

اختبار تأثير عدة تركيبات سائلة لفطر *Trichoderma harzianum* على مدة صلاحية مستحضر المكافحة الحيوية

شادي محمد سليمان*¹ وموسى السمارة¹ ومحمد أحمد² ونوال علي³

1.المعهد العالي لبحوث البيئة، جامعة اللاذقية، اللاذقية، سورية.

2. كلية العلوم، جامعة طرطوس، سورية

3. كلية العلوم، جامعة اللاذقية، سورية

(*للمراسلة: شادي سليمان . البريد الإلكتروني: shady.soliman@latakia-univ.edu.sy هاتف: 0955186636).

تاريخ الاستلام: 2025 /07 /31 تاريخ القبول: 2025 /11 /23

الملخص

اختبرت فترة صلاحية 8 تركيبات سائلة لفطر *Trichoderma harzianum* مكونة من مواد لاصقة ومستحلبة و خافضة للتوتر السطحي، أبدأت التركيبات المختبرة فترات صلاحية متفاوتة بدأت من شهر واحد للشاهد F8 (المكون من الماء و المعلق البوغي) ووصلت إلى ستة أشهر للتركيبه F5 (المكون من الغليسرين والشمع العربي و Tween80 ونشاء الذرة وبولي فينيل بيروليدون PVP ، بولي أيتيلين غليكول) قبل أن ينخفض تركيز الأبواغ بشكل معنوي. أظهرت التركيبات الحاوية على الغليسرين و البوليميرات الواقية (PVP) و (PEG) قابلية أعلى لبقاء الأبواغ الفطرية بالمقارنة مع الشاهد وبقية المعاملات التي لا تحتوي عليها. ظهر أنّ للغليسرين دوراً هاماً في زيادة فترة صلاحية المستحضرات مقارنة بكاربوكسي ميثيل سلولوز، كما أدت إضافة نشاء الذرة للمستحضرات إلى تعزيز فترة الصلاحية ودعم استمرار تكاثر الفطر خلال الفترة الأولى من التخزين من خلال مساهمته كوسط مغذي للفطر. بينت النتائج أهمية كل من PEG و PVP في دعم استقرار وثبات تركيز الأبواغ في التركيبه F5 لفترة أطول مقارنة بباقي التركيبات، كما لوحظ أن دمج هذه البوليميرات في مستحضر واحدة أعطى أفضل نتائج مقارنة باستخدامها على حدى .

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma harzianum* ، التخدير الصلب، فترة الصلاحية، الأبواغ الكونيدية، مستحضرات حيوية

المقدمة:

تعد أنواع فطر *Trichoderma* من عوامل المكافحة الحيوية الأكثر انتشاراً والمستخدمه في مكافحة أمراض النباتات كبديل عن المبيدات الكيميائية. يمكن لأنواع *Trichoderma* أن تعزز نمو النباتات و مقاومتها للأمراض وزيادة إنتاجيتها (Hu et al., 2020; Lorito & Woo, 2015; Blaszczyk et al, 2014). يتطلب إنتاج مبيدات حيوية من عوامل المكافحة الحيوية لمسببات الأمراض النباتية تطوير بروتوكولات الإنتاج لتحسين كمية وجوده المنتج، ووضع تركيبة تحافظ على استقرار المنتج، أثناء فترة التخزين و النقل و التطبيق الحقلية مع ضمان فعاليته (Jan et al., 2011; Montesinos., 2003)، ومن المهم في عملية التصنيع ضمان حماية المكونات النشطة (الأبواغ) من كافة التأثيرات المحتملة كالجفاف والمواد الكيميائية و التلوث ودرجات الحرارة

المرتفعة. يتطلب تطوير عامل مكافحة حيوية موثوق به تحديد تركيبة مناسبة للتغلب على القيود البيئية، حيث يجب أن تجتاز عوامل المكافحة الحيوية عدة خطوات أثناء المعالجة، بما في ذلك حصاد الأبواغ، والتجفيف، والتركيب، والتخزين، والتسليم (Nakkeeran et al., 2016; Mukherjee et al., 2019). تتمثل الأهداف الرئيسية لتشكيل المبيدات الحيوية السائلة القائمة على فطر *Trichoderma harzianum* في تثبيت وحماية المواد الفعالة، وتوفير مستحضر سهل الاستخدام في التطبيق الحقل، وتقليل مخاطر تعرض المُستخدمين لها (Leggett et al., 2011). كما يهدف تطوير المستحضرات السائلة بشكل عام إلى ضمان استقرارها في التخزين، وسهولة التسليم، وزيادة المثابرة الحقلية، والحماية من العوامل البيئية (Lee et al., 2016). كما يُعدّ اختيار المواد الحاملة والمضافة أمراً أساسياً لمنع الفقد السريع للكائنات الدقيقة في التربة. لأجل ذلك استُخدمت العديد من المواد مثل ألبينات الصوديوم، وميثيل سليولوز، والصمغ العربي، والنشا، والجلسرين، وبولي إيثيلين جلايكول (PEG)، وبولي فينيل بيروليديون، كمواضع مضافة أو واقية للخلايا لتعزيز استقرار المستحضرات السائلة (Rai et al., 2016). يعاني إنتاج مستحضرات فطر *Trichoderma harzianum* من قلة فترة صلاحيته للتخزين. تبعاً لذلك، وضعت خطة لاختبار مجموعة من المواد التي يمكن أن تستخدم كمادة حاملة و مضافة لأبواغ الفطر بحيث تساعد في الحفاظ عليها وإطالة فترة حيويتها، مما يساهم في زيادة الانتاج الكمي وكفاءة التطبيق الحقلية لهذا المبيد الحيوي.

مواد البحث و طرائقه:

الحصول على العزلة الفطرية: تم الحصول على عزلة فطر *Trichoderma harzianum* المستخدمة في هذا البحث في وقت سابق من خلال مسح الحقول المزروعة بنبات الباذنجان في حماة عام 2021 وأُجريت عليها اختبارات مخبرية متنوعة، شملت معدل النمو وإنتاج الأبواغ، وأُثبتت فعاليتها في تثبيط بعض مسببات الأمراض (Soliman et al., 2023)

تحضير المعلق البوغي لفطر *Trichoderma harzianum*: استخدم لإكثار العزلة الفطرية وسط مغذي PDA محضر مسبقاً ومعقم عند حرارة 121°س لمدة 45 دقيقة بجهاز الأوتوكلاف وتتم صب الوسط المغذي في أطباق بتري زجاجية و لقع بقرص اسم من مستعمرة نقية لفطر *Trichoderma harzianum*. حضنت الأطباق على درجة حرارة 25°س لمدة 7 أيام (Cavalcante et al., 2008). حضر المعلق البوغي للفطر بإضافة Tween 80 (0.01%) v/v معقم مسبقاً على سطح المزرعة الفطرية ووحرك الطبق بشكل رحوي و كشط بعناية باستخدام قضيب زجاجي و سكب الناتج داخل أنبوب زجاجي مخبري 10 مل عبر تمريره بطبقتين من قماش الموسلين لحجز بقايا الميسيليوم. أُجريت التخفيفات اللازمة و ضبط تركيز الأبواغ عند $10^7 \times 2$ بوغة / مل باستخدام شريحة العد Neubauer chamber (Niranjana et al., 2009). أُجريت عملية التخثير الصلب على وسط حبوب القمح في مرطبات زجاجية سعة 1000 مل تحتوي كل منها على 250 غ من حبوب القمح مغطاة بسداة قطنية (الشكل 1). عدلت رطوبة الوسط عند 55% بإضافة الماء منزوع الأيونات و عقت عند 121°س لمدة 45 دقيقة. بعد التبريد ، لقع الوسط بـ 25 مل من المعلق البوغي لفطر *Trichoderma harzianum* المحتوي على $10^7 \times 2$ بوغة / مل (Roussos et al.; 1991). عدلت درجة الحموضة إلى 5.5 باستخدام حمض كلور الماء 1M HCL ، ثم حضنت عند 30°س ورطوبة 70±5% لمدة 15 يوماً. بعد انقضاء فترة التحضين حصدت الأبواغ الكونيدية من الدوارق باستخدام 50 مل من الماء منزوع الأيونات المعقم الحاوي على Tween 80 (0.01%, v/v) ووضعت الدوارق في جهاز رجاج 300د/د لمدة 30 دقيقة، ثم سكب الناتج إلى دورق معقم عبر تمريره بطبقتين من قماش الموسلين لحجز بقايا الميسيليوم واستخدام مرشح ورقي Whatman n°1 لفصل المعلق البوغي (Bedine et al., 2022). أضيف للمعلق البوغي 1% كربوكسي ميثيل سللوز (CMC) و 0.1%

Tween80 و 1% صمغ عربي Gum Arabic كمواد ناشرة و لاصقة و خافضة للتوتر السطحي، وضبط تركيز المعلق البوغي عند $5 \pm 50 * 10^{10}$ بوغة/ مل باستخدام شريحة العد Neubauer chamber.

تحضير التركيبات السائلة للمبيد الحيوي: اختبرت تركيبات سائلة تتضمن مواد حاملة ومضافة ولاصقة لأجل الوصول إلى أفضل تركيبة للوسط الحامل للمبيد الحيوي تحافظ على حيوية وفعالية الأبواغ لأطول فترة ممكنة وهي موضحة بالجدول 1: غليسرين، صمغ عربي، كربوكسي ميثيل سللوز CMC و Tween80 و نشاء الذرة و بولي فينيل بيروليديون PVP ، وبولي أيتيلين غليكول. وضعت هذه المواد كل منها على حدى بدورق مخروطي سعة ½ لتر و أحكم إغلاقه بسدادة قطنية مع غطاء من ورق الألمنيوم ووعقت بجهاز الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121س لمدة 30 دقيقة. تم خلط المواد الحاملة و المضافة و اللاصقة بالمعلق البوغي وفق النسب الموضحة بالجدول 1 وذلك باستخدام خلاط كهربائي بسرعة 1000 د/د لمدة 20 دقيقة وعدلت درجة الحموضة عند pH=7 لكافة الخلطات باستخدام 1N HCL و 1N NACL . حضر تركيز الأبواغ الكونيدية $10^9 * 50$ بوغة/ مل عن طريق إضافة 10% من المعلق البوغي بتركيز $10^{10} * 50$ وحدة تكاثرية /مل لكل خلطة سائلة مختبرة، تم تعبئة كل خلطة ب 12 أنبوب بلاستيكي سعة 50 مل و أحكم إغلاقها بسدادة قطنية و خزنت على درجة حرارة 25°م. تم إجراء اختبار فترة الصلاحية كل شهر و لمدة 12 شهراً ، تم أخذ 1 مل من كل تركيبة لتقييم قابلية أبواغ *Trichoderma harzianum* للبقاء حية و وتم التقييم من خلال تقنية التخفيف المتسلسل و الزرع في وسط مغذي PDA ضمن أطباق بتري بثلاث مكررات لكل معاملة. (الجدول1): نسب المكونات % للمواد الحاملة لفطر *Trichoderma harzianum* في المستحضرات الثماني المختبرة.

F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	Formulation المستحضر	المحتويات % %Contents
90	87.9	85.9	81.9	82.9	87.9	83.9	88.9	distilled water ماء مقطر	
10	10	10	10	10	10	10	10	تركيز الأبواغ $10^{10} * 50$	
	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	Tween80	
	1	1	1	1	1	1	1	Gum arabic	
			5	5		5		Glycerin	
		0.5	0.5					PEG	
		1			1			CMC	
		0.5	0.5					PVP	
	1	1	1	1				Corn starch	

التحليل الإحصائي: أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستخدام البرنامج الإحصائي statistix10 في تحليل البيانات و حساب أقل فرق معنوي بين المتوسطات LSD عند مستوى معنوية 5% .

النتائج والمناقشة:

تقييم فترة صلاحية التركيب السائلة المختبرة لفطر *Trichoderma harzianum* :

أبدت التركيبات المختبرة فترات صلاحية متفاوتة بدأت من شهر واحد للشاهد F8 (ماء مقطر فقط) و وصلت إلى ستة أشهر للتركيب F5 قبل أن ينخفض تركيز الأبواغ بشكل معنوي. نلاحظ من الجدول 2 أن فترة صلاحية التركيب F1 استمرت لشهرين قبل أن ينخفض تركيز الأبواغ انخفاضاً معنوياً و كان الانخفاض حاداً ابتداءً من الشهر الثالث للتخزين (الشكل 1). و بالمقارنة مع التركيب F2 التي تتميز عن سابقتها بإضافة 5% غليسرين نلاحظ امتداد فترة الصلاحية لمدة ثلاثة أشهر، ثم حصل انخفاض معنوي ولكنه تدريجي لتركيز الأبواغ. بينت النتائج استمرار فترة صلاحية التركيب F3 لمدة شهرين قبل أن يبدأ تركيز الأبواغ بالانخفاض بشكل معنوي، علماً أن التركيب F3 تتميز عن التركيب F2 باستبدال الغليسرين بكربوكسي ميثيل سللوز 1%.

وبالانتقال للتركيبية F4 نلاحظ أنها تميزت عن التركيبات السابقة حيث استمرت فترة الصلاحية لمدة أربعة أشهر قبل أن تبدأ بالانخفاض المعنوي والتدرجي كما تميزت بزيادة تركيز الأبواغ خلال الشهر الأول والثاني من التخزين بالمقارنة مع التركيز الابتدائي، احتوت التركيبية F4 على 5% غليسرين بالإضافة 1% نشاء الذرة . تشير النتائج الواردة في الجدول 2 أن التركيبية F5 احتفظت بفترة صلاحية أطول معنوياً من باقي التركيبات المختبرة، حيث بقي تركيز الأبواغ مستقراً فيها لمدة 6 أشهر مع ملاحظة زيادة تركيز الأبواغ خلال الأشهر الخمسة الأولى من التخزين بالمقارنة مع التركيز الابتدائي وانخفض تركيز الأبواغ اعتباراً من الشهر السادس بشكل تدريجي ليبلغ في الشهر 12 من التخزين $11 \times 10^9 \pm 2.3$ بوغة / مل. تميزت التركيبية F5 عن التركيبية F4 بإضافة 0.5% PVP و 0.5% PEG. انخفضت تركيز الأبواغ في التركيبية F6 بعد الشهر الخامس من التخزين و وكان الانخفاض معنوياً وتدرجياً، في حين استمرت فترة صلاحية التركيبية F7 لمدة 3 أشهر قبل أن ينخفض تركيز الأبواغ بشكل معنوي. بمقارنة التركيبات السابقة بالتركيبية F8 (الشاهد) نلاحظ تفوق كافة التركيبات على الشاهد بشكل معنوي حيث استمرت فترة صلاحية التركيبية F8 لشهر واحد فقط قبل أن ينخفض تركيز الأبواغ بشكل حاد ومتسارع. لعب الغليسرين دوراً هاماً في زيادة فترة صلاحية التشكيلات مقارنة بـ كبروكسي ميثيل سللوز، كما أدى إضافة نشاء الذرة للمستحضرات إلى تعزيز فترة الصلاحية ودعم استمرار تكاثر الفطر خلال الفترة الأولى من التخزين من خلال مساهمته كوسط مغذي للفطر، كما بينت النتائج أهمية كل من PEG و PVP في دعم استقرار و ثبات تركيز الأبواغ في التركيبية F5 لفترة أطول مقارنة بباقي التركيبات وبذلك تكون مكونات التركيبية F5 هي الأمثل بالمقارنة مع باقي التركيبات المختبرة واستطاعت الحفاظ على استقرار التركيبية السائلة لمدة 6 أشهر بدون أن تعاني من انخفاض معنوي $52 \pm 0.6 \times 10^9$ بوغة / مل وانخفض بشكل طفيف ليصل إلى $40.3 \pm 1.9 \times 10^9$ بوغة / مل في الشهر الثامن من التخزين عند درجة حرارة 25 °م. يعد الغليسرين من أكثر المواد استخداماً في تراكيب المبيدات الحيوية لحماية وحفظ الكائنات الحية الدقيقة و المزارع الميكروبية (Hubalek et al., 2003; Leggett et al., 2011; Taurian et al., 2013). كما أن بولي فينيل بيروليديون (PVP) Polyvinylpyrrolidone هو بوليمر اصطناعي من مجموعات فينيل مع حلقة بيرول، وهو مركب ذو وزن جزيئي مرتفع (40000)، قابل للذوبان في الماء، يتميز بخصائص تثبيت ولصق، وقدرته العالية على الاحتفاظ بالماء، مما يُبطئ من معدل تجفيف الوسط، (Singleton et al, 2002; Deaker et al., 2004) كما يتميز بولي فينيل بيروليديون بقدرته على ربط السموم البكتيرية والفطرية التي تُطلق باستمرار في الوسط، عندما تكون الخلايا في طور الثبات (Errington et al., 2002) بالإضافة إلى ذلك، قد تكون البوليمرات المستقرة مثل بولي فينيل بيروليديون مفيدة في تقليل مدى ترسب البروتين أو تخثر الخلايا. قد يُحسّن الحفاظ على البنية الجزيئية الكبيرة من السلامة البيولوجية، مما يؤدي إلى تحسين معدلات البقاء.

بولي إيثيلين غلايكول (PEG) Polyethylene glycol مركب ذو وزن جزيئي صغير (3000)، قابل للذوبان في الماء، ذو قوام لاصق ولزج. تُعزز خاصية الالتصاق لبولي إيثيلين جلايكول التصاق الخلايا بالذور، كما أن طبيعته اللزجة تُبطئ عملية تجفيف الأبواغ (Temperano et al., 2002; McAneney et al., 1982). الصمغ العربي بوليمر حيوي ذو وزن جزيئي كبير، وذو نشاط مائي مرتفع، له خاصية التصاق واستحلاب وخصائص تثبيته، مما يحد من انتقال الحرارة (Mugnier and Jung, 1985)

الجدول (2): تطور تركيز الأبواغ الحية في المستحضرات المختبرة بمضي الزمن عند حرارة 25°س.

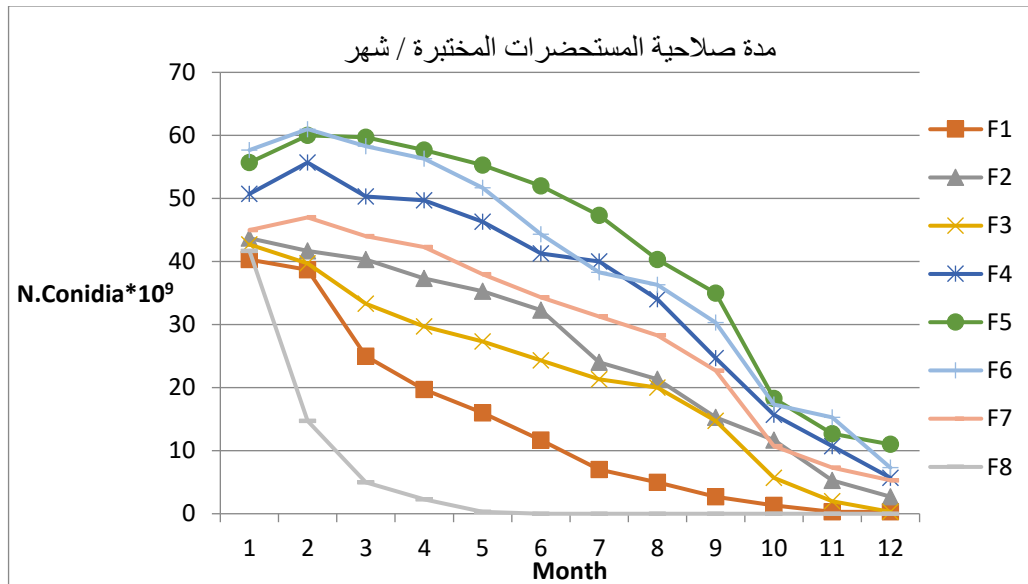
LS D	Formulations المستحضرات								الفترة الزمنية بالشهر
	عدد الأبواغ الكونيدية				N.Conidia×10 ⁹				
	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	
4.2 7	cd 41.7 A	c 45 AB	a 57.7 B	a 55.7 BC	b 50.7 B	cd 42.7 A	cd 43.7 A	d 40.3 A	1
3.4 7	e 14.7B	c 47 A	a 61 A	a 60 A	b 55.7 A	d 39.7 A	d 41.7 B	d 38.7 A	2
2.6 1	g 5 C	c 44 AB	a 58.3B	a 59.7 A	b 50.3 B	e 33.3 B	d 40.3 B	f 25 B	3
2.7 5	g 2.3 D	c 42.3 B	a 56.3 B	a 57.7 AB	b 49.7 BC	e 29.7 C	d 37.3 C	f 19.7 C	4
2.4 5	h 0.3 E	d 38 C	b 51.7 C	a 55.3 BC	c 46.3 C	f 27.3 CD	e 35.3 D	g 16 D	5
4.1 4	f0 E	c34.3 D	b 44.3 D	a 52 C	b 41.3 D	d 24.3 DE	c 32.3 E	e 11.7 E	6
3.4 8	f 0 E	c 31.3 DE	b 38.3 E	a 47.3 D	b 40 D	d 21.3 EF	d 24 F	e 7 F	7
2.8 8	f 0 E	c 28.3 E	b 36.3 E	a 40.3 E	b 34 E	d20 F	d 21.3 G	e 5 FG	8
4.2 8	e 0 E	c 22.7 F	b 30.3 F	a 35 F	c 24.7 F	d 14.7 G	d15.3 H	e 2.7 GH	9
2.8 5	d 0 E	b 10.7 G	a 17.3 G	a 18.3 G	a 15.7 G	c 5.7 H	b11.7 I	d 1.3 H	10
2.6 8	d 0 E	c 7.3 H	a 15.3 G	ab 12.6 H	b 10.7 H	d 2 I	c 5.3 J	d 0.3 H	11
3.2 5	d 0 E	bc 5.3 H	b 7.3 H	a 11 H	bc 5.7 I	d 0.3 I	cd 2.7 K	d 0.3 H	12
	1.53	3.08	2.64	3.72	3.78	3.33	1.94	2.53	LSD

*تشيراأحرف الكبيرة المتشابهة ضمن نفس العمود إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

*تشيراأحرف الصغيرة المتشابهة ضمن نفس الصف إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

أظهرت التركيبات الحاوية على (الغليسرين و PVP و PEG) قابلية بقاء للأبواغ الفطرية أعلى بالمقارنة مع تلك التي لا تحتوي عليها، كما لوحظ أن دمج هذه البوليمرات في تركيبة واحدة أعطى نتائج أفضل مقارنة باستخدامها على حدى حيث بلغ تركيز الأبواغ في التركيبة F5 المكونة من عدة بوليمرات (الغليسرين و PVP و PEG) في الشهر السادس من التخزين $0.6 \pm 52 \times 10^9$ بوغة / مل في حين أن تركيز الأبواغ في التركيبة F7 (الخالية من هذه البوليمرات) بلغ في الشهر السادس من التخزين $0.7 \pm 34.3 \times 10^9$ بوغة / مل. كما لوحظت زيادة في عدد الأبواغ خلال الأشهر الثلاثة الأولى من التخزين في التركيبات الحاوية على نشاء الذرة ، حيث أظهرت تركيبات F6 أعلى زيادة $0.6 \pm 61 \times 10^9$ بوغة / مل ، تلتها التركيبة F5 $0.6 \pm 60 \times 10^9$ بوغة / مل في الشهر الثاني من التخزين حيث ازداد عدد الأبواغ في البداية ثم انخفض تدريجياً بدءاً من الشهر الثالث فصاعداً (الشكل 1). بالمقابل كان هناك انخفاض في عدد الأبواغ مع الزمن في بقية المعاملات غير الحاوية على نشاء الذرة. الجدير بالذكر أن الانخفاض في عدد الأبواغ كان أكثر وضوحاً في الشاهد القائم على الماء المقطر فقط، وفي التركيبات الخالية من البوليمرات وونشاء الذرة . لقد عمل نشاء الذرة كقاعدة غذائية وسمح لفطر *Trichoderma harzianum* بالاستمرار في النمو والتكاثر وبالتالي زيادة في عدد الأبواغ الفطرية وخصوصاً في الفترات الأولى من التخزين (Dinesh et al., 2020). يعزى الانخفاض

اللاحق في عدد الأبواغ الفطرية إلى استنفاد العناصر الغذائية وعدم كفايتها لتلبية احتياجاتها الفطر، وهذا يتوافق ذلك مع ما وجدته كل من Santhosh (2015) و Kumaresan & Reetha (2011) من أن انخفاض عدد الأبواغ أثناء التخزين بسبب استنفاد العناصر الغذائية والتحلل الذاتي للأبواغ، كما وجد Hegde وآخرون (2022) أن التركيبات التي تحتوي على نشاء الذرة احتوت على عدد أكبر من الخلايا البكتيرية بعد التخزين لمدة ستة أشهر بالمقارنة مع الشاهد. ويلعب الصمغ العربي، المعروف بخصائصه اللاصقة والمستحلبة والمثبتة، دوراً حيوياً في الحد من انتقال الحرارة، والحفاظ على نشاط مائي مرتفع، وحماية الأبواغ من الجفاف، هذه القدرة على منع الجفاف التام وضمان بقاء المكونات الحية الأساسية تجعل الصمغ العربي عاملاً لاصقاً مهماً في التركيبات السائلة (Hindersah et al, 2020). من ناحية أخرى يظهر PVP قدرة عالية على ربط السموم الفطرية مما يفيد في تقليل ترسيب البروتين وتخرثر الخلايا مما يعزز قدرتها على البقاء لفترة طويلة (Jaiswal et al, 2023). أكدت دراسات أجراها Sridhar وآخرون (2004) دور الجلوسرين في التركيبات السائلة، وخاصة في الحفاظ على حيوية الخلايا خلال فترات التخزين الطويلة، وقد وُجد أن الغليسرين، إلى جانب PVP والغلوكوز، يدعم زيادة أعداد البكتيريا الحية والأبواغ الداخلية لمدة تصل إلى ستة أشهر من التخزين (Girisha et al., 2006). بالإضافة إلى أن تركيبات المبيدات السائلة الحاوية على بولي فينيل بيروليدون (PVP) كعامل حماية من التناضح أظهرت مدة صلاحية أطول مقارنةً بتلك الخالية من بولي فينيل بيروليدون.



الشكل(1): تطور معدل بقاء الجراثيم في المستحضرات المختبرة من *Trichoderma harzianum* عند 25 درجة مئوية.

الاستنتاجات و التوصيات:

يتميز المستحضر المطور لفطر *Trichoderma harzianum* بطول فترة الصلاحية، التي وصلت إلى ستة أشهر من الاستقرار والمحافظة على حيوية الأبواغ الكونيدية للفطر و دعم تكاثرها حتى خلال التخزين من خلال استخدام توليفة من البوليميرات و نشاء الذرة والجلسرين، كما يتميز هذه المستحضر بسهولة استخدامها الحقلي عن طريق شبكات الري بالتنقيط ورخص مكوناتها وتوافرها. توصي الدراسة بمتابعة اختبار الإضافات الممكنة على الأوساط المغذية لتعزيز إنتاجيتها، بالإضافة إلى اختبار صلاحية التركيبات السائلة عند التخزين في درجات حرارة مختلفة ووعند أرقام حموضة مختلفة و متابعة نتائج الاستخدام والكفاءة الحقلية لهذه التركيبات في مكافحة الأمراض النباتية.

الشكر: أود أن أقدم جزيل الشكر و الإمتنان لمديرية الزراعة في حماة- دائرة مكافحة الحويية، و الزملاء المهندس سامر اسماعيل و المهندس رشا حيدر على مساعدتهم في إنجاز هذا البحث.

المراجع:

- Bedine, M. A. B., Taïeb, N., Agriopoulou, S., Miché, L., Moussango, D., Sameza, M. L., ... & Fekam Boyom, F. (2022). Identification of native soil-derived *Trichoderma* spp. isolates and analysis of their antagonist traits against *Lasiodiplodia theobromae* causing stem-end rot in papaya. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 55(15), 1766-1794
- Blaszczyk, L.; Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Lisiecka, J.; and M. Jedryczka, (2014). *Trichoderma* spp.—Application and prospects for use in organic farming and industry. *J. Plant Prot. Res.*, 54, 309–317.
- Cavalcante, R. S., Lima, H. L., Pinto, G. A., Gava, C. A., & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 100-104,
- Deaker, R.; Roughley, R.J.; Kennedy, I.R. (2004). Legume seed inoculation technology—A review. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1275–1288.
- Errington, J. R., Pablo, G. D. and Brian, A. P. (2002). The stability of proteins in a polyvinylpyrrolidone matrix. Department of chemical engineering, Princeton University, USA.
- Girisha, H.C., Brahmaprakash, G.P., Mallesha, B.C. (2006). Effect of Osmo Protectant (PVP-40) on survival of *Rhizobium* in different inoculants formulation and nitrogen fixation in Cowpea. *GEOBIOS-JODHPUR.* 33 (2/3): 151.
- Hegde, G. M., & Vijaykumar, K. N. (2022). Formulation, Application and Commercialization of Biopesticides in India Formulation, Application and Commercialization of Biopesticides in India. Asia Pacific Biofertilizers and Biopesticides Information Platform.
- Hindersah, R., Setiawati, M.R., Asmiran, P., Fitriatin, B.N. (2020). Formulation of *Bacillus* and *Azotobacter* consortia in liquid cultures: preliminary research on microbes-coated urea. *International Journal of Agriculture System.*; 8 (1):1-10.
- Hu, J.; Zhou, Y.; Chen, K.; Li, J.; Wei, Y.; Wang, Y.; Wu, Y.; Ryder, M.H.; Yang, H.; Denton, M.D. (2020). Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. *Environ. Microbiol.* 22: 1011–1024.
- Hubalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205–229
- Jaiswal, A., Koli, D.K., Pabbi, S., Priya, H., Kumar, A., Mishra, R. (2023). Effect of protective polymers and storage temperatures on shelf life of cyanobacterial liquid formulation. *Indian Journal of Ecology*, 49 (4):1517-1525.
- Jan, A.T.; Azam, M.; Ali, A.; Haq, Q.M.R. (2011). Novel approaches of beneficial *Pseudomonas* in mitigation of plant diseases—an appraisal. *J. Plant Interact.* 6, 195–205.
- Kumaresan, G., and Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of phytology*; 3 (10): 48-51.
- Lee, S.K., Lur, H.S., Lo, K.J., Cheng, K.C., Chuang, C.C., Tang, S.J., (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Applied microbiology and biotechnology.* 100 (18): 7977-7987.
- Leggett, M., Jarrod, L., Ken, K., Beth. E. (2011). Formulation of microbial biocontrol agents - An industrial perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33 (2): 101-107. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.563050>.

- Lorito, M.; and Woo., S.L. (2015). *Trichoderma*: A multi-purpose tool for integrated pest management. In Principles of Plant-Microbe Interactions; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 345–353.
- McAneney, K. J., Harris, R. F. and Gardner, W. R.,. (1982). Bacterial water relations using polyethylene glycol 4000, Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 542-547.
- Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. J. Int. Microbiol, 6, 245–252.
- Mukherjee, P.K.; Mehetre, S.T.; Sherkhane, P.D.; Muthukathan, G.; Ghosh, A.; Kotasthane, A.S.; Khare, N.; Rathod, P.; Sharma, K.K.; Nath, R. (2019). A novel seed-dressing formulation based on an improved mutant strain of *Trichoderma virens*, and its field evaluation. Front. Microbiol. 10, 1910–1923.
- Mungier, J., & Jung, G., (1985). Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer. Appl. Environ. Microbiol., 50: 108-14.
- Nakkeeran, S.; Renukadevi, P.; Aiyathan, K. (2016) Exploring the potential of *Trichoderma* for the management of seed and soil-borne diseases of crops. In Integrated Pest Management of Tropical Vegetable Crops; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; pp. 77–130.
- Niranjana, S.R., Lalitha, S., Hariprasad, P., (2009). Mass multiplication and formulations of biocontrol agents for use against *Fusarium* wilt of pigeon pea through seed treatment. Intern. J. Pest Manag. 55(4): 317–324.
- Rai, D., & Tewari, A. K. (2016). Shelf life studies of different formulations based on *Trichoderma harzianum* (Th14). *Annals of Biological Research*, 7 (7): 1-5
- Roussos, S., Olmos, A., Raimbault, M., Saucedo-Castaneda, G., Lonsane, B. K. (1991). Strategies for large scale inoculum development for solid-state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. Biotechnol Tech. 5(6): 415–420.
- Santhosh, G.P. (2015). Formulation and shelf life of liquid biofertilizer inoculants using cell protectants. International Journal of Research and Bioscience in Agricultural Technology.; 7(2): 243-247.
- Singleton, P., Keyser, H. and Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. In: Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam, ACIAR Proceeding 109e Herridge, D. (ed.), Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, pp. 52-66.
- Soliman, S., Moussa A., Mohammed A., and Nawal A. (2023). Selection of local isolates of the genus *Trichoderma* for use in the control of wilt diseases and Damping off eggplant in Hama. Tishreen University Journal. 45 (6): 31-44.
- Sridhar, V., Brahmaprakash, G.P., Hegde, S.V. (2010). Development of a liquid inoculant using osmoprotectants for phosphate solubilizing bacterium (*Bacillus megaterium*). Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 17 (2): pp20
- Taurian, T., Anzuay, M.S., Ludueoa, L.M., Angelini, J.G., Muooz, V., Valetti, L., Fabra, A. (2013). Effects of single and co-inoculation with native phosphate solubilising strain *Pantoea* sp. J49 and the symbiotic nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 on peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth. Symbiosis 59:77–85.
- Temperano, F. J., Albareda, M., Camacho, M., Daza, A. and Santamaria, C. (2002). Survival of several *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds, Int. Microbiol. 5: 81-86.

The effect of several liquid formulations of the fungus *Trichoderma harzianum* on the shelf life of biological control preparation

Shady Mohammad Soliman^{*1}, Moussa Alsamara¹, Mohammed Ahmad², Nawal Ali³

¹ Higher Institute of Environmental Research, Lattakia University, Syria.

² Faculty of Science, Tartus University, Syria.

³ Faculty of Science, Lattakia University, Syria

(*Corresponding author: Shady soliman, E mail: shady.soliman@latakia-univ.edu.sy, Mobile: 0955186636).



Received: 31/ 07/ 2025

Accepted: 23/ 11/ 2025

Abstract

The shelf life of eight liquid formulations for *Trichoderma harzianum*, comprising adhesives, emulsifiers, and surfactants, was evaluated. The tested formulations exhibited varying shelf lives, ranging from one month for the control (F8), consisting of water and spore suspension, to six months for the F5 formulation)which consisting of glycerol, Arabic gum, Tween 80, corn starch, polyvinylpyrrolidone (PVP), and polyethylene glycol, before the spore concentration significantly decreased. Formulations containing glycerol and protective polymers (PVP and PEG) exhibited higher fungal spore viability compared to the control and other treatments that did not contain these components. Glycerol played a significant role in increasing the shelf life of the formulations compared to carboxymethyl cellulose. The addition of corn starch to the formulations also enhanced shelf life and supported the stability of the formulations. Fungal growth continued during the first storage period, as it served as a nutrient medium. The results also demonstrated the importance of both PEG and PVP in supporting the stability and spore concentration in the F5 formulation for a longer period compared to other formulations. It was also observed that combining these polymers in a single formulation yielded better results than using them alone.

Keywords: polymers, solid state fermentation, formulation, conidia. *Trichoderma*.