جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة مظهرية وجزيئية لبعض الفطريات المرافقة للاسمدة العضوية للمواشي وتقييم كفاءتها في انتاج بعض الانزيمات

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/نبات

كتبت بواسطة:
حسين علي ديلي سويدان المنكوشي
بكالوريوس علوم حياة / جامعة كربلاء
2013

بإشراف

أ.م.د. بانموسى حسن الزبيدي

2024م 1445هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ
وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ
بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

صَدَقَ أللهُ العَلِيُّ العَظِيْمُ

سورة المجادلة أية (11)

﴿إقـــــرار المشرف على الرسالة﴾

أشهد بان إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / النبات/ الفطريات .

التوقيع

الاسم: د. بان حسن موسى

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

التاريخ: / /2024

توصية رئيس قسم علوم الحياة:

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الاستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. نصير مرزة حمزة

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

التاريخ: / /2024

﴿إقـــــــرار المقوم اللغوي﴾

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة **(دراسة مظهرية وجزيئية لبعض الفطريات المرافقة للأسمدة العضوية للمواشي وتقييم كفاءتها في انتاج بعض الانزيمات)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:
الاسم: مسلم مالك الاسدي
المرتبة العلمية: أستاذ دكتور
العنوان: / جامعة كربلاء/ كلية العلوم الاسلامية

إقـــرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد بأننا اطلعنا على هذه الرسالة والمعنونة (دراسة مظهرية وجزيئية لبعض الفطريات المرافقة للأسمدة العضوية للمواشي وتقييم كفاءتها في انتاج بعض الانزيمات)

وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها، وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ ٢/٢/2024 ووجدناها مستوفية بالقبول بدرجة

(أمتياز) لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة /النبات (الفطريات)

التوقيع:

الاسم: د. ياسر ناصر حسين

رئيس اللجنة:

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء /كلية الزراعة

التاريخ: / /2024

التوقيع:

الاسم: د.كوثر محمد علي

عضو اللجنة:

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء /كلية العلوم للبنات

التاريخ: / /2024

التوقيع:

الاسم: د. زينب عليوي محمد

عضو اللجنة:

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء /كلية الزراعة

التاريخ: 10/ 3 /2024

التوقيع:

الاسم: د. بان موسى حسن

عضو اللجنة ومشرف:

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء /كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / /2024

مصادقة عميد كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه.

التوقيع:

الاسم: د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: ٢٣/ 3 / 2024

الاهداء

الى من قاد قلوب البشرية وعقولهم الى مرفأ الأمان، معلم البشرية الأول محمد (صل الله عليه واله وسلم)

الى من شرفني بحمل اسمه، والدي رحمة الله تعالى...

الى من ابصرت بها طريق حياتي و استمديت منها قوتي واعتزازي بذاتي الشامخة التي علمتني معنى الإصرار وان لا شيء مستحيل في الحياة

والدتي الغالية ...امد الله في عمرها.

الى زوجتي ورفيقة دربي. واولادي بذرة الفؤاد وامل الغد.

الى اختي وأخي مصدر فخري واعتزازي.

الى كل من علمني حرفاً وساندني ولو بابتسامة أساتذتي الكرام الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة.

اليكم جميعاً اهدي ثمرة جهدي

الباحث

حسين علي ديلي

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي علم الإنسان ما لم يعلم، وله عظيم كرمه وشكره الذي أعانني على إنجاز هذا البحث. والصلاة والسلام على هادي البشرية نبينا محمد واله. يسرني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لرسالتي ان أتقدم بالشكر والتقدير الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة وبجزيل الشكر لمشرفتي الفاضلة االرقمتاذ المساعد الدكتور بان موسى حسن على إشرافها وتوجيهها العلمي وتشجيعها ودعمها واهتمامها ونصائحها الطيبة، وشكري الى كافة منتسبي قسم علوم الحياة أساتذة وموظفين. وأخص بالذكر منهم الأخ الفاضل االرقمتاذ مياس كمال صالح الذي لم يبخل عليَ بأية مساعدة ولمواقفه النبيلة معي طيلة فترة الدراسة.

. وأخيرًا وليس آخرًا، كل الحب الحقيقي والامتنان لعائلتي على لطفهم ومساعدتهم وتشجيعهم ودعمهم. كما أود أن أشكر كل من ساعدني من زملائي بشكل مباشر أو غير مباشر في إنجاز هذا البحث.

(حسين علي ديلي المنكوشي)

الخلاصة:

هدفت هذه الدراسة إلى التعرف على الفطريات المرافقة للاسمدة العضوية للمواشي في اربعة مناطق ضمن حدود محافظة كربلاء المقدسة متمثلة بحي الحر وحي التحدي وحي النصر ومزارع العتبة الحسينية المقدسة.

أظهرت نتائج العزل وجود 110 عزلة فطرية اختير منها 33 عزلة مختلفة، سجل الفطر *Aspergillus. fumigatus* اعلى نسبة تردد بلغت 13.63 % يليه الفطر *Aspergillus niger* وبنسبة 9.09 % وتلاهما كل من فطر *Penicillium oxalicum* , *Penicillium brefeldianum* *Cephaliophora sp,* وبنسبة تردد بلغت 5.45 % 4.54% ,4.54% على التوالي ، في حين سجل الفطر *A. niger* نسبة ظهور بلغت 31.2% والفطر *A. fumigatus* 46.8 % وأعطى الفطر *P. brefeldianum* نسبة ظهور 15.6% والفطر *P. oxalicum* بنسبة18.7 % والفطر *Cephaliophora* sp بنسبة ظهور 15.6 % في حين سجل الفطر *Geotrichum candidum* ادنى نسبة ظهور بلغت3.1%.

اظهر الفطر *A.niger* كفاءة عالية في انتاج انزيم السليوليز Cellulase حيث بلغ قطر الهالة الشفافة حول مستعمرة الفطر 20.94 ملم تلاه *Aspergillus* sp. بمقدار 16.43ملم ثم *A. fumigatus*4 بقطر هالة شفافة بلغت 14.68ملم في حين سجل كل من الفطرين *Penicillium* sp و *G. candidum* اقل قطر هالة بلغ 9.8ملم و 2.87 ملم على التوالي.

بينت الفطريات *A. niger* ، *A. fumigatus2* ، *A. fumigatus1* قدرة عالية على انتاج انزيم البروتييز Protease وبقطر هالة شفافة أكبر من 15 ملم . بلغت إنتاجية فطر *P. brefeldianum* في انتاج انزيم الامليز Amylase بقطرهالة34.31 ملم يليه النوع *P. oxalicum* بقطر هالة 26.22 ملم وتلاهما الفطر *Cephaliophora* sp. بقطر هالة 24.89 ملم. تفوقت الفطريات متمثلة بـ *A. fumigatus3*, *A. niger* 5 *A. fumigatus*, على باقي الفطريات في انتاج انزيم اللايبييز lippies .

شخصت الفطريات مظهريا باستخدام المفاتيح التصنيفية المعتمدة، شخصت 10 فطريات جزيئيا باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(Polymerase chain reaction, PCR) متمثلة بـ *A. niger*1 ، *p.brefeldianum* ، *A. fumigatus* 1 ، *A. fumigatus*2 ، *A.fumigatus* 3، ، *Cephaliophora* sp. ، *A.fumigatus*4 ، ، *P. Oxalicum* ، *A. niger*2 ، 5 *A. fumigatus* سجلت العينات في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية (National Center for Biotecnology Information, NCBI).

سجل المستخلص الفطري للفطر *A. niger* عند التركيز(100μl) اعلى تثبيط للبكتريا (*E. coli*) بلغ 8ملم في حين اعطى تركيز(75μl) تثبيطاً بلغ 12ملم مقارنة بمعامل السيطرة ،لم يسجل التركيزين (μl

25 و 50 µl)أي تثبيط ، ومن جهة أخرى لم يؤثر المستخلص الفطري للفطر *A. niger* في تثبيط نمو بكتيريا *Staphylococcus aurus* ، بين المستخلص الفطري للفطر*A. fumigatus4* عند التركيز(100µl) اعلى تثبيط للبكتريا (*E. coli*) بلغ 8ملم فيحين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 5ملم مقارنة بمعامل السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين 25 µl و 50 µl أي تثبيط ، لم يسجل المستخلص الفطري لنفس الفطر ضد البكتريا *Staphylococcus aurus* أي نسبة تثبيط ، كانت النتيجة للمستخلص الفطري للفطر*Aspergillus fumigatus5* عند التركيز(100µl) اعلى تثبيط للبكتريا *E. coli* بلغ 9ملم فيحين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 7ملم مقارنة بمعامل السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين 25 µl و 50µlأي تثبيط ، سجل المستخلص الفطري لنفس الفطر ضد البكتريا *Staphylococcus aurus* عند التركيز(100µl) تثبيطا بلغ 8ملم في حين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 6 ملم مقارنة بمعاملة السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين (25 µl و 50 µl)أي تثبيط.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة	أ-ب
	قائمة المحتويات	I
	قائمة الجداول	III
	قائمة الاشكال	IV
	قائمة المختصرات	X
الفصل الأول	المقدمة	
الفصل الثاني	استعراض المراجع	1.2.3
1-2	فطريات التربة Soil fungi	4
2-2	المخلفات العضوية وأثرها في البيئة: Organic waste and its impact on the environment	8
3-2	السماد العضوي organic fertilizers	9
4-2	الاسمدة الحيوانية	11
5 -2	التشخيص الجزيئي	12
6-2	انزيم السليوليز Cellulase enzyme	12
7-2	البروتييز Protease	14
1-7-2	البروتييزات الحامضية Acid protease	16
2-7-2	البروتييزات القاعدية Alkaline Protease	16
3-7-2	البروتييزات المتعادلة Neutral Protease_	16
8-2	الاميليزAmylase	16
1-8-2	أنزيم ألفا اميليز(α-amylases)	17
2-8-2	أنزيم بيتا املیز(β-amylases)	18
3-8-2	انزيم كلايكوأميليز(Glucoamylases)	18
4-6-2	أنزيم isoamylase	19
9-2	الانزيم اللايبيز Lipases	19
الفصل الثالث	مواد وطرائق العمل	
1-1-3	المواد و الاجهزة المستخدمة	22
2-1-3	المواد الكيميائية والاوساط الزرعية المستخدمة	23
2-3	الاوساط الزرعية المستخدمة	25
1-2-3	وسط اكار دكستروز البطاطا (PDA) Potato Dextrose Agar	25
2-2-3	وسط دكستروز البطاطة السائل Dextrose Broth Potato(PDB)	26
3-2-3	وسط أكار- السيليلوز Cellulose Agar	26
4-2-3	وسط إنتاج أنزيم السيليوليزCellulase Product	26
5-2-3	وسط أكار الحليب المقشود Skimmed – milk Agar	27
6-2-3	وسط إنتاج انزيم البروتييز Protease Product	27
7-2-3	وسط -أكار النشأStarch Agar	27
8-2-3	وسط انتاج انزيم الاميليز Amylase prodyct	27
9-2-3	وسط Tween 80 Agar	28
10-2-3	وسط Mueller-Hinton II Agar	28
11-2-3	حفظ العينات الفطرية قصير الأمد	28
12-2-3	حفظ العينات الفطرية طويل الأمد	28
3-3	المحاليل والكواشف المستخدمة	28

1-3-3	المحلول الدارىء سترات الصوديوم	28
2-3-3	محلول ا لفوسفات الدارىء Phosphate buffer بتركيز M 0.2	29
4-3-3	محلول ثلاثي كلورو حامض ا لخليك Trichloro acetic acid(TCA)(5%)	29
5-3-3	محلول اليود Iodine solution	29
6-3-3	محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز (M0.5)	29
7-3-3	محلول يود حامض الهيدروكلوريك HCL .Iodine Solution	29
8-3-3	محلول ا لسيليلوز النقي	29
9-3-3	محلول كاربوكسي ميثيل سيليلوز (CMC)	30
10-3-3	محلول حامض الهيدروكلوريك (HCl) (5) عياري	30
11-3-3	محلول يوديد البوتاسيوم KI	30
12-3-3	محلول ا لكازائين(0.5 %)	30
13-3-3	كاشف ا لنحاس Cupper reagent	30
14-3-3	كاشف نيلسون Nelson’s reagent	31
15-3-3	كاشف النحاس القاعدي	31
16-3-3	كاشف الفينول – سيتاكاليتو Folin reagent	31
17-3-3	Dinitrosalycilic acid (3.5) (كاشفDNSA)	31
18-3-3	محلول ألبومين المصل البقريAlbumin Serum Bov	31
19-3-3	مصل اللبن	32
4-3	طرائق العمل	32
1-4-3	عزل الفطريات من الاسمدة العضوية	32
2-4-3	زراعة وتنقية الفطريات المعزولة	32
3-4-3	تشخيص الفطريات المعزولة بالطريقة التقليدية (مظهريا ومجهريا)	32
4-4-3	النسبة المئوية للتردد والظهور	33
5-3	الفحص الجزيئي لعينات الفطريات المنتخبة	33
1-5-3	طرائق العمل الاستخلاص DNA	33
1-2-5-3	القياس الكمي لل DNA وتحديد الجودة	34
2-2-5-3	مرحلة ال PCR	34
3-2-5-3	تحضير مزيج Green Master Mix	35
4-2-5-3	حالات دورات الحرارة لفحص Conditions PCR Thermal cycler	35
5-2-5-3	تحليل نتائج فحص ال PCR	36
6-3	تسلسل DNA المنتج من ال PCR	36
7-3	الكشف عن الفطريات المحللة	37
1-7-3	السيليلوز	37
2-7-3	البروتين	37
3-7-3	الأميليز	37
4-7-3	اللايبييز	38
8-3	قياس فعالية أنزيم CMC ase	38
9- 3	طريقة Somogyi لتقدير السكريات المختزلة	38
10-3	تركيز مادة شرش اللبن في الوسط الزرعي	41
11-3	قياس فعالية أنزيم البروتييز Protease	41
12-3	تقدير تركيز البروتين	41
13- 3	طريقة Lawry *et al.* لتقدير تركيز البروتين	41
14-3	تقدير كفاءة الأنواع الفطريات قيد الدراسة في انتاج انزيم السيليوليز	42
15-3	تقدير كفاءة الأنواع الفطرية المنتخبة على انتاج انزيم البروتييز	42
16-3	تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على انتاج انزيم الاميليز	42
17-3	تقدير كفاءة الفطريات المنتجة لانزيم اللايبييز	43

18-3	نشاط اللايبيز	44
19-3	قياس الفعالية البايلوجية للفطريات	44
الفصل الرابع	النتائج والمناقشة	
1-4	عزل الفطريات من الاسمدةالعضوية	46
2-4	نسبة التردد والظهور للأنواع الفطرية المعزولة	46
1-2-4	النسبة المئوية للظهور % Occurrence	46
2-2-4	لنسبة المئوية للتردد % Frequency	47
3-4	الصفات المظهرية والمجهرية للفطريات المنتخبة والمنتجة للانزيملت	50
1-3-4	*Aspergillus Niger*	50
2-3-4	*Aspergillus fumigatus*	51
3-3-4	*Penicillium oxalicum*	52
4-3-4	*Cephaliophora sp*	53
5-3-4	*Penicillium brefeldianum*	54
4-4	الكشف عن قدره الفطريات المعزولة على انتاج الانزيمات	55
1-4-4	السيليولوز cellulose	55
2-4-4	البروتييز	56
4 -4-3	الاميليز	59
4-4-4	اللايبييز	61
5-4	التشخيص الجزيئي	61
1-5-4	اختبار الPCR	61
2-5-4	تحليل نواتج ال PCR	62
3-5-4	تحليل Sequence	62
4-5-4	تحليل الحمض النووي وتسلسل قاعدة النيتروجين	64
6-4	تقدير كفاءة الانزيمات المنتجة من الانواع الفطرية المنتخبة قيد الدراسة	75
1-6-4	فعالية انزيم السليولز	75
2-6-4	فعالية انزيم البروتييز	76
3-6-4	فعاليةانزيم الاميليز	77
4-6-4	فعالية انزيم اللايبييز	78
6-4	قياس الفعالية البيولوجية للفطريات المنتخبة	78

قائمة الجداول

الجدول	العنوان	رقم الصفحة
(1-3)	الاجهزة المستخدمة مع الشركة المصنعة للجهاز	22
(2-3)	المواد الكيميائية والغاية من استخدامها والمنشأ- الشركة المصنعة	23
(3-3)	يبين البرايمرات ITS1,ITS4 المستخدمة من شركة (microgen (Korea	34
(4-3)	جدول يبين طريقة تحضير مزيج Green Master Mix	35
(5-3)	جدول يبين عدد الدورات التي تمر بها نواتج ال (PCR) في جهاز	35

	(Thermal cycler)	
(6-3)	لقياس قطر الهالة الشفافة حول المستعمرات الفطرية للأوساط السيليلوز والبروتييز والاملیز للكشف عن فعالية التحلل	37
(1-4)	الانواع الفطرية المعزولة خلال الدراسة من الاسمدة العضوية	47
(2-4)	النسبة المئوية لتردد وظهور الانواع الفطرية المعزولة خلال الدراسة	48
(3-4)	تحلل السيليلوز بواسطة الفطريات على وسط اكار السيليلوز وبدرجة حرارة 25-+2 م° ولمدة تحضين 3 أيام	56
(4-4)	تحلل البروتين بواسطة الفطريات على وسط اكار الحليب المقشود وبدرجة حراره 25-+2 م° ولمدة تحضين 3 أيام	57
(5-4)	تحلل الأملیز بفعل الفطريات على وسط النشأ بدرجة 25+- 2مْ لمدة تحضين 3 أيام	59
(6-4)	تحلل اللايبيز بفعل الفطريات على وسط اللايبيز بدرجة 25-+2 مْ لمدة تحضين 3 أيام	60
(7-4)	جدول يبين أنواع الفطريات التي سجلت ولأرقام البنك الجيني الخاصة بها	62
(8-4)	يبين درجة تحلل السليلوز في المطياف الضوئي	69
(9-4)	يبين درجة تحلل البروتين في جهاز المطياف الضوئي	69
(10-4)	يبين درجة الامتصاصية الاميليز في جهاز المطياف الضوئي	70
(11-4)	يبين فعالية انزيم اللايبيز بطريقه التسحيح	70

قائمة الأشكال

الشكل	العنوان	رقم الصفحة
شكل (1-3)	المنحنى القياسي لتركيز الكلوكوز	40
شكل (2-3)	المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين	41
شكل (3-3)	جهاز المطياف الضوئي(uv vis spectrophotometer)	43
شكل (1-4)	الصفات المظهرية والمجهرية لفطر A. Niger)) والنامي على وسط PDA)) وبعد 7 أيام من الحضن على درجة حرارة 27درجة مئوية(A) السطح العلوي للمستعمرة باللون الاسود الى البني الغامق بحافة خفيفة صفراء أحيانا(B) الجهة الخلفية للطبق عديم اللون الخصائص المجهرية للفطر بينت المستعمرة بعد تصبيغ التراكيب الفطرية بصبغة الاكتوفينول الزرقاء ، C))تبين الكو نيدات التي تظهر على الخيوط	49

	الفطرية بشكل مستدير ومتبادل على الهايفات)التصوير بالمجهر الضوئي على القوةX40	
شكل (4-2)	الخصائص المظهرية والمجهرية للفطرA.fumigatus والنامي على وسط (PDA) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة -- 2+25درجة مئوية(A) السطح العلوي للمستعمرة ذات لون اخضر الى اخضر رصاصي بحافات بيضاء(B) الجهة الخلفية للطبق عديم اللون الخصائص المجهرية للفطر بينت المستعمرة بعد تصبيغ التراكيب الفطرية بصبغة الاكتوفينول الزرقاء (C) غالبا خضراء اللون طولها تقريبا 300 ميكرو ميتر تتوسع تدريجيا الى الأعلى حتى تمر الى الحوصلة على شكل قارورة(التصوير بالمجهر الضوئي على القوةX40)	50
شكل (4-3)	الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر P. oxalicum والنامي على وسط PDA)) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة 25 +-2 درجة مئوية(A) السطح العلوي للمستعمرة كانت مخملية ذات لون رصاصي مخضر وبحافات بيضاء(B) الجهة الخلفية للطبق اعطا صبغة ذات لون برتقالي رمادي اما الخصائص المجهرية للفطر بينت المستعمرة بعد تصبيغ التراكيب الفطرية بصبغة الاكتوفينول الزرقاء C)) لسبورات conidia كانت كثيفة بشكل كتل متراصة عندما بلغت النضج و الحوامل الكونيدية ناعمة متفرعة ذات فرشاة	51
شكل (4-4)	الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر Cephaliophora والنامي على وسط PDA)) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة 25 +- 2 درجة مئوية(A) السطح العلوي للمستعمرة باللون الأصفر مشع بحافات بيضاء ناضجة متعرجة وكانت المستعمرات كثيفة مخملية كرستالية، (B) الجهة الخلفية للطبق اعطا صبغة ذات لون اصفر برتقالي ، اما الخصائص المجهرية للفطر بينت المستعمرة بعد تصبيغ التراكيب الفطرية بصبغة الاكتوفينول الزرقاء C)) الهايفات واضحة بحوامل كونيدية كبيرة كبيرة تحمل في أطرافها المبولة (ampulla) مستقيمة نوعا ما .الكونيدات الصغيرة الحجم	52

شكل (4-5)	الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر P. brefeldianum والنامي على وسط (PDA) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة 25 +- 2درجة مئوية(A) السطح العلوي للمستعمرة مخملية صفراء باهتة وحافاتها بيضاء مجعدة ، (B) الجهة الخلفية للطبق اصفر ناضج بتدرجات برتقالية أحيانا في الحافات، اما الخصائص المجهرية للفطر بينت المستعمرة بعد تصبيغ التراكيب الفطرية بصبغة الاكتوفينول الزرقاء (C) الحوامل الكونيدية طويلة بفرشاة غير متناظرة (Asymmetric penicillin) ثلاثية التفرع واحيانا رباعية مع وجود ميتولات قصيرة (metulae) وفياليدات (phialides) برووس متباعدة تحمل الكونيدات (conidia) كروية او شبة كروية تمتد الكونيدات الى اعلى بشكل سلاسل متباعدة وغير منتظمة	53
شكل(4 -6)	فعالية الفطريات في تحليل السيليلوز على وسط أكار السيليلوز عند درجة حرارة 28 م° بعد ثلاثة ايام من التحضين.	54
شكل(4-7)	تحلل البروتين على وسط اكار الحليب المقشود بفعل الفطريات(*Aspergillus oryzae A. fumigatus A. fumigatus2*)	55
شكل(4-8)	الفطريات الشديدة الفعالية في انتاج انزيم الامليز على وسط اكار النشئ النقي عند درجة حرارة 28 م° وتحضين لمدة 3 أيام	58
شكل(4-9)	فعالية الفطريات في تحليل اللاييبزعلى وسط اللاييبز النقي عند درجة حرارة 28م بعد ثلاثة ايام من التحضين	60
شكل (4-10)	Agarose gel electrophoresis لمنتج PCR في مناطق ITS بواسطة البادئات الزوجية (ITS1-ITS4) من أنواع الفطريات (1.5 غم من هلام Agarose gel 80 فولت و58امبير ولمدة 75دقيقة) DNA ladder,	61
شكل (4-11)	الشجرة الجينية لـ *Aspergillus niger* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطر الذي تم الحصول عليه من مستودع بيانات GenBank	63
شكل (4-12)	الشجرة الوراثية *Penicillium brefeldianum* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank	64
شكل (4-13)	شجرة النشوء والتطور *Aspergillus fumigatus* (المميزة باللون	

	الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بياناتGenBank	64
شكل (4-14)	**شجرة النشوء والتطور *Aspergillus fumigatus 2* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.**	65
شكل (4-15)	**شجرة النشوء والتطور *Aspergillus fumigatus 3* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank**	65
شكل (4-16)	**شجرة والتطور *Cephaliophora Sp* و (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.**	66
شكل (4-17).	**شجرة النشوء والتطور *Aspergillus fumigatus 4* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.**	66
شكل (4-18).	**شجرة النشوء والتطور *Aspergillus fumigatus 5* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.**	67
شكل (4-19)	**شجرة النشوء والتطور *Penicillium Oxalicum* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ردنا بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.**	67
شكل(4-20)	**الشجرة الجينية لـ*Aspergillus niger* 2 (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطر الذي تم الحصول عليه من مستودع بيانات GenBank**	68
شكل(4-21)	فعالية المستخلصات الفطرية الخام للفطريات المنتخبة على تثبيط بكتريا (*Staphylococcus aurus E. coli*)	72

شكل(4-22)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر (*Aspergillus niger*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µl 25و µl 50,µl75,100µl)	72
شكل(4-23)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر (*A.fumigatus4*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µl 25و µl 50 µl, 100µl75)	73
شكل(4-24)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر (*A. fumigatus5*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(25ul50ul75ul100ul)	73
شكل(4-25)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر (*Aspergillus niger*) ضد للبكتريا (*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µl 25و µl 50 µl75,100µl)	74
شكل(4-26)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر(*A.fumigatus4*) ضد للبكتريا (*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µl 25و µl 50 µl75,100µl)	74
شكل(4-27)	يبين من خلالة الراشح الفطري للفطر(*A.fumigatus5*) ضد للبكتريا (*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µl 25و µl 50 µl75,100µl)	75

الملاحق

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
ملحق(1)	تطابق عزلة *A. niger* العزلات العالمية في GenBank .	108
ملحق(2)	تطابق عزلة *P. brefeldianum* مع العزلات العالمية في GenBank	108
ملحق(3)	تطابق عزلة *A. fumigatus1* العزلات العالمية في GenBank.	109
ملحق(4)	تطابق عزلة *A. fumigatus 2* العزلات العالمية في GenBank.	109
ملحق(5)	تطابق عزلة *A. fumigatus* 3 العزلات العالمية في GenBank.	110
ملحق(6)	تطابق عزلة Cephaliophora sp العزلات العالمية فيGenBank .	110
ملحق(7)	تطابق عزلة *fumigatus* 4.*A* العزلات العالمية في GenBank.	111
ملحق(8)	تطابق عزلة *A. fumigatus* 5 العزلات العالمية في GenBank.	111
ملحق(9)	تطابق عزلة *P. oxalicum* العزلات العالمية في GenBank.	112
ملحق(10)	تطابق عزلة *A. niger2* العزلات العالمية في GenBank	112

المختصرات

الكلمة كاملة	المختصر
Potato Dextrose Agar	**PDA**
Potato Dextrose Broth	**PDB**
Polymerase Chain Reaction	**PCR**
Deoxyribo Nucleic Acid	**DNA**
Mueller-Hinton II Adar	**MHA**
Carboxy Methyl Cellulose	**CMC**
Trichloro acetic acid	**TCA**
Dinitrosalycillc acid	**DNSA**
Albumin Serum Bov	**BSA**

المقدمة Introduction

تلعب الفطريات دورًا مهمًا في الطبيعة، إذ تقوم بتكسير الكربوهيدرات المعقدة والبروتينات في الأجسام الميتة لصالح تغذيتها ونموها وتكاثرها،توجد الفطريات في الاسمدة الزراعية والتي تعرف بالمواد الطبيعية أو الاصطناعية التي تمد النبات بالعناصر الغذائية الضرورية لنموه وتطوره وزيادة إنتاجها (Solomon *et al*., 2013).

تصنف الاسمدة حسب مصدرها إلى فئتين رئيسيتين: (الاسمدة العضوية) الطبيعية و (الاسمدةالكيماوية) الصناعية، وتشمل الاسمدة الطبيعية المخلفات الحيوانية والنباتية، بينما يتم تحضير الاسمدة الكيماوية من المواد المعدنية والكيميائية في مصانع متخصصة معدة لهذا الغرض. تصنف الاسمدةالكيماوية بدورها إلى أسمدة بسيطة تحتوي على عنصر واحد فقط مثل النيتروجين، أو أسمدة مركبة تحتوي على أكثر من عنصر مثل النيتروجين والفوسفور (مصطفى.، 2018).

الفطريات هي المجموعة الثانية من الكائنات الحية الدقيقة التي تنتشر في الطعام بعد البكتيريا، حيث اكتشف حتى الآن أكثر من1.5-5 مليون نوع منتشرة في بيئات مختلفة مثل الماء والتربة والهواء وعلى أسطح الأشياء بما في ذلك الإنسان والحيوانات والنباتات (Doyle *et al*., 2020).

تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً كبيراً في تحليل النفايات العضوية، وذلك عن طريق زراعة أنواع معينة من هذه الكائنات (الفطريات الخيطية، البكتيريا، الخمائر) و تحت ظروف معينة يمكن تحويل النفايات إلى مواد بسيطة قابلة للهضم وإنتاج مواد غذائية ذات قيمة عالية مثل البروتينات المستخدمة في غذاء الإنسان والحيوان من خلال التحلل الإنزيمي للمواد المعقدة باستخدام إنزيمات خاصة تفرزها الكائنات المجهرية لغرض استدامة حياتها ونموها(Chang , 1972). ذكر(Legrand *e* t al.,(2010 إنتاج مديـــات واسعـــة من الإنزيمات متمثلة بإنزيــم السيليوليز (Cellulase) والبروتييز (Protease) واللايبيز (Lipase) والبيروكسيديز(Peroxides) والمانييز(Mannase) والارابينيز (Arabinase) وغيرها.

يعد السليلوز أحد البوليمرات الطبيعية الأكثر وفرة في العالم يتم إنتاجه كمخلفات من معظم المحاصيل الزراعية فضلاً عن كونه منتجًا ثانويًا للعديد من الصناعات (Parajó *et al*., 1994 : Srivastava et al., 2021). حلل السيليلوز بالطرق الكيميائية للحصول على الجلوكوز ونمو الخمائر عليه واستخدامه مصدر للبروتين للإنسان ،كما تم تحليله بواسطة إنزيم السيليوليز الذي تفرزه الكائنات المجهرية ويستخدم كوسط في التخمرات الميكروبية المختلفة مثل إنتاج الكحوليات والأحماض والبروتين الميكروبي وتتم عند درجات حرارة عالية مقارنة بالتحلل

الإنزيمي، يسبب التحلل الكيميائي للسلسيلوز مشاكل بيئية غير مرغوب فيها فضلاً عن كونه غير اقتصادي(Xia & Cen, 1999; Haltrich *et al*., 1996:Sohail et al., 2022) .

يتم الحصول على البروتينيز من مصادر متنوعة مثل النباتات والحيوانات، إلا أن الكائنات الحية الدقيقة تعتبر مصدرًا لا مثيل له لإنتاج البروتينيز لأنها تتطلب مساحات محدودة للتكاثر والرعاية، فضلاً عن إمكانية معالجتها وراثيًا (Romaškevič *et al*., 2006:Brahmachari et al., 2016) تستخدم الكائنات الحية الدقيقة في الوسائط قليلة التكلفة لانتاج البروتينيز للاستهلاك البشري والحيواني مثل المخلفات الصناعية، مخلفات الحبوب وأغلفتها، مخلفات المسالخ ، يعد البروتينيز الميكروبي رخيص في السعر وسهل الاستحلاص.(Dunil,1980:Sharma et al., 2022).

استخدم الأميليز الفطري على نطاق واسع في الانتاج الصناعي ، بذلت العديد من المحاولات لتحسين سلالات الفطريات المناسبة لتلبية معايير الإنتاج التجاري من انزيم الاميليز (Abu *et al*., 2005; Reddy *et al*., 2003) .تعتمد عملية تحويل النشأ الى سكريات بسيطة على الاميليز بشكل كامل، يستخدم ألفا أميليز في المجالات الطبية والزراعية وتحضير الأعلاف الحيوانية (Legarreta, 2007) .

ينتشراللايبيزعلى نطاق واسع في الطبيعة فضلاً عن تواجده لدى العديد من الحيوانات والنباتات والبكتيريا والخميرة والفطريات (Saeed *et al*., 2005;Joshi & Kuila, 2018).
يمكن الحصول علية من مصادر مختلفة ذات اختلافات كبيرة في الخصائص الفيزيائية والكيميائية الحيوية مثل خصوصية الموقع والأحماض الدهنية والثبات الحراري ودرجة الحموضة المثلى، فضلا عن استخدامه في معالجة مياه الصرف الصحي (إزالة مصارف الدهون المسدودة) والمستحضرات الصيدلانية ومنتجات الألبان (Kim *et al*., 2005;Polizelli et al., 2013) . 7Frost & Moss, 198.تعد الفطريات من أهم الكائنات الحية الدقيقة المنتجة للأنزيمات لكفاءتها العالية في إنتاج الإنزيم وسهولة فصل الكتلة الحيوية عن راشح الفطري فضلاً عن فائدتها البروتينية الكبيرة(Dalaly ,1983;Dhevagi et al., 2021) .
بالنظر لما تقدم ولعدم وجود دراسة محلية حسب المصادر المتوفرة لدينا هدفت الدراسة إلى استكشاف أنواع الفطريات المحللة والموجودة في الاسمدة العضوية (روث المواشي) والانزيمات التي تنتجها واستخلاص هذه الانزيمات وتقييم كفاءتها، عن طريق التركيب الجيني البايولوجي لها.

شملت محاور الدراسة: -

1. عزل بعض أنواع الفطرية المرافقة الاسمدة العضوية (روث المواشي).

2. اختبار كفاءتها على انتاج بعض الانزيمات (السيليولز، البروتينيز، الاميليز ، اللايبيز) .
3. التشخيص المظهري والمجهري للفطريات المنتجة للأنزيمات .
4. التشخيص الجزيئي بتقنية ال(PCR)للفطريات المنتجة للأنزيمات.
5. اختبار كفاءة الانزيمات المنتجة.
6. اختبار فعالية الانزيمات الفطرية في تثبيط بعض الأنواع البكتيرية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literatures review

1-2 فطريات التربة Soil fungi

التربة عبارة عن وسط معقد يتكون من مخلفات عضوية وغير عضوية ومعادن تعمل كروابط لقنوات والمسام التي تحتوي على الماء و الهواء ،وتتنوع مصادر المادة العضوية مثل جذور النباتات التي تتخلص من أنسجتها الخارجية و تفرز مواد عضوية كالكربوهيدرات، الأحماض الأمينية، الفيتامينات، و الأحماض العضوية و أوراق النباتات و فروعها الميته فوق سطح التربة (Sadhana, 2014).

تنخفض أعداد الفطريات وتنوعها بشكل عام كلما تعمقنا في التربة، وذلك من خلال التغيرات الطبيعية والكيميائية في صفات التربة، ويرتبط انتشار الفطريات في الطبيعة بوجود المادة العضوية، حيث انها تزيد في التنوع والعدد على المخلفات النباتية المتحللة في الطبقة العليا من التربة، بينما تقل في الطبقات السفلى مثل الأنواع التابعة، *Mucor*، *Penecillium*، *Trichoderma*لأجناس *Fusarium*وغيرها(Frąc et al., 2018).

أما في عمق التربة يقل عدد و نوع الفطريات بدرجة كبيرة، وقد تكون ناجمة عن عدم كفاية التهوية حيث تحتاج الفطريات بشكل كبير إلى الرطوبة المرتفعة إذ ان الحد الأدنى الذي يمكن أن تتحملها هو حوالي(20%) ، لذا فهي تنتشر في المناطق الرطبة من التربة وبشكل اساسي في(20) سم العليا من سطح التربة وخصوصا في المناطق الزراعية والغابات إذ تتوزع المواد العضوية وتنمو بكثرة في الظلام او في الضوء الضعيف ،كما انها توجد في المناطق الباردة والحارة ، إذ تنتشر في التربة والهواء والمياه ولأتوجد حواجز جغرافية تقف أمام توزيعها(Alexander, 1978;Janowski & Leski, 2022).

تعد وفرة المادة العضوية في التربة ضرورية لنمو الكائنات غير ذاتية التغذية Heterotrophic، ويعتمد تكوين وحجم المجتمع الفطري في منطقة ما بشكل كبير على تركيز هذه المواد وجودتها. تتأثر الفطريات بشكل مباشر بمحتوى المادة العضوية في التربة، الدور الرئيسي الذي تلعبه الفطريات في التربة هو تحليل المركبات العضوية، كما تلعب النفايات، سواء كانت نباتية أو حيوانية، دورًا في تحويل المواد البروتينية إلى أمونيا ومركبات نيتروجينية بسيطة . (Christensen, 1989;Frąc et al., 2018)

وفي أوقات الجفاف تعمل هذه الفطريات على الحفاظ على النشاط الفسيولوجي في الخلية النباتية مثل البناء الضوئي فضلاً عن دخول بعض الأنواع الفطرية في علاقات تكافلية مع النباتات، تعتبر الفطريات من العناصر المهمة إذ تتواجد بنسبة أكبر مقارنة مع البكتيريا، وتمثل الفطريات المترممة النسبة الأكبر من مجموع فطريات التربة ويزداد نشاط هذه الفطريات كلما ازدادت خصوبة البيئة التي تنمو فيها ، فإنها تعتمد في نموها على مصادر كربونية عضوية لذلك يرتبط نشاطها بتوزيع المادة العضوية على اليابسة تعتبر الفطريات من العوامل المهمة لتحليل المواد العضوية في التربة الجافة ، إذ تملك قدرة عالية جدا على تحليل كميات كبيرة من المادة العضوية التي تحتوي على كمية ضعيفة من النايتروجين وترجع هذه القدرة التحليلية لامتلاكها أنظمة انزيمية خاصة (Deacon, 2005)

يتداخل نشاط الفطريات في التربة مع نشاط غيرها من الأحياء الدقيقة الأخرى كالبكتيريا والطحالب، وأيضا مع جذور النباتات، وعليه يمكن تمييز مجموعتين فطريات التربة وفطريات الجذور (Mycorhizae) حيث تتميز فطريات التربة بقدرتها على النمو اعتماداً على البقايا العضوية دون المرور بمرحلة التعايش أو التطفل، هذه المرحلة تكون ضرورية للفطريات الجذرية ، لقد وجد أن بعض الفطريات غير قادرة على تحليل المركبات المعقدة مثل السيليلوز واللجنين واستعمالها كمصادر كربونية، لذلك فهي تعتمد في نموها على النباتات، هذه الفائدة تعد في نفس الوقت مشكلة بالنسبة للنبات العائل، ولكن ثبت أنه في التربة الفقيرة بالنيتروجين والمعادن، تعمل الفطريات على تزويد النبات بهذه العناصر الاساسية (Smith, 1969;de Sousa, 2023)

تعد الفطريات التي توجد في التربة ممرضة للنبات وهي من أكثر الفطريات خطورةَ وأشدها ضرراً على النبات، كما انها تؤثر على كمية ونوعية المحصول وتؤدي الكثير من هذه الفطريات الى تعفن البذور والجذور وموت البادرات وذبول النباتات مسببة بذلك خسائر اقتصادية كبيرة في النباتات التي تصيبها، وإن الفطريات *Pythium aphanidermtum* و *Fusarium oxysporum* و *Rhizoctonia solani* من أهم وأكثر المسببات المرضية التي تصيب نبات الطماطم حيث تسبب تعفن البذور وموت المبادرات وذبول النبات(Jain et al., 2019).

تعد الفطريات المرضية الموجودة في التربة من الممرضات التي تلحق ضرراً مثل *Rhizoctonia spp.* و *Mucor spp* و *Fusarium spp* من الفطريات الشائعة المتواجد في التربة، وتسبب تعفن بذور وجذور الكثير من النباتات الاقتصادية مثل الطماطم والباذنجان وغيرها، تتواجد هذه الفطريات حول جذور النباتات وبأعداد هائلة، لأن وجود الجذور يُشجع نمو

الجراثيم الفطرية ونمو خيوطها. وتختلف الأجناس الفطرية المتواجدة في التربة حول الجذور عن تلك التي تكون بعيدة عن الجذور (Al-Ezerjawi *et al*., 2013).

ومن خلال بعض الأنواع من التربة الرملية والمزيجية والطينية في محافظة النجف تم عزل وتشخيص 13 نوع تابع للجنس *Fusarium* عشرة منها عزلت لأول مرة في العراق، كما عزل 12نوعاً من فطريات التربة في محافظات وسط وجنوب العراق وهي

Alternaria alternata و *Aspergillus Cladosporium* و *Aspergillus niger* و *flavus* و *Curvularia lunata* و *cladosporioides* و *Fusarium oxysporum* و *Drechslera halodes* و *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium solani* و *Ulocladium* و *Phoma pinodella* و *Pencillium sp. atrum* .(Hussein, 2014).

أن مستعمرات*Aspergillus sp.* تكون بألوان مختلفة تختلف بحسب لون الأبواغ منها: الأبيض والأصفر والبني والرصاصي والأخضر والوردي والأزرق والاخضر والاحمر المائل الى الصفرة أو الاسود، يتميز الغزل الفطري بنموه الكثير، ووفرة تفرعاتها ومقسم من الداخل الى خلايا تحوي كل خلية عدداً من النوى المنتشرة في السيتوبلازم والمحيط بالفجوة العصارية ويوجد الغذاء المخزون داخل الخلية على شكل حبيبات زيتية، ويختلف لون الغزل الفطري باختلاف أنواعه، فمنه الأبيض والأخضر والاسود والأصفر (Zghair, 2019).

ينشأ الحامل البوغي (Conidiophore) عموديا من الخلية القدمية (Foot cell) في الخيط الخضري، والحامل البوغي يكون غير متفرع، وغير مقسم في الغالب، وعديم اللون في جميع أنواع *Aspergillius* الممرضة، وفي بعض الأنواع القليلة ونادرة يحتوي على حاجز واحد أو اثنين، وفي معظم الأنواع يكون عرض الحوامل البوغي أكبر من عرض الخيوط الفطرية، ويكون جدار الحامل البوغي اكثر سمكا من جدار الخيط الفطري، والحوامل الأبواغ تكون ملساء في معظم الأنواع المسببة للمرض و ماعدا *A. flavus. ,A.oryzae.* و*A. avenaceus.*، تنتج حوامل بوغية خشنة، وتتوسع قمة الحامل البوغي ليكون الحوصلة (Vesicle) تكون ذات اشكال أما كروية أو شبه كروية اواهليجية أودورقيه اوصولجانيه وينشأ من سطحها التراكيب القارورية (Phialides) التي تكون أما بصف واحد أو بصفين من الفياليد. وفي الانواع ثنائية الصف (Biseriate) تكون الصفوف الاولية من الخلايا (التراكيب القارورية الاولية) عادة من اثنين الى ثلاثة من التراكيب القارورية الثانوية (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

ويتراوح طول التراكيب القار ورية (Phialides) (بين 20-30) مايكرومتر وسمكها(2-5) مايكرومتر ، وهي احادية أو متعددة النواة ،حيث تنشأ الأبواغ في قمتها بتسلسل قاعدي (Basipetal) أي بشكل سلسلة (Raper & Fennell, 1965;Dou et al., 2007).

وتختلف الأجسام الثمرية في الحجم واللون من نوع إلى آخر، ويتكون الجسم الثمري من طبقة رقيقة من الخلايا التي عادة ما تكون مسطحة، وتسمى هذه الطبقة بجدار الجسم الثمري يضم في داخله العديد من الأكياس البوغية كل منها يحتوي على ثمانية أبواغ كيسيه(Ascospores) . (Al-Shukri, 1991)

حيث وجد في عزلات من *A. niger* و*A. flavus* و *A. oryzae, A. ochraceus* و *A . candidus* قدرة على تكوين تراكيب صلبة كبيرة نسبيًا غامقة اللون، منفصلة ومفردة تدعى الأجسام الحجرية(Sclerotia). وتتغير الأجسام الحجرية في الشكل والحجم واللون ، لكنها تتكون جميعًا من خلايا شبه برنكيمية سميكة الجدران وتحتوي الخيوط الفطرية على خلايا هول Hülle cells اوهي تراكيب متخصصة ذات وظيفة غير معروفة تحتل موقعاً طرفياً أو بينيًا ، ولها شكل كروي أشبه كروي إلى كمثري و متطاولة أو لولبية الشكل (Kwon-Chung & Bennett, 1992;Frisvad et al., 2018).

يعتبر*A. fumigatus* قسم Fumigati ذو أهمية خاصة في مجال الأمراض المعدية لأن هذا القسم لا يشمل فقط *A. fumigatus* ولكن أيضًا 11 نوعًا آخر كعوامل مسببة لـ IA. يتميز قسم فوميجاتي بتكوين حامل كونيديوفوري برؤوس مخروطية عمودية تتكون من حويصلات على شكل قارورة، وفاياليدات غير متسلسلة، وسلاسل طويلة من الكونيديا. الكونيديا لها لون أخضر مزرق إلى أخضر شاحب، وعادة ما تكون كارهة للماء، ويبلغ حجمها 2.5-3.5 ميكرومتر. تشير التقديرات إلى أن *A. fumigatus* هو العامل المسبب لأشكال مختلفة من داء الرشاشيات في أكثر من 200000 مريض سنويًا(Brown et al., 2012).

ويكون فطر*Cephaliophora sp* من مستعمرات باللون الوردي الفاتح إلى البني المحمر وهي عبارة عن كتلة مخروطية الشكل منتفخة و الخيوط سطحية عديمة اللون رقيقة الجدران بقطر 5.0-7.5 ميكرومتروالحوامل كونيدية كبيرة الحجم مع وجود أمبولة طرفية و في حالات نادرة، الفاليدات مستقيمة أو متعرجة قليلاً عديمة اللون و ناعمة تكون الخلية القاعدية شبه منحرفة وتظهر الكونيديا على شكل نتوءات تشبه البالون على سطح خلية الكونيديا. تتشكل الكونيديا بشكل منفردة، غالبًا وتحتوي على 2-3 حواجزالخلية القاعدية أسطوانية أو متفرعة قليلاً، مدببة وفي بعض الجراثيم الناضجة تكون عديمة اللون تقريبًا. الحاجز ذو لون بني داكن.(Ruszkiewicz-Michalska et al., 2017)

اذ تنمو أنواع البنسليوم بشكل أفضل عند درجات حرارة تتراوح بين 5 درجات مئوية و37 درجة مئوية، والنشاط المائي من 0.78 إلى 0.88 ومستوى الرقم الهيدروجيني من 3 إلى 4.5، توجد في التربة وعلى النباتات المتحللة والسماد وعلى الأطعمة المجففة والتوابل والحبوب وفي

الفواكه والخضروات الطازجة وكذلك في الهواء والغبار كما يمكن أن تنمو على جدران البناء خاصة عندما تكون رطوبة مواد البناء عالية ،لدى العديد من أنواع البنسليوم القدرة على إنتاج مجموعة واسعة من المستقلبات بما في ذلك المضادات الحيوية، والعوامل المضادة للفيروسات، والسموم الفطرية (Rundberget et al., 2004;Storey et al., 2004).

2-2 المخلفات العضوية وأثرها في البيئة: Organic waste and its impact on the environment

نظراً لتطور الصناعة والتكنولوجيا والتأثير السلبي لما يسببه من طرح مخلفات مؤثرة في بيئة الإنسان والحيوان والنبات فضلاً عن إلحاق الضرر بالماء والهواء والتربة، هذه المشكلة الخطرة تسترعي انتباه البشر إذ تبحث عن حلول للتقليل من أضرار المخلفات أو الاستفادة منها في مجالات ضمان القضاء على التلوث بوسائل بسيطة (Southgate, 1976).

تعد المخلفات النباتية من بين أكثر المواد العضوية الموجودة بصورة دائمة في الطبيعية ومتجددة فقش الأرز مادة عضوية متوفرة بكثرة في معظم حقول الأرز لأن جزء منها يحرق والجزء الأخر يزال من الحقول ومنها يترك في الحقل ،ويتم انتاج سنوياً في ماليزيا نحو 1.2 طن من قش الأرز،ويمكن تحويل قش الأرز الى سكريات خلال عملية التحلل المائي الإنزيمي ثم تخميرها بعد ذلك الى الايثانول ،وكذلك تعد مادة الخشب هي مادة عضوية أيضاً قابلة للتجديد وهي التركيب الرئيسي لجميع النباتات، ويتم انتاج المخلفات بكميات كبيرة من مصادر مختلفة منها الغابات والمخلفات الزراعية ومخلفات المواد الغذائية والنفايات الصلبة ونفايات الحيوانات (Kim & Dale, 2004 Wen *et al*., 2004);.يمكن معالجة المخلفات واعدادها للاستخدام في مجالات أخرى، إذ أنها لاتزال متواجدة في بعض البلدان النامية بكميات كبيرة مما تسبب في العديد من المشاكل البيئةPalacios-Orueta *et al*., 2005(; Levine, 1996).

تستخدم المخلفات الزراعية في عمليات التخمير السائلة و الصلبة على حد سواء لتقليل تكلفة أوساط التخمر والتي تتكون من الكربون والنيتروجين إذ يعتبران من المصادر الضرورية للنمو والتمثيل الغذائي للكائنات الحية، وتشمل مصادر هذه المغذيات نفايات البرتقال والدخن والنشا والبطاطا والذرة والقمح والأرز والدقيق (Ikram-Ul-haq & Umber, 2006) .

تعد الفطريات من اكثر الكائنات الحية الدقيقة ذات كفاءة في الإنتاج الإنزيمي وإنتاج الكتلة الحيوية وذلك لقدرتها على النمو على مصادر رخيصة (المخلفات الصناعية والزراعية) ،بالإضافة الى قدرتها على النمو بدرجات حرارة تزيد على 35°م وفي مدى واسع من الرقم الهيدروجيني وسهولة فصل كتلتها الحيوية عن الراشح الانزيمي (Soni *et al*., 2008).

3-2- السماد العضوي Organic fertilizers

هي الاسمدة المشتقة من مادة حيوانية (الروث) أو نفايات بشرية أو مواد نباتية (مثل السماد العضوي والسماد الطبيعي) مصنوعة من مواد خام طبيعية ذات قيمة تحليلية عالية عادة ما يتم تصنيع السماد عن طريق تحلل النفايات القابلة للتحلل وتشمل هذه النفايات الأوراق وقشور الفاكهة المتروكة على الأطعمة وحتى عصائر الفاكهة وان الاسمدة العضوية إضافة جيدة للتربة تجعلها صالحة ومثالية للزراعة يتم الحصول على الاسمدة العضوية الرئيسية من الحيوانات الميتة ومخلفات النباتات من الزراعة (P. K. Gupta, 2003).

الاسمدة العضوية هي مركبات كربونية تزيد من جودة وإنتاجية ونمو النباتات، الاسمدة العضوية بعيدًا عن كونها مواد كيميائية منقاه ومبسطة تعد مركبات معقدة تضيف العديد من العناصر الغذائية، المواد العضوية مثل السماد الطبيعي ومسحوق الصخور (مثل الجير والصخور والفوسفات والخضر) ،يحتوي السماد العضوي على مغذيات دقيقة مهمة من شأنه تحسين جودة التربة بدلاً من تدهورها ويعد استنفاد مغذيات التربة واحتمال تدهورها تهديدات خطيرة للإنتاجية الزراعية والتي حددت كأسباب رئيسية لانخفاض غلة المحاصيل وإنتاج الغذاء للفرد (Henao & Baanante, 2006).

للزراعة العضوية أثار ايجابية على البيئة وجودة الغذاء، إذ أنها تساعد المزارع بشكل كبير على تحقيق الاكتفاء الذاتي في متطلباته من المدخلات الزراعية وخفض التكاليف، تسعى الزراعة العضوية إلى الجمع بين عدد من الأهداف العضوية والبيئية والاجتماعية ويتم انتاج السماد الزراعي في صورة سائل يعرف باسم الملاط بواسطة أنظمة تربية المواشي الأكثر كثافة حيث يتم استخدام الخرسانة أو الملح السماد الأخضر هو الوجبات التكميلية الرئيسية التي تضيف مادة العضوية إلى التربة و هي تنطوي على زراعة المحاصيل سريع النمو والحرث لدمجها في التربة(P. K. Gupta, 2003).

يعد النيتروجين ضروري لنمو الأجزاء الخضرية مثل الساق والأوراق وإذا تلقت النباتات ما يكفي من الفسفور سيكون لها جذور صحية، الفوسفور ضروري أيضًا للزهور والفواكه الجيدة، ويحافظ البوتاسيوم على صحة النباتات من خلال تسهيل دوران العناصر الغذائية داخلها، فضلاً عن ذلك تحتاج النباتات إلى مغذيات أخرى مثل الكالسيوم والمغنيسيوم يتم اضافتها للتربة في حالة خلوها تمامًا من هذه المعادن أو المحصول الذي يتم زراعته وقد يتحول إلى مادة عضوية تشبه الدبال(FUNDAMENTALS, 2007).

فضلاً عن فوائد تخزين الكربون الناتج من إضافة السماد إلى التربة الزراعية، يمكن أن يؤدي التسميد إلى تحسين جودة التربة وزيادة الإنتاجية وتوفير التكاليف و على سبيل المثال

السماد العضوي لديه القدرة على توفير الطاقة للنباتات وتحسين خصائص التربة الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية، وامدادات المغذيات ولوحظ ان إضافة السماد إلى التربة له تأثير إيجابي تساعد على نمو المحاصيل وبالتالي زيادة المحصول (Ho *et al*., 2022).

2-4 الاسمدة الحيوانية

تعد الاسمدة الحيوانية مصدر جيد للكثير من العناصر الضرورية للمحاصيل فهى تشمل الاسمدة الناتجة من تخمر المخلفات الحيوانية وإضافتها إلى التربة بعد فترة تخمر مناسبة حتى تصل إلى درجة من النضج كافية لتحسين خواص التربة المختلفة في الغالب تضاف الاسمدة العضوية الحيوانية الناتجة إلى التربة بنثرها على سطح التربة تم تقلب فى هذه التربة يجب خلطها (الشحات ورمضان،2008).

وتستخدم على نطاق واسع وتنتج بكميات كبيرة وتحتوي على نسبة عالية من المادة العضوية (20-50%) وكمصدر للدبال ومصدر لكل من العناصر الغذائية الكبرى الصغرى وكعامل مشجع للكائنات الدقيقة المفيدة ومحتمل أن تكون مصدر للمواد المشجعة لنمو النبات (عزمي، 2010).

تتكون الاسمدة الحيوانية من الروث وهو عبارة عن اجزاء غير مهضومة من غذاء الحيوان وحسب عمره وكذلك نوع العلف الذي يتناوله والبول هوعبارة عن المخلفات الحيوانية السائلة والعناصر الموجودة في البول هي الازوت والبوتاسيوم وكلاهما في صورة ميسورة لتغذية النبات المباشرة تعد الاسمدة الحيوانية من المصادر المهمة لغذاء الكائنات الحية الدقيقة في الأرض وتعطي بما تحتوي من السيليلوز والنشاء والسكريات والدهون والبروتينات لوجود اعداد هائلة من الكائنات المتطفلة عليها البكتريا التكافلية فضلاً عن أنواع الفطريات المرافقة لها (نور الدين ،2008).

2-5التشخيص الجزيئي

تعد القدرة على التعرف بدقة على الكائن الحي أمرًا أساسيًا لجميع جوانب التشخيص تعتمد الطرق التقليدية في كثير من الأحيان على تحديد أعراض المرض، وعزل وزراعة الكائنات البيئية والتعرف المختبري عن طريق الاختبارات المورفولوجية والكيميائية الحيويةعلى الرغم من كونها حجر الزاوية في تشخيص الفطريات، إلا أنها يمكن أن تؤدي إلى مشاكل في تحديد الهوية، مما يؤدي إلى تفسير وتشخيص غير صحيح وعلاج في نهاية المطاف وتعتمد الاساليب على موظفي المختبرات ذوي الخبرة والمهارة وقدرة الكائن الحي على الاستزراع وتستغرق وقتا طويلا وغير كمية وعرضة للتلوث والخطأ وفي حالة الأمراض النباتية والطبية غالبا ما

تؤخر العلاج، يجري تطوير طرق فحص جديدة وسريعة وتستخدم بشكل متزايد في جميع جوانب التشخيص الفطري وتشمل هذه الطرق الطرق المناعية وتكنولوجيا فحص الحمض النووي الريبي النووي (DNA/RNA)، وتكنولوجيا تفاعلات البوليميراز المتسلسلة (PCR) تمت مراجعة كيفية تطبيق هذه الاساليب في أمراض النبات بشكل مكثف (McCartney *et al.*, 2003).

ان أختيار الحمض النووي المستهدف باستخدام معلومات تسلسل محددة من قواعد البيانات مما يسمح بتصميم البادئات عبر المناطق المحفوظة والمتغيرة أو استنساخ وتسلسل أجزاء عشوائية من الجينوم الفطري (Marchesi, 2001).

المجال لرئيسي لتطوير التشخيص الفطري هوجينات ri bosomal موجودة في جميع الكائنات الحية وبأعداد نسخ عالية تساعد في الكشف وحساسية تفاعل PCR يتكون الحمض النووي الريباسي النووي الفطري (rDNA) من ثلاث جينات، جين الوحدة الفرعية الكبيرة (S25)، وجين الوحدة الفرعية الصغيرة (S18)، وجين S5.8، مفصولة بمناطق فاصل منتسوخة داخلية (ITS)، في وحدة تتكرر عدة مرات و تعد منطقة ITS منطقة ذات أهمية خاصة لتشخيص الفطريات، إنه يحتوي على مناطق محمية بدرجة عالية ومناطق شديدة التباين ويعتبر بداية مثالية لتطوير بادئات PCR محددة لتحديد الأنواع الفطرية. تتوفر البادئات العالمية (White, 1990). للفطريات التي تعزل مناطق ITS بمجرد استنساخ هذه التسلسلات يمكن مقارنتها بثروة التسلسلات الأخرى في قاعدة بيانات التسلسل والبادئات التشخيصية التي تم تطويرها لفطر معين ومع ذلك قد لا تكون درجة التباين داخل منطقة أنظمة النقل الذكية كافية للتمييز بشكل كافٍ بين الأنواع الفطرية والأنواع الحيوية في بعض الحالات على الرغم من أن Atkins *et al.*, (2003) ميز بين نوعين من نفس الفطريات الخيطية Pochonia chlamydosporia باستخدام البادئات المعتمدة على منطقة ITS تعد منطقة ITS هي الهدف الرئيسي فقد أصبحت الجينات الأخرى تتم دراستها على نطاق أوسع، ولا سيما جين tubulin وجينات نوع التزاوج (Hirsch *et al.*, 2000)

يعد تطوير البادئات الخاصة بالتصنيفات بناءً على هذه الجينات أمرًا روتينيًا ، هناك العديد من الأمثلة في الأبحاث المختلفة والتي قدمت تحقيقات وبادئات تمييزية (Foster *et al.*, 2002).

6-2 انزيم السليوليز Cellulase enzyme

مجموعة من الأنزيمات تسمى أحيانا Cellulases وهي عبارة عن ثالثة انزيمات تساهم مجتمعة في تكسير الاصرة الكلايكوسيدية بيتا 4-1والأنزيمات الثالثة هي – Endo . glucanase , 1,4 – B – D– glucan glucanohydrolase,CMCase,Cx

B-Exo–glucanase,1-4–B–D–glucan Cellobiohydrolase ,Avicelase , C1 - B - glucosidase, Cellobiase .(Ali *et al*., 2011;A. Singh *et al*., 2009;Reese *et al*., 1950)

تتم عملية التحلل البايولوجي للسيليولوز في خطوتين على الأقل وتنتهي بتحويله الى سكريات بسيطة، تطلق العديد من الكائنات الحية الدقيقة انزيمات معقدة حيث تشترك الأنزيمات الثلاثة في تحليل السيليلوز البلوري على النحو الآتي: -

Crystalline cellulose -↓-Reactive cellulose -↓- cellobiose -↓- glucose

C1 Cx B-glucosidase

إن انزيمات Cx (Endo – glucanase) واسعة الانتشار في الأحياء المجهرية بضمنها الأحياء غير المحللة للسيليلوز على العكس من انزيمات C1 Cellobiohydrolase الأقل شيوعا والتي يقتصر وجودها في الكائنات المحللة للسيليلوز فقط لذا فأن هذة الأنزيمات حسب المخطط الآتي : -

سليلوزتام —C1← سلاسل كلوكوزية متعددة —Cx← جزيئات صغيرة — B - glucosidase ← كلوكوز.

المجاميع الذائبة غير المتفرعة ذائبة مثل السلوبايوز

إذ يحول انزيم C1 التركيب البلوري للسيليلوز الى تركيب عشوائي مائي جاهز لعمل انزيم Cx حيث يعمل هذا الإنزيم على تكسير سلاسل السيليلوز وإنتاج السيليبايوز والذي يتم تحللة بعد ذلك إلى كلوكوز بفعل أنزيم B- Glucosidase (R. Singh *et al*., 2017) .

يمكن أنتاج انزيمات المعقد السيليولوز بطرق مختلفة عن طريق تحليلها للمخلفات السيليولوزية ، أشباه السيليولوزية ، اللكنوسيليلوزية فضلاً عن العديد من المخلفات الصناعية (Han *et al*., 1995) .

يستخدم السيليلوز بعدة طرق، منها إضافته الى غذاء الماشية كمادة مساعدة على الهضم ، يستخدم في عملية استخلاص القهوة والشاي ، استخلاص فول الصويا. والاستخدام الحديث هو تحليل المخلفات السيليلوزية لإنتاج الكلوكوز والذي يمكن استخدامه في تنمية العديد من الأحياء المجهرية لإنتاج منتجات مفيدة مثل الكحول والبروتينات احادي الخلية وغيرها من منتجات التخمر. كما ان لانزيم السليولوز العديد من التطبيقات في الصناعات الكيمياوية والغذائية والطبية والصناعات النسجية(Hadi *et al*., 2012 ;Voragen *et al*., 1980) .

تنتج أنواع عديدة من الاحياء المجهرية انزيم السليلوز مثل بعض الفطريات التابعة لألجناس *Cladosporium , Aspergillus Mucor,Trichoderma*(Shin *et al*., 2000;Liu &

(Chen *et al*., Bacillus بالإضافة إلى بعض أنواع البكتريا مثل Yang, 2007). 2004 Streptomyces(Bijende *et al*., 2009 ;. يتم انتاج الانزيم تجاريًا من الفطر *Trichoderma reesei* وبعض سلالاته المطفرة باستخدام تخمرات الحالة الصلبة (Weber & Agblevor, 2005 ;Wen *et al*., 2005).

السليلوز هو البوليمر الحيوي الأكثر وفرة على وجه الأرض، ويوجد في الأشجار، والنفايات من المحاصيل الزراعية و يمكن تقسيم الألياف التي يتكون منها السيليولوز إلى لبنات بناء، تعرف باسم السليلوز الليفي.(Li *et al*., 2021).

ان وجود المادة السيليلوزية في وسط التنمية أو وسط الإنتاج يحفز الأحياء المجهرية على انتاج انزيم السليلوز ، كما ان نواتج التحلل تستغل بسرعة من قبل تلك الأحياء (Singh *et al*., 2017).

تمكن العلماء باستخدام مصادر كربونية صناعية كألياف القطن أو مسحوق السيليلوز لمدة حضانة تصل إلى ثلاثة أسابيع في حاضنة هزازة للفطر Myrothecium *verrucaria* من انتاج انزيم السيليولوز Endoglucanase (Halliwell, 1961) .

أما الدراسة التي أجريت على انزيم السيليلوز المنتج من *Streptomyces sp. AT7* وفي (5 درجات مئوية) مختلفة فقد أشارت إلى ارتفاع أنتاج للأنزيم خلال 18 يوماً من مدة التحضين كان في اليومين الثامن والتاسع حيث بلغ النشاط الإنزيمي (11.4 ملغرام / مل) وكانت درجة الحرارة المثلى 42 درجة مئوية (Al-Tai *et al*., 1989) .

وفي دراسة أخرى عن كفاءة الفطر (*Trichoderma Ressei LW1*) النامي على تبن الذرة corn straw في أنتاج أنزيم السيليوليز بين أن أعلى فعالية للأنزيم كانت بعد 72 ساعة وبدرجة حرارة 28 °م و pH = 5.5 . (Wang *et al*., 2005) .

مما سبق نلاحظ أن هناك العديد من العوامل التي تؤثر على تحليل المواد السيليلوزية وإنتاج أنزيمات السيلوليز المعقد ومن أهم العوامل هو نوع المادة المكونة للوسط وتركيزها في وسط الإنتاج والخواص الفيزيائية والكيميائية للمادة المتحللة وحجم اللقاح للفطر المستخدم وظروف الاختبار من (مدة التحضين، درجة الحرارة ، الرقم الهيدروجيني) (Kumar *et al*., 2009) .

تعد الفطريات من الأحياء المجهرية التي لها قدرة قوية على النمو والاستفادة من المخلفات السيليلوزية لديها القدرة القوية على النمو بظروف مثل ندرة الماء أو انخفاض مستويات المياه ، تنمو بشكل طبيعي على الحبوب والفواكه وجزيئات التربة التي تحتوي على المواد العضوية وتعد الفطريات الكيسية مثل *Aspergillus* , *Penicillium* هي من الفطريات المناسبة على

النمو بمثل تلك المخلفات ، وذلك لأن خيوطها الفطرية قادرة على اختراق الوسط الصلب واستخدام مكوناتها لإنتاج المركبات الأيضية اثناء عملية التغذي (Manpreet *et al*., 2005).

2-7- البروتييز Protease

البروتييز وهومن الأنزيمات المهمة جداً ويحتل موقعا فيسيولوجية ًغاية في الأهمية اذ يلعب دواراً في نمو وتكاثر الأحياء المجهرية، وهو يؤدي وظيفتي التحلل والبناء (Rao *et al*., 1998).

لانزيم البروتييز دور مهم في التركيبات الصناعية كالصناعات الغذائية والمجالات الطبية وينتمي إنزيم البروتييز إلى إنزيمات التحلل المائي EC 4.3 .23 والذي يحلل الآصرة الببتيدية 1، 2، وتكون أما داخلية (Endo cellular) (التي تكون داخل الخلايا ولا تفرز إلى الوسط الا بعد تحلل الخلية) او تكون (Extracellular) (تفرز إلى الوسط طبيعيا دون تحلل الخلية) هي من أهم المجموعات الإنزيمات التي تشكل الثانية من ثلث إجمالي الإنزيمات الصناعية المتاحة تجارياً(Ozturkoglu-Budak *et al*., 2016; ;Suganthi *et al*., 2013)Humaid *et al*., 2020

إذ يلعب انزيم البروتييز دورا مهما في إنتاج الأطعمة المخمرة وفي صناعة الألبان ولتخثر الحليب (Císarová *et al*., 2021;A. Singh *et al*., 1994).

كما أن نكهة منتج الحليب النهائي ترجع أساسا إلى نشاط تحلل للبروتين (Lopez- Diaz *et al*., 1996;Chou *et al*., 2002 Morrissey *et al*., 2015; Zheng *et al*., 2018 ; Humaid *et al*., 2020;).

تم تصنيف أنزيمات البروتييز ضمن مجموعة أنزيمات التحلل المائي Hydrolases لأنه يحفز على تكسير الآصرة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروف مختلفة وقد حاز أنزيم البروتييز التسمية النظامية (EC.3.4) طبقا للجنة الأنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيمياء الحياتي (Barrett, 1994) .

هنالك العديد من الأحياء المجهرية التي لها القدرة على انتاج الأنزيمات المحللة للبروتين مثل البكتريا و الأعفان والخمائر وتختلف هذه الأنزيمات في تركيب والخصائص إذ تعتمد على الكائن المنتج وظروف نموه إذ يفضل انزيمات البروتييز الميكروبية على النباتية والحيوانية ولاسباب عدة : منها سهولة عملية الاستخلاص وإنتاج أنواع مختلفة و كثيرة من الأنزيمات من قبل الأحياء المجهرية ، فضلاً عن رخص تكلفته الانتاجية والكفاءة العالية لبعض السلالات في أنتاج الأنزيم (Tsuru & Yoshimoto, 1987).

وقد تم إنتاج هذه الأنزيمات بنطاق واسع من قبل بعض الفطريات التابعة للجنس *Aspergillus* ومن البكتريا باستخدام بعض أنواع الجنس *Bacillus* وحاليا يتم انتاج حوالي(10)أطنان من بروتييز الفطريات وما يقارب خمسة اطنان من بروتييز البكتريا(Rodarte *et al.*, 2011) .

وقد شمل تحول البروتين الخلوي (protein cellular of Turnover) لتجهيز الأحماض الامينية والببتيدات الصغيرة اللازمة لبناء البروتينات وتسهم في تكسير البروتينات الموجودة في الوسط الزرعي ثم تستخدمها كمصدر للغذاء(Puthia *et al.*, 2005).

يتأثر انتاج انزيم البروتييز الخارجي بعدة عوامل أهمها : فترة الحضن ودرجة الحرارة فضلاًعن pH الوسط ووسط الإنتاج (Wang *et al.*, 2022).

لوحظ أن الفطر *Microsporum canis* ينتج أنزيم البروتييز خلال فترة حضانة لا تقل عن 10 أيام حيث يعطي الفطر أعلى فعالية للأنزيم في اليوم العاشر (Lee *et al.*, 1987).

وفي دراسة أخرى لنفس الفطر *Microsporum canis* وجد أن أعلى نشاط للأنزيم كانت في اليوم الثامن عشر من مدة الحضانة(Monod *et al.*, 2002) .

بينما ينتج الفطر *Trichoderma harzianum* الأنزيم خلال مدة لا تزيد عن 72 ساعة (De Marco & Felix, 2002) .حيث أنتج أنزيم البروتييز من الفطر *A. fumigatus* *باستخدام* بروتين الكولاجين كمصدر رئيسي للكربون والنيتروجين (Monod *et al.* 2002).

فقد ذكرا(Okafor & Ada,(2000 أن الفطر *M. gypseum* ذو كفاءة عالية في انتاج أنزيم البروتييز (الكايتينيز) الذي يمكنه من تكسير الشعر الذي ينمو عليه .

إذ أن تغير درجة الحرارة المثلى من فطر إلى آخر تكون بالاعتماد على درجة النمو القصوى وهي غالبا ما تكون قريبة على درجة حرارة النمو إذ تؤثر درجة الحرارة على تكوين المنتجات الأيضية وبما في ذلك انزيم البروتييز وليس من الضروري أن تكون درجة حرارة النمو المثلى هي نفس درجة الحرارة الملائمة لإنتاج الأنزيم وبالنسبة للعديد من الأحياء المجهرية الصناعية تكون درجة الحرارة المثلى قريبة من 30°م اذ ينتج انزيمات البروتييز من الفطر *Penicillium janthineilum* عند درجة حرارة 40°م (Jay *et al.*, 2008) .

تقسم انزيمات البروتييز اعتمادا على الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية إلى ثلاث مجموعات: -

2-7-1البروتييزات الحامضية Acid protease

وهي التي تعمل برقم هيدروجيني يتراوح بين (2-5) مثل الببسين والرنين الحيوانية وقد استخدمت تجاريا في صناعة الاجبان، اذ تنتج بصورة رئيسة من الفطريات *Aspergillus*

Rizopus chinensis , *niger* فضلا عن العديد من الصناعات الغذائية الأخرى (Aunstrap ,1968).

وايضاً في عمليات تطرية اللحوم وتحصيل البروتينات من الخضروات وفي عمليات دباغة وصناعة المنظفات كما استخدمت في معالجة الجروح وإزالة الخثرة الدموية (Toranzo *et al*., 2005).

2-7-2- البروتييزات القاعدية Alkaline Protease

عبارة عن بروتييز يعمل برقم هيدروجيني ما بين (8-12) اذ ينتج هذا الإنزيم من قبل العديد من الفطريات مثل، *A.sojae* ، *A. Aspergillus flavus . A. Niger. A. oryzae* ولكن يتم الحصول على معظم الإنتاج التجاري لهذا الإنزيم من بعض أنواع بكتريا *Bacillus* إذ يتميز الإنزيم البكتيري بثبات في ظل ظروف درجة حرارة العالية ومدى واسع من pH يتراوح بين

(6-11) (Aunstrap , 1980).

2-7-3- البروتييزات المتعادلة Neutral Protease_

تعرف على أنها تعمل برقم هيدروجيني (7-8) لذا يتم انتاج هذا الإنزيم بوجود أيونات الكالسيوم والصوديوم والكلور للحفاظ على ثبات الخصائص الفيزيائية والكيميائية، ينتج الأنزيم من قبل العديد من الفطريات *A . sojae* , *A . oryzae* يكون الأنزيم في حالة استقرار عند درجة حرارة (35-45) درجة مئوية (Arya et al., 2021) .

2-8- الاميليز Amylases

عبارة عن انزيم ينتج من المصادر الفطرية والبكتيرية وتستخدم للإنتاج الصناعي بسبب عدة مزايا مثل قلة التكاليف و الوقت والمساحة المطلوبة لإنتاجها وسهولة التعديل ويلعب الاميليز دورا رئيسياً في التمثيل الغذائي للكربوهيدرات ، توجد انزيمات الاميليز في كل من النباتات والحيوانات والميكروبات(Sivaramakrishnan *et al*., 2006)(Burhan *et al*., 2003;.

ويعمل الاميليز على تحلل جزئيات النشا لأعطاء أنتاج متنوع من الدكسترين وبوليمرات اصغرتتكون من وحدات الكلوكوز و المالتوز لذلك تسمى إنزيمات الأميليز بأنزيمات تحلل النشا مائياً.(Friedberg & Rhodes, 1986)

ينتج الاميليز من معظم العزلات الفطرية لنوع الفطر *Aspergillus* لأهميتها التكنولوجية و الطبيعة المنتشرة وغير الحساسة وله منافع اقتصادية (Abe *et al*., 1988).

يُعَد جنس *Aspergillus.ssp*. الأكثر انتشاراً في انتاجية الأميليز عن طريق تخمير الحالة الصلبة (Solid-state fermentation) يعد هذه النوع من المصادر الميكروبية ذات التقنية

قليل التكلفة اذ تكون مجموعة ألفا أميليز من الانزيمات التي تعمل على نوع واحد من بقايا الكلوكوز وتتصل من خلال أواصر كلايكوسايد,16-α،1,4-α-1,1, α (Van Der Maarel *et al.*, 2002). حيث يمكن ان تقسم إلى قسمين ، endoamylases و.exoamylases تمثل مجموعة (Endoamylases) تكسر الأواصر داخل تركيب الفا اميليوز والاميلوبكتين وتمثل مجموعة (Exoamylases) الجلوكوز الخارجي الاتصال للا اميلوزو الاميلوبكتين (Itkor *et al.*, 1989;Gupta *et al.*, 2003)..

هنالك عدة عوامل تتأثر في فعالية انزيم الأميليز منها العناصر المعدنية ومصدر الكاربون وتراكيزهما ومصدر النيتروجين وتركيزه في وسط الإنتاج يعد الوسط الزرعي المستخدم للنمو ذو تأثير هام في فعالية الأميليز، استخدمت الكثير من هذه الأوساط منها ما هو صناعي أو طبيعي مثل نخالة الرز ونخالة الحنطة ووسط جوز الهند ووسط زيت الفول السوداني وغيرها (Suganthi *et al.*, 2013).

ومن المعروف أن انزيم الأميليز يعتمد على ايونات المعادن، وهي أيونات ثنائية التكافؤ مثل Ba^{2+} وMn^{2+} وMg^{2+} وCu^{2+} وCo^{2+} وFe^{2+} وCa^{2+}. (Pandey *et al.*, 2000).

ويمكن تقسيم أنزيم الأميليز إلى المجموعات الرئيسية الآتيه:

2-8-1-أنزيم ألفا اميليز(α-amylases)

EC.3.2.1.1, α-1, 4-glucan-4-glucanhydrolase تتوجد هذه الانزيمات في النبات والحيوان متمثلة بانزيم تحليل النشا والأكثر وفرة في الكائنات المجهرية (Fogarty & Kelly, 2012).

أن معظم انزيمات تحليل النشا تنتمي إلى مجموعة الفا الأميليز هذه الانزيمات هي انزيمات داخلية منفصلة ، بحيث تهاجم بشكل عشوائي آصرة كلايكوسايد α-1،4 ،في أميلوز، أميلوبكتين، الكلايكوجين من اجل انتاج المواد النشوية والمالتوز والكلوكوز (Howling, 1989; Wingender *et al.*, 1999).

وعلى الرغم من أن العديد من هذه الإنزيمات غير قادرة على مهاجمة الأصرة كلايكوسايد α-1, 6 (Fogarty, 1980). الا ان العديد من الدراسات اوضحت أن بعض ألفا أميليز قادر على تحليل أصرة كلايكوسايدα-1,6. وعلى سبيل المثال الفاأميليزالمنتجة بوساطة *Streptococcus bovis* &*Thermoactinomyces* vulgaris (Tonozuka *et al.*, 1993).

يتكون عمل هذا الانزيم على أميلوز من خطوتين: في الخطوة الأولى، يتم إنتاج مالتوزبينما في الخطوة الثانية يؤدي الى انتاج الكلوكوز والمالتوز.

2-8-2 -أنزيم بيتا اميليز(β-amylases)

E C. 3.2.1.2, α-1, 4-glucan maltohydrolase

يوجد الانزيم بشكل واسع بين المملكة النباتية وخصوصا في نقيع الحبوب مثل القمح وفول الصويا والبطاطا(Howling, 1989). وقد عزلت هذه الإنزيمات من الكائنات المجهرية المختلفة مثل *Bacillus megateruim* (Friedberg & Rhodes, 1986 ;Takekawa *et al.*,1991;Abdul-Wahab, 2008.) بيتا أميليز هو أميليزخارجي منفصل يتم مهاجمة النهايات غير المختزلة بسلاسل الأميلوز، أميلوبكتين والكلايكوجين مما يؤدي الى تكوين بيتا مالتوزكناتج نهائي (Abdul-Wahab, 2008; Fogarty ,1980) .

اثناء تحلل أميلوبكتين والكلايكوجين ينتج انزيم بيتا المالتوز وكميات من المواد النشوية التي ترتبط معا من خلال اصرة كلايكوسايد6 ,1-α ويمكن أن يعزى ذلك إلى عدم قدرة هذا الانزيم لمهاجمة اواصر 1,6-α كلايكوسايد1989 (Takasaki, ;Abdul-(Wahab, .;Fogarty & Kelly, 2012;Howling, 19892008

2-8-3-انزيم كلايكوأميليزGlucoamylases

E.C. 3.2.1.3 α-1, 4-glucan glucohydrolase وكذلك يسمى amyloglucosidase الفطريات هي المصدر الرئيسي لهذا الانزيم ويتم أنتاجه بشكل رئيسي من قبل *Aspergillus spp*. *Rhizopus spp*. و*Corticium rolfsii* (Sasaki *et al.*, 1986 ;Wingender *et al.*, 1999 ;Fogarty & Kelly, 2012)

هذا ألانزيم يهاجم الأصرة 1,4-αكلايكوسايد في أمليوزوأمليوبكتين والكلاكوجين لأنتاج بقايا الكلوكوز من نهايات غير مختزلة يمكن لهذا الأنزيم ايضا تحليل الاصرة 1,3-αكلايكوسايد لكن بمعدل أبطأ من أصرة 1,4-α كلايكوسايد. (Tonozuka *et al.*, 1993 ;Fogarty & Kelly, 2012).

2-8-4 أنزيم ايزو اميليز Isoamylase

EC. 3.1.2.68 Glycogen 6-glucanohydrloase الانزيمات من هذه المجموعة لديها القدرة على مهاجمة الاصرة الكلايكوسايد 6 ،1- αفي أمليوبتين والكلايكوجين والبولين حيث عزل هذا الانزيم من الخميرة و تتكون هذه المجموعة من اثنين من الانزيمات الرئيسية أزو اميليزوبولينيز واحدهما يعمل على كلايكوجين وأمليوبكتين بينما الاخر يعمل على أمليوبكتين وبيولينين (Abdul-Wahab, 2008).

2-9- انزيم اللايبيز Lipases

هو أحد الإنزيمات المسؤولة عن تكسير وهضم الدهون ويعد من الاصناف الثانوية للأستيريز (Savendsen, 2000). تعتبر الفطريات مصدر مهم لأنزيم اللايبيز لان افراز الانزيم من قبل الفطريات يكون خارج خلوي ولسهولة استخلاصها من وسط التخمر وهنالك فطريات خيطية تستخدم على نطاق واسع وهي من مصادر اللايبيز مثل:

Rhizopus و *Mucor* و *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Geotrichum* (Sumathy *et al.*, 2012). Lipases (triacylglycerol acylhydrolase)هي مجموعة من الإنزيمات التي تحفز التحلل المائي لثلاثي الجلسرين إلى diacylglycerols و monoacylglycerols والأحماض الدهنية والجلسرين بين المرحلة المائية والدهون(Paoletti *et al.*, 2001). إذ إن اللايبيز يعمل على تكسير الدهون ويعد من الاصناف الثانوية للأستيريز Svendsen, 2000 (; Poza *et al.*, 2001 ;Pekkarinen *et al.*, 2002) ;Suganthi *et al.*, 2013);Thomson *et al.*, 1999;(Veeraragavan, 1990 بعض أنواع اللايبيز غير محددة، تحفز التفاعلات في جميع المواضع في ثلاثي الجلسرين في حين أن بعضها الآخر عبارة عن تفاعلات محددة، تحفز التفاعلات في مواضع محددة على جزيئات الدهون (Sonnet & Gazzillo, 1991;Zarinviarsagh *et al.*, 2017). تدخل هذه مجموعة من الإنزيمات في العديد من التطبيقات الصناعية بما في ذلك تحسين النكهة من خلال إزالة الدهون لمنتجات الألبان (Ko *et al.*, 2005;Zheng *et al.*, 2018). يعد فطر *T. harzianum* هو نوع من الفطريات التي تفرز العديد من الانزيمات محللة ومتنوعة مثل B-glucanase و Cellulase و Chitinase و Amylase و Lipase(Marco *et al.*, 2003).وتفرز انواع جنس المبيضات انزيمات محللة للدهون مثلesterases و lipases و phospholipases ولهذه الانزيمات دور في نمو المبيضات العالي (Khedidja & Abderrahman, 2011)

تمت دراسة اللايبيز الفطري منذ خمسينات القرن الماضي، يتم استخدام هذه اللايبيز بسبب انخفاض تكلفة الاستخراج، والاستقرار الحراري ودرجة الحموضة، وخصوصية الركيزة، والنشاط في المذيبات العضوية ، المنتجون الرئيسيون لليباز التجاري المتمثل بالفطريات *Mucor Humicola lanuginosa , Candida cylindracea , Aspergillus niger*, *R. , R. niveus , R. japonicus , R. delemar , Rhizopus arrhizus , miehei oryzae* (Bridelli *et al.*, 2002). عزلت الإنزيمات المحللة للدهون من سائل الاستزراع Geotrichum (Kazanina *et al.* 1981). اول من عزل انزيم اللايبيز من فطر *T.harzianum* من التربة في تركيا(Topal *et al.*, 2000).

تم فحص اللايبيز الذي أنتجته *Trichosporon heteromorphum* ATCC 20001 في الوسائط التي تحتوي على زيت فول الصويا ولكن في الوقت الحاضر تم إعادة تحديد سلالة ATCC 20001 على أنها Geotrichum klebahnii (Veeraragavan & Gibbs, 1989).

يتم وضع الليباز بعد البروتياز والكربوهيدرات في سوق الإنزيمات العالمي له حصة تبلغ حوالي 5٪ من سوق الإنزيمات (Suganthi *et al*., 2013).تستخدم مادة Tweens بشكل شائع كمادة اساس للاحماض الدهنية (Brunke & Hube, 2006).

تعمل انزيمات اللايبيز على تحلل الروابط الاستر للكولسترول الثلاثي Triaglycerols ويتم تحرر الاحماض الدهنية كنواتج تحلل وغالباً تستخدم مادة توين كحجر أساس للأحماض الدهنية ولهذه الانزيمات دور مهم في ايض الدهون للفطريات والهضم digestion والنقل transport ولها اهمية في تكوين المستعمرات (Park *et al*., 2013).

توجد هذه الانزيمات في النباتات والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة، وبالتالي يتم تصنيفها على أنها اللايبيز نباتي وحيواني وميكروبي. أينما وجدت، وظيفتها تحفيز التحلل المائي للدهون الثلاثية إلى الجلسرين والأحماض الدهنية. مثل الكربوهيدراز يعد اللايبيز ذات الأصل الميكروبي وذات أهمية صناعية أكبر لأنها أكثر استقرارا (مقارنة باللايبيز النباتي والحيواني) ويمكن الحصول عليها بكميات كبيرة بتكلفة منخفضة (Vakhlu, 2006).

يعدل لايبيز الخميرة عبارة عن بروتينات سكرية أحادية خارج الخلية ذات وزن جزيئي يتراوح بين ~ 33 إلى ~ 65 كيلو دالتون. أكثر من 50 ٪ من الليباز التي تنتجها الخميرة، وإنتاجها في أشكال isozymes مختلفة. يتم إنتاج إيزوزيمات الليباز هذه بدورها بواسطة جينات تشفير الليباز المختلفة و من بين العديد من الخمائر المنتجة لليباز، تستخدم خميرة Candida rugosa بشكل متكرر كمصدرللايبيز التجاري (Yadav *et al*., 2012;Zheng *et al*., 2018)هناك العديد من التقارير حول الأشكال المتعددة لليباز التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة وخاصة الفطريات الخيطية(Fukuda *et al*., 2001) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1-المواد: -

3-1-1 الاجهزة المستخدمة: -

الجدول(3-1): الاجهزة المستخدمة مع الشركة المصنعة للجهاز

اسم الجهاز	الشركة المصنعة
الفرن الكهربائي Electric oven	Memmert- Germany
حمام مائيWater bath	Memmert- Germany
ميزان sensitive- Balance	Sartorious- U.K.
حاضنة Incubator	Binder- Germany
جهاز قياس الحموضة pH meter	Philips- Holand
ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Sartorius- Germany
جهاز التعقيم البخاري (المؤصدة)Autoclave	HIR YAMA-HVE-50-England
حجرة تلقيح Hood	Tianjin Taisite-China
جهاز النبذ المركزي Ependroffe centrifuge	Hettich EBA.20- Germany
جهاز رج الأنابيب Vortex mixture	Memmert- Germany
حمام مائي Water bath	Memmert- Germany
PCR Thermo Cycler	Bioneer -Korea
جهاز تقطير الماء Distilled Water apparatus	DAIHAN Lab Tech-Korea
ثلاجة Refrigerator	Concord – Lebanon
كاميرا رقميةDigital Camera	Canon – Japan
المازج الكهربائي Vortex	Bionerr-Korea
محرك مغناطيسي Magnetic stirrer	Iraq
مصباح غا ز Benzene burner	Iraq
مفرغ هوائيVacuum Pump	Yangyi
جهار ترحيل الحامض النووي Gel electrophoresis systems	Bioneer -Korea
PCR Test Tube	Super ester (India)
ابرة تلقيح Needle	CYAN China
الشريحة زجاجية وغطاءSlides and cover slip	Superestar (India)
جهاز المدور الحراري كشف نوع الدنىThermal cycler	Analytik jene-Germany
المطياف الضوئيUv vis spectrophotometer	Shemid zu – Japan
حاضنة هزاز Incubator shaker	Genex -usa
اطباق بتري Petri Dishes	Sailbran china

تصوير وكشف الDNAUv gel documentation	Analytik jene – Germany
انابيب بلاستيكية Test Tube	India
مجهر ضوئيLight Microscope	Germany- Humascope
جهاز تقطيرDistiller water	Korea
كفوفDisposable gloves	(Malaysia)
ادوات زجاجّة مختلفة الاحجام Laboratory glassware	Germany
ثاقب فليني متعدد الاحجام Cork Borer	India
مدقة خزف	China

2-1-3 المواد الكيميائية والاوساط الزرعية المستخدمة

الجدول (3-2) : المواد الكيميائية والغاية من استخدامها والمنشأ- الشركة المصنعة

المادة	الغاية من االرقمتخدام	المنشأ – الشركة المصنعة
كبريتات المغنيسيوم المائية Magnisium sulfate $7H_2O$	وسط الزابك Czapek's dox agar	BDH-England
كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride	وسط الزابك Czapek's dox agar	BDH-England
كبريتات الحديد المائية Ferrous sulfate $7H_2O$	وسط الزابك Czapek's dox agar	BDH-England
نترات الصوديوم Sodium nitrate	وسط الزابك Czapek's dox agar	BDH-England
كاربوكسي مثيل سليلوز Carboxy methyle cellulose	وسط الزابك Czapek's dox agar	BDH-England
كبريتات الكالسيوم المائيةCASO4.5H2O	وسط السليلوز	BDH -England
كبريتات المنغنيز الثنائية MNSO4.5H2	وسط السليلوز	BDH -England
حامض الفوسفوريكH3PO4	وسط السليلوز	BDH -England
كبريتات الزنكZNSO4.7H2O	وسط السليلوز	BDH -England
سليلوز نقي	وسط السليلوز	England
حامض الهايدرو كلوريكHCL	كاشف السليلوز	England
يوديد البوتاسيومKI	كاشف السليلوز	England
كربونات الصوديومNA2CO3	تحضير محلول السليلوز النقي	England
سيترات الصوديوم Na3C6H5O7	تحضير محلول السليلوز النقي	England
سكروزSucrose	مصدر للكاربون في الوسط الزرعي	BDH-England
اكار- اكارAgar – agar	تصلب الوسط الزرعي	Himedia – India
وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA	عزل وتشخيص الفطريات	Himedia – India

Himedia – India	تشخيص الفطريات	Mueller Hinton agar
Indofarma bekasi – Indonesia	مضاد بكتيري اضيف للاوساط الزرعية	كلورامفنيكول Chloramphenicol
Oxoid – England	الكشف عن انزيم البروتييز	Gelatenجيلاتين
SYRBIO-S.A.R	الكشف عن افراز انزيم الاملیز	Gram's iodineكرام ايودين
BHD-England	للاوساط المستخدمة pH تعديل	Acetic acidحامض الخليك
BHD-England	للاوساط المستخدمة pH تعديل	Sodium Hydroxide %40 هيدروكسيد الصوديوم
Fluka – Swiss	لأغراض التعقيم	Ethanol %70ايثانول
Fluka – Swiss	تصبيغ والفحص المجهري للفطريات	صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن Lactophenol cotton blue stain
Promega	PCRفحوصات	Master mix
CBT–U.S.A	DNA فحوصات	Kit favor prep
HIMEDIA-India	تحضير الأوساط	Pepton الببتون
	تحضير وسط الزابك	كبريتات الامونيوم (NH4)2so4
تجاري	تحضير الأوساط	Starch النشا
Fluka(Switzerland)	تحضير الكواشف	اليود
BDH(England)	تحضير الأوساط	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4)
BDH(England)	تحضير الأوساط	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4)
BDH(England)	تحضير الأوساط	كلوريد الكالسيوم$CaCl_2$
BDH(England)	تحضير الزابك	**كلوريد البوتاسيوم KCL**
England	تحضير الكواشف	**كلوريد الأمونيوم NH4CL**
England	مادة قياسية	**GLUCOS**
England	تحضير الكاشف النحاسي	**تترات بوتاسيوم والصوديوم**

KNaC4H4O6·4H2O		
NaHCO3بيكربونات الصوديوم	تحضير الكاشف النحاسي	England
Na2SO4 كبريتات الصوديوم	تحضير الكاشف النحاسي	England
(NH 4) 2 MoO 4مولبيدات الامونيوم	تحضير كاشف نلسون	England
H2SO4حامض الكبريتيك	تحضير الكواشف	England
CASEIN كازائين	في تحضير البروتييز	England
NA2HPO4فوسفات ثنائية الصوديوم	تحضير الكواشف فوسفات الدارىء	England
PO42NAHفوسفات احادية الصوديوم	تحضير الكواشف فوسفات الدارىء	England
HOC(CH$_2$ CO$_2$ H)حامض الستريك اسد	تحضير الكواشف فوسفات الدارىء	England
TWEEN80	في انتاج اللايبيز	England
TCAثلاثي كلورو حامض الخليك	قياس فعالية البروتييز	England

2-3 الاوساط الزرعية المستخدمة: -

3-2-1- وسط اكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA)

تم تحضيروسط **(PDA)** حسب تعليمات الشركة المصنعة (Himedia)بإذابة 39 غم من المسحوق في لتر من الماء المقطر اضيف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 250ملغم/لتر ثم عقم الوسط بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وتحت ضغط 1.5 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة وبعد تبريده صب الوسط المعقم في اطباق بتري بلاستيكية

3-2-2- وسط دكستروز البطاطا السائل(Potato Dextrose Broth (PDB

حضر بإذابة 30غم من الوسط الجاهز في 1000مل من الماء المقطر وفقا لتعليمات الشركة المصنعة (HIMEDIA)، الذي أضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 250 مغم / لتر ، ثم عقم الوسط بجهاز المؤصدة عند 121 درجة مئوية. و ضغط جوي 1.5 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة برد وصب في دوارق مخروطية لحين الاستخدام.

3-2-3- وسط أكار- السيليلوز Cellulose Agar

تم تحضير الوسط وفقاً لطريقة (Bååth & Söderström, 1980)التي تضمنت المواد التالية:-

2 غم NaNO3 ،1 غم (NH4)2SO4 ،1 غم KH2PO4 ، 0.5غم MgSO4.7H2O ، 0.5 غم KCl ، 0.05, غم CaCl2 ، 0.01 غم FeSO4.7H2O ،0.01 غم CaSO4.5H2O ، 0.005 غم MnSO4.4H2O ، 0.001 غم ZnSO4.7H2O ، 15 غم Agar . تمت اذابة المكونات في لتر ماء مقطر وأضيف 5 غم سيليلوز نقي معامل بحامض الاورثوفوسفوريك (85 %) إلى الوسط استخدم الوسط للكشف عن قدرة الفطريات على إنتاج انزيم السيليوليز (Tansey, 1971).

3-2-4-وسط إنتاج أنزيم السيليوليز Cellulase Product

تضمن الوسط المواد الاتية :-

1.5جمK2HPO4 ، 0.4 جم MgSO4 7H2O ، 0.2 جم KCl ، 1 جم NH4NO 3 ، 0.02جم FeSO4 7H2O، 0.02 جمMnSO4 ، 0.02 جمZnSO4 ، 0.33 جم (NH4) 2SO4، 1 جرام من الجلوكوز. تمت إذابة المكونات في لتر ماء مقطر وأضيف مصدر كربوني مناسب (5٪ سليلوز متبقي) إلى الوسط وتم تحضير الوسط وفقًا للطريقة (El-Katatny et al., 2000).

3-2-5- وسط أكار الحليب المقشود Skimmed – milk Agar

تم تحضير الوسط باذابة 5 غم من الحليب المقشود Skim –milk في 50 مل ماء مقطر ، ذوب 10 غم من الآكار في 450 مل ماء مقطر في دورق أخر ، تم تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7 ، اضيف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 250ملغم/لتر عقم المحلولان كل على انفراد ثم بردا الى درجة 45°م ثم تم خلطهم معاً استخدم الوسط للكشف عن قدرة الفطريات على إنتاج انزيم البروتييز (Zghair, 2019).

3-2-6- وسط إنتاج انزيم البروتييز Protease Product

اضيف(0.1 %) CaCl2 ، (% 0.7) KH2PO4 ،(%0.4) K2HPO4 ، (0.01 %) MgSO4.7H2O ، (% 0.1) Glucose إلى 100 مل من شرش اللبن ، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7 باستخدام فوسفات البوتاسيوم وفقا لطريقة Gupta, (2016) اعد الوسط باستخدام مادة الشرش بدلاً من الكازين كمصدر للنيتروجين ، عقمت جميع الوسائط عند 121 درجة مئوية وضغط جوي 1 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة باستثناء الحليب المقشود وشرش اللبن الذان تم تعقيمهما لمدة 5 دقائق، اضيف المضاد الحيوي Chloromphenicolإلى وسط المزرعة قبل التعقيم بتركيز 250 ملغم / لتر لمنع نمو البكتيريا .

3-2-7- وسطـ أكار النشأ Starch Agar

تم تحضيره عن طريق إذابة 15 جم من النشا و1غم من K_2HPO_4 و0.5 غم من $MgSO_4 OH_2 7$. و15غم من الأكار في لتر من الماء المقطر و اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 250ملغم/لتر حسب طريقة (Mohammed et al., 2018)

3-2-8- وسط انتاج انزيم الاميليز Amylase prodyct

الوسط يتكون من 3% كلوكوز و 0.3 % Mgso4.7H2O و 2.2% ببتون 3% KH2PO4 وعدل الى 4.5 الرقم الهيدروجيني وعقم عند درجه حراره 121مْ ولمده 15دقيقة حسب طريقه- AL). Hussuna,2005)

3-2-9- وسط Tween 80 Agar انتاج اللايبيز

تم تحضير هذا الوسط من المكونات التالية (10 غم ببتون ، 5 جم كلوريد الصوديوم ، 0.1 غم كلوريد الكالسيوم) في 1000 مل من الماء المقطر ، اضيف 5 مل من توين 80 ، وضبط الرقم الهيدروجيني

إلى 6.8. اضيف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 250ملغم/لتر وعقم بالمؤصدة ، استخدم الوسط لغرض التحري عن قابلية الفطريات والخمائر على انتاج انزيم اللايبيز.(Slifkin, 2000).

3-2-10- وسط Mueller-Hinton II Agar

تم تحضير الوسط وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة (Biolab) بأذبة 38 غم من المسحوق في لتر واحد من الماء المقطرسخن مع التحريك باستخدام جهاز تقليب حراري مغناطيسي، عقم الوسط في جهاز الأوتوكلاف بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وتحت ضغط 1.5 جوي 1.5 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة، بعد التبريد صب الوسط المعقم في أطباق بتري بلاستيكية لحين زرع البكتريا على الوسط.

3-2-11-حفظ العينات الفطرية قصير الامد

زرعت العزلات الفطريات في انابيب زجاجية سعة 20 مل حاوية على وسط PDAبشكل مائل (Slant) ووضعت في الثلاجة عند درجة حرارة (4° م) لمدة شهرين بعد ذلك زرعت على وسط PDA في طبق بتري وعمل ثلاث مكررات لكل عينة (Kwon Chung- and Bennett, 1992).

3 -3 : المحاليل والكواشف المستخدمة في الدراسة:

3-3- 1- المحلول الدارىء سترات الصوديوم

تم تحضيره من :-

أ – اذيب 21.01 غم بتركيز 0.1 M من حامض الستريك Citric acidغم من الحامض في لتر من الماء المقطر.

ب- اذيب 28.4 غم بتركيز 0.1M من فوسفات الصوديوم ثنائية القاعدة Na2HPO4في لتر من الماء المقطر، أضيف 100 مل من محلول حامض الستريك إلى 97 مل من فوسفات الصوديوم ثنائية القاعدة واكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر تم تحضير عدة قيم من الرقم الهيدروجيني بإضافة الحامض او القاعدة بحسب القيمة المطلوبة(Dawson *et al.*, 2002).

3-3-2محلول ا لفوسفات الدارىء Phosphate buffer بتركيز 0.2 M

أ - محلول NaH2PO4.2H2O بتركيز 0.2 م محضر بإذابة 31.2 جم منه في كمية صغيرة من الماء المقطر ، ثم إضافة الحجم إلى لتر

ب- محلول Na2HPO4بتركيز 0.2 مولار محضر بإذابة 28.39 جم منه في لتر من الماء المقطر ، وخلط المحلولين معًا وفقًا لدرجة الحموضة المطلوبة (Cruichshank *et al.*, 1975).

3-3-4-محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك Trichloro acetic acid (TCA)(5%)

قم بإذابة 5 جم من حمض الخليك ثلاثي الكلور (TCA) في كمية من الماء المقطر مع التحريك، ليصل الحجم إلى 100 مل

3-3-5 - محلول اليودIodine solution

يحضير عن طريق إذابة 1 جم من اليود في 100 مل من الماء المقطر(Pandey *et al.*, 2000)

3-3-6-محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز (0.5M)

ذوب 20 غم من NaOH في لتر من الماء مقطر .

3-3-7 – محلول يود حامض الهيدروكلوريك(HCL)Iodine Solution

حضر المحلول بمزج 100 مل من الحامض (HCL0.1) و 500 مل من (1%) I + (2%) KI بدلالة وزن /حجم نقل و حفظ المحلول في قنينة معتمة(Yeoh *et al.*, 1985) .

3-3-8 - محلول ا لسيليلوز النقي .

حضر من معاملة 15 غم من السيليلوز النقي في 200 مل من حامض الأورثوفوسفوريك (85 %) أضيف الحامض بالتدريج مع التحريك المستمر لمنع حصول التكتلات ، ترك المزيج مدة ساعتين ثم أضيف إليه ماء مقطر مع التحريك، رشح الخليط من خلال ثلاث طبقات شاش فوق ورقتي ترشيح بواسطة (Vaccum) مضخة تفريغ ، أعيدت عملية الغسل عدة مرات أضيف 500 مل من NaCO3 بنسبة 2 % مزج الخليط جيداً وترك مدة 24 ساعة في الثلاجة ثم غسل بالماء المقطر حتى وصول الرقم الهيدروجيني الى 7 (Tansey, 1971) .

3-3-9- محلول كاربوكسي ميثيل سيليلوز (CMC)

1 - ذوب 1غم من مادة CMC في 80 مل ماء مقطر ساخن (80 – 90)°م مع التحريك المستمر .

2 -أضيف 10 مل من 0.5Mمحلول سترات الصوديوم 4.8 =الرقم الهيدروجيني.

3- أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر(Mandels et al., 1974) .

حضر المحلول قبل الاستعمال مباشرة أستخدم المحلول لتقدير فعالية أنزيم(CMCase) .

3-3-10 - محلول حامض الهيدروكلوريك (HCl) (5) عياري

استخدم لتعديل الرقم الهيدروجيني (pH) للأوساط المستخدمة.

3-3-11- محلول يوديد البوتاسيوم KI

حضر من مزج I 3غم /لتر + KI 5 غم /لتر للكشف على قابلية الفطريات على افراز انزيم الاميليز (Hankin & Anagnostakis, 1975).

3-3-12- محلول ا لكازائين(0.5 %)

حضر من اذابة 0.5 غم من الكازائين في 90 مل من محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 0.2M، سخن بدرجة 80°م لحين ذوبان الكازائين عدل الرقم الهيدروجيني الى 7 بإضافة بضع قطرات من محلول NaOH بتركيز 0.5M وأكمل الحجم إلى 100 مل أستخدم المحلول لتقدير فعالية انزيم البروتييز Protease (Hassan ,1996)

3-3-13– كاشف النحاس Cupper reagent

أ- حضر من المحلولين الآتيين: -

ذوبت 6 غم من ترترات صوديوم – بوتاسيوم، 12 غم كربونات الصوديوم اللامائية في 125 مل ماء مقطر ثم أضيف لها 2 غم كبريتات النحاس المائية 8 غم كربونات الصوديوم الحامضية ذوبت المكونات جيداً ثم رشحت.

ب- ذوبت 90غم كبريتات الصوديوم اللامائية في 250 مل ماء مقطر وسخنت لحين اختفاء الفقاعات ورشحت وهي ساخنة ثم خلط المحلولان(أ مع ب) أكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر (Bailey *et al*., 1992)

3-3-14 – كاشف نيلسون Nelson's reagent

أذيب 25 غم من مولبيدات الامونيوم في 450 مل ماء مقطر سخن المزيج تسخينا برفق ثم اذيب 3غم ارسنات الصوديوم في 25 مل ماء مقطر مع الرج المستمر أضيف له 21 مل من حامض الكبريتيك المركز خلطت المكونات واكمل الحجم الى 500 مل بالماء المقطر ثم وضع المزيج في حمام مائي بدرجة55°م مدة 25 دقيقة ثم بردت المحتويات وحفظت في قنينة داكنة بدرجة حرارة الغرفة (Nelson & Somogyi, 1952)أستخدم كاشف النحاس وكاشف نيلسون لتقدير السكريات المختزلة.

3-3-15 – كاشف النحاس القاعدي

يتكون من المواد الآتية :-

محلولA (2.7%) ترترات صوديوم بوتاسيوم في ماء مقطر ، محلولB (1%) كبريتات نحاس مائي في ماء مقطر ، محلول C(2%)كربونات صوديوم ، مذاب في (0.1)مولار(هيدروكسيد الصوديوم) ، تم حفظ المحاليل في الثلاجة وتحضر قبل الاستخدام مباشر(Lowry *et al.*, 1951).

3-3-16- كاشف الفينول – سيتاكاليتو Folin reagent

بتركيز 1 نورمالي المحضر من العبوة الأصلية بتركيز 2 نورمالي

3-3-17-كاشف(DNSA) Dinitrosalycilic acid (3.5)

حضر الكاشف بإذابة 1 غم من المادة في 50 مل من الماء المقطر اضيف 20 مل من هيدروكسيد الصوديوم 2 مولار و30 غم من تترات الصوديوم - البوتاسيوم وبعد الذوبان أضف الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر(Whitaker & Bernhard, 1972) .

3-3-18- محلول ألبومين المصل البقريAlbumin Serum Bov

بتركيز 2 مغم / مل، تم تحضيره عن طريق إذابة 0.2 غم من ألبومين مصل البقر في كمية من الماء المقطر ، اكمل الحجم بإضافة 100مل من الماء المقطر.

3-3-19- مصل اللبن:

هو السائل المتبقي من صناعة الجبن ويحتوي على حوالي 14٪ بروتين (Sigmund *et al.* ,1980). تم جمع العينات من الاسواق المحلية ، وتخزينها في عبوات زجاجية ، وتعقيمها عند 121 درجة مئوية و1بار واحد لمدة 5 دقائق ، حفظت في الثلاجة عند 4 °م لحين الاستخدام في التجارب اللاحقة.

ثانيا :-3-4 طرائق العمل

3-4-1-عزل الفطريات من الاسمدة العضوية

جمعت عينات للاسمدة الحيوانية (روث المواشي) من أماكن مختلفة لحضائر الحيوانات في عدد من مناطق محافظة كربلاء المقدسة متمثلة بحي الحر وحي التحدي وحي النصر ومزارع العتبة الحسينية المقدسة لتربية المواشي ،اخذت 16 عينة متفرقة ومن كل موقع أربعة عينات بواقع 100 غم لكل عينة حفظت ونقلت العينات في اكياس بولي اثلين كل عينة على حدة الى مختبرات الدراسات العليا – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء لحين استخدامها.

3-4-2- زراعة وتنقية الفطريات المعزولة: -

زرعت العينات بطريقة الزرع المباشر على وسط (PDA) حيث اخذ 0.5 غم من كل عينة ووضعت في وسط الطبق حضنت الاطباق عند درجة حرارة 25°م±2 فحصت العينات بعد خمسة أيام من التحضين فحص أولي على الوسط الزرعي استمرت مراقبة الاطباق لغاية سبعة أيام من التحضين نقيت الفطريات باخذ عينة من طرف مستعمرة حديثة النمو بواسطة ثاقب فليني قطر 5ملم وإعادة زرعها على وسط PDA جديد كررت العملية لعدة مرات لحين الحصول على عزلات نقية.

3-4-3-تشخيص الفطريات المعزولة بالطريقة التقليدية (مظهريا ومجهريا) : -

شخصت النموات الفطرية المعزولة بناء على الخصائص المظهرية والمجهرية للمستعمرات الفطرية النامية على وسط (PDA) مثل طبيعة المستعمرات الفطرية وشكلها ولونها وحجمها الجهه الامامية والخلفية للمستعمرة ، الخصائص المجهرية، التركيبات الفطرية التي تنتج عن طريق ألوان المستعمرات مثل الأبواغ الكبيرة والصغيرة من حيث الشكل والحجم ، نوع ولون الصبغات التي ينتجها الفطر في الطبق من خلال الخصائص المجهرية للفطر مثل الأبواغ والهايفات والخيوط، كونيديا، تم التشخيص حسب المفاتيح التصنيفية المعتمدة وتأكيد التشخيص من قبل أ.م.د. بان موسى حسن (Damm *et al.*, .;Pitt & Hocking, 1997);Moubasher, 19932008

3-4-4 النسبة المئوية للتردد والظهور

تم حساب تردد وظهور الفطريات المعزولة من الاسمدة العضوية حسب المعادلتين:-

1.النسبة المئوية للتردد وحسبت من القانون الآتي:

$$\%\ \text{Frequency} = \frac{\text{عدد عزلات الجنس الواحد}}{\text{العدد الكلي لجميع العزلات}} \times ١٠٠$$

2. النسبة المئوية للظهور وحسبت من القانون الآتي:

$$\%\ \text{Occurrence} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{العدد الكلي للعينات خلال الدراسة}} \times ١٠٠$$

3-5- الفحص الجزيئي لعينات الفطريات المنتخبة

تم إجراء الفحص الجزيئي لـ 12عزلة من الفطريات قيد الدراسة في مركز الأمين التابع للعتبة العلوية المقدسة على عدة مراحل (DNA) ومرحلة.(PCR)

3-5-1 طرائق العمل للاستخلاص(DNA)

اجريت عملية الفحص ضمن تعليمات للشركة المصنعة (FAVORGEN) لاستخراج الحمض النووي (DNA)للفطريات و الخمائر

1- نقل 100ulمن المزرعة الفطرية الى أنبوب الطرد المركزي ML1.5
2- اضافه ML1 من FA Buffer لتكسير الألياف للحصول على ال(DNA)
3- مزج الفطر مع محلولFA Buffer بواسطة جهاز الطرد المركزي 5.000 دوره/دقيقة لمدة 2 دقيقة لتكسير الفطر وعزل ال(DNA)
4- اضافه FA Bufferمره أخرى بكمية أقل وعمل طرد مركزي بسيط بأضافه 50ul من انزيم lyticase ثم تحضن العينة 37مْ لمده
5- توضع العينات في الطرد المركزي لمدة 10دقيقة بواقع 5000 دورة_/دقيقة ونقوم بأزاله المادة الطافية
6- يضاف 350 ulم من ال TG1 Buffer للعينات ونعمل مرة أخرى مزج
7- نضع المادة في انابيب او تيوبات صغيره تحتوي على زجاج للتأكد من تكسيرها
8- نقل الراسب إلى تيوب اخر ونقوم بالمزج لمدة 5 دقيقة
9- بعدها نقوم بأ ضافة بروتييز Kبكمية 10mg ونقوم بالمزج مره اخرا جيدا
10- يحضن المستخلص 55 مْ لمده 15 دقيقة وبعدها نقوم بالمزج مرة أخرى وعمل طرد مركزي لمدة دقيقه 5000دورة /دقيقة
11- نضيف 200ul TG2 Buffer ونقوم بالمزج
12- اضافه الايثانول 200ul وبتركيز96% والمزج
13- نضع في ال tg mini columnكلكشن تيوب فلتر ونعمل طرد مركزي 11000دورة'/دقيقه لمدة 30 ثانية وبعدها نقوم بتحويل الى أنبوب جديد TGmini
14- نضع 400ul من w1Buffer الى ال TGmini ونضعها في الطرد المركزي 11000دوره لمدة 30 ثانية والتخلص من التدفق من خلال. وضع عمود TG الصغير مرة أخرى

في أنبوب التجميع. التأكد من إضافة الإيثانول إلى المخزن المؤقت wash Buffer عند الاستخدام لأول مرة.

15- اضافه 750ul من wash Buffer الى TG mini وعمل مزج 30ثانية

16- بعدها نقوم بتنشيف الفلتر بوضعها في الطرد المركزي 18000دوره/ دقيقة لمدة 3 دقيقة إضافية لتجفيف العمود.

17- وضع عمود TG الصغير في أنبوب التجفيف.

18- اضافه ال wash buffer u100_50 ونقوم بالطرد المركزي 18000دورة/دقيقة لمده 1دقيقة

19- قم بتخزين إجمالي ال(DNA) عند درجة حرارة 4 درجات مئوية أو -20 درجة مئوية

3-5-2-1 القياس الكميلل(DNA) وتحديد الجودة

تم استخدام 5 ميكرولتر من ال(DNA) من كل عينة لاختبار السقوط الحيوي، وكان نقاء محلول الحمض النووي في حدود 1.7 ± 0.2 وكان تركيز الحمض النووي 74.65 ملغم / مل (Stephenson, 2016).

3-5-2-2مرحله ال(PCR)

تم اجراء فحص ال(PCR) حسب طريقة(KIT) شركة **promega** حيث يستخدم

Green Master MIX من شركة Promega واستخدم نوعين من البادئات الخاصات ITS 4 و ITS1 macrogen والمبينة في الجدول (3-4)

جدول (3-4) يبين البرايمرات ITS1,ITS4 المستخدمة من شركة (microgen Korea)

Primers		**Sequence**	Amplicon
ITS1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500 bp
ITS4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

3-2-5-3 تحضير مزيج Green Master Mix

تم تحضيره حسب تعليمات الشركة المصنعة Promega الامريكية والمبينة في الجدول(3-5)

جدول (3-5) يبين طريقة تحضير مزيج Green Master Mix

PCR master mix	Volume
Green master mix	12.5µl
Forward primer(10um)	2 µl
Reverse primer(10um)	2 µl
DNA template	6 µl
Free nucleas water	2.5 µl
Total	25 µl

بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج التفاعل PCR التي ذكرت في الجدول اعلاه إلى أنابيب حجم 0.2ml خاصة والحاوي على بقية مكونات تفاعل ال PCR ومن ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin centrifuge vortex)بسرعة 3000rpm لمدة ثلاث دقائق وثم وضعت في جهاز (Thermal cycler)المدور الحراري

3-2-5-4 حالات دورات الحرارة لفحص conditions Pcr Thermal cycler

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام جهاز Thermocycler PCR كما في الجدول (3-6) التالي:

جدول(3-6) يبين عدد الدورات التي تمر بها نواتج ال (PCR) في جهاز (Thermal cycler)

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	94.0°C	4min
Denaturation	35	94.0°C	30sec
Annealing		56.0°C	30sec
Extension		72.0°C	30sec
Final extension	1	72.0°C	7min
Hold	-	4.0°C	Forever

3-5-2-5 تحليل نتائج فحص الPCR

تم اجراء الترحيل الكهربائي Agarose gel electrophoresis باستخدام هلام الاكاروز 1.5%

وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis كما يأتي:-

(Mishra et al., 2010).

1- تم إذابة 1.5 غم من هلام الا كا روز Agarose gel في 100 مل من محلول

الTBE buffer الدارىء بتركيز X1 وباستخدام جهاز Microwave لمدة 5 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50°c وبعدها تم إضافة 3 ميكرو ليتر من صبغة الحمض النووي المشعة bromide Ethidiumومزجت جيدا مع الهلام

3- تم صب هلام الا كروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد أماكن عينات الPCR ، وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية ونقل إلى حوض الترحيل الكهربائي

4- تم عملية تحميل العينات لناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام

5- تم استخدام سلم القياس DNA ladder 100 لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الأولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الكروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1x وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 80فولت وأمبير 58 لمدة 75 دقيقة وتم تصوير الجل تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية وتم تصويره باستخدام الكاميرا الرقمية .

7- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج ال PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجيةUV gel documentation لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

(Sambrook & Russell, 2006).

3-6 تسلسل DNA المنتج من الPCR

وقد أرسلت نواتج ال PCR لموقع شركة Macrogen INCفي كوريا لتلقي بيانات الفطريات المرسلة والتفاعلات المتسلسلة والمنتجة والمنقاة باستخدام kit(Promega) في جهاز Thermo cycle

PCRحيث عرضت نتائج التسلسل في برنامج Bio Edit للتسلسلات المنتجة من ال PCR بطريقة سانجر (Hawksworth *et al*., 2016).

3-7- الكشف عن الفطريات المحللة :-

3-7-1- السيليلوز Cellulose

لقح وسط آ كار – السيليلوز المحضر بحسب الفقرة(3 -2 - 3) بقرص قطره (5 ملم) من الانواع الفطرية النقية والنامية على وسط (PDA) وبعمر ثلاثة ايام ، حضنت الأطباق بدرجة 25°م ± 2لمدة 72 ساعة . تم الكشف عن تحلل السيليلوز باستخدام الكاشف HCl – Iodine والمحضر في الفقرة (3-3- 7) أضيف الكاشف الى الطبق وترك لمدة 5 دقائق، ثم سكب المحلول وترك الطبق مدة 10 دقائقل(33)عزلة (Yeoh *et al*., 1985).

3-7-2 – البروتين Protein

صب وسط اكار الحليب -المقشود المحضر بالطريقة (3-2-5) في أطباق بتري المعقمة. لقحت بأنواع فطرية تم الحصول عليها من مستعمرات نقية نمت على وسط.PDA لقحت بقرص قطره (5 ملم). .حضنت الأطباق بدرجة 25°م ±2لمدة 72 ساعة لـ 32عزلة (Zghair, 2019) .

3-7-3 - الأميليز Amylase

لقح وسط آ كار النشأ المحضر بحسب الفقرة (3-2-7) بقرص قطره 5 ملم من الانواع الفطرية النقية والنامية على وسط (P D A) و بعمرثلاثة ايام ، حضنت الأطباق بدرجة 25°م ±2 مدة 72 ساعة كشف عن تحلل النشأ باستخدام الكاشف اليود المحضر بالفقرة(3 -3-5) أضيف الكاشف الى الطبق و ترك لمدة 5 دقائق ثم سكب المحلول وترك الطبق مدة 5 دقائق لـ 33 عزلة (Pandey *et al*., 2000).

جدول(3-3) لقياس قطر الهالة الشفافة حول المستعمرات الفطرية للأوساط السيليلوز والبروتييز والاملیز للكشف عن فعالية التحلل .

فعالية التحلل	قطر منطقة التحلل (ملم)	الرمز
غير محلل	Zero	-
ضعيف الفعالية	< 10 ملم	+
متوسط فعالية	10 – 15 ملم	++
شديد الفعالية	> 15 ملم	+++

3-7-4- انزيم اللاييبيزLipase :

لقحت الاطباق الحاوية على الوسط (البيتون المدعم بTween 80) بالعزلات الفطرية ل(33)عزلة المراد اختبار قدرتها على افراز انزيم اللاييبيز من خلال نقل قرص لقاحة من المستعمرات النامية على وسط (PDA) بوساطة ثاقب فليني قطر5 ملم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 مْ ±2ولمدة 3 ايام وسجلت النتائج من خلال ملاحظة تكون ترسبات بيضاء اللون حول المستعمرات او من خلال ظهور هالة شفافة حول مستعمرة الفطر(Takó *et al*., 2012) (Takó et al., 2012).

3-8-قياس فعالية أنزيم CMC ase

اتبعت طريقة (Mandels et al., (1974لتقدير فعالية أنزيم CMC ase حيث سحب1 مل من الراشح الأنزيمي بواسطة ماصة معقمة أضيف له 1 مل من محلول المادة الاساس CMC والمحضره بالفقرة(3-3-9) وضع المزيج في الحاضنة الهزازة لمدة 30 دقيقة بدرجة 50°م ثم عمل له طرد مركزي بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق لإيقاف التفاعل اخذ 1 مل من الراشح الأنزيمي لأجراء طريقة Somogyi لتقدير تركيز السكريات المختزلة إما البلانك فيمثل الراشح الأنزيمي بعد تلف الأنزيم حرارياً بوضعه في حمام مائي مغلي بدرجة 100°م لمدة 10 دقائق لقتل أي نشاط انزيمي .

وحسب العلاقة الآتية :-

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة /مل)} = \frac{\text{الامتصاصية /الميل} \times \text{عامل التخفيف}}{\text{الوزن الجزيئي للكلوكوز} \times \text{حجم الأنزيم} \times \text{زمن الحضانة (بالدقيقة)}}$$

(Miller, 1959).

3 – 9- طريقة Somogyi لتقدير السكريات المختزلة

حسب طريقة(Nelson & Somogyi,(1952 قيست السكريات المختزلة Reducing Sugar المتحررة من تحلل السيليلوز في المحلول الزرعي الفطري ، استخدمت مادة الـ Glucose كمادة قياسية Standard لعمل المنحنى القياسي (الشكل3 – 1) للسكريات المختزلة حضر محلول من سكر الكلوكوز وبتركيز (100 مايكرو غرام / مل) كالاتي:

1- إذابة 0.5 جم من الجلوكوز في 500 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 1 مغم / مل(محلول A)

2- خذ 50 مل من محلول A واخلطه مع 500 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 0.1 مغم / مل (100 ميكروغرام / مل) (محلول B)

3– حضرت التراكيز الآتية من (محلول B) :

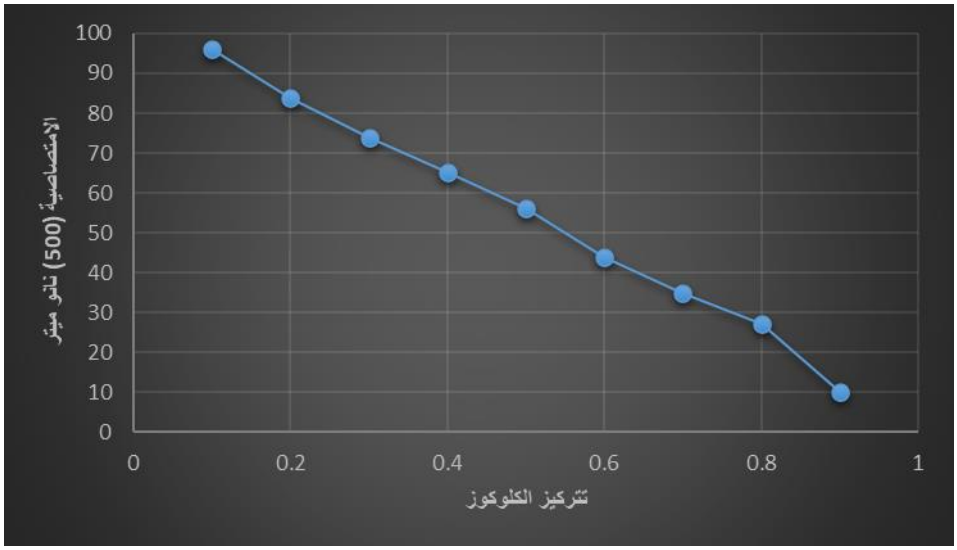
رقم العينة	(محلول B) مل	ماء مقطر/مل	تركيز السكر الناتج
1	0.1	0.9	10مايكروغرام/مل
2	0.2	0.8	20مايكروغرام/مل
3	0.3	0.7	30مايكروغرام/مل
4	0.4	0.6	40مايكروغرام/مل
5	0.5	0.5	50مايكروغرام/مل
6	0.6	0.4	60مايكروغرام/مل
7	0.7	0.3	70مايكروغرام/مل
8	0.8	0.2	80مايكروغرام/مل
9	0.9	0.1	90مايكروغرام/مل

1- أخذ 1 مل من التراكيز المذكورة أعلاه، و حضر بلانك(1 مل ماء مقطر) .

2- اضيف 1 مل من كاشف النحاس (3 - 3 - 13) إلى العينات المذكورة أعلاه ، وضعت في حمام مائي لمدة 10 دقائق ، وبردت بماء الصنبور .

3- اضيف 2 مل من كاشف نيلسون (3-2-14) ووضعت العينات في مكان مظلم لمدة 30 دقيقة .

4- وضعت العينات في جهاز طرد مركزي بسرعة 4000 دورة في الدقيقة فترة 5 دقائق وتمت قراءتها مباشرة بمقياس طيف ضوئي بطول موجي 500 نانومتر



شكل (3-1) المنحنى القياسي لتركيز الجلوكوز

3-10- تركيز مادة شرش اللبن في الوسط الزرعي

حضرت عدة تراكيز من مادة شرش اللبن :-

(20 % ،30%، 40 % ، 50 % ، 60 % ،70% ،80 % ،90 % ، 100 %) للكشف عن أفضل تركيز لإنتاج أنزيم البروتييز حضرت النسب أعلاه داخل دوارق سعة 250 مل بإضافات ثانوية ، أضيفت لها (Ca2Cl %0.1 ، KH2PO4 % 0.7 ، K2HPO4 %0 .4، MgSO4– 7H2O % 0.01، %1 Glucose) ،استخدمت مادة الشرش بتركيز(40 %) بدون إضافات ثانوية لقحت الأوساط بعد التعقيم بقرص قطره (10 ملم) من مستعمرة نقية للفطر وحضنت الدوارق الحاوية على الأوساط بدرجة 30°م وبرقم هيدروجيني 7 مدة 3 أيام ثم قدرت الفعالية الأنزيمية لانزيم البروتييز .

3-11-قياس فعالية أنزيم البروتييز Protease

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Yamada et al.,(1976) في تقدير فعالية أنزيم البروتييز أضيف 0.1 مل من الراشح الإنزيمي الى 2 مل من محلول التفاعل(0.5 % كإزائيين برقم هيدروجيني 7) وضعت العينات في حمام مائي بدرجة 35°م لمدة 20 دقيقة ثم أضيف 3 مل من محلول (TCA) (5%)لإيقاف التفاعل اما (Blank) فيمثل الراشح الأنزيمي بعد تلف الأنزيم حرارياً بوضعه في حمام مائي بدرجة 100°م لمدة 10 دقائق لقتل أي نشاط انزيمي . عدا إضافة محلول(TCA) قبل إضافة الأنزيم نبذت المحاليل بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 4°م ثم قيست الامتصاصية للمحلول الرائق بطول

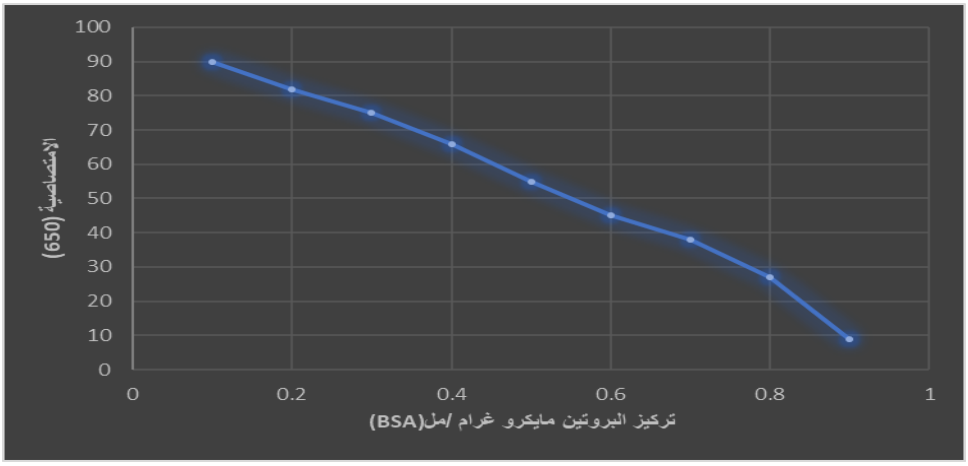
موجي 280 نانوميتر ، ثم قدرت وحدات الفعالية الأنزيمية حيث تعرف وحدة الفعالية بأنها كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على الطول الموجي 280 نانوميتر مقدارها0.01 في الدقيقة تحت ظروف القياس.

12-3-تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة Lowry et al., (1951) لتقدير تركيز البروتين ،أخذ 1 مل من الراشح الإنزيمي ثم أجريت عليه خطوات طريقة Lawry method قيست الامتصاصية على طول موجي 650 نانوميتر ومن قيمة الامتصاصية عرف تركيز البروتين الذائب في الراشح الإنزيمي من المنحنى القياسي للبروتين.

3 –13- طريقة Lawry *et al.* لتقدير تركيز البروتين.

أتبعت طريقة لاوري Lawry *et al.* (1951) لتقدير تركيز البروتينات واستخدم البومين المصل البقري (B.S.A) كمادة قياسية Standard لعمل المنحنى القياسي للبروتين (الشكل 3– 2) حيث حضر المحلول الخزين Stock solution بتركيز (100 مايكرو غرام / مل) ثم حضرت مجموعة تراكيز من المحلول الخزين(10 , 50 , 100 , 150 , 200, 250, 300, 350 , 400) مايكرو غرام / مل ثم أضيف 5 مل لكل من التراكيز المحضرة من كاشف النحاس القاعدي (3 - 2 - 15)وترك مدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة ثم أضيف له 0. 5 مل من كاشف الفينول – سيتكاليتو (3 -2 -15) ثم وضع في حمام مائي بدرجة 55°م مدة 5 دقائق بعدها برد بدرجة حرارة الغرفة ثم قيست الامتصاصية بطول موجي 750 nm ورسم المنحنى القياسي بين تركيز البروتين والامتصاصية كما في شكل(3-3).



شكل (3-2): المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين.

14-3- تقدير كفاءة الأنواع الفطريات قيد الدراسة في انتاج انزيم السليوليز

اضيف وسط الاستزراع المحضر لانتاج انزيم السليوليز(3-2-4) لقح بقرص قطره10ملم من المستعمرات الفطرية النامية على وسط (PDA)وبعمر ثلاث أيام اجري الاختبار على الفطريات التي أعطت اعلى فعالية على وسط اكار السيليولز(3-**2**-**4**)اختبرت الأنواع الفطرية المنتخبة لتشخيص الفطريات الأكثر كفاءة في انتاج الانزيمي من خلال ظروف الحضن الثابتة.حضنت الدوارق لمدة (7)أيام في الحاضنة الهزازة وبسرعة 180دورة /دقيقة وبدرجة 30مْ وبعد انقضاءمدة التحضين تم استخلاص الراشح الانزيمي من الكتلة الحيوية واجراء تقدير السكريات المختزلة ثم قدرت الفعالية الانزيمية الانزيم التحلل السيليولزي CMCase وتركيز من خلال جهاز المطياف الضوئي والتي يعبر عنها كل وحدة واحدة من انزيم السيليوليز تحرر 1مايكرومول من السكر (مادة التفاعل) substrate بالدقيقة تحت ظروف قياسي وعلى طول موجي 500نانوميتر(Miller.,1959)

15-3- تقدير كفاءة الأنواع الفطرية المنتخبة على انتاج انزيم البروتييز

أنتخبت ثلاث أنواع فطرية كان لها أعلى فعالية على وسط أكار الحليب المقشود Skim – milk ونميت الفطريات المنتخبة على الوسط ألزرعي المعدني الحاوي على شرش اللبن (3 -2 - 6) ، أجريت للفطريات ظروف حضانة ثابتة بدرجة حرارة 30°م وبرقم هيدروجيني 6 ومدة 3 أيام قدرت خلالها الفعالية الأنزيمية لأنزيم البروتييز وتركيز البروتين الذائب (Hassan.,1996) .وقيست من خلال جهاز المطياف الضوئي والتي يعبر عنها هي بكمية الانزيم التي تسبب زيادة في امتصاص الضوء على طول موجي280نانوميتر مقدارها0.01مايكرومول في الدقيقة تحت ظروف قياسية (Gupta.,2016)

16-3- تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على انتاج انزيم الاميليز

حضر الوسط الزرعي المعدني الخاص بإنتاج أنزيم الأميليز (3-2-8) ووزعت المكونات على٣ دوارق سعة الدورق الواحد 250 مل بواقع 100 مل لكل دورق وعقمت بالمؤصدة بدرجة 121مْ وضغط ١ باوند/انج^2 لمدة15 دقيقة وبعد التبريد أضيف للوسط قرص قطره 10 ملم من المستعمرات الفطرية النقية والنامية على وسط (PDA) وبعمر ثلاثة أيام اجري الاختبار على ثلاثة انواع من الفطريات التي أعطت أعلى فعالية على وسط أكار النشأ (3-2-7) اختبرت الانواع الفطرية المنتخبة لتشخيص الفطر الأكفأ في الإنتاج الإنزيمي من خلال ظروف حضانة ثابتة. حضنت الدوارق مدة 3 أيام عند درجة حرارة 30 مْ وبعد انقضاء مدة التحضين تم استخلاص الراشح الإنزيمي عن الكتلة الحيوية واجري تقدير لتركيز السكريات المختزلة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيمي التحلل الاميليز وتركيزالبروتين الذائب كالآتي :-أخذ 1مل من

خلاصة الانزيم و 1مل من 1%نشأ مذاب في محلول سترات منظم تركيز 0.05 مولاري و برقم الهيدروجيني (4.5)خليط التفاعل يحضن على 60 °م لمدة 20 دقيقة والتفاعل ينتهي بوساطة أضافة ٢مل من DNSA (3-3-17)في أنابيب اختبار وتغمر الأنابيب في حمام مائي مغلي بدرجة 100مْ لمدة 5 دقائق. تقاس الامتصاصية من خلال جهاز المطياف الضوئي والتي يعبر عنها كل وحدة واحدة من انزيم السيليوليز تحرر 1مايكرومول من السكر (مادة التفاعل) substrate بالدقيقة تحت ظروف قياسي وعلى طول موجي 540نانوميتر (Miller.,1959)

وحسب العلاقة الآتية :-

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة / مل)} = \frac{\text{الامتصاصية / الميل} \times \text{عامل التخفيف}}{\text{الوزن الجزيئي للكلوكوز} \times \text{حجم الأنزيم} \times \text{زمن الحضانة (بالدقيقة)}}$$

(Miller, 1959).

شكل(3-3) جهاز المطياف الضوئي(uv vis spectrophotometer)

3-17- تقدير كفاءة الفطريات المنتجة لانزيم اللايبيز

تم تحضير الراشح الانزيمي من خلال تلقيح وسط Tween 80 Agar(3-2-9) بالعزلات الفطرية المراد اختبار قدرتها على افراز انزيم اللايبيز من خلال نقل قرص لقاحة من المستعمرات النامية على وسط (PDA) بوساطة ثاقب فليني قطر5 ملم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 مْ+_ 2ولمدة 3 أيام اختيرت الفطريات الاكفاء في انتاج الانزيم حيث حضر الوسط الخاص بإنتاج الانزيم على 3 دوارق سعة الدورق الواحد 250 مل بواقع100 مل لكل دورق وعقمت بالمؤصدة بدرجة 121مْ وضغط 1 بار لمدة15دقيقة وبعد

التبريد أضيف للوسط قرص قطره 10 ملم من المستعمرات الفطرية النقية والنامية على وسط(PDA) والمحضر بالفقرة(3-2-1) وبعمر ثلاثة أيام اجري الاختبار على ثلاثة انواع من الفطريات اختبرت الانواع الفطرية المنتخبة لتشخيص الفطر الأكفأ في الإنتاج الإنزيمي من خلال ظروف حضانة ثابتة. حضنت الدوارق مدة 3 أيام عند درجة حرارة 30 مْ وبعد انقضاء مدة الحضانة تم استخلاص الراشح الإنزيمي عن الكتلة الحيوية.

3-18-نشاط اللاييبيز

قيس نشاط اللاييبيز بطريقه التسحسح حسب Pignède et al.,(2000) حضر المستحلب القياسي من زيت الزيتون والعلكة العربية والماء (2:1:2) بكميات مناسبة تم طحن العلكة العربية بواسطه هاون خزفي جاف ونظيف ، خلطت بشكل جيد اضيف الماء بدفعه واحده وطحن جيداً لتكوين المستحلب او كريم ابيض سميك سحب 5 مل من المستحلب و20مايكرولتر من الراشح الانزيمي مع 50ملي فوسفات وعدل الرقم الهايدروجيني 7.0(Na2HPO4-KH2PO4) قبل التحضين ثم حضن بالحاضنة الهزازه لمدة 20 دقيقة بدرجة حراره 37مْ والرج (120دورة /دقيقة) تم إيقاف التفاعل بأضافة 4 مل اسيتون- ايثانول 1:1 حجم تحتوي 2الى 3 قطرات0.09% ثيمولفثالين تم تحديد النشاط الانزيمي من خلال معايرة الحامض الدهني المنبعث من هيدروكسيد الصوديوم 50ملي من خلال التغير اللوني للمستحلب .

3-19- قياس الفعالية البايلوجية للفطريات

حضروسط اكار (MHA) مولر هنتون للبكتريا (3-2-10) ولقح بواسطة نوعين من البكتريا *Staphylococcus aurus, E.coli* النامية والجاهزة من مركز الأمين للأبحاث خلال نشر البكتريا بجميع انحاء الطبق بواسطة سواب ومن ثم تكوين ثقوب في الاكار بواسطة ثاقب فليني حجم 6 ملم على عدد العينات وبواقع مكررين لكل نوع وبعدها تمت إضافة المستخلص الفطري الخام للفطريات المنتخبة قيد الدراسة والتي اعطة امتصاصية عالية في جهاز المطياف الضوئي والقادرة على ووضعها في الحفر و على أرقام الاطباق وبعدها تنقل إلى حاضنة وبدرجة 38°م ولمدة 24 ساعه إذ قيمت أماكن تثبيط المستخلص على الاطباق الحاوية على البكتريا والنامية معاً اذ يتكون الراشح الفطري والمحضر مسبقاً وتمت إضافة قرص بقطر 10 ملم من المستعمرات (PDA) بعمر ثلاثة أيام والتي انتخبت مسبقاً وكانت ذات كفاءة عالية في انتاج الانزيم ووضعت الأقراص الفطرية في الدوارق الحاوية على ال(PDB) للفطريات المنتخبة تم تحضين الدوارق لمدة 3 أيام عند درجة حرارة 30 درجة مئوية ، بعد انقضاء فترة التحضين تم استخراج الراشح الفطري من الكتلة الحيوية واجري بعد ذلك مجموعة من التخفيفات الراشح الفطري الخام للفطريات المنتخبة تمت معالجتها مسبقًا متمثل (µL 1000/ µL100 ، و µL 1000/ µL 75 ، و µL 50

/1000 µL ، و 25 µL /1000 µL)من الراشح لكل 1 مليلتر من الماء المقطر ، وعمل control لكل طبق

(AL-Saeedi & Luti, 2018 ;Bagul & Sivakumar, 2016; Mohtar *et al*., 2014)

النتائج والمناقشة

4-1 عزل الفطريات من الاسمدة العضوية الحيوانية (الروث)

أظهرت نتائج جمع العينات من الأسمدة العضوية المتمثلة(بروث الأغنام والابقار) ولاربعة مناطق في محافظة كربلاء / العراق تمثلت بحي النصر وحي الحر وحي التحدي ومزارع العتبة الحسينية وتم الحصول على 110 عزلة جدول (4-1) اختيرت33 عزلة نقية مختلفة من الفطريات لاجل تشخيص العزلات المنتجة وذات الكفاءة العالية في انتاج الانزيمات وتطبيق محاور الدراسة

4-2 نسبة التردد والظهور للأنواع الفطرية المعزولة

4-2-1النسبة المئوية للظهور Occurrence %

أظهرت نتائج العزل للسماد العضوي المتمثل بروث الأغنام ولابقار ، اذ سجل الفطر *Aspergillus niger* نسبة ظهور 31.2%والفطر*Aspergillus fumigatus* نسبة 46.8 % ايضا ، كما سجل الفطر *Penicillium brefeldianum* نسبة ظهور بلغت 15.6% والفطر *Penicillium oxalicum* *نسبة*18.7 % ، كانت نسبة ظهور الفطر *Cephalospora sp* 15.6 % ، في حين سجل فطر للفطر *Geotrichum candidum* ادنى نسبة ظهور بلغت3.1% ، تدرجت الاجناس الفطرية المتبقية في الظهور ضمن هذه المجتمعات في الاسمدة العضوية بنسب مختلفة والمبينة بجدول (جدول4-2) اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره (Domsch *et al*., 1980) .

يعود سبب ظهور هذا الجنس في جميع العينات الى ملائمة الظروف البيئية المختلفة لنموه وتكاثره كذلك فان للفطر قدرة على تكوين أعداد كبيرة من الوحدات التكاثرية اللاجنسية ولبعض أنواعه طور جنسي وأجسام حجرية أكثر مقاومة للظروف البيئية غير الملائمة كما ان لمعظم انواعه قابلية أنزيمية عالية تساعده على استخدام مختلف المواد العضوية و البروتينية كمصادر غذائية (Flannigan & PN, 1977).

كانت الفطريات الناقصة هي الاكثر ظهوراً خلال الدراسة وقد اشارت العديد من الدراسات إلى انتشار هذه الانواع الفطرية في التربة بمختلف أنواعها , Daraj ; 1996, AL-Bader) (1989;Imran & Hassan, 2008، قد يعود السبب الى تكيف هذه الاجناس للمعيشة في هذه البيئات اضافة الى قدرتها على مقاومة الظروف القاسية مثل تكوين الوحدات التكاثرية المقاومة

مثل الاجسام الحجرية والسبورات الكلاميدية، كما يمتلك هذا الجنس قدرة عالية على انتاج السموم وبالتالي فهو ينافس ويثبط نمو الانواع الفطرية الاخرى , Mishra and Kanaujia (1973).

4-2-2النسبة المئوية للتردد % Frequency

أظهرت نتائج جدول (2-4) لحساب النسبة المئوية لتردد الانواع الفطرية تبايناً واضحاً فيما بينها، حيث سجل الفطر*A. fumigatus* اعلى نسبة تردد 13.63 % يليه الفطر *A. niger* وبنسبة9.09 % وتلاهما في النسب كل من فطر *P.oxalicum* *P .brefeldianum*. *Cephalospora sp* وبنسبة تردد (5.45 % ,4.54% ,4.54%) على التوالي ، بينما سجلت الأنواع الفطرية الأخرى *Altrnaria alternata , Cladosporium herbarium, F .circinatum*)أدني نسبة تردد وبواقع (0.90%) لكل منها.

ذكر (1998) .,Hamad في دراسة اجراها على المجتمع الفطري في الترب العراقية أن أنواع الجنس *Aspergillus* التي كانت الأكثر تردداً هي *A. niger* ، *A. fumigatus* *(Naji Kermasha,. 2020)*كما تقاربت نتائجنا مع ماذكره (Moubasher & Mazen, 1994). جاء النوعين *P .brefeldianum* ، *P. oxalicum.)*) بالمرتبة الثانية في تردد العينات الفطرية وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره (Al-Doory *et al*., 1959) .

أن الفطر*Penicillium* يظهر سيادة في أنواع مختلفة من الترب الزراعية في وسط العراق ، كما ظهر الفطر في الترب العراقية الصحراوية العالية الملوحة وهذا قد يعزى لكون الفطر*Penicillium* يمكنه النمو في تراكيز ملحية عالية (Radwan *et al*., 1984;Abo Nouh *et al*., 2021)

جدول (4-1) الأنواع الفطرية المعزولة خلال الدراسة من الاسمدة العضوية

ت	العزلات الفطرية	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات الكلي
1	*Altrnaria alternata*	1	110
2	*Altrnaria sp*	2	
3	*Aspergillus claratus*	2	
4	*Aspergillus flavus*	5	
5	*Aspergillus fumigatus*	15	
6	*Aspergillus niger*	10	
7	*Aspergillus parasitics*	6	
8	*Aspergillus tamari*	1	
9	*Aspergillus terreus*	2	
10	*Cephalospora sp*	5	
11	*Chaetomium sp.*	2	
12	*Cladosporium herbarium*	1	
13	*Cladosporium oxysporum*	2	
14	*Cladosporium sp.*	2	
15	*F .circinatum*	1	
16	*Fusarium oxusporium*	2	
17	*Fusarium sp*	3	
18	*Geotrichum candidum*	1	
19	*Monilia sp*	1	
20	*Mucor hiemalis*	1	
21	*Mucor mucedo*	3	
22	*Mucor sp*	3	
23	*P .brefeldianum*	5	
24	*Penicillium oxalicum*	6	
25	*Penicillium sp*	1	
26	*Penicllium chrysogenum*	1	
27	*Rhizopus solani*	2	
28	*Rhizopus sp*	3	
29	*Rhizopus stolonifera*	3	
30	*Aspergillus .sp1*	2	
31	*Aspergillus .sp2*	2	
32	*Trichoderma sp*	2	
33	*Aspergillus oryzae*	4	

جدول (4-2) النسبة المئوية لتردد وظهور الانواع الفطرية المعزولة خلال الدراسة

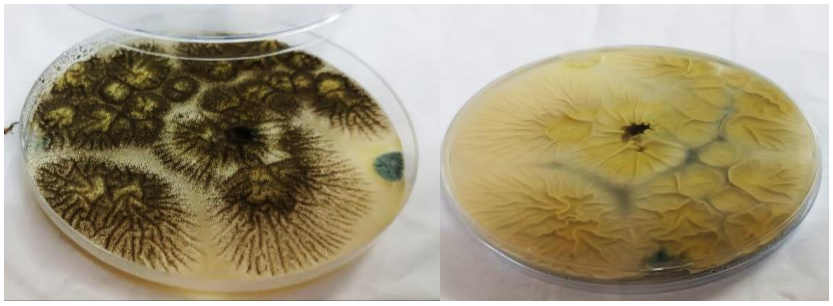
ت	الفطريات المعزولة	النسبة المئوية للتردد%	النسبة المئوية للظهور %
1	*Altrnaria alternata*	%0.90	%9.3
2	*Altrnaria sp*	%1.81	%6.2
3	*Aspergillus claratus*	%1.81	%6.2
4	*Aspergillus flavus*	%4.54	%15.6
5	*Aspergillus fumigatus*	%13.63	%46.8
6	*Aspergillus niger*	%9.09	%31.2
7	*Aspergillus parasitics*	%5.45	%18.7
8	*Aspergillus tamari*	%0.909	%6.2
9	*Aspergillus terreus*	%1.81	%6.2
10	*Cephalospora sp*	%4.54	%15.6
11	*Chaetomium sp.*	%1.81	%9.3
12	*Cladosporium herbarium*	%0.90	%6.2
13	*Cladosporium oxysporum*	%1.81	%6.2
14	*Cladosporium sp.*	%1.81	%6.2
15	*F .circinatum*	%0.90	%3.1
16	*Fusarium oxusporium*	%1.81	%6.2
17	*Fusarium sp*	%2.72	%12.5
18	*Geotrichum candidum*	%0.90	%3.1
19	*Monilia sp*	%0.90	%3.1
20	*Mucor hiemalis*	%0.90	%3.1
21	*Mucor mucedo*	%2.72	%9.3
22	*Mucor sp*	%2.72	%9.3
23	*Penicillium brefeldianum*	%4.54	%15.6
24	*Penicillium oxalicum*	%5.45	%18.7
25	*Penicillium sp*	%0.90	%12.5
26	*Penicllium chrysogenum*	%0.90	%3.1
27	*Rhizopus solani*	%1.81	% 6.2
28	*Rhizopus sp*	%2.72	%9.3
29	*Rhizopus stolonifera*	%2.72	%9.3
30	*Aspergillus*. sp_1	%1.81	%6.2
31	*Aspergillus*. sp_2	%1.81	%6.2
32	*Trichoderma sp*	%1.81	%6.2
33	*Aspergillus orzae*	%2.72	%12.5

3-4 الصفات المظهرية والمجهرية للفطريات المنتخبة والمنتجة للأنزيمات

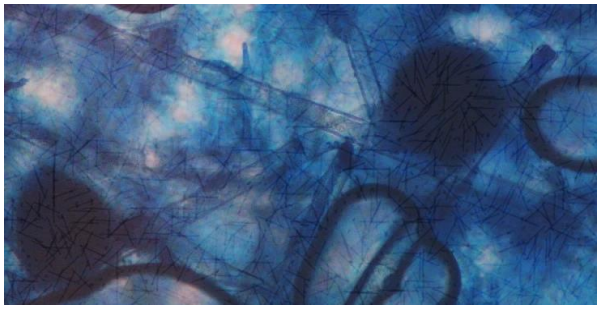
تم التعرف على العزلات الفطرية التي تم الحصول عليها من الاسمدة الحيوانية (الروث) بناءً على الخصائص المظهرية للمستعمرة والفحص المجهري تعد الخصائص والصفات المظهرية للمستعمرات الفطرية المزروعة من السمات المهمة في التشخيص التقليدي شملت الدراسة الأنواع:

1-3-4 الفطر *A. niger*

ظهر الفطر بعزلتان شخصت على انها *A. niger* امتازت مستعمرات الفطر على وسط PDA بنموات بيضاء في بداية تكوينها ثم تتحول بسرعة إلى اللون الاسود أو البني الغامق بحافة خفيفة صفراء أحيانا أما ظهر المستعمرات فقد كان عديم اللون واحيانا بلون كريمي فاتح ، تفتقر المستعمرة إلى أي افرازات على سطحها تراوحت اقطار المستعمرات على وسط PDA من (7-8) سم خلال 7 أيام حضانة برؤوس كونيدية سوداء Conidial head black تراوحت اقطار الحوامل الكونيدية Conidiophores 3مايكرون طول و1.5مايكرون عرض تكون في بداية النمو شفافة اللون وتتحول إلى اللون البني مع تقدم العمر ، الرؤوس الكونيدية Conidial heads كبيرة كروية الشكل ،حويصلية Vesicles كروية أو شبة كروية ، امتازت السلالتين بوجود متيولات Metulae شفافة اللون الى بنية كما تم ملاحظة فياليدات Phialides شفافة اللون هذه الصفات تتفق مع العديد من المصادر التصنيفية (Klich & Pitt, 1988)



(B) **(A)**

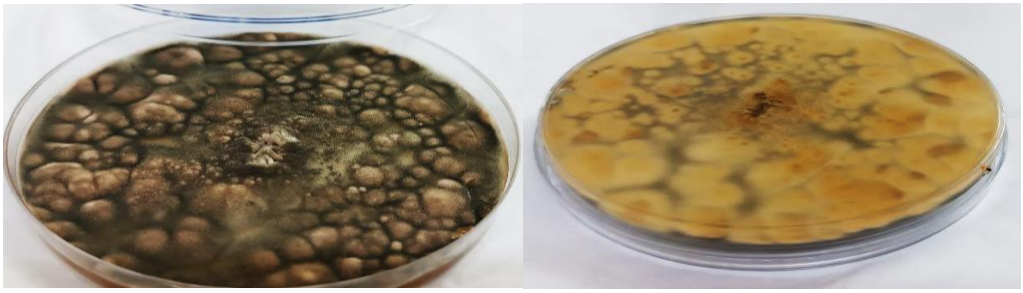


(C)

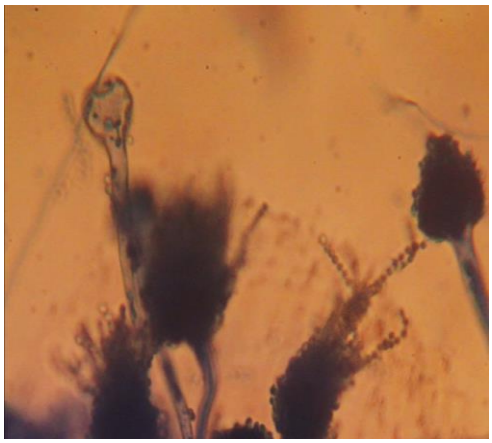
الشكل (4-1) الصفات المظهرية والمجهرية لفطر *A. niger* على وسط PDA لمدة 3-4 أيام تحضين بدرجة حرارة 25°م±2 (A) السطح العلوي للمستعمرة (B) الجهة الخلفية للطبق (C) الكونيدات التي تظهر على الخيوط الفطرية بشكل مستدير ومتبادل على الهايفات (التصوير بالمجهر الضوئي على القوة 40X)

A. fumigatus 2-3-4

تم الحصول على خمس عزلات تحمل صفات الفطر *A .fumigatus* امتازت مستعمرات الفطر*A.fumigatus* على وسط PDA بالنمو السريع إذ بلغت اقطار المستعمرات 8-8.5 سم خلال سبعة أيام ذات لون اخضر إلى اخضر رصاصي بحافات بيضاء اما الجهة الخلفية المستعمرات فقد كانت عديم اللون الحوامل الكونيدية Conuidiophores قصيرة ، غالبا خضراء اللون طولها تقريبا 300 ميكروميتر تتوسع تدريجيا إلى الأعلى حتى تمر إلى الحوصلة على شكل قارورة ، الفياليدات Phialides محمولة على الحويصلات مباشرة uniseriate ، وهي تحمل كونيدات كروية الى شبة كروية (Abdel-Sater et al., 2016).



(B) **(A)**



(C)

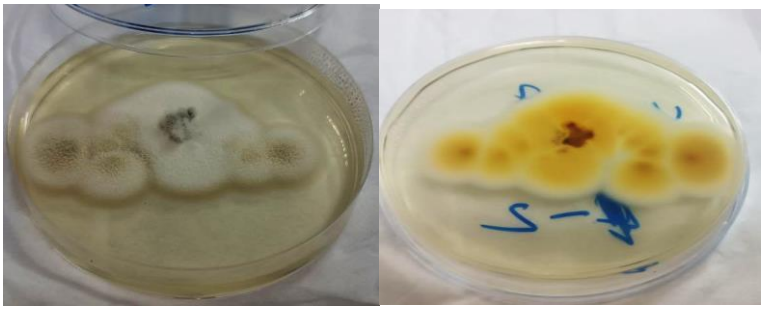
الشكل(4-2) الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر*A.fumigatus* والنامي على وسط (PDA) وبعد 3-4 أيام من التحضين على درجة حرارة 25°م±2 (A) السطح العلوي للمستعمرة (B) الجهة الخلفية للطبق (C) الحوامل الكونيدية غالبا خضراء اللون طولها تقريبا 300 ميكروميتر تتوسع تدريجيا الى الأعلى حتى تمر الى الحوصلة على شكل قارورة (التصوير بالمجهر الضوئي على القوة40X)

ينتج الفطر *A.fumigatus* الالاف من الكونيدات ذات اللون الرصاصي والاخضر والتي تصبح محمولة في الجو بسهولة ،ينمو في مدى واسع من الدرجات الحرارية (Fang & Latgé, 2018).

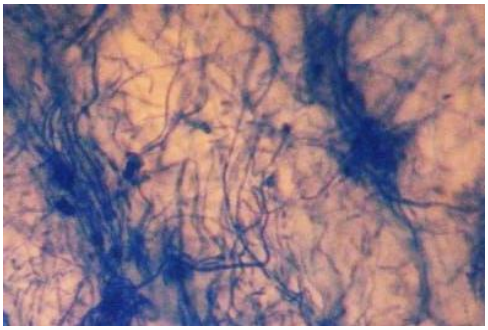
P. oxalicum-3-3-4

امتاز الفطر *P. oxalicum* بمستعمرات سريعة النمو على وسط PDA حيث بلغ اقطار المستعمرات 6-7 سم خلال سبعة أيام من التحضين وبدرجة حرارة 25°م±2 المستعمرة كانت مخملية ذات لون رصاصي مخضر وبحافات بيضاء ، السبورات Conidia كانت كثيفة بشكل كتل متراصة عند النضج ، الجهة الخلفية الطبق اعطى صبغة ذات لون برتقالي رمادي، الحوامل الكونيدية ناعمة متفرعة ذات فرشاة Penicillin نموذجية ثنائية او ثلاثية غير منتظمة asymometrical biveicillate وتحمل 3-4 ميتولات Metulae، الفياليدات متوازية ذات رقبة قصيرة، الكونيدات Conidia بيضوية هذه المواصفات توافقت مع ما جاء به Domsch *et al*., (1980)

أشار(Sabuquillo *et al*., (2006الى استخدامه ضد الفطريات الممرضة التي تنتقل عن طريق التربة مثل فطريات البياض الدقيق على الطماطة ، اول من سجل تواجده على التربة العراقية (Al-Doory *et al*., 1959)



(B) **(A)**



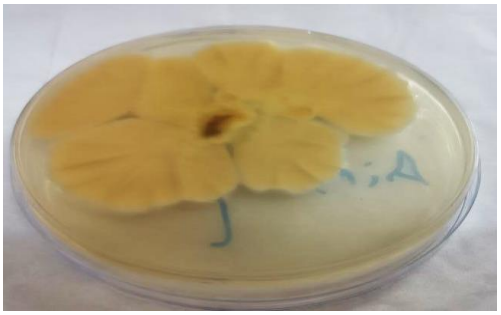
(C)

شكل(4-3) الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر *P. oxalicum* والنامي على وسط (PDA) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة 25°م±2 (A) السطح العلوي للمستعمرة (B) الجهة الخلفية للطبق (C) السبورات Conidia كانت كثيفة بشكل كتل متراصة عندما بلغت النضج و الحوامل الكونيدية ناعمة متفرعة ذات فرشاة.

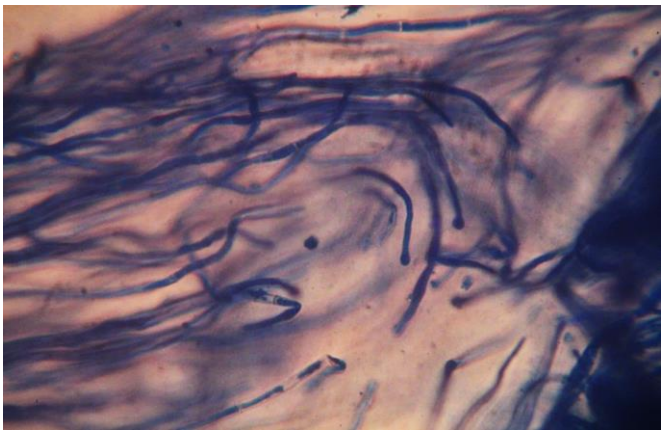
Cephaliophora sp 4-3 -4

تميز جنس *Cephaliophora* بتكوين سبورات conidiaمقسمة طوليا وعرضيا مع وجود حويصلة منتفخة تتطور من الفروع الجانبية للخيط الخضري والكونيدات ذات لون بني غامق اسطواني، امتازت مستعمرة *Cephaliophora* على وسط (PDA) باللون الأصفر المشع بحافات بيضاء ناضجة متعرجة وكانت المستعمرات كثيفة مخملية كرستالية ، ظهرت المستعمرة باللون الاصفر البرتقالي ،الهايفات واضحة بحوامل كونيدية كبيرة تحمل في أطرافها (Ampulla) مستقيمة نوعا ما ، الكونيدات صغيرة الحجم وقليلة توافقت هذه النتائج مع ما جاء به Tanabe *et al*., (1999) . جنس *Cephaliophora* شائع على صوف الأغنام وعلى روث الحيوانات فضلاً عن شيوعه في التربة (Barron *et al*., 1990).

(A)



(B)



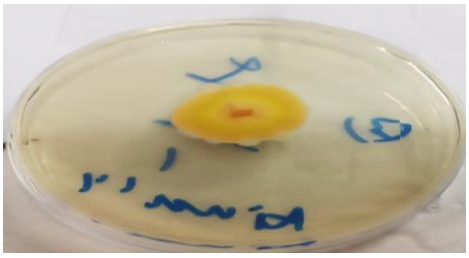
(C)

الشكل(4-4) الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر*Cephaliophora* والنامي على وسط (PDA) وبعد4-3 أيام من التحضين على درجة حرارة 25 ˚م±2 (A) السطح العلوي للمستعمرة (B) الجهة الخلفية للطبق (C) الخيوط الفطرية والحوامل الكونيدية والكونيدات ، (التصوير بالمجهر الضوئي على القوةX40).

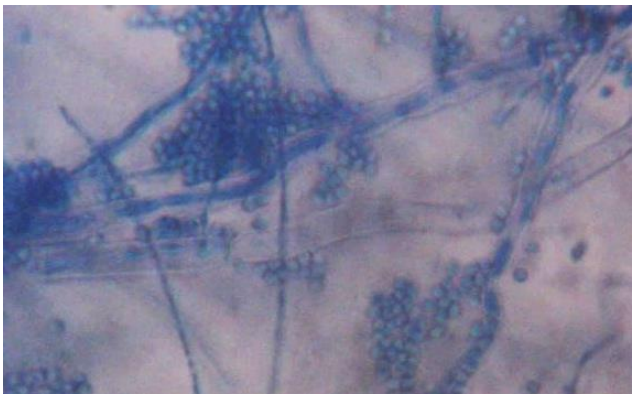
P. brefeldianum -5-3-4

امتازت مستعمرة الفطر *P. brefeldianum* بالنمو البطيء على وسط (PDA) حيث بلغ قطر المستعمرة (2.5-8.5) سم بعد سبع ايام من الزرع بدرجة حرارة 27م بمستعمرة مخملية صفراء باهتة وحافاتها بيضاء مجعدة ،كما كان السطح الخلفي للطبق اصفر ناضج بتدرجات برتقالية أحيانا في الحافات ، الحوامل الكونيدية طويلة بفرشاة غير متناظرة Asymmetric penicilli ثلاثية التفرع وأحيانا رباعية مع وجود ميتولات قصيرة metulae وفياليدات phialides بروؤس متباعدة تحمل الكونيدات conidia كروية او شبة كروية تمتد الكونيدات الى اعلى بشكل سلاسل متباعدة وغير منتظمة . توافقت هذه النتائج مع ما جاء به (Wang & Kong, 2000(Houbraken *et al*., 2012 ; يوجد الفطر *P. brefeldianum* في التربة ، وفي الغبار المتطاير ،كما اشارت العديد من الدراسات الى عزلة من الأشجار المعمرة كفطر داخلي (Endophytic fungi) (Bai *et al*., 2021).

(A)



(B)



(C)

الشكل(4-5) الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر*P. brefeldianum* والنامي على وسط (PDA) وبعد 7 أيام من التحضين على درجة حرارة 25 °م±2 (A) السطح العلوي للمستعمرة (B) الجهة الخلفية للطبق (C) الحوامل الكونيدية ، ميتولات قصيرة (Metulae) ،فياليدات (Phialides) ،الكونيدات (Conidia).

4-4-الكشف عن قدرة الفطريات المعزولة على انتاج الانزيمات

4-4-1-انزيم السليوليز Cellulase

أظهرت نتائج الدراسة التي أجريت على نشاط تحلل السليلوز للفطريات المعزولة من الاسمدة الحيوانية (الروث)على وسط أكار-سليلوز جدول (4-3) أن ثلاثة أنواع من الفطريات المعزولة لديها قدرة على إنتاج إنزيم السليلوز بكفاءة عالية والانواع الثلاثة تعود الى الجنس *Aspergillus* وهي *A. niger*, *A.* sp, *A. fumigatus* اظهر الفطر *A.niger* كفاءة عالية في انتاج الانزيم حيث بلغ قطر الهالة الشفافة حول المستعمرة الفطرية 20.94 ملم ، بينما كانت الهالة الشفافة حول المستعمرة الفطر *A. sp* 16.43ملم وتلاهما في الإنتاج الفطر4*A. fumigatus* بقطر هالة شفافة بلغت 14.68 ملم شكل (4-1) . انتجت بعض الأنواع الأخرى الأنزيم ولكن بكفاءة قليلة تدرجت بهالة شفافة بقطر 9.8 ملم سجلها الفطر *Penicillium* sp إلى أدنى تسجيل كان للفطر *Geotrichum candidum* بقطر هالة بلغ 2.87 ملم .

شكل(4-6) فعالية الفطريات في تحليل السيليلوز على وسط أكار السيليلوز عند درجة حرارة 28 °م بعد ثلاثة ايام من الحضن.

لم تظهر بعض الانواع الفطرية اي انتاجية للانزيم متمثلة بالانواع *Altrnaria alternata* ، *Altrnaria* sp. ، *Aspergillus tamari* ، *Chaetomium* sp. *Cladosporium sp* ,*Cladosporium oxysporum Cladosporium herbarium*, *Monilia sp* , *Fusarium sp* *Fusarium oxusporium*, *F .circinatum*, *Penicllium chrysogenum* . ذكر(1980) Aunstrap من أن معظم الفطريات الحقيقية لديها القدرة على تكسير السليلوز الطبيعي لغرض النمو وديمومة الحياة، عن طريق أنتاج الأنزيمات المحللة للسيليلوز ، تتواجد في الطبيعة العديد من الفطريات التي لها القدرة على تحليل السيليلوز البلوري واهمها*Chaetomium* , *Chrysporium lignorum* , *T . lignorum* *T. koningii* ,. *P*, *thermophile* *verrucosum* *Trichoderma viride*) Enari *et al*., 1980 Fogarty, 1994)إن أحد الاسباب الرئيسية لتواجد هذه الفطريات في

الاسمدة العضوية التي تحتوي على ألياف السليلوز بكميات كثيرة هو قدرتها على انتاج انزيم السليوليز يعد السليلوز المكون الرئيسي للنباتات التي تتغذى عليها (Mandels *et al*., 1976).

قد يعود سبب عدم قدرة بعض العزلات على انتاج انزيم السليوليز لعدة أسباب ، من بينها عدم كفاية فترة الحضانة لانتاجه ، أو عدم ملائمة درجة الحرارة أو د رجة حموضة الوسط لهذه العزلات أو قد تكون كمية اللقاح أو نسبة المخلف السليلوزي غير كافية (Jecu, 2000) . ذكر Egorov *et al* (1983) إن تركيز المادة العضوية في الوسط له تاثير كبير على انتاج الانزيمات فالتراكيز القليلة تكون غير كافية على انتاج الانزيم بينما تثبط التراكيز العالية الانتاجية في حين ان التراكيز المثلى هي التي تعطي افضل انتاج .

2-4-4 انزيم البروتييز Protease

بينت نتائج اختبار قابلية الفطريات المعزولة من الأسمدة الحيوانية(الروث) على انتاج انزيم البروتييز وبدرجة حرارة 28°م ولمدة(3) أيام تحضين جدول (4-4) ، ان جنس *Aspergillus* كانت له قدرة عالية على انتاج الانزيم على وسط اكار الحليب المقشود ومتمثلة بالأنواع *A. niger* ، *A. fumigatus2* ، *A. fumigatus1*، حيث كانت قطر الهالة الشفافة أكبر من (15 ملم) شكل (4-6) ،بينما كانت الأنواع المتبقية متفاوتة الشدة الى غير منتجة . أظهرت دراسة قام بها (Jasim *et al*., n.d.) عن قدرة الفطر*Aspergillus* على انتاج انزيم البروتييز بواسطة الأنواع الفطرية *A. niger* , *A. flavus* , *A. oryzae*عند نموها في وسطين مختلفين أكد Valentin (2003). على مهاجمة الفطريات للجلود كونها مادة عضوية تدخل الدهون والكربوهيدرات والبروتينات في تركيبها .كما استطاع (Ichishima *et al* (1973من أنتاج أنزيم البروتييز من الفطر *A. niger* باستخدام مزيج من فول الصويا ونخالة الحنطة كوسط للإنتاج ، قام Souza *et al*., (2015) باستخدام عصير التمر في انتاج أنزيم البروتييز من الفطر *A. niger* ،وقد ذكر Zghair (2019).أن الفطر *A. niger* كان الأكثر قدرة في أنتاج أنزيم البروتييز على وسط آكار الكازائين الأرجواني لذلك تم استخدامه لتنميته على وسط التخمرات الصلبة (نخالة الحنطة ، الذرة الصفراء) ومن ثم تنقية الأنزيم المنتج .

(شكل4-7) تحلل البروتين على وسط اكار الحليب المقشود بفعل الفطريات

جدول (4-3): تحلل السيليلوز بواسطة الفطريات على وسط اكار السيليلوز وبدرجة حرارة 28 °م ولمدة تحضين 3 أيام

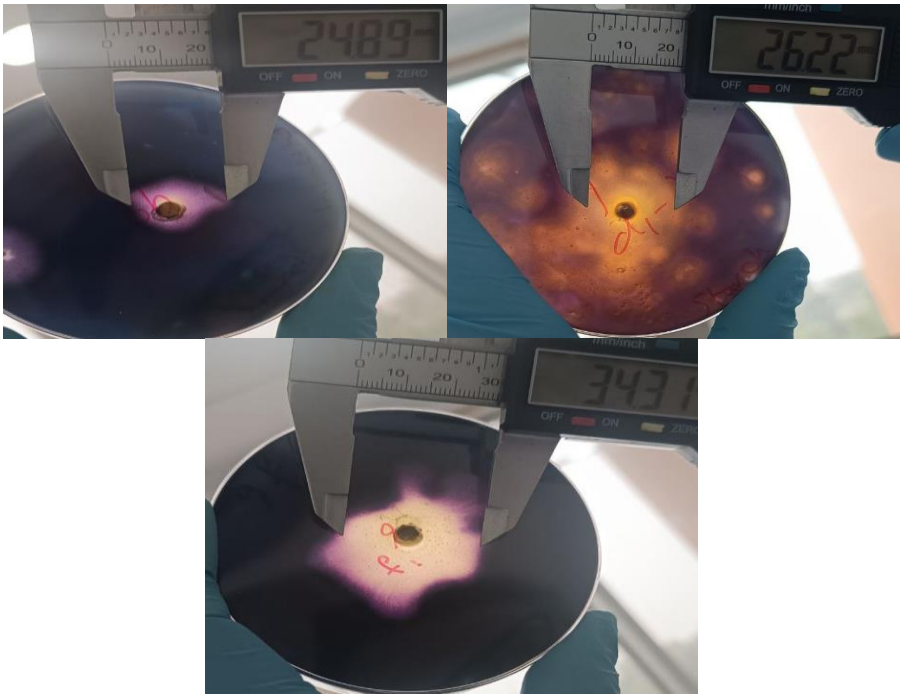
ت	العزلات الفطرية	قطر الهالة الشفافة | ملم
1	*Altrnaria alternata*	0
2	*Altrnaria sp*	0
3	*Aspergillus clavatus*	4.5
4	*Aspergillus flavus*	9.6
5	*Aspergillus fumigatus*	14.68
6	*Aspergillus niger*	20.94
7	*Aspergillus parasitics*	4.87
8	*Aspergillus tamari*	0
9	*Aspergillus terreus*	3.44
10	*Cephalospora sp*	6.66
11	*Chaetomium sp.*	0
12	*Cladosporium herbarium*	0
13	*Cladosporium oxysporum*	0
14	*Cladosporium sp.*	0
15	*F .circinatum*	0
16	*Fusarium oxusporium*	0
17	*Fusarium sp*	0
18	*Geotrichum candidum*	2.87
19	*Monilia sp*	0
20	*Mucor hiemalis*	5.88
21	*Mucor mucedo*	2.99
22	*Mucor sp*	4.1
23	*P .brefeldianum*	7.45
24	*Penicillium oxalicum*	7.91
25	*Penicillium sp*	9.8
26	*Penicllium chrysogenum*	0
27	*Rhizopus solani*	9.5
28	*Rhizopus sp*	8
29	*Rhizopus stolonifera*	6.3
30	*Aspergillus* .sp1	16.43
31	*Aspergillu* .sp2	5.7
32	*Trichoderma sp*	3.59
33	*Aspergillus oryzae*	0

جدول (4-4): تحلل البروتين بواسطة الفطريات على وسط اكار الحليب المقشود وبدرجة حراره 28 °م ولمدة تحضين 3 أيام

ت	العزلات الفطرية	قطر الهالة الشفافة | ملم
1	*Altrnaria alternata*	0
2	*Altrnaria sp*	0
3	*Aspergillus clavatus*	0
4	*Aspergillus flavus*	9.40
5	*Aspergillus fumigatus1, A.fumigatus 2*	24.96-18.29
6	*Aspergillus niger1*	26.17
7	*Aspergillus parasitics*	8.60
8	*Aspergillus tamari*	0
9	*Aspergillus terreus*	0
10	*Cephalospora sp*	17.87
11	*Chaetomium sp.*	0
12	*Cladosporium herbarium*	0
13	*Cladosporium oxysporum*	0
14	*Cladosporium sp.*	0
15	*F .circinatum*	0
16	*Fusarium oxusporium*	0
17	*Fusarium sp*	0
18	*Geotrichum candidum*	0
19	*Monilia sp*	0
20	*Mucor hiemalis*	0
21	*Mucor mucedo*	0
22	*Mucor sp*	0
23	*P .brefeldianum*	15.89
24	*Penicillium oxalicum*	17.73
25	*Penicillium sp*	0
26	*Penicllium chrysogenum*	0
27	*Rhizopus solani*	0
28	*Rhizopus sp*	0
29	*Rhizopus stolonifera*	0
30	*Aspergillus* .sp1	0
31	*Aspergillus* .sp2	0
32	*Trichoderma sp*	0
33	*Aspergillus oryzae*	0

4-4-3-الاميليز

بينت نتائج اختبار فاعلية تحلل الأميليز للفطريات المعزولة من الاسمدة الحيوانية (الروث الأغنام والابقار) للمستعمرات الفطرية (الشكل4-6) ، بينما لم تتمكن اغلب الأنواع من انتاج الانزيم ، وكانت الانتاجية قليلة جدا لبعض الانواع جدول (4-5). لقد كان للفطر *Penicillium* الدور الأكبر في انتاج انزيم الاميليز عند اختبار انتاجية الانزيم على وسط اكار النشأ حيث بلغت إنتاجية فطر*P. brefeldianum* بقطر هالة34.31 ملم يليه النوع *P. oxalicum* بقطر هالة بلغ 26.22 ملم وتلاهما الفطر*Cephaliophora sp* بقطر هالة بلغ 24.89 ملم. قد يكون وجود هذه الفطريات في الاسمدة العضوية بسبب وجود النشا، وهو أحد المواد التي تتكون أوراق وسيقان وأجزاء أخرى من النباتات، وبما أن النشا مركب معقد من الجلوكوز ، فهناك بعض الفطريات المتخصصة في تحللها والتغذية على مكوناتها من خلال إفراز إنزيماتها. (Sasaki *et al*., 1986;Van Der Maarel *et al*., 2002)



Penicillium brefeldianum,Penicillium oxalicum,Cephaliophora sp

شكل(4-8) الفطريات الشديدة الفعالية في انتاج انزيم الاميليز على وسط اكار النشا النقي عند درجة حرارة 28°م وتحضين لمدة 3 أيام

جدول(4-5) تحلل الأمليز بفعل الفطريات على وسط النشأ بدرجة 28 مْ لمدة تحضين 3 أيام

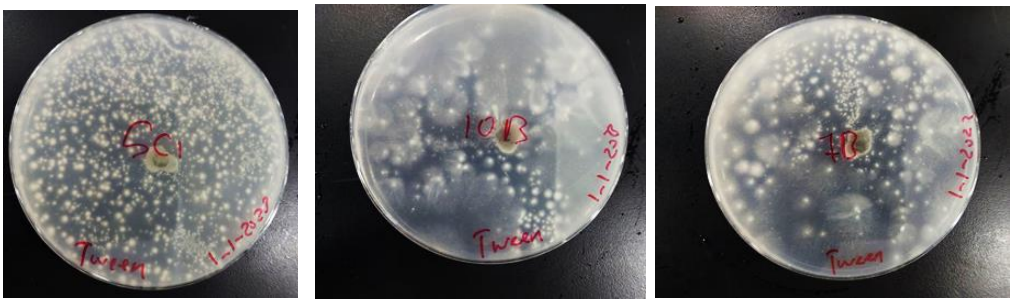
ت	العزلات الفطرية	قطر الهالة الشفافة | ملم
1	*Altrnaria alternata*	9.79
2	*Altrnaria sp*	0
3	*Aspergillus clavatus*	0
4	*Aspergillus flavus*	7.92
5	*Aspergillus fumigatus1, A.fumigatus 2*	0
6	*Aspergillus niger1*	21.08
7	*Aspergillus parasitics*	0
8	*Aspergillus tamari*	0
9	*Aspergillus terreus*	0
10	*Cephalosphora sp*	24.89
11	*Chaetomium sp.*	0
12	*Cladosporium herbarium*	0
13	*Cladosporium oxysporum*	0
14	*Cladosporium sp.*	11
15	*F .circinatum*	0
16	*Fusarium oxusporium*	0
17	*Fusarium sp*	0
18	*Geotrichum candidum*	0
19	*Monilia sp*	0
20	*Mucor hiemalis*	0
21	*Mucor mucedo*	0
22	*Mucor sp*	0
23	*P .brefeldianum*	34.31
24	*Penicillium oxalicum*	26.22
25	*Penicillium sp*	0
26	*Penicllium chrysogenum*	0
27	*Rhizopus solani*	16.18
28	*Rhizopus sp*	0
29	*Rhizopus stolonifera*	0
30	*Aspergillus* .sp1	16.36
31	*Aspergillus* .sp2	0
32	*Trichoderma sp*	0
33	*Aspergillus oryzae*	0

4-4-4- اللايبيز

بينت نتائج اختبار قابلية الفطريات المعزولة من الاسمدة الحيوانية(روث الاغنام والابقار) على انتاج انزيم اللايبيز إن لبعض الانواع قدرة عالية على انتاج الانزيم كان للجنس *Apergillus* الدور الاكبر في الانتاجية تمثلت بثلاثة انواع هي,*A. niger A. fumigatus3* *A. fumigatus*, 5 اشار Sumathy *et al*., (2012) ، الى قدرة الفطريات *Aspergillus* و *Fusarium* و *Geotrichum* على انتاج انزيم اللايبيز ، جائت نتائجنا متقاربة مع ماجاء به (Bramono *et al*., 2006 ;Yenişehirli *et al*., 2010)حول قابلية بعض الفطريات المدروسة على افراز انزيم اللايبيز ، لم تتمكن بقية الأنواع من انتاج الانزيم .

جدول :(4-6) تحلل اللايبيز بفعل الفطريات على وسط اللايبيز بدرجة 28 مْ لمدة حضن 3 أيام

الأنواع الفطريات المنتجة اللايبيز	الناتج
A.s fumigatus3	تكون راسب أبيض مرئي حول المستعمرة
A. fumigatus5	ظهور راسب ابيض مرئي حول المستعمرة
A. niger	تكون راسب أبيض مرئي حول المستعمرة

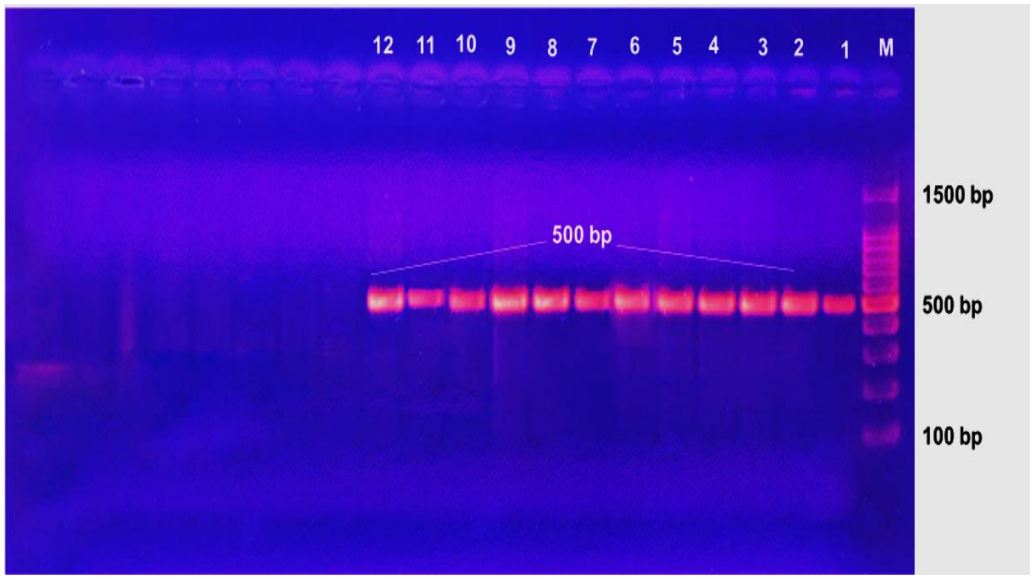


الشكل(4-9) فعالية الفطريات في انتاج انزيم اللايبيزعلى وسط اللايبيز النقي عند درجة حرارة 28°م بعد 3 ايام تحضين

4-5-التشخيص الجزيئي

4-5-1 اختبار الـ PCR

أظهرت النتائج أن الأحجام الجزيئية مختلفة لمنطقة ITS للأنواع الفطرية المختارة. فضلاً عن ذلك ، تم عرض منتجات PCR لهذه العزلات شكل (4-10) , جدول(4-7). تم استخدام زوج تمهيدي لنفس العينة (ITS1-ITS4) وتم استهداف مناطق ITS. للفطريات بحسب (Bellemain *et l*., 2010)



شكل (4-10) Agarose gel electrophoresis لمنتج PCR في مناطق ITS بواسطة البادئات الزوجية (ITS1-ITS4) من أنواع الفطريات (1.5 غم من هلام Agarose gel 80 فولت و58امبير ولمدة 75دقيقة),DNA ladder

4-5-2 تحليل نواتج ال PCR

تم إجراء التحليل الوراثي لـ (10) عزلة من أنواع الفطريات المختلفة بما في ذلك تحليل الحمض النووي (DNA) لمناطق ITS ، وقد ثبت أنه يوفر معلومات مفيدة من الناحية التصنيفية ، لتحديد ما إذا كانت تسلسلات ITS يمكن أن تحدد بدقة العلاقات بين الفطريات المتنوعة. كشفت طوبولوجيا أشجار ITS في أوجه التشابه أيضًا عن اختلافات مع بعض الأنواع الفطرية(Munjal *et al.*, 2018) . اظهرت النتائج أن العزلات المختارة مطابقة للعزلات العالمية.

4-5-3 تحليل Sequence

تم إرسال عشر عينات من منتجات PCR المضخمة (forward and reverse strand) إلى مختبرMacrogen Lab وتمت مقارنة تسلسلاتنا بالتسلسلات العالمية المرجعية في Gen Bankللمركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية(NCBI) .

تم استلام التسلسلات عبر الإنترنت ، مقارنة بقاعدة بيانات NCBI باستخدام برنامج Blast، من خلال برنامج (sequin software). أدت البادئات المستخدمة في الفطريات والخمائر (ITS1-ITS4) ، كما في الملاحق ، إلى تضخيم منطقة ITS لـ 10عينة. تم استخدام برنامج NCBI blast software عبر الإنترنت لمقارنة كل من العينات التي تم إنشاؤها بالتسلسل بقاعدة بياناتNCBI .

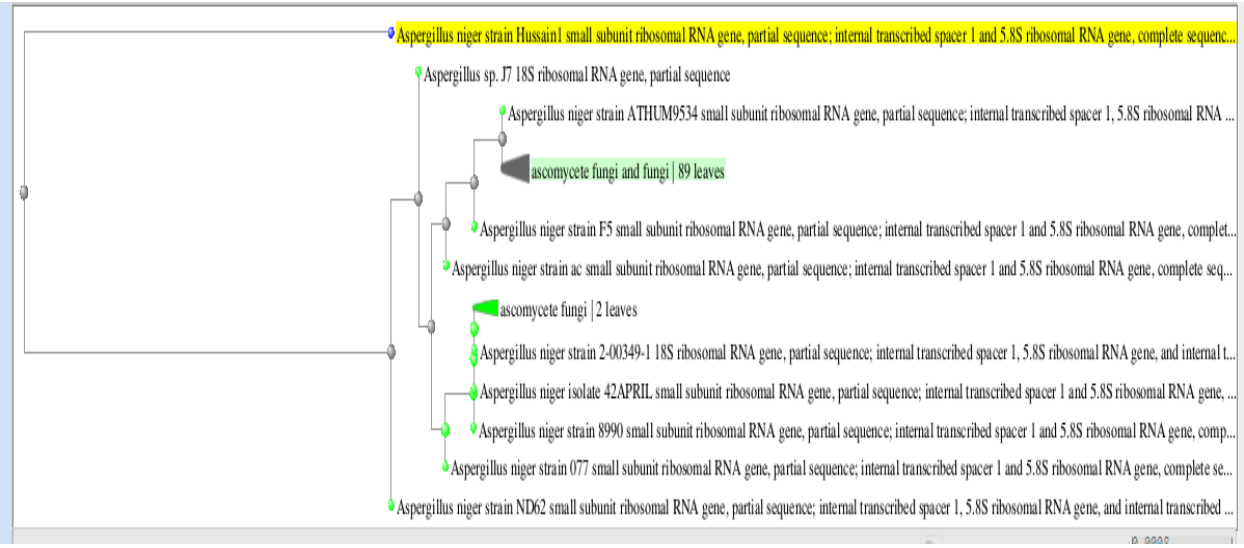
جدول (4-7) يبين أنواع الفطريات التي سجلت وأرقام البنك الجيني الخاصة بها

No of samples	Type of fungi	fungi Record Isolate
1	*Aspergillus niger1*	OR234859
2	*Penicillium brefeldianum*	OR243742
3	*Aspergillus fumigatus1*	OR243745
4	*Aspergillus fumigatus2*	OR243749
5	*Aspergillus fumigatus 3*	OR243753
6	*Cephaliophora* sp.	OR243755
7	*Aspergillus fumigatus4*	OR243757
8	*Aspergillus fumigatus5*	OR243759
9	*Penicillium oxalicum*	OR243760
10	*Aspergillus niger2*	OR243776

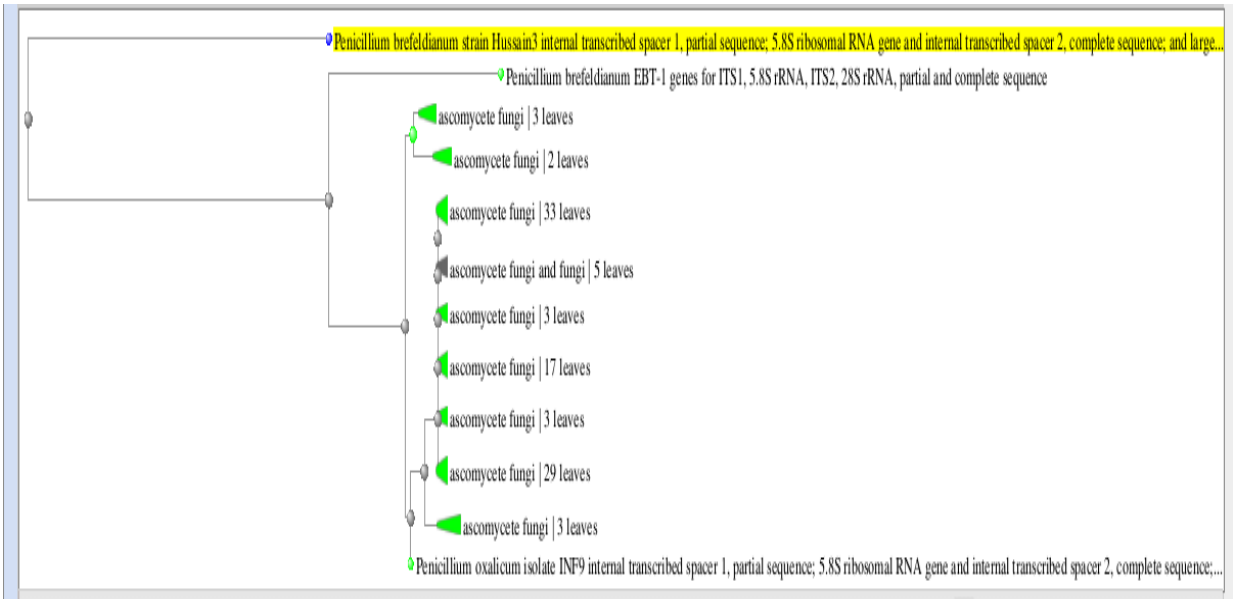
4-5-4 تحليل الحمض النووي وتسلسل قاعدة النيتروجين

أظهرت النتائج أن جميع الفطريات تفاعلت مع جينوماتها من خلال البادئات وتطابقت مع الفطريات المقابلة لها بنسبة 99-100%. اول تسجيل لفطريات التسميد لهذه الانواع هو مدينة كربلاء المقدسة- العراق كما مبين في معلومات التسجيل شكل (4-12) ومن خلال دراسات التقارب والتشابه بين الفطريات المسجلة تم تحديد سلالة العزلات حسب تسلسل العزلة الأولى *A. niger*1 مع الكود التسلسلي ، or234859.1، العزلة الثانية، *p. brefeldianum*، بالرمز التسلسلي، or243742.1، العزلة الثالثة، *A. fumigatus* 1، بالرمز التسلسلي، or243745.1، المعزول الرابع، *A. fumigatus*2، مع الرمز التسلسل، or243749.1 ، والعزلة الخامسة ،*A.fumigatus* 3، الرمز التسلسلي or243753.1 ، العزلة السادسة ، *Cephaliophora* sp. ، مع رمز التسلسل or 243755.1، العزلة السابعة ، *A. fumigatus*4، رمز التسلسل or 243757.1، عزل الثامن ، *P. Oxalicum*، برمز التسلسل

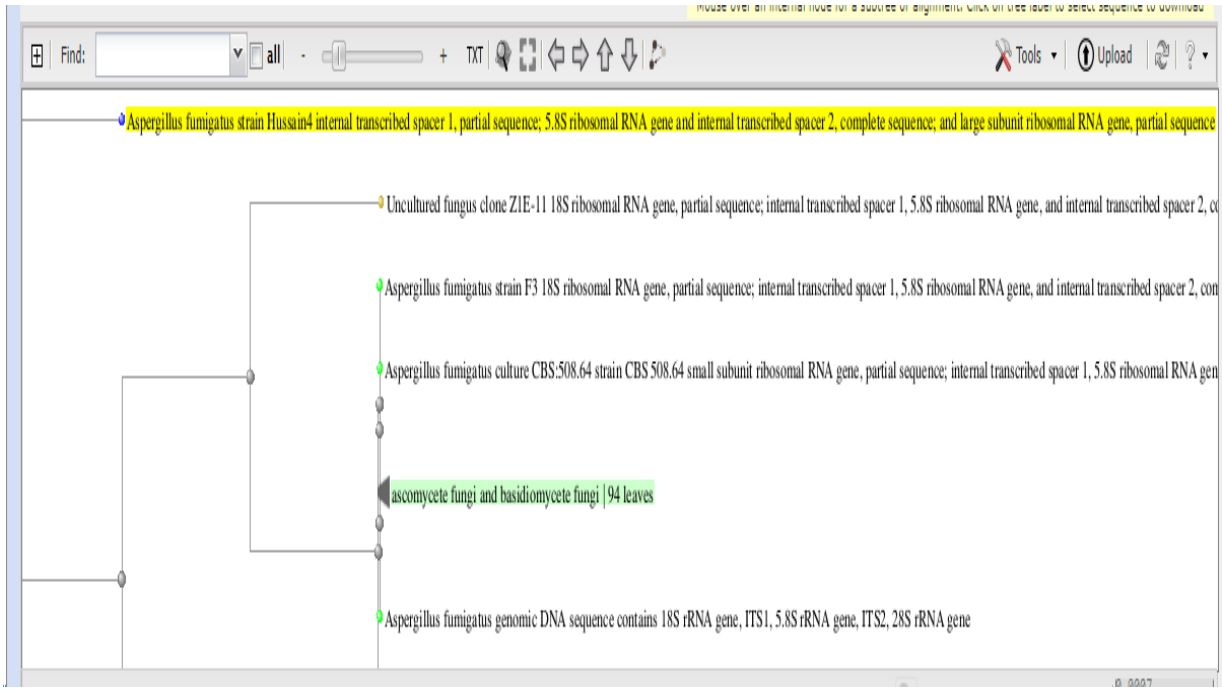
or 243760، عزل التاسع *A . niger*2الرمز التسلسلي or243776.1. العزلة العاشرة 5 *A.fumigatus* رمز التسلسل or243759.1 وأيضا كما مبين في الجدول (4-7) تم إرسال منتجات الجينات المضخمة إلى شركة ماكروجين الكورية لتحديد تسلسل القواعد النيتروجينية، وتمت الموافقة على تلك التسلسلات عن طريق مقارنتها بالمعلومات المتوفرة حول هذا الجين على موقع المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov) وفق برنامجBlast nucleotide ، ومن أجل التعرف على العزلة المختارة، تم تسجيل تسلسل القواعد النيتروجينية، ورسم شجرة النشوء والتطور بعد مطابقتها مع السلالات ذات الصلة الوثيقة في NCBI وبالاعتماد على برنامج عرض Blast Tree. وأظهرت نتائج العزلات تطابقاً بنسبة 100% مع العزلات العالمية. ويعتبر أول تسجيل للعزلات في بنك الجيني كما مبين في(فصل الملاحق)، وتم إعطاء أرقام خاصة كما هو موضح أعلاه في تسلسل العزلات. على الرغم من أن التشخيص المظهري يتم في مجموعات أصغر قبل البدء في استخدام الطرق والتقنيات الأخرى في التشخيص، إلا أن العديد من المشاكل تصاحب التشخيص المظهري للفطريات، وهنا يحتاج الباحث أو المسؤول عن عملية التشخيص، وخاصة الأنواع الفطرية المتقاربة في التشابه مثل *fusarium* و *Aspergillus spp* (Faria *et al.*, 2011).ساهمت طريقة التشخيص المعتمدة على التباين في تسلسل الحمض النووي و الفواصل المكتوب الداخلي في كفاءة عالية في تشخيص العديد من العزلات الفطرية (Alhussaini *et al.*, 2016) كما في الأشكال ، من الشكل (4-11) إلى الشكل(4-20)



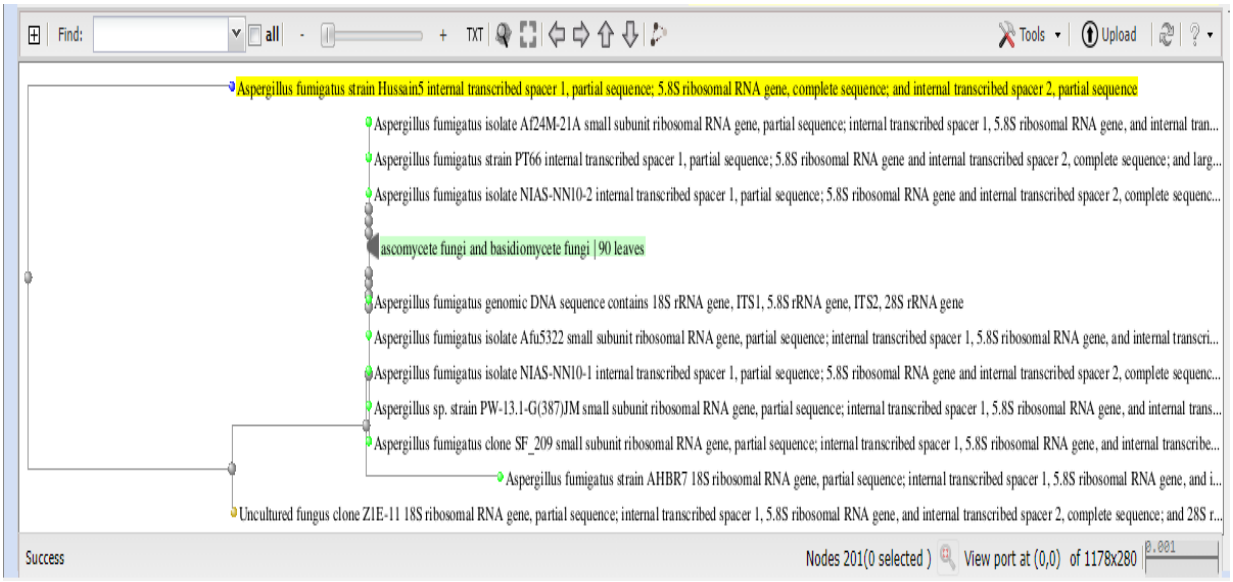
الشكل(4-11) الشجرة الجينية لـ *A. niger* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطر الذي تم الحصول عليه من مستودع بيانات GenBank



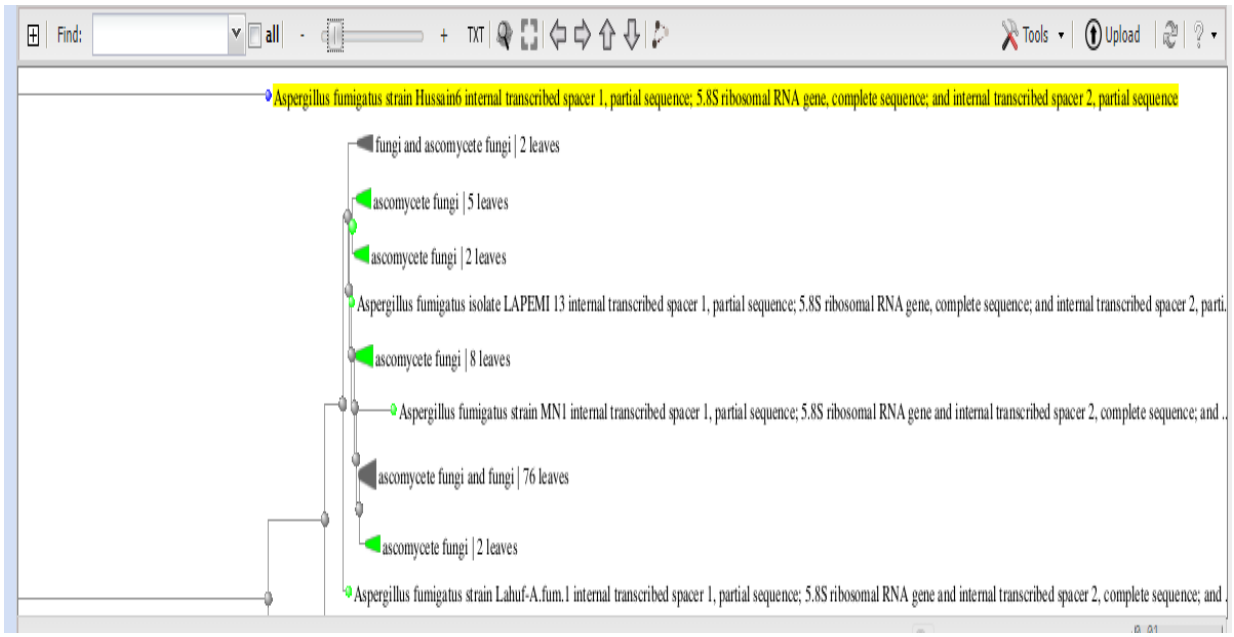
الشكل(4-12) الشجرة الوراثية *P.brefeldianum* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.



الشكل(4-13)شجرة النشوء والتطور *A. fumigatus* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بياناتGenBank .

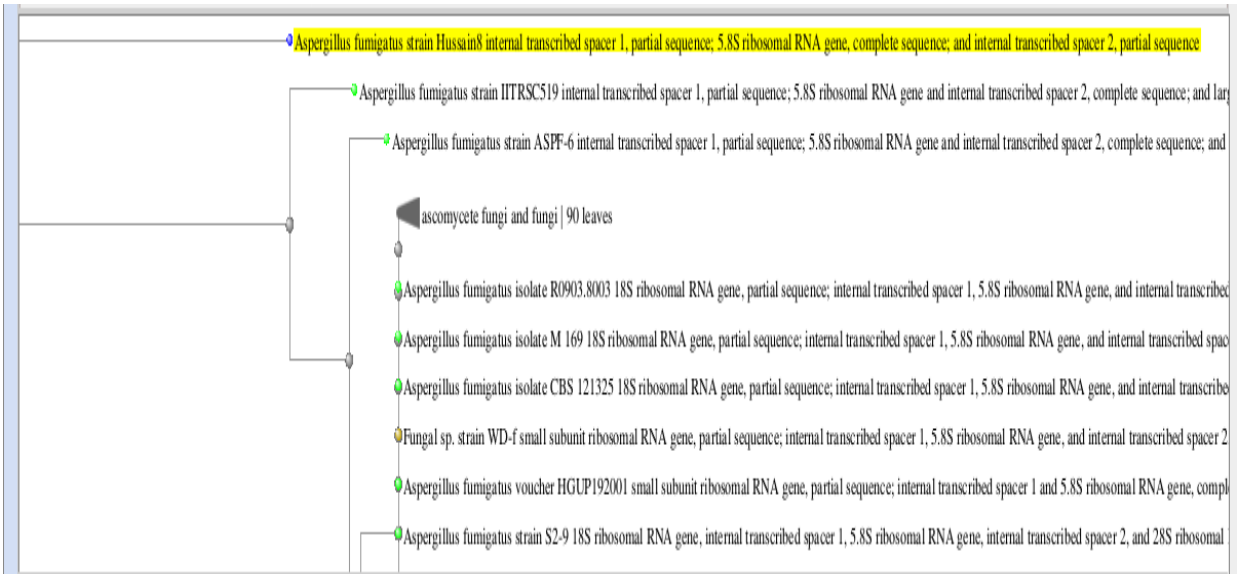


الشكل(4-14). شجرة النشوء والتطور *A. fumigatus* 2 (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.

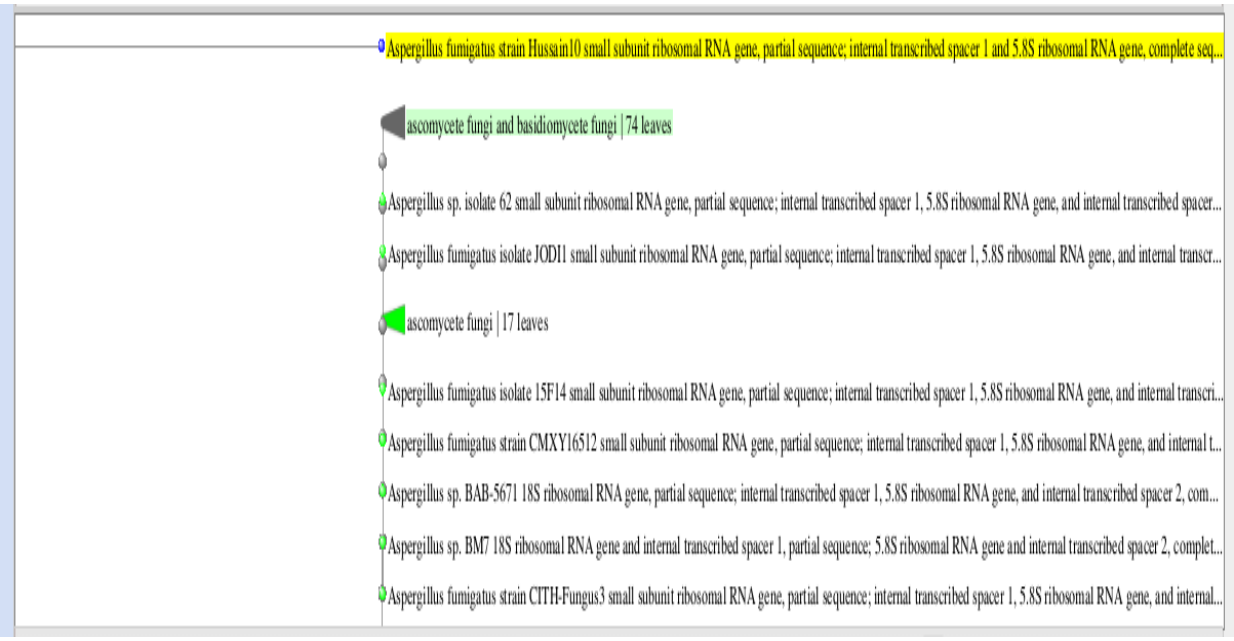


الشكل (4-15)شجرة النشوء والتطور *A. fumigatus 3* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA بالإضافة إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank

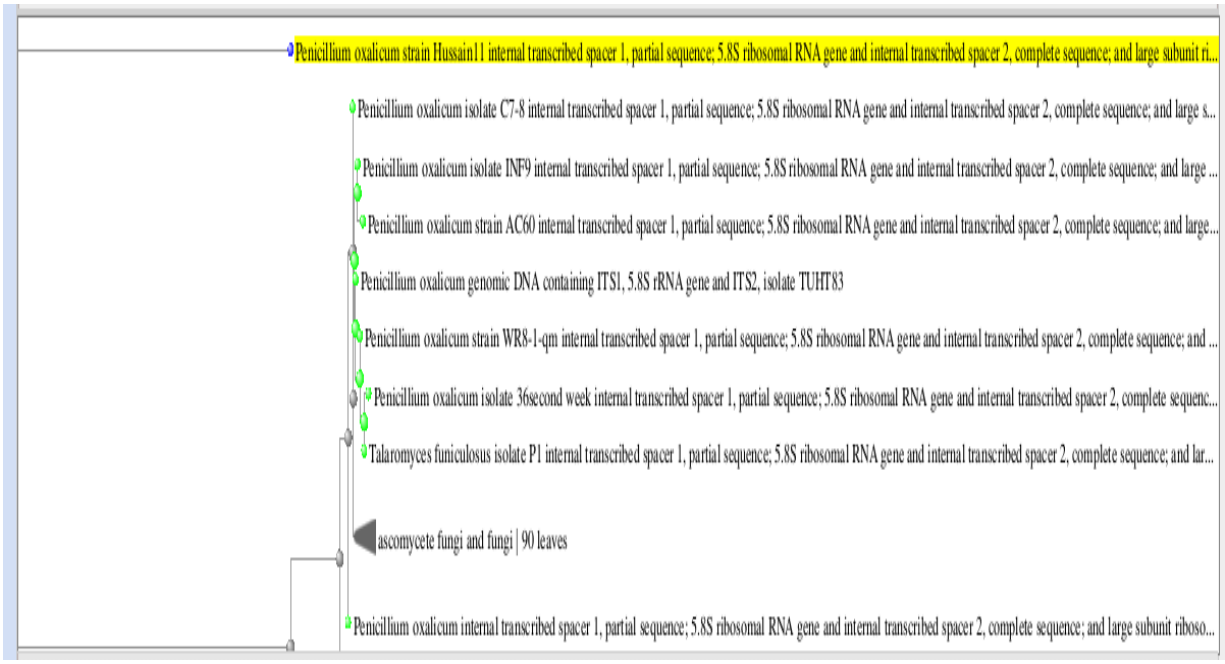
الشكل(4-16) شجرة والتطور .*Cephaliophora* Sp و (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة rDNA فضلاً عن تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.



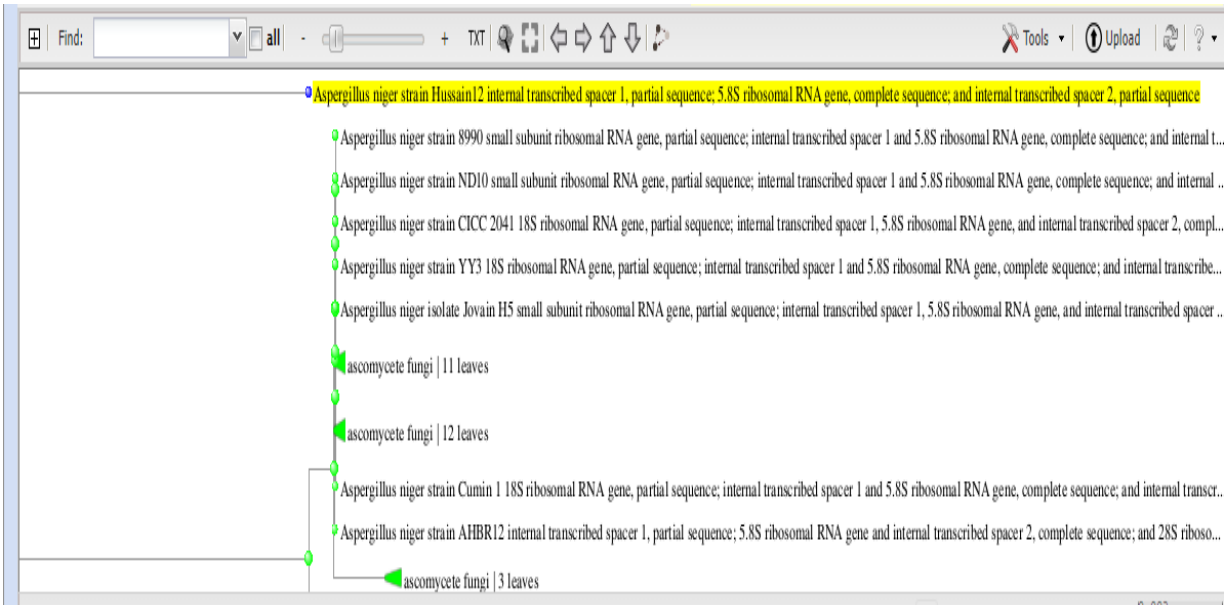
الشكل (4-17). شجرة النشوء والتطور 4 *A.fumigatus* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA فضلاً عن تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.



الشكل (4-18). شجرة النشوء والتطور 5 *A. fumigatus* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA فضلاً عن إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.



الشكل (4-19) شجرة النشوء والتطور *P. Oxalicum* (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة rDNA فضلاً عنإلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطريات التي تم الحصول عليها من مستودع بيانات GenBank.



الشكل(4-20)الشجرة الجينية ل *A. niger* 2 (المميزة باللون الأصفر) بناءً على تسلسل قواعدها النيتروجينية في منطقة ITS-rDNA فضلاً عن إلى تسلسل السلالات العالمية المعروفة لنفس الفطر الذي تم الحصول عليه من مستودع بيانات GenBank.

6-4 تقدير كفاءة الانزيمات المنتجة من الانواع الفطرية المنتخبة قيد الدراسة

1-6-4 فعالية انزيم السليوليز

اعطى الفطر *A. niger* اعلى فعالية انزيمية بلغت 0.321 مايكرومول ، تلاه الفطر *A. fumigatus1* بفعالية بلغت 0.298 مايكرومول وتلاهما الفطر *A. fumigatus2* بفعالية قدرها 0.261 مايكرومول جدول (4-9) اشارت العديد من الدراسات ان للفطر *Aspergillus* قدرة وكفاءة عالية على انتاج انزيم السيلوليز وتحليل واستغلال العديد من المخلفات السليلوزية في الحصول على غذائه ، استخدم العبيدي وآخرون (1985) عصير التمر وبدرجة 28 °م للحصول على اعلى فعالية لانزيم السيلوليزمن الفطر *A.niger* 1 ، وكان الفطر *A. niger* الفطر الأكفأ في انتاج الانزيم عند استخدام نوى التمر كمصدر سليلوزي (العكيدي واخرون ، 1985). تمتاز الفطريات بدور مهم في الطبيعة في تحليل السيليوليز، لذا فأنزيم السليوليز له دور مهم في النشاط الحيوي للفطريات ويؤثر بشكل واضح على انتشارها في بيئات خاصة كمزارع العرهون وأكداس الخشب وأكوام التبن وأعشاش الطيور وروث الحيوانات التي تمتاز جميعها بوفرة السليلوز في مكوناتها وبالرغم من عدم تمكن الفطريات من هضم السليلوز غير الذائب الموجود في الطبيعة، إلا أن ذلك لا يلغي دورها في تحليل السليلوز المترابط مع نشاط الأنواع ذات القدرة على تحليل السليلوز غير الذائب (Campbell , 1952).

جدول (4-8) يبين درجة تحلل السليلوز في المطياف الضوئي

أنواع الفطريات المنتخبة	الفعالية الانزيمية لانزيم السليوليز (مايكرو مول)
A. niger1	**0.321**
A. fumigatus3	**0.298**
A. fumigatus5	**0.261**

4-6-2 فعالية انزيم البروتييز

بينت النتائج في الجدول (4-10) ان الأنواع الفطرية التي أعطت نشاطا لتحلل انزيم البروتييز بأطوال موجية متقاربة وايضاً تبين ان فطر*Aspergillus* من اكفأ الفطريات التي توجد في الاسمدة العضوية من حيث الامتصاصية وإنتاج البروتييز وكان جنس *A. fumigatus*2هو الفطر الاعلى كفاءة في فعالية انزيم البروتييز اذ اعطى درجة للامتصاصية بلغت1.757 مايكرومول تلاه الفطر *A.fumigatus*1بامتصاصية بلغت 1.712 مايكرومول تلاهما الفطر *A. niger* بفعالية بلغت 1.643 مايكرومول وبحسب قابليتها البروتييزات هي مجموعة من الانزيمات المحللة للبروتين تنتج من قبل العديد من الكائنات الحية وتستخدم في العديد من التطبيقات التجارية والطبية وتلعب ادواراً فسيولوجية مهمة مثل وظيفتي التحلل والبناء يقدر الانتاج السنوي من بروتييزات الاعفان مايقارب عشرة اطنان اغلب الانتاجية تعود لانواع الجنس *Aspergillus* (Dunil,1980;Rodate *et al*.,2011).تعد الاعفان مصدر لايضاهى في انتاج البروتييزات فضلاً عن امكانية معالجتها وراثيا (2005 ، Chakrabarti and Stotey).

جدول (4-9) يبين درجة تحلل البروتين في جهاز المطياف الضوئي

أنواع الفطريات المنتخبة	الفعالية الانزيمية لانزيم للبروتييز مايكرومول
A. fumigatus2	1.757
A. fumigatus1	1.712
A. niger1	1.643

4-5-3 فعالية انزيم الاميليز

بينت نتائج جدول (4-11)إن الأنواع الفطرية المختارة أعطت نشاطا لتحلل الاميليز بأطوال موجية متباينة حيث سجل جنس *Cephaliophora sp* كفاءة عالية في انتاج الانزيم بلغت 0.298 مايكرو مول تلاه الفطر *P. oxalicum* مسجلا فعالية بلغت 0.257 مايكرو مول

تلاهما في الفعالية الفطر*P. brefeldianum* ب0.185 مايكرو مول بحسب قابلية كل جنس ودرجة الامتصاصية.

يعد الأميليز الفطري هو الأول عالميًا في الاستخدام التجاري وتم تطبيقه لأول مرة طبيًا في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي(Saranraj and Stella.,2013). كما سجلت العديد من الدراسات امكانية عالية لمختلف الفطريات الأخرى لقدرتها على انتاج انزيم الاميليز باحترافية عالية مثل الفطر *Penicillium*والفطر*Fusarium* (Bakri *et al* , 2014 ; Shruthi *et al* ,2020)

جدول (4-10) يبين درجة الامتصاصية انزيم الاميليز في جهاز المطياف الضوئي

أنواع الفطريات المنتخبة	الفعالية الانزيمية لانزيم الاميليز (وحدة \ مل)
Cephaliophora sp	0.298
P. oxalicum	0.257
P. brefeldianum	0.185

4 -6- 4 فعالية انزيم اللاييبيز

اظهرت نتائج جدول (4-12) ان الفطرية المختارة أعطت نشاطا لتحلل اللاييبيز بدرجات تسحيح مختلفة ان لفطر *Aspergillus* الاكفأ في الإنتاجية اللاييبيز وكان جنس *A. fumigatus1* بدرجة تسحيح 61 ml بينما كان جنس*A. fumigatus4* مسجلاً درجة تسحيح 57ml وتلاهما *Aspergillus niger2* بدرجة تسحيح 55ml . يستخلص انزيم اللاييبيز المايكروبي من العديد من الانواع البكتيرية مثل *Bacillus licheniformis* , *Geobacillus* , *Pseudomonas aeuriginosa thermodenitrificans* , اضافة الى انتاجه العالي من قبل الفطريات مثل الفطر *A. niger, P. verrucosum* ، *Fusarium solani* ويمتاز اللاييبيز الفطري بخصوصية عالية واستقرار حراري فضلاً عن سهولة الاسترداد الخارج خلوي مما جعله ياخذ الاهتمام الاكبر من وجهة النظر التطبيقية (Nema ،2019 ; Putri *et al*, 2020)

جدول (4-11) يبين فعالية انزيم اللاييبيز بطريقه التسحيح

أنواع الفطريات المنتخبة	الفعالية الانزيمية \ مل
A. fumigatus1	61ml
A. fumigatus4	57ml
A. niger2	55ml

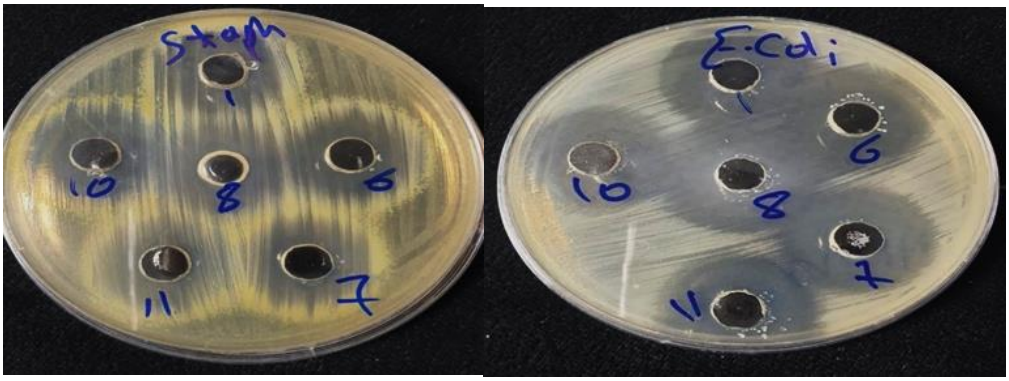
6-4 الفعالية البيولوجية للفطريات المنتخبة

اختبرت فعالية الفطريات قيد الدراسة في التضاد الميكروبي والتي تمثلت بستة انواع وهي *A.niger 1, A. fumigatus 3 ,A.fumigatus 4 , A. fumigatus 5 , P.oxalicum , Cephaliophora* sp ضد نوعين من البكتريا المرضية السالبة والموجبة لصبغة غرام المتمثلة ب*(Staphylococcus aurus, E. coli)*لاختبار قدرتها في المكافحة البيولوجية ، بينت النتائج وجود قدرة تثبيطية عالية من قبل الرواشح الفطرية المنتخبة قياسا لعينة السيطرة Control المتمثلة باستخدام الماء المقطر والتي لم تظهر اي تثبيط للنمو البكتيري.

بينت النتائج ان المستخلصات الفطرية الخام (الغير المخففة) المتمثلة بالستة أنواع المنتخبة وكانت ذات فعالية تثبيطية عالية ضد انواع البكتيريا السالبة لصبغة غرام كما في الشكل (4-21) .وقد كانت الظروف مناسبة لنمو البكتريا من حيث فترة التحضين ودرجة الحرارة واظهرت النتائج وجود فعالية تثبيطية للتراكيز المختلفة للمستخلص الفطري المخفف وكانت فروقات بين المستخلصات واضحة ولعدة أنواع منها وكانت وتمثلت بحجم الهالة المتكونة في اختبار فعالية التضاد البكتيري.اذ سجل الراشح الفطري للفطر *A. niger* عند التركيز(100µl) اعلى تثبيط للبكتريا (*E. coli*) بلغ 8ملم في حين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 4 ملم مقارنة بمعاملة السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين (µl 25 و µl 50)أي تثبيط وقد يكون ذلك لشدة تخفيفة او قلة فترة الحضانة كما في الشكل (4-22) ، اما الراشح الفطري لنفس الفطر ضد البكتريا (*Staphylococcus aurus*) لم يعطي أي نسبة تثبيط كما في الشكل (4-25) ، اعطى الراشح الفطري للفطر*A. fumigatus4* عند التركيز(100µl) اعلى تثبيط للبكتريا (*E. coli*) بلغ 8ملم فيحين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 5ملم مقارنة بمعاملة السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين (µl 25 و µl 50)أي تثبيط وقد يكون ذلك لشدة تخفيفة او قلة فترة الحضانة كما في الشكل (4-23) ، وفيما يخص الراشح الفطري لنفس الفطر ضد البكتريا (*Staphylococcus aurus*) لم يعطي أي نسبة تثبيط كما في الشكل (4-26) سجل الراشح الفطري للفطر*A. fumigatus5* عند التركيز(100µl) اعلى تثبيط للبكتريا (*E. coli*) بلغ 9ملم في حين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 7ملم مقارنة بمعاملة السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين (µl 25 و µl 50)أي تثبيط وقد يكون ذلك لشدة تخفيفة او قلة فترة الحضانة كما في الشكل (4-24) ، اما الراشح الفطري لنفس الفطر ضد البكتريا (*Staphylococcus aurus*) عند التركيز(100µl) اعطى تثبيط بلغ 8ملم في حين اعطى تركيز(75µl) تثبيطاً بلغ 6ملم مقارنة بمعاملة السيطرة ومن جهة أخرى لم يسجل التركيزين (µl 25 و µl 50)أي تثبيط

كما في الشكل (4-27) ،وكانت الفعالية التثبيطية للرواشح الفطرية واضحة بتكوين الهالة على الرغم من شدة تخفيفها وقلة فترة التحضين

;(Stašková *et al*., 2021)AL-Saeedi & Luti, 2018

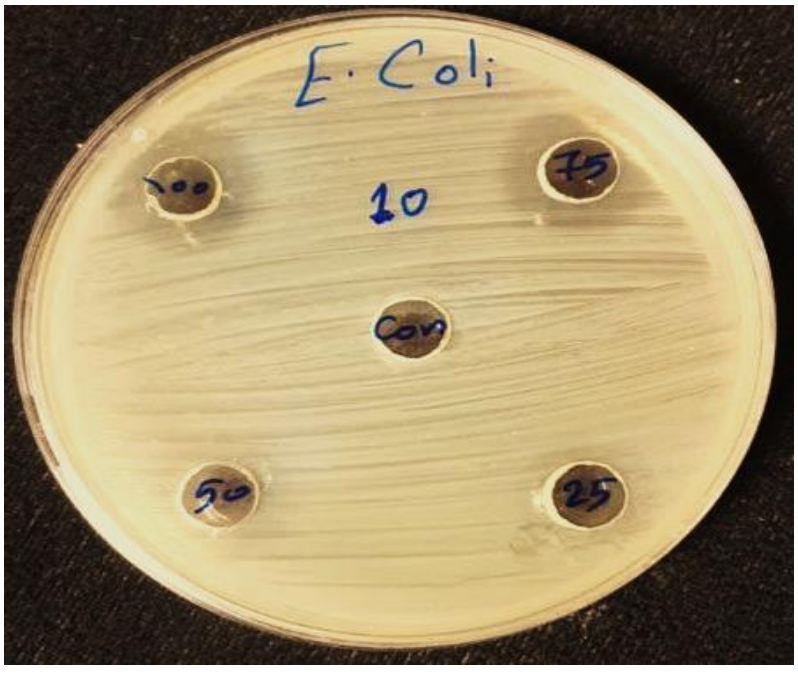


شكل(4-21) فعالية المستخلصات الفطرية الخام للفطريات المنتخبة على تثبيط بكتريا

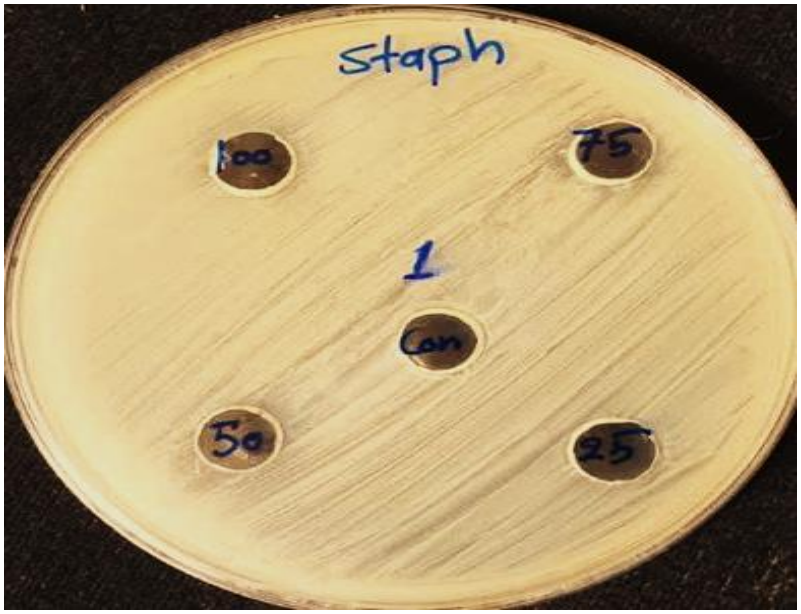
(*Staphylococcus aurus, E. coli)*

شكل(4-22) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*Aspergillus niger*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(25µL ،50 µL ،75 µL ،100µL)

شكل(4-23) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*A.fumigatus4*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µL25، µL 50، µL 75، µL100)

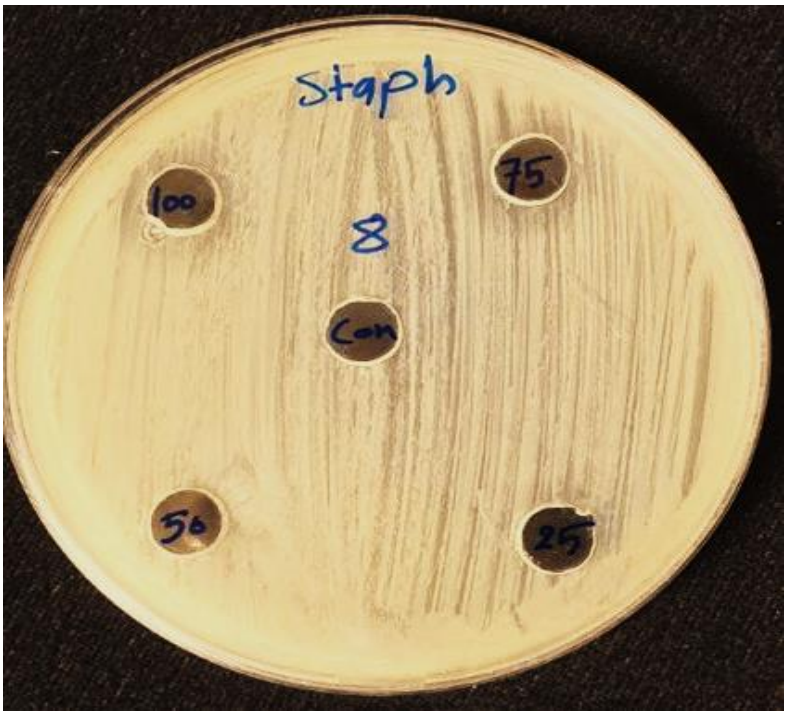


شكل(4-24) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*A. fumigatus5*) ضد للبكتريا(E. coli) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µL25، µL 50، µL 75، µL100)



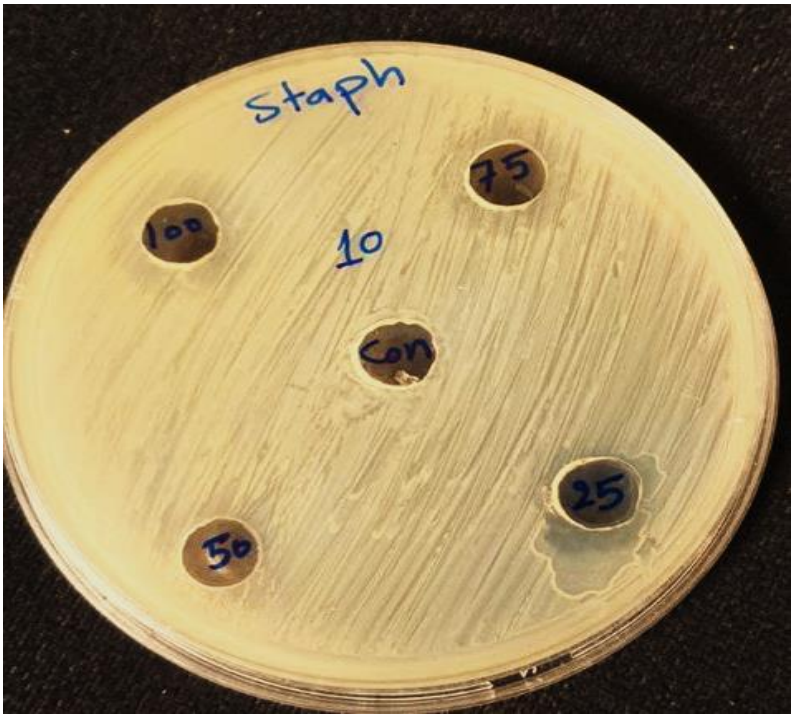
شكل(4-24) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*A. niger*) ضد للبكتريا

(*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µL25 ،µL 50 ،µL 75 ،µL100)



شكل(4-26) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*A.fumigatus4*) ضد للبكتريا

(*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(µL25 ،µL 50 ،µL 75 ،µL100)



شكل(4-27) يبين من خلالة المستخلص الفطري (*A.fumigatus5*) ضد للبكتريا (*Staphylococcus aurus*) وفي التراكيز الواضحة في الثقوب(25µL ،50 µL ،75 µL ،100µL)

تعد المكافحة البيولوجية احد الطرق الاكثر أمنا للتخلص من الافات المرضية كبديل للمكافحة الكيمياوية المرتفعة التكاليف فضلاً عن خطرها من ناحية التلوث البيئي وصحة الانسان (Rocha *et al*., 2009)

إن استخدام المكافحة البيولوجية يعمل على الحد من نشاط الكائنات الممرضة للنبات بعدة اليات تشمل التضاد ، المنافسة ، التطفل (Zabalgogeazcoa , 2008) .

تشمل الية المكافحة البيولوجية عن طريق التضاد اما من خلال انتاجها للمضادات الحياتية او الانزيمات الحالة او المركبات العضوية الطيارة مثل الحوامض والكحولات والكيتونات (Strobel, 2006).

اشار Hoffman *et al* ., (2008) الى امكانية الفطر *Phoma* sp المعزول من تربة زراعية من انتاج مجموعة من الحوامض الفينولية التي اظهرت نشاط ضد بكتيري.

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات:

1- من خلال العزل اكدت الدراسة ان عددا من الفطريات المرافقة للمخلفات العضوية (روث الأغنام والابقار) متمثلة بـ *A.fumigatusm, A. niger, P. brefeldianum, P. oxalicum, Cephaliophora sp* كانت منتجة لانزيم السليوليزوالبروتنيزوالاميليزواللاييز وتم تأكيد التشخيص جزيئياً بأستخدام تقنية الـ(PCR).

2-أظهرت الفطريات *A. fumigatusm, A. niger, P. brefeldianum, P. oxalicum, Cephaliophora sp.* فعالية في تثبيط نمو نوعين من البكتريا المتمثلة بـ Staphylococcus *aurus ,E. coli*

التوصيات:

1.القيام بدراسة مقارنة لأنواع أخرى من الاسمدة العضوية للتعرف على الفطريات المرافقة لها واختبار فعالية انزيماتها في تثبيط نمو أنواع من البكتريا الممرضة.

2.اجراء اختبارات لفعالية الانزيمات المنتجة من قبل الفطريات المدروسة في تثبيط أنواع أخرى من البكتريا الممرضة.

3.دراسة تأثير الانزيمات التي تم التعرف عليها في هذه الدراسة من خلال اختبار فعاليتها على الحيوانات المختبرية.

الزبيدي ، بان موسى حسن (2006) ، كفاءة بعض الأنواع الفطرية المعزولة من ترب محافظة كربلاء في تحليل مخلفات الذرة الصفراء وشرش اللبن ، رسالة ماجستير ،كلية التربية ، جامعة كربلاء.

الشحات م ،رمضان م (2008)، الاسمدة الحيوية والزراعة العضوية غذاء صحي وبيئة نظيفة,دار الفكر العربي ،ص ،-132-134.

العبيدي ، زهير سلمان والعكيدي ، حسن خالد وجاسم ،محمد عبد الصاحب وجعفر ، ثريا صادق (1985) . انناج البروتين الفطري باستخدام عصير التمر بواسطة الفطر Aspergillius niger . محلة البحوث الزراعية والموارد المائية ، 1(2) : 237-247.

العكيدي ، حسن خالد و خليفة ، صالح و هادي ،حمود مطلك والنقاش ، شفاء (1985) . انتاج البروتين بواسطة الفطر *Aspergillius oryzae* باستخدام مسحوق نوى التمر ، مجلة البحوث الزراعية والموارد المائية ، ع (3) : 197-206 .

عزمي م ،(2010) الزراعة العضوية .الزراعة العضوية مواصفاتها وأهميتها على دار وتل للنشر ،ص 132 125. , صحة الانسان.

مصطفى، ك. (2018). النهائية الزراعية: استخداماتها وأضرارها.

نور الدين ،(2008)،تقانات الاسمدة ص2-12.

Abdel-Hafez, A. I. "Some ecological studies on Jordanian soil fungi." *M. Sc* (1976).

Abdullah , S.K. ; Al – Kesraji , T.O. & Al – Edany , T.Y. (1986). Soil mycroflora of the southern desert of Iraq . Sydowia ; 39 : 8 – 16 **.**

Abdul-Wahab, Hanin Saadun. Extraction, partial purification and Characterization of Isoamylase produced by Locally isolated Psuedomonas. Diss. Ministry of Higher Education, 2008.

Abe, J., Bergmann, F. W., Obata, K., & Hizukuri, S. (1988). Production of the raw-starch digesting amylase of Aspergillus sp. K-27. Applied Microbiology and Biotechnology, 27, 447–450.

Abo El-Ezz, S. F., El-Hadidi, E. M., El-Sherpiny, M. A., & Mahmoud, S. E. (2020). Land Reclamation Using Compost, Agricultural Gypsum and Sugar Beet Mud. Journal of Soil Sciences and Agricultural Engineering, 11(9), 503–511.

Abo Nouh, F. A., Gezaf, S. A., Abo Nahas, H. H., Abo Nahas, Y. H., Vargas-De-La-Cruz, C., Solorzano Acosta, R. A., Landa-Acuña, D., Luis-Alaya, B., & Abdel-Azeem, A. M. (2021). Bioprospecting for Biomolecules from Different Fungal Communities: An Introduction. *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules*, 1–71

Abu, E. A., Ado, S. A., & James, D. B. (2005). Raw starch degrading amylase production by mixed culture of Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisae grown on sorghum pomace. African Journal of Biotechnology, 4(8), 785–790.

Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., & Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated Aspergillus species. Process Biochemistry, 38(4), 615–620.

Aguiar, A., de Souza-Cruz, P. B and Ferraz, A. (2006). Oxalic acid, Fe3+ reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from Pinus taeda wood chips biotreated by Ceriporiopsis subvermispora. Enzyme and Microbial Technology, 38(7): 873-878

Al – Bader , S.M. (1996). Study on microfungal community of Al-mousel forest soil , Ph.D. thesis , coll. Sci. Univ . Basrah .(Arabic)

Al-Doory, Y., Tolba, M. K., & Al-Ani, H. (1959). On the fungal flora of Iraqi soils. II. Central Iraq. *Mycologia*, *51*(3), 429–439.

Alexander , M. (1977) . Introduction to soil Microbiology . 2nd ed . , John wiley & sons .U.S.A ; pp : 196 – 202 .

Al-Ezerjawi, N. H. M., Dewan, M. M., & AL-Janabi, J. K. (2013). The role of some of bio–control fungi in the improvement of growth of rice (Oryza sativa L.) class anber-33 and combating Echinochloa crus-galli weeds. Application of Immobilized Cells of Rhodococcus Pyridinivorans GM3 for Phenol Degradation, 841.

Alhussaini, M. S., Alghonaim, M. I., Al-Ghanayem, A. A., Al-Yahya, A. A. I., Hefny, H. M., & Saadabi, A. M. (2016). Characterization of Cladosporium Species by Internal Transcribed Spacer-PCR and Microsatellites-PCR. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS, 19(4), 143–157.

Al-Hussuna Y.R.(2005). Purification and Characterization of α – Amylase Produced by The Local Isolate Xanthomonas campestris H6. A Thesis coll.Sci. ,Univ.Al Nahrain.(Arabic).

Ali, A. J., Ahmed, A. H. A., Hamdan, A. A., & Umar, A. (2011). Optimization of cellulase production by Aspergillus niger and Tricoderma viride using sugar cane waste. Journal of Yeast and Fungal Research, 2(2), 19–23.

AL-Saeedi, B. S. M., & Luti, K. J. K. (2018). Bacteriocin from Streptococcus salivarius optimized statistically by response surface methodology active against different clinical oral pathogenic Streptococci. Iraqi Journal of Science, 463–475.

Al-Shukri, M. M. (1991). The basics of fungi and their plant diseases. Baghdad Uni.

Al-Tai, A. M., Rzzak, S. A., Al-Attiyah, S. S., & Abdul-Nour, B. A. (1989). Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraq soils: II cell growth and cellulase activity of Streptomyces sp. strain AT7 at different temperatures. Journal of Islamic Academy of Sciences, 2(3), 185–188.

Alwash , M.S. (1997) . Study the community of fungi & bacteria in Razaza desert soil .M. Sc. thesis , Univ. Babylon .(Arabic)

AMH, S., Alzubariy, M., & Ameri, G. A. A. (2016). Mycological study on skin diseases in Taiz City, Yemen. *Journal of Environmental Studies*, *15*(1), 59–66.

Anto, H., Trivedi, U. B., & Patel, K. C. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology, 97(10), 1161–1166.

Arunsasi, M., Kani, S. M., Jegadeesh, G., & Ravikumar, M. (2010). Submerged fermentation of amylase enzyme by Aspergillus flavus using Cocos nucifera meal. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, 6(2), 75 87.

Arya, P. S., Yagnik, S. M., Rajput, K. N., Panchal, R. R., & Raval, V. H. (2021). Understanding the basis of occurrence, biosynthesis, and implications of thermostable alkaline proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1–38.

Atkins, S. D., Hidalgo-Diaz, L., Clark, I. M., Morton, C. O., De Oca, N. M., Gray, P. A., & Kerry, B. R. (2003). Approaches for monitoring the release of Pochonia chlamydosporia var. catenulata, a biocontrol agent of root-knot nematodes. *Mycological Research*, *107*(2), 206–212

Aunstrap , K. (1980) . Proteinases In : "Microbial enzymes & bioconversion". A.H. Rose . Academic press Inc . , Newyork & London.

Bååth, E., & Söderström, B. (1980). Degradation of macromolecules by microfungi isolated from different podzolic soil horizons. Canadian Journal of Botany, 58(4), 422–425.

Bagul, Uddav S., and Sivagurunathan M. Sivakumar. "Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices." Int J Pharm 6.3 (2016): 11-17.

Bai, Y., Yi, P., Zhang, S., Hu, J., & Pan, H. (2021). Novel antioxidants and α-glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from an endophytic fungus Penicillium brefeldianum F4a. *Journal of Fungi*, *7*(11), 913.

Bailey, M. J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology, 23(3), 257–270.

Bakri, Y.; Jawhar, M.; Arabi, M.I.E. Enhanced amylase production by *Fusarium solani* in solid state fermentation. Pak. J. Sci. Ind. Res. Ser. B Biol. Sci. 2014, 57, 123–128. [Cross Ref]

Barrett, A. J. (1994). [1] Classification of peptidases. In Methods in enzymology (Vol. 244, pp. 1–15). Elsevier.

Barron, G. L., Morikawa, C., & Saikawa, M. (1990). New Cephaliophora species capturing rotifers and tardigrades. *Canadian Journal of Botany*, *68*(3), 685–690.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology, 10, 1–9.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, *10*, 1–9.

Ben Abdelmalek-Khedher, I., Urdad, M. C., Limam, F., Schmitter, J. M., Marzouki, M. N., & Bressollier, P. (2008). Purification, Characterization, and Partial Primary Sequence of a Major-Maltotriose-producing $\alpha $-Amylase, ScAmy43, from Sclerotinia sclerotiorum. Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(9), 1555–1563.

Bickerstaff, G. F. (1987). Enzymes in industry and medicine. Edward Arnold.

Bijende, K. B., Himani, P., Masood, A. W., Priyanka, S., & Ajay, S. (2009). Purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated Bacillus strain M-9. Indian J Chem Technol, 16, 382–387.

Boddy, L. (1983). Effect of temperature and water potential on growth rate of wood-rotting basidiomycetes. Transactions of the British Mycological Society. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(83)80175-2

Brahmachari, G., Demain, A. L., & Adrio, J. L. (2016). *Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and Industrial applications*. Academic Press.

Bramono, K., Yamazaki, M., Tsuboi, R., & Ogawa, H. (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of Candida species. Japanese Journal of Infectious Diseases, 59(2), 73.

Bridelli, M. G., Capelletti, R., Maraia, F., Mora, C., & Pirola, L. (2002). Initial hydration steps in lipase studied by means of water sorption isotherms, FTIR spectroscopy and thermally stimulated depolarization currents. Journal of Physics D: Applied Physics, 35(10), 1039.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Science Translational Medicine*, *4*(165), 165rv13-165rv13.

Brunke, S., & Hube, B. (2006). MfLIP1, a gene encoding an extracellular lipase of the lipid-dependent fungus Malassezia furfur. Microbiology, 152(2), 547–554.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38(10), 1397–1403.

Campbell, W.G. (1952). In " Wood Chemistry ". Vol. 2 eds ., L. E. Wise and E.C. John.Reinhold publ., Co., New York.

Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen, J., & Villadsen, J. (1996). Morphology and physiology of an α- amylase producing strain

of Aspergillus oryzae during batch cultivations. Biotechnology and Bioengineering, 49(3), 266–276.

Chakrabarti ; A. &Stotey , K. (2005) . Enzyme structure &mechanism , Appl . Biochem .Biotechnol ; 22 : 263 .

Chang, W. T. H. (1972). The growth of Cytophaga on mesquite. Texas Tech University.

Chen, P.-J., Wei, T.-C., Chang, Y.-T., & Lin, L.-P. (2004). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from Sinorhizobium fredii. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45.

Chou, H., Lai, H.-Y., Tam, M. F., Chou, M.-Y., Wang, S.-R., Han, S.-H., & Shen, H.-D. (2002). cDNA cloning, biological and immunological characterization of the alkaline serine protease major allergen from Penicillium chrysogenum. International Archives of Allergy and Immunology, 127(1), 15–26.

Christensin , M. (1989) . Aview of fungil ecology .J. mycologia ; 81: 1- 19 .

Císarová, M., Tančinová, D., Barboráková, Z., Mašková, Z., Felšöciová, S., & Kučerková, V. (2021). Potential production of cyclopiazonic acid by penicillium camemberti strains isolated from camembert type cheese. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2021, 434– 445.

Collee, J. G., Miles, R. S., & Watt, B. (1996). Tests for identification of bacteria. Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14, 131–149.

Cruichshank, R., Duguid, J. P., Marmoin, B. P., & Swan, H. A. (1975). The practice of medical microbiology. Churchill Livingstone, London, 2, 12.

Daraj . H.F. (1989) . Studies on fungi associated with desert plants in south of Iraq . M.Sc. thesis , coll . Educ . Univ . Basrah . (Arabic)

Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., & Jones, K. M. (2002). Data for biochemical research. Clarendon press.

De Marco, J. L., & Felix, C. R. (2002). Characterization of a protease produced by a Trichoderma harzianum isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. BMC Biochemistry, 3, 1–7.

De Sousa, R. N. (2023). Introductory Chapter: Mycorrhizal Fungi–A Current Overview on Agricultural Productivity and Soil Health. *Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agriculture-New Insights*.

Deacon, J. W. (2005). Fungal biology. John Wiley & Sons. Ellaiah, P.,

Dheeran, P., Kumar, S., Jaiswal, Y. K., & Adhikari, D. K. (2010).

Dhevagi, P., Ramya, A., Priyatharshini, S., Geetha Thanuja, K., Ambreetha, S., & Nivetha, A. (2021). Industrially important fungal enzymes: productions and applications. *Recent Trends in Mycological Research: Volume 2: Environmental and Industrial Perspective*, 263–309.

Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T.-H. (1980). *Compendium of soil fungi. Volume 1.* Academic Press (London) Ltd.

Dou, D., Jiang, R. H. Y., Wang, X., Kale, S., Arredondo, F., Tripathy, S., & Tyler, B. M. (2007). Functional Analysis of the Phytophthora sojae effector protein Avr1b. *Book of Abstracts XXIV Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, California, USA, 20-25 March 2007*, 171.

Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., & Hill, C. (2020). Food microbiology: fundamentals and frontiers.

Dunil , P. (1980) . The current Status of enzymes technology . In : "Enzymiz & non - enzymic catalysis" .P. Dunil . ; A. Wiseman . & N. Blakebrorgh . Ellis Horwood 1td . ; C. chichester . England.

Egorov , N.S. ; Yudina , Z.K. & yudina T.G. (1983) . Effect of proteins on exproteas Synthesis in Bacillus thuring iensis . Microbiol . (USSR) ; 52 : 443 – 446 .

El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K.-H., El-Katatny, M. S., & Gübitz, G. M. (2000). Production of chitinase and β-1, 3-glucanase by Trichoderma harzianum for control of the phytopathogenic fungus Sclerotium rolfsii. Food Technology and Biotechnology, 38(3), 173–180.

Enari, T. M., Marja-Leena Niku-Paavola, and M. Nummi. "Comparison of cellulolytic enzymes from Trichoderma reesei and Aspergillus niger." *Proc. 2nd Symp. Bioconversion and Biochemical Engineering, New Delhi*. 1980.

Fang, W., & Latgé, J.-P. (2018). Microbe profile: Aspergillus fumigatus: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology*, *164*(8), 1009.

Faria, C. B., Abe, C. A. L., Silva, C. N. da, Tessmann, D. J., & Barbosa- Tessmann, I. P. (2011). New PCR assays for the identification of Fusarium verticillioides, Fusarium subglutinans, and other species of the Gibberella fujikuroi complex. International Journal of Molecular Sciences, 13(1), 115–132.

Fogarty, W. M. "Amylases, amyloglucosidases and related glucanases." Microbial enzymes and bioconversions (1980): 115-170.

Fogarty, W. M. (1994). Enzymes of the genus Aspergillus. In Aspergillus (pp. 177 218). Springer.

Fogarty, W. M., & Kelly, C. T. (2012). Microbial enzymes and biotechnology. Springer Science & Business Media. Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S.,

Fogarty, William M., and Catherine T. Kelly, eds. Microbial enzymes and biotechnology. Springer Science & Business Media, 2012.

Foster, S. J., Ashby, A. M., & Fitt, B. D. L. (2002). Improved PCR-based assays for pre-symptomatic diagnosis of light leaf spot and determination of mating type of Pyrenopeziza brassicae on winter oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, *108*, 379–383.

Frąc, M., Hannula, S. E., Bełka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal biodiversity and their role in soil health. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 707.

Friedberg, F. and Rhodes, C. (1986). Cloning and characterization of Beta – amylase gene from Bacillus polymyxa. J.Bacteriol., 163(3): 819-824.

Frisvad, J. C., Møller, L. L. H., Larsen, T. O., Kumar, R., & Arnau, J. (2018). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, and Trichoderma reesei. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*, 9481–9515.

Frost, G. M., & Moss, D. A. (1987). Production of enzymes by fermentation. Biotechnology.

Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering, 92(5), 405–416.

FUNDAMENTALS, A. (2007). Composting and greenhouse gas emissions: a producer's perspective. Biocycle, 48(3), 37.

Garcia – Kirchner .O. ; Segura , G.M. Robledo ; B.I. & Duran , P.E . (2000) . Screening of potential antibiotic action of Cellulolytic fung . Dep Bioprosess , Mexico ; 84 : 69 – 78 .

Gasper , A ; Cosson T. Roques C. & Thonart , P. (1997) . Study on the production of axylanolytic complex from *Penicillium canescens* . Lesaffre Develo , Marcq . En – Baroeul , France ; 67 : 45 – 58 .

Ginalska, G., Bancerz, R., & Korniłłowicz-Kowalska, T. (2004). A thermostable lipase produced by a newly isolated Geotrichum-like strain, R59. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31(4),177–182.

Ginalska, G., Bancerz, R., & Korniłłowicz-Kowalska, T. (2004). A thermostable lipase produced by a newly isolated Geotrichum-like strain, R59. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *31*(4), 177–182.

Gupta, P. K. (2003). Handbook of soil, fertilizer and manure. Agrobios (India).

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B.(2003). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38(11), 1599–1616.

Gupta, V. K. (2016). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Aspergillus system properties and applications. Elsevier.

Hadi, A., Ali, N. A. M., & Kamel, B. E. (2012). Production of cellulase enzyme from some local fungal isolates and the effect of some culture conditions. JOURNAL OF EDUCATION AND SCIENCE, 25(3), 93–106.

Halliwell, G. (1961). The action of cellulolytic enzymes from Myrothecium verrucaria. Biochemical Journal, 79(1), 185.

Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., & Župančič, S. (1996). Production of fungal xylanases. Bioresource Technology, 58(2), 137 161.

Hamad , N.S. (1998) . Microfungal community in Iraq desert lands . Ph .F. thesis coll . Sci . Univ . Babylon .(Arabic)

Han, S. J., Yoo, Y. J., & Kang, H. S. (1995). Characterization of a Bifunctional Cellulase and Its Structural Gene: THE cel GENE OF BACILLUS SP. D04 HAS EXO-AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY (∗). Journal of Biological Chemistry, 270(43), 26012–26019.

Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67(3), 597– 607.

Hassan , Sh. S. (1996) . Production , Purification and Charactrization of protease from Aspergillus oryzae by solid Fermination . Ph .D. Thesis coll. Sci .Univ . Baghdad .(Arabic)

Hawksworth, D. L., Hibbett, D. S., Kirk, P. M., & Lücking, R. (2016). Proposals to amend the Codes. 308-310 Proposals to permit DNA sequence data to serve as types of names of fungi. Tax, 65(4), 899– 900.

Henao, J., & Baanante, C. (2006). Agricultural production and soil nutrient mining in Africa: Implications for resource conservation and policy development.

Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., Mendum, T. A., & Kerry, B. R. (2000). Detection of the nematophagous fungus Verticillium chlamydosporium in nematode-infested plant roots using PCR. *Mycological Research*, *104*(4), 435–439.

Ho, T. T. K., Le, T. H., Tran, C.-S., Nguyen, P.-T., Thai, V.-N., & Bui, X.-T. (2022). Compost to improve sustainable soil cultivation and crop productivity. *Case Studies in*

Chemical and Environmental Engineering, *6*, 100211.

Hoffman A. M., Mayer S. G., Strobel G. A., Hess W. M., Sovocool G. W., Grange A. H., Harper J. K., Arif A. M., Grant D. M. and Kelley-Swift E. G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic Phoma species. *Phytochemistry* . 2008; 69: 1049-1056.

Houbraken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overy, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G., & Samson, R. A. (2012). New penicillin-producing Penicillium species and an overview of section Chrysogena. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *29*(1), 78–100.

Howling, D. (1989). Mechanism of starch hydrolysis. International Biodeterioration, 15: 15-19.

Humaid, A. R. A. H., Al-Ghalibi, S. M. S., Abdel-Sater, M. A., & Salahaddin, R. H. (2020). PROTEASES AND LIPASES ACTIVITY OF FUNGI ISOLATED FROM LOCAL CHEESE, REPUBLIC OF YEMEN. Ass. Univ. Bull. Environ. Res, 23(1).

Hussein, S. N. (2014). Some Aspects of Integration to Control Root and Crown Rot Disease of Watermelon. M. Sc. Thesis. Coll. Of Agri. University of Baghdad. Iraq.

Ichishima, Eiji, et al. "Production of a new type of acid carboxypeptidase of molds of the Aspergillus niger group." Applied microbiology 26.3 (1973): 327-331.

Ikram-Ul-haq, H. M., & Umber, H. (2006). Production of protease by Penicillium chrysogenum through optimization of environmental conditions. J. Agric. Soc. Sci, 2(1), 23–25.

Imran, Z. K., & Hassan, K. M. A. (2008). New record for three mushrooms associated with the trunk of trees for the first time in Iraq. *Journal of University of Babylon*, *16*(1), 400–413.

Itkor, P., Shda, O., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. (1989). Screening for raw starch digesting bacteria. Agric. Biol. Chem. 53: 53-60.

Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, *10*(1), 409–424.

Janowski, D., & Leski, T. (2022). Factors in the distribution of mycorrhizal and soil fungi. *Diversity*, *14*(12), 1122.

Jasim, A. A., Hassan, H. A., & Hassoni, A. A. (n.d.). Enzymatic estimation of some fungi isolated from manuscripts preserved at the Al-Hussein holy shrine.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). Modern food microbiology. Springer Science & Business Media.

Jecu, L. (2000). Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial Crops and Products, 11(1), 1–5.

John Wiley & Sons. Essamri, M., Deyris, V., & Comeau, L. (1998). Optimization of lipase production by Rhizopus oryzae and study on the stability of lipase activity in organic solvents. Journal of Biotechnology, 60(1–2), 97–103.

Joshi, R., & Kuila, A. (2018). Lipase and their different industrial applications: A review. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, *5*(10), 237–247.

k. Moustafa. " Agricultural fertilizers: their uses and harms ". 2018.

Kantmen , sh. A. (2001). Study of some skins fungi & its activity to product protease enzyme , Biomas . Biochem . 22 : 67 – 88 .

Khedidja, B., & Abderrahman, L. (2011). Selection of orlistat as a potential inhibitor for lipase from Candida species. Bioinformation, 7(3), 125.

Kim, K. R., Kwon, D. Y., Yoon, S. H., Kim, W. Y., & Kim, K. H. (2005). Purification, refolding, and characterization of recombinant Pseudomonas fluorescens lipase. Protein Expression and Purification,39(1), 124–129.

Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenergy, 26(4), 361– 375.

Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs. *(No Title)*.

Ko, W. H., Wang, I. T., & Ann, P. J. (2005). A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. Soil Biology and Biochemistry, 37(3), 597–599.

Kouadio, E. J. P., Konan, H. K., Dabonné, S., Dué, E. A., & Kouamé, L. P. (2013). Journal of Novel Applied Sciences.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Industrial & Engineering Chemistry Research, 48(8), 3713–3729.

Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. (1992). Medical Mycology Lea and Febiger. Philadelphia, Pa.

Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1992). Medical mycology. Philadelphia, Lea and Febinger. London ,PP:105-155.

Latgé, J.-P. (2001). The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends in Microbiology*, *9*(8), 382–389.

Lee, K. H., Park, K. K., Park, S. H., & Lee, J. B. (1987). Isolation, purification and characterization of keratinolytic

proteinase from Microsporum canis. Yonsei Medical Journal, 28(2), 131–138.

Legarreta, I. G. (2007). Thermal Processing. Handbook of Food Products Manufacturing, Volume 2: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood, and Vegetables, 2, 217.

Legrand, D., Pierce, A., Mazurier, J., Mine, Y., Li-Chan, E., & Jiang, B. (2010). Secreted lactoferrin and lactoferrin-related peptides: Insight into structure and biological functions. Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 179–202.

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). The Fusarium laboratory manual. John Wiley & Sons.

Levine, J. S. (1996). Biomass Burning and Global Change: Remote sensing, modeling and inventory development, and biomass burning in Africa (Vol. 1). MIT Press.

Li, T., Chen, C., Brozena, A. H., Zhu, J. Y., Xu, L., Driemeier, C., Dai, J., Rojas, O. J., Isogai, A., & Wågberg, L. (2021). Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. Nature, 590(7844), 47–56.

Liu, J., & Yang, J. (2007). Cellulase production by Trichoderma koningii AS3. 4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. Food Technology and Biotechnology, 45(4), 420–425.

Lopez-Diaz, T. M., Roman-Blanco, C., Garcia-Arias, M. T., GarcíaFernández, M. C., & García-López, M. L. (1996). Mycotoxins in two Spanish cheese varieties. International Journal of Food Microbiology, 30(3), 391–395.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 265–275.

Mahmoud, D. A. R., & Helmy, W. A. (2009). Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production. Journal of Applied Sciences Research, 5(12), 2466–2476.

Mandels, M., Hontz, L., & Nystrom, J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnology and Bioengineering, 16(11), 1471– 1493.

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 2(1), 1–9.

Marchesi, J. R. (2001). Primer design for PCR amplification of environmental DNA targets. *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*, 43–54.

Marco, J. L. De, Valadares-Inglis, M. C., & Felix, C. R. (2003). Production of hydrolytic enzymes by Trichoderma isolates with antagonistic activity against Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom of cocoa. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 33–38.

McCartney, H. A., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & Ward, E. (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, *59*(2), 129–142.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3), 426– 428.

Mishra , R.R. & Kanaujia , R.S.(1973) . Observation on soil fungistasis in relation to soil depth , Seasonal changes soil

Amendment & physico – chemical characteristics of the soil plant & soil ; 38 : 321 – 330 .

Mishra, V., Nag, V. L., Tandon, R., & Awasthi, S. (2010). Response surface methodology-based optimisation of agarose gel electrophoresis for screening and electropherotyping of rotavirus. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 2322–2331.

Mohammed, B. T., Dakhil, M. H., & Lmutairy, T. (2018). Manuscripts preserved at the Al-Hussein Holy Shrine: Isolation and diagnosis of fungi causing potential damage. Indian Journal of Ecology, 45(1), 214–221.

Mohtar, Johan Ariff, Faridah Yusof, and Najala Mahmoud Hag Ali. "Screening of novel acidified solvents for maximal antimicrobial peptide extraction from Zophobas morio Fabricius." Advances in Environmental Biology 8.3 (2014): 803-809.

Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. International Journal of Medical Microbiology, 292(5–6), 405–419.

Morrissey, J. P., Etschmann, M. M. W., Schrader, J., & de Billerbeck, G. M. (2015). Cell factory applications of the yeast Kluyveromyces marxianus for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. Yeast, 32(1), 3–16.

Moubasher, A. H. (1993). *Soil fungi in Qatar and other Arab countries.* The Centre for Scientific and Applied Research, University of Qatar.

Moubasher, A. H., and M. B. Mazen. "Further studies on cellulose decomposing soil fungi in Egypt." Abhath Al–Yarmock. J 33 (1994): 3-5.

Munjal, G., Sangeet, S., & Madasu, H. (2018). Phylogenetic Methods and its Applications. Open Access Biostatistics and Bioinformatics, 1(10), 1–3.

Naji Kermasha, H. S. (2020). Evaluation of the efficiency of Plearotus Ostreatus in the percentage of inhibition of fungi Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus terreus and Penicillium sp. *EurAsian Journal of Biosciences*, *14*(2).

Nelson, N., & Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. J. Biol. Chem, 195, 19–23.

Nema, A.; Patnala, S.H.; Mandari, V.; Kota, S.; Devarai, S.K. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. Bull. Natl. Res. Cent. 2019, 43, 82. [Cross Ref]

Okafor, J. I., & Ada, N. (2000). Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. The Journal of Communicable Diseases, 32(4), 300–305.

Onyeka, E. U., Udeogu, E., Umelo, C. and Okehie, M. A. (2018). Effect of substrate media on growth, yield and nutritional composition of domestically grown oyster mushroom (Pleurotus ostreatus). African Journal of Plant Science, 2(7): 141-147.

Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 237, 17–27.

Palacios-Orueta, A., Chuvieco, E., Parra, A., & Carmona-Moreno, C. (2005). Biomass burning emissions: a review of models using remotesensing data. Environmental Monitoring and Assessment, 104, 189– 209.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 31(2), 135–152.

Paoletti, M., Castroviejo, M., Bégueret, J., & Clavé, C. (2001). Identification and characterization of a gene encoding a subtilisin-like serine protease induced during the vegetative incompatibility reaction in Podospora anserina. Current Genetics, 39(4), 244–252.

Parajó, J. C., Vázquez, D., Alonso, J. L., Santos, V., & Domínguez, H. (1994). Prehydrolysis of Eucalyptus wood with dilute sulphuric acid: operation in autoclave. Holz Als Roh-Und Werkstoff, 52(2), 102–108.

Park, M., Do, E., & Jung, W. H. (2013). Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. Mycobiology, 41(2), 67–72.

Pekkarinen, A. I., Jones, B. L., & Niku- Paavola, M. (2002). Purification and properties of an alkaline proteinase of Fusarium culmorum. European Journal of Biochemistry, 269(3), 798–807.

Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., & Nicaud, J.-M. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in Yarrowia lipolytica. Journal of Bacteriology, 182(10), 2802–2810.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic Professional. New South Wales, Australia.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage (Vol. 519).Springer.

Polizelli, P. P., Facchini, F. D. A., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2013). Stability of a lipase extracted from seeds of pachira aquatica in commercial detergents and application

tests in poultry wastewater pretreatment and fat particle hydrolysis. *Enzyme Research, 2013*.

Poza, M., De Miguel, T., Sieiro, C., & Villa, T. G. (2001). Characterization of a broad pH range protease of Candida caseinolytica. Journal of Applied Microbiology, 91(5), 916–921.

Priest, F.G. (1993). Bacillus. In:(Biotechnology, H-J. Rehm, and G. Reed, eds., pp. 368-400).

Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., & Tan, K. S. W. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by Blastocystis. Parasitology Research, 97, 386–389.

Putri, D.N.; Khootama, A.; Perdani, M.S.; Utami, T.S.; Hermansyah, H. Optimization of Aspergillus niger lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. Energy Rep. 2020, 6, 331–335. [Cross Ref].

Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J and Huang, C. (2018). High-temperature induced changes of extracellular metabolites in Pleurotus ostreatus and their positive effects on the growth of Trichoderma asperellum. Frontiers in Microbiology, 9, 10

Radwan, S. S., A. A. El-Essawy, and G. A. Helal. "Salinity-loving fungi in Egyptian soils: I. Numbers, identities, and halophilism." Zentralblatt für Mikrobiologie 139.6 (1984): 435-440.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(3), 597–635.

Raper, K. B., & Fennell, D. I. (1965). The Genus Aspergillus The Williams and Wilkins Co. Baltimore. USA, 1–686.

Reddy, N. S., Nimmagadda, A., & Rao, K. R. S. S. (2003). An overview of the microbial α-amylase family. African Journal of Biotechnology, 2(12), 645–648.

Resse , E. T. ; Siu , R . G. & Levinson , H.S. (1950) The biological degradution of soluble cellulose derivative & relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis . J. Bacteriol ; 59 : 485 – 497 .

Rivera – Munoz , G; Tinico – Valencia , J.R. Sanchoz , S. & Farres , **A**. (1991) . Production of microbial lipases in solid state Fermentation system . Biotechnol Lett ; 13 : 277 - 280 .

Rocha R., Luz D. E. D., Engels C., Pileggi S. A. V., Filho D. S. J. F., Matiello R. R. and Pileggi M. selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* l.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.). *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; 40: 73-78.

Rodarte, M. P., Dias, D. R., Vilela, D. M., & Schwan, R. F. (2011). Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (Coffea arabica L.). Acta Scientiarum. Agronomy, 33, 457–464.

Romaškevič, T., Budrienė, S., Pielichowski, K., & Pielichowski, J. (2006). Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. Chemija, 17(4), 74–89.

Rundberget, T., Skaar, I., & Flåøyen, A. (2004). The presence of Penicillium and Penicillium mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(2), 181–188.

Ruszkiewicz-Michalska, M., Knysak, P., Skrobek, I., Gwiazda, A., Piskorski, S., & Żelazna-Wieczorek, J. (2017). Cephaliophora tropica: a third European record. *Mycotaxon*, *132*(2), 445–451.

Sabuquillo, P., De Cal, A., & Melgarejo, P. (2006). Biocontrol of tomato wilt by Penicillium oxalicum formulations in different crop conditions. *Biological Control*, *37*(3), 256–265.

Sadhana, B. (2014). Mycorrhizal Fungi (AMF) as Arbusculaa biofertilizer-a review. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 3(4), 384–400.

Saeed, H. M., Zaghloul, T. I., Khalil, A. I., & Abdelbaeth, M. T. (2005). Purification and characterization of two extracellular lipases from Pseudomonas aeruginosa Ps-x. Polish Journal of Microbiology, 54(3), 233–240.

Salem, F.M; Salem, F.M; Hanna,T and Nouh,E .(2014). Effect of Nutrient Sources and Environmental Factors on the Biomass Production of Oyster Mushroom (Pleurotus Ostreatus). Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences, Vol. 4, No. 4; 3413-3420. E- ISSN: 2249 –1929.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Cycle Sequencing: Dideoxymediated Sequencing Reactions Using PCR and End-labeled Primers. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2, 12–51.

Saranraj, P., & Stella, D. (2013). Fungal amylase—a review. Int. J. Microbiol. Res, 4(2), 203–211.

Sasaki, H., Kurosawa, K., & Takao, S. (1986). Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. Agricultural and Biological Chemistry, 50(6), 1661–1664.

Sasaki, H., Kurosawa, K., & Takao, S. (1986). Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. *Agricultural and Biological Chemistry*, *50*(6), 1661–1664.

Savitha, J., & Ratledge, C. (1992). An inducible, intracellular, alkalophilic lipase in Aspergillus flavipes grown on triacylglycerols. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8, 129–131.

Savitha, J., & Ratledge, C. (1992). An inducible, intracellular, alkalophilic lipase in Aspergillus flavipes grown on triacylglycerols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *8*, 129–131.

Sharma, V., Tsai, M.-L., Nargotra, P., Chen, C.-W., Kuo, C.-H., Sun, P.-P., & Dong, C.-D. (2022). Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. *Catalysts*, *12*(11), 1373.

Shin, C. S., Lee, J. P., Lee, J. S., & Park, S. C. (2000). Enzyme production of Trichoderma reesei Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 237–245.

Shruthi, B.R.; Achur, R.N.H.; Nayaka Boramuthi, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. Curr. Microbiol. 2020, 77, 2192–2206. [Cross Ref] [PubMed].

Shruthi, B.R.; Achur, R.N.H.; Nayaka Boramuthi, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. Curr. Microbiol. 2020, 77, 2192–2206. [Cross Ref] [PubMed].

Singh, A., Ghosh, V. K., & Ghosh, P. (1994). Production of thermostable acid protease by Aspergillus niger. Letters in Applied Microbiology, 18(3), 177–180.

Singh, A., Singh, N., & Bishnoi, N. R. (2009). Production of cellulases by Aspergillus heteromorphus from wheat straw

under submerged fermentation. International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering, 3(3), 124–127.

Singh, R., Rani, A., Kumar, P., Shukla, G., & Kumar, A. (2017). Cellulolytic activity in microorganisms. Bulletin of Pure & Applied Sciences-Botany, 36(1), 28 37.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). a-Amylases from microbial sources–an overview on recent developments. Food Technol Biotechnol, 44(2), 173–184.

Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various Candida species. Journal of Clinical Microbiology, 38(12), 4626–4628.

Smith, G. (1969). An introduction to industrial mycology. Edward Arnold Ltd, London.

Sohail, M., Barzkar, N., Michaud, P., Tamadoni Jahromi, S., Babich, O., Sukhikh, S., Das, R., & Nahavandi, R. (2022). Cellulolytic and xylanolytic enzymes from yeasts: Properties and industrial applications. *Molecules*, *27*(12), 3783.

Solomon, L., Ogugbue, C. J., & Okpokwasili, G. C. (2013). Antibiotic resistance profiles of bacteria associated with fresh and frozen shrimp (Palaemonetes sp.) and their public health significance. International Journal of Scientific Research in Knowledge, 1(10), 448.

Soni, R., Chadha, B., & Saini, H. S. (2008). Novel sources of fungal cellulases of thermophilic/thermotolerant for efficient deinking of composite paper waste. Bioresources, 3(1), 234–246.

Sonnet, P. E., & Gazzillo, J. A. (1991). Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis. Journal of the American Oil Chemists Society, 68(1), 11–15.

Southgate, D. A. T. (1976). Determination of food carbohydrates. (No Title).

Souza, Paula Monteiro de, et al. "A biotechnology perspective of fungal proteases." Brazilian Journal of Microbiology 46 (2015): 337-346.

Srivastava, N., Srivastava, M., Alhazmi, A., Kausar, T., Haque, S., Singh, R., Ramteke, P. W., Mishra, P. K., Tuohy, M., & Leitgeb, M. (2021). Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: A review. *Environmental Pollution*, *287*, 117370.

Stašková, Andrea, et al. "Antimicrobial and antibiofilm activity of the probiotic strain Streptococcus salivarius K12 against oral potential pathogens." Antibiotics 10.7 (2021): 793.

Stephenson, F. H. (2016). Calculations for molecular biology and biotechnology. Academic press.

Storey, E., Dangman, K. H., Schenck, P., DeBernardo, R. L., Yang, C. S., Bracker, A., & Hodgson, M. J. (2004). Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. *Farmington, CT: University of Connecticut Health Center*, 1–206.

Strobel G. A. Muscodor albus and its biological promise. *J Ind Microbiol Biotechnol* , 2006; 33: 514-522.

Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., & Gothandam, K. M. (2013). Screening and optimization of protease production from a halotolerant Bacillus licheniformis isolated from saltern sediments. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 11(1), 47–52.

Sumathy, R., Vijayalakshmi, M., & Deecaraman, M. (2012). Studies on Lipase production from fungal strains by different

inducers at varied concentrations-A comparative study. International Journal of Environmental Sciences, 3(3), 1072 1078.

Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular Enzymology, 1543(2), 223–238.

Szakacs, G., & Pandey, A. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of αamylase by Aspergillus oryzae. Biochemical Engineering Journal, 15(2), 107–115.

Takasaki, Y.(1989). Nvel maltose – producing amylase from Bacillus megateruim G-2. Agric. Biol. Chem. 53(2): 341-347.

Takekawa, S., Uozumi, N,. Tsukagoshi, N. & Uda, S. (1991). Proteases involved in generation of β- and α- amylase from a large amylase precursor in Bacillus polymyxa. J. Bacteriol 173(21): 6820-6825.

Takó, M., Kotogán, A., Németh, B., Radulov, I., Nita, L. D., Tarau, D., Dicu, D., Tóth, B., Papp, T., & Vágvölgyi, C. (2012). Extracellular lipase production of zygomycetes fungi isolated from soil. Review on Agriculture and Rural Development, 1(1), 61–65.

Tamang, J. P., & Fleet, G. H. (2009). Yeasts diversity in fermented foods and beverages. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, 169–198.

Tanabe, Y., Nagahama, T., Saikawa, M., & Sugiyama, J. (1999). Phylogenetic relationship of Cephaliophora to nematophagous hyphomycetes including taxonomic and nomenclatural emendations of the genus Lecophagus. *Mycologia*, *91*(5), 830–835.

Tansey, M. R. (1971). Agar-diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. Archiv Für Mikrobiologie, 77, 1–11.

Thomson, C. A., Delaquis, P. J., & Mazza, G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39(2), 165–187.

Tonozuka, T., Ohtsuka, M., MoGi, S-I., Sakai, H., Ohta, T. & Sakano, Y. (1993). A neeophullulanase – type α-amylase gene from Thermoactinomyces vulgaris R-47. Biosci. Biotech. Boichem., 57(3): 395-401.

Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., & Çeltik, Ö. (2000). Türkiye'nin tarımsal mikoflorasının endüstriyel öneme sahip bazı enzimatik aktivitelerinin incelenmesi-I: amilaz, proteaz, lipaz. Turk J Biol, 24, 79–93.

Toranzo, A. E., Magariños, B., & Romalde, J. L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, 246(1–4), 37–61.

Tsuru, D., & Yoshimoto, T. (1987). Microbial proteases. In "Handbook of Microbiology", eds. Laski, AI, and Lechevalier, HA. CRC Press.

Tudzynski, B., Kawaide, H., & Kamiya, Y. (1998). Gibberellin biosynthesis in Gibberella fujikuroi: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. Current Genetics, 34, 234–240.

Uguru, G. C., Akinyanju, J. A., & Sani, A. (1997). The use of yam peel for growth of locally isolated Aspergillus niger and amylase production. Enzyme and Microbial Technology, 21(1), 48–51.

Vakhlu, J. (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic Journal of Biotechnology, 9(1), 0.

Valentin, N. (2003). Microbial contamination and insect infestation in organic materials. Coalition, 6, 2–5.

Van Der Maarel, M. J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. Journal of Biotechnology, 94(2), 137–155.

Veeraragavan, K. (1990). A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. Analytical Biochemistry, 186(2), 301–305.

Veeraragavan, K., & Gibbs, B. F. (1989). Detection and partial purification of two lipases fromCandida rugosa. Biotechnology Letters, 11(5), 345– 348.

Vihinen, M., & Mantsiila, P. (1989). Microbial amylolytic enzyme. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 24(4), 329–418.

Voragen, F. G. J., Krist, R., Heutink, R., & Pilnik, W. (1980). Apple cell wall digestion by polysaccharide degrading enzymes.

Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E., & Lilly,M. D. (2022). Fermentation & Enzyme Technology. In Volume 0, Number 0 (p. 67). De Gruyter.

Wang, J. S., Wang, J., & Gulfraz, M. (2005). Efficient Cellulase Production from Corn Straw by Trichoderma Reesei LW1 through Solid State Fermentation Process. Ethnobotanical Leaflets, 2005(1), 7.

Wang, L., & Kong, H. (2000). Two new records of Eupenicillium in China. *Mycosystem*, *19*(3), 416–419.

Weber, J., & Agblevor, F. A. (2005). Microbubble fermentation of Trichoderma reesei for cellulase production. Process Biochemistry, 40(2), 669–676.

Wen, Z., Liao, W., & Chen, S. (2004). Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. Bioresource Technology, 91(1), 31–39.

Wen, Z., Liao, W., & Chen, S. (2005). Production of cellulase by Trichoderma reesei from dairy manure. Bioresource Technology, 96(4), 491–499.

Whitaker, J. R., & Bernhard, R. A. (1972). Experiments for an Introduction of Enzymology the Wibber press. Davis, Galif.

White, T. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. *(No Title)*, 315.

Wingender, Jost, Karl-Erich Jaeger, and Hans-Curt Flemming. "Interaction between extracellular polysaccharides and enzymes." Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function (1999): 231-251.

Xia, L., & Cen, P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. Process Biochemistry, 34(9), 909 912.

Yadav, J. S. S., Bezawada, J., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2012). Candida krusei: biotechnological potentials and concerns about its safety. Canadian Journal of Microbiology, 58(8), 937–952.

Yamada, F., Takahashi, N., & Murachi, T. (1976). Purification and characterization of a proteinase from pineapple

fruit, fruit bromelain FA2. The Journal of Biochemistry, 79(6), 1223–1234.

Yenişehirli, G., Bulut, Y., & Tuncoglu, E. (2010). Phospholipase, proteinase and hemolytic activities of Candida albicans isolates obtained from clinical specimens. Mikrobiyoloji Bulteni, 44(1), 71–77.

Yeoh, H. H., Khew, E., & Lim, G. (1985). A simple method for screening cellulolytic fungi. Mycologia.

- **Zabalgogeazcoa I**. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* .2008; 6: 138-146.

Zarinviarsagh, M., Ebrahimipour, G., & Sadeghi, H. (2017). Lipase and biosurfactant from Ochrobactrum intermedium strain MZV101 isolated by washing powder for detergent application. Lipids in Health and Disease, 16(1), 1–13.

Zghair, A. (2019). Enzymatic efficacy of some types of Aspergillus fungi isolated from some manuscripts and its effect on some of the physical and chemical properties of the manuscripts. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 571(1), 12043.

Zharare, G. E., Kabanda, S. M., and Poku, J. Z. (2010). Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight Pleurotus strains. Scientia Horticulturae, 125(2): 95-102.

Zheng, X., Li, K., Shi, X., Ni, Y., Li, B., & Zhuge, B. (2018). Potential characterization of yeasts isolated from Kazak artisanal cheese to produce flavoring compounds. MicrobiologyOpen, 7(1), e00533

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus niger strain Hussain1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space…	Aspergillus niger	1048	1048	100%	0.0	100.00%	567	OR234859.1
Aspergillus niger isolate MEBP0060 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	613	MT597434.1
Aspergillus niger clone SF_352 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer …	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	608	MT529628.1
Aspergillus niger isolate LBM 134 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space…	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	594	MK457457.1
Aspergillus niger strain TA01-24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri…	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	606	KP748369.1
Aspergillus niger isolate AGRIMUS2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp…	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	613	OQ199852.1
Aspergillus niger voucher MSR3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri…	Aspergillus niger	959	1088	97%	0.0	98.19%	673	KJ881376.1
Aspergillus niger strain BS-A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib…	Aspergillus niger	959	959	97%	0.0	98.19%	602	HQ285532.1
Aspergillus niger strain 7M1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	603	MT620753.1
Aspergillus niger isolate M2S4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	603	MT152319.1
Aspergillus niger isolate BBRP small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	602	MT123512.1
Aspergillus niger isolate KUASR4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	605	MN187242.1
Aspergillus niger isolate N_001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer …	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	600	MK989635.1
Aspergillus niger isolate F10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	588	MK828708.1
Aspergillus niger isolate Z1A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	606	MH752206.1
Aspergillus niger isolate ANG-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and int…	Aspergillus niger	955	955	97%	0.0	98.01%	599	MH266204.1

ملحق(1) تطابق عزلة *A. niger* العزلات العالمية في GenBank.

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Penicillium brefeldianum strain Hussain3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA …	Penicillium brefe…	1027	1027	100%	0.0	100.00%	556	OR243742.1
Penicillium brefeldianum EBT-1 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	Penicillium brefe…	946	946	96%	0.0	98.51%	561	LC475454.1
Penicillium oxalicum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra…	Penicillium oxali…	944	944	96%	0.0	98.33%	564	MH367526.1
Penicillium sp. isolate CB3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,…	Penicillium sp.	944	944	96%	0.0	98.33%	582	OQ152079.1
Penicillium oxalicum isolate C7-8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an…	Penicillium oxali…	942	942	96%	0.0	98.50%	563	MG818939.1
Talaromyces funiculosus isolate P1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene …	Talaromyces funi…	942	942	96%	0.0	98.50%	563	KX400570.1
Penicillium oxalicum isolate 36second week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R…	Penicillium oxali…	942	942	96%	0.0	98.50%	567	ON790407.1
Penicillium oxalicum isolate INF9 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an…	Penicillium oxali…	942	942	96%	0.0	98.33%	564	MZ227287.1
Penicillium oxalicum isolate CLC-MF05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g…	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	601	MT597864.1
Penicillium oxalicum isolate 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer…	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	613	MT588795.1
Penicillium sp. isolate 26 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5…	Penicillium sp.	941	941	96%	0.0	98.15%	1064	MT588790.1
Fungal sp. isolate C1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S …	fungal sp.	941	941	96%	0.0	98.15%	595	MT557034.1
Penicillium oxalicum clone SF_700 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s…	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	598	MT529976.1
Penicillium oxalicum clone SF_685 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s…	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	598	MT529961.1
Penicillium oxalicum clone SF_524 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s…	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	599	MT529800.1
Penicillium oxalicum clone SF_313 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene …	Penicillium oxali…	941	941	96%	0.0	98.15%	561	MT529589.1

ملحق(2) تطابق عزلة *P. brefeldianum* مع العزلات العالمية في GenBank

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus fumigatus strain Hussain4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Aspergillus fumig...	1055	1055	100%	0.0	100.00%	571	OR243745.1
Aspergillus fumigatus strain CITH-Fungus3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Aspergillus fumig...	987	987	96%	0.0	99.09%	634	OR077592.1
Uncultured fungus clone Z1E-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri...	uncultured fungus	987	987	95%	0.0	99.45%	621	KJ834341.1
Aspergillus fumigatus strain IITRSC519 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Aspergillus fumig...	987	987	95%	0.0	99.45%	584	MT989355.1
Aspergillus fumigatus culture CBS:508.64 strain CBS 508.64 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence;...	Aspergillus fumig...	983	983	95%	0.0	99.26%	588	MH858497.1
Aspergillus fumigatus genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA ...	Aspergillus fumig...	983	983	95%	0.0	99.26%	618	OW982532.1
Aspergillus fumigatus isolate 13-F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Aspergillus fumig...	983	983	95%	0.0	99.09%	565	GU266273.1
Aspergillus fumigatus strain F3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib...	Aspergillus fumig...	983	983	95%	0.0	99.26%	593	FJ214371.1
Aspergillus fumigatus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	579	MT635279.1
Trametes elegans isolate MEBP0066 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Trametes elegans	981	981	95%	0.0	99.26%	588	MT597442.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0074 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	728	MT597427.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0063 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	750	MT591987.1
Aspergillus oerlinghausenensis isolate 2011F22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran...	Aspergillus oerlin...	981	981	95%	0.0	99.26%	601	MT558945.1
Aspergillus fumigatus isolate 2011F6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	600	MT558940.1
Aspergillus fumigatus clone SF_991 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	605	MT530267.1
Aspergillus fumigatus clone SF_588 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	603	MT529864.1
Aspergillus fumigatus clone SF_501 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	603	MT529777.1
Aspergillus fumigatus isolate S1-31 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Aspergillus fumig...	981	981	95%	0.0	99.26%	683	OR053856.1

ملحق (3) تطابق عزلة *A. fumigatus* العزلات العالمية في GenBank.

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus fumigatus strain Hussain5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,...	Aspergillus fumig...	1037	1037	100%	0.0	100.00%	561	OR243749.1
Aspergillus fumigatus isolate 224_1_4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Aspergillus fumig...	981	981	97%	0.0	98.91%	601	MW789036.1
Uncultured fungus clone Z1E-11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri...	uncultured fungus	977	977	95%	0.0	99.44%	621	KJ834341.1
Aspergillus fumigatus strain SSH01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Aspergillus fumig...	976	976	97%	0.0	98.90%	608	KT266801.1
Aspergillus fumigatus isolate ZW-L-20 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Aspergillus fumig...	976	976	97%	0.0	98.90%	602	OP482428.1
Aspergillus sp. MBL1412 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr...	Aspergillus sp. M...	974	1346	97%	0.0	98.90%	1110	KM924434.1
Aspergillus fumigatus isolate F2P5Rs internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Aspergillus fumig...	974	974	97%	0.0	98.72%	601	OL981325.1
Aspergillus fumigatus strain AHBR7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Aspergillus fumig...	974	974	97%	0.0	98.72%	942	KF305746.1
Aspergillus fumigatus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S rib...	Aspergillus fumig...	972	972	95%	0.0	99.26%	579	MT635279.1
Trametes elegans isolate MEBP0066 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Trametes elegans	972	972	95%	0.0	99.26%	588	MT597442.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0074 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Aspergillus fumig...	972	972	97%	0.0	98.72%	728	MT597427.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0063 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Aspergillus fumig...	972	972	95%	0.0	99.26%	750	MT591987.1
Aspergillus oerlinghausenensis isolate 2011F22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran...	Aspergillus oerlin...	972	972	95%	0.0	99.26%	601	MT558945.1
...internal transcribed sp...	Aspergillus fumig...	972	972	95%	0.0	99.26%	600	MT558940.1

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OR243749.1?report=genbank&log$=nuclTop&blast_rank=1&RID=CTS0CNUK013

ملحق(4) تطابق عزلة *A. fumigatus 2* العزلات العالمية في GenBank.

select all *100 sequences selected* GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus fumigatus strain Hussain6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, ...	Aspergillus fumig...	1040	1040	100%	0.0	100.00%	563	OR243753.1
Aspergillus fumigatus strain Hussain8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, ...	Aspergillus fumig...	571	571	98%	5e-158	85.69%	557	OR243757.1
Aspergillus fumigatus clone M3Ai 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ...	Aspergillus fumig...	551	551	95%	7e-152	85.50%	707	MH378448.1
Aspergillus fumigatus strain Hussain5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, ...	Aspergillus fumig...	551	551	98%	7e-152	84.96%	561	OR243749.1
Aspergillus fumigatus isolate F2P1Rb small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Aspergillus fumig...	551	551	95%	7e-152	85.53%	600	OL981336.1
Aspergillus fumigatus isolate WW3A2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Aspergillus fumig...	551	551	95%	7e-152	85.37%	594	MW485744.1
Aspergillus fumigatus strain C167N small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Aspergillus fumig...	547	547	95%	9e-151	85.40%	603	OP237382.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0062 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gen...	Aspergillus fumig...	545	545	95%	3e-150	85.35%	651	MT593013.1
Aspergillus fumigatus isolate DGGE gel band small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc...	Aspergillus fumig...	545	545	95%	3e-150	85.35%	577	MN519789.1
Aspergillus fumigatus isolate F11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Aspergillus fumig...	545	545	95%	3e-150	85.35%	653	MK816855.1
Aspergillus fumigatus strain Lahuf-A.fum.1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Aspergillus fumig...	545	545	83%	3e-150	87.82%	509	MK070012.1
Aspergillus fumigatus isolate OI5F1T small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Aspergillus fumig...	545	545	96%	3e-150	85.14%	840	KY523044.1
Aspergillus fumigatus strain ASPF-6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Aspergillus fumig...	545	545	95%	3e-150	85.35%	574	KX950672.1
Aspergillus fumigatus strain AX4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and int...	Aspergillus fumig...	545	545	83%	3e-150	87.82%	532	OR053694.1
Aspergillus fumigatus isolate 3-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and in...	Aspergillus fumig...	545	545	83%	3e-150	87.82%	548	KT257728.1

ملحق(5) تطابق عزلة 3 *A. fumigatus* العزلات العالمية في GenBank.

Description	Scientific Name	Score	Score	Cover	value	Ident	Len	Accession
Cephaliophora sp. strain Hussain7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Cephaliophora sp.	1011	1011	100%	0.0	100.00%	547	OR243755.1
Uncultured soil fungus clone C119 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	uncultured fungus	894	894	96%	0.0	97.34%	619	JX489836.1
Uncultured soil fungus clone D147 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	uncultured fungus	894	894	96%	0.0	97.34%	619	JX489812.1
Uncultured Cephaliophora clone SI16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, ...	uncultured Ceph...	861	861	96%	0.0	96.20%	619	KC922140.1
Uncultured fungus clone OTU920 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g...	uncultured fungus	856	856	96%	0.0	96.02%	620	MF971816.1
Uncultured Cephaliophora clone SI10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, ...	uncultured Ceph...	856	856	96%	0.0	96.02%	619	KC922134.1
Cephaliophora sp. strain TD4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	Cephaliophora sp.	813	813	91%	0.0	96.01%	515	KY814682.1
Uncultured Ascomycota clone 4M1_B03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer ...	uncultured Asco...	713	713	96%	0.0	91.17%	1599	EU489889.1
Uncultured fungus genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, clone 12C31d-ITS1F4-26	uncultured fungus	702	702	96%	0.0	90.77%	615	HG327972.1
Hogelandia lambearum strain NL19_27007 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri...	Hogelandia lamb...	684	684	93%	0.0	90.72%	578	MW883423.1
uncultured fungus genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA ge...	uncultured fungus	682	682	93%	0.0	90.70%	1534	OU943016.1
uncultured fungus genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA ge...	uncultured fungus	682	682	93%	0.0	90.70%	1448	OU938732.1
Eleutherascus lectardii CBS 626.71 ITS region; from TYPE material	Eleutherascus le...	619	619	96%	2e-172	87.95%	575	NR_159849.1
Uncultured fungus genomic DNA sequence containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rR...	uncultured fungus	614	614	96%	8e-171	87.80%	616	FN397309.1
Eleutherascus lectardii culture CBS:374.86 strain CBS 374.86 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequen...	Eleutherascus le...	610	610	96%	1e-169	87.62%	577	MH861965.1
Ascodesmis sphaerospora culture CBS:125.61 strain CBS 125.61 small subunit ribosomal RNA gene, partial seq...	Ascodesmis sph...	610	610	95%	1e-169	88.00%	575	MH857994.1
uncultured fungus genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA ge...	uncultured fungus	610	610	96%	1e-169	87.76%	1449	OU939011.1

ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_2532685027

ملحق(6) تطابق عزلة *Cephaliophora* sp العزلات العالمية في GenBank.

Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus fumigatus strain Hussain8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom…	Aspergil…	NA	746128	1029	1029	100%	0.0	100.00%	557	OR243757.1
Aspergillus fumigatus clone EF_476 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	594	MT529125.1
Aspergillus sp. isolate JH-4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe…	Aspergil…	NA	5065	896	896	95%	0.0	97.01%	591	MT487788.1
Aspergillus fumigatus isolate RRF02 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal t…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	568	MT184802.1
Aspergillus sp. isolate C.S4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe…	Aspergil…	NA	5065	896	896	95%	0.0	97.01%	594	MN535082.1
Aspergillus fumigatus isolate SC_OC17_49 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	558	MN634670.1
Aspergillus sp. isolate RSO_SP17_16B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S riboso…	Aspergil…	NA	5065	896	896	95%	0.0	97.01%	557	MN634622.1
Aspergillus fumigatus isolate CM_SP17_35B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; i…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	555	MN634483.1
Aspergillus fumigatus isolate CM_SP17_23B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ri…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	550	MN634476.1
Aspergillus fumigatus isolate 1110009L1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S riboso…	Aspergil…	NA	746128	896	896	97%	0.0	96.69%	546	MN559667.1
Aspergillus fumigatus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	554	MK411417.1
Aspergillus fumigatus isolate MJA small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	559	MN197784.1
Aspergillus fumigatus isolate MUST small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr…	Aspergil…	NA	746128	896	1187	95%	0.0	97.01%	754	MK205155.1
Aspergillus fumigatus strain FOD small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	543	MH810080.1
Aspergillus fumigatus strain IS2_8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	584	MK461034.1
Aspergillus fumigatus isolate SG-17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal …	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	566	MK450298.1
Aspergillus fumigatus isolate S2-R small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	1116	MG674663.1
last.ncbi.nlm.nih.gov… ıall subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra…	Aspergil…	NA	746128	896	896	95%	0.0	97.01%	557	MG659675.1

ملحق(7)تطابق عزلة 4 *A. fumigatus* العزلات العالمية في GenBank.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus fumigatus strain Hussain10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed …	Aspergillus fumig…	1048	1048	100%	0.0	100.00%	567	OR243759.1
Aspergillus fumigatus clone SF_172 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	974	974	99%	0.0	97.88%	605	MT529448.1
Aspergillus sp. isolate AL2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8…	Aspergillus sp.	972	972	99%	0.0	97.87%	602	MN519723.1
Aspergillus fumigatus isolate 13-F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8…	Aspergillus fumig…	972	972	99%	0.0	97.87%	565	GU266273.1
Aspergillus sp. isolate AP5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8…	Aspergillus sp.	970	970	98%	0.0	98.20%	589	MN519725.1
Aspergillus fumigatus strain V-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer …	Aspergillus fumig…	970	970	99%	0.0	97.87%	599	MK490926.1
Aspergillus sp. isolate Aspersp0001 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an…	Aspergillus sp.	970	970	98%	0.0	98.20%	586	OP526910.1
Trametes elegans isolate MEBP0066 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp…	Trametes elegans	968	968	97%	0.0	98.20%	588	MT597442.1
Aspergillus fumigatus isolate MEBP0074 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe…	Aspergillus fumig…	968	1071	99%	0.0	97.70%	728	MT597427.1
Aspergillus fumigatus clone SF_202 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	99%	0.0	97.70%	606	MT529478.1
Aspergillus fumigatus clone SF_168 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	99%	0.0	97.70%	621	MT529444.1
Aspergillus fumigatus clone SF_152 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	97%	0.0	98.20%	625	MT529428.1
Aspergillus fumigatus clone SF_151 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	97%	0.0	98.20%	606	MT529427.1
Aspergillus fumigatus clone SF_148 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	97%	0.0	98.20%	608	MT529424.1
Aspergillus sp. isolate Melodinus suaveolens. small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transc…	Aspergillus sp.	968	968	97%	0.0	98.20%	600	MT084578.1
Aspergillus fumigatus strain TZT-18-24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed …	Aspergillus fumig…	968	968	99%	0.0	97.70%	601	MH919847.1
Aspergillus fumigatus strain MS13.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa…	Aspergillus fumig…	968	968	97%	0.0	98.20%	594	MK329206.1
Aspergillus fumigatus isolate Cuc4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and …	Aspergillus fumig…	968	968	97%	0.0	98.20%	560	MF185151.1

ملحق(8) تطابق عزلة 5 *A. fumigatus* العزلات العالمية في GenBank.

Description	Scientific Name	Score	Score	Cover	value	Ident	Acc. Len	Accession
Penicillium oxalicum strain Hussain11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ge...	Penicillium oxali...	1035	1035	100%	0.0	100.00%	560	OR243760.1
Penicillium brefeldianum strain Hussain3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ...	Penicillium brefe...	824	824	93%	0.0	94.90%	556	OR243742.1
Penicillium oxalicum isolate 2third week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA g...	Penicillium oxali...	817	817	98%	0.0	93.32%	574	ON790434.1
Penicillium brefeldianum EBT-1 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	Penicillium brefe...	811	811	95%	0.0	94.17%	561	LC475454.1
Penicillium oxalicum isolate 13second week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Penicillium oxali...	809	809	98%	0.0	93.00%	568	ON790384.1
Penicillium oxalicum genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain TUHT127	Penicillium oxali...	804	804	99%	0.0	92.68%	591	LN482523.1
Penicillium oxalicum isolate 49third week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ...	Penicillium oxali...	800	800	96%	0.0	93.21%	559	ON790481.1
Penicillium oxalicum genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, strain TUHT129	Penicillium oxali...	798	798	99%	0.0	92.50%	575	LN482525.1
Penicillium oxalicum isolate 36second week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Penicillium oxali...	797	797	98%	0.0	92.75%	567	ON790407.1
Penicillium oxalicum strain WZ-148 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Penicillium oxali...	795	795	98%	0.0	92.47%	596	MN856292.1
Penicillium oxalicum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra...	Penicillium oxali...	795	795	93%	0.0	94.08%	564	MH367526.1
Penicillium oxalicum strain AC99 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Penicillium oxali...	795	795	98%	0.0	92.75%	552	OQ933345.1
Penicillium oxalicum strain AC60 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Penicillium oxali...	795	795	97%	0.0	93.04%	561	OQ933308.1
Penicillium sp. isolate CB3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1,...	Penicillium sp.	795	795	93%	0.0	93.93%	582	OQ152079.1
Penicillium oxalicum isolate 37second week internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal R...	Penicillium oxali...	795	795	98%	0.0	92.75%	561	ON790408.1
Penicillium oxalicum genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, isolate TUHT83	Penicillium oxali...	795	795	93%	0.0	93.93%	589	LN482479.1
Penicillium oxalicum strain p19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Penicillium oxali...	793	793	98%	0.0	92.46%	602	MN795755.1
Penicillium oxalicum isolate C7-8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Penicillium oxali...	793	793	93%	0.0	94.07%	563	MG818939.1
Talaromyces funiculosus isolate P1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Talaromyces funi...	793	793	93%	0.0	94.07%	563	KX400570.1

ملحق (9) تطابق عزلة *P. oxalicum* العزلات العالمية في GenBank.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus niger strain Hussain12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, co...	Aspergillus niger	1038	1038	100%	0.0	100.00%	562	OR243776.1
Aspergillus niger isolate BHU017 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed space...	Aspergillus niger	894	894	97%	0.0	96.17%	575	ON845751.1
Aspergillus sp. isolate CA50 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Aspergillus sp.	891	891	97%	0.0	96.00%	603	OP737618.1
Aspergillus niger isolate 29OCT internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, compl...	Aspergillus niger	889	889	97%	0.0	95.99%	569	ON712259.1
Aspergillus sp. isolate KZ-15 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Aspergillus sp.	889	889	97%	0.0	95.99%	594	MW369587.1
Aspergillus niger isolate RRF04 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer ...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	579	MT184804.1
Aspergillus niger isolate LRP15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer ...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	623	MN372402.1
Aspergillus niger isolate SOS2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	661	MK543209.1
Aspergillus niger strain SG1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	700	MH091026.1
Penicillium georgiense isolate EV24 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Penicillium georg...	887	887	95%	0.0	96.47%	597	MK108398.1
Aspergillus niger strain ND10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 ...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	568	MG659604.1
Aspergillus niger strain RF7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	587	KY357318.1
Aspergillus niger isolate AN2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, ...	Aspergillus niger	887	1191	95%	0.0	96.47%	1003	OR237575.1
Aspergillus sp. strain sand2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Aspergillus sp.	887	887	95%	0.0	96.47%	578	OR205245.1
Aspergillus sp. strain PS4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and ...	Aspergillus sp.	887	887	95%	0.0	96.47%	582	OR205231.1
Aspergillus niger strain URM7014 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	636	KM613139.1
Aspergillus niger strain 2-00349-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	573	KT192372.1
Aspergillus niger isolate 55OCT internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, compl...	Aspergillus niger	887	887	95%	0.0	96.47%	556	ON712285.1

ملحق(10)تطابق عزلة *Aspergillus niger2* العزلات العالمية في GenBank

Aspergillus niger strain Hussain1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR234859.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR234859                  567 bp    DNA     linear
PLN 12-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus niger strain Hussain1 small subunit
ribosomal RNA gene,
            partial sequence; internal transcribed spacer 1
and 5.8S ribosomal
            RNA gene, complete sequence; and internal
transcribed spacer 2,
            partial sequence.
ACCESSION   OR234859
VERSION     OR234859.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 567)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 567)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..567
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain1"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:5061"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>567
                     /note="contains small subunit ribosomal
RNA, internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,
and internal
                     transcribed spacer 2"
ORIGIN
        1 ttttcccgta gggtgacctg cggaaggatc attaccgagt
gcgggtcctt tgggcccaac
       61 ctcccatccg tgtctattgt aaccctgttg cttcggcggg
ccccgccgct tgtcggccgc
      121 cgggggaggc gcctctgccc cccgggcccg tgcccgccgg
agacccccaac tcgaacactg
      181 tctgaaagcg tgcagtctga gttgattgaa tgcaatcagt
taaaactttc aacaatggat
      241 ctcttggttc cggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg
ataactaatg tgaattgcag
      301 aattcagtga atcatcgagt ctttgaacgc acattgcgcc
ccctggtatt ccgggggggca
      361 tgcctgtccg agcgtcattg ctgccctcaa gcccggcttg
tgtgttgggt cgccgtcccc
      421 ctctccgggg ggacgggccc gaaaggcagc ggcggcaccg
cgtccgatcc tcgagcgtat
      481 ggggctttgt cacatgctct gtaggattgg ccggcgccta
ccgacgtttt ccaaacattc
      541 tttggcaagg tggacctttg gggcaac
//
```

Penicillium brefeldianum strain Hussain3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR243742.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243742                  556 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Penicillium brefeldianum strain Hussain3 internal
transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA
gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR243742
VERSION     OR243742.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Penicillium brefeldianum
  ORGANISM  Penicillium brefeldianum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Penicillium.
REFERENCE   1  (bases 1 to 556)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 556)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..556
                     /organism="Penicillium brefeldianum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain3"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:1131482"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>556
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed
spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gaggaggccc tctggtccac ctcccacccg tgtttatcgt
acctttgttgc ttcggcgggc
       61 ccgcctcacg gccgccgggg ggcatccgcc cccgggcccg
cgcccgccga agacacacaa
      121 acgaactctt gtctgaagat tgcagtctga gtacttgact
aaatcagtta aaactttcaa
      181 caacggatct cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc
gaaatgcgat aagtaatgtg
      241 aattgcagaa ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac
attgcgcccc ctggtattcc
      301 ggggggcatg cctgtccgag cgtcattgct gccctcaagc
acggcttgtg tgttgggctc
      361 tcgccccccg cttccggggg gcgggcacga aaggcagcgt
cggcaccgcg tccggtcctc
      421 gagcgtatgg ggcttcgtca cccgctctgt aggcccggcc
gccgcccgcc gacaaacacc
      481 atcaatctta accaggttga cctcggatca ggtagcgata
cccgctgaac ttaagcactg
      541 agcccccgggg gggggg
//
```

Aspergillus fumigatus strain Hussain4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR243745.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243745                  571 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus fumigatus strain Hussain4 internal
transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and
internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR243745
VERSION     OR243745.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
  ORGANISM  Aspergillus fumigatus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 571)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 571)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..571
                     /organism="Aspergillus fumigatus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain4"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:746128"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>571
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed
spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tttttctccc gggggggttt cacggaagga tcattgccga
gtgagggccc tctgggtcca
       61 tcctcccacc cgtgtctatc gtaccttgtt gcttcggcgg
gcccgccgtt tcgacggccg
      121 ccgggggaggc cttgcgcccc cgggcccgcg cccgccgaag
accccaacat gaacgctgtt
      181 ctgaaagtat gcagtctgag ttgattatcg taatcagtta
aaactttcaa caacggatct
      241 cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat
aagtaatgtg aattgcagaa
      301 ttcagtgaat catcgagtct tcgaacgcac attgcgcccc
ctggtattcc gggggggcatg
      361 cctgtccgag cgtcattgct gccctcaagc acggcttgtg
tgttgggccc ccgtcccccct
      421 ctcccgggggg acgggcccga aaggcagcgg cggcaccgcg
tccggtcctc gagcgtatgg
      481 ggctttgtca cctgctctgt aggcccggcc ggcgccagcc
gacacccaac tttatttctc
      541 taaggttgac ctcggatcag gtaggacccc t
//
```

Aspergillus fumigatus strain Hussain5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR243749.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243749                  561 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus fumigatus strain Hussain5 internal
transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,
complete sequence;
            and internal transcribed spacer 2, partial
sequence.
ACCESSION   OR243749
VERSION     OR243749.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
  ORGANISM  Aspergillus fumigatus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 561)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 561)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..561
                     /organism="Aspergillus fumigatus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain5"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:746128"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>561
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, and internal transcribed
spacer 2"
ORIGIN
        1 ttttccccccc ggggggggtc tcggaaggat cattgccgag
tgagggccct ctgggtccaa
       61 cctcccaccc gtgtctatcg taccttgttg cttcggcggg
cccgccgttt cgacgggcgc
      121 cggagaggcc ttgcgctccc gggcccgcgc ccgccgaaga
ccccaacatg aacgctgttc
      181 tgaaagtatg cagtctgagt tgattatcgt aatcagttaa
aactttcaac aacggatctc
      241 ttggttccgg catcgatgaa gaacgcagcg aaatgcgata
agtaatgtga attgcagaat
      301 tcagtgaatc atcgagtctt tgaacgcaca ttgcgccccc
tggtattccg gggggcatgc
      361 ctgtccgagc gtcattgctg ccctcaagca cggcttgtgt
gttgggcccc cgtccccctc
      421 tcccgggggga cgggcccgaa aggcagcggc ggcaccgcgt
ccggtcctcg agcgtatggg
      481 gctttgtcac ctgctctgta ggcccggccg gcgccagccg
acacccaact ttatttttct
      541 aaggttgacc tcggatcaga g
//
```

Aspergillus fumigatus strain Hussain6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR243753.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243753                  563 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus fumigatus strain Hussain6 internal
transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,
complete sequence;
            and internal transcribed spacer 2, partial
sequence.
ACCESSION   OR243753
VERSION     OR243753.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
  ORGANISM  Aspergillus fumigatus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 563)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 563)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..563
                     /organism="Aspergillus fumigatus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain6"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:746128"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>563
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, and internal transcribed
spacer 2"
ORIGIN
        1 acgttttctc ccccgggggt ttctgcggaa ggatcattac
cggggatacg gggccttttg
       61 gggcgcgacc tcccctagca gtaattaaac tttaccttgt
tgcttgcggc ggggcccggcc
      121 ctttagaaca ggtgcgggaa ccccttacgc tcgagggccc
gcgcccgccg aagaccccaa
      181 cacaacgctg ttctgaaagt atgcagtctg agttgattat
cgtaatcagt taaaactttc
      241 aacaactgat ctcttggtac cggcatcgat gaaaatcgca
gcgaaagccg agaactaatg
      301 tgaattggat aattcagtga atcatcgagt ctttgtaagt
acattgctct ccctggtatt
      361 ccggtcgcat gcctgtcaag cgtcatgttg gccaaagttt
tcggcttgtg tgataatcaa
      421 ccgtcccccc ctccccgggggg acgggcccga aaggcagcgg
cgcaccgcgt ccggtcctcg
      481 agcgtatggg gctttgtcac ctgctctgta ggcccggccc
gcgccagccg acaagcaact
      541 ttatttttct agaggtgacc ctg
//
```

Cephaliophora sp. strain Hussain7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR243755.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243755                  547 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Cephaliophora sp. strain Hussain7 internal
transcribed spacer 1,
            partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and
internal transcribed
            spacer 2, complete sequence; and large subunit
ribosomal RNA gene,
            partial sequence.
ACCESSION   OR243755
VERSION     OR243755.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Cephaliophora sp.
  ORGANISM  Cephaliophora sp.
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Pezizomycetes; Pezizales; Ascodesmidaceae;
Cephaliophora.
REFERENCE   1  (bases 1 to 547)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 547)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..547
                     /organism="Cephaliophora sp."
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain7"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:2031148"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>547
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed
spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgattttata ttctttatca acccacactg tgtacctttt
tactgttgct tccatgggac
       61 atggctctgc cacgtcggcc ttatggctgg tgagcgccca
tgggaggaaa acaaaactct
      121 ttgttacaat tgaagtctgt ctgaattgtt tatattaaac
gttaaaactt tcaacaacgg
      181 atctcttggt tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg
cgatacgtag tgtgaattgc
      241 agaattcaga gaatcatcga atctttgaac gcacattgcg
cctcctggta ttccgggagt
      301 catgcatgtt cgagcgtcat caaaaacctc agtctctgat
ttatcattga ttggtcttgc
      361 atcggatgtt catggcgtcc cctgagatat ccaatggcga
agagccacgc tcaccaaagc
      421 gtagtataat aaacctcgta atggatgtgt gtgtgcttct
gccgtaaccc acacattctt
      481 agtttttgac ctctgatcaa gtagggatac ccgctgaact
taagcatata acccccccggg
      541 gaaaaaa
```

Aspergillus fumigatus strain Hussain8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR243757.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243757                  557 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus fumigatus strain Hussain8 internal
transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,
complete sequence;
            and internal transcribed spacer 2, partial
sequence.
ACCESSION   OR243757
VERSION     OR243757.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
  ORGANISM  Aspergillus fumigatus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 557)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 557)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..557
                     /organism="Aspergillus fumigatus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain8"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:746128"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>557
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, and internal transcribed
spacer 2"
ORIGIN
        1 gatttcccca gggggttct gcggaaggat cattaccgag
tgagggccct ctgggtccaa
       61 cctcccaccc gtgttatatc gtaccttgtt gcttcggcgg
gcccgggcgtt tcgaccggcg
      121 gcgggagagg cctttgcgcc cccggggccc gcgcccgccg
aagaccccaa catgaacgct
      181 gttctgaaag tatgcagtct gagttgatta tcgtaatcag
ttaaaacttt caacaacgga
      241 tctcttggtt ccggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc
gataagtaat gtgaattgca
      301 gaattcagtg aatcatcgag tcttcgaacg cacattgcgc
ccccttggtat tccgggggggc
      361 atgcctgtcc gagcgtcatt gctgccctag agcacggctt
gtgtgttgtc acccgtcccc
      421 ctctcccggg ggacgggccc gaaaggcagc ggcgcaccgc
gtccggtcct cgagcgtatg
      481 gggctttgtc acctgctctg taggcccggc cggcgccagc
cgacacccaa ctttattttt
      541 ctaaggtgac ctgggct
```

Aspergillus fumigatus strain Hussain10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR243759.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243759                  567 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus fumigatus strain Hussain10 small
subunit ribosomal RNA
            gene, partial sequence; internal transcribed
spacer 1 and 5.8S
            ribosomal RNA gene, complete sequence; and
internal transcribed
            spacer 2, partial sequence.
ACCESSION   OR243759
VERSION     OR243759.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
  ORGANISM  Aspergillus fumigatus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 567)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 567)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..567
                     /organism="Aspergillus fumigatus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain10"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:746128"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>567
                     /note="contains small subunit ribosomal
RNA, internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA,
and internal
                     transcribed spacer 2"
ORIGIN
        1 atttccgcag ggggtgacct gcggaaggat cattaccgag
tgagggccct ctgggtccaa
       61 cctcccaccc gtgtctatcg taccttgttg cttgggcggg
cccgccgttt cgacgggcgg
      121 ccagagaggc cttgcgcccc cgggcccgcg cccgccgaag
accccaacat gaacgctgtt
      181 ctgaaagtat gcagtctgag ttgattatcg taatcagtta
aaactttcaa caacggatct
      241 cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc gaaatgcgat
aagtaatgtg aattgcagaa
      301 ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac attgcgcccc
ctggtattcc gggggggcatg
      361 cctgtccgag cgtcattgct gccctcaagc acggcttgtg
tgttgggcaa ccgtcccccct
      421 ctcccgggggg acgggcccga aaggcagcgg cggcaccgcg
tccggtcctc gagcgtatgg
      481 ggctttgtca cctgctctgt aggcccggcc ggcgccagcc
```

Penicillium oxalicum strain Hussain11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR243760.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243760                  560 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Penicillium oxalicum strain Hussain11 internal
transcribed spacer
            1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and
internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large
subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR243760
VERSION     OR243760.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Penicillium oxalicum
  ORGANISM  Penicillium oxalicum
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Penicillium.
REFERENCE   1  (bases 1 to 560)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 560)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..560
                     /organism="Penicillium oxalicum"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain11"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:69781"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>560
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed
spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 tgcgaggggc ctctggtcca cctcccaccc gtgtttatcg
taccttgttg cttcggcggg
       61 cccgcctcac ggccgccggg gggcatccgc ccccgggctc
gcgcacgggg aagacacaca
      121 aacgaactct tgtctgaaga ttgcagtctg agtacttgac
taaatcagtt aaaactttca
      181 acaacggatc tcttggttcc ggcatcgatg aagaacgcag
cgaaatgcga taagtaatgt
      241 gaattgcaga attcagtgaa tcatcgagtc tttgaacgca
cattgcgccc cctggtattc
      301 cgggggggctt gcctgtccga gcgtcattga tgccctcaag
cacggcttgt gtgtgggggct
      361 ctcgcccccc gcttccgggg tctgggcaca aaagtcagtt
tgggtacctc gtccggtcct
      421 cgagcgtatg gcgcttcgcc acccgctctg taggcccggc
cgccgccccgc cgacaaacac
      481 catcaatctt aaccaggatg acctcgcatc aggtccgtat
ccccgctgag ctcatgctag
```

Aspergillus niger strain Hussain12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: OR243776.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR243776                  562 bp    DNA     linear
PLN 13-JUL-2023
DEFINITION  Aspergillus niger strain Hussain12 internal
transcribed spacer 1,
            partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene,
complete sequence; and
            internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION   OR243776
VERSION     OR243776.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota;
Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales;
Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 562)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Biomolecular phenotypic study of some fungi
isolated from organic
            fertilizer and evalution of their efficiency in
producing some
            enzymes
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 562)
  AUTHORS   Al-mankoushi,H.A. and Al-zobiady,B.M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-JUL-2023) College of education for
pure sciences,
            Karbala university, street 20, Karbala, Karbala
56001, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..562
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hussain12"
                     /isolation_source="organic fertilizer"
                     /host="Animal wastes"
                     /db_xref="taxon:5061"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="12-Sep-2022"
                     /collected_by="Hussain Ali Dily Al-
mankoushi"
     misc_RNA        <1..>562
                     /note="contains internal transcribed
spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, and internal transcribed
spacer 2"
ORIGIN
        1 ttttttcccc ccgggggtgt ctcggaagga tcattagcga
gtgcgggtcc tttgggagca
       61 ccctcccata agtgtctatt gtaaactgtt gcttgggcgg
gcccgtcgct tgtcggccgc
      121 cgggggggcg cctctgcccc ccgggcgcgt gcgcgccgga
gaccccaact cgaacactgt
      181 ctgaaagcgt gcagtctgag ttgattgaat gcaatcagtt
aaaactttca acaatggatc
      241 tcttggttcc ggcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga
taactaatgt gaattgcaga
      301 attcagtgaa tcatcgagtc tttgaacgca cattgcgccc
cctggtattc cgggggggcat
      361 gcctgtccga gcgtcattgc tgccctcaag cccggcttgt
gtgttgggtc gccgtccccc
      421 tctccgggggg gacgggcccg aaaggcagcg gcggcaccgc
gtccgatcct cgagcgtatg
      481 gggctttgtc acatgctctg taggattgcc ggcgcctgcc
gacctttcc aaacattctt
      541 tgcaggtaac ctgggatcaa ga
//
```

Summary:

This study aimed at identifying fungi accompanying organic fertilizer of livestock in four areas within the borders of the Holy Province of Karbala, representing from Hy- Nasir, Hy-Al-Hur and Hy- Al-Tahaddi, and the Farms of the Holy Imam Hussein Shrine.

Isolation results showed 110 fungal isolation of which 33 different isolations were selected, *Aspergillus fumigatus* recorded the highest frequency of 13.63% followed by *Aspergillus niger* and 9.09% followed by both, *Penicillium oxalicum, Penicillium brefeldianum, Cephaliophora* sp with a frequency of 5.45% 4.54, 4.54% respectively, while the *A. niger* recorded an appearance of 31.2% and *A. fumigatus*. 46.8% and *P. brefeldianum* gave an appearance of 15.6% and *P. oxalicum* at 18.7% and *Cephaliophora* sp. a 15.6% appearance while the recorded the lowest appearance in 3.1%.

A.niger showed high efficiency in the production of cellulase enzyme where the diameter of the transparent halo around the colony reached 20.94 mm followed by sp*. Aspergillus* by 16.43 mm ,then *A. fumigatus 4*.The diameter of the transparent halo reached 14.68 mm while the fungus recorded *Penicillium* sp 2.8 h.8m respectively.

Fungi *A. niger, A. fumigatus* 2, *A. fumigatus*1 demonstrated a high ability to produce protease enzyme and a transparent halo diameter greater than 15 mm. *P. brefeldianum* mushroom was productive in the production of amylase enzyme with diameter of 34.31 mm followed by type *P. oxalicum* with halo diameter of 26.22 mm followed by *Cephaliophora* sp. with halo diameter of 24.89 mm. The fungi were superior to *A. niger A. fumigatus*3*, A. fumigatus* 5, on the rest of the fungi in the production of the lippies enzyme.

The fungi was visually diagnosed using certified classification switches, 10 molecular fungi were diagnosed using the polymerization chain reaction technique. (Polymerase chain reaction, PCR), represented by

A.niger 1*, P.brefeldianum, A. fumigatus* 1*, A. fumigatus*2*, A.fumigatus* 3, *Cephaliophora* sp., *A.fumigatus* 4 were recorded in National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The fungal extract of the fungus *A. niger* when concentrating (100µl) recorded the highest inhibition of bacteria (*E. coli*) was 8mm. While the concentration (75µl) gave a disincentive of 12mm as compared to the control factor, the two concentrations were not recorded (25µl and 50µl) any inhibition, and on the other hand, the fungal extract of the fungus *A. niger* did not affect the inhibition of the growth of (*Staphylococcus aurus*)bacteria, among the fungal extract of the fungus *A*. *fumigatus*4 in focus (100µl) The highest inhibition of the bacteria (*E. coli*) amounted to 8 mm of fiber given concentration (75µl) 5mm inhibition compared to the control factor. On the other hand, the concentrations 25µl and 50µl no inhibition, the fungal extract of the same against the bacteria (*Staphylococcus aurus*) recorded no inhibition ratio, the result of the fungal extract of the fungus *A*. *fumigatus*5 in focus (100µl) The highest inhibition of (*E. coli*) bacteria amounted to 9mm, while the concentration (75µl) was given 7mm inhibition compared to the control factor. On the other hand, the concentrations 25µl and 50µl no inhibition, recorded the fungal extract of the same mushrooms against the bacteria (*Staphylococcus aurus*) when concentrating (100µl) An 8mm inhibition while the concentration (75µl) gave a 6 mm inhibition as compared to the treatment of control. On the other hand, the two concentrations (25µl and 50µl) did not record any inhibition.

University of Karbala

College of Education for Pure Sciences

Department of biology

Phenotypic and molecular study of some fungi accompanying livestock organic fertilizer and assessment of their efficiency in the production of certain enzymes

A thesis

submitted to the Council of The College of Education for Pure Science, University of Karbala in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science / botany

written by

Hussein Ali Daily Sweidan Al-Mankoushi

Bachelor of Life Sciences / University of Karbala

2013

Supervised by

Asst. Prof. Dr. Ban Mousa Hassan Alzobaidy

1445 A **2024 A.D**