جامعة كربلاء
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

التحري عن بعض الفطريات المنتجة للسموم والمرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة والمستخدمة كمواد أولية في تصنيع عليقة الأسماك

رسالة مقدمة الى مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة / وقاية النبات

من قبل
حسين كامل غفوري

بإشراف
أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

2024 م 1446 هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

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

"صدق الله العلي العظيم"

سورة المجادلة (آية 11)

الأهداء

الى روح من تمنتها لي ذات يوم ورحلت . .

ها أنا أحقق أمنيتها

[أمي] فقيدة قلبي

جعلها الله صدقة جارية لروحك الطاهرة

رحمك الله بواسع رحمته

حسين

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الخلق وسيد المرسلين سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم وعلى آل بيته الأطهار عليهم السلام. انطلاقا من قوله تعالى (ومن يشكر فإنما يشكر لنفسه) فأني أسجد لله تعالى شاكراً لجلاله وعظمته على ما امدني به من نعمة الصبر على ما صادفني من صعاب في انجاز هذا العمل المتواضع.

ولايسعني إيمانا لفضل الاعتراف بالجميل وتقديم الشكر والامتنان لأصحاب الفضل والمعروف فأني أتقدم بجزيل الشكر والتقدير والعرفان إلى استاذي ومعلمي ومشرفي أ.د ياسر ناصر حسين الحميري الذي أمدني بالكثير من علمه ووقوفه أزائي فلم أشعر يوما انني تلميذه فقط انما شعرت بأنني أبن أو أخ له حفظه الله.

وقبل الشكر نفسه أشكر روح أمي الغائبة الحاضرة معي بكل خطوات عملي من تمنتها لي ذات يوم وها أنا احقق امنيتها [امي] فقيدتي رحمك الله بواسع رحمته . كما اشكر أبي الحبيب أطال الله عمره.

والشكر موصول الى عمادة كلية الزراعة واخص بالشكر قسم وقاية النبات المتمثل برئيس القسم أ.م.د. علي عبد الحسين كريم و إلى اساتذتي جميعاً ممن وقفوا معي بتسهيل عمل أو نصيحه او سؤال فهم حقا نعم المعلم والناصح والداعم كما اخص بجزيل الشكر والتقدير والاحترام الاساتيذ الافاضل المحترمين أ.د عقيل نزال بربر وأ.د. رجاء غازي عبد المحسن الذين لم يبخلوا بتقديم المساعدة وكانوا داعمين دائمين لي

ويطيب لي أن اشكر الداعم الأول بحياتي التي لا يفيها شكر ولا كلمات صديقتي ورفيقة دربي وزوجتي الحبيبة م. م زهراء جواد كاظم المفرجي التي لولا اصرارها لم أحقق ما تمنته لي امي وتحملها وصبرها لما كنت ما انا عليه اليوم كما أشكر أخوتي واخو اتي سندي حفظهم الله لي .

وختامها مسك بالشكر والتقدير والحب لأصدقائي وزملاء دراستي المحترمين أخوة وأخوات دمتم بحفظ الله.

حسين

اقرار المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة (التحري عن بعض الفطريات المنتجة للسموم والمرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة والمستخدمة كمواد اولية في تصنيع عليقة الاسماك) التي قدمها الطالب (حسين كامل غفوري) قد تم اعدادها بإشرافي في قسم وقاية النبات /كلية الزراعة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة / وقاية النبات.

التوقيع :

الاسم : أ. د. ياسر ناصر حسين الحميري

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية الزراعة

توصية رئيس القسم

بناءًا على توصية الاستاذ المشرف ، ارشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. علي عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة والموسومة (التحري عن بعض الفطريات المنتجة للسموم والمرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة والمستخدمة كمواد اولية في تصنيع عليقة الاسماك) التي قدمها الطالب (حسين كامل غفوري) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير علوم في الزراعة/ وقاية النبات

رئيس اللجنة

أ.د. رجاء غازي عبد المحسن

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً

أ.د. عبد الزهرة جبار علي

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً

أ.م.د. علي فرج جبير

كلية الزراعة / جامعة المثنى

عضواً (المشرف)

أ.د. ياسر ناصر حسين الحميري

كلية الزراعة / جامعة كربلاء

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

الدكتور

أ.د. صباح غازي شريف

عميد كلية الزراعة وكالة/ جامعة كربلاء

الخلاصة:

أجريت الدراسة للتحري عن مدى تلوث حبوب المحاصيل المخزونة المستخدمة كمكونات أساسية لعليقة الأسماك, بالفطريات الخطيرة التي تمتلك المقدرة على انتاج السموم الفطرية الافلاتوكسينB1 والاوكراتوكسينA , والكشف عن تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي على انتاجهما, وتقييم تأثير مستويات التلوث بالافلاتوكسينB1 والاوكراتوكسينA على تربية وصحة الأسماك في العراق. بينت نتائج المسح تلوث جميع العينات المدروسة من حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وعليقة الأسماك المحلية والمستوردة المجموعة من أربع محافظات بغداد و كربلاء وبابل والانباربعزلات فطرية مختلفة كان اهمها *Aspergillus flavus* , *Aspergillus.niger* ، *Penicillium sp* ، *Aspergillus* sp. ، *Cladosporium* ,*Alternaria* sp ، *Fusarium* sp ، *Mucor* sp، *Rhizoctonia* sp ، *Rhizopus* sp *Cylindrocarpon* و *Trichoderma* sp وتركزت عملية العزل على التنوع الاحيائي لعزلات الفطر *Aspergillus spp* .

إذ تم عزل وتشخيص 1400 عزلة فطرية تعود للفطر *A. niger* والتي كانت الأكثر تواجدًا وترددا تلاه عزلات النوع *A. flavus* اذ بلغت 802 عزلة فطرية من بين الفطريات المعزولة. بينما سجلت النسبة المئوية لظهور الفطريات وترددها كان أكثرها ظهوراً هو الفطر*A.niger* اذ بلغت وبمعدل 91.67 % وتردد 30.93 % ضمن العينات المجموعة تلاه الفطر *A.flavus* بمعدل نسبة ظهور 89.58 % وتردد بنسبة 16.88 % .

أثبتت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC قدرة جميع العزلات الفطرية التسعة المختبرة من الفطر *A. niger* على أنتاج سم الاوكراتوكسين بنسب متفاوتة، تصدرت عزلات *A. niger K1* أعلى تراكيز الانتاج بلغت 80.90 مايكروغرام/كغم للعزلة ANK1 في حين كانت أدنى مستويات الإنتاج للعزلة ANA1 بتركيز35.9 مايكروغرام/كغم المعزولة من عليقة الأسماك المحلية بالوقت نفسه اثبت قدرة جميع العزلات الفطرية التسعة المختبرة من الفطر *A. flavus* على أنتاج سم الافلاتوكسين بنسب متفاوتة , تصدرت العزلة *A. flavus K2*. أعلى تراكيز الانتاج بلغت 226.9 مايكروغرام/كغم للعزلة AFK2 في حين كانت أدنى مستويات الإنتاج للعزلة AFB2 بتركيز 134.9 مايكروغرام/كغم المعزولة من عليقة الأسماك المحلية.

بين التحليل الكروموتوكرافي للكشف عن التلوث بالاوكراتوكسين A خلو خمسة عينات من اصل تسعة من التلوث بالسم الفطري الاوكراتوكسين وهي عينات الانبار المحلية A1F و A2F وعينات بابل المحلية H1F و H2F وعينة بابل المستوردة (H1FF)) في حين أظهرت أربع عينات ملوثة بالاوكراتوكسين وبنسب متباينة مع تسجيل أعلى نسبة تلوث للأوكراتوكسين A يصل إلى 6.90 ميكروغرام/كغم للعينة K1F ، تليها B2F و K2F و B1F بتراكيز 6.20 و 5.70 و 5.50 ميكروغرام /كغم على التوالي بينما تم الكشف عن تلوث العينات بالسم الفطري الافلاتوكسين B1 , بان جميع العينات كانت ملوثة باالافلاتوكسين بنسبة 100% وبتراكيز متباينة مع تسجيل أعلى نسبة تلوث بتركيز يصل إلى 9.33 ميكروغرام/كغم للعينة KF2، تليها العينة KF1 بتركيز 9.25 ميكروغرام/كغم ، بينما سُجل أدنى تركيز 2.65 مايكروغرام/كغم لعينة عليقة الأسماك المستوردة H1FF .

أكدت نتائج تشخيص العزلات المنتجة للسموم الفطرية جزيئيًا , والتي تميزت أولى العزلتين بأعلى انتاج للسميين الفطريين Aflatoxin B1 وOchratoxin A وعزلتين الأقل انتاجا لهما في عينات العليقة السمكية المحلية , تشخيصها تحت انواع فطرية متباينة , فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلات الفطرية بان عزلتين تعود للفطر *A. niger* سجلت تحت رموز الانضمام (OR452868.1 و OR449322.1), وعزلتين تعود للفطر *A. flavus* سجلت تحت رموز الانضمام (OR449323.1 OR449324.1) , حفظت التسلسلات الجينومية ضمن قاعدة البيانات التابعة للمركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center For Biotecnology Information وقورنت مع العزلات المسجلة مسبقا في NCBI.

بينت نتائج التجربة الخزنية تسجيل اعلى مستوى لانتاج السم الفطري الافلاتوكسين خلال أطول فترة خزن والمتمثلة بثلاثة اشهر(تناسب انتاج السم الفطري الافلاتوكسين طرديا مع فترات الخزن) اذ بلغ تركيزه 42.12 و 68.43 و 82.34 ppb ضمن ثلاث مستويات رطوبة 10% و 15% و25% على التوالي .بينما سجل اعلى مستوى لانتاج السم الفطري الاوكراتوكسين خلال أطول فترة خزن والمتمثلة بثلاثة اشهر, اذ بلغ تركيزه 46.32 و 49.42 و 64.67 ppb ضمن ثلاث مستويات رطوبة 10% و 15% و25% على التوالي .

في حين اكدت نتائج تأثير السم الفطري الافلاتوكسين B1 والاوكراتوكسين A على معدلات النمو وعدد هلاك الأسماك في فترات التربية , ارتفاع مستوى هلاك الأسماك والتي بلغت النسبة

المئوية للهلاكات (19.4و10.80%) على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت (3.5%) بالوقت نفسه ارتفاع نسبة الخسائر بالوزن للاسماك اذ سجلت اعلى نسبة فقد بالوزن في فترة 180 يوم بلغت(36.60 و 27.20%), في حين سجلت فترة 120 يوم نسبة فقد بالوزن بلغت 43.5% و 20.20% واقل نسبة للفقد كانت بالفترة 60 يوم الأولى التي بلغت (22.4 و 13.70%) مقارنة بمعاملة السيطرة (0.00%). وبينت نتائج مكونات الدم الفسلجية تأثيرات سلبية مختلفة , بسبب التعرض المستمر للسم الفطري الافلاتوكسين B1 والاوكراتوكسين A بخفض , RBC WBC MCH, HGB وPLT مقارنة بمعاملة السيطرة , بينما تسبب رفعًا معنويا في مستوى HCT عن معاملة السيطرة .

قائمة المحتويات

أولآ: المواضيع

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**مراجعة المصادر**	4
1-2	تلوث حبوب المحاصيل الحقلية بالفطريات	4
2-2	اهم الفطريات المنتجة للسموم الفطرية المصاحبة لحبوب المحاصيل الحقلية	6
3- 2	السموم الفطرية : والسموم الملوثة لحبوب المحاصيل الحقلية ومنتجاتها	8
1-3-2	الافلاتوكسينات (Aflatoxins) في حبوب المحاصيل الحقلية	9
2-3-2	الاوكراتوكسينات (Ochratoxins) في حبوب المحاصيل المخزونة	11
4-2	تربية الأسماك ومشاكل تلوث علائقها بالسموم الفطرية والفطريات المنتجة لها	14
5-2	الظروف البيئية المؤثرة في نشاط الفطريات وانتاج السموم الفطرية	16
6-2	خصائص العلائق السمكية المنتجة من مصادر نباتية ومتطلباتها	17
7-2	تأثيرات السموم الفطرية في تربية وصحة الأسماك	19
1-7-2	تأثيرات السم الفطري الاوكراتوكسينA في تربية وصحة الأسماك	20
2-7-2	تأثيرات السم الفطري الافلاتوكسين B1 في تربية وصحة الأسماك	21
3	**المواد وطرائق العمل Materials and Methods**	23
1-3	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .	23
2-3	تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص وتنمية الفطريات	25
1-2-3	وسط البطاطا سكروز اجار Potato Sucrose Agar (P.S.A) .	26
2-2-3	وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز Potato Dextrose Agar P.D.A.	26
3-2-3	وسط الاكار المائي (W.A) Water Agar .	26
4-2-3	وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B.) .	26
5-2-3	وسط حبوب الذرة البيضاء .	27
3-3	جمع العينات Sample collection	27
4-3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا والعليقة السمكية	29
5-3	حفظ العزلات الفطرية المعزولة	30

6-3	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1 وOchratoxin A	30
1-6-3	تنمية العزلات الفطرية لانتاج السموم الفطرية	30
2-6-3	استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A	32
3-6-3	تنقية المستخلص للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A	32
4-6-3	تجهيز السم القياسي Standard	33
5-6-3	الكشف النوعي والتقدير الكمي للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A بتقانة HPLC للعزلات الفطرية	33
7-3	تحليل السموم الفطرية من Aflatoxin B1 وOchratoxin A في عينات العليقة الحيوانية المجموعة .	34
8-3	التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتجة للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A	34
1-8-3	استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات الفطرية	35
2- 8-3	تضاعف الحامض النووي DNA المستخلص	36
3-8-3	مرحلة الترحيل الكهربائي	36
4-8-3	التشخيص الجزيئي بتحليل التتابعات النيوكلوتيدية للعزلات الفطرية	37
9-3	اختبار تأثير فترات التخزين ومستويات الرطوبة لعليقة الأسماك في حيوية الفطريات وتكاثرها ومقدرتها على انتاج السموم الفطرية	38
10-3	الاختبارات الحيوية لتأثير العليقة الملوثة بالسموم الفطرية على نمو الأسماك .	39
11 -3	التحليل الإحصائي Statics Analysis	40
4	**النتائج والمناقشة**	41
1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة للعينات المجموعة	41
1-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعينات حبوب الحنطة	43
2-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعينات حبوب الشعير	45
3-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء :	47
4-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لفول الصويا :	49
5-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعليقة الأسماك المحلية المجموعة	51
6-1-4	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعليقة الأسماك المستوردة المجموعة	53
7-1-4	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة والمرافقة للعينات المجموعة :	55

8-1-4	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة والمرافقة للعينات المجموعة	56
2-4	الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة	58
3-4	الكشف عن السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A	61
1-3-4	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج Aflatoxin B1 وOchratoxin A	61
2-3-4	الكشف عن السموم الفطرية Aflatoxin B1وOchratoxin A في علائق الأسماك	65
4-4	:تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطر *Aspergillus spp* المعزولة	69
1-4-4	:تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A. niger isolate y.n.174.Khafori* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	70
2-4-4	:تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A. niger isolate y.n.175.Khafori* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	71
3-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	73
4-4-4	تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة (*A.flavus isolate y.n.177 .Khafori*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر	74
9-4	تأثير فترات التخزين ومستويات الرطوبة لعليقة الأسماك في حيوية الفطريات وتكاثرها ومقدرتها على انتاج السموم الفطرية	78
10-4	الاختبارات الحيوية لتأثير العليقة الملوثة بالسموم الفطرية على معدلات نمو وصحة الأسماك	83
11-4	التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسموم الفطرية الافلاتوكسين والاوكراتوكسين على معايير الدم الفسلجية	89
5	**الاستنتاجات والتوصيات**	98
6	**الاستنتاجات**	98
7	**التوصيات**	100
8	**المصادر**	101
9	**المصادر العربية**	101

10	المصادر الأجنبية	103
11	الملاحق	117

ثانياً: قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
1	الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث	23
2	المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة .	24
3	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة .	25
4	مكان وتأريخ جمع العينات من اربعة محافظات من العراق	28
5	ترميز العزلات الفطرية المنماة على وسط الذرة البيضاء للكشف عن قابليتها على انتاج السموم الفطري Aflatoxin B1 وOchratoxin A	31
6	تسلسل القواعد النايتروجينية لبادئ ITS1 /ITS4 المستخدمة في تشخيص الفطريات	36
7	برنامج تضاعف ال DNA الخاص بالفطريات	36
8	الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة	44
9	الفطريات المر افقة لعينات حبوب الشعير	46
10	الفطريات المعزولة من حبوب الذرة الصفراء	48
11	الفطريات المعزولة من حبوب فول الصويا	50
12	الفطريات المعزولة من العليقة المحلية	52
13	الفطريات المعزولة من العليقة المستوردة	54
14	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من جميع العينات المجموعة	56
15	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من جميع العينات المجموعة	57
16	التشخيص المظهري لاهم العزلات الفطرية المر افقة لحبوب المحاصيل المخزونة :	58
17	قابلية عزلات الفطر *Aspergillus niger* على أنتاج السم Ochratoxin A	61
18	قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على أنتاج السم Aflatoxin B1	63
19	تلوث عينات عليقة الأسماك المحلية والمستوردة بالسم Ochratoxin A	65
20	تلوث عينات عليقة الأسماك المحلية والمستوردة بالسم Aflatoxin B1	67
21	التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Aspergillus* spp باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number و Submission	69

	Number لها .	
22	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A. niger isolate* y.n.174.Khafori) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	70
23	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A. niger isolate* y.n.175.Khafori) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	72
24	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A.flavus isolate* y.n.176.Khafori) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	73
25	مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A.flavus isolate* y.n.177.Khafori) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)	75
26	تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط ونمو العزلة الفطرية *Aspergillus niger* K1 والفطريات الاخرى ومدى تلوثها لعليقة الأسماك	79
27	تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط العزلة الفطرية *A. niger* K1 ومدى قدرتها على انتاج الاوكر اتوكسين في عليقة الأسماك	80
28	تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط ونمو العزلة الفطرية *Aspergillus flavus* K2 ومدى تلوثها لعليقة الأسماك	81
29	تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط العزلة الفطرية *Aspergillus flavus* K2 ومدى مقدرتها على انتاج السم الافلاتوكسين في عليقة الأسماك	82
30	التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسم الفطري الاوكر اتوكسين على معدلات نمو وصحة الأسماك .	85

31	التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسين على معدلات نمو وصحة الأسماك .	87

ثالثآ: قائمة الصور والأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	الشكل (1) نماذج من تلوث بعض العينات المجموعة في هذه الدراسة بالفطريات	42
2	الشكل (2) نماذج للوصف المظهري لاهم أنواع الفطر Aspergillus المعزولة في هذه الدراسة	60
3	الشكل (3) التقدير الكمي والنوعي لسم OTA المنتج من عزلات الفطر *Aspergillus niger*	62
4	الشكل (4) التقدير الكمي والنوعي لسم Afla B1 المنتج من عزلات الفطر *Aspergillus flavus*	64
5	الشكل (5) التقدير الكمي والنوعي لسم OTA كملوث طبيعي لعينات الدراسة	66
6	الشكل (6) التقدير الكمي والنوعي لسم Aflatoxin B1 كملوث طبيعي لعينات الدراسة	68
7	الشكل (7) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger isolate* y.n.174.Khafori	71
8	الشكل (8) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger isolate* y.n.175.Khafori	72
9	الشكل (9) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A.flavus isolate* y.n.176.Khafori)	74
10	الشكل (10) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A.flavus isolate* (y.n.177.Khafori)	75
11	الشكل (11) الفرق بالتركيب الوراثي بين العزلات الفطرية المنتجة للسموم الفطرية بمستويات متباينة	77
1	صورة لتأثير السم الفطري الافلاتوكسين B1 والاوكر اتوكسين على بعض الحالات المظهرية للاسماك	88
12	شكل (12) تأثير سم Afla و OTA في اعداد كريات الدم البيضاء (WBC).	89
13	شكل (13) تأثير سم Afla و OTA في اعداد كريات الدم الحمراء (RBC).	90

14	تأثيرسم Afla و OTA في كمية هيموكلوبين الدم (HGB).	91
15	تأثيرسم Afla و OTA في مكداس الدم (HCT).	92
16	تأثيرسم Afla و OTA في حجم كرية الدم الحمراء (MCV).	93
17	تأثيرسم Afla و OTA في اعداد الصفيحات الدموية PLT.	94
18	تأثيرسم Afla و OTA في متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء (MCHC).	95
19	تأثيرسم Afla و OTA في متوسط كمية الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء (MCH).	96

1- المقدمة :

تصاب العديد من حبوب المحاصيل الحقلية مثل الحنطة والشعير والذرة الصفراء وغيرها في الحقل واثناء الحصاد وفي المخزن بالعديد من الفطريات التابعة للأجناس *Aspergillus* spp ، *Penicillium* spp ، *Fusarium* spp , *Alternaria* spp ، *Rhizopus* , *Rhizoctonia* ، *Trichoderma* ، *Stemphylium* وغيرها من الفطريات الأخرى (Palencia واخرون , 2010) والعديد من هذه الفطريات تثير القلق والمخاطر لإنتاجها مركبات ايضية ثانوية سامة تسمى السموم الفطرية وخاصة ســـموم الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات والفيومنزينات وغيرها (Zulkifli وZakaria, 2017) ، اذ تم الكشف عن السموم الفطرية الاوكراتوكسين A والافلاتوكسينB1 في حبوب الذرة الصفراء والحنطة والشعير المخصصة لإنتاج الأعلاف الحيوانية بتراكيز مرتفعة تفوق الحدود القصوى المسموح بها (Henry وآخرون , 2009). كما سجل الباحثون مستويات عالية بشكل خاص من السم الفطري الاوكراتوكسين في حبوب فول الصويا المعدة لإنتاج الاعلاف الحيوانية (Tian وآخرون, 2022) بينما في دراسة اخرى ، تم اكتشاف الاوكراتوكسينA والافلاتوكسينB1 في عينات حبوب فول الصويا والنخالة ونخالة الذرة وحبوب أخرى وفي اعلاف مزارع الأسماك (Piotrowska واخرون , 2013). ازداد استخدام حبوب المحاصيل الحقلية في انتاج العليقة الحيوانية الخاصة بتغذية الأسماك. وهي عبارة عن خليط منتجات من أصل نباتي في حالتها الطبيعية، طازجة أو محفوظة، أو المنتجات المشتقة من معالجتها الصناعية واهمها حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا، للتغذية عن طريق الفم في شكل علف كامل، يوفر العناصر الغذائية الضرورية لتغذيتها. وأن هذا الاتجاه الجديد لاستخدام المواد ذات الأصل النباتي في الأعلاف المائية يواجه تحديات كبيرة أهمها تلوث هذه المكونات بالفطريات وسمومها الفطرية (Oliveira و Vasconcelos, 2020). ازداد الاهتمام بالثروة السمكية في الآونة الأخيرة وخاصة من الجانب الصحي والبيئي، وذلك لأنها من أهم المكونات الحية في البيئة المائية ونظرا لفوائدها الكبيرة ومنافعها الجمة لكل من الإنسان والبيئة، لاسيما مع ارتفاع الإنتاج العالمي من تلك الثروة ليبلغ نحو 75 مليون طن سنويا (Taroncher واخرون,2021) . ويعزى اهتمام الدول بالثروة السمكية إلى فوائدها العديدة؛ فهي مصدر اقتصادي أكثر من الثروة الحيوانية الأرضية ، ولها قيمة غذائية كبيرة باعتبارها مكون رئيسي وحازم من مكونات النظام الغذائي المعتمد في صحة وتغذية الانسان وذلك لأنها تشكل مصدرًا مهماً للبروتينات والعناصر الغذائية الحيوية الأخرى فهي تمتلك نسبة أعلى من محتوى البروتين

والأحماض الأمينية الأساسية وأحماض أوميگا 3 الدهنية طويلة السلسلة والفيتامينات ومعظم المعادن الأساسية الاخرى عند مقارنتها باللحوم الأخرى ما يساعد على حل مشكلة نقص المواد الغذائية التي تحوي هذه العناصر لدى بعض الدول النامية إضافة إلى ذلك، تعتبر الثروة السمكية مصدرا مهما للدخل القومي (Tacon وآخرون 2013 و Elesho , 2022) . أدى النمو السكاني السريع في البلدان النامية الى ضغط شديد على المصادر الطبيعية للثروة السمكية فلم تكتف المجتمعات البشرية بصيد الأسماك من الأنهار والبحار والمحيطات، بل لجأت العديد من الدول إلى التربية السمكية التي تعد خطوة مهمة لزيادة الإنتاج وتحقيق الأمن الغذائي. وهذا ما أدى الى ارتفاع الطلب على أعلاف الاسماك والتي تلعب دورا مهما للغاية في تغذية الاسماك وصحتها واستخدام البروتين الحيواني في أعلاف الاسماك مكلف الثمن وبالتالي فأن غالبية المزارعين في البلدان النامية توجهوا الى استخدام مكونات العلف المحلية من أصل نباتي كمصدر للبروتين النباتي (Marijani واخرون , 2020) ومع ذلك فان هذه المكونات من أصل نباتي توفر أفضل الركائز الطبيعية لنمو الفطريات والتي يمكن أن تترافق بسهولة مع تطور السموم الفطرية في ظل ظروف مناسبة , يتكون علف الأسماك المصنوع محليا من مكونات نباتية مثل (الذرة الصفراء ، فول الصويا ، والحنطة ، نخالة الحنطة والشعير) التي يتم خلطها معا وطحنها وبعد ذلك يتم تكوير العلف المركب وتخزينه , وان اكثر ما يثير المخاوف هي حبوب الذرة والبذور الزيتية التي تكون أكثر عرضة للفطريات المسببة للسموم الفطرية مقارنة بالمكونات الاخرى (Al-Musawi وآخرون ,2021) .

أن استخدام المحاصيل النباتية او الحبوب في الأعلاف السمكية يؤدي إلى زيادة مخاطر التلوث بالفطريات والسموم الفطرية وارتفاع معدل الإصابة بالتسمم الفطري في الأسماك (Oliveira و Vasconcelos , 2020) وهذا قد يقلل من إنتاجية تربية الأحياء المائية وبالتالي يؤدي الى حدوث التسمم الفطري وانخفاض وزن الجسم وضعف النمو ومعدلات أعلى من الأمراض والهلاكات في الأسماك. (Fadl واخرون , 2020). فالكثير من هذه الفطريات التي تنمو على مثل هذه الاعلاف والحبوب المخزونة منها والموجودة تحت درجات حرارة ورطوبة مناسبة لنموها منتجة للسموم الفطرية. وان معظم السموم الفطرية المنتجة من هذه الفطريات تكون مسرطنة للخلايا بالإضافة لحدوث اضطرابات عصبية اخرى , ومن بين اهم هذه السموم الفطرية هي الأفلاتوكسينات منتجة بواسطة فطريات *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* والتي تسبب تثبيط وتدهور لخلايا الكبد في الاسماك . من أخطر الافلاتوكسينات

Aflatoxin B1 والذي يسبب أورام وتدهور في خلايا الكبد في الأسماك (Kholife واخرون , 2019) والاوكرتوكسينات المنتجة من قبل *Aspergillus niger* و *Aspergillus ochraceus*, وقد تحمل الاسماك بقايا السموم الفطرية وانتقالها الى الانسان عبر السلسلة الغذائية مما يعرض صحة الانسان للخطر , فمن المهم ضمان السيطرة على تلوث السموم الفطرية في أعلاف الأسماك خاصة أثناء الانتاج والخزين (Marijani واخرون , 2019) وعليه فمن المهم التحري الدوري والسريع عن التعفن الفطري لهذه الاعلاف لضمان الجودة المايكروبايولوجية وسلامة كل من الاعلاف والاغذية (Kitigwa , 2023)

لذا هدفت الدراسة الى التحري عن مدى تلوث حبوب المحاصيل الحقلية المخزونة التي تدخل كمواد اولية في تصنيع عليقة الاسماك بالفطريات الخطيرة المنتجة للسموم الفطرية (Aflatoxin B1 و Ochratoxin A) ومدى تلوث العليقة المحضرة بهذين السمين , وتأثير فترات التخزين على انتاجهما , ودراسة تأثيرهما الحيوي في تربية وإنتاج وصحة الأسماك (**محاور الدراسة**):

1- عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب المحاصيل وعليقة الأسماك المحضرة كالأتي:

أ- جمع العينات من معامل الانتاج لأربع محافظات (كربلاء- بغداد- بابل – الانبار).

ب- عزل الفطريات المرافقة لها بطريقة العزل المباشر.

جـ - تنمية وتشخيص العزلات الفطرية المرافقة. والمنتجة للسموم الفطرية المحددة .

2- الكشف عن تلوث عليقة الأسماك بالسموم الفطرية (أفلاتوكسينB ، أوكراتوكسينA) كالاتي:

أ- تحديد العينات الأكثر تلوثا بالفطريات.

ب- الكشف عن تلوث هذه العينات بالسموم الفطرية (الكشف بتقانة HPLC)

3- اختبار تحديد العزلات المنتخبة لهذه السموم الفطرية (الأكثر انتاجية)

4- اختبار تأثير فترات التخزين للعليقة الملوثة بالعزلات الفطرية المنتخبة كمايأتي:

أ-لفترات زمنية مختلفة (30 – 60– 90)يوم

ب- الاختبار تحت مستويات رطوبة مختلفة (10 – 15 -25 % محتوى رطوبي)

5- دراسة تأثير السموم الفطرية (Aflatoxin B1 و Ochratoxin A) في تربية الاسماك وتقسم الى: أ- الكشف عن تأثير السموم الفطرية كالوزن النهائي للأسماك والنسبة المئوية للهلاكات

ب- الكشف عن تأثير السموم الفطرية على معايير الدم الفسلجية للأسماك

2- مراجعة المصادر:

2-1: تلوث حبوب المحاصيل الحقلية بالفطريات

تتعرض العديد من حبوب المحاصيل الحقلية مثل الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وغيرها لمهاجمة العديد من الفطريات في الحقل واثناء الحصاد والنقل وفي المخزن , ومن اهم هذه الفطريات التابعة للاجناس*Aspergillus* spp ، *Penicillium* spp ، *Fusarium* spp, *Alternaria* , *Rhizopus* , *Rhizoctonia* ، *Trichoderma* ، *Stemphylum* , *Helminthosporium* spp و *Cladosporium* spp. وغيرها من الفطريات الأخرى (Palencia واخرون , 2010 وAnwar واخرون , 2013 و-Abdel Sater واخرون ,2017 وAl-Masoodi واخرون , 2023) . إذ يعتمد مقدار التلف والضرر لهذه الفطريات وفقا لطبيعة نمو المحصول وظروف الخزن والاحتياجات البيئية لهذه الفطريات ويمكن أن تقسم الفطريات التي تصيب المحصول على أساس المتطلبات البيئية إلى مجموعتين ، المجموعة الأولى: وهي فطريات الحقل التي تهاجم حبوب المحاصيل خلال مُدة تكوينها وعند النضج وخلال مُدة الحصاد ، إذ وجد ان نشاط هذه الفطريات يعتمد على المحتوى الرطوبي للحبوب والرطوبة النسبية , فضلاً عن درجات الحرارة اللازمة لنمو هذه الأنواع (Saleemi واخرون , 2012 وJedidi واخرون , 2018) ، واهم أجناس الفطريات التي تهاجم حبوب المحاصيل الحقلية في الحقل هي *Aspergillus* spp. و *Fusarium* spp. و *Alternaria* spp. و *Helminthosporium* spp. و *Cladosporium* spp. (Mahmoud واخرون , 2013)

والمجموعة الثانية : وهي فطريات الخزن التي تعد اكثر خطورة على الحاصل خلال مدة الخزن إذ تشكل فطريات الخزن مشكلة حقيقية لحبوب المحاصيل المخزونة ، ومعظم فطريات الخزن التي تنمو على الحبوب تحتاج إلى رطوبة نسبية تساوي تقريبا 65-90% ومن الأجناس الرئيسة لهذه الفطريات هي *Aspergillus* spp و*Fusarium* spp. و *Pencillium* spp. و*Alternaria* spp. و*Mucor* spp. و*Rhizopus* spp. (Anwar واخرون , 2013 و Abdel-Sater واخرون ,2017 وAl-Masoodi واخرون , 2023).

وقد تؤدي فطريات الخزن إلى انخفاض إنبات البذور المستخدمة للزراعة وتلون وتجعد البذور ورفع درجات الحرارة للبذور نتيجة التنفس فضلا عن التغيرات الكيميائية في البذور كزيادة الأحماض الدهنية وتكوين السموم الفطرية (Chang واخرون , 2020).

وفي دراسة أجريت في العراق للتحري عن الفطريات المصاحبة لحبوب الحنطة والشعير اذ شملت الدراسة ثمانية أصناف من الحنطة وأربعة أصناف من الشعير, أظهرت نتائج البحث وجود أجناس مختلفة من الفطريات مصاحبة لحبوب الحنطة والشعير هي : *Aspergillus*، *Rhizopus*، *Penicillium*، *Helminthosporium*، *Trichoderma*، *Fusarium* ، *Alternaria*، *Rhizoctonia*، *Cladosporium* . وكان أكثر الفطريات ترددا هو الفطر *Aspergillus* ثم الفطر *Fusarium* . أظهرت النتائج أيضا فعالية إفرازات الفطريات في خفض نسبة إنبات البذور معنويا (جابر , 2014) . بينما كشفت دراسة عن تقييم دور طرق عزل الفطريات والاوساط الزرعية للعزل في تباين الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة والذرة الصفراء . فقد وجد ان الفطريات المصاحبة لحبوب الذرة الصفراء و الحنطة المتحصل عليها من العينات المحلية والمستوردة الموجودة في المخازن وهذا لمعرفة تأثير طريقة العزل وأصل العينات على هذه الفطريات باستخدام طريقتين للعزل (المباشرة وغير المباشرة) واثنين من الأوساط الزرعية , الوسط DCPA المعدل و Malt agar مكنت هذه النتائج بتحديد 12 جنس فطري وهي *Fusarium*و *Alternaria* و *Ulocladium* و *Cladosporum* ، *Penicillium*، *Aspergillus*، *Verticillium*، *Phoma*، *Absidia*، *Rhizopus Cunninghamella* *Paecilomyces*. أظهرت النتائج أن الجنس الفطري الأكثر انتشارًا هو جنس *Aspergillus* سجل 85 حالة ظهور تليها جنس *Alternaria* و *Pencillium* مع 43 و 40 ظهورا على التوالي و أن الوسط DCPA أكثر ملائمة لطريقة العزل المباشر. بينما كان وسط الشعير الوسط الأكثر ملائمة لطريقة العزل غير المباشرة. (Henry واخرون , 2009 و Al-Masoodi واخرون , 2023)

بينما اجريت دراسات في العراق لتقييم تلوث حبوب الذرة الصفراء في مخازن محافظات اربيل وكركوك وديالى وبغداد وكربلاء وواسط والقادسية وجد ان نسبة التلف الظاهري التي تسببه الفطريات بلغت 5.8% واهم الأجناس الموجودة من الفطريات هي *Alternaria* spp.

و.*Aspergillus* spp **و**.*Fusarium* spp و.*Phoma* spp و.*Pencillium* spp و.*Rhizopus* وكانت أعلى نسبة حبوب مصابة بأنواع الجنس *Aspergillus* ويليها *F. moniliforme* ، كما أوضحت نتائج التحليل الميكروبي لمعرفة تواجد الفطريات وأنواعها في عينات الذرة الصفراء في بغداد وبابل و واسط كانت الاجناس *Mucor* spp و *F. moniliforme* و*F. graminearum* و*Aspergillus* spp و.*Alternaria* spp و.*Rhizopus* spp و.*Penicillium* spp (الهيتي , 1977 وشهاب , 1998 و حسين , 2000 و الحميري , 2007 والورشان , 2006 و البلداوي, 2007)

اما الاجناس الفطرية *Alternaria* و *Aspergillus* و *Stemphylium* و *Fusarium* و *Cladosporium* و *Trichothecium* فقد تم عزلها من بذور اصناف فول الصويا المخزونة والملوثة بالسموم الفطرية وان اهم ما يفسر تباين ظهور الفطريات بين أنواع الحبوب هو على اساس تباين القدرة التنافسية للفطريات على هذه المحاصيل , كما تؤدي طريقة التعقيم السطحي من عدمها على احداث تباين في الفطريات المعزولة , فقد سجل زيادة معدل ظهور الفطريات على البذور غير المعقمة اكثر من البذور المعقمة بينما اثبت ان دور المحتوى الرطوبي للبذور وفترات التخزين اثرا في تباين تردد الفطريات حيث حصلت زيادة في تردد عدد من انواع الفطريات المتمثلة *Fusarium oxysporum* و*Cladosporium* sp و A. *candidus*. و*A .flavus* بارتفاع المحتوى الرطوبي وازدياد فترة التخزين . (Anwar واخرون , 2013 وPiotrowska واخرون , 2013 وEscamilla واخرون , 2019)

2-2: اهم الفطريات المنتجة للسموم الفطرية المصاحبة لحبوب المحاصيل الحقلية

تُعد الفطريات .*Aspergillus* spp ، *Penicillium* spp ، *Fusarium* spp , *Alternaria , Rhizopus , Rhizoctonia ، Trichoderma ، Stemphylum* , *Helminthosporium* spp و .*Cladosporium* spp وغيرها من اهم الفطريات التي اثبت ترافقها ومصاحبتها مع اغلب حبوب المحاصيل الحقلية وبشكل مستمر ومتزامن سواء كانت قبل او بعد الحصاد او في المخزن , وان اغلب هذه الفطريات او أنواع منها تمتلك القدرة العالية على انتاج السموم الفطرية , ويتصدر هذه الفطريات أنواع الجنس *Aspergillus* spp من ناحية

التردد والظهور بالمحاصيل الحقلية وكذلك انتاج طيف واسع من السموم ذات الخطورة الشديدة على صحة الانسان والحيوان (البلداوي , 2012 و Tolosa واخرون ,2014 وGonçalves واخرون , 2018) .

تقسم الفطريات التي تصيب الحبوب المخزونة إلى قسمين اعتمادا على طبيعة إصابتها، وهي فطريات الحقل Field Fungi وفطريات المخزن Storage Fungi اذ تصيب فطريات الحقل المحاصيل الزراعية قبل الحصاد ويمكن أن يستمر نشاطها في المخازن عند توفر الظروف الملائمة مثل توفر رطوبة نسبية عالية، ومحتوى رطوبي في الحبوب 14% فأكثر، فطريات هذا القسم هي *Alternaria* spp و *Cladosporium* spp و*Fusarium* spp و *Helminthosporium* spp و *Trichoderma* spp . اما فطريات المخزن فأوسعها انتشاراً هي *Aspergillus flavus* و *A . ochraceus* فضلاً عن انواع اخرى من *Aspergillus* spp. و *Fusarium* spp. و *Penicillium* spp. و *Rhizopus* spp و *Mucor* spp . (Alwatban واخرون , 2014 و FAO/WHO،2002) .

أغلب هذه الفطريات تنتج السموم الفطرية ، وهي بشكل عام مسببات مرضية غير عدائية لكن غالبا ماتنبت في الاوساط الزرعية مع زيادة الرطوبة، و هذه المجاميع من الأنواع المنتجة للسموم التي تعود إلى خمسة أجناس رئيسة وهي الاكثر انتشارا *Aspergillus* و*Penicillium* و *Fusarium* و *Claviceps* و *Stachybotrys* هذه الاجناس اختيرت بسبب قدرتها على انتاج السموم الفطرية بتراكيز عالية وبسبب قدرتها على العيش في بيئات متنوعة ومختلفة . فضلا عن اجناس اخرى مثل *Alternaria* و *Rhizopus* و *Mucor* والاجناس الثلاثة *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* هي الاكثر وجوداً وانتاجا للسم في مخازن الحبوب , الفطرين *Aspergillus* و *Fusarium* تهاجم الحبوب في الحقل قبل الحصاد (FAO/WHO،2002) .

من السموم الفطرية الرئيســـــة والمهمة عملياً التي تنتج في علائق الأسماك ، ومكوناتها هي الـ Aflatoxinsو Ochratoxins المنتجـــة من قبل *Aspergillus* و*Penicillium spp* (2002 , Moss)

اذ تعد الفطرين *Aspergillus* spp و *Penicillium* spp. من الفطريات واسعة الانتشار بالبيئة بسبب قدرتهما على تكوين عدد هائل من الوحدات التكاثرية وحيدة الخلية صغيرة الحجم , ويمتلك هذا الفطر خيوطا نحيفة وسريعة النمو وقد تسبب هذين الفطرين تغطية كاملة لحبوب الذرة الصفراء او غيرها بأبواغ الفطر فيمكن ملاحظتها بلون اسود او اخضر او ازرق او بني وغيرها , مما يدل على قدرة هذه الأنواع على استعمار سطوح واسعة من المواد الغذائية (Muñoz واخرون , 2011) .

2 -3: السموم الفطرية : والسموم الملوثة لحبوب المحاصيل الحقلية ومنتجاتها

تبين أن العديد من الفطريات المرافقة للحاصلات الزراعية أثناء الخزن تنتج العديد من مركبات الأيض الثانوي والتي لها نشاط بيولوجي معقد على الأنظمة الحية، عرفت بالسموم الفطرية Mycotoxins ولقد برهنت الدراسات أن تلوث الأغذية والحبوب والأعلاف بمثل هذه الملوثات هي المسبب الرئيسي للعديد من الكوارث التي حلت بالإنسان والحيوان في العالم ولم تفسر في حينها إلا بعد اكتشاف هذه السموم ولعل أبرز الأمثلة على ذلك ما حدث عام 1960 عندما هلكت 100 ألف من الديوك الرومي نتيجة تغذيتها على عليقة فستق الحقل الملوثة بعزلات من مجموعة الفطر *A. flavus* وأوضحت الاختبارات اللاحقة أن هناك عزلات مختلفة وأنواع أخرى مختلفة من الفطريات تنتج السموم الفطرية وقد أطلق على هذه المادة السامة بالأفلاتوكسين Aflatoxin (Van Egmond , 2002 و Abdual-shahid واخرون , 2013) .

اشتق مصطلح السم الفطري Mycotoxin من المصطلحين الإغريقي Mykes وتعني فطر واللاتيني Toxicum وتعني سام واستخدم هذا المصطلح للتعبير عن مجموعة المركبات الأيضية الثانوية السامة والتي تنتج من سلالات معينة لبعض أنواع الفطريات، وعرفت الأمراض الناتجة عن التعرض لهذه السموم بال Mycotoxicoses ، بينما عرفت الأعراض المرضية الناجمة عن الإصابة بالفطريات ذاتها على الحيوانات والإنسان بال Mycoses (Herrman و Walker، 1999) .

لقد ازداد الاهتمام بالسموم الفطرية بعد أن اثبتت مخاطرها على صحة الإنسان وحيواناته كمواد مسرطنة ومطفرة تحدث عند التعرض لها أمراض خطيرة مثل سرطان الكبد وتورمات الأجهزة التناسلية والنزف الدموي والضعف العام مع تشوهات الهيكل العظمي وانخفاض الإنتاجية، إضافة لزيادة حساسية الحيوانات المتعرضة لها للإصابة بالأمراض الفايروسية والبكتيرية نتيجة إضعاف أو تحطيم جهاز المناعة (FAO/WHO،2002) .

على الرغم من أن هنالك العديد من المنتجات الأيضية الثانوية السامة قد تم عزلها من الأوساط الزرعية لبعض الفطريات إلا أن عدد منها شخصت بوصفها ملوثات طبيعية بدرجات معنوية للأغذية والأعلاف وهي الأفلاتوكسينات Aflatoxins والاوكراتوكسين Ochratoxin والترايكوثيسينات Trichothycin والفيومينيزين Fumoinisin والباتيولين Patulin والستركماتوسيستين Strigmatosystin والزيرالينون Zeralenone وحامض البنسليك Penicillic acid والاركوت Ergot (FAO/WHO،2001) .

وتدرس سموم الأفلاتوكسين باهتمام أكثر لما عرفت به من قابليتها المسرطنة للإنسان والحيوان، وأن أغلب حالات التسممات الحادة والمزمنة بهذه السموم ترجع إلى تلوث المنتجات الغذائية النباتية بالفطر *A .flavus* و *A.parasiticus* في الحقل أو خلال الحصاد والخزن وبخاصة عندما تكون هذه المنتجات مخزونة تحت ظروف رطبة (Kitigwa ، 2023) بينما تدرس مركبات الاوكراتوكسين لتأثيراتها المختلفة في أنواع كثيرة من الكائنات الحية فهي بالدرجة الأولى سموم كلوية Nephrotoxic وتؤثر على الكبد Heptatoxic ويشابه في تأثيرها الافلاتوكسينB1 ويسبب كذلك تشوه الأجنة Teratogenic وهو عامـــــــــــل مسرطـــــن Carcinogenic ويقوم بتثبيط جهاز المناعة Immunosuppressive (Moura وآخرون ،2004)

2-3-1: الافلاتوكسينات (Aflatoxins) في حبوب المحاصيل الحقلية

ينتج الفطر *A .flavus* الأفلاتوكسينات B1 و B2 أما الفطر *A.parasiticus* فينتج أيضاً G1 و G2 و M1 (ناتج تحول B1 في الحيوانات اللبونة) فضلاً عن إنتاجه ل B1 و B2 والأفلاتوكسين B1 هو الأكثر خطورة إذ هو المسرطن والمسبب لتلف الكبد للإنسان والحيوان

ولقد جاءت تسمية الأفلاتوكسينات نسبة للفطر المنتج *A. flavus* وذلك بأخذ الحرف A من اسم الجنس والمقطع fla من اسم النوع، وأضيف لها كلمة Toxin للدلالة على السمية، وتشير الأحرف B و G إلى لون التألق الذي تظهره هذه المركبات كلها على صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة Thin-layer chromatography عند فحصها بالأشعة فوق البنفسجية حيث يشير الحرف B إلى اللون الأزرق Blue والحرف G إلى اللون الأخضر Green، أما الأرقام 1،2 فتشير إلى معامل الترحيل Ratio of frount (FAO/WHO،2001) وعلى الرغم من أن عملية تكوين Synthesis السموم مسيطر عليها وراثياً إلا أنها تعتمد اعتماداً مباشراً على المواد الأولية المغذية وعلى العوامل البيئية Environmental factors , ويبدو أن وجود حلقة اللاكتون في جزيئة الأفلاتوكسين هي المسؤولة عن الثبات الكيميائي والحراري للجزيئة (Kitigwa ، 2023)

تعد كل من درجة الحرارة والرطوبة في الحبوب المخزونة والاعلاف أهم عاملين يحددان نمو الفطر وإنتاج الأفلاتوكسين وتعد الرطوبة المناسبة 85% فأعلى أما أقل درجة حرارة ينمو فيها الفطر فهي 12°م والمثلى 27°م وأعلى درجة كانت من 40-42°م أن إنتاج الأفلاتوكسين يتم عند وجود رطوبة نسبية عالية ودرجات الحرارة تتراوح بين 25-30°م ، ويمكن أن تنتج هذه السموم عند درجة حرارة 8-10°م بكميات قليلة وبوقت أطول . هذا وان حدوث التلُوث بالافلاتوكسين لا يقتصر على المخزن فقط لكنه يحدث أيضاً في الحقل وعلى عدة محاصيل مهمة كالحنطة والشعير والذرة الصفراء وغيرها (FAO/WHO،2002) ، وذهبت دراسات أخرى إلى أن التلوث بالأفلاتوكسين يحدث في الحقل وأثناء الحصاد والتجفيف والنقل والخزن وأثناء عملية تصنيع المنتجات الزراعية والاعلاف وحتى لدى المستهلك إذا لم تتخذ بعض التدابير الاحترازية التي تمنع تلوث الأغذية بالفطريات (الورشان , 1999 وAbdel-Sater واخرون , 2017) .

إن الحد المسموح بتواجده من الأفلاتوكسين في الأغذية حسب توصيات المنظمات العالمية يجب إلا يزيد عن 10 مايكروغرام/كغم ، وهذا ما أدى إلى التفكير الجاد في البحث عن طرائق فعالة لتحطيم الأفلاتوكسين والتخلص من آثاره في الأغذية والأعلاف وحماية الإنسان والحيوان من مخاطر هذه السموم , فإن الإدارة الصحيحة للمحاصيل والمراقبة والإشراف الواسعين لا تمثل

الحل الوحيد لمشكلة التلوث ، لذلك فان حماية الأغذية والأعلاف من التلوث بالأفلاتوكسين أصبح موضوعاً ملحاً وضرورياً وكان لابد من تطوير آليات مفيدة وفعالة لتحطيم الأفلاتوكسين وتضمنت هذه الآليات المعالجات الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية (FAO/WHO،2002).

2-3-2: الاوكراتوكسينات (Ochratoxins) في حبوب المحاصيل المخزونة

يتم إنتاج Ochratoxin A بشكل أساسي بواسطة *Aspergillus ochraceus* , *A. carbonarius* و *A. niger* , مع ذلك يتم إنتاجهِ في المواد الغذائية والاعلاف بواسطة الأنواع الأخرى معظمها في المناطق شبه الاستوائية والمدارية , كذلك ينتج من قبل *Penicillium* spp. ولا سيما في المناطق المعتدلة والباردة (De Santis وآخرون,2020)

وفي دراسات سابقة اكدت بأن هناك انواع عديدة من الفطريات قادرة على انتاج الاوكراتوكسين وهي تعود لجنســـــي *Aspergillus* و *Penicillium* منها الانواع التابعة للجنس *Aspergillus* اكثرها شيوعا هي *A . ochraceus* و *A. alliaceus* و *A . melleus* و *A . sclerotiorum* و *A . sulphureus* وهذه الأنواع الأربعة الأخيرة هي وثيقة الصلة بـ *A . ochraceus* , مستعمرات هذه الفطريات عميقة ولكنها ليست كثيفة جدا و تتراوح ألوانها بين البني والبني المصفر، الحوامل Stipe طويلة في هذه الفطريات، وذات رؤوس كبيرة والحويصلات كروية والعناقيد metulae والذنيبات phialides تحزمها بشكل كثيف ، الكونيدات صغيرة الحجم وجدرانها ملساء ولونها بني فاتح , الانواع الاخرى التي ممكن ان تنتج الاوكراتوكسين هـــي*A. ostianus* و *A. petrakii* و *A. elegans* و *A. wentii* و *A. auricomus* و *A. Albertenis* (Rizzo وآخرون ، 2002) .

اما الأنواع التابعة للجنس *Penicillium* فأهمها *P. viridicatum* و*P.cyclopium* و *P.commune* و *P.palitans* و *P. variabile* و *P. purpurescens* و*P.chrysogenum* والنوع الآخر هو *P. verrucosum* ويعتقد بأنه النوع الرئيس من هذا الجنس الذي ينتج الأوكراتوكسين بشكل كبير وليس *P.viridicatum* كما أشارت بعض المصـــادر والفطر (alutaceus) *A. ochraceus* ينتج أيضاً Penicillic acid ولكن

هذا ألسم أقل أهمية وتأثيره مجهول على صحة الإنسان (Geisen وآخرون ، 2018 و Csenki واخرون , 2021)

يعتبر سم OTA من أكثر أنواع Ochratoxin أنتشارًا وسمية غالبًا ما يتم العثور عليهِ في العديد من السلع الغذائية بما في ذلك الحبوب والاعلاف التي تعد من أهم العوامل المساهمة في التعرض الغذائي المزمن للاوكراتوكسين , وبالتالي فهو جزء من السم الذي يتم تناوله يوميًا مما يجعل التقييم الصحيح للمخاطر أمرًا ضروريًا (2020,Schulz).

لقد تبين ان الأنسان حساس بشكلٍ خاص للتعرض لسم OTA مقارنة بالأنواع الاخرى من الحيوانات , وأن الجرعات المنخفضة كافية لأحداث تأثيرات سامة , وفقا للوكالة الدولية لأبحاث السرطان (International Agency for Research on Cancer) (IARC) صُنف ضمن المجموعة B2 (2020,Schulz) بأعتبارهِ مادة مسرطنة للإنسان (Dell'Aquila وآخرون,2021).

تهدد الأثار السامة للـ OTA صحة الإنسان والحيوان , فقد ثبت ان OTA مادة مسرطنة Carcinogenic (Polovic وآخرون,2018), سامة للكبد Hepatotoxic , وسامة للكلى Nephrotoxic و سامة للمناعة Immunotoxic وكذلك يحتوي على مجموعة واسعة من التأثيرات السمية Toxicological effects بما في ذلك التشوهات الخلقية Teratogenicity, الطفرات Mutagenicity, السمية الجنينة Genotoxicity , السمية العصبية Neurotoxicity , إلا أن سميته تختلف في تأثيرها بأختلاف الجنس والنوع والنوع الخلوي cellular type للحيوانات المختبرة (El Khoury وAtoui,2010).

أظهرت نتائج الأبحاث السابقة أن كُل نوع من أنواع الفطريات لهُ ظروف تفضيلية لإنتاج السموم الفطرية وبالتالي يجب أن تبدأ كُل محاولة للسيطرة على تلوث منتج معين بـ OTA من تحديد الكائن الحي المسبب متبوعًا بالتعديل المناسب للظروف البيئية , وبشكل أساسي الرطوبة ودرجة الحرارة أثناء التخزين (Twaruzek واخرون,2020) ولتقليل التعرض الغذائي لِـ OTA حددت الهيئات التنظيمية في جميع أنحاء العالم مستويات قصوى من OTA نظرًا لأن

الإزالة الكاملة من خلال طرق الإنتاج والمعالجة الحالية للمنتجات الزراعية غير مجدية (Zhang وآخرون,2021).

لوحظ إنتاج Ochratoxin A في نطاق متباين قد يفوق الحدود المسموح بها اعتمادًا على السلالات الفطرية ودرجة الحرارة المثلى لإنتاج OTA هي 20 درجة مئوية , تليها درجة الحرارة 15 درجة مئوية , مع أنخفاض كبير في الإنتاج عند 30-37 درجة مئوية . مع الأخذ بعين الاعتبار أن *Aspergillus* و*Penicillium* المسؤلان عن إنتاج الاوكراتوكسين لها نطاق درجة حرارة يتراوح بين 12 و37 م° لـ *A. ochraceus* و0-31 م° لـ *P. verrucosum* يمكن إنتاج OTA في جميع المناطق الزراعية في العالم (Agriopoulou وآخرون,2020).

يتميز السم الفطري Ochratoxin A بانه مركب صلب بلوري أبيض عديم الرائحة , درجة أنصهاره عالية 169 درجة مئوية , وزنه الجزيئي : 403.815 غم/مولاري وصيغته الجزيئية ($C_{22}H_{18}O_6CIN$) (Navale وآخرون,2021) ويمتاز بصيغة تركيبية تتألف من ارتباط احد مشتقات المركب الحلقي آيزوكيومارين مع الحامض الاميني فنيل آلانين (L-phenylalanine) مرتبطة بآصرة آمايدية : L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyrane-7-yl)carbonyl] -(R)-isocoumarin . وهو قليل الذوبان في الماء (حوالي 0.42 ملغم / لتر عند 25 م°) يذوب في المذيبات العضوية القطبية مثل الإيثانول , الميثانول والكلوروفورم بشكل معتدل يعطي تألقًا أخضر تحت الأشعة فوق البنفسجية في الوسط الحامضي و تألقًا أزرق في الظروف القلوية وان المركب Isocoumarin هو المجموعة السامة الرئيسية للأوكراتوكسين A, وتساهم مجموعة الكربوكسيل فينيل ألانين بالإضافة إلى مجموعة Cl في السمية ايضا (Liu وآخرون,2022).

وهو من المركبات الثابتة حراريا , اذ لا يمكن إزالة OTA تمامًا أثناء الطهي , يمكنه أيضا تحمل 3 ساعات من التعقيم عند 121 درجة مئوية و درجات حرارة اعلى و يمكن ان يتحلل جزئيًا فقط عند 250 درجة مئوية (Navale وآخرون,2021).

إنَّ الصيغة التركيبية للاوكراتوكسين A تتالف من ارتباط احد مشتقات المركب الحلقي آيزوكيومارين (chloro -8- hydroxy--5- carboxy -7 3,4dihydro -3R-methyl

isocoumarin -(مع الحامض الاميني فنيل آلانين (L-B–phenylalanine) مرتبطة بآصرة امايدية . بينما يتميز التركيب الكيميائي للاوكراتوكسين A . بانه حامض عضوي ضعيف , وترجع سمية الاوكراتوكسين A الى مجموعة الفينولك هيدروكسيل في حلقة الدي هايدرو آيزو كيومارين وهناك صيغ مختلفة لسموم الاوكراتوكسينات فهناك اوكراتوكسين A و B والتي هي عبارة عن احماض وهناك اوكراتوكسينC وهو عبارة اثيل أيثر اوكراتوكسين A , المركب B اقل امتصاصا واسرع تحللاً وهو في سميته يبلغ 10 % فقط من المركب الاوكراتوكسين A يوجد بشكل نادر كملوث طبيعي . (عبد الحميد ، 2000)

2-4: تربية الأسماك ومشاكل تلوث علائقها بالسموم الفطرية والفطريات المنتجة لها

عليقة الاسماك وهو ما يسمى محليا العلف , هو عبارة عن خليط من منتجات من أصل نباتي في حالتها الطبيعية ، طازجة أو محفوظة ، ومنها حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا ،للتغذية عن طريق الفم في شكل علف كامل ، أي علف مركب من الناحية التغذوية يوفر فقط العناصر الغذائية الضرورية لدعم حياة الاسماك وكما يبدو أن الاتجاه لاستخدام المواد ذات الأصل النباتي في الأعلاف المائية آخذ في الازدياد ومع ذلك، تلوث هذه المكونات بالفطريات التي يحتمل أن تكون سامة ، وخاصة بالفطرين *A.flavus* و *A parasiticus* ، منتشران ويحدثان تلوثا كبيرا بالسموم الفطرية ، اذ تم الكشف عن الافلاتوكسين B1 واوكراتوكسين A في الذرة الصفراء والحنطة والشعير المخصصة لإنتاج أعلاف الأسماك. كما سجل الباحثون مستويات عالية بشكل خاص من السم الفطري الـ zearalenone في الذرة الصفراء (Jakic-Dimic وآخرون 2005) . بينما في دراسة بالبرازيل ، تم اكتشاف الأفلاتوكسين B1 ، في عينات فول الصويا والنخالة ونخالة الذرة وحبوب أخرى من مزارع الأسماك (Gonçalves-Nunes وآخرون 2015).

أن استخدام المحاصيل النباتية او الحبوب في الأعلاف السمكية يؤدي إلى زيادة مخاطر التلوث بالفطريات والسموم الفطرية وارتفاع معدل الإصابة بالتسمم الفطري في الأسماك (Tacon و Metian, 2008). وهذا قد يقلل من إنتاجية تربية الأحياء المائية وبالتالي يؤدي الى حدوث التسمم الفطري ونتيجة لذلك سوف يحدث انخفاض وزن الجسم وضعف النمو

ومعدلات أعلى من الأمراض والهلاكات في الأسماك. بالإضافة إلى ذلك ، قد تتراكم بعض السموم الفطرية في الأسماك في الجهاز العضلي من الأسماك التي يتم إنتاجها عن طريق الاستزراع المائي الصالحة للاستهلاك البشري , التي تعتمد على العلف المقدم من الخارج ، من أجل تعزيز النمو وتحسين أرباح المزارع (Deutsch وآخرون 2007) .

ازداد الاهتمام بجودة وسلامة غذاء الأسماك لانها تشكل مصدرًا للبروتينات والعناصر الغذائية الحيوية الأخرى ، وبالتالي فهي عنصر حاسم ومكون رئيسي من مكونات النظام الغذائي البشري. عند مقارنتها بلحوم الحيوانات الأرضية فإن الأسماك لديها نسبة أعلى من محتوى البروتين والأحماض الأمينية الأساسية وأحماض أوميغا 3 الدهنية طويلة السلسلة والفيتامينات ومعظم المعادن الأساسية (Tacon وآخرون 2013) ,

أدى نمو تربية الاحياء المائية الى ارتفاع الطلب على أعلاف الاسماك والتي تلعب دورا مهما للغاية في تغذية الاسماك وصحتها وأستخدام البروتين الحيواني في أعلاف الاسماك مكلف وبالتالي فأن غالبية المزارعين في البلدان النامية يستخدمون مكونات العلف المحلية من أصل نباتي كمصدر للبروتين النباتي ومع ذلك فان هذه المكونات من أصل نباتي توفر أفضل الركائز الطبيعية للفطريات والتي يمكن أن تترافق بسهولة مع تطور السموم الفطرية في ظل ظروف مناسبة يتكون العلف المصنوع محليا من مكونات مثل (الذرة الصفراء ، فول الصويا ، والحنطة ، نخالة الحنطة والشعير) التي يتم خلطها معا وطحنها وبعد ذلك يتم تكوير العلف المركب وتخزينه من بين المكونات تعد الذرة والبذور الزيتية أكثر عرضة للفطريات المسببة للسموم الفطرية مقارنة بالمكونات الاخرى (SuLeiman وآخرون 2013) وقد تحمل الاسماك بقايا السموم الفطرية على طول السلسلة الغذائية مما يعرض صحة الانسان للأخطار الكبيرة , وعليه فمن المهم الكشف السريع والمحدد عن العفن الفطري لضمان الجودة المايكروبايولوجية وسلامة كل من الاعلاف والاغذية (Sultana وآخرون 2019)

يوجد الكثير من الفطريات التي تنمو على مثل هذه العلائق السمكية ومكوناتها من حبوب المحاصيل الحقلية وخاصة المخزونة منها والموجودة تحت درجات حرارة ودرجات رطوبة مناسبة لنموها , ومعظم السموم الفطرية المنتجة من الفطريات تكون مسرطنة للخلايا بالاضافة لحدوث اضطرابات عصبية اخرى , أن الأفلاتوكسينات المحتوية عليها الأغذية تكون منتجة

بواسطة فطريات *A flavus* والتي تسبب تثبيط وتدهور لخلايا الكبد في الاسماك وان فطريات *Aspergillus* تنتج أنواع كثيرة من الافلاتوكسينات من أخطرها أفلاتوكسين B1 يمكن أن تحدث أورام وتدهور في خلايا الكبد في الاسماك ومن اشهر الفطريات المنتجة للافلاتوكسينات *A flavus* ، *A parasiticus* (Pestka، 2005) . اضافة الى فطريات اخرى تثير القلق ايضا لانتاجها السموم الفطرية تشمل الاوكراتوكسين لتأثيراتها المختلفة في أنواع كثيرة من الكائنات الحية فهي سموم كلوية Nephrotoxic وتؤثر على الكبد Heptatoxic , كذلك تشوه الأجنة Teratogenic وهو عامـــــــــــل مسرطـــــنCarcinogenic ويقوم بتثبيط جهاز المناعة Immunosuppressive (Moura وآخرون ،2004 وGreco واخرون , 2015)

2-5: الظروف البيئية المؤثرة في نشاط الفطريات وانتاج السموم الفطرية

ان نمو الفطريات السامة وانتاجها للسموم الفطرية يتاثر بالعديد من العوامل البيئية مثل الرطوبة والتهوية والحرارة وكثافة السبورات وظروف الخزن وخاصة حدوث حالات تسرب الماء وتكاثفه على شكل بخار داخل المخازن والحرارة الذاتية للمادة المخزونة والتركيب الكيمياوي والقيمة الغذائية للمادة المخزونة وان من اكبر العوامل البيئية الحرجة التي تتحكم بقدرة الوسط الغذائي بدعم النمو الفطري هي درجات الحرارة والمحتوى الرطوبي والزمن ,ان الخزن تحت درجات حرارية واطئة يكون مناسبا للسيطرة على نمو الفطريات وتعد هذه الطريقة احدى اهم المقومات الاساسية للعديد من برامج الخزن التجاري ولكن استخدام المخازن المبردة على نطاق كبير لايعد مجديا من الناحية الاقتصادية وتم استخدام معيار الفعالية المائية عوضا عن نسبة الرطوبة في المواد الاولية المخزونة وكلما كانت الفعالية المائية واطئة كلما تضاءلت الفرصة لنمو الفطريات (FAO/WHO،2002).

بينما أظهرت نتائج الأبحاث السابقة أن كُل نوع من أنواع الفطريات لهُ ظروف تفضيلية لإنتاج السموم الفطرية وبالتالي , يجب أن تبدأ كُل محاولة للسيطرة على تلوث منتج معين بـ OTA مثلا من تحديد الكائن الحي المسبب , متبوعًا بالتعديل المناسب للظروف البيئية , وبشكل أساسي الرطوبة ودرجة الحرارة أثناء التخزين (2020,Twaruzek) ولتقليل التعرض الغذائي لِـ OTA حددت الهيئات التنظيمية في جميع أنحاء العالم مستويات قصوى من OTA , نظرًا

لأن الإزالة الكاملة من خلال طرق الإنتاج والمعالجة الحالية للمنتجات الزراعية غير مجدية (Zhang وآخرون,2021).

6-2: خصائص العلائق السمكية المنتجة من مصادر نباتية ومتطلباتها

تُعد الثروة السمكية من أهم المكونات الحية في البيئة المائية نظرا لفوائدها الكبيرة ومنافعها الجمة لكل من الإنسان والبيئة وقد استفاد الإنسان من هذه الثروة منذ قديم الأزل ولايزال مستمرا في ذلك حتى الوقت الحالي ولم تكتف المجتمعات البشرية بصيد الأسماك من الأنهار والبحار والمحيطات بل لجأت العديد من الدول إلى الاستزراع السمكي الذي يعتبر خطوة مهمة لزيادة الإنتاج وتحقيق الأمن الغذائي .

(Bobadilla-Carrillo واخرون ,2020) وبذلك فان توفير الغذاء (الأعلاف) يعتبر أحد أهم العوامل المهمة في عملية الاستزراع السمكي لدعم نمو الأسماك وصحتها، لذا تلجأ الدول إلى تصنيع أعلاف صناعية من مصادر نباتية توفر كل الاحتياجات الغذائية للأسماك من بروتين وكربوهيدرات ودهون وأملاح وفيتامينات. وتتشابه احتياجات الأسماك الغذائية نسبيا مع الحيوانات والدواجن مع اختلافات بسيطة، فحاجة الأسماك للطاقة أقل، لكن حاجتها للبروتين أكثر مقارنة بالدواجن والحيوانات الأخرى , نظرا لأن محتوى البروتين في المادة الجافة لأجسام الأسماك يتراوح من 60 إلى 93 % (Bhosale واخرون , 2010) .

أما الكربوهيدرات فيجب أن تكون جزيئات بسيطة كالسكريات الأولية حتى يتم هضمها بسهولة وتوفيرها بالكم الكافي لتمد الأسماك بالطاقة من دون اللجوء إلى مصادر أخرى للطاقة كالبروتين، مع الانتباه إلى ضرورة عدم الإفراط منها حتى لا تتخزن الزيادات منها على هيئة دهون والدهون مصدر غذائي في الأعلاف، ولها العديد من الوظائف كإمداد الطاقة وحماية الأعضاء الداخلية والمساعدة على امتصاص الفيتامينات الذائبة في الدهون (Olsen , 2011)

وهنـــاك عـــدد كبيـــر مـــن مصـــادر الأعـــلاف المســـتخدمة فـــي المـــزارع الســـمكية، وأهمهـا: الحبـوب ومخلفاتهـا مثـل الـذرة، ومخلفـات مصـانع الزيـوت مثـل كسـب (مسـحوق) عبـاد الشـمس الغنـي بالفيتامينـات، وفـول الصـويا الـذي يتميـز بتـوافر الليسـين والأحمـاض الأمينيـة، وكسـب الفـول السـوداني الغنـي بالـدهون، مادامـت تتـوافر فيـه بعـض الشـروط وهـي: تـوافره فـي البيئـة المحيطـة مـع رخـص ثمنـه، وقبـول الأسـماك لـه، والهضـم الجيـد، وملاءمـــة تركيبـــه الكيميـــائي لنـــوع الأســـماك. (Bharathi واخـــرون , 2019) . وعلـــى الـرغم مـن كـل الاحتياطـات التـي تتخـذها المصـانع فـي إنتـاج أعـلاف خاليـة مـن الفطريـات وسـمومها ومظـاهر الفسـاد الأخـرى مثـل التـزنخ والـتعفن، فـإن معظـم الأعـلاف تتعـرض نتيجـة للتخـزين السـيئ لمكونـات الأعـلاف وكـذلك العلـف المصـنع، للإصـابة بالعديـد مـن الســموم الفطريــة، وأهمهــا الأفلاتوكســينات والاوكراتوكســينات التــي تعــد أخطــر وأكثــر السـموم الفطريـة انتشـارا. لـذا يجـب إيجـاد طريقـة آمنـة واقتصـادية للـتخلص مـن الآثـار الضـارة التـي تحـدثها السـموم الفطريـة فـي الأسـماك والتـي تـؤثر فـي صـحتها، ومـن ثـم فـي صحة المستهلكين.(Anater واخرون ,2016 و FAO , 2016)

إضـافة إلـى ذلـك، فـالأعلاف التـي تحتـوي علـى نسـبة عاليـة مـن الكربوهيـدرات كـالأرز والـذرة الصـفراء تكـون بيئـة مناسـبة لنمـو الفطريـات بصـورة أسـرع مـن الأعـلاف المحتويـة علـى نسـبة عاليـة مـن الزيـوت. وتنمـو الفطريـات علـى كثيـر مـن الأغذيـة وبخاصـة الأغذيـة المخزونـة والموجـودة تحـت درجـات حـرارة ودرجـات رطوبـة مناسـبة لنموهـا ومعظـم السـموم الفطريـة المفـرزة أو المنتجـة مـن الفطريـات تكـون مسـرطنة للخلايـا وتـؤدي أيضـا إلـى حـدوث اضـطرابات عصـبية التـي قـد تسـبب تثبـيط وتـدهور خلايـا الكبـد فـي الأسـماك، وقـد تسـبب أورامـا وتـدهورا فـي خلايـا الكبـد والكلـى وانخفاضـا فـي معـدلات نمو الأسماك وتدهور جودة لحمها (Gonçalves واخرون , 2020).

وللسـيطرة علـى وجـود هـذه السـموم والحـد مـن أخطارهـا ومحتـوى الأغذيـة منهـا، وصـولاً إلـى مـا يسـمى "بالحـدود الآمنـة" للأسـماك، يجـب اسـتخدام العديـد مـن الطـرق الطبيعيـة والكيميائيـة والبيولوجيـة , وعلـى الـرغم مـن أن الطـرق الطبيعيـة تركـز علـى إزالـة جزئيـة لهـذه السـموم مـن الأغذيـة والأعـلاف الملوثـة بهـا، فـإن فاعليـة هـذه الطـرق فـي إزالـة

سمية هذه السموم والتخفيف من آثارها لا تزال مشكلة مؤرقة , وعموماً فإن الطريقة الناجحة التي تستخدم لإزالة السمية يجب أن تكون اقتصادية وقادرة على إزالة كل الآثار الملوثة من هذه السموم دون أن تترك أي متبقيات ضارة، كما يجب ألا تؤثر في القيمة الغذائية للأسماك ومن أكثر الطرق تطبيقاً لحماية الأسماك من التلوث بالسموم الفطرية استخدام المواد المدمصة التي تخلط مع الأعلاف الملوثة، حيث ترتبط بالسموم الفطرية في القناة الهضمية للأسماك (Sultana وHanif , 2019) .

وأظهرت بعض الدراسات أن السمية في الأسماك الناتجة عن التزنخ والأكسدة للزيوت ربما تتحسن بواسطة إضافة الفيتامين (E) وألفا–توكوفيرول. ومن ثم فإن إضافة المضادات الطبيعية لأكسدة للدهون إلى الأغذية المحتوية على الدهون قد تعوق التأثيرات السامة لهذه الدهون المتزنخة والسموم الفطرية في علائق الأسماك، والتي قد تكون سببا في تدهور الثروة السمكية ومن ثم صحة الإنسان.(Tacon و Metian , 2013). وتعتمد الحماية البيولوجية على مزيج مثبت علميًا من مستخلصات نباتات وطحالب مختارة بعناية، لتعزيز وظائف الكبد والمناعة لدى الأسماك، والتعامل مع الآثار السلبية للسموم الفطرية. ويكون ذلك باستخدام مادة آمنة متاحة ورخيصة وتضاف إلى علائق الأسماك في صورة طبيعية ودون أن تتأثر بعملية التصنيع (2008 , Tacon)

2-7: تأثيرات السموم الفطرية في تربية وصحة الأسماك

قد ينتج عن استخدام عليقة الأسماك النباتية الإصابة بفطريات سامة نواتج أيضها الخطيرة التي يطلق عليها السموم الفطرية , وتعد الأفلاتوكسينات والاوكراتوكسينات من أكثر مجموعات السموم الفطرية تلويثاً للأعلاف ومكوناتها المختلفة، وتتسبب في خسائر اقتصادية كبيرة بمخزون الأسماك الطبيعي، لاسيما في الاستزراع المائي وتعتبر السموم الفطرية السبب الرئيسي لنفوق أعداد كبيرة من الأسماك وقابليتها للإصابة بالأمراض، وانخفاض إنتاجيتها، هذا بجانب ما يتبقى من آثار من هذه السموم في لحوم تلك الأسماك، مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة، فضلا عن تسمم

المستهلكين لها (Gonçalves واخرون , 2015 وMwihia واخرون , 2020و Koletsi واخرون , 2021)

2-7-1: تأثيرات السم الفطري الاوكراتوكسينA في تربية وصحة الأسماك

اشارت الدراسات السابقة ان من اهم التأثيرات على صحة الأسماك نتيجة تعرضها الى عليقة ملوثة بالسم الفطري الاوكراتوكسين A كانت انخفاض في زيادة وزن الجسم , و انخفاض في معدل تحويل الأعلاف , وتدهور اغلب معايير الدم وانخفاض في الهيماتوكريت , حدوث تأثيرات وتشوهات في الكبد والكلية الخلفية اذ تتمركز الخلايا البلعمية الميلانينية في أنسجة الكبد والبنكرياس والكلية الخلفية وانخفاض عدد أو عدم وجود خلايا البنكرياس الخاصة بالإفرازات الخارجية و زيادة معدل الهلاكات (Manning واخرون , 2003) .

بينما أشار Diab وآخرون (2018) الى ان اهم تأثيرات السم الفطري الاوكراتوكسين على صحة الأسماك تمثلت بانخفاض زيادة الوزن وانخفاض تناول العلف ومعدل التحويل العلفي وبالتالي انخفاض الوزن النهائي. وكذلك سجلت حالات الحركة البطيئة , وظهور حالات تدهور في الكبد والكلى والطحال , اذ سجل تضخم واحتقان الكلى والكبد وتمدد الأوعية الدموية وتنخر خلايا الكلى واتلافها وتنخر خلايا الكبد, والتهاب عضلة القلب و تضخم المرارة بينما سجل زيادة مستويات الناقل أمين الألانين، وأمين الأسبارتات الناقل والكرياتين و انخفاض في إجمالي البروتين والألبومين والجلوبيولين, وبالتالي ارتفاع معدل الوفيات

وفي دراسة عن اهم تاثيرات الاوكراتوكسين في بعض النواقل الكيميائية وإنتاج البروتينات الخاصة بتنظيم عمل الخلايا في انسجة الأسماك , وجد ان اهم هذه التاثيرات هو زيادة في الفوسفاتيز القلوي والكوليسترول والبروتين الكلي والألبومين والأسبارتات و كذلك زيادة في مستويات الامينات الناقلة وزيادة التعبير mRNA في تصنيع مجموعة بروتينات مناعية , وهذا ما يؤيد استحثات المقاومة الدفاعية المناعية في الطحال. (Bernhoft واخرون , 2018)

وفي دراسة قام بها El-Sayed واخرون 2009 عن اهم التغيرات السلوكية والتأثيرات المظهرية الخارجية التي تطرآ على الأسماك عند تعرضها الى جرعات محددة من الاوكراتوكسين A ضمن العليقة الملوثه به , اذ سجلت اهم التغيرات السلوكية – الحركة البطيئة، فقدان التوازن، الحركة والتغيرات في نمط السباحة ومظاهرتدهور الجهاز التنفسي , والتشنجات العضلية قبل الوفاة. بينما اهم التغيرات المظهرية تمثلت بظهور بقع نزفية على السطح الظهري , تآكل الزعانف وتشكيل بقع صدئية في منطقة البطن والظهر , تشوهات بالجهاز العضلي وتغلف وتشوه بالخياشيم, وظهور بقع الازدحام على الأطراف وانخفاض بالوزن النهائي وزيادة معدل الوفيات.

2-7-2: تأثيرات السم الفطري الافلاتوكسينB1 في تربية وصحة الأسماك

بينت العديد من الدراسات السابقة التأثيرات الصحية والسلوكية في الأسماك عند تربيتها على عليقة علفية ملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسين B1 , وان اهم هذه التأثيرات انخفاض تناول العلف وفقدان الوزن والضعف في الأداء و التغيرات في سلوك السباحة وظهور تبقعات جلدية نزفية في الرأس والبطن وكذلك بقع صفراء في المنطقة الصدرية وانحناء الحبل الشوكي , وتراكم السوائل في البطين والكلى. والتهاب الكبد وسرطان الكبد. وفرط التهاب المرارة . (Farabi واخرون , 2006)

في حين بينا El-Sayed و Khalil , (2009) بعض التأثيرات المتشابهة لسم الافلاتوكسين على الأسماك , فقد اشارا الى ظهور سلوك غير طبيعي حركات بطيئة، وعدم توازن السباحة، وحركة غامضة سريعة وفقدان التوازن ,التشنجات العضلية قبل الوفاة , وكذلك نزيف وبقع صفراء على سطح الجلد الظهري, وسائل نزفي في تجويف البطن , وسواد سطح الجسم. وكذلك احتقان داخلي شامل وشحوب في لون الكبد والكلى والخياشيم. انتفاخ شديد في المرارة. وتغيرات في عتامة العين وجحوظ العين, زيادة في نشاط الترانساميناسات في الدم والفوسفاتيز القلوي, وانخفاض في بروتينات البلازما والزلال والجلوبيولين.

و أشـــار Jantrarotaiواخـــرون (1990) الـــى ان اهـــم تـــأثيرات الافلاتوكســـين علـــى الاسـماك كانـت ارتجـاع محتويـات المعـدة, و تغيـر لـون الخياشـيم والكبـد والكلـى والطحـال والمعـدة والأمعـاء , واما مـا يتعلـق بمعـايير الـدم فقـد أظهـرت انخفـاض الهيماتوكريـت وانخفـاض تركيـز الهيموكلـوبين وانخفـاض عـدد كريـات الـدم الحمـراء والبيضـاء , ونخـر عـام فـي مكونـات الـدم . وظهـور تشـوهات نسـيجية فـي الغشـاء المخـاطي فـي الأمعـاء ، وخلايـا الكبـد، خلايـا البنكريـاس والغـدد المعديـة , انخفـاض فـي حجـم كريـات الـدم الحمـراء وعددها و الكريات البيضاء في الطحال.

وفـي دراسـة أخـرى بينـت انخفـاض معـدل النمـو وانخفـاض الهيماتوكريـت وتركيـز الهيموكلـوبين وعـدد كريـات الـدم الحمـراء , زيـادة فـي الكريـات البـيض وتنخـر واضـح لخلايـا الكبـد ونخـر فـي الغـدد المعديـة , زيـادة نشـاط المكونـات للأنسـجة المكونـة للـدم .وقـد تتـراكم أصـباغ صـدأ الحديـد فـي ظهـارة الغشـاء المخـاطي فـي الأمعـاء (Jantrarotai و Lovell, 1990)

واكـد Deng واخـرون (2010) ان انخفـاض الـوزن والنمـو واصـفرار سـطح الجسـم والاضـطرابات الكبديـة - انخفـاض محتـوى الـدهون، والارتشـاح عـن طريـق الخلايـا الالتهابيـة ، وظهـور بقـع بيضـاء مـن التنخـر، وتنخـر خلايـا الكبـد وانخفـاض فـي تركيـز البـروتين الكلـي والألبـومين. هـي اهـم تـأثيرات السـموم الفطريـة (الافلاتوكسـينB1) علـى الأسـماك , فـي حـين أشـار Chavez-Sanchez واخـرون (1994) انخفـاض تنـاول الأعـلاف النمـو وظهـور التغيـرات النسـيجية فـي الكبـد - التغيـرات الورميـة (سـرطان الكبـد) والكبد الدهني. احتقان الكلى .

وكـذلك تـم تسـجيل تضـخم الكبـد مـع تغيـرات نسـيجية - عقيـدات بيضـاء أو صـفراء أو تورمـات تشـبه الـورم السـرطاني لخلايـا الكبـد غيـر الطبيعيـة، التنخـر والنزيـف و تضـخم القلب والكلى وتورم البطن(Mwihia واخرون ,2018)

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1: الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب .

الجدول 1: الأجهزة والادوات المستخدمة في أجراء التجارب الواردة في البحث .

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشا
1	الحاضنة (Incubator)	Memmert	Germany
2	المؤصدة (Autoclave)	LabTech	South Korea
3	ثلاجة (Refrigerator)	L.G	Korea
4	مجهر ضوئي مركب (Compound light Microscope)	Olympus	Japan
5	ميزان حساس (balance Analytical)	Sartorius	U.K.
6	انابيب اختبار (Test tubes)	Sigma	England
7	اطباق بتري (Petri-Dishes)	-	Chine
8	دوارق زجاجية مختلفة الاحجام (Flasks)	Unisonic LTD	England
9	اوراق ترشيح (Filter Papers)	Whatman	England
10	شرائح زجاجية (Slides and cover (slide	Whatman 4	England
11	محقنة طبية (Medical Syringe)		England
12	Hood	LabTech	South Korea
13	جهاز تقطير(Distillation)	Gesellschaft fur Laborttechnik(GFL)	Germany
14	جهاز هزاز (Vortex)	Heidolph	Germany
15	أوراق سليفون	Zhangjiagang	China
16	اصص بلاستيكية(Anvil)	---	China
17	القطن (Cotton)	BDH	England
18	milepor	Sartorius Stedim	Germany
20	جهارUv	---	Japan
21	جهار HPLC	---	Japan
23	جهاز EC	---	Germany
24	مناخل (Sieves)	Ogawa seikico	Japan
25	سحاحة	---	China
26	مطحنة كهربائية	Mammanlex	China

27	جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometry)	---	France
28	جهاز قياس درجة الاس الهيدروجيني (pH-meter)	Ogawa seikico	Japan
29	Loop	---	---
30	ثاقب فليني (Cork Borer)	---	Germany
31	جهاز الطرد المركزي Centrifuge Cooling	HettichEBA.20	Germany
32	Ultrasonic bath	---	China

الجدول 2: المواد الكيميائية المستعملة في إجراء التجارب الواردة في هذه الدراسة .

ت	المواد الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشا
1	اكار(Agar)	Himedia	India
2	ماء مقطر (Distilled water)	---	---
3	كحول اثيلي (Ethanol)	الجود	Iraq
4	مضاد حيوي Amoxicillin	Samara	Iraq
5	مضاد حيوي Chloramphinicol	Samara	Iraq
6	كلوروفورمchloroform	HIMEDIA	INDIA
7	ميثانولmethanol	HIMEDIA	INDIA
8	خلات الاثيلethyl acetate	HIMEDIA	INDIA
9	دايكرومات البوتاسيوم potassium dichromate	HIMEDIA	INDIA
10	حامض الكبريتيك المركز Concentrated sulfuric acid	BDH	England
11	سلفات الفضةsilver sulfate	BDH	England
12	حامض الفسفورphosphorous acid	BDH	England
13	داي فينل امينDivinyl Amin	HIMEDIA	INDIA
14	سلفات الحديد iron sulfate	HIMEDIA	INDIA
15	stander	Biobiopha	China
16	فورمالين Formalin	Fluka	Switzerland
17	Sodium Phosphate Buffer	HIMEDIA	INDIA
18	الكاتيكـــول Catechol	HIMEDIA	INDIA

19	Pyrogallol	BDH	England
20	H2O2	BDH	England
21	كاشف فولن Folin – Ciocalteau	BDH	England
22	كاربونـــات الصوديوم	HIMEDIA	INDIA
23	حامضGallic Acid	BDH	England

الجدول 3: الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة .

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	الغرض من استخدامه
1	وسط البطاطا دكستروز آكار Potato Dextrose Agar (P.D.A.)	India-Himedia	عزل وتنمية وتشخيص الفطريات
2	وسط الآكار المائي Water Agar (W.A.)	حضر مختبريا	لمعرفة أمراضية الفطريات
3	وسط البطاطا سكروز السائل Potato Sucrose Broth (P.S.B.)	حضر مختبريا	للحصول على العالق الفطري
4	وسط البطاطا سكروز الصلب Potato Sucrose Agar (P.S.A.)	حضر مختبريا	للحصول على العالق الفطري
5	وسط حبوب الذرة البيضاء	حضر مختبريا	لتنمية الفطريات

3-2: تحضيرالأوساط الزرعية المستخدمة في تنمية الفطريات لاجل العزل والتشخيص

استخدمت في هذه الدراسة أوساطاً زرعية مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها وكذلك لغرض أجراء التجارب الخاصة بها وكما يأتي :

3-2-1: وسط البطاطا سكروز اجار Potato Sucrose Agar (P.S.A) .

حضر الوسط بأخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة والمقطعة الى قطع صغيرة وغليها بالماء المقطر بحجم 500 مل لمدة 20 -30 دقيقة في دورق زجاجي وبعد إنتهاء مدّة الغليان رشح المخلوط في دورق زجاجي بقطعة من القماش الشاش للحصول على الراشح , اذيب 10 غم من سكر السكروز و17 غم من الاكار في 500 مل اخرى ثم اضيف إليها راشح البطاطا واكمل الحجم الى واحد لتر, اضيف اليها 250 ملغم / 1لتر من المضاد الحيوي Chloramphinicol, وزع الوسط في دوارق زجاجية بحسب الحاجة واغلقت فوهاتها بسدادات من القطن وعقمت بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم صب الوسط في الأطباق البلاستيكية حسب التجربة المطلوبة او حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-2:وسط البطاطا دكستروز آكار الجاهز Potato Dextrose Agar P.D.A.

حضر بإذابة 39 غم في واحد لتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol وعقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب , ثم صب الوسط في الأطباق البلاستيكية حسب التجربة المطلوبة أو حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3-2-3: وسط الاكار المائي (W.A) Water Agar .

حضر باذابة 17 غم من الاكارفي واحد لتر من الماء المقطر وتوزيعه في دوارق زجاجية حسب الحاجه, وتعقيمه بواسطة جهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 م ه وضغط 15 باوند /انج2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 مْ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

3-2-4: وسط البطاطا سكروز السائل (P.S.B.) Potato Sucrose Broth .

حضر هذا الوسط بغلي 200 غم بطاطا لكل لتر ماء لمدة 30 دقيقة ثم اخذ الراشح و اضفنا 10 غم سكر سكروز وخلط جيدا وغلق باحكام وعقم بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م°

وضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 20 دقيقة وبعد انتهاء مدّة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م˚ وقبل التصلب ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol ثم صب الوسط في انابيب اختبار خاصة حسب التجربة المطلوبة و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

3-2-5: وسط حبوب الذرة البيضاء .

حضر الوسط باستعمال حبوب الذرة البيضاء , وذلك بعد غسلها جيدا للتخلص من الاتربة والشوائب وتنقيعها لمدة ساعة واحدة بالماء, بعدها تم التخلص من الماء الزائد منها بوضعها على قطعة من الشاش, وزعت باوزان متساوية في دوارق زجاجية , وأغلقت بإحكام بعدها عقمت جميعها بواسطة المؤصدة في درجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند/ انج^2 و لمدة 20 دقيقة , وبعد انتهاء مدة التعقيم تركت الدوارق لحين وصول درجة الحرارة 45 م˚ ثم اضيف إليه المضاد الحيوي Chloramphinicol العكيلي (2022) .

3-3: جمع العينات Sample collection

جُمعت 48 (جدول 4) عينة مختلفة من حبوب المحاصيل الحقلية المخزونة بأشكالها المنفردة والمخلوطة بشكل عليقة حيوانية محلية مصنعة ونماذج من العليقة المستوردة , بصورة عشوائية من ثمان معامل لانتاج العليقة الحيوانية بواقع معملين لكل محافظة والتي شملت محافظات بغداد وكربلاء وبابل والانبار تمت تغطية مجموعة واسعة من حبوب المحاصيل المستخدمة في انتاج الاعلاف الحيوانية , للتأكد من ان المسح الميكروبي يشمل المكونات الأساسية لهذه الاعلاف كافة , اذ شملت العينات حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا ونموذج العليقة المصنعة منها لكل معمل من المعامل المشمولة بالمسح ونموذج من العليقة الجاهزة المستوردة من نفس مناطق الجمع , جمعت العينات خلال شهري آب وأيلول 2022 بواقع ثلاث مكررات للعينة وبأوزان 2-4 كغم / للمكرر الواحد , وضعت في أكياس بولي اثلين , سُجل عليها : رمز العينة , الموقع المأخوذ منه العينة وتاريخ جمع العينة نقلت إلى مختبر السموم الفطرية في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة كربلاء , خلطت مكررات العينة الواحدة جيدا وقُسمت إلى مجموعتين الأولى لعزل الفطريات المرافقة وإجراء الدراسات اللاحقة والثانية تم تخزينها في درجة حرارة الغرفة للكشف عن مدى تلوثها بالسموم الفطرية , خلال الأسبوع الأول بعد الجمع لمنع التلوث الثانوي .

الجدول (4) مكان ونوع العليقة وتأريخ جمع العينات من اربعة محافظات من العراق

ت	المحافظة	المعمل او الموقع	نوع الحبوب او العليقة	الرمز	تاريخ الجمع
1	محافظة الانبار	المعمل الأول قضاء الفلوجة	حبوب الحنطة	A1W	10/ 8 /2022
			حبوب الشعير	A1B	10/ 8 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	A1C	10/ 8 /2022
			حبوب فول الصويا	A1S	10/ 8 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	A 1F	10/ 8 /2022
			العليقة المستوردة	A 1FF	10/ 8 /2022
		المعمل الثاني قضاء الصقلاوية	حبوب الحنطة	A 2W	10/ 8 /2022
			حبوب الشعير	A 2B	10/ 8 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	A 2C	10/ 8 /2022
			حبوب فول الصويا	A 2S	10/ 8 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	A 2F	10/ 8 /2022
			العليقة المستوردة	A 2FF	10/ 8 /2022
2	محافظة بغداد	المعمل الأول قضاء اليوسفية	حبوب الحنطة	B 1W	6/ 8 /2022
			حبوب الشعير	B 1B	6 / 8 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	B 1C	6/ 8 /2022
			حبوب فول الصويا	B 1S	6/ 8 / 2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	B1F	6 / 8 /2022
			العليقة المستوردة	B 1FF	6 / 8/ 2022
		المعمل الثاني ناحية المحمودية	حبوب الحنطة	B 2W	6/ 8 /2022
			حبوب الشعير	B 2B	6/ 8 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	B 2C	6/ 8 / 2022
			حبوب فول الصويا	B 2S	6 / 8 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	B 2F	6 / 8 / 2022
			العليقة المستوردة	B 2FF	6 / 8 /2022
3	محافظة بابل	المعمل الأول قضاء المسيب	حبوب الحنطة	H1W	28 / 7 /2022
			حبوب الشعير	H1B	28 / 7 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	H1C	28 / 7 /2022
			حبوب فول الصويا	H1S	28 / 7 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	H1F	28 / 7 /2022
			العليقة المستوردة	H1FF	28 / 7 /2022
		المعمل الثاني قضاء المحاويل	حبوب الحنطة	H2W	28 / 7 /2022
			حبوب الشعير	H2B	28 / 7 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	H2C	28 / 7 /2022
			حبوب فول الصويا	H2S	28 / 7 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	H2F	28 / 7 /2022
			العليقة المستوردة	H2FF	28 / 7 /2022
4	محافظة كربلاء	المعمل الأول قضاء الهندية	حبوب الحنطة	K 1W	3/ 9 /2022
			حبوب الشعير	K 1B	3/ 9 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	K 1C	3/9 / 2022
			حبوب فول الصويا	K 1S	3/ 9 /2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	K 1F	3/ 9 /2022
			العليقة المستوردة	K 1FF	3/ 9 /2022
		المعمل الثاني ناحية الحر	حبوب الحنطة	K 2W	3/ 9 /2022
			حبوب الشعير	K 2B	3/ 9 /2022
			حبوب الذرة الصفراء	K 2C	3/ 9 / 2022
			حبوب فول الصويا	K 2S	3/ 9 / 2022
			العليقة المتكاملة من الحبوب	K 2F	3/ 9 /2022
			العليقة المستوردة	K 2FF	3/ 9 /2022

3-4: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا والعليقة السمكية

عُقمت الحبوب سطحيًا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 2% لمدة دقيقة , ثم غسلت بالماء المقطر مرتين لإزالة تأثير المادة السامة , جففت بورق ترشيح Watman no.2 وزرعت في أطباق بتري حاوية على الوسط الزرعي PDA بواقع 100 حبة لكل عينة ومن ثم حُضنت الأطباق على درجة حرارة (25 ± 2 مْ لمدة 3-5 أيام), بعد ذلك عُزلت الفطريات المرافقة والملوثة للحبوب التي تعود للأجناس *Penicillium* spp. , *Aspergillus* spp. و *Fusarium* spp. وغيرها .

نُقيت هذهِ النموات الفطرية بإتباع طريقة البوغ المنفرد بتمرير Loop معقم على مستعمرة الفطر المُنماة على وسط PDA وخططت أربع أطباق بتري حاوية على الوسط WA ثم حضنت ليومين وأخذت المستعمرة النامية من البوغ المنفرد لِأطباق حاوية على الوسطPDA , حُضنت وشُخصت وفقًا للمفتاح التصنيفي Samson وآخرون (2019) والصفات المظهرية التي اشار اليهاكُل من Houbraken واخرون (2014) و Demjanova وآخرون (2020) وRozaliyani وآخرون(2021) وLass-Florl وآخرون(2021) وSchmidt وآخرون(2021) وChandra Mohana وآخرون (2022) وAtallah وآخرون (2022) تم تحديد وتأكيد العزلات المنتجة للسموم الفطرية الى مستوى النوع باستخدام الطرق الجزيئية .

تم حساب النسبة المئوية للظهور Occurence والنسبة المئوية للتردد Frequency للعزلات الفطرية المعزولة وفقًا للمعادلات :

$$\textbf{النسبة المئوية لظهور العزلات الفطرية} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكُلي للعينات}} \times \textbf{100\%}$$

$$\textbf{النسبة المئوية لتردد عزلات الفطر} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر الواحد}}{\text{عدد العزلات الكلية في العينات}} \times \textbf{100 \%}$$

(Sharma وآخرون,2021).

3-5: حفظ العزلات الفطرية المعزولة

حُفظت عزلات الفطريات *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* على الوسط الزرعي PDA (بعد تنقيتها بطريقة البوغ المنفرد) اذ صُب الوسط في قناني زجاجية معقمة حجم (25 مل) وضعت بشكلٍ مائل Slant حتى التصلب ثم لقحت بالعزلات الفطرية النقية بواقع 3 مكررات لِكُل عزلة, حُضنت وحفظت في درجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام مع تجديدها كُلما دعت الحاجة لذلك.

3-6: الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج السم الفطري Aflatoxin B1 وOchratoxin A

3-6-1: تنمية العزلات الفطرية لانتاج السموم الفطرية

للكشف عن قدرة العزلات الفطرية على انتاج السموم الفطرية تم تنمية 18عزلة فطرية من الفطر *Aspergillus* spp على وسط الذرة البيضاء , حُضر هذا الوسط حسب الطريقة المذكورة في الفقرة (3-2-5) أضيفت 3 أقراص قطر كُل منها 0.5 سم اخذت من طرف النمو الفطري النقية بعمرسبعة أيام لِكُل دورق زجاجي (250 ml) بواقع ثلاثة مكررات للعزلة الواحدة , حُضن الوسط الملقح بالعزلات الفطرية لمدة 21 يومًا بدرجة حرارة 25±2 °م لتسع عزلات *A niger* وتسع عزلات اخرى تعود للفطر *A flavus* (جدول 5) مع التحريك المستمر لضمان توزيع الفطر على أجزاء الوسط جميعها , ثم خفضت درجة الحرارة بعد انتهاء مدة 21 يوم إلى 15±2 و10±2 م° لسبعة أيام , لِتحفيزها على إنتاج مركبات الايض الثانوي (السموم الفطرية)

الجدول (5) ترميز العزلات الفطرية المنماة على وسط الذرة البيضاء للكشف عن قابليتها على انتاج السموم الفطري Aflatoxin B1 وOchratoxin A

ت	الفطريات المعزولة	رمز العزلة	العينات التي عزلت منها
1	*A. flavus*	A F A 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل الانبار1/ الفلوجة
2	*A. flavus*	A F A 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل الانبار2/ الصقلاوية
3	*A. flavus*	A F B 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل بغداد1/ اليوسفية
4	*A. flavus*	A F B 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل بغداد2 / المحمودية
5	*A. flavus*	A F H 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل بابل1/ المسيب
6	*A. flavus*	A F H 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل بابل 2/ المحاويل
7	*A. flavus*	A F K 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل كربلاء1/ الهندية
8	*A. flavus*	AFK 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل كربلاء2/ الحر
9	*A. flavus*	A F F	عزلت من العليقة المستوردة / الانبار/ الفلوجة
10	*A niger*	A N A 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل الانبار1/ الفلوجة
11	*A niger*	A N A 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل الانبار2/ الصقلاوية
12	*A niger*	A N B 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل بغداد1/ اليوسفية
13	*A niger*	A N B 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل بغداد2 / المحمودية
14	*A niger*	A N H 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل بابل1/ المسيب
15	*A niger*	A N H 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل بابل 2/ المحاويل
16	*A niger*	A N K 1	عزلت من العليقة المحلية / معمل كربلاء1/ الهندية
17	*A niger*	A N K 2	عزلت من العليقة المحلية / معمل كربلاء2/ الحر
18	*A niger*	A N F	عزلت من العليقة المستوردة / الانبار/ االفلوجة

2-6-3 : استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A

طحنت عينات حبوب الذرة البيضاء المنمى عليها العزلات الفطرية باستخدام مطحنة كهربائية للحصول على جزيئات دقيقة ومتجانسة ثم وزن 10 غم من مسحوق كُل عينة أُضيف إلى محلول الاستخلاص (ميثانول CH_4O : كلوريد البوتاسيوم KCL 4%) وبواقع (1:9) وبحجم 60 مل , يتجانس الخليط المتحصل عليه باستخدام هزاز كهربائي Shaker (45 دقيقة , 200 دورة في الدقيقة , بدرجة حرارة الغرفة) رشح الخليط بعد مرور 24 ساعة بورق ترشيح Watman no.2 (راشح أولي) أخذ منه 30 مل وخلط جيدًا مع 30 مل محلول كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ 30% , ثم رشح مرة أخرى بالطريقة نفسها (Hackbart وآخرون,2012).

3-6-3 : تنقية المستخلص للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A

تمت تنقية المستخلص الاولي للسموم باستخدام عمود الكروماتوغرافي (50 cm × 12 mm) حُضر حسب الطريقة المتبعة من قبل العكيلي,(2022) بتنشيط السليكا جل عن طريق التسخين في فرن كهربائي (130 °م , 45 دقيقة) وضعت في قاعدتهِ كرة من الصوف الزجاجي ثم أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لإعطاء قاعدة متساوية لسيلكا جل بعد ذلك أضيف $CHCL_3$ حتى يصبح العمود نصف ممتلئ تقريبا , ثم أضيف ببطء 2.0 غم سليكا جل مع غسل جوانب العمود بالكلوروفورم $CHCL_3$, حرك الخليط بقضيب زجاجي لإزالة فقاعات الهواء المتكونة ولِرص السليكا سُحب $CHCL_3$ إلى الأسفل وتركت مسافة 3 سم فوق السليكا جل لتفادي جفاف العمود بعد ذلك أضيف 0.5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) وبهذا أصبح العمود جاهزًا للاستخدام .

أضيف المستخلص المُحضر سابقًا , ووضع ببطء في العمود ثم جُمع الراشح الأخير في قناني زجاجية vials معتمة (25 mL) تم الفصل بإضافة 50 مل كلوروفورم $CHCL_3$ وضع المزيج في قمع الفصل ورج جيدًا مع مراعاة فتح الصمام بين فترة واخرى لتفريغ الغازات المتكونة وترك على الحامل ليتم الفصل أهملت الطبقة العليا وكررت العملية مرتين ثم مرر الراشح فوق 10 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4). تم تبخير المذيب بدرجة

حرارة 50 °م وحفظ الراشح في Vilas معتمة (2.0 mL, بدرجة حرارة -20 °م) لحين اجراء الكشف النوعي والكمي (Hackbart وآخرون,2012).

4-6-3 : تجهيز السم القياسي Standard

تـم تجهيـز المـادة القياسـية لكـل مـن السـمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A (2mg ,purity>98.9%) من شركة Segma-Aldrich (Germany) وخزنت عند درجة حرارة – 20 م° لحين إجراء التحليل.

5-6-3 : الكشف النوعي والتقدير الكمي للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A بتقانة HPLC للعزلات الفطرية

أُجري التحليل الكروماتوغرافي في وزارة العلوم والتكنلوجيا / دائرة بحوث وتكنلوجيا البيئة والمياه باستخدام نظام كروموتوغرافي سائل عالي الأداء high performance liquid chromatographic (Germany,SYKAMN) (HPLC) مُقترن بـ RF-10A XL fluorescence detector , تم إجراء الفصل الكروماتوغرافي باستخدام عمود Phenomenex HPLC ذي الطور العكسي (C18,250mm x 4.6 mm, 5µm) مع الطور الناقل من الأسيتونيتريل : ماء : 2-بروبانول (30:65:5, v/v/v, ph 2.95) بمعدل جريان 1 مل/دقيقة -1, تم الاحتفاظ بدرجة حرارة العمود عند 25 درجة مئوية. كانت حالة الكشف عن التألق عند 330 nm للتوهج و500 nm للانبعاثات في تحليل Afla(Sari وآخرون,2020),

أما ظروف تحليل OTA :باستخدام عمود طور المعكوس C18 (150mm × 4.6 mm, 3.5 µm) , كاشف الفلوريسنت : (FLD, exc=333 nm , em=460 nm ; gain=100) تمت تصفية العينة بمعدل الجريان 1 مل/دقيقة وكان حجم الحقن 10 ميكرولتر . الطور المتحرك عبارة عن خليط من أسيتونتريل/ماء/حامض أسيتيك (v/v/v , 2:99:99) وكانت درجة حرارة العمود 30 درجة مئوية (Zou وآخرون,2022).

تم حساب التركيز من خلال المعادلة :

$$\text{C sam} = \frac{C\,st * A\,sam}{A\,st} * \frac{D.F}{Wt}$$

(تركيز العينة)*C sam = Concentration of sample

(تركيز المادة القياسية) C st = Concentration of standard

(مساحة العينة) A sam = sample area

(مساحة المادة القياسية) A st = standard area

(وزن العينة) Wt = weight of sample

(معامل التخفيف) D.F = dilution factor

3-7: تحليل السموم الفطرية من Aflatoxin B1 وOchratoxin A في عينات العليقة الحيوانية المجموعة .

نفذ هذا الاختبار للكشف عن تلوث العليقة الحيوانية المصنعة لتغذية الاسماك بالسموم الفطرية , بغض النظر عن تلوثها بالفطريات المصاحبة , اذ تم استخلاص السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A من هذه العينات المدروسة تسع عينات رئيسية ثمانية عينات بلت محلية مصنعة من تجميع الحبوب المخزونة لكل معمل وعينة واحدة للعليقة المستوردة بابل / المسيب (سعودي المنشأ) بعد خلطها جيدًا باتباع خطوات الاستخلاص السابقة وخطوات التنقية (3-6-3) والكشف والتقدير النوعي والكمي باستخدام نظام كروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC كما في الفقرة السابقة (3-6-5) .

3-8 : التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتجة للسمين Aflatoxin B1 وOchratoxin A

استهدفت أربع عزلات فطرية (عزلتان من الفطر *A niger* وعزلتان من الفطر *A flavus*) وفقا لقدرتها على انتاج السموم الفطرية اذ تم انتخاب اعلى عزلة منتجة للسم الافلاتوكسين واقل عزلة منتجه له من الفطر *A flavus* وكذلك بالنسبة للفطر *A niger* في انتاج السم الاوكراتوكسن لدراسة التركيب الجيني والوراثي بين قابلية هذه العزلات على انتاج السموم الفطرية . اذ استخدمت طريقة البوغ المنفرد لتنشيط العزلات الفطرية في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA وضعت عند درجة حرارة (25 ±2 مْ) لمدة سبعة أيام وبعد اكتمال نمو المستعمرات الفطرية اخذت الى شركة جسر المسيب من أجل إجراء مراحل الاستخلاص للـ DNA .

3-8-1 : استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات الفطرية

أجريت عملية استخلاص الحامض النووي DNA حسب تعليمات شركة Bioneer الكورية وذلك حسب الخطوات التاليه :-

1- سحق 100 – 500 ملغم من الغزل الفطري في النتروجين السائل بواسطة هاون خزفي.
2- أخذ 100 ملغم من العينة التي تم سحقها باستخدام ملعقة صغيرة ووضعت في أنابيب بلاستك حجم 2 مل وذلك لاستخلاص الحامض النووي DNA .
3- أضيف 180 مايكرولتر من Universal Digestion Buffer + 20 مايكرولتر من Protenase K للعينات المراد استخلاص المادة الوراثية منها ووضعت في حمام مائي درجة حرارته 56°م لمدة 30 دقيقة لتحطيم الجدار الخلوي .
4- أضيف 100 مللتر من Universal Buffer PF وخلطت المواد بواسطة جهاز Vortex ثم وضعت في حمام مائي درجة حرارته 56 - 60°لمدة 5 دقائق وذلك لتحطيم جدار الخلية
5- وضعت في جهاز الطرد المركزي Centerfuge على سرعة 12000 دورة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم نقل الرائق الى انابيب دقيقة معقمة حجم 1.5 مل وأهمل الراسب
6- أضيف 200 مايكروليتر من Universal Buffer BD وخلطت بواسطة جهاز Vortex وذلك لعزل كل من البروتين والمادة الوراثية والأجسام الأخرى ومساعدة التصاق السليكا بالمادة الوراثية (DNA) إذ إن الأنابيب تحتوي على مادة السيليكا .
7- أضيف 200 مايكروليتر من Ethanol (96 – 100) % ورجت بجهاز الرج vortex.
8- نقل الراسب الى أنابيب دقيقة ونظيفة ومعقمة ووضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة من دون أي إضافة.
9- أضيف 500 مايكروليتر من Universal Wash Solution ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 9000 – 12000 دورة / دقيقة.
10- نقلت العينات إلى أنابيب دقيقة نظيفة ومعقمة ووضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين ثم نقلت الى أنابيب دقيقة نظيفة ومعقمة جديدة للتخلص من الرواسب.
11 أضيف 50 – 100 مايكروليتر من محلول Buffer TE في وسط الأنابيب إذ لا تلامس الجدران ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة للحصول على المادة الوراثية DNA

3-8 -2 : تضاعف الحامض النووي DNA المستخلص

أجريت مضاعفة الحامض النووي الـ DNAجدول (7) وذلك بخلط 5 مايكروليترمن الحامض النووي المستخلص مع 4 مايكروليتر من البادئ أو البرايمر (ITS4) (2 مايكروليتر من Forword و 2 مايكروليتر Reverse) وتسلسل القواعد النايتروجينية من (3_ 5) جدول (6) ثم أكمل الحجم إلى 20 مايكروليتر بإضافة 11 مايكروليتر من الماء الايوني المعقم Sterilized Ionic Water داخل أنابيب صغيرة حاوية على 5 مايكروليتر من Master Mix ثم خلط المواد بواسطة vortex ، وضعت الانابيب في جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل PCR وذلك لغرض إجراء عملية تضخيم DNA وفقآ للظروف المثلى للدورات .

الجدول (6) تسلسل القواعد النايتروجينية لبادئ ITS1 /ITS4 المستخدمة في تشخيص الفطريات

اسم البادئ	تتابع القواعد النيتروجينية
ITS1 ITS4	3-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5 3-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5

الجدول (7) برنامج تضاعف ال DNA الخاص بالفطريات

الخطوات	درجة الحراره (م°)	الزمن	عدد الدورات
المسخ الأول Initil Denaturation	95C°	5 min .	1
المسخ Denaturation	94 C°	30 sec.	35
الربط Annealing	60 C°	30 sec.	
الاستطالة Extension	72 C°	45 sec.	
الاستطالة النهائية Final extension	72C°	5 min.	1

3-8-3 :مرحلة الترحيل الكهربائي

حضر جل الاكر (Agarose Gel) بإذابة 1غم من مادة الاكروز في 90 مل من الماء المقطر المعقم و10 مل من محلول (TBE buffer × 10) وبعدها سخن المزيج حتى الغليان

باستعمال المسخن الحراري بعد ذلك تم تبريد المزيج الى درجة 65 م° مع إضافة 5 مايكروليتر من مادة الايثيديوم بروميد (Ethidium bromide) ، ثم مزج الخليط وصب في المكان المخصص له في جهاز الترحيل الكهربائي وثم وضع مشط معقم بالأشعة الفوق البنفسجية في الخليط لكي يتم عمل حفر في الجل وترك لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة ليتصلب وبعدها تم إزالة المشط وأضيف 5 مايكروليتر من Ladder الى الحفرة الاولى (حاوية على قطع DNA قياسية) وأضيفت الكمية نفسها من الحامض النووي المستخلص الى بقية الحفر ، بعد ذلك تمت تغطية الجهاز بالغطاء الخاص به وتم الترحيل الكهربائي عند 70 فولت ولمدة 60 دقيقه وذلك للكشف عن حزم الحامض النووي ال DNA المستخلص والمضخم والذي يمثل نواتج الـ PCR ومقارنته مع الماركر القياسي ثم أرسلت العينة الى شركة Biogene الكورية من أجل الحصول على تتابع القواعد النتروجينية .

4-8-3 : التشخيص الجزيئي بتحليل التتابعات النيوكلوتيدية للعزلات الفطرية

شخصت العزلات الفطرية التابعة للجنس *Aspergillus* spp جزيئيًا التي أظهرت مقدرة على انتاج سمي **Aflatoxin B1 وOchratoxin A** (4 عزلات فطرية من مجموع 18 عزلة) انتخبت على اساس اختلاف النوع وكمية السموم المنتجة , شخصت عن طريق تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) ومقارنتها بجينوم العزلات المشخصة مسبقا , ارسلت نواتج الـ PCR الى شركة Biogene كورية الجنوبية لغرض تحديد التتابع النيوكلوتيدي للمنطقة الجينية Internal Transcribed Spacer (ITS) وبعد استلام التتابعات النيوكلوتيدية للعزلات الفطرية , حللت التتابعات باستخدام برنامج Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) لمقارنتها مع البيانات المتوافرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية National Center For Biotecnology Information (NCBI) ضمن بنك الجينات الالكتروني التي تعود للعزلات الفطرية نفسها والتي تم تشخيصها عالميا.

سجلت العزلات الفطرية التي لم تطابق اي من التتابعات النيوكلوتيدية 100% في NCBI , كما اجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج MEGA X الاصدار 11 لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز NCBI ضمت شجرة الاصول الوراثية phylogenetic tree من النوع ضم الجوار Neighbor

joining التي تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

3-9: اختبار تأثير فترات التخزين ومستويات الرطوبة لعليقة الأسماك في حيوية الفطريات وتكاثرها ومقدرتها على انتاج السموم الفطرية

نفذت هذه التجربة في منتصف شباط 2023 , لمعرفة تأثير فترات التخزين المختلفة (شهر , شهرين , ثلاثة اشهر) ومستويات المحتوى الرطوبي المتباين 10 , 15 . 25% على العليقة الحيوانية المستوردة (عليقة سعودية المنشأ طافي : من بابل1 / المسيب) والتي تم اثبات خلوها من التلوث الفطري بشكل عام . استخدمت أربع مكررات بواقع ا كيس (50 كغم) لكل مكرر من مستويات المحتوى الرطوبي لكل عزلة فطرية A N K 2 اعلى عزل منتجة للاوكراتوكسن من عزلات الفطر *Aspergillus niger* من الفطريات المعزولة والعزلة k1A F اعلى عزل منتجة للافلاتوكسن من عزلات الفطر *Aspergillus flavus* . والتي تم تنميتها وتهيئتها كلقاح لهذه التجربة على بذور الذرة البيضاء في مختبر السموم التابع لقسم وقاية النبات - كلية الزراعة جامعة كربلاء , في أكياس حرارية بعد تعقيمها بجهاز الاوتوكليف .

اذ تم خلط 500 غم من لقاح كل عزلة فطرية محملة على بذور الذرة البيضاء لكل كيس من العليقة المستوردة على قطعة من النايلون السميك بشكل جيد , واعادتها الى الكيس نفسه. مع مراعاة ترك أربع مكررات للمقارنة بدون تلويث بالعزلات الفطرية وتم تثبيت مستويات المحتوى الرطوبي لكل مكرر 10 , 15 , 25 % محتوى رطوبي . ومتابعتها بشكل دوري اسبوعياً

واخذت النتائج بعد 30 , 60 , 90 يوم اذ سجلت النسبة المئوية للتلوث الفطري وحساب تركيز السموم الفطرية لكل من هذه المراحل .

3-10: الاختبارات الحيوية لتأثير العليقة الملوثة بالسموم الفطرية على نمو الأسماك .

نفذت هذه التجربة في مطلع شهر حزيران 2022 بأحد مناطق قضاء المسيب (أبو لوكة) حيث استخدمت ثلاثة اقفاص عائمة في نهر الفرات . بحيث تم وضع اسماك صغيرة (فقس) بمعدل 100 غم وبواقع 500 فقسة لكل قفص من الاقفاص بمجموع 1500 فقسة من اسماك الكارب . باستخدام العليقة المستوردة المتبقية من التجربة السابقة 3-9: اختبار فترات التخزين في تغذية الأسماك . والتي لوثت بكل عزلة من العزلات الفطرية (A N K 2 اعلى عزلة منتجة للاوكراتوكسنA من الفطر *Aspergillus niger* و A F K 2 اعلى عزلة فطرية منتجة للافلاتوكسنB1 من الفطر *Aspergillus flavus*) . بحيث إضافة هذا العلف للاسماك وتغذيتها لمدة ستة اشهر .

اخذت النتائج بشكل دوري , اذ تم فحص الاوزان والهلاكات لكل قفص على ثلاثة مراحل . كل شهرين من بداية التعليف ومقارنة النتائج مع معاملة السيطرة . اذ تم الفحص بواقع ثلاث رفعات لكل قفص باستخدام صندوق بلاستيكي . اذ يحسب بكل رفعة الوزن الكلي وعدد الأسماك , والعدد الكلي للاسماك لكل مرحلة .

$$\textbf{معدل وزن السمكة الواحدة} = \frac{\text{المجموع الكلي للاوزان}}{\text{المجموع الكلي لعدد الاسماك}}$$

$$\textbf{النسبة المئوية للخسائر بالوزن} = \frac{\text{الوزن بالمقارنة}-\text{الوزن بالمعاملة}}{\text{الوزن بالمقارنة}} \times \mathbf{100}$$

وبعد انتهاء كل مرحلة من مراحل التجربة الحيوية وبعد اخذت النتائج النهائية للاوزان والهلاكات يتم تحليل معايير الدم لهذه الأسماك مع تسجيل بعض الصفات والتغيرات المظهرية للأسماك لدراسة مدى تأثير السموم الفطرية عليها .

3- 11: التحليل الإحصائي Statics Analysis

تم تصميم التجربة وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Replication Design (CRD) وحللت البيانات احصائيًا باستعمال برنامج The Statistical Analysis System (SAS) لحساب المتوسطات ± الانحراف القياسي وأقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى احتمالية ($P\leq 0.05$) , الراوي وخلف الله ,(2000).

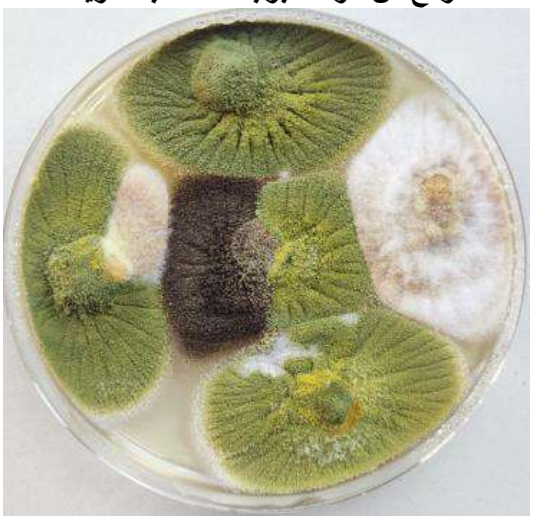
4-النتائج والمناقشة :

4-1: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا والعليقة السمكية .

بينت نتائج المسح المايكروبي الشكل {1} تلوث عينات الدراسة جميعها بعزلات فطرية مختلفة , اذ شمل المسح عينات مختلفة من حبوب المحاصيل الحقلية المخزونة تضمنت الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا بأشكالها المنفردة والمخلوطة بشكل عليقة حيوانية محلية والمستوردة , من ثمان معامل لانتاج العليقة الحيوانية بواقع معملين لكل محافظة والتي شملت محافظات بغداد وكربلاء وبابل والانبار. اذ اظهر المسح تلوث العينات جميعها بالعديد من العزلات الفطرية والتي تتميز بخطورتها الكبيرة لقدرتها العالية لانتاج مدى واسع من السموم الفطرية . وكان أكثر الاجناس الفطرية تواجدًا وترددًا هو *Aspergillus* spp. ويليه الفطر *Penicillium* spp. سجلت أعلى نسب ظهور بلغت 100% في الحبوب المخزونة والعليقة المحلية وبنسب اقل في العليقة المستوردة . فضلا عن العديد من اجناس الفطريات الأخرى كملوثات لهذه الحبوب المخزونة أهمها الفطريات *Cladosporium* و *Fusarium* sp. و *F.graminearum* و *Mucor* sp. و *F. culmorum* و *Mycelia sterilia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* sp وهذا توافق مع الكثير من الدراسات التي عنيت بفحص التلوث الفطري لعليقة الأسماك وحبوب المحاصيل المخزونة المكونة لها ظهور فطريات مختلفة ومتعددة مصاحبة لهذه الحبوب كان أهمها *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus sp*. ، *Cladosporium sp* ، *Alternaria* ,*Fusarium sp* ، *Mucor* sp، *Penicillium sp* ، *Rhizoctonia sp*، *Rhizopus sp* و *Trichoderma sp* (Marijani وآخرون , 2019) .

نموذج من تلوث حبوب الحنطة بالفطريات

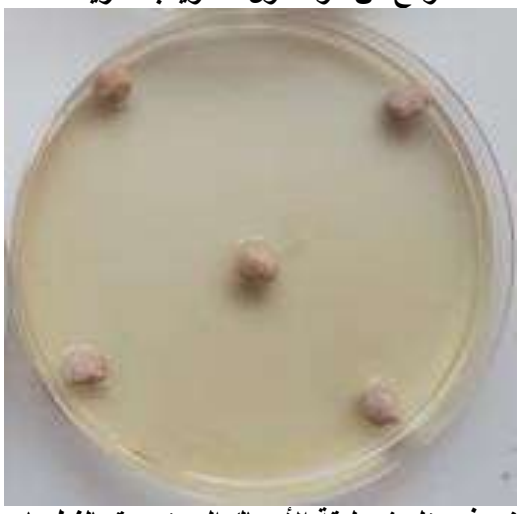
نموذج من تلوث حبوب الشعير بالفطريات



نموذج من تلوث حبوب الذرة الصفراء بالفطريات

نموذج من تلوث فول الصويا بالفطريات

نموذج من تلوث عليقة الأسماك المحلية بالفطريات



نموذج تلوث عليقة الأسماك المستوردة بالفطريات

الشكل (1) نماذج من تلوث بعض العينات المجموعة في هذه الدراسة بالفطريات

4-1-1: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعينات حبوب الحنطة

بينت نتائج العزل والتشخيص (جدول 8 -14 - 15) تلوث عينات حبوب الحنطة جميعها المخزونة والمأخوذة من ثمان معامل لانتاج العليقة الحيوانية تعود لأربع محافظات مختلفة بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100% , اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 825 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها تواجدًا وتلوثا الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً , تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 100 % وبلغت النسبة المئوية للتردد 37.70% و 12.48% على الترتيب . وأنواع أخرى من الفطر *Aspergillus* spp تلتها انواع الفطر .*Penicillium* spp بعدها العديد من الفطريات الأخرى

واهم ما يفسر سيادة أنواع الفطر .*Aspergillius* spp قدرتهِ على استخدام مجموعة واسعة من المواد العضوية والتكيف مع مجموعة واسعة من الظروف البيئية التي تمكنهُ من البقاء والنمو في عوائل متنوعة , بالإضافة لذلك قدرته على تكوين اعداد كبيرة من الكونيدات شديدة التحمل للإجهاد البيئي والتي تتميز بسهولة حملها وانتشارها بالهواء لصغر حجمها (Lass-Florl وآخرون,2021). فالعديد من أنواع هذا الجنس تصيب المحصول في الحقل ويرافق البذور خلال الخزن ويسبب تلوناً للبذور وانخفاضاً في نسبة الانبات ، فضلاً عن افرازه للسموم الفطرية كالافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات وهذا ما يجعل الحبوب الملوثة بانواع هذا الفطر غير صالحة للاستهلاك وغير كفوءة في الانبات ، وهذا مطابق لما اثبته (Santos وآخرون , 2010) فهو يظهر في مختلف انواع الحبوب وهو من فطريات الخزن الشائعة ويوجد بغزارة في الحبوب والبذور ويعتقد بأنه لاتوجد أي نوع من انواع الحبوب الا وتصاب بهذا الفطر . وهذا ما اشارت اليه كثير من الدراسات (Marijani وآخرون , 2019)

واحتل الفطر .*Penicillium* spp الترتيب الثاني من بين الفطريات التي تم عزلها من حبوب الحنطة اذ ظهر بنسبة 100% من العينات المدروسة وبمعدل عدد عزلات 12.38 . ويعد هذا الفطر ذو اهمية كبيرة من حيث وجوده وانتشاره في الحبوب المخزونة والاغذية المختلفة وافرازه العديد من السموم الفطرية (chen واخرون ، 2020). كما اوضحت النتائج وجود العديد من الفطريات أهمها *Cladosporium* و .*Fusarium* sp و.*Mucor* sp و *Mycelia sterilia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* sp في حبوب الحنطة ، هذه

الفطريات وان كانت موجودة بنسب قليلة في العينات الا انها تشكل مع الفطريات الرئيسة تأثير تعاوني Synergastically في رفع تعفن البذور وتدهور نوعيتها وبالتالي انتاج السموم الفطرية بشكل واسع وكبير وذات التأثير الضار للانسان والحيوان Agrios ، 2005).

الجدول (8) الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	12	8	9	12	11	12	20	13	97	12.13
2	*A. flavus*	16	14	11	10	15	8	18	11	103	12.88
3	*A. niger*	42	39	37	36	39	42	38	38	311	38.88
4	*A. parasiticus*	2	4	0	4	0	4	0	0	14	1.75
5	*A. terreus*	0	1	2	0	0	2	1	0	6	0.75
6	*A.ochraceus*	0	2	2	1	0	0	0	0	5	0.63
7	*A.oryzae*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
8	*A. fumigates*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
9	*Penicillium sp*	12	11	13	9	11	8	14	21	99	12.38
10	*P .oxalicum*	1	2	0	0	1	0	0	0	4	0.50
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
12	*Alternaria sp*	2	1	0	0	2	1	3	3	12	1.50
13	*Cladosporiumsp*	12	8	12	12	11	13	10	15	93	11.63
14	*Fusarium spp.*	2	2	1	2	1	3	0	1	12	1.50
15	*F.graminearum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
16	*F.culmorum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
17	*Cylindrocarpom*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
18	*Mycelia sterilia*	0	1	0	0	0	2	0	0	3	0.38
19	*Rhizactonia sp*	2	0	0	1	2	1	0	0	6	0.75
20	*Rhizopus sp.*	4	6	8	8	4	3	1	0	34	4.25
21	*Mucor sp.*	0	4	5	2	3	0	2	0	16	2.00
22	*Trichoderma sp*	0	0	2	0	1	2	1	0	6	0.75
المجموع		107	103	102	99	101	103	108	102	825	

ومن الملاحظ انخفاض نسبة تلوث حبوب الحنطة المخزونة لهذه الدراسة بعزلات الفطر *Fusarium* spp مقارنة بالعينات الأخرى . وبنفس الوقت الكثير من الدراسات إشارة بعزل وتشخيص عدد كبير من أنواع الفطر *Fusarium* من حبوب الحنطة المخزونة . وقد يعزى السبب لهذه الظاهرة الى انخفاض المحتوى الرطوبي لحبوب الحنطة الى حد كبيرة او خزنها بشكل جيد وبمستويات تهوية جيدة. (سلومي , 2007) .

4-1-2: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعينات حبوب الشعير

بينت نتائج العزل والتشخيص (جدول 9 -14 - 15) تلوث عينات حبوب الشعيرجميعها والمأخوذة من ثمان معامل مختلفة لانتاج العليقة الحيوانية تعود لأربع محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار بعزلات فطرية مختلفة بنسبة تلوث 100% , اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 776 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها تواجدًا وتلوثا الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً , تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 100 % لكل منهما وبلغت النسبة المئوية للتردد 34.02% و 16.11% على الترتيب . وأنواع أخرى من الفطر *Aspergillus* spp , تلتها مجموعة أنواع الفطر *Penicillium* spp. وبعدها العديد من الفطريات الأخرى . ومن الملاحظ انخفاض نسبة تلوث حبوب الحنطة المخزونة بعزلات الفطر *Fusarium* spp مقارنة بالعينات الأخرى .

وهذا يتوافق مع نتائج العديد من الدراسات اذ بينت دراسة أجريت لعزل وتشخيص أجناس الفطريات المصاحبة لعدد من أصناف الحنطة و الشعير في العراق .اذ أظهرت نتائج البحث وجود ثمانية أجناس من الفطريات على حبوب الحنطة وستة أجناس على الشعير هي : *Trichoderma* , *Rhizopus* , *Penicillium* , *Helminthosporium*, *Aspergillus* ، *Fusarium* , *Cladosporium* , *Rhizoctonia* , *Alternaria* . وكان أكثر الفطريات ترددا هو الفطر *Aspergillus* (جابر , 2014 و El-Wadii وآخرون ,2020)

واحتل الفطر *Penicillium* spp. الترتيب الثاني من بين الفطريات التي تم عزلها من حبوب الشعير اذ ظهر بنسبة 100% من العينات المدروسة وبمعدل عدد عزلات 10.40 . ويعد هذا الفطر ذو اهمية كبيرة من حيث وجوده وانتشاره في الحبوب المخزونة والاغذية المختلفة وافرازه العديد من السموم الفطرية (Mirza Alizadeh واخرون ، 2022).

كما هناك العديد من الفطريات أهمها *Cladosporium* و *Fusarium* sp. و*Mucor* sp. و *Mycelia sterilia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* sp عزلت من حبوب الشعير ، هذه الفطريات وان كانت موجودة بنسب قليلة في العينات الا انها تشكل مع الفطريات الرئيسة تأثيرات أخرى تعمل على تدهور نوعيتها وبالتالي انتاج السموم الفطرية بشكل واسع وكبير(Manole Cristea) وآخرون , 2015 و Matejova وآخرون ، 2017).

الجدول (9) الفطريات المرافقة لعينات حبوب الشعير

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	5	8	9	10	9	11	12	13	77	9.63
2	*A. flavus*	15	16	17	14	14	15	18	16	125	15.63
3	*A. niger*	34	29	31	41	31	32	34	32	264	33.00
4	*A. parasiticus*	2	4	0	4	0	4	0	0	14	1.75
5	*A. terreus*	0	1	2	0	0	2	1	0	6	0.75
6	*A.ochraceus*	0	2	2	1	0	0	0	0	5	0.63
7	*A.oryzae*	0	1	0	0	0	2	0	1	4	0.50
8	*A. fumigates*	0	2	0	1	0	2	0	0	5	0.63
9	*Penicillium sp*	18	8	12	11	6	8	8	13	84	10.50
10	*P .oxalicum*	1	2	0	0	1	0	0	0	4	0.50
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
12	*Alternaria sp*	2	1	0	0	2	1	3	3	12	1.50
13	*Cladosporiumsp*	6	16	11	12	11	13	6	8	83	10.38
14	*Fusarium spp.*	0	0	2	1	0	1	2	1	7	0.88
15	*F.graminearum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
16	*F.culmorum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
17	*Cylindrocarpon*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
18	*Mycelia sterilia*	0	1	0	1	0	2	0	3	7	0.88
19	*Rhizactonia sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
20	*Rhizopus sp.*	7	6	8	4	4	3	7	4	43	5.38
21	*Mucor sp.*	2	4	5	2	3	0	2	5	23	2.88
22	*Trichoderma sp*	2	0	2	0	1	2	1	3	11	1.38
المجموع		94	101	101	103	82	99	94	102	776	

3-1-4: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء :

اظهرت نتائج عزل وتشخيص (جدول10 -14– 15) الفطريات المرافقة لعينات حبوب الذرة الصفراء الماخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار مرافقة الفطريات: *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus* sp. ، *Penicillium* sp ، *Mucor* sp، *Fusarium* sp ، *Alternaria* ,*Cladosporium* sp ، *Rhizoctonia* sp، *Rhizopus* sp ، *Trichoderma sp*. اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 960 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها ظهوراً الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً , تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 100 % لكل منهما وبلغت النسبة المئوية للتردد 41.63 % و30.50% على الترتيب . تلتها الأنواع الأخرى *A. parasiticus* و *A.ochraceus* و *A.oryzae* و *A. fumigates* .

لوحظ من خلال هذه الدراسة تواجد وظهور الفطر *Fusarium spp* في عينات الذرة الصفراء اعلى من ظهورة في بقية العينات الأخرى , الذي سجل نسبة ظهور بلغت 100 % والنسبة المئوية للتردد بلغت تقريبا 10% يتبعه الفطريات *Penicilliium* و *Alternaria* و *Mucor* و *Rhizoctonia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* .

تتفق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه العديد من الدراسات في العراق فيما يخص سيادة الفطر *Aspergillus spp* وتفوقه على باقي الفطريات في نسب تكرارها ويليه الفطر *Fusarium* .وقد يعود سبب ذلك الى ان جنس *Aspergillus* ينمو وينشط في درجات الحرارة الدافئة وفي محاصيل زراعية ذات رطوبة واطئة وهذه ظروف كانت متوفرة اثناء جمع العينات في حبوب الذرة الصفراء ، ويزداد نشاط انواع الفطر *Aspergillus* في المناطق الواقعة بين خطي عرض 26º - 35º شمالا وجنوبا والعراق يقع ضمن هذه المنطقة التي تتميز بحرارة ودفئ اجوائها ، كذلك فان الفطر و*A flavus* *A niger* يمكن ان ينمو في مدى واسع من درجات الحرارة (12 – 48) مº وظروف اجهاد وجفاف ، البلداوي (2007) .

في حين ينشط الفطر *Fusarium* في حبوب الذرة الصفراء فقد يرجع ذلك للظروف البيئية من درجة حرارة ومحتوى رطوبي ملائمة لنمو الفطر *Fusarium* بالنمو في اوقات جمع

العينات او ما قبلها (فترة الحصاد او قبل الحصاد) . (الورشان ,1999 وحسين ,2000 و سلومي ,2007)

الجدول (10) الفطريات المعزولة من حبوب الذرة الصفراء

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	8	7	6	8	7	7	11	11	65	8.13
2	*A. flavus*	36	32	30	26	29	30	28	33	244	30.50
3	*A. niger*	44	39	42	39	45	42	40	42	333	41.63
4	*A. parasiticus*	6	8	6	8	9	0	11	3	51	6.38
5	*A. terreus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
6	*A.ochraceus*	0	1	1	1	0	0	1	0	4	0.50
7	*A.oryzae*	0	0	0	1	0	1	0	1	3	0.38
8	*A. fumigates*	0	2	2	4	5	4	3	4	24	3.00
9	*Penicillium sp*	5	6	5	4	6	6	7	4	43	5.38
10	*P .oxalicum*	1	4	3	2	1	0	0	3	14	1.75
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
12	*Alternaria sp*	2	1	2	0	2	2	1	1	11	1.38
13	*Cladosporiumsp*	5	4	3	4	3	2	4	4	29	3.63
14	*Fusarium spp.*	2	0	3	2	0	3	0	1	11	1.38
15	*F.graminearum*	4	7	4	9	6	4	8	9	51	6.38
16	*F.culmorum*	3	0	2	1	0	1	3	1	11	1.38
17	*Cylindrocarpon*	0	0	1	1	0	0	0	1	3	0.38
18	*Mycelia sterilia*	0	1	0	0	0	2	0	0	3	0.38
19	*Rhizactonia sp*	2	0	0	1	2	1	0	0	6	0.75
20	*Rhizopus sp.*	3	6	8	8	4	3	1	0	33	4.13
21	*Mucor sp.*	3	2	1	2	2	0	2	0	12	1.50
22	*Trichodermasp*	0	0	2	0	1	2	1	3	9	1.13
المجموع		124	120	121	121	122	110	121	121	960	

4-1-4: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لفول الصويا :

اظهرت نتائج عزل وتشخيص (جدول 11 -14 - 15) الفطريات المرافقة لعينات حبوب فول الصويا الماخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار مرافقة الفطريات : *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus* sp. ، *Cladosporium* sp ,*Penicillium* sp ، *Alternaria* sp ، *Fusarium* sp ، *Rhizoctonia* sp ، *Mucor* sp ، *Rhizopus* sp *Trichoderma* sp. اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 831 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها ظهوراً الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً, تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 100 % لكل منهما وبلغت النسبة المئوية للتردد 33.21 % و 28.40% على الترتيب . تلتها الأنواع الأخرى *A. parasiticus* و *A.ochraceus* و *A.oryzae* و *A. fumigates* . اذ سجل النوع *A. fumigates* نسبة مئوية للتردد بلغت تقريبا 10% في فول الصويا .

وسجل الفطر *Fusarium* spp في عينات فول الصويا نسبة مئوية للتردد 1% وقد يعزى ذلك الى انخفاض المحتوى الرطوبي في حبوب فول الصويا . وكذلك تم عزل مجموعة من الفطريات الأخرى أهمها *Penicilliium* و *Alternaria* و *Mucor* و *Rhizoctonia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* .

تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه Piotrowska واخرون , (2013) بدراسة الفطريات المرافقة او المصاحبة لحبوب فول الصويا في البرازيل فقد وجد سيادة الفطر *Aspergillus* spp وتفوقه على باقي الفطريات في نسب تكرارها وكان من أهمها *A.flavus* و *A.parasiticus*. و *A.ochraceus* و *A.oryzae* و *A. fumigates* .

في حين لم تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه دراسة الباحث Escamilla واخرون {2019}عن الفطريات المرافقة لحبوب فول الصويا , اذ أظهرت نتائجه سيادة الفطر *Alternaria alternata* كملوث رئيس لحبوب فول الصويا *يليه الفطر* *Cladosporium cladosporioides* بالمرتبة الثانية . ويأتي الفطر *Fusarium* sp. المرتبة الثالثة بانواعة المتعددة مثل *F chlamydosporum* و *F proliferatum* و *F equiseti* ويليه الفطر

Penicillium ولم يشر الباحث لتسجيل أنواع للفطر *Aspergillus* spp باي شكل من الاشكال

الجدول (11) الفطريات المعزولة من حبوب فول الصويا

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	7	8	6	8	9	11	8	10	67	8.38
2	*A. flavus*	28	31	29	28	26	28	30	36	236	29.50
3	*A. niger*	31	38	36	38	31	36	34	32	276	34.50
4	*A. parasiticus*	2	4	0	4	0	4	0	0	14	1.75
5	*A. terreus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
6	*A.ochraceus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
7	*A.oryzae*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
8	*A. fumigates*	8	8	9	8	14	12	13	10	82	10.25
9	*Penicillium sp*	8	8	6	6	12	8	8	12	68	8.50
10	*P .oxalicum*	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0.13
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
12	*Alternaria sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
13	*Cladosporiumsp*	9	8	6	5	5	0	2	0	35	4.38
14	*Fusarium spp.*	0	0	3	2	0	1	1	1	8	1.00
15	*F.graminearum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
16	*F.culmorum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
17	*Cylindrocarpon*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
18	*Mycelia sterilia*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
19	*Rhizactonia sp*	2	0	0	1	2	1	0	0	6	0.75
20	*Rhizopus sp.*	7	4	6	2	2	3	1	0	25	3.13
21	*Mucor sp.*	0	0	5	2	2	0	2	0	11	1.38
22	*Trichodermasp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
المجموع		103	109	106	105	103	105	99	101	831	

4-1-5: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعليقة الأسماك المحلية المجموعة :

اظهرت نتائج عزل وتشخيص {جدول12 -14 – 15} الفطريات المرافقة لعينات العليقة السمكية الماخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار بواقع معملين لكل محافظة مرافقة مجموعة متباينة من الفطريات . تميزت بظهور جميع الفطريات التي سجلت مرافقتها لحبوب المحاصيل المخزونة التي تم اختبارها في هذه الدراسة (حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا) من العينات المختلفة . اذ أظهرت النتائج تسجيل الفطريات: *Cladosporium* sp ، *Aspergillus* sp. ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia* sp، *Penicillium* sp ، *Mucor* sp، *Fusarium* sp ، *Alternaria* ، *Trichoderma* sp، *Rhizopus* sp .اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 802 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها ظهوراً الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً , تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 100 % لكل منهما , وجاءت هذه النتائج متوافقة مع نتائج العزل من الحبوب , وبلغت النسبة المئوية للتردد 25.94 % و11.35% على الترتيب . تلتها الأنواع الأخرى *A. parasiticus* و *A.ochraceus* و *A.oryzae* و *A. fumigates* و *A. terreus* باعلى تردد في الفطر *A. fumigates* بلغ 6. % . بينما سجل الجنس *Cladosporium* نسبة تردد مرتفعة بلغت %12.84

لوحظ من خلال هذه الدراسة تلوثا متباين بعزلات الفطر *Fusarium* spp في عينات العليقة المحلية . وظهور الفطريات *Penicilliium* و *Alternaria* و *Mucor* و *Rhizoctonia* و *Rhizopus* و *Trichoderma* وجاءت *هذه النتائج* متوافقة مع نتائج العزل من الحبوب المخزونة

تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Osibona واخرون , 2018 و Marijani وآخرون , 2019) فيما يخص سيادة الفطر *Aspergillus spp* في عليقة الأسماك وتفوقه على باقي الفطريات في نسب تكرارها ويليه الفطر *Cladosporium* و *Penicilliium* , وهي بنفس الوقت من اهم الفطريات المصاحبة والملوثة للعليقة السمكية لمقدرتها العالية على انتاج طيف واسع من السموم الفطرية , وخاصة تلك السموم الخطرة والمسرطنة والتي تتميز بقابليتها على

الثبات الكيميائي والحراري والانتقال عبر السلسة الغذائية وهو بذلك يصل الى جسم الانسان ويسبب الكم الهائل من الاضرار الصحية (Pietsch وآخرون , 2020).

الجدول (12) الفطريات المعزولة من العليقة المحلية

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	12	11	14	12	16	16	12	13	106	13.25
2	*A. flavus*	12	14	11	10	9	8	16	11	91	11.38
3	*A. niger*	24	28	26	24	29	28	26	23	208	26.00
4	*A. parasiticus*	2	3	0	4	0	2	1	1	13	1.63
5	*A. terreus*	0	1	2	2	1	1	1	0	8	1.00
6	*A.ochraceus*	0	3	2	1	0	2	0	2	10	1.25
7	*A.oryzae*	0	1	0	0	0	1	0	1	3	0.38
8	*A. fumigates*	0	6	7	8	6	9	5	8	49	6.13
9	*Penicillium sp*	18	14	11	13	6	8	14	12	96	12.00
10	*P .oxalicum*	1	2	0	0	1	0	0	0	4	0.50
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
12	*Alternaria sp*	2	1	0	0	3	1	3	3	13	1.63
13	*Cladosporiumsp*	16	12	11	12	16	13	12	11	103	12.88
14	*Fusarium spp.*	5	0	3	2	0	3	4	2	19	2.38
15	*F.graminearum*	0	2	0	2	0	1	0	2	7	0.88
16	*F.culmorum*	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0.25
17	*Cylindrocarpom*	0	0	0	1	0	1	0	2	4	0.50
18	*Mycelia sterilia*	0	1	3	0	0	2	1	2	9	1.13
19	*Rhizactonia sp*	0	0	0	1	2	1	0	2	6	0.75
20	*Rhizopus sp.*	3	4	6	4	4	3	2	3	29	3.63
21	*Mucor sp.*	0	3	4	2	3	0	2	0	14	1.75
22	*Trichodermasp*	0	0	2	0	1	2	1	0	6	0.75
المجموع		96	106	102	100	97	103	100	98	802	

4-1-5: عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعليقة الأسماك المستوردة المجموعة

اظهرت نتائج عزل وتشخيص (جدول13 -14 - 15) الفطريات المرافقة لعينات العليقة السمكية المستوردة المأخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار , مرافقة مجموعة محدودة من الفطريات , تميزت بقلة ظهورها وتردده بشكل عام في العليقة المستوردة . اذ أظهرت النتائج تسجيل الفطريات : *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus* sp. ، *Cladosporium* sp ، *Penicillium* sp ، *Rhizopus* sp ، وبمعدلات تلوث منخفضة جدا.اذ أظهرت نتائج العزل والتشخيص الكشف عن 40 عزلة فطرية عائدة لعدد من الأجناس الفطريات كان أكثرها ظهوراً الفطر *Aspergillus* spp. . وكان النوع *A. niger* الأكثر تواجدًا وظهوراً , تلاه النوع *A.flavus* بنسبة ظهور 50 % و37.5 على الترتيب , وبلغت النسبة المئوية للتردد 20 % و7.50% على الترتيب .

لوحظ من خلال هذه الدراسة عدم ظهور عدد من العزلات الفطرية بمجموعة العليقة المستوردة مقارنة بالعليقة المحلية المصنعة مثل الفطر *Fusarium spp* و *Alternaria* و *Mucor* و *Rhizoctonia* و *Mycelia sterilia* و *Trichoderma* و *Cylindrocarpon* *وكذلك أنواع مختلفة من الفطر* *Aspergillus spp* مثل *A. terreus* و *A.ochraceus* و *A.oryzae* و *A. fumigates* . *قد* يعزى انخفاض التلوث الفطري لعليقة الأسماك المستوردة الى اكثر من احتمال , الأول هو استخدام مجموعة حبوب نقية خالية من الفطريات المرافقة , والثاني ان تكون هناك معاملات تعقيم ترافق عملية تصنيع هذه العليقة سواء كانت معاملات حرارية او كيميائية او غيرها , مما تعمل على التخلص من الفطريات المرافقة لهذه المكونات .

وقد لا تتعارض هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Osibona واخرون , 2018 و Marijani وآخرون , 2019) فيما يخص سيادة الفطر *Aspergillus spp* في عليقة الأسماك (*A flavus* ، *A niger*) وتفوقه على باقي الفطريات في نسب تكرارها ولكن هنا كان انخفاض التلوث بهذه الفطريات هي الملاحظة السائدة . فهي بنفس الوقت قد تشكل مشكلة حقيقية في حالة خزن هذه الاعلاف بالطريقة غير الصحيحة . مما يساعد على تضاعف نمو هذه الفطريات وانتشارها بجميع العليقة وانتاج لسموم الفطرية , كما سنرى في التجارب اللاحقة .

الجدول (13) الفطريات المعزولة من العليقة المستوردة

ت	الفطريات المعزولة	محافظة بغداد		محافظة كربلاء		محافظة بابل		محافظة الانبار		مجموع العزلة الفطرية	المعدل
		المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني	المعمل الأول	المعمل الثاني		
1	*Aspergillus sp*	2	2	0	3	0	0	0	2	9	1.13
2	*A. flavus*	0	0	1	0	0	0	2	0	3	0.38
3	*A. niger*	0	0	2	1	0	0	3	2	8	1.00
4	*A. parasiticus*	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0.25
5	*A. terreus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
6	*A.ochraceus*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
7	*A.oryzae*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
8	*A. fumigates*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
9	*Penicillium sp*	2	0	2	1	0	0	1	0	6	0.75
10	*P .oxalicum*	1	2	0	0	1	0	0	0	4	0.50
11	*P. chrysogenum*	0	0	0	1	0	1	0	0	2	0.25
12	*Alternaria sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
13	*Cladosporiumsp*	0	0	1	1	0	2	0	0	4	0.50
14	*Fusarium spp.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
15	*F.graminearum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
16	*F.culmorum*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
17	*Cylindrocarpon*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
18	*Mycelia sterilia*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
19	*Rhizactonia sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
20	*Rhizopus sp.*	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0.25
21	*Mucor sp.*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
22	*Trichoderma sp*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
المجموع		5	4	8	8	3	3	5	4	40	

4-1-7: النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة والمرافقة للعينات المجموعة :

اظهرت نتائج دراسة النسبة المئوية لظهور الفطريات المرافقة لجميع عينات الدراسة والمتضمنة حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وعليقة الأسماك المحلية والمستوردة الماخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار بواقع موقعين لكل محافظة . نسب ظهور مئوية متباينة للفطريات بالنسبة للعينات والعزلات الفطرية (جدول - 14) اذ كانت اعلى نسبة مئوية لظهور الفطريات في الذرة الصفراء (مجموع عينات الذرة الصفراء) بمعدل 68.18% تليها عينات العليقة المحلية بمعدل نسبة ظهور 67.61% تلتها نسب الشعير والحنطة وفول الصويا بمعدلات 55.68% و 52.84% و 41.48% على التوالي . بينما سجل اقل نسبة لظهور الفطريات في عينات العليقة المستوردة اذ بلغت 15.34% لجميع الفطريات المجموعة . ان ارتفاع النسبة المئوية لظهور الفطريات في عينات الذرة الصفراء والعليقة المحلية , قد يعزى أولا الى ارتفاع المحتوى الرطوبي لحبوب الذرة الصفراء اكثر من بقية الحبوب المجموعة بينما ارتفاع نسبة ظهور الفطريات في العليقة المحلية قد يعزى الى تجميع جميع الفطريات المرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة والمستعملة بالدراسة (حنطة وشعير وذرة صفراء وفول الصويا) في العليقة المحلية , وظهورها في هذا الاختبار .

بينما النسبة المئوية لظهور الفطريات بالنسبة للعزلات الفطرية كان أكثرها ظهوراً عزلات الفطر *A. niger* اذ بلغت بمعدل 91.67 % ضمن العينات المجموعة (حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وعليقة الأسماك المحلية والمستوردة) تلاه النوع *A.flavus* بمعدل نسبة ظهور 89.58 % , بينما سجل الفطر *Cylindrocarpon* اقل معدل لنسبة الظهور بلغت 16.67% .

تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Osibona واخرون , 2018 و Marijani وآخرون , 2019) فيما يخص ظهور وسيادة الفطر *Aspergillus* spp في جميع مكونات العليقة وتفوقه على الفطريات الاخرى .

الجدول (14) النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من جميع العينات المجموعة

ت	الفطريات المعزولة	الحنطة	الشعير	الذرة الصفراء	فول الصويا	العليقة المحلية	العليقة المستوردة	المعدل
1	*Aspergillus sp*	100	100	100	100	100	50	91.67
2	*A. flavus*	100	100	100	100	100	37.5	89.58
3	*A. niger*	100	100	100	100	100	50	91.67
4	*A. parasiticus*	50	50	87.5	50	75	25	56.25
5	*A. terreus*	50	50	0	0	75	0	29.17
6	*A.ochraceus*	37.5	37.5	50	0	62.5	0	31.25
7	*A.oryzae*	0	37.5	37.5	0	37.5	0	18.75
8	*A. fumigates*	0	37.5	87.5	100	87.5	0	52.08
9	*Penicillium sp*	100	100	100	100	100	50	91.67
10	*P .oxalicum*	37.5	37.5	75	12.5	37.5	37.5	39.58
11	*P. chrysogenum*	25	25	0	25	25	25	20.83
12	*Alternaria sp*	75	75	87.5	0	75	0	52.08
13	*Cladosporiumsp*	100	100	100	75	100	37.5	85.42
14	*Fusarium spp.*	87.5	62.5	62.5	62.5	75	0	58.33
15	*F.graminearum*	0	0	100	0	50	0	25.00
16	*F.culmorum*	0	0	75	0	25	0	16.67
17	*Cylindrocarpom*	25	0	37.5	0	37.5	0	16.67
18	*Mycelia sterilia*	25	50	25	0	62.5	0	27.08
19	*Rhizactonia sp*	50	0	50	50	50	0	33.33
20	*Rhizopus sp.*	87.5	100	87.5	87.5	100	25	81.25
21	*Mucor sp.*	62.5	87.5	75	50	62.5	0	56.25
22	*Trichoderma sp*	50	75	62.5	0	50	0	39.58
	معدل نسبة ظهور الفطريات	52.84	55.68	68.18	41.48	67.61	15.34	

4-1-8: النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة والمرافقة للعينات المجموعة :

اظهرت نتائج(جدول -15) دراسة النسبة المئوية لتردد الفطريات المرافقة لجميع عينات الدراسة والمتضمنة حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وعليقة الأسماك المحلية والمستوردة الماخوذة من 8 مواقع شملت محافظات بغداد وبابل وكربلاء والانبار بواقع موقعين لكل محافظة . نسب ظهور مئوية متباينة للفطريات بالنسبة للعينات والعزلات الفطرية اذ كانت اعلى نسبة مئوية لتردد العزلات الفطرية هو الجنس *Aspergillus spp* الذي بلغ 67% ضمن العينات المجموعة (حبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء وفول الصويا وعليقة الأسماك المحلية والمستوردة), وكان ألاكثر تردداً منها عزلات النوع *A. niger* اذ بلغت بمعدل 30.93 % تلاه النوع *A.flavus* بمعدل نسبة تردد 16.88 % , بينما سجل النوع *A.*

fumigates نسبة تردد بلغت 3.19% . بينما سجل الجنس *Penicillium sp* المرتبة الثانية بنسبة التردد بلغت 13.59% . يليه الجنس *Cladosporium sp* 8.67% . في حين سجل الجنس *Cylindrocarpom sp* اقل معدل لنسبة التردد بلغت 0.18% .

تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Marijani وآخرون , 2019) فيما يخص ظهور وتردد الفطر *Aspergillus spp* في جميع مكونات العليقة وتفوقه على الفطريات الاخرى .

الجدول (15) النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من جميع العينات المجموعة

ت	الفطريات المعزولة	الحنطة	الشعير	الذرة الصفراء	فول الصويا	العليقة المحلية	العليقة المستوردة	المعدل
1	*Aspergillus sp*	11.76	9.92	6.77	8.06	13.22	22.50	12.04
2	*A. flavus*	12.48	16.11	25.42	28.40	11.35	7.50	16.88
3	*A. niger*	37.70	34.02	34.69	33.21	25.94	20.00	30.93
4	*A. parasiticus*	1.70	1.80	5.31	1.68	1.62	5.00	2.85
5	*A. terreus*	0.73	0.77	0.00	0.00	1.00	0.00	0.42
6	*A.ochraceus*	0.61	0.64	0.42	0.00	1.25	0.00	0.49
7	*A.oryzae*	0.00	0.52	0.31	0.00	0.37	0.00	0.20
8	*A. fumigates*	0.00	0.64	2.50	9.87	6.11	0.00	3.19
9	*Penicillium sp*	12.00	10.82	4.48	8.18	11.97	15.00	10.41
10	*P .oxalicum*	0.48	0.52	1.46	0.12	0.50	10.00	2.18
11	*P. chrysogenum*	0.24	0.26	0.00	0.24	0.25	5.00	1.00
12	*Alternaria sp*	1.45	1.55	1.15	0.00	1.62	0.00	0.96
13	*Cladosporiumsp*	11.27	10.70	3.02	4.21	12.84	10.00	8.67
14	*Fusarium spp.*	1.45	0.90	1.15	0.96	2.37	0.00	1.14
15	*F.graminearum*	0.00	0.00	5.31	0.00	0.87	0.00	1.03
16	*F.culmorum*	0.00	0.00	1.15	0.00	0.25	0.00	0.23
17	*Cylindrocarpom*	0.24	0.00	0.31	0.00	0.50	0.00	0.18
18	*Mycelia sterilia*	0.36	0.90	0.31	0.00	1.12	0.00	0.45
19	*Rhizactonia sp*	0.73	0.00	0.63	0.72	0.75	0.00	0.47
20	*Rhizopus sp.*	4.12	5.54	3.44	3.01	3.62	5.00	4.12
21	*Mucor sp.*	1.94	2.96	1.25	1.32	1.75	0.00	1.54
22	*Trichoderma sp*	0.73	1.42	0.94	0.00	0.75	0.00	0.64

2-4 : الوصف المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لعينات الدراسة

بينت نتائج (جدول 16) وشكل(2) التشخيص المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة استنادًا إلى الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات الفطرية النامية على وسط PDA وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية والصفات المظهرية .

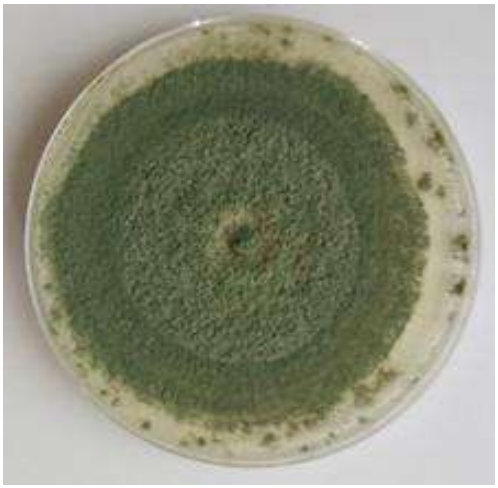
الجدول (16) : التشخيص المظهري لاهم العزلات الفطرية المرافقة لحبوب المحاصيل المخزونة والعليقه السمكية :

No.	Fungus	Characterization
1	***Aspergillus niger***	**Colony :** مستعمرات ناعمة أو صوفية قليلا كان النمو الأولي أبيض اللون وأصبح فيما بعد اسود أو بني داكن **Conidia :** كروية خشنة مصطبغة بشكل غامق الى الاسود . **Reverse of the colony :** أصفر شاحب اللون. **Phialides :** Biseriate وتنشأ من metulae **Vesicles :** كروية الشكل , بنية داكنة وخشنة الجدران. **Conidiophores :** سميكة الجدران ناعمة داكنة اللون. **Sclerotia :** كروية او شبة كروية (بعض العزلات) ذات لون كريمي في بداية تكوينها ثم تتلون بلون أصفر. اتفقت النتائج مع ما ذكره Toma وآخرون (2021).
2	***Aspergillus flavus***	**Colony :** المستعمرات حبيبية، مسطحة، غالبًا مع أخاديد شعاعية، صفراء في البداية ولكنها سرعان ما تصبح مشرقة إلى اللون الأصفر والأخضر الداكن مع تقدم العمر. **Conidia :** الكونيديا هي كروية إلى تحت كروية (قطرها 3-6 ميكرومتر)، لونها أخضر شاحب ولها شكل واضح. بعض السلالات تنتج تصلبًا بنيًا. **Reverse of the colony :** اللون العكسي بني قرفة (اصفر الى كريمي) **Phialides :** وهي ثنائية ولكن تحتوي على بعض الرؤوس مع فياليدات محمولة مباشرة على الحويصلة (وحيدة) **Vesicles :** تكون الرؤوس الكونيدية مشعة، ثم تنقسم لاحقًا لتشكل أعمدة فضفاضة (قطرها في الغالب 300-400 ميكرومتر)، **Conidiophores :** عبارة عن زجاجي وخشن بشكل خشن، وغالبًا ما تكون أكثر وضوحًا بالقرب من الحويصلة. اتفقت هذه النتائج مع ما أشار اليه (Ashtiani واخرون , 2017)
3	***Aspergillus parasiticus***	**Colony:** المستعمرات ذات لون أخضر زيتوني مع غزل ابيض وخشنة مع تقدم العمر **Conidia :** كروية وأخضر داكن اللون ملساء **Reverse of the colony :** أصباغ قابلة للذوبان ذات لون بني (اصفر باهت) **Phialides :** Biseriate **Vesicles :** كانت الحويصلة كمثرية إلى كروية الشكل ويبلغ قطرها 24 - 29 (32) ميكرومتر **Conidiophores :** الحامل الكونيدي قصير 400 ميكروميتر **Sclerotia :** يتحول من الأبيض إلى الوردي والبني الداكن والأسود اتفقت هذه النتائج مع ما أشار اليه (Ashtiani واخرون , 2017)

4	***Aspergillus fumigatus***	**Colony :** أبيض في البداية ثم رمادي دخاني (باللون الأزرق والأخضر مع سطح يشبه الجلد المدبوغ) **Reverse of colony :** أصفر **Conidiophores :** شفاف , أملس **Conidial heads :** عمودي قصير **Vesicle** : شبه كروي او مخروطية , صغيرة **Conidia :** بيضوي **Phialides :** Uniseriate , في الثلثين العلويين من الحويصلة تتفق هذهِ النتائج مع ما توصل إليه Hussein وآخرون (2022) وMutlag وآخرون(2022).
5	***Aspergillus terreus***	**Colony :** يتدرج اللون من بيجي إلى البرتقالي إلى القرفة **Reverse of colony** : وجود أصباغ صفراء. **Conidial heads :** مدمجة وعمودية. **Conidiophores :** شفافة ذات جدران ناعمة. **Conidia :** كروية الشكل , ذات جدران ناعمة وتختلف في اللون من الشفاف إلى الأصفر الفاتح على عكس انواع Aspergillus الأخرى **Phialides :** Biseriate اتفقت النتائج مع ما ذكره Lass-Florl وآخرون (2021).
6	***Aspergillus ochraceus***	**Colony** : المستعمرات برتقالية أو قرفة على PDA مع غزل فطري عديمة اللون **Conidia :** يتراوح حجمها بين 2.5 - 4 ميكرومتر ذات لون برتقالي الى القرفة **Reverse of the colony :** اللون العكسي أصفر (الى بني باهت) **Phialides :** Biseriate غطت الفياليدات الحويصلة بأكملها **Vesicles :** الحويصلة كروية الشكل ويبلغ قطرها 26-45 (65) ميكرومتر برؤوس كونيديا مشعة **Conidiophores :** ستيب قياس 12 ميكرومتر بجدران سميكة وخشنة ذات لون بني اتفقت النتائج مع ماذكره Visagie واخرون ,(2014)

Aspergillus flavus

Aspergillus niger



Aspergillus fumigatus

Aspergillus parasiticus

Aspergillus terreus

Aspergillus ochraceus

الشكل (2) نماذج للوصف المظهري لاهم أنواع الفطر *Aspergillus* المعزولة في هذه الدراسة

4-3: الكشف عن السموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A

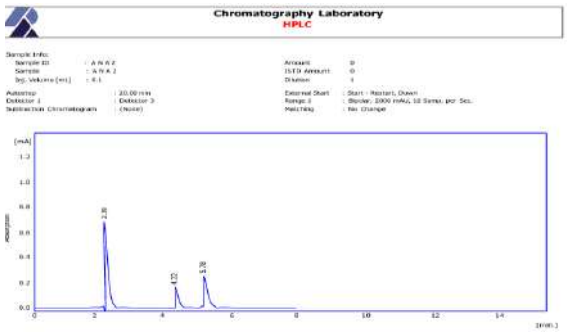
4-3-1: الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج Aflatoxin B1 وOchratoxin A

أظهرت نتائج التحليل الكروموتوغرافي بتقانة HPLC (جدول 17 والشكل 3),مقدرة جميع العزلات الفطرية المختبرة 18 عزلة فطرية على انتاج هذه السموم الفطرية وبمستويات انتاجية مختلفة تراوحت بين عالية الإنتاجية ومنخفضة الإنتاجية . اذ اظهرت العزلات التسعة من الفطر *Aspergillus niger*مقدرة على أنتاج السم Ochratoxin A بنسب متفاوتة اذ كان أعلى تراكيز الانتاج بلغت 80.90 ppb للعزلة الفطرية ANK1 تلتها العزلة الفطرية ANK2 بمعدل انتاج لسم الاوكرتوكسين بلغ 74.50 ppb . بعدها جاءت عزلتي محافظة بغداد اذ بلغت مقدرة العزلة ANB2 على انتاج سم الاوكراتوكسين بلغت 72.60 ppb . والعزلة ANB1 بلغت 68.90 ppb . بينما سجلت العزلة لفطرية ANF المعزولة من العليقة المستوردة والمجموعة من الفلوجة محافظة الانبار اقل مستوى في انتاج السم الفطري الاوكراتوكسين بلغت 22.90 ppb .

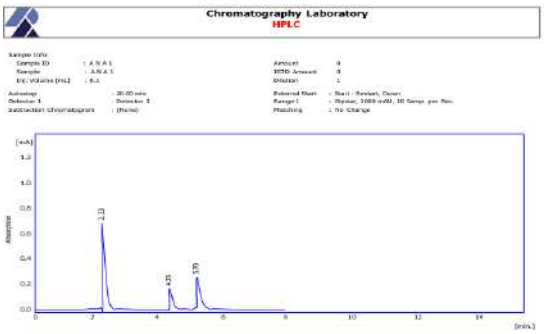
تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة والتي تشير بان المنتج الرئيسي لسم الاوكراتوكسين هو الفطر *A niger* كما في دراسة Chidi وآخرون (2020). وكذلك اثبت إنتاج Ochratoxin A بشكل أساسي بواسطة *A. niger* من قبل De Santis و آخرون (2020) . بينما يُعزى تفاوت العزلات في إنتاج السموم الفطرية على القدرة الوراثية للعزلة الفطرية , والظروف التفضيلية الملائمة لِكُل عُزلة لِإنتاج توكسن معين وبشكل أساسي الرطوبة ودرجة الحرارة أثناء التخزين Twaruzekواخرون,(2020).

الجدول(17): قابلية عزلات الفطر *Aspergillus niger* على أنتاج السم Ochratoxin A

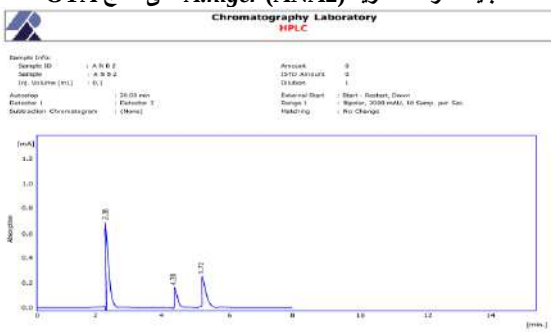
No.	العزلة الفطرية	رمز العزلة	مكان العزل	OTA (ppb)
1	*A niger 1*	A N A 1	عليقة اسماك محلية / معمل1	35.9
2	*Aniger 2*	A N A 2	عليقة اسماك محلية / معمل2	41.6
3	*A niger 3*	A N B 1	عليقة اسماك محلية / معمل1	68.9
4	*A niger 4*	A N B 2	عليقة اسماك محلية / معمل2	72.6
5	*A niger 5*	A N H 1	عليقة اسماك محلية / معمل1	45.9
6	*Aniger 6*	A N H 2	عليقة اسماك محلية / معمل2	52.6
7	*A niger 7*	A N K 1	عليقة اسماك محلية / معمل1	80.9
8	*Aniger 8*	A N K 2	عليقة اسماك محلية / معمل2	74.5
9	*A niger 9*	A N F	عليقة اسماك مستوردة/ فلوجة	22.9



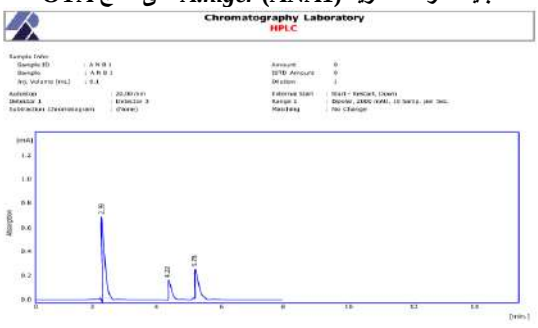
قابلية العزلة الفطرية (ANA2) *A.niger* على انتاج OTA



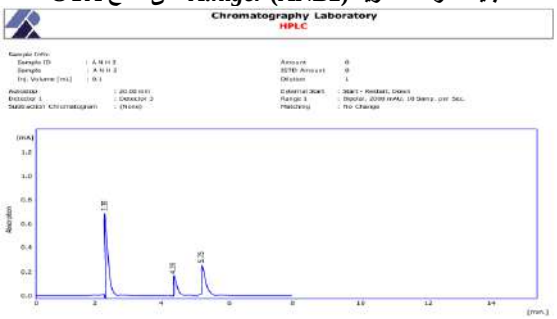
قابلية العزلة الفطرية (ANA1) *A.niger* على انتاج OTA



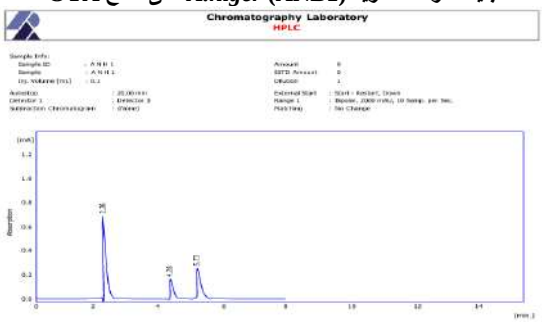
قابلية العزلة الفطرية (ANB2) *A.niger* على انتاج OTA



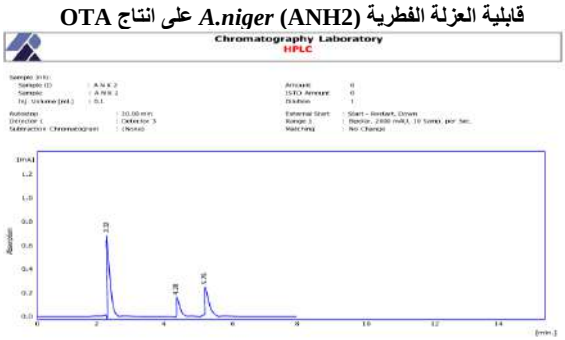
قابلية العزلة الفطرية (ANB1) *A.niger* على انتاج OTA



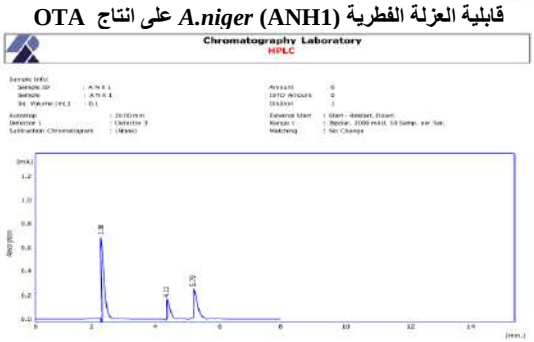
قابلية العزلة الفطرية (ANH2) *A.niger* على انتاج OTA



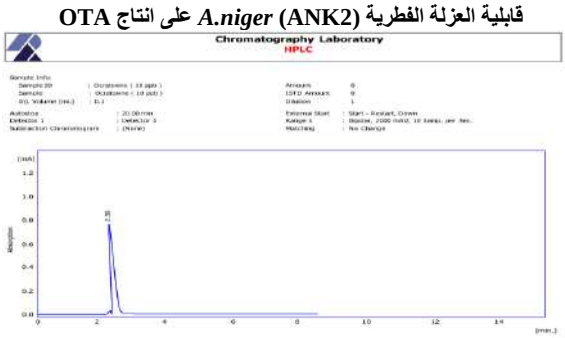
قابلية العزلة الفطرية (ANH1) *A.niger* على انتاج OTA



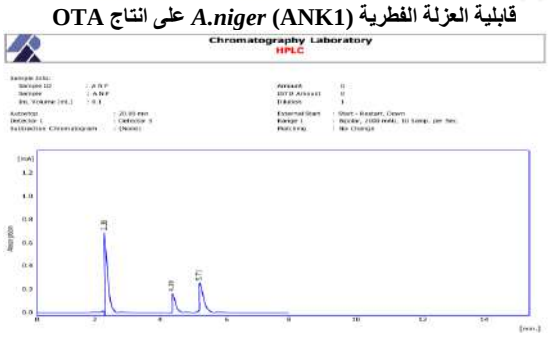
قابلية العزلة الفطرية (ANK2) *A.niger* على انتاج OTA



قابلية العزلة الفطرية (ANK1) *A.niger* على انتاج OTA



المادة القياسية للسم OTA بتركيز (10 ppb)



قابلية العزلة الفطرية (ANF) *A.niger* على انتاج OTA

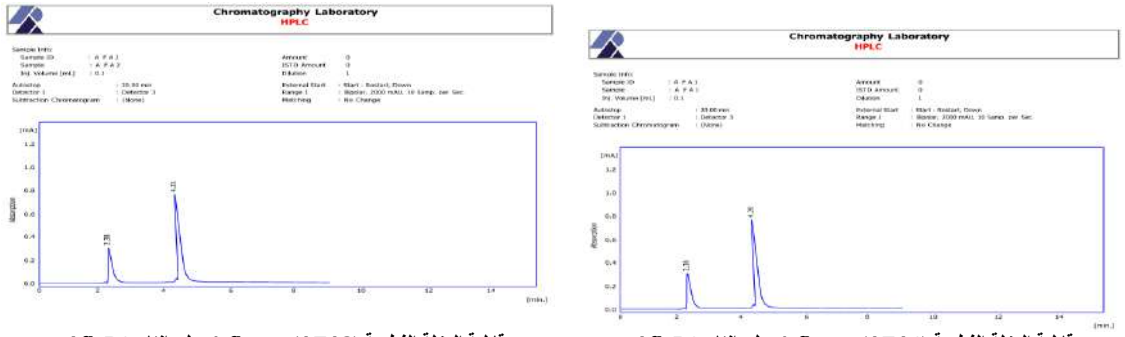
الشكل (3) التقدير الكمي والنوعي لسم OTA المنتج من عزلات الفطر *Aspergillus niger*

كذلك اظهرت العزلات التسعة من الفطر *A flavus* مقدرة كبيرة على أنتاج السم Aflatoxin B1 وبنسب متفاوتة أيضا (جدول 18 والشكل 4), اذ كان أعلى تراكيز الانتاج بلغت226.9 ppb للعزلة الفطرية AFK2 تلتها العزلة الفطرية AFK1 بمعدل انتاج لسم الافلاتوكسين بلغ 214.5 ppb . بعدها جاءت عزلتي محافظة بابل اذ بلغت مقدرة العزلة AFH1 على انتاج سم الافلاتوكسين بلغت 174.9 ppb . والعزلة AFH2 بلغت 170.8 ميكروغرام / كغم . بينما سجلت العزلة لفطرية AFF المعزولة من العليقة المستوردة والمجموعة الفلوجة محافظة الانبار اقل مستوى في انتاج السم الفطري الافلاتوكسين بلغت 42.65 ppb .

تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة والتي تشير بان المنتج الرئيسي لسم الأفلاتوكسين بواسطة فطريات *Aspergillus flavus* والتي تسبب تثبيط وتدهور لخلايا الكبد في الاسماك وفطريات *Aspergillus* تنتج أنواع كثيرة من الافلاتوكسينات من أخطرها أفلاتوكسين B1 يمكن أن تحدث أورام وتدهور في خلايا الكبد في الاسماك ومن اشهر الفطريات المنتجة للافلاتوكسينات *A flavus* ، *A parasiticus* (Pestka، 2005) .

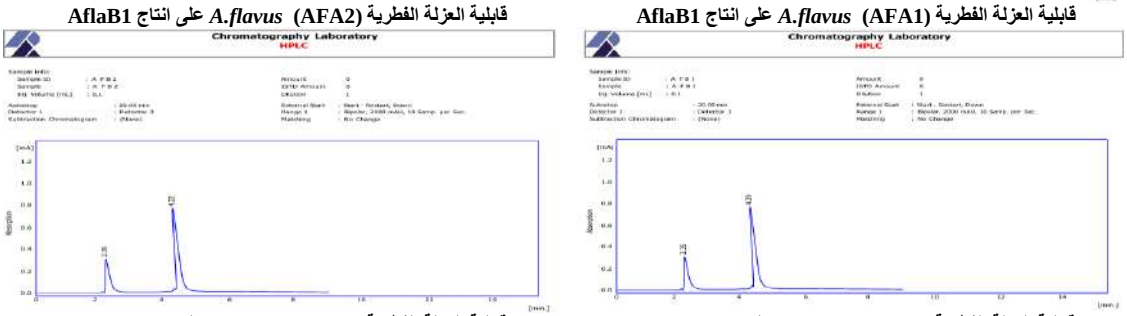
الجدول(18): قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على أنتاج السم Aflatoxin B1

No.	العزلة الفطرية	رمز العزلة	مكان العزل	Afla B1
1	*A flavus 1*	A F A 1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / الانبار	142.5
2	*A flavus 2*	A F A 2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / الانبار	155.9
3	*A flavus 3*	A F B 1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بغداد	142.8
4	*Aflavus 4*	A F B 2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بغداد	134.9
5	*A flavus 5*	A F H 1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بابل	174.9
6	*Aflavus 6*	A F H 2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بابل	170.8
7	*A flavus 7*	A F K 1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / كربلاء	214.5
8	*A flavus 8*	A F K 2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / كربلاء	226.9
9	*A flavus 9*	A F F	عليقة اسماك مستوردة/ فلوجة /	42.65



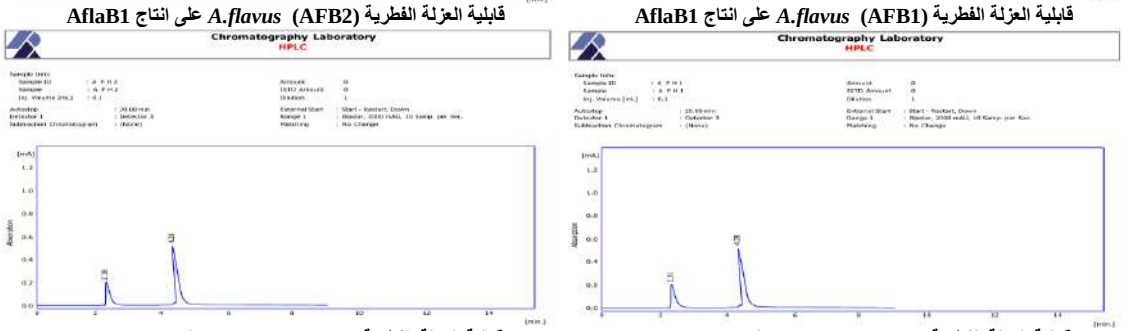
قابلية العزلة الفطرية (AFA1) *A.flavus* على انتاج AflaB1

قابلية العزلة الفطرية (AFA2) *A.flavus* على انتاج AflaB1



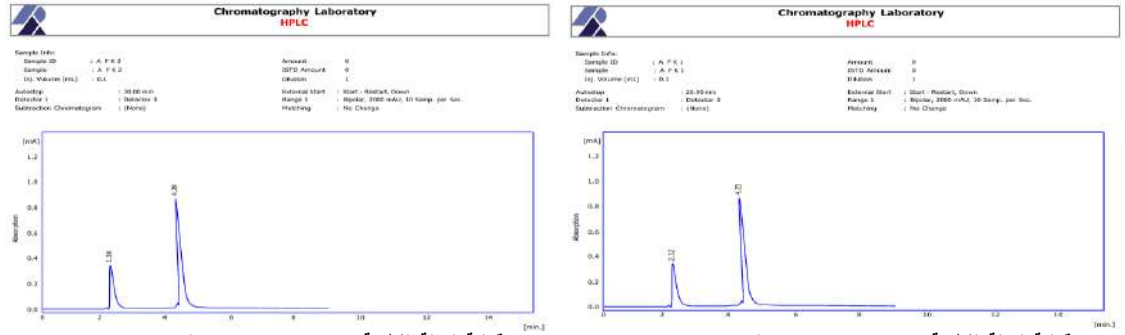
قابلية العزلة الفطرية (AFB1) *A.flavus* على انتاج AflaB1

قابلية العزلة الفطرية (AFB2) *A.flavus* على انتاج AflaB1



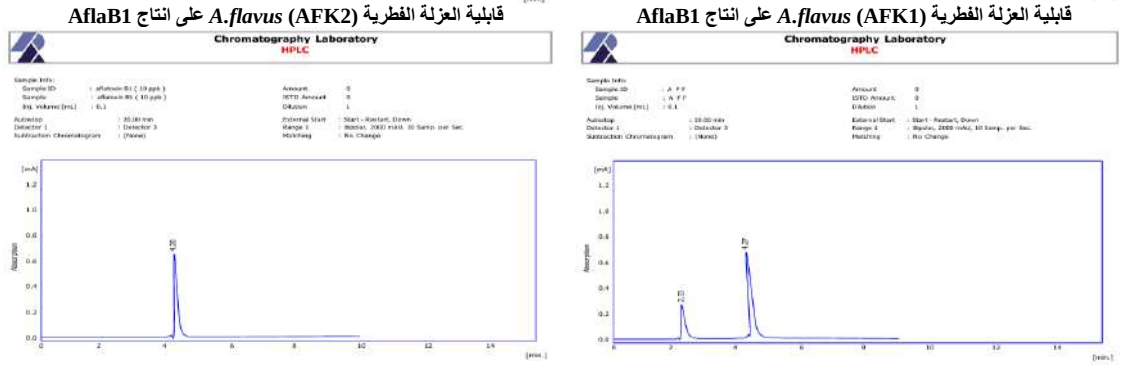
قابلية العزلة الفطرية (AFH1) *A.flavus* على انتاج AflaB1

قابلية العزلة الفطرية (AFH2) *A.flavus* على انتاج AflaB1



قابلية العزلة الفطرية (AFK1) *A.flavus* على انتاج AflaB1

قابلية العزلة الفطرية (AFK2) *A.flavus* على انتاج AflaB1



قابلية العزلة الفطرية (AFF) *A.flavus* على انتاج AflaB1

المادة القياسية للسم Aflatoxin B1 بتركيز (10 ppb)

الشكل (4) التقدير الكمي والنوعي لسم Afla B1 المنتج من عزلات الفطر *Aspergillus flavus*

4-3-2:الكشف عن السموم الفطرية Aflatoxin B1وOchratoxin A في علائق الأسماك

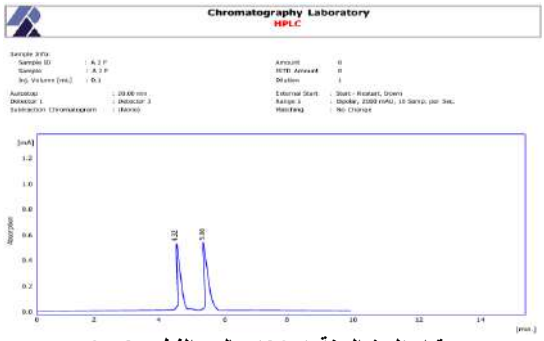
أظهرت نتائج التحليل الكروموتوغرافي للكشف عن التواجد الفعلي للسموم الفطرية Aflatoxin B1 وOchratoxin A في العينات التي تم تحليلها (جدول19 - 20) تلوث اغلب العينات بهذه السموم الفطرية .

اذ اظهر التحليل الكروموتوكرافي للكشف عن التلوث بالاوكراتوكسين A خلو خمسة عينات من اصل تسعة من التلوث بالسم الفطري الاوكراتوسين وهي (عينات الانبار المحلية A1F و A2F وعينات بابل المحلية H1F وH2F وعينة بابل المستوردة H1FF (جدول 19 , شكل 5) في حين أظهرت أربعة عينات ملوثة بالاوكراتوكسين وبنسب متباينة مع تسجيل أعلى نسبة تلوث للأوكراتوكسين A يصل إلى 6.9 ppb للعينة K1F ، تليها B2F و K2F و B1F بتراكيز (6.2 و 5.7 و 5.5 ppb على التوالي)

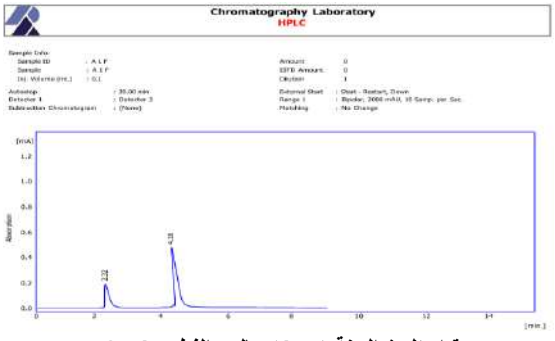
وقد يُعزى التباين بين تركيز السموم الفطرية في العينات التي تم تلوثها بالسموم الفطرية بشكل رئيسي إلى الظروف المناخية والنشاط المائي أثناء التخزين الذي يساعد على نمو الفطريات وإنتاج السموم الفطرية (Li وآخرون،2020). وبالرغم من ان تلوث العينات بمستويات قليلة من السم الفطري الاوكراتوكسين الا انها تفوق الحدود القصوى المسموح بها من قبل الاتحاد الأوربي لجميع العينات والبالغة 5 ppb

الجدول (19) : تلوث عينات عليقة الأسماك المحلية والمستوردة بالسم Ochratoxin A

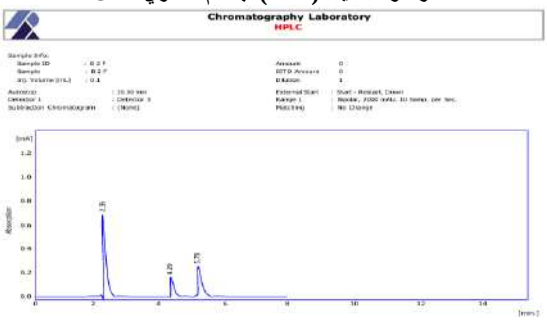
No.	نوع العينة	رمز العينة	OTA (ppb)
1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / الانبار	A 1 F	UDL
2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / الانبار	A 2 F	UDL
3	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بغداد	B 1 F	5.5
4	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بغداد	B 2 F	6.2
5	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بابل	H 1 F	UDL
6	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بابل	H 2 F	UDL
7	عليقة اسماك محلية / معمل1 / كربلاء	K 1 F	6.9
8	عليقة اسماك محلية / معمل2 / كربلاء	K 2 F	5.7
9	عليقة اسماك مستوردة/ بابل/ المسيب	H1FF	UDL



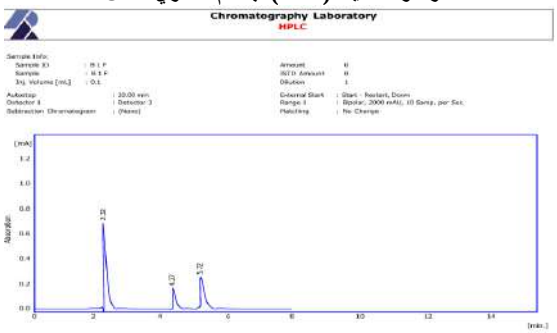
مقدار تلوث العينة (A2F) بالسم الفطريOTA



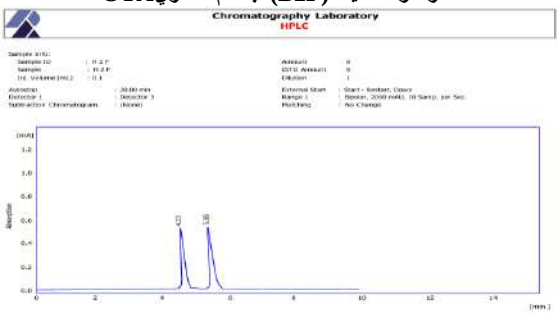
مقدار تلوث العينة (A1F) بالسم الفطريOTA



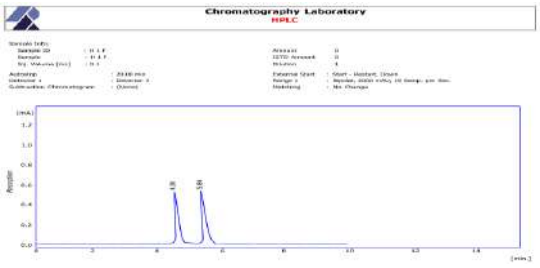
مقدار تلوث العينة (B2F) بالسم الفطريOTA



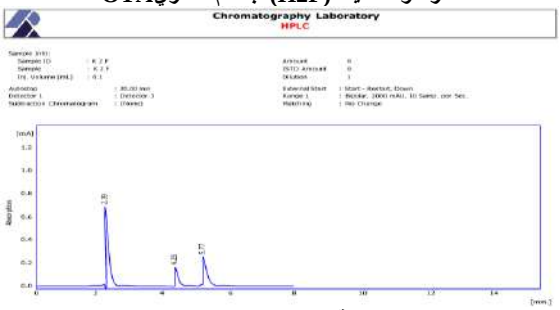
مقدار تلوث العينة (B1F) بالسم الفطريOTA



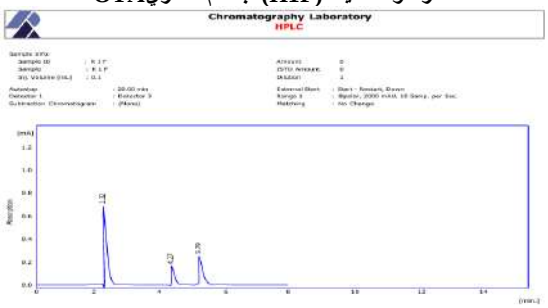
مقدار تلوث العينة (H2F) بالسم الفطريOTA



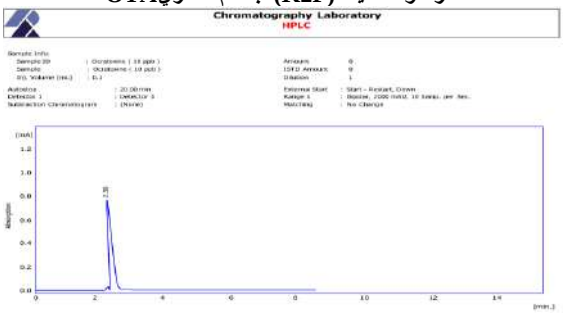
مقدار تلوث العينة (H1F) بالسم الفطريOTA



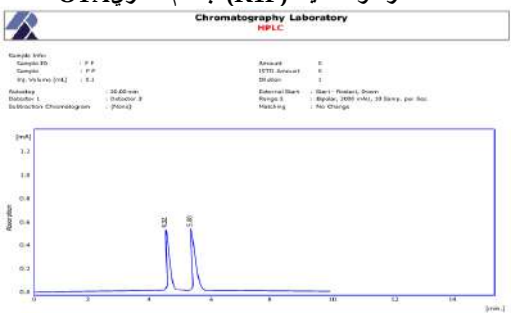
مقدار تلوث العينة (K2F) بالسم الفطريOTA



مقدار تلوث العينة (K1F) بالسم الفطريOTA



المادة القياسية للسم OTA بتركيز (10 ppb)



مقدار تلوث العينة (FF) بالسم الفطريOTA

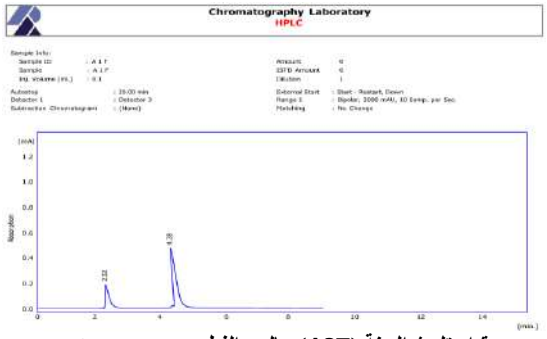
الشكل (5) التقدير الكمي والنوعي لسم OTA كملوث طبيعي لعينات الدراسة

بينما أظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي للكشف عن التلوث بالسم الفطري الافلاتوكسين B1 تلوث جميع العينات التسعة بالسم الفطري الافلاتوكسينB1 , اذ تصدرت عينتي العليقة المجموعة من محافظة كربلاء باعلى مستوى للتوث بالسم الافلاتوكسين B1 اذ بلغتا 9.33 و 9.25 ppb للعينة K 2 F و K 1 F على التوالي . تلتها مجموعتين بمستوى تلوث اقل من الافلاتوكسين تراوح بين 5.08 – 5.60 ppb تمثلت بعينات الانبار المحلية A 1 F و A 2F وعينات بابل المحلية H 1 F وH 2 F ووان اقل مستوى تلوث بالافلاتوكسين بلغ 2.62 ميكروغرام / كغم في عينة بابل المستوردة H1FF (جدول 20 , شكل 6) في حين أظهرت العينتين المجموعة من بغداد تلوث بسيط بالافلاتوكسين يصل إلى 3.90 و 3.60 ppb للعينة B 2 F و B 1 F على التوالي

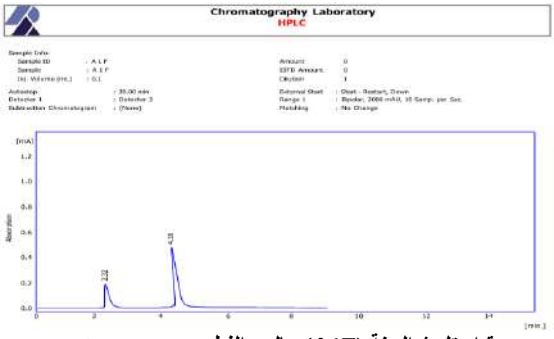
الجدول(20): تلوث عينات عليقة الأسماك المحلية والمستوردة بالسم Aflatoxin B1

No.	نوع العينة	رمز العينة	Afla B1 (ppb)
1	عليقة اسماك محلية / معمل1 / الانبار	A 1 F	5.08
2	عليقة اسماك محلية / معمل2 / الانبار	A 2 F	5.11
3	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بغداد	B 1 F	3.56
4	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بغداد	B 2 F	3.90
5	عليقة اسماك محلية / معمل1 / بابل	H 1 F	5.60
6	عليقة اسماك محلية / معمل2 / بابل	H 2 F	5.25
7	عليقة اسماك محلية / معمل1 / كربلاء	K 1 F	9.25
8	عليقة اسماك محلية / معمل2 / كربلاء	K 2 F	9.33
9	عليقة اسماك مستوردة/ بابل/ المسيب	H1FF	2.65

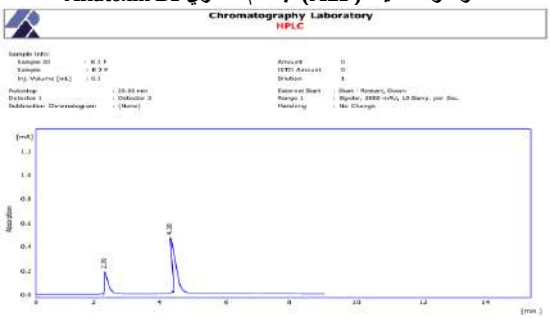
وقد يُعزى التباين بين تركيز السموم الافلاتوكسين في العينات بشكل رئيسي إلى كثافة النمو الفطري للفطر *A. falvus* و *A. parasiticus* المنتجان للافلاتوكسين B_1 وكذلك المحتوى الرطوبي فاذا كانت الظروف البيئية التي رافقت تصنيع العليقة والمحتوى الرطوبي ودرجة حرارة ورطوبة المخزن ملائمة لنمو الفطر ادى ذلك الى تواجد الافلاتوكسين الى مستويات مرتفعة جدا (Mohamed واخرون . 2017)



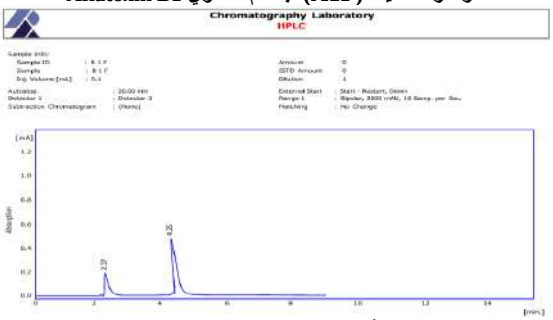
مقدار تلوث العينة (A2F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



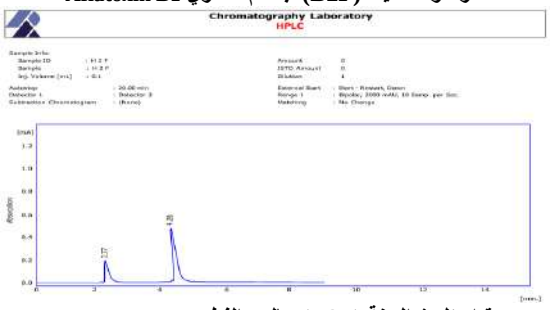
مقدار تلوث العينة (A1F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



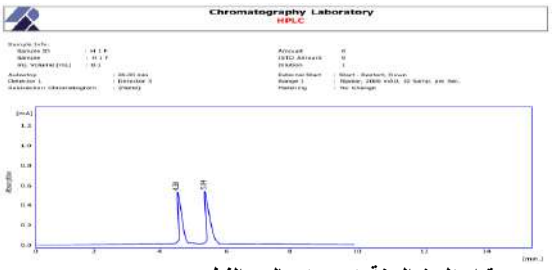
مقدار تلوث العينة (B2F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



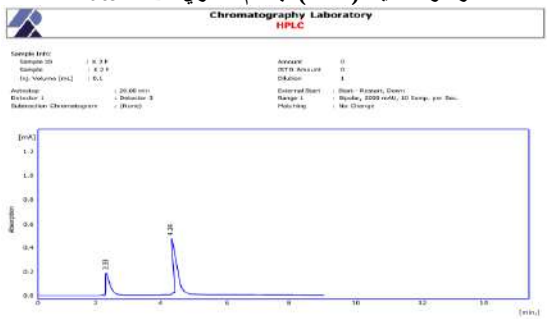
مقدار تلوث العينة (B1F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



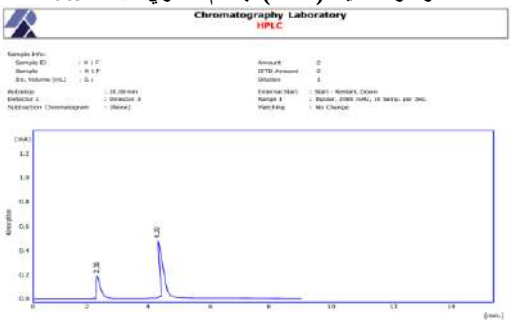
مقدار تلوث العينة (H2F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



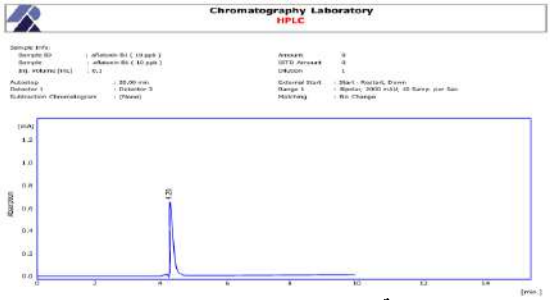
مقدار تلوث العينة (H1F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



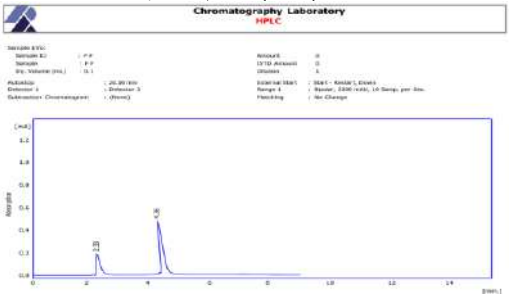
مقدار تلوث العينة (K2F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



مقدار تلوث العينة (K1F) بالسم الفطري Aflatoxin B1



المادة القياسية للسم Aflatoxin B1 بتركيز (10 ppb)



مقدار تلوث العينة (FF) بالسم الفطري Aflatoxin B1

الشكل (6) التقدير الكمي والنوعي لسم Aflatoxin B1 كملوث طبيعي لعينات الدراسة

4-4 : تحليل التتابع النيوكليتيدي لعزلات الفطر *Aspergillus* spp المعزولة

اكدت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لـ 4 عزلات من الفطر ***Aspergillus*** التي تم عزلها من عليقة الأسماك المحلية (البلت) والتي تميزت أولى العزلتين بأعلى انتاج للسميين الفطريين Aflatoxin B1 وOchratoxin A وعزلتين الأقل انتاجا لهما في عينات العليقة السمكية المحلية , تشخيصها تحت انواع متباينة , فقد اظهرت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلات بان عزلتان تعود للفطر *A niger* , وعزلتان تعود للفطر *A flavus* .

اذ تم تسجيل جميع العزلات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوي (NCBI) وتحت الرموز الخاصة المبينة ازاء كل منها في الجدول (21). اذ حققت التسلسلات النيوكليوتيدية الجزيئية اعلى نسبة تطابق تراوحت مابين 99.68 – 98.77 % مع المنطقة الجينية ITS عند مقارنتها مع التسلسلات النيوكليوتيدية المكافئة المسترجعة من بنك الجينات في المركز الوطني للمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) بأستخدام برنامج الـ (BLAST) ولكل عزلة فطرية بشكل منفرد . (Moore واخرون , 2015)

كما أُجريت التحاليل النيوكليوتيدية باستعمال برنامج (MEGA) لتحليل العزلات ورسم شجرة القرابة بين كل من هذه العزلات والعزلات المشابهة لها المسجلة بمركز (NCBI) حيث تم بناؤها من التسلسل الجزيئي النيوكليوتيدي لمنطقة ITS العائدة لكل من العزلات .

الجدول(21) : التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *Aspergillus* spp باستخدام تحليل التتابع النيوكليوتيدي و GenBank Accession Number و Submission Number لها .

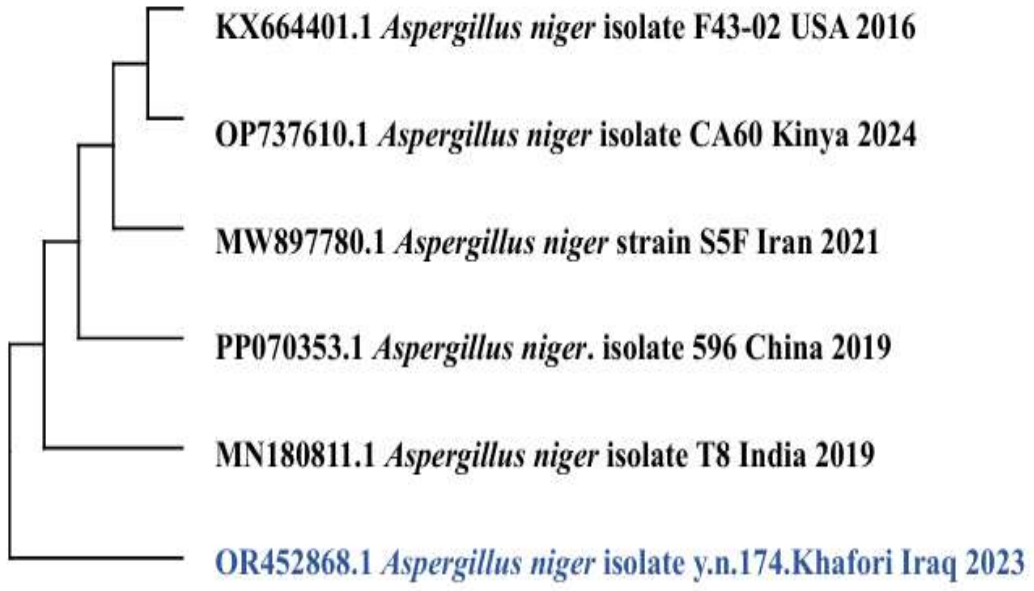
ت	اسم الفطر **Fungal name**	رمز العزلة **Isolate name**	**GenBank Accession Number**	الرمز للعزلات
1	*A niger*	*Y.n.174.Khafori*	OR452868.1	A N A 1
2	*A niger*	*Y.n.175.Khafori*	OR449322.1	A NK 1
3	*A flavus*	*Y.n.176.Khafori*	OR449323.1	A F B 2
4	*A flavus*	*Y.n.177.Khafori*	OR449324.1	A F K 2

1-4-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A. niger isolate y.n.174.Khafori* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر ***A. niger isolate y.n.174.Khafori*** المعزول من عليقة الأسماك المحلية مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.64 – 98.77%) مع جميع عزلات الفطر ***A. niger*** (جدول 22). في حين أظهر الشكل (7) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة لم تظهر تقارب وراثي مع أي من العزلات المسجلة (لم تظهر بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين الأميركية (**KX664401.1**) و الكينية (**OP737610.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 22: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A. niger isolate y.n.174.Khafori*) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر **Fungal name**	رمز العزلة **Isolate name**	مكان العزلة **Origin**	**GenBank Accession Number**	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	***A niger***	**Y.n.174.Khafori**	**Iraq**	**OR452868.1**	**%100**	**2023**
2	***A niger***	**isolate T8**	**India**	**MN180811.1**	**%99.12**	**2019**
3	***A niger***	**isolate 596**	**china**	**PP070353.1**	**%99.64**	**2024**
4	***A niger***	**isolate F43-02**	**USA**	**KX664401.1**	**%98.77**	**2016**
5	***A niger***	**isolate CA60**	**Kenya**	**OP737610.1**	**%98.77**	**2023**
6	***A niger***	**strain S5F**	**Iran**	**MW897780.1**	**% 99.11**	**2021**



الشكل (7) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger isolate y.n.174.Khafori*

2-4-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة *A. niger isolate y.n.175.Khafori* ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر ***A. niger isolate y.n.175.Khafori*** المعزول من عليقة الأسماك المحلية مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.64 – 98.77%) مع جميع عزلات الفطر ***A. niger*** (جدول 23). في حين أظهر الشكل (8) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة اظهرت تقارب وراثي مع العزلة الهندية (**MN180811.1**) (ظهرت بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلة الصينية (**PP070353.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 23: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A. niger isolate y.n.175.Khafori*) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

تأريخ التسجيل في NCBI	Sequence similarity %	GenBank Accession Number	مكان العزلة Origin	رمز العزلة Isolate name	اسم الفطر Fungal name	ت
2023	**%100**	**OR449322.1**	**Iraq**	**Y.n.175.Khafori**	***A niger***	1
2019	**%99.12**	**MN180811.1**	**India**	**isolate T8**	***A niger***	2
2024	**%99.64**	**PP070353.1**	**china**	**isolate 596**	***A niger***	3
2016	**%98.77**	**KX664401.1**	**USA**	**isolate F43-02**	***A niger***	4
2023	**%98.77**	**OP737610.1**	**Kenya**	**isolate CA60**	***A niger***	5
2021	**% 99.11**	**MW897780.1**	**Iran**	**strain S5F**	***A niger***	6

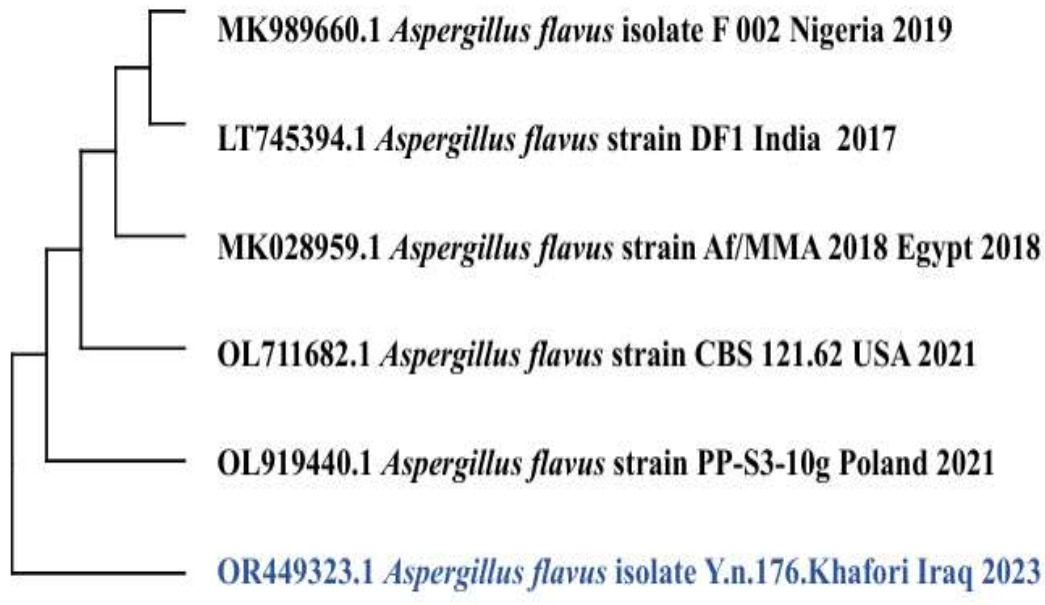
الشكل (8) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger isolate y.n.175.Khafori*

3-4-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للعزلة الفطرية (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*) المعزول من عليقة الأسماك المحلية مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.50%) مع جميع عزلات الفطر ***A.flavus*** (جدول 24). في حين أظهر الشكل (9) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة لم تظهر تقارب وراثي مع أي من العزلات المسجلة (لم تظهر بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين المصرية (**MK028959**) و النيجيرية (**MK989660.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

الجدول 24: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر **Fungal name**	رمز العزلة **Isolate name**	مكان العزلة **Origin**	**GenBank Accession Number**	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	***A flavus***	**Y.n.176.Khafori**	**Iraq**	OR449323.1	**%100**	**2023**
2	***A flavus***	**isolate F_002**	**Nigeria**	**MK989660.1**	**%99.50**	**2019**
3	***A flavus***	**strain Af/MMA 2018**	**Egypt**	**MK028959**	**%99.50**	**2018**
4	***A flavus***	**strain DF1**	**India**	**LT745394.1**	**%99.50**	**2017**
5	***A flavus***	**strain CBS 121.62**	**USA**	**OL711682.1**	**%99.50**	**2021**
6	***A flavus***	**strain PP-S3-10g**	**Poland**	**OL919440.1**	**% 99.50**	**2021**



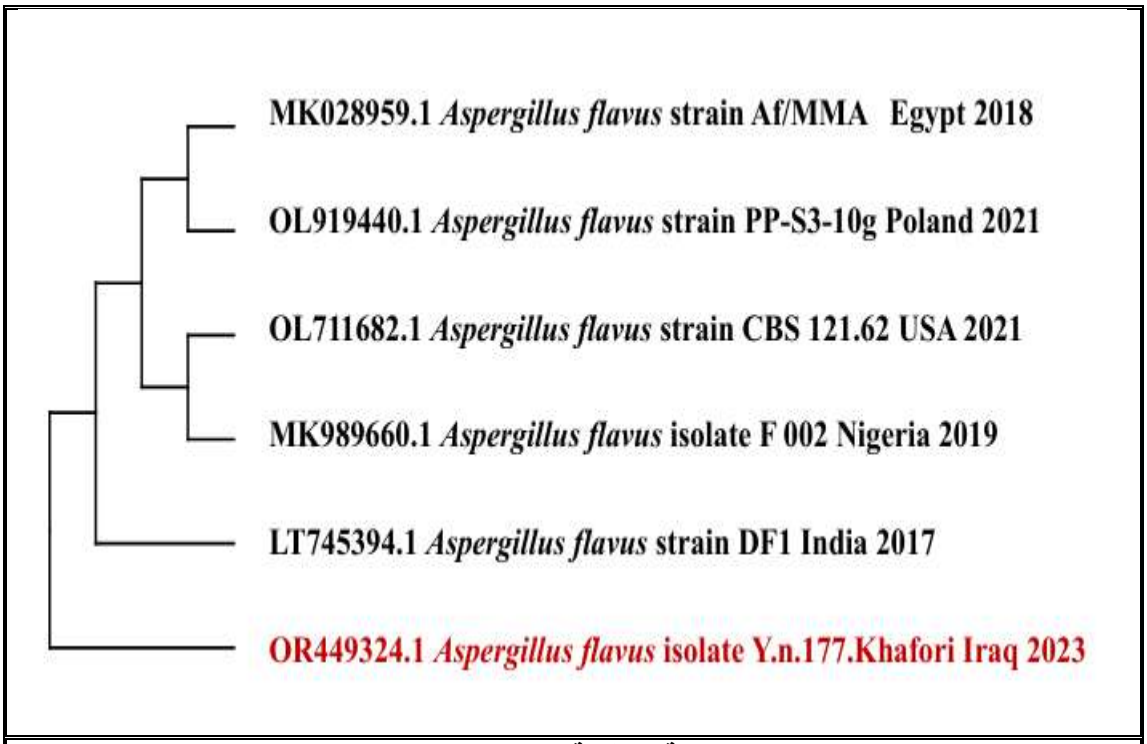
الشكل (9) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*)

4-4-4 : تحليل التتابع النيوكليوتيدي للعزلة (*A.flavus isolate y.n.177 .Khafori*) ومقارنة نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS مع العزلات الفطرية العالمية لنفس الفطر

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للعزلة الفطرية (***A.flavus isolate y.n.177.Khafori***) المعزولة من عليقة الأسماك المحلية مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابة الوراثي بلغت (99.50%) مع جميع عزلات الفطر ***A.flavus*** (جدول 25). في حين أظهر الشكل (10) المتمثل بالشجرة الوراثية بان هذه العزلة لم تظهر تقارب وراثي مع أي من العزلات المسجلة (لم تظهر بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية المسجلة وخاصة عن العزلتين المصرية (**MK028959**) و البولونية (**OL919440.1**) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما.

جدول 25: مقارنة بين نسب تشابه تتابع القواعد النيوكلوتيدية لمنطقة الجين ITS لعزلة الفطر (*A.flavus isolate y.n.177.Khafori*) وبين العزلات الفطرية الاخرى لنفس الفطر المسجلة عالميا في المركز الوطني للمعلومات التقنية والحيوية (NCBI)

ت	اسم الفطر **Fungal name**	رمز العزلة **Isolate name**	مكان العزلة **Origin**	**GenBank Accession Number**	Sequence similarity %	تأريخ التسجيل في NCBI
1	***A. flavus***	**Y.n.177.Khafori**	**Iraq**	**OR449324.1**	**%100**	**2023**
2	***A. flavus***	**isolate F_002**	**Nigeria**	**MK989660.1**	**%99.50**	**2019**
3	***A. flavus***	**strain Af/MMA 2018**	**Egypt**	**MK028959**	**%99.50**	**2018**
4	***A. flavus***	**strain DF1**	**India**	**LT745394.1**	**%99.50**	**2017**
5	***A. flavus***	**strain CBS 121.62**	**USA**	**OL711682.1**	**%99.50**	**2021**
6	***A. flavus***	**strain PP-S3-10g**	**Poland**	**OL919440.1**	**% 99.50**	**2021**



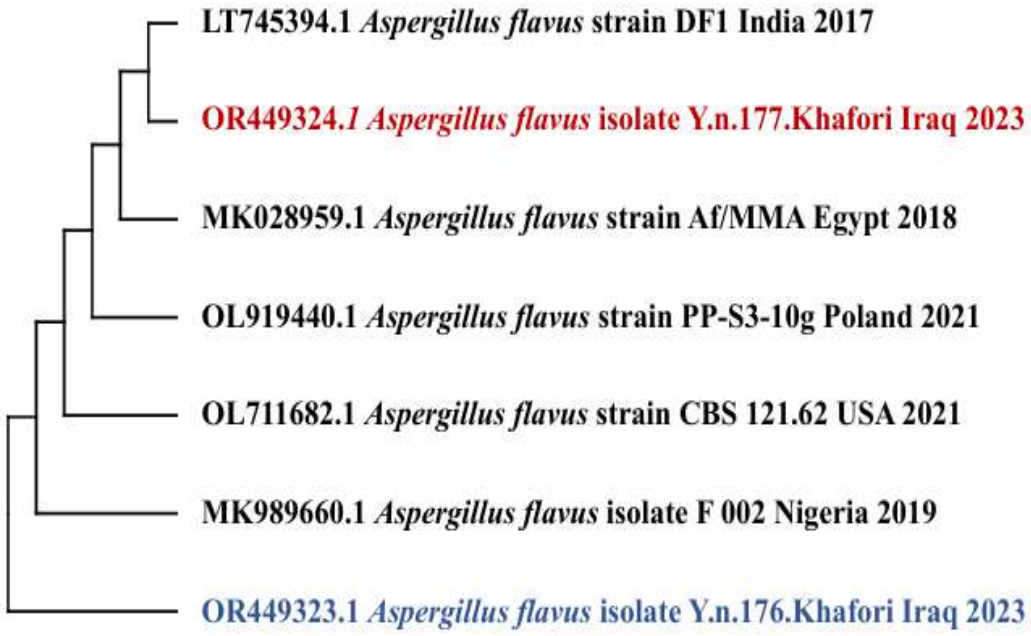
الشكل (10) شجرة التقارب الوراثي للعزلة الفطرية (*A.flavus isolate y.n.177.Khafori*)

بينما اكدت النتائج الخاصة بدراسة مدى ظهور اختلافات كبيرة بالتركيب الوراثي بين العزلات الفطرية المنتجة للسموم الفطرية بمستويات متباينة تراوحت بين عالية الإنتاجية ومنخفضة الإنتاجية بأن هناك اختلافات وراثية كبيرة بين هذه العزلات .

فقد لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للعزلة الفطرية *A.niger isolate y.n.175.Khafori* (OR449322.1) (العزلة الفطرية المنتجة للسم الفطري الاوكراتوكسينA بمستويات مرتفعة جدا) مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) لم تظهر أي تقارب وراثي مع عزلة الفطر *A. niger isolate y.n.174.Khafori* (OR452868.1) (العزلة الفطرية المنتجة للسم الفطري الاوكراتوكسينA بمستويات منخفضة جدا) فأنها ظهرت بتفرعات منفصلة ولم تظهر بنفس التفرع (Clade) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما (الشكل 11) المتمثل بالشجرة الوراثية. بينما اظهرت تقارب وراثي كبير مع العزلة الهندية (MN180811.1) (ظهرت بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية الأخرى .

وبنفس الوقت فقد وجد ومن خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للعزلة الفطرية (*A.flavus isolate y.n.177.Khafori*) (OR449324.1) (العزلة الفطرية المنتجة للسم الفطري الافلاتوكسينB1 بمستويات مرتفعة جدا) مع البيانات المتوفرة في المركز لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) لم تظهر أي تقارب وراثي مع عزلة الفطر (*A.flavus isolate y.n.176.Khafori*) (OR449323.1) (العزلة الفطرية المنتجة للسم الفطري الافلاتوكسينB1 بمستويات منخفضة جدا) فأنها ظهرت بتفرعات منفصلة وبعيدة جدا ولم تظهر بنفس التفرع (Clade) بسبب التباعد الوراثي الكبير بينهما (الشكل 11) المتمثل بالشجرة الوراثية. بينما اظهرت تقارب وراثي كبير مع العزلة الهندية (LT745394.1) (ظهرت بنفس التفرع .clade) بينما ظهرت بتفرعات منفصلة (clades) عن العزلات الفطرية الأخرى .

شجرة التقارب الوراثي بين العزلتين *A. niger isolate y.n.174.Khafori* و *A. niger isolate y.n.175.Khafori*



شجرة التقارب الوراثي بين العزلتين *A.flavus isolate y.n.177.Khafori* و *A.flavus isolate y.n.177.Khafori*

الشكل (11) الفرق بالتركيب الوراثي بين العزلات الفطرية المنتجة للسموم الفطرية بمستويات متباينة

4-9: أختبار تأثير فترات التخزين ومستويات الرطوبة لعليقة الأسماك في حيوية الفطريات وتكاثرها ومقدرتها على انتاج السموم الفطرية

أظهرت نتائج التجربة (جدول 26) الخزنية التي نفذت على عليقة اسماك مستوردة خالية من التلوث الفطري بشكل عام . وذات محتوى رطوبي اولي 10% لدراسة النشاط الحيوي لعزلتين فطريتين (*A niger* K1 , *A flavus K2*) . ومقدرتهما على انتاج السموم الفطرية ضمن ثلاث فترات خزنية وبثلاث مستويات من المحتوى الرطوبي اذ بينت النتائج هناك تباين كبير بحيوية العزلتين متمثلة باعداد العزلات المعزولة وإنتاج السموم الفطرية لكل من هذه الفترات الخزنية والمستويات الرطوبية .

اذ أظهرت نتائج انتشار وحيوية الفطر *A niger* , ان كلما ارتفع المحتوى الرطوبي للعليقة الحيوانية ازدات معدل تلوث وانتشار الفطريات ضمن العينات. اذ سجل اعلى معدل لتلوث العليقة بالفطر *A niger* عند محتوى رطوبي 25% بلغ 65.56% تلاه المحتوى الرطوبي 15% بمعدل تلوث فطري بلغ 60.44% . وان اقل معدل تلوث بلغ 55.56% عند اقل مستوى رطوبي 10% .

بينما أوضحت نتائج التلوث الفطري خلال فترات الخزن المختلفة , بان كلما ازدادت مدة الخزن ارتفع معدل التلوث الفطري بالفطر *A niger* ضمن المستوى الرطوبي المحدد . اذ سجل اعلى معدل للتلوث الفطري ضمن فترة الخزن 90 يوم وبلغ 83.33% بينما سجل بفترة الخزن 60 يوم معدل تلوث بلغ 59.11% في حين ان اقل تلوث فطري للعليقة بلغ 39.11% عند اقل فترة خزنية وهي 30 يوم .

الجدول(26) تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط ونمو العزلة الفطرية *Aspergillus niger IK* والفطريات الاخرى ومدى تلوثها لعليقة الأسماك

ت	المعاملات محتوى رطوبي/ فترات خزن		فترة خزن 30 يوم			فترة خزن 60 يوم			فترة خزن 90 يوم			المعدل
			10 يوم	20 يوم	30 يوم	10 يوم	20 يوم	30 يوم	10 يوم	20 يوم	30 يوم	
1	محتوى رطوبي %10	إضافة الفطر	32	34	38	40	60	62	76	78	80	55.56
		control	3	5	7	10	9	9	11	10	12	8.44
2	محتوى رطوبي %15	إضافة الفطر	40	40	44	42	68	64	80	76	90	60.44
		control	6	8	10	12	13	12	12	10	14	10.78
3	محتوى رطوبي %25	إضافة الفطر	42	36	46	48	72	76	90	88	92	65.56
		control	10	11	14	16	15	16	17	18	22	15.44
المعدل النهائي للمعاملات			% 39.111			% 59.111			% 83.333			
LSD عند مستوى 0.05			4.42			5.65			4.87			

في حين أظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي للكشف عن انتاج السموم الفطرية وانتشار السم الفطري الاوكراتوكسين A في عينات عليقة الاسماك بان جميع فترات التخزين وضمن مستويات المحتوى الرطوبي المختلفة ملوثة بالسم الفطري الاوكراتوكسين A وبتراكيز مختلفة (جدول 27) . اذ سجل اعلى مستوى لانتاج السم الفطري خلال أطول فترة خزن والمتمثلة بثلاثة اشهر(تناسب انتاج السم الفطري الاوكراتوكسين A طرديا مع فترات التخزين) اذ بلغ تركيزه 46.32 و 49.42 و 64.67 ppb ضمن ثلاث مستويات رطوبة (10% و 15% و25%) على التوالي . وبنفس الوقت ارتفعت مستويات انتاج السم الفطري كلما ارتفع المحتوى الرطوبي لعليقة الأسماك لغاية 25% . اذ بلغت 29.54 و 42.23 و 64.67 ppb خلال فترات خزن (30 و 60 و 90 يوم) على التوالي .

وهذا ما أكدته الدراسات السابقة بأن نمو الفطريات السامة وانتاجها للسموم الفطرية يتاثر بالعديد من العوامل البيئية مثل الرطوبة والتهوية والحرارة وطول فترات الخزن والتركيب الكيمياوي والقيمة الغذائية للمادة المخزونة وان من اكثر العوامل البيئية الحرجة التي تتحكم بقدرة الوسط الغذائي بدعم النمو الفطري هي درجات الحرارة والمحتوى الرطوبي والزمن .

فان الخزن تحت درجات حرارية واطئة يكون مناسبا للسيطرة على نمو الفطريات وتعد هذه الطريقة احدى اهم المقومات الاساسية للعديد من برامج الخزن التجاري ولكن استخدام المخازن المبردة على نطاق كبير لايعد مجديا من الناحية الاقتصادية وتم استخدام معيار الفعالية المائية (المحتوى الرطوبي)عوضا عن نسبة الرطوبة في المواد الاولية المخزونة وكلما كانت الفعالية المائية واطئة كلما تضاءلت الفرصة لنمو الفطريات (FAO/WHO،2002 و Schmidt-Heydt واخرون , 2010)

الجدول(27) تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط العزلة الفطرية *A. niger* K1 ومدى قدرتها على انتاج الاوكراتوكسين في عليقة الأسماك

ت	المعاملات محتوى رطوبي/ فترات خزن	فترة تخزين 0 يوم control	فترة خزن 30 يوم (ppb)	فترة خزن 60 يوم (ppb)	فترة خزن 90 يوم (ppb)	المعدل (ppb)
1	محتوى رطوبي 10%	0.00	18.78	34.78	46.32	33.29
2	محتوى رطوبي 15%	0.00	24.56	28.56	49.42	34.18
3	محتوى رطوبي 25%	0.00	29.54	42.23	64.67	45.48
	المعدل النهائي **(ppb)**	0.00	24.29	35.19	53,47	
	LSD عند مستوى 0.05	---	3.23	4.43	4.10	

وأظهرت نتائج انتشار وحيوية الفطر *A flavus* , بان كلما ارتفع المحتوى الرطوبي للعليقة الحيوانية ازداد معدل تلوث وانتشار الفطريات ضمن العينات (جدول 28) . اذ سجل اعلى معدل لتلوث العليقة بالفطر *A flavus* عند محتوى رطوبي 25% بلغ 65.33 % تلاه المحتوى الرطوبي 15% بمعدل تلوث فطري بلغ 59% . وان اقل معدل تلوث بلغ 50.22% عند اقل مستوى رطوبي 10% .

بينما أوضحت نتائج التلوث الفطري خلال فترات الخزن المختلفة , بان كلما ازدادت مدة الخزن ارتفع معدل التلوث الفطري بالفطر *Aspergillus flavus* ضمن المستوى الرطوبي المحدد . اذ سجل اعلى معدل للتلوث الفطري ضمن فترة الخزن 90 يوم وبلغ 73.55% بينما

سجل بفترة الخزن 60 يوم معدل تلوث بلغ 61.44% في حين ان اقل تلوث فطري للعليقة بلغ 39.55% عند اقل فترة خزنية وهي 30 يوم .

الجدول(28) تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط ونمو العزلة الفطرية *Aspergillus flavus K2* ومدى تلوثها لعليقة الأسماك

ت	المعاملات محتوى رطوبي/ فترات خزن		فترة خزن 30 يوم			فترة خزن 60 يوم			فترة خزن 90 يوم			المعدل
			10 يوم	20 يوم	30 يوم	10 يوم	20 يوم	30 يوم	10 يوم	20 يوم	30 يوم	
1	محتوى رطوبي %10	إضافة الفطر	22	28	46	56	60	54	60	62	64	50.22
		control	3	5	7	10	9	9	11	10	12	8.44
2	محتوى رطوبي %15	إضافة الفطر	32	34	52	52	64	62	76	78	80	59.00
		control	6	8	10	12	13	12	12	10	14	10.78
3	محتوى رطوبي %25	إضافة الفطر	42	40	60	68	64	72	78	80	84	65.33
		control	10	11	14	16	15	16	17	18	22	15.44
المعدل النهائي للمعاملات			39.556			61.444			73.556			
LSD عند مستوى 0.05			**4.78**			**5.57**			**4.32**			

وأظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي للكشف عن انتاج السموم الفطرية وانتشار السم الفطري الافلاتوكسين B1 في العينات بان جميع فترات التخزين وضمن مستويات المحتوى الرطوبي المختلفة ملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسينB1 وبتراكيز مختلفة (جدول 29) . اذ سجل اعلى مستوى لانتاج السم الفطري خلال أطول فترة خزن والمتمثلة بثلاثة اشهر(تناسب انتاج السم الفطري الافلاتوكسين طرديا مع فترات الخزن) اذ بلغ تركيزه 42.12 و 68.43 و 82.34 ppb ضمن ثلاث مستويات رطوبة (10% و 15% و25%) على التوالي . وبنفس الوقت ارتفعت مستويات انتاج السم الفطري كلما ارتفع المحتوى الرطوبي لعليقة الأسماك لغاية 25% . اذ بلغت 42.65 و 68.32 و 82.34 ppb خلال فترات خزن (30 و 60 و 90 يوم) على التوالي .

توافقت هذه النتائج مع دراسات سابقة التي اشارت بأن كل من درجة الحرارة والرطوبة وفترات الخزن في الحبوب المخزونة والاعلاف أهم العوامل المحددة لنمو الفطر وإنتاج السموم الفطرية وتعتبر الرطوبة المناسبة لانتاج الافلاتوكسين هي 85% فأعلى , أما أقل درجة حرارة ينمو فيها الفطر *A flavus* فهي 12ْم والمثلى 27ْم وأعلى درجة كانت من 40-42ْم , أن إنتاج الأفلاتوكسين يتم عند وجود رطوبة نسبية عالية ودرجات الحرارة تتراوح بين 25-30ْم ، ويمكن أن تنتج هذه السموم عند درجة حرارة 8-10ْم بكميات قليلة وبوقت أطول . (Saleemi واخرون , 2012)

وقد تكون نتائج هذ الاختبار من انتاج وانتشار السموم الفطرية هي انعكاساً لنمو وانتشار وحيوية الفطريات المنتجة لهذه السموم في هذه العليقة , فان ازدياد اعداد الفطريات وانتشارها كلما ازدادت فترات التخزين وارتفاع المحتوى الرطوبي للعليقة المخزونة وهذا انعكس وبشكل مباشر الى ارتفاع مستويات انتاج السموم الفطرية . (Schmidt-Heydt واخرون , 2009)

الجدول(29) تأثير فترات التخزين ومستويات المحتوى الرطوبي في حيوية ونشاط العزلة الفطرية *Aspergillus flavus K2* ومدى مقدرتها على انتاج السم الافلاتوكسين في عليقة الأسماك

ت	المعاملات محتوى رطوبي/ فترات خزن	فترة تخزين 0 يوم control	فترة خزن 30 يوم (ppb)	فترة خزن 60 يوم (ppb)	فترة خزن 90 يوم (ppb)	المعدل (ppb)
1	محتوى رطوبي 10%	0.00	22.12	38.67	42.12	34.30
2	محتوى رطوبي 15%	0.00	28.75	50.55	68.43	49.24
3	محتوى رطوبي 25%	0.00	42.65	68.32	82.34	64.43
المعدل النهائي **(ppb)**		0.00	31.17	52.51	64.29	
LSD عند مستوى 0.05		---	**3.89**	**5.76**	**6.43**	

4-10: الاختبارات الحيوية لتأثير العليقة الملوثة بالسموم الفطرية على معدلات نمو وصحة الأسماك

نفذت هذه التجربة لتقييم تأثير التعرض المستمر لعليقة الأسماك الملوثة بالسموم الفطرية الاوكراتوكسين والافلاتوكسين في تغذية اسماك الكارب , ودراسة تدهور اوزانها النهائية والهلاكات وبعض معايير الصحة والمتمثلة بتأثيراتها على مكونات الدم الفسلجية. اذ حسبت اغلب النتائج على أساس اخذ ثلاث رفعات عشوائية من الأسماك من نفس قفص التربية في كل موعد لحساب النتائج . اذ تم اعتبار كل رفعة بمثابة مكرر (بواقع ثلاث مكررات) .

أظهرت نتائج تأثير السم الفطري الاوكراتوكسين A على معدلات النمو وعدد الهلاكات الأسماك خلال فترات التربية , ارتفاع مستوى هلاكات الأسماك والتي بلغت النسبة المئوية للهلاكات 10.80% مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 3.5% (جدول 30). بنفس الوقت ارتفاع نسبة الخسائر بالوزن للاسماك اذ سجلت اعلى نسبة فقد بالوزن في فترة 180 يوم بلغت 27.20% , في حين سجلت فترة 120 يوم نسبة فقد بالوزن بلغت 20.20% واقل نسبة للفقد كانت بالفترة 60 يوم الأولى التي بلغت 13.70% مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00% . بينما تم تسجيل بعض الاثار المظهرية السلبية على اسماك التجربة (الصورة 3) مثل بعض حالات لتبقعات على جسم الأسماك وحالات تشوهات الخياشيم وحالات عتامة العين وغيرها .

بينت العديد من الدراسات السابقة التأثيرات الصحية والسلوكية في الأسماك عند تربيتها على عليقة علفية ملوثة بالسم الفطري الاوكراتوكسين A , وان اهم هذه التأثيرات انخفاض تناول العلف وفقدان الوزن والضعف في الأداء و التغيرات في سلوك السباحة فقد أشار Diab وآخرون (2018) الى ان اهم تأثيرات السم الفطري الاوكراتوكسين على صحة الأسماك تمثلت بانخفاض الوزن وانخفاض تناول العلف ومعدل التحويل العلفي وبالتالي انخفاض الوزن النهائي, وكذلك سجلت حالات السباحة البطيئة , وظهور حالات تدهور في الكبد والكلى والطحال , اذ سجل تضخم واحتقان الكلى والكبد وتمدد الأوعية الدموية وتنخر خلايا الكلى وانحطاطها وتنخر خلايا الكبد, والتهاب عضلة القلب و تضخم المرارة.

بينما سجل زيادة مستويات الناقل أمين الألانين، وأمين الأسبارتات الناقل والكرياتين و انخفاض في إجمالي البروتين والألبومين والجلوبيولين. وبالتالي ارتفاع معدل الوفيات (Wardatul واخرون , 2024)

وفي دراسة عن اهم تاثيرات الاوكراتوكسين في بعض النواقل الكيميائية وإنتاج البروتينات الخاصة بتنظيم عمل الخلايا في انسجة الأسماك , وجد ان اهم هذه التاثيرات هو زيادة في الفوسفاتيز القلوي والكوليسترول والبروتين الكلي والألبومين والأسبارتات و كذلك زيادة في مستويات الامينات الناقلة وزيادة التعبير mRNA في تصنيع مجموعة بروتينات مناعية , وهذا ما يؤيد استحثات المقاومة الدفاعية المناعية في الطحال. (Bernhoft واخرون , 2018) . وفي دراسة قام بها El-Sayed واخرون 2009 عن اهم التغيرات السلوكية والتأثيرات المظهرية الخارجية التي تطرآ على الأسماك عند تعرضها الى جرعات محددة من الاوكراتوكسين A ضمن العليقة الملوثه به . اذ سجلت اهم التغيرات السلوكية – الحركة البطيئة، فقدان التوازن، الحركة والتغيرات في نمط السباحة ومظاهرتدهور الجهاز التنفسي , والتشنجات العضلية قبل الوفاة. بينما اهم التغيرات المظهرية تمثلت بظهور بقع نزفية على السطح الظهري , تآكل الزعانف وتشيكل بقع صدئية في منطقة البطن والظهر , تشوهات بالجهاز العضلي وتغلف وتشوه بالخياشيم. وظهور بقع الازدحام على الأطراف وانخفاض بالوزن النهائي وزيادة معدل الوفيات.

الجدول (30) التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسم الفطري الاوكراتوكسين على معدلات نمو وصحة الأسماك .

ت	المعاملات سموم فطرية / فترات تربية		معدل وزن الصندوق رفعة اولى	معدل وزن الصندوق رفعة ثانية	معدل وزن الصندوق رفعة ثالثة	عدد الاسماك	معدل السمكة الواحدة	% لخسارة الوزن	عدد الهلاكات
1	بعد 60 يوم	إضافة OTA	40	39	42	242	500 غم	%13.7	20
		control	39	38	39	200	580 غم	0.00	3
2	بعد 120 يوم	إضافة OTA	40	45	42	87	1487 غم	%20.2	21
		control	40	41	46	67	1865 غم	0.00	7
3	بعد 180 يوم	إضافة OTA	43	44	39	63	2000 غم	%27.2	13
		control	45	40	39	45	2750 غم	0.00	8
LSD عند مستوى 0.05				**4.12**					

بينما أظهرت نتائج التجربة (جدول 31) المنفذة لتقييم تأثير التعرض المستمر لعليقة الأسماك الملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسين في تغذية اسماك الكارب , ودراسة تدهور اوزانها النهائية وهلاكاتها وبعض معايير الصحة والمتمثلة بتأثيراتها على مكونات الدم الفسلجية . اذ تبين تأثير السم الفطري الافلاتوكسين B1 على معدلات النمو وعدد الهلاكات الأسماك خلال فترات التربية , ارتفاع مستوى هلاكات الأسماك والتي بلغت النسبة المئوية للهلاكات 19.4% مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت 3.5%. بنفس الوقت ارتفاع نسبة الخسائر بالوزن للاسماك اذ سجلت اعلى نسبة فقد بالوزن في فترة 120 يوم بلغت 43.5% , في حين سجلت فترة 180 يوم نسبة فقد بالوزن بلغت 36.6% واقل نسبة للفقد كانت بالفترة 60 يوم الأولى التي بلغت 22.4% مقارنة بمعاملة السيطرة 0.00% . بينما تم تسجيل بعض الاثار المظهرية السلبية على اسماك التجربة (الصورة 3) مثل بعض حالات نزف الدم الداخلي وبعض التبقعات على جسم الأسماك وحالات تشوهات الخياشيم وخالات عتامة العين وغيرها .

بينت العديد من الدراسات السابقة التأثيرات الصحية والسلوكية في الأسماك عند تربيتها على عليقة علفية ملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسين B1 , وان اهم هذه التأثيرات انخفاض تناول العلف وفقدان الوزن والضعف في الأداء و التغيرات في

سلوك السباحة وظهور تبقعات جلدية نزفية في الرأس والبطن وكذلك بقع صفراء في المنطقة الصدرية وانحناء الحبل الشوكي , وتراكم السوائل في البطين والكلى. والتهاب الكبد وسرطان الكبد. وفرط التهاب المرارة . (Farabi واخرون , 2006 و Deng واخرون ,2010) , في حين بينا El-Sayed و Khalil , (2009) بعض التأثيرات المتشابهة لسم الافلاتوكسين على الأسماك , فقد اشارا الى ظهور سلوك غير طبيعي - حركات بطيئة، وعدم توازن السباحة، وحركة غامضة سريعة وفقدان التوازن. - التشنجات العضلية قبل الوفاة. وكذلك نزيف وبقع صفراء على سطح الجلد الظهري, وسائل نزفي في تجويف البطن , وسواد سطح الجسم. وكذلك احتقان داخلي شامل وشحوب في لون الكبد والكلى والخياشيم. انتفاخ شديد في المرارة. وتغيرات في عتامة العين وجحوظ العين. زيادة في نشاط الترانساميتات في الدم والفوسفاتيز القلوي. وانخفاض في بروتينات البلازما والزلال والجلوبيولين.

واكد Deng واخرون (2010) ان انخفاض الوزن والنمو واصفرار سطح الجسم والاضطرابات الكبدية - انخفاض محتوى الدهون، والارتشاح عن طريق الخلايا الالتهابية ، وظهور بقع بيضاء من التنخر، وتنخر خلايا الكبد وانخفاض في تركيز البروتين الكلي والألبومين. هي اهم تأثيرات السموم الفطرية (الافلاتوكسينB1) على الأسماك . في حين أشار Chavez-Sanchez واخرون (1994) انخفاض تناول الأعلاف النمو وظهور التغيرات النسيجية في الكبد - التغيرات الورمية (سرطان الكبد) والكبد الدهني. احتقان الكلى . وكذلك تم تسجيل تضخم الكبد مع تغيرات نسيجية - عقيدات بيضاء أو صفراء أو تورمات تشبه الورم السرطاني لخلايا الكبد غير الطبيعية، التنخر والنزيف و تضخم القلب والكلى وتورم البطن Mwihia واخرون (2018)

الجدول (31) التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسم الفطري الافلاتوكسين على معدلات نمو وصحة الأسماك .

ت	المعاملات سموم فطرية / فترات تربية		معدل وزن الصندوق			عدد الاسماك	معدل السمكة الواحدة	% لخسارة الوزن	عدد الهلاكات
			رفعة اولى	رفعة ثانية	رفعة ثالثة				
1	بعد 60 يوم	إضافة Afla B1	35	38	40	251	450	%22.4	31
		control	39	38	39	200	580 غم	0.00	3
2	بعد 120 يوم	إضافة Afla B1	39	40	40	113	1053غم	%43.5	26
		control	40	41	46	67	1865 غم	0.00	7
3	بعد 180 يوم	إضافة Afla B1	45	38	46	74	1743	%36.6	40
		control	45	40	39	45	2750 غم	0.00	8
LSD عند مستوى 0.05			**3.56**						

نموذج لتأثير السم Aflatoxin B1 في عتامة عين الاسماك

نموذج لتأثير السم Aflatoxin B1 في خياشيم الاسماك

نموذج لتأثير السم Aflatoxin B1 في تبقع الظهر الاسماك

نموذج لتأثير السم Aflatoxin B1 في نزف الدم الداخلي

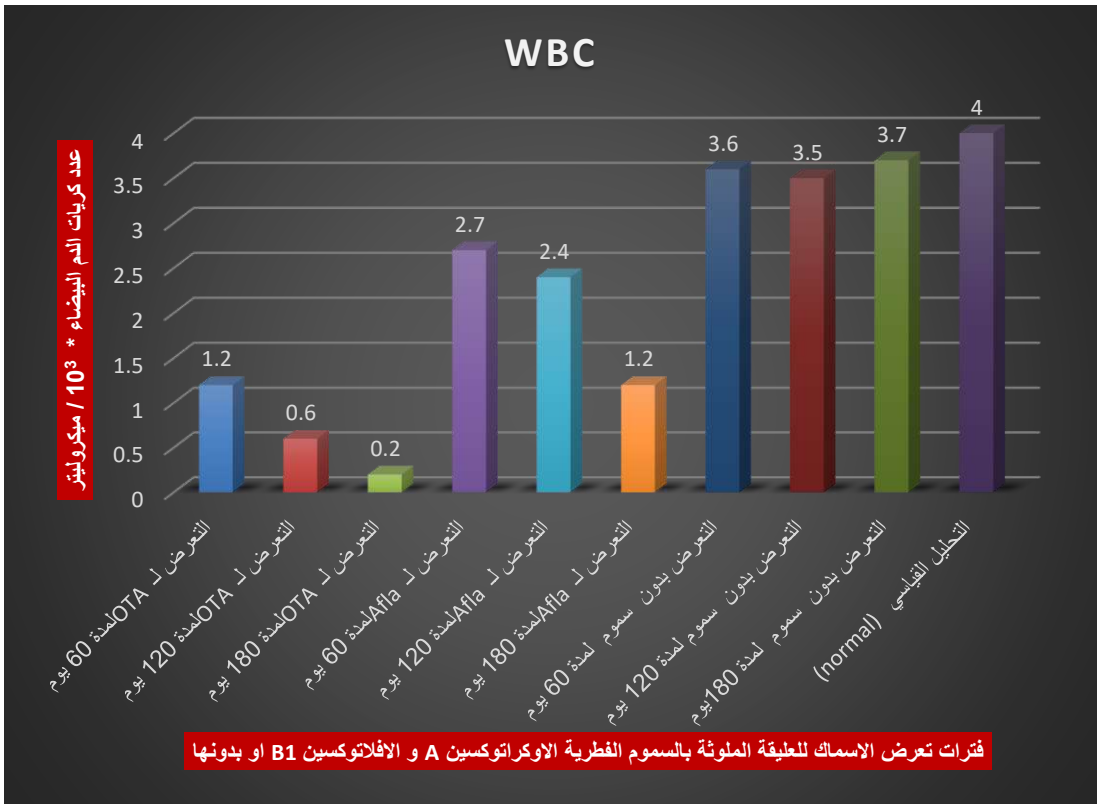
نموذج لتأثير السم Ochratoxin A في تبقع الظهر الاسماك

نموذج لتأثير السم Ochratoxin A في هلاكات الاسماك

الصورة 1: تأثير السم الفطري الافلاتوكسين B1 والاوكراتوكسين على بعض الحالات المظهرية للاسماك

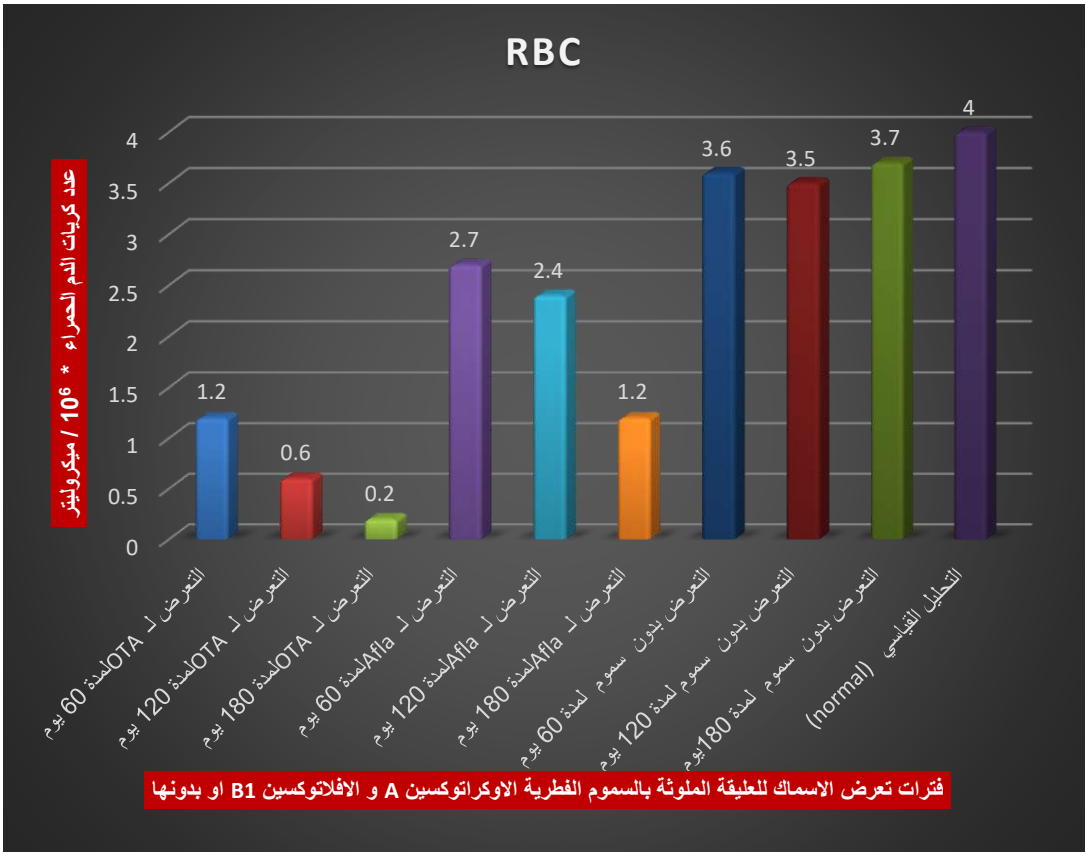
11-4: التأثيرات الحيوية للعليقة الملوثة بالسموم الفطرية الافلاتوكسين والاوكراتوكسين على معايير الدم الفسلجية

أظهرت نتائج مكونات الدم الفسلجية تأثيرات مُختلفة , إذ وجد تأثير في خفض أعداد كريات الدم البيض (WBC) في معاملتي إضافة سم الافلاتوكسينB1 والاوكراتوكسينA تسبب بتثبيط المناعة مع تسجيل أعلى تأثير نتج عنه انخفاض بعدد كريات الدم البيضاء لمعاملة الاوكراتوكسين مُقارنةً بمعاملة السيطرة (شكل 12) قد يُعزى انخفاض أعداد كريات الدم البيضاء (Leukopenia) للإصابة بالسرطان أو قد يكون مؤشرًا لمشاكل صحية في نخاع العظم (Jantrarotai , 1990 و Manning واخرون , 2003) .



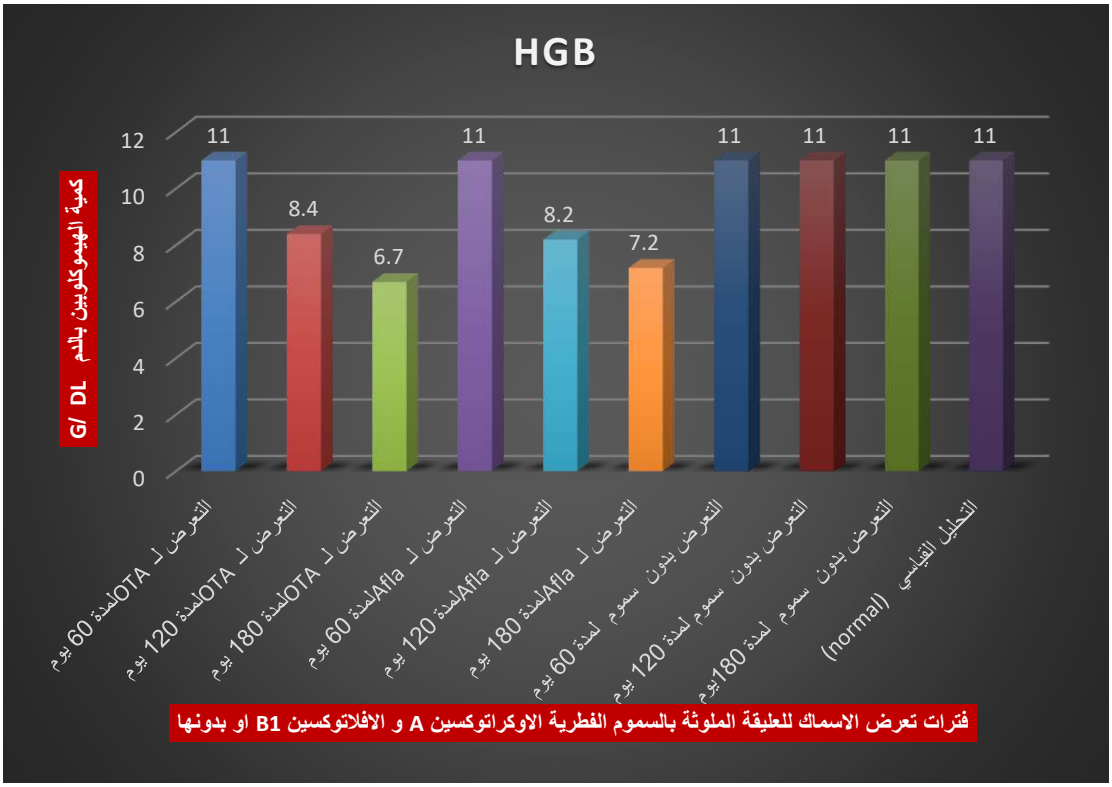
شكل (12) تأثير سم Afla و OTA في اعداد كريات الدم البيضاء (WBC).

كما اوضحت النتائج إن هناك تأثير كبير عند اضافة السمين Afla وOTA في عليقة الاسماك أدى إلى خفض كبير عن مُعاملة السيطرة في عدد كريات الدم الحمراء (RBC) في حين سجل اعلى انخفاض لعدد الكريات في معاملة الاوكراتوكسين , خصوصا خلال المرحلة الأخيرة من تربية الأسماك (بعد 180 يوم من التربية) وقد يعزى السبب إلى انخفاض معدلات الحديد في الجسم التي قد تسبب مشاكل بالأعضاء الحيوية كأمراض الرئة والقلب والكلى والكبد أو تحطم كريات الدم الحمراء قبل استبدالها . (Eissa واخرون , 2023)



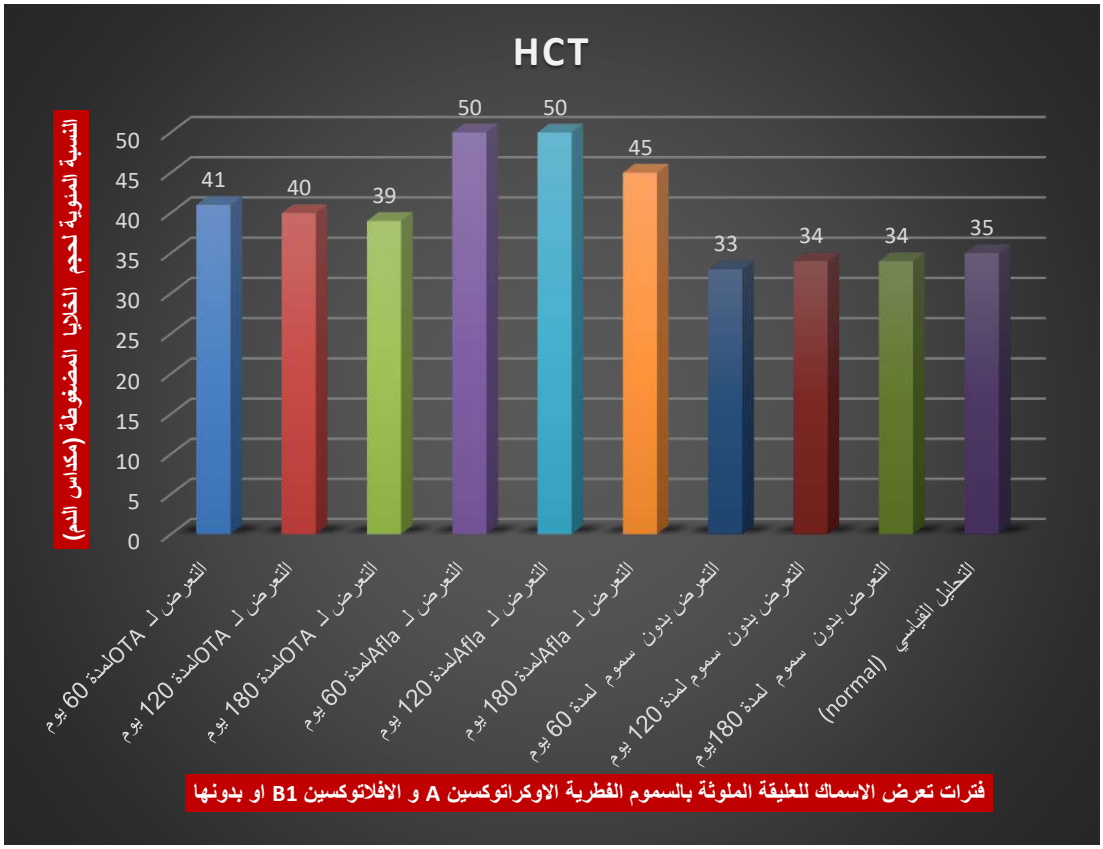
شكل (13) تأثير سم Afla و OTA في اعداد كريات الدم الحمراء (RBC).

بينما لم تسجل النتائج تأثير واضح في كمية الهيموكلوبين (HGB) في معاملتي الاوكراتوكسين والافلاتوكسين عن معاملة السيطرة إذ بلغ (11g/dl) خلال المرحلة الأولى من التربية (ضمن 60 يوم الاولى) في حين بدا كمية الهيموكلوبين بالانخفاض بشكل تدريجي خلال فترة 120 – 180 يوم من التربية (شكل 14) , فقد يسبب انخفاض الهيموكلوبين إلى فشل الجهاز التنفسي في نقل الاوكسجين وتدهور في تغذية الأسماك , وقد ينتج سرطان الكلى او انتاج كريات الدم الحمراء بكميات اكبر للتعويض عن انخفاض مستويات الاوكسجين في الدم (Jantrarotai , 1990 و Manning واخرون , 2003)



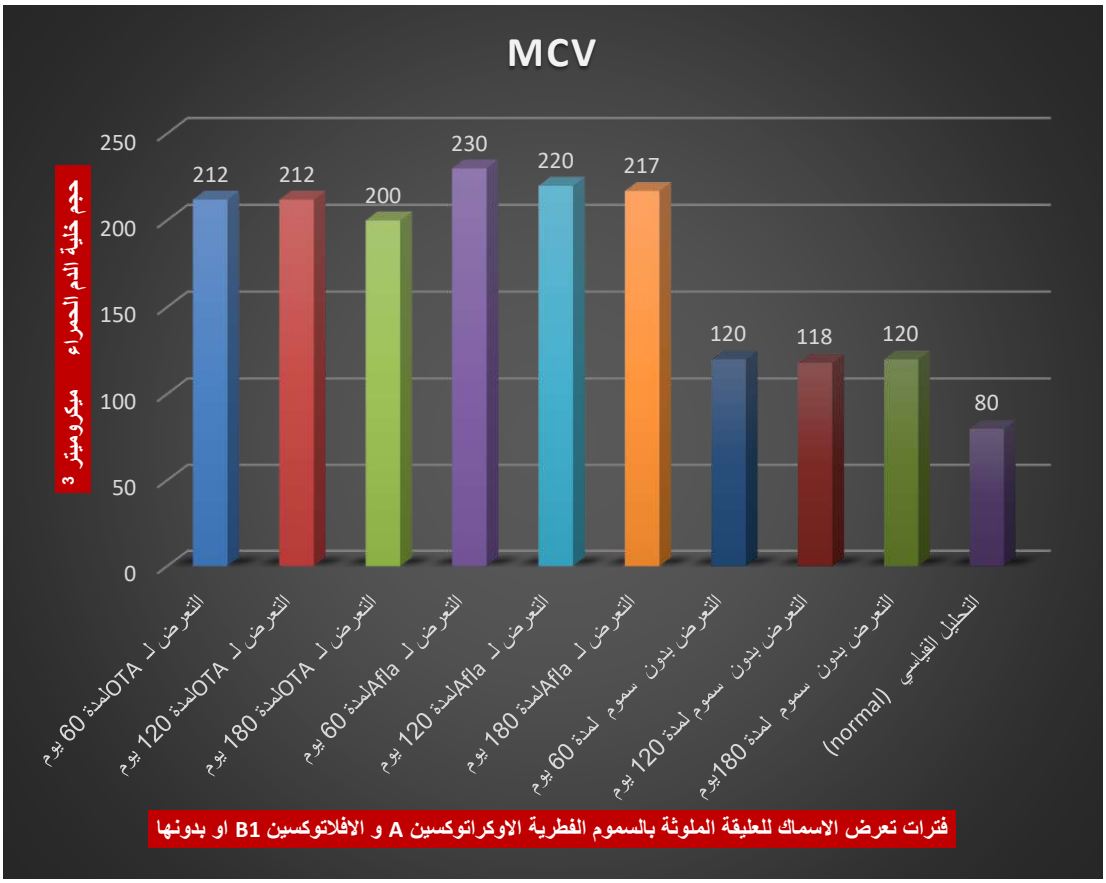
شكل (14) تأثير سم Afla و OTA في كمية هيموكلوبين الدم (HGB).

في حين لم تختلف النتائج في معاملة الاوكراتوكسين عن معاملة السيطرة في تاثيرها بالنسبة المئوية لحجم الخلايا المضغوطة (مكداس الدم) تقريبا في جميع مراحل تربية الأسماك إذ بلغ (40%) (شكل 15) . بينما في معاملة الافلاتوكسين هنالك ارتفاع واضح بالنسبة المئوية لحجم الخلايا المضغوطة بلغت 50% . وهذا يؤدي الى زيادة احتمالية تجلط الدم في الاوعية الدموية وقد يتسبب بهلاكات جديدة . (Eissa واخرون , 2023)



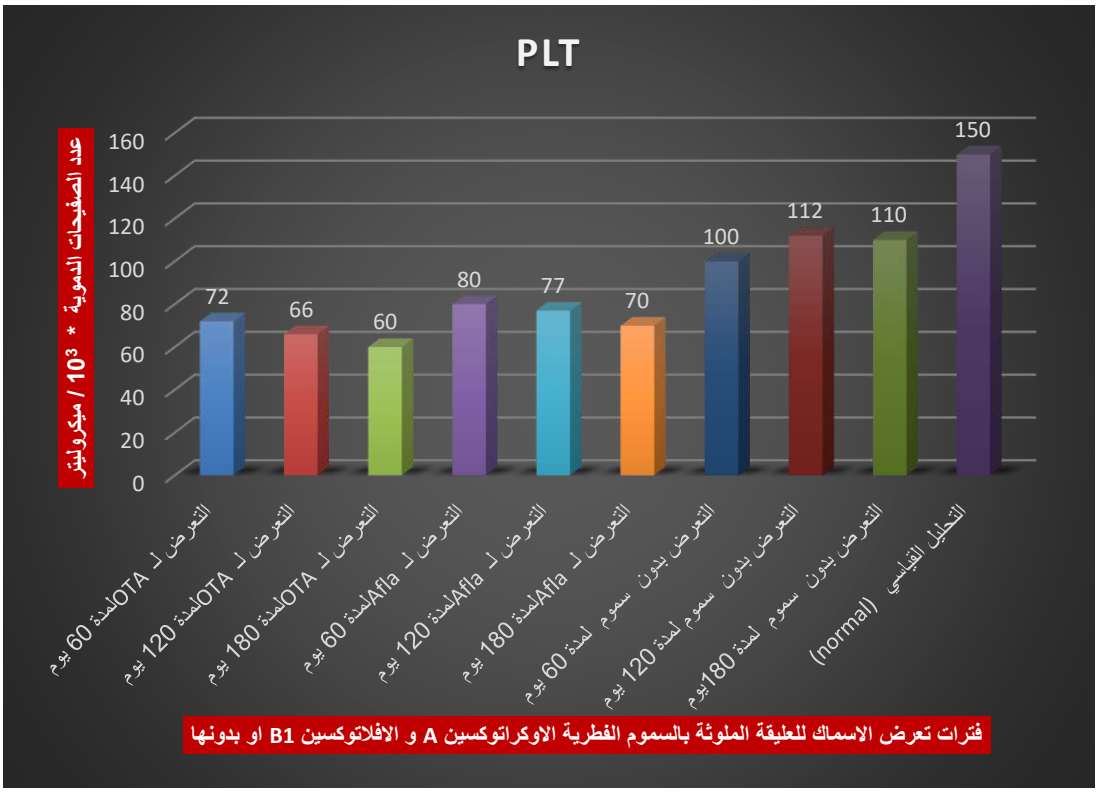
شكل (15) تأثير سم Afla و OTA في مكداس الدم (HCT).

كما اوضحت النتائج (شكل16) إن هناك تأثير كبير عند اضافة السمين Afla وOTA في عليقة الاسماك أدى إلى ارتفاع كبير عن مُعاملة السيطرة في معدل حجم كريات الدم الحمراء (MCV) في حين سجل اعلى زيادة بحجم الكريات في معاملة الافلاتوكسين اذ بلغ متوسط حجم خلية الدم الحمراء (220 µm³) , مقارنةً بمعاملة السيطرة التي بلغت (120 µm³) ضمن جميع مراحل تربية الأسماك , بينما في معاملة السم الاوكراتوكسين بلغ متوسط حجم خلية الدم الحمراء (208 µm³) (Eissa واخرون , 2023)



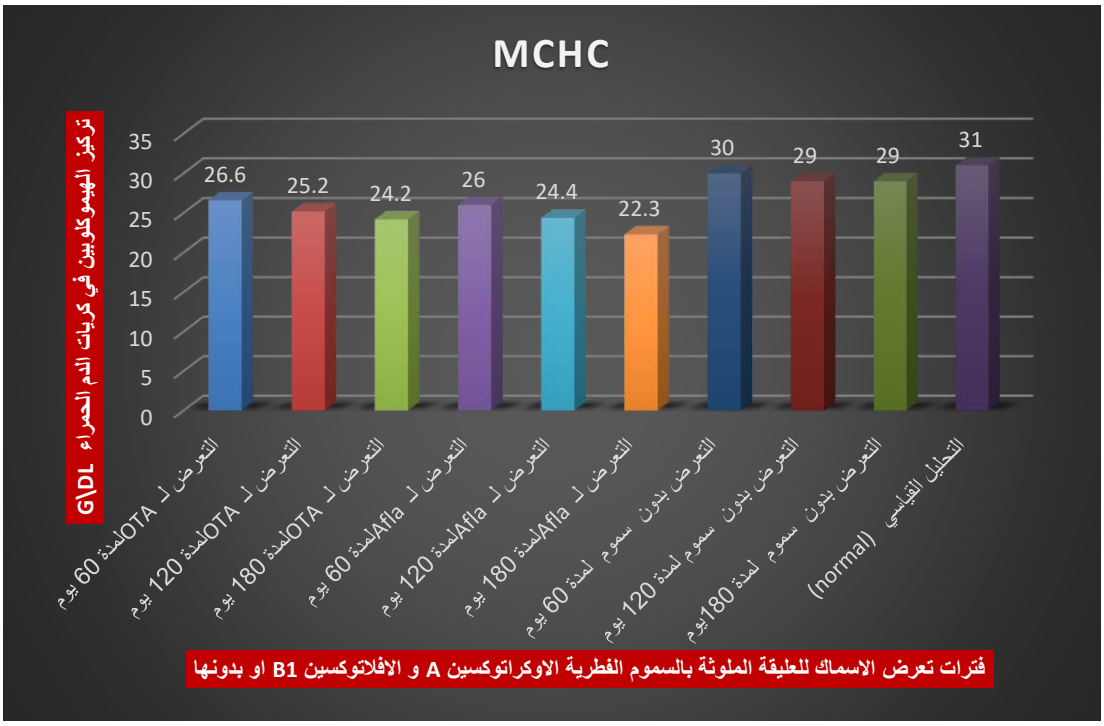
شكل (16) تأثير سم Afla و OTA في حجم كرية الدم الحمراء (MCV).

أظهرت النتائج (شكل 17) ان تأثيرات السموم الفطرية (الاوكراتوكسين والافلاتوكسين) تسببت بخفض اعداد الصفيحات الدموية (PLT) في دم الاسماك المعاملة . اذ اكان تاثير السم الاوكراتوكسين الأكثر شدة في خفض اعداد الصفيحات الدموية .مقارنة بمعاملة الافلاتوكسين . وقد رجح سبب نقصان PLT نتيجةً لاضطراب نخاع العظم أو مشكلة في الجهاز المناعي , الكبد والطحال او الإصابة بالسرطان بسبب التأثير المباشر للسموم الفطرية (Jantrarotai , 1990 و Manning واخرون , 2003)



شكل (17) تأثير سم Afla و OTA في اعداد الصفيحات الدموية PLT.

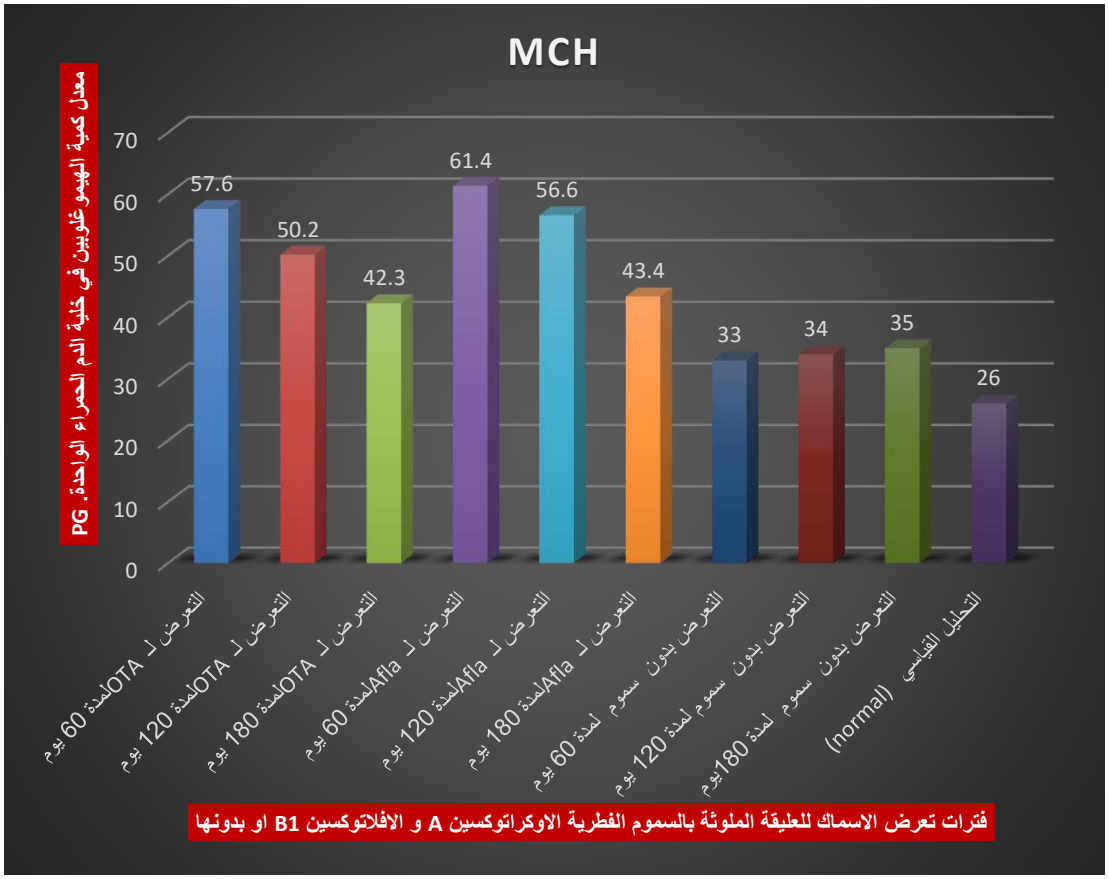
أظهرت النتائج (شكل 18) انخفاضًا في تركيز الهيموكلوبين في كريات الدم الحمراء (MCHC) بلغت (g/dl 24, g/dl 25) بفارق غير معنوي لمعاملتي الاوكراتوكسين والافلاتوكسين على الترتيب عن معاملة السيطرة والتي بلغت (29 g/dl) . (Eissa واخرون , 2023)



شكل (18) تأثير سم Afla و OTA في متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء (MCHC).

أوضحت النتائج (شكل19) وجود تباين في معدل كمية الهيموكلوبين بخلايا الدم الحمرء MCH تسببت معاملة الافلاتوكسين برفع معنوي عن معاملة السيطرة اعلى من معاملة الاوكراتوكسين .

وقد يُعزى ارتفاع متوسط MCH إلى الاصابة بإمراض الكبد أو السرطان أما الانخفاض عن معاملة السيطرة يشير إلى الإصابة بالأنيميا (Jantrarotai , 1990 و Manning واخرون , 2003)



شكل (19) تأثير سم Afla و OTA في متوسط كمية الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء (MCH).

اذ اشارت الدراسات السابقة ان من اهم التأثيرات على صحة الأسماك نتيجة تعرضها الى عليقة ملوثة بالسم الفطري الاوكراتوكسين A كانت انخفاض في وزن الجسم , و انخفاض في معدل تحويل الأعلاف , وتدهور اغلب معايير الدم وانخفاض في الهيماتوكريت , حدوث تأثيرات وتشوهات في الكبد والكلية الخلفية اذ تتمركز الخلايا البلعمية الميلانينية في أنسجة الكبد والبنكرياس والكلية الخلفية , وانخفاض عدد أو عدم وجود خلايا البنكرياس الخاصة بالإفرازات الخارجية و زيادة معدل الهلاكات. (Manning واخرون , 2003) . بينما أشار Jantrarotai (1990) الى ان اهم تأثيرات الافلاتوكسين على الاسماك كانت ارتجاع محتويات المعدة, و تغير لون الخياشيم والكبد والكلى والطحال والمعدة والأمعاء. واما ما يتعلق بمعايير الدم فقد أظهرت انخفاض الهيماتوكريت وانخفاض تركيز الهيموكلوبين وانخفاض عدد كريات الدم الحمراء والبيضاء , ونخر عام في مكونات الدم . وظهور تشوهات نسيجية في الغشاء المخاطي في الأمعاء. ، وخلايا الكبد، خلايا البنكرياس والغدد المعدية. انخفاض في حجم كريات الدم الحمراء وعددها و الكريات البيضاء في الطحال. بينما في دراسة أخرى بينت انخفاض معدل النمو وانخفاض الهيماتوكريت وتركيز الهيموكلوبين وعدد كريات الدم الحمراء. زيادة في الكريات البيض وتنخر واضح لخلايا الكبد ونخر في الغدد المعدية. زيادة نشاط المكونات للأنسجة المكونة للدم .وقد تتراكم أصباغ صدأ الحديد في ظهارة الغشاء المخاطي في الأمعاء (Jantrarotai و Lovell , 1990).

5: الاستنتاجات والتوصيات :

5-1: الاستنتاجات :

1. تلوث حبوب المحاصيل الحقلية وهي المكونات الاساسية لعليقة الاسماك مثل الحنطة والشعير والذرة وفول الصويا بالعديد من العزلات الفطرية المختلفة كان اهمها ، *Aspergillus* sp *A.niger, A. flavus*, *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp ، *Alternaria* sp sp ، *Fusarium* sp *Cylindrocarpon*، *Mucor* spp sp، *Rhizoctonia* ، *Rhizopus* sp و,*Trichoderma* sp وتمركزت على التنوع الاحيائي لعزلات الفطر *Aspergillus* spp

2. الفطريات *A. flavus* *A.niger* المعزولة من حبوب المحاصيل المخزونة تميزت بخطورتها السمية لامتلاكها القدرة على انتاج طيف واسع من السموم الفطرية التي من أهمها سموم الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات

3. الفطريات المعزولة من علائق الأسماك المحلية هي العزلات الفطرية نفسها الملوثة لحبوب المحاصيل المستخدمة كمواد أساسية في صناعة هذه العلائق , لكن تواجدت بمعدلات تلوث اعلى من الحبوب المخزونة .

4. قابلية جميع العزلات المختبرة من النوع *Aspergillus flavus* على انتاج السم الفطري الافلاتوكسين B1 وقابلية جميع عزلات الفطر *A.niger* المختبرة على انتاج السم الفطري الاوكراتوكسين A وقسم منها تنتجه بتراكيز عالية

5. خلو بعض عينات علائق الاسماك المدروسة من الافلاتوكسين B1 بالرغم من عزل العديد من عزلات الفطر *Aspergillus flavus* منها وهذا قد يعزى الى عدم ملائمة ظروف الخزن لانتاج الفطريات لهذا النوع من السموم.

6. ان انتاج السموم الفطرية هي انعكاساً لنمو وانتشار وحيوية الفطريات المنتجة لهذه السموم في علائق الأسماك عند توفر الظروف الملائمة , فان ازدياد اعداد الفطريات وانتشارها كلما ازدادت فترات التخزين وارتفاع المحتوى الرطوبي للعليقة المخزونة ينعكس بشكل مباشر الى ارتفاع مستويات انتاج السموم الفطرية .

7. من اهم الفطريات المنتجة للسم الفطري الاوكراتوكسين هو الفطر *A. niger* عن طريق التشخيص الجزيئي لأبرز العزلات الفطرية المنتجة له . بينما من اهم الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 هو الفطر *A flavus*

8. التعرض المستمر للسموم الفطرية Afla وOTA من قبل الاسماك عن طريق تغذيتها على عليقة ملوثه بهما تسبب هلاكات بمعدلات كبيرة , وخسائر بالوزن للاسماك المتبقية بمعدلات كبيرة أيضا وأظهر سمية خلوية واضرار نسيجية مظهرية على الاسماك المعرضة للسموم الفطرية بالاضافة إلى أظهار تغيرات مختلفة لعدد من معايير الدم الفسلجية .

2-5: التوصيات:

1. التأكيد على خلو علائق الاسماك او حبوب المحاصيل المكونة لها , من الفطريات الملوثة لها والمنتجة للسموم الفطرية او استيرادها من المناشىء التي تخلو حبوبها من الفطريات خصوصاً تلك الفارزة للسموم الفطرية. لان الموضوع يتعلق بصحة وسلامة الانسان بشكل مباشر اوغير مباشر .

2. عدم خزن العلائق السمكية لفترات طويلة , لان كلما ازدادت فترات التخزين ارتفعت معدلات التلوث بالفطريات وانتاجها السموم الفطرية .

3. استخدام العلائق السمكية الطافية بدلاً من الغاطسة وذلك لان من ضمن خطوات تصنيعها استخدام تقانة الاكسترودر (ضغط وحرارة عالية) ضغط يصل الى 30-120 بار وحرارة قد تصل الى 90- 180 مئوي , وهذا يعطي قتل لجميع الميكروبات من ضمنها الفطريات , وقد يؤدي الى تحطيم العديد من السموم الفطرية .

4. اجراء دراسات للكشف عن السموم الفطرية الاخرى والتي لم تشملها هذه الدراسة لارتباطها بصحة الانسان والحيوان.

5. دراسة بعض المركبات الامنة بيئياً في خفض التلوث الفطري في الحبوب المخزونة. والسيطرة على انتاج السموم الفطرية .

6- المصادر :

6-1: المصادر العربية:

العكيلي,ورس فيصل خربيط (2022).التواجد المتزامن لسمي الCitrinin وOchratoxin المنتجة من الفطريات المسببة لأمراض الخزن على حبوب الذرة الشامية وتقييم تأثيرهما حيويا رسالة ماجستير. جامعة كربلاء /كلية الزراعة

البلداوي , منير سعيد محسن (2007). التأثير الفردي والمشترك لسمي الاوكـــــــــــــرا A والافــلا B1 في فروج اللحم وامكانية خفضها باستعمال عوامل نباتية وكيميائية. رسالة ماجستير . جامعة بغداد/كلية الزراعة.

البلداوي , منير سعيد محسن (2012). فاعلية النباتات الطبية والمركبات الكيميائية في إزالة وتحطيم سمي الاوكراA وال Deoxynivalenol خارج الجسم الحي وفي عليقة طير السمان. اطروحة دكتوراه. جامعة بغداد/كلية الزراعة.

الحميري , ياسر ناصر حسين (2007). لتحري عن وجود السم Deoxynivalenol (DON) في حبوب الحنطة والذرة الصفراء وامكانية اختزاله , رسالة ماجستير , كلية الزراعة جامعة بغداد .

الراوي, خاشع محمود وخلف الله, عبد العزيز (2000) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . دار الكتب للطباعه والنشر. جامعة الموصل.الطبعة الثانية. 488ص.

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

الورشـــان ، سالم حسن صالح (1999) . استعمال بعض الممدصـــــــــات الكيميائيـــة للحد من تلوث علائق الطيور الداجنة بالافلاتوكسين B1 . رسالة ماجستير - كلية الزراعة - جامعة بغداد

الورشان، سالم حسن (2006). مقارنة بعض المعززات الحياتية وممتزين في خفض الاثار السلبية للسم افلا B1 وتحسين الاداء الانتاجي لفروج اللحم .اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

جابر. جبار محسن (2014). تأثير بعض الفطريات المنقولة ببذور بعض أصناف الحنطة والشعير ونواتجها الأيضية والمبيد بنليت في النسبة المئوية للإنبات مختبريا وحقليا . مجلة جامعة ذي قار للبحوث الزراعية ، المجلد 3 (1) .

حسيــن ، حليمة زغير (2000). استعمال اليوريا في مقاومة فطريات مابعد الجني وسمومها على الذرة الصفراء المخزونة . اطروحة دكتوراة ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد

سلومي ،علي كريم (2007) .الكشف عن سم الزيرالينون في الذرة الصفراء واختزال سميتة .رسالة ماجستير - قسم وقاية النبات - كليه الزراعة -جامعة بغداد . 84 صفحة.

شهاب، احمد عباس (1998) .تلوث حاصل الذرة الصفراء بالسم (فيومينيزين B1) المنتج من قبل الفطر *Fusarium moniliforme* .رسالة ماجستير .كلية الزراعة .جامعة بغداد.

عبد الحميـد ، محمد عبد الحميد (2000) . الفطريات والسموم الفطرية . كلية الزراعة - جامعة المنصورة ، دار النشر للجامعات - جمهورية مصر العربية .

ميخائيل ، سمير (2000) . أمراض البذور ، منشأة المعارف. إلاسكندرية. جمهورية مصر العربية .

6-2 : References

Abdel-Sater, M., Abdel-Hafez, S., Hussein, N., and Al-amery, E. (2017). Fungi associated with maize and sorghum grains and their potential for amylase and aflatoxins production. Egyptian Journal of Botany, 57(1), 119-137.

Abdual-shahid, D. K., Abbas, O. S., and Mohammed, Z. E. (2013). Isolation and characterization of fungi and mycotoxins (deoxynivalenol and zaralenone) in fish feed from Baghdad city. Diyala Agricultural Sciences Journal, 5(2), 38-44.

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Elsevier.

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., and Varzakas, T. (2020). Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. Foods (Basel, Switzerland), 9(2), 137.

Alegaieli, W. F. K., and Alhamiri, Y. N. H. (2023). Simultaneous Occurrence of Mycotoxins Citrinin and Ochratoxin A in Popcorn Grains and Their Biological Effect on some Physiological Blood Parameters. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1225, No. 1, p. 012078). IOP Publishing.

Al-Masoodi, I. H., Al-Rubaye, A. F. M., and Hussein, H. J. (2023). Isolation and diagnosis of the fungi associated with maize seeds collected from local markets in Karbala, Iraq. Caspian Journal of Environmental Sciences, 21(3), 665-672.

Al-Musawi, M. L., Hussein, S. B., Hassan, Z. A. A., Hamd, M. T., and Jasim, R. I. (2021). Microbial contamination in imported fish feed to Iraq. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1999, No. 1, p. 012026). IOP Publishing.

Alwatban, M. A., Hadi, S., and Moslem, M. A. (2014). Mycotoxin production in Cladosporium species influenced by temperature regimes. J. Pure Appl. Microbiol, 8(6), 4061-4069.

Anater, A., Manyes, L., Meca, G., Ferrer, E., Luciano, F. B., Pimpão, C. T., and Font, G. (2016). Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review. Aquaculture, 451, 1-10.

Anwar, S. A., Riaz, S., Ahmad, C. A., Subhani, M. N., and Chattha, M. B. (2013). Mycoflora associated with stored seeds of soybean. Mycopathologia, 11(2), 85-90.

Ashtiani, N. M., Kachuei, R., Yalfani, R., Harchegani, A. B., and Nosratabadi, M. (2017). Identification of *Aspergillus* sections Flavi, Nigri, and Fumigati and their differentiation using specific primers. *Infez Med*, *25*(2), 127-132.

Atallah, O. O., Mazrou, Y. S., Atia, M. M., Nehela, Y., Abdelrhim, A. S., and Nader, M. M. (2022). Polyphasic Characterization of Four *Aspergillus* Species as Potential Biocontrol Agents for White Mold Disease of Bean. Journal of Fungi, 8(6), 626.

Atallah, O., and Yassin, S. (2020). *Aspergillus spp*. eliminate Sclerotinia sclerotiorum by imbalancing the ambient oxalic acid concentration and parasitizing its sclerotia. *Environmental microbiology*, *22*(12), 5265-5279.

Bernhoft, A., Høgåsen, H. R., Rosenlund, G., Moldal, T., Grove, S., Berntssen, M. H., ... and Alexander, J. (2018). Effects of dietary deoxynivalenol or ochratoxin A on performance and selected health indices in Atlantic salmon (Salmo salar). *Food and Chemical Toxicology*, *121*, 374-386.

Bharathi, S., Antony, C., Cbt, R., Arumugam, U., Ahilan, B., and Aanand, S. (2019). Functional feed additives used in fish feeds. Int. J. Fish. Aquat. Stud, 7(3), 44-52.

Bhosale, S. V., Bhilave, M. P., and Nadaf, S. B. (2010). Formulation of fish feed using ingredients from plant sources. Research Journal of Agricultural Sciences, 1(3), 284-287.

Bobadilla-Carrillo, G. I., Magallón-Servín, P., López-Vela, M., Palomino-Hermosillo, Y. A., Ramírez-Ramírez, J. C., Gutiérrez-Leyva, R., ... and Bautista-Rosales, P. U. (2020). Characterization and proliferation capacity of potentially pathogenic fungi in marine and freshwater fish commercial feeds. Archives of Microbiology, 202, 2379-2390.

Chandra Mohana, N., Narendra Kumar, H. K., Mahadevakumar, S., Sowmya, R., Sridhar, K. R., and Satish, S. (2022). First report of *Aspergillus* versicolor associated with fruit rot disease of tomato (Solanum lycopersicum) from India. Plant Disease, 106(4), 1300.

Chen, L.,Guo ,W.,Zheng, Y.,Zhou,J.,Liu,T.,Chen,W.,and Zhang J,(2020) Occurrence and characterization of fungi and mycotoxine in contaminated medicinal herbs ,toxine, 12(1),30.

Chang, X., Li, H., Naeem, M., Wu, X., Yong, T., Song, C., ... and Yang, W. (2020). Diversity of the seedborne fungi and pathogenicity of Fusarium species associated with intercropped soybean. Pathogens, 9(7), 531.

Chavez-Sanchez, M. C., Palacios, C. M., and Moreno, I. O. (1994). Pathological effects of feeding young Oreochromis niloticus diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. Aquaculture, 127(1), 49-60.

Chidi, F., Bouhoudan, A., and Khaddor, M. (2020). Antifungal effect of the tea tree essential oil (Melaleuca alternifolia) against *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium verrucosum*. Journal of King Saud University-Science, 32(3), 2041-2045.

Csenki, Z., Garai, E., Faisal, Z., Csepregi, R., Garai, K., Sipos, D. K., ... and Poór, M. (2021). The individual and combined effects of ochratoxin A with citrinin and their metabolites (ochratoxin B, ochratoxin C, and dihydrocitrinone) on 2D/3D cell cultures, and zebrafish embryo models. Food and Chemical Toxicology, 158, 112674.

Daradimos, E., Marcaki, P., and Koupparis, M. (2000). Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B1 in olive oil. *Food Additives & Contaminants*, *17*(1), 65-73.

De Santis, B., Gregori, E., Debegnach, F., Moracci, G., Saitta, C., and Brera, C. (2020). Determination of ochratoxin A in pork meat products: single laboratory validation method and preparation of homogeneous batch materials. Mycotoxin research, 36(2), 235–241.

Dell'Aquila, M. E., Asif, S., Temerario, L., Mastrorocco, A., Marzano, G., Martino, N. A., ... and Minervini, F. (2021). Ochratoxin A affects oocyte maturation and subsequent embryo developmental dynamics in the juvenile sheep model. Mycotoxin research, 37(1), 23-37.

Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., and Regecová, I. (2020). Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* isolated from chicken eggs. Processes, 9(1), 53.

Deng, S. X., Tian, L. X., Liu, F. J., Jin, S. J., Liang, G. Y., Yang, H. J., ... and Liu, Y. J. (2010). Toxic effects and residue of aflatoxin B1 in tilapia (Oreochromis niloticus× O. aureus) during long-term dietary exposure. Aquaculture, 307(3-4), 233-240.

Deutsch, L., Gräslund, S., Folke, C., Troell, M., Huitric, M., Kautsky, N., and Lebel, L. (2007). Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. Global Environmental Change, 17(2), 238-249.

Diab, A. M., Salem, R. M., Abeer, E. K. M., Ali, G. I., and El-Habashi, N. (2018). Experimental ochratoxicosis A in Nile tilapia and its amelioration by some feed additives. *International Journal of veterinary science and medicine*, *6*(2), 149-158.

Eissa, E. S. H., Alaidaroos, B. A., Jastaniah, S. D., Munir, M. B., Shafi, M. E., Abd El-Aziz, Y. M., ... and Saadony, S. (2023). Dietary effects of nano curcumin on growth performances, body composition, blood parameters and histopathological alternation in red tilapia (Oreochromis sp.) challenged with *Aspergillus flavus*. *Fishes*, *8*(4), 208.

El Khoury, A., and Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. Toxins, 2(4), 461–493.

Elesho, F. E. (2022). *Protein evaluation in fish: African catfish as a case study* (Doctoral dissertation, Wageningen University and Research).

El-Sayed, Y. S., and Khalil, R. H. (2009). Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B1 in marine water-reared sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Food and chemical toxicology, 47(7), 1606-1609.

El-Sayed, Y. S., Khalil, R. H., and Saad, T. T. (2009). Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Chemosphere, 75(7), 878-882.

El-wadii, r. B., ali, h. M., and jubran, m. O. (2020). Isolation and identification of some pathogenic fungi associated with stored barley grains in zliten area, libya. Journal of basic sciences, 33(2), 104-118.

Escamilla, D., Rosso, M. L., and Zhang, B. (2019). Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments. Food science & nutrition, 7(10), 3194-3205.

Fadl, S. E., El-Shenawy, A. M., Gad, D. M., El Daysty, E. M., El-Sheshtawy, H. S., and Abdo, W. S. (2020). Trial for reduction of Ochratoxin A residues in fish feed by using nano particles of hydrated sodium aluminum silicates (NPsHSCAS) and copper oxide. Toxicon, 184, 1-9.

Farabi, S. M. V., Yousefian, M., and Hajimoradloo, A. (2006). Aflatoxicosis in juvenile Huso huso fed a contaminated diet. Journal of Applied Ichthyology, 22.

Food and Agricultural Organisation (FAO), e State of World Fisheries and Aquaculture, Food and Agricultural Organisation (FAO), Rome, Italy,(2016).

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., and Touhami, N. (2018). Aspects of the occurrence, genetics, and regulation of biosynthesis of the three food relevant *Penicillium* mycotoxins: Ochratoxin A, citrinin, and patulin. In Physiology and Genetics (pp. 413-433). Springer, Cham.

Gonçalves ,N. E. M. C., Gomes-Pereira, M. M., Raposo-Costa, A. P., da Rocha-Rosa, C. A., Pereyra, C. M., Calvet, R. M., ... and Sanches-Muratori, M. C. (2015). Screening of aflatoxin B1 and mycobiotarelated to raw materials

and finished feed destined for fish. Latin American Journal of Aquatic Research, 43(3), 595-600.

Gonçalves, R. A., Naehrer, K., and Santos, G. A. (2018). Occurrence of mycotoxins in commercial aquafeeds in Asia and Europe: a real risk to aquaculture?. Reviews in Aquaculture, 10(2), 263-280.

Gonçalves, R. A., Schatzmayr, D., Albalat, A., and Mackenzie, S. (2020). Mycotoxins in aquaculture: Feed and food. Reviews in Aquaculture, 12(1), 145-175.

Greco, M., Pardo, A., and Pose, G. (2015). Mycotoxigenic fungi and natural co-occurrence of mycotoxins in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) feeds. Toxins, 7(11), 4595-4609.

Hackbart, H., Prietto, L., Primel, E. G., Garda-Buffon, J., and Badiale-Furlong, E. (2012). Simultaneous extraction and detection of ochratoxin A and citrinin in rice. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *23*, 103-109.

Henry, W. B., Williams, W. P., Windham, G. L., and Hawkins, L. K. (2009). Evaluation of maize inbred lines for resistance to *Aspergillus* and *Fusarium* ear rot and mycotoxin accumulation. Agronomy Journal, 101(5), 1219-1226.

Herrman, J. L., and Walker, R. (1999). Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Food Nutrition and Agriculture, 17-24.

Houbraken, J., de Vries, R. P., and Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, *86*, 199-249.

Hussein, M. E., Mohamed, O. G., El-Fishawy, A. M., El-Askary, H. I., El-Senousy, A. S., El-Beih, A. A., ... and Hamed, A. A. (2022). Identification of Antibacterial Metabolites from Endophytic Fungus *Aspergillus fumigatus*, Isolated from Albizia lucidior Leaves (Fabaceae), Utilizing Metabolomic and Molecular Docking Techniques. Molecules, 27(3), 1117

Jakić-Dimić, D., Jeremić, S., Nešić, K., and Radosavljević, V. J. Z. M. (2005). The influence of mycotoxins in food on fish health status. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, (109), 73-79.

Jantrarotai, W., and Lovell, R. T. (1990). Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 2(4), 248-254.

Jantrarotai, W., Lovell, R. T., and Grizzle, J. M. (1990). Acute toxicity of aflatoxin B1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 2(4), 237-247.

Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M. T., and Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. Saudi journal of biological sciences, 25(5), 868-874.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, and World Health Organization. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food (Vol. 56). Food & Agriculture Org..

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, and World Health Organization. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food: Fifty-Sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Vol. 56). World Health Organization.

Kholife, M. M., Moawad, A. A., Diab, A. M., and Abeer, E. K. M. (2019). Mycological examination of fish feed stuff with special reference to mycotoxin production.

Kitigwa, S. (2023). *Occurrence of aflatoxins and associated risk factors in dairy value chain in selected districts of three agro-ecological zones in Tanzania* (Doctoral dissertation, NM-AIST).

Koletsi, P., Schrama, J. W., Graat, E. A., Wiegertjes, G. F., Lyons, P., and Pietsch, C. (2021). The occurrence of mycotoxins in raw materials and fish feeds in Europe and the potential effects of deoxynivalenol (DON) on the health and growth of farmed fish species—A Review. Toxins, 13(6), 403.

Lass-Flörl, C., Dietl, A. M., Kontoyiannis, D. P., and Brock, M. (2021). *Aspergillus terreus* species complex. *Clinical Microbiology Reviews*, *34*(4), e00311-20.

Li, P., Su, R., Yin, R., Lai, D., Wang, M., Liu, Y., and Zhou, L. (2020). Detoxification of Mycotoxins through Biotransformation. Toxins, 12(2), 121.

Liu, L., Xie, M., and Wei, D. (2022). Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. International journal of molecular sciences, 23(3), 1064.

Mahmoud, M. A., Al-Othman, M. R., and Abd El-Aziz, A. R. (2013). Mycotoxigenic fungi contaminating corn and sorghum grains in Saudi Arabia. Pakistan Journal of Botany, 45(5), 1831-1839.

Manning, B. B., Ulloa, R. M., Li, M. H., Robinson, E. H., and Rottinghaus, G. E. (2003). Ochratoxin A fed to channel catfish (Ictalurus punctatus) causes reduced growth and lesions of hepatopancreatic tissue. *Aquaculture*, *219*(1-4), 739-750.

Manole cristea, mali-sanda, and cristea, s. (2015). Identification and quantification of fungi associated with seeds of barley, in terms of 2014. Scientific papers-series a-agronomy, 58, 246-249.

Marijani, E., Charo-Karisa, H., Gnonlonfin, G. J. B., Kigadye, E., and Okoth, S. (2019). Effects of aflatoxin B1 on reproductive performance of farmed Nile tilapia. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 7(1), 35-42.

Marijani, E., Charo-Karisa, H., Kigadye, E., and Okoth, S. (2020). Research Article Occurrence and Exposure Assessment of Aflatoxin B1 in Omena (Rastrineobola argentea) from Kenya.

Marijani, E., Kigadye, E., and Okoth, S. (2019). Occurrence of fungi and mycotoxins in fish feeds and their impact on fish health. International journal of microbiology, 2019(1), 6743065.

Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., and Modra, H. (2017). Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. Journal of the world aquaculture society, 48(2), 186-200.

Mirza Alizadeh, A., Mousavi Khaneghah, A., and Hosseini, H. (2022). Mycotoxins and mycotoxigenic fungi in aquaculture and seafood: a review and new perspective. Toxin Reviews, 41(3), 1058-1065.

Mohamed, H. M., Emeish, W. F., Braeuning, A., and Hammad, S. (2017). Detection of aflatoxin-producing fungi isolated from Nile tilapia and fish feed. EXCLI journal, 16, 1308.

Moore, G. G., Mack, B. M., and Beltz, S. B. (2015). Genomic sequence of the aflatoxigenic filamentous fungus *Aspergillus* nomius. *BMC genomics*, *16*, 1-10.

Moss, M. O. (2002). Mycotoxin review-1. *aspergillus* and *penicillium*. Mycologist, 16(3), 116-119.

Moura , M . A ., C . H . Machado ., L .C . porfirio and R . B . Freire . (2004) . Effects of Ochratoxin A on broiler Leukocytes . Bras . cienc . Avic . Vol . 6 No . 3 .

Muñoz, K., Vega, M., Rios, G., Geisen, R., and Degen, G. H. (2011). Mycotoxin production by different ochratoxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species on coffee-and wheat-based media. Mycotoxin research, 27, 239-247.

Mutlag, N. H. (2022). Isolation And Identification Of Fungi From Soil And Water In The Bahr Al-Najaf Depression. Journal of Pharmaceutical Negative Results, 271-289.

Mwihia, E. W., Lyche, J. L., Mbuthia, P. G., Ivanova, L., Uhlig, S., Gathumbi, J. K., ... and Eriksen, G. S. (2020). Co-Occurrence and levels of mycotoxins in fish feeds in Kenya. Toxins, 12(10), 627.

Mwihia, E. W., Mbuthia, P. G., Eriksen, G. S., Gathumbi, J. K., Maina, J. G., Mutoloki, S., ... and Lyche, J. L. (2018). Occurrence and levels of aflatoxins in fish feeds and their potential effects on fish in Nyeri, Kenya. Toxins, 10(12), 543.

Navale, V., Vamkudoth, K. R., Ajmera, S., and Dhuri, V. (2021). Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. Toxicology reports, 8, 1008–1030.

Oliveira, M., and Vasconcelos, V. (2020). Occurrence of mycotoxins in fish feed and its effects: A review. Toxins, 12(3), 160.

Olsen, Y. (2011). Resources for fish feed in future mariculture. Aquaculture Environment Interactions, 1(3), 187-200.

Osibona, A. O., Ogunyebi, O. O., and Samuel, T. O. (2018). Storage fungi and mycotoxins associated with stored smoked Catfish (Clarias gariepinus). Journal of applied sciences and environmental management, 22(5), 643-646.

Palencia, E. R., Hinton, D. M., and Bacon, C. W. (2010). The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. Toxins, 2(4), 399-416.

Pestka, J. J., and Smolinski, A. T. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 8(1), 39-69.

Pietsch, C., Müller, G., Mourabit, S., Carnal, S., and Bandara, K. (2020). Occurrence of fungi and fungal toxins in fish feed during storage. Toxins, 12(3), 171.

Piotrowska, M., Slizewska, K., and Biernasiak, J. (2013). Mycotoxins in cereal and soybean-based food and feed. Brazil: Soybean-Pest Resistance, 185-230.

Polovic, M., Dittmar, S., Hennemeier, I., Humpf, H. U., Seliger, B., Fornara, P., Theil, G., Azinovic, P., Nolze, A., Köhn, M., Schwerdt, G., and Gekle, M. (2018). Identification of a novel lncRNA induced by the nephrotoxin ochratoxin A and expressed in human renal tumor tissue. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 75(12), 2241–2256.

Rizzo , A ., M . Eskola and F.Atroshi . (2002) . Ochratoxin A in cereals Food Stuffs and human plasma . European Journal Of plant pathology 108 : 631 – 637 .

Rozaliyani, A., Sedono, R., Sjam, R., Tugiran, M., Adawiyah, R., Setianingrum, F., ... and Wahyuningsih, R. (2021). Molecular typing and antifungal susceptibility study of *Aspergillus spp*. in intensive care unit (ICU) patients in Indonesia. The Journal of Infection in Developing Countries, 15(07), 1014-1020.

Saleemi, M. K., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Ul Hasan, Z., Hameed, M. R., ... and Mehmood, M. A. (2012). Occurrence of toxigenic fungi in maize and maize-gluten meal from Pakistan. Phytopathologia Mediterranea, 219-224.

Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., and Andersen, B. (2019). Food and Indoor Fungi. CBS Laboratory Manual Series 2, 2nd Edn. Utrecht: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

Samson, R., Rajput, V., Shah, M., Yadav, R., Sarode, P., Dastager, S. G., ... and Khairnar, K. (2020). Deciphering taxonomic and functional diversity of fungi as potential bioindicators within confluence stretch of Ganges and Yamuna Rivers, impacted by anthropogenic activities. Chemosphere, 252, 126507.

Suleiman, R; K. Rosentrater and C. Bern. (2013) Effects of Deterioration Parameters on Storage of Maize. A Review. Journal ofNatural Sciences Research., 3(9): 147-165

Santos, G. A., Rodrigues, I. A. D. S., Starkl, V., Naehrer, K., Hofstetter, U., and Encarnação, P. (2010). Mycotoxins in aquaculture: Occurrence in feeds components and impact on animal performance. Avances en Nutrición Acuicola.

Sari, F. M., Oztas, E., Ozden, S., and Ozhan, G. (2020). Liquid chromatographic determination of citrinin residues in various meat products: A pioneer survey in Turkey. Journal of the Faculty of Pharmacy of Istanbul University, 50(3), 195-202.

Schmidt, J., Cramer, B., Turner, P. C., Stoltzfus, R. J., Humphrey, J. H., Smith, L. E., and Humpf, H. U. (2021). Determination of urinary mycotoxin biomarkers using a sensitive online solid phase extraction-UHPLC-MS/MS method. Toxins, 13(6), 418.

Schmidt, S., Hogardt, M., Demir, A., Röger, F., and Lehrnbecher, T. (2019). Immunosuppressive compounds affect the fungal growth and viability of defined *Aspergillus* species. *Pathogens*, *8*(4), 273.

Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N., and Geisen, R. (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International journal of food microbiology*, *135*(3), 231-237.

Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C. E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., and Geisen, R. (2010). The production of aflatoxin B 1 or G 1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to afl R expression. *Mycotoxin Research*, *26*, 241-246.

Schulz, M. C. (2020). Modulation der nierenschädigenden Wirkung von Ochratoxin A durch simultane Exposition mit Citrinin und durch tubulo interstitielle Kommunikation.

Sharma, A., Sumbali, G. (2021). Development of Mycotoxicology in India. In: Satyanarayana, T., Deshmukh, S.K., Deshpande, M.V. (eds) Progress in Mycology. Springer, Singapore.

Sultana, N. and N. Hanif. (2019) . Mycotoxin contamination in cattle feed and feed ingredients. Pakistan Vet. J., 29: 211-213.

Tacon, A. G., and Metian, M. (2013). Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. Reviews in fisheries Science, 21(1), 22-38.

Tacon, AGJ,and Metion,M. (2008). Aquaculture feed and food safety: the role of the food and agriculture organization and the codex alimentarius. Ann NY Acad Sci, 1140, 50-59.

Taroncher, M., Rodríguez-Carrasco, Y., Aspevik, T., Kousoulaki, K., Barba, F. J., and Ruiz, M. J. (2021). Cytoprotective effects of fish protein hydrolysates against H2O2-Induced oxidative stress and mycotoxins in Caco-2/TC7 cells. Antioxidants, 10(6), 975.

Tian, F., Woo, S. Y., Lee, S. Y., Park, S. B., Im, J. H., and Chun, H. S. (2022). Mycotoxins in soybean-based foods fermented with filamentous fungi: Occurrence and preventive strategies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 21(6), 5131-5152.

Tolosa, J., Font, G., Manes, J., and Ferrer, E. (2014). Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins in feed and fish from aquaculture. Journal of agricultural and food chemistry, 62(51), 12462-12470.

Toma, M. A., Nazir, K. H. M. N. H., Mahmud, M. M., Mishra, P., Ali, M. K., Kabir, A., Shahid, M. A. H., Siddique, M. P., and Alim, M. A. (2021). Isolation and Identification of Natural Colorant Producing Soil-Borne *Aspergillus niger* from Bangladesh and Extraction of the Pigment. Foods (Basel, Switzerland), 10(6), 1280.

Twaruzek, M., Kosicki, R., Kwiatkowska-Giżyńska, J., Grajewski, J., and Ałtyn, I. (2020). Ochratoxin A and citrinin in green coffee and dietary supplements with green coffee extract. Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology, 188, 172–177.

Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsubé, S., Yilmaz, N., et al. (2014). Ochratoxin Production and Taxonomy of the Yellow Aspergilli (Aspergillus Section Circumdati). Stud. Mycol. 78, 1–61. doi:10.1016/j.simyco.2014.07.001

Van Egmond, H. P. (2002). Worldwide regulations for mycotoxins. In Mycotoxins and food safety (pp. 257-269). Boston, MA: Springer US.

Wardatul Jannah, M., Handayani, F., Sektiari Lukiswanto, B., Al Arif, M. A., Suwarno, S., Purnobasuki, H., ... and Safitri, E. (2024). Investigation of a multicomponent mycotoxin detoxifying agent for aflatoxin B1 and ochratoxin A-induced blood profile in broiler chickens. *Veterinary World*, *17*(5).

Zhang K. (2021). Comparison of Flow Injection-MS/MS and LC-MS/MS for the Determination of Ochratoxin A. Toxins, 13(8), 547.

Zhang, H., Wang, G., Yang, Q., Yang, X., Zheng, Y., Liu, Y., and Xing, F. (2021). Effects of Light on the Ochratoxigenic Fungi *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius*. Toxins, 13(4), 251.

Zou, D., Ji, J., Ye, Y., Yang, Y., Yu, J., Wang, M., Zheng, Y., and Sun, X. (2022). Degradation of Ochratoxin A by a UV-Mutated *Aspergillus niger* Strain. Toxins, 14(5), 343.

Zulkifli, N. A., and Zakaria, L. (2017). Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. HAYATI journal of biosciences, 24(1), 26-34.

7: الملاحق

الصورة (1) مراحل تنفيذ التجربة الحيوية لتقييم تأثير السموم الفطرية في تربية الأسماك

تسجيل النتائج بعد شهرين من تنفيذ التجربة

تسجيل النتائج بعد أربعة اشهر من تنفيذ التجربة

تسجيل النتائج بعد ستة اشهر من تنفيذ التجربة

عينات دم ملوثة بالسم الاوكراتوكسين

عينات الدم ملوثة بالسم الافلاتوكسين

اخذ عينات الدم لكل مراحل التجربة

تعليف الأسماك بالعلائق الملوثة بالسموم الفطرية

المراحل الأولى من تعليف الأسماك

الصورة (2) مراحل تنفيذ التجربة الخزنية لتقييم مدى تلوث عليقة الأسماك بالفطريات وقابليتها على إنتاج السموم الفطرية

مراحل ضبط مستويات المحتوى الرطوبي للعليقة

مراحل خلط اللقاح الفطري بالعليقة السمكية

مرحلة إعادة تغليف العليقة السمكية بعد المعاملات

مرحلة خزن العليقة السمكية الملوثة باللقاح الفطري

ملحق (1): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus niger isolate y.n.174.Khafori* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus niger isolate y.n.174.Khafori internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR452868.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR452868                579 bp    DNA     linear   PLN 21-AUG-2023
DEFINITION  Aspergillus niger isolate y.n.174.Khafori internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR452868
VERSION     OR452868.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 579)
  AUTHORS   Khafori,H.K. and alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-AUG-2023) faculty of Agriculture - Plant Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..579
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.174.Khafori"
                     /isolation_source="corn seed"
                     /db xref="taxon:5061"
                     /country="Iraq"
                     /collection date="2023"
     misc RNA        <1..>579
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 gggctacgag tgcgggtctt tgggccaacc tcccatccgt gtctattata ccctgttgct
       61 tcggcgggcc cgccgcttgt cggccgccgg gggggcgcct ttgccccccg ggcccgtgcc
      121 cgccggagac cccaacacga acactgtctg aaagcgtgca gtctgagttg attgaatgca
      181 atcagttaaa actttcaaca atggatctct tggttccggc atcgatgaag aacgcagcga
      241 aatgcgataa ctaatgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca tcgagtcttt gaacgcacat
      301 tgcgcccccc ggtattccgg ggggcatgcc tgtccgagcg tcattgctgc cctcaagccc
      361 ggcttgtgtg ttgggtcgcc gtcccggtct ccgggggggac gggcccgaaa ggcagcggcg
      421 gcaccgcgtc cgatcctcga gcgtatgggg ctttgtcaca tgctctgtag gattggccgg
      481 cgcctgccga cgttttccaa ccatttttc caggttgacc tcggatcagg tagggatacc
      541 cgctgaactt aagcatatca aaggcgggga aaaagatca
```

ملحق (2): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus niger isolate y.n.175.Khafori* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus niger isolate y.n.175.Khafori internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR449322.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR449322              575 bp    DNA     linear   PLN 21-AUG-2023
DEFINITION  Aspergillus niger isolate y.n.175.Khafori internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and
internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR449322
VERSION     OR449322.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus niger
  ORGANISM  Aspergillus niger
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 575)
  AUTHORS   Khafori,H.K. and alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-AUG-2023) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..575
                     /organism="Aspergillus niger"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="y.n.175.Khafori"
                     /isolation_source="corn seed"
                     /db_xref="taxon:5061"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="2023"
     misc_RNA        <1..>575
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and
large
                     subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ggaggcctct tagtgcgggt ctttgggcca cctcccatcc gtgtctatta taccctgttg
       61 cttcggcggg cccgccgctt gtcggccgcc gggggggcgc ctttgccccc cgggcccgtg
      121 cccgccggag accccaacac gaacactgtc tgaaagcgtg cagtctgagt tgattgaatg
      181 caatcagtta aaactttcaa caatggatct cttggttccg gcatcgatga agaacgcagc
      241 gaaatgcgat aactaatgtg aattgcagaa ttcagtgaat catcgagtct ttgaacgcac
      301 attgcgcccc ctggtattcc gggggggcatg cctgtccgag cgtcattgct gccctcaagc
      361 ccggcttgtg tgttgggtcg ccgtcccccc ctccgggcca cgggcccgaa aggcagcggc
      421 ggcaccgcgt ccgatcctcg agcgtatggg gctttgtcac atgctctgta ggattggccg
      481 gcgcctgccg acgttttcca accatttttt ccaggttgac ctcggatcag gtagggatac
      541 ccgctgaact taagcatatc aataggcgga ggaaa
```

ملحق (3): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus flavus isolate Y.n.176.Khafori* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus flavus isolate Y.n.176.Khafori internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR449323.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       OR449323            558 bp    DNA     linear   PLN 21-AUG-2023
DEFINITION  Aspergillus flavus isolate Y.n.176.Khafori internal transcribed
            spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and
internal
            transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit
            ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR449323
VERSION     OR449323.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus flavus
  ORGANISM  Aspergillus flavus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 558)
  AUTHORS   Khafori,H.K. and alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-AUG-2023) faculty of Agriculture - Plant
Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..558
                     /organism="Aspergillus flavus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.n.176.Khafori"
                     /isolation_source="corn seed"
                     /db_xref="taxon:5059"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="2023"
     misc_RNA        <1..>558
                     /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
                     ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
                   subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 ggggtttcgg agtgcgggac tcgcggccac ctcccaccct tgtctctcta cacctgttgc
       61 tttggcgggc ccactggggc tccctggtcg ccgggggaca cccgtccccg ggcccgcgcc
      121 cgccgaagcg cttcgtgaac cctgatgaag aagggctgtc tgagtactat gaaaattgtc
      181 aaaactttca acaatggatc tcttggttcc ggcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga
      241 taagtaatgt gaattgcaga attccgtgaa tcatcgaatc tttgaacgca cattgcgccc
      301 cctggcattc ccccgggcat gcctgtccga gcgtcatttc tgccctcaag cacggcttgt
      361 gtgttgggtg tggtcccccc ggggacctgc ccgaaaggca gcggcgacgt ccgtctggtc
      421 ctcgagcgta tggggctctg tcactcgctc gggaaggacc tgcgggggtt ggtcaccacc
      481 acattttcca ttatggttga cctcggatca ggtaggagtt acccgctgaa cttaagcata
      541 tcaaaaaacc gggaagaa
```

ملحق (4): بيانات تسجيل العزلة الفطرية *Aspergillus flavus isolate Y.n.177.Khafori* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الحيوية (NCBI) ضمن بيانات GenBank

NCBI Resources How To

Aspergillus flavus isolate Y.n.177.Khafori internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OR449324.1

FASTA Graphics

```
LOCUS       OR449324                597 bp    DNA     linear   PLN 21-AUG-2023
DEFINITION  Aspergillus flavus isolate Y.n.177.Khafori small subunit ribosomal
            RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
            ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete
            sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OR449324
VERSION     OR449324.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus flavus
  ORGANISM  Aspergillus flavus
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
            Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
            Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.
REFERENCE   1  (bases 1 to 597)
  AUTHORS   Khafori,H.K. and alhamiri,y.N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (16-AUG-2023) faculty of Agriculture - Plant Protection,
            University of Kerbala, city center, kerbala KK13DR, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..597
                     /organism="Aspergillus flavus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Y.n.177.Khafori"
                     /isolation source="corn seed"
                     /db_xref="taxon:5059"
                     /country="Iraq"
                     /collection_date="2023"
     misc RNA        <1..>597
                     /note="contains small subunit ribosomal RNA, internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal
                     transcribed spacer 2, and large subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
        1 cttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taccgagtgt agggttccta gcgagcccaa
       61 cctcccaccc gtgtttactg taccttagtt gcttcggcgg gcccgccatt catggccgcc
      121 gggggctctc agccccgggc ccgcgcccgc cggagacacc acgaactctg tctgatctag
      181 tgaagtctga gttgattgta tcgcaatcag ttaaaacttt caacaatgga tctcttggtt
      241 ccggcatcga tgaagaacgc agcgaaatgc gataactagt gtgaattgca gaattccgtg
      301 aatcatcgag tctttgaacg cacattgcgc cccctggtat tccgggggggc atgcctgtcc
      361 gagcgtcatt gctgcccatc aagcacggct tgtgtgttgg gtcgtcgtcc cctctccggg
      421 gcccacgggc cccaaaggca gcggcggcac cgcgtccgat cctcgagcgt atggggcttt
      481 gtcacccgct ctgtaggccc ggccggcgct tgccgaacgc aaatcaatct ttttccaggt
      541 tgacctcgga tcaggtaggg atacccgctg aacttaagca tatcaataag cggagga
```

Abstract :

The study was conducted with the aim of investigating the extent of fungal contamination in stored crop grains used as essential components of fish feed, focusing on dangerous fungi capable of producing mycotoxins aflatoxin B1 and ochratoxin A, and examining the effects of storage periods and moisture content levels on their production, as well as assessing the impact of contamination levels of aflatoxin B1 and ochratoxin A on fish farming and health in Iraq. The survey results indicated contamination in all studied samples of wheat, barley, yellow corn, soybeans, and both local and imported fish feed collected from four governorates (Baghdad, Karbala, Babylon, and Anbar) with various fungal strains, the most important of which were *Aspergillus sp ,A.flavus. A.niger, Cladosporium sp, Alternaria sp, Fusarium sp, Mucor sp, Penicillium sp, Rhizoctonia sp, Rhizopus sp Cylindrocarpom , and Trichoderma sp* .

The isolation process focused on the biodiversity of the fungal strains *Aspergillus spp* , with 1400 fungal isolates identified belonging to the fungus *Aspergillus niger* , which was the most prevalent and frequent, followed by isolates of the species *Aspergillus flavus*, with 802 fungal isolates among the isolated fungi. While the percentage of fungal occurrence and frequency recorded, the most prevalent was the fungus *A.niger* with an average occurrence rate of 91.67% and a frequency of 30.93% among the collected samples, followed by the fungus *A.flavus* with an occurrence rate of 89.58% and a frequency of 16.88

The results of chromatographic analysis using HPLC technology demonstrated the ability of all nine tested fungal isolates of Aspergillus niger to produce ochratoxin in varying proportions. *Aspergillus niger K1* isolates had the highest production concentrations, reaching 80.90 micrograms/kg for the ANK1 isolate, while the lowest production levels were for the ANA1 isolate, at a concentration of 35.9 micrograms. /kg isolated from local fish feed. At the same time, the ability of all nine tested fungal isolates of *Aspergillus flavus* to produce Aflatoxin B1 in varying proportions was demonstrated, with *Aspergillus flavus K2* topping the list. The highest production concentrations reached 226.9 µg/kg for isolate AFK2, while the lowest production levels were for

isolate AFB2 at a concentration of 134.9 µg/kg, isolated from local fish feed.

Chromatographic analysis to detect contamination with ochratoxin A showed that five samples out of nine were free of contamination with the mycotoxin ochratoxin (the local Anbar samples (A1F and A2F), the local Babylon samples (H1F and H2F), and the imported Babylon sample (H1FF)), while four samples showed contamination. With ochratoxin in varying proportions, with the highest percentage of ochratoxin A contamination recorded, reaching 6.90 micrograms/kg for sample K1F, followed by B2F, K2F, and B1F at concentrations (6.20, 5.70, and 5.50 micrograms/kg, respectively. While contamination of the samples with the mycotoxin aflatoxin B1 was detected, all samples were 100% contaminated with Aflatoxin B1 at varying concentrations, with the highest contamination rate recorded at a concentration of up to 9.33 micrograms/kg for sample KF2, followed by sample KF1 with a concentration of 9.25 micrograms/kg, while the lowest concentration was recorded. 2.65 micrograms/kg for imported fish feed sample H1FF.

The results of the molecular diagnosis of mycotoxin-producing isolates, of which the first two isolates were characterized by the highest production of the two mycotoxins Aflatoxin B1 and Ochratoxin A, and the two isolates that produced the least in local fish feed samples, confirmed their diagnosis under different species. The results of the nucleotide sequence analysis of the isolates showed that two isolates belonging to the fungus Aspergillus niger were recorded. Under accession codes (OR452868.1 and OR449322.1), and two isolates belonging to the fungus Aspergillus flavus were registered under accession codes (OR449324.1 OR449323.1), the genomic sequences were preserved in the database of the National Center for Biotechnology Information and were compared with Pre-registered isolates

The results of the storage experiment showed that the highest level of Aflatoxin B1 production was recorded during the longest storage period of three months (the production of Aflatoxin B1 is directly proportional to the storage periods), as its concentration reached 42.12, 68.43, and 82.34 ppb within three humidity levels (10%, 15%, and 25%). respectively. While the highest level of mycotoxin ochratoxin production was recorded during the longest storage period of three months, as its

concentration reached 46.32, 49.42, and 64.67 ppb within three humidity levels (10%, 15%, and 25%), respectively.

The results of the effect of the mycotoxins aflatoxin B1 and ochratoxin A on growth rates and the number of fish kills during the rearing periods showed an increase in the level of fish kills, with the percentage of kills reaching 19.4% and 10.80%, respectively, compared to the control treatment, which amounted to 3.5%. At the same time, an increase in the percentage of weight losses. For fish, the highest percentage of weight loss was recorded in the 180-day period, amounting to 36.6% and 27.20%, while the 120-day period recorded a weight loss percentage of 43.5% and 20.20%, and the lowest percentage of loss was in the first 60 days period, which amounted to 22.4% and 13.70% compared to the treatment. Control 0.00%. The results of physiological blood components showed different negative effects, due to continuous exposure to the mycotoxins aflatoxin B1 and ochratoxin A, by reducing WBC, RBC, HGB, MCHC and PLT compared to the control treatment, while causing a significant increase in the level of HCT compared to the control treatment.

Karbala University
College of Agriculture
Plant Protection

Detection of some Fungi producing mycotoxins associated with stored crop grains used in fish feed.

A Thesis submitted to the Council of the Faculty of Agriculture / Karbala University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree Sciences in Agriculture / Plant Protection

By
Hussein Kamil Ghafori

Supervised by
Prof. Dr. Yasir Naser Hussein Alhamiri

1446 A.H **2024 A.D**