وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـــامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

اختبار كفاءة بعض المستخلصات النباتية وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* والظروف الفيزيائية في تثبيط نمو الفطرين *Aspergillus flavus* و*Aspergillus parasiticus* الفارزة لسم الافلا B_1

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في علوم الحياة - نبات

من قبل

انتظار جبار محمد العيداني

بأشراف

أ. د. بان طه محمد

1435هـ 2014 م

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

((وَعَلَّمَكَ مَالَمْ تَكُن تَعْلَمُوَكَانَ فَضْلُ اللهِ عَلَيْكَ عَظِيماً))

صدق الله ألعلي العظيم
سورة النساء (113)

الاهداء

الى من ضحيا بعمرهما من اجلي وسهرا الليالي ..... ابي وامي

الى رفيق دربي وشريك فرحي وحزني ..... زوجي العزيز

الى بهجة حياتي وقرة عينيَ..... اطفالي الاحبة

الى كل طلاب العلم الذين ساعدوني وشدوا عزمي ..... رفاقي

الباحثة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

شكر وتقدير

الحمد لله الاول قبل الإنشاء والإحياء والاخر بعد فناء الأشياء ,العليم الذي لا ينسى من ذَكَره, ولا يَنقص من شَكره ,ولا يُخيب من دَعاه ولا يَقطع رجاء من رجاه. والصلاة والسلام على خير الأنبياء والمرسلين حبيب ألـه العالمين أبي القاسم محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه الغرّ الميامين ومن أتبعهم بإحسان الى يوم الدين.

اتوجه بالشكر الجزيل الى الاستاذة الفاضلة الدكتورة بان طه محمد التي تفضلت بالاشراف على الرسالة ولما قدمته من اراء ومقترحات سديدة .

أتوجه بالشكر الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة والى د.م.نصير مرزة حمزة رئيس قسم علوم الحياة لما قدموه من تسهيلات لطلبة الدراسات العليا جميعا" .
وكما أتقدم بالشكر والتقدير الى الست م. بان موسى حسن لما قدمته لي من مساعدة علمية ومعنوية . و كذلك اشكر م.م. خالد علي حسين لمساعدته اياي في التحليل الاحصائي .

واخيرا" اشكر رفاقي في الدراسات العليا الذين قدموا لي يد العون والمساعدة وهم كل من الاستاذ علاء عبد الحسين ودعاء فائق وميثم ناصر ودعاء عادل وسراب فاضل .
والله الموفق والحمد لله رب العالمين .

الباحثة
انتظار جبار محمد

الخلاصة

SUMMARY

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء للمدة من 2012/10/11 لغاية 2013/9/27 اذ تم عزل الفطريات من بعض بذور المواد الغذائية كالشعير والحنطة والذرة الصفراء والفاصولياء وفستق الحقل وزهرة الشمس لاسيما عزلات الأنواع التابعة لجنس الفطر Aspergillus المرافقة لبعض الأغذية المحلية والكشف عن قدرتها في إنتاج سموم الافلا باستخدام كشف الامونيا وتقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC), اذ تم تحديد فعالية عزلات الفطرين A.flavus وA.parasiticus في انتاج سم الافلا B1 . واختبار فعالية المستخلصات النباتية الكحولية والمائية المجففة لكل من اوراق نبات الكجرات Hibiscus sabdariffa واوراق نبات اليوكالبتوس Camaldulensis Eucalyptusواوراق نبات النعناع Mentha spicataفي تثبيط نمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus فضلا عن تقييم قدرتها على تحطيم سم الافلا B1. كذلك تقييم كفاءة خميرة الخبز Saccharomyces cerevisiae في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين المدروسين , وتضمنت الدراسة إجراء تجارب أخرى تمثلت في تأثير بعض العوامل الفيزيائية كدرجات الحرارة والاس الهيدروجيني والتهوية تجاه نمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus وانتاجهما سم الافلاB1. كما تم الكشف بطريقة كيميائية عن وجود المواد الفينولية في الفطرين A.flavus وA.parasiticus.

اظهرت النتائج تلوث العينات الغذائية بالفطرين A.flavus وA.parasiticus بأعداد ونسب وجود وتردد مختلفة , ولقد اظهرت عينات الذرة الصفراء اعلى نسب تلوث بالفطرين المذكورين اذ بلغ العدد الكلي الى 48 عزلة , تلاها محصول الحنطة اذ وصل العدد الكلي الى 34 عزلة , ثم عينات الفاصولياء والشعير و زهرة الشمس اذ سجلت 17و27 و32 عزلة على التوالي , اما عينات فستق الحقل فقد سجلت اقل نسبة اذ وصل العدد الكلي الى 15 عزلة.

اظهرت نتيجة الفحص بواسطة طريقة محلول الامونيا 18 عزلة من مجموع 30 عزلة للفطر A. flavus لها المقدرة في انتاج سم الافلا اي بنسبة 60% , و11عزله من مجموع 20 عزلة للفطر A.parasiticus لها المقدرة في انتاج سم الافلا اي بنسبة 55%.

اظهرت نتائج دراسة المستخلصات النباتية للكجرات واليوكالبتوس والنعناع وبنوعيها الكحولي والمائي وبالتراكيز10و20و30 ملغم/مل فعالية تثبيطية ضد نمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus , فوجد ان المستخلص الكحولي للكجرات واليوكالبتوس ثبط نمو الفطرين بنسبة 100% عند التركيز30 ملغم/مل, واظهر المستخلص الكحولي للنباتات تأثيرا" على المستخلص المائي في تثبيط نمو الفطرين المذكورين . وبينت النتائج ان معاملة الفطرين بتركيز 20 و30% من مستخلص الكجرات الكحولي, و المائي واليوكالبتوس المائي والنعناع المائيِ لم ينتج سم الافلاB1, وكذلك معاملة الفطرين بتركيز 10% من مستخلص اليوكالبتوس المائي لم ينتج سم الافلاB1.

وبينت النتائج باستعمال كواشف كيميائية عدة ان المستخلصات النباتية المؤثرة حاوية على العديد من المركبات الفعالة , فقد احتوى المستخلص الكحولي للكجرات على جميع المركبات المدروسة ماعدا الصابونينات و الراتنجات, اما المستخلص المائي للكجرات فلم يحتوي على التانينات

و الصابونينات و الراتنجات , والمستخلص الكحولي لليوكالبتوس احتوى على جميع المركبات المدروسة ما عدا الترايتيربينويد , اما المستخلص المائي لليوكالبتوس فلم يحتوي على القلويدات

و الصابونينات و الراتنجات والفلافونيدات و الترايتيربينويد ,ولقد احتوى المستخلص الكحولي للنعناع على القلويدات و التانينات و الصابونينات والكاربوهيدرات و الترايتيربينويد , وانعدمت الصابونينات والكلايكوسيدات والراتنجات والفينولات و الترايتيربينويد في المستخلص المائي للنعناع .

تشير النتائج إلى كفاءة فاعلية الخميرة S.cerevisiae في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين

A. flavus و A.parasiticus ولقد بلغت نسبة التثبيط 100% للفطر A. flavus عند التركيزين 2 و 3 غم/لتر و91.66% عند التركيز 1 غم/لتر , و بلغت نسبة التثبيط للفطر A.parasitcus 75 % و 70.33%عند التركيزين 2 و 3 غم/لترعلى التوالي و 56% عند التركيز1 غم/لتر, اما بالنسبة لإنتاج سم الافلا B1 فقد اظهرت النتائج ان معاملة الفطر

A. flavusبالتراكيز1و2و3غم/لتر من مستخلص خميرة الخبز ادى الى عدِم انتاج سم الافلا B1 , في حين معاملة الفطر A.parasiticus بالتراكيز3, 2 و1 غم/لتر من مستخلص خميرة الخبز يؤدي الى انتاج سم الافلا B1 .

أظهرت نتائج دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus إن أفضل درجة حرارة لنمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus وانتاجهما سم الافلاB1 كانت 30 مْ اذ بلغ معدل اقطار مستعمرات الفطرين 9 سم . وجاءت في المرتبة الثانية درجة حرارة 20 م ه اذ بلغ معدل قطر المستعمرة للفطرين A.flavus و A. parasiticus 2.83 و 3.04 سم على التوالي وأدى ارتفاع أو انخفاض درجة الحرارة عن هذه الدرجة إلى انخفاض معدلات النمو الفطري, و عدم انتاج سم الافلاB1 عند درجة حرارة50 مْ لكلا الفطرين المدروسين , وكذلك عدم انتاج السم عند درجة حرارة 40 مْ

للفطر A.flavus .في حين ظهر سم الافلاB1 عند درجتي الحرارة 20مْ و30 مْ لكلا الفطرين وكذلك عند درجة حرارة 40 مْ للفطر A. parasiticus

كما أظهرت النتائج ان أفضل رقم هيدروجيني لنمو الفطرين A.flavus وA.parasiticus كانت عند 7.5 pHاذ بلغ معدل اقطار مستعمرات الفطرين A.flavus و6.29 A. Parasiticus و 6.50 سم على التوالي , ثم تلاه 9.5 pH اذ اظهر الفطرين A.flavus

وA. Parasiticus نموا جيدا اذ بلغ معدل قطر المستعمرة للفطرين 5.09 و 5.29 سم على التوالي, في حين لم يحدث أي نمو للفطرين عند pH3.5 اما بالنسبة لإنتاج سم الافلاB1 من قبل الفطرين A.flavus وA. parasiticus فقد ظهر سم الافلاB1 عند pH 5.5 و7.5و9.5.

وفيما يخص دراسة تأثير عامل الحركة على نمو الفطرين المذكورين فقد اوضحت النتائج الى ان هنالك اختلاف في الوزن الجاف للفطرين A.flavus وA. Parasiticus واثبتت ان ظروف الحضن مع االحركة المستمرة لمدة 3 أيام كانت الفضلى في زيادة الوزن الجاف للفطرين مقارنة مع ظروف الحضن بدون حركة اذ بلغ الوزن الجاف للفطرين A.flavus و A. Parasiticus عند الحضن مع الحركة 1.24 و 1.13غم على التوالي وبلغت 0.88 و0.83غم عند الحضن بدون حركة . وأشارت النتائج إلى أن للفطرين A. flavus و A. parasitcus المقدرة على انتاج مركبات فينولية عند تنميتها في وسط مستخلص البطاطا والدكستروز السائلPDB .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
1	المقدمة Introduction	1
2	استعراض المراجع Literature Review	4
1.2	سموم الافلا Aflatoxins	4
2.2	التأثيرات السمية للافلاتوكسينات	5
3.2	الخصائص التصنيفية والتشخيصية لشبه الجنس *Aspergillus*	7
4.2	الاهمية الاقتصادية والصحية لجنس *Aspergillus*	10
5.2	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاجهما للافلاتوكسين	12
1.5.2	نبات الكجرات *Hibiscus*	13
1.1.5.2	الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات	13
2.5.2	نبات اليوكالبتوس *Eucalyptus*	14
1.2.5.2	الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات	14
3.5.2	نبات النعناع *Mentha*	14
1.3.5.2	الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات	14
6.2	خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*	15
1.6.2	صفات ومتطلبات خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*	15
2.6.2	كفاءة الخمائر في تثبيط نموالفطريات والبكتريا المرضية	16
7-2	العوامل الفيزيائية المؤثرة في نمو وتجرثم الفطرين*A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاج ا لسموم الفطرية	17
1-7-2	درجة الحرارة	17
2-7-2	الرقم الهيدروجيني	17
3-7-2	الحركة	18
3	المواد وطرائق العمل	19
1-1-3	الأجهزة والمواد المستخدمة	19

2-1-3	المواد الكيميائية	20
3-1-3	المضادات الحيوية Antibiotics	21
4-1-3	الأوساط الزراعية المستخدمة	21
5-1-3	الصبغات والمحاليل المستخدمة	22
2-3	جمع العينات	22
1-2-3	عزل الفطريات	22
2-2-3	الكشف عن قابلية الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* لانتاج سم الافلا	23
3-2-3	الكشف عن سم الافلا B_1 للفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* باستعمال صفائح الكروموكرافيا الرقيقة (TLC)	24
3-3	العينات النباتية	25
1-3-3	جمع العينات النباتية	25
2-3-3	عملية الاستخلاص	25
3-3-3	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية	26
4-3-3	الكشوفات النوعية للمستخلصات المائية والكحولية الفعّالة	26
5-3-3	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاج سم الافلا B_1	29
6-3-3	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIT)	30
4-3	اختبار كفاءة خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين في الوسط الزرعي PDA	30
5-3	تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاج سم الافلا B_1	31
1-5-3	درجة الحرارة	31
2-5-3	الرقم الهيدروجيني	31
3-5-3	التهوية	31
6-3	الكشف عن وجود الفينولات في الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus*	32
7-3	التحليلات الإحصائية	33

4	النتائج والمناقشة	34
1-4	عزل الفطريات	34
2-4	قابلية عزلات الفطرين*A.flavus* و*A.parasiticus* لانتاج سم الافلا	36
3-4	كفاءة عزلتي الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* في إنتاج سم الأفلا B_1	37
4-4	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية	37
5-4	الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية	539
6-4	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus*	41
7-4	تأثيرالمستخلصات النباتية في إنتاج سم الافلا B_1من قبل الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus*	46
8-4	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)	47
9-4	تأثير خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* على معدل نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاج سم الافلاB_1	48
10-4	تأثير بعض العوامل الفيزيائية في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاج سم الافلا B1	51
1-10-4	تأثير درجة الحرارة	51
2-10-4	تأثير الرقم الهيدروجيني	53
3-10-4	تأثير التهوية	55
11-4	الكشف عن وجود الفينولات في الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus*	56
	الاستنتاجات	57
	التوصيات	58
	المصادر العربية	59
	المصادر الاجنبية	63

قائمة الجداول

التسلسل	عنوان الجدول	الصفحة
1	الخواص الفيزيوكيميائية للافلاتوكسينات	5
2	الأنواع النباتية والأجزاء المستعملة في الدراسة	25
3	العدد الكلي لمستعمرات الفطرين*A.flavus* و*A.parasiticus* المعزولين من عينات المواد الغذائية	34
4	النسب المئوية لتردد الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المعزولين من عينات المواد الغذائية	35
5	النسب المئوية لظهور الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المعزولين من عينات المواد الغذائية	35
6	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات المائية و الكحولية للنباتات قيد الدراسة	38
7	الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية الفعّالة	40
8	تأثير النوع النباتي ومستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة 27 ± 2 م°	44
9	تأثير النوع النباتي ومستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. parasiticus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة 27 ± 2 م°	45
10	تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من المستخلصات النباتية على انتاج سم الافل B1 بفعل الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* في وسط PDA	47
11	التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية الفعالة للفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus*	48
12	تأثير تراكيز مختلفة (غم/200لتر) من خميرة الخبز *S. cerevisiae* في معدل قطر مستعمرة (سم) للفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*	49
13	تأثير تراكيز مختلفة من خميرة الخبز*S.cerevisiae* في النسبة المئوية	50

	لتثبيط الفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* PDA	
14	تأثير تراكيز مختلفة من خميرة الخبز *S. cerevisia* على انتاج سم الافلا B_1 بفعل الفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* في وسط PDA	50
15	تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني في انتاج سم الافلا B_1 بفعل الفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* في وسط PDA	55
16	تأثير الحركة في معدل الوزن الغزل الفطري الجاف (غم) للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* على وسط PDB	56

قائمة الاشكال

التسلسل	عنوان الشكل	الصفحة
1	تأثير درجات الحرارة على معدل قطر المستعمرة(سم) للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus*	52
2	تأثير الرقم الهيدروجيني على معدل قطر المستعمرة(سم) للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus*	54

الفصل الأول

المقدمة

المقدمة

INTRODUCTIO

مـن المشـاكل الكبيـرة التـي تواجـه الانسـان تلـوث البيئـة بالفطريـات ، اذ تعمـل بعـض الفطريـات التـي تنمو بصـوره رميـة (Saprophyttic) علـى بعض المـواد الاوليـة لأطعمـة الانسـان علـى افـراز نـواتج ايضـية عليهـا والتـي تعـرف بالسـموم الفطريـة (Mycotoxin) (Bennett and Klich,2003) ، ومـن اهم هذه السموم الفطرية فعالية والاكثر انتشارا" سموم الافلا التي تمثل مركبات ايضية ثانوية مسرطنة وسامة تنتجها مجموعة من الفطريات أهمها *A. flavus* والذي ينتج كل من الافلا B_1 , B_2 والفطر *A. parasiticus* الذي ينتج اربعة من سموم الافلا والمتمثلةG_1,B_2,B_1 وG_2 (Shier *et al*.,2005) ، و من الفطريات الأخرى القادرة على إنتاج سم الافلا B_1 ولكن بكميات اقل هي *A. niger* ،*A. ruber* و *A. wentii* وكـذلك بعـض الأنـواع التابعـة للجـنس *Penicillium* والمتمثلـة بالفطريـات *P. citrinum*، *P. frequentans* و *P. puberulum* فضلا ً عن الفطر *Rhizopus spp*. (Wood,1998 ؛ Bothast *et al*.,1974). وأن الفطر *A . flavus* ينتج سم الأفلا B_1 بكميات كبيرة جداً مقارنةً بالفطريات الأخرى(Lillohoj *et al*.,1975), وكذلك يعدٌ من اكثر الانواع الفطرية وجودا" في الاغذية (Bennett and Klich,2003) .

عند تناول الاطعمة الملوثة بالسموم الفطرية من قبل الا نسان والحيوان يؤدي الى حدوث العديد من المشاكل الصحية متمثلة بالتسمم الكبدي والتسمم الكلوي والتسمم المناعي والتشوه الجنيني مؤديا" بذلك الى تأثيرات حادة ومزمنة للإنسان والحيوان تمتد الى اضرار في الجهاز العصبي المركزي والاوعية الدموية والجهاز التنفسي والقناة الهضمية وقد يؤدي الى الموت (Makun *et al*.,2010) .

هنالك العديد من الدراسات التي توصف سموم الافلا بأنها مسؤولة عن ظهور العديد من حالات التسمم الحادة في الإنسان ففي تايوان أدى تناول الرز الملوث بالأفلاتوكسين B_1 بكمية تقارب الـ 0.2 ملغم/كغم إلى ظهور عدة أعراض منها وذمة في الأطراف السفلى مع ألم في البطن و تقيؤ (Cocker *et al*.,1984 ؛روبرتس , 1990)، وفي العراق وجد السهيلي وآخرون (1982) تلوث بعض المواد الغذائية في الأسواق المحلية كتلوث طحين الحنطة والرز بمقادير عالية من سم الافلاB_1 في حين كانت محاصيل الحمص والذرة أقل تلوثا ، اما دراسة القزاز, (1986) فقد لاحظ تفوق الذرة الصفراء على الحنطة و الشعير

و البرغل و الجريش و الحبية في محتواها من سموم الأفلا B_1،B_2, وكان الفطر *A. flavus* من أبرز الفطريات المعزولة من هذه المواد .

لذلك كان لابد من حماية الانسان والحيوان من الاضرار الناتجة من هذه السموم وتأتي هذه الحماية بعدة طرق , منها الطرائق الفيزيائية كاستخدام الحرارة والتهوية والتعريض للأشعة فوق البنفسجية والتأين الاشعاعي , او الطرائق البيولوجية كاستخدام بعض انواع الاحياء المجهرية كالبكتريا والخمائر وبعض انواع الطحالب (Azab *et al.*,2005), او باستخدام بعض المواد الكيمياوية كالمعاملة بالأمونيا وبيروكسيد الهيدروجين والكبريتات وغيرها .وبالنظر لان الغالبية العظمى من هذه المواد الكيمياوية لها تأثيرات جانبية فقد تكون من المواد المسرطنة او السامة لذلك اصبح من الضروري ايجاد بدائل لهذه المواد الكيمياوية لذلك اتجهت الدراسات منذ زمن بعيد في العديد من دول العالم للكشف عن منتجات او مستخلصات نباتية تكون بديلا من المواد الكيميائية المصنعة (Cowan,1999).

هناك العديد من الدراسات التي استخدمت الطرائق السابقة , فقد وجد Soliman و Badeaa (2002) ان الزيوت المستخلصة من الزعتر والدارسين ثبطت نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* وانتاجهما للسموم . وكذلك استخدمت الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بتركيز 0.3% لإزالة سم الافلا B_1 بتركيز 2000 جزء بالبليون في علائق الدواجن الملوثة به (Al-Shanon,2001) , في حين أشار نعمة, (2011) إلى فشل الفطر *A.flavus* في النموو انتاج سم الافلا B_1 وB_2 عند 3.5 pH , اما 6.5 pH فقد اعطى اعلى معدل نمو للفطر اذ وصلت نمو المستعمرة 9 سم وكذلك زيادة انتاج سم الافلا لكلا النوعين .

ونظرا" للأهمية الاقتصادية للمواد الغذائية, واعتبارها المصدر الغذائي الرئيسي للإنسان , وامكانية احداثها تأثيرات ضارة من جراء تناول الانسان للمواد الغذائية الملوثة ببعض الانواع الفطرية وخصوصا" الفطريات المنتجة للسموم لذلك هدفت الدراسة الى امكانية استخدام بعض المستخلصات النباتية وخميرة الخبز وبعض العوامل الفيزيائية في قابلية الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* على النمو وانتاج سم الافلا B_1 وذلك من خلال المحاور التالية:

1- عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبعض المواد الغذائية كالشعير, الحنطة، الذرة الصفراء, الفاصولياء, فستق الحقل و زهرة الشمس.

2- اختبار مقدرة العزلات على انتاج سم الافلا B_1 .

3- اختبار الفعل التثبيطي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المجففة لكل من نبات الكجرات واليوكالبتوس والنعناع على معدل نمو اهم الفطريات المنتجة لسموم الافلا B_1 .

4- دراسة اختبار قابلية خميرة الخبز *S. cerevisiae* بالتأثير على معدل نمو الفطرين المدروسين وانتاج سم الافلا B_1.

5- دراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية كاستخدام درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والحركة على الفطريات المنتجة لسموم الافلا B_1 .

6- الكشف عن وجود الفينولات كيميائيا" في الفطريات المنتجة لسموم الافلا B_1 .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

2- استعراض المراجع Literature Review

2-1. سموم الافلا Aflatoxins

وهي مجموعة من المركبات غير البروتينية تعطي الواناً متألقة عند فصلها على صفائح الكروماتوغرافي وتعريض الصفائح الى الأشعة فوق البنفسجية فمنها ما يعطي تألقاً ازرقاً Blue ويظهر عند فصل كل من الافلاتوكسينات B_1 و B_2 ويعطي مركبان اخران تألقاً اخضراً Green أطلق عليهما بسم الافلا G_1 و G_2 اما الارقا 1 و2 فترمز الى معامل الترحيل Rate of flow (Rf) التي تظهرها البقع على صفائح TLC (Cocker *et al.*, 1984)، وشخص فيما بعد نوع اخر من سمو الافلا عرفت (Milk toxins) عزلت من حليب ابقار تغذت على علائق ملوثة بالفطريات المنتجة لسمو الافلا ، وشملت سمو الحليب على سمو الافلا M_1 وM_2 التي تمثل نواتج أيض كل من سم الافلاB_1 و B_2 (Forbish *et al.*, 1986), وتمتاز بذوبانها في الكلوروفورو والميثانول والداي مثيل سلفوكسيد (Meerdink,2004) .

ويعد الباحث Hartley واخرون (1963) اول من عزل واستخلص اربعة انواع من الافلاتوكسينات انتجت من قبل *A. flavus* و*A. parasiticus* بشكل بقع متألقة اطلق عليها G_2, G_1, B_2, B_1 , وتم تحديد الصيغة الجزيئية لمركبات سمو الافلا B_1 وG_1 من قبل Asaoa واخرون(1963) في حين حددت الصيغة التركيبية لسمو الافلا B_2 وG_2 من قبل Chang واخرون(1963) .

الافلاتوكسينات عبارة عن مشتقات لمركب Difuranocoumarin والذي يتكون من حلقتين مرتبطتين من Dihydrofuran والمندمجة مع جزيئة Coumarine (Bhatnagar *et al*.,2002) , والتي تظهر بشكل حلقات غير متجانسة واحتوائها على العديد من ذرات الاوكسجين (Younis and Malik,2003) .

درست سمو الافلا بشكل مستفيض وقسمت حسب درجة سميتها اعتمادًا على تركيبها الكيميائي وبنائها الجزيئي ، و يعد الأفلاB_1 أخطرها و أكثرها سميةً (Chang *et al*.,1963 ؛ Gold blatt,1969؛ Raper and Fennell,1965) بينما النوع M_1 هو اقل سمية بعشرة اضعاف من B_1 (Sudhakar *et al*.,2009).

بشكل عا تخضع معدلات إنتاج سمو الأفلا إلى تأثير عدة عوامل متمثلة بنوع الفطر , نوع العزلة , نوع الوسط الغذائي وتركيبه الكيمائي فضلا عن تأثير منافسة الأحياء الأخرى وتأثير الحرارة والرطوبة وكميتي الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكربون وغيرها من العوامل (Davis *et al*.,1966 ؛ Bullerman,1981) .

جدول (1) الخواص الفيزيوكيميائية للافلاتوكسينات(Jr, 2008 ; Buttinger, 2010)

نوع السم	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي	التوهج عند التعرض للـ (UV)	معامل الترحيل Rf
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312.3	Blue	0.88
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314.3	Blue	0.77
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328.3	Green	0.68
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330.3	Green	0.55
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328.3	Blue	-
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330.3	Blue	-

2-2. التأثيرات السمية لسموم الافلا The Toxic Effects Of Aflatoxins

لقد حظيت سموم الافلا باهتمام كبير من بين مجاميع السموم الفطرية بسبب تأثيرها الفعال على صحة الانسان والحيوان(Guzman-de-Pena and Pena-Cabriales,2005) , فضلاً عن انها من اكثر السموم الفطرية سيادة (Upadhaya *et al*.,1010) .

تعد سموم الافلا من السموم الحادة والمزمنة Acute and Chronic mycotoxicosis، فالحادة تؤدي الى تسمم بعض الاعضاء وخاصة الكبد ثم يتبع ذلك حالة مرضية اوتؤدي الى الموت , اما المزمنة تؤدي الى تكوين اورام سرطانية وضعف في الجهاز المناعي (Qazi and Fayyaz,2006).

أن من اخطر التأثيرات المرضية التي تحدثها سموم الافلا حالات السرطان , فقد ذكرت الوكالة العالمية لبحوث السرطان ان سم الافلا يحتل المرتبة الاولى من بين العوامل المسرطنة للإنسان (Gratz,2007) , إذ اكتشف هذا التأثير أثناء دراسات وبائية أجريت في بعض مناطق أسيا وأفريقيا ولوحظ الارتباط الكبير بين حالات السرطان المسجلة في الإنسان ومحتويات الغذاء من سموم الافلا (Cocker *et al*.,1984) . ويعد سم الافلاB_1 عاملا مسرطنا أشد قوة من سم الافلا G_1 وان كليهما يعدان أكثر فعالية في هذا المجال من سم الافلا B_2 (Benntt and Klich,2003).

أكدت العديد من الدراسات ان تعرض الانسان وحيواناته لسموم الافلا يؤدي الى أحداث امراض خطيرة منها تورمات في الاجهزة التناسلية والإجهاض والنزف الدموي والضعف العام مع تشوهات في الهيكل العظمي فضلاً عن تأثيراتها السامة على الحيوانات مثل انخفاض الإنتاجية وزيادة الاصابة بالأمراض الفايروسية والبكتيرية نتيجة لا ضعاف او تحطم جهاز المناعة (Bryden,1988 ؛ الهيتي ، 1992 ؛ Smith,1994) , على سبيل المثال في غرب الهند عام 1974 تسبب سم الافلا

بموت 100 شخص هندي والذي يعزى الى تسمم الكبد Hepatotoxin الناتج من تناول حوالي 6-2 ملغم من السم المتواجد في الذرة الصفراء يومياً (Benntt and Klich,2003) .

اما في كينيا فقد تم تسجيل وفاة 125 شخصاً عام 2004 بسبب تناولهم الذرة الملوثة بسموم الافلا (Lewis *et al.*,2005 ; Krishnamachari *et al.*,1975) , وتشير التقديرات إلى أن ما يقرب من 4.5 مليار شخص يعيشون في البلدان النامية يتعرضون الى الاصابة إلى حد كبير من الأفلاتوكسين الناتج من سوء في الحصانة والتغذية (Williams *et al.*,2004) .

ومن الناحية الوراثية فان لهذه السموم تأثيرات على المستوى الجزيئي ، فقد اشار Cocker واخرون,(1984) وسهلب وآخرون, (1990) ان سموم الافلا مسؤولة عن حالات تشوهات الأجنة (Teratogens) والطفرات الجينية (Mutagens) ، وذلك من خلال تثبيط بناء الحامض النووي DNA وكذلك تثبيط تصنيع الحامض النووي RNA ، فضلاً عن التأثيرات السمية على جينات الاستنساخ الأمينية ومن ثم تثبيط تكوين البروتين (Haworth *et al.*,1989) , كما وان سموم الافلا تؤدي الى حدوث تغييرات شديدة في المادة الكروماتينية ، وتسبب زيادة غير طبيعية في حجم النوية مع احتقان وعائي في النسيج البرنكيمي للكبد وكذلك تأثيرات على نسيج الكلية لدى الفئران البيض (الجميلي و ابو شبع ، 2005) .

تؤثر سموم الافلا على معايير الدم الفسيولوجية والكيموحيوية المتمثلة بأعداد خلايا الدم البيض وحجم الكريات المضغوط وكمية الهيموكلوبين فقد اشارت نتائج الدراسات التي توصل اليها Marin واخرون, (2002) الى ان لهذه السموم تأثيراً على معايير الدم الفسيولوجية اذ انها سببت ارتفاعاً في عدد خلايا الدم البيض ، فقد وجد ان اعطاء سموم الافلا الى الحيوانات المختبرية ادى الى ارتفاع في عدد خلايا الدم البيض وانخفاض في كمية الهيموكلوبين في كل من المجموعة المعاملة بعد 21 يوماً و بعد 42 يوماً بالمقارنة مع معاملات السيطرة وكذلك ادى الى انخفاض في مستوى كل من البروتين الكلي في البلازما (Total serum protein) والكوليسترول (Sakhare *et al.*,2007) أما الدراسة التي قام بها حمودي و الدوري, (2001) فوجد أن إعطاء علائق ملوثة بسم الافلا B_1 للدجاج و بنسب متزايدة أدى إلى حصول زيادة في معدلات أوزان الأعضاء الداخلية الطحال ، القلب ، المعدة و القانصة ، لكن هذه الزيادة كانت واضحة في وزن الكبد كونه أسرع الأجزاء تأثراً بالسموم الفطرية , وفي دراسة اجراهاMorehouse ,(1979) بين ان الاستهلاك القليل والمنتظم للافلاتوكسين يؤدي الى تحول بطيء للغذاء واكتساب وزن قليل للحيوان وانتاج قليل للحليب في الابقار.

كذلك وجدت سموم الافلا في حبوب مجموعة من المحاصيل والمواد الغذائية والأعلاف عند إصابتها بالفطريات المنتجة للسموم وأن أكثر المحاصيل تعرضاً لسموم هذه الفطريات هي الحنطة والشعير والذرة الصفراء والذرة البيضاء وذلك لاحتوائها على نسبة عالية من الكاربوهيدرات

(إبراهيم والجبوري ، 1998) , و في العراق وجد الهيتي, (1977) أن أعلى معدل إصابة في مخازن الذرة الصفراء هي بعزلات الفطر *A. flavus* وكانت معظمها منتجة لسموم الافلا B_1 و بكميات تراوحت بين 107- 700 جزء بالمليون, وكذلك وجد الفيصل, (2005) ان 0.11 ملغم من سم الافلا لكل كيلو من الحنطة المستخدمة لتصنيع الحبية والبرغل والجريش .

يتفاقم خطر سموم الافلا أثناء ظروف الخزن السيء المتمثلة بتوفر الرطوبة و الحرارة الملائمة للنمو ، إذ إن الفطر ينمو في مدى حراري واسع يتراوح بين 10–50 م° و أن ارتفاع رطوبة الحبوب ولاسيما في بداية التخزين يكون مشجعاً للنمو ، إذ وجد أن الفطر ينتج سموم الأفلا خلال يومين عند حرارة 25 م° و بمحتوى رطوبة للحبوب 30% ، و في عشرة أيام عند حرارة 21 م° و رطوبة حبوب 20% (Fennell and Lillehoj,1977 ؛ Thompson and Payane,1983) .

وبالنظر لخطورة هذه المركبات على صحة الإنسان والحيوان ولتقليل احتمالات التعرض لسموم الأفلا فقد وضعت مواصفات عالمية لا تسمح بتناول الغذاء من قبل الإنسان اذا كان ملوثا بأي جزء من الافلاتوكسينات في حين يسمح بتناول بعضها بوجود أجزاء منه في عليقة الحيوان (باقر ,1984) , اما المنظمة الامريكية لإدارة الغذاء والدواء FDA فقد حددت النسب المسموح لوجودها في أغذية الإنسان والحيوان من سموم الافلا , فقد سمحت بالحد 20 مايكروغرام /كيلو في الاغذية البشرية, اما في أعلاف الأبقار فقد سمحت بالحد 300 مايكرو غرام /كغم (Felicia,2004) , كذلك منع بيع المواد الغذائية بين الدول إذا تجاوز تلوثها بسم الأفلا مجموع 20 جزء في البليون أفلاتوكسين و 0.5 جزء في البليون بسم الافلا M_1 في الألبان. في حين وضعت المفوضية الأوروبية قيودا" على الفول السوداني يخضع لمزيد من المراقبة عند التجهيز اذ يمنع من البيع عندما تصل نسبة تلوثه 15جزء في البليون لمجموع الأفلاتوكسين ، وكذلك المكسرات والفواكه المجففة عندما تصل نسبة تلوثه 10 جزء في البليون لمجموع الأفلاتوكسين (Van Egmond and Jonker,2005).

3-2.الخصائص التصنيفية والتشخيصية لجنس *Aspergillus*

Diagnostic and classification characteristics of genes *Aspergillus*

يصنف جنس الـ*Aspergillus* الى الصنف Hyphomycetes ضمن العائلة Moniliaceae التابعة إلى رتبة Moniliales ، تتكاثر معظم هذه الفطريات لا جنسياً فقط ، وهنالك بعض الانواع تتكاثر جنسياً إذ تسلك سلوك الفطريات الكيسية Ascomycetes ويسمى الطور الجنسي بـEurotium بتكوين أبواغ كيسية Ascospores منتظمة داخل اكياس Asci وتكون الاخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل Cleistothecium

(Pitt and Hockin,1997؛ Chung -Kown and Bennett,1992) . وسمي الفطر بهذا الاسم لأن أنواعه تنتج أبواغها على شكل سلاسل تنشأ من تركيب مركزي بترتيب شعاعي يشبه مرشة الماء التي تدعى باللاتينية *Aspergillum* ومنها اشتق اسم الجنس *A.spergillus* (Chung - Kown and Bennett,1992)

يضم الجنس العديد من الأنواع إذ يبلغ عدد الأنواع المعروفة منه إلى أكثر من مئتين وخمسين نوعاً وتضاف بين الحين والآخر أنواع جديدة تسجل في مناطق مختلفة من العالم وهي أكثر انتشاراً في المناطق الحارة من الباردة (Geiser *et al*.,2008). وقد اكد Batista واخرون(2008) على ان بعضها تكون انتهازية ممرضة للإنسان كما في جنس *A.fumigatus* , وبعضها الاخر يفرز سمو الافلا مثل *A.flavus* و *A.parasiticus* و *A.nomius* , اما النوعين *A.oryzae* و*A.sojae* فقد استخدمت في عمليات التخمر .

تختلف انواع هذا الجنس في ما بينها من حيث قطر المستعمرة ولون الكونيدات والخيوط ولون المستعمرة بالإضافة الى الاختلافات في الخصائص المجهرية مثل حجم وشكل الحويصلات (Vesicles)والميتيولات (Metulae) والفياليدات(Phialides) والكونيدات (Conidia) (Jernejc and Cimerman,2001) .

تكون مستعمرات الفطر *Aspergillus* ذات الوان مختلفة تختلف بحسب لون الأبواغ منها الأبيض ، البني ، الأخضر ، الوردي ، الأزرق ، التبني ، الاسمر المائل الى الصفرة او الأسود (Chung -Kown and Bennett,1992) ، إما الغزل الفطري (Mycelium) للاسبرجلس يتميز بأنه غزير النمو، متفرع و مقسم داخلياً على خلايا و تحتوي كل خلية على عدد من الانوية تنتشر في السايتوبلازم الذي يحيط بفجوة عصارية و يوجد الغذاء المخزون داخل الخلية على هيأة حبيبات زيتية (أبو هيلة، 1987؛ الرحمة، 1998) , وعند نشوء الحوامل الكونيدية (Conidiophores) تتثخن بعض خلايا الخيط الخضري الموجود على سطح الوسط الغذائي وتصبح متميزة عن بقية خلايا الخيط الخضري ويطلق عليها الخلايا القدمية (foot cells) (Bennett,2009) , اي تنشأ الحوامل الكونيدية عمودياً من الخلية القدمية في الخيط الفطري، وتكون في جميع أنواع جنس الأسبرجلس غير متفرعة وغالبا" غير مقسمة ، عديمة اللون في جميع الانواع الممرضة، قد تحتوي على حاجز أو حاجزين في حالات نادرة، تكون الحوامل الكونيدية أسمك من الخيوط الخضرية، كذلك جدرانها أسمك من جدران الخلايا الخضرية، وتكون الحوامل البوغية ملساء في أغلب الأنواع الممرضة ما عدا *A.flavus* و *A.oryzae* و *A.avenaceus* (Conidial Head) (Chung -Kown and Bennett,1992)

.

تتسع قمة الحامل البوغي ليكون انتفاخا" يعرف بالحوصلة (Vesicle) والتي تتخذ أشكالاً مختلفة فمنها كروية وشبه كروية وإهليليجية ودورقيه (Flask-Shaped) أو صولجانية (Clavate) ، وتنشأ من سطحها التراكيب القارورية والتي تدعى بالخلايا المولدة للسبورات Phialides التي تكون على شكل صف واحد من الفياليد او صفين (السهيلي,1982; Bennett, 2009) , وهي عبارة عن تراكيب صغيرة قارورية الشكل يتراوح طولها بين 20-30 مايكروميتر و سمكها 5-10 مايكروميتر، أحادية أو متعددة الأنوية. تنشأ الكونيدات على قمتها بتعاقب قاعدي(Basipetal) بشكل سلسلة (Raper and Fennell,1965) ، يتضيق التركيب القاروري عند قمته مكوناً أنبوب إنتاج الكونيديا، تنقسم نواته انقساما خيطياً و تمر النواة البنوية عبر الأنبوب الكونيدي إلى نهايته المنتفخة بعض الشيء لتتكون الكونيديا، ثم ينشأ حاجز يفصل الكونيديا الأولى، و بالطريقة نفسها تتكون الكونيديا الثانية أسفل الأولى مباشرةً، و تستمر العملية إلى أن تتكون سلسلة من الكونيدات وتكون الأقد□ في القمة والاحدث في القاعدة . وقد تكون الأبواغ فيها كروية الى اهليجية الشكل ، نافرة جدًا للماء وتحمل بالهواء بسهولة بعد نضجها ، وتتباين الوانها من الغامقة الى الفاتحة (Kown and Bennett,1992- Chung؛ Pitt and Hocking,1997) .

يطلق على الحوصلة (Vesicle) ، التراكيب القاروريةPhialides)) وسلاسل الأبواغ (Conidial chains) الراس البوغي (Conidial head) . يتحدد شكل الرؤوس الكونيدية بشكل الحوصلة وترتيب التراكيب القارورية عليها ، إما لونها فيحدده لون الكونيدات التي تحملها ، ويعد كل من لون وشكل وحجم الرؤوس الكونيدية خصائص تصنيفية للأنواع التابعة لشبه الجنس *Aspergillus* (Raper وFennell, 1965). وهنالك بعض أنواع الجنس *Aspergillus* تنتج في طورها الجنسي اجساماً ثمرية كروية (Cleistothecia) ، وتختلف الأجس□ الثمرية في الحجم واللون من نوع الى أخر ، ويتكون الجسم الثمري من طبقة من الخلايا التي تكون مسطحة عادة ، وتدعى هذه الطبقة جدار الجسم الثمري ، ويضم في داخله العديد من الاكياس السبورية الذي يحوي كل منها على ثمانية أبواغ كيسية (Ascospores) (الشكري ، 1991) . وهذه الابواغ تكون عدسية الشكل محدبة من الجانبين تحتوي على أخدود محاط بحافات مثخنة، أغلب انواع هذا الجنس تكون سبوراتها شفافة ما عدا النوع *A. nidulans* الذي يقع طوره الجنسي ضمن الجنس *Emericella* حيث تكون ابواغه الكيسية حمراء إلى بنفسجية اللون (Chung - Kown and Bennett,1992؛ Al-Saadoon and Abdullah,2001) .

ولقد وجد في بعض أنواع جنس الأسرجلس مثل *A. flavus* ، *A. niger* ، *A. oryzae* ، *A. ochraceus* و *A. candidus* القدرة على تكوين تراكيب كبيرة نسبيًا غامقة اللون ، منفصلة

ومفردة تدعى الاجسا الحجرية (Sclerotia) وتتغاير الأجسا الحجرية في الشكل والحجم واللون ، لكنها جميعًا تتكون من خلايا مثخنة الجدران وعلى هيئة برنكيميا كاذبة Pseudo parenchyma (Chung -Kown and Bennett,1992) ، وتتكون هذه الأجسا عند حلول ظروف غير ملائمة لنمو الفطر (أبو هيلة، 1987 ; الرحمة، 1998) .

4-2 . الأهمية الاقتصادية والصحية لجنس *Aspergillus*

يمتاز جنس *Aspergillus* *بأنه* واسع الانتشار في الطبيعة وتعزى سعة انتشاره إلى الكميات الضخمة من الابواغ التي تكونها والتي تمتاز بأنها خفيفة الوزن وصغيرة الحجم والتي يسهل انتشارها بواسطة الريح وهي تتحمل الظروف البيئية القاسية من حرارة وجفاف وغير ذلك بالإضافة إلى قدرة الفطر الكبيرة على النمو في محاليل مركزة من السكريات والأملاح التي لا تستطيع أغلبية الفطريات الأخرى أن تنمو عليها (العروسي وآخرون ,2001 ؛ Klich,2006), وكذلك يستطيع النمو على أي وسط غذائي غير حي، و على جميع البقايا النباتية و الحيوانية الرطبة ، كذلك على الخضروات ، الفواكه ، اللحو و غيرها من المواد الغذائية أثناء تسويقها مسببة" تعفنها (الشكري،1991).

ان أنواع الجنس *Aspergillus* لها القابلية على إنتاج بعض السمو الفطرية (Mycotoxin) التي تسبب التسمم للإنسان والحيوان التي يتغذى عليها ومن أمثلة هذه السمو الـ Aflatoxin ذو التأثير المسرطن للكبد في الإنسان والذي ينتجه الفطر *A.flavus* و *A.parasiticus* عند نموها على ثمار الفول السوداني والحنطة والذرة والشوفان كما تسبب تلك السمو مشاكل صحية عديدة . (Klich,2007؛ Bennett and Klich,2003)

تسبب بعض انواعه امراضاً مختلفة للإنسان والحيوان ، ويطلق عليها مجتمعة أسم داء الرشاشيات (Aspergillosis) وهي تصيب الرئة وتشبه اعراضها اعراض التدرن الرئوي ، وتظهر هذه الامراض بكثرة على الطيور، ولكنها تصيب ايضاً الماشية والأغنا ، والخيول وتصيب الانسان في حالات نادرة ، وتتطفل بعض انواعه على بشرة الأنسان مسببة لها امراضاً تسمى بالأمراض الفطرية Mycosis (الشكري ، 1991) .

كما ان الفطر*A.flavus* يتسبب في أحداث نقص للحبوب وموت الأجنة لها وبخاصة الذرة الصفراء وفستق الحقل والرز والقمح ، و يسبب الفطر*A.flavus* سمية الحبوب و الأعلاف اذ ينتج سم الأفلا، فالحبوب والأعلاف الملوثة بهذه السمو تنجم عن تناولها أمراضٌ سرطانية و حالات من التسمم تأخذ أشكالاً مختلفة ، كما تتلف بعض أنواعه الجلود ،الملابس و الأوراق إذا تعرضت إلى رطوبة و حرارة ملائمة لنمو الفطر، و ذلك يقلل بطبيعة الحال من قيمتها الاقتصادية و تضفي على الملابس و الأحذية رائحة العفن، كما تسبب بعض الأنواع سمية الحبوب و الأعلاف كما في الفطر *A.flavus*

الذي ينتج سم الأفلا،وكذلك الفطر *A.ochraceous* الذي ينتج سم الأوكراتوكسين Ochratoxin (الشكري،1991).

ففي تايوان وجد Tseng و اخرون, (1995) أن أنواع جنس الأسبرجلس هي من أكثر الفطريات الملوثة لحبوب الفاصوليا في المخازن ، فقد تبين من خلال الفحص أنها ملوثة بسمو الأفلا B_1، B_2، G_1 و G_2 و بتراكيز 0.23 , 0.16, 0.37 و 0,72 مايكرو غرا/كغم على التوالي ,

اشارت دراسات الجراح ,(1988) الى إصابة محاصيل الفاكهة المخزونة بالفطر *A.flavus* وكانت أربع عزلات من مجموع تسع عزلات قادرة على إنتاج سمو الافلا B_1 بنسبة 44.4 % في كل من العرموط والرمان, و وجد الجميلي, (1996) أن نسبة إصابة فستق الحقل بالفطر *A.flavus* كانت 16.6 % بعد ستة أشهر من التخزين وكمية الافلاتوكسين المنتجة تقدر ب50 مايكروغرا /كغم. اما نسبة الظهور للفطر *A.parasiticus* فكانت 100% في عينات اللوبياء البيضاء والباقلاء الحمراء والحمص المجروش والسباكيتي التركي والشعرية العراقية والسورية والايرانية والكاجو واللوز(الساعدي,2012) .

أشار الورشان وآخرون (2002) إلى أن أكثر الفطريات الملوثة للفواكه المجففة العنب والمشمش والتين والخوخ هي انواع جنس *Aspergillus* تليها انواع جنس *Penicillium* ثم *Rhizopus* , كما وجد أن 80% من عزلات الفطر *A.flavus* و50% من عزلات الفطر *A.parasiticus* هي منتجة للافلاتوكسين B . في حين اشارت دراسة الساعدي ,(2012) الى ان عزلات الفطر *A.parasiticus* التي مصدرها الذرة الصفراء (مستوردة من تركيا) أعلى مقدرة في إنتاج سم الافلا B_1 وبنسبة 50% في حين أن عزلات الفطر المعزولة من الرز كانت الأعلى مقدرة في إنتاج سمو الافلا B_1 وB_2 وبنسبة بلغت 33.3% .

لبعض انواع جنس *Aspergillus* قدرات إنزيمية ذات فعالية عالية تمكنها من تحليل المركبات الكربوهيدراتية المعقدة وتحويلها إلى سكريات بسيطة ,لذا يستفاد منها في الحصول على بعض الأنزيمات والكحولات والأحماض العضوية بصورة تجارية كما تستخدم أيضا في إنتاج أنواع معينة من المضادات الحياتية مثلFungallin, Flavicin, Aspergillin وGeodin (أبو هيلة ,1987) , كما استعملت بعض أنواع *Aspergillus* في إنتاج الدهون والفيتامينات مثل فيتامين B واستخدم الفطر *A.oryzae* للحصول على نوع معين من الكحولات يعرف لدى الصينيين بالساكي (Saky) , واستخدم في صناعة Diastase .(ألشكري ,1991؛ Wood,1998). كما أنّ بعض أنواع الجنس *Aspergillus* لها القابلية على تحطيم بعض المركبات مثل الدهون والزيوت والكيراتين والكايتين ولذا تكون هذه الفطريات لها القابلية على تجهيز الغذاء لعديد من الأحياء المجهرية الموجودة في التربة . (Carroll and Wicklow,1992)

2-5. تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* وإنتاجهما للافلاتوكسين

Effect plant extracts plants in growth *A. flavus* and *A. parasiticus* and production aflatoxin

لقد اجريت العديد من الدراسات التي تشير الى فعالية المستخلصات النباتية تجاه نمو الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* وانتاج سمو الافلا , ومنها دراسة العاني ,(1998) فقد وجد ان مستخلص الكحول الاثيلي لبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* يمتلك فعالية تثبيطية اعلى من المستخلص المائي للنبات تجاه نمو الفطر *A. flavus* ، في حين وجد محمد ,(1999) ان مستخلص النعناع الكحولي(*Menth sp.*) قد ثبط نمو الفطر*A.flavus* تثبيطا" تاما" عند التركيز 12.5 %, وفي دراسة اخرى وجد نعمة ,(2011) ان المستخلص المائي والكحولي لنبات الكركم(*Curcum longa*) والزعتر(*Thymus vulgaris*) القابلية على تثبيط انتاج سم الافلا B_1 وB_2 للفطر *A.flavus*, ولقد اوضحت دراستي Bullerman واخرون,(1977) ; Hitokoto واخرون,(1978) تأثيرا مثبطا للفطرين*A. flavus* و *A. parasiticus* وانتاجهما للافلاتوكسين باستخدا مستخلص قلف نبات الدارسين(*Cinnamonum cassia*)ومستخلص الفلفل (*Capsicum*). وفي دراسة اخرى وجد Rizki واخرون,(1997) ان مستخلص الكحول الاثيلي لنبات (*Trachspermum ammi*) يمتلك فعالية تثبيط تجاه الفطر *A. flavus* .

واشارت نتائج ياسين واخرون (2012) الى ان للزيت العطري لنبات اكليل الجبل (*Rosmarinusofficinalia*) تاثيرا" مضادا" لنمو الفطر *A. flavus* , اما دراسة عبد اللطيف (2009) اشارت الى استعمال الخلاصة الكحولية لأوراق اكليل الجبل كأحد المبيدات الطبيعية لحماية المحاصيل المختلفة من السم الفطري الافلا B_1 المفرز من قبل الفطر *A. flavus* .

لقد اشار Pundri وJain(2010) الى ان مستخلص الكحول الاثيلي لنبات القرنفل *Zyzygium aromaticum)* يمتلك فعالية تثبيط تجاه نمو مايسيليو الفطر *A. flavus* , في حين ان دراسة Tantaauiو Beraoud ,(1994) اوضحت تأثير عدة انواع من الزيوت الطيارة منها الزيت الطيار لنبات الدارسين والزعتر(*Thymus vulgaris*) والكمون *(Cuminum cyminum)* التي ثبطت نمو الفطر *A. parasiticus* بتركيز 0.1% من الوسط الزرعي بينما ثبطت الزيوت الطيارة لكل من الكركم(*Curcum longa*) والليمون (*Citrus spp.*) نمو الفطر كليا عند تركيز 1% من الوسط الزرعي ، اما الزيوت الطيارة لكل من الكزبرة *Coriandrum sativum* والفلفل الاسود *Piper nigrum* والحصالبان قد ثبط نمو الفطر بين 0.2 – 1% من الوسط الزرعي وهذه الزيوت

فعالة ايضا في تأثيرها على انتاج الافلاتوكسين وفعالة في تثبيط عملية تخليق الافلاتوكسين اكثر من فعاليتها ضد نمو الفطر, وقد وجد Soliman وBadeaa ,(2002) ان الزيوت المستخلصة من الزعتر والدارسين ثبطت نمو الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* وانتاجهما للسموم . وفي دراسة Hasan وAbdelsater ,(1993) في مصر التي تناولت تأثير الشاي الاسود *Camellia sinensis* وجدت فعالية تثبيط لمستخلص هذا النبات في نمو الفطر *A. flavus* وانتاجه للافلاتوكسين عند اضافته الى مرق البطاطا والدكستروز.

واشارت دراسة العواد ,(2001) تأثير مستخلص الهكسان لبذور نبات الكتان *Linum usitatissimum* تجاه الفطر *A. flavus* اذ لم تظهر فعالية تثبيطية تجاه نمو الفطر, كما اوضحت دراسة القيسي, (2004) تأثير المستخلصات القلويدية الخام لنبات خناق الدجاج *Zygophyllum fabago* في نمو الفطر *A. flavus* وانبات ابواغه، اذ اظهرت التراكيز المختلفة للقلويدات تأثيرا مثبطا لنمو مستعمرات *A. flavus* بزيادة التراكيز وصولا الى التثبيط التام عند التراكيز 70،60ملغم/مل، كما اظهر المستخلص القلويدي فعالية تثبيط تامة لإنبات ابواغ الفطر عند التراكيز 60، 70و 80 ملغم / مل واخرت التراكيز الاقل من ذلك انبات الابواغ .

2-5-1.نبات الكجرات *Hibiscus*

2-5-1-1. الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات

General describe and chemical components for plant

يُعد نبات الكجرات(*Hibiscus sabdariffa* L.) من النباتات الطبية التي تنتمي الى نباتات العائلة الخبازية (Malvaceae) وهي مجوعة من النباتات واسعة الانتشار تضم حوالي82 جنسا و1500نوعاً (Ajithadoss *et al*.,2006). و نبات الكجرات نبات شجيري قائم يصل ارتفاعه إلى مترين ، الجذر منه يكون وتدي ، الأزهار تكون ابطية، الأوراق العليا مفصصة ، (حسين ، 1981) ،كما أنه يعد من المحاصيل الصيفية إذ تزرع بذوره خلال شهري اذار ونيسان ويباشر بجني الثمار خلال شهر تشرين الأول ويستمر الجني حتى نهاية كانون الثاني (موسى ,1999) .

تعدُ الاوراق الكاسية(calyxes) لنبات الكجرات من الاجزاء المهمة والغنية بالمواد الكيميائية (المواد الفعالة) اذ تحتوي على ماء, بروتينات, دهون, كاربوهيدرات, الياف fibres, رماد ,Niacin,Riboflavin,Thiamine,Carotene, فيتامين(C) ascorbic acid وعناصر معدنية مثل الكالسيوم Ca , الفسفورP والحديد Fe(Mahadevan *et al*.,2009).

2-5-2.نبات اليوكالبتوس *Eucalyptus*

2-5-2-1. الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات

General describe and chemical components for plant

يعود نبات اليوكالبتوس الى جنس Eucalyptus الى العائلة الاسية (Mytaceac) إذ يحتوي هذا الجنس على 500 نوع تتراوح بين الاشجار والشجيرات(Chakaravarty, 1976). وان اول من قام بتشخيص ووصف نبات اليوكالبتوس هو عالم النبات الفرنسي L'Heritier في سنة 1788 , ويطلق عليه كافوراوسرول (المنظمة العربية للتنمية الزراعية , 1988) , وأن كلمة *Eucalyptus* ذات أصل إغريقي تعنيeucalyptos أي الغطاء الواسع (Trivedi و Hotchandani,2004) تنتشر زراعة أشجار اليوكالبتوس في آسيا وأستراليا ومعظم البلاد العربية. (Chakravrty,1976).

تحتوي أوراق نبات اليوكالبتوس على زيت طيار (Volatil oil) ويتم الحصول عليه بوساطة عملية التقطير البخاري من الاوراق الطازجة أو الفروع النهائية الطازجة(Indian pharmacopeia,1996) , إذ تتراوح نسبة الزيت بين 4-5% (حسين,1981) ، إن أوراق نبات اليوكالبتوس المجففة المستعملة في مجال الطب تحتوي على 2% زيوت طيارة مكونة بشكل اساسي من أكثر من 60 % من 1,8-cineol الذي يسمى eucalyptol وهو المكوّن الفعال والمسؤول عن المفعول الطبي للزيت (Bruneton,1955) ،. كما يحتوي اليوكالبتوس على زيت الكافور (Camphore) (محمد،1985).

2-5-3.نبات النعناع *Mentha*

2-5-3-1. الوصف العام والمكونات الكيميائية للنبات

General describe and chemical components for plant

يعود نبات النعناع الى العائلة الشفوية Labiateae التي تضم 2000 – 5000 نوعاً" فأغلب أنواع هذه العائلة تنتج الزيوت الطيارة بشكل تربينات. ويعد جنس النعناع *Mentha* من أهم الأجناس. إذ يضم هذا الجنس 25 – 30 نوعاً" وتتباين أهمية أنواعه ما بين تجاري وطبي , واغلب أنواعه تتكاثر خضريا عن طريق تكوين المدادات(Stolons) وكذلك عن طريق الجذير(Sucker) (Gershezon *et al*.,2000) .

يحتوي النعناع على زيت طيار نسبته 1% يعرف بزيت النعناع(Peppermint oil) له رائحة مميزة وطعم حاد ويتكون من حوالي50 - 78 % من المنثول Menthol والمنثون Menthone فضلاً عن تربينات أخرى مثل بينين Pinene وفيلاندرين Phelleudrene وليمونين Limonene

وقليل من الراتنجات Resins وتانينات Tannins (أبو زيد، 1988) ومواد دباغيه وعناصر حرة (Edinger,1973) و acetate ، Tocopherols، choline و carotenoids (Murray,1995).

6-2. خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

1-6-2. صفات ومتطلبات خميرة *S. cerevisiae*

Characterizes and requirements yeast *S. cerevisiae*

تنتمي الخميرة *S.cerevisiae* الى صنف الفطريات الكيسية Hemiascomycetes، ورتبة Endomycetales وعائلة Saccharomycetaceae جنس Saccharomyces نوع cerevisiae ،ويمتاز هذا الصنف بتكوين سبورات جنسية داخل كيس أما الخلايا الخضرية فقد تكون بيضوية أو دائرية أو مخروطية أو متطاولة مفردة أو بشكل أزواج أو قد تترتب بشكل مجاميع صغيرة (1984,Atlas ;1996,Alexopoulos) . يحدث التكاثر الخضري بعملية التبرعم Budding وقد تبقى البراعم متصلة بالخلية ألا فتظهر بشكل مايسيليو كاذب اما المايسيليو الحقيقي فلا يتكون مطلقا (Laskin and Lechevalie,1978؛ Lodder,1974) , اما التكاثر الجنسي فيحدث عن طريق الاقتران بين خليتين خضريتين ومن ثم يتكون الكيس Ascus الذي يحتوي على 1-4 سبورات كيسية (Guth *et al.*,1972) .

استعملت خميرة *S. cerevisiae* في العديد من البحوث لسهولة التعامل معها وقدرتها على النمو في رقم هيدروجيني واسع المدى اذ يعد الرقم الهيدروجيني 4.5 - 4 هو الافضل لها , وكذلك تنمو في الظروف الهوائية واللاهوائية إلا إن النمو في الظروف اللاهوائية اقل سرعة منه في الظروف الهوائية (Frazier وWesthoff, 1988) . تنمو خميرة *S. cerevisiae* بصورة جيدة بدرجة حرارة 37 وتتراوح درجة الحرارة المثلى لها بين 25 – 30 (1971,Stokes). للخميرة دور مهم في ايض السكريات إلى غاز ثنائي اوكسيد الكربون CO_2 وماء H_2O في الظروف الهوائية أما في الظروف اللاهوائية فتؤدي إلى إنتاج الكحول الاثيلي نتيجة تخمرات السكر, وتكون الطاقة المنتجة في الظروف الهوائية أكثر من تلك المنتجة في الظروف اللاهوائية (Suomalainen and Oura,1971) .

2-6-2. كفاءة الخمائر في تثبيط نمو الفطريات والبكتريا المرضية

Yeast efficiency inhibition growth fungi and pacteria

تستخدم الخمائر القاتلة في مجال السيطرة او المكافحة الحيوية (Biological Control) ضد الفطريات الممرضة للنبات وكذلك تستخدم في عمليات حفظ الاغذية والاعلاف (Palpacelli *et al.*,1991) فضلاً عن استخدامها في المجال الطبي والعلاجي فقد استخدمت كمواد مضادة للفطريات او في معالجة اصابات الانسان والحيوان المتسببة عن الفطريات المرضية. ولقد أكد كل من Polonelli واخرون(1991) و Graeme واخرون(1995) على قدرة سلالات الخميرة على تثبيط نمو كل من الخمائر الممرضة للانسان مثل *Candida albicans* و *Candida flabrota* وكذلك *Cryptococcus* وعفن الـ *Trichophyton* , كما اشاروا الى قدرة هذه الخميرة على تثبيط نمو الفطريات المسببة للامراض النباتية وتحلل الفواكه والخضروات مثل *Fusarium equiseti* و *Botrytis faba* و *Phoma foveata* و *Botrytis cinerea* في حين دراسة Attyia وYoussry (2001) اكدت على ان لخميرة الخبز القدرة على تثبيط النمو الفطري لكل من *Macrophomina phaseolina* و*Fusarium solani* على الاوساط الغذائية في المختبر . كما ان التركيز المطلوب من خميرة الخبز لتحقيق نسبة التثبيط 50% ضد الفطر *Fusarium.oxyprum* هو 6.35 غم/لتر (Shalaby and El-Nady,2008) , اما دراسة صالح واخرون (2009) اثبت ان خميرة الخبز تعد عامل مكافحة احيائية ضد الفطر *Macrophomina phaseolina* حيث بلغت النسبة المئوية للتثبيط 45.4 و64.8 % عند التركيزين 2 و5 على التوالي .

وصفت خميرة *S. cerevisiae* حديثاً كعلاجاً ناجحاً للأشخاص المصابين بالإسهال الحاد المتسبب عن بكتريا *Clostridium difficile* من الذين لم يستجيبوا للعلاج التقليدي بالمضادات الحيوية فقد لوحظ عودة المرض لدى اكثر من 20% من المعالجين بالمضادين الحيويين Vancomycin و Metronidazole (Schellenberg *et al.*,1994) .

كما أن للخمائر قدرة على تثبيط او معادلة فعل السموم المنتجة من قبل بكتريا *E. coli* وكذلك سموم *Vibrio cholera* (Dias *et al.*,1995؛Vidon *et al.*,1986), واستخدمت الخميرة *S. cerevisia* بتركيز 0.3% لإزالة سم الافلا B_1 بتركيز 2000 جزء بالمليون في علائق الدواجن الملوثة به (Al-Shanon,2001) .

2-7. العوامل الفيزيائية المؤثرة في نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasitcu* وانتاج السموم الفطرية

Effect physical condition in growth *A.flavus* and *A.parasitcus* and production Mycotoxin

2-7-1. درجة الحرارة Temperature

تعد درجة الحرارة من العوامل البيئية المهمة المؤثرة في معدل نمو الكائن الحي وتكاثره وإن حدوث أي تغير في درجة الحرارة يؤدي الى اختلاف في نمو الفطر (Pardo *et al.*,2005 ; Meier *et al.*,2010)، يمتاز الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* بكونهما من الفطريات التي تنمو في درجات حرارية معتدلة ومتماثلة ولهما مدى مُعيّن من درجات الحرارة يتراوح ما بين 12-41 □ غير ان الدرجة الحرارية المثلى للنمو تتراوح بين 25-32 □ , اما بناء سم الافلا يزداد عند درجة حرارة اكثر من 27□ , اذ وجد ان انتاج سم الافلا B_1 يزداد عند درجة حرارة يتراوح بين 24-28□ , اما درجة حرارة 23□ هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج سم الافلا G (Agag,2004) . كذلك أشار نعمة ,(2011) الى ان درجة حرارة 55□ لم تعط نموا" للفطر *A. flavus* في حين ان درجتي الحرارة 15و45□ اعطى نسبة متقاربة حيث وصلت قطر المستعمرة الى 3.2 و2.93 سم على التوالي , اما درجتي الحرارة 25 و35□ فقد اعطى قطر مستعمرة 9 سم للفطر.

2-7-2 .الرقم الهيدروجيني PH

يعد الرقم الهيدروجيني من العوامل البيئية المؤثرة وبشكل واضح على الكائنات الحية، إذ ان الاحياء والخلايا الحية بشكل عا□ تتحمل مدى واسع من الرقم الهيدروجيني في البيئة المحيطة به قياساً بالعمليات الخلوية التي تكون حساسة لأي تغير في الرقم الهيدروجيني ويتأثر نمو الفطريات بالرقم الهيدروجيني لوسط النمو وإن أفضل رقم هيدروجيني من 5-6 (Williams and Wilson,1975). فقد أشارت بعض الدراسات إلى فشل الفطر *A.flavus* في النمو وانتاج سم الافلا B_1 وB_2 عند 3.5 pH , اما 6.5 PH فقد اعطى اعلى معدل نمو للفطر اذ وصلت نمو المستعمرة 9 سم وكذلك زيادة انتاج سم الافلا لكلا النوعين (نعمة, 2011). كما ذكر Shafique واخرون(2009) ان الفطر *A.flavus* ينمو بين مدى PHيتراوح بين 4.5-6.5 . ينمو الفطر *A. parasiticus* في مدى واسع من الاس الهيدروجيني مع نمو امثل يحدث في pH مقداره 4.0-5.o (Lie و Marth ,1968) , اما إنتاج السم يقل في الفطر *A. parasiticus* كلما زاد الرقم الهيدروجيني للوسط (Keller *et al.*,1997) .

3-7-2. الحركة Movement

تعدُ الفطريات من الكائنات عالية الاحتياج من الأوكسجين واللازم للنمو الخضري و التجرثم وتكوين الجراثيم بشكل كبير. كما تتباين الفطريات في قدرتها على تحمل تركيزات عالية من ثنائي أكسيد الكربون, وأن معظم الفطريات لا تستطيع النمو إلا في وجود 1-2% أوكسجين على الأقل. و عموما فإن تقليل تركيز الأكسجين يعمل على نقص إنتاج سم الأفلا, و يكون النقص واضحا عندما يقل تركيز الأوكسجين إلى 1% مع زيادة ثنائي أكسيد الكربون إلى 80%, ولقد وجد أحد الباحثين أن إنتاج سم الأفلا من فطر *A. falvus* قد انخفض بشدة مع انخفاض تركيز الأوكسجين من 5% إلى 1% وزيادة تركيز ثنائي أكسيد الكربون من 0.03إلى 100% (Asker,2004) .

واشار سرحان,(2012) الى ان نمو الفطريات يزداد عموما" بزيادة الحركة وان تنمية الفطريات في المزارع الهزازة يكون اكبر مما هو في المزارع الساكنة لان عملية التحريك او الهز(Shaking) توفر ما يحتاجه الفطر من الاوكسجين لنموه ولفعالياته الايضية, فقد وجد ان الوزن الجاف للفطر*Penicillum expansum* المنمى في مزرعة هزازة يكون اكبر مما هو في المزرعة الساكنة في جميع مراحل النمو.

كما تباينت الحاجة للتهوية في إنتاج الإنزيمات، إذ وجد ان الفطر *Stachybotrys atra* يحتاج لتهوية معتدلة لإنتاج انزيم السليليز Cellulase. في حين لا ينتج الفطر *A. foetidus* انزيم Pectinase في ظروف هوائية نتيجة المزج (الدليمي، 2002). وتختلف الحاجة للمزج والتهوية ما بين الاحياء المجهرية والفطريات والبكتريا إذ ان الفطر *Mucar canis* تتطلب تهوية بمعدل سرعة مزج 150دورة/دقيقة لإنتاج انزيم الكيراتينيز(Lee *et al*.,1987) . في حين البكتريا الخيطية *Streptomyces folbidoflavios* تتطلب تهوية شديدة مقدارها 500 دورة/دقيقة لإنتاج انزيم الكيراتينيز(Bressollier *et al*.,1999).

الفصل الثالث

المصادر

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1. الأجهزة والمواد

3-1-1. الأجهزة Instruments

استعملت كل من الأجهزة الآتية:

ت	الجهاز	العلامة التجارية	البلد المصنع
1	ميزان Balance	Sartorius	المانيا Germany
2	ميزان حساس Analytical Balance	Metterler	سويسرا Switzerland
3-	فرن كهربائي Electrical oven	Memmert	المانيا Germany
4-	مقياس الرقم الهيدروجيني pH Meter	Gallenkamp	انكلترا England
5-	مؤصدة Autoclave	Hirayama	اليابان Japan
6-	حاضنة Incubator	Memmert	المانيا Germany
7-	حاضنة هزازة Shaker Incubator	National	اليابان Japan
8-	مطحنة Blender	Taurus	اسبانيا Spain
9-	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus	اليابان Japan
10-	كابينة اشعة فوق البنفسجية UV. viewing cabinet	Hermannpaulser	المانيا Germany
11-	مازج Vortex mixer	Griffin	انكلترا England
12-	غرفة تعقيم Laminar flow	Kottermann	انكلترا England
13-	خلاط كهربائي Warring Blender	Kottermann	اليابان Japan
14-	حمام مائي هزاز Shaker Water bath	Grant	انكلترا England
15-	وعاء الفصل TLC Jar	Gallenkamp	انكلترا England
16-	Thin layer chromatography plates	Memmert	المانيا Germany
17-	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hettich/ *EBAZO*	المانيا Germany

2-1-3 .المواد الكيميائية Chemical substances

ت	المادة	العلامة التجارية	البلد المصنع
1	كلوريد الصوديوم $NaCl$	BDH	انكلترا England
2	ايثانول C_2H_5OH	BDH	انكلترا England
3	حامض الهيدروكلوريك HCl	BDH	انكلترا England
4	هيدروكسيد البوتاسيوم KOH	Oxide	انكلترا England
5	خلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$	BDH	انكلترا England
6	كلوروفورم $CHCL_3$	Fluka	سويسرا Switzerland
7	يوديد البوتاسيوم KI	Sigma	امريكا U.S.A.
8	هيدروكسيد الصوديوم $NaOH$	BDH	انكلترا England
9	سكروز $C_{12}H_{22}O_{11}$	Fluka	سويسرا Switzerland
10	كبريتات النحاس المائية $Cu\ SO_4\ .\ 7H_2O$	Fluka	سويسرا Switzerland
11	كلوريدالزئبقوز Hg_2Cl_2	BDH	انكلترا England
12	كلوريد الحديديك $FeCl_3$	BDH	انكلترا England
13	كلوريد الزئبقيك $Hg\ Cl_2$	BDH	انكلترا England
14	كليسرول $C_3H_8O_3$	Oxoid	انكلترا England
15	امونيا NH_4	BDH	انكلترا England
16	ميثانول CH_3OH	BDH	انكلترا England
17	ملح روشل Rotchell Salt	Sigma	امريكا U.S.A.
18	حامض الكبريتيك H_2SO_4	Merk	المانيا Germany
19	الفا- نفثول $C_{10}H_9OH$	Fluka	سويسرا Switzerland
20	يود I	Fluka	سويسرا Switzerland
21	بلورات الفينول C_6H_5OH	Sigma	امريكا U.S.A.
22	كحول البروبانول Propanol cohol	BDH	انكلترا England

3-1-3. المضادات الحيوية Antibiotics

1- كلورامفينكول Chloramphenicol

استخدم هذا المضاد الحيوي المجهز من معمل ادوية سامراء – العراق , كمضاد واسع الطيف ضد البكتريا وبتركيز 250 ملغم/لتر.

2- كلوتريمازول Clotrimazole

استخدم هذا المضاد الحيوي المجهز من معمل ادوية الشهاب - سوريا , كمضاد واسع الطيف ضد الفطريات وبتركيز 2 ملغم/مل.

3-1-4 . الاوساط الزرعية المستخدمة

1 - وسط أكار مستخلص البطاطا والدكستروز السائل Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط الجاهز في لتر من الماء المقطر وحسب تعليمات الشركة. استعمل هذا الوسط لتنمية الفطرين *A. flavus* و*A. parasiticus* وفحص حساسيتهما تجاه المستخلصات النباتية المدروسة وبعض العوامل الفيزيائية.

2- وسط مستخلص البطاطا و الدكستروز Potato Dextrose Broth (PDB)

حضر حسب □ريقة Collee واخرون (1996) وذلك بأخذ 200غم من البطا□ا بعد غسلها وتقطيعها إلى قطع صغيرة وضعت في إناء زجاجي ثم أضيف إليها لتر ماء مقطر, وغليت لمدة 20 دقيقة وبعدها رشحت بوسا□ة قطعة شاش نظيفة ثم أضيف إلى الراشح 20غم من سكر الدكستروز وعقم بجهاز المؤصدة لمدة 20 دقيقة بحرارة 121مْ تحت ضغط 1.5جو, واستعمل الوسط في فحص حساسية الفطرين لعامل الحركة واستخلاص المركبات الفينولية .

3- وسط أجار مستخلص جوز الهند Coconut Extract Agar (CEA)

حضر الوسط بأخذ 100 غم من جوز الهند المبروش والمتوافر تجارياً في الاسواق ثم أضُيف اليه 300 مل من الماء المقطر وسخن المزيج لمدة 20 دقيقة ، بعدها رشح المزيج بواسطة قطعة قماش نظيفة (الشاش) واضيف للراشح 2% أجار واكمل الحجم الى 300 مل من الماء المقطر (Lin and Dianese,1976)،عقم الوسط بالأسلوب نفسه الوارد في الفقرة السابقة. استعمل الوسط في الكشف عن مقدرة عزلات الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* على انتاج سموم الافلا .

3-1-5. الصبغات و المحاليل المستخدمة

1- صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين Lactophenol – Methylen blue stain

حضرت هذه الصبغة من المواد الآتية (Ellis , 1994):

- المثيلين الأزرق 0.05 غم
- بلورات الفينول 20 غم
- حامض اللاكتيك 20 مل
- كليسيرول 40 مل
- ماء مقطر 20 مل

تستعمل هذه الصبغة لتصبيغ الفطريات و تثبيتها لغرض الفحص المجهري.

2- محلول هيدروكسيد الصوديومNaOH Solution

تم تحضيره بإذابة 8 غم من هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر, إذ استعمل هذا المحلول لمعايرة الاس الهيدروجيني في الوسط الزرعي .

3- محلول الفصل لصفائح الكروماتوغرافي

حضر هذا المحلول باستخدام (كلوروفورم: ميثانول) (2:98) واستخدم لفصل السموم على صفائح الكروموتوغرافي (Sobolev and Dorner,2002) .

3-2 . جمع العينات

تم جمع 18 عينة من المواد الغذائية تمثلت بحبوب الشعير والحنطة والذرة الصفراء والفاصولياء وفستق الحقل و زهرة الشمس وبواقع 100 غم لكل عينة خلال شهر كانون الاول لسنة 2012 من الاسواق المحلية لمحافظة كربلاء .

3 -2-1. عزل الفطريات

تم الحصول على الفطريات *A.flavus* و*A.parasiticus* من خلال زراعة عدد من المواد الغذائية التي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية , بعد وضعها في اكياس نايلون . بعدها تم تعقيم العينات سطحيا" بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز0.06 ولمدة 5 دقائق . ثم غسلت العينات بالماء المقطر ثلاث مرات ثم وضعت على ورق ترشيح لإزالة الماء الحر وزرعت في أطباق حاوية على وسط اكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar المعقم والمضاف له المضاد الحيوي كلورامفينكول Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/لتر وبواقع ثلاث

مكررات وخمس بذور من كل نوع نباتي , ثم وضعت الأباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 ±2 مْ ولمدة 7 ايام (Hedayati *et al*.,2010 واخرون) .

تم تشخيص الفطريات المعزولة من بذورالمواد الغذائية بواسطة الاستخدام المباشر للمجهر الضوئي وعلى شرائح زجاجية وبالاستعانة بالمفتاح التصنيفي المتخصص لـ(Fennell,1965 Raper and) . بعد ذلك تم حساب العدد الكلي ونسبة الظهور والتردد للفطريات المنتجة لسم الافلا وفق المعادلتين التاليتين :

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد عينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي للعزلات الفطرية}} \times 100$$

2-2-3 .الكشف عن قابلية الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* لانتاج سم الافلا

تم الكشف والتمييز بين العزلات التي تنتج السموم والعزلات غير المنتجة للسموم للفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* ، وذلك وفقاً للطريقة التي ذكرها (Saito and Machida,1999) باستخدام وسط أجار مستخلص جوز الهند Coconut Extract Agar الذي حضر وفقاً للطريقة الموضحة في الفقرة (3-1-4-3) ، ثم صب الوسط في الأباق بتري وزرعت اقراص من عزلات الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* وبقطر 5 ملم وبمعدل ثلاثة أباق لكل عزلة ثم حضنت الأباق بالحاضنة بدرجة 25 ±2 مْ ولمدة اسبوع , وبعدها جرى الكشف عن قدرة العزلات النامية من الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* على إنتاج سموم الافلا من خلال استخدام محلول الامونيا وبتركيز 10 % إذ وضعت اوراق ترشيح مبللة بقطيرات من الأمونيا في غطاء الطبق الحاوي على الفطر النامي على وسط أجار مستخلص جوز الهند (CEA) ثم حضنت الأباق بصورة مقلوبة ولمدة 4 يوم وبدرجة حرارة 25 ± 2 مْ , بعدها أخرجت الأباق ولوحظت ألوان قواعد مستعمرات كل فطر, فحدوث تغيير في لون قواعد المستعمرة من اللون الشفاف الى اللون الأحمر او اللون البرتقالي يدل على ان العزلة النامية قادرة على إنتاج سموم الافلا وان درجة اللون الأحمر تدل على كفاءة العزلة بإنتاج هذه السموم .

3-2-3 . الكشف عن سم الافلا B_1 للفطرين *A.parasiticus, A. flavus* باستعمال طريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC)

تم تنمية عزلات الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* على وسط (PDA) وذلك بوضع أقراص من الفطريات قطرها 5 ملم وبعمر اسبوع في مركز كل □بق وبثلاث مكررات لكل عزلة , حضنت عند درجة حرارة 25م° ± 2 م° لمدة أسبوع بعدها تم تقطيع الوسط الزرعي النامي عليه الفطر بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة , وضعت في الخلا□ الكهربائي مع كمية 50 مل من ماء مقطر لمدة 3 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق الترشيح من نوع Whatman No-1 ثم اخذ الراشح ووضع في قمع الفصل واضيف له مقدار حجمه كلوروفورم مع الرج لطرد الغازات الناتجة وترك المزيج لمدة 15 دقيقة لإتمام عملية فصل الطبقتين ثم وضع الراشح في دورق نظيف ومعقم ووضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م° الى ان جفت العينة وهكذا كررت العملية مع عزلات الفطر المدروسة جميعها .

تم الكشف عن وجود سم الافلا B_1 باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة TLC ذات ابعاد 20×20 سم اذ نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة 120 م° لمدة ساعة قبل الاستعمال (الجميلي ، 1996) . واستخدم نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (98 : 2) .

تم عمل خط مستقيم على صفيحة TLC يبعد بمسافة 1.5 سم من قاعدة الصفيحة ، ووضعت بقعة من سم افلا B_1 القياسي حيث تم الحصول عليه بشكل متبلور في عبوة زجاجية من د. سامي عبد الرضا الجميلي بوزن (1) ملغم واذيب في (5) مل من محلول الكلوروفورم ليصبح التركيز (200) مايكروغرام /مليلتر على الخط بمسافة 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة , كما تم وضع نفس الكميات من كل عينة من عينات الفطريات المختبرة وعلى نفس المسافة المذكورة أعلاه أي 2 سم, بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول الى مسافة تقارب 2 سم من النهاية العليا للصفيحة ، أخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول الموجي 360 نانوميتر وتم الكشف عن وجود سم الافلا B_1 بمطابقة معامل الترحيل Rat of flow ولون التألق لمحتوى المستخلصات من سموم الافلا مع المادة القياسية للسم الافلاB_1 (Sobolev and Dorner,2002) .

3- 3. العينات النباتية

3-3-1. جمع العينات النباتية

تم الحصول على العينات النباتية من الاسواق المحلية والحديقة العامة وتم تشخيصها بالاستعانة بالمصدر التصنيفي المتخصص لـ (1976), Chakravarty .

جدول (2) الأنواع النباتية والأجزاء المستعملة في الدراسة

ت	الاسم العربي	الاسم العلمي	العائلة	الجزء المستعمل
1	الكجرات	*Hibiscus sabdariffa*	الخبازية Malvaceae	الاوراق الكاسية
2	اليوكالبتوس	*Eucalyptus Camaldulensis*	الاسية Mytaceae	الاوراق الفتية
3	النعناع	*Mentha spicata*	الشفوية Labiateae	الأوراق

3-3-2. عملية الأستخلاص

اتبعت الطريقة التي استخدمها الجنابي (1996) في عملية الاستخلاص, إذ حنت الأجزاء النباتية الجافة باستخدام احونة للحصول على مسحوق , نقع اما في الماء المقطرللحصول على المستخلص المائي أو في الايثانول70 % للحصول على المستخلص الكحولي ، اذ أستعمل 20 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 100 مل من سائل الاستخلاص أي بنسبة 1 غم من المسحوق لكل 5 مل من السائل ، و ترك الخليط في حمام مائي هزاز (Shaker Water bath) و بدرجة37 °م و لمدة 24 ساعة ، بعدها تم ترشيح النقيع باستعمال عدة بقات من الشاش الطبي ثم باستعمال ورق ترشيح من نوع Whatman No.1، و عرض الراشح الى الانتباذ بقوة 2500 دورة /دقيقة و لمدة 10دقائق بجهاز الطرد المركزي , بعدها وضع الراشح في أباق بتري زجاجية نظيفة و معقمة و وضعت في الحاضنة بدرجة 40°م و لمدة 2-3 أيام حتى جفاف المستخلص , ثم كشط المستخلص الجاف بوساة سكينة نظيفة و معقمة و حفظ المسحوق الجاف بعد وزنه في أوعية بلاستيكية نظيفة و محكمة لحين الاستعمال و أطلق على هذا المحضر المستخلص المائي الجاف أو المستخلص الكحولي الجاف.

3-3-3. الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية

تم قياس الأس الهيدروجيني (pH) للمستخلصات المائية و الكحولية السائلة بعد عملية الاستخلاص مباشرة , بواسطة جهاز قياس الأس الهيدروجيني (pH meter) .اما النسبة المئوية للمستخلص فتم حسابها بقسمة الوزن الصافي للمستخلص على الوزن الاصلي للمسحوق النباتي الجاف المستعمل 20غم مضروبا" في 100 .

3-3-4. الكشوفات النوعية للمستخلصات المائية و الكحولية الفعّالة

تم اجراء مجموعة من الكشوفات النوعية و ذلك للتعرف على المكونات الكيميائية الأساسية أو المركبات الفعالة الموجودة في المستخلصات المؤثرة و كانت الكشوفات كالآتي :.

1-الكشف عن القلويدات Alkaloids

تم الكشف عن القلويدات باستعمال الكواشف التالية (Harborne,1984) :

أ- كاشف واكنر Wagner reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 1.3 غم من اليود مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر، ثم اضيف اليه المستخلص النباتي فاذا تكون راسب بني دل ذلك على وجود القلويدات.

ب- كاشف ماير Mayer reagent

حضر هذا الكاشف على النحو الآتي :.

1-اضافة 1.36غم من كلوريد الزئبقوز $HgCL_2$ في 60 مل من الماء المقطر .

2-اذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم في 10 مل من الماء المقطر .

تم مزج المحلول 1و2 و اكمل الحجم الى 100مل باستعمال الماء المقطر ، إذ تمت ملاحظة راسب أبيض أو عكورة عند اضافة قطرات من هذا الكاشف الى المستخلص على القلويدات

2. الكشف عن التانينات (العفصيات) Tannins

أ- كشف خلات الرصاص Lead acetate test

حضر المحلول بإذابة 1 غم من خلات الرصاص في 100 مل من الماء المقطر ، ثم اضيفت عدة قطرات منه الى انبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص . فان ظهور راسب ابيض هلامي القوام دليلا على وجود التانينات (Ahmed *et al*.,1989).

ب-كشف كلوريد الحديديك Ferric chloride test

اضيفت عدة قطرات من كلوريد الحديديك $Fe\ Cl_3$ تركيز 1% الى انبوبة اختبار تحوي 0.5مل من المستخلص . فكان ظهور لون أخضر مزرق دليلا على وجود التانينات (Adedayoet al.,2001) .

3. الكشف عن الصابونينات Saponins

أ- كشف كلوريد الزئبقيك Mercuric chloride test

اضيف3مل من المستخلص الى 2 مل من كلوريد الزئبقيك $Hg\ Cl_3$ بتركيز1% فكان ظهور الراسب الأبيض دليلا على وجود الصابونينات (Al-Khazragi,1991).

ب-الرغوة الكثيفة

تم تحضير محلول مائي لمسحوق النباتات الجافة و وضعت في انبوبة اختبار و رجت بشدة ، فاذا ظهرت رغوة كثيفة تبقى لمدة □ويلة دلت على وجود الصابونينات (Harborne,1984)

4. الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

أ- كاشف فهلنك Fehling reagent

حضر هذا الكاشف كما يأتي :.

A- اذابة 70 غم من كبريتات النحاس المائية $Cu\ So_4.7H_2O$ في لتر من الماء المقطر .

B- اذابة 240غم من NaOH و246 غم من ملح روشيل(Sodium Potasium tartarate) في لتر من الماء المقطر .

يمزج حجمان متساويان من محلول (A) و (B) للحصول على كاشف فهلنك ، و عند الكشف مزج 1غم من المسحوق النباتي الجاف مع 10 مل من الماء المقطر ، بعدها رشح المحلول ثم اضيف اليه كاشف فهلنك ، فاذا ظهر اللون الأحمر الغامق دل على وجود الكلايكوسيدات (Adedayo *et al.*,2001) .

ب- كاشف موليش Molish reagent

ان □ريقة عمل هذا الكاشف حسب ما ذكره الشيخلي و آخرون (1993) اذ تم بأخذ 2 مل من المستخلص المراد اختباره و اضيف اليه قطرتان من محلول الفا نفثول α-naphthol و رج المحلول جيدا ، ثم مسكت الأنبوبة بشكل مائل و اضيف 2 مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات على جدار الأنبوبة لحين ظهور □بقتين □بقة الحامض هي السفلى و يفصل بين الطبقتين حلقة بنفسجية اللون عند وجود المواد الكلايكوسيدية .

5. الكشف عن الراتنجات Resins

مزج 1 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 10 مل من الكحول الأثيلي 95% و ترك المحلول لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي بدرجة حرارة 100°م ، ثم رشح المحلول و أضيف اليه 10 مل من محلول مائي لحامض الهيدروكلوريك 4 % و استدل على وجود المواد الراتنجية بظهور العكورة (Shihata,1951).

6. الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

تم الكشف عن الفلافونيدات في ضوء الكشفين الآتيين (Al- Khazragi,1991) :.

ا- كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي

مزج 2 مل من المستخلص مع 1 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي ، فاذا ظهر اللون الأصفر دلً على وجود الفلافونيدات .

ب-كشف حامض الكبريتيك المركز

اذيب 1 مل من المستخلص في1 مل من حامض الكبريتيك المركز ، فاذا ظهر اللون الأصفر الداكن دلً على وجود الفلافونيد و الفلافونول.

7. الكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

- كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز

حضر كاشف الفينول بإذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر ، ثم اضيف 0.5 مل من هذا الكاشف الى 0.5 مل من المستخلص في انبوبة اختبار و رجت جيدا ثم اضيف 2.5 مل من حامض الكبريتيك المركز الى المحلول، فاذا ظهر اللون الأحمر البني فكان دلً على وجود الكربوهيدرات (Meyer and Walther,1988) .

8. الكشف عن الفينولات Phenols

- كاشف كلوريد الحديديك Ferric chloride reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من كلوريد الحديديك $Fe\ Cl_3$ في 100مل من الماء المقطر ، و قد رطبت ورقة ترشيح بالمستخلص النباتي ، ثم اضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك و تم تعريض الورقة الى بخار الامونيا ، فاذا ظهر اللون الازرق دل على وجود الفينولات (Adedayo et al.,2001) .

9. الكشف عن الفيوكيومارينات Fuocoumarins

أضيف 1 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 10 % إلى 1 مل من المستخلص . فاذا ظهر اللون الأصفر أو الأصفر المخضر دلً على وجود الفيوكيومارينات (Harborne,1984) .

10. الكشف عن الترايتيربينويد Triterpenoids

اضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى 1مل من محلول الكلوروفورم ، ثم اضيف الناتج الى 2 مل من المستخلص , فاذا ظهر اللون الأحمر أو الأرجواني دلَّ هذا على وجود الترايتيربينويد (Harborne,1984) .

3-3-5. تأثير المستخلصات في نمو الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* وانتاج سم الافلا B_1

اتبعت طريقة Sundhakar واخرين(2009) ، اذ تم مزج المستخلصات المائية و الكحولية المجففة لكل من نباتات الكجرات واليوكالبتوس والنعناع مع الوسط الزرعي اكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمضاف له المضاد الحيوي كلورامفينكول Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/لتر قبل التصلب، و بثلاثة تراكيز 10 ،20 و30 ملغم/مل، و بمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز، و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر5 ملم من مزرعة الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* وبعمر 7ايام الى وسط الطبق. و تم استعمال نوعين من المقارنة ، (مقارنة1) إذ لم تضف أية مادة للوسط الزرعي ، و(مقارنة2) فيها تمت إضافة المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز 2 ملغم/مل الى الوسط الزرعي. حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 25± 2°م و لمدة اسبوع، و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج و حسبت نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية :

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة 1} - \text{معدل قطر الفطر في أطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة 1}} \times 100$$

اما الكشف عن سم الافلا B_1 فقد اجريت نفس الخطوات في الفقرة (3-2-3) .

3-3-6. تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration

بعد معرفة تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* وتحديد نوع المستخلص الأكثر فعالية في نموها تم اختبار التراكيز 8,6,4,2 و10ملغم/مل من المستخلصات لغرض تحديد أدنى تركيز مثبط MIC لها في نمو الفطرين و بالاعتماد على طريقة مزج المستخلصات الجافة مع الوسط الزرعي ، و قياس قطر مستعمرة الفطر النامي .

3-4. اختبار كفاءة خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* في الوسط الزرعي PDA وانتاج سم الافلا B_1

تم تهيئة أربع دوارق بحجم 250 مل يحتوي كل منها 200 مل من وسط PDA ثم عقمت الدوارق بدرجة حرارة 121 وضغط 1.5 جو لمدة 15 دقيقة وبعدها تركت لتنخفض درجة حرارتها الى 45 - 50مْ , تمت اضافة خميرة الخبز *S. cerevisiae* بتراكيز0.2 و0.4 و0.6غم/ 200 لتر وبواقع تركيز واحد لكل دورق ثم رجت الدوارق جيدا لغرض مزج الخميرة مع الوسط الزرعي , صبت محتويات كل دورق في ثمانية أطباق (Leben *et al.*,1987) بعدها تم تلقيح اربعة اطباق من كل تركيز فضلا" عن معاملة السيطرة بقرص واحد قطره 5 ملم في مركز الطبق من الفطر *A.flavus* بعمر4 ايام ومثلها للفطر *A.parasiticus* . بعد ذلك حضنت جميع الاطباق بدرجة 25± 2 مº .قيست اقطار المستعمرات كل24 ساعة ، وعندما غطى نمو الفطر الممرض كامل أطباق المقارنة غير المعاملة بالخميرة ،حسبت أقطار النمو بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية وبتطبيق معادلة Abbott (1925) وهي كالاتي:

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{اقصى نمو شعاعي للفطر(المقارنة)} - \text{اقصى نمو شعاعي للفطر(المعاملة بالخميرة)}}{\text{اقصى نمو شعاعي للفطر(المقارنة)}} \times 100$$

اما الكشف عن سم الافلا B_1 فقد اجريت نفس الخطوات في الفقرة (3-2-3) .

3-5. تأثير بعض العوامل في نمو الفطرين *A.flavus* و *A. parasiticu* وانتاج سم الافلا B_1

1- درجة الحرارة

استعملت اربع مستويات من درجات الحرارة هي 20, 30,40 و50م° وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى , بعد ان عدل وسط PDA الى 6.5 pH من خلال اضافة قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N, او بضع قطرات من HCl بتركيز12N الى وسط PDA باستخدام جهاز قياس الاس الهيدروجيني (pH meter) بعد تعقيم الوسط , بعدان برد الى 40 مْ صب الوسط في □باق بتري وبعد تصلبه , تم نقل قرص بقطر 5 ملم بواسطة ثاقب فلين Cork borer الى وسط الطبق من مزرعة الفطرين *A.flavus* و *A. parasiticus* وبعمر 7 ايام , حضنت الا□باق جميعها لمدة اسبوع واحد , بعدها تم قياس النمو الشعاعي وذلك بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركز القرص, اما الكشف عن سم الافلا B_1 فقد اجريت نفس الخطوات في الفقرة (3-2-3) .

2- الرقم الهيدروجيني pH

استعملت اربع مستويات منpH 3.5 ,5.5 ,7.5 و 9.5 وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى , وباتباع نفس الخطوات السابقة في □ريقة العمل واخذ النتائج .

3- الحركة

استعملت ثمانية دوارق حجم 250 مل تحتوي على وسط PDP بمقدار 100 مل مضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينكول Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/لتر, ثم لقحت اربعة دوارق بأقراص من الفطر *A.flavus* وبقطر 10 ملم وبمعدل قرص واحد لكل دورق ثم حضنت اثنان منها في جهاز الحاضنة الهزازة Shaker Incubator اي تحت ظروف تحريك بسرعة 100دورة/دقيقة اما الدورقين الآخرين بدون تحريك، وبدرجة حرارة 25± 2 م° لمدة 72ساعة بعدها وبعد انتهاء مدة الحضن فصل الغزل الفطري باستخدام أوراق ترشيح من نوع Whatman No-1، وجففت بعد ذلك بواسطة الفرن الكهربائي Oven بدرجة حرارة 60 مْ لمدة 24 ساعة ثم قُيس الوزن الجاف للفطر, وهكذا بالنسبة للفطر *A.parasiticus* فقد اتبعت نفس الخطوات السابقة .

6-3. الكشف عن وجود المركبات الفينولية في الفطرين *A.flavus* و *A.Parasiticus*

لغرض التحري عن قدرة الفطرين أعلاه على إنتاج المركبات الفينولية تم تهيئة 9 دوارق زجاجية سعة 500 مل وأضيف لكل دورق250 مل من وسط مستخلص مستخلص البطاطا و الدكستروز (Potato Dextrose Broth) وبعد تعقيمها وتبريدها لقح الوسط الزرعي في أربعة دوارق منها بأقراص من عزلة الفطر *A.flavus* والأربعة الأخرى لقح الوسط الزرعي فيها بأقراص من عزلة الفطر *A. parasiticus* وبمعدل قرص واحد بقطر5 ملم لكل دورق في حين ترك الدورق التاسع بدون تلقيح كمجموعة سيطرة. حضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 25 ±2 مْ لمدة ثلاثة اسابيع ، وبعد انتهاء مدة الحضن تم فصل الراشح عن مكونات جسم الفطر (الغزل الفطري) باستعمال أوراق ترشيح Whatman No-1، أخذ الراشح لكلا الفطرين ووضع في قناني زجاجية معتمة ومحكمة الغلق .

اتبعت طريقة O'Connell وFox (2001) في استخلاص المركبات الفينولية من وسط مستخلص البطاطا و الدكستروز السائل فتم أخذ1لتر من الراشح المنماة عليه عزلة الفطر *A.flavus* و الكمية ذاتها من الراشح المنماة عليه عزلة الفطر *A. parasiticus* , ثم جففت العينات بالفرن الكهربائي وبدرجة حرارة 40 مْ بعدها أذيبت المادة الجافة في 50 مل من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2% , ثم وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 100 مْ لمدة ساعة وبعد انتهاء الوقت ترك المحلول ليبرد ثم رشح بورق ترشيح Whatman No-1 ووضع الراشح في قمع الفصل وأضيف إليه حجم مساو من البربانول الطبيعي n-propanol اذ تكونت بقتان عزلت الطبقة العليا الحاوية على المركبات الفينولية ، جففت بعد ذلك في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 مْ , واستخدم كاشف كلوريد الحديديك للتأكد من أن المادة المستخلصة هي الفينولات إذ إن تحول لون الكاشف إلى الأصفر أو الأخضر عند إضافة 2 مل منه إلى 5 مل من المستخلص يدل على وجود الفينولات .

3- 7. التحليلات الإحصائية

تم تصميم التجربة للمستخلصات النباتية بوصفها تجربة عاملية (5x2x3) للنوع النباتي ونوع المستخلص و التركيز على التوالي ، و باستعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD) و بثلاث مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال أقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمالية 0.05 وشمل هذا التحليل تجربة تأثير النوع النباتي و نوع المستخلص وتركيزه والتداخل بينها في معدل قطر المستعمرة (سم). .

أما تجربة خميرة الخبز *S. cerevisiae* فتم تحليلها على أساس أنها تجربة مختبرية(4x1) لخميرة الخبز والتركيز و باستعمال التصميم العشوائي التام CRD و بمعدل اربع مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية 0.05 .

تم تحليل تجربة تأثير كل من العوامل الفيزيائية , درجة الحرارة ,pH , الحركة باستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD و بثلاثة مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية 0.05 .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

4 - النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 . عزل الفطريات

اوضحت نتائج عزل وتشخيص الفطريات من عينات بذور المواد الغذائية الشعير والحنطة والذرة الصفراء والفاصولياء وفستق الحقل وزهرة الشمس التي اخذت عشوائياً من الاسواق المحلية لمحافظة كربلاء فكان ظهور انواع عديدة من الفطريات وتم فقط اخذ الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* ولقد كان العدد الكلي لمستعمرات الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* المعزولين مساويا الى 173 مستعمرة (جدول 4-1) وظهرت اكثر العينات تلوثاً بالفطريات هي عينات الذرة الصفراء اذ كان العدد الكلي مساويا الى 48 مستعمرة تليها عينات الحنطة ثم الفاصولياء بعدد 34 و32 مستعمرة على التوالي, ثم الشعير 27 مستعمرة , زهرة الشمس 17 مستعمرة وفستق الحقل 15مستعمرة, تتفق هذه النتيجة مع دراسة إبراهيم والجبوري (1998) اذ وجدا أن أكثر المحاصيل تعرضاً لسموم هذه الفطريات هي الحنطة والشعير والذرة الصفراء , وذلك لاحتوائها على نسبة عالية من الكاربوهيدرات.

كما يتضح من الجدول (4-2) ان الفطر*A. flavus* سجل اعلى نسبة مئوية كلية للتردد لجميع العينات وكذلك سجل الفطر*A. flavus* اعلى نسبة مئوية كلية للتردد لفستق الحقل وزهرة الشمس فيما اعطى الفطر *A.parasiticus* اعلى نسبة مئوية كلية للتردد في الشعير .

يبين الجدول (4-3) ان الفطر *A. flavus* ظهر في كل العينات المختبرة بنسبة ظهور 100% , في حين ان الفطر *A.parasiticus* ظهر في عينات الفاصولياء بنسبة ظهور 100% بينما لم يظهر في فستق الحقل وزهرة الشمس .

جدول (4-1) العدد الكلي لمستعمرات الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المعزولين □ن عينات البذور المستخد□ة في الدراسة

الاجناس والانواع	العدد الكلي	عدد المستعمرات المعزولة في عينات الدراسة					
		شعير	□نطة	فاصولياء	ذرة الصفراء	فستق الحقل	زهرة الشمس
A. flavus	104	9	22	12	29	15	17
A.parasiticus	69	18	12	20	19	-	-
المجموع الكلي	173	27	34	32	48	15	17

جدول (4-2) النسب المئوية لتردد الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المعزولين□ن عينات ا لبذور المستخد□ة في الدراسة

الاجناس والانواع	النسبة المئوية الكلية للتردد	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة في عينات الدراسة					
		شعير	□نطة	فاصولياء	ذرة الصفراء	فستق الحقل	زهرة الشمس
A. flavus	60.11	33.33	64.70	37.50	60.41	100	100
A.parasiticus	39.88	66.66	35.29	62.50	39.58	-	-

جدول (4-3) النسب المئوية لظهور الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المعزولين□ن عينات ا لبذور المستخد□ة في الدراسة

الاجناس والانواع	عدد العينات التي ظهر فيها الفطر	النسبة المئوية الكلية للظهور	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة في عينات الدراسة					
			شعير %	□نطة %	فاصولياء %	ذرة الصفراء %	فستق الحقل %	زهرة الشمس %
A. flavus	18	100	100	100	100	100	100	100
A.parasiticus	9	50	66.66	66.66	100	66.66	-	-

2-4 . قابلية عزلات الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* لانتاج سم الافلا

اوضحت نتائج الكشف الكيمياوي باستعمال وسط جوز الهند والامونيا قدرة عدد من عزلات الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* المختبرة على انتاج سم الافلا , إذ ظهر تغير واضح في لون قواعد المستعمرات وظهور اللون الاحمر او البرتقالي وبدرجات مختلفة الشكل(1)، وهذا التدرج في اللون ربما يعود الى اختلاف قدرة العزلات على انتاج سم الافلا ، وهذا ما ذكره كل من Saito وMachida ,(1999) إذ اوضحا ان درجة اللون الاحمر تعزى الى الكميات المنتجة من سم الافلا ، فالعزلة ذات اللون الاحمر او البرتقالي الغامق تدل على قدرتها على انتاج كميات اكبر من العزلات التي تكون قواعد مستعمراتها حمراء فاتحة او وردية ، واظهرت نتيجة الفحص لـ30 عزلة للفطر *A. flavus* قابلية 18عزلة لإنتاج سم الافلا اي بنسبة 60 % والتي كان مصدرها 5عزلات من فستق الحقل و 4 عزلات مصدرها الذرة الصفراء و4 عزلات من زهرة الشمس و2عزلة من الفاصولياء و3 عزلات من الحنطة . وهذه النتيجة تتفق مع دراسة Al-Adil واخرون (1977) اذ وجدوا ان 59% من عزلات الفطر *A.flavus* منتجة لسموم الافلا بينما هذه النسبة أقل نسبيا"مع ما ذكره عدد من الباحثين اذ ذكر Davis وDiener (1966) أن 86 % من عزلات الفطر *A. flavus* قادرة على أنْ تصيب فستق الحقل وتلوثه بسموم الافلا ، كما ذكر الورشان وأخرون (2002) أن 80 % من عزلات الفطر *A.flavus* قادرة على إنتاج سموم الافلا ، ولا تتفق مع نتيجة Rahimi واخرين (2009) اذ وجدوا ان 46 عزلة من مجموع 150عزلة قادرة على انتاج سم الافلا اي بنسبة 30%.

كذلك اظهرت نتيجة الفحص لـ20 عزلة الفطر *A.parasiticus* قابلية 11 عزلة لإنتاج سم الافلا اي بنسبة55%, والتي كان مصدرها 4 عزلات من الذرة الصفراء و2 عزلة من الحنطة وعزلة واحدة من الشعير و4 عزلات من الفاصولياء. وهذه النتيجة تتفق مع دراسة الساعدي ,(2012) التي اشارت ان أعلى نسبة من عزلات الفطر *A.parasiticus* المنتجة للسم كان مصدرها الذرة الصفراء والفاصولياء , هذه النتيجة تتفق مع ما أشار اليه الورشان وآخرون ,(2002) اذ وجدوا أن 50% من عزلات الفطر *A.parasiticus* هي منتجة لسم لافلا B . ويعود سبب الاختلاف في معدلات انتاج سم الافلا الى عدة عوامل منها نوع الوسط الغذائي النامي عليه الفطر حيث كلما احتوى الوسط على نسبة عالية من الكاربوهيدرات كانت نسبة تواجده عالية (Bullerman,1981) .

3-4.كفاءة عزلتي الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus* في إنتاج سم الأفلا B_1

أوضحت نتائج الكشف الكيمياوي باستعمال تقنية الصفائح الرقيقة (TLC) لمستخلصي كلا العزلتين *A. flavus* و*A.parasiticus* ، ظهور بقع ذات تألق أزرق عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UV) بلغ معامل جريانها 0.53 و هذا يتطابق تماماً مع لون و معامل جريان البقع لسم الأفلا B_1 القياسي . وظهر تباين في شدة التألق للعزلات المختلفة مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في انتاجها الكمي للافلاتوكسين B_1 , كما اظهرت هذه التجربة ان سم الافلا المنتج من قبل العزلات كان من النوع B_1 فقط دون تكوين سم الافلا G اذ لم تتكون بقع خضراء متألقة. ويرجع سبب الاختلاف في قابلية العزلات على انتاج سم الافلا كمًا" ونوعا" الى جينات الفطر المتخصصة في تشفير الانزيمات المسؤولة عن تكوين او تخليق السم (Scherm *et al*.,2005) , كما وجد Arseculeratne واخرون(1969) ان للمادة الاساس علاقة كبيرة بتخليق سم الافلا فكلما احتوت المادة الاساس على تراكيز عالية من الكاربوهيدرات والاحماض الدهنية فأنها تعزز من انتاج سم الافلا .

4-4. الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية

وكما هو واضح في الجدول(4-4) أن اقل دالة حامضية كانت للنعناع إذ بلغت 6.24 للمستخلص الكحولي و 5.85 للمستخلص المائي ،وفي نبات اليوكالبتوس بلغت 5.32 للمستخلص الكحولي و 5.07 للمستخلص المائي، أما الكجرات فقد بلغت 4.60 للمستخلص الكحولي و 4.10 للمستخلص المائي .

وكذلك يلاحظ أن النسب المئوية للمستخلصات الكحولية أعلى من المستخلصات المائية للنباتات المدروسة ، إذ كانت النسبة المئوية للمستخلصات الكحولية هي 16.4, 14.95 و12.5% للكجرات واليوكالبتوس والنعناع على التوالي ، أما النسبة المئوية للمستخلصات المائية 13.75 , 8.6 و11.3% للكجرات واليوكالبتوس والنعناع على التوالي . و يتبين أن النسبة المئوية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الكجرات أحتلت المرتبة الأولى ، في حين ان المستخلص المائي لليوكالبتوس احتل المرتبة الأخيرة , وهذا قد يعزى الى قابلية الكحول على استخلاص مركبات اكبر من قابلية المستخلصات المائية .

الجدول (4-4) الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات المائية و الكحولية للنباتات قيد الدراسة .

ت	النباتات	نوع المستخلص	لونه و هو سائل	لونه بعد التجفيف	الدالة الحامضية	الوزن الصافي للخلاصة(غم)	النسبة المئوية للخلاصة %
1	الكجرات	مائي	ارجواني	احمر نحاسي	4.10	2.75	13.75
		كحولي	ارجواني	احمر نحاسي	4.60	3.28	16.4
2	اليوكالبتوس	مائي	جوزي	بني فاتح	5.07	1.72	8.6
		كحولي	زيتوني	زيتوني غامق	5.32	2.99	14.95
3	النعناع	مائي	بني محمر	بني غامق	5.85	2.26	11.3
		كحولي	اخضر غامق	اخضر غامق	6.24	2.50	12.5

* علما أن وزن المسحوق النباتي الجاف المستعمل في عملية الاستخلاص هو 20 غم

4-5. الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية

جرى التحري عن محتوى المستخلصات المؤثرة من المركبات الفعالة و ذلك باستعمال الكواشف الكيميائية المختلفة ، إذ أظهرت الكشوفات النوعية أن النباتات المدروسة تحوي عددا من المكونات الفعالة مثل التانينات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و الفينولات و القلويدات و الراتنجات و الفلافونيدات و الكربوهيدرات و الفيوكيومارينات و الترايتيربينويد و غيرها ، و يبين الجدول(4-5) أن المستخلص الكحولي للكجرات احتوى على جميع المركبات التي ذكرت ما عدا الصابونينات و الراتنجات ، أما المستخلص المائي للكجرات فلم يحتوي على الصابونينات و الراتنجات والتانينات وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه Bako واخرون(2009) من حيث وجود القلويدات والفلافونيدات ولكنها غير متوافقة من حيث عدم وجود الصابونينات.كما اظهرت النتائج احتواء مستخلص الكحولي لليوكالبتوس فقد احتوى على جميع المركبات ما عدا الترايتيربينويد ، و كذلك انعدم وجود الترايتربينويد والقلويدات والصابونينات والراتنجات والفلافونيدات في المستخلص المائي لليوكالبتوس، أما مستخلص النعناع الكحولي فلم يحتوي على الكلايكوسيدات و الراتنجات والفلافونيدات والفينولات و لا على الفيوكيومارينات، في حين انعدم وجود الصابونينات والكلايكوسيدات و الراتنجات والفينولات و الترايتيربينويد في المستخلص المائي للنعناع .

الجدول (4-5) الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية الفعَالة

ت	الكشوفات النوعية	مستخلص الكجرات		مستخلص اليوكالبتوس		مستخلص النعناع	
		الكحولي	المائي	الكحولي	المائي	الكحولي	المائي
1	**الكشف عن القلويدات** أ- كشف واكنر ب- كشف ماير	+ +	+ +	+ +	- -	+ +	+ +
2	**الكشف عن التانينات** كشف خلات الرصاص كشف كلوريد الحديديك	+ +	- -	+ +	+ +	+ +	+ +
3	**الكشف عن الصابونينات** أ- كشف كلوريد الزئبقيك ب- رغوة المحلول المائي	- -	- -	+ +	- -	+ +	- -
4	**الكشف عن الكلايكوسيدات** أ- كاشف فهلنك ب- كاشف موليش	+ +	+ +	+ +	+ +	- -	- -
5	**الكشف عن الراتنجات** - كشف حامض HCl 4 %	-	-	+	-	-	-
6	**الكشف عن الفلافونيدات** كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي كشف حامض الكبريتيك المركز	+ +	+ +	+ +	- -	- -	+ +
7	**الكشف عن الكربوهيدرات** - كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز	+	+	+	+	+	+
8	**الكشف عن الفينولات** - كشف كلوريد الحديديك	+	+	+	+	-	-
9	**الكشف عن الفيوكيومارينات** - كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي	+	+	+	+	-	+
10	**الكشف عن الترايتيربينويد** - كشف حامض الكبريتيك المركز مع الكلوروفورم	+	+	-	-	+	-

6-4. تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطرين *A.flavus* و*A.parasiticus*

أظهرت النتائج في الجدولين (4-6) و(4-7) أن هناك فروقات معنوية بين الانواع النباتية ,اذ أظهر نبات اليوكالبتوس تفوقا على بقية النباتات في تأثيره التثبيطي في نمو الفطر *A. flavus* ، فقد أعطى أقل معدل نمو بلغ 3.08 سم وبفروقات معنوية عن كل من النعناع والكجرات, أما فيما يخص الفطر *A.parasiticus* فقد اظهر نبات الكجرات تفوقا على بقية النباتات في تأثيره التثبيطي في نمو الفطر ، إذ أعطى أقل معدل نمو فكان 3.08 سم ،واختلفت معنويا"عن كل من اليوكالبتوس والنعناع. و هذا قد يعود الى الاختلاف في طبيعة و نوعية المركبات التي يحتويها مستخلص كل نبات ، فبعضها مثبط و بعضها مشجع و بعضها الآخر من دون تأثير(Goncalez *et al*.,2003) .

اما بالنسبة لنوع المستخلص فقد أظهر المستخلص الكحولي تفوقا على المستخلص المائي في تأثيره التثبيطي في نمو الفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* وبفروقات معنوية وعند مستوى احتمالية 0.05 ، إذ بلغ معدل النمو للفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* بالمستخلص الكحولي 2.85 و3.11 سم على التوالي في حين كان المستخلص المائي 3.62 و3.61سم على التوالي، و قد يعود هذا التباين الى اختلاف القطبية فيما يخص المذيب المستعمل إذ تعود الى اختلاف ثابت العزل الكهربائي لهذه المذيبات، اذ يبلغ ثابت العزل الكهربائي للماء 78.4 في حين يبلغ 24.5 للكحول الأثيلي و من ثم ستختلف المركبات الذائبة في الماء أو الكحول(Bernard ,1997) .

اظهرت نتائج المستخلص الكحولي للكجرات كفاءة عالية في تثبيط الفطر*A. flavus* وبالتركيز 30ملغم/مل , فلم يحدث نمو في هذا التركيز ولكن ظهر الفطر بشكل غزل فطري ابيض , في حين ان التركيزين 10 و 20 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة فيهما 2.53 و1.57 سم على التوالي , وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي للكجرات فقد كان معدل نمو الفطر 2.00سم عند التركيز 30ملغم/مل و2.83سم عند التركيز 20 ملغم/مل و4.67 سم عند التركيز 10 ملغم/مل الجدول (4-6).

اما الفطر*A.parasiticus* فقد اظهر المستخلص الكحولي للكجرات كفاءة عالية في تثبيط الفطر وبالتركيز 30ملغم/مل , الذي لم يحدث نمو فيه , في حين ان التركيزين 10 و20 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة فيهما 3.08 و1.58سم على التوالي , وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي للكجرات فقد كان معدل نمو الفطر 1.50سم عند التركيز 30ملغم/مل و2.33 سم عند التركيز

20 ملغم/مـل و3.58 سـم عنـد التركيـز 10 ملغم/مـل الجـدول (9) ، وقـد يعـزى السـبب إلـــى وجـــود التانينـــات فـــي المســـتخلص الكحـــولي وغيابـــه فـــي المســـتخلص المـــائي . هـذه النتـائج توافقـت ومـا توصـل اليـه العديـد مـن البـاحثين فقـد أكـد Elmanama واخـرون (2011) علـى ان المسـتخلص المـائي لنبـات الكجـرات يمتلـك فعاليـة تثبيطيـة تجـاه الفطـر *Candida albicans* , وكـذلك بـين ازديـاد النشـاط المضـاد للفطريـات لكـل مـن الكيتوكونازول والفلوكونازول عند خلطها مع نبات الكجرات .

كذلك اظهرت نتائج المستخلص الكحولي لليوكالبتوس كفاءة عالية في تثبيط الفطر *A. flavus* وبالتركيز 30ملغم/مل , الذي لم يلاحظ اي نمو فيه, في حين ان التركيزين 10 و 20 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة فيهما 3.04 و1.50سم على التوالي , وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي لليوكالبتوس فقد كان معدل نمو الفطر 1.50سم عند التركيز 30ملغم/مل و3.04 سم عند التركيز 20 ملغم/مل و3.67 عند التركيز 10 ملغم/مل الجدول (4-6).

اما فيما يخص الفطر *A.parasiticus* فقد اظهر المستخلص الكحولي لليوكالبتوس كفاءة عالية في تثبيط الفطر وبالتركيز 30ملغم/مل , اذ لم يحدث نمو في هذا التركيز , في حين ان التركيزين 10 و 20 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة فيهما 3.09 و 2.25سم على التوالي , وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي لليوكالبتوس فقد كان معدل نمو الفطر 2.25سم عند التركيز 30ملغم/مل و3.09سم عند التركيز 20 ملغم/مل و3.04 سم عند التركيز 10 ملغم/مل، لربما تعزى إلى وجود القلويدات , الصابونينات , الراتنجات والفلافونيدات في المستخلص الكحولي وعدم وجودها في المستخلص المائي الجدول (4-7) .

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Hur واخرون(2000) اذ وجدوا ان المستخلص الميثانولي لثلاثة انواع عائدة لنبات اليوكالبتوس لها فعالية تثبيطية تجاه 22 نوع من الفطريات, وكذلك وجد Trivedi و Hotchandani (2004) أن زيادة تركـــيز مســـتخلص اليوكالبتوس يرافقه زيادة نسبة تثبيط النمو لجميع الجراثيم المختبرة ومنها جراثيم *S.aureus* فقد ابدت تحسساً عند التركيز 25ملغم / مل وازدادت حساسيتها صـعوداً عند التركيز 200ملغم / مل , كما وجد الباحث Babayi وآخرون(2004) ان التانينات في اليوكالبتوس لـها دور تثبيطي لنمو العديد من الاحـياء المجهرية ومن بينها *S.aureus* . ولا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Falahati واخرون(2005) فقد استخدم المستخلص الميثانولي لنبات اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulensis* فوجد التركيز المثبط هو

0.4 – 1.6ملغم/مل بينما التركيز القاتل 0.8 – 6.4 ملغم/مل ضد بعض انواع الفطرين *Trichophyton* و *Microsporum* .

اما نتائج المستخلص الكحولي للنعناع فقد اظهر تأثيرا" تثبيطيا" على نمو الفطر*A. flavus* عند التراكيز 10 و20 و 30 ملغم/مل حيث بلغ نمو المستعمرة 3.17 و2.42 و1.59 سم على التوالي, وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي للنعناع فقد كان معدل نمو الفطر2.34 سم عند التركيز 30ملغم/مل و3.08سم عند التركيز 20 ملغم/مل و4.17 سم عند التركيز 10 ملغم/مل .

اما الفطر *A.parasiticus* فقد اظهر المستخلص الكحولي للنعناع كفاءة في تثبيط الفطر وبالتركيز 30ملغم/مل , فقد كان قطر المستعمرة 2.13سم , في حين ان التركيزين 20 و 30 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة فيهما 3.04 و 4.42 سم على التوالي , وتوجد فروقات معنوية بينه وبين المستخلص المائي للنعناع فقد كان معدل نمو الفطر 3.46 سم عند التركيز 30ملغم/مل و3.54 سم عند التركيز 20 ملغم/مل و4.46 سم عند التركيز 10 ملغم/مل , وقد يعزى السبب إلى وجود الصابونينات والترايتيربينويد في المستخلص الكحولي وغيابه في المستخلص المائي . وهذه النتيجة لا تتفق مع ما توصل اليه محمد, (1999) اذ وجد ان المستخلص الكحولي للنعناع ثبط نمو الفطر *A. flavus* تثبيطا" تاما" عند التركيز 12,5%, اما العامري, (2004) فقد وجد من خلال دراسة التأثير المثبط لمستخلص النعناع المائي على الفطر *Geotrichum candidum* ان نسبة التثبيط بلغت 86.2 % عند التركيز 25 ملغم/مل.

الجدول (4-6) تأثير النوع النباتي و□ستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في□عدل قطر □ستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع□ن الحضن بدرجة□رارة 25 ± 2 ºم

النبات	التركيز / نوع المستخلص	□قارنة 1 □اء □قطر	□قارنة 2 Clotrimazole 2mg/ml	10 mg /ml	20 mg/ml	30 mg/ml	المعدل للنوع النباتي
كجرات	كحولي	9.00	0.00	2.53	1.57	0.00	3.16
	□ائي	9.00	0.00	4.67	2.83	2.00	
يوكالبتوس	كحولي	9.00	0.00	3.04	1.50	0.00	3.08
	□ائي	9.00	0.00	3.67	3.04	1.50	
نعناع	كحولي	9.00	0.00	3.17	2.42	1.59	3.47
	□ائي	9.00	0.00	4.17	3.08	2.34	
□عدل المستخلص الكحولي □ع التركيز		9.00	0.00	2.90	1.83	0.53	
□عدل المستخلص المائي□ع التركيز		9.00	0.00	4.17	2.98	1.94	
المعدل للتركيز		9.00	0.00	3.54	2.41	1.24	

المعدل لنوع المستخلص	كحولي	□ائي
	2.85	3.62

L.S.D على□ستوى 0.05 : النوع النباتي= 0.10 , نوع المستخلص= 0.08 ,التركيز= 0.13 ,تداخل النوع النباتي□ع نوع المستخلص= 0.15 ,تداخل النوع النباتي□ع التركيز= 0.23 ,تداخل نوع المستخلص□ع التركيز=0.19 ,تداخل النوع النباتي□ع نوع المستخلص□ع التركيز= 0.33

* التجربة أجريت بثلاثة مكررات .

الجدول (4-7) تأثير النوع النباتي و□ستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في□عدل قطر □ستعمرة (سم) الفطر *A. parasiticus* بعد أسبوع□ن الحضن بدرجة□رارة 25 ± 2 ºم

النبات	التركيز / نوع المستخلص	□قارنة 1□اء □قطر	□قارنة 2 Clotrimazole 2mg/ml	10 mg /ml	20 mg/ ml	30 mg/ ml	المعدل للنوع النباتي
كجرات	كحولي	9.00	0.00	3.08	1.58	0.00	3.08
	□ائي	9.00	0.00	3.58	2.33	1.50	
يوكالبتوس	كحولي	9.00	0.00	3.09	2.25	0.00	3.18
	□ائي	9.00	0.00	3.04	3.09	2.25	
نعناع	كحولي	9.00	0.00	4.42	3.04	2.13	3.91
	□ائي	9.00	0.00	4.46	3.54	3.46	
□عدل المستخلص الكحولي □ع التركيز		9.00	0.00	3.53	2.29	0.71	
□عدل المستخلص المائي□ع التركيز		9.00	0.00	3.70	2.99	2.40	
المعدل للتركيز		9.00	0.00	3.61	2.64	1.56	

المعدل لنوع المستخلص	كحولي	□ائي
	3.11	3.62

L.S.D على□ستوى 0.05 : النوع النباتي=0.11, نوع المستخلص=0.09 ,التركيز= 0.15 ,تداخل النوع النباتي□ع نوع المستخلص= 0.16 , تداخل النوع النباتي□ع التركيز= 0.25 , تداخل نوع المستخلص□ع التركيز=0.21,تداخل النوع النباتي□ع نوع المستخلص□ع التركيز= 0.36

* التجربة أجريت بثلاثة مكررات .

4-7. تأثير المستخلصات النباتية في انتاج سم الافلا B_1ن قبل الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*

اظهرت النتائج في الجدول(4-8) ان معاملة الفطر *A. flavus* بالتراكيز 20 و30 ملغم/مل من مستخلص الكجرات الكحولي ,الكجرات المائي ,اليوكالبتوس الكحولي ,اليوكالبتوس المائي ,النعناع الكحولي والنعناع المائي ادت الى انعدام ظهور سم الافلا B_1 , وكذلك ادى التركيز 10 ملغم/مل لكل من مستخلصي اليوكالبتوس المائي والنعناع الكحولي الى انعدام سم الافلا B_1 , في حين التركيز 10 ملغم/مل اظهر وجود سم الافلا B_1 لكل من المستخلص الكجرات الكحولي ,الكجرات المائي , اليوكالبتوس الكحولي والنعناع المائي .

اما الفطر *A.parasiticus* فقد اظهرت النتائج في الجدول(4-8) ان معاملة الفطر بالتراكيز 20 و30 ملغم/مل من مستخلص الكجرات الكحولي ,الكجرات المائي, اليوكالبتوس المائي والنعناع المائي تؤدي الى انعدام ظهور سم الافلا B_1 , وكذلك ادى التركيز 10 ملغم/مل لكل من مستخلص اليوكالبتوس المائي الى انعدام سم الافلا B_1 , في حين التركيز 20ملغم/مل من مستخلص اليوكالبتوس الكحولي والنعناع الكحولي والتركيز 10 ملغم/مل لكل من مستخلص الكجرات الكحولي , الكجرات المائي ,اليوكالبتوس الكحولي ,النعناع الكحولي, والنعناع المائي ادى الى ظهور سم الافلا B_1 .

قد يعود السبب في عدم ظهور سم الافلا B_1 هو ان المستخلصات النباتية ربما تمنع المستخلصات تكون مركب Acetate من الأيض الأولي الذي يُعدُّ اللبنة الاساسية في تكوين سم الافلا .

تتفق نتائج الدراسة الحالية في تأثير المستخلص الكحولي لكل من الكجرات واليوكالبتوس على انتاج سم الافلا B_1 مع ما وجده نعمة, (2011) اذ ان معاملة الفطر *A. flavus* بمستخلص الزعتر الكحولي عند التركيز 5 ملغم/مل ادى الى ظهور سم الافلا, لكن زيادة التركيز الى 10 و15ملغم/مل لم يظهر السم , في حين لا تتفق هذه النتيجة مع ما وجده Maraqa واخرون(2007) اذ ان زيادة تركيز الحبة السوداء في وسط النخالة الصلبة يؤدي الى ظهور سم الافلا B_1.

جدول (4-8) تأثير التراكيز المختلفة□لغم/□ل□ن المستخلصات النباتية على انتاج سم الافلا B_1 بفعل الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* في وسط PDA

النوع النباتي	نوع المستخلص	*A. flavus* B_1			*A.parasiticus* B_1		
		10	20	30	10	20	30
الكجرات	كحولي	+	–	–	+	–	–
	□ائي	+	–	–	+	–	–
اليوكالبتوس	كحولي	+	–	–	+	+	–
	□ائي	–	–	–	–	–	–
النعناع	كحولي	–	–	–	+	+	–
	□ائي	+	–	–	+	–	–

+ : انتاج سم الافلا .

_ : عدم انتاج سم الافلا .

4-8. تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC

تم تحديد أدنى تركيز مثبط للمستخلصات الفعالة المدروسة ، إذ اختبرت التراكيز 2 و4 و 6 و 8 و 10 ملغم/مل لتلك المستخلصات و تأثيرها التثبيطي في نمو الفطرين .

وقد بين الجدول (4-9) أن أدنى تركيز مثبط للمستخلص الكحولي للكجرات هو 4 ملغم/مل لكلا الفطرين . في حين ان المستخلص المائي قد سجل 4 ملغم/مل للفطر *A.flavus* و6 ملغم/مل للفطر *A.parasiticus* .اما نبات اليوكالبتوس فقد كان التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي هو 2 ملغم/مل للفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus* في حين سجل المستخلص المائي 4 ملغم/مل لكلا الفطرين المذكورين , في حين سجل نبات النعناع أدنى تركيز مثبط للمستخلص الكحولي 4 ملغم/مل للفطر *A. flavus* و6 ملغم/مل للفطر *A.parasiticus* , اما المستخلص المائي فقد سجل 6 ملغم/مل للفطر *A. flavus* و8 ملغم/مل للفطر *A.parasiticus* .

الجدول (4-9) التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية الفعالة للفطرين *A. flavus* و*A.parasiticus*

النوع النباتي	نوع المستخلص	التركيز المثبط الادنى (ملغم/مل)	
		A. flavus	*A.parasiticus*
الكجرات	كحولي	4	4
	مائي	4	6
اليوكالبتوس	كحولي	2	2
	مائي	4	4
النعناع	كحولي	4	6
	مائي	6	8

4-9. تأثير خميرة الخبز *S.cerevisiae* على□عدل نمو الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* وانتاج سم الافلا B_1

أظهرت النتائج في الجدولين (4-10) و(4-11) ان هناك فروقات معنوية وعند مستوى احتمالية 0.05 . اذ اظهرت النتائج كفاءة فاعلية الخميرة*S.cerevisiae* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين*A. flavus* و*A.parasiticus* اذ بلغت نسبة تثبيط للفطر *A. flavus* 100 % عند التركيزين 0.6 و 0.4 غم/200 لتر في حين بلغت نسبة التثبيط 91.66% عند التركيز 0.2غم/ 200لتر اذ بلغ قطر المستعمرة 0.75 سم . في حين بلغت نسبة التثبيط للفطر *A. parasitcus* 75 % و 70.33% عند التركيزين 0.6 و 0.4 غم/200لترعلى التوالي فقد كان معدل قطر المستعمرة 2.25 و 2.67 سم على التواليو56 % عند التركيز0.2 غم/200لتر اذ بلغ معدل قطر المستعمرة 3.96 سم. ويعود السبب في فاعلية الخميرة*S.cerevisiae* إلى سرعة نموها ومنافستها على المكان والغذاء أو بسبب تطفلها على الفطر الممرض إذ كلها آليات مقترحة لفعل الخمائر كعوامل مكافحة احيائية (Shalaby and El-Nady,2008) , او يعود الى إضعاف وتحليل وتشويه هايفات الفطر الممرض فقد وجد ان لخميرة الخبز القدرة على تثبيط النمو الفطري لكل من *M.phaseolina* و*Fusarium solani* على الاوساط الغذائية في المختبر (Attyia and Youssry,2001) , كما ان التركيز المطلوب من خميرة الخبز لتحقيق نسبة التثبيط 50% ضد الفطر

F.oxyprum هو 6.35 غم/لتر (Shalaby and El-Nady,2008) , اما دراسة صالح واخرين (2009) اثبتت ان خميرة الخبز تعد عامل مكافحة احيائية ضد الفطر *M. phaseolina* اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 45.4 و64.8 % عند التركيزين 2 و5غم/لتر على التوالي .

اما بالنسبة لإنتاج سم الافلا B_1 فقد اظهرت النتائج في الجدول(4-12) ان معاملة الفطر *A. flavus* بالتراكيز0.6, 0.4 و0.2 غم/200 لتر من مستخلص خميرة الخبز يؤدي الى عدم ظهور سم الافلا B_1 وذلك بسبب عدم حدوث نمو للفطر او ربما ان خميرة الخبز منعت تكون مركب Acetate من الأيض الأولي الذي يُعدُّ البادىء الاساسي في تخليق سم الافلا, وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده Al-Shanon (2001) اذ استخدم الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بتركيز 0.3 % لإزالة سم الافلا B_1 بتركيز 2000 جزء بالمليون في علائق الدواجن الملوثة به .

اما الفطر *A.parasiticus* فقد اظهرت النتائج ان معاملة الفطر بالتراكيز 0.6, 0.4 و0.2 غم/200 لتر من مستخلص خميرة الخبز لم يمنع ظهور سم الافلا B_1 , وربما يعود سبب ظهور السم الى حدوث نمو للفطر عند التراكيز الثلاثة .

جدول (4-10) تأثير التراكيز المختلفة (غم/ 200لتر) من خميرة الخبز *S. cerevisiae* في معدل قطر مستعمرة (سم) للفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*

تركيز خميرة الخبز / نوع الفطر	غم/200مل				المعدل
	0	0.2	0.4	0.6	
A.flavus	9.00	0.75	0.00	0.00	2.43
A. parasiticus	9.00	3.96	2.67	2.25	4.47
L.S.D	0.46				0.23
المعدل	9.00	2.35	1.33	1.12	
L.S.D	0.26				

جدول (4-11) تأثير التراكيز المختلفة (غم/لتر)□ن خميرة الخبز *S.cerevisiae* في النسبة المئوية لتثبيط الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*

تركيز خميرة الخبز (غم/200لتر)	*A.flavus* النسبة المئوية للتثبيط (%)	*A. parasiticus* النسبة المئوية للتثبيط (%)
0.6	100	75.00
0.4	100	70.33
0.2	91.66	56.00
0	0.00	0.00

جدول (4-12) تأثير التراكيز المختلفة□ن خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* على انتاج سم الافلا B_1 بفعل الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*

تركيز خميرة الخبز(غم/لتر)	سم الافلا B_1	
	A. flavus	*A.parasiticus*
3	-	+
2	-	+
1	-	+

+ : انتاج سم الافلا B_1.

- : عدم انتاج سم الافلا B_1.

10-4. تـــأثير بعـــض العوامـــل الفيزيائيـــة فـــي نمـــو الفطـــرين *A.flavus* و *A. parasiticus* وانتاج سم الافلا B_1

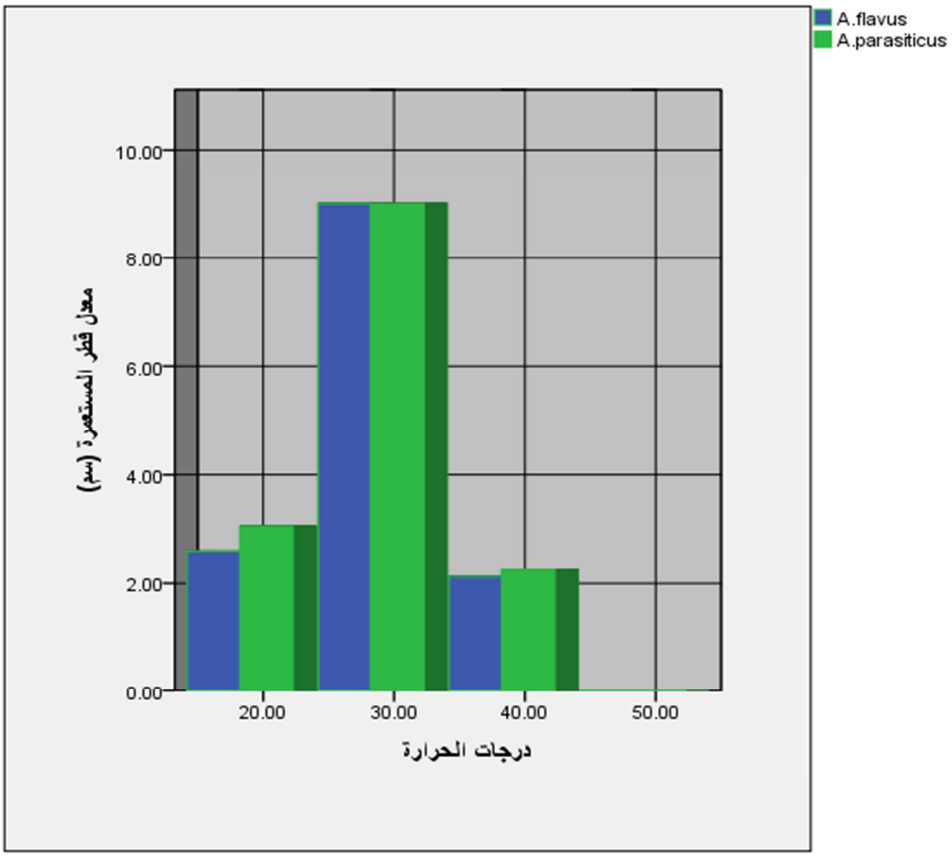
1-تاثير درجة الحرارة

تشير النتائج الموضحة في الشكل (1) الى انَ هناك فروقات معنوية وعند مستوى احتمالية 0.05 بين المستويات . وقد اظهرت النتائج ان هنالك اختلاف في نمو الفطرين *A.flavus* و *A. Parasiticus* عند مستويات الدرجات الحرارية المختلفة بعد الانتهاء من عملية التحضين .اذ ظهر افضل نمو للفطرين عند درجة الحرارة 30 م ° اذ بلغ معدل اقطار مستعمرات الفطرين 9 سم على التوالي بتفوق معنوي على درجات الحرارة الاخرى , ثم درجة الحرارة 20 م ° اذ اظهر الفطرين *A.flavus* و *A. parasiticus* نموا بلغ معدل قطر المستعمرة 2.83, 3.04 سم على التوالي , في حين كان معدل نمو الفطرين *A.flavus* و *A. Parasiticus* عند درجة حرارة 40 م ° هو 2.13 , 2.25 سم على التوالي , اما عند درجة الحرارة 50 مْ فلم يحصل نمو للمستعمرات الفطرية . وهذه النتائج تماثل ما توصل اليه Agag (2004) الذي اشار الى انَ الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* من الفطريات التي تنمو في درجات حرارية معتدلة ومتماثلة ولهما مدى مُعيّن من درجات الحرارة يتراوح مابين 12-41 مْ غير إن الدرجة الحرارية المثلى للنمو تتراوح بين 25-32 مْ , وكذلك تتفق مع ما وجده نعمة (2011) اذ وجد ان درجة حرارة 55 مْ لم تعط نمو للفطر*A. flavus* في حين ان درجتي الحرارة 15و45 مْ اعطت نسبة متقاربة وصلت الى 3.2 و2.93 سم على التوالي , اما درجتا الحرارة 25 و35 مْ فاعطت معدل نمو 9 سم للفطر نفسه .

اما بالنسبة لا نتاج سم الافلاB_1 من قبل الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* فقد اظهر الجدول (4-13) عدم ظهور سم الافلا B_1 عند درجة حرارة 50 مْ لكلا الفطرين المدروسين , وكذلك عدم ظهور السم عند درجة حرارة 40 مْ للفطر *A.flavus* .في حين ظهور سم الافلا B_1 عند درجتي الحرارة 20 و30 مْ لكلا الفطرين وكذلك عند درجة حرارة 40 مْ للفطر *A. parasiticus* .

ان لكل فطر درجة حرارة مثلى للنمو او لا حداث المرض او لإنتاج السموم وان اي ارتفاع أو انخفاض عن هذا المدى يؤدي الى موت الفطر أو توقف فعالياته الحيوية والذي قد يكون ناتجاً من الخلل الحاصل في النشاط الأنزيمي للفطر اذ يؤدي ارتفاع درجة الحرارة عن الحدود المثلى للنمو الى تحطم الأنزيمات مثل أنزيم Cellulase (Rehman *et al.*,2008).

أما الانخفاض الحراري فإنه يسبب توقف تبادل المواد المذابة في الوسط عبر الغشاء السايتوبلازمي (Tanner,1997) .



$L.S.D._{0.05}=0.53$

الشكل(1) تأثير درجات الحرارة على معدل قطر المستعمرة(سم) للفطرين *A.flavus* و *A. Parasiticus*

2- تأثير الرقم الهيدروجيني

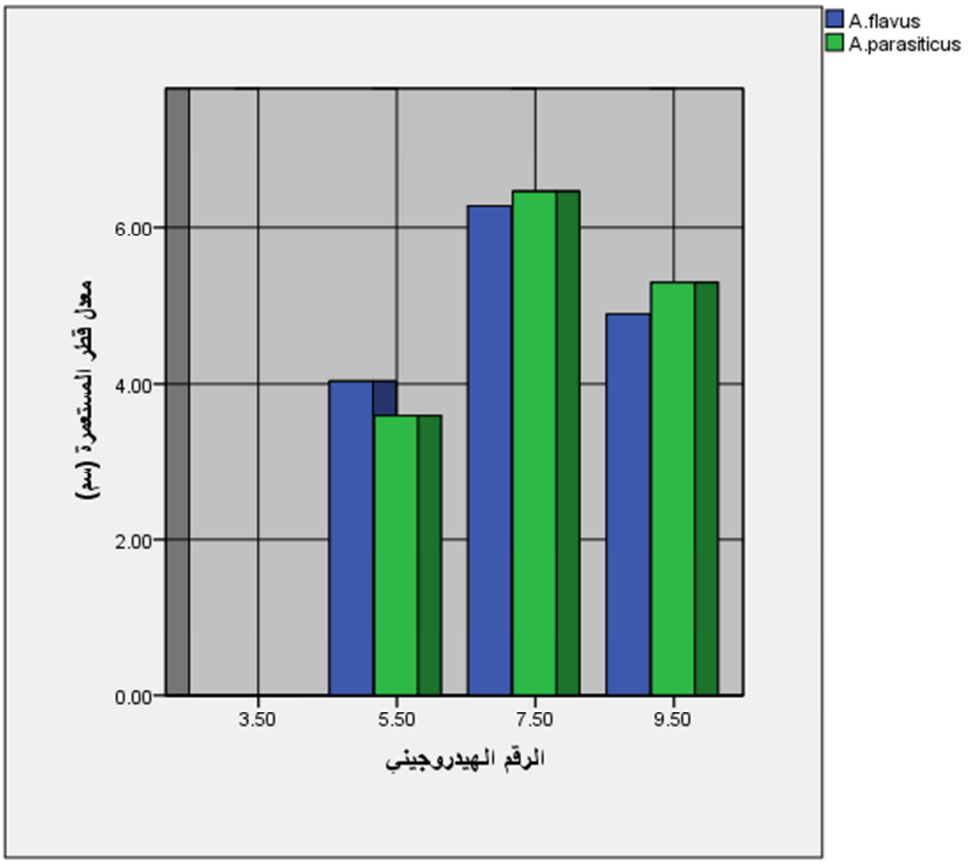
تشير النتائج الموضحة في الشكل (2) ان هناك فروقات معنوية وعند مستوى احتمالية 0.05. وقد اظهرت النتائج ان هناك اختلاف في نمو الفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* عند pH المختلفة بعد الانتهاء من عملية التحضين . اذ ظهر افضل نمو للفطرين عند pH 7.5 اذ بلغ معدل اقطار مستعمرات الفطرين *A.flavus* و *A. Parasiticus* 6.29 و6.50 سم على التوالي , ثم يليه pH 9.5 اذ اظهر الفطران *A.flavus* و *A. parasiticus* نموا جيدا اذ بلغ معدل قطر المستعمرة للفطرين 5.08 و 5.29 سم على التوالي , اما مستوى pH 5.5 بلغ معدل اقطار مستعمرات الفطرين 4.04 و3.58 سم على التوالي , في حين لم يحدث أي نمو للفطرين عند pH 3.5 .

اما بالنسبة لإنتاج سم الافلا B_1 من قبل الفطرين *A.flavus* و*A. parasiticus* فقد اظهر الجدول (4-13) عدم ظهور سم الافلا B_1 عند pH 3.5 لكلا الفطرين المدروسين , في حين ظهرسم الافلا B_1 عند pH 5.5 و7.5و9.5 .

هذه النتائج تماثل ما توصل اليه نعمة ,(2011) فقد اشار إلى فشل الفطر *A.flavus* في النمو وانتاج سم الافلا B_1 وB_2 عند pH 3.5 , اما pH 6.5 فقد اعطى اعلى معدل نمو للفطر اذ وصل نمو المستعمرة 9 سم وكذلك زيادة انتاج سم الافلا لكلا النوعين ,في حين لا تتفق مع دراسة Shafique واخرون(2009) اذ وجدوا ان الفطر *A.flavus* ينمو بين مدى pH يتراوح بين 4.5-6.5 , كذلك لا تتفق مع Lie وMarth (1968) اذ وجدا ان الفطر *A. parasiticus* ينمو في مدى واسع من الاس الهيدروجيني مع نمو امثل يحدث في pH مقداره 4.0-5.0 , اما نتيجة إنتاج السم فأنها تتنفق مع نتيجة Keller واخرين(1997) اذ وجدوا ان انتاج السم يقل في الفطر *A. parasiticus* كلما زاد الرقم الهيدروجيني للوسط.

ان الرقم الهيدروجيني يلعب دورا" مهما" في نمو الكائنات الحية المجهرية ومنها الفطريات حيث وجد ان الرقم الهيدروجيني يؤثر كثيراً في عملية نفاذية الايونات عبر الغشاء الخلوي للكائنات الحية ومنها الفطريات اذ اوضحت نتائج الابحاث العلمية ان افضل حالة لنفاذية الايونات الموجبة والسالبة عبر الغشاء البلازمي للفطريات يحدث عند الرقم الهيدروجيني الواقع بين 5.5-6 اما اذا زاد الرقم الهيدروجيني عن هذا المستوى فتحدث زيادة في نفاذية الايونات الموجبة على حساب كمية الايونات السالبة والعكس صحيح مما يخلق حالة من عدم التوازن في كميات الايونات النافذة عبر الغشاء الخلوي وبالتالي ضعف نمو الفطر كما ان الرقم الهيدروجيني يؤثر على جاهزية العناصر المعدنية التي يحتاجها الفطر اذ ان الفطريات

تستغل العناصر المعدنية بصورتها الايونية وهذه الصورة تتوفر عندما يكون الرقم الهيدروجيني دون7 اما اذا كان الرقم الهيدروجيني اكبر من ذلك فتشكل العناصر المعدنية معقدات مع مركبات اخرى وبالتالي لا تكون جاهزة للفطر كعناصر المغنيسيوم والخارصين والفوسفات (Kavanagh,2005).



$L.S.D_{.0.05}$=1.60

الشكل(2) تأثير الرقم الهيدروجيني على معدل قطر المستعمرة(سم)

للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus*

جدول (4-13) تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على انتاج سم الافلا B_1 بفعل الفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* في وسط PDA

العوامل	سم الافلا B_1							
	A. flavus				*A.parasiticus*			
درجة الحرارة	20	30	40	50	20	30	40	50
	+	+	-	-	+	+	+	-
الرقم الهيدروجيني	3.5	5.5	7.5	9.5	3.5	5.5	7.5	9.5
	-	+	+	+	-	+	+	+

+ : انتاج سم الافلا B_1.

- : عدم انتاج سم الافلا B_1

3- تأثير الحركة

تشير النتائج الموضحة في الجدول (4-14) ان هناك فروقات معنوية وعند مستوى احتمالية 0.05 بين المستويين . وقد اظهرت النتائج ان هناك اختلافا" في الوزن الجاف(غم) للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* عند دراسة تأثير عامل الحركة اذ تبين ان الحضن مع الحركة المستمرة لمدة 3 أيام كانت الفضلى في زيادة الوزن الجاف للفطرين مقارنة مع ظروف الحضن بدون حركة , اذ بلغ الوزن الجاف للفطرين *A.flavus* و*A. Parasiticus* عند الحضن مع الحركة 1.24 و 1.13 غم على التوالي وبلغت 0.88 و0.83غم عند الحضن بدون حركة .

هذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه سرحان,(2012) وهو انَ نمو الفطريات يزداد عموما" بزيادة التهوية وان تنمية الفطريات في المزارع الهزازة يكون اكبر مما هو في المزارع الساكنة لان عملية التحريك او الهز Shaking توفر ما يحتاجه الفطر من الاوكسجين لنموه ولفعالياته الايضية , فقد وجد بان الوزن الجاف للفطر *Penicillum expansum* المنمى في مزرعة هزازة يكون اكبر مما هو في المزرعة الساكنة في جميع مراحل النمو.

جدول (4-14) تأثير الحركة في معدل وزن الغزل الفطري الجاف (غم) للفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus* على وسط PDB

نوع الفطر	معدل الوزن الجاف(غم) للفطر		المعدل
	الحضن بدون حركة	الحضن مع حركة	
A. flavus	0.88	1.24	1.06
A.parasiticus	0.83	1.13	0.98
L.S.D	0.09		0.06
المعدل	0.57	0.79	
L.S.D	0.05		

4-11.الكشف عن وجود الفينولات في الفطرين *A. flavus* و *A. parasitcus*

أشارت النتائج إلى أن للفطرين *A. flavus* و *A. parasitcus* القدرة على أنتاج مركبات فينولية عند تنميتها في وسط مستخلص البطاطا والدكستروز السائلPDB , وذلك عند اضافة كاشف كلوريد الحديديك إذ تحول لون الكاشف إلى الأصفر عند إضافة 2 مل منه إلى 5 مل من المستخلص مما يدل على وجود الفينولات .وهذه النتيجة تتفق مع Porta وAbate, (2003) اذ اشارا الى ان اغلب الفطريات السامة تنتج مركبات ايضية ثانوية ذات طبيعة فينولية وتستخدمها كوسيلة وقائية ضد التغيرات البيئية او ضد فعل الانزيمات التحليلية عند تواجدها داخل جسم المضيف ، واغلب هذه المركبات تشتق من الكايتيدات المتعددة (Polyketides) , كما تتفق مع دراسة الخالدي, (2010) التي اوضحت الى ان الفطرين *G.candidum* و *G.penicillatum* لهما القابلية على انتاج مركبات فينولية في ثمار الطماطة او الوسط الزرعي و هي ذات طبيعة سامة اذ ادت الى حصول تأثيرات واضحة على معايير الدم الفسيولوجية لدى الجرذان المعاملة بها.

الاستنتاجات Conclusions

1- ان اكثر العينات قابلية على التلوث بالفطريات المنتجة لسم الافلا B_1عند توفر الظروف الملائمة للتلوث هي عينات الذرة الصفراء تليها الحنطة ثم الفاصولياء .

2- أن المستخلصات الكحولية لنبات الكجرات واليوكالبتوس والنعناع كانت أفضل من المستخلصات المائية في تثبيط نمو الفطرين *A. flavus* و *A.parasiticus*.

3- وجد ان لبعض المستخلصات الكحولية والمائية للنباتات المدروسة القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 عند جميع التراكيز، في حين ان بعضها الاخر ليس له القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 إلا عند التراكيز العالية .

4- تحتوي النباتات المدروسة على مجموعة من المركبات الفعالة التي يعود إليها التأثير المثبط للفطرين المدروسين مثل القلويدات والتانينات و الفينولات و الصابونينات و الكلايكوسيدات وغيرها .

5- أثبتت خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* كفاءة عالية في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* .

6- ان العوامل الفيزيائية كدرجات الحرارة والرقم الهيدروجيني أعطت معدلات نمو مختلفة ما عدا درجة الحرارة 50 ºم و pH يساوي 3.5 فقد أعطيا نسبة تثبيط 100 % لنمو الفطرين ومنعا ظهور سم الافلا B_1, اما عامل الحركة فان تنمية الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* في المزارع الهزازة يكون الوزن الجاف لها اكبر مما هو عليه في المزارع الساكنة .

التوصيات Recommendation

1- إنشاء مختبرات خاصة تقوم بفحص الأغذية المختلفة في الاسواق وتحديد سلامتها من التلوث بالسموم الفطرية .

2- اجراء دراسات لتنقية المركبات الفعالة التي يعود إليها التأثير التثبيطي على الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* من النباتات الأكثر تأثيرا .

3- التحري عن قابلية نباتات اخرى فعالة ضد الفطريات المنتجة لسموم الافلا .

المصادر

المصادر العربية
ARABIC REFERENCES

- إبراهيم , إسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري (1998). السموم الفطرية , مركز أباء للأبحاث الزراعية .343 صفحة .

- ابو زيد، الشحات نصر(1988). النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية. الطبعة الاولى، الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة . 473 صفحة.

- أبو هيلة ، عبد الله ناصر (1987) . علم الفطريات ، مطبعة الرياض . 447 صفحة .

- الجراح ، نيران سالم (1988) . دراسة تعفن ثمار الكمثري و الرمان و السموم المفرزة من قبل مسببات التعفن بفترة ما بعد الجني . رسالة ماجستير ،كلية الزراعة – جامعة بغداد.86 صفحة.

- الجميلي ,سامي عبد الرضا (1996). المقاومة المتكاملة ضد الإصابة بالفطر*Aspergillus flavus* والتلوث بالسم افلا B_1 في حاصل فستق الحقل. اطروحة دكتوراه, كلية الزراعة – جامعة بغداد.

- الجنابي، علي عبد الحسين صادق(1996). تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الانسان. رسالة ماجستير/ كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.
- الخالدي, بهيجة عبيس حمود (2010) .التوصيف الوظيفي والجزيئي لبعض عزلات الفطر *Sp Geotrichum* والكشف عن بعض تأثيراتها الوظيفية والنسيجية المرضية في ذكور الجرذ الابيض .اطروحة دكتوراه . قسم علوم الحياة . كلية العلوم ,جامعة الكوفة.

- الدليمي، خلف صوفي داوود (2002). الإنزيمات المايكروبية والتفافات الحيوية. جامعة فيلادلفيا- الأردن. 98 – 121.

- الرحمة ، عبد الله بن ناصر (1998). اساسيات علم الفطريات . الرياض . جامعة الملك سعود عمادة شؤون المكتبات .

- الساعدي, ابتسام بشير كاظم (2012). توصيف عزلات الفطر .*Aspergillus* spp الحاملة لجين aflR وإمكانية الحد من إصابتها لبعض الأغذية في أسواق النجف الاشرف . رسالة ماجستير, كلية العلوم . جامعة الكوفة .

- السهيلي ، ابراهيم عزيز، وقيصر نجيب صالح وعبد اللطيف سالم اسماعيل (1982). الفطريات ، دار الكتب للطباعة والنشر.

References.....المصادر

- ألشكري ، مهدي مجيد (1991) .أساسيات الفطريات وأمراضها النباتية مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد. 396 صفحة .

- الشيخلي، محمد عبد الستار و فريال حسن عبد الجليل و حسن فياض العزاوي (1993). الكيمياء الحياتية العملي . الجامعة المستنصرية .

- العاني، اوس هلال جاسم (1998). دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية *Nigella sativa* L. وتأثير مستخلصاتها على بعض الاحياء المجهرية. رسالة ماجستير، كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

- العروسي ، حسين وسمير ميخائيل ومحمد علي عبد الرحيم (2001). أمراض النبات، منشاة المعارف الإسكندرية.

- العساف , شفاء طيار,عبد الكريم سليمان النعيمي و صالح عيسى محمد(2011). التأثير المثبط لمستخلصات بعض النباتات الطبية في فطر *Aspergillus niger* . مجلة ابحاث كلية التربية الاساسية , المجلد 10, العدد 4.

- العواد، هيام عبد الرضا كريم (2001). دراسة المكونات الكيمياوية لبذور نبات الكتان *Linum ustatissimum* وتأثير مستخلصاتها في بعض الاحياء المجهرية المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية، ابن الهيثم/ جامعة بغداد.
- الفيصل, هبة قاسم حميد(2005). التحري عن سموم الافلا B_1 وB_2 اوكرا A والسترينين في الحبية والبرغل والجريش . رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

- القزاز، خالد لقمان إبراهيم(1986). دراسة مسحية عن مدى وجود الافلاتوكسين B1، B2، G1، G2 في بعض الحبوب و مشتقاتها. رسالة ماجستير ، كلية الزراعة- جامعة الموصل .

- القيسي، استبرق عز الدين محمود (2004). تأثير مستخلصات نبات خناق الدجاج *Zygophyllum fabago* L. والزيت الطيار لقشور ثمار النارنج *Citrus aurantium* الخضراء في نمو وفعالية بعض الاحياء المجهرية. رسالة ماجستير، كلية التربية/ ابن الهيثم . جامعة بغداد.

- المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1988) . النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي . جامعة الدول العربية ، الخرطوم . 477 صفحة.

- الهيتي، اياد عبد الواحد (1977). الفطريات التي تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن تشخيصها، تأثيرها، مقاومتها. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

- الهيتي، اياد عبد الواحد (1992). السموم الفطرية – المفهوم العام. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد.

المصادر.....References

- الورشان ، سالم حسن ؛ إسماعيل عباس الدليمي و كمال برزان ندا (2002). التحري عن الفطريات السامة الملوثة للفواكه المجففة في الاسواق المحلية. مجلة القادسية للعلوم الصرفة ، المجلد 7 ، العدد 1. 7 صفحات.

- باقر ,عبد الواحد (1984) .الأحياء المجهرية للحبوب ومنتجاتها مع التركيز على فطريات الحبوب . مجلة الصناعات الغذائية .43(5) : 46-49 .

- حسين، فوزي طه قطب (1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها، دار المريخ للنشر، الرياض . 356 صفحة.

- حمودي ، سنبل جاسم و علي عبدالله الدوري (2001) . تأثير تلوث الأعلاف بسموم الافلا B_1 على وزن الجسم و اوزان بعض الاعضاء الداخلية . مجلة العلوم الزراعية العراقية ، المجلد 32 ، العدد 6 . 8 صفحات .

- روبرتس، ج.ر. (1990). سلامة الغذاء . ترجمة ساجدي، عادل جورج . دار الحكمة للطباعة والنشر-جامعة البصرة. 464 صفحة.

- رويحة، امين (1971). التداوي بالأعشاب بطريقة علمية تشمل الطب الحديث والقديم. الطبعة الثالثة، دار الاندلس للطباعة والنشر. بيروت. 593صفحة.

- سرحان, عبد الرضا طه (2012). علم الفطريات العملي .الطبعة الاولى .كلية مدينة العلم الجامعة بغداد. 128- 129 صفحة .

- سهلب ، عبد العظيم سمو و منيب موسى الساكت و ماضي توفيق الجعيفر و منير ناصر غرايبة (1990) . علم السموم الحديث . دار المستقبل للنشر والاعلان ، الجامعة الاردنية . 330 صفحة.

- صالح, ناهدة مهدي ؛آلاء خضير حسان ؛ ليلى جبار صبر وعمار امجد عايش(2009).تقويم فعالية خميرة الخبز وبعض العناصر وحامض السالسلك في مكافحة *Macrophomina phaselina* .مجلة العلوم الزراعية العراقية . (406):9-16.

- عبد اللطيف, مها (2009). دراسة تأثير الخلاصة الكحولية لأوراق نبات اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في نمو الفطر*Aspergillus flavus* وافراز الافلاتوكسين B_1.مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية , المجلد 25, العدد 1. 121-134صفحة.

- نعمة, عبد عقيل(2011). التحري عن بعض الفطريات المنتجة للافلاتوكسين في بعض الاغذية ومحاولة تقليل اضرارها باستخدام بعض المستخلصات النباتية والفيتامينات. رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة كربلاء.

المصادر.....References

- محمد، صالح عيسى (1999). تأثير بعض المستخلصات النباتية على الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين. رسالة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

- محمد، عبد العظيم كاظم (1985). علم فسلجه النبات الجز ء الثاني. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي: 1058.

- موسى ، طارق ناصر(1999). دراسة مقارنة كيميائية بين شاي الكجرات *Hibiscus sabdariffa* و الشاي الاعتيادي *Camellia sinensis*. مجلة إبن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية , العدد 12(3):1-7 .

- ياسين, نور, ومحمد طاهر اسماعيل وعصام الشماع(2012). تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للزيت العطري لنبات اكليل الجبل الدستوري على نمو الرشاشية الفلافية. كلية الصيلة. الجامعة العربية الدولية الخاصة-سوريا.

المصادر الاجنبية

FOREING REFERENCES

- **Abbott, W. S. (1925).** A method of Computing the effectiveness of an insecticide. J. Ent., 18: 265-267.

- **Adedayo, O. ; Anderson, W. ; Young, M. ; Sncickus, V. ; Patil, P. and Kolawole, D.(2001**). Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower. *Pharacut. Biol*. 39:1-5.

- **Agag,B.I. (2004).** Mycotoxin in foods and feeds : 1-Aflatoxins . Ass. Univ. Bull. Environ. Res.,7(1): 173-206.

- **Ahmed,M. ; Nazil,S. and Anwar,M. (1989)** . Studies on tannins from bark of *Pinus roxburghii* . J. Chem. Soc. Pakistan ., 11 : 213 – 217 .

- **Ajithadoss, K ; Pandian ,T.T; Rathinkumar,S.S;Edwin,.R; Sekar,T; Sakar P and Munusamy, S.(2006)** . Botany Higher Secondary Second Year. 1st Edition. Government of Tamil Nadu Textbook Corporation College Road Chennai.

- **AL-Adil, K.M.,; Basima, A.A. N.; Sawsan, A.Y. and Kassim, A.O. (1977).** Contamination by *Aspergillua flavus* group of some food stuffs in Baghdad. *Bull. Biol. Res*. Center, 9:107-115.

- **Alexopoulos , C.J .; Mims, C.W. and Blackwell , M. (1996).** Introductory mycology . Uthed . John Wiley and Sons , New York.

- **Al-Khazragi, S. M.(1991**). Biopharmacological study of *Artemisia herbaalba*. M. Sc. Thesis. Baghdad University.

- **Al-Saadoon, H. and Abdullah, K.(2001).** Some interesting Ascomycetes from Iraq.Iraqi J. of Biology. 1:125-134.

- **Al-Shanon, A. F. (2001).** Ability of Various isolates of *Saccharomyses cervisiae* on removal of aflatoxin in broiler feed stuff. A thesis of Master of sciene – college of science. Al-Nahrine Unvirsity.And mycotoxicoses.

References.....المصادر

- **Arseculeratne, S. N.; Desiva, L. M.; Wijesundera, S. and Bandunatha, C. H. S.(1969).** Coconut as amedium for the experimental production of layoxin. *J. Appl. Microbiol*., 18:88-94.

- **Asaoa,T . ; Buchi , G . ; Abdel Kader , M . ; Chang , S . B . ; Wick , E . L. and Wogan ,G.N. (1963).**Aflatoxin B and G .J..Am.Chem.Soc.,85:1706-1707.

- **Asker, A. A. (2004).** Physiological effect of aflatoxins on production and reproduction of rabbits. Review Articles Zagazig University.pp,12-14.

- **Atlas , R.M.(1984).** Microbiology : Fundamentals and Application macmillan publish-ing Co. New York .

- **Attyia , S. H. and A.A. Youssry (2001**) . Application of *Saccharomyces cerevisia* as abiocontrol agent against some diseases of solanaceae caused by *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani* . Egyptian Journal of Biology,3:79-87.

- **Azab, R. M. ;Tawakkol, W. M. ;Hamad, A. M.;Abou-Elmagd, M. K.;El-Agrab, H. M. and Refai, M. K. (2005).** Detection and estimation of aflatoxin B1 in feed and its biodegradation by bacteria and fungi. Egypt. J. natur. toxins. ,2:39-56.

- **Bako I, Mabrouk M, Abubakar A.(2009).** Antioxidant Effect of Ethanolic Seed Extract of *Hibiscus sabdariffa* linn (Malvaceae). Alleviate the Toxicity Induced by Chronic Administration of Sodium Nitrate on Some Haematological Parameters in Wistars Rats. Advance Journal of Food Science and Technology; 1(1)**:** 39-42.

- **Batista,P.P. ;Santosi, J.F. ;Oliveira, N.T.;Pires, A.P.D. ;Motta, C.M.S. and Luna-Alyes Lima, E.A.(2008).** Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers . Genet. Mol. Res., 7(3):706-717.

- **Bennett, J. W. (2009)**. An overview of the genus *Aspergillus*. From http://www.horizompress.com/aspergillus.

- **Bennett, J. W. and Klich, M. (2003**). Mycotoxins . Clin. Microbiol.

Rev.16:497–516.

- **Bennett, J.W and Klich, M. (2003).** Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev.,16(3):497-516.

- **Bernard, T.(1997).** "Reactions in Solution". An Applied Analytical Approach. John Wiley and Sons Ltd. England. 554 pp.

- **Bevan , E.A. , and M. Makower (1963)** . The physiological basis of the Killer character in yeast . Proc. XIth Int. Congr. Genet. 1 : 202-203 .

- **Bhatanagar, D. ;Yu,J. and Ehrlich, K. C. (2002).** Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol*.,81:167-206.

- **Bothast, R. J. , Rogers, R. F. and Hesseltine , C. W. (1974**). Milled corn products. *Cereal Chem*. 51:829-838.

- **Bressollier, P.; Letourneau, F. Urdaci, M., and Vernevil, B. (1999).** Purification and characterization of akeratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. Applied and Environmental Microbiol.; 65: 2570-2576.

- **Bruneton, J.(1995)** Pharmacognosy , Phytochemisty of Medicinal Plants . Lavoisier Publishing : Paris .

- **Bryden , W. L. , (1988).** Chronic effects of Mycotoxins in animals. Mycotoxin Symposium. University of Sydney , NSW , Australia. p.11.

- **Bullerman , L. B. (1981) .** Public health significant moulds and mycotoxin in fermented dairy products . *J . Dairy Sci*. , 64 : 2439 – 245.

- **Bullerman, L. B.; Lieu, F. Y. and Sally, A. (1977).** Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci*., 42 (4): 1107-1109.

- **Buttinger, G. ; Oostra, A. and Charoud-Got, J. (2010**).The certification of mass fractions of aflatoxin B1,B2,G1 and G2 in compound feeding stuff (low level). Printed in Belgium, European union.,34pp.

References.....المصادر

- **Carroll, G. C. and Wicklow, D. T. (1992)**. The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem (New York: Marcel Dekker, Inc).

- **Chakravarty , H . L . (1976).** Plant Wealth of Iraq . A dictionary of Economic Plant.Vol I . Botany directorate , Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Baghdad **.**

- **Chang , S . B . ; Abdel-Kader , M . M ; Wick , E.L. and Wagon , G . N . (1963) .** Aflatoxin B2 : Chemical identity and biological activity . Science .,142:1191-1192.

- **Cocker, R.D. ; Jones, B.D.; Nagler,M.J. and inpart, Gillman, G.A., Walbridge, G.A. and Pangrahi,A.J. (1984).** Mycotoxin training manual. Tropical development and Research Institute Overseas development administration. 35 pp.

- **Collee, J. ; Fraser, A. ; Marmion, B. and Simon, A.(1996).** Makie and McCartney practical medical microbiology. 14th. ed. Churchill Livingstone. New York. 978 p.

- **Cowan, M. M. (1999)**. Plant products as antimicrobial agents. ciln. Microbiol- Rev., 12 (4): 564-582.

- **Davis , N.D ; Dinner, U.L. and Eldridge, D.W. .(1966) .** Production of aflatoxin B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in semi synthetic medium . Appl. Micrbiol. 14: 378 -380 .

- **Dias, R.S.; Bambirra, E.A. ; Silva, M.E. and Nicole, J.R. (1995).** Protective effect of *S.boulardii* against the cholera toxin in rats. Braz. J. Med. Biol. Res28 : 323-325 .

- **Droby,S.and Chalutz, E . (1994).** Modeof action of biocontrol agents of postharvest diseases. In C. L. Wilson and M.E. Wisniewski(Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton,p.63-75.

- **Edinger, P. (1973).** How to grow herbs, Lane books menlopavk, caliphornia, 64-65.

References.....المصادر

- **Ellis,D.H. (1994) .** Clinical Mycology **:** The Human Opportunistic Mycosis ., Gillingham printers pty. Ltd. Australia: 166 pp.

- **Elmanama, A. ; Amany, A. and Nedaa, A. (2011**) . Antibacterial, Antifungal and *inermis*, *Punica granatum* and *Hibiscus sabdariffa* Synergistic Effect of Lawsonia . Medical Technology Department, Islamic University-Gaza, Palestine . 7:33-41

- **Falahati,M. ; Tabrizib, N. and Jahaniani, F. (2005**). Anti Dermato phyte activities of *Eucalyptus camaldulensis* in comparison with griseofulvin. *Iranian J. of Pharmacology and Therapeutics*,4,80,(2005).

- **Felicia, W. U. (2004).** Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards .*Environ. Sci. technol.*,38(15):4049-4055.

- **Fennell, D.J. and Lillehoj, E.B. (1977).** *Aspergillus*, aflatoxin presence in silks and insects from developing and mature corn ears. Cereal Chem. 52:220-224.

- **Forbish, R. A.; Bradley, B.D.; Wagner, D. D; Long-Bardly, P. E. and Hairston, H. (1986**). Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally Contiaminated grain. J. Food Prot., 44: 781-785.

- **Frazier ,W.C. and westhoff, D.C.(1988).** Food Microbiology. 4thed McGraw-Hill International eclition, USA.

- **Geiser, D. M.; Samson, R. A.; Varga, J.; Rokas, A. and Witiak, S. M. (2008)**. A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus-wide phylogeny. In: *Aspergillus* in the Genomic in *Aspergillus*, and Samson, R.A., eds. (Netherlands: Wageningen Academic Pubs), pp. 17–32.

- **Gershenzon, J.; Mc.Conkey, M.E. and Croteau, R. (2000).** Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint.*Plant Physiol*., 122: 205–213.

References.....المصادر

- **Goldblatt, L.A. (1969).** Aflatoxin: Scientific background control and implication. Food Science and Technology, a series of monographs, Academic press, New York and London. 472 pp.

- **Goncalez, E.; Fellcio, J.D.;Pinto, M. M.; Rossi, M. H.; Medina, C.; Fernandes, M. J. B. and Simoni, I.C. (2003).** Inhibition of aflatoxin production by *polymnia sonchifolia* and its in vitro cytotoxicity. Arq. *Inst. Biol*., 70(2):139-143.

- **Graeme, M. Walker; Anne, H. Mcleod and Valerie, J. Hodgson . (1995)**. Interactions between Killer yeast and phathogenic.fungi FEMS Microbiology. 127, Issue 3, 213-222 .

- **Gratz,S. (2007).** Aflatoxin Binding By probiotics:Experimental Studies on Intestinal Aflatoxin Transport, Metabolism and griseofulvin. *Iranian J. of Pharmacology andTherapeutics*,4,80

- **Guth , E.H.; Hashimoto, T., and Conti, S.F. (1972).**Morpho-genesis of ascospares in *S.cerevisiae* . *J. Base* 109 :860-880.

- **Guzmán-de-Peña,D. and Peña-Cabriales, J. J. (2005) .** Regulatory considerations of aflatoxin contamination of food in Mexico. Microbiol., 47(3-4): 160-164.

- **Harborne, J. B.(1984).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 2nd. ed. Chapman and Hall, London, New York.

- **Hartley, R. D.; Nesbitt, B.F. and O'Kelly, J. (1963).** Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*., 198: 1056-1058.

- **Hasan, H. A. H.; AbdelSater, M. A. (1993).** Studies on mycoflora and aflatoxin in regular and deca black tea. *Journal of Islamic Academy of Sciences.*, 6(2): 1-7.

- **Haworth, S.R.; Lawler, T.E.; Zeiger, E. and Park, D.L. (1989).** Mutagenic potential ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 66:102-104.

References.....المصادر

- **Hitokoto, H.; Morozumt, S.; Wauke, T.; Sakai, S. and Ueno, I. (1978).** Inhabitation effects of condiments and herbal drugs on the growth and toxin production of toxigenic fungi. Mycopathologia., 66(3): 161-167.

- **Hur,J. ; Ahn,S.Y.; Koh ,Y. J. and Lee, C. I. (2000**).Antimicrobial properties of cold-tolerant *Eucalyptus* species against phytopathogenic fungi and food-Borne Bacterial pathogens, Plant Pathol.J.,16,286.

- **Indian pharmacopoeia (1996).** Delhi : Government of India , Ministry of Health and Family Welfare Controller of Publications .(1) . P . 310.

- **Jernejc, K. and Cimerman. A. (2001**). Morphological Characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus species* . Foo. Tech. Biotech.,39(4)333-340.

- **Jr,A.D.P. (2008).** Evaluation of aflatoxin – related products from ozonated corn .Thesis Ph.D. Louisiana state university,Agricultural and mechanical college.,99pp.

- **Kavanagh, K.D. (2005).** Boom-or-bust growth in the coral reef lagoon. Marine Ecology Progress Series 286:307-310.

- **Keller, N.P. ; Nesb, C.H. ; Phillips, B.S.T.D. and Burow, G.B. (1997).** PH regulation of strigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Asper-gillus spp.* Phytobathology , 87 : 643 – 648 .

- **Klich, M. A. (2003).**Identification of common *Aspergillus s*pecies. CBS, Utrech. the Netherlands.

- **Klich, M. A**. **(2006).** Identification of clinically relevant pergilli. Med. Mycol. 44: 127-131.

- **Klich, M. A**. **(2007).** *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* **8**: 713-22.

- **Kown-Chung , K.J. and Bennet, J.E. (1992)** . Medical mycology .Lea and Febiqer . pp .745.

References.....المصادر

- **Krishnamachari, K.A. ; Bhat, R.V. ; Nagarajan, V. and Tilak, T.B. (1975).** Hepatitis due to aflatoxicosis: An outbreak of hepatitis in parts of western India. *Lancet, 1*, 1061–1063.

- **Laskin , A. I. and Lechevalier, H. A. (1978)**. CRC Handbook of Microbiology 2ed Edition. Π.CRC press. Inc.

- **Leben, S. D. ; Wadi, J. A. and Easton, G. D. (1987)** . Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *V. deliae* . *Phttopathol*. 77 : 1592 – 1595.

- **Lee , L. S. ; Lacey , P. E. ,and Goynes, W. R. (1987)** . Aflatoxin Arizona cottonseed : A model study of insect- vectored entry of cotton bolls by *Aspergillus flavus* . Plant Dis. 71 : 997 – 1001 .

- **Lewis, L.; Onsongo, M.; Njapau, H.; Schurz-Rogers, H.; Luber, G.; Kieszak, S.; Nyamongo, J.;Backer, L.; Dahiye, A.M.; Misore, A.; et al. (2005**). Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Perspect*., 113, 1763–1767.

- **Lie, Jennie L. and Marth, E. H. (1968).** Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in casien substrate at different pH values. *J. Dairy Sci*., 51: 1734.

- **Lillohoj,E.B. ; Kwolek,W.F. and Fennell,D.I. (1975).** Aflatoxin incidance and association with bright greenish yellow fluorescens and insect damage in a limited rurvey of freshly harvested high moister corn. *Cereal Chem.* 52:304-411.

- **Lin, V. A. and Dianese, P. R. (1976).** Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages. J. food sci. 47: 1773-1775.

- **Lodder , J. (1974).** The Yeast Ataxonomic study. North Holland company PP:1-103 .

- **Mahadevan , N. ; Shivali and Pradeep, Kamboj (2009).** *Hibiscus sadariffa* Linn.- An overview natural product radianc .8 (1) :77-83.

References.....المصادر

- **Makun, H. A. ;Anjorin, S. T. ;Moronfoye, B. ;Adejo, F. O. ;Afolabi, O. A. ;Fagbayibo, G. ;Balogun, B. O. and Surajudeen, A. A.(2010).** Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria. *Afr .J. Foo. Scie.* , 4(4) :127-135.

- **Maraqa, A. ;AL-sharo'a, N. F. ;Farah, H. ;Elbjeirami, W. M. ; Shakya, A. K. and Sallal, A. J. (2007)** . Effect of Nigella sativa extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* . Turk . *J. Biol*., 31: 155-159.

- **Marin , D. E. ; Taranu, I. R. P. ; Bunacin , F. ; Pascal ;Tudor ,D.S.;Avarm ,N.; Sarca , M . ; Cureu , I . ; Criste , R . D . ; Stuta , V . and Oswald , I . P . (2002) .**Changes in performance ,blood parameters , humoral and cellular immune responses in wealing piglets exposed to low doses of aflatoxins .*J..Anim.Sci*.80:1250-1257.

- **Meerdink, G. L. (2004).** Aflatoxins . In: Plumlee, K. H. (ed.). Clinical veterinary toxicology . Little Rock, Arkansas, USA.pp:231-235.

- **Meier, C.L. ; Rapp, J. ; Bowers, R.M. ; Silman, M. and Fierer, N. (2010).** Fungal growth on a common wood substrate across a tropical elevation gradient: temperature sensitivity, community composition, and potential for above-ground decomposition. *Soil Biol. Biochem*., 42: 1083-1090.

- **Meyer, E. and Wather, A.(1988).** Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrate and chitin in fresh water invertebrates. *J. Arch. Hydroboil*. 13 : 161-177.

- **Morehouse,L.G.(1979).**Mycotoxicosis of the bovine with reference to fungi and toxins associated with disease .The Bovine Practitioner. , 14:175-180.

- **Murray, M.T. (1995).** The Healing power of Herbs, prima publishing, 2nd ed., 280-285.

- **O'Connell . E. and Fox P. F.(2001).** Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products. International Dairy Journal. 11,Issue 3, P. 103-120.

References.....المصادر

- **Palpacelli ,V.; Cinai, M. and Rosini, G. (1991**).Activity of different "Killer" yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol Lett* 1; 68 (1) : 75-8 .

- **Pardo, E.; Marin, S.; Sanchis, V. and Ramos, A.J. (2005).** Impact of relative humidity and on temperature, visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiol*., 22: 383-389.

- **Pitt , J. I. and Hocking , A. D. (1997).** Fungi and food spoilage (Second ed.) Shampan and Hill .U.K. pp. PP:989.

- **Polonelli, L.; Conti, S. ; Gerloni, M.; Magliani, W.; Morace, G. and Chezzi, C. (1991).** Interfaces of the yeast Killer phenomenon. Grit. Rev. *Microbiol*. 18 :47-87 .

- **Porta,A. and Abate, D. (2003).**Bioactive compounds from plants and higher fungi of Ethiopia ,tranditional medic.oxford,pp.295-312.

- **Pundri,R.K.and Jain,P.(2010).** Antifungal activity of twenty two ethanolic plant extracts against food_associated fungi .journal of pharmacy Rsearch,3,506-510.

- **Qazi,J.L. and Fayyza,Z.(2006).**Aflatoxin contaminated foods and health risk perspective for Pakistani population.Mycppath.,4(2):27-34.

- **Rahimi, E., Shakerian, A., Jafariyan, M., Ebrahimi, M. and Riahi, M. (2009).** Occurrence of aflatoxin M1 in raw, pasteurized and UHT milk commercialized in Esfahan and Shahre Kord, Iran. *Food Security* 1: 317–320.

- **Raper , K.B. and Fennell , D.I. (1965).** The genus *Aspergillus*. The Williams and Wiking Co. , Battimor. 686 pp.

- **Rehman, P.; Sharifnabi, B. and Bahar, M.(2008).** Dectection of aflatoxin in Aspergillus species isolated from Pistachio in Iran. J. phytopathol., 156:15-20.

- **Rizki, Y. M. ; Fatima, K.B. and Badar, Y. (1997**). Antifungal activity of the plant *Trachyspermum ammi*. J. of scientific and Industrial Research. Pakistan., 40: 38-40.

References.....المصادر

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

- **Sakhare,P.S.;Harne,S.D.D.R.;Kalorey,D.;Warke,S.R.;Bhandarka r,A.G. and Kurkure ,N.V.(2007).** Effect of toxirak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxcosis and combined mycotoxicosis in broilers .*Vet.Archiv*.77:129-146.

- **Schellenberg (1994) .** Detal: Treatment of Clostridium difficile Diarrhea with brewers yeast Lancet. 15 ; 343(8890) :171-2 .

- **Scherm, B.; Palpmba, M.; Serra, D.; Marcell0, A. and Migheli, Q.(2005**). Detection of transcripts of the aflatoxins genes af ID, af IO, IP reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxins producing and non-producing isolates of *Aspergillua flavus* and *Aspergillua parasilicus* , Int. J. Food Microbiol.98:201-210.

- **Shafique, S. ; Bajwa, R. and Shafique, S. (2009).** Screening of Aspergillus niger and Aspergillus flavus for extra cellular alpha-amylase activity . Pak.*J. Bot*.,41(2):897-905.

- **Shakhawat, P.S. and Prasada, R. (1971).** Anti Fungal preperties of some plant extract, Growth inhibition, *Sci. cult*. 37(1): 40-41.

- **Shalaby, M. E. and El-Nady, M. F. (2008**). Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugarbeet plants.*Acta Biologica Szegediensis*, 52(2):271-275.

- **Shier,W.T. ; Lao,Y. ; Steele,T.W.J. and Abbas,K.H. (2005).**Yellow pigment used in rapid identification of aflatoxin producing *Aspergillus* strains are anthraquinones associated with the aflatoxin biosynthetic pathway . Bioorganic chemistry.,33;426-438.

- **Shihata, I. M.(1951).** A pharmacological study of *Anagallis arvensis* . M. D. Vet. Thesis. Cairo University.

References.....المصادر

- **Shubina , L . p . ; Siurin , S . A . and Savchenko , V . M . (1990).** Inhalation of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis . Vrachebnoe Delo (Kiev) Part 5 , PP . : 7 – 66

- **Smith, J.E. ; Solomans, S. , G.L. ; Lewis, C.W. and Anderson, J.G. , Ed. (1994).** Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate-General XII, science,Research and Development EVR, 16048 EN.

- **Sobolev, V.S. and Dorner, J.W. (2002).** Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography .J.. of Association of Official analytical Chemist s International,85:642-645.

- **Soliman, K. M. and Badeaa, R. I. (2002).** Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food. Chem. Toxicol., 40 (11): 1669-1675

- **Stokes, J.L. (1971).** Influence of Temperature on the Growth and Metabolism of Yeasts In :The yeast- Vol2. Edited by (Rose, A.H. and Harrison, J.S.) Accademic press, London and New York.

- **Sundahakar, p.;Latha, P. ;Sreenivasulu, Y.; Bhaskar Reddy, B.V. ; Hemalatha, T. M. ; Balakrishna, M. and** Raja **Reddy.(2009).** Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AfB1) in peanut by methleugenol. K. Ind. *J. Exp.Biol*.,47:63-67.

- **Suomalainen, H. and Oura, E. (1971).** Yeast Nutrition and Solute Uptake. In :The yeasts. Vol2. Edited by (Rose, A.H. and Harrison, J.S.) Academic press, London and New York.

- **Takahashi , T . ; Kokubo , R . and Sakaino ,M. (2004).** Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata* Lettersin Applied Microbiology 39(1):60. (Abs.).

- **Tanner, R.S. (1997**). Cultivation of bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology (ed. Hurs, C. J.; Knudsen, G. R.; Mclnerney, M. J.; Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V.). American Society for Microbiology, Washington. pp. 52-60.

References.....المصادر

- **Tantaaui, E. and Beraoud, L. (1994).** Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils at selected plant materials. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncel. ,13(1): 67-77.

- **Thampson, D.L. and Payne, G.A. (1983).** Early appearance of aflatoxin in developing corn kernels after inoculation with *Aspergillus flavus*. *Plant Dis*. 67:1321-1326.

- **Tindall, H.D. (1983).** Vegetables in the tropics. Macmillan press, London, 642.

- **Trivedi, N. A. and Hotchandani, S.C. (2004).** Astudy of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus* . Indian *J* . *Pharmacol* .,36 (2) : 93 – 94 .

- **Tseng, T.S. ; Tu, J.C. and Tzeau, S.S. (1995)** . Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada. Bot. Bull. Acad. Sin. 36 : 229 – 234 .

- **Upadhaya,S.D.;Park,M.A. and Ha,J.K.(2010**). Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review. Asian Aust.*J.Anim.Sci*.,23(9):1250-1260.

- **Van Egmond, H.P.and Jonker, M.A. (2005).** *Worldwide Regulations on Aflatoxins*; Abbas, H.K., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA,; pp. 77–93.

- **Vidon , N. ; Huchet ,T. and Ram, b. (1986)** Influence de ***saccharomyces boulardii.*** Sur la secretion induite chezle rat parla toxin cholera . (Abst) Gastroell terol. *Clin. Biol*. 10 : 13-16 .

- **Williams, B.L. and Wilson, K. (1975**). Principles and Techniques of practical Biochemistry.

- **Williams, J.H.; Phillips, T.D.; Jolly, P.E.; Stiles, J.K.; Jolly, C.M. and Aggarwal, D. (2004) .** Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr., 80,* 1106–1122.

References.....المصادر

- **Wood, J.B. (1998).** Microorganisms in foods. Academic and Professional, An Imprint of champan and Hall press. 1018 pp.

- **Younis,Y.M.H. and Malik.K.M.(2003).** TLC and HPLC assay of aflatoxin contamination in Sudanese peanuts and peanut produts., Kuwait.J.Sci.Eng.30(1):79-94.

- **Wyllie, T.D. and Morehouse, L.C. (1977).** Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An encyclopedic hand book. Vol.1, Mycotoxic fungi chemistry of Mycotoxins. Dekker. 538 pp.

SUMMARY

The study aimed to know the possibility of using some of plants namely Barley, Wheat, Maize, Peanut and Sunflower as well as *Saccharomyces cerevisia* , physical condition such as temperature, pH and aeration on the ability of *A. flavus* and *A. parasiticus* in terms of growth and aflatoxin production .

The results revealed the contamination of plants sample with *A. flavus* and *A. parasiticus* in different number , percentage and frequencies . Maize samples gave higher percentage and contamination i.e. 48 isolates followed by wheat, bean, barly and sunflower giving 34, 32, 27 and 17 isolates respectively . peanut samples gave lower value 15 isolates .

The test by ammonia solution method show 18 isolations out of 30 from *A. flavus* had ability to produce of aflatoxins B_1 60% , while *A. parasiticus* gave 55% .

extracts of Roselle , Eucalyptus and Mint plants either alcoholic or water at 10, 20 and 30 mg /ml inhibited the growth of those two fungi where alcoholic extracts of Roselle and Eucalyptus plants inhibited the growth by 100% at 30mg/ml, the colony appeared while white small isolate . the alcoholic extract was superior as compared with the water extract . results also revealed that , the treatment of those fungi with 20 and 30 mg/ml of alcohol extract of Roselle plant , water extract of Roselle , Eucalyptus and Mint plants as well as the treatment of fungi with 10% of water extract of Eucalyptus plant no aflatoxins B_1 was detected .

test indicated that the effective plants extracts contained many active compounds(ingredients) , alcoholic extract of Roselle plant contained all compounds except Saponins and Resins , whereas

water extract of Roselle did not contain Saponins , Resins and Tannins . alcoholic extract of Eucalyptus contained all compounds except did not contain Triterpenoids ,whereas, its water extract did not contain Alkaloids , Saponins , Resins , Flavonoids and Triterpenoids . the alcoholic extract of Mint contained Alkaloids, Tannins, Saponins, Carbohydrates and Triterpenoids ,with the absence of Saponins, Glycosides, Resins, Phenols and Triterpenoids in its water extract .

Results pointed that, the efficiency of *Saccharomyces cerevisia* in the inhibiting of radial growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* was 100% at 2 and 3 g/L and 91.60% at 1g/L in the *A. flavus* and 75.00 and 70.33% at 3 and 2g/L and respectively 56% at 1g/L for *A. parasiticus* , and the aflatoxin B_1 did not appeared with treatment of *A. flavus* with 1,2and 3 g/L from *Saccharomyces cerevisiae* extract while it appeared with treatment of *A. parasiticus* with 1,2 and 3 g/L from *Saccharomyces cerevisiae* extract .

Some physical parameters showed that the temperature 30^0C was the best for fungi growth and their production from afla B_1, where the mean diameter of the colony was 9 cm followed by 20^0C gaving 2.83 and 3.04 cm for *A. flavus* and *A. parasiticus* respectively .

Increasing and decreasing temperature from this rang toxins reduced in the fungal growth as well as their production of Afl B_1.

The best pH for fungal growth was 7.5 whose the no did growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* was 6.29 and 6.50cm respectively followed pH 9.5 giving 5.09 and 5.29cm for *A. flavus* and *A. parasiticus* respectively .On the other hand . No growth was obtained at pH 3.5 . The afla B_1 did not appeared with pH 3.5 , mean while it appeared with pH 5.5 , 7.5 and 9.5 .

There was difference in the dry weight of the above mentioned fungi due to aeration . the incubation with continuous aeration for 3 day was the best compared without aeration .The dry weight in the first treatment was 1.24 and 1.13g for *A. flavus* and *A. parasiticu* respectively whereas it was 0.88 and 0.83g in the second treatment respectively . Results also indicated that *A. flavus* and *A. parasiticu* had an ability to produce phenolic compounds when they grew on Broth Potato dextrose extract (PDB).

Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Karbala/ College of Education
for Pure Sciences - Department of Biology

Efficiency test of some plants extracts , bread yeast *Saccharomyces cerevisiae* and physical condition on growth inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* producing aflatoxin B_1

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

In

Biology –Botany

by

Antiethar Jabar Mohammad al-Aedany

Supervised By
Prof. Dr. B. T. Mohammad

1435

2014