الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة فرحات عباس **كلية علوم الطبيعة و الحياة**

سطيف **قسم الأحياء الدقيقة**

مذكرة

مقدمة من طرف الطالبة:

ناصف هدى سارة

لنيل شهادة **الماجستير** في علم الأحياء الدقيقة

تخصص: **الهندسة الميكروبيولوجية**

فطريات سبخة: المقاومة الأسموزية لفطر *Aspergillus oryzae*

قدمت أمام لجنة المناقشة المكونة من السادة:

الأستاذ غول مصطفى **رئيسا** أستاذ بجامعة سطيف

الأستاذ لعروس العربي **مشرفا** أستاذ بجامعة سطيف

الأستاذ بلحطاب رشيد **ممتحنا** أستاذ محاضر قسم أ بجامعة سطيف

الأستاذ زروق محمد ميهوب **ممتحنا** أستاذ محاضر قسم أ بجامعة سطيف

2011-2010

بسم الله الرحمن الرحيم

تشكـــرات

إن الحمد لله نحمده و نشكره على نعمة القلم و نصيب العلم الذي وهبنا إياه، فبدونه ما كان لهذا العمل أن ينجز و لولاه ما كنا نجني ثمرة مجهودنا،

فله الحمد حتى يرضى و له الحمد إذا رضي.

أتقدم بفائق الشكر و التقدير إلى الأستاذ المشرف الدكتور

" لعروس العربي" على مساعدته و توجيهاته و نصائحه النيرة.

و أشكر جميع أعضاء لجنة المناقشة الذين قبلوا مناقشة هذا البحث:

الأستاذ غول مصطفى، الدكتور زروق محمد ميهوب

و الدكتور بلحطاب رشيد.

كما أتقدم بالشكر الخاص إلى السادة: فرج الله سمير، سعودي صلاح الدين و السيدة شريات وهيبة و كل موظفي مؤسسة الري العمومية لبلدية العلمة على مساعدتهم في إنجاز هذا البحث.

و أشكر جميع الأساتذة و الطلبة الذين أكرموا علينا بنصائحهم ومساعداتهم، وأخص بالذكرالأساتذة تكسانة عبد العزيز، قندوز علي، عريف فوزية، جلال نجيحة و ساحلي عبد الحكيم.

...جزاهم الله خيــرا

الإهداء

إلى أحب اثنين على قلبي ، يا أعز ما أملك في هذا الوجود

أمـي و أبـي العزيزين.

إلى أخواي العزيزين صلاح الدين و هيثم.

إلى كل أهلي و أقاربي دون استثناء، و أخص بالذكر جدتاي العزيزتان عائشة و جميلة، وخالتي فتيحة وخالي

عبد الحميد، إلى ليندة، سامية، مونية، رفيف، يسرى، فضيلة، وهيبة، ريمة وبنات عمي نزيهة و نسمة.

إلى كل طلبة الماجستير والماستر والدكتوراه.

هـدى سارة

الفهرس

الفهـــــــــــرس

قائمـة المختصرات

قائمـة الأشكـــال و الجـــداول

المقدمة.. 01

الفصل الأول: مراجعة المصادر

1– تعريف السبخة..03

1-1– المميزات الفيزيوكيميائية للتربة السبخة....................................03

1-2– المميزات الحيوية للتربة السبخة..04

1-2-1 – عزل و تشخيص الفطريات من البيئات عالية الملوحة.........................05

2– الفطريات..08

2-1– توزع و انتشار الفطريات في الطبيعة.......................................08

2-1-1- فطريات التربة...08

2-1- 1-1– توزيع الفطريات في التربة...08

2-1- 1-2– نشاط الفطريات في التربة...09

2-2– تنوع الفطريات في الظروف الفسيولوجية.......................................10

2-2–1– تعريف الضغط الأسموزي..10

2-2– 2– تأثير الضغط الأسموزي العالي و المنخفض على نمو و استقلاب الفطريات.........10

2-2– 3– الفطريات المتحملة للجفاف و للضغط الأسموزي العالي.............................12

3 - فسيولوجيا تأقلم الفطريات للنمو في وجود ضغط أسموزي عالي.......................13

3 -1 – توازن الأيونات.......................................13

3 -2 – ميوعة الغشاء البلازمي.......................................15

3-3 – استشعار التراكيز العالية للملح و الاستجابة لها بتعبير جيني مميز.....................16

3 -4 – إستراتيجية المحاليل المتوافقة.......................................17

3-4-1– الكحولات متعددة الهيدروكسيل و السكريات.......................18

3-4- 2 - الأحماض الأمينية و مشتقاتها.......................................20

4 – دراسة فطر *Aspergillus oryzae* 23

4-1– التصنيف.......................................23

4-2– الأهمية الاقتصادية و الصناعية لفطر *A. oryzae* 23

الفصل الثاني: المواد و الطرق

1– منطقة الدراسة.......................................26

2– جلب العينات.......................................26

2-1 – تقدير خواص عينات التربة.......................................26

3- عزل و تشخيص الفطريات.......................................28

3-1- عزل الفطريات من التربة 28

3-2- تنقية و تشخيص الفطريات المعزولة.......................................29

3-2- 1- التشخيص المورفولوجي.......................................29

3-2- 2- التشخيص المجهري.......................................29

4- دراسة فطر *Aspergillus oryzae*..30

4-1- تحديد النوع *A.oryzae* 30

4-2- انتقاء العزلة الأكثر تحملا للملوحة العالية..30

4-2-1 - على وسط صلب (قياس قطر المستعمرات).......................................30

4-2-2- على وسط سائل (تقدير مردود الكتلة الحيوية) 31

4-3- الدراسة الفسيولوجية لفطر *A. oryzae* 32

4 -3-1- تأثير الأوساط الزراعية 32

4-3- 2– تأثير درجة الحرارة..32

4-3- 3– تأثير الأس الهيدروجيني..33

4-3- 4 - تأثير مصادر الكربون و الآزوت 33

5- استخلاص الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي...34

* تحضير المعلق البوغي...34

5-1– أوساط التخمر 34

* وسط Melin-Norkans medium (MNM)...34

* وسط أدنى Minimum Medium (MM)...34

* التخمر في وسط طبيعي (نخالة القمح) Solide State Fermentation (SSF).............35

5-2 - إنتاج الكتلة الحيوية للعزلة S1..35

6- الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفرزة من طرف (S1) *A. oryzae*...............36

6-1- تحضير المستخلص الخلوي...36

6-1-1- من وسط سائل..36
6-1-2- من وسط صلب..36
6-2- الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي 36

الفصل الثالث: النتـائـج

جلب العينات...39
1- قياس العوامل الفيزيوكيميائية..39
2- عزل الفطريات و تشخيصها..41
3- دراسة فطر *A. oryzae*...46
3-1- تشخيص الفطر...46
3-1-1- الدراسة المورفولوجية...46
3-1-2- الدراسة المجهرية...46
3-1-3- أوساط التشخيص...46
3-2- دراسة تأثير الملوحة على نمو الفطر (انتقاء العزلة الأكثر تحملا للملوحة العالية).............49
3-2-1- تأثير الملوحة على قطر المستعمرات (وسط صلب)..49
3-2-2- تأثير الملوحة على مردود الكتلة الحيوية (وسط سائل)...51
3-3- الدراسة الفسيولوجية لفطر (S1) *A. oryzae*.......................................54
3-3-1- تأثير الأوساط الزراعية..54
3-3-2- تأثير درجة الحرارة...57
3-3-3- تأثير الأس الهيدروجيني pH..57

3-3-4- تأثير مصادر الكربون و الآزوت..59

4- استخلاص الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي..61

4-1- بيئات التخمر..61

4-1-1- التخمر على الأوساط الاصطناعية..61

4-1-1-1- وسط MNM..61

4-1-2- التخمر على وسط طبيعي (نخالة القمح)..61

5- الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي..64

1- الكشف عن Glycine betaine و Betaines..64

2- الكشف عن (Polyols) والسكريات..64

6- الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفرزة من طرف العزلة (S1) *A. oryzae*......................65

الفصل الرابع: المناقشة

1- الفطريات المعزولة من السبخة..71

2- تأثير الملوحة على نمو الفطر على نمو الفطر *A. oryzae*..74

3- الدراسة الفسيولوجية لفطر *A. oryzae*..76

4- المقاومة الأسموزية عند فطر *A. oryzae*..78

4-1- المقاومة الأسموزية على الأوساط الاصطناعية..79

4-2- المقاومة الأسموزية على الوسط الطبيعي (عجينة نخالة القمح SSF)..80

الخاتمة..84

الملخص..85

Abstract..86

المراجـع باللغة الأجنبية..87

المراجــع باللغة العربيـة...95

الملحـق...96

قـــائمة المختصرات

Cyclic Adenosine monophosphat :**c–AMP**

(مربع المتوسط) Mean Square :**MS**

millisiemens :**mS**

Phosphatidylcholine :**PC**

Phosphatidylethanolamine :**PEA**

(مجموع المربعات) Sum of Squares :**SS**

Solide State Fermentation :**SSF**

Thin Layer Chromatography :**TLC**

قـائمة الأشكـال:

شكل01: المميزات الأساسية لتأثير الضغط الأسموزي العالي و المنخفض عند خميرة *S. cerevisiae*.........12

شكل02: مخطط لمختلف المركبات التي تدخل في آليات الاستجابة للضغط الأسموزي

لدى حقيقيات النواة...14

شكل03: موقع جمع عينات التربة من سبخة البيضاء في منطقة حمام السخنة.........................27

شكل04: نسبة انتشار الفطريات حسب فترات و مواقع أخذ العينات...............................45

شكل05: مستعمرة *A. oryzae* منماة على وسط PDA عند درجة حرارة 30°م.........................47

شكل06: الرأس البوغية لفطر *A. oryzae* تحت المجهر..47

شكل07: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

منمى على وسط YESA...50

شكل08: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

منمى على وسط أدنى MMA..50

شكل09: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

منمى على وسط YES السائل..52

شكل10: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

منمى على الوسط الأدنى السائل...53

شكل 11: تأثير الأوساط الزراعـية على شكل المستعمرات لفطر *A. oryzae*.......................55

شكل 12: تأثير الأوساط الزراعـية على نمو الفطر *A. oryzae*.............................. 56

شكل 13: تأثير درجة الحرارة على نمو الفطر *A. oryzae*.................................. 58

شكل 14: تأثير درجة الأس الهيدروجيني على نمو الفطر *A. oryzae* 58

شكل 15: تأثير مصادر الكربون على نمو الفطر *A. oryzae* 60

شكل 16: تأثير مصادر الآزوت على نمو الفطر *A. oryzae*......................................60

شكل17: تأثير التراكيز المختلفة من الملح على نمو العزلة (S1) *A. oryzae* على وسط MNM السائل.......62

شكل 18: نمو العزلة (S1) *A.oryzae* على عجينة نخالة القمح (SSF)...................................63

شكل19: فصل Betaines باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)...........................66

شكل20: فصل الكحولات متعددة الهيدروكسيل و السكريات الأساسية باستعمال كروماتوغرافيا

الطبقة الرقيقة..67

قــــائــمة الجــداول:

جدول01: تعـداد الكائنات الحية الدقيقة بدلالة الملوحة. 04

جدول02: التركيب الكيميائي لبعض البيئات عالية الملوحة و مقارنتها بماء البحر. 05

جدول03: أهم الفطريات المحبة و المتحملة للملوحة المعزولة من البيئات عالية الملوحة. 07

جدول04: بعض أنواع المحاليل المتوافقة التي تستعملها الفطريات.......................................21

جدول05: الخصائص الفيزيوكيميائية لعينات التربة المأخوذة خلال شهري مارس و جويلية............40

جدول06: قائمة الفطريات المعزولة بناء على الأوساط المستخدمة و الفترة الزمنية................42

جدول07: الخصائص المزرعية لفطر *A. oryzae* النامي على أوساط التشخيص بعد 7 أيام

حضن في درجات حرارة مختلفة...48

جدول08: الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفروة من طرف عزلة (S1) *A. oryzae*.................70

المقدمة

المقــدمــة

تعتبر التربة موطن للعديد من الكائنات الحية الدقيقة بكل أنوعها. تمثل الفطريات نسبة كبيرة منها، و هي تلعب دورا أساسيا في صيانة و تسيير النظم البيئية التي تحيط بالإنسان كاستمرار الدورة الطبيعية، و ذلك بتحويل المواد العضوية الميتة (خاصة بقايا النباتات) إلى مواد قابلة للاستعمال عن طريق تحليلها بالإنزيمات المحررة بالوسط. و منذ وقت طويل و إلى يومنا هذا يستغل الإنسان هذه القوة المحللة للفطريات لاستعمالها في شتى المجالات مثل صناعة الغذاء، إنتاج الأحماض و الكحولات العضوية، المضادات الحيوية، البروتينات و غيرها (Schutyser، 2003). يعتبر التحويل الحيوي للمخلفات الزراعية إحدى أهم العمليات التي تقوم بها الكائنات الحية الدقيقة نظرا لإيجابياتها، فمن جهة، تقلل من التلوث الذي تسببه هذه المخلفات، و من ناحية أخرى، إنتاج مواد ذات جودة عالية. يتأثر نشاط و تنوع الفطريات في التربة بعوامل حيوية و غير حيوية (biotic and abiotic)، و يعتبر المناخ العامل غير الحيوي الأكثر أهمية، و الذي يتضمن درجة الحرارة، الرطوبة، pH و الملوحة. و يؤدي التغير في أحد هذه العوامل إلى تشكيل ما يسمى بالظروف البيئية القاسية (Extreme envirenments). و تعتبر الملوحة العالية أحد أهم هذه العوامل والتي تؤثر على نشاط و فسيولوجية الخلايا الفطرية، حيث تسبب ارتفاع الضغط الأسموزي، وبالتالي تؤدي إلى انخفاض المحتوى المائي الخلوي. تحدث مشكلة ملوحة التربة نتيجة لزيادة تراكم الأملاح فيها، خصوصا أملاح المغنيسيوم و أملاح الصوديوم. حيث ترجع هذه الزيادة إلى ارتفاع معدل تبخر المياه. تشغل التربة المالحة حوالي 7 % من مساحة اليابسة، و هي تتميز بخصائص فيزيائية غير ملائمة لنمو الكائنات الحية، إلا أن الأبحاث أظهرت أن بعض الكائنات الحية الدقيقة، و خاصة الفطريات قادرة على النمو و التكيف لمثل هذه الظروف، إذ ترجع هذه القدرة إلى تطوير مجموعة مختلفة من الآليات الفسيولوجية للتأقلم. وتعتبر آلية تراكم و/أو إنتاج المحاليل المتوافقة، وخاصة الكحولات متعددة الهيدروكسيل، أهم هذه الاستراتيجيات المتبعة من طرف الفطريات (Kogej و آخرون،2005).

يعزى اهتمام الباحثين بمشكلة الملوحة بسبب تحول مناطق زراعية شاسعة سنويا إلى مناطق غير صالحة للزراعة. و السؤال الذي يطرح نفسه هو: إذا كانت هذه التربة غير صالحة للزراعة، فهل يمكن استغلالها و الاستفادة منها بطرق أخرى غير مباشرة في مجالات مختلفة؟ و للإجابة على السؤال اتبعنا الإستراتيجية التالية :

- عزل و تشخيص الميكوفلورا الكلية لتربة سبخة حمام السخنة، خلال موسمين (مارس و جويلية)، ثم ركزت الدراسة على فطر مفيد هو *Aspergillus oryzae* ، حيث أجري له اختبار تحمل الملوحة لتحديد التركيز الملحي الأقصى الذي يتحمله ، و انتقاء العزلة الأكثر تحملا. كما أجريت عليه دراسة فسيولوجية لتحديد ظروف نموه المثلى (درجة الحرارة، pH، مصادر الكربون و الآزوت).
- و في المرحلة الثانية سوف يتم التحري عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي و تعريفها باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

مراجـــــعة المصـــادر

1- تعريف السبخة:

يطلق لفظ سبخة على الأراضي المنخفضة و المستوية أين تتراكم فيها مياه الأمطار و الترسبات لكي تحمي الأراضي الزراعية من الفيضانات. و تعرف التربة السبخة بأنها تربة غنية بالأملاح المترسبة نتيجة تبخر المحتوى المائي مخلفا وراءه أملاحا مختلفة التراكيب الكيميائية ، وتتحدد الرسوبيات في التربة السبخة في ثلاث طبقات هي: الطبقة العلوية المعروفة بقشرة السبخة ، و الطبقة الوسطى القابلة للانضغاط ، و الطبقة السفلية المعروفة بقاعدة السبخة. (المهيدب، 2002 ؛ Anonyme ، 2004).

1 -1- المميزات الفيزيوكيميائية للتربة السبخة:

تتطلب طبيعة التربة السبخة المحتوية على كمية كبيرة من الأملاح، إجراء المزيد من الدراسات لغرض تحديد الخواص الحقيقية للتربة السبخة لأنها تربة غير عادية . ولذلك فقد اقترح بعض الباحثين إجراء التجارب باستخدام المياه المالحة بدلا من المياه العذبة كتعديل، و يمكن تقسيم المعادن المكونة للتربة السبخة إلى قسمين:

*** المعادن الناشئة من التبخر:**

مثل معدن كربونات الكالسيوم $CaCO_3$ الذي يترسب في بداية تركيز المياه المالحة في رسوبيات السبخة و على سطحها. بالإضافة إلى معدن $CaSO_4.2H_2O$، الذي يعتبر أكثر معادن التبخر شيوعا. معدن كبريتات الكالسيوم CaSO4، الذي يترسب تحت سطح السبخة كبلورات مختلفة الحجم و الشكل ، و معدن NaCl، الذي يترسب على السطح و تبلغ سماكته عدة سنتيمترات ، و معدن $SrSO_4$، الذي يعتبر ثانويا حيث يرتبط بمعدن الكلس و كذلك بعض المعادن الثانوية الأخرى (المهيدب، 2002).

*** المعادن الناتجة عن تفاعل مياه السبخة و الرسوبيات:**

من ضمن هذه المعادن: $CaMg(CO_3)_2$ و معدن $MgCO_3$، الذي يتواجد بنسب كبيرة في الرسوبيات الغنية بالمغنزيوم. حيث ينتج عن تفاعل المغنزيوم مع الكالسيوم مغنزيوم كربونات $CaMg(CO_3)_2$ وفق المعادلة التالية:

$$Mg^{++} + CaMg(CO_3)_2 \longrightarrow 2MgCO_3 + Ca^{++}$$ (المهيدب، 2002)

1-2- المميزات الحيوية للتربة المالحة:

التربة هي موطن ديناميكي لمجموعة متنوعة من الكائنات الحية ، فهي تمنح الدعامة الميكانيكية للنباتات، بالإضافة إلى كونها مصدر غذاء (Heritage و آخرون، 1999) . و يختلف توزع الأحياء الدقيقة في التربة حسب كمية الماء و المادة العضوية المتوفرة، التي تنتج من تحلل النباتات و الحيوانات الميتة، وهي غالبا ما تكون مرتبطة بجزيئات التربة (Stuart، 2005). أظهرت الدراسات أن الأحياء الدقيقة فقط لها القدرة على العيش في ظروف بيئية قاسية (درجة حرارة ، ملوحة). من ضمنها بدائيات النواة خاصة مجموعة Archaea ، و حقيقية النواة التي تتضمن خاصة الطحالب و الفطريات (Cantrell و آخرون، 2006).

تعتبر الكثافة الميكروبية للتربة المالحة ضعيفة مقارنة بالتربة الخصبة ، إذ يلاحظ أن هناك علاقة عكسية بين الميكروفلورا الكلية و التراكيز العالية للملح (Fraj، 2004).

تتواجد الكائنات الحية الدقيقة المحبة و المتحملة للملوحة بمجالاتها الثلاث : حقيقية النواة (Eucaryotes)، بدائيات النواة (Procaryotes) و Archaea في هذه الأوساط عالية الملوحة (Caumette، 1994) ، إلا أن حساسيتها للملوحة تختلف حسب الأنواع ، و كما يتضح من خلال الجدول (01) ، فإن هناك تباين في توزيع الأحياء الدقيقة من خلال درجة تحملها للملوحة ، و يلاحظ أن للفطريات قدرة عالية على التحمل مقارنة مع البكتيريا التي تكون أكثر حساسية (Fraj، 2004).

جدول 01: تعداد الكائنات الحية الدقيقة بدلالة الملوحة (Feraj، 2004)

الكائنات الحية الدقيقة (كائن / غرام من التربة الجافة)	**التربة المالحة : mS / Cm**			**التربة الخصبة**
	6.4	**15.7**	**22.3**	
الفطريات **(10^2 x)**	27	49	51	66
البكتيريا المحللة للسيلسلوز **(10^3 x)**	42	35	31	56
بكتيريا الآزوت **Azotobacter** **(10^3 x)**	39	39	35	50
المجموع **(10^3x)**	83.7	74.49	66.51	106.66

1-2-1- عزل و تشخيص الفطريات من البيئات عالية الملوحة **Hypersaline envirenments**:

تعرف البيئات عالية الملوحة بالأوساط التي يكون تركيز الملح فيها أعلى من تركيزه في ماء البحر، و الذي يقارب 0.5M. و هي تنقسم إلى تحت مجموعتين:

Thalassohaline: و تمثل المياه المنحدرة من البحر بحيث تكون لها نفس التركيبة الكيميائية إلا أنها أكثر تركيزا نتيجة تبخر مياه البحر، كما تتميز بدرجة أس هيدروجيني متعادلة إلى قاعدية قليلا. أما Athalassohaline فهي تشمل المياه المتشكلة في هيئة برك مالحة، ويختلف تركيبها بشكل كبير عن تركيب مياه البحر، وتكون درجة pH حوالي 6 ،و مثالها البحر الميت و البحيرات (Johnson، 2010) (جدول 02).

جدول 02 : التركيب الكيميائي لبعض البيئات عالية الملوحة و مقارنتها بماء البحر(Johnson، 2010)

	البحر الميت	بحيرة الملح العظمى	ماء البحر
Na^{+}(M)	1.74	4.56	0. 45
Mg^{+2}(M)	1.83	0. 46	0.05
Ca^{+2} (M)	0. 44	<0.01	0.01
K^{+} (M)	0.20	0.17	0.01
Cl^{-} (M)	6.3	5.10	0.55
SO_4^{-2} (M)	<0.01	0.28	0.03
pH	6.1	7.7	8.3

تشغل هذه الأوساط الطبيعية نسبة كبيرة من سطح الكرة الأرضية، ومن أمثلتها: بحيرات وادي Natrun في مصر، بحيرة Magadii في كينيا، و البحيرات العظمى الموجودة في الولايات المتحدة (بحيرة Mono ، Owens، Searles و بحيرة Big Soda). و بالإضافة إلى هذه البيئات الطبيعية، قد تكون البيئات عالية الملوحة اصطناعية مثل: حقول الري، البحيرات المصنعة لغرض إنتاج ملح البحر، بالإضافة إلى الأغذية المملحة لغرض الحفظ (MacDonald و آخرون، 1990). تعتبر البيئات عالية الملوحة ظروف قاسية لنمو الكائنات الحية، إلا أنه وجد أن الكائنات الحية الدقيقة بشكل أساسي قادرة على التكيف لمثل هذه الظروف (Johnson، 2010). فقد أظهرت أول دراسة سنة 1914 تواجد البكتيريا ، إلا أنه لم يتم عزل إي كائن من حقيقيات النواة. و في سنة 2000 بينت التقارير الأولى أنه يمكن للفطريات أن تكون كائنات ناشطة في هذه الأوساط، و منذ ذلك الحين تم اكتشاف العديد من الأنواع الفطرية الجديدة و أنواع أخرى كانت معروفة سابقا كملوثات غذائية، في هذه البيئات القاسية حول العالم (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009). حيث تم العزل في البداية من عينات ماء أخذت من بحيرات صغيرة موسمية على طول الساحل الأدرياتيكي(Adriatic) الشمالي (Gunde-Cimerman و آخرون، 2000). بعد ذلك تم العزل من العديد من المناطق مثل: بحيرات Cabo Rojo في الساحل الجنوبي الغربي لـ Puetto Rico، ومياه البحر الميت. كما تمت دراسة الفلورا الفطرية لساحل البحر الأحمر بمحافظة القنفذة في المملكة العربية السعودية (Cantrell و آخرون، 2006 ؛ قشقري و الحازمي، 2006 ؛ Mbata، 2008). إلى جانب المياه المالحة ، تعتبر السبخات كذلك من أهم البيئات عالية الملوحة، حيث تشغل مساحة واسعة، وقد تم عزل العديد من الفطريات المحبة و المتحملة للملوحة من هذه المناطق مثل سبخة العوشزية بمنطقة القصيم بالمملكة العربية السعودية (الخيمي، 2007). و بصفة عامة تتمثل الفطريات المعزولة من هذه الأوساط في أجناس مختلفة منها المحبة، ومنها المتحملة للملوحة. وهي تتباين في نسبة تواجدها، إلا أن كل هذه الدراسات أظهرت أن الجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* هي الأكثر ترددا (جدول 03).

جدول 03: أهم الفطريات المحبة و المتحملة للملوحة المعزولة من البيئات عالية الملوحة (Cantrell و آخرون، 2006 ؛ قشقري و الحازمي، 2006 ؛ Mbata، 2008)

البيئات عالية الملوحة	**البحر الميت**	**ساحل البحر الأحمر**	**بحيرات Cabo Rojo**	**سبخة العوشزية**
الفطريات المعزولة	*Gymanscella* sp. *Eurotium* sp. *Choetomium globosum* *Aspergillus versicolor* *Hortaea werneckii* *Aureobasidium pullulans*	*Aspergillus* sp. *Blastomyces* sp. *Curvularia* sp. *Chrysosporium* sp. *Choetomium* sp. *Cochliobolus* sp. *Fennelia* sp. *Fusarium* sp. *Glimaniella* sp. *Humicola* sp. *Hormodendrum* sp. *Mucor* sp. *Penicillium* sp. *Phoma* sp. *Rhizoctonia* sp. *Syncephalastrum* sp.	*Aspergillus* sp. *Cladosporium* sp. *Curvularia* sp. *Dreschlera* sp. *C. globosum* *H. werneckii* *Humicola* sp. *Myrothecium roridum* *Penicillium* sp. *Sporothrix* sp. *Scopulariopsis* sp. *Phialophora* sp. *Periconia* sp.	*Ulocladium botrytis* *Aspergillus* sp. *Cladosporium* sp. *Phomopsis* sp. *Phoma exigua* *Pythium* sp. *Penicillium* sp.

2- الفطريات:

2-1 - توزع و انتشار الفطريات في الطبيعة :

تنتشر الفطريات في الطبيعة بشكل واسع، حيث تكون لها القدرة على النمو في مناطق بيئية مختلفة. إذ تتكاثر العديد من الفطريات بشكل رئيسي عن طريق تكوين الأبواغ اللاجنسية (الكونيديا Conidia أو الأبواغ الحافظية Sporongiospores)، والتي تنتقل عبر الهواء إلى مسافات طويلة مما يسمح لها بالبقاء في بيئات يمكن أن تكون مختلفة عن بيئاتها الأصلية. و بناء على هذا تكون لها القدرة على التأقلم السريع لأي بيئة خاصة تجد نفسها فيها ، لذلك فهي تنتشر في كل الأوساط سواء في التربة أو الهواء أو الماء (Rocio و آخرون، 2010).

2-1-1- فطريات التربة:

2-1-1-1- توزيع الفطريات في التربة:

التربة هي وسط معقد، يتكون من معادن غير عضوية ومخلفات عضوية تعمل كروابط لقنوات وثقوب تحتوي على الماء و الهواء. فجذور النباتات تتخلص من أنسجتها الخارجية و تفرز موادا عضوية (خاصة الكربوهيدرات، الأحماض الأمينية، الفيتامينات، و الأحماض العضوية)، كما يسقط النبات أوراقه و فروعه الميتة فوق التربة (محمد ، 2003).

تقل أعداد الفطريات و تنوعها بصفة عامة كلما تعمقنا في التربة، حيث ينتج ذلك عن التغيرات الطبيعية و الكيميائية في صفات التربة. ويرتبط توزيع الفطريات في الطبيعة على وجود المادة العضوية ، حيث تزداد في التنوع والعدد على المخلفات النباتية المتحللة في الطبقة العليا من التربة، بينما تقل في الطبقات السفلى مثل الأنواع التابعة للأجناس : *Trichoderma*، *Penecillium*، *Mucor*، *Fusarium* و غيرها. أما في عمق التربة يقل عدد و نوع الفطريات بدرجة كبيرة ، وقد يرجع ذلك إلى قلة التهوية (علي ، 1998).

2-1-1-2 – نشاط الفطريات في التربة:

تعتبر الفطريات عنصرا هاما من ضمن ميكروفلورا التربة ، إذ تتواجد بنسبة أكبر مقارنة مع البكتيريا ، وتمثل الفطريات المترممة النسبة الأكبر من مجموع فطريات التربة (Barratt و آخرون، 2003). ويزداد نشاط هذه الفطريات كلما ازدادت خصوبة البيئة التي تنمو فيها. و حيث إنها كائنات حية غير ذاتية التغذية، فإنها تعتمد في نموها على مصادر كربونية عضوية لذلك يرتبط نشاطها بتوزيع المادة العضوية على اليابسة (محمد ، 2003).

تشكل الفطريات عوامل أساسية لتحليل المادة العضوية في التربة الجافة، و هي تلعب دورا ضعيفا خلال دورة الآزوت. حيث يكمن دورها الأساسي في معدنة الكربون العضوي، إذ تملك قدرة عالية جدا على تحليل كميات كبيرة من المادة العضوية، التي تحتوي على كمية ضعيفة من الآزوت، حيث تكون النسبة N/C عالية (Roger و Garcia، 2001). ترجع هذه القدرة على التحليل لامتلاك الفطريات أنظمة أنزيمية خاصة (Deacon، 2006) .

يتداخل نشاط الفطريات في التربة مع نشاط غيرها من الأحياء الدقيقة الأخرى ، كالبكتيريا و الطحالب و البروتوزوا، وأيضا مع جذور النباتات. وعليه يمكن تمييز مجموعتين: فطريات التربة و فطريات الجذور (Mycorhizae)، حيث تتميز فطريات التربة بقدرتها على النمو اعتمادا 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 تعتبر في نفس الوقت مشكلة بالنسبة للنبات العائل ، ومع ذلك فقد أثبت أنه في التربة الفقيرة من حيث الآزوت و المعادن ، تعمل الفطريات على تزويد النبات بهذه الأساسيات (Smith، 1969).

2- 2- تنوع الفطريات في الظروف الفسيولوجية:

تتأثر الفطريات كغيرها من الكائنات الحية الأخرى، بالتغيرات البيئية المحيطة بها، إذ تؤدي هذه التغيرات إلى خلق ظروف قاسية لنمو الفطريات، حيث لا يقتصر التأثير على معدل النمو فقط بل يؤدي إلى اختلافات في نمط النمو، وتحدث التغيرات غالبا في درجة الحرارة، pH أو الملوحة (Kumar و آخرون، 2009).

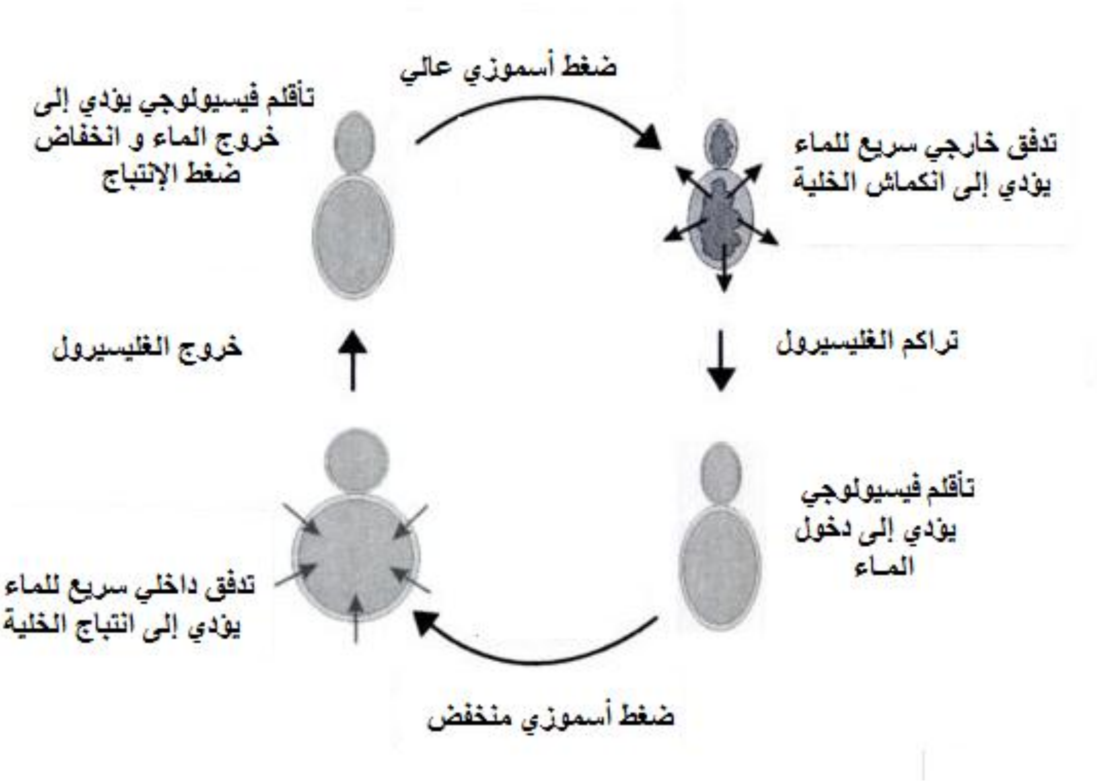
2-2-1- تعريف الضغط الأسموزي:

يحدث الضغط الأسموزي عن طريق إجراء تغيرات في تراكيز الجزيئات المنحلة في الوسط المحيط بالخلية و التي تسمى "Osmotica"، و بالتالي التغيير في المحتوى المائي المتوفر. تؤدي الزيادة في تراكيز الجزيئات المنحلة إلى ارتفاع الضغط الأسموزي (الأسمولارية Osmolarity)، مما يؤدي إلى انخفاض النشاطية المائية (a_w) و الجهد المائي. و العكس صحيح إذ يؤدي انخفاض تراكيز الجزيئات الذائبة في الوسط إلى انخفاض الأسمولارية، و بالتالي ارتفاع النشاطية المائية (a_w)، و ذلك راجع لانتقال الماء دائما عبر غشاء نصف منفذ، من الوسط الأقل تركيز إلى الوسط الأعلى تركيز. يتكون الضغط الأسموزي مخبريا عن طريق إضافة NaCl أو KCl أو Sorbitol إلى وسط النمو(Hohmann و Mager، 2003).

2-2-2- تأثير الضغط الأسموزي على نمو و استقلاب الفطريات:

تعتبر الأغشية البيولوجية أغشية نفاذة للماء أكثر منها للجزيئات الأخرى المنحلة في الوسط. وعليه فإن زيادة تراكيز هذه الجزيئات في الوسط الخارجي للخلية الحية (hyperosmotic Stress) يسمح بخروج الماء من الخلية، في حين أن انخفاض الأسمولارية في الوسط (hypoosmotic Stress) يسمح بانتقال الماء إلى داخل الخلية (شكل 01) (Hohmann و Mager، 2003).تعمل هذه التغيرات في المحتوى المائي و كذلك في حجم الخلية، والمتسببة من طرف تدفق و انتقال الماء من و إلى الخلية على إحداث تغيرات في البنية (Hohmann و Mager،2003). كما يعمل الضغط الملحي على إحداث خلل في الجهد الأسموزي عند الفطريات مما يحدث عجز

مائي، كما يؤدي تدفق الصوديوم إلى استقلابات سمية (Tang و آخرون، 2006). فعلى سبيل المثال يكون الهيكل الخلوي لخيوط الأكتين (Actine) مستقطبا خلال مراحل نمو الخميرة، و التي تعتبر الميزة الأساسية للتبرعم المباشر أثناء الانقسام (الانشطار) الخلوي و تشكيل نتوءات أثناء التزاوج، ويؤدي الضغط الأسموزي كغيره من الضغوط الأخرى إلى فقدان سريع لخيوط الأكتين من الخلايا الأم ، و بالتالي كبح و إيقاف النمو. كما يحدث الضغط الأسموزي خلل في الغشاء البلازمي على مستوى تركيبته، و نفاذيته و كذلك خصائصه الميكانيكية (Hohmann و Mager، 2003). أثبتت الدراسات أن للضغط الأسموزي تأثير كبير على مستوى التعبير الجيني للأنزيمات التي تلعب دورا في استقلاب الدهون. بالإضافة إلى ذلك، يؤثر في زيادة التعبير الجيني للمورثات التي تدخل في بناء PEA و PC، في حين ينخفض تعبير المورثات المشفرة للأنزيمات التي تدخل في البناء الحيوي ل Ergosterol (Hohmann و Mager، 2003). يمكن أن تؤدي هذه التغيرات إلى تغيير في ميوعة الغشاء و/ أو نفاذيته، كما تؤثر على نشاطية بروتينات النقل الموجودة في الغشاء (Osmosensors و Transporters). كما أظهرت الدراسات بأن زيادة الضغط الأسموزي في الوسط أثناء التخمرات الصناعية، بإضافة NaCl، يؤدي إلى زيادة إفراز و إنتاج إنزيم glucose oxidase من طرف *Aspergillus niger*، في حين وجد ارتفاع نشاطية إنزيم glucoamylase المفرز من طرف *Aspergillus oryzae* بحوالي 20 مرة عند انخفاض الضغط الأسموزي، أي ارتفاع المحتوى المائي لمادة نخالة القمح (Rocio و آخرون، 2010).



شكل 01: المميزات الأساسية لتأثير الضغط الأسموزي العالي والمنخفض عند خميرة *S.cerevisiae* (Hohmann و Mager، 2003)

2-2-3- الفطريات المتحملة للجفاف و الضغط الأسموزي العالي:

على الرغم من أن هناك أسباب بيئية للتفرقة بين هاتين المجموعتين من الفطريات ، إلا أن الفروق الفسيولوجية بينهما ليست كبيرة. كما أن بعض الفطريات تظهر تحملا لكل من ظروف الجفاف وارتفاع الضغط الأسموزي في آن واحد، وتشترك في قابليتها على النمو في البيئات ذات النشاط المائي المنخفض (علي ، 1998). ويمكن تعريف الفطريات المتحملة للجفاف و تلك المتحملة للضغوط الأسموزية العالية، بأنها تلك القادرة على النمو في البيئة ذات النشاط المائي (a_w) يقل عن 0.85 a_w (Pitt و Hocking، 1985). إلا أن بعضها ينمو عند 0.75 a_w مثل فطر *Aspergillus candidus* و *A. flavus* ، أما فطر *Penecillium chrysogenum* فينمو عند 0.78 a_w. كما

أن بعض الخمائر تنمو جيدا في البيئات الملحية و السكرية على حد سواء ، وهي تلعب دورا هاما في الصناعات الغذائية ، كما أن بعضها تسبب خسائر فادحة في الأغذية السكرية خلال تخزينها (علي ، 1998). بينما تملك الفطريات المتحملة للملوحة القدرة على النمو في وسط خالي من NaCl ، و كذلك في وجود NaCl بتراكيز عالية تصل إلى 4,5M مثل الفطر الخيطي *Cladosporium glycolicum* و خميرة *Debaryomyces hansenii* (Arora، 2001 ؛ Echigo، 2005) .

3- فسيولوجيا تأقلم الفطريات للنمو في وجود ضغط أسموزي عالي:

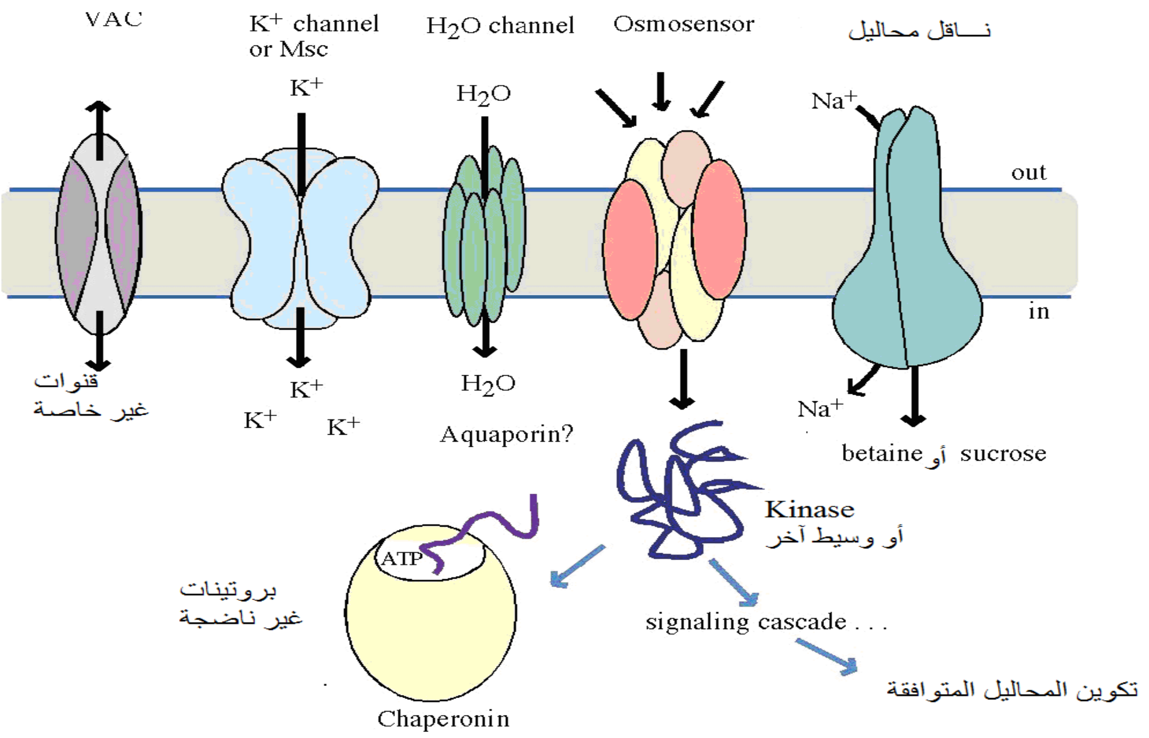
يعتبر التأقلم الخلوي للظروف البيئية القاسية كالأوساط عالية الملوحة عملية بيولوجية أساسية لحياة الكائنات و نموها(Park و Gander ، 1998). وللكائنات الحية الدقيقة ومن بينها الفطريات القدرة على التأقلم للظروف عالية الضغط الأسموزي باتباع استراتجيات مختلفة (Gunde-Cimerman و آخرون، 2007) (شكل 02).

3-1- توازن الأيونات:

يؤدي تراكم الأيونات و الجزيئات غير المتأينة في سيتوبلازم الهيفات الفطرية نتيجة دخولها من الوسط الخارجي المرتفع الأسموزية، إلى خفض الضغط المائي الداخلي ، وتعتبر هذه الوسيلة طريقة سريعة لتعديل الضغط المائي الداخلي، بحيث يستطيع الفطر ضبط الأسموزية داخل هيفاته دون أن يقوم بتخليق كميات إضافية من الكحولات عديدة الهيدروكسيل (Polyoles) (علي ، 1998).

تعتبر خميرة *Debaryomyces hansenii* أكثر الفطريات دراسة من حيث هذه الآلية ، حيث أثبتت الدراسات على خميرة *D. hansenii* المعزولة من مياه البحر ، أنها تتأثر بشكل ضعيف للتراكيز العالية من الملح NaCl. كما وجد أن معامل تدفق Na^+/K^+ يلعب دورا في هذه العملية. بعد ذلك أظهرت الأبحاث أن أيون الصوديوم Na^+ غير سام بالنسبة للخميرة ، وفي وجود تراكيز عالية من NaCl تبدي الخميرة نموا مثاليا ، وتكدس أيونات Na^+ بشكل أكبر مقارنة مع خميرة *Saccharomyces cerevisieae* ، علاوة على ذلك وجود Na^+ في الوسط يحمي

الخلايا من عوامل ضغط إضافية (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009)، كما يظهر أن كلا من *D.hansenii* و *Wellemia ichthyophaga* ، قادرة على تكديس كميات كبيرة من أيونات Na^+ ، مقارنة مع الخميرة *Hortae werenckii* الأكثر تحملا للملوحة العالية (Kogej و آخرون، 2005).



شكل 02 : مخطط لمختلف المركبات التي تدخل في آليات الاستجابة للضغط الأسموزي لدى حقيقيات النواة

(Roberts، 2000)

2-3- ميوعة الغشاء البلازمي:

يعتبر التغير في خصائص الغشاء البلازمي من بين أهم الآليات التي تتبعها الفطريات، نظرا للوظائف الحيوية المهمة التي يقوم بها (Turk وآخرون، 2004). تلعب الليبيدات الغشائية دورا مهما في التحكم في ميوعة الغشاء ، حيث يمكن أن ترجع القدرة على تحمل الملوحة العالية إلى التغيرات في أنماط هذه الليبيدات وبالتالي التركيب الجزيئي للغشاء ، و المحفزة بواسطة تراكيز الملح العالية . تتدخل عدة عوامل في المحافظة على ميوعة الغشاء : نوع سلاسل الأحماض الدهنية (طولها و درجة تشبعها)، كمية الستيرولات و طبيعة مجاميع الرأس القطبية للفوسفوليبيد (Turk وآخرون، 2004). حيث أظهرت الدراسات العلمية أن كلا من خميرتي *D.hansenii* و *H.werenckii* تحافظ على ميوعة غشائها السيتوبلازمي بشكل أكبر، مقارنة مع الخميرة *S.cerevisiae* الأكثر حساسية للملح. كما وجد أن نسبة الستيرولات إلى الفوسفوليبيدات عند كلتا الخميرتين تكون أقل بكثير مقارنة مع خميرة *S.cereviseae*. هذه النتائج تبين أن الحفاظ على هذه النسبة منخفضة تحت ضغط أسموزي عالي يسمح بالتأقلم و النمو. بالإضافة إلى ذلك تعمل الأحماض الدهنية الغشائية في التأثير على خصائصه إذ تستطيع خلايا خميرة *H.werenckii* أن ترفع مستويات الأحماض الدهنية الفوسفوليبيدية غير المشبعة ، وذلك بتشفير ثلاث أنزيمات خاصة هي : D9-Saturase ، D12-Desaturase و Elongase. في حين يعتبر حمض الأولييك Oleic acid، الحمض الدهني الفعال في الغشاء البلازمي لخميرة *D.hansenii*، حيث يصاحب وجود التراكيز العالية للملح ارتفاع في نسبة الحمض الدهني غير المشبع (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009). بالإضافة إلى ذلك فإن بعض أيونات الصوديوم و الكلور تجد طريقها إلى داخل الخلية ، وهذا بدوره يرفع من الضغط الأسموزي لهذه الخلايا، ويساعد على استمرار تدفق الماء من خارج الخلية إلى داخلها. و لقد وجد أن تركيز هذه الأيونات محدودا ولا يصل إلى درجة تضر ببروتوبلازم الخلية. و من الواضح أن هذا التركيز المحدود من الأيونات يتم

التحكم فيه عن طريق كفاءة الغشاء السيتوبلازمي ، حيث تمر هذه الأيونات - و غيرها — من خلال هذا الغشاء. و مازالت كيفية التحكم في حركتها مجهولة (علي ، 1998).

3-3- استشعار التراكيز العالية للملح و الاستجابة لها بتعبير جيني مميز:

تعتبر القدرة على التحسس للتغيرات في تراكيز Na^+ في الوسط ضرورة بيولوجية لحياة الخلية (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009). تستشعر الفطريات للتغيرات الخارجية، و خاصة الضغط الأسموزي عن طريق مسارات تأشيرية (Signaling pathway). حيث بينت الدراسات الأولى على المورثات التي تشترك في التنظيم الجزيئي للإستجابة الخلوية للضغط الأسموزي، أن المسار الرئيسي الذي يدخل في العملية و الاستجابة لها يسمى: « HOG » (High osmolarity glycerol signaling pathway)، والذي تمت دراسته عند الخمائر (*H.werenckii* و *S.cerevisiae*). حيث يتحكم هذا المسار في المورثات الخاصة بالاستجابة للضغوط الأسموزية و هي: gdp1 و gdp2 التي تشفر لأنزيمات البناء الحيوي للغليسيرول glycerol-3-phosphate dehydrogenase و glycerol-3-phosphatase على الترتيب (Roberts، 2000 ؛ Gunde-Cimerman و آخرون، 2009 ؛ Rocio و آخرون، 2010) .

بالإضافة إلى مسار MAP kinase (Mitogen Activated Protein)، الذي يدخل كوسيط في المسار HOG ، حيث تعمل MAPKs المنشطة بفسفرة عدد من المواد، من ضمنها بروتينات تحفيز عملية استنساخ المورثات، و بالتالي البروتينات التي تشترك في عملية الاستجابة. كما يظهر أن لـ c-AMP، الذي يعتمد على Kinases، تأثيرا على التعبير الجيني تحت الضغط الأسموزي ، إلا أن هذه الاستجابة لا تنحصر فقط على الضغط الأسموزي، وإنما بصفة عامة هي استجابة لمختلف الضغوط الأخرى مثل : العوز الغذائي ، الصدمة الحرارية والضغط التأكسدي وغيرها. كما وجد أن الضغط الأسموزي يمكن أن يحفز إنتاج مركبات مثل: Phosphatidylinositol-3,5-biphosphate، الذي يساهم كمرسول ثانوي في تنشيط الاستجابة للضغط الأسموزي (Rocio و آخرون، 2010). ومن جهة أخرى أظهرت الدراسة على خميرة *S.cerevisiae* أنها تستجيب للضغط الأسموزي العالي بتحفيز التعبير الجيني للمورثتين msn2p و msn4p. حيث يتدخل في هذه العملية عوامل استنساخ أساسية هي: Hot1p (High osmolarity induced transcription) و Msn1p، و التي تساهم في رفع قوة ارتباط العوامل المنظمة للنسخ، (منشطات النسخ Msn2/4p)، أثناء الاستجابة للأسمولارية العالية (Roberts، 2000).

3-4- إستراتيجية المحاليل المتوافقة Compatible Solutes:

تطور الفطريات العديد من آليات التأقلم للضغط الأسموزي العالي (Vargas وآخرون، 2005). من بين هذه الآليات تكديس و تخليق جزيئات معقدة ، هذه المركبات لا تسبب أي ضرر لحيوية الخلايا الفطرية حتى عند زيادة تركيزها ، و لذلك يطلق عليها اسم " المحاليل المتوافقة compatible solutes" (علي ، 1998 ؛ Yancey، 2005 ؛ Dyksterluis و Vries، 2006).

تشمل المحاليل المتوافقة العديد من المركبات مثل : الكحولات عديدة الهيدروكسيل (polyols)، الأحماض الأمينية (glutamate و proline)، مشتقات الأحماض الأمينية (glycine betaine و ectoine)، سكريات

(Trehalose و Sucrose)، بالإضافة إلى مركبات methylsulfonium (Dagmar و آخرون، 2005 ؛ Davis و آخرون، 2000). ويتضح أن بعض هذه الجزيئات لا تملك نشاط إستقلابي و إنما تدخل في إحدى التفاعلات التي لها القدرة على حماية الخلايا (Yancey، 2005). تتأقلم الفطريات المتحملة للملوحة بشكل رئيسي عن طريق الإنتاج و التكديس المتزايد للغليسيرول، و أنواع أخرى من المحاليل المتوافقة التي تتضمن : الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols) مثل: Erythritol ، Inositol، Arabitol ، Xylitol و Mannitol، بالإضافة إلى المركبات الآزوتية مثل : Glycine betaine و الأحماض الأمينية (Kogej و آخرون، 2007).

3-4-1- الكحولات المتعددة الهيدروكسيل Polyols و السكريات:

تعرف الفطريات ومن ضمنها الخمائر بقدرتها على النمو و التأقلم في البيئات عالية الضغط الأسموزي بواسطة التكديس الداخلي لأنواع من المركبات المعتدلة و ذات وزن جزيئي صغير، والتي تحمي الخلايا من ضغط الانفجار(Turgor pressur). تنتج الخلايا الفطرية الكحولات عديدة الهيدروكسيل (Polyols) حتى في غياب الضغط الأسموزي ، وتستجيب للضغط الأسموزي عن طريق تكديس الكحولات الأساسية و الأكثر فعالية (Yong و آخرون، 1998). تعمل هذه المحاليل المتوافقة بطريقتين مختلفتين آليا : الأولى هي "التعديل الأسموزي" حيث تسهل احتجاز الماء في السيتوبلازم إذ تسمح لأيونات الصوديوم بالدخول إلى الفجوات الخلوية، بعكس الطريقة الثانية وهي " الحماية من الضغط الأسموزي"، حيث تتفاعل الكحولات متعددة الهيدروكسيل فيما بينها لحماية التركيبة الخلوية، و الأنزيمات وكذلك المركبات الخلوية الأخرى من التراكيز العالية للملح (Hans و آخرون، 1995 ؛ Park و Gander، 1998). حيث يعتقد أنها تقوم بحماية الأنزيمات من التأثيرات المثبطة الناتجة عن زيادة تركيز أيونات الصوديوم و الماغنيسيوم (علي ، 1998).

يعتبر الغليسيرول المحلول الأكثر أهمية و استعمالا من طرف الفطريات النامية في الأوساط المالحة (Park و Gander، 1998 ؛ Aharon، 2002). إذ يتميز بقلة ارتباطه بالبروتينات، وبالتالي فهو لا يسبب تثبيطا

للأنزيمات. ففي خميرة *Saccharomyces roxii*، توجد نسبة عالية من الغليسيرول تقدر بحوالي 9-15% من الوزن الجاف للخلايا (علي ، 1998). كما أثبت أنه في وجود تراكيز عالية من الملح (3M-2 M) تكون نسبة تكديس الغليسيرول عند كل من *H.werenckii* و *S.cerevisiae* و *D.hansenii* ، أكبر من نسبة تكديس Trehalose. إلا أنه تحت ضغط ملحي متوسط ، فإن الخلايا تكدس نسبة أكبر من Trehalose مقارنة مع الغليسيرول. قد ترجع هذه الأهمية للغليسيرول بشكل رئيسي لكون بنائه الحيوي يحفز في وجود تراكيز عالية من أيونات Na^+، و جزئيا إلى ارتفاع التعبير الجيني للمورثات المسؤولة عن ذلك (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009).

بالإضافة إلى الغليسيرول وجد أن بعض الفطريات مثل خميرة *H.werenckii* تكدس مجموعة متنوعة من المركبات العضوية تتضمن : erythritol، arabitol و mannitol ، والتي تتغير كمياتها حسب تركيز الملح في الوسط ، وكذلك حسب مرحلة نمو الفطر . ومع ذلك ترجع كمية الكحولات المتعددة الهيدروكسيل إلى الغليسيرول خلال كل مراحل النمو، حيث يتراكم بالدرجة الأولى خلال المرحلة اللوغاريتمية ثم يقل بشكل حاد خلال مرحلة الاستقرار. من جهة أخرى، تزداد كمية erythritol تدريجيا خلال المرحلة اللوغاريتمية، لتصل إلى أعلى مستوى خلال مرحلة الاستقرار (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009).

ومن ناحية أخرى، يتضح أن لسكر Trehalose دورا فعالا في حماية الغشاء السيتوبلازمي للأبواغ في وجود ضغط أسموزي عالي، إذ يؤدي غيابه إلى جفاف وتغيرات مورفولوجية في الغشاء، حيث تكون الفوسفولبيدات مركبات معقدة متبلورة. بينما يعمل وجود Trehalose على حماية هذه الأغشية من التلف، وذلك عن طريق تعويض مجاميع الهيدروكسيل في المجاميع المتأينة بالغشاء (علي أحمد، 1998) .

كما وجد أن فطر *Aureobasidium* يستجيب للضغط الأسموزي العالي عن طريق تكديس كميات كبيرة من Mannitol ، Glycerol ، Glucose و Trehalose (Ray و Torzilli ، 2002). ومع ذلك تعتبر السكريات

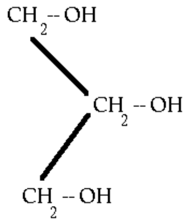
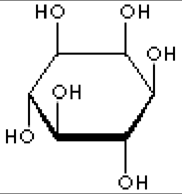
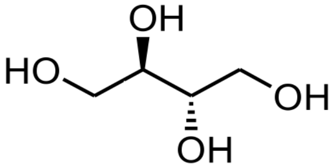
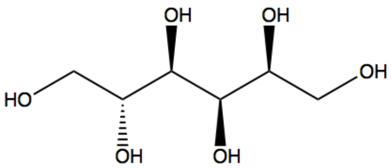
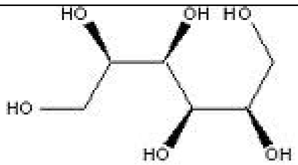
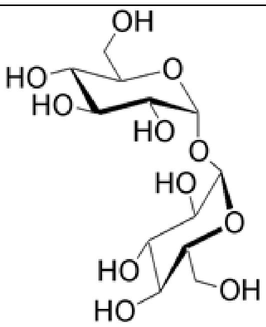
الثنائية (Trehalose و Sucrose) محاليل متوافقة محدودة ، وتتواجد بنسبة ضعيفة مقارنة مع المحاليل الأخرى و هي معروفة بدورها في استقرار الأغشية (Oren، 2002) (جدول 04).

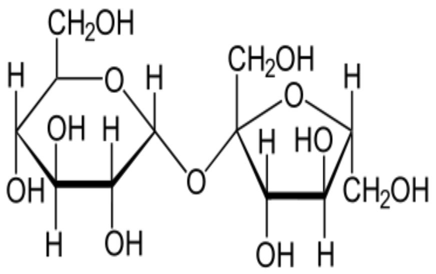
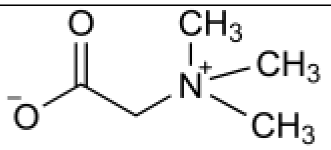
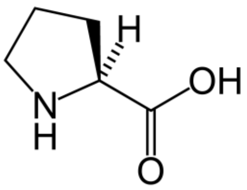
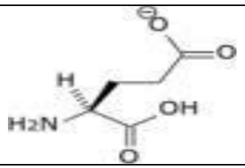
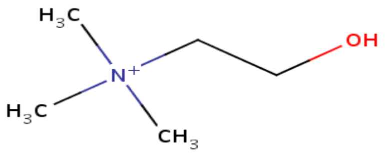
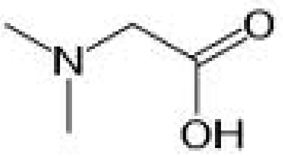
3-4-2- الأحماض الأمينية و مشتقاتها:

لم تظهر الأحماض الأمينية أي دور في الوقاية الأسموزية عند الفطريات الأسكية، إلا أنه وجد أن Proline يلعب دور في التنظيم الأسموزي بالنسبة لبعض الفطريات البيضية و الزيقية (Beever و Laracy، 1986). وتعتبر الأحماض الأمينية المشحونة مثل: glutamate، β-glutamate و glutamate betaine من المحاليل المتوافقة التي لا تتراكم بكميات عالية في التراكيز الملحية التي تفوق 0.4M (Oren، 2002). وقد بينت دراسة أجريت على خميرة *D.hansenii* أن نشاط glutamate في وجود تركيز ملحي عالي، يقتصر على كونه عاملا إضافيا في الحماية من الضغط (Gunde-Cimerman و آخرون، 2009). بالإضافة إلى ذلك وجد أن فطر *Penicillium fellutanum* يكدس كلا من glycine betaine و choline-*O*-sulfate (Park و Gander، 1998).

يدخل Choline في تركيب الأغشية لدى حقيقيات النواة على شكل Phosphatidylcholine (Boncompagni وآخرون، 1999). وهو يعتبر مادة أولية أساسية في البناء الحيوي لـ glycine betaine، والذي يعتبر محلولا متوافقا مهما عند حقيقيات النواة، لكونه يحمي الخلايا من الضغط الأسموزي (Huiming و آخرون، 2010) (جدول 04).

جدول 04 : بعض أنواع المحاليل المتوافقة التي تستعملها الفطريات (Roberts، 2000)

نوع المحاليل المتوافقة		التركيبة الكيميائية
الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols)	Glycerol	
	myo-Inositol	
	Erythritol	
	Sorbitol	
	Mannitol	
السكريات	Trehalose	

<table>
<tr><td></td><td>Sucrose</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td>Glycine betaine</td><td rowspan="5">الأحماض الأمينية و مشتقاتها</td></tr>
<tr><td></td><td>Proline</td></tr>
<tr><td></td><td>Glutamate</td></tr>
<tr><td></td><td>Choline</td></tr>
<tr><td></td><td>Dimethyl glycine</td></tr>
</table>

4- دراسة فطر ***Aspergillus oryzae***:

4 -1- التصنيف: يصنف نوع *Aspergillus oryzae* حسب Webster و Weber (2007) .

المملكة:	**Eucomycota**
الشعبة:	**Ascomycota**
الصف:	**Plectomycetes**
الرتبة:	**Eurotiales**
العائلة:	**Trichocomaceae**
الجنس:	***Aspergillus***
النوع:	***A. oryzae***

4 -2- الأهمية الاقتصادية و الصناعية لفطر *A. oryzae*:

يعتبر فطر *Aspergillus* من أكثر الفطريات شيوعا، حيث يتواجد على عدد كبير جدا من الأوساط الطبيعية. تعيش أغلب أنواعه مترممة ، وعليه فهي محط اهتمام العديد من الباحثين، نظرا لدورها الإيجابي كعوامل مخمرة ، حيث تستعمل تجاريا في إنتاج بعض الأحماض العضوية، و الكحولات و بعض المركبات المحتوية على الكبريت . و من ناحية أخرى، فإن بعضها تسبب مرض Aspergillosis عند الإنسان و الحيوان ، بالإضافة إلى ذلك لها دور في تحليل المنتوجات الزراعية و المنتوجات المخزنة و سميتها (Klish، 2002).

يعتبر النوع *A.oryzae* من الفطريات الخيطية. و هو يتواجد بصفة واسعة في التربة ، حيث يستعمل في آسيا في صناعة الأغذية المخمرة مثل: الصويا و غيرها. على مدى 2000 سنة ، على مطلع القرن العشرين، استعمل *A.oryzae* لأول مرة كمصدر لإنزيم α-amylase، أول إنزيم منتج على السلم الصناعي من أجل الاستعمال الغذائي، و منذ ذلك الحين أصبح يستعمل في إنتاج العديد من الإنزيمات الأصلية و المصنعة (Heterologous enzymes) للإنتاج الغذائي. و إلى حد الآن لم يعرف بأن *A.oryzae* ممرض، إلا أن بعض عزلاته قد تكون قادرة على إنتاج كميات ضئيلة من المستقبلات الثانوية ذات سمية منخفضة إلى متوسطة مثل:

3- β - nitro propionic acid - Cyclopiazonic acid Kojic acid، و يمكن التحكم في إنتاج هذه المركبات و الحد منها عن طريق استعمال ظروف مناسبة (Olempska، 2007) ،و بالرغم من كون *A. oryzae* و *A. flavus* ينتميان لنفس المجموعة *Flavi* و تحت الجنس *Circumdati*، فإن *A. oryzae* يختلف عن *A. flavus* من حيث عدم إنتاجه لسموم Aflatoxines. إلا أن الدراسات الحديثة أظهرت أن بعض عزلات هذا الفطر تملك مورثات بنيوية و تنظيمية تدخل في تصنيع Aflatoxines، إلا أن ذلك يتم تحت ظروف تحفيزية (Machida و آخرون، 2005 ؛ Olempska ، 2007) .

ترجع هذه المميزات إلى الطاقم الجيني للفطر، الذي وجد بأنه أكبر، مقارنة مع الطاقم الجيني لكل من *A. fumigatus* و *A. nidulans* بحوالي 34% و 29 % على الترتيب. وهو يحتوي على تتابعات خاصة غنية بالمورثات المسؤولة عن الاستقلاب (metabolisme) ، وخاصة التي تدخل في بناء المستقبلات الثانوية (أنزيمات الإماهة ، استقلاب الأحماض الأمينية و نواقل الأحماض الأمينية / سكريات) (Machida و آخرون، 2005). حديثا يستعمل *A.oryzae* كحامل (عائل) للتعبير الجيني لإنتاج البروتينات المعدلة وراثيا (Recombinant proteines) (Lui و آخرون، 2009) ، إذ تسمح هذه الآليات الجزيئية بتطوير استعمال فطر *A.oryzae* في إنتاج إنزيمات تجارية (Kitamoto و آخرون، 2005).

بالإضافة إلى ذلك يتميز *A.oryzae* بخصائص بيولوجية أساسية كالنمو الخيطي، وتشابك الميسيليوم، و البنيات اللاجنسية التكاثرية ، وتعدد الخلايا و التي لم تدرس في الأحياء الدقيقة وحيدة الخلية مثل: *S. cerevisiae* (Kitamoto و آخرون، 2005) .

تعتبر أنزيمات Cutinases مسؤولة عن إماهة و تحليل الحشوة الدهنية متعددة الأستر في النباتات (Cutin lipid polyester matrix)، و بالتالي يمكن استغلالها في إماهة الجزيئات متعددة الأستر الصغيرة مثل المواد البلاستيكية. وقد تم استخلاص هذه الإنزيمات من فطر *A.oryzae*، وأثبتت قدرتها على تحمل الدرجات العالية للحرارة التي تصل إلى 59°م مقارنة مع نفس الإنزيم المستخلص من فطر *Fusarium solani* و التي كانت 56°م (Lui و آخرون، 2009). كما يستعمل كعامل بروبيوتيك في تغذية الدواجن (Kyungwoo و آخرون، 2006).

و من جهة أخرى فإن لفطر *A.oryzae* أهمية طبية و صيدلانية كبيرة ، نظرا لقدرته على انتاج مواد مضادة للفطريات مثل : Asperfuran و Oryzachlorin بالإضافة إلى مضادات حيوية مثل : Penicilline (Suzuki و آخرون، 1969 ؛ Anke و آخرون، 1990 ؛Junichiro و آخرون، 2010) .

هذه المميزات تدعم فكرة أن فطر *A. oryzae* هو الكائن الحي الدقيق المناسب لعمليات التخمر و الاستعمال في البيوتكنولوجيا الحديثة (Masayuki و آخرون، 2005).

المـــواد و الطــرق

1- منطقة الدراسة :

سبخة البيضاء هي إحدى المستنقعات الطبيعية الملحية المؤقتة. وهي ترتبط بمرج رطب متواصل و مفتوح على منطقة نباتية محبة للملوحة (Halophytes) تسمى شط Chott. تقع بين خطي عرض °35´35 شمالا وبين خطي طول °5´48 شرقا بالقرب من منطقة حمام السخنة (ولاية سطيف) ، تبلغ مساحتها حوالي 12.223 هكتار. تتميز التربة المحيطة بالموقع بكونها أقل ملوحة إلى مالحة ، قاعدية ذات تركيبة متدرجة صلصالية (Anonyme، 2004).

2- جلـب العينات:

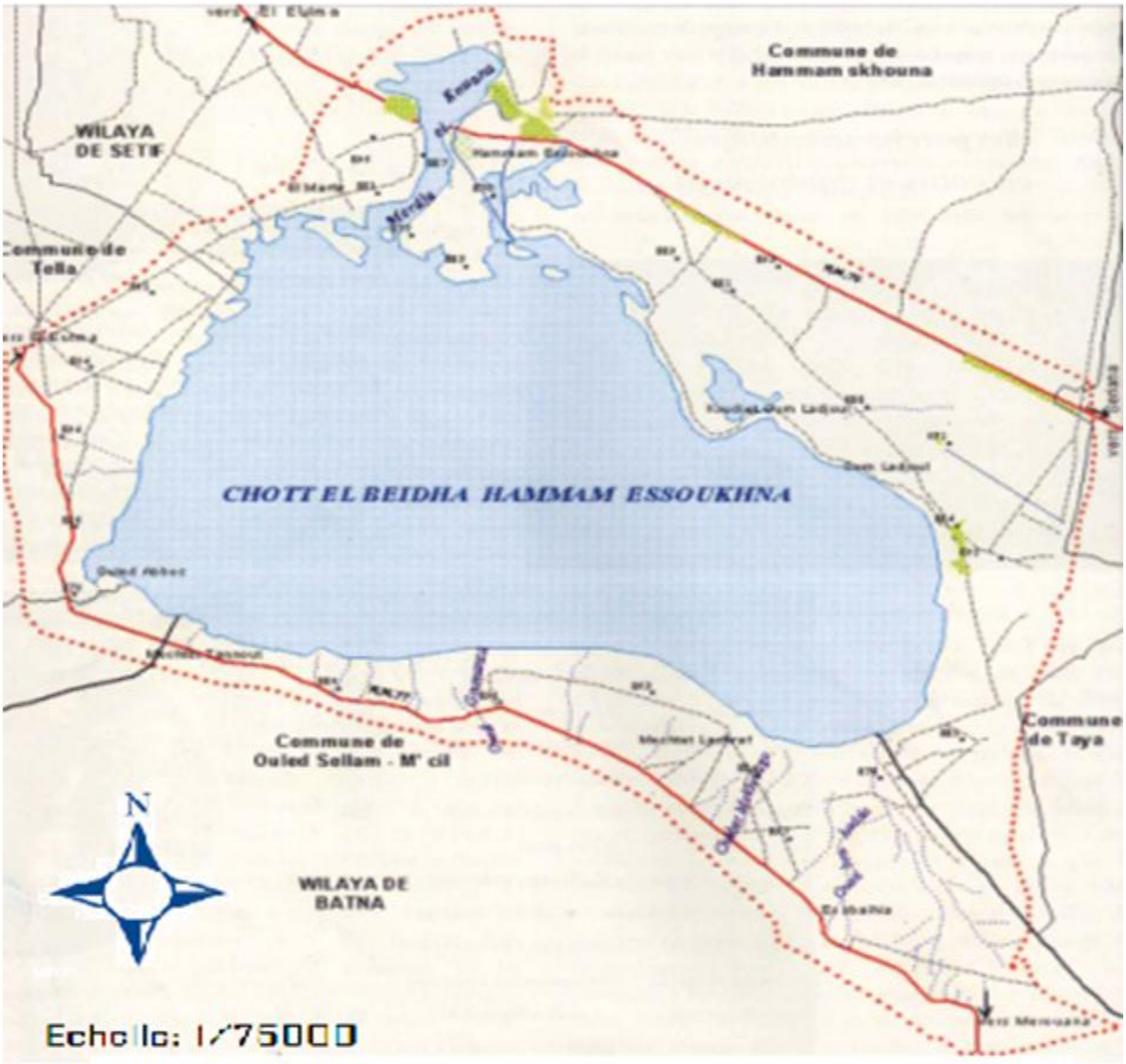
أخذت عينات الدراسة على عمق 12سم وفي ظروف معقمة، على مرحلتين:

* المرحلة الأولى: أخذت ثلاث عينات تربة من مناطق مختلفة من منتصف السبخة في نهاية شهر مارس 2010.

* المرحلة الثانية : أخذت ست عينات تربة ، ثلاث منها من منطقة زراعية تبعد حوالي 100 متر عن منتصف السبخة، و ثلاث عينات من منتصف السبخة في نهاية شهر جويلية 2010 . جمعت العينات في قارورات معقمة و حفظت في الثلاجة في درجة حرارة 4 °م (شكل 03).

2-1- تقدير خواص عينات التربة:

قدرت الخصائص الفيزيوكيميائية (pH و درجة التوصيل الكهربائية Electrical conductivity) بعد تحضير مستخلص التربة المخفف إلى 1/5، حيث أضيف مقدار 10 غرام من التربة إلى 50 ملل من الماء المقطر و نقلت إلى دورق بلاستيكي. تم تقليب محتويات الدورق مرة كل 10 دقائق لمدة 30 دقيقة (Montoroi، 1997) .



شكل 03: موقع جمع عينات التربة من سبخة البيضاء في منطقة حمام السخنة (Anonyme، 2004)

*** تقدير بعض العناصر بالتربة :**

تم تقدير بعض العناصر في التربة و هي: Ca^{+2}، Na^{+}، K^{+}، Mg^{+2}، Cl^{-} ، HCO^{3-}، SO_4^{-2}. في الوكالة الوطنية للموارد المائية (الفرع الجهوي الشرقي) ، باستخدام جهازSperctro colorimetre و جهاز التحليل الذاتي (SKALAR) و جهاز Sherwood Model 410 و (DR 2000) Colorimetre ، Turbidimétrie و Volumétrie .

3- عزل و تشخيص الفطريات:

3-1- عزل الفطريات من التربة:

عزلت فطريات التربة باستخدام الطريقة المباشرة و طريقة التخافيف، حيث تم الزرع على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) مضاف إليه تركيز من NaCl حسب ما يعادله في العينة وهي: 0.43 % ، 1.09% ، 0.4% ، و PDA خالي من NaCl كشاهد.

* **الطريقة المباشرة:** نقلت كمية 1 غ من التربة إلى طبق بتري معقم ، ثم مزجت مع وسط الزرع حتى تتوزع بشكل متجانس مع الوسط . حضنت الأطباق في درجة حرارة 28 °م لحين ظهور المستعمرات.

* **طريقة التخافيف** : مزجت 1غ من التربة في 9 مل من الماء المقطر المعقم، و حضرت سلسلة التخافيف (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}). زرع كل تخفيف بطريقتين (المزج و النشر) و بمكررين لكل تخفيف. حضنت الأطباق في درجة حرارة 28 °م لحين ظهور المستعمرات (Suhail و آخرون، 2007).

3-2 – تنقية و تشخيص الفطريات المعزولة:

تنقى الفطريات على نفس الوسط الذي عزلت منه بشكل متكرر حتى الحصول على مستعمرات نقية ، ثم تنقل للتشخيص.

- تشخص الفطريات المعزولة إلى مستوى الجنس أو النوع إذا أمكن ذلك، اعتمادا على الخصائص المورفولوجية و المجهرية، وأوساط خاصة بالتشخيص وهي: Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA)، Malt Extract Agar (MEA)، Malt Agar (MA)، Aspergillus Flavus Parasiticus Agar (AFPA) مع استعمال مفاتيح التشخيص لكل من Pitt و Hocking (1985)، Botton و آخرون (1990)، Parnela و آخرون(1988)، Barnett و Hunter (1972) ، Pitt (1991) و Champion (1997).

3-2-1- التشخيص المورفولوجي:

اعتمد في التشخيص المورفولوجي على دراسة الخصائص المزرعية (سرعة النمو، لون المستعمرة و خلفيتها، إفراز الصبغات، وجود الأجسام الحجرية (اللون و الحجم)، التركيب السطحي للمستعمرة (قطنية ، مسطحة، مستوية، مجعدة ، ملتوية ...)، إفراز قطرات، الرائحة ...).

3-2-2- التشخيص المجهري:

يراعى في التشخيص المجهري ميزة الميسيليوم (وجود اللون أو غيابه، مقسم أو غير مقسم ومميزاته الشكلية)، الأبواغ (لونها ، حجمها وشكلها المظهري)، وجود أو غياب الأجسام الثمرية.

4- دراسة فطر *Aspergillus oryzae*:

4-1- تحديد النوع *A. oryzae*:

تم تحديد النوع الفطري *A. oryzae* بالاعتماد على طريقة Pitt و Hocking (1985) ، وذلك باستعمال الأوساط الخاصة بالتشخيص وهي: Glycerol Nitrate Agar (G25N) ، Czapek Yeast Agar (CYA) و MEA.

و التي تعتمد بالدرجة الأولى على تركيب الوسط ، و درجة الحرارة التي تحضن فيها الأطباق المزروعة و هي: 5°م، 25°م و 37°م. تمت ملاحظة المستعمرات النامية بعد 7 أيام من الحضن و ذلك بمراعاة الصفات التالية: قطر المستعمرة ، الصفات المورفولوجية و الصفات المجهرية.

4-2- انتقاء العزلة الأكثر تحملا للملوحة العالية:

4-2-1- على وسط صلب (قياس قطر المستعمرات): استعملت أطباق بتري بقطر 90 ملم لدراسة تأثير الملوحة على نمو الفطر، و لقحت الأطباق (ثلاث مكررات) بقرص فطري بقطر 5 ملم من حواف مستعمرة حديثة العمر7 أيام، و حضنت في درجة حرارة 30° م لمدة 7 أيام.

*** وسط غنـي:**

نميت العزلات الثلاث لفطر *A.oryzae* و هي S1 ، S2 و S3 على وسط Yeast Extract Sucrose Agar (YESA) الصلب بتراكيز مختلفة من الملح (0M، 0.2M، 0.4M، 0.6M، 0.8M، 1M، 1.5M، 2M، 2.5M، 3M و 3.5M) (Tang و آخرون ، 2009). و نمي الفطر بنفس التراكيز على وسط أدنى Minimum Medium (MM) بنفس الطريقة السابقة.

4-2-2- على وسط سائل (تقدير مردود الكتلة الحيوية):

*** وسط غني:**

نميت العزلات الثلاث لفطر *A.oryzae* في وسط YES السائل بتراكيز مختلفة من الملح (0M، 0.5M، 1M، 1.5M، 2M، 2.5M، 3M و 3.5M) ، حيث لقحت الحوجلات الحاوية على 100 مل من الوسط بقرص فطري بقطر 5ملم من حواف كل مستعمرة حديثة. و حضنت في درجة 30°م مدة 7 أيام في رجاج بسرعة 100 rpm بثلاث مكررات. و نمي الفطر بنفس التراكيز وبنفس الطريقة على وسط أدنى (MM) (Beever و Laracy، 1986). بعد انتهاء فترة الحضن يرشح الميسيليوم عبر ورق Whatman N°1 ويقاس الوزن الرطب، ثم يجفف عند درجة حرارة 80° م لمدة 24 ساعة (Tang و آخرون، 2009) ، ثم يقدر النمو بقياس المحتوى لمائي وفق المعادلة التالية:

المحتوى المائي = (A-1) – (A-2) (Frances و آخرون، 1979)

حيث : (A) : وزن ورقة الترشيح .

(1) : وزن الميسيليوم الرطب.

(2) : وزن الميسيليوم الجاف.

4-3- الدراسة الفسيولوجية لفطر *A. oryzae* :

لمعرفة تأثير الظروف البيئية على نمو الفطر أحدثت تغيرات في ظروف تنمية المستعمرة : درجة الحرارة، pH ، نوع الوسط و مصادر الكربون و الآزوت. لقحت الأوساط بقرص فطري بقطر 5 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة حديثة بثلاث مكررات. وللدلالة على درجة نمو الفطر تم تحديد متوسط قطر المستعمرات ، وقدر متوسط وزن الميسيليوم المنمى على وسط سائل حسب المعادلة السابقة.

4-3-1- تأثير درجة الحرارة:

نمي الفطر كما ذكر سابقا على وسط YESA و حضنت الأطباق في عدة درجات حرارة مختلفة: 5، 15، 20، 25، 28، 30، 32، 35، 37، 40°م لمدة 7 أيام (Ahmed و آخرون، 2009).

4-3-2- تأثير الأوساط الزراعية:

لمعرفة الوسط المثالي لنمو الفطر ، نمي هذا الأخير في عدة أوساط زراعية مختلفة و هي:

- وسط Potato Dextrose Agar (PDA) .
- وسط Malt Extract Agar (MEA).
- وسط Yeast Extract Saccharose Agar (YESA).
- وسط Czapek.
- وسط Czapek Yeast Extract Agar (CYA).
- وسط MY20.
- وسط Saboraud.

حضنت الأطباق لمدة أسبوع في درجة حرارة 30 °م. و قدر نمو الفطر بقياس قطر المستعمرات (Zain و آخرون ، 2009).

4-3-3 - تأثير الأس الهيدروجيني pH:

لتحديد قيمة pH المثالية لنمو فطر *A.oryzae*، نمي الفطر في حوجلات بسعة 250 ملل تحتوي على 100 ملل من وسط YES السائل. ويتم تعديل الوسط بعدة قيم من pH هي 4.5 ، 5، 5,5، 6، 6,5، 7، 7,5، 8، 8,5، 9 و11 ، و ذلك بإضافة 1N HCl، 1N NaOH. تعقم الحوجلات في درجة 121°م مدة 15 دقيقة ، ثم تلقح بقرص فطري بقطر 5 ملم ،تحضن الحوجلات في درجة حرارة 30°م بثلاث مكررات لمدة 7 أيام (Ahmed وآخرون ، 2009). بعد انتهاء فترة الحضن ، يقدر النمو الفطري حسب الطريقة المذكورة سابقا (Frances و آخرون، 1979؛ Tang و آخرون ، 2009).

4-3-4- تأثير مصادر الكربون و الآزوت:

استعمل لهذه الدراسة الوسط الأساسي (base medium)، مع استعمال (1%) من مصادر الكربون التالية: سكريات أحادية (غلوكوز) ، سكريات ثنائية (سكروز) ، سكريات متعددة (النشاء ، السيليلوز) ، الأحماض العضوية (حمض السيتريك) ، و (1.7 غ/ل) من مصادر الأزوت التالية: اللاعضوية (NH_4Cl و NH_4NO_3) ، و العضوية (البيبتون و Glycine).

لقحت الأطباق بقرص 5 ملم من الفطر ، بثلاث مكررات لكل مصدر ، و حضنت في درجة 30°م لمدة 10 أيام. و بعد انتهاء فترة الحضن يتم قياس قطر المستعمرات و ملاحظة الخصائص الشكلية (Attrassi و آخرون ، 2007).

5- استخلاص الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي:

*** تحضير المعلق البوغي:**

يحضر المعلق البوغي حسب طريقة Cai و آخرون (2010). حيث يسكب 10 مل من الماء المقطر المعقم على طبق بتري المحتوي على العزلة S1 بعمر سبعة أيام. تكشط الأبواغ باستعمال شريحة معقمة ، ثم تحضر سلسلة من التخافيف (10^{-1} ،...... 10^{-7})، و يقدر عدد الأبواغ بتطبيق العلاقة التالية (Raina و آخرون ، 2009).

$$\textbf{عدد الأبواغ (بوغة / مل)} = \frac{\text{مقلوب معامل التخفيف X عدد المستعمرات}}{\text{الحجم المستعمل}}$$

5-1- أوساط التخمر:

لإجراء عملية التخمر استخدمت أوساط اصطناعية هي (وسط (MNM) و وسط أدنى (MM)) و وسط طبيعي (نخالة القمح).

*** وسط MNM:**

استخدم وسط MNM السائل حسب طريقة Bois و آخرون (2005) ،مع إضافة أعلى تركيز ملحي يمكن للفطر تحمله حسب طريقة Nieto و آخرون (1997) . يلقح الوسط بعد تعقيمه بـ 1 مل من المعلق البوغي بتركيز 7×10^{5} بوغة / ملل المحضر سابقا ثم تحضن كل حوجلة بسعة 250 مل تحتوي على 100 مل من الوسط في درجة 30°م لمدة أسبوع في رجاج بسرعة 150 rpm (Xiao و آخرون، 2010) . وأجريت عملية التخمر بنفس الطريقة السابقة مع استخدام الوسط الأدنى (MM) .

*** التخمر على وسط طبيعي (نخالة القمح):**

تستعمل هذه الطريقة لإنتاج الأنزيمات من طرف الفطريات الخيطية، لأن مورفولوجية و فسيولوجية هذه الأعفان تمكنها من الاختراق و النمو في مختلف المركبات الصلبة. يستعمل في هذا النوع من التخمر العديد من المخلفات الزراعية كمصادر للتغذية و كدعامة فيزيائية، و بالتالي إنتاج أنواع مختلفة من المواد المخمرة و الأنزيمات.

استعمل في هذا التخمر عجينة نخالة القمح المحضرة حسب طريقة Ruijter و آخرون (2004). حيث مزجت مع الماء المقطر بنسبة 1 لتر/ (1 كيلوغرام من الوزن الجاف) مع تعديل الطريقة حيث عوض إضافة M 0.6 من NaCl تم إضافة 3M و هو أعلى تركيز يتحمله الفطر. حضرت أقراص من العجينة ثم وضع كل قرص في طبق بتري ، بعد ذلك عقمت لمدة ساعة و نصف ثم لقحت الأطباق بـ 1 ملل من المعلق البوغي 7×10^5 بوغة / مل ثم حضنت في 30°م مدة 48 ساعة (Ruijter و آخرون ، 2004).

5-2- إنتاج الكتلة الحيوية للعزلة S1:

بعد انتهاء مدة الحضن، يرشح الميسيليوم عبر ورق ترشيح Whatman N°1 ويغسل مرتين بمحلول متعادل Isoozmotic (نفس تركيز NaCl المحضر في وسط الزرع) الذي يكون باردا و المحضر بنفس تركيب وسط الزرع مع انعدام مصدر الكربون. يجمع الميسيليوم بعد ذلك و يجمد حتى مرحلة إجراء التحاليل (Gunde-Cimerman و آخرون، 2007).

6- الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفرزة من طرف العزلة S1 :

6-1- تحضير المستخلص الخلوي:

6-1-1- على وسط سائل:

حضر المستخلص الخلوي حسب طريقة Bois و آخرون (2005) ، حيث وزن 0.3 غرام من الميسيليوم المتحصل عليه (إنتاج الكتلة الخلوية) أضيف إليه 6 مل من خليط (كلوروفورم : ميثانول : ماء مقطر) (12 : 5: 3 ، حجم /حجم/ حجم)، ثم حضن في 65 °م مدة 30 دقيقة ، بعد ذلك أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة 14000rpm / 10 دقائق. أخذ الجزء الطافي و أضيف إليه 125ميكرولتر من الماء المقطر لتحفيز عملية الفصل،ثم أجريت عملية طرد مركزي ثانية بسرعة 13000 rpm /10 دقائق. يجمع الجزء الطافي و تجرى له عملية تكثيف عبر جهاز المكثف الدوراني (Rotavapor Buchii)، عند درجة حرارة 40°م ، يضاف للمستخلص المركز 1مل من الماء المقطر و يحفظ في درجة (20-°م) قبل إجراء التحاليل TLC .

6-1-2- على وسط صلب SSF:

حضر المستخلص حسب طريقة Witteveen و آخرون، (1994) عن Ruijter و آخرون (2004) ، حيث يتم كشط الميسيليوم من الأطباق المجمدة و فصله عن الوسط ، بعد ذلك يوزن 0.3غ من الميسيليوم المجفف و يحضر منه المستخلص بنفس الطريقة المذكورة سالفا .

6-2 - الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي:

تم الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي عن طريق الفصل بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) . حيث تعتبر هذه التقنية شائعة الاستعمال في الفصل و الكشف عن المستقلبات الثانوية، وهي تعتمد على توزع المادة بين درجة ادمصاصها على المرحلة الثابتة (سيليس) وذوبانها في المرحلة المتحركة (المذيب)، ويقاس هذا التوزيع بحساب معامل الانسياب Rapport frontale (Rf) الذي يكون خاص بكل مركب .

استخدمت ألواح هلام سليكا (DC-Pet-Folien-Kieselgel with F indicator 254nm) (20x20 سنتيمتر) الجاهزة للاستعمال سمك (0.2 ملم) لفصل محتويات كل مستخلص على حدا. وذلك بوضع حجم 20 ميكرو لتر على خط الانطلاق الوهمي للألواح، وعلى نفس الخط يوضع 5µl من الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي القياسية التالية : Glycerol ، Sorbitol ، Mannitol ، Myo-Inositol ، Trehalose، Fructose ، Sucrose ، Glucose و Glycine betain. تمت العملية تحت التجفيف الضعيف (باستعمال مجفف الشعر)، ثم أجريت الهجرة على مسافة 15سم في أنظمة مختلفة من المذيبات العضوية، وذلك حسب الجزيئات المراد الكشف عنها:

1- الكشف عن Glycine betaine: استعملت أنظمة الهجرة التالية:

* Phenol : H_2O (4:1) حجم / حجم.

بعد الهجرة ترش الصفيحة بملون بروموكريزول الأخضر بتركيز 0.1 % ، ثم تجفف في درجة حرارة 100°م لمدة 5-10 دقائق (Lai و آخرون، 1998).

* NH_4OH : Methanol (1:3) حجم /حجم.

بعد الهجرة تعرض الصفيحة إلى بخار اليود I2. يكثف ظهور الألوان بالرش بواسطة محلول مشبع لـ NaH_2S (Ghoul و آخرون، 1990).

* Methanol :Acetone : HCl (9:1:1) حجم /حجم / حجم.

بعد جفاف الصفيحة، تعرض في الأول لبخار اليود I2. و تلاحظ البقع، بعد ذلك ترش بمحلول ساخن من ninhydrine في (isopropanol : pyridine) (80:20) حجم/ حجم) بتركيز 0.2 % (Lai و آخرون، 1998).

2- الكشف عن الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols) و السكريات : استعملت أنظمة الهجرة التالية:

* Acetone :H_2O (9:1) حجم /حجم

* Methylene Chlorid : Acetate : Methanol :H_2O (50:5:20:5) حجم /حجم /حجم /حجم

(Rapior و آخرون، 1994).

* H_2O : 1-butanol (9:1) حجم /حجم.

*H_2O: 1-propanol :ethylacetate (3:2:1) حجم/حجم/حجم (Kester و آخرون، 1985).

* H_2O: ethylacetate : acetate :methanol (60:15:15:10) حجم /حجم /حجم /حجم (Caprioli و آخرون ، 2004).

*H_2O : butanol : pyridine (15:30:20) حجم/ حجم/ حجم . بعد الهجرة ترش الصفيحة بـ 0.5 % ($KMnO_4$ في NaOH 1N) (Managbanag و Trozilli ، 2002) .

بعد انتهاء الهجرة، تخرج الصفائح و تجفف، ثم تلاحظ الألوان و موقع البقع في الضوء المرئي و تحت الأشعة فوق البنفسجية UV في طول الموجة 254 نانومتر و 366 نانومتر.

* **الدراسة الإحصائية:** أجري التحليل الإحصائي، باستعمال برنامج SAS9 بإجراء اختبار ANOVA المتبوع باختبار Student.

النتـــــــائج

النتائــج:

جلــب العينـات

1- قياس العوامل الفيزيائية:

أظهر التحليل الفيزيوكيميائي لعينات التربة المأخوذة خلال شهري مارس و جويلية أن قيم الأس الهيدروجيني (pH) كانت 8.25 بالنسبة للعينة المأخوذة خلال شهر مارس ، و بين 7.92 و 8.08 بالنسبة لعينات التربة المأخوذة في شهر جويلية من وسط السبخة و على محيطها على الترتيب. بينما كانت درجة الملوحة لعينة التربة لشهر مارس 10 mS ما يعادل 4.34 غ/ل من NaCl. أما العينات المأخوذة خلال شهر جويلية فأظهرت درجة ملوحة 57 mS بالنسبة لتربة منتصف السبخة ، و 4 mS لتربة محيط السبخة و ذلك ما يعادل 10.9 غ/ل و 4.13 غ/ل من NaCl على الترتيب. أما بالنسبة لدرجات الحرارة فقد كان هناك اختلاف بين الموسمين، حيث سجلت 19°م خلال شهر مارس، بينما تراوحت بين 29° و 32 ° م خلال شهر جويلية. كما أظهرت دراسة العناصر في عينات التربة وجود اختلاف واضح في تركيز الأملاح، حيث يكون مرتفعا خلال شهر جويلية وفي عينات منتصف السبخة ، مقارنة مع عينات محيط السبخة، وخاصة تركيز الكلوريد (Cl^-) و الصوديوم (Na^+) (جدول 05).

جدول 05: الخصائص الفيزيوكيميائية لعينات التربة المأخوذة خلال شهري مارس و جويلية.

العينات / الخصائص الفيزيوكيميائية	مـارس	جويـلـيـة	
الموقع	منتصف السبخة	منتصف السبخة	محيط السبخة
pH	8.25	7.92	8.08
T°	19	29	32
CE (mS)	10	57	4
التشبع (%)	57	47	42
CO_3H^- (meq /l)	2.4	2.5	4.2
SO_4^{-2} (meq /l)	180.0	225.0	0.8
Cl^- (meq /l)	1160.0	1300.0	1.2
Ca^{+2} (meq /l)	63.7	74.3	15.1
Mg^{+2} (meq /l)	77.8	100.6	39.0
Na^+ (meq /l)	843.8	1130.0	15.7
K^+ (meq /l)	6.4	4.3	0.3

2- عزل الفطريات و تشخيصها :

تم في هذه الدراسة عزل الفطريات على أوساط مختلفة هي: PDA و PDA مضاف إليه NaCl حسب ما يعادله في العينة وهي : 0.43% ، 1.09% ، 0.4%. وقد تم عزل 21 جنسا فطريا بالإضافة إلى ثلاث خمائر، ويلاحظ أن فطر *Aspergillus* هو السائد بنسبة 43% ، يليه فطر *Penicillium* بنسبة 24 % ثم جنس *Alternaria* بنسبة 7%، أما النسبة المتبقية فهي موزعة على فطريات أخرى مختلفة (جدول 06). أما بالنسبة لفترات أخذ العينات فيلاحظ انتشار واسع للفطريات خلال شهر مارس مقارنة مع شهر جويلية ، وذلك بنسب 75.47 % و 24.53 % على الترتيب. كما يتضح من خلال المقارنة بين مواقع أخذ العينات خلال شهر جويلية ، أن نسبة تواجد الفطريات في منتصف السبخة أكبر منها في محيط السبخة وذلك بنسب 72.22 % و 27.78 % على الترتيب (شكل 04).

جدول (06): قائمة الفطريات المعزولة بناء على الأوساط المستخدمة و الفترة الزمنية

جويلية			**مارس**		
PDA+C	**PDA+M2**	**PDA**	**PDA**	**PDA+M1**	**العينات**
/	*Rhodotorula* sp. *Penicillium* sp.1 *A. niger* S4 *A.niger* S5 *A.unguis* *A.flavus* S3	*A. flavus* S1	*Phoma* sp. 2 *Phoma* sp. 3 *Phoma* sp. 4 *Cladophialophora* *Cladosporium* sp. *Ulocladium* - *chartaumium* *Alternaria solani* *Aspergillus niger* S1 *A. parasiticus* S1 *A. parasiticus* S2 *A. niger* S2 *A.niger* S3 *A.parasiticus* S3 *A.parasiticus* S4 *A.flavus* S2 *Aspergillus* sp. 1 *Pythomyces* sp. *Sporodactylon* sp. *Fusarium* sp. 1 *Mucor* sp. 1	*Alternaria rapheni* *A. brassicicola* *A. alternata* *Phoma* sp. 1 *Eurotium repens* *Aspergillus flavips* *Fusarium compactum* *Aurobasidium* sp. *Mucor* sp 2. *Penicillium citreonigrun*	**ع1**

			Yeast sp. 1 Yeast sp. 2		
/	*A. alternata* *A .rapheni* *Cladosporium* *herbarum*	/	*Alternaria alternata* *A. tenuissiana* *Fusarium* sp. 2 *Fusarium* sp. 3 *F. sacchari* *Penicillium* sp. 2 *Aspergillus* sp. 2 *Aspergillus* sp. 3 *A. parasiticus* S6 *A .niger* S6 *A.niger* S7 *A.parasiticus* S7 *A.parasiticus* S8 *A.parasiticus* S9 *A.flavus* S4 *A.unguis* *A.sydwii* *A.glaucus*	*Stachybotris atra* *Alternaria tenuissia* *Deudriphium* sp. *Biosporalis australiensis* *A .niger S 6* *A.niger S 7* *A.parasiticus* S5 *Fusarium poae* *Trichothesium roseum* *Eupenicillium hirayamae* *Penicillium nigricans*	ع2
/	*Penicillium* sp. 4 *Penicillium* sp. 5 *Penicillium* sp. 6 *A. flavus* S2	*Penicillium* sp. 3 *P. notatum* *Urosporemum* *picroides*	*Aspergillus* sp. 4 *A. candidus* *A. fumigatus* *Alternaria*	*A.parasiticus* S10 *Alternaria alternata* *A.tenuis* *Aspergillus terrus*	ع3

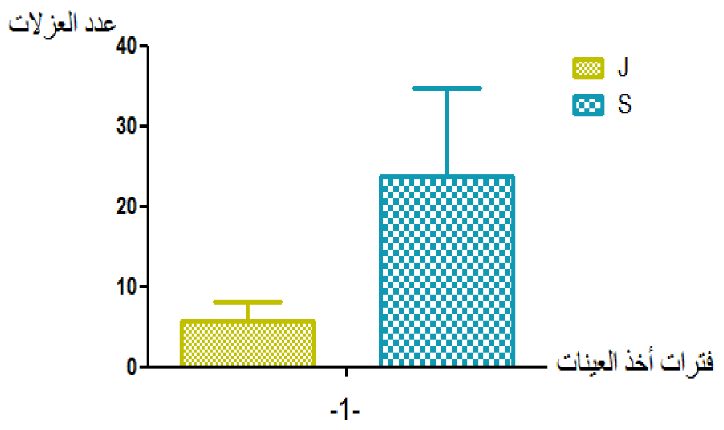
ع3	*A. ochraceus* S1 *A.ochraceus* S2 *A .oryzae* S1 *Cladosporium* sp. *Phoma* sp. 5	*clamydospora* *Helicomyces* sp.	*A. parasiticus* S5	*A.flavus* S4	
ع4	/	/	*A.oryzae* S3 *A.candidus*	/	*A. flavus* S3 *A.oryzae* S2 *A.ochraceus* S3 *A.parasiticus* S6
ع5	/	/	*A.ochraceus* S4 *Rhizopus*	/	*A.candidus*
ع6	/	/	/	/	/

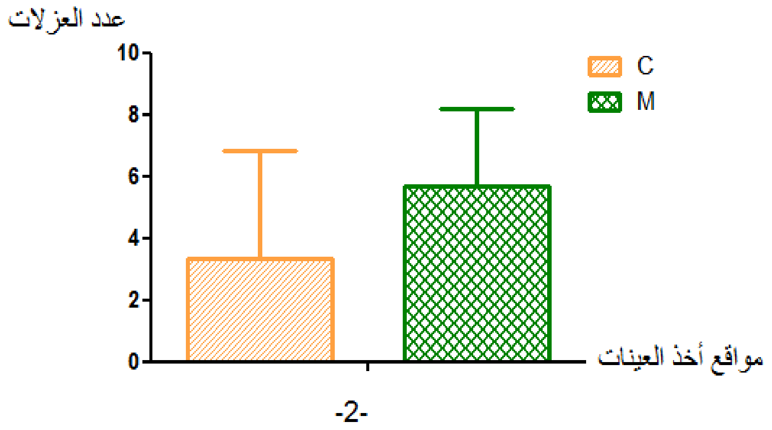
ع1 ،**ع2** ، **ع3** : عينات مأخوذة من وسط السبخة خلال شهر مارس و شهر جويلية.

ع 4، **ع5** ،**ع6** : عينات مأخوذة من محيط السبخة لشهر جويلية .

PDA+M1: وسط PDA مضاف إليه NaCl بتركيز عينات وسط السبخة لشهر مارس و**PDA+M2**: لشهر جويلية.

PDA+C : وسط PDA مضاف إليه NaCl بتركيز عينات محيط السبخة.





شكل (**04**): نسبة انتشار الفطريات حسب فترات و مواقع أخذ العينات

1- نسبة انتشار الفطريات حسب فترات أخذ العينات: جويلية (J) و مارس (S).

2- نسبة انتشار الفطريات حسب مواقع أخذ العينات: منتصف السبخة (M) و محيط السبخة (C).

3- دراسة فطر *Aspergillus oryzae*:

3-1- تشخيص الفطر:

3-1-1- الدراسة المورفولوجية :

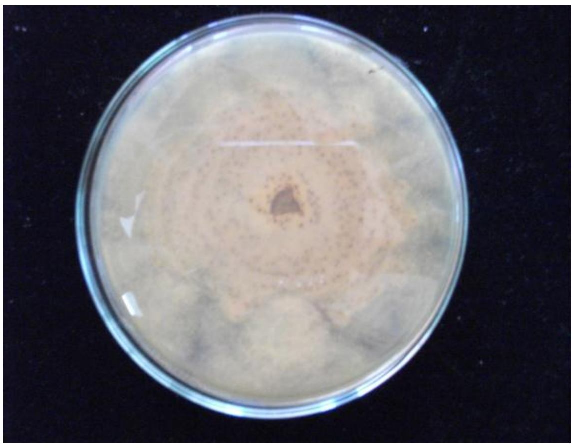
يتضح من خلال الملاحظة العينية لمستعمرة الفطر النامية على وسط PDA ، مستعمرة ناعمة إلى شكل مسحوقي، ذات ميسيليوم هوائي و غنية بالأجسام الحجرية ، حيث تكون في البداية ذات لون أبيض ثم تميل إلى الاصفرار،أما الخلفية فتظهر صفراء شاحبة (شكل05).

3-1-2- الدراسة المجهرية : يتضح من خلال الملاحظة المجهرية للفطر بالمجهر الضوئي أنه يتكون من حامل كونيدي طويل يحمل رأس بوغية كبيرة شبه كروية، عليها زوائد (Phialides) متراصة مع بعضها البعض بشكل منتظم، تحمل أبواغ الفطر،أما الميسيليوم فهو متشابك و يظهر شفاف. تظهر الأبواغ بلون أصفر مخضر داكن إلى زيتوني ذات شكل بيضوي (شكل 06).

3-1-3- أوساط التشخيص:

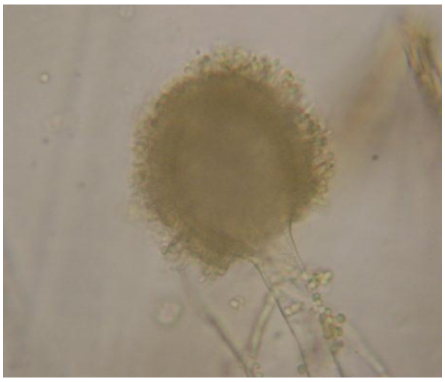
يتضح من خلال نتائج التشخيص بعد ملاحظة الصفات المورفولوجية على وسط PDA ، و أوساط التشخيص في درجات حرارة مختلفة ، أن نوع *Aspergillus* المعزول هو *A.oryzae* ، حيث يبدي الفطر مستعمرات كثيفة و بيضاء غنية بالأجسام الحجرية على وسط CYA، أما على وسط MEA فتظهر المستعمرة صفراء ذات ميسيليوم هوائي، وغنية بالأبواغ و الأجسام الحجرية. بينما كان نمو الفطر على وسط GN25 ضعيفا، حيث لوحظت مستعمرة بيضاء صغيرة في كل درجات الحرارة المختبرة (جدول 07).

الواجهة



الخلفية

الشكل 05: مستعمرة *A. oryzae* منماة على وسط PDA عند درجة 30°م



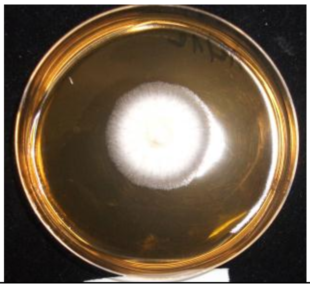
– أ –

– ب –

شكل 06: الرأس البوغية لفطر *A.oryzae* تحت المجهر

– أ–: تكبير X40 – ب–: تكبير X4

جدول 07 : الخصائص المزرعية لفطر *A.oryzae* النامي على أوساط التشخيص بعد 7 أيام من الحضن

وسط التشخيص	درجة الحرارة (م°)	قطر المستعمرة (ملم)	الخصائص المزرعية	
CYA	-25 -37 -5	- 42 - 23 /	– مستعمرة قطنية كثيفة منتفخة، مع ملاحظة وجود عدد كبير من الأجسام الحجرية كبيرة الحجم بلون فضي مسود، ذات حواف غنية بالأبواغ الصفراء. – مستعمرة قطنية كثيفة ذات مركز مصفر داكن مائل إلى اللون الزيتوني، ذات حواف بيضاء ناصعة. مع ملاحظة وجود صبغة صفراء شفافة. و عدد قليل جدا من الأبواغ. – غياب النمو	
MEA	-25 -37 -5	- 52 - 35 /	- مستعمرة قطنية كثيفة ، بيضاء مسطحة ، مع وجود أبواغ صفراء بعدد قليل ، بالإضافة إلى وجود أجسام حجرية ذات لون فضي مسود. - مستعمرة صفراء غنية بالأبواغ. – غياب النمو.	
GN25	-25 -37 -5	- 24 - 29 /	- مستعمرة بيضاء ذات ميسيليوم هوائي خفيف. – مستعمرة بيضاء كثيفة ذات حواف شفافة. – غياب النمو.	

3-2- دراسة تأثير الملوحة على نمو الفطر(انتقاء العزلة الأكثر تحملا للملوحة العالية):

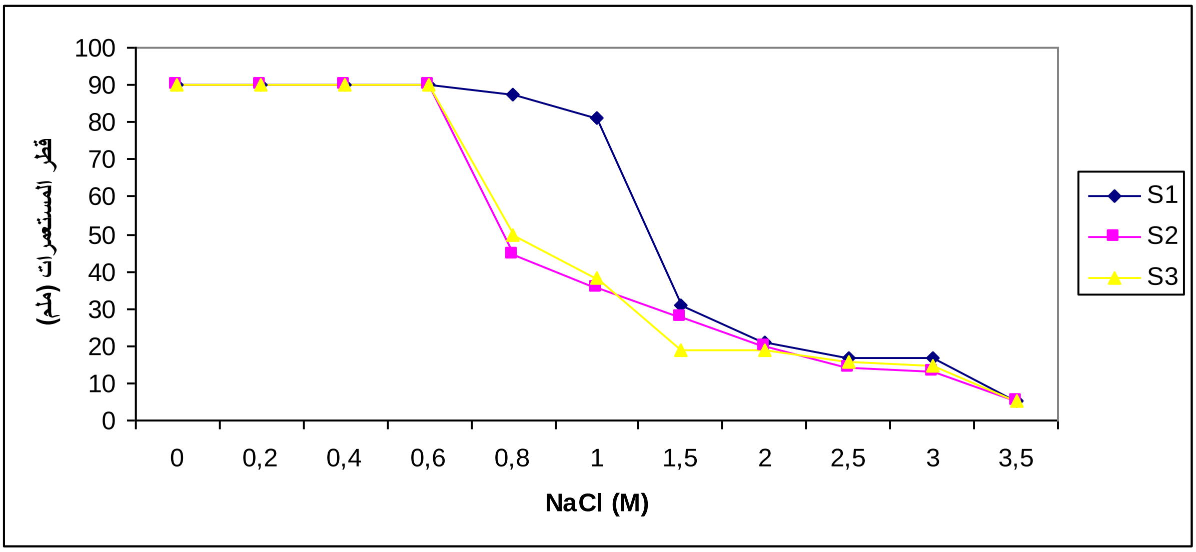
3-2-1- تأثير الملوحة على قطر النمو (وسط صلب):

*** على وسط غني:**

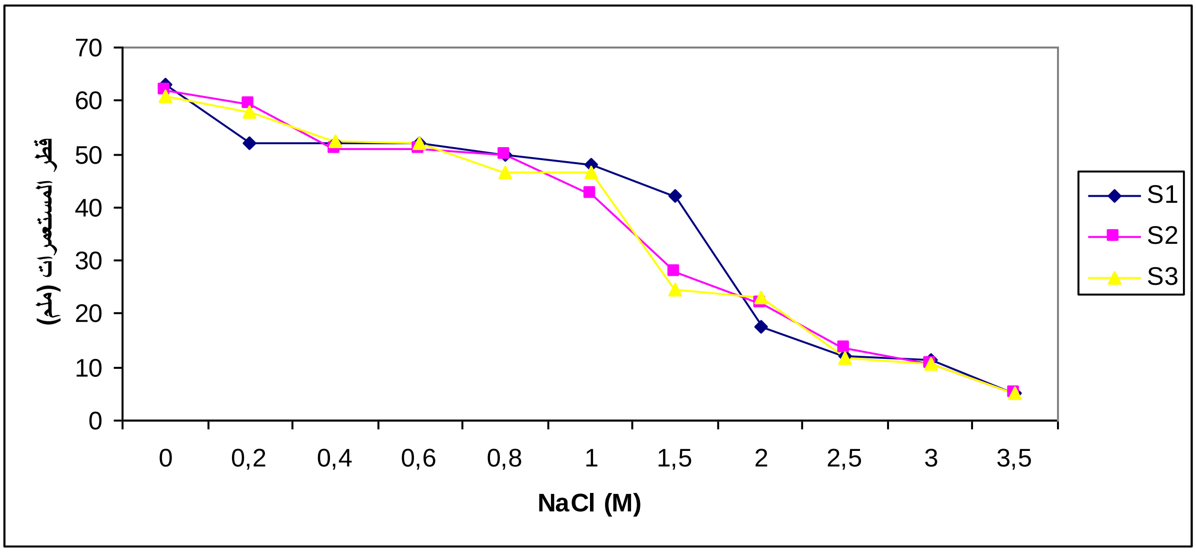
أظهرت نتائج تنمية العزلات على وسط YESA في عدة تراكيز من الملح وجود فرق معنوي جدا في النمو($p < 0.0001$) ، حيث تبدي العزلات الثلاث أقصى نمو لها عند التراكيز الملحية من 0 M إلى 0.6 M بنمو بلغ 90 ملم ، ثم يتناقص النمو تدريجيا كلما زاد تركيز NaCl في الوسط. و يظهر الاختلاف بين العزلات عند التركيز0.8 M، إذ سجلت العزلة (S1) أكبر قيمة للنمو (87.5 ملم) مقارنة مع العزلتين (S2) و (S3) ، حيث قدر النمو عند نفس التركيز بـ 44.3 ملم و 50 ملم على الترتيب، بعد ذلك يستمر التناقص إلى أن يصل أدنى قيمة مسجلة عند التركيز3M بـ 16.5 ملم بالنسبة للعزلة (S1)، و 13.33 ملم بالنسبة للعزلة (S2)، و 14.66ملم بالنسبة للعزلة (S3). بينما لم يلاحظ أي نمو للعزلات الثلاث عند التركيز 3.5 M (الشكل 07).

*** على وسط أدنى:**

يظهر من خلال التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي جدا بين تأثير التراكيز الملحية المختلفة و النمو الفطري ($p< 0.000$) . حيث تنمو العزلات الثلاث بشكل جيد في وسط أدنى خالي من NaCl، إذ سجلت أكبر قيمة لقطر المستعمرات 60 ملم، بعد ذلك يتناقص النمو بشكل متفاوت كلما زاد تركيز الملح في الوسط. ويلاحظ أن العزلة (S1) تبدي تحملا أكثر للملح عند التركيز 1.5M إذ بلغ قطر المستعمرة 42 ملم مقارنة مع العزلتين (S2) و (S3) ، التي سجلت 28 ملم و 24.5 ملم على الترتيب. بينما ينعدم النمو عند التركيز 3.5M (شكل 08).



شكل 07: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* منمى على وسط YESA



شكل 08: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* منمى على وسط أدنى

MMA

3-2-2- تأثير الملوحة على مردود الكتلة الحيوية (وسط سائل):

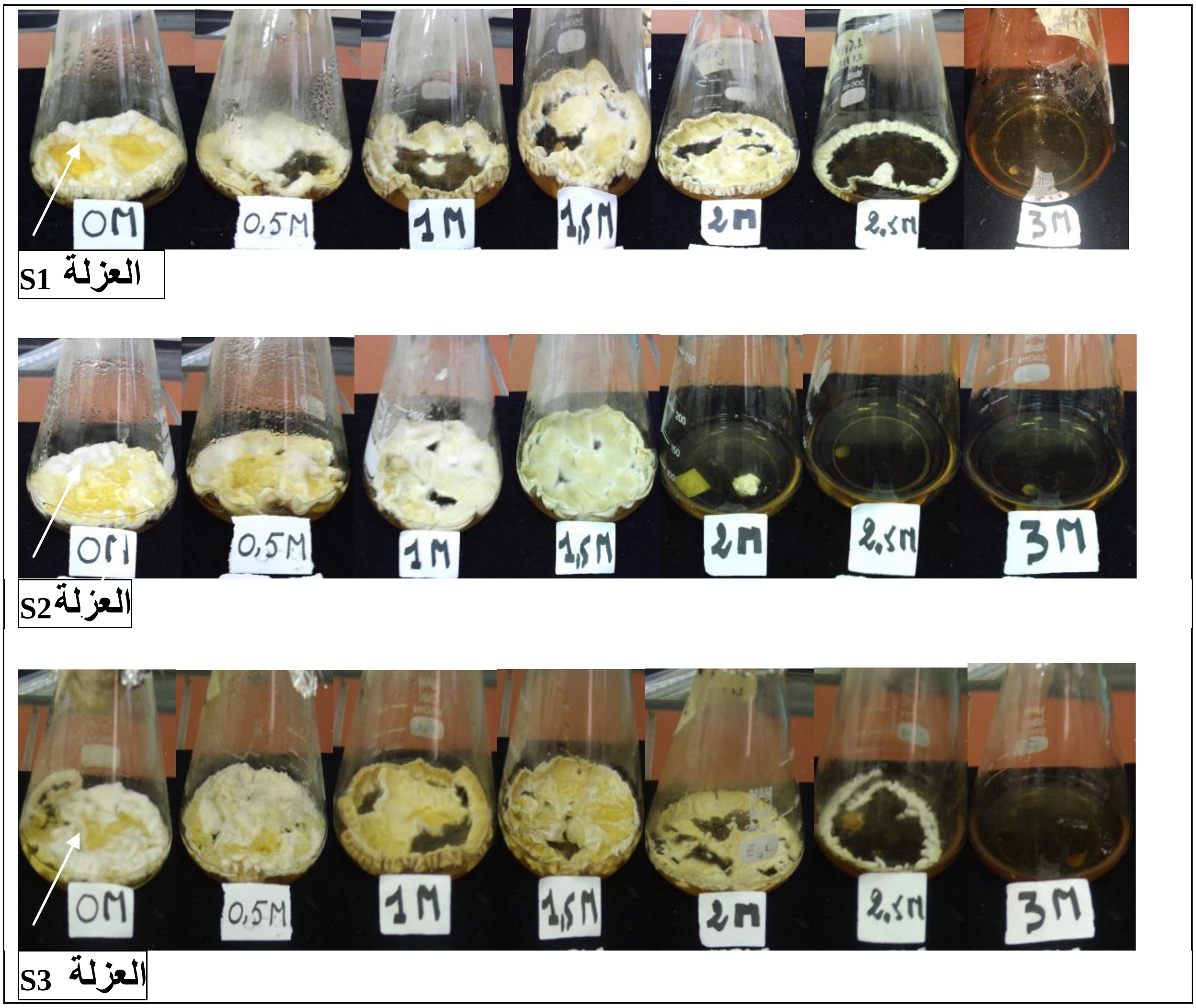
*** على وسط غني:**

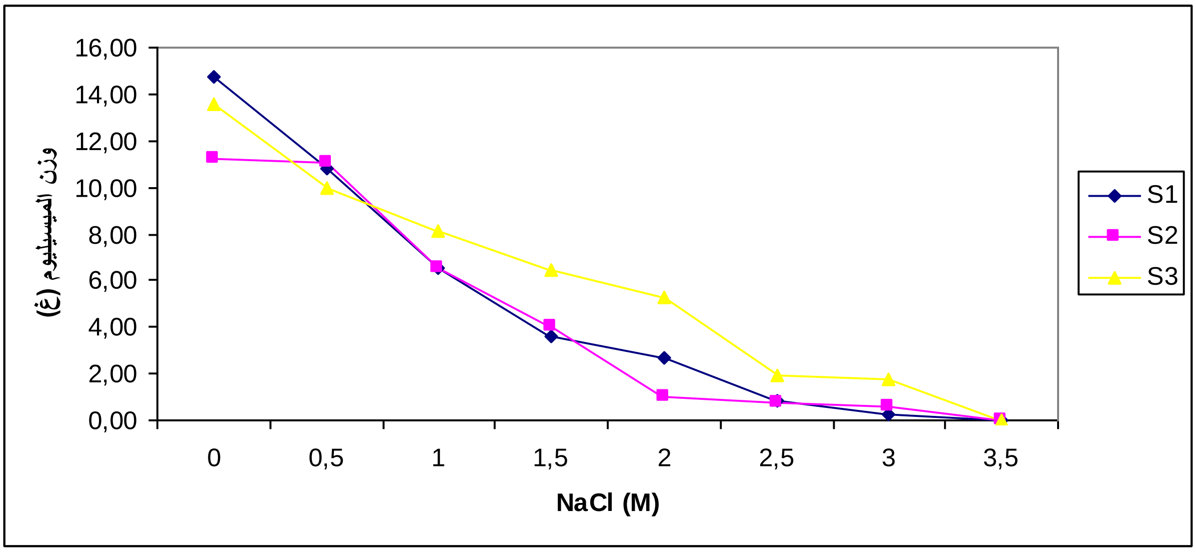
تنمو عزلات *A.oryzae* بشكل جيد في وسط YES الخالي من الملح ، ويتبين من خلال النتائج المتحصل عليها أن وسط الزرع YES محفز لنمو كل عزلات *A.oryzae*، بحيث قدر النمو الأعظمي عند العزلة S1 (14.76غ) ،بعدها كلما زاد تركيز الملح بالوسط تزايد تثبيط النمو ($p<0.0001$). إلا أنه يلاحظ أن العزلة S3 تبدي تحملا أكبر عند التراكيز (≤ 1M) ، حيث سجلت أكبر كتلة حيوية مقارنة مع العزلتين S1 و S2 إلى أن يتوقف النمو عند التركيز 3.5M (شكل 09).

***على وسط أدنى:**

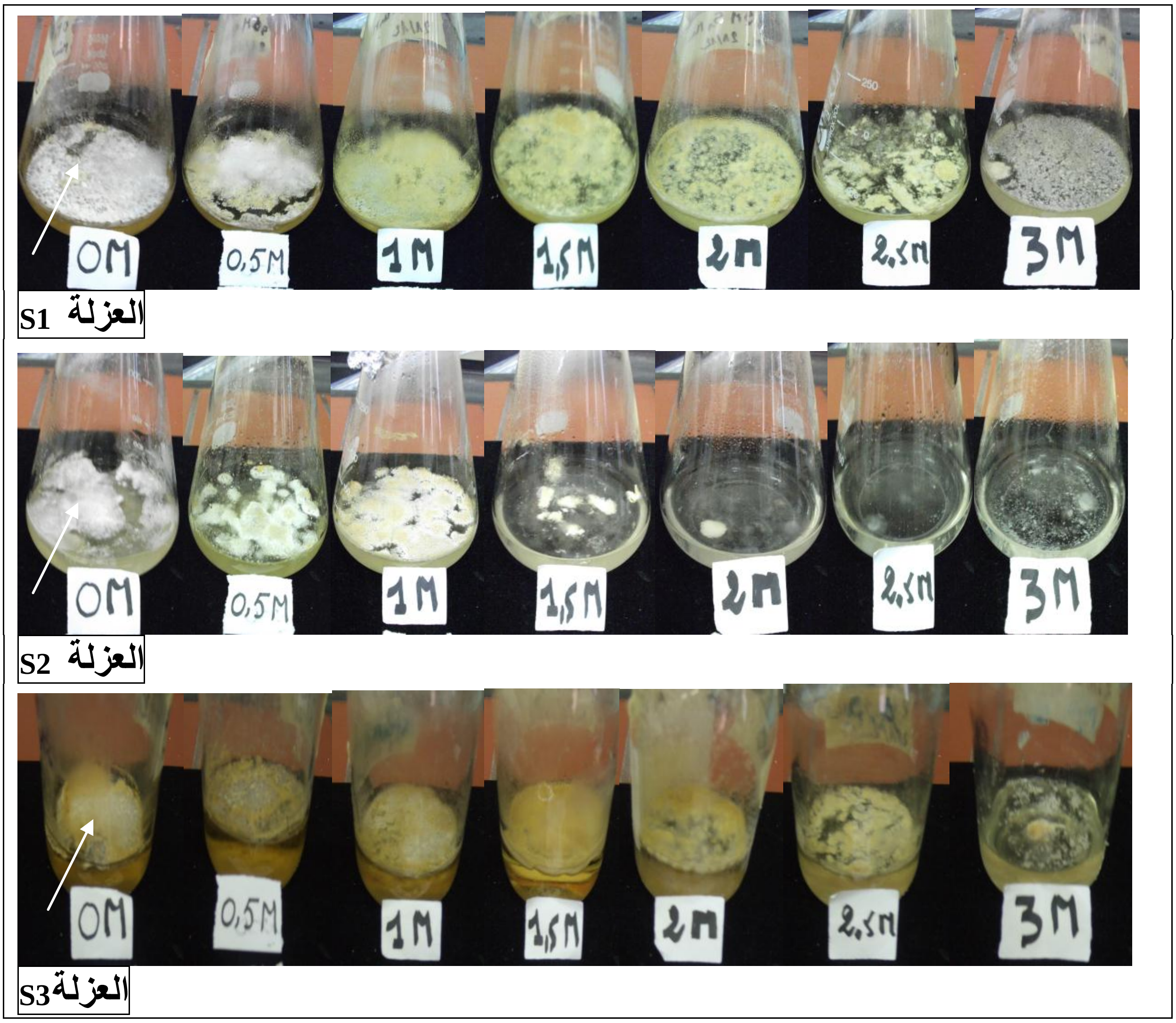
أظهرت النتائج أن أحسن نمو للفطر يكون في الوسط الخالي من NaCl بالنسبة للعزلات الثلاث، إلا أن أحسن نمو قدر عند العزلة S2 (8.20غ) مقارنة مع S1 و S3 اللتين بلغ نموهما 5.15غ و 5.35غ على الترتيب. بعدها كلما زاد تركيز الملح في الوسط كلما تناقص النمو إلى أن يتوقف عند التركيز 3.5M ($p<0.0001$). ويلاحظ أن العزلة S1 تبدي تحملا أكبر عند التراكيز العالية. حيث سجلت أكبر نمو عند التركيز 1.5M (4.01غ) ، بينما كان نمو كل من S2 و S3 (2.24غ) و (3.02غ) على الترتيب عند نفس القيمة (1.5M) (الشكل 10).

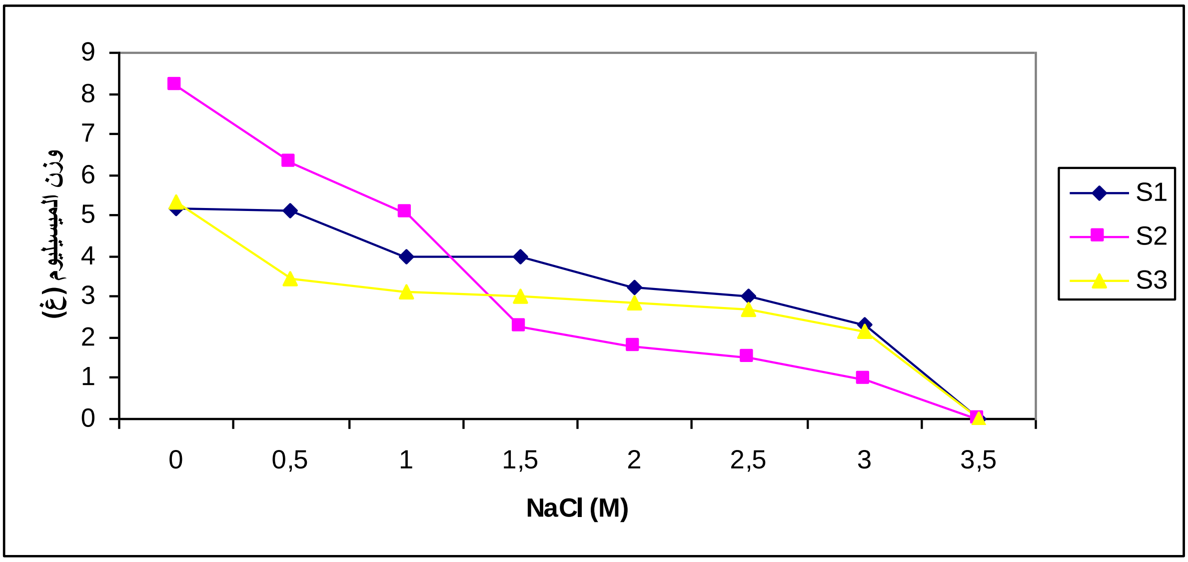
* انطلاقا من النتائج المتحصل عليها، و اعتمادا التحليل الإحصائي، تم انتقاء العزلة S1 لإجراء الدراسة. حيث وجد أنها الأكثر تحملا للملوحة على الوسط الصلب (الأدنى و الغني). إذ سجلت أعلى متوسط نمو قدر بـ 46.00 ملم مقارنة مع S2 و S3 اللتين سجلتا معدل نمو 41.10 ملم و 41.00 ملم على الترتيب، بينما لم يكن هناك فرق بين العزلتين S1 و S3 على الوسط السائل (الأدنى و الغني). حيث كان متوسط نموهما 4.7 غ و 4.9 غ على الترتيب، في حين قدر متوسط نمو العزلة S2 بـ 4.3غ.





شكل 09: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A.oryzae* منمى على وسط YES السائل





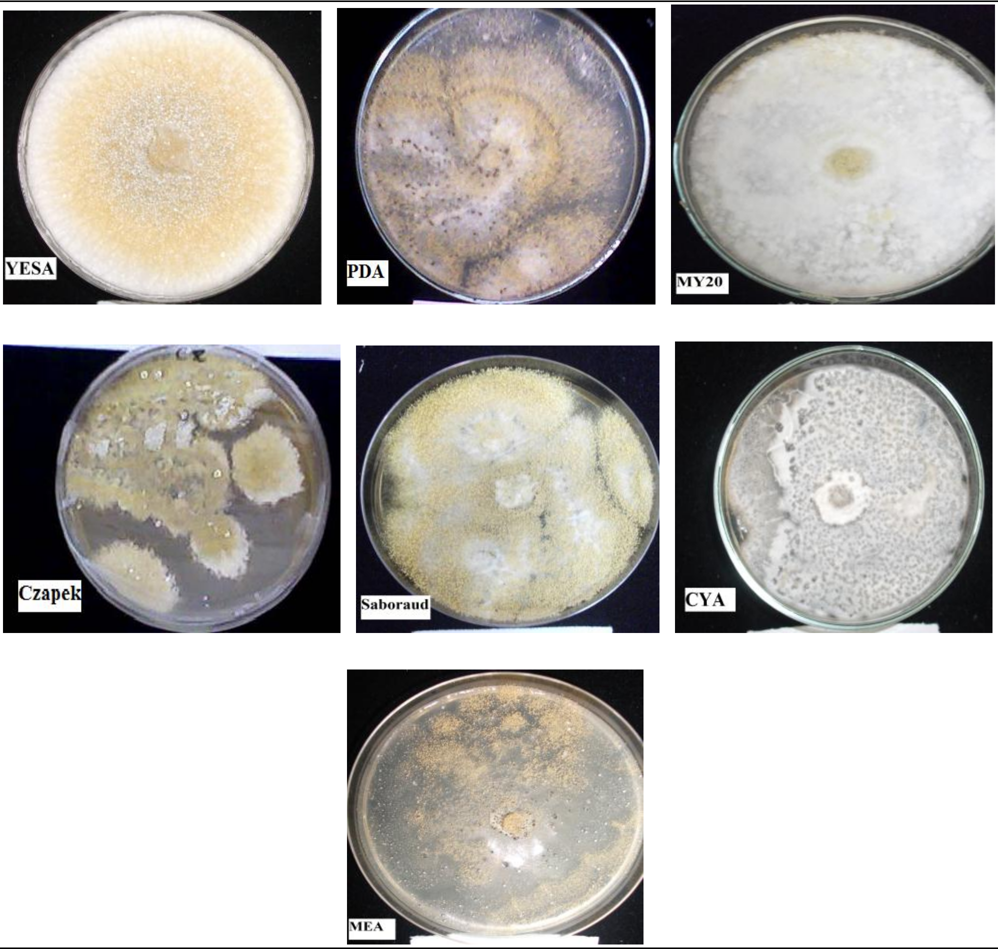
شكل 10: تأثير عدة تراكيز من الملح على نمو العزلات الثلاث لفطر *A.oryzae* منمى على الوسط الأدنى السائل MM

3- 3 - الدراسة الفسيولوجية لفطر (S1) *A. oryzae*:

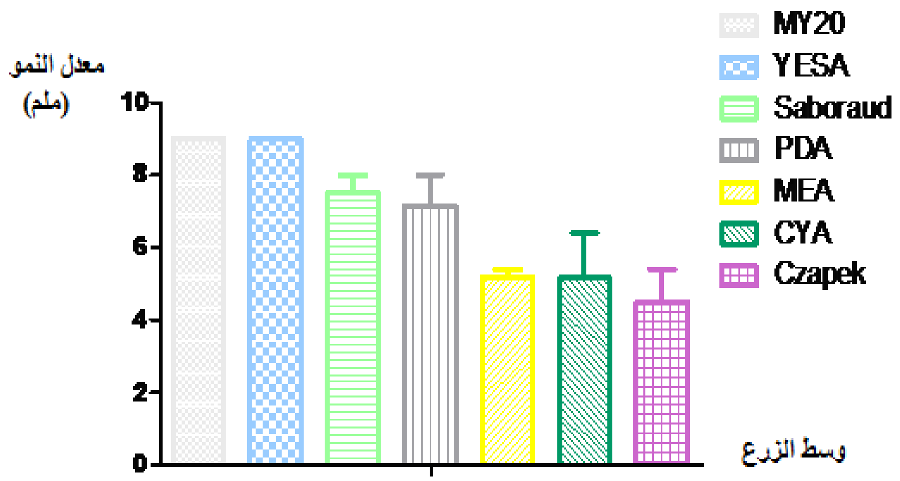
3-3-1- تأثير نوع الأوساط الزراعية على نمو الفطر:

يلاحظ من خلال النتائج أن نوع الوسط الزراعي يؤثر بشكل كبير على شكل المستعمرات، حيث تظهر المستعمرة النامية على وسط YESA، بلون مائل إلى البرتقالي، كثيفة و منتظمة النمو مع وجود عدد قليل من الأجسام الحجرية. بينما تبدو المستعمرة على وسط MY20، بيضاء و كثيفة. أما المستعمرات النامية على الأوساط PDA، MEA ، Saboraud و Czapek فتبدو بلون أصفر و متبعثرة، وغنية بالأجسام الحجرية كما تلاحظ قطرات بلون برتقالي بالنسبة للوسط Czapek . أما على وسط CYA فتظهر المستعمرة بيضاء ، كثيفة و غنية بالأجسام الحجرية (شكل 11).

وقد أظهرت نتائج الدراسة الخاصة باختبار الأوساط الزراعية على نمو فطر *A. oryzae* اختلافا واضحا ($p<0.0001$). وقد تبين بأن الوسطين MY20 و YESA هما الأكثر ملائمة للنمو، حيث سجل 90 ملم مقارنة مع الأوساط الأخرى المستعملة ، يليها وسط Sabouraud و وسط PDA، الذين كان نمو الفطر عليهما جيدا نوعا ما إذ قدر بـ 75 ملم و 71 ملم على الترتيب. أما على وسط Czapek فكان نمو الفطر ضعيفا إذ قدر بـ 45 ملم (شكل 12).



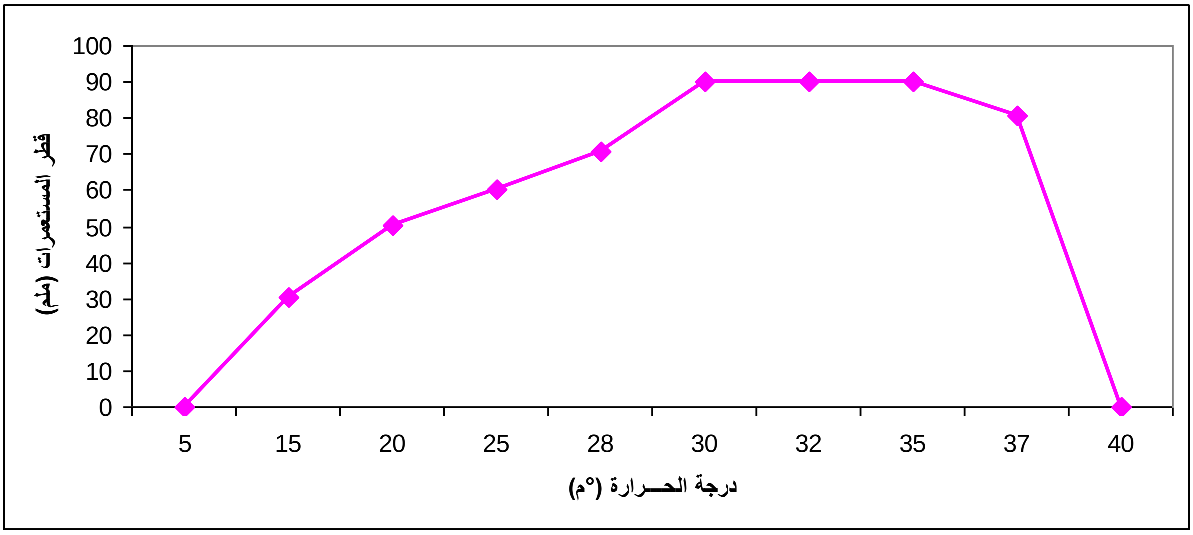
شكل 11: تأثير الأوساط الزراعية على شكل المستعمرات لفطر*A. oryzae*



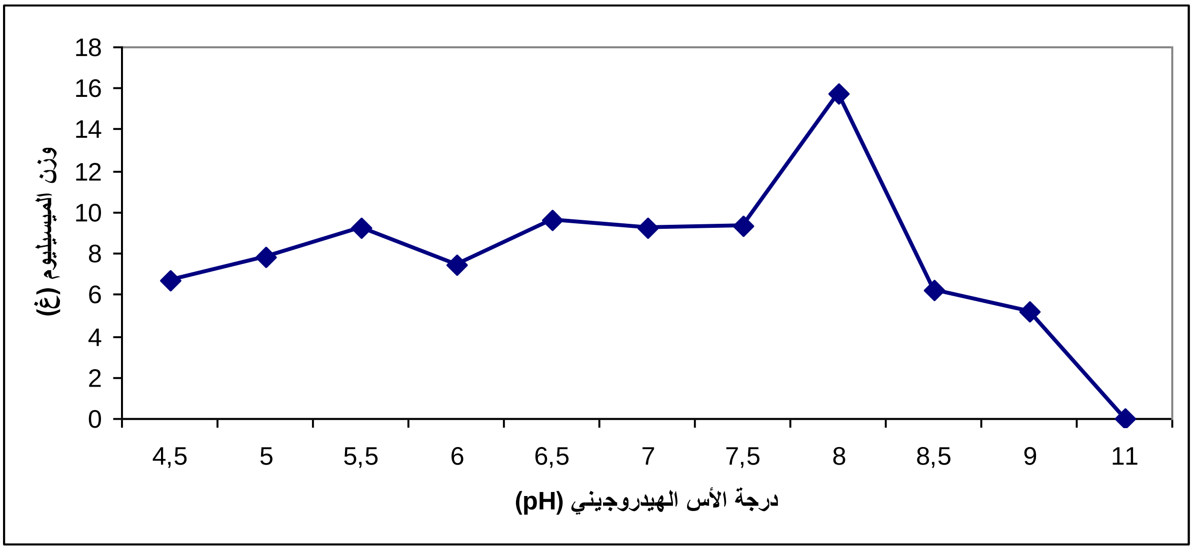
شكل 12: تأثير الأوساط الزراعية على نمو الفطر *A. oryzae*

3-3-2- تأثير درجة الحرارة: تعتبر الحرارة من العوامل البيئية المهمة التي تؤثر على النمو، حيث أظهرت نتائج تنمية الفطر على درجات مختلفة من الحرارة تباينا كبيرا ($p<0.0001$). إذ لم يلاحظ أي نمو للفطر عند درجة الحرارة 5°م، إلا أنه أظهر نموا خفيفا قدر بـ 32 ملم عند الدرجة 15°م، بعدها تكون العلاقة طردية بين عاملي الحرارة و النمو. فكلما ارتفعت درجة الحرارة زاد النمو (قطر المستعمرة) إلى أن يصل إلى أقصاه في المجال بين 30-35 °م ، حيث سجل 90 ملم، بعد ذلك يتناقص النمو كلما ارتفعت درجة الحرارة (علاقة عكسية) إلى أن ينعدم عند الدرجة 40° م (شكل 13).

3-3-3- تأثير الأس الهيدروجيني (pH): من خلال الدراسة الفيزيولوجية التي أجريت لمعرفة قيم الأس الهيدروجيني المثلى لنمو الفطر، و التي شملت اختبار قيم مختلفة لـ pH تتراوح بين 4.5 – 11 ، و قياس وزن الميسيليوم النامي. وقد تبين أن الوسط ذو pH = 8 هو الوسط الأنسب. حيث وصل النمو إلى أقصاه (12.26 غ) ، إلا أنه بعد ذلك ينخفض معدل النمو كلما أصبح الوسط أكثر قاعدية إلى أن ينعدم عند القيمة 11 (شكل14).



شكل 13: تأثير درجة الحرارة على نمو الفطر *A. oryzae*



شكل 14: تأثير درجة الأس الهيدروجيني على نمو الفطر *A. oryzae*

3-3-4- تأثير المصادر الكربونية و الآزوتية:

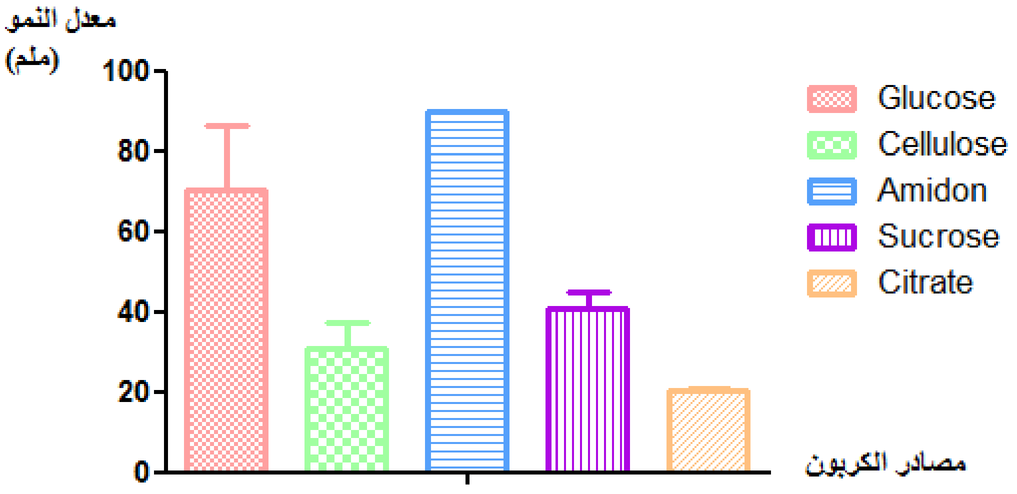
3-3- 4-1- تأثير المصادر الكربونية:

بينت النتائج أن للفطر قابلية عالية للنمو على مصادر كربونية مختلفة، غير أنه يظهر تفاوتا في النمو من حيث قطر المستعمرة و كثافة الميسيليوم الظاهر.

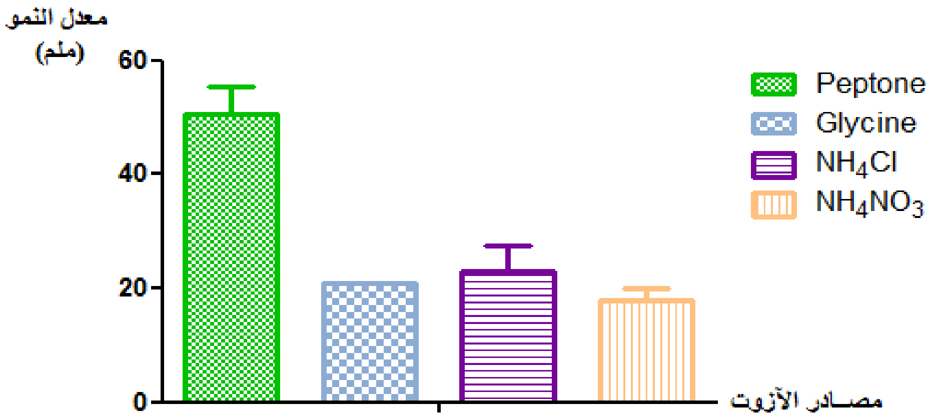
- يسمح النشاء بنمو مثالي للفطر أين أبدى أقصى نمو له (90 ملم)، يليه كل من الغلوكوز و السكروز حيث قدر نمو الفطر بـ 73 ملم و 46 ملم على الترتيب. بينما لوحظ أن السيليلوز أو الأحماض العضوية لا تشكل مصادر مناسبة للنمو. فقد أظهر الفطر أدنى نمو له في وجود هذه المصادر (36 ملم و 24 ملم) على الترتيب (شكل 15).

3-3- 4-2- تأثير المصادر الأزوتية :

أظهرت نتائج تنمية الفطر على عدة مصادر آزوتية وجود فرق معنوي جدا ($p<0.0001$) ، وقد تبين أن البيبتون هو المصدر الآزوتي العضوي الأكثر ملائمة (55 ملم) مقارنة مع Glycine (21 ملم). بينما كان نمو الفطر ضعيفا على العموم في وجود المصادر اللاعضوية المختبرة. حيث سجل 20 ملم بالنسبة لـ NH_4Cl و 18 ملم بالنسبة لـ NH_4NO_3 (شكل16).



شكل 15: تأثير مصادر الكربون على نمو الفطر *A. oryzae*



شكل 16: تأثير مصادر الآزوت على نمو الفطر *A. oryzae*

4- استخلاص الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي:

4-1- بيئات التخمر:

4-1-1- التخمر على الأوساط الاصطناعية:

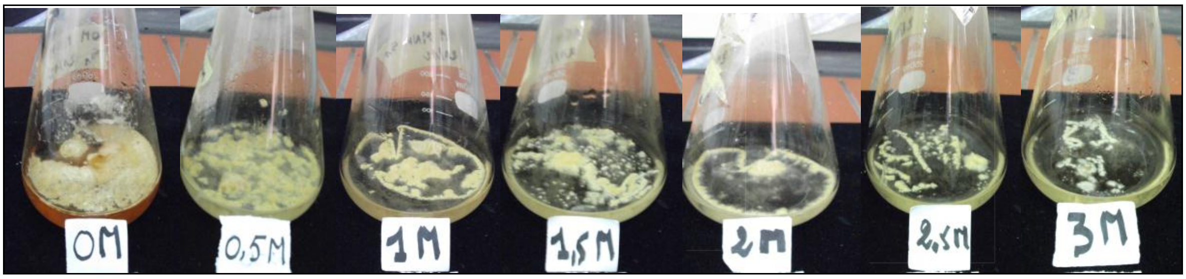
4-1-1-1- وسط MNM:

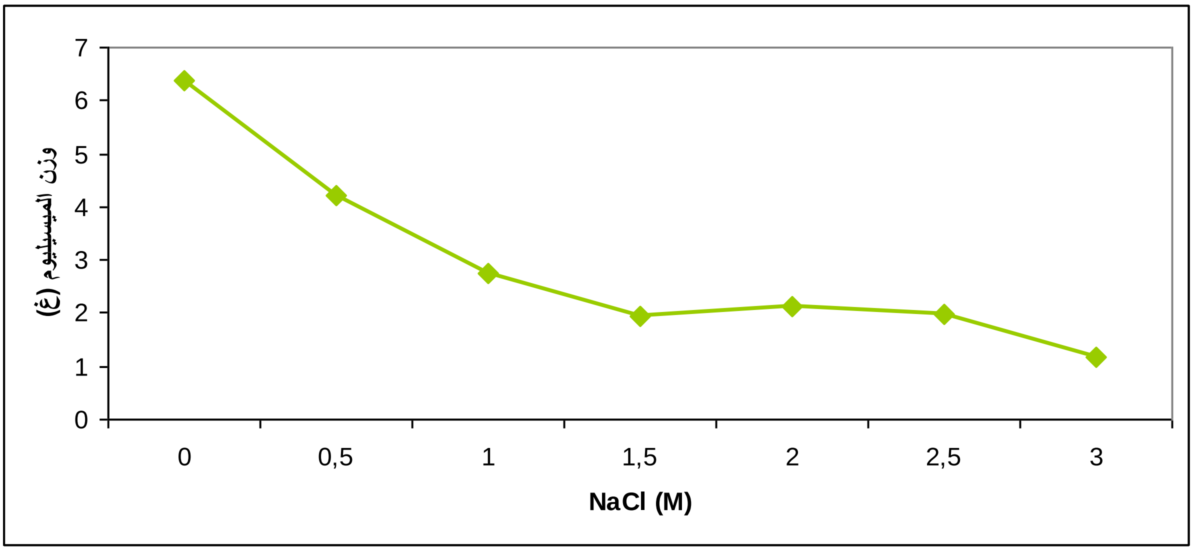
إن الغرض من هذه الدراسة هو التأكد من قابلية الفطر المدروس على النمو على وسط MNM و تحديد أعلى تركيز ملحي يمكن تحمله .

أظهرت نتائج تنمية العزلة (S1) *A.oryzae* على وسط MNM في تراكيز مختلفة من NaCl (0M، 0.5M، 1M، 1.5M ، 2M، 2.5M، 3M، 3.5 M) قدرة الفطر على النمو في تراكيز ملحية عالية تصل إلى 3M. إلا أن أحسن نمو أبداه الفطر كان في الوسط الخالي من الملح ، حيث قدر بـ 5.4 غ ، بعدها ينخفض النمو كلما ارتفع تركيز الملح في الوسط. و قد لوحظ استقرار النمو نوعا ما في المجال المحصور بين 1.5M – 2.5M ، ثم يستمر التناقص ليصل أدنى قيمة له (0.63 غ) عند التركيز 3 M ، بينما لم يلاحظ أي نمو عند التركيز 3.5M (شكل 17).

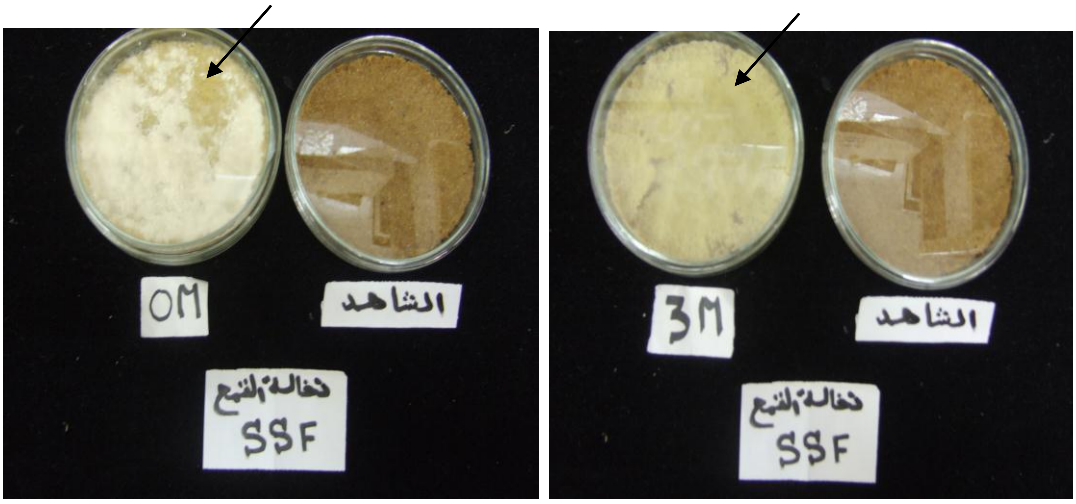
4-2-2- التخمر على وسط طبيعي (نخالة القمح) SSF:

يمكن للعزلة (S1) *A. oryzae* النمو بشكل جيد على وسط عجينة نخالة القمح ذات تركيز 3M من NaCl مقارنة بالشاهد. حيث أنه بعد 48 ساعة من الحضن يلاحظ امتلاء الأطباق. و تظهر المستعمرات بلون أصفر داكن مائل إلى الأخضر الزيتوني ذات شكل مسحوقي و غنية بالأبواغ ، مع غياب تام للأجسام الحجرية. أما في غياب الملح فتظهر المستعمرة بيضاء كثيفة و قطنية (الشكل 18).





شكل 17: تأثير التراكيز المختلفة من الملح على نمو العزلة (S1) *A. oryzae* على وسط MNM السائل



شكل 18: نمو العزلة (S1) *A.oryzae* على عجينة نخالة القمح (SSF).

5- **الكشف عن الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي:**

فحص المستخلص الخلوي المتحصل عليه من عدة أوساط (MNM، MM، نخالة القمح)، بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، و شوهدت الصفائح في الضوء المرئي و تحت الأشعة فوق البنفسجية UV عند طولي الموجة 254 و 366 نانومتر ، قبل و بعد المعاملة الكيميائية بكواشف خاصة . وقد تبين من خلال النتائج المتحصل عليها قدرة العزلة (S1) *A. oryzae* على إنتاج و تكديس عدة مركبات من ضمنها الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي والتي تم تشخيص بعضها اعتمادا على المعطيات النظرية المتعلقة بمعامل الانسياب و لون البقع بعد المعاملة الكيميائية. و كذلك على الجزيئات القياسية (Standards) .

1- **الكشف عن Glycine betaine و Betaines:**

من بين أنظمة الهجرة المستعملة يلاحظ أن النظام (Methanol : Aceton : HCl) هو الذي يسمح بالكشف والفصل الجيد لـ Betaines في وسطي نخالة القمح و MNM، و التي ظهرت باللون الزهري بالمقارنة مع المعيار القياسي المستعمل (شكل 19). بينما لم تلاحظ أي بقعة بالنسبة للوسط الأدنى.

2- **الكشف عن الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols) و السكريات:**

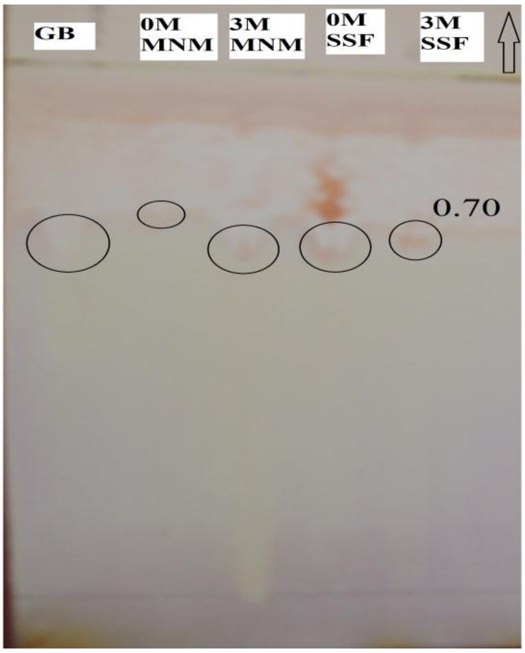
عند فحص المستخلص الخلوي المتحصل عليه عن طريق تنمية الفطر على وسط MNM يلاحظ أن النظام (Butanol : H2O) هو الأفضل للفصل من بين أنظمة الهجرة المجربة ، حيث سمح بالكشف عن أربعة أنواع من الكحولات متعددة الهيدروكسيل هي: Glycerol، Sorbitol، Xylitol و Mannitol . إلا أنه لوحظ ظهور كل من Myo-inositol و سكر Trehalose، عند استعمال النظام (butanol : pyridine: H_2O). بينما لم يلاحظ أي فرق بين الأنظمة المستعملة لفحص المستخلص الخلوي المتحصل عليه من تنمية الفطر على الوسط الأدنى (MM)، إذ سمح كل نظام بالكشف عن مركب واحد، ومن بين هذه المركبات تم تعريف Myo- inositol و Glycerol (شكل20).

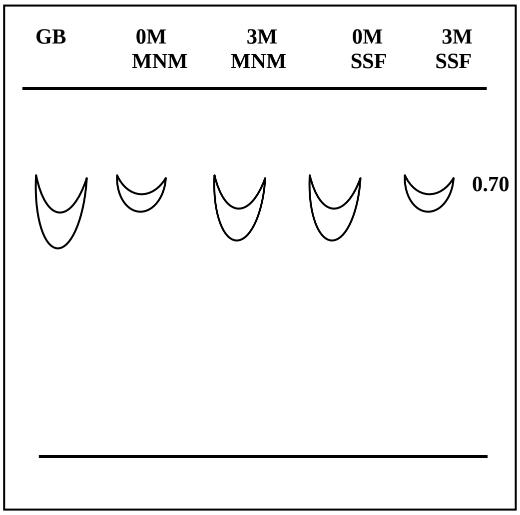
* **وسط عجينة نخالة القمح:**

يتبين من خلال ملاحظة الألواح أن نظام الهجرة (H_2O : Butanol) هو الأحسن لفصل المركبات المفرزة من طرف الفطر النامي على الوسط الطبيعي، حيث كشف عن حوالي 7 مركبات هي : Glycerol، Rhibitol، Erythritol، Fructose، Mannitol، Arabitol، Xylitol . يليه النظام (H_2O : Acetic acid : methanol: Methylene chloride) الذي سمح بالكشف عن أربع مركبات من بينها Glycerol و Fructose بالإضافة إلى Galactose و Trehalose. وقد سمح نظام (H_2O : butanol : pyridine) بالكشف عن Myo-inositol و Fructose، بينما سمح نظام (H_2O : 1-propanol : methanol) بالكشف عن Dulcitol (Rf = 0,74)، Glycerol و Mannitol (شكل20).

6- الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفرزة من طرف عزلة (S1) *A. oryzae*:

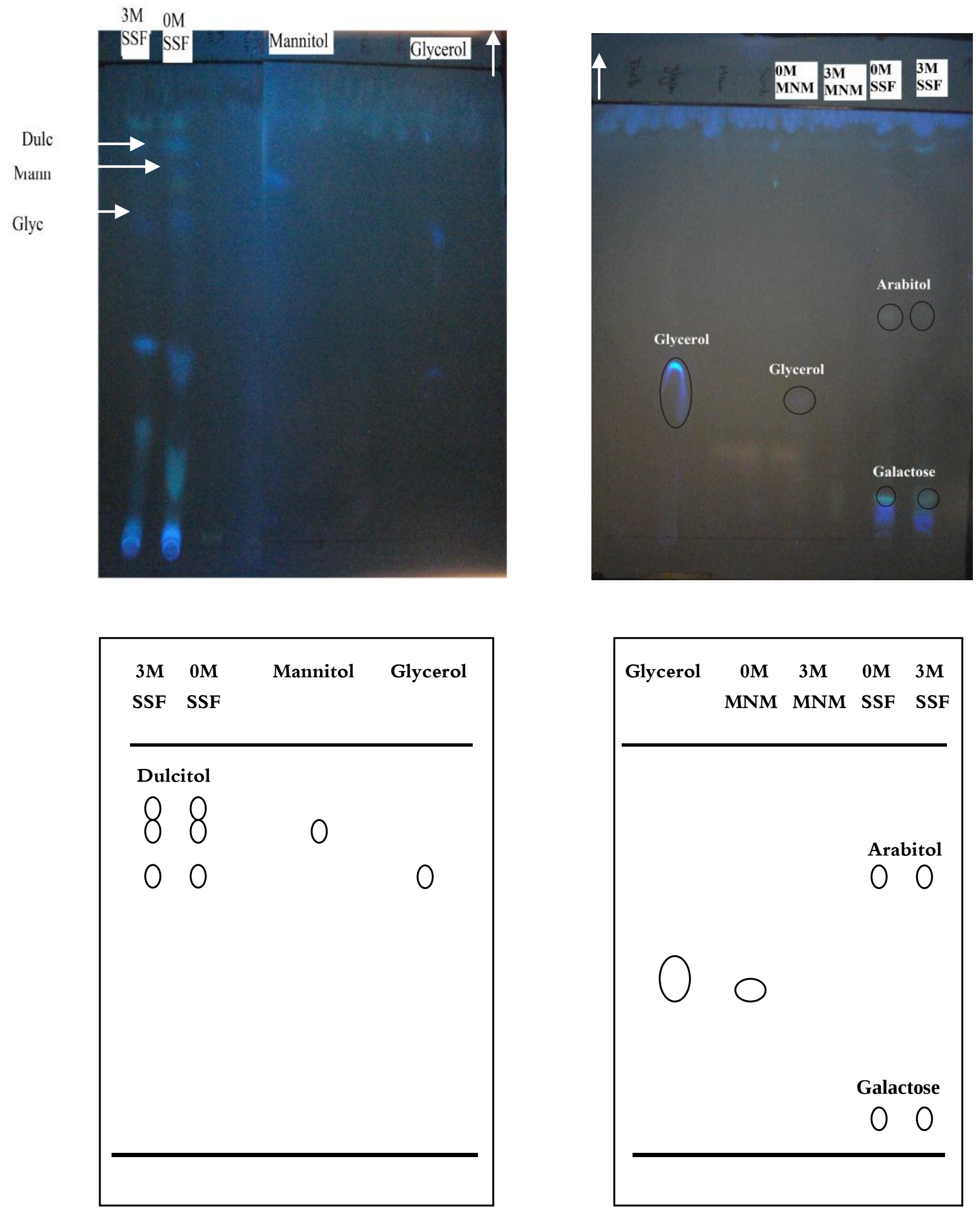
يلاحظ من خلال النتائج المتحصل عليها ، أن للفطر القدرة على إفراز الجزيئات بكمية عالية في غياب الضغط الأسموزي ، خاصة في الوسط الطبيعي (85.71%) يليه وسط MNM (64.28%)، ثم الوسط الأدنى بنسبة 14.28% . بينما في وجود ضغط أسموزي (3M)، فيستمر الفطر في إفراز سوى بعض الجزيئات الأساسية . أما بالنسبة للوسط الأدنى فيلاحظ أن الجزيئات المفرزة عند التركيز 0M هي نفس الجزيئات المفرزة عند التركيز 3M والمتمثلة في Myo-inositol و Glycerol (جدول08).





Methanol : Acetone : HCl
(9:1:1 ح:ح:ح)

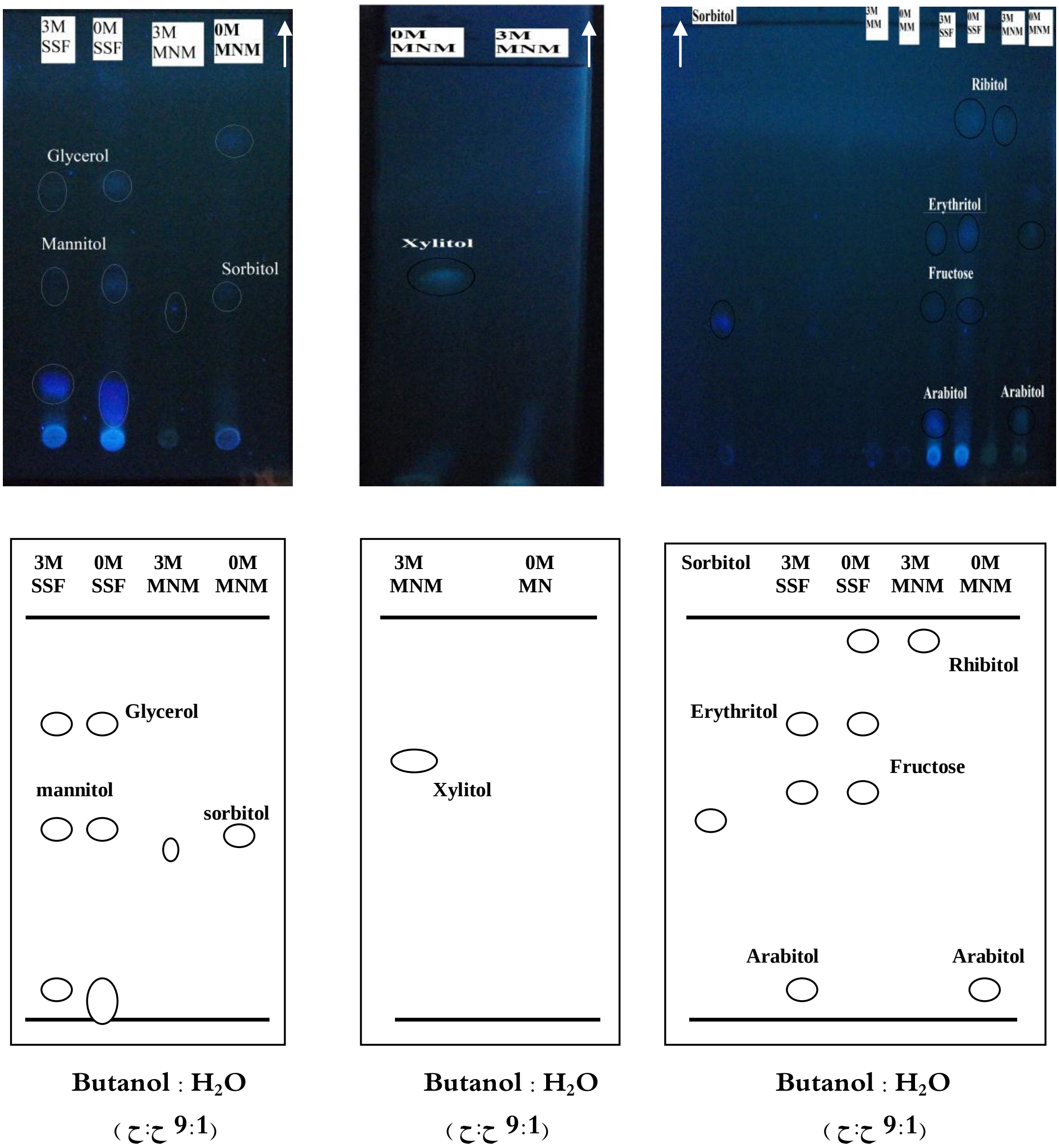
شكل19: فصل Betaines باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)



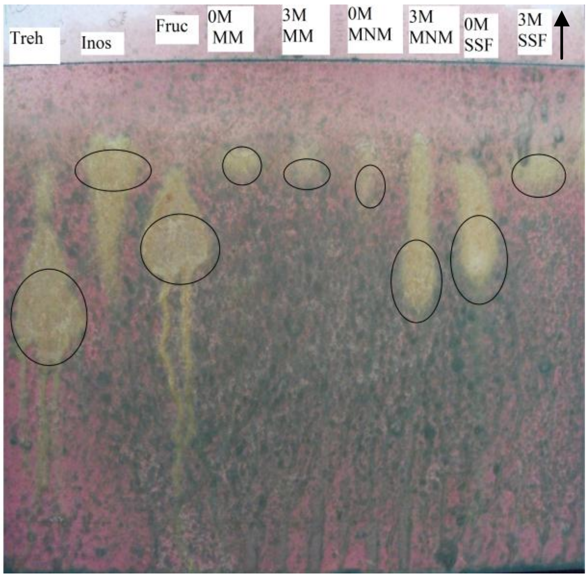
Propanol : **ethylacetate** : H_2O (3:2:1 ح:ح:ح)

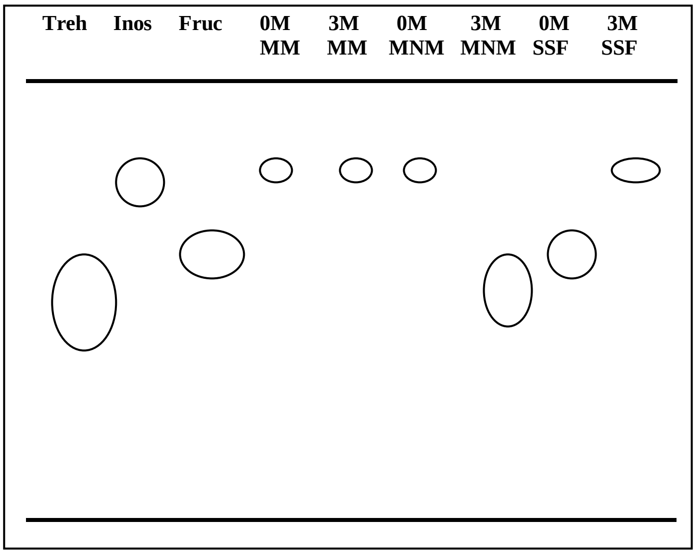
Methylenechloride : **acetate** : **methanol** : H_2O (50:5:20:5 ح:ح:ح:ح)

شكل 20 (أ): فصل الكحولات متعددة الهيدروكسيل و السكريات الأساسية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة



شكل20 (ب): فصل الكحولات متعددة الهيدروكسيل و السكريات الأساسية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة





Butanol : pyridine : H_2O
(15:30:20 ح:ح:ح)

شكل20 (ج): فصل الكحولات متعددة الهيدروكسيل و السكريات الأساسية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

جدول 08: الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي المفرزة من طرف عزلة (S1) *A. oryzae*

الوسط	**وسط MNM**		**وسط أدنى MM**		**وسط طبيعي (عجينة نخالة القمح)**	
تركيز NaCl	**0M**	**3M**	**0M**	**3M**	**0M**	**3M**
الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي	Trehalose	Trehalose	Myo-Inositol	Myo-Inositol	Glycinebetaine	Glycinebetaine
	Glycinebetaine	Glycinebetaine				
	Sorbitol		Glycerol	Glycerol	Dulcitol	Dulcitol
	Mannitol	Mannitol			Mannitol	Mannitol
	Glycerol	Glycerol			Xylitol	
	Myo-Inositol				Glycerol	Glycerol
	Xylitol				Arabitol	Arabitol
	Arabitol				Sorbitol	Sorbitol
	Erythritol					Myo-Inositol
		Rhibitol			Erythritol	Erythritol
					Fructose	
					Trehalose	Trehalose
					Galactose	

المناقشة

المنـــاقشة:

يعتبر الملح البلوري كلوريد الصوديوم (NaCl) عموما مادة مضرة لمعظم أشكال الحياة، و قد استعمل لعدة قرون كمادة حافظة للطعام. و مع ذلك وجد أنه يمكن للكائنات الحية الدقيقة المحبة و المتحملة للملوحة أن تلوث المواد الغذائية التي يتم حفظها بالملح، بالإضافة إلى قدرتها على العيش في البيئات الطبيعية المالحة مثل البحيرات المالحة ، البحار و السبخات. كما يمكنها التكيف للتراكيز القصوى من NaCl، و غالبا للتراكيز العالية للأيونات الأخرى، و أيضا للنشاطية المائية المنخفضة للغاية. و قد تركزت معظم الدراسات على الكائنات الحية الدقيقة المحبة و المتحملة للملوحة كالبكتيريا و Archaea، و الطحلب *Dunaliella salina*، مع الاعتقاد بأن حقيقيات النواة الأخرى مثل الفطريات لا تستطيع التكيف مع هذه الظروف القاسية.

بالرغم من الاستعمالات التجارية الحديثة لهذه الكائنات الحية الدقيقة. فإن العديد من مميزاتها تجعلها ذات أهمية كبرى بيوتكنولوجيا. بالإضافة إلى اعتبارها كمؤشرات جيدة للتلوث و تطبيقاتها في التحويل الحيوي.

1- الفطريات المعزولة من السبخة:

حسب تعريف Le Houérou (1993). تعبر التربة مالحة إذا كان التركيز الأدنى للملح فيها 100 mM (5.84 غ/ل). وعليه لا يمكن اعتبار التربة المأخوذة خلال شهر مارس تربة مالحة، لأن نسبة الأملاح فيها 4.34 غ/ل فقط، أما التربة المأخوذة خلال شهر جويلية من منتصف السبخة فهي تعتبر مالحة إذ تصل درجة ملوحتها إلى 10.9 غ/ل من NaCl .

تبين من خلال عزل و تشخيص الفطريات من عينات تربة سبخة البيضاء من منطقة حمام السخنة، أن الأجناس الأساسية المتواجدة هي: *Aspergillus* و *Penicillium*. حيث كانت لها النسبة الأكبر 43% و 20% على الترتيب، إلى جانب جنس *Alternaria*، *Fusarium*، *Cladosporium* و *Phoma* بالإضافة إلى مجموعة مختلفة من الفطريات الأخرى. تتوافق هذه النتائج مع العديد من الأبحاث التي أجريت على الفطريات المعزولة من

التربة، و لكنها تختلف عنها من حيث تردد الأجناس و زمن تواجدها (Souza-Motta و آخرون، 2003 ؛ قشقري و الحازمي، 2006 ؛ Cantrell و آخرون، 2006 ؛ الخيمي،2007). قد ترجع سيادة الجنس *Aspergillus* في التربة إلى امتلاكه مجموعة متنوعة من أنزيمات الإماهة، التي تساعده على معيشته الرمية على البقايا الموجودة في التربة (Souhail و آخرون، 2007). كما أشار Naseeb و آخرون (2009) إلى أن فطر *Aspergillus* واسع الإنتشار في الطبيعة و خاصة في التربة.

تظهر العينات المأخوذة في شهر مارس أكثر احتواء على الفطريات من حيث العدد الإجمالي، إلا أنه يوجد اختلاف في النوعية. و من الملاحظ أن بيئة PDA الخالية من الملح، كانت مناسبة للنمو مقارنة مع بيئة PDA المضاف إليها NaCl، على عكس ما تحصل عليه الخيمي (2007). حيث وجد أن وسط PDA المضاف إليه 5% NaCl هو الأنسب لنمو جميع الفطريات. و قد يفسر ذلك إلى كون الفطريات المعزولة من الأوساط عالية الملوحة، هي متحملة للملوحة، حيث لا تتطلب الملح لنموها و إنما تتحمل وجود تراكيز عالية منه في الوسط (Gunde-Cimerman و آخرون، 2011). و كما هو متوقع أظهرت العينات المأخوذة في شهر مارس تواجد عدد كبير من الأجناس الفطرية مقارنة مع العينات المأخوذة خلال شهر جويلية 75.47% و 24.53% على الترتيب. تتوافق هذه النتائج مع النتائج المحصل عليها من طرف الخيمي (2007)، الذي و جد أن النمو كان محدودا في شهر سبتمبر و مرتفعا خلال شهر مارس. و يعتقد أن ذلك يرتبط بارتفاع و انخفاض مستوى الملوحة، نتيجة لهطول الأمطار و تغير العوامل المناخية في السبخة. حيث يؤدي سقوط الأمطار إلى إذابة الأملاح التي تنتقل إلى السبخة ، و مع ارتفاع درجة الحرارة يرتفع معدل تبخر المياه من السبخة تاركا العناصر بتراكيز عالية على السطح. مما يؤدي إلى رفع مستويات الملوحة في المنطقة السطحية و تكون ظروف قاسية لنمو الكائنات الحية، و هذا ما أكدته نتائج التحليل الكيميائي للعينات. و نفس النتائج تحصل عليها كل من Bagy و Abdel-Hafez (1984)، حيث أشارا إلى أن زيادة NaCl في التربة يؤدي إلى تناقص العدد الكلي للفطريات.

وعلى العكس مما هو متوقع، بالنسبة للعينات المأخوذة خلال شهر جويلية من منتصف السبخة و محيطها، كانت العينات المأخوذة من منتصف السبخة العالية الملوحة (57mS) أكثر احتواء على الفطريات، مقارنة مع عينات التربة الخصبة ذات الملوحة المنخفضة (4mS). و يرجح ذلك إلى أن الأنواع النامية، و التي اقتصرت خاصة على النوع *A.flavus* و *A.niger* بالإضافة إلى الأجناس *Penicillium*، *Alternaria* و *Cladosporium* متحملة للملوحة القصوى (Kumar و آخرون، 2007) و كما سجل نفس الاستنتاج من طرف الخيمي (2007) عند إضافة تراكيز عالية من الملح (20%)، حيث لاحظ نمو بسيط لبعض الأنواع من *Cladosporium*، *Penicillium*، *Aspergillus* و *Pythium*. تتفق هذه النتائج مع تلك المتحصل عليها من طرف Radwan و آخرون (1984)، الذين سجلوا نمو *Cladosporium* في التراكيز الملحية العالية. كما تحصل Kostadinocva و آخرون (2009) على نفس النتائج، حيث وجدوا أن الأجناس *Cladosporium*، *Aspergillus* ، *Penicillium*و*Alternaria* ، هي الأكثر ترددا في عينات التربة ذات النشاطية المائية المنخفضة جدا. كما قد يرجع أيضا هذا الاختلاف إلى كون الموقع المحيط بالسبخة زراعي، حيث كان من المتوقع أن يحتوي على نسبة أعلى من الفطريات، لاحتوائه على المادة العضوية. إلا أنه قد يرجع هذا إلى المعاملات الكيميائية للتربة، التي أثرت سلبيا على التواجد الميكروبي ، بالإضافة إلى استعمال بعض الطرق الفيزيوكيميائية للمكافحة مثل استعمال Chloropicrin (Trichloronitromethan) الذي يؤثر على التنفس و التغذية و الكتلة الحيوية للكائنات الحية (Tagwa و آخرون، 2010) و قد أشار Stromberger و آخرون (2005) بأن النشاط الأنزيمي للفطريات و خاصة أنزيمات Arysulfatase و Acide phosphatase أكثر حساسية للمعالجة الكيميائية .

2- تأثير الملوحة على نمو الفطر على نمو الفطر ***A.oryzae*** وانتقاء العزلة الأكثر تحملا:

مقارنة مع البكتيريا و Archaea المتحملة للملوحة، تستطيع الفطريات أن تتحمل درجات أعلى من لملوحة تصل إلى 4M كما في حالة خميرة *D.hansenii* و الفطر *A.pullulans*، الذي يتحمل التركيز 2.9M بالإضافة إلى الفطر *P.fellutanum*، الذي يستمر في النمو إلى غاية 3M (Luisa و آخرون، 1997 ؛ Park و Gander، 1998؛ Kogej وآخرون، 2005). و في هذه الدراسة تم إثبات أن الفطر *A.oryzae* يستطيع النمو بشكل بسيط في تركيز ملحي 3M. على عكس البكتيريا المتحملة للملوحة، فإن أعلى تركيز قد تتحمله يصل إلى 0.3M.كما في حالة عائلة Rhizobiaceae و 0.4M بالنسبة لـ *Methanohalophilus portucalensis* (Boncompagni و آخرون،1999 ؛ Lai و آخرون 1999). قد يرجع هذا الاختلاف بين الأحياء الدقيقة إلى قدرة الكائنات حقيقية النواة على استعمال العديد من مصادر الطاقة المتوفرة لمساندة استقلابها (Cantrell و آخرون 2006). و يمكن تفسير انخفاض النمو كلما ارتفع تركيز الملح في الوسط بالتأثير السمي للأيونات، أو أسمولارية المحلول (Han و آخرون، 2003) .بالإضافة إلى ذلك أشار Abu-Seidah (2007) إلى مدى تأثير الملوحة على الأحماض الأمينية و العضوية و التركيبة الفوقية (Ultrastructur) لفطري *A.flavus* و *P.roqufortii*. نفس الاستنتاج سجل من طرف Juliper و Abbott (1991) عن Tang و آخرون (2009) عند دراستهما لتطور الغزل الفطري تحت تأثير الملح، حيث وجدا بأن الملوحة العالية يمكنها أن تخفض من النمو الفطري، و ذلك بتثبيط تشعبه و الزيادة في قطر الهيفا.

حسب التعريف المقدم للفطريات المحبة و المتحملة للملوحة، تصنف عزلات فطر *A.oryzae* الثلاث (S1)، (S2)، (S3) ضمن الفطريات المتحملة للملوحة، حيث أظهرت نموا في الأوساط (YES و MM) السائلة و الصلبة في غياب و وجود تراكيز مختلفة من NaCl. إلا أنها تبدي أعظم نمو عند التراكيز الدنيا من الملح، و عليه يمكن تأكيد هذه الخاصية. تتوافق هذه النتائج مع ما تحصلت عليه Kogej و آخرون(2005)، عند دراسة عدة

تراكيز من الملح في أوساط سائلة و صلبة على خميرة *Aureobasidium pullulans*. و حسب ما أشارت إليه Gunde-cimerman و آخرون (2009)، فإن فطر *A. oryzae* هو متحمل للجفاف أيضا (Xerotolerant)، حيث يوافق التركيز 3M النشاطية المائية $0.85a_w$. و هذا ما أشار إليه كذلك Pit و Hocking (1985) بأن الفطريات التي لها القدرة على النمو في نشاطية مائية$_{aw}$ 0.85 أو أقل تكون متحملة للجفاف. و قد سجل نفس الاستنتاج بواسطة Beever و Laracy (1986)، حيث وجدا أن فطر *A.nidulans* متحمل للجفاف لقدرته على النمو بشكل ضعيف في تركيز 3.4M من NaCl. كما أشار Parkو Gander (1998) أن فطر *P.fellutanum*، الذي يتحمل تركيز 3M من NaCl هو متحمل للضغط الأسموزي و للجفاف (Osmotolerant و Xerotolerant). على عكس النوعين *A.repens* و *A.niger*، الذين كان أقصى تحمل لهما عند التركيز 2M و 0.85M على الترتيب (Dizbay و Mert، 1977 ؛ Kelavkar و Chhatpar، 1993).

وكما هو متوقع بالنسبة للأوساط المستعملة، أظهرت العزلات المدروسة أفضل نمو لها في الوسط الغني YES، سواء الصلب أو السائل مقارنة مع الوسط الأدنى. و قد يرجع ذلك إلى تركيب الوسط، حيث تقوم الخلايا الفطرية بتكديس داخلي للجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي التي تدخل في تركيب الوسط (Csonka، 1989 ؛ Park و آخرون، 1995). و من ناحية أخرى قد تعود قدرة الفطر على تحليل و إماهة المواد الكربونية تحت تحفيز الضغط الملحي (Obuekwe و آخرون، 2005).

أظهرت نتائج دراسة تأثير عدة تراكيز من NaCl على النمو في الوسط السائل و الوسط الصلب، وجود اختلاف بين الوسطين و بين العزلات. حيث أبدت العزلة S1 تحملا أكبر للملح في الوسط الصلب، مقارنة مع الوسط السائل في حين كان العكس بالنسبة للعزلة S3، التي احتلت المرتبة الأولى مع عدم وجود فرق بين العزلتين. و تتوافق هذه النتائج مع تلك المتحصل عليها من طرف Tang و آخرون (2009)، الذين قاموا بدراسة تأثير الملح على ثلاثة أنواع من الفطريات الجذرية و ذلك على وسط صلب و سائل. حيث وجدوا بأن معدل نمو الفطرين

Boletus luridus و*Suillus bovinus* كان أكبر من فطر *Suillus luteus*، الذي أظهر كتلة حيوية أكبر من *S.bovinus*، وبينوا بأن هذا الاختلاف ما هو إلا إستراتيجية تتبعها الأنواع الفطرية لخفض الضغط الأسموزي. كما يمكن أن ترجع هذه القدرة على التحمل في الأوساط السائلة إلى الروابط الكيميائية بين الماء و NaCl (Gunde-Cimerman و آخرون، 2011). و كما أشار Yoshimune (2006) فإن النشاط الأنزيمي يتأثر بطبيعة الوسط إذا كان سائلا أو صلبا.

3- الدراسة الفسيولوجية لفطر *A.oryzae*:

تعتبر العوامل الحيوية من درجة حرارة و درجة أس هيدروجيني، إضافة إلى المصادر الغذائية من أهم العوامل المؤثرة على نمو و انتشار الفطريات، من خلال تأثيرها على مختلف العمليات الحيوية.

بينت النتائج الخاصة باختيار الوسط الزراعي الأنسب لنمو الفطر *A. oryzae*، أن الأوساط MY20 و YES هي الأوساط المثلى لنمو الفطر، إذ أظهر نموا جيدا و كثيفا. وقد يرجع ذلك إلى تركيب الأوساط الغنية بمصادر الكربون والنيتروجين، التي تعد مواد رئيسية هامة يحتاجها الفطر لمختلف تفاعلاته الأيضية الضرورية لنشاطه و نموه. و قد كانت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل إليه Zain و آخرون (2009)، حيث وجدوا بأن YES هو الوسط الأنسب لنمو فطر *A. terrus*، إذ أظهر أكبر معدل نمو (45 ملم). كما قد يرجع ذلك إلى احتواء كلا الوسطين على نسبة عالية من السكر و بالتالي ارتفاع الضغط الأسموزي للوسط، خاصة و أن الفطر معزول من تربة ذات ضغط أسموزي عالي. أما نمو الفطر على وسطي Saboraud و PDA فكان أقل درجة (75 ملم و 71 ملم). على عكس ما تحصل عليه Zain و آخرون (2009)، حيث أبدى الفطر *A.terrus* أدنى نمو له على هذين الوسطين، ويمكن تفسير ذلك باحتواء وسط Saboraud على البيبتون كمصدر رئيسي للنيتروجين (10 غ/ل)

و احتواء وسط PDA على النشاء (المركب الأساسي في البطاطس). وقد تأكد ذلك بشكل واضح من خلال اختبار تأثير مصادر الكربون على نمو الفطر. حيث وجد أن النشاء هو أحسن المصادر المختبرة يليه الغلوكوز ثم

السكروز، و هذا ما يدل على امتلاك الفطر الأنزيمات اللازمة لتحليل و إماهة السكريات المعقدة Polysaccharides مثل α / β-amylase،β-galactosidase و Invertase) Sinohara، 1970 ؛ Mulimani و Shankar، 2007). تتماشى هذه النتائج مع ما توصل إليه Sivaramakarishmen و آخرون (2007)، الذين وجدوا بأن النشاء أكبر محفز لإنتاج و نشاطية الأنزيمات عند *A.oryzae*، حيث تصل نشاطية أنزيم α-amylase عند التركيز 2% 15016IU/gds ، كما يمكن تفسير نمو الفطر بشكل أفضل على الأوساط YES و MY20، مقارنة مع PDA بأن الفطر قد استعمل الغلوكوز الموجود في الوسط PDA (20غ/ل) كمصدر رئيسي للكربون و الطاقة نظرا لسهولة استقلابه، و عند نفاذه يلجأ الفطر إلى استعمال السكر المعقد.كما أن احتواء وسط Saboraud على البيبتون كمصدر أساسي للآزوت حسن من نمو الفطر. وقد تبين ذلك من خلال اختبار تأثير مصادر الآزوت، إذ وجد أن البيبتون هو أحسن المصادر المستعملة بأقصى معدل نمو (55 ملم)، مقارنة مع باقي المصادر الأخرى . تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Nizamuddin و آخرون (2008)، الذين وجدوا بأن وجود البيبتون في الوسط يحسن إنتاج و نشاطية أنزيم β-galactosidase و α-amylase عند فطر *A. oryzae*.

أما فيما يخص وسط Czapek ذو التركيبة الغنية بالأملاح المعدنية ، والفقيرة إلى المواد الغذائية الأساسية التي يحتاجها الفطر لنموه ، فكان النمو به ضعيفا و غير واضح . وتتوافق هذه النتيجة مع تلك المتوصل إليها بعد تنمية فطر *Penicillium duclauxii* على وسط Czapek ، حيث أعطى أدنى نمو (20 ملم) بعد 7أيام من الحضن في 30°م (Zain و آخرون، 2009) .

إضافة إلى تأثير نوعية الأوساط الزراعية على نمو الفطر ، تؤثر درجة الحرارة هي الأخرى على كمية و درجو نمو الأحياء الدقيقة ، وذلك من خلال تأثيرها على التفاعلات الحيوية . وقد وجد في هذه الدراسة أن نمو الفطر *A.oryzae* المثالي يكون في المجال الحراري (30-35°م). تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Beisebeke و آخرون (2002) ؛ Sivaramekrishman وآخرون (2007) ؛ Nizamudddin و آخرون (2008) ، حيث وجدوا أن

درجة الحرارة المثالية والتي تبلغ فيها فعالية العمليات الحيوية أقصاها تكون في المجال الحراري (30 -35°م) بالنسبة لفطر *A.oryzae*. و بالموازاة مع درجة الحرارة تؤثر درجة pH هي الأخرى على نمو و استقلاب الفطريات، وبالرغم من أن العديد من الفطريات لا تفضل النمو في الظروف القلوية السائدة في السبخة ، فقد وجد أن درجة الأس الهيدروجيني المثالية لنمو الفطر هي 8. على عكس ما تحصل إليه Nizamudddin و آخرون (2008)، الذين وجدوا بأن درجة الأس الهيدروجيني المثالية لفطر *A. oryzae* هي5. وقد يرجع هذا الاختلاف بين النتائج إلى البيئة الأصلية التي تم منها عزل الفطر و التي تتميز بالقاعدية (8.25). وهذا ما أشارت إلية بعض الدراسات السابقة التي تم فيها عزل فطريات محبة للقلوية من بعض الترب، حيث نمى فطر *A. flavus* في قيم أس هيدروجيني تراوحت بين 6 و 8 (الخيمي، 2007). كما أشار Sivaramekrishman وآخرون (2007) بأن تغير الأس الهيدروجيني للوسط راجع بشكل أساسي إلى النشاط الإستقلابي للكائن الحي الدقيق، وبأن عملية بناء و إنتاج الأنزيمات تكون في المجال (3-9) .

4- المقاومة الأسموزية عند فطر *A. oryzae*:

تشغل الأتربة المالحة حوالي 7% من سطح الكرة الأرضية ، وتمتاز هذه التربة بعوامل فيزيائية غير ملائمة مثل: pH و الملوحة العالية ، هذه الأخيرة تسبب فقدان المحتوى المائي للخلايا الحية بسبب ارتفاع أيونات الصوديوم أو كاتيونات أخرى. و بالتالي فإن قابلية نمو و حياة الكائنات الحية الدقيقة ذات الجدار الخلوي، تعتمد على إبقاء الجهد المائي الداخلي أقل بقليل من الخارج خلوي، فالتدفق المستمر للماء ضروري لنمو الهيفا الفطرية. ولذلك على الكائنات الحية الدقيقة أن تمتلك آليات فسيولوجية للتكيف و البقاء على نشاطها في مثل هذه الظروف القاسية وإلا ستموت. وتعتمد الفطريات بشكل رئيسي في تأقلمها على تكديس مركبات ذات وزن جزيئي صغير، تعرف بالمحاليل المتوافقة وبشكل خاص على الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols). وما تزال الأبحاث قائمة

حول الاستفادة من هذه الظاهرة الطبيعية و استخلاص هذه المواد الفعالة أو الآليات التي تحكم هذه العلاقة من أجل بلورتها صناعيا و تجاريا و بيوتكنولوجيا.

لوحظ من خلال النتائج أن عزلة (S1) *A. oryzae* تكدس العديد من الجزيئات، التي قد تدخل في التأقلم الفسيولوجي للضغط الأسموزي العالي، وعلى رأسها الكحولات متعددة الهيدروكسيل منها: Glycerol ، Mannitol، Sorbilto، Xylitol ، Erythritol ، Myo-Inositol ، Arabitol و Dulcitol. بالإضافة إلى بعض السكريات هي Fructose و Trehalose. وكذلك مشتقات الأحماض الأمينية مثل Glycine betaine. كما لوحظ اختلاف كمي و نوعي في إنتاج و/أو تكديس هذه المركبات ، حيث أنه في غياب الضغط الأسموزي (0M من NaCl)، تكون كمية الجزيئات المتراكمة أكبر منها في وجود الضغط (3M). وقد فسر ذلك بأن التركيز 3M يثبط قدرة الغزل الفطري على التكديس (Park و Gander، 1998) . بالإضافة إلى ذلك وجد اختلاف بين الأوساط المستعملة (الوسط الأدنى، وسط MNM و وسط عجينة نخالة القمح) من حيث كمية و نوعية الجزيئات. وقد يرجع ذلك إلى تركيب الوسط الذي يؤثر بشكل كبير على استجابة الفطر للضغط الملحي (Bois و آخرون، 2006).

4-1- المقاومة الأسموزية على الأوساط الاصطناعية:

يستعمل وسط MNM في مثل هذه الدراسات لأنه يخفض من احتمال حدوث الطفرات الوراثية، وبالتالي تأكيد الخصائص الأصلية للفطر (Grellier و Letouze و Strullu، 1984).

أظهرت العزلة (S1) النامية على وسط MNM قدرة معتبرة على تكديس داخلي للعديد من الكحولات متعددة الهيدروكسيل في وجود الضغط (3M) وهي: Mannitol، Glycerol و Myo-Inositol، بالإضافة إلى سكر Trehalose. في حين لم يتحر عن وجود Mannitol و Trehalose في العزلة النامية على الوسط الأدنى. ويرجع ذلك إلى اختلاف تركيب الأوساط، حيث يقوم الفطر بتكديس هذه المركبات في حالة توفرها في الوسط، أو يقوم

بنائها ذاتيا (*de novo*) انطلاقا من مواد أولية (Dagmar و آخرون، 2005 ؛ Kogej و آخرون، 2005). وكما أشار Ruijter و آخرون (2003) في دراسته لفطر *A.niger* باستعمال وسط أدنى مضاف إليه 20 غ/ل غلوكوز، حيث وجد بأن الفطر يقوم بالبناء الحيوي للمانيتول انطلاقا من Fructose-6-phosphate ، وبالتالي وجود كمية معتبرة من الغلوكوز في وسط MNM (10 غ/ل)، مقارنة مع الوسط الأدنى (1 غ/ل) قد تساهم في هذه العملية.

4-2- المقاومة الأسموزية على الوسط الطبيعي (عجينة نخالة القمح SSF):

يتميز هذا النوع من التخمرات بالعديد من الإيجابيات ، حيث يعطي مردودا عاليا من الإنتاج ،مميزات أحسن للمنتوج و انخفاض رؤوس الأموال الاستثمارية، انخفاض مستوى المستقلبات المثبطة وانخفاض التلوث البيئي. و تعتبر المخلفات الزراعية أحسن المواد المستعملة لهذا التخمر في الإنتاج الأنزيمي مثل: α-amylase، glucoamylase، Tannase، β-galactosidase و إنزيمات صناعية أخرى. بالإضافة إلى ذلك فإن الهدم الحيوي لهذه المركبات بواسطة عزلة GRAS (Generally Regarded As Safe)، يمكن أن يحسن من قيمة هذه المواد كأعلاف و مغذيات حيوانية. و لقد تم اختيار نخالة القمح لهذا التخمر، اعتمادا على النتائج المتحصل عليها من طرف Sivaramakrishman و أخرون (2007)، عند المقارنة بين تأثير عدة أنواع من المخلفات الزراعية (قشور جوز الهند، قشور الفستق، قشور السمسم، مسحوق بذور الكاكاو، مسحوق بذور التمر الهندي، نخالة الأرز، نواة التمر ، قشور نبات الزيتون، قشور الخردل ، قشور بذور القطن ، قشر الأرز و نخالة القمح). حيث وجد أن نخالة القمح هي الأحسن، و رجح ذلك إلى وجود نسبة كافية من المغذيات، بالإضافة إلى قابليتها على الحفاظ على قيمتها الغذائية حتى في درجات رطوبة مختلفة.

أظهرت نتائج الأبحاث السابقة حول تأثير النشاطية المائية على إنتاج الكحولات متعددة الهيدروكسيل من طرف الفطر *A. oryzae*، بأن هذا الأخير له القدرة على تكديس خليط من هذه المركبات عند تركيز 0.6M من NaCl ($0.97a_w$) وتشمل: Glycerol، Erythritol، Arabitol (Biesbeke و آخرون، 2002 ؛ Ruijter وآخرون، 2004). إلا أنه لا يمكن الجزم من خلال هذه النتائج بأن الفطر *A. oryzae* يقتصر فقط على تكديس

و/أو إنتاج هذه الأنواع، فقد أظهرت العزلة المدروسة قدرة عالية على إنتاج و تكديس أنواع أخرى، بالإضافة إلى الأنواع المذكورة سابقا مثل Myo-Inositol، Sorbitol ، Dulcitol، Trehalose و ذلك عند التركيز 3M. و قد يرجع هذا التنوع إلى الاختلاف الوراثي بين العزلات و هذا ما أشار إليه Machida و آخرون (2005) بأن الطاقم الجيني للفطر *A. oryzae* يلعب دورا هاما في الاستقلاب، و خاصة إنتاج المستقلبات الثانوية، و هذه الخاصية لم تلاحظ عند كل من *A.nidulans* و *A.fumigatus* . بالإضافة إلى ذلك تلعب درجة أسموزية الوسط دورا في تنوع الجزيئات المفرزة (0.6M و 3M). تتوافق هذه الأطروحة مع ما توصل إليه Park وGander (1998)، حيث لاحظا بأن فطر *P.fellutanum* يكدس كلا من Glycerol و Erythritol عند التركيز 2M من NaCl، بينما عند التركيز 3M تم التحري عن وجود Glycerol فقط. و ذات الاستنتاج سجل من طرف Xai و آخرون (1999)، عند دراستهم لبكتيريا *Methanohalophilus Portucalensis*. حيث وجدوا أن التركيز 0.4M من NaCl يحفز تراكم Betaines، بينما عند التركيز 0.8M تقوم البكتريا بتكديس و إنتاج Sarcosine.

من خلال النتائج المتحصل عليها يبدو أن الاختلاف الكمي و النوعي للكحولات المتراكمة داخل خلايا الفطر قد يعود أيضا إلى مصادر الكربون الموجودة في وسط النمو و إلى مرحلة النمو (Nobre و de Costa، 1985 ؛ Van Eck و آخرون، 1989 عن Gunde-Cimerman و آخرون، 2007). حيث أظهرت الدراسات السابقة أن فطر *A. niger* يكدس Glycerol في المرحلة اللوغاريتمية و Mannitol وErythritol في مرحلة الاستقرار. بينما تقوم خميرة *D.hansenii* باستبدال Glycerol بـ Arabitol خلال مرحلة الاستقرار في النمو (Witteveenو Visse ، 1995 ؛ Alder و Gustafsson، 1980 عن Kumar و آخرون، 2009) .

و كما هو ملاحظ تقوم العزلة المدروسة بتكديس Glycerol في جميع الأوساط المستعملة. و تتوافق هذه النتيجة مع النتائج المحصل عليها سابقا، حيث وجد أن الفطريات و الخمائر مثل: *A. niger*، *D. hansenii* و *S.cerevisiae* تنتج الغليسيرول بشكل أساسي و طبيعي (Gunde-Cimerman و آخرون،2007). و قد يرجع

ذلك إلى الوظيفة التي يقوم بها في حماية و تنظيم النشاط الأنزيمي في وجود ضغط ملحي (Yang و آخرون، 2000). و كذلك إلى التعبير الجيني للمورثات المشفرة للأنزيمات المسؤولة عن البناء الحيوي للغليسيرول، التي تحفز بواسطة ضغط أسموزي عالي (Roberts، 2000)، بالإضافة إلى صغر كتلته الحجمية، و نفاذيته العالية عبر الغشاء ثنائي الطبقات. كما وجد أنه يستعمل كمصدر للكربون و الطاقة (Hohmann، 2002 ؛ Gunde-Cimerman و آخرون، 2007).

أعطى استخدام نخالة القمح كوسط طبيعي في التخمر نتائج مشجعة، حيث كانت نسبة الجزيئات المتراكمة و/أو المنتجة من طرف الفطر *A.oryzae* أكبر مقارنة مع الأوساط الاصطناعية. حيث يمكن أن يرجع ذلك إلى المميزات الجزيئية و الفسيولوجية، و كذلك إلى النمط الظاهري للنمو الذي يتبعه الفطر. فمن خلال الدراسة التي أجراها Beisebeke و آخرون (2002)، وجد أن الغزل الفطري النامي على نخالة القمح يكون هوائيا، و بالتالي زيادة عملية التنفس (التهوئة)، بالإضافة إلى زيادة تراكم الكحولات متعددة الهيدروكسيل و تعدد نواقل مصادر الكربون إلى داخل الهيفا. كما أظهرت الدراسة الجزيئية لفطر *A. oryzae* وجود اختلاف نوعي في التعبير الجيني و إنتاج البروتينات، مقارنة مع التخمر في وسط سائل.

لا يمكن الجزم بأن آلية تراكم و إنتاج المحاليل المتوافقة هي الآلية الفسيولوجية الوحيدة المتبعة من طرف الفطر *A.oryzae* للتكيف للضغط الأسموزي العالي. فقد أظهرت دراسة حديثة بأن بعض أنواع *Aspergillus* و من ضمنها *A. oryzae*، تقوم بالاستجابة للضغط الأسموزي العالي باتباع آليات جزيئية على مستوى الطاقم الجيني (Rocio و آخرون ، 2010). و من جهة أخرى أظهرت العزلة قدرة على تكديس Glycine betaine. و تعتبر هذه النتائج مشجعة نظرا لكون هذه الجزيئات معروفة فقط عند البكتيريا و Archaea مثل *Vibrio cholerae* و *Methanogenium cariaci* كمحاليل متوافقة (Robertson و آخرون، 1990 ؛ Dagmar و آخرون، 2005).

وتتماشى هذه النتائج مع ما توصل إليه Park و Gander (1998)، اللذان وجدا بأن فطر *P. fellutanum*

يقوم بتكديس Glycine betaine وCholine-O -Sulfate أو Choline المضافة إلى الوسط في وجود ضغط أسموزي عالي.

من خلال هذه الدراسة يمكن القول بأن الخصائص البيولوجية للفطر *A. oryzae* (S1) مثل النمو، مستوى النسخ و إفراز المستقلبات الثانوية، تتأثر بشكل ضعيف في وجود تراكيز عالية من NaCl (≥ 17.5%) ، و بالتالي يعتبر هذا الفطر ذو أهمية تطبيقية بيوتكنولوجيا، و خاصة إذا كانت ملوحة الوسط ضرورية لعمليات التخمر. و إذا تم تعريف المورثات المسؤولة عن تحمل الفطر للملوحة، سيفتح المجال لدراسة تحسين و تطوير هذه الخاصية بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة ذات الأهمية الصناعية. و بالإضافة إلى ذلك يمكن استغلال المخلفات الزراعية كمصادر كربون و طاقة، خاصة و أنها غير باهظة الثمن.

الخـــاتمـــة

الخـاتمـة :

لقد مكنت هذه الدراسة من وضع جرد شامل لفطريات سبخة البيضاء، و التي تمتاز بتربة قاعدية، و تحتوي على العديد من الفطريات، بالرغم من أن معظم الفطريات لا تفضل النمو في الظروف القلوية السائدة في السبخة. و من خلال اختبار تحمل الملوحة تم تحديد التركيز الملحي الأقصى الذي يتحمله الفطر *A. oryzae*. كما سمحت الدراسة الفسيولوجية للفطر بتحديد الظروف المثلى لنموه. بالإضافة إلى ذلك تم معرفة الجزيئات المقاومة للضغط الأسموزي و المتمثلة بالدرجة الأولى في الكحولات متعددة الهيدروكسيل و بعض السكريات. إلا أنه لا يمكن الاكتفاء بهذه النتائج بل يجب بذل جهود كبيرة من خلال تعميق الدراسة المخبرية للتحري عن آليات المقاومة باستعمال تقنيات حديثة. و هذا ما يوحي بأن تكون هناك دراسات و أبحاث أخرى أكثر عمقا في هذا المجال، خاصة و أن مثل هذا النوع من الكائنات الحية الدقيقة مصدر حيوي في البيوتكنولوجيا الصناعية. إضافة إلى ذلك فإن استعمال المخلفات الزراعية كمواد أولية في التحويل الحيوي، و كذلك في التخمرات الصناعية التي تتطلب وجود الملح باستخدام الفطر *A. oryzae*، سيفتح المجال على مصراعيه للبحث، لكون النتائج المتحصل عليها مشجعة.

يمكن القول أنه قد لا تكون التربة المالحة صالحة في المجال الزراعي، إلا أنه يمكن اعتبارها مخزن للعديد من الكائنات الحية الدقيقة ذات أهمية كبرى في العديد من المجالات: الاقتصادية، الصناعية، الطبية، الصيدلانية و البيوتكنولوجية...

الملخص

الملخــص:

أخذت 9 عينات تربة عند نقاط مختلفة من سبخة البيضاء بمنطقة حمام السخنة ، على مرحلتين. كانت المرحلة الأولى في شهر مارس 2010 (3 عينات من منتصف السبخة)، و المرحلة الثانية خلال شهر جويلية 2010 (3 عينات من منتصف السبخة ، و 3 عينات من محيط السبخة)، ولقد أمكن عزل و تشخيص مجموعة متنوعة من الفطريات تنتمي إلى 21 جنسا بالإضافة إلى 3 خمائر، وقد كان فطر *Aspergillus* هو المسيطر، حيث كانت له أعلى نسبة تواجد قدرت بـ 43% ، يليه فطر *Penicillium* بنسبة 20 % ، ثم جنس *Alternaria* بنسبة 7 % ، بالإضافة إلى أجناس أخرى متوزعة بنسب مختلفة.

ونظرا للتردد العالي لجنس *Aspergillus* ، أختير النوع *A. oryzae* نظرا لأهميته الصناعية و التجارية لإجراءالدراسة.

مكن اختبار فعالية و قدرة العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* على تحمل تراكيز متزايدة من NaCl من انتقاء العزلة S1 التي أبدت تحملا أكثر للملوحة. كما أوضحت الدراسة الفسيولوجية للفطر أن نموه يكون مثاليا في المجال الحراري (30-35°م)، و pH= 8. كما وجد أن الفطر ينمو بشكل جيد في الوسط الحاوي على البيبتون كمصدر وحيد للآزوت و في الوسط الحاوي على النشاء كمصدر وحيد للكربون، وأن وسطي الزرع MY20 و YES هما الأنسب مقارنة مع أوساط PDA، Czapek ، MEA، Saboraud و CYA.

اتضح من خلال استعمال تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) في عدة أنظمة هجرة وباستعمال الجزيئات القياسية قدرة *A.oryzae* على تكديس خليط من الجزيئات المتمثلة في الكحولات متعددة الهيدروكسيل (Polyols) و السكريات بالإضافة إلى بعض الأحماض الآمينية وبعض الجزيئات التي لم يتم تعريفها. وقد بينت النتائج أن أفضل وسط لاستخلاص هذه الجزيئات هو الوسط الطبيعي(عجينة نخالة القمح)، حيث كانت نسبة الجزيئات المستخلصة 85.71% ، يليه وسط MNM بنسبة 64.28% ، ثم الوسط الأدنى MM بنسبة 14.28%. وقد سمحت المقارنة بالشاهد و هو الوسط الخالي من NaCl بملاحظة أن الفطر يفرز هذه الجزيئات بكميات أكبر في غياب الضغط إلا أن القدرة الإفرازية تقل بزيادة الضغط حيث يستمر الفطر بإفراز سوى بعض هذه الجزيئات.

Abstract

Abstract:

Nine soil samples were taken from different places in El-Baida marsh, in two phases: the first one was on March 2010 (3 samples from the mid-marsh), and the second one was on July 2010 (3 samples from the mid- marsh, and 3 from the area surrounding marsh). 21 fungal genus were isolated in addition to 3 yeasts. The genus *Aspergillus* had the highest proportion 43%, followed by *Penicillium* 20%, then the genus *Alternaria* 7% in addition to other various fungi. Due to the high frequency of the genus *Aspergillus*, *A. oryzae,* which shows an industrial and commercial importance, was selected for this study.

It was found that *A.oryzae* is a moderately halotolerant fungus, where it can tolerate a concentration of NaCl up to 3M. and depending on the halotolerance test, *A. oryzae* (S1) strain was selected as the most tolerant comparing to the two other strains. It was also shown that the optimal growth of the fungus was in the thermal field (30-35°C), and the optimum pH estimated was 8. *A. oryzae* was well grown on the medium containing strach as sole source of carbon and medium containing peptone as the sole nitrogen source. In addition, it was found that both of MY20 and YES media, were the most appropriate compared with PDA, Czapek, MEA, Saboraud and CYA.

Thin-layer chromatography technique (TLC) using several systems , showed that *A. oryzae* accumulates mixture of molecules, containing polyols and sugars , some amino acids in addition to some molecules which were not defined. The results illustrated that wheat bran was the best medium for the extraction of these molecules, where the proportion was 85.71%, followed by MNM medium 64.28% , then the minimum medium MM 14.28%.
As it was also noted that the fungus accumulated larger quantities of these molecules in the absence of pressure, but this accumulation capacity decreased with the increase of pressure and the fungus continued to accumulate only some of them.

المراجع

المراجـــع باللغـــة الأجنبـيـــة:

1- **Abu-seidah, A. A. 2007**. Effect of salt stress on amino acids, organic acids and ultrastructure of *Aspergillus flavus* and *Penicillium roquefortii.* Int. J. Agri. Biol. **9:** 419-425.

2- **Ahmed**, **S., Mahjabin, T., Khan, A. S., Moonmoon , M. and Sarker , N. C. 2009.** Effect of media and environmental factors on mycelial growth of *Boletus edulis, Morchella esculenta* and *Pleurotus geesternaus*. Bangladesh J. Mushroom. **3 :** 47-52.

3- **Andrews, S. and Pitt, J. I. 1987.** Further studies on the water relations of xerophilic fungi, including some halophiles. J. Gener. Microbiol. **133:** 233-238.

4- **Anke, H., Pfefferle, W., Bross, M., Steffan, B., Vianden, R., Steglich, R. 1990.** Aspefuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. J. Antibio. **43:** 648-654.

6- **Anonyme, 2004. Direction générale des Forêts.** Atlas des zones humides d'importance internationale.Algérie

7- **Arirriatu, E. L. and Kester, S. A. 1985.** Isolation and characterisation of the pigment esters of *Xanthomonas juglandis* (*campestris*). J. Gener. Microbiol. **131**: 2047-2052.

8- **Arora, P. and S. DasSarma. 2001**. Halophiles. Nature Publishing Group.

9- **Attrassi, K., Benkiran, R., Attarassi, B., Badoc, A. and Douira, A. 2007.** Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **146 :** 211-224.

10- **Badalyan, S. M., Rapior, S., L. Doko, J. L. Quang, M. Jacob, J. J. Serrano and C. Andary. 1994.** Investigation of primary and secondary mitabolites in a chemical study of *Cortinarius armillatus* **(**Cortinariaceae, Telamonia). Cryptogamie. Mycol. **15:** 223- 228.

11- **Bagy, M. M. and Abdel-Hafez, S. I. 1984**. Effect of sodium chloride on Egyptian soil fungi. Bull. Fac. Sci, Assiut Univ**. 13:** 47-58.

12- **Barnett, H. L . and Hunter, B. B. 1972.** Illustrated genera of imperfect fungi. Third ed. Burgess. publishing company. USA. 239 p.

13- **Barratt, S. R., Ennos, A. R., Greenhalgh, M., Robson, G. D., Handley, P. S. 2003.** Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. J. Appl. Microbiol**. 95:** 78-85.

14- **Beever, R. E. and Laracy, E. P. 1986.** Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. **168:** 1358-1365.

15- **Biesebeke, R. T., Ruijter, G., Rahardjo, Y. S. P., Hoogschagen, M. J., Heerikhuisen, M., Levin, A., Deriel, K., Schutyser, M., Dijksterhuis, J., Zhu, Y., Weber, F. J., Vos, W. M., Hondel, K., Rinzema, A. and Punt, P. J. 2002.** *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. FEMS. Yeast Res. **2:** 245-248.

16- **Bohnert , H. J., Nelson , D. E. and Jensen, R. G. 1995.** Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell. **7:** 1099-1111.

17- **Bois, C., Bertrand, A., Piché, Y., Fung, M. and Khasa, D.P. 2006.** Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. Mycorrhiza. **16:** 99-109.

18- **Boncompagni, E., Osteras, M., M-C. Poggi and D. L. Rudulier. 1999**. Occurrence of choline and glycine betaine uptake and metabolism in the family *Rhizobiaceae* and their roles in osmoprotection. Appl. Environ. Microbiol.**65:** 2072-2077.

19- **Botton, B., Breton, A., Fere, M., Gauthir, S., Larpent, J. P., Gay, P., Reymond, P., Sanglier, J. Y., Vayssier, Y. and Veau, P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielles. Masson, Paris. 512 p.

20- **Cantrell, S. A., Martinez, C. L. and Molina, M. 2006.** Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. Mycol. Res**. 110:** 962-970.

21- **Canvas, D. and Lorenzo, V. 2007.** Osmotic stress limits arsenic hypertolerance in *Aspergillus* sp. P37. FEMS. Microbiol. Ecol. **61:** 258-263.

23- **Caprioli, M., Katholm, A. K., Melon, G., Ramlov, H., Ricci, C., Santo, N. 2004.** Trehalose in desiccated rotifers: a comparison between a bdelloid and a monogonot species. Comp. Biochem. Physiol, Part A. **139:** 527-532.

24- **Caumette, P., Matheron, R., Raymond, N., Relexans, J. C.1994**. Microbial mats in hypersaline ponds of Mediterranean salterns (Salins-de-Giraud, France). FEMS Microbiol. Ecol. **13:** 273-286.

25- **Champion, R. 1997.** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA edition. 401 p.

26- **Csonka, L. N. 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. **53:** 121-14.

27- **Dagmar, K., Karatan, E., Pflughoeft, K. J. 2005**. Role of glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. **71:** 3840- 3847.

28- **Davis, D. J., Burlak, C. and Money, N. P. 2000.** Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. Mycol. Res. **104:** 800-804.

29- **Deacon, J. W. 2006.** Fungal biology. Fourth ed. Blackwell publishing Ltd. Australia. pp : 142- 158.

30- **Dijksterhuis, J. and Vries, R. P. 2006.** Compatible solutes and fungal development. Biochem. J. **399 :** 3-5.

31- **Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki,T., Kamekura, M. and Usami, R. 2005.** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-salin Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian duststrom). Sal. Sys. **1:** 1-8.

32- **Fraj, S. 2004.** La salinité et la production végitale. Centre de Publication Universitaire. Tunisie. pp : 64-65.

33- **Frances, A., Draughon and John, C. 1979.** Insecticide inhibition of growth and patulin production by *Penicillium urticae*. J. Food Sci. **44:** 1232- 1234.

34- **Ghosh, S., Sachan, A. and Mitra, A. 2005.** Degradation of ferulic acid by a white rot fungus *Schizophyllum commune*. World J. Microbiol. Biotech. **21:** 385-388.

35- **Ghoul, M., Bernard, T. and Cormier, M. 1990**. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycinebetaine from marine sedements. Appl. Environ. Microbiol.**56**: 551- 554.

36- **Grelliery, B., Letouze, R. and Strullu, D. G. 1984**. Micropropagation of birch and micorrhizal formation *In vitro*. New Phytol. **97:** 591-599.

37- **Gunde-Cimerman, N., Kogej, T., M. Stein, M. Volkmann, Anna A. Gorbushina, Erwin A. Galinski. 2007.** Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanisation. Microbiol. **153**: 4261-4273.

38- **Gunde-Cimerman, N., J. Ramos, A. Plemenitas. 2009.** Halotolerant and halophilic fungi. Mycol. Res. **113**: 1231-1241.

39- **Han, K.-H., Lee,D.- B., Kim,J.- H., Kim, M.- S., Han, K.- Y., Kim, W.- S., Park, Y.- S., Kim, H.- B. and Han, D.- M. 2003.** Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. J. Microbiol. **41:** 34-40.

40- **Heritage, J., Evans, E. G. V. and Killington, R. A. 1999.** Microbiology in action. Cambridge University Press. Australia. pp: 1-32.

41- **Hohmann, S. and Mager, W.H. 2003.** Yeast stress responses. Springer. New York. pp: 122-124.

42- **Huiming, Z., Liu, J., Li, X., Xu, L., Wang, Y., Tang, W. and Han, L. 2010.** Isolation and characterization of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in *Ophiopogon japonicus*. The open Biotech. J. **4 :** 18-25.

43- **Junichiro, M., Sumiko, O.-K., Tomohiro, A., Nishimura, M., Koike, H., Masayuki, M. 2010.** Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. J. Biosc. Bioeng. **110:** 8-11.

44- **Kelavkar, U. P. and Chhatpar, H. S. 1993.** Polyol concentrations in *Aspergillus repens* grown under salt stress. J. Microbiol. Biotech. **9:** 579-582.

45- **Kester, A. S., Lawrence E. and Aririatu. 1985.** Isolation and characterization of the pigment esters of *Xanthomonas juglandis (carnpestris).* J. Gener. Microbiol. **131 :** 2047-2052.

46- **Kitamoto, K., Arioka, M. and Ohneda, M. 2005.** Isolation and characterization of *Aspergillus oryzae* vacuolar protein sorting mutants. Appl. Environ. Microbiol. **71 :** 4856 - 4861.

47- **Klich, M. A. 2002.** Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia. **94:** 21-27.

48- **Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A. and Gunde-Cimerman, N. 2005.** The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline envirenments. Appl. Environ. Microbiol. **71:** 6600-6605.

49- **Kostadinova, N., Krunova, E., Tosi, S., Pashova, M. Angelova. 2009.** Isolation and identificationof filamentous fungi from island Livingston, Antarctica. Biotechnol. & Biotechnol. EQ. 267-270.

50- **Kumar, D., Agrawal, P., Saradesai, V. P., Aravinda, B. J. and Deshpande, S. N. 2007.** Isolation of halotolerant *Penicillium* species from mangroves and salterns and their resistance to heavy metals. Curre. Sci. **92:** 895-897.

51- **Kumar, S. and S. N. Gummadi. 2009.** Osmotic adaptation in halotolerant yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: role of osmolytes and cation transport. Extremoph. **13:** 793-805.

52- **Kunze, G., Stoltenburg, R., Wartmann, T., Yang, X.-X. 2000.** Halotolerance of the yeast *Arxula adeninivorans* LS3.2000. Anton. Van Leeuw. **77:** 303-311.

53- **KyungWoo, L., Soo Kee, L., Bong, D. L. 2006.** *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry. Inter. J. Poult. Sci. **5:** 1-3.

54- **Lai, M. - C., Yang, D. – R., Chuang, M.- J. 1999.** Regulatory factors associated with synthesis of osmolyte glycine betaine in the halophilic methanoarchaeon *Methanohalophilus portucalensis.* Appl. Environ. Microbiol. **65**: 828-833.

55- **Le Houérou, H. N. 1993.** Salt tolerance plants for the arid regions of the Mediterranean isoclimatic zones, pp: 403-422. *In* Lieth, H. and AL Masoom, A. (ed.), Towards the rational use of high salinity tolerant plants, vol. 1. Kluwer Publishers, Netherlands.

56- Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P. J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., Li, H., Butterfoss, L. G., Kong, X.-P., Gross, R. and Montclare, J. K. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. J. A. Chem. Soc. **131 :** 15711-15716.

57- Luisa, M. N., Rui, P. O. and Lucas, C. 1997. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Microbiol. **143:** 1133-1139.

58- Mac Donald, I. R., Reiley II, J. F., Guinasso, N. L., 1990. Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico. Sci. **248:** 1096- 1099.

59- Machida, M., Asai, K., Nierman, W. C., Archer, B. D., Bennett, J. W., Kato, M., Sawano, T., Komori, T., Kuhara, S., Kikuchi, H. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae.* Nature. **438 :** 22-29.

60- Mbata, T. I. 2008. Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. Sudan. J. Pub. Heal. **3:** 170-172.

61- Mert, H. H. and Dizbay, M. 1977. The effect of osmotic pressure and Salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. Mycopath**. 61:** 125-127.

62- Montoroi, J. P. 1997. Conductivité éléctrique de la solution du sol et d'éxtraits aqueux de sol, application à un sol sulfaté acide salé de Basse – Casamance (Sénégal). Etu. Gest. Sol. **4 :** 279-298.

63- Naseeb, S., Sohail, M., Sherwani, K. S., Sultana, S., Aftab, S., Shahzad, S., Ahmed, A. and Khan, A.S. 2009. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre- dominant genus of hydrolase producer. Pak. J. Bot. **41:** 2567-2582.

64- Nieto, J. J., Canovas, D., Vargas, C., Guerra, F. I., Csonka, N. L., Ventosa, A., Rhodes, D. and Novas, C. D. 1997. Isolation and characterization of salt-sensitive mutants of the moderate halophile *Halomonas elongata* and cloning of the ectoine synthesis genes. J. Biol. Chem. **272:** 25794- 25801.

65- Nizamuddin, S., Sridevi, A. and Narasimha, G. 2008. Production of β-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid- state fermentation. Afr. J. Biotechnol. **7:** 1096-1100.

66- Obuekwe, O. C., Adekunle, M. B., Al-Saleh, E. and Mulder, J. L. 2005. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. Inter. Biodeter. Biodeger. **56:** 197-205.

67- Olempska-Beer, Z.S., Merker, R.I., Ditto, M.D., DiNovi, M.J., 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. Regul. Toxicol. Pharmacol. **45 :** 144-158.

68- Oren, A. 2002. Extreme habitats halophilic microorganisms and their environments. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp: 56-294.

69- **Oren, A. and Rainy, F. A. 2006.** Extremophiles, methods in microbiology. Elsevier Ltd. London. pp: 513-615.

70- **Pamela,E. J. and Martin, B. E. 1988.** Microfungi on miscellaneous substrates: An identification handbook. Typeset by Leape And Gard Ltd. England. 237 p.

71- **Park, S., Smith, L. T. and Smith, G. M. 1995.** Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterolitica* ATCC 9610. Appl. Environ. Microbiol. **61:** 4378- 4381.

72- **Park, Y-I. and Gander, E. J. 1998.** Choline derivatives involved in osmotolerance of *Penicillium fellutanum.* Appl. Environ. Microbiol. **64**: 273-278.

73- **Pitt, J. I. 1991.** A laboratory guide to common *Penicillium* species. Second ed. Common Wealth Scientific and Industrial Research Organisition Division of food processing. 65 p.

74- **Pitt, J. I., and Hocking, A. D. 1985**. Fungi and food spoilage. Academic press Inc. Sydney. Orlando, San Diego, New York, London, Tonroto, Montréal, Tokyo. 414 p.

75- **Raina, M., Maier, I. L., Pepper,C. P. G. 2009.** Environmental microbiology. Second ed. California. pp: 75- 137.

76- **Ray, J. and Torzilli, A. P. 2002.** An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. Mycologia. **94:** 384-391.

77- **Roberts, M. F. 2000.** Osmoadaptation and osmoregulation in Archaea. Frontiers in Bioscience . **5 :** 796-812

78- **Robertson, E. D., Noll, D., Roberts, M. F., Menaia, F. G. A. J. and Boon, R. D. 1990.** Detection of the osmoregulator betaine in Methanogenes. Appl. Environ. Microbiol. **56:** 563- 565.

79- **Rocio, D., Jeffrey, W. C. and Calvo, A.M. 2010.** Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesi and secondary metabolism in filamentous fungi. Toxi. **2:** 367-381.

80- **Roger, P. and J.L. Garcia. 2001.** Intoduction à la microbiologie du sol. Laboratoire de microbiologie IRD institut de recherche pour le developpement IFR-BAIM institut fédératif de recherche en biotechnologie agro-industrielle de Marseille. 190 p.

81- **Ruijter, G. J., Visser, J. and A. Rinzema. 2004.** Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. Microbiol. **150:** 1095-1101.

82- **Ruijter, J. G. G., Bax, M., Patel, H., Flitter, J. S., Van de Vondervoort, I. J. P., de Vries, P.R., vanKuyk, P. and Visser, J. 2003.** Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. Eukary. Cell. **2:** 690-698.

83- **Schutyser, M. A. I. 2003.** Mixed solid-state fermentation: Numerical modeling and experimental validation. Ph. D. Thesis, Wageningen University. The Netherlands. pp: 7-9.

84- **Shankar, S.K. and Mulimani, V. H. 2007.** α-galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in Solide State Fermentation. Biores. Technol. **98:** 958-961.

85- **Sinohara, H. 1970.** Induction of enzymes in dormant spores of *Aspergillus oryzae*. J. Bacteriol . **101:** 1070-1072.

86- **Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. and Pandey, A. 2007.** Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. J. Sci. Indus. Res. **66:** 621-626.

87- **Smith, G. 1969.** An introduction to industrial mycology . Sixth ed. London. pp: 328-329.

88- **Suhail, M., Irum, F., Jatt, T., Korejo, F. and Abro, H. 2007.** *Aspergillus* mycoflora isolated from soil of Kotri Barrage Sindh, Pakistan**.** Pak. J. Bot. **39:** 981-984.

89- **Souza-Motta, C. M., Auxiliadora, Q. C. M., Fernandes, S. J-M., Lima, M. M. D., Nascimento, P. J. and Laranjeira, D. 2003.** Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sunflower (*Helianthus annus* L.) Rhizosphere according to their capasity to hydrolyse inulin. Braz. J. Microbiol. **34:** 273-280.

90- **Stromberger, M. E., Klose, S., Ajwa, H., Trout, T. and Fennimore, S. 2005.** Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. Soil Sci. Soci. A. J. **69 :** 1987-1999

91- **Stuart, H. 2005.** Essential microbiology. The university of Glamorgan, UK, England. pp: 394-395.

92- **Suzuki, S., Kato, A., Saeki, T., Ando, K., Tamura, G. and Arima, K. 1969**. Oryzachlorin, a new antifungal antibiotic (Studies on antiviral and antitumor antibiotics. XVIII). J. Antibio. **22:** 322-326.

93- **Tagwa, M., Tamaki, H.,Manom,A., Koyama,O. and Kamagata,Y. 2010**. Isolation and characterisation of antagonistic fungi against potato. FEMS Microbiol. Lett. **305:** 136-142.

94- **Tang, J., Thangavelu, V., Ryan , D. and Valix, M. 2006.** Effect of saline stress on fungi metabolism and biological leaching of weathered saprolite ores. Mineral Engine. **19:** 1266-1273.

95- **Tang, M., Sheng, M., Chen, H. and Zhang, F. F. 2009**. *In vitro* salinity resistance of three ectomycorrhizal fungi. Soil Biol. Bioch. **41:** 948–953.

96- **Turk, M., Méjanelle, L., Sentjure, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. 2004.** Salt-induced changes in lipid composotion and membrane fluidity of halophilic yeast- like melanized fungi. Extrem. **8**: 53-61.

97- **Vargas, C., Jebbar, M., Carrasco, R., Blanco, C., Calderon, M. I., Iglesias-Guerra, F. and Nieto, J. J. 2006.** Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium Chromohalobacter salexigens. J. Appl. Microbiol. **100:** 98-107.

98- **Verscheure, M., Lognay, G. and Marlier, M. 2002**. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **6** : 131–142.

99- **Webster, J. and Weber, R. W. S. 2007**. Introduction to fungi. Third ed. Combridge University Press. New York. 696 p.

100- **Xiao, M., Meng, X. J., Lu, L. L. and Gu, G. F. 2010.** A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves. Res. Microbiol. **20:** 1-8.

101- **Yancey, P. H. 2005.** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. J. Experim. Biol. **208 :** 2819-2830.

102- **Zain, M. E., Razak, A. A., El-Sheikh, H. H., Soliman, H. G. and Khalil, A. M. 2009.** Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. Afr. J. Microbiol. Res. **3 :** 280-286.

المراجع باللغة العربية:

1- **الخيمي، م. ب. أ. 2007.** دراسة بيئية و فسيولوجية للفطريات المتحملة للملوحة المتوسطة في سبخة العوشزية بمنطقة القصيم بالمملكة العربية السعودية.Saudi . J. Biol. Scien . **14:** 115-123.

2- **المهيدب، ع. ب. أ. 2002.** التربة السبخة في المملكة العربية السعودية: خواصها و طرق معالجتها. مجلة جامعة الملك عبد العزيز: العلوم الهندسية، **14 :** 29- 80.

3- **علي ، أ. م. 1998.** عالم الفطريات. الدار العربية للنشر و التوزيع. القاهرة. ص. 194-294.

4- **قشقري، م. ر. و الحازمي، ع. ن. 2006.** دراسات على الفلورا الفطرية لساحل البحر الأحمر بمحافظة القنفذة المملكة العربية السعودية. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. **9:** 15-28.

5- **محمد ، ع. م. 2003.** الفطريات الفسيولوجى، التكاثر و علاقتها بالبيئة و الإنسان (الجزء الثاني) . الطبعة الأولى. الدار العربية للنشر و التوزيع. القاهرة. ص. 267-282.

الملاحق

الملحـق

ملحق (1): الأوساط الزراعية المستعملة في الدراسة

1- وسط مستخلص البطاطا (PDA) Potato Dextrose Agar:

- مستخلص البطاطس...200 غ
- أجار...15 غ
- غلوكوز..20 غ
- ماء مقطر..1000 ملل

2- وسط Malt Extract Agar (MEA):

- مستخلص المالت...20 غ
- بيبتون...1 غ
- غلوكوز..20 غ
- أجار...15 غ
- ماء مقطر..1000 ملل

3- وسط Yeast Extract SucroseAgar (YESA) :

- مستخلص الخميرة..20 غ
- $MgSO_4,5H_2O$...0.5 غ
- سكروز...150 غ
- أجار...15 غ
- Trace metal 1ملل
- ماء مقطر...1000ملل
- **Trace metal:**
- $ZnSO_4,7H_2O$...1 غ
- $CuSO_4,7H_2O$...0.5 غ
- مـاء مقطر...100ملل

4- وسط Czapek:

- $Na\ NO_3$ .... 2 غ
- KH_2PO_4 .... 1 غ
- $Mg\ SO_4.7H_2O$ .... 1 غ
- KCl .... 0.5 غ
- $FeSO_4.7H_2O$ .... 0.01 غ
- سكروز .... 30 غ
- أجار .... 15 غ
- ماء مقطر .... 1000 ملل

يضاف لكل 1 ل من المحلول 1 ملل من المحاليل التالية (0.01 غ من $Zn\ SO_4.7H_2O$ في 100 ملل من الماء المقطر و $CuSO_4\ .7H_2O$ بمقدار 0.01 غ في 100 ملل ماء مقطر) على أن تسخن هذه المحاليل لمدة ربع ساعة في حمام مائي، ثم يعقم الوسط على درجة 121°م لمدة 20 دقيقة.

5- وسط Melin-Norkans medium (MNM):

- KH_2PO_4 .... 0.5 غ
- $(NH_4)_2HPO_4$ .... 0.25 غ
- $FeCl_3$ .... 0.03 غ
- مستخلص المالت .... 3 غ
- $CaCl_2$ .... 0.05 غ
- $MgSO_4,7H_2O$ .... 0.15 غ
- NaCl .... 0.025 غ
- Thiamin-HCl .... 0.0001 غ
- غلوكوز .... 10 غ
- ماء مقطر .... 1000 ملل

6- وسط Saboraud:

- بيبتون...10 غ
- غلوكوز..40 غ
- أجار..20 غ
- ماء مقطر...1000ملل

7- الوسط الأدنى MM:

- NH_4NO_3..3 غ
- $MgSO_4,7H_2O$...2 غ
- NaCl..0.2 غ
- KH_2PO_4..1 غ
- Na_2HPO_4...4 غ
- $CaCl_2$..0.05 غ
- الغلوكوز..10 غ
- ماء مقطر..1000ملل

8- الوسط الأساسي Base medium:

- K_2HPO_4..1 غ
- $MgSO_4,7H_2O$...0.5 غ
- KCl..0.5 غ
- $FeSO_4,7H_2$...0.01 غ
- Asparagin...1.7 غ
- غلوكوز..1 غ
- أجار..20 غ
- ماء مقطر..1000ملل

9- وسط MY20:

- غلوكوز...200 غ
- مستخلص المالت..20 غ
- ماء مقطر..1000ملل

10- وسط 25% glycerol Nitrat Agar (G25N):

- K_2HPO_4..0.75 غ
- مركز Czapek..7.5ملل
- مستخلص الخميرة..3.7 غ
- غليسيرول ....250 غ
- أجار..12 غ
- ماء مقطر..1000ملل

*** مركز Czapek:**

- $NaNO_3$..3 غ
- KCl..0.5 غ
- $MgSO_4,7H_2O$..0.5 غ
- $FeSO_4,7H_2O$..0.01 غ

11- وسط Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA):

- بيبتون..15 غ
- KH_2PO_4..1 غ
- $MgSO_4,7H_2O$..0.5 غ
- Chloramphenicol..0.1 غ
- Dichloran..2 ملغ (0.2% في إيثانول، 1 ملل)
- أجار..15 غ
- ماء مقطر..1000 ملل

12- وسط Malt Agar (MA):

- مستخلص المالت..10 غ
- أجار..20 غ
- ماء مقطر..1000 ملل

13- **وسط Aspergillus Flavus Parasiticus Agar** (**AFPA**):

- بيبتون...10 غ
- مستخلص الخميرة..................................20 غ
- $FeNH_4$,Citrate...................................0.5 غ
- أجار..15 غ
- Dichloran.......................................2 ملغ (0.2% في إيثانول، 1ملل)
- ماء مقطر...1000 ملل

14- **وسط Czapek Yeast extract Agar** (**CYA**):

- K_2HPO_4..1 غ
- مستخلص الخميرة....................................5 غ
- سكروز..30 غ
- أجار..15 غ
- مركز Czapek...10ملل
- ماء مقطر.......................... ....990 ملل

- تعقم الأوساط في درجة 121°م لمدة 20 دقيقة.

ملحق (02): تعداد الأنواع الفطرية المعزولة بناء على فترات أخذ العينات

فترة أخذ العينات	**شهـــر مـــــارس**		**شهـــر جويلـــية**		
الوسط	**PDA**	**PDA+NaCl**	**PDA**		**PDA+NaCl**
ع1	25	10	3		6
ع2	18	12	/		5
ع3	6	9	6		6
المجموع	49	31	9		17
النسبة المئوية (%)	75.47		24.53		
موقع أخذ العينات	**منتصف السبخة**		**محيط السبخة**		
ع1	3	6	**ع4**	2	4
ع2	/	5	**ع5**	2	2
ع3	6	6	**ع6**	/	/
المجموع	9	17	**المجموع**	4	6
النسبة المئوية (%)	72.22		27.78		

ملحق (03): تأثير الملوحة على نمو العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

1- تأثير الملوحة على نمو العزلة S1 على وسط YESA الصلب

NaCl (M)	متوسط النمو	المجموعات
0	0.00±90.00	A
0.2	0.00±90.00	A
0.4	0.00±90.00	A
0.6	0.00±90.00	A
0.8	2.50±87.50	B
1	0.20±81.20	C
1.5	1.00±31.00	D
2	0.00±21.00	E
2.5	0.20±16.80	F
3	1.50±16.50	F
3.5	0.00±5.00	G

لايوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

2- تأثير الملوحة على نمو العزلة S1 على وسط أدنى MM الصلب

NaCl (M)	متوسط النمو(ملم)	المجموعات
0	7.00±63.00	A
0.2	0.00±52.00	B
0.4	0.00±52.00	B
0.6	2.00±52.00	B
0.8	10.00±50.00	B
1	4.00±48.00	B
1.5	0.00±42.00	B
2	2.50±17.50	C
2.5	0.00±12.00	C
3	1.50±11.50	C
3.5	0.00±5.00	D

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

3- تأثير الملوحة على نمو العزلة S2 على وسط YESA الصلب

NaCl (M)	متوسط النمو	المجموعات
0	0.00±90.00	A
0.2	0.00±90.00	A
0.4	0.00±90.00	A
0.6	0.00±90.00	A
0.8	0.50±44.30	B
1	0.50±35.60	C
1.5	2.50±27.50	D
2	1.00±20.00	E
2.5	0.00±14.00	F
3	0.20±13.33	F
3.5	0.00±5.00	G

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

4- تأثير الملوحة على نمو العزلة S2 على وسط أدنى MM الصلب

NaCl (M)	متوسط النمو	المجموعات
0	0.80±62.00	A
0.2	4.50±59.50	AB
0.4	2.00±51.00	BC
0.6	4.00±51.00	B
0.8	0.00±50.00	BC
1	9.50±42.50	C
1.5	6.00±28.00	D
2	1.00±22.00	D
2.5	0.50±13.50	E
3	0.50±10.50	E
3.5	0.00±5.00	F

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

5- تأثير الملوحة على نمو العزلة S3 على وسط YESA الصلب

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	0.00±90.00	0
A	0.00±90.00	0.2
A	0.00±90.00	0.4
A	0.00±90.00	0.6
B	0.00±50.00	0.8
C	2.00±38.00	1
D	3.00±19.00	1.5
D	0.57±18.66	2
E	0.57±15.66	2.5
E	0.57±14.66	3
F	0.00±5.00	3.5

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

6- تأثير الملوحة على نمو العزلة S3 على وسط أدنى MM الصلب

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	1.00±61.00	0
AB	10.00±58.00	0.2
AB	2.50±52.50	0.4
AB	0.00±52.00	0.6
AB	8.50±46.50	0.8
B	3.50±46.50	1
C	0.50±24.50	1.5
C	1.00±23.00	2
D	1.25±11.70	2.5
D	0.25±10.70	3
E	0.00±5.00	3.5

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

7- تأثير الملوحة على نمو العزلة S1 على وسط YES السائل

NaCl (M)	متوسط النمو (غ)	المجموعات
0	0.36±14.76	A
0.5	0.39±10.81	B
1	0.79±6.50	C
1.5	0.71±3.61	D
2	0.45±2.66	E
2.5	0.075±1.81	F
3	0.05±0.75	F

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

8- تأثير الملوحة على نمو العزلة S1 على وسط أدنى MM السائل

NaCl (M)	متوسط النمو	المجموعات
0	1.35±5.15	A
0.5	0.22±5.13	A
1	0.78±4.00	AB
1.5	0.51±4.01	AB
2	0.12±3.26	BC
2.5	0.34±3.00	BC
3	0.07±2.32	C

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

9 - تأثير الملوحة على نمو العزلة S2 على وسط YES السائل

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	1.08±11.24	0
A	1.23±11.09	0.5
B	1.11±6.56	1
C	0.16±4.05	1.5
D	0.12±0.98	2
D	0.44±0.75	2.5
D	0.14±0.58	3

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

10- تأثير الملوحة على نمو العزلة S2 على وسط أدنى MM السائل

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	1.75±8.20	0
AB	1.63±6.33	0.5
B	1.72±5.08	1
C	0.96±2.24	1.5
C	1.50±1.78	2
C	0.21±1.52	2.5
C	0.22±0.95	3

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو ذات نفس الحروف (المجموعات)

11- تأثير الملوحة على نمو العزلة S3 على وسط YES السائل

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	0.64±13.61	0
B	0.01±9.98	0.5
C	0.04±8.15	1
D	1.25±6.45	1.5
D	1.48±5.31	2
E	0.17±1.96	2.5
E	0.13±1.77	3

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

12- تأثير الملوحة على نمو العزلة S3 على وسط أدنىMM السائل

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	1.12±5.35	0
B	0.34±3.43	0.5
B	0.01±3.10	1
B	0.44±3.02	1.5
B	0.62±2.85	2
B	0.47±2.71	2.5
B	0.25±2.14	3

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

ملحق (04): العزلة الأكثر تحملا للملوحة

العزلـــــة	متوســـــط النـــمـــــو			
	الوسط السائل(غ)	المجموعات	الوسط الصلب(ملم)	المجموعات
S1	4.73	AB	46.00	A
S2	4.38	B	41.10	B
S3	4.99	A	41.00	B

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

ملحق (05): الدراسة الفسيولوجية لفطر ***A. oryzae***

1- تأثير درجة الحرارة:

درجة الحرارة (°م)	متوسط النمو (ملم)	المجموعات
5	0.00±.0.00	F
15	2.00±32.00	E
20	0.50±52.50	D
25	1.50±61.50	C
28	1.50±77.50	B
30	0.00±90.00	A
32	0.00±90.00	A
35	0.00±90.00	A
37	0.00±88.00	A
40	0.00±5.00	F

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

2- تأثير الأوساط الزراعية:

الوسط الزراعي	متوسط النمو (ملم)	المجموعات
MY20	0.00±90.0	A
YESA	0.00±90.0	A
Saboraud	5.00±75.00	B
PDA	8.50±71.00	B
MEA	2.00±52.00	C
CYA	12.50±51.00	C
Czapek	9.00±45.00	C

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

3- تأثير pH:

درجة الحرارة (°م)	متوسط النمو (غ)	المجموعات
4.5	0.34±6.71	B
5	1.39±7.81	B
5.5	9.21±2.49	B
6	0.22±7.45	B
6.5	0.35±9.65	B
7	1.49±9.24	B
7.5	0.73±9.34	B
8	4.66±15.72	A
8.5	0.07±6.26	B
9	0.00±5.14	B
11	0.00±0.00	C

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

4- تأثير مصادر الكربون:

مصدر الكربون	متوسط النمو (ملم)	المجموعات
غلوكوز	16.20±73.70	B
سيليلوز	6.50±36.50	CD
نـشاء	0.00±90.00	A
سكروز	4.00±46.00	C
حمض السيتريك	0.50±24.50	D

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

5- تأثير مصادر الآزوت:

مصدر الآزوت	متوسط النمو (ملم)	المجموعات
بيبتون	5.00±55.00	A
Glycine	0.00±21.00	B
NH_4Cl	4.50±23.00	B
NH_4NO_3	2.00±18.0	B

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة

ملحق (6): تأثير الملوحة على نمو العزلة S1 على وسط MNM

المجموعات	متوسط النمو	NaCl (M)
A	0,70±5.44	0
B	2,18±3.40	0.5
BC	0,65±2,09	1
BC	0,28±1,19	1.5
BC	0,31±1,48	2
BC	0,09±1,31	2.5
BC	0,26±0,63	3

لا يوجد فرق معنوي بين متوسطات النمو التي تنتمي إلى نفس المجموعة