4 الأوساط الإنتاجية المستعملة

تم تحضير ثلاثة اوساط انتاجية للتحري عن عوامل ضراوة الفطر*M. anisopliae* وهي كما يلي :-

1- وسط الحد الأدنى المدعم بالكازائين Casein media

حضر هذا الوسط بأذابة 0.1 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و0.05 غم من كبريتات المغنيسيوم و 0.25 غم من كلوريد الصوديوم و 1 غم من الكازائين في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر عقمت في جهاز المؤصدة على درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة وبعد انتهاء عملية التعقيم اخرجت الدوارق وبردت الى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح (Dhar and Kaur, 2010).

2- وسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين الغروي Colloidal chitin

تم تحضير هذا الوسط بأذابة 0.1غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 0.05 غم من كبريتات المغنيسيوم و 0.25غم من كلوريد الصوديوم و 1 غم من الكايتين الغروي في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني ثم اكمل الحجم وعقم الوسط كما في الفقرة السابقة (Dhar and Kaur, 2010).

3- وسط انتاج المضادات الحيوية

حضر هذا الوسط باذابة 2.5 غم مالتوز و 0.75 غم باكتوببتون Bactopepton و 0.02 غم بيتا – الانين B-alanine و 0.43 غم كلوكوز في كمية من الماء المقطر وبعد تمام الاذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني ثم اكمل الحجم وعقم الوسط كما في الفقرة السابقة (Liu *etal*.,2000) .

5-2-3 التحري عن الأنزيمات والمضادات الحيوية المنتجة من الفطر *M. anisopliae*

تم التحري عن كل من الانزيمات البروتييز و الكايتنيز واللاييز في كل من الاوساط الانتاجية الثلاثة الاولى الواردة في الفقرة (3-2-4) (وكلاً على انفراد) وكذلك التحري عن المضادات الحيوية في كل من الاوساط الأنتاجية الثلاثة فضلاً عن وسط انتاج المضادات الحيوية .

1-5-2-3 التحري عن انزيم البروتييز

تم التحري عن فعالية انزيم البروتييز المنتج من الفطر *M. anisopliae* وتقديرها في راشح المزرعة تبعا للطريقة الموصوفة من قبل Sirisha *et al*. (2010) مع بعض التحوير .

المحاليل المستعملة:-

محلول رقم (1) - (0.5) مولر هيدروكسيد الصوديوم

حضر بأذابة 0.2 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر ، وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – محلول الكازائين الخزين

حضر بأذابة 2 غم من الكازائين في 90 مل من الماء المقطر ، مع التسخين الى 90 مْ واضافة 5 مل من محلول رقم 1 ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3)- محلول 1 مولر منظم الترس (8.5 **pH**)

حضر بأذابة 12.11 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر ، وبعد تعديل الـ **pH** الى (8.5) اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (4) - محلول مادة التفاعل

حضر بمزج حجم واحد من محلول رقم 2 واربع حجوم من الماء المقطر وحجم واحد من محلول رقم 3 .

محلول رقم (5) - محلول Trichloroacetic acid (TCA) 10 %

حضر بإذابة 10 غم من مادة TCA في (90) مل من الماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الأنزيمية على درجة حرارة 37 مْ كما يأتي :-

1- اضيف 0.2 مل من المستخلص الأنزيمي الى 2 مل من محلول رقم 4 في انابيب اختبار واجري التفاعل لمدة 20 دقيقة .

2- اوقف التفاعل بأضافة 3 مل من محلول رقم 5 بعدها طردت الأنابيب مركزيا بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة .

3- عمل محلول صفري (Blank) بأضافة 3 مل من محلول رقم 5 الى 2 مل من محلول رقم 4 ثم اضيف 0.2 مل من المستخلص الأنزيمي الى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي ذو الأشعة فوق البنفسجية - المرئية .

وَتُعرَّف وحدة الفعالية الأنزيمية لأنزيم البروتييز بانها (كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الأمتصاص مقدارها 0.001 على طول موجي 280 نانوميتر وتحت ظروف التقدير) .

2-5-2-3 تقدير البروتين :-

تم تقدير البروتين حسب طريقة (Bradford , 1976) باستخدام البومين المصل البقري كبروتين قياسي .

عمل المنحنى القياسي:-

المحاليل المستعملة :

1- محلول صبغة كوماسي الزرقاء (Coomasie Brilliant Blue G250)

اذيب 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء في 50 مل من الكحول الأثيلي 95% ، ثم اضيف الى هذا المحلول 100 مل من حامض الفسفوريك 85 % مع التبريد ، بعدها اكمل الحجم الى لتر باضافة الماء المقطر ثم حفظت بقناني معتمة في الثلاجة لحين الاستعمال .

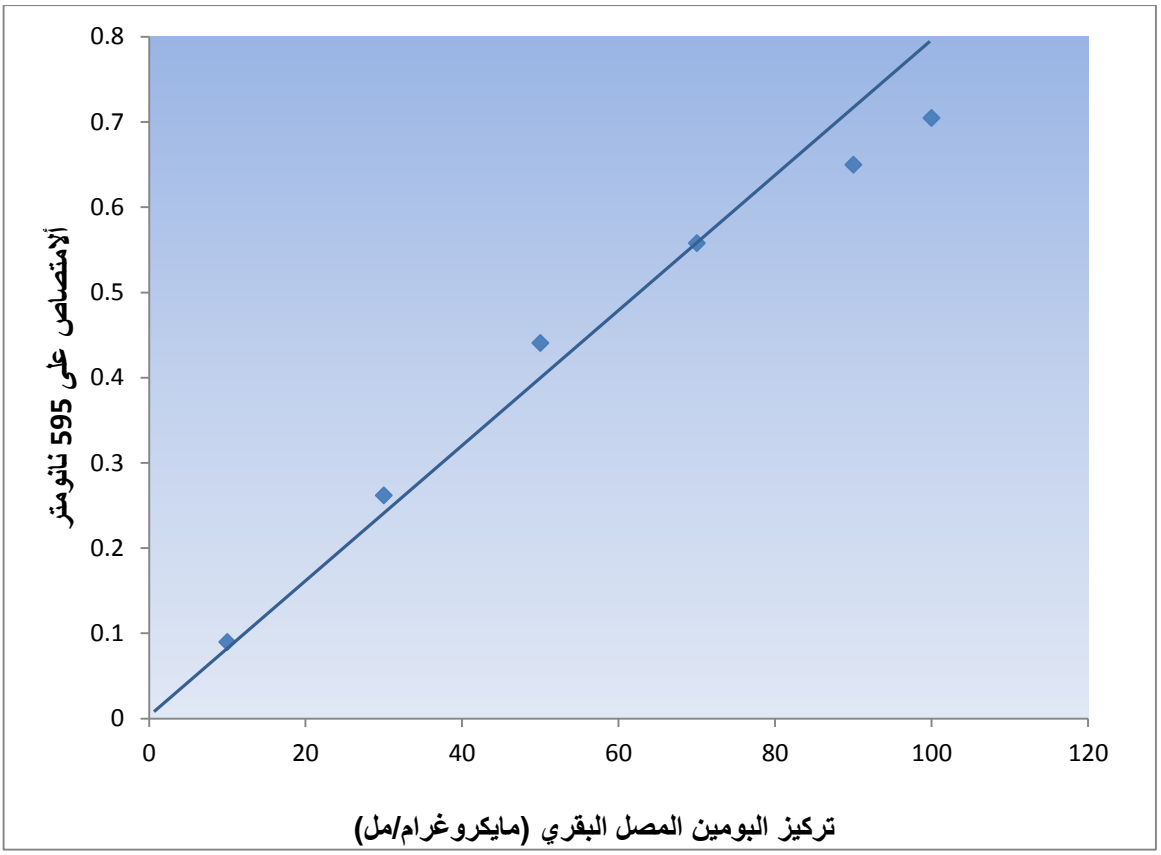
2- محلول البومين المصل البقري القياسي (100 مايكروغرام / مل)

حضرت تراكيز متدرجة من البومين المصل البقري حسب الجدول الآتي :-

المحلول الخزين (مايكروليتر)	الماء المقطر (مايكروليتر)	الحجم الكلي (مايكروليتر)	تركيز البروتين (مايكروغرام)
100	900	1000	10
300	700	1000	30
500	500	1000	50
700	300	1000	70
900	100	1000	90
1000	0.0	1000	100

اضيف 2.5 مل من محلول رقم 1 الى 500 مايكروليتر من كل تركيز ، ثم مزج المحلول جيداً وترك لمدة خمس دقائق ، بعدها تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 595 نانوميتر ، بعد ان تم تصفير جهاز المطياف بمحلول صفري (Blank) الذي يتكون من 0.5 مل منظم الخلات pH 5.0 و2.5 مل من محلول رقم 1 .

استحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة بين الامتصاص عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقابل تركيز البومين المصل البقري (شكل 1) .



الشكل (1) : المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد(1976) .

3-5-2-3 تقدير فعالية انزيم الكايتنيز :-

قدرت الفعالية لانزيم الكايتنيز وكما يلي :-

تقدير الفعالية الانزيمية للكايتنيز الخارج خلوي باستخدام مادة (p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide , pNP-GlcNAc) كمادة تفاعل :-

تم تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي المنتج من الفطر *M. anisopliae* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Park *et al.* (2000) مع بعض التحوير بالاعتماد على كمية البارانيتروفينول (p-Nitrophenol, pNP) المتحررة من تحلل مادة

(p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide , pNP-GlcNAc) .

1- عمل المنحنى القياسي لمادة البارانايتروفينول pNP :-

المحاليل المستعملة :-

محلول رقم (1) - محلول (2.5×10^{-4}) مولاري بارانايتروفينول :- حضر باذابة 0.0348 غم من مادة pNP في كمية من الماء المقطر ، ثم اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر .

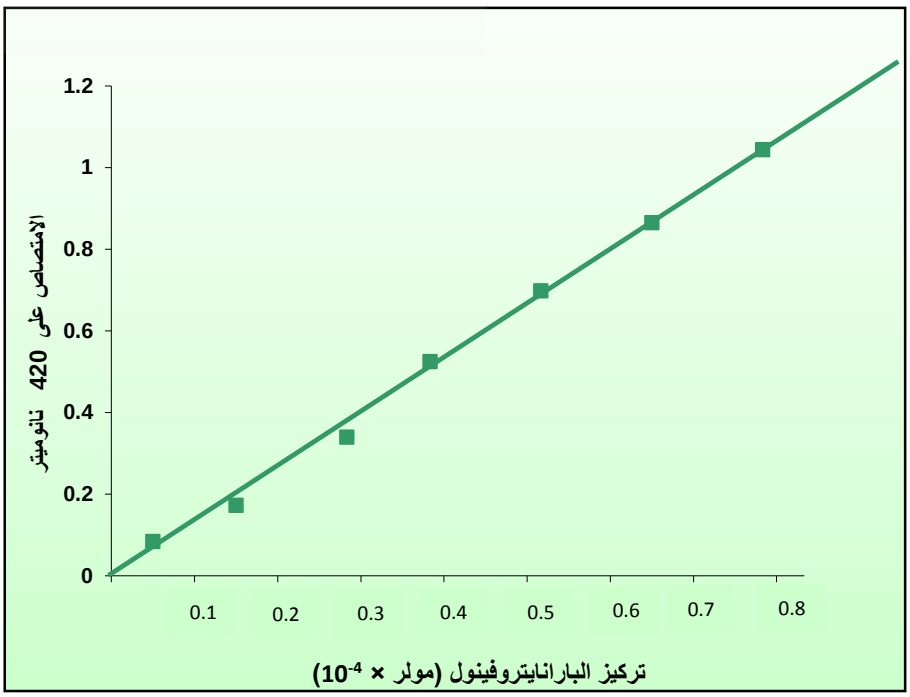
محلول رقم (2) - محلول 0.5 مولر كاربونات الصوديوم

حضر باذابة 5.299 غم من كاربونات الصوديوم (Na_2CO_3) في كمية من الماء المقطر ، ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

اضيفت الحجوم المبينة في الجدول التالي في انابيب اختبار وبواقع مكررين لكل حجم (duplicate) .

رقم الأنبوب	مل من محلول رقم (1)	مل من الماء المقطر	مل من محلول رقم (2)	التركيز النهائي للبارانيتروفينول(ملي مولر)
1	0.00	4.00	1	0.00 (Blank)
2	0.125	3.875	1	0.00625
3	0.25	3.75	1	0.0125
4	0.50	3.50	1	0.025
5	0.75	3.25	1	0.0375
6	1.00	3.00	1	0.050
7	1.25	2.75	1	0.0625
8	1.50	2.50	1	0.075

وتمت قراءة الامتصاص على 420 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي واستحصل المنحنى القياسي للبارانايتروفينول برسم العلاقة بين الامتصاص وتركيز الـ pNP(الشكل 2) .



الشكل (2) : المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP)

2- تقدير الفعالية :-

المحاليل المستعملة:-

محلول رقم (1) – محلول 0.1 مولر منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر ، وبعد تعديل الـ pH الى 5 اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2)- محلول مادة التفاعل pNP-GlcNAc بتركيز (4) ملي مولر.

حضر باذابة 0.13 غم من مادة pNP-GlcNAc في كمية من محلول رقم 1، وبعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بمحلول رقم 1 ذاته .

محلول رقم (3)- محلول1 مولر كاربونات الصوديوم .

حضر باذابة 10.58 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر ، ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الأنزيمية على درجة حرارة 37 م° كما يلي :-

1- اضيف 0.2 مل من المستخلص الأنزيمي الخام الى 0.2 مل من محلول رقم 2 مع 0.6 مل من محلول رقم 1 واجري التفاعل لمدة 30 دقيقة .

2- اوقف التفاعل باضافة 1 مل من محلول رقم 3

3- عمل محلول صفري (Blank) باضافة 1 مل من محلول رقم 3 الى 0.2 مل من محلول رقم 2 مع 0.6 مل من محلول رقم 1 ثم اضيف 0.2 مل من المستخلص الانزيمي الى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على (420) نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من مادة pNP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التقدير) .

4-5-2-3 تقدير فعالية انزيم اللايبيز

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Ali *et al* (2010) مع بعض التحوير في تقدير فعالية انزيم اللايبيز المنتج من الفطر *M. anisopliae* عن طريق تسحيح الحوامض الدهنية المتحررة بفعل انزيم اللايبيز مع قاعدة هيدروكسيد البوتاسيوم ذات عيارية 0.05 نورمالي .

1- المحاليل المستعملة:-

محلول رقم (1)- محلول مادة التفاعل :- زيت الزيتون Olive Oil .

محلول رقم (2)- محلول فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية KH_2PO_4 (0.1 مولاري ، pH 7.0) .

حضر هذا المحلول بأذابة 1.36 غم من فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية KH_2PO_4 في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7 اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

محلول رقم (3)- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (0.05 N):

حضر هذا المحلول بأذابة 0.28 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر و بعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضاً.

محلول رقم (4)- دليل الثايموفثالين :- حضر باذابة 0.05غرام من الدليل في 25 مل من 96% ايثانول وأكمل الحجم الى 50 مل بأستخدام الايثانول96%.

محلول رقم (5)- كحول اثيلي 96 % لأيقاف التفاعل .

2- طريقة العمل :-

1- اضيف 1 مل من زيت الزيتون و1 مل من المستخلص الانزيمي الخام الى 2 مل من محلول رقم 2 ووضعت في انابيب اختبار .

2- حضن المزيج لمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة 37 مْ في حمام مائي هزاز بسرعة 120 دورة / دقيقة .

3- تم ايقاف التفاعل باضافة 5 مل من محلول رقم 5 .

4- اضيف 0.1 مل من دليل الثايموفثالين الى مزيج التفاعل ثم اجريت عملية التسحيح بأستخدام محلول رقم 3.

5- حضرت عينة السيطرة (Blank) بالطريقة نفسها باستثناء اضافة الانزيم بعد اضافة محلول رقم 5 .

حسبت الفعالية الانزيمية على اساس ان ملليتر واحد من قاعدة هيدروكسيد الصوديوم ذات عيارية 0.05 مولاري تعادل 50 مايكرومول من الاحماض الدهنية المتحررة حسب تعريف شيري وكراندل (Varley *et al.*,1976) . وتعرف وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم التي تحرر مايكرومول من الاحماض الدهنية كل دقيقة تحت ظروف التقدير .

5-5-2-3 التحري عن المضادات الحيوية المنتجة من الفطر *M. anisopliae*

A - تم التحري عن وجود المضادات الحيوية المنتجة من الفطر*M. anisopliae* بالخطوات التالية :-

تم التحري عن المضادات الحيوية التي ينتجها الفطر *M. anisopliae* في الاوساط الانتاجية الثلاثة المشار اليها في الفقرة 3-2-4 .اذ لقحت الاوساط المذكورة بأبواغ الفطر وتمت التنمية في الحاضنة الهزازة تحت الظروف المشار اليها سابقا . ثم رشحت الأوساط اذ اهملت الخلايا في حين تم استخلاص المضادات الحيوية من الراشح.

B – الفعاليـــــة المضـــــادة للمســـــتخلص الفطـــــري ضـــــد بكتريـــــا *Staphylococcus aureus*

تم الحصول على عزلة من بكتريا *S. aureus* من كلية العلوم /قسم علوم الحياة/جامعة كربلاء . وقد استعملت العزلة المذكورة لاختبار الفعالية التثبيطية للمواد المنتجة من الفطر *M.anisopliae* وذلك حسب الخطوات التالية .

1- تنشيط بكتريا *S. aureus*

- الاوساط المستعملة:-

1- وسط Mannitol Salt agar:

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 111 غم من الوسط في 1 لتر ماء مقطر و عقم بالمؤصدة ، و تم صبه في اطباق بتري و قد أستعمل هذا الوسط لتنمية بكتريا *S. aureus*.

2- الوسط المغذي السائل (Nutrient broth):

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 13 غم من الوسط في 1 لتر من

الماء المقطر ، و تم تعقيم الوسط باستخدام جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م° و لمدة 15 دقيقة و قد تم استعمال هذا الوسط لتنشيط العزلة البكتيرية.

3- وسط Muller Hinton agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 38 غم في 1 لتر من الماء المقطر، و عقم باستخدام المؤصدة ، وتم صبه في أطباق بتري معقمة ، و قد تم استعمال هذا الوسط لغرض اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الفطري ضد بكتريا *S. aureus*.

4- المحلول الملحي الفسيولوجي :

حضر باذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر ، وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضاً.

2- تحضير اللقاح

أستعمل الوسط المغذي السائل لغرض تحضير اللقاح ، اذ وزع الوسط في انابيب اختبار بواقع 10 مل لكل انبوبة وعقم بالمؤصدة . وحضر اللقاح للعزلة البكتيرية بنقل قطعة من الاكار ذات قطر5 ملم من العزلة المنماة على الوسط المغذي الصلب بعد التاكد من نقاوتها الى الانابيب المخصصة لها وثم رجت الانابيب جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

3 - الفعالية التثبيطية للمستخلص الفطري ضد بكتريا *S. aureus*

تم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص الفطر *M. anisopliae* وفق طريقة الأنتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove ,1985) بحسب الآتي :-

1- تم عمل سلسلة من التخافيف العشرية للعزلة البكتيرية و لغاية الحصول على التخفيف المناسب .

2- سحب 0.1 مل من التخفيف المناسب للعزلة البكتيرية ، و اضيف الى اطباق حاوية على 20 مل من وسط Muller Hinton agar ، الصلب وتم نشره جيداً على سطح الطبق بوساطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .

3- تم عمل حفر على سطح الاكار باستخدام الثاقب الفليني ذو قطر 5 ملم بحيث كانت المسافة متساوية بين حفرة و اخرى.

4- وضع (30) مايكروليتر من راشح مزرعة الفطر ذو التركيز (0.1 ملغم/ مل) في ثلاث من الحفر في حين تركت الرابعة كمعاملة سيطرة ، و حضنت الاطباق لمدة ساعة في الثلاجة ، و من ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة .

5- تم قياس اقطار تثبيط نمو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكتمال مدة الحضن.

6-2-3 تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*

تم دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* إشتملت هذه العوامل على اختيار المصدر الكاربوني وتركيزه و نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه ودرجة الحرارة ومدة الحضن و سرعة الرج و نوع الأملاح المعدنية وتركيزها وحجم اللقاح والرقم الهيدروجيني .

3-2-6-1 المصدر الكاربوني وتركيزه

أ- **المصدر الكاربوني**

- **تحضير عصير التمر**

أستعمل عصير التمر الزهدي كمصدر كاربوني في وسط انتاج انزيم البروتييز من الفطر *M.anisopli*ae ، حضر العصير وفق الطريقة الموصوفة من قبل AL-Obaidi وجماعتها(1987) اذ اضيف 500 مل من الماء المغلي الى 250غم من تمر الزهدي المزال منه النوى والأقماع وترك لمدة 24 ساعة للحصول على العصير ثم رشح باستخدام قماش الململ اعقبها عملية نبذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق للحصول على الراشح بشكل رائق. ثم خفف العصير المتحصل عليه الى النسبة المطلوبة من السكريات المختزلة .

1- تقدير السكريات المختزلة

قدرت السكريات المختزلة في وسط عصير التمر بطريقة Miller(1959) واعتمادا على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل .

2- عمل المنحنى القياسي للكلوكوز

- **المحاليل** المستعملة

محلول رقم (1) – محلول الكلوكوز الخزين (1 mg / ml) حضر هذا المحلول بأذابة 0.1 غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – محلول 3,5 ثنائي نيترو حامض السالسيليك (3,5 Dinitrosalicylic acid , DNSA)

حضر هذا المحلول بأذابة 1 غم من المادة في 50 مل من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة اضيف 20 مل من هيدروكسيد الصوديوم (2 مولر) ثم اضيف 30 غم

من ترترات الصوديوم البوتاسيوم ($CuH_4KNaO_6.4H_2O$) وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

تم عمل المنحنى القياسي للكلوكوز بحسب الخطوات التالية :-

1- خفف محلول الكلوكوز القياسي بالماء المقطر للحصول على التراكيز (0.1 و 0.3 و 0.5 و 0.7 و 0.9 و 1.0) ملغم / مل بحسب الجدول الاتي :-

رقم الأنبوبة	حجم محلول الكلوكوز الخزين (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	كمية الكلوكوز (ملغم/مل)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	0.1
3	0.3	0.7	0.3
4	0.5	0.5	0.5
5	0.7	0.3	0.7
6	0.9	0.1	0.9
7	1.0	0.0	1.0

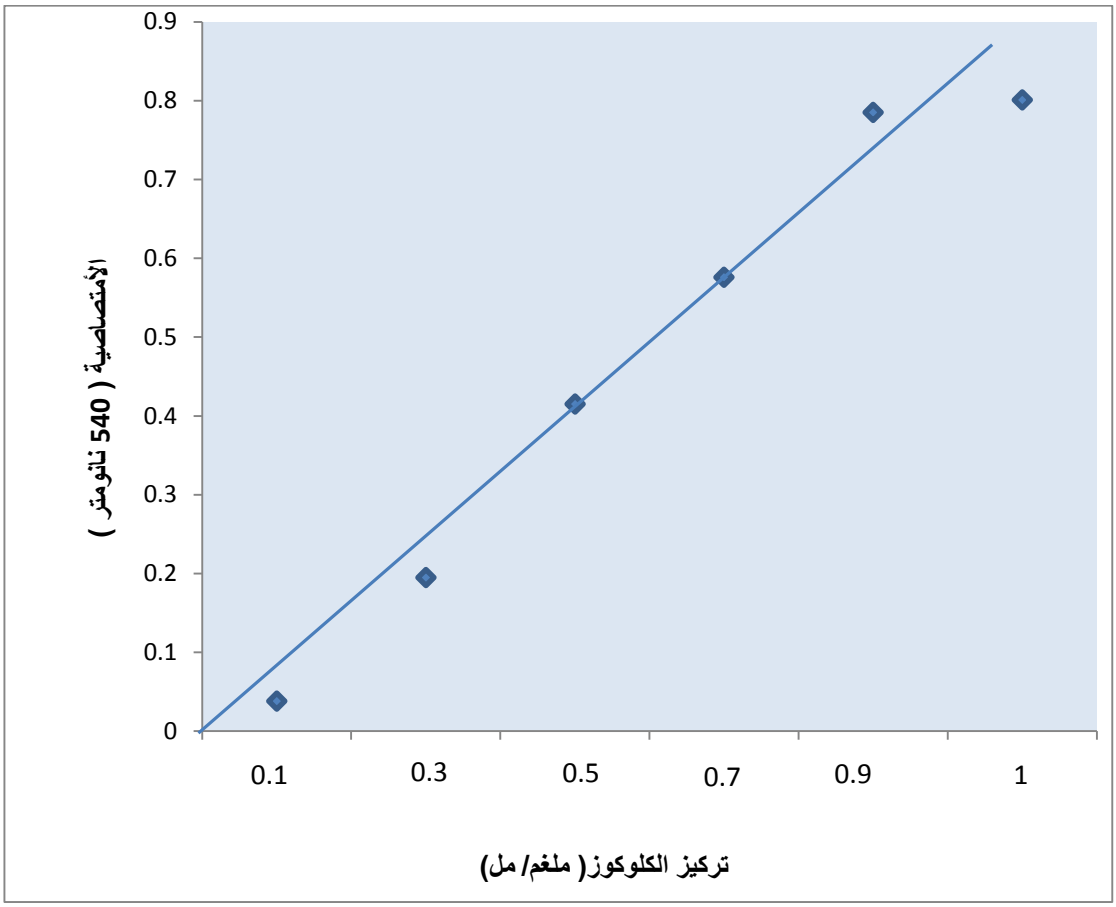
2- أضيف 1 مل من كاشف محلول رقم (2) لكل أنبوبة ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق.

3- بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي بعد انتهاء مدة الغليان مباشرة .

4- أضيف 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة وتم رجها جيداً .

5- تمت قراءة الأمتصاص في جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر واستعمل الأنبوب الأول في تصفير الجهاز(Blank) .

واستحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة البيانية بين الأمتصاص على الطول الموجي 540 نانوميتر وكمية الكلوكوز(ملغم) وكما موضح في الشكل (3) .



الشكل (3) : المنحنى القياسي للكلوكوز (السكريات المختزلة) بطريقة (3,5 Dinitro salicylic acid,DNSA)

ب – تركيز المصدر الكاربوني

لتحديد التركيز الأمثل من عصير التمر لأنتاج انزيم البروتييز خفف عصير التمر ليعطي تراكيز متدرجة من السكريات المختزلة (0.01 و 0.05 و 0.1 و 0.3 و 0.5 و 0.7) % فضلاً عن المعاملة الخالية من العصير. تم تدعيم العصير ببعض المغذيات التي اشتملت على فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية بنسبة 0.1% و كبريتات المغنيسيوم بنسبة 0.05% وكلوريد الصوديوم بنسبة 0.25% ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وبعدها اكمل الحجم الى 100 مل بالعصير نفسه لكل تركيز وعقم بالمؤصدة ، ثم لقح بحجم لقاح مقداره 6% من حجم الوسط وحضن في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 28 م˚ وبسرعة رج 150 دورة /دقيقة لمدة 72 ساعة وبعدها فصلت الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الحاوي على الانزيم وذلك للحصول على الانزيم بشكل رائق .

3-2-6-2 تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه

أ- نوع المصدر النيتروجيني

تم أختيار ستة مصادر نيتروجينية هي (كبريتات الأمونيوم و كلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم واليوريا والكازائين والجيلاتين) حيث أذيبت هذه المواد بنسبة 1%في وسط عصير التمر الحاوي على السكريات المختزلة 0.05% ودعم بالمغذيات المشار اليها سابقا وعقم الوسط ثم لقح بأبواغ الفطر وتم الحضن تحت الظروف السابقة وصفها وذلك لتحديد المصدر النيتروجيني الامثل لانتاج انزيم البروتييز .

ب- تركيز المصدر النيتروجيني

أستخدمت تراكيز متدرجة من الجيلاتين (0.25 و 0.5 و 1 و 2 و 3 و 4) % لغرض تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني المستعمل و تمت إذابتها في وسط الإنتاج الموصوف في الفقرة السابقة .

3-2-6-3 تأثير درجة الحرارة

درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الحاوي على عصير التمر والجيلاتين بنسبة 0.5% والملقح بالفطر *M.anisopliae* على درجات حرارة (25 و 30 و 35) مْ .

3-2-6-4 تأثير سرعة الرج

حضن وسط إنتاج أنزيم البروتييز الموصوف سابقاً و الملقح بالفطر *M. anisopliae* لمدة 72 ساعة في حاضنتين احداهما ساكنة أي سرعة الرج صفر والأخرى هزازة و بأستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 150) دورة / دقيقة .

3-2-6-5 تأثير حجم اللقاح

لقح وسط إنتاج إنزيم البروتييز بحجوم لقاح مقدارها (4 و 8 و 12 و 16 و20)% من لقاح الفطر *M.anisopliae* وذلك لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيم .

3-2-6-6 تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي

عُدِّل الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج الإنزيم إلى (4.5 و 5.0 و 5.5 و 6.0 و 6.5 و 7.0 و 7.5) باستعمال 0.2 مولر هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك (HCl) ولقح الوسط الإنتاجي بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 100 دورة / دقيقة .

3-2-6-7 تأثير مدة الحضن

لمعرفة تأثير مدة الحضن لقح وسط الإنتاج الموصوف بالفقرا ت السابقة بنسبة لقاح 16% وحضن لمدة 168 ساعة وتمت متابعة إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر قيد البحث يوميا وطوال مدة الحضن وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين و قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج .

3-2-6-8 تأثير نوع الأملاح المعدنية وتركيزها

أ- تأثير نوع الاملاح المعدنية

درس تأثير كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكلوريد الصوديوم (الموجودة أصلاً في وسط الإنتاج بالتراكيز 0.025 و0.05 و 0.125 على التوالي) ، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم المائية و بعدم وجودها و بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم وجودها وبوجود كلوريد الصوديوم وبعدم وجوده إضافةً إلى المعاملات الحاوية على كلا الملحين وغياب الثالث اضافة الى المعاملة الحاوية على كل الأملاح و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي في الحاضنة الهزازة لمدة 72 ساعة.

ب- تركيز الاملاح المعدنية

درست ست تراكيز من كلوريد الصوديوم هي(0.05 و 0.1 و 0.25 و 0.5 و 0.75 و1)% ولقح الوسط الإنتاجي بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 100 دورة / دقيقة وذلك لتحديد تركيز كلوريد الصوديوم الامثل لانتاج انزيم البروتييز.

3-2-7 تنقية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر *M.anisopliae*

بعد تثبيت الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* ، حضر وسط الإنتاج المكوّن من عصير التمر بتركيز 0.05 % و 0.1 % من كلوريد الصوديوم والجيلاتين بنسبة 0.5% و بعد إتمام الإذابة لهذه المكونات عدل الرقم الهيدروجيني إلى 5.5 و عقم بالمؤصدة ثم لقح بحجم لقاح مقداره 16% وحضن في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 100 دورة/ دقيقة لمدة 72 ساعة ، بعدها فصلت الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الحاوي على الإنزيم و ذلك للحصول على الإنزيم بشكل رائق . وجرت جميع مراحل التنقية تحت ظروف مبردة بحسب الخطوات الآتية :

1- الترسيب بالايثانول 60 %

أجريت عملية الترسيب للمستخلص الإنزيمي بوساطة الإيثانول المبرد بنسبة 60 % ثم طرد مركزياً بإستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ ، ثم أذيب الراسب في كمية من محلول منظم الترس (pH 8) وقدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز إضافة إلى تقدير البروتين .

2-التبادل الايوني بإستخدام المبادل DEAE-Cellulose (Batch wise)

- المحاليل المستعملة:

محلول رقم (1) - (0.25) مولر هيدروكسيد الصوديوم – (0.25) مولر كلوريد الصوديوم

حضر بإذابة 2.5 غم من هيدروكسيد الصوديوم و 3.625 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - (0.25) مولر محلول حامض الهيدروكلوريك

حضر بتخفيف 5.38 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - (0.1) مولر منظم الترس (pH8.0)

حضر بإذابة 12.1 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.0 أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

محلول رقم (4) - (0.005) مولر منظم الترس (pH8.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.0 أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

محلول رقم (5) - (0.3) مولر كلوريد الصوديوم

حضر بإذابة 8.7 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من محلول رقم 4 ثم أكمل الحجم

إلى 500 مل بالمحلول رقم 4 ذاته .

محلول رقم (6)- (0.6) مولر كلوريد الصوديوم

حضر بإذابة 17.55 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من محلول رقم 4 ثم أكمل الحجم إلى 500 مل بالمحلول رقم 4 ذاته .

حضر المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (1972) و ذلك بإتباع الخطوات الآتية :

1- خلط 20 غم من المبادل الأيوني مع 1 لترمن الماء المقطر و ترك ليركد ثم أزيل السائل العلوي و كررت هذه الخطوة مرات عدة الى أن أصبح السائل العلوي رائقاً ثم رشح تحت التفريغ بإستخدام قمع بخنر .

2- نشط المبادل بإضافة 250 مل من محلول رقم 1 لمدة 30 دقيقة و غسل في قمع بخنر بالماء المقطر، بعدها أضيف 250 مل من محلول رقم 2 ولمدة 30 دقيقة وغسل مرات عدة بالماء المقطر .

3- علق المبادل في محلول رقم 4 ولغاية وصول الرقم الهيدروجيني للمبادل الى 8.0 .

4 – أضيف 15 مل من النموذج المتحصل عليه من خطوة الترسيب بالإيثانول 60 % إلى (3) غم من المبادل الايوني ومزج جيدا ووضع في ظروف مبردة لمدة ساعة ثم غسل المبادل بترشيحه بمضخة تفريغ وبعدها تم التخلص من الراشح .

1- اجريت عملية استرداد اولي بمحلول رقم (5) وتم حفظ محلول الاسترداد ثم استرد بمحلول رقم (6) واحتفظ بالمحلول و بعد إنتهاء العملية تم تقدير الفعالية لإنزيم البروتييز فضلاً عن تقدير البروتين .

3- الترشيح الهلامي بإستخدام الهلام Sephadex G -150

- المحاليل المستعملة:

محلول رقم (1) - (0.2) مولر منظم الترس (pH8.0)

حضر بإذابة 24.2 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.0 أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

- تحضير الهلام Sephadex G-150

حضر هلام السيفادكس وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة (Pharmacia) وذلك بتعليق 20 غم من مسحوق السيفادكس (Sehpadex G-150) في 500 مللتر من الماء المقطر ثم وضع في حمام مائي بدرجة حرارة 90 مْ لمدة ساعة واحدة ثم ترك ليبرد وغسل عدة مرات بمحلول رقم (1) لحين استقرار الرقم الهيدروجيني على 8.0 ثم اعيد وضعه في الحمام المائي على 90 مْ لمدة ساعة اخرى وبعد ذلك ترك الهلام ليبرد وتم ازالة الهواء منه Degassing بوساطة مضخة تفريغ ثم عبء في عمود زجاجي ذي جدار مزدوج ليعطي هلاماً بأبعاد (1.4 × 87) سم ، ثم ربط العمود بالحمام المائي البارد ذي الماء الدائر لضمان اجراء عملية الفصل تحت ظروف مبردة ،وتمت موازنته بمحلول منظم الترس نفسه بسرعة جريان 20 مللتر /ساعة .

- إضافة النموذج :

أضيف 3 مل من النموذج المتحصل عليه من خطوة التبادل الأيوني إلى سطح عمود الترشيح الهلامي بهدوء واجريت عملية الفصل بمحلول منظم الترس بتركيز 0.2 مولر وبرقم هيدروجيني 8.0 وجمعت الأجزاء المنفصلة من العمود في أنابيب إختبار بواقع 4 مل لكل أنبوب و بسرعة جريان ثابتة 20 مللتر / ساعة . وتمت قراءة الامتصاص للأجزاء المنفصلة (القمم) وفي الأجزاء التابعة للقمم عند طول موجي 280 نانوميتر ، وقدرت الفعالية الانزيمية والبروتين في القمم والاجزاء التابعة للقمم .

3-2- 8 توصيف إنزيم البروتييز

3-2-8-1 تقدير الثوابت الحركية للإنزيم

قدرت قيم ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max}) بوساطة المنحنى المقلوب (Reciprocal plot) لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية استناداً لطريقة Lineweaver & Burk (1934) .

- المحاليل المستعملة:

محلول رقم (1) - (1) مولر منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 12.11غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول مادة التفاعل

حضرت مادة التفاعل (الكازائين) بتراكيز (0.05-3) % إذ حضرت التركيز (3) % على إنفراد بينما حضر المحلول 2% و عدّ محلولاً خزيناً وتم عمل التخافيف منه وكما هو موضح بالجدول الآتي :

التركيز النهائي %	الحجم النهائي (مللتر)	مللتر من 1 مولر محلول منظم الترس	مللتر من 2% كازائين
0.05	40	39	1
0.1	40	38	2
0.5	40	30	10
1	40	20	20
1.5	40	10	30
2	40	0.0	40

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتيز بإستعمال محاليل مادة التفاعل أعلاه ، وأستحصلت قيم K_m و V_{max} بإستخدام المنحنى المقلوب لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية .

2-8-2-3 تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل (Substrate Specificity):

أ- الفعالية النسبية للإنزيم بإستعمال مواد تفاعل مختلفة

- المحاليل المستعملة:

حضرت محاليل مواد التفاعل لبروتينات الكازائين (Casien) والبومين المصل البقري (BSA) والجيلاتين (Gelatin) بإذابة 2 غم من كل بروتين على إنفراد في كمية من محلول منظم الترس 1 مولر و رقم هيدروجيني 8.5 وبعد الإذابة التامة للبروتين أكمل الحجم إلى 100 مل بمحلول الترس نفسه .

- طريقة العمل :

أختبرت ثلاثة أنواع من مواد التفاعل لتحديد تخصص إنزيم البروتييز حيال مادة التفاعل شملت الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري، وتم تقدير الفعالية الإنزيمية للبروتييز وتم إعتبار الفعالية الإنزيمية بإستعمال الكازائين كمادة تفاعل 100% وحسبت الفعالية النسبية لبقية مواد التفاعل وفق المعادلة الآتية :-

$$\text{الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز بإستعمال أي مادة تفاعل \%} = \frac{\text{الفعالية الإنزيمية للبروتييز بإستعمال أي مادة تفاعل}}{\text{الفعالية الإنزيمية بإستعمال الكازائين كمادة تفاعل}} \times 100$$

ب-تقدير الثوابت الحركية للإنزيم بإختلاف مادة التفاعل

تم حساب قيمة ثابت ميكالس والسرعة القصوى للإنزيم ولكن بإستعمال مواد التفاعل الجيلاتين و البومين المصل البقري وبتراكيز(0.05 – 3) % وبإتباع طريقة تقدير الثوابت الحركية للإنزيم نفسها عند إستعمال الكازائين كمادة تفاعل والموصوفة سابقاً .

3-8-2-3 تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز

- المحاليل المستعملة:

محلول رقم (1) – 0.1 مولر منظم الفوسفات بمدى pH من (7.0 –7.5)

حضر بإذابة 0.34 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – 1 مولر منظم الترس بمدى pH من (8.0- 10.5)

حضر بإذابة 0.3029 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـpH الى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم الى 25 مل بالماء المقطر.

محلول رقم (3) - محلول مادة التفاعل 2% كازائين

حضر بمزج حجم واحد من محلول الكازائين الخزين (المحضر سابقاً) مع حجمين من الماء المقطر وحجم واحد من المحاليل المنظمة المحضرة سابقاً بمدى الأرقام الهيدروجينية (7.0–10.5) .

- طريقة التقدير :

قدرت الفعالية لإنزيم البروتييز في كل محلول من محاليل مادة التفاعل المحضرة في الخطوة السابقة بالأسلوب نفسه المتبع في تقدير الفعالية الإنزيمية و رسمت العلاقة بين الـ pH و الفعالية الإنزيمية لتحديد الـ pH الأمثل للفعالية .

4-8-2-3 تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم البروتييز

حضرت محاليل منظمة ذات قوة أيونية واحدة 0.2 مولر بمدى قيم pH من (6.5-10.5) وعلى النحو الآتي :

محلول رقم (1) - منظم الفوسفات (pH 6.5)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.109 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 6.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - منظم الفوسفات (pH 7.0)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.066 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 7 أكمل الحجم إلى25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - منظم الفوسفات (pH 7.5)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 7.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (4) - منظم الترس (pH 8.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.13 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (5) - منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.223 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (6) – منظم الترس (pH 9.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة

الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 9 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (7) - منظم الترس (pH 9.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 9.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (8) – منظم الترس (pH 10.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 10 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (9) – منظم الترس (pH 10.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 10.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

– طريقة التقدير :

حضن 2 مل من إنزيم البروتييز مع 2 مل من كل من المحاليل المنظمة [محلول رقم 1 ولغاية محلول رقم 9] في أنابيب اختبار في حمام مائي على درجة حرارة 37 مْ ولمدة 30 دقيقة ثم بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي وقدرت فعالية إنزيم البروتييز المتبقية في كل نموذج بالأسلوب نفسه الذي سبق وصفه في تقدير الفعالية الإنزيمية ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية و الـ pH لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم .

3–2–8–5 تقدير الثبات الحراري للإنزيم

حضن 2 مل من إنزيم البروتييز في حمام مائي على درجات حرارة (20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65) مْ لمدة 30 دقيقة . وبردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي مباشرة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية .

3–2–8–6 تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم

حضرت محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيميائية أدناه بتراكيز 10 ملي مولر كمحلول خزين كالآتي :

محلول رقم (1) – محلول كلوريد المنغنيز

حضر بإذابة 0.063 غم من كلوريد المنغنيز ($MnCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (2) – محلول كلوريد الزئبق

حضر بإذابة 0.135 غم من كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (3) – محلول كلوريد النيكل

حضر بإذابة 0.065 غم من كلوريد النيكل ($NiCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (4) – محلول كلوريد المغنيسيوم

حضر بإذابة 0.048 غم من كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (5) – محلول كلوريد الكالسيوم

حضر بإذابة 0.055 غم من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (6) – محلول كلوريد الحديدوز ($FeCl_2$)

حضر بإذابة 0.0635 غم من كلوريد الحديدوز ($FeCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (7) - محلول (Iodoacetamide , IAA)

حضر بإذابة 0.092 غم من مادة IAA في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (8) - محلول (Ethylene Diamine Tetra acetic acid , EDTA)

حضر بإذابة 0.186 غم من مادة EDTA في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (9) - محلول المركابتوايثانول

حضر بتخفيف 0.035 مل من المركابتوايثانول في كمية من الماء الخالي من الأيونات ثم أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (10) – محلول حامض البوريك

حضر بإذابة 0.031 غم من حامض البوريك في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (11) – محلول (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride ,PMSF)

حضر بإذابة 0.095 غم من مادة PMSF في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

– طريقة التقدير :

مزج محلول إنزيم البروتييز مع حجم مماثل لكل من المحاليل آنفة الذكر للحصول على تركيز 5 ملي مولر لكل محلول ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10 دقائق ، أعقبها تقدير الفعالية الإنزيمية فضلاً عن تقدير الفعالية الإنزيمية للسيطرة (المحلول الإنزيمي دون معاملة بأي من محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيمياوية) وذلك لتحديد نسبة الفعالية المتبقية .

3- 2- 9 التحليل الإحصائي

تم تحليل البيانات وفق تصميم التجربة العاملية Completely Randomized Design(CRD) وصححت النسبة المئوية للهلاك على وفق معادلة Orell and Shneider(شعبان والملاح،1993) واستعمل اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D) في تشخيص الفروق الإحصائية بين المعاملات (الراوي وخلف الله،2000) . تم قياس استعداد البالغات لمعلقات الفطر وراشح المزرعة الخام للفطر وذلك من خلال جمع نسب الهلاك للتراكيز المستعملة عند مدة التعرض الأخيرة ثم يؤخذ المعدل الذي يمثل استعداد اليرقات والبالغات لمعلقات وراشح المزرعة الخام للفطر(الخفاجي،2010) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

النتائج و المناقشة

1-4 الاختبار الحيوي للمعلق البوغي وراشح مزرعة الفطر *M. anisopliae* في أدوار حياة عثة الشمع الكبرى *Galleria mellonella*

1-1-4 الاختبار الحيوي في البيوض

يتبين من الجدول (1) نتائج تأثير تراكيز مختلفة من المعلق البوغي للفطر في نسب هلاك بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* ، اذ بلغت أعلاها 62.88 % عند التركيز 1× 10^7 بوغ\مل. بينما سُجلت أوطأها 31.78 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل . و يُشير إلى وجود علاقة طردية بين كل من التركيز ونسبة الهلاك . كما اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية بين التراكيز لصالح التركيز الرابع 1× 10^7 بوغ\مل . اما الجدول (2) فيوضح تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة في بيض عثة الشمع اذ سبب التركيز 100% أقصى نسبة هلاك والتي بلغت 60.91 % ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت 26.82 % ، و توضح النتائج وجود علاقة طردية بين كل من التراكيز المستعملة ونسب الهلاك .كما اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية بين التراكيز . قد يرجع السبب في قدرة الفطر على اختراق قشرة البيض الى التكامل في النشاطين الأنزيمي والميكانيكي لديه ، اذ انه قادر على افراز انزيمات البروتييز والكايتنيز واللايبيز والسموم فضلاً عن قوة الفعل الميكانيكي (Charnley, 2003) .

تشابه نتائج الدراسة الحالية نتيجة الباحث Genthner وجماعته (1998) الذي اثبت ان راشح الفطر *M. anisopliae* يحوي مواداً سامة مثل Methelen chloride والذي يسبب تسمماً لأجنة الحيوانات المائية كالقشريات والبرمائيات فقد احدث تشوهات في اجنة الروبيان *Palaemonetes pugio* واجنة الضفدع *Xenopus laevis* كما اكد الباحث ان تعريض اجنة الضفدع لأبواغ الفطر لم تؤثر معنويا في هلاكات اوتشوهات هذه الأجنة .

جدول (1) تأثير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

التركيز (بوغ / مل)	عدد البيوض المعاملة	النسبة المئوية المصححة للهلاك
1×10^{4}	100	31.78
1×10^{5}	100	43.82
1×10^{6}	100	49.84
1×10^{7}	100	62.88

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 =1.25

جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في بيوض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

التركيز	عدد البيوض المعاملة	النسبة المئوية للهلاك
%25	100	26.82
%50	100	39.86
%75	100	46.87
%100	100	60.91

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 = 1.27

وتتفق هذه النتائج مع ماوجده صالح وجماعته (1999) عند استعمال الفطر *B. bassiana* في مكافحة بيض الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* تحت ظروف البيت الزجاجي اذ بلغت نسبة التطفل 81.16 بعد 7 ايام من المعاملة ، كما بين الحيدري (2000) عند استعمال الفطر المذكور سابقاً في مكافحة حشرة حفار ساق الذرة ان له قدرة عالية في هلاك البيض اذ بلغت نسبتها 87.5 – 100 % . ايضاً تتشابه نتائج الدراسة مع ما وجده كل من Weibin و Mingguang (2004) عند معاملتهما بيوض حلم العنكبوت القرمزي *Tetranychus cinnabarinus* بأبواغ الفطريين *Paecilomyces fumosoroms* و *B. bassiana* حيث أدى إلى هلاكها بنسبة 64.6 % ، كما اشار علي (2007) ان تعريض بيوض *Cx.pipiens* L. لأبواغ الفطر *B. bassiana* أدى إلى هلاكها جميعهاً . واكد Santos وجماعته (2009) إلى أن نسبة فقس بيوض بعوضة *Aedes aegypti* المعرضة لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 2.8×10^{2} بوغ /مل أدى إلى اختزال نسبة الفقس الى 50% عند درجة رطوبة 98 % .

وقد حصل الأمارة (2009) في نتائجه على انخفاض في نسبة فقس بيوض الخابرا *Trogoderma granarium* الى 56.67 % و 48.33 % عند التركيزين 2×10^6 و 2×10^8 بوغ/مل على التوالي عند تعريضها للفطر *M. anisopliae* .

اما Shanthakumar وجماعته (2010) فقد استعملوا المعلق البوغي للفطر *Nomuraea rileyi* ضد عثة التبغ *Spodoptera litura* ووجدوا ان نسبة فقس البيض كانت 0 % عند التراكيز 2.4×10^5 و 2.4×10^6 و 2.4×10^7 بوغ /مل وقد اعطى التركيز 2.4×10^4 بوغ /مل نسبة فقس 10 % فقط مقارنة بـ 90% عند معاملة السيطرة .

وقد كانت نسبة البيض غير الفاقس 59% بعد معاملة بيض عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* بالعالق الفطري 133×10^5 بوغ /مل للفطر *N. rileyi* ، اما تراكيز العالق الفطري 250×10^5 و 250×10^3 و 250×10^1 بوغ /مل للفطر *B. bassiana* فقد حققت نسبة (45.4 و 24.9 و 45.2) % من البيض غير الفاقس للعثة آنفة الذكر . (كريم ،2011)

كما استعمل المحنة (2011) أبواغ الفطر *M. anisopliae* في احداث الهلاكات في بيوض البعوض *An.stephensi* و*Cx. Quinquefasciatus* اذ سبب التركيز 2×10^5 اقصى نسبة هلاكات في البيوض قد بلغت قيمتها (60.33 و 58.66) % على التوالي .

4-1-2 الاختبار الحيوي للأطوار اليرقية الثلاثة

يتبين من الجدول (3) تأثير تراكيز مختلفة لمعلقات الفطر قيد الدراسة في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* إذ كانت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 1×10^7 بوغ/مل والتي بلغت 51.87 % خلال 24 ساعة وترتفع هذه النسبة مع زيادة مدة التعريض لتصل الى 76.94 % بعد 72 ساعة و 100.00% بعد 120 ساعة ليرقات الطور الأول في حين كانت اقل نسبة هلاكات في التركيز 1×10^4 بوغ/مل اذ بلغت (17.77 ، 37.83 ، 62.90)% بعد مرور 24 و72 و120 ساعة على التوالي مما يشير الى وجود علاقة طردية بين مدد التعريض ونسب القتل سواءً في التراكيز العالية او الواطئة وكذلك تظهر العلاقة ذاتها في يرقات الطور الرابع والسابع ، تعزى الزيادة في نسب الهلاك بزيادة التركيز الى الزيادة في عدد الأبواغ ومن ثم ازدياد نسبة الأبواغ النامية عند مهاجمة العائل واضعاف النظام المناعي للحشرة وبالتالي الزيادة في النسب المئوية للهلاك ، وقد اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية في النسب المصححة للقتل بين الاطوار اليرقية الثلاث عند مستوى معنوية 0.05 وان العلاقة بين نسب القتل والطور اليرقي كانت علاقة عكسية ، قد يعود السبب الى كون جدار وانسجة الجسم في الطور اليرقي الأول رهيفة مما يسمح بسهولة اختراقها من قبل ابواغ الفطر اذ ان الطريقة الأساسية لدخوله بواسطة الأختراق المباشر لجدار الجسم عن طريق الأنبوب الجرثومي الذي يتكون بعد يومين من وقوع الأبواغ على الحشرة وتحصل الأصابة عند توفر الحرارة

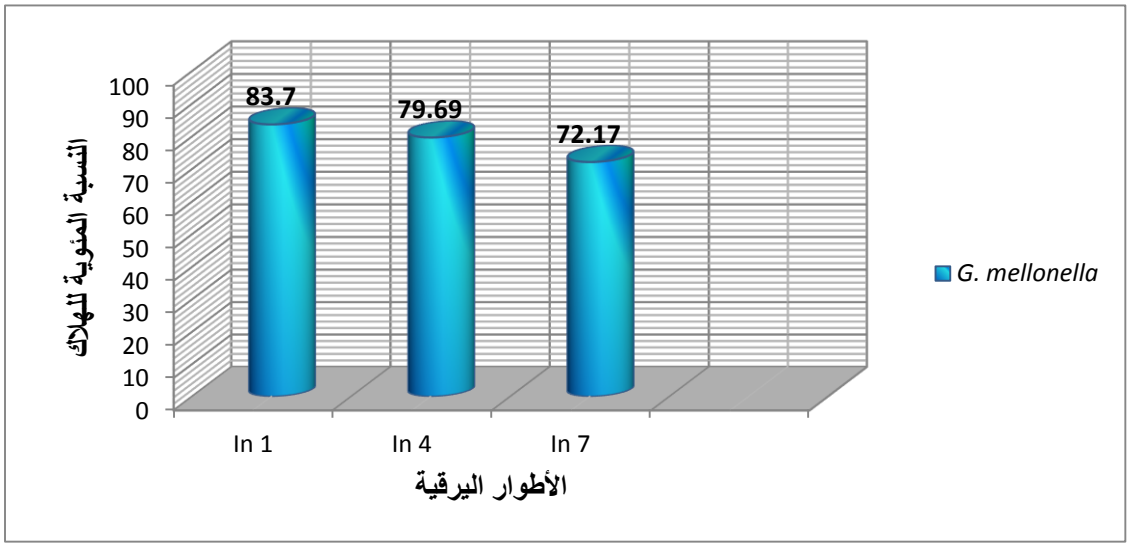
والرطوبة المناسبتين (Steinhause , 1949) غير انه قادر على الدخول وبشكل اقل عن طريق القصيبات الهوائية المفتوحة او عن طريق القناة الهضمية (Boucias & Pendland , 1998) وتتميز يرقات عثة الشمع الكبرى بأن بناء الكايتين فيها يصل الى اقصى درجة عند يرقات الطور الأخير وعند مرحلة ماقبل العذراء Prepupae ومرحلة العذراء البيضاء White pupae ومرة اخرى يضاعف تكوين الكايتين قبل بزوغ البالغات بـ 4-6 يوم (Ferkovich *et al*. ,1981) .

كما اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية وعلى مستوى 0.05 تبعاً للتراكيز المستخدمة ومدد التعريض . كما تشير النتائج إلى اختلاف استعداد الأطوار اليرقية لمختلف تراكيز المعلق البوغي ، اذ كان الطور الأول أشدها استعداداً مقارنة مع بقية الأطوار(شكل4) والسبب في انخفاض حساسية اليرقات تجاه الفطر بتقدم عمرها اليرقي يعود الى إنه كلما تقدم عمر اليرقات ازداد عدد خلايا الدم والتي من خلالها يزداد عدد خلايا الدم الملتهمة المتجولة (السابحة في الدم) مثل خلايا الدم البلازمية (Plasmatocytes) وخلايا الدم الحبيبية (Granular haemocytes) والتي يعود لها الفضل الأكبر في التهام الأجسام الغريبة التي تدخل إلى داخل جسم اليرقات ، وهذا ماأكده كل من Lavine و strand (2002) اذ ذكرا ان عوامل الدفاع الخلوي في رتبة حرشفية الأجنحة تتجلى في هذين النوعين من الخلايا ، في حين إن يرقات الأطوار الأولى لم تكتمل أجهزتها الدفاعية خاصةً خلايا الدم المتكونة التي اغلبها تكون من النوع البدائي (Prohaematocytes) والتي لا تشترك عادة في التهام البكتريا والأجسام الغريبة الداخلة إلى تجويف جسمها (الزبيدي، 1992) .

جدول (3) تأثير المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الطور	التراكيز (بوغ /مل)	النسبة المئوية المصححة للهلاك بعد (ساعة)		
		24	72	120
الأول	10×1^{4}	17.77	37.83	62.90
	10×1^{5}	23.79	48.86	77.94
	10×1^{6}	35.82	58.88	93.98
	10×1^{7}	51.87	76.94	100.00
الرابع	10×1^{4}	16.77	34.82	58.88
	10×1^{5}	22.78	46.85	74.93
	10×1^{6}	36.82	61.89	87.97
	10×1^{7}	44.85	76.94	96.99
السابع	10×1^{4}	14.76	31.81	50.86
	10×1^{5}	18.77	35.82	68.91
	10×1^{6}	31.81	53.87	77.94
	10×1^{7}	40.83	69.92	90.97

- قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للتراكيز = 5.67 للزمن = 11.95 للأطوار = 4.23



***In= Instar**

شكل(4) استعداد الأطوار اليرقية الثلاث للعالق البوغي للفطر *M. anisopliae*

In 1 = الطور اليرقي الاول ، In 4 = الطور اليرقي الرابع ، In 7= الطور اليرقي السابع

اما عن تأثيرات راشح المزرعة للفطر فيوضح الجدول (4) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة في الأطوار اليرقية الثلاثة اذ سبب التركيز 100% أقصى نسبة هلاك في يرقات الطور الأول والتي بلغت 100 % بعد 72 ساعة ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت 67.96 % لهذه

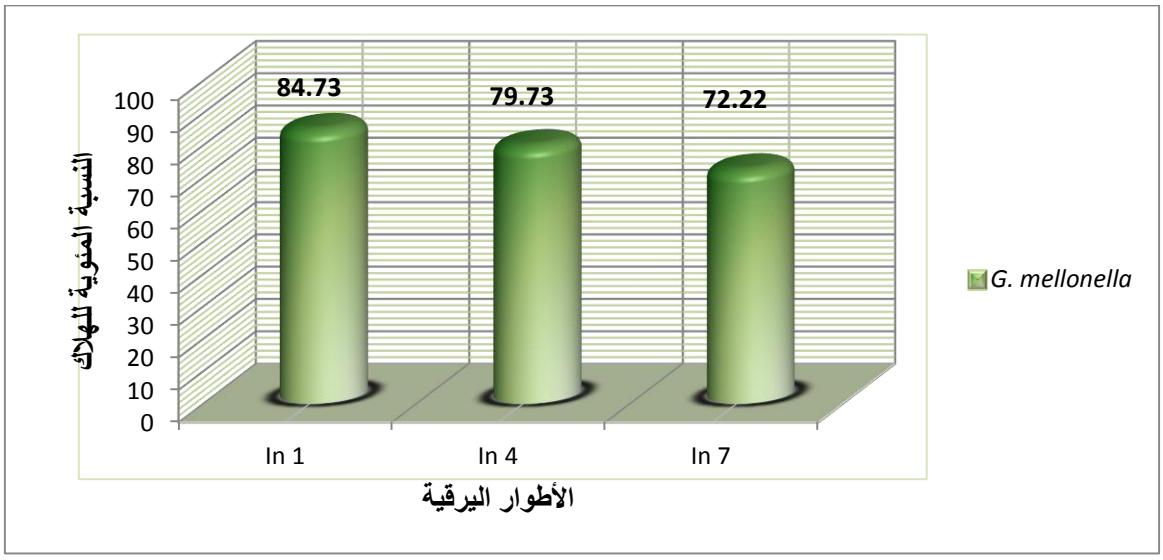
اليرقات في المدة نفسها ، وسبب ارتفاع نسب الهلاك هو صغر حجم الطور اليرقي الأول ورقة ورهافة جدار الجسم فيه لضعف سمك طبقة الكايتين فضلا عن النظام الدفاعي فيها غير مكتمل مما يسمح لأنزيمات الفطر ان تحدث الضرر القاتل و الأبادي لهذا الطور ومن الجدير بالذكر ان الفطر قادر على افراز انزيمات البروتييز والكايتنيز واللايبيز والتي يختلف افرازها بحسب نوع السلالة الفطرية ونوع العائل (Balachander *etal*.,2012) ، ذكر Arnold (1952) ان يرقات العمر الأول لفراشة الطحين *Ephestia* تكون نسبة خلايا الدم فيها من نوع Prohaemocytes (33-36) % في حين لاتتجاوز الـ 3 % في يرقات العمر الأخير كما ان هذه الخلايا قلما تشترك في عملية الألتهام . وبين Witting (1965) إن 50 % من مجمل عدد خلايا الدم المتجولة ليرقة حشرة *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera : Noctuidae) شاركت في عملية الالتهام بعد حقن اليرقة بجرع عالية من عصيات البكتريا البلورية *Bacillus thuringiensis* وإن 90 % من خلايا الدم البلازمية دقيقة النواة ساهمت في تلك العملية.

وتوضح هذه النتائج وجود علاقة طردية بين كل من التركيز ونسبة الهلاك وكذلك بين مدة التعرض ونسب الهلاك . ويُشير التحليل الإحصائي إلى وجود فروقات معنوية بين مدد التعريض فمثلاً كانت نسبة هلاك يرقات الطور الأول 77.97 % بعد 24 ساعة من المعاملة بالتركيز 100 % وارتفعت إلى (90.99 و 100)% بعد 48 و 72 ساعة من المعاملة على التوالي . وتُشير النتائج إلى اختلاف استعداد الأطوار اليرقية لتراكيز راشح المزرعة الخام للفطر ، إذ كان الطور الأول أكثرها استعداداً لجميع التراكيز بينما أبدى الطور السابع مقاومة ملحوظة للتراكيز المستخدمة جميعاً شكل (5) .

جدول (4) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في الاطوار اليرقية الثلاث لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الطور	التركيز	النسبة المئوية للهلاك بعد (ساعة)		
		24	48	72
الأول	%25	38.93	61.95	67.96
	%50	48.94	77.97	78.97
	%75	66.96	84.98	91.99
	%100	77.97	90.99	100.00
الرابع	%25	34.92	54.95	64.96
	%50	45.94	60.95	68.97
	%75	63.96	78.97	87.99
	%100	67.96	86.98	97.00
السابع	%25	28.91	39.93	54.95
	%50	40.93	59.95	63.96
	%75	51.94	71.97	77.97
	%100	65.96	79.98	91.99

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للأطوار=8.9 ، للتراكيز=5.51 ، للزمن= 4.6



***In= Instar**

شكل (5) استعداد الاطوار اليرقية الثلاثة لتراكيز راشح المزرعة للفطر *M. anisopliae*
In 1 = الطور اليرقي الاول ، In 4 = الطور اليرقي الرابع ، In 7= الطور اليرقي السابع

ومن خلال سير الدراسة تمت ملاحظة سلوك اليرقات غير الطبيعي فوجد أنها تتسم ببطء الحركة وفي اغلب الأحيان تشاهد متوقفة عن الحركة والتغذية ، كما كانت اليرقات ممتدة بشكل طولي على السطح الداخلي لقناني التجارب تحت ورق الترشيح ولوحظ أن اليرقات المصابة يظهر عليها بقع

سوداء ويصبح لونها داكن ومن ثم يتحول الى اللون الأسود بعد موت اليرقة (صورة 1)، ان تلون الكيوتكل بالبقع السوداء يدل على فرط الميلانين وهذا بدوره مؤشر عن مهاجمة الفطر للجهاز المناعي لليرقة وهذا الأمر يعمل على تحفيز النظام الأنزيمي Phenoloxidase وهو المسؤول عن عمليتي الملننة Melanosis ومقاومة الممرضات Pathogen resistance (Bitondi *et al.*,1998) .

-A - -B - -C -

يرقة سليمة **يرقة مصابة** **يرقة ميتة**

صورة (1) تأثير معاملات الفطر *M. anisopliae* في يرقات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

وهذه النتيجة تتفق مع Hussein وجماعته (2012) اذ وجدوا ظهور بقع سوداء اللون على كيوتكل يرقات الطور الرابع لعثة الشمع الكبرى ويميل لونه الى الأسود عند تعريضها لعالق الفطرين *M. anisopliae* و *B. bassiana* .

تشابه نتائج الأختبار الحيوي للدراسة الحالية نتائج Roberts (1970) اذ حصل على نسبة هلاك 100% ليرقات *An. gambiae* عند تعريضها لأبواغ الفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.02 mg بعد مرور أربعة أيام . وان عزلات *M. anisopliae* الأكثر أمراضية ليرقات بعوض *Cx. pipiens pipiens* أدت إلى هلاكها بنسبة 100% خلال خمسة أيام (Daoust and Roberts,1982) . وبين DeAndrade (1993) أن تعريض يرقات الطور الثاني لبعوض *An.walkeri* لأبواغ هذا الفطر أدى إلى هلاك اليرقات جميعاً بعد مرور أربعة أيام .

ان الحشرات المصابة بالفطر *M. anisopliae* قد تعيش لمدة 3-5 ايام نتيجة لاستنبات الأبواغ واختراق الخيوط الفطرية بشكل واضح بعد 48 ساعة من مهاجمة جسم عائلها وذلك عبر الفتحات التنفسية والقصبات الهوائية والذي يُسبب اختناق اليرقات نتيجة لإغلاق الفتحات التنفسية ثم تمتد لتخترق خلايا البشرة ثم ينمو الفطر في القناة الوسطى لليرقات واستنزاف المواد الغذائية لليرقات ، وبعد 72 ساعة تتحطم الأنسجة الدهنية وبالتالي قد تصل نسبة هلاك الحشرات الى 100% بعد 96 ساعة (El-Sinary , 2002 ; Quesada-Moraga *et al.*, 2006) . كما أن بعض اليرقات

المعاملة تموت خلال الانسلاخ (Roberts,1970; Ravallec *et al.*,1989) وأضاف Lacey وجماعته (1988) أن ابتلاع اليرقات للأبواغ يتبعه إفراز سموم من الفطر والذي يؤدي إلى تسمم الدم ونتيجة لذلك يؤدي إلى موت اليرقات خلال 24 ساعة .

ان العلاقة ما بين تركيز الأبواغ ونسب الهلاك طردية اذ كلما ازداد تركيز العالق البوغي للفطر أرتفع معدل هلاك الحشرة ، وقد يعود السبب في ذلك إلى زيادة عدد الأبواغ (الوحدات الأساسية للإصابة الفطرية) فضلاً عن أن الجهاز المناعي لليرقات يستطيع الدفاع عن الجسم فقط عند التراكيز الواطئة وعند زيادة التركيز يفقد الجهاز المناعي كفاءته (Scholte *et al.*,2003a) ، ان تعريض يرقات الطور الثالث لبعوض *Cx. quinqufasciatus* لأبواغ الفطر *B. bassiana* أدى إلى هلاكها بنسبة 100% بتركيز 1×10^{8} بوغ/مل خلال يومين وبنسبة هلاك بلغت 97.11 % بتركيز 1×10^{7} بوغ/مل بعد مرور خمسة ايام (Gayathri *et al.*,2010) ، بين كريم (2011) ان نسب الهلاكات في الأطوار اليرقية المختلفة لدودة الشمع الكبرى تزداد بزيادة تراكيز العالق الفطري للفطر *B. bassiana* اذ كانت نسب القتل لليرقات (38 ، 28.9 ، 22)% عند التراكيز (2.317×10^{5} و2.317×10^{3} و 2.317×10^{1}) على التوالي . كذلك حصل المحنة (2011) على نفس النتيجة عندما عرض الأطوار الأربعة ليرقات البعوض *An. stephensi* و *Cx. Quinquefasciatus* لتراكيز العالق الفطري للفطر *M. anisopliae* اذ وجد ان نسب الهلاك تزداد بزيادة تركيز العالق الفطري ومدة التعرض ، ولم يختلف Hussein وجماعته (2012) عن نتائج من سبقه اذ وجد ان نسبة الهلاك تزداد طرديا مع زيادة تركيز المعلق البوغي فقد كانت نسبة الهلاكات في يرقات الطور الرابع لعثة الشمع الكبرى (10 ، 20 ، 65 ، 90 ، 100)% عند التركيز (4.8×10^{2} و 4.8×10^{3} و 4.8×10^{4} و 4.8×10^{5} و 4.8×10^{6}) على التوالي لعالق السلالة الفطرية Man3085AUMC للفطر *M. anisopliae* .

أما بخصوص حساسية الأطوار اليرقية فقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه Balaraman وجماعته (1979) عندما وصف العلاقة بين الأطوار اليرقية لبعوض *An. stephensi* ونسبة الهلاك حيث وجد أن نسبة الهلاك تقل كلما تقدم عمر الطور ، وأضاف أن نسبة هلاك يرقات الطور الأول بلغت 100% يليه الطور الثاني بنسبة 89% والثالث بنسبة 73% والرابع بنسبة 71% عند معاملتها بالعالق الفطري للفطر *M. anisopliae* بتركيز 0.033 mg .

وتتفق النتائج الحالية مع ما توصل اليه Bukhari وجماعته (2010) من ان يرقات الطور الأول والثاني للنوعين *An. gambiae* و *An. Stephensi* تكون اكثر حساسية لأبواغ الفطر *M. anisolpliae* من يرقات الطور الثالث والرابع ، ويُعلل هلاك يرقات الطور الأول بسبب رقة الكيوتكل بعد الانسلاخ مما يجعلها أكثر عرضة للإصابة الفطرية بالمقارنة مع يرقات الطور الثالث

والرابع التي تكون ذات كيوتكل متثخن وبالتالي أقل عرضة للإصابة الفطرية (Sandhu *et al*.,1993; Lord and Fukuda, 1990) .

ذكر Huxham وجماعته (1989) ان راشح مزرعة الفطر *M . anisopliae* الحاوي على سم الدستروكسين قد اثر على المناعة الخلوية بتثبيطه لخلايا الدم لحشرتي الصرصر الأمريكي *Periplaneta americana* و الجراد الصحراوي *Schistocerca gregaria* .

كذلك ذكر Vilcinskas وجماعته (1997 b,c) ان راشح المزرعة للفطرين *M . anisopliae* و *B. bassiana* تضعف التمييز الخلوي والتفاعلات الدفاعية للعائل اذ وجدوا ان هذه النواتج تضعف الخلايا البلازمية المعزولة من يرقات عثة الشمع الكبرى . وجد Onofre وجماعته (2002) ان البيتيدات المعزولة من راشح مزرعة الفطر *Nomuraea rileyi* لها تاثير قاتل في يرقات الطور الثالث لحشرة *Anticarsia gemmatalis* (Lep. : Noctuidae) وان العلاقة بين نسبة الهلاك وتركيز البيتيد كانت طردية اذ بلغت نسبة الهلاك (2 و 10 و 40 و 80 و 81 و 82.6)% عند التركيز (0.0001 و 0.001 و 0.01 و 0.1 و 0.2 و 1.0) ملغم / مل على التوالي .

اكد Quesada-Moraga وجماعته (2006) أن خلط 1.8 ملغم من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* مع 1 غم من الغذاء يؤدي إلى هلاك يرقات الطور الثاني لحشرة *Spodoptera littoralis* بنسبة 85.5% بعد سبعة أيام من التغذية .

من المعروف أن الكثير من الفطريات الممرضة للحشرات تمتلك مدى واسع من المضائف وتسبب الموت السريع لمضائفها ويعود ذلك لامتلاكها نواتج ثانوية حيوية تأخذ دوراً مهماً في أمراضية الفطريات للحشرات المستهدفة ، إذ تمتاز النواتج الايضية الثانوية بقابليتها على التداخل مع الجهاز المناعي وتغيرات في سلوك المضيف مثل اختزال النشاط و شلل الحشرة واختزال التغذية وتغيرات في تراكيب الأنسجة وبالتالي الموت السريع للمضيف (Charnley, 2003) .

ايضا النتيجة مقاربة لما وجده العطبي (2012) عند معاملة الطور السابع ليرقات عثة الشمع الكبرى بمستخلص نوعين من البروبولس وهما البروبولس السوري والعراقي اذ وجد ان نسبة الهلاك تزداد بزيادة تركيز البروبولس وكانت نتائج الهلاكات (13.36 و 15.56 و 26.66) % و (6.66 و 14.83 و 24.83) % عند التراكيز (25 ، 50 ،75) % من مستخلص البروبولس السوري والعراقي على التوالي .

4-1- 3 الاختبار الحيوي في دور العذراء

توضح النتائج في الجدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من المعلق البوغي في عذارى عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* اذ سجلت أعلى نسبة هلاك 54.89 % عند التركيز 1×10^{7} بوغ/مل واوطأ نسبة

هلاك 36.85 % عند التركيز 1×10^4 بوغ/مل ، وقد اثبت التحليل الأحصائي وجود فروقات معنوية في النسب المصححة لهلاكات العذارى تبعا للتراكيز المستخدمة ، اذ يلاحظ من هذه النتائج وجود علاقة طردية بين التراكيز ونسب الهلاك . كما يوضح الجدول (6) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة في عذارى عثة الشمع اذ سبب التركيز 100% أقصى نسبة هلاك والتي بلغت 50.96 % ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت 32.95 % وانعدمت الهلاكات في معاملة السيطرة ، و توضح النتائج ايضا وجود علاقة طردية بين التركيز ونسبة الهلاك .

ان سبب انخفاض تأثير كل من عالق وراشح المزرعة للفطر في العذارى يعود الى وجود الشرانق التي تنسجها والتي تعمل كبيئة كارهة للماء ، كما انها تقلل من اختراق الأبواغ فضلا عن كيوتكل العذارى أكثر صلابة من الأطوار اليرقية وذلك لان بناء الكايتين يصل الى اعلى مستوى له في مراحل ماقبل العذراء والعذراء البيضاء وقبل بزوغ البالغات (Ferkovich *et al.* ,1981) . وظهرت أعراض الإصابة على العذارى المريضة التي تمثلت بلونها البني الداكن عند بداية الإصابة متحولا إلى اللون الأسود في نهاية الإصابة صورة -2- .

جدول (5) تأثير المعلق البوغي للفطري في دور العذراء لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

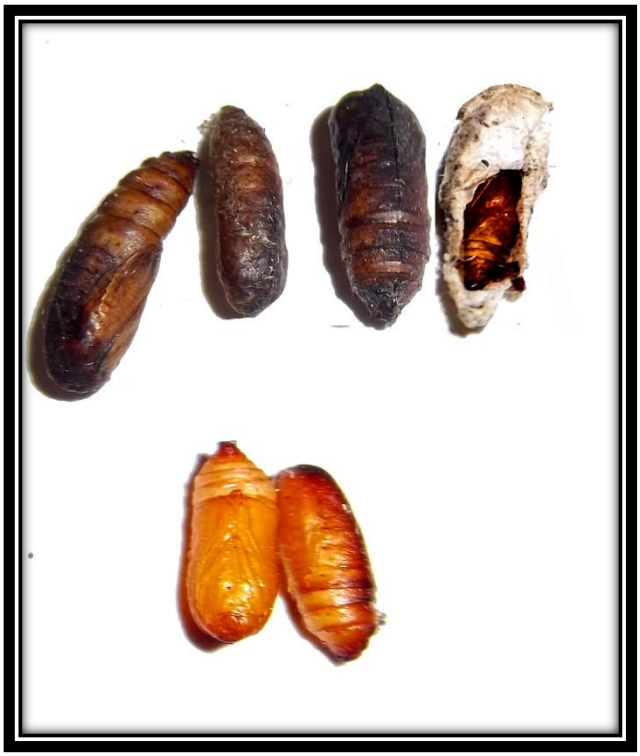
التركيز (بوغ / مل)	عدد العذارى المعاملة	النسبة المئوية للهلاك
1×10^4	40	36.85
1×10^5	40	45.87
1×10^6	40	49.88
1×10^7	40	54.89

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 للتراكيز=1.2

جدول (6) تأثير راشح المزرعة الخام في دور العذراء لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

التركيز	عدد العذارى المعاملة	النسبة المئوية للهلاك
%25	40	32.95
%50	40	40.95
%75	40	44.96
%100	40	50.96

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 = 1.38



صورة (2) تأثير معاملات الفطر *M. anisopliae* في عذارى عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* (الى الأعلى العذارى المصابة ويلاحظ تغير لونها الى اللون الأسود ، الى الأسفل العذارى السليمة)

أشار Angel-Sahagun وجماعته (2005) إلى أن تعريض عذارى ذبابة القرن *Haematobia irritans* إلى ثلاثة أنواع من الفطريات *M. anisopliae* و *B. bassiana* و *P. fumosoroseus* سبب هلاكها بنسب انحصرت بين (50% - 71.3%) . وبلغت نسبة هلاك عذارى بعوض *Cx. pipiens pipiens* 30% عند تعريضها لأبواغ الفطر *B. bassiana* بتركيز 10^4 بوغ /مل (علي، 2007) . وحصل المشهداني (2010) على نسبة قتل لعذارى الذبابة المنزلية *Musca domestica* بلغت16.66% عند تعريضها لأبواغ الفطر *Entomophthora muscae* بتركيز 5×10^5 بوغ /مل ، اما Shanthakumar وجماعته (2010) فقد اكدوا ان تراكيز المعلق البوغي للفطر *Nomuraea rileyi* لم تؤثر على نسب هلاك العذارى لحشرة *Spodoptera litura* بقدر تاثيرها في احداث التشوهات للبالغات البازغة من هذه العذارى وقد بلغت نسبة التشوه لبالغات الحشرة 96.7 % عند تعريض العذارى للتركيز 2.4×10^6 بوغ / مل . وقد اكد العبيدي وسمير(2011) ان للفطر *B. bassiana* تاثير قليل في عذارى دودة ورق القطن قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغ معدل الموت فيها صفر ، كما تدنت نسب الهلاك في عذارى بعوضتي *An. stephensi* و *Cx. Quinquefasciatus* عند تعرضها للمعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* اذ بلغت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 2×10^5 بوغ/مل بلغت 50% لعذارى الانوفليس و 46.66% لعذارى الكيولكس وبعد 72 ساعة من بداية التعرض للمعلق البوغي للفطر (المحنة ،2011) ، وجد

كريم (2011) عند معاملته عذارى عثة الشمع الكبرى بالعالق البوغي للفطر *Nomuraea rileyi* ان نسب الهلاك بلغت 100 % وعلل ذلك بصغر أبواغ الفطر وقدرتها على اختراق شرنقة العذراء ومن ثم اتمام عملية التطفل اما عند معاملته هذه العذارى بالعالق البوغي للفطر *B. bassiana* فقد كانت نسب الهلاك (25 و 35 و 15) % عند التركيز (218.7 × 10^5 و 218.7 × 10^3 و 218.7 × 10^1) بوغ / مل على التوالي وقد كانت هذه اقل نسب الهلاكات من بين كل المعاملات التي جربه في بحثه ، درس محمود وجماعته (2012) تاثير تراكيز المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae* في عذارى خنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculates* وقد وجدوا ان نسب الهلاك للعذارى بعمر 120 ساعة بلغت (100 و 70 و 70) % عند التركيز (5 × 10^5 و 5 × 10^3 و 5 × 10^1) بوغ /مل على التوالي .

4-1- 4 الاختبار الحيوي في البالغات

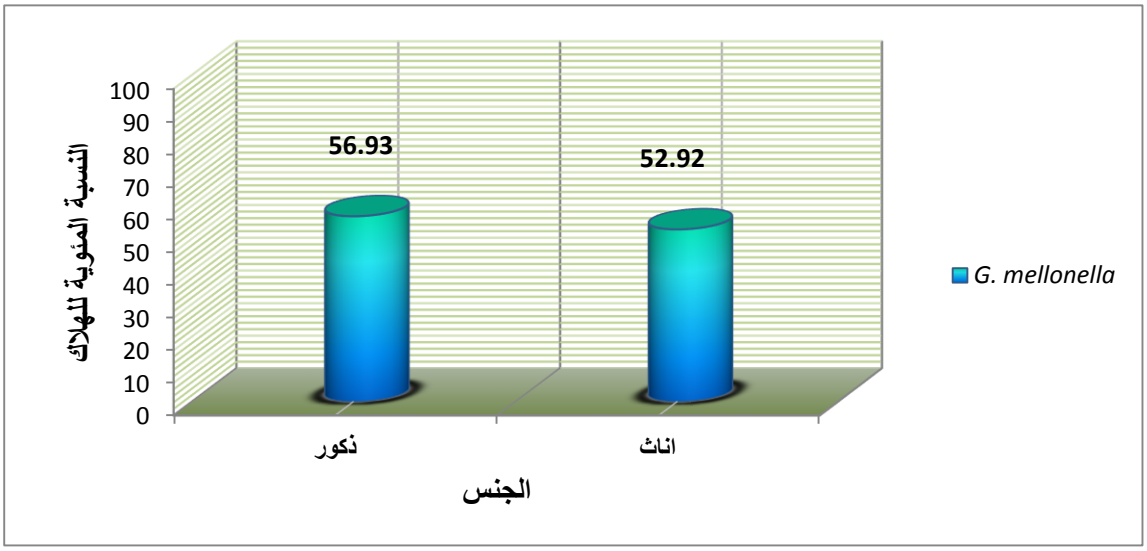
يُشير الجدول (7) إلى تأثير تراكيز مختلفة من المعلق البوغي للفطر في بالغات *G. mellonella* حيث دلت النتائج أن أعلى نسبة هلاك سُجلت عند التركيز 1×10^7 بوغ /مل لكل من الذكور والإناث،اذ كانت نسبة هلاك الذكور 69.95 % والإناث 63.94 % بعد مرور 168 ساعة ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك عند التركيز 1×10^4 بوغ /مل اذ كانت نسبة هلاك الذكور والأناث 41.91 % و 43.91 % على التوالي . وقد اثبت التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية تبعاً للجنس ولصالح الاناث التي اظهرت مقاومة اكبر من الذكور ، ويُستنتج من الجدول أدناه أن العلاقة بين تراكيز المعلق البوغي وكل من نسب الهلاك كانت طردية ، أما بخصوص حساسية جنس الحشرة فيوضح الشكل (6) أن الذكور كانت أكثر حساسية للإصابة من إناث عثة الشمع .

ويوضح الجدول (8) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae* في بالغات عثة الشمع ، اذ تفوق التركيز 100% على باقي المعاملات بنسبة هلاك (68.90 و 58.98) % للذكور والأناث على التوالي بعد 72 ساعة ، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت (37.98 و 32.97) % للذكور والأناث على التوالي وفي المدة نفسها . في حين لم تسجل معاملة السيطرة أية نسبة هلاك ، وتوضح النتائج وجود علاقة طردية بين كل من نسب الهلاك والتركيز . وذُعمت جميع النتائج من خلال الفروقات المعنوية بين المعاملات ،كما بينت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين الذكور والأناث في معدلات الهلاك على الرغم من ان الذكور كانت اكثر حساسية من الأناث (شكل 7) .

جدول (7) تأثير المعلق البوغي للفطر في دور البالغات لعثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الجنس	التركيز	النسبة المئوية للهلاك
ذكور	10×1^{4}	41.91
	10×1^{5}	53.93
	10×1^{6}	61.94
	10×1^{7}	69.95
اناث	10×1^{4}	43.91
	10×1^{5}	47.92
	10×1^{6}	55.93
	10×1^{7}	63.94

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 = 1.3

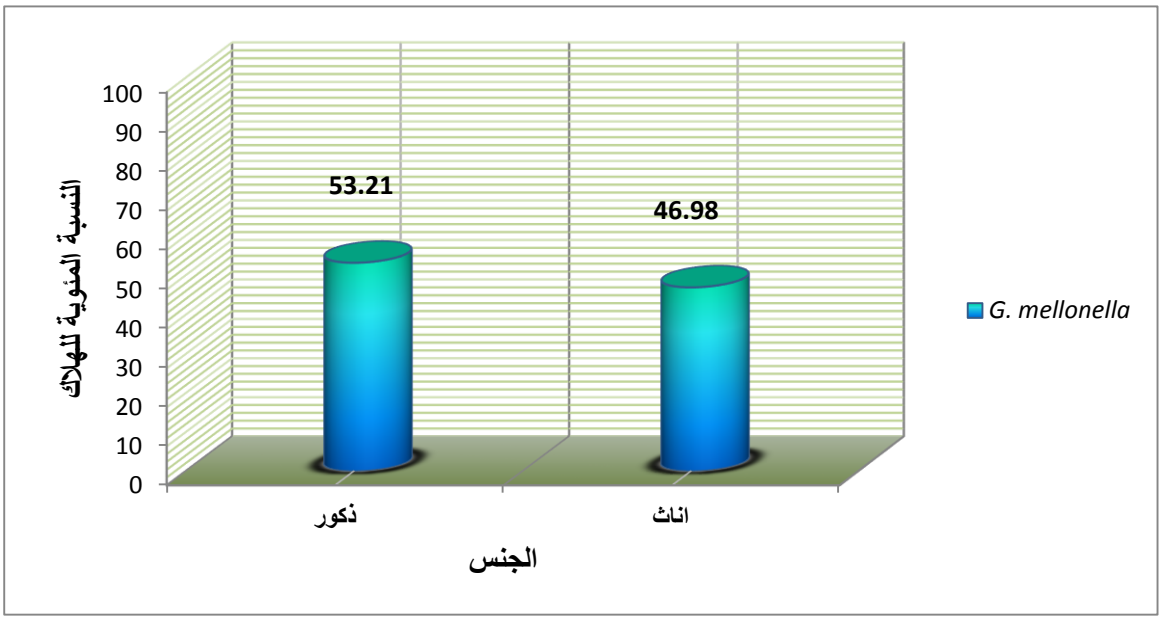


شكل (6) استعداد ذكور واناث عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* لتراكيز المعلق البوغي للفطر *M. anisopliae*

جدول (8) تأثير تراكيز مختلفة من راشح المزرعة الخام في بالغات عثة الشمع الكبرى *G. mellonella*

الجنس	التركيز	النسبة المئوية للهلاك
ذكور	%25	37.98
	%50	44.98
	%75	60.98
	%100	68.90
اناث	%25	32.97
	%50	42.98
	%75	52.98
	%100	58.98

قيمة L.S.D تحت مستوى معنوية 0.05 = 6.29



شكل (7) استعداد ذكور واناث عثة الشمع الكبرى *G. mellonella* لتراكيز راشح المزرعة الخام للفطر *M. anisopliae*

تشابه النتائج الحالية نتائج Clark وجماعته (1968) عندما عرض بالغات *Cx. tarsalis* و *Cx. pipiens* و *Ae. Aegypti* و *Oc. sierrensis* و *An. albimanus* لأبواغ الفطر *B. bassiana* حيث أدى إلى هلاكها جميعاً خلال خمسة أيام. وبين Scholte وجماعته (2003b) ان قيمة LT_{50} (الزمن اللازم لهلاك نصف العدد من الحشرات) تساوي 3.5 يوم عند تعريض بالغات *An. gambiae* لأبواغ الفطر *B. bassiana* ، وتبلغ تلك القيمة 4.1 يوم لإناث بعوض *Ae. aegypti* عند تعريضها للفطر *M. anisopliae* بتركيز 1.6×10^{10} بوغ/مل (Scholte *et al*.,2007) ، في حين بلغت القيمة المذكورة وللبعوض نفسها 4.4 يوم عند تعريضها لأبواغ الفطر المذكور (Leles *et al*.,2010) ، وفي دراسات اخرى لتجريب اثر الفطريات *M. anisopliae* و *B.bassiana* في بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية جرب Cherry وجماعته (2005) 12 عزلة فطرية من الفطرين ووجد ان اكثر عزلتين اثرت في بالغات الحشرة هي *B.bassiana* 0362 و *M. anisopliae* 0351 وكانت الجرعة نصف القاتلة (9.10×10^{4} و7.10×10^{4}) بوغ/ مل على التوالي ، اما Mahdneshin وجماعتها (2011) فقد جربوا خمس عزلات للفطرين *M. anisopliae* و *B.bassiana* في بالغات خنفساء اللوبيا الجنوبية ووجدوا ان اكثر عزلة فطرية مؤثرة في البالغات هي *B.bassiana* IRAN 715C اذ حققت اعلى نسبة هلاك بلغت 76 % عند غمس بالغات الحشرة بالعالق البوغي للفطر ذو التركيز 1×10^{8} بوغ / مل ، بين المحنة (2011) في دراسته تأثير العالق البوغي للفطر *M. anisopliae* في بالغات البعوض

An. stephensi و *Cx. quinquefasciatus* وكانت أعلى نسبة هلاك عند التركيز 2×10^5 بوغ /مل لكل من الذكور والإناث ولكلا النوعين ، وكانت نسبة هلاك ذكور بعوض *An. stephensi* 100% والإناث 96.66% بعد مرور 168 ساعة ، بينما بلغت نسبة هلاك ذكور بعوض النوع الثاني93.33% و الإناث 90% في المدة ذاتها ، في حين كانت أوطأ نسبة هلاك عند التركيز 2×10^2 بوغ /مل وكانت نسبة هلاك ذكور وإناث بعوض النوع الأول 66.66% و 56.66% على التوالي بالمقارنة مع نسب هلاك ذكور وإناث بعوض النوع الثاني والتي بلغت 56.66% و 50% في المدة نفسها . استعمل بعض الباحثين تأثير الغذاء المخلوط بالعالق البوغي للفطر في احداث مختلف التأثيرات في عثة الشمع الكبرى فقد اكد كريم (2011) ان الغذاء المعامل بالعالق البوغي للفطر *B. bassiana* قد اثر على عمر الأناث و وضعها للبيض وكان اكثر التراكيز تأثيرا هو 265.1×10^5 بوغ /مل في معاملة (ذكور معاملة × اناث معاملة) اذ كان عمر الاناث 5 يوم وعدد البيض الموضوع من قبلها 374 بيضة لكل انثى مقارنة بمعاملة السيطرة (ذكور سليمة×اناث سليمة) اذ بلغ عمر الاناث 13.33 يوم وعدد البيض الموضوع 1064 بيضة لكل انثى .

تنسجم النتائج الحالية في إطارها العام مع بعض الأبحاث حول تأثير أنواع أخرى من الفطريات في بالغات الحشرات كالبعوض حيث ذكر Soares (1982) أن تعريض بالغات بعوض *Oc. sierrensis* للعالق البوغي للفطر *T. cylindrosporum* بتركيز 5×10^6 بوغ/مل يؤدي إلى هلاك 50% من البالغات بعد خمسة أيام و 100% بعد تسعة أيام من المعاملة . وان استعمال الفطر *Fusarium pallidorosum* ضد إناث *Cx. quinquefascitus* يؤدي إلى هلاكها جميعا خلال أربعة أيام (Mohanty *et al.*,2008a) . وفيما يتعلق بحساسية ذكور وإناث بالغات عثة الشمع الكبرى لأبواغ الفطر ، فقد جاءت نتائج الدراسة مشابهة لما وجده Scholte وجماعته (2003a) عندما استعمل الفطر قيد الدراسة بتركيز 1.6×10^8 بوغ /مل ضد ذكور وإناث *An. gambiae* مما أدى الى هلاكها جميعاً خلال سبعة أيام ، كما أوضح ايضاً أن هلاك بالغات *Cx. quinquefasciatus* بلغت 100% بعد مرور ستة أيام للذكور وسبعة أيام للإناث . بين Mnyone وجماعته (2009) أن الفطر المذكور من سلالة IP46 يُصيب ذكور وإناث النوعين *An. gambiae* و *An. arabiensis* اذ وجد ان ذكور كلا النوعين تكون أكثر تأثيراً بالإصابة الفطرية من الإناث . وفيما يخص أنواعا أخرى من الحشرات الطبية، فقد وجد Kaaya (1989) ان ذكور ذبابة التسي تسي *G. morsitans morsitans* أكثر حساسية للإصابة بالفطرين *M. anisopliae* و *B.bassiana* من الإناث . وتتعارض في الوقت نفسه مع ما وجده كل من Maniania و Odulaja (1998) من ان الذبابة المذكورة عند تعريضها لأبواغ الفطر قيد الدراسة تكون الإناث أكثر حساسية للإصابة بالفطر من الذكور ، حيث كانت نسبة هلاكها 98% للإناث و

89.6% للذكور ، كذلك وجد كريم (2011) في دراسته ان البالغات من الذكور لعثة الشمع الكبرى اقل تاثرا بالعالق البوغي للفطر *B.bassiana* من الأناث .

اما عن النتائج الحالية لتاثير راشح المزرعة الخام للفطر في البالغات فتشابه نتائج الجبوري (2003) عندما عامل بالغات الذبابة المنزلية *Musca domestica* براشح المزرعة الخام للفطر *Aspergillus niger* أدى إلى هلاكها بنسبة 90% بعد مرور 96 ساعة . وأشار Verma و Praksh (2010) ان معاملة خليط من بالغات *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* و *Ae. aegypti* براشح المزرعة للفطر *C. tropicum* بتركيز 9:1 (Metabolite /Methanol) سبب هلاك البالغات بنسبة 70.58% بعد 8 ساعات. وأن تعريض الذبابة المنزلية *Musca domestica* لراشح مزرعة الفطر *E. muscae* أدى إلى هلاكها بنسبة 99.99% بعد 48 ساعة وعند التركيز 100% (المشهداني،2010) ، ايضا جرب المحنة (2011) تراكيز مختلفة من راشح مزرعة الفطر *M. anisopliae* في بالغات نوعين من البعوض *An. stephensi* و *Cx. quinquefasciatus* فلاحظ تفوق التركيز 100% بفارق معنوي على باقي المعاملات بنسبة هلاك 100% للنوع الاول و 96.66% للنوع الثاني بعد 72 ساعة، بينما سجل التركيز 25% أوطأ نسبة هلاك بلغت 70% و 60% للنوعين وبحسب الترتيب وفي المدة نفسها . أن الأنزيمات والسموم الفطرية Mycotoxin تؤثر في الفعاليات الحيوية لأجسام الكائنات الحية فقد تعمل على تعطيل بعض الأنسجة أو قتلها أو قد تؤثر على نمو وتطور الحشرة (Lalor *etal*.,1976) . وذكر Wright وجماعته (1982) أن تعريض بالغات *Ae. aegypti* لمركب Aflatoxin بتركيز 0.006% يؤدي إلى خفض أنتاج البيض لديها ويقلل من قابليته على الفقس .

4 - 2 التحري عن الأنزيمات والمضادات الحيوية المنتجة من الفطر *M. anisopliae*

تم التحري عن انتاج انزيمات البروتييز والكايتنيز واللايبيز من الفطر *M. anisopliae* في وسطين انتاجيين فضلا عن انتاج المضاد الحيوي والذي تم التحري عنه في الوسط الخاص بانتاج المضادات الحيوية علاوة على الوسطين المذكورين اعلاه .

وقد بينت النتائج الموضحة في الجدول (9) قابلية الفطر على انتاج الأنزيمات الثلاثة فقد بلغت الفعالية النوعية لإنزيم البروتييز (1.07 ، 4.11) وحدة / ملغم بروتين في الوسطين المدعم بالكايتين الغروي و المدعم بالكازائين على التوالي . اما انزيم الكايتنيز فقد بلغت اعلى فعالية له في الوسط المدعم بالكايتين الغروي اذ كانت الفعالية النوعية (2.48) وحدة / ملغم بروتين يليه الوسط المدعم بالكازائين اذ بلغت الفعالية النوعية (1.09) وحدة / ملغم بروتين. وقد ابدى انزيم اللايبيز اعلى فعالية له في الوسط المدعم بالكايتين الغروي ثم في الوسط المدعم بالكازائين اذ كانت الفعالية النوعية (6.1 و 4.02) وحدة / ملغم بروتين على التوالي .

ان التباين الحاصل في إفراز الانزيمات الثلاثة في الأوساط الزرعية المستعملة يعود الى الاختلاف في نمط التعبير الجيني للفطر إذ أنه يختلف بحسب طبيعة البيئة المغذية (Freimoser *etal.*,2005) .

جاءت نتيجة الدراسة الحالية متشابهة مع العديد من الدراسات التي تم التحري فيها عن الانزيمات من فطريات مختلفة فضلاً عن دراسة الظروف الملائمة لإنتاج الانزيمات من هذه الفطريات. ففي دراسة اجراها Kang وجماعته (1999) عن نوع جديد من انزيم الكايتنيز المنتج من الفطر *M. anisopliae* وجد ان وسط الحد الأدنى [مكون من أملاح كبريتات المغنسيوم المائية $MgSo_4.7H_2o$ 0.5% وفوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين $NaHPO_4$ 0.5%] والمدعم بالكايتين الغروي كان الأفضل في انتاج انزيم الكايتنيز إذ بلغت الفعالية الأنزيمية أعلى قيمة لها 8.66 وحدة/مل مقارنة بباقي الأوساط .

وجدَ Tikhonov وجماعته (2002) ان الوسط المدعم بالكايتين الغروي هو الأفضل في انتاج انزيم الكايتينيز من الفطريات الممرضة للنيماتودا *Verticillium chlamydosporium* و *V. suchlasporium* ولم تختلف نتيجة الباحث Duo-Chuan وجماعته (2005) عما سبقه من البحوث إذ أعطى الوسط المدعم بالكايتين أعلى انتاجية لإنزيم الكايتنيز المنتج من الفطر المتطفل على الفطريات *Talaromyces falvus* .

بلغت أعلى فعالية نوعية لانزيم الكايتينيز المنتج من الفطر *Trichoderma virens* UKMI (14.59) وحدة/ ملغم بروتين عند استعماله الكايتين الغروي (Abd-Aziz *etal.*,2008).

استعمل كل من Dhar و Kaur (2009) العديد من مصادر الكاربون والنايتروجين لتحديد المصدر الأفضل في انتاج انزيم الكايتنيز من الفطر *M. anisopliae* ووجد ان الوسط الحاوي على الكايتين الغروي كمصدر كاربوني وخميرة الخبز كمصدر نتيروجيني هو الوسط الأمثل لإنتاج انزيم الكايتينز، وأكد الباحثان على ان انتاج انزيم الكايتينز يختلف باختلاف العزلات الفطرية والبيئات المستخدمة في تنمية الفطر . وحدد Dhar و Kaur (2010) تأثير مصدرين للكاربون وهما الكايتين الغروي والدكستروز ومصدر نايتروجيني هو خميرة الخبز في أربعة اوساط انتاجية لانتاج انزيم الكايتنيز من 17 عزلة فطرية للفطر *B. bassiana* ووجد ان الوسط الحاوي على الكايتين الغروي كمصدر وحيد للكاربون هو الأفضل في انتاج انزيم الكايتنيز ثم الوسط الحاوي على الكايتين الغروي والمدعم بخميرة الخبز. ان انتاج الانزيمات الخارجية يتأثر كثيراً ببعض العوامل كالمصادر الكاربونية والنايتروجينة ودرجة الحموضة (Vaidya *etal.*,2001) .

وجد Ali وجماعته (2009) من خلال دراسته للظروف المثلى لإنتاج انزيم اللايبيز من الفطر *M. anisopliae* أن أعلى فعالية انزيمية بلغت 1.96± 97.44 وحدة / مل عند اضافة زيت الزيتون 2% الى وسط الحد الأدنى.

وفيما يخص انزيم البروتييز جاءت نتيجة الدراسة الحالية مطابقة لما وجده Bhagya وجماعته (2010) عند دراستهم تأثير الوسطين الزرعيين [وسط الحد الأدنى المدعم بالكازائين MM+C ووسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين الغروي MM+CC] على انتاج انزيم البروتييز Pr1 و Pr2 من الفطرين *B. bassiana*(UB9) و *M. anisopliae*(UM4) ، إذ حصلا على أعلى فعالية للأنزيمين بعد مرور 72 ساعة في الوسط المدعم بالكازائين 1% إذ بلغت الفعالية الأنزيمية (28.5 و 4.26) وحدة/ مل للأنزيمين Pr1 و Pr2 على التوالي من الفطر *B. bassiana* ، وبلغت (30.08 و 16.36) وحدة/مل للأنزيمين Pr1 و Pr2 على التوالي من الفطر *M. anisopliae* .

أوضح Dhar و Kaur (2010) عند دراستهم تأثير الأوساط الزرعية [MM+CC, MM+C, MM] على انتاج انزيم البروتييز من 17 عزلة فطرية للفطر *B.bassiana* ان وسط الحد الأدنى المدعم بالكازائين له القدرة على انتاج أعلى كمية من انزيم البروتييز كما ان وسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين الغروي 2% قادر على ان يستحث انتاج انزيم Pr1 غير ان بعض العزلات أظهرت فعالية عالية لانزيم Pr1 في وسط الحد الأدنى MM إذ بلغت الفعالية الأنزيمية (3.88 و 4.44) وحدة/مل في العزلتين UB3 و UB13 على التوالي، وأظهرت فعالية واطئة في الوسط المدعم بالكازائين 1% إذ كانت الفعالية الانزيمية (2.56و 0.07) وحدة/مل في العزلتين UB3 و UB13 على التوالي وهذه النتيجة تدل على وجود كبح هدمي (catabolite repression) لأنزيم Pr1 عند بعض العزلات الفطرية.

بينَّ Cuervo-parral وجماعته (2011) في دراسته لقابلية الفطر *Trichoderma harizianum* VSL291 على انتاج البروتييز والكايتنيز واللايبيز والزايلانيز Xylanases و β -1,3-glucanases في وسط الحد الأدنى المدعم بالجدار الخلوي للفطريات الممرضة للنبات كمصدر للكاربون وقد وجد أن أعلى فعالية نوعية للأنزيمات قد بلغت (0.42 و 0.89 و 0.60 و 1.82و 3.22) وحدة/ ملغم بروتين لأنزيم البروتييز والكايتنيز واللايبيز و الزيالانيسز وبيتا 3.1 . كلوكانيز على التوالي وفي الوسط المدعم بالجدار الخلوي للفطر الممرض للنبات *Moniliophthora roreri* .

درس Nadia وجماعته (2010) قابلية الفطر *Mucor racemosus* على انتاج انزيم اللايبيز في خمسة أوساط انتاجية وتبين ان الوسط الحاوي على الببتون 3% و زيت الزيتون : كلوكوز 1% هو الأفضل في انتاج انزيم اللايبيز إذ بلغت الفعالية الانزيمية 337.6 وحدة/مل والفعالية النوعية 7.3 وحدة/ ملغم بروتين.

استطاع Rustiguel وجماعته (2012) اختبار قابلية 4 عزلات للفطر *M. anisopliae* على انتاج انزيم الكايتنيز تحت تخمرات الحالة الصلبة وباستعمال شرانق دودة القز كمادة اساس وكانت أعلى

انتاجية للإنزيم (7.14 وحدة/غم من المادة الأساس) في السلالة IBCB360 ، وبينّ الباحث بأن الفطر قادر على انتاج متناظرات انزيمية Isoforms لانزيم الكايتنيز وذلك حسب نوع المادة الأساس المستعملة في الوسط المغذي للفطر.

أظهرت العزلة الفطرية IWST-Ma7 للفطر *M.anisopliae* اقصى انتاجية لأربعة من الانزيمات إذ بلغت الفعالية النوعية (1.90 و 1.80و 0.98 و 0.80) وحدة/ملغم بروتين لأنزيم الكايتينز و كايتين دي استليز (CDA) chitin deacetylase والبروتييز واللايبيز على التوالي مقارنة بالعزلات التسعة وهي IWST- Ma1 و IWST- Ma2 و IWST- Ma3 و IWST- Ma4 و IWST- Ma13 و IWST- Ma16 و ARSEF7413 و ARSEF3603 و ARSEF2596 . (Balachander *etal.*,2012)

تحرى Hussein وجماعته (2012) عن انزيمي البروتييز واللايبيز المفرزة من قبل عزلات الفطر *B.bassiana* و الفطر *M.anisopliae* . اختبرت لأجل ذلك 90 عزلة من الفطر *B. bassiana* و 15 عزلة من الفطر *M. anisopliae* . اظهرت جميع عزلات الفطر *B. bassiana* قابلية على إفراز انزيم البروتييز عدا ثمانية عزلات، كما ان هنالك تبايناً بين العزلات في انتاج انزيم البروتييز غير أن اكثر العزلات فاعلية في انتاج الانزيم هي Bba AUMC Nos.3260, 3263, 3268, 3271, 3566, 3573 and 3574 وبالنسبة لانزيم اللايبيز فتستطيع جميع العزلات انتاج الانزيم وتختلف العزلات فيما بينها بقوة الانتاجية.

أما عزلات الفطر *M. anisopliae* الخمسة عشر فأظهرت جميعها القدرة على انتاج البروتييز وكانت أعلى انتاجية للإنزيم من قبل العزلة Man AUMC No.3329 ، في حين أظهرت ستة عزلات فقط القابلية على انتاج اللايبيز وحققت العزلة Man AUMCNo.3085 أقصى انتاجية للأنزيم.

استطاع Khan وجماعته (2012b) ان يختبر قابلية ستة عزلات فطرية على انتاج الانزيمات الثلاثة البروتييز والكايتيز واللايبيز ثلاثة من هذه العزلات تعود للفطر *B.bassiana* والثلاثة المتبقية تعود للفطر *Verticillium lecanii*. ووجدَ ان العزلة *V.lecanii* 3 هي الأكفأ من بين العزلات الستة في انتاج انزيمي الكايتينيز واللايبيز وقدرته على انتاج انزيم اللايبيز أعلى من قدرته في انتاج الكايتنيز.

كما ان العزلة *B.bassiana* 70 هي الأكفأ في انتاج انزيم البروتييز إذ بلغت الفعالية الانزيمية 0.493 و 0.64 وحدة/مل في اليوم الثالث والرابع على التوالي من بدء فترة الحضن.

أجرى الباحث Fernandes وجماعته (2012) بحثاً حول قابلية ثلاثة أنواع من الفطريات الممرضة للحشرات على إفراز انزيم البروتييز واللايبيز والاميليز والسيلوليز والاستريز والبكتنيز في وسط الحد الأدنى المدعم بمواد أساس (Substrates) الخاصة بكل نوع من أنواع الانزيمات قيد الدراسة،

وأظهرت نتائج الدراسة الخاصة بالفطر *M. anisopliae* قدرته العالية على افراز انزيم البروتييز في الوسط المدعم بالجيلاتين عند التركيزين 1% و 4% ، وأظهر قدرة اضعف لانتاج باقي الانزيمات.

أظهرت العزلة الفطرية الجديدة *B. bassiana* (HQ917687) (Novel) في اليوم الخامس من فترة الحضن قابلية على افراز انزيم الكايتنيز أعلى من قابليتها على افراز انزيم البروتييز واللايبيز في وسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين 1%، إذ كانت الفعالية الانزيمية (5.24 و 4.73 و 4.66 و 2.26) وحدة/مل لانزيم الكايتنيز والبروتييز Pr1 والبروتييز Pr2 واللايبيز على التوالي (Mishra *etal.*,2013) .

جدول (9) :التحري عن الانزيمات المنتجة من الفطر *M. anisopliae* في وسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين الغروي ووسط الحد الأدنى المدعم بالكازائين .

نوع الوسط	نوع الانزيم	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
MM+CCh*	بروتييز	1.07
	كايتينيز	2.48
	لايبيز	6.1
MM+Cas**	بروتييز	4. 11
	كايتينيز	1.09
	لايبيز	4.02

*Collidal chitin(MM+CC), **Casein(MM+C)

اما فيما يتعلق بإنتاج المضاد الحيوي فقد اعتمد على تثبيط بكتريا *S. aureus* كـ دليل على انتاجه ضمن الأوساط الأنتاجية الثلاثة وقد بلغ قطر تثبيط البكتريا 5.3 ملم في وسط انتاج المضادات الحيوية (جدول 10) في حين لم يلاحظ وجود فعالية تثبيطية عند استعمال الراشح المنتج من استعمال الوسطين المدعم بالكايتين الغروي والمدعم بالكازائين .

ان هذه النتيجة مشابهة لما وجده Liu وجماعته (2000) إذ اختبروا اضافة عدة أنواع من المصادر الكاربونية والنايتروجينية الى وسط انتاج الدستروكسين Czapek- Dox broth [CD broth] لزيادة انتاجه من الفطر *M.anisopliae* وتبين ان اضافة المالتوز Maltos كمصدر كاربوني والببتون Pepton كمصدر نايتروجيني هما الأفضل في زيادة انتاجية الدستروكسين كما ان اضافة الحامض

الاميني B-alanine بنسبة 0.1% الى الوسط الانتاجي قد زاد الانتاجية الى الضعفين مقارنة بمجموعة السيطرة وهذا يدل على ان اضافة هذا الحامض هو المفتاح لبناء حلقة الدستروكسين، إذ يرتبط حامض $\alpha - Hydroxy$ مع $\beta - alanine$ خلال البناء الحيوي لهذا المنتج .

قام Liu وجماعته (2007) باستعمال نفس مكونات وسط إنتاج الدستروكسين [المالتوز، باكتو-ببتون Bacto-pepton ، بيتا- الآنين، كلوكوز] لغرض دراسة العوامل المؤثرة على إنتاج الدستروكسين A و B من الفطر *M.anisopliae* ووجد ان الرقم الهيدروجيني (9) هو الأمثل لإنتاج الدستروكسين A و B إذ بلغت قيمة الإنتاجية (71.0 و 310.6) ملغم/لتر على التوالي كما ان اقصى إنتاجية للدستروكسين B وصلت إلى 700.0 ملغم/لتر عند نسبة تهوية (1.5vvm) .

ان عدم تثبيط بكتريا *S. aureus* بالمستخلص الناتج من وسط الحد الأدنى المدعم بالكايتين الغروي أو الكازائين قد يعود إلى عدم إنتاجية المضاد الحيوي (الدستروكسين) في هذين الوسطين وهذا قد يرجع إلى قصر فترة التخمر المستخدمة في هذه الدراسة، إذ عادة تكون فترة التخمر 12-14يوم. (Liu *etal.*,2000 ; Liu *etal.*, 2007) .

يوجد اكثر من 35 مركب مختلف له علاقة بالدستروكسين عزل من بيئة الفطر *M. anisopliae* (Pedras *etal.*,2002) وعزل الدستروكسين لأول مرة من الفطر *M. anisopliae* غير انه عزل أيضاً من فطريات ممرضة أخرى مثل *Alternaria brassicae* (Ayer and Pena-Rodriguez,1987) . والفطر *Trichothecium roseum* (Springer *etal.*,1984) والفطر *Ophisophaerella herpotricha* (Venkatsubbaiah *etal.*,1994) وعلى الرغم من ان الدستروكسين شُخص لأول مرة من الفطر *M. anisopliae* إلا أن بعض عزلاته تكون قليلة الإنتاجية أو معدومة الإنتاجية (Wang *etal.*,2003) إ ذ إن إنتاج الدستروكسين يعتمد على نوع السلالة ونوع المضيف (Skrobek *etal.*,2008) .

يقوم الدستروكسين بعدة وظائف إذ إنه يعد كمضاد للسرطان Antitumoral أو مضاد فايروسي antiviral أو قاتل للحشرات insecticidal أو سام للخلايا cytotxic أو مثبط للمناعة immunosuppressant أو سام للنباتات phytotoxic (Liu and Tzeng, 2012) كما ان الدستروكسين يعد مثبط لنمو مختلف سلالات البكتريا (kaijiang and Roberts,1986;Dumas *etal.*,1995) وهذا يؤكد ما وجد في نتيجة الدراسة الحالية إذ وجد ان هنالك تثبيط لنمو بكتريا *S. aureus* من قبل المضاد الحيوي المنتج من قبل الفطر*M. anisopliae* .

جدول (10) :التحري عن المضاد الحيوي المنتج من الفطر *M. anisopliae*

نوع الوسط	قطر الفعالية التثبيطية (ملم)
MM+CC*	0.0
MM+C**	0.0
DTX***	5.3

3-4 تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

ان انتاج الانزيمات يتأثر بصورة كبيرة بأيض الخلية المايكروبية المنتجة لها والذي بدوره يتأثر كثيرا بمكونات الوسط الذي تنمو فيه هذه الكائنات المجهرية (Gearage *et al*.,1995) .

رغم ان الطبيعة الوراثية للكائنات المجهرية تؤثر كثيرا في انتاجها للأنزيمات غير ان لمكونات الوسط الكيميائية كالمصدر الكاربوني والنتروجيني ونسبتهما الى بعضهما البعض ونوع الايونات المعدنية وتركيزها الأثر الكبير في تحديد خصائص الانزيمات المنتجة فضلا عن ان تلك الخصائص تتأثر بالصفات الفيزيائية للوسط مثل الرقم الهيدروجيني للوسط ودرجة الحرارة وسرعة الرج وتهوية الوسط وحجم اللقاح ومدة الحضن (Kole *et al*.,1998 ; Reddy *et al*.,2011) ،لذا يعد تحديد الظروف المثلى لنمو الكائنات المجهرية من الامور ذات الاهمية البالغة للوصول الى افضل نمو لهذه الاحياء وبالتالي اقصى انتاجية للأنزيمات نظرا لاهميتها في الحفاظ على التوازن بين مختلف مكونات الوسط والتقليل من كمية المكونات غير المستخدمة في نهاية العملية التخمرية .(Kathiresan and Manivannan,2006)

1- تأثير تركيز المصدر الكاربوني

يبين الشكل (8) أن أفضل تركيز لعصير التمر لإنتاج إنزيم البروتييز هو 0.05 % إذ بلغت الفعالية النوعية 3.34 وحدة /ملغم بروتين ، وفي ضوء هذه النتائج تم استعمال عصير التمر بتركيز 0.05 % لإنتاج الإنزيم في مراحل البحث اللاحقة جميعها.

ان لتواجد المصدر الكاربوني في وسط التغذية اهمية في انتاج الانزيمات وذلك لأهميته في تحرير الطاقة التي تحتاجها الكائنات المجهرية للنمو وانتاجها للانزيمات (Haq *et al*.,2008 ; Ire *et al*.,2011) .

تتباين المصادر الكاربونية في انواعها وتراكيزها وفقا لاحتياجات الكائنات المجهرية (Jaswal *et al*.,2008) وان البحث عن مصادر كاربونية جديدة ورخيصة ومتوافرة في البيئة يعد

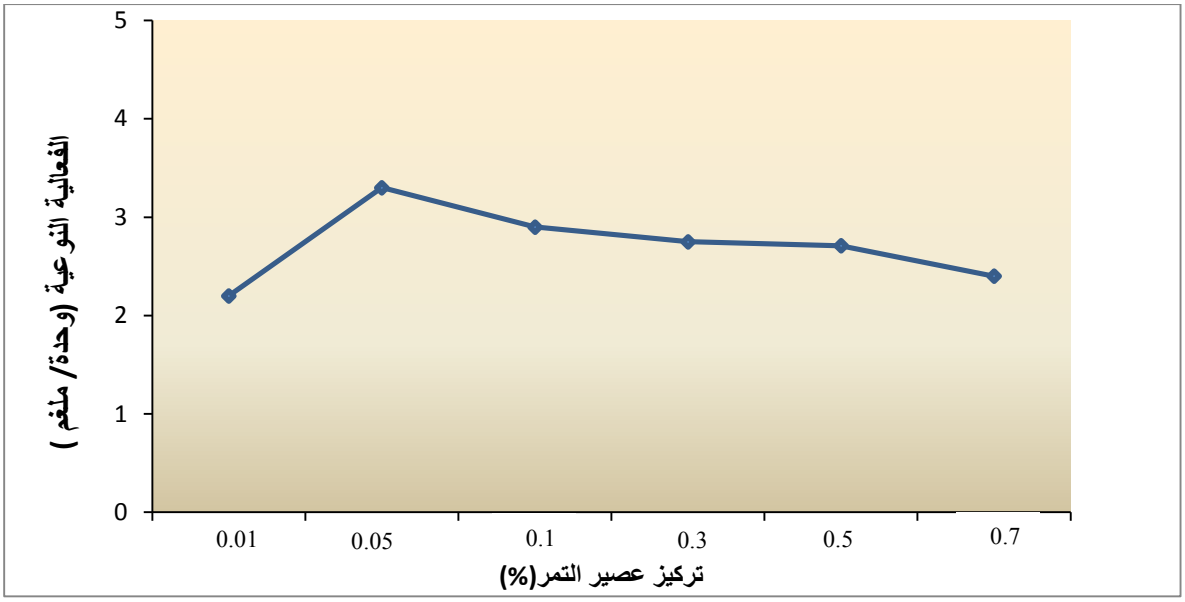
هدفاً اساسياً تقام عليه البحوث العلمية وذلك لارتفاع اسعار السكريات النقية والهايدروكاربونات(Dahot ,1994) لذا تم اختيار عصير التمر Date syrup (DS) والمستحصل عليه من ثمار الصنف الزهدي الذي تحتوي ثماره على نسبة عالية من السكريات تصل الى74% معظمها سكريات مختزلة (بلاكت,1988) .

يحتوي عصير التمر فضلا عن السكريات على الاحماض الدهنية و الاحماض الامينية والبروتينات والفيتامينات مثل فيتامين C والمعادن مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والبوتاسيوم والصوديوم (AI-Khateeb,2008) لذا عُدَّ مصدرا بديلا للكاربون والايونات المعدنية ويحوي المغذيات الكافية لنمو الاحياء المجهرية (Khiyami *etal*.2008 ; Mossavi- Nasab and Yousefi , 2011) .

تناولت دراسات عديدة انتاج انزيم البروتييز من الاحياء المجهرية باستعمال مصادر كاربونية مختلفة وبتراكيز مختلفة ،اذ حصل Mohanty وجماعته (2008b) على اعلى انتاجية لانزيم البروتييز بنوعيه(Pr1) chymoelastase و(Pr2)trypsin like protease من الفطر *M. anisopliae* 892 عندما اضاف الى وسط الانتاج كيوتكل بعوض *Culex quinquefasciatus* وبفعالية نوعية بلغت (0.365 و0.308) وحدة/ملغم بروتين ،على التوالي، مقارنة مع كل من الوسط الذي اضيف له كيوتكل البعوض *Anopheles stephensi* والبعوض *Aedes aegypti* اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيمين (0.211 و0.258) و(0.154 و0.244) وحدة/ملغم بروتين على التوالي بعد 8 ساعات من الحضن .

استعملت نخالة الرز لانتاج انزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus oryzae* اذ بلغت اعلى فعالية انزيمية 1400 وحدة/ غم مقارنة بالفعالية الانزيمية 1000 وحدة/غم باستعمال نخالة الحنطة (Chutmanop *et al*.,2008).

بينت العبادي (2012) ان استعمال خميرة الخبز كمصدر كاربوني بنسبة 1.5% في وسط الانتاج للفطر *B. bassianin* قد اعطى اعلى انتاجية لانزيم البروتييز اذ بلغت الفعالية النوعية 638.2 وحدة /ملغم بروتين .

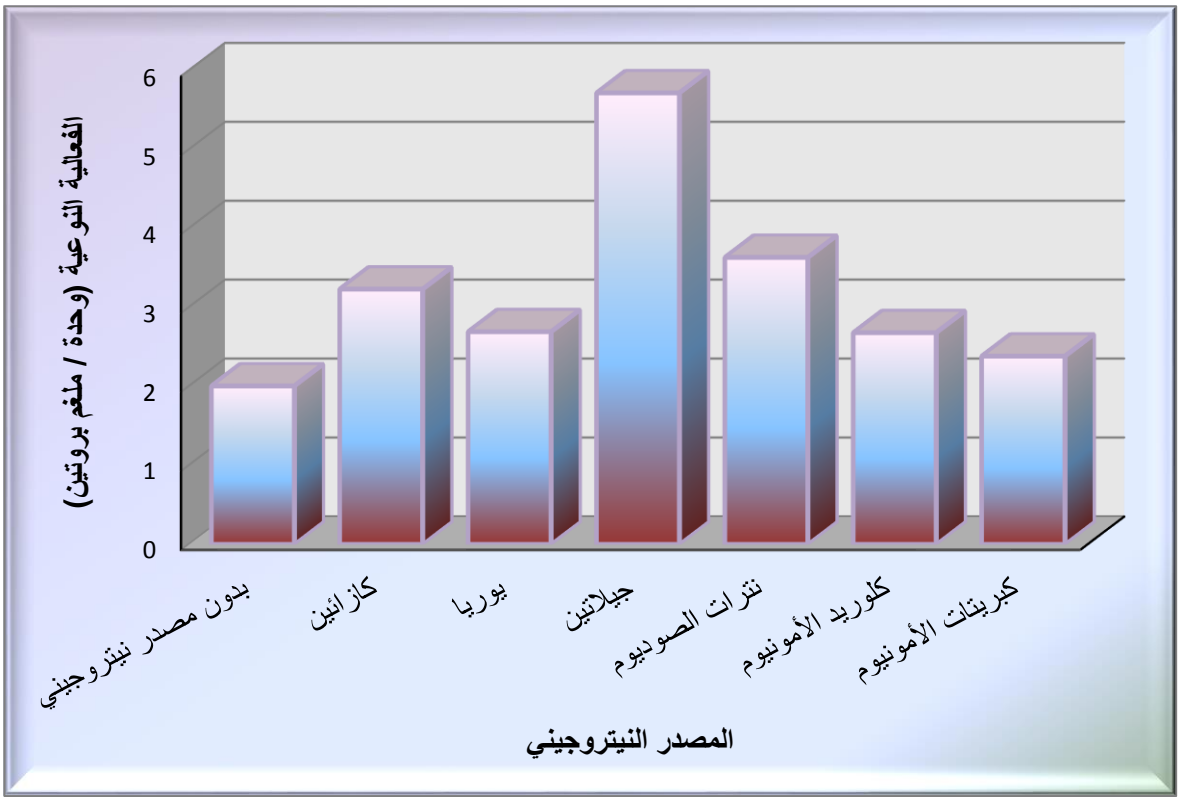


الشكل (8) : تأثير تركيز المصدر الكاربوني (عصير التمر) في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه

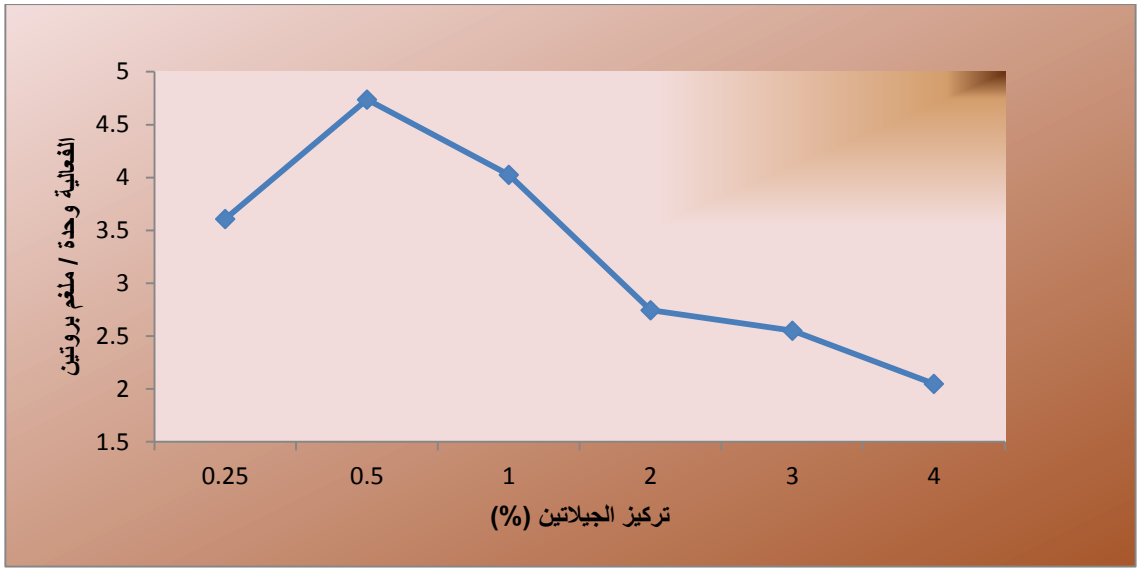
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (9) أن الجيلاتين هو المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيم مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية النوعية حدها الأقصى (5.714) وحدة / ملغم بروتين . في حين سجلت أوطأ فعالية نوعية للإنزيم بوجود كبريتات الامونيوم اذ بلغت (2.378) وحدة / ملغم بروتين .

وإستناداً لهذه النتائج تم إختيار الجيلاتين مصدراً نيتروجينياً لإنتاج إنزيم البروتييز في تجارب البحث اللاحقة كافة .



الشكل (9) : تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

وبعد أن تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم درست تراكيز مختلفة من الجيلاتين لتحديد التركيز الأمثل منه لإنتاج الإنزيم ، ويتبين في الشكل (10) إن اعلى فعالية نوعية 4.739 وحدة / ملغم بروتين عند استعمال تركيز 0.5 % من الجيلاتين، في حين إنخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستعمل في هذا البحث حتى وصلت اقلها عند التركيز 4 % من الجيلاتين اذ بلغت 2.048 وحدة / ملغم بروتين ، وبناءاً عليه فقد أُعتِمد هذا التركيز بالتجارب اللاحقة .



الشكل (10) : تأثير تركيز الجيلاتين في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

يعد المصدر النيتروجيني المستعمل في وسط الانتاج احد العوامل الاساسية المؤثرة في نمو الخلايا المايكروبية وله تأثير حاث او مثبط في انتاجها للأنزيمات (Wang *et al.*,2005)، وبالنسبة لانزيم البروتييز يعد المصدر النيتروجيني مكون اساسي وجوهري يدخل في بناء الاحماض الامينية (Patil and Chaudhari,2013) وعلى الرغم من استعمال عصير التمر الذي يحوي على المغذيات الكافية لنمو الاحياء المجهرية الا ان بعض الدراسات والتجارب اثبتت انه غير غني بالاحماض الامينية والدهنية لذا وجب تزويد الوسط المغذي للكائن المجهري بعوامل داعمة كالمصدر النتروجيني لغرض تحفيز انتاجه لمواده الايضية (Djilali *et al.*,2012)، لذا تم اختيار الجيلاتين كمصدر نتروجيني داعم لوسط تنمية الفطر *M. anisopliae* بعد ان اثبتت كفاءته في رفع مستوى انتاج انزيم البروتييز من الفطر المستعمل ، يعد الجيلاتين مصدرا نتروجينيا مهما اذ يتألف من العديد من الاحماض الامينية والسكريات اذ وجد على الاقل 75% من السكريات السداسية الموجودة في الكولاجين (Cllagen) الذي يعد مصدر تصنيع الجيلاتين ترتبط بالمشتق الاميني Hydroxylysine بآصرة كلايكوسيدية O-glycoside linkage وان قسم من هذه السكريات ومنها سكر الكلوكوز تبقى الى حد ما مرتبطة بمكونات النتروجين (Wood,1958) لهذا عد الجيلاتين مصدرا كاربونيا جيدا من لدن بعض الباحثين .

وجد ان النتيجة المستحصل عليها خلال هذه الدراسة لاتتفق مع نتيجة (Clarkson,1996) الذي بين ان الجيلاتين هو الافضل كوسط زرعي سائل لزيادة انتاج الكتلة الحيوية للفطر *M. anisopliae* دون ان يكون هنالك استحثاث لانتاج او افراز انزيم Serine endoprotease (Pr1) الذي ينتجه

غالبا هذا الفطر وغيره من الفطريات مثل *Aschersonia aleyrodis* و *Verticillium lecanii* و *B. bassiana* والذي يفرز في الغالب من العضو الضاغط appressorium اثناء عملية الاختراق لكيوتكل الحشرات .

تتفق نتيجة البحث الحالي مع ماذكره الباحثان Bidochka وKhachatourians (1988) بأن استعمال الجيلاتين بتركيز 1% له دور فعال في تحفيز وزيادة انتاج انزيم البروتييز المحلل للبروتينات من فبل الفطر *B. bassiana* .

كذلك اتفقت مع نتيجة الباحث Mohanty وجماعته (2008b) الذين وجدوا ان انتاج انزيم البروتييز المفرز من الفطر بنوعيه Pr_1 وPr_2 المفرز من الفطر 892 *M.anisopliae* قد ازداد ثلاث مرات نتيجة لاضافة الجيلاتين كمادة حاثة مقارنة مع معاملة السيطرة .

كان البيبتون المصدر النتروجيني الأكفأ في انتاج انزيم البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* اذ بلغت الفعالية الانزيمية 12.71 وحدة/مل (Haq *et al*.2008) .

وجد أن كبريتات الأمونيوم هي المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيمين من الفطر *B. bassiana* مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية النوعية حدها الأقصى لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (676.47 و20.43) وحدة / ملغم بروتين ، على التوالي . في حين ظهرت أوطأ فعالية نوعية للإنزيمين بوجود اليوريا اذ بلغت قيمتها (208.85 و2.55) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي أيضاً .(العبادي ، 2012)

قد يفسر ذلك الى ان الجينات المشفرة للانزيمات المطلوبة لاستهلاك النتروجين تنظم عادة بآليات استحثاث او تحفيز متخصصة تخضع الى آلية سيطرة رئيسية تعرف بآليات كبح ايض النتروجين (Nitrogen metabolic repression) وتبعا لهذه الآليات فالجينات تعبر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط، اما عند النمو بوجود مصادر نايتروجينية جاهزة ومفضلة فأنه يؤدي الى اعطاء اشارة لا يقاف التعبير الجيني للانزيمات المحللة (Marzluf,1997) وهذا مابينه Larcher وجماعته (1996) اذ لاحظوا ان اعلى انتاج لانزيم البروتييز من الفطر *Scledosporium apiospermum* يكون عند تركيز الببتون 0.1% في حين ان زيادة التركيز في الوسط الى 1% ادى الى زيادة في معدل نمو الفطر وانخفاض كبير جدا في انتاج الانزيم .

كما لاحظ Ashur وجماعته (1996) ان كلا من الببتون والكازائين يحفز تراكم انزيم البروتييز في الوسط الزرعي لفطر *A. terreus* وبالتالي انخفاض الفعالية الانزيمية وذلك لان هذه المصادر النيتروجينية البسيطة تكون حاوية على عدد كبير من الاحماض الامينية والببتيدات الصغيرة وبذلك تؤدي الى ايقاف انتاج الانزيم بآلية كبح الايض الهدمية (Catabolic repression) ، ان المصادر النتروجينية العضوية المعقدة تكون مصدرا لتراكيز متباينة من الاحماض الامينية الحرة والببتيدات

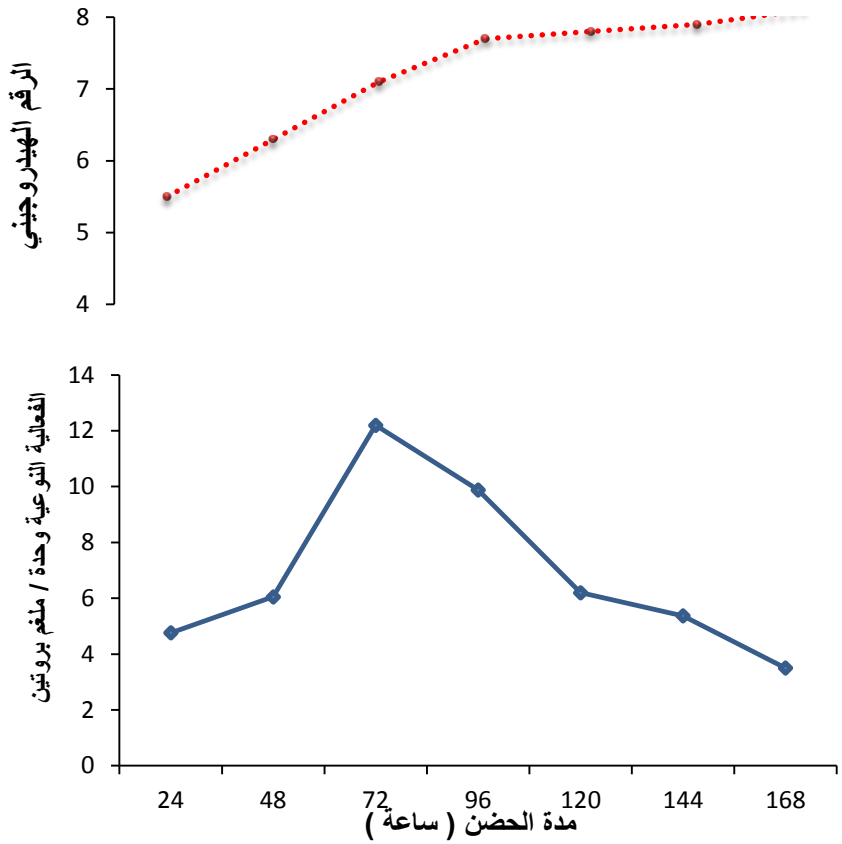
التي يكون لها تأثيرا مهما في تنظيم انتاج انزيمات البروتييز حسب الآلية المذكورة سابقا قد تكون الاحماض الامينية بتراكيز قليلة غير كافية لحث انتاج الانزيم او بتراكيز مثلى لحث الانتاج فتسبب اعلى انتاج للانزيم او انها قد تكون بتراكيز عالية فتسبب كبح انتاج انزيمات البروتييز (Egorov *et al*.,1983).

3- تأثير مدة الحضن

يوضح الشكل (11) أن إنتاج الإنزيم يبدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 4.76 وحدة /ملغم بروتين ليصل إلى أقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 12.25 وحدة / ملغم بروتين.

تتفق هذه النتيجة مع ماذكره Ito وجماعته (2007) ان 80% من فعالية انزيم البروتييز المنتج من الفطر *B. bassiana* قد بدأت بعد 24 ساعة من الحضن و وصلت اقصاها بعد 120 ساعة.
ومع ماوجدته العبادي (2012) التي ذكرت ان انتاج انزيم البروتييز المفرز من الفطر *B. bassiana* قد بدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 133.3 وحدة / ملغم بروتين ليصل الى اقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 1304.34 وحدة /ملغم بروتين .
ان الافراز المبكر والسريع لانزيم البروتييز يدل على وفرة وغزارة المواد الغذائية في وسط التنمية الذي يحوي متطلبات النمو للكائن المجهري فضلا عن متطلبات انتاجه للانزيم (Qureshi *et al*.,2011; Pandit and Maheshwari,2012) .

وفي ضوء هذه النتائج فقد تم تثبيت مدة حضن قدرها 72 ساعة لأفضل إنتاج من الإنزيم وتم إستخدامها في التجارب كافة . بينما وجد كل من Dhar وKaur (2010) عند تحديد اعلى انتاجية لانزيم البروتييز المفرز من قبل اربعة عزلات للفطر *M. anisopliae* اذ كانت في الايام 4-6 يوم من بداية الحضن ، ولاحظ Ali وجماعته (2011) بأن مدة حضن مقدارها 5 أيام هي المثلى لانتاج انزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* IF 28.2 .



الشكل (11) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم البروتييز من *الفطر M.anisopliae*

بينما اتفقت نتيجة البحث مع مابينه Campos وجماعته (2005) في حال انتاج انزيم البروتييز من كل من الفطريات *B. bassiana* و *B. amorpha* ، ومع ماوجده Haq وجماعته (2006) عند انتاج انزيم البروتييز من الفطر *Penicillium griseoroseum* ، وكذلك ، وهذا ماأكده ايضا Simkoviê وجماعته (2012) بالنسبة للفطر *Trichoderma atroviride* ، وايضا بالنسبة للفطر *Rhizopus* sp. التي اعطت اعلى انتاجية لانزيم البروتييز المتعادل بعد مرور ثلاثة ايام من بداية الحضن (Sumantha,2006 b) .

ان استعمال اوساط زرعية مختلفة لتنمية الاحياء المجهرية ينتج عنه اختلاف في مدة الحضن اللازمة لإنتاج الانزيمات كما بين ذلك كل من Prakash و Padmaja (2012) اذ اوضحا ذلك بأستعمال سلالتين من الفطر *M. anisopliae* احداهما ذات انتاج عالي لانزيم البروتييز وهي سلالة M19 والاخرى ذات انتاج واطئ للانزيم وهي سلالة M10 وبأستعمال 7 اوساط زرعية احدها وسط

الحد الادنى (minimal media (MM) [وهو وسط مكون من املاح كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وفوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين $KHPO_4$ وكبريتات المغنسيوم $MgSO_4$] ان كلا السلالتين اعطت اعلى فعالية للانزيم خلال 72 ساعة بأستعمال وسط MM بينما اعطت سلالة M10 وسلالة M19 وبأستعمال باقي الاوساط الزرعية اعلى فعالية للانزيم خلال 96 ساعة و120 ساعة على التوالي .

واختلفت نتيجة البحث الحالي مع ماحصل عليه Braga وجماعته (1999) اذ اشاروا الى ان مدة الحضن المثلى لاعطاء اعلى انتاجية لانزيم البروتييز من سلالة 22 وسلالة CL11 العائدتين للفطر *M. anisopliae* هي خمسة ايام .

وتجدر الأشارة الى ان هنالك تبايناً واضحاً في مدة الحضن لانتاج الانزيم من الفطريات قد تطول او تقصر، فقد كانت مدة الحضن 96 ساعة هي المثلى لاعطاء اعلى انتاجية لانزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus flavus* AS2 (Rani *et al*.,2012) وفي الفطر *Nomuraea rileyi* كانت مدة الحضن المثلى 10 ايام (Nunes *et al*.,2010) اما في الفطر *Hirsutella rhossiliensis* فكانت مدة الحضن 12 يوم كافية للحصول على الانتاجية القصوى للأنزيم (Wang *et al*. , 2009) .

بعد مدة الحضن المثالية يبدأ إنتاج الإنزيم بالانخفاض تدريجياً حتى تصل الفعالية النوعية في اليوم السابع إلى(3.5) وحدة / ملغم بروتين، ان انخفاض انتاجية الانزيم عند زيادة مدة الحضن دليل على ان الانزيم من مواد الايض الاولية التي تطرح في الطور اللوغارتمي من نمو الفطريات مستفيدةً من توفر المواد الغذائية في الوسط الزرعي (Sumantha *et al*.,2006) ثم يبدأ بالانخفاض التدريجي والذي قد يعزى الى حدوث تغيرات في وسط النمو وبشكل خاص في قيمة الرقم الهيدروجيني ، وافراز الكائن الحي لانزيمات اخرى تعمل على تحطيم الانزيم قيد الدراسة (Al-juamily and Al-Zaidy,2012) ، او قد يكون السبب نضوب المواد الغذائية بمرور الوقت وانتاج مواد ايضية سامة (Romero *et al*.1998).

وفضلاً عن ذلك فأن الشكل (11) يشير ايضاً الى إزدياد قيمة الرقم الهيدروجيني تدريجياً عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5.5 لوسط التخمر ليصل إلى 7.1 بعد 72 ساعة حيث يصل إنتاج إنزيم البروتييز إلى أقصاه ، و بلغت أعلى قيمة للرقم الهيدروجيني في اليوم السابع 8.14 .

تتفق هذه النتيجة مع ماأشار اليه Braga وجماعته (1999) من ارتفاع الرقم الهيدروجيني التدريجي خلال فترة التخمر عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.45 لوسط تخمر السلالة 22 من الفطر *M. anisopliae* ليصل الى 7.78 في اليوم الخامس اذ تصل انتاجية انزيم البروتييز الى الذروة وليبلغ الرقم الهيدروجيني اعلى قيمة له 8.57 في اليوم السادس عشر من بداية الحضن ، اما بالنسبة

لسلالة CL11 من الفطر *M. anisopliae* فكانت النتيجة مشابهة للسلالة 22 اذ ارتفع الرقم الهيدروجيني تدريجيا عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.46 ليصل الى 8.14 في اليوم الخامس ثم يزداد ليصل الى 8.67 في اليوم السادس عشر من بداية الحضن .

تناظر نتائج البحث الحالية نتيجة العبادي (2012) اذ اشارت الى ازدياد الرقم الهيدروجيني تدريجيا عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.5 لوسط تخمر الفطر *B. bassiana* ليصل الى 7.0 بعد 72 ساعة حيث سجل اقصى انتاج لأنزيم البروتييز .

لعل ارتفاع الرقم الهيدروجيني خلال فترة التخمر يعزى الى وجود عصير التمر فضلا عن الجيلاتين اللذان يزودان الوسط بالاحماض الامينية الضرورية لتنمية الفطر *M. anisopliae*، اذ انه في حالة استعمال الاحياء المجهرية للمركبات الامينية العضوية لغرض النمو فأن ذلك يؤدي الى ارتفاع الرقم الهيدروجيني لكون هذه المركبات ستفقد مجموعة الامين مما يؤدي الى ارتفاع الرقم الهيدروجيني (الحيدري والمصلح،1989).

4- تأثير درجة الحرارة

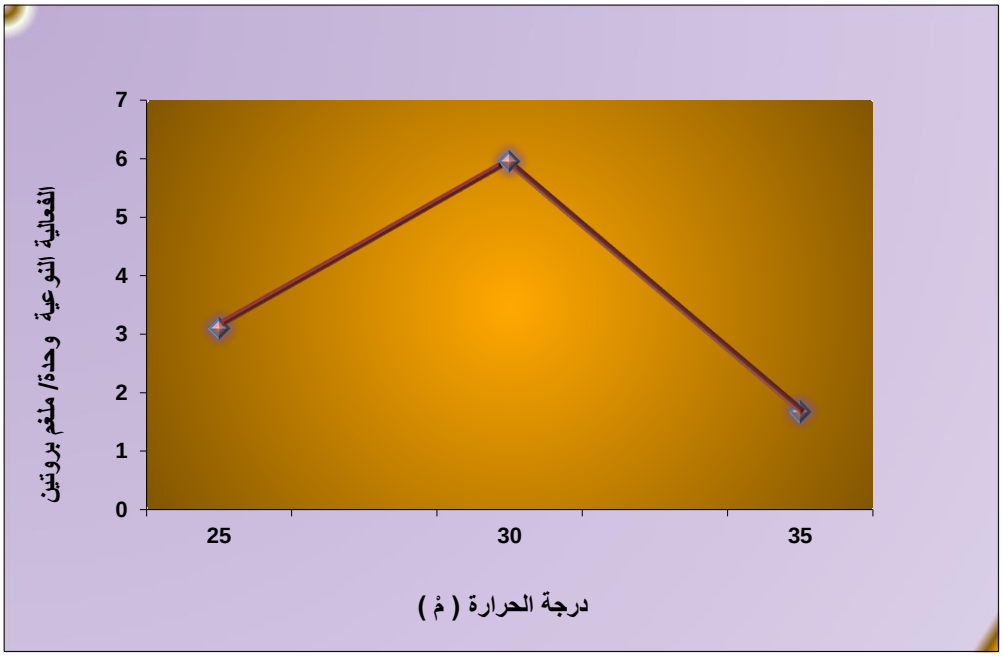
يوضح الشكل(12) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* ويبين إنخفاض إنتاج الإنزيم عند درجة حرارة 25 مْ إذ بلغت الفعالية النوعية (1.67) وحدة / ملغم بروتين يمكن تفسير ذلك بانه عند درجات الحرارة الواطئة تصبح الفعاليات الايضية للأحياء المجهرية بطيئة (Ellaiah and Srinivasulu,1996) . فيما إزدادت هذه الفعالية ووصلت إلى أقصاها عند الدرجة الحرارية 30 مْ حيث بلغت (95 .5) وحدة / ملغم بروتين ، مما يشير إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي 30 مْ والتي أعتمدت في التجارب اللاحقة كافة . وفضلاً عن ذلك فأن الشكل المذكور يوضح إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بإزدياد درجة الحرارة إلى 35 مْ ويمكن تفسير هذه الحالة أن درجات الحرارة العالية تؤثر عكسيا على العمليات الايضية للاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات المحللة للبروتين مسببة تثبيط نمو الفطر وبالتالي انتاج الانزيم (Irfan *et al*.,2011) .

تعد درجة حرارة الحضن معيارا حرجا يؤثر على كل من عمليتي بناء وافراز انزيم البروتييز القاعدي في الاحياء المجهرية (Peek *et al*.,1992;Engel *et al*.,1998) وذلك من خلال تأثيره على :-

1- عمليـــــة امتصـــــاص الاوكســـــجين وتزويـــــد الطاقـــــة لاداء الفعاليـــــات الايضـــــية (Frankena *et al.*,1986) .

2- عمليات النقل والترجمة لتصنيع البروتين (Votruba *et al.*,1991) .

3- تأثيرها على الخواص الفيزيائية للغشاء الخلوي (Rahman *et al.*,2005).



الشكل (12) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

ان النتيجة الحالية بهذا الخصوص لاتتفق مع ما أورده Ali وجماعته (2011) اذ اوضحوا أن درجة الحرارة 35 مْ هي التي تسجل عندها السلالات M408 وM440 وM460 للفطر *M. anisopliae* اقصى انتاجية لانزيم البروتييز القاعدي المعروف بـ Subtilisin-like (Pr1) وكذلك للانزيم Trypsin-like (Pr2) .

وان الدرجة الحرارية السابقة الذكر هي المثلى لانتاج انزيم البروتييز من سلالتي M10 (السلالة قليلة الانتاج لانزيم البروتييز) وM19 (السلالة غزيرة الانتاج لانزيم البروتييز) للفطر *M.anisopliae* (Prakash and Padmaja,2012).

واتفقت مع ماورد في العديد من الأبحاث لفطريات اخرى اذ وجد Haq وجماعته (2004) ان الانتاجية القصوى لانزيم البروتييز المفرز من السلالة الطافرة للفطر *Penicillium griseoroseum* HUV-21 كانت عند الدرجة الحرارية 30 مْ اذ بلغت الفعالية الانزيمية 58 وحدة / ملغم بروتين كذلك حصلت العبادي (2012) على اعلى انتاجية لانزيم البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* عند درجة الحرارة 30 مْ اذ بلغت الفعالية الانزيمية (887.66 و57.64) وحدة / ملغم بروتين لانزيمي البروتييز والكايتينيز على التوالي .

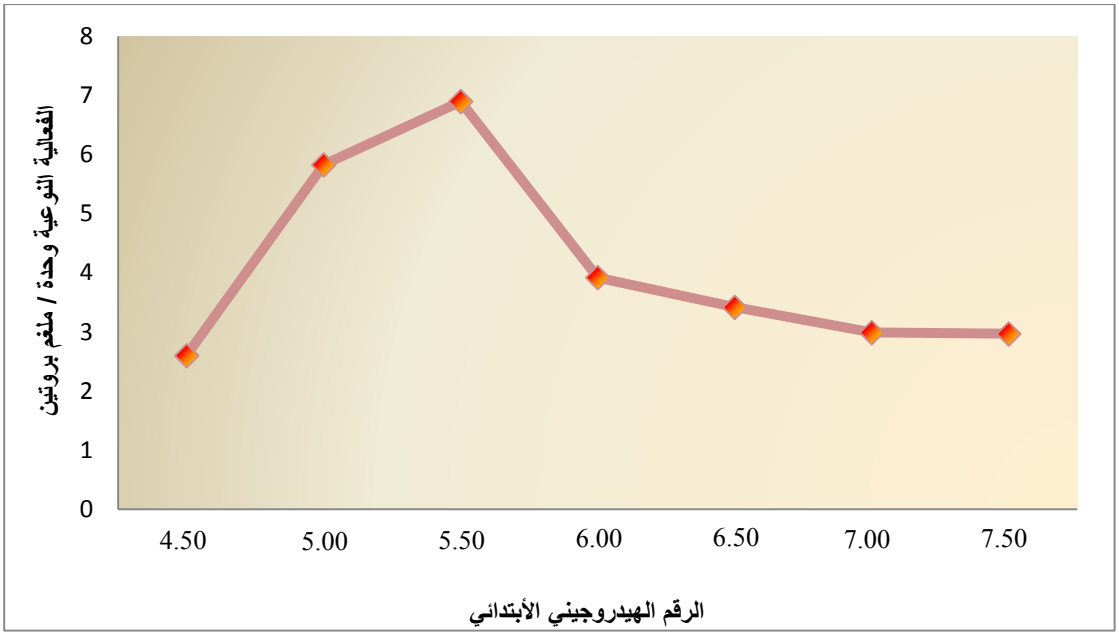
و تتباين درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم البروتييز بتباين الفطريات اذ استعملت درجة الحرارة 22 مْ لانتاج انزيم البروتيز من الفطر *T. harzianum* (Elad and Kapat,1999)، وكانت درجة الحرارة 28 مْ هي الملائمة للانتاجية المثلى لانزيم البروتييز من الفطر *Nomuraea rileyi* (Nunes *et al*.,2010) . و تحققت الانتاجية القصوى لانزيم البروتييز المفرز من الفطر *Aspergillus flavus* عند 30 مْ اذ بلغت الفعالية الانزيمية 45 وحدة / ملغم بروتين (Muthulakshmi *et al*.,2011) . كذلك أكد Chutmanop وجماعته (2008) على ان 30 مْ هي درجة الحرارة المثلى لانتاج اقصى كمية من انزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus oryzae* .

وقد يكون لنفس الفطر اكثر من درجة حرارية ملائمة لتحقيق اعلى انتاجية لانزيم البروتييز كما بين ذلك Krishna وجماعته (2009) اذ كانت درجتي الحرارة (27 و 30) مْ هي الملائمة للانتاج الامثل لانزيم البروتييز من الفطر *Penicillium* sp. .

5- تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي

إن تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** موضح في الشكل (13) إذ يلاحظ أن الفطر قادر على إنتاج الإنزيم بشكل أفضل في مدى رقم هيدروجيني (5 - 6) بيد أن أعلى إنتاج تحقق عند الرقم الهيدروجيني 5.5 اذ بلغت الفعالية النوعية لإنزيم البروتييز (6.90) وحدة / ملغم بروتين وانخفضت تدريجياً حتى وصلت أوطأ قيمة لها(2.97) وحدة / ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني 7.5 .

وبناءً على ما تقدم من نتائج فقد تم تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى 5.5 في مراحل البحث اللاحقة جميعها .



الشكل (13) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

يعد الرقم الهيدروجيني من العوامل المهمة التي تحدد نمو الفطريات وفعاليتها الحيوية أمرًا معقدًا، وتمتاز الفطريات بتحملها للأرقام الهيدروجينة الواطئة وان معظمها يمتلك رقمًا هيدروجينياً أمثلًا للنمو ما بين 5.0 - 6.0 (Berry,1975) .

ان إنتاج إنزيم البروتييز بوساطة الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على قيمة الرقم الهيدروجيني خارج الخلية إذ يتركز تأثيره على صفات الوسط الغذائي كذوبان المواد الغذائية وانتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات الناتجة من ذوبان ثاني أوكسيد الكاربون الذي يؤثر على السعة الدارئة للوسط الغذائي والتي ينعكس تأثيرها على نمو الفطر وإنتاجه للإنزيمات (Bull & Bushnel,1976).

كما ان للرقم الهيدروجيني تأثير كبير على العديد من العمليات الإنزيمية ونقل المكونات المختلفة عبر الغشاء الخلوي والذي بدوره يعزز نمو الخلايا وإنتاجها للإنزيم (Ellaiah *etal*.,2002; Akujobi *etal*.,2012; Ali and Vidhale,2013).

وقد ذكر Ramon وجماعته (1999) أن الرقم الهيدروجيني يؤثر على عملية الترجمة والاستنساخ وبناء البروتين ، أما Patil و Chaudhari (2013) فقد ذكرا أن للرقم الهيدروجيني تأثير في ميكانيكية التعبير الجيني المنظم للتفاعلات الأيضية، وأن تكوين المواد الأولية والثانوية الداخلة في العمليات الحيوية لإنتاج إنزيم البروتييز القاعدي تعتمد كثيرًا على الرقم الهيدروجيني للوسط.

اختلفت قيم الرقم الهيدروجيني المستخدمة في الدراسات البحثية لإنتاج انزيم البروتييز باختلاف الأحياء المجهرية فقد أكد Chutmanop وجماعته (2008) على ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي للمادة الأساس يؤثر على إنتاج انزيم البروتييز وتحقيقه أعلى فعالية إنزيمية من خلال دراستهم للظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus oryzea* إذ وجدوا ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لتحقيق أعلى انتاجية للإنزيم 7.5 . كما وجد Abdul Sahib (2009) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي (10) هو الأمثل لتحقيق أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز القاعدي من العزلة المحلية للفطر *Aspergillus niger* .

وفي دراسة للظروف المثلى لإنتاج البروتييز من الفطر *Paecilomyces marquandii* وجد Soares وجماعته (2010) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي(5) كان الأمثل في تحقيق أقصى إنتاجية لإنزيم البروتييز . وحصلت العبادي (2012) على أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المفرز من الفطر *B. bassiana* عند الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.5 إذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم 603.3 وحدة/ ملغم بروتين.

ان القيمة المستحصلة الحالية تتفق مع ما ذكره (Kucera ,1981) اذ وجد ان أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المفرز من الفطر *M. anisopliae* كانت عند الرقم الهيدروجيني 5.5 .

واتفقت مع نتيجة الباحثين Negi و Banerjee (2010) إذ وجدا ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5.5 كان الأفضل في إنتاج انزيمي البروتييز والأميليز من الفطر *Aspergillus awamori* MTCC6652 .

ولم تختلف نتيجة البحث الحالي مع نتيجة الباحث Dias وجماعته (2008) الذي أكد أن أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز Pr1 و Pr2 من الفطر *B. bassiana*(CG425) كانت عند الرقم الهيدروجيني 5.5 . كما استعمل الرقم الهيدروجيني ذاته من قبل Irfan وجماعته (2011) لتحقيق أقصى انتاجية لإنزيم البروتييز الحامضي من الفطر *Rhizopus oligosporus*-M30 .

ولم تتفق نتيجة البحث مع ما وجده كل من Dhar و Kaur (2010) إذ بينا أن اعلى انتاجية لإنزيم البروتييز بنوعيه Pr1 و Pr2 المفرز من 7 عزلات فطرية للفطر *M. anisopliae* كانت عند الرقم الهيدروجيني 7.0 . كذلك لم تتفق نتيجة الدراسة مع نتيجة الباحث Ali وجماعته (2011) إذا أكدوا أن أعلى فعالية لإنزيم البروتييز Pr1 و Pr2 المفرز من الفطر *M. anisopliae* كانت عند الرقم الهيدروجيني 8 إذ بلغت أعلى فعالية لإنزيم البروتييز Pr1

177.89 و 139.36 و 118.00 للعزلة M408 و M440 و M460 على التوالي. ولعل هذا الأختلاف في النتيجة الحالية يعزى الى اختلاف العزلة الفطرية المستعملة في البحث .

أن إنتاج كل نوع من أنواع إنزيمات البروتييز يتبع طريقة تعبير جيني مختلفة كاستجابة للرقم الهيدروجيني الخارجي (Ambient pH) إذ إن الإنزيمات تنتج عند الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده فعالة أو مؤثرة فقط (Ramon *etal*.,1999) .

6- تأثير حجم اللقاح

يعد تركيز اللقاح عاملًا حرجًا لأي عملية حيوية لكونه مؤثرًا في نمو الخلية وبناء الإنزيم لذا يجب أن يضاف بالمستوى الأمثل(Sandhya *etal*.,2004; Patil &Chaudhari,2013)

وأن تلقيح بيئة النمو بعدد معلوم من الأبواغ يعد من الطرائق شائعة الاستعمال في إنتاج الإنزيمات من الفطريات ، إذ تضمن الحصول على نتائج قابلة للتكرار وغير متذبذبة . يُعّرف Abusham وجماعته (2009) حجم اللقاح الأمثل بأنه الحجم الذي يحتوي عدد محدود ومعلوم من الأحياء المجهرية القادرة على الاستفادة من المغذيات المحدودة في الوسط الزرعي وتحقيق الإنتاجية القصوى من الإنزيم.

تبين النتائج الموضحة في الشكل (14) زيادة تدريجية في إنتاج الإنزيم مع زيادة أعداد الخلايا في كمية اللقاح المضافة إلى الوسط الزرعي حتى بلغت الفعالية النوعية أقصاها (11.35) وحدة / ملغم بروتين عند إضافة حجم لقاح مقداره 16% ، إلا أنها إنخفضت بعد ذلك لتصل إلى (4.91) وحدة /ملغم بروتين عند استعمال حجم لقاح 20 % . تعطي هذه النتيجة مؤشرًا على ان حجم اللقاح العالي ليس بالضرورة أن يعطي حصيلة عالية من الأنزيم وإنما ينتج عنه نفاذ المواد الغذائية من الوسط الزرعي بوقت مبكر فضلًا عن فقدان الأوكسجين وذلك للنمو السريع للمزرعة وتكتل الخلايا مما يؤدي إلى انخفاض نسبة السكر والأوكسجين المستهلكين وبالتالي انخفاض إنتاج الإنزيم

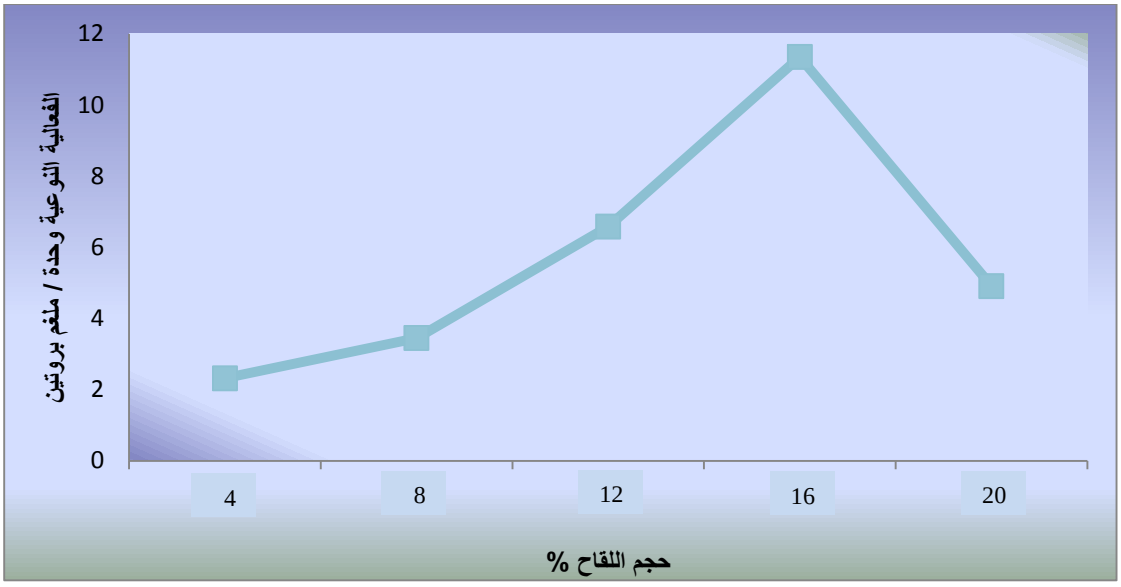
(Haritha *etal*.,2011; Muthulakshmi *etal*.,2011; Deb *etal*.,2013;Patil &Chaudhari,2013)

كما ان لحالة التنافس لهذه الأعداد الكبيرة من الخلايا تأثير على تمثيل العناصر الغذائية الأساسية في الوسط الزرعي وتغير الرقم الهيدروجيني له مما يؤثر سلباً في فعالية الإنزيم المنتج (سعود وآخرون، 2009) . لذا فقد تم استعمال حجم اللقاح 16% لإنتاج إنزيم في مراحل البحث اللاحقة اعتمادًا على النتيجة المستحصلة من هذا البحث .

وهنالك العديد من الدراسات أهتمت بدراسة العلاقة بين حجم اللقاح وبين كمية الأنزيمات المنتجة من فطريات مختلفة أما من خلال استعمال أعداد محدودة من الأبواغ أو من خلال استعمال حجوم معينة من اللقاح فقد وجد Paterson وجماعته (1994) أن حجم اللقاح 4×10^6 بوغ/مل هو الأفضل لإنتاج انزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* . واستعمل Braga وجماعته (1999) حجم لقاح مقدار 3×10^7 بوغ/ مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* . في حين قام كل من Ali وجماعته (2011) و Prakash و Padmaja (2012) باستعمال حجم لقاح مقداره 1×10^6 بوغ/ مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر المذكور نفسه.

اتفقت نتيجة الدراسة مع ما توصلت إليه العبادي (2012) في دراستها حول الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز والكايتنيز من الفطر *B. bassiana* إذ وجدت ان حجم اللقاح 16% هو الأمثل لإنتاج الإنزيمين وانخفض إنتاج الإنزيمين بزيادة حجم اللقاح إلى 20 %.

أكد Abdul Rauf وجماعته (2010) ان إنزيم البروتييز الحامضي المنتج من الفطر *Rhizopus oligosporus* وصل إلى أقصى إنتاجية عند الحجم اللقاح 1% ، بينما أوضح Shankar وجماعته (2011) ان 10% هو حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيم من الفطر *Beauveria* sp. . وكان حجم اللقاح 3 % هو الأمثل لتحقيق الإنتاجية القصوى لإنزيم البروتييز المفرز من الفطر *A. flavus* (MuthulakShmi *etal*.,2011) . أما الفطر *A. flavus* AS2 والمطفر وراثيًا فقد وصل إلى الإنتاجية القصوى لإنزيم البروتييز عند استعمال حجم لقح مقداره 10% (Rani *etal*.,2012) .



الشكل (14) : تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

7- تأثير سرعة الرج

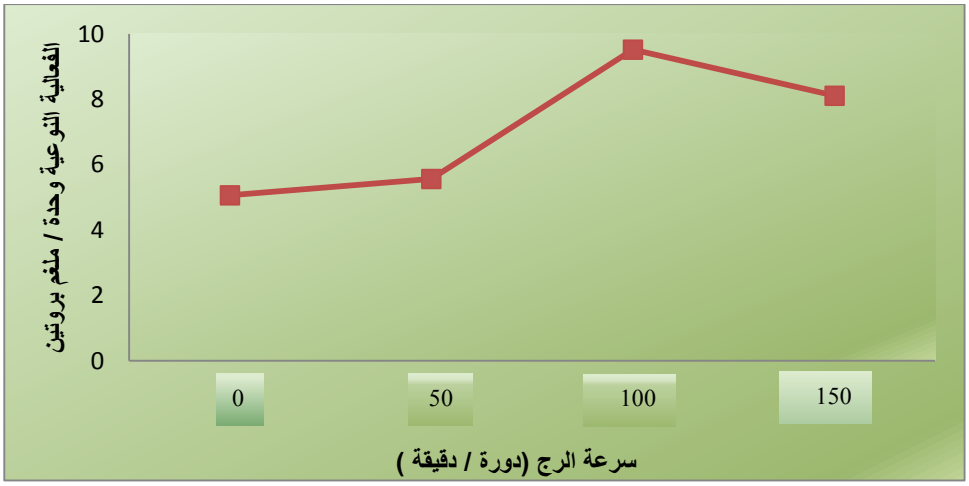
يوضح الشكل (15) أن أعلى فعالية نوعية لإنزيم البروتييز بلغت (9.52) وحدة /ملغم بروتين ، عند سرعة رج 100 دورة /دقيقة ، حيث تزداد تهوية الوسط الزرعي عند هذه السرعة والتي تكفي لتجهيز الأوكسجين الذائب والمواد الغذائية في الوسط مما ينتج عنه زيادة الإنتاجية ، بينما ظهرت أوطأ فعالية نوعية للإنزيم عند سرعة رج صفر (الوضع الساكن) ، إذ بلغت 5.07 وحدة / ملغم بروتين ويعزى ذلك إلى عدم كفاية التهوية والمواد الغذائية والتي تؤدي إلى عدم قدرة الفطر للنمو بشكل كفوء (Sepahy & Jabalameli ,2011) ، ان استعمال الحاضنة الهزازة في إنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية الهوائية كالفطريات يسمح بالاستغلال الأمثل لمكونات الوسط الزرعي فضلاًعن تكون طبقة رقيقة نسبيًا من البيئة (الوسط الزرعي) المهواة بوساطة الانتشار خلال سطح السائل عن طريق الحركة الرحوية للرج ، وبذلك يسمح الرج أو التحريك بمزج وتجانس مكونات الوسط الزرعي بشكل جيد وكفوء بحيث يستطيع الفطر من النمو في اتزان بين الإمداد من الهواء في الأعلى والإمداد من المواد الغذائية في الأسفل (Rhodes & Fletcher ,1966 ; Casida ,1968;Stanbury & Whitaker , 1984)

وقد أوجز كل من Genckal و Tari (2006) و Calik وجماعته (2002) فوائد الرج للوسط الزرعي بالآتي:

1) زيادة ذوبان الأوكسجين من خلال تحريك ومزج مكونات الوسط الزرعي.
2) تحسين توزيع المغذيات في الوسط الزرعي.
3) تشتيت أو تفريق الخلايا المتكتلة .
4) زيادة العمليات الايضية الهوائية خلال عملية التخمر.

كذلك يبين الشكل (15) إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بزيادة سرعة الرج اذ بلغت 8.12 وحدة /ملغم بروتين عند سرعة رج 150 دورة / دقيقة .

ان السرع العالية للرج لا تؤدي بالضرورة إلى زيادة إنتاج الإنزيم بل قد تؤدي الى تقليل إنتاجه من خلال مسخ الإنزيم وتحطيم الخلايا أو إنها تؤدي إلى تحلل الخلايا وزيادة نافذيتها نتيجة الاحتكاك بفعل قوى القص Shear forces (Singh *etal*,2007 b ; Haritha *etal*., 2011; Sepahy & Jabalameli,2011)



الشكل (15) : تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

و في ضوء هذه النتيجة تم تثبيت الحاضنة الهزازة على سرعة رج 100 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** وأعتمدت في مراحل البحث اللاحقة .

استعملت سرع رج مختلفة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* فقام كل من Patrson وجماعته (1994) و Mohanty و جماعته (2008 b) باستعمال سرعة الرج 150 دورة/دقيقة، بينما قام Ali وجماعته (2011) باستعمال سرعة الرج 180 دورة/دقيقة.

وقد استعملت سرعة الرج 150 دورة/ دقيقة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. flavoviride* (Tiago *etal*.,2002) كذلك كانت تلك السرعة هي المثلى في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتنيز من الفطر *B. bassiana* (العبادي،2012). والفطر *B. bassiana* و *B.amorpha* (Campos *etal*.,2005) ، وإنتاج البروتييز من الفطر *B. bassiana* (Rao *etal*.,2006; Ito *etal*.,2007) . أما Abdul Sahib (2009) فقد تمكن من الحصول على أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المنتج من العزلة المحلية للفطر *A. niger* عند سرعة الرج 140 دورة/دقيقة. ووجد Alves وجماعته (2005) ان سرعة الرج 120 دورة/دقيقة هي المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Muco*r sp. .

لم تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع ما وجد في الدراسات السابق ذكرها ولعل الفطر المستعمل في هذه الدراسة يعود لسلالة لا تحتاج إلى الأوكسجين بكميات كبيرة.

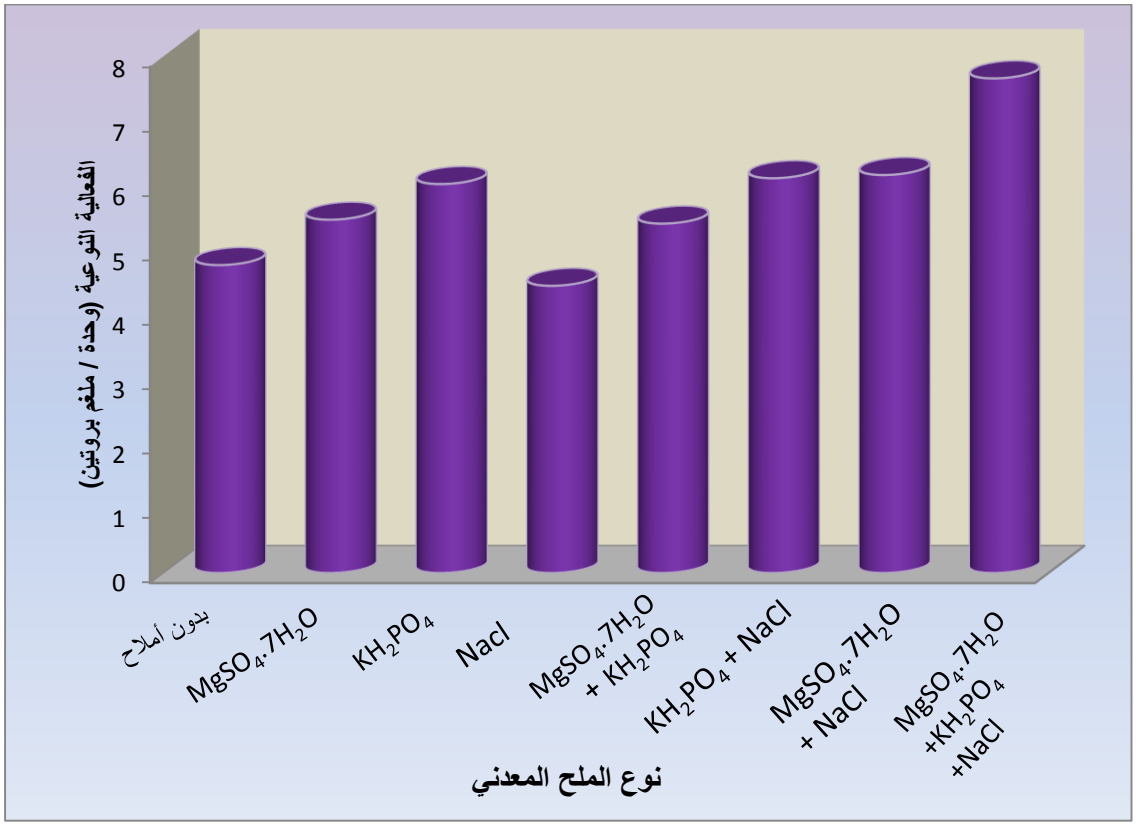
ان اختلاف سرع الرج باختلاف الأحياء المجهرية قد يعزى إلى الاختلافات في فسيولوجية الكائن المنتج للإنزيم ومكونات الوسط وحجمه بالدورق (Ghanem *etal*.,2011).

8- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها

يظهر من الشكل(16) إن لاستعمال الأملاح الثلاثة معاً تأثيراً تنشيطياً واضحاً في إنتاج إنزيم البروتييز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية النوعية (7.66) وحدة /ملغم بروتين ، بينما أظهرت المعاملة الخالية من الأملاح المذكورة أقل فعالية نوعية إذ بلغت 4.78 وحدة / ملغم بروتين ، وتدرجت المعاملات الاخرى في تأثيرها على انتاج الأنزيم بين المعاملة الثلاثية الاملاح والاخرى الخالية منها . غير ان المعاملة الحاوية على ملح كلوريد الصوديوم لوحده قد كان لها تأثيراً تثبيطياً على انتاج الأنزيم اذ كانت لها فعالية نوعية اقل من اقل معاملة (المعاملة الخالية من الاملاح) وقد بلغت قيمتها 4.46 وحدة / ملغم بروتين .

تعد الأملاح المعدنية (الأيونات المعدنية) أحد المغذيات الأساسية التي تحتاجها الأحياء المجهرية بمقادير ضئيلة للنمو وتكوين الإنزيمات وثبوتية واستقرار بعضها الآخر لكنها تختلف

بالاعتماد على مصدر الإنزيم (Stanbury & Whitaker ,1984; Ire *etal*.,2011) كما إن وجود بعض هذه الأيونات يزيد من الثبات الحراري للأنزيمات ويجعلها فعالة حتى عند درجات الحرارة العالية (Haq *etal*.,2006) .



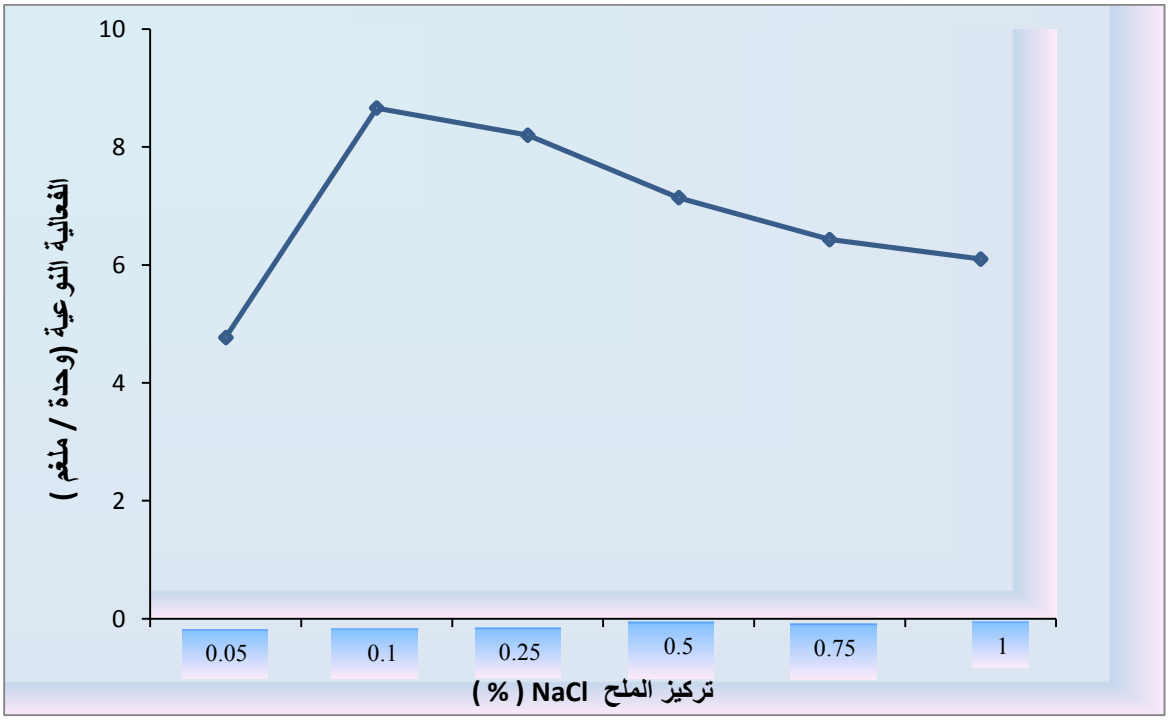
الشكل (16) : تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M .anisopliae*

يوجد العديد من الأبحاث التي أوضحت الدور الفعال للأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيم من الفطريات، فقد استعمل Prakash و Padmaja (2012) أملاح كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) وفوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (K_2HPO_4) وكبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ في انتاج انزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae* . ولإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana* استعمل Dhar و Kaur (2010) أملاح فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين(KH_2PO_4) 0.1 % وكبريتات المغنسيوم 0.05% وكلوريد الصوديوم 0.05%.

قام Saravanakumar وجماعته (2010) بتدعيم الوسط المنتج لإنزيم البروتييز من الفطر *A. fischeri* بكل من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (1) غم وكلوريد البوتاسيوم (1) غم وكبريتات الحديدوز المائية (0.02) غم و كبريتات المغنسيوم المائية (0.5) غم.

وفي ضوء النتائج اعلاه لقد تم التركيز على ملح كلوريد الصوديوم فقط لدراسة تأثير اختلاف تركيزه في انتاج انزيم البروتييز مع ثبوتية تركيز الملحين الآخرين (كبريتات المغنيسيوم المائية وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين) اذ درست تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم لتحديد التركيز الأمثل منه لإنتاج الإنزيم ، وقد سجلت أعلى فعالية نوعية عند استخدامه بتركيز 0.1 % وكما موضح في الشكل (17) اذ بلغت الفعالية النوعية (8.66) وحدة / ملغم بروتين، في حين إنخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز الملح فوصلت الى 6.1 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 1% من ملح كلوريد الصوديوم .

ان التراكيز العالية لملح NaCl تعمل على خفض إنتاجية البروتييز من الأحياء المجهرية (Ventosa *etal.*,1998) لكونها تسبب تغيرات في تركيب اللبيدات المكونة للغشاء الخلوي لخلايا الأحياء المجهرية (Suganthi *etal.*,2013) .



الشكل (17) : تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

اتفقت نتيجة البحث مع نتيجة الباحث Ire وجماعته (2011) إذ حصلوا على أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *A. carbonarius* عند تركيز 0.1 % لملح كلوريد الصوديوم . كذلك استعمل Haq وجماعته (2008) الملح المذكور نفسه بتركيز 0.1 % فضلًا عن فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبنفس التركيز لتدعيم الوسط المنتج لإنزيم البروتييز من الفطر *P. chrysogenum* .

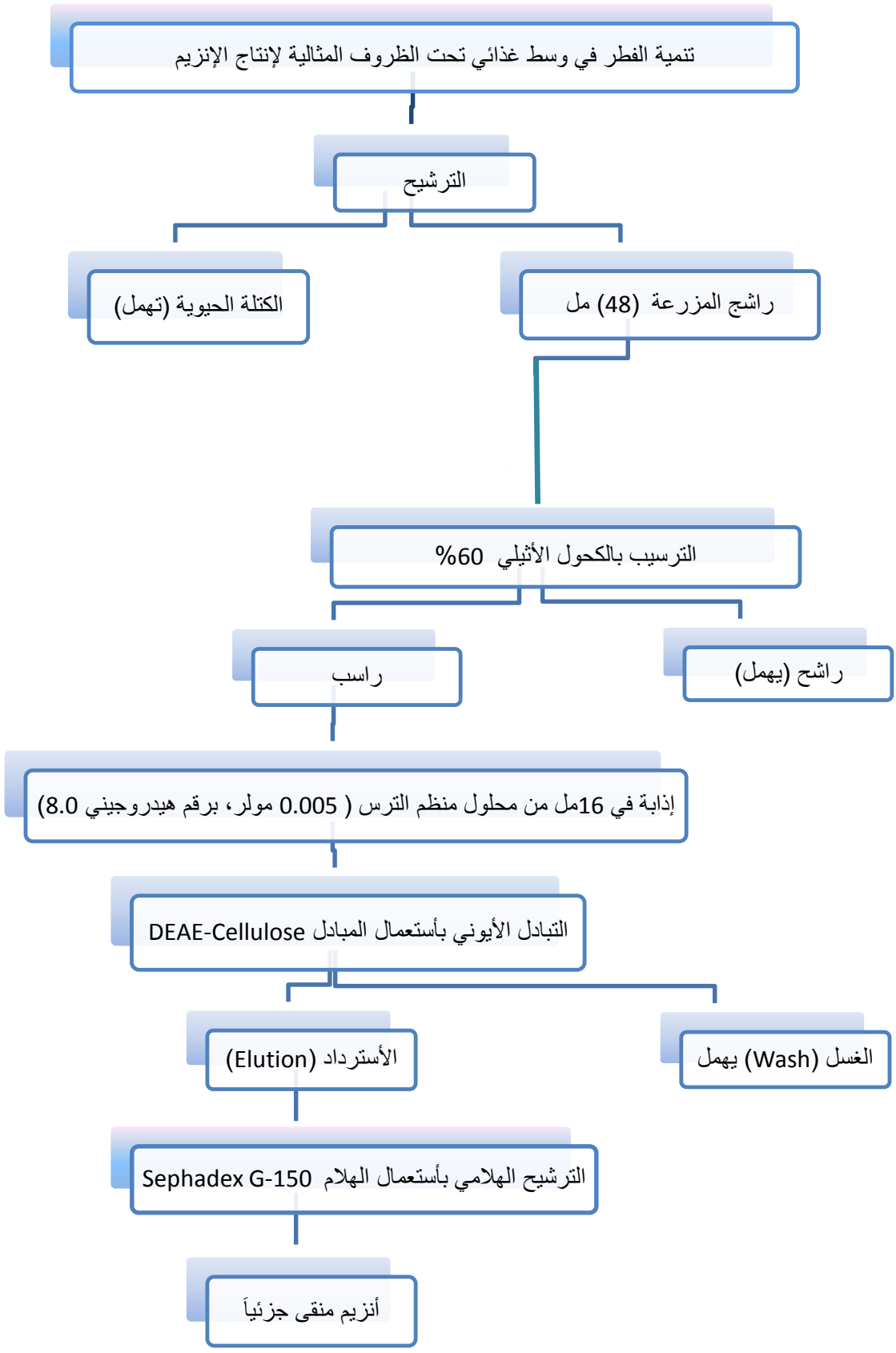
واختلفت النتيجة الحالية مع ما وجده الباحث Abdul Sahib (2009) عند دراسته للظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *A. niger* إذ حصل على أعلى إنتاجية للإنزيم عندما كان تركيز كلوريد الصوديوم 1%.

4-4 التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز

تم إنتاج 48 مل من إنزيم البروتييز وذلك بتنمية الفطر ***M. anisopliae*** في وسط الإنتاج المكون من عصير التمر 0.05 % والمدعم بـ 0.5 % من الجيلاتين كمصدر نايتروجيني و 0.1 % من كلوريد الصوديوم و تحت الظروف المثالية للإنتاج التي تم تحديدها من خلال التجارب السابقة ، لغرض استخدامه في تنقية الإنزيم .

خطوات التنقية :

جرت جميع خطوات تنقية الإنزيم تحت ظروف مبردة ، و يلخص المخطط 1 خطوات التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر ***M. anisopliae*** .



مخطط (1) : خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

1- الترسيب بالكحول الأثيلي

أظهرت النتائج أن 60 % هو التركيز الأمثل لترسيب إنزيم البروتييز وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية لإنزيم البروتييز بعدد مرات تنقية مقدارها 1.9 مرة و حصيلة إنزيمية مقدارها 56.37 % و كما هو موضح في (جدول 11) .

ان الهدف من عملية تركيز الأنزيمات عندما تتم في المراحل الأولى من التنقية هو التخلص من اكبر كمية ممكنة من الماء للحصول على محاليل بروتينية اكثر تركيزا ، فضلا عن تحقيق درجة من النقاوة عبر التخلص من البروتينات غير الأنزيمية (Reed, 1975) وتستخدم لهذا الغرض اما المذيبات العضوية مثل الكحول الأثيلي او الأسيتون ، او تستخدم الأملاح غير العضوية مثل كبريتات الأمونيوم او كبريتات الصوديوم او الكلوريدات في الغالب ، كما تستخدم البوليمرات العضوية بعملية التركيز مثل البولي اثيلين كلايكول (PEG) Poly ethylene glycol (White *et al.* 1973) .

يحدث الترسيب بالمذيبات العضوية مثل الإيثانول بسبب خفض ثابت العزل الكهربائي (dielectric constant) للوسط اذ يتغير تأثير الإذابة لجزيئات الماء المحيطة بالإنزيم مما يؤدي إلى زيادة التداخل بين جزيئات البروتين وبالتالي تكتلها ثم ترسبها(Whitaker,1972) . ولأنه من الممكن أن يفقد الإنزيم فعاليته بسهولة بهذه المذيبات فقد وجبت السيطرة على تركيز المذيب ودرجة الحرارة . ويعتمد الترسيب على كل من وقت المزج والذي يؤثر على تكوين التكتلات (Agglomerate) والفعالية الإنزيمية ، وقوى القص (Shear forces) المتولدة بوساطة المزج (Stirring) والتي تؤثر أيضاً على تكوين التكتلات (Aehle ,2004) .

جدول (11) : خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة/مليلتر)	تركيز البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الإنزيمي الخام	48	1.02	0.3	3.4	48.96	1	100
الترسيب بالكحول الأثيلي 60%	24	1.15	0.178	6.46	27.6	1.9	56.37
التبادل الأيوني باستعمال المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose (طريقة الوجبة Batch wise) الأسترداد بـ 0.3 مولاري كلوريد الصوديوم ثم الأسترداد بـ 0.6 مولاري كلوريد الصوديوم	22.2	0.5625	0.011	51.136	12.488	15.04	25.5
الترشيح الهلامي باستعمال المبادل Sephadex G-150	20	0.293	0.003	97.666	5.86	28.726	11.97

استعملت طرائق الترسيب بالأملاح والمذيبات العضوية في تنقية إنزيم البروتييز من الأحياء المجهرية ، استعمل Somkuti و Babel (1968) الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 85 % ثم بالكحول الأثيلي كخطوات اولية في تنقية انزيم البروتييز من الفطر *Mucor pusillus* وكانت الحصيلة الأنزيمية بعد الترسيب بالكحول الأثيلي 64 % .

استعمل الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع (60–75)% كخطوة اولية في تنقية انزيم البروتييز الخارجي من الفطر *B.bassiana* بعدد مرات تنقية 2.8 مرة وحصيلة انزيمية 47.4 % (Bidochka and Khachatourians,1987) .

وجرت تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات *Talaromyces flavus* و *T.harzianum* باستعمال المادة المذكورة آنفاً وتم الحصول على عدد مرات تنقية (3.8 و2.5) مرة وبحصيلة إنزيمية (68.1 و55.2) % ، على التوالي (Haggag *et al*. ,2006) .

وإستعمل Namasivayam وجماعته (2010) الترسيب بكبريتات الأمونيوم 80 % لدى تنقيته لإنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* .

في حين إستطاع Zanphorlin وجماعته (2011) الترسيب بالكحول الأثيلي كخطوة أولى في تنقية إنزيم البروتييز السيريني القاعدي من الفطر *Myceliophthora sp.* بعدد مرات تنقية 1.6 مرة وحصيلة إنزيمية 79.5 % .

وقام Shankar وجماعته (2011) باستعمال الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع (40- 70) % لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. وكانت الحصيلة الإنزيمية 69.5 % وعدد مرات تنقية 1.5 مرة .

وتم الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 70 % كخطوة اولية في تنقية انزيم البروتييز من الفطر *Pleurotus sajor-caju* وكان عدد مرات التنقية 1.08 والحصيلة الأنزيمية 73.33 % (Ravikumar *etal*.,2012)

وكانت الحصيلة الأنزيمية 41.47 % وبعدد مرات تنقية 1.728 مرة عند الترسيب بالكحول الأثيلي 70 % في عملية تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* (العبادي ، 2012) .

2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (طريقة الوجبة)

تشير النتائج المدرجة في الجدول (11) إلى إن عدد مرات التنقية للإنزيم بلغت 15.04 مرة و الحصيلة الإنزيمية 25.5 % عندما مرّرَ الإنزيم المنقى جزئياً الناتج من الخطوة السابقة في المبادل الأيوني الموجب الشحنة DEAE-Cellulose و بأستعمال محلول الأسترداد ذو التركيز 0.3 مولاري كلوريد الصوديوم ثم بأستعمال المحلول ذاته ذو التركيز 0.6 مولاري ولكون الإنزيم إرتبط بالمبادل في ظروف الفصل المستخدمة لذا فهو يحمل شحنة سالبة .

استعمل المبادل المذكور لما يتميز به من ميزات عدة جعلته من اكثر انظمة الكروماتوغرافيا شيوعا منها القدرة العالية على الفصل (High resolving power) والسعة العالية لاستيعاب البروتينات المرتبطة (High protein –binding capacity) ووضوح وبساطة مبدأ الفصل والذي يعتمد بشكل اساس على الأختلاف في الشحنة ، فضلاً عن كونه ملائما لفصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة وقلة احتمالية مسخ البروتين .(Jonson & Ryden ,1998 ; Karlsson *et al*. 1998)

اما طريقة الوجبة فهي تقنية تقليدية تستخدم في المراحل الأولى من تنقية الأنزيم وهي تستعمل في فصل الأنزيم بصورة متكررة من المبادل الأيوني (Bruton,1983) . استعملت طريقة الوجبة كخطوة في تنقية انزيم البروتييز الحامضي من الفطر *Penicillium duponti* K1014 وذلك من خلال تمرير الأنزيم عبر المبادل الأيوني CM-cellulose ذو الشحنة السالبة وبوجود محلول منظم الخلات (pH 4.0) ذو التركيز 0.01 مولاري وكانت الحصيلة الأنزيمية بعد هذه الخطوة 31.9 % (Hashimoto *et al*.1973) . ايضا تم استعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بطريقة الوجبة في التنقية الجزئية لأنزيم البروتييز من الفطر *Microsporum canis* بوساطة المبادل الأيوني السالب CM-cellulose ثم المبادل الأيوني الموجب DEAE-cellulose بطريقة العمود ، وكان عدد مرات التنقية المستحصلة من الخطوة الأخيرة 35.8 مرة والحصيلة الأنزيمية 62.1 % (شخير وجماعته ،2007) .

أستعملت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستعمال المبادلات الأيونية الموجبة الشحنة في العديد من دراسات تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات ، فقد تمت تنقية إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *Trichoderma viride* باستعمال المبادل DEAE- Sephadex A-50 وكانت الحصيلة الإنزيمية بعد إجراء التنقية بمقدار (20−30)% (Šimkovič *et al*. ,2008) .

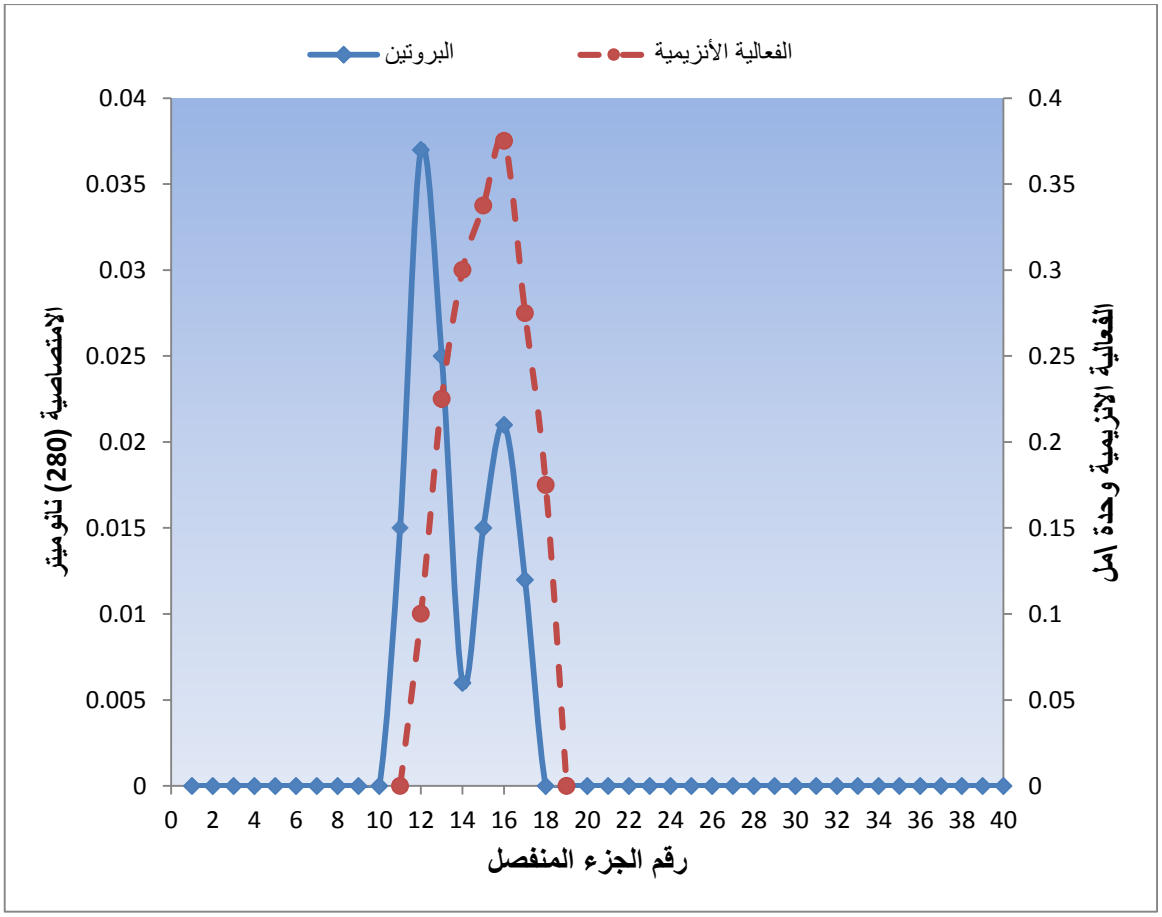
كما نُقي انزيم البروتييز من الفطر *A. niger* باستعمال المبادل المذكور آنفاً وكان عدد مرات التنقية بعد اجراء هذه الخطوة 34.42 مرة والحصيلة الأنزيمية 32 % (Devi *et al*., 2008) . واستعمله Shankar وجماعته (2011) في تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. و كان عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 10.02 مرة بحصيلة إنزيمية 38.6 % . كما

أستعمل المبادل المذكور في خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات *Neurospora crassa* و *Penicillium janthinellum* بعدد مرات تنقية (3.1 و9.3) مرة ، على التوالي وبحصيلة إنزيمية (76 و28) % ، على التوالي أيضاً (Abirami *et al.* ,2011) . واستعمل هذا المبادل ايضا من قبل العبادي (2012) في تنقية انزيم البروتييز القاعدي السيريني من الفطر *B.bassiana* ليصبح عدد مرات التنقية 2.13 مرة ولتصبح الحصيلة الأنزيمية 16.3 % . في حين استعمل المبادل الأيوني السالب CM-Cellulose في تنقية إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *A. tamari* بعدد مرات تنقية 26 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 50% (Sharma & De ,2011) .

3-الترشيح الهلامي

اعقبت خطوة التبادل الأيوني خطوة الترشيح الهلامي لتنقية انزيم البروتييز باستعمال هلام السيفاديكس Sephadex G-150 ، اختير هذا الهلام لان حدود الفصل فيه للبروتينات تتراوح بين 5-300 كيلودالتن (المظفر ، 1990) وهذا المدى يغطي الأوزان الجزيئية لأنزيم البروتييز القاعدي والتي يتراوح مداها بين 30- 39 كيلودالتن (Yang *et al*.2008) .

يوضح الشكل (18) الترشيح الهلامي للأنزيم والذي نتج عنه ظهور قمتين بروتينيتين في الأجزاء 11-17 وبتقدير الفعالية الأنزيمية اتضح وجود فعالية انزيمية في الأجزاء 12-18 وبعد جمع تلك الأجزاء بلغ حجمها 20 مللتر وبتقدير فعاليتها الأنزيمية فضلا عن البروتين ، امكن الحصول على فعالية نوعية 97.666 وحدة / ملغم بروتين وقد حققت هذه الخطوة من تنقية الأنزيم عدد مرات تنقية مقدارها 28.726 مرة وحصيلة انزيمية 11.97 % .



الشكل (18) : كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* باستعمال عمود Sephadex G -150 بأبعاد (1.4× 80) سم والذي تمت موازنته بمحلول منظم الترس (0.02 مولر ، برقم هيدروجيني 8.0) بسرعة جريان 20 مللتر / دقيقة وبواقع 4 مل / جزء

ورد استعمال هلام السيفاديكس في العديد من الأبحاث المتعلقة بتنقية انزيم البروتييز من الأحياء المجهرية ، فقد استعمل هلام SephadexG-75 في تنقية انزيم البروتييز من الفطر *M. pusilllus* وبلغ عدد مرات التنقية 34.0 مرة وبحصيلة انزيمية 55.0 % (Somkuti & Babel ,1968) . وأستعمل Hashimoto وجماعته (1973) هلام Sephadex G-200 في تنقية انزيم البروتييز من الفطر *P. duponti* K1014 وحققت هذه الخطوة حصيلة انزيمية بلغت 25.5 % .

استعمل الهلام Sephadex G-100 في تنقية انزيم البروتييز من الفطر *A. oryzae* لتصبح الحصيلة الأنزيمية 20.4 % وعدد مرات التنقية 33.76 مرة (Murthy & Naidu,2010).

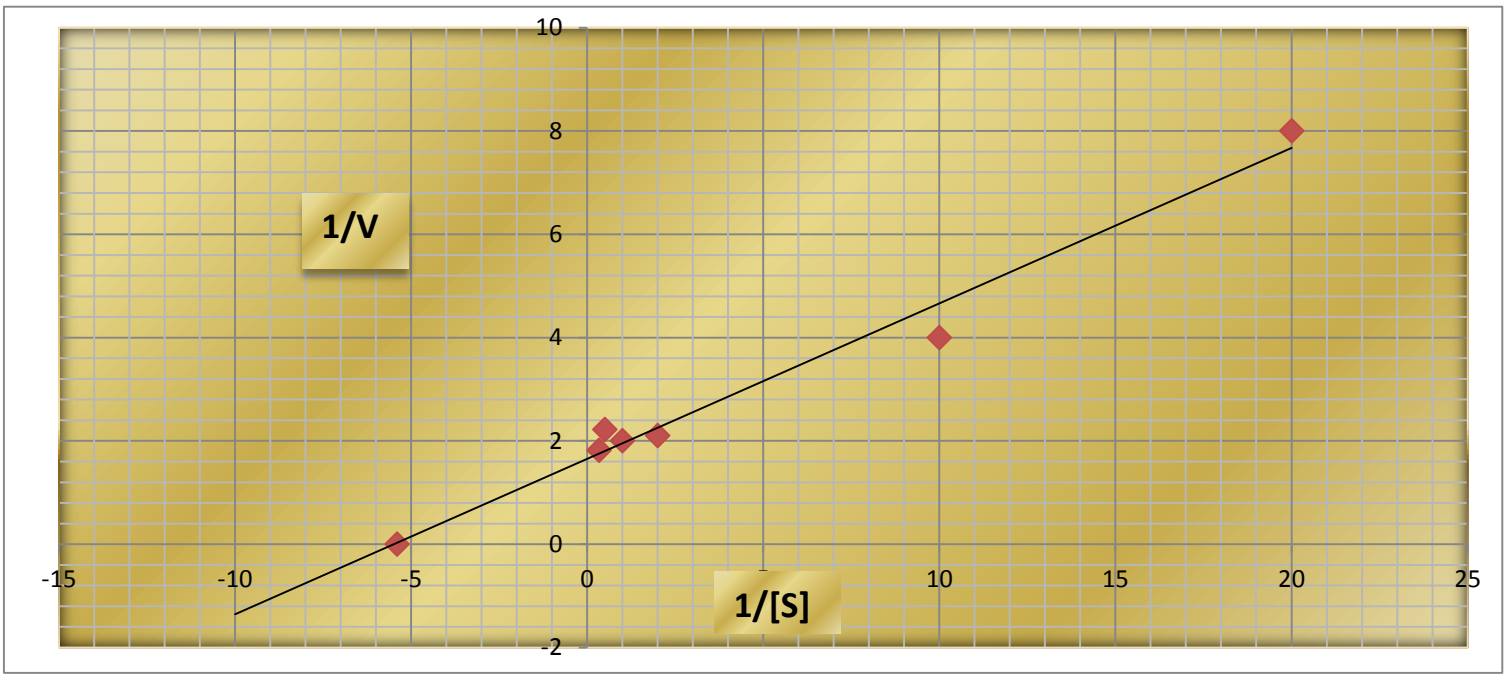
واستعمل الهلام Sephadex G-75 لتنقية انزيم البروتييز من الفطر *Rhizopus oligosporus* (Devi *et al*.2011) .

5-4 توصيف إنزيم البروتييز

أستعمل المستخلص الإنزيمي المتحصل عليه من خطوة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في دراسة بعض الصفات المهمة لإنزيم البروتييز .

1- الثوابت الحركية [ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max})] :

استعملت طريقة لاينويفر- بورك (1934) لتقدير ثابت ميكالس و السرعة القصوى لإنزيم البروتييز باستعمال مادة التفاعل الكازائين و بتراكيز انحصرت بين (0.05-3) % . يتضح من خلال النتائج أن قيمة ثابت ميكالس لإنزيم البروتييز بلغت 0.182 ملغم/ مل بينما بلغت قيمة السرعة القصوى 0.364 ملغم / مل . دقيقة ، (الشكل 19).



الشكل (19) : منحنى لاينويفر-بورك (1934) لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae* باستعمال الكازائين مادة تفاعل

يعد ثابت ميكالس K_m من أهم الثوابت المميزة للأنزيم كونه يعبر عن عدد من خواصه ولاسيما درجة ألفته لمادة التفاعل فكلما كانت قيمته واطئة كلما كانت ألفة الإنزيم عالية الارتباط بمادة التفاعل ، وتشير قيمة K_m الكبيرة إلى الحاجة إلى تركيز عالي من مادة التفاعل للوصول إلى نصف التشبع (ساجدي وعلي ، 1983 ; Whitaker,1972). ويختلف هذا الثابت باختلاف مصدر الإنزيم ومادة التفاعل(Segel,1976) ، وتعتمد قيمة K_m والسرعة القصوى V_{max} على تركيز مادة التفاعل والظروف المحيطة مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية (Voet & Voet,2010) .

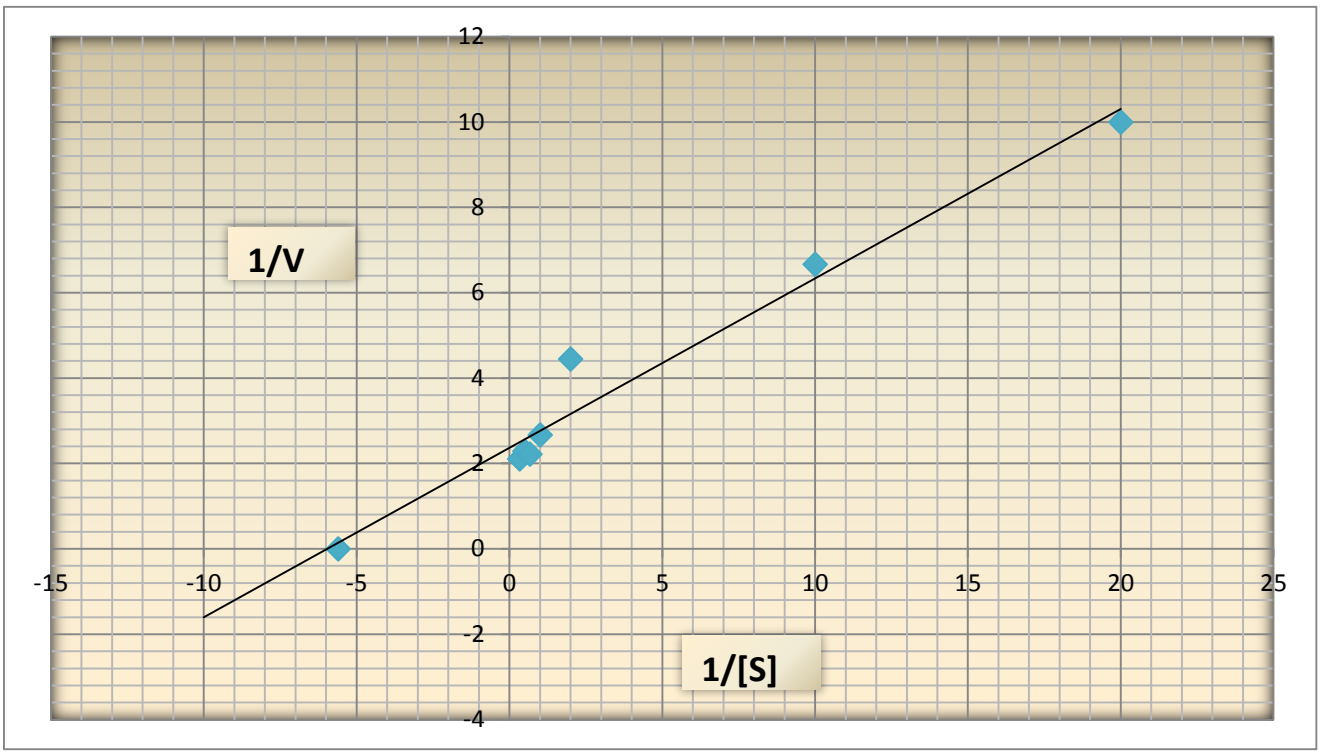
ذكـر Devi وجماعتـه (2008) عنـد توصـيف أنـزيم البروتييـز المنقـى جزئيًـا مـن الفطـر *A. niger* أن قيمـة K_m بلغت 0.8 ملغم/ مل و قيمـة V_{max} بلغت 85.0 وحدة/ملغم وبأستعمال الكـازائين كمـادة للتفاعل . أمـا Murthy و Naidu (2010) فقد حددا الثوابت الحركيـة لإنـزيم البروتييز المنقى من الفطر *A. oryzea* و وجدا ان قيمـة K_m 3.0 ملغم/ مل وقيمـة V_{max} 715 ملغم/مل . دقيقة وبأستعمال الكازائين كمادة للتفاعل .

وجدت العبادي (2012) أن قيمة الـ K_m بلغت 4.34 ملغم/مل وقيمـة الـ V_{max} بلغت 16.13 ملغم/مل .دقيقة و بأستعمال الكازائين كمادة تفاعل عند دراستها لصفات إنزيم البروتييز القاعدي والمنقى جزئيًا من الفطر *B. bassiana* .

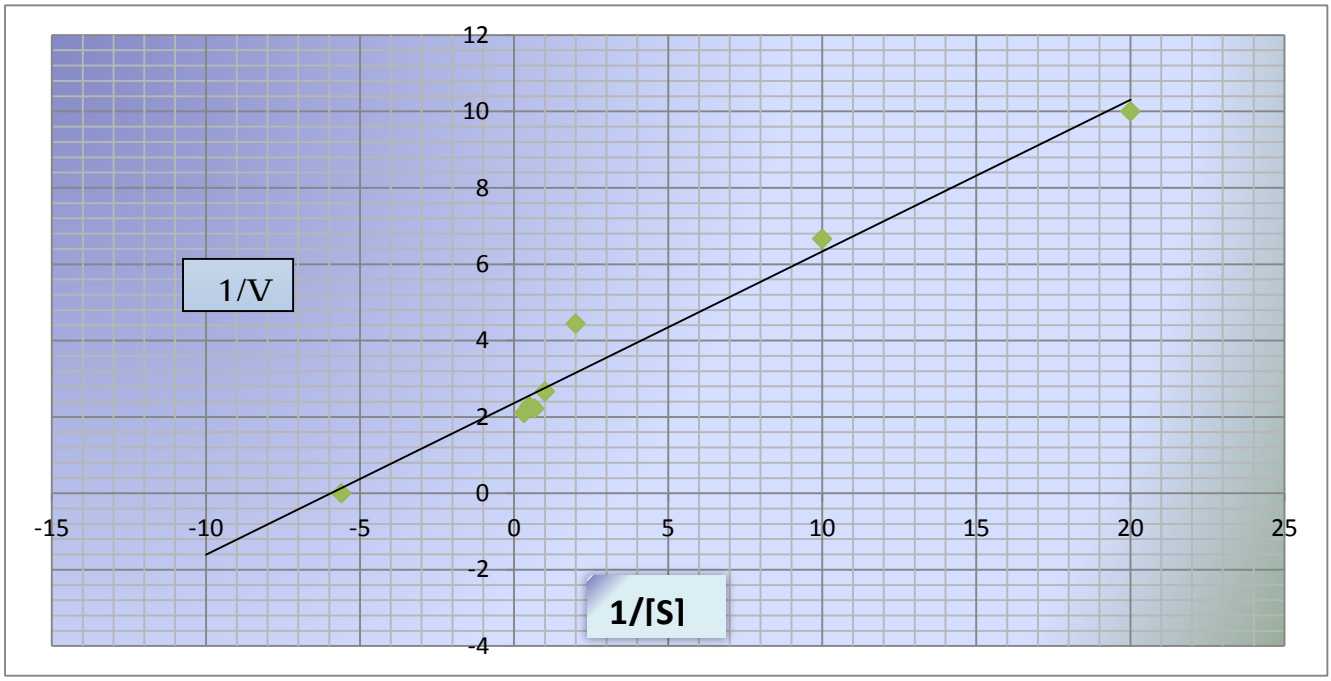
2- تخصص الإنزيم حيال مواد تفاعل مختلفة

يمتاز إنزيم البروتييز بتخصصه الواسع وفعاليته حيال العديد من مواد التفاعل سواء كانت صناعية أو بروتينات طبيعية (Gupta *etal*.2002) ، لذا تم التعرف على تخصص إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *M. anisopliae* ودرجة ألفته حيال كل من الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري بإعتبارها مواد تفاعل يعمل عليها الإنزيم . كما تم تقدير الثوابت الحركية K_m و V_{max} بطريقة لاينويفر- بورك (الأشكال 19 و 20 و 21) . كما تم حساب نسبة السرعة القصوى إلى ثابت ميكالس V_{max} / K_m. أظهرت النتائج أن قيمة ثابت ميكالس كانت الأقل بأستعمال الجيلاتين كمادة تفاعل مقارنة مع أستعمال البومين المصل البقري و الكازائين ، إذ بلغت قيم K_m للإنزيم (0.178 و0.179 و0.182) ملغم/ مل على التوالي . بينما بلغت قيم V_{max} (0.465 و0.339 و0.364) ملغم / مل . دقيقة حيال البروتينات الثلاثة المذكورة ، على التوالي أيضاً . وبلغت نسبة V_{max} / K_m لإنزيم البروتييز 2.612 حيال الجيلاتين و 1.894 حيال البومين المصل البقري و 2.00 حيال الكازائين وكما موضح في الجدول (12) .

واستناداً الى ماتقدم فأن الجيلاتين أفضل مادة تفاعل لإنزيم البروتييز قيد البحث . إن العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز مادة التفاعل تعتمد على ألفة الإنزيم لمادة تفاعله وهذا دائماً ما يعبر عنه بثابت ميكالس $\mathbf{K_m}$ للإنزيم (Ahmed *et al*. ,2011) .



الشكل (20) : منحنى لاينويفر- بورك (1934) لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae* بأستعمال الجيلاتين كمادة تفاعل.



الشكل (21) : منحنى لاينويفر-بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae* بأستعمال البومين المصل البقري مادة تفاعل.

كما قدرت الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز حيال البروتينات المستخدمة في هذه الدراسة مقارنة مع الكازائين والذي تحسب فعاليته النسبية 100% . ويتضح من الجدول 14 أن لإنزيم البروتييز مقدرة أفضل لتحليل الجيلاتين مقارنة بمواد التفاعل الأخرى المستخدمة وتحت ظروف الإختبار نفسها ، إذ بلغت الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز (136.36 و109.1) % باستعمال مواد التفاعل الجيلاتين والبومين المصل البقري ، على التوالي .

تتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما توصل إليه كل من Mohanty و جماعته (2008 b) إذ وجدوا عند إضافة الكازائين و الجيلاتين وألبومين المصل البقري (BSA) والببتون مواد حاثة لإنتاج إنزيم البروتييز Pr1 و Pr2 من الفطر892 *M. anisoplia* ان الجيلاتين قد حفز إنتاج إنزيم البروتييز Pr1 وكانت إنتاجيته ثلاثة أضعاف ما أنتجته البيئة الأساسية المتكونة من الأملاح فقط . إذ بلغت الفعالية النوعية 0.168 وحدة/ملغم بروتين مقارنة بالكازائين 0.089 وحدة/ملغم بروتين وبعد 12 ساعة من بدء التخمر، ولم يحفز إنتاجه ألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin(BSA) و الببتون . أشار Yang وجماعته (2005) إلى قابلية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Lacanicillium psalliotae* على تحليل مدى واسع من مواد التفاعل كان أفضلها الكازائين يليه ألبومين المصل البقري والجيلاتين والكولاجين ثم كيوتكل النيماتودا بفعالية نسبية (100و 29و 20و 14و 12) % ، على التوالي.

وأيضًا وجد Yang وجماعته (2007a)ان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Dactylellina varietas* يستطيع تحليل مدى واسع من مواد التفاعل اشتملت على الكازائين وألبومين المصل البقري والجيلاتين وكيوتكل النيماتودا والكولاجين بفعالية نسبية (100و32و10و 20 و 3)% على التوالي.

وأوضح Yang وجماعته (2007b) ان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Arthrobotrys conoides* ذو تخصصية عالية حيال الكازائين وبدرجة أقل حيال ألبومين المصل البقري والكولاجين الممسوخ . أظهر إنزيم البروتييز المنقى من الفطر .*Beauveria* sp أعلى فعالية نسبية حيال الكازائين كمادة تفاعل إذ بلغت 100% مقارنة بالفعالية النسبية لكل من الهيموغلوبين وألبومين المصل البقري والتي بلغت (47.38 و 5.06) % على التوالي (Shankar *etal*.,2011) .

ولم تختلف النتيجة التي حصلت عليها العبادي (2012) عن ما ورد ذكره في الدراسات أعلاه إذ وجدت أيضًا أن الفعالية النسبية بلغت (100و 91.9 و 88.4 و 86.5)% حيال الكازائين وألبومين البيض والجيلاتين وألبومين المصل البقري على التوالي.

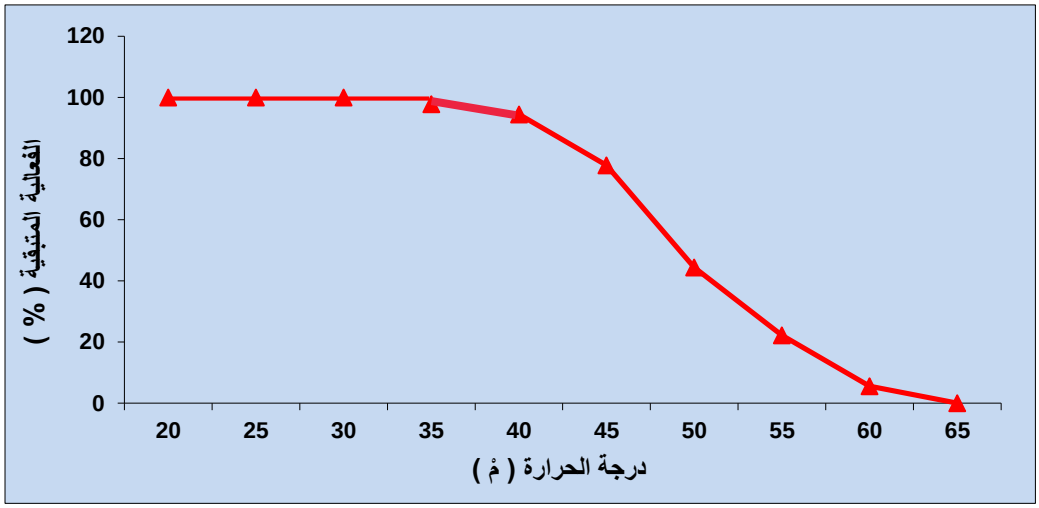
ذكرت (فليح، 1987) عدد من العوامل التي تعتمد عليها طبيعة التخصص في ارتباط مادة التفاعل بالأنزيم، وهذه العوامل هي: تجاذب المجموعات المشحونة لمادة التفاعل مع تلك الموجودة في الإنزيم ، تداخل المجموعات الكارهة للماء مع تلك الموجودة في البروتين ، التآصر الهيدروجيني مع البروتين ، التداخل مع المجموعات المترابطة للبروتين .

جدول (12) : الثوابت الحركية والفعالية النسبية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *M. anisopliae* حيال مواد تفاعل (بروتينات) مختلفة

مادة التفاعل	Km(ملغم / مل)	Vmax(ملغم/مل .دقيقة)	Vmax / Km	الفعالية النسبية %
الجيلاتين	0.178	0.465	2.612	136.36
البومين المصل البقري	0.179	0.339	1.894	109.1
الكازائين	0.182	0.364	2.00	100

3-الثبات الحراري للإنزيم

أظهرت نتائج حضن إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر ***M. anisopliae*** بدرجات حرارة تنحصر بين (20–65) مْ و لمدة 30 دقيقة ، أن الإنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجات حرارة انحصرت بين (20–30) مْ (الشكل 22) ، وإحتفظ الإنزيم بحوالي 97.8 % من فعاليته الأصلية بدرجة حرارة 35 مْ ، إنخفضت بعدها الفعالية الإنزيمية بشكل ملحوظ بدرجة حرارة (55 و 60) مْ ، و فقد الإنزيم 94.5 % من فعاليته بدرجة حرارة 60 مْ ، بينما فقدها تماماً عند درجة حرارة 65 %.



الشكل (22) : الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae*

يمكن ان يعزى سبب الانخفاض في فعالية الإنزيم عند درجة الحرارة العالية إلى تغير الحالة الطبيعية للأنزيم (مسخ بروتين الأنزيم) denaturation وأن التغير السريع في طبيعة الإنزيم يؤدي إلى تحطيم الأواصر الهيدروجينية الضعيفة بصورة تؤدي إلى فقدان الإنزيم لفعاليته كليًا (دلالي، 1986 ; Muthulaksmi, *etal.*,2011) .

تبدي أغلب الإنزيمات حساسية لدرجات الحرارة العالية إذ تعمل على تكسر الأواصر غير التساهمية التي تحافظ على التركيب ثلاثي الأبعاد للأنزيم فتبدأ السلاسل متعددة الببتيد بالانفتاح والذي يرافقه فقدان سريع للفعالية الأنزيمية (Whitaker,1972; Murray,2003) .

وقد تباينت الأبحاث في تحديد الثبات الحراري لأنزيم البروتييز وذلك حسب مصدر الإنزيم فقد وجد Liang وجماعته (2006) في دراسته للثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Monascus purpurcus* ان الإنزيم كان ثباتًا لغاية درجة حرارة 40 مْ .

وامتلك إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Arthrobotrys coniode* ثباتًا حراريًا عند مدى حراري (42-60) مْ بعد حضنه 20 دقيقة، لكنه يثبط تمامًا بدرجة حرارة 70مْ (Yang *etal*., 2007b) .

بين Abirami وجماعته (2011) ان إنزيم البروتييز المنقى من الفطرين *Neurospora crassa* و *Penicillium janthinellum* كان ثابتًا حراريًا لمدة ثلاث ساعات عند درجات انحصرت بين

(30–40) مْ ، أبدى إنزيم البروتييز المنقى من العزلة المحلية للفطر *A.niger* ثباتاً حراريًا مع الاحتفاظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة (40) مْ ولمدة ساعة كاملة (Devi *etal*.,2008) .

أما إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. فأنه يكون ثابتًا حراريًا عند درجة 30 مْ ويفقد 15% من فعاليته بدرجة حرارة 40 مْ بعد حضنه لمدة ساعة (Shankar *etal*.,2011) .

ولم يختلف كثيرًا في ثباته الحراري إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* إذ وُجِدَ إن الأنزيم احتفظ بكامل فعاليته بمدى حراري (20–40) مْ ، واحتفظ الإنزيم بحوالي 90% من فعاليته الأصلية بدرجة حرارة 45مْ، وفقدها تمامًا عند درجة حرارة 70% . (العبادي، 2012).

4- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

أن تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** موضح في (الشكل 23) فكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم قيد البحث 8.0 مما يشير إلى كونه من البروتييزات القاعدية Alkaline Protease .

ذكر de Man (2007) أن كل إنزيم يمتلك رقمًا هيدروجينيًا مثاليًا واحدًا لفعاليته ، بيد أن بعض الإنزيمات تمتلك أكثر من ذلك ، وعادة ما يكون هذا الرقم بمدى ضيق تمامًا إلا أن بعض الإنزيمات تبدي مدى واسع له.

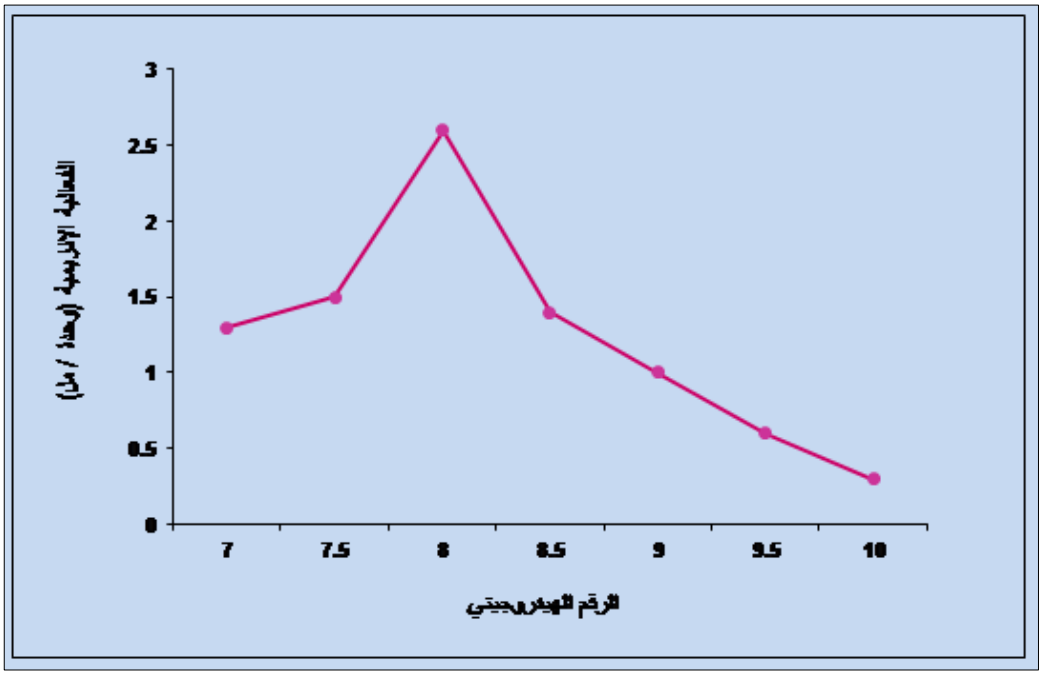
تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Erlacher وجماعته (2006) من أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. brongriartii* هو (8.0) . و ماذكره Yang وجماعته (2007a) من أن الرقم الهيدروجيني (8) كان الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Dactylellina varietas* ، ولم يختلف إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* إذ كانت أعلى فعالية له عند الرقم الهيدروجيني (8) (Namasivayam *etal*.,2010) . ان الرقم الهيدروجيني المذكور هو الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Pleurotus sajor-Caju* (Ravikumar *etal*.,2012) .

ان تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز يختلف حسب مصدر الإنزيم فقد وجد Liang وجماعته (2006) ان مدى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Monascus purpurcus* ينحصر بين 7 - 9 ، ووجد Devi وجماعته (2008) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز القاعدي والمنقى من الفطر *A. niger* كان (10).

وكان الرقم الهيدروجيني السابق الذكر هو الأمثل لأنزيم البروتييز المنقى من الفطر *A. oryzae* (Murthy &Naidu,2010) . وكان هذا الرقم هو الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. (Shankar *etal*.,2011) وكذلك لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Myceliophthora* sp. (Zanphorlin *etal*.,2011) .

يلاحظ من الشكل (20) أن الفعالية الإنزيمية تقل عند قيم pH أقل أو أكثر من قيمة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وذلك بسبب تكوين صورة أيونية للإنزيم أو للمادة الأساس أو لكليهما معًا غير ملائمة للتفاعل الأنزيمي، وقد يكون بسبب تغير في التركيب الطبيعي للإنزيم (الداودي،1991) .

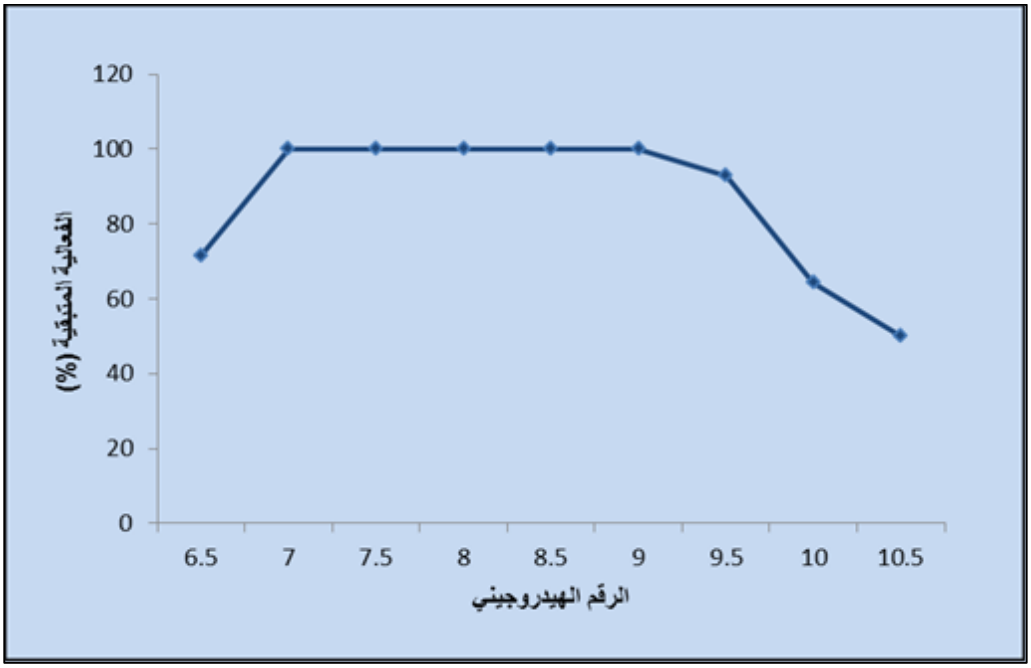
إن التأثير في ثمالات الأحماض الامينية عند القيم الأعلى والاوطأ من الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية والتي يجب أن تكون في حالة معينة لكي يحدث التفاعل من شأنه أن يؤثر على ارتباط المادة الأساس بالإنزيم، إضافة إلى تأثيراته على شحنة الإنزيم ومادة التفاعل أو كليهما أو اكتساب أو فقدان مجاميع مشحونة ستؤثر عكسيًا على ارتباط مادة التفاعل بالإنزيم لذا سوف يعيق أو يبطل التحفيز (Murray,2003; Yandri *etal*., 2008) .



الشكل (23) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae*

5- الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم

ان تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم يعد ضروريًا لكونه من الصفات المهمة في تحديد التنقية وخزن الإنزيم (Whitaker,1972) ، لذلك درس الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى من *M.anisopliae* ، و يتضح من (الشكل 24) أن الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته عند رقم هيدروجيني بمدى (7.0- 9.0) كما يلاحظ أن الإنزيم احتفظ بـ 92.86 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 9.5 بعد حضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 مْ ، و انخفضت الفعالية إلى 50.0% عند الرقم الهيدروجيني 10.5 ، كذلك إنخفضت الفعالية الإنزيمية في الأرقام الهيدروجينية الحامضية والقريبة من الرقم الهيدروجيني المتعادل ، إذ بلغت الفعالية 71.43% عند الرقم الهيدروجيني 6.5 .



الشكل (24) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *M. anisopliae*

وإعتماداً على هذه النتيجة فإن الإنزيم يعد ثابتاً نسبياً في الأرقام الهيدروجينية القاعدية والقريبة من التعادل إلا أنه غير ثابت في الظروف الحامضية والقاعدية المتطرفة ، وقد يعود السبب إلى حدوث تغيرات في التركيب الثانوي والثالثي لجزئية الإنزيم (الدنتره) علاوة على تغيير الحالة الأيونية للموقع الفعال ومادة التفاعل (Lehmacher & Bisswanger ,1990) ، وعلل Bisswanger (2008)

أن عدم الثبات قد يعزى إلى حدوث تغيرات في شحنة المجاميع الأيونية الموجودة داخل الإنزيم وعلى سطحه (والتي لها دور مهم في وظيفة الإنزيم) وهذا سيؤثر على الشحنة الكلية للأنزيم والتي بدورها سوف تؤثر بشكل غير عكسي على التركيب الطبيعي للأنزيم.

تباينت الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم، وذلك لاختلاف مصدر الإنزيم والطبيعة الكيمياوية للمحلول المنظم واللذان يعدان من العوامل المهمة في تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الأنزيم (Segel,1976) .

تتفق نتيجة البحث مع نتيجة Yang وجماعته (2008) ، إذ وجدَ أن إنزيم البروتييز القاعدي السيريني المنقى من الفطر *Monacrosporium cystosporium* احتفظ بفعالية عالية عند المدى (7–9) ولمدة 30 دقيقة . وجد kim (2003) أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *A. flavus* K-03 يكون ثابتًا ويحتفظ بـ 80% من فعاليته عند رقم هيدروجيني ينحصر بين (8–11) بعد حضنه لمدة 24 ساعة . أما إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Lacanicillium psalliotae* فقد وُجِدَ أنه يبقى ثابتًا عند رقم هيدروجيني ينحصر (9–10) . (Yang *etal.*,2005).

بقي إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Hirsutella rhossiliensis* ثابتًا عند رقم هيدروجيني ينحصر بين (5–6) عند حضنه لمدة 120 دقيقة واحتفظ بـ20% فقط من فعاليته عند كل من الرقم 4 و 7 بعد حضنه لنفس المدة (Wang *etal.*,2009).

احتفظ إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* بكامل فعاليته عند رقم هيدروجيني ينحصر بين (8.0–10.0) كما احتفظ بـ 78.5% من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 7.5 بعد حضنه لمدة (30) دقيقة بدرجة حرارة 37 مْ . (العبادي، 2012) .

كان لإنزيم البروتييز القاعدي السيريني المنقى جزئيًا من الفطر *Alternaria solani* مدى واسع من الثباتية إذ كان مدى الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم (6–12) . (Chandrasekaran and Sathiyabama, 2013)

6- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم

وتشير النتائج المبينة في الجدول (13) إلى تباين تأثير الأيونات الفلزية في فعالية الإنزيم فقد كانت لأيونات الحديدوز (Fe^{+2}) فقط تأثيراً حاثاً للإنزيم عند التركيز 5 ملي مولر ، إذ أرتفعت الفعالية بنسبة (290.566) % .

أما كلوريد النيكل وحامض البوريك فقد كان لهما تأثيراً تثبيطياً واضحاً في فعالية الإنزيم إذ بلغت الفعالية المتبقية باستعمال المادتين المذكورتين (71.698 و 64.151) % على التوالي . كما تدل النتائج في الجدول المذكور أن لأيونات المغنسيوم (Mg^{+2}) والمنغنيز (Mn^{+2}) والكالسيوم (Ca^{+2}) تأثيرًا تثبيطيًا في فعالية الإنزيم أقوى من تأثير كلوريد النيكل وحامض البوريك إذ بلغت نسبة الفعالية المتبقية للإنزيم (33.96 و 33.96 و 37.73)% على التوالي، غير أن أيون الزئبق كان له التأثير التثبيطي الأقوى إذ بلغت الفعالية المتبقية للأنزيم (16.98)% وذلك لكون أيونات الزئبق تتفاعل مع مجاميع الثايول (Thiol groups) في البروتين وتحولها Mercaptides فضلًا عن أنها تتفاعل مع ثمالات الأحماض الأمينية الهستدين Histidine والتريبتوفان Tryptophan ، علاوة على ذلك فأن الروابط الثنائية الكبريت الموجودة في الإنزيم تتحطم بفعل أيون الزئبق (Wellingta *etal*. 2004 , Do Nascimento & Martins,2004) .

جاءت هذه النتائج متفقة مع الكثير من الأبحاث السابقة، إذ اثبت Merheb- Dini وجماعته (2009) ان إنزيم البروتييز المعدني والمنقى من الفطر *Thermoascus aurantiacus* يحفز بوجود أيون الحديدوز Fe^{+2} .

وجد Upadhyay وجماعته (2010) ان إنزيم البروتييز الخارجي والمنقى من الفطر *A. flavus* (MTCC277) تزداد فعاليته بوجود أيونات الحديد Fe^{+2} والخارصين Zn^{+2} والكوبلت Co^{+2} عند التركيز 50 ملي مولر وتثبط فعاليته عند نفس التركيز بوجود أيونات الصوديوم Na^{+1} والمغنسيوم Mg^{+2} والكالسيوم Ca^{+2} والمنغنيز Mn^{+2} والزئبق Hg^{+2} والنحاس Cu^{+2}.

أما Yin وجماعته (2013) فقد وجدوا بأن إنزيم البروتييز الحامضي والمنقى من الفطر *A. niger* BCRC32720 ينشط بوجود أيونات الحديدوز Fe^{+2} .

جدول (13) : تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *M. anasopliae*

الأيون أو المادة الكيميائية	التركيز (ملي مولر)	الفعالية (وحدة / مل)	الفعالية المتبقية (%)
إنزيم غير معامل	–	0.33	100
كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$)	5	0.125	37.73
كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$)	5	0.11	33.96
كلوريد المنغنيز ($MnCl_2$)	5	0.11	33.96
كلوريد الحديدوز ($FeCl_2$)	5	0.96	290.5
كلوريد النيكل ($NiCl_2$)	5	0.23	71.69
حامض البوريك (Boric acid)	5	0.21	64.15
كلوريد الزئبق ($HgCl_2$)	5	0.056	16.98
PMSF	5	0	0
اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك (EDTA)	5	0.33	100
Iodoacetamide (IAA)	5	0.537	113.158
مركابتوايثانول (mercaptoethanol)	5	0.087	26.41

ان وجود الأيونات المعدنية يوفر حماية للأنزيم ضد المسخ الحراري ويلعب دور مهمًا في استمرار الشكل الفعال للأنزيم عند درجات الحرارة العالية (Paliwal *etal*.,1994).

أوضح كل من Femi-Ola و Bamidele (2012) سبب القابلية التحفيزية لبعض الأيونات وذلك لكونها حينما ترتبط مع مجاميع العوامل المساعدة Catalytic groups الموجودة عند المواقع الفعالة للأنزيمات توفر الحماية لها وتحافظ على استقرار معقد الإنزيم- المادة الأساس لإعطاء الناتج النهائي، أما سبب القابلية التثبيطية للبعض الأخر من الأيونات فيعود الى قابلية التأكسد والأختزال لدى هذه الأيونات إذ تعمل على إخراج الالكترونات من التفاعل الحاصل بين المواقع الفعالة للإنزيمات وركائزها (المادة الأساس) مسببةً حدوث تشوهات أما في تركيب الإنزيم أو تركيب المادة الأساس معطلةً تكون معقد الإنزيم- المادة الأساس وبذلك تمنع تكوين الناتج النهائي.

أما فيما يتعلق بتأثير المثبطات المختلفة في فعالية الإنزيم فأن النتائج تشير إلى أن الإنزيم فقد فعاليته تماماً بوجود الـ PMSF (أحد مثبطات البروتييز السيريني) والذي يحدد طبيعة البروتييز ضمن مجموعة Serine Proteases ، حيث أنه يقوم بسلفنة (كبرتة) Sulfonated للحامض الأميني السيرين Serine الموجود في الموقع الفعال للإنزيم وبالتالي ينتج عنه فقدان الفعالية بالكامل (Sharma & De ,2011) . وتم أثبات ان التركيز (1-5) ملي مولار للمثبط PMSF يثبط بشدة إنزيم البروتييز القاعدي السيريني في عدد غير قليل من الأبحاث (Kumar *etal*.,1999;Huang *etal*.,2003;Kamoun *etal*.,2008;Reddy *etal*.,2008) .

بينما لم يكن هنالك تأثيراً في الفعالية الأنزيمية من الـ EDTA (أحد مثبطات البروتييز المعدني) مما يدل على أن الإنزيم قيد البحث ليس ضمن مجموعة Metallo-Proteases . وعند استعمال الـ IAA (أحد مثبطات بروتييز السيستاين Cystein Proteases) إزدادت الفعالية بنسبة 113.158 % .

فضلاً عن ذلك فأن الجدول المذكور يبين أن لمادة الـ Mercaptoethanol تأثيراً تثبيطياً واضحاً في فعالية إنزيم البروتييز إذ بلغت نسبة الفعالية المتبقية للإنزيم 26.415 % .

وجِدَ أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* يثبط بنسبة 95% بوجود مادة Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) عند التركيز 10 ملي مولار. وعند نفس التركيز لم يتأثر بمادة Iodoacetamide أو مادة EDTA إذ بلغت الفعالية الإنزيمية (100و 99) % على التوالي وثبط كذلك عند التركيز (0.1 و10) ملي مولار بوجود كلوريدات الصوديوم والمغنسيوم والكالسيوم والحديد ومادة Mercaptoethanol (Bidochka & Khachatourians,1988) .

وأوضح Yangوجماعته (2007a) ان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Dactylellina varietas* يثبط بشدة بوجود مادة الـPMSF . كما أثبت Shankar وجماعته (2011) أن لأيونات الزئبق (Hg^{+2}) تأثيرًا تثبيطيًا في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. إذ بلغت الفعالية المتبقية 63.16% عند التركيز (10) ملي مولر ، بينما أدى استعمال (1) ملي مولر من مادة الـPMSF إلى تثبيط الفعالية بنسبة 97.75% ، أما مادتي الـ EDTAو IAA فلم يكن لها تأثيرًا ملحوظًا في فعالية الإنزيم .

لوحظ ان فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Myceliophthora* sp. قد ثبطت تمامًا بوجود 5 ملي مولر من مادة الـPMSF ، في حين لم تتأثر الفعالية الإنزيمية بوجود الـ EDTA و IAA إذ بلغت الفعالية المتبقية للأنزيم (95 و 100)% على التوالي . أما أيون الزئبق فقد كان مثبطًا قويًا إذ بلغت الفعالية المتبقية له 33.3% (Zanphorlin *etal*.,2011).

وبينت العبادي (2012) ان فعالية إنزيم البروتييز تزداد بوجود كلوريدات الكالسيوم والمغنسيوم إذ كان الفعالية المتبقية (174.67 و 140.83)% عند التركيز 5 ملي مولار على التوالي ، أما كلوريد المنغنيز والنيكل والزئبق فقد ثبطوا فعالية الإنزيم عند نفس التركيز إذ بلغت الفعالية المتبقية (87.34و 52.40و 36.03)% على التوالي. وثبط حامض اليوريك الفعالية الانزيمية بنسبة 50% تقريبًا عند التركيز 5 ملي مولر . أما مادة PMSF فقد أدت إلى تثبيط الفعالية الانزيمية بصورة كلية عند التركيزين (1و 5) ملي مولر، وعند استعمال 5 ملي مولار من مادتي EDTA و IAA ازدادت الفعالية الانزيمية للأنزيم لتصبح الفعالية المتبقية (144.13و 114.63)% على التوالي وعند استعمال نفس التركيز السابق من مادة Mercaptoethanol ثبطت الفعالية الإنزيمية بنسبة 33%.

الأستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات (Conclusions)

1- تبين من الدراسة أن المعلق البوغي وراشح المزرعة للفطر *M. anisopliae* لهما تأثير واضح في ادوار حياة عثة الشمع الكبرى ولكن بصورة متباينة فقد أبدت البيوض والعذارى مقاومة ملحوظة بينما تعرضت اليرقات والبالغات الى الهلاك بنسبة اكثر وكان الطور اليرقي الأول أكثر حساسية للمعلق البوغي وراشح المزرعة من الطورين الرابع و السابع .

2- تبين ان العزلة الفطرية قيد الدراسة قادرة على انتاج انزيمات البروتييز والكايتينيز واللايبيز فضلا عن مضاد الأحياء المجهرية (الدستروكسين) غير ان عامل الضراوة الرئيسي للفطر هو انزيم البروتييز .

3- أمكن تركيب وسط اقتصادي من مواد متوفرة محلياً ورخيصة الثمن لأنتاج انزيم البروتييز يتمثل باستعمال وسط عصير التمر المدعم ببعض المغذيات .

4- أظهر إنزيم البروتييز قيد الدراسة تخصصاً حيال العديد من مواد التفاعل مما يشير إلى إمكانية إستعماله في السيطرة الحيوية ضد أنواع مختلفة من الحشرات .

5- إمكانية إستخدام إنزيم البروتييز في السيطرة الحيوية ضد الحشرات التي تنتشر في فصلي الخريف والربيع ، ولا يمكن إستعماله في فصل الصيف نظراً لقلة ثباته في درجات الحرارة العالية .

التوصيات (Recommendations)

1- أجراء دراسات مختبرية وحقلية حول استعمال الفطر في السيطرة على أنواع أخرى من الحشرات الاقتصادية و الطبية ومفصليات الأرجل فضلا عن تاثيره في الأعداء الحيوية .
2- أجراء دراسة حول تأثير الفطر في النحل عندما يستعمل في السيطرة على عثة الشمع الكبرى .
3- تحسين إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** بالطرائق الوراثية .
4- دراسة المواد الأيضية الأخرى المنتجة من الفطر (مثل الأحماض العضوية) والتي لها دور في السيطرة الحيوية .
5- دراسة الظروف المثلى لأنتاج سموم الدستروكسين لتحسين انتاجه من الفطر .

المصادر

References

المصادر العربية

الامارة، محمد صبري جبر **(** 2009). تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية والكيميائية في بعض اوجه حياتية حشرة خنفساء الحبوب الشعرية (الخابرا) (*Trogoderma granarium*) (Coleoptera: Dermestidae)(Everts) رسالة ماجستير. كلية الزراعة / جامعة البصرة.113 صفحة.

البنبي ، محمد علي .(1994). نحل العسل ومنتجاته . مصر .دار المعارف، 207 صفحة.

التميمي، نهاد كاظم خلف. (1998). بعض أوجه المكافحة لدودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae) المرباة على أوساط غذائية صناعية. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.

الجبوري، دينا حسين هاتف **.(** 2003) . دراسات مختبرية حول استخدام رواشح بعض الفطريات كطعوم سامة لمكافحة حشرة الذباب المنزلي *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). رسالة ماجستير. الكلية التقنية / المسيب. صفحة 120.

الجوراني ، رضا صكب **.** (1991) **.** تأثيرات مستخلصات نبات الأس *Myrtus communis* L. في حشرتي الخابرا ودودة الشمع الكبرى . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد. العراق .

الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب . (1989) . الأحياء المجهرية الصناعية . الطبعة الأولى ، جامعة بغداد .

الحيدري ، عادل طه .(2000). دراسات مختبرية وحقلية حول تأثير الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill في حفار ساق الذرة (Phalaenidae : Lepidoptera) *Sesamia cretica* . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد (65 صفحة) .

الخفاجي، زهرة محمود . (1990) . التقنية الحيوية . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي/ جامعة بغداد . مطابع دار الحكمة للطباعة و النشر.

الخفاجي ، هبة عباس علي **.**(2010) . تأثير مستخلصات أوراق نبات الخروع *Ricinus communis* L. في بعض جوانب حياتية لبعوضة الكيوليكس *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) رسالة ماجستير.كلية العلوم / جامعة القادسية.

الداودي، علي محمد حسن . (1991) . الكيمياء الحيوية المتقدمة . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي / جامعة بغداد – كلية الزراعة.

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبدالعزيز محمد.(2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعه والنشر. جامعة الموصل. الطبعة الثانية. 488 صفحه.

الزبيدي، حمزة كاظم (1992) . المقاومة الحيوية للآفات . دارالكتب للطباعـــــة والنـشر. جامعة الموصل .63-167 .

السعد، مها رؤوف . (1980) . مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية . الطبعة الثانية . جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي. صفحة 396 .

العبادي ، سرور محمد علي .(2012) .دراسة كيموحيوية لأنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria bassiana* . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة كربلاء .

العبيدي ، شيماء حميد و سمير، صالح حسن.(2011). كفاءة الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. في المكافحة الاحيائية لدودة ورق القطن *Spodoptera littoralis* (Boisd.) . مجلة وقاية النبات العربية . الحجم 29 . العدد1. 77- 82 .

العطبي ، مسلم عاشور عبد الواحد .(2012) .تاثير مستخلص البروبويس الفينولي وبعض منظمات النمو الحشرية في دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* L.(Lepedopteera:Pyralidae) . مجلة الكوفة للعلوم الزراعية /المجلد (4) / العدد (1) . 159 -166 .

المحنة ، احمد غانم نوري (2011) . تقييم كفاءة الفطر *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. في مكافحة نوعين من البعوض (Diptera: Culicidae) في محافظة الديوانية .رسالة ماجستير /كلية العلوم / جامعة القادسية .

المشهداني، حسين رياض محمود **.(** 2010) . المكافحة الجرثومية للذبابة المنزلية *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) باستخدام الفطر المضاد *Entomophthora muscae* .رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة القادسية.صفحة 69 **.**

المظفر ، سامي عبد المهدي (1990). الكيمياء الحياتية. الجزء الأول ، الطبعة الثانية ،جامعة بغداد ،وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . صفحة 492 .

الوائلي ، اسيل كامل عبد الحسين (2013) . تأثير مستخلصات نبات السبحبح *Melia azedarach*(Geranial:Meliaceae) في بعض جوانب الأداء الحياتي لعثة الشمع الكبرى (*Galleria mellonella* L.(Lepidoptera:Pyrallidae رسالة ماجستير / كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة .

الياسري ، علي مرتضى كاظم (2014) . تأثير بعض عوامل المكافحة الحيوية في بعض الجوانب الحياتية للذبابة المنزلية *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae) . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة القادسية .

بلاكت ، رعد طه .(1988) .تأثير منظمات النمو :الأيثرل ، NAA ، CA_3 في التساقط وبعض الصفات الطبيعية والكيمياوية لثمار نخلة التمر صنف زهدي ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد – العراق .

تقي ، حقي إسماعيل داوي (2007) . تقييم كفاءة بعض طرق المكافحة في السيطرة على دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae) وتأثيراتها على نحل العسل . رسالة ماجستير . كلية زراعة / جامعة بغداد .

خنبش ، محمد سعيد وعوشان ، هيثم سالم . (1997) . دراسة حياتية وبيئية دودة حياة دودة الشمع الكبيرة في منطقة لحج – اليمن . مجلة وقاية النبات العربية . 15(2) : 80 – 83 .

دلالي، باسل كامل . (1983) . فهم الأنزيمات . مطابع جامعة الموصل –الموصل (ترجمة) صفحة 468 .

دلالي، باسل كامل . (1986) . أساسيات الكيمياء الحيوية . جامعة الموصل / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي.

رمال، حسين . **(2005) .** موسوعة تربية النحل وكيفية معالجتها . دار اليوسف. بيروت. لبنان . 341 صفحة.

ساجدي، عادل جورج و علي، علاء يحيى محمد . (1983) . كيمياء الأغذية . (ترجمة). كلية الزراعة / جامعة البصرة . تأليف : أل .دبليو .أوراند و أي .إي .وودز . الطبعة الأولى.

سعود ، اسماء محمد ؛ عزيز ، غازي منعم ؛ الخفاجي ، زهرة محمود (2009) تحديد الظروف المثلى لأنتاج البروتييز من بكتريا *Staphylococcus aureus AG10* المعزولة محليا . المجلة العراقية للتقانات الحياتية 8 (1): 10-26 .

شخير ، حيدر ؛ عمران ، رباب ؛ الجنابي ، جواد كاظم عبود (2007). التنقية الجزئية وبعض صفات البروتييز من *Microsporum canis* . المجلة العراقية للتقانة الحيوية .Iraqi J.Biotech ، المجلد 6 ، العدد 1 ، الصفحات 119-131 .

شعبان، عواد والملاح ، نزارمصطفى .(1993). المبيدات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 520 صفحة.

صالح ، حمود مهدي ؛ عبود ، هادي مهدي ؛ علي ، حمدية زاير؛ عبود ، فاتن حمادة ؛ سعيد ، فالح حسن . (1999) . تقويم القابلية الأمراضية للفطريات الممرضة لحشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci* . مجلة الزراعة العراقية . مجلد 4 عدد 1 آذار .

صبر، سعدي حسين و الجوراني ، رضا صكب و عبد الجبار، تماضر مروان . (2004) **.** تأثير المستخلص الكحولي لنبات اليوكالبتوس في حياتية دودة الشمع الكبرى *mellonella Galleria* L. . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 35 (4): 89 – 94 .

عبد الجبار، تماضر مروان . (2001) . تأثير نبات اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh) في حياتية دودة الشمع الكبرى . رسالة ماجستير . كلية الزراعة . جامعة بغداد. العراق .

علي، هالة هيثم محمد. (2007) **.** دراسة تأثير المستخلص الايثانولي لأوراق وثمار نبات الدورانتا *Duranta repens* L. وفطر *Beauveria bassiana(*Balsamo)على الاداء الحياتي لبعوضة *Culex pipiens pipiens* L. رسالة ماجستير. كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد.137 صفحة.

عمران ، عبد الملك محمد ؛ ابوغرة ، صياح ؛ الفاهوم ،سحر خالد .(2006).تعيين الظروف المثلى لأنتاج انزيم البروتييز القلوي من بكتريا *Bacillus firmus* المعزولة من ترب مختلفة في محافظة دمشق . مجلد(22) – العدد (2) الصفحات 373- 387 .

فليح ، خولة أحمد . (1987) . مدخل إلى الكيمياء الحياتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة الموصل .

كريم ، حسنين طاهر .(2011) . دراسة القدرة الأمراضية لبعض المسببات المرضية في دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera : Pyralidae) مختبريا . رسالة ماجستير . كلية زراعة / جامعة بغداد .

محمود ، عماد احمد ؛ محمد ، حسام الدين عبدالله ؛ النعيمي ، مروة ثامر عبد الستار .(2012) تأثير فطر *Metarhizum anisopliae* (Metchnikoff)Sorokin ومبيد الأكتلك في الدور العذري بعمر 24 و 120 ساعة لخنفساء اللوبيا الجنوبية *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae). مجلة بغداد للعلوم . مجلد 9 (3) .

المصادر الأجنبية

Abd-Aziz , S.; Sin, T.L.; Alitheen,N. ; Shahab N. and Kamaruddin,K. (2008). Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens*UKM1. J. Biol. Sci., 8: 52-59.

Abdul Rauf ; Irfan,M. ; Nadeem,M. ; Ahmed,I. & Iqbal,H. (2010). Optimization of Growth Conditions for Acidic Protease Production from *Rhizopus oligosporus* through Solid State Fermentation of Sunflower Meal. World Academy of Science , Engineering and Technology. 72.

Abdul Sahib,R.A.(2009).Study of optimum condition for alkaline protease production from local isolate of Aspirgillus niger .Iraqi Journal of Science,Vol.50,No.4,pp.476-481

Abirami,V. ; Meenakshi,S. ; Kanthymathy,K. ; Bharathidasan,R.; Mahalingam,R. & Panneerselvam,A. (2011). Partial Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. European Journal of Experimental Biology.1(3):114-123.

Abu Sayem , S. M. , Alam , M. J. & Mozammel Hoq , Md. (2006) .Effect of temperature ,Ph and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03 .Proc.Pakistan Acad.Sci.43(4):257-262.

Abusham,R.A.;Rahman,R.N.Z.RA.;Salleh,A.B.(2009).Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent –tolerant protease from anewly isolated halo tolerant Bacillus subtilis strain Rand .Microbial cell Factories,8:20 .

Adams D.J. **(**2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology , 150: 2029–2035.

Adinarayana,K.;Ellaiah,P. and Prasad D.S.(2003).Purification and partial characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from a newly isolated Bacillus subtilis PE-11.AAPS PharmSciTech,4(4)ARTICLE 56.

Aehle, W. (2004) . Enzymes in industry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA,Weinheim.

Ahmed, I. ; Zia, M. & Iqpal, H. (2011). Purification and kinetic parameters characterization of an alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* through submerged fermentation technique . World Applied Sciences Journal. 12(6): 751-757.

Akujobi ,C. ; Odu, N. ; Okorondu,S. & Ike,G.(2012) . Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment . Journal of Research in Biology. Vol.2. No.2:077-082 .

Aldridge, D. C. and Turner, W. B. (1969). Structures of Cytochalasin C and Cytochalasin D from *Metarhizium anisopliae. Journal of the Chemical Society Section C Organic Chemistry*, 923-928.

Al-Khateeb, A.A., (2008). Enhancing the growth of date palm (Phoenix Dactylifera) in vitro tissue by adding date syrup to the culture medium. Sci. J. King Faisal University (Basic Appl. Sci.) 19, 71–85.

Ali, S. ; Zhen , H.; Xiang, R.S.; Bashir, M.H. ; Afzal, M. and Long , T.(2009). Production and extraction of extracellular lipase from entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Clavicipitaceae: Hypocreales). Pakistan Journal of zoology. Vo.41 No.5 pp.341-347.

Ali,S. ; Ren,S. ; Huang,Z. & Wu,J. (2010). Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi.Current Research,Tecnology and Education Topics in Applied Microbiology and microbial Biotechnology .

Ali,S. ; Huang,Z, ; Zang,W. & Ren,S. (2011) . Production and Regulation of Extracellular Proteases from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the Presence of Diamondback Moth Cuticle. Pakistan J. Zool., vol. 43(6). pp. 1203-1213.

Ali, S. S.; Vidhale ,N.N.(2013) Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid- State Fermentation Using Rice Bran . American Journal of Microbiological Research, Vol. 1, 3, 45-47.

Al-Juamily and H. Al-Zaidy, B.(2012)Optimization Conditions of Production Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus lichniformis*. British Journal of Pharmacology and Toxicology 3(6): 289-295.

AL- Obaidi ,Z. S. ; Gh.M. Aziz ; Th. S. AL- Hakkak and M. A. AL- Hilli .(1987) . Optimization of propagation medium for bakers yeast using date extract and molasses . Date palm J.5(1) : 164-178 .

Almas, S.; Hameed, A.; Shelly, D.; Mohan, P. (2009). Purification and characterization of a novel protease from Bacillus strain SAL1. African Journal of Biotechnology, 8 (15): 3603-360 .

Alves, M. ; de Campos-Takaki, G. ; Okada, K. ; Pessoa, I. & Milanez,A. (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. Rev Iberoam Micol. 22:114-117.

Ambethgar,V.(2009). Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. Journal of Biopesticides. 2(2): 177-193.

Amiri, B.**,** Ibrahim, L. and Butt, T. M. (1999). Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pests. *Biocontrol Science and Technology* 9, 487498.

Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M. L. and Butt, T. M. (2000). Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological Research* 104, 447452.

Angel-Sahagun,C.A.; lezama-Gutierrez, R.; Molina-Ochoa, J.; Galindo-Velasco, E.; Lopez-Edwards, M.; Rebolledo-Dominguez, O.; Cruz-Vazquez, C; Reyes-Velazquez, W.P; Skoda,S.R, and Foster,J.E. (2005).Susceptibility of biological stages of the hornfly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). J. insec. Sci..33:1-8

Annamalai,N.; Rajeswari,M. ; Vijayalakshmi,S. & Balasubra-manian,T.(2011) . Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. Annals of Microbiology. 61(4): 801–807.

Arnold , J.W. (1952). The haemacytes of Mediterranean flour moth Ephestia kuhniella Zell.(Lepid.Pyralididae) Can.J.Zool.30,352-64.

Ashiralieva, A., Genersch, E. (2006). Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees - a review, *Apidologie* 37, 411–420.

Ashur,S.A.;El-Shura, H.M.;Metwally ,M. and Habib,S.A.(1996).Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of protease .Micrbios.86(346):59-69.

Ayer, W.A and Pena-Rodriguez, L.M.(1987). Metabolites produced by *Alternaria brassicae* , The black spoot pathogen of canola. Part1. The phytotoxic components part2, sesquiter penoid metabolites . J.Nat.prod.50,400-417.

Bakhiet, N., Stahly, D.P.(1985). Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. *Applied Environmental Microbiology* 50, 690 – 92.

Balachander, M.;Remadevi, O.K.; Sasidharan, T.O and Bai, N.S.(2012). Virulence and mycotoxic effects of *Metarhizium anisopliae* on Mahogany shoot borer, Hypsipyla robusta (Lepidoptera:pyralidea). Journal of Forestry Research.23(4):651-659.

Balaraman, K.; Bheemarao, N.S. and Rajagopalan ,P.K. (1979). Isolates of Metarhizium anisopliae , Beauveria tenella and Fusarium oxysporum (Deuteromycetes) and their pathogenicity to Culex fatigans and Anopheles stephensi. Indian J.Med.70:718-722.

Barata, R. ; Andrade, M.; Rodrigues,R. & Castro, I. (2002). Purification and characterization of an extracellular trypsina-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 94. No. 4. pp. 304-308.

Barreh, A.J. (1977). Proteinases in mammalians cell and tissues. North Holland publishing, company Amsterdam, New York, Oxford.

Benito, M.J.;Rodríguez, M.; Dez, F.l. N.; Asensio, M.A.;Dez,M. E. B. and Co´rdoba, J. J.(2002) Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 Active against Meat Proteins.American Society for Microbiology. Vol. 68. 3532–3536.

Berry, D.R. (1975). The Environmental control of the physiology of filamentous fungi. In the filamentous fungi. Vol. 1 (ed. by Smith, J.R. & Berry, D.R) pp.16-32-Arnold.

Beys da Silva, W.O. ; S. Mitidieri; A. Schrank and M.H. Vainstein, (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Process Biochem., 40: 321-326.

Beys Da Silva ,W.O. ; Santi,L.; Schrank,A.; Vainstein,M.H.(2010). *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in Rhipicephalus (Boophilus) microplus infection fungal biology 114,10-15.

Bhagya,L. ; Gurvinder,K. & Padmini.P. (2010). Isolation and purification of cuticle degrading extra cellular proteases from entomopathogenic fungal species of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technolgy.vol.1.Issue-3.

Bidochka, M. & Khachatourians, G.(1987). Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 53. No.7. p. 1679-1684.

Bidochka, M. & Khachatourians,G. (1988). N-Acetyl-d-Glucosamine – Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomo – pathogenic fungus *Beauveria bassiana* .Appl. Environ. Microbiol. Vol.54 No. 11. 2699-2704.

Bischoff , J.F., Rehner , S.A.and Humber,R.A.(2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia, v.101, p.512-530.

Bisswanger, H.(2008). Enzyme kinetics.Principles and Methods. 2nd edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA,Weinheim.

Bitondi , M.M., Mora, I.M., Simose,Z.L.P. and Figueiredo, V.L.C. (1998).The *Apis mellifera* pupal melanisation program is affected by treatment with ajuvenile hormone analogue. Journal of Insect Science,3,34-38.

Bohlmann, J.T.; Cameselle,C. ; Nunez , M.J. and Lema, J.M. (1998) . Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part II: Optimisation of fermentation with milk whey as carbon source. Bioprocess Eng., 19: 337-342.

Bollhalder, F. (1999). Trichogramma for wax moth control. Amer. Bee J. 139(9): 711-712.

Boucias, D. G. and J. C. Pendland. (1998) . Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. London. pp. 537.

Bradford, M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry , 72: 248-254 .

Braga, G.; Destéfano, R. & Messias,C. (1999) . Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. Revista de Microbiologia. 30 : 107-113.

Bruton,G.J.(1983).Large-scale purification of enzymes.Phil.Trans.R.Soc. Lond.B 300,249-261.

Bukhari, T.; Middelman, A.; Koenraadt, C. J.M.; Takken, w. and Knols, B.G. (2010). Factors affecting fungus induced larval mortality in Anopheles gambiae and Anopheles stephensi. Malaria Journal.9:22.

Bull,A.T**.** and Bushnel,,M.E.(1976).Environmental control of fungal growth .Inthe filamentous fungi.J.E.Smith and D.R.Berry eds.Vol.2:1-26.Edward Arnold.London.

Burges, H. D. (1978). Control of wax moths : Physical, chemical and biological methods. Bee World. 59: 129-138.

Burgess, R. R. (2008) . Protein Purification . in: Proteomics of the Nervous System . Edited by Nothwang, H. G. & Pfeiffer, S. E. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim .

Calik.P.;Bilir,E.;Calic,G. and Özdamar ,T.H.(2002). Influence of pH condition on metabolic regulation in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* .Enzyme Microbial Technology .vol.31,no.5,pp.685-697 .

Campos, R.; Arruda, W.; Boldo, J.; da Silva, M.; de Barros, N.; de Azevado, J.; Schrank, A. & Vainstein, M. (2005). *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. Current Microbiology.Vol. 50. pp. 257-261.

Cantwell, G. E. and Smith, L. J. (1970). Control of the greater wax moth *Galleria mellonella*, in honeycomb and combhoney. Amer. Bee J. 110: 141.

Cantwell, G. E.; Jay, E. G.; Pearman Jr, G. C. and Thompson, J. V. (1972). Control of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.), in comb honey with carbon dioxide. Part I. Laboratory studies. Amer. Bee J. 112: 302-303.

Cantwell, G. E.; Lehnert, T. and Travers, R. S. (1975). USDA research on ethylene oxide fumigation for control of disease and pests of the honey bee. Amer. Bee J. 115: 96-97.

Cantwell, G. E. and Lehnert, T. (1979). Microbial control of the greater wax moth on stored comb. Amer. Bee J. 119: 200-201.

Carlile,M.J.;Watkinson,S.C. and Gooday,G.W.(2001) TheFungi

.AcademicPress, New York.pp:85-184.

Caron , D. M .(1992) . Wax moth . American . Bee . J .,132: 647-649.

Casida, L. E. Jr. (1968) . Industrial microbiology . John Wiley and Sons , Inc. , New York .

Chandrasekaran , M. and Sathiyabama, M.(2013) , Production , Partial Purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi Alternaria solani (E11. And Mart.) sorauer . Journal of Basic Microbiology . Abstract .

Charnley, AK.(2003). Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical* Research.40: 241-321.

Charreire, J. D. and Imdorf, A . (1999) . Protection of honey combs from wax moth damage. Amer. Bee J., 139: 627- 630.

Cherry ,A.J.; Abalo, P. ; Hell, K. (2005). A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*(Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. J. Stored Prod. Res., 41: 295-309.

Chutmanop, J.; Chuichulcherm, S.; Chisti, Y. & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83:1012–1018.

Clark, T.B.; Kellen, W.R.; Fukuda, T. and Lindegren, J.E. **(**1968). Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes . J.Invert. Pathol.11(1):1-7.

Clarkson, J. M. (1996). Molecular biology of fungi for the control of insects. In molecular biology of biological control of plants. Edited by Gunasekaran, M. and Weber, D.J.© by CRC press, Inc.

Cloyd, R.A.(1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizum anisopliae* Midwest Biological control News.5(7).

Coggshall , W. L . and Morse , R. A .(1995). Bees wax . wiewas press . 193pp .

Colter, D. (1994). Those pesky wax moths. Amer. Bee J. 134(12): 824-826.

Cuervo-Parra1, J.A.; Ramírez-Suero1, M.; Sánchez-López, V. and Ramírez-Lepe1,M. (2011) Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. African Journal of Biotechnology Vol. 10(52), pp. 10657-10663.

Dahiya,N. ; Tewari,R. & Hoondal,G. (2006). Biotechnological aspect of chitinolytic enzymes: a review. Appi Microbial Biotechnol . 71:773-782.

Dahot, M. (1994). Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum.* Journal of Islamic Academy of Sciences. 7:2. 100-105.

Dako, E., Bernier, A.; Dadie, A.T. and Jankowski, C. K.(2012). The Problems Associated with Enzyme Purification.Chemical Biology, 978-953.

Daoust, R.A. and Roberts, D.W. (1982). Virulence of natural and insect passed strain of *Metarhizium anisopliae* to mosquito larvae. J . Invert. Pathol.40:107-117.

Da Silva, J.C. ;Junior,J.P.D. and Marcondes,C.B.(1989).Selection of *Metarhizium anisopliae* for extracellular enzyme production and virulence toward *Triatoma infestans* .Brazil.J.Genetics, 12,1,1-17.

Davidson, R.; Gertler, A. and Hofmann ,T. (1975). "Aspergillus oryzae acid proteinase. Purification and properties, and formation of pi-chymotrypsin." Biochem. J. 147(1); 45-53. PMID: 239702

De Andrade, C.F. **(**1993). *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. : potential to recycle in mosquito larvae. Boyce Thompson Institute at Cornell University.

Deb, P.; Talukdar, S. A.; Mohsina, K.; Sarker, P. K. and Abu Sayem, S.M.(2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* .SpringerPlus , 2:154.

De Man, J. M. (2007) . Principles of Food Chemistry . Third Edition . Springer International Edition .

De Marco, J. & Felix, C. (2002) .Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease . BMC Biochemistry . 3: 3 .

Devi,M. ; Banu,A. ; Gnanaprabhal,G. ; Pradeep,B. & Palaniswamy, M.(2008). Purification , Characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Joyrnal of Science and Technology. Vol.1. No.7.

Devi,P. ; Raghavan,P. ; Vasudheven,I. ; Joshua,L. & VijayaKumar, M. (2011). Purification and Characterization of Protease from *Rhizopus oligosporus*. International Journal of Biological Technology. 2(2): 46-49.

Dhar, P and Kaur , G.(2009) Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopiale* isolates. Annals of Microbiology. Volume 59, Issue

pp.545-551.

Dhar, P and Kaur , G.(2010) Cuticle – Degrading protease produced by *Metarhizium anisopliae* and their in Different Media .Indian J Microbiol .50 (4) 449-455 .

Dias, B.; Neves, P.; Furlaneto-Maia, L. & Furlaneto,M. (2008). Cuticle – degrading proteases produced by the entomo-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology. 39: 301-306.

Dienes, D. ; Börjesson, J. ; Hägglund, P. ; Tjerneld, F. ; Lidén, G. ; Réczey, K. & Stålbrand, H. (2007). Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. Enzyme and Microbial Technology. 40: 1087-1094.

Djilali,B.;Bouziane ,A.;Ahmed,H.;Kada,I. and Nawal,O.(2012).Study of the Behaviour of Lactbacillus Delbrueckii Subsp.Bulgaricus in Date Syrup in Batch Fermentation with Controlled pH .J.Biotechnol Biomaterial.2

Do Nascimento,W. & Martins,M. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of

Microbiology . 35:91-96.

Dumas, C.; Robert, P.; Pais , M.;Vey , A. and Quiot , J.M. (1995), Insecticidal and cytotoxic effects of natural and hemisynthetic destruxins . comp. Biochem. Physiol., 108,195-203.

Duo-Chuan, L. ; Shu, C. ; Jing, L.U. (2005). Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. Mycopathologia 159: 223–229.

Dutta, P. ; Dutta, J. & Tripathi, V. (2004) . Chitin and chitosan : chemistry, properties and application . Journal of Scientific and Industrial Research . 63: 20-31 .

Eaton, G.K. AND AYRES, M.P. (2002). Plasticity and constraint in growth and protein mineralization of ectomycorrhizal fungi under simulated nitrogen deposition. *Mycologia*, 94: 921-932.

Ebadi, R. (1975) . Wax of bee. Journal of Iranian Entomology. 10(4), 61-64.

Egorov , N. S. ;Loriya,Z.K.and Yudina, T.G.(1983) .Effect of protein on exprotease synthesis in *Bacillus thuringiesis*.Microbiol. (USSR),52 (4):443-446.

Egorov , N. S. (1985) . Antibiotics ascientific approach . Mir publishers Moscow .

Elad, Y. and Kapat, A. (1999) .The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Pathology . 105: 177-189 .

Ellaiah,**P**. and Srinivasulu,D.(1996).Production of extracellular protease by Streptomyces fradiae.Hind.Antibiot.Bull.,38:41-47.

Ellaiah,P.;Adinarayana,K.;Bhavani,Y.;Padmaja,P. and Srinivasulu,B.(2002).Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated Aspergillus species .Process Biochem,38:615-620.

El-Sinary, N. H. (2002). Influence of the entomopathogenic fungus , *Beauveria bassiana* (Balsamo) on the mature larvae of the potato tuber moth, Phthorimaea operculella (Zeller) under different degrees of temperature and relative humidity. Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 27, 4151–4161.

Engel,L.S.;Hill,J.M.;Caballero,A.R.;Green,L.C. and Callaghan,R.J. (1998). Protease IV a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa .J.Biol. Chem. .vol.273,no.27 ,pp.16792-16796 .

Erlacher, A. ; Sousa, F. ; Schroeder, M. ; Jus, S. ; Kokol, V. ; Cavaco-Paulo, A. & Guebitz, G.(2006). A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. Biotechnol Lett. 28:703–710.

Faria, M.R. and Wraight, S.P.(2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control 43: 237-256.

Femi- Ola , T.O and Bamidele , O.S.(2012) . Studies on the catalytic properties of Partially Purified Alkaline protease from some selected Microorganisms. Malaysian Journal of Microbiology . Vol.8(3) pp.191-196.

Ferkovich ,S.M. ;Oberlander,H. and Leach, C.E.(1981).Chitin synthesis in larval and pupal epidermis of the Indian meal moth,*Plodia interpunctella* (Hubner), and the greater wax moth *Galleria mellonela* (L.). Journal of insect Physiology ,27,509-514 .

Fernandes , E.G. ; Valério , H.M. ; Feltrin , T. and Sand , S.T.V.D. (2012) . Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates . Brazilian Journal of microbiology : 827 – 833 . ISSN 1517 – 8382 .

Flint, H. M. and Merkel, J. R. (1983). Mating behavior, sex phermon responses and radiation sterilization of the greater wax moth (Lepidoptera : Pyralidae). J. Econ. Entomol. 76: 467-472.

Frankena,J.;Koningostein,VanVerseveld,H.and Stouthamer,A.(1986).Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis* .Applied Microbiology and Biotechnology .vol.24,no.2,pp.106-112 .

Freimoser , F.M. ; Hu , G. and St Leger , J. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro . Microbiology , 151 , 361 – 371 .

Fullbrook, P.D (1983). Practical limits and prospects. In: Industrial Enzymology (eds. Godfrey, T. and Reichelt J.) p.41-110 nature Press.

Garraway, M .O. and Evans, R.C. (1984). Fungal nutrition and physiology. John Wiley and sons. New York and Toronto.

Gaur, S.; Agrahari,S. and Wadhwa, N.(2010). Purification of Protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 Isolated from Poultry Waste Site The Open Microbiology Journal 4,64-74.

Gayathri, G.; Balasubramanian, C.; Moorthi, P.V. and Kubendran, T. (2010). Larvicidal potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Paecilomyces fumosoroseus*(Wize) Brown and smith on *Culex quinquefasciatus* (Say). J.Biopesti.3(1):147-151.

Gearage ,S.;Raja,V. ;Krishna,M.R.V.;Subramanian,T.V.and Jayaraman,K.(1995),Process Biochem,30,457-462.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae subsp. pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae subsp. Larvae* as Paenibacillus larvae without subspecies differentiation, Int. *Journal of Systematic and Evoloutionary Microbiology* 56, 501–511.

Genckal,H. and Tari,C.(2006).Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats .Enzyme Microbial Technology .vol.39,no.4,pp.703-710 .

Genthner, F.J.; Chancy,C.A.;Couch,J.A.;Foss,S.S.;Middaugh,D.P. ; George,S.E. ;Warren,M.A.;Bantle,J.A.(1998). Toxicity and Pathogenicity Testing of the Insect Pest Control Fungus Metarhizium anisopliae .Springer.V.35 ,Issue 2 ,pp317-324

Ghanbary, M.A.T., A. Asgharzadeh, A.R. Hadizadeh and M.M. Sharif, (2009). A quick method for *Metarhizium anisopliae* isolation from cultural soils. Am. J. Agric. Biol. Sci., 4: 152-155. http://www.scipub.org/fulltext/AJAB/AJAB42152-155.pdf

Ghanem, K. ; AL-Fassi,F. & Farsi, R. (2011). Statistical optimization of cultural condition for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata* . African Journal of Microbiology Research. Vol. 5(13).pp.1649-1659.

Ghosh,P.K.;Saxena,R.K.;Gupta, R.;Yadav,R.P. and Davidson S.(1996) .Microbial lipases: production and applications. Science progress,79(2) :119-157 .

Goettel, M.S. and Inglis, D**.**(1997). Fungi: Hyphomycetes. In. : Lacey, L.(ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. Sandiego.409 pp.

Goodman, R. D., Williams, P., Oldroyd, B. P., & Hoffman, J. (1990). Studies on the use of phosphine for the control of greater wax moth, Galleria mellonella in stored honeybee comb. American Bee Journal,130, 437–477.

Graham, L.S. & Sticklen M.B.(1994).Plant chitinases. Can J Bot, 72: 1057 –1083.

Graham, M.J. (2003). The Hive and The Honey bee. Dadant and Sons, INC. Hamilton. Illinois. USA. pp. 1324.

Graniti, A. (1972). The evolution of the toxin concept in plant pathology. In'Phytotoxins in Plant Diseases' (R. K. S. Woods, A. Ballio and A. Graniti, eds.), pp. 1-18. Academic Press, New York.

Griesch, J. and Vilcinskas, A. (1998). Proteases released by entomopathogenic fungi impair phagocytic activity, attachment and spreading of plasmatocytes isolated from haemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella. Biocontrol Science and Technology* 8, 517-531.

Griesch, J., Wedde, M. and Vilcinskas, A. (2000). Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria meltoneIla:* a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 461472.

Gross, O.; Tijssen, P.; Weinberg, D. and Tal, J. (1990). Expression of densonucleosis virus GmDNV in *Galleria mellonella* larvae : size analysis and in vitro translation of viral transcription products. J. Invertebrate pathology. 56(2): 175-180.

Gunduz, E. A. and Gulel, A. (2005). Investigation of fecundity and sex ratio in the parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera : Braconidae) in relation to parasitoid age. Turk J. Zool. 29 : 291-294.

Gupta, S.; Roberts, D.W. and Renwick, J.A.A. **(**1989). Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high- performance liquid – chromatography. Journal of Liquid Chromatography.12 :383-395.

Gupta,S.,Krasnoff,S.B.,Renwick,J.A.A.,Roberts,D.W.,Steiner,J.R.and Clardy ,J.(1993a). Viridoxin-a and Viridoxin-b –Novel toxins from the fungus Metarhizium flavoviride .Journal of Organic Chemistry 58,1062-1067.

Gupta,R. ; Beg,Q. ; Khan,S. & Chauhan,B.(2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appi Microbial Biotechnol. 60: 381-395.

Haggag, W.; Kansoh, A. & Aly, A. (2006) . Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* : Purification , Characterization and Antifungal Activity Against Brown Spot Disease on Faba Bean. Plant Pathology. Bulletin. 15: 231-239 .

Haq, I.-U. ; Mukhtar, H. ;Ali,Z. and Riaz, N. (2004). Protease Biosynthesis by Mutant Strain of *Penicillium griseoroseum* and Cheese Formation . Pakistan J. of Biological Sciences . 7. (9): pp. 1473-1476 .

Haq, I. and Mukhtar, H.(2005).Studies on the optimization of protease production by Bacillus subtilis IH-16.Pak.J.Zool.,24:67-74.

Haq, I.-U.; Mukhtar, H. & Umber, H. (2006). Production of protease by *penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental conditions.Journal of Agriculture & Social Sciences.Vol.2. No.1: 23-25.

Haq, I.-U. ; Mukhtar, H. & Umber, H. (2008). Fermentation Medium Optimization For The Biosynthesis of Protease by *Penicillium chrysogenum* in shake flasks. Pakistan J. Zool. Vol. 40. (2): pp. 69-73.

Haran, S. H. Schickler, A. Oppenheim and Chet I. (1995). Mycology Research99:441-446.

Haritha, R. ; SivaKumar,K. ; Swathi,A. ; Mohan,Y. & Ramana,T. (2011) . Characterization of marine *Streptomyces carpaticus* and optimization of condition for production of extracellular protease. Microbiology Journal . pp.1-13.

Hassan, F.; Shah, A.A.; and Hameed, A. (2006).Industrial application of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology; 39(2), 235-251.

Hasan, S. ; Ahmed, A. ; Purwar ,A. ;Nausheen , K. ; Kundan , R. & Gupta, G. (2013). Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* . Bioinformation 9(5):238-242 .

Hashimoto,H.;Kaneko,Y.;Iwaasa,T. and Yokotsuka,T.(1973).Production and purification of acid protease from the thermophilic fungus ,Penicillium duponti K1014.Applied Microbiology.Vol.25,No.4,pp:584-588.

Hattori, M. ; Isomura, S. ; Yokoyama, E. ; Ujita, M. & Hara, A.(2005).Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris.* Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 100. Issue (6). pp. 631–636.

Hegedus, D.D. and Khachatourians, G.G., (1988). Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana. Biotechnol. Lett.,* 10: 637-642.

Hesseltine ,C.W. (1972). Solid state fermentations. Biotechnol. Bioeng, 14: 517-532.

Hoe, P.K.; Bong, C.F.; Jugah, K. and Rajan, A. (2009). Evaluation of *Metarhizium anisopliae var anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates and their effects on subterranean termite *Coptotermes curvignathus* (Isoptera: Rhinotermitidae) . Am. J. of Agricul. And Biol. Sci. 4 (4) : 289-297.

Holme , D. & Peck,H. (1998). Analytical Biochemistry .third edition. Prentice Hall.

Huang ,Q.; Peng, Y. and Li, X. (2003). Purification and Characterization of an alkaline serine protease from dehairing function from *Bacillus pumilus*. Curr Microbiol 46: 169-173.

Humber, R.A. (1997). Fungi : Identification. In Manual of Techniques in Insect Pathology (L.A.Lacey,ed.) , pp. 153-185. Academic Press : London.

Hussain, A. and Mannan A., Zubair H., Mirza B. (2010). Purification and Characterization of Alkaline Proteases from *Aspergillus terreus*, J. Chem. Soc. Pak., Vol. 32.

Hussein, K.A.; Abdel-Rahman,M.A.A.; Abdel-Mallek, A.Y.; El-Maraghy, S.S. and Joo, J.H.(2012). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*.phytoparasitica 40:117-126 .

Huxham,I.M.;Lackie,A.M. and McCorkindale, N.J.(1989).Inhibitory effects of cyclodepsipeptides,destruxins,from the fungus *Metarhizium anisopliae,* on cellular immunity in insects. Journal of Insect Physiology .Volume 35,Issue 2 , p:97-105.

Ire,F. ; Okolo,B. ; Moneke,A. & Odibo,F. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation.African Journal of Food Science. Vol. 5(6):pp. 353-365.

Irfan,M. ; Abdul Rauf, ; Syed,Q. ; Nadeem,M. & Baig,S. (2011). Exploitation of Different Agro-residues for Acid protease Production by *Rhizopus sp.*in Koji Fermentation. IJAVMS. Vol. 5. Issue 1:43-52.

Ito, E. ; Varéa-Pereira, G. ; Miyagui, D. ; Pinotti, M. and Neves, P. (2007). Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer,*Hypothenemus hampei*. Brazilian Archives of Biology and Technology.V.50. No.2. pp. 217-223.

Jafari, R. ; Goldasteh , S. and Afrogheh ,S.(2010) .Control of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : pyralidae) by the Male sterile Technique (MST).Arch.Biol.Sci.Belgrade. , 62:309-313 .

James, P. J., Kershaw, M. J., Reynolds, S. E. and Charnley, A. K. (1993). Inhibition of desert locust *(Schistocerca gregaria)* malpighian tubule fluid secretion by destruxins, cyclic peptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae. Journal of Insect Physiology* 39, 797-804.

Jaswal,R.; Kocher,G. & Virk,M. (2008).Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues:A statistical approach. Indian Journal of Biotechnology.Vol.7. pp. 356-360.

Jegorov, A.; Matha, V.; Sedmera, P. and Roberts, D.W.(1989). Destruxin from *Metarhizium anisopliae* . In proceding of the International conference on Biopesticides , Theory and practice(Ed. By A.Jegorov and V.Matha). 64-70 pp.

Jegorov, A.; Sedmera, P.; Havlicek, V. and Matha, V. (1998). Destruxins Ed(1) acyclopeptide from the fungus *Metarhizium anisopliae*. Phytochemistry . 49:1815-1817.

Jonson, J.C. and Ryden, L. (1998). Protein purification principles, highresolution methods, and application, 2nd ed. John Wiley& Sons .Inc, pp.695.

Jonason,N.B;Boetel,M.A.;Eide,J.D.;Campbell,L.G.and Rao,M.B.(2005). Virulence of *Metarhizium anisopliae*(Deuteromcotina:Hyphomycetes) to sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiidae)larvae.J.Sugar Beet Research, 42 (3-4):103 –117

Kaaya, G.P. (1989). *Glossina morsitans morsitans*: mortalities caused in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi . Acta tropica. 46: 107-114.

Kaaya, G.P.; Seshu-Reddy, K.V.; Kokwaro, E.D. and Munyinyi, D.M. (1993). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* , *Metarhizium anisopliae* and *Serratia marcescens* to the banana weevil *Cosmopolites sordidus* . Internati. centre of insect physiol. and ecol. 3:177-187.

Kaaya, G.P. and Hassan, S. (2000). Entomogenous fungi as promising biopesticides for teck control . Exp. Appl. Acarol.24:913-926.

Kaijiang, L. and Roberts, D.W.(1986) The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var.*major*. J. Invert. Pathol.,47,120-22.

Kamoun ,S.A.; Haddar, A. and El-Hadj, A.N.(2008) .Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiol Res 3: 299-306 .

Kang, S. ; Park, S. & Lee, D. (1999) . Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* . Journal of Invertebrate Pathology. 73: 276-281.

Karlsson, E. Ryden, L. and Brewer, J. (1998) . Ion exchange chromatograph . In : Introduction To Protein Purification (ed. Wiley . Liss) A John Wiley and Sons , INC . Publication . (Cited from Mukran ,2003) .

Kathiresan, K. and Manivannan, S.(2006) .Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), 829-832.

Kaur, M.; Dhillon, S.; Chaudhary, K.; and Singh, R. (1998). Production, purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Bacillus polymyxa*. Indian J. Microbiol. 38: 63-67.

Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E. and Charnley, A. K. (1999). The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology* 74, 213-223.

Khan,S. ; Guo,L. ; Maimaiti,Y. ; Mijit,M. & Qiu,D. (2012a). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent . Molecular Plant Breeding . Vol.3. No.7 .

Khan, S.;Guo, L.;Shi,H.,Mijit, M. and Qiu, D.(2012b) Bioassay and enzymatic comparison of six entomopathogenic fungal isolates for virulence or toxicity against green peach aphids myzus persicae. African Journal of Biotechnology Vol.11(77) pp.14193-14203.

Khetan, S.K. **(**2001). Microbial pest control ,1st edition.Marcel Dekker.

Khiyami, M.;Aboseide ,B. and Pometto , A.(2008).Influence of complex nutrient sources:Dates syrup and dates pits on Lactocooous lactis growth and nisin production.J.Biotechnol.136:717-742.

Kim,J. (2003). Preliminary Characterization of Keratinolytic Enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and Its Potential in Biodegradation of Keratin Wastes. Mycobiology. 31(4): 209-213.

Klingen, I.; Meadow, R. and Aandal, T. (2002). Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. J. Appl. Entomol. 126(5): 231-237.

Kodaria, Y. (1961).Biochemical studies on the muscardine fungi in the silk worms, *Bombyx mori* L. Journal of faculty Textile Technology . Sinshu University.5:1-68.

Kole,M.M.,Draper,I.andGerson,D.F.(1998).J.Chem.Technol.Biotechnol.41,197-206.

Kornberg, A. (1990). Why purify enzymes. "In Method In Enzymology" Vol, 182(edited by Deutscher, M.P.) 1-5, Academic press. New York.

Krishna,V. ; Gupta,M. ; Gupta,N. ; Gaudani,H. ; Trivedi,S. ; Patil, P. ;Gupta, G. ; Khairnar,Y. ; Borasate,A. & Mishra,D. (2009). Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. International Journal of Microbiology Research. Vol.1. Issue.1. pp.14-18.

Kucera,M.(1981).The production of toxic protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture .Journal of Invertebrate Pathology .Vol.38.(1), pp:33-38.

Kumar ,C.G. ;Tiwari, M.P. and Jany, K.D. (1999).Novel alkaline serineproteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purifi cation and some properties. Process Biochemistry 34: 441-449.

Kumar,C. & Takagi,H. (1999).Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.Biotechnology Advances. 17.561-594.

Lacey, C.M.; Lacey, L.A. and Roberts , D.W. (1988). Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus* .J.Invert.Pathol.52:108-118.

Lacey, L.A. (1997). Manual of techniques in insect pathology (Biological Techniques) . Academic Press. Sadiego.London.Boston.408pp.

Lalor, J.H.; Chinuici, J.P. and Liewellyn, G.C.(1976). Effect of fungal metabolite , alfatoxin B1 on larval viability and gross morphology in Drosophila melanogaster in press. J. Microbiol. 17: 210-215.

Lambert, K. (2003) . Field trials using the fungal pathogen , *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) in honey bee colonies. J. Econ.Entomol.96(4):1091-1099.

Larcher ,G.;Cimon,B.;Symoens,F.Trongchin,G.;Chabase,D. and Bouchara,J. (1996).A 33 Kda serine proteinase from Scedosporium apiospermum .Biochem.J.315:11a-126.

Lavine, M.D and M.R. Strand .(2002). Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem. Mol. Biol. 32(10): 295-309.

Lehmacher, A. and Bisswanger, H. (1990). Isolation and characterization of an extremely thermostable D- glucose / xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8. J. Gen. Microbiol. 136: 679-686.

Leles, R.N.; Sousa, N.; Rocha, L.F.; Santos, A.H.; Silva, H.H.G. and Luz, C. (2010) . Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera:culicidae) Parasitol.Res.107:1271-1274.

Liang,T. ; Lin,J. ; Yen,Y. ; Wang,C. & Wang,S.(2006).Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme and Microbial Technology.Vol. 38. Issues. 1-2. pp.74-80.

Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) . The determination of enzyme dissociation constants . J. Am. Chem. Soc. , 56: 658-666 .

Liu , B-L. ; Chen , J-W. and Tzeng ; Y.M. (2000) . Production of -cyclodepsipeptides Destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae* . Biotechnol . Prog. 16 , 993 – 999 .

Liu, B-L.;Rou, T-M.; Rao, Y.K. and Tzeng, Y,-M.(2007). Effect of PH and Aeration on the production of Destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. International Journal of Applied science and Engineering , 5 ,1:17-26.

Liu, B-L. and Tzeng.(2012) . Development and applications of destruxins : A review . Biotechnology advances. Volume 30, Issue 6, pages 1242-1254.

Lord, J.C. and Fukuda, T. (1990). Aleptolegnia (Saprolegniales) pathogenic for mosquito larvae. J. Invert. Pathol.55:130-132.

Madelin,M.F.(1963).Diseases caused by Hyphomycetous fungi .pp.233-271.in E.A.Steinhaus [ed.].Insect pathology.An Advanced Treatise.Vol.2.Academic Press,New York.

Mahdneshin,Z.;Vojoudi.S.;Ghosta,Y.;Safaralizadae,M.H. and Saber, M.(2011).Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorokin against the control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera:Bruchidae) .African Journal of Microbiology Research .Vol.5 (29),pp.5215-5220.

Mahmoud, M.F.(2009). Pathogenicity of three commercial products of entomopathogenic fungi ,*Beauveria bassiana* , *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* against adults of olive fly , *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) in the laboratory . Plant Protect. Sci.45(3):98-102.

Maniania, N.K. and Odulaja, A. (1998) .Effect of species ,age and sex of tsetse on response to infection by *Metarhizium anisopliae* .Biocontrol.43:311-323.

Marzluf,G.(1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi.Microbiol.Mol.Biol.Rev.61(1):17-32.

Matsumoto,K.S.(2006) .Fungal chitinases. Research Signpost. 289-304 ISBN: 81-7736-269-0

McCoy, C. W., Samson, R. A., and D.G. Boucias (1988). Entomogenous fungi. In Handbook of Natural Pesticides, Boca, Raton, Fla: Mr ic Press. Vol. 5, Microbial Insecticides, Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, C. M. Ignoffo and N. B. Mandava, eds.

McCoy, C. & Tigano-Milani, M. (1992). Use of entomo - pathagenic fungi in biological control : A world view . Pesq. Agropec. Bras. Brasflia.27: 87-93.

Mehta ,J. ; Jakhetia, M. ; Choudhary, S. ; Mirza, J. ; Sharma, D. ; Khatri, P.; Gupta , P. and Nair , M. M.(2012). Impact of Carbon & Nitrogen Sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) *and Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi) European Journal of Experimental Biology, 2 (6):2061-2067.

Merheb-Dini, C. ; Cabral, H. ; Leite, R.; Zanphorlin, L. ; Okamoto, D.; Rodriguez, G.; Juliano, L. ; Arantes, E.; Gomes, E. & Da-Silva, R. (2009). Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Journal Agricultural and Food Chemisty. 57(19): 9210-9217.

Miller ,G .I. (1959) . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. , 3r . 426-428 .

Mishra , S. ; Kumar , P. and Malik , A. (2013) Effect of process parameters on the enzyme activity of anovel *Beauveria bassiana* isolate . International journal of current microbiology and Applied sciences . V.2 , N.9 , PP.49 – 56 .

Mnyone, L.L.; Russell,T.L.; Lyimo, I.N.; Lwetoijera, D.W.; Kirby, M.J. and Luzm, C. (2009). First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* S.S and *An. Arabiensis*(Diptera: culicidae) . Parasites and Vectors.1-4.

Mohanty, S.S. ; Raghavendra, K.; Rai, U and Dash, A.P. (2008a). Efficacy of female *Culex quinquefasciatus* with entomopathogenic fungus *Fusarium pallidoroseum.* Parasitol. Res.103:171-174.

Mohanty, S.S. ; Raghavendra, K. and Dash, A.P. (2008b).Induction of chymoelastase(Pr1) of *Metarhizum anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae .World J Microbiol Biotechnol 24:2283-2288

Molnάr, I. ; Gibsonc, D. M. and Krasnoffc, S. B.(2010). Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. Nat. Prod. Rep., vol. 27,no.9,pp: 1252 .

Moosavi-Nasab,M. and Yousefi ,A. (2011) .Biotechnological production of cellulose by Gluconacetobacter xylinus from agricultural waste .Iranian Journal of Biotechnology .Vol.9,No.2 ,pp:94-101.

Morse, R.A. (1978) .Honey bee pests,predators and diseases. Cornell Unversity Press.

Morse, R.A. and K. Flottum. (1997). Honey bee pests, predators and disease. 3rd edition. the. A. I. Root company. USA. pp. 718.

Mracek, Z.; Becvar, S.; Rezac, P.; Kindlmann, P. and Webster, J. M. (1997). Canadian steinernematid (Nematoda) isolates and their infectivity , under cold condition, to greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae. Biological control. 8(2): 160-164.

Muller-Kogler ,E. and Stein, W.(1976)Gewachshausversuche mit metarhizium anisopliae(Metsch)Sorok.zur infektion von Sitona lirmatus L. im Boden.Pflanzenschutzberichte,83,96-108.

Murray,R. ; Granner,D. ; Mayes,P. & Rodwell,V. (2003). Harper‘s Illustrated Biochemistry. Twenty-sixth edition . Mc Graw-Hill companies , Inc.USA.

Muthulakshmi, C.; Gomathi, D.; Kumar, D.; Ravikumar, G. ; Kalaiselvi, M. and Uma, C.(2011). Production ,purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation . Jordan Journal of Biological Sciences. Vol.4. No. 3. pp.137-148.

Murthy,P. & Naidu,M. (2010). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation Utilizing Coffee By-Products. World Applied Sciences Journal. 8(2):199-205.

Nadia , N.; Nehad , Z.A.; Elsayed , A.E.; Essam , M.A. and Hanan M.A.(2010). Optimization of lipase synthesis by Mucor racemosus-production in atriple impeller bioreactor . Malaysian Journal of Microbiology 6(1) :7-15.

Naidu,K.S.(2011).Characterization and Purification of Protease enzyme. Journal of Applied Pharmaceutical Science 01(03):107-112.

Namasivayam,S.; *Sivasubramanian*,S. & *Kumar*,G. (2010). Influence of media on protease production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. and

stability towards commercially available detergents, surfactants and enzyme inhibitors. International Journal of Biological Technology .1(1) :78-83.

Negi,S. and Banerjee,R.(2010).Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation .African Journal of Biochemistry Research, 4(3):73-80.

Nigam, P. (1990). Investigation of some factors important for SSF of bagasse for animal feed production. J.Microb. Technol .12:808-811. [cited from mohmmad Sae'ed ,(1996)].(in Arabic)

Nirmal,N.; Shankar,S. & Laxman,R. (2011). Fungal proteases :An Overview. Int. J. Biotech & Biosci. Vol. 1(1): pp.1-40 .

Nunes,A.; Martins,J. ; Furlaneto,M. & Barros,N. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis* . Ciência Rural. Santa Maria. Vol.40. No.9. pp. 1853-1859.

Onofre,S.B.;Gonzalez,R.R.;Messias,C.L.;Azevedo,J.L. and de Barros,N.M. (2002).LC_{50} of the Peptide Produced by the Entomopathogenic Fungus Nomuraea rileyi (Farlow)Samson Active Against Third Instar Larvae of Anticarsia gemmatalis (Lep.:Noctuidae) .Brazilian Archves of Biology and Technology.Vol.45,n.3:pp.269-275.

Paliwal N., Singh S.P. and Garg S.K. (1994). Cation induced thermal

Stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. Bioresour Technol 50:209-211.

Palsaniya, P.; Mishra, R.;Beejawat,N.; Sethi, S. and Gupta, B. L.(2012).

Optimization of alkaline protease production from Bacteria isolated from soil. Journal of Microbiology and Biotechnology Research,2 (6):858-865.

Pandit, N.P. and Maheshwari ,S.K. (2012) Optimization of Cellulase Enzyme Production from Sugarcane Pressmud Using Oyster Mushroom - *Pleurotus Sajor-Caju* by Solid State Fermentation. J Bioremed Biodegrad 3:140. doi:10.4172/2155-6199.

Park,S. ; Lee,J. & Lee,H. (2000) . Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp.98CJ11027. The Journal of Microbiology. 38(4) : 224-229.

Paterson,I.C. ;Charnley,A.K.; Cooper,R,M. and Clarkson,M.(1994).Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* .Microbiology,140,pp:185-189.

Patil,U. and Chaudhari, A.(2013). Production of Alkaline Protease by Solvent-Tolerant Alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 Isolated from Hydrocarbon Contaminated Habitat: Process Parameters Optimization .Indian Journal of Biotechnology .

Pedras, M.S.C., Zaharia , L.I and Ward , D.E.(2002) The destruxins : synthesis , biosynthesis biotransformation and biological activity. Phytochemistry , 59:579-596. DOI: 10.1016/500 31-9422(02) 00016-x.

Peek,K. ;Daniel,R.M.; Monk,C.;Parker,L. and Coolbear ,T.(1992).Purification and characterization of athermostable proteinase isolated from *Thermus* sp.strain Rt 41 A . European Journal of Biochemistry.Vol.207.NO.3 .PP. 1035-1044.

Poprawski, T. J., Robert, P. H. and Maniania, N. K. (1994). Contact activity of the mycotoxin destruxin E to *Empoasca vitis. Journal of Applied Entomology*117, 135 -143.

Powell,J.A. and Opler, P.A.(2009).Moths of western north America.University of Calfornia press, pl.24-51,p.186.

Prakash,G.V.S.B. and Padmaja,V.(2012).Substrate effects and abiotic factors influencing protease enzyme production in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* .African J.of Biotechnology.Issn 1684-5315.

Prosser, J.I. and A.J. Tough, (1991). Growth mechanisms and growth Kinetics of filamentous microorganisms. Crit. Rev. Biotechnol., 10: 253-274.

Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-Álvarez, C. (2006). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology, 99, 1955–1966.

Quiot, J. M., Vey, A., Vago, C. and Pais, M. (1980). Anti-viral activity of a mycotoxin- study of the toxin of the hyphomycete *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok in lepidoptera celt-culture. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* 291,763 766.

Quiot, J. M., Vey, A. and Vago, C. (1985). Effects of mycotoxins on invertebrate cells *In vitro. Advances in Cell Research* 4, 203-212.

Qureshi,A. ; Bhutto,M. ; Khushk,I. & Dahot,M. (2011). Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(26). pp. 5173-5181.

Rahman, R.N.A.; Geok. L.P.; Basri. M. and Saleh. A.B, (2005).Physical Factors Affecting the Production of Organic Solvent-tolerant Protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain k. Bioresource technology (96) :429-436.

Raju, K.; Jaya, R. and Ayyanna, C. (1994). Hydrolysis of casein by Bajara protease importance. Biotechnol. Coming Decadea, **181**: 55–70

Ramon, A.M.;Porta,A. and Fonzi, W.A.(1999).Effect of environmental Ph on morphological development of Candida albicans is mediated via the pac C-related transcription factor encoded by PRR2.J.Bacteriol.181(24):7524-7530.

Rani, M. R., Prasad, N. N. and Sambasivarao ,K.R.S. (2012). Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. Asian J. Exp. Biol. Sci. vol,3(3): 565-576.

Rao,M.; Tanksale,A.; Ghatge,M. and Deshpande, V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases . Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3):597-635.

Rao, Y. ; Lu, S. ; Liu, B. and Tzeng, Y. (2006). Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. Biochemical Engineering Journal. Vol. 28. Issue(1). pp. 57–66.

Ravallec, M.; Riba, G. and Vey, A. (1989). Sensibilite *d'Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) a I'hyphomycete entomopathogen *Metarhizium anisopliae* . Entomophaga.34:209-217.

Rath,A.C.;Worledge,D.;Anderson,C. and Carr,C.J.(1995). Virulence of the Entomogenous Fungi *Metarhizium anisopliae*(Metschnikoff) Sorokin, *M. flavoviride* Gams and Rozsypal and *Beauveria bassiana* (Ballsamo) Vuillemin to *Adoryphorus couloni* (Burmeister) (Coleoptera: Scarabaeidae). J . Aust. ent. Soc., 34: 181-186

Ravikumar,G.; Gomathi,D.; Kalaiselvi,M. & Uma ,C.(2012). A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju;* production, purification and partial characterization. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1- 6.

Raw, G. R. (1954). Enemies of bees. Bee World. 35: 159-160.

Reddy ,L.V.A. ; Wee, Y.J.and Ryu, H.W. (2008). Purification and Characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3. J Chem Technol Biotechnol 83: 1526-1533.

Reddy, M.; Kumar,C.; Swathi,K. ; Nagamani,B.; Venkateshwar, S. & Rao, L. (2011). Extracellular alkaline protease production from isolated *Bacillus subtili*s SVR -70 by using submerged fermentation . International Journal of Pharma . Research & Development. Vol.3. pp.216-220.

Reed, G. (1975). Oxidoreductase, in ((Enzyme in Food Processing)) P. (176-196) Academic Press.

Rhodes, A. and Fletcher, D. L. (1966) . Principles of industrial microbiology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford .

Rifaat, H.M.;Hassanein, S.M.; El-Said,O.H.;Saleh, S.A. and Selim, M. S. M.(2005) Purification and characterisation of extracellular neutral protease from *Streptomyces microflavus*. Arab J. Biotech., Vol. 9, No. (1) Jan. (2006): 51-60.

Roberts, D. W. (1966a). Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* 1. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *Journal of" Invertebrate Pathology*8, 212 221.

Roberts, D. W. (1966b). Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* II. symptoms and detection in moribund hosts. Journal of Invertebrate Pathology 8, 222 - 227.

Roberts, D.W. (1970).*Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. Miscellaneous publications of the Entomological Society of America.7:140-155.

Roberts, D. W. (1980). Toxins of entomopathogenic fungi. In 'Microbial Control of Insects, Mites and Plant Diseases' (H. D. Burges, ed.), pp. 441-463. Academic Press, New York.

Roberts, D. (1989). World picture of biological control of insects by fungi .Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 84. Supl.III. 89-100.

Roberts, D. W. & St.Leger, R. J. S. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. Adv Appl Microbiol 54: 1–70.

Romero, F.; Garcia L.A.;and Diaz, M. ;(1998). Protease production from whey at high concentration by *Serratia marcescens.* Resour. Environ. Biotechnol., 2: 93–115. Cited from Muthulakshmi *et. al.* (2011).

Rustiguel, C.B; Jorge , J,A. and Guimarães, L.H.S.(2012). Optimization of the chitinase production by different *Metarhizium anisopliae* strains under solid – state Fermentation with silkworm chrysalis as substrate using CCRD. Advances in Microbiology,2,268-276.

Samarntarn, W.; Cheevadhanarak, S. and Tanticharoen, M. (1999). Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *J. Gen. App. Microbiol*. 45: 99-103.

Samson, R. A., Evans, H. C., and Latg, J.P. (1988). Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Samuels, R. I., Charnley, A. K. and Reynolds, S. E. (1988a). Application of reversed-phase hplc in separation and detection of the cyclodepsipeptide toxins produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae. Journal of Chromatographic Science* 26, 15-19.

Samuels, R. I., Charnley, A. K. and Reynolds, S. E. (1988b). The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia* 104, 51-58.

Samuels, R. I., Reynolds, S. E. and Charnley, A. K. (1988c). Calcium-channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*90, 403-412.

Samuels, K. D. Z., Pinnock, D. E. & Allsopp, P. G. (1989). The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin(Deutermycotina: Hyphomycetes) as a biological control-agent of Inopus rubriceps (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). J. Aust. Entomol. Soc. 28, 69–74.

Sandhu, S.S.; Rajak, R.C. and Sharma, M. (1993). Bioactivity of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae as pathogens of Culex tritaeniorhynchus and Aedes aegypti : Effect of instar, dosages and time. Indian Journal of microbiol.33:191-197.

Sandhya, C. ; Adapa, L. K. ; Nampoothiri, K. M. ; Binod, P. ; Szakacs, G. ; Pandy, A. (2004) . Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation . J. Basic Microbiol. , 44(1): 49-58

Santos, A.H.; Tai, M.H.; Rocha, L.F.; Silva, H.H.G. and Luz, **C**.(2009).Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on Aedes aegypti.Bio control.1:37-42.

Saravanakumar,K.;Thiyagarajan,A.andKaviyarasan,V.(2010).Optimization of medium constituents for the production of extracellular alkaline protease by Aspergillus fiscberi using response surface experimental design.J.Biosci.Res.,Vol.1(3):118-129.

Saurabh, S.; Jasmine, I.; Pritesh, G. & Kumar, R. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. Malaysian Journal of Microbiology . Vol.3(1). pp.1 – 6.

Saxena,R.K.;Sheoran, A.;Giri,B.and Davidson,W.S.(2003). Purification strategies for microbial lipases. (Review). Journal of Microbiological Methods 52 , 1 – 18.

Scholte, E.J.; Njiru, B.N.; Smaliegange, R.C.; Takken, W. and Knols, B.G.J. (2003a). Infection of malaria(*Anopheles gambiae* S.S) and filariasis(*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Malaria Journal.2:1-10.

Scholte, E.J.; Takken, W. and Knols, B.G.J. (2003b). Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae* S.S (Diptera: Culicidae) mosquitoes.Netherlands Entomological Society.14:25-29.

Scholte, E.J.; Knols, B.G.J.; Samson, R.A. and Takken , W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control : areview.J. of Insect Sci.4:24pp.

Scholte, E.J.; Takken, W. and Knols, B.G.J. (2007). Infection of adults *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* . Acta Trop.102:151-158.

Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations. John Wiley and Sons New York, London.

Sepahy,A. & Jabalameli, L. (2011) . Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. Isolated from soil sample of Lavizan Jungle park. Enzyme Research. pp. 1-7 .

Sevinc,N. & Demirkan, E. (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. J.Biol. Environ.Sci. 5(14): 95-103.

Shahid, A.A, Qayyumrao A., Bakhsh A., Husnain T. (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. Arch. Biol. Sci. 64(1):21-42.

Shankar, S. ; Rao, M. & Laxman, R. (2011), Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. .Process Biochemistry.Vol. 46. pp. 579-585.

Shanthakumar, S.P.; P.D. Murali; S. Malarvannan; V. R. Prabavathy and S.Nair.(2010). Laboratory evaluation on the potential of entomopathogenic fungi, *Nomuraea rileyi* against tobacco caterpillar, *Spodopteralitura Fabricius* (Noctuidae: Lepidoptera) and its safety to *Trichogramma* sp. J. Biopesticides 3(1 Special Issue) 132-137.

Sharma, N. & De, k.(2011). Production, Purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. Agric. Biol. J. N. Am. 2(7): 1135-1142.

Shimanuki , H . (1981) . Controlling the greater wax moth , apest of honey combs. United States University of Minnesota Science and Education Administration .pp 11.

Shimizu, S.; Tsuchitani, Y. & Matusumoto, T. (1992). Purification and properties of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* . Journal of Sericultural Science of Japan. Vol. 61. No.5 : 421-428.

Šimkovič,M. ; Kurucová,A. ; Hunová,M. & Varečka, Ľ.(2008). Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. Acta Chimica Slovaca. Vol.1. No. 1: 250 – 264.

Šimkovič,M. ; Gdovinova´,A. ;Zemkova´,Z and Varecˇka,L. (2012). Properties of secreted protease from vegetative *Trichoderma atroviride* mycelia cultivated with protein inducer reveal a complex protein-recognition mechanism. Antonie van Leeuwenhoek. 101: 253–265.

Singh, R.S.; Dhaliwal, R. and Puri, M. (2007a). Partial purification and characterization of exo inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of High- Fructose Syrup. J. M.icrobiol. Biotechnol. 17(5): 733-738.

Singh, R.S.; Sooch, B.S. and Puri, M. (2007b). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology 98: 2518-2525.

Singh, G and Prakash, S. (2010) . Fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) metabolites for controlling malaria and filarial in tropical countries. Advances in Biomedical Research. 238-242.

Sirisha,S. ; Gurvinder, K . & Padmini,P. (2010). Strain improvement of entomopathogenig fungal species *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by Protoplast Fusion. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.Vol.1: Issue-3.

Skrobek , A.; Shah, F.A; Butt, T.M.(2008). Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. Biocontrol.53:361-373.

Sloman, I. S. and Reynolds, S. E. (1993). Inhibition of ecdysteroid secretion from *Manduca* prothoracic glands in vitro by destruxins - cyclic depsipeptide toxins from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae. Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23, 43- 46.

Smith, A.D.; Datta,S.P. ; Howard, S.G.; Campbell, P.N.; Bentley R. and McKenzie,H.A. (1997) . Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford.

Soares, Jr.G.G. (1982).Pathogenesis of infection by the hyphomycetous fungus *Tolypocladium cylindrosporum* in *Aedes sierrensis* and *Culex tarsalis* (Diptera: culicidae) . Entomophaga.27: 283-300.

Soares,F. ; Braga,F. ; Geniêr,H.; de Araújo,J. ; Ferreira,S. ; Araujo,J. ; Tavela,A. ; Vilela,V. & de Queiróz, J. (2010). Optimization of medium composition for protease production by *Paecilomyces marquandii* in solid-state fermentation using response surface methodology. African Journal of Microbiology Research. Vol. 4(24). pp. 2699-2703.

Somkuti,G. & Babel, F. (1968). Purification and Properties of *Mucor Pusillus* Acid Protease. Journal of Bacteriology. Vol. 95. No . 4. p.1407-1414. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 5(4) : 349-360 .

Soundarapandian, P. and Chandra ,R., (2007). Mass Production of Endomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the Laboratory. Research Journal of Microbiology, 2: 690-695.

Springer , J.P; Cole, R.J.; Dorner ,J.W.; Cox, R.H.; Richard, J.L.; Barnes , C.L.; Vander Halem, D.(1984). Structure and conformation of roseiotoxin B.J.Am. chem..soc.106,2388-2392.

Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (1984) . Principles of fermentation technology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford .

Stawski, D.; Rabiej, S.; Herczynska,L. & Draczynski, Z. (2008). Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. Journal Of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol.93(2):489-494.

Steinhause, E.A.(1949).Principle of In Pathology .New York.Tornto. London.Mc Graw- Hill book company INC.757.

St. Leger, R. J., Staples, R. C. and Roberts, D. W. (1992c). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, Ssga, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae. Gene*120, 119-124.

Suganthi ,C.;Msgeswari,A. ;Karthikeyan,S.;Anbalagan,M.;Sivakumar,A. and Gothandam,K.M.(2013).Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments.J.of Genitic Engineering and Biotechnology .11,47-52.

Sumantha, A.; Larroche,C. & Pandey,A.(2006 a). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food- Grade Proteases : A Perspective. Food Technol. Biotechnol. 44 (2): 211-220.

Sumantha, A.; Deepa, P.; Sandhya1, C.; Szakacs, G.; Carlos, R. S. and Pandey1, A.(2006 b).Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. Brazilian archives of biology and technology. Vol.49, n. 5 : pp. 843-851.

Sung, G.H.; Hywel-Joues, N.L.; Sung, J.M.; Luangsa-ard, J.J.; Stresh tha, B. and Spatafora, J.W.(2007) . Phylogenetic classification of *cordyceps* and clavicipitaceous fungi. Studies in Mycology.57:5-59.

Suzuki, A. and Tamura, S. (1972). Isolation and structure of protodestruxin from *Metarrhizium anisopliae. Agricultural and Biological Chemistry* 36, 896-898.

Szabo, I. T. and Heikel, D. (1987). Fumigation with SO_2 to control wax moth in honeybee comb. Bee World. 68: 37-38.

Tal, J. and Attathom, T. (1993). Insecticidal potential of the insect parvovirus GmDAN. Archives of Biochemistry and Physiology. 22: 345-356.

Tambekar,D. & Tambekar ,S. (2011). Partial Characterization and Optimization of Protease Production from newly isolated *Cohnella Thermotolerans* from Lonar Lake .Journal of Research in Biology. Vol.1. No.4:292 – 298 .

Tamerler, C.; Ullah, M.; Adlard, M.W. and Keshavarz, T. (1998). Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. FEMS Microbiol. Lett. 168(1): 17-23.

Tanada, Y. and Kaya, H.K. (1993). Insect Pathology, Academic Press, San Diego, CA.

Tangthirasunun , N.; Poeaim , S. ; Soytong, K. ; Sommartya, P. and Popoonsak, S. (2010) Variation in morphologyy and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. Journal of Agricultural Technology. Vol. 6(2): 317-329

Tedders, W.L.; Weaver, D.J.; Wehunt, E.J. and Gentry, C.R. (1982). Bioassay of *Metarhizium anisopliae* , *Beauveria bassiana* and *Neoaplectana carpocapsae* against the larvae of the plum curculio, *Conotrachelus uenuphar*(Herbst) (Coleoptera: Curculionidae) . Environ.Entomol.11: 901-904.

Tew, J.E.(2001). Beekeeping principles, a Manual for the Beginner, a Guide for the Gardener. 1st edition. James. E. Tew and Walter. T. Kelley Co. Inc. (USA , 2000). pp. 200.

Theunis, W. (1997). Technigues and media for isolation , culture, storage and Bioassay of *Metarhizum anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. Pacific Regional Agriculture Programme.14:1-11.

Thungrabeab, M. & Tongma,S.(2007). Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insect. KMITL Sci.Tech. J. Vol.7. No. 1.

Tiago, P.V.; Fungaro, M.H.P.; Furlaneto, M.C.(2002) Cuticle- degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. Lett. Appl. Microbiol. 34:91–94.

Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J. and Jansson, H.-B. (2002) Purification and characterization of chitinases from the nematophagousfungi *Verticillium,chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet Biol* 35, 67–78.

Toriello, C.;Pe´ rez-Torres, A.; Burciaga-Dı´az, A.; Navarro-Barranco, H.; Pe´ rez-Mejı´a, A.; Lorenzana-Jime´ nez, M. and Mier, T.(2006). Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of Metarhizium anisopliae var. anisopliae from spittlebugs. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 278–287.

Tremacoldi, C.R.; Carmona, E.C. (2005). Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. World J. Microbiol Biotechnol 21: 169–172.

Turner, W. B. and Aldridge, D. C. (1983). Triterpenoids and steroids. In 'Fungal Metabolites 2nd Edition (W. B. Turner and D. C. Aldridge, eds.), pp. 225-336. Academic Press, London.

Unsal, S.; Ozparlak, H. and Aktumsek, A. (2004). Effect of diflubenzuron on the integument of fifth instar *Galleria mellonella* larvae. Phytoparasitica. 32(1): 43-51.

Upadhyay , M.K.; Kumar ,R. ;Kumar, A.; Gupta , S.; Kumari , M.; Singh ,A.; Jain , D. and Verma, H.N.(2010). Optimization and Characterization of an extracellular protease from *Aspergillus Flavus* "MTCC277". African Journal of Agriculture Research Vol.5(14) pp.1845-1850.

Usharani, B. & Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. African Journal of Microbiology Research. Vol.4.(11).pp. 1057-1063.

Ustariz , F. ;Laca,A. & Diaz, L. (2008). Fermentation condition increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. Rev.Tec.Ing. Univ.Zulia. Vol.31. No.1.79-89.

Vaidya , R.J.; Shah, I.M.; Vyas, P.R. and Chhatpar , H.S.(2001).Production of chitinase and optimization from anovel isolate Alcaligenes xylosoxydans: potential in antifungal biocontrol. World J. Microb. Bioechnol. 17:691-696.

Varley, H.; Gowenlock, A.H.; Bell, M.(1976) . *Practical Biochemistry*, 5th ed.; I.W. Heinemann: London, UK .

Venkatsubbaiah , P.; Tisserat , N.A. and Chilton , W.S.(1994) metabolites of Ophiosphaerella herpotricha Mycopathologia,128,155-159.

Ventosa,A.;Nieto,J.J.andOren,A. (1998).Microbiol.Mol.Biol.Rev.62:504-544.

Verma, P. and Prakash, S. (2010). Efficacy of *Chrysosporium tropicum* metabolite against mixed population of adult mosquito (*Culex quinquefasciatus* , *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*) after purification with flash chromatography. Springer-Verlag.107: 163-166.

Verma,J.;Modi,D.; Sharma,R. & Saxena,S.(2011). Vetal role of Alkaline Protease in Bio-industreis : A review . Plant archives . Vol . 11. No. 2.pp. 1083-1092.

Vilcinskas, A. and M. Wedde.(1997a). Inhibition of *Beauveria bassiana* proteases and fungal development by inducible protease inhibitors in the haemolymph of *Galleria mellonella* larva, Bio. Sci. and Tech 12:591-602.

Vilcinskas, A., Matha, V. and Gotz, P. (1997b). Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella. Journal of Insect Physiology* 43, 1149-1159.

Vilcinskas, A., Matha, V. and Gotz, P. (1997c). Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of lnsect Physiology* 43, 475-483.

Vining, L. C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology* 44, 395-427.

Voet, D. & Voet, J. (2010). Biochemistry. Fourth edition. John Wiley & Sons , Inc.

Votruba ,J.;Pazlarova ,J.;Dvorakova,M.,Vachora,L.,Strnadova,M.; Kucerova, H.,Vinter,V.;Zourabian,R.and Chaloupka,J.(1991). External factors involved in the regulation of synthesis of an extracellular proteinase in Bacillus megaterium:effect of temperature .Applied Microbiology and Biotechnology,Vol.35,No.3,pp.352-357.

Wang, J.J. and Shih , J.C.H. (1999) Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, no. 6, p. 608-616.

Wang, C. ; Skrobek , A. and Butt, T.M.(2003). Concurrence of losing a chromosome and the ability to produce destruxins in a mutant of *Metarhizium anisopliae* . FEMS Microbiology Letters 226.P.373-378.

Wang,L.; Ridgway,D.; Gu,T. & Moo-Young,M. (2005) . Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentation. Biotechnology Advances . 23. pp.115-129.

Wang, B. ; Liu, X. ; Wu, W. ; Liu, X. & Li, S. (2009). Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis.* Microbiological Research. 164: 665-673.

Ward , A.G. and A. Courts . (1977). The Science and Technology of Gelatin. A Cademic press . London , New York , San Francisco . 506pp.

Warhust, P. and Goebel, R. (1995). The bee book , beekeeping in the warmer areas of Australia. State of Queensland, Department of Primary Industries. pp. 244.

Weibin, S.H.I. and Mingguang, F.E. (2004). Ovicidal activity of two fungal pathogens(Hyphomycetes) against *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina: Tetranichidae) . Chinese Sci. Bull.49(3): 263-267.

Wellingta, C.A.N. and Meire, L.L.M.(2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic Bacillus sp.Braz .J. Microbiol.35:1-2.

Whitaker,J.(1972). Principles of Enzymology for the Food Science . Marcel Dekker, Inc. New York.

White, A.; Handler, p. and Smith, E. (1973). Principles of biochemistry. Mc Grow – Hill Book Company – Albakistan Publication, New York.

Witting,G. (1965).Astudy of the role of blood cells in insect disease.12th Int.Congr.Ent.(London,1964),743.

Wood , H.W.(1958).Technical and pharmaceutical uses of gelatine. J. Photogr. Sci , 6 , 91-96. (Cited from ward and courts , 1977).

Wright, V.F.; Vesonder, R.F. and Ciegler, A. (1982).Mycotoxins and other fungal metabolites as insecticide. In: Kurstak, E. (ed.) microbial and viral pesticides . Marcel Dekker.580pp.

Yandri, ; Suhartati,T.; Herasari,D. & Hadi,S. (2008). The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride polyethylenglycol. European Journal of Scientific Research. Vol. 23 No.1. pp. 177-186.

Yang, J. ; Huang, X. ; Tian, B. ; Wang, M. ; Niu ,Q. & Zhang, K. (2005). Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematicidal activity. Biotechnology Letters. 27 : 1123–1128.

Yang, J.; Liang, L. ; Zhang, Y. ; Li, J. ; Zhang, L. ; Ye, F. ; Gan, Z. & Zhang, K. (2007a). Purification and cloning of a novel serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellina varietas* and its potential roles in infection against nematodes. Appl. Microbiol Biotechnol. 75: 557-565.

Yang,J. ; Li,J. ; Liang,L. ; Tian,B. ; Zhang,Y. ; Cheng,C. & Zhang, K. (2007b). Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. Arch. Microbiol. 188:167–174.

Yang ; Jin-Kui, ; Ye,F. ; Mi,Q. ; Tang,S. ; Li,J. & Zhang,K.(2008). Purification and Cloning of an Extracellular Serine Protease from the Nematode-Trapping Fungus *Monacrosporium cystosporium*. J. Microbiol. Biotechnol. 18(5): 852–858.

Yeh, S.F.; Pan, W.; Ong, G.T.; Chiou, A.J.; Chuang, C.C.; Chiou, S.H. and Wu, S.H. (1996) . Study of structure-activity correlation in destruxins , aclass of cyclodepsipeptide possessing suppressive effect on the generation of hepatitis B virus surface antigen in human hepatoma cells .Biochem and Biophysi. Res. Communica.229: 65-72.

Yike, I. (2011). Fungal proteases and their pathophysiological effects . Mycopathologia . 171:299–323.

Yin , L.J.;Hsu, T.H. and Jiang , S.T.(2013) . Characterization of Acidic protease from *Aspergillus niger*, BCRC 32770. Journal of Agriculture & Food chemistry .

Zabriskie , D.W. , W.B. Armiger , D.H. Phillips and P.A. Albano . (1980). Trader's guide to fermentation media formulation. Traders protein , Memphis , Tennessee. (cited from Dokken , 2007).

Zacarin, G. G.; Gobbi, N. and Chaud-Netto, J. (2004). Host preference of *Apanteles galleria* (Wilkinson) (Hymenoptera : Braconidae) for *Galleria mellonella* (L.) or *Achroia grisella* (Fabricius) (Lepidoptera : Pyralidae). Neotropical Entomology. 33(1): 65-70.

Zanphorlin, L.; Cabral,H.; Arantes,E.; Assis,D.; Juliano,L.; Juliano, M.; Da-Silva,R.; Gomes,E. & Bonilla-Rodriguez,G. (2011) . Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora sp.*, Process Biochemistry. 46: 2137-2143.

Zayed,A. (2003). Pathgenicity of two *Beauveria bassiana* indigenous isolates towards the greater wax moth *Galleria mellonella* L. Larvea in Egypt. Efflatounia. 3: 10-14.

Zhao, M. ; Huang, J. ; Mo, M. & Zhang, K. (2005). A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. Fungal Diversity. 19: 217-234.

Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science* **37**: 375-379.

Zimmermann, G., Papierok, B. and Glare, T.(1995).Elias Metschinokoff, Elie Metschnikoff or Ilya Mechnikov (1845-1916) a pioneer insect pathology, the first describer of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and how to translate a Russian name. *Biocontrol Science and technology* **5**:527-530.

Summary

This studying consist of two main axis , the first was carried out to evaluation the efficiency of local isolate of fungus *Metarhizium anisopliae* for control Grater wax moth *Galleria mellonella* L. by using fungal suspension and secondary metabolites concentrations , and in the second axis the study was focused on production and characterization of an effective biological control agent from this fungus . The results showed as later :

1- (A) The different concentration of fungal spore suspension have affected the life stages of *G. mellonella* . The mortality percentages of eggs was 62.88 % at the concentration of 1×10^7 spore/ml and decreased to 31.78 % at the concentration of 1×10^4 spore/ml . The larval instars have showed highest mortality rate reached (100 , 96.99 and 90.97) % for 1st , 4th and 7th larval instars respectively , during 120 h at the concentration of 1×10^7 spore/ml . The values of lowest mortality rate when treated with 1×10^4 spore /ml during 120 h were (62.90 , 58.88 , 50.86) % for 1st , 4th and 7th larval instars respectively . 54.89 % the highest mortality rate for the pupae was recorded when treated with $1\times^7$10 spore /ml while 36.85 % were found to be dead when exposed to $1\times^4$10 spore /ml. for the adults , and the treatment with highest concentration of spore suspension caused a high adult mortality, i.e 69.95 % and 63.94 % for adult males and for females after 168 hours. While the lowest mortality percentages were 41.91 % and 43.91 % when treated with 1×10^4 spore/ml for the same time .

(B) The relationship between cultural filtrate which contain different secondary metabolites and percentage of mortality of egg ,larvae, pupa and adult were positive. 60.91 % of egg dead at a concentration 100% , and 26.82 % were dead at the concentration 25% . The full cultural filtrate caused a mortality at a rate (100 , 97 and 91.99) % from 1st , 4th and 7th larval instars respectively during 72 h . Decline to (67.96 , 64.96 and 54.95) % mortality was found for the same instar respectively when treated with concentration 25 % at 72 hours . This indicates that the secondary metabolites of the fungal were more effective on 1st larval instars than the 7th instars . that highest mortality was 50.96 % at the concentration 100% and 32.95 % with concentration 25 % for pupa . As for adults the results revealed that the highest mortality was (68.90 and 58.98) % for male and female respectively at a concentration 100% while the lowest rate of mortality were (37.98 and 32.97) % for male and female at aconcentration of 25% respectively.

2- Display the isolate of fungus ability on the production enzymes protease , chitinase and lipase but the optimum production recorded for protease in minimal media supported with casein where the specific activity was 41.12 units / mg protein . The largest inhibitor diameter for resistant organisms was 5.3 mm which taken from destroxins media against *S. aureus* .

3- The optimal conditions for the enzyme production from the fungus used in this study were found using medium composed of Date syrup (DS) at concentration 0.05 % supplemented with 0.5 % gelatin , at initial pH 5.5 with an inoculum size 16 % , and incubation at 30 ˚C on a rotary shaker at 100 rpm for 72 h.

4- Protease from culture filtrate of *M. anisopliae* , were partially purified by precipitation with 60% ethanol and Ion exchange chromatography using DEAE- Cellulose (Batch wise) then by gel filtration chromatography using Sephadex G-150 . Fold purification was 28.726 with 11.97 % yield for the enzyme at the final step of this purification procedure.

5- The purified Protease was characterized . The results showed the following :

A- The K_m values for protease were (0.178 , 0.179 and 0.182) mg/ml , against gelatin , BSA and casein as substrates , respectively . While the V_{max} values were (0.465 , 0.339 and 0. 465) mg/ml.min for the three substrates respectively too .

B- The optimum pH for the Protease activity was pH 8.0 , and it was stable in the pH ranged between (7.0 - 9.0) .

C-The Protease showed heat stability at (20-30) ˚C for 30 minutes .

D-The efects of protease inhibitors and various metal ions on the enzyme activity were determined. Only in the presence of PMSF at (5) mM the enzyme activity was strongly inhibited, indicating that protease enzyme belongs to the serine-type peptidase group, While iron chloride ($FeCl_2$) had stimulated effect on the enzyme activity .

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbela

College of Education for pure sciences

Department of Biology

Production and Characterization of Alkaline protease from *Metarhizium anisopliae* as abiological control agent against Greater wax moth *Galleria mellonella*

A thesis Submitted

To the Council of the College of Education for Pure Sciences - Kerbela University as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Philosophy Dactora degree of science in Biology / Zoology (Biological control)

By

Muna Ibrahim Jasim AL-Musawi

M. Sc. In Biology / zoology

Supervision

Assist Prof.Dr.MOHAMMAD REDDA ANNON

1436 *A.H.* 2015 *A.D.*