

تقويم نشاط إنزيم التاناز المنتج بفعل الفطرين *Trichoderma citrinoviride* و *Trichoderma brevicompactum* المعزولين من ترب حراجية سورية على تفكيك التانينات

منال النحلاوي¹، عدنان علي نظام¹ ومنال داغستاني²

(1) قسم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: manalnhlaoui5.92@gmail.com

(2) قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

النحلاوي، منال، عدنان علي نظام ومنال داغستاني. 2021. تقويم نشاط إنزيم التاناز المنتج بفعل الفطرين *Trichoderma citrinoviride* و *Trichoderma brevicompactum* المعزولين من ترب حراجية سورية على تفكيك التانينات. مجلة وقاية النبات العربية، 39(2): 126-134. أُجري هذا البحث خلال الفترة 2019-2020 بهدف تعريف نوعين من *Trichoderma* المعزولين من ترب حراجية، والتحرري عن كفاءة كل منهما في التفكيك الحيوي للتانينات ونشاط إنزيم التاناز المنتج منهما. عُزل النوع *Trichoderma citrinoviride* من منطقة ميسلون في دمشق، وتميز بنمو كثيف للأبواغ في مركز وسط الزرع، ولون مستعمرات خضراء مصفرة، وعُزل النوع *T. brevicompactum* من منطقة بلوران في اللاذقية، وتميز بحلقات منتظمة متحدة المركز، بلون أصفر. تفوق *T. citrinoviride* في التفكيك الحيوي، إذ كانت النسبة المئوية في تفكيك تراكيز مختلفة من التانينات (2، 4 و 6%) التانينات [جمعت من السنديان العادي (*Quercus coccifera*) من منطقة بملكة في طرطوس] في الوسط السائل، وبلغت نسبة التفكيك 85، 87 و 90%، للتراكيز الثلاثة، على التوالي، بعد 12 يوماً من التحضين، ووصل نشاط التاناز المنتج إلى 37.9 وحدة/مغ. أما نسبة التفكيك في النوع الثاني *T. brevicompactum* فبلغت 67، 80 و 89%، على التوالي، أيضاً بعد 12 يوماً من التحضين، ووصل نشاط الإنزيم المنتج إلى 35.2 وحدة/مغ.

كلمات مفتاحية: *Trichoderma*، التانينات، التاناز، التفكيك الحيوي، نشاط الإنزيم.

المقدمة

ترتبط مقدرة الأحياء الدقيقة على النمو وتتحمّل التراكيز العالية من التانينات أو استعمالها كمصدر وحيد للكربون بامتلاكها إنزيم التاناز (tannase) (EC 3.1.1.20)، الذي يعمل على تفكيكها إلى حمض الغاليك (gallic acid) أو حمض الإلاجيك (ellagic) والغلوكوز (glucose) (Govindarajan et al., 2018). لإنزيم التاناز أهمية كبيرة في التطبيقات الصناعية والطبية، إذ يشكل 7% من السوق العالمية للإنزيمات في فترة 2015-2020 (Albuquerque et al., 2020). أنتج الإنزيم من مصادر مختلفة، كأعضاء حيوانات العاشبة (Sabu et al., 2006)، والنباتات (Lekha & Lonsane, 1997)، والبكتيريا مثل *Enterobacter* و *Lactobacillus* (Govindarajan et al., 2018؛ Wang et al., 2018)، وأنتج حديثاً من الفطور لمقدرتها على إنتاج الإنزيم بتراكيز عالية، وبتكاليف منخفضة، حيث تتمي غالبية الفطور على المخلفات الزراعية (Al-Mraai et al., 2019)؛ *Trichoderma* المرحلة الناقصة للجنس *Hypocrea* الذي يصنف من شعبة الفطور الزقية Ascomycota (Jangir et al., 2017)، من أكثر أجناس الفطور انتشاراً

توجد التانينات (المواد الدباغية) Tannins في الأوراق والخشب واللحاء والشمار والأزهار من عرايات البذور ومغطة البذور، وتكون 5-20% وتبلغ في بعض الأنواع 40% من الوزن الجاف للنباتات (Van Diepeningen et al., 2004)، وهي مستقلبات ثانوية تمثل مجموعة غير متجانسة من المركبات عديدة الفينول (Sharma et al., 2019). لهذه المواد خصائص طبية بالتراكيز المنخفضة، لكن ازدياد تركيزها وتراكمها يؤدي إلى أضرار على النباتات والأحياء الدقيقة المتعايشة معها أو المفيدة لها، فهي تعمل على إعاقة تفكيك المواد العضوية في التربة، وتعيق نمو الأحياء الدقيقة وتثبط إنزيماتها (Triebwasser et al., 2012)، وترتبط بالعناصر المعدنية المغذية كالفوسفور والمغنيزيوم والكالسيوم مكونة معقدات عسرة الامتصاص، ما يترك تأثيراً ضاراً في النمو النباتي ويعرقل التمعن (Adamczyk et al., 2013).

ظهرت، اختُبر منها الجنس *Trichoderma* وفقاً للخواص المجهرية المحددة له. نُقيت عزلات الفطر بعد زرعها على أوساط زراعية جديدة مرات متكررة حتى الحصول على مستعمرات نقية تماماً بهدف تصنيفها، حيث تمت زراعة الفطر على وسط PDA، وتتميته عند حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ تحت ظروف 12 ساعة إضاءة و12 ساعة ظلام (متناوبة)، اعتماداً على المراجع الأساسية للتصنيف.

تعريف التريكودرما

حددت أنواع *Trichoderma* اعتماداً على السمات المجهرية [أنماط حوامل الكونيدات (conidiophores) والزوائد القارورية (phialides)، والأبواغ الكونيدية (conidia spores)، والأبواغ الكلمايدية (chlamydospores)]، بعد التلوين بملون أزرق لآكتوفينول، وفُحصت بالمجهر الضوئي على نمطين من التكبير (400 X، 600 X)، إضافةً إلى الخواص المورفولوجية للمستعمرات النامية، وفق المراجع الأساسية التي ذكرت المفاتيح التصنيفية للأنواع المسجلة في هذا البحث (Błaszczuk et al., 2014؛ Siddiquee 2017؛ Yabuki et al., 2014).

استخلاص التانينات وتنقيتها جزئياً

استعملت طريقة هاربورن (Harborne 1973) لاستخلاص التانينات الخام من أوراق السنديان (*Quercus coccifera*)، بمذيبات مختلفة القطبية للحصول على التانينات تتابعياً؛ إذ غسلت الأوراق أولاً، وجففت بدرجة حرارة الغرفة في الظل، ثم طحنت وأُجري استخلاص التانينات بطريقة الاستخلاص المتتابع باستخدام السوكسليه. أُخذ 60 غ من الأوراق المطحونة، واستخلصت بالمذيبات العضوية الإيثري البترولي والهكسان 95% (مذيبات لا قطبية) عند حرارة $60-80^\circ\text{C}$ بالتتابع مدة 6 ساعات لكل مذيب، للتخلص من الأصبغة والدهون، ثم استُعمل الإيثانول 95% (مذيب قطبي) مدة 48 ساعة للحصول على التانينات الخام. فصلت التانينات عن الإيثانول بالمبخار الدوار وجُفف الناتج، بعد ذلك جُففت العينة النباتية تماماً من المذيبات ووضعت في الماء الساخن عند حرارة 80°C مدة 48 ساعة، لإتمام عملية الاستخلاص، ثم رشح السائل باستعمال أوراق الترشيح بقبوب قطرها 11 ميكرومترًا. أُخذ السائل الطافي وجفف عند حرارة 50°C ، بعد ذلك جمع ناتج المستخلص الإيثانولي (بعد تبخير المذيب) مع ناتج المستخلص المائي (بعد تبخير الماء) وأُجري فيه تحديد الفينولات والتانينات.

تحديد الفينولات الكلية

حددت الفينولات الكلية باستعمال طريقة فولين سيوكالتو (Folin Ciocalteu)، حيث حُصن 1 مل من الخلاصة النباتية و4 مل

في العالم، وله مقدرة كبيرة على التكيف مع البيئات المختلفة حتى الفقيرة بالغذاء منها (Goh et al., 2018)، وهو كذلك من أهم فطور مكافحة الحيوية للفطور الممرضة للنباتات، مثل: *Verticillium dahlia* (Mokhtari et al., 2018)، *Fusarium oxysporum* (Giurgiu et al., 2018)، ويُستعمل لإنتاج الصادات الحيوية المثبطة لخمائر مبيضات البيض *Candida albicans* والجراثيم الممرضة مثل *Pseudomonas fluorescens* و *E. coli*، *Bacillus subtilis* (Awada et al., 2018).

هدف هذا البحث إلى تصنيف أنواع جنس *Trichoderma* المعزولة من غابات حراجية واختبار قدرتها على تفكيك التانينات وإنتاج التاناز وتقييم نشاطه، لا سيما بسبب التأثير الضار للتانينات في البيئة والنباتات والحيوانات والإنسان، وندرة الأبحاث المحلية والعالمية على تقويم كفاءة التريكودرما في التفكيك الحيوي للتانينات، وإنتاج التاناز من عزل (أ) وتعريف أنواع *Trichoderma* المعزولة من ترب حراجية في سورية، (ب) استخلاص التانينات وتنقيتها جزئياً من أوراق السنديان العادي (*Quercus coccifera*)، وتعيين الفينولات والتانينات فيها، (ج) تقويم مقدرة الأنواع المعزولة على تفكيك التانينات المستخلصة من أوراق السنديان بتركيز مختلفة في الوسط السائل، و (د) إنتاج إنزيم التاناز من الأنواع المعزولة وتقييم نشاطه.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جُمعت عينات التربة من الطبقة الدبالية في غابات حراجية في بلوران باللاذقية (6 تشرين الأول/أكتوبر 2019) وميسلون بدمشق في 27 تشرين الأول/أكتوبر 2019، بعد إزالة الطبقة السطحية وحفر التربة بعمق 20 سم، وأُخذت العينات من أكثر من نقطة في الموقع وخلطت معاً، لتكوين عينة واحدة ممثلة للموقع الواحد. كما جُمعت عينات أوراق نبات السنديان العادي من منطقة بملكة في طرطوس بتاريخ 30 أيلول/سبتمبر 2019.

عزل التريكودرما من التربة

عُزلت فطور *Trichoderma* من مصادر متنوعة من التربة في بلوران وميسلون وفق طريقة التخفيفات (Rohilla & Salar 2012)، حيث أُخذ 1 غ من التربة الجافة هوائياً، ووضعت في 9 مل ماء معقم للحصول على محلول تربة أم. بعد ذلك أُجري التخفيف حتى 10^6 ، وزرع من آخر تخفيف 1 مل على وسط البطاطا دكستروز آغار PDA (HIMEDIA-India)، ثم حضنت الأطباق المملحة في الحاضنة عند حرارة $28 \pm 2^\circ\text{C}$ مدة 5 أيام. بعد الفحص المجهرى للأجناس التي

الطافي كإنزيم خام في التلاجة عند حرارة -20°س لحين الإستعمال (Kapoor & Iqbal, 2013).

قياس نشاط إنزيم التاناز

حدد نشاط الإنزيم بحلمهة الروابط الإستيرية في حمض التانيك، بإضافة 0.5 مل من خلاصة الإنزيم الخام إلى 2 مل من 0.35% من حمض التانيك المحضر بمحلول موقى الأسيتات 0.05 M (وزن/حجم)، وضبط pH عند 5.5، ثم أخذ 20 ميكرولتراً من مزيج التفاعل وأضيف إليه 2 مل من الإيثانول لإيقاف التفاعل وسُجلت الامتصاصية في جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 320 نانومتراً في الزمن (t₁) قبل بدء التفاعل، وسُجلت امتصاصية مزيج التفاعل بدون إضافة الإيثانول، بعد حضنه مدة 20 دقيقة (t₂) عند حرارة 40°س. قيس النشاط الإنزيمي اعتماداً على القانون التالي (Brahmbhatt & Modi, 2015):

$$\frac{114 \times \text{التغير في الامتصاصية}}{(t_2 - t_1)} = \text{النشاط الإنزيمي (وحدة/مل)}$$

الدراسة الإحصائية

أجريت التجارب باستعمال ثلاثة مكررات لكل شرط تجريبي، ولمقارنة المعايير في المجموعات المختلفة استعمل اختبار ANOVA 2 way، واعتمدت احتمالية P < 0.005 كقيمة لهذا التعداد، واستعمل برنامج SPSS version 22 لمعالجة البيانات وتحليلها إحصائياً ورسم المنحنيات البيانية، باستعمال المتوسط الحسابي والانحراف المعياري.

النتائج والمناقشة

نتائج عزل الفطور وتعريفها

بينت نتائج جمع العينات وجود مستعمرات *Trichoderma sp.* على هيئة نمو قطني متكتل، بلون أخضر متدرج أو أصفر على وسط دكستروز البطاطا الصلب PDA. وعند الفحص المجهرى كانت الخيوط الفطرية حاجزية مرتبطة بحوامل الأبواغ الكونيدية المتشعبة ذات الزوائد القارورية، كما ظهرت الأبواغ الكونيدية بيضوية أو كروية، وكانت الأبواغ الكلاميدية ببنية أو انتهائية.

ونتيجة دراسة الصفات الشكلية، اعتماداً على مظهر الأفطورة (الميسليوم)، والصفات المجهرية، اعتماداً على الأبواغ الكلاميدية، ومظهر تفرع حوامل الأبواغ، ومظهر الأبواغ الكونيدية، أمكن التأكد من وجود نوعين من فطور التريكودرما: *T. citrinoviride*، *T. brevicompactum*.

من كربونات الصوديوم 2% (Na²CO³)، مع 200 ميكرولتراً من كاشف فولين سيكاتو، ثم حضن المزيج مدة ساعة بالظلام وسُجلت الامتصاصية بالمطيافية الضوئية عند طول موجة 765 نانومتراً باستعمال سلسلة معيارية من حمض الغاليك (McDonald et al., 2001).

تحديد التانينات الكلية

حددت التانينات الكلية باستعمال طريقة ترسيب البروتينات، حيث حُضِن 1 مل من الخلاصة النباتية مع 2 مل من مصّل ألبومين البقر BSA (1مغ/مل)، تُرك المزيج 15 دقيقة، ثم تُثَل لمدة 15 دقيقة بسرعة 4000 دورة، أُخذ الراسب وأُذيب في 4 مل من SDS-Triethanolamine (1% وزن/حجم). أُضيف بعد ذلك 1 مل من كاشف كلوريد الحديد (0.13 M) FeCl₃، وتُرك المزيج 15 دقيقة ثم قُرأت الامتصاصية عند طول موجة 510 نانومتراً، باستعمال سلسلة معيارية من حمض التانيك التجاري (Mondal & Pati, 2000).

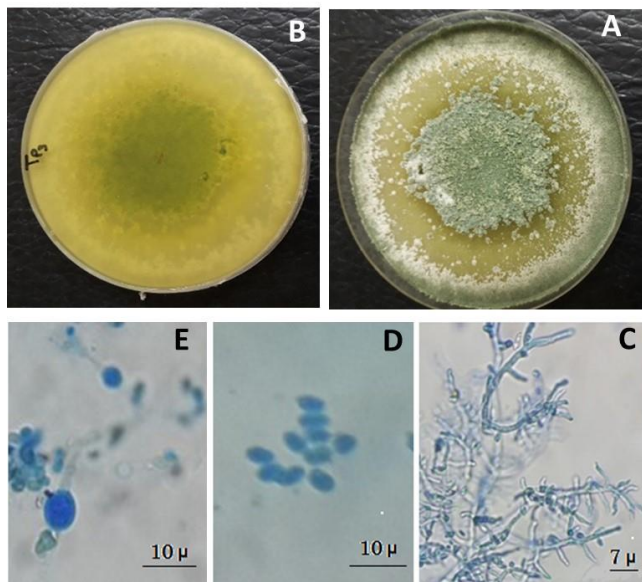
تفكيك التانينات على الأوساط السائلة

حضر وسط تفكيك التانينات السائل باستعمال التانينات المستخلصة من أوراق السنديان والمنقاة جزئياً كمصدر وحيد للكربون، بتركيز مختلفة (2، 4 و 6% وزن/حجم)، كما ذكر سابقاً (Murugan et al., 2007)، مع بعض التعديل، حيث أُضيفت 0.002 غ Na₂MoO₄·2H₂O لزيادة إنتاج الإنزيم وضُبطت درجة الحموضة عند pH 7 من أجل عمل الإنزيم، ثم عُقم الوسط بالأوتوكلاف مدة 20 دقيقة بضغط 1 جو. حضر معلق بوعي من الفطر كلفاح، باستعمال محلول Tween 80 0.01% المحضر بالماء المقطر المعقم لفصل الأبواغ الكونيدية عن الميسليوم، حيث لُفح كل 100 مل من الوسط بمقدار 2 × 10⁻⁷ بوغية، ثم وضع الوسط السائل مع اللقاح في حاضنة هزازة عند حرارة 28°س، ومعدل اهتزاز 300 دورة في الدقيقة، مدة 12 يوماً، مع مراقبة نسبة التفكيك في الأيام 6 و 12 من النمو بقياس تركيز التانينات في وسط الزرع في الأيام 6 و 12 من التحضين، بطريقة ترسيب البروتينات ومقارنتها بالشاهد.

استخلاص الإنزيم الخارج خلوي

حُضِر وسط استخلاص الإنزيم من خلاصة الشعير السائل إخلاصة الشعير (malt extract) 2%، فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (K₂HPO₄) 0.05%، كلوريد الأمونيوم (NH₄Cl) 0.1% إضافة إلى حمض التانيك 1% (وزن/حجم). لُفح الوسط بمعلق الأبواغ بكل 100 مل من الوسط 2 × 10⁻⁷ بوغية، ثم حضن الوسط في حاضنة هزازة عند حرارة 30°س، 200 دورة/دقيقة، مدة 3 أيام. بعد الحض رشح الوسط بقماش نوعي، وفُصلت الكتلة الحيوية للفطر، ثم أُخذ السائل وثقل بمثقلة مبردة عند حرارة 4°س مدة 15 دقيقة بمعدل 5 آلاف دورة/دقيقة. حُفظ

توضع عليها الأبواغ الكونيدية بيضوية الشكل، صفراء اللون، أبعادها 3.4×5 ميكرومتراً. تميز النوع بعدم وجود الأبواغ الكلاميدية (جدول 1، شكل 2).



شكل 1. الصفات المورفولوجية للنوع *Trichoderma citrinoviride*. A= الوجه العلوي للمستعمرة، B= الوجه السفلي للمستعمرة، C= حوامل الكونيديا بتكبير 400، D= أبواغ كونيدية بتكبير 600، E= أبواغ كلاميدية بتكبير 600.

Figure 1. Morphological features of *Trichoderma citrinoviride*. A= Colony top look, B= Colony under side look, C= Conidiophores 400X, D= Conidiospores 600X, E= Chlamydiospores 600X.

صفات النوع *T. citrinoviride*

بدأت المستعمرة على وسط PDA خلال 5 أيام من التحضين عند حرارة 28 ± 2 °س، قطنية المظهر بطيئة النمو، قطرها 45 مم مع إظهار كثافة بوعية في المركز بلون أخضر مصفر، وحلقة على حواف الطبق، ورائحة مميزة، وصباغ صفراء منتشرة في الطبق، أما الوجه الخلفي للمستعمرة فكان بلون أخضر قاتم في المركز. كانت حوامل الأبواغ الكونيدية خيوطاً دقيقة، وتفرعها غير منتظم، توضعت الزوائد القارورية على نهاية تفرعاتها، مستقيمة النهاية، أبعادها 2.9×6.9 ميكرومتراً، وعرض قاعدتها 1.9 ميكرومتراً، تتوضع عليها الأبواغ الكونيدية بلون أخضر مصفر، وذات جدر ملساء، أبعادها 2.2×3.6 ميكرومتراً. وفي نهاية أسبوع التحضين أخذت تتشكل الأبواغ الكلاميدية ذات التوضع الانتهائي في الخيوط الفطرية، مستديرة الشكل، ذات جدار مضاعف، أبعادها 6.9×7.6 ميكرومتراً (جدول 1، شكل 1).

صفات النوع *T. brevicompactum*

بينت النتائج، بعد 5 أيام من التحضين عند حرارة 28 ± 2 °س، أن خيوط المسليوم بيضاء اللون، حاجزية، تفرع تفرعات عديدة لتكوين حلقتين متراكبتين، قطر المستعمرة 90 مم، بطيئة النمو، عديمة الصباغ في الوسط، بلون أصفر، قطنية المظهر، الوجه الخلفي للمستعمرة بلون كريمي مصفر، يصبح قاتماً في مناطق تشكل الحلقات من كثافة الأبواغ الكونيدية. تفرعت حوامل الأبواغ الكونيدية على نحو كبير بانتظام، وتوضعت الفروع الأولية التي نشأت من الخيط متقابلة بزواوية 90 تقريباً، بنهايتها زوائد قارورية، توضعت عامودياً، منتخفة الوسط ومستديرة، قصيرة، أبعادها 3×3.9 ميكرومتراً، عرض القاعدة 1.7 ميكرومتراً،

جدول 1. متوسط قطر المستعمرة والزوائد القارورية والأبواغ الكونيدية والأبواغ الكلاميدية لنوعي *Trichoderma*.

Table 1. Mean colony diameter and morphological features (phialides, conidial spores, chlamydiospores) for two *Trichoderma* species.

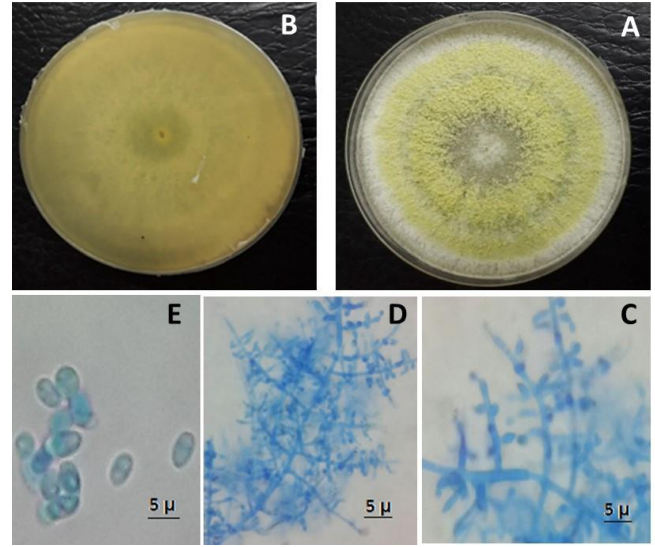
<i>T. citrinoviride</i>		<i>T. brevicompactum</i>			
Maysalon	ميسلون	Blluran	بلوران	Location	المنطقة
Irregular	غير منتظم	Regular	منتظم	Branching of conidiophores	تفرع حوامل الأبواغ
Slow	بطيء	Slow	بطيء	Growth rate	معدل النمو
45		90		Colony diameter (mm)	قطر المستعمرة (مم)
0.28±6.96		0.28±3.90		Length	الطول
0.36±2.96		0.36±3.06		Width	العرض
0.29±1.90		0.32±1.73		Base	القاعدة
0.38±3.63		0.44±5.03		Length	الطول
0.26±2.23		0.29±3.40		Width	العرض
0.28±7.66		Absent	غير موجودة	Length	الطول
0.28±6.93				Width	العرض
					الأبواغ الكونيدية
					Conidia
					الأبواغ الكلاميدية
					Chlamydiospore

(Luczaj *et al.*, 2014). ويعود تباين التراكيز لاختلاف النوع النباتي والجزء المدروس منها، إذ تتفاوت نسبة التانينات في الأجزاء النباتية (Scalbert, 1991). كما يمكن أن يعزى التباين أيضاً لاختلاف مكان الجمع، إذ تتكوّن في النبات استجابة لتأثير رعي الحيوانات العاشبة ومسببات الأمراض والأشعة فوق البنفسجية ونقص المغذيات والعوامل البيئية الأخرى، مثل: ارتفاع درجة الحرارة أو انخفاضها، والإجهاد المائي، والضوء الشديد وكثافة التربة (Constabel, 1999) إضافة إلى اختلاف الطريقة المتبعة في الاستخلاص واختلاف المذيب المستعمل.

نتائج تفكيك التانينات على الأوساط السائلة

أظهرت نتائج التفكيك على الوسط السائل ازدياد معدل التفكيك الحيوي لنوعي الفطريات بازدياد تراكيز التانينات، فقد بلغت أعلى قيمة تفكيك للنوع *T. citrinoviride* 87% عند التركيز 6% في اليوم السادس من التحضين، وازدادت نسبة التفكيك بازدياد مدة الحضانة، إذ بلغت 90% في اليوم الثاني عشر، أما أدنى قيمة تفكيك فسُجلت عند التركيز 2%، إذ بلغت نسبة التفكيك 59% في اليوم السادس من التحضين، وازدادت إلى 85% في اليوم الثاني عشر من التحضين. أما النوع الثاني *T. brevicompactum* فكان أقل تفكيكاً من *T. citrinoviride*، إذ سُجلت أعلى نسبة تفكيك 84% عند التركيز 6% في اليوم السادس من التحضين، وازدادت إلى 89% في اليوم الثاني عشر، وكانت أدنى نسبة تفكيك 56% عند التركيز 2% في اليوم السادس من التحضين، وبلغت نسبة التفكيك 67% في اليوم الثاني عشر في التركيز نفسه (جدول 2). عند مقارنة قيمة التفكيك الحيوي وتراكيز التانينات، بينت النتائج وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية ($P < 0.05$) بين متوسطات نشاط نوعي التريكويدوما على تراكيز مختلفة من التانينات في الأوساط السائلة. تتفق نتائج هذا البحث مع أبحاث عُنيبت بتفكيك التانينات في عصير الرمان، إذ بلغت نسبة التفكيك 89.36% باستعمال فطر *Talaromyces verruculosus* (Aharwa & Parihar, 2019)، ويعادل ذلك نسبة تفكيك *T. brevicompactum* إذ بلغت 89%، وقد ارتفعت نسبة التفكيك في فطر *T. citrinoviride* لتصل إلى 90%، وهذا ما يقارب نسبة تفكيك فطر *T. verruculosus* للتانينات في عصير البرتقال التي بلغت 93% (Aharwa & Parihar, 2019).

وفاقت نتائج هذا البحث ما وصلت إليه نتائج أبحاث سابقة (Prigione *et al.*, 2018)، باستعمال أربعة أجناس فطرية (*Talaromyces*، *Paecilomyces*، *Aspergillus*، *Penicillium*) في تفكيك التانينات البسيطة والمكثفة المستخلصة من خشب *Schinopsis lorentzii* و *Caesalpinia spinosa* ولحاء الأوكاسيا (*Acacia mearnsii*) بتراكيز عالية 30–50%، فكانت نسبة تفكيك



شكل 2. الصفات المورفولوجية للنوع *Trichoderma brevicompactum*. A= الوجه العلوي للمستعمرة، B= الوجه السفلي للمستعمرة، C= حوامل الكونيديا والقوارير بتكبير 400، D= حوامل الكونيديا بتكبير 400، E= أبواغ كونيدية بتكبير 600.

Figure 2. Morphological features of *Trichoderma brevicompactum*. A= Colony top look, B= Colony under side look, C= Conidiophores and phalides 400X, D= conidiophores 400X, E= Conidiospores 600X.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج أبحاث سابقة (Błaszczuk *et al.*, 2014؛ Siddiquee, 2017؛ Yabuki *et al.*, 2014) من حيث الخواص المورفولوجية والمجهرية وأبعاد الأبواغ الكونيدية والكلاميدية والزوائد القارورية، باتباع الشروط المماثلة من حرارة ومدة التحضين والإضاءة ووسط الزرع.

تركيز التانينات والفينولات في الخلاصة المنقاة جزئياً

أظهرت نتائج الاستخلاص المتتابع لأوراق السنديان (*Quercus coccifera*) أن تركيز التانينات في كلتا الخلاصتين المائية والإيثانولية 0.27 مغ/مل بعد التبخير والتجفيف، وبلغ تركيز الفينولات الكلية 1.28 مغ/مل، أما في خلاصة الإيثر البترولي والهكسان فكانت خالية من التانينات والفينولات.

عند مقارنة نتائج هذا البحث بنتائج الدراسات السابقة كان هناك اختلاف في تركيز التانينات والفينولات الكلية. ففي دراسة للتانينات من قلف ثلاثة أشجار من السنديان (*Quercus suber*) باستعمال الميثانول والماء، بلغ تركيز الفينولات الكلية 4.8 مغ/مل، وتركيز ellagitannins 2.6 مغ/مل (Cadahía *et al.*, 1998)، وكان تركيز الفينولات الكلية 4.2، 4.3 و 2.6 مغ/مل وتركيز التانينات 3.4، 3.3 و 0.9 مغ/مل، في التانينات المستخلصة من ثمار *Q. petraea*، *Q. robur*، *Q. pubescens* باستعمال الماء كمذيب، على التوالي

أبحاث سابقة، إذ أبدى التاناز المنتج من فطر *Trichoderma viride* المعزول من ترب الشاي المتحلل، أقصى نشاط نوعي 4.3 وحدة/مغ عند استعمال أوراق الجوافة وأدنى نشاط 0.06 وحدة/مغ باستعمال أوراق الكافور (Shajitha & Nisha, 2018)، كما اختلفت نتائج هذا البحث مع نتائج سابقة (Aharwar & Parihar, 2019)، إذ أبدى التاناز المنقى جزئياً من *T. verruculosus* المعزول من ترب غنية بالتانينات نشاطاً نوعياً بلغ 13.2 وحدة/مغ، وكانت النتائج أعلى في بحث آخر (Iqbal & Kapoor, 2012)، إذ كان النشاط الحجمي للإنزيم من *T. harzianum* MTCC 10841 32.3 وحدة/مغ، أما في هذا البحث فقد أبدى النوع *T. citrinoviride* نشاطاً إنزيمياً حجماً بلغ 11.48 وحدة/مغ، والنوع *T. brevicompactum* 8.98 وحدة/مغ.

التانينات 60% بفعل *Aspergillus tubingensis* و *Paecilomyces variotii*.

نشاط إنزيم التاناز

بينت النتائج تفوق التاناز الخام المستخلص من *T. citrinoviride* الذي بلغ معدل نشاطه النوعي 37.9 وحدة/مغ، وكان معدل النشاط النوعي للنوع *T. brevicompactum* 35.24 وحدة/مغ، باختلاف تركيز البروتين في الخلاصة الإنزيمية واختلاف النشاط الحجمي (جدول 3)، كما بينت النتائج وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية ($P < 0.05$) بين متوسطات فعالية الإنزيم لنوعي *Trichoderma*.

لوحظ تفوق معدل نشاط إنزيم *T. citrinoviride* الذي بلغ 37.94 وحدة/مغ والنوع *T. brevicompactum* 35.24 وحدة/مغ مقارنة بنتائج

جدول 2. معدل تركيز التانينات (مغ/مل) ونسبة تفكيك التانينات المضافة بتركيزات مختلفة (2، 4 و 6%) إلى الوسط المغذي بوساطة نوعين من الفطر *Trichoderma*. الأرقام بين قوسين تمثل النسبة المئوية للتفكيك.

Table 2. Average tannins content (mg/ml) and % degradation by two *Trichoderma* sp. following different incubation periods, when different tannin concentrations (2, 4 & 6%) were added to the nutrient media. Values between brackets represent % degradation.

Concentrations			النوع الفطري Fungal sp.	وقت أخذ العينة Sampling time
%6	%4	%2		
0.0025±1.09	0.006±0.55	0.004±0.27		قبل التفكيك Before degradation
0.02±0.15 (87)	0.01±0.13 (77)	0.001±0.11 (59)	<i>T. citrinoviride</i>	اليوم 6 من التحضين 6 th day of incubation
0.01±0.18 (84)	0.01±0.14 (75)	0.004±0.12 (56)	<i>T. brevicompactum</i>	
0.005±0.10 (90)	0.01±0.09 (87)	0.04±0.04 (85)	<i>T. citrinoviride</i>	اليوم 12 من التحضين 12 th day of incubation
0.01±0.12 (89)	0.003±0.11 (80)	0.005±0.09 (67)	<i>T. brevicompactum</i>	

جدول 3. نشاط إنزيم التاناز الناتج من نوعي *Trichoderma* المعزولين.

Table 3. Tannase enzyme activity obtained from the two isolated *Trichoderma* spp.

Fungus species		نوع الفطر	
<i>T. brevicompactum</i>	<i>T. citrinoviride</i>		
0.008±0.255	0.007±0.294		البروتين (مغ/مل) Protein concentration (mg/ml)
0.11±8.988	0.36 ±11.48		النشاط الإنزيمي الحجمي (وحدة/مل) Enzyme activity (unit/ml)
35.24	37.94		النشاط الإنزيمي النوعي (وحدة/مغ) Specific enzyme activity (unit/mg)
0.20±0.6	0.20±0.5		الكتلة الحيوية (غ) Biomass (g)
0.01±0.265	0.01±0.418		وزن الخلاصة الأنزيمية (غ) Weight of the enzymatic extract (g)

مقدرتها الاستقلابية لتحمل سمية التانينات واستعمالها كمصدر للغذاء (Prigione *et al.*, 2018)، إضافة إلى العديد من العوامل التي تؤثر في إنتاج التاناز، مثل الركائز ومصدر الكربون ومصدر النتروجين وإضافة إيونات المعادن وزيادة الحجم الجزيئي للركائز وطريق الاستخلاص والنشاط الإنزيمي (Niehaus & Gross, 1997).

يمكننا أن نستنتج من هذه الدراسة وجود نوعين من جنس التريكويدرا المعزولين من تربة حراجية أول مرة في المجموعات الفطرية السورية الأولى: من تربة بلوران باللانقية *T. brevicompactum* والثاني من تربة ميسلون غرب دمشق *T. citrinoviride*، مع تفوق النوع *T. citrinoviride* في التفكيك الحيوي للتانينات بالتراكيز الثلاثة المستخدمة، حيث ظهرت فروق معنوية بينه وبين النوع الثاني *T. brevicompactum*. كما أبدى النوع *T. citrinoviride* نشاطاً إنزيمياً مرتفعاً (37.94 وحدة/مل)، مقارنة بالنوع الثاني *T. brevicompactum* الذي بلغ نشاط إنزيمه 35.24 وحدة/مل).

يعزى سبب اختلاف نسبة تفكيك التانينات لتباين نشاط التاناز الذي ينتجه الفطر لاختلاف الأجناس والأنواع المدروسة (Aharwa & Parihar, 2019؛ Shajitha & Nisha, 2018)، وكذلك يعود تباين نسبة التفكيك والنشاط لاختلاف مصدر التانينات وتركيزها المستعمل كمصدر وحيد للكربون لنمو الفطر (Iqbal & Kapoor, 2012). ويعود اختلاف تركيز التانينات في الوسط لمقدرة الفطر على تحمّل التراكيز العالية منها، إضافة إلى نشاط الإنزيم الذي قد يتشبط بتراكيز عالية للركيزة (Bajpai & Patil 1996, 1997)، وقد يؤثر اختلاف التركيب الكيميائي للتانينات في كفاءة الفطر ونشاطه في التفكيك، إذ إن الغالوتانينات تكون سهلة التفكيك بفعل الفطور، أما الإلاجيك تانين والتانينات المعقدة فتكون صعبة التفكيك بسبب الرابطة C-C بين هياكلها (Mingshu *et al.*, 2006)، وقد يكون لمكان الانتشار تأثير في مقدرة الفطور المعزولة على التفكيك، إذ إن الأجناس المعزولة من البيئة التي تحتوي على المخلفات النباتية الغنية بالتانينات تكون قد طورت من

Abstract

Al-Nhlaoui, M., A.A. Nizam and M. Daghestani. 2021. Evaluation of Activity of Tannases Produced by Isolated from Syrian Woody Soils *Trichoderma citrinoviride* and *T. brevicompactum* on Tannins Degradation. Arab Journal of Plant Protection, 39(2): 126-134.

This study was conducted during the period 2019–2020 to identify *Trichoderma* spp. isolated from woody soils and assessing their efficacy for biodegradation of tannins through tannase enzyme activity produced. Results obtained confirmed the presence of two species; *Trichoderma citrinoviride*, which was isolated from Maysalon area near Damascus, and characterized by yellowish green colony with dense growth of spores at the center of the colony, and *Trichoderma brevicompactum* isolated from the Balluran area near Lattakia characterized by yellow colonies with concentric rings. *Trichoderma citrinoviride* had higher biodegradation activity, measured by degrading different tannins concentrations (2, 4, 6%) collected from *Quercus coccifera* from Bmelka area in Tartous in liquid medium and led to 85, 87 and 90% degradation, for the three concentrations, respectively, following 12 days incubation. The activity of the produced tannase was measured to be 37.9 units/mg. Whereas, the decomposition rate of the three tannin concentrations by *Trichoderma brevicompactum* reached 67, 80, 89%, respectively, again after 12 days of incubation, with enzyme activity measured to be 35.2 units/mg.

Keywords: *Trichoderma*, tannins, tannase, biodegradation, enzyme activity.

Affiliation of authors: Manal Al-Nhlaoui¹, Adnan Ali Nizam¹ and Manal Daghestani². (1) Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus, Syria, Email: manalnhlaoui5.92@gmail.com; (2) Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Damascus, Syria.

References

- Adamczyk, B., V. Kitunen and A. Smolander. 2013. Response of soil C and N transformations to condensed tannins and different organic N-condensed tannin complexes. Applied Soil Ecology, 64: 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.003>
- Aharwar A. and D. Parihar. 2019. *Talaromyces verruculosus* tannase production, characterization and application in fruit juices detannification. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 18: 101-114. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.052>
- Albuquerque, K.K., W. Albuquerque, R. Costa, J. Batista, D. Marques, R. Bezerra, P. Herculano and A. Porto. 2020. Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and

chromatographic techniques. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 23: 101453.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101453>

- Al-Mraai, S.T.Y., D. Al-Fekaiki and A. Abd Al-Manhel. 2019. Purification and characterization of tannase from the local isolate of *Aspergillus niger*. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 7: 029-034. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70106>

- Awada, N.E., H. Kassemb, M. Hamedc, A. El-Fekya, M. Elnaggard, K. Mahmouda and M. Alie. 2018. Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. Mycology, 9: 70-80. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423126>

- Bajpai B. and S. Patil.** 1996. Tannin acyl hydrolase (EC3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 217–220.
- Bajpai, B. and S. Patil.** 1997. Induction of tannin hydrolase (EC3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzyme Microbial Technology*, 20: 612–614.
- Blaszczak, L.M., M. Siwulski, K. Sobieralski, J. Lisiecka and M. Jedryczka.** 2014. *Trichoderma* spp.–application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54: 309–314. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>
- Brahmbhatt, D. and H. Modi.** 2015. Comparative studies on methods of tannase assay. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 3: 715–720.
- Cadahía, E., E. Conde, B. Fernández de Simón and M. García-Vallejo.** 1998. Changes in tannic composition of reproduction cork *Quercus suber* throughout industrial processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2332–2336. <https://doi.org/10.1021/jf9709360>
- Constabel C.P.** 1999. A survey of herbivore inducible defensive proteins and phytochemicals. Pages 137–166. In: *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores*. A.A. Agrawal, S. Tuzun and E. Bent (eds.). APS Press, USA.
- Giurgiu, R.M., A. Dumitraş, G. Morar, P. Scheewe and F. Schröder.** 2018. A study on the biological control of *Fusarium oxysporum* using *Trichoderma* spp., on soil and Rockwool substrates in controlled environment. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici cluj-napoca*, 46: 260–269. <https://doi.org/10.15835/nbha46110939>
- Goh, J., B. Nam, J. Lee, H. Mun, Y. Oh, H. Lee, N. Chung and Y. Choi.** 2018. First Report of six *Trichoderma* species isolated from freshwater environment in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 46: 213–225. <https://doi.org/10.4489/KJM.20180027>
- Govindarajan, R.K., M. Krishnamurthy, R. Neelamegam, D.J.H. Shyu, K. Muthukalingan and K. Nagarajan.** 2019. Purification, structural characterization and biotechnological potential of tannase enzyme produced by *Enterobacter cloacae* strain 41. *Process Biochemistry*, 77: 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.10.013>
- Harborne, J.B.** 1973. *Phytochemical Methods*. First edition. Halsted Press, Division of John Wiley & Sons, Inc. New York. 383 pp.
- Iqbal, H. and A. Kapoor.** 2012. Tannin degradation efficiency of tannase produced by *Trichoderma harzianum* MTCC 10841 and its biochemical properties. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1: 106–117.
- Jangir M., R. Pathak and S. Sharma.** 2017. *Trichoderma* and its potential applications. Pages 323–339. In: *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. D.P. Singh, H. B. Singh and R. Prabha (eds.). Springer, Singapore. 763 pages. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4>
- Kapoor, A. and H. Iqbal.** 2013. Efficiency of tannase produced by *Trichoderma harzianum* MTCC 10841 in Pomegranate juice clarification and natural tannin degradation. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4: 641–650.
- Lekha, P.K. and B. Lonsane.** 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in Applied Microbiology*, 44: 215–260. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(08\)70463-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70463-5)
- Luczaj, L., A. Adamczak and M. Duda.** 2014. Tannin content in acorns (*Quercus* spp.) from Poland. *Dendrobiology*, 72: 103–111. <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.072.009>
- McDonald, S., P. Prenzler, M. Autolovich and K. Robards.** 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73:73–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
- Mingshu, L., Y. Kai, H. Qiang and J. Dongying.** 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 68–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510600>
- Mokhtari, W., M. Achouri, A. Remah and H. Boubaker.** 2018. *Verticillium dahlia* -eggplant as the pathosystem model to reveal biocontrol potential of three *Trichoderma* spp. in greenhouse conditions. *Atlas Journal of Biology*, 2018: 417–421. <https://doi.org/10.5147/ajb.v0i0.172>
- Mondal, K.C. and B. Pati.** 2000. Studies on extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR6. *Journal of Basic Microbiology*, 40: 223–232. [https://doi.org/0.1002/1521-4028\(200008\)40:4<223::AID-JOBM223>3.0.CO;2-L](https://doi.org/0.1002/1521-4028(200008)40:4<223::AID-JOBM223>3.0.CO;2-L)
- Murugan K., S. Saravanababu and M. Arunachalam.** 2007. Screening of tannin acyl hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Bioresource Technology*, 98: 946–949. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.031>
- Niehaus, J.U. and G. Gross.** 1997. A gallotannin degrading esterase from leaves of pedunculate Oak. *Phytochemistry*, 45: 1555–1560. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00261-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00261-6)
- Prigione V., B. Trocini, F. Spina, A. Poli, D. Romanisio, S. Giovando and G. Varese.** 2018. Fungi from industrial tannins: potential application in biotransformation and bioremediation of tannery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 4203–4216. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8876-x>
- Rohilla, S.K. and R. Salar.** 2012. Isolation and characterization of various fungal strains from agricultural soil contaminated with pesticides. *Research Journal of Recent Sciences*, 1: 297–303.
- Sabu A., C. Augur, C. Swati and A. Pandey.** 2006. Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 41: 575–580. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.05.011>
- Scalbert A.** 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)

- Shajitha, G. and M. Nisha.** 2018. Tannase production from agro-wastes as substrate by *Trichoderma viride*. International Journal of Current Research in Life Sciences, 7: 1994-1997.
- Sharma, K., V. Kumar, J. Kaur, B. Tanwar, A. Goyal, R. Sharma, Y. Gat and A. Kumar.** 2019. Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. Toxin Reviews, 38: 1-13.
<https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813>
- Siddiquee S.** 2017. Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Diversity of *Trichoderma*. National University of Ireland Galway, Ireland.
- Triebwasser, D.J., N. Tharayil, C. Preston and P. Gerard.** 2012. The susceptibility of soil enzymes to inhibition by leaf litter tannins is dependent on the tannin chemistry, enzyme class and vegetation history. New Phytologist, 196: 1122–1132.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04346.x>
- Van Diepeningen, A.D., A. Debets, J. Varga, M. Van Der Gaag, K. Swart and R. Hoekstra.** 2004. Efficient degradation of tannic acid by black *Aspergillus* species. Mycological Research, 108: 919-925.
<https://doi.org/10.1017/s0953756204000747>
- Wang, D., Y. Liu, D. Lv, X. Hu, Q. Zhong, Y. Zhao and M. Wu.** 2018. Retracted Article: Substrates specificity of tannase from *Streptomyces sviceps* and *Lactobacillus plantarum*. AMB Express, 8: 147.
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0677-1>
- Yabuki, T., K. Miyazaki and T. Okuda.** 2014. Japanese species of the Longibrachiatum clade of *Trichoderma*. Mycoscience, 55: 196-212.
<https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.08.006>

Received: February 21, 2021; Accepted: June 1, 2021

تاريخ الاستلام: 2021/2/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/6/1