وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفّة ـ قسم علوم الحياة

التحري عن بعض الفطريات المنتجة للافلاتوكسين في بعض ألاغذية ومحاولة تقليل أضرارها باستخدام بعض المستخلصات النباتية والفيتامينات

رسالة مقدمة

إلى

مجلس عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة

ماجستير علوم

في

علوم الحياة/ علم نبات ـ علم الفطريات

من قبل

عقيل عبد نعمة

(بكالوريوس / علوم حياة ٢٠٠٩)

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة بان طه محمد

١٤٣٣ هـ ٢٠١١ م

بِسۡمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحۡمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ٱلۡحَمۡدُ لِلَّهِ رَبِّ ٱلۡعَٰلَمِينَ﴾

صَدقَ ٱللَّهِ العَليُّ العِظيمُ

سورة الفاتحة : الاية (٢)

توصية المشرفين

نشهد بان إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات درجة ماجستير في علوم الحياة / النبات .

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / ٢٠١١

توصية رئيس قسم علوم الحياة

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

التوقيع:

الاسم: د. قيس حسين عباس

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة– جامعة كربلاء

التاريخ: / / ٢٠١١

إقرار المقوم اللغـوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (التحري عن بعض الفطريات المنتجة للافلاتوكسين في بعض ألاغذية ومحاولة تقليل أضرارها باستخدام بعض المستخلصات النباتية والفيتامينات) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع:

الاسم : د.فهد نعمة مخليف

المرتبة العلمية: مدرس

الكلية والجامعة: التربية للعلوم الانسانية / كربلاء

التأريخ: / /٢٠١١

إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ادناه نشهد بإطلاعنا على الرسالة الموسومة " التحري عن بعض الفطريات المنتجة للافلاتوكسين في بعض ألاغذية ومحاولة تقليل أضرارها باستخدام بعض المستخلصات النباتية والفيتامينات " وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل مايتعلق بها ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (جيد جيداً) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / نبات (الفطريات) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. مجيد متعب ديوان

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة الكوفة / كلية الزراعة

التاريخ : /٢٠١١/١١

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. كامل سليمان جبر

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة بغداد / كلية الزراعة

التاريخ : /٢٠١١/١١

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. ابراهيم خليل حسون

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : الكلية التقنية / المسيب

التاريخ : /٢٠١١/١١

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم :د. بان طه محمد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : /٢٠١١/١١

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أُصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : د.قيس حسين السماك

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان :عميد كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء

التاريخ : /٢٠١١/١١

الإهداء

إلى صاحب الموجة الرقيقة والعيون الدافئة ..... بلدي العراق

إلى الحضن الدافئ .....إلى منبع الحنان .....إلى بر الأمان

حبيبتي ..... أُمي

إلى من ضحى بعمره من اجلي .....إلى من سهر الليالي

حياتي ..... أبي

إلى مرافقي دربي .....وباقة وردي

أخوتي وأخواتي

إلى الحياة القادمة .....

اهدي جهدي المتواضع هذا

الباحث

شكر وتقدير

الحمد لله المتفضل بنعمائه ، المنفرد بملكوته فوق سمائه ، العادل بين جميع الخلق في حكمه وقضائه ، أحمده على ما فضلنا به من الإسلام ، وجعلنا من أمة محمد عليه وعلى آله السلام ، وممن آمن به وصدق واقتدى بآثاره وسننه وتحقق ، فصلوات الله عليه مادام قلب يخفق ، وعلى أصحابه وأزواجه وذريته ما طلعت شمساً إلا تشرق .

أتوجه بشكري الجزيل وعرفاني الجميل لأستاذتي الفاضلة الدكتورة بان طٰه محمد التي تفضلت بالإشراف على إعداد هذه الرسالة ولما قدمته من أراء سديدة ، كان له اثر كبير في إخراج الرسالة بهذا الشكل .

كما أتوجه بالشكر إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة والى رئاسة قسم علوم الحياة لما قدموه من تسهيلات لطلبة الدراسات العليا.

وكذلك أتوجه بالشكر والامتنان إلى الأستاذ الدكتور عبد عون الغانمي لمساعدتي في التحليل الإحصائي ، واشكر كذلك الأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان لتأكيده على تشخيص الفطريات .

ومن جميل العرفان أن أقدم جزيل الشكر إلى أصحاب القلوب الطيبة والضمائر الحية باسم كاظم بريسم وخضر عبد الحسين وعلاء عبد الحسين و احمد محمد علي لما قدموه من مساعده علمية ، ولا يفوتني إلا إن اشكر زملائي في الدراسات العليا مالك عبد الله عذبي وعلياء عزيز جبر وهبة علوان ومحمد وسام ، وأخيرا أتقدم بعظيم الشكر والامتنان إلى كل من قدم لي يد العون والمساعدة لإتمام هذه الدراسة والله الموفق وهو الهادي إلى سواء السبيل .

✍ عقيل عبد نعمة

الخلاصة

SUMMARY

أجريت تجارب مختبريه في مختبر الدراسات العليا بكلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء لتحديد مدى تلوث بعض المواد الغذائية كالحنطة *Triticum aestivum* والذرة *Zea mays* وفستق الحقل *Arachis hypogaea* وفستق الحلبي *Pistacia vera* وحب القرع العسلي *Cucurbita moschata* وحب زهرة الشمس *Helianthus annus* بالفطريات لاسيما الفطر *Aspergillus flavus* والتي تم الحصول عليها عشوائياً من الشركة العامة لتجارة الحبوب / فرع كربلاء وسوق الدهان وسوق الجملة والأسواق المحلية . كما تم تحديد فعالية عزلات الفطر *A. flavus* المستحصل عليها من هذه الدراسة في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 . درست فعالية المستخلصات النباتية المائية والكحولية المجففة لكل من نباتات الكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* ، وكذلك كل من فيتامينات A ، E ، C تجاه الفطر *A. flavus* وإنتاجه سم الافلا B_1 وB_2 المعزول من هذه المواد ، كما دُرس تأثير بعض العوامل البيئية كدرجـة الحرارة والأس الهيدروجيني و الرطوبة النسبية تجاه الفطر *A. flavus* وإنتاجه سم الافلا .

فقد بينت النتائج أن هنالك ٥٤٧ عزلة فطرية تمثلت بـ *Alternaria alternata* ، *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus terreus* ، *Cladosporium cladosporioides* ، *Fusarium oxysporum* ، *Penicillium digitatum* ، *Penicillium spinulosum* ، *Penicillium* spp و *Rhizopus* spp وان أكثر المواقع تلوثاً بالفطريات هو سوق الدهان والذي سجل ٢١٦ عزلة ، إما سوق الجملة فقد سجل ثاني أعلى موقع في التلوث الفطري إذ وصلت إعداد الفطريات إلى ١٥٥ عزلة ، في حين سجلت الأسواق المحلية 122عزلة ، وجاءت مخازن الحبوب في المركز الأخير من بين مواقع الجمع فسجلت اقل نسبة بالتلوث الفطري والتي بلغت ٥٤ عزلة . ولم تختلف محتوى المواد الغذائية نسبياً من حيث الأنواع والأجناس المعزولة ، لكنها تختلف كماً فعينات الذرة الصفراء بلغت أعلى تلوثاً بالفطريات إذ كان العدد الكلي مساوياً إلى ١٢٣ عزلة ، أما عينات الحنطة فقد سجلت اقل نسبة إذ وصل العدد الكلي إلى ٥٤ عزلة ، في حين سجلت عينات حب القرع العسلي ثاني اكبر نسبة فقد وصلت إلى ١١٠عزلة ، تلتها عينات فستق الحقل وحب زهرة

الشمس وفستق الحلبي إذ سجلت ٩٦ ، ٩٠ و٧٤ عزلة على التوالي ، إذ كان أكثر الفطريات سيادة لجميع عينات الدراسة هو الفطر *A. flavus* والذي سجل ٩٩ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي ١٨,١ % ، في حين الفطريات الأخرى سجلت نسب اقل من ذلك .

أظهرت نتيجة الفحص هذا لـ ١٨ عزلة للفطر *A. flavus* قابلية ١١ عزلة فقط لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 أي بنسبة ٦١,٢ % ، في حين ٧ عزلات وبنسبة ٣٨,٨ % غير المنتجة لسم الافلا B_1 وB_2 .

استخدمت المستخلصات النباتية للكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* وبنوعيها المائي والكحولي بتراكيز ٥ ، ١٠ و١٥ ملغم/مل لدراسة تأثيرها في نمو الفطر *A.flavus* في الوسط الزرعي PDA الحاوي على هذه المستخلصات ، فوجد ان المستخلص الكحولي للكركم والزعتر ثبط نمو الفطر بنسبة ١٠٠ % عند جميع التراكيز ما عدا التركيز ٥ ملغم/مل من المستخلص الكحولي للزعتر ، وأظهر المستخلص الكحولي للنباتات جميعها تفوقا على المستخلص المائي في تثبيط نمو الفطر ، وقد أدت المستخلصات المثبطة منع تكوين الابواغ إذ ظهرت بشكل عزلة صغيرة بيضاء . أظهرت معاملة الفطر بتركيز ٥ ، ١٠ و ١٥ ملغم/مل من مستخلص الكركم الكحولي والزعتر المائي في انعدام ظهور سم الافلا B_1 و B_2 . وكذلك بينت النتائج إن معاملة الفطر بتركيز ١٥ و ١٠ ملغم/مل من مستخلص الكركم المائي والزعتر الكحولي لم يظهر سم الافلا B_1 و B_2 ، في حين التركيز ٥ ملغم/مل اظهر وجود سم الافلا B_1 لكلا المستخلصين . أما المستخلص المائي والكحولي للهيل فقد منع ظهور سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز ١٥ ملغم/مل ، والتركيز ١٠ملغم/مل فقد ظهر فيه سم الافلا B_1 ، في حين ظهر سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز ٥ ملغم/مل للمستخلص المائي وظهر النوع B_1 للمستخلص الكحولي عند نفس التركيز .

و بينت النتائج باستعمال كواشف كيميائية عدة أن المستخلصات النباتية المؤثرة حاوية على العديد من المركبات الفعالة كمواد حافظة ، فقد احتوى المستخلص الكحولي للزعتر على جميع المركبات التي تم الكشف عنها ما عدا الصابونينات ، أما المستخلص المائي للزعتر فلم يحتوي على الصابونينات والراتنجات و الفلافونيدات ، في حين المستخلص المائي والكحولي للهيل لم يحتويان على الراتنجات والفلافونيدات والفينولات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد وكذلك عدم وجود القلويدات في المستخلص الكحولي للهيل ولا الصابونينات في المستخلص المائي للهيل ، واحتوى المستخلص الكحولي للكركم على الكلايكوسيدات والراتنجات

والكربوهيدرات والفينولات ، وانعدم وجود القلويدات والتانينات والراتنجات والفلافونيدات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد في المستخلص المائي للكركم .

وفيما يخص فيتامينات A ، E و C فقد استخدمت بتراكيز ١ ، ٢ و٣ ملغم/مل لدراسة تأثيرها في نمو الفطر *A.flavus* في الوسط الزرعي PDA الحاوي على هذه الفيتامينات ، فقد اظهر فيتامين A تفوقاً على بقية الفيتامينات في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *A. flavus* ، فأعطى أقل معدل نمو للفطر و هو ٣,٠٥ سم ، و يأتي فيتامين E بالمرتبة الثانية بين الفيتامينات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو 4.52 سم ، و جاء فيتامين C بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو ٥,٤٨ سم ، فوجد زيادة تركيز أي نوع من الفيتامينات يزيد من تثبيط الفطر ، إذ إن التركيز ٣ ملغم/مل من فيتامين A ثبط نمو الفطر بنسبة ١٠٠% ، إما التراكيز الأخرى لهذا الفيتامين والفيتامينات الأخرى ثبطت نمو الفطر لكن بدرجة اقل . و ظهر فيتامين E تفوقاً على باقي الفيتامينات إذ ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند جميع التراكيز ، إما فيتامين A فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند تركيز 3 و٢ ملغم/مل ، وجاء فيتامين C في المرتبة الأخيرة فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند تركيز ٣ملغم/مل .

و قد أظهرت النتائج أن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ ٤,٨٣ سم عند الدرجات الحرارية المختلفة ، و ٤,٨٩ سم عند مستويات pH المختلفة ، وبلغ ٥,٨٨ سم عند مستويات رطوبية مختلفة ، إن الدرجة الحرارية ٥٥ ^{o}م عند pH يساوي ٦,٥ و pH ٣,٥ عند درجة حرارة ٢٥ ^{o}م أعطى نسبة تثبيط ١٠٠% للفطر ، في حين المستويات الأخرى للعوامل الثلاثة أعطت معدلات نمو مختلفة للفطر ، وانعدم ظهور سم الافلا B_1 وB_2 عند معاملة الفطر بمستوى حراري ٣٥ ^{o}م و٥٥ ^{o}م ، في حين انعدم ظهور سم الافلا B_2 عند المستويين الحراريين ٢٥ ^{o}م و٤٥ ^{o}م ، لكن ظهر كلا النوعين من سم الافلا عند مستوى حراري ١٥ ^{o}م ، وفيما يخص pH ظهر سم الافلا B_1 وB_2 عند مستوى pH يتراوح بين ٩,٥ - ٦,٥ ، لكن عند مستوى pH ٣,٥ انعدم ظهور كلا النوعين من سم الافلا ، إما pH ٥ فقد ظهر النوع B_1وكانت درجة الحرارة عند جميع المستويات ٢٥ ^{o}م ، إما الرطوبة النسبية فقد ظهر سم الافلا B_1 عند مستوى RH يساوي ٢٠ ، ٦٥ و٨٠ ، في حين انعدم النوعين عند مستوى RH يساوي ٥٠ ، ولكن مستوى RH يساوي ٣٥ ظهر النوع B_2 فقط .

المحتويات
CONTENTS

الصفحة	العنوان	ت
	الفصل الأول **المقدمة**	
١	**المقدمة**	١-١
	الفصل الثانـي **استعراض المراجع**	
٤	الفطريات وسمومها	2 -1
6	سموم الافلا	٢-٢
9	التخليق الحيوي لسموم الافلا	2 - ٢ - 1
10	تلوث المنتجات النباتية بسموم الافلا	٢ - ٢-٢
١١	تأثير سموم الافلا على صحة الإنسان والحيوان	2- ٢ - ٣
12	العوامل المؤثرة في إنتاج سم الافلا	2 -2- 4
13	العوامل أللاإحيائية	2 - 2 -4 -1
15	العوامل الإحيائية	2- 2- 4 - 2
16	جنس *Aspergillus*	3-2
١٦	الخصائص التصنيفية للفطر *Aspergillus flavus*	1-3-2
17	الصفات المظهرية والمجهرية والوراثية	2-3-2
18	سموم الفطر	3-3-2
18	تأثير المستخلصات النباتية في الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2	4-2
19	نبات الكركم *Curcuma longa L.*	1-4-2
20	الأهمية الطبية لنبات الكركم	1-1-4-2
21	المكونات الكيميائية لنبات الكركم	2-1-4-2
21	نبات الزعتر *Thymus vulgaris* L.	2-4-2
22	الأهمية الطبية لنبات الزعتر	1-2-4-2
23	المكونات الكيميائية لنبات الزعتر	2-2-4-2

ت	العنوان	الصفحة
3-4-2	نبات الهيل *Elettaria cardamomum (Linn.), Maton*	٢٤
1-3-4-2	الأهمية الطبية لنبات الهيل	24
2-3-4-2	المكونات الكيميائية لنبات الهيل	25
5-2	الفيتامينات وأهميتها البيولوجية	٢٦
1-5-2	فيتامين A	26
2-5-2	فيتامين E	27
3-5-2	فيتامين C	27
	الفصل الثالث ***المواد وطرائق العمل***	
1-3	الأجهزة والمواد المستخدمة	28
١-1-3	الأجهزة	28
٢-1-3	المواد الكيميائية	29
٣-١-٣	المضادات الحيوية Antibiotics	30
٤-١-٣	الأوساط الزراعية المستخدمة	30
٥-١-٣	الصبغات والمحاليل المستخدمة	30
٢-٣	جمع العينات	32
٣-٣	التحري عن العزلات الفطرية وتنقيتها	32
١-٣-٣	عدد العزلات الكلية	32
٢-٣-٣	النسبة المئوية للظهور Occurrence%	33
٣-٣-٣	النسبة المئوية للتردد Frequency %	33
٤-3	اختبار قابلية عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2	33
1-٤-3	إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 على وسط PDA	33
2-٤-3	استخلاص سم الافلا B_1 و B_2	33
3-٤-3	الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 على صفائح الكروماتوكرافي	34
٥-3	العينات النباتية	35
1-٥-3	جمع العينات النباتية	35
2-٥-3	تشخيص العينات النباتية	35

ت	العنوان	الصفحة
3-٥-3	عملية الاستخلاص باستخدام جهاز السوكسوليت Soxchlet	35
4-٥-3	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية	36
5-٥-3	الكشوفات النوعية للمستخلصات المائية والكحولية الفعَالة	36
٦-3	تأثير المستخلصات النباتية في الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 وB_2	39
٧-3	تأثير الفيتامينات في الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 وB_2	40
8-3	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)	40
9-3	تأثير بعض العوامل في الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 وB_2	40
1-9-3	تأثير الـpH	40
2-9-3	تأثير درجة الحرارة	41
3-9-3	تأثيرالـRH	41
10-3	التحليلات الإحصائية	42
	الفصل الرابع ***النتائج والمناقشة***	
1-4	التحري عن العزلات الفطرية في العينات	43
2-4	كفاءة عزلات الفطر *A. flavus* في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2	53
3-4	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية	٥٦
4-4	الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية	57
5-4	تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus*	٥٩
6-4	تأثيرالمستخلصات النباتية في إنتاج سم الافلاB_1 وB_2 من قبل *A. flavus*	63
7-4	تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus*	64
8-4	تأثير الفيتامينات في إنتاج سم الافلاB_1 وB_2 من قبل *A. flavus*	66
9-4	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)	67
١٠-4	تأثيردرجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في *A. flavus*	68
١١-4	تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 من قبل *A. flavus*	70
	الاستنتاجات والتوصيات	
	الاستنتاجات	73
	التوصيات	74

ت	العنوان	الصفحة
	المصادر	
	المصادر العربية	75
	المصادر الأجنبية	76

قائمة الجداول
LIST OF TABLES

ت	العنوان	الصفحة
1	الخواص الفيزيوكيميائية لسموم الافلا	8
2	الأنواع النباتية والأجزاء المستعملة في الدراسة	35
3	عدد الفطريات في كل موقع من مواقع الدراسة	44
4	العدد الكلي لمستعمرات الفطريات المعزولة من عينات الحبوب قيد الدراسة	49
5	النسب المئوية لتردد العزلات من عينات الحبوب قيد الدراسة	50
6	النسب المئوية لظهور الفطريات المعزولة من عينات الحبوب قيد الدراسة	52
7	لإنتاج سم الافلا اختبار عزلات الفطر *A. flavus* لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 باستخدام TLC	54
8	الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات المائية و الكحولية للنباتات المدروسة	56
9	الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية الفعّالة	58
10	تأثير النوع النباتي ومستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة ٢٧ ± ٢ °م	61
11	تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من المستخلصات النباتية الفعالة على إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA	64
12	تأثير الفيتامينات وتركيزها والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة ٢٧ ± ٢ °م	٦٥
13	تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من الفيتامينات على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2بفعل *A. flavus* في وسط PDA	٦٧
14	التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية الفعّالة في الفطر *A. flavus*	٦٧
15	التركيز المثبط الأدنى للفيتامينات في الفطر *A. flavus*	٦٨
16	تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد عشرة أيام من الحضن	٧٠
17	تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية على إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA	72

قائمة الإشكال
LIST OF FIGARE

ت	العنوان	الصفحة
1	رسم تخطيطي للأجناس الفطرية المنتجة للسموم (أ) *Aspergillus* ، (ب) *Fusarium* ، (ج) *Penicillium*	6
2	التراكيب الكيميائية لبعض أنواع سموم الافلا	٨
3	المظهر الخارجي لنبات الكركم	20
4	التركيب الكيميائي للكركمنCurcumin	21
٥	المظهر الخارجي لنبات الزعتر	22
٦	التركيب الكيميائي لأهم المركبات في الزعتر	23
٧	المظهر الخارجي لنبات الهيل	24
٨	التركيب الكيميائي لأهم المركبات في الهيل	25
٩	مخطط البحث	٣١
١٠	ترحيل مستخلص عزلة AfZ_3 *A. flavus* على صفائح الكروموتوكرافي وبالمقارنة مع سم الافلا القياسي B_1 وB_2	55
11	فطرAfZ_3 *A.flavus* .(أ) سطح المستعمرة ،(ب) ظهر المستعمرة ،(ج) الأجزاء التكاثرية (40X)، (د) الخيط Hyphae مع الكونيديات Conidia (40X)	55
12	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus*	62

قائمة الملاحق
LIST OF APPURTENANCE

ت	العنوان	الصفحة
١	النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الكركم على وسط PDA	9٧
٢	النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الزعتر على وسط PDA	9٧
٣	النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الهيل على وسط PDA	9٧
٤	تأثير الأس الهيدروجيني على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA	٩٨
٥	تأثير درجات الحرارة على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA	٩٨
٦	تأثير الرطوبة النسبية على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA	٩٨
٧	النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من فيتامين A وE وC على وسط PDA	٩٩

الفصل الأول

المقدمة

المقدمة

INTRODUCTION

يعد تلوث البيئة بالفطريات من أحدى المشاكل التي تواجه الإنسان ، لتباين طرائق الامراضية بها فمنها ما تكون انتهازية Opportunistic للجسم مسببةً له ما يعرف بالإمراض الفطرية Mycoses ، بينما تتسبب الأخرى الامراضية بصورة غير مباشرة عن طريق نموها الرمي Saprophytic على بعض المواد الأولية لأطعمة الإنسان وإفرازها النواتج الايضية عليها والتي تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins مسببةً له أمراض السموم الفطرية Mycotoxicoses (Bennett and Klich,2003) . وعند تناول مثل هذه الأطعمة الملوثة بالسموم الفطرية من قبل الإنسان والحيوان فستبدأ بذلك سلسلة من المشاكل الصحية متمثلة بالتسمم الكبدي Hepatotoxic والتسمم الكلوي Nephrotoxic والتسمم المناعي Immunotoxic والتشوه الجنيني Teratogenic والتطفير الجينومي Mutagenic مؤدياً بذلك إلى تأثيرات حادة ومزمنة للإنسان والحيوان تمتد من أضرار في الجهاز العصبي المركزي والأوعية الدموية والجهاز التنفسي والقناة الهضمية إلى الموت (Makun *et al.*,2010) .

تُنتج السموم الفطرية بشكل نواتج ايضية ثانوية Secondary metabolites من قبل بعض الأجناس الفطرية مثل *Aspergillus* و*Penicillium* و*Fusarium* ولكنها تقتصر على أنواع قليلة منها ، وتعتمد سمية السموم الفطرية بدورها على نوع السم ونوع الحيوان وعمره وحالة التغذية ، ومعظم تأثيرات السموم محددة بأعضاء خاصة ، في حين البعض منها تؤثر على العديد من الأعضاء في جسم الكائن الحي (Hedayati *et al.*,2010) .

تتعرض المحاصيل في العالم للتلوث بالسموم الفطرية بما يقدر ٢٥% منها سنوياً ، ويعتقد إن سبب إنتاج السم هو استجابةٌ إلى عوامل الإجهاد التي تواجه الفطر ، إذ يعد من المواد الكيميائية المستقرة فعند تعرض الحبوب المصابة بالفطريات السامة إلى الطحن ودرجة حرارة وجفاف عاليين تقتل الفطريات المحملة بالحبوب دون تحطيم السم . إن النسب الكبيرة للسموم الفطرية في الحبوب وصفة المقاومة التي تمتلكها جعلتها من المشاكل الصحية المهمة في حياة الإنسان (Lawlor & Lynch,2001) .

يعد سم الافلا Aflatoxin المنتج بشكل نواتج ايضية ثانوية بوساطة بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* مثل *A. flavus* و*A. parasiticus* و*A. nomius* واحد من أهم السموم الفطرية والذي يظهر في محاصيل الحبوب والمشروبات المخمرة المصنعة من الحبوب والحليب ومنتجاته واللحم وعصير الفاكهة (Alpsoy, 2010) .

هنالك أنواع عديدة من سم الافلا ولكن توجد ستة أنواع مهمة والمتمثلة بـ B_1 وB_2 وG_1 وG_2 وM_1 و M_2 (Aly & Anwer, 2009) ، يعد النوع B_1 من أكثر الأنواع سمية ثم تتبعه الأنواع G_1 وB_2 وG_2 وعلى التوالي (Sudhakar *et al.*, 2009) ، وتعود قوة سمية النوع B_1 لسرعة ارتباطه بالحامض النووي DNA عن طريق تكوين جذور حرة والتي ترتبط بدورها مع DNA لذا يعد عامل مطفر Mutagenic ومسرطن Carcinogenic (Alpsoy,2010) ، ومن جانب أخر عند تناول الحيوانات أعلاف ملوثه بالنوع B_1 فأنه يتأيض Metabolic إلى النوع M_1 داخل معدة تلك الحيوانات ولذا تكمن خطورة هذا النوع من السم في قدرته على الانتقال عن طريق الحليب ومنتجاته إلى الإنسان عند تناولها ، ونظراً لهذه السمية التي يمتلكها النوع B_1 فقد استخدم بصورة سيئة كسلاح بيولوجي (حيدر، ٢٠٠٣) . لقد ذكر الباحثان Bennett & Klich (٢٠٠٣) بأن سم الافلا تسبب بموت ١٠٠ شخص هندي عام ١٩٧٤ والذي يعزى إلى تسمم الكبد Hepatotoxin الناتج من تناول حوالي (٢- ٦) ملغرام من السم المتواجد في الذرة الصفراء يومياً ، علماً أنهما لم يحددا الفترة الزمنية لظهور المرض ، والذي بدوره قاد إلى دراسات مكثفة حول وجود سم الأفلا في المواد الغذائية . ولقابلية الفطريات المنتجة لسم الافلا على النمو بمديات واسعة من الرطوبة ودرجات الحرارة ، لذلك فالعديد من الأطعمة والمواد الغذائية تتعرض إلى التلوث بهذا السم ، فتصبح مشكلة السيطرة على إنتاج سم الأفلا معقدة لقوة نشاط الأنواع التابعة لهذا الجنس *Aspergillus* في إنتاج السم ، فهناك العديد من الطرائق المستخدمة للحد من سم الأفلا في المواد الغذائية المخزونة (Trenk & Hartman,1970) ومنها الطرائق الفيزيائية باستخدام الحرارة Heat والأشعة فوق البنفسجية Ultra violate والتأين ألإشعاعي Ionizing radiation أو الطرائق الكيميائية مثل الكلورة Chlorination والأكسدة Oxidizing والتحلل المائي Hydrolytic لكن طريقة المعاملة بالامونيا تعد من أهم الطرائق الكيميائية المستخدمة بكثرة ، أما بالنسبة إلى الطرائق البيولوجية المستخدمة كمحطمات للسم فتتم بوساطة بعض أنواع الإحياء المجهرية

كالبكتريا مثل بكترية حامض اللاكتيك والخمائر والاكتينومايسس و بعض أنواع الطحالب (Azab *et al.*,2005) . بالإضافة إلى بعض أنواع التوابل والتي تستخدم كمواد حافظة للأطعمة ضد نمو الفطريات المنتجة لسم الأفلا مثل الدار صيني *Cinnamomum cassia* والقرنفل *Syzygium aromaticum* والفلفل *Piper*، بينما الخردل *Brassica* والزنجبيل *Zingiber officinale* فأنها تشجع من نمو الفطريات المنتج لسم الافلا . (Sudhakar *et al* ., 2009 ; Rajasinghe *et al* ., 2009)

هناك العديد من الدراسات التي أظهرت استخدامها للطرائق السابقة ، ففي الهند استعمل Verma *et al* (2008) فيتامين E مع زيت الزيتون لاختزال سم الأفلا في الفئران البيض والمجرعة به من قبل . وفي سوريا تمكن Ghanem *et al* (2008) من تحطيم سم الافلا من النوع B_1 باستخدام أشعة كاما Gamma radiation ، أما في العراق فقد استطاع الوائلي (2006) من تثبيط نمو الفطر *Aspergillus flavus* و سم الافلا B_1 باستخدام الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* و الزيت الطيار لأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citrates* .

ونظراً للأهمية الاقتصادية للمواد الغذائية ، وتماسها المباشر بحياة الإنسان كونها تشكل الغذاء الرئيسي له ، وإمكانية إحداثها تأثيرات ضارة بالصحة ناتجة عن تلوثها ببعض الأنواع الفطرية ، لذا هدفت الدراسة إلى :

١. عزل وتشخيص الفطريات المنتجة لسم الافلا B_1 وB_2 المصاحبة لبعض المواد الغذائية كالحنطة *Triticum aestivum* والذرة *Zea mays* وفستق الحقل *Arachis hypogaea* وفستق الحلبي *Pistacia vera* وحب القرع العسلي *Cucurbita moschata* وحب زهرة الشمس *Helianthus annus* .
٢. دراسة تأثير المستخلصات النباتية المائية والكحولية المجففة لكل من النباتات الكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* والفيتامينات A ، E وC على معدل نمو الفطر *A. flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2 .

٣. دراسة تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية على معدل نمو الفطر *A. flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2 .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

استعراض المراجع

LITERATURE REVIEW

٢ – ١. الفطريات وسمومها

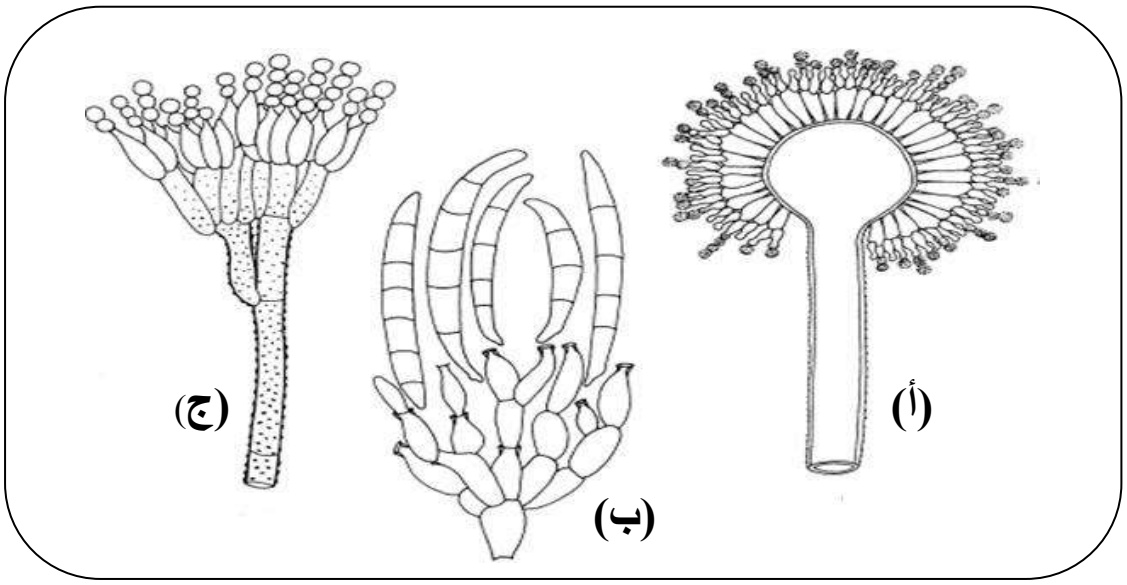
تعد الفطريات من الكائنات المجهرية ذات التنوع الكبير ، ولها قابلية النمو على أسطح المواد الغذائية مسببةً فسادها من جراء إفرازها العديد من المواد الكيميائية السامة عليها والتي من بينها السموم الفطرية Mycotoxins (Korukluoglu & Yigit, 2007) .

اشتق مصطلح السم الفطري Mycotoxin من الكلمة الإغريقية "*Mykes*" والتي تعني الفطر بينما اشتق الجزء الثاني من الكلمة اللاتينية "*Toxicum*" وتعني السم (Bhavan, 2003)، وتمتاز كل السموم الفطريات بأنها نواتج طبيعية وذات أوزان جزيئه واطئة تنتج بشكل نواتج ايضية ثانوية من قبل بعض الفطرية الخيطية Filamentous fungi (Buffon & Furlong ,2010) ، وتقدر بحوالي ٣٠٠ إلى ٤٠٠ مركب مُيزت كسموم فطرية والتي تقع ضمن مجاميع منتظمة ومنها الأفلاتوكسينات Aflatoxins والاوكراتوكسينات Ochratoxins وسم T-2 والسترنين Citrinin والترايكوثسينات Trichothecenes والزيرالينون Zearalenone (Hedayati *et al.*,2010) . وصنفت مجاميع السموم بالاعتماد على أسس عديدة فقد صنفها الأطباء السريريون تبعاً إلى العضو المتأثر مثل سموم الكبد Hepatotoxins وسموم الكلى Nephrotoxins وسموم الأعصاب Neurotoxins ، أما علماء الخلية فقد صنفوا السموم على أساس الضرر الخلوي الملحق بفعل السموم مثل عوامل مطفرة Mutagens وعوامل مسرطنة Carcinogens ، إما علماء الكيمياء العضوية فقد صنفوها على أساس تركيبها الكيميائي مثل اللاكتونات Lactones والكاوميرنيات Coumarins ،وعلماء الفطريات صنفوا السموم على حساب الفطريات المنتجة لها مثل سموم الاسبيرجلس *Aspergillus* toxins وسموم البنسيليوم *Penicillium* toxins (Bhatnagar *et al.*,2002 ; Bennett & Klich,2003) . تسببت السموم الفطرية بالعديد من الكوارث السمية خلال حقب زمنية معينة في مجموعة من دول العالم ، ففي عام ١٩٣٤ ، سجلت حالة هلاك أكثر من ٥٠٠٠ حصان في الشرق الأوسط

نتيجة استهلاك حبوب الذرة الصفراء الملوثة بالأعفان وقد سمي المرض بمرض تعفن الذرة Moldy Corn disease (Jacobsen *et al.*, 1993) ، أما في انكلترا عام ١٩٦٢ فقد تسبب سم الافلا بموت أكثر من ١٠٠٠٠٠ ديك رومي ولم يعرف سبب المرض آنذاك ،لذلك سميّ عندها بمرض الديك الرومي المجهول Turkey X disease (Vermin,2004)، وسجل أيضاً موت ١٠٠ شخص هندي عام ١٩٧٤ بسبب تسمم الكبد Hepatotoxin الناتج من التعرض إلى ما يقدر بحوالي ٢- ٦ ملغرام من سم الافلا المتواجد في الذرة الصفراء يومياً ، إذ قدرت الجرعة نصف المميتة Lethal dose (LD_{50}) للبالغين حوالي ١٠-٢٠ ملغم / كغم (Bennett & Klich,2003) .

وتتصف الأنواع الفطرية المنتجة للسموم بتنوعها واختلافها عن بعضها البعض في الشكل والكيموحيوية والمتطلبات البيئية (CAST, 2003) ، فبعض السموم الفطرية تنتج بوساطة نوع فطري واحد أو سلالة من نوع فطري معين أو بوساطة عدد من الأنواع الفطرية ، والسموم تنتج عموماً في مايسليوم Mycelia الفطريات الخيطية لكنها تتراكم في تراكيب خاصة من الفطريات مثل الكونديات Conidia والأجسام الحجرية Sclerotia والفياليدات Phialides بالإضافة إلى البيئة التي تحيط الفطر (Bhatnagar *et al.*,2002) . ومن أهم الأجناس الفطرية التي لها القدرة على إفراز السموم في الطبيعة *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* (Whitlow & Yr,2005). والأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* تتألف من الكونديات Conidia المحمولة على تراكيب تعرف بالفياليدات Phialides ذات الشكل القارووري وقسم منها تنشأ من الماتيولات Metulae والتي تحيط بالحويصلة Vesicle والأخيرة بدورها محمولة على تركيب يعرف بالحامل الكونيدي Conidiophore (Jeamjitt *et al.*,2006 ; Chung *et al.*, 2011) ، بينما جنس *Penicillium* يكون مشابهة إلى تركيب *Aspergillus* ولكن الفياليدات تشبه الأصبع Finger-like ، في حين جنس *Fusarium* تكون الفياليدات فيه أكثر تباعد مما علية في الجنسين السابقين والتي تحمل نوع واحد أو أكثر من الكونديات (Ellis *et al.*,2007) . وأوضح (1986) Kendrick في دراسته بان الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* تمتاز بمقاومتها العالية لإجهاد الجفاف Drought-tolerant ، بينما بعض الأنواع الأخرى التابعة لنفس الجنس تمتاز بمقاومتها للإجهاد الحراري Thermotolernat ، أما الأنواع التابعة لجنس *Penicillium* فمعظمها

محبة للحرارة المعتدلة Mesophiles ، في حين بعض الأنواع التابعة لجنس *Fusarium* تتميز بتحملها درجات الحرارة المنخفضة Psychrotolerant ، وبذلك تتميز هذه الأجناس بقابليتها على النمو بمديات واسعة من درجات الحرارة ، ومن خلال ذلك تُحقق هذه الأجناس مآربها في الاستمرارية بإفراز السم ، مسببةً فساد أطعمة الإنسان والحيوان (Suzuki *et al.*,2002) .



الشكل (١) رسم تخطيطي للأجناس الفطرية المنتجة للسموم (أ) *Aspergillus* ، (ب) *Fusarium* ، (ج) *Penicillium* (Kendrick, 1986).

على الرغم من وقوع حالات عدة من الإصابة بالسموم الفطرية في مواقع مختلفة من العالم إلا انه لم يتم تحديد دور الفطريات بشكل قاطع في إحداث هذه الحالات إلا بعد اكتشاف سموم الافلا ، إذ كانت تعزى جميع الحالات إلى الإصابات البكتيرية والفيروسية والطفيلية ، لذا فان الفترة الواقعة من ١٩٦٠ إلى ١٩٧٥ فتحت الأفاق للاهتمام بعلم السموم الفطرية Mycotoxicology (Bennett & Klich,2003) .

٢ – ٢. سموم الافلا

تشتق جميع سموم الافلا من المركب Difuranocoumarine والذي يتكون من جزيئتين منbis-Furan والمندمجة مع جزيئة Coumarine (Bhatnagar *et al.*,2002) ، وجميعها تمتلك صيغة فراغية متشابهة والتي تظهر بشكل مركبات حلقية غير متجانسة

واحتوائها على العديد من ذرات الأوكسجين (Younis & Malik,2003) . و تعود تسمية سم الافلا Aflatoxin إلى النوع *Aspergillus flavus* الذي يفرزه ، إذ يشير حرف A إلى اسم الجنس ، إما المقطع fla إلى اسم النوع (A+fla+toxin) (Agag ,2004) . وينتج سم الافلا بشكل نواتج ايضية ثانوية Secondary metabolites بوساطة *A.flavus* و*A.parasiticus* و*A. bombycis* و*A. ochraceoroseus* و *A.nomius* و *A. pseudotamari* لكن النوع *A. flavus* من أكثر الأنواع المتواجد في الأغذية (Bennett & Klich,2003) .

وذكر Safara *et al*., 2010 الى انه يوجد حوالي ٢٠ نوع مختلف من سموم الافلا لكن من أهم أنواعهُ B_1 وB_2 وG_1 وG_2 وM_1 وM_2 الأنواع الأربعة الأولى توجد بصورة طبيعية في المواد الغذائية ذات الخزن السيئ مثل الحنطة والرز والذرة والسمسم والفستق والفلفل الأسود والأحمر (Bokhari,2002) . في حين يتواجد النوعين الآخرين في الحليب والبول والبراز (Verma, 2004) . وينتج كل من M_1 وM_2 من تأيض B_1 وB_2 داخل القناة الهضمية وعلى التوالي بعملية تسمى Hydroxylation (Ghanem *et al* .,2008) . وتشير الأحرف إلى لون التألق التي تظهر بشكل بقع على صفائح الكروماتوغرافي Thin layer Chromatography عند فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية، إذ يرمز الحرف B إلى اللون الأزرق Blue ، والحرف G إلى اللون الأخضرGreen ، والحرف M يشير إلى كلمة الحليب Milk إذ شخص لأول مرة فيه ، إما الأرقام ١ و٢ فترمز إلى معامل الترحيل (R_f) Rate of flow التي تظهرها البقع على صفائح Thin layer chromatography (TLC) (Agag ,2004; Jr ,2008; Guo *et al*.,2009) .

درست سموم الافلا بعد ذلك بشكل مستفيض وقسمت حسب درجة سميتها ونسب تواجدها في الأغذية والأعلاف إذ مثل النوع B_1 من أكثر الأنواع خطورةً ويتواجد بتراكيز أعلى مـن بقية السموم فـي التلـوث الطبيعي للمنتجات يليه النوع G_1 ثم B_2 وG_2 ،أما النوع M_1 فهو اقل سمية بعشرة أضعاف من B_1 (Bhatnagar *et al*.,2002 ; Sudhakar *et al* ,2009) .

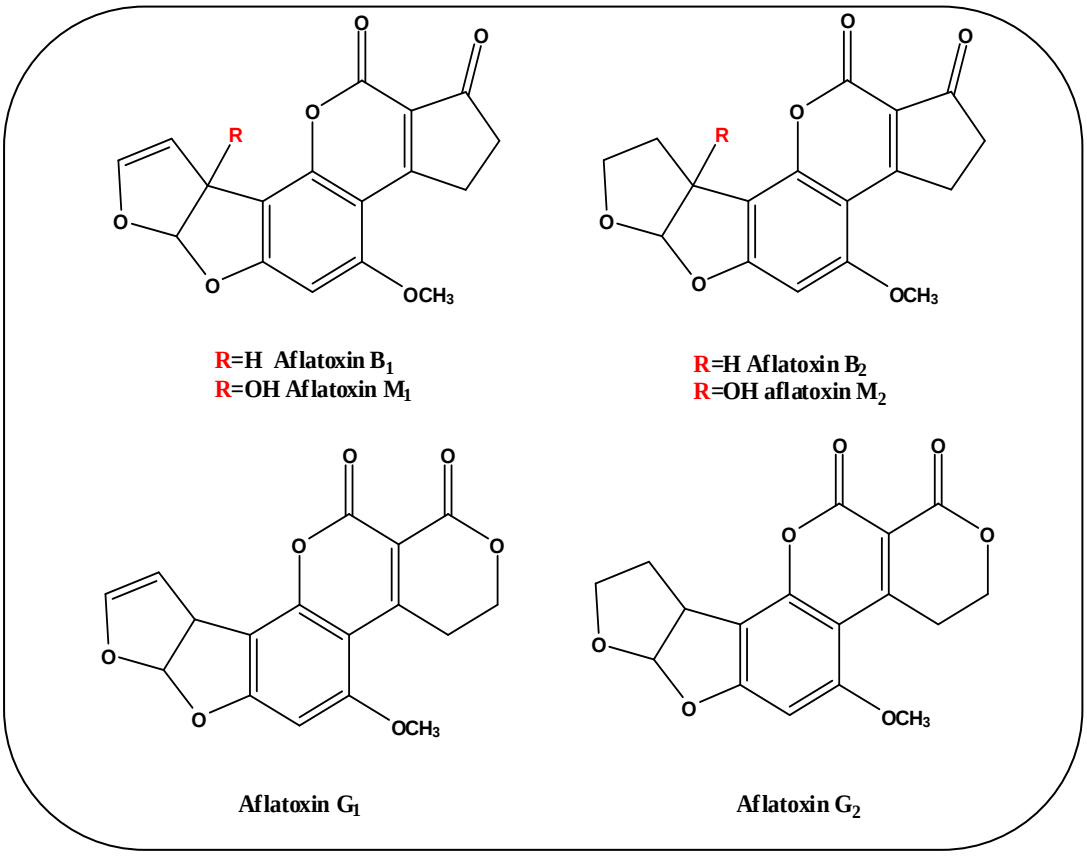
وقد وجد أن الفطر *A. flavus* ينتج نوعين من سم الافلا وهما B_1 وB_2 ، بينما الفطر *A. parasiticus* ينتج أربعة أنواع من سم الافلا والمتمثلة B_1 وB_2 وG_1 وG_2 (Shier *et al.*,2005).

الجدول (١) الخواص الفيزيوكيميائية لسموم الافلا

. (Jr,2008 & Buttinger *et al* .,2010)

نوع السم	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي غرام/مول	التوهج عند التعرض لـ (UV)	معامل الترحيل R_f*
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312.3	Blue	0.٨٨
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314.3	Blue	0.٧٧
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328.3	Green	0.٦8
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330.3	Green	0.٥٥
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328.3	Blue	-
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330.3	Blue	-

*- استخدمه الطور الناقل لقياس قيمة R_f حسب النسب التالية (اثير٩٦%-ميثانول٣%-ماء١%) .



الشكل (٢) التراكيب الكيميائية لبعض أنواع سموم الافلا (Younis & Malik, 2003) .

٢ – ٢ - ١.التخليق الحيوي لسموم الافلا

يعد مركب Acetate الناتج من الايض الأولي Primary metabolite البادئ الأساسي في تخليق سموم الافلا ، إذ يدخل هذا المركب المسار الحيوي Polyketide pathway والذي يمثل الايض الثانوي منتجا بدورهِ سموم الافلا (Yu *et al.*,2004) ، يحدث الايض الأولي في طور تروبو Tropophase (المتمثل بالطور اللوغارتمي Log phase والطور المتوازن Stationary phase) بينما يحدث الايض الثانوي في طور اديو Idiophase (Detroy *et al.*,1973).

أن بناء سم الافلا مسيطر علية بوساطة أنزيمات معينة التي تشفر من مجموعة جينات ، إذ كل جين يترجم Transcription إلى الحامض النووي الرايبوزي RNA وهذا بدوره

يستنسخ Translation إلى بروتين ومن ثم تجرى عملية تصليح على البروتين لتنتهي بتكوين الأنزيمات (Alpsoy , 2010). وتتكون سموم الافلا من خلال ٢٣ تفاعل إنزيمي ولا يقل عن ١٥ مركب وسطي(Guo *et al.*, 2009) ، إذ يبدأ مسار تخليق السم من تكثيف وحدة من Acetyl- COA الناتجة من Acetate مع تسع وحداتMalonyl-COA ، مكون بذلك Hexanoyl- CoA والذي يكون بدورة Decaketide norsolorinic acid (NOA) وهو أول مركب وسطي ثابت في مسار تخليق سموم الافلا Yu *et* ; Payne & Brown 1998) (*al.*,2002، وبعد ذلك تبدأ سلسلة من تفاعلات الأكسدة – الاختزال لتنتهي بتكوين السم وكما في المسار الأتي:

hexanoyl CoA precursor ⟶ norsolorinic acid, NOR ⟶ averantin, AV ⟶ hydroxyaverantin, HAVN ⟶ averufin, AVF hydroxyl-versicolorone, HVN ⟶ versiconal hemiacetal acetate, VHA ⟶ versiconal, VAL ⟶ versicolorin B, VERB ⟶ versicolorin A, VER ⟶ demethyl-sterigmatocystin, DMST ⟶ sterigmatocystin, ST O-methylsterigmatocystin, OMST ⟶ aflatoxin B1, AFB1 and aflatoxin G1, AFG1.

ويتفرع من هذا المسار عند المركب versiconal hemiacetal acetate, VHAتفرع أخر ليكون aflatoxin B2 و aflatoxin G2 (Yu *et al.*,2002).

٢ – ٢ - ٢. تلوث المنتجات النباتية بسموم الافلا

تتلوث المنتجات النباتية بأبواغ الفطريات وأجزاء الغزل الفطري بوساطة الحشرات الحاملة لها أو عن طريق تلامس الأجزاء المصابة من النبات مع الأجزاء السليمة وتلعب الظروف البيئية من درجة حرارة ورطوبة ملائمة دوراً هاماً في زيادة هذا النوع من التلوث (CAST, 2003)، إذ تتلف كميات كبيرة من المحاصيل النباتية كل سنة بسبب تلوثها بالنواتج الايضية الفطرية المفرزه بفعل الفطريات السامة وهذا ما يكون ملحوظ بصورة واضحة في البلدان ذات المناخ الحار (Ahsan *et al.*,2010) ، وبذلك يقدر ٢٥% من هذه المحاصيل تتلوث بالسموم الفطرية في جميع أنحاء العالم (Lawlor & Lynch,2001) .

ويعد الفطر *A. flavus* احد الأنواع الفطرية الواسعة الانتشار في المناطق المدارية وشبة المدارية والذي يسبب تلف المحاصيل ذات الخزن السيئ بفعل إفراز سم الافلا عليها ومن المحاصيل التي تتعرض إلى التلوث بهذا السم هي الفول السوداني والقطن والحبوب مثل الحنطة والشعير والذرة والرز بالإضافة إلى المكسرات مثل اللوز والجوز والفستق والبندق وزهرة الشمس (Bokhari,2002) ، وأن إفراز سم الافلا يعتمد بدوره على عدد من العوامل والتي تضم : المناخ والطراز الوراثي للنبات ونوع التربة وفعالية الحشرات وسقوط الأمطار غير الموسمية عند فترة الحصاد والخزن السيئ (Bhat,2008) ، فقد أجريت دراسة مسحية لمنتجات الفستق في جنوب أمريكا إذ وجد 19 % من ١٤١٦ عينة ملوثة بسم الافلا ومستوى متوسط السم فقد بلغ ١ملغم/ كيلو، وفي تايلاند وجد 49 % من 216 عينة ملوثة بسم الافلا B_1 عند مستوى متوسط 424 مايكرو غرام / كيلو، وأكثر من 260 مايكرو غرام من سم الافلا لكل كيلو من الشوفان في السويد (Verman ,2004) ، وفي السعودية وجد 22.75 % من 1600 عينة من منتجات الفستق ملوثة بسم الافلا وكان مستوى متوسط السم 16.25 مايكرو غرام /كيلو (Younis & Malik,2003) ، وفي العراق فقد وجد الفيصل (2005) 0.11 ملغم من سم الافلا B_1 لكل كيلو من الحنطة المستخدمة لتصنيع الحبية والبرغل والجريش .

ونظرا لخطورة تلوث الأغذية والأعلاف بهذه المركبات السامة فقد وضعت المنظمات العالمية ومنها المنظمة الأمريكية FDA حدود للنسب المسموح وجودها من سموم الافلا في أغذية الإنسان والحيوان ، فقد سمحت بالحد ٢٠ مايكرو غرام /كيلو في ألأغذية البشرية، إما في أعلاف الأبقار فقد سمحت بالحد ٣٠٠ مايكرو غرام / كغم ، وفي الحليب يكون مستوى سم الافلا المسموح به ٠,٥ مايكرو غرام /كيلو (Felicia,2004) .

قُسمت الفطريات التي تُصيب النباتات الى قسمين (Magan & Lacey,1988) :

- فطريات الحقل Field fungi : وتتمثل بالفطريات التي تصيب الحاصل في الحقل و تشمل بعض انواع *Fusarium* ، *Alternaria* و*Cladosporium* ، ونادراً ما تصيب المحاصيل في الخزن .
- فطريات الخزن Storage Fungi : والتي تنمو بسرعة على المحاصيل بعد الحصاد أي في مرحلة الخزن والتي بدورها تعتمد على درجة الحرارة والرطوبة ،

لكنها تتواجد بقلة قبل الحصاد وتشمل بعض انواع *Aspergillus* و *Penicillium* .

ومن جانب أخر لا يخفى على إن بعض الأنواع الفطرية تدخل في صناعة الأطعمة مثل الجبن والخبز وبعض المشروبات الكحولية بالإضافة إلى إنتاج بعض المضادات الحيوية Antibiotics (Hugo & Russell, 1998).

٢- ٢ - ٣. تأثير سموم الافلا على صحة الإنسان والحيوان

إن للسموم الفطرية القدرة على إحداث العديد من الأمراض للإنسان فبعضها ما تكون حادة Acute ، والأخرى منها مزمنة Chronic (Bryden , 2007) . و لقد حظيت سموم الافلا باهتمام كبير من بين مجاميع السموم الفطرية بسبب تأثيرها الفعال على صحة الإنسان والحيوان (Guzmán-de-Peña & Peña-Cabriales ,2005) . فقد ذكرت الوكالة العالمية لبحوث السرطان إن سم الافلا قد احتل المرتبة الأولى من بين العوامل المسرطنة للإنسان (Gratz , 2007) . ومن جانب أخر يعد من أكثر السموم الفطرية سيادةً (Upadhaya *et al*.,2010) .

إن التسمم الناتج من تناول أغذية ملوثة بسموم الافلا يعرف بأمراض سموم الافلا Aflatoxicosis ، ويوجد شكلين من أمراض سموم الافلا فأما أن تكون حادة من خلال تسمم بعض الأعضاء وخاصةً الكبد ثم يتبع ذلك حالة مرضية أوالى الموت ، أما الشكل الثاني فيكون مزمن مؤدياً إلى تكوين أورام سرطانية وضعف في المناعة (Qazi & Fayyaz , 2006) . فهناك العديد من الدراسات الوبائية والتجريبية التي أجريت في بلدان مختلفة من العالم لمعرفة قابلية سموم الافلا على أحداث الامراضية للإنسان والحيوان (Bennett & Klich,2003; Del- Bianchi *et al* .,2005 ; Gratz , 2007; Wild & Montesano,2009).

وأن ميكانيكية حدوث السرطان تتم عن طريق تفاعل الأيبوكسيد Epoxide الذي يحدث عند الموقع – ٩،٨ من سم الافلا لحلقة الفيوران الطرفية Terminal furan ليكون مركب مستقر الذي يعرف Aflatoxin- 8,9 – Epoxide والذي بدورة يرتبط بآصرة تساهمية مع الكوانين Guanine في موقع ذرة النيتروجين السابعة لنيوكليوتيدات Nucleotides الجينات

Genes ، وتعتمد فعالية السرطان على موقع ارتباط سم الافلا بالجين (موقع الطفرة في ألجين) (Agag , 2004 ; Gratz , 2007) ، وفضلاً عن السرطان الذي يسببه سم الافلا فأنه يحث على الضعف المناعي Immunosuppression وبذلك يزيد من مهاجمة البكتريا والفيروسات للجسم ، وفي تجربة أجريت على الطيور لدراسة الجانب المناعي عليها من خلال تجريعها سم الافلا فوجد أن السم يخفض بعض الكلوبيولينات Globulins مثل IgA و IgM و IgG (Agag , 2004) .

وكما وجد إن هناك علاقة تآزرية Synergistic بين بعض الأمراض وسموم الافلا ومنها مرض التهاب الكبد الفيروسي Hepatitis من نوع B و C ، فان وجود هذا المرض مع سموم الافلا يؤدي إلى زيادة احتمالية حصول سرطان الكبد (Williams *et al* .,2004).

٢ – ٢ - ٤. العوامل المؤثرة في إنتاج سم الافلا

هنالك العديد من العوامل التي تؤثر على إنتاج سم الافلا وقد تكون هذه العوامل إحيائية فتشمل نوع سلالة الفطر و الإحياء المجهرية المتنافسة ، أو قد تكون لاإحيائية تشمل درجة الحرارة والرطوبة والأس الهيدروجيني والإشعاع واستخدام بعض المواد الكيميائية أو المستخلصات النباتية .

٢ – ٢ – ٤ – ١. العوامل اللاإحيائية

١. درجة الحرارة

تنمو الفطريات بصورة عامة ضمن مدى حراري يتراوح بين ١٢ – ٤٨ °م ، ولكل فطر منها درجة حرارة مثلى للنمو أو لإحداث الإصابة أو المرض أو لإنتاج السموم (Hedayati *et al* ., 2007) ، ينمو النوعان *A. flavus* و *A. parasiticus* بدرجات حرارية متماثلة تتراوح

بين ١٢-٤١ °م ، لكن الدرجة الحرارية المثلى تتراوح بين ٢٥ – ٣٢ °م (Agag ,2004) . إما الإنتاج الأمثل للسموم فيقع ضمن مدى حراري يتراوح بين ٢٤ – ٢٨ °م ويشذ عن ذلك سم T – 2 إذ يبلغ إنتاجه الأعظم عند درجة حرارة ١٥ °م (Bhatnagar *et al.*, 2002) ، في حين بناء سم الافلا يزداد عند درجة حرارة أكثر مـــن ٢٧ °م ، ويتغير إنتاج سموم الافلا بتـغير درجات الحرارة ففي مدى درجة الحرارة يتراوح بين ٢٤ – ٢٨ °م يزداد إنتاج سم الافلا B ، أما درجة حرارة ٢٣ °م هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج سم الافلا G ، في حين المدى الحراري المنخفض المتراوح ٨ – ١٠ °م ينتج كل من سم الافلا GوB بكميات متساوية تقريبا ، لكن كمية الإنتاج الكلي لهما تكون قليلة وتتطلب وقت أكثر (Agag ,2004) .

٢. الرطوبة النسبية

تعرف الرطوبة النسبية على أنها كمية بخار الماء في الهواء الجوي إلى كمية بخار الماء الذي يمكن إن يشغل ذلك الحيز من الهواء إلى حد الإشباع عند نفس الدرجة الحرارية (Tucker & Featherstone , 2011).

يزداد معدل نمو كل من *A.flavus* و *A.parasiticus* عند رطوبة نسبية تتراوح بين ٧٨ – ١٠٠ % وبهذا المدى يغزو الفطرين سطح الثمرة أو يمتد إلى لبها ، اما المدى المثالي لنمو الفطرين عند رطوبة نسبية تتراوح بين ٩٨ – ١٠٠ % (Purcell *et al* .,1980) . وفي تجربة أجراها الباحثان Boller & Schroeder (1973) لدراسة نمو الفطر *A. parasiticus* على حبوب الرز فقد وجدا الرطوبة النسبية عند مستوى ١٠٠ و ٨٠ % هو المستوى الأفضل لغزو جميع حبوب الرز ، إما إنتاج سم الافلا فقد بلغ أقصاه عند نفس المستوى الرطوبي .

٣. الأس الهيدروجيني pH

يوجد العديد من الدراسات التي تبين تأثير pH على إنتاج سم الافلا لكنها مجربة في الأوساط السائلة وعلى المواد الغذائية مثل الذرة و الرز . ففي الوسط السائل اكار مستخلص الخميرة AMY فأن المستوى pH المتراوح بين ٣ – ٦ ملائم لإنتاج سم الافلا B ، إما المستوى pH المتراوح بين ٦ – ٨ ملائم لإنتاج سم الافلا G

(Buchanan & Ayres 1975) ، وفي دراسة أجراها الباحثان Horn & Wicklow (1983) على تأثير مستوى pH على معدل إنتاج سم الافلا من نوع B_1 في حبوب الذرة فقد وجد مستوى pH المتراوح بين ٢ – ٣ يثبط إنتاجه بصورة تامة ، إما مستوى pH المتراوح بين ٣ – ٧ يزيد من إنتاج سم الافلا B_1 وبشكل طردي مع مستوى pH .

٤. الإشعاع

أوضحت CAST (2003) بأن للإشعة فوق البنفسجية القابلية على اختزال سم الافلا في زيوت الفستق ، كما إن تعرض منتجات الفستق إلى أشعة كاما ليس لها تأثير على تحطيم مستويات سم الافلا . لكن وجد Ghanem *et al* (2008) أن لإشعة كاما لها القابلية على تحطيم سم الافلا في الفستق والرز والذرة ويزداد التحطيم مع زيادة قوة الإشعاع لأشعة كاما . وعند تعرض الحليب الملوث بسم الافلا M_1 إلى أشعة فوق البنفسجية لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة ٢٥ فان السم يتكسر بنسبة ٨٩,١ % لكن بوجود 0.05 % من البيروكسيد Peroxide ، وبنسبة ٦٠,٧ % في حالة عدم وجود البيروكسيد ، وأن لإشعة المايكروويف Microwave لها القدرة على تحطيم سم الافلا B_1 ,B_2, G_1, G_2 المتواجد في الأغذية ، إما ضوء الشمس يمتلك فعالية عالية على اختزال سم الافلا B_1 في مدى لا يقل عن ٧٧– ٩٠ % من خلال تعرض مسحوق الفستق الملوث بالسم لمدة ١٤ ساعة من الإضاءة (ACST , 2003) .

٦. المواد الكيميائية

توجد العديد من الدراسات التي تبين استخدامها للمواد الكيميائية كعوامل مختزلة لسم الافلا والتي تضم الحوامض والقواعد والغازات وعوامل الأكسدة (Safara *et al* ., 2010). فقد أوضح Chen *et al* (2007) إن لبعض المحاليل القاعدية لها القدرة على اختزال سم الافلا B_1 في الرز ، فقد وجد محلول الامونيا NH3 . H2O له القابلية على تحطيم السم بدرجة اقل من هايبوكلورات الصوديوم NaOCl و هيدروكسيد الصوديوم NaOH . وإن لحامض ألستريك Citric acid القابلية على اختزال سم الافلا B_1وB_2 في الذرة البيضاء وتزداد هذه القابلية على الاختزال مع زيادة تركيزه (Méndez-Alboresa *et al*., 2008) . وكذلك تمتلك المركبات الفينولية Phenolic Compounds مثل Acetosyringone ،

Syringaldehyde وSinapinic acid القدرة على اختزال سم الافلا B_1 المنتج من الفطر *A. flavus* ، لكن Acetosyringone يعد من أقوى المركبات الفينولية في اختزال سم الافلا B_1 وبنسبة ٩٦ % عند تركيز ٤ ملغرام لكل مل من وسط PDA (Hua *et al.*, 1999) .

٢ – ٢ – ٤ – ٢.العوامل الإحيائية

١. نوع السلالة الفطرية

يحدد نوع الفطر نوع السم المنتج من قبله فالفطر *A. flavus* وجد انه ينتج نوعين من سم الافلا B2, B1 في حين ينتج الفطر *A. parasiticus* سم الافلا G2, G1, B2, B1 (Shier *et al.*,2005) ، فضلا عن ذلك وجد إن النمط الجيني genotype للسلالة هو المسؤول عن تحديد إنتاج سم الافلا ، أي وجود أو عدم وجود mRNA المتخصص في تشفير الإنزيمات المسؤولة عن تخليق السم (Scherm *et al.*,2005) . ومن جانب أخر يتأثر إنتاج سم الافلا ضمن أفراد النوع الواحد . فقد لوحظ في الولايات المتحدة الأمريكية أن سلالة الفطر *A. flavus* - S تنتج كميات كبيرة من سم الافلا B ، إما في أفريقيا تنتج هذه السلالة نوعين من سم الافلا وهما B وG ، في حين إن سلالة الفطر *A. flavus* – L في كلا القارتين لا تنتج سم الافلا B أو تنتجه بكميات كبيرة (Bandyopadhyay *et al.*, 2005) .

٢. الإحياء المجهرية المنافسة

تؤثر الإحياء المجهرية المنافسة على إنتاج سم الافلا من خلال خفض pH الوسط أو أنتاجها المواد الايضية المثبطة (Stanojevic *et al.*, 2009) . فقد وجد Khanafari *et al* (2007) إن لبكتريا *Lactobacillus plantarum* القابلية على اختزال ٧٧ % من سم الافلا B_1 ، وكذلك تحيط هذه البكتريا ابواغ الفطر *A. flavus* مما تعيق نموها بصورة تامة . وان للفطر *Trichoderma harzianum* القابلية على تثبيط الفطر *A. flavus* النامي على الذرة الصفراء بنسبة ٩٠ % واختزال ٥١,٨٧ % من سم الافلا B_1 ويعزى ذلك إلى قابليته على إنتاج الزيوت الطيارة مثل hexanal و octanal و 1-heptanal (Agüero *et al.*, 2008) . وان للبكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* و الفطر *Trichoderma viride* القابلية على تثبيط نمو *A. flavus* بنسبة ٧٢

% ، ٧٤ % و ٦٥ % واختزال سم الافلا B_1 بنسبة ٥٤% ، ٦٢,٦ و٣٩ % وعلى التوالي في حبوب الذرة البيضاء والمستخدم كوسط تنمية (Reddy *et al*., 2010) .

2 – ٣. جنس *Aspergillus*

ينتمي هذا الجنس إلى مجموعة الفطريات الخيطية Filamentous fungi ، وذات الانتشار الواسع في الطبيعة وخاصةً في المناطق المدارية ، واغلب الأنواع التابعة لهذا الجنس تكون رمية المعيشة Saprophytes (Pitt,1994) . وقد أكد Batista *et al* 2008 بأن هناك ٢٠٠ نوع تابع لهذا الجنس فبعضها ما تكون انتهازية Opportunistic ممرضة للإنسان كما في جنس *A. fumigatus* ، في حين البعض الأخر منها تفرز سموم الافلا مثل *A.flavus* و *A. parasiticus* و *A. nomius* ، إما النوعين *A.sojae* و *A.oryzae* فقد استخدمت في بعض الدول الأسيوية في عمليات التخمر .

وأنواع هذا الجنس تختلف عن بعضها البعض من حيث قطر المستعمرة ولون الكونيديات والخيوط ولون ظهر المستعمرة ، بالإضافة إلى الاختلافات في الخصائص المجهرية مثل حجم وشكل الحويصلات Vesicles والميتيولات Metulae والفياليدات Phialides والكونيديات Conidia (Jernejc & Cimerman,2001) ، وتنتج الكونيديات على شكل سلاسل أو أعمده تنشأ من تركيب مركزي بترتيب شعاعي، إذ تكوّن قالباً أو نموذجاً يشبه مرشة الماء التي تدعى باللاتينية (Aspergillum) و منها أشتق اسم الجنس *Aspergillus* (Bennett & Kwon-Chung, ١٩٩٢) .

٢ – ٣ – ١. الخصائص التصنيفية للنوع *Aspergillus flavus*

العديد من الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* غير معرف فيها الطور الجنسي وتقدر بحوالي ٦٠ % مثل *A. parasiticus* و *A. flavus* و *A. oryzae* و *A. niger* و *A. fumigatus* إذ أنها تمتلك تراكيب تكاثرية عقيمة مثل الأجسام الحجرية و خلايا هول Hulle cells إلا أنَّ هناك بعض الأنواع تتكاثر جنسياً إذ تسلك سلوك الفطريات الكيسية ، بتكوين سبورات كيسية Ascospores منتظمة داخل أكياس Asci وتكون الأخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل Cleistothecium (Webster & Weber ,2007) .

ويعود هذا الفطر تصنيفياً إلى عائلة Moniliaceae التابعة إلى رتبة Moniliales وتسمى أيضا Plectoscales (Bennett & Kwon-Chung, ١٩٩٢) .

٢ – 3 – 2. الصفات المجهرية و المظهرية والوراثية

وصِفَ هذا النوع لأول مرة من قبل العالم Link عام ١٨٠٩ ، على انه يمتلك حامل كونيدي Conidiophore متثخن الجدار عديم اللون وذات طبيعة خشنة ويبلغ طول الحامل اقل من ١ملم وتتسع نهاية الحامل لتكوّن حويصلة Vesicle والتي تمتلك شكل متطاول في المراحل الأولى مـن النمو وفيما بعد يصبح شكلها شبة كروي أو كـروي و يـتراوح قطـرها ١٠-٦٥ مايكرو متر وتحاط الحويصلات بالميتيولات Metulae وفي بعض الحالات تفتقر إلى ذلك ، إما الفياليدات Phialides هذا النوع أحادية التفرع أو ثنائية التفرع والتي تحمل الكونيديات Conidia ذات شكل كروي أو شبة كروي ويتراوح قطرها ٣,٥-٤,٥ مايكرومتر (Hedayati *et al.*,2007) .

أما الصفات المظهرية للضروب التابعة لنوع *A.flavus* يصعب التميز بينها ويعود السبب إلى التداخل في الخصائص المظهرية والكيموحيوية ، وبشكل عام تمتلك جميعها مستعمرات خضـراء اللون مع تضليل اصفر اما ظهر المستعمرة فيكون لونها ذهبي إلى بني محمر . نسجة المستعمرة مترابطة غير مفككة غائرة في الوسـط الغذائي وذات طبيعة مخمـلية Velvety ، وعند تقدم المستعمرة بالنمو فأنها تتحول إلى اللون البني (Koh & Tseng ،١٩٧٥) ، وفي حالة تعرض الفطر إلى ظروف بيئية غير ملائمة فأنه يتحول إلى ما يعرف بالجسم الحجري Sclerotium ، وحسب شكل ومعدل نمو الجسم الحجري فقد قسم *A.flavus* إلى سلالتين S وL ، السلالة S تنتج عدد كبير من الأجسام الحجرية صغيرة الحجم إذ يبلغ قطرها اقل من ٤٠٠ مايكرو متر وتنتج بما يقدر ٩٨% من سم الافلا ، إما السلالة L تنتج عدد قليل من الأجسام الحجرية كبيرة الحجم (Nelson *et al.*,1998) .

وفيما يخص الصفات الوراثية ، فأن العديد من الأنواع العائدة إلى جنس *Aspergillus* تكون ذات مورثات متشابه نسبياً ، إذ يمتلك الفطر *A.flavus* ثمان كروموسومات ، في حين

يبلغ حجم الجينوم Genome بما يقدر ٣٦,٣ ميغا من الزوج القاعدي Mb والمورثة تتكون من ١٣٠٧١ جين Gene (Yu *et al.*,2005) ، وكل جين مكّون من ١٣٨٤ زوج قاعدي bp (Hedayati *et al.*,2007) .

٢ – ٣ -٣. سموم الفطر

أن لبعض سلالات *A.flavus* القابلية على إفراز سم الافلا B_1 و B_2 في حين إن البعض الأخر ليس لها القابلية على ذلك ، ولهذا الفطر القابلية على إنتاج بعض المركبات الأخرى ذات الطبيعة السامة وهي ستركماتوسيستين Sterigmatocystin وحامض البزونك الحلقي Cyclopiazonic acid و حامض الكوجيك Kojic acid و حامض بيتا-نايتروبروبانويك β -nitropropionic acid و سم الاسبر Aspertoxin والافلا تريم Aflatrem وسم الكليو Gliotoxin وحامض الاسبيرجليك Aspergillic acid وبالإضافة إلى ذلك إن هذا الفطر قد ينتج بعض النواتج الايضية الثانوية مثل الافلافنين ثنائي الهيدروكسي Dihydroxyaflavinine والاندول Indole وبسبيلينين Paspalinine و فرسيكولورين A – Versicolorin A (Hedayati *et al.*,2007 ; Guo *et al.*,2009) .

٢- 4. تأثير المستخلصات النباتية في الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1و B_2

تملك الأعشاب والتوابل تأريخ طويل في الاستخدامات العلاجية للإنسان ، إذ وجدت العديد من النصوص القديمة التي تشير إلى استخدامها في الحضارات البابلية والسومرية والمصرية (Peter & Nirmal – Babu , 2004) .

ويعرف النبات الطبي على انه النبات الذي يحتوي واحد أو أكثر من المكونات التي يمكن استخدمها للأغراض العلاجية أو التي يمكن استخدمها كمواد أولية لتصنيع العقاقير ، وقد قدرت بحوالي ٢٥٠٠٠ – ٥٠٠٠٠٠ نوع نباتي موجود على سطح الأرض ، وتستخدم نسبة قليلة من تلك النباتات بقدر ١ – ١٠ % كغذاء للإنسان والحيوان ، والتي قد تمتلك بعض الخصائص العلاجية التي تعزى إلى احتوائها على العديد من المكونات الفعالة حيوياً مثل الكاربوهيدرات Carbohydrates والبروتينات Proteins والأنزيمات Enzymes والدهون Fats

والزيوت Oils والمعادن Minerals والفيتامينات Vitamins والقلويات Alkaloids والتيربينويدات Terpenoids والفلايفونويدات Flavonoids والكوينونات Quinines والكاروتينات Carotenoids والستيرولات Sterols والكلاكوسيدات الحوامض الفينولية البسيطة Simple phenolic glycosides والتانينات Tannins والصابونيات Saponins والفينولات المتعددة Polyphenols (Olowokudejo *et al.*,2008) .

وقد أجريت العديد من الدراسات لبيان فعالية المستخلصات النباتية والمركبات الفعالة تجاه فطر *A.flavus* وسم الافلا ، ومنها دراسة Maraqa *et al* 2007 فقد وجد أن مستخلص الحبة السوداء *Nigella sativa* لهُ القابلية على تثبيط سم الافلا من نوع B_1 ، B_2 و G_1عند تركيز 5 % لفطر *A.flavus* في الوسط ألزرعي السائل نقيع النخالة الصلب ، أما زيوت الحبة السوداء فثبطت كل من B_1 ، B_2 ، G_1 وG_2 عند تركيز 3 % ، في حين يثبط مسحوق حبوب القهوة B_1 ، G_1 وG_2 عند تركيز 6 % ، وللكافائين القدرة على تثبيط G_1 وG_2 عند تركيز 2 % . وللمركب الفعال Methyleugenol القدرة على تثبيط الفطر *A.flavus* بنسبة 100 % على الوسط PDA عند تراكيز مختلفة ٠,١ ، ٠,٥ و١,٥ % (Sudhakar *et al* .,2009). في حين وجد Reddy *et al* (2011) إن المستخلص المائي لأوراق البصل *Allium cepa*عند تركيز ٣٠٠ملغرام /مل من الوسط يثبط من الوزن الجاف للفطر *A. flavus* بنسبة ٢,٣ ملغرام /مل من وسط الزابك Czepek's medium ، إما سم الافلا فقد ثبط بنسبة ٥١,٣٨ مايكرو غرام /مل من الوسط نفسه ، لكن وجد Hajare *et al* (2005) إن لنبات النانخة *Trachyspermum ammi* القدرة على اختزال سم الافلا B_1 ، B_2 ، G_1 وG_2 بنسبة ٨٠ % ، وفي دراسة أخرى وجد Robertson & Teunisson (1967) ان لنبات *Tetrahymena pyriformis* القدرة في تكسير سم الافلا B_1 بنسبة ٥٨ % خلال مدة ٢٤ ساعة وبنسبة ٦٧ % خلال مدة ٤٨ ساعة .

٢ – 4 - ١. نبات الكركم *Curcuma longa* L.

يعود هذا النبات تصنيفاً إلى العائلة الزنجبلية Zingiberaceae والاسم الانكليزي له Turmeric والموطن الأصلي لهذا النبات هو الهند ويتميز بكونه نباتاً عشبياً معمراً Herb perennial (Quiles *et al.* ,2002 ; Chattopadhyay *et al* .,2004) . ويتركب

جسمه من 2 -3 ساق كاذب Pseudostems ويتراوح طول كل ساق كاذب 90-100 سنتيمتر ، شكل نصل الورقة رمحي Lanceolate أو اهليجي Elliptic ، لون الأوراق العليا خضراء في حين لون الأوراق السفلى خضراء شاحب ، طول الورقة 30-40 سنتيمتر وعرضها 12- 8 سنتيمتر ، والنورات الزهرية Inflorescence اسطوانية الشكل وذات طبيعة لحمية Fleshy وطولها 10-15 سنتيمتر وكل نورة زهرية تتكون من ٣٠ زهرة ، وتنشأ الرايزومات Rhizomes تحت سطح الأرض من قاعدة السيقان الكاذبة وتتكوَن من رايزوم الأم الذي يتفرع منه ثلاث رايزومات ثانوية متراصة إصبعية الشكل ، أما لون الرايزومات برتقالي مائل إلى البني أو أصفر باهت أو أصفر محمر (Sasikumar ,2001) . الشكل (٣) .

الشكل (٣) المظهر الخارجي لنبات الكركم (Duke *et al*.,2002).

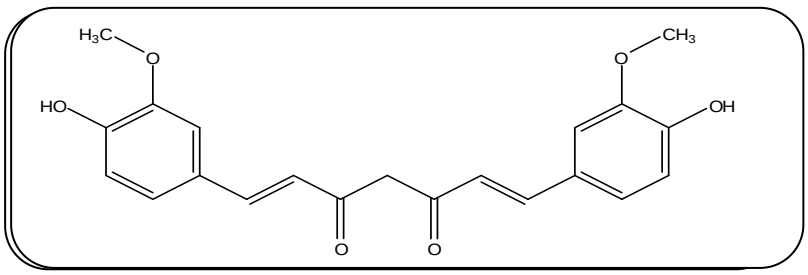
٢ ـ ٤ ـ ١ـ ١. الأهمية الطبية لنبات الكركم

منذ زمن قديم استخدمت مستخلصات الكركم في علاج أمراض الجلد والكبد والقرحة وكذلك استخدم لعلاج الطفيليات المعوية وسموم الأفاعي آنذاك (Quiles, 2002) . ومن خلال الدراسات والبحوث العلمية أشار Chattopadhyay *et al* (2004) أن نبات الكركم يعد

كمضاد للالتهابات والأكسدة والسرطان والطفرة والتخثر والخصوبة ومرض السكري والبكتريا والفطريات والفيروسات والابتدائيات والسم والقرحة . فقد وجد Çikrikçi *et al* (2008) أن للمركب الفعال Curcumin الموجود في نبات الكركم له القدرة على تثبيط الفطر *Candida albicans* . كما استخدم Curcumin في علاج أمراض الأمعاء مثل سرطان القولون (Ireson *et al* .,2002).

٢ – 4 - ١ – ٢. المكونات الكيميائية لنبات الكركم

يحتوي الكركم على العديد من المكونات الكيميائية ، إذ تشكل البروتينات ٦,٣ % والدهون ٥,١ % والمعادن ٣,٥ % والكاربوهيدرات ٦٩,٤ % ومحتوى رطوبي ١٣,١ % ، أما الزيوت الطيارة فتشكل ٥,٨ % والتي تضم a - فليندرين *a*- phellandrene و سابنين Sabinene و سنيول Cineol و بورنيول Borneol و زنجبيرين Zingiberene و التربينات المتسلسلة Sesquiterpines ، والكركمن Curcumin يشكل ٣ – ٤ % وهو المسؤول عن اللون الأصفر في الرايزومات والذي يضم ثلاثة أشكال الكركمن الأول curcumin I نسبة ٩٤ % و الكركمن الثاني curcumin II نسبة ٦ % و الكركمن الثالث curcumin III نسبة ٠,٣ % ، بالإضافة إلى الكركمن منقوص الميثوكسي Desmethoxycurcumin والكركمن منقوص مجموعتين ميثوكسي Bisdesmethoxycurcumin (Chattopadhyay *et al* .,2004) . الشكل (٤) .



الشكل (٤) التركيب الكيميائي للكركمنcurcumin (Somchit *et al*., 2002).

٢ – ٤ - ٢. نبات الزعتر *Thymus vulgaris* L.

يعود هذا النبات تصنيفاً إلى العائلة Lamiaceae وكذلك تعرف بالعائلة الشفوية Labiatae والاسم الانكليزي لـه Thyme والموطن الأصلي لهذا النبات هو جنوب أوربا

الممتدة من اسبانيا إلى ايطاليا (Stahl-Biskup & Venskutonis , 2004) ، ويتميز بكونه نباتاً شجرياً معمراً Perennial sub-shrub ويتركب جسمه من ساق متصاعد Ascended رباعي الزوايا Quadrangular ويبلغ طوله 10 – 30 سنتيمتر ، ولونه رمادي ضارب على البني إلى اللون الأرجواني الضارب على البني ، والأوراق مخضرة ومتقابلة Oppositeوشبة جالسة على الساق وشكلها رمحي متطاول Oblong-lanceolate إلى البيضوي المتطاول Ovate-lanceolate وكلا سطحي الورقة مغطى بكساء سطحي Indumentum رمادي إلى رمادي مخضر ويبلغ طولها 4 – 12 مليمتر وعرضها 3 مليمتر ، والأزهار ذات لون بنفسجي براق light-violet وشكلها ثنائي الشفاه Bilabiate وطولها يبلغ ٥ مليمتر (WHO ,1999 ; Stahl-Biskup & Venskutonis , 2004) . الشكل (٥) .

الشكل (٥) المظهر الخارجي لنبات الزعتر (Duke *et al.*,2002).

٢ – ٤ – ٢ - ١. الأهمية الطبية لنبات الزعتر

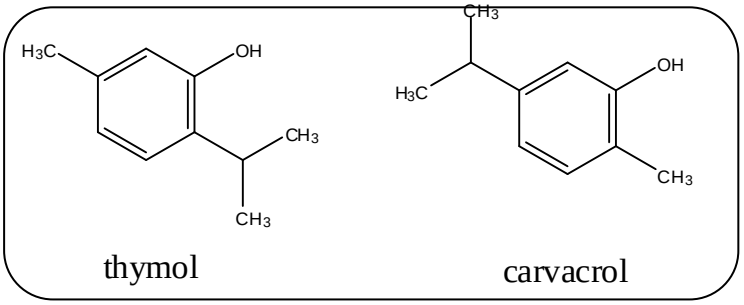
يعد نبات الزعتر من النباتات التي شاعَ استخدامها في وقت مبكر من القرون الوسطى في العديد من الدول بسبب امتلاكه الخصائص المنهكة للغذاء وكذلك في الأغراض الطبية (Stahl-Biskup & Venskutonis ,2004) . فقد ذكر كل من الباحثين Kulevanova & Panovska (2001) بأن نبات الزعتر يمتلك الفعالية البيولوجية ضد البكتريا والفطريات ومانع للتأكسد ويعمل كمقشع ومسكن للألأم والتشنجات .

ولزيوت الزعتر القابلية على تثبيط كل من الفطريات *Rhizoctonia solani* ، *Macrophomina phaseolina* ، *Fusarium oxysporum* ، *Helminthosporium* Sp ، *Alternaria alternata* و *Diplodia* Sp (El – zemity & Ahmed ,2005) .

٢ – ٤ – ٢ - ٢. المكونات الكيميائية لنبات الزعتر

تحتوي الأوراق والسيقان والنورات الزهرية لنبات الزعتر على زيوت طيارة Essential oils ذات رائحة عطرية وطعم حاد وبنسبة ١-٢,٥% ويشكل Thymol و Carvacrol نسبة أكثر من ٦٤ % من الزيت الطيارة ، فضلاً عن أحتواء الزيت على Linalool ، *p*-Cymol ، Cymene ، Thymene ، α-Pinene ، Apigenin ، Luteolin و6-Hydroxyluteolin glycosides (WHO ,1999) .

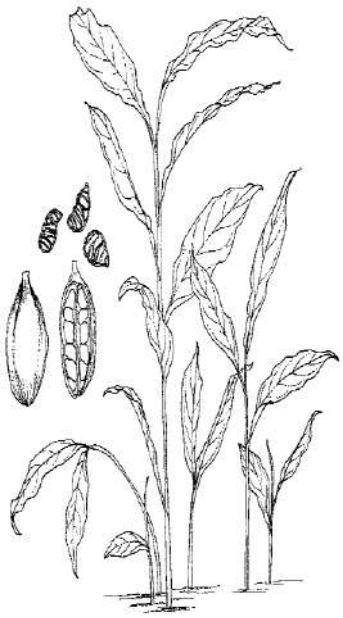
وتوجد هذه المكونات بنسب تختلف من نوع نباتي إلى أخر ، فمثلاً يحتوي زيت الزعتر *Thymus vulgaris* L. على Thymol بنسبة ٣٠-٥٥ % ، و Carvacrol بنسبة – 5 1 % ، *P*-cymene بنسبة ١٥-٢٠ % ، و γ - terpinene بنسبة 5 - ١٠ % و Linalool بنسبة 1 – 5 % ، و β-caryophyllene بنسبة 1 – 3 % ، إما Borneol ، Camphor ، Limonene ، Myrcene ، β-pinene ، α-terpineol و Trans-Sabinene hydrate فتشكل نسبة قليلة 0.5 – 1.5 % ، بالإضافة إلى الزيوت الطيارة فقد يحتوي الزعتر على التانينات Tannins والافلافونيدات Flavonoids ومشتقاته (Stahl-Biskup & Venskutonis ,2004) الشكل (٦) .



شكل (٦) التركيب الكيميائي لأهم المركبات في الزعتر (WHO ,1999) .

٢ – ٤ - ٣. نبات الهيل *Elettaria cardamomum* (Linn.), Maton

يعود هذا النبات تصنيفاً إلى العائلة الزنجبلية Zingiberaceae والاسم الانكليزي له Cardamom ويعرف باللغة الشعبية بملكة التوابل Queen of spices والموطن الأصلي لهذا النبات هو الغوط الغربي الواقعة في جنوب الهند ويتميز بكونه نباتاً عشبياً معمراً Perennial herb (Ravindran , 2002) ، طول النبات يصل إلى ٤ متر والأوراق رمحية الشكل Lanceolate ويصل طول السويق فيها ٢,٥ سنتيمتر إما طول النصل ١متر وعرضه ١٥ سنتيمتر والسطح السفلي للورقة ذات طبيعة زغبية أو أملس ، النورات الزهرية محمولة بصوره منفصلة وزاحفة أو شبة منتصبة أو منتصبة ، الثمار من النوع الكبسولي Capsule متطاولة الشكل أو كروية تقريباً (Madhusoodanan *et al.*, 2002) الشكل (7) .



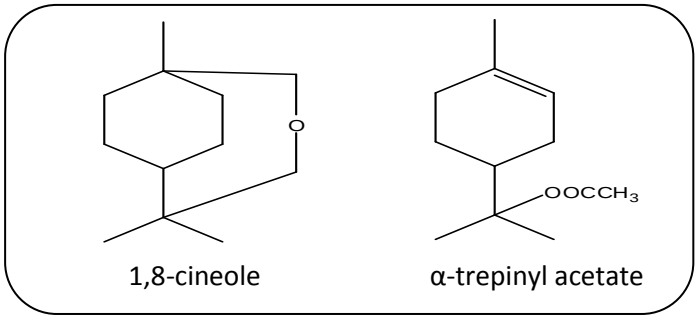
الشكل (٧) المظهر الخارجي لنبات الهيل (Duke *et al*.,2002)

٢ ـ ٤ ـ ٣ ـ ١ . الأهمية الطبية لنبات الهيل

يعد نبات الهيل من التوابل التي شاعَ استخدامها منذ القدم في جميع أنحاء العالم (Lwasa & Bwowe , 2007) . وقد ذكر Verma *et al*(2009) أن لنبات الهيل العديد من الأغراض ومنها كمنكهات للغذاء وفي العلاجات الطبية مثل علاج أمراض القناة الهضمية والقلب والكلى والربو والضعف وسوء التغذية وفي تلطيف رائحة الفم . وأن للزيوت الطيارة في نبات الهيل لها القابلية على تثبيط كل من نمو الفطرين *A. fumigatus* و *A.niger* (Bansod & Rai , 2008) والمستخلص الايثانولي لأوراق الهيل لها القابلية على تثبيط الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* اكثر مما عليه من المستخلص المائي (yulia *et al* .,2006) .

٢ ـ 4 - ٣ ـ ٢. المكونات الكيميائية لنبات الهيل

تحتوي الثمار الجافة لنبات الهيل على العديد من المكونات والمتمثلة بالزيوت الطيارة و الدهون و الأصباغ و البروتينات و سكر وسيليلوز و بنتوسانات و سيلكا و أوكزالات الكالسيوم و بالإضافة إلى المعادن ، ويشكل النشأ نسبة كبيرة من البذور ويقدر بأكثر من ٥٠ % ، بينما غلاف الثمرة يتكون بنسبة كبيرة من الألياف الخام وتقدر بأكثر من ٣١ % (Zachariah ,2002) . ومن أهم المركبات الفعالة الموجودة8،1 - سينول 1,8 - Cineole و إلفا- أستات التربينيل α- Terpinyl acetate وهما من الزيوت الطيارة والمسؤولة عن الرائحة العطرية للنبات ، ويتركب الهيل بصورة عامة من α – Pinene ١,٥ % ، β – Pinene ٠,٢ % ، Sabinene ٢,٨ % ، Myrcene ١,٦ % α –Phellandrene 0.2 % ، Limonene١١,٦ % ، 1,8 – Cineole ٣٦,٣ % ، γ- Terpinene 0.7 % ، p-Cymene ٠,١ % ، Linalyl acetate 2.5 % ، Linalool 3.0 % ، Terpinolene ٠,٥ % ، Terpinen-4-01 ٠,٩ % ، α- Terpineol 2.5 % ، α – terpinyl acetate 31.3 % ، Citronellol 0.3 % ، Nerd 0.5 % ، Geraniol 0.5 % ، Methyl eugenol ٠,٢ % و Trans-nerolidol 2.7 % (Korikanthimath , 2001) الشكل (8) .



الشكل (8) التركيب الكيميائي لأهم المركبات في الهيل (Zachariah ,2002).

2 – ٥. الفيتامينات وأهميتها البيولوجية

تعد الفيتامينات من المركبات العضوية والمتواجد بكميات قليلة في الأغذية وهي ضرورية في النمو والحفاظ على الصحة ، عرفت الفيتامينات من خلال بعض الإمراض التي تتصاحب مع نقصها في بعض المكونات الغذائية مثل مرض داء الإسقربوط والكساح والبري بري ، وفي هذا الصدد يأتي العالم Funk في عام 1913 ليعطي الدليل الأول على وجود الفيتامينات في الغذاء الطازج وذلك من خلال أبحاثه على مرض البري بري Beriberi في الطيور، إذ استطاع هذا العالم من استخلاص مادة من الخميرة ونخالة الرز يمكن إن تداوي هذا المرض وسميت تلك المادة في البداية الأمين الحيوي Vita amine ومنه اشتق المصطلح Vasudevan Vitamin) (Sreekumari , 2004 & . بعد ذلك توالت الدراسات لتكتشف بان الفيتامينات تضم انواعاً مختلفة تختلف في خصائصها الكيميائية والحياتية ، وبصورة عامة فإنها تقسم إلى مجموعتين أساسيتين ، فيتامينات ذائبة في الدهون Fat-soluble وتشمل فيتامينات A ، E ، D ، K وفيتامينات ذائبة في الماء Water-soluble وتشمل فيتامين C ومجموعة فيتامينات معقد B .(Bender & Mayes ,2003)

٢ – ٥ – ١. فيتامين A

يعد فيتامين A من الفيتامينات الذائبة في الدهون ويوجد في الأغذية ذات الأصل الحيواني مثل الحليب والكبد ، كما يوجد أيضا في الأغذية النباتية بهيئة بيتا - كاروتين β – Carotene ، وهذا الأخير يعد Provitamin A والذي يتحول إلى فيتامين A في الأمعاء أو الكبد ، ويمتلك فيتامين A ثلاثة إشكال فعالة ويطلق عليها جميعها Retinoides ، وهو إما

أن يكون كحولي Retinol ، أو الديهايدي Retinal ، أو حامضي Retinoic acid (Vasudevan & Sreekumari , 2004) . ويعمل فيتامين A كعامل مضاد للأكسدة وله القابلية على اختزال مرض التسمم بسم الافلا aflatoxicosis في الكبد والكلى لطيور Japonica *Coturnix coturnix* بعد إن جرعت بالسم مسبقاً (Denli *et al.*,2003) . ووجد Norton (1997) بأن بيتا – كاروتين β- Carotene له القابلية على تثبيط إنتاج كل من المركب الوسطي Norsolorinic acid وسم الافلا ، وكذلك اختبرت فعالية بيتا – كاروتين ضد الفطر *A. flavus* والذي اختزل نمو الفطر بنسبة (٨٩ – ٩٦) % عند إضافة ٥٠ مايكروغرام منه لكل مل من الوسط الصلب .

٢ – 5 – ٢. فيتامين E

يعد فيتامين E من الفيتامينات الذائبة في الدهون كذلك ، ويمتلك فيتامين E شكلين وهما Tocotrienols و Tocopherols والأخير إما أن يكون α أو β أو γ ، لكن النوع α -Tocopherol أكثرها فعالية ، ويعمل فيتامين E كعامل مضاد للأكسدة في الجسم (Bender & Mayes ,2003) . ولاحظ Chen *et al* (1982) بأن لفيتامين E القدرة على اختزال سم الافلا B_1 المجرع للدجاج عن طريق منع ارتباط السم بالحامض النووي لخلايا الكبد وبالتالي منع حدوث السرطان . ووجد كذلك Verma *et al* (2008) في تجربة على ذكور الفئران البيض في قابلية فيتامين E المجرع مع زيت الزيتون على اختزال سم الافلا ومنع حدوث التغيرات النسجية غير ألطبيعية في البربخ .

٢ – ٥ – ٣. فيتامين C

يعرف فيتامين C أيضا بإسم Ascorbic acid والذي يعد من الفيتامينات السهلة الذوبان في الماء ، ويتكسر بسهولة عند تعرضه إلى الحرارة أو القواعد أو الخزن وقد وجد ٧٠% من فيتامين C ينفقد من الأغذية عند تعرضها إلى عمليات الطبخ (Vasudevan & Sreekumari , 2004) . ويعد فيتامين C كعامل مختزل Reducing agent فعالاً في الأنسجة ، وكذلك يساعد على زيادة امتصاص عنصر الحديد من الأمعاء ، ووجد إن لفيتامين C القابلية على زيادة فعالية بعض الإنزيمات (عامل مرافق للإنزيم) خارج الجسم *in vitro* (Bender & Mayes ,2003) . وذكر Shehata *et al* (2009) عند

إضافة ٣ مليغرام من سم الافلا إلى كيلو واحد من غذاء اسماك *Oreochromis niloticus* هي الكمية الكافية لإحداث التسمم لها ، ويمكن اختزال هذه السمية عند إضافة ٥٠٠ مليغرام من فيتامين C إلى الغذاء المعامل بالسم .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل
MATERIALS AND METHODS

٣ – ١. الأجهزة والمواد المستخدمة

٣ – ١ – ١. الأجهزة

استعملت كل من الأجهزة التالية :

ت	الجهاز	العلامة التجارية	البلد المصنع
١	ميزان حساس Analytical Balance	Sartorius	ألمانيا Germany
2	مؤصدة Autoclave	Allamerican	أمريكا U.S.A.
3	حاضنة Incubator	Lab Tech	كوريا Korea
4	مجهر ضوئي Light Microscope	Humascope	ألمانيا Germany
5	مطحنة Blender	Sayona	صين China
6	وحدة نمو Growth Cabinet	Tianjin Taisite	صين China
7	مقياس الرقم الهيدروجيني pH Meter	Gallenkamp	انكلترا England
8	فرن كهربائي Electrical oven	Lab Tech	كوريا Korea
9	تقطير الماء Distiller water	Lab Tech	كوريا Korea
10	حمام مائي Water bath	Crest	انكلترا England
11	غرفة تعقيم Laminar flow	Lab Tech	كوريا Korea
١٢	شريحة العد Haemocytometer	-	-
١٣	سوكسليت Soxhlet	-	-
١٤	حجرة تلقيح hood	Tianjin Taisite	صين China
15	مازج مغناطيسي Magnetic Stirrer	Metops	ألمانيا Germany
١٦	كاميرا مجهرية Microscope camera	-	-
١٧	الإضاءة عبر الأشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator	Cleaver Scientific	ألمانيا Germany

3 – ١ – ٢. المواد الكيميائية

ت	المادة	العلامة التجارية	البلد المصنع
1	فيتامين A Vitamin A	BDH	انكلترا England
2	فيتامين E Vitamin E	BDH	انكلترا England
3	فيتامين C Vitamin C	Fluka	سويسرا Switzerland
4	هيدروكسيد الصوديوم NaoH	Fluka	سويسرا Switzerland
٥	كلورفورم $CHCl_3$	Fluka	سويسرا Switzerland
6	ميثانول CH_3OH	Fluka	سويسرا Switzerland
٧	خلات الاثيل $C_4H_8O_2$	BDH	انكلترا England
8	كليسرول $C_3H_8O_3$	Oxoid	انكلترا England
٩	كلوريد الصوديوم Na Cl	BDH	انكلترا England
10	هكسان $CH_3(CH_2)_4CH_2OH$	Merk	ألمانيا Germany
11	ايثانول C_2H_5OH	BDH	انكلترا England
١٢	يوديد لبوتاسيوم KI	Sigma	أمريكا U.S.A.
13	كلوريد الزئبقوز Hg_2Cl_2	BDH	انكلترا England
14	خلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$	BDH	انكلترا England
15	كلوريد الحديديك $Fe\ Cl_3$	BDH	انكلترا England
16	كلوريد الزئبقيك $Hg\ Cl_2$	BDH	انكلترا England
17	كبريتات النحاس المائية $Cu\ So_4.7H_2O$	Fluka	سويسرا Switzerland
18	ملح روشل Rotchell Salt	Sigma	أمريكا U.S.A.

١٩	الفا – نفثول	$C_{10}H_9OH$	Fluka	Switzerland سويسرا
20	يود	I	Fluka	Switzerland سويسرا
21	حامض الكبريتيك	H_2So_4	Merk	Germany ألمانيا
22	بلورات الفينول	C_6H_5OH	Sigma	U.S.A. أمريكا
23	آمونيا	$NH_3 . H_2O$	BDH	England انكلترا
24	حامض الهيدروكلوريك	HCl	Merk	Germany ألمانيا

٣ – ١ – ٣. المضادات الحيوية Antibiotics

١.كلورامفينكول Chloramphenicol

استخدم هذا المضاد الحيوي المجهز من معمل أدوية سامراء – العراق ، كمضاد واسع الطيف ضد البكتريا .

٢. كلوتريمازول Clotrimazole

استخدم هذا المضاد الحيوي المجهز من معمل أدوية الشهاب – سوريا ، كمضاد واسع الطيف ضد الفطريات .

٣ – ١ - ٤. الأوساط الزرعية المستخدمة

١. وسط أكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر بإذابة (39) غم من مسحوق الوسط الجاهز وحسب تعليمات الشركة المصنعة (LAB "England") في لتر من الماء المقطر . استعمل هذا الوسط لتنمية جميع الأنواع الفطرية ، وكذلك في فحص حساسية الفطر *Aspergillus flavus* تجاه المستخلصات النباتية المدروسة.

٣- ١ – ٥. الصبغات والمحاليل المستخدمة

١- صبغة اللاكتوفينول أزرق المثيلين

حضرت هذه الصبغة وفقاً الى Ellis (1994) من المواد الآتية :

- المثيلين الأزرق ٠,٠٥ غم
- بلورات الفينول ٢٠ غم
- كليسيرول ٤٠ مل

- حامض اللاكتيك ٢٠ مل
- ماء مقطر ٢٠ مل

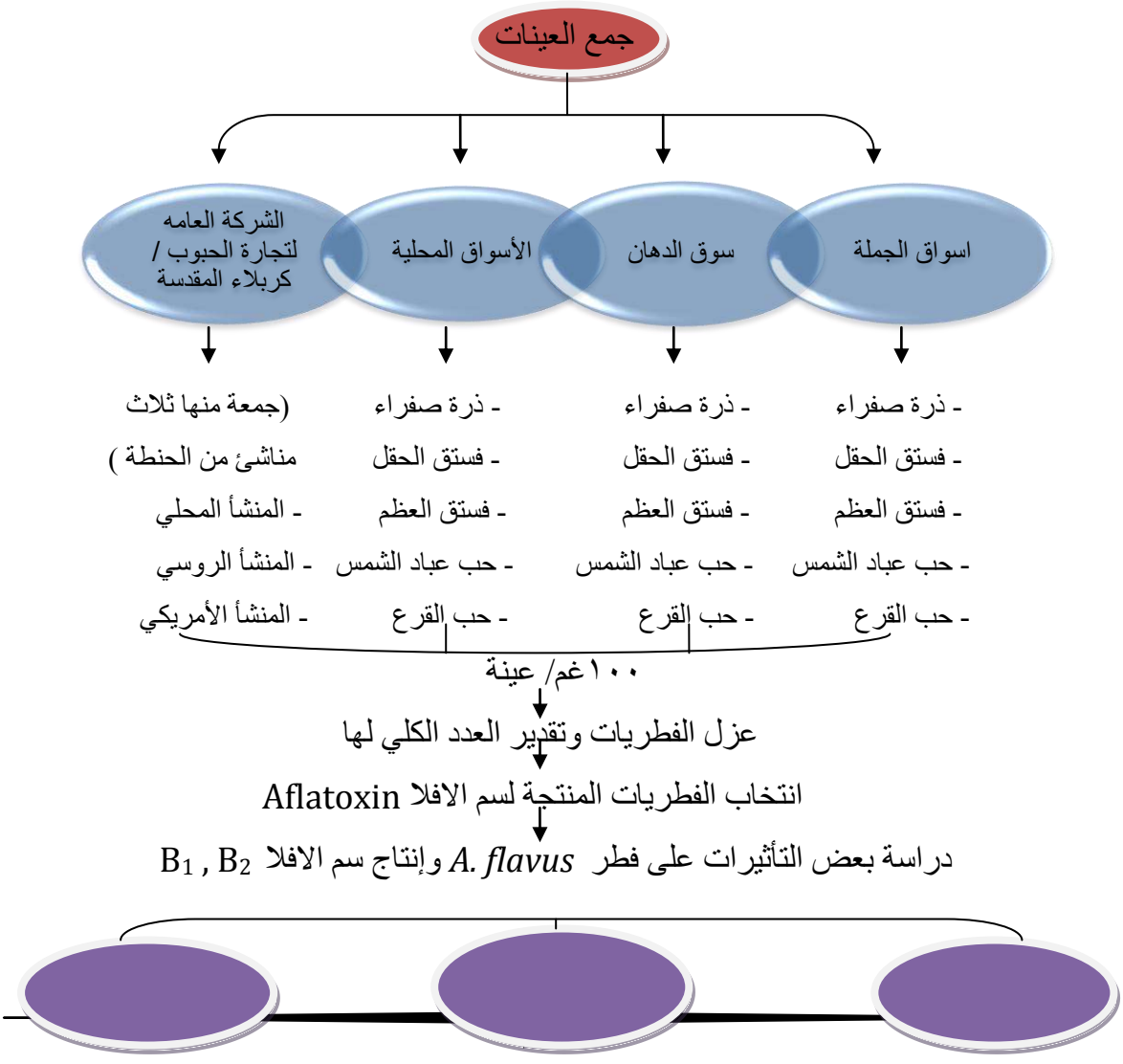
تستخدم لتصبيغ الفطريات وتثبيتها لغرض الفحص ألمجهري .

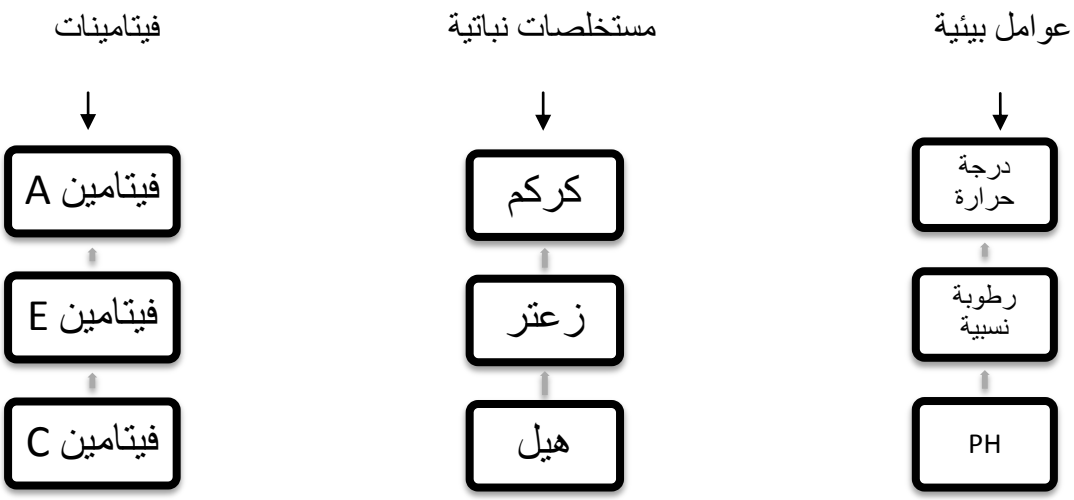
2- ألمحلول الملحي الفسيولوجي NaCl Solution

تم تحضيره بإذابة ٠,٨٥ غم من كلوريد الصوديوم في ١٠٠ مل ماء مقطر (Collee *et al.*,1996) ، وعقم بالمؤصدة واستخدم في تحضير المعلق السبوري لفطر *A. flavus* .

٣ – محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH Solution

تم تحضيره من إذابة ٨ غم من هيدروكسيد الصوديوم في ١٠٠ مل ماء مقطر ، واستخدم لمعايرة الأس الهيدروجيني في الوسط ألزرعي .





الشكل (٩) مخطط البحث .

٣ – ٢.جمع العينات

جمعت عينات الدراسة في شهر تشرين الأول خلال سنة ٢٠١٠ من أربعة مواقع مختلفة لمحافظة كربلاء . إذ تم جمع ١٨ عينة والمتمثلة بثلاث مناشئ من الحنطة والمتمثلة بالمنشأ المحلي والروسي والأمريكي من الشركة العامة لتجارة الحبوب / فرع كربلاء المقدسة وبواقع ١٠٠ غم لكل عينة ، والذرة الصفراء وزهرة الشمس وحب القرع العسلي وفستق الحقل وفستق الحلبي فقد جمعت من ثلاث مناطق مختلفة شملت سوق الدهان وأسواق الجملة والأسواق المحلية وبواقع ١٠٠ غم لكل عينة للمناطق المأخوذ منها وبصورة عشوائية وضعت العينات في أكياس نايلون وأغلقت بأحكام وبعد ذلك نقلت العينات للمختبر وحفظت بدرجة حرارة المختبر نفسه لحين التحري عن العزلات الفطرية خلال مدة لم تتجاوز ٣ أيام .

٣ – ٣.التحري عن العزلات الفطرية وتنقيتها

جرى التحري عن العزلات الفطرية في العينات المنتخبة . إذ عقمت البذور سطحياً لكل عينة على حده بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (المستحضر التجاري فاست) بتركيز ١ % ولمدة ٣ دقائق .غسلت البذور ثلاث مرات بالماء المقطرالمعقم ثم جففت بورق ترشيح وزرعت على أطباق حاوية على وسط آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمضاف له المضاد الحيوي كلورمفنيكول Chloramphenicol بمعدل ٢٥٠ ملغم/ لتر وبواقع خمس مكررات وخمسة بذور من كل نوع نباتي لكل منطقة ، بعدها حضنت الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة ٢٥ ±٢°م لمدة ٧ أيام (Hedayati *et al.* ,2010). نقيت

العزلات الفطرية ، بأتباع طريقة النقل المتتالي للمستعمرات الفطرية على الوسط ألزرعي نفسه . شخصت الأنواع الفطرية من قبل الأستاذ الدكتور مجيد متعب ديوان كلية الزراعة / جامعة الكوفة بحسب أشكالها المورفولوجية وألوان المستعمرات على وسط PDA إضافة إلى الصفات التشخيصية لكل فطر .

وتم حساب ما يلي :

٣ – ٣ – ١. عدد العزلات الكلية

تم حساب العدد الكلي للعزلات والأنواع الفطرية المعزولة لكل موقع من مواقع الدراسة .

٣ – ٣ – ٢.النسبة المئوية للظهور % Occurrence

حسبت النسبة المئوية لظهور الأنواع الفطرية المعزولة للعينات المأخوذة من مواقع الدراسة باستخدام المعادلة التالية (Booth *et al.*,1988) :

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{عدد العينات المستخدمة في الدراسة}} \times ١٠٠$$

٣ – ٣ – ٣.النسبة المئوية للتردد %Frequency

تم حساب النسبة المئوية لتردد كل نوع من الأنواع الفطرية المعزولة للعينات المأخوذة من مواقع الدراسة باستخدام المعادلة التالية (Rajasinghe *et al* .,2009):

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي للعزلات الفطرية}} \times ١٠٠$$

3 – ٤.اختبار قابلية عزلات الفطر *A. flavus* على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2

٣ – ٤ – ١ . إنتاج سم الافلاB_1 و B_2 على وسط PDA

اختبرت قابلية ١٨ عزلة الفطر *A.flavus* والمحصل عليها في الفقرة (٣-٣) على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 بتنميتها على وسط آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) لمدة ١٥ يوم عند درجة حرارة ٢٥ ± ٢ وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة من الفطر .

٣ – ٤ – ٢. استخلاص سم الافلا B_1 و B_2

استخلص سم الافلا B_1 وB_2 من مزارع العزلات بأتباع طريقة Aryantha & Lunggani (2007) أخذت عزلات الفطر *A. flavus* وقشطت خيوط الفطر من الوسط بوساطة سكينة نظيفة ومعقمة ثم سحقت بهاون خزفي ، وخلط الاخير بصورة جيدة مع وسط الفطر نفسه ، وضع المزيج الكلي في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل وأضيف إلية ٥٠ مل من الكلوروفورم مع الأخذ بنظر الاعتبار شطف الهاون الخزفي بكمية قليلة من كلوروفورم وأضيف إلى الدورق ، بعدها وضع الأخير على المحرك المغناطيسي لمدة ٢٠ دقيقة ومن ثم رشح باستعمال ورقة ترشيح من نوع (Whatman No-1) ، أضيف مرةً أخرى ٥٠ مل من كلوروفورم إلى المزيج المتبقي في الدورق ووضع على المحرك المغناطيسي لمدة ١٥ دقيقة ورشح أيضاً باستعمال ورقة ترشيح من نوع (Whatman No-1) ، خلط الراشح الأول مع الثاني ووضع في الحمام المائي إلى إن يجف ، ومن ثم نقل إلى أنابيب محكمة الغلق ومغلفة بطبقة من الألمنيوم لتجنب تحلل السم بفعل الضوء ، ثم وضعت في الثلاجة لحين الكشف عن سم الافلا .

٣ – ٤ – ٣. الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2على صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة

تم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 في مستخلصات مزارع عزلات الفطر *A. flavus* باستعمال صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة Thin Layers Chromatography (TLC) نوع TLC Glass sheets silica gel قياس ٢٠×٢٠ سم مجهزة من شركة -Switzerland (Fluka) وسم الافلا القياسي Stander aflatoxin B_1, B_2 مجهز من قبل الشركة U. S. A.) (Promega -. وبإتباع الطريقة المذكورة من قبل Bokhari (2002) ووفق الخطوات التالية :

- أذيب المستخلص الجاف لكل عينة في الفقرة (٣ – ٤ – ٢) في ١ مل من الكلوروفورم ورج بشكل جيد لضمان الإذابة الكاملة .

- اخذ 10 مايكروليتر من كل عينة باستعمال أنبوبة شعرية Capillary tube ووضع بشكل بقع spots على الواح الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC وبمسافة ١,٥ سم بين بقعة وأخرى وبمسافة ١,٥ سم من الحافة السفلى للوح الفصل وتركت لتجف.
- وضعت بقعة من سم افلا B_1 وB_2 القياسي المخضر بإذابة ١ ملغم من السم في ١ مل من الكلوروفورم بالطريقة نفسها عند طرف لوحة TLC وتركت لحين الجفاف .
- وضعت لوحة TLC في حوض الفصل المحتوي على نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (٣:٩٧)بحيث يكون مستوى المحلول تحت مستوى البقع و بعد صعود محلول الفصل إلى ١٨ سم من الحافة العلوية للوح أخرجت الصفائح لتجف بدرجة حرارة المختبر ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet (UV) لملاحظة التألق .
- قورن تألق البقع الناتجة من مستخلصات العزلات ومن حيث مطابقة مسافة الترحيل واللون بتلك الناتجة من المادة القياسية ، واختيرت العزلة الأعلى إنتاجاً لسم الافلاB_1 وB_2من خلال شدة التألق .

٣ ـ ٥. العينات النباتية

٣ ـ ٥- ١. جمع العينات النباتية

تم جمع العينات النباتية المستعملة في هذه الدراسة لغرض اختبار فاعلية مستخلصاتها المائية و الكحولية ضد الفطر *A.flavus* وسم الافلاB_1 وB_2، وذلك بشرائها من الأسواق المحلية ومن ثم جُلبت إلى المختبر وتم تنظيف النباتات من الأتربة والشوائب وحفظت جميعها في أكياس ورقية لحين الاستخلاص .

٣ ـ ٥ ـ ٢. تشخيص العينات النباتية

تم تشخيص العينات النباتية في معشب كلية العلوم - بنات / قسم علوم الحياة / جامعة بابل من قبل الأستاذ الدكتور عبد الكريم البيرماني ومثل ما هو مبين في الجدول (٢) .

الجدول (٢) الأنواع النباتية والأجزاء المستعملة في الدراسة .

ت	الاسم العربي	الاسم العلمي	العائلة	الجزء المستعمل
١	الكركم	*Curcuma longa*	Zingiberaceae	الجذور
٢	الزعتر	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	الأوراق

٣	الهيل	*Elettaria cardamomum*	Zingiberaceae	الثمار

٣ ـ ٥ ـ ٣. عملية الاستخلاص باستخدام جهاز السوكسوليت Soxhlet

اتبعت الطريقة التي استخدمها Kerem *et al* 2005 في عملية الاستخلاص ، إذ طحنت الأجزاء النباتية باستخدام طاحونة Blender ، وبعدها غربلت الأجزاء المطحونة من خلال غربيل مساحة ثقوبه ٢ ملم^{٢} جمع المسحوق وتركَ عند درجة حرارة ٥٥°م لمدة ٧٢ساعة ، وزن ٢٠ غم من المسحوق الجاف ووضع في جهاز السوكسوليت Soxhlet لبدء عملية الاستخلاص باستخدام ٣٠٠ مل من الميثانول المطلق ٩٩,٩ % كمذيب (للحصول على المستخلص الكحولي) ، أو ٣٠٠ مل من الماء المقطر كمذيب (للحصول على المستخلص المائي) ، وبذلك تصبح نسبة المسحوق الجاف إلى المذيب (١غم : ١٥مل) ، واستمرت عملية الاستخلاص لمدة ثلاث ساعات .

بعدها وضع المستخلص الناتج في أطباق بتري زجاجية نظيفة و معقمة ومغلفة من الداخل بأكياس نايلون نظيفة و وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة ٣٧ °م وتركت لتجف ، تم اخذ المستخلص الجاف بسهولة بواسطة نزع الكيس من الطبق ومن ثم حفظ بعد إن وزن في أوعية بلاستيكية نظيفة و محكمة الغلق لحين الاستعمال و أطلق على هذا المستحضر المستخلص المائي الجاف أو المستخلص الكحولي الجاف .

٣ ـ ٥ ـ ٤. الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية

تم قياس الأس الهيدروجيني pH للمستخلصات المائية و الكحولية السائلة بعد إن استخلصت مباشرةً ، بوساطة جهاز قياس الأس الهيدروجيني .

أما النسبة المئوية للمستخلص فتم حسابه بقسمة الوزن الصافي للمستخلص على الوزن الأصلي للمسحوق النباتي الجاف المستعمل ٢٠غم مضروباً في ١٠٠ .

٣ ـ ٥ ـ ٥. الكشوفات النوعية للمستخلصات المائية والكحولية الفعَالة

أجريت مجموعة من الكشوفات النوعية وذلك من أجل التعرف على المكونات الكيميائية الأساسية أو المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات وكالآتي :

١ـ ألكشف عن القلويدات Alkaloids

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

أ ـ كاشف واكنر Wagner reagent

حُضّر هذا الكاشف بإذابة ١,٣ غم من اليود مع ٢ غم من يوديد البوتاسيوم في ١٠٠ مل من الماء المقطر ، ثم يضاف إلية المستخلص النباتي فعند ظهور الراسب البني دل ذلك على وجود القلويدات .

ب ـ كاشف ماير Mayer reagent

حُضّر هذا الكاشف على النحو الآتي :

١. بإضافة ١,٣٦ غم من كلوريد ألزئبقوز Hg_2Cl_2 في ٦٠ مل من ألماء ألمقطر .

٢. بإذابة ٥ غم من يوديد ألبوتاسيوم في ١٠ مل من الماء ألمقطر .

تم مزج المحلول (١) و (٢) وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بإضافة الماء المقطر ، ثم أضيفت قطرات من هذا الكاشف إلى المستخلصات النباتية فعند ظهور راسب ابيض أو عكورة دل ذلك على وجود القلويدات .

٢ـ ألكشف عن ألتانينات (ألعفصيات) Tannins

أ ـ كشف خلات ألرصاص Lead acetate test

حُضّر المحلول بإذابة ١ غم من خلات ألرصاص في ١٠٠ مل من الماء المقطر ثم أضيفت قطرات عدة منه إلى أنبوبة اختبار تحوي ٠,٥ مل من ألمستخلص . فإذا تكوَن راسب أبيض هلامي القوام دل على وجود التانينات (Ahmed *et al.*, 1989) .

ب ـ كشف كلوريد ألحديديك Ferric chloride test

أضيفت قطرات عدة من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ بتركيز ١ % إلى أنبوبة اختبار تحوي ٠,٥ مل من المستخلص . فكان ظهور لون أخضر مزرق دليلاً على وجود التانينات (Adedayo *et al.*, 2001) .

3ـ ألكشف عن ألصابونينات Saponins

أـ أضيف ٣ مل من المستخلص إلى ٢ مل من كلوريد الزئبقيك HgCl 2 بتركيز ١ % . فكان ظهور الراسب الأبيض دليلاً على وجود الصابونينات (Al-Khazragi,1991) .

ب ـ تم تحضير محلول مائي لمسحوق النباتات الجافة ووضعت في أنبوبة اختبار ورُجّت بشدة ، فكان ظهور رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة دليلاً على وجود الصابونينات (Harborne,1984)

٤- الكشف عن ألكَلايكو سيدات Glycosides

أ- كاشف فهلنك Fehling reagent

حضر هذا الكاشف كما يأتي :

١. اذابة ٧٠ غم من كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.7H_2O$ في لتر من الماء المقطر .

٢. اذابة ٢٤٠ غم من NaOH و٢٤٦ غم من ملح روشيل Sodium Potasium tartarate في لتر من الماء المقطر .

يمزج حجمان متساويان من محلول (1) و (2) للحصول على كاشف فهلنك ، و عند الكشف يمزج ١ غم من المسحوق النباتي الجاف مع ١٠ مل من الماء المقطر ، بعدها يرشح المحلول ثم يضاف إليه كاشف فهلنك ، فإذا ظهر اللون الأحمر الغامق دل على وجود الكلايكوسيدات (Adedayo *et al.*, 2001).

ب- كاشف موليش Molish reagent

أن طريقة عمل هذا الكاشف حسب ما ذكره الشيخلي وجماعته (١٩٩٣) حيث تتم بأخذ ٢ مل من المستخلص المراد اختباره و يضاف إليه قطرتان من محلول α-naphthol و يرج المحلول جيدا ، ثم تمسك الأنبوبة بشكل مائل و يضاف ٢ مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات على جدار الأنبوبة لحين ظهور طبقتين طبقة الحامض هي السفلى و يفصل بين الطبقتين حلقة بنفسجية اللون عند وجود المواد الكلايكوسيدية .

5- ألكشف عن ألراتنجات Resins

مُزج ١ غم من المسحوق النباتي الجاف مع ١٠ مل من الكحول الأثيلي ٩٥ % وتُرك المحلول لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي بدرجة حرارة ١٠٠ مْ ، ثم رُشّح المحلول وأضيف إليه ١٠ مل من محلول مائي لحامض الهيدروكلوريك ٤ % واستدل على وجود المواد الراتنجية بظهور العكورة (Shihata,1951) .

٦- ألكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

تم الكشف عن الفلافونيدات حسب ما ذكره (Al-Khazragi,1991) من خلال الكشفين التاليين :

أ- كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي

مُزج ٢ مل من المستخلص مع ١ مل من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي ، فكان ظهور اللون الأصفر دليلاً على وجود الفلافونيدات .

ب - ألكشف عن الفلافونيد والفلافونول

أذيب ١ مل من المستخلص في ١ مل من حامض الكبريتيك المركز. فكان ظهور اللون الأصفر الداكن دليلاً على إن الكشف أيجابي .

٧- ألكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

- **كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز**

حُضّر كاشف الفينول بإذابة ٢٥ غم من بلورات الفينول في ٥٠٠ مل من الماء المقطر . ثم أضُيف ٠,٥ مل من هذا الكاشف إلى ٠,٥ مل من المستخلص في أنبوبة اختبار ورُجّت جيداً ثم أضيف ٢,٥ مل من حامض الكبريتيك المركز إلى المحلول . فكان ظهور اللون الأحمر البني دليلاً على وجود الكاربوهيدرات (Meyer & Walther ,1988) .

8- ألكشف عن الفينولات Phenols

- **كاشف كلوريد الحديديك Ferric chloride reagent**

حُضّر هذا الكاشف بإذابة ١ غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في ١٠٠ مل من الماء المقطر . وقد رُطّبت ورقة ترشيح بالمستخلص النباتي ، ثم أضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك وتم تعريض الورقة إلى بخار الأمونيا . فإذا ظهراللون الأزرق دليلاً على وجود الفينولات (Adedayo *et al.*,2001) .

٩- ألكشف عن الفيوكيومارينات Fuocoumarins

أضيف ١ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي ١٠ % إلى ١ مل من المستخلص . فكان ظهور اللون الأصفر أو الأصفر المخضر دليلاً على وجود الفيوكيومارينات (Harborne,1984) .

10- ألكشف عن الترايتيربينويد Triterpenoids

أضيف ١ مل من حامض الكبريتيك المركز إلى ١ مل من محلول الكلوروفورم ، ثم أضيف المحلول الناتج إلى ٢ مل من المستخلص . فكان ظهور اللون الأحمر أو الأرجواني دليلاً على وجود الترايتيربينويد (Harborne,1984) .

٣ – 6.تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2

اتبعت طريقة Sudhakar *et al* 2009 ، إذ تم مزج كل من المستخلصات المائية أو الكحولية لكل من نبات الكركم والزعتر والهيل كل على حده مع الوسط الزرعي آكار دكستروز البطاطا (PDA) بعد إن برد إلى ٤٠ °م ، و بثلاثة تراكيز ٥ ، ١٠ و ١٥ % لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ، و بمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز ، و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام . وتم استعمال مجموعتين سيطرة الأولى بدون إضافة إي مادة للوسط ألزرعي ، والثانية بإضافة Clotrimazole بتركيز٢ ملغم / مل إلى الوسط ، حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة (٢٧±2) °م و لمدة سبعة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسبت نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية (Yigit & Korukluoglu , 2007) :

نسبة التثبيط = [(السيطرة – المعاملة) / السيطرة] X ١٠٠

أما الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 فقد أجريت نفس الخطوات في الفقرتين (٣–٤ – ٢) و(٣ – ٤ -٣) .

٣ – ٧.تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2

اتبعت نفس الخطوات في الفقرة (٣ - ٦) لكن باستخدام فيتامينات A ، E وC ، وباستخدام التراكيز ١ ، ٢ و ٣ % .

٣ – ٨. تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير المستخلصات النباتية والفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع المستخلص والفيتامين الأكثر فعالية في نمو الفطر تم اختبار التراكيز ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ و٦ ملغم/مل من المستخلصات المؤثرة والتراكيز ٠,٥ ، ١ ، ١,٥ ، ٢ ، ٢,٥ و ٣ من الفيتامينات لغرض تحديد أدنى تركيز مثبط MIC لها في نمو الفطر و بالاعتماد على طريقة الانتشارdiffusion method إذ نشر معلق الأبواغ للفطر *A. flavus* بقدر ٢×١٠ $^{-٤}$ بوغ/مل بوساطة ناشر spreader على وسط PDA بعد تصلبه ، ثم عملت الحفر بوساطة الثاقب الفليني قطر ٠,٥ سم ووضع كل تركيز من المستخلصات النباتية والفيتامينات في حفره بقدر ١٠٠ مايكروليتر، مع الأخذ بنظر الاعتبار بان هناك سيطرة موجبة ماء مقطر وسيطرة سالبة بإضافة Clotrimazole بتركيز٢ ملم / مل من الماء المقطر إلى الوسط ، وحسب بعد ذلك التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية والفيتامينات (Thenmozhi & Kannabiran ,2010)

٣ – 9. تأثير بعض العوامل في فطر *A. flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2

٣ – 9 – ١. تأثير الـpH

استعملت خمس مستويات من pH ٣,٥ ، ٥ ، ٦,٥ ، ٨ و ٩,٥ من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N ، أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى ٤٠°م وفي ظروف معقمة باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter و بمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى (Yigit & Korukluoglu , 2007) ، و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام ، بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة ٢٧±2 °م و لمدة عشرة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو من خلال حساب نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية :

معدل نمو الفطر = ١٠٠ – نسبة التثبيط

أما الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 فقد أجريت نفس الخطوات في الفقرتين (٣–٤ – ٢) و(٣ – ٤ -٣) .

٣ – ٩ – ٢. تأثير درجة الحرارة

استعملت خمس مستويات من درجات الحرارة ١٥ ، ٢٥ ، ٣٥ ، ٤٥ و٥٥ ، وبمعدل ثلاث مكررات لكل مستوى ، بعد إن عدل وسط PDA إلى pH ٦,٥ من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N ، أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى ٤٠°م وفي ظروف معقمة باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter ، بعدها صب الوسط في إطباق بتري و بعد تصلبه ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PAD و بعمر 5 أيام ، بعدها حضنت الأطباق جميعها لمدة عشرة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، و حسب معدل النمو للفطر كما في الفقرة (٣ – ٩ – ١) ، أما الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 فقد أجريت نفس الخطوات في الفقرتين (٣– ٤ – ٢) و(٣ – ٤ -٣) .

٣ – ٩ – ٣. تأثير الرطوبة النسبية RH

استعملت خمس مستويات من RH 20 ، ٣٥ ، ٥٠ ، ٦٥ و80 ، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى ، بعد إن عدل وسط PDA إلى pH ٦,٥ من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N ، أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى ٤٠°م وفي ظروف معقمة باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter ، بعدها صب الوسط في إطباق بتري و بعد تصلبه ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام . بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة ٢٧±2 °م لمدة عشرة أيام في وحدة النمو Growth Cabinet. و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو للفطر كما في الفقرة (٣ – ٩ – ١) ، أما الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 فقد أجريت نفس الخطوات في الفقرتين (٣– ٤ – ٢) و(٣ – ٤ -٣) .

٣ – ١٠. التحليلات الإحصائية

تم تصميم التجربة للمستخلصات النباتية بوصفها تجربة عاملية (5x2x3) للنوع النباتي و نوع 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 و على مستوى احتمالية ٠,٠٥ وشمل هذا التحليل تجربة تأثير النوع النباتي و نوع المستخلص وتركيزه والتداخل بينها في معدل قطر المستعمرة (سم) . أما تجربة الفيتامينات فتم تحليلها على أساس أنها تجربة عاملية (5x3) لنوع الفيتامين والتركيز و باستعمال التصميم العشوائي التام (CRD) و بثلاث مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية ٠,٠٥ .

و تم تحليل تجربة تأثير كل من العوامل pH والرطوبة و درجة الحرارة بوصفها تجربة عاملية ، و باستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD و بثلاث مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية ٠,٠٥ (الإمام ، ٢٠٠٧) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة

RESULTS & DISCUSSION

٤ – ١. التحري عن العزلات الفطرية في العينات

أوضحت نتائج عزل وتشخيص الفطريات من ١٨ عينة من عينات الجمع المتمثلة بالحنطة والذرة وفستق الحقل وفستق الحلبي وحب القرع العسلي وزهرة الشمس ، فظهر العدد الكلي للعزلات الفطرية المعزولة مساويا إلى ٥٤٧ عزلة ، وأظهرت النتائج عزل ١٠ أنواع من الفطريات تعود إلى ٦ أجناس .

ويبين الجدول (٣) إن أكثر المواقع تلوثاً بالفطريات هو سوق الدهان والذي سجل ٢١٦ عزلة وبنسبة مئوية للتردد ٣٩,٤ % واحتل الفطر *A. flavus* اكبر عدد من بين الفطريات في هذا الموقع وصلت إلى ٩٤ عزلة ، إما الفطر *C. cladosporioides* فلم يظهر في هذا الموقع ، وجاء الفطر *A. niger* في المرتبة الثانية إذ وصلت عدد العزلات إلى ٥٤ عزلة ،في حين تراوحت إعداد الفطريات الأخرى بين ٣ – ١٦ عزلة . إما سوق الجملة فقد سجل ثاني أعلى موقع في التلوث الفطري إذ وصلت إعداد الفطريات إلى ١٥٥ عزلة وبنسبة مئوية للتردد ٢٨,٣ % و سجل الفطر *C. cladosporioides* أعلى عدد في هذا الموقع وصل إلى ٣٦ عزلة ، يليه *P. spinulosum* والذي سجل ٣١ عزلة ، إما الفطر *A. flavus* فلم يظهر في هذا الموقع ، إما الفطران *P.digitatum* و*Penicillium* spp فقد احتلا نسبة معتدلة وصلت إلى ٢٧ و٢٣ عزلة على التوالي ، إما الفطريات الأخرى لا تتجاوز إعدادها بين ١ – ١٦ عزلة . إما الأسواق المحلية فسجلت 122عزلة وبنسبة مئوية للتردد ٢٢,٥% إذ ظهر كل من الفطر *Penicillium* sp و *C. cladosporioides* و *Rhizopus* sp بعدد ٢٥ عزلة ، إما الفطريات *A. niger* و *A. flavus* و *A.terreus* و *A. alternata* فلم تظهر في هذا الموقع في حين سجل الفطر *P. spinulosum* ٢١ عزلة ، والفطرين *P.digitatum* و *F . oxysporum* فقد احتلا نسبة مقاربة وصلت إلى ١٤ و١٢ عزلة على التوالي . وجاءت الشركة ألعامة لتجارة الحبوب / كربلاء في المركز الأخير من بين مواقع الجمع فسجلت اقل نسبة بالتلوث الفطري والتي بلغت ٥٤ عزلة وبنسبة مئوية للتردد ٩,٨% وظهر فيها أكثر الفطريات سيادة *A. niger* وصل إلى ١٠ عزلة ، إما *A.terreus* و *P. spinulosum* سجلا ٩ عزلة ، و *Rhizopus* sp سجل ٨

عزلة ، إما الفطران *A. flavus* و *C. cladosporioides* قد ظهر في ٥ عزلة لكل منها ، والفطريات الأخرى تراوح عددها بين 1 – 4 عزلة . ومن هذا فقد تبين إن هناك اختلاف في تواجد الفطريات كماً لمواقع جمع العينات قيد الدراسة (سوق الدهان و سوق الجملة و الأسواق المحلية و مخازن الحبوب) إذ احتوى سوق الدهان زيادة في إعداد الفطريات مقارنة بباقي المواقع ، و يعود ذلك إلى اختلاف ظروف الخزن لكل موقع من مواقع الجمع (Azab *et al*., 2005) .

الجدول (٣) عدد العزلات الفطرية في كل موقع من مواقع الدراسة .

ت	الفطر	سوق الدهان	سوق الجملة	الأسواق المحلية	مخازن الحبوب	المجموع
١	*A . alternata*	١٦	٥	-	٢	٢٣
٢	*A.flavus*	94	-	-	5	99
٣	*A . niger*	54	6	-	10	70
٤	*A . terreus*	12	1	-	9	22
٥	*C.cladosporioides*	-	36	25	5	66
٦	*F . oxysporum*	7	11	12	4	34
٧	*P.digitatum*	11	27	14	1	53
٨	*P.spinulosum*	5	31	21	9	66
٩	*Penicillium* sp	3	23	25	1	52
١٠	*Rhizopus* sp	١٤	١٥	٢٥	٨	٦٢
المجموع		٢١٦	١٥٥	١٢٢	٥٤	٥٤٧
النسبة المئوية للتردد		%٣٩,٤	%٢٨,٣	%٢٢,٥	%٩,٨	%١٠٠

يوضح الجدولين ٤ و٥ سيادة الفطر *A. flavus* على بقية الأنواع والأجناس في اغلب العينات ، إذ ظهر بعدد ٢٤ عزلة وبنسبة تردد ٢٥,٠% في عينات فستق الحقل ، و 20 عزلة ونسبة تردد ١٨,٢% في عينات حب القرع العسلي ، و١٩ عزلة ونسبة تردد ٢١,١ % في زهرة الشمس ، وفي عينات الذرة الصفراء وصل إلى ١٧ عزلة وبنسبة تردد ١٤ % ، إما عينات فستق الحلبي فوصلت عدد العزلات فيها إلى ١٤ عزلة وبنسبة تردد ١٩% ، وعينات الحنطة سجلت اقل نسبة بعدد عزلات الفطر فوصلت إلى ٥ عزلات وبنسبة تردد ٩,٣ %. تلاه النوع *A. niger* والذي ظهر بعدد ٢٠ عزلة وبنسبة تردد ١٨,٢ % في عينات حب القرع العسلي ، و١٤ عزلة لكل من عينات الذرة الصفراء وفستق الحقل وبنسبة تردد ١١,٥ % و

١٤,٦ % على التوالي ، ووصل العدد إلى ١٠ عزلة ونسبة تردد ١٨,٥ % في الحنطة ، و٧ عزلة ونسبة تردد ٩,٥ % في فستق الحلبي ، أما حب زهرة الشمس فقد سجل اقل عدد إذ وصل العدد إلى ٥ عزلة ونسبة تردد ٥,٦ %. وجاء الفطر *A. terreus* في المرتبة الأخيرة إذ سجل أعلى نسبة له في عينات الحنطة والذي وصل العدد إلى ٩ عزلة ونسبة تردد ١٦,٧ % ، إما عينات الذرة الصفراء وفستق الحقل لم تسجل أي نسبة لهذا الفطر ، و٦ عزلة ونسبة تردد ٦,٧ % في حب زهرة الشمس ، إما عينات فستق الحلبي وحب القرع العسلي فقد سجلا عدد متقارب لهذا الفطر والذي وصل إلى ٤ و ٣ عزلة ونسبة تردد ٥,٥ % و ٢,٧ % وعلى التوالي . وكذلك أظهرت النتائج إن الفطر *A. alternata* سجل نسبة مقاربة للفطر السابق إذ بلغت أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء فوصل إلى ٧ عزلة وبنسبة تردد ٥,٧ % ، في حين عينات فستق الحقل سجلت اقل نسبة وصلت إلى ١ عزلة ونسبة تردد ١,١ % ، ووصل العدد إلى ٥ عزلة لكل من عينات فستق الحلبي وحب القرع العسلي وبنسبة تردد ٦,٧ % و ٤,٦ % على التوالي ، ووصل العدد إلى ٢ عزلة ونسبة تردد ٣,٧ % في الحنطة ، أما حب زهرة الشمس فقد سجل ٣ عزلة ونسبة تردد ٣,٣ % . وبينت النتائج إن الفطر *Penicillium* sp سجل أعلى نسبة له في عينات فستق الحقل والتي وصلت إلى ٢٠ عزلة وبنسبة تردد ٢٠,٨ % ، وبالمقابل فقد سجل اقل نسبة في عينات الحنطة وصلت إلى ١ عزلة ونسبة تردد ١,٨ % ، أما عينات فستق الحلبي وحب زهرة الشمس وحب القرع العسلي والذرة الصفراء سجلت نسب متدرجة إذ بلغت ١٠ ، ٩ ، ٨ و٤ عزلة ونسبة تردد 13.5% ، 10.0 % ، ٧,٣ % و٣,٢ %. وسجل الفطر *P. digitatum* أعلى نسبة له في عينات حب زهرة الشمس والتي وصلت إلى ١٥ عزلة وبنسبة تردد ١٦,٦ % ، لكن عينات الحنطة سجلت اقل نسبة والتي وصلت إلى ١ عزلة ونسبة تردد ١,٨ % ، في حين سجلت عينات فستق الحلبي ثاني أعلى نسبة للفطر وصلت إلى ١٤ عزلة ونسبة تردد ١٩,٠ % ، إما عينات حب القرع العسلي وفستق الحقل فقد احتلت نفس النسبة وصلت إلى ٨ عزلة و نسبة تردد ٧,٣ % و ٨,٢ % على التوالي ، و٧ عزلة ونسبة تردد ٥,٧ % في عينات الذرة الصفراء . وأظهرت النتائج كذلك إن الفطر *P. spinulosum* فسجل أعلى نسبة له في عينات حب القرع العسلي وصلت إلى ١٦ عزلة وبنسبة تردد ١٤,٥ % ، لكن عينات فستق الحلبي سجلت اقل نسبة والتي وصلت إلى ٦ عزلة ونسبة تردد ٨,٠ % ، في حين سجلت عينات فستق الحقل ثاني أعلى نسبة للفطر وصلت إلى ١٢ عزلة ونسبة تردد ١٢,٥ % ، إما عينات الذرة الصفراء وحب زهرة الشمس والحنطة فقد احتلت نسبة متدرجة وصلت إلى ١٣ ،

١٠ و٩ عزلة و نسبة تردد ١٠,٥ % ، ١١,١ % و١٦,٧ % على التوالي . والفطر *C.cladosporioides* سجل أعلى نسبة له في عينات حب القرع العسلي وحب زهرة الشمس بلغت ١٦ و ١٥ عزلة ونسبة تردد ١٤,٥ % و ١٦,٧ % على التوالي ، وسجلت عينات فستق الحقل والذرة الصفراء ١١ و١٤ عزلة ونسبة تردد ١١,٥ % و ١١,٤ % على التوالي ، إما عينات الحنطة وفستق الحلبي فقد حظيت بنفس عدد العزلات والتي وصلت إلى ٥ عزلة وبنسبة تردد 9.3 % و٦,٧ % على التوالي . والفطر *F. oxysporium* سجل أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء وصلت إلى ٢٢ عزلة ونسبة تردد ١٧,٩ % ، إما عينات الدراسة الأخرى فظهرت فارق كبير بينها وبين عينات الذرة الصفراء إذ لم يظهر الفطر في عينات حب القرع العسلي وكذلك ظهر الفطر بنسبة قليلة في عينات فستق الحلبي وحب زهرة الشمس فوصلت إلى ١ و ٢ عزلة ونسبة ١,٣ % و ٢,٢ % على التوالي ، في حين عينات فستق الحقل و الحنطة سجلت نسبة معتدلة وصلت إلى ٥ و٤ عزلة وبنسبة تردد ٥,٢ % و ٧,٤ % وعلى التوالي . وان للفطر *Rhizopus sp* أعلى نسبة له في عينات الذرة الصفراء إذ بلغت ٢٥ عزلة وبنسبة تردد ٢٠,٣ % ، في حين سجل الفطر في عينات فستق الحقل اقل نسبة وصلت إلى ١ عزلة وبنسبة تردد ١,١ %، تليها عينات حب زهرة الشمس فكان عدد العزلات ٦ عزلة وبنسبة تردد ٦,٧ % ، إما عينات الحنطة وفستق الحلبي سجلت ٨ عزلة ونسبة تردد ١٤,٨ % و ١٠,٨ % وعلى التوالي ، وعينات حب القرع العسلي حظيت بنسبة ١٤ عزلة و نسبة تردد ١٢,٧ % . ولم تختلف المحاصيل الستة نسبياً فيما بينها من حيث أنواع وأجناس الفطريات المعزولة إذ احتوت هذه المحاصيل على الأنواع والأجناس التي تتواجد عادة وتلوث المحاصيل في الحقل Field fungi مثل الفطر *Cladosporium* ، *Fusarium* و *Alternaria* (Lacey, 1988 & Magan) ، و كذلك شملت فلورا هذه المحاصيل فطريات الخزن Fungi Storage وهي أنواع جنس *Aspergillus* و*Penicillium* (Rajasinghe *et al*., 2009 ; Rahimi *et al*., 2008) ، وهذه النتيجة تتشابة مع ما عزلهُ Krishna Kishore *et al* (2002) إذ تمكن من عزل *Fusarium* sp و *A.flavus* من الفول السوداني ، وكذلك عزل الباحث (Campos *et al* 2008) أنواع من جنس *Aspergillus* ، *Penicillium* و *Fusarium* من الذرة الصفراء والبيضاء ومنتجاتهما ، في حين Hedayati *et al* (2010) عزلة من الفستق والفول السوداني أنواع من جنس *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Fusarium* ، *Alternaria* و *Cladosporium* .

يتبين من نفس الجدولين ٤ و٥ إن الفطر *A. flavus* أكثر الفطريات سيادة لجميع عينات الدراسة والذي سجل ٩٩ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي ١٨,١ % ، في حين سجل الفطرين *A. terreus* و *A. alternata* اقل نسبة من بين جميع الفطريات والتي بلغت ٢٢ و٢٣ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 4.2 % و٤,٣ % وعلى التوالي ، والفطر *A. niger* سجل ثاني اكبر نسبة من بين جميع الفطريات والتي وصلت إلى ٧٠ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي ١٢,٨ % ، يله الفطريين *P. spinulosum* و *C. cladosporioides* الذين سجلا ٦٦ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 12.0 % ، في حين ظهره الفطر *Rhizopus* sp ٦٢ عزلة وبنسبة ١١,٣ % ، واظهر كل من الفطر *Penicillium* sp و *P. digitatum* نسبة متقاربة إذ سجل لهما ٥٢ و٥٣ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي 9.5 % و ٩,٦ % وعلى التوالي ، أما الفطر *F. oxysporum* سجل ٣٤ عزلة وبنسبة مئوية للتردد الكلي ٦,٢ % . وبصورة عامة كانت أكثر الفطريات انتشاراً التابعة لجنس *Aspergillus* و*Penicillium* ويعزى ذلك إلى ما تتميز به أنواع هذين الجنسين من قابلية نمو في مديات بيئية مختلفة وقابلية إنزيمية عالية تمكنها من السيادة على بقية الفطريات (Pitt ,1994). وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية (Hedayati *et al* 2010) إذ احتل الفطر *A. flavus* المرتبة الأولى من بين جميع الفطريات المعزولة بقدر ٢٣٦ و٢٣٥ عزلة وبنسبة تردد ٥٨,٦ % و ٥١,٢ % في الفول السوداني والفستق على التوالي ، إما *Alternaria* و *Fusarium* شكلا اقل عدد من بين جميع الفطريات إذ لم يظهرا في الفول السوداني لكن في الفستق ووقع نصيب كل منهما ١ عزلة وبنسبة تردد ٠,٢ % . وكذلك تتفق هذه النتيجة مع توصل إلية الوائلي (2006) إذ احتل فطر *A. flavus* المرتبة الأولى كذلك بقدر ٨١١٠ عزلة وبنسبة تردد ٣٨,٦٣ % لكل من عينات الذرة الصفراء والحنطة والشلب ، في حين جاء الفطر *A. niger* من بعده إذ قدرة بعدد ٦٠٣٠ عزلة وبنسبة تردد ٢٨,٧٢ % للعينات نفسها.

وأظهرت النتائج كذلك في الجدول (٤) إن أكثر العينات تلوثاً بالفطريات هي عينات الذرة الصفراء إذ كان العدد الكلي مساوياً إلى ١٢٣ عزلة ، أما عينات الحنطة سجلت اقل نسبة فقد وصل العدد الكلي إلى ٥٤ عزلة ، في حين عينات حب القرع العسلي سجلت ثاني اكبر نسبة فقد وصلت إلى ١١٠عزلة ، تلتها عينات فستق الحقل وحب زهرة الشمس وفستق الحلبي إذ سجلت ٩٦ ، ٩٠ و٧٤ عزلة وعلى التوالي . وقد يعود سبب زيادة إعداد الفطريات في الذرة

الصفراء وخاصةً بالفطر *A.flavus* بالمقارنة مع العينات الأخرى إلى تلوثها إثناء نموها في الحقل أو في مرحلة الحصاد أو سوء خزن الحاصل وهذا بدورة يتأثر بعوامل معينه مثل مقاومة النبات ودرجة الحرارة و الرطوبة ومستويات الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكاربون والغازات الأخرى والحموضة وكذلك نوع المنتج (Harwig & Munro ,1975) ، وتتفق هذه النتيجة مع Makun *et al* (2010) إذ وجدوا الذرة الصفراء أكثر إصابة بالفطريات وخاصةً الفطر *A.flavus* بالمقارنة مع عينات الجبس والفاصوليا و الحنطة وقد عزاها الباحثين إلى نسبة الرطوبة العالية في الذرة الصفراء بالمقارنة مع العينات الأخرى ، فقد ذكر Trenk & Hartman (1970) بأن فطر *A. flavus* يزيد من إصابة الذرة الصفراء بزيادة الرطوبة والدفئ ، وكذلك تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية الجبوري (1998) إذ إن الفطر *A. flavus* شكل أعلى نسبة على حبوب الذرة الصفراء ، وكذلك تتفق هذه النتيجة مع الوائلي (2006) إذ وجد حبوب الذرة الصفراء أكثر إصابة بالفطريات وصلت إلى ١١٧٤٠ عزلة مقارنةً بالحنطة والشلب إذ وصلا إلى ٦٣٠٠ و٢٩٥٠ عزلة على التوالي .

بينت النتائج في الجدول (٦) إن الفطر *A. terreus* سجل اقل نسبة تواجد في العينات وصلت إلى 5 عينات والنسبة المئوية للظهور الكلي بلغت 27.7 % ، في حين الفطر *A. flavus* و *A. alternata* سجلا ثاني اقل نسبة تواجد وصلت إلى٦ و٧ عينات والنسبة المئوية للظهور الكلي بلغت٣٣,٣ % و ٣٨,٨ % على التوالي ، إما الفطر *P. spinulosum* سجل أعلى نسبة تواجد إذ وصلت ١٧ عينة وبنسبة مئوية للظهور الكلي ٩٤,٤ % ، والفطر *F. oxyporium* و *Rhizopus* sp و *A. niger* احتل كل منهم نسبة تواجد وصلت إلى ١٠ عينات وبنسبة مئوية للظهور الكلي ٥٥,٥ % ، وشكلا الفطرين *Penicillium* sp و *P. digitatum* نفس نسبة التواجد إذ بلغت ١٣ عينة وبنسبة مئوية للظهور الكلي ٧٢,٢ % ، والفطر *C. cladosporsis* احتل ١٢ عينة وبنسبة تردد للظهور الكلي بلغت ٦٦,٦ % .

٤ – ٢. كفاءة عزلات الفطر *A. flavus* في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2

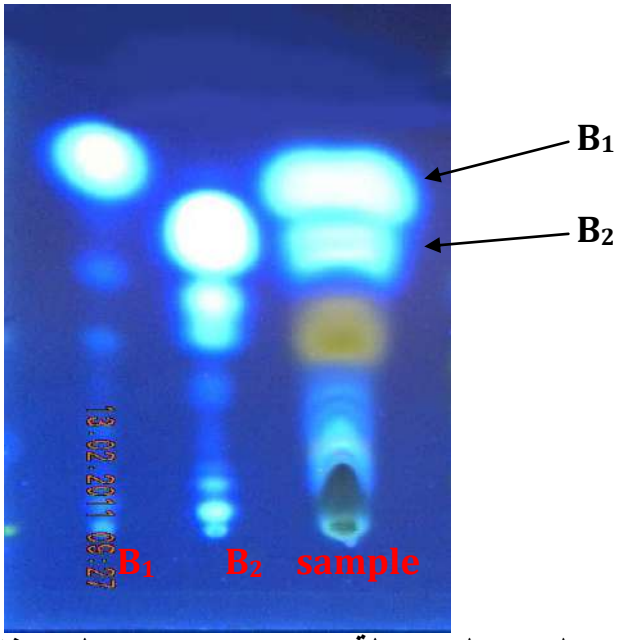
أظهرت النتائج وجود تبايناً في شدة التألق للعزلات المختلفة مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في أنتاجها لسم الافلا B_1 وB_2 . أظهرت نتيجة الفحص هذا لـ ١٨ عزلة للفطر *A. flavus* قابلية ١١ عزلة فقط لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 أي بنسبة ٦١,٢ % ، في حين ٧ عزلات وبنسبة ٣٨,٨ % غير منتجة لسم الافلا B_1 وB_2 (جدول ٧) . وظهرت العزلتين AfZ_3 و AfH_2 أعلى تألق من بين جميع العزلات الشكل (١٠) ، تليهما العزلة AfZ_1 ، أما العزلة AfW_1 سجلت اقل تألق ، كما أظهرت هذه التجربة إن سم الافلا المنتج من قبل العزلات كان من النوع B فقط دون تكوين سم الافلا G إذ لم تتكون بقع خضراء متألقة . و يرجع سبب الاختلاف في قابلية العزلات على إنتاج سم الافلا كماً و نوعاً إلى جينات الفطر *A. flavus* المتخصصة في تشفير الإنزيمات المسؤولة عن تخليق سم الافلا Aflatoxin (Scherm *et al* ., 2005) ، ومن جانب أخر لقد وجد إن للمادة الأساس علاقة كبيرة بتخليق سم الافلا المنتج وان المادة الأساس التي لها تراكيز عالية من الكاربوهيدرات والأحماض الدهنية تعزز من إنتاج سم الافلا كما هو ملاحظ في المستويات العالية من سم الافلا الناتج من جوز الهند الطازج (Arseculeratne *et al.*, 1969) . لا تتفق هذه النتيجة مع ما وجده Batista *et al* (2003) من إن ثلث عزلات الفطر *A. flavus* أي بنسبة ٣٣,٤ % فقط من مجموع ١٨ عزلة كانت منتجة لسم الافلا B_1 وB_2 ، وكذلك لا تتفق مع ما وجده Rahimi *et al* (2008) إذ وجده ٤٦ عزلة أي بنسبة ٣٠,٧ %من مجموع ١٥٠ عزلة للفطر *A. flavus* منتجة للسم و١٠٤ عزلة أي بنسبة ٦٩,٣ % غير منتجة لسم الافلا .

جدول (٧)اختبار عزلات الفطر *A. flavus* لإنتاج سم الافلا B_1 وB_2 باستخدام TLC.

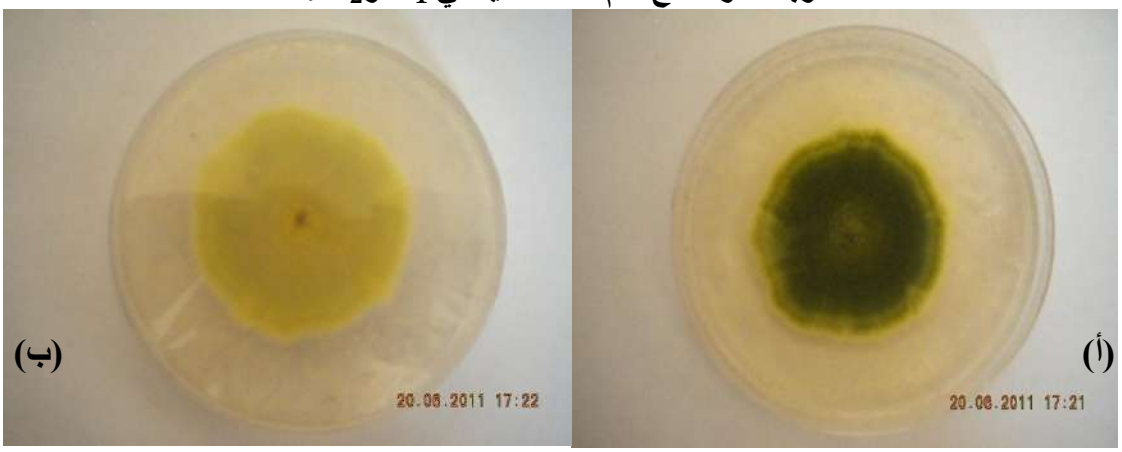
ت	رمز العزلة	شدة التألق تحت UV مقارنة بالسم القياسي	
		B_1	B_2
١	AfW_1	-	-
٢	AfW_2	+++	++
٣	AfW_3	++	+
٤	AfZ_1	++++	+++
٥	AfZ_2	+++	++
٦	AfZ_3	++++	++++
٧	AfL_1	+++	++
٨	AfL_2	-	-
٩	AfL_3	+++	++
١٠	AfP_1	-	-
١١	AfP_2	-	-
١٢	AfP_3	++	++
١٣	AfC_1	+++	+++
١٤	AfC_2	-	-
١٥	AfC_3	-	-

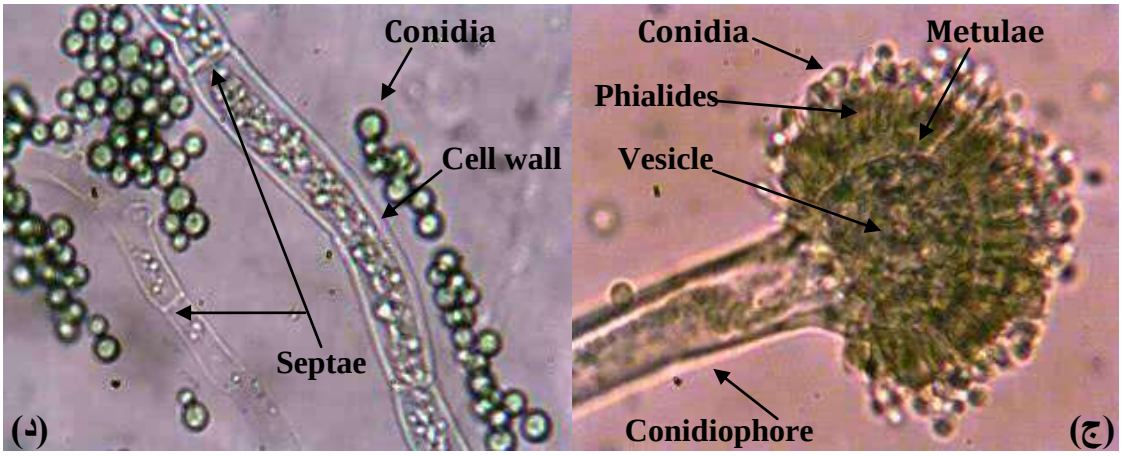
١٦	AfH_1	-	-
١٧	AfH_2	++++	++++
١٨	AfH_3	+++	+++

* (+): تألق ضعيف . * AfW: حنطة . * AfP: فستق الحلبي
* (++): تألق متوسط . * AfZ : ذرة صفراء . * AfC: حب قرع العسلي
* (+++): تألق عالي . * AfL: فستق الحقل . * AfH: حب عباد الشمس
* (++++): تألق عالي جدا.
* (-): غير متألق.



الشكل (١٠) ترحيل مستخلص عزلة AfZ_3 *A. flavus* على صفائح الكروموتوكرافي وبالمقارنة مع سم الافلا القياسي B_1 وB_2 .





الشكل (١١) فطر *A.flavus* AfZ_3 .(أ) سطح المستعمرة ،(ب) ظهر المستعمرة ،(ج) الأجزاء التكاثرية (40_X)، (د) الخيط Hyphae مع الكونيديات Conidia (40_X) .

٤ – ٣. الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية .

وكما هو واضح في الجدول (٨) أن أقل دالة حامضية كانت مسجلة للكركم إذ بلغت ٦,٩٦ للمستخلص الكحولي و٦,٥٠ للمستخلص المائي ، وفي نبات الزعتر بلغت ٥,٩١ للمستخلص الكحولي و٥,٥٤ للمستخلص المائي ، أما الهيل فقد سجل أعلى دالة حامضية للمستخلص الكحولي والتي بلغت ٥,٤٢ في حين المستخلص المائي سجل ٥,٩٨ .

وكذلك يلاحظ في الجدول نفسه أن النسب المئوية للمستخلصات المائية أعلى من المستخلصات الكحولية للنباتات المدروسة في ماعدا الكركم ، إذ كانت النسبة المئوية للمستخلصات المائية هي ١١,٧٥ % ، ١١,١ % و ٦,٢٥ % للهيل و الزعتر و الكركم على التوالي ، أما النسبة المئوية للمستخلصات الكحولية فقد كانت ٩,٥ % ، ٨,٨ % و ٨,٠٥ % للزعتر و الهيل والكركم على التوالي . ويتبين أن النسبة المئوية للمستخلص المائي لثمار الهيل احتلت المرتبة الأولى ، في حين المستخلص المائي للكركم احتل المرتبة الأخيرة . .

الجدول (٨) الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات المائية و الكحولية للنباتات المدروسة

ت	النباتات	نوع	لونه وهو سائل	لونه بعد التجفيف	الدالة	الوزن الصافي	النسبة المئوية

		المستخلص			الحامضية	للمستخلص(غم)	للمستخلص %
١	الزعتر	مائي	بني فاتح	برتقالي غامق	٥,٥٤	٢,٢٢	% ١١,١
		كحولي	زيتوني	زيتوني غامق	٥,٩١	١,٩٠	% ٩,٥
٢	الكركم	مائي	أصفر معتم	برتقالي محمر	٦,٥٠	١,٢٥	% ٦,٢٥
		كحولي	أصفر براق	ذهبي	٦,٩٦	١,٦١	% ٨,٠٥
٣	الهيل	مائي	ليموني	اصفر فاتح	٥,٩٨	٢,٣٥	% ١١,٧٥
		كحولي	اصفر مخضر	اصفر مخضر	٥,٤٢	١,٧٦	% ٨,٨

٤ – ٤.الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية

نظرا لما أظهرته المستخلصات النباتية المدروسة من فاعلية تثبيطية عالية تجاه الفطر *A. flavus* ، 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 يوضح الجدول (٩) أن المستخلص الكحولي للزعتر احتوى على جميع المركبات التي ذكرت ما عدا الصابونينات ، أما المستخلص المائي للزعتر فلم يحتوي على الصابونينات والراتنجات و الفلافونيدات ، في حين المستخلص المائي والكحولي للهيل لم يحتويان على الراتنجات والفلافونيدات والفينولات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد وكذلك عدم وجود القلويدات في المستخلص الكحولي للهيل ولا الصابونينات في المستخلص المائي للهيل ، واحتوى المستخلص الكحولي للكركم على الكلايكوسيدات والراتنجات والكربوهيدرات والفينولات ، وانعدم وجود القلويدات والتانينات والراتنجات والفلافونيدات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد في المستخلص المائي للكركم .

الجدول (٩) الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية الفعَالة .

ت	الكشوفات النوعية	المستخلص المائي للزعتر	المستخلص الكحولي للزعتر	المستخلص المائي للكركم	المستخلص الكحولي للكركم	المستخلص المائي للهيل	المستخلص الكحولي للهيل
١	**الكشف عن القلويدات**						
	أ- كشف واكنر	+	+	-	-	+	-
	ب- كشف ماير	+	+	-	-	+	-
٢	**الكشف عن التانينات**						
	أ- كشف خلات الرصاص	+	+	-	-	+	+
	ب- كشف كلوريد الحديديك	+	+	-	-	+	+
٣	**الكشف عن الصابونينات**						
	أ- كشف كلوريد الزئبقيك	-	-	+	-	-	+
	ب- رغوة المحلول المائي	-	-	+	-	-	+
٤	**الكشف عن الكلايكوسيدات**						
	أ- كاشف فهلنك	+	+	+	+	+	+
	ب- كاشف موليش	+	+	+	+	+	+
٥	**الكشف عن الراتنجات**						

	- كشف حامضHCl 4 %	-	+	-	+	-	-
٦	**الكشف عن الفلافونيدات** أ- كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي	-	+	-	-	-	-
	ب- كشف حامض الكبريتيك المركز	-	+	-	-	-	-
٧	**الكشف عن الكربوهيدرات** - كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز	+	+	+	+	+	+
٨	**الكشف عن الفينولات** - كشف كلوريد الحديديك	+	+	+	+	-	-
٩	**الكشف عن الفيوكيومارينات** - كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي	+	+	-	-	-	-
١٠	**الكشف عن الترايتيربينويد** - كشف حامض الكبريتيك المركز مع الكلوروفورم	+	+	-	-	-	-

٤ ـ ٥. تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus*.

أظهرت النتائج في الجدول (١٠) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين النوع النباتي و نوع المستخلص و التراكيز ، و أن هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ٠,٠٥ نتيجة التداخل بين العوامل الثلاثة أعلاه .

فمن حيث النوع النباتي أظهر نبات الكركم تفوقاً على بقية النباتات في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *A. flavus* ، إذ أعطى أقل معدل نمو للفطر و هو ٤,٤٥ سم ، و يأتي نبات الزعتر بالمرتبة الثانية بين النباتات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو ٤,٥٨ سم ، و جاء نبات الهيل بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو ٥,٣٩ سم ، إذ لم يوجد أي فرق معنوي بين نبات الكركم والزعتر ، في حين يوجد فرق معنوي بين نبات الكركم والهيل ، وكذلك بين نبات الزعتر والهيل و عند مستوى احتمالية ٠,٠٥ ، و هذا قد يعود إلى اختلاف في طبيعة و نوعية

المركبات التي يحتويها كل نبات أو الجزء النباتي ، فبعضها مثبط و بعضها مشجع و بعضها الآخر من دون تأثير (Gonçalez *et al.*, 2003) .

أما فيما يخص نوع المستخلص فقد أظهر المستخلص الكحولي تفوقاً على المستخلص المائي في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر المدروس و بفروقات معنوية و عند مستوى احتمالية ٠,٠٥ ، إذ بلغ معدل النمو للفطر باستعمال المستخلص الكحولي ٢,٩٥ سم ، في حين كان بإستعمال المستخلص المائي ٦,٦٦ سم ، و قد يعود هذا التباين إلى اختلاف القطبية فيما يخص المذيب المستعمل إذ تعود إلى اختلاف ثابت العزل الكهربائي لهذه المذيبات ، و من ثم ستختلف المركبات الذائبة في الماء أو الكحول (Bernard, 1997) .

لقد أظهرت المستخلصات الكحولية فاعلية تثبيطية أعلى من المستخلصات المائية في كل من نباتات الكركم والزعتر، إذ لم يظهر إلا سوى تأثير طفيف للمستخلصات المائية ، أما فيما يخص المستخلص المائي لنبات الهيل الذي أظهر فاعلية تثبيطية أعلى من المستخلص الكحولي الشكل (١٢) ، إذ أشار مجيد و جماعته (1998) إلى أن الفاعلية التثبيطية القليلة للمستخلصات النباتية قد يعزى إلى قلة كمية المواد الفعالة في المستخلصات ، أو ضعف فاعليتها أو إلى ضرورة فصل المكونات الفعالة لها .

لقد اظهر المستخلص الكحولي للكركم كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر و بالتراكيز ٥ ، ١٠ و١٥ ملغم/مل ، فقد كان قطر المستعمرة ٠ سم للتراكيز جميعها إذ منع تكون السبورات وظهر الفطر بشكل مستعمرة صغيره بيضاء ، و توجد فروقات معنوية واضحة بينه وبين المستخلص المائي للكركم ، إذ لم يظهر أي تأثير على نمو الفطر فيما عدا تركيز ١٥ ملغم/مل فقد بلغ قطر المستعمرة عنده ٨,٥ سم ، وقد يعزى السبب إلى وجود الراتنجات في المستخلص الكحولي وغيابه في المستخلص المائي .

وكذلك اظهر المستخلص الكحولي للزعتر كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر وبالتركيزين ١٠ و١٥ ملغم/مل ، فقد كان قطر المستعمرة ٠ سم في حين التركيز ٥ ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة ٢ سم ، وتوجد فروقات معنوية واضحة بينه وبين المستخلص المائي للزعتر ، إذ لم يظهر أي تأثير على نمو الفطر فيما عدا تركيز ١٥ ملغم/مل فقد بلغ قطر المستعمرة عنده ٧,٧٥

سم ، لربما تعزى إلى وجود الراتنجات والفلافونيدات في المستخلص الكحولي وعدم وجودها في المستخلص المائي .

في حين اظهر المستخلص الكحولي للهيل تأثيرا تثبيطياً معتدل على نمو الفطر عند التراكيز ٥ ، ١٠ و١٥ ملغم/مل وبمعدل نمو ٤,٤١ ، ٤,٩١ و ٥,٩١ سم ، وتوجد فروق معنوية كذلك بينه وبين المستخلص المائي للهيل فقد كان معدل نمو الفطر ٥,٢٥ سم عند التركيز ٥ ملغم/مل و ٦,٤١ سم عند تركيز ١٠ ملغم/مل و ٩ سم عند تركيز ١٥ ملغم/مل ، ويتبين لنا بأن المستخلص المائي والكحولي للهيل يزيد من معدل نمو الفطر *A. flavus* بزيادة التركيز ، بالعكس على ما هو عليه في مستخلصي الكركم والزعتر بنوعيهما المائي والكحولي ، و قد يعود السبب في ذلك إلى التداخل بين المواد المستخلصة و تأثيرها على المادة التي يعود اليها التأثير التثبيطي ، إذ أشار Al- Rawi (1988) إلى أنه أحياناً يؤدي وجود المكونات الفعالة مع بعضها في المستخلصات الخام Crude Extracts إلى تأثير سلبي وليس فعال .

و قد يعود التباين بين النباتات في تأثيرها على نمو الفطر *A. flavus* المدروس إلى ما تحتويه من مركبات كيميائية أساسية و ثانوية و نوعية مركباتها الفعالة التي يعود اليها التأثير التثبيطي ، إذ يحتوي النبات الواحد على أكثر من مادة فعالة ، لما لها من استخدام كمواد حافظة للإغذية ، فرايزومات نبات الكركم تحتوي على الزيوت الطيارة مثل *α*-phellandrene ، Sabinene ، Sesquiterpines ، Cineol ، Borneol ، Zingiberene ،بالإضافة إلى Curcumin (Chattopadhyay *et al* .,2004) .إما أوراق نبات الزعتر فقد تحتوي على أهم مركبين Thymol و Carvacrol (WHO ,1999) . في حين تحتوي ثمار الهيل على مركبين مهمين 1,8 – Cineole وα-Terpinyl acetate . (Korikanthimath , 2001)

الجدول (١٠) تأثير النوع النباتي ومستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة ٢٧ ± ٢ °م .

النبات	التركيز / نوع المستخلص	مقارنة ١ ماء مقطر	مقارنة ٢ Clotrimazole 2mg/ml	5 mg /ml	10 mg/ml	15 mg/ ml	المعدل للنوع النباتي
كركم	كحولي	٩	٠	٠	٠	٠	٤,٤٥

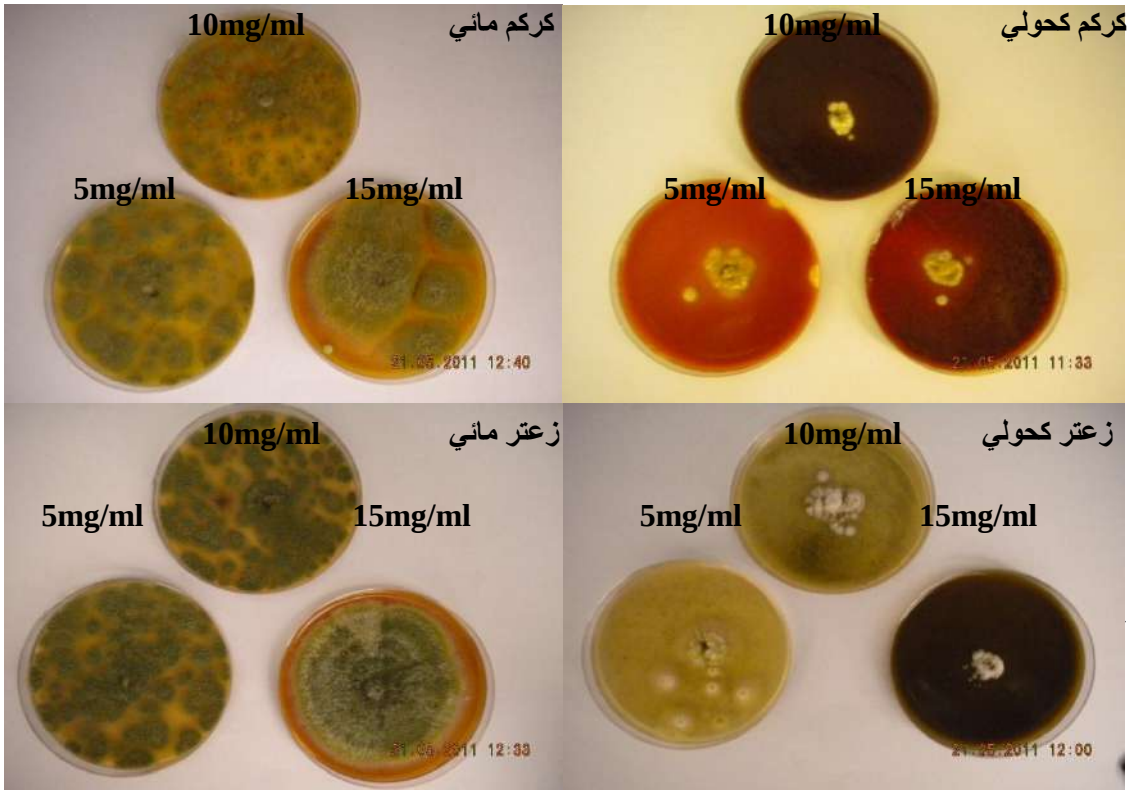
	مائي	٩	٠	٩	٩	٨,٥	
زعتر	كحولي	٩	٠	٢	٠	٠	٤,٥٨
	مائي	٩	٠	٩	٩	٧,٧٥	
هيل	كحولي	٩	٠	٤,٤١	٤,٩١	٥,٩١	٥,٣٩
	مائي	٩	٠	٥,٢٥	٦,٤١	٩	
	المعدل للتركيز	٩	٠	٤,٤٩	٤,٨٩	٥,١٩	

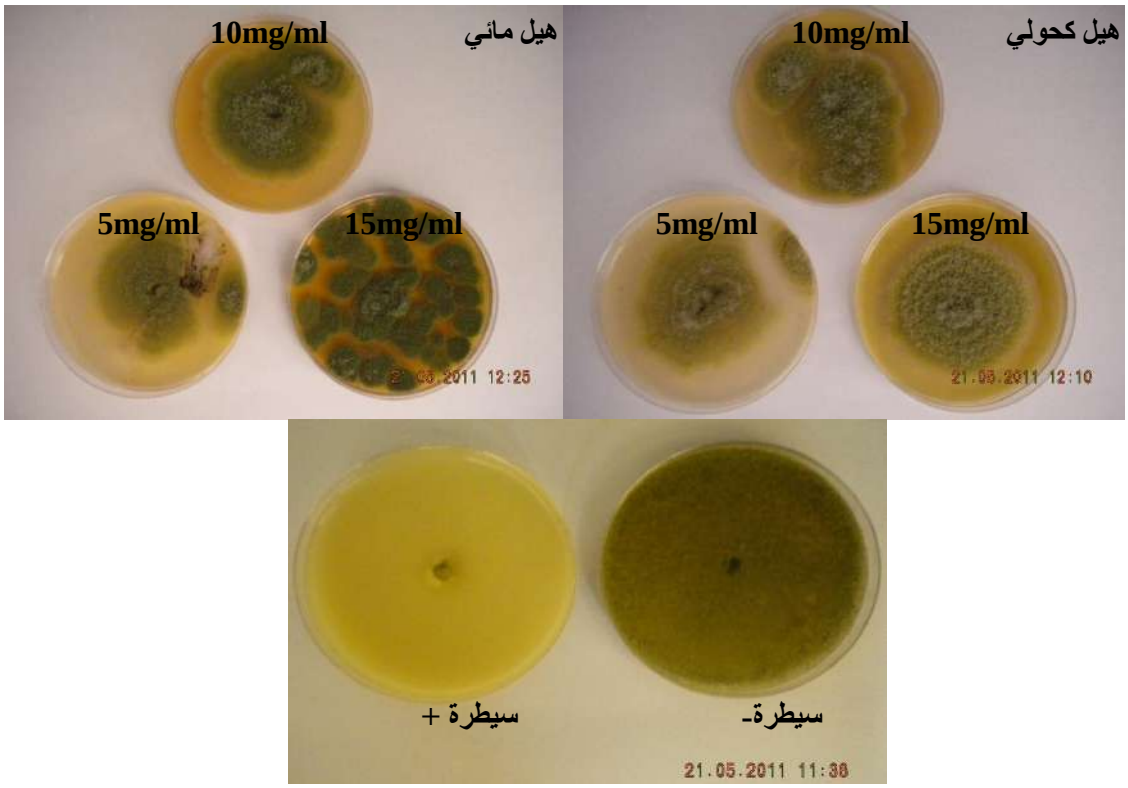
المعدل لنوع المستخلص	كحولي	مائي
	٢,٩٥	٦,٦٦

العامل	النوع النباتي	نوع المستخلص	التركيز	التداخل
LSD 0.05	0.22	0.18	0.28	0.68

* التجربة أجريت بثلاث مكررات .

*يتبع الملحق (١) و (٢) و(٣) لمعرفة النسبة المئوية للتثبيط .





شكل (١٢) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus*

٤ - ٦. تأثير المستخلصات النباتية في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 من قبل الفطر *A. flavus*.

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط PDA الحاوي على تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية بعد تنمية العزلة فيه لمدة ٧ أيام بدرجة ٢٧±٢°م ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي.

أظهرت النتائج في الجدول (١١) أن معاملة الفطر بالتراكيز ٥ ، ١٠ و ١٥ ملغم/مل من مستخلص الكركم الكحولي والزعتر المائي يؤدي إلى انعدام ظهور سم الافلا B_1 و B_2 . وكذلك بينت النتائج أن معاملة الفطر بالتركيزين ١٠ و ١٥ ملغم/مل من مستخلص الكركم المائي والزعتر الكحولي لم يظهر سم الافلا B_1 و B_2 ، في حين التركيز ٥ ملغم/مل اظهر وجود سم الافلا B_1 لكلا المستخلصين. أما المستخلص المائي والكحولي للهيل فقد منع ظهور سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز ١٥ ملغم/مل ، والتركيز ١٠ملغم/مل فقد ظهر فيه سم الافلا B_1 ، في حين ظهر سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز ٥ ملغم/مل للمستخلص المائي وظهر النوع B_1 للمستخلص الكحولي عند نفس التركيز .

وقد يعود السبب في عدم ظهور سم الافلا B_1 و B_2 هو أن المستخلصات تعمل على تغير التركيب الكيميائي للسم أو ترتبط بشدة معه (Hajare *et al* ., 2005) ، أو ربما تمنع المستخلصات تكون مركب Acetate من الايض الأولي الذي يعتبر اللبنة الأساسية في تكوين سم الافلا ، إما في حالة ظهور سم الافلا B_1 وغياب B_2 هو لربما ارتباط المستخلصات بأحد مركبات مسار تكوين سم الافلا B_2 .

ويتفق تأثير المستخلص الكحولي للكركم والمائي للزعتر على إنتاج سم الافلا مع ما وجده (Maraqa *et al.*, 2007) إذ إن جميع التراكيز ٢ ، ٤ و٦ % من الكافائين في وسط النخالة الصلبة ثبط إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 ، في حين لا تتفق نتائج تأثير المستخلص المائي للكركم والكحولي للزعتر والمستخلص المائي والكحولي للهيل مع ما وجده (Maraqa *et al.*, 2007) إن زيادة تركيز القهوة في وسط النخالة الصلبة يؤدي إلى ظهور سم الافلا ، لكنها تتفق مع ما وجده الوائلي (2006) إذ إن معاملة الفطر بتراكيز قليلة من الزيت

الطيار لقشور ثمار الكريب فروت عند التركيزين ٠,١٢٥ و٠,٢٥ % في وسط مستخلص الخميرة والسكروز أدى إلى ظهور النوع B_1، لكن زيادة التركيز إلى ٠,٥% لم يظهر سم الافلا.

الجدول (١١) تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من المستخلصات النباتية الفعالة على إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

ت	النوع النباتي	نوع المستخلص	سم الافلا					
			B_1			B_2		
			5	10	15	5	10	15
١	الكركم	كحولي	-	-	-	-	-	-
		مائي	+	-	-	-	-	-
٢	الزعتر	كحولي	+	-	-	-	-	-
		مائي	-	-	-	-	-	-
٣	الهيل	كحولي	+	+	-	-	-	-
		مائي	+	+	-	+	-	-

+ : أنتاج سم الافلا .

- : عدم أنتاج سم الافلا .

٤ - ٧. تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* .

أظهرت النتائج في الجدول (١٢) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين الفيتامينات والتركيز ، و أن هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ٠,٠٥ نتيجة التداخل بين العاملان أعلاه .

فمن حيث نوع الفيتامين فقد اظهر فيتامين A تفوقاً على بقية الفيتامينات في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *A. flavus* ، فأعطى أقل معدل نمو للفطر و هو ٣,٠٥ سم ، إذ بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر ٠ سم عند تركيز ٣ ملغم/مل ، في حين التركيزين ٢ و ١ ملغم/مل أعطى معدل نمو للفطر ٢,٥٨ و ٣,٧٥ سم على التوالي ، و يأتي فيتامين E بالمرتبة الثانية بين الفيتامينات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو 4.52 سم ، فقد بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر ٤,٢٥ سم عند تركيز ٣ ملغم/مل ، في حين التركيزين ٢ و ١ ملغم/مل أعطى معدل نمو للفطر

4.33 و ٥ سم على التوالي ، و جاء فيتامين C بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو ٥,٤٨ سم ، إذ بلغ معدل نمو الفطر ٥ سم عند تركيز ٣ ملغم/مل ، في حين التركيزين ٢ و ١ ملغم/مل أعطى معدل نمو ٦ و٧,٢٥ سم على التوالي . و هذا قد يعود إلى اختلاف في طبيعة وتركيب كل فيتامين لما يحتويه من مجاميع فعاله لتثبيط السم.

و قد أظهر التركيز ٣ ملغم/مل تفوقا على التركيزين ١ و ٢ ملغم/مل في تأثيره التثبيطي و بفروقات معنوية عند مستوى احتمالية ٠,٠٥ ، إذ أعطى معدل نمو للفطر ٣,١١ سم ، يليه التركيز ٢ ملغم/مل الذي أعطى معدل نمو ٤,٣٣ سم ، و أخيرا التركيز ١ ملغم/مل إذ أعطى معدل نمو ٥,٣١ سم ، وهذه النتيجة تتفق مع (2009) Sudhakar *et al* الذي وجد التراكيز القليلة من مادة Methyleugenol لها فعالية تثبيطية قليلة على الفطر بالمقارنة مع التراكيز العالية أي إن معدل نمو الفطر *A. flavus* يصل إلى ٣,٩ سم على وسط اكار مستخلص الفستق PMAعند تركيز ٠,١ % ، بينما يصل النمو إلى ٠ سم عند تركيز ٥,٠ % من المادة ، وكذلك اتفقت مع (2002) Sung-eun *et al* حيث وجد إن للمركبات القلوية الأربعة Piperlongumine ، Piperine ، Pipernonaline و Piperoctadecalidine معا لها تاثير على معدل نمو الفطر *A.flavus* فالتركيز ٠,١ % من هذه القلويدات يبلغ معدل نمو الفطر إلى ٥٠ ملم في وسط PDA ، في حين التركيز ٠,٥ % يصل معدل نمو الفطر إلى ٤٧ ملم ، أي زادة نسبة التثبيط بزيادة تركيز المادة .

الجدول (١٢) تأثير الفيتامينات وتركيزها والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة ٢٧ ± ٢ °م .

التركيز / الفيتامين	مقارنة ١ ماء مقطر	مقارنة ٢ Clotrimazole 2mg/ml	1 mg /ml	2 mg/ml	3 mg/ ml	المعدل للفيتامين
A	٩	٠	3.75	2.58	٠	٣,٠٥
E	٩	٠	5	4.33	4.25	٤,٥٢
C	٩	٠	7.25	6	5	٥,٤٨
المعدل للتركيز	٩	٠	٥,٣١	٤,٣٣	٣,١١	

العامل	الفيتامين	التركيز	التداخل
LSD 0.05	٠,٤٤	٠,٥٧	٠,٩٨

* التجربة أجريت بثلاث مكررات .

* ينبع الملحق (٧) لمعرفة النسبة المئوية للتثبيط .

4 -٨. تأثير الفيتامينات في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 من قبل الفطر *A. flavus*

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط PDA الحاوي على تراكيز مختلفة من الفيتامينات بعد تنمية العزلة فيه لمدة ٧ أيام بدرجة ٢٧±٢°م ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي .

أظهرت النتائج في الجدول (١٣) فيتامين E تفوقاً على باقي الفيتامينات إذ ظهر سم الافلا B_1 عند معاملة الفطر بتركيز ١ ، ٢ و٣ ملغم/مل ، لكن ثبط إنتاج سم الافلا B_2 ، إما فيتامين A فقد ظهر النوع B_1 عند جميع التراكيز بالإضافة إلى النوع B_2 عند تركيز ١ملغم/مل ، وجاء فيتامين C في المرتبة الأخيرة في قابلية على تثبيط سم الافلا B_1 وB_2 ، إذ ظهر النوعان عند جميع التراكيز ماعدا تركيز ٣ملغم/مل فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 .

وقد يعود السبب في عدم ظهور سم الافلا B_1 و B_2 هو إنها تعمل على تغير التركيب الكيميائي للسم أو ترتبط بشدة معه (Hajare *et al* ., 2005) ، أو ربما تمنع المستخلصات تكون مركب Acetate من الايض الأولي الذي يعتبر اللبنة الأساسية في تكوين سم الافلا ، إما في حالة ظهور سم الافلا B_1 وغياب B_2 هو لربما ارتباط المستخلصات بأحد مركبات مسار تكوين سم الافلا B_2 . وقد تبين من النتائج أعلاه أن جميع تراكيز الفيتامينات ليس لها القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 ، وهذه النتيجة لا تتفق مع ما وجده Norton (1997) إذ إن جميع التراكيز α- Carotene أظهرت سم الافلا B_1 عند مستوى اقل ١ ملغم/مل ، في حين التركيز ١ ملغم/مل منع ظهور سم الافلا B_1 ، ومن جانب أخر تتفق النتائج مع Norton (1997) إذ وجد جميع التراكيز المنحصرة بين ٠,٠٣٢ – ١٠٠٠ مايكروغرام/مل من β- Carotene لا تثبط إنتاج سم الافلا B_1 .

الجدول (١٣) تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من الفيتامينات على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

ت	نوع الفيتامين	سم الافلا					
		B_1			B_2		
		1	2	3	1	2	3
١	A	+	+	+	+	-	-
٢	E	+	+	+	-	-	-
3	C	+	+	+	+	+	-

+ : أنتاج سم الافلا .

- : عدم أنتاج سم الافلا

٤ – ٩. تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير المستخلصات النباتية والفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع المستخلص والفيتامين الأكثر فعالية في نمو الفطر .

ويبين الجدول (١٤) أن المستخلص الكحولي للكركم والزعتر سجلا أدنى تركيز مثبط هو ١ملغم / مل ، في حين المستخلص المائي لهما لم يسجل إي تركيز مثبط أدنى ، إما نبات الهيل فقد كان التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي هو ٢ ملغم /مل بينما المستخلص المائي سجل ٤ ملغم / مل .

الجدول (١٤) التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية الفعّالة في الفطر *A. flavus* .

ت	النوع النباتي	نوع المستخلص	التركيز المثبط الأدنى
١	**الكركم**	الكحولي	1 mg/ml
		المائي	-
٢	**الزعتر**	الكحولي	1 mg/ml
		المائي	-

٣	**الهيل**	الكحولي	2 mg/ml
		المائي	4 mg/ml

إما في ما يخص الفيتامينات فقد بين الجدول (١٥) إن فيتامين E و C كان لهما التركيز المثبط الأدنى هو ٠,٥ ملغم / مل ، في حين فيتامين A فتركيزه المثبط الأدنى بلغ ١ ملغم / مل .

الجدول (١٥) التركيز المثبط الأدنى للفيتامينات في الفطر *A. flavus* .

ت	نوع الفيتامين	التركيز المثبط الأدنى
١	**A**	1 mg/ml
٢	**E**	0.5 mg/ml
٣	**C**	0.5 mg/ml

٤ – ١٠. تأثير درجة الحرارة و الأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في نمو الفطر*A. flavus* .

أظهرت النتائج في الجدول (١٦) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين المستويات . و قد أظهرت النتائج أن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ ٤,٨٣ سم عند الدرجات الحرارية المختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى ٠ سم عند مستوى حراري ٥٥ ºم ، إما المستويان الحراريان ٢٥ و٣٥ ºم فقد أعطى معدل نمو ٩ سم للفطر ، في حين أن المستويين الحراريين ١٥ و ٤٥ ºم أعطى نسبة متقاربة وصلت إلى ٣,٢ و ٢,٩٣ سم وعلى التوالي ، إذ أشار(Hedayati *et al* (2007 إن الفطر *A. flavus* ينمو في مدى حراري يتراوح بين ١٢ – ٤٨ ºم لكن الدرجة الحرارية المثلى للنمو هي ٣٧ ºم ، وتتفق مع ما وجده Bokhari & Aly (2009) إن الدرجة الحرارية المنخفضة والمرتفعة تقلل من الوزن الجاف للفطر *A. flavus* فالدرجة الحرارية ٤ ºم تعطي نمو ١,٤ ملغم/مل من الوسط ، إما درجة الحرارة ٢٨ ºم أعطت ١٣,٣ ملغم/مل ، في حين الدرجة الحرارية ٣٨ ºم بلغ فيها وزن الفطر ٥,٤ ملغم/مل ، ولا تتفق مع ما توصل إلية (١٩٨٩) Olama & Sabry إذ وجد الدرجة الحرارية ٤٥ º م تعطي أعلى معدل للنمو بقدر ٧٢١ ملغم / ١٠٠ مل من الوسط ، إما الدرجة

الحرارية ٣٠ ° م أعطت ٥٤٠ ملغم / ١٠٠مل ، في حين الدرجة الحرارية ٥٥ ° م قد أعطت نمو ١٣٨ ملغم / ١٠٠مل . وضح الجدول نفسه إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ ٤,٨٩ سم عند مستويات pH المختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى ٠ سم عند مستوى pH يساوي ٣,٥ ، إما مستوى pH يساوي ٦,٥ فقد أعطى أعلى معدل نمو للفطر الذي وصل إلى ٩ سم ، في حين جاء مستوى pH يساوي 8 بالمرتبة الثانية فقد وصل معدل نمو الفطر إلى 6.5 سم ، إما في pHيساوي٩,٥ الثالثة فقد وصل معدل نمو الفطر إلى ٥,٧٧ سم ، ووصل نمو الفطر إلى ٣,٢ سم عند pH يساوي ٥ ، إذ أشار(Shafique *et al* (2009 إن الفطر *A. flavus* ينمو بين مدى pH يتراوح بين ٤,٥ – ٦,٥ ، لا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية Holmquist 1983 *et al* إن الفطر *A. flavus* يصل إلى أقصى نمو عند pH يساوي ٥ ودرجة حرارة ٣٣ °م . لكنها تتفق مع (١٩٨٩) Olama & Sabry إذ وجد معدل نمو الفطر يزداد بزيادة pH حتى ٧pH ثم يبدأ معدل النمو بالانخفاض نحو ١٠ pH ،فعند ٤ pH معدل نمو الفطر قليلة لقد بلغ ٤٦٠ ملغم/ ١٠٠ مل من الوسط ، لكن pH فان معدل نمو الفطر يصل إلى أقصة فقد بلغ ٧٢١ ملغم/ ١٠٠مل ، في حين pH تساوي ١٠ فقد بلغ معدل نمو الفطر ٥٠٤ ملغم/ ١٠٠مل .

وبين الجدول كذلك إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ ٥,٨٨ سم عند مستويات رطوبية مختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى أدنى حد بلغ ٣,٢٧ سم عند مستوى RH يساوي٣٥ ، إما مستويان RH ٦٥ و٥٠ فقد أعطى معدل نمو ٤,٧٧ و ٤,٧٠ سم للفطر ، في حين أعطى مستوى RH يساوي٨٠ أعلى معدل لنمو الفطر وهو ٩ سم ، ووصلت نمو مستعمرة الفطر إلى ٧,٦٧ سم عند مستوى RH يساوي٢٠ . إذ أشار Nawar (2008) إن الفطر *A. flavus* يزداد معدل نموه بزيادة الرطوبة النسبية وصولا إلى ١٠٠ % ، وتتفق هذه النتيجة مع Hettiarachchi *et al* (2001) إذ وجد إن الرطوبة النسبية من ٨٠ % فما فوق تزيد من إصابة حبوب الذرة مختبرياً بالفطر *A.flavus* . وكذلك تتفق هذه النتيجة مع Boller & Schroeder (1973) إذ وجدا تزداد إصابة حبو ب الرز عند مستوى رطوبة نسبية تساوي ٨٠ % ودرجة حرارة تتراوح بين ٢٥ – ٣٥ ° م .

الجدول (١٦) تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد عشرة أيام من الحضن

درجة الحرارة	معدل نمو الفطر	الأس الهيدروجيني	معدل نمو الفطر	الرطوبة النسبية	معدل نمو الفطر
١٥	٣,٢٠	٣,٥	٠,٠٠	٢٠	٧,٦٧
٢٥	٩,٠٠	٥	٣,٢٠	٣٥	٣,٢٧
٣٥	٩,٠٠	٦,٥	٩,٠٠	٥٠	٤,٧٠
٤٥	٢,٩٣	٨	٦,٥٠	٦٥	٤,٧٧
٥٥	٠,٠٠	٩,٥	٥,٧٧	٨٠	٩,٠٠
المعدل	٤,٨٣	المعدل	٤,٨٩	المعدل	٥,٨٨

العامل	PH	°C	RH
$LSD_{0.05}$	1.06	1.00	2.25

* التجربة أجريت بثلاث مكررات .

* يتبع الملحق (٤) و(٥) و(٦) لمعرفة النسبة المئوية لمعدل نمو الفطر .

٤ – ٩. تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 من قبل الفطر *A. flavus*

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط PDA عند مستويات مختلفة من درجات الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية بعد تنمية العزلة فيه لمدة ١٠ أيام ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي.

اظهر الجدول (١٧) انعدم ظهور سم الافلا B_1 وB_2 عند معاملة الفطر بمستوى حراري ٣٥ ºم و٥٥ ºم ، في حين انعدم ظهور سم الافلا B_2 عند المستويين الحراريين ٢٥ ºم و٤٥ ºم ، لكن ظهر كلا النوعين من سم الافلا عند مستوى حراري ١٥ ºم ، وكانت جميع المستويات عند pH٦,٥ ، وربما يعود إفراز سم الافلا B_1 وB_2 عند درجة حرارة ١٥ºم هو إلى عامل الإجهاد التي يوجها الفطر لان هذه الدرجة الحرارية لا تمثل النمو الأمثل للفطر ، إما درجة الحرارة ٥٥ºم منعت نمو الفطر بصورة تامة وبالتالي عدم إنتاج سم الافلا ، ولا تتفق هذه النتيجة مع توصل Kamil & Lupuliasa (2011) فقد وجدا ان الدرجة الحرارية ٣٥º م تنتج سم الافلا B_1 ، وكذلك لا تتفق مع Cole *et al* (1985) إذ وجدوا إن الفول السوداني يزداد بالتلوث بسم الافلا عند درجة حرارة أكثر من ٢٩,٦ º م .

وكذلك بين الجدول نفسه وفيما يخص pH ظهور سم الافلا B_1 وB_2 عند مستوى pH يتراوح بين ٦,٥ – ٩,٥ ، لكن عند مستوى pH يساوي ٣,٥ انعدم ظهور كلا النوعين من سم الافلا ، إما pH يساوي ٥ فقد ظهر النوع B_1 وكانت درجة الحرارة عند جميع المستويات ٢٥ ºم ، وهذا قد يعزى إلى إن الفطر يفضل الأوساط ذات الطبيعة الحامضية المعتدلة والقاعدية الضعيفة لإنتاج سم الافلا ، وتتفق هذه النتيجة مع Horn & Wicklow (1983) فقد وجدا ان مستوى pH المتراوح بين ٢ – ٣ يثبط إنتاج سم الافلا بصورة تامة في حبوب الذرة الصفراء ، إما مستوى pH المتراوح بين ٣ – ٧ يزد من إنتاج سم الافلا B_1 وبشكل طردي مع مستوى pH .

وبين الجدول نفسه أن الرطوبة النسبية فقد أظهرت سم الافلا B_1 عند مستوى RHيساوي ٢٠ ، ٦٥ و٨٠ ، في حين انعدم النوعين عند مستوى RH يساوي ٥٠ ، ولكن مستوى RH يساوي ٣٥ ظهر النوع B_2 فقط ، وكانت جميع مستويات RH عند درجة حرارة ٢٥ ºم و PH ٦,٥ ، وتتفق هذه النتيجة مع (Johnsson *et al* (2008 فقد وجدوا ان الرطوبة النسبية عند ٨٠ % يزيد من معدل إنتاج سم الافلا في البندق البرازيلي ، وكذلك مع ما توصل إليه الباحثين Boller & Schroeder (1973) إذ وجدا الرطوبة النسبية عند ٨٥ تؤدي إلى إفراز سم الافلا B_1 في الرز .

الجدول (١٧) تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية على إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

العوامل	سم الافلا									
	B_1					B_2				
الأس الهيدروجيني	3.5	5	6.5	8	9.5	3.5	5	6.5	8	9.5
	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
درجة الحرارة	15	25	35	45	55	15	25	35	45	55
	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
الرطوبة النسبية	20	35	50	65	80	20	35	50	65	80
	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-

+ : إنتاج سم الافلا .

- : عدم إنتاج سم الافلا .

الاستنتاجات

&

التوصيات

الاستنتاجات

CONCLUSIONS

١. أن أكثر المواقع تلوث بالفطريات هو سوق الدهان ، وجاءت مخازن الحبوب في المركز الأخير من بين مواقع الجمع فسجلت اقل نسبة بالتلوث الفطري .

٢. تباينت عزلات الفطر *A. flavus* في قابليتها على إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 بين عزلات غير منتجة إلى عزلات منتجة بشدة تألق مختلفة تحت الأشعة فوق البنفسجية .

٣. أن المستخلصات الكحولية لنبات الكركم والزعتر كانت أفضل من المستخلصات المائية في تثبيط نمو الفطر *A. flavus* .

٤. أن المستخلص المائي لنبات الهيل كان أفضل من المستخلص الكحولي في تثبيط نمو الفطر *A. flavus* .

٥. وجد المستخلص المائي والكحولي لنبات الكركم والزعتر القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 ، في حين المستخلص المائي والكحولي لنبات الهيل ليس له القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 وخاصةً B_1 إلا عند التراكيز العالية .

٦. تحتوي النباتات المدروسة على مجموعة من المركبات الفعالة التي يعود إليها التأثير والتي يمكن استخدامها كمواد حافظة مثل التانينات و الفينولات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و غيرها .

٧. أن زيادة تركيز كل من الفيتامين A ، E وC يزداد من معدل تثبيط نمو الفطر *A.flavus* وكل أنواع الفيتامينات ليس لها القدرة على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 عند جميع التراكيز.

٨. جميع المستويات للعوامل الحرارة والرطوبة النسبية والأس الهيدروجيني أعطت معدلات نمو مختلفة ما عدا درجة الحرارة ٥٥ °م و pH يساوي ٣,٥ فقد أعطيا نسبة تثبيط ١٠٠ % لنمو الفطر ، ومنعا ظهور سم الافلا B_1 و B_2 ، وكذلك RH يساوي ٥٠ ثبط إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 .

التوصيات

RECOMMENDATIONS

١. استعمال طرائق لغرض التقدير الكمي لسم الافلا B_1 وB_2 بعد تأثير المستخلصات أو الفيتامينات أو بعض العوامل البيئية مثل استعمال جهاز HPLC أو Elisa .

٢. القيام بدراسات كيميائية لتحديد موقع التأثير الذي تسببه هذه المستخلصات النباتية أو الفيتامينات في تثبيط سم الافلا ، أو القيام بدراسة جزيئه على مستوى DNA لمعرفة تأثير المستخلصات النباتية أو الفيتامينات على الجينات المسؤولة عن تشفير الإنزيمات التي تدخل في تخليق سم الافلا .

٣. إجراء دراسات لتنقية المركبات الفعالة التي يعود إليها التأثير التثبيطي على الفطر *A. flavus* من النباتات الأكثر تأثيرا .

٤. البحث في دراسات أخرى تشمل المزيد من النباتات لغرض الحصول على مواد أكثر فعالية لاستعمالها كمواد حافظة للأغذية ضد الفطريات المنتجة لسم الافلا .

المصادر

المصادر العربية

ARABIC REFERENCES

- **الإمام ، محمد محمد الطاهر (٢٠٠٧) .** تصميم وتحليل التجارب . دار المريخ للنشر ، المملكة العربية السعودية ، ط١ : ٤٠٨ صفحة .

- **الجبوري، كركز محمد ثلج (١٩٩٨).** عزل الفطريات المنتجة للسموم من بعض اعلاف الدواجن. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. المجلد ١١، العدد ١:٤٥-٥٠.

- **حيدر ، علي . (٢٠٠٣)** . شبح أسلحة الدمار الشامل (الكيميائية -البايولوجية –النووية) : رعب يداهم البشرية.ط١، مؤسسة الفكر الإسلامي للطباعة والتوزيع والنشر : ٣٨٩ صفحة .

- **الشيخلي، محمد عبد الستار و عبد الجليل، فريال حسن و العزاوي، حسن فياض(١٩٩٣).** الكيمياء الحياتية العملي، الجامعة المستنصرية.

- **الفيصل ، هبه قاسم حميد (٢٠٠٥)** . التحري عن سموم افلا B1 و B2و اوكرا A و السترينين في الحبية والبرغل والجريش . رسالة ماجستير / كلية الزراعة – جامعة بغداد.

- **مجيد، قيثار رشيد و الشطي، صباح مالك حميد و عبد الكريم، علي حسين (١٩٩٨).** المحتوى الكيميائي للزعتر Thymus vulagaris و تأثير مستخلصه التثبيطي على بعض البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام. مجلة البصرة للعلوم الزراعية. المجلد١١ ، العدد١: ٤١-٥٠ .

- **الوائلي ، هديل وائل (٢٠٠٦)** . تأثير الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* وأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citratus* فـي نمـو الفطـر *Aspergillus flavus* وانتاجه للافلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير/ كلية التربية / ابن الهيثم – جامعة بغداد .

المصادر الأجنبية

FOREING REFERENCES

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

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

- **Agüero, L. E. M. ; Alvarado, R. ; Martínez, A & Dorta, B. (2008).** Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B_1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *trichoderma harzianum* RIFAI. INTERCIENCIA ., 33 (3): 219 – 222.

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

- **Ahsan, S. ;Bhatti, I. A. ;Asi, M. R. ;Bhatti, H. N. & Sheikh, M. A. (2010) .** Occurrence of aflatoxins in maize grains from central areas of Punjab, Pakistan . Int. J. Agr. Boil., 12(4):571-575.

- **AL-Khazragi,S.M. (1991) .** Biopharmacological study of Artemisia herba alba . M.Sc.thesis . Univ . Baghdad .

-**Alpsoy, L. (2010).** Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr. J. Biotechnol. ,9(17):2474-2481.

- Al-Rawi, A.(1988). Poisonous plants of Iraq. 3rd . edt. Baghdad

-Aly, S. A. & Anwer, W. (2009) . Effect of naturally contaminated feed with aflatoxin on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B_1 residues in table eggs . Pak. J. Nutri. ,8(2):181-186..

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

- Aryantha, N. P. ; Lunggani, A. T. (2007) . Suppression on the aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by lactic acid bacterial (*Lactobacillus delbrueckii , Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus planetarium*) . Biotechnol., 6(2):257-262.

- Azab, R. M. ;Tawakkol, W. M. ;Hamad, A. M.;Abou-Elmagd, M. K.;El-Agrab, H. M. & Refai, M. K. (2005). Detection and estimation of aflatoxin B_1 in feed and its biodegradation by bacteria and fungi. Egypt. J. natur. toxins. ,2:39-56.

- Bandyopadhyay, R. ; Kiewnick, S; Atehnkeng, J. ;Donner, M ; Cotty, P. J. & Hell, K. (2005). Biological control of aflatoxin contamination in maize in Africa . Conf. Int. Agr. Res. Development. , 5pp.

- **Bansod,S. & Rai, M. (2008).** Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* ., World J. Med . Sci . 3 (2): 81-88 .

- **Batista, L. R. ; Chalfoun, S. M.; Prado, G.; Schwan, R. F. and Wheals, A. E. (2003).** Toxigenic fungi associated with processed green coffea beans (*Coffea arabical* L.). Int. J. Food Microbiol., 85 (3): 293-300.

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

- **Bender,D. A & Mayes, P. A. (2003) .**Vitamins & Minerals **:in Murray, R. K. ; Granner, D. K. ; Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (2003) .** Harper's Illustrated Biochemistry **.** 26th edn., McGraw-Hill Companies : 693 pp.

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

- **Bennet and Known- Chung, K.J., J. E. (1992).** Medical Mycology. Lea and Febiqer. , : 866pp .

- **Bernard, T.(1997).** Reactions in Solution. An Applied Analytical Approach**.** 1st . edt **.,** John Wiley & Sons Ltd. England : 554 pp.

- **Bhat, R. V. (2008).** Human health problems associated with current agriculture food production . Asia . pac. J. Clin. Nutr., 17(1): 91-94.

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

-**Bhavan, N. (2003).** Curricula on Food Safety**,** 5th edn ., Directorate General of Health Services , New Delhi:245 pp **.**

- **Bokhari, F. & Aly, M. M. (2009) .** Trials towards reduction of fungal growth and aflatoxin G_1 production in Arabic coffee using different additives . Afr. J. Food Sci., 3 (3) : 68-76.

- **Bokhari, F. M. (2002) .** Aflatoxins production by *Aspergillus flavus* ,isolated from different food stuffs commonly used in Jeddah region , Saudi Arabia . Pak. J. Biol. Sci., 5(1):69-74.

- **Boller, R. A. & Schroeder, H. W. (1973).** Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus* . Phytopathol. , 63 : 283 – 286 .

- **Booth , T. ; Gorrie , S. & Mabsin , T.M. (1988) .** Life Strategies among fungal ; assemblages on *Salicornia europase* agg . Mycol. ; 80 : 176 - 191 .

- **Bryden, W. L. (2007) .** Mycotoxins in the food chain: human health Implications. Asia. Pac. J. Clin. Nutr., 16(1): 95-101.

- **Buchanan, R. L. & Ayres, G. C. (1975) .** Effect of initial pH on aflatoxin production . Appl. Microbiol., 30(6) :1050 – 1051.

-Buffon,J. G. and Furlong, E. B. (2010) . Kinetics of deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. J. Braz. Chem. Soc.,21(4):710-714.

-Buttinger, G. ;Oostra, A. & Charoud-Got, J. (2010). The certification of mass fractions of aflatoxin B_1 , B_2 ,G_1 and G_2 in compound feeding stuff (low level). Printed in Belgium, European union .,34pp.

- Campos, S. G. ; Cavaglieri, L. R. ; Ferna´ndez Juri, M. G. ; Dalcero, A. M. ; Kru¨ ger, C. L. ;Keller, A. M. ; Magnoli, C. E. & Rosa, C. A. R. (2008) . Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil . J. Animal Physiol. Animal Nutr. 92 : 377–383 .

- CAST (Council for Agricultural Science and Technology).(2003). Mycotoxins:Risks in Plant, Animal and Human Systems **.** Task Force Report No. 139.

- Chattopadhyay, I. ;Biswas, K. ;Bandyopadhyay, U. & Banerjee, R. K. (2004) . Turmeric and curcumin**:** biological actions and medicinal applications **.** Current Sci ., 87 (1, 10): 44 – 53.

- Chen, J ; Goetchius, M. P. ; Combs - Jr, G. F. & Campbell, T. C. (1982) . Effects of dietary selenium and vitamin e on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules . J. Nutr., 112: 350-355 .

- **Chen, W. L. ;Zhou, D. & Xing, D. (2007) .** Chemical detoxification of aflatoxinB_1 in rice by several solutions through fluorescence spectral experiment . Int. J. Engineering Res. Afr., 364 – 366 : 1032 – 1036 . (Abstract) .

-**Chung, D. W. ;Greenwald, C. ;Upadhyay, S. ;Ding, S. ;Wilkinson, H. H. ;Ebbole, D. J. & Shaw, B. D. (2011) .** Acon-3, the *neurospora crassa* ortholog of the developmental modifier, medA, complements the conidition defect of the *Aspergillus nidulans* mutant . fungal Genet. Biol., (Article in Press).

- **Çikrikçi, S. ; Mozioglu, E. & Yilmaz, H. (2008) .** Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* . Rec. Nat. Prod., 2(1): 19 – 24 .

- **Cole, R. J. ; Sanders, T. H. ; Hill, R. A. & Blankenship, P. D. (1985) .** Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress . Mycopathol. , 91 : 41 – 46 .

- **Collee,J. ; Fraser,A. ; Marmion,B. & Simon,A. (1996) .** Makie And Mccartney Practical Medical Microbiology **.** 14th. edt., Churchill Livingstone . New York : 978 pp.

Del-Bianchi, M. ; Oliveira, C. A. F. ; Albuquerque, R. ;Guerra, J. L. & Correa, B. (2005). Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and fumonisin B_1 in broiler chickens . Poultry Sci., 84:1835–1840.

- **Denli, M. ; Celik, K. & Okan, F. (2003) .** Effects of vitamin a supplementary in the feed to reduce toxic effects of aflatoxin B1 on japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Int. J. Poultry Sci. ,2 (2) : 174 – 177 .

- **Detroy, R. W. ;Freer, S & Ciegler, A. (1973) .** Aflatoxin and anthraquinone biosynthesis by nitrosoguanidine-derived mutant of *Aspergillus parasiticus* . Can. J. Microbiol., 19:1373-1378.

- **Duke, J. A. ; Bogenschutz-Godwin, M. J. ; duCellier, J. & Duke, P. K. (2002) .** Handbook of Medicinal Herbs . 2nd edn ., CRC Press , Boca Raton London New York Washington, D.C. : 870 pp .

- **El – zemity, S. R. & Ahmed, S. M. (2005) .** Antifungal activity of some essential oils and their major chemical constituents against some phytopathogenic fungi . J. Pest. Cont. Environ. Sci., 13(1): 61 – 72 .

- **Ellis, D. ;Davis, S. ;Alexiou, H. ;Handke, R. & Bartley, R. (2007) .** Descriptions of Medical Fungi . 2 nd edt., Mycology unit ,North Adelaide, Australia : 198 pp.

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

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

-Ghanem, I.;Orfi, M. and Shamma, M. (2008) . Effect of gamma radiation on the inactivation of aflatoxin B_1 in food and feed crops. Braz. J. Microbiol. ,39:787-791.

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

- Gratz, S. (2007). Aflatoxin Binding By Probiotics : Experimental Studies 0n Intestinal Aflatoxin Transport, Metabolism and Toxicity. 1 st edt., Kuopio University Library ., 85 pp.

- Guo, B. ;Yu, J. ; Holbrook, C. C. ;Cleveland, T. E. ;Nierman, W. C. & Scully, B. T. (2009) . Strategies in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. Peanut Sci., 36:11-20.

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

- Hajare, S. S. ; Hajare, S. N. & Sharma, A. (2005) . Aflatoxin inactivation using aqueous extract of ajowan (*Trachyspermum ammi*) seeds . J. food Sci., 70(1): 29 – 34 .

- Harborne,J.B. (1984) . Phytochemical Methods : Aguide to Modern Techniques of Plants Analysis . 2nd . edt. , Chapman & Hall , London , New York .

- **Harwig, J. & Munro, C. I. (1975) .** Mycotoxins of possible importance in diseases of canadian farm animals . can. vet. jour., 16 (5): 125 – 141.

- **Hedayati, M. T.;Kaboli, S. & Mayahi, S. (2010).** Mycoflora of pistachio and peanut kernels from Sari,Iran. J. Microbiol .,3(3):114-120.

- **Hedayati, M. T.; Pasqualotto, A. C.;Warn, P. A.; Bowyer, P. & Denning, D. W. (2007).** *Aspergillus flavus* : human pathogen, allergen and mycotoxin producer . Microbiol., 153: 1677-1692.

- **Hettiarachchi, G. H. C. M. ; Gooneratne, J. & Hirimburegama, W. K. (2001) .** Effect of initial moisture content and relative humidity 0n the accumulation of aflatoxin in maize grains (*Zea mays*) during storage . J. Natn. Sci. 29 (1 -2): 29 – 34 .

- **Holmquist, G. U. ; Walker, H. W. & Stahr, H. M. (1983) .** Influence of temperature, PH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* . J. food Sci., 48 (3) : 778 – 782 , **(Abstract).**

- **Horn, B. W. & Wicklow, D. T. (1983) .** Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger* . Can. J. Microbiol., 29: 1087-1091.

- **Hua, S. S. T. ; Grosjean, O. K. & Baker, J. L. (1999) .** Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds . Letters Appl. Microbiol. , 29:289–291.

- Hugo, W. B. & Russell, A. D. (1998) . Pharmaceutical Microbiology. 6 Th edt., Marston book services LTd :510 pp.

- Ireson, C. R, ;Jones, D. J. L. ; Orr, S. ;Coughtrie, M. W. H. ;Boocock, D. J. ;Williams, M. L. ;Farmer, P. B. ;Steward, W. P. & Gescher, A. J. (2002) . Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine . Cancer Epidemiol. , 11 : 105 – 111**.**

-Jacobsen, B . J . ;Bowen, K . L . ;Shelpy, R . A . & Diener,U. L. (1993) . Mycotoxin and mycotoxicoses. Albama Cooperatrive Extention System . Circular ANR – 767 **.**

- Jeamjitt, O. ;Manoch, L. & Visarathanonth, N. (2006) . Diversity and distribution of hyphomycetes from dung in Thailand . Kasetsart J. Nat. Sci., 40 :890-901.

-Jernejc, K. & Cimerman, A. (2001) . Morphological Characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus species* . Food Technol. Biotechnol., 39 (4) 333–340.

-Johnsson, P. ; Lindblad, M. ; Thim, A. M. ; Jonsson, N. ; Vargas, N. L.; Medeiros, E. A. ; Brabet, C. ; de Araújo4, M. Q. & Olsen, M .(2008) . Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nut . World Mycotoxin J. 1(2) : 127 – 137 . **(Abstract)** .

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

- **Kamil, O. M. & Lupuliasa, D . (2011).** Modern aspects regarding the microbial spoilage of pharmaceutical products . Farmacia ., 59 (2) : 133 – 146 .

- **Kendrick, B. (1986) .** Biology of toxigenic anamorphs . Pur . Appl. Chem., 58 (2):211-218.

- **Kerem, Z. ; German-Shashoua, H. & Yarden, O. (2005).** Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L) . J. Sci. Food Agric., 85:406–412.

- **Khanafari, A. ; Soudi, H. & Miraboulfathi, M. (2007) .** Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B_1 production in corn . Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., 4(3): 163 – 168.

- **Koh, H. & Tseng, T. (1975).** Isolation and identification of an aflatoxin-production strain of *Aspergillus flavus* group from stored rice . Bot. Bull. Academia Sinica., 16:155-125.

- **Korikanthimath, V. S. (2001) .** Cardamom (small) **: in Peter, K. V. (2001) .** Handbook of Herbs and Spices. 1st volume ., Woodhead Publishing Ltd : 326 pp .

- **Korukluoglu, M. & Yigit, A. (2007) .** The effect of potassium sorbate, Nacl and PH on the growth of food spoilage fungi . Annals. Microbiol., 57(2):209-215.

- **Krishna Kishore, G. ; Pande, S. ; Manjula, K. ; Narayana Rao, J. & Thomas, D. (2002) .** Occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds in Andhra Pradesh, India . Plant Pathol. J., 18(4) : 204-209.

- **Kulevanova, S. & Panovska, T. K. (2001) .** Antioxidant activity of essential oils of different wild *Thymus* L. Species . Bull. Chem. Technol. Macedonia , 20(1): 61-66 .

-**Lawlor, P. G. & Lynch, P. B. (2001).** Mycotoxin in pig feeds 1:source of toxins,prevention and management of mycotoxicosis. peer reviewed. ,54(3);117-120.

- **Lwasa , S & Bwowe, E . (2007) .** Exploring the economic potential of cardamom (*Elettaria cardamomum*) as alternative and promising income source for Uganda's smallholder farmers . Afr. Crop Sci. Soci., 8:1317 – 1321.

- **Madhusoodanan, K.J. ; Pradip Kumar, K. & Ravindran, P.N.(2002).** Botany, Crop Improvement and Biotechnology of Cardamom : **: in Ravindran, P.N. & Madhusoodanan, K.J.(200٢).**Cardamon:The Geneus *Elattaria* ., 30th Volume . Taylor & Francis Inc . : 368 pp.

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

- **Magan, N. & Lacey, J. (1988) .** Ecological determinants of mould growth in stored grian . Int. J. Food Microbiol. 7: 245-256.

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

- **Méndez-Alboresa, A. ; Veles-Medinab, J. ;Urbina-Álvarezb, E. ;Martínez-Bustos, F. & Moreno-Martíneza, E. (2008) .** Effect of citric acid on aflatoxin degradation and on functional and textural properties of extruded sorghum . Anim. Feed Sci. Technol. , 14 pp.

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

- **Nawar, L. S. (2008) .** prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia . Saudi J. Biolo. Sci., 15 (1): 105-112 .

- **Nelson, M. R.; Bigelow, R. D. M.;Cotty, P. J. & Orum, T. V. (1998).** Regional recurring patterns of S and L strains of *Aspergillus flavus*. National Cotton Council,Memphis TN., 1:163-163.

- **Norton, R. A. (1997) .** Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus* . Phytopathol., 87 (8) : 814 – 821 .

- **Olama, Z. A. & Sabry, S. A. (1989) .** Extracellular amylase synthesis by *Aspergillus flavus* and *Penicillium purpurescence* . J. Islamic Academy Sci. 2 (4) :272-276 .

- **Olowokudejo, J. D. ;Kadiri, A. B. & Travih, V.A. (2008) .** An Ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in lagos state of Nigeria . Ethnobotanical Leaflets., 12: 851-65 .

- **Payne, G. A. & Brown, M. P. (1998) .** Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis . Annu. Rev. Phytopathol., 36:329-62.

- **Peter, K. V. & Nirmal - Babu, K .(2004) .** Introduction: **in Peter, K. V. (2004)**. Handbook of Herbs and Spices . 2nd Volume ., Woodhead Publishing Ltd : 365 pp.

- **Pitt, J. I. (1994) .** The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health . J. Med. Vet. Mycol., 32(1):17-32.

- **Purcell, S. L. ;Phillips, D. J. & Mackey, B. E. (1980) .** Distribution of *Aspergillus flavus* and other fungi in several almond – growing areas California . phytopathol. , 70: 926 – 929.

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

- **Quiles, J. L. ;Mesa, M. D. ;Ramírez-Tortosa, C. L. ;Aguilera, C. M. ;Battino, M. ;Gil, A. & Ramírez-Tortosa, M. C. (2002) .** *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits . Arterioscler Thromb Vasc Biol., 22:1225-1231.

- **Rahimi, P. ; Sharifnabi, B. & Bahar, M. (2008).** Detection of aflatoxin in *Aspergillus* species isolated from Pistachio in Iran . J. Phytopathol., 156 :15–20 **.**

- **Rajasinghe, M. ;Abeywickrama, K. & Jayasekera, R. (2009) .** Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxin formation in selected spices during storage . Trop. Agr. Res. Ext., 12(1):1- 6 .

- **Ravindran, P. N.(2002) .** Intoduction **: in Ravindran, P.N. & Madhusoodanan, K.J.(200٢)**.Cardamon:The Geneus *Elattaria* ., 30th Volume . Taylor & Francis Inc . : 368 pp.

- **Reddy, K.R.N. ; Raghavender, C.R. ;Reddy, B.N. & Salleh, B. (2010).** Biological control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B_1 production in sorghum grains . Afr. J. Biotechnol. , 9 (27) : 4247-4250 .

- **Reddy,V. K ; Srinivas, M. ; Reddy, A. R. ; Srujana, G. ; Surekha, M. & Reddy, S. M. (2011) .** Plant extracts in the management of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* . Intern. J. Pharma . Bio. Sci., 2(2) :492 – 498 .

- **Safara, M. ;Zaini, F. ;Hashemi, S. J. ;Mahmoudi, M. ;Khosravi, A. R. & Shojai-Aliabadi, F. (2010) .** Aflatoxin detoxification in rice using citric acid . Iranian. J. Publ. Health., 39(2):24-29.

- **Sasikumar, B. (2001) .** Turmeric **: in Peter, K. V. (2001) .** Handbook of Herbs and Spices**.** 1st volume ., Woodhead Publishing Ltd : 326 pp .

- **Scherm, B. ; Palomba, M. ; Serra, D. ; Marcello, A. & Migheli, Q. (2005) .** Detection of transcripts of the aflatoxin genes af lD, af lO, and af lP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* . Int. J. Food Microbiol. 98: 201 – 210 .

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

- **Shehata, S.A.; El-Melegy, K.M. & Ebrahim M.S. (2009) .** Toxicity reduction of aflatoxin B_1 by vitamin C in Fish . J. Arab. Aquaculture Soc. 4 (2) : 73 – 86 .

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

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

- **Somchit, M.N. ;Sulaiman, M.R. ;Noratunlina, R. & Ahmad Z. (2002) .** Hepatoprotective effects of *Curcuma longa* rhizomes in paracetamol-induced liver damage in rates . Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia ., 1: 698-702 .

- **Stahl-Biskup, E. & Venskutonis, R. P. (2004) .** Thyme **: in Peter, K. V. (2004).** Handbook of Herbs and Spices. 2nd Volume ., Woodhead Publishing Ltd : 365 pp.

- **Stanojevic, D. ; Comic, L. ; Stefanovic, O. & Solujic-Sukdolak, S. (2009).** Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro . Bulgarian J. Agr. Sci., 15(4): 307-311 .

-**Sudhakar, 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 methyleugenol . K. Ind. J. Exp. Biol. ,47:63-67.

- **Sung-eun, L. ; Mahoney, N. E. & Campbell, B. C. (2002) .** Inhibition of aflatoxin B_1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. J. Microbiol. Biotechnol., 12 (4) :679 – 682 .

- **Suzuki, T. ;Noro, T. ;Kawamura, Y. ;Fukunaga, K. :Watanabe, M. ;Ohta, M. ;Sugiue, H. ;Sato, Y. ;Kohno, M. & Hotta, K. (2002) .** Decontamination of aflatoxin-forming fungus and elimination of aflatoxin mutagenicity with electrolyzed Nacl anode solution . J. Agric. Food chem., 50: 633-641.

- **Teunisson, D. J. & Robertson, J. A. (1967) .** Degradation of Pure Aflatoxins by *Tetrahymena pyriformis*. Appl. Microbiology. , 15(2) : 1099 -1103 .

- **Thenmozhi, M. & Kannabiran, K. (2010) .** Studies on isolation, classification and phylogenetic characterization of novel antifungal *Streptomyces sp*. VITSTK7 in India . Curr. Res. J. Biol. Sci., 2(5): 306-312 .

-**Trenk, H. L. & Hartman, P.A. (1970).** Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. Appl. microbiol. ,19(5)781-784.

-**Tucker, G. & Featherstone, S. (2011).** Essentials of Thermal Processing . 1st edn., Blackwell : 28 pp (Chapter 1).

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

-**Vasudevan, D. M. & Sreekumari, S. (2004).** Text Book Biochemistry . 4th edn. , Jaypee Brothers : 896 pp.

-Verma, R. J.;Nair, A. and Mathuria, N. (2008) . Vitamin E ameliorates aflatoxin-induced alterations in the epididymis of mice . Acta poloniae pharmaceutica-drug research. ,65(3):331-337.

- Verma, S. K. ;Jain, V. & Katewa, S. S. (2009) . Blood pressure lowering , fibrinolysis enhancing and antioxidant activities of cardamomum (*Elettaria cardamomum*). Ind. J. Biochemistry & Biophysics ., 46 : 503 – 506.

- Verman, R. J. (2004). Aflatoxin cause DNA damage . Int. J. Hum. Genet., 4(4):231-236.

- Webster, J. & Weber, R. W. S. (2007). Introduction to Fungi . 3th ., Cambridge University Press : 841 pp .

- Whitlow, L. W. & Yr, W. M. H. (2005). Mycotoxins in dairy cattle:Occurrence, toxicity, prevention and treatment . proc. Southwest nutr. Conf .,124-138.

- WHO (World Health Organization) . (1999) . Monographs on Selected Medicial Plants **.** 1ST volume ., WHO Library Cataloguing in Publication Data : 289 pp.

- Wild, C. P. & Montesano, R. (2009) . A model of interaction: Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention . Cancer Letters., 286 :22–28.

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

- **Yigit, A. & Korukluoglu, M. (2007) .** The effect of potassium sorbate , NaCl and PH on the growth of food spoilage fungi . Annals Microbiol., 57 (2): 209-215.

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

- **Yu, J. ;Bhatnagar, K. & Ehrlich, K. C. (2002).** Aflatoxin biosynthesis. Rev. Iberoam. Micol., 19:191:200.

- **Yu, J. ;Chang, P. ;Ehrlich, K. C. ;Cary, J. W. ;Bhatanagar, D. ;Cleveland, T. E. ;Payne, G. A. ;Linz, J. E. ;Woloshuk, C. P. & Bennett, J. W. (2004).** Cluster pathway gene in aflatoxin biosynthesis . Appl. Environ. Microbiol. 70(3):1253-1262.

- **Yu, J. ;Cleveland, T. E. ;Nierman, W. C. & Bennett, J. W. (2005).** *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health,food safety, and crop resistance to diseases . Rev. Lberoam. Micol.,22:194-202.

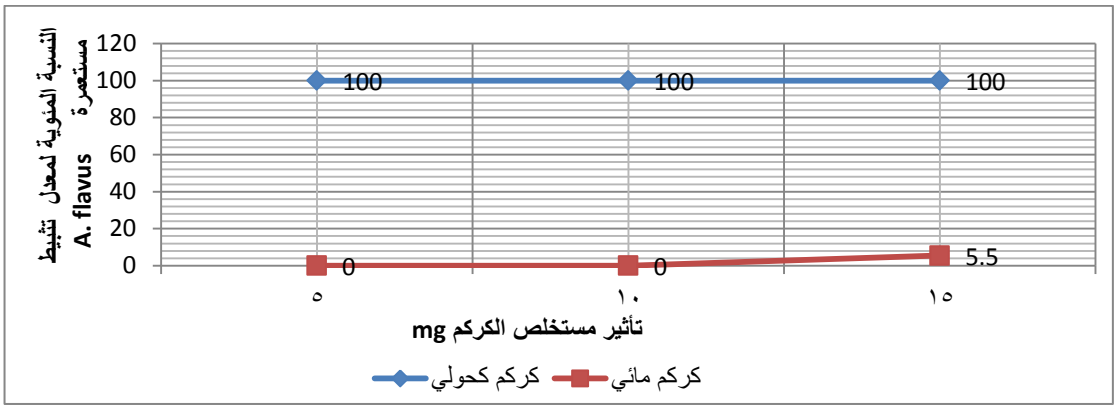
- **yulia, E ;shipton, W. A. & Coventry, R. J. (2006) .** Activity of some plant oils and extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* . plant Pathol. J. , 5 (2) : 253 – 257 .

-Zachariah, T. J. (2002) Chemistry of Cardamom**.: in Ravindran, P.N. & Madhusoodanan, K. J.(200٢).**Cardamon:The Geneus *Elattaria* ., 30th Volume . Taylor & Francis Inc . : 368 pp.

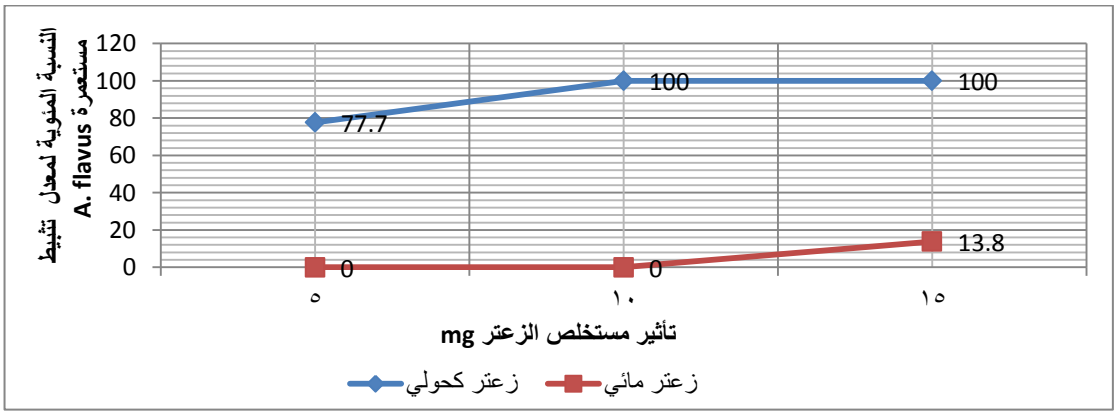
الملاحق

الملاحق

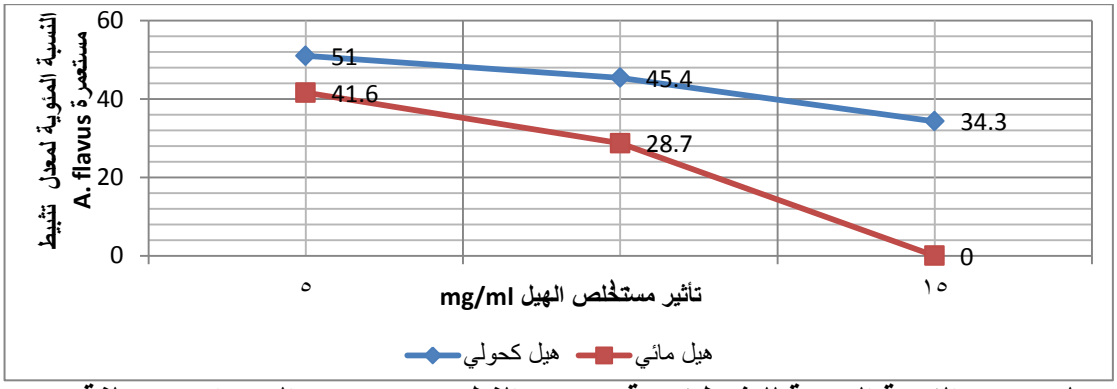
APPURTENANCE



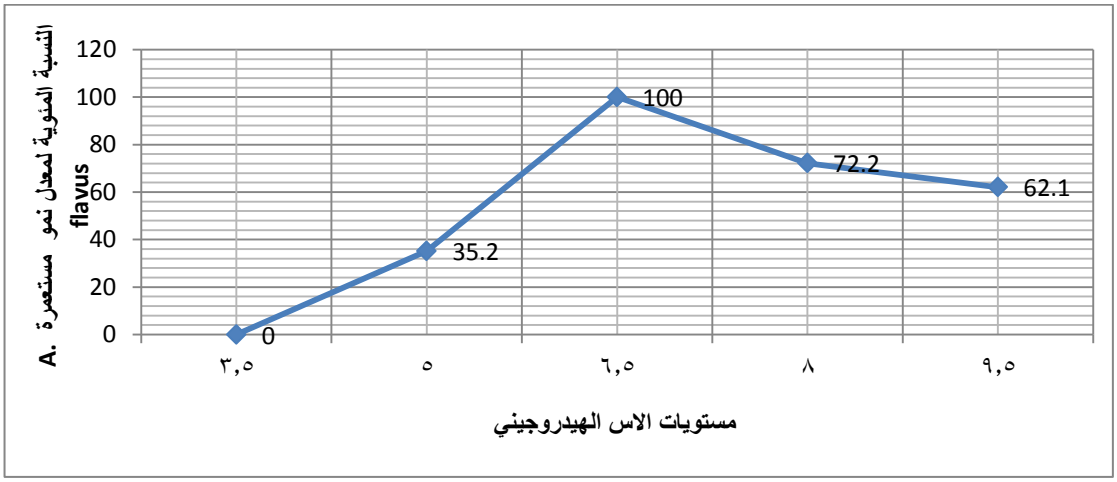
ملحق (١) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الكركم على وسط PDA .



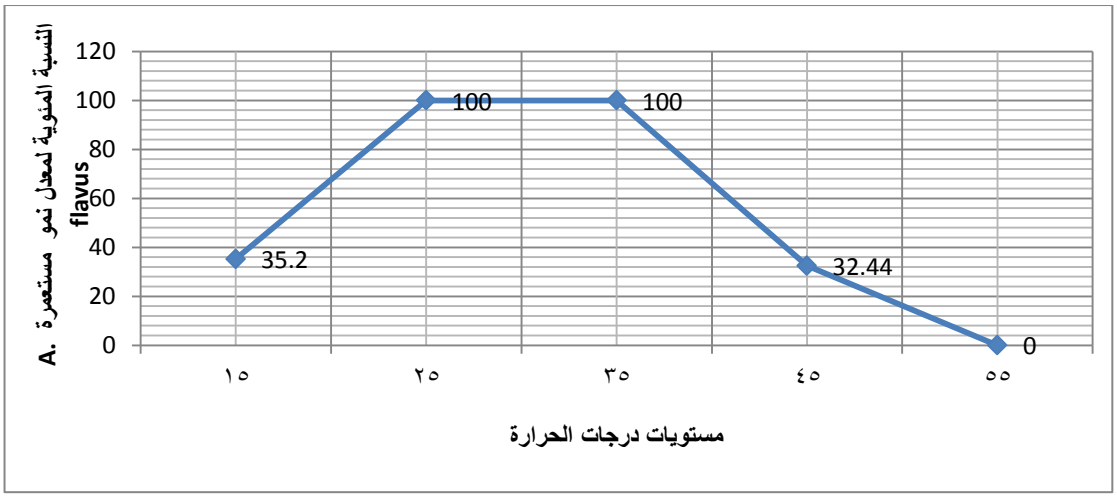
ملحق (٢) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الزعتر على وسط PDA .



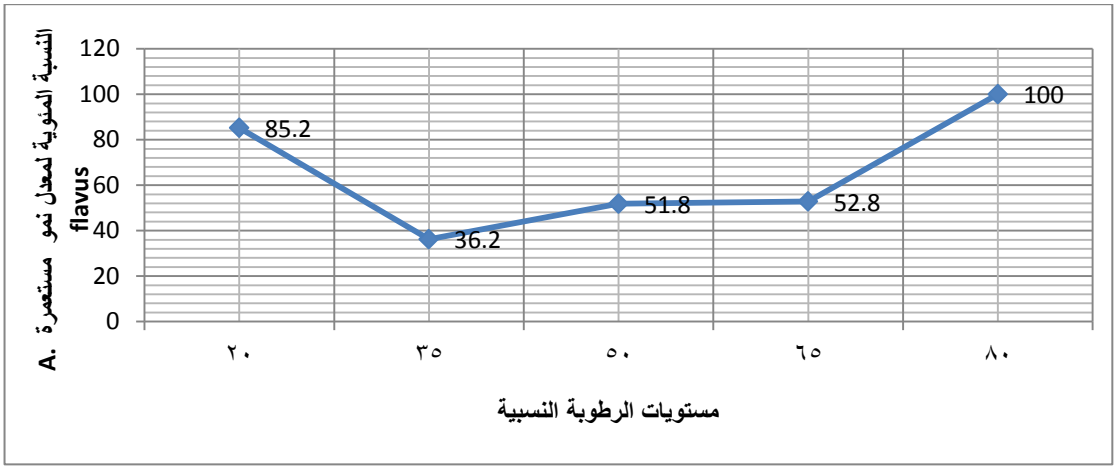
ملحق (٣) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الهيل على وسط PDA .



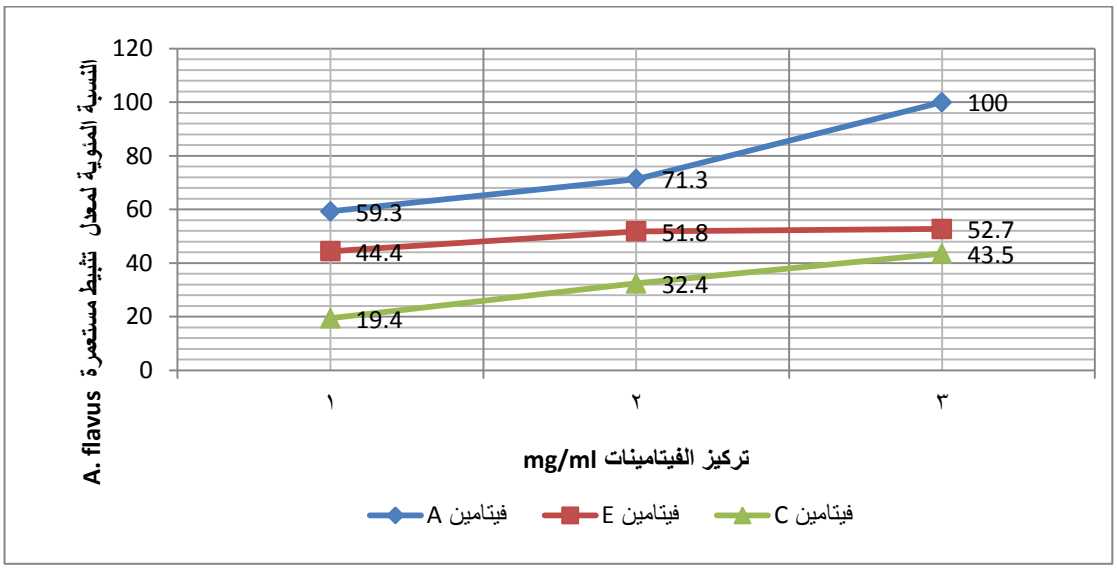
ملحق (٤) تأثير الأس الهيدروجيني على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA.



ملحق (٥) تأثير درجات الحرارة على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA



ملحق (٦) تأثير الرطوبة النسبية على معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA



ملحق (٧) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من فيتامين A وE وC على وسط PDA .

جدول (٤) العدد الكلي للفطريات المعزولة من المواد الغذائية قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	العدد الكلي	عدد الفطريات المعزولة من عينات الدراسة					
		الحنطة	ذرة صفراء	فستق حقل	فستق حلبي	حب قرع العسلي	زهرة الشمس
A . alternata	٢٣	٢	7	١	٥	٥	٣
A.flavus	٩٩	٥	١٧	٢٤	١٤	٢٠	١٩
A . niger	٧٠	١٠	١٤	١٤	٧	٢٠	٥
A . terreus	٢٢	٩	-	-	٤	٣	٦
C.cladosporioides	٦٦	٥	١٤	١١	٥	١٦	١٥
F . oxsyporum	٣٤	٤	٢٢	٥	١	-	٢
P.digitatum	٥٣	١	7	٨	١٤	٨	١٥
P.spinulosum	٦٦	٩	١٣	١٢	٦	١٦	١٠
***Penicillium* sp**	٥٢	١	4	٢٠	١٠	٨	٩
***Rhizopus* sp**	٦٢	٨	25	١	٨	١٤	٦
المجموع الكلي	٥٤٧	٥٤	١٢٣	٩٦	٧٤	١١٠	٩٠

جدول (٥) النسب المئوية لتردد الفطريات المعزولة من المواد الغذائية قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	النسبة المئوية الكلية للتردد %	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من عينات الدراسة					
		الحنطة %	ذرة صفراء %	فستق حقل %	فستق حلبي %	حب قرع العسلي %	زهرة الشمس %
A . alternata	4.3	٣,٧	٥,٧	١,١	٦,٧	٤,٦	٣,٣
A.flavus	١٨,١	٩,٣	١٤,٠	٢٥,٠	١٩,٠	١٨,٢	٢١,١
A . niger	12.8	١٨,٥	١١,٥	١٤,٦	٩,٥	١٨,٢	٥,٦
A . terreus	٤,٢	١٦,٧	-	-	٥,٥	٢,٧	٦,٧
C.cladosporioides	١٢,٠	٩,٣	١١,٤	١١,٥	٦,٧	١٤,٥	١٦,٧
F . oxysporum	٦,٢	٧,٤	١٧,٩	٥,٢	١,٣	-	٢,٢
P.digitatum	9.6	١,٨	٥,٧	٨,٢	١٩,٠	٧,٣	١٦,٦
P.spinulosum	12.0	١٦,٧	١٠,٥	١٢,٥	٨,٠	١٤,٥	١١,١
***Penicillium* sp**	9.5	١,٨	٣,٢	٢٠,٨	١٣,٥	٧,٣	١٠,٠

***Rhizopus* sp**	11.3	١٤,٨	٢٠,٣	١,١	١٠,٨	١٢,٧	٦,٧

جدول (٦) النسب المئوية لظهور الفطريات المعزولة من المواد الغذائية قيد الدراسة .

المواد الغذائية / الفطريات	عدد العينات التي ظهر فيها الفطر	النسبة المئوية الكلية للظهور%	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من عينات الدراسة					
			الحنطة %	ذرة صفراء %	فستق حقل %	فستق حلبي %	حب قرع العسلي %	زهرة الشمس %
A . alternata	٧	٣٨,٨	٣٣,٣	٣٣,٣	٣٣,٣	33.3	66.6	33.3
A.flavus	٦	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3	33.3
A . niger	١٠	٥٥,٥	33.3	٦٦,٦	٣٣,٣	66.6	66.6	66.6
A . terreus	٥	٢٧,٧	33.3	-	-	66.6	33.3	33.3
C.cladosporioides	١٢	٦٦,٦	٦٦,٦	٦٦,٦	٦٦,٦	66.6	66.6	66.6
F . oxysporum	١٠	٥٥,٥	100	100	66.6	33.3	-	33.3
P.digitatum	١٣	٧٢,٢	33.3	66.6	١٠٠	66.6	١٠٠	66.6

66.6	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٩٤,٤	١٧	***P.spinulosum***
١٠٠	66.6	66.6	١٠٠	66.6	33.3	٧٢,٢	١٣	***Penicillium* sp**
66.6	66.6	33.3	٣٣,٣	66.6	100	٦١,١	١١	***Rhizopus* sp**

SUMMARY

Laboratory experiments were carried out in the postgraduate laboratories, Biology Department – College of Education for sheer sciences / Kerbala University . The study aimed to determine contamination extent of some foodstuff like Wheat *Triticum aestivum* , Corn *Zea mays* , Groundnut *Arachis hypogaea* , pistachio *Pistacia vera* , honey pumpkin grain *Cucurbita moschata* and sunflower grain *Helianthus annus* with fungi, particularly *Aspergillus flavus* and the collections of the General Company for Grain Trade / Branch of Karbala, Al-Dehan market , the wholesale and local markets . also determination of isolates fungus *A. flavus* has been done which obtained from this study in the production of aflatoxin B_1 and B_2. as well as Studying the viability extracts of plant; aqueous and alcohol the dried for plants turmeric *Curcuma longa* , thyme *Thymus vulgaris* and cardamom *Elettaria cardamomum ,* and the vitamins A , E and C for trend fungus *A. flavus* and production aflatoxin B_1 and B_2 isolated from these materials . The Study aimed to assess the effect of some environmental factors such as temperature, pH and relative humidity trend *A. flavus* and production of aflatoxin.

The results showed in found 547 fungal isolated included *Alternaria alternata* , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* , *Cladosporium cladosporioides* ,*Fusarium oxysporum* ,*Penicillium digitatum* , *Penicillium spinulosum* , *Penicillium* spp and *Rhizopus* spp that more contaminated sites with fungal was Al-Dehan market with 216 isolate , and the wholesale market has the second highest location in contamination with 155 isolate, while the local market recorded 122 isolate, grain stores came in last level among the sites with 54 isolate. These crops were

not different in their content from genera and species , but they differed in quantity, where the corn reached the highest contamination of fungi with 123 isolate , the wheat had the lowest percentage of the wholesale number 54 isolates , while honey pumpkin grain recorded the second largest proportion reached to 110 isolate, followed groundnut, sunflower grain and pistachio which recorded 96, 90 and 74 isolate, respectively. The first fungus *A. flavus* that Recorded 99 isolate at a percentage of 18.1% , while other fungi recorded lower rates.

also showed 18 isolations of the fungus *A. flavus* isolates only 11 can produce aflatoxin B_1 and B_2 at a rate of 61.2%, while 7 with 38.8% non-produced aflatoxin B_1 and B_2.

Plant extracts had been used at concentrations 5, 10 and 15 mg / ml to study its impact on the growth of fungus *A.flavus* in PDA containing these extracts, so found the extracted alcohol of turmeric, thyme inhibit mold growth completely at all concentrations, except the concentration 5 mg / ml of alcohol extract of thyme, and alcoholic extracts of plants superior to the aqueous extract in inhibiting the growth of fungus, extracts inhibitory caused preventing the formation of spores as it appeared in a small white isolate.

The fungus study with concentration 5, 10 and 15 mg / ml of alcoholic extract of turmeric and aqueous of thyme showed the disappearance of aflatoxin B_1 and B_2. as well as the results showed that the treatment of fungus concentration of 15 and 10 mg / ml of aqueous extract of turmeric and alcohol of thyme does not appear aflatoxin B_1 and B_2 , while the concentration 5 mg / ml showed the presence of aflatoxin B_1 for both extracts. The aqueous extract and alcohol of the cardamom prevented the appearance of aflatoxin B_1

and B_2 at a concentration of 15 mg / ml, and concentration 10 mg / ml showed aflatoxin B_1 , while the aflatoxin B_1 and B_2 appeared at in concentration of 5 mg / ml of the aqueous extract and the type B_1 of alcohol extract appeared with the same concentration.

Results showed with the use of several chemicals reagents as effective plant extracts contained many of the active compounds as preservatives, thyme alcohol extract contains all compounds that were previously detected except saponins , while the aqueous extract of thyme did not contain saponins , resins and flavonoids , while aqueous and alcohol extraction of the cardamom did not contain resins , flavonoids , phenols , fuocoumarins and triterpenoids , as well as the absence of alkaloids in the alcohol extract to the cardamom and saponins in the aqueous extract of the cardamom , and contained extract alcohol of turmeric on glycosides , resins, carbohydrates, phenols, and the disappearance of the alkaloids and tannins, resins and flavonoids and fuocoumarins and triterpenoids in the aqueous extract of turmeric .

Concerning the vitamins, they were used in concentrations 1, 2 and 3 mg / ml to study their impact on the growth of fungus *A.flavus* in PDA containing these vitamins. vitamin A showed an on impaction the other vitamins in the impact of inhibitory of growth of fungus *A. flavus* , the lowest growth of the fungus it was 3.05 cm .vitamin E came in the second rank among the vitamins in the impact of inhibitory as it gave the growth rate of 4.52 cm , then vitamin C came in the last rank , which gave a growth rate of 5.48 cm. It was found that the increase concentrations of any type of vitamins increases the inhibition of fungus as the focus of 3 mg / ml of vitamin A inhibit fungus growth by 100% , while the other concentrations of vitamin A

and other vitamins inhibited the growth of fungus, but to a lesser extent . Vitamin E exceeded the rest of the vitamins as it inhibited the production of aflatoxin B_2 at all concentrations, while vitamin A inhibited the production of aflatoxin B_2 at a concentration of 3 and 2 mg / ml , and vitamin C came in the last rank, as it inhibited the production of aflatoxin B_2 at a concentration of 3 mg / ml .

Results showed that, the rate of growth of fungus *A. flavus* was 4.83 cm at different temperatures, and 4.89 cm at different levels of pH and 5.88 cm at different levels of relative humidity . The temperature 55°C at the pH was equal to 6.5 and pH 3.5 at a temperature of 25°C gave 100% of the inhibition of the fungus , while other levels of the three factors gave different rates of growth to the fungus. Aflatoxin B_1 and B_2 disappeared at the treatment of fungus at the temperature 35 °C and 55 °C , while aflatoxin B_2 disappeared at temperature 25°C and 45°C , but both types of aflatoxin appeared at temperature 15°C . Concerning pH , aflatoxin B_1 and B_2 appeared at pH ranged 9.5 to 6.5 , but at the level of pH 3.5 both types of aflatoxin disappeared , when pH was equal to 5 , type B_1 appeared with the temperature at all levels of 25 °C . Concerning relative humidity, aflatoxin B_1 appeared at RH equal to 20, 65 and 80, while both types disappeared at the level of RH equal to 50, but at the level of RH equal to 35, only type B_2 appeared .

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

INVESTGATION OF SOME PRODUCTED AFLATOXIN-PRODUCTION FUNGI IN SOME FOODSTUFF AND DECREASING ATTEMPT OF ITS DAMAGE BY USAGE SOME PLANT EXTRACTS AND VITAMINS

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

AQEEL ABD NEAMA
(B. Sc. karbala / 2009)

Supervised By
Assist. Prof. Dr. B. T. Mohammad

September 2011