تحليل المجتمع الفطري في وسائد القطن لمحافظة بابل باستخدام التنوع الحيوي وبعض التقانات الجزيئية

انمار علاء الربيعي
كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل

رجاء عبد الرزاق العنبكي
كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء

الخلاصة :

نفذت دراسة للكشف عن التلوث الفطري للوسائد ذات الحشوة القطنية في 30 عينة عشوائية في محافظة بابل جمعت من أربعة مدن. حلل تركيب المجتمع الفطري في العينات باستخدام مؤشرات التنوع الإحيائي و درس النشاط الإنزيمي الخارج خلوي لأنزيمي السليوليز والبروتييز لبعض الفطريات المعزولة وكذلك الكشف عن قابليتها على فرز سموم الافلاتوكسين. درس التنوع الوراثي ما بين بعض العزلات الفطرية باستخدام بعض التقانات الوراثية وهي PCRلتضخيم مناطق ITS و البصمة الوراثية اعتمادا على RABD. أظهرت النتائج عزل 32 جنس و76 نوع. بينت نتائج تحليل المجتمع الفطري تباين أعداد الأنواع و المستعمرات في العينات المدروسة ،اختلفت نسب تردد الظهور والسيادة النسبية في الأجناس المعزولة ،وكان الفطر *Aspergillus* الأعلى تردد ظهور96.67% و سيادته 62.22 % . أما بالنسبة للأنواع فقد ساد الفطر*A.niger* بنسبة 42.737% وتردد ظهور93.33 %. طبقت مؤشرات التنوع الإحيائي الفطري في العينات وبين مؤشري شانون- ويفر و سمبسون بأن العينات 26 و 8 و27 و17 و1 و6 و22و29الأكثرتنوعا في حين كانت العينة11هي الأقل تنوعا.اظهر مؤشر غزارة الأنواع أن العينات 27و8و26و29و17الأكثرغزارة أما العينة11 فكانت الأقل غزارة في حين أشار مؤشر تجانس ظهور الأنواع أن العينة 26 هي الأكثر تجانس والعينة 2 الأقل. أشارت نتائج النشاط الإنزيمي الخارج خلوي لإنزيم السليوليز لبعض الفطريات المعزولة ، قابلية جميع العزلات الخاضعة للاختبار على إفراز الإنزيم. أما النشاط الإنزيمي للبروتييز فقد امتلكت27.27% و12.12% و45.45% من الفطريات فعالية إنزيمية جيدة ومتوسطة وواطئة على التوالي و15.15% لم تمتلك أي فعالية،كما اختلفت الفعالية الإنزيمية بين الأجناس والأنواع المختلفة وحتى بين العزلات التابعة لنفس النوع. أظهرت نتائج الكشف النوعي عن قابلية الفطريات المختبرة على إفراز سموم الافلاتوكسين أن جميعها ذات قدرة على إفرازه لكنها تباينت من ضعيفة إلى عالية باختلاف الأجناس والأنواع و العزلات. أن دراسة بعض الخصائص الوراثية للفطريات *A.niger* و*Pencillium* sp و sp *Cladosporium* أكدت كفاءة عدة استخلاص الدنا في معظم العزلات وأظهرت نتائج تضخيم تسلسلات الدنا للبادئ العامITS1 وITS2 حزم متماثلة وبناتج بلمرة ذو حجم تقريبا 270-280 زوجا قاعديا لعزلات *A.niger* و240 زوجا قاعديا للنوع *Cladosporium* sp و250-260 زوجا قاعديا لعزلتا sp *Pencillium*. اما تضخيم مناطقITS2 وITS5 فقد لوحظ حزم متماثلة وبناتج بلمرة ذو حجم 290-300 زوجا قاعديا لمعظم عزلات *A.niger* و275 زوجا قاعديا للنوع sp *Cladosporium*و250-270 لعزلات sp *Pencillium*. بين التشخيص الجزيئي باستخدام البادئ المتخصص وجود الجين المستهدف في العزلة 3.نجحت طريقة البصمة الوراثية في الكشف عن التنوع الوراثي بين العزلات المدروسة وتقسيمها إلى مجاميع متشابهة وراثيا Genetic similarity groups (عناقيد Cluster) باستخدام معامل جاكارد Jaccard coefficient .

*** البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول**

ISSN 2072-3875

ANALYSIS OF FUNGAL COMMUNITY OF COTTON PILLOWS IN BABYLON PROVINCE BY USING BIODIVERSITY AND SOME GENETIC TECHNIQUES

Anmar Alaa Addullah Al-Rubaiy **Rajaa Abdulrazzaq Al-anbagi**

ABSTRACT :

A study carry out for detect the fungal pollution in 30 random samples of cotton bolster in Babylon Province ,they were collected from four region .Analysis of fungal community structure by using biodiversity index .Also a study enzyme activity of cellulase and protease enzymes in vitro and ability to secrete aflatoxin of some isolated fungi. Genetic variety between some fungi isolates was studied by using some genetic techniques as PCR for amplification ITS region by set of general primers ITS1,ITS2,ITS4 , ITS5 and finger print depending on RAPD.The results showed that isolate from samples include 32 Genera and 76 species , Results of analysis of fungal community structure showed that there were variety in species numbers and CFU in studied samples .Frequency of occurrence and relative dominance of isolated Genera were different , the genus *Aspergillus* was highest in frequency of occurrence (96.67%) and relative dominance (62.22%).Results of frequency of occurrence and relative dominance of species showed that *A. niger* was highest in frequency of occurrence 93.33 % and relative dominance 42.737% . Fungal biodiversity indexes: Shanon –waner and Sempson appeared that the samples 26 ,8,27,17,1,6, 22 and 29 respectively highest in biodiversity ,while the sample 11was lowest .Species Richness index showed that the samples 27,8,26,29 and 17 were more richness of species while the sample 11 was lowest , however the species uniformity index of samples showed that the sample 26 was highest while the sample 2 was lowest.Results of enzyme activity of cellulase that all fungal isolates were able to secrete there enzyme .Also, 27.27,12.12 and 45.45% of fungi have high , medium and low enzyme activity of protease respectively , 15.15% of fungi don't have this activity .Results of qualitative detection of fungi ability to secrete Aflatoxin that all tested fungal isolates have ability to secrete this toxin ,but they were varied from low to high according to genus , species and isolate .Results of some genetic characters of *A.niger* , *Pencillium* sp and *Cladosporium* sp indicated that potential of DNA extraction of most fungi ,also the result of amplification of general primers ITS 1 and ITS2 showed that produce similar bands and polymer production that size proximately 270-280 pd for isolates of *A.niger* , 240 pd for *Cladosporium* sp and 250- 260 pd for *Pencillium* sp. Wile the result of amplification of ITS 2 and ITS5 showed that produce similar bands and polymer production that size proximately 290-300 pd for isolates of *A.niger* , 275 pd for *Cladosporium* sp and 250- 270 pd for *Pencillium* sp. Molecular diagnosis by using specific primer indicated that found goal gene in isolate 3 .Also the

ISSN 2072-3875

finger print was successful in detection of genetic variation between tested isolates and divided to Genetic similarity groups (Cluster) by using Jaccard coefficient.

المقدمة :

تتواجد الفطريات في كل مكان سواءا أكانت البيئة داخلية أم خارجية و سجل سابق تقريبا 10 % من الأشخاص في العالم يمتلكون حساسية تجاه الفطريات الى ان هذه نسبة تزايدت في الثلاثين سنة الأخيرة حتى وصلت إلى حد الإصابة بالربو (Pasanen وآخرون ،1996 و Woodcock و آخرون، 2006). القليل من الدراسات أشارت إلى الدور الحقيقي للفطريات في داخل المنازل و إمكانية دخولها من المصادر المتعددة إلى بيئته الداخلية أن توفر الظروف الملائمة من الرطوبة و درجات الحرارة فما أن تتماس السبورات مع السطوح الصلبة كمواد البناء أو الأثاث و النباتات الداخلية او السائلة، فإنها تبدأ بالاستقرار و التجرثم والنمو و إفراز المركبات الايضية المتعددة أو نواتج التحلل وبالتالي تصبح مصدر خطر على صحة الإنسان (Hawksworth,2002 و Tangوآخرون،2003 و Abedinواخرون،2012).

استخدم الإنسان الوسائد للنوم عليها كمصدر من مصادر الراحة إلا إن قلة من الناس من طرأت فكرة أنها من الممكن أن تكون مصدر إزعاج أو أذى صحي لهم. يقضي الناس ثلث حياتهم في النوم على وسائد متنوعة الحشو و غالبا ما ينامون ويتنفسون بالقرب من مصدر كبيرومختلف من الفطريات لاسيما إذا علمنا ان العديد من البحوث أكدت على وجود الفلورا الفطرية الطبيعيةMycoflora في كل مكان (Yassinو Almouqatea،2010). تعبر الوسائد بيئة مثالية لنمو و تكاثر الفطريات فالإنسان البالغ ينتج حوالي 100 لتر من العرق سنويا عند نومه 8 ساعات في اليوم عند درجة حرارة 30 م˚ كم إن تواجد ألياف القطن و عث الفراش السائد غالبا في الوسائد و قشور جلد الإنسان ممكن ان تكون مصدر تغذية متنوع للفطريات (Woodcockوآخرون، 2006). اعتقد أن ابواغ أو غزول الفطريات و نواتجها الايضية ممكن أن تمر إلى جهازه التنفسي أو إلى أماكن أخرى في جسمه بل حتى انتقالها من شخص إلى أخر مسببة أمراض عدة أو إثارتها للأمراض كالربو أو ممكن أن تسبب الالتهابات القاتلة للأشخاص ذوي المناعة الضعيفة (Currie و Casadevall ,1994و Jawtez وآخرون ,2004 وBowyer وآخرون ،2006).

وفقا لما ذكر أعلاه ولقلة البحوث حول الفطريات الملوثة لحشوة الوسائد المنزلية في العراق ، إجريت هذه الدراسة وهدفت إلى عزل وتشخيص الفطريات الملوثة للحشوه القطنية في الوسائد المنزلية في محافظة بابل. تحليل تركيب المجتمع الفطري باستخدام بعض مؤشرات التنوع الإحيائي. دراسة بعض الأنشطة الإنزيمية الخارج خلوية لبعض الفطريات المدروسة كأنزيم السليوليز والبروتييز وتحديد قابلية بعض عزلاتها على إفراز سموم الافلاتوكسين. دراسة التغاير أو التنوع الوراثي ما بين بعض العزلات الفطرية باستخدام بعض التقانات الوراثية كتقانة تفاعل البلمرة التسلسليPolymerase chain reaction (PCR)لتضخيم المنطقة Intergenic spacer region (ITS) باستخدام طقم البوادئ ITS1/ ITS2 وITS5/ITS2 و تقانة البصمة الوراثية اعتمادا على بعض بوادئ التضخيم العشوائي المتعدد الإشكال RABD. أكد التشخيص المظهري جزيئيا باستخدام الزوج البادئ ITS1 والمتخصص NIG للنوع *A.niger* .رسمت الشجرة التطورية لتوضيح نمط العلاقات الوراثية بين بعض العزلات الفطرية .

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات :

جمعت 60 عينة موزعة من أربعة مدن مختلفة في محافظة بابل ضمت الحلة و المسيب والإسكندرية و المحاويل للفترة من أيلول إلى تشرين الثاني للعام 2012 لتحديد عدد و نوع الفطريات المتواجدة في الوسائد المنزلية ذات الحشوة القطنية. انتخب بشكل عشوائي 30 نموذج من العينات السابقة وسجلت منطقة الجمع و تأريخ الجمع . زرعت بعض العينات و حفظ البعض منها في الثلاجة لحين زراعتها في الإطباق .

ISSN 2072-3875

عزل الفطريات المرافقة لألياف القطن :

عزلت الفطريات باستعمال طرائق الفحص غير المباشرة في أطباق الاكار Agar plates method ومزارع التخفيف Dilution culture. أخذ عشوائيا 10غم من ألياف القطن من المحيط الخارجي ومركز الوسائد بعد إزالة قماش أغلفتها ، ثم اخذ منها عشوائيا 1غم. زرعت الألياف مرة في أطباق بتري بلاستيكية (تقريبا 5-7 أطباق) حاوية على الوسط الزرعي أكار البطاطا و الدكستروز (PDA) والوسط سابروید Sabouraud agar (SA) كلا على حدة وبواقع 3 قطع لكل طبق و استعملت طريقة التخافيف مع 99مل ماء مقطر معقم، رجت جيدا لمدة 5 دقائق ثم اخذ 3.3 مل منها ووزعت في الأطباق وبثلاث مكررات وأضيفت إلى الوسطين أعلاه. حضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25 ±2 ºم ولمدة 5- 7 أيام (Cookو Foter,1958وWoodcock وآخرون، 2006). بعد انتهاء مدة الحضن، سجلت أعداد المستعمرات وخواصها المظهرية و المجهرية في كلا الوسطين ثم شخصت اعتمادا على المفاتيح التصنيفية التالية (Booth، 1971 و Ellis ،1971وDomsch ،1980 وPitt وHocking ،1997 و Marie وآخـــــــرون،1997وBarnettوHunter،1998وNavi وآخـــــــرون،1999وWatanabe،2002و Hambletonوآخـــرون، 2005 وLiang وآخـــرون، 2005 وSamson وآخـــرون، 2007وJaya ،2008و Manamgoda وآخرون،2012) .

تحليل المجتمع الفطري :

تنوع الأنواع :

درس التنوع الفطري في حشوه الوسائد المنزلية اعتمادا على النسبة المئوية لتردد الظهور Frequency occurrence percentage (Maria وSridhar،2003) ومؤشرات الوفرة النسبية Relative abundance index (Harrison,2002 وWahegaonker وآخرون ،2011)وغزارة الأنواع The species richness (Margalef،1972). استخدم أيضا مؤشرات شانون- ويفر Shannon-Weaver وسمبسون Simpson وتجانس ظهور الأنواع The species uniformity(Margalef ،1971 وKrebs ,1989) .

دراسة بعض الأنشطة الإنزيمية و السمية الخارج خلوي :

استخدمت الأوساط الزرعية الصلبة الخاصة بالاختبارات النوعية Qualitative testes في الكشف عن فعالية بعض الفطريات المعزولة والمنتخبة عشوائيا في إنتاجها لبعض الإنزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes كإنزيم السليوليزو تقدير كفاءته بطريقة الإطباق(Kasana وآخرون،2008 وAbu Bakar وآخرون، 2010) وإنزيم البروتييز باستخدام طريقة الأنابيب Tubes assay الحاوية على وسط الجيلاتين (Koch وDedic ,1957 و-El Kady وآخرون،1984). كشفت العزلات المنتجة لسموم الافلاتوكسين بدلالة التغير اللوني لقواعد الوسط الزرعي والغزل الفطري(Saitoو Machida,1999 و Kumar وآخرون،2007).

دراسة بعض الخصائص الجزيئية للفطريات *A.niger* و *Pencillium* sp و *Cladosporium* sp

تضمنت الدراسة الجزيئية التالي :

استخلاص وتنقية الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

اتبعت طريقة العمل الخاصة بعدة الاستخلاص والتنقية لشركة Biobasic الأمريكية المنشأ. قدرت نقاوة وتركيز الدنا المستخلص باستعمال جهاز المطياف الكهربائي Nano spectrophotometer،إذ قرأت الكثافة الضوئية Optical densityعلى الأطوال الموجية 260 و280 نانوميتر، مثلت نسبة260 ODنانوميتر (درجة نقاوة الدنا) و280 نانوميتر(نسبة البروتين). حفظ الدنا المستخلص في درجة حرارة -20 ˚م لحين الاستعمال .

دراسة جزيئية باستخدام البوادئ ITS1 / ITS2 و ITS2/ ITS5

ISSN 2072-3875

ضخمت منطقة(ITS) Intergenic spacer region باستخدام طقم البوادئ ITS1 primer sets/ ITS2وITS5/ITS2. حضرت مكونات خليط التفاعل Reaction mixture بحجم 25 مايكروليتر في أنابيب جهاز الطرد المركزي (سعة 0.2 مل معلمة بأرقام العزلات المراد دراستها) الحاوية على مكونات الخلط الرئيسي Master PCR Pre Mix بحجم0. 13 مايكروليتر وTemplate DNA بحجم 5. 2 تركيز 50-5 نانوكرام والبوادئ Primers حجم 1.5 مايكروليتر وتركيز 10 بيكامول ثم أكمل الحجم بالماء المقطر منزوع الايون Deionizead distlled water.مُزجت مكونات التفاعل بجهاز المازج الكهربائي Vortex ثم نقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermal cycler وضبط برنامج عمل جهاز التضخيم (جدول 1).

جدول (1) خطوات برنامج التضخيم باستخدام البوادئ ITS1 / ITS2 و ITS2/ ITS5

تسلسل الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة مْ	الزمن	عدد الدورات
1	المسخ الاول Initial denaturaion لشريط الدنا	95	5 min	1
2	مسخ دنا القالبDenaturation	95	30sec	35
3	التحام البادئاتAnnealing	57	60 sec	
4	لاستطالة البادئاتElongation	72	60 sec	
5	الاستطالة النهائيةFinal extension	72	7 min	1

التشخيص الجزيئي للفطر *A.niger* باستخدام البادئ المتخصص في تقانة تفاعل البلمرة التسلسلي :

أجريت تجربتان في درجات حرارة مختلفة لمرحلة الالتحام Anneling الأولى في درجة الحرارة 66 مْ والثانية في درجات حرارية مختلفة58و60و62 و64و66و68 مْ لإثبات التشخيص جزيئيا للعزلاتان 3 و4 العائدتان للفطر*A.niger* باستخدام زوج البوادئITS1 والمتخصص NIG فضلا عن استخدامه لإثبات قدرة العزلات على إفرازسموم الاوكراتوكسين. حضر الخليط بحجم 25 مايكروليتر وكالتالي: خليط التفاعل Master Mix بحجم 5. 12وقالب الدنا Template DNAبحجم 5 مايكروليتر وتركيز50 - 5 نانوكرام وبوادئ بحجم 1.5مايكروليترو تركيز 10بيكامول ثم أكمل الحجم بالماء المقطرمنزوع الايونDeionizead distilled water . مُزجت مكونات التفاعل بجهاز المازج الكهربائي Vortex ثم نقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermal cycler و أدخلت بيانات برنامج التفاعل (Gonzalez–Salgadoوآخرون،2005).

جدول (2) خطوات برنامج التضخيم باستخدام البادئ المتخصص

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة مْ	الزمن	عدد الدورات
1	المسخ الاول لشريط الدناInitial dena-turaion	95	4min 30sec.	1
2	مسخ دنا القالبDenaturation	95	30sec	25
3	الالتحام Annealing	66	30 sec	
4	الاستطالة Elongation	72	40 sec	
5	الاستطالة النهائيةFinal extension	72	5min	1

دراسة التنوع الوراثي لبعض عزلات الفطريات *A.niger* و*Pencillium* sp و*Cladosporium* sp باستخدام تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال PCR -RAPD

حضرت مكونات خليط التفاعل حجم 25 مايكروليتر في أنابيب جهاز الطرد المركزي (سعة 0.2 مل معلمة بأرقام العزلات المراد دراستها) الحاوية على مكونات الخلط الرئيسي PCRPre Master Mix حجم12.5

ISSN 2072-3875

مايكروليتر والبوادئ العشوائية OPB6حجم 1مايكروليتروتركيز10بيكامول و09 -DecamerBو10-DecamerB أحجامهما1مايكرون وتركيزهما 50 بيكامول وقوالب الدنا Template DNAحجم 5 مايكرون وبتراكيز تراوحت 50-5 نانوكرام ثم أكمل الحجم بالماء المقطر منزوع الايون Deionizead distlled water (مع وضع كل بريمر على حده و أجراء برنامج التضخيم الخاص بها حسب المصادر) مُزجت مكونات التفاعل بجهاز المازج الكهربائي Vortex ثم نقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري الحلقي Thermal cycler وضبط برنامج عمل الجهاز للبادئ Primer-OPB6(Aiate،2006) أما البادئان Decame rB-09 و10-DecamerB فقط استخدمت درجة الحرارة 35 ْم لمرحلة الالتحام Anneling كما في البادئ الأول فضلا عن الدرجات الحرارية 35و 38و40و42 ْم في تجارب مختلفة للحصول على نواتج تضخيم كما في الجدول(2)(Irshadو Nawab، 2012).

جدول (2) خطوات برنامج التضخيم الخاص بالبادئين DecamerB-09 وDecamerB-10

تسلسل الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة مْ	الزمن	عـــــــدد الدورات
1	المسخ الاول Initial denaturaion لشريط الدنا	94	5min	1
2	مسخ دنا القالبDenaturation	94	30 -1	40-48
3	التحام البادئات Annealing	42-40-38-35	1	
4	استطالة البادئاتElongation	72	2	
5	الاستطالة النهائيةFinal extension	72	5	1

الكشف عن نواتج تضاعف الكشف عن الحامض النووي منقوص الأوكسجين :

استخدم الترحيل الكهربائي Electrophoresis للحامض النووي منقوص الأوكسجين في هلام الأكاروز تركيز 1.5%. في دارىء TBE(تركيز1%). وضعت نواتج تفاعلات تضخيم البلمرة التسلسلي في حفر الهلام أومزج 9 مايكروليترمن نواتج الاستخلاص مع 3 مايكروليترمن محلول صبغة DNA loading dye في حالة الكشف عن الدنا المستخلص. رحلت النماذج في الفولتية 65 ولمدة ساعة ثم نقلت إلى وحدة الأشعة فوق البنفسجية UV–Transilluminator وفُحصت تحت طول موجي 300 نانوميتر لملاحظة الحزم البرتقالية اللون للدنا المتداخلة مع صبغة الاثيديوم بروميد ثم صورت في جميع التفاعلات (Sambrook وآخرون،1989).

تحليل البيانات الجزيئية لتقانة التضاعف العشوائي المتعدد الإشكالRAPD – PCR :

حللت نتائج التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال التي ظهرت في هلام الاكاروز للبادئ الثالث للعزلات المدروسة بجمعها في جداول اعتمادا على مقارنة وجود أو غياب الحزم وذلك بوضع الرقم 1 في الحالة الأولى و الرقم 0 في الحالة الثانية. أوجد قيم التشابه Similarty والبعد الوراثي Genetic distance لمعرفة التباين الوراثي أو طبيعة العلاقات الوراثية ما بين الفطريات والسلالات المنتخبة أو المدخلات باستخدام معامل جكارد Jaccard similarity index . اجري تحليل تجميعي Cluster analysis باستخدام الحاسوب ثم رسم مخطط للبعد الوراثي مابين المدخلات باستخدام طريقة المجموعات الزوجية الغير مزانة Unweighted pair group mean with arithmetic mean algorithm (UPGMA) لرسم الشجرة التطورية للعزلات الفطرية (Sneath و Sokal ، 1973) .

ISSN 2072-3875

النتائج و المناقشة :

تحليل بيانات المجتمع الفطري وتنوع الأنواع :

أظهرت نتائج تحليل المجتمع الفطري المعزول من حشوه وسائد القطن المنزلية أن العينات المدروسة احتوت على عدد كبير من المستعمرات الفطريات ضمت 32 جنس و76 نوع (جدول3). اختلفت أعداد الأنواع في العينات المدروسة إذ احتوت العينات 27 و8 و26 و14 و17 و1 على أكبر عدد من الأنواع وكانت 22 و18 و15 و14على التوالي و13 في العينتين الأخيرتين في حين احتوت العينات11 و24 على اقل عدد (2) من الأنواع (جدول 3) .

جدول (3) المجتمع الفطري في عينات وسائد القطن

تسلسل العينة	الفطريات المعزولة	عدد الأنواع	عدد المستعمرات لكل غم قطن
1	***A. alternate, Ascophanus carneus, Aspergillus carponaria, A. flavus, A. niger, A.parasiticus, A. sojae, Cirrenalia* sp, *Chaetmium* sp, *Curvularia lunta , Helicomyces* sp, *Olpitricum* sp , *Rhizomucor* sp.**	13	319
2	***Alternaria dianthicola , Aspergillus carponaria, A. flavus, A. niger , Heli-comyces sp, Olpitricum sp, Rhizomucor* sp .**	7	735
3	***Aspergillus carponaria, A. flavus, A. niger, A. terrus, Cladosporium* sp, *Humicol ofuscotra, Paceliumyces* sp, Yeast.**	8	241
4	***A. alternate, Aspergillus niger, A. terrus ,Cladosporium* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* sp, Yeast .**	7	233
5	***Alternaria* sp, *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A.terrus, Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp, Yeast**	9	498
6	***Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, Cladosporium* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* sp, Yeast**	7	432
7	***Aspergillus candidus, Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp**	4	116
8	***A.alternate, A.citri, A.raphani, A.tenuessima, A.clavata,A. heteromorphus, A.niger, A.pencilloids, Bipolaris spicifera, Cladosporium aphide, C. carni, C.sphaerospermum, Curvularia clavata, Drechslera halodes Helicomyces* sp, *Nigrospora* sp, *Mucor* sp, *Penicillium* sp**	18	311
9	***Aspergillus flavus, A.niger,A.resticurs, Penicillium* sp, *Rhizopus* sp**	5	155
10	***Aspergillus niger ,Penicillium* sp, *Rhizopus* sp**	3	683
11	***Aspergillus niger, Rhizopus* sp**	2	320
12	***A. alternate, Aspergillus flavus, A. japanicus, A.niger, A. oryfish , Neosar-tory fischeri, Penicillium* sp,**	7	239
13	***Aspergillus candidus, A.japanicus, A. niger, Penicillium* sp,**	4	68
14	***A. cremonium, A. heteromorphus, Aspergillus niger, Bipolaris Penicillium chrysognum* sp, *Bipolaris spicifera, Cladosporium sp, Penicillium* sp**	8	293
15	***Aspergillus niger ,Chaetmium sp, Humicol ofuscotra, Penicillium* sp**	4	101
16	***Aspergillus carponaria,A. flavus, A.niger, Paceliumyces sp, Torulomyces* sp**	5	570

ISSN 2072-3875

207	**13**	***Aspergillus alliaceus ,A. beijingensis, A. flavus, A. fumigatus, A.japanicus, A. niger, A. ochraceus, A. terrus, Chalaropsis* sp, *Cladosporium aphidis, Cladosporium* sp, *Cunninghamella elengans, Penicillium* sp**	**17**
68	**5**	***Aspergillus niger, A.sojae, Humicol ofuscotra, Leohumicola terminalis, Penicillium* sp**	**18**
176	**4**	***Alternaria longipes, Aspergillus japanicus, A. niger, Penicillium* sp,**	**19**
71	**6**	***Alternaria* sp, *Aspergillus flavus, A. niger, Cladosporium cladosporidus, Rhizopus* sp**	**20**
61	**3**	***Alternaria alternate, Cladosporium cladosporidus, Rhizopus* sp**	**21**
87	**6**	***Aspergillus flavus, A.japanicus, A. niger, A. parasiticus, Penicillium restricum, Penicillium* sp,**	**22**
103	**6**	***Alternaria* sp, *Aspergillus carponaria, A.flavus, A. fumigatus, A. niger, Rhizopus* sp**	**23**
50	**2**	***Aspergillus niger ,Rhizopus* sp**	**24**
84	**3**	***A. cervinus, Aspergillus niger, A. ochraceus***	**25**
180	**15**	***A.alternate,A.citri, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A.niger,A. ochraceus, A.oryza,A.terrus,Cladophialophoro* sp ,*C.carrionii , Fusarium* sp,*Paecil- om yces penci , P. puntoni ,P.victoria, P .expansum***	**26**
318	**22**	***A.alternate, A. arbusti, A. tenuessima, A.awamor Aspergillus beijingensis, A.flavus, A.fumigatus, A.pencilloides A. tricola. A. niger, Botrytis cinerea, Brachysporium* sp,*Chaetomium* sp,*Cladosporium aphidis,C.cladospor- ioides,Cladosporium* sp, *Emericell nidulans, Helminthospoium* sp, *Neos-artorya* sp, *Penicillium* sp, *Torulomyces* sp**	**27**
61	**4**	***Alternaria* sp ,*Aspergillus niger, Aspergillus* sp, *Penicillium janthinellum***	**28**
217	**14**	***A. alternate, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, Cladosporium aphidis, C. cladosporioides Cladosporium Helicominas* sp *hadotorella* sp sp. *Penicillium citranium, P. scedosporium,Penicillium sp***	**29**
61	**3**	***Aspergillus flavus, A. niger, Paecilomyces victoria***	**30**
7057	**217**	**العدد الكلي**	

النسب المئوية للتردد الظهور و السيادة النسبية

بينت نتائج حساب النسب المئوية لتردد ظهور الأجناس في العينات أن الجنس *Aspergillus* كان الأعلى تردد ظهور إذ بلغ 96.67% و سياده نسبية 62.22% تلاه جنس *Penicillium* كان تردده 56.66% وسيادته النسبية 8.105% ثم تبعتهما الأجناس *Alternaria*و *Cladosporium*و *Rhizopus* وكما في الجدول (4).

ISSN 2072-3875

جدول (4) تردد الظهور والسيادة النسبية للأجناس المعزولة من وسائد القطن

الأجناس الفطرية	عدد العينات التي ظهر فيها	عدد المستعمرات	تردد الظهور %	السيادة النسبية %
Alternaria	14	256	46.67	3.627
Ascophanus	1	10	3.33	0.141
Aspergillus	29	4391	96.67	62.221
Bipolaris	2	33	6.66	0.467
Botrytis	1	11	3.33	0.156
Brachysporium	1	11	3.33	0.156
Cirrenalia	1	13	3.33	0.184
Chaetmium	3	34	10	0.481
Chalaropsis	1	10	3.33	0.141
Cladophialophoro	1	10	3.33	0.141
Cladosporium	13	558	43.33	7.907
Curvularia	2	30	6.66	0.425
Cunninghamella	1	11	3.33	0.156
Drechslera	1	10	3.33	0.141
Emericell	1	11	3.33	0.156
Fusarum	1	10	3.33	0.141
Helicomina	1	10	3.33	0.141
Helicomyces	3	81	10	1.147
Helminthosporum	1	11	3.33	0.156
Humicola	3	44	10	0.623
Leohumicola	1	11	3.33	0.156
Mucor	3	57	10	0.807
Neosartory	2	42	6.66	0.595
Nigrospora	1	12	3.33	0.170
Olpitricum	2	20	6.66	0.283
Paecilomyces	4	61	13.33	0.864
Penicillium	17	572	56.66	8.105
Rhadotorella	1	10	3.33	0.141
Rhizomucor	2	20	6.66	0.283
Rhizopus	11	233	36.66	3.301
Torulomyces	2	21	6.66	0.297
Yeast	4	443	13.33	6.277

%62.22* < أنـواع سـائدة (D) Dominant، 3.301%-62.22% أنـواع وفيـرة (G) General، %0.141- 3.301 % أنواع نادرة (R) Rare .

أما بالنسبة للسيادة النسبية للأنواع فقد لوحظ أن الفطر *Aspergillus niger* كان أكثرها سيادة، إذ بلغت نسبة سيادته 42.737% وتردد ظهور 93.33 % تلاه الفطر *A. flavus* بنسبة سيادة 9.536 % وتردد ظهور 53.33%. تبعهما الفطريات *Penicillium*spp وYeast و spp *Chaetmium* و*Rhizopus* spp و *A.alternate* و*A.fumigatus* و*A.heteromorphus* و *Helicomyces* spp و*A. terrus* و*A. carponaria* (جدول 5).

ISSN 2072-3875

جدول (5) تردد الظهور والسيادة النسبية للأنواع الفطرية المعزولة من وسائد القطن

الأنواع الفطرية	عدد العينات التي ظهر فيها	عدد المستعمرات	تردد الظهور%	السيادة النسبية %
Alternaria alternate	8	123	26.66	1.743
A. arbusti	1	12	3.33	0.170
A. citri	2	23	6.66	0.326
A.dianthicola	1	10	3.33	0.141
A longipes	1	10	3.33	0.141
A. raphani	1	11	3.33	0.156
Alternaria sp	4	47	13.33	0.666
A. tenuessima	2	20	6.66	0.283
Ascophanus carneus	1	10	3.33	0.141
Aspergillus alliaceus	1	12	3.33	0.170
A.awamori	1	10	3.33	0.141
A. candidous	2	31	6.66	0.439
A. carponaria	5	72	16.66	1.02
A. cervinus	1	11	3.33	0.156
A. clavata	1	10	3.33	0.141
A. cremonium	1	12	3.33	0.170
A. beijingensis	2	33	6.66	0.467
A. flavus	16	673	53.33	9.536
A. fumigatus	7	101	23.33	1.431
A. heteromorphus	2	90	6.66	1.275
A. japanicus	5	65	16.66	0.921
A. niger	28	3016	93.33	42.737
A. parasiticus	2	47	6.66	0.666
A.pencilloids	2	20	6.66	0.283
A. resticus	1	10	3.33	0.141
A. ochraceus	3	33	10	0.467
A. oryfish	1	10	3.33	0.141
A. oryza	1	10	3.33	0.141
A. sojae	2	32	6.66	0.453
Aspergillus sp	1	10	3.33	0.141
A. terrus	5	73	6.66	1.034
A. tricola	1	10	3.33	0.141
Bipolaris sp	1	12	3.33	0.170
B. spicifera	2	21	6.66	0.297
Botrytis cinerea	1	11	3.33	0.156
Brachysporium sp	1	11	3.33	0.156
Cirrenalia sp	1	13	3.33	0.184
Chaetmium sp	13	34	43.33	0.481
Chalaropsis sp	1	10	3.33	0.141

ISSN 2072-3875

0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Cladophialophoro carrionii***
0.864	**13.33**	**61**	**4**	***Cladosporium aphide***
0.566	**3.33**	**40**	**1**	***C.arni***
0.708	**13.33**	**50**	**4**	***C. cladosporiods***
5.625	**33.33**	**397**	**10**	***Cladosporium sp***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***C. sphaerospermum***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Curvularia clavata***
0.283	**3.33**	**20**	**1**	***Curvularia lunta***
0.156	**3.33**	**11**	**1**	***Cunninghamella elengans***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Drechslera halodes***
0.156	**3.33**	**11**	**1**	***Emericell nidulans***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Fusarium* sp**
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Helicomina* sp**
1.148	**10**	**81**	**3**	***Helicomyces* sp**
0.156	**3.33**	**11**	**1**	***Helminthospoium* sp**
0.623	**10**	**44**	**3**	***Humicola fuscotra***
0.156	**3.33**	**11**	**1**	***Leohumicola terminalis***
0.807	**10**	**57**	**3**	***Mucor* sp**
0.595	**6.66**	**42**	**2**	***Neosartory fischeri***
0.170	**3.33**	**12**	**1**	***Nigrospora* sp**
0.283	**6.66**	**20**	**2**	***Olpitricum* sp**
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Paecilomyces penci***
0.156	**3.33**	**11**	**1**	***P. puntoni***
0.283	**6.66**	**20**	**2**	***Paecilomyces* sp**
0.283	**6.66**	**20**	**2**	***P.victoria***
7.156	**50**	**505**	**15**	***Penicillium* sp**
0.184	**3.33**	**13**	**1**	***Penicillium chrysognum***
0.170	**3.33**	**12**	**1**	***P. citranium***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***P .expansum***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***P. janthinellum***
0.170	**3.33**	**12**	**1**	***P. restricum***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***P. scedosporium***
0.141	**3.33**	**10**	**1**	***Rhadotorella* sp**
0.283	**6.66**	**20**	**2**	***Rhizomucor* sp**
3.301	**36.66**	**233**	**11**	***Rhizopus* sp**
0.297	**6.66**	**21**	**2**	***Torulomyces sp***
6.277	**13.33**	**443**	**4**	**Yeast**
		7057		**مجموع المستعمرات**

مؤاشرت التنوع : شانون-ويفر و سمبسون و غزارة الأنواع و تجانس ظهور الأنواع :

أظهرت نتائج مؤشرات التنوع الفطري المتمثلة بشانون-ويفر و سمبسون و غزارة الأنواع و تجانس ظهور الأنواع، أن هناك تفاوت كبير في تنوع الفطريات في عينات الوسائد المدروسة (جدول 6) . وضح مؤشر شانون-ويفر أن قيمته تناسبت طرديا مع تنوع العينات،إذ إن العينات 26 و8 و27و17 و1 و6 كانت الأعلى تنوعا وقيم مؤشراتها 3.474 و2.734 و2.708 و2.379 و2.150 و2.11 على التوالي . أما مؤشرسمبسون للتنوع فان قيمته

ISSN 2072-3875

تناسبت بشكل عكسي مع تنوع العينات فقد تقاربت نتائجه مع نتائج مؤشر شانون ويفر بان العينات 27 و26 و8 و 17 و22 و1 و29 هي الأعلى تنوعا وكانت قيمها 0.067 و0.071 و0.086 و0.115 و0.172 و0.180 و0.201 على التوالي. لوحظ إن العينة 11 هي الأقل تنوعا حسب المؤشرين أعلاه (جدول 6) .

أشار مؤشر غزارة الأنواع أن العينات27 و8 و26 و29 و17هي الأكثر غزارة في الأنواع أما العينة 11فكانت الأقل غزارة. أظهر مؤشر تجانس ظهور الأنواع إن العينة 26 هي الأكثر تجانسا وكانت قيمتها 1.283 والعينة 2 الأقل تجانسا في ظهور الأنواع وكانت 0.375 (جدول 6) .

جدول (6) مؤشرات التنوع الفطري في عينات الوسائد القطنية

تسلسل العينة	مؤشر شانون –ويفر	مؤشر سمبسون	مؤشر غزارة الأنواع	مؤشر تجانس الأنواع
1	2.150	0.180	4.793	0.838
2	0.730	0.686	2.093	0.375
3	1.578	0.292	2.939	0.759
4	1.691	0.218	2.534	0.869
5	1.817	0.209	2.966	0.827
6	1.411	0.271	2.277	0.725
7	1.063	0.444	1.453	0.767
8	2.734	0.086	6.820	0.946
9	1.346	0.309	1.826	0.836
10	0.571	0.663	0.706	0.520
11	0.234	0.882	0.399	0.337
12	1.577	0.265	2.523	0.810
13	1.303	0.281	1.637	0.940
14	1.734	0.215	2.838	0.834
15	1.127	0.391	1.497	0.813
16	0.802	0.581	1.451	0.498
17	2.379	0.115	5.181	0.928
18	1.532	0.224	2.183	0.952
19	1.002	0.441	1.336	0.723
20	1.573	0.203	2.700	0.878
21	0.882	0.481	1.120	0.809
22	1.750	0.172	2.578	0.977
23	1.575	0.254	2.484	0.879
24	0.500	0.673	0.589	0.722
25	0.735	0.589	1.040	0.669
26	3.474	0.071	6.208	1.283
27	2.708	0.067	8.392	0.876
28	1.251	0.317	1.680	0.902
29	2.110	0.201	5.564	0.799
30	0.860	0.497	1.120	0.783

يعد استخدام الوسائد كمصدر من مصادر الراحة للإنسان لكن في الوقت نفسه ممكن أن تكون مصدر إزعاج أو ذات تأثيرات صحية سلبية، إذ بينت الدراسة الحالية وجود 7057 مستعمرة فطرية تعود 32 جنس و76 نوع في

ISSN 2072-3875

الوسائد المحشوة بألياف القطن والموجودة في منازل ذات أنظمة بيئية مختلفة. أشار عدد المستعمرات إلى أن ألياف القطن ممكن أن تتواجد أو تلتصق عليها الفطريات من مصادر مختلفة أما من الحقل أو أثناء الخزن والتداول أومن الإنسان نفسه أثناء استخدامه لها أو من البيئة الداخلية المحيطة بالوسائد(El-Naghy وآخرون،1991 وHake وآخرون، 1992وChunو 2004, Anthony وWoodcock وآخرون ,2006 و Samawaty– El وآخرون، 2011). أشارت الدراسة أيضا إلى النسبة العالية لتردد الظهور والسيادة للفطر*Aspergillus* في العينات المدروسة تبعته الأجناس *Penicillium* و*Alternaria*و *Cladosporium* و*Rhizopus* فضلا عن ألأجناس ألأخرى وهذا ما أكدته دراسة سابقة عن تواجدها في حشوة الوسائد المصنعة من الريش والألياف الصناعية (Woodcock وآخرون,2006) . أن مؤشرات تردد الظهور والسيادة تدل على ثبوت بعض الأجناس في البيئة وتكرار ظهورها دليل على مدى تحملها للتغيرات البيئية المختلفة ونشاطها فسلجيا او ايضيا كسرعة نموها ونشاطها الإنزيمي والسمي مقارنة بغيرها فضلا عن أمكانية أنتاجها أعداد كبيرة من الوحدات التكاثرية ولذلك فقد أشارت الدراسات إلى نسب ترددها العالي في البيئات المختلفة(Dharmage وآخرون، 2001و Panda وآخرون،2010 و Wahegaonkar وآخرون،2011). أن الأنواع الفطرية المعزولة بدءا من الأكثر سيادة *Aspergillus niger* والفطريات الأخرى المعزولة صنفت في بحوث عدة على أنها خطرة من الناحية الصحية للإنسان ، فإذا علمنا أن معدل اليومي لنوم الإنسان الطبيعي غالبا 8 ساعات بالتالي فان نومه على وسائد ملوثة بهذه الفطريات من الممكن أن تمر ابواغها أو غزولها إلى جهازه التنفسي أو إلى أماكن أخرى في جسمه بل حتى انتقالها من شخص إلى أخر مسببة العديد من الإمراض أو إثارتها للأمراض كالربو مثلا (Green وآخرون،2003 وBowyer وآخرون،2006). أكدت الدراسة الحالية على اخذ جانب الحيطة و الحذر عند استخدام الوسائد من قبل الأشخاص ضعيفي المناعة فقد تكون السبب الرئيس للالتهابات القاتلة الناتجة عن الفطريات الانتهازية Opportunistic fungi (Currie و Casadevall ، 1994و Jawtez وآخرون،2004 و Denning وآخرون 2006). اقترحت الدراسة الحالية أيضا إمكانية إضافة الوسائد كمصدر من مصادر التلوث الفطري للبيئة الداخلية أو المنازل بما تنتجه من وحدات تكاثرية مختلفة لاسيما أذا علمنا صغر حجم الغزول الفطرية وابواغها وإمكانية انتقالها خلال ثقوب الوسائد وحملها في الهواء .

أشارت مؤشرات التنوع الإحيائي المستخدم فيها المقاييس الرياضية إلى تنوع الأنواع Species diversity في العينات أو المجتمعات المدروسة. أن التغيير في التنوع الإحيائي يعد مؤشر مناسب للتغيرات في الظروف البيئية المحيطة، إذ لوحظ وجود تنوع فطري في اغلب العينات مما أكد على توفر الظروف البيئية الملائمة كالغذاء والرطوبة ودرجة الحرارة أدت إلى نمو الفطريات وتكاثرها وبالتالي صحة المجتمع و ثباته المتواجدة فيه. أما قلة التنوع في العينة 11 يعني وجود خلل في مجتمع الوسائد القطنية في احد الظروف أعلاه بمعنى أخر أن الظرف المحيطة بالوسائد (المنزل)كانت غير ملائمة لنموها و تكاثرها. وضح مؤشر غزارة الأنواع في معظم العينات إلى صحة التجمعات و الأماكن التي تعيش فيها بينما أشار مؤشر تجانس ظهور الأنواع إلى نمط و كيفية توزيع الإفراد ما بين الأنواع فكلما اقتربت الإفراد من بعضها بعضا من ناحية الكثافة كلما اقتربت القيمة من 1 (Margalef ، 1972وKrebs ،1989 وHarrison ،2004 وWahegaonker وآخرون،2011) .

النشاط الإنزيمي الخارج خلوي لانزيمات السليوليزو البروتييز وإفراز سموم الأفلاتوكسين :

أظهرت نتائج إفراز أنزيم السليوليز قدرت جميع العزلات الخاضعة للاختبار على إفراز الإنزيمات المدروسة. امتازت الفطريات بكفاءتها في إفراز أنزيم السليولييز وتباين أقطار هالات التحلل حول مستعمراتها تبعا لكفاءة الفطريات على إفرازه إذ تراوحت 1.5-7.35 سم وبفعالية إنزيمية تراوحت 0.81 - 5.9 (جدول 7). اتفقت نتائج الدراسة مع دراسات عديدة بأن الفطريات أدناه لها القدرة على إفرازه وبكميات متفاوتة *Aspergillus niger* و*A.flavus* و*Alternaria alternate* و *Chaetomium* sp و*Cladosporium* sp و*Penicillium* sp و *Fusarium solani* و*Rhizopus* sp (ملا ورمضان ، 2010 وعبد الهادي وآخرون، 2012) وكفاءة كرام ايودين في الكشف عن إفرازه (Kasana وآخرون ،2008 وAbu Bakar وآخرون، 2010 وعبد الهادي , 2011). أظهرت النتائج تباين قدرة العزلات على إفراز الإنزيم سواءا كان ما بين الأجناس والأنواع المختلفة أم ضمن إفراد

ISSN 2072-3875

النوع الواحد ولوحظ أن الفطر *Aspergillus sojae* امتلك كفاءة عالية في إفراز الأنزيم بينما تفاوتت الكفاءة في الأجناس الأنواع الأخرى. لوحظ أيضا تباين في ما بين العزلات التابعة للنوع *A. niger* من ضعيفة إلى جيدة . يمكن تفسير ضعف قدرة بعض العزلات على إفراز السليوليز لعدة أسباب منها عدم كفاية مدة التحضين لتحفيز إفرازه واختلافها في القدرة على استغلال الوسط الزرعي أو لعدم ملائمة الأس الهيدروجيني للوسط (Luiza ، 2000 وعبد الهادي وآخرون،2012) .

جدول (7) الكشف عن الفعالية الإنزيمية لإنزيم السليوليز لبعض الفطريات المعزولة

ت	الفطريات المعزولة	قطر المستعمرة (سم)	قطر الهالة (سم)	النشاط الإنزيمي
1	***Alternaria alternate***	0.9	3.75	*** † 0.28 ±4.17
2	***A. alternate***	3.15	3.6	* 0.05± 1.14
3	***Aspergillus fumgatus***	1.5	4	** 0.05± 2.7
4	***A. niger* aggregate**	1	3.25	** 0.15±3.25
5	***A. niger* aggregate**	1.7	2	* 0.04± 1.18
6	***A. niger* aggregate**	1.4	3	* 0.02±2.14
7	***A. niger* aggregate**	1.5	2.25	* 0.38±1.5
8	***A. niger* aggregate**	1.4	4	** 0.15±2.9
9	***A. niger* aggregate**	1	2.5	* 0.05±2.5
10	***A. niger* aggregate**	1	5.5	*** 0.5±5.5
11	***A.niger* ver.niger**	1.25	3.9	** 0.03±3.12
12	***A.niger* ver.niger**	1.1	2.05	* 0.1±1.9
13	***A. niger* var usamii**	1.25	3.1	** 0.05±2.5
14	***A. sojae***	1.25	7.35	**** 0.18±5.9
15	***A. wentii***	0.95	6.5	** 0.89 ±3.34
16	***Bipolarus spicifera***	4	3.25	* 0.07±0.81
17	***Cladosporium* sp**	1	3	** 0.05± 3
18	***Neosartory fischeri***	1	1.5	* 0.02 ±1.5
19	***Pencillum* 1**	1	3	** 0.02 ± 3
20	***Pencillum* 2**	1	4.3	*** 0.25±4.3
21	***Pencillium* 3**	1.15	3.25	** 0.17±2.8

مثلت كفاءة ضعيفة للفطر على إفراز ألإنزيم و تكون هالة رائقة حول المستعمرات الفطرية بقطر (1- 2.5 سم). ** مثلت كفاءة متوسطة للفطر على إفراز ألإنزيم و تكون هالة رائقة حول المستعمرات الفطرية بقطر (2.6- 4.0 سم). مثلت كفاءة جيدة للفطر على إفراز ألإنزيم و تكون هالة رائقة حول المستعمرات الفطرية بقطر (4.1- 5.5 سم). **** مثلت كفاءة عالية للفطر على إفراز ألإنزيم و تكون هالة رائقة حول المستعمرات الفطرية بقطر (5.6- 7سم). استخدم التدرج حسب ما استخدمه عبد الهادي (2011). ± † الانحراف المعياري S.D.**

أظهرت نتائج الكشف عن فعالية أنزيم البروتييز امتلاك جميع العزلات الخاضعة للاختبار على إفراز الإنزيم رغم اختلاف الفعالية الإنزيمية بين الأجناس الفطرية والأنواع وحتى ما بين العزلات التابعة للنوع نفسه كما في الفطر *Alternaria alternate* و*Aspergillus* sp. اتفقت نتائج الدراسة مع كل من Dion (1950) و Das وآخرين (1979) الذين أوضحوا بان الفطريات التابعة لجنس نفسه أو النوع ممكن أن تتباين في قدراتها الإنزيمية وأن الإحياء المجهرية غالبا ما تختلف في فعاليتها الفسلجية بين السلالات المختلفة التابعة لنفس النوع وهذا ما لوحظ في الفطريات التي تستخدم في العمليات الصناعية (Gray، 1959). أن اختلاف قابلية إفرازالإنزيم لبعض أنواع *Aspergillus*مثل *A.fumigatus* و *A.sojae* و *A.wentii* ذات قابلية جيدة في حين كانت معظم عزلات

ISSN 2072-3875

A.niger ذات قابلية منخفضة ربما يعزى إلى طبيعة الرقم الهيدروجيني للوسط إذ لاحظ Zielinsa و Kaczkowski(1972) أن قابلية الفطر لإفراز الإنزيم تكون جيدة عند pH تراوحت ما بين2.5- 3.

أظهرت نتائج الكشف النوعي عن قابلية جميع الفطريات المختبرة على إفراز سموم الافلاتوكسين من خلال ملاحظة التغير اللوني و بدرجات متفاوتة للوسط الزرعي دليل على التباين في قابلية إفرازها (جدول9). أن قدرت الفطريات المدروسة على إفراز سموم الافلاتوكسين تتفق مع نتائج عدد من البحوث (EL-Naghy وآخرون، 1991وYazdani وآخرون، 2010). أن تباين الفطريات أو العزلات المدروسة في إنتاج السموم قد تعزى إلى الظروف الزرعية لتنمية الفطريات حيث تتأثر نسبة السم بعدد من العوامل منها تجزؤ السم ما بين الغزل الفطري والمادة الأساس وتحلل السم خلال أطالة مدة الحضن وكمية السم المنتج (EL-Naghy وآخرون، 1991). أثبتت الدراسة أيضا كفاءة استخدام وسط مستخلص الخميرة و السكروز عند تعرضه لبخار الامونيوم في الكشف عن قدرة الفطريات على إفراز السم (Saito وMachida، 1999وKumarوآخرون،2007).أن قابلية الفطريات المعزولة على إفراز السموم ممكن أن تكون لها تأثيرات صحية على الأشخاص المستخدمين للوسائد، إذ تحتل هذه السموم الموقع الأهم بين السموم الفطرية في ضوء طبيعتها الفعالة في الإصابة بالإمراض المختلفة للإنسان والتي تتأثر بعوامل متعددة منها مدة التعرض للسموم الفطرية والحالة الصحية والعمرية (Klein وآخرون، 1993والحمداني و آخرون ،) 2011). عموما ، أن النشاط الأنزيمي والسمي الذي أبدته الفطريات المدروسة أكد على قدرتها على الاستفادة من الوسط الذي تعيش فيه للحصول على غذائها من المواد السليلوزية والنتروجينية المحيطة بها وكذلك قدرتها على اختراق و إصابة أنسجة الإنسان كالجلد أو الإذن، لاسيما أذا علمنا أنها فطريات انتهازية متى ما ضعفت مناعة الجسم أحدثت أضرار صحية بليغة (الحمداني وآخرون،2011) .

جدول (9) الكشف النوعي عن القابلية على إفراز سموم الافلاتوكسين لبعض الفطريات المعزولة

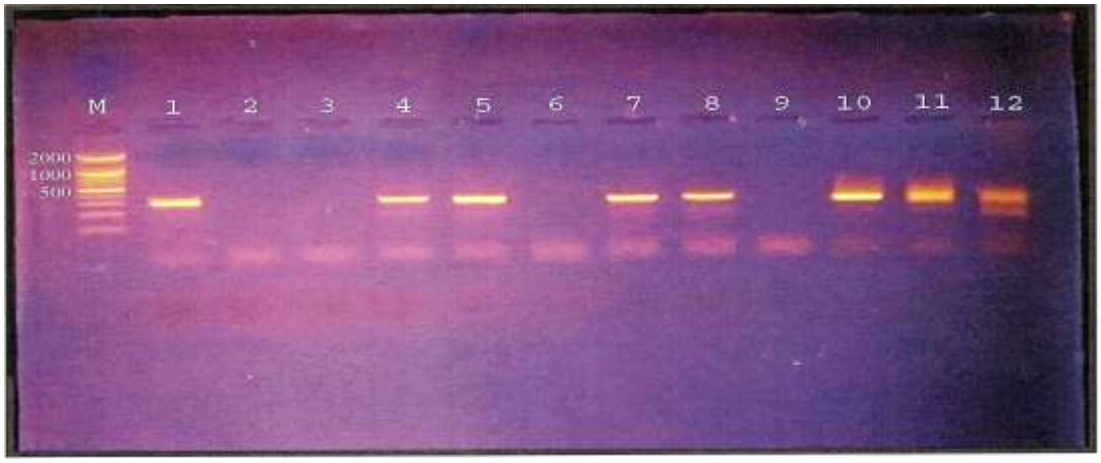
الأجناس الفطرية	العزلات والأنواع الفطرية	الاستجابة للتغير اللوني		
		+	++	+++
Alternaria	***A. alternate***		_	
	A. alternate		_	
	A. alternate	_		
Aspergillus	***A.flavus***			-
	A.flavus		-	
	A.niger aggregate		-	
	A.niger aggregate		-	
	A.nigr aggregate	-		
	A.niger aggregate		-	
	A.nigre aggregate			-
	A.niger aggregate		-	
	***A.niger* ver.niger**		-	
	***A.niger* ver.niger**	-		
	A. wentii			-
Cladosporium	***C. cladosporoides***	-		
	C. cladosporoides			-
	C. cladosporoides	-		
Pencillium	***Pencillum* sp 1**			-
	***Pencillum* sp 2**			-
	***Pencillium* sp 3**		-	

+ اصفر برتقالي فاتح (ضعيف)، ++ اصفر برتقالي معتدل (معتدل)، +++ اصفر برتقالي غامق (عالي).

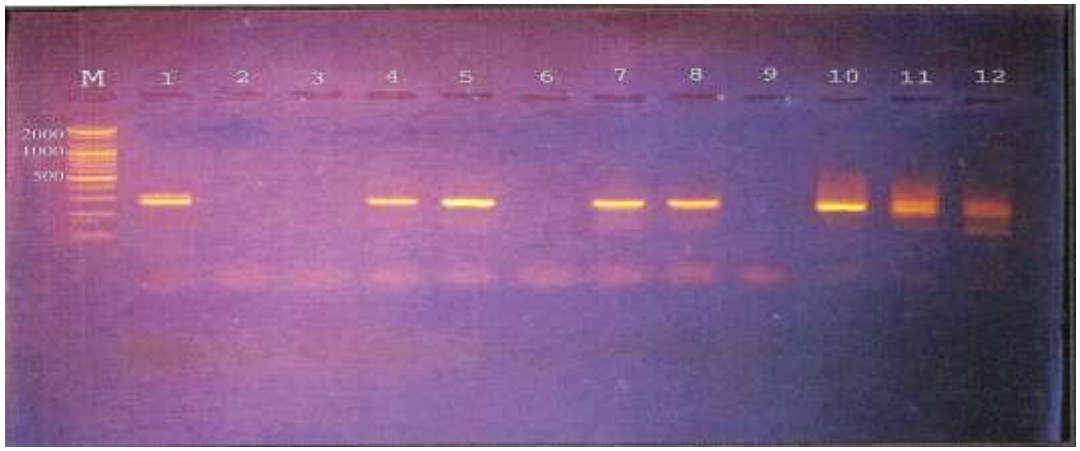
ISSN 2072-3875

الخصائص الوراثية للفطر *A.niger* والفطرين *Cladosporium* و *Pencillium* باستخدام البوادئ ITS1 و ITS2

لوحظ كفاءة استخلاص الدنا لأثنتا عشر عزلة ضمت ثماني عزلات للفطر *A.niger* و اربع عزلات للفطرين *Pencillium* و *Cladosorium*، إذ تراوح نقاوتهم مابين 0.99- 2.75 . بينت نتائج تضخيم تسلسلات الدنا للبوادئ العام ITS1 & ITS2 لعزلات *A.niger* حزم متماثلة و بناتج بلمرة ذو حجم تقريبا 270-280 زوج قاعدي في حين كانت أحجام الحزم تقريبا 240 زوج قاعدي للنوع *Cladosporium* و250- 260 زوج قاعدي لعزلتا النوع *Pencillium* كما لوحظ عدم ظهور الحزم في بعض العزلات (شكل1 و2).



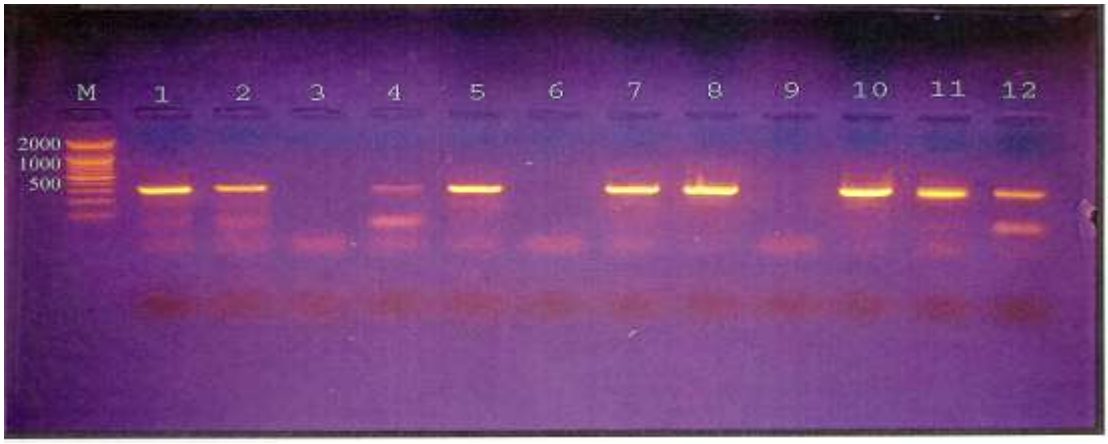
شكل (1) نواتج تضخيم الدنا بعد مرور 40 دقيقة على الترحيل الكهربائي باستخدام البادئ ITS1/ITS2 . مثلت الحفر الثمانية الأولى عزلات الفطر *A .niger* والحفرتين 9 و12الفطر *Pencillium* والحفرتين 10 و11 الفطر *Cladosporium* .



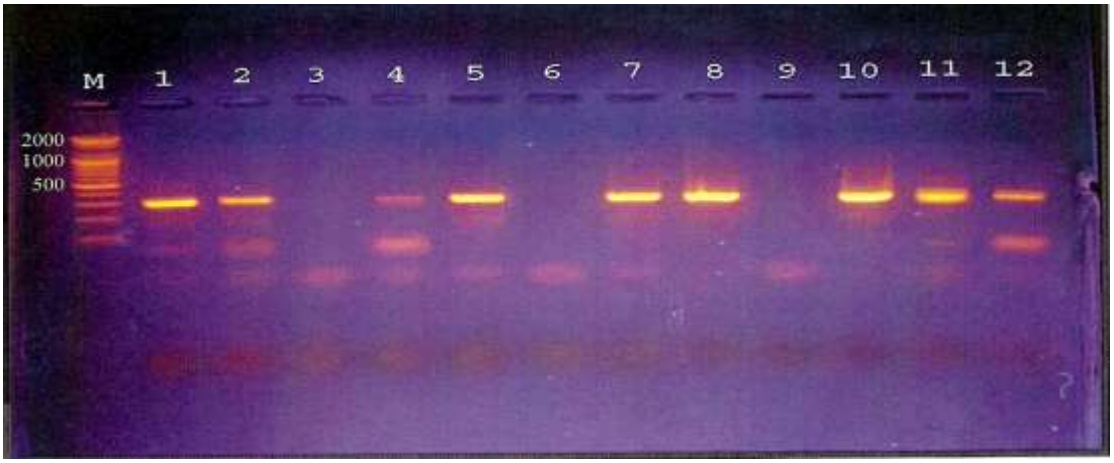
شكل (2) نواتج تضخيم الدنا بعد مرور 60 دقيقة على الترحيل الكهربائي باستخدام البادئ ITS1/ITS2 . مثلت الحفر الثمانية الأولى عزلات الفطر *A .niger* والحفرتين 9 و12الفطر *Pencillium* والحفرتين 10 و11 الفطر *Cladosporium*

ISSN 2072-3875

أظهرت نتائج تضخيم مناطق ITS2 وITS5 امتلاك معظم عزلات النوع *A.niger* حزم متماثلة وبناتج بلمرة ذو حجم 290-300 زوج قاعدي في حين كانت احجام البلمرة 275 زوج قاعدي للنوع*Cladosporium*و250 - 270 لعزلات النوع *Pencillium* في حين لم تظهر الحزم في بعض العزلات (شكل 3).إن نتائج التضخيم تدل على إمكانية استخدام مناطق ITS أعلاه في التشخيص التقليدي للفطريات وعلى الأغلب نجاحها في التشخيص على مستوى الأجناس والأنواع (White وآخرون، 1990 وMorrison وآخرون، 2011 و Ciardo وآخرون ، 2010والربيعي، 2013) كما فضل استخدامها في الفطر*Aspergillug* لكونها تحتوي على مناطق تغاير كثيرة وبالتالي إمكانية استخدامها في تصميم معلمات تشخيصية متخصصة للنوع Species-specific diagnostic probes (De Aguirre وآخرون، 2004 وMorrison وآخرون، 2011). ممكن إن تعزى أسباب عدم ظهور الحزم في بعضها إلى كمية الدنا القليلة في كتلة الغزل نتيجة التحطيم الغير مكتمل لجدار الخلية أو ممكن أن يؤدي إلى تحويرات غير معروفة لمركبات الجدار أو تثبيط تفاعل PCR بوساطة المركبات الفطرية التي تتحرر أثناء تحطيم الخلية في عملية استخلاص الحامض النووي (Ciardo وآخرون، 2010).



شكل (3) نواتج تضخيم الدنا بعد مرور 40 دقيقة على الترحيل الكهربائي باستخدام الزوج البادئ ITS2/ITS5 مثلت الحفر الثمانية الأولى عزلات الفطر *A niger.* والحفرتين 9 و 12 الفطر *Cladopsorium* والحفرتين 10 و11 الفطر *Pencillium* .

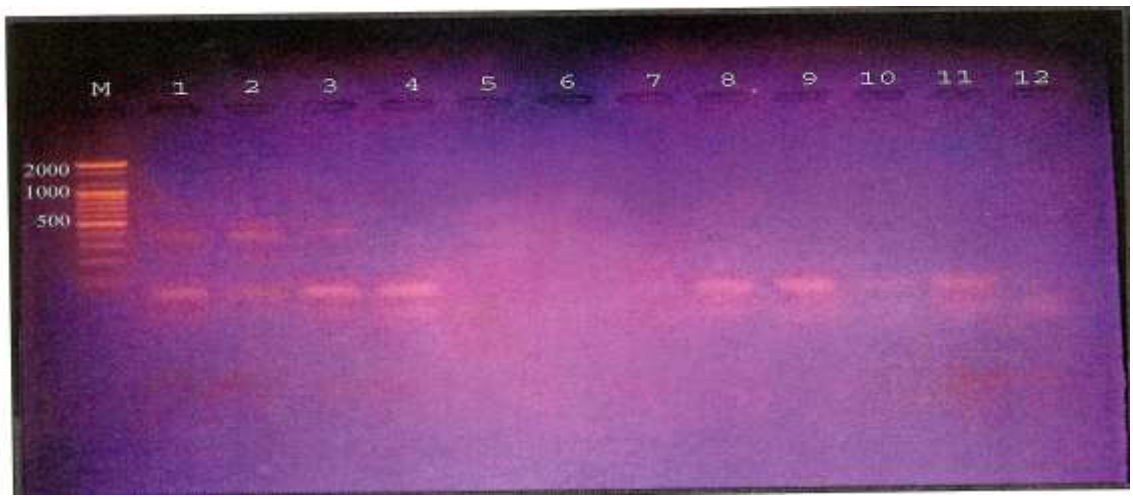


شكل (4) نواتج تضخيم الدنا بعد مرور60 دقيقة على الترحيل الكهربائي باستخدام البادئ ITS2/ITS5 . مثلت الحفر الثمانية الأولى عزلات الفطر*A niger.* والحفرتين 9 و12الفطر *Cladosporium* و 10و11 الفطر *Pencillium* .

ISSN 2072-3875

التشخيص الجزيئي للفطر *A.niger* بإستخدام البادئ المتخصص بتقانة تفاعل البلمرة التسلسلي :

اثبت التشخيص الجزيئي للفطر *A.niger* المنتج لسموم Ochratoxin A بان الجين المستهدف موجود في العزلة رقم 3عند الوزن الجزيئي 374 زوجا قاعديا في درجات الحرارة 58 و60 و 62 ْم في حين لم يظهر هذا الجين في العزلة الثانية رقم 4 (شكل 5) كما أظهرت نتائج هذا الاختبار إن كلا العزلتين لم تظهر أي نتيجة في درجة الحرارة 66 مْ .



شكل (5) الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة التسلسلي لعزلتي الفطر *A.nger* . مثلت الحفر الأربعة الأولى درجات حرارة الالتحام في 58 ،60 ،62 و66 ْم على التوالي للعزلة 3 في حين مثلت الحفر9، 11,10 و12 درجات الحرارة السابقة للعزلة 4 .

أظهرت نتيجة الدراسة مطابقتها لنتائج الباحثين ومؤكدة ومكملة لتشخيص الفطر فضلا عن الطرق التقليدية كون التسلسل المستخدم متخصص للفطر *A.niger* ، أما عدم ظهوره في العزلة الأخرى ممكن أن يعزى إلى عدم قابلية العزلة على إفراز السم أو عدم ملائمة الظروف البيئية المحيطة(كالوسط ألزرعي مثلا) لإفراز السم أو نتيجة لتثبيط تفاعل PCR بواسطة مكونات جدار الخلية أثناء عملية استخلاص الحامض النووي(Gonzalez -Salgado وآخرون،2005 وZanzotto وآخرون، 2006 و Ciardoوآخرون،2010) إن استخدام الطرق المعتمدة على PCRالمستهدفة للدنا DNA تعد بديلا جيدا وسريعا لتشخيص الفطريات لأنها عالية التخصص وحساسة وفضل أيضا استخدام المنطقةITS1 في الفطر*Aspergillus* لأنها تحتوي على مناطق كثيرة التغاير(Zhao وآخرون ، 2001 وMorrison وآخرون، 2011)

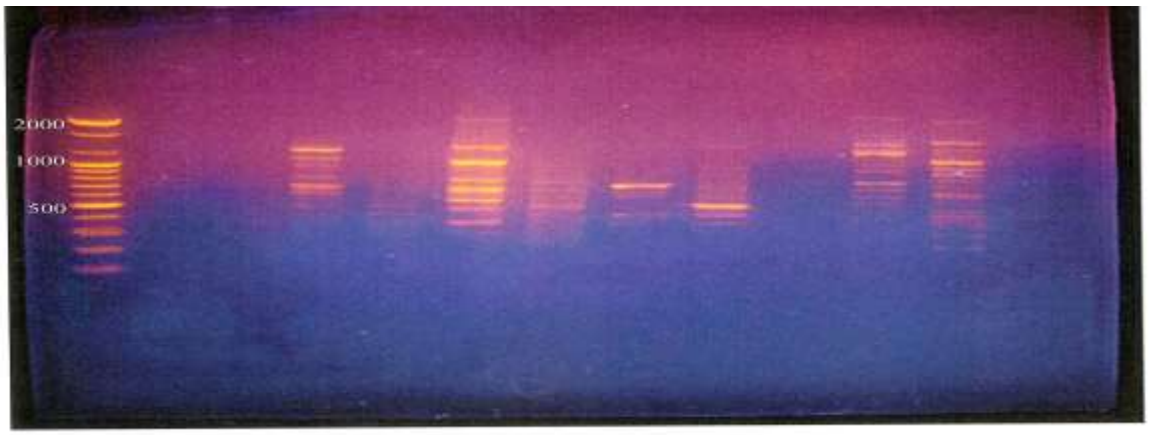
التنوع الوراثي لبعض عزلات الفطريات *A.niger* و*Cladosporium* و *Pencillium* باستخدام تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الإشكال RAPD – PCR

أوضحت نتائج دراسة التنوع الوراثي لبعض العزلات الفطرية المدروسة باستخدام تقانة RAPD المعتمدة على PCR لثلاث بوادئ هي ACT C وTGG GGG وCTG CTG GGA C وTGC TCT GCC C عدم الحصول على نواتج التضخيم باستخدام البادئان الأول و الثاني ، في حين نجح البادئ الثالث في كشف التنوع الوراثي Genetic diversityبين الفطريات المدروسة (شكل6). اظهر البادئ الأخير نواتج تضاعف متباينة بين العزلات حيث كون 12 حزمة تراوحت أحجامها 200- 2000 زوجا قاعديا كما تباينت في تألق الحزم. لوحظ عدم وجود حزم مشتركة أو متشابهة Monomorphic bands بين بعض العينات بما فيها عزلات الفطر *Pencillium*

ISSN 2072-3875

وعدم وجود تسلسلات البادئ الثالث في الفطر *Cladosporium*. يمكن تفسير عدم الحصول على نواتج التضاعف باستخدام البادئين إلى عدم وجود المواقع المكملة لتسلسلات هذين البادئين في جينوم الفطريات المدروسة و قد يعزى الاختلاف في عدد الحزم و أوزانها الجزيئية في حالة البادئ الثالث إلى الاختلاف في عدد المواقع المكملة لجينوم الفطريات مما أكد على وجود تنوع وراثي ما بين الفطريات المدروسة أو مابين العزلات وهذا ما أكدته الدراسة الحالية الإنزيمية والسمية. أن التباين في تألق الحزم قد يفسر عادة إلى ظهور بعض الحزم المتضاعفة معا ذات وزن جزيئي متماثل فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة أو نتيجة لزيادة تركيز DNA القالب مما أدى إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف وبالتالي إلى تضاعف الموقع نفسه أكثر من مرة (Vogt وآخرون، 1997) .

اتفقت النتائج أعلاه مع عدد من الباحثين التي أكدت على أمكانية الاستفادة من تقانة البلمرة العشوائية في تمييز أو الكشف عن مواقع الطفرة Mutant loci وفي تخمين البعد الوراثي ورسم البصمة الوراثية للعزلات أو الأجناس الفطرية وإمكانية البحث عن مناطق تضخيم متخصصة بالنوع Species-specific amplicons للكشف عن الأنواع أو حتى السلالات لغرض استخدامها في الدراسات التصنيفية والطبية (Hinrikson وآخرون، 2005 و Swelim، 2005 وAiat ، 2006) وكذلك استخدامه في كشف مستوى التباين الوراثي للمجتمعات أو السكان (Skibinski ، 1994).



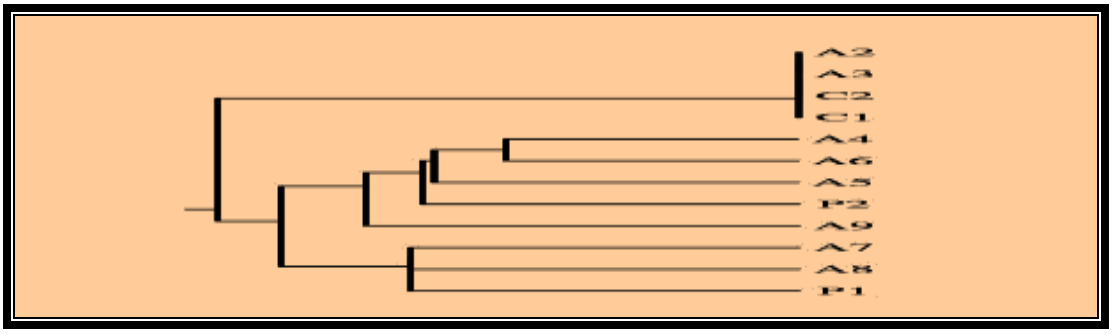
شكل (6) نواتج تضخيم الدنا باستخدام تضاعف البلمرة العشوائية .مثلت الحفر الثمانية الأولى عزلات الفطر*A. niger* و الحفر9 و11عزلتي الفطر *Cladosporium* و الحفر10 و 12عزلتي الفطر *Pencillium*.

الشجرة التطورية :

وضح شكل(7) الشجرة التطورية Phylogenetic tree بهيئة شكل تطوري Phylogram مرسوم على أساس بيانات RAPD لتحديد طبيعة العلاقات الوراثية بين بعض الفطريات المدروسة . استخدمت نتائج البعد الوراثي للبادئ الثالث لغرض فصل العزلات المدروسة الى مجاميع متشابهة وراثيا Genetic similarity gropes (عناقيد Cluster) باستخدام معامل جكارد Jaccard coefficient . لوحظ تكون عنقودين كبيرين ، الأول تكون من أربعة فطريات لم تكون أي حزم ، تعود لنمط Patterns واحد فقط والعنقود الثاني تكون من 5 عناقيد ثانوية .العنقود الاول تكون من العنقودين A4 و A6 العائدين للفطر *A.niger* والمعزولين من الحصوة والاسكندرية حيث كانا الأكثر تشابه وراثيا فيما بينهما مقارنة بالعزلات الأخرى (جدول 21 و 22) .

أن النتائج أعلاه أظهرت وجود تنوع وراثي كبير بين العزلات المدروسة والتي قد تكون دليل على تطور هذه العزلات نتيجة لتغير في المادة الوراثية كحدوث الطفرات أو ما يتبعها من تغيير في الجزيئات الحيوية او التعبير الجيني بسبب الظروف البيئية المختلفة المتعرضة لها أو نتيجة لتأثرها بشكل كبير في معدل عمليات الايض Esser (، 2006).

ISSN 2072-3875



شكل(7) الشجرة التطورية والعلاقات الوراثية بين بعض العزلات الفطرية .

جدول(10) قيم التشابه بين العينات اعتمادا على معامل جكارد

A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	C2	P1	P2	C1		
A2	1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	
A3		1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	
A4			1	0.250	0.500	0.250	0.250	0.375	0.000	0.250	0.250	0.000	
A5				1	0.500	0.333	0.000	0.250	0.000	0.000	0.333	0.000	
A6					1	0.200	0.000	0.167	0.000	0.200	0.500	0.000	
A7						1	0.333	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000	
A8							1	0.250	0.000	0.333	0.000	0.000	
A9								1	0.000	0.000	0.250	0.000	
C2									1	0.000	0.000	1.000	
P1										1	0.333	0.000	
P2											1	0.000	
C1												1	

جدول(11) يوضح قيم البعد الوراثي بين العينات اعتمادا على معامل جكارد

	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	C2	P1	P2	C1	
A2	0	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	
A3		0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	
A4			0	0.750	0.500	0.750	0.750	0.625	1.000	0.750	0.750	1.000	
A5				0	0.500	0.667	1.000	0.750	1.000	1.000	0.667	1.000	
A6					0	0.800	1.000	0.833	1.000	0.800	0.500	1.000	
A7						0	0.667	1.000	1.000	0.667	1.000	1.000	
A8							0	0.750	1.000	0.667	1.000	1.000	
A9								0	1.000	1.000	0.750	1.000	
C2									0	1.000	1.000	0.000	
P1										0	0.667	1.000	
P2											0	1.000	
C1													

ISSN 2072-3875

المصادر :

الحمداني ،عدنان حمد عبيد ; سرحان، عبد الرضا طه; عبد الحسين، محمد محسن.2011. الكشف عن قابلية بعض الفطريات الانتهازية المسببة لالتهابات الإذن الوسطى على إنتاج الأفلاتوكسين . مجلة كلية المأمون الجامعة . 17 : 157- 164.

الربيعي ، أزل علاء عباس .2013 . التنميط الجزيئي بالبلمرة البسيطة والعشوائية لعزلات الفطر *Aspergillus terreus* وتقييم كفاءتها في إنتاج الستاتين .رسالة ماجستير .كلية العلوم للبنات .

عبد الهادي ،شمال يونس. 2011.تحديد كفاءة العزلات الفطرية في إنتاج إنزيم السليوليز . مجلة تكريت للعلوم الصرفة .16 (2): 167-174.

عبد الهادي ، شمال يونس و نور عامر محمد وبشرى عصام كامل .2012. إنتاج إنزيم السليوليز من بعض العزلات الفطرية المحلية ودراسة تأثير بعض الظروف الزراعية .

ملا , فاتن نوري و رمضان ، عبد نديم احمد . 2010 . الفطريات المنتجة لأنزيم السليوليز والمحمولة ببذور بعض أنواع البقوليات . مجلة علوم الرافدين. 21 (4):57- 65 .

Abedin,R. M.; El-Aassar , S. A.; Hassan , M. A. ; Salem , S. R. & Salama , A. M. 2012. Isolation and screening of some medically important fungi from indoor environment: studying the effect of some environmental and chemical factors on their growth and spore adhesion . Afr. J. Biotechol. 11(80):14569-14577.

Abu Bakar , N.K.; Abd-Aziz,S.; Hassan, M.A.& Ghazali,F.M.2010. Isolation and selection of appropriat cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil plam empty fruit bunch .Biotechnol.9(1):73-78.

Aiat, N. 2006. Genetic variability among three species of *Aspergillus* 2. random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis. J. Appl. Sci. Res. 2:709-713.

Barnett, H. L. & Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. American Phytopathological Society Press.. 218pp

Bowyer, P. ; Fraczek M. &Denning ,D.W. 2006.Comparative genomics of fungal allergens and epitopes shows widespread distribution of closely related allergen and epitope orthologues .BMC. Genomics.7: 251 .

Booth,C.1971.The genus *Fusarium*.Commonwealth Mycological Institute .Kew..237pp.

Ciardo, D.E.; Lucke, K.; Imhof, A.; Bloemberg,G.V.& Bottger,E.C.2010. Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-Year Study. J. Clinical Microbiol. 84(8): 2809-2813.

Chun, D.T.& Anthony, W. S. 2004 .Engineering and ginning effects of adding moisture at the gin lint slide on cotton bale microbial activity and fiber quality. J. Cotton Sci.8:83–90 .

Cooke ,W. B. & Foter ,M.J.1958. Fungi in used bedding materials. Appl. Microbiol.6 (3):169- 173.

ISSN 2072-3875

Currie,B.P.& Casadevall,A.1994.Estimation of the prevalence of cryptococcal infection amonypatients infected with the human immunodeficiency virus in NewYork city.Clin.Infect.Dis.19:1029-1033.

Das ,A.; Chatterjee ,M. &Roy,A.1979.Enzymes of some higher fungi .Mycologia 71:530-535.

De Aguirre, L.; Hurst, S. F.; Choi, J. S.; Shin, J. H.; Hinrikson, H. P. & Morrison, C. J. 2004. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay. J Clin. Microbi. 42: 3495–3504.

Denning , D.W.;O'Driscoll ,B.R.;Hogaboam ,C.M. ; Bowyer ,P. & Niven , R.M. 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence.Eur. Respir. J. 27: 615–626.

Dharmage, S.; Bailey, M.; Raven, J.; Mitakakis, T.; Cheng, A.;Guest D.; Rolland, J.; Forbes, A.; Thien,F.; Abramson, M. &Walters, H. 2001.Current indoor allergen levels of Fungi and cats, but not house dust mites, influence allergy and asthma in adults with high dust mite exposure. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 (1): 65-71.

Dion,W.M.1950.The proteolytic enzymes of microorganisms: Survey of fungi and Actinomycetes for protease production in submerged culture .Can .J.Re.Sec. C. 28(6):577- 585.

Domsch, K.H.; Gams W. & Anderson T.H. 1980. Compendium of soil fungi. 1. Academic Press. London. 859pp.

El-Kady , I.A. ; Mazen , M.B. & Saber,S.M., 1984. Some enzymatic activities of fungi isolated from cotton seeds and cotton seed products.Qatar Univ .Sci .Bull. 4:85-93.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England. 608pp.

EL-Naghy, M. A.; . Mazen, M.B& Fadl-Aallah , E. M .1991.Studies on the fungus flora and aflatoxin production of cotton seeds in Egypt. J. Islamic Academy of Science.4(2): 141-145 .

El-Samawaty, A. M. A.; Omar, M. R.; El-Wakil, D. A. Naglaa, T. & Mohamed, J. 2011. Plant Prot. Pathology. Mansoura Univ. 2 (6): 583 – 595.

Esser,K.2006. The Mycota. Springer-Verlag Berlin Heidelberg . Press,. Germany. 283pp.

Gonzalez-Salgado, A.; Patno, B.; Vazquez, C.& Gonzalez-Jaen, M.T. 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. FEMS Microbiol. Letters . 245:353 -361.

Gray ,W.D.1959.The relation of fungi to human affairs .Henry Holt and Co. Inc.,New York.P. 510 .

Green, B.J.; Mitakakis, T.Z& Tovey, E.R. 2003. Allergen detection from11fungal species before and after germination. J Allergy .Clin . Immunol .111:285–289.

Hake, K. ; Banks,J.C. ; Bourland, F. ; Sasser, P. Tugwell , P. & Williford, R. 1992.Boll Weathering. Cotton Physiology Today. 3(10)1-4.

ISSN 2072-3875

Hambleton, S.; Nickerson, N. L. &Seifert, K. A..2005. *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. Studies in Mycology 53: 29–52..

Hawksworth, D.L. 2002. Tropical mycology. Micromycetes-CABI.2 :1- 11.

Hinrikson, H. P.; Hurst,S. F.; Lott,T. J.; Warnock,D. W. & Morrison, C. J. .2005.Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal trans-cribedspacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. J. Clin. Microbi.43:2092 -2103.

Jawetz,C.;Melink,A.;Adelbengs,S.;Brooks,G.;Butel,J.&Morse,S. 2004. Medical microbiology . 20th ed.Exclusive rights by McGraw-ltill.Eduction (Asia).

Jaya ,S; Sathiya, S.; Ali ,F.; Ali, A.; Sepiahmuid , K. & Abdullah, M.T. 2008 . Bats (chiropteran) reported with *Aspergillus* species from Kubah National Park, Sarawak, Malaysia. J. Tropical Bio. Conservation. 4 (1) : 81- 97.

Kasana , R.C.; Salwan, R; Dhar ,H ; Dutt, S. & Gulati ,A.2008.A Rapid and easy method for the detection of microbial cellulase on agar plates using grams iodine.Curr.Microbiol.57:503-507 .

Klein, G.L.& Snodgrass, W.R. 1993. Cellulose. In: Macrae R, Robinson RK, Saddler MJ, editors. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. London: Academic Press. p 758– 767.

Koch,O.C.&Dedic,G.A.1957.Contribution to the proteolytic activity of moulds .Biochem.Z.328:536-548.

Krebs, C.J .1989. Ecological methodology. New York: Harper and Row Publisher.

Kumar, S.; Shekhar, M.; Ali, K.A. & Sharma, P. 2007. A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain.Ind. Phytopathol. 1: 31-34.

Liang, Z.Q.; Han, Y.F.; Chu, H.L. &Liu, A.Y. 2005. Studies on the genus *Paecilomyces* in China. I. Fungal Diversity. 20: 83-101.

Luiza, J. 2000. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endogluconaes production. Industrial Crops and Products. 11: 1-5.

Manamgoda,D.S.;Cai,L.; McKenzie,E.H.C.; Crous,P.W.;Madrid,H.; Chuk-eatirote, E. ; Shivas, R.G.; Tan,Y. P.& Hyde, K.D.2012.A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris -Cochliobolus-Curvularia* complex . Fungal Diversity .56:131–144.

Margalef, R. 1972. Homage to evelyn hutchinson, or why there is an upper limit to diversity. Pp. 211–235. *In:* E.S. Deevey (ed.), Growth by intussusception; ecological essays in honor of G.Evelyn Hutchinson.Transactions. Connec -ticut Academy of Arts and Sciences . 44:1-443.

Maria, G.L. and Sridhar, K.R.2003. Diversity of filamentous fungi on woody litter of five mangrove plant species from the southwest coast of India. Fungal Diversity 14: 109-126.

ISSN 2072-3875

Marie,T.P; Maza,L. M; and Baron, E. 1997.Color atlas of diagnostic microbiology .Walsworth Press.USA.233pp .

Morrison,C.J.; Decatur,G A; Hinrikson, H. P.& Wallisellen,C.H.2011. Molecular identification of *Aspergillus* species. United States Patent.Appl.No. 7,871,779 B2 :1-33 .

Navi, S.S.; Bandyopadhyay, R.; Hall, A.J.& Bramel-Cox, P.J. 1999. A pictorial guide for the identification of mold fungi on sorghum grain. Icrisat Press. India.118 pp.

Panda, T.; Pani ,P.K. ; Mishra, N.; & Mohanty, R.B. 2010. A Comparative account of the diversity and distribution of fungi in tropical forest soils and sand dunes of orissa, India. J.Biodiversity. 1 (1) : 27-41 .

Pasanen, A. L.; Lappalainen, S.; Pasanen, P.1996. Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. 121.Analyts 1949-1953.

Pitt, J.I. and Hocking,A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall. 593pp.

Irshad, S..& Nawab, R. 2012 . Molecular characterization of seven different species of *Aspergillus* through random amplified polymorphic DNA (RAPD) and enzyme analysis . J. Microbiol. Res. 2(3): 47-50

Saito, M .& Machida, S. 1999. A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience. 40(2): 205-208 .

Sambrook, J . ; fritsch ,E. F, &Maniatis ,T.1989. Molecular cloning a labrotary manual . 2nd ed Gold spring Harbor . New York. USA. 631- 632pp.

Samson,R.A.; Noonim1,P.; Meijer, M.; Houbraken J.; Frisvad J.C. & Varga, J. .2007.Diagnostic tools to identify black aspergilli . Studies in Mycology. 59: 129–145.

Skibinski, D.O.F.1994 .Potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: Beaumont, A.R. (ed) Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. Chapman and Hall, London . 177-199pp.

Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy.W. H. Freeman and Company, San Francisco.cited fromThierry Backeljau, Luc De Bruyn, Hans De Wolxt Kurt Jordaens,"f Stefan Van Dongen, T & Birgitta Winnepenninckx Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages.1996 .Mol.Biol.Evol.13(2):309- 313.

Swelim ,M.A. 2005.RABD-PCR.analysis of some *Asergullius flavu*s strains isolated from different sourcse .Egypt .J.Biotech. 20:446-455.

Tang, A.M.C., Hyde, K.D. & Corlett, R.T.2003.Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong. Fungal Diversity .14: 165-185.

Yassin, M. F.& Almouqatea, S.2010. Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. Int. J. Environ. Sci. Tech.7(3) 535-544.

ISSN 2072-3875

Yazdani, D.; Zainal Abidin, M. A.; Tan, Y. H. & Kamaruzaman, S.2010. Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. Afr. J. Biotechnol. 9(45): 7654-7659.

Vogt,T.; Francoise,M.; Frank,K.; Welshand,J.& Clelland, M.1997.Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR.In: G. Caetano–Anolles, and P.M.Gresshof.(eds.) DNA Markers. Protocols Application and Overview.New York.p.55-74.

Wahegaonkar,N.; Salunkhe,S.M.; Palsingankar P.L. & Shinde, S.Y.2011. Diversity of fungi from soils of Aurangabad, M.S., India. Annals of Biological Research. 2 (2) : 198-205.

Watanabe, T.,2002.. Pictorial atlas of soil and seed fungi : morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed.CRC Press LLC.USA.506pp.

Woodcock, A.A.; Steele, N.; Moore, C.B.; Howard, S.H.; Custovic, A.& Denning , D.W .2006. Fungal contamination of bedding. Allergy. 61(1):140-2.

Zanzotto, A.; Burruano ,S. &Marciano, P .2006. Digestion of DNA regions to discriminate ochratoxigenic and non-ochratoxigenic strains in the *Aspergillus niger* aggregate. Inter. J. Food Microbiol. 110: 155–159.

Zhao, j.; Kong, F.; Li, R.; Wang, X.; Wan, Z.; & Wang, D. 2001.Identification *Aspergillus fumigatus* and related species by neasted PCR.targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions .J. Clin . Microbiol. 39.2261 -2266

Zielinska, K. & Kaczkowski, J. 1972 .Extracellular acid protease produced by *Aspergillus niger* . Bull . Acad . Pol . Sci . Biol . 20 : 81-86 .

ISSN 2072-3875